

甲殼素促進防衛血球活力之研究

黃世鈴、劉富光、施美娟

水產試驗所淡水繁養殖研究中心

飼料中添加甲殼素 (Chitosan) 之研究，目的在於檢測試驗魚防衛細胞如巨噬細胞的防禦能力，期能提高防衛細胞對抗細菌侵入的活性，進而比較應用細菌性疫苗與甲殼素對於保護魚類的差異性，亦即運用細菌免疫學的方法來預防魚類細菌性疾病的發生及病害發生後可以增加療效。

一、試驗吳郭魚的培養

試驗魚為本研究中心自行培育之雜交種黑色吳郭魚，平均體重為 100 g，試驗分兩組進行，餵食期間為 1 個月。試驗組的飼料為鰻粉 + 3‰ 甲殼素 + 水調製成練餌，對照組則為鰻粉加水調製成練餌。每日投餌量為體重的 1.5%。

二、脾臟或前腎分離巨噬細胞

組織洗滌液成份為 4°C Leibovitz-15(L-15)medium 含有 heparin 10 i.u./ml、1% penicillin/streptomycin (P/S) 及 2% heat inactivated fetal calf serum (FCS)。試驗魚經小心解剖，無菌摘取前腎及脾臟，用剪刀剪碎組織，細胞懸浮液加入 34%/51% (v/v) Percoll gradient，在溫度 4°C，以 400 × g 離心條件下，離心 30 分鐘，分離出 leukocytes，收集 leukocytes 後，以 L-15 含 heparin 10 i.u./ml、1% P/S、2% FCS 洗滌 1 次，再以 400 × g 離心 10 分鐘 (4°C)。

三、培養巨噬細胞

細胞懸浮液培養在 24 T 塑膠培養瓶中，每塑膠培養瓶加入 5ml 細胞懸浮液，

在 18 °C 下培養 2h。巨噬細胞粘附底部後，以 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -free Hanks'balanced salt solution (HBSS) 洗 3 次，含 1% P/S、10% FCS 之 L-15 medium 隔夜培養，隔夜培養好的巨噬細胞先以 HBSS 洗 2 次，塑膠培養瓶加入 L-15 medium 含 10% FCS。

四、巨噬細胞檢測

分離之巨噬細胞 pellet 懸浮於含 1% P/S、10% FCS 之 L-15 medium，細胞濃度調製成 1.5×10^7 cell/ml，使用白血球分類計數法、Wright-Giemsa stain 及 Trypan blue exclusion 等方法，進行細胞純度和生存活力 (viability) 測驗。

五、鏈球菌培養及巨噬細胞吞噬試驗

鏈球菌菌株 LK0321，分離自中心罹病吳郭魚，以 LK0321 在 35 °C 下培養，24 h 後收集細菌，以 PBS 調製成 2.6×10^6 cfu/ml 之濃度，試驗組每 well 加入 0.2 ml 細菌，在 18 °C 下培養 1 h，然後以 HBSS 洗 5 次，再以含 1% P/S、10% FCS 之 L-15 medium 培養，檢查時間分別為 0、60、120、180 分鐘。

進行巨噬細胞吞噬細菌試驗時，以 Acridine orange-crystal violet technique (AO-CV technique) 染色，在螢光顯微鏡下以 1,000 倍油鏡觀察，計算 100 個巨噬細胞中，吞噬細菌的細胞比例，及 100 個吞噬細菌的細胞中，吞噬的細菌數量及存活的細菌數量。

六、結果與討論

經細胞檢測結果，存活的細胞超過 90%，死亡的懸浮細胞低於 10%。細胞純度試驗顯示，超過 50% 的懸浮細胞是巨噬細胞，其他為淋巴球、顆粒球及紅血球。以 AO-CV technique 進行染色時，死亡之鏈球菌很容易和 Acridine orange 染劑結合，在螢光顯微鏡下呈現螢光紅 (metachromasy)，活存的鏈球菌則結合較少量的 AO 染劑，在螢光顯微鏡下呈現螢光綠 (orthochromasy) 至淡橘色，再以 crystal violet 染色，可以消除吸附在細胞外的螢光，使用 AO-CV technique 可以區別細胞內活存及死亡的鏈球菌。

細菌吞噬試驗結果顯示，添加甲殼素試驗組吞噬細菌之巨噬細胞為 78~80%，而對照組為 70~72%，試驗組有明顯增強巨噬細胞吞噬細菌的活力。試驗組於 0 分鐘和 120 分鐘吞噬細菌的數量，分別為 6.68 ± 1.10 與 6.62 ± 1.10 ，並沒有顯著的差異。而對照組於 0 分鐘和 120 分鐘吞噬細菌的數量，則分別為 4.42 ± 0.40 與 4.30 ± 1.00 ，也沒有顯著的差異。但試驗組吞噬細菌的數量在 0 分鐘和 120 分鐘均比對照組多 (表 1)。

表 1 甲殼素試驗組與對照組之巨噬細胞吞噬細菌之比較

Condition	Minutes of incubation		Phagocytosis (%) in 0 min
	0 min	120 min	
	Mean±S.D.		
Chitosan exp.	6.68±1.10	6.62±1.60	78~80%
Control group	4.42±0.40	4.30±1.00	70~72%