

文章编号: 1674 - 5566(2011)01 - 0089 - 07

感染鳃弧菌对花鲈非特异性免疫功能的影响

郭伟荣, 刘利平, 张宗锋, 林 升

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘 要: 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是海水鱼常见的一种细菌性病。以A组: 1×10^6 cfu/mL、B组: 1×10^7 cfu/mL、C组: 1×10^8 cfu/mL 3组不同浓度的鳃弧菌菌液通过腹腔注射感染花鲈(*Lateolabrax japonicus*),在其感染后不同时间取血,通过测定呼吸爆发、碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)、酚氧化酶(PO)以及超氧化物歧化酶(SOD)活力的变化趋势来研究感染鳃弧菌对花鲈的非特异性免疫功能的影响。结果表明:呼吸爆发在鳃弧菌感染12 h、36 h时,B组和C组与对照组比较极显著下降($P < 0.01$);PO活性,在鳃弧菌感染12 h、36 h、60 h、84 h、108 h时,A组、B组、C组与对照组比较差异极显著下降($P < 0.01$);ALP活性,在鳃弧菌感染60 h时,A组、B组、C组与对照组比较差异极显著下降($P < 0.01$);ACP活性,在60 h、84 h、108 h时,A组、B组、C组与对照组比较差异显著升高($P < 0.05$);SOD活性,在鳃弧菌感染12 h、36 h、60 h、84 h、108 h时,无显著性差异($P > 0.05$)。此外,在半致死的实验中,鳃弧菌浓度为 1×10^6 cfu/mL、 1×10^7 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL 的实验组的50%的致死时间分别为12 d、11 d、8 d,对照组则无死亡。结果表明:在感染期间,实验组鱼表现出特定的症状,如尾鳍溃烂、鳃丝发白、内部有黄色粘稠腹水等;鳃弧菌浓度越高,达到50%的致死时间越早,花鲈的死亡率和鳃弧菌的浓度成正相关。

研究亮点: 选用鳃弧菌感染海水鱼,观察鳃弧菌感染海水鱼后,海水鱼的几种非特异性免疫指标的变化;把呼吸爆发、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、酚氧化酶、超氧化物歧化酶这5个非特异性免疫指标综合在一起评价海水鱼的免疫力。

关键词: 花鲈; 鳃弧菌; 非特异性免疫; 半致死时间

中图分类号: S 943

文献标识码: A

花鲈(*Lateolabrax japonicus*)是我国主要的海水鱼养殖品种,因其生长快、适应性强、营养丰富,是我国主要的名优水产品之一。近年来,病害对花鲈养殖业的影响越来越严重,弧菌病危害尤为明显^[1]。弧菌病的症状随弧菌及鱼的种类不同而有差别,其中鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是主要病原之一^[2-3]。

鳃弧菌广泛存在于沿海水、沉积物和海洋动物体中,是海水鱼、虾、贝类的一种常见的细菌性病原。肖慧等从发生烂鳃、烂尾病的鲈鱼体内分离到鳃弧菌,人工感染表明有较强的致病性^[4],感染鳃弧菌后的鱼虾会表现出病情逐步加

深的症状。据研究报道,部分感染鳃弧菌的鱼体表最初出现局部褪色,鳍条、鳍基部及腮骨下部充血发红,肛门红肿,继而肌肉组织有弥散性或点状出血,体表发黑,鳍部出现溃烂;解剖时有明显的黄色粘稠腹水,肠粘膜组织腐烂脱落,部分鱼肝脏坏死^[5-6]。

鱼类的免疫体系包括特异性免疫和非特异性免疫,在感染各种病原体初期,抗体尚未形成,主要靠非特异性免疫发挥作用^[7]。本文以不同浓度的鳃弧菌通过腹腔注射感染海水鲈鱼,在其感染后不同时间取血,通过测定呼吸爆发、碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)、酚氧化酶

收稿日期: 2009-11-20

修回日期: 2010-08-22

基金项目: 上海市教育委员会科研(创新)项目(09YZ277);上海市青年科技启明星项目(08QA1405900);上海市重点学科建设项目(Y1101);美国国际发展署(USAID);AquaFish CRSP项目(3001325371)

作者简介: 郭伟荣(1984-),女,硕士研究生,专业方向为水产动物细胞免疫与繁殖生物学。E-mail: guangrongmao@163.com

通讯作者: 刘利平, E-mail: lp-liu@shou.edu.cn

(PO)、超氧化物歧化酶(SOD)活力变化趋势来研究感染病原菌对海水鱼非特异性免疫功能的影响。以期为鱼类在感染病原微生物后的非特异性免疫响应研究提供可借鉴的手段,在鱼类的抗病分析、疾病预报等方面提供应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲈鱼购自浙江省宁波象山港养殖个体户,平均体长为 22 ± 2.56 cm,平均体重为 100 ± 8.69 g,随机分为4组,每组3个平行,每组18尾,其中一组为对照组,养于室外水泥池中,水体体积为 $100 \text{ cm} \times 100 \text{ cm} \times 150 \text{ cm}$ 。每隔24 h换水一次,及时吸出粪便保持水质清洁。

鳗弧菌购自上海海洋大学病原库菌种保藏中心,菌株号:BYK.000400。

普通营养琼脂38 g,加蒸馏水1 000 mL,加热溶解后分装在三角烧瓶中,经 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌20 min 备用。氯化硝基四氮唑兰(NBT):无菌蒸馏水配制成0.2%的溶液。CM缓冲溶液:0.35 mol/L NaCl,5.5 mol/L KCl,13 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,15 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$,0.4 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,1 mmol/L L-谷氨酰胺,pH 7.6。基质液:2.0 mmol/L 次黄嘌呤(Sigma),溶于pH为8.2的 KH_2PO_4 (48 mmol/L)-硼砂(36 mmol/L)缓冲溶液中。酶溶液:0.006 U/mL 黄嘌呤氧化酶(Sigma),溶于pH 8.2的 KH_2PO_4 (80 mmol/L)-硼砂(60 mmol/L)-EDTA(0.1 mmol/L)溶液中。亚硝基发生剂:10 mmol/L 羟胺(AR,上海),0.65 mmol/L 羟胺-O-磺酸(Sigma),溶于 dH_2O 中。显色剂:2.5 mmol/L 对氨基苯磺酸(AR,上海),0.05 mmol/L a-萘胺(AR,上海),溶于0.3 mol/L的HCl中。抗凝剂的配制(pH 7.0):柠檬酸27 mmol/L,NaCl 336 mmol/L,Glucose 115 mmol/L,EDTA- Na_2 9 mmol/L。

1.2 方法

1.2.1 鳗弧菌悬液的制备

将鳗弧菌接种至无菌斜面培养基上, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养24 h,用0.75%的无菌生理盐水从营养琼脂斜面上洗下菌落,取100 μL 菌悬液,用细胞计数板计数,梯度稀释法得到 1×10^6 cfu/mL、 1×10^7 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL 3个浓度梯度的菌悬液。

1.2.2 注射感染

以腹腔注射的方式使鲈鱼感染鳗弧菌。对照组每尾注射1 mL 无菌生理盐水,实验组A、B和C分别注射 1×10^6 cfu/mL、 1×10^7 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL 3个浓度的菌悬液1 mL。分别在12 h、36 h、60 h、84 h、108 h后取血进行各项酶活指标的检测。

1.2.3 全血和血清的收集

采血样前,先将花鲈置于100 mg/L的MS-222中麻醉,用1 mL注射器(先加入0.2 mL的抗凝剂)尾椎静脉采血,混匀,其中0.8 mL直接加入1.5 mL离心管中3 000 r/min离心,收集血清,用于ALP、ACP、PO、SOD酶活检测;0.2 mL加入另一离心管中,用于呼吸爆发的检测。

1.2.4 呼吸爆发的测定

在呼吸爆发期间由噬菌细胞产生的氧化基产物通过氯化硝基四氮唑兰(NBT; Sigma)分析测定^[8]。血液和0.2% NBT按1:1比例混合,在室温下温育30 min,然后取出50 μL 装在1.5 mL的离心管中,加1 mL的二甲基甲酰胺(Sigma)以2 000 r/min离心5 min,取其漂浮物,在540 nm的光波下测出漂浮物的光密度,用二甲基甲酰胺作为对照组。

1.2.5 碱性磷酸酶活性测定

试验混合物为0.1 mL碳酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L,pH 9.5);0.1 mL 0.1 mol/L MgCl_2 ;取0.1 mL血清,0.1 mL新鲜的已准备好的0.1 mol/L对硝基苯磷酸二钠(P-NPP)作为酶作用底物,反应混合物在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中温育15 min,加入0.1 mol/L NaOH 停止反应,在410 nm波长下读其光密度。ALP的活性以每升血清在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 时每分钟释放的对硝基酚表达^[9]。

1.2.6 酸性磷酸酶活性测定

试验混合物为0.1 mL醋酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L,pH 5.0);0.1 mL 0.1 mol/L MgCl_2 ;0.1 mL血清,0.1 mL新鲜的已准备好的0.1 mol/L对硝基苯磷酸二钠(P-NPP)作为酶作用底物,反应混合物在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中温育15 min,加入0.1 mol/L NaOH 停止反应,在410 nm波长下读其光密度。ACP的活性以每升血清在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 时每分钟释放的对硝基酚表达^[10]。

1.2.7 酚氧化酶OD值的测定

取50 μL 血清,250 μL 0.01 mol/L 3,4-二羟

基苯丙氨酸(L-DOPA, sigma)和 150 μL CM 混合液,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时温育 30 min,于 490 nm 波长下,每隔 2 min 读取光密度数值。OD₄₉₀ 对反应时间作图,以实验条件下每分钟 OD₄₉₀ 增加 0.001 为一个活性单位^[11]。

1.2.8 超氧化物歧化酶活性测定

依次加入待测血清(用 dH₂O 稀释 50 倍)0.5 mL, dH₂O 0.1 mL, 基质液 0.1 mL, 亚硝基发生剂 0.1 mL, 酶溶液 0.2 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保存 30 min; 然后加入显色剂 2 mL, 室温放置 10 min, 于 550 nm 波长处测定其吸光度; 对照管用 0.5 mL dH₂O 代替血清样品^[12]。

1.3 统计分析

采用 Excel 软件和 SPSS 16.0 进行数据整理和统计分析,对花鲈的 5 个酶活指标进行单因素方差分析和多重比较,以及累积死亡率的统计。

2 结果

2.1 鳎弧菌感染后花鲈达到半致死的时间

花鲈腹腔注射鳎弧菌后,鳎弧菌浓度为 1×10^8 cfu/mL 的实验组鱼中,开始出现反应症状,有的鱼体表面出现溃烂症状,在 50 h 后,鳎弧菌浓度为 1×10^8 cfu/mL 的实验组鱼开始死亡(图 1),并在 8 d 达到一半死亡,鳎弧菌浓度为 1×10^7 cfu/mL 的实验组鱼在 11 d 达到一半死亡,鳎弧菌浓度为 1×10^6 cfu/mL 的实验组鱼在 12 d 达到一半死亡,对照组则无死亡。死亡率随时间变化呈递增趋势,鳎弧菌浓度越高,达到 50% 的致死时间越早。说明随着注射时间的增加,鳎弧菌的浓度和花鲈死亡率成正相关。

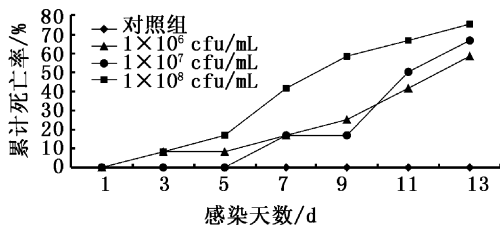


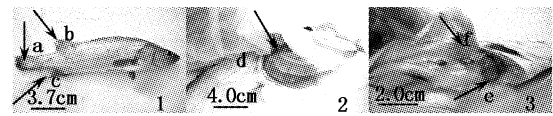
图 1 感染鳎弧菌后花鲈的累积死亡率和时间关系图

Fig. 1 The correlation of time and cumulative mortality of *Lateolabrax japonicus* exposed to different concentration of *Vibrio anguillarum*

2.2 鳎弧菌感染后花鲈的病症

感染鳎弧菌后,花鲈主要症状为尾鳍、背鳍、

臀鳍部分溃烂、鳃丝发白、解剖后观察内有黄色粘稠的液体。结果表明鳎弧菌的致病能力很强,对鱼的不同部分都有不同程度的致病作用。在 24 h 时,可观察到鳎弧菌浓度为 1×10^8 cfu/mL 的部分花鲈的尾鳍、背鳍、臀鳍出现溃烂(图版-1),鳃丝发白糜烂(图版-2),在 60 h 时,解剖检验,发现有明显的黄色粘稠腹水,部分鱼肝脏暗淡,发白(图版-3)。在 84 h 解剖时,发现有明显的黄色粘稠腹水,部分鱼肝脏暗淡,发白。在 48 h 时,鳎弧菌浓度为 1×10^6 cfu/mL 的部分花鲈的尾鳍、背鳍、臀鳍出现溃烂,在 96 h 解剖时,发现有明显的黄色粘稠腹水,部分鱼肝脏暗淡,发白。



图版 鳎弧菌感染后花鲈病症

Plate Symptoms of sea perch *Lateolabrax japonicus* after *Vibrio anguillarum* challenging

a. 尾鳍溃烂; b. 背鳍溃烂; c. 臀鳍溃烂; d. 鳃丝发白糜烂; e. 肝脏暗淡,发白; f. 胆汁外渗。

2.3 非特异性免疫反应的检测

2.3.1 呼吸爆发的测定

注射鳎弧菌 12 h、36 h、60 h、84 h、108 h 后,呼吸爆发氧自由产物 NBT 活性总体变化趋势先升高后下降(图 2)。在感染鳎弧菌 12 h、36 h 后,对照组和鳎弧菌浓度为 1×10^7 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL 的实验组比较,呼吸爆发活性极显著下降($P < 0.01$);鳎弧菌感染 36 h、60 h、84 h 内,鳎弧菌浓度为 1×10^7 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL 的实验组和鳎弧菌浓度为 1×10^6 cfu/mL 的实验组之间比较差异显著下降($P < 0.05$)。总体上花鲈感染鳎弧菌呼吸爆发氧自由产物 NBT 活性具有明显的时间效应和剂量效应。

2.3.2 碱性磷酸酶活性的测定

注射鳎弧菌 12 h、36 h、60 h、84 h、108 h,ALP 的活性随时间的变化出现先下降后升高再下降的趋势(图 3)。在鳎弧菌感染 60 h,鳎弧菌浓度为 1×10^6 cfu/mL、 1×10^7 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL 的实验组和对照组比较,ALP 活性极显著下降($P < 0.01$)。

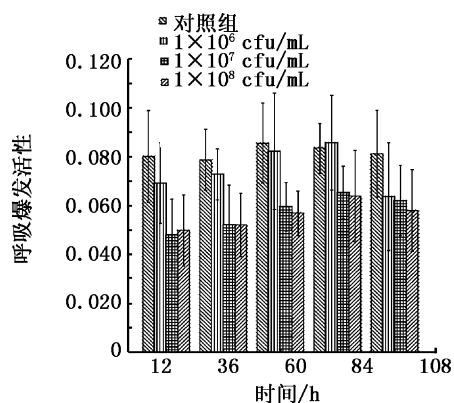


图2 感染鳃弧菌后不同时间花鲈血液呼吸爆发活性变化趋势

Fig. 2 The variation of respiratory burst of blood serum of sea perch *Lateolabrax japonicus* after *Vibrio anguillarum* challenging

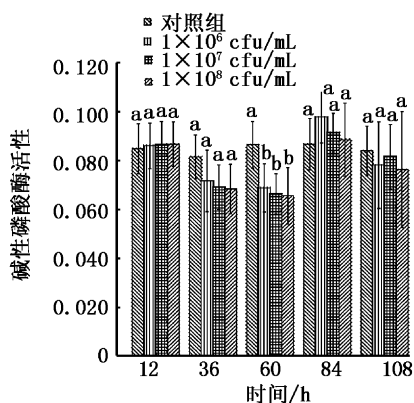


图3 感染鳃弧菌后不同时间花鲈血清 ALP 活性变化趋势

Fig. 3 The variation of ALP activity of blood serum of sea perch *Lateolabrax japonicus* after *Vibrio anguillarum* challenging

2.3.3 酸性磷酸酶活性的测定

注射鳃弧菌 12 h、36 h、60 h、84 h、108 h, ACP 的活性随时间的变化大体上出现先下降后升高再下降的趋势(图4)。在 60 h、84 h、108 h, 鳃弧菌浓度为 1×10^6 cfu/mL、 1×10^7 cfu/mL 的实验组和对照组比较, ACP 活性极显著升高 ($P < 0.01$), 而 1×10^8 cfu/mL 的实验组和对照组比较, ACP 活性显著升高 ($P < 0.05$)。

2.3.4 酚氧化酶活性的测定

注射鳃弧菌 12 h、36 h、60 h、84 h、108 h, PO 活性总体随时间的变化呈先下降后升高的趋势

(图5)。在感染 12 h、36 h、60 h、84 h、108 h, 在鳃弧菌浓度为 1×10^6 cfu/mL、 1×10^7 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL 的实验组和对照组比较差异极显著下降 ($P < 0.01$)。

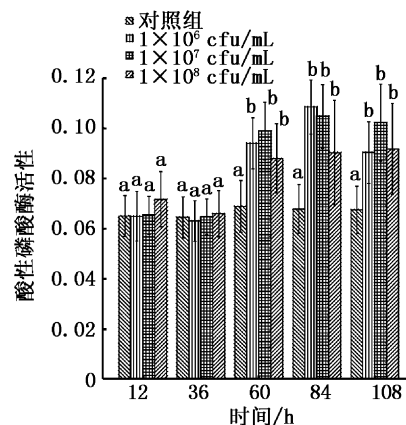


图4 感染鳃弧菌后不同时间花鲈血清 ACP 活性变化趋势

Fig. 4 The variation of ACP activity of blood serum of sea perch *Lateolabrax japonicus* after *Vibrio anguillarum* challenging

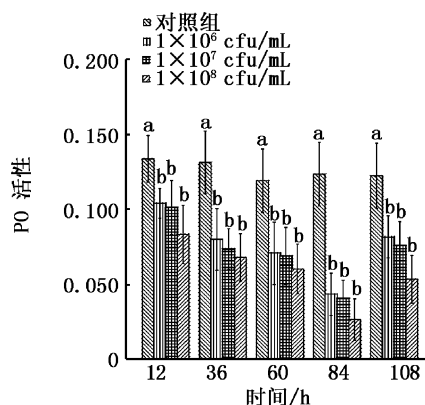


图5 感染鳃弧菌后不同时间花鲈血清 PO 活性变化趋势

Fig. 5 The variation of PO activity of blood serum of sea perch *Lateolabrax japonicus* after *Vibrio anguillarum* challenging

2.3.5 超氧化物歧化酶活性的测定

注射鳃弧菌 12 h、36 h、60 h、84 h、108 h, SOD 的活性随时间的总体变化先升高后下降的趋势(图6)。在感染 12 h、36 h、60 h、84 h、108 h, 鳃弧菌浓度为 1×10^6 cfu/mL、 1×10^7 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL 的实验组和对照组比较都无显著性差异 ($P > 0.05$)。

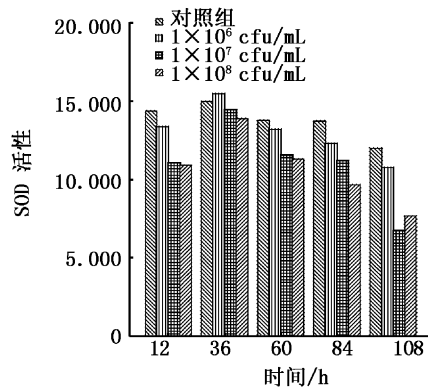


图 6 感染鳃弧菌后不同时间 SOD 活性变化趋势

Fig. 6 The variation of SOD activity of blood serum of sea perch *Lateolabrax japonicus* after *Vibrio anguillarum* challenging

3 讨论

鱼类的免疫系统包括非特异性免疫和特异性免疫,非特异性免疫可以在微生物入侵时立即发生作用,有效地清除、降解病原微生物和其他有害物质^[7,13]。

鱼类具有吞噬功能的血细胞包括嗜中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞^[14],能参与炎症反应,吞噬和杀死微生物,以及参与抗体的表达^[15],在先天性免疫反应中起重要的作用。许多作者证明了用不同的病原菌感染之后,呼吸爆发活性增加。然而,LEIRO 等^[16-17]和 VILLAMIL 等^[18]报道在一些感染的大菱鲆中,呼吸爆发受到抑制。KARAGOUNI 等^[19]在粘孢子虫感染幼体和成体金头鲷一文中,呼吸爆发下降,出现抑制免疫反应的状态。本实验中,不同浓度的鳃弧菌感染花鲈后,其呼吸爆发的活性与对照组比较显著下降,呼吸爆发受到抑制,结果与 LEIRO, VILLAMIL 和 KARAGOUNI 等人一致。

ALP 参与动物机体内的免疫预防,主要机制是催化有机磷酸酯水解,打开磷酸酯释放磷酸离子,可以通过改变细菌表面的结构增强其异己性,从而被动物体内的吞噬细胞吞噬和降解。ALP 主要分布于机体的肝脏,在正常情况下这些血清酶活性低且相对稳定,但当肝脏发生损伤时,陈寅儿等^[20]证明患病后鲈鱼血清中 ALP 的含量上升。在本实验中注射鳃弧菌 12-36 h 内,ALP 和对照组比较无显著差异。但在 60 h 时,

ALP 的实验组和对照组之间比较显著升高,可能是花鲈的肝脏受损,进一步解剖发现,鱼体内的肝脏发黑。结果与陈寅儿等人相同。

ACP 的活性程度可以判定巨噬细胞激活程度,同时反映机体的免疫机能状况。酸性磷酸酶作为溶酶体酶的重要组成部分,在鱼类等低等脊椎动物及软体动物中,保证了溶酶体有效完成防御和消化的双重功能。张梁等^[21]证明无论是草鱼的肝脏还是血清中的 ACP 活性增加,均提示草鱼的巨噬细胞被激活,标志草鱼的抗应激水平得以提升。本实验中,在 60-108 h 内,鳃弧菌感染的实验组,ACP 活性显著升高,由于花鲈的巨噬细胞被激活,使花鲈血清中 ACP 的活性升高,抗应激水平提升,增强了花鲈对病原微生物的抵御能力。

PO 在分子氧存在下,酚类物质可被酚氧化酶氧化成醌,醌类可抑制微生物的感染。金头鲷感染寄生虫后,血清中的 PO 活性增加,但随着时间的延长,PO 活性下降^[22]。本实验中,鳃弧菌感染花鲈后,PO 的活性显著低于对照组。本实验结果与 CUESTA 等^[22]的实验结果不一致,可能是由于鱼类在寄生虫感染和细菌感染后免疫应激机理存在差异所致。

SOD 能专一地清除体内有害的自由基,以解除自由基氧化体内的某些组分而造成的机体损害。在本实验中,鳃弧菌感染花鲈后,实验组 SOD 活性与对照组比较无显著差异。关于水产动物组织中 SOD 酶活性受有关物质影响的实验,所得结论不一致^[23-26]。本实验结果与张梁等^[21]、柯浩等^[23]、艾春香等^[25]研究结果一致,表明花鲈对鳃弧菌的体内吞噬作用抑制和消除了自由基的形成,使 SOD 的活性变化不明显,可以保持细胞免受损害,从而维护细胞的正常结构和功能。

本文着重从非特异性免疫的角度讨论了花鲈感染鳃弧菌后,鱼类非特异性免疫体系对病原菌入侵的反应,其结果可以为深入研究鱼类和病原菌的相互作用进一步提供科学依据。

感谢上海海洋大学陈再忠、陈桃英老师和浙江大学蔡立胜老师提供实验便利,感谢浙江省宁波市象山育苗场全体职工和浙江省宁波市李惠利医院史新建医生的帮助。

参考文献:

- [1] 张新中, 张世秀, 李海平, 等. 海水养殖动物致病性(Patogenicity)鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)的研究综述[J]. 现代渔业信息, 2007, 22(1):16-19.
- [2] 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定[J]. 微生物学报, 2002, 42(3):263-269.
- [3] 李清禄, 陈强. 海水网箱养殖大黄鱼细菌性病原鉴定与感染治疗研究[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(5):489-493.
- [4] 肖慧, 李军, 徐怀恕, 等. 鲈鱼苗烂腮、烂尾病病原的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(1):87-93.
- [5] 张晓华. 中国对虾育苗池水中哈维氏弧菌的检测[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(1):70-73.
- [6] SORENSEN U B, LARSEN J L. Serotyping of *Vibrio anguillarum* [J]. Appl Environ Microbiology, 1986, 51(3):593-597.
- [7] 聂品. 鱼类非特异性免疫研究的新进展[J]. 水产学报, 1997, 21(1):69-74.
- [8] JINEE E, KYEONG-JUN L. Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2008, 25(5):611-616.
- [9] DEBNATH D, PAL A K, SAHU N P, et al. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2007, 146(1B):107-114.
- [10] PAN Z C, HE J G, WEN S P, et al. Changes in mortality and immunological variables of *Litopenaeus vannamei* parents and their filial families infected with white spot syndrome under different experimental conditions [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2008, 25(5):459-471.
- [11] CHANG C F, SU M S, CHEN H Y, et al. Dietary b-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2008, 39(14):1574-1578.
- [12] 王珉, 李洪, 朱红枫. 改良的黄嘌呤氧化酶-羟胺法检测血清 SOD 活性 [J]. 川北医学院学报, 2003, 18(2):91-93.
- [13] 孙峰, 张煜, 李立德, 等. 感染嗜水气单胞菌对鲫鱼非特异性免疫功能的影响 [J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(5):815-818.
- [14] NEUMANN N F, STAFFORD J L, BARREDA D, et al. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2001, 25(8-9):807-825.
- [15] SECOMBES C J. The nonspecific immune system: cellular defenses [M]//IWAMA G, NAKANISHI T. The fish immune system. San biego, CA, USA: Academic Press, 1996:63-101.
- [16] LEIRO J, ARRANZ J A, IGLESIAS R, et al. Effects of the histi-ophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* on turbot (*Scophthalmus maximus* L) phagocyte responses [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2004, 17(1):27-39.
- [17] LEIRO J, IGLESIAS R, PARAMA A, et al. Effect of *Tetramicra brevifilum* (Microspora) infection on respiratory-burst responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L) phagocytes [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2001, 11(7):639-652.
- [18] VILLAMIL L, FIGUERAS A, ARANGUREN R, et al. Non-specific immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L), experimentally infected with a pathogenic *Vibrio Pelagius* [J]. Fish Dis, 2003, 26(6):321-329.
- [19] KARAGOUNI E, ATHANASSOPOULOU F, TSAGOZIS P, et al. The impact of a successful anti-myxosporean treatment on the phagocyte functions of juvenile and adult *Sparus aurata* [J]. Immunopathol Pharmacol, 2005, 18(1):121-132.
- [20] 陈寅儿, 金珊, 王国良. 鲈鱼溶藻弧菌病的血液生理生化指标研究 [J]. 台湾海峡, 2005, 24(1):105-107.
- [21] 张梁, 沈建忠, 敖茂权, 等. 蛭弧菌对草鱼免疫相关酶活性的影响 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(2):296-299.
- [22] CUESTA A, ESTEBAN M A, MESEGUER J. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost MHC class II alpha suggests a role for acidophilic granulocytes and antigen-presenting cells [J]. Molecular Immunology, 2006, 43(8):1275-1285.
- [23] 柯浩, 王江勇, 彭绪运, 等. 复方中草药对杂色鲍幼鲍血淋巴中几种酶活力的影响 [J]. 海洋水产研究, 2004, 25(5):74-79.
- [24] 周进, 宋晓玲, 黄健, 等. 3 α 肽聚糖对牙鲆不同组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(4):296-301.
- [25] 艾春香, 陈立侨, 高露姣, 等. Vc 对河蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响 [J]. 台湾海峡, 2002, 21(4):431-438.
- [26] 李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 等. 维生素 C 对胡子鲶血清免疫相关酶活性的影响 [J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(4):301-305.

The impact of *Vibrio anguillarum* challenging on non-specific immune responses of sea perch *Lateolabrax japonicus*

GUO Wei-rong, LIU Li-ping, ZHANG Zong-feng, LIN Sheng

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Vibrio anguillarum* is a common form of bacterial pathogens for marine fish. In this paper, sea perch (*Lateolabrax japonicus*) was challenged with an intraperitoneal injection at different concentrations of *V. anguillarum*: namely treatments A: 1×10^6 pfu/mL, B: 1×10^7 pfu/mL, C: 1×10^8 pfu/mL and the innate immunity indicators were investigated. Blood samples were taken at different time, and the effects of challenging of *V. anguillarum* on the immunity responses were studied by measuring the respiratory burst, alkaline phosphatase (ALP), acid phosphatase (ACP), phenoloxidase (PO) and superoxide dismutase (SOD) activities. The results showed that: 1) Compared with the control group, the respiratory burst activity of treatment B and C decreased significantly ($P < 0.01$) at 12h and 36h of injection. 2) Compared with the control group, the PO activity of treatment A, B and C at 12 h, 36 h, 60 h, 84 h and 108 h after injection decreased significantly ($P < 0.01$). 3) There was no significant difference between treatments and control groups for ALP activity except for at 60 h. 4) Compared with the control group, the ACP activity of treatment A, B and C at 60 h, 84 h and 108 h after injection increased significantly ($P < 0.05$). 5) There was no significant difference between treatments and control groups for SOD activity at 12 h, 36 h, 60 h, 84 h and 108 h ($P > 0.05$). Moreover, in the semi-lethal experiment, *V. anguillarum* at the concentration of 1×10^6 pfu/mL, 1×10^7 pfu/mL and 1×10^8 pfu/mL 50% of death in experimental group occurred on 12 d, 11 d and 8d respectively, while no death for control group. During infection, experimental group has different symptoms: caudal fin ulceration, gill pale, whitish cornea, the mouth's ulceration, the inside has yellow viscous ascites. The higher the concentration infection with *V. anguillarum*, the earlier was for 50% of the death. These results indicated that *V. anguillarum* concentration and the mortality rate are positively correlated.

Key words: *Lateolabrax japonicus*; *Vibrio anguillarum*; innate immunity; semilethal time