

草鱼、中华鳖 IL-2 活性影响因素的研究*

郭 琼 林

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 结果显示: 当年草鱼种和中华鳖脾细胞培养上清液中能检测出 IL-2 活性, 而且 1 龄以上草鱼、中华鳖的 IL-2 活性高于当年孵化的草鱼和中华鳖。草鱼、中华鳖脾细胞在 25℃ 培养温度条件下, 其上清液中 IL-2 活性最高, 35℃ 次之, 15℃ 最低。因此, 草鱼、中华鳖 IL-2 活性在一定范围内是随着年龄增加而增强和依赖温度的。通过小鼠胸腺细胞增殖和对小鼠 L₉₂₉ 细胞杀伤率的实验表明 37℃ 比 25℃ 检测温度下所测的 IL-2 活性高, 而中华鳖胸腺细胞增殖实验却显示 25℃ 检测温度下 IL-2 活性高于 37℃。本文讨论了年龄、温度对免疫反应影响的机理。

关键词: 白细胞介素 2; 年龄与温度; 发育和比较免疫学; 草鱼; 中华鳖

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)04-0311-06

前期研究工作已证实 ConA 刺激的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus* Valenciennes)、中华鳖(*Trionyx sinensis* Wiegmann)脾细胞培养上清液中白细胞介素-2(Interleukin-2, IL-2)物质的存在, 其 IL-2 活性表现在促进小鼠、中华鳖胸腺细胞的增殖, 协同和激发杀伤细胞杀伤小鼠 L₉₂₉ 细胞(一种瘤靶细胞)^[1]。除了 Hardie 等发现虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) T 淋巴细胞产生的另一类作用于巨噬细胞的淋巴因子即巨噬细胞激活因子(Macrophage activating factor, MAF)在体内、外的产生都取决于温度外^[2], 迄今为止, 作者尚未发现对水生动物 IL-1、IL-2、IL-4 和 IL-6 研究中有关影响因素的报道。有资料表明: 不同年龄的水生动物如青鳉(*Pollachius virens*)和斑点叉尾 (*Ictalurus punctatus*) 机体的特异性抗体免疫反应是有差异的^[3,4]; 不同温度(包括季节)对草鱼、鲑(*Salmo salar*)、斑点叉尾和金眼石鲈(*Morone chrysops*) 机体抗体反应也有不同程度的影响^[5-9]。本研究旨在探讨草鱼、中华鳖细胞免疫的作用和规律以及某些因素影响免疫反应的机理, 为确定免疫防病实践及免疫实验最佳条件提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂来源 实验鱼为当年健康草鱼种(平均体长 15cm)、1 龄草鱼(平均体重 0.75kg)、2 龄草鱼(平均体重 1.8kg); 实验鳖为当年孵化中华鳖(体重 100—150g)、1 龄中华鳖(体重 400—450g)、2 龄中华鳖(体重 600—750g); C57BL/6—8 周小鼠由湖北省卫生

收稿日期: 2000-12-25; 修订日期: 2001-03-06

基金项目: 国家自然科学基金(No. 39470555; 30070588); 湖北省自然科学基金; 中国科学院所长择优基金资助项目

作者简介: 郭琼林(1957—), 女, 山西晋城人; 副研究员; 硕士, 研究方向: 水生动物病理学与免疫学

防疫站提供;瘤靶细胞为对 NK 细胞敏感的小鼠 L₉₂₉细胞系。

1.2 含 IL-2 物质的草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液制备^[1] 培养温度分 15℃、25℃和 35℃3 组。

1.3 草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液 IL-2 活性的检测 小鼠胸腺细胞³H-TdR 掺入法同文献[1],待测样品稀释度均为 1: 8(下同),检测温度(检测时的培养温度)为 15℃、25℃、37℃。体外杀伤活性的³H-TdR 释放法同文献[1],效靶比均为 200: 1。

1.4 不同年龄草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液 IL-2 活性的检测 将不同年龄(1 龄以下、1 龄和 2 龄)草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液(培养温度均为 25℃)作为待测样品,采用小鼠胸腺细胞³H-TdR 掺入法和体外杀伤活性的³H-TdR 释放法检测其 IL-2 活性变化,检测温度均为 37℃。

1.5 不同培养温度对草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液 IL-2 活性的影响 将 3 种不同温度条件下 1 龄草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液作为待测样品,采用小鼠胸腺细胞³H-TdR 掺入法和体外杀伤活性的³H-TdR 释放法检测其 IL-2 活性变化,检测温度均为 37℃。

1.6 不同检测温度对草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液 IL-2 活性的影响 将 25℃培养条件下的 1 龄草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液,检测温度分 15℃、25℃和 37℃3 组,采用小鼠胸腺细胞³H-TdR 掺入法和体外杀伤活性的³H-TdR 释放法检测其 IL-2 活性变化。实验数据以 X±SE 表示,采用 t 检验进行显著性比较。

2 结果

2.1 不同年龄草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液 IL-2 活性的变化

不同年龄草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液对小鼠胸腺细胞的促增殖作用和体外对小鼠 L₉₂₉细胞的杀伤率是有差异的。图 1、图 2 显示:1 龄、2 龄草鱼、中华鳖的脾细胞培养上清液对小鼠淋巴细胞的促增殖作用和对小鼠 L₉₂₉细胞的杀伤率较当年孵化的草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液高(P< 0. 01), 1 龄、2 龄草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液对小鼠胸腺细胞的促增殖作用和对小鼠 L₉₂₉细胞的杀伤率无明显差异(P> 0. 05),而不同年龄中华鳖的 IL-2 活性均高于同龄草鱼(P< 0. 01)。

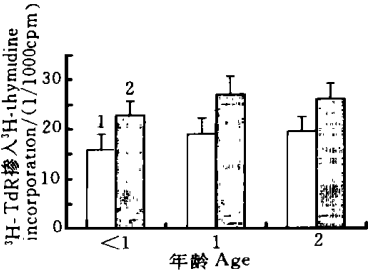


图 1 不同年龄草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液对小鼠胸腺细胞增殖的影响

Fig. 1 The effect of splenocyte culture supernatant of grass carp and Chinese soft shelled turtle on thymocyte (C57BL/ 6- 8 mice) proliferation with different age

1. 草鱼组 2. 中华鳖组

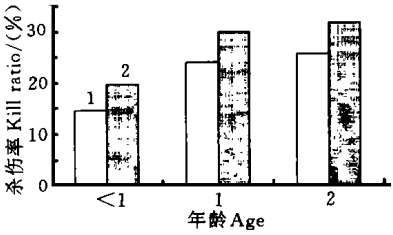


图 2 不同年龄草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液对 L₉₂₉细胞杀伤率的影响

Fig. 2 The effect of splenocyte culture supernatant of grass carp and Chinese soft shelled turtle on L₉₂₉ cytotoxicity with different age (1—2 图注同图 1)

2.2 不同培养温度草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液 IL-2 活性的变化

不同培养温度条件下, 1 龄草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液对小鼠胸腺细胞促增殖作用和对小鼠 L₉₂₉ 细胞的杀伤率是不同的。图 3、图 4 显示: 25℃培养温度条件下, 草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液的促小鼠胸腺细胞增殖和对小鼠 L₉₂₉ 细胞的杀伤率最明显, 35℃次之, 15℃最低($P < 0.01$), 而在同样培养温度条件下的中华鳖 IL-2 活性均高于草鱼($P < 0.01$)。

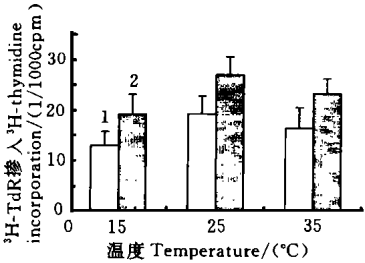


图 3 不同培养温度下草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液对小鼠胸腺细胞增殖的影响

Fig. 3 The effect of splenocyte culture supernatant of grass carp and Chinese soft shelled turtle on thymocyte (C57BL/6- 8 mice) proliferation with different culture temperature(1—2 图注同图 1)

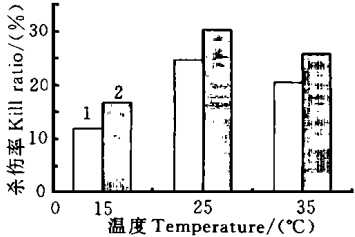


图 4 不同培养温度下草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液对 L₉₂₉ 细胞杀伤率的影响

Fig. 4 The effect of splenocyte culture supernatant of grass carp and Chinese soft shelled turtle on L₉₂₉ cytotoxicity with different culture temperature(1—2 图注同图 1)

2.3 不同检测温度对草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液 IL-2 活性的影响

图 5、图 7 显示: 1 龄草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液在不同检测温度下对小鼠胸腺细胞的促增殖作用和对小鼠 L₉₂₉ 细胞的杀伤率有明显的不同, 检测温度为 37℃时的 IL-2 活性最高, 25℃次之, 15℃最低($P < 0.01$)。同样检测温度条件下的中华鳖 IL-2 活性均高于草鱼($P < 0.01$)。而图 6 则显示: 1 龄中华鳖脾细胞培养上清液在检测温度为 37℃时, 小鼠胸腺细胞³H-TdR 的掺入明显高于中华鳖胸腺细胞($P < 0.001$); 检测温度为 25℃、15℃时, 中华鳖胸腺细胞³H-TdR 的掺入高于、低于小鼠胸腺细胞, 但差异均不显著($P > 0.05$)。小鼠胸腺细胞³H-TdR 的掺入在 37℃时最高, 25℃次之, 15℃最低($P < 0.01$); 而中华鳖胸腺细胞³H-TdR 的掺入在 25℃时最明显, 37℃次之, 15℃最低($P < 0.01$)。

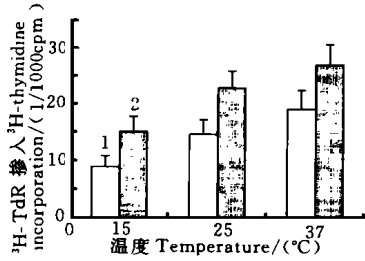


图 5 不同检测温度下草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液对小鼠胸腺细胞增殖的影响

Fig. 5 The effect of splenocyte culture supernatant of grass carp and Chinese soft shelled turtle on thymocyte (C57BL/6- 8 mice) proliferation with different assay temperature(1—2 图注同图 1)

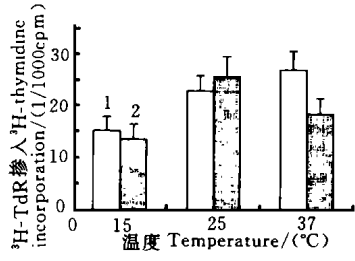


图 6 不同检测温度下中华鳖脾细胞培养上清液对小鼠、中华鳖胸腺细胞增殖的影响

Fig. 6 The effect of splenocyte culture supernatant of Chinese soft shelled turtle on thymocyte (C57BL/6- 8 mice and Chinese soft shelled turtle) proliferation with different assay temperature 1. 小鼠组 2. 中华鳖组

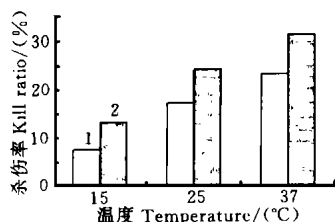


图7 不同检测温度下草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液对 L₉₂₉ 细胞杀伤率的影响

Fig. 7 The effect of splenocyte culture supernatant of grass carp and Chinese soft shelled turtle on L₉₂₉ cytotoxicity with different assay temperature (1—2 图注同图 1)

3 讨论

尽管存在着种间、个体差异,但总体来说,年龄大小仍是影响机体免疫反应的一个重要因素。鱼类免疫系统的个体发育研究表明鲤发育到 3、4 月龄时才具有显著的免疫反应^[10]。即使是进化程度较高的爬行动物的抗体产生也需在出生 3 个月以后^[11]。Priebe 等报道金眼石酯的抗体产生与年龄有关;Ourth 等在对斑点叉尾的研究中发现:2 月龄时检测出 IgM 为 1.5mg/mL,而到 5 龄时已增加到 8.2mg/mL。这些研究资料表明:鱼类免疫系统成熟与年龄相关原因之一在于年龄影响机体特异性抗体反应。鱼类、爬行类动物属变温动物,对温度变化的刺激反应最敏感。因此,在鱼类、爬行类特异性免疫反应的环境因子

中最重要且研究最多的是温度。江育林、杨先乐等的实验结果表明:草鱼抗体反应随温度升高而增强,在 25℃ 时最高效价达 1:200000,但在 32℃ 以上时又降低。当水温低于 10℃ 时,草鱼免疫反应受到抑制。Lovely 等证实在低温(7—8℃)腹腔注射病原导致鱼体无症状。感染后 31 周,仅 4% 大西洋鲑能产生抗体。Wetherall 等发现蜥蜴(*Tiliqua rugosa*)抗体反应在 20—30℃ 范围内,随温度升高而加强^[12]。关于年龄、温度对特异性细胞免疫影响的资料相对较少。Collazos 等曾报道淋巴细胞丝裂原反应在冬季最低、夏季最高^[13],虹鳟巨噬细胞活化因子(MAF)在体内、外的产生都取决于温度。Bly 等发现斑点叉尾的冬季水霉病是与低温导致免疫抑制和水霉(*Saprolegnia* sp.)的入侵有关,其病灶部位缺少粒细胞浸润,而这种粒细胞浸润病灶部位实为粒细胞在白细胞移动抑制因子(Leukocyte Migration Inhibitory Factor, LIF)等作用下向炎症部位聚集的形态学证据。实验结果显示:草鱼、中华鳖淋巴细胞的 IL-2 活性即促使 T 淋巴细胞增殖及对 L₉₂₉ 细胞的杀伤率在一定的范围内是随着年龄的增加而增强和依赖温度的。这一结果与上述温度对抗体反应的影响基本吻合。由于哺乳动物的 IL-2 已被证明为 T 辅助细胞(Th 细胞)产生,而且 IL-2 作为 B 细胞活化的第二信号能促使 B 细胞活化、增殖并分化为抗体分泌细胞。因此,抗体的产生在很大程度上依赖于 Th 细胞以及 Th-B 细胞之间的相互作用。根据实验结果和对上述资料的综合分析,作者推测:水生动物年龄、温度对免疫影响的机理在于这些因素可能直接影响 Th 细胞的功能和代谢状态以及与 B 淋巴细胞的相互作用。正因为如此,即使是 T 记忆细胞、B 淋巴细胞受低温抑制的影响不明显^[14, 15],但由于 Th 细胞及其 IL-2 对年龄、温度条件的敏感和 Th 细胞及 IL-2 物质在抗体反应中的特殊作用,所以机体 B 淋巴细胞介导的抗体反应仍与温度、年龄等因素密切相关。作者认为:实验结果表明的 Th 细胞的功能状态和 IL-2 的产生与活性高低正是直接导致抗体反应高低的重要原因之一。此外,本实验的重要意义还在于为免疫预防实践提供了理论和实验依据,强调了过分地依赖较低的免疫状态来完成免疫保护可能达不到理想的效果,提醒免疫防病中要特别注意免疫对象的年龄及环境温度。至于年龄、温度对非特异性免疫,主要为对吞噬细胞功能的影响的报道则不尽相同,但有趣的是大部分的意见一致认为:吞噬作用不完全

取决于年龄与温度, 吞噬作用在低温条件下的防御机制中具有重要意义^[16-20]。

值得指出的是: 检测温度对草鱼、中华鳖 IL-2 活性的影响是复杂的。通过小鼠胸腺细胞增殖和对 L₉₂₉ 细胞的杀伤率的实验, 结果显示 37℃ 比 25℃ 检测温度下所测的 IL-2 活性高, 而中华鳖胸腺细胞增殖实验却显示 25℃ 检测温度下 IL-2 活性高于 37℃。小鼠、中华鳖分属恒温动物和变温动物, 它们对温度变化的应激能力的不同决定了它们体内的恒定温度不一样, 检测最佳温度也不一样。Collazos 等实验显示, 当检测温度在 22℃ 时, 冬季淋巴细胞的丝裂原反应也较明显。李静等研究表明: 饲养于 5—8℃ 条件下的草鱼白细胞在 5℃ 测试温度下的免疫和正常吞噬活性均高于在 22℃ 饲养条件下的草鱼。这里指的测试温度是相对实验时的鱼体饲养温度而言, 而作者所指的检测温度是考虑了受测动物细胞对温度变化应激状态的不同。因此, 本实验结果除了对今后草鱼、中华鳖免疫防病实践提供可靠的理论和实验依据外, 亦为进一步开展 IL-2 及其细胞免疫机理的研究和实验方案的确定奠定了基础。

参考文献:

- [1] 郭琼林. 草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液 IL-2 物质的检测[J]. 水生生物学报, 2001, **25**(1): 21—27
- [2] Hardie L J, Fletcher T C, Secombes C J. Effect of temperature on macrophage activation and production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes[J]. *Dev Comp Immunol*, 1994, **18**(1): 57—66
- [3] Priebe K, Huber C, Maertlbauer E, Terplan G. Detection of antibodies against larvae of *Anisakis simplex* in the *Poikilotherm* *ladihus virens* by ELISA[J]. *J Vet Med B*, 1991, **38**: 209—214
- [4] Ourth D D, Ratts V D, Parker N C. Bactericidal complement activity and concentration of immunoglobulin M, transferin, and protein at different age of channel catfish[J]. *J Aquat Anim Health*, 1991, **3**(4): 274—280
- [5] 江育林, 李燕, 于平. 草鱼免疫反应的初步研究[J]. 水生生物学报, 1991, **15**(4): 321—326
- [6] Yang X, Zuo W. (杨先乐, 左文功) Relation between water temperature and immune response of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V.) [J]. *Asian Fish Sci*, 1997, **10**(2): 169—177
- [7] Lovely J E, Cabo C, Griffiths S G, et al. Detection of *Renibacterium salmoninarum* infection in asymptomatic Atlantic salmon[J]. *J Aquat Anim Health*, 1994, **6**(2): 126—132
- [8] Bly J E, Lawson L A, Abdel Aziz E S, Clem L W. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, immunity to *Saprolegnia* sp. [J]. *J Appl Aquacult*, 1993, **3**(1—2): 35—50
- [9] Hrubec T C, Robertson J L, Smith S A, et al. The effect of temperature and water quality on antibody response to *Aeromonas salmonicida* in sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1996, **50**(1—2): 157—166
- [10] Secombes C J, Margaret J, Manning J. Comparative studies on immune system of fishes and amphibian: antigen localization in the carp *Cyprinus carpio* L [J]. *J Fish Dis*, 1980, **3**: 399—412
- [11] Sidky Y A, Auerbach R. Tissue culture analysis of immunological capacity of snapping turtles [J]. *J Exp zool*, 1968, **167**: 187—196
- [12] Wetherall J D, Tumer K. Immune response of the Lizard, *Tiliqua rugosa* [J]. *Aust. J Exp Biol Med Sci*, 1972, **50**: 79—95
- [13] Collazos M E, Bariga C, Ortega Rincon E. Seasonal variations in the immune system of the tench, *Tinca tinca* (Cyprinidae): Proliferative response of lymphocytes induced by mitogens [J]. *J Comp Physiol*, 1996, **165**(7): 592—595
- [14] Bly J E, Clem L W. Temperature and teleost immune functions [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1992, **2**(3): 159
- [15] Le Morvan C, Clerton P, Deschaux P, et al. Effects of environmental temperature on macrophage activities in carp [J].

Fish Shellfish Immunol, 1997, **7**(3): 209—212

- [16] Lopez C, Carballal M J, Azevedo C, et al. Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clem *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia) [J], *Dis A quat Org*, 1997, **30**(3): 209—215
- [17] Collazos M E, Ortega E, Barriga C. Effect of temperature on immune system of a cyprind fish (*Tinca tinca* L). Blood phagocyte function at low temperature[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1994, **4**(3): 231—238
- [18] Collazos M E, Barriga C, Ortega E. Seasonal variations in immune system of the cyprinid *Tinca tinca*. phagocytic function[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1995, **18**(2): 105—113
- [19] Ainsworth A. J, Cherr Dexiang. , Waterstrat, P. R, et al. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). I. Leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior kidney at 10 degree C[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1991, **100A**(4): 907—912
- [20] 李静, 陈昌福. 低温季节草鱼离体白细胞吞噬活性的研究[J]. 水生生物学报, 1998, **22**(增刊): 132—137

A STUDY OF INFLUENTIAL FACTORS ON IL-2 ACTIVITY OF GRASS CARP, *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* AND CHINESE SOFT-SHELLED TURTLE, *TRIONYX SINENSIS*

GUO Qionglin

(Institute of hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: Interleukin-2 (IL-2) activities were tested in splenocyte culture supernatant of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* and Chinese soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis* under one age. IL-2 activities of grass carp and Chinese soft-shelled turtle above one age were higher than those under one age. Within 15 °C to 35 °C range, IL-2 activities of splenocyte culture supernatant of grass carp and Chinese soft-shelled turtle were the highest at 25 °C, the lowest at 15 °C. Thereby, IL-2 activities increased with age and depended on temperature within a certain range. However, effects of assay temperature on IL-2 activity of grass carp and Chinese soft-shelled turtle were complicated. By thymocyte (C57BL/6—8 mice) proliferation and L₉₂₉ cytotoxicity assay, IL-2 activities of grass carp and Chinese soft-shelled turtle at 37 °C was higher than those at 25 °C. But by thymocyte (*T. sinensis*) proliferation assay, IL-2 activity of Chinese soft-shelled turtle at 25 °C was higher than those at 37 °C. The influential mechanism of age and temperature on immune response has been discussed.

Key words: Interleukin 2; Age and temperature; Developmental and comparative immunology; Grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*; Chinese soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*