

灭活鲈鱼诺卡氏菌对乌鲢非特异性免疫指标的影响

解俊 彭程远 金珊* 赵青松 陈寅儿 王锡波 王国良

(宁波大学海洋学院, 315211)

摘要 应用浓度为 10^8 CFU/ml 的 0.4% 甲醛灭活鲈鱼诺卡氏菌 *Nocardia seriolae*, 经超声波破碎后对乌鲢进行腹腔注射, 剂量为 0.5 ml/尾, 对照组同法等量注射灭菌生理盐水。分别于实验第 0、3、6、9、12、15、18、21 天抽取乌鲢血液, 测定其血细胞数、血清总蛋白含量及血清碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶活性。结果显示, 注射灭活鲈鱼诺卡氏菌后, 乌鲢血细胞数呈先升高后降低的变化趋势, 在实验第 12 天时注射组血细胞数显著高于对照组; 血清总蛋白含量在实验第 9 天后均高于对照组; 血清碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、超氧化物歧化酶和溶菌酶等活性在实验时间内均发生了显著的变化。研究表明, 灭活菌苗的刺激能引起乌鲢血细胞的增殖以及血清中各非特异性免疫指标的变化, 从而提高机体自身的免疫保护力。

关键词 鲈鱼诺卡氏菌 乌鲢 非特异性免疫指标

中图分类号 S942.1 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2013)04-0071-06

Effects of inactivated *Nocardia seriolae* on the nonspecific immune indexes of *Channa argus*

XIE Jun PENG Cheng-yuan JIN Shan* ZHAO Qing-song
CHEN Yin-er WANG Xi-bo WANG Guo-liang

(School of Marine Sciences, Ningbo University, 315211)

ABSTRACT Experiments were carried out to evaluate the influences of inactivated *Nocardia seriolae* on the nonspecific immune indexes of *Channa argus*. One hundred healthy fish (*C. argus*) at body weight of 300~400 g were divided randomly into immunized and control groups. Each individual in the immunized group was intraperitoneally injected with 0.5 ml 1.0×10^8 CFU/ml *N. seriolae* which was inactivated by formalin and ultrasonic disruption, while each individual was intraperitoneally injected with 0.5 ml sterile saline solution in the control group. After the injection, blood samples were taken from the fish caudal vein on days 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 21 to test the changes of nonspecific immune indexes such as haematocyte number, serum total protein, alkaline phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP), superoxide dismutase (SOD) and lysozyme activities. The results showed that haematocyte number in immunized *C. argus* increased at first and was significantly higher than that in control group on day

浙江省自然科学基金(Y3100511)、宁波市自然科学基金(2012A610138)和宁波大学学科项目(xk111094)共同资助

* 通讯作者。E-mail: jinshan@nbu.edu.cn, Tel: (0574)87600916

收稿日期: 2012-07-15; 接受日期: 2012-10-31

作者简介: 解俊(1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产病害防控研究。E-mail: xiexiao3sheng@126.com, Tel: (0574)87600894

12, but then decreased. Content of serum total protein of the immunized *C. argus* was significantly higher than that in the control group on day 9. Alkaline phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP), superoxide dismutase (SOD) and lysozyme activities showed significant changes during the experiment. All these findings indicate that inactivated *N. seriolae* may enhance the non-specific immunity of *C. argus*, producing a significant protection against the pathogen bacteria.

KEY WORDS *Nocardia seriolae* *Channa argus* Nonspecific immune indexes

诺卡氏菌 *Nocardia* 是一种革兰氏阳性丝状杆菌,广泛分布于土壤、活性污泥和水中,以腐生为主,一些菌株是人和动物的机会致病菌。水产养殖中首例诺卡氏菌病发生在阿根廷养殖的虹彩脂鱼 *Hyphessobrycon innesi* 上(Valdez *et al.* 1963),它曾是日本、美国、加拿大、澳大利亚等地水产养殖中最主要的疾病之一。近10年来诺卡氏菌病对我国广东、福建、浙江、台湾等省的水产养殖业影响也很大,先后在大口鲈 *Micropterus salmoides*、七星鲈 *Lateolabrax japonicus*、斑鳢 *Channa maculata*、大黄鱼 *Pseudosciaena crocea*、乌鳢 *Channa argus* 等养殖鱼类中暴发该病,造成巨大的经济损失(王国良等 2009)。

由于鱼类诺卡氏菌病是一种慢性的疾病,发病前期病症极不明显,早期发现和诊断率低,一旦出现病症往往已无法控制,因此该病的预防措施就极为重要。目前关于鱼类诺卡氏菌病的防治研究资料较少,而且主要集中在药物防治方面。但是,利用药物控制诺卡氏菌病的方法也受到很大的争议。因为化学药物固然具有一定效果,但用药时间需要很长,有时要在感染鱼群中使用药物长达数月方能有效控制该病的发生,这样就给食品安全和环境安全带来严重隐患和威胁。而关于免疫防治方面的研究,仅有 Kusuda(1987)研制疫苗防治黄尾鲈诺卡氏菌病,Itano 等(2006)用 *N. seriolea*, *N. fluminea* 和 *N. uniformis* 作为活疫苗免疫健康五条鲈,但以上研究均未取得较好效果。为了更加全面地了解诺卡氏菌对鱼类免疫功能的刺激作用,本研究以乌鳢诺卡氏菌病的病原菌——鲈鱼诺卡氏菌 *N. seriolea* 作为试验菌,研究了腹腔注射灭活鲈鱼诺卡氏菌破碎菌后,乌鳢血液非特异性指标的变化,以期为鱼类诺卡氏菌病疫苗的研制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼和菌种

乌鳢于2011年9月5号购自宁波市水产市场,体重300~400 g,共100尾,养于室内大塑料水簇箱中,并用遮阳布适当遮盖。根据水质情况每天及时吸出粪便并用事先曝气处理的自来水换水1~2次,每次换水1/3,试验期间连续充氧,适量投喂小杂鱼。

鲈鱼诺卡氏菌 *N. seriolea* 由宁波大学海洋学院水产动物病害防控实验室提供。

1.2 试剂和药品

碱性磷酸酶(AKP)试剂盒、酸性磷酸酶(ACP)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、溶菌酶(LSZ)试剂盒等试剂购自南京建成生物工程研究所,TSA培养基,TSB培养基,甲醛(分析纯),肝素钠。

1.3 灭活菌的制备

菌种接种于TSA斜面上,28℃培养7d后,用0.7%无菌生理盐水将菌苔洗脱下来再接种于盛有TSB液体培养基的三角烧瓶中进行二级扩大培养,28℃培养7d。往培养好的三角烧瓶中加入0.4%甲醛静置灭活48h,之后涂TSA平板确认菌已灭活,离心收集灭活菌体(1438 g,20 min),所得菌泥用0.7%无菌生理盐水洗涤离心4~5遍后,用0.7%无菌生理盐水制成浓度约为 10^8 CFU/ml的菌悬液,超声波破碎(400 W,工作2 s,间歇3 s,共20 min),4℃冰箱保存备用。菌悬液浓度采用麦氏比浊法确定。

1.4 血清和血细胞的收集

将乌鲢分为实验组和对照组,每组 50 尾。实验组每尾腹腔注射 0.5 ml 灭活破碎菌,对照组用同样方法注射等量灭菌生理盐水。于腹腔注射后第 0、3、6、9、12、15、18、21 天随机从各组中取 5 尾鱼,尾静脉采血。所采血液分为两份,一份不抗凝,取出后直接加至离心管中 4 °C 静置 2h,956 g 离心 10 min,取上层血清,用于各种生化指标的测定;另一份用无菌肝素钠抗凝,用于血细胞计数。

1.5 免疫指标测定

1)血细胞计数:参考赵维信(1992)的方法进行。2)血清生化指标测定:碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)和溶菌酶(LSZ)的测定采用南京建成生物工程研究所的试剂盒。血清总蛋白(TP)在 7020 全自动生化仪上测定。每一指标测定均重复两次。

1.6 统计分析

实验结果采用 SPSS 16.0 进行生物统计分析。以 t 检验进行差异显著性检验: $P>0.05$,不存在显著性差异; $0.01<P<0.05$,存在显著性差异,用 * 表示; $P<0.01$,存在极显著性差异,用 ** 表示。

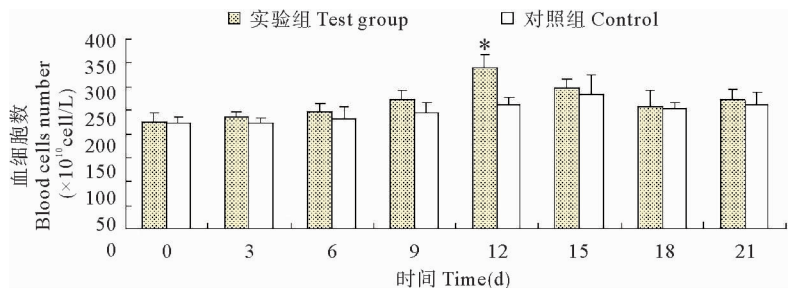
2 结果

2.1 注射灭活鲷鱼诺卡氏菌后乌鲢血细胞数的变化

乌鲢注射灭活鲷鱼诺卡氏菌后血细胞数的变化见图 1。乌鲢在受灭活鲷鱼诺卡氏菌刺激后其血细胞数呈先升高后降低的变化趋势,其中在 0~12 d 时实验组血细胞浓度有显著上升的趋势,之后降低。在注射灭活菌后第 12 天实验组血细胞数显著高于对照组($P<0.05$),其值为 340.33×10^{10} cell/L,其他各时间点实验组与对照组间及实验组间差异不显著($P>0.05$)。

2.2 注射灭活鲷鱼诺卡氏菌后乌鲢血清碱性磷酸酶(AKP)的变化

乌鲢注射灭活鲷鱼诺卡氏菌后血清碱性磷酸酶的变化见图 2。由图 2 可知,乌鲢在注射灭活菌后 6 d 和 9 d 时其体内 AKP 活力分别出现了两次显著升高的过程。相比于对照组,实验组分别在第 6 天时出现显著性差异($P<0.05$)和第 9 天出现极显著性差异($P<0.01$),其余时间点均无显著性差异($P>0.05$)。其中实验组乌鲢血清 AKP

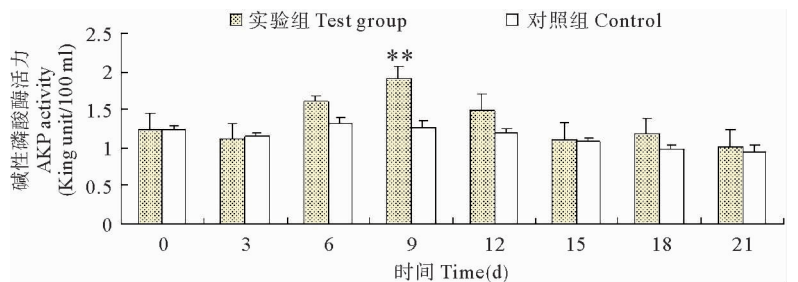


注: * 表示该实验组和对照组存在显著性差异($P<0.05$)

Note: * show significant difference between treatment and control ($P<0.05$)

图 1 注射灭活菌后不同时间乌鲢的血细胞数

Fig. 1 Variation in blood cell number of *C. argus* after injection of inactivated *N. serioleae*



注: * 表示该实验组和对照组存在显著性差异($P<0.05$),

** 表示该实验组和对照组存在极显著性差异($P<0.01$)

Note: * and ** show significant difference ($P<0.05$) or highly significant difference ($P<0.01$) between treatment and control, respectively

图 2 注射灭活菌后不同时间乌鲢的 AKP 活性

Fig. 2 Variation in AKP of *C. argus* after injection of inactivated *N. serioleae*

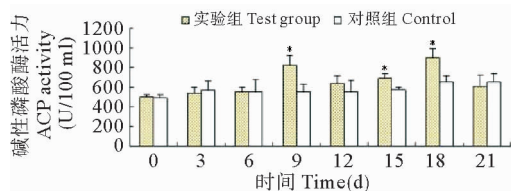
含量在第9天时达峰值,为1.91金氏单位/100 ml。

2.3 注射灭活鲮鱼诺卡氏菌后乌鲢血清酸性磷酸酶(ACP)的变化

乌鲢注射灭活鲮鱼诺卡氏菌后血清酸性磷酸酶的变化见图3。由图3可知,在注射灭活菌后第9、15、18天时,实验组血清酸性磷酸酶活性显著高于对照组($P < 0.05$),第12天时实验组 ACP 活性也高于对照组但无显著性差异($P > 0.05$),其余时间点均无显著性差异($P > 0.05$)。

2.4 注射灭活鲮鱼诺卡氏菌后乌鲢血清超氧化物歧化酶(SOD)的变化

乌鲢注射灭活鲮鱼诺卡氏菌后血清超氧化物歧化酶的变化见图4。由图4可得,注射灭活菌后乌鲢血清超氧化物歧化酶活性呈先降低后升高再降低的变化趋势,其中在12 d时有一个明显的升高过程。相比对照组,实验组乌鲢在注射灭活菌后第9、12、15、18天时其体内 SOD 均高于对照组,但仅第12天时实验组显著高于对照组($P < 0.05$),其他组无显著性差异($P > 0.05$)。

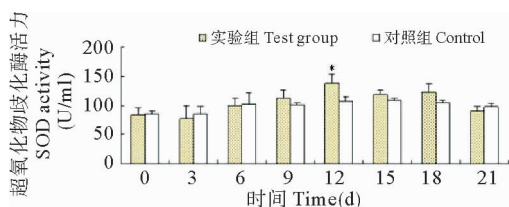


注: * 表示该实验组和对照组存在显著性差异($P < 0.05$)

Note: * show significant difference between treatment and control ($P < 0.05$)

图3 注射灭活菌后不同时间乌鲢的 ACP 活性

Fig. 3 Variation in ACP of *C. argus* after injection of inactivated *N. serioleae*



注: * 表示该实验组和对照组存在显著性差异($P < 0.05$)

Note: * show significant difference between treatment and control ($P < 0.05$)

图4 注射灭活菌后不同时间乌鲢的 SOD 活性

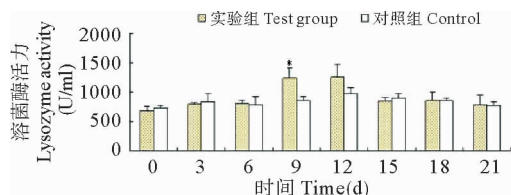
Fig. 4 Variation in SOD of *C. argus* after injection of inactivated *N. serioleae*

2.5 注射灭活鲮鱼诺卡氏菌后乌鲢血清溶菌酶(LSZ)的变化

乌鲢注射灭活鲮鱼诺卡氏菌后血清溶菌酶的变化见图5。与对照组相比,实验组乌鲢血清溶菌酶活性呈先降低后升高再降低的变化趋势,但仅第9天时实验组血清溶菌酶活性显著高于对照组($P < 0.05$),其他实验时间点均无显著性差异($P > 0.05$)。

2.6 注射灭活鲮鱼诺卡氏菌后乌鲢血清总蛋白(TP)的变化

乌鲢注射灭活鲮鱼诺卡氏菌后血清总蛋白的变化见图6。由图6可见,实验组从第9天开始直至第21天,

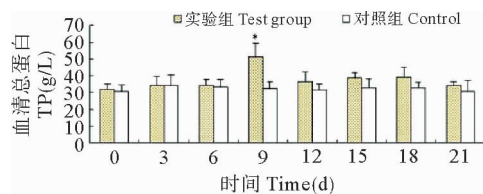


注: * 表示该实验组和对照组存在显著性差异($P < 0.05$)

Note: * show significant difference between treatment and control ($P < 0.05$)

图5 注射灭活菌后不同时间乌鲢的 LSZ 活性

Fig. 5 Variation in LSZ of *C. argus* after injection of inactivated *N. serioleae*



注: * 表示该实验组和对照组存在显著性差异($P < 0.05$)

Note: * show significant difference between treatment and control ($P < 0.05$)

图6 注射灭活菌后不同时间乌鲢的 TP 活性

Fig. 6 Variation in TP of *C. argus* after injection of inactivated *N. serioleae*

乌鲢血清总蛋白均高于对照组;但仅在第9天时显著高于对照组($P < 0.05$),其他时间点均无显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

鱼类作为较低等的脊椎动物,其非特异性防御机制在免疫抗病方面扮演着重要角色。众多的研究表明,鱼类的非特异性免疫可在微生物入侵时短时间内即发挥有效清除、降解等作用。单红等(2005)用灭活嗜水气单胞菌疫苗免疫南方鲇,研究发现,灭活菌苗诱导受试鱼早期防御能力的提高主要表现在非特异性细胞免疫方面;罗芬等(2010)在研究灭活菌苗免疫的中华倒刺鲃外周血免疫指标的变化时也证实,免疫早期(7d)灭活菌苗主要是通过促进中华倒刺鲃血细胞增殖,提高吞噬细胞的吞噬活力等非特异性细胞免疫起作用的。本研究的结果也表明,注射灭活鲱鱼诺卡氏菌后21d内乌鲢血细胞数量,血清中碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶以及血清总蛋白等非特异性免疫指标也均出现了明显的变化。

自Siegel等(1981)首次提出了“红细胞免疫系统”的概念之后,很多的研究也证实了水产动物如鲤 *Cyprinus carpio* Linnaeus、金鱼 *Carcassius auratus* Linnaeus 和草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* Cuvieret Valenciennes 红细胞的免疫作用,观察到许多鱼类不仅其白细胞具有捕捉并消化外来异物的功能,其红细胞也具有吞噬异物、分泌活性物质、参与机体伤口修复等功能(冯来坤等 1992;王旭东等 1996)。本研究结果显示,乌鲢在受到灭活鲱鱼诺卡氏菌的刺激后其血细胞数短期内呈现显著升高的现象,说明乌鲢免疫清除作用加强,这与高冬梅等(2003)用灭活鳗弧菌免疫牙鲆免疫虹鳟,Chen等(1996)用 *Mycobacterium* spp. 胞外产物免疫虹鳟所得研究结果一致。

碱性磷酸酶(AKP)和酸性磷酸酶(ACP)是动物体内参与免疫防御的两种重要水解酶。郭伟荣等(2011)用鳗弧菌感染花鲈后发现,实验组在注射鳗弧菌60h时AKP活性显著升高,在60~108h内ACP活性显著升高;张梁等(2006)用蛭弧菌免疫草鱼测定相关酶活性发现,实验组与对照组相比,其血清中AKP活性在21d时显著升高,ACP活性在21d和42d时均显著升高。认为AKP可催化有机磷酸酯水解,打开磷酸酯释放磷酸离子,通过改变细菌表面结构增强其异己性,从而更好地被动物体内的吞噬细胞吞噬降解。ACP的升高则意味着巨噬细胞被激活,动物体内的应激水平得到提升。本研究结果也表明,灭活鲱鱼诺卡氏菌的刺激会使乌鲢血清碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性产生显著增强,提高乌鲢的防御能力。

超氧化物歧化酶主要是去除动物体液或组织中的超氧基,从而起到减少或去除超氧基氧化破坏动物细胞膜或细胞内还原性活性成分的作用。高冬梅等(2003)、孟凡伦等(1999)、牟海津等(1999)等用灭活鳗弧菌和免疫多糖注射牙鲆、南美白对虾、扇贝后,发现这些动物血清中的SOD活性均有不同程度的提高,认为超氧化物歧化酶的活性与病原菌生物的入侵及生物的免疫水平密切相关。本研究也显示,乌鲢注射灭活鲱鱼诺卡氏菌后第9天开始,其血清超氧化物歧化酶的活性较对照组都有所增高,在第12天时达到峰值,说明灭活鲱鱼诺卡氏菌能刺激乌鲢产生大量超氧阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 等氧化自由基,从而提高乌鲢的抗氧化性和免疫能力。

血清溶菌酶主要由单核细胞和粒细胞产生,它不仅能水解革兰氏阳性细菌细胞壁中的粘肽,破坏和消除侵入体内的异物,而且还可改善和增强巨噬细胞的消化功能,增强机体抵抗力(符莉芳 2008)。Siwicki等(1987)用产碱假单胞菌 *Pseudomonas alcaligenes* 和斑点气单胞菌 *Aeromonas punctata* 感染鲤鱼,发现感染7d和14d时其血清溶菌酶活性提高极为显著。本研究结果也表明,灭活鲱鱼诺卡氏菌能刺激乌鲢分泌溶菌酶,增强鱼体的吞噬活力。

血清总蛋白包括白蛋白和球蛋白,它们在维持血浆胶体渗透压、物质运输、体内酸碱度平衡、机体免疫等方面起着重要的作用(陈晓耘 2000)。Chu等(1993)和Camino等(2000)研究发现,被 *Perkinsus marinus* 感染的牡蛎和被 *P. atlanticus* 感染的蛤都表现出血清蛋白浓度升高现象。本研究结果亦显示,注射灭活鲱鱼诺卡氏菌9d后乌鲢血清蛋白含量均高于对照组,说明机体受刺激后特异性多肽合成增加,血清中溶菌物质和杀菌物质含量升高,机体体液免疫反应增强。

参 考 文 献

- 王国良,徐益军,金 珊,祝璟琳,朱文渊. 2009. 养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究. 水生生物学报, 33(2): 277-283
- 王旭东,饶家荣. 1996. 红细胞广泛吞噬作用的发现和研究. 水产学报, 20(1): 72-75
- 冯来坤,伊 栋,刘玉斌,冯怀亮,梁焕春. 1992. 鱼类红细胞免疫功能的初步研究. 鱼类病害研究, 14(1): 11-12
- 牟海津,江晓路,刘树青,管华诗. 1999. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响. 青岛海洋大学学报, 29(3): 463-468
- 张 梁,沈建忠,敖茂权,张我松. 2006. 蛭弧菌对草鱼免疫相关酶活性的影响. 江西农业大学学报, 28(2): 296-299
- 陈晓耘. 2000. 鱼类的血液. 重庆师专学报, 19(3):70-73
- 单 红,张其中,刘强平,赵海涛,周晓扬,冉江波. 2005. 灭活菌苗免疫的南方鲈外周血液细胞免疫指标的变化. 中国水产科学, 12(3): 275-280
- 罗 芬,张其中,冯汉茹,朱成科,袁 娟,组 超. 2010. 灭活菌苗免疫的中华倒刺鲃外周血免疫指标的变化. 水产学报, 34(4): 626-634
- 孟凡伦,马桂荣,孔 健. 1999. 乳链球菌 SB900 肽聚糖对中国对虾免疫功能的影响. 山东大学学报(自然科学版), 34(1): 88-93
- 赵维信. 1992. 鱼类生理学. 北京: 高等教育出版社, 212-215
- 高冬梅. 2003. 鳃弧菌疫苗对牙鲆和鲈鱼免疫效果研究. 见: 中国海洋大学硕士研究生学位论文
- 郭伟荣,刘利平,张宗峰,林 升. 2011. 感染鳃弧菌对花鲈非特异性免疫功能的影响. 上海海洋大学学报, 20(1): 89-95
- 符莉芳. 2008. 溶菌酶的研究进展. 浙江预防医学, 20(4):56-59
- Chen SC, Yoshida T, Adams A and 2 others. 1996. Immune response of rainbow trout to extracellular products of *Mycobacterium* spp. Journal of Aquatic Animal Health 8(3): 216-222
- Chu FLE, La Peyre JF. 1993. Development of disease caused by the parasite *Perkinsus marinus* and defense-related hemolymph factors in three populations of oysters from the Chesapeake Bay, USA. Journal of Shellfish Research 12: 21-27
- Itano T, Kawakami H, Kono T, Sakai M. 2006. Live vaccine trials against nocardiosis in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Aquaculture 261(4): 1 175-1 180
- Kusuda R. 1987. Direct and indirect fluorescent antibody identification of yellowtail pathogens. Bulletin of the Japaneses Society of Scientific Fisheries 53(3): 389-394
- Ordás MC,Ordás A,Beloso C,Figueras A. 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus altanticus*. Fish and Shellfish Immunology 10(7): 597-609
- Siegel I, Liu TL, Gleicher N. 1981. The red cell immune system. Lancet 12(2): 556-559
- Siwicki A, Studnicka M. 1987. The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. Journal of Fish Biology 31(Supplement A): 57-60
- Valdez IE, Conroy DA. 1963. The study of a tuberculosis-like condition in Neon tetras (*Hyphessobrycon innessi*). II. Characteristics of the bacterium isolated. Microbiologia Espanola 16: 249-253