



· 综述 ·

鱼类鼻黏膜相关淋巴组织的研究进展

绳秀珍, 王锦诚, 唐小千, 邢婧, 迟恒, 战文斌*

(中国海洋大学, 水产动物病害与免疫学实验室, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 鱼类黏膜相关淋巴组织是抵御病原入侵的第一道防线。其中, 鱼类鼻黏膜相关淋巴组织 (nasal-associated lymphoid tissue, NALT) 近年来被国内外学者所关注, 并被证明是嗅觉器官中抗原识别和启动黏膜免疫应答的重要场所, 在细菌、病毒和寄生虫感染后可发挥快速的局部免疫响应。以 NALT 为靶点, 对鱼类开展疫苗鼻内接种可起到良好的免疫保护效果。但目前, 对 NALT 中复杂的免疫细胞与分子网络及其互作机制知之甚少。本文对鱼类嗅觉器官结构与功能、NALT 的细胞与分子网络及免疫应答、鼻内接种的应答及免疫保护效果等方面的最新研究进展进行综述, 旨在阐明鱼类 NALT 在黏膜局部发挥的免疫防御机制, 以期新型黏膜疫苗的设计与研发提供参考。

关键词: 鱼类; 鼻黏膜相关淋巴组织 (NALT); 黏膜免疫; 嗅觉器官; 鼻内接种疫苗

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

鱼类生活的水环境富含病原微生物, 绝大多数病原经过黏膜表面侵入鱼体引发疾病。黏膜相关淋巴组织 (mucosal-associated lymphoid tissue, MALTs) 是鱼类发挥黏膜免疫功能并维持局部稳态的主体, 是鱼体抵御病原入侵的第一道防线。先前 MALTs 的研究主要聚焦于鳃、肠道和皮肤黏膜相关淋巴组织^[1-7], 但近年来, 鱼类鼻黏膜相关淋巴组织 (nasal-associated lymphoid tissue, NALT) 得到国内外学者关注并取得突破性进展, 也逐渐被接纳为鱼类的第四大黏膜相关淋巴组织。NALT 存在特殊于其他黏膜相关淋巴组织的免疫细胞与分子机制, 在鱼类黏膜免疫研究中占据重要地位。研究表明, NALT 是鱼类鼻腔中富含髓样和淋巴样细胞的弥散状组织, 作为嗅觉器官中主要的黏膜免疫诱导部位, 在抗原处理和免疫激活中发挥重要作用^[8]。目前, 学者已通过组织病

理学、分子生物学、免疫学和生物信息学等研究方法, 对以虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 为主的数种鱼类的 NALT 展开多层次的分析, 同时以 NALT 为作用靶点, 实施鱼类疫苗鼻内注射的接种策略并评估其免疫保护效果。本文梳理了鱼类 NALT 的发现及复杂组织结构、免疫细胞与分子网络、病原侵染诱导的 NALT 免疫应答以及鼻内接种的保护效果, 旨在阐述鱼类 NALT 的免疫应答和黏膜防御机制, 探究鼻内免疫策略及效果, 以期新型黏膜疫苗的设计与研发提供参考。

1 鱼类 NALT 的发现

脊椎动物的嗅觉器官不仅发挥化学感觉器作用, 也具备抵御病原入侵的能力。其中, NALT 在嗅觉器官中执行免疫防御功能, 维持局部黏膜稳态^[9]。作为一种古老而保守的黏膜免疫系统,

收稿日期: 2022-12-29 修回日期: 2023-02-04

资助项目: 国家自然科学基金 (32273163, 31730101, 31872599); 山东省泰山学者特聘专家项目

第一作者: 绳秀珍 (照片), 从事水产动物病害与免疫学研究, E-mail: xzsheng@ouc.edu.cn

通信作者: 战文斌, 从事水产动物病害与免疫学研究, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn



NALT 不局限存在于高等脊椎动物。研究表明, 从硬骨鱼、两栖类到哺乳动物, NALT 逐渐向“淋巴组织器官化”方向进化。作为低等脊椎动物, 硬骨鱼的 NALT 为弥散状, 不具有完整的淋巴结构, 称为弥散状鼻黏膜相关淋巴组织 (diffuse NALT, D-NALT)。肺鱼在进化生物学研究中占据重要位置, 学者发现非洲肺鱼 (*Protopterus annectens*) 存在包裹化的鼻咽淋巴细胞聚集体 (encapsulated nasal lymphoid aggregates)^[10]。在哺乳动物与鸟类中, 存在组织结构良好、可辨识的 NALT, 称为组织化的黏膜相关淋巴组织 (organized NALT, O-NALT)^[9, 11-14]。从进化免疫学的角度考虑, NALT 结构随进化地位升高渐趋复杂, 向包裹化、团块状的形态进化, 极大提高了 NALT 中免疫监视能力与免疫细胞互作效率, 使得免疫机能更为完善。

2014 年, Irene Salinas 研究团队首次在硬骨鱼虹鳟中发现 NALT^[8]。研究表明, 虹鳟 NALT 由淋巴样细胞和髓样细胞组成弥散状结构, 缺乏哺乳动物鼻咽组织中成形的扁桃体和腺样体结构。但在 2022 年, 该团队报道了新的发现, 即虹鳟鼻腔中存在从鼻孔最背侧开口延伸到鼻腔腹侧的淋巴细胞聚集体, 由约 56% CD4⁺ T 细胞、24% IgM⁺ B 细胞、16% CD8 α ⁺ T 细胞和 4% IgT⁺ B 细胞组成^[15]。这是在硬骨鱼中, 首次对 O-NALT 的结构展开描述, 进一步研究发现, 虹鳟 O-NALT 在鼻内疫苗免疫后成为 B 细胞增殖与凋亡的活跃场所, 并表达哺乳动物生发中心 (germinal center, GC) 特征的分子标记, 推测该特殊部位可能作为虹鳟早期适应性免疫反应的诱导位点。但 NALT 局部免疫是否能够诱导鱼体全身黏膜组织的效应性应答及其对系统性免疫应答的影响仍有待研究。

2 鱼类嗅觉器官的形态结构

脊椎动物的嗅觉系统, 在解剖学上属于一类跨物种保守的感觉系统, 鱼类嗅觉系统由嗅觉器官和嗅球组成。鱼类通过受自主神经纤维支配的嗅觉器官探测气味信号与环境变化, 从而开展进食、交配、联络和危险感知等生存行为^[9, 16-17]。除了良好的化学感知能力, 鱼类的嗅觉器官同时具备抵御病原的特殊解剖学与形态学构造。独特的组织结构使鱼类嗅觉器官成为研究病原体侵袭和免疫-中枢神经互作的理想模型。

2.1 鱼类嗅觉器官的解剖学研究

在解剖学上, 鱼类的嗅觉器官经前鼻孔和后

鼻孔与外界相通, 直接暴露于复杂的水环境中。在肌肉泵动、水流推动和支持细胞纤毛的摆动下, 嗅觉器官被水环境中的病原或信号分子充分浸润, 尤其是关键部位——嗅囊。作为一对内陷的构造, 嗅囊多开口于头部背前方, 被软骨紧密保护, 由嗅囊膜 (olfactory sac membrane)、嗅轴 (rachis) 和嗅板 (olfactory lamellae) 组成, 唯一的嗅上皮位于嗅囊中^[16]。大量形态类似于鳃丝的嗅板结构为鱼类嗅觉器官与外界物质的交流提供了广阔的黏膜表面积, 有利于鱼类行使嗅觉功能和免疫防御功能。

2.2 鱼类嗅觉器官的形态学研究

因物种或环境差异, 硬骨鱼嗅觉器官的形态多变。出于对嗅觉功能、环境胁迫和物种进化等目标的研究, 诸多学者对多种鱼类的嗅觉器官开展了形态学以及超微结构观察^[17-24], 例如, 对大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 嗅觉器官的组织学研究发现, 大口黑鲈嗅囊为“扇形莲花状”结构, 其中嗅上皮由神经上皮 (感觉上皮) 和黏膜上皮 (非感觉上皮) 中的 5 类功能各异的细胞组成, 即嗅觉感觉神经元、支持细胞、基底细胞、淋巴细胞和黏液细胞^[24]。斑马鱼 (*Danio rerio*) 嗅觉器官包括数个排列有序的片层 (嗅板), 形成双侧对称的“玫瑰花结”(rosettes) 结构, 片层嗅上皮侧部为非感觉上皮区; 中部是连续感觉上皮区, 该区域为典型的假复层柱状上皮, 主要由嗅觉感觉神经元、基底细胞和支持细胞组成^[16]。鱼类 NALT 具备其他 MALTs 所需的细胞与分子特征, 即黏膜处的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞形成一个动态白细胞网络, 弥散状分布于鼻黏膜的上皮层和固有层^[1], 从而为抗体分泌和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应的诱导和调节提供了解剖学、生理学和免疫学基础。

2.3 鱼类嗅觉器官的神经-免疫微环境

鱼类嗅觉器官中神经上皮与黏膜上皮交错分布, 神经系统以复杂的方式调节黏膜免疫。鱼类嗅觉感觉神经元作为双极性感觉神经, 从基底层延伸到上皮细胞的顶端区域。黏膜顶端的嗅觉感觉神经元检测到水中的气味和抗原信号后, 将信号向基底层投射, 嗅神经轴突在基底层中聚集, 再延伸投射到嗅球作进一步信息加工。该过程在斑马鱼和斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 嗅觉感受器细胞类型和功能的研究中被阐释^[25-26]。

神经元可能积极参与并整合到鱼类的黏膜免疫反应中。Sepahi 等^[27]证明了一种神经-免疫互作机制, 即嗅觉器官中隐窝神经元细胞表面表达的原肌球蛋白受体激酶 A (TrkA) 可与病毒糖蛋白产生相互作用, 从而介导抗病毒反应, 破坏该相互作用, 则足以阻断神经元活化和鼻腔抗病毒免疫应答。可见硬骨鱼嗅觉感觉神经元作为病原的第一接触者, 在鼻-中枢神经系统 (nasal-CNS axis) 协同抗病毒免疫应答中发挥重要的调节功能^[28]。由此可以预测, 神经-免疫相互作用可能同样普遍存在于鱼类其他黏膜部位, 抗原触发的快速神经元反应对鱼类黏膜免疫的激活存在重要影响。未来, 鱼类嗅神经-免疫领域具备较为突出的研究前景, 鱼类 NALT 中的免疫细胞与相邻的嗅觉感觉神经元之间独特的合作机制有待被揭示, 嗅觉器官局部的“神经-免疫”通讯微环境值得深入研究。

3 鱼类 NALT 的免疫应答

3.1 鱼类 NALT 的免疫细胞与分子网络

在高等动物中, NALT 是滤泡相关上皮 (FAE)、高内皮小静脉生发中心、抗原递呈细胞和淋巴细胞等免疫细胞富集区组成的有机系统。人类 (*Homo sapiens*) O-NALT 包括 Waldeyer 氏环, 其由 3 种扁扁桃体排列成环状结构, 即位于舌根的舌扁扁桃体以及位于鼻咽后壁的腺样体和腭扁扁桃体^[14]。小鼠 (*Mus musculus*) 位于鼻咽导管两侧的成对淋巴组织结构在功能上被认为与人类的 Waldeyer 氏环相当^[29]。学者鉴定出大鼠 (*Rattus norvegicus*) 与新西兰兔 (*Oryctolagus cuniculus*) NALT 中 M 细胞 (微褶皱细胞, microfold cells) 特异性表面标记物, 并证明其与肠派尔集合淋巴结 (Peyer patch) 中 M 细胞功能相似, 可主动摄取腔内颗粒抗原, 从而启动免疫反应初始步骤^[30-31]。NALT 中的抗原呈递细胞 (antigen-presenting cells, APCs), 包括树突状细胞 (dendritic cell, DC) 和巨噬细胞, 对诱导和调节黏膜免疫反应至关重要。可溶性抗原可穿过鼻黏膜, 在巨噬细胞和树突状细胞作用下被迁徙到淋巴结。而颗粒状抗原则通过 M 细胞摄取后转运至下方的免疫细胞, 并可被引流到淋巴结得到进一步加工与处理^[32-34]。

在高等动物中, NALT 免疫细胞与分子组成被阐释地较为清晰, 但硬骨鱼 NALT 的免疫组分及功能存在较大的研究空缺。已知鱼类 NALT 由

弥漫性的淋巴细胞网络组成, 其中 IgT^+ B 细胞在虹鳟 NALT 中占 B 细胞总数的 51.5%, IgM^+ B 细胞占比为 48.5%。相较于存在于固有层的肠道 B 细胞, 以上两种 B 细胞被发现主要存在于虹鳟的嗅上皮层内, 在鼻黏膜上皮顶端区域观察到多聚免疫球蛋白受体 (pIgR) 富集现象^[8]。细菌荧光原位杂交结果显示, 大量的共生菌在虹鳟鼻腔黏液中定殖, 这些共生菌被 sIgM、sIgT 和 sIgD 包裹, 学者推测嗅觉器官中 IgM^+ 、 IgT^+ 和 IgD^+ B 细胞的组成比例在很大程度上被鼻腔黏膜屏障所独有的抗原环境所塑造^[8]。虹鳟鼻腔嗅板外侧富含杯状细胞^[8], 而杯状细胞分泌的黏蛋白可有效抑制黏膜病原微生物的繁殖与侵染。值得注意的是, $CD8\alpha^+$ T 细胞和 MHC II⁺ 细胞在虹鳟嗅板的黏膜上皮顶端聚集, 弥散分布在神经上皮区域附近, 推测由于黏膜上皮顶端 CCL19、ICAM-1 和 VCAM-1 的表达高于神经上皮, $CD8\alpha^+$ T 细胞和 MHC II⁺ 细胞被此类趋化因子和黏附因子招募并滞留在嗅板顶端局部^[35]。另外 MHC II⁺ 细胞还特异性分布在神经上皮外侧临近空腔处, 特殊的分布使 MHC II⁺ 细胞得以快速获取鼻腔抗原^[35], 推测其可能像哺乳动物树突状细胞一样将树突结构穿过嗅上皮延伸到鼻腔, 直接采集鼻腔内抗原, 继而快速启动鼻黏膜局部的免疫应答^[36]。目前, 鱼类 NALT 中尚未报道 M 细胞的存在, 作为鼻内免疫后诱导黏膜免疫的抗原摄取的重要环节, M 细胞和树突状细胞在鱼类 NALT 中的存在情况和免疫特性需进一步研究, 开发并应用特异性抗体、凝集素等分子标记物对 NALT 抗原摄取过程开展追踪和评估意义重大。

除了具备与鳃、肠道和皮肤等黏膜相关淋巴组织相似的免疫组分外, 诸多未知的免疫细胞与分子不断在鱼类 NALT 中被发现。例如, 趋化因子作为信使, 在鼻腔和全身淋巴组织之间发挥免疫调节的生物学作用。Sepahi 等^[37]发现, 趋化因子 CK12a 是鼻黏膜免疫的重要调控因子, 鼻内接种趋化因子 CK12a 重组蛋白后, 可引发虹鳟嗅板固有层膨大, 继而招募 $CD8\alpha^+$ T 细胞与 MHC II⁺ 细胞发挥效应。此外, 虹鳟鼻内接种传染性造血器官坏死病毒 (IHNV) 减毒活疫苗后, NALT 形成和功能维持所必需的 CCL19 与 DNA 结合抑制物 2 (ID2) 表达持续上调^[8]。有学者通过多种形态学手段在虹彩鲨 (*Epalzeorhynchus frenatum*) 嗅觉器官中鉴定出 6 个发育阶段的小棒细胞 (rodlet

cells)^[38]。而虹彩鲨鼻腔中的另外一种间充质来源的间质细胞——特络细胞 (telocytes), 被发现可与处于不同发育阶段的小棒细胞建立直接接触, 从而调节基质金属蛋白酶 9 (MPP-9) 在小棒细胞中的表达, 进一步影响免疫细胞的运动和迁移能力^[39]。由于生活环境与进化程度的差异, 鱼类存在特殊而又保守的黏膜防御机制, 但目前我们对鱼类 NALT 中复杂的免疫细胞和分子网络仍缺乏全面了解。

3.2 鱼类 NALT 的局部免疫应答

鱼类鼻腔的开放性使得其成为病原入侵起点及靶器官, 目前已知多种病原可通过鼻腔入侵鱼体, 如海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*)^[40]、鲷爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*)^[41]、IHNV^[42]、病毒性出血败血症病毒 (VHSV)^[43] 和神经坏死病病毒 (NNV)^[44] 等。文献表明, 海豚链球菌和鲷迟钝爱德华氏菌可以将鱼类鼻腔作为致病的起始部位, 进一步导致神经系统或全身感染^[40-41]。为保护嗅觉器官免受水传播病原体的侵害, 鱼类在漫长的进化过程中形成了 NALT。虹鳟 NALT 积极发挥局部免疫应答, 分泌免疫球蛋白识别并包裹共生菌, 从而调节鼻黏膜菌群。利用特异性抗体对分离的鼻腔细菌开展免疫荧光分析, 发现 66% 的鼻腔细菌被黏膜免疫球蛋白包裹, 在被包裹的细菌中, IgM 与 IgT 包裹菌均占 16%, 剩余 34% 的细菌由 IgM 和 IgT 双重包裹^[8]。与嗅觉器官存在显著差异, 虹鳟肠道和皮肤黏膜大多数共生菌被 IgT 包裹^[45-46], 这说明鱼类嗅觉器官中, 可能存在不同于其他黏膜部位的细菌群落, 后期需结合鼻腔局部免疫应答情况分析 NALT 与共生菌的动态关联。

作为嗅觉器官的第一道防线, NALT 可产生针对特定抗原的免疫响应。柱状黄杆菌 (*Flavobacterium cloumnare*) 和多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 浸泡感染后, 虹鳟嗅觉器官均可检测到明显的组织病理改变和局部适应性免疫^[47-48], 其中 IgT⁺ B 细胞快速响应并增殖, 在鼻腔黏液检测出柱状黄杆菌与 IgT 的特异性反应, 这些结果证实了鱼类 NALT 与其他 MALTs 功能相似, 通过专用的黏膜免疫球蛋白的抗体库在鱼类黏膜表面发挥免疫防御作用。虹鳟嗅觉器官 IgM⁺ 和 IgT⁺ B 细胞抗体库 (antibody repertoire) 在个体之间存在较大的异质性, 但与脾脏相比, 嗅觉器官 B 细胞抗

体库总体上规模较小, IgM 和 IgT 的多样性有限, 以少数扩增的克隆型为主^[49]。虹鳟 NALT 的 IgM 库主要偏向于 1 个或 2 个免疫球蛋白重链可变基因 (IGHV) 家族, 而 IgT 库则略显多样化, 体现了微生物对 B 细胞库多样性不可忽视的塑造作用, 在这一点上, NALT 中 IgM 和 IgT 库显示出与人类和小鼠肠道黏膜 IgM 和 IgA 库相似的特征^[50-51]。NALT 可缓冲病原对嗅觉器官的影响, 对鼻黏膜稳态的维持至关重要。鲤 (*Cyprinus carpio*) 在感染鲤春病毒血症病毒 (SVCV) 后, 转录组分析结果显示, NALT 中多种免疫基因表达上调, 病毒感染和继发细菌感染的相关信号通路开启, 最终 NALT 和微生物群之间的动态相互作用促进嗅觉器官达到新的稳态^[52]。

4 鱼类鼻黏膜疫苗接种的研究进展

4.1 鼻内接种疫苗的优势

学者很早便意识到, 鼻内免疫是诱导高等动物黏膜免疫的一种有效途径^[53-54], 在所有已知的黏膜接种策略中, 鼻内接种疫苗同时可能是产生全身特异性免疫应答最有效的途径。首先, 高等脊椎动物鼻黏膜表面具有大量纤毛, 表面积大, 上皮层薄, 含丰富微血管, 可保证疫苗被快速吸收。同时, 由于鼻黏膜高度血管化, 其可在物理、化学或病原刺激下迅速改变血管的通透性, 因此嗅觉器官与体液循环的解剖联系比其他黏膜更为紧密^[33-34, 55], 这可能导致免疫应答后, 淋巴细胞能被快速地募集到鼻黏膜局部。值得注意的是, 与传统注射法相比, 鼻内接种具备无创性的优势。鼻腔非酸性环境, 可降解疫苗的酶含量和黏膜表面积远低于消化道等黏膜部位, 疫苗所需剂量显著减少。大量临床结果表明, 鼻内接种可影响肺部的黏膜免疫强度, 从而有效预防肺部感染^[56], 这也是流行性感鼻吸式疫苗研发的理论基础之一。鼻吸式疫苗可产生与注射疫苗类似的保护作用^[57], 证实了哺乳动物鼻腔黏膜是一处良好而特殊的黏膜免疫位点。

在哺乳动物中, 每种黏膜相关淋巴组织都存在一定程度的区室化。学者将黏膜抗原被摄取后刺激 B、T 淋巴细胞的位点称作黏膜诱导部位/组织 (inductive mucosal site/tissue), 而将效应细胞外渗、滞留和分化并发挥免疫功能, 如分泌特异性抗体的位点称为黏膜效应位点 (effector mucosal

site/tissue)。哺乳动物中存在共同黏膜免疫系统 (common-mucosal immune system, CMIS), 即以一处 MALT 作为诱导位点加以刺激, 作为效应位点的远端 MALT 可被激活并做出应答^[54], 如呼肠孤病毒 (reovirus) 对小鼠经鼻给药, 在小鼠呼吸道和肠道中也可检测出呼肠孤病毒特异性 IgA。不像哺乳动物的 MALTs 存在明显分区, 硬骨鱼的 MALTs 存在一定程度的连续性, 再加上缺乏引流淋巴结和明显的 O-MALT (至今仅在虹鳟上被报道)^[1, 15], 因此是否存在共同黏膜免疫系统还有待研究, 鱼类黏膜免疫的诱导/效应部位也有待系统阐释。同时, 在鱼类局部黏膜刺激或接种后, 能否在其他部位产生免疫应答, 以及产生免疫应答的分子基础尚不明确。

4.2 鱼类鼻内接种疫苗后的免疫应答

在鱼类疫苗和免疫学领域, 无创鼻疫苗接种提供了一种新的免疫策略, 现仅在虹鳟中有较多报道。对虹鳟开展鼻内免疫可引发 NALT 强烈的抗菌与抗病毒的局部免疫应答^[8]。经 IHN 减毒活疫苗鼻内接种后的第 4 天, 虹鳟 NALT 中白细胞介素、干扰素、趋化因子、补体因子、黏蛋白、抗菌肽和 toll 样受体等参与先天免疫的基因表达发生了显著改变, 部分神经元和嗅觉相关基因的表达显著上调, 嗅板固有层扩大, 髓样细胞和淋巴样细胞浸润。第 14 天, 促炎细胞因子的表达恢复到基础水平, 但参与适应性免疫反应的基因表达水平相较于第 4 天显著提高。其中, IgM 基因表达上调最为显著, 而 IgT 与 IgD 的表达无显著变化, 说明在虹鳟鼻黏膜局部, IgM 发挥重要的抗病毒作用^[8]。Magadan 等^[49]应用 5' RACE 和基于深度测序的方法, 探究了腹腔注射和鼻内接种肠炎红嘴病 (enteric red mouth, ERM) 灭活疫苗后虹鳟抗体库的改变情况, 发现系统和局部水平的免疫均可诱导虹鳟嗅觉器官 B 细胞免疫应答并改变抗体库组成。腹腔注射疫苗后, NALT 中 IgM 库多样性增加, IgT 库多样性无显著变动。而在鼻内接种疫苗后, 虹鳟的脾脏和 NALT 中的 B 细胞库克隆结构改变, 产生了不同的 IgM 和 IgT 库动态变化, 其中 NALT 中 IgM 库 IGHV6 和 IGHV11 的表达量趋于增加, 而 IgT 库中 IGHV8 的表达量增加, 并在脾脏中诱导了显著的 IgT 反应。ELISA 结果表明, 与腹腔注射相比, ERM 疫苗鼻内接种引起的特异性 IgM 全身的抗体反应较弱^[49]。以上

研究结果说明了在鼻内接种疫苗后, NALT 可发挥以免疫球蛋白为基础的特异性免疫应答, 然而, NALT 局部免疫应答的细胞与分子机制仍不明晰, 鼻内接种对鱼体系统免疫及可能存在的共同黏膜免疫的诱导规律仍需进一步研究。

4.3 鱼类疫苗鼻内接种的免疫保护效果

鼻内接种可发挥理想的免疫保护作用。数据表明, 鼻内注射与传统肌肉注射的免疫保护效果无统计学差异, 虹鳟鼻内接种疫苗后的存活率与对照组 (未暴露于病毒) 相似, 鼻内接种 ERM 灭活疫苗后第 7 天的存活率大于 92%, 远高于未接种疫苗组 60% 存活率, 在第 28 天时, 鼻内接种组得到 100% 的免疫保护效果, 可有效预防肠炎红嘴病^[8]。另外, 分别在鼻内接种和肌肉接种 IHN 减毒活疫苗 6 个月对虹鳟开展 IHN 攻毒, 测得鼻内免疫组累积死亡率为 58%, 肌肉免疫组的累积死亡率为 72%, 两组累积死亡率均显著低于未接种疫苗的对照组 (97%), 证明鼻内接种疫苗可产生长期免疫保护效果^[58]。另外, 分别在鼻内接种和腹腔接种灭活的 ERM 菌液 6 个月对虹鳟开展鲁氏耶尔森菌 (*Yersinia ruckeri*) 攻毒, 两组的累积死亡率分别为 63% 和 23%。相较于腹腔免疫, 鼻内免疫的保护效果较差, 这可能由于鼻内接种疫苗量未达到最佳保护抗原剂量从而导致抗原刺激不足^[58], 而最佳保护抗原剂量不明确是鱼类黏膜疫苗设计面临的关键挑战之一, 有待进一步研究。此外, 为评价不同生长阶段鱼类的鼻内免疫效果, 研究人员选取孵化后 70、30 和 24 d 的幼龄虹鳟, 鼻内注射 IHN 减毒活疫苗和 ERM 灭活疫苗, 结果显示, 孵化后 70、30 和 24 d 虹鳟在 IHN 攻毒后的存活率分别为 95%、100% 和 97.5%; 在鲁氏耶尔森菌攻毒后存活率分别为 82.5%、87.5% 和 77.5%^[59]。该实验结果证明了虹鳟鼻内疫苗接种的可行性和有效性, 提示在幼龄鱼上及时鼻内接种减毒活疫苗, 可降低因病死亡率。

考虑到生产实际中, 养殖鱼类可能同时感染多种病原, 有学者使用两种病原的多价疫苗, 对虹鳟单鼻腔/双鼻腔分别开展鼻内接种^[60]。将 IHN 和 ERM 疫苗混匀接种至虹鳟双鼻孔后, 检测到与单种疫苗接种单鼻孔时相似的免疫保护作用。尝试将 IHN 疫苗接种到虹鳟左鼻孔, ERM 疫苗接种到右鼻孔, 得到了优于先前两组的良好效果^[60]。推测硬骨鱼双鼻腔分别接种异种疫苗可能触发协

同作用, 提高免疫保护效果, 是一种新颖而有效的鱼类疫苗接种策略。

鉴于嗅觉器官中神经元和 NALT 存在复杂的“神经-免疫”相互作用, 开展鼻内接种疫苗对中枢神经系统的安全性评估十分关键。减毒活疫苗, 尤其如 IHNV 这类嗜神经病毒, 可通过嗅球抵达大脑, 破坏宿主的神经系统^[28, 43]。尽管鼻黏膜是许多抗原进入中枢神经的途径, 但嗅觉器官 NALT 被证明可有效清除抗原, 从而保护鱼类中枢神经系统。虹鳟初次经鼻接种 IHNV 减毒活疫苗后, 至少 4 d 仍可在嗅觉器官中检测到抗原, 随后 NALT 通过多种机制清除剩余抗原, 例如免疫细胞浸润后摄取抗原。然而, 相较于初次免疫, 二次免疫 4 d 后, 83.3% 的虹鳟嗅觉器官中未检出 IHNV, 说明鼻内免疫已触发局部免疫记忆, 从而快速清除抗原^[61], 上述研究结果进一步证实了鱼类鼻内疫苗接种的安全性。

5 鱼类 NALT 研究及鼻内疫苗接种的挑战与意义

鱼类黏膜免疫应答机制是国际前沿科学问题和热点问题。鼻黏膜相关淋巴组织是鱼类黏膜免疫的重要组成部分, 近年来逐渐被重视, 不断深入的研究揭示了 NALT 是保守而高效的局部黏膜免疫位点, 在细菌、病毒和寄生虫感染后可产生快速而精准的免疫应答。相较于高等脊椎动物, 鱼类 NALT 的研究存在理论基础薄弱、研究对象局限 (仅虹鳟等极少数鱼类)、细胞与分子机制不明等问题。相较于消化系统和呼吸系统, 我们对鱼类嗅觉系统的黏膜免疫研究尚显不足, 对鱼类 NALT 复杂的细胞和分子网络仍缺乏全面了解, 对鱼类鼻黏膜抗原摄取和免疫球蛋白分泌过程及其效应机制知之甚少。为弥补研究短板, 以鼻黏膜相关淋巴组织为模型, 阐明鱼类 MALTs 的局部免疫应答机制, 对于提高鱼类 MALTs 的认知维度至关重要。从进化角度而言, 硬骨鱼生存在相较于陆生动物更为复杂的水环境中, 低等脊椎动物硬骨鱼弥散性 NALT 与高等脊椎动物组织性 NALT 在结构与功能上存在联系与差异。阐释 NALT 由弥散性向组织性结构的进化过程, 以及环境变化对其进化程度的影响, 对于物种起源研究具有重大意义。

随着水产养殖业高密度、集约化、规模化高速发展, 病害已成为产业健康可持续发展的重大

挑战。鱼类接种疫苗既可以防控水产病害发生, 又可以减少生态风险和水产品食品安全等问题^[62]。鱼类疫苗接种策略属于疫苗学领域的重要范畴, 典型的疫苗接种方式包括肌肉注射、腹腔注射和浸泡免疫。随着鱼类鼻内接种逐渐进入公众视野, 并从高效性、安全性和适用性等多种角度验证了鼻内接种疫苗的可行性, 为深入开展鼻内免疫接种策略及效果研究, 以及新型黏膜疫苗的设计与研发奠定了基础。

嗅觉器官中神经上皮与黏膜上皮交错分布, NALT 中 B 细胞、T 细胞、黏液细胞和抗原递呈细胞等免疫细胞与神经元存在微妙的空间联系, 使得鼻内接种后 NALT 可产生强烈的局部免疫应答, 通过神经-免疫互作影响中枢神经系统, 继而诱发固有免疫和适应性免疫应答的全身响应。硬骨鱼鼻腔是一对沟通外环境的独立腔室, 不与呼吸系统相连, 因此, 以嗅觉器官为模型, 开展鼻内接种疫苗, 可揭示局部与全身免疫应答的联系。以往的部分研究结果表明, 鼻内接种疫苗, 可诱发脾脏及全身黏膜组织抗体库的变化, 这提示鱼类中几种 MALTs 间可能存在密切的物质交流, MALTs 与系统免疫间可能通过某些未知机制沟通。哺乳动物体内存在的共同黏膜免疫系统在硬骨鱼中是否存在以及存在形式如何, 需要进一步探究。相信未来随着 MALTs 中淋巴细胞迁移、分化以及功能的研究不断深入, 鱼类“共同黏膜免疫系统”的存在形式及协调机制将被说明。

综上所述, 鱼类 NALT 是保守而又特殊的黏膜免疫相关淋巴组织, 病原刺激 NALT 可触发嗅觉器官局部和鱼体系统性免疫应答。鱼类 NALT 研究起步较晚, 其中细胞与分子组成和免疫应答机制尚不清楚, 鼻内接种疫苗后局部与系统免疫应答情况仍需进一步验证。开展鱼类 NALT 免疫应答的细胞与分子机制研究, 无论对阐明鱼类黏膜免疫防御机制, 还是对新型黏膜疫苗的设计和应用, 都至关重要。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Salinas I. The mucosal immune system of teleost fish[J]. *Biology*, 2015, 4(3): 525-539.
- [2] Rombout J H W M, Yang G W, Kiron V. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish[J].

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(2): 634-643.
- [3] Gomez D, Sunyer J O, Salinas I. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(6): 1729-1739.
- [4] Muñoz-Atienza E, Díaz-Rosales P, Tafalla C. Systemic and mucosal B and T cell responses upon mucosal vaccination of teleost fish[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 11: 622377.
- [5] Liang C C, Sheng X Z, Tang X Q, *et al.* Structural characteristics and mucosal immune response of the interbranchial lymphoid tissue in the gills of flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 123: 388-398.
- [6] Sheng X Z, Guo Y, Zhu H, *et al.* Transepithelial secretion of mucosal IgM mediated by polymeric immunoglobulin receptor of flounder (*Paralichthys olivaceus*): *in-vivo* and *in-vitro* evidence[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 868753.
- [7] Xu M J, Hu K L, Liu Y P, *et al.* Systemic metastasis-targeted nanotherapeutic reinforces tumor surgical resection and chemotherapy[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 3187.
- [8] Tacchi L, Musharrafieh R, Larragoite E T, *et al.* Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5205.
- [9] Sepahi A, Salinas I. The evolution of nasal immune systems in vertebrates[J]. *Molecular Immunology*, 2016, 69: 131-138.
- [10] Tacchi L, Larragoite E T, Muñoz P, *et al.* African lungfish reveal the evolutionary origins of organized mucosal lymphoid tissue in vertebrates[J]. *Current Biology*, 2015, 25(18): 2417-2424.
- [11] Kang H H, Yan M F, Yu Q H, *et al.* Characterization of nasal cavity-associated lymphoid tissue in ducks[J]. *The Anatomical Record*, 2014, 297(5): 916-924.
- [12] Kang H H, Yan M F, Yu Q H, *et al.* Characteristics of nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and nasal absorption capacity in chicken[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84097.
- [13] Kuper C F, Hameleers D M H, Bruijntjes J P, *et al.* Lymphoid and non-lymphoid cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) in the rat. An immuno- and enzyme-histochemical study[J]. *Cell and Tissue Research*, 1990, 259(2): 371-377.
- [14] Pabst R. Mucosal vaccination by the intranasal route. Nose-associated lymphoid tissue (NALT)-structure, function and species differences[J]. *Vaccine*, 2015, 33(36): 4406-4413.
- [15] Garcia B, Dong F, Casadei E, *et al.* A novel organized nasopharynx-associated lymphoid tissue in teleosts that expresses molecular markers characteristic of mammalian germinal centers[J]. *The Journal of Immunology*, 2022, 209(11): 2215-2226.
- [16] Olivares J, Schmachtenberg O. An update on anatomy and function of the teleost olfactory system[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7808.
- [17] Hansen A, Eckart Z. The peripheral olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*: an ultrastructural study[J]. *Chemical Senses*, 1998, 23(1): 39-48.
- [18] Arvedlund M, Munday P L, Takemura A. The morphology and ultrastructure of the peripheral olfactory organ in newly metamorphosed coral-dwelling gobies, *Paragobiodon xanthosomus* Bleeker (Gobiidae, Teleostei)[J]. *Tissue and Cell*, 2007, 39(5): 335-342.
- [19] Fishelson L. Comparative morphology and cytology of the olfactory organs in moray eels with remarks on their foraging behavior[J]. *The Anatomical Record*, 1995, 243(4): 403-412.
- [20] Camilieri-Asch V, Shaw J A, Yopak K E, *et al.* Volumetric analysis and morphological assessment of the ascending olfactory pathway in an elasmobranch and a teleost using diceCT[J]. *Brain Structure and Function*, 2020, 225(8): 2347-2375.
- [21] Dymek J, Kuciel M, Żuwała K. Structural diversity of olfactory organs in Osteoglossiformes[J]. *Journal of Zoology*, 2021, 314(1): 43-57.
- [22] Dymek J, Rosenqwert G, Kuciel M, *et al.* Micro- and macro-morphology of the olfactory organ of *Syngnathus typhle* (Syngnathidae, Actinopterygii)[J]. *Acta Zoologica*, 2021, 102(2): 206-219.
- [23] Pintos S, Rincon-Camacho L, Pandolfi M, *et al.* Morphology and immunohistochemistry of the olfactory organ in the bloodfin tetra, *Aphyocharax anisitsi* (Ostariophysi: Characidae)[J]. *Journal of Morphology*, 2020, 281(8): 986-996.
- [24] Kim H T, Yun S W, Park J Y. Anatomy, ultrastructure

- and histology of the olfactory organ of the largemouth bass *Micropterus salmoides*, Centrarchidae[J]. *Applied Microscopy*, 2019, 49(1): 18.
- [25] Calvo-Ochoa E, Byrd-Jacobs C A. The olfactory system of zebrafish as a model for the study of neurotoxicity and injury: implications for neuroplasticity and disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(7): 1639.
- [26] Hansen A, Rolen S H, Anderson K, *et al.* Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23(28): 9328-9339.
- [27] Sepahi A, Kraus A, Casadei E, *et al.* Olfactory sensory neurons mediate ultrarapid antiviral immune responses in a TrkA-dependent manner[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(25): 12428-12436.
- [28] Das P K, Salinas I. Fish nasal immunity: From mucosal vaccines to neuroimmunology[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 104: 165-171.
- [29] Asanuma H, Thompson A H, Iwasaki T, *et al.* Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1997, 202(2): 123-131.
- [30] Takata S, Ohtani O, Watanabe Y. Lectin binding patterns in rat nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and the influence of various types of lectin on particle uptake in NALT[J]. *Archives of Histology and Cytology*, 2000, 63(4): 305-312.
- [31] Carapelli A, Regoli M, Nicoletti C, *et al.* Rabbit tonsil-associated M-cells express cytokeratin 20 and take up particulate antigen[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2004, 52(10): 1323-1331.
- [32] Kiyono H, Fukuyama S. NALT-versus PEYER'S-patch-mediated mucosal immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4(9): 699-710.
- [33] Wu H Y, Nguyen H H, Russell M W. Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1997, 46(5): 506-513.
- [34] Takaki H, Ichimiya S, Matsumoto M, *et al.* Mucosal immune response in nasal-associated lymphoid tissue upon intranasal administration by adjuvants[J]. *Journal of Innate Immunity*, 2018, 10(5-6): 515-521.
- [35] Sepahi A, Casadei E, Tacchi L, *et al.* Tissue microenvironments in the nasal epithelium of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) define two distinct CD8 α^+ cell populations and establish regional immunity[J]. *The Journal of Immunology*, 2016, 197(11): 4453-4463.
- [36] Lee H, Ruane D, Law K, *et al.* Phenotype and function of nasal dendritic cells[J]. *Mucosal Immunology*, 2015, 8(5): 1083-1098.
- [37] Sepahi A, Tacchi L, Casadei E, *et al.* CK12a, a CCL19-like chemokine that orchestrates both nasal and systemic antiviral immune responses in rainbow trout[J]. *The Journal of Immunology*, 2017, 199(11): 3900-3913.
- [38] Abd-Elhafeez H H, Soliman S A, Attaai A H, *et al.* Endocrine, stemness, proliferative, and proteolytic properties of alarm cells in ruby-red-fin shark (rainbow shark), *Epalzeorhynchus frenatum* (Teleostei: Cyprinidae)[J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2021, 27(5): 1251-1264.
- [39] Abd-Elhafeez H H, Abdo W, Kamal B M, *et al.* Fish telocytes and their relation to rodlet cells in ruby-red-fin shark (rainbow shark) *Epalzeorhynchus frenatum* (Teleostei: Cyprinidae)[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 18907.
- [40] Evans J J, Shoemaker C A, Klesius P H. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops \times *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation[J]. *Aquaculture*, 2000, 189(3-4): 197-210.*
- [41] Morrison E E, Plumb J A. Olfactory organ of channel catfish as a site of experimental *Edwardsiella ictaluri* infection[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1994, 6(2): 101-109.
- [42] Harmache A, LeBerge M, Droineau S, *et al.* Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for *Novirhabdovirus*[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(7): 3655-3659.
- [43] Marty G D, Freiberg E F, Meyers T R, *et al.* Viral hemorrhagic septicemia virus, *Ichthyophonus hoferi*, and other causes of morbidity in Pacific herring *Clupea pallasii* spawning in Prince William Sound, Alaska, USA[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1998, 32(1): 15-40.
- [44] Tanaka S, Takagi M, Miyazaki T. Histopathological studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, at the grow-out

- stage[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2004, 27(7): 385-399.
- [45] Zhang Y A, Salinas I, Li J, *et al.* IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity[J]. *Nature Immunology*, 2010, 11(9): 827-835.
- [46] 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.
- [47] Yu Y Y, Kong W G, Yin Y X, *et al.* Mucosal immunoglobulins protect the olfactory organ of teleost fish against parasitic infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(11): e1007251.
- [48] Dong F, Yin G M, Meng K F, *et al.* IgT plays a predominant role in the antibacterial immunity of rainbow trout olfactory organs[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 583740.
- [49] Magadan S, Jouneau L, Boudinot P, *et al.* Nasal vaccination drives modifications of nasal and systemic antibody repertoires in rainbow trout[J]. *The Journal of Immunology*, 2019, 203(6): 1480-1492.
- [50] Lindner C, Wahl B, Föhse L, *et al.* Age, microbiota, and T cells shape diverse individual IgA repertoires in the intestine[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2012, 209(2): 365-377.
- [51] Holtmeier W, Hennemann A, Caspary W F. IgA and IgM V_H repertoires in human colon: evidence for clonally expanded B cells that are widely disseminated[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1253-1266.
- [52] Wu Z B, Meng K F, Ding L G, *et al.* Dynamic interaction between mucosal immunity and microbiota drives nose and pharynx homeostasis of common carp (*Cyprinus carpio*) after SVCV infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 769775.
- [53] Zuercher A W, Coffin S E, Thurnheer M C, *et al.* Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses[J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 168(4): 1796-1803.
- [54] Wu H Y, Russell M W. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system[J]. *Immunologic Research*, 1997, 16(2): 187-201.
- [55] Kanaya K, Kondo K, Suzukawa K, *et al.* Innate immune responses and neuroepithelial degeneration and regeneration in the mouse olfactory mucosa induced by intranasal administration of Poly(I: C)[J]. *Cell and Tissue Research*, 2014, 357(1): 279-299.
- [56] Nelson S A, Sant A J. Potentiating lung mucosal immunity through intranasal vaccination[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 808527.
- [57] Mayor S. Intranasal flu vaccine provides similar protection to injected flu vaccine, finds study[J]. *BMJ*, 2016, 354: i4481.
- [58] Ma J, Casadei E, Bruce T J, *et al.* Long-term efficacy of nasal vaccination against enteric red mouth (ERM) disease and infectious hematopoietic necrosis (IHN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Vaccine*, 2022, 40(2): 229-238.
- [59] Salinas I, LaPatra S E, Erhardt E B. Nasal vaccination of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis and enteric red mouth disease[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 53(1): 105-111.
- [60] LaPatra S, Kao S, Erhardt E B, *et al.* Evaluation of dual nasal delivery of infectious hematopoietic necrosis virus and enteric red mouth vaccines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Vaccine*, 2015, 33(6): 771-776.
- [61] Larragoite E T, Tacchi L, LaPatra S E, *et al.* An attenuated virus vaccine appears safe to the central nervous system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after intranasal delivery[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 49: 351-354.
- [62] 王启要. 中国鱼类疫苗技术研发及应用研究进展[J]. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(1): 1-9.
- Wang Q Y. Fish vaccine technology development and application in China: a review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(1): 1-9 (in Chinese).

Advances in the study of nasal-associated lymphoid tissue in fish

SHENG Xiuzhen, WANG Jincheng, TANG Xiaoqian, XING Jing, CHI Heng, ZHAN Wenbin*

(Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, Key Laboratory of Mariculture of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The mucosa-associated lymphoid tissue is the first line of defense against pathogens in fish. In recent years, the nasal-associated lymphoid tissue (NALT) of fish has attracted worldwide attention from researchers, and has proved to be an important site for antigen recognition and initiation of mucosal immune response in olfactory organs. NALT exerts a rapid local immune response following bacterial, viral and parasitic infections. Intranasal inoculation of fish targeting NALT can provide excellent immune protection. However, the complex network of cells and molecules in NALT and their interaction mechanisms are still largely unknown. Here, the latest progress in studies on the structure and function of olfactory organs, cellular and molecular networks and immune response of NALT, as well as response to intranasal inoculation and its immunoprotective effect on fish are reviewed. This information will promote understanding of the immune defense mechanism exerted by fish NALT locally in the mucosa, which will benefit the design and development of novel mucosal vaccines.

Key words: fish; nasal-associated lymphoid tissue (NALT); mucosal immunity; olfactory organs; intranasal vaccination

Corresponding author: ZHAN Wenbin. E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32273163, 31730101, 31872599); Taishan Scholar Program of Shandong Province