

硫化物胁迫对凡纳滨对虾血细胞的毒性影响

汪 蕾¹, 张秀霞², 冼健安²

(1. 华南师范大学药物研究院, 广东 广州 510631;

2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南 海口 571101)

摘要:硫化物是水产养殖过程中常见的水体污染物之一。为探讨水体硫化物胁迫对虾类血细胞的毒性影响,以不同浓度(0.5 mg/L, 2.0 mg/L)的硫化物对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)进行胁迫,于胁迫后6、12、24和48 h取血淋巴,应用流式细胞术测定血细胞的总数(THC)、活性氧(ROS)含量、一氧化氮(NO)含量以及凋亡率。结果显示,经0.5 mg/L硫化物胁迫48 h后,对虾 THC 显著下降至 11.78×10^6 个/mL,为对照组的72.7% ($P < 0.05$), ROS 含量为对照组的225.2% ($P < 0.05$),血细胞凋亡率显著上升至7.42% ($P < 0.05$);经2.0 mg/L硫化物胁迫6 h开始,对虾 THC 呈现显著的下降($P < 0.05$),血细胞 ROS 含量和凋亡率显著提高($P < 0.05$);表明硫化物胁迫刺激对虾血细胞产生大量 ROS,诱导血细胞凋亡,从而导致 THC 下降,这一过程可能是硫化物导致虾类细胞免疫下降的重要机制;随着硫化物浓度的升高,其细胞毒性作用明显提高。血细胞 NO 含量在2.0 mg/L硫化物胁迫12和48 h时显著升高($P < 0.05$),推测 NO 可能在硫化物胁迫防御调控中起着信号因子的作用。

关键词: 硫化物;血细胞;凋亡;凡纳滨对虾

中图分类号: X503.225 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2017)03-0097-06

硫化物是水产养殖中常见的水体污染物之一。养殖池塘中的硫化物主要有2个来源:一是硫酸盐在硫酸盐还原菌的作用下异化还原而形成;二是水产动物的代谢物、残饵等有机质中的含硫氨基酸被微生物分解利用而产生的。硫化物对水产动物具有较强的毒性,其毒性研究主要还集中在急性致死浓度上,多种虾类的硫化物半致死浓度已有研究报道,如日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) (管越强等, 2011)、斑节对虾(*Penaeus monodon*) (杨世平等, 2014)、日本对虾(*Penaeus japonicus*)和克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) (於叶兵等, 2011)。研究表明,较低浓度的硫化物胁迫也会抑制虾类的免疫力 (Cheng et al, 2007; Hsu et al, 2007; 管越强等, 2011; 余静等, 2011; 许燕等, 2014)、干扰正常的呼吸和能量代谢 (管越强等, 2009),对虾类的养殖

产生不利影响;张吕平等(2008)研究了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)集约化养殖过程中的水质变化,认为 $H_2S \geq 0.1$ mg/L 时会引发凡纳滨对虾大量死亡或病害流行。

血细胞在虾类免疫过程中发挥重要作用,但硫化物对血细胞的毒性影响机制仍不明确。因此本研究应用流式细胞术(FCM)从细胞水平上分析水体硫化物胁迫对凡纳滨对虾血细胞的毒性影响,以期探讨硫化物对虾类的细胞毒性机制,为进一步研究如何提高虾类抗硫化物胁迫能力以及虾类养殖过程中的硫化物防控提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

凡纳滨对虾购自广东省广州市番禺区某养殖场。对虾平均体重为 (8.32 ± 0.72) g,在实验室环境条件下进行驯养,养殖用水为稀释海水,盐度20, pH 7.9~8.0,温度22~24℃,一直保持曝气,并进行循环过滤。驯养1周后,选取健康无病患、附肢完整、处于蜕皮间期的对虾进行实验。

SYBR Green I, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), DAF-FM DA 购自 Sigma 公司, Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自 Invitrogen 公司,其它试剂为国产分析纯。

收稿日期:2016-04-07

基金项目:国家自然科学基金(31500326);广东省自然科学基金(2014A030310185);广东省普通高校青年创新人才项目(2014KQNCX056);广东省普通高校特色创新项目(2015KTSCX019);中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630052016011和1630052016021)。

作者简介:汪蕾,1986年生,女,讲师,主要从事水产养殖生态及毒理学研究。E-mail: wanglei@scau.edu.cn

通信作者:冼健安,1983年生,男,助理研究员。E-mail: xian-ja@163.com

1.2 硫化物胁迫

以硫化钠作为硫化物来源,配制硫浓度为1 g/L的硫化钠溶液,用于调节水体硫化物浓度。根据参考文献(Hsu et al, 2007),设置硫化物胁迫浓度为0.5 mg/L和2.0 mg/L,不添加组为对照组,硫化物浓度采用亚甲基蓝分光光度法进行测定,实测浓度分别为 (0.46 ± 0.04) mg/L和 (1.94 ± 0.08) mg/L。每组设3个平行,每个养殖桶(直径70 cm的塑料圆桶)加入盐度20的水180 L,放养对虾20尾。为保证硫化物浓度恒定,根据实际测定的浓度每6 h换水1次,换水量约为50%。分别在胁迫的0、6、12、24、48 h进行取样。

1.3 血细胞悬液的制备

用2.5 mL一次性注射器吸取300 L预冷的抗凝剂(葡萄糖20.5 g/L,柠檬酸钠8 g/L,氯化钠4.2 g/L,pH 7.5)。从虾的围心腔抽取等量的血淋巴,加4倍预冷的抗凝剂调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL。

1.4 流式细胞仪

所用流式细胞仪为美国BD公司的FACSCalibur,应用CellQuest软件(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)进行实验数据的获取和分析。用绿色荧光通道(第一荧光通道,FL1)获取SYBR Green I、DCF、DAF-FM和FITC的荧光数据;通过橙黄色荧光通道(第二荧光通道,FL2)获取PI的荧光数据。

1.5 血细胞总数

血细胞总数(Total haemocyte count, THC)根据先前的实验方法进行测定。取血细胞悬液200 μ L,加入终浓度为 $10 \times$ 的SYBR Green I,室温避光孵育60 min,经200目筛网过滤后上机,每个样品上样1 min,根据划定的完整细胞区域分析记录完整细胞的个数,每个样品读取3次。根据仪器上样速度和公式计算THC(洗健安等,2015)。

1.6 活性氧含量

以DCFH-DA为标记探针检测活性氧(Reactive oxygen species, ROS)含量的变化(洗健安等,2012a)。取血细胞悬液200 μ L,加入终浓度为10 μ mol/L DCFH-DA,混匀后室温避光孵育30 min,经200目筛网过滤后上机检测。每个样品的细胞获取数为10 000个。结果以DCF荧光量(FL1)为横坐标、细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示,分析细胞的DCF平均荧光量,DCF荧光量与胞内ROS含量成正比。

1.7 一氧化氮含量

以DAF-FM DA为标记探针检测一氧化氮(NO)含量的变化(Xian et al, 2013)。取血细胞悬液200 μ L,加入终浓度为10 μ mol/L的DAF-FM DA,混匀后室温避光孵育60 min,经200目筛网过滤后上机检测。每个样品的细胞获取数为10 000个。结果以DAF-FM荧光量(FL1)为横坐标、细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示,分析细胞的DAF-FM平均荧光量,DAF-FM荧光量与胞内NO含量成正比。

1.8 血细胞凋亡率

采用Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒检测血细胞的凋亡率(洗健安等,2013)。血淋巴取出后,进行离心然后重悬于1x Annexin V结合缓冲液中,调整细胞浓度约 3×10^6 个/mL,每100 μ L血细胞悬液加入5 μ L Annexin V-FITC和10 μ L PI工作液,避光染色15 min,再加入400 μ L 1x Annexin V结合缓冲液,200目筛网过滤后立即上机检测,每个样品的细胞获取数为10 000个。结果以Annexin V-FITC荧光强度(FL1)为横坐标,PI荧光强度(FL2)为纵坐标的散点图显示。

用十字门划分各类细胞的区域:活细胞(Annexin V-FITC-/PI-)位于左下象限,前期凋亡细胞(Annexin V-FITC+/PI-)位于右下象限,后期凋亡细胞和死细胞(Annexin V-FITC+/PI+)位于右上象限,分析各象限细胞占总细胞数的比例。细胞总凋亡和死亡率为前期凋亡、后期凋亡和死亡细胞(右下+右上象限)所占的比例。

1.9 统计分析

实验结果显示为平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)。实验数据利用SPSS 19.0进行统计单因素方差分析(One-Way ANOVA),设定 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 血细胞总数

血细胞总数结果如图1所示。初始THC为 $(15.93 \pm 1.20) \times 10^6$ 个/mL,经0.5 mg/L硫化物胁迫48 h后,对虾THC为 $(11.78 \pm 1.24) \times 10^6$ 个/mL,呈现显著下降($P < 0.05$),为对照组的72.7%;经2.0 mg/L硫化物胁迫6 h开始,对虾THC呈现显著下降($P < 0.05$),在胁迫12 h时达到最低值 $(10.25 \pm 1.42) \times 10^6$ 个/mL,为对照组的66.3%,随后有一定的回升,在48 h时为对照组的77.5%。

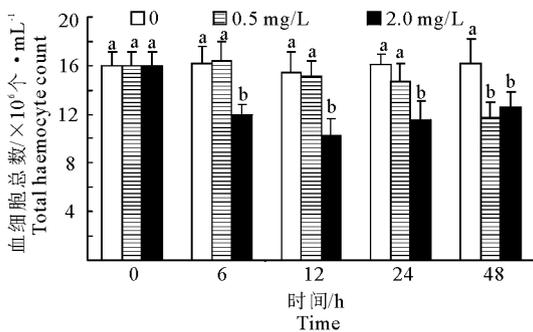


图 1 凡纳滨对虾经不同浓度硫化物胁迫后的血细胞总数 ($n=6$)

Fig. 1 Total haemocyte count of *L. vannamei* after exposure to different doses of sulfide

2.2 ROS 含量

血细胞胞内 ROS 含量变化如图 2 所示。经 0.5 mg/L 硫化物胁迫 48 h 后, ROS 含量显著升高至对照组的 225.2% ($P < 0.05$); 2.0 mg/L 硫化物胁迫组, 对虾血细胞 ROS 含量在 6 h 开始显著提高 ($P < 0.05$), 在 12 h 时达到最大值, 为对照组的 335.3%, 在 48 h 时略有下降, 但仍显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

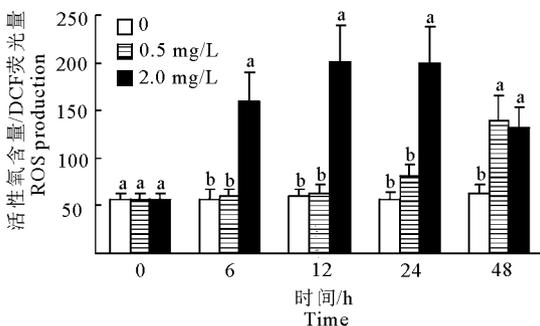


图 2 凡纳滨对虾经不同浓度硫化物胁迫后的血细胞活性氧含量 ($n=6$)

Fig. 2 ROS production in haemocytes of *L. vannamei* after exposure to different doses of sulfide

2.3 NO 含量

血细胞胞内 NO 含量变化如图 3 所示。0.5 mg/L 硫化物胁迫对血细胞 NO 含量没有显著的影响 ($P > 0.05$); 2.0 mg/L 硫化物胁迫组中, 对虾血细胞 NO 含量分别在 12 h 和 48 h 有显著提高 ($P < 0.05$), 分别达到对照组的 140.3% 和 134.8%。

2.4 血细胞凋亡率

血细胞凋亡率变化如图 4 所示。对照组凋亡率在 3.36% ~ 4.34%, 0.5 mg/L 硫化物胁迫组对虾的血细胞凋亡率在 48 h 显著上升至 7.42% ($P < 0.05$); 2.0 mg/L 硫化物胁迫组血细胞凋亡率

在 6 h 开始有显著上升, 在 24 h 时达到最高值, 为 9.55% ($P < 0.05$)。

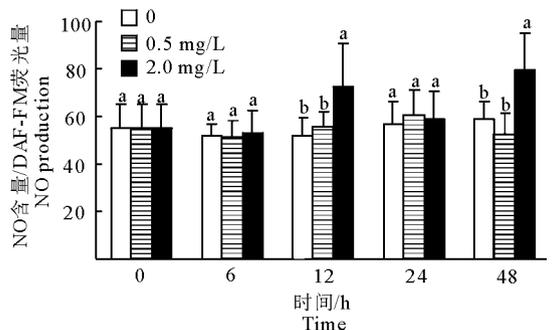


图 3 凡纳滨对虾经不同浓度硫化物胁迫后的血细胞一氧化氮含量 ($n=6$)

Fig. 3 NO production in haemocytes of *L. vannamei* after exposure to different doses of sulfide

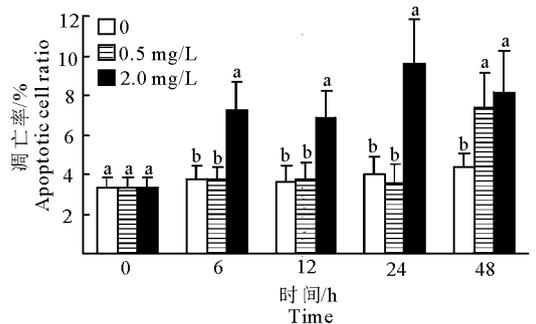


图 4 凡纳滨对虾经不同浓度硫化物胁迫后的血细胞凋亡率 ($n=6$)

Fig. 4 Apoptotic haemocyte ratio of *L. vannamei* after exposure to different doses of sulfide

3 讨论

3.1 硫化物对虾类的毒性影响

养殖池塘中的硫分为无机硫和有机硫, 硫酸盐和硫化物是无机硫的主要形式, 硫化物的含量虽然不足总硫含量的 1%, 但却是总硫中毒性最强的 (冯奇飞等, 2014)。多种虾类的硫化物半致死浓度已有报道, 硫化物对克氏原螯虾幼虾的 24 h LC₅₀ 为 12.96 mg/L (於叶兵等, 2011), 对斑节对虾 (盐度 20) 为 11.3 mg/L (杨世平等, 2014), 对日本沼虾为 22.5 mg/L (管越强等, 2011)。我国渔业水质标准 (GB/T11607-1989) 规定, 硫化物含量在水中应低于 0.2 mg/L, 虽然半致死浓度远高于该标准规定的浓度, 但研究表明较低浓度的硫化物也会对虾类产生毒害作用, 包括抑制生长、造成免疫力下降和代谢紊乱等 (Cheng et al, 2007; Hsu et al, 2007; 管越强等, 2009; 许燕等, 2014)。

血细胞在虾类的细胞免疫和体液免疫过程中均

发挥重要作用 (Johansson et al, 2000), 但由于技术手段缺乏等原因, 针对环境胁迫细胞毒性机制的研究仍不够深入, 一般仅以显微技术分析 THC 和吞噬活力的变化。虾类的循环血细胞密度容易受到环境胁迫 (Lorenzon et al, 2001) 或病原体感染 (Li et al, 2008) 的影响, 因此常以 THC 作为虾类免疫水平的重要指标。

一般认为 THC 呈现显著下降是虾类免疫力下降的一种体现。以往的研究表明, 各类环境因子胁迫均会导致虾类 THC 下降, 如低温 (Li et al, 2014)、重金属 (Lorenzon et al, 2001)、亚硝酸盐 (Xian et al, 2011) 等, 在硫化物胁迫的研究中也有报道 (Cheng et al, 2007; Hsu et al, 2007; 管越强等, 2011)。本研究应用 FCM 测定的结果与以往的研究结果一致, 表明硫化物胁迫作用下, 对虾的免疫力受到了抑制; 毒性作用呈现出明显的剂量效应, 硫化物浓度较低 (0.5 mg/L) 时, 在胁迫 48 h 才呈现 THC 下降; 而浓度达到 2.0 mg/L 时, 对虾 THC 在胁迫后 6 h 即显著下降。

3.2 硫化物产生细胞毒性的机制

研究认为, 氧化胁迫是环境胁迫的普遍毒性作用机理之一, 这在亚硝酸盐 (Xian et al, 2011)、 Cd^{2+} (洗健安等, 2012b)、 Cu^{2+} (Xian et al, 2010) 等胁迫研究中已得到了证实。凡纳滨对虾、日本囊对虾和日本沼虾的相关研究结果均显示, 硫化物胁迫可诱导虾体 SOD 活力的提高 (Cheng et al, 2007; Hsu et al, 2007; 管越强等, 2011), 这些结果也表明硫化物胁迫对虾体的氧化平衡产生影响, 可能对虾体造成了氧化胁迫。为证实这一推论, 本研究应用 FCM 测定了血细胞胞内 ROS 含量的变化, 结果显示经 2.0 mg/L 硫化物胁迫 12 h 后, 胞内 ROS 含量达到了对照组的 335.3%, 表明硫化物胁迫诱导血细胞产生大量 ROS, 对血细胞造成氧化胁迫作用。硫化物对 ROS 含量的影响也呈现明显的浓度效应, 即低浓度时 (0.5 mg/L), ROS 含量在胁迫 48 h 后呈现显著提高; 高浓度 (2.0 mg/L) 时, ROS 含量在胁迫 6 h 就显著提高。

活性氮 (RNS) 与 ROS 相似, 也是具有高度氧化性的自由基, 虽然它们在机体抗菌防御中发挥重要作用, 但过量时会对机体自身造成氧化损伤。一些研究显示, 环境胁迫也会诱导 NO 的大量产生, 对机体造成氧化胁迫威胁 (郭慧等, 2015)。本研究也测定了硫化物胁迫下对虾血细胞胞内 NO 含量的变化, 结果显示 NO 含量仅在 2.0 mg/L 胁迫浓度下才

有显著提高, 且相对 ROS 而言, 提高程度较少, 最高时仅为对照组的 140.3%; 而 0.5 mg/L 低浓度硫化物胁迫对 NO 含量未造成显著影响。这些结果表明在硫化物胁迫作用下, ROS 是主要造成虾体氧化损伤的自由基。NO 的另一重要作用是作为机体内重要的信号因子, 因此推测少量提高的 NO 可能只是作为信号因子, 在抗硫化物胁迫调控过程中发挥作用, 其具体作用仍有待进一步的研究。

ROS 被认为是诱导细胞发生凋亡的重要因素之一 (Orrenius, 2007)。本研究结果显示, 经不同浓度硫化物胁迫后, 对虾血细胞凋亡率呈现不同程度的提高, 其变化规律基本与 ROS 含量的变化规律相吻合, 表明硫化物胁迫诱导血细胞产生过量的 ROS, 造成氧化胁迫, 从而诱导了血细胞发生凋亡。在时间和浓度效应上, 凋亡率与 THC 的变化也存在明显的关联性, 2.0 mg/L 胁迫浓度下, 凋亡率在 6 h 开始显著提高, 此时 THC 也开始显著下降; 0.5 mg/L 浓度下, 凋亡率在 48 h 开始显著提高, THC 也在此时呈现显著降低, 表明 THC 的下降是由于血细胞凋亡率的上升。细胞凋亡不同于细胞坏死, 它是为维持内环境稳定而自发的有序的死亡, 在机体去除不需要的或异常的细胞中起着重要作用 (Elmore, 2007); 因此推测在硫化物胁迫下发生的血细胞凋亡, 可能是机体为了清除被氧化损伤的血细胞而自发的一种保护性调节策略。

诱导氧化胁迫和细胞凋亡的现象在其它一些环境胁迫研究中也有发现。镉离子胁迫诱导河南华溪蟹 (*Sinopotamon henanense*) 鳃组织中 H_2O_2 的大量产生, 导致鳃组织脂质过氧化程度以及凋亡率显著提高 (Wang et al, 2013)。急性酸性胁迫诱导罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 血细胞产生大量 ROS, 导致血细胞 DNA 损伤并诱导发生凋亡 (Mai et al, 2010)。本研究结果也显示, 硫化物胁迫诱导虾血细胞产生大量 ROS, 血细胞凋亡率上升, THC 显著下降, 表明诱导氧化胁迫继而导致血细胞凋亡及数量下降可能是硫化物对虾类血细胞产生细胞毒性的重要机制之一。由此可见, 即使在较低的浓度下, 硫化物也会对虾类血细胞产生毒性影响, 抑制其细胞免疫功能, 导致机体免疫力下降, 这一影响具有明显的剂量和时间效应; 随着养殖时间的延长, 硫化物浓度也逐渐升高 (甘居利等, 2005), 可能成为疾病爆发的重要隐患; 硫化物与氨氮等其它污染物还存在毒性叠加作用 (吴进锋等, 2006)。因此, 此类现象在水产养殖过程中不容忽视。

- 参考文献**
- 冯奇飞, 臧维玲, 戴习林, 等, 2014. 罗氏沼虾养殖塘底质硫化物含量及其与其他因子关系的研究[J]. 广东农业科学, (12): 175 - 188.
- 甘居利, 林钦, 李卓佳, 等, 2005. 斑节对虾节水型养殖期间虾池硫化物含量的变化特征[J]. 台湾海峡, 24(1): 83 - 89.
- 管越强, 王慧春, 李利, 2009. 硫化物胁迫对日本沼虾呼吸代谢和能量代谢酶的影响[J]. 生态环境学报, 18(6): 2017 - 2022.
- 管越强, 裴素蕊, 李泽健, 2011. 急性硫化物胁迫对日本沼虾免疫和抗氧化系统的影响[J]. 水生态学杂志, 32(6): 89 - 94.
- 郭慧, 洗健安, 王安利, 2015. 亚硝酸盐对凡纳滨对虾血细胞毒性及 p53 基因表达的影响[J]. 水生态学杂志, 36(2): 61 - 67.
- 吴进锋, 陈素文, 陈利雄, 等, 2006. 硫化物和氨对西施舌幼贝的毒性影响研究[J]. 热带海洋学报, 25(1): 42 - 46.
- 洗健安, 苟妮娜, 陈晓丹, 等, 2012a. 流式细胞术检测虾类血细胞活性氧含量方法的建立[J]. 海洋科学, 36(2): 29 - 33.
- 洗健安, 王安利, 苗玉涛, 等, 2012b. 镉对凡纳滨对虾离体血细胞的毒性影响[J]. 水生态学杂志, 33(1): 112 - 115.
- 洗健安, 苗玉涛, 叶超霞, 等, 2013. 饲料铜含量对亚硝酸盐胁迫下斑节对虾血细胞的影响[J]. 水生态学杂志, 34(5): 71 - 75.
- 洗健安, 张秀霞, 郭慧, 等, 2015. 应用流式细胞术检测虾类血细胞总数方法的建立[J]. 水生态学杂志, 36(3): 89 - 94.
- 许燕, 余静, 王芳, 等, 2014. 酵母细胞壁多糖和硫化氢对罗氏沼虾 3 种免疫酶活性的影响[J]. 水生生物学报, 38(2): 382 - 385.
- 杨世平, 阮德雄, 陈兆明, 等, 2014. 不同盐度条件下硫化物对斑节对虾的毒性试验[J]. 安徽农业科学, 42(15): 4673 - 4675.
- 余静, 许燕, 王芳, 2011. 硫化氢对罗氏沼虾 4 种组织中 POD、PPO 酶活力的影响[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 40(5): 546 - 550.
- 於叶兵, 陆伟, 黄金田, 等, 2011. 亚硝酸盐和硫化物对克氏原螯虾幼虾的毒性效应研究[J]. 水生态学杂志, 32(1): 111 - 114.
- 张吕平, 胡超群, 沈琪, 等, 2008. 集约化养殖凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的水质监测指标及合理放养密度[A]. 第六届世界华人虾蟹类养殖研讨会论文摘要集[C].
- immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 16 - 26.
- Elmore S, 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death [J]. *Toxicologic Pathology*, 35: 495 - 516.
- Hsu S W, Chen J C, 2007. The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress [J]. *Aquaculture*, 271: 61 - 69.
- Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, et al, 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis [J]. *Aquaculture*, 191: 45 - 52.
- Li B, Xian J A, Guo H, et al, 2014. Effect of temperature decrease on hemocyte apoptosis of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture International*, 22: 761 - 774.
- Li C C, Yeh S T, Chen J C, 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 853 - 860.
- Lorenzon S, Francese M, Smith V J, et al, 2001. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaeomonetes elegans* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 11: 459 - 472.
- Mai W J, Yan J L, Wang L, et al, 2010. Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells [J]. *Aquatic Toxicology*, 100: 271 - 281.
- Orrenius S, 2007. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death [J]. *Drug Metabolism Reviews*, 39: 443 - 455.
- Wang J, Zhang P, Shen Q, et al, 2013. The effects of cadmium exposure on the oxidative state and cell death in the gill of freshwater crab *Sinopotamon henanensis* [J]. *Plos ONE*, 8(5): 1 - 9.
- Xian J A, Wang A L, Ye C X, et al, 2010. Phagocytic activity, respiratory burst, cytoplasmic free-Ca²⁺ concentration and apoptotic cell ratio of haemocytes from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* under acute copper stress [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 152: 182 - 188.
- Xian J A, Wang A L, Chen X D, et al, 2011. Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis [J]. *Aquaculture*, 317: 240 - 244.
- Xian J A, Guo H, Li B, et al, 2013. Measurement of intracellular nitric oxide (NO) production in shrimp haemocytes by flow cytometry [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 35: 2032 - 2039.
- Cheng S Y, Hsu S W, Chen J C, 2007. Effect of sulfide on the

Toxic Effects of Sulfide on Haemocytes of *Litopenaeus vannamei*

WANG Lei¹, ZHANG Xiu-xia², XIAN Jian-an²

(1. Institute of Pharmaceutical Research, South China Normal University, Guangzhou 510631, P. R. China;

2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, P. R. China)

Abstract: Sulfide is one of the common water pollutants in shrimp farming ponds and is highly toxic to shrimp. In this study we investigated the effects of sulfide toxicity on the haemocytes of shrimp and discussed the toxic mechanism, aiming to provide a theoretical basis for preventing and controlling sulfide pollution in shrimp farms. *Litopenaeus vannamei* (8.32 ± 0.72) g, commonly known as white shrimp, were acclimated for a week at $22 - 24^\circ\text{C}$, pH 7.9 - 8.0 and salinity of 20 g/kg. Healthy shrimp were then randomly selected for different sulfide exposures (0, 0.5 and 2.0 mg/L), with 20 shrimp per group and each group in triplicate. After exposure, in shrimp breeding barrels, for 6, 12, 24 and 48 h, the total haemocyte count (THC), reactive oxygen species (ROS) production, NO production and apoptotic cell ratio of haemocytes were determined using flow cytometry (FCM). The THC of the shrimp was initially $(159.3 \pm 12.0) \times 10^5$ cells/mL and the count decreased significantly to 117.8×10^5 cells/mL after 48 h exposure to 0.5 mg/L sulfide (72.7% of the control group, $P < 0.05$). The shrimp THC also decreased significantly after 6 hr at 2.0 mg/L, reaching the minimum value after 12 h (66.3% of the control group) and then increasing slowly to 77.5% of the control group after 48 h. After 48 hr at 0.5 mg/L sulfide, ROS production in the haemocytes was 225.2% that of the control ($P < 0.05$) and ROS production at 2.0 mg/L sulfide treatment increased significantly ($P < 0.05$) after 6 h, increasing to the maximum value after 12 h (335.3% of the control). No significant change was observed in NO at 0.5 mg/L sulfide, but NO did increase significantly ($P < 0.05$) after exposure to 2.0 mg/L sulfide for 12 (140.3% of control) and 48 h (134.8% of control). The apoptosis rate of haemocytes in the control group was 3.36% - 4.34%, rose to 7.42% ($P < 0.05$) after 48 h at 0.5 mg/L sulfide, and was highest at 9.55% ($P < 0.05$) after 24 hr at 2.0 mg/L sulfide. These results indicate that sulfide exposure causes an overproduction of ROS and increases the rate of apoptosis in haemocytes, reducing the THC and consequently affecting the immune function of *L. vannamei*. This mechanism is likely responsible for the observed decline in shrimp immune function associated with sulfide toxicity and there is a clear dose-response relationship.

Key words: sulfide; haemocyte; apoptosis; *Litopenaeus vannamei*