

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00402

凡纳滨对虾不同组织内 SOD、POD 酶的细胞化学定位

许燕¹ 杨洁¹ 孙静秋¹ 俞亚东¹ 叶军强²

(1. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234; 2. 上海奉贤区水产技术推广站, 上海 201400)

摘要: 运用电镜酶细胞化学技术对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)体内肝脏、肌肉、心脏、复眼和鳃等5种组织的SOD和POD酶的细胞化学定位进行了研究, 并与感染病毒的凡纳滨对虾体内5种组织中SOD和POD的细胞化学定位进行比较。结果显示, 在健康对虾体内, SOD酶阳性反应颗粒主要定位于肌肉、心脏、肝脏和鳃等组织细胞的线粒体膜、细胞质中, 以及肝细胞的脂滴周围; POD酶主要定位于心脏、鳃和肝脏组织细胞的过氧化物酶体内, 肝细胞中脂滴周围也有POD的阳性反应颗粒。感染病毒后, 各组织细胞表现出明显的病理性结构变化, 大量的髓样小体出现, 脂滴数量明显减少。同时各组织中SOD和POD酶的细胞化学定位也发生了明显的变化, 表现为心脏、鳃、肌肉组织细胞胞质中的SOD阳性颗粒消失, 肝细胞中的SOD阳性颗粒明显减少, 在心脏和鳃的线粒体基质内也出现SOD阳性颗粒; POD仍主要定位于过氧化物酶体中, 但心脏中的过氧化物酶体解体而有呈阳性反应的小颗粒分布在细胞质中。结果表明SOD和POD在凡纳滨对虾防御氧的毒性损伤以及整个机体的免疫功能等方面起着重要的作用。

关键词: 凡纳滨对虾; 病毒; SOD; POD; 细胞化学定位

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)02-0402-08

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)俗称南美白对虾, 是我国主要的经济水产养殖虾类, 然而随着养殖面积的不断扩大、养殖强度的不断增加、养殖生态环境的不断恶化, 凡纳滨对虾的病害也日趋严重, 其中病毒是对虾暴发性流行病发生的主要病原因子^[1]。而提高对虾的自身免疫力, 增强其抗病机能是综合防治的根本措施之一^[2], 因此研究凡纳滨对虾的免疫因子, 有效提高对虾本身的抗病能力, 已经越来越受到人们的重视。

超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)是广泛存在于需氧和耐氧生物各组织中的二种重要的抗氧化酶, 在对甲壳动物的研究中, 已把SOD和POD看作是两种具有免疫功能的酶, 可与其他一些酶共同作为检测甲壳动物免疫功能的指标酶^[2-4]。以前这方面的研究工作多以测定血清和组织提取液中酶活性为手段, 而对其在甲壳类动物组织细胞中的存在部位和形成方式报道很少^[5-8], 有关凡纳滨对虾体内肝脏、肌肉、心脏、复眼和鳃等5种组织中这两种酶的细胞化学定

位及感染病毒后的定位变化研究国内外尚未见报道。本文采用电镜酶细胞化学技术, 以健康和患病毒性病的凡纳滨对虾为材料, 在透射电镜下观察其肝脏、肌肉、心脏、复眼和鳃等5种组织中SOD、POD这2种免疫相关酶在细胞内的酶活性反应部位, 比较分析感染病毒前后对虾体不同组织中SOD、POD的定位变化, 为进一步认识凡纳滨对虾体内各组织细胞中SOD、POD的免疫作用提供基础资料, 并为凡纳滨对虾病毒性疾病的预防与诊断提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料

2006年7、8月虾病流行期间, 从上海市奉贤区水产技术推广站获取典型的患病毒性疾病的凡纳滨对虾和健康的凡纳滨对虾成体, 体长为7—8 cm。

1.2 方法

样品制备 按健康凡纳滨对虾和感染病毒的凡纳滨对虾分成两组, 每组各10只, 活体解剖, 分别

收稿日期: 2008-07-18; 修订日期: 2009-05-26

基金项目: 上海市教委高校科技发展基金项目(05DZ30); 上海师范大学科研项目(SK200716)资助

通讯作者: 许燕(1962—), 女, 汉族, 浙江嘉兴人; 副教授, 博士; 主要从事甲壳动物学生理生化研究。E-mail: xuyan6@shnu.edu.cn.

取其复眼、肝脏、心脏、肌肉和鳃, 并剪切成 1 mm^3 的小块, 同时对这两组凡纳滨对虾的相同组织再设立对照组。

酶的孵育反应 SOD 孵育反应: 参照邱兰萍等^[5]的方法配制 SOD 孵育液。将各组织小块在 4°C 条件下经 4% 多聚甲醛-2% 戊二醛固定 1h 后, 用二甲胂酸钠缓冲液漂洗, 再分别放入 pH 7.4 的 SOD 孵育液和对照液中室温条件下反应 1h (对照液不含三氯化铈)。

POD 孵育反应: 参照钟慈声^[9]的方法稍作改动后配制 POD 孵育液。将各组织小块在 4°C 条件下经 4% 多聚甲醛-2% 戊二醛固定 1h 后, 用二甲胂酸钠缓冲液漂洗, 再分别放入 pH 7.6 的 POD 孵育液和对照液中 37°C 条件下反应 1h (对照液不含 $1\% \text{H}_2\text{O}_2$, 并加入 0.05 mol/L 3-AT)。

孵育后的样品处理 样品经 0.05 mol/L 二甲胂酸钠缓冲液冲洗后。在 4°C 条件下 1% 锇酸后固定 1h, 常规乙醇、丙酮逐级脱水, Epon812 环氧树脂渗透包埋, 65°C 条件下聚合 48h。ULTRACWT E 超薄切片机切片, H-600 透射电镜观察并拍照。

2 结 果

2.1 凡纳滨对虾不同组织 SOD 酶细胞化学定位及其变化

透射电镜观察显示, SOD 酶活性反应产生的铈沉积颗粒在切片上定位清晰, 有酶活性部位呈棕色的中电子密度反应沉积物, 其形态近似圆形, 对照切片呈阴性反应(图版 I -5)。

健康对虾复眼细胞中, 色素颗粒饱满, 呈圆形, 细胞内未见任何铈沉积颗粒。病虾的复眼细胞内大部分色素颗粒出现中空现象, 细胞超微结构不清晰, 线粒体结构模糊, 甚至有些线粒体肿胀导致膜破裂, 同样细胞内未观察到有 SOD 阳性反应。

健康对虾肌肉组织中, 肌纤维排列紧密, 细胞核完整, 在线粒体膜上观察到铈沉积颗粒(图版 I -1)。病虾肌肉组织的肌纤维排列疏松、散乱, 肌质网膨胀扩张, 甚至破裂; 胞内线粒体溶解, 致使其结构模糊, 在细胞质中以及部分线粒体膜上观察到弱 SOD 阳性铈沉积颗粒(图版 I -2)。

在健康凡纳滨对虾心脏中, 心肌纤维呈现明显的明暗带, 排列整齐规律。细胞质中观察到强阳性 SOD 铈沉积颗粒, 在线粒体膜上有弱 SOD 阳性颗粒

(图版 I -3)。而病虾心脏的肌纤维结构模糊, 部分线粒体发生溶解现象, 线粒体内部的基质出现絮状致密化, 在这些线粒体的膜上及致密化基质内均观察到 SOD 阳性沉积物(图版 I -4)。

在健康对虾肝脏中, 细胞结构完整, 脂滴大而饱满(图版 I -5)。在线粒体膜、脂滴周围以及细胞质中均观察到 SOD 铈沉积颗粒(图版 I -6)。而在受病毒感染的对虾肝脏中, 细胞结构被严重破坏。细胞内部的脂滴数量明显减少, 在线粒体膜上仍然观察到 SOD 阳性反应颗粒, 细胞质中充满了紊乱的膜结构, 在胞质中还能观察到少数几个铈沉积颗粒(图版 I -7)。

健康对虾的鳃中, 可以观察到细胞内充满了丰富的内质网以及各种大小的泡, 在线粒体膜上和细胞质中均观察到 SOD 阳性反应沉淀物(图版 I -8)。在病虾鳃中, 膜结构受损严重, 细胞质中出现大量的髓样小体结构, 在线粒体膜上仍观察到铈沉积颗粒, 并在线粒体基质中也观察到 SOD 阳性颗粒(图版 I -9)。

2.2 凡纳滨对虾不同组织 POD 酶细胞化学定位及其变化

透射电镜观察显示, 在有 POD 酶活性的部位呈棕色的中电子密度反应沉淀物。在胞质中观察到有 POD 阳性反应的大颗粒, 这些阳性颗粒多为圆形或卵圆形, 有单位膜包裹, 直径为 $300\text{--}500\text{ nm}$, 即 POD 酶主要存在于过氧化物酶体(Ps)内。对照切片呈阴性反应(图版 II -1)。

在健康对虾的复眼组织中, 色素颗粒饱满, 呈圆形(图版 II -1)。细胞内观察到与色素颗粒的颜色以及内含物基质不相同的阳性过氧化物酶体大颗粒(图版 II -2)。在病虾复眼中, 细胞质混浊, 大部分色素颗粒出现中空现象, 而且细胞超微结构模糊, 在细胞内出现了较多的髓样小体结构(图版 II -3), 未见阳性反应的过氧化物酶体。

在健康对虾肌肉中, 肌纤维排列致密、整齐, 细胞内未见 POD 阳性反应(图版 II -4)。而在病虾的肌肉组织中, 肌纤维排列散乱、不规则, 细胞器结构模糊, 胞质中有呈弱 POD 阳性反应的过氧化物酶体大颗粒(图版 II -5)。

凡纳滨对虾健康体的心脏中, 心肌纤维排列有规则、整齐, 细胞核结构完整。在细胞内能观察到有 POD 阳性反应的大颗粒(图版 II -6)。在病虾心脏中, 细胞质中出现大量的髓样小体结构, 细胞核形

状不规则,部分线粒体内部基质发生絮状致密化;未见有 POD 阳性反应的过氧化物酶体大颗粒,但在胞质中出现有 POD 阳性反应的小颗粒(图版 II-7)。

健康对虾肝脏的细胞结构完整,各类细胞器清晰可见,脂滴大而饱满。在脂滴周围有 POD 阳性反应沉淀物,同时细胞质中也观察到有 POD 阳性反应的过氧化物酶体大颗粒(图版 II-8)。而在病虾肝脏中观察发现,其细胞结构尤其是膜系统被严重破坏,几乎看不到脂滴的存在,在胞质中有较强 POD 阳性反应的大颗粒,但数量有减少。在细胞质中还能观察到被次级溶酶体包裹的尚未降解的线粒体(图版 II-9)。

在健康虾鳃细胞的胞质中能观察到呈弱 POD 阳性反应的过氧化物酶体大颗粒(图版 II-10)。但受病毒感染后,内质网及小泡体等一系列膜结构均变得模糊不清,细胞核部分核膜发生溶解,在胞质中仍观察到有呈较强 POD 阳性反应的大颗粒,但数量有减少(图版 II-11)。

3 讨论

3.1 凡纳滨对虾体内 SOD 酶细胞化学定位及其免疫防御作用

SOD 是需氧生物的一种重要酶,能催化超氧阴离子自由基(O_2^-)发生歧化反应,从而能有效清除体内 O_2^- 。而 O_2^- 与许多动物疾病的发生和形成有关,因此 SOD 在生物体防御氧的毒性损伤以及整个机体的免疫功能等方面起着重要的作用^[10],被认为是机体防御氧化损害系统的关键酶之一,已经作为一类敏感分子生态毒理学指标^[11]被广泛应用于研究中。国内外有关 SOD 生物化学研究方面的报道^[6,12]很多,但是对于 SOD 酶活性的细胞定位研究主要集中在脊椎动物方面。一般认为 SOD 有 CuZn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD 三种类型,CuZn-SOD 存在于细胞浆内,Mn-SOD 在线粒体内。本实验的结果显示,除了复眼内未发现 SOD 阳性反应之外,凡纳滨对虾的肌肉、心脏、肝脏和鳃等组织细胞内 SOD 的活性位置存在于细胞质、线粒体膜上和脂滴周围,而细胞核等其他细胞器未见到任何钡颗粒沉积,这些结果与邱兰萍等^[5]研究的鼠心肌细胞内 SOD 定位是相同的。至于复眼中未见 SOD 酶活性可能与其作为视觉器官的单一功能和能量代谢不旺盛有关系。有报道认为细胞质、线粒体 SOD 的作用就是维持生物体内 O_2^- 的产生与消除的动态平衡,生物体内 O_2^-

绝大部分来源于线粒体的呼吸功能。因此,在健康凡纳滨对虾体内,这些由线粒体呼吸链产生的多余 O_2^- 就被线粒体中的 Mn-SOD 及时清除,在胞质中的 O_2^- 就被 CuZn-SOD 清除并生成 H_2O_2 ,一方面少量的 H_2O_2 可以抵御病原体的入侵,另一方面 H_2O_2 主要被谷胱甘肽过氧化物酶等清除。而在肝细胞脂滴周围定位到的 SOD,推测是胞质中的 CuZn-SOD,其作用可能是减少脂质的过氧化反应。

当凡纳滨对虾受病毒感染后,电镜观察发现 5 种组织细胞结构均表现出明显的病理变化^[13],如出现大量的髓样小体,膜结构受损严重,部分组织线粒体发生溶解现象,脂滴数量明显减少;同时 SOD 酶的定位也发生变化。在复眼中仍未观察到 SOD 阳性反应,而其他几个组织中虽仍有 SOD 阳性反应,但其定位有明显变化。心脏、鳃、肌肉和肝等各组组织细胞线粒体膜上仍观察到钡沉淀颗粒,但心脏、鳃、肌肉组织细胞胞质中的 SOD 阳性颗粒消失,即原先在胞质中均有定位的 SOD 酶,现只存在于肝细胞中,但肝细胞中的 SOD 阳性颗粒明显减少;另外还发现线粒体越是受损严重的部位,SOD 阳性反应也越强,尤其是在心脏和鳃中,不仅在线粒体外膜有 SOD 阳性反应,而且其致密化的基质中也出现 SOD 钡沉积颗粒。最近的研究发现,SOD 的活性与水生生物的免疫水平密切相关,对于增强吞噬细胞防御能力和整个机体的免疫功能有重要作用^[5,7]。蔡完其等^[13]认为感染莫格球拟酵母病的罗氏沼虾肝胰腺 SOD 活性显著降低,表明病虾代谢功能和免疫功能明显衰退和紊乱。本实验结果表明当病毒入侵后,凡纳滨对虾体内呼吸链活性受阻、机体应激等因素造成线粒体呼吸链损伤时,会使 O_2^- 生成量进一步在细胞内的增加和积聚,从而引起线粒体的氧化损伤。从钡沉淀的强度可看出,在线粒体基本结构还完好的情况下,线粒体结构损伤越重的部位,钡沉淀越多;损伤较轻的部位,钡沉淀较少。这就说明当体内 O_2^- 还能处在动态平衡时, O_2^- 产生的越多,对细胞损伤越重,SOD 活性也就越强^[5,11]。一旦细胞内的 O_2^- 失去动态平衡后, O_2^- 浓度逐渐偏高,引起线粒体变性溶解,随着线粒体能量代谢逐渐衰退与丧失,细胞处于崩解状态,机体组织就会发生病变,甚至死亡。通过透射电镜观察还发现,病虾肝细胞中的脂滴数量急剧减少,这进一步说明病虾组织细胞内的氧化损伤程度非常严重。从观察到的病虾体

内 SOD 酶活性下降及其组织细胞内分布的变化, 可以认为感染病毒的凡纳滨对虾其机体防御机能明显衰退。

3.2 凡纳滨对虾体内 POD 酶细胞化学定位及其免疫防御作用

POD 是一类含铁的金属酶类, 同样被看作是一种具有免疫功能的酶, 它与动植物的抗病性有密切关系。其功能就是利用细胞内有害的代谢产物 H_2O_2 、 O_2^- 等将同样是代谢过程中产生的酚、胺、醇、醛等有害物质分解成没有毒性的小分子物质, 以减轻细胞内的毒性, 防止活性氧自由基启动膜脂过氧化或膜脂脱脂作用, 从而保护细胞生物膜不被破坏^[14-16]。但 POD 在对虾免疫防御反应中的地位及具体作用仍不十分清楚。本实验通过透射电镜观察发现, 凡纳滨对虾 5 种组织的 POD 主要定位在过氧化物酶体上, 这一结果与常纛等^[15]对甜菜中的过氧化物酶体定位的研究结果相一致, 同时实验中所观察到的过氧化物酶体形状、大小以及结构都与钟慈声的描述相符。此外, 我们还在肝细胞的脂滴周围观察到有 POD 阳性反应颗粒, 有研究^[16,17]表明过氧化物酶体的形成与脂滴存在着某种关系, 认为过氧化物酶体最初是由脂滴成分与粗面内质网(RER)共同构成的。最初的过氧化物酶体仅表现出较弱的 POD 阳性反应, 随着 RER 的包被以及来自脂滴的成分进入到颗粒中, 颗粒的 POD 阳性反应逐渐增强, 从而最终形成成熟的过氧化物酶体。因此在实验中定位到的各组织细胞内过氧化物酶体的阳性反应强度并不一致。还有研究^[18]表明过氧化物酶体参与了脂类的分解代谢, 催化脂肪酸裂解为乙酰辅酶 A, 经胞液转运到线粒体加入三羧酸循环。根据本实验中在脂滴周围发现 POD 阳性反应这一事实, 表明 POD 与脂类代谢确实存在着密切的关系。

病毒感染凡纳滨对虾后, 电镜观察发现 5 种组织细胞内 POD 酶的定位也发生了变化。复眼和心脏中阳性反应的过氧化物酶体消失, 肝脏和鳃中的过氧化物酶体数量有减少, 脂滴及其周围的 POD 几乎不见, 而在心脏的细胞质中出现呈阳性反应的小颗粒。这一结果与雷质文等报道的中国对虾因感染 WSSV 而使血淋巴的 POD 活性降低^[4]一致。可以认为病毒入侵凡纳滨对虾后, 引起虾体生理代谢功能紊乱, POD 酶活性下降, 导致对虾清除体内活性氧以及代谢过程中所产生的有毒物质的能力也开始下

降, 随着机体内有毒物质的不断积聚以及活性氧对细胞器造成的氧化损伤, 最终导致细胞中毒。因此过氧化物酶体中的 POD 与对虾清除进入机体有害异物的免疫反应具有密切的关系, POD 酶活性的大小可用作对虾病毒病检测的辅助生理生化指标。

本研究从超微结构形态上显示了 SOD、POD 在凡纳滨对虾体内五种组织细胞中的存在部位以及感染病毒后组织细胞内的酶定位变化。结果表明凡纳滨对虾体内不同组织细胞中均有这两种同工酶存在, 但有明显的组织特异性, 且不同的细胞器内的 SOD 和 POD 具有不同的生理功能。从感染病毒后凡纳滨对虾各组织中细胞超微结构的变化以及 SOD 和 POD 酶细胞定位的变化, 表明 SOD 和 POD 这两种酶在凡纳滨对虾感染病毒后防御氧的毒性损伤等免疫反应中发挥着积极的作用。在水产养殖类的病害防治过程中, 化学药物和抗生素的使用对环境和食品安全存在着潜在的危害, 免疫防治成为目前水产病害防治技术研究的热点之一, 因此对凡纳滨对虾等水产养殖类自然防御体系的认识是非常必要的。本文针对凡纳滨对虾病毒感染前后 SOD 和 POD 酶免疫因子的定位变化进行了初步探讨, 可为今后凡纳滨对虾非特异性免疫研究以及在生产实际中应用免疫技术防治病害提供参考。

参考文献:

- [1] Chen X C. The Shrimp's Illness spread in the world and the involvement on shrimp's illness in china [J]. *China Feed*, 1995, **11**: 10—11 [陈宪春. 世界性虾病蔓延及我国虾病防治进展. 中国饲料, 1995, **11**: 10—11]
- [2] Wang Y S, Qian L M. Nonspecific immune effect of three immune preparations as feed additives on pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2006, **25**(1): 41—47 [王永胜, 钱鲁闽. 三类免疫制剂对凡纳滨对虾非特异性免疫效应的研究, 台湾海峡, 2006, **25**(1): 41—47]
- [3] He N H. The establishment and application of immune indexes of penaeid shrimp [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2004, **43**(3): 385—388 [何南海. 对虾免疫功能指标的建立及其应用. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, **43**(3): 385—388]
- [4] Lei Z W, Huang J, Liang C Z. Biological characters of white spot syndrome virus (wssv) [J]. *Marine Sciences*, 2002, **26**(3): 26—31 [雷质文, 黄捷, 梁成珠. 白斑综合症病毒的生物学特性. 海洋科学, 2002, **26**(3): 26—31]
- [5] Qiu L P, Li G Z, Zhu T Y. Electron microscopic observation of sod location in cardiac muscle cell [J]. *Journal of Chinese*

- Electron Microscopy Society*, 1998, **17**(3): 291—294 [邱兰萍, 李光芝, 朱天义. 心肌细胞内 SOD 定位的电镜观察. 电子显微学报, 1998, **17**(3): 291—294]
- [6] Ke S S, Wang K M. Activity measurement and location staining of SOD and its isozyme in *Rosarioxburghii* juice [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2001, **13**(3): 176—178 [柯世省, 王克满. 刺梨汁 SOD 及其同工酶的活力测定与定位染色. 浙江农业学报, 2001, **13**(3): 176—178]
- [7] Yao C L, Wang W N, Wang A L. Progress of studies on superoxide dismutase in the body of aquatic animals [J]. *Marine Sciences*, 2003, **27**(10): 18—21 [姚翠鸾, 王维娜, 王安利. 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展. 海洋科学, 2003, **27**(10): 18—21]
- [8] Yang M H, Zheng Z, Jan E L. Histochemical and ultrastructural demonstration of peroxidase activity during infection of rice by *Magnaporthe grisea* [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2002, **16**(1): 57—62 [杨民和, 郑重, Jan E. Lench. 水稻受稻瘟病菌感染后过氧化物酶定位的超微观察. 中国水稻科学, 2002, **16**(1): 57—62]
- [9] Zhong C S. Enzyme tissue cytochemical technique [M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press. 1987 [钟慈声. 酶组织细胞化学技术. 上海: 上海医科大学出版社. 1987]
- [10] Cao S H, Zha X D. Summary of the research on superoxide dismutase [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2003, **31**(4): 599—601 [曹淑华, 查向东. 超氧化物歧化酶研究综述. 安徽农业科学, 2003, **31**(4): 599—601]
- [11] Xu L H, Zhang Y Y and Chen Y Y. The advances of molecular ecotoxicology and its significance in water environment protection [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, **19**(2): 171—185 [徐立红, 张甬元, 陈宜瑜. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义. 水生生物学报, 1995, **19**(2): 171—185]
- [12] Xiao X, Huang Z X, Zang E X, *et al.* Studies on purification and characters of superoxide dismutase from *Sinonovacula constricta* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2002, **5**: 172—177 [肖湘, 黄智璇, 张尔贤, 等. 益蛭超氧化物歧化酶的纯化和性质研究. 台湾海峡, 2002, **5**: 172—177]
- [13] Cai W Q. A study on pathology of the disease caused by *Torulopsis mogli* in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1996, **20**(1): 13—17 [蔡完其. 罗氏沼虾莫格球拟酵母病的病理研究. 水产学报, 1996, **20**(1): 13—17]
- [14] Jia S J, Ying X P, Chen Y L, *et al.* A study on isozymes changes during variant development periods of eriocheir sinensis [J]. *Transaction of Oceanology and Limnology*, 2004, **4**: 52—60 [贾守菊, 应雪萍, 陈艳乐, 等. 中华绒螯蟹不同发育阶段腹腔粘液腺同工酶的比较. 海洋湖沼通报, 2004, **4**: 52—60]
- [15] Chang Y, Dai J J, Ma F M. The study of the activity in peroxidase of first year bolting sugar beet induced by low temperature and photoperiod [J]. *China Beet & Sugar*, 2002, **2**: 3—5 [常纓, 戴建军, 马凤鸣. 温光诱导甜菜当年抽薹过程中过氧化物酶的研究. 中国甜菜糖业, 2002, **2**: 3—5]
- [16] Liu X Y, Zhang Z F, Bao Z M. The peroxisome in the tissue cell of *Penaeus chinensis* [J]. *Marine Sciences*, 2003, **27**(11): 43—46 [刘晓云, 张志峰, 包振民. 中国对虾组织细胞中的过氧化物酶体. 海洋科学, 2003, **27**(11): 43—46]
- [17] Vogt G, Storch V, Quintio E. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *penaeus monodon* [J]. *Aquacul*, 1985, **48**: 1—12
- [18] Chen K. The function of peroxidase in the animal [J]. *Biology Bulletin*, 1995, **30**(10): 18—19 [陈康. 动物细胞中过氧化物酶体的功能. 生物学通报, 1995, **30**(10): 18—19]

CYTOCHEMICAL LOCATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND PEROXIDASE IN DIFFERENT TISSUES OF *LITOPENAEUS VANNAMEI*

XU Yan¹, YANG Jie¹, SUN Jing-Qiu¹, YU Ya-Dong¹ and YE Jun-Qiang²

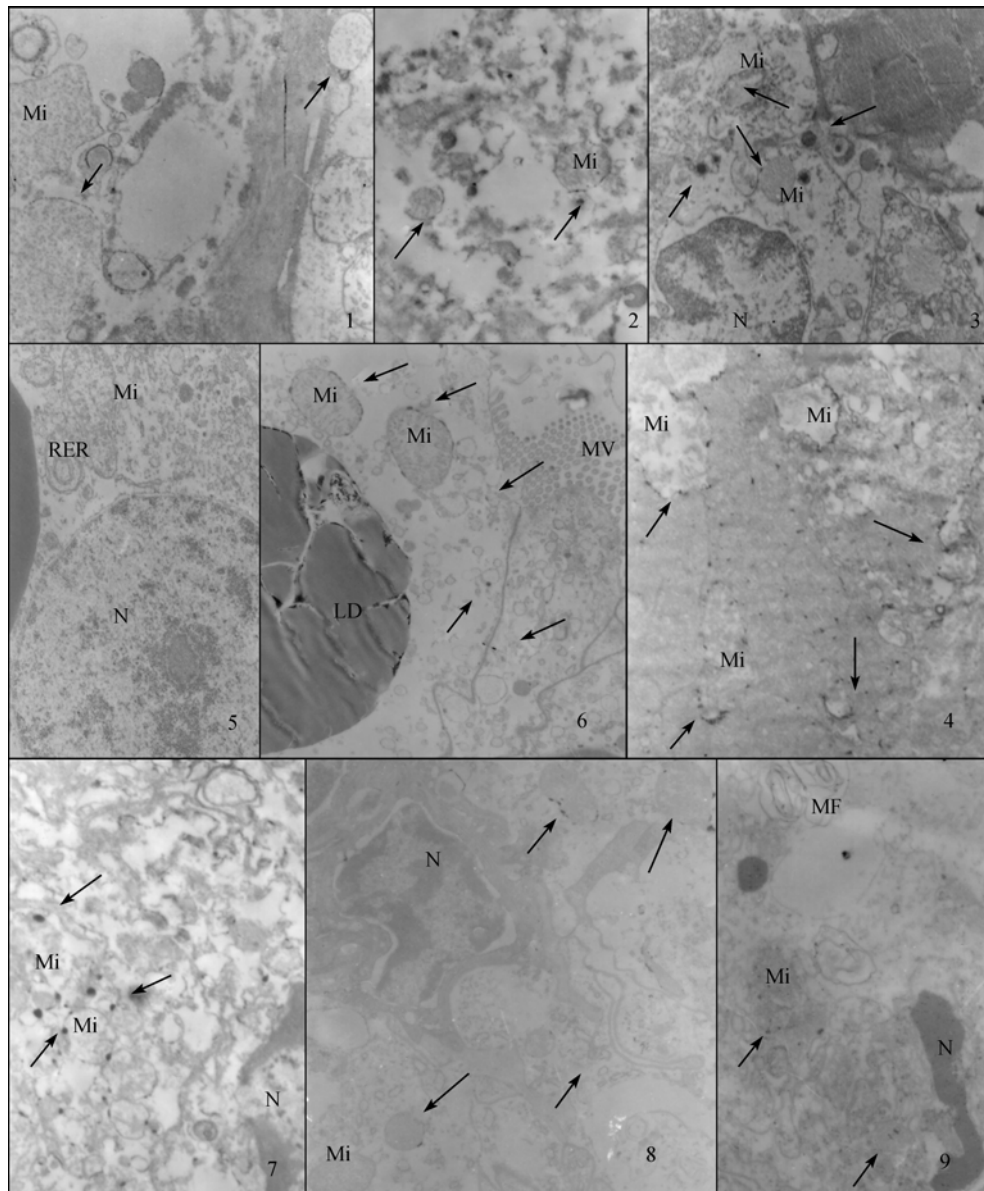
(1. College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2. Shanghai Fishery Technical Extension Center, Shanghai 201400, China)

Abstract: Superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) are two important anti-oxidation enzymes that exist widely in tissues of aerobic and anaerobic creatures. SOD and POD have been taken as two immune enzymes and a marker with several other related enzymes in evaluating crustacean animals' immune function. *Litopenaeus vannamei* is Chinese major raised aquatic shrimp, and Virus is a major reason for the spreading of epidemic *Litopenaeus vannamei* diseases. To improve the own immunity of *Litopenaeus vannamei* and enhance its anti-virus function become the basic method of comprehensive prevention and cure. Therefore, people pay more and more attention to study the immunity factors of *Litopenaeus vannamei* and improve their anti-diseases ability effectively.

The activities and location of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) in the liver, muscle, heart, eye and gill of *Litopenaeus vannamei* were studied with enzyme cytochemical technique of electronic microscope, compared with the infected shrimp. The results showed that SOD positive reactions were mainly deposited in mitochondrion membrane and cytoplasm in the cells of the liver, muscle, heart and gill of the healthy shrimp. Furthermore, SOD activity was located around lipid droplet in liver. POD positive reactions were mainly deposited in specific organelle: peroxisome in the cells of the liver, heart and gill respectively. There were also POD positive granules around lipid droplet in liver. In the infected shrimp, the obviously histopathological changes were detected in five tissues, and more myelin figures appeared in the cell of each tissue and the number of the fat drops in liver cells sharply reduced. There were evident differences in tissues between diseased shrimp and healthy shrimp in the activities and location of SOD and POD. SOD positive granules in cytoplasm of the muscle, heart and gill of the infected shrimp disappeared; and the activities of SOD in liver decreased. At the same time, SOD positive reactions were also found in mitochondrial matrix of heart and gill. POD positive reactions were still found in peroxisome of the liver, heart and gill. But the number of peroxisome positive reactions in liver and gill got decreased; POD positive granules around lipid droplet in liver almost disappeared; part of peroxisomes in heart disintegrated and lots of positive-reacting granules scattered in cytoplasm.

The results indicated that the activities and distribution of SOD and POD isozyme in *Litopenaeus vannamei* cells had clear tissue-specific, and SOD and POD played an important role in defense oxygen toxicity injury and the immune function of *Litopenaeus vannamei*. Our study will provide theoretical foundation for the application of immune technology in disease prevention and control in *Litopenaeus vannamei* in future.

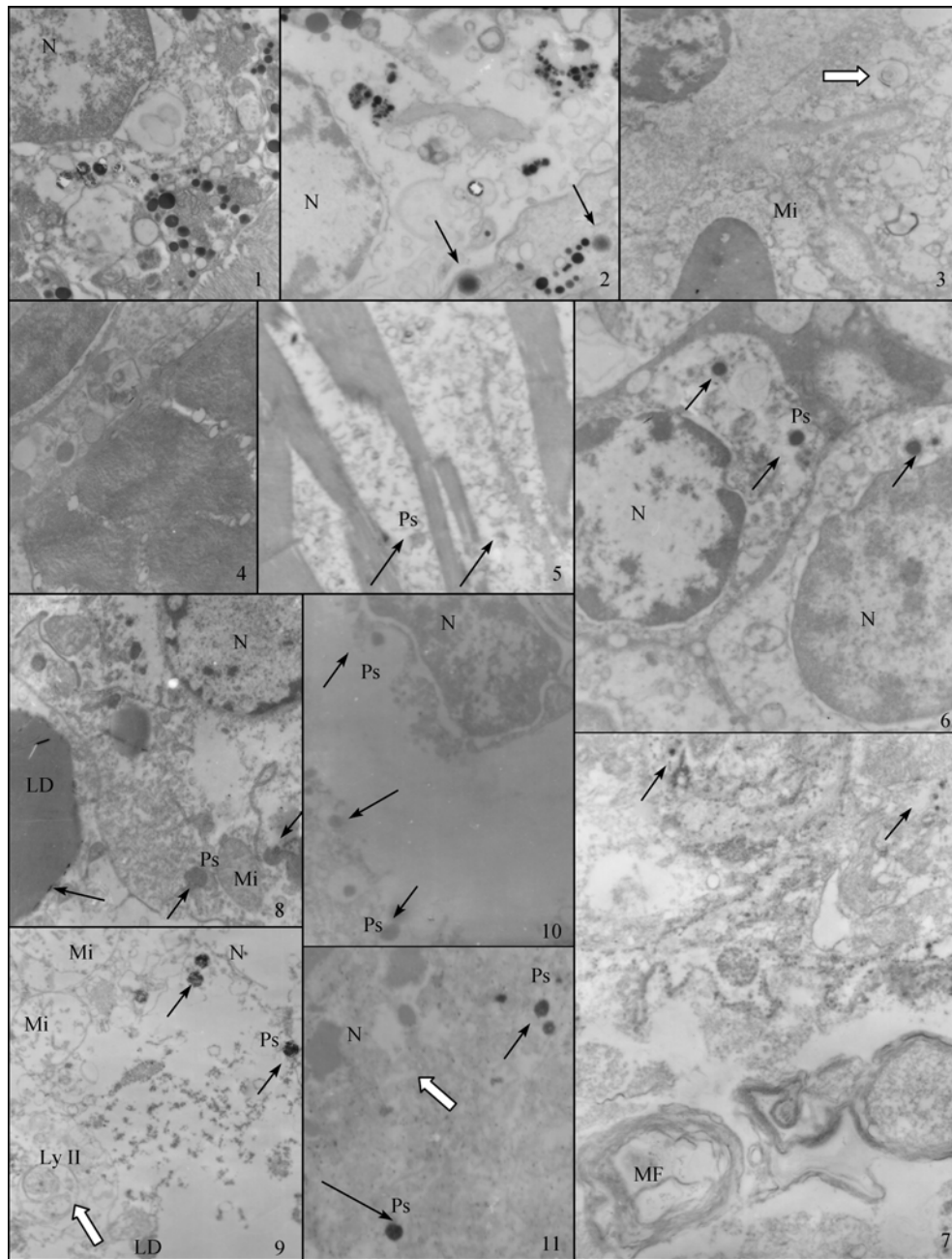
Key words: *Litopenaeus vannamei*; Virus; Superoxide dismutase (SOD); Peroxidase (POD); Cytochemical location



图版 I 凡纳滨对虾不同组织 SOD 酶细胞化学定位

Plate I SOD cytochemical localization in different tissue of *L. vannamei*

1. 健康虾肌肉实验组: Mi 膜上有钼沉淀物(→), ×6000; 2. 病虾肌肉实验组: Mi 膜及细胞质内有弱 SOD 阳性反应沉淀物(→), ×6000;
3. 健康虾心脏实验组: Mi 膜上有弱 SOD 阳性反应, 细胞质中有强 SOD 钼沉淀颗粒(→), ×6000; 4. 病虾心脏实验组: Mi 膜上有 SOD 阳性沉淀物(→), 线粒体内结构模糊, ×8000; 5. 健康虾肝脏对照组: 未见 SOD 阳性反应, ×6000; 6. 健康虾肝脏实验组: Mi 膜、LD 周围以及细胞质内有 SOD 阳性沉淀物(→), ×6000; 7. 病虾肝脏实验组: Mi 膜及细胞质内有 SOD 阳性反应沉淀物(→), ×8000; 8. 健康虾鳃实验组: Mi 膜及细胞质内有 SOD 阳性反应沉淀物(→), ×6000; 9. 病虾鳃实验组: Mi 上有钼沉淀物(→), ×6000
1. Healthy shrimp muscle: SOD positive granules in mitochondria membrane(→), ×6000; 2. Infected shrimp muscle: weakly SOD positive granules in mitochondria membrane and cytoplasm(→), ×6000; 3. Healthy shrimp heart: weakly SOD positive granules in mitochondria membrane and strongly SOD granules in cytoplasm(→), ×6000; 4. Infected shrimp heart: SOD positive granule in the mitochondria membrane(→), mitochondria's structure shows vague, ×8000; 5. Healthy shrimp liver control team: No SOD positive reaction was observed, ×6000; 6. Healthy shrimp liver: SOD positive granules in the mitochondria membrane, around LD and cytoplasm(→), ×6000; 7. Infected shrimp liver: SOD positive granules in the mitochondria membrane and cytoplasm(→), ×8000; 8. Healthy shrimp: SOD positive granules in the mitochondria membrane and cytoplasm(→), ×8000; 9. Infected shrimp gill: granules in the mitochondria(→), ×6000



图版 II 凡纳滨对虾不同组织 POD 酶细胞化学定位

Plate II POD cytochemical localization in different tissue of *L. vannamei*

1. 健康虾复眼对照组: 未见 POD 阳性反应, $\times 6000$; 2. 健康虾复眼实验组: 呈 POD 阳性反应的 Ps 大颗粒(\rightarrow), $\times 6000$; 3. 病虾复眼实验组: 细胞内 MF 增多, $\times 6000$; 4. 健康虾肌肉实验组: 未见 POD 阳性反应, $\times 6000$; 5. 病虾肌肉实验组: Ps 上呈弱 POD 阳性反应(\rightarrow), $\times 5000$; 6. 健康虾心脏实验组: Ps 上呈 POD 阳性反应(\rightarrow), $\times 6000$; 7. 病虾心脏实验组: 胞质中出现大量的 MF, 有 POD 阳性反应的颗粒(\rightarrow), $\times 6000$; 8. 健康虾肝脏实验组: Ps 上、LD 周围呈 POD 阳性反应(\rightarrow), $\times 6000$; 9. 病虾肝脏实验组: Ps 上呈 POD 阳性反应(\rightarrow), Ly II (\Rightarrow)内含尚未降解的 Mi, $\times 6000$; 10. 健康虾鳃实验组: 有阳性反应的 Ps 颗粒(\rightarrow), $\times 6000$; 11. 病虾鳃实验组: 有阳性反应的 Ps 颗粒(\rightarrow), 部分核膜发生溶解(\Rightarrow), $\times 8000$
1. Healthy shrimp eye control team: No POD positive reaction, $\times 6000$; 2. Healthy shrimp eye: POD positive reaction in the Ps, $\times 6000$; 3. Infected shrimp eye: more MF in the cell, $\times 6000$; 4. Healthy shrimp muscle: No POD positive reaction, $\times 6000$; 5. Infected shrimp muscle: Weakly POD positive reaction in the Ps, $\times 5000$; 6. Healthy shrimp heart: POD positive reaction in the Ps, $\times 6000$; 7. Infected shrimp heart: MF and POD positive granules in the cytoplasm, $\times 6000$; 8. Healthy shrimp liver: POD positive reaction in the Ps and LD, $\times 6000$; 9. Infected shrimp liver: POD positive reaction in the Ps, undegraded mitochondria in the Ly II, $\times 6000$; 10. Healthy shrimp gill: positive granules in the Ps, $\times 6000$; 11. Infected shrimp gill: positive granules in the Ps, some nucleus's membrane dissolved, $\times 8000$
- LD: 脂滴; Ly II: 次级溶酶体; MF: 髓样小体; Mi: 线粒体; MV: 微绒毛; N: 细胞核; Ps: 过氧化物酶体(微体)
- LD: lipid droplet; Ly II: secondary lysosome; MF: myelin figure; Mi: mitochondrion; MV: microvillus; N: nucleus; Ps: peroxisome