

文章编号:1000-0615(2005)04-0552-08

综述·

鱼类免疫增强剂的研究现状与进展

黄洪敏, 邵健忠, 项黎新

(浙江大学生命科学院, 浙江 杭州 310012)

关键词: 鱼类; 免疫增强剂; 机理; 应用

中图分类号: S963 文献标识码: A

Current research status and progress of fish immunostimulants

HUANG Hong-min, SHAO Jian-zhong, XIANG Li-xin

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Immunostimulants are valuable for the control of fish diseases. At present, it has already been a main tendency to discover and develop novel immunostimulants with characteristics of low toxicity, high efficacy, immediate efficacy and long-term efficacy. In this review, the definition, defense mechanism, categories and application of fish immunostimulants are introduced and fish immunostimulants are classified systematically according to their sources. Moreover, the latest literature about fish immunostimulants in detail were presented and reviewed and three methods for control of fish disease were compared: vaccination, chemotherapy and immunostimulants. Fish immunostimulants were thought to be safer than chemotherapeutics and their range of efficacy was wider than vaccination. They may be able to compensate for these limitations of chemotherapeutics and vaccines, thus they hold tremendous potential for use in fish culture to reduce losses from fish diseases. Meanwhile, concepts of use of fish immunostimulants were presented and principles for use were also noted. For aquaculture, this review provided a scientific reference for control of fish disease by immunostimulants.

Key words: fish; immunostimulant; mechanism; application

现代水产养殖业追求优质高产,但在大规模高密度的养殖生产中,往往会导致鱼体的抗应激能力下降,病害增多,成活率下降,造成重大经济损失。近年来,国内外学者对鱼类免疫机制及其病害防治方法已进行了大量研究,其中免疫增强剂因能增强机体抗疾病感染的能力,其免疫增强作用所需时间较短,且没有记忆成分,被认为是一种提高鱼体免疫活性及疾病抵抗力的有效方法,具有重要的应用价值。

1 鱼类免疫增强剂的含义和作用机理

免疫增强剂是指一些化学物质、药物、应激原或某些能引起特异、非特异性免疫反应活动,增强动物对病毒、细菌、真菌、寄生虫等抵抗力的物质。目前免疫增强剂的

种类可分为人工合成制剂、微生物来源制剂、动植物来源制剂、营养因子类物质和生物活性因子类物质等五大类。鱼类免疫增强剂主要通过增强非特异性免疫应答而发挥作用,如促进补体、溶菌酶、蛋白酶抑制剂、C-反应蛋白、天然溶血素、凝聚素、-巨球蛋白、巨噬细胞活化因子和干扰素等的合成,活化巨噬细胞、嗜中性粒细胞、非特异性细胞毒性细胞的吞噬杀菌功能。另外,免疫增强剂也能提高鱼体 IgM 抗体水平,增强鱼类特异性免疫应答水平^[1,2]。

2 鱼类免疫增强剂的种类

2.1 人工合成的免疫增强剂

目前,在鱼类中报道的人工合成免疫增强剂主要有

收稿日期:2004-08-16

资助项目:国家自然科学基金(30371096,30271015);浙江省自然科学基金(301307);高等学校博士学科点专项基金(20030335040)

作者简介:黄洪敏(1981-),男,浙江乐清人,硕士研究生,研究方向为鱼类分子免疫学。E-mail: zjuhmm100@hotmail.com

通讯作者:邵健忠, Tel: 0571-88273287, E-mail: Shaojz@zju.edu.cn

左旋咪唑 (levamisole, LMS) 和寡聚脱氧核糖核苷酸 (oligodeoxynucleotides, ODNs) 等。LMS 是一种合成药物, 在人类和高等动物中用来治疗线虫等感染。在鱼类中, LMS 被证明是一种免疫增强剂, 可提高嗜中性粒细胞的代谢及嗜菌活性, 也可提高白细胞的数量及血清中溶菌酶水平, 具有增强细胞免疫的作用, 能使受感染后被抑制的吞噬细胞和淋巴细胞恢复正常, 从而增强机体对细菌、病毒等的防御能力。Muleró 等^[3]曾报道金鲷 (*Sparus aurata*) 在喂饲 LMS 5 周后, 其淋巴细胞分泌巨噬细胞活化因子 (MAF) 的能力以及巨噬细胞的吞噬活性和呼吸爆发作用均显著增加, 血清补体活性也明显上升, 鱼体对鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 的抵抗力增强。Jeney 等^[4]报道了虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 在 LMS ($5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 中浸泡 30 min 后, 再在杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) O - 抗原疫苗中浸泡 2 min, 其吞噬细胞活力和杀菌指数等非特异免疫指标和特异性抗体滴度都有所提高。Cuesta 等^[5]在体内实验中发现, 金鲷用含 LMS 的饲料饲喂 10 d 后, 其 NCC 活力显著增强, 并且这种增强作用可以维持 6 周以上。

ODNs 是一种含 CpG 基序 (CpG motifs) 的免疫增强序列 (immunostimulatory sequence, ISS), 一般由 20 个左右的脱氧核糖核苷酸组成, 以未甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸为核心, 两侧由特定的嘌呤和嘧啶核苷酸组成侧翼序列, 不同动物的免疫增强作用对侧翼序列的要求不尽相同, 如适合人和小鼠的 ODNs 分别为 5TCGTCGT TTTGTCGTTT TGGTCGTT T3 和 5TCCATGACGTTTCCTGACGTT3, 适合大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的 ODN 为 5ACCGATAACGTTGCCGGTGACG3^[6]。在人和小鼠等动物中证明, ODNs 是免疫水平的强有力增强剂, 它具有促进 B 淋巴细胞增殖分化、分泌白细胞介素、诱导免疫球蛋白合成、增加 B 细胞表面主要组织相容性抗原 (MHC - II) 和协同刺激分子 B7 - 1 和 B7 - 2 等的表达、促进机体产生抗原特异性免疫反应、直接增强单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞在体内上调其共刺激分子的表达和分泌多种 Th1 型细胞因子如 IFN、IL - 1、IL - 12 和 TNF、增强 NK 细胞的杀伤能力并刺激其分泌 IFN - 等功能, 此外 ODNs 还是一种新型而安全的佐剂, 能引发强的抗体反应和 Th1 型体液免疫应答^[7]。近年来, 在鱼类中也证实, ODNs 是一种有效的免疫增强剂。Jørgensen 等^[8]最早利用质粒 DNA (含天然 CpG 基序) 和人工合成的 CpG - ODNs 体外刺激大西洋鲑白细胞, 48h 后, 检测到上清具有很强的抗病毒活性, 认为是 I 型和 II 型 IFN 的混合物。此后, Jørgensen 等^[9]又用 CpG-ODNs 处理虹鳟巨噬细胞, 8h 后, Northern 杂交即显示 IL - 1 的表达量增加, 48 h 后出现了抗病毒活性, 而经氯奎处理的细胞再与 CpG - ODNs 作用, 则发现抗病毒活性的产生和 IL - 1 表达均受到严重抑制, 远远低于未经处理时的水平。

这一结论与 Krieg 等^[10]在小鼠中得到的结果类似, 由于氯奎是一种胞内酸化的特异抑制剂, 它可阻断 CpG-ODNs 的诱导作用, 因而证明了 CpG-ODNs 是经内吞作用进入细胞, 经一系列信号传递, 从而增强免疫细胞功能的。研究中还发现, 当用氯奎处理巨噬细胞后再经 LPS 作用, 则 IL-1 的表达并未受影响, 这也提示, 在鱼类中 CpG-ODNs 与 LPS 增强免疫细胞是经两条不同途径实现的, 这与在高等动物中的结论相同^[11]。另外, Tassakka 等^[12]还发现, 在体外 CpG - ODNs 能增强鲤 (*Cyprinus carpio*) 头肾吞噬细胞的活力, 提高超氧阴离子的产量, 同时也能诱导头肾淋巴细胞的增殖; Ounouna 等^[13]发现 CpG - ODNs 能增强斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) NCC 的活力。最近作者实验室的研究也证明, CpG - ODNs 能在体外直接活化草鱼巨噬细胞, 增强其呼吸爆发活性, 引起巨噬细胞内 O_2 和 H_2O_2 的增加, 促进酸性磷酸酶的合成, 提高其杀灭细菌的能力^[6]。这些结果表明, ODNs 能增强鱼体的先天免疫应答。

此外, 甲酰基肽 (formyl peptides) 也是一种人工合成的鱼类免疫增强剂。N - 甲酰 - 蛋氨酸 - 亮氨酸 - 苯丙氨酸 (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, FMLP) 是以细菌分泌物中的一种多肽物质为模型而人工合成的化合物。secombes 等^[14]曾报道在鲈 (*Pleuronectes platessa*) 的中性粒细胞中添加 FMLP 后, 能增加其迁移率, 使得中性粒细胞对炎症的反应更加敏感。

2.2 微生物来源的免疫增强剂

菌体组分 研究表明, 微生物的许多菌体组分如胞壁酰二肽、脂多糖、壳多糖、壳聚糖、葡聚糖、肽聚糖等都是有效的免疫增强剂。胞壁酰二肽 (muramyl dipeptide, MDP) 来自分支杆菌的细胞壁, 具有免疫刺激作用。Olivier 等^[15]曾报道银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 注射 MDP 和弗氏不完全佐剂后, 对杀鲑气单胞菌的抵抗力提高了 47 倍; Kodama 等^[16]报道了虹鳟腹腔注射 MDP-Lys 后能增强头肾白细胞的吞噬作用、呼吸爆发反应和迁移率, 提高对杀鲑气单胞菌的抵抗力, 同时他们还证实了注射 MDP-Lys 的虹鳟的血清能刺激头肾细胞克隆的形成。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌细胞壁的一种组分, 大量研究表明, 它能促进鱼类 B 淋巴细胞的增殖与分化。除此之外, Salati 等^[17]还发现真鲷 (*Pagrus major*)、鲈和大西洋鲑注射 LPS 后能增强其巨噬细胞的吞噬活力和迁移率, 增加超氧阴离子的产量; Neumann 等^[18]发现 LPS 能促进鲫 (*Carassius auratus*) 白细胞产生巨噬细胞活化因子和斑点叉尾鲷单核细胞产生 IL-1 样分子。Paulsen 等^[19]将大西洋鲑的头肾巨噬细胞在含 LPS 和酵母 - 葡聚糖的培养基中共培养, 发现其上清液中溶菌酶的含量在第 3 天开始增加, 第 6 天达到高峰, 此时其含量可以达到对照组的 5 ~ 6 倍, 实验显示 LPS 的最适浓度为 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而酵母 - 葡聚糖的最适浓度为 $1\sim 250\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

mL^{-1} 。随后 Paulsen 等^[20]又报道了大西洋鲑腹腔注射 LPS 和酵母-葡聚糖后,能增强血液、头肾、肠白细胞中溶菌酶的活力,而在脾脏和肾中的溶菌酶活力没有改变。值得一提的是, Park 等^[21]还报道了来自杂色革盖菌 (*Coniolum versicolor*) 的蛋白多糖 (PS-K) 能增强尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 对迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 的抵抗力。

壳多糖是一种多糖类物质,它是形成某些真菌细胞壁以及甲壳动物和昆虫外骨骼的主要组分,壳聚糖则是一种脱乙酰基的壳多糖。在壳多糖和壳聚糖的免疫学功能研究方面, Anderson 等^[22]曾报道了溪鱧 (*Salvelinus fontinalis*) 和虹鳟经壳聚糖溶液注射或浸泡后,血液中的一些免疫指标如杀菌活力、髓过氧化物酶活性和 IgM 浓度均显著增强,对杀蛙气单胞菌感染的抵抗力也明显增加; Esteban 等^[23]则发现金鲫饲喂壳多糖后,能增强天然溶血补体和细胞毒活力,促进吞噬细胞呼吸爆发和杀菌作用,但溶菌酶的活力没有改变;此外 Bullock 等^[24]的研究也表明,虹鳟经腹腔注射壳多糖后,其血液补体活力、吞噬细胞呼吸爆发和吞噬活力显著增强,而经静脉注射壳多糖后,所有的免疫指标却没有发生变化。

葡聚糖也是一种重要的免疫增强剂,其中对酵母葡聚糖的研究最为广泛。Robertsen 等^[25]曾报道了大西洋鲑、斑点叉尾鲷等腹腔注射或口服酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞壁葡聚糖后,能增加对鳗弧菌、杀蛙弧菌 (*Vibrio salmonicida*)、鲁氏耶尔森菌 (*Yersinia ruckeri*) 和爱德华菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 的抵抗力; Sung 等^[26]发现斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 经酵母葡聚糖溶液 ($0.5 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 浸泡后能增加对创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 的抵抗力。另有研究证实,酵母葡聚糖还具有免疫佐剂作用,大西洋鲑联合注射杀蛙气单胞菌疫苗和酵母葡聚糖后,与单独注射疫苗的对照组相比,其抗体应答水平和对疝病的抵抗力显著增强,而只注射酵母葡聚糖的实验组,免疫保护作用不明显^[27]。此外,在对大西洋鲑、虹鳟、木叶鲢 (*Scophthalmus maximus*)、斑点叉尾鲷和斑节对虾等的研究中还分别发现,酵母葡聚糖能增强溶菌酶、补体和巨噬细胞的杀菌活力^[28,29]。除了酵母葡聚糖外,来自裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 的-1,3 葡聚糖 (VST) 也有增强抗病的作用。Niki 等曾报道银大麻哈鱼注射或口服 VST 后能增强对杀蛙气单胞菌的抵抗力; Stolen 等^[30]报道了斑点叉尾鲷饲喂 VST 后,其巨噬细胞超氧阴离子的产量增加,受爱德华菌胁迫时死亡率降低,但其血清溶菌酶活力没有增加,VST 对爱德华菌疫苗的佐剂作用也不明显; Sahoo 等^[31]还用 VST 饲喂印度野鲮 (*Labeo rohita*),发现鱼体非特异性免疫和特异性免疫水平均明显增强,对嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的抵抗力增加。此外还有研究表明,来自乳糖发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) 的肽聚糖在青甘 (*Seriola*

quiqueradiata) 和虹鳟中能增强吞噬细胞活性,提高鱼体对格氏乳球菌 (*Enterococcus seriola*) 和弧菌的抵抗力^[32]。

在菌体组分中,具有免疫增强作用的还有细菌 DNA。20 世纪 80 年代, Yamonato 等^[33]报道了来源于一种非致病性的结核杆菌样分支杆菌 (BCG) 的基因组 DNA 提取物能活化小鼠天然杀伤细胞,并诱导产生干扰素,从而抑制病毒复制和肿瘤生长。该发现揭示了 DNA 不仅是重要的遗传物质,而且还具有免疫调节作用。1991 年,另一研究也发现某些特定的细菌 DNA 能刺激小鼠 B 淋巴细胞增殖和免疫球蛋白的分泌,而脊椎动物 DNA 却没有这种作用^[34]。这一现象引起了科学界的关注,之后大量的研究证明,这种免疫调节作用与细菌基因组 DNA 的特殊结构有关,在细菌基因组中,非甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸 (CpG) 出现频率很高,平均每 16 对二核苷酸就出现一次,而在脊椎动物基因组中该结构的出现频率仅为细菌的 1/4,并且胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸呈高度甲基化。因此,人们把以未甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸为核心的特殊核苷酸序列称为免疫刺激序列 (ISS),动物免疫系统正是通过识别 ISS 的特征结构来识别微生物 DNA 和自身 DNA,从而形成针对病原体的特异免疫防护机制^[35]。近年来的研究表明,含有 ISS 序列的细菌、病毒和质粒 DNA 也能增强鱼类的先天免疫应答,如 Johansen 等^[36]报道了质粒 pBLCA2 DNA 能诱导大西洋鲑白细胞产生有抗病毒作用的细胞因子,而质粒经 DNase I 处理后,则无此应答; Ounouna 等^[37]报道了海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 基因组 DNA 能增强斑点叉尾鲷 NCC 的活力,而基因组 DNA 经 Dnase I 处理后,该作用消失; Kanellos 等^[38]报道了鲫联合注射含有 CpG 基序的质粒 DNA 和蛋白亚单位疫苗后,能增强鱼体抗体的应答能力;此外, Kanellos^[39]、Kim^[40]和 Heppell 等^[41]也有类似的报道。

另外,核苷酸早就被认为是哺乳动物营养的重要组成部分,可增强小鼠对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和白色假丝酵母 (*Candida albicans*) 的抵抗力。在鱼类中, Burrells 等^[42]报道了大西洋鲑、银大麻哈鱼和虹鳟饲喂添加有外源核苷酸的饲料后,能增强对细菌、病毒、立克次体感染的抵抗力。Sakai 等^[43]也发现,饲料中添加酵母来源的核苷酸,能增强鲤的非特异性免疫反应。

微生物代谢和发酵产物 研究表明,微生物的某些代谢和发酵产物能作为鱼类免疫增强剂,如 FK-565 (庚酮-D-谷氨酸-L-内消旋-二氨基庚二基-DC2 丙氨酸) 是与乳酰四肽 (FK-156) 相关的一种多肽,它是从橄榄灰链球菌 (*Streptomyces olivaceogriseus*) 的培养液中分离获得的。Kitao 和 Yoshida 等^[44]证实,虹鳟和青甘注射 FK-565 后能使吞噬细胞活化,增强抗杀蛙气单胞菌的能力;在虹鳟中,用鲁氏耶尔森菌或杀蛙气单胞菌 O-抗原制剂和 FK-565 联合免疫后,能提高脾抗体形成细胞的数量和体液中抗体的滴度^[45]。EF203 是微生物利用鸡蛋的发酵产物,

Yoshida 等^[46]报道了虹鳟口服 EF203 后,能刺激白细胞的活力,如增强吞噬作用和化学发光反应,并能增加对链球菌的抵抗力。Sakai 等^[47]发现虹鳟在接种鲑肾杆菌 (*Renibacterium salmoninarum*) 疫苗的同时使用 EF203,虽然血清凝集抗体滴度没有增加,但吞噬细胞的吞噬作用明显加强,头肾白细胞的 NBT 反应也更活跃,在抗鲑肾杆菌感染方面,其存活率有明显提高。

微生物菌体 微生物菌体除了可以作为疫苗进行鱼类病害免疫防治外,还可作为免疫增强剂发挥作用,如鳗弧菌就已作为一种重要的免疫增强剂应用于鲑鱼养殖生产。研究显示,该菌通过注射、口服、浸泡等途径给药都有效果。Sakai 等^[48]发现虹鳟经鳗弧菌溶液浸泡后,能增强其对链球菌感染的抵抗力;Norqvist 等^[49]报道了减毒鳗弧菌可使虹鳟对杀蛙气单胞菌有抵抗作用。除了鳗弧菌外,有报道认为虹鳟、斑点叉尾鲷、金鲷注射或口服冻干的酿酒酵母和假丝酵母 (*Candida utilis*) 后,能同时增强体液和细胞免疫应答,增加对病菌的抵抗力^[50-52]。此外,Rodríguez 等^[53]还研究了 3 种不同的卷枝毛霉菌 (*Mucor circinelloides*) 对金鲷的免疫刺激增强性,发现饲喂含有冻干卷枝毛霉菌的饲料后,能增强鱼体血清溶菌酶的活力、白细胞吞噬作用和细胞毒活性。

狭盐无色杆菌 (*Achromobacter stenohalis*) 是从海水中分离的一种 G⁻ 细菌, Kawahara^[54] 等发现白斑红点鲑 (*Salvelinus leucomaenis*) 注射灭活的该种细菌后能增强头肾细胞的化学发光反应,活化补体成分,增强对杀蛙气单胞菌的抵抗力^[22]。丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) 已在医学临床上用来预防人类肠道内微生物菌落的紊乱,如 Young 等^[55]报道了该菌能刺激人巨噬细胞和 NK 细胞活化,增强抗念珠菌的感染。研究显示,它在鱼类中也有免疫调节作用,如 Sakai 等^[56]发现虹鳟口服丁酸梭菌后能通过对白细胞的活化(包括吞噬作用的增强和超氧阴离子量的增加)而增强对弧菌病的抵抗力。此外,灭活的乳酪分枝杆菌 (*Mycobacterium butyricum*) 常被作为弗氏完全佐剂成分之一,用于增强鱼体的免疫应答和疫苗的效力。

2.3 动植物来源的免疫增强剂

动物提取物 研究显示,一些无脊椎动物的提取物也有免疫刺激作用,如海产被囊类动物中的加勒比海海鞘 (*Ecteinascida turbinata*) 的提取物 *Ete* 和皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 的水提取物 *Hde* 中的一种糖蛋白组分已被证明能在体外促进人肿瘤细胞的死亡,并抑制体内肿瘤的生长。Davis 等^[57]发现, *Ete* 和 *Hde* 在鱼类中也有免疫调节作用,如美洲鳗 (*Anguilla rostrata*) 和虹鳟分别注射 *Ete* 和 *Hde* 后,能增强吞噬细胞和 NK 细胞活性,在嗜水气单胞菌和鳗弧菌的胁迫下存活率有明显增加。此外,一种萤火鱿 (*Watasenia scintillans*) 的提取物,也被证实能刺激虹鳟巨噬细胞活性,促进淋巴母细胞转化为淋巴细胞^[58]。鱼类蛋白水解物中的酸肽成分在大西洋鲑中也

被认为有明显的免疫刺激作用^[59]。

植物提取物 许多植物提取物同样具有免疫刺激作用,如甘草皂苷是一种糖基化的皂甙,它能通过免疫调节途径而发挥抗炎症、抗肿瘤的活性。Edahiro 等报道了青甘口服甘草皂苷后能增加对格氏乳球菌的抵抗力^[60]。Jang 等^[61]报道了虹鳟巨噬细胞和淋巴细胞经甘草皂苷处理后,能分别增强其呼吸爆发水平和增生应答水平。伴刀豆球蛋白 A (concanavalin A, Con A) 是一种具有 T 细胞丝裂原活性的凝集素,研究表明,它与植物凝集素 PHA 一样,不仅能促进虹鳟、鲤等 T 淋巴细胞的增殖分化,同时还能活化巨噬细胞,并诱导白细胞产生巨噬细胞活化因子^[62,63]。此外还有研究显示,虹鳟口服大豆蛋白后,能增强其白细胞的活力^[64];虹鳟经植物皂甙 Quil A 浸泡后,能增强其对鲁氏耶尔森菌的杀菌力;在青甘中,口服 Quil A 皂甙后能增加白细胞的迁移率^[65];罗非鱼、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 饲喂大麦葡聚糖、云芝多糖后能提高对嗜水气单胞菌的抵抗力^[66]。最近, Candan 等^[67]还研究了饲喂几种医用植物如姜 (*Zingiber officinale*)、荨麻 (*Urtica dioica*)、槲寄生 (*Viscum album*) 提取物对鱼类免疫系统的影响,发现这几种饲料添加剂都能增强巨噬细胞呼吸爆发反应,虹鳟饲喂 1% 的姜粉水提取物,3 周后能显著增加鱼体的非特异免疫应答。

2.4 营养因子类免疫增强剂

维生素 C、E、A 等不仅是鱼类正常生长最基本的组分,也能增强鱼类的特异和非特异性免疫应答。Cuesta 等^[68]在这方面做了大量研究,先后报道了维生素 E 能增强金鲷的 NCC 活力,维生素 C 能增强金鲷的 NCC 活力和血清溶菌酶活力^[69],金鲷口服 150 ~ 300 mg · kg⁻¹ 的醋酸维生素 A,能增强头肾 NCC 活力、吞噬细胞呼吸爆发和白细胞的髓过氧化物酶活性,而腹腔注射醋酸维生素 A 则对金鲷有毒性作用^[70,71]。Clerton 等^[72]报道了改变食物中维生素 E 的含量能调节肠道白细胞的吞噬功能,说明维生素 E 更多的是在局部发生作用,特别是在肠道吞噬细胞的粘膜非淋巴样防御中起重要作用。除了上述维生素外, Amar 等^[73]还报道了类胡萝卜素和虾黄素能提高虹鳟的体液和细胞免疫应答水平,包括血清的补体成分和溶菌酶活力、细胞吞噬作用和细胞毒效应。类胡萝卜素在与其它维生素如 A、C、E 联合使用时,还能表现出更高的免疫刺激作用。此外,其它营养成分如脂类、微量元素等也能影响鱼体的免疫应答水平。

2.5 生物活性因子类免疫增强剂

激素 Kajita 等^[74]的研究表明,在鱼类中外源生长激素 (GH) 和催乳素 (PRL) 能直接影响鱼类淋巴细胞、巨噬细胞和 NK 细胞活性,如 GH 对淋巴细胞有丝裂原的活性,并能活化 NK 细胞。Narnaware 等^[75]证实,在高盐和低盐环境中, PRL 均能提高银鲟 (*Salmo gairdneri*) 血液中的淋巴细胞数目,鱼体注射 PRL 能引起白细胞的分裂增殖,在体

外 PRL 还能活化吞噬细胞的活力; Yada 等^[76]报道了 PRL 或 GH 在调节 IgM 含量中也起重要作用,他们还发现 PRL 和 GH 能阻止由氢化可的松引起的免疫抑制,恢复鱼类特异免疫功能^[77]。在激素中,前阿黑皮素的 N 端肽链(N-terminal peptides of proopiomelanocortin, NPP)是由前阿黑皮素经翻译后加工而成的,在体外和体内实验中,NPP 都能增强虹鳟和鲤巨噬细胞的吞噬活力,增加超氧阴离子的产量^[78]。另外, Watanaki 等^[79]还报道了 - 内啡肽能增加虹鳟白细胞的吞噬作用; Kele 等^[80]则发现用含有折仑诺(zeranol)激素的饲料饲喂虹鳟后,能显著增强非特异性免疫活力。

细胞因子 细胞因子是一类具有特定生物学功能的多肽或糖蛋白,近年来对鱼类细胞因子的研究已取得较大进展,特别是一批免疫相关的细胞因子及其基因如 IL-1、IL-2、IL-8、IFN、TNF、NKEF、TGF 等已先后被鉴定和克隆,在这些细胞因子中,已有部分因子被证实是有效的免疫增强剂,可用于病害的免疫防治,如 Kwang 等报道了鱼类 IL-1 可在鲤和黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)中作为免疫佐剂,黑鲈幼鱼腹腔注射鳗弧菌血清 1 型、2 型疫苗和黑鲈 IL-1 后,能增加特异性抗弧菌抗体的产量,增强血清抗体应答^[81,82]。Peddie 等^[83]报道了 IL-1 在体外能引起虹鳟头肾白细胞的迁移。作者实验室在研究草鱼干扰素的功能时发现,鱼类干扰素不仅具有抗病毒活性,而且还具有增强巨噬细胞杀菌活性,调节淋巴细胞增殖分化等功能,说明其可作为一种免疫增强剂而得到应用^[84]。可以预示,随着鱼类免疫细胞因子的相继发现和研究的不断深入,它们必将为鱼类病害防治开辟新的途径,发挥越来越重要的作用。

乳铁蛋白 乳铁蛋白具有很多重要的生物学功能,如抗菌活性、铁元素吸收的调控、巨噬细胞的生长促进作用,也有报道认为它能调节巨噬细胞、中性粒细胞的超氧阴离子活性,如 Sakai 等报道了虹鳟口服牛乳铁蛋白后,能增加巨噬细胞超氧阴离子的产量,大大增强对鳗弧菌的抵抗力,对链球菌属的某些种的抵抗力也有增加^[85]。Kakura 等^[86]发现真鲷口服牛乳铁蛋白后,能增加血液中粒细胞和淋巴细胞的数量,并能提高自身粘液的分泌,增强对刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的抵抗力。

3 鱼类免疫增强剂的应用与展望

免疫增强剂在鱼体中的应用有注射法、浸泡法和口服法,在生产中以口服法最实用。虽然注射法效果较明显,但劳动强度大,耗时长,对鱼体会造成严重的应激刺激,幼鱼常不宜使用这种方法;浸泡法对鱼体所造成的应激性刺激较小,而且可同时处理多个鱼体,但在浸泡过程中免疫刺激物是通过鳃和其他器官进入体内的,所以吸收量较少,作用时间较短;口服法则不仅可以使鱼体所受到的应激性刺激减少到最低程度,而且还适用于各种规

格的鱼体^[22]。但值得注意的是,免疫刺激剂的效力与给药途径有关,如腹腔注射和口服醋酸维生素 A 对金鲷免疫系统的影响不同,口服可以提高鱼体的免疫应答,而腹腔注射则对鱼体有毒性^[70]。免疫增强剂的使用时机对鱼体的免疫效果也很关键,由于免疫增强剂可使因压抑而导致的免疫抑制恢复,所以为了减少因发病而造成的损失,免疫刺激剂一般应在鱼体发病前使用,但是有些免疫增强剂如 *Eie* 的有效给药时机却比较特殊,表现为在鱼体感染后再注射,则免疫抵抗力有所增强,而在感染前或感染同时使用,反而没有保护作用^[87]。此外,口服使用免疫增强剂虽然是有效的方法,然而长期服用的影响仍不清楚,有研究显示长期口服使用免疫增强剂,反而会降低免疫应答反应,这可能是鱼体中存在一种对免疫刺激剂的负反馈系统,使得免疫水平回到初始的状态。所以有必要研究每一种免疫增强剂的最有效免疫时期^[88]。同样,免疫增强剂的效果并不都依赖于其剂量,有些免疫增强剂在高剂量条件下,不仅不会增强其免疫效果,反而还会抑制免疫反应^[19]。另一方面,对免疫增强剂的副作用还有待深入研究,有实验显示,当鱼体产卵时,免疫系统会被性激素所抑制,尽管使用免疫增强剂可以使受性激素抑制的免疫系统恢复过来,但它们可能会因此而扰乱鱼体的性成熟和其它与产卵有关的基本功能^[89]。

目前,对鱼类疾病的控制主要有 3 种方法,即化学疗法、疫苗接种和使用免疫增强剂。化学药物治疗虽是主要的鱼病防治方法,但化学药剂和抗生素的大量使用往往会导致药物残留和耐药性的产生,污染水环境,对人们的健康造成潜在威胁。疫苗虽然可以成为控制鱼类疾病最直接有效的方法,但是目前疫苗的开发和广泛应用也存在一定的困难,而且由于免疫反应具有特异性,一种疫苗只能特异性地预防相应的某种疾病,所以实际作用也非常有限。免疫增强剂则能弥补化学治疗法和疫苗法的不足,虽然免疫增强剂也存在一些问题,但仍被认为是一种比化学疗法更安全、比疫苗法有更广泛效力的防治方法。如果将疫苗和免疫增强剂联合使用,将能增加疫苗的效力。目前,通过多来源、多途径的方式开发研制低毒、高效、速效、长效的新型免疫增强剂已成为鱼类疾病防治研究的主要趋势,而随着人们对鱼类免疫机制的更深入全面的研究,鱼类免疫增强剂将会成为控制鱼类疾病,提高鱼体免疫力的极为有效的途径。

参考文献:

- [1] 聂品. 鱼类非特异性免疫研究新进展[J]. 水产学报, 1997, 21(1): 69-73.
- [2] Shen L, Stuge T B, Zhou H, et al. Channel catfish cytotoxic cells: a mini-review[J]. Dev Comp Immunol, 2002, 26: 141-149.
- [3] Mulero V, Esteban M A, Meseguer J, et al. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of

- the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 1998, 8:49 - 62.
- [4] Jeney G, Anderson D P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants [J]. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3: 51 - 58.
- [5] Cuesta A, Esteban M A, Meseguer J. Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2002, 89:169 - 174.
- [6] Meng Z, Shao J Z, Xiang L X. CpG oligodeoxynucleotides activate grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) macrophages [J]. Dev Comp Immunol, 2003, 27:313 - 321.
- [7] Krieg A M. The role of CpG motifs in innate immunity [J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12:35 - 43.
- [8] Jørgensen J B, Johansen A, Stenersen B, et al. CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25:313 - 321.
- [9] Jørgensen J B, Zhou J, Johansen A, et al. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1 and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11:673 - 682.
- [10] Krieg A M, Hartmann G, Yi A K. Mechanism of action of CpG DNA [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2000, 247:1 - 21.
- [11] Stacey K J, Sweet M J, Hume D A. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA [J]. J Immunol, 1996, 157:2116 - 2122.
- [12] Tassakka A R, Sakai M. CpG oligodeoxynucleotides enhance the non-specific immune responses on carp, *Cyprinus carpio* [J]. Aquac, 2002, 209:1 - 10.
- [13] Oumouna M, Jaso-Friedmann L, Evans D L. Activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) with synthetic oligodeoxynucleotides and bacterial genomic DNA Binding, specificity and identification of unique immunostimulatory motifs [J]. Dev Comp Immunol, 2002, 26:257 - 269.
- [14] Secombes C J. Enhancement of fish phagocyte activity [J]. Fish Shellfish Immunol, 1994, 4:421 - 436.
- [16] Kodama H, Hirota Y, Mukamoto N, et al. Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes by muramyl dipeptide [J]. Dev Comp Immunol, 1993, 17:129 - 140.
- [17] Salati F, Hamaguchi M, Kusuda R. Immune response of red sea bream to *Edwardsiella tarda* antigens [J]. Fish Pathol, 1987, 22: 93 - 98.
- [18] Neumann N F, Fagan D, Belosevic M. Macrophage activating factors secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leucocytes synergies with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages [J]. Dev Comp Immunol, 1995, 19:475 - 482.
- [19] Paulsen S M, Engstad R E, Robertsen B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11:23 - 37.
- [20] Paulsen S M, Lunde H, Engstad R E. *In vivo* effects of β -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 14:39 - 54.
- [21] Park K H, Jeong H D. Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharide [J]. Aquac, 1996, 143:135 - 143.
- [22] Anderson D P, Siwicki A K. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan of chitosan by injection or immersion [J]. Prog Fish Cult, 1994, 56:258 - 261.
- [23] Esteban M A, Cuesta A, Meseguer J. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11:303 - 315.
- [24] Bullock G, Blazer V, Tsukuda S. Toxicity of acidified chitosan for cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquac, 2000, 185:273 - 280.
- [25] Robertsen B, Røstad G, Engstad R, et al. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls [J]. J Fish Dis, 1990, 13:391 - 400.
- [26] Sung H H, Kou G H, Song Y L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Fish Pathol, 1994, 29:11 - 17.
- [27] Røstad G, Aasjord P. M, Robertsen B. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3:179 - 190.
- [28] Jørgensen J B, Robertsen B. Yeast β -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages [J]. Dev Comp Immunol, 1995, 19:43 - 57.
- [29] Baulny M O D, Quentel C, Fournier V, et al. Effect of long-term oral administration of β -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus* [J]. Dis Aquat Org, 1996, 26: 139 - 147.
- [30] Stolen J S, Fletcher T C. Modulators of fish immune Responses [M]. SOS Publication, 1994.
- [31] Sahoo P K, Mukherjee S C. Effect of dietary β -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11:683 - 695.
- [32] Itami T, Kondo M, Uozu M S, et al. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolocida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck and Schlegel), by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum* [J]. J Fish Dis, 1996, 19:185 - 187.

- [33] Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, *et al.* DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferon, activates natural killer cells and inhibits tumor growth [J]. *Microbiol Immunol*, 1992, 36: 983 - 7.
- [34] Messina J P, Gilkeson G S, Pisetsky D S. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA [J]. *J Immunol*, 1991, 147:1759 - 64.
- [35] Bird A P. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus [J]. *Trends Genet*, 1987,3:342 - 347.
- [36] Johanson B, J Črgensen, Audny Johansen, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25:313 - 321.
- [37] Ounouna M, Jaso - Friedmann L, Evans D L, *et al.* Activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) with synthetic oligodeoxynucleotides and bacterial genomic DNA Binding, specificity and identification of unique immunostimulatory motifs [J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26:257 - 269.
- [38] Kanellos T S, Sylvester I D, Butler V L, *et al.* Mammalian granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and some CpG motifs have an effect on the immunogenicity of DNA and subunit vaccines in fish[J]. *Immunology*, 1999, 96:507 - 10.
- [39] Kanellos T, Sylvester I D, Howard C R, *et al.* DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish [J]. *Vaccine*, 1999, 17: 965 - 972.
- [40] Kim C H, Johnson M C, Drennan J D, *et al.* DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish[J]. *J Virol*, 2000, 74 (15) : 7048 - 7054.
- [41] Heppell J, Heather, Davis L, *et al.* Application of DNA vaccine technology to aquaculture [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 43:29 - 43.
- [42] Burrells C, Williams P D, Forno P F. Dietary nucleotides : a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to disease in salmonids[J]. *Aquac*, 2001, 199:159 - 169.
- [43] Sakai M, Taniguchi K, Mamoto K, *et al.* Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. [J]. *J Fish Dis*, 2001, 24:433 - 438.
- [44] Kitao T, Yoshida T. Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1986, 12:287 - 291.
- [45] Kitao T, Yoshida T, Anderson D P, *et al.* Immunostimulation of antibody-producing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier[J]. *J Fish Biol*, 1987, 31:87 - 91.
- [46] Yoshida T, Sakai M, Kitao T, *et al.* Immunodulatory effects of the fermented products of chicken egg, EF203, on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquac*, 1993, 109:207 - 214.
- [47] Sakai M, Yoshida T, Kobayashi M. Influence of the immunostimulant, EF203, on the immune responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to *Renibacterium salmoninarum* [J]. *Aquac*, 1995, 138:61 - 67.
- [48] Sakai M, Atsuta S, Kobayashi M. Efficiencies of combined vaccine for *Vibrio anguillarum* and *Streptococcus* sp. [J]. *Fisheries Sci*, 1995, 61:359 - 360.
- [49] Norqvist A, Hagstrom A, Wolf-Watz H. Protection of rainbow trout against vibriosis and furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55:1400 - 1405.
- [50] Siwicki A K, Anderson D P, Rumsey G L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1994, 41:125 - 139.
- [51] Ortuo J, Cuesta A, Rodr uez A, *et al.* Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2002, 85:41 - 50.
- [52] Rodr uez A, Cuesta A, Ovtuno J, *et al.* Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, 96:183 - 192.
- [53] Rodr uez A, Cuesta A, Esteban M *et al.* The effect of dietary administration of the fungus *Mucor circinelloides* on non-specific immune responses of gilthead seabream [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16(2) :241 - 249.
- [54] Kawahara E, Sakai M, Nomura S. Immunomodulatory effects on white-spotted char, *Sallelinus leucomaenis*, injected with *Achromobacter stenohalis* [C]. *The Asian Fisheries Forum, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines*, 1994,390 - 393.
- [55] Young C H, Kaneda S, Mikami Y, *et al.* Protection activity induced by the bacterial vaccine, heat-killed *Clostridium butyricum* against *Candida albicans* infections in mice [J]. *Jap J Med Mycol*, 1987,28:262 - 269.
- [56] Sakai M, Yoshida T, Atsuta S, *et al.* Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration *Clostridium butyricum* bacterin [J]. *J Fish Dis*, 1995, 18:187 - 190.
- [57] Sakai M, Kamiya H, Atsuta S, *et al.* Immunodulatory effects on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, injected with the extract of abalone, *Haliotis discus hannai* [J]. *J Appl Ichthyol*, 1991, 7: 54 - 59.
- [58] Siwicki A K, Miyazaki T, Komatsu I, *et al.* *In vitro* influence of heat extract from firefly squid *Watasenia scintillans* on the phagocyte and lymphocyte activities in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Fish Pathol*, 1996, 31: 1 - 7.
- [59] Gildberg A, Bogwald J, Johansen A, *et al.* Isolation of acid peptide fractions from fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1996, 114B: 97 - 101.
- [60] Edahiro T, Hamoguchi M, Kusuda R. Suppressive effect of glycyrrhizin against streptococcal infection promoted by feeding

- oxidized lipids to yellowtail, *Seniolo quinqueradiata* [J]. Suisanzoshoku, 1991, 39:21 - 27.
- [61] Jang S I, Marsden M J, Kim Y G, *et al.* The effect of glycyrrhizin on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), leucocyte responses[J]. J Fish Dis, 1995, 8:07 - 315.
- [62] Neumann N F, Stafford J L, Belosevic M. Biochemical and functional characterisation of macrophage stimulating factors secreted by mitogen-induced goldfish kidney leucocytes[J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10:167 - 186.
- [63] Neumann N F, Belosevic M. Sequential activation and deactivation of antimicrobial killing mechanisms of cytokine activated goldfish macrophages[J]. Dev Comp Immunol, 1997, 21: 188.
- [64] Rumsey G L, Siwicki A K, Anderson D P, *et al.* Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1994, 41: 323 - 339.
- [65] Ninomiya M, Hata H, Fujiki M, *et al.* Enhancement of chemotactic activity of yellowtail *Seniolo quinqueradiata* leucocytes by oral administration of quillaja saponin [J]. Fish Shellfish Immunol, 1995, 5:325 - 328.
- [66] Wang W S, Wang D H. Enhancement of the resistance of tilapia and grass carp to experimental *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* infections by several polysaccharides [J]. Comp Immune Microbiol Infect Dis, 1997, 20(1):261 - 270.
- [67] Dženci S K, Arda N, Candan A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish[J]. J Ethnopharmacol, 2003, 88:99 - 106.
- [68] Cuesta A, Esteban M A, Ovtuno J, *et al.* Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) [J] Fish Shellfish Immunol, 2001, 11:293 - 302.
- [69] Cuesta A, Esteban M A, Meseguer J, *et al.* Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C[J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 13:97 - 109.
- [70] Cuesta A, Ortuno J, Esteban M A, *et al.* Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate[J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 13: 279 - 291.
- [71] Cuest A, Esteban M A, Meseguer J, *et al.* Tumouricidal activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) natural cytotoxic cells the roleplayed *in vitro* and *in vivo* by retinol acetate[J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 14:133 - 144.
- [72] 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.
- [73] Amar E C, Kiron V, Satoh S, *et al.* Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. Aquac Res, 2001, 32(12):162 - 173.
- [74] Kajita Y, Sakai M, Atsuta S, *et al.* The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss* [J]. Fish Pathol, 1990,25:93 - 98.
- [75] Narnaware Y K, Kelly S P, Woo N Y S, *et al.* Stimulation of macrophage phagocytosis and lymphocyte count by exogenous prolactin administration in silver sea bream *Sparus sarba* adapted to hyper and hypo-osmotic salinities [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1998, 61: 387 - 391.
- [76] Yada T, Nagae M, Moriyama S, *et al.* Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin M levels of hypophysectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1999, 115:46 - 52.
- [77] Yada T, Misumi I, Muto K, *et al.* Effects of prolactin and growth hormone on proliferation and survival of cultured trout leucocytes [J]. Gen Comp Endocrinol, 2004, 136:298 - 306.
- [78] Sakai M, Yamaguchi T, Watanuki H, *et al.* Modulation of fish phagocytic cells by N-terminal peptides of proopiomelanocortin (NPP) [J]. J Exp Zool, 2001, 290:341 - 346.
- [79] Watanuki H, Takahashi A, Yasuda A, *et al.* Kidney leukocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, are activated by intraperitoneal injection of β -endorphin [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1999, 71:89 - 97.
- [80] Kele T O, Candan A, Bakirel T, *et al.* The investigation of the anabolic efficiency and effect on the nonspecific immune system of zeranin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. Turk J Vet Anim Sci, 2002, 26: 925 - 931.
- [81] Yin Z, Kwang J, *et al.* Carp interleukin-1 in the role of an immunoadjuvant [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10:375 - 378.
- [82] Buonocore F, Mazzini M, Forlenza M, *et al.* Expression in *Escherichia coli* and purification of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) interleukin 1, a possible immunoadjuvant in aquaculture [J]. Mar Biotechnol, 2004, 6:53 - 59.
- [83] Peddie S, Zou J, Cunningham C, *et al.* Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 and derived peptides induce migration of head-kidney leucocytes *in vitro* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11:697 - 709.
- [84] 邵健忠, 项黎新. 草鱼干扰素的免疫调控功能[J]. 动物学报, 2001, 47(04):404 - 411.
- [85] Sakai M, Kobayashi M, Yoshida T. Activation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, phagocytic cells by administration of bovine lactoferrin [J]. Comp Biochem Physiol, 1995, 110B:755 - 759.
- [86] Kakuta I, Kurokura H, Nakamura H, *et al.* Enhancement of the nonspecific defense activity of the skin mucus of red sea bream by oral administration of bovine lactoferrin [J]. Suisanzoshoku, 1996, 44:197 - 202.
- [87] Davis J F, Hayasaka S S. The enhancement of resistance of the American eel, *Anguilla rostrata* Le Sueur, to a pathogenic bacterium *Aeromonas hydrophila*, by an extract of the tunicate *Ecteinascidia turbinata* [J]. J Fish Dis, 1984, 7:311 - 316.
- [88] Yoshida T, Kruger R, Inglis V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants [J]. J Fish Dis, 1995, 18:195 - 198.
- [89] Wang R, Belosevic M. The *in vitro* effects of estradiol and cortisol on the function of a long-term goldfish macrophage cell line [J]. Dev Comp Immunol, 1995, 19:327 - 336.