

文章编号: 1000-0615(2019)01-0156-12

DOI: 10.11964/jfc.20180411228

· 综述 ·

鱼类抗刺激隐核虫感染的黏膜免疫研究进展

李言伟^{1,2}, 江 颺¹, 但学明², 李安兴^{1*}

(1. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室,
广东省水生经济动物繁育重点实验室, 广东 广州 510275;
2. 华南农业大学海洋学院, 广东 广州 510642)

摘要: 刺激隐核虫是一种原生纤毛类寄生虫, 可以感染几乎所有海水硬骨鱼类并导致死亡, 给海水鱼类养殖业造成巨大经济损失。由于刺激隐核虫体表寄生的特性, 使其成为研究鱼类黏膜免疫机制的良好病原模型, 可为高效疫苗的研发提供理论依据。本文综述了鱼类抗刺激隐核虫感染的黏膜免疫研究进展, 以期为开展海水鱼类抗刺激隐核虫感染的免疫防控措施研究提供理论支撑。已有研究表明, 受刺激隐核虫感染后, 斜带石斑鱼皮肤黏液或其培养上清液能使幼虫发生阻动, 由皮肤中的抗体分泌细胞产生的特异性IgM抗体在抗寄生虫感染中发挥重要作用; 同时在刺激隐核虫感染时, 多种免疫细胞如NCC细胞、中性粒细胞等在寄生虫周围聚集, 趋化因子以及趋化因子受体表达量在寄生虫感染部位上调, 暗示其调节的免疫细胞也参与抗虫免疫; 此外, 研究发现黄斑蓝子鱼对刺激隐核虫具有天然抗性, 其血清和皮肤黏液对刺激隐核虫幼虫和滋养体均具有杀灭作用, 已从其血清中分离到一种天然抗虫蛋白—L-氨基酸氧化酶, 为刺激隐核虫病的防控提供新的途径; 在理论研究的基础上, 通过免疫实验证实疫苗防控刺激隐核虫病是可行的。

关键词: 海洋鱼类; 刺激隐核虫; 黏膜免疫; 体液免疫; 细胞免疫; 疫苗

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)是一种寄生于海水鱼类体表和鳃上的原生纤毛虫, 其可以感染几乎所有海水硬骨鱼类, 引起海水养殖鱼类严重的致死性疾病—白点病(图1)^[1-3]。刺激隐核虫的生活史包括滋养体、包囊前体、包囊



图1 刺激隐核虫感染引起卵形鲳鲹体表和鳃上出现大量小白点^[1]

Fig. 1 The skin and gill showing of pompanos a lot of white-spot post *C. irritans* infection

和幼虫4个阶段(图2), 其中只有滋养体营专性寄生生活, 以宿主体液、组织碎片以及完整细胞等为食^[4]。以卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)为宿主, (27±0.5) °C时刺激隐核虫一个完整的生活史大约需要7 d^[2]。然而, 不同宿主和温度条件下, 其完成一个生活史所需要的时间则不同^[5-7]。

近年来, 随着我国海洋开发的不断深化, 海水养殖渔业的持续发展, 养殖密度加大, 导致养殖环境恶化, 刺激隐核虫病的暴发越来越频繁, 危害越来越严重。特别是广东、广西、海南和福建等海水鱼类主养殖区, 刺激隐核虫引发的白点病已成为大范围、经常性暴发的烈性传染性疾病, 仅广东地区每年因刺激隐核虫引发的白点病造成的经济损失就过亿元。2008

收稿日期: 2018-04-04 修回日期: 2018-06-20

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-47)

通信作者: 李安兴, E-mail: lianxing@mail.sysu.edu.cn



图 2 刺激隐核虫生活史模式图^[3]

Fig. 2 Life cycle of *C. irritans*

年, 农业部将刺激隐核虫病列入我国“二类动物疫病”名录, 是我国“一、二类动物疫病”名录中唯一一种水产寄生虫病。

由于海水养殖的开放性特征, 很难杜绝刺激隐核虫对鱼体的感染, 加之尚无有效的治疗药物和处理方法, 使得该病的防治异常困难。免疫防治被证实是预防该病的有效途径, 国内

外学者也开展了大量的疫苗研究工作。然而, 关于海水鱼类抗御刺激隐核虫感染的免疫机制研究较少, 但该项工作的开展是研发高效疫苗的理论支撑; 同时, 刺激隐核虫主要寄生于宿主体表和鳃上, 也是开展海水鱼类黏膜免疫抗病原感染研究的良好模型。中山大学李安兴课题组自2003年开始研究刺激隐核虫病, 由于刺激隐核虫不能进行体外培养^[8-9], 其建立了以卵形鲳鲹为宿主的刺激隐核虫标准化传代和保种方法, 自主研发了刺激隐核虫专用收虫器(图3), 为实验室开展研究提供大量虫源^[2, 10]。同时, 该课题组以斜带石斑鱼(*Epinephelus daemeli*)为宿主建立了刺激隐核虫感染和免疫模型, 开展刺激隐核虫疫苗以及宿主抗寄生虫感染的黏膜免疫机制研究。以下就国内外研究团队在鱼类-刺激隐核虫模型上取得的相关研究成果进行综述。

1 鱼类抗刺激隐核虫的黏膜抗体应答

Yoshinaga等^[11]证实刺激隐核虫感染后, 底鳃(*Fundulus heteroclitus* sp.)血清使刺激隐核虫发生阻动的现象(图4)。Yambot等^[12]研究发现, 刺激隐核虫感染后, 斜带石斑鱼皮肤黏液能使刺激隐核虫幼虫发生部分阻动, 且特异性IgM抗体

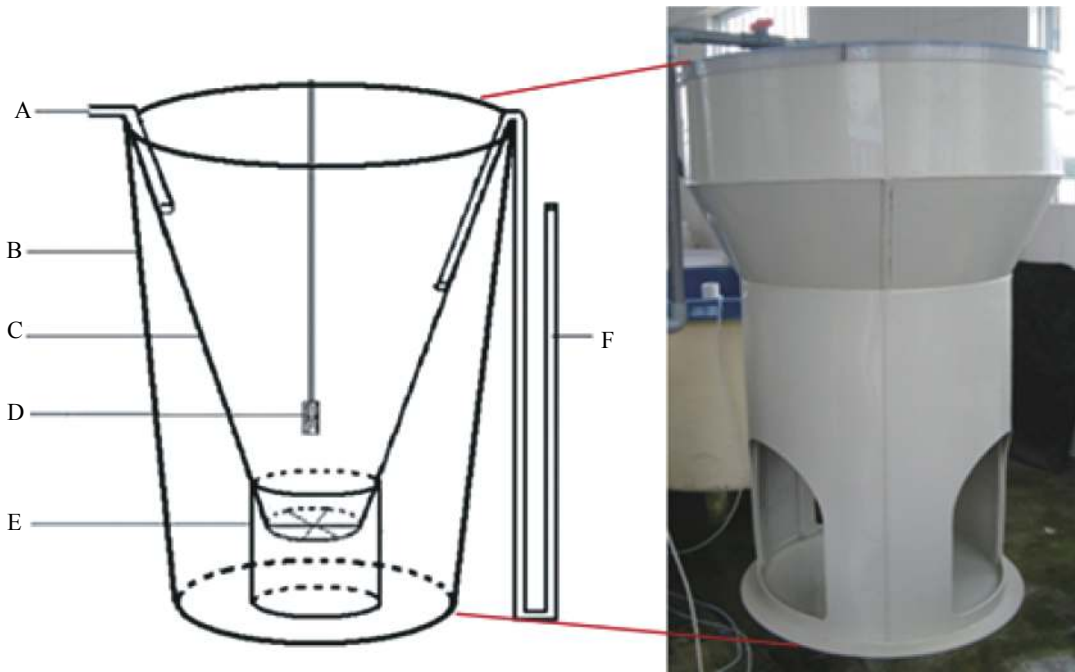


图 3 刺激隐核虫专用收虫器^[2]

A.进水管; B.160 L塑料桶; C.漏斗; D.气石; E.2 L烧杯; F.出水管

Fig. 3 The special collection unit for *C. irritans*

A. inlet-tube; B. 160 L plastic bucket; C. funnel; D. airstone; E. 2 L beaker; F. outlet-tube

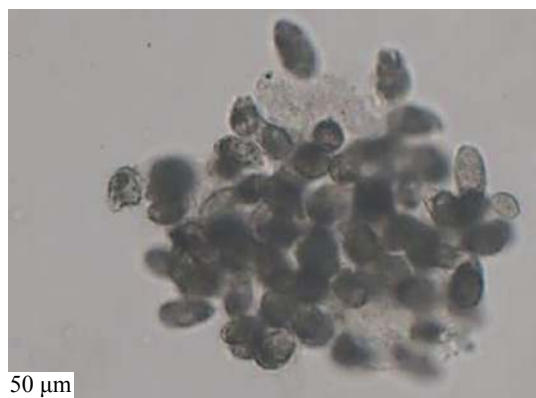


图4 免疫鱼血清使刺激隐核虫幼虫发生阻动的现象^[11]

Fig. 4 The immobilisation and clumping together of theronts by immune serum^[11]

滴度增加。柏建山^[13]和Luo等^[14]研究发现,活幼虫浸泡免疫和灭活幼虫腹腔注射免疫,均能诱导斜带石斑鱼血清和皮肤黏液产生抗刺激隐核虫特异性IgM抗体和阻动效价,但浸泡免疫产生的抗体效价和阻动效价比腹腔注射免疫高。进一步的研究发现^[15],引起宿主产生特异性抗体应答的抗原位于幼虫细胞膜表面,特别是纤毛上。以上研究说明,斜带石斑鱼IgM抗体参与抗刺激隐核虫免疫应答过程。

鱼体被刺激隐核虫感染后,其血清和皮肤黏液中均存在IgM抗体,关于抗体在抗寄生虫感染中的作用已有不少研究。柏建山^[13]通过给斜带石斑鱼腹腔注射鱼或兔抗刺激隐核虫抗血清发现,注射兔抗血清能使健康鱼体获得免疫保护,在受免鱼的皮肤黏液和血清中均能检测到兔IgG抗体;而注射鱼抗血清未能使健康鱼体获得免疫保护,虽然在血清中能检测到IgM特异性抗体,但在其皮肤黏液中检测不到抗体,说明鱼类血清中的抗体不能被转运到体表黏液中,且皮肤黏液中的抗体在抗刺激隐核虫中发挥主要作用。此现象与多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)的研究结果相似^[16-18],推测可能是由于鱼类血清IgM抗体主要以4聚体存在,超大分子量限制了其转运,但兔IgG抗体分子量较小,可以被转运到鱼的体表,给健康鱼以被动免疫保护。

血清中的IgM抗体不能被转运到皮肤黏液中,有学者研究了参与皮肤黏膜免疫的抗体产生的途径。Luo等^[14]体外培养被刺激隐核虫免疫后的斜带石斑鱼皮肤组织,发现其培养上清液能使刺激隐核虫幼虫发生阻动,且检测到抗刺

激隐核虫特异性IgM抗体,说明皮肤组织中存在特异性IgM抗体分泌细胞。柏建山^[13]用刺激隐核虫感染斜带石斑鱼,12 h后取皮肤组织进行体外培养,5 d后同样在培养上清液中检测到抗刺激隐核虫特异性IgM抗体,而取皮肤组织时斜带石斑鱼血清中尚无抗刺激隐核虫抗体,因此,推测皮肤黏膜局部可以独立完成刺激隐核虫抗原呈递、鱼类T/B细胞激活以及抗体分泌过程,但详细的机制尚待揭示。

近期关于虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的研究发现^[19-20],多子小瓜虫感染能诱导皮肤组织和鳃中IgT⁺细胞数量增加、特异性抗寄生虫IgT抗体效价升高,但IgM抗体效价及其分泌细胞数量未发生显著变化,说明IgT是虹鳟抗多子小瓜虫感染的主要抗体。目前,由于缺乏斜带石斑鱼IgT特异性抗体,因此,IgT是否参与其抗刺激隐核虫免疫应答,以及IgM和IgT在抗寄生虫感染中的作用孰轻孰重尚不清楚。

2 鱼类抗刺激隐核虫的黏膜细胞免疫应答

细胞免疫在鱼类抗寄生虫感染过程中起到重要作用。然而,目前由于缺少鱼类免疫细胞特异性标记,使鱼类细胞免疫的研究非常滞后,关于鱼类抗刺激隐核虫感染细胞免疫的研究更是匮乏。柏建山^[13]用刺激隐核虫感染斜带石斑鱼,使其获得免疫保护力,再注射氢化可的松抑制细胞免疫,结果发现,血清IgM抗体效价未出现显著变化,但保护率却显著降低。进一步的组织学观察发现^[21],刺激隐核虫感染后第3天,滋养体寄生部位的鳃上存在大量白细胞的迁入或增殖的现象,这些细胞主要包括嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞等(图5-1)。此外,定量研究发现^[22],斜带石斑鱼趋化因子*IL-8*的表达量在刺激隐核虫感染后的皮肤中极显著升高,而*IL-8*正是嗜碱性粒细胞、中性粒细胞和外周血T淋巴细胞等细胞的趋化因子。以上研究暗示,除特异性抗体外,细胞免疫在斜带石斑鱼黏膜抗刺激隐核虫感染过程中发挥重要作用。

黄夏子^[23]关于非特异性毒性细胞(NCC细胞)的研究发现,刺激隐核虫感染后第1天和第2天的斜带石斑鱼鳃上,NCC细胞大量聚集,且有滋养体寄生的鳃丝上NCC细胞数量比没有滋养体寄生的鳃丝多(图5-2)。随后,NCC细胞的数量

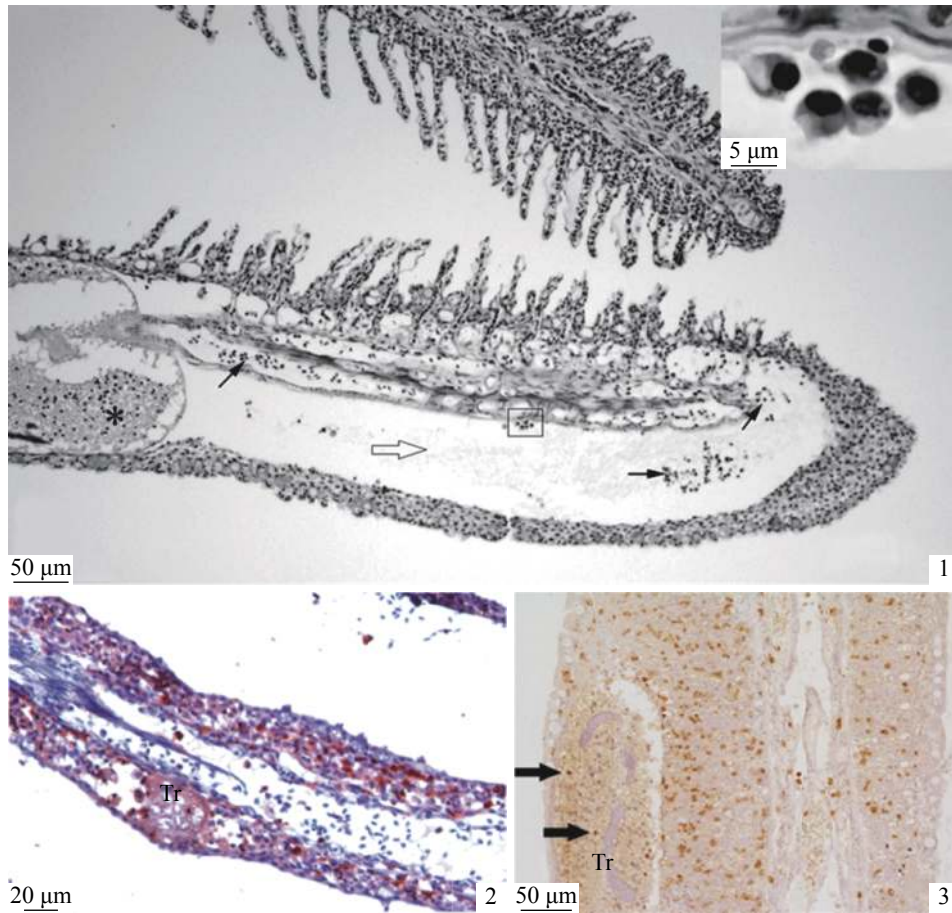


图 5 刺激隐核虫感染斜带石斑鱼后鳃的组织学图片^[21, 23-24]

1. 刺激隐核虫感染后第3天鳃的组织切片, *表示滋养体, 白色箭头标记寄生虫寄生造成的组织坏死, 黑色箭头表示白细胞迁入, 方框标记的是中性粒细胞; 2. 刺激隐核虫感染后第2天鳃的免疫组化(红色表示NCC细胞), Tr表示滋养体; 3. 刺激隐核虫感染后第3天鳃的免疫组化(黄色示中性粒细胞)

Fig. 5 Histological sections of the grouper gill post *C. irritans* infection

1. histological sections of grouper gill on the 3th day infected with *C. irritans*, * indicates trophonts, the white arrow marks the tissue necrosis caused by parasitic parasites, the black arrow indicates that the white blood cells move in, and the box is marked with neutrophils; 2. immunohistochemistry analysis of gill on the 2nd day post *C. irritans* infection (red indicates the NCC cell), Tr indicates trophonts; 3. immunohistochemistry analysis of gill on the 2nd day post *C. irritans* infection

逐渐减少, 但是直到第7天, 感染组鳃丝上的NCC细胞数量仍然高于对照组。相对于感染部位, 系统免疫器官脾脏和头肾中的NCC细胞含量在整个实验过程中与对照组无显著性差异。王海青^[24]关于中性粒细胞的研究发现, 刺激隐核虫感染后第1天, 斜带石斑鱼鳃中的中性粒细胞数量开始增加, 在第2天细胞数量最多, 此后维持较高水平, 直到第7天才有所减少(图5-3)。此外, 以上研究中均发现大量免疫细胞在滋养体周围聚集的现象, 说明这些免疫细胞主动参与杀虫免疫应答。然而, NCC细胞和中性粒细胞比刺激隐核虫滋养体小的多, 难以像吞噬细菌或病毒一样进行细胞内杀伤, 推测可能通过释放

一些胞外酶或利用细胞外诱捕网等起到杀伤寄生虫的作用, 但具体机制有待进一步研究。

在斜带石斑鱼中鉴定到2种巨噬细胞集落刺激因子受体基因(*MCSFR1/2*), 免疫组化显示, *MCSFR1*⁺细胞在健康斜带石斑鱼多个组织中均能观察到, 且在脾脏、头肾、体肾、肝脏和肠中均检测到黑色素巨噬细胞^[25-26]。定量研究显示, 刺激隐核虫感染能诱导斜带石斑鱼皮肤和鳃中*MCSFR1/2*基因表达量升高, 特别是皮肤中, 其表达量均呈显著上调。另外, *MCSFR*的2种配体基因—*IL-34*和*MCSF2*在感染后的鳃中也出现显著上调。推测刺激隐核虫感染诱导局部*IL-34*和*MCSF2*表达量增加, 其再募集*MCSFRs*⁺巨噬细胞

到感染部位,参与局部炎症反应。哺乳动物XCR1主要在CD8 α 样DC细胞中表达,XCR1-XCL1轴参与自生耐受性的建立、辅助性T细胞产生以及DC细胞介导的细胞毒性反应。哺乳动物中只有1种,但在斜带石斑鱼中鉴定到3种成员,包括XCR1、XCR1L和CCR12^[27],定量研究显示,刺激隐核虫感染后的皮肤中,XCR1和CCR12表达量显著升高,且CCR12在鳃中也出现显著上调。CCR6主要表达于DC细胞、T细胞和B细胞,通过诱导靶细胞到上皮炎症位点而介导黏膜免疫刺激隐核虫感染后的皮肤中,CCR6A和CCR6B的表达量上调^[28]。此外,刺激隐核虫感染后期的

鳃中,CCR9a/b以及其配体基因CCL25的表达量出现上调,而其介导T细胞的迁移和肠道归巢^[29]。刺激隐核虫感染后,基因在鳃和皮肤中的表达量的变化见表1。以上研究表明,刺激隐核虫感染能诱导黏膜免疫中抗原呈递细胞以及淋巴细胞细胞数量的增加,其可介导局部特异性B细胞的激活,进而产生抗体。

3 鱼类抗刺激隐核虫的先天性免疫

对刺激隐核虫进行流行病学调查时发现,即使刺激隐核虫可以感染几乎所有种类海水养

表 1 刺激隐核虫感染斜带石斑鱼后免疫相关基因表达量变化

Tab. 1 The expression changes of orange-spotted grouper's genes after *C. irritans* infection

基因 genes	组织 tissues	感染时间 infection time						参考文献 references
		6 h	12 h	1 d	2 d	3 d	5 d	
MCSFR1	皮肤 skin	1.45±0.03	3.51±0.37	3.94±0.42	1.79±0.33	3.47±0.72	2.68±0.28	[26]
	鳃 gill	0.76±0.01	1.27±0.04	0.68±0.10	0.66±0.09	2.07±0.31	1.04±0.16	
MCSFR2	皮肤 skin	3.32±0.56	9.49±0.66	11.47±0.84	5.02±0.23	13.11±0.31	12.74±1.01	
	鳃 gill	1.35±0.28	3.35±1.22	3.28±0.67	3.63±0.42	7.81±0.61	1.81±0.22	
IL-34	皮肤 skin	1.27±0.23	1.22±0.03	0.39±0.04	0.50±0.01	2.48±0.22	0.21±0.01	
	鳃 gill	1.66±0.05	1.47±0.01	3.55±0.21	1.96±0.05	3.64±0.05	0.86±0.01	
MCSF2	皮肤 skin	0.81±0.05	0.91±0.06	0.77±0.01	0.77±0.04	0.39±0.03	0.6±0.02	
	鳃 gill	3.58±0.15	1.62±0.11	7.26±0.26	6.13±0.03	8.73±0.14	0.99±0.14	
XCR1	皮肤 skin	6.13±0.31	4.35±0.21	6.85±0.95	3.12±0.01	3.34±0.25	10.29±1.06	[27]
	鳃 gill	1.07±0.01	1.00±0.14	0.79±0.11	0.22±0.01	2.22±0.45	0.6±0.27	
CCR12	皮肤 skin	2.71±0.14	3.33±0.09	1.93±0.18	1.82±0.23	2.65±0.04	16.51±1.20	
	鳃 gill	1.33±0.07	2.93±0.3	3.29±0.04	0.76±0.13	10.12±1.14	2.01±0.10	
CCR6A	皮肤 skin	0.42±0.09	2.39±0.16	2.65±0.15	1.55±0.27	5.15±0.45	1.15±0.13	[28]
	鳃 gill	2.67±0.15	1.04±0.15	0.70±0.11	0.90±0.09	0.54±0.06	0.85±0.03	
CCR6B	皮肤 skin	0.89±0.06	4.73±0.13	17.14±0.68	6.85±0.75	15.16±1.11	5.22±0.77	
	鳃 gill	0.85±0.13	1.05±0.29	1.11±0.14	0.98±0.09	3.08±0.77	0.72±0.06	
CCR9a	皮肤 skin	0.45±0.03	0.12±0.01	0.22±0.04	0.45±0.01	1.06±0.05	0.51±0.02	[29]
	鳃 gill	1.28±0.17	0.77±0.04	1.89±0.12	2.86±0.11	3.48±0.11	1.96±0.23	
CCR9b	皮肤 skin	0.45±0.03	0.12±0.01	0.22±0.04	0.45±0.01	1.06±0.06	0.51±0.01	
	鳃 gill	1.28±0.17	0.77±0.04	1.89±0.12	2.86±0.10	3.48±0.10	1.96±0.24	
CCL25	皮肤 skin	0.26±0.01	0.74±0.06	0.13±0.01	1.05±0.14	2.18±0.04	1.41±0.01	
	鳃 gill	1.36±0.02	2.17±0.04	1.01±0.01	1.05±0.01	1.24±0.04	1.96±0.01	

注:表中数据显示每个时间点感染组比对照组变化的倍数

Notes: The data in the table show that the change fold of infected group's gene expression to its control at the same time point

殖的鱼类, 并引起大量暴发性死亡, 但其唯独不感染黄斑蓝子鱼(*Siganus oramin*)。Wang等^[30]对黄斑蓝子鱼等8种主要养殖鱼类进行刺激隐核虫攻毒实验, 发现黄斑蓝子鱼对刺激隐核虫的易感性非常低, 因而推测黄斑蓝子鱼对刺激隐核虫具有天然抗性。对其抗病机制研究发现, 黄斑蓝子鱼血清和皮肤黏液对刺激隐核虫幼虫和滋养体均有很强的杀灭作用, 此杀灭作用与免

疫后血清产生的使幼虫发生阻动的效果完全不同; 血清的阻动活性会使幼虫运动速度减慢、聚集在一起, 再慢慢死亡, 而黄斑蓝子鱼血清或黏液会快速的使寄生虫细胞膜和核膜破裂死亡(图6)。此外, 其血清和皮肤黏液对多子小瓜虫、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*), 以及一些常见的细菌都具有很好的杀灭效果, 但对真菌无显著抑菌效果^[31-32]。

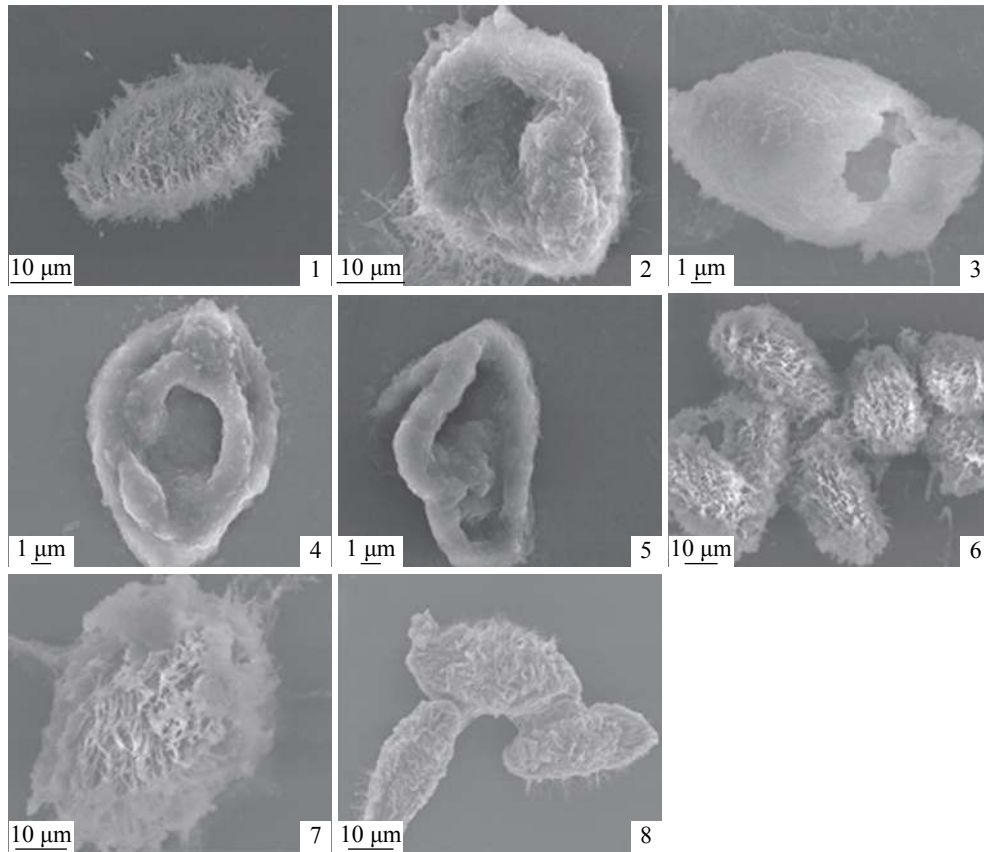


图6 扫描电镜分析不同鱼血清对刺激隐核虫幼虫的杀灭效果^[30]

1. 未处理的幼虫; 2. 黄斑蓝子鱼血清处理的幼虫, 示纤毛脱落; 3和4. 黄斑蓝子鱼血清处理后, 幼虫细胞膜破裂; 5. 黄斑蓝子鱼血清处理后, 幼虫细胞膜完全破裂、内容物流出; 6. 斜带石斑鱼抗血清使幼虫发生阻动的现象; 7. 寄生虫的分泌物; 8. 纤毛交叉连接在一起

Fig. 6 Scanning electron microscopy analysis of the effects of different fish serum on theront of *C. irritans*^[30]

1. untreated theront of *C. irritans*; 2. *C. irritans* treated with rabbitfish serum, shows the cilia beginning to fall off; 3 and 4. rupture of the *C. irritans* membranes in different body positions; 5. complete membrane rupture, shape change and efflux of the content; 6. immobilization of the immune grouper serum to *C. irritans*; 7. secretion of the *C. irritans*; 8. cross linkage of the cilia

通过层析、液相色谱等的方法, 从黄斑蓝子鱼血清中分离到一种大小约61.7 ku的蛋白, 其杀虫机制与血清一致, 主要作用于刺激隐核虫的细胞膜和细胞核, N-端测序和肽指纹谱分析显示, 该蛋白是一种L-氨基酸氧化酶^[30]。进而克隆了该蛋白的全基因序列, 定量分析显示, 高剂量刺激隐核虫感染早期, 黄斑蓝子鱼鳃和脾

脏中L-氨基酸氧化酶基因的表达量显著升高, 更进一步证实该蛋白参与天然抗寄生虫免疫^[33]。利用原核和真核表达系统分别表达了L-氨基酸氧化酶的重组蛋白, 发现细菌表达的重组蛋白对刺激隐核虫依然具有很好的杀灭效果, 为刺激隐核虫病的防治开辟新的途径。而真菌表达的蛋白具有很好的杀菌作用, 说明该酶杀虫和杀菌

的机制存在差异。

4 刺激隐核虫疫苗研究

从淡水鱼的多子小瓜虫免疫学研究获得启示, Colorni^[34]曾提出鱼类对刺激隐核虫可能会产生获得性免疫保护, 这一猜想粗唇龟鲟(*Chelon labrosus*)上得到了证实^[35]。随后, Yoshinaga等^[11]发现, 底鲮经刺激隐核虫体表感染后, 能抵抗刺激隐核虫的再次感染, 进一步证实疫苗可能成为防治刺激隐核虫的有效方法。近年来, 免疫防治已经成为刺激隐核虫研究领域的热点, 国内外研究者开展了大量的研究工作(表2)。Luo等^[14]和

Yambot等^[12]发现, 体表感染活幼虫或腹腔注射灭活幼虫都能给予斜带石斑鱼免疫保护, 预防刺激隐核虫的再次感染。Bai等^[36]比较了刺激隐核虫幼虫、滋养体和包囊作为灭活疫苗抗原对斜带石斑鱼的免疫保护效果, 发现刺激隐核虫幼虫的免疫原性最好, 给予斜带石斑鱼较高的免疫保护。Dan等^[37]进一步研究了幼虫抗原剂量对斜带石斑鱼免疫效果的影响, 发现随着抗原剂量的增加保护率升高。以上研究表明, 刺激隐核虫幼虫活疫苗或灭活疫苗都能给予斜带石斑鱼抗刺激隐核虫感染的免疫保护, 但活疫苗的保护效果比灭活疫苗好。

表2 刺激隐核虫疫苗对宿主的免疫保护效果

Tab. 2 Protective immunity in hosts following immunization with *C. irritans* vaccines

受免鱼 hosts	免疫原 immunogen	免疫途径 immunization route	阻动效价和抗体效价 immobilization titer and antibody titer	保护效果 immune protection	参考文献 references
粗唇龟鲟 <i>C. labrosus</i>	活幼虫	体表感染	/	寄生虫感染量显著降低, 且保护效果与感染剂量呈正相关; 保护期可达6个月	[35]
底鲮 <i>F. heteroclitus</i> sp.	活幼虫	体表感染	血清可以阻动幼虫	寄生虫感染量显著降低	[11]
斜带石斑鱼 <i>E. daemeli</i>	活幼虫	体表感染	黏液能使幼虫阻动, 且检测到特异性抗体	/	[12]
	灭活幼虫	腹腔注射	/	包囊和滋养体数量显著减少; 保护率升高, 且与免疫剂量呈正相关	[12]
	活幼虫	体表感染	皮肤培养液和血清的阻动效价和抗体效价升高	100%的相对保护率	[14]
	灭活幼虫	腹腔注射	皮肤培养液和血清的阻动效价和抗体效价升高	100%的相对保护率	[14]
	灭活幼虫、包囊或滋养体	腹腔注射	幼虫免疫组产生较高的血清阻动效价和抗体效价	56.7%(幼虫)、13.3%(包囊)和10%(滋养体)的相对保护率	[36]
	灭活幼虫	腹腔注射	/	80%(3万幼虫)和40%(1万幼虫)相对保护率	[37]
	兔或鱼抗刺激隐核虫血清	腹腔注射	在血清和皮肤黏液中鉴定到兔抗血清; 仅在血清中检测到鱼抗血清	腹腔注射兔抗血清, 给予宿主保护; 而腹腔注射鱼抗血清不能给予宿主保护	[13]
	i-antigen重组蛋白和基因疫苗	肌肉注射	血清阻动效价和抗体效价升高	40%~46%的相对保护率	[38]
	i-antigen和hsp70基因疫苗	口服	/	100%的相对保护率	[39]
卵形鲳鲹 <i>T. ovatus</i>	活幼虫	体表感染	血清和皮肤培养液阻动效价升高	60%的相对保护率; 寄生虫的相对感染强度下降50.6%	[40]
	灭活幼虫	腹腔注射	血清和皮肤培养液阻动效价升高	40%的相对保护率; 寄生虫的相对感染强度下降37.2%	[40]
莫桑比克口孵非鲫 <i>Oreochromis mossambicus</i>	活幼虫	体表感染	血清阻动效价和抗体效价升高, 但与感染剂量无关; 黏液中只检测到抗体效价	寄生虫感染量显著降低	[41-42]

尽管刺激隐核虫幼虫疫苗能使鱼体获得免疫保护力, 但虫体的获得和制备疫苗方法等存在诸多限制, 如通过鱼体繁殖虫体难以获得足够的疫苗用抗原, 且刺激隐核虫不能在体外进行大量培养和繁殖^[8-9], 成为该疫苗产业化生产的巨大障碍。多子小瓜虫的研究发现, 阻动抗原在诱导宿主免疫保护过程中起到重要作用,

以其作为抗原免疫鱼体能保护其免受寄生虫的感染^[16, 43-48]。近些年, 从刺激隐核虫中也鉴定到大量阻动抗原蛋白或基因, 以及其他疫苗候选蛋白或基因(表3)。Hatanaka等^[49-50]从2株刺激隐核虫日本分离株中鉴定到2种阻动抗原。Bai等^[36]从刺激隐核虫广东株中也鉴定到1种阻动抗原, 并克隆了部分基因序列。通过转录组测序, Mo等^[51]

表 3 从刺激隐核虫中鉴定的阻动抗原和其他潜在抗原蛋白或基因

Tab. 3 The immobilisation antigens or other potential antigenic proteins or genes identified from *C. irritans*

基因或蛋白 genes or proteins	鉴定方法 assay methods	参考文献 references
阻动抗原	western blot 同源克隆 转录组数据	[36, 41-42, 49-50] [38] [51]
CiSA-32.6和14-3-3基因	cDNA文库	[52-53]
α -微管蛋白、 β -微管蛋白、肌动蛋白、烯醇化酶、DnaK、V型ATP合酶催化亚基 α 、Mcm2-3-5家族蛋白、26S蛋白酶体亚基P45家族蛋白、蛋白激酶结构域蛋白、热激蛋白70	比较蛋白组学	[54]
肌动蛋白、 α -微管蛋白、 β -微管蛋白、热激蛋白70、线粒体热激蛋白70、V型ATP合酶催化亚基 α 、DnaK以及2种功能不明的未知蛋白	免疫蛋白组学 (兔抗刺激隐核虫抗血清)	[54]
β -微管蛋白、烯醇化酶、多嘧啶尾端结合蛋白、蛋白激酶结构域蛋白、TNFR/NGFR 富含半胱氨酸区域家族蛋白、V型ATP合酶催化亚基 α 、NADH-泛醌氧化还原酶75 ku亚基、谷氨酰胺合成酶催化亚基、苹果酸脱氢酶以及2种功能不明的未知蛋白	免疫蛋白组学 (鱼抗刺激隐核虫抗血清)	[54]

从该分离株中鉴定到9种新的阻动抗原基因。以上研究表明, 阻动抗原基因在刺激隐核虫中同样存在。Jose Priyaa等^[38]基于Hatanaka的阻动抗原基因序列, 从刺激隐核虫中国台湾嘉义株中克隆了阻动抗原基因, 以其制备的疫苗经肌肉注射免疫后, 斜带石斑鱼能获得40%~46%的相对保护率。Jose Priya等^[39]将此阻动抗原基因与刺激隐核虫Hsp70 C-端区分别连到pcDNA3.1表达载体上, 同时口服免疫石斑鱼, 能使其获得100%的相对保护率, 说明基于刺激隐核虫阻动抗原基因疫苗的研发是可行性的。此外, Lin等^[52]和Huang等^[53]报道了2个具有较好免疫原性的刺激隐核虫蛋白(CiSA-32.6和Ci14-3-3)。Mai等^[54]利用比较蛋白组学和免疫蛋白组学方法, 鉴定了大量刺激隐核虫幼虫期特异性高的表达蛋白以及具有免疫原性的蛋白, 以上工作的开展为研发基于这些蛋白的亚单位疫苗或DNA疫苗提供可能。

5 展望

近年来, 虽然在鱼类抗刺激隐核虫感染的黏膜免疫方面取得一些进展, 但仍有许多问题尚待解析: 1. 抗刺激隐核虫感染的黏膜免疫中哪种抗体起主要作用, 这些抗体是在黏膜组织中产生还是由系统免疫组织产生再分泌到黏膜组织中尚不清楚; 2. 如果抗体是由局部黏膜组织产生, 那么这些抗体分泌细胞是在局部黏膜组织中激活的, 还是在系统免疫部位激活再迁移到局部黏膜组织中; 3. 抗体参与杀刺激隐核虫的机制是什么? 通过抗体介导的补体经典途径, 抗体依赖性介导的细胞毒作用, 还是其他机制;

4. 腹腔注射免疫和体表感染免疫引起宿主抗体应答的机制是否一致? 这直接关系到疫苗的免疫途径以及免疫保护效果; 5. 哪些细胞参与局部抗刺激隐核虫免疫应答, 以及其杀虫机制。以上问题的阐明, 对于研发刺激隐核虫高效疫苗具有重要意义。

参考文献:

- [1] Colorni A, Burgess P. *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of 'white spot disease' in marine fish: an update[J]. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1997, 1(4): 217-238.
- [2] Dan X M, Li A X, Lin X T, et al. A standardized method to propagate *Cryptocaryon irritans* on a susceptible host pompano *Trachinotus ovatus*[J]. *Aquaculture*, 2006, 258(1-4): 127-133.
- [3] 江飏. 大黄鱼刺激隐核虫病的防治措施研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016
Jiang B. Study on prevention and treatment of *Cryptocaryon irritans* infection of cultured large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016(in Chinese)
- [4] Burgess P J, Matthews R A. A standardized method for the in vivo maintenance of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) using the grey mullet *Chelon labrosus* as an experimental host[J]. *The Journal of Parasitology*, 1994, 80(2): 288-292.
- [5] Colorni A. Biology of *Cryptocaryon irritans* and strategies for its control[J]. *Aquaculture*, 1987, 67(1-2): 236-237.

- [6] Diggles B K, Lester R J G. Influence of temperature and host species on the development of *Cryptocaryon irritans*[J]. *The Journal of Parasitology*, 1996, 82(1): 45-51.
- [7] Wang J L, Lao G F, Li Y W, *et al.* Effects of temperature and host species on the life cycle of *Cryptocaryon irritans*[J]. *Aquaculture*, 2018, 485: 49-52.
- [8] Yoshinaga T, Akiyama K, Nishida S, *et al.* *In vitro* culture technique for *Cryptocaryon irritans*, a parasitic ciliate of marine teleosts[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 78(2): 155-160.
- [9] Yambot A V, Song Y L. Short term *in vitro* culture of *Cryptocaryon irritans*, a protozoan parasite of marine fishes[J]. *Fish Pathology*, 2004, 39(4): 175-181.
- [10] Dan X M, Lin X T, Yan Y X, *et al.* A technique for the preservation of *Cryptocaryon irritans* at low temperatures[J]. *Aquaculture*, 2009, 297(1-4): 112-115.
- [11] Yoshinaga T, Nakazoe J I. Acquired protection and production of immobilization antibody against *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora, Hymenostomatida) in Mummichog (*Fundulus heteroclitus*)[J]. *Fish Pathology*, 1997, 32(4): 229-230.
- [12] Yambot A V, Song Y L. Immunization of grouper, *Epinephelus coioides*, confers protection against a protozoan parasite, *Cryptocaryon irritans*[J]. *Aquaculture*, 2006, 260(1-4): 1-9.
- [13] 柏建山. 刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)诱导的石斑鱼免疫反应特征及其阻动抗原基因的克隆与分析[D]. 广州: 中山大学, 2007
- Bai J S. The characters of grouper immune response elicited by *Cryptocaryon irritans* and cloning and analysis of its immobilization antigen gene[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2007(in Chinese)
- [14] Luo X C, Xie M Q, Zhu X Q, *et al.* Protective immunity in grouper (*Epinephelus coioides*) following exposure to or injection with *Cryptocaryon irritans*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(4): 427-432.
- [15] Luo X C, Xie M Q, Zhu X Q, *et al.* Some characteristics of host-parasite relationship for *Cryptocaryon irritans* isolated from South China[J]. *Parasitology Research*, 2008, 102(6): 1269-1275.
- [16] Clark T G, Lin T L, Dickerson H W. Surface antigen cross-linking triggers forced exit of a protozoan parasite from its host[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(13): 6825-6829.
- [17] Lin T L, Clark T G, Dickerson H. Passive immunization of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) against the ciliated protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis* by use of murine monoclonal antibodies[J]. *Infection and Immunity*, 1996, 64(10): 4085-4090.
- [18] Clark T G, Dickerson H W. Antibody-mediated effects on parasite behavior: evidence of a novel mechanism of immunity against a parasitic protist[J]. *Parasitology Today*, 1997, 13(12): 477-480.
- [19] Xu Z, Parra D, Gómez D, *et al.* Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(32): 13097-13102.
- [20] Xu Z, Takizawa F, Parra D, *et al.* Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods[J]. *Nature Communication*, 2016, 7: 10728.
- [21] 李言伟. 石斑鱼TLRs功能及刺激隐核虫感染后免疫相关基因表达分析[D]. 广州: 中山大学, 2012
- Li Y W. Research on TLRs and immune-related genes expression profile of grouper infected with *Cryptocaryon irritans*[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2012(in Chinese)
- [22] Li Y W, Dan X M, Zhang T W, *et al.* Immune-related genes expression profile in orange-spotted grouper during exposure to *Cryptocaryon irritans*[J]. *Parasite Immunology*, 2011, 33(12): 679-987.
- [23] 黄夏子. 斜带石斑鱼非特异细胞毒性抗刺激隐核虫感染的作用[D]. 广州: 中山大学, 2014
- Huang X Z. Response of nonspecific cytotoxic cells in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) to *Cryptocaryon irritans* infection[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2014(in Chinese)
- [24] 王海青. 石斑鱼NADPH氧化酶和髓过氧化物酶基因鉴定及抗寄生虫功能研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017
- Wang H Q. Molecular cloning and characterization of grouper (*Epinephelus coioides*) phagocyte NADPH oxidase and myeloperoxidase[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017(in Chinese)
- [25] Dan X M, Zhong Z P, Li Y W, *et al.* Cloning and expression analysis of grouper (*Epinephelus coioides*)

- M-CSFR gene post *Cryptocaryon irritans* infection and distribution of M-CSFR+cells[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(2): 240-248.
- [26] Mo Z Q, Li Y W, Zhou L, *et al.* Grouper (*Epinephelus coioides*) IL-34/MCSF2 and MCSFR1/MCSFR2 were involved in mononuclear phagocytes activation against *Cryptocaryon irritans* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 142-149.
- [27] Ni L Y, Zhou L, Wang H Q, *et al.* Identification and expression analysis of three XCR1-like receptors from *Epinephelus coioides* after *Cryptocaryon irritans* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 95-102.
- [28] Mo Z Q, Chen R A, Li Y W, *et al.* Characterization and expression analysis of two novel CCR6 chemokine receptors and their three potential ligands CCL20Ls of grouper (*Epinephelus coioides*) post *Cryptocaryon irritans* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(1): 280-288.
- [29] Yang M, Zhou L, Wang H Q, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of CCL25 and its receptor CCR9s from *Epinephelus coioides* post *Cryptocaryon irritans* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 402-410.
- [30] Wang F H, Xie M Q, Li A X. A novel protein isolated from the serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) is lethal to *Cryptocaryon irritans*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 32-41.
- [31] 黎睿君, 刘芳, 王方华, 等. 黄斑蓝子鱼皮肤黏液对刺激隐核虫及一些病原菌的抑杀作用[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(2): 243-251.
- Li R J, Liu F, Wang F H, *et al.* Skin mucus of rabbitfish (*Siganus oramin*) is lethal to *Cryptocaryon irritans* and some other pathogenic organisms[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 243-251(in Chinese).
- [32] Wang F H, Li R J, Xie M Q, *et al.* The serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) has antimicrobial activity to some pathogenic organisms and a novel serum L-amino acid oxidase is isolated[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(4-5): 1095-1108.
- [33] Jiang B, Wang J, Luo H L, *et al.* L-amino acid oxidase expression profile and biochemical responses of rabbitfish (*Siganus oramin*) after exposure to a high dose of *Cryptocaryon irritans*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 69: 85-89.
- [34] Colorni A. Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans*, and hyposalinity as a control measure in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1985, 1: 19-22.
- [35] Burgess P J, Matthews R A. *Cryptocaryon irritans*(Ciliophora): acquired protective immunity in the thick-lipped mullet, *Chelon labrosus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1995, 5(6): 459-468.
- [36] Bai J S, Xie M Q, Zhu X Q, *et al.* Comparative studies on the immunogenicity of theronts, tomonts and trophonts of *Cryptocaryon irritans* in grouper[J]. *Parasitology Research*, 2008, 102(2): 307-313.
- [37] Dan X M, Zhang T W, Li Y W, *et al.* Immune responses and immune-related gene expression profile in orange-spotted grouper after immunization with *Cryptocaryon irritans* vaccine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(3): 885-891.
- [38] Jose Priya T A, Lin Y H, Wang Y C, *et al.* Codon changed immobilization antigen (iAg), a potent DNA vaccine in fish against *Cryptocaryon irritans* infection[J]. *Vaccine*, 2012, 30(5): 893-903.
- [39] Jose Priya T A, Chien K H, Lin H Y, *et al.* Immobilization antigen vaccine adjuvanted by parasitic heat shock protein 70C confers high protection in fish against cryptocaryonosis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 517-527.
- [40] 但学明, 李安兴, 林小涛, 等. 卵形鲳鲹对刺激隐核虫的免疫应答和免疫保护研究[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(1): 13-18.
- Dan X M, Li A X, Lin X T, *et al.* Immune response and immunoprotection of pompanos (*Trachinotus ovatus*) against *Cryptocaryon irritans*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(1): 13-18(in Chinese).
- [41] Misumi I, Lewis T D, Takemura A, *et al.* Elicited cross-protection and specific antibodies in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) against two different immobilization serotypes of *Cryptocaryon irritans* isolated in Hawaii[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(4-5): 1152-1158.
- [42] Misumi I, Leong J A C, Takemura A, *et al.* Immune protection of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) exposed to different infectious doses of

- ectoparasite (*Cryptocaryon irritans*)[J]. [Parasitology Research](#), 2012, 110(1): 363-372.
- [43] Dickerson H W, Clark T G, Findly R C. *Ichthyophthirius multifiliis* has membrane-associated immobilization antigens[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1989, 36(2): 159-164.
- [44] Lin T L, Dickerson H W. Purification and partial characterization of immobilization antigens from *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1992, 39(4): 457-463.
- [45] Xu C H, Clark T G, Leff A A, *et al.* Analysis of the Soluble and Membrane-bound Immobilization Antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. [Journal of Eukaryotic Microbiology](#), 1995, 42(5): 558-564.
- [46] He J Y, Yin Z, Xu G L, *et al.* Protection of goldfish against *Ichthyophthirius multifiliis* by immunization with a recombinant vaccine[J]. [Aquaculture](#), 1997, 158(1-2): 1-10.
- [47] Wang X T, Clark T G, Noe J, *et al.* Immunisation of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, with *Ichthyophthirius multifiliis* immobilisation antigens elicits serotype-specific protection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 13(5): 337-350.
- [48] Wang X T, Dickerson H W. Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. [Clinical and Vaccine Immunology](#), 2002, 9(1): 176-181.
- [49] Hatanaka A, Umeda N, Hirazawa N. Molecular cloning of a putative agglutination/immobilization antigen located on the surface of a novel agglutination/immobilization serotype of *Cryptocaryon irritans*[J]. *Parasitology*, 2008, 135(9): 1043-1052.
- [50] Hatanaka A, Umeda N, Yamashita S, *et al.* Identification and characterization of a putative agglutination/immobilization antigen on the surface of *Cryptocaryon irritans*[J]. [Parasitology](#), 2007, 134(9): 1163-1174.
- [51] Mo Z Q, Li Y W, Wang H Q, *et al.* Comparative transcriptional profile of the fish parasite *Cryptocaryon irritans*[J]. *Parasites & Vectors*, 2016, 9: 630.
- [52] Lin Q Q, Yang M, Huang Z, *et al.* Cloning, expression and molecular characterization of a 14-3-3 gene from a parasitic ciliate, *Cryptocaryon irritans*[J]. [Veterinary Parasitology](#), 2013, 197(3-4): 427-435.
- [53] Huang X H, Sun Z Y, Guo G W, *et al.* Cloning and characterization of a surface antigen CiSA-32.6 from *Cryptocaryon irritans*[J]. [Experimental Parasitology](#), 2012, 130(3): 189-194.
- [54] Mai Y Z, Li Y W, Li R J, *et al.* Proteomic analysis of differentially expressed proteins in the marine fish parasitic ciliate *Cryptocaryon irritans*[J]. [Veterinary Parasitology](#), 2015, 211(1-2): 1-11.

Advances in the research on mucosal immune response of fish against *Cryptocaryon irritans* infection

LI Yanwei^{1,2}, JIANG Biao¹, DAN Xueming², LI Anxing^{1*}

(1. State Key Laboratory of Biocontrol, Guangdong Provincial Key Lab for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Cryptocaryon irritans* is an important parasite in mariculture fish, which can infect almost all kinds of marine bony fishes, causing fatal diseases and huge economic losses to marine aquaculture in China. Due to the property of living in the epidermis of the skin and gills, this makes it as good model to study the mucosal immunity of seawater fish, which are conducive to developing effective vaccine. In this paper, we reviewed the current progress of grouper (*Epinephelus coioides*) anti-*C. irritans* infection, which will provide the theoretical support for carrying out the immune prevention and control measures against *C. irritans*. The existing results show that after *C. irritans* infection, grouper skin mucous or its culture supernatant can immobilize the theronts, and specific IgM antibody anti-*C. irritans* was detected, which is produced by the antibody secreting cells in the skin and plays an important role in resistance to parasitic infections; We found many immune cells such as NCC cells, neutrophil cells around the parasites; meanwhile, the expression levels of some chemokines and chemokine receptors were significantly increased in the infection sites, implying that these immune cells may also involve resistance to parasite infection; In addition, we found that rabbitfish (*Siganus oramin*) was naturally resistant to *C. irritans* infection, the serum and skin mucous of which could kill the theronts and tomites of *C. irritans*. Next, a novel protein that is lethal to *C. irritans* was isolated from the serum of rabbitfish and which was identified as L-amino acid oxidase. Finally, by immune experiment, we proved the feasibility of vaccines for prevention and control of cryptocaryoniasis.

Key words: marine fishes; *Cryptocaryon irritans*; mucosal immunity; humoral immunity; cellular immunity; vaccine

Corresponding author: LI Anxing. E-mail: lianxing@mail.sysu.edu.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-47)