文章编号:1000-0615(2010)05-0726-07 DOI:10.3724/SP.J.1231.2010.06789

脂多糖、多巴胺与蛋白激酶抑制剂联合作用对凡纳滨对虾血细胞吞噬率、胞吐酚氧化酶活力的影响

潘鲁青*, 谢 鹏, 岳 峰, 孙晓华
(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室,山东 青岛 266003)

摘要:研究了脂多糖(LPS)、多巴胺(DA)对凡纳滨对虾血细胞吞噬、胞吐及信号通路的影响。结果表明,LPS、DA对凡纳滨对虾血细胞数量、吞噬率和胞吐酚氧化酶活力影响显著($P<0.05$),LPS、DA与血细胞孵育30 min后,高浓度(1~10 mg/L或μmol/L)处理组对虾血细胞数量均随作用浓度增大而明显下降,胞吐酚氧化酶活力则显著升高,LPS处理组对虾血细胞吞噬率显著升高,而DA处理组对虾血细胞吞噬率则表现出明显的下降趋势。同时在LPS作用下,分别加入蛋白激酶C(PKC)、酪氨酸蛋白激酶(TPK)抑制剂chelerythrine、genistein后,凡纳滨对虾血细胞吞噬和胞吐作用均受到明显的抑制作用,抑制剂对吞噬的抑制效果为genistein > chelerythrine,对胞吐的抑制效果则为chelerythrine > genistein;在DA作用下,加入蛋白激酶A(PKA)抑制剂H-89后,血细胞吞噬作用得到增强,但对胞吐作用无明显影响,chelerythrine、genistein均抑制对虾血细胞的胞吐作用,抑制剂的作用效果为chelerythrine > genistein,两种抑制剂对吞噬均无显著影响。

关键词:凡纳滨对虾;血细胞;胞吐;吞噬;脂多糖;多巴胺;信号通路
中图分类号:S 942.5 **文献标识码**:A

甲壳动物免疫以非特异性免疫反应为主,主要包括血细胞的吞噬、包裹和凝集以及释放到血淋巴中多种活性因子如酚氧化原激活系统(proPO系统)、凝集素和抗菌肽等[1-2]。细胞免疫和体液免疫互相协同,许多过程表现为复杂的级联反应,其中proPO系统在免疫识别和防御中起着关键作用。proPO系统以非活化状态存在于血细胞的颗粒内,极微量微生物多糖可引起血细胞的胞吐作用,释放、激活酚氧化酶原系统,产生了一系列免疫活性物质,通过多种方式参与免疫防御反应[3-5]。血细胞吞噬、胞吐作用不仅是甲壳动物重要的免疫功能,也反映了血细胞免疫应答的水平。

许多学者多以果蝇、蚊子等昆虫作为模式动物研究节肢动物血细胞非特异性免疫调控机理[6-7],并发现昆虫体内存在一大类蛋白激酶,比较重要的有蛋白激酶A(PKA)、蛋白激酶C(PKC)、酪氨酸蛋白激酶(TPK)等,它们作为3条不同但又相互联系的信号通路,通过一系列蛋白激活裂解的级联反应控制机体的细胞免疫和体液免疫。已有研究表明,昆虫血细胞吞噬、胞吐作用和甲壳动物血细胞的胞吐作用均与PKA、PKC、TPK等多种信号途径有关[8-10]。本文研究了脂多糖(lipopolysac charide, LPS和多巴胺(dopamine, DA))对凡纳滨对虾血细胞数量、吞噬率和胞吐酚氧化酶活力的影响,以期为对虾血细胞免疫防御信号通路的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用凡纳滨对虾购自青岛市崂山对虾养殖场,虾体长为(8.5±0.5) cm,体色正常,健康活泼。实验前暂养7 d,海水盐度为31,pH 8.1,温度为(20±0.5) ℃,连续充气,日换水

收稿日期:2010-01-05 修回日期:2010-03-01
资助项目:教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0597);高等学校创新引智计划(B08049)
通讯作者:潘鲁青,E-mail:panlq@ouc.edu.cn

2 次,换水量为 1/3 ~ 1/2,并投喂对虾配合饲料。

1.2　血细胞的制备

选取健康的凡纳滨对虾,用消毒的 5 号针头和 2 mL 注射器从对虾头胸甲后缘心血窦处取血,注射器中预先吸入已灭菌的预冷抗凝剂(0.45 mol/L 氯化钠、0.01 mol/L 氯化钾、0.01 mol/L EDTA 二钠、0.01 mol/L HEPES, pH 7.45,渗透压为 780 mOsm/kg),血淋巴与抗凝剂的最终比例为 1∶1,将抗凝血样品混合于离心管中。取抗凝血样品 1 mL,于 4 ℃、700 × g 离心 10 min,弃上清,将沉于底部的血细胞以 0.6 mL 的 CM 缓冲液(0.45 mol/L 氯化钠、5.6 mol/L 氯化钾、2.4 mol/L 磷酸氢二钠、12.9 mol/L 硫酸镁、6.7 mol/L氯化钙、2 mol/L L-谷氨酰胺、pH 7.45,渗透压为 780 mOsm/kg)洗涤重悬 2 次,采用台盼蓝排斥法[11]检测血细胞存活率均在 85% 以上,并将血细胞数量调整为 $(42.0 \pm 2.0) \times 10^5$ cells/mL 即为制备的血细胞样品。

1.3　实验方法

实验分为 LPS、DA 单独作用和脂多糖、多巴胺与蛋白激酶抑制剂联合作用两部分。各实验梯度均设 3 个平行组,实验均在室温 20 ℃下进行。脂多糖、多巴胺及 3 种蛋白激酶抑制剂均为 Sigma 公司产品,均用 CM 缓冲液配制。

在 LPS、DA 单独实验中,DA 梯度设置主要依据凡纳滨对虾血淋巴中 DA 的含量为 1 μmol/L 左右[12],实验梯度设置为 0、0.2、1.0、5.0、10 μmol/L,脂多糖梯度设置为 0、0.5、1.0、5.0、10 mg/L,并以 CM 缓冲液作为对照组。取血细胞样品经 4 ℃、700 × g 离心 10 min 后分别置于多巴胺、脂多糖不同梯度中孵育 30 min,然后混匀,取部分孵育液测定血细胞数量和吞噬率,其余部分经离心,取上清液用于血细胞胞吐酚氧化酶活力的测定。

在 LPS、DA 与蛋白激酶抑制剂联合作用中,3 种蛋白激酶抑制剂分别为蛋白激酶 A (PKA) 抑制剂 (H-89)、蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂 (chelerythrine)、酪氨酸蛋白激酶 (TPK) 抑制剂 (genistein),依据单独作用结果 LPS、DA 的浓度分别设置为 1 mg/L、1 μmol/L,3 种蛋白激酶抑制剂浓度参考文献[10,13]的方法,分别为 H-89: 25、50 μmol/L, chelerythrine: 10、20 μmol/L, genistein:15、30 μmol/L。实验设为 LPS、DA 分别与 3 种蛋白激酶抑制剂各梯度组合为 12 个处理组,并分别以 LPS、DA 单独处理组作为对照组;同时经预实验表明 3 种抑制剂单独作用与 CM 缓冲液处理组的血细胞吞噬率和胞吐酚氧化酶活力无显著性差异。实验过程与单独作用实验相同,分别测定血细胞吞噬率和胞吐酚氧化酶活力。

1.4　实验指标的测定

血细胞数量测定　血细胞数量的测定采用血球计数板在 Olympus 光学显微镜下直接计数的方法,取 100 μL 血细胞悬液与 100 μL 的 10% 甲醛于 Eppendorf 离心管中混匀,固定 30 min 后,取混匀血细胞悬液置于血球计数板上,观察计数血细胞数量(THC)。

酚氧化酶活力测定　酚氧化酶活力测定,以 L-DOPA 为底物,参照 Ashida[14] 的方法进行。将 3 mL 0.1 mol/L 的磷酸钾盐缓冲液(pH 6.0)与 100 μL 的0.01 mol/L的 L-DOPA 和 100 μL 上清液样品置于室温下混匀,立即在 490 nm 波长处测定光密度值($OD_{490\ nm}$),每间隔 2 min 读取 1 次,共测定 30 min。以 $OD_{490\ nm}$ 对反应时间 (min) 作图,以实验条件下每分钟 $OD_{490\ nm}$ 增加 0.001 定义为一个酶活力单位。

血细胞吞噬率测定　实验所用细菌为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*),用无菌生理盐水配成浓度约10^8 ind/mL的菌悬液。取血细胞样品与菌悬液各 100 μL 加入无菌塑料凹孔板中,置于湿盒中 37 ℃下孵育 30 min,取一滴混合液置载玻片上,经室温干燥、吉姆萨染色、中性树胶封片,每个样品做 3 张涂片。在 Olympus 光学显微镜(油镜)下,观察计数吞噬病原菌的血细胞数量,随机计数 200 个血细胞,采用以下公式计算血细胞吞噬率:

吞噬率(%) = (吞噬的血细胞数目/总血细胞数目 200) × 100

1.5　数据处理与分析

所有实验数据均以 3 个平行组数据的平均值 ± 标准误(mean ± SE)表示;并采用单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 氏检验法统计分析。

2 结果

2.1 脂多糖、多巴胺对凡纳滨对虾血细胞数量、吞噬率和胞吐酚氧化酶活力的影响

LPS、DA对凡纳滨对虾血细胞数量、吞噬率和胞吐酚氧化酶活力影响显著($P<0.05$)。在实验浓度范围内,5~10 mg/L脂多糖处理组对虾血细胞数量明显下降,1~10 mg/L处理组吞噬率、胞吐酚氧化酶活力显著升高,而1~10 μmol/L DA处理组血细胞数量、吞噬率明显降低,胞吐酚氧化酶活力则显著升高;其它LPS、DA处理组测定指标与对照组无明显差异(表1)。同时各处理组血细胞数量、吞噬率和胞吐酚氧化酶活力分别与LPS、DA浓度呈明显的负、正相关性。

表1 脂多糖、多巴胺对凡纳滨对虾血细胞数量、吞噬率和胞吐酚氧化酶活力的影响

Tab.1 The effect of LPS and dopamine on haemocyte counts, phenoloxidase activity, phagocytic activity of *Litopenaeus vannamei*

处理 treatment	浓度 concentration	血细胞数量($\times10^5$ ind/mL) haemocyte counts	吞噬率(%) phagocytic activity	酚氧化酶活力(unit) phenoloxidase activity
脂多糖(mg/L) LPS	0	42.67 ± 1.45^a	50.33 ± 3.71^a	2.35 ± 0.18^a
	0.5	39.67 ± 1.67^a	51.00 ± 1.15^a	3.59 ± 0.62^a
	1	36.00 ± 3.52^a	60.33 ± 2.40^b	3.86 ± 0.59^b
	5	19.00 ± 2.08^b	62.33 ± 2.18^b	4.59 ± 0.46^b
	10	17.33 ± 2.60^b	65.67 ± 1.76^b	4.43 ± 0.68^b
多巴胺(μmol/L) DA	0	42.67 ± 1.45^a	50.33 ± 3.71^a	2.35 ± 0.18^a
	0.2	33.00 ± 5.13^a	50.86 ± 1.15^a	2.61 ± 0.69^a
	1	22.67 ± 3.52^b	37.67 ± 3.84^b	4.14 ± 0.49^b
	5	20.00 ± 3.46^b	36.33 ± 0.88^b	4.38 ± 0.30^b
	10	14.00 ± 2.08^b	27.67 ± 1.55^b	5.22 ± 0.72^b

注:同列数据右上角标注字母不同的表示差异显著($P<0.05$)。

Notes:Means in the same row with different superscripts indicate significant diffderence($P<0.05$).

2.2 脂多糖、多巴胺与蛋白激酶抑制剂联合作用对凡纳滨对虾血细胞吞噬率、胞吐酚氧化酶活力的影响

LPS、DA与3种蛋白激酶抑制剂联合作用对凡纳滨对虾血细胞吞噬率、胞吐酚氧化酶活力影响显著($P<0.05$)。在LPS、抑制剂联合作用中,PKA抑制剂处理组与对照组血细胞吞噬率、胞吐作用无明显差异,PKC、TPK抑制剂对吞噬率、胞吐作用具有显著抑制作用,而且对吞噬率的抑制效果为TPK>PKC,对胞吐作用为PKC>TPK(图1)。在DA、抑制剂联合作用中,PKA抑制剂对吞噬率具有显著增强作用,而对胞吐作用无明显影响;PKC、TPK抑制剂处理组与对照组的吞噬率差异不显著,而对胞吐作用抑制明显,且抑制效果为PKC>TPK(图2)。

3 讨论

3.1 脂多糖、多巴胺对对虾血细胞吞噬、胞吐作用的影响

以适量的脂多糖(LPS)进行注射或投喂后,对虾血细胞数量有所增加,血浆酚氧化酶明显升高,抗弧菌感染的能力增强[15-16];李光友等[17]研究表明脂多糖(<10 μg/mL)与中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血细胞作用后,吞噬功能显著增强。另据Cheng等[18-19]报道注射多巴胺、去甲肾上腺素后凡纳滨对虾血细胞数量、酚氧化酶原活力和吞噬率均明显下降,对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的易感性提高;胡发文等[20]研究发现注射多巴胺、5-羟色胺后,凡纳滨对虾血细胞数量、吞噬率下降,血浆酚氧化酶活性升高,溶菌、抗菌活力降低。由此可见,微生物多糖、生物胺均能引发对虾血细胞的吞噬、胞吐作用,但两者免疫响应有所不同。本研究显示在脂多糖、多巴胺作用下凡纳滨对虾血细胞数量均明显下降,胞吐酚氧化酶活力显著升高,而且脂多糖显著增强了血细胞吞噬活性,多巴胺则呈抑制作用,这与上述研究结果基本一致。这说明脂多糖、多巴胺均能引起对虾血细胞酚氧化酶原系统的胞吐作用,而血细胞吞噬活性则表现出完全不同的效应。作者认为脂多糖作为革兰氏阴性菌细胞壁外膜成分,与血细胞膜上多糖蛋白具有分子识别作用,而生物胺作为神经内分泌因子(神

经递质或激素),可通过血细胞跨膜蛋白受体发生作用,它们可能通过血细胞中不同的信号转导途径,诱发或激活血细胞吞噬、胞吐作用,由此产生不同的免疫效应。

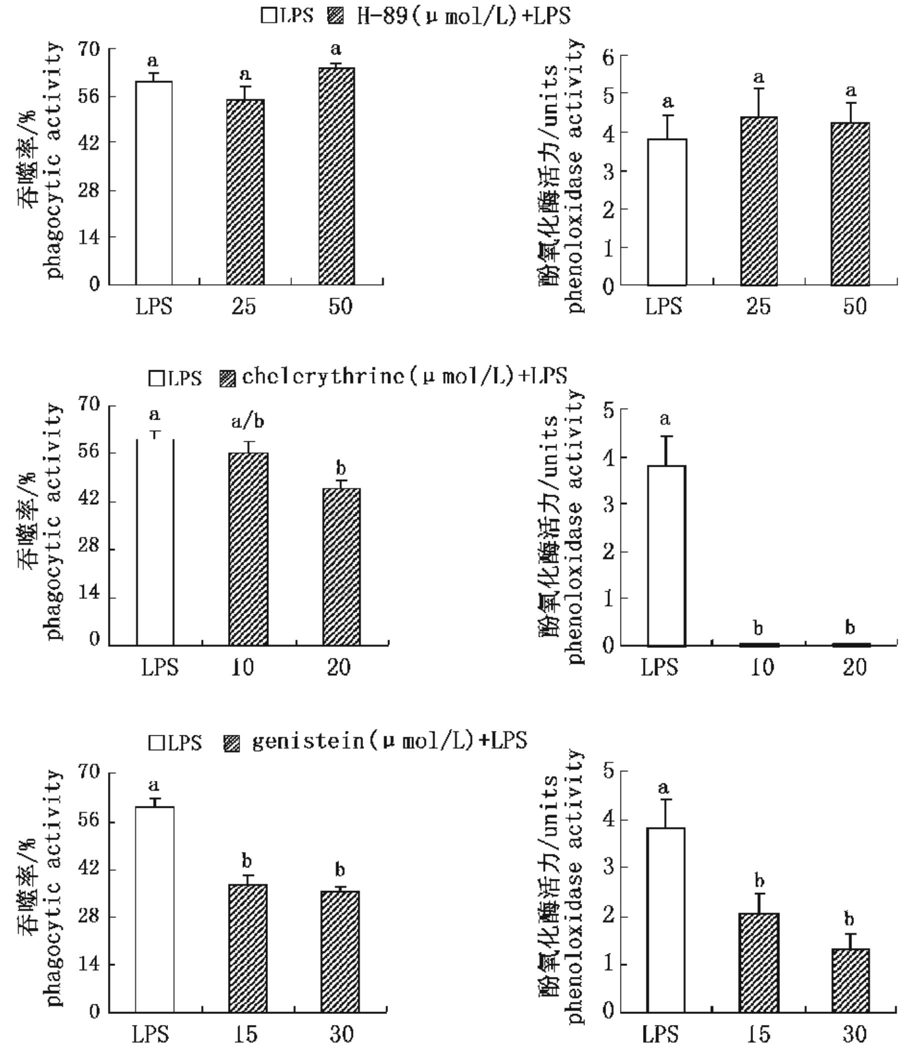

图 1　脂多糖与蛋白激酶抑制剂联合作用对凡纳滨对虾血细胞吞噬率和胞吐酚氧化酶活力的影响

Fig. 1　The effect of combination of LPS and protein kinase inhibitors on phagocytic activity and extracelluar phenoloxidase activity of haemocyte in *Litopenaeus vannamei*

3.2　对虾血细胞吞噬、胞吐作用的信号转导机制

许多学者研究发现对虾血细胞膜上存在多糖(如 LPS)结合蛋白或受体蛋白,病原表面的多糖与膜上相应的蛋白作用,激活 proPO 级联系统,启动氧化杀菌机制[21-23]。Brooks 等[9]和 Charalambidis[24]研究显示 TPK 和 PKA 在昆虫血细胞非几识别蛋白表达和吞噬功能中具有重要的作用,可能通过限制血细胞膜上受体蛋白与微生物多糖的相互作用,抑制或调节血细胞的吞噬作用。已有研究表明黏附蛋白(76 ku 蛋白)和β-1,3-葡聚糖结合蛋白能够通过启动 PKC 和 TPK 信号通路引发淡水螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)血细胞脱颗粒[25];据 Chuo 等[10]报道在病原组分未甲基化寡居脱氧核糖核苷酸(CpG-ODN)作用下分别通过 PKC 和 TPK 正、反向调节罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)血细胞的胞吐反应,且此过程与 PKA 无关;Solon 等[26]研究认为在 LPS 作用下鲎(*Limulus polyphenmus*)血细胞发生胞吐反应与 PKC 和 TPK 信号通路无关。本研究

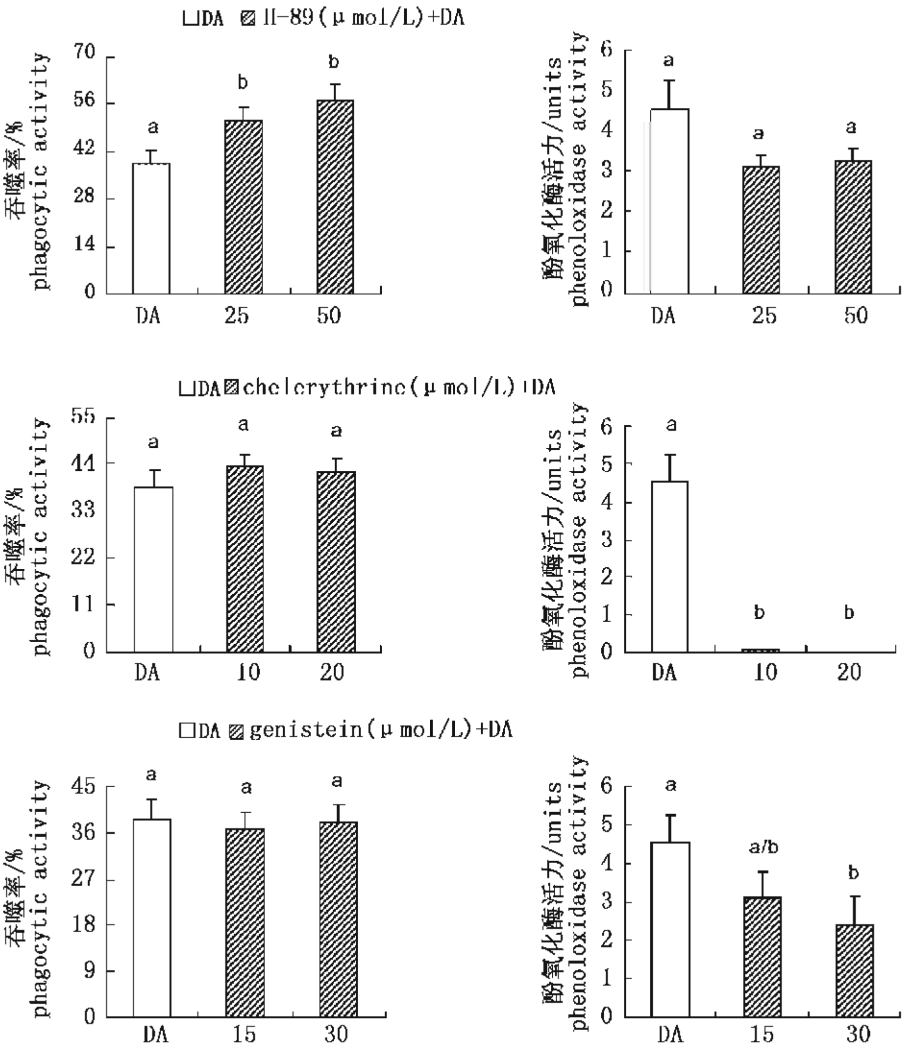

图2 多巴胺与蛋白激酶抑制剂联合作用对凡纳滨对虾血细胞吞噬率和胞吐酚氧化酶活力的影响

Fig. 2 The effect of combination of dopamine and protein kinase inhibitors on phagocytic activity and extracelluar phenoloxidase activity of haemocyte in *Litopenaeus vannamei*

显示在LPS作用下,凡纳滨对虾血细胞吞噬、胞吐作用受PKC、TPK信号通路的正向调节,而与PKA信号通路无关,且对吞噬率、胞吐作用的抑制效果分别为TPK > PKC、PKC > TPK,这与上述研究结果不尽相同。由此说明在LPS作用下,PKC、TPK对甲壳动物血细胞吞噬、胞吐具有重要的调节作用,而且不同的甲壳动物或微生物多糖启动的信号通路和调节作用有差异,同时PKC、TPK信号通路对对虾血细胞吞噬、胞吐的调节作用具有一致性,但调节的效应有所不同,而LPS诱导的血细胞吞噬和胞吐作用与PKA信号通路无关。

Lacoste等[13]研究发现太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)血细胞膜上存在β-肾上腺素受体,去甲肾上腺素通过血细胞膜上β-肾上腺素受体—cAMP—PKA的信号路径对牡蛎的血细胞吞噬作用进行调节;Brooks等[9]研究认为PKA可能通过阻止释放黏附蛋白的方式来抑制蜡螟(*Galleria mellonella*)血细胞的吞噬功能。另有研究表明生物胺可能通过与对虾血细胞相互作用,引发血细胞脱颗粒,释放、激活proPO系统,而吞噬率明显下降[19]。本研究显示在多巴胺作用下,凡纳滨对虾血细胞吞噬作用受PKA信号通路反向调节,胞吐作用与PKA信号通路无关,而PKC、TPK信号通路对胞吐作用为正向调节,且抑制效果为PKC > TPK,对吞噬无调节作用,这

与以上研究基本一致。这说明多巴胺通过与血细胞膜上受体的作用,分别通过 PKA 和 PKC、TPK 信号通路调节血细胞的吞噬、胞吐作用,两者具有不同的信号转导途径。

综上所述,脂多糖、多巴胺对对虾血细胞吞噬作用的信号调节通路不同,而对胞吐作用(PKC、TPK 信号通路)则具有一致性,同时在两者的作用下血细胞均被诱发产生胞吐作用,但吞噬率分别表现为升高和下降,而且在脂多糖作用下调节血细胞吞噬、胞吐作用的信号通路具有一致性,而多巴胺则完全不同。这说明不同外界信号(LPS、DA)与对虾血细胞膜上的受体蛋白相互作用,对血细胞的吞噬作用具有多条信号调节通路,而胞吐作用可能具有单一的信号通路,最终均使血细胞发生胞吐反应。已有研究显示对虾酚氧化酶原激活系统组分如 76 ku 黏附蛋白等,能通过多种方式参与免疫防御反应,包括提供调理素,促进血细胞的吞噬作用等[27]。作者认为对虾血细胞酚氧化酶原系统在 LPS、DA 作用下通过 PKC、TPK 信号通路发生胞吐作用,激活了酚氧化酶原系统,但对免疫防御(如吞噬作用等)具有不同的调节作用,这可能是由于启动信号不同,胞吐或激活机制存在不同,也可能在下游信号链或存在其它信号调控途径等问题,在这方面仍需进一步深入研究。

参考文献:

[1] Bachere E. Shrimp immunity and disease control[J]. Aquaculture, 2000, 191(1-3): 3-11.

[2] 陈国福, 黄倢, 宋晓玲. 对虾免疫机能研究概况[J]. 水产学报, 2004, 28(2): 209-215.

[3] 孟凡伦, 张玉臻, 孔健,等. 甲壳动物中酚氧化酶原激活系统研究评价[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(1): 110-116.

[4] Perazzolo L M, Barracco M A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated fators[J]. Dev Comp Immunol, 1997, 21(5): 385-395.

[5] Hernandez-alopea J. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*)[J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 113C: 61-66.

[6] Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions[J]. Curr Opin Microbiol, 2002, 5: 102-110.

[7] Hoffmann J A. The immune response of *Drosophila*[J]. Nature, 2003, 426(6962): 33-38.

[8] Aravamudan B, Broadie K. Synaptic *Drosophila* UNC-13 is regulated by antagonistic G-protein pathways via a proteasome-dependent degradation mechanism[J]. J Neurobiol, 2003, 54(3): 417-438.

[9] Brooks C L, Dunphy G B. Protein kinase A affects *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidotera) larval haemocyte non-self responses[J]. Immunol Cell Biol, 2005, 83: 150-159.

[10] Chuo C P, Liang S M, Sung H H. Signal transduction of the prophenoloxidase activating system of prawn haemocytes triggered by CpG oligodeoxynucleotides[J]. Fish & Shellfish Immun, 2005, 18: 149-162.

[11] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社,1996: 40-182.

[12] Pan L Q, Hu F W, Jing F T, *et al.* The effect of diff-erent acclimation temperatures on the prophenoloxidase system and other defence parameters in *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immun, 2008, 25: 137-142.

[13] Lacoste A, Malham S K, Cueff A, *et al.* Noradrenaline Modulates Oyster Hemocyte Phagocytosis via a β-Adrenergic Receptor-cAMP Signaling Pathway[J]. Gen Comp Endocrinol, 2001, 122: 252-259.

[14] Ashida M. Purification and characterization of prephenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*[J]. Arch Biochem Biophys, 1971, 144(2): 749-762.

[15] 汪小锋, 樊廷俊, 丛日山,等. 几种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量、形态结构以及酚氧化酶产量和活性的影响[J]. 水产学报, 2005, 29(1):66-73.

[16] Felix S. Pro-PO based immunomodulatory effect of glucan and LPS on tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius)[J]. Diseases in Asian Aquaculture V, 2005, 477-482.

[17] 李光友, 王青. 中国对虾血细胞及其免疫研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(6): 591-596.

[18] Cheng W, Chieu H T, Ho M C, *et al.* Noradrenaline modulates the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immun, 2006, 21:11-19.

[19] Cheng W, Chieu H T, Tsai C H, *et al.* Effects of dopamine on the immunity of white shrimp

Litopenaeus vannamei[J]. Fish & Shellfish Immun, 2005, 19:375 -385.

[20] 胡发文, 潘鲁青, 杨慧赞. 注射生物胺对凡纳滨对虾血细胞免疫指标的影响[J]. 热带海洋学报, 2007, 26(5): 64 -68.

[21] Cheng W, Liu C H, Tsai C H, *et al*. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and β-1, 3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immun, 2005, 18: 297 -310.

[22] Yang L S, Yin Z X, Liao J X. A toll receptor in shrimp[J]. Mol Immunol, 2007, 44: 1999 -2008.

[23] Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response[J]. Aquaculture, 2000, 191: 13 -21.

[24] Charalambidis N D, Zervas C G, Lambropoulou M, *et al*. Lipopolysaccharide-stimulated exocytosis of nonself recognition protein from insect hemocytes depend on protein tyrosine phosphorylation[J]. Eur J Cell Biol, 1995, 67(1): 32 -41.

[25] Johansson M W, Söderhäll K. Intracellular signaling in arthropod blood cells: involvement of protein kinase C and protein tyrosine phosphorylation in the response to the 76-kDa protein or the b-1, 3-glucan binding protein in crayfish [J]. Dev Comp Immunol, 1993, 17: 495 -500.

[26] Solon E, Gupta A P, Gaugler R. Signal transduction during exocytosis in *Limulus polyphemus* granulocytes[J]. Dev Comp Immunol, 1996, 20: 307 -321.

[27] Johansson M W, Söderhäll K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system [J]. Parasitol Today, 1989, 5(6): 171 -176.

Haemocyte phagocytosis, exocytosis and their signal transduction in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) induced by lipopolysaccharide and dopamine

PAN Lu-qing*, XIE Peng, YUE Feng, SUN Xiao-hua

(*The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China*)

Abstract: Effects of bacterial lipopolysaccharide (LPS) and dopamine (DA) on phagocytic activity, exocytosis and signal transduction of haemocytes in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) were studied. The haemocytes treated with LPS (1 -10 mg/L) and dopamine (1 -10 μmol/L) in vitro showed conspicuous dose-dependent decrease in cell count, and increase in extracellular phenoloxidase (PO) activity. Phagocytic activity of haemocytes was promoted by LPS and inhibited by dopamine. Meanwhile, the addition of chelerythrine (a PKA inhibitor) and genistein (a TPK inhibitor) to haemocytes can inhibit phagocytosis and exocytosis induced by LPS, and the inhibitory efficiencies on phagocytosis and exocytosis respectively were: genistein > chelerythrine, chelerythrine > genistein. Dopamine-induced cell phagocytosis was strenghtend by H-89 (a PKA inhibitor), its exocytosis was inhibited by chelerythrine and genistein, and the efficiency was chelerythrine > genistein, and the two inhibitors had no impact on dopamine-induced phagocytosis.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; lipopolysaccharide; dopamine; phagocytosis; exocytosis; signal pathway

Corresponding author: PAN Lu-qing. E-mail: panlq@ouc. edu. cn