

3种壳聚糖对团头鲂体外头肾吞噬细胞呼吸爆发功能的影响

郗明君 刘立春 张涓 汤孝成 刘小玲 林 蟾

华中农业大学水产学院/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心/农业部淡水生物繁育重点实验室,武汉 430070

摘要 采用51% Percoll非连续密度梯度离心法分离团头鲂头肾吞噬细胞,在光镜和电镜下观察所分离细胞的显微、超微结构及吞噬作用;以二氢罗丹明(DHR123)为荧光探针,流式细胞仪检测细胞在佛波豆蔻酸乙酯(PMA)刺激下产生的呼吸爆发活动;光镜下观察壳聚糖对吞噬细胞吞噬功能的影响。结果表明:分离得到的细胞具有吞噬细胞(巨噬细胞与中性粒细胞)的形态学及功能特征;3种壳聚糖组(100 μg/mL)均能提高吞噬细胞的呼吸爆发功能,在发荧光细胞比例及细胞发荧光强度上均极显著高于对照组。其中水溶性壳聚糖组的发荧光细胞比例显著高于其他试验组,而在细胞发荧光强度上,普通壳聚糖作用相对较高;同时壳寡糖能增强吞噬细胞的吞噬活性。

关键词 团头鲂; 吞噬细胞; 呼吸爆发; 壳寡糖; 水溶性壳聚糖; 普通壳聚糖; 吞噬作用

中图分类号 S 942.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)03-0072-06

近年来,随着水产养殖业的发展,养殖规模不断扩大、养殖密度不断增加,养殖过程中疾病的发生越来越频繁,经常发生病毒性、细菌性、寄生虫感染等疾病,而抗生素的使用所带来的负面影响也日益突出,如病原菌耐药性的增强,水产动物细胞免疫和体液免疫功能的下降,同时药物的残留也直接威胁到人类的健康和安全,因此,从免疫学角度对水产动物进行病害防治逐渐成为研究热点。免疫刺激剂是指能够激活机体免疫机能,增强机体对传染性疾病抵抗力的一种物质。其主要作用机制是作用于细胞表面的受体,使细胞产生细胞因子从而将病原清除,以达到增强机体免疫功能的目的^[1]。免疫刺激剂的应用对控制水产养殖中的鱼类疾病具有重要意义^[2]。壳聚糖作为一种免疫刺激剂,是自然界唯一存在的碱性多糖,其在调节哺乳动物体外分离免疫细胞的功能已有报道^[3]。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是一种重要的养殖鱼类,头肾是其重要的免疫器官,头肾吞噬细胞是其非特异性防御系统中的关键部分。当病原生物侵入机体时,吞噬细胞被激活并迁移至炎症

部位,吞噬病原体,并且产生一系列活性氧杀死病原生物。同时其他免疫参数如溶酶体活性、补体活性都得到加强。吞噬活性和呼吸爆发功能被认为是评价活化吞噬细胞功能的重要指标。

目前壳聚糖对鱼类吞噬细胞呼吸爆发功能的体内试验已有报道^[4-6],而壳聚糖对体外分离吞噬细胞的影响还未见报道。本试验采取体外分离团头鲂头肾吞噬细胞,检测3种壳聚糖对吞噬细胞呼吸爆发功能的影响,旨在为研究壳聚糖与吞噬细胞结合的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验鱼:团头鲂(体质量180~270 g,体长20~29 cm)购自武汉市先建村渔场,于华中农业大学水产养殖基地进行驯养,驯养期间水温为25~28 ℃,水源为充分曝气的自来水,溶氧保持在6 mg/L,每日投喂2次(09:00,16:00)。投喂饲料由水产基地提供。

试剂:L-15培养基购自Gibco公司。Percoll分

收稿日期: 2013-03-12

基金项目:中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室开放课题(2010FEA03012)和国家重点基础研究发展计划("973")项目(2009CB118706)

郗明君,硕士研究生。研究方向:水产动物疾病防治。E-mail: xi_ming_jun@126.com

通信作者:刘小玲,博士,副教授。研究方向:水产动物疾病防治。E-mail: liuxl@mail.hzau.edu.cn

离液、PBS(pH 7.4)购自 Amersham 公司。佛波豆蔻酸乙酯(PMA)、二氢罗丹明(DHR123)、Hanks'液购自 Sigma 公司。胎牛血清购自杭州四季青生物公司。壳寡糖(3 ku)、水溶性壳聚糖(100 ku)、普通壳聚糖(<100 ku)购自青岛云宙有限公司。

1.2 样品采集和分析

1)分离头肾。用 MS-222(150 mg/mL)将鱼体麻醉,小心去除其他内脏,留下头肾和体肾,观察头肾的具体形态并分离头肾。

2)头肾吞噬细胞的分离。细胞的分离参照文献[7]的方法,并做了一些改进。将取出的头肾透过0.15 mm 尼龙网,研磨成单细胞悬液。所用单细胞悬液培养液为含 2% 胎牛血清,0.2% 青链双抗,0.1% 肝素的 L-15 培养基。细胞培养液为含 10% 胎牛血清的 L-15 培养基。整个过程均为无菌操作。吞噬细胞的分离采用 51% Percoll 非连续密度梯度离心法,冷冻离心(1 500 r/min,4 ℃)30 min 后收集中间带细胞。Hanks'液洗 3 次,每次离心(1 500 r/min,4 ℃)10 min。一部分细胞在 2.5% 戊二醛中固定,用于头肾吞噬细胞超微结构的观察;另一部分细胞用少量细胞培养液重悬后涂片,瑞士吉姆萨染色后光镜下观察。

3)头肾吞噬细胞超微结构及吞噬作用的观察。戊二醛固定的分离细胞经常规超薄切片处理后在 H-7650 透射电镜下观察并拍照。福尔马林灭活的金黄色葡萄球菌(formalin killed *Staphylococcus aureus*, F-SA)为吞噬原,F-SA 用细胞培养液调整成浓度为 2×10^8 cells/mL 的菌液后备用。分离细胞重悬液与 F-SA 菌液孵育后用 2.5% 戊二醛固定,常规超薄切片处理后电镜下观察并拍照。

4)贴壁头肾吞噬细胞的形态观察。在直径为 35 mm 的培养皿中放入无菌的盖玻片,将分离的细胞悬液滴入培养皿中进行培养,细胞分别培养 3、18 h 时取出盖玻片,Hanks'液漂洗,瑞士吉姆萨染色后光镜下观察并拍照。

5)分离头肾吞噬细胞呼吸爆发的测定。参照文献[8]采用 DHR123 和流式细胞仪(FACS Calibur)测定呼吸爆发。将浓度为 1×10^6 cells/mL 分离细胞 900 μ L 加入 100 μ L PMA 工作液共同孵育 30 min,加入 DHR123 100 μ L 孵育 10 min,并设定对照组,流式细胞仪检测。

6)壳寡糖对吞噬细胞吞噬功能影响的测定。吞

噬功能的测定方法同 3),试验分为对照组与试验组,试验组中添加壳寡糖,孵育 30 min,涂片,瑞士吉姆萨染色后光镜下观察吞噬作用。

7)3 种壳聚糖对吞噬细胞呼吸爆发功能影响的测定。呼吸爆发的测定方法同 5),试验分为 4 组,分为对照组与试验组,试验组中将 5)中的 PMA 分别换为壳寡糖、水溶性壳聚糖、普通壳聚糖,质量浓度均为 100 μ g/mL。

1.3 统计分析

利用 STATISTICA (Version 6.0)统计软件对 PMA 影响吞噬细胞呼吸爆发的试验数据进行方差分析(One-way ANOVA),差异显著性水平为 0.01。对 3 种壳聚糖影响吞噬细胞呼吸爆发的试验数据进行多重比较,差异显著性水平为 0.01。

2 结果与分析

2.1 团头鲂头肾的解剖结构特征

团头鲂头肾位于胸腔内,呈扁平状,左右各一个,红褐色,头肾被膜为一薄层纤维结缔组织。两叶头肾在基部相连,上部被脊柱骨相隔,与腹腔内肾脏组织的最前端相连(图 1)。

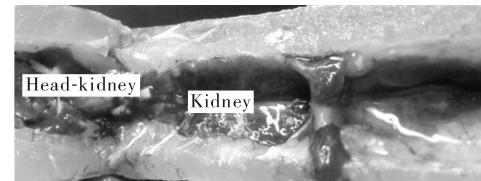
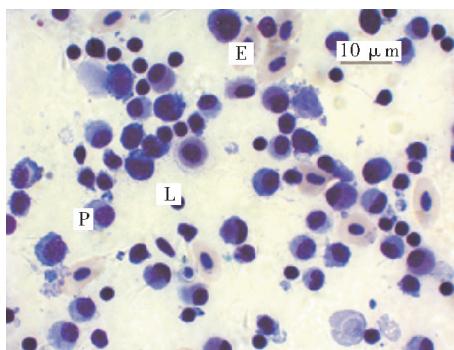


图 1 团头鲂头肾解剖结构

Fig. 1 The dissection structure of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) head-kidney

2.2 头肾吞噬细胞显微与超微结构特征

头肾单细胞悬液主要含有巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞及红细胞(图 2)。头肾单细胞悬液经 Percoll 非连续密度梯度离心后,形成 3 条主带。中间带含约 90% 的吞噬细胞,光镜下观察,主要含有巨噬细胞、中性粒细胞及少量淋巴细胞(图 3)。电镜下显示分离细胞主要有 2 种类型,其中巨噬细胞胞质含有大量溶酶体、空泡以及线粒体、内质网;溶酶体电子密度不一,大小不等,核内异染色质少,主要沿核膜分布。中性粒细胞中含有空泡及特殊颗粒;空泡大小不同,特殊颗粒电子密度不一(图 4)。



L:淋巴细胞 Lymphocyte; E:红细胞 Erythrocyte; P:吞噬细胞 Phagocyte.

图2 团头鲂头肾单细胞悬液细胞涂片的光镜照片

Fig. 2 Light micrograph of smear of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) head-kidney cell suspensions

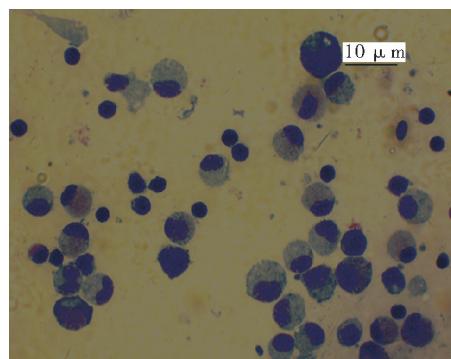


图3 51% Percoll 非连续密度梯度离心分离的团头鲂头肾吞噬细胞涂片的光镜照片

Fig. 3 Light micrograph of smear of Wuchang bream phagocytes

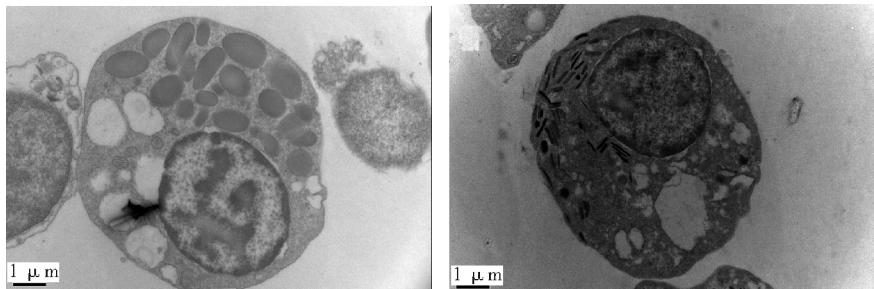


图4 分离吞噬细胞的电镜照片

Fig. 4 Electron micrograph of the separated head kidney phagocytes

2.3 吞噬细胞的贴壁性观察

分离头肾吞噬细胞培养3 h后,贴壁细胞呈圆形,中性粒细胞及淋巴细胞含量很少(图5A)。培养18 h后,贴壁细胞铺展或伸长在培养皿底部(图5B)。

2.4 头肾吞噬细胞的吞噬作用

刚分离得到的吞噬细胞具有很强的吞噬F-SA的能力,油镜下计数吞噬百分比为25.50%±0.58%,吞噬指数为0.910±0.008,其中巨噬细胞和中性粒细胞均具有吞噬活性,电镜下可以观察到

2种细胞内均具有大小不等的吞噬泡,有些吞噬泡中的细菌已经开始变形降解(图6)。

2.5 头肾吞噬细胞的呼吸爆发活动

试验结果发现,对照组中发荧光的细胞比例为4.44%±0.42%,荧光强度为107.12±5.39。而试验组中发荧光的细胞比例为78.57%±0.69%,荧光强度为449.53±3.34。试验组的发荧光细胞比例和细胞荧光强度均极显著高于对照组($P<0.01$)。

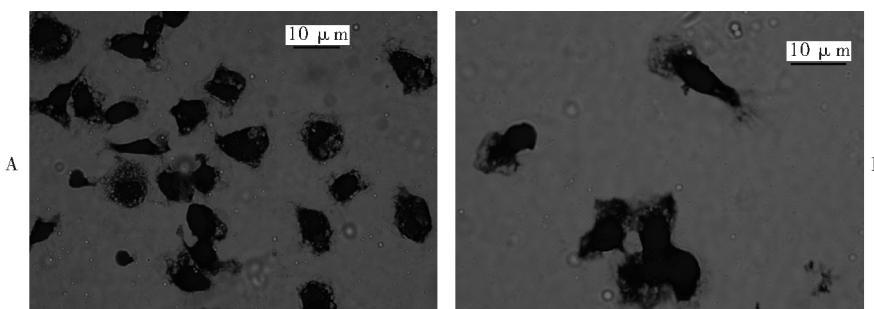


图5 团头鲂头肾吞噬细胞培养3 h(A)、18 h(B)后的贴壁光镜照片

Fig. 5 Light micrograph of the spreading head kidney macrophages after 3 h and 18 h cultivation

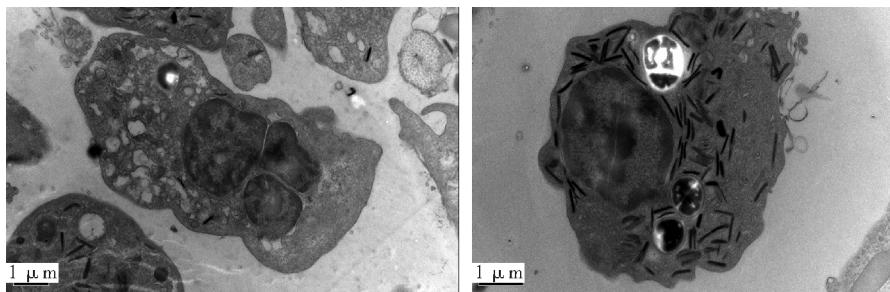


图6 吞噬细菌的团头鲂头肾吞噬细胞的电镜照片

Fig. 6 Electron micrograph of the separated head kidney phagocytes containing phagocytized bacteria

2.6 壳聚糖对头肾吞噬细胞吞噬功能的影响

试验组吞噬细胞吞噬能力显著增加,细胞内吞噬大量的金黄色葡萄球菌,并且细胞发生变形(图7),而对照组吞噬的金黄色葡萄球菌相对较少(图8)。

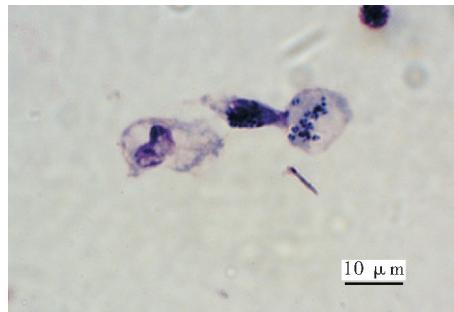


图7 壳聚糖刺激后吞噬细菌的团头鲂头肾吞噬细胞的光镜照片

Fig. 7 Light micrograph of the head kidney phagocytes containing phagocytized bacteria stimulated by chitosan

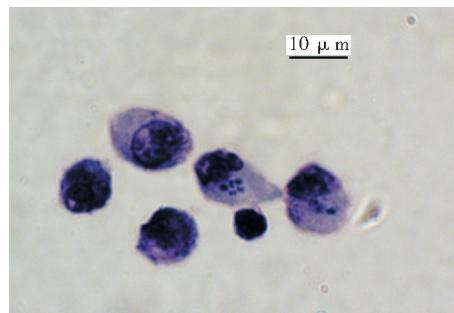


图8 吞噬细菌的团头鲂头肾吞噬细胞的光镜照片

Fig. 8 Light micrograph of the head kidney phagocytes containing phagocytized bacteria

2.7 3种壳聚糖对头肾吞噬细胞呼吸爆发活动的影响

通过流式细胞仪测定结果可知,对照组发荧光的细胞比例为 $3.18\% \pm 0.31\%$,荧光强度为 55.36 ± 1.09 。而试验组壳寡糖刺激后发荧光的细胞比例为

$69.79\% \pm 1.69\%$,荧光强度为 365.32 ± 1.87 ;水溶性壳聚糖刺激后发荧光的细胞比例为 $97.52\% \pm 0.91\%$,荧光强度为 386.73 ± 9.42 ;普通壳聚糖刺激后发荧光的细胞比例为 $56.30\% \pm 1.05\%$,荧光强度为 423.06 ± 7.79 。试验组的发荧光细胞比例和细胞荧光强度均极显著高于对照组($P < 0.01$)。在发荧光的细胞比例中,水溶性壳聚糖极显著高于其他试验组,而在荧光强度上普通壳聚糖有更强的作用。

3 讨 论

硬骨成鱼的肾脏分为头肾和体肾,头肾是鱼类最重要的免疫器官。本试验通过观察团头鲂头肾的解剖结构,发现团头鲂的头肾形态结构与已报道的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、花尾胡椒鲷(*Plectrohinchus cinctus*)等的头肾形态结构相同^[9-10]。

目前,一般用51% Percoll或者2个梯度的非连续密度梯度离心法^[11-12]分离头肾巨噬细胞。本试验采用51% Percoll非连续密度梯度离心法,通过光镜及电镜进行观察,发现分离细胞主要有巨噬细胞和中性粒细胞,其中巨噬细胞胞质中含有大量大小不一的空泡、溶菌酶及内质网,中性粒细胞胞质中含有大小不一、电子密度不同的特殊颗粒。本试验结果与其他鱼头肾中分离的巨噬细胞结果相似^[10,13],表明本试验分离的细胞具有巨噬细胞和中性粒细胞形态学特征。

在对分离得到的吞噬细胞进行短时间的贴壁培养时,发现贴壁细胞铺展在培养皿底部,呈煎鸡蛋状,核偏向细胞的一侧,具有贴壁性。此结果与鲤科鱼类的巨噬细胞短期培养结果相同^[10-11,13],表明本试验分离得到的吞噬细胞具有一定的贴壁性。

吞噬作用及呼吸爆发功能结果显示了头肾吞噬

细胞的功能特点,这两个功能被认为是鱼体在防御疾病时非特异免疫的重要指标。壳聚糖由单体N-乙酰葡萄糖胺组成,早期试验表明乙酰葡萄糖胺与巨噬细胞表面特定受体的结合是增强巨噬细胞功能的先决条件,并且这个受体可能是甘露糖受体^[14-16]。本试验发现壳聚糖能增强吞噬细胞吞噬功能,其作用机制可能与吞噬细胞表面的模式识别受体以及诱导产生的细胞因子有关。

壳聚糖是甲壳素经脱乙酰基的产物,学名为(1,4)-2-氨基-β-D-葡萄糖,其化学结构与其他多糖类物质的结构相似,并且含有带正电荷的氨基,是自然界存在的唯一带正电荷的天然高分子。在壳聚糖对吞噬细胞呼吸爆发影响的测定中,发现试验组的呼吸爆发强度均极显著高于对照组,且水溶性壳聚糖在发荧光细胞比例上极显著高于其他试验组,普通壳聚糖在荧光强度上相对较高。一些研究表明,壳聚糖与巨噬细胞表面模式识别受体的结合与其相对分子质量及水溶性有关^[14-15,17-18]。在壳聚糖诱导人单核细胞产生TNF-α的试验中,发现其诱导TNF-α产生的能力与壳聚糖的水溶性及相对分子质量有关^[17]。还有研究发现,高分子质量的壳聚糖可以诱导巨噬细胞中的IL-1、TNF-α、GM-CSF、NO、IL-6等细胞因子的产生^[19-21]。因此,本试验选取了3种不同分子质量、不同水溶性壳聚糖,水溶性壳聚糖在发荧光细胞比例上极显著高于其他试验组的原因可能是与巨噬细胞表面受体介导的膜蛋白的内吞作用及其水溶性有关。而普通壳聚糖是不溶于水的大颗粒物质,增强呼吸爆发的原因可能与其大的相对分子质量刺激巨噬细胞的吞噬作用从而产生了一些细胞因子有关。

吞噬细胞的呼吸爆发活动是利用活性氧对病原体进行杀伤的作用,同时生成超氧离子(O₂⁻)及其质子化产物过氧化氢(H₂O₂)、羟基自由基(-·OH)等活性氧自由基。但在某些病理状态下,活性氧自由基对机体具有巨大的损伤作用,使组织细胞的化学结构发生破坏性反应,可导致核酸主链、蛋白质肽键的断裂、细胞膜脂质的过氧化及细胞的凋亡^[22]。壳聚糖具备一定的抗氧化能力。蒋煊等^[23]采用电子顺磁共振(ESR)技术检测发现,不同脱乙酰度、不同分子质量的壳聚糖对超氧阴离子自由基和亚油酸脂类自由基具有明显的抑制作用,对亚油酸脂类自由基的抑制率除与壳聚糖的浓度有关外,还随脱乙酰度的增加和分子质量的降低有所增强。

参 考 文 献

- [1] BRICKNELL I, DALMO R A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19: 457-472.
- [2] SAKAI M. Current research status of fish immunostimulants [J]. Aquaculture, 1999, 172: 63-92.
- [3] PELUSO G, PETILLO O, RANIERI M, et al. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function[J]. Biomaterials, 1994, 15: 1215-1220.
- [4] HARIKRISHNAN R, KIM J S, BALASUNDARAM C, et al. Dietary supplementation with chitin and chitosan on haematology and innate immune response in *Epinephelus bruneus* against *Philasterides dicentrarchi*[J]. Experimental Parasitology, 2012, 131: 116-124.
- [5] LIN S, MAO S, GUAN Y, et al. Dietary administration of chitooligosaccharides to enhance growth, innate immune response and disease resistance of *Trachinotus ovatus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32: 909-913.
- [6] LIN S, MAO S, GUAN Y, et al. Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*)[J]. Aquaculture, 2012, 342: 36-41.
- [7] BRAUN-NESJE R, BERTHEUSSEN K, KAPLAN G, et al. Salmonid macrophages: separation, *in vitro* culture and characterization[J]. Journal of Fish Diseases, 1998, 4: 141-151.
- [8] MORITOMO T, SERATA K, TESHIROOGI K, et al. Flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst of ayu, *Plecoglossus altivelis*: comparison with other fresh water fish [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003, 15: 29-38.
- [9] 卢全章.草鱼头肾免疫细胞组成和数量变化[J].动物学研究, 1998, 19(1): 11-16.
- [10] 李长玲,曹伏君,刘楚吾.花尾胡椒鲷脾脏和头肾显微结构的观察[J].海洋通报,2002,21(2): 30-35.
- [11] SØRENSEN K K, SVEINBJØRNSSON B, DALMO R A, et al. Isolation, cultivation and characterization of head kidney macrophages from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. [J]. Journal of Fish Diseases, 1997, 20: 93-107.
- [12] NORUM M, BØGWALD J, DALMO R A. Isolation and characterisation of spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) macrophages[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 18: 381-391.
- [13] WANG R, NEUMANN N F, SHEN Q, et al. Establishment and characterization of a macrophage cell line from the goldfish [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1995, 5: 329-346.
- [14] SHIBATA Y, FOSTER L A, METZGER W J, et al. Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-d-glucosamine, in mice[J]. Infection and Immunity, 1997, 65: 1734-1741.

- [15] FENG J, ZHAO L, YU Q. Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 317: 414-420.
- [16] HAN Y, ZHAO L, YU Z, et al. Role of mannose receptor in oligochitosan-mediated stimulation of macrophage function[J]. International Immunopharmacology, 2005, 5: 1533-1542.
- [17] OTTERLEI M, VARUM K M, RYAN L, et al. Characterization of binding and TNF-alpha-inducing ability of chitosans on monocytes: the involvement of CD14[J]. Vaccine, 1994, 12: 825-832.
- [18] WU G J, TSAI G J. Chitooligosaccharides in combination with interferon-gamma increase nitric oxide production via nuclear factor- κ B activation in murine RAW264.7 macrophages[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(2): 250-258.
- [19] TOKORO A, TATEWAKI N, SUZUKI K, et al. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1988, 36(2): 784-790.
- [20] PELUSO G, PETILLO O, RANIERI M, et al. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function[J]. Biomaterials, 1994, 15: 1215-1220.
- [21] JEONG H J, KOO H N, OH E Y, et al. Nitric oxide production by high molecular weight water-soluble chitosan via nuclear factor- κ B activation[J]. International Journal of Immunopharmacology, 2000, 22: 923-933.
- [22] 印大中, 刘希彬. 自由基伤害衰老理论的严重缺陷[J]. 中国老年学杂志, 2003, 23(2): 123-126.
- [23] 蒋煊, 薛培华, 陈士明, 等. 壳聚糖对超氧阴离子自由基和亚油酸脂类自由基的抑制作用[J]. 科学通报, 2002, 47(3): 182-184.

Effect of three chitosan on respiratory burst activity of head-kidney phagocytes in Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*)

XI Ming-jun LIU Li-chun ZHANG Juan TANG Xiao-cheng LIU Xiao-ling LIN Li

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Hubei collaborative Innovation Center for Freshwater Aquaculture/Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China

Abstract The aim of this study was to investigate the effects of oligochitosan(OCS), water soluble chitosan (WSC) and acid soluble chitosan(ASC) on the respiratory burst activity of head-kidney phagocytes in Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*). The head-kidney phagocytes of Wuchang bream were separated by 51% Percoll gradient and the morphological and ultrastructural features were observed under light and electron microscope. *Staphylococcus aureus* killed by formalin (F-SA) were incubated with phagocytes and observed. PP and PI were counted with Wright Giemsa staining under oil-immersion microscopy. The respiratory burst activity of phagocytes was measured by flow cytometry using dihydrorhodamine 123 (DHR123) as fluorescence probe after stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). The results indicated that the separated cells showed the morphological and functional characteristics of phagocytes. OCS (100 μ g/mL), WSC (100 μ g/mL) and ASC (100 μ g/mL) were all able to stimulate the respiratory burst activity of head-kidney phagocytes after incubation for 30 min. The percentage of fluoresce cell and the fluorescence intensity of fluoresce cell (two parameters of respiratory burst activity) in the experimental group were significantly different ($P<0.01$) from the control group. However, the percentage of fluoresce cell of the phagocytes stimulated by WSC was the highest. But the strongest fluorescence intensity was observed in the phagocytes stimulated by ASC.

Key words Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*); phagocytes; respiratory burst activity; oligochitosan; water-soluble chitosan; acid soluble chitosan; phagocytic activity