

环境胁迫因子对鱼类免疫功能的影响

李 彦 江育林 (中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

与人类和其他脊椎动物一样,鱼类也是通过其免疫系统识别和消除异物,行使防御、自身稳定和免疫监督三大功能的。鱼病的发生是鱼体、病原和环境三者相互作用的结果。由于鱼类是水生低等脊椎动物,更容易受外界环境的影响,特别是养殖水体,因人为作用的加强,易导致生态环境变化并趋于恶化,各种因子的影响逐渐显露出来,从而对鱼类健康造成不利影响。环境对鱼的各种刺激,即为环境胁迫因子(environment stress factor)。这些因子可以是致死性的,也可以是亚致死性的,并足以引起鱼体的应激反应(stress)。处于应激状态的鱼可通过其血浆中皮质醇激素(cortisol)的变化间接影响鱼类免疫功能^[1,2]。多年来,国外大量的工作均集中在环境胁迫因子对鱼类生理学和血液学方面的研究^[3~5]。由于在免疫学检测方法上存在较大困难,胁迫因子对鱼类免疫系统及功能影响的研究相对较少。尽管如此,还是有许多科研工作者从不同角度探索了鱼类机体的各种免疫功能在环境胁迫下的变化。

1 鱼类免疫系统

1.1 免疫组织器官 鱼类参与免疫应答的组织器官是胸腺、头肾、脾、肠道淋巴组织。胸腺的形成最早,是鱼类淋巴细胞增殖和分化的主要场所,其组织结构上分化为皮质和髓质,内有大、中、小三类淋巴细胞^[6]。有人认为鱼的胸腺参与 T 淋巴细胞的成熟(与哺乳动物相似),主要承担细胞免疫功能。头肾是鱼类重要的造血器官,有许多红细胞、粒细胞及淋巴细胞。脾脏是鱼类红细胞和粒细胞产生、储存及成熟的主要场所,由红骨髓组成,其椭圆体也被认为含造血物质,同样存在大量淋

巴细胞。头肾和脾参与体液免疫反应,Secombes 等^[7]用免疫荧光技术间接证明抗原在鲤鱼肾、脾的定位。除鲑鳟鱼类以外,所有硬骨鱼肾、脾中具有的黑素巨噬细胞中心在免疫反应中的作用是,从血液循环中清除异物,在组织损伤的修复中清除死亡组织的降解代谢产物,储存铁以供红细胞发生再利用及加工、提呈抗原。但钟明超^[8]对此持有异议。他研究了鲶鱼(*Silurus asotus*)含色素的巨噬细胞集结的诱导产生,认为黑素巨噬细胞中心不具有从循环中清除异物和组织降解产物的功能,也不具备加工、提呈抗原的功能,更不是鱼类淋巴细胞原始的生发中心。

1.2 免疫相关细胞 70 年代前,国外众多学者对鱼外周血白细胞进行过分类、形态、细胞化学及功能的研究^[3],近年来国内也有许多这方面的报道^[9~12]。鱼外周血细胞的组成和比例,因种类、年龄、季节及性别不同而不同^[3],因此在实验结果中必须说明上述条件。

鱼类是否存在 T、B 两类淋巴细胞即淋巴细胞异质性的问题,从 70 年代起就有争议。Blax-hal^[13]用 Percoll 连续梯度分离出外周血淋巴细胞。他采用人类淋巴细胞鉴定常用的丝裂原(mitogen)反应即植物血凝素(Phytohemagglutinin PHA)、刀豆球蛋白 A(Concanavallina Con A)主要刺激 T 细胞,脂多糖(lipopolysaccharide LPS)主要刺激 B 细胞,并通过电镜观察对分离的虹鳟鱼不同密度层的淋巴细胞进行了鉴定,发现 T 细胞主要在密度 1.056 层, B 细胞主要在 1.07 层,而人类 T 细胞密度高于 B 细胞密度。Sizemore^[14]和 Miller^[15]应用单克隆抗体间接"panning"技术分离斑点叉尾鮰(Channel catfish) sIg⁺ 和 sIg⁻ 淋巴细胞,丝裂原反应证明 sIg⁺ 细胞对 LPS 刺激产生反应, sIg⁻ 在有巨噬细胞存在时对 LPS、Con A 刺激均产生反应。这些结果说明真骨鱼类含有

类似于哺乳动物体系的 T 细胞 (sIg^- 淋巴细胞)、B 细胞 (sIg^+ 淋巴细胞) 和附属细胞 (巨噬细胞)。Reitan^[16] 从接种了 *Aeromonas salmonicida* 菌苗的鳟鱼 (*Salmo salar* L) 中分离白细胞, 其中 Ig^- 细胞对 PHA 反应, 并且 *A. salmonicida* 能诱导它们产生强的反应; Ig^+ 细胞对 LPS 反应, *A. salmonicida* 对这些细胞的诱导反应很弱, 因为 Ig^+ 细胞群中无巨噬细胞出现, 再次证明了上述的结论。近年来, 有些学者采用表面标记技术来确认淋巴细胞, 如用免疫荧光抗鳟鱼 IgM 的兔 IgG 来检测该鱼血细胞的 $SmIg$, 推测鳟鱼的这些 $SmIg$ 细胞类似哺乳动物的 B 细胞^[17]; 用 FITC 标记分裂素 (PHA Con A LPS) 检测出鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 淋巴细胞上有 PHA Con A LPS 的受体, 存在类似哺乳动物的 T B 细胞^[18]; 另外有的研究推测鱼类还存在类似哺乳动物的 Th 细胞、 T_s 细胞和 NK 细胞。以上这些资料证明, 真骨鱼类确有 T B 细胞之分, 下一步就是对这些细胞进行分离, 以进一步确认它们与哺乳动物的异同及在体液免疫和细胞免疫中的作用。

1.3 与免疫相关的因子

1.3.1 补体 (complement) 血清中的由一组蛋白成分组成的复合酶。对热敏感, $45^{\circ}C$ 20 min 便可灭活。主要作用是导致细胞溶解, 协助抗体杀死病原体。其释放因子可介导炎症反应, 并吸引及增强吞噬细胞的活性。

1.3.2 干扰素 (interferon) 鱼体重要的抗病病毒感染防御因子, 由白细胞产生。

1.3.3 溶菌酶 (lysozyme) 许多鱼粘液、血清及吞噬细胞中存在的水解酶, 能抗病原微生物使鱼获得保护。

1.3.4 白细胞介素 (interleukin, IL) Grondel (1984) 研究证实, 在激活的鲤鱼头肾细胞上清液中有 IL-2

1.3.5 巨噬细胞活化因子 (macrophage activating factor, MAF) 刺激鳟鱼头肾及外周血白细胞, 能提高巨噬细胞释放量和杀菌能力^[19, 20]。

1.3.6 巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibition factor, MIF) 鲤鱼头肾细胞经丝裂原如 Con A 刺激, 可产生 MIF

1.3.7 趋化因子 (chemokinetic factor, CF) 被丝裂原或抗原刺激的白细胞上清液中有 CF, 可吸引许多白细胞, 使体外纯培养的巨噬细胞扩展、空泡化及粘附。

2 鱼类免疫功能

2.1 非特异性免疫 鱼体鳞片、皮肤、粘液中的溶酶体、溶菌酶及其他障碍微生物运动的粘多糖, 组成鱼类非特异性防御的第一道防线。如果这道防线被病原体穿透, 就会吸引大量吞噬细胞 (单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞), 引起炎症反应。吞噬作用是鱼体最重要的非特异性免疫。Avtalion 等^[21] 进行过一系列鲤鱼吞噬细胞的实验, 证明吞噬细胞对杀伤外源细胞及病原体具有高效活性, 吞噬细胞的吞噬能力、胞饮能力、趋化作用及趋光作用都是行使非特异性免疫防卫的表现。近年研究发现, 皮肤粘液中的糖蛋白对细菌分泌的酶具有极强的抵抗力, 并在水中形成膨胀结构, 微生物被封入后, 失去活动能力。

2.2 特异性免疫

2.2.1 体液免疫反应 体液免疫是由 B 淋巴细胞介导的。在初次应答基础上, 再次应答可产生免疫记忆, 抗原刺激鱼体可导致成熟细胞产生抗体。真骨鱼类仅具有一种免疫球蛋白, 类似哺乳动物的 IgM , 由 2 条轻链和 2 条重链组成单体, 但在血清中通过“J”链连接成四聚体。有研究报道板鳃纲鱼的 IgM 是五聚体。

哺乳动物和鸟类除血液中有抗体外, 还存在分泌型抗体。鱼类是否存在还未见报道, 但已发现鱼体体表和肠管的粘液中有抗体存在^[22]。

2.2.2 细胞免疫反应 细胞免疫是由 T 淋巴细胞介导的。鱼类细胞免疫方面的研究还很肤浅。鱼类存在着与哺乳类和鸟类相似的淋巴细胞的丝裂原反应、迟发型超敏反应、混合淋巴反应、巨噬细胞移动抑制反应、同种异体移植排斥等。T 淋巴细胞介导的细胞免疫反应^[18, 23~26]。

3 环境胁迫因子对鱼类免疫系统及功能的影响

3.1 对鱼类免疫系统的影响 环境因子的胁迫可使免疫组织器官受损, 导致免疫细胞的组成发生改变。早在 1935 年 Dowson 发现鲶鱼 (*Ictalurus melas*) 长期置于含铅水体中, 血细胞受损。处于应激状态的鱼, 其脾脏增大^[1]; 有相当比例的吞噬细胞退化, 分解后形成坏死区域^[27]。低剂量⁶⁰Co γ 射线照射的虹鳟鱼, 其白细胞数减

少,胸腺淋巴样组织的细胞受损^[28]。钟明超^[8]的研究结果表明,严重的水污染可使鲫鱼头肾、脾中多种细胞出现亚显微结构异常改变,并使许多细胞坏死。鱼在溶氧不足的情况下淋巴细胞数减少。

Pickering^[29]的研究表明河鲢和虹鲢处于拥挤状态 3 周,血细胞组成发生变化,血栓细胞及淋巴细胞数明显减少,雄鱼红细胞数上升。斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) 在经受处理和运输 18 h 后,血液中 T B 淋巴细胞数减少^[24]。Ainsworth (1991) 进行的相似实验显示, B 淋巴细胞百分率明显下降, T 淋巴细胞及中性粒细胞的百分率明显增加。Gill (1985) 发现,生活在 0.63~0.84 mg/L CaCl₂ 中的鲤科鱼红细胞胞质空泡化,血栓细胞及中性粒细胞数减少,但小淋巴细胞数增加。Pickering (1985) 研究了鲢鱼生活在含 2.27×10^{-6} 孔雀石绿的水中,其外周血红细胞、血栓细胞、淋巴细胞数都没有改变,而中性粒细胞数明显降低。

3.2 对非特异性免疫功能的影响 环境胁迫因子可使鱼的某些非特异性免疫功能增强或减弱。吞噬细胞的吞噬作用明显地受环境温度影响。鲤鱼吞噬细胞在 25℃ 下吞噬活性高,吞噬力强^[21];而虹鲢吞噬细胞的吞噬活性在 20℃ 最高,低于 10℃ 时显著下降。当然,不同种类鱼对温度有不同的适应性。研究鱼类吞噬细胞的吞噬作用,可以很好地评价环境因子对鱼类非特异性免疫的胁迫。

鲤鱼置于致死剂量 25~15 mg/L 亚致死剂量 (4.9±0.2) mg/L 的氨水中会产生防御性反应,粘液大量分泌^[4]。虹鲢鱼处于应激状态时,吞噬细胞变得活跃,表现为细胞肥大,伸出伪足,自我吞噬率也加强,体内和体外的吞噬酵母细胞试验显示吞噬率增强^[27]。幼鲤处于拥挤条件下,非特异性免疫学参数活性在实验的 7~30 d 内保持着低水平,对 *A. hydrophila* 入侵的低抗力明显下降^[30]。Weeks 等^[31]研究受污染 Elizabeth 河中 *Leiostomus xanthurus* 和 hogchoker, *Trinectes maculatus* 鱼体,从其肾中分离的巨噬细胞的吞噬能力和趋化性反应明显下降 (40%~60%)。但 Kelly-Reay (1994) 对受污染的 Elizabeth 河中 *Fundulus heteroclitus* 鱼的化学趋光反应 (chemiluminescent, CL) 测定,结果相反, CL 反应活性明显比 Youk 河中的鱼群要高。这可能是巨噬细胞受到刺激,或某些化学物质刺激影响

CL 反应

一些研究表明,亚致死剂量的铜、铝可导致吞噬细胞 CL 反应显著减弱,而亚致死浓度的镉使 CL 反应显著增强^[32]。Muhvich^[33]的研究指出,铜以一种复杂方式影响巨噬细胞的吞噬功能,抑制或刺激 CL 反应依赖于铜的浓度。Bennett 等 (1987) 研究证实,亚致死浓度 endrin (一种有氯杀虫剂) 可使虹鲢鱼的移动抑制因子试验明显比对照组减弱。

3.3 对特异性免疫功能的影响 影响鱼类特异性免疫反应的环境因子中,研究得最多也是最重要的是温度。因为鱼是变温动物,对温度变化反应敏感。抗体的产生在反应的初始阶段是依赖温度的。江育林等^[34]、Ahne (1986)、Avatlian (1969) 均发现鱼类抗体的产生都要求一个最低临界温度,在最适温度下抗体水平达到最高,在适宜温度范围内,抗体效价随温度升高而增高。李亚南等^[35]、Clem (1984) 采用丝裂原反应试验研究后认为,低温介导的免疫抑制是由于 T 细胞免疫应答受抑制, B 淋巴细胞未受抑制。

环境中的物理和化学因子明显影响鱼类的细胞及体液免疫。Maule 等 (1989) 证明处于应激状态的鱼,其头肾中特异性抗体产生细胞 (APC) 下降;Fevolden 等^[36]将处于低应激状态和高应激状态的两组鲑鱼 *Salmosalar* 用 *A. salmonicida* 攻毒,测其血清溶血活性 (溶血斑试验),结果表明处于高应激状态下的鱼免疫活性明显低;Ellsaesser 等^[24]证实,经过处理、运输而处于应激状态的鱼,其淋巴细胞不再对 LPS Con A 丝裂原反应,也不对依赖胸腺或非依赖胸腺抗原产生反应。

重金属如铅、镉、银、铜等可影响鱼体抗体的产生。Roales 和 Perlmutter (1977) 发现,亚致死水平的甲基银和铜 (浓度均为 9 μg/L) 可使毛足鲈抗 IPN 病毒及 *Proteus vulgaris* 菌的抗体滴度降低;Thuvander (1986) 将用鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 免疫的虹鲢鱼置于含镉 (3.6 μg/L) 水体中 9 周,其对抗原的细胞免疫反应低于对照组,但体液抗体的滴度高于对照组。鲶鱼置于含镉水体中 1 周后, IgM 明显下降,但 2 周后又上升^[37];PHA 刺激 T 淋巴细胞的增殖转化反应则受抑制^[38]。有可能是镉抑制了鱼 T 细胞反应而没有影响 B 细胞。Muller (1979) 报道,慢性口喂镉后,鼠的迟发性超敏反应受抑制,体液免疫不受影响, T B 淋巴细胞的丝裂原反应增强,其结果与

鱼的相反。Anderson等(1989)将虹鳟鱼的脾脏培养在含铜离子(0.1~10 mg/L)培养基中,发现其产生的抗体产生细胞(APC)数比对照产生得少。

Goncharov和Mikryakov(1970)将1~2龄的鲤鱼置于含无毒水平酚(12.5 mg/L)的水体中,其抗*A. punctata*的凝集滴度也会降低;Ben-nett等(1987)让虹鳟鱼处于亚致死浓度杀虫剂endrin中,尽管腹腔巨噬细胞的吞噬能力没受影响,但是被动溶血斑试验(PFC)和血清凝集滴度试验(SAG)明显比对照组减弱。置于dioxin(TCDD)的鳟鱼脾脏和胸腺细胞悬液的丝裂原反应同样受到抑制。Grondel和Boesten(1982)发现土霉素可使鲤鱼脾脏细胞悬液的丝裂原反应受抑制。

目前,常用的一些免疫学试验方法都是检测非特异性及特异性免疫功能的试验^[36]。由于免疫系统的复杂性以及免疫反应的器官和细胞的多样性,因此要确定某一环境因子对免疫功能的影响,不能仅限于一项指标,而需研究其对鱼类吞噬细胞功能、细胞免疫、体液免疫等的综合影响。另外,鱼的种间差异很大,某一环境胁迫因子对某种鱼的影响结果不能简单地推论到其他鱼。与人和哺乳动物免疫学相比,鱼类免疫学起步较晚,一些免疫学指标的正常值还很缺乏,因此在进行免疫学试验中必须设立对照组。

(王伟俊先生审阅本文并提出宝贵意见,在此表示感谢)

主要参考文献

- Anderson D P *et al.* Dev Comp Immunol, 1982, 6 (Supplement 2): 197~ 204
- Stave J W *et al.* Dev Comp Immunol, 1985, 9 77~ 84
- Ellis A E. J Fish Biol, 1977, 11 453~ 491
- Flis J. ACTA Hydrobiol, 1968, 10(1~ 2): 205~ 238
- Jeney G *et al.* Aquacul, 1993, 112 283~ 287
- 卢全章. 水生生物学报, 1991, 15(4): 327~ 332
- Secombes C J *et al.* J Fish Dis, 1980, 3 399~ 412
- 钟明超. 鱼类免疫细胞的研究: [学位论文]. 济南: 山东大学, 1993
- 冯怀亮等. 水产学报, 1991, 15(3): 241~ 244
- 冯来坤等. 鱼类病害研究, 1992, 1 11~ 12
- 赵明蓓. 水生生物学集刊, 1979, 6(4): 453~ 463
- 赵宝刚等. 水生生物学报, 1991, 15(2): 184~ 186
- Blaxhall P C. J fish Biol, 1972, 4 593~ 604
- Sizemore R C *et al.* J Immunol, 1984, 133(6): 2920~ 2924
- Miller N W *et al.* J Immunol, 1985, 134 2884~ 2888
- Reitan L J *et al.* J Fish Dis, 1994, 17 549~ 553
- Hamaguchi M *et al.* Fish Pathol, 1988, 23(4): 257~ 262
- Xia C *et al.* 水产增殖(日), 1994, 42(1): 53~ 56
- Francis C H *et al.* Fish & Shellfish Immunol, 1994, 4 489~ 497
- Graham S *et al.* Immunol, 1988, 65 293~ 297
- Avtalion R R *et al.* Immunol, 1975, 29 1181~ 1187
- 中科院水生所鱼病室编. 鱼病学研究论文集(第二辑). 北京: 海洋出版社, 1995. 21~ 25
- Dannevig B H *et al.* J Fish Dis, 1993, 16 351~ 359
- Ellsaesser C F *et al.* J Fish Biol, 1986, 28 511~ 521
- Knoll R M *et al.* Vet Immunol Immunopathol, 1986, 12 359~ 364
- Thuvander A. J Fish Biol, 1989, 35 521~ 529
- Peters G *et al.* Fish & Shellfish Immunol, 1991, 1 (1): 17~ 31
- Chilmonzyk S *et al.* Vet Immunol Immunopathol, 1988, 18 173~ 180
- Pickering A D *et al.* J Fish Biol, 1987, 30 701~ 712
- Yin Z *et al.* Fish & Shellfish Immunol, 1995, 5 519~ 529
- Weeks B A *et al.* Mar Environ Res, 1984, 14 327~ 335
- Ellsaesser M S *et al.* Vet Immunol Immunopathol, 1986, 12 243~ 250
- Muhvich A G *et al.* Fish & Shellfish Immunol, 1995, 5 251~ 264
- 江育林等. 水生生物学报, 1990, 14(3): 276~ 279
- 中科院水生所鱼病室编. 鱼病学研究论文集(第二辑). 北京: 海洋出版社, 1995. 15~ 20
- Fevolden S E *et al.* Aquacul, 1993, 109 215~ 224
- Albergoni V *et al.* Fish & Shellfish Immunol, 1995, 5 89~ 95
- Albergoni V *et al.* Fish & Shellfish Immunol, 1995, 5 301~ 311