

# 两种免疫方式对欧洲鳗鲡肠上皮内淋巴细胞和杯状细胞的影响

黄春兰<sup>1,2</sup>, 林 旋<sup>2</sup>, 李艳虹<sup>1</sup>, 宋铁英<sup>1</sup>

(1. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

**摘要:** 利用嗜水气单胞菌- ISCOMs 疫苗口服或注射免疫欧洲鳗鲡, 分别于口服或注射免疫后第 1、7、14 和 21 d 采集欧洲鳗鲡前、中、后肠, 经石蜡制片, HE 和 AB-PAS 染色计数肠上皮内淋巴细胞和杯状细胞数量。结果显示: 两种免疫方式均能不同程度影响肠道上皮内淋巴细胞和杯状细胞数量; 血清抗体效价检测结果显示, 免疫 7 d 后抗体效价开始升高, 且注射免疫组血清效价整体水平高于口服免疫组。

**关键词:** 口服免疫; 注射免疫; 淋巴细胞; 杯状细胞

中图分类号: S 941. 99

文献标识码: A

## Effects of two vaccination methods on lymphocytes and goblet cells in intestinal epithelium of *Anguilla anguilla*

HU ANG Chun lan<sup>1,2</sup>, LIN Xuan<sup>1</sup>, LI Yan hong<sup>1</sup>, SONG Tie ying<sup>1</sup>

(Biotechnology Institute of Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

**Abstract:** Oral or injection immunization with *Aeromonas hydrophila* ISCOMs was applied on *Anguilla anguilla* for the study. The numbers of lymphocytes and goblet cells in the intestinal epithelium of *A. anguilla* at days 1, 7, 14 and 21 after the vaccination were determined by using HE and AB-PAS staining. The results showed that the immunization changed the numbers of lymphocytes and goblet cells, and the antibody activity in serum became higher after day 7. It was found that the injection immunization produced a higher antibody activity than the oral application.

**Key words:** oral immunization; injection immunization; lymphocyte; goblet cell

我国是世界上最大的鳗鲡生产国, 全国共有鳗鲡养殖场 1 700~1 800 个, 2003 年产量约 17.817 万 t, 居世界第一。嗜水气单胞菌是引起鳗细菌性败血症最主要的病原菌, 每年给我国鳗鲡养殖业带来巨大的经济损失<sup>[1~2]</sup>。近年来, 关于鳗鲡细菌性疾病免疫预防的研究报道, 主要集中在疫苗免疫和其他保护性抗原所引起的鳗鲡体液免疫应答的水平变化和免疫保护率测定方面<sup>[3]</sup>, 而有关疫苗免疫后组织变化方面的研究材料较少<sup>[4]</sup>。本试验利用嗜水气单胞菌- ISCOMs 疫苗免疫欧洲鳗鲡, 采集肠道, 石蜡切片, HE 和 AB-PAS 染色, 观察免疫后不同时间各肠道段上皮内淋巴细胞和杯状细胞水平; 探索嗜水气单胞菌作用机理, 为合理使用疫苗提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

嗜水气单胞菌疫苗 (ZN1-ISCOMs 和 MOMP-

ISCOMs) 由福建省农业科学院鱼病中心制备。试验所用欧洲鳗鲡由福建省长乐顺德鳗鲡场提供, 规格为 80~120 g·尾<sup>-1</sup>。50 cm×30 cm×40 cm 塑料水族箱注水至箱深的 2/3 处, 每个水族箱放养鳗鲡 10 尾, 控制室温 24±1℃。水源为暴气自来水, 视水色变化给予适当换水, 普通小型充气机连续充气直到试验结束。欧洲鳗鲡在免疫前暂养 1 周, 检测鳗鲡健康后用于本次试验。注射后停止饲喂 3 d, 然后继续饲喂基础饵料。

### 1.2 免疫接种

选用欧洲鳗鲡 90 尾, 随机分为 3 组: 对照组、口服组和注射组, 每组 30 尾。口服组利用 ZN1-ISCOMs 按 0.75 mg·尾<sup>-1</sup> 剂量拌料饲喂, 连续口服 21 d; 注射组腹腔注射 MOMP-ISCOMs, 100 μg·尾<sup>-1</sup>, 一免 7 d 后进行二免, 剂量与一免相同。

### 1.3 组织切片制作及染色

分别于口服或一免后第 1 d、7 d、14 d 和 21 d

收稿日期: 2009-07-29 初稿; 2009-12-14 修改稿

作者简介: 黄春兰 (1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产保护学研究

通讯作者: 宋铁英 (1963-), 女, 研究员, 主要从事水产保护学研究 (E-mail: tieyingsong@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目 (2007N0033); 农业部公益性农业专项 (nyhyzx07-043-15); 福建省财政专项—福建省农业科学院科技创新团队建设基金项目 (STIF-Y02); 科技部科技人员服务企业行动项目 (2009GJC40042)

随机取免疫组和对照组欧洲鳗鲡各 5 尾。鳗鲡经尾静脉采血后, 按常规方法解剖, 迅速取出鳗鲡欧洲前肠、中肠、后肠 3 段, 长度 0.5~1.0 cm, 浸入 pH 值 7.2 的磷酸盐缓冲液迅速洗掉内溶物。组织经 Carnoy's 固定液固定 24 h, 常规石蜡切片, 厚度 4 μm。HE 染色法显示肠黏膜上皮内淋巴细胞; AB-PAS 染色法显示肠上皮内杯状细胞。

#### 1.4 免疫细胞的观察

光镜下观察各肠段染色情况, 每个肠管取 5 张着色良好的切片, 每张切片在 40×10 倍放大倍数下随机选取 5 个视野, 计数每个视野上皮内的淋巴细胞和杯状细胞数量。两种细胞数量变化采用试验组细胞数量减去对照组细胞数量表示, 并用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

#### 1.5 免疫血清抗体效价检测

ELISA 测定免疫欧洲鳗鲡血清抗体效价, 经系列稀释的欧洲鳗鲡血清为第一抗体, 第二抗体为 1:2 000 稀释的兔抗欧洲鳗鲡多克隆抗体, 第三抗体为 1:2 000 稀释的 HRP 酶标羊抗兔抗体 (sigma); 双氧水活化的 DAB 显色, 2 mol·L<sup>-1</sup> 硫酸终止反应。在酶标检测仪 (Multiskan

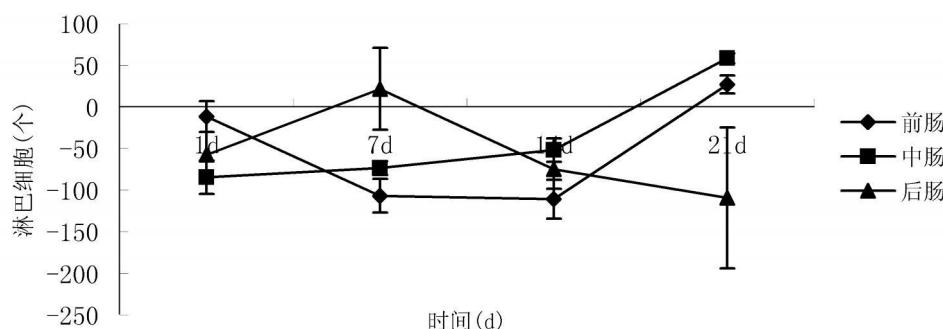
Mk3) 上, 于 490 nm 处, 以空白对照调零后测各孔 OD 值, 大于阴性对照 OD 值 2 倍 ( $S/N > 2$ ) 判为阳性, 结果以抗体稀释度表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 欧洲鳗鲡免疫后肠上皮内淋巴细胞数量变化规律

对口服或注射免疫不同时间后欧洲鳗鲡肠上皮内淋巴细胞数量变化情况进行跟踪观察, 结果显示: 两种免疫方式均能引起肠道上皮内淋巴细胞发生免疫应答, 且差异显著。

**2.1.1 欧洲鳗鲡口服免疫后不同时间肠上皮内淋巴细胞数量变化规律** 欧洲鳗鲡口服免疫后各肠段上皮内淋巴细胞数量变化的跟踪观察结果显示, 免疫后第 1 d、7 d、14 d、前、中肠上皮内淋巴细胞数量与对照相比总体呈下降趋势; 21 d 后前、中肠上皮内淋巴细胞数量开始上升。后肠上皮内淋巴细胞数量的变化情况与前、中肠有些不同, 表现为口服后第 1 d 淋巴细胞数量下降, 第 7 d 时淋巴细胞数量先小幅上升后下降, 第 14 d 时显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ); 第 21 d 持续降低, 达到试验期间最低值(图 1)。



注: 图中试验数据为试验组淋巴细胞数量减去对照组淋巴细胞数量所得差值, 图 2 同。

图 1 欧洲鳗鲡口服免疫后肠道上皮内淋巴细胞数量变化图

Fig 1 Changes of lymphocyte number at intestines of *A. anguilla* after oral vaccination

**2.1.2 欧洲鳗鲡免疫后肠上皮内淋巴细胞数量变化规律** 注射免疫方式下, 欧洲鳗鲡前、中、后肠上皮内淋巴细胞数量变化规律与口服组明显不同。前、中、后肠淋巴细胞变化规律相似, 具体表现为第 1 次免疫后淋巴细胞数量略微上升后, 第 7 d 时下降至低于对照; 二次免疫后淋巴细胞变化幅度明显加大, 免疫后淋巴细胞重新回升, 第 14 d 达到峰值后下降; 后肠上皮内淋巴细胞数量的变化趋势与前、中肠略有不同, 在第 21 d 时后肠淋巴细胞数量仍然维持较高水平(图 2)。

#### 2.2 欧洲鳗鲡免疫后肠上皮内杯状细胞数量变化

规律

**2.2.1 欧洲鳗鲡口服免疫后肠上皮内杯状细胞数量变化规律** 欧洲鳗鲡经口服免疫后, 肠上皮内杯状细胞数量变化结果显示, 口服免疫方式可以引起欧洲鳗鲡肠上皮内杯状细胞数量的显著变化, 但在肠道的不同部位表现不同。具体表现为口服疫苗第 1 d 后前、中、后肠杯状细胞数量均迅速下降, 显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 之后细胞数量回升, 前肠杯状细胞数量在 14 d 内保持回升, 第 14 d 时细胞数量显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 之后开始下降; 中肠杯状细胞数量在 21 d 内保持回升趋势,

第21 d时显著高于对照组( $P<0.01$ )；后肠上皮内杯状细胞数量呈现波动，口服1 d后显著低于对照组( $P<0.01$ )，饲喂7 d时上升，显著高于对照

组( $P<0.01$ )，14 d时又下降，显著低于对照组( $P<0.01$ )，至21 d时恢复正常水平，和对照组差异不显著( $P>0.05$ )（图3）。

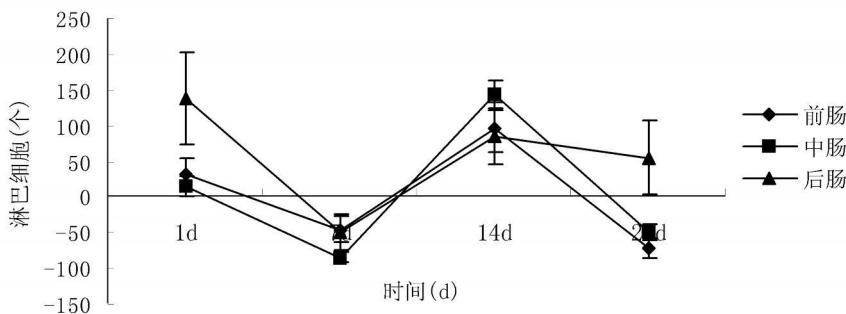
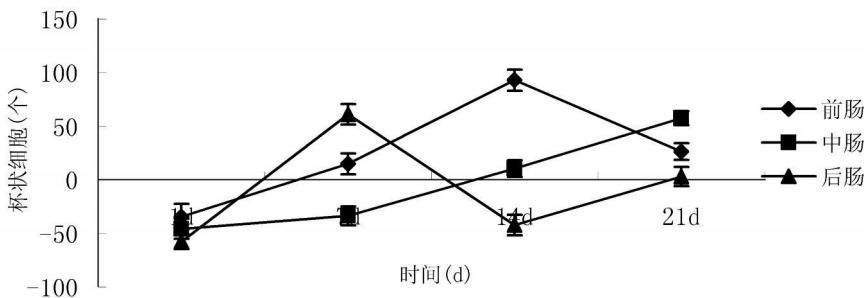


图2 欧洲鳗鲡注射免疫后肠上皮内淋巴细胞数量变化图

Fig 2 Changes of lymphocyte number in intestines after injection vaccination



注：图中试验数据为试验组杯状细胞数量减去对照组杯状细胞数量所得的差值，图4同。

图3 欧洲鳗鲡口服免疫后肠上皮内杯状细胞数量变化

Fig 3 Changes of global cell number in intestines after oral vaccination

**2.2.2 欧洲鳗鲡注射免疫后肠上皮内杯状细胞数量变化规律** 欧洲鳗鲡经注射免疫后肠上皮内杯状细胞数量变化结果显示，注射免疫方式对欧洲鳗鲡肠道上皮内杯状细胞的增殖作用强于口服。注射免疫后第1、7、14 d，前、中、后肠上皮内杯状细胞数量均不同程度高于对照组水平( $P<0.01$ )。但肠道不

同位置杯状细胞的变化规律不同，前肠上皮内杯状细胞在第1次注射免疫后小幅上升后下降，二次免疫后重新升高，第21 d仍保持高水平；中肠上皮内杯状细胞数量则在1次免疫后缓慢上升，第7d达到峰值后下降；后肠杯状细胞的变化规律与中肠相似，但免疫后上升趋势持续到第14 d开始下降(图4)。

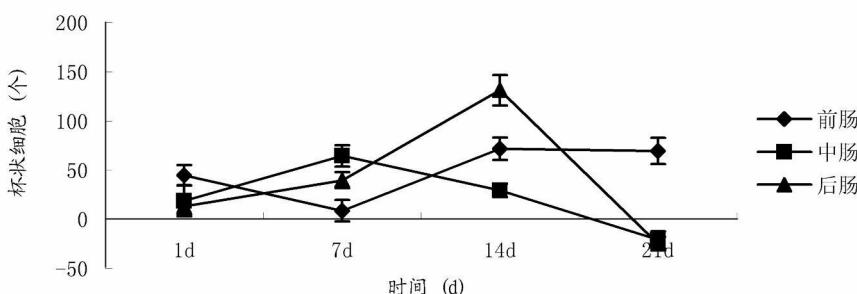


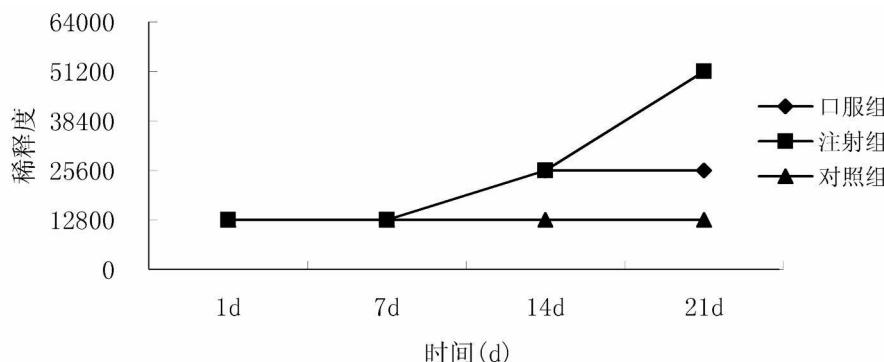
图4 欧洲鳗鲡口服免疫后肠上皮内杯状细胞数量变化

Fig 4 Changes of global cell number in intestines after injection vaccination

### 2.3 欧洲鳗鲡血清抗体效价

用 ELISA 法检测嗜水气单胞菌疫苗免疫欧洲鳗鲡后的血清抗体效价, 结果显示, 口服或注射免

疫第 7 d 后血清特异性抗体效价开始缓慢升高, 且注射免疫组血清抗体效价整体高于口服免疫组(图 5)。



注: 图中纵坐标表示血清稀释倍数, 依次分别为 1: 12800、1: 25600、1: 51200、1: 6400。

图 5 欧洲鳗鲡免疫后血清抗体效价

Fig 5 Antibody activity (OD<sub>495 nm</sub>) in serum of *A. anguilla* after vaccination

## 3 讨 论

口服免疫可以诱导粘膜及系统免疫应答, 相对于其他免疫方式更适合水产养殖。研究证实, 抗原经制备成 ISCOMs 疫苗后, 可以通过口服刺激鱼类肠道淋巴相关组织 (MALT), 诱导白介素、干扰素产生, 活化 T 辅助细胞 (Th)、细胞毒性 T 细胞 (CTL)、B 细胞, 具有激发宿主产生全面免疫应答的能力<sup>[5]</sup>; 前期试验结果也证明, ISCOMs 疫苗经由肠胃途径免疫, 可显著提高鳗鲡淋巴细胞的增殖转化能力, 并诱导免疫保护<sup>[6]</sup>。本次试验结果表明: 拌料饲喂 ISCOMs 疫苗 21 d 后, 前、中肠淋巴细胞数量显著升高, 说明疫苗饲喂一定时间后能够刺激前、中肠上皮内淋巴细胞增殖; 进一步分析不同时间段前、中、肠上皮内淋巴细胞变化规律, 发现前、中肠变化趋势相似, 均表现为先下降后上升。原因可能是疫苗经过口服拌料后直接进入肠道, 刺激上皮内淋巴细胞处于活化状态, 进行了转移。

后肠淋巴细胞变化规律不同于前、中肠, 淋巴细胞总体呈下降趋势, 分析原因可能是后肠作为吸收的主要部位, 其生理结构和功能不同于前、中肠, 淋巴细胞提前进入活化状态, 发生了转移。但淋巴细胞数量的变化对鱼体免疫功能的影响还需要进一步分析。

注射免疫主要是诱导体液免疫应答, 注射免疫后肠道淋巴细胞均出现增长, 说明 ISCOMs 疫苗注射免疫可以在一定时期内刺激肠上皮内淋巴细胞

增殖; 在第 1 次免疫后第 7 d 和二次免疫 14 d 后肠道淋巴细胞数量下降, 表明注射免疫对于刺激淋巴细胞增殖只能维持一定时间; 但后肠淋巴细胞数量在二次免疫 14 d 后仍维持较高水平, 可能是因为肠道的不同部位免疫功能有所区别, 其免疫应答反应所维持的时间也有所不同。

杯状细胞作为粘液细胞的一种类型, 可分泌具有抵抗病原微生物入侵的非特异性的免疫化学反应物质, 在鱼类非特异性免疫应答中具有重要作用。有研究发现腹腔注射 ConA 能够使鲤鱼粘膜上皮、口腔粘膜上皮和皮肤的粘液细胞数量明显增多<sup>[7]</sup>, PHA 通过口服、浸泡和注射 3 种不同的处理方式都可以明显刺激鲤幼鱼粘液细胞的增殖, 提高粘液细胞的密度<sup>[8]</sup>。还有研究表明鱼类粘液中具有同血液相似的血清学反应<sup>[9]</sup>, 免疫电泳分析也证明了粘液中含有免疫球蛋白<sup>[10]</sup>。本试验结果显示: 注射免疫能够显著提升肠上皮内杯状细胞水平, 而采用口服免疫的方式饲喂 ISCOMs 疫苗第 14 d 后, 欧洲鳗鲡前、中、后肠上皮内杯状细胞数量升高, 说明口服疫苗一定时间后也可以提高肠上皮内杯状细胞水平。血清抗体效价检测结果, 两种免疫方式免疫欧洲鳗鲡, 第 7 d 后血清抗体效价均开始升高, 且注射免疫血清效价整体水平高于口服免疫血清。

上述试验表明, 两种免疫方式免疫均能引起欧洲鳗鲡肠上皮内淋巴细胞和杯状细胞数量的显著变化, 并刺激鱼体血清产生特异性抗体, 说明口服和注射两种免疫方式都能够刺激鱼体产生免疫保护。

鱼类疫苗的免疫途径主要有口服、浸泡和腹腔

注射等。与其他的免疫方式相比, 口服免疫具有操作简单, 省时省力的优点, 更适合于水产养殖; 此外口服免疫不受鱼群大小和时间的限制, 对鱼的应激较小, 适合多次重复免疫。本试验结果也表明, 采用口服疫苗和腹腔注射均能刺激影响淋巴细胞、杯状细胞水平, 这对我们研究鱼类口服疫苗的免疫机制, 进一步优化疫苗制备方法, 达到有效防治预防的目的意义重大。

### 参考文献:

- [1] 樊海平, 徐娟儿, 黄晓泛. 福建省养殖鳗鲡细菌性疾病的调查与防治 [J]. 海洋湖沼通报, 1996 (2): 66– 70.
- [2] 龚晖, 杨金先, 许斌福, 等. 欧洲鳗败血症的诊治 [J]. 水产科技情报, 2001, 28 (3): 115– 116.
- [3] 董传甫, 林天龙, 龚晖, 等. 嗜水气单胞菌主要外膜蛋白对欧洲鳗鲡的免疫保护试验 [J]. 水生生物学报, 2005, 29 (3): 285– 290.
- [4] 宋铁英, 龚晖, KHOMYAKOVA T I. 嗜水气单胞菌 ZH1 攻击鳗鲡后的组织病理学观察 [J]. 福建农业学报, 2008, 23 (1): 25– 30.
- [5] FUJIHASHI K, YAMAMOTO M, MCGHEE J R, et al. α $\beta$  TCR+ IELs with CD4+, CD8- and CD4+, CD8+ phenotypes from orally-immunized mice provide Th2 like function for B cell responses [J]. Immunol, 1993, 151: 6681– 6691.
- [6] 龚晖, 林天龙, 吴宗福, 等.  $\beta$ -hem A- ISCOMs 对鳗鲡的口服免疫效果 [J]. 福建农业学报, 2006, 21 (4): 325– 329.
- [7] 朱启忠. ConA 对鲤鱼粘液细胞的影响 [J]. 动物学杂志, 2000, 35 (1): 10– 12.
- [8] 安利国, 尹苗, 杨桂文, 等. 鲤幼鱼粘液细胞对不同 PHA 刺激方式的反应 [J]. 齐鲁渔业, 2000, 17 (1): 27– 29.
- [9] HARRELL L. Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease II Anti-vibrio anguillurum activity in mucus and observations on complement [J]. Aquac, 1976 (7): 363– 370.
- [10] 杨桂文, 安利国, 王长法, 等. 鲤鱼皮肤粘液与血清中免疫球蛋白的比较研究 [J]. 动物学研究, 1998, 19 (6): 489– 492.

(责任编辑: 翁志辉)