

鳗弧菌灭活疫苗对牙鲆外周血细胞 吞噬活性的影响^{*}

张振冬^{1,2} 张培军¹ 莫照兰¹ 徐永立¹

(¹中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(²国家海洋环境监测中心, 大连 116023)

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是我国名贵的海产鱼类, 也是我国北方沿海地区大规模增殖的经济鱼种之一。目前随着牙鲆养殖业的蓬勃发展, 养殖规模也不断扩大, 养殖中各种病害的爆发也相继增多, 由此给养殖业户造成了巨大的经济损失。为此科学家们研究出了各种防病、治病方法。其中, 通过接种疫苗对鱼类病害进行免疫防治被认为是最重要、有效和绿色环保的方法之一, 许多针对鱼类病原的灭活、减毒和基因工程疫苗相继研制成功, 这些疫苗的应用在不同程度上都可以提高鱼类的抗病性, 减少发病率。作者利用制备鳗弧菌灭活疫苗对牙鲆进行注射免疫的方法, 从而观察牙鲆外周血细胞吞噬活性的变化, 探讨了鱼类非特异性细胞免疫的保护机制, 为今后进一步深入研究提供了可靠依据。

一、材料与方法

1. 菌株及其培养

鳗弧菌菌株 M3 分离自患皮肤溃烂的养殖牙鲆, 此菌株毒力较强, 肌肉注射感染牙鲆的半致死浓度为 5.144×10^3 cfu/尾。挑取单菌落接种于 2216E 海水培养基 28℃ 培养 24 h 生理盐水清洗菌体, 用最终浓度为 0.5% 的福尔马林灭活后, 用生理盐水洗涤两次, 调整成浓度为 $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml 的菌悬液备用。

用作吞噬原的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由中科院海洋研究所徐涤博士提供。挑取单菌落接种于 LB 培养基 37℃ 过夜培养, 生理盐水将菌体, 离心洗涤, 用浓度为 0.5% 的福尔马林溶液在 4℃ 条件下将其灭活。灭活后用生理盐水洗涤两次, 调整成浓度约为 10^8 cfu/ml 的菌悬液备用。

2. 方法

通过肌肉注射鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 灭活疫苗对养殖牙鲆进行免疫接种, 接种

^{*} 国家重点基础研究发展规划项目 (973), G1999012003 号。

通信作者: 张振冬, 男, 出生于 1977 年 1 月, 博士; E-mail: zdzhang@imm.cn.gov.cn

张培军, 男, 研究员, 主要从事发育生物学研究; E-mail: pizhang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2006 年 6 月 16 日。

量为 0.2 mL/尾, 观察接种疫苗后牙鲆外周血细胞的吞噬活力的变化情况, 同时以注射生理盐水的牙鲆作为对照组进行观察。在免疫接种后的第 2、3、4、5 周随机选取实验牙鲆进行尾静脉采血, 收集外周血细胞测定其吞噬活性。

3. 实验鱼免疫

作者用健康牙鲆作实验对象, 牙鲆体长 15 cm 左右, 购自山东荣成寻山水产养殖公司。玻璃钢水槽中循环过滤海水暂养一周, 平均水温 18℃。挑选健康有活力的牙鲆肌肉注射鳃弧菌疫苗, 0.2 mL/尾, 同时设置对照组, 注射等量的灭菌生理盐水。在初次免疫后 2 周, 采用同样方式进行二次免疫。

4. 采血

对初次进行免疫的牙鲆鱼, 2 周后开始每隔一周随机选取 3 尾进行尾静脉采血收集血细胞, 采用阿氏抗凝剂与牙鲆外周血细胞 1:1 混合, 再加入等体积的生理盐水适当稀释, 温度为 4℃ 备用。

5. 外周血细胞的吞噬活性

取适量的金黄色葡萄球菌悬液与牙鲆外周血细胞混合, 两种细胞个数的比例约为 10:1, 放入容器中轻轻混匀后, 温度在 28℃ 进行孵育 45 min。孵育过程中每间隔 10 min 轻轻摇动混匀。孵育完毕从中取混合液适量制作血涂片 (用蜡笔在血涂片上划出染色区, 以防止滴加染液时溢流), 自然晾干后用甲醇固定 2 min。血涂片平放于桌面上, 每片滴加适量瑞氏染色液 (Wright's), 染色液布满所划范围内的血膜, 染色 2 min 后, 再加入适量 pH 6.4 的 PBS 缓冲液继续染色 3 min。晃动载玻片使沉渣浮起, 用蒸馏水轻轻冲洗, 至血膜呈淡红色, 将玻片直立晾干, 镜检观察, 计算牙鲆外周血细胞的吞噬百分率 (Phagocytic Percentage, PP) 和吞噬指数 (Phagocytic Index, PI), 其定义为

$$PP = \frac{100 \text{ 个细胞中参与吞噬的细胞数}}{100} \times 100\%$$

$$PI = \frac{\text{吞噬细胞中的金黄色葡萄球菌总数}}{\text{参与吞噬的细胞数}} \times 100\%$$

二、结 果

1. 外周血细胞吞噬指数和吞噬百分率的变化

外周血细胞吞噬实验表明, 牙鲆在接种疫苗后, 刺激了外周血中吞噬细胞的免疫防御活力, 在免疫之后 2 周吞噬细胞的吞噬指数和吞噬百分率都得到不同程度的提高。对照组在整个实验期间的吞噬指数为 (1.95 ± 0.25), 而免疫组的吞噬指数由免疫两周后的 (3.1 ± 0.1) 上升至五周后的 (4.05 ± 0.15) (图 1); 对照组的吞噬百分率为 (21.1 ± 1.4)%, 而免疫组的吞噬百分率由免疫两周后的 (25.2 ± 0.5)% 上升至五周后的 (34.1 ± 0.7)% (图 2)。免疫组牙鲆外周血细胞的 PP 和 PI 均显著高于对照组 (检验,

$P < 0.05$)。在本实验为期 5 周的观察期间, 免疫组牙鲆外周血细胞的吞噬活性是逐渐增加的, 在免疫后 4~5 周牙鲆外周血细胞的吞噬率和吞噬指数基本达到最高。

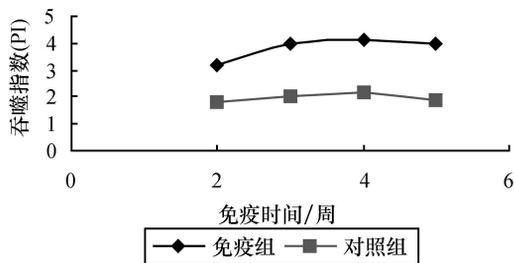


图 1 牙鲆外周血细胞吞噬指数

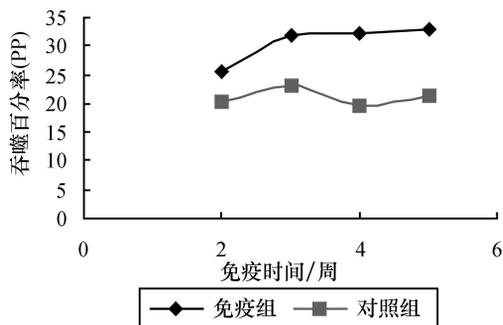


图 2 牙鲆外周血细胞吞噬百分率

2. 牙鲆红细胞的吞噬活性

鱼类红细胞不同于人类和其他哺乳动物, 它具有细胞核, 在细胞质中还有少量细胞器, 结构和功能是相适应的, 这些结构可能使鱼类红细胞具有除运输氧气外其他的重要功能(刘云等, 2000)。实验首次观察到牙鲆外周血中的红细胞也具有较强的吞噬能力, 可形成明显的伪足对金黄色葡萄球菌进行黏附、包围和吞噬。牙鲆的红细胞为椭圆形, 细胞中央具有一个圆形或椭圆形的细胞核, 核膜清晰可见, 可被 Wright 染色液染成紫红色。红细胞在接触到金黄色葡萄球菌之后, 接触部位的细胞膜内陷形成伪足, 包围并吞噬金黄色葡萄球菌。图 3 和图 4 为牙鲆外周血中白细胞和红细胞吞噬金黄色葡萄球菌的情形。在显微镜下可经常观察到一个红细胞吞噬多个金黄色葡萄球菌的现象, 表明牙鲆红细胞具有较强的吞噬能力。结果显示, 在接种鳗弧菌灭活疫苗 2 周后, 免疫牙鲆外周血细胞的吞噬活性(包括吞噬指数和吞噬率)显著提高, 免疫组和对照组差异明显(检验。

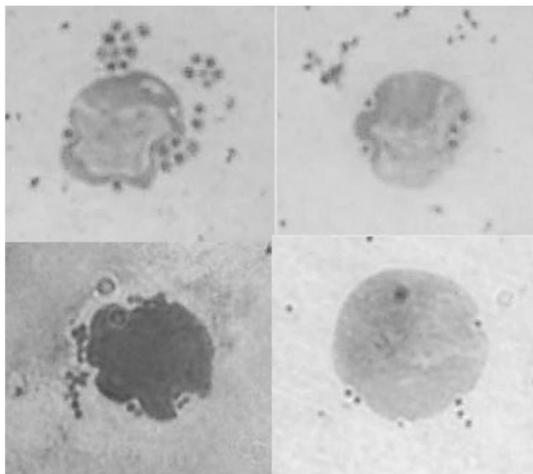


图 3 牙鲆外周血各种白细胞吞噬金

黄葡萄球菌($\times 1,800$)

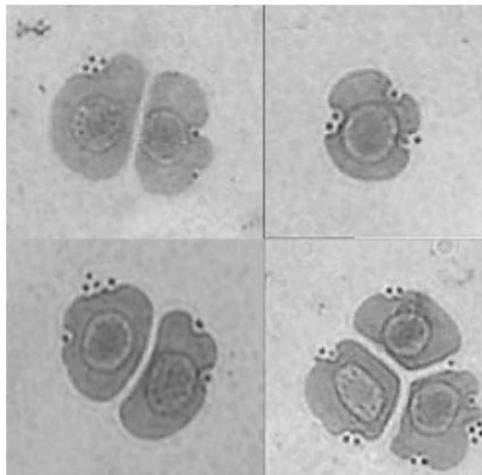


图 4 牙鲆外周血红细胞吞噬金

黄葡萄球菌($\times 1,800$)

$P < 0.05$)。通过实验,作者首次发现牙鲆红细胞也具有较强的吞噬活力。这表明牙鲆红细胞除具有运输 O_2 和 CO_2 的机能外,还具有重要的免疫防御功能。

三、讨 论

鱼类虽是较低等的脊椎动物,但已经具备一个相当完善的免疫系统,通过特异性和非特异性免疫防御来抵抗病原体的侵袭。鳃弧菌是我国北方海水养殖鱼类细菌性疾病的主要病原(莫照兰等,2003),通过制备鳃弧菌灭活疫苗对养殖牙鲆进行免疫接种,可以显著提高牙鲆细胞免疫和体液免疫应答水平,溶菌酶活力和攻毒后的免疫保护率也得到提高。

血细胞特别是粒细胞和单核细胞等吞噬细胞是鱼类非特异性免疫防御体系中的重要防线之一,能够有效清除和杀灭侵入到宿主循环系统中的病原微生物。测定鱼类吞噬细胞的活性可作为判定机体抗病力的一个重要指标。本实验表明,在注射鳃弧菌灭活疫苗2周后,牙鲆外周血细胞的吞噬活力得到提高,在5周后基本达到了最高水平,同对照组相比差异明显。安利国等(1999)对鲤鱼注射豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)灭活疫苗后,大大提高了鲤鱼腹腔吞噬细胞和血清溶菌酶的活性。单红等(2005)利用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)灭活疫苗作为免疫原对南方鲇进行注射免疫,结果发现,既增加了南方鲇外周血中白细胞的数量,也提高了南方鲇吞噬细胞的吞噬活性。这与作者的实验结果是一致的。表明接种疫苗对鱼类非特异性细胞免疫起到了激活作用,非特异性细胞免疫是鱼类一种重要的免疫保护机制。

目前报道的鱼类的吞噬细胞主要有单核细胞、巨噬细胞和各种粒细胞(周永灿,2003;张永安,2000)。但在本实验中,发现牙鲆的红细胞也具有很强的吞噬活性,说明鱼类的红血细胞除了运输 O_2 和 CO_2 的主要机能外,也具有一定的免疫防御功能。王旭东(1996)报道了两种两栖动物和3种鱼类的红细胞均具有一定的吞噬活力;蔡完其(2003)证实了红鲤的4种群体的红细胞具有黏附和吞噬能力,种群间还存在一定的差异;Passantino(2002)也报道了虹鳟的红细胞具有黏附和内吞酵母的活性,与本实验中的研究结果相同。目前被证实的具有红细胞免疫功能的哺乳类和鸟类逐渐增多(王旭东等,1995;Molina et al.,1992),而且在人类(朱大栩,1993;孙建中,2001)及其他哺乳类和鸟类的红细胞偶尔也可以表现出吞噬和黏附等免疫功能。因此有学者推测红细胞的吞噬功能至少在两栖类和鱼类中是具有广泛性的。既然红细胞具有这种吞噬活性,其数量众多,在外周血中是白细胞的500~1000倍,那么它在机体免疫系统中的作用一定十分巨大。红细胞免疫是目前免疫学领域中一个较新的研究内容。由于红细胞的构造很简单,因而过去人们一直以为其功能也很简单,仅仅是一种运输 O_2 和 CO_2 的工具。但后来人们发现事实上并非如此。1981年美国的生殖免疫学家 Siegel(1981)在前人研究的基础上提出了“红细胞免疫系统(Red Cell Immune System, RCIS)”的新概念,更新了人们对红细胞功能的认识,促进了红细胞免疫研究工作的迅速发展。这些工作主要在人类以及其他

哺乳类和鸟类中开展最多, 在较为低等的鱼类中有关红细胞免疫的报道很少。因此对鱼类红细胞免疫系统的进一步研究, 将对全面客观地了解鱼类机体的防御系统具有重要的理论和现实意义, 为我们将进一步开展鱼类红细胞免疫机理的深入研究, 探究鱼类红细胞免疫功能的分子打下基础。

参 考 文 献

- 安利国, 冯程强, 邢维贤等. 1999. 灭活疫苗对鲤鱼血清溶菌酶和腹腔吞噬细胞活性的作用. 山东师大学报(自然科学版), 175~179
- 蔡完其, 轩兴荣. 2003. 红鲤 4 群体间红细胞免疫功能及其差异. 中国水产科学, 10(2): 133~136
- 刘云, 姜明, 姜国良等. 2000. 牙鲆外周血细胞显微及亚显微结构的研究. 青岛海洋大学学报, 30(2): 141~147
- 莫照兰, 陈师勇, 谭训刚等. 2003. 养殖牙鲆细菌性病原分离与鉴定. 海洋科学集刊 45: 163~168
- 单红, 张其中, 刘强平等. 2005. 灭活菌苗免疫的南方鲈外周血液细胞免疫指标的变化. 中国水产科学, 12(3): 275~280
- 孙建中, 郭峰, 丁苏苏. 2001. 红细胞对细菌的天然免疫黏附实验研究. 中国血液流变学杂志, 11(1): 48~51
- 王旭东, 饶家荣. 1996. 红细胞广泛吞噬作用的发现与研究. 水产学报, 72~75
- 王旭东, 饶家荣, 李正甫等. 1995. 11 类哺乳类和鸟类动物红细胞免疫功能的对比研究. 畜牧兽医学报, 26(6): 524~529
- 朱大栩. 1993. 生物化学与生物物理进展. 膜锚蛋白结构与功能及其调控机制. (1): 17~21
- 周永灿, 邢玉娜, 冯全英. 2003. 鱼类血细胞研究进展. 海南大学学报(自然科学版), 21(2): 171~176
- 张永安, 孙宝剑. 2000. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况. 水生生物学报, 24(6): 648~654
- Molina H, Wong W, Kinoshita T et al. 1992. Distinct receptor and regulatory properties of recombinant mouse complement receptor 1 (CR1) and Cr3: the two genetic homologues of human CR1. J EXP Med 175(1): 121~129
- Passantino L, Alamanu M, Ciancotta A. 2002. Fish Immunology I: Binding and engulfment of *Candida albicans* by erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Immunopharmacology and Immunotoxicology 24(4): 665~678
- Siegel J, Liu TL, Gleicher N. 1981. The red cell immune system. Lancet 2(8246): 556~559

EFFECT OF INACTIVATED *VIBRIO ANGUILLARUM* VACCINE ON PHAGOCYTOSIS OF *PARALICHTHYS OLIVACEUS* PERIPHERAL BLOOD CELLS

ZHANG Zhendong² ZHANG Peijun MO Zhaoan XU Yongli

(¹ Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

(² National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023)

ABSTRACT

Left eyed flounders, *Paralichthys olivaceus*, were inoculated with inactivated *Vibrio anguillarum* vaccine via intramuscular injection to analyze level of cellular immune responses induced by the immunogen. The vaccinated as well as control fish were serially sampled for blood cells 2, 3, 4, 5 weeks post immunization to evaluate phagocytosis activity. Changes of phago-

cytic index (PI) and phagocytic percentage (PP) determined by measurement of ingesting *Staphylococcus aureus* were observed with Wright's stain. Results showed that phagocytosis activity began to increase from 2 weeks post immunization. There is a statistically significant difference in PI and PP ($P < 0.05$) between vaccinated and control fish. The red cell phagocytosis of left-eyed flounders described in the present study for the first time indicates red cell plays an important role not only in respiratory function but also in immune function.