

中国对虾疾病与免疫机制*

REVIEW OF DISEASE AND IMMUNE MECHANISM IN *Penaeus chinensis*

李光友

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

疾病对于海水养殖对虾来说是一个严重的问题,在文献中有许多关于细菌、真菌、病毒、原生动物和寄生虫疾病的报道。但我们对于对虾病理,特别是病毒及与之有关的疾病病理,了解甚少。因而,对于某些疾病的预防和治疗缺乏有效地措施。

对虾和其他甲壳动物一样,生活在一个具有潜在危害的病原体的水环境中。尽管有坚硬外壳的保护,可以抵御病原体的侵袭,但还需要有一种有效的内部防御网络来对付任何通过伤口或其它途径进入机体的各种病原体。对虾的防御主要通过循环血细胞的吞噬、包裹、凝集、溶力和凝固等作用来完成。在某些情况下,病原体能够躲避或破坏对虾的防御网络,结果不可避免地产生疾病。如养殖密度过高,溶解氧、pH、温度急剧变化,金属污染,有毒物质的产生,药物使用不当以及藻相的改变等等。一些因素除给病原微生物提供良好的滋生环境外,还会激发潜伏在体内的病原体。对虾因全力抵抗外界环境的变化,会引起对虾体内机能协调失常或组织损伤,降低了对入侵病原体的防御能力,以致于平时不会构成危害的病原体也会造成严重病害。疾病的发生是对虾机体和病原体相互作用,并在适宜的环境条件影响下而产生的。病原体究竟如何躲避或破坏对虾的防御机构,了解甚少。但要找到预防和治疗措施,还必须从细胞和分子基础上对致病机理进行深入研究。

1 对虾血细胞在防御中的作用

对虾的防御反应如同其他甲壳动物一样,是由循环血细胞以及存在于或从细胞释放到血浆中的多种因子的活性而产生的。因而对虾的血细胞既是细胞免疫的担当者,又是体液免疫因子的提供者。从形态上看,对虾血细胞有三种不同的类型:透明细胞(Hyaline cell)、半颗粒细胞(Semi-granular cell)和颗粒细胞(Granular cell)。它们可以用密度梯度离心法从全血淋巴中分离得到。对不同细胞组分的分析表明,这些细胞不仅在形态上不同,而且在生化组成和体外培养时所表现的活力上也有区别。

1995年第4期

首先,关于透明细胞,经研究表明该细胞不仅缺少大的细胞内颗粒,而且还缺乏酚氧化酶活性。吞噬作用是这类细胞的一种基本性能,在体外培养时,有强的附着和广泛散布于玻璃表面的能力。在接触溶解的异物分子(β 1,3-葡聚糖或LPS)时似乎不受影响,但在体外可被酚氧化酶组分促进其吞噬活性。透明细胞在形态和功能上可能与昆虫的质细胞(Plasmatocyte)相同,这类细胞几乎是所有无脊椎动物中具有变形细胞的一种基本形态。

对半颗粒细胞的研究表明,该细胞含有数目可变的小细胞质颗粒和少量的酚氧化酶原。该类细胞极度敏感,在处理时或体外条件下,容易脱颗粒或细胞溶解。正是由于半颗粒细胞的敏感性,因此认为它是防御反应中的关键细胞,活跃的脱颗粒作用与识别异物的能力有关。

对虾的颗粒细胞与上述细胞的不同之处是,细胞内含大的颗粒以及其有大量酚氧化酶原组分。这类细胞不具有吞噬性,在玻璃表面上仅形成弱的附着和有限的散布。用溶解的 β 1,3-葡聚糖或LPS处理时,通常观察不到脱颗粒,但有活性的酚氧化酶存在时,它们很快进行胞吐作用。

细胞的胞吐作用是机体防御反应中极重要的过程。半颗粒细胞和颗粒细胞的胞吐作用,除异物分子(LPS, β 1,3-葡聚糖)外,还可被低浓度的钙离子所诱导,由此而脱颗粒释放无活性状态酚氧化酶。该过程被阴离子通道阻断剂SITS(4-乙酰氨基-4'-异硫氰基芪-2,2'-二磺酸二钠盐)和钙离子通道阻断剂钴氯(cobalt chloride)所阻止。用蜂毒进行实验,发现蜂毒在体外可诱导细胞溶解,但蜂毒不能引发酚氧化酶的激活。通过注射纯化的寄生虫卵的病毒,酚氧化酶的活性几乎全部丧失。关于病毒究竟如何对宿主产生这种效应还不清楚。

根据用分离的血细胞群对胞吐作用的研究结果,认为半颗粒细胞在宿主防御过程中是关键细胞,推测该细胞在受到非已物质刺激时,由胞吐作用释放通讯信号

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第2646号。

(可能是酚氧化酶蛋白)。这些信号直接作用于透明细胞或引起颗粒细胞释放更多的酚氧化酶组分,这些组分依次影响对稳态失调的细胞应答。因此,胞吐作用首先释放细胞中某些因子到血淋巴中,在血淋巴中被生化激活,发挥各自的生理功能。

2 对虾机体对异物的识别

对病原体入侵所发生的任何细胞性或体液性反应的中心,是宿主对异物的初始识别。在哺乳类动物中,已知这是通过特异的抗体,T淋巴细胞和补体途径完成的。但是无脊椎动物不具有免疫球蛋白和类似的淋巴细胞。很多学者认为无脊椎动物可能具有与补体相似的分子,现在已经积累的证据说明,酚氧化酶原激活系统组成了宿主——无脊椎动物免疫反应中的这样一种补体途径。

在对虾及其他甲壳动物中,酚氧化酶原激活系统由血细胞中的丝氨酸蛋白和其它因子的一种复杂的级联所组成,可以被外来异物分子特异地引发。该级联反应以酶原转化成活性的酚氧化酶——黑色素合成中的主要酶。血细胞溶胞产物上清液(HLS)中的酚氧化酶活性可以用L-dopa作为底物而进行分光光度测定。在体外,酚氧化酶原还可以被多种试剂,或热、去垢剂、有机溶剂等非生理性地激活。

作为非已识别,酚氧化酶原激活级联可以作为微生物和其它病原体表面上存在的或释放出的非已信号的受体,由这种相互作用产生的生化变化接着启动细胞活性或自身发挥抗病原体作用。对于革兰氏阴性菌和真菌,细胞壁上的非已信号分别是脂多糖(LPS)和 β 1,3-葡聚糖,这些分子的浓度低致 $10^{-9} \sim 10^{-10}$ g/ml时也可被特异激活。其它糖类,如海藻糖、葡萄糖、甘露糖、甘露醇、甲壳素、透明质酸或右旋糖苷等,不能激活酚氧化酶原系统。用多粘菌素B(poly-myxin B)预处理LPS,可以消除LPS对酚氧化酶原系统的激活作用。实际上,在体外细胞培养液中,LPS的浓度高于 10^{-4} g/ml时,它可以阻止酶的激活。

关于病原体对识别的躲避,可能采取的一种方法将其表面携带的非已分子隐藏或伪装起来。宿主仅能进行微弱的和极不充足的防御反应来抵抗它。有证据表明,病原体的外膜的生化结构,特别是多糖组成的变化可能影响宿主的免疫应答。躲避的另一种方式,可能是由病原体产生抑制物质抵抗宿主的防御网络。

3 对虾防御反应中血细胞的协作机制

在哺乳动物中,抵抗入侵病原体的防御反应,是通

过不同淋巴细胞亚群间的相互作用达到的。在无脊椎动物中不具备这样复杂的细胞协作机制,但在不同类型的血细胞间似乎确实存在着某种通讯和相互作用。有关研究表明,酚氧化酶原系统中的成分与这一现象有关。有关专家认为,当外界异物侵袭机体时,异物表面的分子(信号)作用于宿主的半颗粒细胞,该细胞受体与非已分子结合,刺激细胞产生胞吐作用进行脱颗粒,把酚氧化酶原系统释放到周围介质中,随后酚氧化酶原系统被非已分子激活形成附着和有活性的酚氧化酶。该酶又与邻近的颗粒细胞、半颗粒细胞相互作用并诱导它们脱颗粒释放到周围介质中,以此连锁反应放大了对外界因素的细胞应答。研究发现,酚氧化酶原系统被非已分子激活后可产生多种粘性蛋白,并具有诱导细胞的吞噬活性。因此,有的学者认为,由酚氧化酶原系统产生的粘性蛋白有调理素作用,具有抗微生物和溶解细胞的性能。

4 海水中的病毒是对虾病毒病的根源

关于水体中病毒的研究很少。一般人们认为,病毒只是生态系统中很不重要的一部分。前些年挪威的科学家们对海洋、湖泊、河流的水样进行检测,用“传导电子显微镜”来观察和统计水中的微小浮游生物的数量。他们统计的结果是,被测水样中病毒粒子含量最高为每毫升 2.5×10^8 个。这个数字比水中计测的任何一种生物数量都大。他们还发现,海洋中的病毒含量有季节性变化,冬天数量少,春天数量大增。

挪威科学家认为,上述发现从两方面具有重要意义。首先,病毒数量巨大,可以控制生活在水中的其他微小生物的数量。传统观点认为,原生动物掠食细菌才得以保持细菌数量的平衡,现在看来,主要是病毒攻击细菌来控制这种平衡。另一方面,数量巨大的病毒能够在水体中转移不同生物间的基因材料。例如它们错误结合一些其宿主细菌的DNA于自体上,然后又将这些DNA转移至另外的宿主内。其结果,使细菌改变自己,以适应改变着的外界环境。

上述的发现有助于细菌的抗药性的产生;病原体改变表面构型逃避宿主的防御网络的识别以及病原体对宿主毒性的演变等问题。对虾病毒病的爆发与流行,可能与水生态系统中细菌和病毒数量平衡失调有关,也许对虾是这种平衡失调的直接受害者之一。

5 对虾感染疾病的机理

关于对虾疾病已有许多文献报道,目前国内外不少学者从病原角度,把对虾疾病分为:细菌性疾病、真菌性

疾病、病毒性疾病、原生动物和寄生虫疾病。还有一些病因不明的疾病。也有的学者从疾病的症状角度,把对虾疾病分为:红腿、烂鳃、烂眼、黑鳃、褐斑、黑白斑、聚缩虫、纤毛虫、肌肉白浊及痉挛等疾病。

对虾有多种防御机制对抗病原体的入侵,如体表的甲壳和体内的防御网络。但病原体也有种种机能破坏这些防线,通过对虾机体的伤口或非钙化区域进入机体感染致病。目前已知的病原微生物感染宿主的机理,是病原微生物表面的某些分子和宿主细胞膜上的某些分子能够结合,其关系就像钥匙和锁一样。称病原微生物表面的某些分子为附着因子,一般由蛋白质组成(或称作凝集素);称宿主细胞膜上的某些分子为受体,一般多为糖类或糖蛋白。凝集素与糖的结合,就是病原微生物粘附到宿主细胞上的分子机理。有些病原微生物能够迅速改变表面构型,躲避宿主受体的识别,因而能够侵入宿主体并能生存下来。另有研究证实,胞外的凝集素能在病原微生物和宿主细胞膜表面的糖分子间起桥梁作用。而这种凝集素可以是宿主产生的内源凝集素,也可以是外源的。病原微生物表面的糖也能和宿主细胞膜上所含的凝集素结合,如肝胰脏细胞膜上的凝集素就可作为某些细菌的受体,使侵入机体的细菌很快就出现在肝胰脏内。

关于病毒对宿主细胞的感染机理,还缺乏深入研究。某些研究结果表明,病毒也有起附着作用的蛋白质能识别宿主细胞膜上的糖分子。最新研究表明,宿主细胞膜表面的蛋白质除有本身的生理功能外还兼作病毒的受体。病毒与膜受体结合后可通过细胞内吞或质膜融合方式进入细胞内。一般 DNA 病毒在胞核内,DNA 病毒在细胞质内繁殖。宿主细胞的成分或结构都可被病毒占用并改变成新形式为其增殖服务。

6 多糖类物质对防治对虾疾病的作用

多糖是含有六个以上糖亚单位组成的一类化合物。

这些分子通常具有很大的分子量,并且往往与其它化合物结合形成糖蛋白、糖脂或脂多糖。多糖分子多为链状结构并有高度分枝的支链,糖链的还原端结合在与其相联的肽或脂分子上,其非还原端向外,构成抗原决定簇,引起免疫反应,在高等动物中则引起抗体形成。一般情况是糖链的向外的末端的几个单糖构成抗原决定簇,高度分枝的糖链则有多个决定簇。

自 60 年代多糖被认为是一种广谱的非特异性免疫促进剂以来,其研究和应用有了迅速发展。目前多糖已成为一类重要的天然活性物质。在人体免疫中,多糖可增强宿主的细胞免疫和体液免疫功能,如激活巨噬细胞、T-细胞、B-细胞、NK-细胞,可促进抗体生成,激活补体及诱导产生干扰素等。其作用特点是激活人体的非特异性防御机能,在治疗肿瘤、心血管病、放射病防护及抗衰老等多个方面有很好疗效。近年的研究还发现,多糖对蛋白质结构和细胞特性有决定性影响,还能控制细胞的分裂和分化,调节细胞的生长和衰老等等。

近年来我们从免疫学角度对中国对虾的免疫功能及抗病能力进行了若干探索研究,研究证实,一些富含多糖、生物碱、有机酸等多种成分的天然免疫物质既有强的抗菌作用,又有免疫刺激作用,可提高对虾血淋巴因子的活性,增强其抗病防病能力,应用于对虾养殖生产有良好效果。利用口服免疫多糖,从提高对虾抗病能力,以预防为主,解决对虾疾病问题,可望是一条主要途径,进而促进我国对虾养殖业的发展。

参考文献略