

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20170604001

杨宗英, 杨移斌, 张一柳, 等. 阿维菌素对中华绒螯蟹肝胰腺氧化胁迫效应和组织结构的影响[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(4): 337-347

Yang Z Y, Yang Y B, Zhang Y L, et al. Effects of avermectin exposure on oxidative stress and histological structure of hepatopancreas in *Eriocheir sinensis* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(4): 337-347 (in Chinese)

阿维菌素对中华绒螯蟹肝胰腺氧化胁迫效应和组织结构的影响

杨宗英^{2,3}, 杨移斌⁴, 张一柳², 胡鲲², 曾柳根³, 刘力硕², 闫子君², 杨先乐^{2, #}, 常藕琴^{1, *}

1. 农业部渔用药物创制重点实验室, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380

2. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306

3. 南昌市农业科学院, 南昌 330038

4. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223

收稿日期: 2017-06-04 录用日期: 2017-07-31

摘要: 采用半静态染毒法, 研究不同浓度(1.6、8.0、16.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)阿维菌素在胁迫中华绒螯蟹 12、24、48、96 h 时肝胰腺超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)积累量等氧化胁迫相关指标的变化; 并在胁迫 60 d 时, 记录各实验组和对照组中华绒螯蟹肝胰腺颜色的变化并进行组织病理观察。3 个阿维菌素浓度组为实验组, 空白组和溶剂组为对照组。结果表明在整个实验过程中空白组和溶剂组各个时间点各项指标之间无显著差异($P>0.05$); 低浓度(1.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组 SOD 和 CAT 活力变化不显著($P>0.05$); 中浓度(8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组 SOD 和 CAT 活力变化趋势一致, 持续被诱导, SOD 活力在 24 h 以后显著高于空白组($P<0.01$), CAT 活力在 48 h 以后显著高于空白组($P<0.01$); 高浓度(16.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组 SOD 和 CAT 活力在 12 h~24 h 之间变化趋势一致, 表现为显著升高($P<0.05$), 但是在 48 h 之后, SOD 活力显著下降($P<0.05$); 96 h 时, 高浓度组 SOD 活力显著低于空白组($P<0.01$), 而 CAT 活力显著高于空白组($P<0.01$); 在整个实验过程中各实验组 MDA 积累量逐渐增加, 高浓度组氧化胁迫指标的变化幅度大于低浓度组。胁迫 60 d 时, 取样观察可见对照组中华绒螯蟹肝胰腺正常, 各实验组中华绒螯蟹肝胰腺发生了不同程度的病变, 肝胰腺颜色由最开始的橘黄色变成了淡黄色、黄白色甚至白色, 高、中、低各浓度组肝胰腺白化所占的比例分别是 66.6%、57.1% 和 25.0%。组织病理分析显示, 淡黄色肝胰腺的病理变化主要是 B 细胞数量减少, 肝胰腺上皮细胞部分肿大并出现空泡; 黄白肝病理观察可见肝胰腺上皮细胞中空泡数量增多, 体积增大, 且空泡内出现内容物, 细胞核固缩; 白肝的病理表现主要是基膜增厚, 上皮细胞大量脱落, 散落在管腔中, 空泡数量进一步增多, 肝胰腺的生理功能受损。由此得出, 阿维菌素会对中华绒螯蟹肝胰腺造成氧化胁迫和组织损伤, 且阿维菌素和对肝胰腺的氧化胁迫效应和组织结构损伤程度有一定的剂量-效应关系。

关键词: 阿维菌素; 中华绒螯蟹; 氧化胁迫指标; 肝胰腺组织结构

文章编号: 1673-5897(2017)4-337-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Avermectin Exposure on Oxidative Stress and Histological Structure of Hepatopancreas in *Eriocheir sinensis*

Yang Zongying^{2,3}, Yang Yibin⁴, Zhang Yiliu², Hu Kun², Zeng Liugen³, Liu Lishuo², Yan Zijun²,

基金项目: 农业部渔用药物创制重点实验室开放课题资助

作者简介: 杨宗英(1988-), 女, 博士研究生, 研究方向为水产动物免疫学与病害控制, E-mail: lxyangzongying@163.com;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: changouqin@163.com;

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: xlyang@shou.edu.cn

Yang Xianle^{2, #}, Chang Ouqin^{1, *}

1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province; Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China

2. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3. Nanchang Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330038, China

4. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Received 04 June 2017 accepted 31 July 2017

Abstract: An acute semi-static toxic test was carried out to study the modulation of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde content (MDA), which was the main product of lipid peroxidation, at 12, 24, 48 and 96 h in hepatopancreas when *Eriocheir sinensis* was exposed to different avermectin concentrations including 1.6, 8.0 and 16.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Histological structure and color variations of hepatopancreas were observed on day 60 in test group, blank group and vehicle group, respectively. Three different avermectin concentration groups were test groups, and blank group and vehicle group were control groups. Results were as follows: (1) The three indicators had no significant differences at different time in both vehicle group and blank group, and vehicle group also had no obvious differences from blank group. SOD and CAT activities at the concentration of 1.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ also had no significant differences from control groups ($P>0.05$). The activities of SOD and CAT showed the similar variation in 8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ group, and they were induced continuously throughout the experiment. SOD activity increased extremely significantly compared with blank group ($P<0.01$) after 24 h, and CAT activity was extremely significantly higher than blank group after 48 h ($P<0.01$). SOD and CAT activities were all induced between 12 h and 24 h at the concentration of 16.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, but SOD activity decreased significantly after 48 h ($P<0.05$). At 96 h, the activity of SOD was extremely lower than blank group. However, CAT activity was still extremely significantly higher than blank group ($P<0.01$). MDA levels of test groups gradually increased along with the increase of stress time of avermectin, and the oxidative stress indicators of low avermectin concentration group varied less than that of high concentration group. (2) Histological structure and color of hepatopancreas were affected at different degrees at different avermectin concentrations for 60 days. The hepatopancreas of *E. sinensis* of control groups was normal, but hepatopancreas of test groups changed from orange red to light yellow, yellowish-white or stark white. The percentage of white hepatopancreas of 16.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 1.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ groups was 66.6%, 57.1% and 25.0%, respectively. Histopathological analysis revealed the different pathological lesions of hepatopancreas of different colors. The number of B cells of hepatopancreas was decreased, and some hepatic cells were swelling and had cavity in hepatopancreas of light yellow. When the color of hepatopancreas changed to yellowish-white, the degree of deterioration of hepatopancreas aggravated. The number and volume of vacuoles increased, some contents were present in the vacuoles, and nucleus were pyknotic. In the white hepatopancreas, the basement membrane became thicker, some hepatic cells were crushing and many cell debris appeared in the lumen, many vacuoles existed between the basement membrane and epithelial cells, and the physiological function of hepatopancreas was impaired. The results indicated that avermectin could result in oxidative stress and tissue damage in hepatopancreas of *E. sinensis*, and the oxidative stress effects and the degree of pathological lesions had a dose-effect relationship with avermectin.

Keywords: avermectin; *Eriocheir sinensis*; oxidative stress indicators; hepatopancreas structure

阿维菌素(avermectins, AVMS)又叫阿佛曼菌素,是一种大环内脂类化合物^[1-2]。1976年阿维菌素最先在日本静冈县伊东市川奈地区的土壤中被发现^[3],随后发现阿维菌素具有驱虫活性,且是阿维链

霉菌的自然发酵产物^[4-5]。研究表明,阿维菌素由于具有高脂溶性和广谱高效杀虫的特点^[2],且对哺乳动物低毒,对植物无毒^[6],已广泛应用于农业和畜牧业中。近年来,阿维菌素已成为应用最多的抗寄生

虫药之一^[7-8],目前阿维菌素也被广泛应用于水产养殖中。阿维菌素可以用来治疗草鱼、青鱼、鲫、鲤因三代虫、锚头蚤、指环虫等引起的病症^[9-11]。阿维菌素虽然对哺乳动物和鸟类低毒,对植物无毒,但是对鱼类和虾蟹类则毒性较高^[12-13],阿维菌素的大量使用过程中很容易造成水生生物中毒^[14]。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)又称河蟹、毛蟹、清水蟹、大闸蟹,因其味道鲜美而深受人们喜爱,是一种重要的淡水养殖动物。我国的中华绒螯蟹养殖模式在不断地改善和发展,养殖产量也在逐年上升,统计资料显示,2009年全国中华绒螯蟹养殖面积达1 449.28万亩,养殖总产值达320亿元^[15]。随着中华绒螯蟹养殖产业的发展,中华绒螯蟹的质量和安全性问题也越来越受到人们的关注,由于在中华绒螯蟹养殖中,阿维菌素常被用来控制蟹塘中的轮虫、枝角类及挠足类等浮游动物^[16],极易造成阿维菌素污染养殖水源。目前关于阿维菌素对中华绒螯蟹的影响研究主要集中于急性毒性^[17-18]和富集消除规律^[19]等方面,而关于不同剂量阿维菌素长期暴露对中华绒螯蟹的生理生化及组织结构的影响尚未见报道。

超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)是甲壳动物抗氧化系统的关键酶,SOD催化 $\cdot O_2$ 生成 H_2O_2 ,CAT催化 H_2O_2 生产 O_2 和 H_2O ,防止体内过多的活性氧造成氧化损伤^[20],MDA是脂质过氧化的产物,能引起蛋白质分子交联,造成细胞损伤^[21],SOD、CAT和MDA是反映机体氧化胁迫状况的重要指标。同时,肝胰腺是中华绒螯蟹及其他甲壳动物重要的消化和解毒器官,其组织结构的变化可在一定程度上反映生物体对外界环境的适应性改变^[22]。

本文选择不同的药物浓度对中华绒螯蟹进行毒害胁迫,研究亚致死浓度下阿维菌素对其抗氧化胁迫指标及肝胰腺组织结构的影响,为中华绒螯蟹的健康养殖和疾病防控提供参考。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 试验动物

中华绒螯蟹幼蟹取自江苏省兴化市安丰镇某养殖场,体重为 (5.4 ± 0.68) g,在室内暂养一周,在中华绒螯蟹死亡率低于5%且稳定时,挑选健康、附肢健全、规格相对一致的幼蟹进行试验。试验用水为充分曝气的自来水,水温为 $22 \sim 23$ °C,pH为 7.25 ± 0.15 。

1.2 试验药物和器材

药品:阿维菌素,B1含量99%,购自湖北鸿运隆生物科技有限公司,用丙酮配制为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母

液;冰醋酸(分析纯)、二甲苯(分析纯)、无水乙醇(分析纯)、苦味酸(分析纯)均购买于上海国药集团;蜡块、苏木精、伊红均购买于上海生工生物工程有限公司;SOD、CAT、MDA和考马斯亮蓝总蛋白试剂盒均购买于南京建成生物工程研究所。

仪器:冷冻离心机(BECKMAN COULTER Aggl-15R)、紫外分光光度计(普析通用T6-新世纪)、组织匀浆机(高信化玻)、组织切片机(LEICA RM2135)、Olympus显微镜(OLYMPUS BX51)。

1.3 试验方法

1.3.1 暴露试验

选择90 L的水族箱,放水20 L,各箱中按照生产推荐用量以及推荐用量的5倍和10倍,即 $1.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $8.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $16.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 设置实验浓度。各箱中放入中华绒螯蟹幼蟹30只,试验期间,投喂中华绒螯蟹全价配合饲料,每天饲喂2次,同时每天各水族箱换水一半并补足原药物的浓度,同时设置丙酮溶剂组(CK)和空白组作为对照组,溶剂组中丙酮含量与对应的实验组相同,每组设置3个平行。

1.3.2 氧化胁迫相关指标的测定

各组在胁迫中华绒螯蟹12、24、48、96 h之后,从各组中任意取5只中华绒螯蟹,冰冻麻醉之后,迅速采取肝胰腺,用预冷的生理盐水制成10%的匀浆液。

肝胰腺中SOD、CAT和MDA的测定严格按照南京建成试剂盒使用说明书操作。SOD的测定采用黄嘌呤氧化酶法,定义为每毫克组织蛋白在1 mL反应液中SOD抑制率达到50%时所对应的数值为一个活力单位(U),单位为 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ pro}$;CAT的测定采用240 nm紫外分光光度法,定义为每克组织蛋白中CAT每秒钟分解吸光度为0.5~0.55的底物中过氧化氢相对量为一个活力单位,单位为 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ pro}$;MDA的测定采用硫代巴比妥酸法,MDA可与硫代巴比妥酸缩合,形成红色产物,在532 nm处有最大吸收峰,单位为 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ pro}$;蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法,单位为 $\text{mg pro} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.3.3 肝胰腺组织切片的制备

在阿维菌素胁迫60 d时分别观察并记录各组中华绒螯蟹肝胰腺的颜色变化,迅速取出不同病变程度的肝胰腺,Bouin氏液固定24 h,固定样品经70%、80%、95%、100%梯度酒精脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋。使用手摇式切片机切片(厚度约5 μm),H.E(苏木精-伊红)染色,Olympus显微镜观察、拍片。

1.4 数据处理

试验所得数据用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示;采用 Microsoft Office Excel 2007 和 SPSS 17.0 进行统计计算并进行单因素方差分析(one-way ANOVA),氧化胁迫生理指标均为 5 个样品的平均值,运用 Duncan's 多重比较对均值进行差异显著性检验,显著水平设为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 。

2 结果 (Results)

2.1 中华绒螯蟹阿维菌素中毒症状

在整个实验过程中未出现中华绒螯蟹死亡,根据文献可知,本实验所选取的 3 个阿维菌素浓度均是幼蟹的亚致死浓度^[17-18]。试验中发现,浓度 $8.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组在整个实验过程中,中华绒螯蟹未出现明显的异常现象,浓度 $16.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,刚开始把中华绒螯蟹放入药液时,即出现爬箱壁爬气石试图逃出水族箱的行为;接下来的几个小时,中华绒螯蟹逐渐适应所生存的水体环境。在试验后期,浓度 $16.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组部分中华绒螯蟹出现中毒症状,主要表现在吃食量减少,趴在箱底,身体失去平衡;随着毒害时间的延长,中华绒螯蟹开始出现肌肉抽搐,附肢僵硬、张开,甚至附肢脱落,并出现明显的抱团和相互攻击的打架行为。

2.2 阿维菌素对中华绒螯蟹肝胰腺 SOD 活力的影响

不同浓度阿维菌素胁迫下,中华绒螯蟹肝胰腺的 SOD 活力如图 1 所示,低浓度($1.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组在整个试验过程中,SOD 活力变化不大且和空白组差异不显著;中浓度($8.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组 SOD 活力持续被诱

导;高浓度($16.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组 SOD 活力表现出先被诱导后被抑制的变化趋势。在整个试验过程中空白组、溶剂组和低浓度($1.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组的 SOD 活力变化不显著($P>0.05$),且 3 组之间的差异不显著($P>0.05$)。阿维菌素胁迫 12 h 时,3 个浓度组均出现了 SOD 活力升高,但仅高浓度组 SOD 活力显著高于空白组($P<0.05$),其余 2 组与空白组相比无明显差异;12 h 之后,除低浓度($1.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组以外,中浓度($8.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组和高浓度($16.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组的 SOD 活力出现了迅速上升,且显著高于空白组($P<0.01$);24 h 时,中浓度组和高浓度组的 SOD 活力比空白组升高了 44.07% 和 72.88%;24 h 以后中浓度组 SOD 活力继续上升($P<0.01$),48 h 时,中浓度组 SOD 活力是空白组的 1.53 倍,高浓度组的 SOD 活力下降到和空白组差异不显著;48 h 后,中浓度组 SOD 活力继续升高,高浓度组 SOD 活力继续受到抑制,一直持续到 96 h,中浓度组仍然显著高于空白组($P<0.01$),高浓度组 SOD 活力显著低于空白组($P<0.01$)。

2.3 阿维菌素对中华绒螯蟹肝胰腺 CAT 活力的影响

不同浓度阿维菌素胁迫下,中华绒螯蟹肝胰腺 CAT 活力变化见图 2,各时间点溶剂组和空白组的 CAT 活力无明显变化($P>0.05$),溶剂组和空白组的 CAT 活力相比差异不显著($P>0.05$),说明溶剂对中华绒螯蟹的肝胰腺 CAT 活力影响不大。整个实验过程中,除低浓度组 CAT 活力变化不大以外,中浓度组和高浓度组 CAT 活力均表现被诱导的现象。阿维菌素胁迫 12 h 时,各浓度组 CAT 活力均出现升高,其中高浓度组显著高于空白组($P<0.01$);胁迫

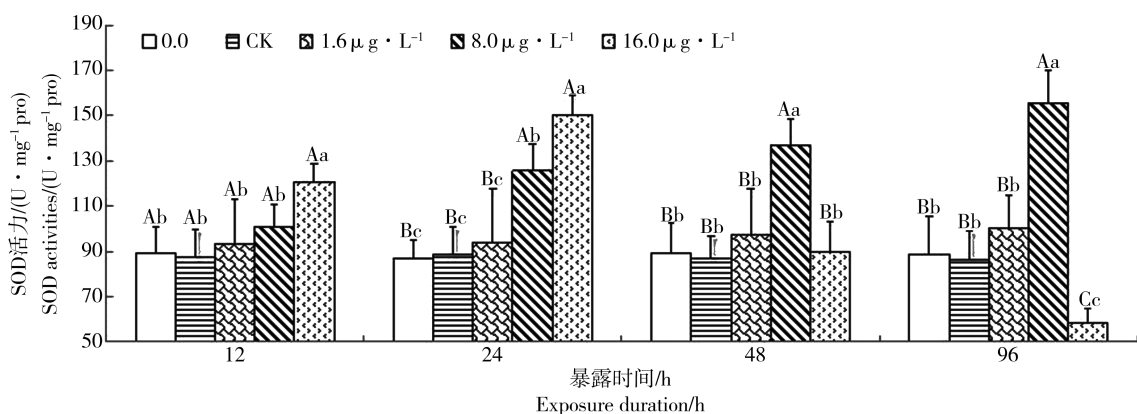


图1 阿维菌素对中华绒螯蟹肝胰腺 SOD 酶活力的影响

注:不同大写字母表示组间差异显著($P<0.01$);不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$);相同字母表示组间差异不显著(下同)。

Fig. 1 Effects of avermectin on SOD activities in hepatopancreas in *E. sinensis*

Note: Different capital letters indicate significant difference between groups at 0.01 level; different small letters mean significant differences between groups at 0.05 level; the same letters indicate no significant difference between groups. The same below.

24 h 时,3 个浓度组的 CAT 的活力继续被诱导,但是仍然只有高浓度组的 CAT 活力显著高于空白组 ($P<0.01$),其他 2 组的 CAT 活力也高于空白组,但是差异不显著 ($P>0.05$);48 h 时 CAT 活力继续升高,中浓度组和高浓度组的 CAT 活力分别比空白组升高了 18.84% 和 24.17%;48 h 到 96 h 之间,各浓度组的 CAT 活力出现持续性升高,96 h 时,中浓度组和高浓度组 CAT 活力均显著高于空白组 ($P<0.01$),且高浓度组也显著高于中浓度组 ($P<0.01$)。

2.4 阿维菌素对中华绒螯蟹肝胰腺 MDA 含量的影响

不同浓度阿维菌素胁迫导致的中华绒螯蟹肝胰腺中 MDA 含量的变化如图 3 所示,整个实验过程,各浓度组的 MDA 均高于空白组和溶剂组,溶剂组和空白组在各个时间点的 MDA 变化不显著,且溶剂组和空白组的 MDA 含量差异不明显 ($P>0.05$),说明溶剂对中华绒螯蟹肝胰腺中的 MDA 含量无显著影响。阿维菌素胁迫 12 h 后,各个浓度组的 MDA

含量和空白组差异不显著 ($P>0.05$);24 h 时,低浓度组和空白组差异不显著,但是中浓度组显著高于空白组 ($P<0.05$),高浓度组 MDA 含量显著高于空白组 ($P<0.01$);48 h 时,各浓度组 MDA 含量均显著高于空白组,中浓度组和高浓度组显著高于空白组 ($P<0.01$),分别是空白组的 1.84 倍和 2.35 倍;从 48 h 到 96 h,各浓度组 MDA 含量继续增加,均显著高于空白组 ($P<0.01$)。

2.5 各组中华绒螯蟹肝胰腺发生病变的比例

在饲养 60 d 以后,统计分析空白组、溶剂组和 3 个阿维菌素实验组中华绒螯蟹肝胰腺病变所占的比例(表 1)(为 3 个平行组的平均值)。溶剂组和空白组中,中华绒螯蟹肝胰腺正常,肝胰腺仍然呈现橘黄色(图 4-1),3 个阿维菌素浓度组中,中华绒螯蟹肝胰腺分别出现了不同程度的病变,橘黄色肝胰腺变为淡黄色(图 4-2)、黄白色(图 4-3)甚至是完全白色(图 4-4)。其中低浓度组的病变肝胰腺主要呈现为淡黄肝

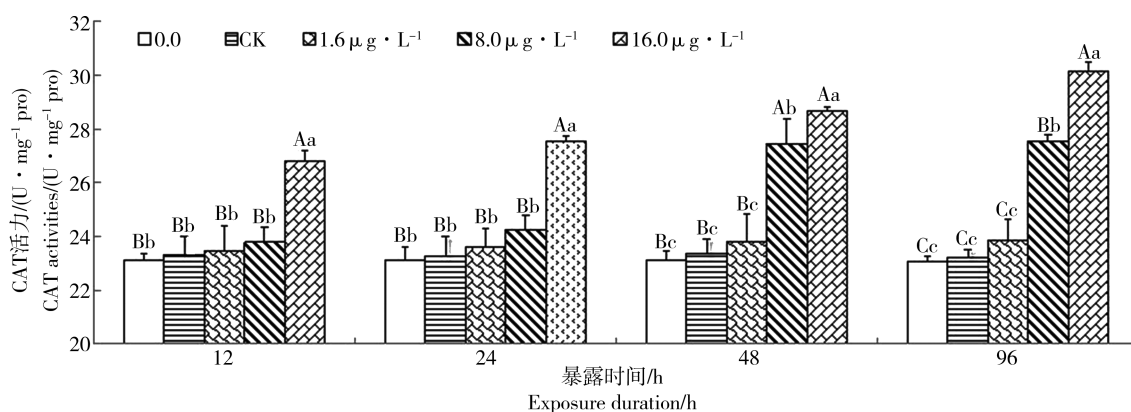


图2 阿维菌素对中华绒螯蟹肝胰腺 CAT 酶活力的影响

Fig. 2 Effects of avermectin on CAT activities in hepatopancreas in *E. sinensis*

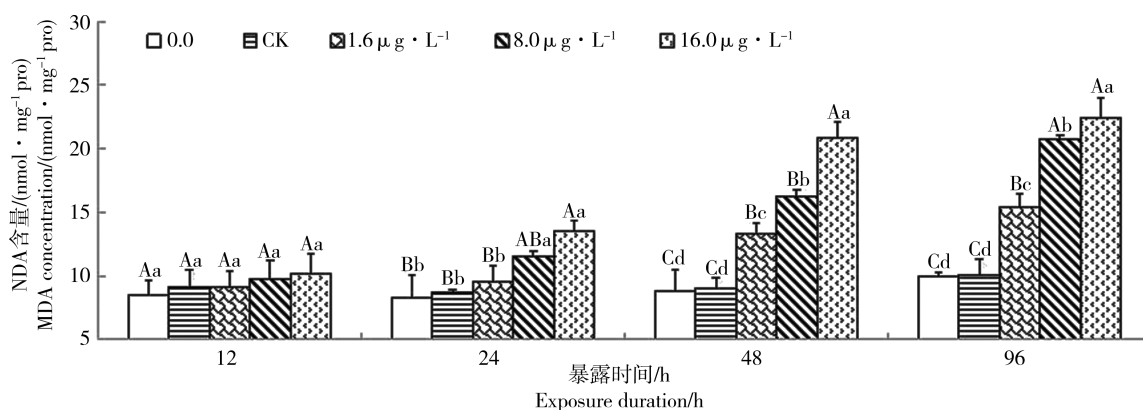


图3 阿维菌素对中华绒螯蟹肝胰腺 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effects of avermectin on MDA concentration in hepatopancreas in *E. sinensis*

和黄白肝,中浓度和高浓度的病变肝胰腺主要呈现为白肝,且高浓度组的白肝比例高于中浓度组和低浓度组。阿维菌素对中华绒螯蟹的作用有一定的剂量-效应关系。

2.6 阿维菌素对中华绒螯蟹肝胰腺组织结构的影响
组织切片观察发现空白组中华绒螯蟹的肝小管结构正常,上皮细胞排列整齐,极少有空泡出现(图

5-1)。淡黄色肝胰腺的单层柱状上皮细胞肿大,B细胞数量减少,柱状上皮细胞细胞质中出现空泡(图 5-2);花白肝胰腺组织病理观察可见上皮细胞中的空泡数量增多,空泡中出现颗粒物质(图 5-3);白肝的肝胰腺基膜增厚,且基膜与单层柱状上皮细胞之间形成大量的空泡,上皮细胞大量脱落,细胞核固缩(图 5-4)。



图 4 阿维菌素胁迫对中华绒螯蟹肝胰腺颜色的影响

注:箭头所示为中华绒螯蟹肝胰腺;1. 正常蟹的肝胰腺为橘黄色;2. 肝胰腺病变呈现淡黄色;3. 肝胰腺病变呈现黄白色;4. 肝胰腺病变呈现白色。

Fig. 4 Effects of avermectin exposure on the color of hepatopancreas in *E. sinensis*

Note: Hepatopancreas were indicated by arrows. 1. The healthy hepatopancreas showed orange in color; 2.the color of hepatopancreas turned into light yellow; 3. the color of hepatopancreas turned into yellowish-white ; 4. the color of hepatopancreas turned into white.

表 1 不同阿维菌素浓度组中中华绒螯蟹不同肝胰腺病变所占的比例

Table 1 The percentage of different lesion degrees of hepatopancreas of *E. sinensis* exposed to different avermectin concentrations

阿维菌素浓度 Avermectin concentration	比例/% Percentage/%		
	淡黄肝	黄白肝	白肝
	Light yellow hepatopancreas	Yellowish-white hepatopancreas	White hepatopancreas
0.0	0.0	0.0	0.0
CK	0.0	0.0	0.0
1.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	37.5	37.5	25.0
8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	14.3	28.6	57.1
16.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10.1	23.3	66.6

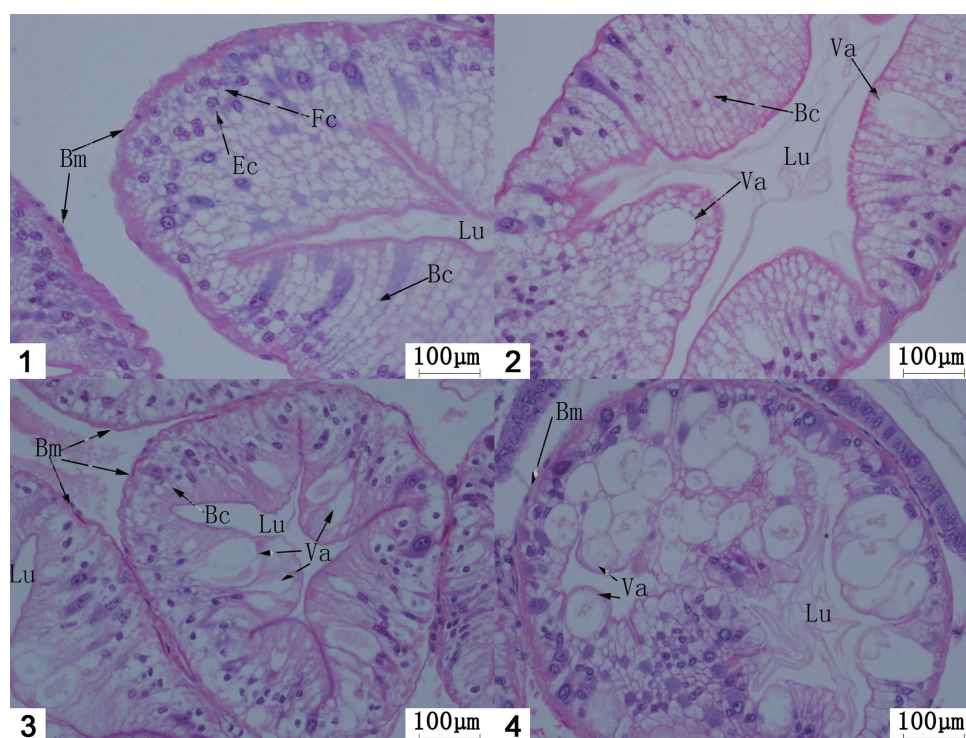


图5 阿维菌素胁迫对中华绒螯蟹肝胰腺组织结构的影响

注:1. 正常肝小管,肝细胞排列整齐,管腔(Lu)清晰,核圆形位于基底部,示 Bm(基膜)、Bc(分泌细胞)、Fc(吸收细胞)、Ec 细胞(胚细胞);×400;2. 淡黄色肝胰腺,肝细胞肿大并部分空泡样变性,细胞核固缩,示空泡(Va)、管腔(Lu)、基膜(Bm);×400;3. 黄白色肝胰腺,空泡数量增多,体积增大,空泡中出现内容物;×400;4. 白色肝胰腺,基膜增厚,基膜和单层柱状上皮细胞之间出现大量的空泡,上皮细胞大量脱落,散入管腔,细胞核固缩;×400。

Fig. 5 Effects of avermectin on histological structure of hepatopancreas in *E. Sinensis* in different colors

Note: 1. Control group, normal hepatic lobule; hepatopancreas cells arranged well; lumen (Lu) was clear; nuclear circle located at base; the arrows point to the basement membrane (Bm), B cells (Bc), F cells (Fc), E cells (Ec); ×400. 2. Hepatopancreas showed light yellow in color; some hepatic cells were swelling and had cavity; nucleus were pyknotic; the arrows point to vacuole (Va), lumen (Lu), basement membrane (Bm); ×400. 3. Hepatopancreas showed yellowish-white in color, enlarged size and increased number of vacuoles; some contents appeared in the vacuoles; ×400. 4. Hepatopancreas showed white in color; the basement membrane became thicker; many vacuoles appeared between basement membrane and epithelial cells, many epithelial cells fell off; nucleus were pyknotic; ×400.

3 讨论 (Discussion)

3.1 阿维菌素对中华绒螯蟹的毒性机理

根据 WHO 的标准,阿维菌素因具有神经毒性和发育毒性而被归为高毒化合物^[23]。阿维菌素的神经毒性主要表现在阿维菌素可以作用于谷氨酸门控 Cl⁻ 和 GABA 受体,阿维菌素通过作用于谷氨酸门控氯离子通道和 GABA 门控氯离子通道,增强了氯离子的通透性,引起氯离子通道长时间开启,氯离子大量内流,阻断了神经和肌肉之间的信号传递,引起生物体行动失衡,附肢麻痹,吃食量减少,最终死亡^[4, 24]。在本实验后期,中华绒螯蟹幼蟹表现出的附肢僵硬、吃食量减少等中毒症状和阿维菌素的毒

性作用机制相符。

3.2 阿维菌素对中华绒螯蟹氧化胁迫指标的影响

甲壳动物具有非特异性免疫,其主要由血细胞及血细胞被激发释放出的酚氧化酶、溶菌酶和抗氧化酶等多种免疫因子组成^[25],其中 SOD 和 CAT 是机体抗氧化系统的关键酶,MDA 是脂质过氧化的代谢产物,这 3 个指标的变化能反映机体受氧化损伤程度。

本试验中,在 3 个不同浓度阿维菌素药液胁迫 12 h 之后,各实验组 SOD 和 CAT 的活力均升高,肝胰腺中的 MDA 含量升高,且高浓度组的变化幅度要大于中、低浓度组,说明了阿维菌素对中华绒螯蟹

造成了氧化损伤,且阿维菌素与肝胰腺中的 SOD 和 CAT 活性具有一定的剂量-效应关系,在 24 h 时, SOD 和 CAT 活力继续被诱导且变化趋势一致,说明进入蟹体的阿维菌素对中华绒螯蟹产生了应激反应,蟹体为了消除毒物的影响,应急诱导产生 SOD 和 CAT,但是尽管如此,机体的 MDA 含量继续升高,说明虽然蟹体应急提高了 SOD 和 CAT 的活力,但是机体仍然处于脂质过氧化状态。在 48 h 到 96 h 之间, CAT 活力和 MDA 含量继续升高,但是高浓度组的 SOD 活力开始下降,说明 SOD 已不能及时去除由阿维菌素胁迫产生活性氧自由基,大量的活性氧自由基反过来抑制了 SOD 的活力^[21]。

陈家长等^[26-27]在研究阿维菌素对鲤鱼肝脏 SOD 和 CAT 的活性影响时发现,低浓度组 SOD 活力变化不显著,中浓度组显著上升,高浓度组 SOD 活力显著下降; CAT 活力总体表现为低浓度诱导,高浓度先诱导后抑制。本文的研究结果与之不同可能和阿维菌素胁迫的对象以及阿维菌素对不同生物的毒性高低不同有关。研究表明, SOD 的活力变化和 CAT 活力变化往往呈正相关关系^[28-29],但是本研究中发现阿维菌素胁迫 48 h 之内, SOD 活力和 CAT 活力变化一致,均表现被诱导,但是在 48 h 到 96 h 之间,高浓度组 SOD 活力受到抑制, CAT 活力则继续升高,与 Ma 等^[23]的研究结果一致,这样的变化一方面是因为过量的活性氧抑制了 SOD 活性,另一方面可能是因为 O_2 的歧化反应, CAT 可以催化 H_2O_2 生产 O_2 和 H_2O , O_2 和 H_2O 也可以反过来生成 H_2O_2 , 并且细胞色素 P450 酶系是重要的异物代谢酶,阿维菌素也可以通过 P450 的氧化产生 H_2O_2 , 从而大量的 H_2O_2 继续诱导 CAT 的活力升高^[30]。

3.3 阿维菌素对中华绒螯蟹肝胰腺颜色的影响

甲壳动物的体色主要取决于类胡萝卜素的含量,虾青素是体表色素中主要的类胡萝卜素^[31],虾青素本身呈现红色,在与蛋白质结合后生产蓝色虾青素蛋白沉积于甲壳动物体表,从而使甲壳动物体色呈现出淡蓝色到深灰色不等的体色,在对虾的体表色素中,虾青素含量可达到 86%~98%^[32]。与虾青素不同, β -胡萝卜素主要储存在甲壳动物的脂肪组织中,其本身的颜色因浓度的差异,可涵盖由橘红至黄色的所有色系,在肝胰腺中, β -胡萝卜素所占的比例高达 42%~90%^[33],正因为 β -胡萝卜素的含量不同,致使甲壳动物的肝胰腺也呈现不同程度的黄色。

本研究中发现,随着阿维菌素胁迫时间的延长,

中华绒螯蟹出现肝胰腺颜色由橘红色变成淡黄色,最终变为白色,甲壳颜色加深等症状,分析主要由以下 3 个方面因素决定的。首先,虾青素和 β -类胡萝卜素均属于类胡萝卜素,而甲壳动物缺少相关的酶系,不能自身合成类胡萝卜素,必须从食物中获得,从而将类胡萝卜素直接沉积或者转化为自身所需要的类胡萝卜素种类^[34-35],而阿维菌素胁迫的中华绒螯蟹在后期吃食量减少,限制了食物中类胡萝卜素的摄入;另一个方面,虾青素和 β -类胡萝卜素是重要的单线态氧淬灭剂^[36-37],具有抗氧化活性,其中虾青素的单线态氧淬灭能力是 α -生育酚的 100 倍^[38], β -胡萝卜素的单线态氧淬灭能力是 α -生育酚的 50 倍^[39-40],阿维菌素胁迫可引起中华绒螯蟹氧化应激,虾青素和 β -类胡萝卜素很可能最先被动用清除体内的活性氧自由基,从而引起类胡萝卜素的含量减少,体色和脏器颜色发生改变。常国亮等^[41]在研究中华绒螯蟹肝胰腺白化症时发现,中华绒螯蟹肝胰腺的颜色变化和抗应激能力有很大的关系。还有一点就是类胡萝卜素是脂溶性的,不饱和脂肪酸的含量越高越有利于类胡萝卜素的吸收和沉积^[42],研究表明阿维菌素等杀虫药主要通过和细胞膜的膜蛋白和脂质结合,引起脂质过氧化,影响蛋白质、脂质和色素的合成过程,从而引起细胞膜脂蛋白和色素组成成分的改变,导致细胞膜结构和功能的改变,同时脂质的过氧化也使细胞膜脂肪酸的不饱和度降低,吸收和沉积类胡萝卜素的能力也随之降低^[43]。

3.4 阿维菌素对中华绒螯蟹肝胰腺组织结构的影响

中华绒螯蟹肝胰腺和其他十足目甲壳动物^[44]一样,是甲壳动物重要的消化免疫器官,主要由 4 种细胞组成,分别是 B 细胞(分泌细胞)、E 细胞(胚细胞)、F 细胞(吸收细胞)和 R 细胞(储存细胞)。动物肝胰腺的组织结构变化常常可以反映异物的毒性大小,毒物的毒性越大,中华绒螯蟹肝胰腺结构受到破坏的程度越高^[45]。

本研究中发现在 3 个不同浓度的阿维菌素药液胁迫下,中华绒螯蟹的肝胰腺结构受到了不同程度的破坏,3 个浓度中中华绒螯蟹肝胰腺均出现了肝胰腺颜色变淡甚至是完全白化的症状,其中高浓度组肝胰腺颜色变淡和白化的比例高于中浓度和低浓度组,并且随着肝胰腺颜色变淡,中华绒螯蟹的肝胰腺受损越严重。主要的病理变化主要是肝胰腺上皮细胞出现大面积空泡,空泡内出现内容物,基膜增厚,细胞核固缩, B 细胞数量减少,这些组织病理变

化与虹鳟受到阿维菌素胁迫^[46],中华绒螯蟹受到全氟辛酸磺酸盐胁迫^[47]和小龙虾受到黄曲霉素胁迫^[48]时表现出的症状相似,推测肝胰腺上皮细胞空泡中出现的颗粒物可能含有阿维菌素或阿维菌素的代谢物,空泡可将这些毒物排除体外,起到解毒的作用。在阿维菌素胁迫下,中华绒螯蟹肝胰腺基膜的增厚是机体在受到胁迫时产生的胶原纤维和黑色素引起的,这些物质可抑制病原体的几丁质酶和胞外蛋白酶的活性,从而抑制或杀死病原体,是动物的一种自我防御^[49]。

阿维菌素胁迫导致肝胰腺B细胞数量减少和中华绒螯蟹受到全氟辛酸磺酸盐胁迫^[45]和氨氮胁迫^[50]的结果一致。研究表明甲壳动物肝胰腺中的细胞比例在环境胁迫下会发生变化^[51],且B细胞是由F细胞分化而来^[52],在分化过程中存在一种P-糖蛋白,这种P-糖蛋白可以消除某些化合物的毒性^[53]。在阿维菌素长期胁迫下,中华绒螯蟹的肝胰腺B细胞数量减少,可能是因为中华绒螯蟹动用了肝胰腺中的P-糖蛋白进行解毒,从而阻碍了F细胞向B细胞转化的过程,最终使B细胞数量减少,但是这种P-糖蛋白是否真的可以解除阿维菌素的毒性有待进一步的研究。

致谢:感谢农业部渔用药物创制重点实验室,广东省水产动物免疫技术重点实验室,中国水产科学研究院珠江水产研究所对本课题的资助。

通讯作者简介:常藕琴(1972—),女,硕士学位,副研究员,主要研究方向为水产动物疾病防治。

共同通讯作者简介:杨先乐(1948—),男,学士学位,教授,主要研究方向为水产生物免疫学与病害控制。

参考文献(References):

- [1] Fisher M H, Mrozik H. Chemistry [M]//Campbell W C. Ivermectin and Abamectin. New York: Springer Verlag, 1989: 1-23
- [2] Roth M, Richards R H, Sommerville C. Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: A review [J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 16(1): 1-26
- [3] Lasota J A, Dybas R A. Avermectins, a novel class of compounds: Implications for use in arthropod pest control [J]. Annual Review of Entomology, 1991, 36(1): 91
- [4] Kwon D H, Yoon K S, Clark J M, et al. A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch [J]. Insect Molecular Biology, 2010, 19(4): 583
- [5] Hüter O F. Use of natural products in the crop protection industry [J]. Phytochemistry Reviews, 2011, 10(2): 185-194
- [6] Halley B A, Vanden Heuvel W J A, Wislocki P G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock [J]. Veterinary Parasitology, 1993, 48: 109-125
- [7] Lankas G R, Gordon L R, Campbell W C. Ivermectin and Abamectin [M]//Campbell W C. Ivermectin and Abamectin. New York: Springer Verlag, 1989: 113-130
- [8] Kovecses J. Avermectins: Potential environmental risks and impacts on freshwater ecosystems in Quebec [J]. Fibers & Polymers, 2002, 11(3): 455-463
- [9] 农业部《新编渔药手册》编撰委员会. 新编渔药手册 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 521-527
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. New Fish Medicine Handbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 521-527 (in Chinese)
- [10] 周帅. 水产养殖用阿维菌素水乳剂的研制与应用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2009: 1-10
Zhou S. Development and application of abamectin emulsion in water [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2009: 1-10 (in Chinese)
- [11] 吴秀云. 阿维菌素在贝类养殖中杀灭线虫效果的初步观察[J]. 中国水产, 2009(7): 58-59
Wu X Y. Preliminary observation of deratization effect of nematode of abamectin in shellfish culture [J]. China Fisheries, 2009(7): 58-59 (in Chinese)
- [12] Tatjana T, Nevenka K. Abamectin in the aquatic environment [J]. Ecotoxicology, 2006, 15(6): 495-502
- [13] Mccracken D I. The potential for avermectins to affect wildlife [J]. Veterinary Parasitology, 1993, 48(1-4): 273-280
- [14] Courtney C H, Roberson E L. Antinematodal Drugs, Chemotherapy of Parasitic Diseases [M]//Adams H R. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 6th ed. Ames: Iowa State University Press, 1995: 916-932
- [15] 周刚, 宋长太. 河蟹健康养殖百问百答[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 1-20
Zhou G, Song C T. Bai Wen Bai Da of *Eriocheir sinensis* Healthy Breeding [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010: 1-20 (in Chinese)
- [16] 马爱彬. 河蟹养殖渔药使用技术[J]. 科学养鱼, 2008(1): 50-51
Ma A B. Technology for the use of fish drugs in the culture of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Scientific

- ic Fish Farming, 2008(1): 50-51 (in Chinese)
- [17] 王锡珍, 陆宏达. 阿维菌素对几种淡水水生动物的急性毒性作用[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(7): 593-597
Wang X Z, Lu H D. Acute toxic effect of abamectin on fresh-water aquatic animals [J]. Journal of Environment and Health, 2009, 26(7): 593-597 (in Chinese)
- [18] 李赫, 宋文华, 李文宽, 等. 三种常用农药对中华绒螯蟹幼蟹的急性毒性研究[J]. 水产学杂志, 2013(6): 44-47
Li H, Song W H, Li W K, et al. Acute toxicity of three pesticides to juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2013(6): 44-47 (in Chinese)
- [19] 张卫卫. 阿维菌素在养殖水环境中的归趋研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014: 32-41
Zhang W W. Fate of avermectin in aquaculture environment [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014: 32-41 (in Chinese)
- [20] Halliwell B, Gutteridge J M C. Free Radicals in Biology and Medicine [M]. New York: Oxford University Press, 1999: 72
- [21] Papadimitriou E, Loumbourdis N S. Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: Impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2002, 69(6): 885-891
- [22] Papathanassiou E, King P E. Effects of starvation on the fine structure of the hepatopancreas in the common prawn *Palaemon serratus*, (pennant) [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part A Physiology, 1984, 77(2): 243-249
- [23] Ma J, Zhou C, Li Y, et al. Biochemical responses to the toxicity of the biocide abamectin on the freshwater snail *Physa acuta* [J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2014, 101(1): 31-35
- [24] Arena J P, Liu K K, Paress P S, et al. Expression of a glutamate-activated chloride current in *Xenopus* oocytes injected with *Caenorhabditis elegans* RNA: Evidence for modulation by avermectin [J]. Molecular Brain Research, 1992, 15(3-4): 339-384
- [25] Martin R J, Robertson A P, Wolstenholm A J. Mode of Action of the Macrocyclic Lactones [M]// Vercruysse J, Rew R S (Eds). Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy. Wallingford, United Kingdom: CABI, 2002: 125-162
- [26] 陈家长, 杨光, 马晓燕, 等. 低浓度阿维菌素对鲤鱼超氧化物歧化酶(SOD)的影响[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(6): 823-828
Chen J Z, Yang G, Ma X Y, et al. Effect of low concentration of avermectins on superoxide dismutase (SOD) activities in common carp [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(6): 823-828 (in Chinese)
- [27] 陈家长, 杨光, 孟顺龙, 等. 不同浓度阿维菌素对鲤鱼过氧化氢酶和谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响[J]. 生态学杂志, 2010, 29(4): 680-686
Chen J Z, Yang G, Meng S L, et al. Effects of different concentration avermectin on the catalase and glutathione-S-transferase activities of common carp [J]. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29(4): 680-686 (in Chinese)
- [28] Richardson B J, Mak E, De Luca-Abbott S B, et al. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organo-chlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? [J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 57(6): 503-514
- [29] Wu H, Liu J, Zhang R, et al. Biochemical effects of acute phoxim administration on antioxidant system and acetylcholinesterase in *Oxya chinensis*, (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) [J]. Pesticide Biochemistry & Physiology, 2011, 100(1): 23-26
- [30] Livingstone D R, Archibald S, Chipman J K, et al. Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea [J]. Marine Ecology Progress, 1992, 91(1-3): 97-104
- [31] Cianci M, Rizkallah P J, Olczak A, et al. The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: β - Crustacyanin at 3.2-Å resolution [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(15): 9795-9800
- [32] Okada S, Nur-e-borhan S A, Yamaguchi K. Carotenoid composition in the exoskeleton of commercial black tiger prawns [J]. Fisheries Science, 1994, 60(2): 213-215
- [33] Mahaeajan A, Vaseehran B, Rajalakshmi S, et al. Effect of copper on morphology, weight, and chromosomal aberrations in the spiny lobster, *Panulirus homarus*, (Linnaeus, 1758) [J]. Biological Trace Element Research, 2011, 144(1): 769-780
- [34] Lee S H, Min D B. Effects, quenching mechanisms, and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1990, 38(8): 1630-1634
- [35] Shmidzu N, Goto M, Miki W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms [J]. Fisheries Science, 1996, 62: 134-137
- [36] Paiva S A, Russell R M. β -carotene and other carotenoids as antioxidants [J]. Journal of the American College of Nutrition, 1999, 18(5): 426-433

- [37] Terao J, Oshima S, Ojima F, et al. Carotenoids as Antioxidants [M]// Food and Free Radicals. New York: Springer US, 1997: 21-29
- [38] Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids [J]. Pure & Applied Chemistry, 1991, 63(1): 141-146
- [39] Di M P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1989, 274(2): 532
- [40] Conn P F, Schalch W, Truscott T G. The singlet oxygen and carotenoid interaction [J]. Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology, 1991, 11(1): 41-47
- [41] 常国亮, 成永旭, 吴旭干, 等. 中华绒螯蟹白化症, 正常肝胰腺组织结构及脂肪酸组成的比较研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(5): 687-693
- Chang G L, Cheng Y X, Wu X G, et al. Comparative studies of micro-ultrastructure and fatty acid composition of normal and albino hepatopancreas of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(5): 687-693 (in Chinese)
- [42] Fox H M, Vevers G. The Nature of Animal Colors [M]. London: Sidgwick and Jackson, Ltd., 1960: 62
- [43] Cengiz E I, Kan Y, Kizmaz V, et al. The protective role of vitamin E on the fatty acid composition of phospholipid structure in gill and liver tissues of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 80(2): 381-385
- [44] 吴志强, 姜国良, 李立德. 十足目动物消化系统及消化酶生理研究概况[J]. 海洋科学, 2004, 28(3): 50-54
- Wu Z Q, Jiang G L, Li L D. Study of the digestive system and physiology of decapoda: A review [J]. Marine Science, 2004, 28(3): 50-54 (in Chinese)
- [45] Papathanassiou E, King P E. Effects of starvation on the fine structure of the hepatopancreas in the common prawn *Palaemon serratus*, (pennant) [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part A Physiology, 1984, 77(2): 243-249
- [46] Jencic V, Cerne M, Erzen N K, et al. Abamectin effects on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Ecotoxicology, 2006, 15(3): 249-257
- [47] Zhang F, Wei J, Li Q, et al. Effects of perfluorooctane sulfonate on the immune responses and expression of immune-related genes in Chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis* [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part C Toxicology & Pharmacology, 2015, 172-173: 13-18
- [48] Bautista M N, Lavilla Pitogo C R, Subosa P F, et al. Aflatoxin B1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult *Penaeus monodon* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1994, 65(1): 5-11
- [49] Jiravanichpaisal P, Miyazaki T, Limsuwan C. Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon* [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1994, 6(1): 27-35
- [50] 洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412-418
- Hong M L, Chen L Q, Gu S Z, et al. Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 412-418 (in Chinese)
- [51] 陶易凡, 强俊, 王辉, 等. 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃和肝胰腺酶活力及组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1279-1289
- Tao Y F, Qiang J, Wang H, et al. Acute toxicity of high pH stress and its effect on enzymes activity and histological structure of gill and hepatopancreas in *Procambarus clarkia* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1279-1289 (in Chinese)
- [52] Caceci T, Neck K F, Lewis D D H, et al. Ultrastructure of the hepatopancreas of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) [J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1988, 68(2): 323-337
- [53] Köhler A, Lauritzen B, Jansen D, et al. Detection of P-glycoprotein mediated MDR/MXR in *Carcinus maenas* hepatopancreas by immuno-gold-silver labeling [C]// AGU Fall Meeting. AGU Fall Meeting Abstracts, 1998, 387(99): 175-180