

文章编号:1000-0615(2009)06-1003-08

注射菌苗的生殖期黄颡鱼亲鱼的外周血细胞和体液免疫变化

冯汉茹¹, 张其中^{1,2}, 罗 芬³, 朱成科¹, 鉏 超¹

(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. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632; 3. 宁德高等师范专科学校生物系, 福建 宁德 352100)

摘要: 阐明生殖期亲鱼在注射灭活菌苗后的血细胞和体液免疫变化规律, 是预防亲鱼产后虚弱患病和仔鱼染病死亡的理论基础。本研究在试验组和对照组黄颡鱼胸鳍基部分别注射 0.2 mL 浓度为 1.0×10^8 CFU/mL 福尔马林灭活温和气单胞菌苗(F-AS)和 0.65% 灭菌生理盐水, 在免疫后第 1、2、4、7、14、21、28、35 天, 从尾静脉采血, 测定外周血液血细胞数量及组成比例, 血细胞吞噬活性和抗体效价。结果显示: 注射菌苗后白细胞数量和淋巴细胞的白细胞分类计数逐渐增加, 显著高于对照; 中性粒细胞、单核细胞的白细胞分类计数以及吞噬百分比(PP)、吞噬指数(PI)在 4~7 d 显著高于对照; 抗体效价逐渐升高且在第 14 天达到最高, 随后逐渐下降; 而红细胞数和血栓细胞的白细胞分类计数逐渐下降, 显著低于对照组。结果表明: 单次注射菌苗后亲鱼可以产生良好的免疫应答, 1~7 d 以增强单核细胞和中性粒细胞等非特异细胞免疫为主; 7~35 d 淋巴细胞增值, 并大量释放抗体且在第 21 天淋巴细胞出现极显著升高, 此后虽逐渐下降但仍显著高于对照, 抗体维持在较高水平上的时间为 1 周左右, 建议在黄颡鱼催产前 10~14 d 进行单次菌苗注射以增强亲鱼免疫力。

关键词: 黄颡鱼; 温和气单胞菌苗; 细胞免疫; 体液免疫; 抗体效价

中图分类号: S 917

文献标识码: A

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson), 属鲇型目(Siluriformes), 鲇科(Bagridae), 肉质细嫩、营养丰富、经济价值高, 是重要的养殖经济鱼类。随着集约化养殖的发展, 黄颡鱼的疾病越来越多。在规模化养殖中发现亲鱼在产卵生殖过程中体能消耗大, 且易受催产药物副作用的影响, 抵抗力下降; 其硬棘相互刺伤鱼体, 易受到病原感染, 引发疾病。仔鱼也容易被病原感染, 患出血性水肿病频繁, 死亡率可高达 90%。

鱼类在仔鱼阶段特异性免疫器官尚未发育完全, 还不能执行免疫功能, 只能依靠来自亲鱼母体免疫分子抵御外界病原感染^[1]。从大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)的成熟卵母细胞^[2]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的受精卵^[3]中分离得到 IgM, 而卵母细胞、受精卵和胚胎^[4]中却不能自身

合 IgM, 因此, IgM 被认为是来自母体的免疫物质^[1]。在鲫(*Carassius auratus*)^[4]中发现母源性免疫球蛋白最早在早期卵子 IV 时相中出现, 且定位于卵膜内侧和卵黄^[4-6]并得出母体免疫可以传递; 而免疫产卵前的银鲈(*Oncorhynchus kisutch*)发现母源性保护作用可以一直持续到仔鱼卵黄囊吸收完毕^[7]。因此在催产前对亲鱼注射菌苗增强其免疫力, 既可减少亲鱼患病机率, 又可降低仔鱼死亡率, 而确保亲鱼在免疫后处在细胞免疫和体液免疫最旺盛的时段内产卵繁殖, 就需要阐明免疫后亲鱼的细胞免疫和体液免疫的变化规律, 以便确定繁殖前的合适免疫时间。目前, 免疫黄颡鱼亲鱼后, 其细胞免疫和体液免疫的变化规律尚未见报道。

收稿日期: 2009-04-15

修回日期: 2009-06-10

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

通讯作者: 张其中, E-mail: zqz666@sina.com

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

2008 年 5 月在重庆市黄颡鱼苗繁殖场购买 170 尾 3 龄亲鱼,饲养在室外水泥鱼池中,入池前用 3% 食盐水消毒亲鱼 10 min。微流水培养 3 周,养殖期间的水温为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, pH 值为 6.8 ± 0.1 , 溶氧充足,每天按鱼体重 2% 投喂浮性饵料(粗蛋白质 $\geq 36.0\%$),每天吸出池底残渣,换水约 1/3。

1.2 疫苗制备

温和气单胞菌全菌苗(F-AS)制备 取自西南大学微生物室鉴定的从患典型细菌性败血症的草鱼内脏分离的温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*),接种在普通琼脂培养基(pH 7.3)上,28 $^\circ\text{C}$ 恒温摇床(125 r/min)培养 24 h,收集菌液。用麦氏比浊法^[8]测定细菌浓度,再用无菌生理盐水稀释至 2.5×10^8 CFU/mL,加入 1% 福尔马林,28 $^\circ\text{C}$ 灭活 26 h,8 000 r/min 离心洗涤 3 次,再用无菌生理盐水稀释至 1.0×10^8 CFU/mL 即为 F-AS 全菌苗,置于 4 $^\circ\text{C}$ 冷藏备用。

表 1 试验组和对照组黄颡鱼全长和体重($n=65$)
Tab.1 Total length and body weight of yellow catfish in test and control group($n=65$)

组别 group	平均全长 (cm) total length	平均体重 (g) body weight
试验组 test	16.419 ± 1.899	67.225 ± 16.946
对照组 control	16.717 ± 1.828	69.270 ± 16.696

金黄色葡萄球菌的制备 将金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)接种于淡水鱼类培养基(pH 7.2)上,28 $^\circ\text{C}$ 摇床(128 r/min)培养 28 h,再用无菌生理盐水洗脱菌苔,按上述方法制备 2.5×10^8 CFU/mL 菌悬液,加入 1% 甲醛,28 $^\circ\text{C}$ 灭活 26 h,8 000 r/min 离心洗涤 3 次后,调整细菌浓度至 1.0×10^8 CFU/mL,置于 4 $^\circ\text{C}$ 冷藏备用。

1.3 温和气单胞菌全菌苗的安全性检测

取灭活菌苗,将试验鱼随机分为试验组($n=25$)和对照组($n=15$)。试验组胸鳍基部注射全菌苗 0.25 mL/尾 F-AS,观察 7 d;对照组注射等量的 0.65% 无菌生理盐水,观察 7 d。

1.4 免疫注射及采血

将试验鱼随机分为试验组($n=65$)和对照组($n=65$),胸鳍基部注射全菌苗(F-AS)0.2 mL/100 g 鱼体重,对照组注射无菌生理盐水 0.2 mL/

100 g。免疫后第 1、2、4、7、14、21、28、35 天从各组中随机取 3 尾鱼,从尾静脉采血^[9] 2 mL,分为 2 份,1 份加入枸橼酸—枸橼酸钠抗凝剂(ACD)抗凝;另 1 份不加抗凝剂。抗凝血分为 2 份:1 份用于血细胞计数和白细胞分类,1 份用于吞噬活性测定;不抗凝血在室温下静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 10 min 取上层血清,用于测定血清抗体效价。

1.5 血液生理指标测定

红细胞和白细胞(RBC 和 WBC)计数 用 Dacie 氏稀释液^[10] 将外周血稀释 400 倍,在 Neubauer 计数板上完成血细胞计数。

白细胞分类计数(differential leucocyte count, DLC) 每尾鱼制作 3~5 张血涂片,风干后,每张涂片经甲醇固定 5 min 后,用 Wright-Giemsa 染液混合染色 1 h,镜检,在 Nikon ECLIPSE 80i 显微镜 100 $\times$ 油镜下观察 200 个白细胞,记录百分比,并在 Nikon ECLIPSEE 200 下拍照。

血细胞染色方法 每张血涂片风干后,甲醇固定 5 min,待甲醇临近全干时,滴加 Wright-Giemsa 染液,该染液用磷酸盐缓冲液(pH 6.9)稀释到 3 倍或 5 倍体积(现配现用,以免影响染色效果),室温染色 1 h(直至染液出现金属光泽),自来水冲洗,再用蒸馏水冲洗,晾干, Nikon ECLIPSE 80i 显微镜 40 $\times$ 下观察着色情况。

1.6 吞噬试验

抗凝血加入灭活 0.05 mL 浓度为 1.0×10^8 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌悬液,充分混匀后于 28 $^\circ\text{C}$ 下水浴 60 min,水浴期间每隔 10 min 摇匀 1 次,然后以 1 000 r/min 离心 5 min,吸取血细胞和血清之间的白细胞层置于载玻片上涂片,每个血样涂片 3~5 张。待水分临近全干时滴加甲醇固定 5~7 min,蒸馏水冲洗, Wright-Giemsa 染色 25 min,自来水冲洗,再用蒸馏水冲洗,晾干,油镜观察记录结果,计数 100 个吞噬细胞。

吞噬活性分别以吞噬百分比(phagocytic percentage, PP)和吞噬指数(phagocytic index, PI)表示,并按下式计算:

$$PP = (N_{100} / 100) \times 100\%$$

$$PI = N_1 / N_2$$

式中, N_{100} 指 100 个吞噬细胞中参与吞噬的细胞数; N_1 为吞噬细胞吞噬菌体总数; N_2 为参与吞噬

的吞噬细胞数。

1.7 血清抗体效价检测

采用试管凝集法,取血清 0.2 mL,按 2 倍稀释法用 0.65% 无菌生理盐水稀释血清,加入 1.0×10^8 CFU/mL 温和气单胞菌活菌 0.2 mL,37 °C 恒温水浴锅孵育 24 h,取出后在室温下静置 15 min,肉眼观察凝集反应程度。

1.8 统计方法

SPSS 11.5 和 EXCEL 2003 进行统计分析,数据以平均值 $\pm$ 标准差表示,各项指标差异性显著性采用 t 检验。

2 结果

2.1 安全性试验结果

注射菌苗后经过 7 d 饲养,100% 存活,未发现染病症状和死亡现象,表明全菌苗安全可用。

2.2 外周血细胞形态观察

红细胞(erythrocyte)包括成熟红细胞和幼稚红细胞(unmatured erythrocyte)(图版-1)。成熟红细胞椭圆形、圆形,表面光滑;核位于细胞中央,卵圆形,深紫红色;细胞质浅粉色。幼红细胞圆形;核圆形、较大,紫色;胞质浅灰蓝色。

血栓细胞(thrombocyte)是数量最多的一种白细胞(图版-2)。血栓细胞长条形、卵圆形、圆形

以及裸核圆形,其中以长条形,卵圆形较为常见,核紫红色,胞质为灰白色,或者几乎不被着色,偶可见浅粉色胞质,围绕在核周围。

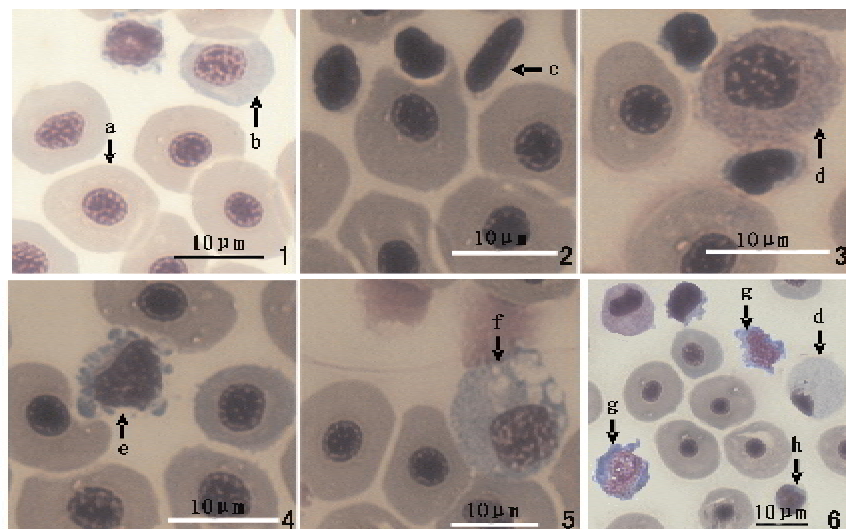
中性粒细胞(neutrophil)是唯一观察到的粒细胞(图版-3)。中性粒细胞椭圆形,圆形;核杆状、椭圆形和肾形,紫红色,位于一侧或居于中央,没有观察到分叶核;细胞质粉红色或灰白色。

淋巴细胞(lymphocyte)是核质比最高的细胞(图版-4,6),大小差异明显,可观察到小淋巴细胞和大淋巴细胞,其中以小淋巴细胞为主。小淋巴细胞(图版-6)卵圆形,不规则形;核卵圆形,紫红色,位于中央,与胞质相切,几乎占据整个细胞;胞质天蓝色且不均匀,有时可见伸出长度不等的伪足。大淋巴细胞(图版-4)与小淋巴细胞形态相仿,仅胞核比小淋巴细胞大,胞质比小淋巴细胞丰富,胞核的染色稍淡,有时还可见伸出的伪足。

单核细胞(monocyte)是体积最大也是数量最少的白细胞(图版-5)。单核细胞圆形,不规则形;胞核卵圆形,不规则形,深紫色;胞质不均匀,可见大小不等的空泡或伸出的伪足样胞突。胞质浅天蓝色,较淋巴细胞颜色浅。

2.3 红细胞(RBC)和白细胞(WBC)计数结果

黄颡鱼亲鱼外周血红、白细胞计数结果(图 1 和图 2)。试验组红细胞数在 $1.62 \times 10^6/\mu\text{L} \sim 1.94 \times$



图版 黄颡鱼注射 F-AS 后外周血细胞观察照片

1. 红细胞(a), 幼红细胞(b); 2. 血栓细胞(c); 3. 中性粒细胞(d); 4. 大淋巴细胞(e); 5. 单核细胞(f); 6. 大淋巴细胞(g), 小淋巴细胞(h)

Plate The peripheral blood cell of mature yellow catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*, immunized with formalin-killed *Aeromonas sobria*

1. erythrocyte(a), unmatured erythrocyte(b); 2. thrombocyte (c); 3. neutrophil(d); 4. large lymphocyte(e); 5. monocyte(f); 6. large lymphocyte(g), small lymphocyte(h)

$10^6/\mu\text{L}$ 间缓慢上升,对照组在 $2.32 \times 10^6/\mu\text{L} \sim 2.88 \times 10^6/\mu\text{L}$ 间快速上升,红细胞数在第 1~4 天试验组和对照组均无显著差异 ($P > 0.05$),第 7~35 天,试验组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。白细胞数第 1~21 天试验组在 $1.88 \times 10^5/\mu\text{L} \sim 4.07 \times 10^5/\mu\text{L}$ 间上升,对照组基本稳定在 $1.65 \times 10^5/\mu\text{L} \sim 2.68 \times 10^5/\mu\text{L}$ 间。白细胞数在第 1 天两组无差异 ($P > 0.05$),第 2~35 天两组差异显著 ($P < 0.05$),显著高于对照;第 21~35 天虽逐渐下降但仍显著高于对照 ($P < 0.05$)。

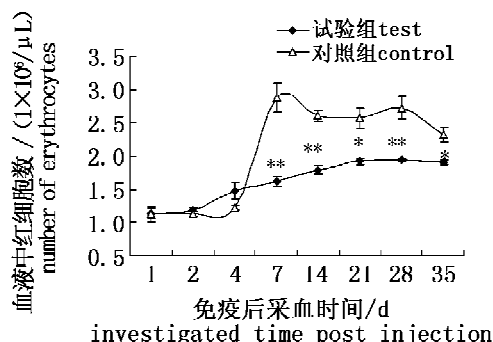


图1 试验组和对照组黄颡鱼红细胞数目变化

* 表示试验组与对照组差异显著 ($0.01 < P < 0.05$); ** 表示试验组与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig.1 Changes of erythrocyte number in the blood of control and test yellow catfish

* Significant ($0.01 < P < 0.05$) difference in erythrocyte number between control and test group; ** Very significant ($P < 0.01$) difference in erythrocyte number between control and test group

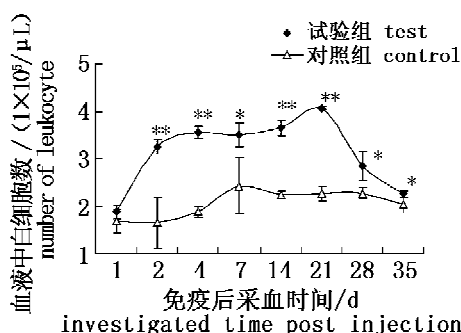


图2 试验组和对照组黄颡鱼白细胞数变化

* 表示试验组与对照组差异显著 ($0.01 < P < 0.05$); ** 表示试验组与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig.2 Changes of leukocyte number in the blood of control and test yellow catfish

* Significant ($0.01 < P < 0.05$) difference in leukocyte number between control and test group; ** Very significant ($P < 0.01$) difference in leukocyte number between control and test group

2.4 白细胞分类计数(DLC)结果

血栓细胞(thrombocyte)的白细胞分类计数(图3)在第1~2天均逐渐下降,两组无显著差

异;第4~28天试验组显著降低 ($P < 0.05$),并在第7、21天极显著降低 ($P < 0.01$)。淋巴细胞(lymphocyte)的白细胞分类计数(图4)在第1~2天两组无显著差异 ($P > 0.05$),但在4~28天试验组淋巴细胞显著高于对照 ($P < 0.05$),并在第7~28天极显著高于对照 ($P < 0.01$),分类百分比为34.06%,对照组淋巴细胞分类计数值变化小,较稳定。中性粒细胞(neutrophil)的白细胞分类计数(图5)总体变化趋势是先逐步上升至第4天(对照组)或第7天(试验组)达到峰值,然后逐步下降。试验组中性粒细胞的白细胞分类计数值仅在第7天极显著高于对照组 ($P < 0.01$),其分类百分比为14.93%,其余时间两组间无显著差异 ($P > 0.05$)。单核细胞(monocyte)白细胞分类计数值试验组在第1~7天持续升高,于第7天达到峰值,在第4、7天均极显著高于对照组 ($P < 0.01$),其值分别为3.29%和4.55%,第7天后逐渐下降;对照组的值变化小(图6)。

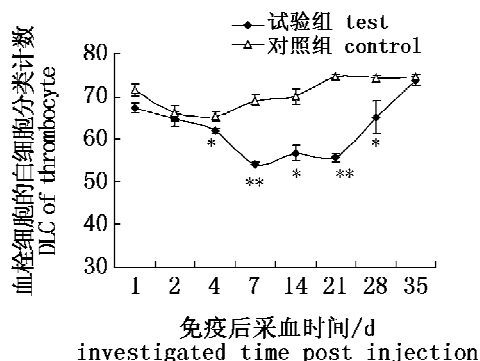


图3 试验组和对照组黄颡鱼血栓细胞的白细胞分类计数变化

* 表示试验组与对照组差异显著 ($0.01 < P < 0.05$); ** 表示试验组与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig.3 Kinetics of thrombocyte percentage in leucocytes of blood in control and test yellow catfish

* Significant ($0.01 < P < 0.05$) difference in thrombocyte percentage in leucocytes of blood between control and test group; ** Very significant ($P < 0.01$) difference in thrombocyte percentage in leucocytes of blood between control and test group

2.5 吞噬试验结果

试验组在第1~7天吞噬百分比(PP)和吞噬指数(PI)均逐渐上升,其中PP在第4~7天极显著高于对照 ($P < 0.01$),在第4天达到了32.29%,第7天出现了最大值37.89%,是对照组的1.60倍(表2)。PI在第7天极显著高于对照 ($P < 0.01$),是对照组的1.39倍。第7天以后,试验组和对照组PP和PI均无显著差异。

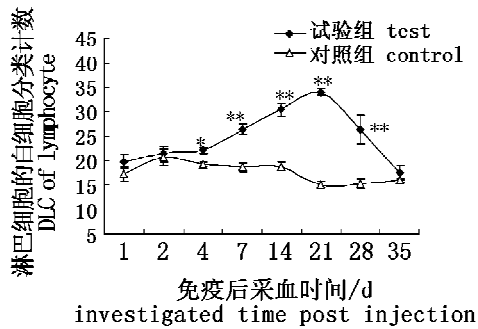


图4 试验组和对照组黄颡鱼淋巴细胞的白细胞分类计数变化

* 表示试验组与对照组差异显著 ($0.01 < P < 0.05$);
* * 表示试验组与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig.4 Kinetics of lymphocyte percentage in leucocytes of blood in control and test yellow catfish

* Significant ($0.01 < P < 0.05$) difference in lymphocyte percentage in leucocytes of blood between control and test group; * * Very significant ($P < 0.01$) difference in lymphocyte percentage in leucocytes of blood between control and test group

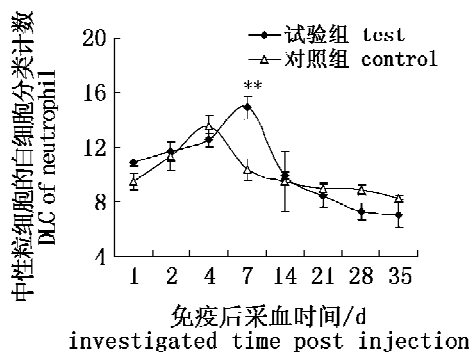


图5 试验组和对照组黄颡鱼中性粒细胞的白细胞分类计数变化

* * 表示试验组与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig.5 Kinetics of neutrophil percentage in leucocytes of blood in control and test yellow catfish
* * Very significant ($P < 0.01$) difference in neutrophil percentage in leucocytes of blood between control and test group

2.6 血清抗体效价检测

单次注射菌苗后,试验组亲鱼凝集抗体效价在第1~14天逐渐上升,第14~35天逐渐下降,其中第14~21天抗体效价维持在高水平(1:512~1:768),而对照组血清效价一直很低(1:64)且无变化(表3)。

3 讨论

3.1 菌苗对红细胞数的影响

鱼体被感染^[11-13]或受免疫后^[14-15],其红细胞数量会发生变化。本试验发现,对照组红细胞在第7~28天持续增加,而试验组红细胞在第7~35天显著低于对照。对照组红细胞数的这种变化可

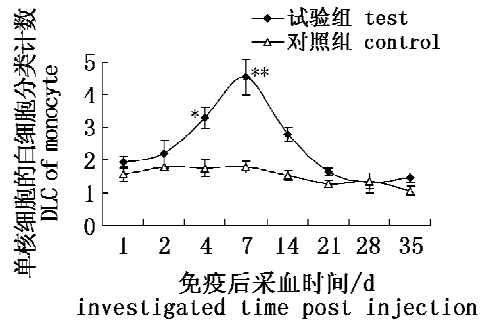


图6 试验组和对照组黄颡鱼单核细胞的白细胞分类计数变化

* 表示试验组与对照组差异显著 ($0.01 < P < 0.05$); * * 表示试验组与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig.6 Kinetics of monocyte percentage in leucocytes of blood in control and test yellow catfish

* Significant ($0.01 < P < 0.05$) difference in monocyte percentage in leucocytes of blood between control and test group; * * Very significant ($P < 0.01$) difference in monocyte percentage in leucocytes of blood between control and test group

能与亲鱼临近繁殖期性激素水平^[16]有关,这与底鳉在产卵期间红细胞数增加的现象相似^[16];而试验组红细胞数显著低于对照可能与注射菌苗后红细胞发挥运载清除循环免疫复合物^[15]的功能过程中消耗了部分红细胞有关^[17-18],即红细胞通过表面补体受体与病原免疫复合物结合,促进吞噬细胞对该复合物的吞噬作用^[18],从而消耗了与免疫复合物结合的红细胞。注射菌苗后红细胞数量下降的现象在鲫(*Carassius auratus*)^[12]和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[14]中也有发现。但是,Brenden等^[19]用嗜水气单胞菌感染金鱼(*Carassius auratus* L.)后发现有更多未成熟红细胞出现,引起金鱼红细胞增值。说明不同免疫原接种不同的鱼对红细胞数影响不同。

3.2 菌苗对白细胞数和组成比例的影响

白细胞数在正常情况下较稳定^[16],但当鱼体患病出现炎症时,有增加趋势^[13, 16, 20]。本试验白细胞数包含血栓细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞,且在预试验已得出雌雄性白细胞数无显著差异,因此没有按雌雄分别统计数据。注射菌苗后黄颡鱼白细胞数在第2~35天显著增加,在第1~21天在 $1.88 \times 10^5 \sim 4.07 \times 10^5/\mu\text{L}$ 间上升且在第21天时试验组是对照组的1.79倍。白细胞数增加的现象在大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* Richardson)被溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)感染^[11]、南方鲇(*Silurus meridionalis*)^[21]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[22]受嗜水气单胞菌

(*Aeromonas hydrophila*) 苗免疫后均有发现。单核细胞的白细胞分类计数自第 4 天开始增加,到第 7 天达到最高 4.55%;中性粒细胞的白细胞分类计数变化趋势和单核细胞的相似,第 7 天出现最高 14.93%;淋巴细胞的白细胞分类计数在第 4 天开始增加,至第 21 天达到最高 34.06%,随后逐渐下降,但截至第 28 天依然显著高于对照。由此可见亲鱼外周血中白细胞显著增加主要由中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞逐渐升高引起。其中,中性粒细胞和单核细胞数量显著增加主要发生在第 4~7 天之间,且第 7 d 时观察到了外周血

中含大量空泡的单核细胞,此种单核细胞可能是吞噬后期阶段的单核细胞,吞噬大量细菌所致,表明在菌苗免疫初期中性粒细胞和单核细胞能快速发挥吞噬作用,有效清除病原^[23]。而淋巴细胞的显著增加主要发生在免疫后第 7 天及以后的 3 周,且淋巴细胞出现了明显的指状伪足。淋巴细胞显著增加滞后了 1 周,这可能与亲鱼受到刺激后淋巴细胞首先在脾脏增值,随后才随血液循环进入外周血有关^[21-22],反映了菌苗刺激后特异性免疫应答在中后期逐渐增强。

表 2 试验组和对照组黄颡鱼白细胞吞噬百分比和吞噬指数变化

Tab. 2 Kinetics of phagocytic percentage (PP) and phagocytic index (PI) in control and test yellow catfish

采血时间(d) sampling time	吞噬百分比(PP)		吞噬指数(PI)	
	试验组 test	对照组 control	试验组 test	对照组 control
1	24.160 ± 0.966	22.490 ± 1.435	1.890 ± 0.273	2.132 ± 0.129
2	26.370 ± 2.542	23.717 ± 0.911	2.120 ± 0.220	2.267 ± 0.108
4	32.293 ± 1.558 **	23.477 ± 1.442	2.544 ± 0.281	2.283 ± 0.150
7	37.890 ± 1.465 **	23.57 ± 1.196	3.090 ± 0.497 **	2.224 ± 0.105
14	24.097 ± 1.029	23.277 ± 0.729	2.308 ± 0.100	2.242 ± 0.101
21	24.560 ± 0.748	23.120 ± 1.033	2.302 ± 0.055	2.228 ± 0.071
28	24.317 ± 1.088	23.650 ± 0.812	2.390 ± 0.181	2.300 ± 0.094
35	23.980 ± 0.882	23.440 ± 0.844	2.257 ± 0.244	2.293 ± 0.083

注: * 表示试验组与对照组差异显著(0.01 < P < 0.05); ** 表示试验组与对照组差异极显著(P < 0.01)

Notes: * Significant (0.01 < P < 0.05) difference in phagocytic percentage and phagocytic index of phagocytes between control and test group;

** Very significant (P < 0.01) difference in phagocytic percentage and phagocytic index of phagocytes between control and test group

表 3 试验组和对照组黄颡鱼血清抗体凝集效价

Tab. 3 Agglutinating antibody titers in control and test yellow catfish

组别 group	采血时间(d)与抗体效价 investigated time and agglutinating antibody titers							
	1 d	2 d	4 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
试验组 test	1:128	1:192	1:192	1:256	1:768	1:512	1:256	1:128
对照组 control	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64

3.3 菌苗对血清抗体的影响

菌苗能快速的启动体液免疫,产生抗体。本试验发现血清抗体从第 7 天开始增加,第 14 天出现最大值 1:768,且在第 14~21 天维持在相对较高水平上,有效维持时间为 1 周。抗体效价的变化和淋巴细胞的数量变化基本一致。最高抗体效价的出现时间比受菌苗免疫后的南方鲇(*Silurus meridionalis*)^[21]和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus* Rafinsque)^[24]提前 1 周,比大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* Richardson)^[11]提前 1 天,与卡特拉鲃(*Catla catla*)^[25]、南亚黑鲷(*Labeo rohita*)^[25]和麦瑞加拉鲷(*Cirrhinus mrigala*)^[25]一致,说明菌苗

能使黄颡鱼快速启动体液免疫反应。根据亲鱼较高抗体滴度维持时间,并结合较强细胞免疫出现的时间段,建议在水温(25 ± 2)℃时,在催产^[26]前 10~14 天,对黄颡鱼亲鱼进行单次菌苗注射,使得亲鱼在免疫后处在免疫最旺盛的时段内产卵繁殖以保护亲鱼和仔鱼。

本试验用灭活菌苗单次注射 3 龄黄颡鱼亲鱼,结果显示免疫繁殖前的黄颡鱼亲鱼后 1~7 天,主要增强非特异细胞免疫;7~35 天,以增强特异性免疫为主,淋巴细胞大量增值且血清抗体效价显著增加。

感谢西南大学生命科学学院张耀光教授和金丽老师在试验过程中提供大量帮助。

参考文献:

- [1] 唐 玫, 马广智, 徐 军. 鱼类免疫学研究进展[J]. 免疫学杂志, 2002, 18 (3) : 112 - 127.
- [2] Fuda H, Hara A, Yamazaki F, *et al.* A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum salmo (*Oncorhynchus keta*) [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1992, 16 (5) : 255 - 264.
- [3] Robert J, Bildfell R J, Frederick M, *et al.* Purification and partial characterization of a rainbow trout egg lectin [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1997, 4 (2) : 97 - 105.
- [4] 李大疆, 钟明超, 林浩然. 鲫鱼 (*Carassius auratus*) 卵和胚胎中母源性免疫球蛋白的定位 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2001, 40 (2) : 82 - 85.
- [5] Hayman J R, Lobb C J. Immunoglobulin in the eggs of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1993, 17 : 241 - 248.
- [6] Olsen Y A, Press C M. Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. , and the localisation of immunoglobulin in the egg [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1997, 7 : 81 - 91.
- [7] Brown L L, Evelyn T P T, Iwama G K. Specific protective activity demonstrated in eggs of broodstock salmon injected with rabbit antibodies raised against a fish pathogen [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1997, 31 (2) : 95 - 101.
- [8] 沈 萍, 范秀容. 微生物学实验 [M]. 三版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 160 - 167.
- [9] 邱郁春. 水污染鱼类毒性实验方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1992: 100 - 104.
- [10] Blaxhall P C, Daisley K W. Routine haematology methods for use with fish blood [J]. Journal of Fish Biology, 1973, (5) : 771 - 781.
- [11] 鄢庆彬, 张俊杰, 皱文政, 等. 人工感染溶藻弧菌对大黄鱼免疫功能的影响 [J]. 水产学报, 2007, 31 (2) : 250 - 256.
- [12] 孙 峰, 张 煜, 李立德. 感染嗜水气单胞菌对鲫鱼非特异性免疫功能的影响 [J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35 (5) : 815 - 822.
- [13] 林浩然. 鱼类生理学 [M]. 二版. 广州: 广东教育出版社, 2007: 90 - 93.
- [14] Ranzani-Paiva M J T, Ishikawa C M, Eiras AC, *et al.* Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tiapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) [J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2004, 47 (6) : 945 - 953.
- [15] 刘至治, 蔡完其, 季高华, 等. 几种免疫增强剂对中华鳖红细胞数量及免疫功能的影响 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15 (1) : 1 - 6.
- [16] 尾崎久雄. 鱼类血液与循环生理 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 55 - 66.
- [17] 王旭东, 饶家荣. 红细胞广泛吞噬作用的发现与研究 [J]. 水产学报, 1996, 20 (3) : 72 - 75.
- [18] 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 & Immunotoxicol, 2002, 24 (4) : 665 - 678.
- [19] Brenden R A, Huizinga H W. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus* (L.) [J]. Journal of Fish Diseases, 1986, 9: 163 - 167.
- [20] Ellis A E. Immunity to bacteria in fish [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9 : 291 - 308 .
- [21] 单 红, 张其中, 刘强平, 等. 灭活疫苗免疫的南方鲇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.
- [22] Kollner B, Kotterba G. Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunization with *Aeromonas salmonicida* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12 : 35 - 48.
- [23] 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 - 654.
- [24] 李惠芳, 汪成竹, 陈昌福. 斑点叉尾鲷对 3 种致病菌灭活疫苗的免疫应答 [J]. 华中农业大学学报, 2006, 25 (6) : 654 - 658.
- [25] Chandran M R, Aruna B V, Logambal S M, *et al.* Immunisation of Indian major carps against *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 13: 1 - 9.
- [26] 肖秀兰, 张 明, 魏宏民, 等. 鄱阳湖黄颡鱼胚胎发育观察 [J]. 淡水渔业, 2003, 33 (3) : 36 - 37.

The changes of cellular and humoral immunity of mature yellow catfish, *Pseudobagrus fulvidraco* Richardson, immunized with formalin-killed *Aeromonas sobria*

FENG Han-ru¹, ZHANG Qi-zhong^{1,2}, LUO Fen³, ZHU Cheng-ke¹, CHU Chao¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Organism Reproduction and Development, Ministry of Education,

Key Laboratory 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. Hydrobiology Institute of Ji'nan University, Guangzhou 510632, China;

3. Biology Department, Ningde Teachers College, Ningde 352100, China)

Abstract: Spawned yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco* Richardson) and their fry usually die of infective diseases. In order to enhance the resistant ability of spawning yellow catfish and their fry against pathogens, it is necessary to illuminate changes of immune parameters of periphery blood in immunized mature yellow catfish. In this study, one hundred and thirty healthy mature yellow catfish were randomly divided into test and control groups. Each individual was intraperitoneally injected with 0.2 mL of bacterial suspension at a concentration of 1.0×10^8 CFU/mL formalin-killed *Aeromonas sobria* for the test group, and with 0.2 mL of 0.65% sterile saline solution for the control group. Then, approximate 2 mL of blood was taken from each fish caudal vein at 1, 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35 d post injection. Three yellow catfish were sacrificed at each sampling time. The haematological indices, such as leucocyte and erythrocyte number per microlitre, differential leucocyte count (DLC), and serum antibody titer and activity of phagocytes, were investigated for each blood sample of the test and control group. The results were as follows: The leucocyte number per microlitre of test group drastically increased and was significantly (or very significantly) higher than that of control from the 2nd day to 35th day post immunization (Fig. 2). The differential leucocyte count (DLC) of the test group prominently increased and was significantly (or very significantly) higher than that of control for neutrophil and monocyte from day 4 to day 7 (Fig. 5 & Fig. 6), and for lymphocytes from the 4th day to 28th day (Fig. 4). The phagocytic percentage and phagocytic index also gradually increased from day 1 to day 7 and peaked at 7 d, then dropped down to the control level (Tab. 2). However, the test group was significantly lower than the control in erythrocyte number per microlitre between the 7th day and 35th day (Fig. 1), and in DLC of thrombocyte between day 4 and day 28 (Fig. 3). The serum antibody titer gradually increased from day 1 to day 14 and reached the highest value at 14 d, then, slowly decreased from day 14 to day 35, and maintained a higher level between day 14 and day 21 in comparison with the values at other sampling times (Tab. 3). From what has been stated above, the immunized mature yellow catfish were enhanced in their resistant ability against bacterial pathogens by means of increment of non-specific cellular immunity, such as monocyte and neutrophil, during the early period (from day 1 to day 7) post single dose immunization, and of specific cellular and humoral immunity, such as lymphocytes and antibody, from day 7 to day 35 after the immunization. And the higher antibody titer level could last for a week from day 14 to day 21 post the immunization. Therefore, it is suggested that the mature fish should be immunized with single-dose vaccine at day 10 – 14 before breeding to enhance the resistant ability of spawn yellow catfish against pathogens, and further to reduce mortality rate of the spawned yellow catfish and their fry caused by infective diseases.

Key words: *Pseudobagrus fulvidraco* Richardson; *Aeromonas sobria*; cellular immunity; humoral immunity; serum antibody titer