

## 灭活菌苗免疫的中华倒刺鲃外周血免疫指标的变化

罗芬<sup>1,2</sup>, 张其中<sup>1,3\*</sup>, 冯汉茹<sup>1</sup>, 朱成科<sup>1</sup>, 袁娟<sup>1</sup>, 鉏超<sup>1</sup>

(1. 西南大学生命科学学院, 淡水生物生殖与发育教育部重点实验室, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆 400715;

2. 宁德师范高等专科学校生物工程系, 福建 宁德 352100;

3. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

**摘要:**以温和气单胞菌灭活菌苗为免疫原,平均体重(100±25)g的健康中华倒刺鲃为实验对象,免疫组腹腔注射0.2 mL浓度为 $1.0 \times 10^8$  CFU/mL的免疫原,对照组注射等量灭菌生理盐水,分别在单次注射0、1、2、4、7、14、21、28、35 d后随机从两组各取6尾实验鱼,尾静脉采血,测定外周血的血细胞数量、白细胞分类计数、吞噬活性、抗体效价和蛋白质含量等免疫指标的变化,第35天活菌攻毒。结果表明:温和气单胞菌灭活菌苗(F-AS)可诱导中华倒刺鲃红细胞和白细胞数量增加,并引起各种白细胞分类百分比变化,提高吞噬活性和抗体效价,血清中总蛋白及球蛋白含量增加,红细胞也具有免疫功能,灭活菌苗的相对免疫保护力达65.21%。免疫早期(第1周)主要是红细胞、单核细胞和中性粒细胞数量明显增加,吞噬细胞的吞噬活性迅速提高,吞噬百分比和吞噬指数第4天达峰值;随后则是淋巴细胞大量增殖,第21天淋巴细胞、抗体效价及球蛋白达峰值。可见灭活菌苗通过促进中华倒刺鲃血细胞增殖、提高吞噬细胞的吞噬活性、产生特异性抗体等方式提高免疫保护力;免疫早期非特异性细胞免疫起重要作用,之后特异性免疫起主要作用。

**关键词:**中华倒刺鲃;灭活温和气单胞菌菌苗;血细胞数量;白细胞分类计数;吞噬活性;抗体效价

**中图分类号:**S 942.5

**文献标识码:**A

中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis* Bleeker)俗称青波、乌鳞、青板,主要分布于我国长江及其支流,属广温性底栖鱼类,其个体大、生长快、食性广、味鲜美、肉质细嫩、营养丰富,养殖利润高,是我国长江流域近年新兴的一种名优养殖鱼类<sup>[1-2]</sup>。随着养殖密度的提高,各种传染性疾病日益增多,制约了养殖规模的发展,如肌肉溃烂病就是嘉陵江网箱养殖中华倒刺鲃的常见病,已初步确定由细菌引起<sup>[3]</sup>。在细菌病控制中,阐明接种菌苗后该鱼细胞和体液免疫的变化规律是细菌病免疫预防的重要基础。

免疫接种已被证实是预防鱼类疾病发生的有效途径,迄今已有不少灭活全菌疫苗问世,它们不

同程度地提高了鱼类的抗病性,减少了发病率<sup>[4-5]</sup>。鱼类具有一般脊椎动物的免疫应答特征,包括非特异性免疫和特异性免疫,但其抗原识别机制并不完善<sup>[6]</sup>。对鱼类疫苗免疫保护作用机理的研究目前多集中于抗体效价等特异性免疫方面<sup>[7-8]</sup>。但是,注射疫苗到产生大量抗体需要一段时间<sup>[9-10]</sup>,这段时间中疫苗是否能诱导机体产生保护作用,以及使用疫苗后鱼体的非特异细胞免疫在保护中的作用等问题都值得更多的关注和研究,同时弄清非特异性免疫和特异性免疫的发展规律有助于生产中制定合理免疫方案。

温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)广泛存在于水域、土壤及水生动物体内,是水生生物的主要致

收稿日期:2009-10-19 修回日期:2009-12-07

资助项目:重庆市重大科技攻关资助项目(CSTC,2005AB1009);三峡库区生态环境教育部重点实验室资助项目;福建省教育厅科技项目(JB09233);宁德师范高等专科学校教授培养工程资助项目

通讯作者:张其中,E-mail:zhangqzdr@126.com

病原体之一,可危害几乎所有淡水鱼类、蛙类、鳖类,甚至鸟类和哺乳动物<sup>[9]</sup>。在患肌肉溃烂病的中华倒刺鲃内脏中也分离出该菌。本研究以灭活温和气单胞菌菌苗免疫人工饲养的健康中华倒刺鲃,通过测定外周血的血细胞数量、白细胞分类计数、吞噬活性、抗体效价和蛋白质含量等多项免疫指标的变化,阐明受疫苗诱导后中华倒刺鲃免疫力的发展过程及免疫保护机制,尤其是抗体大量产生前细胞免疫的变化及其作用,以期揭示鱼用疫苗在鱼病预防中的作用机理提供基础资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**实验鱼** 中华倒刺鲃 240 尾购自重庆合川养殖网箱,平均体重(100 ± 25) g,平均体长(15.5 ± 1.5) cm。

**菌种** 温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)菌种由西南大学微生物室提供。

### 1.2 免疫原和吞噬原的制备

温和气单胞菌接种于普通琼脂培养基,生化培养箱 28 ℃ 培养 48 h,灭菌生理盐水(质量分数为 0.65%)洗下菌落,冷冻离心机 4 ℃ 4 000 r/min 离心集菌,麦氏比浊法测浓度。一份制成浓度为  $5.0 \times 10^7$  mL 的活菌,用于攻毒实验及血清抗体效价检测;另一份加入终浓度为 1% 的甲醛,恒温水浴锅 28 ℃ 灭活 24 h,即成甲醛灭活的温和气单胞菌全菌苗(formalin killed *Aeromonas sobria* cells, F-AS);离心洗涤 3 次,稀释至  $1.0 \times 10^8$  mL;平板培养法检查灭活效果,将证实已被彻底灭活的菌液作为免疫原,置 4 ℃ 冰箱备用。

同法制成甲醛灭活的浓度为  $1.0 \times 10^8$  mL 的金黄色葡萄球菌菌液(formalin killed *Staphylococcus aureus* cells, F-SA),作为吞噬原,置 4 ℃ 冰箱备用。

### 1.3 实验设计

**饲养条件** 实验鱼饲养于西南大学生命科学学院室外养殖池,每天换水、投饵 1 次。暂养 7 d 后开始实验,实验期间水温为(28 ± 2.5) ℃。60 尾用于安全性实验,180 尾用于免疫指标检测实验。

**安全性实验** 60 尾实验鱼随机分为实验组和对照组,每组 30 尾。实验组通过腹腔每尾注

射 0.2 mL F-AS,对照组注射等量灭菌生理盐水,观察 14 d。

**免疫与采血** 180 尾实验鱼随机分为免疫组和对照组,每组 90 尾。免疫组通过腹腔每尾注射 0.2 mL F-AS,对照组注射等量灭菌生理盐水。注射 0、1、2、4、7、14、21、28、35 d 后随机从两组各取 6 尾,尾静脉采血约 2 mL,血液不混合。其中 3 尾血液抗凝,用于血细胞计数、白细胞分类计数及吞噬活性测定;另 3 尾血液不抗凝,室温静置 1 h,4 ℃ 冰箱静置 24 h,4 000 r/min 离心 3 min,取上层血清,用于抗体效价和蛋白质含量检测。

**攻毒实验** 免疫后第 35 天随机从两组各取 30 尾,免疫组通过腹腔每尾注射  $5.0 \times 10^7$  mL 温和气单胞菌活菌 0.2 mL,对照组注射等量灭菌生理盐水,观察 14 d,记录感染发病和死亡情况,计算相对免疫保护力(relative percent survival, RPS)<sup>[10]</sup>。

### 1.4 免疫指标检测

**血液生理指标** (1)血细胞计数:Dacie 氏稀释液<sup>[11]</sup>将血液稀释 400 倍,Neubarer 计数板完成红细胞(red blood cell, RBC)和白细胞(white blood cell, WBC)计数,每个样品重复 3 次;(2)白细胞分类计数(differential leucocyte count, DLC):常规方法每尾推血涂片 3 ~ 5 张,晾干,甲醇固定 3 ~ 5 min, Wright-Giemsa 染液混合染色 25 min,冲洗晾干,油镜下随机观察 100 个左右白细胞,计数各类白细胞数量,得出某种白细胞所占分类百分比。

**白细胞吞噬活性** 0.2 mL 抗凝血中加入 0.05 mL 甲醛灭活金黄色葡萄球菌(F-SA),充分混匀,恒温水浴锅 25 ℃ 下 60 min,每隔 10 min 摇匀 1 次;1 000 r/min 离心 10 min;吸取白细胞层制涂片 3 ~ 5 张。Wright-Giemsa 染液混合染色,油镜下观察。吞噬活性以吞噬百分比(phagocytic percentage, PP)和吞噬指数(phagocytic index, PI)表示<sup>[8]</sup>。

**血清抗体效价** 取 0.2 mL 血清于指形管中,用生理盐水按对倍稀释法稀释,加入等体积上述温和气单胞菌活菌,置恒温水浴锅 37 ~ 38 ℃ 孵育 15 ~ 20 h,取出后室温静置 15 min,肉眼观察血清凝集反应的强度。

**蛋白质含量** 总蛋白、白蛋白和球蛋白的测定按文献[12]的方法进行,所用试剂盒为宁波

美康生物科技有限公司产品,由西南大学第一医院用 Tms1024i 全自动生化分析仪测定。

### 1.5 实验数据处理

实验数据采用 SPSS13.0 进行生物统计分析。以  $t$  检验进行差异显著性检验:  $P > 0.05$ , 不存在显著性差异;  $0.01 < P < 0.05$ , 存在显著性差异,以 \* 表示;  $P < 0.01$ , 存在极显著性差异,以 \*\* 表示。

## 2 结果

### 2.1 安全性实验

注射灭活温和气单胞菌菌苗(F-AS)及生理盐水的中华倒刺鲃经 14 d 饲养一切正常,未发现

死亡现象或染病症状,表明所用疫苗及其剂量对中华倒刺鲃是安全的。

### 2.2 灭活菌苗对外周血细胞数量和白细胞分类百分比的影响

注射灭活温和气单胞菌菌苗(F-AS)后中华倒刺鲃外周血细胞计数结果如图 1 所示。从图 1-a 可见注射疫苗后第 2 和 4 天免疫组红细胞(RBC)数显著高于对照组( $0.01 < P < 0.05$ ),其它时间无显著差异( $P > 0.05$ )。注射疫苗后第 4 和 7 天免疫组白细胞(WBC)数极显著高于对照组( $P < 0.01$ ),第 14 天显著高于对照组( $0.01 < P < 0.05$ ),其它时间无显著差异( $P > 0.05$ ) (图 1-b)。

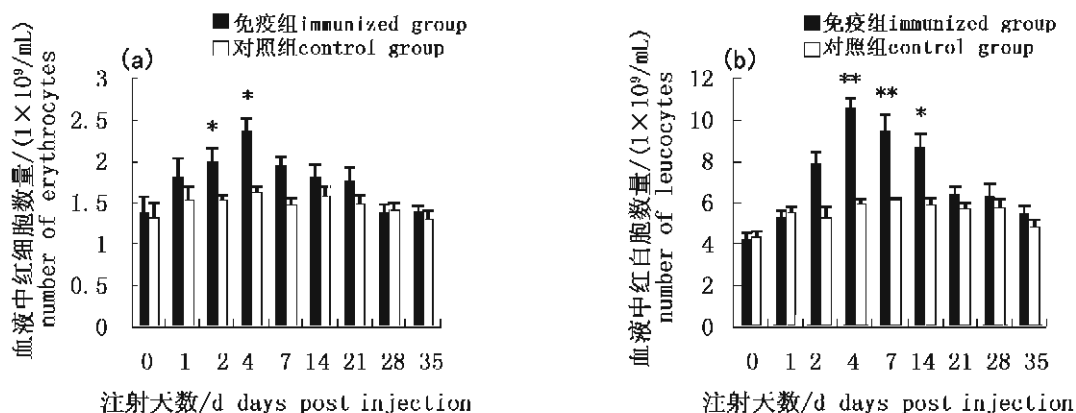


图 1 注射灭活温和气单胞菌或生理盐水后中华倒刺鲃外周血细胞数量变化  
\* 表示免疫组与对照组差异显著( $0.01 < P < 0.05$ ); \*\* 表示免疫组与对照组差异极显著( $P < 0.01$ )。下同。

Fig. 1 The variation of hematocyte numbers in peripheral blood of *S. sinensis* post injection with F-AS or saline solution

\* Significant( $0.01 < P < 0.05$ ) difference between control and immunized groups; \*\* Very significant( $P < 0.01$ ) difference between control and immunized groups. The same as follows.

注射灭活温和气单胞菌菌苗(F-AS)后中华倒刺鲃外周血白细胞分类百分比(DLC)如图 2 所示。单核细胞(monocyte)和中性粒细胞(neutrophil)的变化趋势较为接近(图 2-a 和图 2-b)。第 4 和 7 天单核细胞分类百分比免疫组显著高于对照组( $0.01 < P < 0.05$ );第 7 天达峰值  $3.82\% \pm 1.15\%$ , 是对照组的 2 倍,且有聚集现象;其它时间无显著差异( $P > 0.05$ ) (图 2-a)。免疫组中性粒细胞分类百分比所测峰值出现在第 4 天,达  $29.08\% \pm 7.32\%$ ,较对照组提高近 1 倍,且极显著高于对照组( $P < 0.01$ );第 7 天显著高于对照组( $0.01 < P < 0.05$ );其它时间无显著差异( $P > 0.05$ ) (图 2-b)。免疫组淋巴细胞(lymphocyte)分类百分比在第 21 天达峰值,为  $30.00\% \pm 9.77\%$ , 是对照组的 3.5 倍,且极显著

高于对照组( $P < 0.01$ );第 14 和 28 天显著高于对照组( $0.01 < P < 0.05$ );其它时间无显著差异( $P > 0.05$ ) (图 2-c)。第 4 和 21 天血栓细胞(thrombocyte)分类百分比免疫组显著低于对照组( $0.01 < P < 0.05$ ),其它时间无显著差异( $P > 0.05$ ) (图 2-d)。

### 2.3 灭活菌苗对白细胞吞噬百分比和吞噬指数的影响

注射灭活温和气单胞菌菌苗(F-AS)后中华倒刺鲃外周血吞噬细胞的 PP、PI 变化如图 3 所示,免疫组 PP、PI 迅速上升,第 4 天达峰值,分别为  $37.00\% \pm 17.39\%$  和  $(3.56 \pm 1.14)$ ,约为对照组的 2 倍,且极显著高于对照组( $P < 0.01$ );第 2、7 天显著高于对照组( $0.01 < P < 0.05$ );其它时间无显著差异( $P > 0.05$ )。在体外观察到中华倒刺

鲃的单核细胞和中性粒细胞吞噬了多个金黄色葡萄球菌;在混有红细胞的涂片发现许多红细胞内

有多个金黄色葡萄球菌,并具有变形能力,能粘附、包围、吞噬金黄色葡萄球菌。

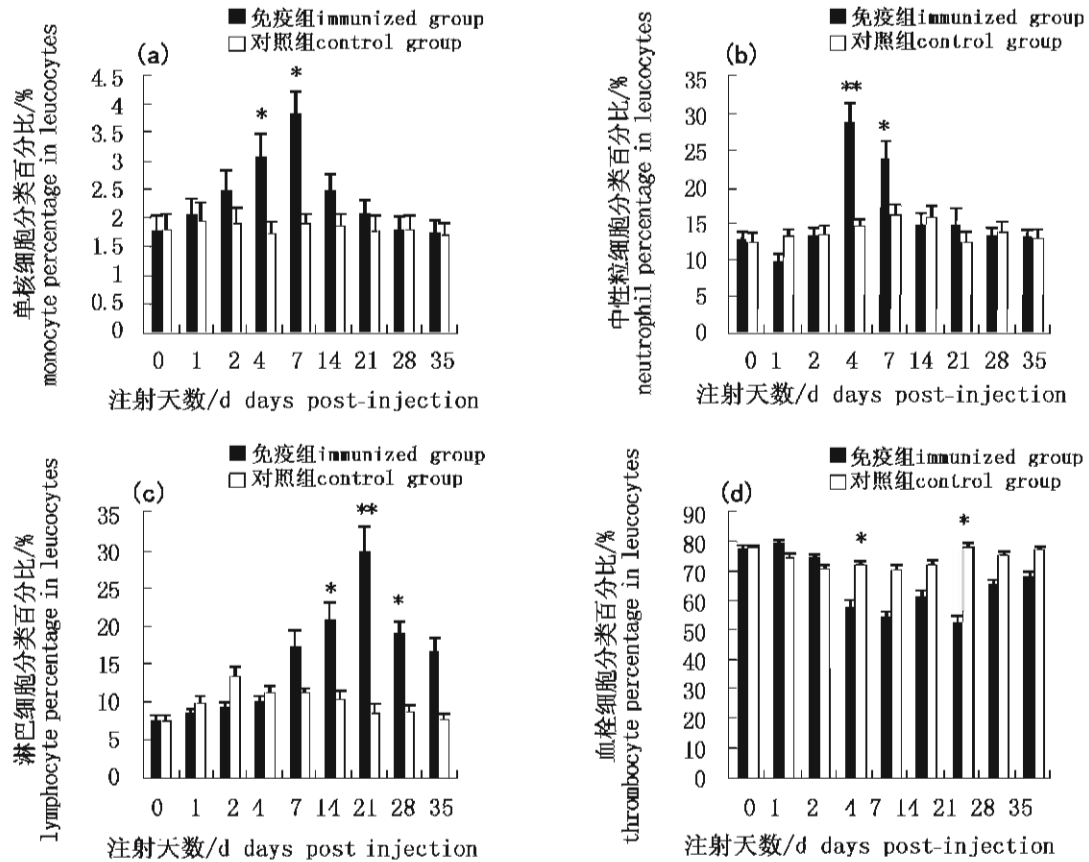


图2 注射灭活温和气单胞菌或生理盐水后中华倒刺鲃外周血白细胞分类百分比变化  
Fig.2 The variation of differential leucocyte count in peripheral blood of *S. sinensis* post injection with F-AS or saline solution

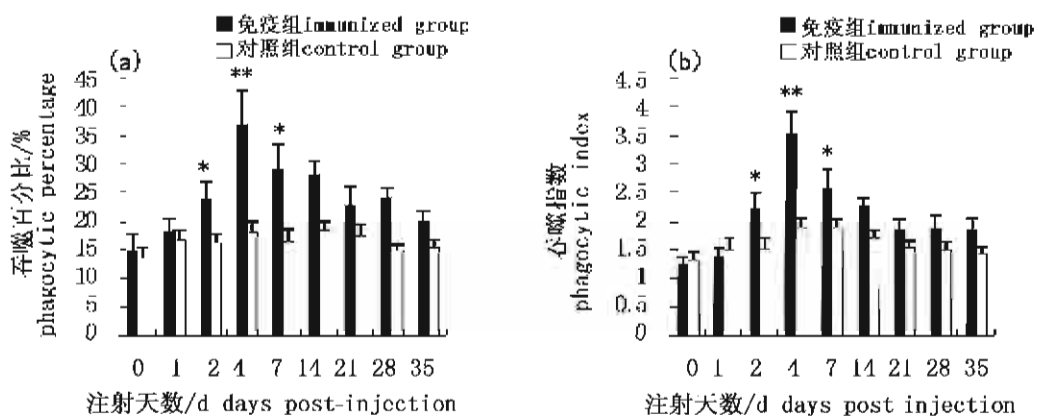


图3 注射灭活温和气单胞菌或生理盐水后中华倒刺鲃吞噬细胞吞噬活性变化  
Fig.3 The variation of phagocytic activity of phagocytes in peripheral blood of *S. sinensis* post injection with F-AS or saline solution

## 2.4 灭活菌苗对血清抗体效价的影响

注射灭活温和气单胞菌苗(F-AS)后中华倒刺鲃血清凝集抗体效价检测结果如表1所示,免疫组抗体效价缓慢升高,第21天达峰值1:

213.33,随后逐渐下降。对照组抗体效价低,且稳定在1:4~1:5.33。灭活温和气单胞菌苗(F-AS)能引起中华倒刺鲃抗体水平明显升高。

表1 灭活温和气单胞菌苗免疫的中华倒刺鲃血清抗体效价变化

Tab.1 Changes of serum antibody titers of *S. sinensis* immunized with F-AS

组别 group	注射天数(d) days post-injection								
	0	1	2	4	7	14	21	28	35
免疫组 immunized group	1:4.0	1:10.67	1:10.67	1:26.67	1:53.33	1:85.33	1:213.33	1:128	1:106.67
对照组 control group	1:4.0	1:4.0	1:4.0	1:5.33	1:4.0	1:5.33	1:4.0	1:4.0	1:4.0

注:数据用平均值表示( $n=3$ )。

Note: The data were expressed as mean( $n=3$ ).

## 2.5 灭活菌苗对血清中蛋白质含量的影响

注射灭活温和气单胞菌苗(F-AS)后中华倒刺鲃血清总蛋白、白蛋白和球蛋白含量检测结果如表2所示,免疫组总蛋白(total protein)和球蛋白(globulin)含量从第4天起逐渐升高,至第21天达峰值,分别为( $46.37 \pm 3.17$ ) g/L 和

( $31.20 \pm 3.26$ ) g/L,其中球蛋白含量显著高于对照组( $0.01 < P < 0.05$ );随后逐渐降低。对照组总蛋白和球蛋白含量在较小范围波动。两组白蛋白(albumin)含量波动均较小。灭活温和气单胞菌苗(F-AS)能引起中华倒刺鲃血清中蛋白质尤其是总蛋白和球蛋白的含量增加。

表2 灭活温和气单胞菌苗免疫的中华倒刺鲃血清中蛋白质含量变化

Tab.2 Changes of serum protein contents of *S. sinensis* immunized with F-AS g/L,  $n=3$

注射后天数(d) days post-injection	总蛋白 total protein		白蛋白 albumin		球蛋白 globulin	
	免疫组	对照组	免疫组	对照组	免疫组	对照组
	immunized group	control group	immunized group	control group	immunized group	control group
0	$32.40 \pm 2.57$	$33.30 \pm 2.37$	$12.70 \pm 1.57$	$11.80 \pm 0.61$	$19.70 \pm 1.71$	$21.50 \pm 2.71$
1	$30.93 \pm 2.03$	$30.60 \pm 0.40$	$11.03 \pm 0.70$	$12.33 \pm 0.50$	$19.90 \pm 1.34$	$18.27 \pm 0.73$
2	$29.50 \pm 1.91$	$33.03 \pm 1.82$	$11.57 \pm 0.75$	$14.27 \pm 0.71$	$17.93 \pm 1.17$	$18.77 \pm 1.11$
4	$36.03 \pm 1.67$	$32.53 \pm 1.78$	$13.30 \pm 0.95$	$13.10 \pm 1.78$	$22.73 \pm 1.27$	$19.43 \pm 1.67$
7	$37.80 \pm 0.91$	$34.53 \pm 0.87$	$16.47 \pm 0.59$	$13.67 \pm 1.42$	$21.33 \pm 1.42$	$20.87 \pm 1.68$
14	$41.80 \pm 1.40$	$33.13 \pm 2.17$	$15.33 \pm 0.90$	$13.13 \pm 0.68$	$26.47 \pm 0.54$	$20.00 \pm 1.64$
21	$46.37 \pm 3.17$	$35.10 \pm 2.46$	$15.17 \pm 1.01$	$14.07 \pm 2.02$	$31.20 \pm 3.26^a$	$21.13 \pm 0.34^b$
28	$39.73 \pm 2.07$	$31.80 \pm 1.13$	$13.13 \pm 1.07$	$12.97 \pm 1.28$	$26.60 \pm 1.00$	$18.83 \pm 2.35$
35	$38.63 \pm 1.09$	$32.90 \pm 2.31$	$15.27 \pm 1.69$	$13.40 \pm 1.45$	$23.37 \pm 0.94$	$19.50 \pm 1.61$

注:相同行中帶不同的上标数值表示差异显著( $0.01 < P < 0.05$ );数据用平均值 $\pm$ 标准误表示。

Notes: The values with different superscripts in the same row denote significant differences( $0.01 < P < 0.05$ ); The data were expressed as mean $\pm$ SE.

## 2.6 免疫保护力

对免疫组和对照组以温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)活菌攻毒实验的结果见表3,攻毒14天后中华倒刺鲃相对免疫保护力(RPS)为65.21%,接种该灭活菌苗后该鱼对温和气单

胞菌产生了免疫力,成活率明显提高。对死亡鱼解剖检查的结果证实,死亡鱼出现明显的败血症状;无菌接种濒死病鱼内脏,发现存在大量温和气单胞菌,证实都是人工感染该病菌致死。

表3 活菌攻毒后中华倒刺鲃的相对存活率

Tab.3 Relative percent survival of *S. sinensis* after challenge with live *A. sobria*

组别 group	攻毒鱼尾数 no. of fish challenged	存活鱼尾数 no. of fish survival	死亡率(%) mortality	相对免疫保护力(%) RPS
免疫组 immunized group	30	22	26.67	65.21
对照组 control group	30	7	76.67	

### 3 讨论

#### 3.1 外周血红细胞的免疫功能

Siegel 等<sup>[13]</sup>于 1981 年提出人类红细胞免疫系统的概念。后来研究发现鲤 (*Cyprinus carpio* Linnaeus)、金鱼 (*Carassius auratus auratus* Linnaeus) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus* Cuvier et Valenciennes) 的红细胞具有免疫作用<sup>[14]</sup>,观察到鲤、鳊 (*Aristichthys nobilis* Richardson) 和草鱼的红细胞具吞噬作用<sup>[15]</sup>。相关研究表明:鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix* Cuvier et Valenciennes)、鳊、鲫 (*Carassius auratus auratus* Linnaeus)、鳙 (*Monopterus albus* Zuiew) 和青鱼 (*Mylopharyngodon riceus* Richardson) 的红细胞亦具免疫功能,并存在种间、种内及种群间差异<sup>[16-19]</sup>。本研究发现在混有红细胞的吞噬实验涂片中,清晰地观察到许多红细胞内有多个金黄色葡萄球菌,且观察到红细胞通过变形、粘附、包围进而吞噬金黄色葡萄球菌,这与在牙鲮 (*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel) 中的观察结果一致<sup>[20]</sup>,这些观察结果显示中华倒刺鲃的红细胞具有较强的吞噬活性,是吞噬细胞。此外,研究发现虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) 的红细胞表面有补体片段 ( $C_{3b}$ ) 受体,介导了病原体的清除,并通过释放细胞因子以调节巨噬细胞的免疫功能<sup>[21-24]</sup>。这些事实都说明鱼类红细胞不仅是氧气和二氧化碳的运载工具,还是重要的非特异免疫细胞,参与了免疫反应,并具有一定的免疫调节作用。吞噬作用是鱼类红细胞免疫功能的主要体现形式。本研究发现注射灭活菌苗的第 2 和 4 天免疫组红细胞数量明显增加,可能与其免疫清除作用相关。

#### 3.2 菌苗增强中华倒刺鲃免疫力的发展过程及免疫保护机制

本研究温和气单胞菌活菌攻毒 14 d 后相对免疫保护力 (RPS) 达 65.21%, 显示中华倒刺鲃接种该灭活菌苗后增强了对温和气单胞菌的免疫力。实验表明腹腔注射灭活菌苗引起中华倒刺鲃外周白细胞数增加,免疫早期 (第 1 周) 主要引起单核细胞和中性粒细胞数增加,随后淋巴细胞数上升,这与注射嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 灭活疫苗后虹鳟<sup>[25]</sup>和南方鲇 (*Silurus meridionalis* Chen)<sup>[8]</sup>的变化相似。中华倒刺鲃接

受免疫后,中性粒细胞和单核细胞在较短时间 (分别是第 4、7 天) 达峰值,同期淋巴细胞数量变化不大;随后淋巴细胞数明显增加,并于第 21 天达峰值,同期中性粒细胞和单核细胞数量逐渐减少。研究发现虹鳟的淋巴细胞受抗原刺激增殖发生在脾脏,后随血液循环进入外周,故淋巴细胞的增长趋势滞后<sup>[8, 25]</sup>。可以推断单核细胞和中性粒细胞较淋巴细胞发挥作用早,即免疫早期主要是单核细胞和中性粒细胞首先发挥作用,之后则主要是淋巴细胞发挥作用。

鱼类特异性免疫机能较为低下,其免疫防御主要依靠非特异防御机制<sup>[26]</sup>。吞噬作用是鱼类主要的非特异免疫机制之一,由单核细胞和中性粒细胞发挥这一作用<sup>[6]</sup>。本研究体外观察证实了中华倒刺鲃的单核细胞和中性粒细胞是吞噬细胞,与虹鳟<sup>[27]</sup>及南方鲇<sup>[8]</sup>的研究结果一致。吞噬细胞的数量和吞噬能力可以反映鱼类非特异性免疫能力<sup>[26]</sup>。受菌苗刺激,中华倒刺鲃外周血液的单核细胞和中性粒细胞在免疫早期 (第 1 周) 不仅数量显著增加,而且吞噬功能显著增强 (PP 和 PI 迅速上升),说明接种疫苗早期,中华倒刺鲃通过增强非特异细胞免疫来增强抗病力。

抗体效价反映了鱼类特异性体液免疫水平,常被用于评估免疫接种的效果和病原微生物对鱼体产生的影响<sup>[7, 28-29]</sup>。本研究显示注射疫苗后中华倒刺鲃抗体效价缓慢升高,并在第 21 天达峰值,随后逐渐下降但远高于对照组,变化趋势与斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus* Rafinsque)<sup>[10]</sup>相似;也与实验中淋巴细胞分类百分比变化趋势一致。且同期球蛋白含量和抗体效价变化趋势吻合,这提示球蛋白增加的主要是免疫球蛋白。免疫球蛋白是鱼类特异性免疫应答中最主要的介质<sup>[30]</sup>。

总之,腹腔注射灭活温和气单胞菌菌苗 (F-AS) 后,中华倒刺鲃在免疫早期 (第 1 周) 主要是红细胞、单核细胞和中性粒细胞数量明显增加,吞噬活性迅速提高;随后吞噬细胞数量和吞噬活性降低,淋巴细胞大量增殖,抗体效价及球蛋白在第 21 天达峰值。中华倒刺鲃注射疫苗到产生大量抗体需一段时间,与南方鲇<sup>[9]</sup>和斑点叉尾鲷<sup>[10]</sup>相似。免疫早期抗体尚未大量形成,中华倒刺鲃是靠吞噬细胞数量和吞噬活性的增加来吞噬病原菌以保护机体,吞噬细胞首先发挥重要的非特异性细胞免疫作用;随后借助淋巴细胞增殖、球蛋白

含量增加及抗体效价升高来抵抗病原菌攻击,特异性细胞和体液免疫起主要作用。所以,我们认为诱导红细胞、单核细胞和中性粒细胞等具有吞噬功能的细胞数量增加和吞噬功能增强,可能是疫苗早期保护作用的重要机制之一,在这段时间疫苗诱导鱼体依靠非特异性细胞免疫产生保护作用,这可能也是有的鱼用疫苗虽血清抗体效价较低却可以产生较强免疫保护力的原因<sup>[7, 31-32]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 蔡焰值,何长仁,蔡焯强,等. 中华倒刺鲃生物学初步研究[J]. 淡水渔业,2003,33(2):16-18.
- [2] 邴旭文,蔡宝玉,王利平. 中华倒刺鲃肌肉营养成分与品质的评价[J]. 中国水产科学,2005,12(2):211-215.
- [3] 王贞琼,冯兴无,江涛,等. 中华倒刺鲃肌肉溃烂病及其防治的初步研究[J]. 淡水渔业,2005,35(4):34-36.
- [4] Press C M, Lillehaug A. Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects[J]. Br Vet J,1995,151(1):45-69.
- [5] Sommerset I, Krossoy B, Biering E, et al. Vaccines for fish in aquaculture [J]. Expert Rev Vaccines, 2005,4(1):89-101.
- [6] Yakhnenko V M, Klimenlov I V. Specific features of blood cell composition and structure in fishes from the pelagial and coastal zones of Lake Baikal [J]. Bio Bull,2009,36(1):37-44.
- [7] 张秋胜,陈昌福. 异育银鲫对嗜水气单胞菌灭活菌苗的免疫应答[J]. 华中农业大学学报,2001,20(3):271-274.
- [8] 单红,张其中,刘强平,等. 灭活菌苗免疫的南方鲂外周血液细胞免疫指标的变化[J]. 中国水产科学,2005,12(3):275-280.
- [9] 贺蓉,陈礼强,王金胜,等. 南方大口鲂对温和气单胞菌的免疫反应[J]. 西南农业大学学报(自然科学版),2005,27(5):692-695.
- [10] 李惠芳,汪成竹,陈昌福. 斑点叉尾鲷对3种致病细菌灭活菌苗的免疫应答[J]. 华中农业大学学报,2006,25(6):654-658.
- [11] Blaxhall P C, Daisley K W. Routine haematological methods for use with fish blood [J]. J Fish Biol, 1973,5(6):771-781.
- [12] 李萍,刘彬. 生物化学检验[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2006:147-148.
- [13] Siegel I, Liu T L, Gleicher N. The red cell immune system[J]. Lancet,1981,12(2):556-559.
- [14] 冯来坤,伊栋,刘玉斌,等. 鱼类红细胞免疫功能的初步研究[J]. 鱼类病害研究,1992,14(1):11-12.
- [15] 王旭东,饶家荣. 红细胞广泛吞噬作用的发现和研究[J]. 水产学报,1996,20(1):72-75.
- [16] 蔡完其,孙佩芳. 三种鲤对暴发性鱼病的抗病力差异[J]. 水产学报,1994,18(4):290-296.
- [17] 蔡完其,孙佩芳. “四大家鱼”对暴发性鱼病的抗病力的种间差异[J]. 中国水产科学,1995,2(2):71-77.
- [18] 蔡完其,轩兴荣. 红鲤4群体间红细胞免疫功能及差异[J]. 中国水产科学,2003,10(2):133-136.
- [19] 彭远义,王豪举,刘华英,等. 鲫和鳊红细胞 C<sub>3b</sub>受体的研究[J]. 西南农业大学学报,1995,17(5):467-469.
- [20] 张振冬,张培军,莫照兰. 牙鲆红细胞免疫功能的初步研究[J]. 高技术通讯,2006,16(12):1312-1315.
- [21] Passantino L, Altamura M, Cianciotta A, et al. Fish immunology I. Binding and engulfment of *Candida albicans* by erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) [J]. Immunopharmacol and Immunotoxicol,2002,24(4):665-678.
- [22] Passantino L, Tafaro A, Altamura M, et al. Fish immunology II. Morphological and cytochemical characterization and phagocytic activities of head kidney macrophages from rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) [J]. Immunopharmacol and Immunotoxicol,2002,24(4):679-691.
- [23] Passantino L, Altamura M, Cianciotta A, et al. Maturation of fish erythrocytes coincides with changes in their morphology, enhanced ability to interact with *Candida albicans* and release of cytokine-like factors active upon autologous macrophages [J]. Immunopharmacol and Immunotoxicol,2004,26(4):573-585.
- [24] Jirillo E, Passantino L, Ribaud M R, et al. Fish immunology. fish erythrocytes release cytokine-like factors that modulate autologous macrophage function [J]. Anatomia Histologia Embryologia, 2005,34(Suppl 1):23-24.
- [25] Köllner B, Kotterba G. Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunization with *Aeromonas salmonicida* [J]. Fish & Shellfish Immunol,2002,12(1):35-48.
- [26] Macarthur J I, Thelma C, Fletcher. Fish immunology [M]. London: Academic Press,1985:29-45.

- [27] O' Neill J G. Fish immunology [ M ]. London: Academic Press, 1985: 47 - 55.
- [28] Magnadottir B, Gudmundsdottir B K. A comparison of total and specific immunoglobulin levels in healthy Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and in salmon naturally infected with *Aeromonas salmonicida* subsp. achromogenes [ J ]. Vet Immunol Immunopathol, 1992, 32(1 - 2): 179 - 189.
- [29] Palm R C, Landolt M L, Busch R A. Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [ J ]. Dis Aquat Organ, 1998, 33 (3): 157 - 166.
- [30] 张永安, 聂品. 鱼类体液免疫因子研究进展 [ J ]. 水产学报, 2000, 24(4): 376 - 381.
- [31] Cipriano R C. Immunization of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) against *Aeromonas salmonicida*: immunogenicity of virulent and avirulent isolates and protective ability of different antigens [ J ]. Can J Fish Aquat Sci, 1982, 39(1): 218 - 221.
- [32] 周晓杨. 南方鲇出血病的病原、病理及免疫预防研究 [ D ]. 重庆: 西南师范大学, 2004.

## Changes of immune parameters in periphery blood of *Spinibarbus sinensis* Bleeker immunized with formalin-killed *Aeromonas sobria*

LUO Fen<sup>1,2</sup>, ZHANG Qi-zhong<sup>1,3\*</sup>, FEN Han-ru<sup>1</sup>, ZHU Cheng-ke<sup>1</sup>, YUAN Juan<sup>1</sup>, CHU Chao<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Organism Reproduction and Development (Ministry of Education), Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), Key Laboratory of Aquatic Science of

Chongqing, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Bioengineering Department, Ningde Teachers College, Ningde 352100, China;

3. Hydrobiology Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** *Spinibarbus sinensis* Bleeker in the Yangtze River and its tributaries is of great economical value. However, it suffers from serious diseases, particularly a bacterial disease named "muscle ulceration" in intensive aquaculture. In order to effectively control the disease of *S. sinensis*, it is necessary to clarify the changes of immune parameters of periphery blood in *S. sinensis* immunized with a kind of dead bacteria. One hundred and eighty healthy fish (*S. sinensis*) with an average body weight of (100 ± 25) g were divided randomly into immunized and control groups. Each individual was intraperitoneally injected with 0.2 mL  $1.0 \times 10^8$  mL formalin-killed *Aeromonas sobria* in immunized group, and with 0.2 mL 0.65% sterile saline solution in control group. Then, approximate 2 mL of blood was taken from each fish caudal vein on Day 0, 1, 2, 4, 7, 14, 21, 28 and 35 post injection to study the changes of immune parameters, such as haematocyte number, differential leucocyte count (DLC), serum antibody titer, phagocytic activity of phagocytes and serum protein content. The results were as follows: the number of erythrocytes and leucocytes in peripheral blood of immunized *S. sinensis* increased during the first 4 days post injection and peaked on 4th day, then, gradually decreased to the control level (Fig. 1-a & 1-b). The differential leucocyte count (DLC) of the immunized group increased and was significantly (or very significantly) higher than that of control group for monocytes and neutrophils from day 4 to day 7 (Fig. 2-a & 2-b), and for lymphocytes from the 14th day to 28th day (Fig. 2-c), but lower than that of control group for thrombocytes on day 4 and 21 (Fig. 2-d), and was the same level as that of control group for the four kinds of cells at the other sampling times. The phagocytic percentage (PP) and phagocytic index (PI) of phagocytes in immunized *S. sinensis* were significantly higher than those of the non-immunized fish between day 2 and day 7, and of the maximum value on day 4, but were not significantly different from those of the non-immunized *S. sinensis* at the other



sampling times (Fig. 3-a & 3-b). The serum antibody titers gradually increased in immunized *S. sinensis* during the first 21 days post injection and reached the greatest value on day 21, then, gradually dropped off, but always kept the low level of 1:4 – 1:5 in the non-immunized fish (Tab. 1). The serum globulin content gradually increased in the immunized fish from day 4 to day 21, peaked and significantly higher than that of the non-immunized fish on day 21 (Tab. 2). The serum globulin changes resulted in the same change model of serum total protein, which was not of significant difference between immunized and control groups (Tab. 2). However, the serum albumin quantity was not significantly different between the immunized and control groups, and fluctuated a little in the two groups (Tab. 2). Relative percent survival was 65.21% for the immunized *S. sinensis* after challenge by means of injection with 0.2 mL live *A. sobria* at a concentration of  $5.0 \times 10^7$  mL for every individual (Tab. 3). This indicated that the formalin-killed *Aeromonas sobria* (F-AS) stimulated *S. sinensis* to produce a significantly protective immunity against the pathogen bacteria infection. All the results stated above suggested that the vaccine (F-AS) made *S. sinensis* enhance the non-specific cell immunity, such as monocytes, neutrophils and erythrocytes, during the early period (from day 1 to day 7), and the specific cellular and humoral immunity, such as lymphocytes and antibodies, during the later period against the bacterial pathogen infection post single dose immunization, and the relative percent survival reached 65.21% for the immunized *S. sinensis* after challenge with live *A. sobria*.

**Key words:** *Spinibarbus sinensis* Bleeker; formalin-killed *Aeromonas sobria*; haematocyte number; differential leucocyte count; phagocytic activity of phagocytes; antibody titer

**Corresponding author:** ZHANG Qi-zhong. E-mail: zhangqzdr@126.com