

虾类免疫学的基础和应用研究*

STUDY ON BASIS AND APPLICATION OF SHRIMP IMMUNOLOGY

章跃陵 王三英 彭宣宪

(厦门大学生命科学学院,细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 361005)

无脊椎动物免疫学是一门新兴学科,甲壳动物免疫学是其中的一个分支^[1]。自60年代后期以来,瑞典、美国、日本等国学者发表了大量的论文及专著,对甲壳动物免疫机制等问题进行了有益的探索。近十余年来,甲壳动物免疫学发展较快,正在逐渐形成一门新的学科分支,引起国内外学者的高度重视,其中虾

类免疫学发展最快。鉴于目前虾类病害防治不理想的现状,可以认为虾类免疫学的研究是最终战胜虾类

* 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物工程重点实验室开放课题基金资助项目。

收稿日期:2000-02-14;修回日期:2000-05-12

病害的重要基础。本文力图对该领域的最新进展作一概述。

1 免疫系统的研究

1.1 免疫应答的淋巴器官和组织

虾类免疫应答的主要组织和器官为淋巴器和血淋巴。淋巴器位于虾体胃的腹侧,左右各1叶,长约5~7 mm,为膜包被的管状结构,由内皮细胞、基质细胞和血细胞3种细胞组成^[1]。淋巴器为一造血结,可产生无颗粒细胞和颗粒细胞。最近,刘晓云等^[2]在研究中国对虾淋巴器时发现,淋巴器起源于触角动脉,外包结缔组织膜,内部充满小管,小管依其发育时期和功能不同表现为3种不同的形态,其中第二种小管具有生成和释放血细胞的功能。

1.2 免疫应答细胞

虾类的免疫功能主要是通过血细胞来完成。它既是免疫细胞的担当者,又是体液免疫的提供者^[4]。李光友1995年根据扫描电镜和透射电镜的观测结果,提出了以在光镜下有无颗粒,颗粒多少及颗粒大小为依据的分类标准,将血细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞和颗粒细胞。小颗粒细胞富含线粒体使其在防御反应中具有活跃的胞吐作用和识别异物的能力,是防御反应之关键细胞。颗粒细胞无吞噬能力,但活化的酚氧化酶系统的组分处理可迅速使之发生胞吐作用释放出有活性的酚氧化酶参与体液免疫。刘晓云等^[2]在研究中国对虾时认为无颗粒细胞具有两种不同的形态特征,分属两类不同的细胞,一种具有巨噬细胞的性质,以其吞噬功能参与对虾机体免疫;另一种具有类似淋巴细胞的性质即在接受抗原刺激后,细胞表现出一种浆细胞样分化,在内质网中有免疫物质合成,并以细胞表面形成泡状突起的方式进行释放。这些所释放的免疫物质也许是通过促使颗粒细胞释放出酚氧化酶原系统而参与了体液免疫。以上研究表明,在虾类防御反应中可能存在细胞合作现象。此外,虾血细胞还具有一定的抗菌能力,且抗菌能力的大小与细菌和虾的种类有关^[3,18]。研究证实,虾类循环血细胞可进行分裂和增殖,其增殖能力的大小与是否受异物刺激有关^[25]。根据血细胞的免疫特征,研究者先后建立了检测中国对虾血细胞吞噬功能的吡啶橙检测法, TTC法和花环法。这些定量检测方法可较好地评价血细胞的免疫功能,反映机体免疫状态^[15,6]。

1.3 免疫应答因子

1.3.1 酚氧化酶原激活系统

国内外研究表明,酚氧化酶原激活系统是由丝氨酸蛋白酶和其他因子组成的一复杂酶级联系统。它无论从组成、激活方式还是从免疫功能上都非常类似于高等动物的补体系统。自从Aspan 1991年从血细胞中分离出酚氧化酶原(Prophenobxidase, proPO)和酚氧化酶原激活酶(Prophe nobxidase activating enzyme, ppA)以后,Rantamaki等1991年、Duvic 1993年、Cerenius 1994年、Soderhall 1992年报道,许多与proPO系统有关的因子都陆续被提纯和鉴定。关于酚氧化酶活性在体内的存在形式,目前尚无定论。Leonard等1985年、Soderhall 1982年认为酚氧化酶主要以酶原形式存在于血细胞中,但Saul等1985年报道酚氧化酶主要存在于血浆中。新近Rerazzole等在研究对虾(*Penaeus paulensis*)时发现,大于90%的酚氧化酶活性存在于虾血细胞中,少量存在于虾血清中^[14]。Soderhall等1986年研究还证实,细胞内存在调节因子调节proPO系统的释放与激活,半颗粒细胞可通过与微生物多糖(LPS或 β G)结合而导致该系统的释放,Johansson等1988年、Barracco等1991年认为,颗粒细胞则主要由76 kD因子或 β -1, 3-glucan结合蛋白(BGBP)引起。同时,Aspan等1990年认为血清蛋白中存在蛋白酶抑制剂防止proPO的自发释放。据Barracco 1991年报道,活化过程中产生的一系列活性物质可通过多种方式参与宿主的防御反应,包括提供调理素,促进血细胞的吞噬和包裹作用,介导凝集和凝固产生杀菌物质,以及“异己”的识别等。此外,Aspan等1991年认为由酚氧化酶催化生成的黑色素及黑化反应的中间产物都具有淋巴毒性和抗微生物功能。大量实验证明,酚氧化酶活力与机体免疫有直接相关性,可以作为一个衡量虾免疫功能大小的指标^[7,8]。

1.3.2 凝集素

Marchalonis 1968年, Cornick等1973年,高健等1992年,陈皓文等1995年已经在40多种甲壳类动物体内发现血细胞凝集素的存在。Vazquez L在研究淡水虾(*Macrobrachium rosenbergii*)时发现凝集素的本质是68~72 kD的蛋白质,它们在血细胞上规则分布^[26]。凝集素在免疫反应中可作为识别因子与外来异物结合或覆盖在异物表面使其失去进一步感染宿主的能力。同时,陈皓文认为其又具有调理素功能,能促使吞噬细胞的吞噬和识别作用。按Wright的说法,它的机能也许类似脊椎动物的免疫球蛋白或它的前身。

Sharon 等 1972 年认为,凝集素能够选择异物凝集并充当识别因子,这是由于凝集素表面携带有特异性糖基决定受体,它根据颗粒物质表面的糖基组成来区分“自己”和“异己”。凝集素活力与虾的病害密切相关,它可以作为虾类健康与否的一个血液学指标,而且其活力可被一些免疫增强剂所诱导^[9,11,12]。

1.3.3 其他免疫因子

研究发现,虾类血淋巴中除了主要含有上述两种淋巴因子以外,还含有许多与免疫有关的其他免疫应答因子。

1.3.3.1 类免疫球蛋白和补体分子 一般认为,无脊椎动物体内没有免疫球蛋白存在。但近年来一些研究发现,虾血清能与抗人免疫球蛋白、补体和 C 反应蛋白 (CRP) 的抗血清发生特异性结合,且某些因子与机体免疫功能有直接相关性^[13]。这些结果提示,虾血清中可能有类 IgG、类 IgA、类 IgM 等免疫球蛋白样物质,类 C₃、类 C₄ 等补体蛋白样物质以及类 CRP 物质的存在。然而,此类物质是否存在于虾血清中,还有不同的观点,因此,这些能与人抗血清发生反应的虾血清成分的本质有待于进一步研究。采用现代分子生物学技术,克隆其基因具有重要意义。

1.3.3.2 类固醇 Lndap MM 等^[12]从对虾中提取并鉴别出一种具有生物活性的类固醇,并证明该物质具有溶血能力,可有效抑制蚊子幼虫的生长^[22]。

1.3.3.3 蛋白酶抑制剂 Hall 等 1989 年、Aspanl 1990 年在螯虾中分离出几种蛋白酶抑制剂,并发现它与其他血浆因子一起参与对抗异物入侵,且对免疫应答起调节作用。

1.3.3.4 抗菌肽 Destou micux D. 等 1997 年、1999 年、2000 年从对虾 (*Penaeus vannamei*) 的血淋巴中分离出 3 种不同的抗菌肽,并证明其分子量为 5.5~6.6 kD,由颗粒细胞的颗粒合成和分泌,对革兰氏阳性菌和真菌具有较明显的抗菌活力,而且经微生物刺激后,其在血浆中的含量明显升高^[22-24]。

2 虾类免疫应答机制

目前认为,虾类免疫主要包括血细胞的吞噬、包裹、凝集和溶菌活性以及血淋巴中的免疫应答因子,如酚氧化酶原系统、凝集素、类免疫球蛋白分子、溶菌酶和溶血素的识别和防御作用。反应机制传统上被分为细胞免疫和体液免疫,两者缺一不可,密切相关。其免疫过程可能为:当外界异物侵袭机体时,异物表面的分子作用于宿主的半颗粒细胞,细胞受体与非

己分子结合,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,酚氧化酶被激活,活化过程中产生一系列的活性物质,促进血细胞的吞噬作用,介导凝集和凝固,产生杀菌物质,从而消除入侵的病原和外来异物^[5,7]。叶孝经 1990 年研究发现,虾类免疫系统被激活后其活性一般可持续一段时间并有免疫记忆的特点。

3 免疫学防治

目前,虾类免疫学防治的主要内容是研制合适的免疫激活剂和虾用疫苗,用于激活和诱导其免疫系统,增强其抗病防病能力。

研究表明,一些富含多糖、生物碱、有机酸等多种成分的天然免疫物质给虾口服或注射后,既有抗菌作用,又有免疫刺激作用。它们能增强虾类机体的细胞免疫和体液免疫的功能^[4],提高血淋巴中的免疫因子及相关酶的活性^[6,10,11,14-16],许兵 1992 年诱导并加强巨噬细胞中 O₂ 和 H₂O₂ 的产生和释放,明显提高血细胞的吞噬能力和吞噬指数^[10],增强其免疫保护率,并有明显的促生长、增重效果。

虾用疫苗的研究进展缓慢。目前,除对虾弧菌疫苗外几乎没有其他成功的报道。弧菌疫苗口服后可使白对虾产量提高 8%~10%,死亡率减少。最近,丁燊等^[17]从抗原免疫及免疫激活剂入手,在以病原为免疫原的前提下,再筛选出几种糖蛋白类免疫激活剂制成复合疫苗进行免疫实验。结果表明,复合疫苗具有提高 SOD 和溶菌活力的作用。可以增强中国对虾的防御能力^[17]。此外,一些研究者使用抗血清被动免疫对虾,同样可以提高对虾的抗病能力^[23]。

4 结语

至今,虾类免疫学的知识还很不系统,发展和丰富虾类免疫学的任务还很艰巨。笔者认为,虾类免疫学今后发展的主要方向是,深化基础理论的研究,系统阐明虾类免疫的基本原理和规律,探讨虾类免疫的特点,克隆免疫因子基因,研究其信号传导途径。在此基础上,加强应用研究,用系统的理论指导实践,并通过应用研究来丰富免疫学理论。

参考文献

- 1 贾翠红等. 中国水产科学,1999,6(1):9~11
- 2 刘晓云等. 青岛海洋大学学报,1999,29(1):167~171
- 3 李春猛等. 青岛海洋大学学报,1999,29(4):599~603
- 4 李光友. 海洋科学,1999,4:1~3

研究综述 REMEMS

- 5 杜爱芳等。中国水产科学,1997,4(2):1~6
- 6 江晓路等。中国水产科学,1999,6(1):66~68
- 7 李天道等。海洋湖沼通报,1998,1:51~56
- 8 孟孔伦等。海洋与湖沼,1999,30(1):110~115
- 9 罗日祥。海洋学报,1997,17(4):117~120
- 10 江晓路等。动物学研究,1999,20(1):41~45
- 11 牟海津等。中国水产科学,1999,6(3):32~35
- 12 罗日祥。海洋与湖沼,1997,28(6):573~577
- 13 王伟庆等。水产学报,1998,22(2):170~174
- 14 刘恒、李光友。海洋与湖沼,1998,29(2):113~118
- 15 刘树青等。中国水产科学,1999,6(3):107~108
- 16 刘树青等。海洋与湖沼,1999,30(3):278~283
- 17 丁燊等。海洋与湖沼,1999,30(4):355~361
- 18 Chisholm J. R., Smith V. J. . *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.*, 1999, **110**(1):39~45
- 19 Destoumieux et al. . *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(45):28398~28406
- 20 Destoumieux D. et al. . *European Journal of Biochemistry*, 1999, **266**(45):335~346
- 21 Destoumieux D. et al. . *Journal of Cell Science*, 2000, **113**(3):461~469
- 22 Indap M. M. et al. . *Indian J. Exp. Biol.*, 1996, **34**(6):988~989
- 23 Lee K. K., *Letter in Applied Microbiology*, **25**(1):34~37
- 24 Perazzolo L. M., Barracco M. A. . *Dev. Comp. Immunol.*, 1997, **21**(5):385~395
- 25 Sequeira T. et al. . *Dev. Comp. Immunol.*, 1996, **20**(2):97~104
- 26 Vázquez L. et al. . *J. Exp. Zool.*, 1997, **279**(3):265~272

(本文编辑:刘珊珊)