



王芳, 刘春, 姜兰, 等. 四带无须鲃透明品系的海分枝杆菌感染模型[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(6): 20-26.

四带无须鲃透明品系的海分枝杆菌感染模型

王芳, 刘春, 姜兰, 冯永永, 李凯彬
(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

摘要:【目的】了解海分枝杆菌 *Mycobacterium marinum* 对四带无须鲃 *Puntius tetrazona* 透明品系的感染特性, 构建感染模型。【方法】分别采用腹腔注射、肌肉注射及与感染鱼共居的感染方式, 研究海分枝杆菌对四带无须鲃透明品系的感染特性; 组织切片和压片观察细菌在四带无须鲃体内不同组织的分布及其引起的特征病理变化。【结果】2 种注射方式均在感染部位周围观察到病变, 并导致鱼体死亡; 共居感染鱼病程发展较为缓慢, 并出现消瘦、体色苍白等症状。感染鱼均可分离到病原菌, 主要器官观察到典型肉芽肿结构, 且抗酸染色能将其中细菌特异染色; 各器官有黑色素巨噬细胞中心形成, 并伴有不同程度的病理变化。【结论】四带无须鲃透明品系对海分枝杆菌敏感, 症状便于观测, 病理变化典型, 可作为感染模型系统发展。

关键词: 四带无须鲃; 透明品系; 海分枝杆菌; 感染模型
中图分类号: Q959.468 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2017)06-0020-07

A *Mycobacterium marinum* infection model for transparent tiger barb *Puntius tetrazona*

WANG Fang, LIU Chun, JIANG Lan, FENG Yongyong, LI Kaibin
(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: 【Objective】To study the characteristics of transparent tiger barb *Puntius tetrazona* infected with *Mycobacterium marinum* and develop an infection model. 【Method】*P. tetrazona* were infected with *M. marinum* via intraperitoneal injection, intramuscular injection and cohabitation experiment. The fish characteristics after infection were observed. Distribution of bacteria and pathological changes in the fish were evaluated by wet-mount preparations and tissue slices. 【Result】Both injection methods resulted in pathologic damages around the infection sites, and gradually led to fish death. The disease progression was slow for the fish in the cohabitation experiment, and the fish appeared thin and pale. The pathogenic bacteria were isolated from fish with different infection treatments. Granulomas, the classic symptom for infection, were observed in major organs. *M. marinum* could be specifically stained by Ziehl-Neelsen stain. A number of melano-macrophage centers developed in different organs, and the organs were associated with different degrees of pathologic lesion. 【Conclusion】The transparent line of tiger barb is a susceptible host of *M. marinum*, and the symptoms can be conveniently observed with typical pathological changes. *P. tetrazona* is an excellent model for further infection research.

Key words: *Puntius tetrazona*; transparent line; *Mycobacterium marinum*; infection model

分枝杆菌 *Mycobacterium* 可感染包括人类在内的多种动物, 为全球流行的重要传染性病原, 其代表结核分枝杆菌 *M. tuberculosis* 引起的结核病是严重威胁人类健康的传染病, 由于耐药菌株的出现以及日渐频繁的人口流动, 该病已成为倍受关注的公共卫生问题^[1]。在感染过程中, 分枝杆菌与宿主免疫系统的相互作用关系非常复杂, 在研究和应用上亟需不同的感染模型理解相关机制, 以便更好地指导该病的防控^[2]。海分枝杆菌 *M. marinum* 是人类的机会致病菌, 其与结核分枝杆菌进化地位较为接近, 其感染的病理变化也与结核杆菌引起人肺部的组织病变相类似, 在鱼体的多器官形成典型的肉芽肿^[3-6]。在研究中, 海分枝杆菌对生物安全的要求不如结核杆菌严格, 而鱼类作为试验材料易于大量获得, 且费用相对低廉, 从而吸引研究者将其应用于病原与宿主相互作用相关研究。由于便于观测, 海分枝杆菌的斑马鱼 *Danio rerio* 感染模型较好地从病原宿主相互作用的角度阐述了分枝杆菌感染慢性化发展机理, 成了该病防控机制研究的重要模型^[7-12]。

鱼类在生命早期大多身体透明, 但随着色素细胞的发育, 光线难以透过身体, 内部组织便无法直接观察。故在成体阶段, 鱼类的实时观测需通过连续解剖采样或依靠复杂仪器系统, 其应用效果也可能不尽如人意。中国水产科学研究院珠江水产研究所水生实验动物研究室在四带无须鲃 *Puntius tetrazona* 中发现了 1 个透明的自发突变个体, 不论幼鱼或成体, 突变个体的内脏、脊椎等均肉眼清晰可见。将透明四带无须鲃应用于匹里虫 *Pleistophora hyphessobryconis* 体内感染的研究, 发现病原在鱼体内的扩散及引起炎症反应、病理变化可直观观察, 病原入侵和机体反应的动态过程、空间分布能实时获得, 有普通鱼类无法比拟的应用优势^[13-14]。四带无须鲃具有与斑马鱼相似的优点, 体型小、繁殖力强、饲养容易等, 且常年可以获得, 不失为构建病原感染模型的优良材料。研究中发现四带无须鲃对海分枝杆菌敏感, 感染后多组织均出现典型的肉芽肿病变, 且由于透明突变个体各器官组织可直接观测, 在同一动物身上可能得到一系列的动态试验数据, 更为直观了解试验过程, 或可作为感染模型进行系统研究。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

透明突变的四带无须鲃, 中国水产科学研究院
<http://xuebao.scau.edu.cn>

珠江水产研究所水生实验动物研究室选育并保存。该品系虹彩色素细胞和黑色素细胞缺失, 故内部器官可直接观测^[13]。试验选用 2 月龄个体。

1.2 海分枝杆菌注射感染

海分枝杆菌分离自患病斑马鱼, 中国水产科学研究院珠江水产研究所水生实验动物研究室保存。用接种环在平板上挑取特征明显的海分枝杆菌菌落, 接种于生理盐水中, 震荡, 使细菌完全分散, 离心, 生理盐水重悬, 洗 2~3 次; 用生理盐水稀释成 1.0×10^7 、 1.0×10^8 cfu·mL⁻¹ 的菌悬液。用 0.2 mg·mL⁻¹ 的 Tricaine Methanesulfonate (MS-222) 将透明四带无须鲃麻醉, 上述 2 种浓度的菌悬液分别采用腹腔和肌肉注射方式进行人工感染, 每尾注射量为 0.1 mL, 每组 15 尾, 并设 1 个生理盐水的对照组。

养殖水温 (27±2) °C, 保持全天充气、每天进行换水等相应管理, 定期观察, 注意鱼体肌肉出现的白色不透明变化, 了解其发展过程, 并定期收集病变组织, 压片或组织切片, 于显微镜下观察肉芽肿的形成情况及组织的病理变化。濒死鱼内脏用罗氏培养基进行细菌分离培养, 并通过 PCR 法扩增其 16S rRNA 序列, 测序确定菌株。

1.3 海分枝杆菌的共居感染

透明四带无须鲃分 3 组, 每组 16 尾, 饲养于 30 L 玻璃缸中, 并设对照组。感染组分别放入出现海分枝杆菌感染症状的斑马鱼 3 尾, 水温控制于 (27±2) °C, 每天保持 14 h 光:10 h 暗的光周期。每隔 5 d 换去 1/5 的水, 配合饲料喂养, 每天投喂 2 次。每组用具严格分开, 防止交叉感染。死亡斑马鱼头肾压片, 观察肉芽肿病变以确认海分枝杆菌感染; 共栖 10 d 后, 将所有斑马鱼捞出, 同样确认斑马鱼的海分枝杆菌感染。

定期观察, 出现死鱼取头肾、脾脏、肾等组织压片观察是否存在肉芽肿病变, 并用 PCR 法检测海分枝杆菌; 感染 30 d 后, 每组取 4 尾鱼 (包括期间死亡的鱼), 进行肉芽肿观察和 PCR 检测; 每隔 30 d 取样 1 次, 采样方法和检测如前; 90 d 后处死所有鱼, 检测, 并固定肝、脾、肾、头肾等脏器, 用于组织病理观察。

1.4 组织病理观察

四带无须鲃各内脏组织用体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定 48 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。用 Leica RM-2145 型轮转式切片机切片, 厚度为 3 μm, HE(hematoxylin and eosin) 染色; Ziehl-Neelsen 法进行抗酸染色^[15], 并于光学显微镜下观察, 了解四带无须鲃感染海分枝杆菌的病理特征及其引起的组织变化。

2 结果与分析

2.1 四带无须鲃的海分枝杆菌注射感染

采用人工注射的方式，海分枝杆菌对透明四带无须鲃的感染过程较为缓慢，感染初期，鱼体肌肉组织依然清澈透明。感染 6~8 d 后，肌肉注射的四带无须鲃感染部位慢慢变得浑浊，随着病变发展，白色混浊呈云雾状，体积逐渐扩大，与透明的肌肉反差更为明显；随后，腹腔内也出现肉眼依稀可辨的浑浊，并逐渐发展增大，越发明显 (图 1A)；感染 18 d 后， 1.0×10^8 cfu·mL⁻¹ 肌肉注射组有鱼死亡，注射部位肌肉溃破。取内脏各组织压片，于显微镜下观察，脾脏、肾脏、头肾等组织均可观察到大量透光性较差的结节类似结构存在；结节的大小不一，通常近圆形，向周围空间不规则发展，形成形态各异的增生物，呈散在分布；每个结节有明显的膜状结构包围，质地较硬，且有棕黑色颗粒不均匀分布，尤以头肾、脾等组织更为明显 (图 1C、1D)。1.0×10⁷ cfu·mL⁻¹ 肌肉注射组在感染 22 d 后也出现死亡个体，并陆续有症状明显的感染个体死亡。至感染第 39 天，2 个浓度组已没有存活个体。从感染鱼中也分离到生长及形态特征与海分枝杆菌相符的菌株；经 16S rRNA 基因测定发现与感染菌株相同，与 *M. marinum* 标准株 ATCC927(NCBI 序列号: AB255698) 相似性为 99%，确认了海分枝杆菌的感染。

腹腔注射组的可见症状主要在体内，表现为腹腔内的浑浊病变 (图 1B)，出现可见症状在感染 10 d 之后。高浓度组在感染后 20 d 发现死鱼，31 d 后所有个体全部死亡；而低浓度组 22 d 出现死亡个体，44 d 后所有鱼死亡。内脏出现的结节症状和结构与肌肉注射感染的相同；在感染鱼中也分离到了海分枝杆菌菌株。

2 种注射方式均可使透明四带无须鲃成功感染海分枝杆菌，并呈现出典型的结节症状。比较而言，肌肉注射能在感染部位发生可见病变，位置更明显，且易于观察，在感染后期，其肾和头肾位置也会出现结节病变，比腹腔注射更适合于在毒力比较评价中应用。

2.2 海分枝杆菌的共居感染

经检测，用于共居感染的斑马鱼头肾均发现了结节病变。在感染过程中并未发现透明四带无须鲃的非正常死亡，压片和 PCR 检测的结果见表 1。在感染 30 d 后，于显微镜下在头肾或脾脏压片中观察到结节，相应组织 PCR 检测也呈阳性；随着时间推移，感染率略有升高，至感染 90 d 大部分鱼均能检测到。共居方式能使四带无须鲃感染海分枝杆菌，但其病程发展较为缓慢，从外部性状看，早期并未发现试验鱼的异常，至 80 d 左右，有部分感染个体出现体色黯白、消瘦等症状。

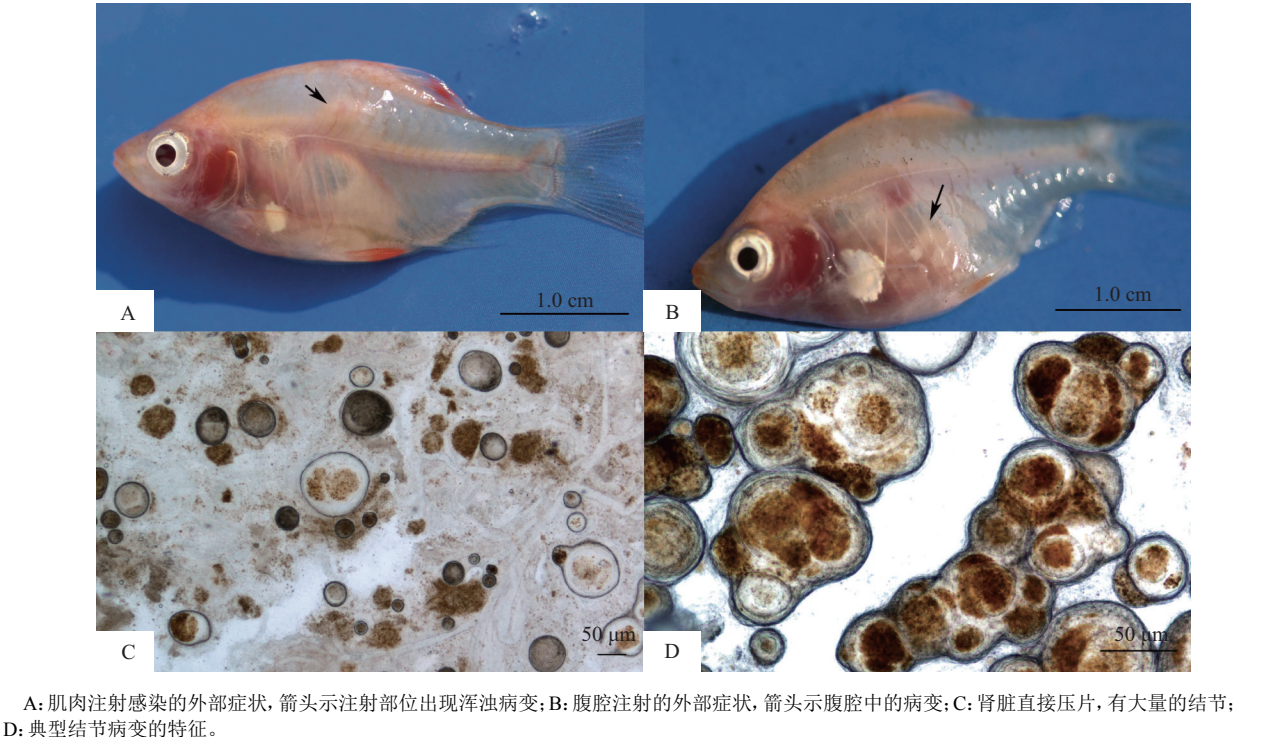


图 1 透明四带无须鲃的海分枝杆菌感染症状及其组织压片

Fig. 1 Symptoms of *Puntius tetrazona* infected with *Mycobacterium marinum* and wet-mount of tissues
<http://xuebao.scau.edu.cn>

表 1 四带无须鲷共居感染海分枝杆菌的检测

Tab. 1 Detection of *Mycobacterium marinum* infected *Puntius tetrazona* under cohabitation with sick fish

组别	<i>t</i> _{感染/d}	检出比例 ¹⁾	
		结节	PCR
1	30	2/4	3/4
	60	2/4	3/4
	90	5/8	7/8
2	30	1/4	3/4
	60	2/4	4/4
	90	5/8	8/8
3	30	1/4	3/4
	60	2/4	4/4
	90	6/8	7/8
对照	30	0/4	0/4
	60	0/4	0/4
	90	0/8	0/8

1)分母为检测总尾数, 分子为检出尾数。

2.3 海分枝杆菌的组织病理变化

显微镜下观察, 肝、脾、肾、头肾和卵巢等组织均发现了典型的肉芽肿结节, 其中尤以头肾、脾脏、肠系膜的结节数量为多, 严重组织遍布大小不一、形态各异的肉芽肿结构(图 2)。结节的切面多为近圆形, HE 染成红色, 一般有明显的中心, 为纤维状结构层层包裹, 外层有类上皮细胞, 与周围组织形成明显差别; 有时多个结节紧密排列, 外层有纤维层包裹, 形成切面形状各异的大结节。从组织切片获得的图像对结节的结构进行分析, 其性状特征与压片观察到的结节相吻合。在各器官切片中, 发现一定数量棕黑色的黑色素巨噬细胞中心 (Melano-macrophage centres, MMCs), 聚集了大量的黑色素巨噬细胞, 有的包裹于肉芽肿结节中, 或分布于结节周围, 以头肾和脾脏最为明显; 大量的 MMCs 存在应是压片中观察到棕褐色颗粒的原因。同时, 各

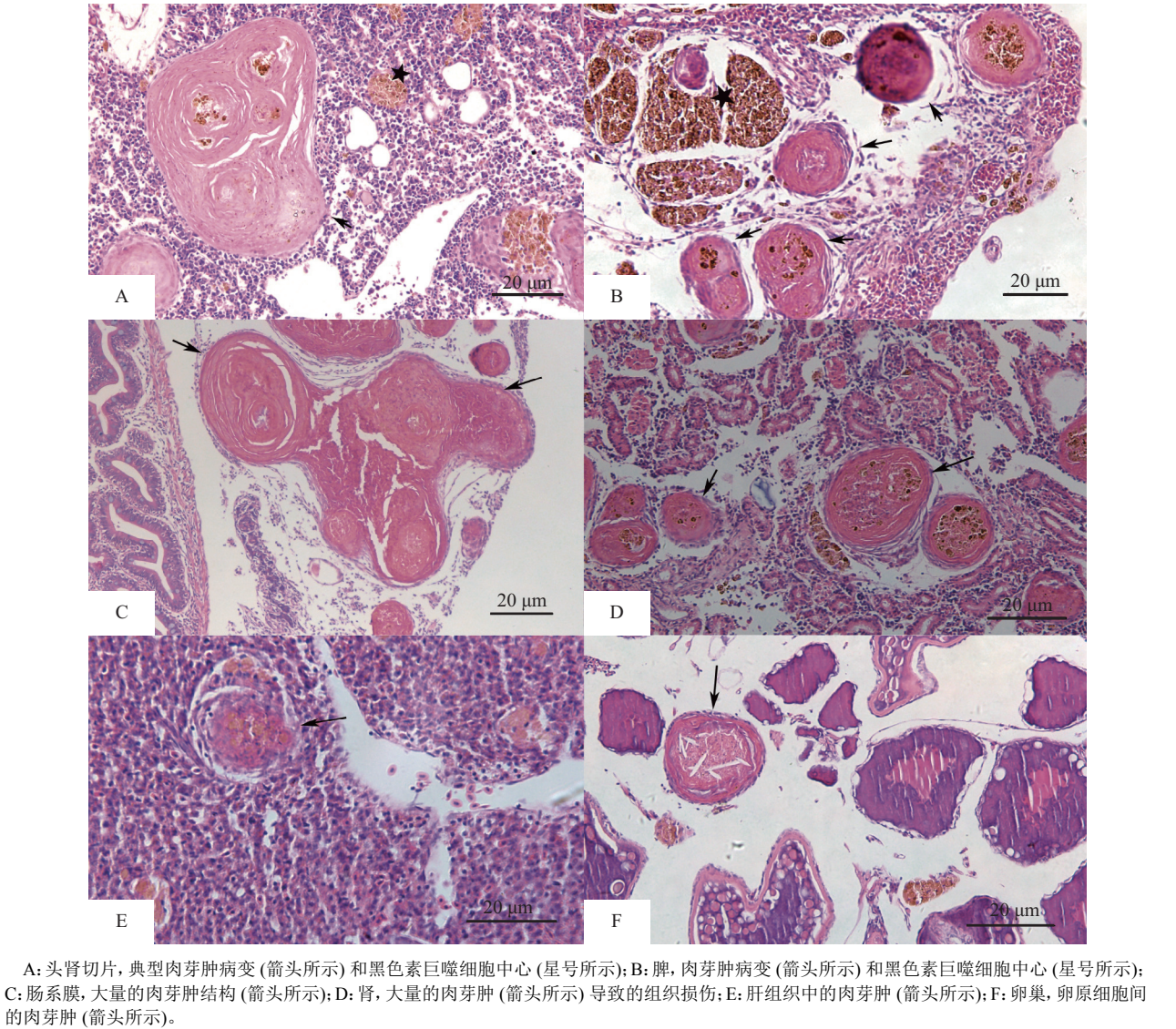


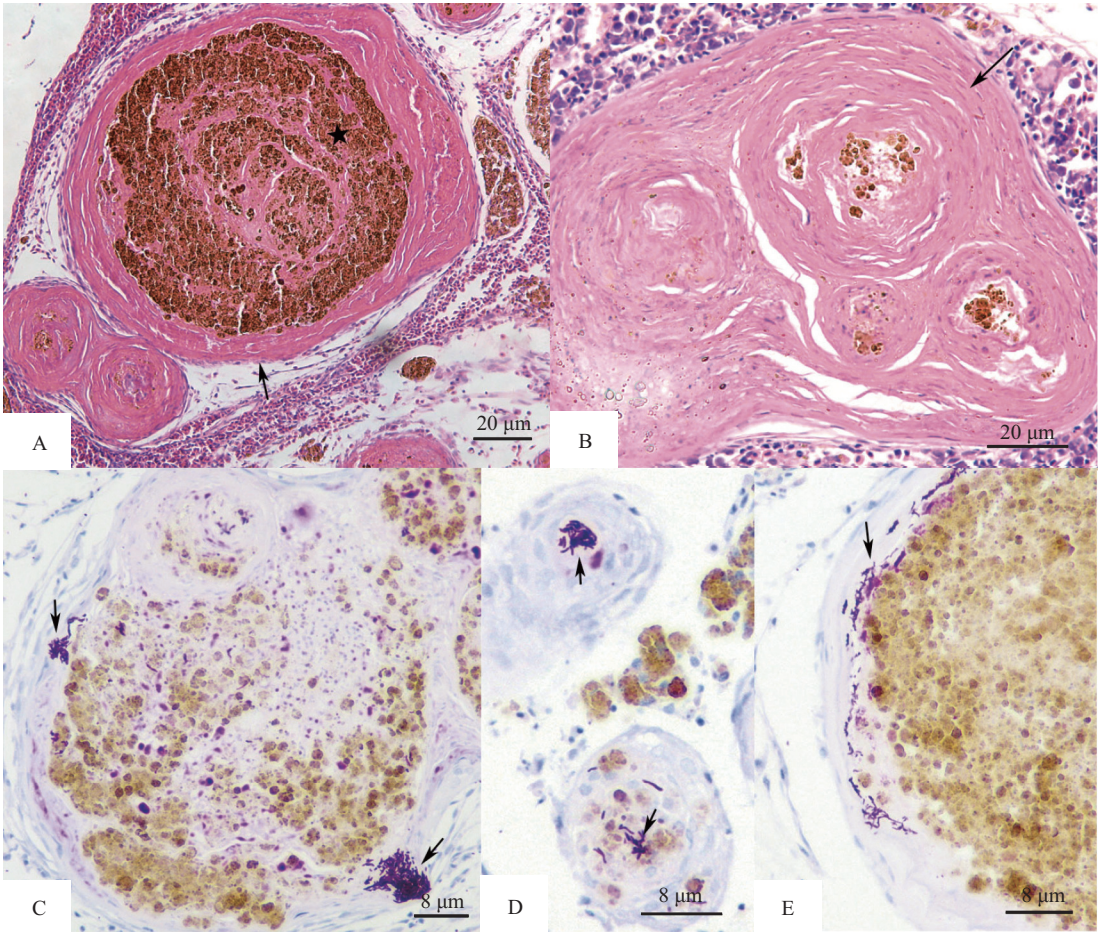
图 2 海分枝杆菌感染引起四带无须鲷的组织病理变化

Fig. 2 Pathological changes in tissues of *Puntius tetrazona* infected with *Mycobacterium marinum*

器官观察到不同程度的组织病理变化。脾脏及头肾的淋巴细胞数量增多, 由于大量肉芽肿存在, 形成多处的空泡性病变 (图 2A、2B); 肾脏能观察到肾小球毛细血管扩张, 肾小管细胞水肿、变性等病理变化 (图 2D); 肝脏中结节数量相对较少, 但周围组织也发现肝细胞肿胀、坏死的类似病变 (图 2E); 在各种卵母细胞之间, 也发现了肉芽肿病变和黑色素巨噬细胞中心 (图 2F)。因而, 在感染后期, 海分枝杆菌对四带无须鲷各系统功能的影响非常严重。

HE 染色虽发现感染鱼脾脏和头肾均有典型的肉芽肿病变和大小各异的 MMCs, 但难以对组织内

的细菌直接观测 (图 3A、3B); 而采用抗酸染色方法, 显微镜下可观察到海分枝杆菌染成了特异的紫红色, 与周围组织有明显反差 (图 3C); 海分枝杆菌通常发现于肉芽肿内, 为纤维结构包围, 或菌丝缠绕成线团般存在, 或散落分布其中。在较小的结节里, 细菌多见于肉芽肿正中; 而大的结节则多处有分布, 特别是肉芽肿内的黑色素巨噬细胞中心周围 (图 3D、3E)。这说明四带无须鲷的肉芽肿病变应是海分枝杆菌感染所致, 其形成或与病原和宿主相互作用密切相关。



A: 脾脏典型的肉芽肿 (箭头所示), 内部或周围有黑色素巨噬细胞中心; B: 头肾, 多个肉芽肿 (箭头所示) 的汇合; C: 脾脏肉芽肿内海分枝杆菌被染成紫红色 (箭头所示), 或散在或成团分布; D: 脾脏, 细菌位于小的肉芽肿正中 (箭头所示); E: 头肾, 肉芽肿内细菌 (箭头所示) 的分布。

图 3 典型肉芽肿和海分枝杆菌的结构及其抗酸染色

Fig. 3 Structures and Ziehl-Neelsen staining results of typical granuloma and *Mycobacterium marinum*

3 讨论与结论

腹腔注射、肌肉注射、病鱼共栖等方式均可使海分枝杆菌成功感染四带无须鲷, 并引发其多器官的结节, 导致典型的肉芽肿病变, 说明四带无须鲷透明品系是海分枝杆菌的敏感宿主。海分枝杆菌感染是典型的慢性病, 研究显示, 该菌一般不导致急

性死亡, 一定程度上或可与鱼宿主长期共存, 这与本研究的感染特征非常相似。从组织病理分析发现, 海分枝杆菌感染的主要器官是脾、肾、头肾和肠系膜等体内组织, 其病变过程难以观测; 而本研究选用的品系通体透明, 内脏组织可肉眼直接观测, 在感染试验中发现: 细菌在鱼体内引起的某些损伤能实时观测, 可以看到病原在体内扩散以及导致机

体反应的动态过程, 与普通鱼类比较应用优势明显, 因而, 四带无须鲃透明品系是海分枝杆菌感染研究模型的优良材料。

四带无须鲃具有体型小、繁殖简单、饲养容易、常年可以获得等特点, 其透明突变个体内部器官便于观测, 在同一动物身上或可得到一系列的动态试验数据, 更为直观了解试验过程, 可作为鱼类试验动物系统发展, 因而, 微生物的控制将是其试验动物化的重要内容。本研究表明, 四带无须鲃对海分枝杆菌敏感, 且可通过密切接触传播, 导致多组织的病变, 严重影响感染个体多个系统的功能。在斑马鱼中, 海分枝杆菌能在群体中长期隐匿存在, 其感染使得试验的敏感性和稳定性难以保障, 对于试验结果的均一性和可重复性有直接影响^[16-17]。故海分枝杆菌应列入四带无须鲃培育过程重点监测的病原, 防止群体内的感染, 以保障其作为标准材料得以应用。

试验表明, 肉芽肿病变是海分枝杆菌感染四带无须鲃的特征病理变化。作为宿主控制病原的重要策略, 肉芽肿作用非常矛盾: 虽然将病原菌限制于较小区域, 但其内部的分枝杆菌无法彻底清除, 可处于潜伏甚至繁殖状态, 成为细菌在宿主体内重要栖息地; 同时也为细菌在体内的扩散提供新的可能^[5-8]。组织切片常常发现四带无须鲃的多个肉芽肿外围有纤维结构包裹, 形成大的结节; 抗酸染色发现海分枝杆菌分布于结节的各个位置, 一定程度说明四带无须鲃的肉芽肿在对海分枝杆菌的限制及其扩散中有重要的作用。肉芽肿在机体和病原的相互作用过程自相矛盾的功能应是疾病慢性化发展的原因。一方面, 肉芽肿内的免疫细胞通过吞噬等作用杀灭入侵病原; 另一方面, 海分枝杆菌可依托肉芽肿逃避机体免疫系统的攻击甚至于在体内扩散, 这种复杂的相互作用关系是疾病发生和发展的关键^[8, 10-11, 17]。四带无须鲃透明品系或可作为海分枝杆菌感染的模型材料系统发展。

黑色素巨噬细胞中心 (MMCs) 发现于鱼类、爬行类和鸟类等脊椎动物, 通常由带色素的独特细胞聚集而成^[18]。本研究 MMCs 多在鱼的脾和头肾等组织观察到, 而肠系膜等较为少见, 符合 MMCs 分布的基本规律。现有资料表明, 鱼类生理或病理的变化可影响 MMCs 的数量和体积, 如饥饿、维生素 E 缺乏、衰老以及三丁基锡等污染物的胁迫等, 故 MMCs 或可成为监测鱼体健康以及水体污染指示指标^[19-20]。同时, 研究也发现, MMCs 通常为淋巴细胞所包围, 且有时可观察到巨噬细胞等与抗原提呈

功能相关的细胞, 故有学者认为 MMCs 和高等脊椎动物的淋巴结类似, 与免疫功能密切相关^[21]。对河鲈 *Perca fluviatilis* 的研究发现, 绦虫 *Triaenophorus nodulosus* 寄生形成的肉芽肿周围可观察到 MMCs, 而鲁氏耶尔森 *Yersinia ruckeri* 感染虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 后导致肾脏 MMCs 数量发生变化, 有学者认为 MMCs 吞噬了微生物及其他外来物质, 或可作为一种特殊的肉芽肿^[22-23]。从四带无须鲃脾脏、头肾压片看, 肉芽肿结构内大多有色素细胞; 组织切片发现 MMCs 有的位于结节内, 有的分布于结节周围; 抗酸染色在 MMCs 周围或黑色素细胞间确认了海分枝杆菌的存在, 这提示 MMCs 与海分枝杆菌感染有直接关系。正如我们所知, 海分枝杆菌的感染过程非常缓慢, 由此引起的慢性炎症或是 MMCs 形成的原因, 而在此过程中的 MMCs 与肉芽肿间的相互关系值得深入研究。

参考文献:

[1] GETAHUN H, MATTEELLI A, CHAISSON R E, et al. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. New Engl J Med, 2015, 372(22): 2127-2135.

[2] TAN S, RUSSELL D G. Trans-species communication in the *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophage[J]. Immunol Rev, 2015, 264(1): 233-248.

[3] STINEAR T P, SEENANN T, HARRISON P F, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Genome Res, 2008, 18(5): 729-741.

[4] AUBRY A, CHOSIDOW O, CAUMES E, et al. Sixty-three cases of *Mycobacterium marinum* infection: Clinical features, treatment, and antibiotic susceptibility of causative isolates[J]. Arch Intern Med, 2002, 162(15): 1746-1752.

[5] SWAIM L E, CONNOLLY L E, VOLKMAN H E, et al. *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity[J]. Infect Immun, 2006, 74(11): 6108-6117.

[6] 张德锋, 李爱华, 龚小宁. 鲟分枝杆菌病及其病原研究[J]. 水生生物学报, 2014, 38(3): 495-504.

[7] DAVIS J M, RAMAKRISHNAN L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection[J]. Cell, 2009, 136(1): 37-49.

[8] PROUTY M G, CORREA N E, BARKER L P, et al. Zebrafish-*Mycobacterium marinum* model for mycobacterial pathogenesis[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 225(2): 177-182.

[9] VAN LEEUWEN L M, VAN DER KUIP M, YOUSSEF S A, et al. Modeling tuberculous meningitis in zebrafish using *Mycobacterium marinum*[J]. Dis Model Mech, 2014, 7(9): 1111-1122.

- [10] 田蔚蔚, 张晓东, 王秋玲, 等. 分枝杆菌感染肉芽肿体外模型的建立和验证[J]. 中华皮肤科杂志, 2014, 47(3): 186-191.
- [11] 侯曼美, 谢建平. 斑马鱼-海分枝杆菌模型研究对结核病致病机理的启示[J]. 微生物学报, 2010, 50(1): 15-22.
- [12] POURAHMAD F, NEMATI M, RICHARDS R H. Comparison of three methods for detection of *Mycobacterium marinum* in goldfish (*Carassius auratus*)[J]. Aquaculture, 2014, 422/423: 42-46.
- [13] LI K B, CHANG O Q, WANG F, et al. Identification of a transparent mutant tiger barb *Puntius tetrazona* and its use for *in vivo* observation of a *Pleistophora* sp.(Microsporidia) infection[J]. J Fish Biol, 2012, 80(7): 2393-2404.
- [14] LI K, CHANG O, WANG F, et al. Ultrastructure, development, and molecular phylogeny of *Pleistophora hyphessobryconis*, a broad host microsporidian parasite of *Puntius tetrazona*[J]. Parasitol Res, 2012, 111(4): 1715-1724.
- [15] SALEH M A D, KHALEEL K J, ALSAADI L A S. Comparison between polymerase chain reaction and Ziehl-Neelsen stain for detection renal tuberculosis[J]. Int J Curr Microbiol App Sci, 2014, 3(6): 408-414.
- [16] WATRAL V, KENT M L. Pathogenesis of *Mycobacterium* spp. in zebrafish (*Danio rerio*) from research facilities[J]. Comp Biochem Phys C, 2007, 145(1): 55-60.
- [17] MASON T, SNELL K, MITTGE E, et al. Strategies to mitigate a *Mycobacterium marinum* outbreak in a zebrafish research facility[J]. Zebrafish, 2016, 13(S1): 77-87.
- [18] AGIUS C, ROBERTS R J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology[J]. J Fish Dis, 2003, 26(9): 499-509.
- [19] PASSANTINO L, SANTAMARIA N, ZUPA R, et al. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being[J]. J Fish Dis, 2014, 37(3): 241-250.
- [20] HAAPARANTA A, VALTONEN E T, HOFFMANN R, et al. Do macrophage centres in freshwater fishes reflect the differences in water quality?[J]. Aquat Toxicol, 1996, 34(3): 253-272.
- [21] PASSANTINO L, CIANCIOTTA A, JIRILLO F, et al. Lymphoreticular system in fish: Erythrocyte-mediated immunomodulation of macrophages contributes to the formation of melanomacrophage centers[J]. Immunopharm Immuno, 2005, 27(1): 147-161.
- [22] DEZFULI B S, GIARI L, LORENZONI M, et al. Perch liver reaction to *Triaenophorus nodulosus* plerocercoids with an emphasis on piscidins 3, 4 and proliferative cell nuclear antigen (PCNA) expression[J]. Vet Parasitol, 2014, 200(1/2): 104-110.
- [23] GREGORI M, MIRAGLIOTTA V, LEOTTA R, et al. Morphometric evaluation of interrenal gland and kidney macrophages aggregates in normal healthy rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and after bacterial challenge with *Yersinia ruckeri*[J]. Vet Medicine Intern, 2014, 2014(1): 1-7.

【责任编辑 李晓卉】

欢迎订阅 2018 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、综述等, 涵盖动物科学、兽医学、农学、园艺学、土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、农业工程和食品科学等学科。本刊附英文目次和英文摘要。读者对象主要是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部。

本刊为《中文核心期刊要目总览》综合性农业科学核心期刊, 《中国科学引文数据库(CSCD)》、《中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)》及《中国学术期刊综合评价数据库》等来源期刊, 并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内。为美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《CABI》、英国《动物学记录》、英国《食品科技文摘》、《中国生物学文摘》、日本科学技术振兴机构数据库及国内农业类文摘期刊等多家国内外著名文摘固定刊源。

双月刊, 逢单月上旬出版, A4 幅面。定价 15.00 元/册, 全年 90.00 元。自办发行, 参加全国非邮发报刊联合征订发行, 非邮发代号: 6573。国内外公开发行, 欢迎订阅!

订阅款邮汇至: 300381 天津市卫津南路李七庄邮局 9801 信箱, 全国非邮发报刊联合征订服务部。

《华南农业大学学报》编辑部

<http://xuebao.scau.edu.cn>