

鱼类三种致病菌的粗脂多糖对异育银鲫的免疫原性

陈昌福 陈超然

(华中农业大学农业微生物教育部重点开放实验室, 武汉 430070)

摘要: 用温酚法从柱状嗜纤维菌、嗜水气单胞菌和鳃弧菌中提取的粗脂多糖(LPS)作为免疫原, 分别接种异育银鲫后, 通过测定受免鱼的交叉凝集抗体效价, 头肾和血液中吞噬细胞的吞噬活性和用 *A. hydrophila* 活菌攻毒的方法, 探讨鱼类 3 种致病菌的粗 LPS 对异育银鲫免疫原性的试验结果。结果表明, 从 3 种致病菌中提取的粗 LPS 对异育银鲫均具有较强的免疫原性, 受免鱼的血清中存在对 3 种致病菌的交叉凝集抗体; 与对照鱼相比, 头肾和血液中吞噬细胞的吞噬活性明显上升, 受免鱼对 *A. hydrophila* 活菌攻毒均产生了较强的免疫保护力。说明在每种供试菌的粗 LPS 上都不同程度地存在 3 种致病菌的共同保护性抗原。

关键词: 柱状嗜纤维菌; 嗜水气单胞菌; 鳃弧菌; 粗脂多糖; 异育银鲫; 免疫原性

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)05-0483-06

从革兰氏阴性菌中提取的粗脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS), 虽然细菌的种类不同, 其菌体粗 LPS 的化学成分有所不同^[1], 而且具有不同化学成分的菌体粗 LPS 对受免鱼类的免疫原性也是有所不同的^[2]。但是, 已经有较多的研究结果证明, 从鱼类致病菌中提取的菌体粗 LPS 对各种受免鱼类都能显示出较强的免疫原性, 而且受免鱼均能获得良好的免疫保护力^[3]。本研究以从鱼类的 3 种致病菌中提取的粗 LPS 作为免疫原, 以异育银鲫(*Carassius auratus gibelio* Bloch)为试验鱼, 旨在避免供试鱼种内遗传差异对免疫应答影响的前提下, 比较 3 种致病菌粗 LPS 的免疫原性。

1 材料与方法

1.1 菌株及其培养条件 分别将柱状嗜纤维菌(*Cytophaga columnaris* Garjbst) GCR-9061 菌株^[4]接种在 *Cytophaga* 培养基^[5]中, 在 25℃ 条件下, 培养 36h, 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* stanier) CS-6 菌株^[6]接种在脑心浸液培养基(BHI, Difco)中, 在 28℃ 条件下, 培养 48h, 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*=*Listonella anguillarum*) V-1070(V-36)菌株^[7]接种在 FWA 培养基^[8]中, 在 25℃ 条件下, 培养 48h 后, 离心法集菌并以灭菌生理盐水清洗 3 次, 稀释菌液至一定的浓度后, 加入福尔马林使菌液中的终浓度达到 0.5%, 冷藏备用。

1.2 菌体粗 LPS 的提取 参照文献[9]的方法分别从 GCR-9061 菌株, CS-6 菌株和 V-36 菌株等 3 种供试菌中提取粗 LPS(分别简称为 cc-LPS、ahr-LPS 和 var-LPS)。

收稿日期: 2001-10-20; 修订日期: 2001-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870598)

作者简介: 陈昌福(1952—), 男, 湖北省宜昌市人; 副教授, 博士; 从事水产动物病理与免疫学研究

1.3 供试鱼及其饲养条件 为了避免因为供试鱼的种内遗传差异导致试验结果的误差, 本研究中用在武汉市南湖渔场繁殖并隔离饲养的平均体重为 $52.6 \pm 2.7\text{g}$ 、健康活泼的异育银鲫(来自同 1 尾雌亲鱼所产的卵, 孵化而育成的“同腹仔”)作试验鱼。每个 $86\text{cm} \times 50\text{cm} \times 53\text{cm}$ 的塑料水族箱中放养 10 尾鱼, 以充分曝气去氯后的自来水充气饲养, 每天按鱼体重的 1.0% 的投喂 1 次人工配合饲料(武汉海大饲料有限公司产品)。供试鱼在室内水族箱中驯养 14d, 待供试鱼适应环境, 并确认无疾病症状后, 开始试验, 试验期间控制水温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

1.4 免疫与采血 用灭菌生理盐水分别将 3 种菌体粗 LPS 调整至 5.0mg/mL 的浓度后, 按 25.0mg/kg 鱼体重的接种量, 以注射法经供试鱼的胸腔接种, 每种菌体 LPS 溶液各注射 45 尾供试鱼, 分别作为 3 个试验组。另设注射相同剂量生理盐水的 45 尾供试鱼作对照组。于免疫接种后第 28d, 从每个试验组和对照组中各随机捞起 15 尾供试鱼, 切断腹主动脉采血。将每尾鱼的血液均分为 2 份, 1 份置常温下凝血后分离血清, 供检测凝集抗体效价用; 另一份以肝素抗凝, 供分离白细胞测定其吞噬活性之用。

1.5 头肾吞噬细胞液的制备 对采血后的供试鱼立即解剖, 取出头肾, 在 L-15 培养基中用灭菌剪刀剪碎, 再用白金网过滤, 去除组织块, 然后在 L-15 培养基中以 600r/min 离心 10min, 将滤液中的细胞清洗 3 次后, 以血球计数板计数法将离心回收的细胞用 L-15 培养基调整至 $1.5 \times 10^5\text{cells/mL}$ 的浓度, 作为吞噬细胞液, 备用。

1.6 凝集抗体效价的测定 采用血凝板法进行。反应抗原分别采用经过福尔马林灭活的 GCR-9061 菌株(简称 F-CC)、CS-6 菌株(简称 F-AH)和 V-36 菌株(简称 F-VA)。

1.7 吞噬活性的测定 以 600r/min 的速度离心 5min, 从抗凝血中分离收集白细胞层, 用灭菌生理盐水调整细胞浓度至 $1.3 \times 10^5\text{cells/mL}$, 作为血液中吞噬细胞液。分别在 0.5mL 的头肾和血液的吞噬细胞液中添加 0.2mL 经福尔马林灭活的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, 简称 F-SA), 置 25°C 水浴中孵育 40min 后, 涂片, Giemsa 染色, 镜检。依照下式计算各种吞噬细胞的吞噬百分比(Phagocytic Percentage, PP)和吞噬指数(Phagocytic index, PI)。

吞噬百分比(PP) = 100 个白细胞中参与吞噬的细胞数 / 100

吞噬指数(PI) = 100 个吞噬细胞内细菌总数 / 100

1.8 杀菌活性的测定 参照楠田^①和文献[10]的方法进行。即在盛有 0.5mL 的头肾或血液的吞噬细胞液的试管中分别添加 0.2mL CS-6 菌株活菌, 在 25°C 水浴中孵育 40min 后, 加入 1.0mL L-15 培养基, 以 600r/min 离心 10min 的方法清洗吞噬细胞 3 次, 弃上清后再添加 0.3mL 0.2% 的 Tween 20(日水)水溶液并摇动 5min, 使吞噬细胞破碎, 加入 2.0mL BHI, 在 25°C 培养箱中培养 16h, 每支试管中加入 0.05mL 浓度为 5.0mg/mL 的 MTT (Monotetrazolium, 日水)溶液, 摇动 15min 后用 751 分光光度计于 600nm 处测定吸光度(O.D.), 并且依下式评价受免和对照鱼的吞噬细胞对 CS-6 菌株活菌的杀菌活性(Bactericidal activity, BA)。

$$\text{杀菌活性(BA)} = \frac{\text{试验鱼吞噬细胞还原的 MTT 的 O.D.}}{\text{对照鱼吞噬细胞还原的 MTT 的 O.D.}}$$

① 楠田理一. プリの免疫机构に关する基础的研究(3) プリ食细胞内杀菌活性の测定. ワクチンの实用化に关する研究. 见: 日本水产资源保护协会编, 昭和 62 年度水产厅委托事业鱼病对策技术开发研究报告书, 第一分册. 1988, p53~60

1.9 攻毒试验 对每尾供试鱼经胸鳍基部注射 0.3mL 浓度为 1.2×10^7 cfu/mL 的 CS-6 菌株活菌液。对注射攻毒后的供试鱼继续饲养 21d, 观察和记录发病与死亡状况。依照下式计算各免疫组的相对百分成活率(Relative percent survival, RPS)。

相对百分成活率(RPS) = $(1 - \frac{\text{免疫鱼死亡率}}{\text{对照鱼死亡率}}) \times 100$

2 结果

2.1 凝集抗体效价

受免和对照异育银鲫血清中凝集抗体效价和交叉凝集抗体效价的测定结果如表 1 所示。由表 1 可以看出, 用 3 种不同的菌体粗 LPS 注射接种异育银鲫后, 受免异育银鲫血清中凝集抗体效价和交叉凝集抗体效价均有明显地上升, 而对照组的凝集抗体效价很低。

表 1 受免和对照异育银鲫血清中凝集和交叉凝集抗体效价
Tab. 1 Agglutinating antibody titers and cross agglutinating antibody titers in the sera of immunized and control *C. auratus gibelio*

反应原 Reactogens	抗血清和凝集抗体效价 Antiserum and agglutinating antibody titer			
	cc LPS	alr LPS	va LPS	对照 Control
F-CC	I: 512~ 1024 (I: 724. 1)	I: 64~ 128 (I: 84. 4)	I: 64~ 128 (I: 97. 0)	I: < 4~ 4 (I: 2. 3)
F-AH	I: 128~ 256 (I: 181. 0)	I: 256~ 512 (I: 415. 9)	I: 32~ 64 (I: 36. 8)	I: < 4~ 4 (I: 2. 8)
F-VA	I: 64~ 128 (I: 78. 8)	I: 64~ 128 (I: 90. 5)	I: 512~ 1024 (I: 776. 0)	I: < 4~ 4 (I: 2. 6)

括号中数字为几何平均数, Figures in parenthesis indicate geometric average value.

2.2 血液和头肾中吞噬细胞的吞噬活性

受免和对照异银鲫血液和头肾中吞噬细胞对 F-SA 的吞噬活性的测定结果如表 2 所示。由表 2 可以看出, 采用 3 种致病菌粗 LPS 注射接种异育银鲫后, 受免异育银鲫血液和头肾中吞噬细胞的 PP 和 PI 值, 均极显著地高于对照组($p < 0. 01$)。

表 2 受免和对照异育银鲫血液和头肾中吞噬细胞对 F-SA 的吞噬活性
Tab. 2 Phagocytic activity of phagocytes in the blood and head kidney to formalin killed *S. aureus* of immunized and control *C. auratus gibelio*

样品 Samples	项目 Items	组别与吞噬活性 Groups and phagocytic activity			
		cc LPS	alr LPS	va LPS	对照 Control
血液 Blood	吞噬百分比(PP)	56. 0±2. 32	55. 6±3. 15	51. 2±2. 46	33. 2±2. 45
	吞噬指数(PI)	6. 38±1. 32	6. 69±1. 45	7. 02±1. 43	4. 63±1. 37
头肾 Head Kidney	吞噬百分比(PP)	27. 6±1. 23	21. 6±2. 27	22. 4±2. 03	17. 5±2. 52
	吞噬指数(PI)	2. 64±1. 58	2. 37±1. 52	2. 46±1. 45	1. 86±1. 49

2.3 血液和头肾中吞噬细胞的杀菌活性

对受免和对照异育银鲫血液和头肾中吞噬细胞的杀菌活性的测定结果如表 3 所示。由表 3 可以看出, 经 3 种致病菌粗 LPS 注射接种同腹异育银鲫后, 受免同腹异育银鲫血液和头肾中吞噬细胞的杀菌活性均显著地高于对照组($p < 0.05$), 但是各免疫组之间的差异则不显著($p > 0.05$)。

表 3 受免和对照异育银鲫血液和头肾中吞噬细胞的杀菌活性
Tab. 3 Bactericidal activity of phagocytes in the blood and head kidney to live
A. hydrophila of immunized and control *C. auratus gibelio*

吞噬细胞来源 Source of phagocytes	组别与杀菌活性 Groups and bactericidal activity			
	cc LPS	alr LPS	va LPS	对照 Control
血液 Blood	0.08±0.012	0.07±0.011	0.07±0.011	1.00
头肾 Head kidney	0.09±0.012	0.08±0.013	0.08±0.011	1.00

2.4 攻毒试验结果

对受免和对照异育银鲫用 CS-6 菌株活菌液攻毒后的死亡情况如表 4 所示。由表 4 可以看出, 用 3 种不同菌体粗 LPS 注射接种异育银鲫后, 受免同腹异育银对 CS-6 菌株活菌攻毒均产生了不同程度的免疫保护力, 用 CS-6 菌体粗 LPS 接种异育银鲫的 RPS 高达 88.9%, 而用 GCR-9061 和 V-36 菌体粗 LPS 接种异育银鲫的 RPS 也分别达到 84.8% 和 74.1%。

表 4 受免和对照同腹异育银鲫经 *A. hydrophila* 活菌攻毒后的免疫保护力
Tab. 4 Relative percent survival of immunized and control *C. auratus gibelio* challenged by live *A. hydrophila*

组别 Groups	攻毒鱼数 No. of fish Challenged	存活鱼数 No. of survival fish	存活率(%) Survival	相对百分成活率 RPS
cc LPS	30	25	83.3	84.8
alr LPS	30	27	90.0	88.9
va LPS	30	23	76.7	74.1
对照 Control	30	3	10.0	

3 讨论

鱼类的免疫应答除受到很多环境因素影响外, 还要受到遗传因素的影响^[11]。稻田等首先探讨了香鱼(*Plecoglossus altivelis*) 的种内遗传差异对灭活 *V. anguillarum* 菌苗免疫应答的影响^[12]。为了避免因为供试鱼的种内遗传差异导致试验结果的误差, 在本研究中选用了同腹异育银鲫作试验鱼。根据董仕等的研究结果, 行雌核发育的银鲫的“同腹子”之间是不存在遗传差异的^[13]。在本研究获得的凝集抗体效价和吞噬细胞的吞噬活性的个体间差异较小, 这是否意味着本研究中利用了同腹异育银鲫作试验鱼, 消除了由供试鱼的种内遗传差异引起的免疫应答水平差异的缘故, 尚有待深入研究。

用 3 种不同菌体粗 LPS 注射接种同腹异育银鲫后, 受免鱼不仅产生了较高效价的交叉凝集抗体, 对 *A. hydrophila* 活菌的杀灭能力也有所增强, 而且对活菌攻毒也显示出了较强的交叉免疫保护力。对这种结果, 推测主要有两方面的原因: 一是由于粗 LPS 具有佐剂性(Adjuvanticity), 能够刺激受免鱼的非特异性免疫系统而诱导其非特异性的细胞免疫应答^[22]。而且因为鱼类属于较低等的变温脊椎动物, 其特异性免疫应答能力相对低下, 因此, 能否诱导受免鱼类的产生较强的非特异性免疫应答, 既是决定对鱼类免疫接种能否成功的关键, 也是评价鱼用疫苗免疫原性强弱的重要标准。本研究中对同腹异育银鲫接种 3 种不同致病菌菌体粗 LPS 后, 受免鱼血液和头肾中吞噬细胞的吞噬活性和杀菌活性均显著地高于对照鱼, 这说明 3 种菌体粗 LPS 均具有较强的诱导受免鱼非特异免疫应答的免疫原性。二是由于粗 LPS 上存在的多糖既是不同的革兰氏阴性菌的特异性抗原, 也是能刺激受免鱼产生特异性免疫应答并能在离体条件下形成可见免疫反应的抗原部分。本研究中对异育银鲫接种 3 种不同致病菌菌体粗 LPS 后, 受免鱼血清中的除能对提取粗 LPS 的病原菌产生特异性凝集抗体外, 还存在对其它 2 种病原菌的交叉凝集抗体, 这说明在这 3 种菌体粗 LPS 上除存在 3 种不同致病菌的特异性抗原外, 还可能存在 3 种致病菌的共同保护性抗原。

参考文献:

- [1] 陈昌福, 李 静, 吴志新. 不同方法提取两种鱼类病原菌脂多糖的化学成分分析[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(5): 481—483
- [2] 陈昌福, 罗宇良, 曾妍雄, 等. 不同血清型柱状嗜纤维菌脂多糖蛋白质成分及其对鳊的免疫原性影响的研究[J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(5): 483—486
- [3] 吴志新, 陈昌福. 三种爱德华氏菌脂多糖对日本 免疫原性的比较[J]. 水生生物学报, 1998, 22(增刊): 126—131
- [4] 陈昌福. 柱状嗜纤维菌的血清型与其菌苗抗原性的关系[J]. 华中农业大学学报, 1997, 16(6): 585—588
- [5] Pacha R E, Poter S. Characteristics of myxobacteria isolated from the surface of freshwater fish[J]. *Appl Microbiol*, 1968, 16: 1901—1906
- [6] 陈昌福, 李 静. 翘嘴鲌细菌性败血症病原菌的分离及致病力的研究[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(4): 119—121
- [7] 楠田理一, 佐古 浩, 川合研儿. 病鱼から分离された *Vibrio* 属细菌の分类学的研究—I. 形态学的, 生物学的, ならびに生化学的性状による检讨[J]. 鱼病研究, 1979, 13(3): 123—137
- [8] 吉水 守, 木村乔久, 板村 捻. サケ科鱼类的肠内细菌丛に関する研究—I. 饲养鱼の肠内细菌と细菌丛[J]. 日本水产学会志, 1976, 42(1): 91—99
- [9] Whistler R L, BeMiller J N, Wolfrom M L, et al. Methods in carbohydrate chemistry[M]. New York: Academic Press, 1965
- [10] Graham S, Jeffries A H, Secombes C J. A novel assay to detect macrophage bactericidal activity in fish: factious influencing the killing of *Aeromonas salmonicida*[J]. *J Fish Dis.*, 1988, 11, 389—396
- [11] Klein D., Ono H., OhUigin C, et al. Extensive MHC variability in cichlid fishes of Lake Malawi[J]. *Nature*, 1993, 364: 330—334
- [12] 稻田善和, 筑紫康博, 迁村明夫, 谷口顺彦. ビブリオ病に対するアユの免疫的形質の評価[J]. 水产育种, 1996, 23(1): 29—39
- [13] 董 仕, 谷口顺彦. RAPD-PCR およびアイザイムパターンによるギンブナー腹子のクローン性の証明[J]. 日本水产学会志, 1996, 62(6): 891—896

IMMUNOGENICITY OF CRUDE LIPOPOLYSACCHARIDE OF THREE PATHOGENIC BACTERIA OF FISH TO SILVER CRUCIAN CARP, *CARESSIUS AURATUS GIBELIO*

CHEN Changfu and CHEN Chaoran

(Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Ministry of Education, Wuhan 430070)

Abstract: The silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) were immunized with crude lipopolysaccharide (LPS) extracted from *Cytophaga columnaris*, *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum*. The relative percent survival (RPS) of silver crucian carp were compared by examining the agglutinating antibody titers, cross-agglutinating antibody titers of serum and the phagocytic activity of phagocytes in the blood and head kidney challenged with live *A. hydrophila*. The experimental results showed that the agglutinating antibody titers and cross-agglutinating antibody titers of immunized silver crucian carp were higher than the control group, and the phagocytic activity of phagocytes in the blood and head kidney of silver crucian carp was significantly boosted and had a high level cross-RPS. The crude LPS of three pathogenic bacteria were thought to have a common protective antigens to causing a cross-RPS to silver crucian carp.

Key words: *Cytophaga columnaris*; *Aeromonas hydrophila*; *Vibrio anguillarum*; *Carassius auratus gibelio*; Crude lipopolysaccharide; Immunogenicity