

氨氮胁迫对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 免疫功能的影响*

黄鹤忠 李 义 宋学宏 王永玲 杨彩根
(苏州大学生命科学学院 苏州大学水产科学研究所 苏州 215006)

提要 在实验室条件下构建不同氨氮浓度环境和养殖时间的组间差异,研究氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫功能的影响。结果表明,中华绒螯蟹在 NH_4^+-N 3.0mg/L 10天或 1.0mg/L 20天时,其血淋巴细胞密度极显著地低于对照组 ($P < 0.01$)。 NH_4^+-N 2.0mg/L 和 3.0mg/L 无论 10天或 20天,血细胞吞噬百分率均分别为显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) 地低于对照组。 NH_4^+-N 3.0mg/L 10天或 2.0mg/L 20天,血细胞吞噬指数显著低于对照组 ($P < 0.05$)。 NH_4^+-N 1.0mg/L 和 2.0mg/L 分别 20天时,血清溶菌酶 (LSZ) 活力分别为显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) 地低于对照组。 NH_4^+-N 1.0—5.0mg/L 10天时,血清酚氧化酶 (PO) 活力均极显著 ($P < 0.01$) 下降;但 NH_4^+-N 1.0—4.0mg/L 20天时,血清 PO 活力水平平均比 10天时有所上升。 NH_4^+-N 3.0—4.0mg/L 10天或 1.0—2.0mg/L 20天,以及 5.0mg/L 10天或 3.0—5.0mg/L 20天时,超氧化物歧化酶 (SOD) 活力分别为显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) 地低于对照组。上述结果表明,随着氨氮胁迫浓度的增加和胁迫时间的延长,会引起中华绒螯蟹血细胞数量、血细胞吞噬能力、溶菌酶活力、酚氧化酶活力和超氧化物歧化酶活力等的逐渐下降,使机体非特异性免疫防御系统遭到损伤,同时机体清除自由基的能力下降,机体细胞和组织受到伤害甚至出现死亡。

关键词 中华绒螯蟹,氨氮胁迫,血细胞,免疫功能

中图分类号 Q48

在集约化养殖系统中,由于养殖动物的排泄和残饵的氨化作用,造成氨氮不断积累,影响养殖生物的生长,甚至发生毒害。氨氮已成为水产养殖系统中最普遍的毒性物质,但人们很少了解氨氮对甲壳动物免疫系统的影响 (Gilles *et al.* 2000)。已有报道表明,氨氮能对水生生物的许多器官造成损伤,是十分有害的物质 (Colt *et al.* 1981)。中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 是目前我国内陆水域中最重要的名特优养殖品种之一,其养殖规模不断扩大,养殖产量不断提高。但许多养殖地区盲目追求产量、片面地增加放养密度和投饵量而忽视了养殖水质的保护,导致氨氮等有害物质在水中大量积累,引起养殖蟹生长缓慢、

体质下降、各种蟹病不断发生。例如,传统的中华绒螯蟹静水充气育苗中后期即便通过大量换水改善水质,水中的氨氮含量仍然高达 2.97mg/L,是导致成活率下降的重要原因 (王武等, 1999)。目前还未见到国内外有关氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫功能影响的研究报道。本试验中作者采用实验生态学方法,研究了养殖中华绒螯蟹在不同氨氮胁迫环境条件下 10天和 20天以后血淋巴细胞数、吞噬细胞吞噬能力、血清酚氧化酶 (PO) 活力、血清溶菌酶 (LSZ) 活性、血清超氧化物歧化酶 (SOD) 5种非特异性免疫指标的变化情况,为中华绒螯蟹的环境生理和免疫机制以及养殖水环境调控提供基础数据和理论依据。

* 江苏省科技厅社会发展项目, BS2002016号; 苏州市重点科技攻关项目, ZN0308号。黄鹤忠, 副教授, E-mail huangh@suda.edu.cn, suda-shu@163.com

收稿日期: 2005-01-10 收修改稿日期: 2005-08-15

1 材料与方法

1.1 实验用蟹与用水

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 于 2004 年 3 月 20 日取自江苏省常熟市水产养殖场池塘养殖的健康个体, 体重 (65.32 ± 3.46) g 至分组实验前在养殖生态室 PVC 水槽内适应性暂养 2 周, 暂养期间水温逐渐升至 21℃ 并保持恒定, 气石连续充气, 每天吸污换水 1/4 池水, 饵料投喂采取上午为泡软的玉米粒, 傍晚为新鲜洗净的螺蛳肉, 确保摄食充足。养殖环境安静, 无攀爬出水面和打斗现象。以自来水为养蟹实验用水, 添加适量硫代硫酸钠中和氯气, 经充氧机曝气 24h 并将水温逐渐增至 21.0℃ 后使用。

1.2 实验设计

设置 5 个实验组和 1 个对照组, 每组随机取健康无残肢的中华绒螯蟹 30 尾分设 2 个平行, 分别在水体为 0.9m^3 ($1.0\text{m} \times 2.0\text{m} \times 0.45\text{m}$) 的 PVC 水族箱中进行试验, 每箱中 15 尾。保证蟹体在整个实验期间浸没于水体中。所有组的水温、投饵等养殖条件与暂养时相同, 充气量也保持一致。每天早晨 8:10 将各箱水体全部更新并向各实验组添加氯化铵 (NH_4Cl), 实验组 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的添加浓度依次为 1.0mg/L、2.0mg/L、3.0mg/L、4.0mg/L、5.0mg/L, 对照组不添加。在实验进行到第 10 天和第 20 天时, 分别从各箱中随机取出 5 尾蟹 (即每组 10 尾), 剪肢取血进行各项免疫因子测定, 同时统计各组的成活率 (成活率 = 存活蟹数 \cdot 100% / 蟹总数)。

1.3 血细胞计数

剪蟹足取血, 按抗凝剂与血淋巴 1:1 的比例关系将蟹血淋巴 0.5ml 与 0.5ml 的等量血液抗凝剂 (蔡武城等, 1983) 同时装入 Eppendorf 管混匀, 将各组抗凝血分别充入血球计数板, 静置 2—3min 待细胞下沉后, 用高倍镜计数。

1.4 吞噬试验

参照朱忠勇 (1997) 的方法, 有改进。剪肢放血, 将离心 (5000r/min , 5min , 4C) 抗凝血与等体积 1.4×10^7 ind/ml 的白色酵母菌悬液 0.5ml 在 Eppendorf 管中混匀, 在 28℃ 恒温下水浴 1h 取出后用改良瑞氏-姬姆萨染液染色 5min, 高倍镜下观察计数, 随机检测 100 个血细胞, 计算吞噬率和吞噬指数。吞噬百分率 (PP) = 吞噬有细菌的血细胞数 / 检测血细胞总数 \times 100%; 吞噬指数 (PI) = 每个吞噬细胞平均吞噬的细菌数。

1.5 血清酚氧化酶 (PO) 活力的测定

以 L-dopa 为底物, 参照 (Ashida 1971) 的方法进行。将 3ml 0.1mol/L 的 pH 为 6.0 的磷酸缓冲液与 0.1ml 0.01mol/L 的 L-dopa 及 0.1ml 待测血清于室温下混匀, 每次间隔 1min 读取在 490nm 波长下的光吸收值。以 A_{490} 对反应时间作图。以试验条件下 A_{490} 每分钟增加 0.001 定义为 1 个酶活力单位 (Unit)。

1.6 血清溶菌酶 (LSZ) 活力的测定

取溶壁微球菌 (*Micrococcus lysoleiticus*) 冻干粉适量, 经 2 次活化的溶壁微球菌接种于液体培养基内摇床培养 48h 后取出, 经 4000r/min 离心 5min 后倒去上清液, 用 0.1mol/L, pH 为 6.4 的磷酸缓冲液配成 A_{570} 约为 0.3 的底物悬液, 按 Hultmark 等 (1980) 的改进方法进行测定。取 3ml 该悬液于试管内置冰浴中, 与 100 μ l 待测血清混匀后测 A_0 值, 然后将试液移入 28℃ 温浴中作用 30min, 取出后再置冰浴中 10min 以终止反应, 测 A 值。血清溶菌酶活力 (U/ml) = $(A_0 - A) / A_0$ 。

1.7 血清超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的测定

参照邓碧玉等 (1991) 的方法进行。用 0.05mol/L, pH 为 8.4 的磷酸缓冲液 4.5ml 与 0.05mol/L 连苯三酚 10 μ l 混合并迅速摇匀, 立即每隔 20s 测 A_{325} 值一次, 要求自氧化速率每分钟 OD_{325} 值变化约 0.07。酶活性测定方法与此相同, 在加入连苯三酚前, 加入待测的血清 50 μ l 室温下混匀。酶活性 = $(0.07 - A_{325}/\text{min}) / (0.07 \times 50\%) \times 100\% \times$ 反应液体积 \times 样液稀释倍数 / 样液体积; 酶活单位定义: 每 ml 反应液中, 每 min 抑制连苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量为 1 个酶活单位 (U/ml)。

1.8 数据分析

数据用 SPSS10.0 (Statistical Package for Social Sciences) 统计软件进行方差分析 (ANOVA) 和均值多重比较分析法 (LSD 法) 检验各组间的差异显著性 (陈平雁等, 2002)。各组各时间点的样品数均为 10 ($n = 10$), 所有的结果均以平均值 \pm 标准差来表示。

2 结果

2.1 水质因子的检测结果

从表 1 中看出, 随着水体中残饵和粪便被微生物分解以及蟹体新陈代谢活动的不断进行, 各组水体的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 量在一天内均有一定程度的积累和上升, 但各试验组与对照组间均保持了较稳

表 1 实验期间 24h 内水化学检测结果

Tab 1 Results of chemical analysis of water during experiment in 24 hours

时间 (h:m in)	13:00			20:00			8:00		
	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	pH	溶氧 (mg/L)	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	pH	溶氧 (mg/L)	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	pH	溶氧 (mg/L)
1.0	1.148	7.65	6.63	1.214	7.68	6.62	1.326	7.68	6.60
2.0	2.153	7.68	6.54	2.206	7.68	6.51	2.307	7.65	6.52
3.0	3.156	7.62	6.37	3.256	7.61	6.26	3.335	7.58	6.29
4.0	4.155	7.64	6.53	4.197	7.64	6.47	4.283	7.62	6.36
5.0	5.157	7.65	6.56	5.202	7.64	6.53	5.326	7.61	6.44
0.0	0.174	7.67	6.74	0.272	7.65	6.73	0.346	7.64	6.64

定的浓度梯度差,其值基本依次保持在 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/L 左右。每天的溶氧量恒定在较高水平,各组 pH 值均有轻微的下降,但都维持在同一水平。

尽管实验中每天 8:10 全部更新各组水体,但为了检测实验水体中 24h 内的水质因子变化状况,随机于实验的第 2 天、第 8 天和第 19 天的 13:00、20:00、8:00 三个时间段分别对各池水体的 NH₄⁺-N 量、pH 值、溶氧量进行检测并求出各组均值,其结果见表 2。

表 2 氨氮胁迫对中华绒螯蟹成活率的影响

Tab 2 Effects of NH₄⁺-N stress on the survival rate of *E. sinensis*

NH ₄ ⁺ -N 浓度 (mg/L)	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
第 10 天成活率 (%)	100	100	100	96.7	95.3	90.0
第 20 天成活率 (%)	100	100	96.7	90.0	86.7	83.3

2.2 蟹体成活率的变化

试验期间每天观察蟹体存活情况,结果发现对照组和 NH₄⁺-N 浓度 1.0 mg/L 组的蟹体比较健康活泼、摄食一直正常,而 NH₄⁺-N 浓度 3.0 mg/L 以上各组的摄食量较低。在试验进行到第 10 天和 20 天时分别统计各组的成活率,结果见表 2。从表 2 中看出,水体 2.0 mg/L NH₄⁺-N 20 天或 3.0 mg/L NH₄⁺-N 10 天即对蟹体的存活产生影响,且随着氨氮胁迫浓度的增高和时间的延长,中华绒螯蟹成活率呈逐渐降低的趋势。

2.3 血细胞密度的变化

由表 3 可知,随着各实验组氨氮浓度的增加,其血细胞密度呈明显下降趋势,在氨氮胁迫

10 天和 20 天后,各实验组血细胞密度依次较对照组 19.20 × 10⁴ cells/ml 和 19.33 × 10⁴ cells/ml 分别下降了 10.94%、12.60%、19.95%、29.01%、39.74% 和 15.03%、14.54%、19.30%、35.18%、43.61% { [(对照组值 - 实验组值) / 对照组值] × 100%, 下同 }。随着氨氮胁迫时间的增加,同一组的血细胞密度也有不同程度地减少。经方差分析和 LSD 均值多重比较分析显示,3.0 mg/L 以上 NH₄⁺-N 胁迫 10 天或 1.0 mg/L 以上 NH₄⁺-N 胁迫 20 天各组的血细胞密度与对照组都存在极显著差异 (P < 0.01)。

2.4 血细胞吞噬活性的变化

用血细胞的吞噬百分率和吞噬指数来检测血细胞的吞噬活性,结果见表 3。10 天和 20 天后,血细胞的吞噬百分率和吞噬指数均随氨氮胁迫浓度和时间的增加而下降。第 10 天和 20 天, NH₄⁺-N 1.0—5.0 mg/L 各实验组血细胞的吞噬百分率较对照组 23.48% 和 22.63% 分别下降了 7.41%、16.14%、34.50%、40.12%、70.02% 和 7.34%、17.45%、34.82%、45.38%、80.60%; 吞噬指数分别较对照组 2.64 和 2.65 下降了 9.85%、14.02%、25.00%、25.76%、50.00% 和 12.45%、22.64%、31.32%、43.77%、57.36%; 经 LSD 均值多重比较分析显示,从 10 天至 20 天, NH₄⁺-N 2.0 mg/L 组和 3.0 mg/L 以上各组的血细胞吞噬百分率分别与对照组之间存在显著差异 (P < 0.05) 和极显著差异 (P < 0.01); NH₄⁺-N 3.0 mg/L 以上 10 天和 2.0 mg/L 以上 20 天胁迫后血细胞吞噬指数与对照组都存在显著差异 (P < 0.05); NH₄⁺-N 5.0 mg/L 10 天以上各组血细胞吞噬指数与对照组都存在极显著差异 (P < 0.01)。

表 3 氨氮胁迫对中华绒螯蟹血细胞密度和吞噬活性的影响 (平均值 ± 标准差)

Tab 3 Effects of NH_4^+-N stress on the haemocyte counts and phagocytic activity in *E. sinensis* (mean ± S.D.)

添加 NH_4^+-N (mg/L)	血细胞密度 (10^4 cells/ml)		吞噬百分率 (%)		吞噬指数	
	10天	20天	10天	20天	10天	20天
1.0	17.10 ± 1.73 ^{ab}	16.43 ± 2.08 ^b	21.74 ± 2.08 ^A	20.97 ± 2.05 ^A	2.38 ± 0.52 ^a	2.32 ± 0.62 ^a
2.0	16.78 ± 3.21 ^{ab}	16.52 ± 1.67 ^b	19.69 ± 1.69 ^a	18.68 ± 3.42 ^a	2.27 ± 0.64 ^{ab}	2.05 ± 0.81 ^b
3.0	15.37 ± 3.06 ^{bc}	15.60 ± 1.73 ^b	15.38 ± 1.53 ^b	14.75 ± 2.01 ^b	1.98 ± 0.57 ^b	1.82 ± 0.71 ^b
4.0	13.63 ± 2.52 ^c	12.53 ± 1.53 ^c	14.06 ± 1.31 ^b	12.36 ± 1.06 ^B	1.96 ± 0.41 ^b	1.49 ± 0.38 ^c
5.0	11.57 ± 3.51 ^C	10.90 ± 1.00 ^d	7.04 ± 1.00 ^C	4.39 ± 0.58 ^C	1.32 ± 0.31 ^B	1.13 ± 0.32 ^d
0.0	19.20 ± 2.00 ^A	19.33 ± 1.53 ^A	23.48 ± 2.36 ^A	22.63 ± 1.55 ^A	2.64 ± 0.47 ^a	2.65 ± 0.37 ^a

注: 同一列数据右上角不同上标小写字母表示有显著差异 ($P < 0.05$), 不同上标大写字母表示有极显著差异 ($P < 0.01$)

2.5 血清溶菌活力的变化

NH_4^+-N 1.0—2.0 mg/L 和 3.0 mg/L 胁迫 10 天后, 中华绒螯蟹血清溶菌酶 (LSZ) 活力分别极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$) 地高于对照组; 而当 NH_4^+-N 浓度增至 4.0 mg/L 和 5.0 mg/L 时, 血清 LSZ 活力则分别显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) 地低于对照组。经过 20 天的氨氮胁迫后, 各实验组血清 LSZ 活力均低于 10 天时的水平, 且与对照组相比均有显著或极显著的下降 (见表 4)。

2.6 血清酚氧化酶活力的变化

NH_4^+-N 1.0—5.0 mg/L 胁迫 10 天后, 中华绒螯蟹各实验组血清酚氧化酶 (PO) 活力均极显著 ($P < 0.01$) 地低于对照组水平。而当继续胁迫至 20 天后, 除 NH_4^+-N 5.0 mg/L 组以外, NH_4^+-N 1.0—4.0 mg/L 各组的血清 PO 活力均分别比 10 天时有所升高, 但 NH_4^+-N 3.0 mg/L 以上各组的血清 PO 活力仍然显著或极显著地低于对照组水平 (表 4)。

表 4 氨氮胁迫对中华绒螯蟹血清溶菌酶、酚氧化酶和超氧化物歧化酶活力的影响 (平均值 ± 标准差)

Tab 4 Effects of NH_4^+-N stress on LSZ, PO, and SOD activities in *E. sinensis* (mean ± S.D.)

添加 NH_4^+-N (mg/L)	溶菌酶活力 (U/ml)		PO 活力 (Units)		SOD 活力 (U/ml)	
	10天	20天	10天	20天	10天	20天
1.0	0.168 ± 0.052 ^A	0.123 ± 0.043 ^a	4.47 ± 0.12 ^B	6.58 ± 0.14 ^A	105.35 ± 16.34 ^{AB}	97.38 ± 16.75 ^a
2.0	0.165 ± 0.056 ^A	0.105 ± 0.045 ^b	4.25 ± 0.13 ^B	6.14 ± 0.15 ^A	101.49 ± 15.37 ^{AB}	96.48 ± 15.54 ^{ab}
3.0	0.161 ± 0.059 ^{AB}	0.092 ± 0.042 ^B	3.65 ± 0.11 ^c	5.53 ± 0.12 ^a	98.32 ± 18.57 ^{ab}	92.46 ± 17.35 ^B
4.0	0.124 ± 0.046 ^c	0.084 ± 0.038 ^B	3.43 ± 0.15 ^C	4.97 ± 0.15 ^b	92.41 ± 15.46 ^{ab}	83.51 ± 16.53 ^B
5.0	0.117 ± 0.042 ^c	0.050 ± 0.036 ^C	3.07 ± 0.14 ^d	2.92 ± 0.12 ^C	72.71 ± 13.62 ^b	65.82 ± 14.37 ^C
0.0	0.143 ± 0.048 ^b	0.140 ± 0.038 ^A	6.22 ± 0.12 ^A	6.18 ± 0.14 ^A	112.63 ± 14.64 ^A	113.57 ± 15.36 ^A

注: 同一列数据右上角不同上标小写字母表示有显著差异 ($P < 0.05$), 不同上标大写字母表示有极显著差异 ($P < 0.01$)

2.7 血清超氧化物歧化酶活力的变化

总体来说, 氨氮胁迫 10 天和 20 天后, 中华绒螯蟹血清超氧化物歧化酶 (SOD) 活力会随着氨氮胁迫时间的延长和浓度的增加而逐渐降低 (见表 4)。10 天时, NH_4^+-N 3.0—4.0 mg/L 和 5.0 mg/L

组的 SOD 活力分别显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) 地低于对照组; 20 天时, NH_4^+-N 1.0—2.0 mg/L 和 3.0—5.0 mg/L 组的 SOD 活力分别显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) 地低于对照组。

3 讨论

3.1 氨氮胁迫对中华绒螯蟹血细胞及其免疫的影响

由于甲壳类动物缺乏像高等动物由免疫球蛋白介导的特异性免疫,因此血细胞在甲壳动物的非特异性防御反应中起着主要作用(陈国福等, 2004)。血细胞通过吞噬、包囊、形成肉芽肿等防御反应清除血窦中侵入的异己颗粒。因为中华绒螯蟹防御反应同其他甲壳动物一样,是由循环血细胞以及存在于细胞或从细胞释放到血浆中的多种因子的活性而产生的,所以中华绒螯蟹的血细胞既是细胞免疫的担当者,又是体液免疫因子的提供者,血细胞总数总是随着甲壳动物自身的生理状况及周围水体环境条件的改变而不断发生变化。但总的来说,血细胞总数常常可作为甲壳动物健康状况的评定指标(陈国福等, 2004)。本研究结果显示,中华绒螯蟹在 NH_4^+-N 3.0mg/L 胁迫 10天或 1.0mg/L 20天时,其血淋巴血细胞密度显著下降,且随着水体中氨氮胁迫浓度的升高和胁迫时间的延长其血细胞密度逐渐下降,这可能是由于氨氮中的非离子氨不具有电荷,具有相对高的脂溶性,容易透过细胞膜直接损伤血淋巴中血细胞的缘故。这与中国对虾生活在 2.5mg/L 氨氮水体中 20天左右,其血细胞数量显著低于在浓度为 0.4mg/L 氨氮水体中对虾的血细胞数(孙舰军等, 1999)以及日本对虾血淋巴中血蓝蛋白浓度随着水体中氨氮浓度提高而减低(Chen *et al.* 1994)的结果相一致。在环境因子对虾类免疫力影响的研究中也发现,蓝对虾(*Penaeus stylirostris*)在低氧状态下其血细胞总数减少(Le Moullac *et al.* 1998);罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)在较低和较高温度下或较低和较高 pH 下的血细胞总数均比正常温度和正常 pH 环境下为低(Cheng *et al.* 1997)。因此,血细胞数量的变化可作为甲壳动物对外界环境胁迫因子响应的一个重要指标。

研究表明,甲壳动物血细胞所包含的大颗粒细胞、小颗粒细胞和透明细胞均与吞噬作用有关(Bachne *et al.* 1995)。甲壳动物的吞噬作用在免疫防御中起到识别吞噬外来异物颗粒、抗菌杀菌、激活酚氧化酶原系统等作用(Bachne *et al.* 1995; Smith 1995)。从表 3 结果明显看出,随着水体中氨氮胁迫浓度和胁迫时间的增加,不但会造成中华绒螯蟹血细胞的损伤和密度逐渐下降,

而且使其吞噬百分率和吞噬活性也同步逐渐下降。由此可见,水体氨氮对中华绒螯蟹血细胞及其免疫活力都具有明显的损伤作用。

3.2 氨氮对中华绒螯蟹血淋巴中的免疫应答因子活力的影响

溶菌酶和酚氧化酶原系统是甲壳动物重要的血淋巴免疫应答因子。甲壳类的颗粒细胞含有大量酚氧化酶原,这种酶原在异物初始识别中起关键作用(Vem eer 1987)。当机体受到外界异物侵袭机体时,会刺激细胞产生胞吐作用进行脱颗粒,把酚氧化酶原系统释放到周围介质中,酚氧化酶随后被激活(Sung *et al.* 2000)。本实验结果表明,在氨氮胁迫 10天时,各试验组酚氧化酶(PO)活力均极显著地低于对照组,这与蓝对虾(*Penaeus stylirostris*)在氨浓度 1.5mg/L 和 3.0mg/L 的水体中 PO 活力降低的结果(Gilles *et al.* 2000)相似。而继续氨氮胁迫至 20天时,除了高浓度 NH_4^+-N 组(5.0mg/L)以外,其余较低浓度氨氮组的酚氧化酶(PO)活力水平均高于 10天时的水平。可推测,氨氮对含有酚氧化酶原的大颗粒细胞和小颗粒细胞(Sequeira *et al.* 1995)具有损伤作用,导致血浆 PO 值随细胞密度的下降而降低,但较长期(20天)4.0mg/L 以下氨氮浓度刺激则会激活现有的酚氧化酶原系统,使其酚氧化酶活力有所提高,这与斑节对虾在饲喂活的芽孢杆菌(*Bacillus S11*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)被注射活的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)后其血淋巴中的酚氧化酶活性显著升高(Sirirat *et al.* 2000; Sung *et al.* 2000)相类似。而高 NH_4^+-N 浓度(5.0mg/L 以上)则会严重破坏酚氧化酶原系统,使其酚氧化酶活力显著下降。由此可见,氨氮对中华绒螯蟹酚氧化酶活力的影响是一个长期和复杂的过程,虽然 PO 活性对环境胁迫因子很敏感,但仅从其单一的指标往往不能正确反映机体的健康状况,其机制有待进一步深入研究。

溶菌酶是一种碱性蛋白,能水解革兰氏阳性细菌的细胞壁中黏肽乙酰基多糖并使之裂解并释放出来,形成一个水解酶体系,破坏和消除侵入体内的异物,从而担负起机体防御的机能(赵红霞等, 2003)。血清中的溶菌酶(LSZ)主要由吞噬细胞释放,故可作为吞噬系统功能的指标。由本研究结果可知,中华绒螯蟹在 3mg/L 以下 NH_4^+-N 浓度下的较短时期(10天)内可增强溶菌

酶活力, 较长时期内 (20天) 则会降低溶菌酶活力; 而 $\text{NH}_4\text{-N}$ 3mg/L 以上浓度会较快地降低溶菌酶活力, 且随着时间的延长, 其活力降低的幅度越明显。表明在胁迫初期, 蟹体受到较强应激, 溶菌酶活力因此而升高, 此后蟹体产生了一定的耐受性, 溶菌酶活力趋于降低。因此, 溶菌酶活力可作为蟹类应激的信号。本实验结果也表明, 中华绒螯蟹在高浓度氨氮环境或长期处于较低氨氮环境下, 均会降低其血清溶菌酶活力, 溶菌酶活力的下降可能是导致吞噬细胞吞噬活性降低的重要因素之一。

3.3 氨氮胁迫对中华绒螯蟹超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的影响

动物机体内的抗氧化酶系统和抗氧化物质组成了一个较为完善的抗氧化体系, 可以清除体内多余的自由基, 使自由基的产生与消除处于一种动态平衡中, 从而起到免除自由基对生物分子的损伤等作用 (张春丹等, 2006)。超氧化物歧化酶 (SOD) 是重要的抗氧化酶之一, 在清除自由基、防止自由基对生物分子损伤方面有十分重要的作用。近年来研究表明 SOD 酶活性与生物的免疫水平密切相关, 可用它们的活性变化作为机体非特异性免疫指标, 甚至定量指标 (赵红霞等, 2003), 其活力的变化反映了机体抵制自由基损伤的能力 (孙虎山等, 2000)。从本研究结果看出, SOD 酶活性的降低与氨氮胁迫浓度和时间成正相关, 结合本实验中中华绒螯蟹的死亡率也与氨氮胁迫浓度和时间成正相关的结果可以推测, 机体为了清除由于氨氮侵入而产生的大量自由基, 消耗了大量的 SOD 酶, 使 SOD 酶的活性显著低于对照组。同时由于自由基对生物膜脂质的损伤最为广泛和严重, 蟹体含脂质较多, 因此蟹体易受到自由基的损害而发生脂质过氧化, 损伤部位及其周围的正常细胞消耗了过多的 SOD 酶, 使体内自由基清除酶活性降低或使其合成障碍, 自由基的防卫系统受到破坏, 促使超氧阴离子自由基、过氧化氢、单线态氧等浓度剧增, 导致多种酶的失活, 从而加剧细胞的变性甚至死亡 (Rovin *et al.* 1993 宋林生等, 2004)。这可能是氨氮胁迫导致中华绒螯蟹血细胞密度和吞噬活力下降和死亡率增高的主要原因之一。

水体氨氮对蟹体的毒性主要取决于水中 pH 值、温度、盐度、溶解氧等水体环境状况和蟹体大小及生理状态等内部条件。氨氮由离子氨和非

离子氨组成, pH 值、温度、盐度主要影响氨氮中非离子氨的比例, pH 值的很小增高可引起非离子氨成倍增长, 毒性也随之增加。因非离子氨不具有电荷, 具有相对高的脂溶性, 故容易透过细胞膜损伤组织, 引起蟹体中毒。但在低 pH 值时, 离子氨在总氨氮中占比例很高时也会表现出中毒作用。溶解氧对氨氮毒性的影响也较大, 低氧可增加氨的毒性 (Vermeer 1987)。本试验中, 水体环境的 pH 值为 7.58—7.68, 溶氧值为 6.26—6.7, 水中添加的是离子氨, 故本试验的氨氮浓度对蟹体的毒性作用相对高 pH 值和低溶氧值水体环境的毒性较小。

本研究结果表明, 随着氨氮胁迫浓度的增加和胁迫时间的延长会引起中华绒螯蟹血细胞数量逐渐减少、血细胞吞噬率能力逐渐下降、溶菌酶和酚氧化酶活力逐渐下降, 使非特异性细胞免疫和血淋巴中的免疫应答因子活力等免疫防御系统逐渐遭到损伤, 同时机体清除自由基的能力也逐渐下降, 机体细胞和组织受到伤害, 进而引起中华绒螯蟹出现死亡。这一结果有助于我们了解环境中氨氮等胁迫因子对中华绒螯蟹等水生动物生理和机体损伤的影响, 同时为今后判断中华绒螯蟹等水生甲壳动物的免疫状况和调控养殖水环境提供重要的参考依据。

参 考 文 献

- 王 武, 颜鸿利, 1999. 中华绒螯蟹温室育苗的水处理. 水产学报, 23(4): 369—374
- 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰等, 1991. 改良后的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法. 生物化学与生物物理进展, 18(2): 163—165
- 朱忠勇, 1997. 实用医学检验学. 人民军医出版社, 795—805
- 孙虎山, 李光友, 2000. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究. 海洋与湖沼, 31(3): 259—265
- 孙舰军, 丁美丽, 1999. 氨氮对中国对虾抗病力的影响. 海洋与湖沼, 30(3): 267—272
- 陈平雁, 黄浙明, 2002. SPSS 10.0 统计软件应用教程. 北京: 人民军医出版社, 102—107
- 陈国福, 黄 捷, 宋晓玲, 2004. 对虾免疫机能研究概括. 水产学报, 28(2): 209—215
- 宋林生, 季延宾, 蔡中华等, 2004. 温度骤升对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 几种免疫化学指标的影响. 海洋与湖沼, 35(1): 74—77
- 张春丹, 黄福勇, 李明云等, 2006. 镉胁迫条件下大弹涂鱼

- (*Boleophthalmus pectinirostris*)外周血微核标记及肝脏过氧化物酶标记的变化. 海洋与湖沼, 37(1): 7—13
- 赵红霞, 张艳秋, 黄 磊等, 2003. 虾类的免疫系统与免疫防治. 中国兽医杂志, 39(1): 42—44
- 蔡武城, 李碧羽, 李玉民, 1983. 生物化学实验技术教程. 上海: 复旦大学出版社, 47
- Ashida M, 1971. Purification and characterization of prophenoloxylase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. Arch Biochem Biophys, 144: 749—762
- Bachne E, Mialhe E, 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusca and crustacean immunology. Aquaculture, 132: 17—32
- Chen J C, Chen Sha-Yen, Chen Chung-Tin *et al*, 1994. Changes of haemocyanin protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. Comp Biochem Physiol, 109A: 339—347
- Cheng W, Chen J C, 1997. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergi*. Fish Shellfish Immunology, 6: 178—186
- Colt J E, Armstrong D A, 1981. Nitrogen Toxicity to Crustaceans. Fish and Molluscs. In: Allen and L J, Kinney E. Ed. Proceedings of the Bio-Engineering Symposium for Fish Culture. Fish Culture Section of the American Fisheries Society (FCS publ. 1), Bethesda MD, 34—47
- Gilles L M, Philippe H, 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. Aquaculture, 191: 121—131
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T *et al*, 1980. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur J Biochem, 106: 7—16
- LeMoullac G, Soyez C, Sauhier D *et al*, 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Fish Shellfish Immunol, 8: 621—629
- Rovin J D, Stamler J S, Loscalzo J *et al*, 1993. Sodium nitroprusside, an endothelium-derived relaxing factor congener, increases platelet cyclic GMP levels and inhibits epinephrine-exacerbated *in vivo* platelet thrombus formation in stenosed canine coronary arteries. J Cardiovasc Pharmacol, 22(4): 626—631
- Sequeira T, Cerenius L, 1995. Flow cytometric analysis of molt-related changes in haemocyte type in male and female *Penaeus japonicus*. Biol Bull, 189: 376—380
- Sirirat R, Sombat R, Somkiat P *et al*, 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiotic bacterium (*Bacillus S11*). Aquaculture, 191: 271—288
- Smith C, 1995. Comparison of antibacterial activity in the haemocytes of different crustacean species. Comp Biochem and Physiol, 110: 39—45
- Sung H H, Huang S F, Tasi F M, 2000. Responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aeromonas* spp. J Invertebr Pathol, 76: 278—284
- Vemmer G K, 1987. Effects of air exposure on desiccation rate, hemolymph chemistry and escape behavior of the spiny lobster *Panulirus argus*. Fish Bull U S, 85: 45—51

NH₄⁺-N STRESS ON IMMUNE FUNCTION OF *ERIOCHEIR SINENSIS*

HUANG He-Zhong LI Yi SONG Xue-Hong WANG Yong-Ling YANG Cai-Gen

(Institute of Life Science, Suzhou University, Fisheries Research Institute of Suzhou University, Suzhou, 215006)

Abstract To study the effects of NH₄⁺-N stress on immune function of the Chinese mitten-hand crab *Eriocheir sinensis*, the most widespread aquatic breeding crustacea in fresh water pond, groups in different NH₄⁺-N concentrations (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 mg/L) and different treating lengths (10d and 20d) were set up in laboratory condition for comparison among the groups during March to May 2004. The haemocyte counts of the groups under the NH₄⁺-N stress of 3.0 mg/L for 10 days or 1.0 mg/L for 20 days was significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$). The phagocytic percent of the groups under the NH₄⁺-N stress of 2.0 and 3.0 mg/L from 10 to 20 days were lower ($P < 0.05$) and much lower ($P < 0.01$) than those of the control group respectively. The phagocytic index of the groups under the NH₄⁺-N stress of 3.0 mg/L for 10 days or 2.0 mg/L for 20 days was much lower than that of the control group ($P < 0.05$). The lysozyme (LSZ) activities of the groups under the NH₄⁺-N stress of 1.0 mg/L for 20 days and 2.0 mg/L for 20 days were lower ($P < 0.05$) and much lower ($P < 0.01$) than those of the control group respectively. The phenoloxidase (PO) activity of the all groups under the NH₄⁺-N stress of 1.0–5.0 mg/L for 10 days declined sharply ($P < 0.01$). At the 20th day, the PO activity of the groups under the NH₄⁺-N stress of 1.0–4.0 mg/L increased, but the PO activity was much lower than that of the control while the NH₄⁺-N concentration was above 3.0 mg/L ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The activity of superoxide dismutase (SOD) was lower ($P < 0.05$) and much lower ($P < 0.01$) than that of the control respectively on the stress of 3.0–4.0 mg/L for 10 days or 1.0–2.0 mg/L for 20 days and 5.0 mg/L for 10 days or 3.0–5.0 mg/L for 20 days.

All the results indicated that NH₄⁺-N stress could result in declining haemocyte counts and phagocytic percentage, decreasing the activity of phagocytic, LSZ, PO and SOD, damaging non-specific immune system then its functions of the body. Meanwhile, it reduces the ability of eliminating free radicals and impairs the cells and tissues of the body, and even causes death of the Chinese mitten-handed crab. The reaction degree is positively related to the stress of NH₄⁺-N concentration and time length treated.

Key words *Eriocheir sinensis*, NH₄⁺-N stress, Haemocyte, Immune functions