

活性氮中间体和一氧化氮合成酶系统在水产养殖生物病害防御中的作用

Role of reactive nitrogen intermediates (RNIs) and nitric oxide synthase in disease resistance of maricultured organisms

姜国建¹, 于仁诚², 周名江²

(1. 中国海洋大学 海洋法学研究所, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院 海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071)

中图分类号: S9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)03-0090-04

有关活性氮中间体 (Reactive Nitrogen Intermediates, RNIs) 在生物防病抗病方面的研究是在近几年才开始的。近年来, 有关生物体内一氧化氮 (NO) 的研究进入了一个全新的时代, 并由此产生一项诺贝尔奖。以往对于一氧化氮的研究主要是基于其作为神经递质的生理作用及其在细胞内的产生机理, 但近来的研究发现, 一氧化氮除作为化学信号物质外, 还具有抵抗病原体的作用。作者将针对以一氧化氮自由基为代表的活性氮中间体, 就其在生物疾病抵抗能力方面的研究进展进行综述, 以期对养殖生物的抗病力研究提供依据。

1 活性氮中间体的产生及其对病原生物的毒性机制

活性氮中间体包括一氧化氮自由基及其通过多种复杂反应而生成的产物, 如 NONOates、亚硝基硫化物 (S-nitrosothiols)、过氧一氧化氮 (ONOO⁻) 等^[2], 统称为活性氮中间体。生物体内的活性氮中间体与催化一氧化氮产生的一氧化氮合成酶 (Nitric Oxide Synthase, NOS) 有直接关系。NOS (EC 1.14.13.39) 存在于细胞质或线粒体中, 是一个含有血红素的复合物, 这个复合物分为氧化区 (催化区) 和还原区, 氧化区由血红素和四氢生物喋呤组成, 其功能是结合底

物 L-精氨酸, 还原区由 FAD、FMN、NADPH 等辅助因子组成, 起传递电子的作用。生物体内的一氧化氮合成酶一般分为结构型一氧化氮合成酶 (cNOS) 和诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 两类。与抗病有关的 iNOS 通常存在于吞噬细胞中, 可以被细胞因子如干扰素、白介素、肿瘤坏死因子和病原体 (细菌、病毒、寄生虫) 及免疫刺激物 (脂多糖) 等激活, 激活后的 iNOS 能够催化 L-精氨酸产生一氧化氮, 并通过多种复杂反应产生不同类型的活性氮中间体, 起到防御病原体的作用。

RNIs 对病原生物的毒性作用可以通过多种机制实现, 如作用于病原体蛋白质、核酸或脂类, 单独或协同杀灭病原生物。但这些作用并不具有特异性, 对生物自身也会产生毒害效应。

RNIs 对病原体蛋白质的影响表现在对多种酶活性的抑制, 体现在以下 5 个方面: (1) 通过与血红素相结合形成 NO-血红素加合物后, 抑制含有血红素的酶如鸟氨酸环化酶、血红蛋白、细胞色素氧化酶等; (2) 与硫、氮、氧和芳香环等亲核中心发生亲核反应, 如

收稿日期: 2004-08-08; 修回日期: 2004-10-20

基金项目: 国家重点基础研究项目 (G1999012011)

作者简介: 姜国建 (1969-), 男, 山东烟台人, 博士, E-mail:

jiangguojian_jiang@yahoo.com.cn

通过硫-亚硝基化 (S-nitrosylation) 反应抑制依赖巯基的酶活性;(3)使酪氨酸亚硝基化或通过脱氨基作用使蛋白质变性、失活;(4)介导 Fe^{2+} 的释放,影响含 Fe^{2+} 酶的活性;(5)介导蛋白激酶 C 等含 Zn^{2+} 蛋白中 Zn^{2+} 的释放等,影响相关酶的活性。

RNIs 对病原体核酸的破坏作用可以通过两种不同的途径实现,一种是 RNIs 通过对脱氧核苷酸的亚硝基化作用使其碱基脱氨基,从而引起 G:C 到 A:T 的转变,可能导致 DNA 链的断裂;另一种是通过作用于与遗传物质相关的酶,间接影响 DNA 的稳定性。

RNIs 对病原体脂类的影响主要是通过过氧化作用造成破坏,其中过氧化氮对脂类的过氧化作用最强,它可以直接氧化不饱和脂肪酸,也可以通过与低密度脂蛋白结合,释放 NO 和氧自由基,对不饱和脂肪酸起到氧化作用。过氧化氮还可以通过消除维生素 E 等低分子抗氧化剂氧化细胞膜。

针对活性氮中间体和一氧化氮合成酶系统在病原生物防御机制方面的研究主要是针对哺乳动物进行的,但这也为在水产养殖生物中开展相关研究提供了理论依据和研究思路。

2 水产养殖生物中活性氮中间体和一氧化氮合成酶系统在病害防御中的作用研究

近年来,由于病毒、细菌病的肆虐,使得养殖生物病害问题成为制约水产养殖业持续发展的主要因素之一。因此,养殖生物流行病的控制和预防是水产养殖业需要首先解决的问题,也是水产科学的研究热点之一,而搞清宿主的免疫机理和宿主与病原之间的相互作用是制定防病策略的依据。众所周知,先天性免疫系统在生物抵抗病原体方面起重要作用,它主要由体液免疫和细胞免疫组成,对此国内已有比较系统的研究报告和综述^[1,2]。但是,对于活性氮中间体和一氧化氮合成酶系统在病原生物防御方面的作用一直没有得到足够的重视。由于活性氮中间体对细菌、病毒和寄生虫等病原生物具有广谱抵抗能力,因此对它们的深入探讨对于揭示水产养殖生物的免疫机制以及活性氮中间体的免疫地位有重要意义。

在水产养殖动物中有关鱼类 iNOS 的研究已比较

深入。鱼类的 iNOS 能够被多种因子所诱导,从而起到防御病原体的功能。脂多糖等免疫刺激物和干扰素、白介素、巨噬细胞激活因子、肿瘤坏死因子等细胞因子都可以诱导鱼类 iNOS 的产生^[3,4]。此外,细菌、病毒和寄生虫等病原体的入侵也能诱导某些鱼类 iNOS 而产生 NO,从而起到防御作用。研究结果表明,鱼类的 iNOS 主要存在于白细胞、头肾巨噬细胞和鳃细胞中^[5,6]。部分鱼类 iNOS 的全序列已经测定,其保守序列与哺乳动物的 NOS 有很高的同源性,如在鲤鱼的 iNOS 中也存在四氢生物喋呤、FAM、FAD 以及 NADPH 等 iNOS 辅助因子的结合位点^[7],这方面的研究表明 iNOS 在生物进化过程具有相当高的保守性,同时对于揭示 iNOS 在鱼类先天性免疫系统中的功能具有重要的意义。

贝类的 iNOS 主要存在于血细胞中,在细胞白介素 (IL-1、IL-2)、转移因子 (TNF- α) 等细胞因子、脂多糖和大肠杆菌的刺激下,贝类 iNOS 的活性显著升高,催化生成大量的 NO,能够清除细菌并强化吞噬作用^[8]。但有时 NO 的产生和吞噬作用的增强不同步,说明 NO 和吞噬作用驱除细菌是通过两种不同的机制实现的^[9],NO 对细菌有直接的杀灭作用,而吞噬作用则是将细菌吞噬后将其消解。随着检测方法的发展,已有很多种贝类的 iNOS 得到了鉴定^[10]。

到目前为止,有关 NOS 在对虾免疫学中的地位和作用的研究还没有开展起来。Holmblad 等^[11]曾在甲壳类免疫模型中强调了一氧化氮和活性氮中间体可能具有重要作用,但其作用机制还不清楚。这方面的工作需要逐步展开,首先要在对虾的免疫细胞中或体液免疫系统中鉴定到 RNIs 的来源,建立测量 iNOS 活性的方法,并确定 RNIs 及 iNOS 在对虾免疫学中的地位和作用及其机制^[12]。目前作者的研究工作已证实在中国对虾和日本对虾的血细胞中均存在可被诱导的一氧化氮合成酶,而且酶的活性变化与白斑综合症病毒 (WSSV) 感染的过程密切相关^[13]。可以认为,一氧化氮和活性氮中间体在对虾的疾病抵抗能力中应当具有重要作用,一氧化氮合成酶的活性可以作为反映对虾健康状况和疾病抵抗能力的有效指标,但其作用机制还有待于深入研究。有关水产养殖生物 iNOS 的研究现状详见表 1。

表 1 水产养殖生物 iNOS 的研究现状

生物种类	iNOS 的存在位置	影响 iNOS 活力的因素	产生的效应	参考文献
金头鲷 (<i>Sparus aurata</i>)	血清	美人鱼发光细菌 (<i>Photobacterium damsela</i>)	诱导 iNOS, 并产生大量的 RNIs	[14]
	头肾巨噬细胞	巨噬细胞激活因子 (MAF) 和脂多糖 (LPS) 香豆素 A (ConA)	诱导 iNOS, 并产生大量的 RNIs	[15]
鲫 (<i>Carassius aurata</i>)	头肾巨噬细胞	巨噬细胞激活因子 (MAF)	诱导 iNOS, 并产生大量的 RNIs	[16]
大菱鲆 (<i>Scophthalmus maximus</i>)	头肾巨噬细胞	出血性败血病病毒 (VHSV)	诱导 iNOS, 并产生大量的 RNIs	[17]
	头肾巨噬细胞	脂多糖 (LPS)	诱导 iNOS, 并产生大量的 RNIs	[18]
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	头肾巨噬细胞和鳃组织	杀鲑气单胞菌 (<i>Aeromonas salmonicida</i>)	iNOS 的表达水平明显上升	[5]
鲤 (<i>Cyprinus carpio</i>)	头肾巨噬细胞、淋巴发生细胞和白细胞	鞭毛虫 (<i>Trypanoplasma borreli</i>)	诱导 iNOS, 并产生大量的 RNIs	[19]
紫贻贝 (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	血细胞	细胞白介素、酵母聚糖、佛泊醇、海藻多糖、脂多糖 (LPS)	诱导 iNOS, 并产生大量的 RNIs 能够促进吞噬	[8, 20]
蛤仔 (<i>Ruditapes decussates</i>)	血细胞	弧菌 (<i>Vibrio tapetis</i>)	诱导血细胞合成 iNOS 并产生大量的 RNIs, 抑制了病原菌的生长	[21]
淡水蜗牛 <i>Viviparus ater</i>	血细胞	细胞白介素 (IL-1、IL-2)、转移因子 (TNF- α) 脂多糖 (LPS) 大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	诱导 iNOS, 并产生大量的 RNIs	[9, 10]
中国明对虾 (<i>Fenneropenaeus chinensis</i>)	血细胞	白斑综合症病毒 (WSSV) LPS	WSSV 使得 iNOS 的活力在感染初期升高, 后期下降	[13]
日本对虾 (<i>Marsupenaeus japonicus</i>)	血细胞	白斑综合症病毒 (WSSV) LPS	LPS 诱导血细胞合成 iNOS 并产生大量的 RNIs	[12]

参考文献:

- [1] 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. 海洋科学, 1995, 4: 1-3.
- [2] 李光友, 王青. 中国对虾血细胞及其免疫研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(6): 591-597.
- [3] Neumann N F, Belosovic M. Deactivation of primed respiratory burst response of goldfish macrophages by leukocyte-derived macrophage activating factor(s) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1996, 20: 427-439.
- [4] Secombes C J, Wang T, Hong S, *et al.* Cytokines and immunity of fish [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 25: 713-723.
- [5] Laing K J, Hardie L J, Aartsen W, *et al.* Expression of an

- inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 1999, 23: 71 – 85.
- [6] Laing K J, Grabowski P S, Belosevic M, *et al.* A partial sequence for nitric oxide synthase from a goldfish *Carassius auratus* macrophage cell line[J]. **Immunology and Cell Biology**, 1996, 74: 374 – 379.
- [7] Saeij J P J, Stet R J M, Groeneveld A, *et al.* Molecular and functional characterization of a fish inducible-type nitric oxide synthase[J]. **Immunogenetics**, 2000, 51: 339 – 346.
- [8] Torreilles J, Gueurin M C. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes *in vitro*[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 1999, 9: 509 – 518.
- [9] Franchini A, Fontanili P, Ottaviani E. Invertebrate immunocytes – relationship between phagocytosis and nitric oxide production [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1995, 110 B: 403 – 407.
- [10] Conte A, Ottaviani E. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes[J]. **FEBS Letters**, 1995, 365: 120 – 124.
- [11] Holmblad T, Söderhäll K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity[J]. **Aquaculture**, 1999, 172: 111 – 123.
- [12] 姜国建, 于仁诚, 王云峰, 等. 对虾血细胞中一氧化氮合成酶鉴定与分析方法研究[J]. **中国水产科学**, 2004, 11: 177 – 184.
- [13] 姜国建, 于仁诚, 王云峰, 等. 中国明对虾血细胞中一氧化氮合成酶的鉴定及其在白斑综合症病毒感染过程中的变化[J]. **海洋与湖沼**, 2004, 35: 346 – 352.
- [14] Acosta F, Ruiz de Galarreta C M, Ellis A E, *et al.* Activation of the nitric oxide response in gilthead seabream after experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2004, 16(5): 581 – 588.
- [15] Mulero V, Meseguer J. Functional characterisation of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 1998, 8: 143 – 156.
- [16] Neumann N F, Barreda D R, Belosevic M. Generation and functional analysis of distinct macrophage sub-populations from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney leukocyte cultures[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2000, 10(1): 1 – 20.
- [17] Tafalla C, Figueras A, Novoa B. Role of nitric oxide on the replication of haemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus[J]. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 1999, 72: 249 – 256.
- [18] Tafalla C, Novoa B. Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages[J]. **Developmental & Comparative Immunology**, 2000, 24: 623 – 631.
- [19] Scharsack J P, Steinhagen D, Kleczka C, *et al.* The haemoflagellate *Trypanoplasma borreli* induces the production of nitric oxide, which is associated with modulation of carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte functions[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2003, 14: 207 – 222.
- [20] Gourdon I, Guérin M C, Torreilles J, *et al.* Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, 2001, 5 (1): 1 – 6.
- [21] Tafalla C, Gómez-León J, Novoa B, *et al.* Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussates*) hemocytes[J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 2003, 27: 197 – 205.

(本文编辑:张培新)