

贝类血细胞活性氧体内防御作用的研究进展*

PROGRESS ON RESEARCHES OF REACTIVE OXYGEN INTERMEDIATES OF MOLLUSCS HEMOCYTES IN INTERNAL DEFENSE

张 峰¹ 李光友²

(¹ 大连水产学院 116023)

(² 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266003)

不论是在海水还是淡水,贝类的生存环境中充满了各种各样的寄生虫和病原体。因此,贝类必须具备一个有效的防御系统来抵抗各种病原微生物的侵袭,使其免受感染。虽然贝类具备坚硬的外壳形成一个物理和化学屏障,但仍然需要一个有效的体内防御网来对付通过伤口或其他途径偶然进入体内的病原微生物。贝类的体内防御系统不同于高等动物,缺乏特异性免疫机制,是以血细胞为防御基础的,这些血细胞能够通过吞噬和包裹来清除体内的外来病原微生物。血细胞释放一些毒性物质来杀灭和消化病原微生物,这些毒性物质中有一类是血细胞在吞噬过程中释放的胞毒的活性氧(ROIs)。近年来国外关于经济贝类的免疫抗病机制研究,尤其是关于贝类血细胞吞噬释放活性氧的杀灭病原微生物的机制的研究做了大量工作,为今后的贝类免疫防病机制的研究提供了理论基础。本文依据 80,90 年代主要参考文献予以综合评述,以期为国内贝类学研究和人工增殖提供参考。

1 活性氧的产生和种类

适当的刺激,吞噬细胞经历呼吸爆发并制造大量的胞毒氧化剂,即胞毒活性氧。这一现象最初是在哺乳动物的嗜中性白细胞和巨噬细胞观察到的。现已查明呼吸爆发的第一个反应是氧还原一个电子形成超氧阴离子(O_2^-),是由吞噬细胞膜上的 NADPH 氧化酶催化的。 O_2^- 超氧阴离子被胞质酶超氧化物歧化酶(SOD)催化转换成过氧化氢(H_2O_2)。过氧化氢活性很高是有毒的 ROIs 之一,同髓过氧化物酶(MPO)及卤素形成了强力杀菌系统的基础。另外,还可产生羟自由基(OH)和单线态氧(1O_2)等毒性 ROIs。这些 ROIs 能够参与细胞介导的杀灭细菌、真菌和原生动物的。吞噬细胞还具有解毒作用的酶用来防止自身氧化而被

损伤,这些酶有 SOD,谷胱甘肽过氧化物酶,过氧化氢酶和某些维生素等,它们都是自由基清除剂。

2 测定 ROIs 方法

目前已知,通过膜受体紊乱或消化外源颗粒刺激吞噬细胞,能够引发增加耗氧,增加 NADPH 氧化酶和己糖单磷酸支路的活性。在呼吸爆发过程中测定 ROIs 已在很多贝类血细胞中报道过。最早测定 ROI 方法之一是氮蓝四唑(NBT)还原检测 O_2^- 。象大多数 O_2^- 测定法一样,NBT 还原对过氧化物并非都是特异性的;测试的特异性要用超氧化物歧化酶(SOD)作对照。NBT 最初在显微镜下利用细胞化学方法证实 O_2^- 的产生。在有 O_2^- 存在时,浅黄色的 NBT 被转变成暗蓝色,形成在吞噬细胞质内易观察到的不溶沉淀物 Formazan,通过此法了解白细胞产生 O_2^- 及细胞内反应的强度。如已知的 NBT 还原定量法,用比色法测定吡啶或二甲基亚砷的白细胞抽提物内的 Formazan 的浓度。有时也用 O_2^- 测定法,刺激细胞后检测高铁细胞色素 C 在细胞外的还原。

活体内, O_2^- 迅速地与其他分子反应或被 SOD 歧化成 H_2O_2 。 H_2O_2 被认为是一种主要的毒性 ROI,通常利用过氧化物酶催化氧化某种底物进行定量,并通过检测介质中过氧化氢酶包含物确定检测的特异性。在细胞吞噬过程中,二氨基联苯胺(DAB)在有 H_2O_2 和过氧化物酶存在时会在细胞溶酶体内氧化成明显的棕色产物。DAB 反应用于显微水平评价氧化爆发作用。更多的定量数据从荧光测定高香草酸(Homovanillic acid)或测定在 610 nm 处酚红氧化时的最大吸收值。呼吸爆发时产生的 ROIs 能与化学发光探

* 国家攀登计划 B 资助项目 PDB6-6-3 号。

收稿日期:1998-11-04;修回日期:1998-12-20

针反应产生光子,可以用液体闪烁计数器或标准鲁米诺计进行定量。为此,化学发光(CL)已经成为最常用的方法来测定 ROI 的产生和血细胞杀菌能力。最常用的探针是鲁米诺,它能与 O_2^- , H_2O_2 和 1O_2 反应产生强烈的 CL 信号,但通常认为鲁米诺依赖的 CL 测定的主要是 MPO 的活性。Lucigenin 也作为 CL 的探针特异性测定 O_2^- 。一些荧光探针现在也用来测定白细胞的呼吸爆发。例如,2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA) 会进入白细胞内,然后代谢成为无荧光的,不透过膜的 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH)。细胞内 DCFH 在激活呼吸爆发后被氧化成荧光性的 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) 便可以测定吞噬体内形成的 ROIs。二氢若丹明 (Dihydrohodamine 123, DHR), 一种不带电、无毒、无荧光的若丹明 123 激光染料的衍生物,也是一种测定呼吸爆发活动的荧光探针。在吞噬细胞氧化活动时, DHR 在细胞内氧化成强荧光 R123, 这种检测要比 DCFH-DA 灵敏 3 倍以上。

3 贝类 ROI 的产生

目前已知,很多贝类的血细胞都有典型的呼吸爆发现象同时伴有 ROI 的产生。最初的实验是测定蛤血细胞吞噬时氧吸收的增加或 MPO-卤素- H_2O_2 的系统活性但没有成功。Dikkeboom 等 1985 年刺激椎实螺 (*Lymnaea stagnalis*) 血细胞成功地测定了 O_2^- 的产生;同年 Nakamura 等人测定了扇贝血细胞在静止和刺激状态时产生 H_2O_2 。此后,有关软体动物血细胞 ROI 的文章不断增多。在这些文章中, O_2^- 的测定采用 NBT 或细胞色素 C 还原法, H_2O_2 测定采用比色(二氨基联苯胺或酚红还原)或荧光法。CL 也用作 ROI 产生的批示剂。CL 法不能提供特殊 ROI 种类的定量信息,要区别 O_2^- 或 H_2O_2 产生的 CL 信号要用适当的酶抑制剂。目前认同为,吞噬细胞的 CL 反应与呼吸爆发时的杀菌活性有关。这种方法特别推荐用于贝类。Anderson 1994 年和 Adema 等 1992 年,已经将鲁米诺 CL 检测法用在了评价几种双壳类 ROI 的产生^[2,3],如 *Crassosrea virginica*, *C. gigas*, *Ostrea edulis*, 和 *Pecten maximus*。同样地,刺激腹足类血细胞用 CL 测定也能显示 ROI 现象,如 *Lymnaea stagnalis*, *Helix aspersa* 及 *Achatina achatina*。

Noel 等人 1993 年报道了 *Mytilus deultis* 的血细胞用酵母聚糖诱导的 CL 活性。鲁米诺依赖的 CL 主要测定 H_2O_2 /MPO 的活性,叠氮化钠(一种 MPO 的抑制剂)能抑制 *M. deultis* 血细胞产生 CL。然而,使用 SOD

并无明显的抑制作用。有报道表明,贻贝的 CL 反应弱于牡蛎和扇贝,表明不同的动物反应不同,另外不同的季节也有不同的反应。Adema 等人 1993 年研究表明在 *M. deultis*, NADPH 氧化酶活性的抑制剂也抑制 CL;用酵母聚糖诱导时,这些儿茶酚样酚类物质同样能抑制腹足类血细胞的氧化活性。现在采用不连续的 Percoll 密度梯度离心获取了几种贻贝血细胞亚群,用形态学和单克隆抗体对血细胞类型分类。与嗜碱性粒细胞或透明细胞相比,刺激产生的 CL 则与浓缩的嗜酸性颗粒亚群有直接关系。

Pipe 1992 年研究了 *Mytilus deultis* 血细胞的 NBT 的定量还原反应。用探针二氢若丹明 123 活化可证明血细胞产生 O_2^- 。虽然常报道 O_2^- 的产生需要呼吸爆发氧化酶的活化,但 Pipe 证实 *M. deultis* 血细胞 NBT 还原可以在无吞噬或其他刺激下进行。Anderson 等人 1992 年报道 *Crassosrea virginica* 血细胞也有类似的结果;Pipe 1992 年同时证实酵母聚糖诱导的血细胞经酚红氧化产生 H_2O_2 ,但未发现有自发的 H_2O_2 产生。除有直接细胞毒性, H_2O_2 可能于抗菌 HOCl 的产生有关,因为贻贝血细胞内有 MPO。Anderson 等人 1992 年也使用了 NBT 还原技术,即分光光度测定了从还原细胞抽提的蓝色 Formazan 产物。SOD 可以部分地抑制 NBT 还原,在静止和吞噬时的血细胞都有此现象。在野外采集地和实验室内做过牡蛎血细胞全年的 NBT 还原活性记录。随着周围水温的升高(2~29 °C),刺激的血细胞的 NBT 还原水平倾向于提高,但似乎在一定范围内与盐度无关。2~13 °C 范围牡蛎血细胞在 NBT 还原时温度对吞噬作用影响统计学上差异不显著。然而,21~29 °C 时温度对牡蛎血细胞还原活性有显著的活化作用。这些结果表明, NBT 还原反应有依赖温度季节变化的现象,这一点在设计 and 解释 ROI 诱导研究时应考虑进去。

Ito 等 1992 年证实经高香草酸氧化作用,海胆 (*Strongylocentrotus mudus*) 吞噬细胞经诱导产生 H_2O_2 。Bell 等人 1993 年报道了蟹 (*Carcinus maenas*) 血细胞刺激后产生 O_2^- 最先证实了甲壳类血细胞的呼吸爆发现象。除此以外,关于水生无脊椎动物血细胞产生 ROI 的报道都集中在贝类。

4 生态环境中化学物质对贝类血细胞产生 ROI 的影响

有些学者测定了重金属杀虫剂或其他有机化合物在体外或体内对 *Crassosrea virginica* 血细胞 CL 反应

的影响。发现在体外或体内实验,铜是 *C. virginica* 血细胞 CL 反应最有效的抑制剂,大多数化合物似乎也有抑制作用,特别是在高浓度时。有些化学物质如 Cd, Al, Zn, Dieldrin 和 Naphthalene 在低浓度时似乎有促进作用,而在高浓度时则作用相反。

Fisher 等人 1989 和 1990 年报道在体外条件下,用 Tributyltin(TBT)处理 *Crassostrea virginica* 和 *C. gigas* 在低浓度时产生轻微的促进作用(0.4×10^{-9}),而高浓度时有抑制作用。TBT 抑制性浓度($40 \times 10^{-9} \sim 400 \times 10^{-9}$)远远超过了大多数环境中的 TBT 抽样浓度;然而,野生牡蛎的血细胞或许在高浓度 TBT 中其结果产生了生物积累。

Anderson 等 1992 年的室内实验结果表明,Cd 对牡蛎血细胞的 CL 有免疫抑制效应。当这些血细胞在体外暴露在 Cd 亚致死浓度时,记录到了 ROI 产生的剂量与抑制依赖关系。测定了几种 CL 的参数,如静止或基础的 CL 即无吞噬刺激的细胞活性;CL 峰值即酵母颗粒诱导吞噬作用时的最大 CL 反应和总的 CL 即 CL 反应曲线面积总和。 $2 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6}$ Cd 对 CL 峰值和总 CL 都有明显的抑制作用。但实验的多种浓度($1 \times 10^{-6} \sim 50 \times 10^{-6}$)的 Cd 对静止时的 CL 无影响。Cd 对血细胞影响的效应性受血细胞介质组成的影响,特别是有牡蛎血清存在,其内含有金属结合蛋白。不管介质内是否有一定浓度的 Cd,CL 的实际出现的抑制是细胞内 Cd 浓度在起作用。将牡蛎暴露在 $0 \sim 0.25 \times 10^{-6}$ Cd 中两周在体外模拟体内的免疫抑制效应实验。Roesijadi 等 1989 年和 Shuster 等 1969 年证实随着条件指数和壳生长的降低,大约在 0.2×10^{-6} 时毒性作用变得明显。实验 Cd 浓度($\leq 0.25 \times 10^{-6}$)不同对牡蛎血细胞的 CL 反应不同,但不表现明显的剂量依赖特点。牡蛎血细胞暴露在微粒性青铜,铜和五氯苯酚中也会出现类似的鲁米诺依赖性 CL 反应的诱导性抑制。

5 贝类疾病中 ROIs 产生的调节

5.1 血瘤病

现已确认在几种双壳类贝类有血瘤病。如软壳蛤、贻贝, *Mytilus edulis* 发生一种血液再生性疾病,有时称为白血病。对这两种贝类来说,这种疾病是累进的,侵蚀性的而最终是致死的。与正常血细胞相比,这种血瘤病细胞具有扩大的核,非常少的细胞质以及附着玻璃板的能力明显降低。

血瘤病在高等脊椎动物通常与免疫缺陷即损害了正常的识别和消灭变态细胞的能力有关。Kent 等

1989 年描述了患血瘤病的 *Mytilus edulis* 受损害的防御机制。患血瘤病的贻贝,清除注射的细菌(*Cytophaga* sp.)的能力明显受到损害。然而,这种缺陷似乎是变态细胞无法吞噬外源颗粒的一种表达,而不是形态正常的血细胞吞噬能力的损害。血清成分似乎并不影响正常或变态血细胞的吞噬能力。这种疾病的产生或加重未必是来自免疫监视能力的下降,因为未变态血细胞继续行使正常功能,至少是有正常的吞噬活力。然而,血瘤病细胞的吞噬能力是非常有限的,如在严重感染的贻贝大约 90% 的血细胞是这种变态细胞,因此这些细胞的存在必然导致机体防御机制的严重损害。上述结果也说明了患细菌败血症的贻贝最终发展为血瘤病。

5.2 寄生现象

有些腹足类软体动物是原生动物寄生虫的中间宿主,这些寄生虫能够逃避螺类血细胞常规的包囊和细胞毒性作用。在血细胞和寄生虫相互作用过程中,ROIs 的作用目前还不了解。Loker 1986 年从免疫学角度详细地研究了 *Biomphalaria glabrata* 作为宿主和寄生虫的关系。已知哺乳动物吞噬细胞利用 ROIs 和过氧化物酶杀死血吸虫。已有的研究表明, *Lymanaea stagnalis* 的血细胞也可能产生 ROIs 和过氧化物酶参与消灭不能共生的寄生虫(*Schistosoma mansoni*)孢子的过程。这些孢子与血细胞接触被包囊,然后在 24 h 内被杀死;血浆对寄生虫无影响。上述过程初期,利用二氨基联苯胺反应和 NBT 还原反应证实包囊寄生虫的周围发现 O_2^- 活性。这些反应可以被过氧化氢酶和 SOD 抑制。在寄生虫和包囊界面间也证实有过氧化物酶的活性。但没有记录到鲁米诺增强的 CL 现象。或许,ROI 的产生只发生在血细胞包囊内的与寄生虫之间的接触点上;或包囊内不易接触到介质中的鲁米诺。然而组织化学证据表明在体外实验中,血细胞介导的抗寄生虫机制中确有 ROIs 产生。

有些学者分离和鉴定了 *Schistosoma mansoni* 孢囊产生的一些糖蛋白,其中一些排泄分泌的产物能调节宿主的防御机制,干扰血细胞的杀菌,吞噬作用,游动性和生物合成活性。寄生虫或其产物的存在对宿主的免疫调节可能决定于宿主品系的感性或抵抗特点的程度,其例证就是这些排泄分泌产物能够抑制 *Biomphalaria glabrata* 血细胞的吞噬作用和产生 O_2^- 。抗寄生虫螺品系的血细胞比来自感性品系的血细胞更有能力产生 SOD 抑制 O_2^- 。*S. mansoni* 的排泄分泌产物可抑制上述两种品系血细胞的吞噬作用和产生 O_2^- ,但抗寄生虫品系血细胞将保持更高的活性。这就意

味着寄生虫的排泄分泌产物更进一步降低了在感性品系中已存在的具消化和消灭寄生虫能力的血细胞提供的低水平的保护。类似的机制可以解释 *Perkinsus marinus* 和其他一些寄生虫有能力逃避贝类血细胞的消灭而不引发血细胞的吞噬作用产生 CL 反应。更令人感兴趣的是 *P. marinus* 产生的排泄分泌产物能够消除和歧化 O_2^- 。

有些学者报道了一种牡蛎 *Ostrea edulis* 细胞内寄生虫 *Bonamia ostreae* 能够被 *O. edulis* 和 *Crassosrea gigas* 血细胞吞噬,但只有 *O. edulis* 吞噬后才被感染。两种牡蛎血细胞在体外都可以吞噬酵母而产生 CL 反应,但寄生虫 *B. ostreae* 被上述两种血细胞吞噬后都不能引发 CL 活性。*C. virginica* 血细胞吞噬了 *Perkinsus marinus* 后也出现同样的缺乏 CL 活性的现象。能够感染扇贝 *Pecten maximus* 腮和血液的立克次氏体样生 (RLO) 使宿主缺乏 CL 活性。酵母可作为扇贝 *P. maximus* 血细胞吞噬激活物,但消化 RLO 后却不能产生 CL 反应。

利用贝类血细胞在体外的吞噬原生动物寄生物,鲁米诺增强的 CL 反应时发现不能引发产生 ROIs,但细胞内长期存在有寄生虫或许会增加血细胞对氧化刺激的反应性。Anderson 等人 1992 年研究了被 *Pecten marinus* 感染的 *Crassosrea virginica* 血细胞;测定了每毫升血淋巴的循环血细胞数目,正常吞噬刺激的 CL 反应和被 *P. marinus* 感染后的 CL 反应。测定每毫升血淋巴 *Perkinsus* 细胞数量用于评价感染强度。虽然用酵母聚糖诱导的 CL 反应在轻度和中度感染组之间几乎无差别,但是重度感染组牡蛎血细胞总的 CL 及 CL 峰值则明显的高于轻度和中度感染组。如果根据牡蛎个体诊断评价,将总血细胞计数数据分组,则重度

感染组症状与血细胞数目升高之间的联系非常显著。从 CL 测定数据看,比较轻度或中度与重度感染组的血细胞数目有着显著差异,而轻度和中度之间差异不显著。因此,前述病例似乎可用进入血淋巴循环的血细胞数量变化和激活来定性。

6 结语

目前,贝类病害已成为贝类人工养殖发展的重大障碍,尤其进入 90 年代以来,人工养殖的珍品贝类,特别是鲍的病害日趋严重,所以贝类的免疫抗病机制的研究显得尤为重要。近年来关于贝类体内抗病机制的研究取得了一些进展,已确认贝类血细胞在吞噬过程中能够产生 ROIs 参与抗病过程,但很多的详细机制并不清楚。例如,贝类体内 ROIs 产生的免疫调节机理;研究筛选合适的免疫增强剂提高贝类体内防御功能;环境污染对贝类血细胞吞噬活动的影响,了解体内 ROIs 的释放对周围正常组织的损害和体内抗氧化机制之间的调节关系等都将为今后贝类病害及其防治研究的重要方向。

主要参考文献

- 1 Loker, E. S. . and Bayne, C. J. . Immunity to trematode larvae in the snail *Biomphalaria*. In: Lackie, A. M. ,Ed. Immune Mechanism in Invertebrate Vectors. Oxford: Oxford University Press, 1986. 199
- 2 LaPeyre, J. F. , Chu, F. -L. E. and Vogelbein, W. K. . *J. Shellfish Res.* , 1992, 11: 200