

文章编号: 1674-5566(2014)03-0423-06

黄芪多糖对克氏原螯虾抗白斑综合征病毒(WSSV)感染的效果研究

洪徐鹏^{1,2}, 陆宏达^{1,3}, 张庆华^{1,2}, 夏思瑶¹, 唐嘉荃⁴, 丁正峰⁵, 薛 晖⁵,
唐建清⁵

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源挖掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 4. 扬州大学 兽医学院, 江苏 扬州 225009; 5. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017)

摘要: 研究了基础饲料中添加不同浓度的黄芪多糖 (astragalus polysaccharides, APS) 对克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 抗白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 的效果。用添加 0%、0.2%、0.4%、0.8% 黄芪多糖的基础饲料作为药饵, 投喂 20 d 后, 对各组经 PCR 检测 WSSV 呈阴性的健康克氏原螯虾进行 WSSV 病毒悬液腹节背部注射攻毒试验, 当添加 0% 黄芪多糖的阳性对照组中死亡率达到 100% 时, 添加 0.2%、0.4%、0.8% 黄芪多糖实验组的死亡率分别为 (86.67 ± 13.33)%、(91.11 ± 7.70)%、(73.33 ± 17.64)%。为了评价黄芪多糖对克氏原螯虾各器官组织的影响, 对其鳃、肝胰腺、心肌组织进行病理组织切片观察, 结果发现: 添加 0% 黄芪多糖的阳性对照组中克氏原螯虾的鳃、肝胰腺、心肌组织出现细胞排列无序、细胞破裂、核仁皱缩等明显的病理变化; 而添加 0.8% 黄芪多糖的实验组中克氏原螯虾的鳃、肝胰腺组织未见明显病变, 心肌组织核仁出现一定程度的皱缩, 但细胞尚未破裂。研究表明: 与阳性对照组相比, 添加 0.8% 的黄芪多糖可提高 26.67% 的存活率, 对克氏原螯虾抗 WSSV 感染有很好的提高效果, 可望在生产中收到良好的经济效益。

研究亮点: 由白斑综合征病毒 (WSSV) 引起的白斑病是近十多年来对对虾养殖危害最大的病毒性疾病, 本文通过在饲料中添加不同浓度的黄芪多糖, 通过感染实验和组织病理检测等方法研究了黄芪多糖对克氏原螯虾抗 WSSV 的效果, 对探索由 WSSV 感染引起的白斑病的防控具有良好指导意义。

关键词: 黄芪多糖; 白斑综合征病毒; 克氏原螯虾; 病理组织切片

中图分类号: S 945

文献标志码: A

黄芪多糖 (astragalus polysaccharides, APS) 是一种从中草药黄芪中提取的免疫多糖, 具有抗病毒、抗疲劳等功能^[1], 有研究报道黄芪多糖可以提高刺参的非特异性免疫力和抗病力^[2]。克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 俗称小龙虾, 属节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda), 是目前我国养殖最广的淡水螯虾品种^[3], 在我国长江中下游地区广泛养殖, 其肉质鲜美, 营养丰富, 深受消费者的青睐。

白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus,

WSSV) 是一种具有囊膜的杆状病毒^[4], 地理分布广、流行范围大、传染性强、发病时间短, 目前尚无有效的药物能够控制疫情, 是中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 养殖中的主要病原^[5-6]。研究表明 WSSV 具有广泛的宿主, 可以感染甲壳纲十足目的大部分动物^[7]。近年来发现在克氏原螯虾养殖中也广泛流行, 给克氏原螯虾养殖业带来巨大的经济损失^[8]。自然条件下, 经口摄食是

收稿日期: 2013-12-07 修回日期: 2014-03-12

基金项目: 国家级大学生创新训练计划项目 (B-5106-12-0002); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201003070); 上海高校知识服务平台 (ZF1206)

作者简介: 洪徐鹏 (1993—), 男, 研究方向为水产动物病害。E-mail: xphong1017@163.com

通信作者: 张庆华, E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

WSSV 感染宿主的主要途径,即健康对虾摄食携带病毒的饵料生物均能感染上该病毒^[9];在试验条件下,WSSV 也可通过浸泡或共居方式传播,只是感染的病毒量很少,不足以使对虾发病,而以潜伏感染的方式存在于对虾体内。

目前已有实验证明 WSSV 灭活制剂和壳聚糖、葡聚糖及甲壳素对克氏原螯虾抗白斑综合征病毒有作用^[10],且有报道称榴莲多糖可提高斑节对虾的抗病力^[11]。我们前期研究发现,0.4% ~ 0.8% 的黄芪多糖可以提高克氏原螯虾的超氧化歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)、溶菌酶(LSZ)等非特异性免疫力^[12],但黄芪多糖对抵抗白斑综合征病毒感染的效果如何?目前尚未见相关的报道。本实验旨在研究黄芪多糖对克氏原螯虾抗 WSSV 感染的效果,为克氏原螯虾中普遍流行的 WSSV 病毒病的防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 黄芪多糖药饵的制备

实验用黄芪多糖(批号:20120701,购自大连容海生物科技有限公司),含 70% 的有效成份。以江苏省淡水水产研究所提供的不含免疫多糖的河蟹用饲料为基础饲料,在每 100 g 基础饲料中分别添加 0 g、0.2 g、0.4 g、0.8 g 的黄芪多糖,配制成 0%、0.2%、0.4%、0.8% 的实验饲料,自然风干。在干燥条件下密封保存备用。

1.2 克氏原螯虾的养殖

克氏原螯虾取自江苏省淡水水产研究所泗洪基地,平均体重(10.27 ± 1.6)g,平均头胸甲长(22.7 ± 3.4)mm。用上游引物:5' - TCACAGG CGTATTGTCTCTCCT - 3' 及下游引物:5' - CACGAGTCTACCGTCACAACATC - 3' 进行 WSSV 的 PCR 检测,扩增产物为 300 bp^[8]。实验用虾均经 PCR 检测呈阴性,实验在 80 cm × 58 cm × 60 cm 的聚乙烯塑料箱中进行,设置 PVC 管、石棉瓦作为掩蔽物,养殖用水为充分曝气 3 d 的自来水,每天采用便携式多参数水质分析仪(YSI-ADV6600)监测水质,pH 7.4 ~ 7.9,总硬度为 100 ~ 250 mg/L,温度为(25 ± 2)℃,溶解氧为 7.05 ~ 8.67 mg/L,在实验室内自然光照,实验室条件下驯食一周,待用。

实验分为基础饲料中添加 0% 黄芪多糖的阴性对照组(NO 组)和阳性对照组(C1 组)、添加

0.2% (C2 组)、0.4% (C3 组)和 0.8% (C4 组)黄芪多糖的实验组。每组设置 3 个平行,每组投放 20 只克氏原螯虾,总计用虾 300 只。每天定时投喂 2 次,食量为克氏原螯虾体重的 10%。次日,用虹吸管将未利用的饲料吸出。实验期间,每天更换 1/3 的养殖用水。

1.3 WSSV 病毒悬液的制备

经 WSSV 感染死亡且 PCR 检测为阳性的克氏原螯虾,去除附肢、甲壳等,加入 5 倍体积的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中,用玻璃匀浆管匀浆处理,匀浆液经 3 000 r/min 离心 20 min,上清液依次用定性滤纸和直径为 0.22 μm 的滤膜(德国 MEMBRANA 公司原产膜)过滤除菌,制备成 WSSV 病毒悬液。

1.4 人工感染实验

投喂饲料 20 d 后,各组取 15 只健康状况良好的克氏原螯虾进行实验,NO 组腹节注射 0.01 mol/L PBS,C1 组、C2 组、C3 组、C4 组腹节注射病毒悬液攻毒,每只虾接种量为 100 μL。每天统计各组死亡情况,当 C1 组死亡率达到 100% 时,计算各组累积死亡率 R_D 、存活率 R_S 并对各组虾进行 PCR 检测。

$$R_D = \sum D_t / N \quad (1)$$

$$R_S = 1 - (\sum D_t / N) \quad (2)$$

式中: D_t 表示 t 天时死亡数量; N 表示实验前各组总量。

1.5 组织病理学观察

取 NO、C1、C4 组病虾分离心脏、肝胰腺及鳃组织,经 Bouin's 液固定 24 h 后,用 75% 的乙醇浸洗,并保存备用。固定后的组织经酒精脱水,石蜡包埋,切片厚度为 5 μm,再用苏木精-伊红染色,中性树胶封片后在显微镜(Leica DMLB2 型)下观察,用数码摄像系统(Leica DC300F 型)拍照。

1.6 数据处理

实验数据以平均值 ± 标准误差表示,采用 SigmaPlot 12.0 软件对数据进行方差分析(ANOVA)与作图。

2 结果

2.1 黄芪多糖对克氏原螯虾抗 WSSV 感染的效果评价

2 d 时,C4 组死亡率与 C1 组、C2 组和 C3 差

异极显著($P < 0.01$);3 d时,C4组死亡率与其他各实验组差异极显著,而C2组、C3组死亡率与C1组差异显著($P < 0.05$);4 d时,各实验组之间差异极显著,C2组、C4组与C1组差异极显著(图1)。5 d时,当C1组累积死亡率达到100%时,N0组的累积死亡率为 $(11.11 \pm 3.85)\%$,C2组为 $(86.67 \pm 13.33)\%$,C3组为 $(91.11 \pm 7.70)\%$,C4组为 $(73.33 \pm 17.64)\%$;黄芪多糖浓度对克氏原螯虾抗WSSV感染的效果差异极显著($P < 0.01$),C2组、C4组与C1组差异极显著,C3组与C1组差异不显著($P > 0.05$)。通过数学模型得出黄芪多糖浓度(x)对累积死亡率(R_D)符合 $R_D = 1 - 1.44x + 4.72x^2 - 4.17x^3$,当累积死亡率为0时,对应的黄芪多糖浓度为1.02%。

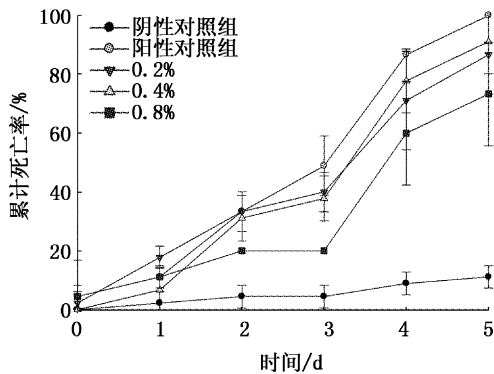


图1 注射感染WSSV后克氏原螯虾累积死亡率
Fig.1 Cumulative mortality of *Procambarus clarkii* after injection of WSSV

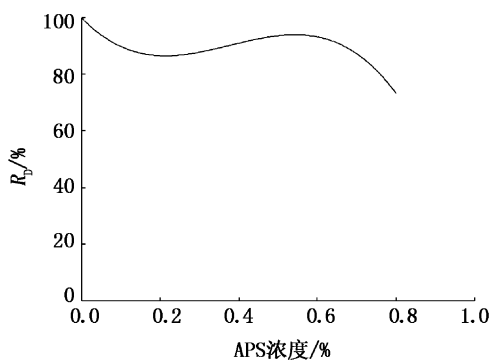


图2 黄芪多糖浓度对累积死亡率 R_D 的影响
Fig.2 The effect of APS concentration on R_D

通过PCR检测,C1组、C2组、C3组、C4组的WSSV均呈阳性,N0组WSSV呈阴性。由PCR产物的电泳条带可知:0.8%APS的添加组中病毒含

量与其他各实验组病毒含量差异显著($P < 0.05$)。本实验结果表明:饲料中添加0.8%黄芪多糖对克氏原螯虾抗WSSV感染有很好的效果。

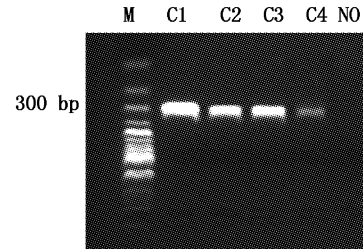


图3 注射WSSV 5 d后PCR检测各组克氏原螯虾体内的WSSV

Fig.3 PCR test for WSSV in *Procambarus Clarkii* body 5 d after injection

2.2 组织病理学观察

C4组的克氏原螯虾鳃组织未见明显病理变化(图版-1);C1组中,鳃出现严重病变,染色质碎裂、边缘化,细胞破裂、分布也不均匀(图版-2);而N0组健康的克氏原螯虾(图版-3)鳃丝排列整齐,表面光滑平整,内部上皮细胞分布均匀,结构清晰。

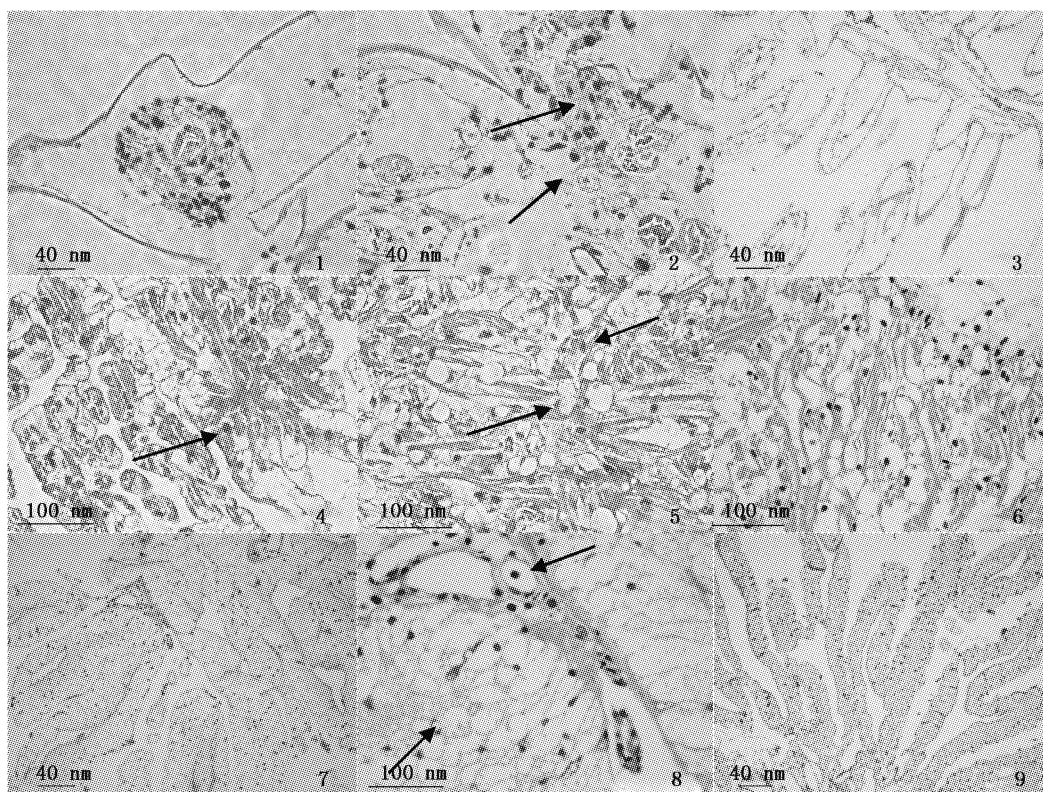
C4组的克氏原螯虾心肌组织核仁皱缩,细胞尚未破裂(图版-4);而感染WSSV后C1组的克氏原螯虾心肌细胞核肿胀,核浓染并固缩,细胞排列杂乱无章,界限消失(图版-5);N0组健康螯虾的心肌组织内细胞排列有序,细胞界限分明,细胞完整(图版-6)。

C4组的克氏原螯虾肝胰腺尚未见明显病变(图版-7)。C1组克氏原螯虾感染WSSV后细胞呈现空泡化,细胞核固缩(图版-8);N0组健康的克氏原螯虾肝胰腺细胞饱满,色泽红润(图版-9)。

3 讨论

白斑综合征病毒(WSSV)具有泛嗜性,凡纳滨对虾、中国明对虾、斑节对虾等都是WSSV的自然宿主^[5-6];拟穴青蟹也是WSSV的自然宿主,可以通过摄食携带WSSV饵料而使WSSV在体内累积和增殖^[13];朱斐等认为,克氏原螯虾是白斑综合征病毒的中间宿主^[14]。在本实验中存活的克氏原螯虾中均检测出WSSV阳性,说明克氏原螯虾也是白斑综合征病毒的宿主之一,可以引

起克氏原螯虾的大规模死亡。



图版 鳃、心肌、肝胰腺组织切片光镜观察

Plate Gills, heart, hepatopancreas sections under light microscope

1. C4 组鳃; 2. C1 组鳃, 箭头示鳃组织细胞破裂, 核固缩; 3. N0 组鳃; 4. C4 组心肌, 箭头示核仁固缩、细胞尚未破裂; 5. C1 组心肌, 箭头示核浓染并固缩, 细胞排列杂乱无章; 6. N0 组心肌; 7. C4 组肝胰腺; 8. C1 组肝胰腺, 箭头示肝胰腺细胞呈现空泡化; 9. N0 组肝胰腺。

虾蟹类的免疫系统以非特异性免疫为主, 也有报道称无脊椎动物具有获得性免疫^[15-16]。研究表明, 对克氏原螯虾注射灭活的 WSSV, 可提高克氏原螯虾对 WSSV 的抗病力^[17]; 李战军等研究表明, 中国明对虾可能存在类免疫保护作用, 对虾类抗病力与接种疫苗的活力有关^[18]; 另有研究表明, WSSV 可以在对虾体内潜伏感染, 携带少量病毒的对虾可以继续生存而不引起暴发性死亡。虽然潜伏感染看似是一种静止状态, 而当对虾受到外源性刺激引起机体免疫功能降低时, 可引发对虾体内病毒的大量扩增而发病, 从而有利于病毒的传播与扩散^[19]。因此添加 0.2%、0.4%、0.8% 黄芪多糖的实验组在 2~3 d 时死亡率减缓可能与病毒扩增但并未引起死亡以及与克氏原螯虾的自身免疫有关。当病原入侵时, 甲壳动物通过体液免疫因子等识别病原, 将信息传递到特

定的细胞内, 进一步促进免疫因子的合成, 这些免疫因子又可协助免疫细胞清除病原等异物, 进一步发挥免疫功能^[20]。黄芪多糖可以提高克氏原螯虾体内非特异性免疫相关酶的活性, 特别是超氧化物歧化酶(SOD)^[12], 从而氧化杀死体内的病原生物。阴性对照组 N0 中出现少量死亡, 与克氏原螯虾生性好斗和恃强凌弱的习性有关^[21]。本实验中 0.2%、0.4%、0.8% 黄芪多糖浓度组的相对存活率为 $13.33\% \pm 13.33\%$ 、 $8.89\% \pm 7.70\%$ 和 $26.67\% \pm 17.64\%$; 其中以 0.8% 组的免疫保护效果最好, 存活率显著高于其它组 ($P < 0.05$), 这可能与黄芪多糖对克氏原螯虾的非特异性免疫有促进作用有关^[12]。在 PCR 检测中, 由于提取组织部位、组织块质量大小相同以及体外扩增程序一致, 所呈现出的条带可反映出各组织中模板 DNA 含量的差异。因

此,0.8%黄芪多糖组的WSSV含量显著低于其他各组。而0.8%组在3d后的死亡率显著低于阳性对照组及0.2%、0.4%组,且肝胰腺、鳃组织细胞尚未见明显病变,说明0.8%的黄芪多糖可以提高克氏原螯虾对WSSV的抗病力。

本实验研究表明:0.8%黄芪多糖可以增强克氏原螯虾对WSSV抗病力,但对于攻毒的病毒悬液活力是否有影响以及具体抗病机理仍有待进一步实验证明。在20d时,C2组、C4组与C1组差异极显著,C3组与C1组差异不显著($P > 0.05$),C3组与C2组、C4组差异不显著;其具体原因仍需通过进一步浓度梯度实验研究证明。由黄芪多糖对累积死亡率函数模型分析可知,当添加1.02%的黄芪多糖时可使克氏原螯虾累积死亡率为0;至于黄芪多糖最佳添加浓度,还需通过实验证明。

黄芪多糖是中草药黄芪中提取的免疫多糖,具有绿色、健康、无残留的特点,将其作为克氏原螯虾白斑综合征的防治药物可以减少药物残留,同时具有良好的经济效益,也可运用在凡纳滨对虾的养殖中。研究表明添加0.4%~0.8%黄芪多糖对克氏原螯虾生长及非特异性免疫均有促进作用^[12]。本实验结果表明:添加0.8%黄芪多糖对克氏原螯虾抵抗WSSV的感染有明显效果,因此可以将黄芪多糖作为饲料添加剂,在获得较高收益的同时减少病害的发生。

参考文献:

- [1] 高慧,韩森,叶凤兰,等.黄芪多糖的免疫学研究进展[J].饲料研究,2007(6):35-36.
- [2] 许拉,樊英,李天保,等.黄芪多糖微胶囊制备及对刺参抗病力的影响[J].渔业科学进展,2013,34(1):172-176.
- [3] 中华人民共和国农业部渔业局.中国渔业年鉴[M].北京:中国农业出版社,2012.
- [4] ESCOBEDO B C M, ALDAY S V, WILLE M, et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus [J]. Journal of Fish Diseases, 2008, 31(1): 1-18.
- [5] 雷质文,黄健,史成银,等.白斑综合征病毒(WSSV)的宿主调查[J].海洋与湖沼,2002,33(3):250-258.
- [6] SÁNCHEZ-PAZ A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern [J]. Veterinary Research, 2010, 41: 2-26.
- [7] BALAKRISHNAN P, PRAVEEN R, SEETHAPPA A, et al. Biology, host range, pathogenesis and diagnosis of white spot syndrome virus [J]. India Journal of Virology, 2012, 23(2): 161-174.
- [8] 丁正峰,薛晖,夏爱军,等.白斑综合征病毒在养殖克氏原螯虾中感染流行研究[J].南京农业大学学报,2008,31(4):129-133.
- [9] 何建国,周化民,姚伯,等.白斑综合征杆状病毒的感染途径和宿主种类[J].中山大学学报:自然科学版,1999,38(2):65-69.
- [10] 朱斐.对虾白斑综合征病毒灭活制剂及多糖对克氏原螯虾抗WSSV作用的研究[D].杭州:浙江大学,2009.
- [11] PHOLDAENG K, PONGSAMART S. Studies on the immunomodulatory effect of polysaccharide gel extracted from *Durio zibethinus* in *Penaeus monodon* shrimp against *Vibrio harveyi* and WSSV [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28: 555-561.
- [12] 洪徐鹏,夏思瑶,唐嘉苒,等.黄芪多糖对克氏原螯虾生长和非特异性免疫指标的影响[J].上海海洋大学学报,2013,22(4):571-576.
- [13] 周俊芳,房文红,胡琳琳,等.白斑综合征病毒(WSSV)在拟穴青蟹体内增殖的研究[J].海洋渔业,2012,34(1):71-75.
- [14] 朱斐,吕梦园,许梓荣.白斑综合征病毒感染克氏原螯虾后的PCR检测及组织病理学研究[J].淡水渔业,2012,42(6):43-48.
- [15] ARALA CHAVES M, SEQUEIRA T. Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates [J]. Aquaculture, 2000, 191(1/4):247-258.
- [16] KURTZ J, FRANZ K. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity [J]. Nature, 2003, 425(6953): 37-38.
- [17] ZHU F, DU H, MIAO Z G, et al. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using inactivated WSSV [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(5): 685-690.
- [18] 李战军,孟宪红,孔杰,等.中国对虾对白斑综合征病毒的类免疫反应与验证[J].中国水产科学,2012,19(6):989-993.
- [19] 张涛,郭志勋,黄建华,等.低剂量对虾白斑综合征病毒粗提液对斑节对虾体内潜伏期病毒及血细胞的影响[J].水产学报,2012,36(10):1544-1553.
- [20] 杨玉姣,王国良,金珊,等.环境胁迫对对虾免疫系统的影响研究[J].水产科学,2006,25(12):652-655.
- [21] 谢文星,董方勇,谢山,等.克氏原螯虾的食性、繁殖和栖息习性研究[J].水利渔业,2008,28(4):63-65.

Effect of Astragalus Polysaccharide on the anti-infection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkia*

HONG Xu-peng^{1,2}, LU Hong-da^{1,3}, ZHANG Qing-hua^{1,2}, XIA Si-yao¹, TANG Jia-jin⁴, DING Zheng-feng⁵, XUE Hui⁵, TANG Jian-qing⁵

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resource, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China; 5. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, Jiangsu, China)

Abstract: We studied the effects of anti-infection of white spot syndrome virus (WSSV) by adding different concentrations of astragalus polysaccharides (APS) to the basal diet in *Procambarus clarkii*. The healthy *P. clarkii* which were negative of WSSV by PCR detection were injected intraperitoneally, with 100 μ L WSSV, and fed with 0%, 0.2%, 0.4%, 0.8% of APS bait. After feeding 20 d, the result revealed that when the positive control group mortality rate was 100 \pm 0%, the mortality of 0.2%, 0.4%, 0.8% APS addition groups were 86.67% \pm 13.33%, 91.11% \pm 7.70%, 73.33% \pm 17.64%, respectively. In order to evaluate the effect of APS on visceral organs, such as gill, hepatopancreas, and myocardial tissue in *P. clarkii*, the tissue sections were observed. The results showed that there was significant pathological change like nuclear pyknosis, cell ruptured and arranged desultorily in the group of 0% APS bait, but there were no obviously pathological changes in the gills and hepatopancreas, whereas nucleoli displayed a certain degree of shrinkage, while the cells have not yet broken in the myocardial tissue in the group of adding 0.8% APS bait. This experiment showed that the survival rate can be increased to 26.67% when adding 0.8% APS bait compared with the positive control in *P. clarkii*. The APS can significantly improve the effect of resistance of *P. clarkii* to the WSSV infection, and it can be expected to receive good economic benefits in the actual aquaculture production.

Key words: astragalus polysaccharides; white spot syndrome virus(WSSV); *Procambarus clarkii*; pathologic tissue slice