

研究报告

## 维氏气单胞菌菌蛻疫苗免疫后鲤免疫应答与 *hepcidin* 基因表达特征

闫兵兵<sup>1A</sup> 姜娜<sup>2A</sup> 罗琳<sup>2</sup> 马志宏<sup>2\*</sup> 邢薇<sup>2</sup> 李铁梁<sup>2</sup> 刘彩霞<sup>3</sup> 袁丁<sup>2</sup> 杨先乐<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 国家水生动物病原库 上海 201306)

(2. 北京市水产科学研究所 北京 100068)

(3. 天津科技大学 天津 300457)

**摘要:**【目的】为探讨接种维氏气单胞菌菌蛻疫苗后鲤的应答反应特征及与甲醛灭活苗的效果比较,在实验条件下研究了接种疫苗后鲤(*Cyprinus carpio*)的特异性、非特异性免疫指标及 *hepcidin* 基因表达量的变化。【方法】在开始实验的第 1、15 和 29 天使用菌蛻疫苗(CLGs)和甲醛灭活疫苗(FKC)对鲤进行注射 3 次免疫,并设一个注射磷酸缓冲液(PBS)的对照组,每个组设 3 个重复。从第一次免疫后每隔 7 d 从每个重复中随机取三尾鱼进行取样,对血清抗体滴度、相对免疫保护率(RPS)、溶菌酶(LZM)、呼吸暴发、补体 C3、髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)及 *hepcidin* 基因表达量进行测定。【结果】二次免疫后,CLGs 组抗体凝集效价达  $2^6-2^8$ ,显著高于 FKC 和 PBS 组( $P<0.05$ ),且其呼吸暴发、LZM、MPO 含量和 *hepcidin* 基因表达量显著高于 PBS 组( $P<0.05$ ),MDA 含量显著低于 PBS 组( $P<0.05$ );CLGs 组 C3 含量在 35 和 42 d 显著低于 PBS 组( $P<0.05$ );FKC 组 MPO 含量和 *hepcidin* 基因表达量显著低于菌蛻组( $P<0.05$ )。CLGs 组的 RPS 为 57.70%,FKC 组 RPS 为 30.77%。【结论】接种一定强度维氏气单胞菌菌蛻疫苗,能够提高鲤血清抗体效价和呼吸暴发、LZM、MPO 等非特异性免疫指标及 *hepcidin* 基因表达,而且整体免疫效果好于甲醛灭活苗。

**关键词:** 维氏气单胞菌菌蛻, 鲤(*Cyprinus carpio*), 特异性免疫, 非特异性免疫, *hepcidin* 基因

**Foundation item:** Natural Science Foundation of Beijing City (No. 6152006); Ornamental Fish Industry Innovaton Team Project of Beijing City (No. BAIC03-2016)

\*Corresponding author: Tel: 86-10-67588781; E-mail: mzh255@sohu.com

△These authors equally contributed to this work

Received: October 17, 2016; Accepted: December 15, 2016; Published online (www.cnki.net): January 03, 2017

基金项目: 北京市自然科学基金项目(No. 6152006); 北京市观赏鱼产业创新团队项目(No. BAIC03-2016)

\*通讯作者: Tel: 86-10-67588781; E-mail: mzh255@sohu.com

△对本文贡献相同

收稿日期: 2016-10-17; 接受日期: 2016-12-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-01-03

## Effect of injection immunization with *Aeromonas veronii* ghosts on immunological responses and *hepcidin* gene expression in common carp

YAN Bing-Bing<sup>1Δ</sup> JIANG Na<sup>2Δ</sup> LUO Lin<sup>2</sup> MA Zhi-Hong<sup>2\*</sup> XING Wei<sup>2</sup>  
LI Tie-Liang<sup>2</sup> LIU Cai-Xia<sup>3</sup> YUAN Ding<sup>2</sup> YANG Xian-Le<sup>1</sup>

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animal of Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100068, China)

(3. Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the immunological responses of common carp (*Cyprinus carpio*) after being vaccinated with *Aeromonas veronii* ghosts and formalin inactivated *A. veronii* vaccine. [Methods] The experiment was consisted of three treatments and conducted in cylindrical fiberglass tanks (260 L/tank): CLGs group injected with CL0901 ghost vaccine, FKC group with formalin killed cell vaccine and the control group with phosphate buffer solution (PBS). All treatments were injected on 1st, 15 th and 29 th day after the experiment started. Three fish in each tank were sampled for blood and tissue at every 7 days after the first inoculation. The evaluation parameters included the serum antibody titer, relative percent survival (RPS), lysozyme (LZM), respiratory burst, complement protein 3 (C3), myeloperoxidase (MPO), malonic dialdehyde (MDA) and relative expression content of *hepcidin* gene. [Results] After the secondary inoculation, the antibody titer in CLGs group reached  $2^6-2^8$ , and it was significantly higher than that in other groups ( $P<0.05$ ). The respiratory burst, serum LZM, MPO and expression of *hepcidin* gene of CLGs group were significantly higher than those of PBS group ( $P<0.05$ ). C3 in CLGs group was significantly lower than that in PBS group on 35 and 42 d ( $P<0.05$ ). The MPO and expression of *hepcidin* gene of FKC group were significantly lower than those of CLGs group ( $P<0.05$ ). The RPS was 57.70% in CLGs group, but 30.77% in FKC group. [Conclusion] These results indicated that the CLGs could enhance the serum antibody titer, respiratory burst, lysozyme, myeloperoxidase and relative expression content of *hepcidin* gene. As a whole, the effect of immune protection of CLGs is better than that of FKC.

**Keywords:** *Aeromonas veronii* ghosts, Common carp (*Cyprinus carpio*), Specific immune, Non-specific immune, *hepcidin* gene

鲤(*Cyprinus carpio*)是我国主要养殖鱼类, 养殖水域广, 具有很大的经济价值, 维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)是一种革兰氏阴性菌, 广泛分布于水生环境, 能够引起多种水产动物疾病<sup>[1]</sup>。传统抗生素治疗和预防方法不仅会引起药物残留和细菌耐药性产生, 而且会对食品安全造成一定影响<sup>[2]</sup>, 而细菌疫苗因为能够诱导鱼体自身免疫应答, 达到有针对性地防治鱼类细菌病而倍受关注。

菌蛻(Bacterial ghosts, BGs)是革兰氏阴性菌被噬菌体 PhiX174 裂解基因 E 裂解后形成的完整细菌空壳, 虽不含有胞浆成分, 但仍保持细菌细胞形态,

并保留了黏附性和细菌表面抗原, 可以直接作为疫苗来激发鱼类一些免疫反应<sup>[3-6]</sup>。在评价鱼类疫苗免疫保护效果时, 经常从引发鱼类特异性免疫着手, 但鱼类处于系统发育的低级阶段, 其特异性免疫远不如高等脊椎动物的精细和发达, 非特异性免疫在机体防御病原生物侵害方面发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。呼吸暴发、血清溶菌酶(Lysozyme)、补体 C3、髓过氧化物酶(Myeloperoxidase)、丙二醛(Malondialdehyde)是鱼体抵御病原入侵的重要非特异性免疫反应或效应因子, 可以作为鱼类非特异性免疫的主要指标<sup>[8]</sup>。

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)是机体天

然免疫的重要效应因子<sup>[9]</sup>,由细菌性的病原诱导产生,其抗菌反应发生快,是构成免疫防御的第一道防线,其中铁调素 Hcpidin 是抗菌肽家族的重要成员之一。

鉴于特异性和非特异性免疫在鱼体防御病原体感染方面的重要作用,本研究以维氏气单胞菌 CL0901 株菌蛻疫苗对鲤进行免疫接种,根据接种后鲤特异性、非特异性免疫指标变化,考察维氏气单胞菌菌蛻疫苗的免疫效果,为菌蛻疫苗在水产养殖中的应用提供实验参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株及实验鱼:含噬菌体 PhiX174 裂解酶基因 E 的维氏气单胞菌 CL0901<sup>[1]</sup> (pBBR1MCS2-E)由本实验室制备。实验鱼购自北京市房山区某养殖场,健康无病史,鲤鱼 300 尾,体重 150±10 g,在水族缸中暂养两周,实验期间水温为 26.0±2.0 °C,持续充氧。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基:RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser、荧光定量试剂盒 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>, TaKaRa 公司;其它非特异性免疫指标试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。荧光定量 PCR 仪 FTC-7500 型, Applied Biosystem 公司;全自动生化仪 7160 型,日本 Hitachi 公司;全波长酶标仪 PowerWave XS2,美国 BioTek 公司。LB 培养基(g/L):Tryptone 10.0, Yeast extract 5.0, NaCl 10.0。

### 1.2 实验方法

1.2.1 疫苗制备:按本研究室优化的方法进行维氏气单胞菌 CL0901 菌蛻疫苗制备<sup>[10]</sup>。培养转化有重组质粒 pBBR1MCS2-E 的重组维罗纳气单胞菌,在 42 °C 诱导裂解基因 E 的表达。诱导表达后 12–16 h,获得菌蛻。用无菌 PBS 调整菌蛻浓度为 2.25×10<sup>8</sup> CFU/mL, 4 °C 保存,经无菌检验后用于免疫接种。维氏气单胞菌 CL0901 全菌灭活疫苗 (Formalin killed cell, FKC)制备:将维氏气单胞菌 CL0901 接种至 LB 培养基中,28 °C、220 r/min 培养过夜,4 °C、6 000×g 离心 10 min 收集菌体,用

无菌 PBS 调整细菌浓度为 4.4×10<sup>8</sup> CFU/mL,加入福尔马林至终浓度 0.3%,室温放置 3 d,涂布平板检测无菌后 4 °C 保存备用。

1.2.2 免疫实验与采样:设计菌蛻组 (CLGs)、甲醛灭活组 (FKC)和对照组 (PBS) 3 个处理组,每个处理组设 3 个重复,每个重复 30 尾规格均匀的健康鱼,养在 260 L 的圆锥型玻璃纤维桶中,每个养殖桶自体循环,持续充氧。采用腹腔注射方法分别对实验鱼进行免疫,注射剂量为 0.4 mL/尾。首次免疫后第 15、29 天对同组实验鱼用同样方法进行第 2 和 3 次免疫<sup>[11]</sup>,首免后 7、14、21、28、35、42 d 分别取样一次,每组随机取 3 尾鱼分别从尾静脉采血,取 100 μL 全血(抽取的血液放入装有 1.5% EDTA-Na<sub>2</sub> 溶液的离心管中)用于测定呼吸暴发,其余血样于 4 °C 条件下 3 000 r/min 离心 10 min,收集血清并保存于 -80 °C,用于各项非特异性免疫指标和血清滴度检测。采血后的鱼取肝脏、脾脏和头肾存入 -80 °C,提取总 RNA 用来测定 *hepcidin* 基因的表达量<sup>[12]</sup>。

1.2.3 微量凝集反应测定血清抗体效价:采用 96 孔板血凝试验,进行 2 倍稀释法稀释血清。1–11 孔每孔加 50 μL 不同稀释度血清,然后分别加入 2×10<sup>7</sup> CFU/mL CL0901 菌液 50 μL,第 11 孔不加菌。第 12 孔只加菌液作为对照。室温进行凝集反应,24 h 后观察并记录实验结果。肉眼及显微镜下观察判定结果,U 形孔底部出现边缘不整齐的凝集块为阳性,若底部出现轮廓清晰的圆形沉淀则判定为阴性。呈明显阳性反应的最高稀释度为该血清的效价。

1.2.4 免疫保护率测定实验:当实验进行到 42 d,最后一次取样结束后,对各组剩余的实验鱼进行攻毒实验,检测免疫保护率。用维氏气单胞菌 CL0901 株进行攻毒实验,采用半致死浓度 2.86×10<sup>7</sup> CFU/mL,腹腔注射 0.4 mL/尾,连续观察 14 d 并记录死亡数,测定相对免疫保护率 RPS=1-(免疫组的死亡率/对照组的死亡率)×100%。

1.2.5 非特异性免疫相关指标的测定:呼吸暴发测定参照 NBT 测定方法<sup>[13]</sup>;溶菌酶、补体 C3、髓过

氧化物酶、丙二醛测定参照试剂盒说明书操作。

### 1.3 荧光定量 PCR 检测 *hepcidin* 基因表达水平

**1.3.1 引物设计:** 根据 GenBank 鲤鱼 *hepcidin* 序列 JX855261.1, 应用 Primer 5.0 软件设计引物, *hepcidin* 基因 Forward: 5'-ATGAAGTTGACACGTGTGGCTCT-3'; Reverse: 5'-GCTTCACTCTCCACATGATGCT-3'。根据 GenBank 鲤  $\beta$ -actin 序列 M24113.1 设计引物  $\beta$ -actin-F: 5'-GCTGTCCCTGTATGCCTCTGGT-3';  $\beta$ -actin-R: 5'-GGCGTAACCCTCGTAGATGGG-3'。所有引物均由华大基因合成, 扩增片段为 124 bp。

**1.3.2 总 RNA 的提取及反转录:** 参照 Ambion RNA 试剂提取盒说明书, 提取肝脏、脾脏、头肾的总 RNA, 按试剂盒 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 的方法进行反转录合成 cDNA, -80 °C 保存。

**1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 *hepcidin* 基因的表达:** 荧光定量 PCR 体系: SYBR<sup>®</sup> Premix ExTaq<sup>™</sup> II (2 $\times$ ) 25  $\mu$ L, PCR Forward (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, PCR Reverse (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) 1  $\mu$ L, cDNA 模板 4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 16  $\mu$ L。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。以  $\beta$ -actin 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法对基因表达进行相对定量分析。

### 1.4 数据处理

实验所得数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差, 采用软件 Statistica 7.0 进行数据处理, 并采用单因子方

差分析(One-Way ANOVA)进行差异性分析,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 血清抗体凝集效价

免疫实验鲤鱼血清抗体凝集效价结果见表 1。在免疫 7、14、21、28、35 和 42 d, CLGs 组凝集效价都显著高于 PBS 组( $P < 0.05$ ); 在免疫 7、14、35 和 42 d, CLGs 组凝集效价显著高于 FKC 组( $P < 0.05$ )。另外, CLGs 组血清凝集效价在首次和二次免疫, 即 7–28 d 期间变化不显著, 在 35 d 三次免疫后出现峰值, 并能维持到第 42 天, 而 FKC 组在免疫后 42 d 时的血清凝集效价显著高于 7–28 d 时( $P < 0.05$ )。

### 2.2 免疫保护率

维氏气单胞菌 CL0901 攻毒试验的死亡结果见图 1, 在攻毒 2 d 后对照组死亡 6 尾、FKC 组死亡 1 尾, CLGs 组在 4 d 才出现死亡, 而且在 1–14 d 不同时间死亡个数最少, 群体状态稳定。免疫保护实验结果见表 2。14 d 之内 CLGs 组攻毒死亡率明显低于 FKC 组和对照组( $P < 0.05$ )。CLGs 相对免疫保护率为 57.70%, FKC 相对免疫保护率为 30.77%。

### 2.3 非特异性免疫指标测定结果

**2.3.1 呼吸暴发测定:** 鲤鱼血细胞呼吸暴发测定结果如图 2 所示。在免疫后第 21 天, CLGs 组和 FKC 组呼吸暴发作用显著强于 PBS 组( $P < 0.05$ ), 其它时间段 3 组间无显著差异( $P < 0.05$ )。

表 1 免疫 CLGs、FKC 和 PBS 对鲤血清凝集效价的影响  
Table 1 Effects of inoculating CLGs, FKC and PBS on serum antibody titer in carp

组别 Group	免疫时间 Immune time (d)					
	7	14	21	28	35	42
CLGs	4.44 $\pm$ 0.44 <sup>Ac</sup>	5.50 $\pm$ 1.63 <sup>Ac</sup>	4.67 $\pm$ 0.66 <sup>Ab</sup>	21.50 $\pm$ 6.71 <sup>Ab</sup>	114.28 $\pm$ 27.80 <sup>Bb</sup>	104.00 $\pm$ 26.18 <sup>Bb</sup>
FKC	2.33 $\pm$ 0.47 <sup>Ab</sup>	3.11 $\pm$ 0.48 <sup>Ab</sup>	4.00 $\pm$ 0.86 <sup>Ab</sup>	10.11 $\pm$ 2.04 <sup>Ab</sup>	19.12 $\pm$ 7.80 <sup>ABa</sup>	31.55 $\pm$ 12.55 <sup>Ba</sup>
PBS	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>Aa</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>Aa</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>Aa</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>Aa</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>Aa</sup>	0.44 $\pm$ 0.44 <sup>Aa</sup>

注: 表中数值表示为平均数 $\pm$ 标准差( $n=9$ )。同一列上标小写字母不同表示组间差异显著( $P < 0.05$ ); 同一行上标大写字母不同表示同一实验组在不同时间点差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Values represent mean  $\pm$  SE of 9 numbers of fish in each treatment. Values with different lower case letters superscripts in each column are significantly different ( $P < 0.05$ ); Values with different upper case letters superscript in the same line at different time are significantly different ( $P < 0.05$ ).

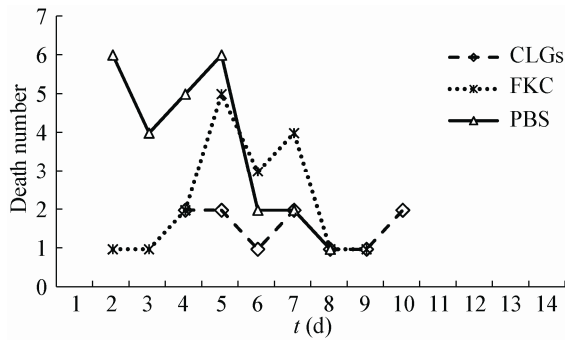


图 1 攻毒试验的死亡结果

Figure 1 Death number during challenging test

**2.3.2 血清溶菌酶含量测定:** 免疫接种后鲤鱼血清溶菌酶含量变化见图 3。免疫 28 d 后, CLGs 组和 FKC 组的血清溶菌酶含量显著高于 PBS 组 ( $P < 0.05$ ); 免疫 42 d, CLGs 组与 FKC 组的都显著低于 PBS 组 ( $P < 0.05$ )。

**2.3.3 髓过氧化物酶测定:** 鲤鱼血清髓过氧化物酶测定结果见图 4。在免疫 28 d 后, CLGs 组的髓过氧化物酶活性显著高于 FKC 组和 PBS 组 ( $P < 0.05$ )。

表 2 攻毒后相对免疫保护率

Table 2 Relative percentage survival after challenging

组别	攻毒数(尾)	死亡数(尾)	死亡率	平均死亡率	相对免疫保护率
Group	Challenge number	Mortality	Mortality rate (%)	Average mortality rate (%)	RPS (%)
CLGs	10	4	40	36.67±3.33 <sup>a</sup>	57.70
	10	4	40		
	10	3	30		
FKC	10	6	60	60.00±5.77 <sup>b</sup>	30.77
	10	5	50		
	10	7	70		
PBS	10	8	80	86.67±6.66 <sup>c</sup>	0
	10	8	80		
	10	10	100		

注: 同一列中上标字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different superscript within same row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

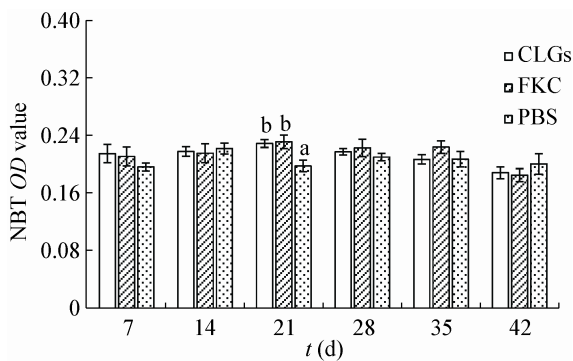


图 2 免疫 CLGs、FKC 和 PBS 对鲤鱼呼吸暴发的影响  
Figure 2 Effects of inoculating CLGs, FKC and PBS on the respiratory burst in carp

注: 同一时间内上标字母不同表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 图 3-9 同。

Note: Bars bearing different superscript (lower case letter) at same time are significantly different ( $P < 0.05$ , the same in Figure 3-9).

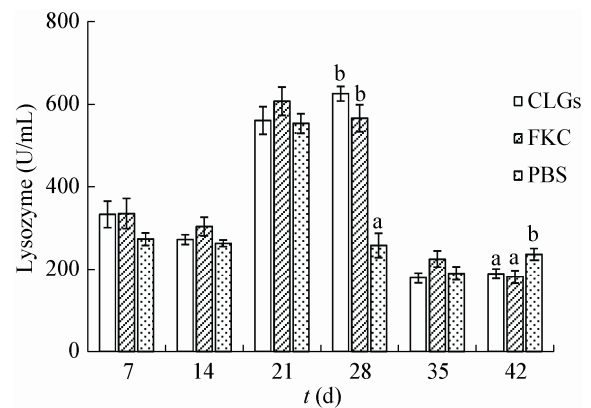


图 3 免疫 CLGs、FKC 和 PBS 对鲤鱼血清溶菌酶含量的影响  
Figure 3 Effects of inoculating CLGs, FKC and PBS on the content of serum lysozyme in carp

Figure 3 Effects of inoculating CLGs, FKC and PBS on the content of serum lysozyme in carp

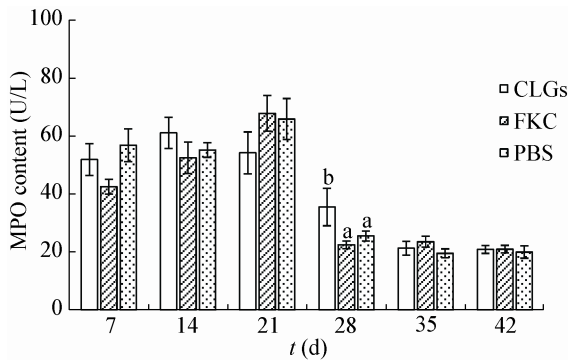


图4 免疫 CLGs、FKC 和 PBS 对鲤鱼血清髓过氧化物酶含量的影响

Figure 4 Effects of inoculating CLGs, FKC and PBS on the content of serum MPO in carp

2.3.4 血清丙二醛测定: 鲤鱼血清中丙二醛含量如图5所示。免疫14 d后, CLGs组血清中丙二醛含量与FKC组、PBS组不存在显著差异, 而FKC组显著高于PBS组( $P<0.05$ ); 免疫28 d后, CLGs组与FKC组显著低于PBS组( $P<0.05$ )。

2.3.5 补体 C3: 鲤鱼血清补体 C3 含量变化如图6显示。在免疫后第35天, CLGs组血清补体 C3 含量显著低于PBS组( $P<0.05$ ), 与FKC组相比略低, 但不存在显著差异; 在免疫42 d, CLGs组血清补体 C3 含量显著低于FKC组和PBS组( $P<0.05$ ) FKC组与PBS组之间差异不显著。

## 2.4 不同组织 *hepcidin* 基因相对表达量

2.4.1 肝脏组织中 *hepcidin* 基因相对表达量: 各处理组鲤鱼肝脏组织中 *hepcidin* 基因相对表达量见图7。

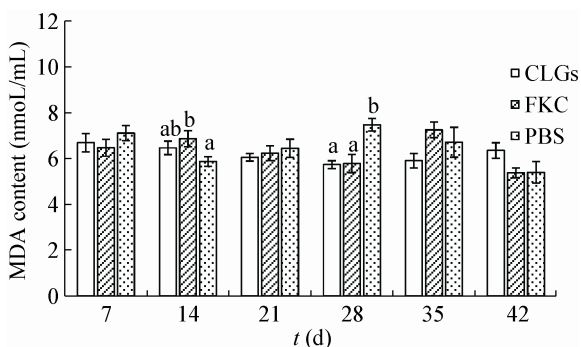


图5 免疫 CLGs、FKC 和 PBS 对鲤鱼血清丙二醛含量的影响

Figure 5 Effects of inoculating CLGs, FKC and PBS on the content of serum MDA in carp

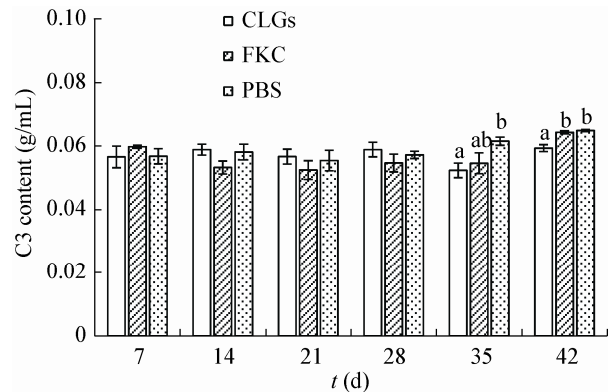


图6 免疫 CLGs、FKC 和 PBS 对鲤鱼血清 C3 的影响

Figure 6 Effects of inoculating CLGs, FKC and PBS on C3 content in carp

免疫7 d后 CLGs组和FKC组 *hepcidin* 基因相对表达量显著低于PBS组( $P<0.05$ ); 28 d后 CLGs组 *hepcidin* 基因相对表达量显著高于FKC组和PBS组( $P<0.05$ )。

2.4.2 头肾组织中 *hepcidin* 基因相对表达量: 如图8所示, 免疫14 d后, FKC组的头肾组织中 *hepcidin* 基因表达量显著低于PBS组( $P<0.05$ ); 免疫21 d后

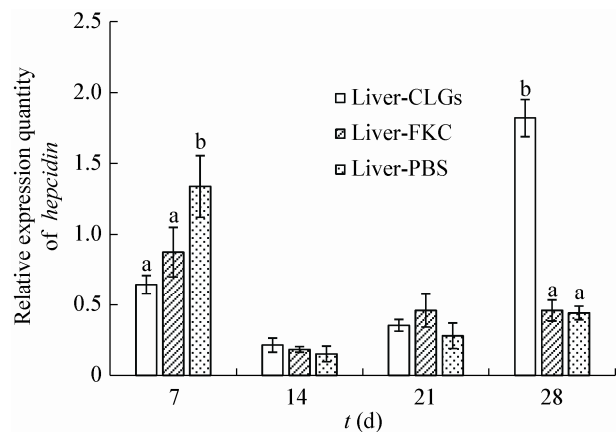


图7 CLGs、FKC 和 PBS 处理组对鲤鱼肝脏中 *hepcidin* 基因表达量的影响

Figure 7 Effects of inoculating CLGs, FKC and PBS on the content of the relative expression of *hepcidin* gene in carp liver tissue

注: 同一时间内组间上标字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )。

Note: Bars bearing different superscript (lower case letter) at same time are significantly different ( $P<0.05$ ).

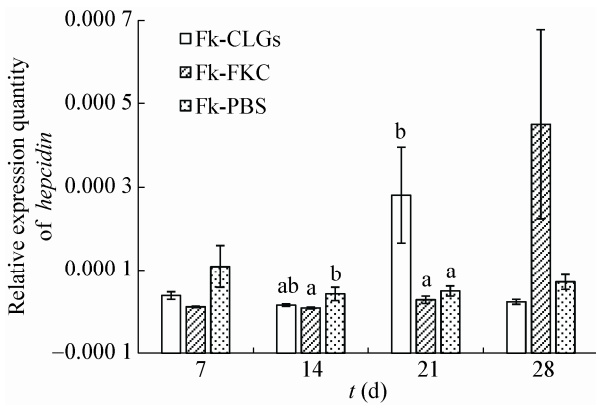


图 8 免疫 CLGs、FKC 和 PBS 对鲤鱼头肾中 *hepcidin* 基因表达量影响

Figure 8 Effects of inoculating CLGs, FKC and PBS on the content of the relative expression of *hepcidin* gene in carp head kidney tissue

CLGs 组 *hepcidin* 基因相对表达量显著高于 FKC 组和 PBS ( $P<0.05$ )；其它时间点没有显著差异。

2.4.3 脾脏组织中 *hepcidin* 基因相对表达量: 脾脏组织中, 免疫 7 d 后 CLGs 组和 FKC 组的脾脏组织中 *hepcidin* 基因表达量显著低于 PBS 组( $P<0.05$ , 图 9); 在 14 和 21 d 三个处理组不存在显著差异; 在免疫 28 d CLGs 组 *hepcidin* 基因相对表达量显著高于 FKC 组和 PBS 组( $P<0.05$ )。

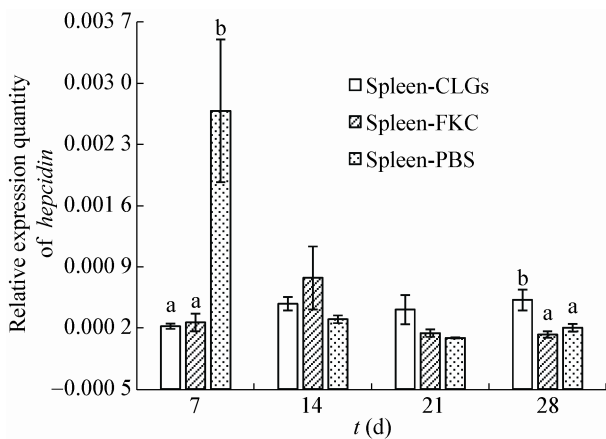


图 9 免疫 CLGs、FKC 和 PBS 对鲤鱼脾脏中 *hepcidin* 基因表达量影响

Figure 9 Effects of inoculating CLGs, FKC and PBS on the content of the relative expression of *hepcidin* gene in carp spleen tissue

### 3 讨论

#### 3.1 鲤对维氏气单胞菌菌蛻疫苗特异性免疫应答反应

菌蛻疫苗作为一种新型疫苗, 通过生物灭活方法保留了其天然表面抗原, 能够激发鱼体产生抗体, 提高鱼体对该病原菌感染的抵抗力。本研究中接种维氏气单胞菌菌蛻疫苗组在首免、二免血清抗体效价没有明显差异, 在三免后 35 d 抗体效价水平为  $2^6-2^8$  达到峰值, 明显高于甲醛灭活组, 42 d 后仍可以维持较高抗体效价, 表明该菌蛻疫苗可以有效刺激机体产生针对该致病菌的抗体。从首免、二免未出现显著差异可以看出, 达到较高抗体效价需要一定的免疫强度和ación, 这与 Lamers 等<sup>[14]</sup>通常高强度免疫才能激发鲤鱼较强体液免疫和免疫记忆结论相符。付立霞<sup>[15]</sup>在对嗜水气单胞菌非质粒依赖性菌蛻疫苗免疫异育银鲫后, 血清抗体凝集效价在 35 d 达到最高为  $2^7$ 。郝金婷<sup>[16]</sup>在迟缓爱德华菌菌蛻疫苗对罗非鱼的免疫保护效果研究中也得出菌蛻注射组免疫后抗体效价显著高于甲醛灭活组的结论; 菌蛻疫苗与甲醛灭活苗相比能够快速刺激机体产生高效价抗体的原因可能是维氏气单胞菌是 G<sup>-</sup>菌, S 层、外膜蛋白、细胞壁脂多糖 LPS (O 抗原)和鞭毛(H 抗原)是体现其抗原性的重要结构, 在甲醛灭活过程中会引起细菌表面抗原结构改变造成其抗原性减弱<sup>[17]</sup>, 导致其免疫后激发的特异性免疫弱于菌蛻疫苗。

#### 3.2 免疫维氏气单胞菌菌蛻疫苗对鲤免疫保护

相对免疫保护率是评价疫苗免疫效果的综合指标, 本次实验中用维氏气单胞菌 CL0901 株攻毒后, 菌蛻组在死亡记录时间内都没有出现大量死亡, 死亡个体数量均衡, 且菌蛻疫苗相对免疫效率为 57.70%, 高于甲醛灭活组 30.77%, 说明菌蛻疫苗免疫后鲤群体产生针对维氏气单胞菌 CL0901 株致病菌免疫保护, 而且综合免疫保护效果强于常规甲醛灭活苗。这一结论与徐展<sup>[10]</sup>用维氏气单胞菌 NC4122-3 菌蛻免疫草鱼后进行攻毒实验相同。



### 3.3 鲤对维氏气单胞菌菌蛻疫苗非特异性免疫应答反应

呼吸暴发是生物体天然免疫过程中的一种氧依赖杀伤机制,在吞噬细胞发挥吞噬作用时,细胞膜上的氧化型  $\text{NADP}^+$  把分子氧转化为超氧自由基<sup>[18]</sup>,这些自由基可以独立或与溶酶体酶联合杀死外来病原菌<sup>[19]</sup>。Shariff 等<sup>[20]</sup>在用嗜水气单胞菌感染鲤鱼及 Dash 等<sup>[21]</sup>用嗜水气单胞菌灭活苗免疫鲤鱼时呼吸暴发作用都增强。本实验中,接种菌蛻疫苗和甲醛灭活苗 21 d 后呼吸暴发作用显著强于 PBS 组,说明用菌蛻疫苗进行二次免疫后能够明显加强机体吞噬细胞对入侵病原的吞噬作用,提升细胞免疫能力。

溶菌酶是一种可以水解 $\beta$ -1,4 糖苷键的阳离子胞壁酸酶,可以引起细菌溶解,在鱼体抵抗感染性病原的最前沿防御机制中发挥作用<sup>[22-23]</sup>。本研究中菌蛻疫苗接种鲤后,血清溶菌酶含量在第 28 天显著升高,与 Kato 等<sup>[24]</sup>实验结果一致,但第三次免疫后菌蛻疫苗和甲醛灭活苗组溶菌酶含量明显下降,低于正常对照组。血清溶菌酶主要由巨噬细胞、嗜中性粒细胞等吞噬细胞分泌,随着吞噬细胞活性增强,分泌溶菌酶能力也会增强,从各实验组 NBT 的变化可以看出,接种菌蛻疫苗和甲醛灭活苗 21 d 后吞噬细胞的呼吸暴发作用显著强于 PBS 组,说明吞噬细胞活性有所增强,而血清溶菌酶含量在 21 d 也有所升高,且在 28 d 时菌蛻组和甲醛灭活组的明显高于对照组,这与吞噬细胞活性的变化相吻合,而后期的下降可能是由于特异性免疫在这一阶段开始发挥作用,从而使非特异性免疫的作用有所减弱,这一现象与 Dash 等<sup>[21]</sup>的结论相符合;另外,陈艳等<sup>[25]</sup>在对溶菌酶研究进展中提到溶菌酶活性受组胺和 N-乙酰葡糖胺的抑制,组胺为炎症反应产物,而 N-乙酰葡糖胺来自细菌细胞壁胞壁质中,在该实验后期免疫强度增大,与抗原抗体激烈反应也可能产生这些物质,从而抑制了溶菌酶活性。

髓过氧化物酶能催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  和卤化物反应生成次氯酸盐,后者可与胺盐反应生成氯胺,具有快速

强烈的杀菌作用,参与机体的免疫防御<sup>[26]</sup>,同时髓过氧化物酶也是中性粒细胞功能的激活标志,其含量高低也能说明中性粒细胞功能的强弱<sup>[27]</sup>。本实验中免疫菌蛻疫苗 28 d 后血清髓过氧化物酶含量显著高于对照组,表明二次免疫菌蛻疫苗能够有效加强血浆嗜中性粒细胞的免疫功能,这与 Wang 等<sup>[28]</sup>用爱德华氏菌菌蛻免疫斑点叉尾鲷的结论一致;鄢庆彬等<sup>[29]</sup>在采用腹腔注射溶藻弧菌对大黄鱼免疫功能的影响时发现,在注射后 7-15 d 内外周血中性粒细胞减少,分析原因是中性粒细胞具有趋化作用,会向注射接种部位转移,从而使血清中的中性粒细胞减少。本实验也是采用腹腔注射的方法进行接种,因此 28 d 后所有组别血清髓过氧化物酶含量降低,可能也是由于趋化作用导致血清中中性粒细胞减少所致。

丙二醛是生物体内自由基作用于脂质发生过氧化反应的氧化终产物,加速自由基的产生<sup>[30]</sup>。因此测定丙二醛能比较准确地反映机体内自由基的代谢状况及组织的损伤情况,对判断鱼体的健康状况具有重要价值。本研究中二次免疫后,免疫组血清丙二醛含量明显低于对照组,这与陈贺<sup>[31]</sup>用无乳链球菌灭活苗免疫罗非鱼后丙二醛的变化相同。菌蛻疫苗免疫后,对机体的脂质过氧化作用起到一定的抑制作用,减少了丙二醛的生成,从而降低了丙二醛对机体带来的破坏作用。

补体由多种具有酶活性的球蛋白组成,能够增强体液和细胞介导的特异性免疫<sup>[32]</sup>。本实验中补体 C3 量在 35 和 42 d 时菌蛻疫苗组显著低于对照组,而甲醛灭活苗组与对照组之间没有明显差异,说明此时菌蛻疫苗对补体 C3 的产生起到了抑制作用。栗志民等<sup>[33]</sup>在细菌逃避补体识别和攻击的机制中指出,部分革兰氏阴性菌对补体不敏感,可以通过脂多糖、荚膜、外膜蛋白、唾液酸等抑制补体激活。李墨非<sup>[34]</sup>在海水鱼类病原菌迟缓爱德华氏菌和海豚链球菌的致病机制研究中,也指出迟缓爱德华氏菌在抵抗血清杀伤作用时,其表面抗原成分能够抑制补体 C3 激活的旁路途径。本实验所采用的菌蛻



疫苗正是利用了细菌外壳上的脂多糖、荚膜和外膜蛋白等来诱导鱼体产生免疫反应的, 经过多次免疫后, 可能菌蛻上的脂多糖、荚膜和外膜蛋白的量达到了抑制补体激活的量, 而在甲醛灭活过程中会引起细菌表面抗原结构的改变<sup>[17]</sup>, 因此是菌蛻疫苗而非甲醛灭活苗对补体 C3 产生了抑制作用。

### 3.4 免疫维氏气单胞菌菌蛻疫苗对 *hepcidin* 基因表达的影响

铁调素 Heparin 是由 *hepcidin* 基因编码产生的小分子多肽, 具有抑制多种病原生物生长繁殖的作用, 是机体天然免疫的一种有效分子, 参与炎症反应, 其表达受到多种病原影响。李华<sup>[35]</sup>在对鲤鱼抗菌肽 *hepcidin* 基因表达分析时发现 *hepcidin* 表达主要发生在肝脏, 其次为脾脏和头肾; Chen 等<sup>[36]</sup>用大肠杆菌感染真鲷后, 脾脏、鳃、肝脏和小肠中 *hepcidin* 的表达量都显著增高, 本研究 3 种组织 *hepcidin* 表达情况与上述报告结果相同, 3 个处理组 *hepcidin* 基因表达量变化主要发生在肝脏, 脾脏、头肾变化较小; 菌蛻疫苗二次免疫后肝脏和脾脏中 *hepcidin* 表达量达到最高, 而且菌蛻疫苗对提高 *hepcidin* 表达量作用比甲醛灭活苗强; 但首次免疫后出现对照组 *hepcidin* 表达量变化最大的情况, 分析其原因可能是机体在初次免疫刺激时发生炎症反应, Park 等<sup>[37]</sup>也指出在致炎因子作用下 *hepcidin* 表达量会变化, 帮助机体抵御炎症反应, 而菌蛻组和甲醛灭活组能够刺激巨噬细胞呼吸作用加强, 鱼体需要大量氧, 而氧气运输需要血铁参与。Nemeth 等<sup>[38]</sup>报道当机体血铁减少, 铁调素 *hepcidin* 基因会通过其表达量下调来增加肠道铁离子吸收, 因此免疫组和对照组 *hepcidin* 表达出现不同可能是两者共同作用的结果。但随着免疫次数增加, 机体对免疫刺激适应, 使具有完整细菌外壳的菌蛻疫苗成为诱导抗菌肽生成的主要原因, 因此出现了 3 种组织中菌蛻疫苗组 *hepcidin* 基因表达量显著高于其它两组的现象。

综上所述, 维氏气单胞菌菌蛻疫苗在二次免疫鲤 28 d 后, 鱼体呼吸暴发作用提高, 血清溶菌酶、

髓过氧化物酶含量大幅度提升, *hepcidin* 基因表达量显著提高, 以提高鱼体的非特异性免疫为主; 免疫 35 d 后血清特异性抗体效价显著升高, 发挥特异性免疫作用, 其作用优于甲醛灭活苗。

### 参 考 文 献

- [1] Jiang N, Ma ZH, Li TL, et al. Isolation of ulcer disease pathogen from infected ornamental carp (*Cyprinus carpio* L.) and identification of the strain's 16S rRNA[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(2): 174-177 (in Chinese)  
姜娜, 马志宏, 李铁梁, 等. 鲤锦溃疡病原菌的分离及 16S rRNA 鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(2): 174-177
- [2] Fang H, Chen CZ, Zhang XJ, et al. Examination of the pathogenic *Aeromonas veronii* isolated from crab *Eriocheir sinensis*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2008, 24(1): 45-49 (in Chinese)  
房海, 陈翠珍, 张晓君, 等. 中华绒螯蟹病原维氏气单胞菌的检验[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(1): 45-49
- [3] Lu CP. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it[J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(3): 282-288 (in Chinese)  
陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288
- [4] Jalav K, Hensel A, Szostak M, et al. Bacterial ghosts as vaccine candidates for veterinary applications[J]. Journal of Controlled Release, 2002, 85(1/3): 17-25
- [5] Szostak MP, Hensel A, Eko FO, et al. Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines[J]. Journal of Biotechnology, 1996, 44(1/3): 161-170
- [6] Eko FO, Witte A, Huter V, et al. New strategies for combination vaccines based on the extended recombinant bacterial ghost system[J]. Vaccine, 1999, 17(13/14): 1643-1649
- [7] Chen HQ, Lu CP. Fish immune characteristics from the comparative immunology[J]. Chinese Journal of Zoology, 1994, 29(4): 56-60 (in Chinese)  
陈怀青, 陆承平. 从比较免疫学看鱼类的免疫特性[J]. 动物学杂志, 1994, 29(4): 56-60
- [8] Chen CF, Luo YL, Cai B, et al. Effects of water temperature on Lysozyme activity of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V.)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1996, 3(3): 24-30 (in Chinese)  
陈昌福, 罗宇良, 蔡冰, 等. 饲养水温对草鱼溶菌酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 1996, 3(3): 24-30
- [9] Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(11): 7806-7810
- [10] Xu Z. Construction of *Aeromonas veronii* bacterial ghost and evaluation of immune efficacy[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2014 (in Chinese)  
徐展. 维氏气单胞菌菌蛻的构建及免疫效力评价[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2014
- [11] Kwon SR, Nam YK, Kim SK, et al. Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(4): 621-626
- [12] Liu Y, Wei LL, Li L, et al. Effect of formalin inactivated *Flavobacterium columnare* on expression of immune related genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(6): 794-801 (in Chinese)  
刘毅, 隗黎丽, 李莉, 等. 福尔马林灭活柱状黄杆菌对草鱼

- 免疫相关基因表达的影响[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 794-801
- [13] Sahoo PK, Kumari J, Mishra BK. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2005, 21(2): 151-155
- [14] Lamers CHJ, De Hass MJH, Van Muiswinkel WB. Humoral response and memory formation in carp after injection of *Aeromonas hydrophila* bacterin[J]. Developmental & Comparative Immunology, 1985, 9(1): 65-75
- [15] Fu LX. Generation and evaluation of *Aeromonas hydrophila* plasmid-independent ghost vaccine[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese)  
付立霞. 嗜水气单胞菌非质粒依赖性菌蛻疫苗的研制及评价[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2012
- [16] Hao JT. Immune efficacy of *Edwardsiella tarda* ghosts vaccine for *Oreochromis niloticus* by different inoculation routes[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2015 (in Chinese)  
郝金婷. 迟缓爱德华菌菌蛻疫苗对罗非鱼的免疫保护效果研究[D]. 济南: 山东农业大学硕士学位论文, 2015
- [17] Jolie RAV, Mulks MH, Thacker BJ. Cross-protection experiments in pigs vaccinated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* subtypes 1A and 1B[J]. Veterinary Microbiology, 1995, 45(4): 383-391
- [18] Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent[J]. Journal of Clinical Investigation, 1973, 52(3): 741-744
- [19] Grant JJ, Loake GJ. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance[J]. Plant Physiology, 2000, 124(1): 21-30
- [20] Shariff M, Jayawardena PAHJ, Yusoff FM, et al. Immunological parameters of Javanese carp *Puntius gonionotus* (Bleeker) exposed to copper and challenged with *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2001, 11(4): 281-291
- [21] Dash S, Das SK, Samal J, et al. Dose dependence specific and non-specific immune responses of Indian major carp (*L. rohita* Ham) to intraperitoneal injection of formalin killed *Aeromonas hydrophila* whole cell vaccine[J]. Veterinary Research Communications, 2011, 35(8): 541-552
- [22] Bayne CJ, Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(8/9): 725-743
- [23] Blake CCF, Koenig DF, Mair GA, et al. Structure of Hen egg-white lysozyme: A three-dimensional fourier synthesis at 2 angstrom resolution[J]. Nature, 1965, 206(4986): 757-761
- [24] Kato G, Kondo H, Aoki T, et al. *Mycobacterium bovis* BCG vaccine induces non-specific immune responses in Japanese flounder against *Nocardia seriolae*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(2): 243-250
- [25] Chen Y, Jiang MF, Ye YH, et al. Advances in the study of lysozyme[J]. Journal of Biology, 2009, 26(2): 64-66 (in Chinese)  
陈艳, 江明锋, 叶煜辉, 等. 溶菌酶的研究进展[J]. 生物化学杂志, 2009, 26(2): 64-66
- [26] Naskalski JW, Marcinkiewicz J, Drozd R. Myeloperoxidase-mediated protein oxidation: its possible biological functions[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2002, 40(5): 463-468
- [27] Mak TW, Saunders ME. The Immune Response: Basic and Clinical Principles[M]. Oxford: Academic Press, 2005
- [28] Wang RH, Xiao TY, Zeng LB, et al. Generation and use of *Edwardsiella ictaluri* ghosts as a vaccine against enteric septicemia of catfish (ESC)[J]. Aquaculture, 2016, 456: 9-15
- [29] Yan QP, Zhang JJ, Zou WZ, et al. Effect of experimental infection with *Vibrio alginolyticus* on immune parameters of *Pseudosciaena crocea*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(2): 250-256 (in Chinese)  
鄢庆彬, 张俊杰, 邹文政, 等. 人工感染溶藻弧菌对大黄鱼免疫功能的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 250-256
- [30] Harmian D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry[J]. Journal of Gerontology, 1956, 11(3): 298-302
- [31] Chen H. Preparation and immunological efficacy on the inactivated vaccine of *Streptococcus agalactiae* isolated from Tilapia[D]. Zhanjiang: Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2012 (in Chinese)  
陈贺. 罗非鱼源无乳链球菌灭活疫苗的研制及其免疫效果的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文, 2012
- [32] Tahmasebi-Kohyani A, Keyvanshokoh S, Nematollahi A, et al. Dietary administration of nucleotides to enhance growth, humoral immune responses, and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(1): 189-193
- [33] Li ZM, Zhang SC. Mechanisms of bacterial escaping recognition and attack by complement system[J]. Periodical of Ocean University of China, 2008, 38(4): 595-600,652 (in Chinese)  
栗志民, 张士瑞. 细菌逃避补体识别和攻击的机制[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(4): 595-600,652
- [34] Li MF. Pathogenic mechanism of *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae* in marine fish[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of the University of Chinese Academy of Sciences, 2015 (in Chinese)  
李墨非. 海水鱼类病原菌迟缓爱德华氏菌和海豚链球菌的致病机制[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2015
- [35] Li H. Cloning, expression and function of a hepcidin antimicrobial peptide gene from carp (*Cyprinus carpio* L.)[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Normal University, 2010 (in Chinese)  
李华. 鲤鱼抗菌肽 hepcidin 的基因克隆、表达及其功能的研究[D]. 济南: 山东师范大学硕士学位论文, 2010
- [36] Chen SL, Xu MY, Ji XS, et al. Cloning, characterization, and expression analysis of hepcidin gene from red sea bream (*Chrysophrys major*)[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(4): 1608-1612
- [37] Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(11): 7806-7810
- [38] Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2004, 113(9): 1271-1276