

文章编号 : 1004 - 7271(2003)03 - 0238 - 05

中华鳖温和气单胞菌病对其免疫功能的影响

付立霞, 蔡完其, 刘至治

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要 : 从红细胞 C_3b 受体花环率、红细胞免疫复合物花环率、红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环率、T 淋巴细胞活性 E 花环率及白细胞吞噬活性五方面, 比较了患病鳖和健康鳖在免疫功能上的差异。结果表明, 在红细胞 C_3b 受体花环率、T 淋巴细胞活性 E 花环率及白细胞吞噬活性方面, 患病鳖极显著地低于健康鳖 ($t < 0.01$); 在红细胞天然免疫粘附肿瘤花环率上, 患病鳖显著低于健康鳖 ($t < 0.05$); 而在红细胞免疫复合物花环率方面, 患病鳖极显著地高于健康鳖 ($t < 0.01$)。综上可知, 由于受到病原的侵袭, 患病鳖的免疫功能明显下降。

关键词 : 中华鳖, 温和气单胞菌病, 免疫功能

中图分类号 : S947.1 文献标识码 : A

The influence of *Aeromonas sobria* disease on the immune function of *Trionyx sinensis*

FU Li-xia, CAI Wan-qi, LIU Zhi-zhi

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract : The variations of immune function were studied between diseased soft-shelled turtle and healthy soft-shelled turtle from five aspects. The results were as follows : (1) the percentage of erythrocyte C_3b receptor rosette, the percentage of erythrocyte active rosette (EaR) of T lymphocyte and activity of leukocyte phagocyte, there were highly significant difference between diseased soft-shelled turtle and healthy soft-shelled turtle ($t < 0.01$). (2) the percentage of erythrocyte native immune adhering tumor cell rosette of the diseased soft-shelled turtle was significantly lower than that of healthy soft-shelled turtle ($t < 0.05$). (3) the percentage of erythrocyte immune complex rosette of the diseased soft-shelled turtle was very significantly higher than that of healthy soft-shelled turtle ($t < 0.01$). From above all, it can be seen that the immune function of the diseased soft-shelled turtle was seriously decreased because of the disease attack.

Key words : soft-shelled turtle, *Aeromonas sobria* disease, immune function

中华鳖温和气单胞菌病是由温和气单胞菌感染引起的一种细菌性疾病, 温室中饲养 40d 左右的稚

收稿日期 2003-04-11

基金项目 : 上海市水产办“中华鳖养殖业持续发展研究”项目(科 0095)

作者简介 : 付立霞(1978 -)男, 湖北洪湖人, 上海水产大学 2000 级硕士生, 从事水产动物医学研究。

通讯作者 : 蔡完其(1939 -)女, 浙江鄞县人, 教授, 博士生导师, 从事水产动物病理与抗逆育种的研究。E-mail : Lisifak@online.sh.cn

鳖至成鳖均可患病,感染率高,而且迁延不愈,病重时可使鳖死亡,即使存活下来的鳖也因此失去商品价值,给生产单位造成巨大损失。本文通过对健康鳖与患病鳖免疫指标的测定,分析了该病对中华鳖免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

健康鳖、患病鳖均来自上海市崇明县东风养鳖场的同一温室的不同鳖池,各取 40 只,体重 150 ~ 250g。患病鳖症状明显,健康鳖健壮活泼。

致敏酵母、肿瘤细胞(S180,艾氏腹水癌细胞)购自第二军医大学长海医院血站,-20℃保存。

温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*),由本实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 红细胞 C₃b 受体花环试验

参照郭峰等的方法^[1]。①红细胞悬液的制备。将鳖断头,取血 4~5 滴,用 0.85% 的生理盐水洗涤、离心(2000 r/min,5min)两次,取沉淀物用显微记数法配制成浓度为 1.25×10^7 个/mL 的红细胞悬液;②致敏酵母的处理。用少量的生理盐水溶解致敏酵母,然后洗涤,离心一次(2000 r/min,5min),弃上清液,用生理盐水配成 1×10^8 个/mL 的致敏酵母悬液。红细胞和致敏酵母在配置的过程中要充分混匀,使其在显微镜下呈单个分散状态;③C₃b 受体花环的形成。将致敏酵母悬液与红细胞悬液各 100 μ L 等量混合,28℃水浴孵育 30 分钟后,加 200 μ L 生理盐水稀释,用 50 μ L 0.25% 戊二醛固定,轻轻单向摇匀;④玻片制备及镜检与计数。每只鳖制备 3 片,涂片薄而均匀,冷风吹干,甲醇固定 3min,瑞氏染色液染色 5min,全片记数,以 200 个红细胞为单位,计算形成红细胞 C₃b 受体花环的百分率(一个红细胞粘附 2 个或 2 个以上致敏酵母为 1 个花环),作为 C₃b 受体活性的指标。

1.2.2 红细胞免疫复合物(IC)花环试验

与红细胞 C₃b 受体花环试验基本相同,只是以酵母多糖代替致敏酵母进行试验。

1.2.3 红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环试验

参照沈关心和周汝麟^[2]的方法进行。①红细胞悬液制备。方法同“红细胞 C₃b 受体花环试验”,配制成浓度为 1×10^8 个/mL 的红细胞悬液;②肿瘤细胞的处理。冰冻艾氏腹水癌细胞加蒸馏水充分吹打溶解(在 37℃水浴中),移入离心管后加 8~9mL 蒸馏水,充分混匀,离心(2000 r/min,5min),倒尽上清液,加 1~1.5mL 生理盐水,充分混匀,配成 1×10^6 个/mL 的肿瘤细胞悬液;③自身血浆的制备。新鲜枸橼酸(3.8%)抗凝血 1mL(血:枸橼酸=9:1),离心(2000 r/min,5min),取上清液(即血浆)备用;④肿瘤细胞花环的形成。取 100 μ L 肿瘤细胞悬液、50 μ L 自身血浆和 50 μ L 红细胞悬液,充分混匀,28℃水浴孵育 30min 后,轻轻单向摇匀,加 50 μ L 0.25% 戊二醛固定,单向摇匀;⑤玻片制备及镜检与计数。同上述红细胞 C₃b 受体花环率方法。

1.2.4 白细胞吞噬活性试验

参照蔡完其等的方法^[3]。①玻片制备。取鳖血 1mL 于肝素处理过的离心管中,摇匀。加入等量的温和气单胞菌菌液(6×10^8 个/mL),摇匀,置 28℃水浴 30min(每 10min 摇一次)。取出后,1500 r/min 水平离心 5min,弃上清液,吸取沉淀的表层制成血涂片(每只鳖 3 片);②镜检计数。在油镜下,全片记数,根据公式(吞噬百分率 = 吞噬有细菌的白细胞/观察的白细胞总数 $\times 100\%$)求得该鳖的白细胞吞噬率。

1.2.5 T 淋巴细胞活性 E 花环试验

参照文献李振林^[4]和杜念兴^[5]的方法。①淋巴细胞悬液制备。取鳖血 1~2mL 于肝素处理过的离心管中,摇匀,接着加入等量的 Hanks 液稀释,摇匀。在另一只离心管中加入 1mL 淋巴细胞分离液,将稀释后的鳖血 2mL 沿着管壁缓缓加于淋巴细胞分离液上,水平离心(3000 r/min,15min)后,吸取淋巴细胞层,以 5 倍体积的 Hanks 液洗涤(1500 r/min,10min)两次,显微计数,以 Hanks 液配成 3×10^6 个/mL 的淋

巴细胞悬液 ②SRBC 悬液制备。取绵羊红细胞(SRBC)以阿氏液保存,SRBC:阿氏液=1:2),以 Hanks 液洗涤(1500 r/min,10min)三次,配成 6×10^7 个/mL 的 SRBC 悬液 ③玻片制备及镜检与记数。取淋巴细胞和 SRBC 悬液各 100 μ L,小牛血清 50 μ L,单相摇匀,立即离心(500 r/min,5min),单相摇匀,使沉下的细胞重新摇匀,加 100 μ L 0.25%戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定 15min。单相摇匀,涂片。染色、记数同红细胞 C₃b 受体花环试验方法。

1.3 数据处理

用 SPSS11.0(Statistical Package for Social Sciences)统计软件^[6]中的独立性 t 检验对健康鳖和患病鳖的各项免疫测定指标进行分析。

2 结果

2.1 红细胞 C₃b 受体花环

健康鳖和患病鳖的红细胞均能为致敏酵母形成 C₃b 受体花环,花环百分率大小为:健康鳖 $11.32\% \pm 1.46\%$,患病鳖 $7.65\% \pm 1.75\%$ (表 1),二者差异极显著($t < 0.01$)。

2.2 红细胞免疫复合物(IC)花环试验

与红细胞 C₃b 受体花环率相反,红细胞免疫复合物花环百分率大小为:健康鳖 $3.55\% \pm 1.53\% <$ 患病鳖 $6.28\% \pm 1.48\%$ (表 1),患病鳖极显著地高于健康鳖($t < 0.01$)。

表 1 健康鳖和患病鳖免疫指标比较(均值 \pm 标准差)

Tab.1 Comparison on the immune indexes between the healthy soft-shelled turtle and diseased soft-shelled turtle ($\bar{X} \pm SD$)

| | 健康鳖 | 患病鳖 |
|----------------------------------|------------------|------------------|
| 红细胞 C ₃ b 受体花环率(n=20) | 11.32 \pm 1.46 | 7.65 \pm 1.75 |
| 红细胞免疫复合物花环率(n=20) | 3.55 \pm 1.53 | 6.28 \pm 1.48 |
| 红细胞天然粘附肿瘤细胞花环率(n=20) | 5.16 \pm 1.28 | 3.97 \pm 1.52 |
| T 淋巴细胞活性 E 花环率(n=20) | 18.35 \pm 2.01 | 16.37 \pm 2.41 |
| 白细胞吞噬率(n=20) | 31.95 \pm 4.25 | 24.45 \pm 4.02 |

2.3 红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环试验

健康鳖和患病鳖的红细胞均能与肿瘤细胞形成花环。健康鳖的花环百分率为 $5.16\% \pm 1.28\%$,患病鳖为 $3.97\% \pm 1.52\%$ (表 1),二者差异显著($t < 0.05$)。

2.4 T 淋巴细胞活性 E 花环

健康鳖和患病鳖的 T 淋巴细胞均能与绵羊红细胞形成活性 E 花环,花环百分率大小为:健康鳖 $18.35\% \pm 2.01\% >$ 患病鳖 $16.37\% \pm 2.41\%$ (表 1),二者差异极显著($t < 0.01$)。

2.5 白细胞吞噬试验

健康鳖和患病鳖的白细胞均能吞噬温和气单胞菌。健康鳖的白细胞吞噬百分率($31.95\% \pm 4.25\%$)极显著地高于患病鳖($24.45\% \pm 4.02\%$)($t < 0.01$)表 1)。

3 讨论

3.1 疾病对红细胞免疫功能的影响

SiegeL 等^[7]的研究表明,红细胞除具有携氧、运输气体等功能外,还具有重要的免疫功能,且红细胞免疫系统概念至少适用于哺乳动物,而非灵长类独有。20 世纪 90 年代以来,我国学者在鱼类红细胞和

免疫方面进行了不少的研究,证实了鱼类的红细胞同样具有免疫功能,且这种功能存在种间、种群间及群体间的差异^[3,8-10],但关于疾病对水产动物红细胞免疫功能的影响尚未见报道。

红细胞免疫功能主要通过红细胞表面的 C₃b 受体来实现的。红细胞 C₃b 受体总数与白细胞受体总数为 20:1,血液中 95% 的 C₃b 受体位于红细胞上,故接触免疫复合物的机会比白细胞大 500~1000 倍。在运载和清除免疫复合物方面起着重要作用。通过 C₃b 受体花环和免疫复合物(IC)的形成,血液中的异物(如病原微生物)被红细胞所粘附,随血液被运输到肝、脾等器官,由吞噬细胞吞噬并排出体外,从而降低了异物对机体的危害^[7]。

在临床上,许多疾病(如免疫性疾病、恶性肿瘤、手术和创伤等)都伴有红细胞免疫功能的变化^[11,12]。本研究中,我们发现,受温和气单胞菌感染的患病鳖,其红细胞 C₃b 受体花环率、红细胞天然粘附肿瘤细胞花环率比健康鳖分别下降了 32.42% 和 23.06%,说明患病鳖的红细胞免疫吸附能力显著下降。与此相反,患病鳖的红细胞免疫复合物花环率极显著地高于健康鳖($t < 0.01$),表明机体消除免疫复合物的能力较差,造成有较多的免疫复合物粘附在红细胞膜上,这也是红细胞免疫功能呈继发性下降的一个指标。此外,笔者在其它试验中还发现,受温和气单胞菌感染的患病鳖,其红细胞数量平均要比健康鳖下降 40.14%,且个体间的变化差异甚大,病情较轻的个体,红细胞数量较多(6.41×10^7 个/mL),病重的个体,红细胞数量则急剧下降(1.83×10^7 个/mL),前者是后者的 3.5 倍;而健康鳖的红细胞数量较多的个体(1.1×10^8 个/mL)又为较少个体(6.07×10^7 个/mL)的 1.8 倍^①,这表明温和气单胞菌的侵袭使患病鳖的生理机能发生了明显改变。红细胞数量的下降,一方面降低了生病鳖体内的 O₂ 及 CO₂ 的运输能力,影响了机体的正常新陈代谢,降低了抗感染能力;另一方面,这种改变,也从红细胞免疫功能上表现出来。综上所述,由于受到病原的侵袭,患病鳖的红细胞免疫功能显著下降。

3.2 疾病对 T 淋巴细胞活性和白细胞吞噬活性的影响

人和高等动物的 T 淋巴细胞表面具有红细胞受体(E 受体),能与异种或同种动物的红细胞结合,形成玫瑰花环,称为 E 玫瑰花环。通过检测活性 E 花环率,可以准确地了解机体的 T 淋巴细胞的功能状态,而常规的 E 玫瑰花环试验仅能反映出淋巴细胞中 T 淋巴细胞的数量^[4]。由表 1 可知,患病鳖的 T 淋巴细胞活性 E 花环率为($16.37\% \pm 2.41\%$),比健康鳖降低了 10.79%,极显著地低于健康鳖($18.35\% \pm 2.01\%$) ($t < 0.01$),说明由于受到疾病的侵扰,患病鳖的 T 淋巴细胞的活性降低,这从另一方面说明了患病鳖机体细胞免疫功能低下。

白细胞吞噬是鳖的免疫功能的重要组成部分,它具有吞噬和消灭病原微生物的作用。鉴于温和气单胞菌为本病的致病菌,因此,在相同条件下了解健康鳖和患病鳖的白细胞对温和气单胞菌吞噬能力的强弱,有助于了解它们的免疫状况。研究表明,患病鳖的白细胞对温和气单胞菌的吞噬率比健康鳖平均降低了 23.4%,差异极显著($t < 0.01$)表明患病鳖对该菌具有易感性。而且由于抵抗力低下,更易合并感染,造成并发症,这与生产上的观察相一致。

3.3 免疫指标变化对疾病诊断和治疗的意义

免疫指标的变化在不同的疾病和疾病的不同阶段不尽一致^[13-17],甚至在不同的个体和个体不同的年龄阶段,这种变化也不一致^[18]。临床上,通过测定一些免疫指标,可以了解机体的免疫状况,为诊断和治疗提供依据,这其中的关键便是确定对照组的阈值范围。本试验中,由于中华鳖个体的差异和病情程度的不同,患病鳖在红细胞 C₃b 受体花环率、红细胞免疫复合物花环率、红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环率、T 淋巴细胞活性 E 花环率及白细胞吞噬活性等方面的数值范围与对照组均有不同程度的重合。在红细胞 C₃b 受体花环率、红细胞免疫复合物花环率、红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环率、T 淋巴细胞活性 E 花环率及白细胞吞噬率、患病鳖与健康鳖的重合区间大小分别为 2.18%, 2.26%, 4.24%, 4.87%, 10.57%。相比之下,红细胞 C₃ 受体花环和红细胞免疫复合物花环较少受到个体差异和病情程度的影响,可作为该病诊断的主要指标。红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环、T 淋巴细胞活性 E

① 付立霞. 中华鳖温和气单胞菌病研究. 上海水产大学硕士学位论文(D). 2003. A.

花环及白细胞吞噬率则可作为辅助诊断的指标。

在取材和试验过程中,得到了本研究室的轩兴荣、杨怀宇、刘志国和上海水产大学 1999 级生物技术班的黄玲璘、邓唯唯的许多帮助,谨致谢忱!

参考文献:

- [1] 郭 峰,虞紫茜,赵中平.红细胞免疫功能的初步研究[J].中华医学杂志,1982,62(12):715-716.
- [2] 沈关心,周汝麟主编.现代免疫学实验技术[M].武汉:湖北科学技术出版社,2002.301-303,429-430.
- [3] 蔡完其,孙佩芳.三种鲫鱼对暴发性鱼病的抗病力[J].水产学报,1993,17(1):44-51.
- [4] 李振林.微生物学及其检验技术[M].广东:广东科技出版社,1993.68-69,536-539.
- [5] 杜念兴.兽医免疫学[M].北京:中国农业出版社,1995.31,59-66,210-213.
- [6] 陈平雁,黄浙明主编.SPSS 10.0 统计软件应用教程[M].北京:人民军医出版社,2002.102-107.
- [7] Siegel I, Lin T L, Gleichen N. The red cell immune system[J]. Lancet, 1981, 2: 556-559.
- [8] 蔡完其,孙佩芳.三种鲤对暴发性鱼病抗病力的差异[J].水产学报,1994,18(4):290-295.
- [9] 蔡完其,孙佩芳.“四大家鱼”对暴发性鱼病的抵抗力的种间差异[J].中国水产科学,1995,(2):71-77.
- [10] 蔡完其,宫兴文,孙佩芳.中华鳖太湖群体和台湾群体非特异性免疫功能比较[J].水生生物学报,2001,25(1):95-97.
- [11] 张秋业,董增义,董争鸣,等.原发性肾病综合症红细胞免疫功能的初步观察[J].中华儿科杂志,1996,34(2):101.
- [12] 宋德余,李鲁全,李占元,等.胃癌大肠癌病人手术前后红细胞免疫功能的动态研究[J].齐鲁肿瘤杂志,1997,4(3):175.
- [13] 曲少莲,许 静,杨长春,等.喘息性支气管炎、哮喘及肺炎患儿红细胞免疫功能变化的比较[J].滨州医学院学报,2002,25(4):246-248.
- [14] 赵怀顺,魏虎来,李兰庆,等.生物治疗对白血病患者细胞免疫功能的影响[J].兰州医学院学报,1996,22(1):39-40.
- [15] 苏德永,邓维琴,谭文慧.T 淋巴细胞花环试验与复发性口腔溃疡关系的探讨[J].职业卫生与病伤,2000,15(1):52-53.
- [16] 陈菊滢.肿瘤患者红细胞免疫粘附及白细胞吞噬力的初步观察[J].实用医学杂志,1992,8(5):46-47.
- [17] 余叶蓉,梁苾忠.糖尿病人白细胞吞噬功能的研究[J].华西医科大学学报,1994,25(2):134-137.
- [18] 杜智敏,刘崇礼.高海拔地区不同年龄正常人红细胞免疫功能测定及分析[J].高原医学杂志,1999,9(1):38-39.