

综 述

粘孢子虫免疫学研究进展

汪建国 吴英松 鲁义善

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

ADVANCES IN RESEARCH OF MYXOSPOREAN IMMUNOLOGY

WANG JianGuo, WU Ying-Song and LU Yi-Shan

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

关键词: 粘孢子虫; 免疫学; 进展

Key words: Myxosporean; Immunology; Advance

中图分类号: Q959.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)05-0539-003

粘孢子虫(Myxosporean)除少数种类寄生在蠕虫、两栖类和爬行类外^[1], 绝大部分寄生于鱼类(包括海水鱼类和淡水鱼类), 可以说粘孢子虫是鱼类特有的一类寄生原生动物。自Gluge首次发现粘孢子虫以来, 至今国内外报道的有近1200种^[2], 其中在我国淡水鱼类中寄生的就有600余种, 此类寄生虫几乎已在鱼体的所有器官中发现, 往往在鱼的体表和内脏形成许多大小不一的胞囊, 使商品鱼失去价值, 严重时可导致鱼类大量死亡, 给鱼类养殖生产带来巨大的经济损失^[3]。

鱼类粘孢子虫病的防治十分困难, 这是因为粘孢子虫的成熟孢子有一层几丁质壳片, 具有很强的耐药力, 至今尚未筛选出一种杀灭其孢子的有效药物。因此, 探索粘孢子虫的免疫防治已迫在眉睫。但在粘孢子虫免疫原性问题上存在许多争议, 表现在粘孢子虫能否导致宿主(鱼体)产生体液免疫反应, 粘孢子虫是否存在种、属特异性抗原和期特异性抗原, 以及在整个粘孢子虫的生活史过程中是否存在某些共同抗原等。这些争议严重妨碍了粘孢子虫病的免疫防治。

1 炎症反应

普遍认为, 组织寄生的种类一般都能导致宿主产生免疫反应, 而腔寄生的粘孢子虫种类由于寄主和寄生虫之间长时间的相互适应, 不产生或产生很微弱的寄主反应^[4]; 然而, 个别腔寄生的粘孢子虫能导致宿主产生炎症反应, 包括淋巴细胞的浸润, 上皮细胞的脱落、坏死, 粘液分泌物的增多以及组织的充血和增生^[5]。

Nigrelli等^[6]最先描述了宿主对粘孢子虫入侵后产生的炎症反应, 包括其表皮和皮下组织细胞的成纤维细胞化, 不仅胞囊寄生部位的组织产生反应, 胞囊周围的组织也产生反应。病鱼的肝脏、肾、心脏发生退行性变化, 包括巨噬细胞的活动, 嗜酸性细胞、淋巴细胞、浆细胞和成纤维细胞的聚集^[7]。Dykova等^[8]通过对感染两种尾孢虫的鱼鳃的组织病理观察, 提出鱼体对粘孢子虫的反应分为两个阶段, 首先, 随原质体的生长, 组织变形、水肿和增生, 尽管器官的功能受到损伤, 鱼体并不产生防御反应; 第二阶段是原质体内充满成熟的孢子, 激起宿主产生炎症反应, 导致原质体被肉芽肿所代替。组织寄生的粘孢子虫导致鱼体产生炎症反应, 包括巨噬细胞和单核淋巴细胞浸润的肉芽肿反应, 另一些种类导致侵袭组织的完全退化, 相连组织细胞的水肿和成纤维细胞的侵入^[9-12]。鲑科鱼类对PKX的入侵也能产生细胞炎症反应, 主要是包括巨噬细胞和单核淋巴细胞浸润的肉芽肿反应, 引起炎症反应主要是由于鲑鱼是PKX的异常宿主, 炎症反应的产生抑制了PKX发育为成熟的孢子^[13,14]。

谢杏人等在鲤鱼白细胞对“未明血液生物体”(UBO)的免疫反应的研究过程中, 发现“UBO”感染鲤鱼后, 白细胞的数量大幅度增加, 单核细胞对“UBO”进行吞噬、消化, 鲤鱼对“UBO”的入侵表现出一种典型细胞免疫反应^[15]。

2 特异性体液免疫

鱼类不仅能以细胞免疫的方式对外来异己抗原进行免疫, 以维持机体的正常功能及自身的相对稳定, 而且还可以

收稿日期: 2002-11-22; 修订日期: 2002-12-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271028); 中国科学院知识创新项目(KSCX2-1-04)

作者简介: 汪建国(1948—), 男, 湖北省黄梅人; 研究员, 博士生导师; 主要从事寄生原动物学和鱼病学研究 Email: wangjg@ihb.ac.cn; 吴英松的现在工作单位为中国人民解放军第一军医大学

合成免疫球蛋白(可能仅 IgM),以体液免疫方式来阻止寄生虫的入侵。但粘孢子虫能否导致宿主产生体液免疫,存在两种相反的观点。

2.1 不产生体液免疫反应的证据

Pauley^[16]应用免疫琼脂扩散试验未能证明抗体的存在,他认为其原因可能是脑粘体虫能够模仿寄主自身抗原从而逃避了宿主的免疫监督;Halliday^[17]用间接免疫荧光试验(IFAT)检测不到自然感染脑粘体虫的虹鳟血液中的抗体存在。Siau^[18]用免疫琼脂扩散试验也检测不到用细微碘泡虫(*Myxobolus exiguus*)免疫的鲮属鱼抗体的存在。Bartholomew等^[19]在研究自然感染萨斯塔角形虫(*Ceratomyxa shasta*)的鱼类时,发现尽管病鱼出现严重的炎症反应,也同样检不出抗体。Western blot 试验表明宿主和虫体抗原具有相同的表位,因而,他也认为粘孢子虫能够模仿寄主自身抗原从而逃避了宿主的免疫监督。同样在患肾增生病(Proliferative kidney disease, PKD)和鳃增生病(Proliferative gill disease, PGD)的病鱼中,都没有发现产生体液免疫^[20]。作者认为不能产生抗体一方面是由于抗原模拟宿主抗原,还可能是虫体抗原的阶段变化,不同发育时期其本身的抗原性有不同的变化,另外腔寄生的粘孢子虫种类和组织寄生的种类的抗原性是否有所不同,还有待研究论证。

2.2 产生体液免疫反应的证据

Griffin^[21]采用 IFAT 在患脑晕症虹鳟体内检测到循环抗体的存在。宿主通过对虫体产生免疫反应将虫体数量控制在宿主可以忍受的范围,保证宿主不被寄生虫所致死,从而维持两者的共处关系。他认为 Pauley^[16]和 Halliday^[17]在病鱼血清中检测不出抗体,是由于免疫琼脂扩散法缺乏敏感性或 IFAT 法无特异性荧光抗体结合物所致。但是 Bartholomew等^[19]认为 Griffin 等^[21]的结果可能是兔抗鱼 IgM 抗体直接与虫体反应,而不是鱼抗体同虫体反应。Markiw 等^[22]和 Amandi 等^[23]分别用 IFAT、FAT 和凝集试验检测到病鱼血清中抗体的存在。Hoffman 将孢子培养于虹鳟血清中,经 ELISA 检测,49 例感染的虹鳟血清中的 29 例为阳性,而所有未感染的虹鳟的样品都为阴性。Furuta 等^[20]在“鲤鱼对饼形碘泡虫的免疫应答”的研究中用被动红细胞凝集试验检测到抗体的存在。吴英松等^[24]运用间接红细胞凝集试验检测自然感染圆形碘泡虫(*Myxobolus rotundus*)鲫鱼血清中的循环抗体。结果表明,在 16 尾感染圆形碘泡虫的鲫鱼血清中能检出抗体的有 14 尾,效价在 1:16 到 1:128 之间;而 9 尾未感染圆形碘泡虫的鲫鱼中仅 1 尾检出抗体,效价为 1:8,说明自然感染圆形碘泡虫的鲫鱼血清中存在循环抗体,并且感染强度与抗体水平不相关。肖武汉等对大量感染单极虫的鲤鱼血清去除脂蛋白后,经 SDS PAGE 电泳,样品中有 5—7 条蛋白带,经交叉免疫电泳,该血清能与单极虫孢子抗原发生沉淀发应,而对照组均为空白(资料)。

3 粘孢子虫抗原特性的研究

粘孢子虫是否具有期特异性抗原(Stage specific antigen)

或种特异性抗原?以及在整个粘孢子虫生活史中是否存在共同抗原?Bartholomew 等^[19, 25]以自然感染萨斯塔角形虫(*C. shasta*)的虹鳟腹水为抗原制备了 4 株单抗,以孢子为抗原制备了多抗,采用 IFAT、ELISA 和 Western blot 试验表明,单抗只与营养体抗原起反应,而不与该虫成熟孢子抗原起反应,表明营养体抗原与成熟孢子抗原不同,说明了该虫具有期特异性抗原,该抗原在某一特定的生活周期中,具有特异性。Paulley^[16]研究发现,兔抗脑粘体虫血清不与一种碘泡虫(*Myxobolus* sp.)的虫体起反应,因而认为脑粘体虫(*Myxosoma cerebri*)具有种特异性抗原^[26]。Amandi 等^[23]的凝集试验表明,抗 *Myxobolus insidiosus* 血清不与其他虫体起反应,而从不同地区、不同种类宿主收集的 *M. insidiosus* 具有相关的抗原性。Markiw 等^[22]分别用营养体和孢子抗原免疫新西兰白兔产生两种多抗,FAT 和 IFAT 试验表明,两种多抗除与自身抗原起反应外,还发生交叉反应,从而认为在同源系统中,该虫不同发育时期具有共同抗原。他还发现用脑粘体虫孢子和三突放射孢子虫(*Triactinomyxon* sp.)制备的抗血清都能与两者发生反应,因而支持脑粘体虫与三突放射孢子虫是同一生物体的不同发育阶段^[27]。吴英松等^[24]以圆形碘泡虫孢子的可溶性蛋白为抗原免疫新西兰白兔制备抗血清,ELISA 试验表明,该血清除能与圆形碘泡虫的营养体起反应外,还与关桥碘泡虫(*Myxobolus guangqiaoensis*)及野鲤碘泡虫(*Myxobolus koi*)的孢子起交叉反应;而与饼形碘泡虫(*M. artus*)、多格里尾孢虫(*Henneguya dogieli*)、时珍粘体虫(*Myxosoma sigini*)、箭形单极虫(*Thelohanellus sagittarius*)、湖北球孢虫(*Sphaerospora hupehensis*)的孢子不发生反应。表明该虫在其生活史发育过程中存在共同抗原,并且具有属特异性抗原。Furuta 等^[20]发现一些自然感染饼形碘泡虫的鱼类血清中循环抗体仅与该虫超声波破碎的抗原起反应,而不与完整的虫体起反应。当鲤鱼注射完整或破碎孢子时,鲤鱼并没有产生抗体,而当注射营养体期的虫体或用 BSA 培养的破碎孢子时可诱导鱼体产生抗体。因而认为早期营养体对鲤鱼具有抗原性,而孢子无抗原性^[16, 18]。粘孢子虫的抗原特性受抗原制备方法的影响,液氮冷冻研磨法制备的抗原的抗原性较强,超声波破碎法制备的抗原次之,完整孢子的无抗原性^[16]。

目前主要运用镜检法检查鱼体是否感染粘孢子虫的情况,但当病鱼感染轻微或虫体还处在早期发育阶段,特别是鱼体体表不现症状时,则传统方法很难检测出,而运用免疫学方法可在脑粘体虫发病前两个月即虫体还处在早期阶段即可作出诊断^[21]。另外,可以通过制备粘孢子虫种、属特异性单克隆抗体,运用免疫学方法检测种之间的交叉反应特性,对于粘孢子虫的分类以及研究其生活史具有一定的辅助意义。

参考文献:

[1] Overstreet R M. *Fabespora vermicola* sp. n., the first Myxosporidan from a platyhelminth[J]. *J. Parasit.* 1976, **62**(5):680—684
[2] Lom J. Myxosporae: a new look at long known parasites of fish[J]. *Parasitol. Today*. 1987, **3**(11): 327—332

- [3] Chen Q L, Ma C L. Fauna sinica Myxozoa: Myxosporidia[M]. Beijing: Science Press. 1998. [陈启鏊, 马成伦. 粘孢子虫志. 北京: 科学出版社, 1998]
- [4] Lom J. Diseases caused by protists[A]. Diseases of Marine Animals [C], Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland, 1984, IV: 114—168
- [5] Lom J. Cold blooded immunity to protozoa[A]. Immunity to Parasitic Animals[C]. Appleton Century crofts, New York, 1969, 1: 249—265
- [6] Nigrelli R F, Smith G M. A papillary cystic diseases affecting the barbels of *Ameiurus nebulosus* (Le Sueur), caused by the Myxosporidian *Henneyuya ameiurensis* sp. Nov[J]. *Zoologica N. Y.*, 1940, 25: 89—96
- [7] Jakowska S, Nigrelli R F. The pathology of myxosporidiosis in the Electric eel, *Electrophorus electricus* (L.), caused by *Henneyuya visceralis* and *H. electrica* sp. Nov[J]. *Zoologica N. Y.*, 1953, 38: 183—191
- [8] Dykova I, Lom J. Histopathological changes in fish gills infected with myxosporidian parasites of the genus *Henneyuya*[J]. *J. Fish Biology*, 1978, 12: 197—202
- [9] Robert R J, Elson K G R. An outbreak of whirling disease in rainbow trout[J]. *Veterinary Record*, 1970, 86: 258—259
- [10] Taylor R E, Haber M H. Opercular cyst formation in trout infected with *Myxosoma cerebralis*[J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 1974, 10: 347—351
- [11] Halliday M M. The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease of salmonids[J]. *J. Fish Biol*, 1976, 9: 339—357
- [12] Duhamel G E, Kent M L, Dybdal N O, et al. *Henneyuya exilis* Kurdo associated with granulomatous branchitis of channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) [J]. *Veterinary Pathology*, 1986, 23: 354—361
- [13] Kent M L, Hedrick R P PKX, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD) in Pacific salmonid fishes and its affinities with the Myxozoa[J]. *J. Protozool*, 1985a, 32: 254—260
- [14] MacConnell E, Smith C E, Hedrick R P, et al. Cellular inflammatory response of rainbow trout to the protozoan parasite that causes proliferative kidney disease[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1989, 1: 108—118
- [15] Xie X R, Yang M Y, Xiao W H. The immunoreaction of carp's white blood cell to "unidentified blood organism" (UBO) [C]. Transactions of Researches on Fish Diseases, 1993, (1): 72—76. [谢杏人, 杨名义, 肖武汉. 鲤白细胞对“未明血液生物体” (UBO) 的免疫反应. 鱼病学研究论文集(第一辑), 北京: 海洋出版社, 1993, 72—76]
- [16] Pauley G B. Fish sporozoa: extraction of antigens from *Myxosoma cerebralis* spores which mimic tissue antigens of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *J. Fish Res. Board Can*, 1974, 31: 1481—1484
- [17] Halliday M M. Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids IV. A preliminary immunofluorescent investigation of the spores of *Myxosoma cerebralis*[J]. *Nordisk Veterinaer Medicin*, 1974, 26: 173—179
- [18] Siau Y. Immunologic observations in fish of the genus *Mugil* parasitized by the myxosporidian *Myxobolus exiguus* Thelohan, 1895[J]. *Zeitschrift für parasitenkunde*, 1980, 62: 1—6
- [19] Bartholomew J L, Rohovec, J. S. and Fryer, J. L. Development, characterization, and use of monoclonal and polyclonal antibodies against the myxosporidian, *Ceratomyxa shasta* [J]. *J. Protozool*, 1989a, 36(4): 397—401
- [20] Furuta T, Ogawa, K. and Wakabayashi, H. Humoral immune response of carp *Cyprinus carpio* to *Myxobolus artus* (Myxozoa: Myxobolidae) infection[J]. *J. Fish Biology*, 1993, 43: 441—450
- [21] Griffin B R, and Davis, E. *Myxosoma cerebralis*: detection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *J. Fish Res. Board Can*, 1978, 35: 1186—1190
- [22] Markiw M E, and Wolf, K. *Myxosoma cerebralis*: fluorescent antibody techniques for antigen recognition[J]. *J. Fish. Res board. Can*, 1978, 35: 828—832
- [23] Amandi A, Fryer J L. Observations on *myxobolus insidiosus* (Myxozoa: Myxosporidia) a parasite of salmonid fishes [J]. *Fish pathology*, 1985, 20: 287—304
- [24] Wu Y S, Wang J G. The immunogenicity of *Myxobolus rotundus* Nemeczek, 1911[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(3): 246—251. [吴英松, 汪建力. 圆形碘泡虫免疫原性的研究. 水生生物学报, 2000, 24(3): 246—251]
- [25] Bartholomew J L, Smith, C. E., Rohovec, J. S., et al. Characterization of a host response to the myxosporidian parasite, *Ceratomyxa shasta* (Nobel), by histology, scanning electron microscopy and immunological techniques [J]. *J. Fish Dis*, 1989b, 12: 509—522
- [26] Yokoyama H. *Myxobolus koi* (Myxozoa: Myxosporidia) forms large and small type 'cyst' in the gill of common carp [J]. *Fish Pathology*, 1997, 32(4): 211—217
- [27] Markiw M E. Salmonid whirling disease: myxosporidian and acitiosporidian stages cross react in direct fluorescent antibody test[J]. *J. Fish Dis*, 1989, 12: 137—141