

鱼类感染刺激隐核虫的免疫保护机制

陈小玲, 黄志清 (福建师范大学生命科学学院, 福建福州 350108)

摘要 刺激隐核虫病是海水名优鱼类养殖中的常见寄生虫病, 鱼类感染该病后, 自身会产生一系列的免疫保护反应。笔者综述了刺激隐核虫诱导鱼类发生免疫保护、免疫反应机制以及刺激隐核虫疫苗的研究现状, 以期防治该病提供理论依据。

关键词 鱼类; 刺激隐核虫; 免疫保护; 疫苗

中图分类号 S941.51 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)12-05521-02

The Immune Protection Mechanism of Infection of Fishes to the Diseases of *Cryptocaryon irritans*

CHEN Xiao-ling et al (College of life sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108)

Abstract *Cryptocaryon irritans* is the common parasites of the breeding of domestic seawater famous fish. The infection of fishes to the *Cryptocaryon irritans* can induce immune protection effects to some certain. The paper reviewed the immune protective of fishes against *Cryptocaryon irritans*, mechanisms of immune response and the research updates on *Cryptocaryon irritans* vaccine.

Key words Fishes; *Cryptocaryon irritans*; Immune protective; Vaccine

近年来, 我国海水鱼类养殖的发展非常迅速, 但随之侵害海水鱼类养殖的病害问题也日益突出, 主要包括寄生虫病、细菌病、真菌病和病毒病等, 而致病力最强的寄生虫为刺激隐核虫。刺激隐核虫最早是1937年由日本学者Sikana在海水观赏鱼上发现的^[1], 之后对刺激隐核虫仅有零星的报道^[2-3]。但随着海水养殖集约化程度的逐渐提高和养殖密度的加大, 刺激隐核虫引起海水鱼类养殖病害的问题, 越来越严重。研究表明, 被刺激隐核虫感染的石斑鱼、大黄鱼和卵形鲳鲹的死亡率, 分别高达50%、75%和100%^[4], 给渔业养殖生产造成了巨大的损失^[5]。

国内外学者对刺激隐核虫的研究工作主要集中在虫体的地理分布、形态结构、生长发育、传播形式、宿主的免疫、组织病理学以及防治措施等方面。鱼类对刺激隐核虫的免疫保护机制, 至今还不十分清楚, 但国内外学者已渐渐在粘膜免疫、主动免疫和被动免疫等方面展开了研究^[4,6-7]。笔者概述了刺激隐核虫免疫方面的最新研究进展, 指出了未来疫苗开发的发展方向, 旨在为有效防治刺激隐核虫病提供理论依据。

1 宿主的免疫反应

鱼类被刺激隐核虫侵染时, 会产生免疫保护反应, 但迄今为止, 刺激隐核虫引起鱼发生抵抗性免疫反应的机制, 还不是很清楚。有研究表明, 在鱼类抗刺激隐核虫感染的免疫反应中, 皮肤免疫和系统免疫共同参与了免疫反应, 并能产生免疫记忆, 当宿主再次被感染时, 会产生很好的免疫保护效果^[4], 这提示免疫防疫, 可能将是控制该病最有前景的途径。

1.1 粘膜免疫 鱼类的粘膜免疫组织主要包括皮肤、鳃及肠道, 这些组织中分布有各种免疫细胞, 使其具有独立完成局部免疫应答的能力^[8]。因而其不仅是物理屏障, 而且在局部免疫应答中, 对抵御病原体也起到非常重要的作用^[9]。近年来, 随着鱼类粘膜免疫系统对疾病抵抗的重要性, 逐渐为人们所认识, 加之市场对口服疫苗及浸泡疫苗的需要, 粘膜

免疫系统的研究, 逐渐得到了越来越多学者的关注^[10]。一些学者以斜带石斑鱼为研究对象, 建立了皮肤体外培养模型, 从粘膜免疫组织和免疫细胞的分布, 来研究其在鱼的粘膜免疫应答中的作用。研究表明, 皮肤、鳃及后肠是石斑鱼的主要粘膜免疫组织, 分布有单核细胞、巨嗜细胞、粒细胞、淋巴细胞等免疫细胞, 具有可以不依赖系统免疫而独立完成免疫应答的细胞基础^[4]。滕楠^[6]用刺激隐核虫幼虫, 对卵形鲳鲹分别采用体表感染活幼虫、腹腔注射活幼虫和腹腔注射死幼虫三种方式, 进行免疫, 发现体表感染所产生的保护性, 比活虫注射强, 且皮肤抗体效价与相对保护强度和血清效价之间没有相关性。这些现象均表明, 鱼类的粘膜免疫系统是独立于系统免疫的, 这对进一步深入研究鱼类病害的防治及口服、浸泡疫苗的研制具有重要的意义。

1.2 宿主的主动免疫应答和免疫保护 目前对多子小瓜虫的免疫已开展了大量的研究^[5,11-12], 而刺激隐核虫的研究工作才刚刚开始。以往研究表明, 刺激隐核虫与多子小瓜虫具有很多相似的生活史、感染模式、病理特征等^[5,13], 因此鱼类对这两种纤毛虫的免疫防御机制, 可能有很多相似之处, 可以借鉴一些多子小瓜虫的免疫研究方法, 来对刺激隐核虫加以研究。Burgess等^[14]首次证明了乌头鳍(*Chelon labrosus*)可以对刺激隐核虫产生获得性免疫保护, 且保护力与感染强度和接触水平成正比。Yoshinaga等^[15]发现, 经刺激隐核虫免疫后, 底鳞鱼能产生抗血清。该血清在低效价时, 可使幼虫纤毛发生聚积, 游泳速度变慢; 在高效价时, 导致幼虫纤毛聚积成团, 并发生阻动效应, 而被免疫过的鱼则不会发生再次感染。罗晓春^[4]研究了斜带石斑鱼, 对刺激隐核虫的免疫应答反应, 发现无论是腹腔注射, 还是体表人工感染刺激隐核虫幼虫, 均能引起石斑鱼的保护性免疫应答, 并且发现免疫鱼的血清能阻动刺激隐核虫的幼虫。但学明^[7]用刺激隐核虫, 免疫卵形鲳鲹后, 发现免疫鱼对该寄生虫产生主动免疫反应, 并获得了相应的免疫保护, 这一发现对利用疫苗, 来防治该寄生虫提供理论依据。

1.3 宿主的被动免疫应答和免疫保护 鱼类的被动免疫研究工作已经开展很多年了, 防治的对象主要是鱼类的细菌和病毒, 如鳃弧菌^[16]、爱德华菌^[17]、鲁氏耶尔森菌^[18]、杀蛙气单胞菌^[19]、链球菌^[20]、感染性的造血坏死病毒^[21]以及感染性

作者简介 陈小玲(1977-), 女, 江西永新人, 博士, 讲师, 从事寄生虫病分子生物学研究。

收稿日期 2009-01-22

的沟贴病毒^[22]等。而用被动免疫方法来防治鱼类寄生虫病的研究还很少,有关刺激隐核虫的被动防御研究目前仅见一篇研究报道^[7]。但学明首次使用刺激隐核虫的外源性抗体(鱼抗血清、兔抗血清和鸡卵黄抗体)腹腔注射海水鱼卵形鲳鲀使被免疫鱼获得很好的免疫保护,证实了被动免疫方法防治该寄生虫的可行性。这为采用被动免疫方法,来防治海水鱼类刺激隐核虫病,提供了直接的依据。

2 免疫保护机制

鱼类对纤毛虫的侵染产生免疫保护作用的机制,还不是很清楚。目前研究最多的是鱼类对多子小瓜虫的免疫反应,主要的免疫应答机制是血清中的免疫球蛋白使其纤毛产生凝聚,对多子小瓜虫产生阻动作用^[5]。引起阻动的抗原为膜表面的一种蛋白,被称为阻动抗原,目前人们已成功分离到这类与阻动有关的抗原蛋白,该蛋白分子量大约在40~70 kD左右^[23-24]。罗晓春^[4]采用Western blot免疫印迹方法进行研究,结果发现,一年后,免疫鱼体血清和皮肤上的清液,能识别多子小瓜虫幼虫1条10 kD的未知蛋白带,其信号强于I-抗原的带。Yoshinaga等^[15]研究发现,免疫鲳鱼的血清能使刺激隐核虫幼虫阻动,并产生凝聚现象。罗晓春^[4]研究报道,石斑鱼和花尾胡椒鲷的免疫血清能引起刺激隐核虫幼虫阻动,并能使其裂解。而对于刺激隐核虫引起鱼类阻动免疫应答的抗原,目前还没有找到,免疫组化的结果发现,引起免疫应答的抗原,存在于膜表面,尤其是纤毛上^[4,7]。目前暨南大学正在进行相关的研究,已从刺激隐核虫幼虫的膜蛋白中分离出了一种46 kD的蛋白,Western杂交结果显示,这种蛋白与兔抗血清呈阳性,并能使免疫小鼠产生特异性阻动抗体。因此,可以推测这种蛋白很可能就是刺激隐核虫的阻动抗原^[7]。

3 疫苗开发

过去对白点病的治疗主要采用一些化学药物,如硫酸铜、奎宁、亚甲蓝、孔雀石绿、苯扎氯铵、苯氧乙醇、福尔马林等^[25-26]。言颖秀^[27]研究了三种抗球虫药物对刺激隐核虫病的防治效果,结果表明口服抗球虫药能显著减少刺激隐核虫数目,增强鱼体抗病力。但学明^[7]也证实了,口服化学药物盐霉素钠,能对实验鱼起到明显的保护作用。但是长期使用这些药物,不但会使寄生虫产生抗药性,而且会对环境造成了污染,更严重的是,大量药物残留在食用鱼体内,间接危害人体健康。刺激隐核虫主要生长在宿主的上皮层内,与宿主关系密切,研制出一种有效的刺激隐核虫疫苗,将成为较为理想选择。截止到目前,虽然还没有一种市场化的刺激隐核虫疫苗,但是实验室疫苗的研制正在逐渐开展。大量实验研究表明,活体接种刺激隐核虫能对宿主起到很好的免疫保护作用^[4,6-7]。此外,对于刺激隐核虫的体外长期保存、培养的方法也有了新的突破,这对于长期获取抗原来制作疫苗提供了保障^[7]。今后防治刺激隐核虫病的研究思路是,首先获得刺激隐核虫的表面阻动抗原蛋白,进行基因分析,然后通过分子生物学技术生产基因工程疫苗。

4 展望

刺激隐核虫病对渔业发展危害巨大,并且防治难度较大,因此刺激隐核虫病的防治,将成为将来渔业发展研究的

重点。目前对刺激隐核虫的研究,主要集中在自然感染或发病时的病原生物学和流行病学研究^[28],实验性感染、分类地位、地理分布、生活史和传播方面。为获得足够的寄生虫研究材料,提高寄生虫产量,人们开始以卵形鲳鲀为研究对象,建立了一套高效的刺激隐核虫传代系统,并且找到一条在低温条件下,保存刺激隐核虫的方法^[7]。但关于刺激隐核虫,还有许多方面还需要进一步深入研究,如获得刺激隐核虫的主要表面抗原、免疫反应机制、疫苗的研制和开发等许多方面。随着分子生物学技术的迅速发展,基因工程方法的引入,有望促进刺激隐核虫抗原以及宿主免疫机制等方面,取得新的进展,为刺激隐核虫病的有效防治,渔业的健康发展提供安全保障。

参考文献

- [1] SKAMA Y. Preliminary report on white spot disease in marine fishes[J]. *Suisan Gakkaishi*, 1937, 7: 149-160.
- [2] NIGRELLI R F, RUGGERI G D. Eizootics in the New York Aquarium caused by *Gyrodactylus irritans* Brown, 1951 (= *Ichthyophthirius nainus* Skana, 1961), a ciliated ciliate in the skin, eyes, and gills of marine fishes[J]. *Zoologica*, 1966, 51: 97-102.
- [3] WILKE D W, GORDIN H. Outbreak of cryptocaryoniasis in marine aquaria at Scripps Institution of Oceanography[J]. *California Fish and Game*, 1969, 55: 227-236.
- [4] 罗晓春. 刺激隐核虫(*Gyrodactylus irritans*)与多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)免疫学特性研究[D]. 广州: 中山大学, 2005.
- [5] DICKERSON H, CLARK T. *Ichthyophthirius multifiliis*: a model of cutaneous infection and immunity in fishes[J]. *Immunological Reviews*, 1998, 166: 377-384.
- [6] 滕楠. 刺激隐核虫(*Gyrodactylus irritans* Brown 1951)在卵形鲳(*Tachinotus ovatus*)上的传代及免疫应答反应[D]. 广州: 中山大学, 2005.
- [7] 但学明. 刺激隐核虫(*Gyrodactylus irritans*)的传代、保存及刺激隐核虫病的防治研究[D]. 广州: 暨南大学, 2006.
- [8] PRESS C M, EVENSEN O. The morphology of the immune system in teleost fishes[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1999, 9(4): 309-318.
- [9] CAIN K D, JONES D R, RAISON R L. Characterisation of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2000, 10(8): 651-666.
- [10] HINS H, DAVIDSON G A, SECOMBES C J, et al. Morphological study of cells isolated from the perfused gill of dab and Atlantic salmon[J]. *Journal of Fish Biology*, 1998, 53(3): 560-568.
- [11] XU, D H, KLESIUS P H. Antibody mediated immune response against *Ichthyophthirius multifiliis* using excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), immune to *Ichthyophthirius*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(5): 299-306.
- [12] MAH J L, DICKERSON H W. Systemic and cutaneous mucus antibody responses of channel catfish immunized against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2003, 10(5): 876-881.
- [13] COLORN A, BURGESS P. *Gyrodactylus irritans* Brown 1951, the Cause of 'White Spot Disease' in Marine fish: an Update[J]. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1997, 1(4): 217-238.
- [14] BURGESS P J, MATHEWS R A. *Gyrodactylus irritans* (*Glyphra*): acquired protective immunity in the thick-lipped mullet, *Chelon labrosus*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1995, 5(6): 459-468.
- [15] YOSHINAGA T, NAKAZOE J. Acquired protection and production of immobilization antibody against *Gyrodactylus irritans* (*Glyphra*, *Hymenostomatida*) in *Mummichog* (*Fundulus heteroclitus*)[J]. *Fish Pathology*, 1997, 32: 229-230.
- [16] AKHLAGH M. Passive immunisation of fish against vibriosis, comparison of intraperitoneal, oral and immersion routes[J]. *Aquaculture*, 1999, 180(3/4): 191-205.
- [17] GUIJERREZ M A, MIYAZAKI T, HATA H, et al. Protective properties of egg yolk IgY containing anti-Edwardsiella tarda antibody against paraclo disease in the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1993, 16(2): 113-122.
- [18] OLESEN N J. Detection of the antibody response in rainbow trout following immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* bacteria by ELISA and passive immunization[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 1991, 7(1): 36-43.

更加放肆,无视环境法律法规的存在。

2.4 企业和居民的环保意识淡薄 高耗能高污染企业一味追求企业产量的增加和利润的最大化,缺乏污染物排放量对自然环境和人类生存的危害性认识。有些企业在政府的强制管理之下,虽然购置了污染处理设备,但考虑到处理设备运行的成本很高,除非应付环保部门的检查,一般都处于闲置状态,所以处理设备也就成了“摆设”。另一方面居民缺乏对环境污染的监督意识,目睹了环境污染,也感觉到了环境污染带来的损害,但由于居民个人力量有限或者与污染企业有着某种利益关系,不愿意向有关环保部门举报。这2个主要的微观经济主体对环境保护的消极态度,加大了环保部门的执法难度,也加大了环境治理的成本。

3 加强陕西省环境保护的对策

3.1 加快产业结构升级优化,倡导循环经济和清洁生产 产业结构升级是解决污染问题的根本办法。目前陕西省三次产业构成中,第二产业仍然是主体,第三产业占的比例相对于第二产业仍然较低,而第二产业内部的主体是工业,主要是能源、化工等重工业。根据陕西省三次产业结构的实际状况,应鼓励第三产业的发展,特别是劳动密集型的服务业和具有环保性的旅游业。大力发展第三产业是解决环境污染问题的突破口。同时对第二产业内部结构也要进行调整,尤其对污染的主要制造者重工业实行行业整合,使其形成规模性经营,引导其进行清洁生产,建立行业的循环经济。在积极推进整体产业结构向节能型、高级化发展,积极发展第三产业,调整第二产业的同时,还应大力培育和发展环保产业。

3.2 增加环境治理投资 工业污染治理投资占固定资产投资的比率应该在2%以上、占工业总产值的比率应该在1%以上才能有效治理环境污染问题。目前,陕西省的环保投资占固定资产投资和工业总产值的比重与国际经验水平相比偏低。随着陕西省工业化和城市化进程的加快,污染物特别是工业“三废”的排放量仍会继续增长。然而要使总体的环境质量不断改善,陕西省各级政府部门应继续加大对环境保护的投资,包括人力、物力的投资,逐步形成以政府投资为主体,居民、企业以及各类社会团体等参与投资的长效机制,实现投资主体的多元化,不断拓宽环境投资的融资渠道,保证有充足的污染治理资金。

3.3 进一步建立健全环境保护制度 针对目前陕西省在环境保护方面存在的问题和漏洞,各级环保部门要根据具体情况制定一系列的制度和措施来完善环境保护和环境治理制度。如建立项目准入机制,凡是国家产业政策限制的,特别是一些高能耗、高污染、低效益的项目,要抬高进入门槛,严格审批;建立公众参与机制,落实公众知情权、参与权和监督权,提高广大公众环保意识,维护广大公众切身利益的内在要求;建立信息发布制度,对于重大项目的建设,要广泛征求群众特别是项目所在地周边群众对环境质量、拟建项目可能对环境质量造成的影响等方面意见,鼓励广大群众对建设项目环境影响评价过程进行全方位的监督,真正做到环保工作的公开、公平和公正;健全监督处罚机制,同时加大环境执法管理力度、区域环境监测力度、监督处罚力度;确保环境保护法制化和制度化。

3.4 加强环保教育,提高环保意识 1992年6月,联合国环境与发展大会在巴西里约热内卢召开,会议通过了《21世纪议程》,该议程第四章指出,教育是实施可持续发展战略及增强人们解决环境与发展问题能力的决定因素。1994年,中国政府通过了《中国21世纪议程——人口、环境与发展白皮书》,该书第六章也指出,将可持续发展思想贯穿于从初等到高等的整个教育过程中^[2]。所以在保护和治理环境过程中,教育起着非常重要的作用。环保教育首先从省内各级领导做起。由于陕西省社会经济发展水平相对落后,大多数民众尤其是广大农村农民基本生活并不富裕,希望他们自觉地维护生态环境难度很大。因此根据实际状况陕西省环境教育在很大程度上必须从上到下实施强制性措施,而这一举措能否成功,关键在于各级党政机关能否身体力行。其次,要提高居民的环境意识还必须重点加强对中、小学及幼儿的环境教育,定期开展宣传活动,发放宣传资料,鼓励学生参与环保活动,从而带动和影响家长和社会各界积极加入到环境保护队伍中来,在全社会中形成良好的环保氛围,激励全民为建设生态陕西、绿色陕西作出应有的贡献。

参考文献

(上接第5522页)

- [19] TURGEON Y, ELAZHARY Y. Furunculosis control with anti-Aeromonas salmonicida hyperimmune serum (SHAAS) [J]. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, 1992, 92(1): 64-67.
- [20] SHELBY R A, KLESUS P H, SHOEMAKER C A, et al. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera [J]. Journal of Fish Disease, 2002, 25(1): 1-6.
- [21] LAPAIRA S E, LAUDA K A, JONES G R, et al. Development of passive immunotherapy for control of infectious hematopoietic necrosis [J]. Disease of Aquatic Organisms, 1994, 20: 1-6.
- [22] HEDRICK R P, MCDOWELL T. Passive transfer of sera with antiviral neutralizing activity from adult channel catfish protects juveniles from channel catfish virus disease [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1987, 116(2): 277-281.
- [23] LINT L, DICKERSON H W. Purification and partial characterization of mobilization antigens from *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Journal of Protozoology, 1992, 39(4): 457-463.
- [24] LINT L, CLARK T G, DICKERSON H W. Passive immunization of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) against the ciliated protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis* by use of murine monoclonal antibodies [J]. Infection and Immunity, 1996, 64(10): 4085-4090.
- [25] HRAZAMA N, GOTO T, SHIRASU K. Killing effect of various treatments on the non-gemmate *Heterobdellium mokamuti* eggs and on cercaria and the ciliate *Gyrodactylus imitans* cysts and theronts [J]. Aquaculture, 2003, 223: 1-13.
- [26] HIRONET F N, JONES J B. Treatments for ectoparasites and diseases in captive Western Australian dhufish [J]. Aquaculture International, 2000, 8(4): 349-361.
- [27] 言颖秀. 刺激隐核虫 (*Gyrodactylus imitans* Brown 1951) 生物学特性的研究 [D]. 广州: 中山大学, 2006.
- [28] YAMBOT A V, SONG Y L, SUNG H H. Characterization of *Gyrodactylus imitans*, a parasite isolated from marine fishes in Taiwan [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 54: 147-156.