

柱状噬纤维菌免疫后兴国红鲤免疫细胞数量变化的研究

胡成钰 洪江 林光华

(南昌大学生命科学与食品工程学院, 南昌 330047)

摘要: 用柱状噬纤维菌灭活菌苗免疫兴国红鲤, 于免疫后 2 周、4 周分别对其外周血液和胸腺、脾脏、头肾和体肾中的免疫细胞数量变化进行了测定。结果显示: 外周血液中, 淋巴细胞有显著的增加, 粒细胞和单核细胞有明显的下降。胸腺中淋巴细胞数目略有增加。脾脏中淋巴细胞有显著的增加, 而粒细胞和单核细胞正相反。头肾中淋巴细胞有较多的增加, 粒细胞数目增加不明显, 单核细胞有大幅下降。体肾中, 粒细胞和淋巴细胞大幅上升, 单核细胞下降。

关键词: 兴国红鲤; 柱状噬纤维菌; 免疫细胞

中图分类号: S941.42 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)06-0674-05

鱼类属低等脊椎动物, 虽然其免疫系统不够完善和集中、淋巴组织呈现弥散状态, 但能对外来抗原产生免疫应答^[1,2]。硬骨鱼类的免疫器官主要包括胸腺、脾脏、头肾和体肾等, 免疫细胞主要由淋巴细胞、粒细胞和单核细胞组成^[3,4]。血液是鱼体内一种重要的生理生化指标, 其内各种免疫细胞会随鱼体生理状态的改变而发生变化^[5,6]。因此, 对免疫后兴国红鲤 *Cyprinus carpio* var. *singouensis* 外周血液及胸腺、脾脏、头肾、体肾中免疫细胞数目的变化进行研究和分析, 找到各种免疫细胞数目变化的规律, 有一定的理论意义。

柱状噬纤维菌 [*Cytophaga columnaris* (Davis) Gamjobet] 是一种世界性分布的致病菌, 该菌有较强的感染性, 会引起鱼体白皮病、烂鳃病等多种疾病^[7]。几乎所有的淡水鱼类都易受到感染, 水温在 20—30℃ 时, 感染死亡率很高。因此, 选择柱状噬纤维菌作为抗原, 旨在了解鱼体内各种免疫细胞对该菌应答的规律, 从而为鱼类细菌性疾病防治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼 取自江西省兴国红鲤国家原种场。选择自孵化、仔鱼一直到试验前从未感染过任何疾病的兴国红鲤 40 尾, 体重 100—150g/尾, 分为两组, 1 组为试验组, 2 组为对照组。饲养于同一生态条件下的水族箱中, 氧泵增氧, 水温控制 20—25℃, 日按鱼体重 1% 投喂饵料, 2 周后, 进行实验。

1.2 菌苗的制备及免疫 柱状噬纤维菌购自中国科学院水生生物研究所。经培养、分离

收稿日期: 2001-12-12; 修订日期: 2002-01-30

基金项目: 国家自然科学基金(编号 30060066)资助

作者简介: 胡成钰(1964—), 男, 江西省南昌市人; 副教授; 主要从事细胞生物学研究

和集菌后, 0. 65% 生理盐水稀释, 10% 福尔马林溶液灭活 24h, 生理盐水洗涤 3 次, 稀释成 10^9 个/mL 浓度的菌苗, 攻毒试验无毒后于鱼体腹腔按 0. 3mL/ 尾注射菌苗, 对照组注射等量的 0. 65% 生理盐水。

1.3 血涂片和印迹片的制备 分别于免疫后2周和4周时取兴国红鲤外周血液及胸腺、脾、头肾和体肾。常规方法制备血涂片(取白细胞层)。各器官剥离后, 用 0. 65% 生理盐水迅速洗去血渍, 将每个器官切成 4 个断面, 制成 4 片印迹片。涂片和印片均用 Wright 和 Giemsa 双重染色, 显微观察。

1.4 免疫细胞的分类及统计方法 按林光华等^[5, 6] 方法对淋巴细胞、粒细胞和单核细胞进行分类, 计数和统计。试验组涂片每尾鱼随机统计 200 个白细胞, 每次取样 10 尾鱼, 对照组以 2 周和 4 周时两次实验的均值计算。在各免疫器官中, 免疫细胞各统计 400 个, 划分为幼稚型和成熟型, 并分别计数统计。

2 结果

2.1 兴国红鲤外周血液中免疫细胞(图 1)

兴国红鲤外周血液中, 免疫后 2 周时, 小淋巴细胞的数量为 74. 91% / 65. 10% (对照值, 下同) 略有上升, 大淋巴细胞数量为 5. 76% / 5. 35%, 没有明显增加, 单核细胞数量 4. 75% / 5. 00% 略有下降, 粒细胞数量 14. 58% / 24. 55% 有明显的减少。免疫后 4 周时, 小淋巴细胞 87. 99% 和大淋巴细胞 8. 70% 继续增加, 而粒细胞 1. 68% 和单核细胞 1. 63% 明显减少。

2.2 兴国红鲤胸腺、脾脏、头肾和体肾中的免疫细胞(图 2, 3, 4, 5)

在免疫后 2 周时, 胸腺内淋巴细胞总数几乎没有增加, 为 49. 08% / 48. 90%, 但幼稚型淋巴细胞数目 4. 26% / 10. 04% 有明显减少, 而成熟淋巴细胞 44. 82% / 38. 86% 稍有增加, 4 周时, 淋巴细胞的总数 76. 60% 有较大增加, 幼稚型细胞 22. 24% 和成熟型细胞 48. 18% 均有增加。在免疫 2 周时的脾脏中, 淋巴细胞总数 48. 49% / 14. 31% 大量增加, 其中成熟型淋巴细胞 42. 00% / 9. 52% 尤为明显, 4 周时, 淋巴细胞数目 37. 56% 虽有下降, 但仍远高于对照组, 粒细胞 1. 02% (第 2 周) / 8. 91% 和单核细胞数目 0. 96% / 5. 92% (第 4 周) 有显著的下降, 其中 2 周时单核细胞未发现, 而 4 周时粒细胞没有发现。头肾中, 免疫 2 周时, 淋巴细胞总数 51. 44% / 25. 28% 有较大的增加, 4 周时, 回落到正常值附近, 主要是成熟型淋巴细胞数目 20. 28% 较 2 周时 (44. 36%) 有大幅下降。粒细胞数目 18. 93% (第 2 周) / 15. 78% 和 20. 01% (第 4 周) 在免疫后有一定的增加, 单核细胞数目在免疫后 4. 78% (第 2 周) / 12. 23% , 1. 47% (第 4 周) 一直大幅度下降。体肾中, 淋巴细胞 18. 79% (第 2 周) / 10. 77% 和 26. 84% (第 4 周) 及粒细胞在免疫后 2 周 15. 04% / 6. 51% 和 4 周 19. 10% , 数目持续上

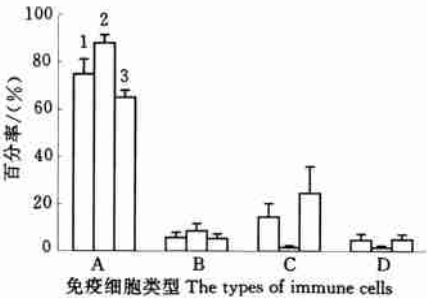


图 1 外周血液中免疫细胞数量的变化
Fig 1 The variation of immune cells in peripheral blood

A 小淋巴细胞(Small lymphocyte); B 大淋巴细胞 (Large lymphocyte); C 粒细胞 (Granulocyte); D 单核细胞 (Monocyte) 1, 2, 3 分别代表免疫第 2 周, 免疫第 4 周和对照组 (图 3, 4, 5 同)

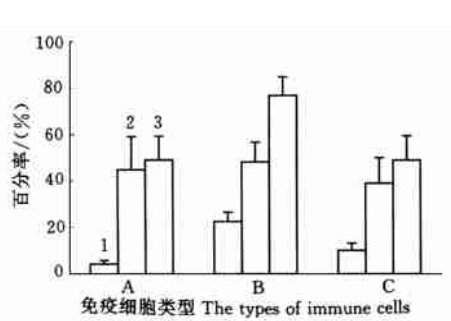


图 2 胸腺中免疫细胞数量的变化

Fig.2 The variation of the immune cells in the thymus
1, 2, 3 分别代表幼稚型淋巴细胞, 成熟型淋巴细胞和淋巴细胞总数。A 免疫 2 周时, 淋巴细胞数量(2 weeks after immunized, the variation of lymphocyte); B 免疫 4 周时, 淋巴细胞数量(4 weeks after immunized, the variation of lymphocyte); C 对照组, 淋巴细胞数量(In control group, the variation of lymphocyte):

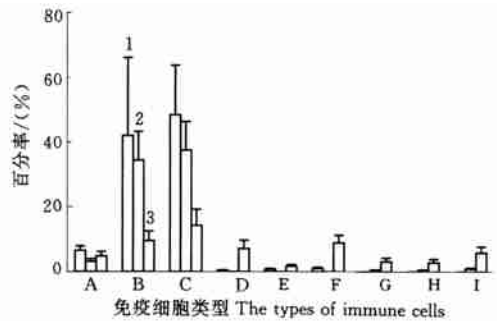


图 3 脾中免疫细胞数量的变化

Fig. 3 The variation of the immune cells in the spleen
图 3-5 的 A-I 分别代表: 幼稚型淋巴细胞(Immature lymphocyte): 成熟型淋巴细胞(Mature lymphocyte): 淋巴细胞总和(The total value of lymphocyte): 幼稚型粒细胞(Immature granulocyte): 成熟型粒细胞(Mature granular cyte): 粒细胞总和(The total value of granulocyte): 幼稚型单核细胞(Immature monocyte): 成熟型单核细胞(Mature monocyte): 单核细胞总和(The total value of monocyte):

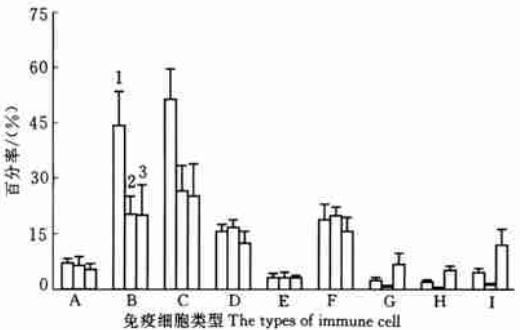


图 4 头肾中免疫细胞数量的变化

Fig.4 The variation of the immune cells in the anterior kidney

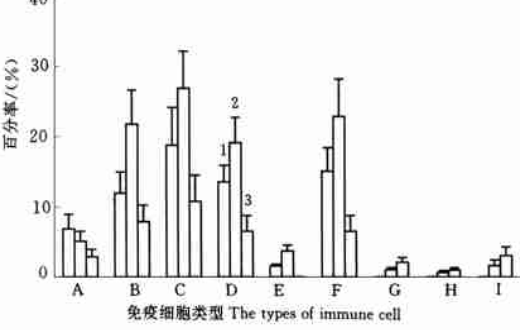


图 5 体肾中免疫细胞数量的变化

Fig. 5 The variation of the immune cells in the posterior kidney

升, 幼稚型和成熟型细胞均有增加, 其中幼稚型淋巴细胞 6. 85% (第 2 周)/2. 89%、5. 10% (第 4 周), 成熟型淋巴细胞 11. 94% (第 2 周)/7. 88%、21. 74% (第 4 周) 和幼稚型粒细胞 13. 52% (第 2 周)/6. 51%、19. 10% (第 4 周), 成熟型粒细胞 1. 52% (第 2 周)/0%、3. 71% (第 4 周)。单核细胞在免疫 4 周时, 仅有少量 1. 61%/3. 05%。

3 讨 论

3.1 兴国红鲤外周血液和免疫器官中淋巴细胞数量的变化

淋巴细胞是鱼体内参与特异性免疫反应的免疫细胞, 在免疫应答中起介导细胞免疫且调节免疫应答、在体液免疫中产生特异性免疫因子和免疫球蛋白的作用。因此, 淋巴细

胞在免疫中起主导作用^[8]。兴国红鲤外周血液和免疫器官中均有淋巴细胞分布。胸腺中只有淋巴细胞, 包括幼稚型和成熟型细胞, 其总量占总血细胞的 48.90%, 说明胸腺是淋巴细胞产生的主要器官之一。Chilmonczyk^[4]认为胸腺是 T 淋巴细胞产生的主要器官, 脾脏、头肾是 B 淋巴细胞产生的主要器官。经柱状噬纤维菌免疫后, 兴国红鲤外周血液和免疫器官中淋巴细胞数量都有不同程度的增加, 说明在兴国红鲤免疫应答中, 淋巴细胞起极其重要的作用。

3.2 兴国红鲤外周血液和免疫器官中单核细胞和粒细胞数量的变化

鱼类吞噬细胞主要由单核细胞和粒细胞组成。鱼类吞噬细胞是组成非特异性防御系统的关键成分, 在抵御病原生物感染中发挥重要的作用。单核细胞和粒细胞等免疫细胞一方面可以破坏和降解血液及各器官和组织的病原体, 另一方面又会被活化并产生更多的抗病因子。经柱状噬纤维菌免疫后, 兴国红鲤外周血液和免疫器官中单核细胞数量均是明显的降值, 与 Suzuki 的结果不太一致, 他认为环境污染或疾病感染会引起鱼类血液中单核细胞的显著增加^[9]。兴国红鲤单核细胞形状变化较大, 胞内有一些大液泡和吞噬物, 并能对血液中的菌体进行吞噬, 在血涂片和印片中还可以观察到即将解体的单核细胞。笔者认为免疫初期血液中的单核细胞数量会代偿性增加, 从免疫中后期开始由于单核细胞的大量解体, 使得其数量急剧下降。兴国红鲤粒细胞数目除在头肾和体肾中增加外, 在其余的器官和组织中都是下降值。Sivicki^[10]等认为鱼类粒细胞也具有活跃吞噬功能, 但吞噬能力较单核细胞弱。兴国红鲤头肾中粒细胞总数及幼稚型细胞数目较多, 分别为 15.78% 和 12.53%, 同时, 单核细胞及其幼稚细胞有较高的比例, 其总数达 12.23% 和 6.88%。因此, 头肾可能是兴国红鲤粒细胞和单核细胞形成的主要器官之一。Dalmo 等认为单核细胞及粒细胞数目的急剧减少, 可能与这两种细胞参与对细菌吞噬作用后解体有关。

参考文献:

- [1] Huizinga H, Nadakavukam M J. Cellular responses of goldfish, *Carassius auratus* (L.) to the metacercariae of *Ribeiroia marini*[J]. *Journal of fish diseases*, 1997, **20**: 401—408
- [2] Dalmo R A, Ingebrigsten K, Bogwald J. Non specific defence mechanisms in fish, with particular reference to reticulo endothelial system (RES)[J]. *Journal of fish diseases*, 1997, **20**: 241—273
- [3] 郭琼林, 卢全章. 草鱼肾脏和脾脏血细胞发育过程的观察[J]. *水生生物学报*, 1993, **17**(1): 40—45
- [4] 卢全章. 草鱼头肾免疫细胞超微结构的观察[J]. *水生生物学报*, 1997, **21**(2): 152—155
- [5] 林光华, 张丰旺. 兴国红鲤血液的研究—白细胞百分式和血细胞大小的测定[J]. *江西大学学报(自然)*, 1987, **11**(1): 41—45
- [6] 林光华, 张丰旺. 性别和繁殖对兴国红鲤血液指标的影响[J]. *水生生物学报*, 1989, **13**(1): 91—93
- [7] 徐伯亥, 殷战, 吴玉深, 等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌研究[J]. *水生生物学报*, 1993, **17**(5): 259—266
- [8] 张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况[J]. *水生生物学报*, 2000, **24**(6): 648—655
- [9] Suzuki Y. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudates cells in tilapia, *Oreochromis niloticus*(Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L [J]. *J Fish Biol*, 1986, **29**: 349—364
- [10] Sivicki A, Studnicha M. The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L[J]. *J Fish Biol*, 1987, **31**: 57—60

**STUDIES ON THE VARIATION OF IMMUNE CELLS IN XINGGUO RED
CARP, *CYPRINUS CARPIO* VAR. SINGUONENSIS, IMMUNIZED
BY *CYTOPHAGA CALUMNARIS***

HU Cheng-yu, HONG Yi-jiang and LIN Guang-hua

(College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract: Xingguo red carp, *Cyprinus carpio* var. *singuonensis*, was immunized by Formalin killed vaccine of *Cytophaga calumnaris*. The variation of the immune cells and total value including immature and mature cells of lymphocytes, the granulocytes and the monocytes which locate in the peripheral blood, thymus, spleen, anterior kidney and posterior kidney were measured both after 2 weeks and 4 weeks immunized. The results show: In the peripheral blood, the value of lymphocytes increases but the granulocytes and the monocytes decrease. The value of lymphocytes also increase in the thymus and the spleen. On the other hand, the value of the granulocytes and the monocytes drop down. In anterior kidney the lymphocytes increase however the monocytes decrease drastically. In the posterior kidney the value of lymphocytes and granulocytes go up remarkably, on the contrary of the monocytes.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *singuonensis*; *Cytophaga calumnaris*; Immune cells