

## 异尖科线虫诱导长江刀鲚免疫反应研究

王红篮<sup>1,2</sup>, 应聪萍<sup>2,3</sup>, 杨彦平<sup>2</sup>, 郭文君<sup>2</sup>, 徐跑<sup>1,2,3</sup>, 刘凯<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 无锡 214081; 3. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081)

**摘要:** 为探究长江刀鲚 TH1 细胞、MIF、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IgM、IgT 和 IgD 的常规水平及异尖科线虫寄生所导致的免疫变化, 采用 ELISA 法分别测定了空白组和 3 个寄生组的脾脏、头肾和血清中 7 种免疫分子的表达水平。结果显示: (1) 空白组脾脏、头肾和血清中免疫分子水平均表现为 IgD ( $P < 0.01$ ) > IgM ( $P < 0.001$ ) > IgT ( $P < 0.001$ ) > MIF ( $P < 0.001$ ) > TH1 细胞 ( $P > 0.05$ ) > TNF- $\alpha$  ( $P > 0.05$ ) > IL-10, 且血清中免疫分子水平显著高于脾脏和头肾 ( $P < 0.001$ ); (2) 各寄生组脾脏中 7 种免疫分子水平均显著高于空白组 ( $P < 0.001$ ), 头肾中除 IgM 外的 6 种免疫分子水平均显著高于空白组 ( $P < 0.05$ ), 血清中仅 IL-10 水平显著高于空白组 ( $P < 0.001$ ); (3) 整体而言, 长江刀鲚寄生组 IL-10 水平随着寄生数量增加而下降, TH1 细胞随着寄生数量的增加呈下降后上升趋势, MIF、TNF- $\alpha$ 、IgD、IgM 和 IgT 则与 TH1 细胞相反, 且脾脏 (IgT、TNF- $\alpha$ 、TH1 细胞、MIF、IgM)、血清 (TH1 细胞、IgD、IL-10、TNF- $\alpha$ ) 和头肾 (IgT、TNF- $\alpha$ ) 中免疫分子水平与寄生虫数量间的相关关系均达到显著水平。综上, 异尖科线虫寄生可增加长江刀鲚免疫分子的表达水平, 诱导炎症反应和适应性免疫反应的发生, 脾脏、头肾和血清中部分免疫分子水平与异尖科线虫数量间的相关性显著, 其中血清 TH1 细胞、脾脏中 IgT 和 TNF- $\alpha$  可作为长江刀鲚应对异尖科线虫寄生的免疫功能测定优选指标。

**关键词:** 长江刀鲚; 异尖科线虫; 免疫分子; 酶联免疫测定

中图分类号: S965.227; S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)04-0595-08

### Study on immune response of *Coilia nasus* induced by Anisakidae Nematodes

WANG Honglan<sup>1,2</sup>, YING Congping<sup>2,3</sup>, YANG Yanping<sup>2</sup>, GUO Wenjun<sup>2</sup>, XU Pao<sup>1,2,3</sup>, LIU Kai<sup>1,2,3</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Station Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081; 3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081)

**Abstract:** To investigate the level of seven immune molecules (TH1 cells, MIF, IL-10, TNF- $\alpha$ , IgM, IgT and IgD) in *Coilia nasus* influenced by Anisakidae-infected, the expression of seven immune molecules in the spleen, head kidney and serum were measured by ELISA. The results showed that: (1) For the blank group, the level of immune molecules in spleen, head kidney and serum all showed the trend: IgD ( $P < 0.01$ ) > IgM ( $P < 0.001$ ) > IgT ( $P < 0.001$ ) > MIF ( $P < 0.001$ ) > TH1 cell ( $P > 0.05$ ) > TNF- $\alpha$  ( $P > 0.05$ ) > IL-10, and the expression of seven immune molecules in serum were significantly higher than those in spleen and head kidney ( $P < 0.001$ ). (2) For parasitic group, the level of seven immune molecules in spleen of *C. nasus* were significantly higher than those of the blank group ( $P < 0.001$ ). The level of six immune molecules except IgM in head kidney were significantly higher than those in the blank group ( $P < 0.05$ ), and the level of IL-10 in the serum of head kidney was significantly higher than the blank group ( $P < 0.001$ ). (3) Overall, the IL-10 level of parasitic group in *C. nasus* decreased with the increase of parasitic number. The TH1 cell level of parasitic group in *C. nasus* decreased firstly but then increased with the parasitic number increasing, while MIF, TNF- $\alpha$ , IgD, IgM and IgT showed the opposite tendency. Moreover, there was a significant correlation between the level of immune molecules in spleen (IgT, TNF- $\alpha$ , TH1 cell, MIF, IgM), serum (TH1 cell,

收稿日期: 2021-11-02

基金项目: 刀鲚资源状况及捕捞管理形势研究项目(CJBYZGL2021-24)和农业农村部长江口水域渔业资源调查项目(JC201905)共同资助。

作者简介: 王红篮, 硕士研究生。E-mail: 17339996117@163.com

\* 通信作者: 刘凯, 博士, 研究员。E-mail: liuk@ffrc.cn

IgD, IL-10, TNF- $\alpha$ ), head kidney (IgT, TNF- $\alpha$ ) and the parasites number. In conclusion, Anisakidae nematodes parasitism increased the expression level of immune molecules, inducing inflammatory and adaptive immune response. There was a significant correlation between the level of some immune molecules in spleen, head kidney and serum and the number of Anisakidae nematodes, and serum TH1 cells, IgT and TNF- $\alpha$  in spleen could be used as optimized indexes to measure the immune function of *C. nasus* in response to Anisakidae nematodes parasitism.

**Key words:** *Coilia nasus*; Anisakidae; immune molecules; ELISA

刀鲚 (*Coilia nasus*) 隶属于鲱形目 (Clupeiformes) 鳀科 (Engraulidae) 鲚属 (*Coilia*), 主要分布于中国、日本、朝鲜沿海及与之相通的河流和湖泊。刀鲚每年繁殖季节聚集于长江口, 集群溯河而上进行生殖洄游, 从而形成渔汛<sup>[1]</sup>。20 世纪 70 年代以后, 由于长江水域水利工程的大规模修建、水环境的污染和过度捕捞等因素, 导致水生生物生境被破坏, 生物总量减少, 生产力持续下降<sup>[2]</sup>。而刀鲚也出现了显著的衰退趋势, 为遏制刀鲚资源的急剧衰退, 原农业部于 2012 年 12 月 7 日公告成立长江刀鲚国家级水产种质资源保护区, 2018 年 4—7 月保护区安庆段刀鲚资源调查显示, 资源状况仍不乐观<sup>[3-4]</sup>。

异尖科线虫 (Anisakidae) 是海水性寄生虫, 其成虫寄生于鲸类和鳍足类动物, 其三期幼虫感染了第二中间宿主鱼类和桡足类动物后, 在宿主体内仍具感染性, 但不继续发育<sup>[5]</sup>。据学者研究, 刀鲚因生殖洄游前需大量摄食以储备生殖洄游所需能量, 极易摄入含异尖科线虫的鱼虾<sup>[6]</sup>。代培等<sup>[7]</sup>通过分子技术鉴定寄生刀鲚的线虫种类, 结果表明刀鲚寄生的线虫共 2 属, 分别为异尖属和宫脂属, 都属于异尖科线虫。而异尖科线虫主要寄生于长江刀鲚腹腔, 受水中盐度、温度等条件改变的影响较少, 洄游过程基本不会离开宿主<sup>[1,8]</sup>。

以往关于寄生虫与鱼类之间的研究集中在寄生虫种类<sup>[9]</sup>、感染率和分布结构<sup>[1]</sup>等的调查, 以及寄生虫对鱼类组织损伤<sup>[9]</sup>、行为<sup>[10]</sup>、繁殖<sup>[11]</sup>和免疫<sup>[12-13]</sup>等方面的研究, 近年来有学者研究了寄生虫对长江刀鲚肝脏组织<sup>[14]</sup>和肠道微生物的影响<sup>[15]</sup>, 但针对长江刀鲚应对异尖科线虫感染的免疫应答方向研究较少。本研究采用 ELISA 法分别测定了健康长江刀鲚和 3 组寄生异尖科线虫长江刀鲚的脾脏、头肾和血清中 7 种免疫分子的表达水平, 以期获得不同寄生数量对长江刀鲚的影响, 探究异尖科线虫寄生刀鲚后其免疫系统的应对策略, 为研究异尖科线虫寄生对刀鲚生殖洄游及群体补充的影响积累素材。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验采样

2020 年 6 月在安庆江段 (简称 AQ, 调查水域

中心经纬度为 30°28'56.43" N, 116°59'27.37" E) 使用流刺网采集长江刀鲚样本, 水温 (27.68±0.51)°C, pH 为 7.14±0.08。捕获后立即置于解剖盘抽血, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 获得血清, 并解剖取头肾和脾脏, 于液氮中保存后移至 -80°C 冰箱待用。选取体表完整、外观无明显病变的 5 尾健康雌性刀鲚样本为空白组 (group-0), 以及 15 尾寄生雌性刀鲚样本为寄生组 (图 1), 且寄生组按异尖科线虫寄生数量分 3 组, 分别为 1~10 条组 (group-1)、11~20 条组 (group-2) 和 21~50 条组 (group-3), 每组各 5 个样本。

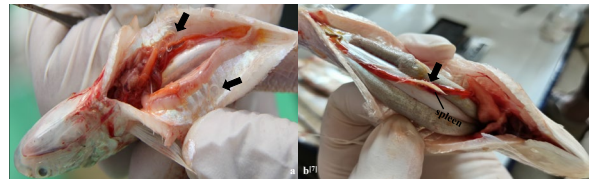


图 1 异尖科线虫寄生于刀鲚腹腔

Figure 1 Anisakidae-infected in the abdominal cavity of *C. nasus*

寄生组体长为 (286.08±8.38) mm, 体重为 (89.7±9.72) g, 空白组体长为 (287.81±3.59) mm, 体重为 (89.84±3.38) g。寄生组异尖科线虫分布情况如表 1 所示。

### 1.2 试验方法

试验采用酶联免疫吸附试验方法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定长江刀鲚脾脏、头肾和血清中 TH1 细胞、巨噬细胞迁移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 10 (interleukin 10, IL-10)、免疫球蛋白 IgM、IgT 和 IgD 的水平。以上鱼类免疫分子 ELISA 试剂盒均购自南京森贝伽科技有限公司。

操作流程如下: 将脾脏和头肾 4 °C 解冻, 加入定量 PBS (1 g 组织: 9 mL 0.01 mol PBS, pH7.4) 制成匀浆, 离心 20 min (2 500 r·min<sup>-1</sup>), 收集上清液。常温放置 ELISA 试剂盒 20 min, 设置空白孔 (不加样)、标准品孔 (标准品+标准品稀释液混匀后, 各孔浓度分别为 54、36、18、9 和 4.5 ng·L<sup>-1</sup>, 50  $\mu$ L·孔<sup>-1</sup>) 和样本孔 (10  $\mu$ L 待测样品+40  $\mu$ L 样品稀释液, 50

$\mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$ ), 37 °C 温育 30 min, 弃去液体甩干, 洗涤 5 次; 除空白孔外, 标准品孔和样本孔再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记试剂 50  $\mu\text{L}$ , 用封板膜封板后, 37 °C 温育 30 min, 弃去液体甩干, 洗涤 5 次。避光

加入显色液 A、B 各 50  $\mu\text{L}$  混匀, 37 °C 显色 15 min, 最后加终止液 50  $\mu\text{L}$ , 15 min 内在 450 nm 波长处检测各孔 OD 值。

表 1 刀鲚生物学信息统计  
Table 1 Biological statistics of *C. nasus*

组别	地点	体长/mm	体重/g	异尖科线虫寄生数量	
寄生组	group-1	安庆 AQ	287.39	89.32	8
		安庆 AQ	291.63	92.93	4
		安庆 AQ	292.72	90.53	7
		安庆 AQ	292.70	85.41	7
		安庆 AQ	288.81	88.83	4
	group-2	安庆 AQ	295.90	101.35	16
		安庆 AQ	283.42	87.59	16
		安庆 AQ	300.44	93.33	17
		安庆 AQ	290.46	110.65	12
		安庆 AQ	281.14	83.78	12
	group-3	安庆 AQ	283.42	89.30	25
		安庆 AQ	282.26	94.27	27
		安庆 AQ	272.94	88.42	20
		安庆 AQ	271.28	64.80	26
		安庆 AQ	276.64	85.02	49
空白组	group-0	安庆 AQ	286.63	86.94	0
		安庆 AQ	285.90	86.82	0
		安庆 AQ	289.34	94.82	0
		安庆 AQ	283.95	89.13	0
		安庆 AQ	293.21	91.50	0

### 1.3 数据处理

使用 Excel 2013 和 SPSS 24.0 处理和分析试验数据, 并进行多因素方差分析和 Pearson 相关分析, 使用 Origin 9.0 和联川生物云平台 (<https://www.omicstudio.cn/tool>) 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 刀鲚免疫分子 PCoA 分析

91.45% 的 PCo1 可较好的反映各组免疫分子的表达特征。PCoA 分析结果表明 4 组间存在差异, 其中寄生组和健康组免疫分子表达区分明显, 且仅有一个异常离群样本, 表明试验分组设计的稳定性 (图 2)。

### 2.2 异尖科线虫寄生对刀鲚免疫分子水平的差异分析

**2.2.1 刀鲚不同组织免疫分子水平** 空白组中 7 种免疫分子水平在脾脏、头肾和血清中的规律为 IgD (脾脏,  $(4.35\pm 0.28) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 头肾,  $(3.4\pm 0.48) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 血清,  $(4.86\pm 0.38) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $P < 0.01$ ) >

IgM (脾脏,  $(3.17\pm 0.19) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 头肾,  $(3.38\pm 0.19) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 血清,  $(4.13\pm 0.35) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $P < 0.001$ ) > IgT (脾脏,  $(1.48\pm 0.14) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 头肾,  $(1.39\pm 0.05) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 血清,  $(1.86\pm 0.07) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $P < 0.001$ ) > MIF (脾脏,  $(6.14\pm 0.47) \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 头肾,  $(7.06\pm 0.12) \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 血清,  $(8.3\pm 0.35) \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $P < 0.001$ ) > TH1 细胞 (脾脏,  $(77.28\pm 4.76) \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 头肾,  $(83.12\pm 4.11) \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 血清,  $(127.15\pm 6.74) \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $P > 0.05$ ) > TNF- $\alpha$  (脾脏,  $(50.09\pm 6.70) \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 头肾,  $(50.58\pm 6.11) \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 血清,  $(81.29\pm 3.95) \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $P > 0.05$ ) > IL-10 (脾脏,  $(44.8\pm 4.0) \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 头肾,  $(43.78\pm 4.20) \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 血清,  $(70\pm 4.93) \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。7 种免疫分子水平均在血清中最高, 除 IgD 外, 其余 6 种免疫分子在血清中的表达水平极显著高于脾脏和头肾 ( $P < 0.001$ ), 但脾脏中 7 种免疫分子的表达水平与头肾相比无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 3)。

**2.2.2 不同寄生数量的影响** 脾脏中, MIF (图 3(a))、TH1 细胞 (图 3(c))、IL-10 (图 3(b))、TNF- $\alpha$  (图 3(g))、IgD (图 3(e))、IgM (图 3(f)) 和 IgT (图 3(d)) 在寄生组 1、寄生组 2、寄生组 3 中的表达水平均极显著高于空白组 ( $P < 0.001$ )。TH1 细胞 ( $116.49 \pm 6.12$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、IL-10 ( $70.28 \pm 2.64$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、TNF- $\alpha$  ( $69.68 \pm 4.28$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、IgD ( $5.55 \pm 0.24$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 IgM ( $4.28 \pm 0.10$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  在寄生组 1 中最高, IgT ( $1.8 \pm 0.08$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  在寄生组 2 中最高, MIF ( $7.84 \pm 0.27$ )  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  在寄生组 3 中最高 (图 3)。

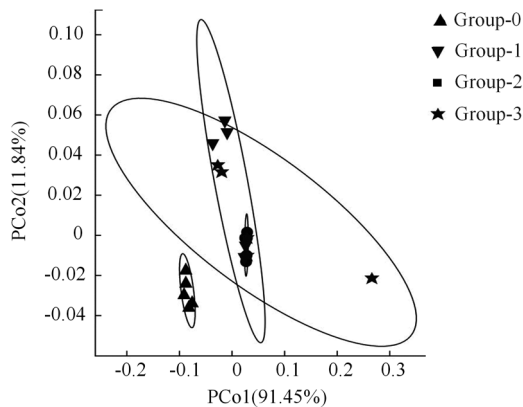


图 2 刀鲚免疫分子的主坐标分析

Figure 2 PCoA of immune molecules in *C. nasus*

头肾中, MIF ( $P < 0.05$ )、TH1 细胞 ( $P < 0.001$ )、IL-10 ( $P < 0.001$ )、TNF- $\alpha$  ( $P < 0.001$ )、IgD ( $P < 0.05$ ) 和 IgT ( $P < 0.05$ ) 在寄生各组中的表达水平均显著高于空白组, IgM 只在寄生组 2 中的水平显著高于空白组 ( $P < 0.05$ )。此外, TH1 细胞 ( $134.85 \pm 3.53$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 TNF- $\alpha$  ( $74.01 \pm 2.87$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的水平在寄生组 1 中最高, MIF ( $7.64 \pm 0.19$ )  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 IgM ( $3.44 \pm 0.13$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  在寄生组 2 中最高, IL-10 ( $70.56 \pm 2.87$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、IgT ( $1.58 \pm 0.03$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 IgD ( $4.73 \pm 0.15$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  在寄生组 3 中最高 (图 3)。

血清中, IL-10 在寄生组 1 ( $P < 0.05$ )、寄生组 2 ( $P < 0.001$ )、寄生组 3 ( $P < 0.05$ ) 中的水平显著高于空白组, TH1 细胞在寄生组 2 和寄生组 3 中的水平显著高于空白组 ( $P < 0.05$ )。此外, IL-10 ( $81.39 \pm 3.7$ )、TNF- $\alpha$  ( $93.48 \pm 11.68$ ) 和 IgD ( $5.64 \pm 0.55$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的表达水平在寄生组 2 中最高, TH1 ( $143.04 \pm 14.94$ )

$\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  在寄生组 3 中最高 (图 3)。

**2.2.3 淋巴器官和血清的差异** 寄生组 1 中, 脾脏 TH1 细胞的水平 ( $116.49 \pm 6.12$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.001$  极显著低于头肾 ( $134.85 \pm 3.53$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和血清 ( $138.14 \pm 1.99$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 而 IgD 则表现出相反趋势 (脾脏, ( $5.55 \pm 0.24$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 头肾, ( $4.73 \pm 0.15$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 血清, ( $4.8 \pm 0.13$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $P < 0.001$ )。血清 IL-10 ( $76.56 \pm 3.14$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.01$  和 TNF- $\alpha$  ( $82.75 \pm 2.74$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.001$  的水平显著高于脾脏 (IL-10, ( $70.28 \pm 2.64$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; TNF- $\alpha$ , ( $69.68 \pm 4.28$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和头肾 (IL-10, ( $70.56 \pm 2.87$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; TNF- $\alpha$ , ( $74.01 \pm 2.49$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。脾脏 IgM ( $4.38 \pm 0.11$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.001$  极显著高于血清 ( $3.74 \pm 0.14$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 且血清 IgM 水平显著高于头肾 ( $3.45 \pm 0.13$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ 。脾脏 ( $1.74 \pm 0.05$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和血清 ( $1.74 \pm 0.07$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  IgT 的水平极显著高于头肾 ( $1.58 \pm 0.04$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.001$  (图 3)。

寄生组 2 中, 血清 MIF ( $9.11 \pm 1.03$ )  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ 、TH1 ( $143.04 \pm 1.45$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ 、IL-10 ( $81.39 \pm 1.7$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.01$  和 TNF- $\alpha$  ( $93.48 \pm 11.48$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.001$  的水平显著高于脾脏和头肾, 头肾 IgT ( $1.59 \pm 0.12$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 IgD ( $4.71 \pm 0.56$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的水平显著低于血清 (IgT,  $2.06 \pm 0.20$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; IgD, ( $5.64 \pm 0.55$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $P < 0.05$ ) (图 3)。

寄生组 3 中, 血清 TH1 细胞和 TNF- $\alpha$  的水平显著高于脾脏 (TH1, ( $113.25 \pm 9.27$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; TNF- $\alpha$ , ( $68.51 \pm 3.53$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $P < 0.05$ ) 和头肾 (TH1, ( $123.7 \pm 15.25$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; TNF- $\alpha$ , ( $71.31 \pm 8.43$ )  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $P < 0.05$ ), 血清 IgM 和 IgT 的水平显著高于头肾 (IgM, ( $3.6 \pm 0.34$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; IgT, ( $1.68 \pm 0.67$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $P < 0.05$ ) (图 3)。

**2.2.4 刀鲚寄生组间相关性分析** 总体分析发现, 寄生刀鲚 IL-10 水平随着寄生数量增加而不断下降, 在寄生组 1 中最高。TH1 细胞随寄生数量增加呈下降后升高, 在寄生组 1 中最高。MIF、TNF- $\alpha$ 、IgM、IgT 和 IgD 随寄生数量增加呈上升后下降趋势, 在寄生组 2 中最高 (表 2)。

刀鲚免疫分子与寄生数量之间存在正相关关系 (图 4), 其中正相关关系达到显著水平 ( $P < 0.05$ ) 的免疫分子包括: 脾脏中 IgT ( $r = 0.5096$ ) > TNF- $\alpha$  ( $r = 0.5073$ ) > TH1 ( $r = 0.5049$ ) > MIF ( $r = 0.4980$ ) > IgM ( $r = 0.4462$ ), 头肾中 IgT ( $r = 0.4900$ ) > TNF- $\alpha$  ( $r = 0.4878$ ), 血清中 TH1 细胞 ( $r = 0.6719$ ) > IgD ( $r = 0.4961$ ) > IL-10 ( $r = 0.4945$ ) > TNF- $\alpha$  ( $r = 0.4606$ )。

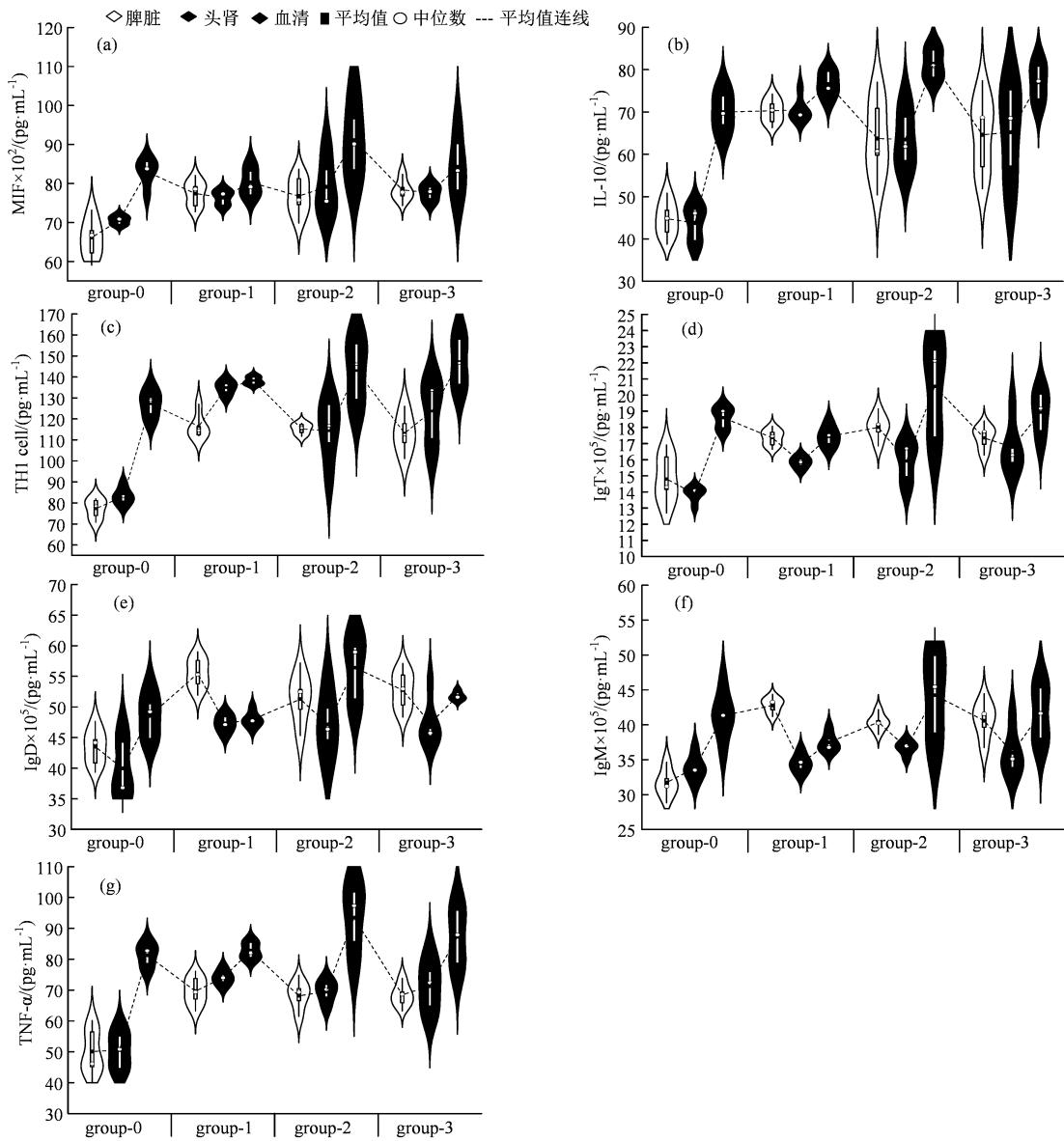
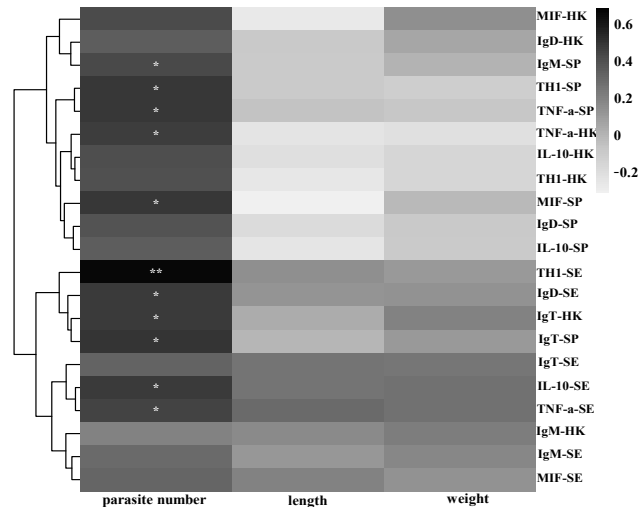


图 3 不同组别刀鲚脾脏、头肾和血清中免疫分子水平 ( $n = 5$ )

Figure 3 The immune molecules level of different group of *C.nasus* in spleen, head kidney and serum ( $n = 5$ )



数据为  $r$  值 ( $n=20$ ), SP 为脾脏, HK 为头肾, SE 为血清, \*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ 。

图 4 刀鲚免疫分子的相关性热图

Figure 4 Correlation heatmap of immune molecules in *C. nasus*

表 2 寄生组刀鲚的免疫分子水平

Table 2 Immune molecular level of parasitic *C. nasus*(pg·mL<sup>-1</sup>)

免疫分子	group-1 1~10	group-2 11~20	group-3 21~50
MIF×10 <sup>2</sup>	78.04±3.23	82.34±9.74	79.78±5.37
TH1	129.83±10.61	124.23±18.13	126.69±18.39
IL-10	73.97±4.02	69.54±10.78	68.37±10.11
TNF- $\alpha$	75.48±6.38	77.06±13.91	74.88±10.82
IgM×10 <sup>5</sup>	38.24±3.75	40.45±4.76	39.25± 4.03
IgT×10 <sup>5</sup>	16.88±0.9	18.15±2.65	17.60±1.52
IgD×10 <sup>5</sup>	50.25±4.17	51.60±6.12	50.53±3.68

注: n=15, mean±SD.

### 3 讨论与结论

#### 3.1 长江刀鲚淋巴器官和血清中免疫分子水平

硬骨鱼是兼具适应性和先天性免疫反应的最低等的脊椎动物,而炎症因子、TH1细胞和免疫球蛋白在抵御寄生虫中发挥着重要作用。前人研究发现IL-10、TNF- $\alpha$ 、IgM、IgT和IgD在鱼类不同组织(脾脏、头肾、肠道、脑、肝、鳃)中均有表达,且鱼的种类不同,相同组织也会有不同的表达量<sup>[16-20]</sup>。本研究表明长江刀鲚7种免疫分子(TH1细胞、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IgM、IgT和IgD)在头肾、脾脏和血清中均有表达,其中IgD水平最高,其次是IgM,IL-10最低。

分析脾脏、头肾和血清中免疫分子水平发现,健康刀鲚血清MIF、TH1细胞、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IgM和IgT水平显著高于脾脏和头肾,而脾脏与头肾则无显著性差异。免疫因子由免疫细胞分泌,迟恒<sup>[19]</sup>研究表明,大西洋鲑Ig<sup>+</sup>细胞表达规律为外周血细胞(47.95±2.32)%>脾脏(34.21±3.41)%>前肾(26.54±3.61)%。因此推测长江刀鲚血清中高水平的炎症因子和免疫球蛋白可能是由血液中白细胞分泌以及其他细胞的输送所导致,而免疫因子在脾脏和头肾中不同表达水平可能由淋巴器官中不同水平的免疫细胞造成。

#### 3.2 长江刀鲚寄生异尖科线虫后免疫分子应答

适应性免疫反应由T细胞和B细胞介导,先天性免疫反应主要包括吞噬作用、炎症反应等。而寄生虫导致的鱼类先天性免疫和适应性免疫经常整合在一个多层次网络中发挥作用,而不单独发挥作用<sup>[12-13]</sup>。因此选择炎症指标(促炎因子MIF和TNF- $\alpha$ ; 抑炎因子IL-10)和适应性免疫指标(TH1细胞、IgM、IgT和IgD)反映刀鲚免疫反应的情况。

**3.2.1 炎症反应** 炎症反应是一个复杂的病理过程,以防御病原体和细胞损伤,诱导机体抗病能力

增加,而参与炎症反应的因子称炎症因子,包括TNF- $\alpha$ 、IL-10、MIF等<sup>[21]</sup>。MIF抑制淋巴细胞和巨噬细胞的迁移<sup>[22]</sup>,却不能直接促进炎症因子的表达,而是先诱导TLR受体表达,从而产生大量的炎症因子,如TNF- $\alpha$ <sup>[21]</sup>。MIF和TNF- $\alpha$ 均可刺激宿主炎症相关基因的表达和诱导巨噬细胞增强吞噬病原体的能力,但TNF- $\alpha$ 的过度表达与机体的病变相关<sup>[21-23]</sup>。机体可通过调节IL-10抑制过度炎症反应引起的损伤,也有观点认为IL-10是寄生虫免疫调节策略使宿主免疫反应因子失活,利于寄生虫的生存<sup>[23]</sup>。Mao等<sup>[24]</sup>研究表明,感染弧菌的大黄鱼肝脏和头肾中MIF表达显著上调,且Qiu等<sup>[25]</sup>发现重组MIF显著降低鱼血液、肾脏和脾脏中细菌负荷。Ilgová等<sup>[26]</sup>发现,孢子虫寄生鲤鱼后IL-10和TNF- $\alpha$ 表达量高于对照组,且IL-10最大增加了1456倍。本研究发现,寄生异尖科线虫刀鲚的脾脏和头肾中MIF、TNF- $\alpha$ 和IL-10表达显著高于健康刀鲚,表明异尖科线虫寄生可诱导炎症反应的发生。而IL-10随着寄生虫数量的增加而减少,MIF和TNF- $\alpha$ 随着寄生虫数量增加呈先升高后降低趋势,在寄生11~20条时最高,推测寄生11~20条的异尖科线虫可诱导刀鲚炎症反应增强,以降低异尖科线虫对宿主造成的危害,此结果还需要最直接的组织病理学观察,有待进一步研究。

**3.2.2 适应性免疫反应** 适应性免疫反应由外来因素引发从而使宿主获得抵抗病原体感染的能力,主要包括T细胞主导的细胞免疫和B细胞主导的体液免疫,而TH1细胞是T细胞的一个细胞亚群,分泌IFN- $\gamma$ 和IL-2等细胞因子,主要激活毒性T淋巴细胞,诱导巨噬细胞和自然杀伤细胞参与细胞免疫及迟发型超敏反应,也可协助B细胞产生免疫球蛋白<sup>[19]</sup>。免疫球蛋白IgM、IgT和IgD参与体液免疫,清除细胞外的抗原。本研究发现,血清中TH1细胞水平与寄生数量之间呈显著正相关关系,并随寄生

数量增加而不断增加, 在寄生 21~50 条组中最高, 而脾脏和头肾中 TH1 细胞水平变化与之相反, 在寄生 1~10 条组中最高。粘虫寄生黑鲟后头肾 TH 淋巴细胞相关基因 (*cd4-1* 和 *cd4-2*) 出现显著下调, 脾脏中无变化, 前肠中反而增加<sup>[27]</sup>, 以上结果可能表明 TH 细胞的表达与靶器官感染状态相关<sup>[27]</sup>。Xu 等<sup>[28]</sup>研究表明, 花鲷感染小瓜虫后脾脏和头肾中 IgM、IgT 和 IgD 高度上调, 以及粘虫寄生黑鲟后脾脏中效应 B 细胞标记分子 *sIgM* 和 *mIgT* ( $P > 0.05$ ) 上调<sup>[27]</sup>。本结果与之相似, 寄生异尖科线虫刀鲚的脾脏和头肾中免疫球蛋白水平高于空白组, 而 IgM 具有介导杀死细菌和清除寄生虫等功能, IgD 可与肥大细胞和嗜酸性粒细胞结合参与呼吸道免疫防御, 还可诱导免疫活化因子和促炎因子的表达<sup>[29]</sup>, 表明异尖科线虫寄生后, 刀鲚免疫球蛋白表达量增加, 有助于增强宿主对抗病原体感染的能力。刀鲚脾脏 IgT 水平与异尖科线虫数量间存在显著正相关关系, IgT 可对抗肠道寄生虫, 在肠道抗体反应中发挥着重要作用, 比 IgM 更加重要<sup>[29]</sup>, 而刀鲚脾脏位于胃的下方, 肠道背侧且异尖科线虫主要寄生于刀鲚肠道<sup>[7]</sup>, 推测寄生异尖科线虫刀鲚的脾脏 IgT 水平升高可能与肠道免疫反应相关。有趣的是, 脾脏中 IgM 和 IgD 的水平在寄生 1~10 条异尖科线虫组中显著高于血清 ( $P < 0.001$ ), 但其余 5 种免疫分子在血清中水平高于脾脏。而抗体依赖性的细胞介导的毒性作用 (antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC) 是人体主要的杀伤蠕虫机制<sup>[30]</sup>, 罗晓东<sup>[31]</sup>推测 ADCC 效应也应该是小鼠抗线虫感染的主要免疫机制。而感染了异尖科线虫的长江刀鲚体内 TH1 细胞和免疫球蛋白水平的变化, 是否也可能与 ADCC 有关, 有待进一步研究。

**3.2.3 刀鲚免疫分子与寄生虫数量之间的关系** 相关性分析发现, 刀鲚脾脏、头肾和血清中促炎因子 TNF- $\alpha$  水平与寄生数量间的相关性达到显著水平, 以及脾脏中 MIF、TH1、IgM 和 IgT 亦是如此。相比于头肾和血清, 脾脏中达到显著相关的免疫分子种类最多, 且寄生后 7 种免疫分子水平变化均达到显著水平。大多数寄生虫引发的免疫反应局限于附着点或其身体附近<sup>[32]</sup>, 异尖科线虫寄生于刀鲚腹腔内 (图 1), 脾脏位于腹腔内且离异尖科线虫最近, 故而受异尖科线虫影响最大。Ilgová 等<sup>[26]</sup>用重组的扁虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (rEnStef) 注射鲤鱼发现, 10 和 20  $\mu\text{g}$  rEnStef 可使 TNF- $\alpha$  表达降低 24% 和 33.3%, IL-10 表达降低 26.6% 和 51.5%。Ronza 等<sup>[33]</sup>研究表明, 感染黏虫的大菱鲆脾脏和肾脏中 TNF- $\alpha$ ,

早期阶段表达增加, 感染严重时表达减少。所以上述结果表明宿主免疫因子的变化与寄生数量、寄生位置、寄生虫本身和寄生时间存在关联。

综上, 异尖科线虫寄生可增加长江刀鲚免疫分子的表达水平, 诱导炎症反应和适应性免疫反应, 长江刀鲚淋巴器官和血清中 7 种免疫分子水平因异尖科线虫的寄生而发生改变, 脾脏、头肾和血清中部分免疫分子水平与异尖科线虫数量间的相关性达到显著, 其中血清 TH1 细胞、脾脏中 IgT 和 TNF- $\alpha$  水平与异尖科线虫数量间的相关系数较大, 建议可优先作为检测长江刀鲚感染异尖科线虫的免疫功能测定指标。此外, 虽已尽量控制其他变量对本结果的影响, 但由于对长江刀鲚免疫系统研究尚浅, 以及野外采样条件和技术的限制, 仍旧存在很多不可控因素。目前并未有刀鲚免疫系统受细菌、病毒等其他病原的相关研究。关于其他因素 (细菌、病毒等) 对刀鲚免疫系统造成的影响, 后续将进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] 袁传宓. 刀鲚的生殖洄游[J]. 生物学通报, 1987, 22(12): 1-3.
- [2] 庾莉萍. 我国江海渔业资源衰退及保护现状扫描[J]. 渔业致富指南, 2007(6): 15-16.
- [3] 代培, 严燕, 朱孝彦, 等. 长江刀鲚国家级水产种质资源保护区(安庆段)刀鲚资源现状[J]. 中国水产科学, 2020, 27(11): 1267-1276.
- [4] 徐跑, 徐钢春, 刘凯. 长江刀鲚种质资源及人工繁育技术[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 187-189.
- [5] 张森. 水产品中异尖线虫和颚口线虫的分类鉴定与快速检测技术的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- [6] 姜涛, 刘洪波, 李孟孟, 等. 溯河洄游长江刀鲚(*Coilia nasus*)摄食虾类的调查[J]. 湖泊科学, 2018, 30(2): 458-463.
- [7] 代培, 田佳丽, 马凤娇, 等. 长江安庆段刀鲚线虫感染现状调查[J]. 大连海洋大学学报, 2022, 37(3): 464-470.
- [8] 李文祥, 王桂堂. 洄游型、淡水型和陆封型刀鲚的寄生蠕虫群落结构[J]. 动物学杂志, 2014, 49(2): 233-243.
- [9] 王雪芹, 阳涛. 我国鱼类寄生虫病的防治策略及研究现状[J]. 水产养殖, 2020, 41(11): 5-10.
- [10] 唐嘉嘉, 李诗钰, 李安兴. 鲢鳙鱼类寄生虫病研究进展与展望[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 200-210.
- [11] SAYYAF DEZFULI B, FERNANDES C E, GALINDO G M, et al. Nematode infection in liver of the fish *Gymnotus inaequilabiatus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Pantanal Region in Brazil: pathobiology and inflammatory response[J]. Parasites Vectors, 2016, 9(1): 1-10.
- [12] FLAJNIK M F, DU PASQUIER L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?[J]. Trends



- Immunol, 2004, 25(12): 640-644.
- [13] ALVAREZ-PELLITERO P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunophylactic prospects[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008, 126(3/4): 171-198.
- [14] LIU K, YIN D, SHU Y, et al. Transcriptome and metabolome analyses of *Coilia nasus* in response to Anisakidae parasite infection[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 87: 235-242.
- [15] 姜敏, 张希昭, 杨彦平, 等. 陈氏刺棘虫感染对洄游型刀鲚肠道微生物群落的影响[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 577-585.
- [16] 侯红红, 苗亮, 李多云, 等. 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)白细胞介素 10(IL-10)基因克隆及溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)侵染后表达变化分析[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(6): 1334-1340.
- [17] 陈孔茂, 唐小千, 绳秀珍, 等. 大菱鲆 mIgD 重链基因的克隆与表达分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(3): 26-33.
- [18] 杜小溪. 斑点叉尾鮰巨噬细胞移动抑制因子(MIF)基因序列克隆及多态性分析[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2014.
- [19] 迟恒. 大西洋鳕鱼 T 细胞分化相关基因及牙鲆组织中 Ig+细胞分布与应答的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [20] 葛辉, 林克冰, 周宸, 等. 10 种免疫相关基因在斜带石斑鱼组织中的表达分析[J]. 渔业研究, 2017, 39(5): 379-385.
- [21] LV Z, GUO M, LI C, et al. Macrophage migration inhibitory factor is involved in inflammation response in pathogen challenged *Apostichopus japonicus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 87: 839-846.
- [22] XU F, SHI Y H, CHEN J. Characterization and immunologic functions of the macrophage migration inhibitory factor from Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 86: 947-955.
- [23] KORYTÁŘ T, WIEGERTJES G F, ZUSKOVÁ E, et al. The kinetics of cellular and humoral immune responses of common carp to presporogonic development of the myxozoan *Sphaerospora molnari*[J]. Parasit Vectors, 2019, 12(1): 208.
- [24] MAO Y, XU B, SU Y Q, et al. Cloning and mRNA expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Acta Oceanol Sin, 2010, 29(3): 63-73.
- [25] QIU R, LI J, XIAO Z Z, et al. Macrophage migration inhibitory factor of *Sciaenops ocellatus* regulates immune cell trafficking and is involved in pathogen-induced immune response[J]. Dev Comp Immunol, 2013, 40(3/4): 232-239.
- [26] ILGOVÁ J, KAVANOVÁ L, MATIAŠKOVÁ K, et al. Effect of cysteine peptidase inhibitor of *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) on cytokine expression of macrophages in vitro[J]. Mol Biochem Parasitol, 2020, 235: 111248.
- [27] PIAZZON M C, ESTENSORO I, CALDUCH-GINER J A, et al. Hints on T cell responses in a fish-parasite model: *Enteromyxum leei* induces differential expression of T cell signature molecules depending on the organ and the infection status[J]. Parasit Vectors, 2018, 11(1): 443.
- [28] XU J, YU Y, HUANG Z, et al. Immunoglobulin (Ig) heavy chain gene locus and immune responses upon parasitic, bacterial and fungal infection in loach, *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 86: 1139-1150.
- [29] YE J, KAATTARI I M, MA C, et al. The teleost humoral immune response[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 35(6): 1719-1728.
- [30] FABRE V, BEITING D P, BLISS S K, et al. Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection[J]. J Immunol, 2009, 182(3): 1577-1583.
- [31] 罗晓东. 广州管圆线虫感染 BALB/c 小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群和血清抗体的变化[D]. 广州: 广州医学院, 2012.
- [32] DEZFULI B S, BOSI G, DEPASQUALE J A, et al. Fish innate immunity against intestinal helminths[J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 50: 274-287.
- [33] RONZA P, BERMÚDEZ R, LOSADA A P, et al. Immunohistochemical detection and gene expression of TNF $\alpha$  in turbot (*Scophthalmus maximus*) enteromyxosis[J]. Fish Shellfish Immunol, 2015, 47(1): 368-376.