

文章编号: 1000- 0615(2005)03- 0411- 06

#综述#

## 鱼类粘膜免疫研究进展

罗晓春<sup>1</sup>, 谢明权<sup>1</sup>, 黄玮<sup>2</sup>, 李安兴<sup>1</sup>

(1. 中山大学生命科学学院水生生物研究所, 广东 广州 510275;

(2. 广东省水产学校, 广东 广州 510320)

关键词: 鱼类; 粘膜组织; 特异性免疫; 非特异性免疫; 免疫调节

中图分类号: S917 文献标识码: A

### Review of fish mucosal immunity research

LUO Xiaochun<sup>1</sup>, XIE Mingquan<sup>1</sup>, HUANG Wei<sup>2</sup>, LI Anxing<sup>1</sup>

(1. Institute of Hydrobiology, Life Science College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Aquaculture School of Guangdong Province, Guangzhou 510320, China)

Abstract: Fish immunology has achieved great progress in recent years. While before 1990s, most researches focused on the fish systematic immunity, and the mucosal immunity of fish had not been given enough attention. Indeed, it has been shown that fish mucosal immunity plays an important role in disease defense. Fish mucosal immunity research has made some exciting progress in this decade. This review will focus on such progress: Constitution of mucosal associated tissues and distribution of different immune cells, including T/B lymphocytes, granules, monocytes, macrophages, goblet cells, etc, in these sites have been well described with the development of some monoclonal antibody to these cells and associated techniques. Non-specific immune response mechanism of mucosal tissues reported these years, such as secretion of non-specific anti-bacteria and anti-fungi substances in mucus, the respiratory burst, enzyme activity of immune cells and so on, is believed important for fish disease defense. The specific immunity of mucosal tissues also attracts much interest and makes great achievement in antigen presenting, MHC genes, antibody producing and antibody secreting cells, comparison of serum and mucus immunoglobulin, relationships of immune response between different mucosal immune tissues. Whether mucosal immune system is independent of systematic immune system is another interesting question and causes great concern. In recent years, some evidences from phyletic evolution and ontogenesis show that mucosal immunity is prior to systematic immunity in evolution. Dynamics of antibody producing of mucosal tissues and serum in immersion or oral vaccines immunized fish also shows immune response can be elicited in mucosal tissues independent of systematic immune system. Some researchers also begin to pay attention to factors involved in mucosal immune regulations, for instance, neuromodulators and cytokines. The level of these factors changes in fish immune response process but the mechanisms of regulation still remain unknown. Prospect of the promising future of fish mucosal immunity has also been discussed in this review.

Key words: fish; mucosal tissue; specific immunity; non-specific immunity; immune regulation

近二十年来, 鱼类免疫学研究逐渐地成为了鱼类学研究中的热点, 并且取得了很大的进步<sup>[1]</sup>。但目前的研究大多都集中在系统免疫(systematic immunity)方面, 而对粘膜免疫(mucosal immunity)则没有引起足够的重视<sup>[2,3]</sup>。而在哺乳动物中, 粘膜免疫的研究却倍受重视, 成为免疫学研究中最活跃的领域之一<sup>[4,5]</sup>。

鱼类生活在水环境中, 其大面积的粘膜包括皮肤、鳃、消化道等是病原感染鱼类时最先接触的部位。许多证据

表明粘膜并不仅仅是物理屏障, 其局部的免疫应答对病原体的抵御更加重要, 因此, 粘膜免疫系统研究逐渐受到了重视<sup>[6,7]</sup>。目前认为, 疫苗是鱼病防治最好的方式, 口服疫苗和浸泡疫苗的研究需要也促使了人们对鱼类粘膜免疫系统进行更深入的研究。本文将对鱼类粘膜免疫系统的组成、非特异性及特异性免疫应答、免疫调节、口服疫苗、浸泡疫苗等研究的最新进展作一综述, 并对粘膜免疫系统各组成之间的关系, 以及粘膜免疫与系统免疫之间的

收稿日期: 20031201

资助项目: 广东省自然科学基金团队项目(20023002)

作者简介: 罗晓春(1977-), 男, 福建上杭人, 博士研究生, 主要从事鱼类病害研究。E-mail: lxcsy@163.net

通讯作者: 李安兴, Tel: 020-84115113, E-mail: ls58@zsu.edu.cn

关系等问题进行了讨论。

## 1 粘膜免疫系统的组成

真骨鱼类粘膜相关淋巴组织 (mucosa-associated lymphoid tissues) 主要包括肠道、皮肤和鳃, 这些暴露于外环境的组织及其表面的粘液构成了抵御病原入侵的第一道屏障<sup>[8]</sup>。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功能<sup>[2,9]</sup>。

### 1.1 肠道

鱼类的肠道粘膜层可分为两层: 肠上皮层 (lamina epithelialis) 和肠固有层 (lamina propria)<sup>[9,10]</sup>。粘膜层中分布有粒细胞、巨嗜细胞等白细胞, 主要存在于肠道皱褶的固有层, 而上皮层中较少<sup>[11]</sup>。

鱼类肠道虽然没有类似哺乳动物 Peyer 氏淋巴集结, 但是还有着相当数量的淋巴细胞, 主要分布在肠道的中后部。根据它们的位置, 可以分为肠道固有层淋巴细胞 (lamina propria lymphocytes, LPLs) 和上皮内淋巴细胞 (intraepithelial lymphocytes, IELs)。通过免疫组化检测发现, 后肠中的  $Ig^+$  淋巴细胞主要分布在固有层, 上皮层中的淋巴细胞则大多是  $Ig^-$  细胞<sup>[10,12]</sup>, 也有报道在中肠上皮层有  $Ig^+$  细胞的分布<sup>[13]</sup>。 $Ig^-$  的细胞一般被认为是 T 细胞, Abdeli 等<sup>[14]</sup>应用胸腺细胞的单抗检测肠道淋巴细胞, 也证实 T 细胞主要分布于肠道上皮层。McMillan 和 Secombes<sup>[11]</sup>发现, 肠上皮层细胞淋巴细胞对肿瘤靶细胞具有类似 T 细胞的细胞毒性, 这个结果与 T、B 淋巴细胞在肠道中的分布情况相吻合。

### 1.2 皮肤

鱼类的皮肤表皮主要由上皮细胞组成, 其间分布有粘液细胞和囊状细胞<sup>[9,15]</sup>, 另外还证实, 皮肤表皮还存在抗体分泌细胞<sup>[16]</sup>。

### 1.3 鳃

鳃组织的细胞主要由大淋巴细胞、小淋巴细胞、巨嗜细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、杯状细胞、泌氯细胞 (chloride cells)、上皮细胞等构成。鳃上淋巴细胞和巨嗜细胞的存在, 暗示着鳃具有抗原处理、呈递及免疫应答的细胞基础<sup>[17,18]</sup>。通过检测这些细胞内酶的活性, 结果表明部分粒细胞及巨嗜细胞具有酸性磷酸酶、碱性磷酸酶及非特异性脂酶的活性, 类似于外周血免疫细胞的酶活性特点<sup>[18]</sup>。进一步研究表明鱼类鳃上的细胞能产生和分泌一种化学趋化物质 (chemoattractants), 能引起白细胞向鳃的局部迁移; 而鳃上的白细胞迁移活性远远低于头肾白细胞, 这种现象与肠道白细胞类似, 意味着白细胞迁移到粘膜组织后, 就对趋化物质不敏感了, 因而驻留在粘膜组织。从鳃淋巴细胞对有丝分裂原 LPS 和 PHA 的应答情况看, PHA 能明显引起淋巴细胞转化, 而 LPS 引起的淋巴细胞转化则相对较弱, 推测鳃上的淋巴细胞中 T 细胞占多数<sup>[19,20]</sup>。

## 2 粘膜免疫系统的非特异性免疫

鱼类的非特异性免疫, 如通过一些非特异性的溶菌酶、蛋白酶及呼吸暴发产生的活性氧自由基等来杀灭入侵微生物, 是鱼类相当重要的防御机制之一<sup>[21]</sup>。研究表明, 粘膜免疫系统也存在这些非特异性的免疫机制。

通过对鱼的皮肤和粘液抽提物进行研究, 发现其中有一些非特异性的抗细菌、真菌的物质<sup>[22]</sup>, 这些物质对病原的作用具有广谱性。对皮肤粘液与寄生虫感染的关系研究发现, 虹鳟鳍条和皮肤粘液细胞密度与三代虫感染强度呈负相关, 并认为粘液中的溶菌酶、蛋白酶、免疫球蛋白及 C3 补体对寄生虫的感染都有影响<sup>[23]</sup>。

鱼类鳃和肠道的吞噬细胞都存在活性氧自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ )。鳃上的吞噬细胞具有吞噬活性, 但是从其  $O_2^{\cdot-}$  活性看, 其呼吸暴发 (respiratory burst) 强度不如头肾白细胞<sup>[20]</sup>。而对肠道巨嗜细胞的呼吸暴发进行研究, 结果表明虹鳟后肠巨嗜细胞对 PMA 刺激后的化学发光反应 (chemiluminescence response) 强度明显比前肠细胞强, 这种差别并不是因为巨嗜细胞在前、后肠中数量上的明显差别, 而是两个部位的巨嗜细胞细胞反应强度不相同<sup>[2]</sup>。此外, 大剂量的维生素 E 可以增强鱼类肠道白细胞的吞噬活性, 这可能与维生素 E 能增强吞噬细胞膜的流动性有关<sup>[24]</sup>。

鱼类的嗜曙红细胞 (eosinophilic granule cells, EGCs) 在非特异性免疫中也有相当重要的作用。Flano 等<sup>[25]</sup>发现虹鳟鱼体外培养的鳃在受到细菌刺激时, EGCs 数量增加, 并推测 EGCs 是由局部的前体细胞分化而来。Holland 等<sup>[1]</sup>的结果也证实了这一点, 在体外培养的鳃受到 LPS 和人重组 TNFA 刺激时, EGCs 的数量有显著的增加, 并且还发现鱼体受急性应激 (acute stress) 和慢性应激 (chronic stress) 时, EGCs 的数量也会增加, 这些现象类似于哺乳动物肥大细胞应激时的反应机制。另外鱼类皮肤、鳃及肠道的 EGCs 与哺乳动物肥大细胞有类似的细胞酶活性 (如磷酸酶, 非特异性脂酶等), 并在 P 物质 (substance P, SP)、辣椒素等物质的刺激下发生去颗粒化<sup>[20]</sup>, 因而一般认为鱼类的 EGCs 细胞与哺乳动物肥大细胞是同源的。

## 3 粘膜免疫系统的特异性免疫

在哺乳动物中, 当抗原接触粘膜时, 可以引起局部的免疫应答, 并分泌特异性的 IgA 抗体。然而, 鱼类粘膜免疫系统是否能在局部独立完成特异性免疫应答, 一度引起了相当的争议<sup>[12]</sup>。最初, 研究表明口服和肠道灌注的方法进行免疫都可以引起体液和细胞免疫应答<sup>[7]</sup>, 而且口服疫苗可以使鱼体产生不依赖于血清抗体的粘膜抗体<sup>[12]</sup>。近十年来, 围绕这一问题的研究取得了很大的进展, 越来越多的学者倾向于粘膜免疫系统可以不依赖系统免疫, 独立地完成特异性免疫应答这一观点; 粘膜免疫系统可独立

完成抗原摄取、呈递及抗体分泌, 并且局部的免疫应答对抵御病原的入侵起着重要的作用<sup>[27, 28]</sup>。

### 3.1 抗原摄取及呈递

在自然状况下, 大多数病原入侵时首先接触到的是粘膜系统, 粘膜摄取和呈递抗原对粘膜免疫和系统免疫都有重要作用<sup>[7]</sup>, 因而人们开始对肠道、鳃、皮肤组织结构、抗原摄取及主要组织相容性抗原 MHC 等进行了研究。

**肠道对抗原的摄取** 由于鱼类肠道没有类似于哺乳动物的 Peyer 氏淋巴集结, 这样可能影响其对颗粒性抗原的摄取和呈递。肠道对抗原的摄取主要发生在鱼类肠道的后半部分(被称为 hind gut 或 the second gut), 占肠道总长的 20%~25%, 这个部分的肠道上皮细胞可以通过吞方式摄取并转移大分子抗原, 转送到肠道固有层的巨嗜细胞和血液循环系统中<sup>[29]</sup>。虽然在大西洋鲑中发现肠道的前半部分也能吸收大分子物质并转送到循环系统<sup>[30]</sup>, 但是目前普遍认为前肠主要执行消化功能, 而后肠才是肠道的主要抗原摄取及免疫应答部位<sup>[9]</sup>。虽然可溶性抗原较颗粒性抗原更易被肠道吸收, 但也易被降解, 而包埋在微颗粒中的可溶性抗原却可以抵抗消化道酸性环境及蛋白酶的消化, 到达肠道后部, 从而引起更强的免疫应答<sup>[7]</sup>, 并且再次应答的强度也更高<sup>[31]</sup>。

**皮肤及鳃对抗原的摄取** 皮肤和鳃也具有抗原摄取的功能。Moore 等<sup>[32]</sup>用 BSA 乳胶颗粒浸泡虹鳟, 对颗粒抗原的计数发现抗原摄取量与浸泡浓度呈正相关, 并且抗原主要由皮肤和鳃摄取, 虽然在鱼肠腔中可见颗粒性抗原, 但是并未进入肠组织内。身体各部分皮肤对抗原的摄取量没有明显差异。摄取的抗原可在皮肤和鳃中至少滞留 24 d, 数量随天数减少。抗原在皮肤和鳃上滞留足够长的时间, 可以引起局部的免疫应答。皮肤和鳃摄取的抗原可以向头肾和脾脏转移。通过对皮肤和鳃的形态学观察, 颗粒性抗原先出现在皮肤的柱状上皮中, 随后在真皮中也可见; 而鳃上抗原颗粒主要是吞噬细胞摄取的。

**MHC 及粘膜免疫系统的抗原呈递** 在哺乳动物的外源抗原呈递处理中 MHC (major histocompatibility complex) 分子起了重要的作用。在真骨鱼类中也有许多的证据, 如急性移植排斥、混合淋巴细胞反应等, 表明真骨鱼类具有功能性的 MHC II (MHC class II) 基因, 并且在草鱼、斑马鱼、驼背犬齿罗非鱼 (*Cyphotilapia frontosa*)、斑鲈、虹鳟、大西洋鲑的头肾克隆到了 MHC II 的 cDNA<sup>[33, 34]</sup>。近年来的研究表明, MHC II 不仅在主要淋巴器官中表达, 在鳃及后肠中也有表达, 并且其表达量在免疫后的鱼内显著增加, 这些证据表明, MHC 分子在鱼类的粘膜免疫抗原呈递中发挥了重要的作用<sup>[35]</sup>, 但是目前对抗原处理及呈递的具体机制还知之甚少<sup>[9]</sup>。

### 3.2 肠道粘膜的特异性免疫应答

许多研究表明, 通过口服疫苗或肛门灌注 (peranal, PA.) 方法能有效地引起肠道的免疫应答, 并产生有效的

免疫保护<sup>[9]</sup>。近年来通过 ELISPOT 方法研究肠道抗体产生的动力学时发现, 口服疫苗不仅能引起肠道粘膜的免疫应答, 在皮肤、鳃中都可检测到特异性抗体分泌细胞 (antibody secreting cells, ASC)<sup>[28, 36]</sup>。一般认为口服疫苗引起免疫应答以粘膜免疫应答为主, 系统免疫应答并不是很强, Lin 等<sup>[28]</sup>发现口服乳化 HGG 后, 头肾中没有特异性 ASC。Merin & Contreras 等<sup>[36]</sup>在口服细菌疫苗的鱼脾脏中检测到了特异性 ASC, 但是数量没有肠道多。

### 3.3 皮肤及鳃粘膜的特异性免疫应答

Lumsden 等<sup>[37]</sup>用黄杆菌浸泡免疫虹鳟, 发现鳃上产生的免疫应答对免疫保护起着相当重要的作用。通过 ELISPOT 方法检测鳃及外周血的 ASC 时发现, 鳃上的 ASC 占鳃细胞总数的 0.42%, 明显较外周血 ASC 的比例高, 再根据鳃组织的细胞组成, 认为鳃具有独立免疫应答的能力<sup>[3, 18]</sup>。

dos Santos 等<sup>[27]</sup>检测细菌浸泡免疫后的石齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 幼鱼各免疫组织中的 ASC, 发现无论是初次免疫还是再次免疫, 鳃上的 ASC 数量都显著高于后肠、脾脏及头肾, 系统免疫并没有产生强的免疫应答, 并且通过比较浸泡免疫后鳃上的 ASC 比例和注射免疫后头肾中 ASC 比例, 前者明显高于后者, 发生应答的时间也早于注射免疫。另外研究发现, 浸泡免疫时, 抗原摄取的部位主要是皮肤和鳃, 并且摄取后的抗原主要停留在局部, 只有少部分转移到了头肾和脾脏<sup>[32, 38]</sup>, 这一现象也解释了为何免疫应答主要发生在粘膜上的原因。

Xu 等<sup>[16]</sup>的实验为证明皮肤能独立分泌抗体提供了直接的证据。切取免疫过多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 的鲢皮肤, 进行体外培养, 发现其培养液中具有聚集、阻动及致死小瓜虫的抗体存在, 并且在培养后 24~72 h 达到抗体分泌的高峰期, 证明抗体是在皮肤局部合成的, 并能有效地阻止小瓜虫幼虫对鲢的侵入。

### 3.4 粘膜免疫系统的免疫记忆

粘膜免疫应答是否具有免疫记忆, 是口服和浸泡疫苗有效与否的重要指标之一, 目前对这一问题的研究还较少。dos Santos 等<sup>[27]</sup>发现初次浸泡和再次浸泡后, 鳃上的 ASC 细胞数量并没有显著增加, 但是初次浸泡后再经注射免疫同种抗原时, ASC 细胞数量较初次浸泡的要高。Cain 等<sup>[39]</sup>应用 BIAcore 生物感应器检测了初次应答及再次应答的血清及粘液抗体与抗原的解离常数, 发现再次应答的抗体与抗原的解离常数降低, 亲和力较初次应答的抗体高出 2~3 倍, 由于鱼类免疫球蛋白没有高可变区的重组, 对亲和力提高的具体机制还不清楚。

### 3.5 粘液免疫球蛋白与血清免疫球蛋白

粘液和血清免疫球蛋白是否同源, 一直都存在争议。Lobb 和 Clem<sup>[40]</sup>发现粘液和血清免疫球蛋白都是四聚体, 并且有相同分子量的重链、轻链; Rombout 等<sup>[12]</sup>的研究结果却表明草鱼的粘膜 Ig 与血清 Ig 是有差异的, 血清 Ig 的

单抗能识别血清和粘液 Ig, 而粘液 Ig 的单抗仅能识别粘液 Ig; Kaattari 等<sup>[41]</sup>也发现真骨鱼类存在不同氧化还原电位的 Ig; Cain 等<sup>[6]</sup>发现虹鳟粘液 Ig 的 SDS-PAGE 电泳带型与血清 Ig 的带型不一样, 除了具有血清 Ig 重链、轻链带(72 kDa 和 28 kDa)外, 还有 68 kDa 和 43 kDa 的带。这些结果都说明了鱼类确实存在异源形式 (heterogeneous forms) 的 Ig, 但是具体的原因还有待于进一步的研究。

### 3.6 粘膜免疫系统各组成之间的关系

在哺乳动物中粘膜免疫有一种现象, 即当某一部分的粘膜受到抗原刺激时, 能激活其它部位的粘膜免疫组织的应答<sup>[4]</sup>, 在鱼类中也存在这一现象, 其中机制还不是很清楚。比如鱼体口服疫苗时, 除了肠道粘膜外, 在皮肤、鳃中都检测到特异性抗体分泌细胞<sup>[28, 36]</sup>。但也有报道口服疫苗时, 后肠有显著的免疫应答, 鳃上却没有<sup>[3]</sup>; 当浸泡免疫时鳃有很强的免疫应答, 而肠粘膜应答则很弱<sup>[27]</sup>。这些现象可能是因抗体检测方法不同造成的, 或是其中有某种机制, 还需要进一步的研究。

### 3.7 粘膜免疫和系统免疫的关系

系统免疫与粘膜免疫在个体发育及进化中的关系是发育和比较免疫学需要解决的一个重要问题。在哺乳动物中, 有学者基于 TCR (T cell receptor) CD 淋巴细胞大多位于粘膜上皮中, 而 TCRC D 淋巴细胞在进化上是早于 TCRA B 淋巴细胞, 因而一般认为在体表粘膜免疫的出现在进化上先于系统免疫<sup>[42]</sup>。而且近年来的研究也表明在鼠肠道中的 TCD 淋巴细胞亚群并不是来源于胸腺, 而是产生于肠道的淋巴集结<sup>[43]</sup>。从鱼类胚胎发育过程看, 胸腺是由第二鳃囊发育而成; 而从解剖学上看, 胸腺上皮并没有完全从鳃上皮中分离出, 它们是相连的, 这些证据暗示胸腺可能是由鳃粘膜进化来的<sup>[44]</sup>。

在免疫应答中, 粘膜免疫和系统免疫之间是相互关联的。在鱼类免疫学中, 过去一般认为鱼类的粘膜免疫系统不完整, 不能独立完成免疫应答, 是依附于系统免疫的, 而且有证据表明鱼体腹腔注射免疫后, 粘液抗体效价会随着血清抗体效价而变化, 呈现出血清抗体向皮肤粘液渗透的现象<sup>[6, 45]</sup>。但是近年来的研究表明粘膜免疫和系统免疫应答机制并不一致<sup>[7]</sup>。通过浸泡免疫引起的系统免疫应答有时很弱甚至检测不到, 但是并不表明鱼体没有产生免疫应答, 而是免疫应答主要发生在鳃局部的粘膜免疫组织中<sup>[46]</sup>, 而且在某些情况下血清抗体的浓度与免疫保护并不相关<sup>[46, 47]</sup>; Cain 等<sup>[6]</sup>也发现经肠道灌注可溶性抗原后, 肠道粘膜的抗体水平出现高峰的时间早于血清, 并认为粘膜抗体的产生并不是依赖于外周血, 而是在局部免疫应答中产生的; Xu 等<sup>[16]</sup>的实验也证实离体培养的皮肤还具有分泌特异性抗体的功能。这些证据都表明粘膜免疫系统可独立于系统免疫, 完成免疫应答。

## 4 粘膜免疫系统的免疫调节

目前鱼类的免疫调节的研究尚为起步阶段, 对粘膜免

疫系统的免疫调节则还很欠缺。Dezfuli 等<sup>[48]</sup>对感染绦虫的褐鳟 (*Salmo trutta*) 肠道中的多种神经调节因子, 包括 P 物质 (substance P, SP)、降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP)、甲硫啡肽、肠血管肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP)、血清素等进行研究, 这些神经因子都是哺乳动物肠道免疫调节相关因子, 结果表明鱼类抗肠道绦虫炎症反应中, 这些神经因子的水平也有发生变化, 如 SP、甲硫啡肽、VIP、血清素水平都有不同程度的上升, 暗示着这些神经因子参与了鱼类肠道的免疫调节, 但这些因子如何调节免疫系统则还有待于进一步的研究。另外有研究表明粘膜免疫系统对抗原的应答具有选择性, Jones 等<sup>[49]</sup>发现鱼类肠道对 KLH (keyhole limpet hemocyanin) 不产生免疫应答, 而通过注射 KLH 却可以引起系统免疫应答, 其原因是肠道 B 淋巴细胞对该抗原是选择性不应答, 对肠道适应性的 B 细胞层次的免疫调节。

## 5 粘膜免疫研究展望

由于鱼类是进化上最早具有较完善免疫系统的动物, 对其粘膜免疫系统的研究, 将丰富人们对鱼类免疫学、比较和发育免疫学的认识, 对免疫系统的发生和进化都有重要意义, 日前已逐渐为人们所重视, 成为鱼类免疫学中的又一热点<sup>[41]</sup>。然而目前仍然有许多问题尚待进一步研究, 包括粘膜免疫应答的机制, 如抗原的摄取、呈递、T/B 淋巴细胞的应答; 细胞因子及内分泌系统对粘膜免疫系统的调节; 致敏免疫细胞从诱导部位到效应部位的归巢 (homing) (这一点是目前哺乳动物免疫学研究中的前沿及热点<sup>[41]</sup>); 粘膜免疫与系统免疫之间的相互协作关系等等。

另外, 对鱼类粘膜免疫的研究, 最初很大程度上是出于浸泡疫苗和口服疫苗研制的需要<sup>[30]</sup>, 而今后这两种疫苗相关的研究也还会是粘膜免疫研究中的重点之一, 其中主要包括以下两个问题: 一是如何进一步优化抗原的包被方法, 如报道过的使用藻酸盐微颗粒、聚乙丙交酯等包被抗原的方法<sup>[7, 31]</sup>, 使抗原能成功被粘膜免疫组织摄取, 并引起有效的免疫应答; 二是如何选取增强粘膜免疫系统应答的佐剂, 如霍乱毒素 B (cholera toxin B, CTB) 和大肠杆菌热稳定毒素 (heat labile toxin, hLT) 等<sup>[32, 51]</sup>, 刺激粘膜免疫系统产生更强的应答。

## 参考文献:

- [1] Holland J W, Rowley A F. Studies on the eosinophilic granule cells in the gills of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1998, 120C: 321- 328.
- [2] Clerton P, Troutaud D, Desjeux P. The chemiluminescence response of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, 8: 73- 76.
- [3] Davidson G A, Lin S H, Secombes C J, et al. Detection of specific and - constitutive antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1997, 58: 363-

- 374.
- [4] 李国平, 杨 恬. 粘膜免疫系统的研究进展[J]. 细胞及分子免疫学杂志, 2001, 17(6): 594- 597.
- [5] Vancikova Z. Mucosal immunity: basic principles, ontogeny, cystic fibrosis and mucosal vaccination[J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2002, 2(1): 83- 95.
- [6] 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 Shellfish Immunol*, 2000, 10: 651- 666.
- [7] Joosten P H M, Tiemersma E, Threels A, et al. Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1997, 7: 471- 485.
- [8] Dalmo R A, Ingebrigtsen K, Bergwald J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES) [J]. *J Fish Dis*, 1997, 20: 241- 273.
- [9] Press C M, Evensen O. The morphology of the immune system in teleost fishes[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, 9: 309- 318.
- [10] Fournierbetz V, Quentel C, Lamour F, et al. Immunocytochemical detection of Ig $\alpha$  positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, 10: 187- 202.
- [11] McMillan D N, Secombes C J. Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1997, 7: 527- 541.
- [12] Rombout J H W M, Tavem $\alpha$ Thiele A J, Villena M I. The gut associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1993, 17: 55- 66.
- [13] Scapigliati G, Romano N, Picchiatti S, et al. Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalisation of immunoglobulin bearing cells and applicability in immunoassays [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1996, 6: 383- 401.
- [14] Abelli L, Picchiatti S, Romano N, et al. Immunohistochemistry of gut associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1997, 7: 235- 245.
- [15] Fast M D, Sims D E, Burka J F, et al. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2002, 132A: 645- 657.
- [16] Xu D H, Klesius P H, Shelby R A. Cutaneous antibodies in excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, immune to *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *J Fish Dis*, 2002, 25: 45- 52.
- [17] 刘 云, 姜国良, 姜 明, 等. 牙鲆鳃淋巴样组织内免疫相关细胞的超微结构[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(6): 872- 876.
- [18] Lin S H, Davidson G A, Secombes C J, et al. Morphological study of cells isolated from the perfused gill of dab and Atlantic salmon [J]. *J Fish Biol*, 1998, 53: 560- 568.
- [19] Davidson G A, Ellis A E, Secombes C J. Cellular responses of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. *J Fish Dis*, 1991, 14: 651- 659.
- [20] Lin S H, Ellis A E, Davidson G A, et al. Migratory, respiratory burst and mitogenic responses of leucocytes isolated from the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, 9: 211- 226.
- [21] Secombes C J. Enhancement of fish phagocyte activity [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1994, 4: 421- 436.
- [22] Hellio C, Pons A M, Beaupeil C, et al. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus [J]. *Int J Antimicrob Ag*, 2002, 20: 214- 219.
- [23] Buchmann K, Bresciani J. Microenvironment of *Gyrodactylus dejavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection [J]. *Parasitol Res*, 1997, 84(1): 17- 24.
- [24] Clerton P, Troutaud D, Verlhac V, et al. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, 11: 1- 13.
- [25] Flano E, LopezFierro P, Razquin B E, et al. In vitro differentiation of eosinophilic granular cells in *Renibacterium salmoninarum* infected gill cultures from rainbow trout [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1996, 6: 173- 84.
- [26] Powell M D, Wright G M, Burka J F. Degranulation of eosinophilic granule cells induced by capsaicin and substance P in the intestine of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) [J]. *Cell Tissue Res*, 1991, 266: 469- 74.
- [27] dos Santos N M S, Tacame $\alpha$ Thiele J J, Barnes AC, et al. The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, 11: 65- 74.
- [28] Lin S H, Davidson G, Secombes C J, et al. Use of a lipid emulsion carrier for immunization of dab (*Limanda limanda*) by bath and oral routes: an assessment of systemic and mucosal antibody responses [J]. *Aquac*, 2000, 181: 11- 24.
- [29] Strand H K, Dalmo R A. Absorption of immunomodulating B $\alpha$ 1, 3)2glucan in yolk sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.) [J]. *J Fish Dis*, 1997, 20: 41- 49.
- [30] Dalmo R A, Bergwald J. Distribution of intravenously and perorally administered *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide in Atlantic salmon, *Salmo salar* L [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1996, 6: 427- 441.
- [31] Lavelle E C, Jenkins P G, Harris J E. Oral immunization of rainbow trout with antigen microencapsulated in poly(DL-lactide $\alpha$  glycolide) microparticles [J]. *Vaccine*, 1997, 15(10): 1070- 1078.
- [32] Moore J D, Ototake M, Nakanishi T. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: the effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, 8: 393- 407.
- [33] Rodrigues P N S, Hermesen T T, Rombout J H W M, et al. Detection of MHC class II transcripts in lymphoid tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1995, 19: 483- 496.
- [34] Walker R A, McConnell T J. Variability in an MHC class II a chain encoding gene in striped bass (*Morone saxatilis*) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1994, 18: 325- 342.
- [35] Koppang E O, Lundin M, Press C M, et al. Differing levels of Mhc class II B chain expression in a range of tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, 8: 183- 196.
- [36] Merin $\alpha$ contreras M L, Guzman $\alpha$ murillo M A, Ruiz $\alpha$ bustos E, et al. Mucosal immune response of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) orally immunised with an extracellular lectin of *Aeromonas veronii* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, 11: 115- 126.
- [37] Lumsden J S, Osland V E, MacPhee D D, et al. Production of gill associated and serum antibody by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following immersion immunization with acetone-killed *Flavobacterium branchiophilum* and the relationship to protection from experimental challenges [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1995, 5: 151- 165.
- [38] Ototake M, Iwama G K, Nakanishi T. The uptake of bovine serum albumin by the skin of bath-immunised trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1996, 6: 321- 333.
- [39] Cain K D, Jones D R, Raison R L. Antibody $\alpha$ ntigen kinetics following immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

- with a T2cell dependent antigen[J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26: 181- 190.
- [40] Lobb C J, Clem L W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XI. Secretory immunoglobulins in the cutaneous mucus of the sheepshead[J]. *Dev Comp Immunol*, 1981, 5: 587- 596.
- [41] Kaattari S, Evans D, Klemer J. Varied redox forms of teleost IgM: an alternative to isotypic diversity? [J]. *Immunological Reviews*, 1998, 166: 133- 142.
- [42] Lefrancois L. Extrathymic differentiation of intraepithelial lymphocytes: generation of a separate and unique T cell repertoire? [J]. *Immunol Today*, 1991, 12: 436- 438.
- [43] Mowat A, McI, Vinney J L. The anatomical basis of intestinal immunity[J]. *Immunol Rev*, 1997, 156: 145- 166.
- [44] Matsunaga T, Rahman A. In search of the origin of the thymus: the thymus and GALT may be evolutionarily related[J]. *Scand J Immunol*, 2001, 53: 1- 6.
- [45] LaFrentz B R, LaPatra E, Jones G R, et al. Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative percent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *J Fish Dis*, 2002, 25: 703 - 713.
- [46] Nakanishi T, Ototake M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination [A]. In fish vaccinology (R. Gudding, A. Lillehaug & P. J. Miltlyng, eds): developments in biological standardization[M], Basel, Karger, 1997, 90: 59 - 68.
- [47] Magarinos B, Romalde J L, Santos Y, et al. Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*[J]. *Aquac*, 1994, 120: 201- 208.
- [48] Dezfili B S, Arrighi S, Domeneghini C, et al. Immunohistochemical detection of neuromodulators in the intestine of *Salmo trutta* L. naturally infected with *Cyathocphalus truncatus* Pallas (Cestoda) [J]. *J Fish Dis*, 2000, 23: 265- 273.
- [49] Jones DR, Hannan C M, Russel Jones C J, et al. Selective B cell nonresponsiveness in the gut of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquac*, 1999, 172: 29- 39.
- [50] Gudding R, Lillehaug A, Evensen «. Recent developments in fish vaccinology[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999, 72: 203- 212.
- [51] Miltlyng P J. A field study on intraperitoneal vaccination of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1996, 6: 553- 565.