

文章编号: 1000-0615(2005)02-0227-05

## 异育银鲫实验性免疫抑制模型的建立

陈 勇<sup>1</sup>, 周洪琪<sup>1</sup>, 余奇文<sup>2</sup>, 张继英<sup>2</sup>, 沈佰华<sup>2</sup>, 柏 峻<sup>2</sup>

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 上海第二医科大学, 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

**摘要:** 分别以每 kg 体重鱼注射 0、1、10、20 mg 环磷酰胺的剂量, 每隔 5 d 给异育银鲫注射 1 次, 共注射 3 次, 第 16 天检测各组试验鱼外周血白细胞数量及吞噬活性、不同类型的白细胞数量变化、脾脏和头肾的溶菌酶活性、体外培养外周血 B 淋巴细胞分泌的 IgM、IFN- $\alpha$  含量、外周血 NK 细胞杀伤功能及头肾、脾脏、外周血 B 淋巴细胞转化能力。结果表明, 环磷酰胺剂量的增加可以使试验鱼外周血白细胞的数量包括各种类型的白细胞的数量、体外培养外周血 B 淋巴细胞分泌的 IgM、IFN- $\alpha$  含量下降, 脾脏和头肾的溶菌酶活性、外周血白细胞吞噬活性及头肾、脾脏、外周血 B 淋巴细胞转化能力降低。提出每 kg 鱼 10 mg 的环磷酰胺是建立异育银鲫实验性免疫抑制模型的适宜剂量。

**关键词:** 异育银鲫; 免疫抑制模型; 环磷酰胺

中图分类号: S942.5

文献标识码: A

## Preliminary study on establishing the experimental immunosuppression model of allogynogenetic silver crucian carp

CHEN Yong<sup>1</sup>, ZHOU Hong-qi<sup>1</sup>, YU Qi-wen<sup>2</sup>, ZHANG Ji-ying<sup>2</sup>, SHEN Bai-hua<sup>2</sup>, BAI Jun<sup>2</sup>

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Shanghai Second Medical University, Shanghai Institute of Immunology, Shanghai 200025, China)

**Abstract:** Different doses (0, 1, 10 and 20 mg per kg fish) of cyclophosphamide were respectively injected into abdominal cavity of one of four groups of allogynogenetic silver crucian carp every 5 days for three times. Splenic, head kidney and peripheral blood B lymphocytes proliferation, leucocytes count, including different types of leucocytes count in peripheral blood and phagocytic activity, lysozyme activity of spleen and head kidney, IgM and IFN- $\alpha$  content produced by B cell cultivated *in vitro* and natural killer cell activity in peripheral blood were observed for each group on the 16th day. The results showed that IgM and IFN- $\alpha$  content produced by B cell cultivated *in vitro* and leucocytes count, including different types of leucocytes count in peripheral blood obviously decreased and that splenic, head kidney and peripheral blood B lymphocytes proliferation, lysozyme activity of spleen and head kidney, natural killer cell activity in peripheral blood and leucocytes phagocytic activity evidently reduced with increasing of dose of cyclophosphamide. It is thought that 10mg·kg<sup>-1</sup> is a suitable dose of cyclophosphamide for establishing the experimental immunosuppression model of allogynogenetic silver crucian carp.

**Key words:** allogynogenetic silver crucian carp; immunosuppression model; cyclophosphamide

水产动物疾病已成为限制当今水产养殖业发展的瓶颈, 滥用抗生素能造成的严重后果, 逐渐为人们所关注, 目前的趋势是从药物防治开始向免

疫防治发展。疫苗虽然是最终战胜病害的最有力手段, 然而疫苗在实际生产中的应用现状却不乐观。在这种情况下, 免疫增强剂的研究和使用

收稿日期: 2004-09-23

资助项目: 上海市科委重点攻关项目(013212101)

作者简介: 陈 勇(1964-), 男, 辽宁本溪人, 副教授, 博士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料学。Tel: 021-65710916, E-mail: Chenyong186@sohu.com

通讯作者: 周洪琪, Tel: 021-65710017, E-mail: Hqzhou@shfu.edu.cn

就具有重要的现实意义。

免疫功能正常的动物对病原的入侵具有较高抵抗能力,不会轻易得病,只有当动物机体免疫功能低下而又遇到病原时才会患病。免疫增强剂的作用恰是在动物机体免疫功能下降、尚未得病之时刺激免疫系统,使其功能得到提高,恢复其抗病能力。目前水产动物免疫增强剂的研究均是将免疫增强剂给予正常的水产动物后测定其免疫水平,依据免疫水平的提高来评定免疫增强剂的作用<sup>[1-3]</sup>。然而动物的免疫系统是相对稳定的,在正常情况下免疫系统会将机体的免疫功能整合在一个适宜的水平。免疫增强剂只可能较大幅度地提高免疫功能低下的水产动物的免疫水平,而对于免疫功能正常的水产动物会因机体自身免疫系统的调节阻止其免疫水平过高而影响免疫增强剂的真实效果,况且免疫水平也并非越高越好,免疫水平过高会导致免疫亢进,引起各种类型的超敏反应、炎症和自身免疫性疾病<sup>[4,5]</sup>。因此,有必要建立水产动物的免疫抑制模型来检验免疫增强剂,以获得真实、准确的效果。

本研究选用环磷酰胺作为免疫抑制剂,研究其对异育银鲫的免疫抑制效果,探讨建立免疫抑制模型的可行性,为建立水产动物免疫抑制模型提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

异育银鲫购自上海市南汇水产养殖场,2龄鱼种,体重  $166.7 \pm 9.4$  g,体质健壮。环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy)由上海华联制药有限公司生产。

### 1.2 试验设计

将试验鱼随机分成4组,每组20尾,分养在4个水泥池(1.5 m × 1.5 m × 1.0 m)中。每天按体重3%分3次(8:30、12:30、16:30)投喂自制的配合饲料(鱼粉10%、豆粕20%、菜籽粕20%、次粉25%、玉米粉17.5%、啤酒酵母5%、植物油1%、复合添加剂1.5%)。待试验鱼摄食正常后开始试验,随机选3组为试验组,分别按每公斤鱼注射1 mg、10 mg、20 mg 环磷酰胺(下文及表中以  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  表示)3种剂量注射,每隔5 d注射1次,共注射3次,每次每尾鱼注射的药液量控制在0.5 mL左右。对照组注射等量的生理盐水。第3次注射

结束后第6天,取外周血、头肾、脾脏待测。

### 1.3 测定(每组均不少于10个样本)

**外周血白细胞计数** 每尾鱼取全血10  $\mu\text{L}$ ,用染色液将血稀释200倍,光镜下白细胞计数。

**外周血白细胞吞噬活性** 每尾鱼取抗凝全血100  $\mu\text{L}$ ,加入白色葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)20  $\mu\text{L}$ (37℃培养24h后隔水煮沸10 min,再用无菌生理盐水稀释至  $30 \times 10^8 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),混匀后26℃共同孵育30 min,取白细胞层1滴推片,风干后瑞氏染色,干燥后40倍光镜下计数,按下列公式计算吞噬率及吞噬指数。

吞噬率(%) = 100个白细胞中吞噬细菌的白细胞数/100 × 100

吞噬指数 = 100个参与吞噬的白细胞内吞噬的细菌数/100

**外周血白细胞分类** 另取每尾鱼的全血1滴涂片,瑞氏染色,风干后多形核白细胞、单核巨噬样细胞、淋巴细胞计数。

**脾脏、头肾溶菌酶** 脾脏、头肾细胞悬液的制备:称取组织若干,用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 6.4的磷酸缓冲液以5倍体积稀释匀浆,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液备用。将溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)在37℃条件下培养24 h后,用上述缓冲液稀释至波长为570 nm时吸光度为0.3的菌悬液。将5 mL菌悬液与0.01 mL组织悬液充分混合,测定反应开始时570 nm波长下的吸光度  $A_0$ ,37℃水浴30 min,取出后冰浴10 min以终止反应,再测定此条件下的吸光度  $A$ ,溶菌酶活性  $U = (A_0 - A)/A$ 。

**体外培养外周血B淋巴细胞分泌的IgM** 分离外周血获得的淋巴细胞经LPS刺激,培养5 d后取上清液,采用ELISA方法测定<sup>[6]</sup>,并于490 nm处测定吸光值,根据标准曲线求得相应IgM。

**体外培养外周血B淋巴细胞分泌的IFN- $\alpha$**  采用IFN- $\alpha$ ELISA试剂盒(购于上海茂元生物试剂公司)提供的ABC-HRP方法测定<sup>[7,8]</sup>。分离外周血淋巴细胞,经LPS刺激,培养5 d后的上清液加入酶标板中,每孔100  $\mu\text{L}$ ,37℃孵浴60 min,洗5次后,加入底物溶液A和B,每孔各50  $\mu\text{L}$ 。37℃孵浴60 min后,以终止液终止反应,于490 nm处测定吸光值。根据标准曲线求得相应的IFN- $\alpha$ 值<sup>[9,10]</sup>。

**外周血自然杀伤细胞(NK细胞)杀伤功能的**

分析 采用靶细胞乳酸脱氢酶释放法<sup>[11,12]</sup>。

无菌条件下分离淋巴细胞,制成淋巴细胞悬液( $6 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),以小鼠淋巴瘤细胞株 YAC-1 为靶细胞( $3 \times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),靶细胞和效应细胞按 100  $\mu\text{L}$ :100  $\mu\text{L}$  的比例添加。将细胞混匀后置于 29 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 2h,吸取 100  $\mu\text{L}$  上清液,加入酶标板中,再加入 100  $\mu\text{L}$  LDH 底物溶液,5 min 后加入 50  $\mu\text{L}$  1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  的 HCl 终止反应,测定 490 nm 处的吸光值。阴性对照组用相同体积的 0.5% BSA-1640 液代替效应细胞,阳性对照组用相同体积的 1% NP-40 液代替效应细胞,以分别获得自然释放值和最大释放值。NK 细胞的杀伤活性用下式计算:

$$\text{NK 细胞杀伤活性}(\%) = \frac{\text{测定组 OD 值} - \text{自然释放组 OD 值}}{\text{最大释放组 OD 值} - \text{自然释放组 OD 值}} \times 100$$

外周血、脾脏、头肾 B 淋巴细胞转化能力采用同位素法测定<sup>[13,14]</sup>。无菌条件下取每尾鱼脾脏和头肾,放入 RPMI 1640 培养液中,用棉签将头肾和脾脏挤压过 200 目不锈钢网筛后,4 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,沉淀细胞悬于 RPMI 1640 培养液中,用 Ficoll 液(比重 1.082 g $\cdot\text{mL}^{-1}$ )分离淋巴细胞(外周血直接用 Ficoll 液分离淋巴细胞),并

调整细胞浓度为  $6 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$  然后将它接种于 96 孔圆底板,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,再加等量的刺激原 LPS( $20 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),在 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中 29 $^{\circ}\text{C}$  培养 120 h,加入  $^3\text{H-TdR}$ ,16 h 内收集细胞,纤维滤纸法制备样品,并测定每分钟脉冲数(cpm),结果以刺激指数(stimulation index, SI)表示。

$$\text{SI} = \text{添加刺激原组 cpm} / \text{未添加刺激原组 cpm}$$

#### 1.4 统计方法

所有数据用 ANOVA 进行方差分析、Duncan 氏进行多重比较。

## 2 结果

### 2.1 环磷酰胺对外周血白细胞数量及外周血白细胞吞噬活力的影响

注射环磷酰胺对异育银鲫外周血白细胞数量有显著影响(表 1)。白细胞数量随环磷酰胺剂量的增加而显著减少,1 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$  组的白细胞数量与对照组相比已有显著差异( $P < 0.05$ ),10 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$  组与对照组相比有极显著差异( $P < 0.01$ )。白细胞吞噬活力也与环磷酰胺存在着剂量依赖关系,即随其注射剂量的增加而白细胞吞噬率和吞噬指数极显著下降( $P < 0.01$ )。

表 1 不同剂量环磷酰胺对外周血白细胞数量及外周血白细胞吞噬活力影响

Tab.1 Effect of different doses of cyclophosphamide on leucocytes count and leucocyte phagocytic activity

组别 group	白细胞数( $10^4 \cdot \text{mm}^{-3}$ ) leucocyte count	白细胞吞噬率(%) leucocyte phagocytic rate	吞噬指数 phagocytic index
对照组 control	$3.65 \pm 0.39^{\text{Aa}}$	$53.15 \pm 2.84^{\text{Aa}}$	$4.04 \pm 0.24^{\text{Aa}}$
1 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$	$3.32 \pm 0.44^{\text{Ab}}$	$47.36 \pm 5.93^{\text{Bb}}$	$3.61 \pm 0.31^{\text{Bb}}$
10 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$	$2.18 \pm 0.34^{\text{Bc}}$	$37.93 \pm 5.68^{\text{Cc}}$	$2.62 \pm 0.64^{\text{Cc}}$
20 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$	$2.01 \pm 0.40^{\text{Bc}}$	$34.09 \pm 4.03^{\text{Cd}}$	$2.39 \pm 0.21^{\text{Cc}}$

注:不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ ),不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同

Note: Different capital letters indicate marked significance at  $P < 0.01$ , and different lower cases indicate significance at  $P < 0.05$ . The same below

### 2.2 不同剂量环磷酰胺对外周血不同类型白细胞数量的影响

注射环磷酰胺对异育银鲫外周血不同类型白细胞的数量有显著影响(表 2)。除了 1 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$  组的单核巨噬样细胞数与对照组相比无统计学差异( $P > 0.05$ ),10 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$  组和 20 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$  组单核巨噬样细胞数显著低于对照组( $P < 0.05$ )外,其余各组不同类型白细胞的数量均随环磷酰胺剂量的增加而呈减少的趋势,与对照组相比均有极

显著差异( $P < 0.01$ )。

### 2.3 不同剂量环磷酰胺对头肾、脾脏溶菌酶活性的影响

注射环磷酰胺对异育银鲫头肾、脾脏溶菌酶活性有显著影响(表 3)。头肾、脾脏的溶菌酶活性随环磷酰胺剂量的增加而减少,但 1 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$  组与对照组相比溶菌酶活性均无统计学差异( $P > 0.05$ ),10 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$  组和 20 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$  组与对照组相比均有极显著差异( $P < 0.01$ )。

## 2.4 环磷酰胺对外周培养外周血 B 细胞分泌的 IgM、IFN- $\alpha$ 及外周血 NK 细胞杀伤功能的影响

环磷酰胺对 IgM 含量具有极显著影响(表 4)。1 mg·kg<sup>-1</sup>组与对照组无统计学差异,当其注射剂量增加至 10 mg·kg<sup>-1</sup>以上,IgM 的含量呈极显著下降( $P < 0.01$ )。IFN- $\alpha$  含量与环磷酰胺也存在剂量依赖关系(除 20 mg·kg<sup>-1</sup>组外),即随注射剂量的增加 IFN- $\alpha$  含量下降,10 mg·kg<sup>-1</sup>组与对照组相比有极显著差异( $P < 0.01$ )。但环磷酰胺对外周血 NK 细胞杀伤功能无显著影响。

## 2.5 环磷酰胺对 B 淋巴细胞转化能力的影响

虽然脾脏(除 20 mg·kg<sup>-1</sup>组)、头肾、外周血 B 淋巴细胞转化能力随环磷酰胺剂量的增加都有下降趋势,但总的来说影响并不十分显著(表 5)。头肾各组 B 淋巴细胞转化能力与对照组相比均无统计学差异( $P > 0.05$ ),脾脏、外周血在注射剂量达到 10mg·kg<sup>-1</sup>以上时,与对照组相比才有显著差异( $P < 0.05$ ),仅脾脏 B 淋巴细胞转化能力在注射剂量达到 20 mg·kg<sup>-1</sup>时,呈极显著降低( $P < 0.01$ )。

表 2 不同剂量环磷酰胺对外周血不同类型白细胞数量的影响

Tab.2 Effect of different doses of cyclophosphamide on different types of leucocytes count in peripheral blood

组别 group	多形核白细胞数 ( $10^3 \text{cell} \cdot \text{mm}^{-3}$ ) polymorphonuclear count	单核巨噬样细胞数 ( $10^3 \text{cell} \cdot \text{mm}^{-3}$ ) monocyte-macrophagocytelike count	淋巴细胞数 ( $10^3 \text{cell} \cdot \text{mm}^{-3}$ ) lymphocytes count
对照组 control	1.04 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>ABa</sup>	2.25 ± 0.08 <sup>Aa</sup>
1 mg·kg <sup>-1</sup>	0.87 ± 0.03 <sup>Bb</sup>	0.39 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	2.06 ± 0.05 <sup>Bb</sup>
10 mg·kg <sup>-1</sup>	0.52 ± 0.03 <sup>Cc</sup>	0.30 ± 0.06 <sup>Bb</sup>	1.35 ± 0.04 <sup>Cc</sup>
20 mg·kg <sup>-1</sup>	0.42 ± 0.04 <sup>Dd</sup>	0.30 ± 0.03 <sup>Bb</sup>	1.28 ± 0.03 <sup>Cd</sup>

表 3 不同剂量环磷酰胺对脾脏、头肾溶菌酶活性的影响

Tab.3 Effect of different doses of cyclophosphamide on the lysozyme activity of spleen and head kidney

组别 group	头肾溶菌酶活性 lysozyme activity of head kidney	脾脏溶菌酶活性 lysozyme activity of spleen
对照组 control	0.0572 ± 0.0189 <sup>ABa</sup>	0.0378 ± 0.0117 <sup>Aa</sup>
1 mg·kg <sup>-1</sup>	0.0626 ± 0.0193 <sup>Aa</sup>	0.0305 ± 0.0089 <sup>ABab</sup>
10 mg·kg <sup>-1</sup>	0.0297 ± 0.0134 <sup>Cb</sup>	0.0166 ± 0.0073 <sup>Cc</sup>
20 mg·kg <sup>-1</sup>	0.0366 ± 0.0153 <sup>BCb</sup>	0.0229 ± 0.0100 <sup>BCbc</sup>

表 4 不同剂量环磷酰胺对 IgM、IFN- $\alpha$  及外周血 NK 细胞杀伤功能的影响

Tab.4 Influence of different doses of cyclophosphamide on IgM, IFN- $\alpha$  content produced by B cell cultivated *in vitro* and natural killer cell activity

组别 group	IgM ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	IFN- $\alpha$ ( $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	NK 细胞杀伤活性 (%) natural killer cell activity
对照组 control	338.47 ± 25.66 <sup>Aa</sup>	28.85 ± 9.25 <sup>Aa</sup>	46.01 ± 26.61 <sup>Aa</sup>
1 mg·kg <sup>-1</sup>	341.47 ± 24.75 <sup>Aa</sup>	18.13 ± 6.29 <sup>ABab</sup>	68.78 ± 19.02 <sup>Aa</sup>
10 mg·kg <sup>-1</sup>	208.87 ± 98.88 <sup>Bb</sup>	3.11 ± 2.65 <sup>Bc</sup>	59.98 ± 5.31 <sup>Aa</sup>
20 mg·kg <sup>-1</sup>	197.45 ± 83.42 <sup>Bb</sup>	12.81 ± 6.47 <sup>ABc</sup>	64.84 ± 9.46 <sup>Aa</sup>

表 5 不同剂量环磷酰胺对 B 淋巴细胞转化能力的影响

Tab.5 Effect of different doses of cyclophosphamide on B lymphocytes proliferation

组别 group	脾脏淋巴细胞转化 * splenic lymphocytes proliferation *	头肾淋巴细胞转化 * head kidney lymphocytes proliferation *	外周血淋巴细胞转化 * peripheral blood lymphocytes proliferation *
对照组 control	2.18 ± 0.17 <sup>Aa</sup>	1.10 ± 0.13 <sup>Aa</sup>	2.26 ± 0.21 <sup>Aa</sup>
1 mg·kg <sup>-1</sup>	2.25 ± 0.25 <sup>Aa</sup>	1.10 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	2.02 ± 0.32 <sup>ABab</sup>
10 mg·kg <sup>-1</sup>	1.71 ± 0.27 <sup>ABb</sup>	0.93 ± 0.22 <sup>Aa</sup>	1.82 ± 0.22 <sup>Ab</sup>
20 mg·kg <sup>-1</sup>	1.41 ± 0.20 <sup>Bb</sup>	0.89 ± 0.12 <sup>Aa</sup>	1.75 ± 0.61 <sup>Ab</sup>

注: \* 刺激指数

Notes: \* stimulation index, SI

### 3 讨论

采用环境抑制<sup>[15]</sup>、病原抑制或药物抑制可使动物人为地处于免疫抑制状态。但在试验条件下,人为制造环境胁迫因子也可能建立鱼类免疫抑制模型,但由于环境胁迫因子产生的方法、强度、条件的复杂性可能引起免疫抑制水平不一致,难以复制。病原抑制即人为感染病原使动物致病而达到动物体免疫功能低下<sup>[16-18]</sup>,但用病原抑制建立的免疫抑制模型也同样会存在因病原体血清型的复杂性而引起模型的不稳定性<sup>[19-21]</sup>。药物抑制即使用免疫抑制药物使动物体处于免疫抑制状态,因药物的稳定性可以克服以上两种方法的缺点而获得稳定的、能够重复的免疫抑制状态,因此本试验选用药物抑制的方法来建立鱼类免疫抑制模型。

环磷酰胺在医学上属细胞周期非特异性化疗药物,对增殖周期中各期细胞均有杀伤作用,但对Go期(造血干)细胞和非增殖更新细胞作用较弱或无作用<sup>[22]</sup>、机体大部分白细胞寿命较短,环磷酰胺的杀伤作用首先通过外周血白细胞反映出来<sup>[23]</sup>。从本试验中白细胞(包括各种类型的白细胞)的数量及吞噬活力变化看,环磷酰胺对鱼类也有类似的作用。其次,外周血B细胞分泌的IgM和IFN- $\alpha$ 、脾脏和头肾溶菌酶活性、外周血和脾脏B淋巴细胞转化能力也呈显著下降,说明用环磷酰胺来建立鱼类免疫抑制模型是可行的,采用10 mg·kg<sup>-1</sup>的剂量建立的异育银鲫实验性免疫抑制模型可以用于鱼类免疫学的实验性研究。

环磷酰胺作为抗癌药广泛应用于临床和科研,在医学研究上也常作为免疫抑制剂,用于建立免疫抑制模型<sup>[24]</sup>。它是人工合成的氮芥类烷化剂,是“潜伏化”药物,本身没有活性,必须经肝微粒体p450酶系代谢转化为具有烷化作用的醛磷酰胺和氯乙基磷胺<sup>[25]</sup>,醛磷酰胺通过烷基取代其它物质的氢离子,使细胞DNA链交联、脱氧核糖核酸失去活性,致使细胞分裂减少,不能复制,从而起免疫抑制作用<sup>[26]</sup>。但是其在鱼类中的使用尚未见报道,作用机理尚不清楚,有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Sakai M. Current research status of fish immunostimulants[J]. Aquac, 1999,172:63-92.

- [2] Cuesta A, Meseguer J, Esteban M A. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. Vet Immunol Immunopath, 2004, 101(3-4):203-210.
- [3] Dugenci K. Some medicinal plants as immunostimulant for fish [J]. J Ethnopharmacology, 2003,88(1): 99-106.
- [4] 周光炎 免疫学原理[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2000. 208-239.
- [5] Knott R M, Munro A L S. The persistence of infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon[J]. Vet Immunol Immunopath, 1986, 12(1-4):359-364
- [6] Timothy J B, Katy A, Philip M, et al. Long-term study of antibody response and injection-site effects of oil adjuvants in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 14(4):363-369.
- [7] 张义兵,俞小牧.鱼类干扰素的研究进展[J].中国水产科学,2000,7(3):97-101.
- [8] 符少辉,陈 韬.人IFN- $\alpha$ 诱导草鱼肾细胞对草鱼出血病毒毒性作用的研究[J].水生生物报,1999,23(3):290-292.
- [9] 陈立祥,张学文,肖调义,等.人 $\alpha$ -干扰素基因在转基因草鱼中的表达[J].湖南农业大学学报,2001,27(3):177-178
- [10] 章怀云,屈孝初,包树均.人干扰素对草鱼出血病毒干扰作用的研究[J].湖南师范大学自然科学学报,1993,16(增刊):104-107.
- [11] Kita Masakazu, Yamada Osamu, Yamaji Masahiro, et al. The LDH (lactate dehydrogenase) method: a new technique to measure human natural killer activity [J]. Kyoto Pasuturu Kenkyusho Kenkyu Hokoku,1987,1,67-73
- [12] 唐雪明 胡元亮.应用乳酸脱氢酶释放法研究黄芪多糖对雏鸡外周血中自然杀伤细胞活性的影响[J].中兽医学杂志,1997,(2):9-11.
- [13] 叶应妩.全国临床检验操作规程[M].南京:东南大学出版社,1997.379-381
- [14] 唐雪明,胡元亮.黄芪多糖对雏鸡外周血T淋巴细胞转化功能的影响[J] 中国兽医学报,1998,18(3).269-271
- [15] 王文博,李爱华.环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况[J].水产学报,2002,26(4).368-374.
- [16] 蔡完其,孙佩芳.三种鲫鱼对暴发性鱼病的抗病力[J].水产学报,1993,17(1):44-51.
- [17] 郑国兴.不同家系的万氏对虾对对虾杆状病毒抗病力的差异[J].水产学报,1994,18(2):148-152.
- [18] Chevassus B, Drson M. Genetics of resistance to disease in fishes [J]. Aquac,1990, 85:83-107.
- [19] 钱 冬,陈月英.引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型,毒力及溶血性[J] 微生物学报,1995,35(6):460-464.
- [20] Thomas L M, Gross R J, Cheasty T, et al. Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* species [J]. J Clin Microbiol,1990,28(5):980-984.
- [21] Shimada T, Kosako Y J. Comparison of two O-serogrouping systems for mesophilic *Aeromonas* spp. [J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(1):197-199.
- [22] Shulman L N. The biology of alkylating-agent cellular injury [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 1993, 7(2):325-35.
- [23] Artym J, Zimecki M, Kruzal M. Normalization of peripheral blood cell composition by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice [J]. Med Sci Monit, 2004, 10(3):BR84-89.
- [24] Allison A C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward [J]. Immunopharmacology, 2000,47(2-3):63-83.
- [25] Anderson D, Bishop J B, Garner R C, et al. Cyclophosphamide Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks [J]. Mutat Res. 1995,330: 115-181.
- [26] Povirk L F, Shuker D E. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards [J]. Mutat Res, 1994,318(3):205-226.