

尖吻鱸(*Lates calcarifer*)淋巴細胞亞群免疫分析系統之建立

摘要

由於魚類各種淋巴細胞表面蛋白標記(marker)與單株抗體之缺乏，B 細胞、T 細胞、巨噬細胞/單核球等白血球各細胞亞群(subpopulation)一直無法有效分離，而限制了魚類免疫學的發展。B 細胞因細胞表面具有 IgM (B cell receptor)，因此較易以自血液中純化之 IgM 為抗原製備 anti-sIgM 之單株抗體。為配合台灣養殖業現況，本實驗計劃以台灣常見的養殖魚種之一尖吻鱸(*Lates calcarifer*)為實驗材料，製備 anti-sea bass sIgM 之單株抗體。此抗體日後可用來建立 ELISA 分析系統以偵測特異性抗體的產生，並可供 B 細胞之辨識與分離，為日後魚類疫苗發展之基礎工作。

前言

在宿主防禦(host defence)機制演化的過程中，自軟骨魚類始出現適應性免疫系統(adaptive immunity)，因此科學家可藉由各種疫苗之開發，幫助養殖戶降低因魚病所造成的損失。然而對魚類免疫系統之研究，始終受限於對魚類免疫系基礎知識之不足與相關試劑之缺乏而進展有限，對於魚病之控制依舊停留在隔離病源與施用抗生素等傳統方法。近年來由於人類基因體計劃的完成與基因體學的進展，河豚與斑馬魚之基因體已先後完成定序，對於魚類免疫學的進展提供相當的助力，魚類 CD4、CD8、TCR、MHC-II 等免疫相關分子的基因亦相繼被定序出來。然而市場上依然買不到可供辨識 B 細胞與 T 細胞之單株抗體，因此本計劃原選擇南台灣常見的養殖魚種之一尖吻鱸(*Lates calcarifer*)為實驗材料，欲純化其血液中之免疫球蛋白(immunoglobulin)並進一步製備單株抗體，以可供 B 細胞之辨識與分離。然而因魚體內每次抽取的血液量極為有限(不足 1ml)，因此需要大量的魚才足以取得足夠的血清為抗原免疫老鼠。然而因計畫經費有限且無養殖場能夠配合，因此本實驗目的轉而依白血球之吸附性與功能之不同，意圖自鱸魚頭腎細胞中分離出具吞噬作用的細胞如嗜中性球與巨嗜細胞。

依個人之前的研究成果顯示，CpG ODN (oligodeoxynucleotide)能刺激鱒魚(*Oncorhynchus mykiss*)白血球(取自脾臟與頭腎)產生細胞分裂促進因子(proliferation-inducing factors; PIF)，促進脾臟與頭腎細胞之分裂。然而若將B細胞(sIgM⁺)去除後再以CpG ODN加入細胞懸浮液中，經過 24 小時後清洗三次，更換新培養液後繼續培養 48 小時。培養 48 小時後之上層培養液(supernatant)能夠促進脾臟與頭腎細胞分裂，即使將B細胞(sIgM⁺)去除後，依然可觀察到極旺盛之細胞分裂現象。由此結果推測 PIF並非由B細胞所產生，且PIF之target cell亦非B細胞，此與在哺乳類動物上所觀察到之現象極為不同。先前研究顯示，CpG motif能直接刺激哺乳類B細胞分裂並提高抗體的

產生量(Krieg et al., 1995)，但在魚類並未觀察到CpG motif對B細胞有直接或間接之活化作用促進其進行分裂。而PIF究竟為何？作用之標的細胞為何？其促進sIgM⁺細胞分裂之機制為何均為未知。之前的研究是以彩虹鱒魚(*Oncorhynchus mykiss*)為對象，其主因為彩虹鱒魚一向為歐美地區主要養殖魚種之一，基於經濟因素成為研究魚類免疫時之重要對象，其MHC-I、MHC-II、IL-1 β 均已被定序出，且有能夠辨識sIgM之單株抗體以供區別、分離B細胞。然為配合台灣漁業現況，本計劃選擇南台灣常見的養殖魚種之一尖吻鱸(*Lates calcarifer*)為實驗材料，除材料取得容易外，有關鱸魚免疫之相關文獻發表量豐富具參考價值，日後之研究成果亦希望能實際應用於產業界。

實驗先期先將之前在鱒魚身上所用之實驗系統於鱸魚上重新建立起來。其要點包含下列各項：

- 1) 脾臟與頭腎組織中白血球(leucocyte)之分離與培養條件之建立。
- 2) 以流式細胞儀(flow cytometer)分析脾臟與頭腎之細胞族群(subpopulations)。
- 3) 以數種 CpG ODN 及細菌 DNA 處理脾臟與頭腎細胞進行細胞分裂測試 (proliferation assay)。
- 4) 將細胞依其功能與對培養容器吸附性之不同分離頭腎中之吞噬性球。

材料與方法

實驗動物

金目鱸魚(*Lates calcarifer*)

實驗用金目鱸魚(*Lates calcarifer*)向高雄縣養殖漁業生產區發展協會購買，長度約為30cm，在實驗前一天購回置於實驗室水槽中，使用魚塭養殖池的水並給予打氣。

實驗藥品

Lipopolysaccharide (LPS)

Escherichia coli 026:B6 之 LPS 購自 Sigma。以 PBS 稀釋至 0.1 mg/ml 後保存於-20℃。

Histopaque-1077

Histopaque-1077 (Sigma) 是一種含聚蔗糖(polysucrose)和泛影鈉(sodium diatrizoate)的溶液，密度是 1.077g/ml。主要用於分離血液中的單核球細胞，儲存在 4℃。

4,4'-(9-fluorenylidene)bis(2-phenoxy-ethanol)

是魚類麻醉劑能使魚維持在鎮靜期，也就是對於外界環境反應部分喪失，100ppm 濃度下作用 30 分鐘，在解剖魚之前先用乾淨的水沖掉魚體表面的 2-phenoxy-ethanol。

Polystyrene para-magnetic microparticles

具有磁性的聚苯乙烯珠子購自 Polysciences Inc, 直徑約 1~2 μm , 含有 2.52% solids-latex。

Synthetic CpG containing oligodeoxynucleotides (CpG ODN)

購自 Bio Basic Inc. 其核苷酸序列如下表, CpG ODN 溶於 PBS 中後於 4°C 下保存。

CpG sequence GCATAACGAGGAGCT
GpC sequence (reverse control of CpG) GCATAACGAGGAGCT

培養液

Leibovitz's L-15 medium (Gibco) 加入 10% FCS 以及 50 IU/ml penicillin / 50 μM streptomycin。

緩衝液

PBS 1L	NaCl (BDH, Poole, UK)	8 g
	Na ₂ HPO ₄ • 12 H ₂ O (BDH)	2.8 g
	KH ₂ PO ₄ (BDH)	0.2 g
	KCl (BDH)	0.2 g

實驗方法

組織淋巴球分離與培養

將鱸魚頭腎取出後置於細胞過濾器中以滅菌後之PBS沖洗數次, 然後以 1 ml 針筒末端擠壓揉碎組織塊並以L-15 培養液沖洗後得到細胞懸浮液。將 10 ml 細胞懸浮液置於 15ml 離心管中, 下層以pasteur pitpet 注入 3 ml Histopaque 1.077 (Sigma)後, 於 4°C 下以 300g 離心 30 分鐘。以pasteur pitpet吸取位於培養液與Histopaque液面間之白色懸浮細胞層即為白血球。以血球計數器計算細胞密度(cell density)後以培養液(L-15 + 10% FCS)稀釋至 1×10^6 cells/ml 於 20°C 下培養。

細胞分裂測試

頭腎細胞, 培養在 96 孔組織培養皿中, 每一孔的細胞濃度是 1×10^6 cell/ml, 200 μl /well, 進行三重複實驗, 觀察魚的白血球對LPS, CG 或 GC 序列的反應, 細胞培養在 20°C。細胞培

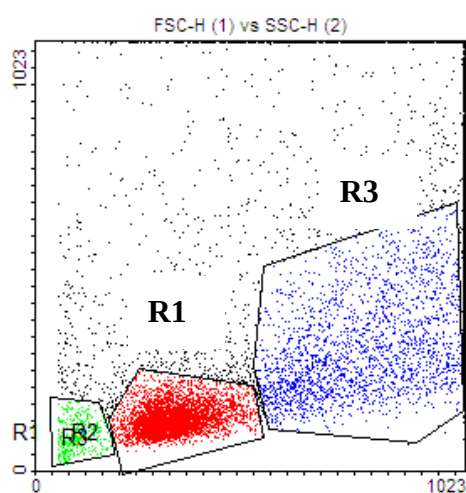
養 72 小時後加入 Quick Cell Proliferation Assay Kit (BioVision)，每一孔加入 $20\ \mu\text{l}$ kit reagent，之後每 24 小時測一次吸光值 OD_{450} 。

吞噬性球之分離

用 PBS 清洗磁珠兩次，加入細胞 (1×10^6 cell/ml) 與磁珠混合均勻充分接觸，在室溫下靜置 40 分鐘，每 10 分鐘震盪細胞與磁珠。使用磁鐵將吞噬磁珠之吞噬細胞分離，其下的細胞以流式細胞儀分析。

結果

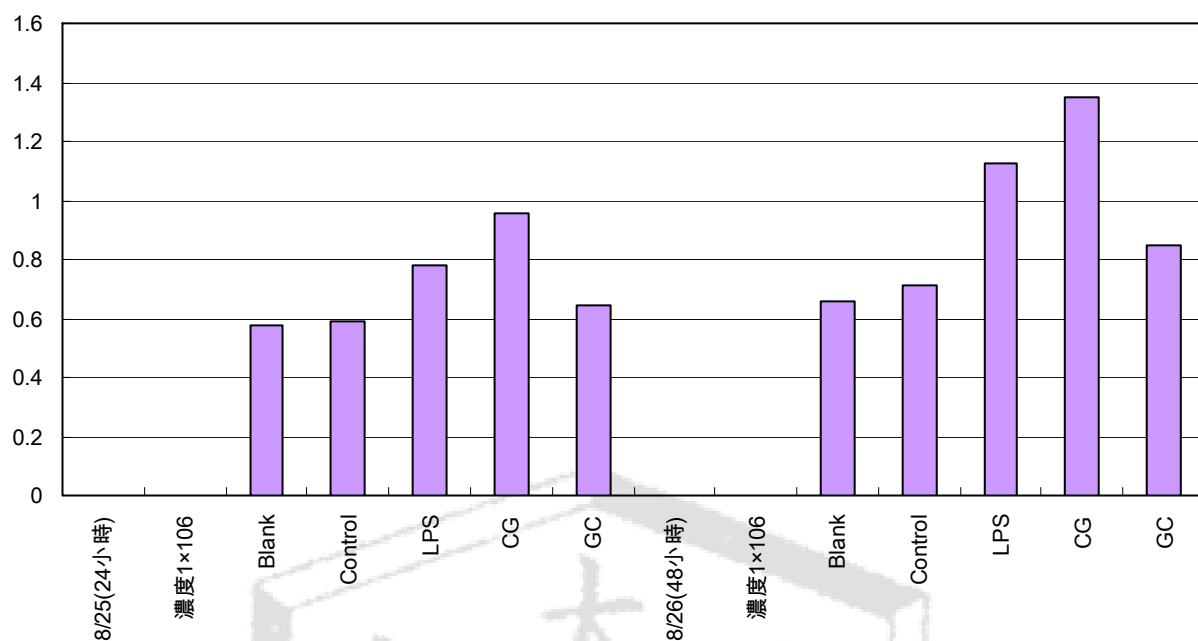
以用流式細胞儀分析金目鱸魚細胞組成其結果如圖一所示。R1 為淋巴球細胞佔 42.09%；R2 為紅血球細胞佔全部細胞的 3.64%；R3 為巨噬細胞族群佔全部細胞 21.14%。呈現典型之細胞亞群組成。



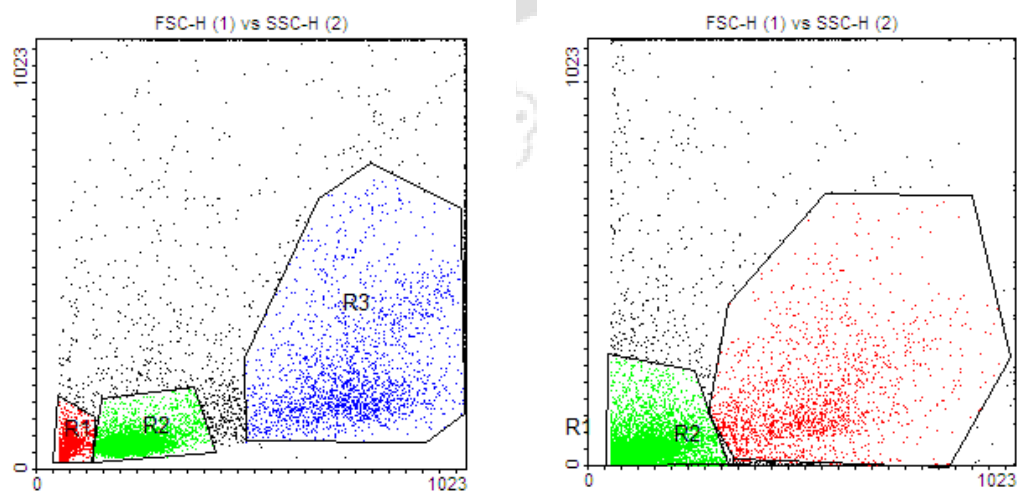
圖一：以流式細胞儀分析頭腎之細胞組成。

合成之 CpG ODN 能夠成功的刺激頭腎細胞分裂，而作為控制組的 GpC ODN 則無反應(圖二)。進一步探討此細胞分裂現是否為 CpG ODN 刺激 macrophage 產生 cytokines，進而刺激 T 細胞分裂所造成。因此我們嘗試以磁珠去除吞噬性球，結果如圖三所示。細胞與磁珠作用 40 分鐘後，R3 之 macrophage、neutrophils 族群由原本的 25.02% 降為 18.21%。顯示有 1/4 到 1/3 的 R1 細胞亞群為吞噬性球，並成功的以磁珠將其移除。

HK cell (細胞濃度: $1 \times 10^6/\text{ml}$) 培養72小時



圖二：CpG ODNs 成功促進鱸魚頭腎細胞分裂。



圖三：以磁珠移除 R3 族群中之吞噬性球。

結論

本實驗成功的自願魚頭腎分離出白血球細胞，並於體外培養超過 6 天。鱸魚頭腎之亞族群組成與鱒魚相似，由紅血球、淋巴球、巨噬細胞/單核球三族群所組成，而不同於金魚之 4 個亞族群。除了鱸魚細胞培養系統之建立外，CpG ODN 亦成功的誘發細胞分裂反應。然而反應強度並不如預期，其可能的原因為魚在取得之時於養殖池中已有輕微感染現象，免疫系統已處於活化狀態，因此 CpG ODN 對免疫反應之促進程度有限。

再進一步以磁珠分離吞噬性球得到良好的效果，然而在分離出吞噬性球後，頭腎細胞對 CpG ODN 之反應是否會受到影響為日後研究的重點。

參考文獻

蔡靜宜，2004。魚類疫苗在金目鱸魚苗之應用。國立屏東科技大學水產養殖系碩士學位論文。

dos Santos, N. M., Taverne-Thiele, J.J., Barnes, A. C., Ellis, A. E. & Rombout, J. H. (2001). Kinetics of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) systemic and mucosal antibody secreting cell response to different antigens (*Photobacterium damsela* spp. piscicida, *Vibrio anguillarum* and DNP). *Fish Shellfish Immunol.* 11, 317-331.

Du Pasquier, L. (1993). Evolution of the immune system. In *Fundermental Immunology* (W. E. Paul, ed), pp.199-233.

Scapigliati, G., Meloni, S., Buonocore, F., Bossu, P., Prugnoli, D. & Secombes, C.J. (2003). Immunopurification of B lymphocytes from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Mar. Biotechnol.* 5, 214-221.

Scapigliati, G., Romano, N. & Abelli, L. (1999). Monoclonal antibodies in teleost fish immunology: identification, ontogeny and activity of T and B lymphocytes. *Aquaculture.* 172, 3-28.

Scapigliati, G., Romano, N., Picchietti, S., Mazzini, M., Mastrolia, L., Scalia, D. & Abelli, L. (1996). Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalization of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays. *Fish Shellfish Immunol.* 6, 383-401.

Shen, K.Y., Hogstrand C. & Davies D.H. (2006) A newly identified CpG oligodeoxynucleotide motif that stimulates rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune cells to produce immunomodulatory factors. *Devel. Comp. Immunol.* 30, 311-324.