

# $\gamma$ -干扰素对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)在青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)巨噬细胞胞内存活的影响\*

林桂芳<sup>1</sup> 陈文博<sup>1</sup> 苏永全<sup>2</sup> 覃映雪<sup>1</sup> 徐晓津<sup>1</sup>  
马 英<sup>1</sup> 鄢庆枇<sup>1</sup>

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 厦门大学海洋与环境学院 厦门 361005)

**提要** 采用大肠杆菌重组 $\gamma$ -干扰素(rIFN- $\gamma$ )单独和联合处理青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)头肾巨噬细胞的方法,进行了重组 $\gamma$ -干扰素对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)在巨噬细胞内存活研究。结果表明,溶藻弧菌感染巨噬细胞后暴露于 $\gamma$ -干扰素的细胞内细菌存活数量[(1380  $\pm$  80)CFU/mL]明显降低。然而,在 24h,  $\gamma$ -干扰素及脂多糖联合处理组巨噬细胞内溶藻弧菌的存活数量[(463  $\pm$  32)CFU/mL]比暴露于含有或者不含有脂多糖, N<sup>G</sup>-单甲基-L-精氨酸(NMMA)和过氧化氢酶的 $\gamma$ -干扰素处理组少。采用 $\gamma$ -干扰素,  $\gamma$ -干扰素和脂多糖,  $\gamma$ -干扰素、脂多糖和 NMMA,  $\gamma$ -干扰素、脂多糖和过氧化氢酶四种方式处理 24h 能提高巨噬细胞过氧化氢的释放,而不能提高 NO<sub>2</sub>的产物。另外,经过 $\gamma$ -干扰素处理能够明显降低巨噬细胞对溶藻弧菌的吞噬作用,但不影响对溶藻弧菌的杀伤作用。本文数据表明,过氧化氢的释放和细胞吞噬作用能明显减少溶藻弧菌在巨噬细胞内存活的数量。

**关键词** 溶藻弧菌;  $\gamma$ -干扰素; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>产物; 吞噬作用

**中图分类号** S432.1

由于石斑鱼具有生长迅速,饲料利用率高和市场价值高等优点,因此在中国南方和东南亚是一种普遍的商业养殖鱼类(覃映雪等,2004)。近年来,随着石斑鱼集约化养殖的加速发展,传染性鱼病,特别是弧菌、病毒和寄生虫病频发,造成了巨大的经济损失。其中,溶藻弧菌也对石斑鱼的海上养殖造成严重影响(Zhou *et al.*, 2002; 鄢庆枇等,2006)。

巨噬细胞在特异以及非特异性免疫反应中发挥着重要作用,主要功能有抗原呈递功能,吞噬及杀死病原菌,分泌细胞因子以及产生非特异性体液防御组分(McCarthy *et al.*, 2008)。由于巨噬细胞是病原菌在侵入宿主后很可能首先遇到的一种细胞类型以及它的重要作用是在免疫反应中作为一种效应细胞,因此,某些病原菌已经适应在巨噬细胞内存活并将其作为生活史的一部分,免受其它的细胞介导和体

液免疫反应的伤害(Kaufmann, 1993)。

胞内存活是一种重要的毒力因子(De Herdt *et al.*, 1995)。很多鱼类病原体,如分支杆菌属(Chen *et al.*, 1998)、鱼立克次氏体(McCarthy *et al.*, 2008)以及耶尔森氏菌属(Ryckaert *et al.*, 2010)等被报道能够抵御巨噬细胞的杀伤作用。由于病原体能够在吞噬细胞内存活,如链球菌能够利用这些细胞在宿主体内自由出入的特性,从病灶部位转移到其它部位进而引起系统性感染(Medina *et al.*, 2003)。

研究表明,活体或者体外的 $\gamma$ -干扰素是一种有效的巨噬细胞激活因子(Black *et al.*, 1987),它能够抑制多种原生动物的胞内繁殖,提高分泌活性氧中间体(ROI)和活性氮中间体(RNI)的能力,并在二次刺激能够杀死肿瘤,如:内毒素(Suzuki *et al.*, 1988)。在 $\gamma$ -干扰素或 $\gamma$ -干扰素与脂多糖(LPS)联合,或 $\gamma$ -干扰素与肿

\* 公益性行业(农业)科研专项, 200903029 号; 国家自然科学基金项目, 31272699 号; 福建省杰出青年基金项目资助, 2011J06014 号; 厦门市科技计划项目, 2012S0486 号; 厦门市海洋与渔业局科技项目, 201309050001 号。林桂芳, 硕士研究生, E-mail: 824494371@qq.com

通讯作者: 鄢庆枇, 教授, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

收稿日期: 2013-02-18, 收修改稿日期: 2013-04-30

瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )的联合作用下,能够激活小鼠巨噬细胞产生一氧化氮杀死或抑制分支杆菌(Flesch *et al.*, 1991)。暴露于 $\gamma$ -干扰素的巨噬细胞能够有效将李斯特菌限制在吞噬体中及阻止其在细胞内繁殖(Scorneaux *et al.*, 1996)。重组体牛 $\gamma$ -干扰素激活分支杆菌感染单核细胞释放一氧化氮,只能适度增加单核细胞抗分支杆菌的活力(Zhao *et al.*, 1997)。尽管内源性 $\gamma$ -干扰素能够抵御多种细胞内病原体,但对肺炎球菌却没有抵御能力(Rijneveld *et al.*, 2002)。重组 $\gamma$ -干扰素能够降低胞内细菌的存活,但在细菌感染宿主后作用却不大(Kolodziej *et al.*, 2008)。然而事实上,巨噬细胞在 T 细胞上清、细菌脂多糖或 T 细胞上清和细菌脂多糖的激活下并不能有效控制感染,反而提高了牛分支杆菌的胞内存活。脂多糖激活巨噬细胞分泌炎症细胞因子及生成活性氧和氮(Von Knethen *et al.*, 2001)。目前,溶藻弧菌在石斑鱼头肾巨噬细胞内存活及 $\gamma$ -干扰素对溶藻弧菌胞内存活的影响还未见过报道。本文研究了 $\gamma$ -干扰素对溶藻弧菌在青石斑鱼头肾巨噬细胞内存活的影响,以便增进对溶藻弧菌在鱼类吞噬细胞内存活特性的了解。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和培养条件

溶藻弧菌保存于本实验的 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。溶藻弧菌于 $28^{\circ}\text{C}$ 含2%的牛肉膏蛋白胨培养基上培养。培养18h后,收集菌体并重悬于磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4),用酶标仪在550nm处将菌悬液浓度调至 $2 \times 10^8$ CFU/mL。

### 1.2 头肾巨噬细胞的收集

头肾巨噬细胞的分离参照 Bayne(1986)的方法,并稍作修改。在超净台内剖取青石斑鱼的头肾,并置于盛有2mL含有100IU/mL双抗链霉素和青霉素(S/P)和2%胎牛血清的L-15培养基(Biological Industries, Israel)的离心管中,用剪刀剪碎头肾,挤着通过100目的尼龙网。细胞悬液缓慢加到34%/51%不连续的Percoll(Amersham Pharmacia Biotech, UK)分离液上,在 $4^{\circ}\text{C}$ , $400 \times g$ 离心30min。收集34%/51%接触面的细胞带,并在 $4^{\circ}\text{C}$ , $400 \times g$ 离心10min的条件下用L-15培养基清洗细胞两次。用台盼蓝染色法检测细胞活性,用血细胞计数器计数,并用含10%胎牛血清的L-15调整细胞的浓度为 $2 \times 10^6$ 个/mL,接种至六孔板中。

### 1.3 药物对溶藻弧菌胞内存活的影响

头肾巨噬细胞于细胞培养液L-15(10 IU/mL肝

素钠,100IU/mL双抗S/P,10%胎牛血清)中培养2h。溶藻弧菌在 $28^{\circ}\text{C}$ 及5% $\text{CO}_2$ 条件下感染巨噬细胞30min(感染复数100:1)。在 $28^{\circ}\text{C}$ 用3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素作用20min杀死胞外菌,随后加入新鲜L-15培养液(10 IU/mL肝素钠,100IU/mL双抗S/P,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素,10%胎牛血清)。孔板在 $28^{\circ}\text{C}$ 孵育2h,之后加入1000U/mL重组 $\gamma$ -干扰素或250 $\mu\text{g}/\text{mL}$  NMMA,1mg/mL过氧化氢酶。

另外,作者研究溶藻弧菌在药物联合作用下的胞内存活情况。溶藻弧菌在 $28^{\circ}\text{C}$ 及5% $\text{CO}_2$ 条件下感染巨噬细胞30min(感染复数100:1)。在 $28^{\circ}\text{C}$ 用3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素作用20min杀死胞外菌,随后加入新鲜L-15培养液(10IU/mL肝素钠,100IU/mL双抗S/P,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素,10%胎牛血清)。孔板在 $28^{\circ}\text{C}$ 孵育2h,细菌感染之后加入1000U/mL重组 $\gamma$ -干扰素或1000U/mL重组 $\gamma$ -干扰素和250 $\mu\text{g}/\text{mL}$  NMMA或1000U/mL重组 $\gamma$ -干扰素和1mg/mL过氧化氢酶。脂多糖(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )在溶藻弧菌感染巨噬细胞前加入,且细菌感染后24h内,药品持续存在于细胞培养液中。

### 1.4 重组 $\gamma$ -干扰素对溶藻弧菌胞内存活的影响

接种至六孔板的巨噬细胞分成四组,A组为溶藻弧菌感染巨噬细胞前后均不用1000U/mL重组 $\gamma$ -干扰素处理,B组为溶藻弧菌感染巨噬细胞后加入1000U/mL重组 $\gamma$ -干扰素,C组为溶藻弧菌感染巨噬细胞前用1000U/mL重组 $\gamma$ -干扰素处理,2h后换液,加入含有1000U/mL重组 $\gamma$ -干扰素的新鲜培养基,D组为溶藻弧菌感染巨噬细胞前用1000U/mL重组 $\gamma$ -干扰素处理,2h后换液,加入不含有1000U/mL重组 $\gamma$ -干扰素的新鲜培养基。巨噬细胞培养24h后,平板涂布计数。

### 1.5 $\text{NO}_2^-$ 的测定

采用 Griess 反应法(Zhao *et al.*, 1997)测定一氧化氮的稳定产物 $\text{NO}_2^-$ 的量,来分析由巨噬细胞所产生的一氧化氮的量。简单来说,收集培养基,400 $\times g$ 离心10min,收集上清液。96孔板每孔加入100 $\mu\text{L}$ 的上清液,再加入等量的Griess反应液(0.1%萘基乙二胺二盐酸盐和1%磺胺溶解在2.5%的磷酸中),室温反应10min,用酶标仪测 $\text{OD}_{550}$ 。每个样品做至少三个平行。 $\text{NO}_2^-$ 的量通过亚硝酸钠的标准曲线换算得到。

### 1.6 过氧化氢的测定

巨噬细胞过氧化氢的释放量参照 Pick 等(1981)方法测定,主要采用酚红-辣根过氧化物酶微量板法测定。简单来说,经过溶藻弧菌( $2.0 \times 10^5$  cells/孔)感

染后的巨噬细胞在 96 孔板上培养,并在各个时间点加入溶有辣根过氧化物酶(25U/mL, Sigma)和 0.2g/L 酚红的 PBS 溶液,将 96 孔板于 28℃ 培养 60min,之后加入 0.01mL 1mol/L NaOH 终止反应。使用酶标仪(BioTek)测定上清液的 OD<sub>630</sub>。过氧化氢释放量由 1—50nmol 过氧化氢(含 25U/mL 过氧化物酶和 0.2g/L 酚红的 PBS 溶液)的标准曲线换算得到。

### 1.7 溶藻弧菌细胞内存活及吞噬率测定

溶藻弧菌体外吞噬率和杀菌速率的测定根据 Hampton 等(1994)。将  $1 \times 10^7$ /mL 细菌悬浮于含有 10% 血清的 PBS 中。将装有悬浮液的离心管于 28℃, 4r/min 旋转培养 20min。细菌感染前,巨噬细胞用 1000U/mL 重组 $\gamma$ -干扰素, 1000U/mL 重组 $\gamma$ -干扰素和 250 $\mu$ g/mL NMMA 或 1000U/mL 重组 $\gamma$ -干扰素和 1mg/mL 过氧化氢酶处理 2h。

将  $2 \times 10^7$  个预处理过的巨噬细胞悬液或 PBS 和  $2 \times 10^7$  CFU 调理细菌于 28℃, 4r/min 转速培养 30min。同时在上述溶液中加入脂多糖,药物持续存在于细胞培养基中 30min。吞噬后,将悬浮液于 110g 离心 5min,收集上清并用 2mL 预冷的 PBS 清洗沉淀两次。收集的 6mL 上清和细胞沉淀作为样品,采用菌落计数法计算上清液(胞外菌)的细菌数。PBS 重悬含有细菌的巨噬细胞(初始浓度)。取 100 $\mu$ L 巨噬细胞样品,加入 900 $\mu$ L 无菌蒸馏水用力振荡破碎细胞。破碎后用无菌蒸馏水 10 倍稀释,涂布牛肉膏蛋白胨培养基上培养进行活菌计数。实验中的巨噬细胞存活率(台盼蓝染色)超过 90%。

细菌吞噬率常数( $K_1$ )的计算,根据公式  $K_1 =$

$[\ln N(t=0) - \ln N(t)]/t$ ,  $N(t)$  为  $t$ (min)时的胞外菌数量, $N(t=0)$  为实验初始的细菌数量,作为  $t = 0$ min 时空白管的菌数。

胞内杀菌率常数( $K_2$ ),根据以下公式计算:  $K_2 = K_1 + 1/t \times \ln[B/N(t=0)/K_1]$ ,  $B$  为  $t$ (min)时胞内细菌数, $K_1$  同上面的公式。细菌被吞噬的半数率( $t/2$ )为:  $t_{1/2} = \ln 2/K_2$ 。

### 1.8 数据分析

结果用平均值  $\pm$  标准偏差来表示,用 SPSS17.0 来分析组间差异。 $P < 0.05$  和  $P < 0.001$  分别表示显著性差异和极显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 3种药物对溶藻弧菌胞内存活的影响

见表 1。随着细菌感染时间的延长,无论巨噬细胞是否经过药物处理,巨噬细胞内存活菌数都呈现逐渐衰减的趋势。溶藻弧菌感染巨噬细胞 24h 后,暴露于重组 $\gamma$ -干扰素的巨噬细胞内的细菌存活数[(1380  $\pm$  80)CFU/mL]比未处理的巨噬细胞内存活菌数[(2090  $\pm$  99)CFU/mL]降低了 34.0% ( $P = 0.001 < 0.005$ )。暴露于 NMMA 的巨噬细胞内的细菌存活数 [(1750  $\pm$  14)CFU/mL]比未处理的降低了 16.3% ( $P < 0.05$ )。而暴露于过氧化氢酶的巨噬细胞内的细菌存活数 [(1890  $\pm$  71)CFU/mL]比未处理的降低了 9.6% ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 重组 $\gamma$ -干扰素对溶藻弧菌细胞内存活的影响

溶藻弧菌感染不经过重组 $\gamma$ -干扰素处理的巨噬细胞 24h 后,细菌胞内存活数为(2090  $\pm$  99)CFU/mL (表 2, A 处理组)。巨噬细胞被溶藻弧菌感染后暴露于

表 1 3种药物对溶藻弧菌胞内存活的影响

Tab.1 Effects of three drugs on the intracellular fate of *V. alginolyticus*

感染时间(h)	药物处理后细菌存活数量			
	A(L-15)	B(+重组 $\gamma$ -干扰素)	C(+NMMA)	D(+过氧化氢酶)
0	2750000 $\pm$ 145000	2750000 $\pm$ 145000	2750000 $\pm$ 145000	2750000 $\pm$ 145000
1	233470 $\pm$ 4200	113330 $\pm$ 1414	118667 $\pm$ 18148	102000 $\pm$ 9165
12	91327 $\pm$ 2122	17240 $\pm$ 1329	34800 $\pm$ 5758	63333 $\pm$ 3055
24	2090 $\pm$ 99	1380 $\pm$ 80	1750 $\pm$ 14	1890 $\pm$ 71

表 2 重组 $\gamma$ -干扰素处理时间先后对溶藻弧菌细胞内存活的影响

Tab.2 Effects of timing of rIFN- $\gamma$  treatment on the intracellular fate of *V. alginolyticus*

感染时间(h)	药物处理后细菌存活数量			
	A(无重组 $\gamma$ -干扰素)	B(感染后添加重组 $\gamma$ -干扰素)	C(感染前后添加重组 $\gamma$ -干扰素)	D(感染前添加重组 $\gamma$ -干扰素,感染后不添加)
1	233470 $\pm$ 4200	113330 $\pm$ 1414	43790 $\pm$ 1560	98070 $\pm$ 1180
12	91327 $\pm$ 2122	17240 $\pm$ 1329	42990 $\pm$ 4380	59270 $\pm$ 8960
24	2090 $\pm$ 99	1380 $\pm$ 80	1800 $\pm$ 0	1790 $\pm$ 297

重组 $\gamma$ -干扰素, 24h 后细菌在细胞内的存活数( $1380 \pm 80$ )比不使用重组 $\gamma$ -干扰素处理的降低 34.0% (表 2, B 处理组,  $P=0.012<0.05$ )。巨噬细胞经过重组 $\gamma$ -干扰素预处理后被溶藻弧菌感染并持续暴露于重组 $\gamma$ -干扰素, 24h 后细菌在细胞内的存活数( $1800 \pm 0$ )比不暴露于重组 $\gamma$ -干扰素的降低 13.9% (表 2, C 处理组,  $P>0.05$ )。巨噬细胞经过重组 $\gamma$ -干扰素预处理后被溶藻弧菌感染但不暴露于重组 $\gamma$ -干扰素, 24h 后细菌在细胞内的存活数( $1790 \pm 297$ )比不经过重组 $\gamma$ -干扰素处理的降低 14.3%(表 2, D 处理组,  $P>0.05$ )。

2.3 药物联合处理对溶藻弧菌胞内存活的影响

未使用药物处理组(对照组)的溶藻弧菌感染 24h 后, 细胞内存活的菌量为( $4100 \pm 0$ )CFU/mL (表 3, A 处理组)。溶藻弧菌感染巨噬细胞并使用重组 $\gamma$ -干扰素处理 24h 后, 胞内存活菌量为( $1140 \pm 221$ )CFU/mL 比对照组降低了 4 倍(表 3, B 处理组,  $P<0.001$ )。溶藻弧菌感染巨噬细胞并使用重组 $\gamma$ -干扰素和脂多糖联合处理 24h 后, 胞内存活菌量为( $463 \pm 32$ )CFU/mL 比对照组降低了 9 倍(表 3, C 处理组,  $P<0.001$ ), 但与 B 处理组不存在显著性差异。溶藻弧菌感染巨噬细胞并使用重组 $\gamma$ -干扰素, 脂多糖和 NMMA 联合处理 24h 后,

胞内存活菌量为( $2800 \pm 283$ )CFU/mL 比对照组降低了 2 倍(表 3, D 处理组,  $P<0.001$ ), 与 B 处理组存在显著性差异。溶藻弧菌感染巨噬细胞并使用重组 $\gamma$ -干扰素, 脂多糖和过氧化氢酶联合处理 24h 后, 胞内存活菌量为( $1493 \pm 57$ )CFU/mL 比对照组降低了 2 倍(表 3, E 处理组,  $P<0.001$ ), 与 B 处理组存在显著性差异。

2.4 药物联合处理对细菌感染头肾巨噬细胞后释放  $\text{NO}_2^-$  的影响

见图 1。感染溶藻弧菌的头肾巨噬细胞的  $\text{NO}_2^-$  释放量随着时间延长而逐渐增加( $P<0.001$ )。采用重组 $\gamma$ -干扰素处理的巨噬细胞被溶藻弧菌感染后 1h、3h、12h 和 24h, 上清液中过氧化氢( $\text{nmol/L}/10^5 \text{ cells}$ )释放量与对照组存在显著性差异( $P=0.000<0.001$ )。类似的情况也出现在 $\gamma$ -干扰素, 脂多糖和 NMMA 联合处理及重组 $\gamma$ -干扰素, 脂多糖( $P=0.014<0.05$ )和过氧化氢酶联合处理组中( $P=0.000<0.001$ )。但在同一时间内, 不同药物之间并不存在显著性差异。

2.5 药物联合处理对细菌感染头肾巨噬细胞后释放  $\text{H}_2\text{O}_2$  的影响

见图 2。采用重组 $\gamma$ -干扰素, 脂多糖及过氧化氢酶联合处理的巨噬细胞被溶藻弧菌感染 12h ( $15.449 \pm$

表 3 多种药物联合处理对溶藻弧菌胞内存活的影响  
Tab.3 Effects of multiple drugs combination on the intracellular fate of *V. alginolyticus*

感染时间(h)	药物处理后细菌存活数量				
	A(L-15)	B(+重组 $\gamma$ -干扰素)	C(+重组 $\gamma$ -干扰素+脂多糖)	D(+重组 $\gamma$ -干扰素+脂多糖+NMMA)	E(+重组 $\gamma$ -干扰素+脂多糖+过氧化氢酶)
1	146500 $\pm$ 3540	139000 $\pm$ 4240	87000 $\pm$ 1410	145500 $\pm$ 1061	138000 $\pm$ 8490
3	115000 $\pm$ 4240	84000 $\pm$ 1273	65500 $\pm$ 4950	93500 $\pm$ 7780	131000 $\pm$ 2830
12	55333 $\pm$ 9452	40500 $\pm$ 707	18333 $\pm$ 1528	34333 $\pm$ 1155	57000 $\pm$ 4243
24	4100 $\pm$ 0	1140 $\pm$ 221	463 $\pm$ 32	2800 $\pm$ 283	1493 $\pm$ 57

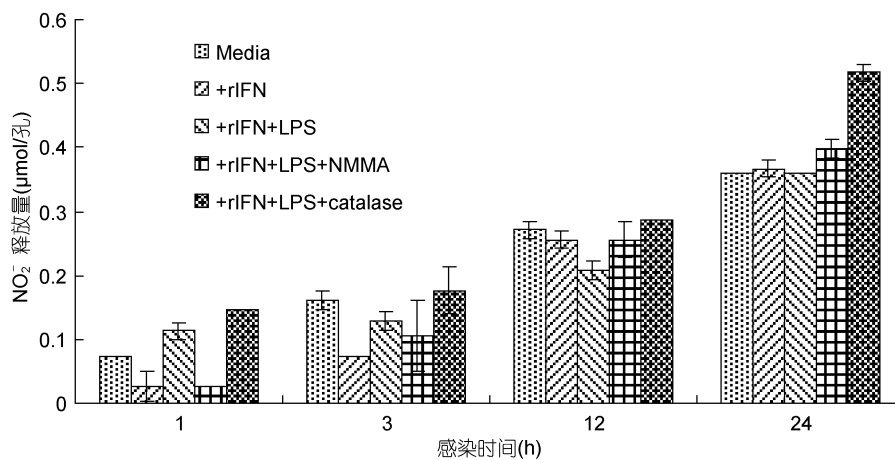


图 1 多种药物联合处理对细菌感染头肾巨噬细胞后释放  $\text{NO}_2^-$  的影响

Fig.1 Effects of multiple drugs combination on  $\text{NO}_2^-$  released by the head kidney macrophages after bacterial infection

0.251)和 24h ( $22.406 \pm 0.502$ )后, 上清液中过氧化氢( $\text{nmol/L}/10^5 \text{cells}$ )释放量分别显著高于对照组被感染 12h ( $15.449 \pm 0.435$ )和 24h ( $13.855 \pm 1.225$ )后的释放量( $P=0.000 < 0.001$ ), 类似的情况也出现在重组 $\gamma$ -干扰素, 脂多糖和 NMMA 联合处理组中。而重组 $\gamma$ -干扰素处理的巨噬细胞被溶藻弧菌感染 12h 和 24h 后, 上清液中过氧化氢( $\text{nmol/L}/10^5 \text{cells}$ )释放量与对照组被感染 12h 和 24h 后的释放量存在显著性差异( $P < 0.001$ ), 然而在重组 $\gamma$ -干扰素和脂多糖联合处理组不存在显著性差异。

## 2.6 药物联合处理对巨噬细胞的吞噬作用及溶藻弧菌胞内杀伤作用的影响

见表 4。30min 时, 分别经过 $\gamma$ -干扰素( $0.022 \pm 0.006$ ),  $\gamma$ -干扰素和脂多糖( $0.029 \pm 0.001$ ),  $\gamma$ -干扰素, 脂多糖和 NMMA( $0.036 \pm 0.002$ ),  $\gamma$ -干扰素, 脂多糖和过氧化氢酶( $0.033 \pm 0.000$ )处理的巨噬细胞对溶藻弧菌的吞噬作用显著低于对照组( $0.084 \pm 0.006$ ) ( $P=0.000 < 0.005$ )。30min 时, 分别经过 $\gamma$ -干扰素( $0.107 \pm 0.008$ ),  $\gamma$ -干扰素和脂多糖( $0.105 \pm 0.004$ ),  $\gamma$ -干扰素, 脂多糖和 NMMA( $0.099 \pm 0.004$ ),  $\gamma$ -干扰素, 脂多糖和

过氧化氢酶( $0.100 \pm 0.009$ )处理的巨噬细胞内对溶藻弧菌的杀伤作用低于对照组( $0.114 \pm 0.003$ ), 但不存在显著性差异( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

$\gamma$ -干扰素是一种重要的巨噬细胞抗菌功能激活剂, 包括释放活性氮和氧中间体杀死非特定的专性或兼性细胞内微生物(Thale *et al.*, 2005)。在获得性免疫反应阶段,  $\gamma$ -干扰素是一个关键的多功能细胞因子尤其是在 Th1 型反应以及炎症的调节中起重要作用(Thale *et al.*, 2005)。NMMA 是一种非特异性 iNOS 抑制剂, 能够降低一氧化氮(NO)和相关活性氮中间体(RNI)的生成, 影响依赖性 L-精氨酸细胞毒性途径, 该途径介导小鼠巨噬细胞的抗菌功能。过氧化氢酶主要是催化过氧化氢分解成氧和氢气, 其存在于很多好养生物中, 包括人类和细菌以及许多厌氧微生物和兼性厌氧微生物(Day *et al.*, 2000)。

### 3.1 $\gamma$ -干扰素及其它三种药物单独处理影响巨噬细胞内细菌存活

在类结核分枝杆菌感染经过 $\gamma$ -干扰素预处理的

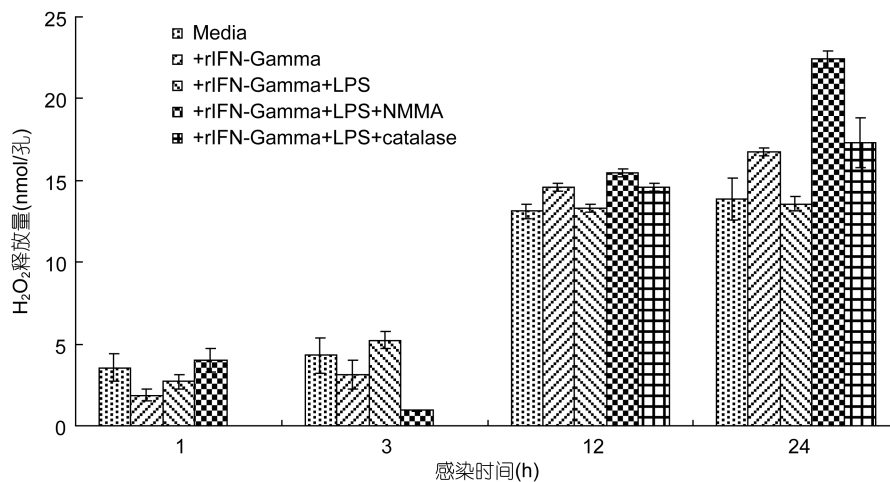


图 2 多种药物联合处理对细菌感染头肾巨噬细胞后释放  $\text{H}_2\text{O}_2$  的影响

Fig.2 Effects of multiple drugs combination on  $\text{H}_2\text{O}_2$  released by the head kidney macrophages after bacterial infection

表 4 多种药物联合处理对巨噬细胞吞噬溶藻弧菌速率常数及胞内杀溶藻弧菌速率常数的影响

Tab.4 Effects of multiple drugs combination on the rate constant for phagocytosis and intracellular killing of *V. alginolyticus*

药物	吞噬作用		杀伤作用	
	$K_1 (\text{min}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min})$	$K_2 (\text{min}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min})$
A(L-15)	$0.084 \pm 0.006$	8.2	$0.114 \pm 0.003$	6.1
B(+ $\gamma$ -干扰素)	$0.022 \pm 0.006$	31.3	$0.107 \pm 0.008$	6.5
C(+ $\gamma$ -干扰素+脂多糖)	$0.029 \pm 0.001$	24.0	$0.105 \pm 0.004$	5.6
D(+ $\gamma$ -干扰素+脂多糖+NMMA)	$0.036 \pm 0.002$	19.0	$0.099 \pm 0.004$	7.0
E(+ $\gamma$ -干扰素+脂多糖+过氧化氢酶)	$0.033 \pm 0.000$	20.9	$0.100 \pm 0.009$	6.9

并连续不断的使用 $\gamma$ -干扰素处理的单核细胞中, 细菌数量只有轻微的增加, 而类结核分枝杆菌感染不经过 $\gamma$ -干扰素预处理, 之后暴露于 $\gamma$ -干扰素的单核细胞或经过 $\gamma$ -干扰素预处理但感染后不暴露在 $\gamma$ -干扰素的单核细胞内细菌数量有明显增加(Zhao *et al.*, 1997)。然而, 由于添加 $\gamma$ -干扰素时同时感染弗兰西斯氏菌或加入 $\gamma$ -干扰素后感染弗兰西斯氏菌能够抑制 $\gamma$ -干扰素诱导的 iNOS 的表达, 因此与不加 $\gamma$ -干扰素或感染细菌 8h 后添加 $\gamma$ -干扰素或共同刺激相比, 预先在 RAW 264.7 细胞加入 $\gamma$ -干扰素 8h 或加入 $\gamma$ -干扰素时同时感染弗兰西斯氏菌能显著降低细胞内细菌存活数量(Parsa *et al.*, 2008)。本文结果表明溶藻弧菌感染后暴露于 $\gamma$ -干扰素的巨噬细胞内细菌存活数量显著低于对照组, 且低于其它三种处理方式。研究发现在四种处理方式 1h 和 3h 中 NO 的释放量不存在显著性差异(数据未显示)。

### 3.2 重组 $\gamma$ -干扰素处理方式的不同影响胞内细菌存活

有研究发现, RAW 264.7 细胞在 $\gamma$ -干扰素或 $\gamma$ -干扰素和脂多糖的处理下能提高巨噬细胞内 NO 或过氧化物的释放从而降低利什曼原虫的存活(Assreuy *et al.*, 1994; Kolodziej *et al.*, 2008)。RAW 264.7 细胞和 HL-60 细胞感染嗜肺军团菌后经过鼠重组 $\gamma$ -IFN (100U/mL) 或鼠重组 $\gamma$ -IFN + NGMMA (2.0mmol/L) 处理能促进细胞释放 NO 自由基从而降低两种细胞内细菌存活数量(Summersgill *et al.*, 1992)。被类结核分枝杆菌感染的牛单核细胞, 在 $\gamma$ -干扰素或 $\gamma$ -干扰素和脂多糖的诱导处理下能够释放 NO, 进而适当抑制该菌在细胞内的存活(Zhao *et al.*, 1997)。小鼠巨噬细胞被酵母聚糖和 $\gamma$ -干扰素(醛醇缩合酶/ $\gamma$ -干扰素)激活, 产生过氧化物(激活后 1—2h 达到高峰, 之后急剧下降)和 NO(在 6h 内难以检测, 24h 达到高峰), 从而杀死利什曼原虫(Assreuy *et al.*, 1994), 本文研究结果与以上研究相似。然而, 重组 $\gamma$ -干扰素或与大肠杆菌脂多糖结合并不能提高牛巨噬细胞对结核分枝杆菌的杀伤作用(Simutis *et al.*, 2007)。

### 3.3 重组 $\gamma$ -干扰素和其它三种药物联合处理影响胞内细菌存活

本文研究了细菌感染头肾巨噬细胞后,  $\gamma$ -干扰素或 $\gamma$ -干扰素分别和脂多糖, NMMA, 过氧化氢酶联合处理细胞的情况下 NO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的释放。Simutis 等(2007)研究表明 $\gamma$ -干扰素或 $\gamma$ -干扰素和脂多糖结合作用与对照组相比并不影响牛结核分枝杆菌感染牛巨噬细胞亚硝酸盐的产生。本文结果表明: 细菌感染头

肾巨噬细胞 24h 后,  $\gamma$ -干扰素或 $\gamma$ -干扰素和脂多糖结合作用与对照组相比并不影响 NO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的释放, 这同上述研究相符合。另外, 本文研究中 $\gamma$ -干扰素或 $\gamma$ -干扰素和其它药物结合作用与对照组相比则存在显著性差异, 从而说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能导致溶藻弧菌细胞内存活的减少。这与以前鼠重组 $\gamma$ -干扰素或鼠重组 $\gamma$ -干扰素和脂多糖结合作用抑制弓形虫细胞内存活且提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 NO<sub>2</sub> 释放量的结果相符合(Langermans *et al.*, 1992)。

### 3.4 重组 $\gamma$ -干扰素影响溶藻弧菌的吞噬作用

本文研究发现, 经过 $\gamma$ -干扰素处理的巨噬细胞能显著降低溶藻弧菌的吞噬作用。这与 Toba 等(1989)的研究结果即 $\gamma$ -干扰素降低人类单核细胞对副结核分枝杆菌的吞噬相一致。但是本文的结果与 Zhao 等(1997)研究结果即经过 $\gamma$ -干扰素预处理的牛单核细胞轻微提高该细胞对副结核分支杆菌的吞噬作用结果不一致, 以及与 Zurbrick 等(1988)的结果不一致, 即牛单核细胞经过天然 $\gamma$ -干扰素、干扰素或重组 $\gamma$ -干扰素处理后比未经处理的细胞能摄取更多的副结核分支杆菌。因此,  $\gamma$ -干扰素影响细胞对溶藻弧菌的吞噬作用从而降低溶藻弧菌的细胞内存活, 与细胞本身的杀伤作用无关。细胞吞噬能力的降低可能部分是由于暴露于 $\gamma$ -干扰素的巨噬细胞产生的氧代谢物所造成的, 因为 $\gamma$ -干扰素可能作为细胞活性的调节器, 比如吞噬作用(Bermudez, 1993)。

总之, 经 $\gamma$ -干扰素或 $\gamma$ -干扰素与脂多糖,  $\gamma$ -干扰素与 NMMA,  $\gamma$ -干扰素与过氧化氢酶分别处理的巨噬细胞内存活的溶藻弧菌数量低于对照组。同时在 24h 内, 经过 $\gamma$ -干扰素或 $\gamma$ -干扰素与脂多糖,  $\gamma$ -干扰素与脂多糖、NMMA,  $\gamma$ -干扰素与脂多糖、过氧化氢酶分别处理能提高巨噬细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的释放而不能增强其 NO<sub>2</sub> 的产生。另外,  $\gamma$ -干扰素处理能显著降低巨噬细胞对溶藻弧菌的吞噬作用。本文研究显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的释放及细胞吞噬作用能降低溶藻弧菌在细胞内存活。

## 参 考 文 献

- 覃映雪, 池信才, 苏永全等, 2004. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原. 水产学报, 28(3): 297—302
- 鄢庆彬, 陈 强, 邹文政等, 2006. 不同环境条件对溶藻弧菌粘附大黄鱼肠粘液的影响. 水产学报, 30(2): 254—259
- Assreuy J, Cunha F Q, Epperlein M *et al.*, 1994. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. Eur J Immunol, 24: 672—676
- Bayne J, 1986. Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio*: Isola-

- tion, separation and characterization. *Vet Immunol Immunop*, 12: 141—151
- Bermudez L E, 1993. Differential mechanisms of intracellular killing of *Mycobacterium avium* and *Listeria monocytogenes* by activated human and murine macrophages. The role of nitric oxide. *Clin Exp Immunol*, 91: 277—281
- Black C M, Catterall J R, Remington J S, 1987. *In vivo* and *in vitro* activation of alveolar macrophages by recombinant interferon-gamma. *J Immunol*, 138: 491—495
- Chen S C, Adams A, Thompson K D *et al*, 1998. Electron microscope studies of the *in vitro* phagocytosis of *Mycobacterium* spp. by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* head kidney macrophages. *Dis Aquat Organ*, 32: 99—110
- Day W A Jr, Sajecki J L, Pitts T M *et al*, 2000. Role of catalase in *Campylobacter jejuni* intracellular survival. *Infect Immun*, 68: 6337—6345
- De Herdt P, Haesebrouck F, Charlier G *et al*, 1995. Intracellular survival and multiplication of virulent and less virulent strains of *Streptococcus bovis* in pigeon macrophages. *Vet Microbiol*, 45: 157—169
- Flesch I E, Kaufmann S H, 1991. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun*, 59: 3213—3218
- Hampton M B, Vissers M C, Winterbourn C C, 1994. A single assay for measuring the rates of phagocytosis and bacterial killing by neutrophils. *J Leukoc Biol*, 55: 147—152
- Kaufmann S H, 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol*, 11: 129—163
- Kolodziej H, Radtke O A, Kiderlen A F, 2008. Stimulus (polyphenol, IFN-gamma, LPS)-dependent nitric oxide production and antileishmanial effects in RAW 264.7 macrophages. *Phytochemistry*, 69: 3103—3110
- Langermans J, Van Der Hulst M, Nibbering P *et al*, 1992. Intravenous injection of interferon-gamma inhibits the proliferation of *Listeria monocytogenes* in the liver but not in the spleen and peritoneal cavity. *Immunology*, 77: 354
- McCarthy U M, Bron J E, Brown L *et al*, 2008. Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 477—484
- Medina E, Rohde M, Chhatwal G S, 2003. Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. *Infect Immun*, 71: 5376—5380
- Parsa K V L, Butchar J P, Rajaram M V S *et al*, 2008. Francisella gains a survival advantage within mononuclear phagocytes by suppressing the host IFN-gamma response. *Mol Immunol*, 45: 3428—3437
- Pick E, Mizel D, 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunological Methods*, 46: 211—226
- Rijneveld A W, Lauw F N, Schultz M J *et al*, 2002. The role of interferon-gamma in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*, 185: 91—97
- Ryckaert J, Bossier P, D'Herde K *et al*, 2010. Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol*, 29: 648—655
- Scorneaux B, Ouadrhiri Y, Anzalone G *et al*, 1996. Effect of recombinant human gamma interferon on intracellular activities of antibiotics against *Listeria monocytogenes* in the human macrophage cell line THP-1. *Antimicrob Agents Chemother*, 40: 1225—1230
- Simutis F J, Jones D E, Hostetter J M, 2007. Failure of antigen-stimulated [gamma][delta] T cells and CD4+ T cells from sensitized cattle to upregulate nitric oxide and mycobactericidal activity of autologous *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 116: 1—12
- Summersgill J T, Powell L A, Buster B L *et al*, 1992. Killing of *Legionella pneumophila* by nitric oxide in gamma-interferon-activated macrophages. *J Leukoc Biol*, 52: 625—629
- Suzuki Y, Orellana M A, Schreiber R D *et al*, 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, 240: 516—518
- Thale C, Kiderlen A F, 2005. Sources of interferon-gamma (IFN-gamma) in early immune response to *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology*, 210: 673—683
- Toba H, Crawford J T, Ellner J J, 1989. Pathogenicity of *Mycobacterium avium* for human monocytes: absence of macrophage-activating factor activity of gamma interferon. *Infect Immun*, 57: 239—244
- Von Knethen A A, Brune B, 2001. Delayed activation of PPARgamma by LPS and IFN-gamma attenuates the oxidative burst in macrophages. *FASEB J*, 15: 535—544
- Zhao B, Collins M T, Czuprynski C J, 1997. Effects of gamma interferon and nitric oxide on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with bovine monocytes. *Infect Immun*, 65: 1761—1766
- Zhou Y C, Huang H, Wang J *et al*, 2002. Vaccination of the grouper, *Epinephelus awoara*, against vibriosis using the ultrasonic technique. *Aquaculture*, 203: 229—238
- Zurbrick B G, Follett D M, Czuprynski C J, 1988. Cytokine regulation of the intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine monocytes. *Infect Immun*, 56: 1692—1697

## EFFECTS OF IFN-GAMMA ON INTRACELLULAR SURVIVAL OF *VIBRIO ALGINOLYTICUS* IN MACROPHAGES OF *EPINEPHELUS AWOARA*

LIN Gui-Fang<sup>1</sup>, CHEN Wen-Bo<sup>1</sup>, SU Yong-Quan<sup>2</sup>, QIN Ying-Xue<sup>1</sup>,  
XU Xiao-Jin<sup>1</sup>, MA Ying<sup>1</sup>, YAN Qing-Pi<sup>1</sup>

(1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen, 361021; 2. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)

**Abstract** The effects of recombinant *Escherichia coli* gamma interferon (rIFN-gamma) on the interaction of *Vibrio alginolyticus* with *Epinephelus awoara* head kidney were examined. The results show that the number of intracellular survival *V. alginolyticus* in macrophages exposed to IFN-gamma after infection with *V. alginolyticus* was fewest [(1380±80)CFU/mL] at 24 hours among the four treatment ways. However, the number of intracellular survival *V. alginolyticus* in macrophages treated with INF-gamma and in combination with LPS gained the fewer [(463±32)CFU/mL] at 24 hours than that in macrophages exposed to INF-gamma together with or without LPS and NMMA and catalase. Macrophages treated with IFN-gamma or together with LPS or LPS and NMMA or LPS and catalase enhanced the release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 24 hours, while these did not reinforce the NO<sub>2</sub><sup>-</sup> production. What's more, macrophage treated with IFN-gamma significantly reduced phagocytosis of *V. alginolyticus*, while this didn't cause influence to killing of *V. alginolyticus*. Our data demonstrated that the amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release and phagocytosis can contribute to the decrease in intracellular *V. alginolyticus*.

**Key words** *Vibrio alginolyticus*; IFN-gamma; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub><sup>-</sup> production; phagocytosis