

红鲤4群体间红细胞免疫功能及其差异

蔡完其, 轩兴荣

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

摘要:应用红细胞 C_3b 受体花环试验和红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环试验方法, 证实兴国红鲤 (*Cyprinus carpio*, var. *singguonensis*)、玻璃红鲤 (*C. carpio*, var. *wananensis*)、荷包红鲤 (*C. carpio*, var. *wuyuanensis*) 及瓯江彩鲤 (*C. carpio*, var. *color*) 的红细胞表面都存在 C_3b 补体受体, 均可形成花环; 红鲤的红细胞免疫粘附能力存在着种群间差异, 上述2种花环试验的花环率大小的顺序均是: 兴国红鲤 > 荷包红鲤 > 瓯江彩鲤 > 玻璃红鲤, 差异都极显著 ($P < 0.01$); 4群体红鲤的红细胞均具有吞噬作用。结果证实, 鱼类红细胞免疫功能在机体防御病原的过程中占有重要地位。

关键词:红细胞免疫功能; 兴国红鲤; 荷包红鲤; 玻璃红鲤; 瓯江彩鲤

中图分类号: S942.116

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)02-0133-04

据 Siegel 等^[1]和郭峰^[2]报道, 人类红细胞除具有携氧、运输气体等功能外, 还具有识别、粘附、杀伤抗原, 清除循环免疫复合物和病原体、参与免疫调控等多种重要免疫功能。迄今, 在水产动物, 红细胞免疫功能的研究均采用红细胞 C_3b 受体花环试验^[3-6], 但尚未见红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环试验的报道。

红鲤是鲤 (*Cyprinus carpio*) 中的特殊类群, 是重要的种质资源, 主要包括兴国红鲤 (*C. c.* var. *singguonensis*)、荷包红鲤 (*C. c.* var. *wuyuanensis*)、和玻璃红鲤 (*C. c.* var. *wananensis*) 和瓯江彩鲤 (*C. c.* var. *color*)。它们具有生长快、繁殖力强、抗逆性强、耐低氧、食性广以及适应性强等优点, 既可食用, 又有观赏价值, 经济价值较高。目前对这4种群红鲤的报道多为生物学、养殖学及杂交利用等研究^[7], 未见对红鲤种群间差异、尤其是免疫功能差异的报道。本研究首次把红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环试验运用于鱼类, 结合红细胞 C_3b 受体花环试验, 检测红鲤种群间红细胞免疫功能的差异。

收稿日期: 2002-07-17.

基金项目: 上海水产大学-浙江龙泉市水利局合作项目 (技 99-12).

作者简介: 蔡完其 (1939-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事水产动物抗逆性和育种研究. E-mail: lisifak@online.sh.cn

1 材料和方法

1.1 材料

兴国红鲤、玻璃红鲤、荷包红鲤和瓯江彩鲤均取自上海水产大学种质资源试验站, 同池饲养。并在试验前于室内 28℃ 的水族箱中再暂养 1 周, 以消除环境等因子的影响。

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

1.2 方法

1.2.1 红细胞 C_3b 受体花环试验 每种鱼取 20 尾。参考蔡完其等^[4-5]的方法进行。

(1) 红细胞悬液的制备。从鱼的尾静脉抽血, 用 0.85% (质量分数) 的生理盐水洗涤、离心 2 次 (2 000 r/min, 5 min), 取沉淀物用显微计数法配制浓度为 1.25×10^7 /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 1 次 (2 000 r/min, 5 min), 弃上清液, 然后用生理盐水配成 1×10^8 /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。

(3) C_3b 受体花环的形成。将 C_3b 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 min 后, 再加 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。每尾鱼制备3片,涂片薄而均匀,冷风吹干,甲醇固定,瑞氏染色液染色。

(5)采用 Smart scape 2000 生物显微图象分析软件观察(400倍),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(1个红细胞粘附2个或以上致敏酵母为1个花环),作为C₃b受体活性的指标。

1.2.2 红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环试验

每种鱼取20尾。参考郭峰等^[21]的方法进行。

(1)红细胞悬液制备。从鱼的尾静脉抽血,用0.85% (质量分数)的生理盐水洗涤、离心2次(2 000 r/min, 5 min),取沉淀物用显微记数法配制成浓度为 1×10^8 /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(37℃水浴)移入离心管加8~9 mL蒸馏水,充分混匀,离心(2 000 r/min, 5 min),倒尽上清液,加入1~1.5 mL生理盐水,充分混匀,按白细胞记数法记数,配成 1×10^6 /mL的肿瘤细胞悬液。

(3)自身血浆的制备。新鲜枸橼酸(质量分数3.8%)抗凝血离心(2 000 r/min, 5 min)沉淀,取上清液(即血浆)备用。

(4)肿瘤细胞花环的形成。取100 μL肿瘤细胞悬液,50 μL自身血浆和50 μL红细胞悬液,充分混合均匀,28℃水浴孵育30 min后,取出,轻轻单向摇匀,加50 μL 0.25%戊二醛固定,轻轻单向摇匀。

(5)玻片制备。每尾鱼制备3片,涂片薄而均匀,冷风吹干,甲醇固定,瑞氏染色液染色。

(6)采用 Smart scape 2000 生物显微图象分析软件观察(400倍),全片记数,以200个肿瘤细胞为单位,计算形成肿瘤细胞花环的百分率(1个肿瘤细胞上粘附2个或以上红细胞为1个花环)。

1.2.3 数据分析 按 Zar^[8] 进行群体间差异显著性方差分析和均值多重比较分析。

2 结果

2.1 红细胞C₃b受体花环试验

4群体红鲤的红细胞均能与致敏酵母形成C₃b受体花环(见图1),花环百分率的大小顺序为:兴国

红鲤>荷包红鲤>瓯江彩鲤>玻璃红鲤(见表1)。群体间差异极显著($P < 0.01$)。邓肯均值多重分析表明,除瓯江彩鲤和玻璃红鲤相互间差异不显著外($P > 0.05$),其他群体相互间的差异极显著($P < 0.01$)。

2.2 红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环试验

4群体红鲤的红细胞均能粘附肿瘤细胞形成花环(图2),花环百分率的高低为:兴国红鲤>荷包红鲤>瓯江彩鲤>玻璃红鲤(见表1)。4群体间差异极显著($P < 0.01$)。邓肯均值多重比较分析表明,兴国红鲤同荷包红鲤,瓯江彩鲤同玻璃红鲤之间差异不显著($P > 0.05$),其他群体间均差异极显著($P < 0.01$)。

表1 4群体红鲤红细胞C₃b受体花环和天然免疫粘附肿瘤细胞花环百分率

Table 1 Percentage of erythrocyte C₃b receptor rosettes and native immune adhering tumor cell rosettes in four populations of red common carp

群体* Population*	X ± SD, %	
	红细胞C ₃ b受体花环率 Percentage of erythrocyte C ₃ b receptor rosettes	红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环率 Percentage of erythrocyte native immune adhering tumor cell rosettes
兴国红鲤 <i>C. carpio</i> . var. <i>singguonensis</i>	13.33 ± 1.70	19.17 ± 1.79
荷包红鲤 <i>C. carpio</i> . var. <i>wuyuanensis</i>	10.62 ± 1.51	18.46 ± 2.10
瓯江彩鲤 <i>C. carpio</i> . var. <i>color</i>	7.80 ± 1.69	16.76 ± 1.56
玻璃红鲤 <i>C. carpio</i> . var. <i>wananensis</i>	7.10 ± 0.76	16.14 ± 2.07

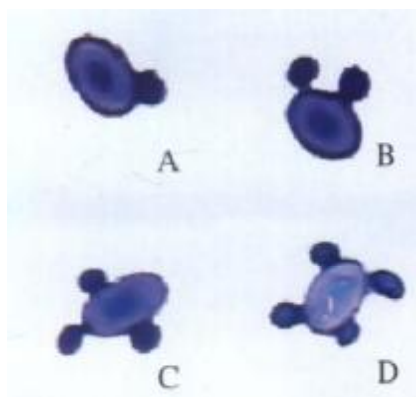
* 各测试品种样本均为20尾。

The sample numbers for each population are all 20 individuals.

2.3 红细胞的吞噬现象

在记数观察过程中,发现4群体红鲤的红细胞均能够吞噬酵母细胞。当红细胞靠近酵母细胞,首先伸出细长的触手,牵引它们接近,然后伸出粗大的伪足,待酵母细胞靠近红细胞时,红细胞自身形状发生变化,胞浆膜向核的方向下陷,将酵母细胞慢慢吞噬到细胞内。整个吞噬过程如图3所示。

1) 郭峰,等. 红细胞天然免疫与循环免疫复合物测定新技术. 上海: 长海医院输血科血液免疫研究室, 2001.



红细胞粘附1个(A)、2个(B)、3个(C)、4个(D)致敏酵母
Erythrocyte adhering 1(A), 2(B), 3(C), and 4(D) sensitive yeasts

图1 红鲤红细胞粘附致敏酵母形成花环

Fig.1 Rosettes of erythrocyte adhering sensitive yeast in red common carp

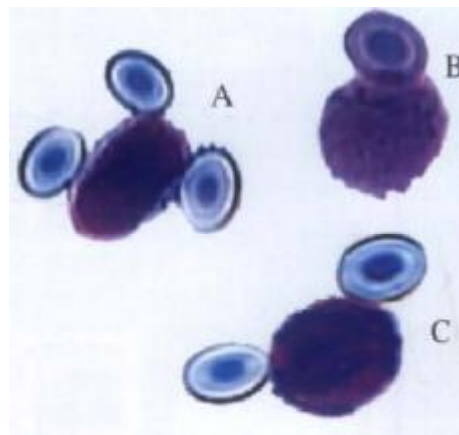


图2 红鲤的1个(A)、2个(B)及3个(C)红细胞粘附在肿瘤细胞上而形成花环

Fig.2 Rosettes formed by 1(A), 2(B) and 3(C) erythrocyte adhering tumor cell in red common carp

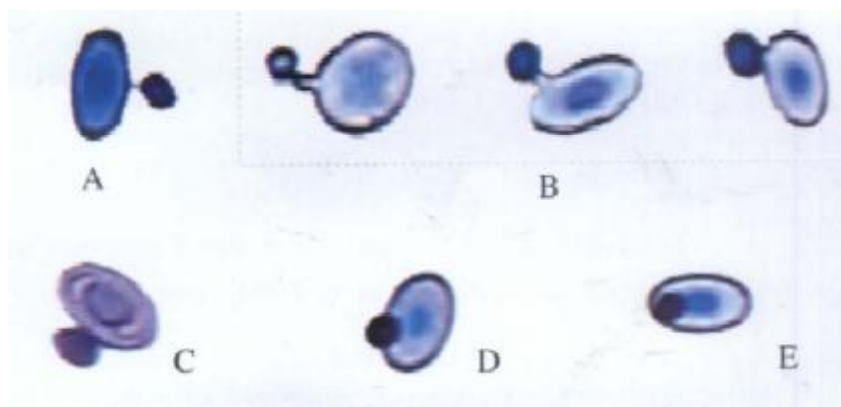


图3 红鲤红细胞吞噬致敏酵母的过程

Fig.3 Phagocytotic process of erythrocyte adhering sensitive yeast in red common carp

A. 红细胞伸出触手牵拉致敏酵母细胞;B. 红细胞伸出伪足;C. 红细胞接触到酵母细胞后,细胞膜内陷;D. 酵母细胞被红细胞慢慢地吞噬到胞浆中;E. 酵母细胞完全被红细胞吞噬到胞浆中

A. Erythrocyte pushing sensitive yeast by antenna. B. Erythrocyte extending its pseudopodium. C. Erythrocyte membrane caving in when touching sensitive yeast. D. The sensitive yeast swallowed slowly into plasma. E. The sensitive yeast swallowed fully into plasma

3 讨论

本研究证明了红鲤4群体的红细胞膜上均存在 C_3b 受体,具有粘附异物的能力,表明Siegel等^[1]提出的人类红细胞免疫系统的概念也适用于鱼类。4群体红鲤红细胞 C_3b 受体花环率大小均存在极显著差异($P < 0.01$),表明红细胞免疫功能存在种群间

差异。王旭东等^[9]报道,在哺乳动物和鸟类动物之间,在同一门类动物的不同属、种间,红细胞 C_3b 受体花环数目和活性有差异。蔡完其等比较水产动物 C_3b 受体花环率的种间、种内差异时,发现青鱼、草鱼、鲢及鳙4个物种间^[4],建鲤、野鲤、镜鲤3个鲤群体间^[3],中华鳖的太湖群体和台湾群体间^[5], C_3b 受体花环率存在种间、种内差异。这与本研究结果一

致证明,水生动物不仅在种间、而且在种群间存在着红细胞免疫功能的差异。这类种质上的重要差异,是育种工作应予重视和利用的。

红细胞免疫粘附属于非特异性免疫粘附范围。非特异性免疫(也称天然免疫)是对病原体的天然抵抗力,它是物种在进化过程中,长期与自然界各种病原体抗争中逐步形成的。鱼类的免疫地位较低等,免疫系统不是很完善,特异性免疫功能低下,只能产生免疫球蛋白(IgM),其免疫功能的主要形式为吞噬细胞的吞噬作用,天然免疫占主要位置。王旭东等^[9]报道鱼类的红细胞具有吞噬功能,这与本研究的结果一致,表明红细胞免疫功能在鱼类免疫防御中占有重要地位。

从个体发育看,一切动物的红、白细胞均来源于骨髓造血干细胞。在高等动物中,各种细胞分工较为明确,白细胞获得各种免疫防御能力,而红细胞专职运输气体,调节体液中酸碱和离子平衡^[10]。与高等动物不同,鱼类血细胞的分化尚不十分完全,还具有细胞核,可能保存了部分类似白细胞的吞噬功能。

本研究把红细胞天然免疫粘附肿瘤细胞花环试验应用于鱼类,表明4群体红鲤的红细胞均能吞噬肿瘤细胞。本研究所做的红细胞肿瘤花环试验是把肿瘤细胞作为入侵异物来处理的。在镜下观察到,

一般都是由2个或2个以上的红细胞粘附1个肿瘤细胞。可以认为,鲤鱼红细胞的C₃b受体具有较强的粘附和吞噬入侵异物的能力。

参考文献:

- [1] Siegel I, Lin T L, Gleichan N. The red cell immune system[J]. *Lancet*, 1981, 2:556-559.
- [2] 郭峰. 红细胞天然免疫研究进展[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2001, 11(6):321-322, 325.
- [3] 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.
- [4] 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(2):71-77.
- [5] 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.
- [6] 彭远义, 王豪举, 刘华英, 等. 鲤和鳙红细胞C₃b受体的研究[J]. *西南农业大学学报*, 1995, 17(5):467-469.
- [7] 王成辉. 中国红鲤遗传多样性研究[D]. 上海:上海水产大学, 2002.
- [8] Zar J H. *Biostatistical Analysis*[M]. New Jersey:Prentice-Hall, Inc. 1974. 130-162.
- [9] 王旭东, 饶家荣, 李正普, 等. 11种哺乳类和鸟类动物红细胞免疫功能的对比研究[J]. *畜牧兽医学报*, 1995, 26(6):526-529.
- [10] 何泽涌. *组织与胚胎学*[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983. 42-54, 99-115.

Variations of erythrocyte immune functions in four populations of red common carp

CAI Wan-qi, XUAN Xing-rong

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

Abstract: The red common carp of four populations were employed, which were Xingguo red common carp (*Cyprinus carpio*. var. *singguonensis*), glass red common carp (*C. carpio*. var. *wananensis*), purse red common carp (*C. carpio*. var. *wuyuanensis*) and Oujiang color common carp (*C. carpio*. var. *color*). The tests of erythrocyte C₃b receptor rosettes and erythrocyte native immune adhering tumor cell rosettes were conducted, and for each test, twenty individuals were collected in each population. The results confirm that there are C₃b receptors on the surface of red blood cells in the four populations of red common carp, of which the C₃b receptors can all form rosettes. But among the four populations, the adhering ability of red cell is different. The rosette percentages of both tests follow the order of Xingguo red common carp > purse red common carp > Oujiang color red common carp > glass red common carp, and the difference was highly significant ($P < 0.01$). The red cells of the four populations are of phagocytotic ability. The conclusion is that the erythrocyte in fish plays an important role in defending antigen.

Key words: erythrocyte immune functions; *Cyprinus carpio*. var. *singguonensis*; *Cyprinus carpio*. var. *wuyuanensis*; *Cyprinus carpio*. var. *wananensis*; *Cyprinus carpio*. var. *color*