

脑啡肽对栉孔扇贝血细胞聚集和附贴的影响

王娜娜, 孙虎山, 王宜艳

(烟台师范学院 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 用质量浓度为 2, 5 和 25 mg/L 的脑啡肽对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 血细胞聚集和附贴的影响进行了研究。结果表明质量浓度为 2~25 mg/L 的脑啡肽均抑制血细胞的聚集, 并且随着脑啡肽质量浓度的升高, 对血细胞聚集的抑制作用加强。2 mg/L 的脑啡肽促进血细胞的附贴, 5 mg/L 和 25 mg/L 的脑啡肽抑制血细胞的附贴。实验证明脑啡肽对栉孔扇贝的免疫调节有重要作用。

关键词: 脑啡肽; 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*); 细胞聚集; 细胞附贴

中图分类号: S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2006)09-0028-03

脑啡肽 (Enkephalin) 是神经内分泌系统产生的一种多肽激素, 属内源性阿片样物质。有 2 种形式的脑啡肽: 甲硫氨酸-脑啡肽 (met-Enk), 分子式为 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH; 亮氨酸-脑啡肽 (leu-Enk), 分子式为 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH。脑啡肽广泛地存在于高等动物大脑许多区域, 以纹状体中含量最高, 整个胃肠道均含有脑啡肽, 以胃窦和十二指肠含量最高, 回肠次之, 结肠最低^[1]。实验证明, 低等无脊椎动物贝类也含有这种物质。Stefano 等^[2]用免疫组化法证明脑啡肽存在于贻贝的足神经节内, 还分布于富含多巴胺的结构中。脑啡肽具有免疫调节作用, 在体及离体实验证实, 小剂量可增强免疫功能, 大剂量则产生抑制效应^[3]。细胞聚集和细胞附贴是细胞两种不同的行为, 细胞聚集是细胞与细胞之间的相互作用, 细胞附贴是细胞和接触物之间的相互作用^[4]。细胞聚集率和附贴率的高低, 与血细胞的吞噬、结节形成、炎症反应、伤口修复和包囊化作用有着直接的关系。有关脑啡肽对低等动物细胞的聚集和附贴的影响, 国内尚未见报道。作者通过测定不同浓度的脑啡肽对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 血细胞聚集和附贴的影响, 来探讨脑啡肽在低等动物双壳贝类中的免疫调节作用。

1 材料和方法

1.1 材料

栉孔扇贝购自烟台水产市场, 壳长 4~5 cm, 放于

一个过滤的、可循环的、持续充气的容器中养殖 (pH7.6, 15 °C)。脑啡肽购自 sigma 公司, 用之前先配成质量浓度为 100 mg/L 的溶液, 4 °C 下保存。CM-TBS (100 mmol/L CaCl₂, 60 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L Tris-HCl, 2% NaCl, pH7.4) 作缓冲液。细胞破碎液为 2% Na₂CO₃ 和 0.1 mol/L NaOH。

1.2 方法

1.2.1 血细胞聚集

血细胞聚集实验采用 Chen 等^[4]的方法。先在实验组的小试管中分别加入质量浓度为 100 mg/L 的甲硫氨酸脑啡肽原液 0.02, 0.05 和 0.25 mL, 再分别加入 2% NaCl 0.48, 0.45 和 0.25 mL, 对照组只加 0.5 mL 2% NaCl。用 5 号针头 5 mL 注射器自栉孔扇贝闭壳肌血窦取血, 迅速向各管中加入 0.5 mL 血淋巴, 使实验组各管内脑啡肽最终质量浓度分别达 2, 5, 25 mg/L。室温 (18 °C) 下放置 15 min, 最后各管均加入 0.02 mL 福尔马林原液进行固定。滴片后在相差显微镜下进行观察, 并利用血球计数板计数每 mL 血淋巴中没有参与聚集 (分散) 的血细胞数, 3 个以上细胞联结在一起即做为聚集, 每管各计 3 次。

收稿日期: 2004-12-27; 修回日期: 2005-01-10

基金项目: 国家 973 计划资助项目 (G1999012005)

作者简介: 王娜娜 (1980-), 女, 山东即墨人, 硕士, 研究方向: 贝类免疫学, E-mail: wangnana_nuoer@chinaren.com;

孙虎山, 通讯作者, E-mail: s_hushan@163.com

1.2.2 血细胞附贴

血细胞附贴实验也采用 Chen 等^[4]的方法, 略有改动。取 12 只干净的 5 mL 塑料离心管, 每 3 只为一组, 各加 0.2 mL 血淋巴, 分别加入 100 mg/L 脑啡肽原液, 使之最终质量浓度分别达 2, 5, 25 mg/L, 对照组加 2% NaCl, 各管内液体最终体积均为 0.4 mL。室温 (18 °C) 下放置 15 min 后, 用移液器将液体轻轻吸出, 残留液体慢慢倾出, 各加入 CMTBS 缓冲液 0.4 mL, 再轻轻吸出, 重复 3 次。冲洗完毕后, 在每只试管里加入 0.5 mL 细胞破碎液, 计时 30 min, 期间不时地放在微型漩涡混合器中进行振荡。30 min 后, 按照 Folin-酚试剂法测蛋白质含量的方法分别加入 Folin-酚试剂 1 (室温下 10 min) 和 Folin-酚试剂 2 (室温下 30 min), 分光光度计 500 nm 下测吸光度 A 值, 血细胞附贴率等于实验组 A 值与对照组 A 值之比。

2 结果

2.1 脑啡肽对血细胞聚集的影响

脑啡肽对栉孔扇贝血细胞聚集的影响测定结果见图 1。实验组与对照组相比, 无聚集细胞的数量都有所增加。随着脑啡肽质量浓度的升高, 由 2 mg/L 升高到 25 mg/L, 无聚集的细胞数也随着增加, 脑啡肽质量浓度为 2 mg/L 时无聚集的细胞数最少, 无聚集细胞数比对照组增加了 22.71%; 增加最多的是脑啡肽质量浓度为 25 mg/L 时, 无聚集细胞数比对照组增加了 30.17%。无聚集细胞数的增加, 说明聚集细胞数随着脑啡肽质量浓度的增加在减少, 聚集率在下降。

2.2 脑啡肽对血细胞附贴的影响

脑啡肽对栉孔扇贝血细胞附贴影响的测定结果见图 2。当脑啡肽质量浓度为 2 mg/L 时, 血细胞附贴率最高为 101.2%, 与对照组血细胞附贴率 100% 相比较, 增加了 1.12%。脑啡肽质量浓度升高到 5 mg/L 时, 血细胞附贴率为 67.04%, 降低了 32.96%, 脑啡肽质量浓度继续升高到 25 mg/L 时, 细胞附贴率最低为 48.60%, 降低了 51.40%。说明低浓度的脑啡肽促进细胞的附贴; 高浓度的脑啡肽抑制细胞的附贴, 而且浓度越高, 抑制作用越强。

3 讨论

细胞的聚集作用是细胞之间的结合, 属于细胞的自我识别; 细胞的附贴作用是细胞与接触物之间的结

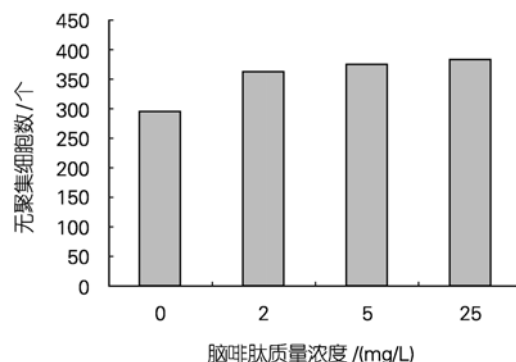


图 1 脑啡肽对栉孔扇贝血细胞聚集的影响

Fig. 1 The influence of enkephalin on hemocyte aggregation in *Chlamys farreri*

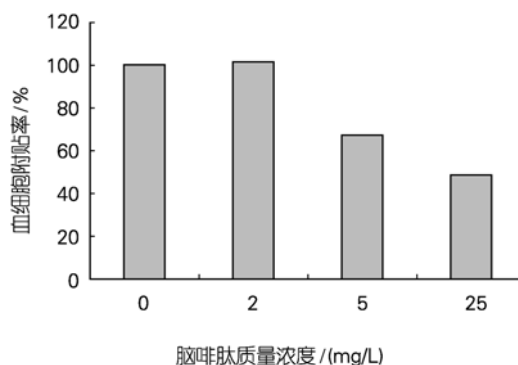


图 2 脑啡肽对栉孔扇贝血细胞附贴的影响

Fig. 2 The influence of enkephalin on hemocyte adhesion in *Chlamys farreri*

合, 属于细胞的非自我识别。血细胞的吞噬和包裹作用是无脊椎动物主要的防御机制^[5], 当体壁受到损伤时, 大量的血细胞通过聚集作用渗透聚集到受伤部位, 损伤的细胞被吞噬掉, 与受伤表面接触后, 许多原来的球形血细胞变长, 细胞通过附贴和聚集作用使血细胞在受伤组织中形成凝血, 当组织恢复正常时, 凝血块被清除^[5]。大颗粒 (直径大于 10 μm) 进入贝类体内后, 血细胞可将其包围形成包裹, 释放 ACP 等水解酶将异物分解。血细胞聚集和附贴作用强时, 形成的伪足也较长, 有利于增强其吞噬作用, 也有利于血细胞对大的颗粒进行包裹化作用。作者在做脑啡

肽对栉孔扇贝血细胞伪足形成的影响实验时发现,在扫描电镜下观察,血细胞的伪足与对照组的相比较短且数量较少,明显的被抑制,说明脑啡肽能抑制细胞伪足的形成,这很可能是导致细胞聚集率和附贴率降低的一个重要原因。

关于脑啡肽对免疫的调节作用,在高等动物研究报道较多^[1-2]。实验证实,低浓度的脑啡肽具有增强免疫力的作用,即正调节作用;高浓度的脑啡肽具有降低免疫力的作用,即负调节作用。本实验结果表明质量浓度 2 mg/L 的脑啡肽对栉孔扇贝血细胞的附贴作用具有促进作用,质量浓度为 5 和 25 mg/L 时起抑制作用,与在高等动物得到的结果相似。而脑啡肽质量浓度从 2 mg/L 到 25 mg/L,对血细胞的聚集作用都产生了抑制,如果浓度再进一步降低,脑啡肽对血细胞的聚集作用是否会有促进的一面,还有待于进一步的实验研究。

实验证实,脑啡肽能抑制伪足的形成,这可能是脑啡肽抑制细胞聚集和附贴的一个重要原因,但是否有其他原因以及脑啡肽抑制伪足形成的机制还不明确,需要进一步研究证实。脑啡肽可通过对血细胞聚集和附贴的影响来调节免疫力,已有研究表明贝类的足神经节等处存在脑啡肽^[6-7],所以贝类可能通过神

经系统分泌脑啡肽的多少来调节自身免疫力。

参考文献:

- [1] 张勇,凌蔚. 脑啡肽类物质与胃肠运动[J]. 西南国防医药, 1996, 6 (6): 372-373.
- [2] 孙虎山, 李光友. 双壳贝类参与免疫防御的体液因子[J]. 海洋科学, 2001, 25 (4): 34-36.
- [3] 高娜, 王阿敬, 杨渝珍, 等. 阿片受体介导大鼠海马内脑啡肽对细胞免疫功能的调节[J]. 生理学报, 1999, 51 (1): 106-110.
- [4] Chen J H, Bayne C J. Bivalve mollusc hemocyte behaviors: Characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in the California mussel (*Mytilus californianus*) [J]. *Biol Bull*, 1995, 188:255-266.
- [5] 刘世良, 麦康森. 贝类免疫系统和机理的研究进展[J]. 海洋学报, 2003, 25 (2): 96-100.
- [6] 陈竞春, 石安静. 贝类免疫生物学研究概况[J]. 水生生物学报, 1996, 20 (1): 76-77.
- [7] Stefano G B. Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 626-630.

The influence of enkephalin on hemocyte aggregation and adhesion in *Chlamys farreri*

WANG Na-na, SUN Hu-shan, WANG Yi-yan

(College of Life Science Yantai Normal University, Yantai 264025, China)

Received: Dec. , 27, 2004

Key words: enkephalin; *Chlamys farreri*; hemocyte aggregation; hemocyte adhesion

Abstract: The *in vitro* effects of methionine-enkephalin on hemocyte aggregation and adhesion of *Chlamys farreri* were studied with the concentration of enkephalin in 2, 5 and 25 mg/L. The results indicated that the enkephalin could inhibit hemocyte aggregation. The low concentration of enkephalin improved hemocyte adhesion and the high concentration of enkephalin inhibited hemocyte adhesion. The experiment proved that enkephalin may play an important role in the immune regulation in scallop.

(本文编辑: 张培新)