

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14527

大黄鱼刺激隐核虫病组织中巨噬细胞移动抑制因子的检测分析

徐晓津¹, 桑本红¹, 覃映雪¹, 邹文政¹, 毛勇², 邹峰¹, 罗罡¹, 苏永全²

1. 集美大学 水产学院, 福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 厦门大学 海洋与地球学院, 福建 厦门 361005

摘要: 由刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)感染引发的“白点病”为大黄鱼(*Larimichthys crocea*)养殖业带来重大损失, 但仍未找到安全、有效的治疗方法。本研究应用免疫组织化学方法, 对健康大黄鱼和患刺激隐核虫病大黄鱼肠、脾、头肾与肝组织中巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)蛋白进行检测, 研究刺激隐核虫病大黄鱼组织中 MIF 的表达情况及其对预后的影响。结果表明, MIF 在健康大黄鱼肠、脾、头肾、肝各组织中均无表达; MIF 在刺激隐核虫病大黄鱼各组织中高表达, 表达强度从弱到强依次是肠、肝、脾、头肾, MIF 表达阳性率分别为 54%、80%、86%、90%。推测 MIF 在大黄鱼刺激隐核虫病发病过程中发挥作用。

关键词: 大黄鱼; 巨噬细胞移动抑制因子; 刺激隐核虫; 免疫组织化学

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1227-07

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 属鲈形目 (Perciformes), 石首鱼科 (Sciaenidae), 黄鱼属, 是中国东南沿海重要养殖鱼类, 单品产量较高, 养殖规模不断增大, 各种疾病频繁发生。刺激隐核虫病是由刺激隐核虫寄生于大黄鱼等多种海水鱼类体表和鳃所引起的一种烈性病, 在养殖密度大、水质环境差、鱼体免疫力低下时, 极易暴发, 且难以控制。2008–2010 年, 宁德沙埕港、三都湾以及福州罗源湾都暴发了刺激隐核虫病, 平均发病率在 30%~100%, 局部死亡率达 80%, 经济损失都超过 1 亿元^[1]。刺激隐核虫病的暴发造成经济损失较大, 严重制约福建省大黄鱼养殖业发展^[2–3]。

近年来, 巨噬细胞移动抑制因子(MIF)的研究备受人们关注。虽然人类 MIF 功能研究和疾病治疗的应用已取得令人瞩目的成效, 目前 MIF 与鱼疾病关系研究较少^[4], 主要进行黄鳍金枪鱼

(*Thunnus albacares*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)等 MIF 基因研究^[5–8]。MIF 是与许多炎症疾病相关的免疫调节蛋白, 与炎症应答、细胞增殖、神经内分泌及肿瘤血管生成等关键环节密切相关^[9], MIF 是机体炎症反应重要的组成成分, 还参与体内多个系统疾病的发生发展^[10]。已有研究表明, 在多种炎症甚至肿瘤疾病组织中 MIF 表达水平高于正常组织^[11], 虽然 MIF 对抗感染是必需的, 但 MIF 高表达易促进肿瘤的生长及转移, 引起免疫系统功能紊乱, 出现全身性炎症反应综合症。在败血症小鼠的循环系统中发现有高水平的 MIF, 中和 MIF 活性或剔除 MIF 基因均可降低炎症前活性和提高实验动物的存活率。MIF 在呼吸窘迫综合症和其他炎症疾病形成过程中起作用^[12], 说明 MIF 与炎症疾病的发病机制有关。

本文检测 MIF 在大黄鱼刺激隐核虫病和健康

收稿日期: 2014-08-14; 修订日期: 2015-06-05.

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2013J01140); 2014 年福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室科技项目(ZK2014004); 2015 年集美大学福建省大学生创新项目(201510390074); 福建省研究生教育教学改革研究项目(闽教高[2015]11 号, 集美大研[2015]19 号); 厦门南方海洋研究中心科技项目, 海洋经济发展区域示范项目(14PYY050SF03; 14PYY050SF03).

作者简介: 徐晓津(1969–), 女, 副教授, 硕士研究生导师. E-mail: xiaojinxu@jmu.edu.cn

鱼组织中不同的表达量变化,探讨 MIF 表达与疾病发生的关系,为大黄鱼刺激隐核虫病的研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用鱼器官的采集 在福建省宁德市三都澳大湾鱼排,取体重 350~460 g 的健康大黄鱼 15 尾,暂养于养殖池,换水 1 次/日,投饲料 2 次/日,水温 24~25℃,暂养 1 周,取样。同时于“白点病”发生期间,取鱼排中 15 尾发病较严重,有典型病症,鱼体布满白点,体重 350~450 g 的大黄鱼。分别从“白点病”组和对照组随机取大黄鱼各 6 尾,分别取肠、脾、头肾与肝组织,固定于 10% 甲醛 24 h,包埋,切片(厚度 4 μm)。

1.1.2 刺激隐核虫孢囊的采集 刺激隐核虫分离自患病且鱼体布满白点大黄鱼,将平皿铺在有鱼圆桶底部收集刺激隐核虫孢囊。收集的孢囊用灭菌海水清洗几次,用 12 孔板保存于 12℃ 恒温培养箱,用于观察。

1.2 方法

MIF 的免疫组织化学检测采用(S-P)法。由厦门大学海洋与地球学院生化组实验室提供大黄鱼的 MIF 抗体^[8],大黄鱼 MIF GenBank 登录号为 FJ415099。将 MIF 一抗按 1:200 浓度稀释。SP-9001 染色试剂盒、DAB 显色试剂盒及兔超敏二步法试剂相关试剂购自北京中杉金桥公司。免疫组织化学中染色方法同参考文献[13],按试剂盒说明书进行操作,将在甲醛固定液中组织经过脱蜡、水化,滴入 5 mL 3% H_2O_2 用于阻断内源性过氧化物酶活力,静置 10 min;用 PBS 冲洗,5 min×3 次;用 0.5% BSA 封闭 1 h,滴入一抗,于 4℃ 中过夜,用 PBS 冲洗切片 5 min×3 次;再滴入二抗,于 37℃ 中孵育 20 min;加入 DAB 显色 10 min,用 PBS 冲洗共 5 min×3 次;再复染苏木素 5 min 后用水冲洗;用盐酸酒精分化再水冲洗,于不同梯度浓度酒精中脱水、于二甲苯溶液中透明,最后用中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。用已知阳性的大黄鱼刺激隐核虫病组织为 MIF 阳

性对照。

1.3 结果判断

MIF 阳性细胞呈棕黄色染色。在高倍镜下每张切片随机选 10 个视野,共数 1000 个细胞,采取染色强度及阳性细胞数百分比综合计分作半定量分析^[14]。①根据多数细胞染色特点评分:无着色,0 分;淡黄色,1 分;棕黄色,2 分;棕褐色,3 分。②以阳性细胞数百分比即按阳性细胞占所计数视野内细胞总数的多少评分:0 分:0~5%,1 分:6%~25%,2 分:26%~50%,3 分:51%~75%,4 分:>75%。按这①、②两项指标的积分相加,结果可分为 4 级:阴性(-):0 分,弱阳性(+):1~2 分,中度阳性(++):3~4 分,强阳性(+++):5~7 分。

1.4 统计处理

采取 SPSS 17.0 软件包,进行数据统计学分析,用 χ^2 检验, $P < 0.05$, 差异具统计学意义。

2 结果与分析

2.1 大黄鱼白点病及刺激隐核虫孢囊

刺激隐核虫寄生在大黄鱼体表与鳃丝等,并形成孢囊,病鱼黏液分泌增多,表皮细胞增生,包裹虫体,结成白色孢囊,呈白点形状,肉眼清晰可见,严重时鱼体体表白点较多,鳞片部分脱落(图 1-A、图 1-B)。刺激隐核虫引起大黄鱼活动异常、食欲下降、呼吸困难,造成鱼体器官受损及功能障碍,易继发细菌感染而死亡。严重时感染率可达 70%,死亡率大于 30%。

选择鱼体布满白点的大黄鱼,就能从体表收集到刺激隐核虫孢囊。其中孢囊体形状呈圆形或椭圆形,孢囊壁呈多层结构,孢囊表面出现较毛糙的结构(图 1-C、图 1-D)。

2.2 MIF 在刺激隐核虫病大黄鱼各组织器官中的表达

2.2.1 肠组织 健康大黄鱼肠组织中 MIF 表达呈阴性(图 2-A)。刺激隐核虫病大黄鱼的肠壁黏膜下层有空泡。MIF 呈阳性表达,在病鱼肠固有膜结缔组织与黏膜上皮细胞中,棕黄色阳性颗粒比较多,在肠黏膜层着色较强,MIF 阳性细胞在肠肌层和浆膜层存在一定程度的表达(图 2-B)。

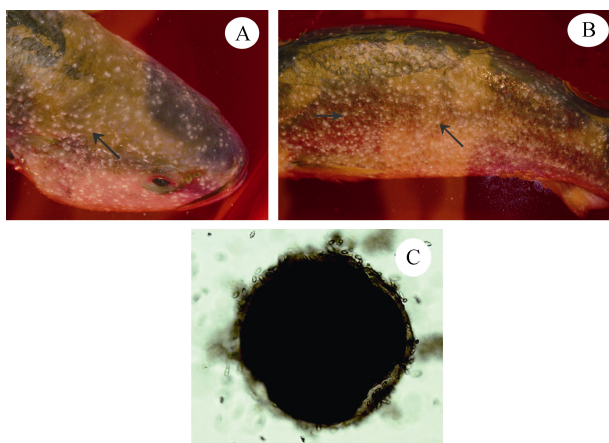


图 1 大黄鱼白点病及刺激隐核虫包囊

A、B: 大黄鱼白点病; C: 刺激隐核虫包囊。

Fig. 1 White-spots disease of *Larimichthys crocea* and cysts of *Cryptocaryon irritans*

A, B: white-spots disease of *Larimichthys crocea*; C: cysts of *Cryptocaryon irritans*.

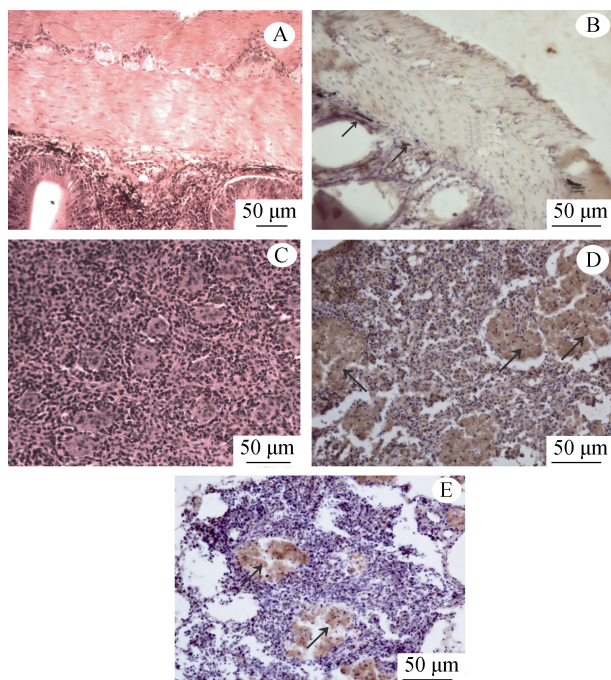


图 2 MIF 在大黄鱼各组织中的表达

A: MIF 在健康大黄鱼肠中呈阴性表达; B: MIF 在刺激隐核虫病鱼肠呈阳性表达(箭头示阳性细胞); C: MIF 在健康大黄鱼脾呈阴性表达; D、E: MIF 在刺激隐核虫病鱼脾呈阳性表达(箭头示阳性细胞)。

Fig. 2 MIF immunohistochemistry in the healthy tissues and diseased tissues of *Larimichthys crocea* infected with *Cryptocaryon irritans*

A: no stained cell is observed in the healthy intestines; B: many intensely labeled cells are observed in the diseased intestines (marked with arrows); C: no stained cell is observed in the healthy spleen; D and E: many intensely labeled cells are observed in the diseased spleen (marked with arrows).

2.2.2 脾组织 健康大黄鱼的脾组织 MIF 表达呈阴性(图 2-C)。患刺激隐核虫病大黄鱼脾索和脾窦分界不清晰, 脾脏边缘组织严重坏死。病鱼脾组织 MIF 阳性棕黄色颗粒呈弥漫性或灶状, 阳性表达较强(图 2-D、图 2-E)。

2.2.3 头肾组织 健康大黄鱼的头肾中 MIF 表达阴性(图 3-A), 患刺激隐核虫病大黄鱼头肾空泡增多。头肾中有许多 MIF 阳性细胞, 其小型颗粒异常地增多, 且染色强度为棕褐色, 为强阳性高度表达(图 3-B、图 3-C)。

2.2.4 肝组织 MIF 在健康大黄鱼肝中阴性表达(图 3-D), 刺激隐核虫病大黄鱼部分肝细胞萎缩(图 3-E), 随着病程的发展, 肝细胞解体, 形成局灶性坏死(图 3-F)。MIF 在患病大黄鱼肝组织

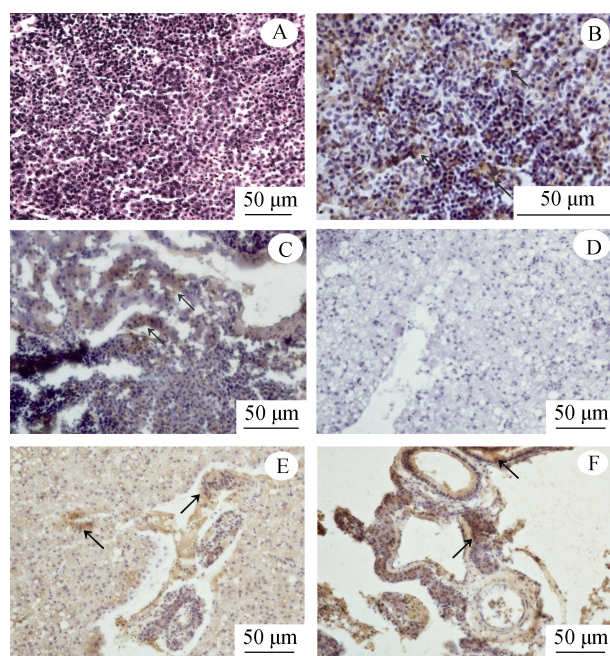


图 3 MIF 在大黄鱼各组织中的表达

A: MIF 在健康大黄鱼头肾呈阴性表达; B、C: MIF 在刺激隐核虫病鱼头肾呈阳性表达(箭头示阳性细胞); D: MIF 在健康大黄鱼肝呈阴性表达; E、F: MIF 在刺激隐核虫病鱼肝呈阳性表达(箭头示阳性细胞)。

Fig. 3 MIF immunohistochemistry in the healthy tissues and diseased tissues of *Larimichthys crocea* infected with *Cryptocaryon irritans*

A: no stained cell is observed in the healthy head kidney; B and C: many intensely labeled cells are observed in the diseased head kidney (marked with arrows); D: no stained cell is observed in the healthy liver; E and F: many intensely labeled cells are observed in the diseased liver (marked with arrows).

中的表达为强阳性, 阳性部分呈现棕黄色颗粒状(图 3-E、图 3-F)。

2.3 患刺激隐核虫病大黄鱼各免疫器官 MIF 免疫组织化学比较研究

健康大黄鱼肠、脾、头肾、肝中 MIF 均呈阴性; 大黄鱼患刺激隐核虫病肠组织中 MIF 表达强阳性率

45%, 阳性率 54%。MIF 在病鱼脾强阳性表达率 76%, 阳性率 86%。病鱼头肾 MIF 表达强阳性率 79%, 阳性率 90%。病鱼肝 MIF 表达强阳性率为 71%, 阳性率 80%(表 1)。说明患刺激隐核虫病大黄鱼头肾中 MIF 强阳性表达率最高, MIF 在刺激隐核虫病大黄鱼表达强度从弱到强依次是肠、肝、脾、头肾(表 1)。

表 1 MIF 在健康大黄鱼与刺激隐核虫病大黄鱼组织中的表达
Tab. 1 Synopsis of MIF reactivity in the tissues of *Larimichthys crocea* between healthy and diseased fish

类别 subject	肠 intestine		脾 spleen		头肾 head kidney		肝 liver	
	对照组 control	刺激隐核虫病 diseased	对照组 control	刺激隐核虫病 diseased	对照组 control	刺激隐核虫病 diseased	对照组 control	刺激隐核虫病 diseased
例数 number	100	100	100	100	100	100	100	100
MIF 的表达强度 /% staining intensity	—	46	100	14	100	10	100	20
	+	9	0	10	0	11	0	9
	++	21	0	30	0	25	0	26
	+++	24	0	46	0	54	0	45
阳性表达率/% expression rate	0	54.00*	0	86.00*	0	90.00 [△]	0	80.00 [△]

注: * $P<0.05$, $^{\Delta}P<0.01$. 阳性表达强度: 阴性(—), 弱阳性(+), 中度阳性(++), 强阳性(+++).
Note: * $P<0.05$, $^{\Delta}P<0.01$. Staining intensity: —, no staining; +, few; ++, weak; +++, strong.

3 讨论

在自然海域中, 刺激隐核虫密度较低, 野生鱼较少受到严重感染, 目前未有报道海洋中其他非鱼类动物感染刺激隐核虫。但在海水养殖鱼类中, 刺激隐核虫没有特异性选择宿主, 除蓝子鱼与软骨鱼类有抵抗力外, 其他所有养殖鱼如大黄鱼、石斑鱼与黑鲷等^[3]都易得病。在春秋两季即水温 24~28℃, 每年 3—4 月及 9—10 月, 养殖水体上凉下热, 海底的鱼粪便及残饵等污物浮到表面, 水易浑浊, 水质变差, 这时刺激隐核虫繁殖迅速, 易于寄生于鱼类。尤其是网箱、水族箱与水泥池等高密度人工养殖过程中鱼易致病。因此, 近几年来, 在福建、浙江、广东等主要海水鱼类养殖地区刺激隐核虫暴发频繁, 与海区中养殖密度不断增加密切相关。高密度养殖环境下, 水流不畅、鱼体营养不良、抗病力差, 这时容易引起刺激隐核虫病暴发, 造成了较为严重的经济损失^[15]。

目前还未有明显疗效的刺激隐核虫病治疗方法, 刺激隐核虫寄生鱼体, 会使鱼体产生氧化胁

迫与脂质过氧化反应, 寄生虫增多, 会造成鱼体免疫因子释放受抑制及紊乱发生, 鱼体质下降明显^[16]。采用药浴法治疗大黄鱼刺激隐核虫病, 用三氯异氰尿酸、硫酸铜、甲醛或高锰酸钾均有一定疗效, 能杀灭大黄鱼体表寄生的刺激隐核虫, 但也易造成鱼体死亡。这些防治方法存在一定的缺陷, 主要是由于刺激隐核虫一旦进入鱼体后, 能够刺激鱼体分泌黏液, 形成包囊, 能较好地抵抗外源药物的处理。刺激隐核虫的生活史可分为营养体(成虫)、包囊、纤毛幼虫 3 个时期。包囊壁呈多层结构, 包囊能无性分裂, 出现多细胞结构, 并最终形成纤毛幼虫。使用药物治疗, 只能杀死在鱼体表上的幼虫, 而成虫形成包囊并脱落, 并迅速增殖, 长出的纤毛幼虫呈几何级数增长, 再侵袭鱼体, 治疗效果甚微。对于其他海水鱼, 闫茂仓等^[16]发现用淡水浸泡再进行甲醛药浴对鲢鱼刺激隐核虫病疗效较好。也有学者为预防刺激隐核虫寄生将网箱移到水深达 30 m 的外海, 海水水流不断冲刷, 使鱼体表包囊得以脱落, 或在人工养殖过程中, 通过换水超过 50%, 避免继发

性感染。尽管如此,借助免疫手段将是今后刺激隐核虫病预防研究的主要方向^[17]。MIF 来源于单核细胞、巨噬细胞及垂体前叶细胞,在机体多个器官表达, MIF 因其可抑制单核细胞与巨噬细胞移动而得名, MIF 加强巨噬细胞黏附与吞噬功能,可促进巨噬细胞的聚集及在炎症局部浸润、增生,在多种免疫反应性与炎症疾病中发挥重要作用。MIF 在肿瘤血管形成过程中也发挥重要作用^[18]。MIF 能限制巨噬细胞聚集于异位灶处^[19],激活并增强巨噬细胞功能,使其分泌出各种细胞因子包括单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)等及血管形成因子与生长因子, MIF 能刺激血管内皮细胞增殖及血管上皮细胞进行有丝分裂,促进血管形成^[20]。

近年来福建多次暴发严重的大黄鱼刺激隐核虫病,而 MIF 与大黄鱼刺激隐核虫病发病机制的关系,尚未有报道。本研究结果中, MIF 在正常大黄鱼头肾、脾、肝、肠组织中表达呈阴性,在患刺激隐核虫病大黄鱼组织中高表达,患病大黄鱼头肾、脾、肝 MIF 阳性率达到 80%以上,在不同器官中 MIF 表达差异较大,表达强度从强到弱依次是头肾、脾、肝、肠。MIF 在患病大黄鱼头肾表达强阳性为 79%,阳性率为 90%,达最高。MIF 在患刺激隐核虫病大黄鱼肠表达强阳性为 45%,阳性率为 54%,最低。说明 MIF 与刺激隐核虫病有着密切的关系。

自 MIF 发现至今,随着其结构与功能研究的逐渐深入,研究 MIF 和鱼类炎症疾病的相关性及其在鱼类疾病防治中的潜在应用价值越来越受到人们重视。MIF 参与炎症反应^[14]。关于 MIF 蛋白的表达与炎症疾病的发病因素、发展过程、预后等究竟有怎样的关系?既往的研究结果包括: MIF 涉及机体各种炎症性、自身免疫性疾病的发病机制, MIF 能促使巨噬细胞在炎症部位聚集、增生、活化及分泌炎症因子,活化的炎症因子又进一步促进巨噬细胞大量释放,聚集在炎症部位,以扩大炎症反应^[21-23]。在肺部炎症反应时,大量

炎症细胞及炎症因子聚集在肺泡腔、肺毛细血管内,在增强炎症反应的同时使正常肺组织遭到破坏,从而导致肺泡损伤和毛细血管通透性增加,最终可致肺的炎症反应失调,阻碍肺发育, MIF 在早产儿肺组织中高度表达,尤其在新生儿呼吸窘迫综合征患儿更为显著^[24]。研究表明, MIF 还参与感染等病理过程, MIF 在全身多种炎症性疾病中高表达, MIF 通过炎症反应促进子宫内膜异位症的发生,在正常子宫内膜、在位内膜、异位内膜 MIF 均有表达,以正常子宫内膜、异位内膜和在位内膜的顺序逐渐呈强表达。MIF 还参与子宫内膜异位症血瘀证的发病, MIF 抑制 P53 基因引起凋亡, MIF 通过炎症反应促进子宫内膜异位症的发生^[25]。MIF 在肾虚血瘀型异位及在位内膜中高表达,在分泌中晚期增高最为显著^[25]。

综上所述, MIF 在刺激隐核虫病大黄鱼器官中的阳性表达及联合检测可作为评价鱼病的发生发展、恶性程度的重要指标之一,对大黄鱼白点病的早期诊断及预后等具有重要指导意义。而深入研究 MIF 在大黄鱼刺激隐核虫病中的调控机制,有利于为白点病的治疗提供新思路。

参考文献:

- [1] Chen Y T. The new circumstances and countermeasures of the fish disease in cage culture in summer of Fujian[J]. China Fisheries, 2011(9): 48-51.[陈燕婷. 福建省夏季网箱养殖鱼类主要病害情况及对策[J]. 中国水产, 2011(9): 48-51.]
- [2] Sun Z Y, Zheng C F, Wu X Y, et al. The Strain and life-cycle of *Cryptocaryon irritans* isolated from *Pseudosciaena crocea* cultured in Xiapu, Fujian[J]. Journal of Fujian Normal University: Natural Science Edition, 2011, 27(2): 101-108.[孙志宇, 郑昌峰, 武晓燕, 等. 福建霞浦海区刺激隐核虫菌株鉴定及生活史观察[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2011, 27(2): 101-108.]
- [3] Zou F, Su Y Q, Qin Y X, et al. Chemotaxis of marine fish parasite *Cryptocaryon irritans*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(4): 1003-1007.[邹峰, 苏永全, 覃映雪, 等. 福海水鱼类寄生虫刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)趋化性研究[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(4): 1003-1007.]
- [4] Roger T, Froidevaux C, Martin C, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4) [J]. J Endotoxin Res, 2003, 9(2): 119-123.

- [5] Jin H J, Shao J Z, Xiang L X. Identification and bioinformatic analysis of *Fugu rubripes* MIF gene[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(1): 135–138. [金红建, 邵健忠, 项黎新. 红鳍东方鲀 MIF 基因的鉴定及生物信息学分析[J]. 水生生物学报, 2007, 31(1): 135–138.]
- [6] Ito K, Yoshiura Y, Ototake M, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is essential for development of zebrafish, *Danio rerio*[J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32(6): 664–672.
- [7] Mao Y, Wang J, Zhang Z W, et al. Molecular cloning and sequence analysis of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene from *Thunnus albacares*[J]. Marine Sciences, 2009, 33(9): 30–34. [毛勇, 王军, 张之文, 等. 黄鳍金枪鱼巨噬细胞移动抑制因子(MIF)的克隆与序列分析[J]. 海洋科学, 2009, 33(9): 30–34.]
- [8] Rendon B E, Roger T, Teneng I, et al. Regulation of human lung adenocarcinoma cell migration and invasion by macrophage migration inhibitory factor[J]. J Biol Chem, 2007, 282(41): 29910–29918.
- [9] Stosic-Grubic S, Stojanovic I, Nicoletti F. MIF in autoimmunity and novel therapeutic approaches[J]. Autoimmun Rev, 2009, 8(3): 244–249.
- [10] Wang W C, Xia Y F, Hu Y J. Expression and significance of macrophage migration inhibitory factor in ARDS induced in intestinal ischemia-reperfusion[J]. Journal of Binzhou Medical University, 2012, 35(5): 335–338. [王蔚琛, 夏永富, 胡业佳. 巨噬细胞移动抑制因子在肠缺血再灌注致ARDS中的表达及意义[J]. 滨州医学院学报, 2012, 35(5): 335–338.]
- [11] Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis[J]. Circulation, 2002, 105(13): 1561–1566.
- [12] Beswick E J, Reyes V E. Macrophage migration inhibitory factor and interleukin-8 produced by gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* exposure induce expression and activation of the epidermal growth factor receptor[J]. Infect Immun, 2008, 76(7): 3233–3240.
- [13] He X X, Yang J, Ding Y W, et al. Increased epithelial and serum expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer: potential role of MIF in gastric carcinogenesis[J]. Gut, 2006, 55(6): 797–802.
- [14] Liu Z Y, Xie Y Q. The observation of the life history of *Cryptocaryon irritans*[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2010, 26(1): 46–48. [刘振勇, 谢友伦. 刺激隐核虫生活史的观察[J]. 福建水产, 2010, 26(1): 46–48.]
- [15] Yin F, Gong Q Y, Shi Z H, et al. Stress and immune responses of the marbled rockfish *Sebastes marmoratus* infected with *Cryptocaryon irritans*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(4): 681–688. [尹飞, 龚颖杨, 施兆鸿, 等. 刺激隐核虫感染对褐鳕的胁迫及鱼体的免疫应答[J]. 水生生物学报, 2014, 38(4): 681–688.]
- [16] Yan M C, Shao X B, Shan L Z, et al. Study on Prevention and Treatment of *Cryptocaryon irritans* with Formalin for brown croaker, *Miichthys miiuy*[J]. Modern Fisheries Information, 2008, 11(23): 16–19. [闫茂仓, 绍鑫斌, 单乐州, 等. 福尔马林防治鳊鱼刺激隐核虫的研究[J]. 现代渔业信息, 2008, 11(23): 16–19.]
- [17] Qiu J Q, Liu W, Yang X L, et al. Advances in the immunological study of *Cryptocaryon irritans*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2011, 6(10): 787–788. [邱军强, 刘玮, 杨先乐, 等. 刺激隐核虫免疫学研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(10): 787–788.]
- [18] Yang W L, Yang J, Huang X Y. Clinical analysis of sero resistance of syphilis in the past decade[J]. Journal of Clinical Dermatology, 2005, 34(1): 719–721. [杨文林, 杨健, 黄新宇. 近 10 年梅毒血清固定患者临床分析[J]. 临床皮肤科杂志, 2005, 34(1): 719–721.]
- [19] Shan Z X, Lin Q X, Yang M, et al. Transcription factor Ap-1 mediates proangiogenic MIF expression in human endothelial cells exposed to Angiotensin II[J]. Cytokine, 2011, 53(1): 35–41.
- [20] Ren Y, Tsui H T, Poon R T P, et al. Macrophage migration inhibitory factor: Roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2003, 107(1): 22–29.
- [21] Agarwal R, Whang D H, Alvero A B, et al. Macrophage migration inhibitory factor expression in ovarian cancer[J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 196(4): 348. e1–5.
- [22] Ren Y, Law S, Huang X, et al. Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Ann Surg, 2005, 242(1): 55–63.
- [23] Tang Z H, Yang X F. The expression and significances of VEGF and MIF at implantation window phase of cases with polycystic ovary syndrome[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2011, 26(5): 737–739. [唐智华, 杨雪峰. 多囊卵巢综合征患者着床窗口期子宫内膜 VEGF、MIF 的表达及意义[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(5): 737–739.]
- [24] Cai Y L. Clinical study on the correlation between nuclear factor - κ B, macrophage migration inhibitory factor and endometriosis[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2013, 28: 1170–1173. [蔡亚兰. NF- κ B 和 MIF 的表达与子宫

- 内膜异位症的临床相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28: 1170–1173.]
- [25] Wen Y, Huang J Y, Zhong Z D, et al. Expressions and correlation of macrophage migration inhibitory factor in endometriosis of blood stasis[J]. Journal of Nanjing University of TCM, 2013, 29(2): 132–134.[文怡, 黄金燕, 钟振东, 等. MIF 表达与子宫内膜异位症血瘀证的相关性研究[J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(2): 132–134.]

Detecting macrophage migration inhibitory factor in tissues of *Larimichthys crocea* with *Cryptocaryon irritans* disease

XU Xiaojin¹, SANG Benhong¹, QIN Yingxue¹, ZOU Wenzheng¹, MAO Yong², ZOU Feng¹, LUO Gang¹, SU Yongquan²

1. Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Fishery Resources and Eco-environment, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. College of Ocean & Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: *Cryptocaryon irritans* is a holotrichous marine ciliate protozoan that causes “white spot disease”, which is one of the most devastating parasites of *Larimichthys crocea* in Fujian Province. No safe drug strategy has been identified to prevent and cure “white spot disease”. To investigate the expression and prognostic value of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in *C. irritans* diseased *L. crocea* tissues, MIF expression was detected by immunohistochemistry of intestine, spleen, head kidney, and liver specimens of pathologically identified and healthy *L. crocea* tissues. None of the negative controls reacted, but MIF staining was intense in all *L. crocea* tissues infected with *C. irritans* disease. The MIF staining rates for the intestines, liver, spleen, and head kidney were 54%, 80%, 86% and 90%, respectively. The high MIF expression levels in diseased tissues indicate that MIF plays an important role in homeostasis of *C. irritans* infected with *L. crocea*.

Key words: *Larimichthys crocea*; macrophage migration inhibitory factor; *Cryptocaryon irritans*; immunohistochemistry