

文章编号: 1000- 0615(2000)04- 0376- 06

• 综述 •

# 鱼类体液免疫因子研究进展

## Humoral immune factors of fish: a review

张永安, 聂 品

(中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

ZHANG Yong an, NIE Pin

(*Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072, China*)

关键词: 鱼类; 体液免疫因子

**Key words:** fish; humoral immune factor

中图分类号: S917 文献标识码: A

同高等脊椎动物一样, 鱼类也是通过免疫系统来抵御外来病原生物的危害, 通过非特异性和特异性的免疫防御机制来维持机体的正常功能及自身内环境的稳定。但是, 近年来鱼类病害发生频繁, 其中某些疾病给水产养殖业造成灾难性的危害。这就使得免疫防治技术在鱼病防治中呈现出日趋广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。因此, 对鱼类特别是重要的经济鱼类免疫系统的研究受到国内外学者的广泛关注。鱼类的免疫系统是鱼体执行免疫功能的机构, 是产生免疫应答的物质基础, 由免疫器官、免疫细胞和体液免疫因子组成。本文着重就鱼类体液免疫因子的研究进展作一概述, 包括抗体和多种非特异性的免疫分子。

## 1 抗体

抗体是脊椎动物在对抗原刺激的免疫应答中, 由淋巴细胞产生的一类能与相应抗原特异性结合的具有免疫功能的球蛋白。1964 年世界卫生组织决定将具有抗体活性或化学结构与抗体相似的球蛋白统一命名为免疫球蛋白。免疫球蛋白是化学结构的概念, 而抗体则是生物学功能的概念。免疫球蛋白包括抗体和一些未证实抗体活性的异常免疫球蛋白。因此, 抗体都是免疫球蛋白, 但免疫球蛋白并非都是抗体。不过, 通常情况下抗体与免疫球蛋白作为同义词混用。

抗体主要以分泌形式存在于血液和其它体液中介导体液免疫, 还可作为抗原受体结合于 B 淋巴细胞膜上, 即膜表面免疫球蛋白。根据重链(H 链) 恒定区化学结构的不同, 可以将免疫球蛋白划分为多种类型。从系统进化的角度来讲, 地位越低等的动物产生的免疫球蛋白的种类越少。例如, 哺乳动物具有五类免疫球蛋白, 而鱼类是最早产生免疫球蛋白的动物, 可能仅有一类免疫球蛋白<sup>[2- 4]</sup>。

### 1.1 免疫球蛋白的分子结构

目前人们已从许多鱼类中分离得到免疫球蛋白。无颌鱼类免疫球蛋白表达量很少, 有关其特性目前尚有争议<sup>[5, 6]</sup>。有颌鱼类血清中主要免疫球蛋白类似于哺乳动物的 IgM (下文通称 IgM), 在血液中的相对水平较哺乳动物的高<sup>[7]</sup>, 是由等量的重链( $\mu$  链, 分子量约 60~ 81kD) 和轻链(L 链, 分子量约 20~ 30kD) 组成。其结构基本重复单元为  $\mu_2L_2$ , 即单体形式, 包含 2 个抗原结合位点。软骨鱼和肺鱼高分子量 IgM 是五聚体(分子量约 900~ 1 000kD), 与高等脊椎动物的一样, 含有 10 条重链和 10 条轻链。硬骨鱼高分子量 IgM 却为四聚体(分子量约为 610~ 900kD), 含有 8 条重链和 8 条轻链, 它们之间一般是由共价二硫键连接<sup>[8]</sup>。但事实上, 许多硬骨鱼 IgM 多聚体亚单位间在某种程度上存在非共价连接

收稿日期: 1999- 08- 26

基金资助: 中国科学院“九五”重大 B 资助项目(KZ951- B1- 111)

作者简介: 张永安(1972-), 男, 陕西省西安人, 博士, 主要从事鱼类免疫学研究。Tel: 027- 87647721, E-mail: Fishdis@ihb.ac.cn

键<sup>[9, 10]</sup>。同哺乳动物一样,某些鱼类高分子量 IgM 单体间也发现有 J 链连接<sup>[11]</sup>,但是另外一些鱼类 IgM 可能缺少 J 链<sup>[5, 9]</sup>。鱼类免疫球蛋白 H 和 L 链分别包含数个独特的功能区, L 链有两个,而 H 链有三个、四个或五个,它们分为两类: N 端为可变区(VH 和 VL), C 端为恒定区(CH1-4 和 CL)。V 区是抗体分子上可与抗原结合的部位,包含三个互补性决定区(complementarity determining region, CDR1-3),另外还有四个构架区(framework region, FR1-4)。

## 1.2 免疫球蛋白的基因结构

鱼类两种形式(膜结合形式和分泌形式)的免疫球蛋白是由相同的基因编码的,但信使 RNA 前体的加工过程决定着哪种形式的免疫球蛋白将被合成与表达<sup>[12]</sup>。硬骨鱼类免疫球蛋白 H 链基因座的组织形式与哺乳动物的一样,即数百个可变区基因区段(variable segment, V<sub>H</sub>)位于多变区基因区段聚簇(cluster of diversity segment, D)的上游,紧接着是连接区基因区段(joining segment, J<sub>H</sub>),而在 3' 端是编码恒定区(constant region, C<sub>H</sub>)的基因区段。这种基因组织形式称为“易位子”排列<sup>[13-15]</sup>。板鳃亚纲鱼类免疫球蛋白 H 链和 L 链基因座是以另一种称为“多簇”排列的形式组织的,即 V, (D), J 和 C 区段形成聚簇,它们在基因组中作为统一体可多次复制<sup>[16-19]</sup>。硬骨鱼类 L 链基因座也是以(V<sub>L</sub>-J<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>)多簇的形式组织的,但进一步分析表明 V<sub>L</sub> 区段与 J<sub>L</sub> 和 C<sub>L</sub> 区段的转录方向相反<sup>[20, 21]</sup>。Amemiya 等<sup>[22]</sup>报道了腔棘鱼(*Latimeria chalumnae*)V<sub>H</sub> 和 D 区段形成聚簇,但 J<sub>H</sub> 和 C<sub>H</sub> 的定位还不清楚,这可能是 H 链基因座的另一种组织形式。基因座中 VH 区段为 Ig V<sub>H</sub> 功能区的 CDR1 和 CDR2 编码, CDR3 由 D 区段编码;而 V<sub>L</sub> 功能区的 CDR1-3 都是由 V<sub>L</sub> 区段编码的<sup>[5, 12]</sup>。

## 1.3 免疫球蛋白类和亚类的多样性

所有陆生脊椎动物都有不止一类免疫球蛋白,但是鱼类免疫球蛋白是否也具有类或亚类的多样性,目前还存在诸多争议。

Lobb 和 Olson<sup>[23]</sup> 和 Killie 等<sup>[24]</sup> 分别用单克隆抗体检测出硬骨鱼类存在抗原性不同的高分子量 IgM。Ghaffari 和 Lobb<sup>[25]</sup> 对斑点叉尾 (*Ictalurus punctatus*) IgM 肽谱及 N 端有限氨基酸序列进行比较分析同样表明硬骨鱼类具有不止一类的高分子量 IgM。Hordevik 等<sup>[26]</sup> 的研究也表明鱼类具有两类由不同基因座编码的四聚体 IgM。但是这并不能排除单抗是同重链可变区而非恒定区抗原决定簇作用的可能,而且被认为是编码另一类 IgM 的 DNA 序列并不一定是功能基因<sup>[5]</sup>。因此,硬骨鱼类是否仅有一类多聚体 IgM, 还需进一步研究。

一些鱼类血清或卵中存在低分子量的免疫球蛋白,其 H 链分子量或抗原性明显不同于高分子量 IgM 的 H 链<sup>[27-31]</sup>。这似乎说明了低分子量抗体代表另一类免疫球蛋白。但是也有人认为低分子量的抗体是 IgM 的单体或二聚体形式,它们看来并非多聚体形式的前体或降解产物,可能是生理上需要这种更易扩散的分子。而且,高等脊椎动物免疫应答过程中由 IgM 转变为低分子量免疫球蛋白(哺乳动物为 IgG)的现象在鱼类中几乎不存在<sup>[6, 12]</sup>。因此根据现有资料尚不能确切回答这类低分子量免疫球蛋白与高分子量 IgM 的关系。

硬骨鱼类皮肤和肠粘液中发现有抗体存在,它们似乎是由局部组织淋巴细胞产生的,而并非来自血清<sup>[32, 33]</sup>。但斑点叉尾 和草鱼 (*Ctenopharyngodon iddus*) 皮肤粘液中仅发现一类与血清中相同的免疫球蛋白<sup>[34, 35]</sup>。而羊头原鲷 (*Archosargus probatocephalus*) 皮肤粘液中存在两类免疫球蛋白,一类与血清免疫球蛋白相似,另一类为二聚体<sup>[36]</sup>。鱼类胆汁中免疫球蛋白的研究十分有限。对于羊头原鲷的研究表明:胆汁中免疫球蛋白在生理条件下为二聚体,在变性条件下解离为单体,具有典型的轻链,但其重链比 μ 链小(约为 55kD),并非来自血清的四聚体 IgM<sup>[36]</sup>。而杨桂文等<sup>[37]</sup>通过对鲤胆汁和血清中免疫球蛋白的某些理化性质和免疫原性进行比较研究,推断二者具有一定的同源性。至此鱼类粘膜免疫系统抗体特性及其与血清抗体间的关系尚不十分清楚。

某些硬骨鱼类免疫球蛋白经还原 SDS-PAGE 分析呈现多条轻链蛋白质带,分子量 22~29kD<sup>[38-40]</sup>。用单抗及肽谱分析同样可以区分出斑点叉尾 和硬头鲮 (*Salmo gairdneri*) 免疫球蛋白中存在两类 L 链,这可能反映了硬骨鱼类 L 链的不同种型<sup>[41, 42]</sup>。但是这一推测还有待于更精确的分子免疫学手段加以验证。

## 1.4 影响免疫球蛋白表达水平的因素

大多数鱼类的胸腺随着年龄的增长发生退化现象,这势必会对鱼体的免疫应答产生影响。Tatner 等<sup>[43]</sup>用 HGG(胸腺依赖性抗原)和胸腺非依赖性抗原(*Aeromonas salmonicida*)注射切除胸腺的成年硬头鲮,9 个月后,注射 HGG 的实验鱼抗体滴度低于对照鱼,而实验鱼对胸腺非依赖性抗原的应答与对照鱼相当。这说明随着鱼类年龄的增长,鱼体对胸腺依赖性抗原的体液免疫应答水平有所下降。激素在鲑科鱼类从幼鲑到初次由河入海的小鲑的转化中起着重要作用,而且在此过程中血清总蛋白和 IgM 水平降低,入海后免疫球蛋白水平又恢复如初<sup>[44]</sup>。

环境胁迫也可影响鱼类免疫球蛋白表达水平。如,运输使斑点叉尾 对有丝分裂原或抗原刺激不能产生应答<sup>[45]</sup>。季节变化同样会影响免疫球蛋白在鱼体内的表达水平,夏季最高,冬季较低<sup>[46]</sup>。这不仅仅是由环境温度变化引起的,可能还与光周期等因素有关。

影响鱼类免疫球蛋白表达水平的因素远不止这些,总而言之来自三个方面:抗原方面(包括抗原性质、剂量、免疫方式等)、机体方面(包括性别、年龄、体长、体重、生长率、营养状况以及激素水平等)和环境方面(包括胁迫、季节、温度、光照以及水体中的有机或无机物等)。

## 2 非特异性免疫因子

在鱼类的体液、组织和卵中存在多种非免疫球蛋白的蛋白质或糖蛋白分子,它们在鱼类非特异性防御机制中发挥着重要作用。根据它们对入侵病原微生物的效应可以将这些免疫因子分为以下几类。

### 2.1 微生物生长抑制物

微生物生长抑制物(microbial growth inhibitory substance)能够夺取微生物生长所需的基本养分,或在细胞内阻断其代谢途径,从而可以干扰病原微生物的代谢作用<sup>[47]</sup>。鱼类中微生物生长抑制物包括转铁蛋白、血浆铜蓝蛋白、金属硫蛋白和干扰素等。

转铁蛋白是由单一多肽链组成的糖蛋白,分子量约80kD<sup>[47]</sup>。铁是微生物代谢和繁殖所必需的基本元素。转铁蛋白具有很高的铁结合能力,因此当它存在时,微生物的生长和繁殖便会受到抑制<sup>[6]</sup>。转铁蛋白的抗菌活性还表现在直接作用于病原菌的膜蛋白而实现杀菌作用<sup>[48]</sup>。

血浆铜蓝蛋白是由单一多肽链组成的蓝蛋白,可以螯合铜和其它的二价阳离子。血浆铜蓝蛋白又称为亚铁氧化酶(ferroxidase),因为它可以将亚铁离子氧化为高铁离子,后者将结合到转铁蛋白上;在此过程中,血浆铜蓝蛋白可以加速周围铁的转运,从而降低微生物获取的机会<sup>[47]</sup>。

金属硫蛋白是一种低分子量、热稳定的蛋白质,含有丰富的半胱氨酸用以结合铜、锌、镉和汞等金属离子<sup>[47]</sup>。在环境金属离子污染和机体炎症反应中,金属硫蛋白含量增加,能够特异性结合到巨噬细胞膜上,并引起巨噬细胞呼吸爆发(respiratory burst)和信号传递,其结果是巨噬细胞释放活化产物以杀灭细胞外环境中的细菌或寄生蠕虫<sup>[6, 49]</sup>。

干扰素能够抑制病毒的复制,是鱼类重要的抗病毒感染防御因子,分子量约20kD。包括I型( $\alpha$ -或 $\beta$ -)干扰素和II型( $\gamma$ -)干扰素<sup>[50]</sup>。I型干扰素是由白细胞和成纤维细胞产生;II型干扰素可以在细胞分裂素刺激下由T淋巴细胞产生,除了抗病毒作用外,还可以激活巨噬细胞,是一种重要的巨噬细胞活化因子(macrophage activation factor, MAF)<sup>[51]</sup>。

### 2.2 酶抑制剂

在鱼类血清中存在多种酶抑制剂(enzyme inhibitor),主要为蛋白酶抑制剂,包括(a)丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine proteinase inhibitor)、(b)半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cysteine proteinase inhibitor)、(c)金属蛋白酶抑制剂(metalloproteinase inhibitor)和(d) $\alpha 2$ -巨球蛋白( $\alpha 2$ -macroglobin,  $\alpha 2$ -M)。其中(a)(b)和(c)能够特异性地与相应的酶结合,而(d)则能与所有的蛋白酶结合<sup>[47]</sup>。酶抑制剂的基本功能是维持机体血液和其它体液的内环境稳定,还可以调节补体系统和凝集机制的活性。它们能够抑制许多病原微生物胞外酶的活性,能够调节抗原呈递作用,从而参与特异性免疫。另外, $\alpha 2$ -巨球蛋白还能够与转化生长因子(transforming growth factor, TGF)和血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等蛋白质形成共价连接<sup>[50]</sup>。

### 2.3 细胞溶素

细胞溶解作用可以通过补体系统介导,也可以通过单一的细胞溶素来完成。鱼类的细胞溶素有水解酶、蛋白酶和一些非特异性溶素。

鱼类组织和分泌物中具有三类水解酶,分别是溶菌酶、壳多糖酶和壳二糖酶。它们作用于微生物表面的糖苷部分。溶菌酶可以破坏细菌细胞壁并对真菌细胞壁和昆虫的外骨骼进行有限的水解<sup>[47]</sup>。壳多糖酶和壳二糖酶可以破坏外膜具有壳多糖的微生物或寄生虫<sup>[52]</sup>。

鱼类皮肤粘液以及鳃和肠的表皮和上皮细胞层中都检测到蛋白酶,它们具有类似胰蛋白酶的活性,能够破坏革兰氏阴性细菌<sup>[53, 54]</sup>。

鱼类血清中存在一种天然溶血素分子,它可能是一种酶,能够溶解异源红细胞和各种细菌。在环境胁迫时,某些热

带海洋鱼类粘液中发现有毒素释放,属于胆碱酯、小肽或低分子量碱性蛋白,可能具有抗寄生虫的作用<sup>[47]</sup>。

## 2.4 凝集素和沉淀素

同其它脊椎动物一样,鱼类也具有相对非特异性自发产生的固有凝集素(aggglutinin)。它们属于蛋白质或糖蛋白,在理化、生物学和抗原特性方面均不同于抗原刺激产生的免疫球蛋白。凝集素能够与碳水化合物和糖蛋白结合,从而使异源细胞或微生物发生凝集,或使各种可溶性糖结合物发生沉淀,被认为是机体自然防御机制中原始的识别分子和免疫监督分子<sup>[47]</sup>。

沉淀素(precipitin)包括C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、血清淀粉样P成分(serum amyloid P-component)和 $\alpha$ -沉淀素( $\alpha$ -precipitin)。前二者是关系密切的血清蛋白,具有广泛的同源氨基酸序列,都是五聚体,作为急性期蛋白(acute phase protein)反应时都需要钙离子。但是CRP在组织损伤、发炎或感染后浓度迅速增加,而血清淀粉样P成分并不受此影响<sup>[47]</sup>。CRP存在于鱼类血清、卵和精子中,其中卵和精子中的CRP可能来源于血清。在钙离子存在时,CRP能够与含有C-多糖或磷酸胆碱的大分子反应,而这些分子普遍存在于细菌、真菌和寄生蠕虫等病原生物的细胞壁或其它表面结构中。作为调理素,CRP能够单独或通过经典途径激活补体系统来影响吞噬细胞的迁移、吞噬和呼吸爆发,能够辅助补体依赖性溶解作用并对自体衰老细胞的组分(尤其是染色质)进行清除<sup>[47, 50]</sup>。 $\alpha$ -沉淀素的防御功能可能表现在它们(包括13种蛋白成分)能够与真菌等微生物表面的糖和糖蛋白发生反应;另外, $\alpha$ -沉淀素也能与可溶性淀粉,特别是支链淀粉反应<sup>[48]</sup>。

## 2.5 补体

补体系统是脊椎动物抵抗微生物感染的重要成分,由存在于体液中的数十种具有酶活性的球蛋白组成<sup>[55]</sup>。随着有颌鱼类的进化和免疫球蛋白的出现,补体激活通过经典途径得以实现。与高等脊椎动物相同,有颌鱼类补体的生物学活性主要显示于以下两个方面:(a)由替代(抗体非依赖性)途径或经典(抗体依赖性)途径激活的细胞溶解作用;(b)由被激活的补体组分释放的片段所行使的调理作用<sup>[6, 55, 56]</sup>。但是,鱼类补体对热更不稳定,具有更低的最适反应温度,更难于保存,抗微生物活性更高,而且具有更明显的种或种群特异性<sup>[48, 55]</sup>。无颌鱼类的C3仅通过替代途径激活,其补体系统的主要作用是促进细胞吞噬,而不是细胞溶解<sup>[57]</sup>。软骨鱼类补体系统经典途径是由六种功能不同的成分组成,即C1n~C4n, C8n和C9n。硬骨鱼类中发现有C1~C9等补体成分<sup>[58]</sup>。而且虹鳟C3<sup>[59]</sup>和C9成分<sup>[60]</sup>cDNA序列已被测定与哺乳动物相应成分具有很大的同源性。

硬骨鱼类补体因子是通过多糖(如脂多糖)或免疫球蛋白Fc区糖基部分的存在来激活的,能够通过攻膜复合物完成细胞溶解作用<sup>[50]</sup>。包括血细胞溶解作用、杀寄生虫活性、杀菌和溶菌活性、细菌胞外毒素灭活作用、杀病毒活性和可能的脱毒作用。这些作用可能属于鱼类补体活性的同一机制。补体激活过程中释放的片段具有广泛的调理作用,包括对白细胞的化学吸引作用(C5a),过敏作用(C3a)和促进细胞吞噬活性的作用(C3b)<sup>[48, 55]</sup>。攻膜复合物对细胞吞噬也具有调理作用<sup>[6]</sup>。可见,作为抗体和吞噬细胞间连接的中介,鱼类补体能够增强体液和细胞介导的特异性免疫,而且在宿主非特异性自然防御机制中发挥重要作用,其中C3是补体系统的关键成分<sup>[6, 55]</sup>。

## 参考文献:

- [1] 李亚南, 陈全震, 邵健忠, 等. 鱼类免疫学研究进展[J]. 动物学研究, 1995, 16(1): 83-94.
- [2] Kobayashi K, Tomonaga S. The second immunoglobulin class is commonly present in cartilaginous fish belonging to the order rajiformes[J]. Mol Immunol, 1988, 25: 115-120.
- [3] Fuda H, Soyano K, Yamazaki F, et al. Serum immunoglobulin M (IgM) during early development of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1991, 99A: 637-643.
- [4] 张永安, 聂品. 鳊血清免疫球蛋白的分离纯化及其亚单位分子量的测定[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 192-194.
- [5] Wilson M R, Warr G W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them[J]. Ann Rev Fish Dis, 1992, 2: 201-221.
- [6] Manning M J. Fishes[A]. Turner R J. Immunology: A Comparative Approach[M]. Britain: John Wiley & Sons Ltd. 1994, 69-99.
- [7] Israelsson O, Petersson A, Bengén E, et al. Immunoglobulin concentration in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., serum and cross reactivity between anti cod antibodies and immunoglobulins from other species[J]. J Fish Biol, 1991, 39: 265-278.
- [8] Lobb C J. Covalent structure and affinity of channel catfish anti dinitrophenyl antibodies[J]. Mol Immunol, 1985, 22: 993-999.
- [9] Kobayashi K, Hara A, Takano K, et al. Studies on subunit components of immunoglobulin M from a bony fish, the chum salmon, (*Oncorhynchus keta*) [J]. Mol Immunol, 1982, 19: 95-103.
- [10] Warr G W. Immunoglobulin of the toadfish, *Spheroides glaber* [J]. Comp Biochem Physiol, 1983, 76B: 507-514.

- [11] Hagiwara K, Kobayashi K, Kajii T, et al. J chain like component in 18s immunoglobulin of the skate, *Raja kenoi*, a cartilaginous fish[J]. Mol Immunol, 1985, 22: 775- 778.
- [12] Pilstrom L, Bengtén E. Immunoglobulin in fish genes, expression and structure[J]. Fish Shellfish Immunol, 1996, 6: 243- 262.
- [13] Ghaffari S H, Lobb C J. Organization of immunoglobulin heavy chain constant and joining region genes in the channel catfish[J]. Mol Immunol, 1992, 29: 151- 159.
- [14] Ventura Holman T, Jones J C, Ghaffari S H, et al. Structure and genomic organization different V<sub>H</sub> gene families are interspersed and closely linked[J]. Mol Immunol, 1994, 31: 823- 832.
- [15] Hordvik I, Lindstrom C D V, Voie A M, et al. Structure and organization of the immunoglobulin M heavy chain genes in Atlantic salmon, *Salmo salar*[J]. Mol Immunol, 1997, 34: 631- 639.
- [16] Shambloot M J, Litman G W. Complete nucleotide sequence of primitive vertebrate immunoglobulin light chain genes[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1989, 86: 4684- 4688.
- [17] Harding F A, Cohen N, Litman G W. Immunoglobulin heavy chain gene organization and complexity in the skate, *Raja erinacea*[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 1015- 1020.
- [18] Hohman V S, Schluter S F, Marchalonis J J. Complete sequence of a cDNA clone specifying sandbar shark immunoglobulin light chain gene organization and implications for the evolution of light chains[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1992, 89: 276- 280.
- [19] Hohman V S, Schuchman D B, Schluter S F, et al. Genomic clone for sandbar shark  $\lambda$  light chain: Generation of diversity in the absence of gene rearrangement[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1993, 90: 9882- 9886.
- [20] Ghaffari S H, Lobb C J. Structure and genomic organization of immunoglobulin light chain in the channel catfish[J]. J Immunol, 1993, 151: 6900- 6912.
- [21] Lundqvist M, Bengtén E, Stömberg S, et al. Ig light chain gene in the siberian sturgeon (*Acipenser baeri*)[J]. J Immunol, 1996, 157: 2031- 2038.
- [22] Amemiya C T, Ohta Y, Litman R T, et al. V<sub>H</sub> Gene organization in a relict species, the coelacanth *Latimeria chalumnae*: evolutionary implications[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1993, 90: 6661- 6665.
- [23] Lobb C J, Olson M O J. Immunoglobulin heavy H chain isotypes in a teleost fish[J]. J Immunol, 1988, 141: 1236- 1245.
- [24] Killie J K, Espelid S, Jorgensen T O. The humoral immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against the hapten carrier antigen NIP - LPH: the effect of determinant (NIP) density and the isotype profile of anti- NIP antibodies[J]. Fish Shellfish Immunol, 1991, 1: 33- 46.
- [25] Ghaffari S H, Lobb C J. Nucleotide sequence of channel catfish heavy chain cDNA and genomic blot analysis. Implications for the phylogeny of Ig heavy chain[J]. J Immunol, 1989, 143: 2730- 2739.
- [26] Hordvik I, Voie A M, Glette J, et al. Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmo salar*, L[J]. Eur J Immunol, 1992, 22: 2957- 2962.
- [27] Kobayashi K, Tomonaga S, Kajii T. A second class of immunoglobulin other than IgM present in the serum of a cartilaginous fish, the skate, *Raja kenjei*: Isolation and characterization[J]. Mol Immunol, 1984, 21: 397- 404.
- [28] Kobayashi K, Tomonaga S, Tanaka S. Identification of a second immunoglobulin in the most primitive shark, the frill shark, *Chlamydoselachus anguineus*[J]. Dev Comp Immunol, 1992, 16: 295- 299.
- [29] Kofod H, Pedersen K, Larsen J L, et al. Purification and characterization of IgM-like immunoglobulin from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Acta Vet Scand, 1994, 35: 1- 10.
- [30] Fuda H, Hara A, Yamazaki F, et al. A peculiar immunoglobulin- M (IgM) identified in eggs of chum salmon (*Oncorhynchus keta*)[J]. Dev Comp Immunol, 1992, 16: 415- 423.
- [31] Suzuki Y, Orito M, Furukawa K, et al. Existence of low molecular-weight immunoglobulin M in carp eggs[J]. Fisheries Science, 1994, 60: 159- 162.
- [32] St Louis Comier E A, Osterland C K, Anderson P D. Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Dev Comp Immunol, 1984, 8: 71- 80.
- [33] Hart S, Wrathmell A B, Harris J E, et al. Gut immunology of fish: a review[J]. Dev Comp Immunol, 1988, 12: 453- 480.
- [34] Lobb C J. Secretory immunity induced in catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization[J]. Dev Comp Immunol, 1987, 11: 727- 738.
- [35] 陈昌福, 纪国良, 罗宇良, 等. 草鱼体表和肠粘液中免疫球蛋白的初步研究[A]. 鱼病学研究论文集(第二辑)[C]. 北京: 海洋出版社, 1995. 21- 25.
- [36] Lobb C J, Clem L W. The metabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus, and bile[J]. J Immunol, 1981, 127: 1525- 1529.
- [37] 杨桂文, 安利国, 温武军, 等. 鲤胆汁与血清中免疫球蛋白的比较研究[J]. 水产学报, 1998, 22(3): 199- 203.
- [38] Lobb C J, Olson M O J, Clem L W. Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish[J]. J Immunol, 1984, 132: 1917- 1923.

- [39] Sánchez C, Dominguez J, Coll J. Immunoglobulin heterogeneity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson [J]. J Fish Dis, 1989, 12: 459- 465.
- [40] Palenzuela O, Sitjar Bobadilla A, Alvarez Pelletiero P. Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 1996, 6: 81- 94.
- [41] Sánchez C, Dominguez J. Trout immunoglobulin populations differing in light chains revealed by monoclonal antibodies [J]. Mol Immunol, 1991, 28: 1271- 1277.
- [42] Sánchez C, López Fierro P, Zapata A, et al. Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulin [J]. Fish Shell Immunol, 1993, 3: 237- 251.
- [43] Tatner M F, Adams A, Leschen W. An analysis of the primary and secondary antibody responses in intact and thymectomised rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to human gamma globulin and *Aeromonas salmonicida* [J]. J Fish Biol, 1987, 31: 177- 195.
- [44] Meligen G O, Stefansson S O, Berg A, et al. Changes in serum protein and IgM concentration during smolting and early postsmolt period in vaccinated and unvaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish Shell Immunol, 1995, 5: 211- 222.
- [45] Ellsässer C F, Clem L W. Hematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport [J]. J Fish Biol, 1986, 28: 511- 521.
- [46] Nakanishi T. Seasonal changes in the humoral immune responses and lymphoid tissue on the marine teleost, *Sebastes marmoratus* [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1986, 12: 213- 221.
- [47] Alexander J B, Ingram G A. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish [J]. Ann Rev Fish Dis, 1992, 2: 249- 279.
- [48] Yano T. The nonspecific immune system: humoral defense [A]. Iwama G, Nakanishi T. The Fish Immune System [M]. London: Academic press, 1996. 105- 157.
- [49] Youn J, Borghese L A, Olson E H, et al. Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein. II. Effects on macrophage functions [J]. J Toxicol Environ Health, 1995, 45: 397- 413.
- [50] Dalmo R A, Ingebrigtsen K, Bogwald J. Non specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES) [J]. J Fish Dis, 1997, 20: 241- 273.
- [51] Graham S, Secombes C J. Do fish secrete interferon- $\gamma$ ? [J]. J Fish Biol, 1990, 36: 563- 573.
- [52] Manson F D S, Fletcher T C, Gooday G W. Localization of chitinolytic enzymes in blood of turbot, *Scophthalmus maximus*, and their possible roles in defense [J]. J Fish Biol, 1992, 40: 919- 927.
- [53] Hjelmeland K, Christie M, Raa J. Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance [J]. J Fish Biol, 1983, 23: 13- 22.
- [54] Braun R, Amesen J A, Rinne A, et al. Immunohistological localization of trypsin in mucus secreting cell layers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. [J]. J Fish Dis, 1990, 13: 233- 238.
- [55] Sakai D K. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish [J]. Ann Rev Fish Dis, 1992, 2: 223- 247.
- [56] 聂品. 鱼类非特异性免疫研究的新进展 [J]. 水产学报, 1997, 21(1): 69- 73.
- [57] Fujii T, Nakamura T, Sekizawa A, et al. Isolation and characterization of a protein from hagfish serum that is homologous to the third component of the mammalian complement system [J]. J Immunol, 1992, 148: 117- 123.
- [58] Yano T. The complement system of fish [J]. Fish Pathol, 1995, 30: 151- 158.
- [59] Lambris J D, Lao Z, Pang J, et al. Third component of trout complement cDNA cloning and conservation of functional sites [J]. J Immunol, 1993, 151: 6123- 6134.
- [60] Stanley K K, Herz J. Topological mapping of complement component C<sub>9</sub> by recombinant DNA technique suggests a novel mechanism for its insertion into target membranes [J]. EMBO J, 1987, 6: 1951- 1957.