

DOI: 10.5846/stxb201211291707

许星鸿, 张雁秋, 阎斌伦, 徐加涛, 房树全, 周黎, 刘艳晴, 黄福林. 氨氮胁迫对日本蟳免疫生理指标及器官结构的影响. 生态学报, 2014, 34(14): 3885-3894.

Xu X H, Zhang Y Q, Yan B L, Xu J T, Fang S Q, Zhou L, Liu Y Q, Huang F L. Effects of ammonia-N stress on immunity-related indicators and histological structure of some organs of the marine crab, *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards). Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(14): 3885-3894.

氨氮胁迫对日本蟳免疫生理指标及器官结构的影响

许星鸿^{1,2}, 张雁秋^{1,*}, 阎斌伦², 徐加涛², 房树全², 周黎², 刘艳晴², 黄福林²

(1. 中国矿业大学环境与测绘学院, 徐州 221008; 2. 淮海工学院海洋学院, 连云港 222005)

摘要: 采用生物酶测定及组织学方法, 研究了水体中不同浓度氨氮胁迫下日本蟳免疫相关指标的变化, 以及对鳃、肝胰腺和胃等器官结构的影响。结果表明: 在氨氮胁迫下, 各实验组的血细胞密度(DHC)、血蓝蛋白含量、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活力, 以及低浓度胁迫组的酚氧化酶(PO)和溶菌酶(LSZ)活力呈“先升后降”的变化趋势; 高浓度组LSZ活力持续下降。在低浓度氨氮胁迫下, 过氧化代谢产物丙二醛(MDA)含量呈“先升后降再升”, 而高浓度氨氮胁迫导致MDA含量持续上升。胁迫第15天, 除低浓度组的DHC、血蓝蛋白含量和PO活力略高于对照组外, 其他实验组所测指标均低于对照组; PO、LSZ、SOD和CAT等酶活力以及DHC均与氨氮胁迫浓度呈显著负相关, MDA含量则与胁迫浓度呈显著正相关($P < 0.01$)。高浓度氨氮胁迫会导致鳃几丁质膜变薄、断裂, 鳃上皮排列紊乱、染色质异固缩; 鳃腔中血淋巴减少, 密度降低, 血细胞凝集、质膜破裂, 胞质严重空泡化; 肝胰腺上皮形态不规则, B细胞减少, 腺细胞出现大量空泡, 染色质凝聚; 胃几丁质膜断裂, 胃上皮排列不规则, 胞质中出现大量残余体。研究表明高浓度氨氮胁迫对日本蟳免疫相关指标和器官结构产生显著影响, SOD活力和MDA含量长期变化情况可作为衡量日本蟳在氨氮胁迫下免疫状态的指标。

关键词: 氨氮胁迫; 日本蟳; 免疫指标; 器官结构

Effects of ammonia-N stress on immunity-related indicators and histological structure of some organs of the marine crab, *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards)

XU Xinghong^{1,2}, ZHANG Yanqiu^{1,*}, YAN Binlun², XU Jiatao², FANG Shuquan², ZHOU Li², LIU Yanqing², HUANG Fulin²

1 School of Environment Science and Spatial Informatics, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221008, China

2 School of Marine Science & Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China

Abstract: *Charybdis japonica* is an important marine crab, that is widely distributed in the China sea area. Enzymatic and histological methods were used to analyze changes in the activities of immune-related enzymes in the blood serum, and in the histology of major organs of this crab exposed to different levels of ammonia-N stress. The primary objective of the study was to provide a theoretical basis for research into ammonia-N toxicity in relation to the control of water quality in artificial cultures of this crab.

The crabs were exposed to ammonia-N concentrations of 0, 2, 5, 10, 15, and 20 mg/L for up to 15 days. After times of 0, 1, 3, 5, 10, and 15 days, blood samples were taken for measurement of changes in immunity-related indicators, including the density of hemocytes (DHC); hemocyanin concentration; the activities of phenoloxidase (PO), lysozyme

基金项目: 中央财政支持地方高校发展专项资金项目(CXTD29); 江苏省科技厅苏北科技发展计划项目(BN2010026); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

收稿日期: 2012-11-29; **网络出版日期:** 2014-02-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yqzhang@cumt.edu.cn

(LSZ), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT); and the malondialdehyde (MDA) concentration. On day 15, samples were taken of the gills, hepatopancreas and stomach tissue of the crabs in the 20 mg/L of ammonia-N medium, for observations of histological changes.

Many of the measured indices showed an initial increase in response to ammonia-N stress, which was followed by a decreasing trend over time. This was observed in the values of DHC and hemocyanin concentration, in the activities of the SOD and CAT in all treatments, and in the activities of the PO and LSZ in the experimental groups at low ammonia-N concentrations. In contrast, the LSZ activity declined continuously in crabs at high concentration of ammonia. At low ammonia-N concentrations, the MDA content initially increased, and then decreased, and finally rose again. At higher concentrations, MDA continuously increased. After exposure to ammonia-N for 15 days, most of the measured indices were lower in the ammonia-N treatments than in the control group, with the exception of DHC, hemocyanin concentration, and PO activity, which were slightly higher. There were significant negative correlations between ammonia-N concentration and DHC, and ammonia concentration and the activities of PO, LSZ, SOD, and CAT. In contrast, the MDA content was positively correlated with the ammonia-N concentration ($P < 0.01$). Noticeable changes were observed in the histological structure of some organs in crabs exposed to high concentrations of ammonia-N. The chitin layer of the gills became thin and was partly ruptured, the epithelial lamina became disorganized, and the chromatin condensed. The quantity of hemolymph in the gill cavity was reduced and its density decreased. Hemocytes were condensed with ruptured cytomembranes and abundant vacuoles in cytoplasm. The glandular epithelium exhibited an irregular morphology, the number of secretory cells (B-cells) decreased and numerous vacuoles appeared. There were fewer organelles and the chromatin was condensed. The chitin layer of the stomach ruptured and the gastric epithelium became disordered, with abundant residual bodies formed in the cytoplasm.

We conclude that high concentrations of ammonia-N have significant effects on the activities of immune-related enzymes and on organ morphology in *Charybdis japonica*. Changes in the activities of SOD and in the content of MDA, may be used as indices for evaluating the immune state of *C. japonica* under ammonia-N stress.

Key Words: ammonia-N stress; *Charybdis japonica*; immunity-related indicators; histological structure

氨氮是养殖水体中常见的污染因子之一,氨氮胁迫会造成水生动物摄食减少、生长率下降^[1],免疫力降低甚至会引起疾病的暴发^[2]。关于氨氮对水生动物的毒害机制已有一些报道,Randall 等^[3]发现氨中毒会导致鱼类呼吸道上皮损伤、神经系统紊乱;洪美玲等^[4]报道高浓度的氨氮胁迫会抑制中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)抗氧化酶活性并造成肝细胞核解体。日本蟳(*Charybdis japonica*)为分布较广且经济价值较高的海产蟹类^[5],随着养殖规模的扩大,环境胁迫对其生理机制的影响亦日益受到关注。王春琳等^[6]分析了硫酸铜蓄积对日本蟳保护酶系统的影响,张红霞等^[7]就重金属离子对日本蟳抗氧化酶活力的影响进行了探讨,许星鸿等^[8]报道了亚硝态氮胁迫下日本蟳免疫相关指标的变化规律,但迄今尚未见有关氨氮胁迫对日本蟳毒害机制的研究报道。本文运用酶学和组织学的实验方法,研究氨氮胁迫

对日本蟳血淋巴免疫生理指标及鳃、胃、肝胰腺等器官结构的影响,旨在探讨氨氮胁迫对日本蟳的毒性机理,为养殖水环境调控及病害防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

日本蟳于 2011 年 9 月购自连云港市高公岛码头,采用生态闭路循环养殖系统暂养 7 d,盐度 25, pH 8.0,水温 20 °C,自然光照,连续充气,1 日投喂 2 次鲜活贝类。选择附肢完整、活力强者用于实验,体质量为 (82.35 ± 15.72) g。

1.2 实验设计

氨氮源为氯化铵,为国产分析纯。根据养殖水体通常的氨氮污染浓度^[9],本实验氯化铵浓度设 6 组:对照组(0 mg/L)、低浓度组(2 和 5 mg/L)、中浓度组(10 和 15 mg/L)和高浓度组(20 mg/L),每组

设 3 个平行,每个平行随机取 25 只蟹,饲养 15 d。水温、投饵、充气等养殖条件与暂养时相同。每日定时换水 2 次,每次更换水体的 50%,并维持各组氯化铵质量浓度。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫生理指标的测定

免疫相关指标选用血细胞密度(DHC)、血蓝蛋白含量、酚氧化酶(PO)、溶菌酶(LSZ)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活力及过氧化代谢产物丙二醛(MDA)含量。于实验 0、1、3、5、10、15 d,每缸随机抽取 3 只蟹采集血样,测定各项免疫指标。用无菌注射器先吸取 ACD 抗凝剂^[10] 1 mL,再由蟹第 3 步足基关节处按 1:1 比例抽取血淋巴,充分混匀后,用血球计数板计数,计算血细胞密度,然后用分光光度计测定血蓝蛋白含量^[11]。

将血淋巴 5000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液即为血清,-80 ℃冷冻保存待测酶活。PO 测定采用 Ashida^[12]的方法,LSZ 活力测定采用 Hultmark^[13]的方法,SOD 测定采用邻苯三酚自氧化法^[14],CAT 测定采用 Góth^[15]的过氧化氢法,MDA 含量采用南京建成生化试剂盒测定。

1.3.2 组织学观察

于胁迫后第 15 天,从对照组与高浓度(20 mg/L)胁迫组分别随机取出 3 只蟹,冰冻麻醉后解剖取出鳃、胃、肝胰腺。一部分样品用 Bouin's 液固定,石

蜡包埋,切片厚 6—7 μm,苏木精-伊红染色,Nikon E1000 显微镜观察、拍照。另取一部分样品用 2.5% 戊二醛预固定(4 ℃),1% 锇酸后固定,梯度乙醇脱水,Epon812 环氧树脂包埋。LKB-Nova 超薄切片机切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,日本电子 JEM-1200EX 型透射电镜观察、摄影。

1.4 数据分析

所测数据采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,进行单因子方差分析(One-Way ANOVA),LSD(Least Significant Difference)多重比较和 Duncan 检验。显著水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 氨氮对日本蟳 DHC 和血蓝蛋白含量的影响

由图 1 可以看出,在氨氮胁迫下,各实验组 DHC 均呈“先升后降”的趋势。处理第 1 天,实验组 DHC 均显著高于对照组,以中浓度组 DHC 上升较快,在胁迫 1 d 时即已升至最大值,随后逐渐下降。低浓度组 DHC 于处理第 3 天升至最大值,其中 5 mg/L 组 DHC 升高幅度最大,为对照组的 4.18 倍。高浓度组 DHC 上升较慢,于处理第 5 天升到最大值。处理第 15 天,15 和 20 mg/L 组 DHC 显著低于对照组,DHC 与氨氮胁迫浓度呈显著负相关($r = -0.931$, $P < 0.01$)。

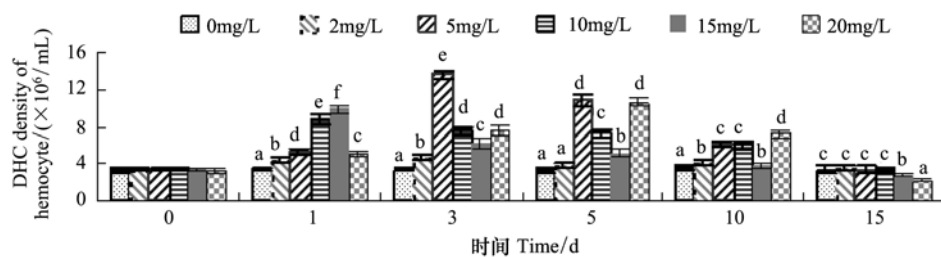


图 1 氨氮胁迫对日本蟳 DHC 的影响

Fig.1 Effect of ammonia-N stress on DHC in *Charybdis japonica*

上标不同小写字母表示同一测试时间不同处理组间差异显著($P < 0.05$)

从图 2 可知,在氨氮胁迫第 1 天,各实验组血蓝蛋白含量均显著高于对照组。中浓度组于处理第 1 天,血蓝蛋白含量升至最高,随后呈下降趋势。2 mg/L 组上升速度较慢,于处理第 5 天升至最大值,5 和 20 mg/L 两组均于处理第 3 天升至最高。处理第 10 天,各实验组血蓝蛋白含量均出现下降,但仍显著

高于对照组。至处理第 15 天,各实验组血蓝蛋白含量与对照组差异均不显著($P > 0.05$)。

2.2 氨氮胁迫对日本蟳 PO 和 LSZ 活力的影响

如图 3 所示,在氨氮胁迫下,除 20 mg/L 组外,其他实验组 PO 活力均先升后降。处理第 1 天,除 20 mg/L 组 PO 活力明显低于对照组外,其他实验组

PO 活力均有显著上升,以 15 mg/L 组上升最快。处理第 3 天,15 mg/L 组 PO 活力有所下降,而其他实验组 PO 活力升至最大值,上升幅度以 10 mg/L 组最大,20 mg/L 组为最小。随着处理时间的延长,各实

验组 PO 活力均呈下降趋势。至处理第 15 天,胁迫浓度 10 mg/L 及以上组 PO 活力明显低于对照组,且 PO 活力与氨氮胁迫浓度呈显著负相关($r = -0.965$, $P < 0.01$)。

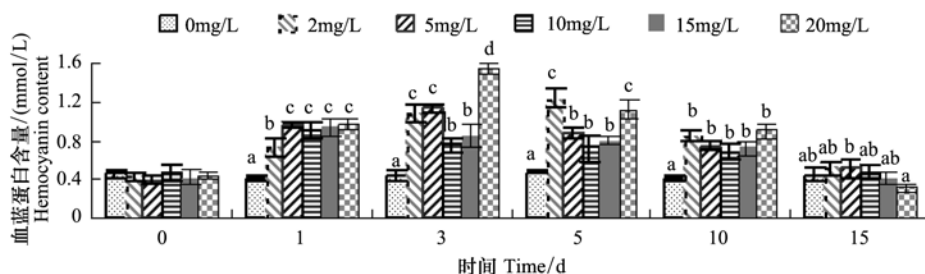


图2 氨氮胁迫对日本蟳血蓝蛋白含量的影响

Fig.2 Effect of ammonia-N stress on hemocyanin content in *Charybdis japonica*

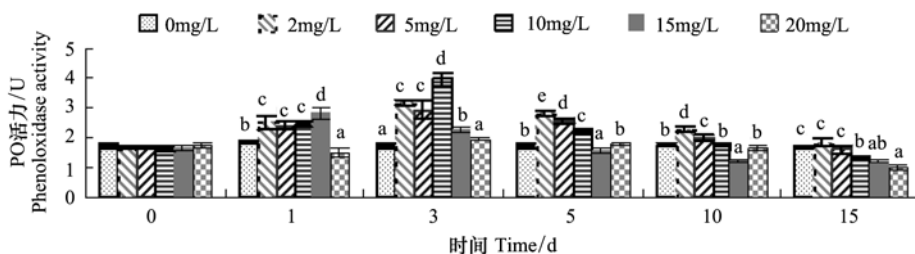


图3 氨氮胁迫对日本蟳 PO 活力的影响

Fig.3 Effect of ammonia-N stress on PO activity of *Charybdis japonica*

由图 4 可见,在氨氮胁迫下,实验组 LSZ 活力呈现 3 种变化规律:浓度在 10 mg/L 及以下组 LSZ 活力先升后降;15 mg/L 组 LSZ 活力在处理第 1 天出现下降,于第 3 天略有升高,随后呈下降趋势;高浓度组 LSZ 活力持续下降。低浓度组 LSZ 活力于处理第

5 天升至最高,而中浓度组 LSZ 活力最大值出现在处理第 3 天,升高幅度以 5 mg/L 组最大。处理第 15 天,各实验组 LSZ 活力均低于对照组,且 LSZ 活力与氨氮胁迫浓度呈显著负相关($r = -0.986$, $P < 0.01$)。

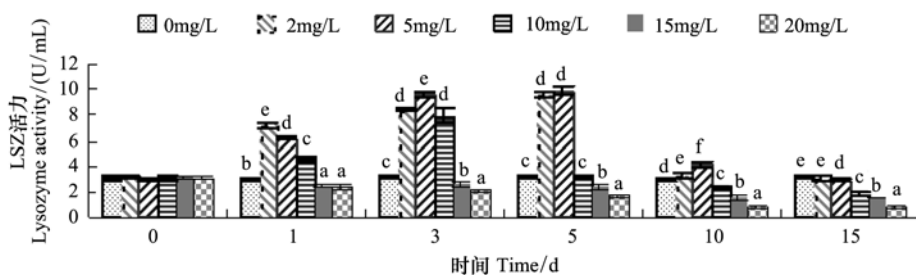


图4 氨氮胁迫对日本蟳 LSZ 活力的影响

Fig.4 Effect of ammonia-N stress on LSZ activity of *Charybdis japonica*

2.3 氨氮胁迫对日本蟳 SOD 活力、CAT 活力和 MDA 含量的影响

从图 5 可以看出,在氨氮胁迫下,各实验组 SOD 活力均为先升后降。低浓度组 SOD 活力上升较慢,2 mg/L 组 SOD 活力于处理第 5 天升至最大值,随后下

降。随着胁迫浓度的升高,各实验组 SOD 活力的上升速度也随之加快,5、10 和 15 mg/L 三组 SOD 活力于处理第 3d 升至最高值,升高幅度以 15 mg/L 组最大。20 mg/L 组 SOD 活力于处理第 1 天即升至最高值,但升高幅度较小。至处理第 15 天,除 2 mg/L 组

外,其他实验组 SOD 活力均显著低于对照组 ($P < 0.05$),且 SOD 活力与氨氮胁迫浓度呈显著负相关 ($r = -0.983, P < 0.01$)。

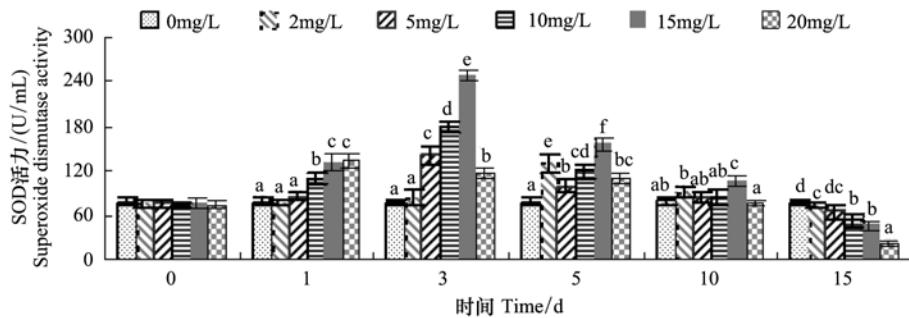


图5 氨氮胁迫对日本鳊 SOD 活力的影响

Fig.5 Effect of ammonia-N stress on SOD activity of *Charybdis japonica*

在氨氮胁迫下,各实验组 CAT 活力亦呈现“先升后降”的变化规律(图 6)。处理第 1 天,各实验组 CAT 活力均高于对照组,以 20 mg/L 组上升幅度较大。处理第 3 天,5 和 10 mg/L 两组 CAT 活力升至最大值,而 15 和 20 mg/L 两组出现下降。处理第 5

天,2 mg/L 组 CAT 活力升至最高,其他实验组均下降。处理第 10 天,各实验组 CAT 活力均低于对照组,除 2 mg/L 组外均差异显著。至处理第 15 天,各实验组 CAT 活力继续下降,CAT 活力与氨氮胁迫浓度呈显著负相关($r = -0.972, P < 0.01$)。

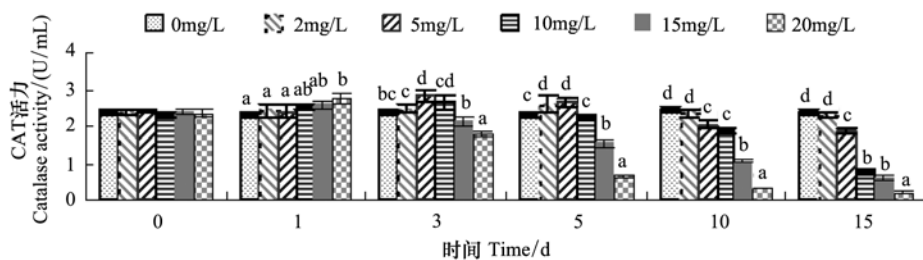


图6 氨氮胁迫对日本鳊 CAT 活力的影响

Fig.6 Effect of ammonia-N stress on CAT activity of *Charybdis japonica*

由图 7 可见,在氨氮胁迫下,各实验组 MDA 含量呈现两种变化模式:低浓度组为“先升后降再升”,而高浓度组为持续上升。处理第 1 天,各实验组 MDA 含量均显著高于对照组,以 10 mg/L 组升高幅度最大。处理第 3 天,2、5 和 10 mg/L 三组 MDA 含

量出现下降。处理第 5 天,15 和 20 mg/L 两组 MDA 含量显著高于对照组,且 MDA 含量与剂量浓度存在显著正相关关系($r = 0.955, P < 0.01$)。处理第 15 天,各实验组 MDA 含量均高于对照组,除 2 mg/L 组外差异均显著($P < 0.05$)。

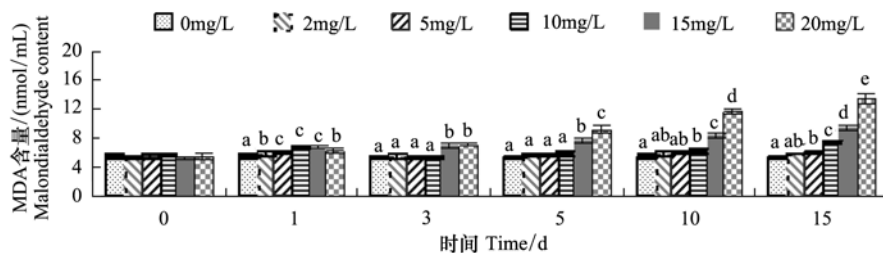


图7 氨氮胁迫对日本鳊 MDA 含量的影响

Fig.7 Effect of ammonia-N stress on MDA content of *Charybdis japonica*

2.4 氨氮胁迫对日本鳉主要器官结构的影响

日本鳉的鳃由鳃壁和鳃腔组成(图 8-1),鳃壁由外到内可分为几丁质膜、上皮细胞层和基膜,鳃腔中流动着血淋巴。对照组(图 8-1,3)的鳃几丁质膜可分为内外两层,其中外层较厚且电子密度较低,内层薄而致密,紧密贴于鳃上皮的游离面。鳃上皮为单层柱状,上皮细胞排列整齐。胞质中含丰富的线粒体和质膜内褶等结构,核内染色质均匀分布。鳃腔中血淋巴丰富。在氨氮胁迫下,鳃结构呈现显著变化(图 8-2,4)。几丁质膜外层显著变薄,电子密度增大并出现纵纹,局部有断裂现象。鳃上皮细胞形状不规则、排列紊乱。胞质中线粒体、质膜内褶等细胞

器减少,电子密度降低。核形状不规则,局部核膜出现缢缩,核内染色质呈异固缩状态。鳃腔中血淋巴减少,密度降低,血细胞出现凝集现象。

日本鳉血细胞可分为无颗粒细胞、小颗粒细胞、中间型细胞和大颗粒细胞等 4 种类型^[16]。对照组鳃腔中的血细胞质膜完整,形成丰富的伪足,胞质中颗粒明显,内质网、线粒体等细胞器结构正常,并有少量的液泡(图 8-5)。在氨氮胁迫下,血细胞中出现大量的空泡(图 8-6,8),内质网、线粒体等细胞器减少,伪足不明显。中间型细胞内出现较多的残余体结构,部分颗粒破碎(图 8-7)。无颗粒细胞质膜多处破裂,核异固缩,形状不规则(图 8-8)。

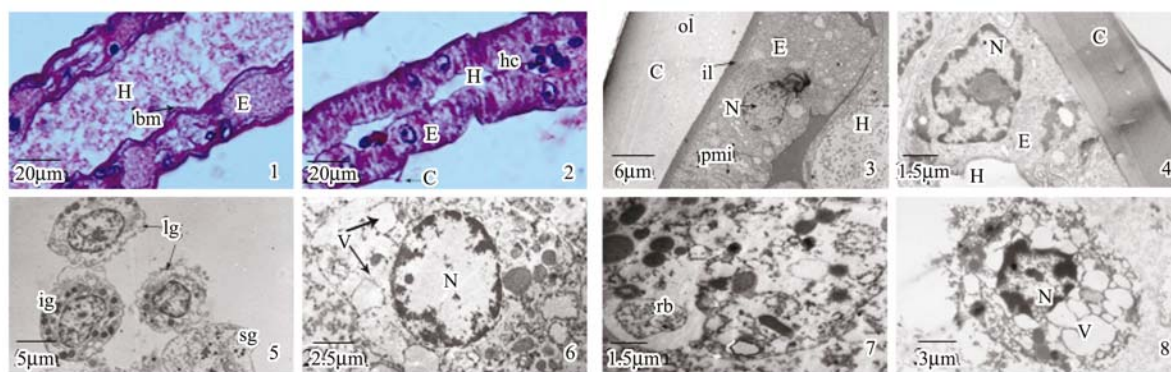


图 8 氨氮胁迫下日本鳉鳃与血细胞的结构变化

Fig.8 Ambient ammonia stress on the structure of gills and hemocytes in *Charybdis japonica*

1: 对照组鳃显微结构;2: 氨氮胁迫下鳃显微结构:几丁质膜断裂,鳃腔变小,血淋巴减少,血细胞凝集;3: 对照组鳃超微结构;4: 氨氮胁迫下鳃超微结构:鳃上皮排列紊乱,染色质异固缩;5: 对照组血细胞超微结构;6—8: 氨氮胁迫下血细胞超微结构;6: 大颗粒细胞空泡化;7: 中间型细胞胞质中出现残余体;8: 无颗粒细胞严重空泡化,核膜缢缩,染色质异固缩;bm:基膜;C:几丁质膜;E:上皮;H:鳃腔;hc:血细胞;ig:中间型细胞;il:内层;lg:大颗粒细胞;N:细胞核;ol:外层;pmi:质膜内褶;rb:残余体;sg:小颗粒细胞;V:空泡

日本鳉肝胰腺结构与其他十足类^[17]一致,为复管状腺,其腺上皮包含 4 类细胞:分泌(B)细胞、吸收(R)细胞、纤维(F)细胞和胚(E)细胞(图 9-1)。对照组腺上皮为单层柱状,排列整齐,各类细胞特征明显:B 细胞游离面不规则;R 细胞呈嗜酸性,胞质内有脂肪滴;F 细胞为强嗜碱性,电镜观察可见丰富的糙面内质网与核糖体(图 9-3)。在氨氮胁迫下,腺上皮形态不规则,排列紊乱,B 细胞减少,腺腔中出现细胞碎片(图 9-2)。腺细胞内出现大量空泡,有些细胞大半体积甚至整个细胞都呈空泡状(图 9-4)。F 细胞内质网、核糖体等细胞器减少,核内染色质凝聚。

日本鳉胃粘膜上皮为单层柱状上皮,对照组胃上皮排列整齐,其游离面覆盖着几丁质膜(图 9-5)。与鳃相同,胃几丁质膜也可分为外层和内层,内层与

胃上皮游离面紧密相接,连接面平整。胃上皮胞质中含有丰富的糙面内质网和核糖体(图 9-7)。在氨氮胁迫下,胃几丁质膜外层局部断裂,内层与胃上皮连接面呈锯齿状。胃上皮排列不规则,染色变浅,基膜变薄且不连续(图 9-6)。胃上皮细胞中出现大量的残余体,内质网等细胞器显著减少(图 9-8)。

3 讨论

3.1 氨氮胁迫对日本鳉免疫生理指标的影响

甲壳动物为非特异性免疫,其细胞免疫体现为血细胞对病原体的吞噬、包掩和凝集等作用,而体液免疫是通过血细胞被激发释放出酚氧化酶、溶菌酶、抗氧化酶等多种免疫因子于血浆中而实现^[18],常将血细胞数量作为衡量甲壳动物免疫水平的一个重要指标^[19]。黄鹤忠等^[20]报道中华绒螯蟹在氨氮

(5 mg/L)胁迫 10 d 时,DHC 下降 39.74%;而凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[21] 在氨氮浓度为 5.24 mg/L 的水体中暴露 7 d,其 DHC 无显著变化。本实验结果显示,日本蟬在氨氮胁迫处理 15 d 时,低浓度组(2 和 5 mg/L) DHC 略高于对照组,而高浓度组(15 和 20 mg/L) DHC 显著低于对照组,表明低浓度

氨氮胁迫下,日本蟬机体处于持续应激状态,DHC 较高,而当胁迫超过一定阈值时,会造成机体不可逆转的损伤^[22],导致胁迫初期短暂出现 DHC 升高的应激反应后迅速下降。不同动物对氨氮胁迫所表现出 DHC 的不同响应与其对氨氮耐受能力有关。

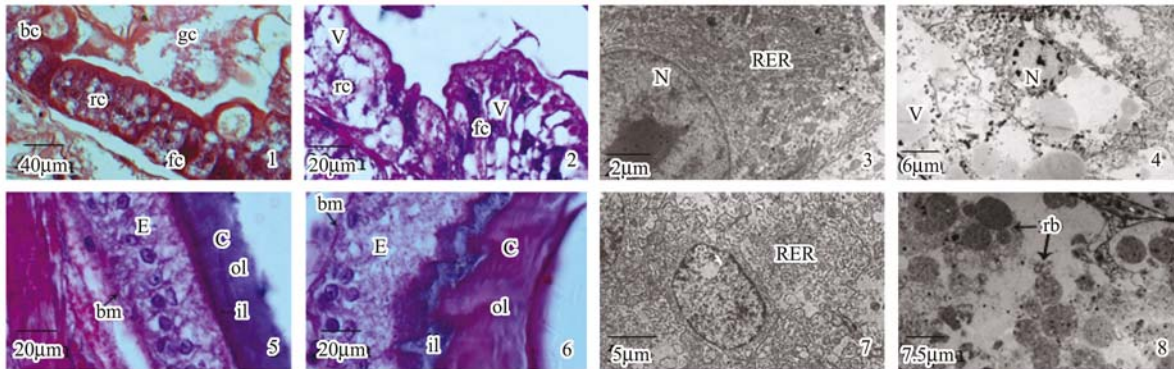


图 9 氨氮胁迫下日本蟬肝胰腺与胃的结构变化

Fig.9 Ambient ammonia stress on the structure of hepatopancreas and stomach in *Charybdis japonica*

1: 对照组肝胰腺显微结构;2: 氨氮胁迫下肝胰腺显微结构;腺上皮形态不规则,排列紊乱,腺腔中出现细胞碎片,胞质内含大量空泡;3: 对照组 F 细胞超微结构;4: 氨氮胁迫下腺上皮超微结构;腺上皮严重空泡化,染色质异固缩;5: 对照组胃显微结构;6: 氨氮胁迫下胃显微结构;几丁质膜外层局部断裂,内层与胃上皮连接面呈锯齿状,胃上皮排列不规则;7: 对照组胃上皮细胞超微结构;8: 氨氮胁迫下胃上皮超微结构;胞质中出现大量残余体;bc: B 细胞;bm: 基膜;C: 几丁质膜;E: 上皮;fc: F 细胞;gc: 腺腔;il: 内层;N: 细胞核;ol: 外层;rc: R 细胞;rb: 残余体;RER: 糙面内质网;V: 空泡

血蓝蛋白是甲壳动物血淋巴中的呼吸色素,参与免疫、渗透压维持及蜕皮等多种生命活动^[23]。Chen 等^[24]发现水体中氨氮浓度升高会造成日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 血蓝蛋白浓度下降。本实验中,在氨氮胁迫下,日本蟬血蓝蛋白含量先升后降,至处理后期,20 mg/L 组血蓝蛋白含量下降明显。胁迫初期血蓝蛋白含量的升高可能与机体应激反应时耗氧量增加有关,而高浓度氨氮胁迫会影响 ATP 酶活性,氨氮分泌受抑制,血淋巴中氨氮浓度明显增高,导致 pH 值上升,血蓝蛋白降解^[25]。

酚氧化酶原系统和 LSZ 是甲壳动物重要的血淋巴免疫应答因子。已有研究表明,在适量外源刺激或胁迫下,颗粒细胞通过胞吐作用释放酶原于血浆中并激活,免疫力增强^[26],而 LSZ 是一种碱性蛋白,可裂解微生物细胞壁,具有重要的防御功能^[27]。据姜令绪等^[28]报道,凡纳滨对虾在氨氮(0.5—2.5 mg/L)胁迫 2 d 内,随着氨氮浓度升高,PO 活力升高,而 LSZ 活力下降。黄鹤忠等^[20]研究显示,中华绒螯蟹在 1 mg/L 的氨氮下处理 20 d 时,PO 活力高于对照组,但 LSZ 活力较低,浓度在 2 mg/L 以上的氨氮胁迫会造成 PO 活力下降。本实验结果与之相近,日本

蟬在 2 mg/L 氨氮胁迫 15 d 时,与对照组相比,PO 活力略高,LSZ 活力略低。表明低浓度的氨氮刺激会激活酚氧化酶原系统,使 PO 活力升高,而高浓度的氨氮胁迫下,虽然 PO 活力随着机体应激反应而出现一定上升,但高浓度氨氮的持续作用会造成酚氧化酶原系统进一步的合成或释放受阻,PO 活力随之下降。LSZ 活力对不同浓度氨氮胁迫的响应较复杂,低浓度氨氮的长期胁迫与高浓度氨氮的短期胁迫对日本蟬 LSZ 活力均有抑制效应,表明 LSZ 较 PO 对氨氮胁迫更为敏感。

SOD 和 CAT 是生物体抗氧化防御系统的关键酶,SOD 能催化 O_2^- 生成 H_2O_2 ,而 CAT 可催化 H_2O_2 生成 H_2O 和 O_2 ,防止过多的活性氧积存对机体造成氧化损伤^[29]。MDA 是机体内脂质过氧化反应的重要产物,能引起蛋白质分子内与分子间交联,导致细胞损伤^[30]。本研究中,在氨氮胁迫初期,各实验组 SOD 与 CAT 活力均高于对照组,且酶活升高幅度与胁迫程度呈正相关,表明氨氮胁迫对日本蟬 SOD 与 CAT 活力有明显的诱导效应,与洪美玲等^[4]对中华绒螯蟹的研究结果一致。氨氮胁迫会造成机体内产

生大量的活性氧自由基, SOD 和 CAT 活力的迅速升高可以保护机体免受自由基的伤害。随着氨氮胁迫时间的延长, SOD 和 CAT 活力在升高后呈现下降趋势, 且酶活力与氨氮胁迫浓度呈显著负相关, 而 MDA 含量与胁迫浓度呈显著正相关, 表明氨氮的长期胁迫会破坏抗氧化系统, 导致机体清除自由基能力降低, 过多的活性氧使机体脂质过氧化程度加剧, MDA 含量随之增加。实验中 SOD 活力和 CAT 活力的变化表现出非同步性, 表明两者在功能上具有相对的独立性, 可能与“CAT 底物 H_2O_2 除了由 SOD 催化 O_2^- 的歧化反应获得外, 亦可从氨基酸或细胞色素 P450 酶系激活产生”^[31] 有关。本实验中, MDA 含量与 SOD 活力呈极显著负相关, 可将 SOD 活力和 MDA 含量的长期变化情况配合用于评价氨氮胁迫下日本鳊的免疫状态。

3.2 氨氮胁迫对日本鳊器官结构的影响

甲壳动物的鳃具有呼吸、排泄及渗透压调节等多种功能, 因其与水体直接接触, 又是阻挡病原侵袭的第一道防线, 易受到环境的影响及病害的侵袭。Chen 等^[24] 发现氨氮会破坏日本对虾鳃组织, 降低血淋巴输送氧气功能。本实验光镜及电镜结果显示, 高浓度氨氮胁迫对日本鳊鳃结构影响显著: 几丁质膜变薄、局部断裂, 鳃上皮排列紊乱、细胞器和质膜内褶减少, 鳃腔狭窄、血淋巴减少, 与吕晓燕等^[32] 对亚硝酸盐胁迫下红螯光壳蟹 (*Cherax quadricarinatus*) 鳃结构的观察结果相近。覆盖在鳃上皮游离面的几丁质膜是阻止病原侵蚀的屏障^[33], 几丁质膜的破坏将导致机体容易感染病原。质膜内褶膜上富有 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶, 与离子转运有关^[34], 质膜内褶的减少会影响渗透压调节。鳃腔变得狭窄和血淋巴的减少会严重影响鳃的呼吸功能。

甲壳动物血细胞除了与呼吸有关外, 还担负着机体防御保卫功能。王玥等^[35] 报道氨氮胁迫会导致罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 血细胞粗面内质网、核糖体和线粒体数量减少。本文超微结构观察结果与之一致, 在氨氮胁迫下, 血细胞中细胞器减少、空泡化严重, 表明血细胞合成免疫因子的能力下降; 伪足的减少表明其吞噬功能降低; 染色质的异固缩和基因转录活性丧失有关, 直接影响到免疫相关基因的表达^[36]。

通常认为甲壳类肝胰腺中 R 细胞具有细胞内消

化及储存脂肪的功能, F 细胞含有发达的糙面内质网与核糖体, 主要功能是合成和分泌消化酶, 进行细胞外消化, 而 B 细胞具有细胞内消化和分泌的功能^[37]。已有研究表明, 亚硝酸盐胁迫和锌胁迫会分别导致红螯光壳蟹^[32] 和中华绒螯蟹^[38] 肝胰腺细胞的空泡化。本实验结果中, 氨氮胁迫造成日本鳊肝胰腺上皮排列紊乱, 腺腔中甚至出现细胞碎片, 表明其组织结构损害明显, 消化功能受到影响。R 细胞严重空泡化, 势必影响到其细胞内消化功能; F 细胞空泡化, 内质网、核糖体减少, 核内染色质凝聚, 对消化酶的合成产生显著影响。本实验中发现氨氮胁迫导致 B 细胞减少的现象和洪美玲等^[4] 对中华绒螯蟹的研究结果一致。一般认为甲壳类 B 细胞由 F 细胞分化形成^[39], 氨氮胁迫在影响到 F 细胞合成消化酶功能的同时, 也影响其进一步的分化, 所以导致 B 细胞减少。

蟹类贲门胃由发达的几丁质膜形成齿和嵴突, 构成胃磨, 对食物进行研磨; 而幽门胃的几丁质特化形成刚毛, 构成过滤器, 可对研磨后的食物进行过滤^[34]。关于氨氮胁迫对蟹类胃结构的影响尚未见报道。本研究发现, 氨氮胁迫可导致日本鳊胃壁几丁质膜变形, 局部断裂, 会对其研磨、过滤的功能产生影响。崔龙波等^[40] 报道日本鳊幽门胃上皮具有一定的消化酶活性, 本实验通过透射电镜也观察到胃上皮胞质中含有丰富的糙面内质网和核糖体, 表明其具有较强的合成功能, 而氨氮胁迫导致胃上皮内质网显著减少, 代之以大量的残余体, 表明其合成功能受到较大的影响。

从本实验结果综合来看, 在低浓度氨氮 (2 mg/L) 的胁迫下, 虽然日本鳊 DHC、血蓝蛋白含量和 PO 活力等保持在较高的水平, 但 LSZ 和抗氧化酶活力已出现一定下降, 表明低浓度氨氮的长期胁迫也会对机体免疫功能产生一定的影响, 这在养殖生产中不宜忽视。而高浓度氨氮胁迫会造成免疫相关指标水平大幅下降及器官结构显著变化, 严重影响机体免疫、呼吸及消化等多种生理机能, 可能导致疾病暴发。

References:

- [1] Person-Le R, Lamers A, Le Roux A, Sévère A, Boeuf G, Mayer-Gostan N. Long-term ammonia exposure of turbot: effects on plasma parameters. *Journal of Fish Biology*, 2003, 62 (4):

- 879-894.
- [2] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 16 (3) : 321-334.
- [3] Randall D J, Tsui T K N. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(9) : 17-23.
- [4] Hong M L, Chen L Q, Gu S Z, Liu C, Long Z Q, Zhang W. Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(3) : 412-418.
- [5] Liang X Q, Fang J Z, Yang H Q. *Hydrobiology*. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 360.
- [6] Wang C L, Ding A X. Effects of accumulated copper sulfate on protective system of *Charybdis japonica*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2005, 20 (4) : 278-282.
- [7] Zhang H X, Pan L Q, Liu J. Effects of heavy metal ions on the antioxidant enzymes of the haemolymph of crab *Charybdis japonica*. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(1) : 49-53.
- [8] Xu X H, Yan B L, Xu J T, Xu H R, Zhou L, Liu Y Q, Zhang Y Q. Effects of Nitrite-N Levels on Immunity-related Indicators in Japanese swimming crab *Charybdis japonica*. *Fisheries Science*, 2012, 31 (7) : 392-397.
- [9] Zhong S L, Chen Y Z, Zhong S L, Chen Y Z, Lin K B, Chen B X, Cai Q H, Chen M. Studies on variation of contents of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 S^{2-} and heterotrophic bacteria in substrate of shrimp ponds and their correlations. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1997, 16(4) : 449-454.
- [10] Zhou K, Fang W H, Qiao Z G. Classification and morphological observation on haemocytes in mud crab *Scylla serrata* by light and electronic microscope. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13 (2) : 211-216.
- [11] Wang S C, Xu L. Changes of the content of total proteins and hemocyanin in hemolymph of *Eriocheir sinensis* at different salinities. *Journal of Huainan Teachers College*, 2003, 5 (3) : 24-26.
- [12] Ashida M. Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1971, 144(2) : 749-762.
- [13] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman H G. Insect immunity. purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*, 1980, 106(1) : 7-16.
- [14] Gao J G, Guo C R. *General Experimental Guidance of Biochemistry*. Beijing: Chemical Industry Press, 2009: 105-108.
- [15] Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 1991, 196: 143-151.
- [16] Xu X H, Yan B L, Zheng J S, Shao Y Z, Xu J T, Xu G C, Zhou M, Zhou L. Hemocytes and blood biochemical values of *Charybdis japonica*. *Marine Science*, 2011, 35(8) : 51-57.
- [17] Wu Z Q, Jiang L D, Li L D. Study of the digestive system and physiology of decapoda; a review. *Marine Science*, 2004, 28(3) : 50-54.
- [18] Tseng I T, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 17 (4) : 325-333.
- [19] Moullac L G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture*, 2000, 191: 121-131.
- [20] Huang H Z, Li Y, Song X H, Wang Y L, Yang C G. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ stress on immune function of *Eriocheir Sinensis*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2006, 37(3) : 198-205.
- [21] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 16: 321-334.
- [22] Lepage G, Mnuoz G, Champagne J, Roy C C. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 1991, 197(2) : 277-283.
- [23] Adachi K, Endo H, Watanabe T, Nishioka T, Hirata T. Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: enzymatic properties and immunolocalization. *Pigment Cell Research*, 2005, 18 (2) : 136-143.
- [24] Chen J C, Cheng S Y, Chen C T. Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 1994, 109: 339-347.
- [25] Yue F, Pan L Q, Xie P, Li J. Effects of ammonia exposure on prophenoloxidase system and immune parameters of swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Journal of Fishery Science of China*, 2010, 17(4) : 761-772.
- [26] Macey B M, Rathburn C K, Thibodeaux L K, Burnett L E, Burnett K G. Clearance of *Vibrio campbellii* injected into the hemolymph of *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab; the effects of prior exposure to bacteria and environmental hypoxia. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(6) : 718-730.
- [27] Zhao H X, Zhang Y Q, Huang L, Chu L N, Zhan Y. Immune system and immunological protection of shrimp. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2003, 39(1) : 41-44.
- [28] Jiang L X, Pan L Q, Xiao G Q. Effects of ammonia-N on immune parameters of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Science of China*, 2004, 11(6) : 537-541.
- [29] Halliwell B, Gutteridge J M C. *Free Radicals in Biology and*

- Medicine. 2nd ed, Oxford: Clarendon Press, 1989.
- [30] Papadimitriou E, Loumbourdis N S. Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, 69(6): 885-891.
- [31] Peters L D, Porte C, Albaigés J, Livingstone D R. 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of Sardine (*Sardina pilchardus*) from the north coast of Spain. *Marine Pollution Bulletin*, 1994, 28(5): 299-304.
- [32] Lv X Y, Li J Y, Fang Y, Guo Z L, Zhao Y L, Li K. Nitrite stress on immune-related enzymes and the ultrastructure in different tissue of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(12): 1812-1820.
- [33] Gu Z F, Wang W, Du K H, Chen Y F. Histological and ultrastructural studies on the gill in *Eriocheir sinensis*. *Journal of Lake Science*, 2000, 12(2): 182-184.
- [34] Li X. Histology and embryology of aquatic animals. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 132, 187-189.
- [35] Wang Y. Influence of two major environmental factors on the immune function of *Macrobrachium rosenbergii*. Hangzhou: Zhejiang University, 2004.
- [36] Zhai Z H, Wang X Z, Ding M X. Cell biology. Beijing: Higher Education Press, 2007: 332.
- [37] Li F H, Li S J. Studies on the hepatopancreas of the larva of *Scylla serrata*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 1998, 29(1): 29-32.
- [38] Cheng Y X, Xu Z L, Chen Y Q. Ultrastructural study of the toxic effect of different of Zn^{2+} on hepatopancreas in the larvae of Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *Zoological Research*, 2000, 21(5): 343-347.
- [39] Caceci T, Neck K F, Lewis D D H, Sis R F. Ultrastructure of the hepatopancreas of the Pacific White Shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1988, 68(2): 323-337.
- [40] Cui L B, Liu P, Ma S Y. Histochemical study on the digestive system of *Charybdis japonica* Milne-Edwards. *Yantai Teachers University Journal (Natural Science)*, 2000, 16(2): 136-139.
- [7] 张红霞, 潘鲁青, 刘静. 重金属离子对日本鳊血淋巴抗氧化酶 (SOD, CAT, GPx) 活力的影响. *中国海洋大学学报 (自然科学版)*, 2006, 36(增刊): 49-53.
- [8] 许星鸿, 阎斌伦, 徐加涛, 等. 亚硝态氮胁迫对日本鳊免疫相关指标的影响. *水产科学*, 2012, 31(7): 392-397.
- [9] 钟硕良, 陈月忠, 林克冰, 陈碧霞, 蔡清海, 陈木. 虾池底质中 NH_4^+ -N, S^{2-} 和异养细菌含量的变化及其相关性研究. *台湾海峡*, 1997, 16(4): 449-454.
- [10] 周凯, 房文红, 乔振国. 锯缘青蟹血细胞的形态及分类. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 211-216.
- [11] 王顺昌, 许立. 不同盐度下中华绒螯蟹血清总蛋白和血蓝蛋白含量的变化. *淮南师范学院学报*, 2003, 5(3): 24-26.
- [14] 高继国, 郭春绒. 普通生物化学教程实验指导. 北京: 化学工业出版社, 2009: 105-108.
- [16] 许星鸿, 阎斌伦, 郑家声, 邵营泽, 徐加涛, 徐国成, 周盟, 周黎. 日本鳊血细胞及血液生化指标的研究. *海洋科学*, 2011, 35(8): 51-57.
- [17] 吴志强, 姜国良, 李立德. 十足目动物消化系统及消化生理研究概况. *海洋科学*, 2004, 28(3): 50-54.
- [20] 黄鹤忠, 李义, 宋学宏, 王永玲, 杨彩根. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 免疫功能的影响. *海洋与湖沼*, 2006, 37(3): 198-205.
- [25] 岳峰, 潘鲁青, 谢鹏, 李健. 氨氮胁迫对三疣梭子蟹酚氧化酶原系统和免疫指标的影响. *中国水产科学*, 2010, 17(4): 761-772.
- [27] 赵红霞, 张艳秋, 黄磊, 褚玲娜, 詹勇. 虾类的免疫系统与免疫防治. *中国兽医杂志*, 2003, 39(1): 41-44.
- [28] 姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳对虾免疫指标的影响. *中国水产科学*, 2004, 11(6): 537-541.
- [32] 吕晓燕, 李嘉尧, 方燕, 郭占林, 赵云龙, 李恺. 亚硝酸盐对红螯光壳蟹不同组织免疫相关酶活性及超微结构的影响. *水产学报*, 2010, 34(12): 1812-1820.
- [33] 顾志峰, 王文, 杜开和, 陈亚芬. 中华绒螯蟹鳃的组织及超微结构. *湖泊科学*, 2000, 12(2): 182-184.
- [34] 李霞. 水产动物组织胚胎学. 北京: 中国农业出版社, 2006: 132, 187-189.
- [35] 王玥. 两种主要环境因子对罗氏沼虾免疫功能的影响. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [36] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 2007: 332.
- [37] 李富花, 李少菁. 锯缘青蟹幼体肝胰腺的观察研究. *海洋与湖沼*, 1998, 29(1): 29-34.
- [38] 成永旭, 徐兆礼, 陈亚瞿. Zn^{2+} 对中华绒螯蟹蚤状幼体肝胰腺超微结构的影响. *动物学研究*, 2000, 21(5): 343-347.
- [40] 崔龙波, 刘萍, 马圣媛. 日本鳊消化系统的组织化学研究. *烟台师范学院学报 (自然科学版)*, 2000, 16(2): 136-139.
- 参考文献:
- [4] 洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 刘超, 龙章强, 张伟. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响. *中国水产科学*, 2007, 14(3): 412-418.
- [5] 梁象秋, 方纪祖, 杨和荃. 水生生物学. 北京: 中国农业出版社, 1996: 360.
- [6] 王春琳, 丁爱侠. 硫酸铜蓄积对日本鳊体内保护酶系统的影响. *大连水产学院学报*, 2005, 20(4): 278-282.