

# 贝类血细胞的吞噬作用和非我识别\*

## PHAGOCYTOSIS AND NON-SELF RECOGNITION OF MOLLUSCAN BLOOD CELLS: A REVIEW

马洪明 麦康森

(青岛海洋大学海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

中图分类号 Q952.5 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)02-0016-03

贝类在我国的海水养殖业中具有重要的经济意义。但近年来频发的大规模病害严重阻碍了贝类养殖业的健康可持续发展。目前从生理、病理、种质、营养、生态等各方面对防治贝类病害进行了很多研究。其中从贝类免疫学角度进行的研究,前人尚涉足较少,逐渐成为贝类病害研究的热点之一。

贝类没有免疫球蛋白以及淋巴系细胞,因此缺乏获得性免疫(acquired immunity 或 adaptive immunity),其免疫防御功能依赖于天然免疫(innate immunity)的有关机制。这些免疫防御机制主要由贝类的血细胞来行使。目前关于贝类血细胞的分类虽然仍没有一致的看法,但粒细胞(granulocyte)和透明细胞(hyalinocyte)作为两种主要的细胞类型得到一致的公认。这两种细胞承担了已知主要的免疫防御功能如吞噬、包裹、愈合、移植排斥等。其中主要由粒细胞行使的吞噬作用是贝类抵御外物入侵的主要防线,在贝类的免疫防御中起重要作用。本文就贝类的吞噬作用及相关的非我识别作用的研究进展做一综述。

### 1 吞噬作用(Phagocytosis)

吞噬作用的功能主要是清除侵入机体的外源异物如生物大分子、无机物颗粒、细菌、真菌,以及自身的坏死细胞及细胞碎片等。同时也是提供营养的一种手段。在大多数报道的贝类中,吞噬作用主要由粒细胞完成,透明细胞也具有一定的吞噬能力,但不是主要的。另有报道在结缔组织中有一类固定的细胞也可以进行吞噬作用,如澳大利亚石鳖 *Liolophum gai m r d i*,它们在超微结构和组织化学(不含过氧化物酶)方面均与粒细胞不同,这类细胞可能主要是起消化和营养作用。从免疫防御的角度讲,血细胞可以活跃地趋化到炎症和损伤部位,进行吞噬,是免疫防御的主要

细胞类型<sup>[1,2]</sup>。

#### 1.1 吞噬和杀伤机制

吞噬作用的过程大致可以分为趋化、黏附、内吞以及杀伤消化四个阶段。研究证明贝类血细胞可以向外源颗粒趋化靠近。Schmidl 1975年通过体外实验,第一次揭示了贝类血细胞的趋化行为。发现田螺 *Vipans malleatus* 的粒细胞可以被经 80℃ 灭活的金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 菌以及细菌胞壁物质 N-乙酰葡糖胺吸引。贝类具有开放式循环系统,器官浸浴在血淋巴中,血管也没有完整的内皮系统,血细胞可以较自由地到达广泛的器官和组织,与外来物质的接触较为充分。因此,趋化的选择意义不象在高等动物那样重要。

血细胞靠近异物后首先发生黏附。随后,血细胞伸出伪足对异物进行包裹,伪足相接触后细胞质膜融合,形成吞噬体(phagosome)进入细胞。Cajaraville 和 Pal 1995年对贻贝 *Mytilus edulis* 亚显微结构的电镜研究表明,粒细胞和透明细胞都可以由局部细胞质膜内陷形成衣被小泡或无衣被的电子透明的内吞小体(endosome),完成内吞。Le Gall 等 1988年以及 Moore 等 1992年并证明内吞过程有细胞骨架的活跃参与。

粒细胞完成对异物的吞噬后,通过两条途径对其进行处理。一是吞噬体与溶酶体融合,其内容物被溶酶体中的水解酶类消化降解。另一条途径通过伴随吞噬作用的呼吸爆发(respiratory burst)产生大量活性氧

\* 国家重点基础研究(973)项目 G1999012010号。

第一作者:马洪明,出生于1970年,理学硕士,讲师。电话:0532-2032495, E-mail: mahongm@ouqd.edu.cn

收稿日期:2001-04-16;修回日期:2001-05-30

自由基,杀伤吞入的微生物。

超微结构研究显示了吞噬体与溶酶体融合的过程。贝类溶酶体中含有丰富的水解酶类,如酸性磷酸酶、蛋白酶、非特异性脂酶、糖苷酶等。吞噬颗粒在溶酶体酶的作用下被水解消化,此时溶酶体中可见到清楚的环状片层样膜结构,表明细胞在进行活跃的胞内消化。细胞中还可观察到多胞小体(MVB)的出现。细胞质中有大量糖原颗粒聚集以及脂肪滴出现,被认为是细胞内消化的产物。这些消化产物随着血液循环被血细胞带到各处组织作为营养物质传递给其它细胞。如果吞噬了不可消化的物质,吞噬细胞将通过血细胞渗出(diapedesis),经过肾上皮、外套膜、肠、生殖管等迁移到外部环境而离开机体,这是一种自杀性的行为。或者迁移到身体某一部分,变为代谢静默,永久居留。

伴随吞噬作用,贝类的粒细胞还可向血浆中释放溶酶体酶,即所谓的脱颗粒作用。溶酶体与细胞质膜融合并释放内容物的过程得到许多学者的观察证实。Cheng在1981年的综述文章中认为在某些情况下,当内吞还没有全部完成,即包绕异物的伪足还没有完全接触、融合形成吞噬体时,与溶酶体的融合已经发生,溶酶体内容物因此可以逸散到细胞外,也是溶酶体酶释放的一个途径<sup>[1]</sup>。Cajaraville和Pal1995年对贻贝 *Mytilus edulis* 进行的超微结构观察则认为吞噬和脱颗粒可能分别由不同的粒细胞完成,因为在富含吞噬残余小体(phagocytosed residual body)的粒细胞中,仍然充满了颗粒,没有发现脱颗粒,而在进行胞吐的粒细胞则没有发现吞噬的迹象。

另一条对吞入物进行处理的途径是通过伴随吞噬作用的呼吸暴发产生多种活性氧自由基,较近的文献一般称之为反应性氧媒介(reactive oxygen intermediate species ROIs),这些 ROIs 可以利用其强氧化性直接杀伤吞入的微生物。据 Trush 等1978年报道,ROIs 的产生与位于细胞质膜上的 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase)有关。在呼吸暴发过程中产生的 ROIs 包括超氧阴离子、过氧化氢、羟基自由基、超卤化物(hypohalides)等<sup>[3]</sup>。它们对磷脂双分子膜、蛋白质乃至核酸都会造成严重的损伤。目前,检测过的绝大多数双壳或腹足贝类中都发现了伴随吞噬的呼吸爆发现象<sup>[4]</sup>。但并不是所有的贝类都有此种杀伤机制,如 Lopez 等用细胞化学方法在蛤仔 *Ruditapes decussates* 没有检出 NADPH 氧化酶,而对照贻贝 *Mytilus galloprovincialis* 则呈阳性。Cheng 早在1976年研究了硬壳蛤 *Merxenaia mercenaia* 吞噬过程的能量需求,发现其

没有伴随吞噬作用的耗氧增加,也没有基于髓过氧化物酶的过氧化物杀伤机制。

## 1.2 包囊作用(encapsulation)

如果异物比血细胞大得多,例如寄生虫、坏死组织、外源植入物等,则血细胞对该异物的吞噬动员了全部的细胞膜表面积,表现为血细胞在异物表面上完全伸展,扁平化,由若干吞噬细胞共同将异物包裹起来。这称为包囊作用。Bayne 称之为受挫的吞噬作用。最初,血细胞对异物的包裹比较疏松,随着越来越多的细胞聚集到异物处,与异物直接接触的细胞变扁平,并充分伸展,形成包裹异物的连续的细胞层。在伸展和扁平化的过程中微管以及成束的微丝出现在细胞质周边区域。说明这些结构在细胞伸长的过程中起到了重要的作用。最后,包囊变得越来越坚固。血细胞通过细胞内和细胞外消化将被包囊的异物清除。

## 2 识别(Recognition)

在吞噬作用中涉及到的一个重要的问题是,血细胞怎样有效地识别异物,区分自我和非我(self and nonself)。这是吞噬作用发挥防御功能的前提。

### 2.1 调理作用

由于贝类没有类似于高等动物主要组织相容性复合体(MHC),免疫球蛋白(Ig)那样的基于可重排分子的识别系统。贝类对异物的识别主要依赖于一些其他非特异的识别因子。

研究发现,贝类血细胞的趋化、黏附和吞噬过程都可被某些血清因子促进。这说明贝类血细胞对异物的识别,类似于高等生物,也依赖于血浆中某些因子的作用。这些因子统称为调理素(opsonin)。在环节动物、昆虫、甲壳动物、棘皮动物以及贝类中均已证明有体液调理因子存在。

Smirnia 等1979年证明将酵母和羊红细胞预先在静水椎实螺 *Lymnaea stagnalis* 的无细胞血淋巴中进行温育,可以显著提高其血细胞在体外对酵母和羊红细胞的吞噬。Renwantz 和 Mohr 1978年的体内实验从另一个角度说明了同样的问题。他们将人 A1 和 B 型红细胞预先与盖罩大蜗牛 *Helix pomatia* 的血清在体外进行温育处理,然后注射入该动物,发现可以显著提高其对入红细胞的清除速率。他们还发现,如果在首次注射大剂量未经处理的 A1 型人红细胞后,经过 12~19h 后再次注射同样未经处理的 A1 型人红细胞时,则清除速度与第一次注射相比极为缓慢,表现出一种抑制效应。而如果将第二次注射的红细胞预先与

该种动物的血清进行温育,则其清除速度与第一次注射类似。这说明产生抑制效应的原因是第一次注入的大剂量的外源颗粒消耗掉了血浆中某种对识别起辅助作用的调理因子而不是饱和了动物的吞噬能力。说明调理素对血细胞识别异物有重要的促进作用。但并不是所有的识别作用都依赖于血浆因子的调理作用,如 Renwantz 等 1981 年证明盖罩大蜗牛 *H. pumilia* 对酵母菌的清除并不依赖于血浆成分的调理作用。

在高等动物中起调理作用的主要是免疫球蛋白,补体成分以及细胞或细菌表面的凝集素 (agglutinin or lectin) 分子。在贝类中还没有存在类抗体样分子和补体系统的可靠证据,但血淋巴中的内源性凝集素已被证明对于识别和吞噬外源颗粒具有重要的辅助作用。凝集素是一类糖蛋白,可以与外源异物相结合,同时可以与吞噬细胞相结合,象桥梁一样连接血细胞和异物,起到调理作用。另外,Cheng 和 Dougherty 1989 年认为吞噬细胞的脱颗粒作用释放出的酶可以修饰外来细胞的表面结构,从而使外源细胞被有效识别。因此溶酶体酶在此也起到了调理素的作用。

## 2.2 血细胞表面受体

无论识别是否依赖调理作用,吞噬细胞表面特定的识别分子(受体)都是必需的。在需要调理素的情况下,调理素通过识别并结合于外来物质或损伤组织的表面,为吞噬细胞表面受体提供了易于识别的标记,受体识别外来颗粒表面的调理素分子。而在不依赖调理素的情况下,细胞表面受体直接识别异物。识别的完成最终取决于吞噬细胞膜上的受体。

目前对贝类吞噬细胞的膜表面特征还知之甚少。一些工作揭示了吞噬细胞表面存在不同专一性受体。如 Fryer 等 1989 年发现双肺螺 *Bio niphonia glabmtad* 血细胞对未被调理的酵母的识别可被  $\beta$ -1,3 葡聚糖 (glucan) 封闭,因而推测双肺螺 *B. glabmtad* 血细胞具有  $\beta$ -1,3 葡聚糖专一性的表面受体。由于凝集素具有与血细胞结合的特性,目前已被越来越多地用于对贝类血细胞的表面分子特征进行研究。单克隆抗体以及多克隆抗体也被用来对贝类血细胞表面特征进行研究,但主要集中在对血细胞的分型。虽然目前这方面的工作还不多,但单克隆抗体和凝集素的运用必将大大推动对细胞膜表面结构的了解,并将成为重要的研究手段。

## 2.3 识别机理

贝类没有象高等动物那样复杂的基于基因重排分子的识别系统,它怎样识别众多入侵的病原体和异

物呢?近年来研究发现,天然免疫识别分子可以识别为一大组或几组病原体所共有的,保守的,不同于宿主自身成分的某类分子的结构模式(称为病原体相关分子模式, pathogen associated molecular pattern, PAMP),如细菌细胞壁中的肽聚糖,革蓝氏阴性菌细胞壁的脂多糖,革蓝氏阳性菌细胞壁的磷壁酸,细菌 DNA 中未甲基化的 CpG 二核苷酸, RNA 病毒的双链 RNA 等<sup>[5]</sup>。与抗体对抗原物质的识别不同的是,天然免疫分子识别的不是高度专一性的空间结构和化学结构(抗原决定簇),而是某种结构模式,因而是广谱的。这些对 PAMP 进行识别的免疫识别分子包括血浆中的调理因子以及血细胞表面的某些受体,它们的存在保证了贝类可以有效地对异物进行识别进而清除。

对外源无机物颗粒的识别,可能也依赖了类似的机制,即,无机颗粒与宿主细胞在疏水性和携带电荷方面的显著不同构成了另一种可识别的结构模式,被相关的免疫识别分子识别。

## 3 结语

贝类免疫学的研究还非常初步,一个重要的原因是贝类基本的生物学背景知识还相当欠缺。贝类血细胞的吞噬作用和非我识别是贝类免疫防御的核心。对有关过程和机制的阐明,是贝类免疫学研究的重要内容。贝类免疫系统结构和功能的不断阐明不仅将揭示一些无脊椎动物免疫学的基础问题,对解决养殖贝类病害的监测、预报、防治及抗逆品种的培育等问题更有重要指导意义。

## 参考文献

- 1 Cheng T C. Bivalves. In: Ratcliffe N A, Rowley A F eds. Invertebrate blood cells. London: Acad Press, 1981. 233 - 300
- 2 Sminia T. Gastropods. In: Ratcliffe N A, Rowley A F, eds. Invertebrate blood cells. London: Acad Press, 1981. 191 - 232
- 3 Ortuno J, et al. Kinetics of hydrogen peroxide production during in vitro respiratory burst of seabream *Sparus aurata* L.) head kidney leucocytes, as measured by a flow cytometric method. Fish & Shellfish Immunol, 2000(10): 725 - 729
- 4 张峰,李光友. 皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的研究. 海洋与湖沼, 2000, 31(4): 386 - 391
- 5 陈政良,朱锡华. 天然免疫系统的“分子模式识别作用”及其免疫生物学意义. 免疫学杂志, 2000, 16(3): 161 - 165

(本文编辑:李本川)