

两种多糖作为迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)灭活疫苗佐剂对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的免疫保护效果*

隋虎辰^{1,2} 谢国骝^{2,3} 边慧慧^{2,3} 王秀华² 张晓华¹ 黄 捷²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学 上海 201306)

提要 采用黄芪多糖、葡聚糖作为免疫佐剂,与迟缓爱德华氏菌灭活疫苗配伍后注射免疫大菱鲆,测定免疫 28d 后血清中溶菌酶活力、SOD 活力、抗体效价和各免疫组的相对保护率(RPS)。结果表明,添加多糖免疫佐剂能提高疫苗免疫的大菱鲆的各免疫指标,添加佐剂的免疫组的血清溶菌酶活力、SOD 活力和血清效价比单纯的疫苗免疫组显著提高($P < 0.05$), 2.5mg/ml 黄芪多糖混合疫苗免疫组和 5mg/ml 葡聚糖混合疫苗免疫组的相对保护率最高,分别达(78.7±1.3)%和(64.0±8.9)%,且溶菌酶活力、SOD 活力及血清效价等指标较其他各组有提高。

关键词 迟缓爱德华氏菌, 大菱鲆, 黄芪多糖, 葡聚糖, 疫苗, 佐剂

中图分类号 S941.42

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)引起的鱼类感染症常统称为爱德华氏菌病。该菌宿主十分广泛,且呈世界性分布(陈翠珍等, 2005)。大菱鲆因其较高的经济价值,已成为我国重要的海水养殖品种(马爱军等, 2010),随着密集化养殖的展开,迟缓爱德华氏菌并已成为其养殖中重要病原之一。在鱼类细菌病防治中常采用抗生素,随着抗生素的使用,病原菌耐药性也随之增强,而且药物残留和在环境中的扩散已经引起了食品安全、环境及公共卫生方面的问题。鱼用疫苗使用后不会产生污染,不会在免疫鱼体内形成残留,可以避免环境污染并维持鱼体本身的品质,反复使用也不会产生耐药性,应用前景广阔(曹宏梅等, 2006)。国内外有迟缓爱德华氏菌的灭活疫苗、DNA 疫苗、亚单位疫苗以及减毒活疫苗等研究的报道,由于迟缓爱德华氏菌为胞内寄生菌,其疫苗的免疫效果在不同的报道中表现出较大差异(Castro *et al.*, 2008; Mo *et al.*, 2007; 刘瑞等, 2011)。灭活疫苗具有经

济、安全、稳定等特性,但在作者前期研究的结果中表明对迟缓爱德华氏菌的免疫保护效果较差,这与多数报道相同(王燕等, 2009; Mekuchi *et al.*, 1995),研究人员开始注意到免疫佐剂在提高迟缓爱德华氏菌疫苗免疫保护效果中的作用(Chu, 2006)。

黄芪多糖(Astragalus polysaccharides, APS)是从黄芪根部分离出的多糖组分,是黄芪的主要活性成分之一,具有广泛的免疫增强作用和抗病作用,可作为免疫调节剂使用(高慧等, 2007)。葡聚糖(Glucan)是最早发现的免疫促进剂之一,对水产动物具有较强的免疫调节作用(Brattgjerd *et al.*, 1994)。适量的 β -葡聚糖能够提高水生动物对疾病的抵抗力。可通过增强机体的特异性与非特异性免疫两种方式来提高机体的免疫力(王光花等, 2007)。国内外一些学者从免疫学角度进行水产养殖病害防治研究,通过给水产动物注射或服用多糖等免疫促进剂来提高其特异性和非特异性免疫机能,以提高其抗病能力(Mekuchi *et al.*,

* 国家自然科学基金项目, 31172440 号。隋虎辰, E-mail: suihuchen@163.com

通讯作者: 黄 捷, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2011-12-15, 收修改稿日期: 2012-02-16

1995; Sakai, 1999)。本研究尝试将黄芪多糖或葡聚糖作为迟缓爱德华氏菌灭活疫苗的免疫佐剂, 探讨并比较它们对疫苗免疫效果的影响, 并筛选最佳的佐剂浓度来增强其免疫能力, 旨在解决爱德华氏菌灭活疫苗免疫效果差的问题, 为鱼类爱德华氏菌病防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验用鱼为大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼[(11.4±1.8)g], 2010年10月4日购自山东烟台海阳水产公司, 并运至本实验所在的山东省昌邑市海水养殖实验基地的水泥养殖池中暂养2周, 实验前后移入圆形玻璃钢桶(水体0.7m³)中, 流水养殖, 水温(18±2)°C。每日清污2次, 投喂3次, 每日按鱼体重3%投喂升索牌配合饲料(山东升索渔用饲料研究中心)。

1.2 爱德华氏菌的培养与灭活

迟缓爱德华氏菌株 *Edwardsiella tarda* 1101 由本实验室分离保藏(杨春志等, 2008)。将 *E. tarda* 用 TSB 液体培养基(北京陆桥技术有限责任公司)振荡培养, 离心收集菌液, 无菌 1×PBS (2.67mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O, 7.67mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O, 154mmol/L NaCl; pH 7.2)洗涤3次, 并悬浮, 制成 1×10⁹cfu/ml 菌悬液, 加入福尔马林至 1% (V/V), 于 4°C 过夜, PBS 清洗3次以除去福尔马林, 制成 1×10⁹cfu/ml 灭活疫苗(formalin killed cells, FKC), 4°C 保存。疫苗使用前取 0.1ml 涂布 TSA 平板(北京陆桥技术有限责任公司), 28°C 培养 48h, 观察有无菌落生长。另取 1×10⁸cfu/ml 疫苗腹腔注射 20 尾大菱鲆, 注射剂量为 100μl/尾, 观察 2 周进行疫苗的安全性检验。最终确定疫苗的安全性。

1.3 佐剂

黄芪多糖(西安小草植物科技有限责任公司)和葡聚糖(珠海天添生物工程技术有限公司)分别溶于蒸馏水中, 制备成 20mg/ml 的母液, 于 4°C 保存, 用于配伍疫苗注射免疫大菱鲆。

1.4 分组免疫及采血

对 600 尾健康大菱鲆进行随机分组, 设 PBS 对照

组、灭活疫苗组、黄芪多糖组、不同浓度的黄芪多糖与灭活疫苗配伍组、葡聚糖组和不同浓度的葡聚糖与灭活疫苗配伍组等 10 个实验组(表 1), 每组 20 尾大菱鲆, 设 3 个重复。

各组灭活疫苗终浓度均为 10⁸cfu/ml, 各组多糖的终浓度见表 1, 通过腹腔注射(100μl/尾)接种。免疫后第 4 周, 每组各取 5 尾鱼抽取 0.1ml 尾静脉血, 置于 4°C 静置 12h, 收集血清, 混合同组鱼血清, -20°C 储存备用。

1.5 免疫保护效果测试

1.5.1 迟缓爱德华氏菌半数致死量(LD₅₀)测定 将新鲜培养的菌液(1×10⁹cfu/ml)用 PBS (pH 7.2) 10 倍系列稀释, 分为 7 组。每组大菱鲆 15 尾。分别注射 100μl 的 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²cfu/ml, 实验重复 3 次。实验观察 4 周, 每日记录死亡鱼数。

1.5.2 迟缓爱德华氏菌感染实验 免疫接种 4 周后, 将每个组分别再分为 3 个小组, 每组 15 尾大菱鲆, 每尾按 10LD₅₀ 经腹腔注射迟缓爱德华氏菌。记录感染后 14d 内各组的累积死亡, 并按[1 - (免疫组死亡率/对照组死亡率)]×100% 计算相对免疫保护率(Relative percentage survival, RPS)。

1.6 免疫指标的测定

1.6.1 血清抗体效价测定 参照抗大菱鲆 IgM 的小鼠单克隆抗体(Aquatic Diagnostic Ltd, 英国)使用说明测定血清抗体效价, 每孔加入 100μl 1.0×10⁸ cfu/ml 重悬于包被液中的 *E. tarda* 1101 悬液加盖后 4°C 过夜包被 96 孔酶标板, 然后再向各孔加入 50μl PBS 稀释的 0.05% (V/V)戊二醛, 22°C 静置 20min, 用低盐洗液洗板 3 次; 加入 250μl 1% BSA 封闭, 22°C 静置 2h, 低盐溶液洗板 3 次; 再分别向每孔中加入 100μl 用 PBS 系列稀释的大菱鲆血清, 每个稀释度作 3 个平行, 22°C 静置 3h 后高盐洗液洗板 5 次, 最后一次孵育 5min; 每孔加入 100μl 再生的抗大菱鲆 IgM 单克隆抗体, 22°C 静置 60min 后按前述高盐溶液洗板方法洗板 5 次; 再向每孔中加入 100μl 1:1000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗(天根生化科技有限公司), 22°C 静置

表 1 迟缓爱德华氏菌福尔马林灭活疫苗佐剂测试的大菱鲆实验组
Tab.1 Experimental groups for the adjuvant test for FKC of *E. tarda* with turbot

Group	CN	CV	CA	AV1	AV2	AV3	CG	GV1	GV2	GV3
APS (mg/ml)	—	—	5	2.5	5	10	—	—	—	—
Glucan (mg/ml)	—	—	—	—	—	—	5	2.5	5	10
FKC (cfu/ml)	—	1×10 ⁸	—	1×10 ⁸	1×10 ⁸	1×10 ⁸	—	1×10 ⁸	1×10 ⁸	1×10 ⁸

60 min, 按前述高盐溶液洗板 5 次; 之后每孔加入 100 μ l TMB 溶液, 22 $^{\circ}$ C 显色 10min; 每孔加入 50 μ l 2mol/L H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪在 450nm 处测 OD 值。分析样品(P)和空白对照(N)的 OD 值, 计算 P/N 比值, P/N = 3.0 时样品为阳性, P/N<3.0 时样品为阴性(王秀华等, 2011)。

1.6.2 溶菌酶活力 大菱鲂血清溶菌酶活力参照 Hultmark 等(1980)的方法稍作改进后进行, 溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)(本实验室保藏)用 LB 培养基经 28 $^{\circ}$ C 培养过夜, 离心收集菌体, 以 0.1mol/L 磷酸钾盐缓冲液(pH 6.4)悬浮, 调 OD₅₇₀ 值于 0.3—0.5 之间。取 200 μ l 溶壁微球菌悬液置于 96 孔酶标板孔内, 加入 20 μ l 血清与之混合, 于 570nm 出测其 OD 值(A₀), 将 96 孔酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 温浴 30min, 取出后立即置于冰水浴 10min 以终止反应, 测其 570nm 处的 OD 值(A), 溶菌酶活力(U_L)按(A-A₀)/A 计算。

1.6.3 超氧化物歧化酶活力 参照超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书测定大菱鲂血清超氧化物歧化酶活力, 将试剂盒中的各试剂分别加入测定管和对照管, 测定管吸取 30 μ l 血清加入, 对照管加入等量的蒸馏水, 用旋涡混匀器充分混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 40min 后, 加显色剂 2ml, 混匀, 室温静置 10min 后测 OD₅₅₀ 值。SOD 活力 = (对照管 OD₅₅₀ - 测定管 OD₅₅₀) / 对照管 OD₅₅₀ / 50% \times 反应体系稀释倍数。

2 结果

2.1 大菱鲂 LD₅₀ 计算

根据 *E. tarda* 对大菱鲂 LD₅₀ 剂量测定实验中 4 周内累积死亡鱼数(表 2), 计算得出 *E. tarda* 对大菱鲂 LD₅₀ 剂量为 2.36 \times 10² cfu/g (3 次重复实验结果分别为 2.75 \times 10²、2.1 \times 10²、2.23 \times 10²cfu/g)。濒死大菱鲂腹腔粘液划线接种于 EIM 培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 48h, 均出现绿色半透明菌落, 因此可以认为大菱鲂是 *E. tarda* 感染致死。

2.2 免疫效果评估

大菱鲂在用 10LD₅₀ 迟缓爱德华氏菌感染后的

表 2 *E. tarda* 对大菱鲂 LD₅₀ 死亡记录
Tab.2 Mortalities recorded for LD₅₀ of *E. tarda* in turbot

菌液浓度(cfu/ml)	死亡数		
	1	2	3
10 ⁸	15	15	15
10 ⁷	13	14	14
10 ⁶	11	12	12
10 ⁵	10	10	10
10 ⁴	8	8	7
10 ³	2	2	3
10 ²	0	0	0

14d 内, 无免疫的对照组大菱鲂(CN)的累积死亡率为 (48.6 \pm 4.1)% (图 1), 而仅用爱德华氏菌灭活疫苗免疫的大菱鲂(CV)的累积死亡率达(39.6 \pm 3.4)%, 单纯的灭活疫苗的免疫保护率仅为(18.5 \pm 7.0)% (表 3)。采用 2.5mg/L、5mg/L 和 10mg/L 的黄芪多糖作为爱德华氏菌灭活疫苗的免疫佐剂时, 各组的死亡率显著低于未免疫的对照组(CN)和单纯用爱德华氏菌灭活疫苗的免疫组(CV) (P <0.05), 各组相对保护率(RPS)分别达到(78.7 \pm 1.3)% (AV1)、(75.7 \pm 6.4)% (AV2)和(48.6 \pm 10.3)% (AV3)。但值得注意的是, 单纯用 5mg/L 黄芪多糖注射大菱鲂(CA), 其免疫保护率也达到了 70.9%; 同时, 高浓度的黄芪多糖(10mg/L)与灭活疫苗疫苗配伍(AV3)的免疫保护率出现显著下降(P <0.05)。采用 2.5mg/L、5mg/L 和 10mg/L 的葡聚糖作为爱德华氏菌灭活疫苗的免疫佐剂时, 各组死亡率显著低于未免疫的对照组(CN)和单纯用爱德华氏菌灭活疫苗的免疫组(CV) (P <0.05), 各组相对保护率(RPS)分别达到

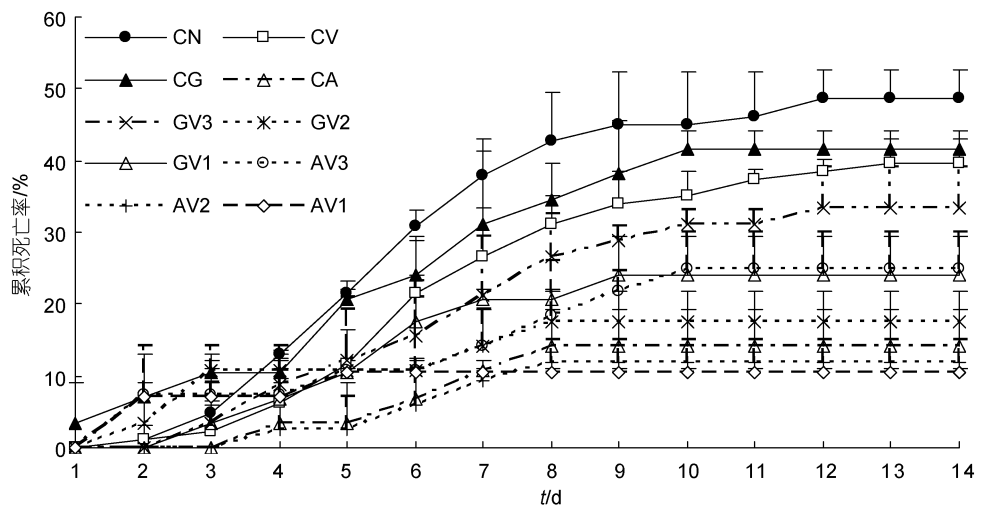


图 1 免疫 28d 后攻毒实验中各组大菱鲂平均累积死亡率

Fig.1 Average cumulative mortalities in turbot challenged i.p. with *E. tarda* 28 days post-vaccination in each group

表 3 应用黄芪多糖为免疫佐剂各组死亡率和相对保护率
Tab.3 Mortality and relative percentage survival in groups of applied APS as adjuvant

组别	死亡率(%)	RPS(%)
CN	48.6±4.1 ^a	—
CV	39.6±3.4 ^b	18.5±7.0 ^c
CA	10.4±0.6 ^d	70.9±10.7 ^a
AV1	11.8±3.1 ^d	78.7±1.3 ^a
AV2	25.0±5.0 ^c	75.7±6.4 ^a
AV3	14.2±5.2 ^d	48.6±10.3 ^b

注: 同一列中不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

(50.5±10.8)% (GV1)、(64.0±8.9)% (GV2) 和 (31.4±11.9)% (GV3)。单纯用 5mg/L 葡聚糖注射大菱鲆(CG), 其免疫保护率仅为 14.7%, 免疫保护效果极低。高浓度的葡聚糖(10mg/L)与灭活疫苗配伍(GV3)的免疫保护率出现显著下降(P<0.05), 较低浓度的葡聚糖(2.5mg/L)与灭活疫苗配伍(GV1)的免疫保护率也有下降, 但不显著(P>0.05)。

2.3 多糖佐剂及爱德华氏菌灭活疫苗对大菱鲆血清抗体效价的影响

采用抗大菱鲆 IgM 的单克隆抗体对免疫 28d 大菱鲆血清进行抗体效价分析结果(图 2)表明, 爱德华氏菌灭活疫苗采用 2.5mg/ml 黄芪多糖(AV1)或 5mg 葡聚糖(GV2)作为佐剂进行免疫使大菱鲆获得了最高的血清抗体效价, 分别达到 853±105 和 683±125, 分别是未免疫的对照组(CN)的 8 倍和 6.4 倍, 而无佐剂的爱德华氏菌灭活疫苗免疫的大菱鲆(CV)的血清抗体效价仅为 171±74, 血清抗体效价的高低与免疫保护率的结果有较好的对应关系。

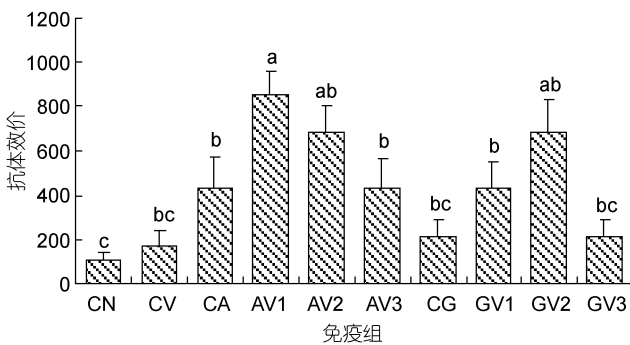


图 2 大菱鲆经 28d 免疫的血清 IgM 效价

Fig.2 The IgM titer in the serum of turbot after 28d post-immunization

注: CN 为 PBS 对照组; CV 为灭活疫苗组; CA 为 5mg/ml 黄芪多糖组; AV1 为 2.5mg/ml 黄芪多糖+灭活疫苗; AV2 为 5mg/ml 黄芪多糖+灭活疫苗; AV3 为 10mg/ml 黄芪多糖+灭活疫苗; CG 为 5mg/ml 葡聚糖组; GV1 为 2.5mg/ml 葡聚糖+灭活疫苗; GV2 为 5mg/ml 葡聚糖+灭活疫苗; GV3 为 10mg/ml 葡聚糖+灭活疫苗

2.4 多糖佐剂及爱德华氏菌灭活疫苗对大菱鲆血清溶菌酶活力的影响

大菱鲆经多糖佐剂和爱德华氏菌灭活疫苗免疫 28d 后, 与未经免疫的对照组(CN)相比, 血清溶菌酶活力均得以显著提高(图 3)。2.5、5 和 10mg/ml 黄芪多糖与爱德华氏菌灭活疫苗配伍的各组大菱鲆血清的溶菌酶活力与单纯用爱德华氏菌灭活疫苗免疫的大菱鲆(CV)血清的溶菌酶活力相比分别高出 110.5% (AV1)、84.2% (AV2)和 58.4% (AV3), 2.5mg/ml 黄芪多糖与爱德华氏菌灭活疫苗混合免疫组(AV1)的血清溶菌酶活力最高, 达到 22.8U/ml。2.5mg/ml、5mg/ml 和 10mg/ml 葡聚糖与爱德华氏菌灭活疫苗混合免疫的各组大菱鲆血清溶菌酶活力与单纯用爱德华氏菌灭活疫苗免疫的大菱鲆(CV)血清的溶菌酶活力相比分别高出 65.9% (GV1)、143.4% (GV2)和 41.4% (GV3), 其中 5mg/ml 葡聚糖与爱德华氏菌灭活疫苗混合免疫组(GV2)的血清溶菌酶活力最高, 达到 26.8U/ml。

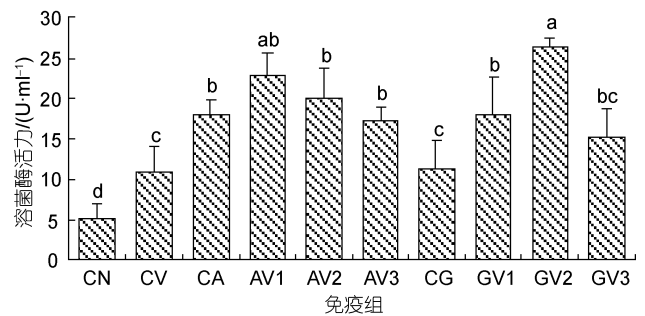


图 3 大菱鲆经 28d 免疫的血清溶菌酶活力

Fig.3 Lysozyme activity in the serum of turbot after 28d post-immunization

2.5 多糖佐剂及爱德华氏菌灭活疫苗对大菱鲆血清超氧化物歧化酶活力的影响

免疫 28d 后的大菱鲆血清中超氧化物歧化酶(SOD)活力分析也显示出受多糖佐剂及爱德华氏菌灭活疫苗的影响(图 4)。SOD 活性在未免疫对照组(CN)血清中的活力达(57.5±2.9)U/ml; 与之相比, 单纯灭活疫苗免疫组(CV)、5mg/ml 黄芪多糖免疫组(CA)和 5mg/ml 葡聚糖免疫组(CG)大菱鲆血清的 SOD 活力分别高出 22.9%、48.7%和 34.3%。而 2.5mg/ml (AV1)、5mg/ml (AV2)和 10mg/ml (AV3)黄芪多糖与灭活疫苗共同作用的各组大菱鲆血清 SOD 活力比单纯灭活疫苗免疫组(CV)高出 40.0%、32.0%和 25.5%。相应的葡聚糖与灭活疫苗共同免疫各组大菱鲆血清 SOD 活力依次高出 31.8%、34.9%和 24.8%。

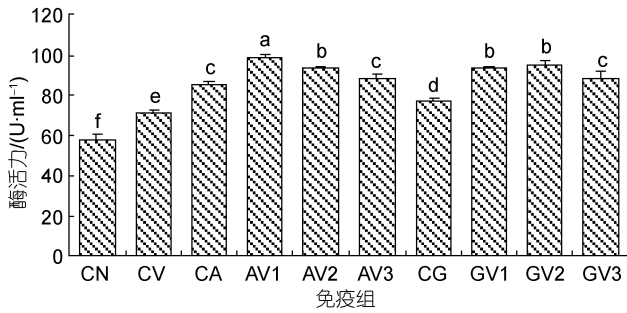


图 4 大菱鲂经 28d 免疫的血清超氧化物歧化酶活力

Fig.4 Superoxide dismutase activity in the serum of turbot after 28d post-immunization

2.6 大菱鲂血清免疫因子活性与相对保护率的相关性分析

本实验中测定了抗体效价、溶菌酶活力和 SOD 活力等免疫指标, 通过采用 SPSS 16.0 对三项免疫指标与 RPS 相关性进行偏相关分析, 结果表明, 所有实验组的 RPS 与抗体效价、溶菌酶活力、SOD 活力相关性系数分别为 0.694、0.060、0.172; RPS 与抗体效价相关性最大, 说明特异性保护作用是免疫保护效果的主要贡献因素。将疫苗与两种多糖佐剂的各免疫组的三项指标与 RPS 分别进行偏相关性分析, 得出黄芪多糖组的相关性系数分别为 0.792、0.498、0.373; 而葡聚糖组则为 0.821、0.204、0.399 (图 5); 两组数据的抗体滴度与 RPS 的相关性均比 SOD 活力和溶菌酶活力这两种非特异性免疫指标高得多。黄芪多糖与灭活疫苗联用所产生的相对免疫保护率虽比葡聚糖与灭活疫苗联用所产生的相对免疫保护率高(表 3 和表 4), 但葡聚糖作为佐剂对爱德华氏菌灭活疫苗的特异性免疫的激发作用比黄芪多糖作为佐剂略高。而在溶菌酶活力这一非特异性免疫指标上, 黄芪多糖组的溶菌酶活力与 RPS 相关性明显大于葡聚糖组。

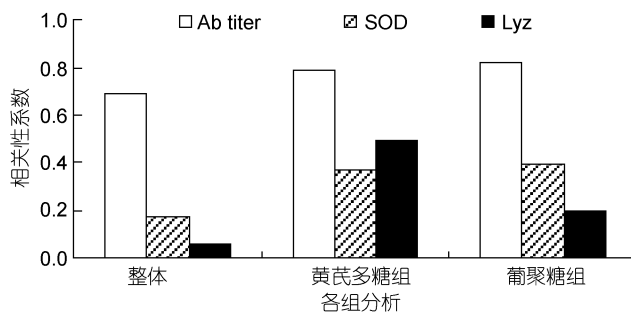


图 5 免疫指标与 RPS 相关性分析

Fig.5 Correlation analysis between the immune factors and the RPS

表 4 应用葡聚糖为免疫佐剂各组死亡率 and 相对保护率
Tab.4 Mortality and relative percentage survival in groups of applied glucan as adjuvant

组别	死亡率(%)	RPS(%)
CN	48.6±4.1 ^a	—
CV	39.6±3.4 ^b	18.5±7.0 ^{bc}
CG	41.5±2.6 ^{ab}	14.7±5.3 ^c
GV1	24.1±5.2 ^c	50.5±10.8 ^a
GV2	17.5±4.3 ^c	64.0±8.9 ^a
GV3	33.3±5.8 ^b	31.4±11.9 ^b

注: 同一列中不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

3 讨论

鱼类虽是低等脊椎动物, 但其免疫系统已经具备较完备的适应性免疫机制, 能对外源抗原产生特异性免疫应答, 因此疫苗注射能成为鱼类抗感染免疫的有效途径。但由于迟缓爱德华氏菌能够侵入细胞并在其内繁殖(Srinivasa Rao *et al*, 2003), 能够破坏宿主免疫系统致病(Sahoo *et al*, 2000)并抵抗血清中吞噬细胞等的杀伤作用(Han *et al*, 2006), 迟缓爱德华氏菌灭活疫苗往往得不到理想的免疫效果, 在本实验室在前期研究中就观察到这种现象, 本研究采用单纯的迟缓爱德华氏菌灭活疫苗进行免疫时, 其免疫保护率仅为 18.5%, 印证了前述研究的结果。针对迟缓爱德华氏菌疫苗技术的这一问题, 国内外研究者相应开展了迟缓爱德华氏菌的减毒活疫苗、DNA 疫苗、亚单位疫苗、菌蛻等研究。灭活疫苗由于其具有经济、安全、技术成熟、研发周期短等无可比拟的优点, 解决迟缓爱德华氏菌灭活疫苗免疫效果差的问题仍具有重要的实际意义。佐剂作为促进机体非特异性免疫并增强疫苗免疫效果的重要制剂, 在鱼类疫苗的研发中得到了许多应用, 张吉红等(2003)应用 IMS1312 来增强对嗜水性气单胞菌疫苗免疫保护作用, 而在爱德华氏菌疫苗研发中, Castro 等(2008)应用 Montanide ISA 763 AVG 配伍迟缓爱德华氏菌灭活疫苗使免疫保护效果有显著提高。

溶菌酶是吞噬细胞杀菌的物质基础, 是动物机体许多组织重要的非特异性免疫因子。在动物免疫研究中, 血清溶菌酶活力是衡量动物体非特异性免疫力的一个重要量化指标。作为活性氧自由基清除剂, SOD 在延缓机体衰老及防止生物大分子损伤方面具有极重要的作用。有研究发现 SOD 活性与生物的免疫功能水平密切相关, 已应用于评价免疫刺激剂对

机体非特异性免疫力的影响(Campa-Cordova *et al.*, 2002)。Muona 等(1992)认为在一定程度上,血清中溶菌酶活性的变化与其循环系统中白细胞的数量变化呈正相关,超氧化物歧化酶在生物体内起到清除活性氧自由基的作用,可以增强吞噬细胞的吞噬能力和促进免疫蛋白的产生。在本研究中,添加葡聚糖组较添加黄芪多糖组溶菌酶活力高,但是免疫保护效果较低,可能说明迟缓爱德华氏菌病原清除不能完全靠体液免疫进行。添加两种佐剂的组分 SOD 活力均有不同程度提升,保护效果较好的免疫组中均高于其他免疫组。从抗体效价结果中看出添加相同佐剂各组分之间差异不明显,这可能与 *E. tarda* 为胞内寄生菌,不能有效刺激宿主产生抗体有关。

黄芪多糖可促进抗体的合成,增强体液免疫,促进未成熟 T 细胞转化并提高其活性,刺激 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的功能,显著提高机体的非特异性免疫功能(高慧等, 2007),可清除侵入细胞内的病原。在疫苗中添加黄芪多糖免疫效果均强于灭活疫苗免疫组,且血清中溶菌酶、SOD 活力均高于灭活疫苗组,血清抗体效价也较疫苗免疫组要高,说明黄芪多糖是一种高效的免疫佐剂。这与胡兵等(2008)在黄芪多糖对异育银鲫非特异性免疫的影响中结论相同。在没有疫苗的情况下,黄芪多糖单独注射免疫大菱鲂仍有较高的免疫保护效果,达到 70.9%,说明黄芪多糖对大菱鲂来说有很强的非特异性免疫增强剂的作用,从相关性分析结果来看,黄芪多糖组之所以能获得更好的相对免疫保护率,是因为它的溶菌酶活力与 RPS 相关性较高且明显大于葡聚糖组,说明黄芪多糖比葡聚糖能激发更多抵抗细菌感染的非特异性免疫指标,推测可能在感染初期,黄芪多糖组的受免鱼由于溶菌酶的作用,先一步对病原起作用,然后再通过特异性免疫反应清除病原,同时也可说明黄芪多糖对非特异性免疫作用较大,可以说明在不添加疫苗作用下黄芪多糖有较高保护率的原因;研究表明,葡聚糖能够活化巨噬细胞等,进而能提高白细胞素、细胞分裂素以及特异性抗体的含量,从而全面刺激机体的免疫系统,有效调节机体免疫机能(Misra *et al.*, 2006)。由本研究中可知,添加葡聚糖能提高血清溶菌酶、SOD 活性。从相关性分析结果(图 5)来看,葡聚糖效价相关性系数较高,说明葡聚糖可以有效增强机体对疫苗的特异性应答,非特异性指标低可以说明在不添加疫苗下保护率较低的原因。葡聚糖作为佐剂对爱德华氏菌灭活疫苗的特异性免疫的激发作用比黄芪多糖作为佐剂略高,可以说明葡聚糖作为佐

剂能够较高提高 RPS 的原因。另外,与黄芪多糖不同的是,在疫苗中添加葡聚糖的免疫效果与剂量有关,从表 7 可看出免疫效果在添加 5mg/ml 葡聚糖时最佳,高于或低于这个浓度都会影响免疫效果。这一点与 Ai 等(2007)的研究结果相同。

两种多糖作为佐剂免疫大菱鲂的抗体滴度与 RPS 的相关性均比 SOD 活力和溶菌酶活力这两种非特异性免疫指标高的多,说明这两组的免疫保护主要仍来自特异性免疫。虽然黄芪多糖与灭活疫苗联用所产生的相对免疫保护率比葡聚糖与灭活疫苗联用所产生的相对免疫保护率高(表 3 和表 4),但葡聚糖作为佐剂对爱德华氏菌灭活疫苗的特异性免疫的激发作用比黄芪多糖作为佐剂略高。在迟缓爱德华氏灭活疫苗中添加黄芪多糖、葡聚糖为佐剂时均会高效增强其免疫效果。通过相关性分析可以得出,葡聚糖仅可以通过做为免疫佐剂来提高机体的免疫应答能力,而黄芪多糖可以作为免疫增强剂来研究,通过黄芪多糖自身作用来提高机体非特异性免疫作用来提高机体免疫能力。

参 考 文 献

- 马爱军,王新安,薛宝贵等,2010.大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)选育家系的构建和培育技术研究.海洋与湖沼,41(3):301—306
- 王燕,张晓华,吕俊超等,2009.养殖大菱鲂病原菌迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及其疫苗研制.中国水产科学,16(3):394—403
- 王光花,周小秋,2007.葡聚糖与水生动物免疫功能的关系.中国饲料,(1):29—31
- 王秀华,周凌云,王玉娟等,2011.多效价载体疫苗免疫大菱鲂效果评价.中国水产科学,18(4):918—923
- 刘瑞,赵明君,杨慧等,2011.副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)*tdh2*基因和鳃弧菌(*V. anguillarum*)*ompU*基因二联 DNA 疫苗制备及其对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)免疫保护作用.海洋与湖沼,42(4):580—586
- 杨春志,王秀华,黄捷,2008.养殖大菱鲂迟缓爱德华氏菌的分离鉴定与系统发育分析.上海水产大学学报,17(3):280—284
- 张吉红,陆承平,2003.佐剂对嗜水气单胞菌灭活疫苗免疫效果的作用.中国兽药杂志,37(4):26—27
- 陈翠珍,房海,张晓君等,2005.牙鲆与大菱鲂病原迟缓爱德华氏菌生物学特性及系统发育学分析.高技术通讯,15(10):83—88
- 胡兵,刘军,侯永清等,2008.黄芪多糖对异育银鲫非特异性免疫力的影响.水利渔业,28(3):108—111
- 高慧,韩森,叶凤兰等,2007.黄芪多糖的免疫学研究进展.饲料研究,(6):35—36
- 曹宏梅,李健,战文斌,2006.鳃弧菌和溶藻弧菌二联疫苗对大菱鲂的免疫效果.中国水产科学,13(3):397—402

- Ai Q, Mai K, Zhang L *et al*, 2007. Effects of dietary beta-1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22(4): 394—402
- Brattgjerd S, Evensen O, Lauve A, 1994. Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophages in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., as evaluated by in vitro hydrogen peroxide production and phagocytic capacity. *Immunology*, 83(2): 288—294
- Campa-Cordova A I, Hernandez-Saavedra N Y, Ascencio F, 2002. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 133(4): 557—565
- Castro N, Toranzo A E, Nunez S *et al*, 2008. Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(3): 208—212
- Chu W-H, 2006. Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 21(1): 113—117
- Han H-J, Kim D-H, Lee D-C *et al*, 2006. Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 29: 601—609
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T *et al*, 1980. Insect immunity purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*, 106(1): 7—16
- Mekuchi T, Kiyokawa T, Honda K *et al*, 1995. Vaccination trials in the Japanese flounder against edwardsiellosis. *Fish Pathology*, 4(30): 251—256
- Misra C K, Das B K, Mukherjee S C *et al*, 2006. Effect of multiple injections of beta-glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(3): 305—319
- Mo Z L, Xiao P, Mao Y X *et al*, 2007. Construction and characterization of a live, attenuated *esrB* mutant of *Edwardsiella tarda* and its potential as a vaccine against the haemorrhagic septicaemia in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 23(3): 521—530
- Muona M, Soivio A, 1992. Changes in plasma lysozyme and blood leucocyte levels of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta* L.) during parr-smolt transformation. *Aquaculture*, 106(1): 75—87
- Sahoo P K, Swain P, Sahoo S K *et al*, 2000. Pathology caused by the bacterium *Edwardsiella tarda* in *Anabas testudineus* (Bloch). *Asian Fisheries Science*, 13: 357—362
- Sakai M, 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1): 63—92
- Srinivasa Rao P S, Yamada Y, Leung K Y, 2003. A major catalase (KatB) that is required for resistance to H₂O₂ and phagocyte-mediated killing in *Edwardsiella tarda*. *Microbiology*, 149(9): 2635—2644

THE IMMUNE PROTECTION EFFECTS OF TWO POLYSACCHARIDES AS THE ADJUVANTS OF INACTIVATED *EDWARDSIELLA TARDA* VACCINE IN TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*

SUI Hu-Chen^{1,2}, XIE Guo-Si^{2,3}, BIAN Hui-Hui^{2,3}, WANG Xiu-Hua², ZHANG Xiao-Hua¹, HUANG Jie²
(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao, 266003; 2. Laboratory of Maricultural Organism Disease Control and Molecular Pathology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071; 3. Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306)

Abstract The immune protection effects of two polysaccharides as the adjuvants of inactivated *Edwardsiella tarda* vaccine in turbot were studied in this research. The vaccines were prepared with two polysaccharides, astragalus polysaccharides (APS) and glucan (Glu) were added to the inactivated *E. tarda* vaccine separately. Turbots *Scophthalmus maximus* were inoculated by intraperitoneal (i.p.) injection. The lysozyme activity (Lyz), superoxide dismutase activity (SOD), and antibody titer in the sera were determined after 28 day post-vaccination; meanwhile, the relative percentage survival (RPS) in each group was compared. The results indicated that the addition of polysaccharide adjuvants in the inactivated vaccine could enhance the immune functions to the vaccinated turbot. The Lyz, SOD, and the antibody titer in the sera of the turbot inoculated with the mixtures of inactivated vaccine and each polysaccharide adjuvant were significantly increased ($P < 0.05$). The RPS in the vaccination group with the mixture of inactivated vaccine and 2.5mg/ml APS and the vaccination group with the mixture of inactivated vaccine and 5mg/ml Glu have reached to the best protection effects at $(78.7 \pm 1.3)\%$ and $(64.0 \pm 8.9)\%$, respectively. The SOD, Lyz, and the antibody titer in the best RPS groups with the two polysaccharides also reached higher levels than those in the other groups did.

Key words *Scophthalmus maximus*, *Edwardsiella tarda*, Astragalus polysaccharides, Glucan, Vaccine, Adjuvant