

嗜水气单胞菌感染对背角无齿蚌 5 种免疫相关酶活力的影响

饶玉才 胡宝庆 文春根

(南昌大学生物科学系, 南昌 330031)

摘要: 本研究以背角无齿蚌为材料, 利用嗜水气单胞菌为诱导刺激物, 对背角无齿蚌进行注射感染, 在注射后 3、6、12、24、48h 分别取血淋巴、肝胰腺, 测定其超氧化物歧化酶 (SOD)、酚氧化酶 (PO)、酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP) 及过氧化氢酶 (CAT) 的活力, 并研究各项酶活力的变化规律。结果表明: 除 3h 外, 实验组肝胰腺的 SOD 活力均不同程度地高于对照组; 血清实验组的 PO 活力开始显著高于对照组, 然后降低, 而肝胰腺实验组的 PO 活力持续高于对照组; 另外, 与对照组相比, 实验组中血淋巴与肝胰腺的 ACP、AKP 和 CAT 活力在不同的时间段虽然有所增强, 但两者之间无显著差异。因此, 认为 SOD、PO 活性可以作为背角无齿蚌免疫抗病功能指标参数, 而 ACP、AKP 及 CAT 活性能否作为该参数还有待于进一步研究。

关键词: 背角无齿蚌; 嗜水气单胞菌; 超氧化物歧化酶; 磷酸酶; 酚氧化酶; 过氧化氢酶

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)03-0406-07

贝类缺乏特异性免疫系统, 无法实现高效专一的抗原-抗体防御反应, 但由血细胞吞噬作用和多种体液因子共同组成的非特异性免疫系统, 能有效地识别非己物质和抵抗病原微生物等的入侵^[1]。体液性免疫因子, 包括天然形成或诱导产生的各种生物活性分子以及各种具有免疫活性的酶类等, 它们在机体免疫防御过程中起到了十分重要的作用^[2]。嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, Ah) 是养殖水体中最主要的爆发性疾病导致者之一, 致病范围十分广泛, 可引起贝类等水产动物组织和器官理化因子方面的改变, 也能影响与免疫抗病作用相关酶的活性^[3]。酸性磷酸酶的活力变化可能作为贝类养殖环境监测和病理变化的一种检测指标^[4]。在翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 血浆与血细胞中均发现有酚氧化酶激活系统 (proPO 系统) 存在, 可在识别异己和宿主免疫反应中发挥重要作用^[5]。因此, 这些免疫相关酶活性的变化在一定程度上反映出生物体抗病免疫功能的强弱。

国内外有关贝类免疫酶类的研究多为海洋贝类^[6-9]。对淡水贝类免疫相关酶的研究则较少报道。背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 是我国广泛分布的贝类, 具有较重要的经济价值。本文利用嗜

水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 对背角无齿蚌进行人工感染, 并对其免疫相关的 5 种酶进行检测分析, 以期探讨病原菌对淡水贝类非特异性免疫功能的影响提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器 材料: 背角无齿蚌于 2006 年 12 月至 2007 年 2 月采自鄱阳湖水域的扬子洲。嗜水气单胞菌菌种 (编号 XS 91-4-1) 由中国科学院水生生物研究所赠送, 于牛肉膏-蛋白胨培养基上培养 2—3d 温度为 28—30℃。冰箱中 (4℃) 保存, 备用。

仪器和试剂: UV-3100 型紫外可见分光光度计及 V-1200 型可见分光光度计均为上海美谱达仪器有限公司产品。L-DOPA 为 Sigma 公司产品, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验分组及预处理 选择壳长为 (13.58 ± 1.12) cm、壳高 (8.34 ± 0.91) cm 的健康蚌, 在水族箱中暂养一周以上, 水温控制在 9—10℃, 保持水中通气 (连续冲气暂养), 每天换水一次, 将无齿蚌 40 只随机分成实验组和对照组, 每组 20 只, 取经分离纯化的嗜水气单胞菌, 用无菌生理盐水稀释到浓度

收稿日期: 2007-07-31; 修订日期: 2008-12-16

基金项目: 国家自然科学基金 (30571434); 江西省科技攻关项目 (2004) 资助

作者简介: 饶玉才 (1976—), 男, 汉族, 江西九江人; 硕士研究生; 主要从事贝类生理化和免疫学研究

通讯作者: 文春根 (1963—), 男, 汉族, 江西南昌人; 教授, 博士; 主要从事水产动物疾病方面的研究。E-mail: cgwen@ncu.edu.cn

为 1.6×10^8 cell/mL。按每个个体 50 μ L 的剂量用微量进样器从蚌闭壳肌背后缘注射, 对照组注射等量的无菌生理盐水。

1.3 样品的制备及酶活力测定

1.3.1 血清样品的制备 注射后 3、6、12、24、48h 分别用 2.5 mL 注射器 5号针头从各蚌闭壳肌血窦中取血约 1.5 mL, 以 3600 r/min 的转速低温 (4 $^{\circ}$ C) 离心 10min, 移出上清液, 获得实验所用血清样品, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.3.2 肝胰腺提取液的制备 蚌取血后, 取出适量肝胰腺, 滤纸吸干水分后称重, 加入无菌生理盐水于冰浴中匀浆, 使浓度达到 0.1 g/mL, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 以 3000 r/min 离心 10min, 除去沉淀后获得蚌的肝胰腺组织提取液, 并以其作为酶原液进行酶活性测定, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.3.3 酶活力测定 SOD 活力测定采用连苯三酚自氧化法, 酶活力单位定义为每毫升反应液中, 每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量为一个酶活力单位 (U/mL); CAT 活性测定按照钼酸铵显色法测定, 其活性定义每分钟分解 1 μ mol 过氧化氢为一个酶活力单位; PO 活力测定以 OD₄₉₀ 每分钟增加 0.001 定义为一个酶活力单位; ACP 和 AKP 活力

测定均采用磷酸苯二钠法并加以改进, 其活力大小按金氏单位计算。

1.4 数据处理 结果均用平均值 $\pm$ 标准差 (M $\pm$ SD) 表示, 采用 SPSS13.0 软件对实验组与对照组数据进行 *t*-检验统计学分析。

2 结果

2.1 嗜水气单胞菌对背角无齿蚌超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的影响

经嗜水气单胞菌感染后, 蚌的血清和肝胰腺 SOD 活力变化趋势基本相同 (图 1), 均是先升高后降低, 12h 时达到最高点, 在 24—48h 之间变化不大。但血清 SOD 活力 12—24h 之间下降明显, 24h 时达到最低点 (图 1A); 肝胰腺 SOD 活力在 12—48h 之间下降平缓 (图 1B)。对照组蚌血清 SOD 活力也是先升后降, 但在 6h 时达到最高点。*t*-检验显示实验与对照组蚌的血清 SOD 活力在 3、12 和 48h 时差异显著 ($t = 3.55、2.62$ 和 $2.86, p < 0.05$)。对照组蚌的肝胰腺 SOD 活力先快速下降, 6h 时开始上升, 至 24h 后又快速下降。*t*-检验显示实验与对照组蚌的肝胰腺 SOD 活力仅在 48h 时的差异显著 ($t = 3.37, p < 0.05$)。

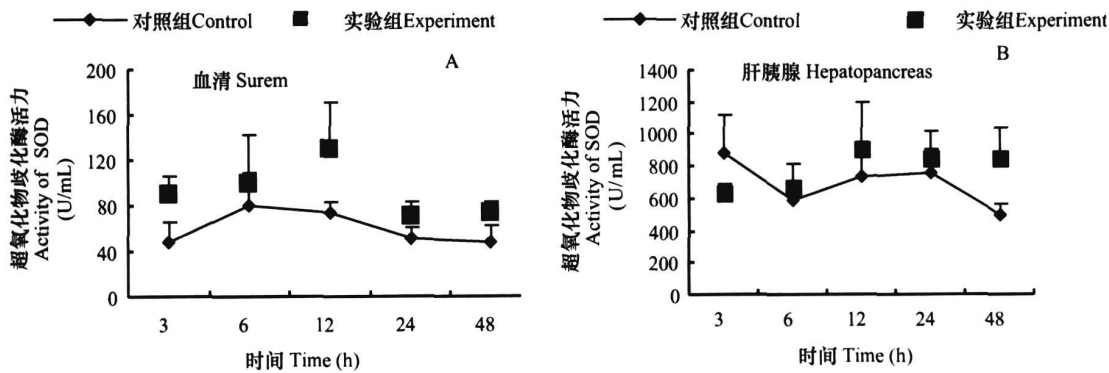


图 1 嗜水气单胞菌感染对背角无齿蚌血清和肝胰腺中超氧化物歧化酶活力的影响

Fig 1 Effect of infection by *Aeromonas hydrophila* on SOD activities in serum and hepatopancreas from *Anodonta wailiana*

2.2 嗜水气单胞菌对背角无齿蚌过氧化氢酶 (CAT) 活力的影响

由图 2 可见, 嗜水气单胞菌感染后, 实验组蚌的 CAT 活力较对照组的趋势明显。其中实验组蚌血清 CAT 活力先逐步下降至 24h 时的最低点。对照组也是在 24h 时达到最低, 但是酶活力的曲线

变化波动比较大 (图 2A)。 *t*-检验显示两组间无显著差异 ($p > 0.05$)。实验组蚌的肝胰腺 CAT 活力的最低点分别在 6h 时和 24h 时, 在 12h 时是最高点。对照组蚌的肝胰腺 CAT 活力在 24h 内变化不大 (图 2B)。经 *t*-检验显示在 24h 时和 48h 时两组间有显著差异 ($t = 2.52$ 和 $3.70, p < 0.05$)。

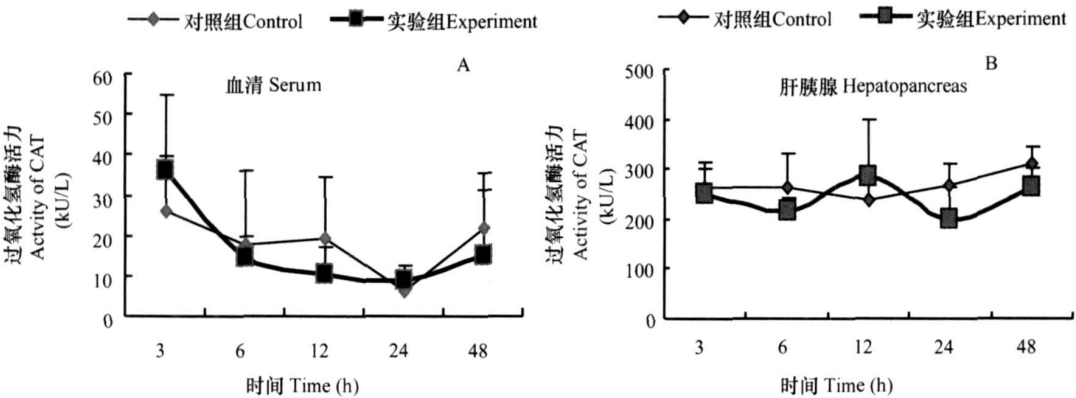


图 2 嗜水气单胞菌感染对背角无齿蚌血清与肝胰腺中过氧化氢酶活力的影响
Fig. 2 Effect of infection by *Aeromonas hydrophila* on CAT activities in serum and hepatopancreas from *Anodonta woodiana*

2.3 嗜水气单胞菌对背角无齿蚌酚氧化酶 (PO) 活力的影响

由图 3可以看出, 实验组蚌的血清与肝胰腺 PO 活力变化随时间有所不同。其中血清 PO 活力由 3h 时的最高点一直下降。对照组血清 PO 活力先逐渐升高(图 3A)。t-检验结果显示, 实验与对照组在 3h 时和 6h 时差异分别是显著 ($t = 2.48, p < 0.05$)

和极显著 ($t = 4.05, p < 0.01$); 肝胰腺 PO 活力先由 3h 时的最高点快速下降至 6h 时的最低点后又逐渐上升, 从 24h 后又下降。对照组蚌的肝胰腺 PO 活力先在 3h 时和 12h 时之间明显升高, 12h 后缓慢下降(图 3B)。t-检验结果显示对照与实验组在 3h 时差异极显著 ($t = 9.47, p < 0.01$)。

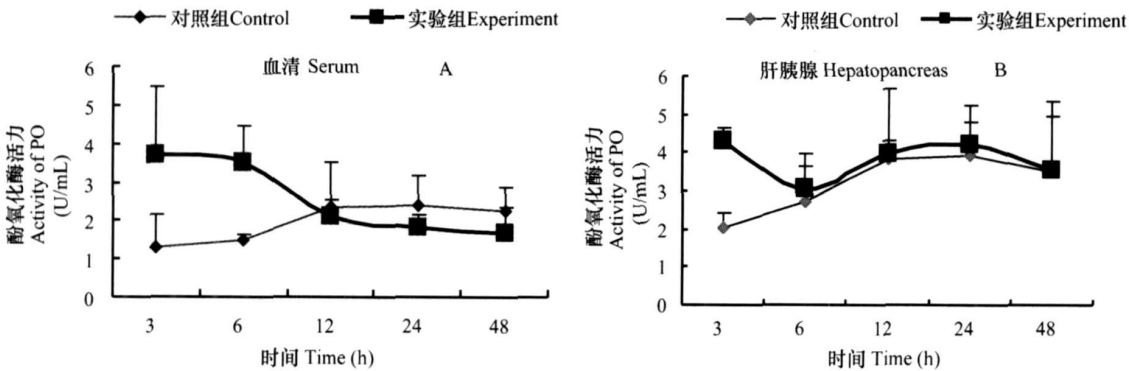


图 3 嗜水气单胞菌感染对背角无齿蚌血清与肝胰腺中酚氧化酶活力的影响
Fig. 3 Effect of infection by *Aeromonas hydrophila* on PO activities in serum and hepatopancreas from *Anodonta woodiana*

2.4 嗜水气单胞菌对背角无齿蚌碱性磷酸酶 (AKP)活力的影响

如图 4所示, 实验组蚌的血清与肝胰腺 AKP 活性随时间变化较大。血清 AKP 活力变化幅度比较大, 于 6-12h 时分别达到最高点和最低点。对照组血清 AKP 活性在 6h 时达到最高值后下降(图 4A)。t-检验结果显示这两组间无显著差异 ($p > 0.05$),

实验组蚌的肝胰腺 AKP 活性由 3h 时的最高点急剧下降。而对照组蚌的肝胰腺 AKP 活性先逐步上升到 12h 时的最高点。24-48h 间先降后升(图 4B)。t-检验结果显示在这两组间 3h 时差异显著 ($t = 2.21, p < 0.05$), 其余时相两组差异不显著 ($p > 0.05$)。

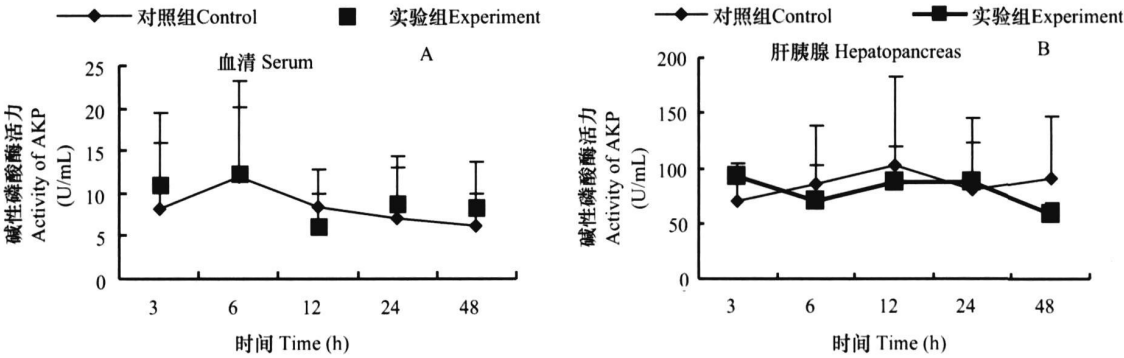


图 4 嗜水气单胞菌感染对背角无齿蚌血清与肝胰腺中碱性磷酸酶活力的影响

Fig 4 Effect of infection by *Aeromonas hydrophila* on AKP activities in serum and hepatopancreas from *Anodonta woodiana*

2.5 嗜水气单胞菌对背角无齿蚌酸性磷酸酶 (ACP)活力的影响

从图 5可见,实验组蚌的血清 ACP活力与肝胰腺 ACP活力变化趋势与 AKP类似。血清 ACP活力先逐步下降至 12h 时达到最低点, 24h 时又上升到最高点。对照组血清 ACP活力由 3h 时的最高点降到 6h 时的最低点, 12—48h 之间呈波动变化 (图 5

A)。t-检验显示 12h 时两组间差异显著 ($t = 2.83, p < 0.05$)。而实验组蚌的肝胰腺 ACP 活性在 3h 后下降, 6h 时达到最低点, 再逐渐上升至 24h 时最高点。而对照组蚌的肝胰腺 ACP 活性变化恰好相反, 但整个变化趋势较平稳 (图 5B)。经 t-检验显示两组间无显著差异 ($p > 0.05$)。

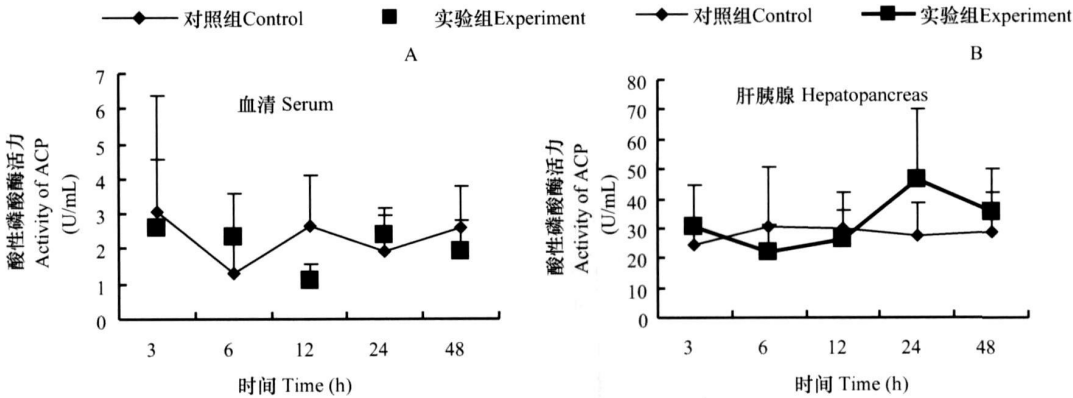


图 5 嗜水气单胞菌感染对背角无齿蚌血清与肝胰腺中酸性磷酸酶活力的影响

Fig. 5 Effect of infection by *Aeromonas hydrophila* on ACP activities in serum and hepatopancreas from *Anodonta woodiana*

3 讨论

3.1 背角无齿蚌超氧化物歧化酶 (SOD)与过氧化氢酶 (CAT)的变化

SOD 和 CAT 是水产无脊椎动物中的重要抗氧化防御性功能因子, 成为机体内活性氧自由基 (ROS) 的天然清除剂^[10]。当有害超氧阴离子自由基被 SOD 分解为 H₂O₂后, 存在于过氧化物酶体的 CAT 能催化 H₂O₂等生成水和氧气, 防止自由基对细胞的毒害^[11]。因此, SOD 和 CAT 的活性变化在一定程度上可反映出机体在胁迫逆境下的免疫力。

杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 在注射病毒悬液后, SOD 活力在 8h 时升至最高^[12]。注射大肠杆菌后, 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 血细胞 SOD 活力在 15h 和 30h 时极显著地提高^[8], 背角无齿蚌血清 SOD 活力在 3—12h 也明显地升高。SOD 活力的升高, 意味着有大量超氧阴离子 O₂⁻等氧化自由基产生, 表明生物有机体抗氧化性和免疫能力增强^[13]。因此, 适当量的嗜水气单胞菌诱导能够提高蚌的免疫机能。另外, 实验中背角无齿蚌肝胰腺 SOD 3h 时的活力比对照组稍低, 表明细菌在短时间内还不能够有效地激活蚌的肝胰腺中的抗氧化酶系统。

用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 注射栉孔扇贝后, 贝的血淋巴 CAT 活力显著增强^[8]。然而, 不等壳毛蚶 (*Scapharca inaequivalvis*) 置于 0.1×10^6 的铜离子溶液中 15d, SOD 活力显著地提高, CAT 的活力却显著降低^[6]。紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 置于 $80 \mu\text{g/L}$ 的镉离子中和 $500 \mu\text{g/L}$ 的 2-乙基己基酯中 7d 其消化腺的 CAT 活力无变化^[14]。贻贝 (*Mytilus edulis*) 的 CAT 活力在较高温度状态下增强, 且具有明显的季节性变化^[15]。在壬基苯酚 (4-nonylphenol) 溶液刺激下, 菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) SOD 活力明显地增强。SOD 活力的提高可以促使 O_2^- 转化为 H_2O_2 , 而 H_2O_2 却以一种不显著的方式刺激 CAT, 使 CAT 活性基本不受影响^[16]。本实验在室温为 10°C 左右的冬季进行, 背角无齿蚌的 SOD 活力也明显地增加, CAT 活力却受到了抑制; 可能是由于超氧阴离子 O_2^- 对 CAT 活力产生了抑制, 导致了 CAT 活性降低。另外, 背角无齿蚌肝胰腺 SOD 和 CAT 活力均明显地高于血清; 可能是由于消化腺是一个高代谢活性中心, 易产生过氧化自由基, 从而诱发大量抗氧化酶合成^[17]。

3.2 背角无齿蚌酚氧化酶 (PO) 的变化

PO 广泛分布在微生物和动植物体中, PO 与其激活系统 (proPO) 已证明在贝类免疫识别过程中发挥着关键性作用^[15]。罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 被注射活性嗜水气单胞菌 (*Aeromonas* sp.) 后, 血淋巴中的 PO 活性均显著地升高^[18]; 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 被注射多糖后, 也能在较短时间内有效地提高 PO 的活力^[19]。进入虾体的异物作用于半颗粒细胞和颗粒细胞, 刺激细胞产生胞吐作用, 进行脱颗粒, 激活 proPO 系统, 以此产生对外源异物的细胞应答, 可以使 PO 活力增强^[15]。然而, 皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 的 PO 活力在异物入侵后的一定时间内呈升高趋势, 然后下降^[7]。背角无齿蚌在注射嗜水气单胞菌后, 血清 PO 活力也在显著增强后迅速下降。proPO 系统受到异物刺激后, 活性 PO 可以黏附到异物表面, 起到识别调理作用^[20]。因此, 低浓度的嗜水气单胞菌刺激背角无齿蚌, 对酚氧化酶原具有激活作用, 起始阶段使血清 PO 活力上升; 随着感染时间延长, 细菌繁殖增多, 又会对含有酚氧化酶原的大颗粒细胞和小颗粒细胞产生损伤作用, 从而使血清 PO 随细胞密度的下降而降低。贝类的肝胰腺是重要的免疫器官, 因此, 背角无齿蚌的肝胰腺 PO 活力始终呈增强趋势。

3.3 背角无齿蚌酸性磷酸酶 (ACP) 与碱性磷酸酶 (AKP) 的变化

ACP 和 AKP 均为磷酸单酯水解酶, 在贝类免疫防御反应中, 这两种酶作为溶酶体酶的重要组分, 对细菌等异物在溶酶体内的消化降解起重要作用^[21]。两种磷酸酶活力也被认为是判断虾贝类等水产动物免疫能力的指标之一^[9]。经大肠杆菌刺激后, 杂色鲍的 ACP 和 AKP 活性并没有明显差别^[22]。背角无齿蚌的 ACP 和 AKP 活力同样没有显著变化。水解酶的活性对温度很敏感, 其活力在高温条件下比低温更强^[23]。本实验的低温度条件可能对蚌的 ACP 和 AKP 活性产生了一定的影响。季节及环境化学因子同样影响着贝类水解酶的活性^[24]。因此, 能否利用 ACP 和 AKP 活性的变化作为贝类免疫功能的指标还有待于更多的证据。

参考文献:

- [1] Zhou Y C. Advances in studies on marine molluscan diseases [J]. *Natural Science Journal of Hainan University*, 2000, **18** (2): 207—212 [周永灿. 海洋贝类病害及其研究进展. 海南大学学报自然科学版, 2000, **18** (2): 207—212]
- [2] Chu F E. Humoral defense factors in marine bivalves [A]. In Fisher W S (Eds.), *Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs*. Bethesda Maryland: American Fisheries Society Special Publication 18, 1988, 178—188
- [3] Wang Y, Hu Y B, Jiang N C. Effects of ammonia-N and nitrite-N on immune enzymes of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2005, **32** (6): 698—705 [王玥, 胡义波, 姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾免疫相关酶类的影响. 浙江大学学报 (理学版), 2005, **32** (6): 698—705]
- [4] Wei W, Zhang H Y, Shi A J. The study of relationship between Acid-phosphatase activity and oyster defence [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25** (4): 413—415 [魏炜, 张洪渊, 石安静. 育珠蚌酸性磷酸酶活力与免疫反应关系的研究. 水生生物学报, 2001, **25** (4): 413—415]
- [5] Rengasamy A, Annugan M, Mullanadnan P. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus [J]. *Dev Comp Immunol*, 1997, **21** (1): 1—12
- [6] Isani G, Monari M, Andreani G, et al. Effect of Copper Exposure on the Antioxidant Enzymes in Bivalve Mollusc *Scapharca inaequivalvis* [J]. *Vet Res Commun*, 2003, **27** (Suppl 1): 691—693
- [7] Ding X Y, Li G Y, Zhai Y M. Study on the changes of some factors in haemolymph of induced *Haliotis discus hannai* [J]. *Oceanologiae Limnologia Sinica*, 1996, **27** (4): 362—367 [丁秀云, 李光友, 翟玉梅. 皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中一些因子变化的研究. 海洋与湖沼, 1996, **27** (4): 362—367]

- [8] Sun H S, Li G Y. Activity change of seven enzymes in haemolymph in scallop *Chlamys farreri* after challenge with *Escherichia coli* [J]. *Marine Sciences*, 1999, **4**: 54—58 [孙虎山, 李光友. 大肠杆菌感染后栉孔扇贝血淋巴中 7 种酶活力的变化. 海洋科学, 1999, **4**: 54—58]
- [9] Mu H J, Jiang X L, Liu S Q, *et al*. Effects of immunopolysaccharide on the activities of acid phosphatase, alkaline phosphatase and superoxide dismutase in *Chlamys farreri* [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1999, **29**(3): 463—468 [牟海津, 江晓路, 刘树青, 等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响. 青岛海洋大学学报, 1999, **29**(3): 463—468]
- [10] Winston G W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 1991, **100**: 173—176
- [11] DiGiuseppi J, Fridovich I. The toxicology of molecular oxygen [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1984, **12**(4): 315—342
- [12] Wang J Y, Ge Z X, Feng J, *et al*. Changes of immune factors in serum of *Haliothis diversicolor* Reeve infected by virus [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, **12**(3): 344—347 [王江勇, 郭志勋, 冯娟, 等. 病毒感染后杂色鲍部分血清免疫因子的变化. 中国水产科学, 2005, **12**(3): 344—347]
- [13] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases [J]. *Annu Rev Biochem*, 1995, **64**: 97—112
- [14] Orbea A., Ortiz-Zamagaitia M., Cajaraville M P. Interactive effects of benzo(a) pyrene and cadmium and effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on antioxidant and peroxisomal enzymes and peroxisomal volume density in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* Imk [J]. *Biomarkers*, 2002, **7**(1): 33—48
- [15] Pellerin-Massicotte J. Influence of elevated temperature and air exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) [J]. *J Redd Oceanogr*, 1997, **22**: 91—98
- [16] Valerio M., Ballarin L, Marin M G. Exposure of the clam *Tapes philippinarum* to 4-nonylphenol changes in anti-oxidant enzyme activities and re-burrowing capability [J]. *Mar Pollut Bull*, 2004, **48**(5—6): 563—571
- [17] Iato P, Piccinni C A, Santovito G. Antioxidant responses to variations in dissolved oxygen of *Saptharca inaequalis* and *Tapes philippinarum*, two bivalve species from the lagoon of Venice [J]. *Mar Pollut Bull*, 2007, **54**(7): 1020—1030
- [18] Sung H H, Huang S F, Tasi F M. Responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aeromonas* spp [J]. *J Invertebr Pathol*, 2000, **76**: 278—284
- [19] Chang M X, Chen X X. Effects of two kinds of polysaccharide on the phenoloxidase activity in *Macrobrachium nipponense* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(3): 269—272 [昌鸣先, 陈孝煊. 两种多糖对日本沼虾酚氧化酶活力的影响. 水生生物学报, 2003, **27**(3): 269—272]
- [20] Soderhall K. Prophenoloxidase activating system and melanization: a recognition mechanism of arthropods. A review [J]. *Dev Comp Immunol*, 1982, **6**: 601—611
- [21] Cheng T C. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* haemocytes by certain bacteria [J]. *J Invertebr Pathol*, 1992, **59**: 197—220
- [22] Wang S H, Wang Y L, Zhang Z X, *et al*. Activities of selected enzymes in cell free haemolymph from abalone (*Haliotis diversicolor*) injected with *E. coli* or *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, **11**(1): 37—40 [王淑红, 王艺磊, 张朝霞, 等. 弧菌和大肠杆菌感染对杂色鲍无细胞血淋巴中几种酶活力影响. 中国水产科学, 2004, **11**(1): 37—40]
- [23] Chen M Y, Yang H S, Maryse D, *et al*. Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures [J]. *J Exp Mar Bio Ecol*, 2007, **345**: 52—60
- [24] Sun H S, Li G Y. Humoral factors of bivalves participating in immunity defence [J]. *Marine Sciences*, 2001, **25**(4): 34—36 [孙虎山, 李光友. 双壳贝类参与免疫防御的体液因子. 海洋科学, 2001, **25**(4): 34—36]

THE CHANGES OF FIVE IMMUNE ENZYMES FROM *ANODONTA WOODIANA* INFECTED WITH *AEROMONAS HYDROPHILA*

RAO Yu-Cai HU Bao-Qing and WEN Chun-Gen

(Department of Bioscience, Nanchang University, Nanchang 330031)

Abstract It is suggested that the status and function in the internal defence mechanisms on immune enzymes in seashell have been noticed by more and more scholars in the world at present. Understanding the activation or effect factors of the enzymatic system can enable the evaluation of the health of breed aquatic. The activation of the enzymatic system by bacterial or fungal components is an additional clue of the involvement of these enzymes in invertebrate immune defence mechanisms. This paper reported the activities of selected enzymes in haemolymph and hepatopancreas from *Anodonta woodiana* infected by *Aeromonas hydrophila*. Healthy *Anodonta woodiana* were collected from Yangzi Island near Poyang Lake, with body length of 13.58 ± 1.12 cm and height of 8.34 ± 0.91 cm. Haemolymph and hepatopancreas were extracted at 3h, 6h, 12h, 24h and 48h from the *Anodonta woodiana* injected with *Aeromonas hydrophila* (1.6×10^8 cell/mL) and 0.9% NaCl solution (control group) respectively. The levels of Superoxide dismutase (SOD), Phenoloxidase (PO), Alkaline phosphatase (AKP), Acid phosphatase (ACP) and Catalase (CAT) were tested. The results showed that the activities of SOD from haemolymph injected by *Aeromonas hydrophila* could be significantly higher than that in control at 3h, 12h and 48h respectively, but only at 48h from hepatopancreas. PO activities in serum were notable higher than that in control at 3h and 6h and had the highest level at 3h after injection, then decreased appreciably, however, PO activities in hepatopancreas increased significantly at 3h. It proved that the activities of SOD and PO in the haemolymph and hepatopancreas of *Anodonta woodiana* could be induced significantly elevation by *Aeromonas hydrophila*. While there was no overt difference between injection and control group for the changes of ACP activities, which might indicate that the effect of stimulation on *Anodonta woodiana* with *Aeromonas hydrophila* was not obvious, so that it might not stimulate acute increase and release of lysosomes. The same explanation was fit for the change of AKP activities which increased slightly the whole time in the haemolymph and significantly in the hepatopancreas at 3h. In addition, the changes of CAT activities in the haemolymph of *Anodonta woodiana* were not obvious even it restrained notably in the hepatopancreas at 24h and 48h, the enzymatic responses were compared with other studies and the possible reasons were discussed. It showed that activities of SOD and PO may be used as an indicator on immune disease-resistance, while further research will be needed to understand the activities, functions and mechanism of AKP, ACP and CAT.

Key words *Anodonta woodiana*, *Aeromonas hydrophila*, Phenoloxidase, Superoxide dismutase, Phosphatase, Catalase