

水生病原菌對雜交吳郭魚 (*Oreochromis Niloticus* × *Oreochromis Mossambicus*) 頭腎來源之巨噬細胞非特異性免疫反應之影響

¹陳明輝 ²洪紹文 ³林育興 ¹鄭清福 ⁴涂青宇 ¹張鎮璿 ¹王孟亮 *¹王渭賢

¹國立中興大學獸醫學院獸醫學系 台中市

²中央研究院農業生物科技研究中心 台北市

³元培科技大學護理學系 新竹市

⁴行政院農業委員會農藥藥物毒物試驗所殘毒管制組 台中市

(收件日期：100 年 01 月 11 日。接受日期：100 年 03 月 24 日)

摘要 實驗目的在於研究吳郭魚頭腎來源巨噬細胞對水生病原菌的非特異性免疫反應。由實驗結果顯示經誘發之頭腎巨噬細胞的吞噬能力，以吞噬 yeast 之能力最高，吞噬 *Streptococcus iniae*、*Vibrio sp.* 及 *Edwardsiella tarda* 之能力最低。頭腎巨噬細胞吞噬 *Vibrio sp.* 後可產生最高的自由基量。此外，在細菌接種 12 小時內，頭腎巨噬細胞一氧化氮之產生和細胞死亡即有顯著地增加，其中以吞噬 *Vibrio sp.* 最高。利用 FITC-Annexin V 和 propidium iodium 進行染色後再以 flow cytometer 進行檢測，顯示在接種細菌 12 小時後，頭腎巨噬細胞發生 apoptosis 的比例顯著增加，其中以接種活的 *Vibrio sp.* 最高。綜合結果發現不同水生病原菌確實會影響頭腎巨噬細胞的非特異性免疫反應能力，並以 apoptosis 為主要誘發巨噬細胞死亡之機制。[陳明輝、洪紹文、林育興、鄭清福、涂青宇、張鎮璿、王孟亮、*王渭賢。水生病原菌對雜交吳郭魚 (*Oreochromis Niloticus* × *Oreochromis Mossambicus*) 頭腎來源之巨噬細胞非特異性免疫反應之影響。台灣獸醫誌 37 (3)：203-213, 2011。*通訊作者 TEL：886-4-22840894 ext 508, FAX：886-4-22862073, E-mail：wswang@dragon.nchu.edu.tw]

關鍵詞：細胞計畫性死亡，自由基，巨噬細胞，非特異性免疫，吳郭魚

緒 言

巨噬細胞在哺乳類動物的免疫防禦機制上扮演一個非常重要的角色，主要的功能為殺死入侵之微生物。魚類頭腎來源之巨噬細胞為在魚類免疫防禦非常重要，主要是負責非特異性免疫防衛之角色。然而，最近的研究文獻發現病原性細菌如 *Shigella spp.*、*Bordetella pertussis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Listeria monocytogenes*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Candida albicans* 及 *Salmonella spp.* 等 [1,3,14] 會誘導宿主之吞噬細胞或其他細胞產生細胞計畫性死亡 (apoptosis) [15,19,20,22]。Keane 等

[14] 和 Monack 等 [16] 指出，細胞內寄生的微生物如 *Chlamydia trachomatis*、*Brucella suis* 及 *Rickettsia rickettsii* 可藉由抑制細胞發生 apoptosis，以確保自身不為宿主免疫系統消滅。綜合上述之研究結果，發現病原除了具有逃避細胞毒殺的能力外，亦具有能誘導吞噬細胞發生 apoptosis [4,5,11,12,16]。然而，真正之機制至今尚未完全釐清，值得未來加以研究。

自由基在抗微生物感染方面扮演著重要角色。當細菌或病毒侵入時，便會誘發巨噬細胞產生 oxygen free radicals 和 reactive oxygen species (ROS) 及增加呼吸爆 (respiratory burst)。這些 ROS 包括

superoxide (O_2^-)、hydrogen peroxide (H_2O_2)、hydroxyl radical ($\cdot OH$) 及 singlet oxygen (1O_2) [20]。一氧化氮 (nitric oxide; NO) 合成主要是利用精胺酸 (L-arginine) 在一氧化氮合成酵素 (nitric oxide synthase; NOS) 的催化下，將 L-arginine 分解成 L-瓜胺酸 (L-citrulline) 和 NO [20]。NO 在生物體內可與 superoxide 產生 peroxynitrite，吞噬細胞亦可藉由 NO 與 peroxynitrite 來殺死細胞內和細胞外之微生物，在非特異性免疫防衛功能上亦扮演著一個非常重要的角色 [20]。

Evans 等 [10] 之研究結果發現吳郭魚以 *Streptococcus iniae* 誘導後，可造成周邊血液中的非特異性毒殺細胞發生 apoptosis。然而，對於其他相關之水生細菌如 *Streptococcus* sp.、*Aeromonas hydrophila*、*Vibrio* sp. 及 *Edwardsiella tarda* 等在被殺死和存活狀態下，宿主巨噬細胞的吞噬能力、細胞毒殺作用及誘發細胞發生 apoptosis 之相互關係仍有未釐清。因此，本研究嘗試以不同的水生細菌來刺激魚類之頭腎來源巨噬細胞，以評估巨噬細胞對不同狀態下之細菌的吞噬能力、細胞毒殺作用及誘發細胞死亡之機制，並嘗試探討水生細菌之致病機制和宿主免疫防禦機制間之關係。期待本研究之結果能對細菌和魚類宿主間的免疫調控作用機制能有進一步之瞭解，以做為未來疾病之防制或疫苗開發之基礎。

材料與方法

實驗動物 雜交種吳郭魚 (*Oreochromis Niloticus* × *Oreochromis Mossambicus*) 體重約為 600 至 700 g，馴養於水量 6 噸之魚池中。水源為經紫外燈過濾消毒之地下水並採流水式養殖，每日餵飼 2 次市售吳郭魚浮水飼料 (福壽，台中，台灣)，餵飼量為魚隻體重的 1%。

頭腎巨噬細胞之分離 本法係參考 Norum 等 [18] 之方法，並稍加修改後再以施行。將吳郭魚以 1:3,000 之 benzocaine (Sigma, Louis, MO, USA) 進行麻醉，以無菌操作手術將頭腎取出並置於內含 100 IU/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin 及 10 IU/mL heparin 的 RPMI-1640 medium 中，磨碎後靜置 1 分鐘，將上清液加入 Percoll (Sigma) 梯度溶液 (30%-40%-50%) 中，於 4°C 離心 30 分鐘 (800 × g)。將位於 30%-40% 界面層中之細胞取出，並以 RPMI-1640 medium 進行清洗並培養於含 5 mM sodium pyruvate、2 mM L-glutamine、50 IU/mL peni-

cillin、50 μ g/mL streptomycin、50 μ M 2-mercaptoethanol 及 10% fetal bovine serum (FBS) 的 RPMI-1640 medium 中供後續實驗之使用。

頭腎巨噬細胞之穿透式電子顯微鏡觀察 本法係參考 Stolen 等 [19] 之方法，並稍加修改後再以施行，其目的在於確認所分離出之頭腎細胞確實為巨噬細胞。將位於 30%-40% Percoll 界面層中之細胞離心取得細胞團塊後，以 2.5% 戊二醛磷酸緩衝液 (2.5% glutaraldehyde/0.1M phosphate buffer; GA) 於 4°C 中前固定 2 小時，而後以 0.1M PBS (pH 7.2) 進行清洗 (至少 6 次)，再以 1% Osmium tetroxide (OsO_4) 進行後固定 1 小時後，以 0.1M PBS (pH 7.2) 進行清洗 (至少 6 次)。然後依序使用 30% 酒精、50% 酒精、70% 酒精、80% 酒精、90% 酒精、95% 酒精、100% 酒精 (連續 3 次) 進行脫水，每次 10 分鐘。完成脫水步驟之後以 Spurr's Epon 置換 100% 酒精，100% 酒精與 Spurr's Epon 先以 1:1 混合置換 1 小時，之後再以 75% Spurr's Epon 置換 2 小時，90% Spurr's Epon 置換 2 小時，100% Spurr's Epon 置換 2 次 (2 小時/次) 後進行包埋，之後放入 BEEM® Capsules 中於 70°C 下 24 小時即可完成硬化聚合。包埋物先以玻璃刀粗切成厚度 0.5-1.0 μ m 之切片，並以光學顯微鏡先行檢查，之後才以鑽石刀於超薄切片機 (ultra-microtome; Reichert-Jung Ultracut E) 下切成厚度為 50-100 nm 之切片，將超薄切片置於銅網 (copper grid) 上並浸泡在 70% 酒精的飽和醋酸鈾 (uranyl acetate) 溶液中 50 分鐘，水洗後再浸泡 0.4% 檸檬酸鉛 (lead citrate) 水溶液中 15 分鐘，最後用水洗去多餘染劑後完成醋酸鈾與檸檬酸鉛雙重染色，並以穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM; JEOL JEM-1200CX II) 進行觀察。

細菌和 yeast 來源與製備 Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) 為非病原菌，購自 Sigma (No. YSC-1)，此外，經由高溫 (100°C) 處理可獲得不活化 yeast。*S. iniae* (No. CA98001-1)、*A. hydrophila* (No. CA98001-2)、*Vibrio* sp. (No. Ital72) 及 *E. tarda* (No. E910) 皆分離自吳郭魚，並長期保存於本研究室 -20°C 冰箱中。將保存於 -20°C 之 *S. iniae*、*A. hydrophila* 及 *E. tarda* 菌株取出後並培養於 tryptic soy broth (TSB) 中，而 *Vibrio* sp. 則培養於含 1.5% NaCl 的 TSB。各於 25°C 培養 18-24 小時，並將經 2 次繼代培養之上述細菌培養液，於 25°C 離心 20 分鐘 (2,500 × g) 以去除上清液，之後再以無菌 PBS 將

菌液濃度配製成 1×10^8 CFU/mL 供後續實驗使用。此外，不活化的細菌製備是將細菌與含 10% methanol-free formaldehyde 的 PBS (pH 7.4) 於室溫下感作 20 分鐘，再以 PBS (pH 7.4) 進行清洗，於 25°C 離心 20 分鐘 ($2,500 \times g$)，去除上清液後留下死亡之菌體以供後續實驗使用。死菌的偵測是將菌液以滅菌白金耳接種至 TSB，於 25°C 培養 24-48 小時，以確定沒有細菌生長。此外，將菌液塗抹至載玻片上以革蘭氏染色後，於光學顯微鏡下觀察細菌型態是否仍保持完整。

細菌之螢光標示 將 1 mg fluorescein isothiocyanate (FITC) 螢光染劑溶解於 1 mL 滅菌 PBS (pH 7.4)，然後取 500 μL FITC 螢光染劑與等量之不活化或活的細菌混合均勻，並置於 25°C 震盪避光感作 40 分鐘。待感作完成後，再以 10 mL PBS 於 25°C 離心 ($2,500 \times g$) 20 分鐘進行清洗。最後將細菌懸浮於 PBS 中，以供後續實驗使用。

頭腎巨噬細胞之吞噬試驗 取魚隻頭腎巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL; 3×10^5 cells) 以 RPMI-1640 medium (含有 10% FBS) 於 25°C 含 5% CO_2 環境下的 24 孔平底培養盤培養。而後加入上述 FITC 標示之死菌或活菌 (5×10^7 CFU/mL; 1,000 CFU) 作用 90 分鐘後，以內含 100 IU/mL penicillin 與 100 μg /mL streptomycin 之磷酸緩衝液 (PBS) 連續清洗 3 次以去除未吞噬之細菌。期間每隔 15 分鐘取頭腎巨噬細胞以流式細胞儀 (FACS Calibar flow cytometer, Becton Dickson) 進行檢測，並利用 CellQuest 軟體進行分析。吞噬指數 (phagocytosis index) 為計算 10,000 個巨噬細胞吞噬細菌後所表現之 FITC 螢光強度，用以表示頭腎巨噬細胞的吞噬能力。吞噬指數 = (平均螢光強度 \times 陽性細胞之百分比) / 100。

頭腎巨噬細胞死亡評估 Lactate dehydrogenase (LDH) 是一種與葡萄糖代謝有關的酵素，當細胞受到傷害死亡時，LDH 濃度會上升。因此，本研究係參考 Baran 等 [1] 之方法修改後加以實行。將頭腎巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL; 3×10^5 cells) 以 RPMI-1640 medium (含 10% FBS) 於 25°C 下與活菌、死菌或 latex beads 共同培養後，收集細胞培養液並進行 LDH 濃度分析來判定細胞死亡程度。

Superoxide、peroxynitrite 及 NO 的產生 取 5×10^7 CFU/mL (1,000 CFU) 的活菌或死菌加到含有 4 μM cypridna luciferin analog 的 HBSS 溶液中，

分別加入培養魚隻頭腎巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL; 3×10^5 cells) 之 24 孔平底培養盤之各孔中，於 25°C 共同培養 90 分鐘 (for superoxide detection) 與 30 分鐘 (for peroxynitrite detection)，期間每隔 15 分鐘 (for superoxide) 與 5 分鐘 (for peroxynitrite) 偵測每一孔之 chemiluminescence 以判定 superoxide 和 peroxynitrite 的產量。同樣地，在已培養有魚隻頭腎巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL; 3×10^5 cells) 放在 24 孔平底培養盤中，之後以 5×10^7 CFU/mL (1,000 CFU) 的活菌或死菌共同培養 12 小時後，收集其細胞培養液使用一氧化氮測定儀 (Duo · 18, World Precision) 測定 NO 之產量。此外，為了解巨噬細胞在吞噬非病原菌之顆粒後，是否也會誘發冷光的產生？特在實驗中加入直徑 1 μm 的 latex bead-carbohydrate (Sigma, No. L8905) 和直徑 2 μm 的 latex bead-amine (Sigma, No. L4530) 兩組作為 NO 產生量之比較。

細胞計畫性死亡與壞死之偵測 本法係參考 Stolen 等 [19] 之方法修改後而施行。將魚隻之頭腎巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL; 3×10^5 cells) 分別與死菌、活菌 (5×10^7 CFU/mL; 1,000 CFU) 及 latex beads 於 RPMI-1640 medium 中，在 25°C 共同作用 12 小時，而後收集魚隻之頭腎巨噬細胞，再加入 50 μL (5 μg /mL) 之 FITC-Annexin V (Sigma) 於 4°C 中作用 15 分鐘後，再以 25 mM HEPES 溶液 (Sigma) 進行清洗，而後再加入 5 μL (5 μg /mL) propidium iodide (PI)，並以 flow cytometer 進行檢測，其所得之結果並以 CellQuest 軟體進行分析。

統計分析 實驗中所得數據以 Student's t-test 進行分析，當 $P < 0.05$ 即代表有顯著性差異。

結 果

吳郭魚頭腎巨噬細胞之分離與純化 將吳郭魚之頭腎細胞液以不同比重的 Percoll 進行分離，並以 flow cytometer 進行分析。結果發現利用 30% (2 mL) -40% (2 mL) -50% (2 mL) 之 Percoll 不連續梯度進行離心，在 30%-40% Percoll 界面層中可得一群細胞，其比重為 1.065 g/mL。經 flow cytometer 分析細胞族群，發現細胞純度達 87.30% (Fig. 1A)。再以 Diff-Quik stain 染色後，發現此族群以核質比相當豐富的細胞為主，並存有少數大型之顆粒細胞。再經由穿透式電子顯微鏡觀察，此核質比相當豐富細胞之細胞質中可見溶菌小體和黑色顆粒

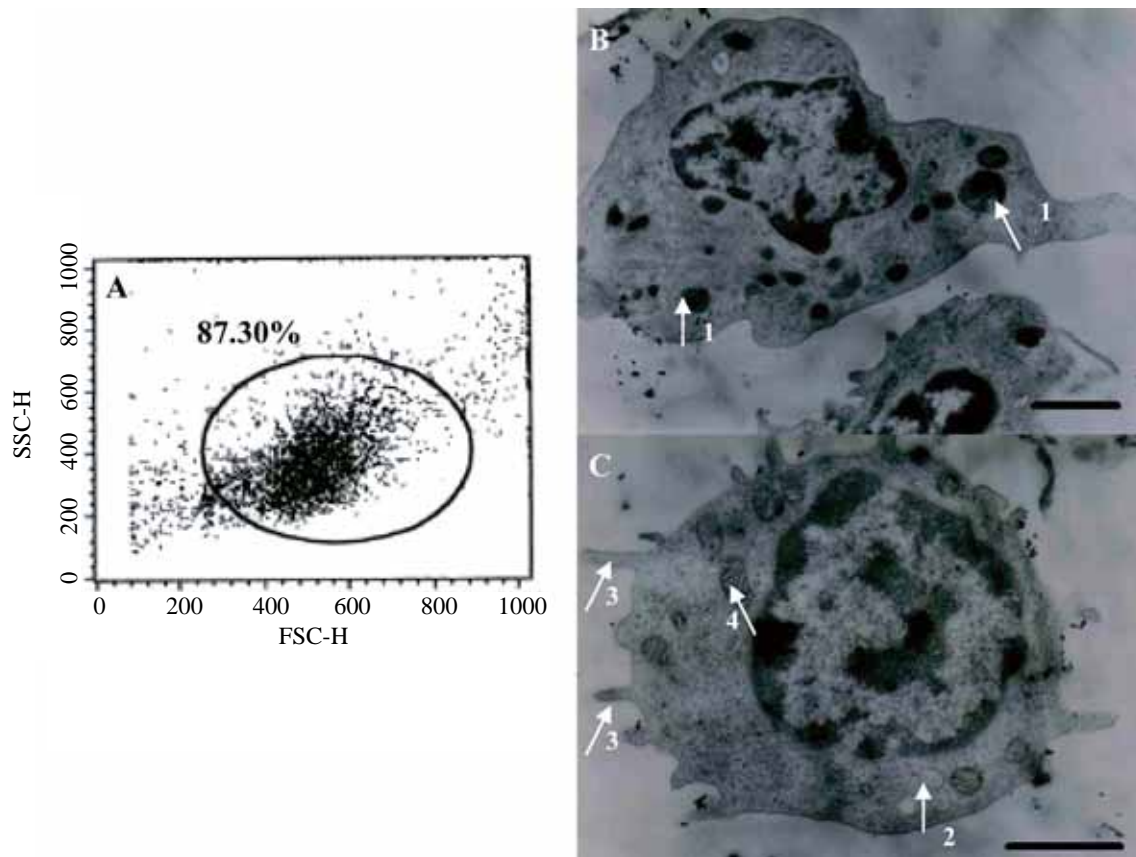


Fig. 1 The purification and morphology of anterior kidney-derived macrophages of hybrid tilapia. (A) The portion of the anterior kidney-derived macrophages in the tilapia blood cells (87.30%). (B & C) The morphology of anterior kidney-derived macrophages under transmission electron microscope. There were many melanous pigments (arrow 1) in the plasma, lysosomes (arrow 2), villi (arrow 3), and mitochondria (arrow 4) were found. The bar indicated as 2 μm in Fig. 1B and 3 μm in Fig. 1C.

存在 (Fig. 1B)。此外，尚可見伸出偽足之細胞存在 (Fig. 1C)。綜合以上之結果，我們發現以 Percoll 不連續梯度 (30%-40%-50%) 可用來分離吳郭魚之頭腎巨噬細胞。

吳郭魚頭腎巨噬細胞對細菌的吞噬能力 吳郭魚之頭腎巨噬細胞對細菌的吞噬能力評估方面，使用的菌株為保存於本實驗室對吳郭魚具有病原性之細菌 (*A. hydrophila*、*E. tarda*、*S. iniae* 及 *Vibrio* sp.) 與非病原菌 yeast。實驗結果發現吳郭魚之頭腎巨噬細胞在 15 分鐘時，對 yeast 與 *A. hydrophila* 具有較強之吞噬能力，以吞噬 yeast 最強，*A. hydrophila* 次之，並且在 15-90 分鐘之間，細胞之吞噬力並無明顯的下降 (Fig. 2)。此外，頭腎巨噬細胞對於 *S. iniae*、*Vibrio* sp. 及 *E. tarda* 之吞噬能力偏低 (Fig. 2)。至於對死菌和活菌狀態之吞噬力方面，結果發現吳郭魚之頭腎巨噬細胞對於死菌或活菌之吞

噬能力沒有顯著性差異 (Fig. 2)。

細菌誘發吳郭魚頭腎巨噬細胞 superoxide、peroxynitrite 及 NO 的產生 將吳郭魚之頭腎巨噬細胞與死菌或活菌共同作用後，利用 lucigenin-dependent chemiluminescence (CLA) 偵測冷光之強度以評估 superoxide 的產生量。實驗結果發現頭腎巨噬細胞與細菌共同培養後，在 15 分鐘就能偵測到強烈的冷光反應，30 分鐘後冷光強度則急速下降，此顯示細菌 superoxide 的產生高峰在吞噬細菌後 15 分鐘 (Fig. 3A)。我們的研究結果發現，吳郭魚之巨噬細胞吞噬不同活菌後之冷光強度，以吞噬 *Vibrio* sp. 後之冷光強度最高，*E. tarda* 和 *S. iniae* 次之，*A. hydrophila* 再次之，而 yeast 最低 (Fig. 3A)。另一方面，在同樣的巨噬細胞吞噬不同死菌後之冷光強度，仍以 *Vibrio* sp. 最強，*S. iniae* 次之，*E. tarda* 再次之，yeast 和 *A. hydrophila* 最低

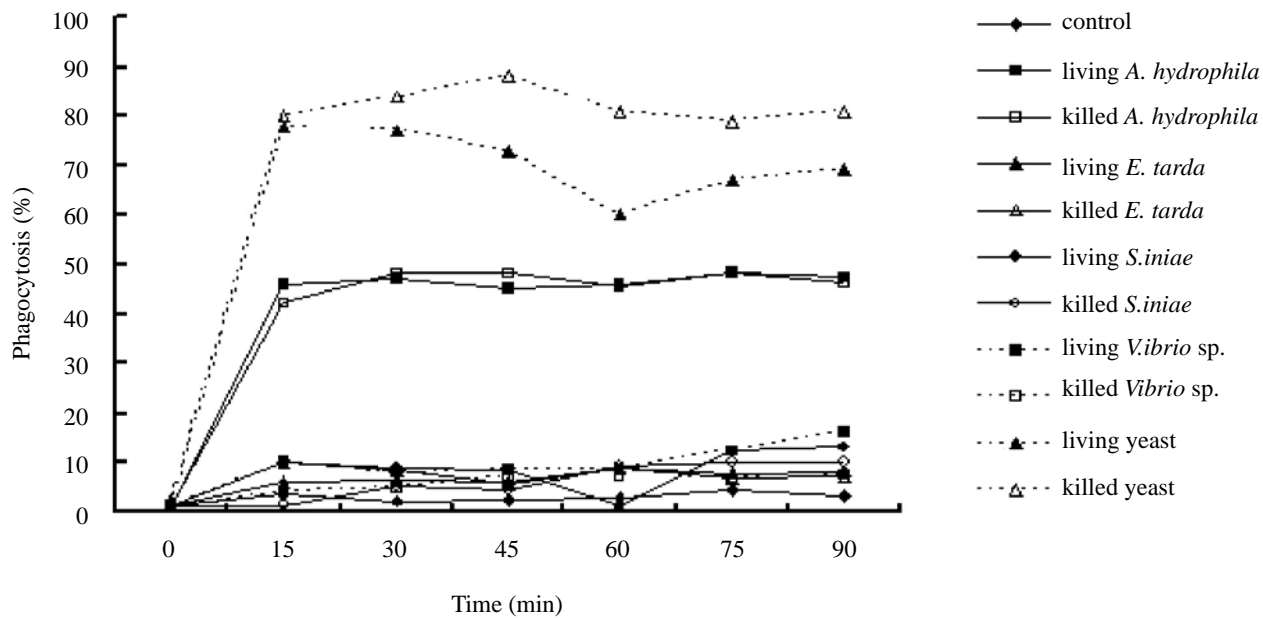


Fig. 2 Phagocytosis abilities of anterior kidney-macrophages reacted with different aquatic bacteria. *: There was significant difference between the tested and control groups ($P < 0.05$). There were triplicate in the experiment.

(Fig. 3A)。另外，由我們的研究結果顯示，吳郭魚之巨噬細胞分別吞嚥 latex bead-carbohydrate 和 latex bead-amine 兩種 beads 之後，其冷光強度並無增加之現象 (Fig. 3A)，此顯示吳郭魚之頭腎巨噬細胞如吞嚥或經細菌誘導後，細胞之 superoxide 產生量會增加，然而對於 latex bead-carbohydrate 和 latex bead-amine 則其 superoxide 產生量並不會增加。

以 CLA 來偵測冷光之強度來評估細菌誘發吳郭魚頭腎巨噬細胞之 peroxynitrite 產生量。實驗結果發現頭腎巨噬細胞與細菌共同培養後，最強烈的冷光在 5 分鐘內即可被偵測到，然而在 10 分鐘後其強度則急速下降 (Fig. 3B)。由此可見吳郭魚之巨噬細胞在與細菌作用後 5 分鐘內，很快速地產生 peroxynitrite 來進行防衛之機制。另外，我們在巨噬細胞之吞嚥不同活菌後 peroxynitrite 產生量之實驗結果顯示，以吞嚥 *Vibrio sp.* 最高，*E. tarda* 次之，*S. iniae* 再次之，*A. hydrophila* 和 yeast 最低 (Fig. 3B)。而巨噬細胞吞嚥不同死菌後 peroxynitrite 產生量之實驗結果發現，以吞嚥 *Vibrio sp.* 仍為最高，而 *S. iniae* 次之，*E. tarda* 再次之，yeast 和 *A. hydrophila* 仍最低 (Fig. 3B)。並且巨噬細胞吞嚥 latex bead-carbohydrate 和 latex bead-amine 之後，其 peroxynitrite 產生量沒有增加之現象 (Fig. 3B)，此顯示此二種非病原菌之 beads 被吞嚥後，無法誘導吳郭魚之頭腎巨噬細胞產生 peroxynitrite。

細菌誘發吳郭魚之頭腎巨噬細胞 NO 的產生研究結果顯示，巨噬細胞吞嚥活菌 *Vibrio sp.*、*E. tarda*、*S. iniae* 及 yeast 後，巨噬細胞產生 NO 的量會有顯著性增加，其中以吞嚥 *Vibrio sp.* 最高 (3.12 $\mu\text{M NO/mL}$)、*E. tarda* (1.56 $\mu\text{M NO/mL}$) 次之、*S. iniae* (1.23 $\mu\text{M NO/mL}$)、而 yeast (1.03 $\mu\text{M NO/mL}$) 最低 (Fig. 3C)。同樣的，當巨噬細胞吞嚥死菌後，NO 的產生量仍以 *Vibrio sp.* 最高 (2.36 $\mu\text{M NO/mL}$)、*E. tarda* (2.01 $\mu\text{M NO/mL}$) 次之、而 *S. iniae* (2.0 $\mu\text{M NO/mL}$) 和 yeast (1.60 $\mu\text{M NO/mL}$) 最低 (Fig. 3C)。

細菌誘發吳郭魚頭腎巨噬細胞死亡 分析吳郭魚之頭腎巨噬細胞和細菌或 latex beads 共同培養之培養液之 LDH 濃度來判定吳郭魚之頭腎巨噬細胞的死亡程度。實驗結果顯示巨噬細胞與活菌作用後，LDH 的濃度有顯著性地增加，其中以 *Vibrio sp.* 最高、*S. iniae* 次之、*E. tarda* 再次之、yeast 和 *A. hydrophila* 最低 (Fig. 4)。同時亦發現，巨噬細胞與死菌作用後，LDH 的濃度亦有顯著性地提高，其中 *S. iniae* 最高、*Vibrio sp.* 次之、*E. tarda* 再次之、而以 yeast 和 *A. hydrophila* 最低 (Fig. 4)。

細菌誘發吳郭魚頭腎巨噬細胞產生 apoptosis 我們嘗試以 FITC-Annexin V 和 PI 進行雙重螢光染

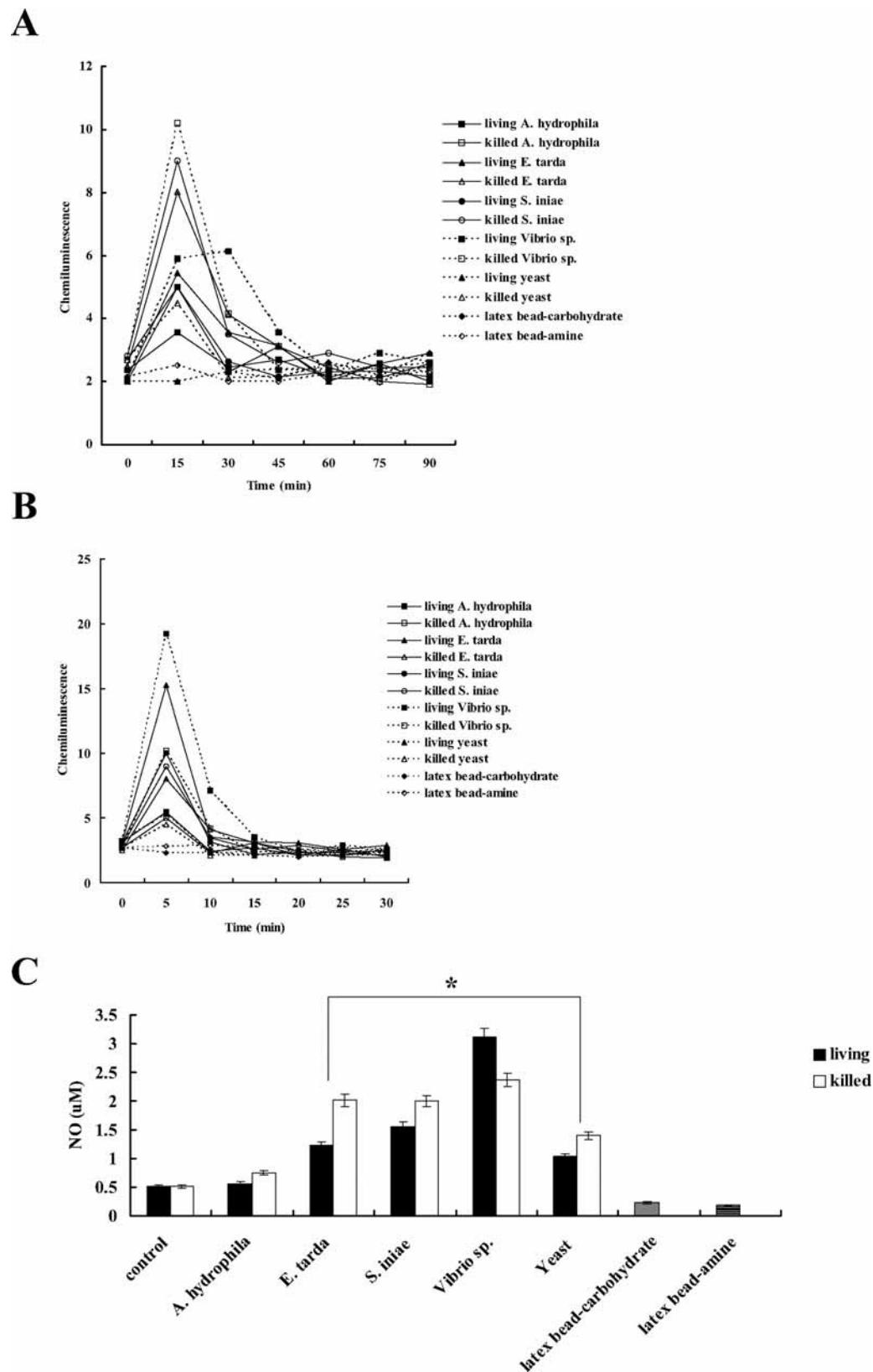


Fig. 3 Free radicals and NO productions from anterior kidney-derived macrophages reacted with different aquatic bacteria and latex beads. (A) Superoxide production. (B) Peronitrite production. (C) NO production. *: There was significant difference between the tested and control groups ($P < 0.05$). There were triplicate in the experiment.

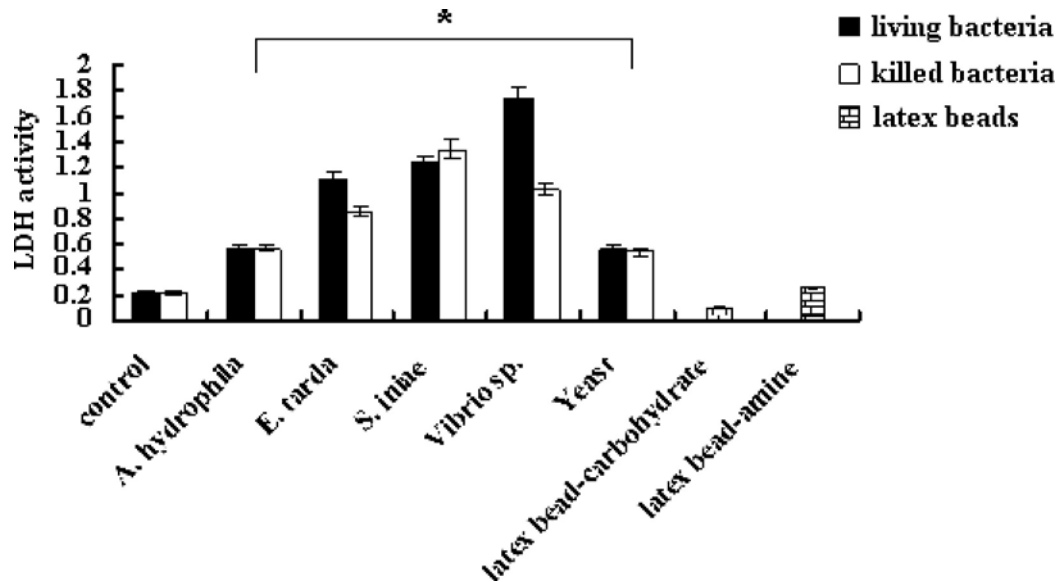


Fig. 4 Cell death of anterior kidney-macrophages reacted with different aquatic bacteria and latex beads. *: There was significant difference between living and killed bacteria ($P < 0.05$). There were triplicate in the experiment.

色來研究細菌誘發吳郭魚之頭腎巨噬細胞之死亡機制。實驗結果發現不論不活化或活的 *Vibrio sp.*、*E. tarda*、*S. iniae* 及 *A. hydrophila* 皆可顯著地誘發吳郭魚之頭腎巨噬細胞發生 apoptosis，其中以 *Vibrio sp.* 死菌誘發吳郭魚之頭腎巨噬細胞發生 apoptosis 之百分比最高 (33.80%) (Fig. 5A)。此外，我們亦發現細菌與吳郭魚之頭腎巨噬細胞作用後第 4 個小時，頭腎巨噬細胞發生 apoptosis 之百分比即有顯著地增加，並且隨著作用時間的增加，apoptosis 的比率亦增高 (data not shown)。

由細菌誘發吳郭魚之頭腎巨噬細胞產生 necrosis 實驗結果顯示，除了 *A. hydrophila* 活菌可明顯提升細胞發生 necrosis 的比率外，其他無論是 *Vibrio sp.*、*E. tarda* 及 *S. iniae* 活菌或死菌體和 *A. hydrophila* 死菌體均無法誘發之吳郭魚之頭腎巨噬細胞產生 necrosis (Fig. 5B)。另外，我們發現 latex bead-carbohydrate (Sigma) 和 latex bead-amine (Sigma) 均會誘發吳郭魚之頭腎巨噬細胞產生 apoptosis 和 necrosis。並且發現 latex bead-amine 會使頭腎巨噬細胞產生相當高比率 (50.46%) 之 necrosis (Fig. 5B)。

討 論

在水生動物，由於目前尚缺乏市售商業化之標示細胞表面抗原之抗體，以致使得對水生動物之細

胞分類和其功能相關之研究進展得相當緩慢。Chilmonczyk 和 Monge [2] 曾以 flow cytometer 來分析虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 的非特異性細胞毒殺作用，並指出吞噬活性和呼吸爆可以是一種迅速且可靠的評估方法。Norum 等 [18] 則以 37%/51% Percoll 來純化 spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) 頭腎巨噬細胞，將所得之巨噬細胞進行培養並觀察型態學上的變化。本研究以 Percoll 不連續梯度 (30%-40%-50%) 進行吳郭魚之頭腎巨噬細胞的分離純化，再以 flow cytometer 進行細胞之分析。結果發現在 30%-40% Percoll 界面的細胞群 (比重 1.065 g/mL) 如以光學顯微鏡和穿透式電子顯微鏡進行型態學的觀察，可以發現此細胞族群乃以核質比豐富的細胞為主，其中細胞直徑約為 6-8 μm 。細胞質中可見溶菌小體和黑色顆粒存在，由細胞型態學研究可判定為巨噬細胞。所以，我們推薦以 Percoll 離心純化技術搭配 flow cytometer 技術將可以成功地將魚類細胞純化，並酌以型態學之觀察研究，即可明確地將魚類細胞進行分類。

一般認為寄生於細胞內具有侵略性的細菌 (如 *Listeria*、*Shigella* 及 *Mycobacteria*) 和寄生蟲 (*L. donovani*) 大多會造成宿主細胞產生 apoptosis，並降低抗原呈現細胞如 B 細胞和 T 細胞產生 necrosis 的比率 [2]。有許多之研究報告指出，硬骨魚類具有非特異性毒殺細胞 (nonspecific cytotoxic cells; NCC)，尤以對細菌和寄生蟲具有細胞毒殺作用

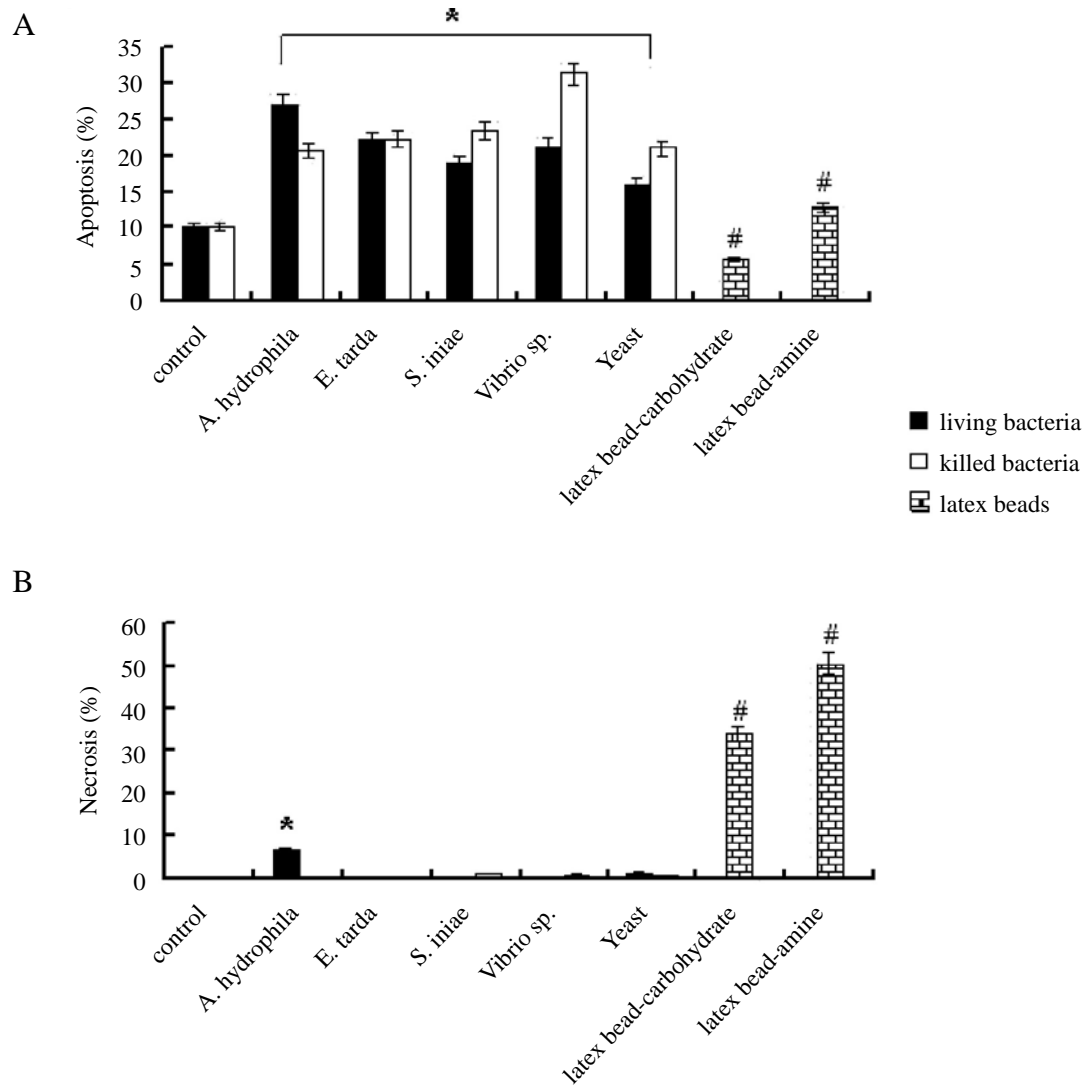


Fig. 5 Different aquatic bacteria and latex beads induced anterior kidney-macrophages of tilapia to apoptosis and necrosis. (A) apoptosis (B) necrosis *: There was significant difference between the bacterium-treated and control groups ($P < 0.05$). #: There was significant difference between the latex bead-treated and bacterium-treated groups ($P < 0.05$). There were triplicate in the experiment.

[6,7,8,13,18]。Evans 等 [9] 指出 channel catfish 感染 *E. ictalurus* 後，細菌會活化 NCC 細胞並引起細胞死亡。亦有研究報告顯示魚類（吳郭魚和鱒魚）和人類感染 *S. iniae* 後，NCC 細胞之毒殺能力被活化，並指出當宿主細胞被細菌感染時，NCC 扮演著非常重要的免疫防禦角色 [20]。Taylor 等 [20] 指出 NCC 細胞與分離自發病吳郭魚和鱒魚之 *S. iniae* 作用後，NCC 細胞產生 apoptosis 之比率明顯地下降，然而 necrosis 之產生比率卻顯著地增加。有趣的是當 NCC 細胞與分離自人類和海豚的 *S. iniae* 作用後，NCC 細胞產生 apoptosis 和 necrosis 之比率

均有些微地增加。然而，本實驗結果指出吳郭魚之頭腎巨噬細胞與具病原性的 *Vibrio sp.*、*E. tarda*、*S. iniae* 及 *A. hydrophila* 死菌或活菌體作用後，數小時內即可造成巨噬細胞顯著地產生 apoptosis 作用。有趣的是除了 *A. hydrophila* 活菌使吳郭魚之頭腎巨噬細胞產生 necrosis 的比率有稍微增加外，其他如 *Vibrio sp.*、*E. tarda*、yeast 及 *S. iniae* 死菌和活菌體及 *A. hydrophila* 死菌體均無法使 necrosis 之產生比率有顯著性地增加。由此可見無論是死菌或活菌均可誘發吳郭魚之頭腎巨噬細胞產生 apoptosis 作用。我們的結果與 Taylor 等 [20] 不同，主要可

能原因在於使用不同的病原菌或不同的細胞種類，所以造成細胞之 apoptosis 和 necrosis 程度有所不同。Zlotkin 等 [21] 將從虹鱔分離出之 *S. iniae* 分為兩種血清型 (serotype I 和 serotype II)，*S. iniae* serotype II 屬於侵入性 (invasive) 鏈球菌會促進鮭魚巨噬細胞發生 apoptosis，而 *S. iniae* serotype I 屬於非侵入性 (noninvasive) 鏈球菌，則會抑制鮭魚巨噬細胞發生 apoptosis，本實驗所選用之吳郭魚分離出之 *S. iniae* 可造成吳郭魚頭腎巨噬細胞發生 apoptosis，結果和 Taylor 等 [20] 研究結果相似。至於 *Vibrio* sp.、*E. tarda*、yeast 及 *A. hydrophila* 造成吳郭魚頭腎巨噬細胞發生 apoptosis 的機制，未來值得再做更進一步研究。

本研究結果發現不同種類之細菌，被吳郭魚之頭腎巨噬細胞吞噬的比例有所差異，其中對 yeast 和 *A. hydrophila* 之吞噬能力最強，然而以 *S. iniae*、*Vibrio* sp. 及 *E. tarda* 最低，其原因應與病原菌種類有關。同時，實驗結果顯示吳郭魚之頭腎巨噬細胞對於死菌和活菌之巨噬能力並沒有明顯之差異。另外，非特異性毒殺作用之實驗結果顯示，吳郭魚之頭腎巨噬細胞之 superoxide、peroxynitrite、NO 產生量，均以與 *Vibrio* sp. 作用後產生量最高，*E. tarda* 和 *S. iniae* 次之，而 yeast 和 *A. hydrophila* 最低。亦發現活菌 *Vibrio* sp. 可誘發巨噬細胞產生 apoptosis 之比率最高。此外，巨噬細胞吞噬非病原物如 latex bead-carbohydrate 和 latex bead-amine 後，實驗結果發現 latex bead-carbohydrate 和 latex bead-amine 均會造成巨噬細胞產生 apoptosis 和 necrosis，其中 latex bead-amine 會造成 50.46% 巨噬細胞產生 necrosis，其主要原因可能是 amine 毒性直接快速造成宿主細胞產生 necrosis。此外，我們亦發現 latex bead-carbohydrate 可使 37.5% 之巨噬細胞產生 necrosis，此顯示非病原物亦可引起宿主細胞產生 necrosis，此一結果與病原菌誘發宿主之結果有所不同，其可能機制為吞噬物質之表面抗原不同而誘發吳郭魚之頭腎巨噬細胞死亡有所不同，然而其真正機制實有待進一步之研究。

非特異性免疫為魚類對抗外來病菌時之主要防衛機制，並且頭腎巨噬細胞在此機制上又扮演著一個相當重要的角色。因此，釐清頭腎巨噬細胞和病原在非特異性免疫上之關係，將有助於魚隻對抗外來病原的感染。所以，期盼本研究結果可以提供給相關研究之人員參考，並在臨床魚類免疫防衛上有所助益。

誌 謝

本研究承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局之經費支持 (99AS-9.2.2-BQ-B1 (28))，特為致謝！

參考文獻

1. Baran J, Guzik K, Hryniewicz W, Ernst M, J. Pryjma Flad. Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infect Immun* 64: 4242-4248, 1996.
2. Chilmonczyk S, Monge D. Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish Shellfish Immunol* 9: 319-333, 1999.
3. Cotter G., Verhaegen S, Clynes M, Kavangh K. Membrane changes associated with the early stages of apoptosis in Hep-2 cells decrease susceptibility to adherence by *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 35: 219-224, 1997.
4. do Vale A, Marques F, Silva MT. Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Shellfish Immunol* 15: 129-144, 2003.
5. do Vale A, Silva MT, dos Santos NM, Nascimento DS, Reis-Rodrigues P, Costa-Ramos C, Ellis AE, Azevedo JE. AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Mol Microbiol* 58: 1025-1038, 2005.
6. Evans DL, Cooper EL. Nature killer cells in ectothermic vertebrates. *Bioscience* 40: 745-749, 1990.
7. Evans DL, Jaso-Friedmann L. Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annu Rev Fish Dis* 2: 109-121, 1992.
8. Evans DL, Jaso-Friedmann L. NK-cell in domestic animals: phenotype, target cell specificity and cytokine regulation. *Vet Res Commun* 17: 429-447, 1993.
9. Evans DL, Shotts EB, Jaso-Friedmann L. *In vivo* modulation of innate resistance to *Edwardsiella ictaluri* with a phosphatase inhibitor. *Dis Aquat Org* 33: 19-24, 1998.
10. Evans DL, Taylor SL, Leary JH, Bishop GR, Eladar A, Jaso-Friedmann L. *In vivo* activation of tilapia nonspecific cytotoxic cells by *Streptococcus iniae* and amplification with apoptosis regulatory factor. *Fish Shellfish Immunol* 10: 419-434, 2000.
11. Grayfer L, Garcia EG, Belosevic M. Comparison of macrophage antimicrobial responses induced by type II interferons of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *J Biol Chem* 285: 23537-23547, 2010.
12. Grayfer L, Hanington PC, Belosevic M. Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) induces pro-inflammatory gene expression and enhances antimicrobial responses

- of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. Fish Shellfish Immunol 26: 406-413, 2009.
13. Hosoki K, Nakamura A, Nagao M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Wada H, Nobori T, Fujisawa T. Differential activation of eosinophils by 'probiotic' *Bifidobacterium bifidum* and 'pathogenic' *Clostridium difficile*. Int Arch Allergy Immunol 152 Suppl 1: 83-89, 2010.
 14. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. Infect Immun 65: 298-304, 1997.
 15. Lee J, Remold HG, Leong MH, Kornfeld H. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. J Immunol 176: 4267-4274, 2006.
 16. Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, Falkow S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 93: 9833-9838, 1996.
 17. Moore KJ, Maltashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. J Immunol 152: 2930-2937, 1994.
 18. Norum M, Bogwald J, Dalmo RA. Isolation and characterisation of spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) macrophages. Fish Shellfish Immunol 18: 381-91, 2005.
 19. Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, van Muiswinkel WB. Techniques in Fish Immunology. Fair Haven, NJ, USA. P. 11-12, 1990.
 20. Taylor SL, Jaso-Friedmann L, Allison AB, Eldar A, Evans DL. *Streptococcus iniae* inhibition of apoptosis of nonspecific cytotoxic cells: a mechanism of activation of innate immunity in teleosts. Dis Aquat Org 46: 15-21, 2001.
 21. Zlotkin A, Chilmonczyk S, Eyngor M, Hurvitz A, Ghittino C, Eldar A. Trojan horse effect: phagocyte-mediated *Streptococcus iniae* infection of fish. Infect Immun 71: 2318-2325, 2003.
 22. Zychlinsky A, Sansonetti P. Apoptosis in bacterial pathogenesis. J Clin Invest 100: 493-496, 1997.

Non-Specific Immune Responses of Hybrid Tilapia (*Oreochromis Niloticus* × *Oreochromis Mossambicus*) Anterior Kidney-Derived Macrophage Against Different Aquatic Bacteria

¹ Ming-Hui CHEN, ² Shao-Wen HUNG, ³ Yu-Hsing LIN, ¹ Ching-Fu CHENG, ⁴ Ching-Yu TU,
¹ Chen-Hsuan CHANG, ¹ Min-Liang WONG, *¹ Way-Shyan WANG

¹ Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan

² Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica, Taipei 115, Taiwan

³ Nursing Department of Yuanpei University, Hsinchu 300, Taiwan

⁴ Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taichung 413, Taiwan

(Received: January, 11, 2011. Accepted: March, 24, 2011)

ABSTRACT The aim of this study was to investigate the non-specific immuno-responses of hybrid tilapia (*Oreochromis Niloticus* × *Oreochromis Mossambicus*) anterior kidney-derived macrophage (AKM) against different aquatic bacteria. Our results showed that AKM possessed a highest phagocytic ability to engulf yeast, but a lowest phagocytic ability to engulf *Streptococcus iniae*, *Vibrio* sp., and *Edwardsiella tarda*. Furthermore, AKM showed the highest production of free radicals when engulfing *Vibrio* sp.. The production of nitric oxide, cell death, and apoptosis stained with FITC-annexin V and propidium iodide were significantly increased in AKM treated with bacteria for 12 h. AKM exhibited the highest apoptosis rate when AKM were inoculated with *Vibrio* sp.. Based on these results, aquatic bacteria could affect non-specific immune responses of AKM and induced apoptosis that was the main mechanism of cell death when AKM were infected with bacteria. [Chen MH, Hung SW, Lin YH, Cheng CF, Tu CY, Chang CH, Wong ML, * Wang WS. Non-Specific Immune Responses of Hybrid Tilapia (*Oreochromis Niloticus* × *Oreochromis Mossambicus*) Anterior Kidney-Derived Macrophage Against Different Aquatic Bacteria. Taiwan Vet J 37 (3): 203-213, 2011. * Corresponding author TEL: 8864-22840894 ext508, FAX: 886-4-22862073, E-mail: wswang@dragon.nchu.edu.tw]

Key words: apoptosis, free radicals, macrophage, non-specific immunity, tilapia