



草鱼 *IgM* 的表达及 B 淋巴细胞的抗菌活性

张梦兰, 卢志杰, 詹凡玢, 李亚男, 施斐,
赵丽娟, 林鑫*, 秦真东*

(广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心, 广州市水产病害与水禽养殖重点实验室,
仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东广州 510225)

摘要: 为了更加了解草鱼 B 淋巴细胞吞噬活性, 本研究采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测了 *IgM* 在胚胎发育中的表达量, 并且检测了 *IgM* 在不同组织中的分布以及细菌刺激下 *IgM* 的转录情况。结果显示, *IgM* 在卵裂期到出膜前期的表达量变化不明显, 在出膜后开始显著增加; *IgM* 在检测的组织中均有分布, 在头肾中表达量最高, 并且其表达量在不同细菌的刺激下均显著上调。从草鱼外周血中分离纯化得到 B 淋巴细胞, 并通过吉姆萨染色、qRT-PCR 和间接免疫荧光进行了验证。细菌吞噬实验结果显示, B 淋巴细胞对嗜水气单胞菌具有一定的吞噬能力, 并随孵育时间增加而逐渐增强。细菌刺激 B 淋巴细胞后活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 释放量显著上升; 血清调理实验结果显示, 通过血清调理可以显著促进 B 淋巴细胞 ROS 的释放, 然而对 NO 的释放水平没有显著影响。研究表明, 草鱼 B 淋巴细胞对细菌具有一定的吞噬能力, 并且可以通过呼吸爆发等非特异性免疫的方式直接参与抗菌免疫。

关键词: 草鱼; B 淋巴细胞; 吞噬; *IgM*; 呼吸爆发

中图分类号: Q 25; S 917.4

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是中国极具特色的养殖品种, 主要分布于长江、珠江以及黑龙江这三大水系, 其养殖产量长期居中国淡水养殖之首^[1]。随着养殖规模和密度的增加, 环境不断恶化, 导致多种疾病频繁暴发, 因此, 开展其抗病机制研究十分必要。

鱼类可以通过特异性免疫和非特异性免疫来维持内环境的稳定^[2]。免疫球蛋白是一种具有抗体活性的动物蛋白, 为异链四聚体构型 (H_2L_2), 其基本结构由 2 条重链 (heavy chain) 和 2 条轻链 (light chain) 组成, 链内和链间存在二硫键连接,

形成“Y”字型结构^[3]。目前, 在硬骨鱼中已经被证实存在的免疫球蛋白有 *IgM*、*IgD* 和 *IgT*, 其中 *IgM* 的含量占绝对优势^[4-5]。硬骨鱼 *IgM* 为四聚体结构已经在多种鱼中被报道证实, 如鲤 (*Cyprinus carpio*)^[6]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[7]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[8] 和草鱼^[9] 等。非特异性免疫系统为鱼体提供了第一道抗病原体免疫防线, 包括物理、化学和细胞成分屏障^[10]。其中, 吞噬作用是宿主细胞进行非特异性免疫的核心^[11], 主要由巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞等吞噬细胞完成^[12]。很长一段时间里, B

收稿日期: 2020-06-07 修回日期: 2020-08-19

资助项目: 国家自然科学基金 (31902409, 31872606, 31572657, 31602190, U1701233); 广东省海洋与渔业局基金 (GDME-2018C006, D21822202, A201512C003, 2015-115); 广东省教育厅基金 (KA170500G, TK222001G, KA18058B3, KA1819604)

第一作者: 张梦兰, 从事水产动物病害研究, E-mail: 2018022517@m.scnu.edu.cn;
卢志杰, 从事红细胞免疫学研究, E-mail: lzjaquaculture@163.com

通信作者: 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn; 秦真东 (照片), E-mail: qinzhendongsc@163.com



淋巴细胞被认为只参与特异性免疫反应,而在2006年Li等^[13]在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中首次发现B淋巴细胞对细菌具有吞噬能力后,重新定义了人们对于B淋巴细胞的认知。近年来,陆续有学者对硬骨鱼B淋巴细胞的吞噬能力展开研究,比如在圆鳍鱼(*Cyclopterus lumpus*)^[14]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[15]、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[16]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[17]等鱼中均进行了相应的研究。然而,目前对于草鱼B淋巴细胞的吞噬能力及抗菌活性研究还未见详细报道。

本研究首先探究了IgM在胚胎发育及组织的分布表达情况,其次研究了IgM在细菌刺激下的表达模式。为进一步探究B淋巴细胞的抗菌活性,分离纯化了外周血中的B淋巴细胞,并对其吞噬活性和呼吸爆发水平进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验对象

受精卵和实验鱼均来自湖北武汉团风渔场,运回实验室暂养于200 L循环曝气水缸中,保持溶解氧充足,水质干净。实验中的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)均来自本实验室。

1.2 IgM在胚胎发育过程及不同组织的分布表达情况

为了探究IgM在不同胚胎发育时期中的表达水平,运回的受精卵迅速观察其发育情况,分别在卵裂期、囊胚期、原肠胚期、眼囊期、肌效期、心跳期、出膜后1、5、10和20 d采集样品并迅速放置于液氮中保存。组织分布研究中,随机采集6条健康草鱼[(100±10)g]的头肾、中肾、脾脏、肌肉、肠、肝脏和鳃组织,加入1 mL RNAiso Plus试剂并置于液氮中保存。根据RNAiso Plus试剂(TaKaRa公司,大连)说明书对上述采集的组织进行总RNA提取,并用Nano-2000微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司)检测RNA的纯度和浓度。RNA按照反转录试剂盒(Vazyme公司,南京)说明书合成cDNA,-20℃保存备用。

利用qRT-PCR检测IgM在不同发育时期和不同组织中的表达情况,反应体系和反应程序

参照UltraSTBR Mixture(北京康为世纪生物科技有限公司)试剂说明书,反应在qTOWER3 touch3荧光定量PCR仪中进行。每个样品的目的基因IgM和内参基因 β -actin分别独立做3次重复,利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行数据分析。数据显示方式为平均值±标准差,使用GraphPad Prism 7软件进行作图和单因素方差分析, $P<0.05$ (*)表示差异显著, $P<0.01$ (**)表示差异极显著。

1.3 IgM在细菌刺激下的表达模式

健康草鱼[(100±10)g]随机分成3组,实验组分别注射100 μL的 1×10^7 CFU/mL嗜水气单胞菌和金黄色葡萄球菌,对照组注射等体积的无菌生理盐水。分别在感染后3、6、12、24和48 h采集头肾组织,将采集的样品装于RNAiso Plus试剂放进液氮,然后按照上述方法进行RNA提取和cDNA合成,通过qRT-PCR检测IgM的表达情况。

1.4 B淋巴细胞的分离与纯化

用含有0.1 mg/mL肝素钠(Sigma公司)的10 mL无菌注射器从草鱼(500 g±50 g)尾静脉采集血液,以灭菌的0.7%生理盐水(0.7 g NaCl, 100 mL ddH₂O)按2:1的比例稀释采集的血液。在15 mL离心管中加入3 mL人外周血淋巴细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司),将3 mL血液缓慢加于分离液中,20℃条件下 $400\times g$ 离心20 min后,取中间白细胞层1 mL至新的离心管中,加入10 mL细胞洗涤液混匀,20℃, $250\times g$ 离心10 min后弃上清液,重复2次。使用完全RPMI-1640培养基调整细胞浓度至 2×10^6 个/mL,并将细胞悬液置于斜颈培养瓶中。在28℃,CO₂为5%的培养箱中,培养1 h后将非贴壁细胞转移至装有脱脂棉的柱子中,28℃静置孵育1 h后用预热的培养基以流速1 mL/min洗柱2~3次,收集流出液,1 300 r/min离心10 min后得到T细胞。L15培养基洗涤柱子2次后,挤压脱脂棉,使B细胞从脱脂棉上脱离下来,1 300 r/min离心10 min后得到B细胞。

1.5 台盼蓝染色检测细胞活性

将细胞悬液在4℃条件下1 300 r/min离心5 min,弃上清液,并用适量含10% FBS的RPMI-1640重悬细胞。取细胞悬液100 μL于新的1.5 mL

离心管中, 并加入等量的 0.4% 的台盼蓝染液, 混匀, 光学显微镜观察并检测细胞活性。

1.6 瑞氏吉姆萨染色

将分离纯化后的 B 淋巴细胞均匀地涂到载玻片上, 风干后, 4% 的多聚甲醛室温固定 10 min, 以生理盐水清洗固定剂, 风干。加 1 滴瑞氏吉姆萨染色液 (南京建成生物工程研究所) 试剂 A 均匀覆盖载玻片, 室温染色 1 min, 然后加 3 滴瑞氏吉姆萨染色液试剂 B 均匀覆盖载玻片, 混匀染色 5~8 min。水洗 5 min, 再以 95% 的酒精清洗 10 s。晾干, 显微镜下观察并拍照。

1.7 RT-PCR 和间接免疫荧光法鉴定 B 淋巴细胞

首先将分离纯化的 B 淋巴细胞按照上述方法进行 RT-PCR 检测。采用间接免疫荧光方法: 将分离纯化的 100 μ L B 淋巴细胞均匀地涂到载玻片上, 风干后, 用 4% 的多聚甲醛室温固定 10 min, PBST 洗涤 2 次, 用山羊阴性血清在 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。加入鼠抗草鱼 IgM 单克隆抗体 (1 : 500) 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次后, 加入 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG (1 : 200) 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次。DAPI 染色液 (武汉赛维尔生物科技有限公司) 孵育 5 min, PBST 洗涤 3 次, 荧光显微镜观察并拍照。

1.8 B 淋巴细胞吞噬活性检测

从 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱取出嗜水气单胞菌, 接种于 LB 液体培养基中, 在 28 $^{\circ}$ C, 200 r/min 摇床培养过夜。将过夜培养的菌液以 6 000 r/min 离心 5 min, PBS (磷酸盐缓冲溶液) 洗涤 3 次后用 PBS 重悬并调节细菌数至 2×10^7 CFU/mL, 60 $^{\circ}$ C 灭活 1 h 后, 加入 10 μ L 异硫氰酸荧光素 (FITC, Sigma 公司) 染液室温标记 30 min, PBS 洗涤 3 次, 用 RPIM-1640 培养基将 B 淋巴细胞调节细胞个数至 2×10^6 个/mL, 并接种到 6 孔板中, 细胞和细菌按 1 : 10 比例混匀, 28 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育。分别于孵育后 30 min 和 1 h 后用荧光显微镜观察与拍照。

1.9 B 淋巴细胞的呼吸爆发水平测定

将 B 淋巴细胞 (2×10^6 个/mL) 按照每孔 100 μ L 的体积培养于 96 孔板, 将嗜水气单胞菌及大肠杆菌 (终浓度为 2×10^7 CFU/mL) 与细菌分别孵育 1、

2 和 4 h。

活性氧的检测 在 96 孔板中加入 100 μ L NBT, 置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 1 h 后去除孔中悬液, 并加入 80% 的甲醇溶液固定 1 min, 去除上清液后加入 100% 甲醇试剂洗涤 1 次, 再分别加入 140 μ L 二甲基亚砜 (DMSO) 和 120 μ L 氢氧化钾, 酶标仪检测 OD_{620 nm} 处吸光值。

一氧化氮的测定 在细胞中加入 100 μ L gressA 试剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 后再加入试剂 100 μ L gress B, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 后, 酶标仪检测 OD_{540 nm} 处吸光值。

1.10 血清调理对 B 淋巴细胞呼吸爆发的影响

为了探究血清调理作用对 B 淋巴细胞呼吸爆发的影响, 将培养的嗜水气单胞菌分为 2 组, 一组与草鱼血清在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 然后用 PBS 洗涤 3 次, 另外一组不做任何处理。分别将 2 组细菌 (终浓度为 2×10^7 CFU/mL) 加入到细胞中 (2×10^6 个/mL), 28 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后, 按照上述方法对活性氧和一氧化氮的含量进行测定。

2 结果

2.1 IgM 在草鱼不同发育时期及成鱼不同组织中的相对表达量

利用 qRT-PCR 检测 IgM 在胚胎发育过程中的表达情况, 结果显示, IgM 的相对表达量在卵裂期到出膜前无显著差异, 而在出膜后, 特别是在出膜 20 d 时 IgM 的相对表达量显著增加 (图 1-a)。检测 IgM 在组织中的分布情况时发现, IgM 在各组织中均有表达, 其中 IgM 在头肾中的表达量最高, 其次为中肾和脾脏 (图 1-b)。

2.2 IgM 响应细菌感染

为进一步研究细菌刺激下 IgM 表达情况, 用嗜水气单胞菌和金黄色葡萄球菌刺激草鱼后采集头肾组织, 通过 qRT-PCR 检测 IgM 的表达情况。结果显示, 在嗜水气单胞菌感染草鱼 3、6、12 和 48 h 后, IgM 相对 0 h 的相对表达量显著上升 ($P < 0.05$), 但在 24 h IgM 相对表达量下降 (图 2-a)。在金黄色葡萄球菌感染草鱼后, IgM 的相对表达量在 3、6 和 12 h 逐渐升高, 并在 12 h 达到峰值 ($P < 0.01$); 在 24 和 48 h IgM 的相对表达量逐渐下降 (图 2-b)。

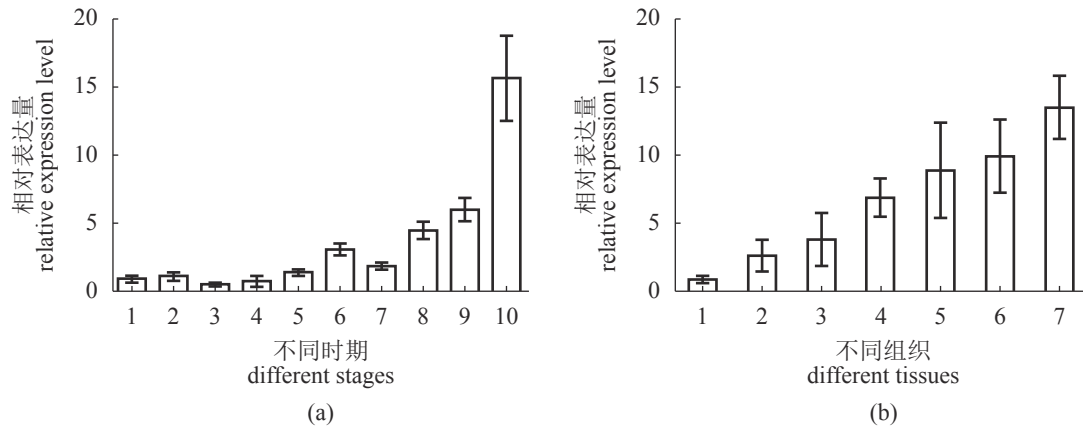


图 1 *IgM* 在草鱼不同时期 (a) 及不同组织中 (b) 的相对表达量

(a) 1. 卵裂期, 2. 囊胚期, 3. 原肠胚期, 4. 眼囊期, 5. 肌效期, 6. 心跳期, 7. D1, 8. D5, 9. D10, 10. D20; (b) 1. 鳃, 2. 肝脏, 3. 肠, 4. 肌肉, 5. 脾脏, 6. 中肾, 7. 头肾

Fig. 1 Relative expression of *IgM* in different stages (a) and tissues (b) of *C. idella*

(a) 1. cleavage stage, 2. blastocyst stage, 3. gastrula stage, 4. eye pouch stage, 5. muscle effect period, 6. heart beating stage, 7. D1, 8. D5, 9. D10, 10. D20; (b) 1. gill, 2. liver, 3. intestines, 4. muscle, 5. spleen, 6. middle kidney, 7. head kidney

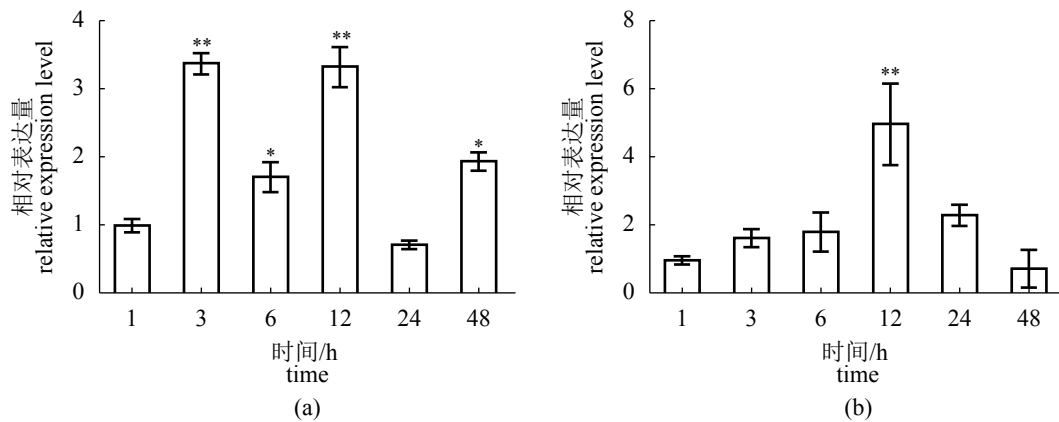


图 2 细菌感染后草鱼头肾组织中 *IgM* 的表达模式

(a) 嗜水气单胞菌感染组; (b) 金黄色葡萄球菌感染组

Fig. 2 Expression pattern of *IgM* in head kidney of *C. idella* after bacterial infection

(a) *A. hydrophila*; (b) *S. aureus*. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

2.3 细胞分离鉴定

为进一步研究 B 淋巴细胞在抗菌中的作用, 首先对分离纯化的 B 淋巴细胞进行瑞氏吉姆萨染色鉴定。结果显示, B 淋巴细胞较小, 细胞核占整个细胞的比例较大, 符合 B 淋巴细胞的结构特征; 而巨噬细胞较大, 细胞核偏位 (图 3-a)。其次, 以 *IgM* 特异性引物 (表 1) 对分离出的细胞进行 RT-PCR 检测。结果显示, B 淋巴细胞有单一的目的条带, 而巨噬细胞未出现目的条带 (图 3-b)。同时, 通过间接免疫荧光法进一步检测 IgM^+ B 细胞, 结果显示, 每个分离的 B 淋巴

细胞表面都有 *IgM* 分布 (图 3-c), 表明分离的细胞为 B 淋巴细胞。

2.4 B 细胞吞噬活性检测

吞噬实验结果显示, 在嗜水气单胞菌与 B 淋巴细胞孵育 30 min 后, B 淋巴细胞对嗜水气单胞菌表现出一定的吞噬活性, 随着孵育时间的延长, 在孵育 60 min 后, B 淋巴细胞内有大量的嗜水气单胞菌存在, 绿色荧光明显高于孵育 30 min 时, 表明 B 淋巴细胞吞噬能力随孵育时间延长而增加 (图 4)。

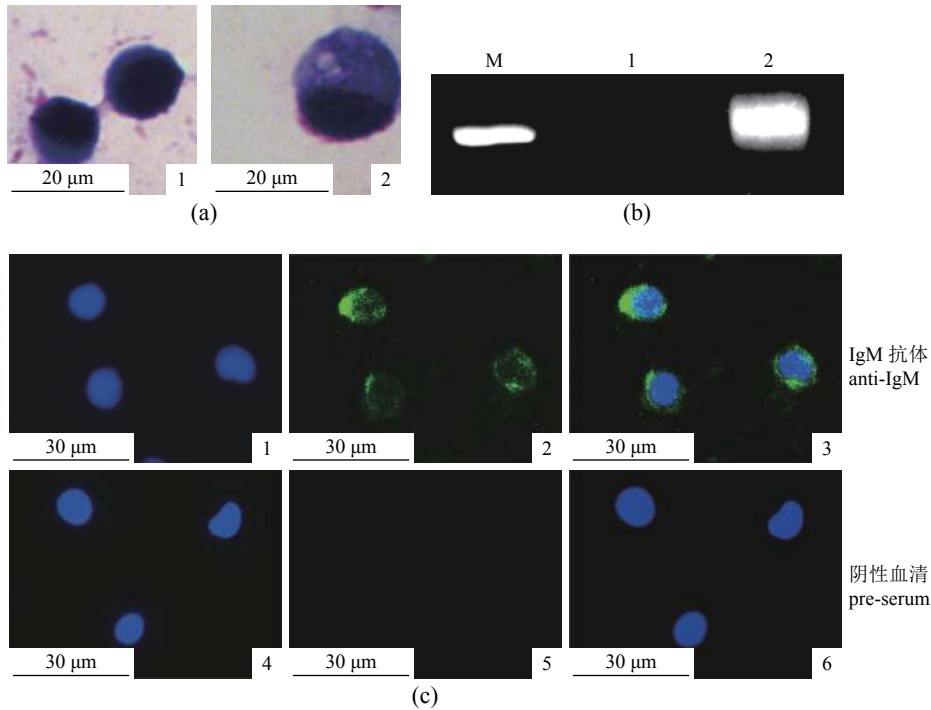


图 3 草鱼 B 淋巴细胞的鉴定

(a) 吉姆萨染色鉴定, 1. B 淋巴细胞, 2. 巨噬细胞; (b) B 淋巴细胞 *IgM* 特异性引物检测, M. Marker, 1. 巨噬细胞, 2. B 淋巴细胞; (c) 间接免疫荧光鉴定 B 淋巴细胞, 1~3. *IgM* 抗体, 4~6. 阴性对照

Fig. 3 *C. idella* B lymphocytes identification

(a) Giemsa staining identification, 1. B lymphocytes, 2. macrophage; (b) detection of *IgM* specific primers in B lymphocytes, M. Marker, 1. macrophages, 2. B lymphocytes; (c) indirect immunofluorescence identification of B lymphocytes, 1-3. *IgM* antibody, 4-6. negative control

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

引物名称 primers	序列(5'-3') sequences
<i>GcIgM</i> -RT-PCR-F	CTACCTCCAACCTCCACCAC
<i>GcIgM</i> -RT-PCR-R	ATTGTATTTGCCACCTGAT
<i>GcIgM</i> -qPCR-F	AGGCATCGGAGGCACATTTC
<i>GcIgM</i> -qPCR-R	ACTCTCATCTGTATCAATGGGTT
<i>β-actin</i> -qPCR-F	ACCCACACCGTGCCCATCTA
<i>β-actin</i> -qPCR-R	CGGACAATTTCTTTTCGGCTG

2.5 草鱼 B 淋巴细胞呼吸爆发的检测

为进一步探究 B 淋巴细胞对细菌的杀伤作用, 实验测定了细菌刺激后 B 淋巴细胞的呼吸爆发水平。结果表明, 在 2 种细菌感染后, B 淋巴细胞产生的 ROS 水平均显著高于对照组, 并且随着刺激时间的增加而逐渐升高 (图 5-a)。NO 测定结果显示, 细菌刺激下均能使 NO 水平升高, 在大肠杆菌的刺激下, B 淋巴细胞释放的 NO 水

平随着刺激时间的延长显著增加, 而在嗜水气单胞菌刺激下, NO 释放水平随时间延长变化不明显 (图 5-b)。

2.6 草鱼血清调理后对 B 淋巴细胞呼吸爆发的作用

为了研究草鱼血清对 B 淋巴细胞呼吸爆发水平的影响, 本研究进行草鱼血清调理实验。结果显示, 草鱼血清调理后显著促进 B 淋巴细胞 ROS 的释放 ($P < 0.05$, 图 6-a); 然而, 草鱼血清调理后 B 淋巴细胞 NO 的释放没有显著变化 ($P > 0.05$, 图 6-b)。

3 讨论

硬骨鱼中 B 淋巴细胞是介导体液免疫反应的主要细胞, 能合成和分泌多种免疫球蛋白, 其中, *IgM* 含量最高, 其通常以分泌型的四聚体形式 (s*IgM*) 和 B 细胞膜型的单聚体 (m*IgM*) 形式存在^[3, 18]。近年来的研究表明, B 淋巴细胞广泛参与非特异性免疫反应。然而目前关于草鱼 B

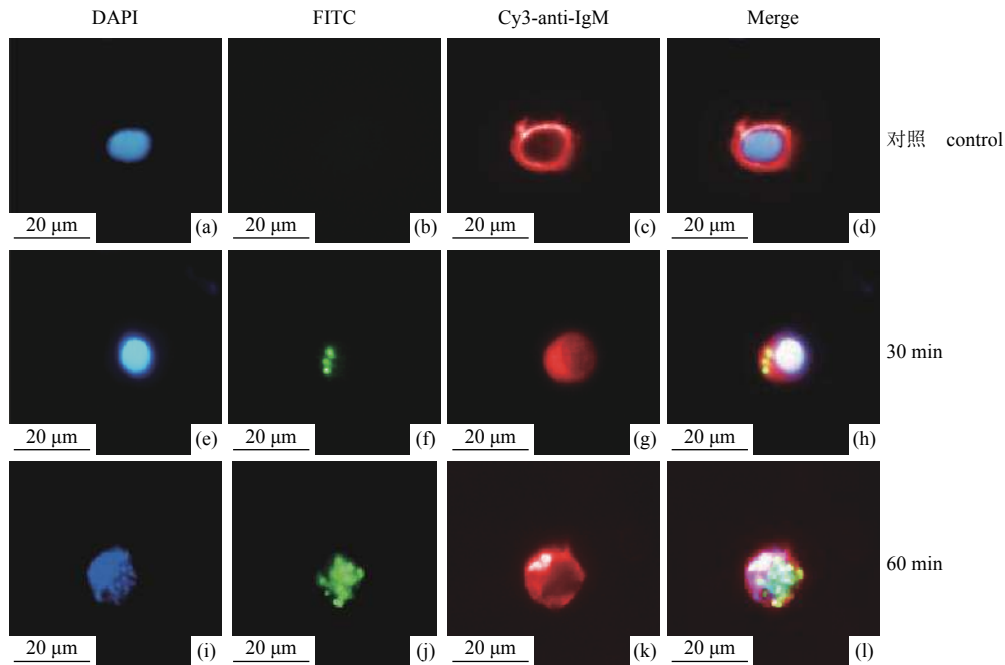


图 4 草鱼 B 淋巴细胞对嗜水气单胞菌的吞噬活性检测

Fig. 4 Detection of phagocytic activity of B lymphocytes against *A. hydrophila* in *C. idella*

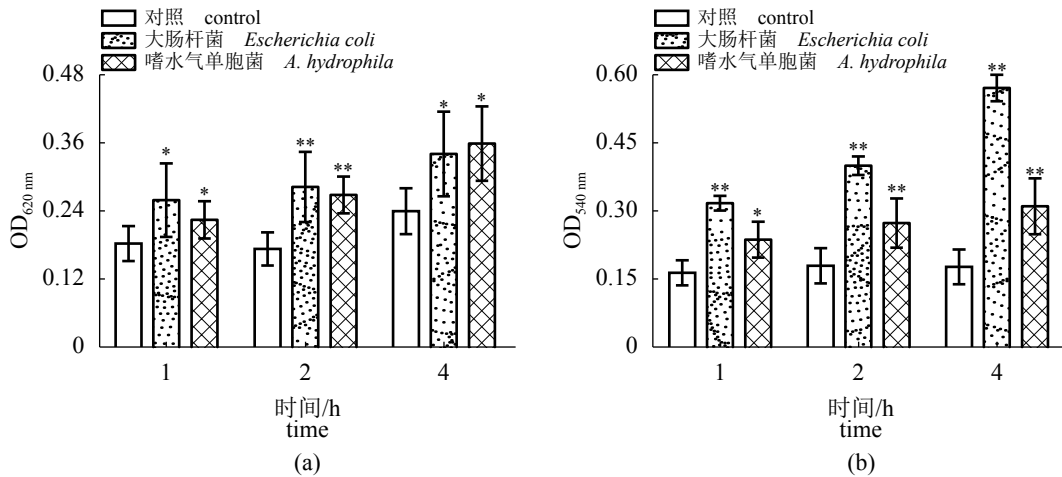


图 5 草鱼 B 淋巴细胞呼吸爆发释放的 ROS 和 NO 含量的测定

(a) ROS 的测定; (b) NO 的测定。星号表示不同组别在同一时间点有显著差异

Fig. 5 Determination of ROS and NO released by respiratory burst of B lymphocytes in *C. idella*

(a) determination of ROS; (b) determination of NO. The stars indicate significant difference between different groups at the same time, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

淋巴细胞在抗菌免疫中作用的相关研究还相对比较缺乏。本研究首先检测了 IgM 在胚胎发育过程中的表达情况, 结果显示, IgM 在卵裂期到出膜前的表达量相对平缓, 而出膜后其表达量迅速增加, 这与尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) IgM 在不同发育时期表达量研究结果一致^[19]。此外, 通过对 IgM 在不同组织中相对表达量的

分析, 结果显示, IgM 在头肾、中肾和脾脏等免疫组织中表达量较高, 这与在大菱鲆^[20]和尼罗罗非鱼^[21]中的 IgM 组织分布研究结果一致。细菌感染实验结果显示, 在细菌的刺激下, IgM 的相对表达量显著升高, 表明 B 淋巴细胞可以直接响应细菌的刺激过程, 本研究结果与南亚野鲮 (*Labeo rohita*)^[22]和鳊 (*Siniperca chuatsi*)^[23]中

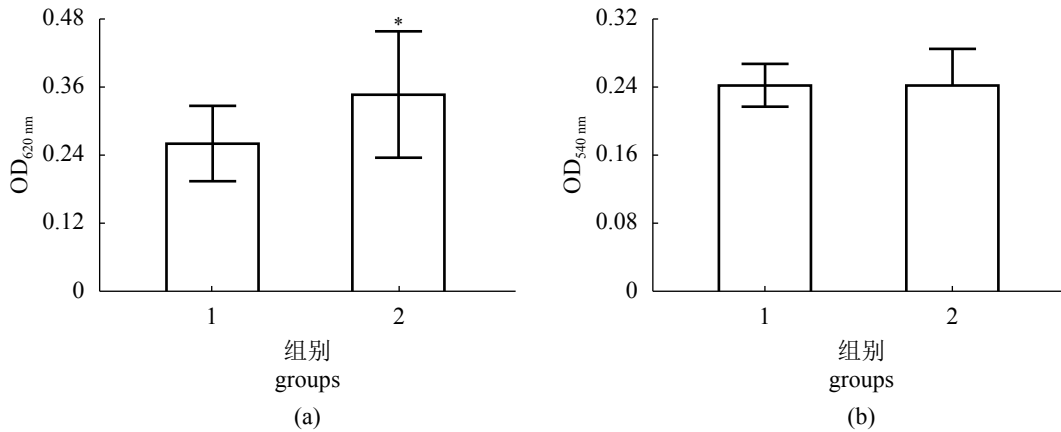


图 6 草鱼血清调理对 B 淋巴细胞呼吸爆发的检测

(a) ROS 的测定, (b) NO 的测定; 1. 对照组, 2. 处理组

Fig. 6 Detection of respiratory burst of B lymphocytes by serum conditioning in *C. idella*

(a) determination of ROS, (b) determination of NO; 1. control, 2. treatment group, *. $P < 0.05$

IgM 的研究结果相一致。

吞噬作用是吞噬细胞发挥免疫功能的重要步骤, 传统观点认为 B 淋巴细胞没有吞噬的功能^[24]。而 Li 等^[13]在 2006 年首次报道硬骨鱼类 IgM⁺ B 淋巴细胞具有较强的吞噬能力, 且吞噬后经过降解途径形成融合的吞噬溶酶体杀灭所吞噬的细菌。后续研究陆续在大西洋鲑、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)^[25]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[26]、大菱鲆^[27] 及尼罗罗非鱼^[28] 等物种中发现 B 淋巴细胞的吞噬活性。因此, B 淋巴细胞同时参与 2 种免疫反应, 即“先天性免疫”和“获得性免疫”^[13, 29]。本研究利用 RT-PCR 和间接免疫荧光等技术证明分离获得的细胞为草鱼 B 淋巴细胞, 同时检测了 B 淋巴细胞对嗜水气单胞菌的吞噬作用, 结果发现草鱼 B 淋巴细胞对嗜水气单胞菌具有一定的吞噬能力, 这与在多种硬骨鱼中的研究结果一致^[14-17], 且 B 淋巴细胞的吞噬能力随着时间的增加而增强。

呼吸爆发在微生物的消灭过程中起着至关重要的作用, 同时也是重要的非特异性细胞防御机制之一。这种杀伤微生物的能力是通过 NADPH 氧化酶介导活性氧的生成而获得的^[30]。当免疫细胞对细菌、病毒等外来物的刺激进行应答时, 不但会产生活性氧, 还会产生 NO^[31]。本研究以嗜水气单胞菌和大肠杆菌对草鱼 B 淋巴细胞进行刺激, 发现 ROS 和 NO 水平均显著升高, 因此, 草鱼 B 淋巴细胞可以通过呼吸爆发对病原菌进行杀伤。

综上所述, 本实验首先对 IgM 在胚胎发育和组织中的分布表达情况进行了研究, 其次, 通过表达模式发现, IgM 可以响应细菌的刺激。此外, 体外吞噬实验结果表明草鱼 B 淋巴细胞对嗜水气单胞菌具有吞噬能力, 并可以通过释放 ROS 和 NO 产生抗菌活性。本实验的研究结果为草鱼健康养殖提供了一定的参考作用。

参考文献 (References):

- [1] 沈玉帮, 张俊彬, 李家乐. 草鱼种质资源研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7): 369-373.
Shen Y B, Zhang J B, Li J L. Advances in studies on genetic resources of grass carp[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(7): 369-373(in Chinese).
- [2] 唐海蓉, 银梅, 陈仕均. 鱼类免疫组织和细胞的研究进展 [C]//中国畜牧兽医学会, 中国病理生理学会. 中国畜牧兽医学会兽医病理学分会第十三次学术讨论会暨中国病理生理学会动物病理生理产业委员会第十二次学术讨论会. 呼和浩特: 中国畜牧兽医学会, 中国病理生理学会, 2005: 158-164.
Tang H R, Yin M, Chen S J. Immune tissues and cells of fish: a review[C]//Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, Chinese Association of Pathophysiology. Symposium of Veterinary Pathology Branch of Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine and Symposium of Professional Committee of Animal Pathophysiology of Chinese Pathophysiology Society. Hohhot: Chinese Association

- of Animal Science and Veterinary Medicine, Chinese Association of Pathophysiology, 2005: 158-164 (in Chinese).
- [3] Kaattari S, Evans D, Klemer J, *et al.* Varied redox forms of teleost IgM: an alternative to isotypic diversity?[J]. *Immunological Reviews*, 1998, 166(1): 133-142.
- [4] Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, *et al.* The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z[J]. *Nature Immunology*, 2005, 6(3): 295-302.
- [5] Wilson M, Bengtén E, Miller N W, *et al.* A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(9): 4593-4597.
- [6] Rombout J H W M, Taverne N, Kamp M V D, *et al.* Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1993, 17(4): 309-317.
- [7] Håvarstein L S, Aasjord P M, Ness S, *et al.* Purification and partial characterization of an IgM-like serum immunoglobulin from Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1988, 12(4): 773-785.
- [8] Clem L W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. IV. Immunoglobulins of the giant grouper, *Epinephelus itaira*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1971, 246(1): 9-15.
- [9] 陈丛琳, 罗绍祥, 张晓华, 等. 草鱼免疫球蛋白IgM四聚体的分析鉴定[J]. *水生生物学报*, 2012, 36(1): 173-176.
- Chen C L, Luo S X, Zhang X H, *et al.* Analysis and characterization of serum immunoglobulin IgM tetramer from grass carp(*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(1): 173-176(in Chinese).
- [10] Boshra H, Li J, Sunyer J O. Recent advances on the complement system of teleost fish[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 239-262.
- [11] Zhao L J, Tu J G, Zhang Y L, *et al.* Transcriptomic analysis of the head kidney of topmouth culter (*Culter alburnus*) infected with *Flavobacterium columnare* with an emphasis on phagosome pathway[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 57: 413-418.
- [12] Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction[J]. *Trends in Cell Biology*, 1995, 5(3): 85-87.
- [13] Li J, Barreda D R, Zhang Y A, *et al.* B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities[J]. *Nature Immunology*, 2006, 7(10): 1116-1124.
- [14] Rønneseth A, Ghebretnsae D B, Wergeland H I, *et al.* Functional characterization of IgM⁺ B cells and adaptive immunity in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.)[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 52(2): 132-143.
- [15] Yang S, Tang X Q, Sheng X Z, *et al.* Analysis of the role of IL-10 in the phagocytosis of mIgM⁺ B lymphocytes in flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 92: 813-820.
- [16] Yang S, Tang X Q, Sheng X Z, *et al.* Development of monoclonal antibodies against IgM of sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and analysis of phagocytosis by mIgM⁺ lymphocytes[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 78: 372-382.
- [17] 李逸群. 鲆鲽鱼 IgM⁺ B 细胞内吞作用及其调控机制研究 [D]. 青岛: 中国科学院大学 (中国科学院海洋研究所), 2018.
- Li Y Q. A study on the endocytosis and its regulatory mechanism in IgM⁺ B cells from flatfish[D]. Qingdao: The University of Chinese Academy of Sciences(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2018(in Chinese).
- [18] Lobb C J, Clem L W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function-x. Humoral immunoglobulins of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1981, 5(2): 271-282.
- [19] 张武凤. 尼罗罗非鱼 IgM、IgT 重链基因的克隆及表达 [D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- Zhang W F. Cloning and expression of immunoglobulin M and T in Nile tilapia[D]. Chongqing: Southwest University, 2015(in Chinese).
- [20] Gao Y, Yi Y Y, Wu H Z, *et al.* Molecular cloning and characterization of secretory and membrane-bound IgM of turbot[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(2):

- 354-361.
- [21] Yin X X, Mu L L, Fu S L, *et al.* Expression and characterization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) secretory and membrane-bound IgM in response to bacterial infection[J]. *Aquaculture*, 2019, 508: 214-222.
- [22] Kar B, Mohapatra A, Mohanty J, *et al.* Transcriptional changes in three immunoglobulin isotypes of rohu, *Labeo rohita* in response to *Argulus siamensis* infection.[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(1): 28-33.
- [23] Tian J Y, Sun B J, Luo Y P, *et al.* Distribution of IgM, IgD and IgZ in mandarin fish, *Siniperca chuatsi* lymphoid tissues and their transcriptional changes after *Flavobacterium columnare* stimulation[J]. *Aquaculture*, 2009, 288(1-2): 14-21.
- [24] Vidard L, Kovacovics-Bankowski M, Kraeft S K, *et al.* Analysis of MHC class II presentation of particulate antigens of B lymphocytes[J]. *Journal of Immunology*, 1996, 156(8): 2809-2818.
- [25] Øverland H S, Pettersen E F, Rønneseth A, *et al.* Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 28(1): 193-204.
- [26] Edholm E S, Bengtén E, Stafford J L, *et al.* Identification of two IgD⁺ B cell populations in channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 185(7): 4082-4094.
- [27] Li Y Q, Sun L, Li J. Internalization of large particles by turbot (*Scophthalmus maximus*) IgM⁺ B cells mainly depends on macropinocytosis[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, 82: 31-38.
- [28] 吴丽婷, 孔令贺, 王君如, 等. 尼罗罗非鱼IgM单抗的制备及IgM⁺B淋巴细胞吞噬能力的研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2018, 50(5): 60-68.
- Wu L T, Kong L H, Wang J R, *et al.* The preparation of McAb against IgM from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the analysis of the phagocytosis of fluorescence microspheres by mIgM⁺B lymphocytes[J]. *Journal of South China Normal University(Natural Science Edition)*, 2018, 50(5): 60-68(in Chinese).
- [29] Zhang Y A, Salinas I, Li J, *et al.* IgT, a primitive Immunoglobulin class specialized in mucosal immunity[J]. *Nature immunology*, 2010, 11(9): 827-835.
- [30] Chanock S J, Benna J E, Smith R M, *et al.* The respiratory burst oxidase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(40): 24519-24522.
- [31] 胡文琴, 王恬, 孟庆利. 动物中活性氧的产生及清除机制[J]. 家畜生态, 2004, 25(3): 64-67.
- Hu W Q, Wang T, Meng Q L. Mechanisms of generating and scavenging reactive oxygen species in animals[J]. *Ecology of Domestic Animal*, 2004, 25(3): 64-67(in Chinese).

***IgM* expression and B lymphocyte antibacterial activity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)**

ZHANG Menglan, LU Zhijie, ZHAN Fanbin, LI Yanan, SHI Fei,
ZHAO Lijuan, LIN Li*, QIN Zhendong*

(Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center,
Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Sciences and Technology,
Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225)

Abstract: Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is a unique aquaculture species in China, which is mainly distributed in the Yangtze River, Pearl River and Heilongjiang River, and its aquaculture output has long been the highest in freshwater aquaculture in China. With the increase of culture scale and density, the environment continues to deteriorate, resulting in frequent outbreaks of a variety of diseases. Therefore, it is necessary to study its disease resistance mechanism. B lymphocytes are the key cells of adaptive immune response, and can secrete a variety of immunoglobulins which play an important role in the immune response. Respiratory burst is an oxygen-dependent killing mechanism of immune cells when pathogenic microorganisms invade the body. Previous studies suggested that fish B lymphocytes can participate in non-specific immune process through phagocytosis. However, the study of the phagocytic activity of B lymphocytes in *C. idella* is still not well known. To elucidate the immune function of IgM, real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of IgM in embryonic development, the distribution of IgM in different tissues and the transcription of IgM stimulated by bacteria. The results showed that during embryonic development, the expression of IgM was not significantly changed from cleavage stage to pre-hatching stage, and it significantly increased after hatching stage; IgM was distributed in all tested tissues, with the highest expression in the head kidney, and its expression was significantly up-regulated after the stimulation of different bacteria. B lymphocytes were isolated and purified from the *C. idella* blood and verified by Giemsa staining, RT-PCR and indirect immunofluorescence. The results of bacterial phagocytosis test showed that B lymphocytes had phagocytic ability to *Aeromonas hydrophila*. Furthermore, we also found that the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) in grass carp B cells could be significantly up-regulated after being infected by microbes. Finally, the serum conditioning assay showed that the release of ROS from B lymphocytes could be enhanced through serum conditioning, however, there was no influence on NO production. Taken together, the results of this study showed that B lymphocytes of *C. idella* have the potential of phagocytic ability to bacteria and can directly participate in anti-bacterial immunity by producing non-specific immunity such as respiratory burst.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; B lymphocytes; phagocytosis; *IgM*; respiratory burst

Corresponding authors: LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn;

QIN Zhendong. E-mail: qinzhendongsc@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31902409, 31872606, 31572657, 31602190, U1701233); Fund of Guangdong Provincial Bureau of Marine and Fisheries (GDME-2018C006, D21822202, A201512C003, 2015-115); Fund of Guangdong Department of Education (KA170500G, TK222001G, KA18058B3, KA1819604)