

多醣類 β -1,3-glucan (from *Schizophyllum commune*) 應用於 強化草蝦抵抗白點症病毒之研究

張正芳^{1*}、楊佳宏¹、陳紫嫻¹、蘇茂森²

¹行政院農業委員會水產試驗所 生物技術組

²行政院農業委員會水產試驗所

摘要

本試驗主要針對 WSSV 對草蝦之致病感染機制作進一步研究，探討草蝦受 WSSV 感染後，比較口投與注射多醣類，對強化草蝦抵抗 WSSV 之效果，同時監測蝦血淋巴液中之血淋巴球數目與免疫酵素如酚氧化酵素 (phenoloxidase, PO)、超氧離子 (superoxide anion, O_2^-)、超氧歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD) 等之變化。以添加或未添加多醣 (β -1,3-glucan, 2g kg^{-1} diet) 之試驗飼料餵飼草蝦 ($10.5 \pm 0.5\text{ g}$) 20 天後，進行 WSSV 病毒液注射感染，並在感染前與感染後之第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 天監測血淋巴球數目與免疫酵素之活性。結果顯示，未添加多醣組與多醣注射組分別在感染後第 4 與 5 天內試驗蝦全數死亡，而多醣飼料組試驗蝦之死亡率，在感染後 4 天減緩 ($p < 0.001$)，且試驗結束後，有 25 % 試驗蝦活存。試驗蝦的血淋巴球數目、血淋巴球吞噬作用、血淋巴液中之酚氧化酵素活性、超氧離子與超氧歧化酵素之產生量等，在感染後的第 1-3 天明顯地降低 ($P < 0.001$)；但是多醣飼料組之試驗蝦，在 WSSV 感染後第 5 天後，血淋巴球之數目回升，血淋巴液中之所有免疫酵素也回復正常。顯示投餵含多醣類之飼料，可幫助草蝦增強血淋巴液中免疫酵素之活性，而強化草蝦對 WSSV 之抵抗能力。

關鍵詞：草蝦、多醣類、白點症病毒、超氧離子、超氧歧化酵素。

前言

蝦類白點病由白點症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 所引起，病毒之病原性強、傳播迅速，感染之範圍遍及亞洲各主要養蝦

區，寄主包括草蝦 (*Penaeus monodon*)、斑節蝦 (*P. japonicus* or *Marsupenaeus japonicus*)、熊蝦 (*P. semisulcatus*)、中國對蝦 (*P. chinensis* or *Fenneropenaeus chinensis*)、砂蝦 (*Metapenaeus ensis*)、紅尾蝦 (*P. penicillatus* or *Fenneropenaeus penicillatus*)、淡水長腳大蝦 (*Macrobrachium*

*通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁里 67 號，TEL: (08) 832-4121；FAX: (08)832-0234；e-mail: cfchang@mail.tfrin.gov.tw.

rosenbergii) 等重要養殖蝦種⁽¹⁻⁶⁾。罹病初期，病蝦會沿著池邊淺水區緩慢游行或打轉，在蝦殼及表皮有明顯白點出現，一旦白點病徵出現後，約 3~7 天內即造成池蝦大量死亡。將自然感染的病蝦組織濾液以浸泡或注射方式感染健康蝦，可使蝦體出現白點症狀，造成蝦子死亡⁽⁷⁻¹⁰⁾。WSSV 在進入蝦體後，會快速感染蝦體內各器官組織之上皮細胞，病原毒性強、增殖快，常造成受感染之蝦子突然暴斃。WSSV 之寄主範圍甚廣，可謂所有的十足目，包括蝦類，蟹類，橈腳類都是其攻擊目標與帶原生物。因此，針對有關 WSSV 之生物學特性、致病機制、寄主與載體範圍、傳染途徑以及防疫方法等都是目前世界各國加緊研究的課題。

蝦類之血淋巴球數量在非特異性免疫功能中，扮演非常重要之角色。由血淋巴球之數量與血淋巴球種類之比例，可以推知蝦類之健康情形。蝦類血淋巴球之數量會隨著蝦種、性別與健康情況而變化。藍蝦 (*P. stylirostris*) 在脫殼期間，血淋巴球數量會明顯減少⁽¹¹⁾。而雌性草蝦之血淋巴球數量較雄性者為多⁽¹²⁾。斑節蝦感染白點症病毒之後，血淋巴球數量會減少三分之一，而感染後的第六天，血淋巴球數量下降至 6.4×10^6 cells/ml，酚氧化酵素 (phenoloxidase, PO) 與超氧歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD) 含量，也會隨著血淋巴球的減少而降低，並發生大量死亡⁽¹³⁾。依據 Chang⁽¹⁴⁾ 之研究結果顯示，正常蝦血淋巴球數目約為 $2.0 \sim 4.0 \times 10^7$ cells/ml，而感染 WSSV 後 24 小時血淋巴球數量減少為 4.86×10^6 cells/ml；48 小時後為 3.04×10^5 cells/ml，且試驗蝦開始死亡；72 小時繼續降低為 8.03×10^4 cells/ml，死亡蝦子增多；96 小時降至 6.27×10^3 cells/ml，感染蝦全數死亡。WSSV 感染後 PO 與 SOD 含量也隨著血淋巴球的減少而降低。

Song *et al.*^(15,16) 與 Huang and Song⁽¹⁷⁾ 利用萃取自酵母菌細胞壁的多醣類 (β -1,3-1,

6-glucan)，餵飼草蝦稚蝦或注射草蝦母蝦或浸泡無節幼蟲與後期幼蟲，結果發現均能夠增強草蝦抵抗 WSSV 感染的能力。而 Hennig *et al.*⁽¹³⁾ 與 Itami *et al.*⁽¹⁸⁾ 則發現利用萃取自 *Bifidobacterium thermophilum* 的 peptidoglycan，能夠增強草蝦抵抗 WSSV 感染的能力。Chang *et al.*⁽¹⁹⁾ 也證實口投自 *Schizophyllum commune* 萃取之多醣類 β -1,3-glucan 能有效增強草蝦之蝦苗與稚蝦抵抗 WSSV 的感染。本試驗主要探討草蝦受 WSSV 感染後，口投或注射多醣類，對強化草蝦抵抗 WSSV 之效果，同時監測蝦血淋巴液中之免疫酵素如 PO、超氧離子 (superoxide anion, O_2^-)、SOD 等之變化，及上述各因子間的相關性，建立 WSSV 感染後，蝦體內免疫酵素變化之基本資料，以找出 WSSV 防治的可行方式。

材料與方法

一、試驗飼料之配製與投飼

本試驗之對照組飼料依據 Liao *et al.*⁽²⁰⁾ 之配方調製，作為對照組飼料。另外，以同樣配方添加多醣類 2 g/kg diet，製成粒狀飼料，做為試驗組飼料。其中每 100 g 含有粗蛋白 46 g、粗脂肪 12 g 及灰分 8.5 g。飼料原料均勻混合後，製成 2~5 mm 的小粒，經烘乾後貯存於 -20℃ 冷凍櫃直至餵飼。使用之 β -1,3-glucan 係萃取自 *Schizophyllum commune*，呈微粒狀，由日本台糖株式會社製造。試驗用草蝦為水產試驗所生物技術組自行人工繁殖，於室外水泥池養殖二個月以上，選取體色具光澤、體表無損傷，鰓部清潔及活力佳，體重 10.5 ± 0.5 g 之草蝦。經逢機取樣分為多醣餵飼組與對照組共二組，每組 450 尾蝦。每一組又分為三重覆組，每一重覆各 150 尾蝦置於流水式及打氣設備的 2500 公升圓形 FRP 水槽。每一組之每一重覆組的試驗蝦授予一種試驗飼料 20 天後，進行 WSSV 感染試驗。每天早上餵飼前，抽除所有槽底殘餌及污物。餵飼比例為

蝦體重之 5~7%，一天投餵兩次（09:00 及 17:00），並隨試驗蝦之攝餌情形做適當調整。試驗期間之水溫為 29~31℃、鹽度為 30~32 ppt、pH 為 7.8~8.5。

二、草蝦白點症病毒液的製作

病蝦為養殖時罹患白點病之草蝦，儲存於 -80℃ 超低溫冷凍櫃中。製作病毒液時，將病蝦由超低溫冷凍櫃取出，稍微解凍後，取下其外殼。以 1 公克蝦殼加 9 ml 滅菌海水（32 ppt），均質 10000 rpm、2 分鐘，再以 0.45 μm 濾紙濾除雜質，成為病毒原液，保存於 4℃ 中，一小時內使用。處理過程中均以冰塊保持低溫，以免影響病毒液之病原毒性。正式感染試驗前，需先定量最適感染劑量，將病毒原液以不同的倍數稀釋，分別注射非供試驗之同批草蝦各 10 尾，每尾注射 0.05 ml，根據其結果，計算出 48 小時 LD₅₀ 之感染病毒液稀釋倍數，作為正式感染試驗注射量。

三、聚合酶鏈反應（Polymerase Chain Reaction, PCR）WSSV 檢測

PCR 檢測依據 Lo *et al.*^(4,5) 之方法進行，並利用銳基國際股份有限公司製造之蝦類白點症病毒試劑組檢測。在各項感染試驗進行前，試驗蝦先隨機採樣各 20 尾，進行 PCR WSSV 檢驗，以確定所使用之試驗蝦為未受 WSSV 感染。而在感染試驗時死亡之試驗蝦與感染試驗結束後之活存試驗蝦，也進行 PCR WSSV 檢驗，以確定試驗蝦受 WSSV 感染之情形。

四、WSSV 感染試驗

各組試驗蝦投餵試驗用飼料 20 天後，開始進行 WSSV 感染試驗。多醣飼餵組中每一個重複水槽分別隨機採取 120 尾蝦，其中 40 尾注射含多醣（2 mg/100 g 蝦重）與病毒稀釋混合液共

0.05 ml（Glu+IG+W），40 尾注射病毒稀釋液 0.05 ml（Glu+W）；另外 40 尾為空白組，僅注射生理食鹽水 0.05 ml（Glu-C）。飼餵對照組之試驗蝦的處理方法同上，即 40 尾注射含多醣（2 mg/100 g 蝦重）與病毒稀釋混合液與 0.05 ml（C+IG+W）；40 尾注射病毒稀釋液 0.05 ml（C+W）；40 尾為空白組，注射生理食鹽水 0.05 ml（C-C）。病毒液之調配係以冰存之原病毒液，以生理食鹽水稀釋 20 倍後使用。注射於草蝦腹側第四、五節間之肌肉。注射後，以手指輕按注射部位，防止病毒液流出。

注射後之所有各組試驗蝦，分別放入 FRP 水槽（120×60×70 cm）中，內含 400 公升經沙層過濾之海水，並分別於注射前與後之第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 天，由各組之各水槽隨機取樣三尾試驗蝦，進行血淋巴球之數量、吞噬作用、PO 活性、O₂⁻、SOD 等之測定。各組每隔 8~12 小時觀察一次，每日視蝦活動情形而適量投予對照組飼料，並更換部份飼育水。當試驗蝦死亡時，立即採取泳足放入 1.5 ml 離心管（eppendorff tube），貯存於液態氮中，一週內進行 PCR 分析。

五、草蝦血淋巴球吞噬作用（Phagocytosis）之測定

依據 Itami *et al.*⁽²¹⁾ 之方法，並作小部分修正後使用。先自草蝦第五或第六對步腳中間之腹部動脈，抽出血淋巴液，以甲殼類血淋巴培養液（CM, 350 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 13 mM MgSO₄·7H₂O, 15 mM CaCl₂·2H₂O, 0.4 mM NaH₂PO₄·2H₂O and 1 mM L-glutamine, pH 調整為 7.6，滲透壓為 780±15 mOs kg⁻¹）加入 5 % L-cysteine 作為抗凝血劑，在 1000 rpm、4℃ 下、離心 10 分鐘，收集蝦之血淋巴球。經重複沖洗二次，再以 CM 將血淋巴球稀釋成 1.0×10⁴ cells/ml。另外將螢光乳珠（Latex 1.0, Polysciences, Inc., Tokyo）也用 CM 沖洗數次，

在 1000 rpm、4°C 下、離心 20 分鐘，收集沉澱之螢光乳珠，以 CM 稀釋成 1.0×10^7 beads/ml。將稀釋好之蝦血淋巴球 100 μ l 滴放在蓋玻片（24×24 mm）上靜置，使蝦血淋巴球吸附在蓋玻片上，30 分鐘後以 CM 沖去未附著之蝦血淋巴球，再將螢光乳珠 100 μ l 加於附著之蝦血淋巴球，並在室溫下培養 40 分鐘。接著以 0.125% 之 glutaraldehyde 固定 3 分鐘，用 CM 沖洗 2~3 次。最後在倒立螢光顯微鏡（400X）下，計數血淋巴球內有吞噬螢光乳珠之血淋巴球數量及螢光乳珠被吞噬之數量，以推估血淋巴液中血淋巴球吞噬狀況。血淋巴球之吞噬指數（phagocytic index, PI）之計算方法如下：

$$PI = \left(\frac{\text{具有吞噬螢光乳珠之血淋巴球總數}}{\text{觀察之血淋巴球總數}} \right) \times \left(\frac{\text{被吞噬螢光乳珠之總數}}{\text{觀察之血淋巴球總數}} \right) \times 100$$

六、草蝦血淋巴球之計數 (Total haemocyte count)

蝦血淋巴球數量之計數，依據 Chang *et al.* ⁽¹⁴⁾ 方法，由試驗蝦之腹部動脈抽出血淋巴液 0.1 ml，取 20 μ l 以 phosphate buffered saline (PBS) 稀釋 25 倍，以腺核苷三磷酸分析儀 (ATP Analyzer, AF-100, TOA Electronic Ltd., Tokyo, Japan) 測量 ATP 之濃度。最後由直線相關方程式，計算出血淋巴球之數量。

七、草蝦血淋巴球細胞產生 O_2^- 之定量分析

依據 Song and Hsieh ⁽²²⁾ 之方法，並作小部分修正。先各以 100 μ l 之 poly-L-lysine 溶液 (0.2%, Sigma)，加入 96 槽之平底微量滴定盤，30 分鐘後取出，以增加各槽血淋巴球吸附數量。試驗蝦由腹部動脈抽出血淋巴液，加入經處理過的微量滴定盤，每槽 100 μ l，再加入 100 μ l 之 CM，在 1000 rpm、4°C，離心 5 分鐘，去除上清液後，

加入 0.3 % NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma) 100 μ l，在 37°C 下培養 30 分鐘，再去除上清液加入 100 % Methanol 固定，並以 70 % Methanol 沖洗 2~3 次，風乾後加入 2 M KOH 120 μ l 與 140 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck)，混合均勻後，以 Automatic microplate reader (MRX, Dynex Technologies, Inc., Virginia) 測量 Formazon 在波長 OD₆₃₀ nm 之吸光值。將處理組之吸光值除以未處理組之吸光值後所得之比值，來定量草蝦血球細胞產生 O_2^- 量之增減。

八、草蝦血淋巴液產生 PO 活性之測定

依據 Cardenas and Dankert ⁽²³⁾ 之方法，並作小部分修正。草蝦由腹部動脈抽出血淋巴液，置於 1.5 ml 微量離心管中，每管 100 μ l，加入 500 μ l 之 CM，以超音波細胞粉碎機 (Sonicator, Microson XL-2020, Misonix Inc., NY) 震碎一分鐘後，於 13000 rpm、4°C，離心 30 min。取上層液加入 96 槽之平底微量滴定盤，每槽 50 μ l，再加入含 0.1 % trypsin (Sigma) 之 CM 50 μ l 共同作用 40 分鐘後。加入 50 μ l 之 L-3,4-dihydroxyphenyl alanine (L-DOPA, Sigma) 與 150 μ l 之 CM 混合均勻，作用 30 分鐘後，以 Automatic microplate reader (MRX, Dynex Technologies, Inc., Virginia) 測量在波長 OD₄₉₀ nm 之吸光值。經上述相同步驟後所得處理組與空白組之吸光值比較，以求出各試驗組 PO 之相對值。

九、草蝦血淋巴液產生 SOD 之測定

依據林 ⁽²⁴⁾ 之方法並作經小部分修正後使用。利用 Randox 公司研發之 SOD 試劑 (Ransod, Randox Lab. Ltd., UK) 進行測定。每次測定 SOD 前，均先製作標準曲線。由草蝦抽出之血淋巴液，置於 1.5 ml 微量離心管中，每管 20 μ l，再加入 480 μ l 之 PBS 混和後，以超音波細胞粉碎

機 (Sonicator, Microson XL-2020, Misonix Inc., NY) 震碎一分鐘, 經 13000 rpm、4℃ 下、離心 30 min。取 25 μ l 的上層液加入 850 μ l 的 Mixed substrate 與 125 μ l 的 Xanthine oxidase, 混合後以分光光度計於 37℃ 下, 分別於 30 秒與 3 分 30 秒的時候測波長 OD₅₀₅ nm 的吸光值分別為 A1 與 A2。由上述公式計算即可得樣品的抑制百分比。如抑制百分比未落在 30 %~60 %, 則需對樣品再稀釋或濃縮。樣品抑制百分比可利用標準曲線內插而求出 SOD 的活性。

十、統計分析方法：

各試驗結果, 均以 SAS 套裝軟體作變異數 (ANOVA) 與特奇氏公正顯著差異法 (Tukey's honest significant difference HSD), 測試全部處理組及各組間是否有顯著差異。

結果

一、WSSV 感染試驗

草蝦飼料試驗飼料 20 天後, 以 WSSV 病毒液進行注射感染, 其結果如 Fig. 1。飼料對照組飼料中之 WSSV 感染組 (C+W) 與加強注射多醣組之 WSSV 感染組 (C+IG+W), 二組試驗蝦在注射感染後 2 天, 發生大量死亡, 並分別於感染後第 4 與 5 天內全數死亡。多醣飼料組中之 WSSV 感染組 (Glu+W) 與加強注射多醣組中之 WSSV 感染組 (Glu+IG+W) 試驗蝦, 在感染後 2-3 天內, 死亡率超過 50%。但是第 4 天之後, 死亡情形開始減緩, 試驗結束後, 分別有 25.5 與 28.9 % 試驗蝦活存。試驗期間, 飼料對照組與多醣飼料組飼料中之空白組 (C-C 與 Glu-C), 試驗蝦全部活存。

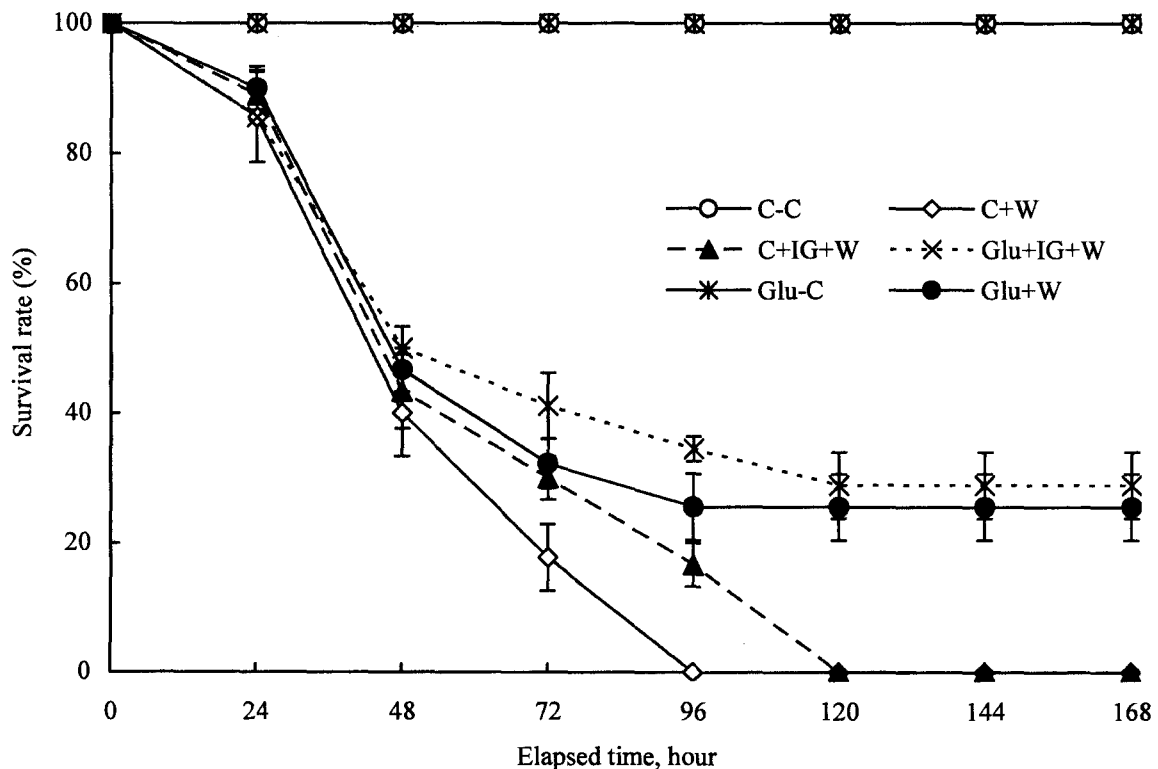


Fig. 1. Survival rates of *Penaeus monodon* fed a diet either containing (treatment) or no (control) β -1,3-glucan for 20 days and then challenged with injection of WSSV solution. C-C: blank control. C+W: control with WSSV challenge. C+IG+W: control with glucan and WSSV injection. Glu-C: treatment control. Glu+W: treatment with WSSV challenge. Glu+IG+W: treatment with glucan and WSSV injection.

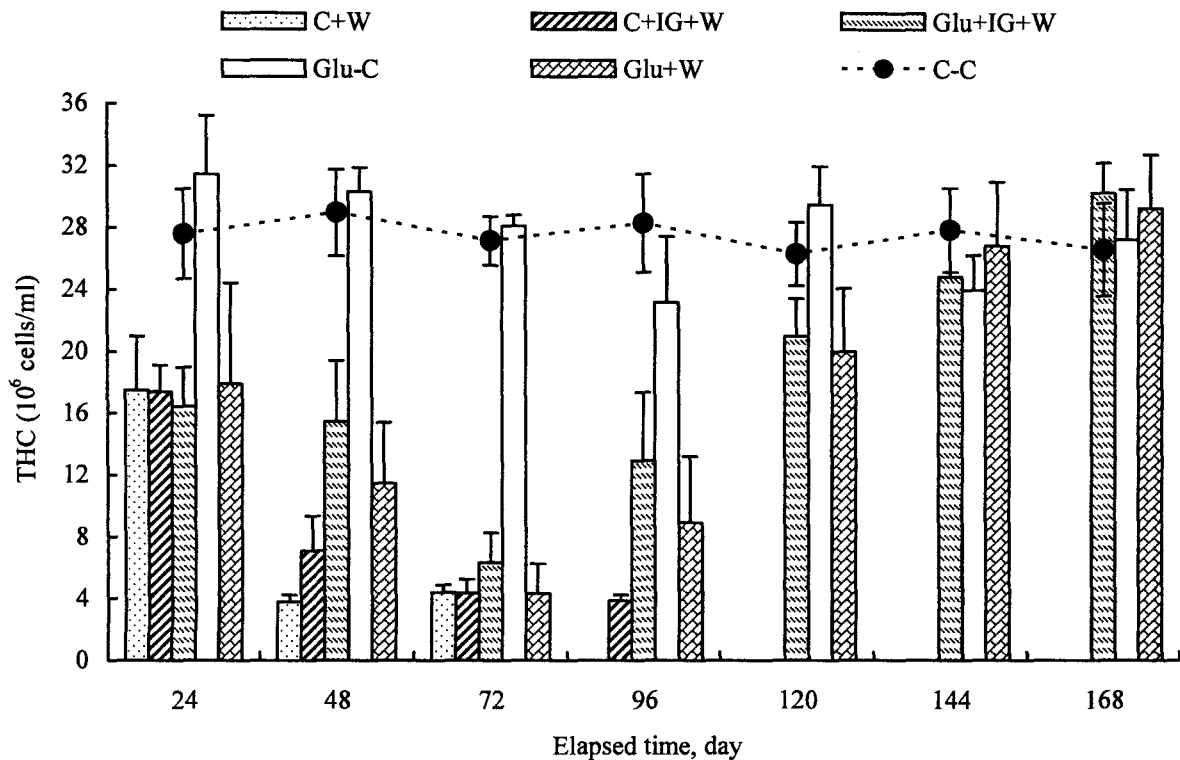


Fig. 2. Total haemocyte counts (THCs) of *Penaeus monodon* fed a diet either containing (treatment) or no (control) β -1,3-glucan for 20 days and then challenged with injection of WSSV solution. C-C: blank control. C+W: control with WSSV challenge. C+IG+W: control with glucan and WSSV injection. Glu-C: treatment control. Glu+W: treatment with WSSV challenge. Glu+IG+W: treatment with glucan and WSSV injection.

在感染試驗進行前，各組試驗蝦先進行 WSSV 檢驗，經 PCR 擴增反應結果，均無 WSSV 感染反應。感染試驗開始後，將每日死亡之試驗蝦，進行 WSSV 檢測，在 PCR 擴增反應結果，發現所有死亡之蝦子，均有強烈的 WSSV 感染反應。因此，本試驗蝦之死亡，應是受 WSSV 感染的結果。

二、草蝦血淋巴球之數目

試驗蝦在 WSSV 注射感染後之血淋巴球之數目變動情形如 Fig. 2 所示。感染後第 1 天，感染各組試驗蝦之血淋巴球數均較注射生理食鹽水之二組，明顯地大量減少 ($P < 0.001$)。感染後第 2 天，對照組中，C+W 與 C+IG+W 二組之血淋巴球數目減少將近 75%，由試驗蝦抽出之血淋巴液外觀上如透明水樣。多醣餵飼組中，

Glu+W 和 Glu+IG+W 二組，雖在 WSSV 感染後，血淋巴球數目也會減少，但在第 4 天後，血淋巴球之數目逐漸回升，至感染後第 6 天，試驗蝦之血淋巴球數目全都回復正常。由注射 WSSV 感染之試驗蝦與注射生理食鹽水之試驗蝦的血淋巴球數目比較，若血淋巴球數目低於 5×10^6 cells/ml 以下，則試驗蝦會有發生大量死亡之傾向。

三、草蝦血淋巴球之吞噬作用

試驗蝦感染 WSSV 後，試驗蝦血淋巴球之吞噬能力，在感染後第 1 天，除加強注射多醣之 C+IG+W 與 Glu+IG+W 二組外，C+W 與 Glu+W 二組均較注射生理食鹽水組者，呈明顯下降 (Fig. 3) ($P < 0.001$)。C+IG+W 組在感染第 2 天後，血淋巴球之吞噬能力也開始降低。感染第 3 天

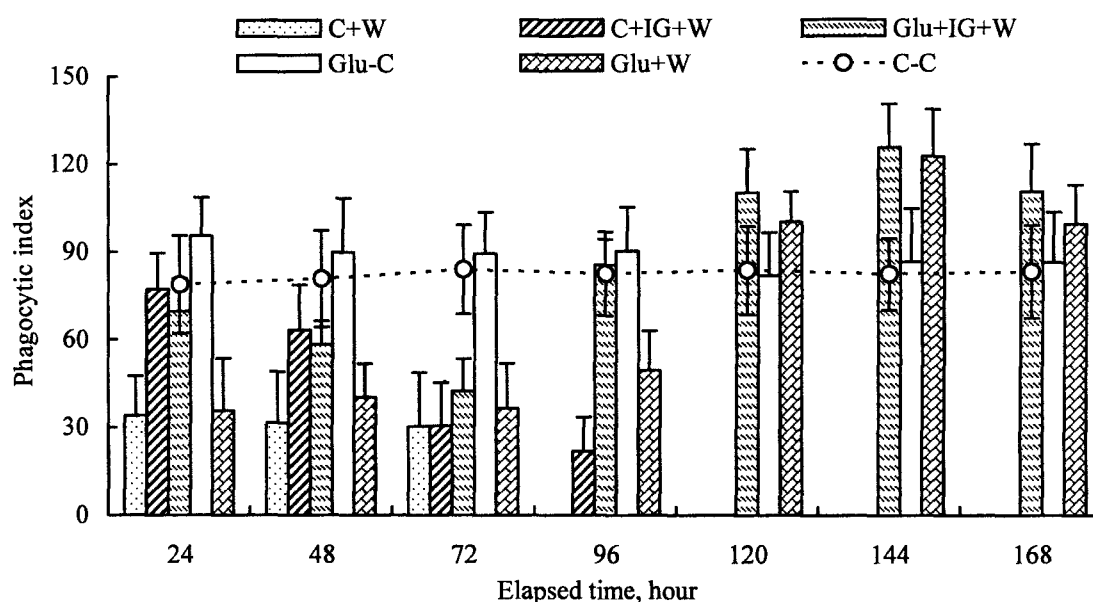


Fig. 3. Phagocytic index of *Penaeus monodon* fed a diet either containing (treatment) or no (control) β -1,3-glucan for 20 days and then challenged with injection of WSSV solution. C-C: blank control. C+W: control with WSSV challenge. C+IG+W: control with glucan and WSSV injection. Glu-C: treatment control. Glu+W: treatment with WSSV challenge. Glu+IG+W: treatment with glucan and WSSV injection.

後，對照組之 C+W 與 C+IG+W 二組之血淋巴球吞噬能力降至最低點，試驗蝦也陸續全數死亡。在感染第 4 天後，多醣飼料組中，Glu+IG+W 組之試驗蝦的血淋巴球吞噬能力先恢復正常。隨後 Glu+W 組也逐漸回復，死亡率減緩。至感染後第 6 天，此二組血淋巴球之吞噬能力已經高於注射生理食鹽水各組 ($p < 0.01$)。顯然飼料含多醣飼料，可幫助草蝦增強血淋巴球吞噬能力，抵抗 WSSV 之感染。

四、草蝦血淋巴液中之 PO 測定

草蝦投餵試驗飼料 20 天並以 WSSV 感染後，試驗蝦血淋巴液中之 PO 活性變動情形如 Fig. 4 所示。在感染後第 1 天，對照組中，C+W 組呈明顯下降 ($P < 0.001$)。C+IG+W 組也在感染第 2 天後，血淋巴液中之 PO 活性也明顯降低 ($P < 0.001$)。在感染第 3 天後，對照二組之血淋巴液中之 PO 活性降至最低點，試驗蝦也全數死亡。而在多醣飼料組中，經 WSSV 感染後，

試驗蝦血淋巴液中之 PO 活性先下降。唯，第二天後則較其他各組明顯增強 ($p < 0.001$)。此有可能因 WSSV 進入草蝦體內後刺激血淋巴球，大量活化 PO 所致。尤其是 Glu+IG+W 組在感染後第 3-6 天中，血淋巴液中之 PO 活性最高，且持續至試驗結束。

五、草蝦血淋巴球中之 O_2^- 產生量測定

草蝦血淋巴球中之 O_2^- 產生量變動情形，在感染後第 1 天，除對照組中之 C+IG+W 組外，其餘 C+W，Glu+IG+W 與 Glu+W 三者均較注射生理食鹽水各組，呈明顯下降 ($P < 0.001$) (Fig. 5)。C+IG+W 組在感染第 3 天後，血淋巴球中之 O_2^- 產生量也明顯降低。感染第 3 與 4 天後，C+W 與 C+IG+W 二組之血淋巴球中之 O_2^- 產生量分別降至最低點，試驗蝦也全數死亡。在感染第 2 天後，多醣飼料組之試驗蝦血淋巴球中的 O_2^- 產生量逐漸回升，死亡率減緩。在感染後第 5 天，血淋巴球中之 O_2^- 產生量已較其他組明顯高 ($p < 0.001$)。

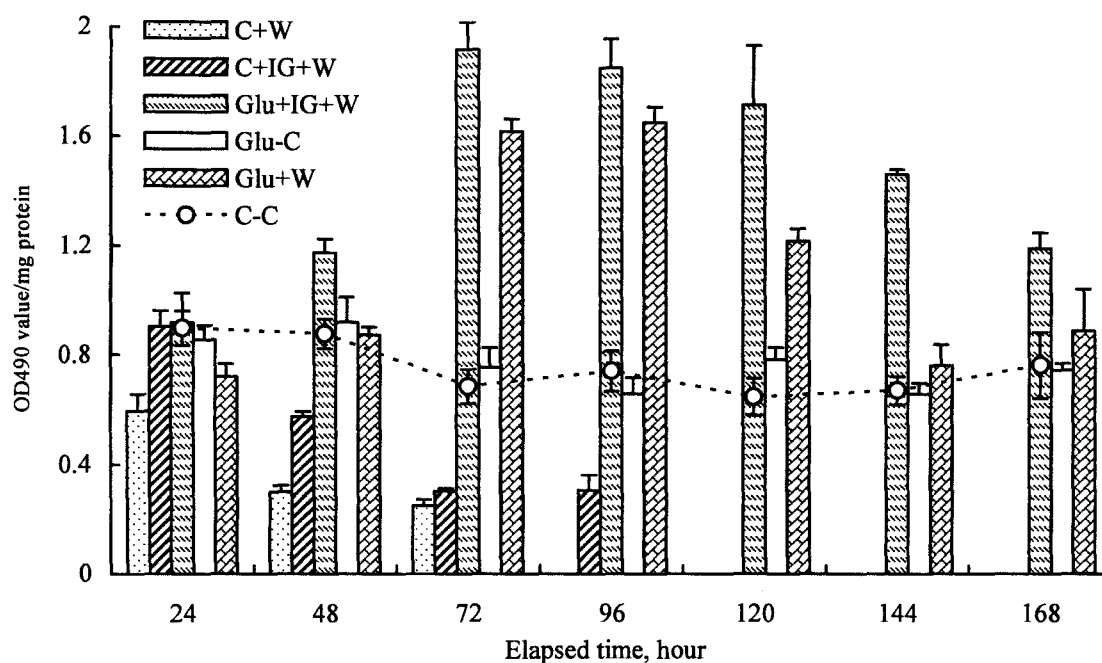


Fig. 4. Phenoloxidase (OD₄₉₀ value) of *Penaeus monodon* fed a diet either containing (treatment) or no (control) β -1,3-glucan for 20 days and then challenged with injection of WSSV solution. C-C: blank control. C+W: control with WSSV challenge. C+IG+W: control with glucan and WSSV injection. Glu-C: treatment control. Glu+W: treatment with WSSV challenge. Glu+IG+W: treatment with glucan and WSSV injection.

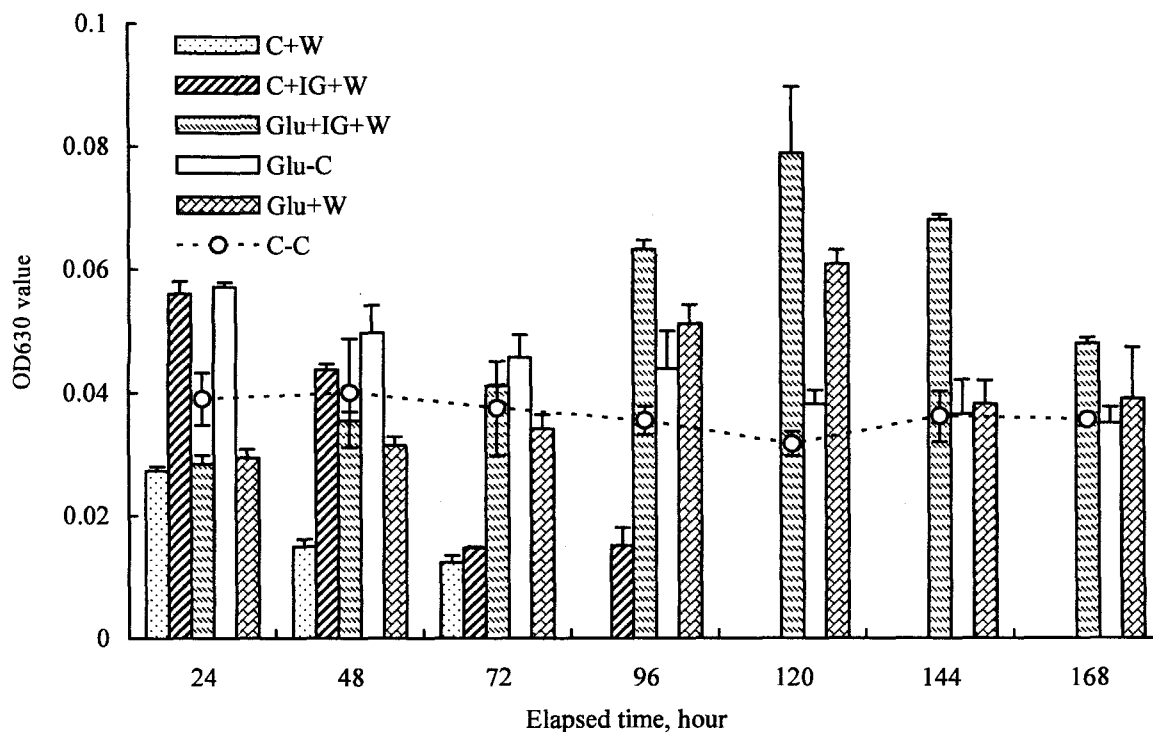


Fig. 5. Superoxide anion (OD₆₃₀ value) of *Penaeus monodon* fed a diet either containing (treatment) or no (control) β -1,3-glucan for 20 days and then challenged with injection of WSSV solution. C-C: blank control. C+W: control with WSSV challenge. C+IG+W: control with glucan and WSSV injection. Glu-C: treatment control. Glu+W: treatment with WSSV challenge. Glu+IG+W: treatment with glucan and WSSV injection.

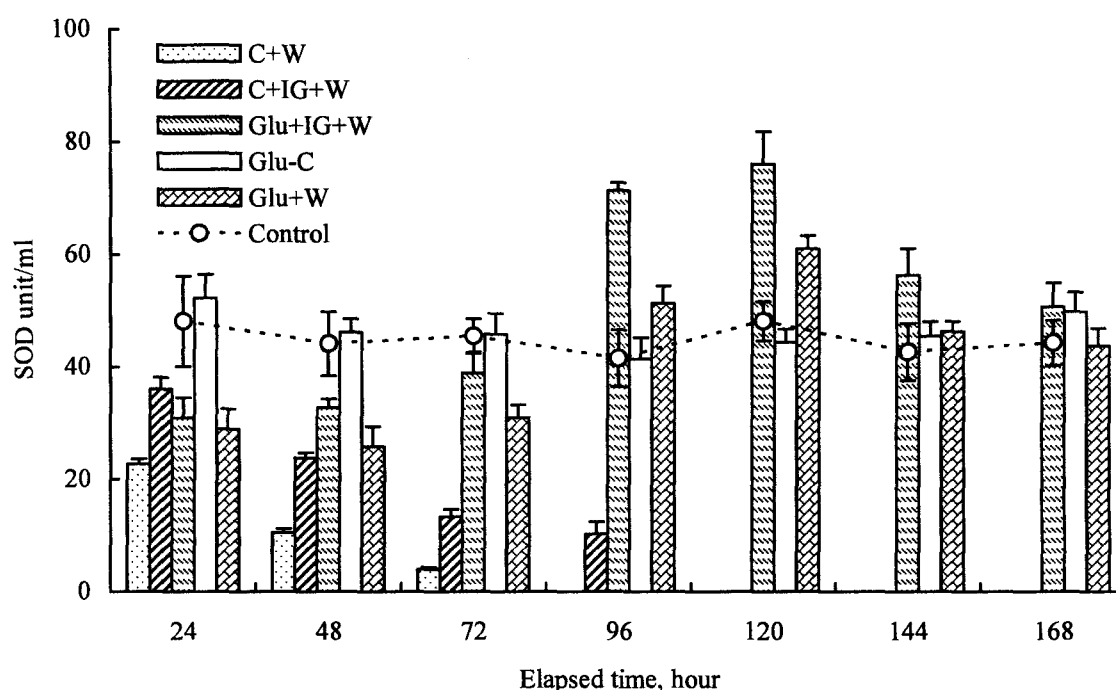


Fig. 6. Superoxide dismutase (SOD) of *Penaeus monodon* fed a diet either containing (treatment) or no (control) β -1,3-glucan for 20 days and then challenged with injection of WSSV solution. C-C: blank control. C+W: control with WSSV challenge. C+IG+W: control with glucan and WSSV injection. Glu-C: treatment control. Glu+W: treatment with WSSV challenge. Glu+IG+W: treatment with glucan and WSSV injection.

六、草蝦血淋巴球中 SOD 產生量測定

草蝦飼料試驗飼料 20 天後，以 WSSV 病毒液注射感染，試驗蝦 SOD 產生量變動情形如 Fig. 6 所示。感染後第 1 天，受 WSSV 感染各組呈明顯下降 ($P < 0.01$)。感染第 3 與 4 天後，對照組中之 C+W 與 C+IG+W 二組之血淋巴球中 SOD 產生量分別降至最低點，試驗蝦也全數死亡。但在多醣飼料組，感染第 3 天後，試驗蝦血淋巴球中之 SOD 產生量逐漸回復，死亡率減緩，在感染後第 5 天，血淋巴球中之 SOD 產生量較其他組高 ($p < 0.01$)。試驗期間，注射生理食鹽水之二組 (C-C, Glu-C)，血淋巴球中之 SOD 產生量變動很小。

討論

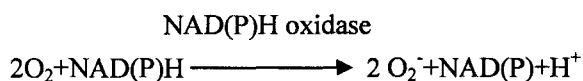
甲殼類之細胞性防禦反應主要由血淋巴球細胞 (haemocytes) 產生之原酚氧化酵素激活系

統 (prophenoloxidase system, Pro-PO) 來完成。原酚氧化酵素系統能被許多微生物細胞壁的成分如脂多醣類、 β -1,3-glucan、peptidoglycan 或因加熱或鈣離子濃度下降等而活化^(25,26)。反應後產生的中間產物包括許多組成因子與 PO，當其釋出細胞外後，可以活化甲殼類血淋巴球的免疫反應，如刺激血淋巴球細胞進行吞噬作用 (phagocytosis)、包膜作用 (encapsulation)、形成肉芽 (granuloma formation)、凝血作用 (clotting) 與細胞毒殺作用 (cytotoxicity) 等⁽²⁷⁾。尤其是吞噬作用，是甲殼類清除外來微生物的主要防禦機制之一。在本試驗中，感染 WSSV 後，試驗蝦之血淋巴球數目減少，致使吞噬作用、PO 活性、 O_2^- 、SOD 產生量全部降低，但是第 3 天後，添加多醣組之試驗蝦的血淋巴球數量回升，PO 活性增強，啟動了試驗蝦之免疫系統，增強了吞噬作用，並增加了 O_2^- 、SOD 的產量，而幫

助了試驗蝦抵抗 WSSV 之感染。

蝦類的血淋巴球細胞依據形態，可分為透明、半顆粒及顆粒球等三類，在非特異性免疫功能中，扮演一非常重要之角色，目前對各種血淋巴球之功能尚未完全解明。但是蝦類血淋巴球數量與血淋巴球種類之比例，會隨著蝦種、性別與健康情況而會有所變化。本試驗中，感染 WSSV 後，血淋巴球數量會大量減少，連帶使草蝦所有免疫防禦機制產生問題而發生大量死亡。由此可見血淋巴球數量之多寡，可決定蝦類抵抗體外入侵病原能力之強弱。添加多醣組試驗蝦逐漸恢復血淋巴球數量，即代表其免疫防禦機制已開始啟動。唯感染 WSSV 後，蝦體內所有之血淋巴球究竟是全部減少或是只有其中一種類減少，而多醣之添加到底有助於那一種形態之血淋巴球增多，這些問題仍有待更進一步之試驗證明。

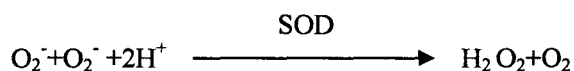
當微生物被甲殼類血淋巴球吞噬後，一系列之殺菌物質如：superoxide anion (O_2^-)、hydrogen peroxide (H_2O_2)、hydroxide ion (OH^-)、singlet oxygen (O_2^1)、myeloperoxidase (MPO) 等產生⁽²⁸⁾，可以直接殺死入侵之微生物或間接抑制其活性。當吞噬作用進行時，首先是呼吸量上升 (respiratory burst)，其主要原因是細胞膜上的 NAD(P)H oxidase，利用電子供應者 NADPH 或 NADH 將氧分子還原，因而消耗大量氧，其作用方程式如下⁽²⁸⁾：



其最先產生之殺菌物質為 O_2^- ，因此定量血淋巴球 O_2^- 的產生量，可用來作為偵測呼吸量上升反應的一個指標⁽²⁹⁾。在本試驗中，餵飼添加多醣試驗蝦之血淋巴球數目，由感染後第 5 天起開始回升，相對於血淋巴球 O_2^- 的產生量，在此組也有相同之上升之趨勢。

SOD 是一類具有抗氧化活性的高分子生物

酵素，它是迄今為止被發現的唯一以 O_2^- 作為基質來進行反應的酵素⁽³⁰⁾，並廣泛存在於各種生物與好氧性或厭氣性的真核或原核生物中。Fridovich⁽³¹⁾證實 SOD 在生物體內以酵素的形式將超氧陰離子自由基歧化成過氧化氫 (H_2O_2) 或氧分子 (O_2)，其反應式如下：



目前已經證實，感染病毒易造成生物體內產生高濃度的氧化物，導致體細胞發生病變⁽³²⁾。由林⁽²⁴⁾之研究，初步判斷草蝦具有兩種型態的 SOD，均為 Mn-SOD 類型。將健康的草蝦經注射 WSSV 病毒，在 41 小時後，大部分的試驗蝦出現罹患白點病症狀，而血淋巴液內 SOD 相對值下降至 0.6。感染 65 小時後，試驗蝦血淋巴液內 SOD 相對值下降至 0.3，試驗蝦開始死亡。感染 72 小時後，試驗蝦大量死亡。在本試驗中，未添加組與多醣注射組，分別在感染第二天後與第三天，SOD 產生量降至 20 unit/ml 以下，試驗蝦不久就全數死亡。但添加多醣組在 SOD 產生量回升至 40 unit/ml 以上，試驗蝦就無死亡發生。

Nakano *et al.*⁽⁷⁾以罹患 WSSV 病蝦之淋巴器官，磨碎後濾液注射感染健康之斑節蝦，受感染之蝦在五天後全數死亡。Chou *et al.*⁽⁹⁾以罹患 WSSV 病蝦之淋巴器官，磨碎後濾液浸泡感染健康之斑節蝦苗，受感染之蝦苗也在 4-6 天後全數死亡。本試驗中，在感染後第一天，試驗蝦血淋巴球數目急速減少，使得以非專一性免疫反應 (non-specific immune response) 為主之開放式循環系統，無法立即而有效誘發防禦反應來應付病原入侵，而造成蝦子全數死亡。再由蝦血球之吞噬作用來看，吞噬作用為甲殼類受外物入侵後，最快啟動之非專一性免疫防禦反應之一，而在本試驗中，受 WSSV 感染一天後之草蝦，蝦血淋巴球、PO 活性、吞噬作用能力、 O_2^- 量與 SOD

量等明顯下降，由此可知 WSSV 對草蝦之免疫機能破壞力很強，會引起受感染蝦之急速死亡。Song *et al.*⁽¹⁶⁾ 利用自酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 抽出之多醣類，間歇地投飼草蝦四個半月後以 WSSV 浸泡感染六小時，其感染後 12 天存活率為 59%。Itami *et al.*⁽¹⁸⁾ 也證實以真菌 (*Bifidobacterium thermophilum*) 抽出之多醣類 (peptidoglycan)，投飼斑節蝦七天後，連續引入蕃養受白點症病毒 (RV-PJ) 感染之斑節蝦的飼育用水。30 天後，養殖試驗蝦存活率最高可達 100%。而本試驗結果以添加多醣組有 25% 試驗蝦活存，雖比上述二研究者活存率低，但因本試驗採用較具侵略性之肌肉注射感染法，試驗蝦直接遭受病毒之攻擊，死亡情形較為嚴重。唯，本試驗也證實多醣之添加，在 WSSV 感染後，能增強草蝦免疫能力，幫助草蝦抵抗 WSSV 之侵襲。

謝辭

本研究係在行政院農業委員會水產試驗所公務預算八十八下半年及八十九年度試驗研究計畫項下完成，試驗期間承蒙生物技術組許月娥與許家惠小姐協助試驗蝦之畜養、採樣與感染等工作，特此致謝。

參考文獻

1. Inouye, K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano, T. Kimura, K. Momoyama and M. Hiraoka (1994) Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol.*, 29: 149-158.
2. Momoyama, K., M. Hiraoka, H. Nakano, H. Koube, K. Inouye and N. Oseko (1994) Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological study. *Fish Pathol.*, 29: 141-148 (in Japanese).
3. Cai, S., J. Huang, C. Wang, X. Song, X. Sun, J. Yu, Y. Zhang and C. Yang (1995) Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. *J. Fish China*, 19: 112-117.
4. Lo, C. F., C. H. Ho, S. E. Peng, C. H. Chen, H. E. Hsu, Y. L. Chiu, C. F. Chang, K. F. Liu, M. S. Su, C. H. Wang and G. H. Kou (1996). White spot syndrome associated virus (WSSV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, 27: 215-225.
5. Lo, C. F., J. H. Leu, C. H. Ho, C. H. Chen, S. E. Peng, Y. T. Chen, C. M. Chou, P. Y. Yeh, C. J. Huang, H. Y. Chou, C. H. Wang and G. H. Kou (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSSV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, 25: 133-141.
6. Peng, S. E., C. F. Lo, C. H. Ho, C. F. Chang, and G. H. Kou (1998) Detection of white spot syndrome baculovirus (WSSV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* using polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 164: 253-262.
7. Nakano, H., H. Koube, S. Umezawa, K. Momoyama, M. Hiraoka, K. Inouye and N. Oseko (1994) Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathol.*, 29: 135-139 (in Japanese with English abstract).
8. Takahashi, Y., T. Itami, M. Kondo, M. Maeda, R. Fujii, S. Tomonaga, K. Supamattaya and S. Boonyaratpalin (1994) Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathol.*, 29: 121-125.
9. Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, H. C. Chiang and C. F. Lo (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot

- syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, 23: 165-173.
10. Chang, P. S., C. F. Lo, Y. C. Wang and G. H. Kou (1996) Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in shrimp, *Penaeus monodon*, by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, 27: 131-139.
 11. Moullac, G. L., M. L. Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard, P. Levy and Aquacop (1997) Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 227-234.
 12. Owens, L. and A. O'Neill (1997) Use of a clinical cell flow cytometer for differential counts of prawn *Penaeus monodon* haemocytes. *Dis. Aquat. Org.*, 31: 147-153.
 13. Hennig, O., T. Itami, M. Maeda, M. Kondo, Y. Natsukari and Y. Takashi (1998) Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid rod-shaped DNA virus. *Fish Pathol.*, 33: 389-393.
 14. Chang, C. F., M. S. Su and H. Y. Chen (1999) A rapid method to quantify total haemocyte count of *Penaeus monodon* using ATP analysis. *Fish Pathol.*, 34: 211-212.
 15. Song, Y. L., J. J. Liu, L. C. Chan and H. H. Sung (1997) Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Vaccinol.*, 90: 413-421.
 16. Song, Y. L., C. C. Huang, Y. F. Kao and I. C. Yu (1998) Application of yeast glucan to prevent diseases of culture shrimp (*Penaeus monodon*) in the field. In *Research and Application of Biotechnology in Aquaculture* (N. H. Chao, C. I. Liang and H. W. Hsu eds.). Council of Agriculture, Taiwan, 167-183.
 17. Huang, C. C. and Y. L. Song (1999) Maternal transmission of white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev. Comp. Immunol.*, 23: 545-552.
 18. Itami, T., M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakagawa, N. Takeno, H. Nishimura, M. Maeda, M. Kondo and M. Takahashi (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164: 277-288.
 19. Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen, H. Y., C. F. Lo, G. H. Kou and I. C. Liao (1999) Effect of dietary beta-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 163-168.
 20. Liao, I. C., M. S. Su, C. F. Chang, B. Y. Her and T. Kojima (1996) Enhancement of the resistance of grass prawn *Penaeus monodon* against *Vibrio damsela* infection by beta-1,3-glucan. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 23: 109-116.
 21. Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igusa and M. Kondo (1994) Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). In *The Third Asian Fisheries Forum* (L. M. Chou, A. D. Munro, J. J. Lam, T. W. Chen, L. K. K. Cheong, J. K. Ding, K. K. Hooi, H. W. Khoo, V. P. E. Phang, K. F. Shim and C. H. Tan eds.). Asian Fisheries Society, Manila, Philippine, 375-378.
 22. Song, Y. L. and Y. T. Hsieh (1994) Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 201-209.
 23. Cardenas, W. and J. R. Dankert (1997) Phenoloxidase specific activity in the red swamp

- crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 283-295.
24. 林婉曼 (1998) 草蝦超氧岐化酵素之研究: 病毒感染、純化與生物特性之研究。國立台灣海洋大學水產生物技術研究所 碩士論文。
 25. Johansson, M. W. and K. Soderhall (1985) Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish hemocytes. *J. Comp. Physiol.*, 156: 175-181.
 26. Soderhall, K., V. J. Smith and M. W. Johansson (1986) Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. *Cell Tissue Res.*, 245: 43-49.
 27. Bauchau, A. G. (1981) Crustacean. *In Invertebrate Blood Cell* (A. F. Rowley ed.). Academic Press, London, 387-417.
 28. Segal, A. W. (1989). The electron transport chain of the microbicidal oxidase of phagocytic cells and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous diseases. *J. Clin. Invest.*, 83: 1785-1793.
 29. Secombes, C. J. (1990) Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *In Techniques in Fish Immunology* (J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson and W. B. Van Muiswinkel eds.). SOS Publications, Fair Haven, NJ, 137-154.
 30. Wong, V. L., J. J. Burke and R. D. Allen (1991) Isolation and sequence analysis of cDNA that encodes pea manganese superoxide dismutase. *Plant Mol. Biol.*, 17: 1271-1274.
 31. Fridovich, I. (1986) Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.*, 58: 61-97.
 32. Bennet, I. L., R. R. Wagner and V. S. Lequire (1949) Pyrogenicity of influenza virus in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 71: 132-133.

Application of Dietary β -1,3-glucan (from *Schizophyllum commune*) for Enhancing Resistance of Grass prawn, *Penaeus monodon*, Against White Spot Syndrome Virus

Cheng-Fang Chang^{1*}, Chia-Hung Yang¹, Tzyy-Ing Chen¹ and Mao-Sen Su²

¹Biotechnology Division, Taiwan Fisheries Research Institute

²Taiwan Fisheries Research Institute

Abstract

The effectiveness of a β -1,3-glucan (derived from *Schizophyllum commune*) containing diet to enhance the resistance of the prawn to a white spot syndrome virus (WSSV) was investigated. Juvenile grass prawn, *Penaeus monodon*, was fed either a β -1,3-glucan 2 g kg⁻¹ diet, or a glucan-free diet for 20 days, and was then challenged by injection of WSSV solution either blank, WSSV only, or a mixture of WSSV and glucan. The haemolymph total haemocyte counts (THC), phagocytosis (PI), phenoloxidase (PO), superoxide anion (O₂⁻) and superoxide dismutase (SOD) production were measured at days 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 after challenge, and prawn survival rates also recorded. The results showed that all of the prawn fed with glucan-free diet and injected either WSSV or a mixture solution died at day 4 and 5, respectively. Conversely, the survival rate of prawn fed with β -1,3-glucan contained diet was significantly high ($P < 0.001$) at day 4. As the prawn were infected with WSSV, THC, phagocytic activity, PO, O₂⁻ production and SOD activity significantly reduced ($P < 0.001$) in the first three days. After five days, they, however, rebounded for the glucan fed group. Therefore, oral administration of β -1,3-glucan 2 g kg⁻¹ diet for 20 days effectively enhanced the immune system and improved the survival of WSSV-infected grass prawn.

Key words: *Penaeus monodon*, β -1,3-glucan, White spot syndrome virus, Superoxide anion, Superoxide dismutase.

*Correspondence: Biotechnology Division, Taiwan Fisheries Research Institute, Tungkang, Pingtung 928, Taiwan.
E-mail: cfchang@mail.tfrin.gov.tw.