



硬骨鱼类黏膜B细胞和免疫球蛋白研究进展

孔维光¹, 曹佳烽², 程高锋², 于永耀², 徐镇^{1*}

1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070

* 联系人, E-mail: zhenxu@ihb.ac.cn

2022-12-06 收稿, 2023-01-05 修回, 2023-01-06 接受, 2023-01-09 网络版发表

国家自然科学基金(32225050, 32073001)资助

摘要 鱼类生存环境特殊, 黏膜组织与外界水环境直接接触, 极易受到水中各种病原的侵染. 在长期演化过程中, 鱼类形成了一套独特的黏膜免疫系统, 即黏膜相关淋巴组织(mucosal-associated lymphoid tissues, MALTs), 包含B细胞和免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)等重要的免疫细胞和效应分子, 在抵御外界病原感染过程中发挥重要的功能. 此外, 鱼类黏膜表面定居着大量共生菌, 其与黏膜免疫之间的互作共同维持了宿主的黏膜稳态平衡. 类似于哺乳类和鸟类黏膜IgA, 硬骨鱼类分泌型免疫球蛋白T(secretory immunoglobulin T, sIgT)能够结合到共生菌群表面发挥免疫排斥作用, 在维持黏膜稳态中具有重要的功能. 解析MALTs在鱼类抗感染免疫以及黏膜微生物稳态调节中的机制对鱼类免疫学乃至整个脊椎动物比较免疫学的基础研究都具有重要意义. 本文就鱼类黏膜免疫系统组成、黏膜B细胞和Ig抵御病原感染的功能以及黏膜Ig与共生微生物互作等方面的研究进行了综述, 并对鱼类黏膜免疫的发展前景进行了展望, 旨在从黏膜免疫角度为鱼类疾病的防控提供参考依据.

关键词 鱼类, 黏膜免疫, B细胞, 免疫球蛋白, 黏膜稳态

自20世纪60年代以来, 脊椎动物黏膜免疫研究一直是生命科学领域中最活跃的研究热点之一. 尤其近年来, 随着对哺乳动物黏膜免疫系统的深入解析, 越来越多的研究表明黏膜免疫系统是机体直接防御外界病原的“边防部队”, 为机体筑起一道重要的保护屏障. 鱼类生存环境特殊, 与陆生环境相比, 水中病原微生物更为丰富, 因此鱼类需要更加重要的保护机制以应对外界病原入侵^[1]. 在长期演化过程中, 鱼类形成了丰富而广泛的黏膜组织, 具有类似于哺乳动物的黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissues, MALTs), 包含T细胞、B细胞、巨噬细胞、树突状细胞等主要的免疫细胞类群和细胞因子以及免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)等重要的效应分子^[1-3]. 研究表明, 水体中绝大

多数的病原(细菌、病毒和寄生虫等)经黏膜入侵鱼体^[4]. 当受到病原感染时, 鱼类MALTs能够启动一系列精密而有序的免疫反应来清除病原体^[1]. 尽管鱼类黏膜存在适应性免疫应答的现象已经被广泛证实报道^[4-6], 但其深层次的机制研究还十分有限. 近年来, 正是得益于鱼类黏膜Ig分子和B细胞的发现及其在黏膜免疫中的功能解析^[3,7], 病原诱导的鱼类黏膜适应性免疫应答机制才逐渐被揭示^[8], 这对鱼类免疫学的理论知识体系和鱼用黏膜疫苗的设计都具有重要的意义. 因此, 本文总结了鱼类黏膜免疫系统组成、黏膜B细胞和Ig在抵御病原感染中的功能以及黏膜Ig维持微生物稳态的作用机制研究进展, 并对其在水产养殖中的应用前景进行了展望, 期望为鱼类疾病的生物防控提供参考依据.

引用格式: 孔维光, 曹佳烽, 程高锋, 等. 硬骨鱼类黏膜B细胞和免疫球蛋白研究进展. 科学通报, 2023, 68: 1869–1883

Kong W G, Cao J F, Cheng G F, et al. Research progress and prospects of mucosal B cells and immunoglobulins of teleost fish (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 1869–1883, doi: [10.1360/TB-2022-1251](https://doi.org/10.1360/TB-2022-1251)

1 硬骨鱼类黏膜免疫系统的组成

鱼类MALTs主要包括肠、皮肤、鳃等暴露于外界环境中的组织及其表面黏液,构成了抵御病原入侵的第一道防线。根据位置的不同,目前已鉴定出7种不同的MALTs^[9,10]: 肠相关淋巴组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)、鳃相关淋巴组织(gill-associated lymphoid tissue, GIALT)、皮肤相关淋巴组织(skin-associated lymphoid tissue, SALT)、鼻相关淋巴组织(nasal-associated lymphoid tissue, NALT)、口相关淋巴组织(buccal-associated lymphoid tissue)、咽相关淋巴组织(pharyngeal-associated lymphoid tissue)和鳔相关淋巴组织(swim bladder-associated lymphoid tissue)(图1)。

1.1 肠相关淋巴组织(GALT)

肠是鱼体消化道的重要组成部分,也是食物抗原和病原入侵机体的主要部位之一。根据肠细胞的显微结构,鱼类肠道一般被细分为3段: 第一段肠道细胞常被视为吸收细胞,主要用于摄取食物中的蛋白质;第二段肠道细胞具有高胞饮活性,可吸收大分子等物质;第三段肠道细胞具有渗透压调节功能^[11]。研究显示,肠道除具有消化功能外,肠黏膜还含有大量免疫细胞,参与机体的抗感染免疫应答^[12]。目前普遍认为,前肠主要执行消化功能,而中后肠是抗原摄取以及免疫应答的主要部位^[13]。与哺乳动物不同的是,鱼类肠黏膜缺乏派尔集合淋巴结(Peyer patch, PP)或肠系膜淋巴结(mesenteric lymph node, MLN)^[14]。免疫细胞按位置分布可分为: 固有层淋巴细胞(lamina propria lymphocytes, LPLs)和上皮内淋巴细胞(intraepithelial lymphocytes, IELs),两者均呈弥散性分布。其中LPLs包括多种常驻免疫细胞,如粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞,而IELs

主要由T细胞和B细胞组成^[12,14]。此外,肠黏膜含有丰富的天然免疫成分(如溶菌酶、抗菌肽、补体、促炎细胞因子、抗炎细胞因子和白细胞介素等)和适应性免疫成分(抗体),能抵抗病原入侵、维护肠黏膜的免疫稳态^[3,15]。

1.2 鳃相关淋巴组织(GIALT)

鳃是鱼类的主要呼吸器官,与外界直接接触,从水环境中摄取溶解氧,同时兼具离子交换、小分子代谢物排泄和渗透压调节等生理机能^[16]。鱼类鳃组织包括鳃耙、鳃弓、鳃丝、鳃小片及鳃盖等结构,其中鳃小片富含上皮细胞、柱细胞、内皮细胞、黏液细胞、泌氯细胞和毛细血管网,是行使生理功能的基本单元^[17,18]。黏液细胞可以不断地产生黏液覆盖于鳃黏膜表面,形成一个保护鳃细胞免受外部污染物、毒素和病原体侵染的保护层^[17]。免疫细胞如淋巴细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、抗体分泌细胞等和效应分子如抗菌肽、补体、急性反应物质等为鳃黏膜提供一道重要的免疫屏障^[19,20]。一直以来,人们普遍认为鱼类仅存在弥散性MALT(diffused-MALT, D-MALT),缺乏恒温动物组织型淋巴结构(organized-MALT, O-MALT)。然而,有学者在大西洋鲑(*Salmo salar*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的鳃中发现了一种由网状上皮细胞构成的淋巴组织,称为“鳃间淋巴组织”(interbranchial lymphoid tissue, ILT),其中聚集了大量T细胞和少量的B细胞^[21,22],从而颠覆了鱼类中缺乏O-MALT结构的认知。但这种结构是否具有特定功能以及是否称得上是真正意义的O-MALT还有待进一步研究。

1.3 皮肤相关淋巴组织(SALT)

脊椎动物皮肤结构非常相似,主要由表皮层和真

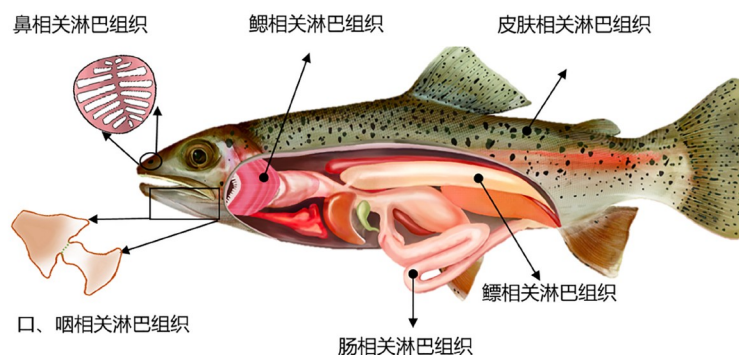


图1 (网络版彩色)鱼类黏膜相关淋巴组织(MALTs)

Figure 1 (Color online) Teleost mucosa-associated lymphoid tissues (MALTs)

皮层组成。然而,由于不同分类地位的脊椎动物经历了来自外界环境不同程度的演化压力,它们的皮肤在结构和成分上也存在各自的独特性^[23]。哺乳动物中,皮肤表皮层出现角质化,免疫应答反应主要发生于真皮层^[24]。与哺乳动物皮肤不同,鱼类的皮肤未角质化,被一层具有活性上皮细胞所覆盖,是鱼类暴露于外界环境面积最大的黏膜组织,在抵御各种病原入侵中发挥重要作用。鱼类表皮层含有大量黏液细胞,以及巨噬细胞、粒细胞、淋巴细胞等免疫细胞^[25],皮肤黏液中富含黏蛋白、抗菌肽和Ig等免疫分子。这些免疫细胞和免疫分子在皮肤黏膜中发挥重要的免疫防御功能^[26,27]。鱼类皮肤真皮层主要由弹性纤维和胶原纤维构成,其中嵌入少量平滑肌细胞、结缔细胞和神经纤维细胞等细胞类群^[25]。因此,鱼类皮肤黏膜具有免疫反应所需的基本元素,且免疫反应主要发生于表皮层中^[27]。

1.4 鼻相关淋巴组织(NALT)

鼻腔是脊椎动物重要的嗅觉器官,在个体摄食过程中起着重要的作用^[28]。尽管嗅觉器官的形态在不同脊椎动物之间存在很大的差异,但嗅觉器官在解剖学和分子组成上具有高度的保守性^[28,29]。鼻腔主要存在两种类型的上皮,即神经上皮和黏膜上皮,神经上皮具有感知化学信号的功能,而黏膜上皮主要负责鼻腔内黏液的分泌工作^[30]。陆生动物通过鼻腔吸入空气,神经上皮感受气体中的化学信号,然后经神经纤维传递到大脑,最终使机体产生一系列的生活行为。鱼类则是通过鼻腔感知水体中的化学物质,进而影响鱼类摄食、繁殖、洄游和防御等生命活动^[31]。脊椎动物鼻腔在感知气体或水体中化学物质的同时,也面临来自空气和水体中各种病原微生物的侵害。大多数哺乳动物鼻腔内含有O-MALT(如扁桃体)和一些D-MALT,从而形成重要的免疫保护屏障^[32,33]。为了抵御水中病原对嗅觉系统的损伤,鱼类鼻腔黏膜形成了哺乳动物类似的NALT^[34-36]。长期以来,科学家一直认为鱼类鼻腔黏膜缺乏O-MALT。直到2015年,Tacchi等人^[37]发现,在非洲肺鱼(*Protopterus annectens*)上下颌黏膜中存在由B细胞和T细胞聚集而成的O-NALT,但其不具有生发中心(germinal center)的形态。另外,最新研究发现,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)鼻腔黏膜存在O-NALT——一种新型淋巴上皮,即淋巴细胞大量聚集的位置,经过免疫接种后B细胞在此处能够发生增殖,并且表达哺乳动物生发中心典型的分子标记,如AICDA、CXCR4和

CXCR5等^[38]。但关于鱼类O-NALT的具体功能还需要进一步解析。

1.5 口和咽相关淋巴组织

口咽腔位于脊椎动物消化道的最前端,是连接消化道和呼吸道的十字路口,会同时受到来自食物、空气或水中大量病原微生物的多重威胁^[39]。口咽黏膜覆盖整个口咽腔,起到重要的免疫防御作用。陆生脊椎动物口咽腔通过内鼻孔与鼻腔相连,两者黏膜层中存在由扁桃体组成的咽淋巴环(Waldeyer's ring)和一些D-MALT^[40]。当受到外界病原感染,口咽黏膜能及时启动有效的先天性和适应性免疫应答保护机体^[41]。与哺乳动物不同,硬骨鱼类缺乏内鼻孔,口咽腔与鼻腔为两个独立的隔室,且不存在扁桃体,但存在D-MALT,其中含有大量黏液分泌细胞和弥散性分布的B细胞^[42],在受到病原侵染时能够产生类似哺乳动物的免疫防御机制^[43,44]。

1.6 鳔相关淋巴组织

鳔俗称鱼泡,是一种充气器官,它可以通过充气和放气来调节鱼体的比重,以调控鱼体游动时的上浮和下潜。从演化角度上,人们普遍认为鱼鳔是肺的同源器官^[45]。事实上,某些演化早期鱼类如肺鱼(*Dipnomorpha*)、弓鳍鱼(*Amia calva*)和雀鳝(*Lepisosteus*)等的鳔在结构上已特化为呼吸器官,具有气体交换功能。除此之外,鱼鳔还具有感觉和发声的作用^[46,47]。鳔黏膜由纤维结缔组织分成很多小气室,每个小室还含有若干个小气囊,它们分别类似于哺乳动物的肺泡和肺小泡。多项研究表明,四足动物的肺是一个重要的MALT,参与呼吸道抗感染免疫过程^[48,49]。大多数鱼类的鳔与食道相连,因此,在一定程度上可能会受到来自消化道病原微生物的刺激。Villasante等人^[50]发现,虹鳟鳔内存在不同区系的微生物群落,但其与消化道内的微生物组成存在很大的差异。然而,目前关于鳔黏膜免疫应答的研究还十分有限。Yang等人^[51]经过转录组测序分析发现鲶鱼(*Ictalurus punctatus*)鳔内表达大量趋化因子。本实验室最新研究发现,虹鳟鳔黏膜存在MALT,弥散性分布着丰富的B细胞,病毒诱导能够产生强烈的免疫应答反应^[10]。

2 硬骨鱼类MALTs中B细胞和免疫球蛋白

2.1 B细胞

脊椎动物B细胞主要承担合成抗体的功能,在适应

性免疫应答中发挥重要作用,而且这一功能在进化过程中高度保守^[52]。值得一提的是,B细胞还具有吞噬能力、分泌天然Ig和细胞因子等先天性免疫特征^[53]。尽管无颌鱼类存在可变淋巴细胞受体(variable lymphocyte receptor, VLR)样B细胞,但其不具备抗体分泌能力,因此有颌鱼类是最早拥有真正意义上B细胞和Ig的脊椎动物^[54]。目前,硬骨鱼类已先后被鉴定出3种主要B细胞亚群(IgM⁺、IgM⁻IgD⁺和IgT⁺ B细胞)^[55]。其中IgM⁺ B细胞主要分布于血清、脾脏和头肾中,在系统免疫中发挥重要功能。IgT⁺ B细胞是MALT中的优势B细胞亚群,主要参与黏膜免疫反应。IgM⁺ B细胞在虹鳟系统性组织内占有所有B细胞的72%~83%,而IgT⁺ B细胞占有所有B细胞的16%~27%。相比之下,在黏膜组织中IgT⁺ B细胞含量却略高于IgM⁺ B细胞(图2)^[3,10,27,35,43,44,56]。IgM⁻IgD⁺ B细胞是在斑点叉尾鲷中首次发现的一种新B细胞类型^[55],也是到目前为止鱼类中功能最不明确的一类B细胞类群。后来的研究发现,在虹鳟的鳃和肠中也存在IgM⁻IgD⁺ B细胞,进一步暗示IgM⁻IgD⁺ B细胞也可能在鱼类黏膜免疫应答中发挥着重要的功能^[57,58]。此外,最新研究发现,当机体受到刺激时,IgM⁻IgD⁺ B细胞表达独特VDJ基因组库,在脾脏和黏膜组织中的表达有很大差异^[58]。

2.2 免疫球蛋白

免疫球蛋白是体液免疫中最为关键的效应分子之一^[59],其结构通常由两条重链和两条轻链组成,每条重链和轻链又分别包括恒定区(constant region, C区)和可变区(variable region, V区)。其中,C区主要用于定义Ig类型和介导抗体分子的功能,如调理作用、中和作用、抗体依赖性细胞毒性(antibody-dependent cellular

cytotoxicity, ADCC)和补体激活等;V区则主要用于抗原的特异性识别^[60]。在哺乳动物中,根据Ig重链C区的不同,将其重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 和 ϵ 五类,分别负责编码5种主要类型的Igs(IgG、IgA、IgD、IgE和IgM),而硬骨鱼类中主要存在3种Ig类型^[9],即IgM、IgT和IgD,它们的重链依次为 μ 、 δ 和 τ/ζ ^[7,61]。

IgM是硬骨鱼类体液中最丰富的Ig类型。编码IgM的 μ 链(*Igh μ*)由4个 μ 恒定区(C μ)和两个跨膜区组成^[61]。与哺乳动物类似,硬骨鱼类*Igh μ* 的前体mRNA经过差异剪接,可以形成分泌型IgM(sIgM)和膜结合型IgM(mIgM)。大多数硬骨鱼类sIgM拥有4个C μ 结构域(C μ 1~C μ 4)和1个分泌尾,而mIgM则由3个C μ 结构域(C μ 1~C μ 3)和1个分泌尾组成^[62]。另外,在南极鳕(*Notothenia coriiceps*)和青鳉(*Oryzias latipes*)中mIgM仅含两个C μ 结构域(C μ 1和C μ 2)^[63,64],斑马鱼的mIgM只含1个C μ 结构域^[65]。不同于哺乳动物五聚体IgM,硬骨鱼类血清和黏液中的IgM主要以四聚体形式存在,分子量大小为660~800 kD,且单体之间缺乏J链连接,主要以二硫键结合^[3,66]。据报道,二硫键具有增加IgM的稳定性以及对抗原的亲和力^[67]。不同鱼类血清中IgM浓度差异很大,变化范围为0.6~21 mg/mL,同时受到水温、水质、应激、感染和免疫接种等多种因素影响^[61,68]。然而,与血清相比,黏液中IgM含量较低,含量在3.7~280 μ g/mL之间(表1)。免疫接种或病原感染都可诱导血清产生高效价的IgM抗体,而黏液中IgM抗体效价很低,甚至在有些黏液中难以被检测到^[3,27,35,43,44]。值得一提的是,IgM的亲合成熟已在硬骨鱼类中得到证实,但其在鱼类中的亲和力程度远低于哺乳动物^[67]。此外,有报道显示,鱼类IgM重链基因可变区的DNA存在体细胞超突变,但其是否与鱼类抗体的亲和力成熟直接相关还有待进

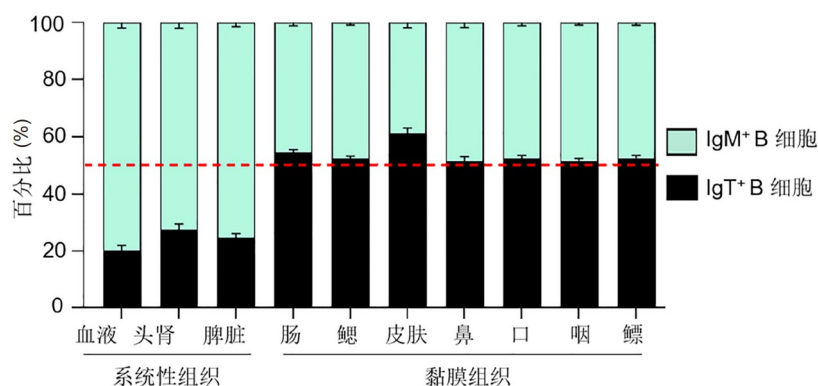


图2 (网络版彩色) IgT⁺和IgM⁺ B细胞在虹鳟系统组织和黏膜组织中的百分比

Figure 2 (Color online) Percentage of IgT⁺ and IgM⁺ B cells in the systemic and mucosal tissues of rainbow trout

表1 虹鳟血清和黏液中免疫球蛋白的含量^[10,61,68]Table 1 Concentrations of immunoglobulins in rainbow trout serum and mucus^[10,61,68]

样品	浓度(μg/mL)			血清(IgT/IgM)/ 黏液(IgT/IgM)
	IgM	IgD	IgT	
血清	2520~5534	18.59~35.6	3.7~11	
肠黏液	~74.9	未检测	~7.1	~63
皮肤黏液	~4.63	~0.52	~0.31	~38
鳃黏液	~20.06	~1.22	~1.55	~124
鼻黏液	~280	~0.84	~1.7	~4
口黏液	~221	~7	~9	~23
咽黏液	~72.5	~1.85	~3.46	~20
鳔黏液	~3.7	~0.23	~0.25	~30

一步研究^[58,69]。

IgD是脊椎动物最原始的Ig类型之一,在低等的软骨鱼类到高等的哺乳类动物中都普遍存在^[2,12]。由于鱼类基因存在多轮复制和缺失, *ighδ*基因编码2~16个δ恒定区(Cδ),因此IgD在不同物种间的可塑性非常高^[12]。在虹鳟和斑马鱼中, sIgD和mIgD都是由同一个*ighδ*基因编码而成^[70,71],而斑点叉尾鲷则是由两个不同*ighδ*基因分别编码^[72]。有趣的是,在河豚(*Takifugu rubripes*)、青鳉和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中仅存在mIgD^[64,73,74]。截至目前,鉴于有限的抗体工具,仅在虹鳟和鲶鱼中检测了IgD蛋白水平。虹鳟血清中存在两种sIgD,分子量分别约为400和240 kD,浓度为2~80 μg/mL^[12]。然而,鲶鱼血清中的两种sIgD分子量分别约为180和130 kD,总浓度约为40 μg/mL^[61]。据报道,IgD在血清中的浓度远高于黏液^[27,35,43,44]。一些研究显示,在受到病毒、病原菌和寄生虫感染后,虹鳟IgD的转录水平有所增加,但血清和黏液中并没有检测到病原特异性IgD抗体^[27,35,43,44,75,76]。虽然有报道表明,鱼类IgD有可能作为模式识别受体在先天免疫过程中发挥作用^[57],但其在病原感染中的具体作用机制仍需进一步研究。

硬骨鱼类IgT的鉴定最早始于2005年,科研工作者首先在虹鳟和斑马鱼中发现了一种新的IgH基因,分别命名为*ighτ*和*ighζ*(分别编码为IgT和IgZ)^[7]。后来经广大科研人员的呼吁,于2021年将IgT和IgZ统一命名为IgT^[77]。在大多数硬骨鱼类中, *ighτ*基因编码4个τ恒定区(Cτ)和两个跨膜区。然而,不同硬骨鱼类IgT所含CH结构域的数目也不尽相同,在斑马鱼、虹鳟、鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、大西洋

鲑和太平洋蓝鳍金枪鱼(*Thunnus orientalis*)等硬骨鱼类中, IgT含有4个Cτ结构域,但是在个别物种中IgT仅含有两个或3个Cτ结构域,如三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、南极鳕和河豚等^[7,61]。迄今为止,仅对斑马鱼和虹鳟中IgT蛋白的结构与功能进行了较为详细的研究^[12,78]。斑马鱼中的IgT包括两种亚型,即IgT1和IgT2,其中IgT1主要存在血清、鳃和皮肤黏液中,而IgT2仅存在于黏液中^[78]。虹鳟中IgT存在3种亚型,即IgT1、IgT2和IgT3,它们都具有分泌型和膜结合型的形式。研究进一步发现,虹鳟血清中的IgT以单体形式存在,分子量约为180 kD,而在黏液中主要以多聚体形式存在,少量则以单体形式存在^[3,10,27,35,43,44]。尽管在黏液中IgT的浓度(0.25~9.0 μg/mL)低于血清(3.7~11.0 μg/mL),但IgT和IgM含量在黏液中的比值是其在血清中的4~124倍^[10,61](表1)。值得注意的是,多项研究表明,鱼类IgT的功能与哺乳动物和鸟类IgA以及两栖类IgX类似,被认为是一种特异于黏膜免疫的Ig类型,在黏膜抵御病原感染过程中扮演重要的角色^[3,61],即当鱼体受到病原感染后,其血清中含有大量特异性IgM,而黏膜局部则分泌大量病原特异性IgT^[3,10,27,35,43,44,79]。

3 硬骨鱼类黏膜B细胞和Ig抗感染免疫

3.1 寄生虫诱导的B细胞和Ig免疫反应

寄生虫通常寄生在鱼体表黏膜及体内的各种组织器官上,导致鱼体生长缓慢、抵抗力下降并引起死亡,给鱼类养殖业造成重大经济损失^[80]。虽然近年来鱼类寄生虫的分类学和生物学得到广泛研究^[81],但是关于鱼类抵抗寄生虫感染的黏膜免疫机制研究仍相对较少。

研究发现,虹鳟感染黏孢子虫(*Ceratomyxa shasta*)和多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)后^[3,27,35,43,44,56],黏膜组织中IgT⁺ B细胞的数量相对于未感染组显著增加了2~8倍,黏液中IgT的浓度升高了5~51倍,特异性IgT抗体效价达到1:10~1:160,而IgM⁺ B细胞的数量和IgM浓度则没有显著变化。此外,IgM抗体效价在黏液中也较低,在鳃、鼻、口和咽黏液中仅为1:10,甚至在皮肤和肠黏液中未检测到病原特异性IgM抗体效价。与黏膜组织相反,系统组织(脾脏)中IgT⁺ B细胞的数量没有显著变化,而IgM⁺ B细胞的数量相对于未感染组增加了~2倍。同时血清中IgM浓度增加了3~5倍,特异性IgM抗体效价达到1:4000,而IgT浓度升高了2~5倍,但特异性IgT抗体效价仅为1:10(表2)。然而,无论在血清还是黏液中均未检测到IgD的响应。在三代虫(*Gyrodactylus cichlidarum*)感染尼罗罗非鱼的研究中发现,皮肤中IgT的转录水平上调,而IgM保持不变^[82]。这些结果说明IgT主要在黏膜免疫中发挥功能,而IgM主要在系统免疫中发挥功能。但也有研究指出,海水黏孢子虫(*Enteromyxum scophthalmi*)感染大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)能够导致肠黏膜IgM⁺ B细胞数量显著升高^[83]。在肠道原生寄生虫卡氏钩虫(*Goussia carpelli*)感染鲤的研究中也获得了类似的结果^[84]。此外,Olsen等人^[85]通过免疫组织化学分析发现,虹鳟感染多子小瓜虫后,其鳃中IgT⁺ B细胞和IgM⁺ B细胞并没有显著变化。在鲈鱼的研究中发现,小瓜虫感染导致皮肤中IgM⁺ B细胞数量和IgM抗体分泌量均显著增加,且黏液中特异性IgM抗体可以显著降低鲈鱼的易感性^[86]。Luo等人^[87]研究发现,石斑鱼(*Epinephelus coioides*)被刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)感染后,其血清和皮肤黏液中均存在特

异性IgM抗体,且皮肤中特异性IgM能降低刺激隐核虫幼虫的游动能力。我们最近的研究发现,虹鳟黏液中特异性IgT抗体可以结合到小瓜虫(已侵染到体表组织中)表面,驱使其从宿主体表脱离^[43]。而对于游离状态的寄生虫,鱼类皮肤黏液(含有高IgT抗体滴度)可以显著降低小瓜虫的游动速度(图3),而黏液中IgT耗竭后对小瓜虫游动速度的影响与对照组相比无明显差异(结果未发表)。以上研究表明,鱼类B细胞和Ig在黏膜抗寄生虫感染过程中发挥重要的免疫功能。值得一提的是,鱼类B细胞和Ig对不同种属寄生虫感染时的免疫应答响应和类型似乎存在一定的差异性,这与哺乳动物肠黏膜感染不同株型的寄生虫后IgA的响应类似^[88]。

3.2 病原菌诱导的B细胞和Ig免疫反应

细菌性疾病是限制水产业健康发展的主要因素之一,因此,对鱼类抗病原菌感染的免疫功能研究一直是国内外科研工作者的重点关注方向。鱼类黏膜与外界病原菌直接接触,是多数病原菌入侵机体的主要门户,而鱼类黏膜B细胞和Ig免疫反应在抵御病原菌感染、维持内环境稳态和机体健康方面起着重要作用^[61]。Evenhuis和Cleveland^[89]用耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)浸泡感染虹鳟,发现肠黏膜中的IgM和IgT基因在感染10 d后显著上调表达,当采用注射方式进行感染,10 d后,肠黏膜中仅IgM表达水平显著增加,而IgT没有显著变化。与注射相比,浸泡迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)更能诱导IgT在肠、胃、皮肤和鳃等黏膜组织的表达水平,而注射则显著提高IgT在脾脏等系统组织的表达水平^[90]。Velázquez等人^[91]用迟钝爱德华氏菌浸泡感染尼罗罗非鱼,发现IgT在皮肤的表达水平显著升高,

表2 寄生虫感染后虹鳟系统和黏膜组织中B细胞与免疫球蛋白的变化^[3,27,35,43,44,56]

Table 2 Responses of B cells and immunoglobulins in systemic and mucosal tissues of rainbow trout that survived parasitic infection^[3,27,35,43,44,56]

样品	寄生虫类型	IgT ⁺ B细胞 升高倍数	IgT浓度 升高倍数	IgT效价	IgM ⁺ B细胞 升高倍数	IgM浓度 升高倍数	IgM效价
肠	黏孢子虫	~4.8	~51	~160	无变化	无变化	无
皮肤	多子小瓜虫	~8	~10	~10	无变化	无变化	无
鳃	多子小瓜虫	~2	~10	~100	无变化	无变化	~1:10
鼻	多子小瓜虫	~2	~6	~100	无变化	无变化	~1:10
口	多子小瓜虫	~8	~8	~40	无变化	无变化	~1:10
咽	多子小瓜虫	~6	~5	~40	无变化	无变化	~1:10
头肾	多子小瓜虫	无变化	未检测	未检测	~2	未检测	未检测
血清	多子小瓜虫	未检测	3~5	~10	未检测	3~5	~1:4000

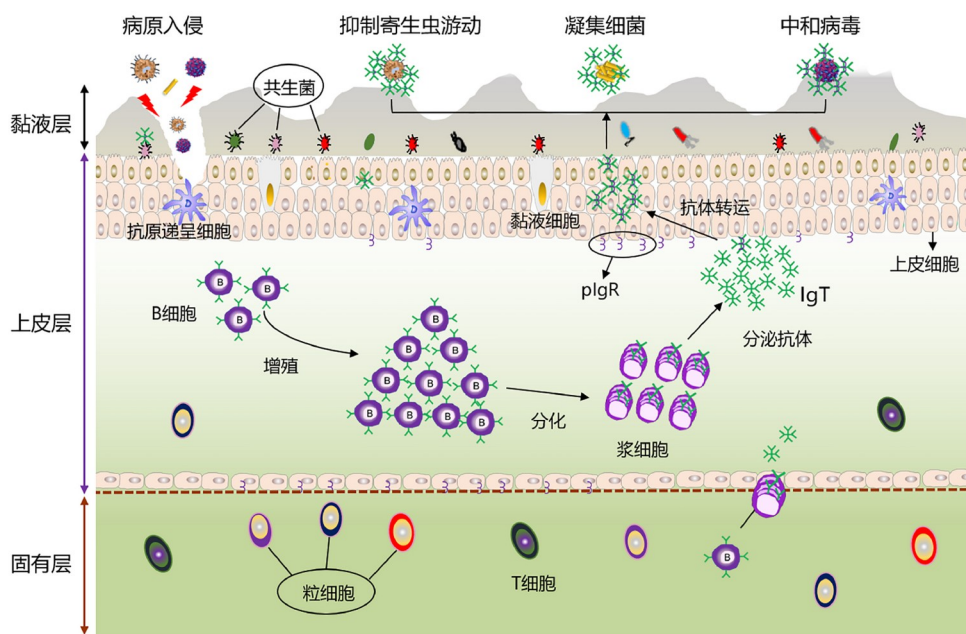


图3 (网络版彩色)鱼类MALTs B细胞和Ig免疫应答

Figure 3 (Color online) B cells and Ig immune responses in fish MALTs

而在头肾没有明显变化。柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)浸泡感染泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)后,皮肤中IgT的表达量显著升高,且变化倍数远高于IgM^[92]。此外,香鱼(*Plecoglossus altivelis*)在浸泡感染鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)10和20 d后,其体肾和鳃中IgM和IgT的表达水平均显著升高,且在鳃中增加的幅度大于体肾,而IgD表达水平无显著变化^[93]。这些数据表明,当病原菌经黏膜途径感染时,IgT的分子表达水平显著上升,表明IgT在黏膜组织被病原菌普遍诱导。上述研究仅分析了鱼类黏膜中Ig在病原菌感染后转录表达水平的变化。近几年,在中国科学院水生生物研究所鱼类免疫与寄生虫学科组支持下,本实验室成功建立了柱状黄杆菌对虹鳟的浸泡感染模型,进一步从细胞和蛋白水平上分析了病原菌诱导的鱼类黏膜B细胞和Ig的免疫应答反应。研究发现,受到柱状黄杆菌感染后,虹鳟黏膜组织(皮肤、鳃、鼻和口)中IgT⁺ B细胞数量均显著增加(分别上升~4、~6、~5和~5倍),黏液中分泌有大量病原菌特异性IgT^[36,79,94,95],发挥显著的凝集作用(结果未发表)(图3)。而在系统组织如头肾和脾脏中,感染后IgM⁺ B细胞数量显著上升,血清中含有大量特异性IgM,能显著凝集柱状黄杆菌,降低其对鱼体的感染力^[96]。这些结果进一步证实,IgM和IgT分别在系统免疫和黏膜免疫中发挥重要作用。然而有些研究显示,

IgM在黏膜免疫中也发挥一定功能。Mu等人^[97]用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)注射感染鲤,发现其血清和肠黏液中存在大量特异性IgM抗体。值得注意的是,von Gersdorff Jørgensen等人^[98]采用同居感染模型对虹鳟进行嗜冷黄杆菌(*Flavobacterium psychrophilum*)感染实验,发现皮肤中IgM⁺和IgD⁺ B细胞的数量显著增加,而IgT⁺ B细胞非常稀少,且在整个实验周期内保持不变。这种差异可能主要源于两个原因:一方面是B细胞针对不同类型的病原菌产生不同B细胞类型的反应;另一方面是不同类型的抗虹鳟IgT抗体对B细胞具有不同的识别能力。在斑马鱼的研究中,Ji等人^[78]发现,在受到迟钝爱德华氏菌感染后,IgT1⁺ B细胞在脾脏、头肾、血液、肠、鳃和皮肤中均有所增加,而IgT2⁺ B细胞仅在肠、鳃和皮肤等黏膜组织中显著增加。同时,他们在黏液中检测到了高滴度特异性IgT1和IgT2,而在血清中仅存在特异性IgT1抗体(未检测到IgT2)。这些数据表明,斑马鱼IgT2是专职的黏膜Ig类型,而IgT1则在系统和黏膜免疫中都发挥功能,同时也表明IgT亚型之间在鱼类黏膜免疫应答中的功能存在差异。

3.3 病毒诱导的B细胞和Ig免疫反应

多项研究表明,病毒可以入侵鱼类肠^[99]、皮肤^[100]、鳃^[101,102]、鼻^[34]和鳔^[10]等黏膜组织。然而,与寄

生虫和病原菌相比, 鱼类黏膜B细胞和Ig在病毒感染过程中的免疫应答研究非常有限. 早期研究中, 科研人员一度认为鱼类B细胞和Ig可能不参与黏膜抗病毒感染过程. Cain等人^[103]用传染性造血坏死病毒(infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV)感染虹鳟, 发现血清中可以检测到IgM中和抗体, 而肠和皮肤分泌物中却未检测到病毒的中和抗体. 另外, 大比目鱼(*Hippoglossus stenolepis*)感染诺达病毒(nodavirus)后, 其肠和皮肤黏膜中IgM⁺ B细胞数量也没有发生明显改变^[104]. 甚至, 皮肤IgM转录水平和血清IgM的浓度在受到病毒感染后显著降低^[105]. 但是, 近年来多项研究表明, 病毒感染能够诱导鱼类黏膜处B细胞和Ig的免疫响应. 例如, 病毒性出血性败血症病毒(viral haemorrhagic septicaemia virus, VHSV)感染能够上调虹鳟肠黏膜中IgM、IgT和IgD转录表达水平^[106]. Wu等人^[107]研究发现, 鲤在注射感染鲤春病毒血症病毒(spring viraemia of carp virus, SVCV)后, IgT1和IgT2在肠道中的转录水平均显著升高, 在皮肤和鳃中的变化并不显著, 而IgM表达量在脾脏中显著升高. 传染性胰腺坏死病病毒(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)感染虹鳟7 d后, 前肠和幽门盲肠中IgM⁺ B细胞和IgT⁺ B细胞数量显著升高^[108]. 此外, Austbø等人^[109]发现, 大西洋鲑鱼受到传染性鲑鱼贫血症病毒(infectious salmon anaemia virus, ISAV)感染后, IgT在鳃ILT中表达水平显著上升. 以上这些研究暗示黏膜B细胞和Ig参与鱼体的抗病毒感染免疫. 在哺乳动物的研究中, 黏膜IgA主要通过中和作用来抵御病毒对机体的再次感染^[48]. 然而, 关于鱼类黏膜Ig对病毒具体作用机制的研究还是一片空白. 最近, 本实验室通过成功构建IHNV感染虹鳟黏膜模型发现, 病毒能入侵黏膜上皮, 诱导局部产生强烈的适应性免疫反应, 包括IgT⁺ B细胞数量的增加和病毒特异性IgT抗体的分泌. 重要的是, 类似哺乳动物的IgA, IgT也能够通过中和作用阻止病毒对黏膜上皮细胞的黏附和入侵, 从而增强鱼体对病毒的抵抗力(图3). 当IgT⁺ B细胞被耗竭后, 黏膜组织病毒载量以及实验鱼的死亡率显著升高, 该研究首次揭示了鱼类黏膜IgT⁺ B细胞和IgT在抗病毒感染过程中的重要功能^[10].

4 硬骨鱼类黏膜B细胞的增殖与Ig的转运

在哺乳动物中, MALT按功能不同可以分为两个部位, 即诱导位点和效应位点, 两者呈典型的局域化特征^[32]. 诱导位点是黏膜免疫系统捕获抗原并形成免疫

效应细胞的部位, 主要位于含有生发中心的淋巴结中, 如派尔集合淋巴结、扁桃体和肠系膜淋巴结等. 效应位点则是效应细胞和效应分子发挥免疫功能的部位, 主要位于黏膜的固有层^[33]. 抗原由黏膜上皮侵入, 经抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APCs)递呈给诱导位点的T细胞和B细胞, 使其在生发中心发生增殖, 然后致敏的淋巴细胞和浆细胞通过归巢迁移至黏膜效应位点, 抗体和致敏淋巴细胞在此处发挥免疫功能^[110]. 在鱼类研究中, 本研究团队通过向虹鳟尾静脉注射5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)(一种能在细胞分裂时嵌入到胸腺嘧啶的染料), 检测病原感染后虹鳟黏膜B细胞的增殖情况, 发现IgT⁺ B细胞在黏膜处大量增殖, 而IgM⁺ B细胞没有明显变化. 相反, 在系统组织头肾中IgM⁺ B细胞发生显著的增殖反应, 而IgT⁺ B细胞却没有发生明显的增殖, 说明黏膜增加的IgT⁺ B细胞是由黏膜局部增殖而来的. 进一步研究还发现, 体外培养病原感染后的黏膜组织, 其上清中存在大量病原特异性IgT抗体, 证明黏液中针对病原产生的特异性IgT是由黏膜IgT⁺ B细胞局部合成的^[10,27,35,43,44,79]. 这些研究结果首次表明了鱼类黏膜可以作为免疫反应的诱导位点和效应位点.

哺乳动物中, sIg通过与黏膜上皮细胞表达的多聚免疫球蛋白受体(polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)结合后转运至黏液层, 参与黏膜防御功能, 维持宿主黏膜的稳态和平衡^[111]. 当将pIgR敲除后, 小鼠则无法将IgA转运至肠腔内^[112]. 2010年, Zhang等人^[3]首次在虹鳟肠黏液中检测到pIgR的分泌成分, 并发现其与肠黏液中的IgT和IgM相结合. 随后, 本实验室通过免疫共沉淀和免疫荧光实验发现, 虹鳟pIgR能与其他黏液(皮肤、鳃、鼻腔、口、咽和鳃)中IgT、IgM和IgD相互结合, 且pIgR分泌细胞和IgT阳性细胞能够同时被抗体共染^[10,27,35,43,44,56], 这些结果暗示了sIgs通过pIgR介导转运, 但具体机制的解析还需要鱼类pIgR敲除模型进一步证实. 因此, 尽管鱼类与哺乳类动物黏膜免疫系统在结构上存在一定差异, 但为了维持黏膜稳态平衡, B细胞和Ig采用类似的免疫应答机制. 如图3所示, 当鱼类黏膜受到病原感染后, 黏膜IgT⁺ B细胞首先被诱导, 在黏膜局部发生增殖, 进而分化成浆母细胞或浆细胞分泌sIgT, 然后由上皮细胞分泌的pIgR转运至黏液层, 结合到病原表面来抑制寄生虫运动、凝集病原菌以及中和病毒等, 行使抵御病原侵染的重要功能.

5 硬骨鱼类黏膜Ig与共生菌的互作

鱼类黏膜表面存在大量的共生微生物,与宿主互利共生,参与了鱼体营养、代谢、免疫等一系列生命过程.研究表明,鱼类黏膜Ig与微生物之间形成了一个特定的微生态平衡,在黏膜免疫防御中发挥重要的功能^[113].黏膜Ig还能够塑造黏膜微生物的结构组成,调节微生物稳态^[9].在鱼类中,Zhang等人^[3]首先报道IgM和IgT均能够包被肠黏膜表面共生菌,其中sIgT比例最高,sIgM次之,而且被包被的细菌既有被IgT或IgM单独包被,也有被两者同时包被.随后,在鱼类其他MALTs表面也发现了类似结果,而且除了IgT和IgM,IgD也能够包被部分黏膜共生菌^[3,27,34,43,44,56].值得注意的是,除了在鼻腔中IgT和IgM包被微生物的比例相当,大部分MALT处IgT包被细菌比例最高^[34].这一结果暗示,相对于其他黏膜,鼻黏膜IgM可能在微生物调节中发挥更重要的功能.另外,鱼类MALTs表面细菌普遍被sIgT和sIgM双重包被,少部分被sIgT、sIgM和sIgD三重包被^[10,114].类似结果在人肠黏膜中有所报道^[115],并且IgA和IgM双重包被的菌群较为丰富,表明IgM可能与黏膜Ig(鱼类中IgT,哺乳动物中IgA)在控制微生物群稳态中共同发挥作用.

基于IgA测序技术(IgA-Seq)的开发,在哺乳动物中,人们可以快速精准鉴定IgA包被微生物群落种类和结构组成^[116].研究表明,sIgA可以特定包被某些有益

和致病的菌群,而且IgA包被的菌群与肠炎疾病的发生密切相关^[116,117].2021年,采用类似的技术方法,Xu等人^[113]对虹鳟鳃黏膜微生物进行了IgT-Seq分析,结果发现,鱼类sIgT能够广泛作用于黏膜表面共生微生物,既能包被潜在的益生菌群,如梭状芽孢杆菌和丙酸杆菌,又能靶向潜在致病菌,如肠杆菌和假单胞菌.为了进一步探究sIgs包被共生微生物的生物学功能,Xu等人^[113]通过体内注射IgT单克隆抗体,首次建立了鱼类IgT⁺ B细胞耗竭模型.以鳃黏膜为例,发现IgT⁺ B细胞耗竭导致黏液中IgT含量显著下降,鳃黏膜微生物比例严重失衡,拟杆菌门与厚壁菌门比例增加了约10倍,而变形杆菌门的益生菌群显著减少.因此,sIgT包被可能在抑制病原菌的过度生长和促进有益菌群的定植发挥一定作用.此外,IgT⁺ B细胞耗竭后,虹鳟黏膜组织出现损伤,大量条件性病原菌产生易位(即穿过上皮层并进入血液循环),进而诱导机体炎症反应,表明了IgT具有将病原菌锚定在黏膜层的功能.值得指出的是,当注射IgT单克隆抗体3个月后,虹鳟黏液中IgT恢复到原有水平,黏膜组织结构及微生物组成又恢复到正常稳态(图4).引起我们兴趣的是,在哺乳动物研究中也有类似的报道,sIgA促进肠黏膜中的细菌-细菌相互作用,从而形成共生群落并维持黏膜稳态^[118].因此,黏膜免疫球蛋白(鱼类sIgT和哺乳动物sIgA)在维持黏膜表面微生物稳态的这一功能在整个脊椎动物演化过程中具有一定

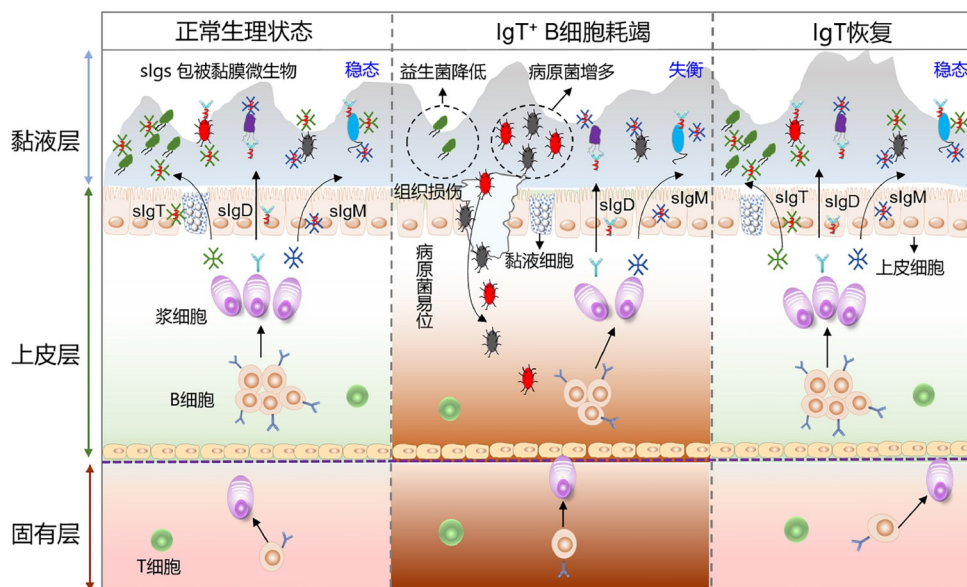


图4 (网络版彩色)鳃黏膜Igs与共生微生物的互作

Figure 4 (Color online) Interactions between gill mucosal Igs and symbiotic microbiota

的保守性。

6 总结与展望

黏膜组织作为脊椎动物免疫防御的第一道防线,对预防动物传染性疾病的发生具有重要作用。鱼类是演化史上最早具有完善免疫系统的脊椎动物,为了应对水生环境中复杂的病原微生物,鱼类黏膜组织形成了特有的黏膜相关免疫系统,包含具有独特表型和生物学功能的B细胞与免疫球蛋白等重要的细胞类群和效应分子。虽然近年来对鱼类黏膜B细胞的功能研究取得了突破性进展,但关于黏膜免疫应答机制中仍有许多科学问题亟待解决,例如:鱼类黏膜组织中是否存在M细胞、黏膜抗原摄取和递呈机制、黏膜T细胞和B细胞的互作机制、黏膜淋巴细胞归巢效应、黏膜淋巴细胞与上皮细胞之间的联系、黏膜免疫与系统免疫的协作关系以及黏膜免疫记忆等。对鱼类黏膜免疫系统及其应答机制的深入研究,能够丰富人们对鱼类免疫学以及整个脊椎动物的发育和比较免疫学的认知。

鱼类黏膜微生物与宿主之间存在稳定的共生关系,

黏膜免疫系统参与菌群的形成和稳态,同时,微生物又能影响黏膜系统的发育和成熟,二者协同作用共同维持黏膜稳态平衡。sIgT作为黏膜免疫的重要效应分子,在维持黏膜菌群稳态方面发挥着重要作用,但关于sIgT靶向微生物的具体机制尚不清楚。此外,鱼类黏膜sIgM和sIgD也可以包被一定比例的共生菌,且可以与IgT双重甚至三重包被,但是目前关于它们包被菌群类型及鱼类黏膜稳态中的功能还有待解析。鱼类黏膜sIgs能够包被益生菌群,促进其定植。如果有效利用这一特性,未来或许可以实现益生菌株的高效筛选,然后根据病原的特性,对抗原进行设计和修饰,采用益生菌作为疫苗活载体进行黏膜递送,诱导机体黏膜适应性免疫反应,有效预防鱼类重大疫病的发生。

总体来说,尽管鱼类黏膜B细胞和Ig功能的研究取得了一定进展,但鱼类黏膜免疫应答机制的研究依然任重道远,需要科研工作者坚持不懈地努力。对鱼类黏膜适应性免疫机制的全面解析,可为鱼类浸泡和口服等黏膜疫苗的开发提供理论支撑和新思路,从而促进鱼类养殖产业的健康可持续发展。

参考文献

- Gomez D, Sunyer J O, Salinas I. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 35: 1729–1739
- Flajnik M F, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: Genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 47–59
- Zhang Y A, Salinas I, Li J, et al. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat Immunol*, 2010, 11: 827–835
- Salinas I, Zhang Y A, Sunyer J O. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev Comp Immunol*, 2011, 35: 1346–1365
- Salinas I, Magadán S. Omics in fish mucosal immunity. *Dev Comp Immunol*, 2017, 75: 99–108
- Cabillon N, Lazado C. Mucosal barrier functions of fish under changing environmental conditions. *Fishes*, 2019, 4: 2
- Hansen J D, Landis E D, Phillips R B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 6919–6924
- Zhang Y A. Research progress on the teleost specific immunoglobulin T: A review (in Chinese). *J Dalian Ocean Univ*, 2022, 37: 183–190 [张永安. 硬骨鱼类特有免疫球蛋白IgT的研究进展. 大连海洋大学学报, 2022, 37: 183–190]
- Yu Y, Wang Q, Huang Z, et al. Immunoglobulins, mucosal immunity and vaccination in teleost fish. *Front Immunol*, 2020, 11: 567941
- Yu Y, Huang Z, Kong W, et al. Teleost swim bladder, an ancient air-filled organ that elicits mucosal immune responses. *Cell Discov*, 2022, 8: 31
- Rombout J H W M, Abelli L, Picchietti S, et al. Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31: 616–626
- Parra D, Korytář T, Takizawa F, et al. B cells and their role in the teleost gut. *Dev Comp Immunol*, 2016, 64: 150–166
- Vervarcke S, Ollevier F, Kinget R, et al. Mucosal response in African catfish after administration of *Vibrio anguillarum* O2 antigens via different routes. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 18: 125–133
- Salinas I. The mucosal immune system of teleost fish. *Biology-Basel*, 2015, 4: 525–539
- Zhu L, Nie L, Zhu G, et al. Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev Comp Immunol*, 2013, 39: 39–62
- Maina J N. Structure, function and evolution of the gas exchangers: Comparative perspectives. *J Anat*, 2002, 201: 281–304
- Oğuz A R, Oğuz E K. Histopathology and immunohistochemistry of gills of Van fish (*Alburnus tarichi* Gildenstädt, 1814) infected with myxosporean parasites. *J Histotechnol*, 2020, 43: 76–82

- 18 Zhao Q Y, Wang X D, Sun X J, et al. Light and transmission electron microscopic observation on the structure of zebrafish (*Danio rerio*) gill (in Chinese). *Chin J Zool*, 2018, 53: 92–98 [赵巧雅, 王新栋, 孙雪婧, 等. 斑马鱼鳃的光镜和透射电镜观察. *动物学杂志*, 2018, 53: 92–98]
- 19 Xu J, Feng L, Jiang W D, et al. Effects of dietary protein levels on the disease resistance, immune function and physical barrier function in the gill of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after challenged with *Flavobacterium columnare*. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 57: 1–16
- 20 Björger H, Koppang E O. Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Immunogenetics*, 2021, 73: 53–63
- 21 Rességuier J, Dalum A S, Pasquier L D, et al. Lymphoid tissue in teleost gills: Variations on a theme. *Biology-Basel*, 2020, 9: 127
- 22 Haugarvoll E, Bjerkås I, Nowak B F, et al. Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *J Anat*, 2008, 213: 202–209
- 23 Kabashima K, Honda T, Ginhoux F, et al. The immunological anatomy of the skin. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19: 19–30
- 24 Tong P L, Roediger B, Kolesnikoff N, et al. The skin immune atlas: Three-dimensional analysis of cutaneous leukocyte subsets by multiphoton microscopy. *J Invest Dermatol*, 2015, 135: 84–93
- 25 Ángeles E M. An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunol*, 2012, doi: 10.5402/2012/853470
- 26 Guardiola F A, Cuesta A, Esteban M Á. Using skin mucus to evaluate stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 59: 323–330
- 27 Xu Z, Parra D, Gómez D, et al. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 13097–13102
- 28 Ache B W, Young J M. Olfaction: Diverse species, conserved principles. *Neuron*, 2005, 48: 417–430
- 29 Saraiva L R, Ahuja G, Ivandic I, et al. Molecular and neuronal homology between the olfactory systems of zebrafish and mouse. *Sci Rep*, 2015, 5: 11487
- 30 Das P K, Salinas I. Fish nasal immunity: From mucosal vaccines to neuroimmunology. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 104: 165–171
- 31 Agbesi M P K, Naylor S, Perkins E, et al. Complex flow in the nasal region of guitarfishes. *Comp Biochem Physiol Part A-Mol Integr Physiol*, 2016, 193: 52–63
- 32 Bailey M, Haverson K, Inman C, et al. The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: Balancing regulatory and effector function. *Proc Nutr Soc*, 2005, 64: 451–457
- 33 Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: Communication on slippery ground. *Trends Immunol*, 2004, 25: 570–577
- 34 Tacchi L, Musharrafieh R, Larragoite E T, et al. Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates. *Nat Commun*, 2014, 5: 5205
- 35 Yu Y Y, Kong W G, Yin Y X, et al. Mucosal immunoglobulins protect the olfactory organ of teleost fish against parasitic infection. *PLoS Pathog*, 2018, 14: e1007251
- 36 Dong F, Yin G, Meng K, et al. IgT plays a predominant role in the antibacterial immunity of rainbow trout olfactory organs. *Front Immunol*, 2020, 11: 583740
- 37 Tacchi L, Larragoite E T, Muñoz P, et al. African lungfish reveal the evolutionary origins of organized mucosal lymphoid tissue in vertebrates. *Curr Biol*, 2015, 25: 2417–2424
- 38 Garcia B, Dong F, Casadei E, et al. A novel organized nasopharynx-associated lymphoid tissue in teleosts that expresses molecular markers characteristic of mammalian germinal centers. *J Immunol*, 2022, 209: 2215–2226
- 39 Graham A, Richardson J. Developmental and evolutionary origins of the pharyngeal apparatus. *EvoDevo*, 2012, 3: 24
- 40 Sepahi A, Salinas I. The evolution of nasal immune systems in vertebrates. *Mol Immunol*, 2016, 69: 131–138
- 41 Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 273–293
- 42 Yashpal M, Kumari U, Mittal S, et al. Histochemical characterization of glycoproteins in the buccal epithelium of the catfish, *Rita rita*. *Acta Histochem*, 2007, 109: 285–303
- 43 Yu Y Y, Kong W G, Xu H Y, et al. Convergent evolution of mucosal immune responses at the buccal cavity of teleost fish. *iScience*, 2019, 19: 821–835
- 44 Kong W, Yu Y, Dong S, et al. Pharyngeal immunity in early vertebrates provides functional and evolutionary insight into mucosal homeostasis. *J Immunol*, 2019, 203: 3054–3067
- 45 Bi X, Wang K, Yang L, et al. Tracing the genetic footprints of vertebrate landing in non-teleost ray-finned fishes. *Cell*, 2021, 184: 1377–1391.e14
- 46 Blaxter J H, Tytler P. Physiology and function of the swimbladder. *Adv Comp Physiol Biochem*, 1978, 7: 311–367
- 47 Alexander R M. Physical aspects of swimbladder function. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1966, 41: 141–176
- 48 Sterlin D, Mathian A, Miyara M, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med*, 2021, 13: eabd2223
- 49 Schaefer I M, Padera R F, Solomon I H, et al. *In situ* detection of SARS-CoV-2 in lungs and airways of patients with COVID-19. *Modern Pathol*, 2020, 33: 2104–2114

- 50 Villasante A, Ramírez C, Rodríguez H, et al. In-depth analysis of swim bladder-associated microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). [Sci Rep](#), 2019, 9: 8974
- 51 Yang Y, Fu Q, Wang X, et al. Comparative transcriptome analysis of the swimbladder reveals expression signatures in response to low oxygen stress in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. [Physiol Genomics](#), 2018, 50: 636–647
- 52 Parra D, Takizawa F, Sunyer J O. Evolution of B cell immunity. [Annu Rev Anim Biosci](#), 2013, 1: 65–97
- 53 Sunyer J O. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. [Nat Immunol](#), 2013, 14: 320–326
- 54 Boehm T, McCurley N, Sutoh Y, et al. VLR-based adaptive immunity. [Annu Rev Immunol](#), 2012, 30: 203–220
- 55 Edholm E S, Bengtén E, Stafford J L, et al. Identification of two IgD⁺ B cell populations in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. [J Immunol](#), 2010, 185: 4082–4094
- 56 Xu Z, Takizawa F, Parra D, et al. Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods. [Nat Commun](#), 2016, 7: 10728
- 57 Perdiguero P, Martín-Martín A, Benedicenti O, et al. Teleost IgD⁺IgM[−] B cells mount clonally expanded and mildly mutated intestinal IgD responses in the absence of lymphoid follicles. [Cell Rep](#), 2019, 29: 4223–4235.e5
- 58 Castro R, Bromage E, Abós B, et al. CCR7 is mainly expressed in teleost gills, where it defines an IgD⁺IgM[−] B lymphocyte subset. [J Immunol](#), 2014, 192: 1257–1266
- 59 Twigg H L. Humoral immune defense (antibodies): Recent advances. [Proc Am Thoracic Soc](#), 2005, 2: 417–421
- 60 Schroeder Jr H W, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. [J Allergy Clin Immunol](#), 2010, 125: S41–S52
- 61 Salinas I, Fernández-Montero Á, Ding Y, et al. Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances. [Dev Comp Immunol](#), 2021, 121: 104079
- 62 Bengtén E, Wilson M. Antibody repertoires in fish. [Results Probl Cell Differ](#), 2015, 57: 193–234
- 63 Coscia M R, Varriale S, Giacomelli S, et al. Antarctic teleost immunoglobulins: More extreme, more interesting. [Fish Shellfish Immunol](#), 2011, 31: 688–696
- 64 Magadán-Mompó S, Sánchez-Espinel C, Gambón-Deza F. Immunoglobulin heavy chains in medaka (*Oryzias latipes*). [BMC Evol Biol](#), 2011, 11: 165
- 65 Hu Y L, Zhu L Y, Xiang L X, et al. Discovery of an unusual alternative splicing pathway of the immunoglobulin heavy chain in a teleost fish, *Danio rerio*. [Dev Comp Immunol](#), 2011, 35: 253–257
- 66 Bromage E. Use of staphylococcal protein A in the analysis of teleost immunoglobulin structural diversity. [Dev Comp Immunol](#), 2004, 28: 803–814
- 67 Ye J, Bromage E S, Kaattari S L. The strength of B cell interaction with antigen determines the degree of IgM polymerization. [J Immunol](#), 2010, 184: 844–850
- 68 Solem S T, Stenvik J. Antibody repertoire development in teleosts—A review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. [Dev Comp Immunol](#), 2006, 30: 57–76
- 69 Jiang N, Weinstein J A, Penland L, et al. Determinism and stochasticity during maturation of the zebrafish antibody repertoire. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2011, 108: 5348–5353
- 70 Zimmerman A M, Moustafa F M, Romanowski K E, et al. Zebrafish immunoglobulin IgD: Unusual exon usage and quantitative expression profiles with IgM and IgZ/T heavy chain isotypes. [Mol Immunol](#), 2011, 48: 2220–2223
- 71 Ramirez-Gomez F, Greene W, Rego K, et al. Discovery and characterization of secretory IgD in rainbow trout: Secretory IgD is produced through a novel splicing mechanism. [J Immunol](#), 2012, 188: 1341–1349
- 72 Bengtén E, Clem L W, Miller N W, et al. Channel catfish immunoglobulins: Repertoire and expression. [Dev Comp Immunol](#), 2006, 30: 77–92
- 73 Saha N R, Suetake H, Kikuchi K, et al. Fugu immunoglobulin D: A highly unusual gene with unprecedented duplications in its constant region. [Immunogenetics](#), 2004, 56: 438–447
- 74 Wang B, Wang P, Wu Z H, et al. Molecular cloning and expression analysis of IgD in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to *Streptococcus agalactiae* stimulus. [Int J Mol Sci](#), 2016, 17: 348
- 75 Basu M, Lenka S S, Paichha M, et al. Immunoglobulin (Ig) D in *Labeo rohita* is widely expressed and differentially modulated in viral, bacterial and parasitic antigenic challenges. [Vet Immunol Immunopathol](#), 2016, 179: 77–84
- 76 Makesh M, Sudheesh P S, Cain K D. Systemic and mucosal immune response of rainbow trout to immunization with an attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine strain by different routes. [Fish Shellfish Immunol](#), 2015, 44: 156–163
- 77 Dornburg A, Ota T, Criscitiello M F, et al. From IgZ to IgT: A call for a common nomenclature for immunoglobulin heavy chain genes of ray-finned fish. [Zebrafish](#), 2021, 18: 343–345
- 78 Ji J, Hu C, Shao T, et al. Differential immune responses of immunoglobulin Z subclass members in antibacterial immunity in a zebrafish model. [Immunology](#), 2020, 162: 105–120

- 79 Zhang X T, Yu Y Y, Xu H Y, et al. Prevailing role of mucosal Igs and B cells in teleost skin immune responses to bacterial infection. *J Immunol*, 2021, 206: 1088–1101
- 80 Shinn A P, Pratoomyot J, Bron J E, et al. Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture. *Parasitology*, 2015, 142: 196–270
- 81 Alvarez-Pellitero P. Fish immunity and parasite infections: From innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 126: 171–198
- 82 Zhi T, Huang C, Sun R, et al. Mucosal immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* during *Gyrodactylus cichlidarum* infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 106: 21–27
- 83 Bermúdez R, Vigliano F, Marcaccini A, et al. Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): A histopathological and immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 21: 501–512
- 84 Steinhagen D, Rombout J H. Response of Ig-positive cells to *Goussia carpelli* (Protozoa: Apicomplexa) infections in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Folia Parasitol*, 1994, 41: 173–176
- 85 Olsen M M, Kania P W, Heinecke R D, et al. Cellular and humoral factors involved in the response of rainbow trout gills to *Ichthyophthirius multifiliis* infections: Molecular and immunohistochemical studies. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 30: 859–869
- 86 Xu D H, Klesius P H. Protective effect of cutaneous antibody produced by channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), immune to *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet on cohabited non-immune catfish. *J Fish Dis*, 2003, 26: 287–291
- 87 Luo X C, Xie M Q, Zhu X Q, et al. Protective immunity in grouper (*Epinephelus coioides*) following exposure to or injection with *Cryptocaryon irritans*. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22: 427–432
- 88 Langford T D, Housley M P, Boes M, et al. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun*, 2002, 70: 11–18
- 89 Evenhuis J P, Cleveland B M. Modulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal immune gene expression following bacterial challenge. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 146: 8–17
- 90 Du Y, Tang X, Zhan W, et al. Immunoglobulin tau heavy chain (IgT) in flounder, *Paralichthys olivaceus*: Molecular cloning, characterization, and expression analyses. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 1571
- 91 Velázquez J, Acosta J, Lugo J M, et al. Discovery of immunoglobulin T in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A potential molecular marker to understand mucosal immunity in this species. *Dev Comp Immunol*, 2018, 88: 124–136
- 92 Xu J, Yu Y, Huang Z, et al. Immunoglobulin (Ig) heavy chain gene locus and immune responses upon parasitic, bacterial and fungal infection in loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 86: 1139–1150
- 93 Kato G, Takano T, Sakai T, et al. Cloning and expression analyses of a unique IgT in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Sci*, 2015, 81: 29–36
- 94 Xu H Y, Dong F, Zhai X, et al. Mediation of mucosal immunoglobulins in buccal cavity of teleost in antibacterial immunity. *Front Immunol*, 2020, 11: 562795
- 95 Tongsi P, Meng K, Liu X, et al. The predominant role of mucosal immunoglobulin IgT in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after infection with *Flavobacterium columnare*. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 99: 654–662
- 96 Cao J F, Ding L G, Wang Q C, et al. Conserved role of mTORC1 signaling in B cell immunity in teleost fish. *J Immunol*, 2022, 209: 1–13
- 97 Mu Q, Dong Z, Kong W, et al. Response of immunoglobulin M in gut mucosal immunity of common carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Front Immunol*, 2022, 13: 1037517
- 98 von Gersdorff Jørgensen L, Schmidt J G, Chen D, et al. Skin immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) experimentally exposed to the disease Red Mark Syndrome. *Vet Immunol Immunopathol*, 2019, 211: 25–34
- 99 Huang Z, Zhan M, Cheng G, et al. IHNV infection induces strong mucosal immunity and changes of microbiota in trout intestine. *Viruses*, 2022, 14: 1838
- 100 Liu R, Hu X, Lü A, et al. Proteomic profiling of zebrafish challenged by spring viremia of carp virus provides insight into skin antiviral response. *Zebrafish*, 2020, 17: 91–103
- 101 Aquilino C, Castro R, Fischer U, et al. Transcriptomic responses in rainbow trout gills upon infection with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Dev Comp Immunol*, 2014, 44: 12–20
- 102 Buonocore F, Stocchi V, Nunez-Ortiz N, et al. Immunoglobulin T from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Molecular characterization, tissue localization and expression after nodavirus infection. *BMC Mol Biol*, 2017, 18: 8
- 103 Cain K D, LaPatra S E, Baldwin T J, et al. Characterization of mucosal immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* challenged with infectious hematopoietic necrosis virus: Identification of antiviral activity. *Dis Aquat Org*, 1996, 27: 161–172
- 104 Grove S, Johansen R, Reitan L J, et al. Quantitative investigation of antigen and immune response in nervous and lymphoid tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) challenged with nodavirus. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 21: 525–539
- 105 Cordero H, Cuesta A, Meseguer J, et al. Characterization of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) immune response under a natural

- lymphocystis disease virus outbreak. *J Fish Dis*, 2016, 39: 1467–1476
- 106 Leal E, Ordás M C, Soletto I, et al. Functional nutrition modulates the early immune response against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 94: 769–779
- 107 Wu S, Meng K, Wu Z, et al. Expression analysis of Igs and mucosal immune responses upon SVCV infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol Rep*, 2021, 3: 100048
- 108 Ballesteros N A, Rodríguez Saint-Jean S, Pérez-Prieto S I, et al. Modulation of genes related to the recruitment of immune cells in the digestive tract of trout experimentally infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or orally vaccinated. *Dev Comp Immunol*, 2014, 44: 195–205
- 109 Austbø L, Aas I B, König M, et al. Transcriptional response of immune genes in gills and the interbranchial lymphoid tissue of Atlantic salmon challenged with infectious salmon anaemia virus. *Dev Comp Immunol*, 2014, 45: 107–114
- 110 Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, et al. Terminology: Nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol*, 2008, 1: 31–37
- 111 Johansen F E, Kaetzel C S. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: New advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol*, 2011, 4: 598–602
- 112 Davids B J, Palm J E D, Housley M P, et al. Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the lumen-dwelling protozoan parasite *Giardia*. *J Immunol*, 2006, 177: 6281–6290
- 113 Xu Z, Takizawa F, Casadei E, et al. Specialization of mucosal immunoglobulins in pathogen control and microbiota homeostasis occurred early in vertebrate evolution. *Sci Immunol*, 2020, 5: eaay3254
- 114 Yu Y, Ding L, Huang Z, et al. Commensal bacteria-immunity crosstalk shapes mucosal homeostasis in teleost fish. *Rev Aquac*, 2021, 13: 2322–2343
- 115 Magri G, Comerma L, Pybus M, et al. Human secretory IgM emerges from plasma cells clonally related to gut memory B cells and targets highly diverse commensals. *Immunity*, 2017, 47: 118–134.e8
- 116 Palm N W, de Zoete M R, Cullen T W, et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*, 2014, 158: 1000–1010
- 117 Bunker J J, Flynn T M, Koval J C, et al. Innate and adaptive humoral responses coat distinct commensal bacteria with immunoglobulin A. *Immunity*, 2015, 43: 541–553
- 118 Nakajima A, Vogelzang A, Maruya M, et al. IgA regulates the composition and metabolic function of gut microbiota by promoting symbiosis between bacteria. *J Exp Med*, 2018, 215: 2019–2034

Summary for “硬骨鱼类黏膜B细胞和免疫球蛋白研究进展”

Research progress and prospects of mucosal B cells and immunoglobulins of teleost fish

Weiguang Kong¹, Jiafeng Cao², Gaofeng Cheng², Yongyao Yu² & Zhen Xu^{1*}

¹ State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

² College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

* Corresponding author, E-mail: zhenxu@ihb.ac.cn

Fish live in a microbially rich and complex aquatic environment, which exposes their mucosal surfaces to a variety of attacks from external pathogens. Teleost fish have evolved unique mucosa-associated lymphoid tissues (MALTs) that serve as the first line of defense against pathogens. So far, seven MALTs in teleost fish have been described, including gut-associated lymphoid tissue (GALT), skin-associated lymphoid tissue (SALT), gill-associated lymphoid tissue (GIALT), nasal-associated lymphoid tissue (NALT), buccal-associated lymphoid tissues, pharyngeal-associated lymphoid tissues, and the newly discovered swim bladder-associated lymphoid tissues. Because teleost MALT lacks lymph nodes, it has only evolved as a network of diffuse leucocytes within the mucosal epithelia, which is known as diffuse MALT (D-MALT).

Teleost fish, unlike invertebrates, have evolved the cardinal elements of adaptive immunity to protect themselves from pathogens in their aquatic environment. Mucosal B cells and immunoglobulins (Igs) in teleost MALTs, in particular, are important players in local mucosal adaptive immune responses. In teleost fish, the three bona fide immunoglobulin isotypes (i.e., IgM, IgD, and IgT) can be found in varying proportions in MALT secretions, and the IgT/IgM ratio in mucus is much higher than that in serum in the absence of antigenic stimulation. A couple of functional studies have recently revealed that IgM and IgT responses are specialized in systemic and mucosal compartments, respectively. The primary role of Igs in adaptive immune responses has been conserved throughout evolution, as they can neutralize pathogens or promote their elimination on mucosal surfaces, preventing further infection. Teleost fish lack organized lymphoid structures known as O-MALT (e.g., Peyer's patches and tonsils), but B-cells could locally proliferate and generate pathogenic-specific Igs in the MALTs, indicating that MALT in teleosts may function as both an inductive and effector site.

Mucosal surfaces in teleost MALT harbor an incredibly dense and diverse commensal microbiota, which is one of the conserved features. Notably, a significant portion of the commensal microbiota is coated with secreted Igs (sIgs), with IgT being the predominant isotype associated with those bacteria. Recent advances in bacterial flow cytometry combined with high-throughput sequencing have aided in the identification of IgT-coated bacteria and shed light on the biological implications of sIgs coating commensal microbiota. Teleost fish secretory IgT, like mammalian and bird IgA, may target mucosal pathogens for elimination, and coating on the surface of microbiota allows for commensal colonization and homeostasis.

Therefore, studying and revealing the immunological mechanism of fish MALT in anti-infection and maintaining mucosal commensal homeostasis is extremely important in fish immunology and even vertebrate comparative immunology in general. We summarize the current research process on the composition of the fish mucosal immune system, the function of mucosal B cells and Igs against pathogen infections, and the interactions between sIgs and microbiota in this review. Finally, we outline the future prospects for fish mucosal immunity, with the goal of providing a reference from a mucosal vaccination standpoint for the prevention and control of fish diseases.

fish, mucosal immunity, B cells, immunoglobulins, mucosal homeostasis

doi: [10.1360/TB-2022-1251](https://doi.org/10.1360/TB-2022-1251)