

·综述·

鱼类免疫球蛋白研究进展

Advances in the study on immunoglobulin of fishes

王长法* 安利国 杨桂文 温武军

(山东师范大学生物系, 济南 250014)

Wang Changfa* An Liguang Yang Guiwen Wen Wujun

(Department of Biology, Shandong Normal University, Jinan 250014)

关键词 鱼类, 免疫球蛋白, 血清, 粘液

Key words fishes, immunoglobulin, serum, mucus

在过去的几十年里, 在高等脊椎动物体内既发现有正常的血清免疫系统, 还发现存在局部粘液免疫系统, 粘液免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)在免疫防御中起一定的作用。而对鱼类免疫学的研究特别是关于鱼类的粘液性Ig方面的研究才刚刚起步, 还很不深入, 也不系统。对它的研究既有助于人们对高等动物Ig的个体发生及系统发育的理解; 又在鱼类免疫和鱼病防治方面有重要意义。现就目前国内外的研究进展综述如下。

1 鱼类血清Ig

1.1 真骨鱼类血清中的Ig

在真骨鱼类血清中, 目前多数人认为只存在1种Ig, 类似于哺乳动物的IgM, 它由2条轻链(L链)和2条重链(H链)所组成的单体通过连接链“J”将4个单体连接成一个四聚体^[1]。在沟鲈、大鲈、鲤和羊头鲷血清中皆发现血清Ig是四聚体, 分子量700~800 kD(1 kD=1 000 Dalton), H链的分子量约为70 kD^[2~4], 也存在78 kD(大鲈)和45 kD(羊头鲷)2种异型; L链的分子量约为19 kD, 但也存在25 kD(鲤)、27 kD(大鲈)和22 kD、24 kD、26 kD 5种异型(羊头鲷)^[5]。

但也有人认为真骨鱼类血清中存在着2种以上的Ig, Trump等人^[6]发现鲫血清中存在着抗原性和电泳图谱各不相同的2种Ig。Clem^[7]发现在1种海洋真骨鱼类中存在着16S和7S 2种Ig, 并且认为7S Ig不可能是16S的降解产物。

1.2 软骨鱼类血清中Ig

软骨鱼类的血清中目前发现有2种Ig, 大的Ig分子与

人的IgM相似(分子量为900 kD, 19S); 小的Ig分子与人IgG类似(分子量为150 kD, 7S); Clem等^[8]发现鲨鱼、角鲨和沙洲鲨血清Ig具有19S的五聚体和7S的单聚体2种形式。这2种Ig皆由同一类L链和H链组成。Partula^[9]运用电泳和免疫印迹技术分析了鲟鱼血清的优球蛋白, 发现该蛋白是类似于IgM的分子, 由等分子数的70 kD的H链和26~30 kD的L链组成。它可以形成(H₂L₂)_n形式的高分子量的多聚体; 或170 kD的H₂L₂形式的单聚体; 或L₂形式的二聚体。宽纹虎鲨的血清中含有分子量分别为900 kD和180 kD的2种Ig分子, 这2类Ig分子的H链分子量皆为68 kD, 且抗原性相同, 而组成它们的L链经SDS-PAGE电泳时出现2条带, 分子量分别为25 kD和22 kD, 类似高等脊椎动物的 κ 和 λ 链^[10]。

而从斑鲳的血清中也分离出2种Ig; 高分子量免疫球蛋白(HMW Ig)和低分子量免疫球蛋白(LMW Ig)。HMW Ig为五聚体, 分子量为840 kD, 沉降系数为18S; 被认为是斑鲳的IgM; 其H链分子量为70 kD。LMW Ig, 分子量为320 kD, 沉降系数是8.9S。它是由2个分子量为150 kD的单体通过非共价键聚合而成, 它的H链分子量为45~50 kD, 比HMW Ig的H链的小, 并且HMW和LMW Ig的H链皆有自己的特异性抗原决定簇。说明斑鲳的血清中HMW Ig和LMW Ig不是同一种物质^[11]。

2 鱼类粘液性Ig

鱼类的皮肤表面和消化道表面有一层丰富的粘液层。水中的病原菌和碎屑接触到这层粘液时, 就被粘在一起, 阻止病原体的移动^[12], 粘液中还含有丰富的溶菌和杀菌物质, 如溶菌酶、水解酶等, 它的屏障作用极为有效。重要的是这类粘液性物质中还含有特异性Ig, 因其分布在器官表面, 直接与外界接触, 因此对鱼类就具有更为重要的意义。

收稿日期: 1998-05-06

* 现工作单位: 山东省农业科学院生命科学研究室, 济南 250100

2.1 皮肤粘液 Ig

在粘液性 Ig 的研究中,皮肤粘液的 Ig 是研究最多的。Fletcher 等^[13]通过口服和注射途径免疫鳟鱼后,在皮肤粘液内发现有 Ig 存在,其含量高低因免疫途径不同而异。Lobb 等^[14]从羊头鲷的皮肤粘液中分离纯化出了 2 种类型的 Ig:一种是四聚体,分子量为 700 kD,由 2 条 H 链和 2 条 L 链组成,H 链分子量为 70 kD,L 链为 25 kD;另一种是二聚体,分子量为 95 kD,H 链和 L 链的分子量分别是 70 kD 和 25 kD。二聚体有 2 种聚合形式,一种通过共价键相连,另一种通过非共价键相连。

Rombout 等^[3]从鲤鱼皮肤粘液中分离纯化出 Ig,其电泳特性与血清 Ig 没有明显差别。

2.2 肠粘液中的 Ig

口服疫苗可使肠粘液中的特异性抗体比血清中增加多倍,肠粘液经 Sephadex G-200 层析后,可呈现典型的 Ig 吸收峰^[13,15]。

2.3 胆汁中的 Ig

Lobb 等^[4]发现:羊头鲷胆汁中含有 Ig,抗原性同其血清中的四聚体高分子 Ig 相同,为二聚体结构,分子量 320 kD,在磷酸缓冲液中经 SDS 处理,成为分子量为 160 kD 的单体,每条单体由 H 链和 L 链组成,H 链的分子量为 55 kD,介于血清 Ig 的 H 链(70 kD)和 L 链(25 kD)之间。表明胆汁中的 Ig 与血清 Ig 不完全相同。有人经鲤肛门接种灭活的菌苗(*Vibrio anguillarum*)后,在胆汁、消化道和皮肤粘液中皆发现了特异性抗体,只是 Ig 的浓度比血清中的要低。

3 鱼卵中的 Ig

除了在血清和粘液中外,在鱼卵中也发现有 Ig。已经在沟鲇、鲤、罗非鱼、大麻哈鱼、河鲈、孔雀鱼和鳊等多种鱼类的卵中发现了 Ig。对它们的电泳特性进行分析,所得结果不一。有人认为卵 Ig 与血清 Ig 一致,有的认为不一致。卵中的 Ig 分散于整个卵黄中,但在卵壳内膜处最集中^[16-19]。

4 鱼类粘液 Ig 与血清 Ig 的关系

Lobb 等^[14]将放射性标记的 Ig 注射入羊头鲷血液中后,并未在粘液中找到标记物产物,因而认为皮肤粘液 Ig、胆汁 Ig 与血清 Ig 之间在代谢上没有联系。口服及浸泡途径免疫鱼类后,在皮肤粘液及胆汁中发现有特异性抗体存在,而在血清中却很少或检测不到这种抗体。Rombout 等^[3]利用单克隆抗体技术对鲤鱼皮肤粘液和血清 Ig 的研究表明,皮肤粘液 Ig 与血清 Ig 在抗原性上不完全相同。表明粘液 Ig 和血清 Ig 之间存在着差异。

但也有资料表明,粘液性 Ig 和血清 Ig 在许多方面是相同的,Lobb 等^[20]将沟鲇浸泡在含有 DNP 化的马血清蛋白溶液中,刺激沟鲇产生特异性抗白蛋白 DNP 的抗体,结果发现从皮肤粘液中纯化的抗白蛋白 DNP 抗体和血清中的 Ig 不论在半体(HL)的共价结合方式还是在 H 链或 L 链等

方面,都没有明显的区别。St Louis-Cormier^[21]对鲑鱼和 L-tam^[22]对香鱼利用电泳等技术所作的实验证明了粘液性 Ig 和血清 Ig 具有许多一致性。

5 鱼类 Ig 产生的细胞和组织学基础

鱼类的前肾、脾脏、胸腺以及消化道淋巴与血液淋巴等,是鱼类免疫应答的主要器官与组织。很多事实证明真骨鱼类的前肾和脾脏与体液免疫有关,其中前肾起着很大作用,此外鱼类的肠粘膜中也存在着淋巴细胞。Kobayashi^[23]发现在鳗的胚胎期和成年期的脾中 Ig 形成细胞(IgFC)数量分别为 $1 \sim 14 \text{ mm}^{-2}$ 和 $250 \sim 600 \text{ mm}^{-2}$ 。Castillo Ana 等^[18]研究了 IgM 和 IgM 携带细胞在虹鳟体内的发育,发现在胚胎孵化前的第 12 天首次在细胞质内观察到 Ig,在此期间无细胞表面 Ig 出现,IgM 携带细胞在虹鳟胚胎孵化后的第 4 天的头肾中首次被观察到。Paul Lloyd-Evans^[24]研究了狗鱼的淋巴系统发育情况,发现 2 个月后肝脏是第 1 个含 IgM 阳性细胞的器官,这些 IgM 阳性细胞主要出现在肝小叶间的组织,紧随其后的是 3 个月后肾脏的间隙出现含 IgM 的阳性细胞。胸腺、脾和莱迪氏器官 4 个月后又出现含 IgM 的阳性细胞;最后出现的组织是消化道相关淋巴组织。

6 鱼类 Ig 产生的基本过程和一般规律

鱼类和哺乳动物一样,抗原最初侵入机体后出现一潜伏期,这时血清中 Ig 很少或没有。抗原进入后通过巨噬细胞的吞噬或胞饮作用,送至肾和脾吸收、积累^[25,26]。信息传递给淋巴细胞后,使淋巴细胞增殖,从而形成抗体生成细胞。刺激后大约 2~3 月,被免疫了的鳟鱼血清中,开始出现特异性 Ig,Ig 产生细胞在这期间,充分发挥其产生特异性 Ig 的功能,随后,血清中 Ig 量保持一稳定时期,而后逐渐减弱,直至刺激源再次侵入,才能再开始产生特异性 Ig。相同免疫原不同的侵入途径,可能对鱼类产生不同免疫效应,如口服疫苗可使肠粘液中 Ig 含量比血清中 Ig 含量高出 4 倍;注射疫苗可使血清中 Ig 的含量比肠粘液中高 128 倍,浸泡途径可使皮肤粘液中的 Ig 量明显提高。

与哺乳动物相比,鱼类的免疫应答一般较缓慢,Ig 的产生受温度影响较大,在最适温度,接种抗原 7~10 d 后,Ig 产生细胞才出现,7~14 d 后血清中才出现 Ig。造成这种现象的主要原因,首先,低温能阻止或延缓鱼类免疫应答的产生,各种鱼类都有不同的免疫临界温度,一般来说温水性鱼类的高,冷水性鱼类的低,在低于临界温度时鱼类的免疫应答机制可能丧失^[27];其次,低温会限制浆细胞释放抗体,鱼类的免疫记忆比哺乳动物弱,并且同样受到温度影响^[28]。

综上所述,人们已初步了解部分鱼类 Ig 的结构、理化特性,但无论是从鱼类免疫还是鱼病防治方面来看,对鱼类 Ig 的了解,特别是对粘液性 Ig 的一些理化特性、免疫特性、及和血清 Ig 之间的关系等方面的了解还远远不够,仍有待于进一步的深入研究。

参 考 文 献

- 1 Jurd R D. Specialisation in the teleost and anuran immune response. In: M J Manning, M F Tatner. A comparative critique in fish immunology. London: Academic Press, INC, 1985. 9~28
- 2 Estevez J, et al. Isolation and partial characterization of turbot immunoglobulins. *Comp Biochem Physiol*, 1993, 105A: 275~281
- 3 Rombout J H W M, et al. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp. *Dev Comp Immunol*, 1993, 17: 309~317
- 4 Lobb C J, et al. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. X II. Secretory immunoglobulins in the bile of the marine teleost *Archosargus probatocephalus*. *Molecular Immunology*, 1981b, 18(7): 615~619
- 5 Lobb C J, et al. Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish. *J Immunol*, 1984, 132(4): 1 917~1 922
- 6 Trump G N, Hildemann W H. Antibody response of goldfish to bovine serum albumin: Primary and secondary responses. *Immunology*, 1970, 19: 627
- 7 Clem L W, et al. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. II Immunoglobulin of the nurse shark. *J Immunol* 1967a, 99: 1 226
- 8 Clem L W, et al. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. IV Immunoglobulins of the giant grouper, *Epinephelus itaira*. *J of Biological*, 1967b, 246: 9~15
- 9 Partula S, et al. Characterization of serum immunoglobulins in a chondrosteacan fish. *Dev Comp Immunol*, 1993, 17: 515~524
- 10 Tomanaga S, et al. Studies on immunoglobulin and immunoglobulin-forming cells in *Heterodontus japonicus*, a cartilaginous fish. *Dev comp Immunol*, 1985, 9: 617~626
- 11 Kobayashi K, et al. Second class of immunoglobulin other than IgM present in the serum of a Cartilaginous fish, the kite, *Raja kenjei*: isolation and characterigation. *Molecular Immunology*, 1984, 21(5): 397~404
- 12 Sibbing F A, et al. Regional specializations in the oropharyngeal wall and food processing in the carp. *Netherland J Zool*, 1985, 35(3): 377~422
- 13 Fletcher T C, White A. Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aqua culture*, 1973, 417~428
- 14 Lobb C J, et al. The metabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus, and bile. *J Immunol*, 1981a, 127(4): 1 525~1 529
- 15 Agius C, et al. Immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis: comparison of an extract antigen with whole cell bacterins by oral and intraperitoneal routes. *J. Fish Dis*, 1983; 6: 129~134
- 16 Hayman J R, et al. Immunoglobulin in the eggs of the channel catfish. *Dev Comp Immunol*, 1993, 17: 241~248
- 17 Takemura A. Changes in an immunoglobulin M-like protein during larval stages in tilapia. *Aquaculture*, 1993, 115: 233~241
- 18 Castillo A, et al. Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev Comp Immunol*, 1993, 17: 419~424
- 19 Fuda H, et al. Serum IgM during early development of masu salmon. *Comp Biochem Physiol*, 1991, 99A(4): 637~643
- 20 Lobb C J, et al. Secretory immunity induced in catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization. *Dev Comp Immunol*, 1987, 11: 727~738
- 21 St Louis - Cormier E A, et al. Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout. *Dev Comp Immunol*, 1984, 8: 71~80
- 22 Itami T, et al. Purification and characterization of immunoglobulin in skin mucus and serum of ayu. *Nippon Suisan Gaakkaish*, 1988, 54: 1 611~1 617
- 23 Kobayashi K, et al. Ontogenic studies on the appearance of two classes of immunoglobulin-forming cells in the spleen of the skate, *Bathyraja aleutica*, a cartilaginous fish. *Eur J Immunol*, 1985, 15: 952~956
- 24 Paul Lloyd - Evans. Development of the lymphomyeloid system in the dogfish. *Dev Comp Immunol*, 1993, 17(8): 501~514
- 25 Sexombes C J, et al. Comparative studies on the immune system of fish and amphibians; Antigen localization in the carp. *J Fish Dis*, 1980, 3(5): 399~412
- 26 Davina, J H, et al. Effect of oral administration of *Vibrio* bacterin on the intestine of cyprinid fish. *Dev Comp Immunol*, 1982, 2: 157~166
- 27 Baudouy A M, et al. Viremie printaniere de la carp: etude experimentale de L infection evoluant a differentes temperature. *Ann Virot (Institut Pasteur)*, 1980, 131E: 4229~488
- 28 Dorson M. Applied immunology of fish. In: P de kinekin. Symposium on Fish Vaccination. O I E. Paris: 20~22 Feb. 1984. 39~74