

综述

# 甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统 研究评价<sup>\*</sup>

孟凡伦 张玉臻 孔健 马桂荣

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**提要** 依据80—90年代国际关于甲壳动物免疫机制的资料,对甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统的研究进展予以综合评价,目的在于为中国科技工作者防治虾蟹类疾病提供参考。现有的研究表明,甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统可被微生物多糖激活,在激活过程中产生一系列活性物质,通过多种形式参与宿主防御反应。在甲壳动物中,与proPO系统有关的因子正在被逐步纯化出来;proPO可由内源蛋白酶转化成活性形式,存在调节因子调节proPO系统的释放与激活。与proPO系统有关的两种蛋白即76kD蛋白和BGBP-L直接参与细胞间信息传递。该系统在甲壳动物的识别、防卫及细胞间信息传递中发挥着重要作用。

**关键词** 甲壳动物免疫 酚氧化酶原激活系统 蛋白酶抑制剂 细胞间信息传递

**学科分类号** S945.4

近年来严重的养殖虾蟹类疾病使中国水产养殖业蒙受巨大损失。由于使用抗生素等药物有安全性及抗药性等方面的考虑,因此研究甲壳动物的免疫机制,有效提高虾蟹类本身的抗病能力,是解决问题的根本之道。近年来的研究显示,甲壳动物的免疫机制以非专一性免疫反应为主。在甲壳动物的开放式循环系统中,必须有立即反应而非缓慢诱导的防卫机制来阻止伤后异源物质的入侵和防止血液流失。其中酚氧化酶原激活系统(prophenoloxidase activating system, proPO系统)作为一识别和防御系统发挥着重要作用(Söderhäll, 1992)。本文报告近几年国际上对甲壳动物proPO系统的研究概况,以期为中国科技工作者防治虾蟹类疾病提供参考。

## 1 甲壳动物 proPO 系统的性质及生理活性

甲壳动物中的proPO系统是一种与脊椎动物补体系统类似的酶级联系统。该系统中的因子以非活化状态存在于血细胞的颗粒中,极微量的微生物多糖成分就可激活proPO系统。以L-DOPA为受体,检测酚氧化酶(phenoloxidase, PO)催化的产物在490nm的吸光值,即可了解proPO系统被活化的程度。研究结果发现,proPO系统可以被 $\beta$ -1,3-葡聚糖( $\beta$ -1,3-glucan,  $\beta$ G)(Söderhäll *et al.*, 1986)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(Söderhäll *et al.*, 1984)、肽聚糖(peptidoglycan, PG)(Ashida *et al.*, 1990)、胰蛋白、十二烷基硫酸钠

<sup>\*</sup> 国家“八五”科技攻关资助项目,85-016-01-02号。孟凡伦,男,出生于1971年5月,硕士,现在山东省食品卫生监督检验所,邮政编码:250014, Fax: 0086-0531-2968215

收稿日期:1996-10-28, 收修改稿日期:1998-08-17

(sodium dodecyl sulfate, SDS)、加热或  $Ca^{2+}$  浓度下降所活化(Ashida *et al.*, 1984)。活化过程中产生一系列活性物质, 可通过多种方式参与宿主防御反应, 包括提供调理素, 促进血细胞吞噬作用、包裹作用和结节形成, 以及介导凝集和凝固, 产生杀菌物质等。最近在对甲壳动物的研究中还发现 proPO 系统的成分直接参与细胞间信息传递(Barracco *et al.*, 1991)。因此该系统在甲壳类动物的防卫机制中极为重要。

## 2 甲壳动物中与 proPO 系统有关的蛋白质

甲壳动物 proPO 系统中的蛋白质成分在血液中含量很低并且极微量的微生物多糖就可激活该系统, 这大大增加了分离纯化的难度。因此尽管有大量关于甲壳动物中 proPO 系统及其被激活的报道, 但有关该系统被激活的细节问题仍不明了。1991 年, Aspán 等从螯虾(*Pacifastacus leniusculus*) 血细胞中提纯到酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO), 该酶原由一条单一的多肽链构成。同时, Aspán 等(1991)从血细胞中还分离出酚氧化酶原激活酶(prophenoloxidase activating enzyme, ppA), 该酶是一种丝氨酸蛋白酶, 分子量为 36kD, 可通过蛋白水解作用将 76kD 的 proPO 裂解为 60 与 62kD 的两个具 PO 活性的酶分子, 而商品胰蛋白酶裂解 proPO 生成一 60kD 的酶分子。近几年从甲壳动物中分离提纯的与 proPO 系统有关的蛋白质见表 1。

表1 甲壳动物中与proPO系统有关的蛋白质

Tab.1 Proteins associated with proPO system in crustaceans

蛋白质	分子量(kD)	功能	主要存在部位	来源生物
$\alpha_2$ -巨球蛋白	2×190	蛋白酶抑制剂	血浆	<i>Astacus astacus</i>
				<i>P. leniusculus</i>
	2×180	<i>Homarus americanus</i>		
胰蛋白酶抑制剂	155	调节proPO系统的激活	血浆	<i>P. leniusculus</i>
枯草杆菌蛋白酶抑制剂	23	抑制微生物蛋白酶	血细胞	<i>Astacus astacus</i>
$\beta$ -1, 3-葡聚糖结合蛋白(BGBP)	100	与 $\beta$ -1, 3-葡聚糖结合后激活 proPO, 参与细胞间信息传递	血细胞	<i>P. leniusculus</i>
BGBP-受体	350	参与细胞间信息传递	血细胞膜	<i>P. leniusculus</i>
76kD蛋白	76	细胞附着, 脱颗粒、促包囊、参与细胞间信息传递	颗粒细胞	<i>P. leniusculus</i>
酚氧化酶原(proPO)	76	PO的前体	颗粒细胞	<i>P. leniusculus</i>
酚氧化酶原激活酶(ppA)	36	激活proPO系统	颗粒细胞	<i>P. leniusculus</i>

## 3 甲壳动物 proPO 系统释放和被激活的调节控制

昆虫中的 proPO 系统依种的不同而分别位于血细胞或血浆中, 但甲壳动物中该系统却位于颗粒细胞或半颗粒细胞的颗粒中。半颗粒细胞通过与微生物多糖(LPS 或  $\beta$ G) 结合而导致该系统的释放。在颗粒细胞中, 该系统的释放则主要由 76kD 因子或  $\beta$ -1, 3-glucan 结合蛋白( $\beta$ -1, 3-glucan binding protein, BGBP)引起。由于 proPO 系统主要存在于颗粒细胞中, 因此 76kD 因子和 BGBP 就成为控制 proPO 系统释放的重要物质。基于 proPO 系统在血细胞中的分区存在及只有特异性分子才能作为激活剂引起胞吐作用, 甲壳动物可

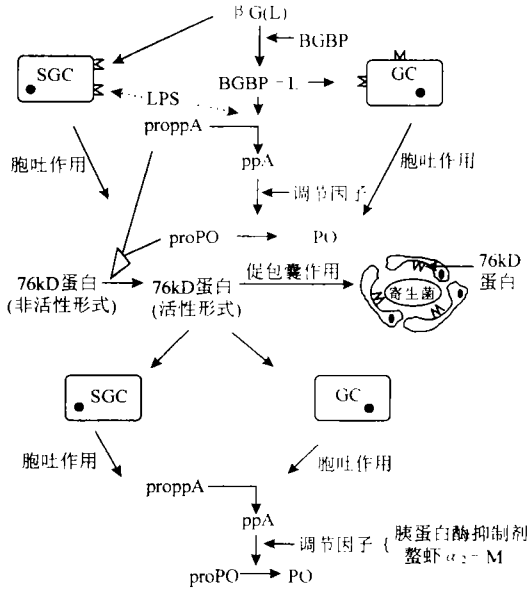


图 1 甲壳动物中 proPO 系统的激活模式

Fig.1 Model for the activation of the proPO system in crustaceans

$\beta G(L)$  为  $\beta$ -1, 3-glucan, BGBP 为  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein, LPS 为 lipopolysaccharide, PG 为 peptidoglycan, proppA 为非活性的 proporphenoloxidase activating enzyme, ppA 为被激活的 proporphenoloxidase activating enzyme, proPO 为 proporphenoloxidase, PO 为 phenoloxidase, SDS 为 sodium dodecyl sulfate. 图中虚线表示激活细节尚不清楚。(根据文献 Söderhäll, 1992; Söderhäll *et al.*, 1986; Söderhäll *et al.*, 1984; Ashida *et al.*, 1990; Ashida *et al.*, 1984 综合而来)

有效地控制 proPO 系统的释放。另一方面,血浆中存在蛋白酶抑制剂来防止血细胞中 proPO 系统的自发释放(如通过自溶作用)后的激活,从而起到保护自身的作用。Aspán 等 (1990) 在螯虾 (*P. leniusculus*) 中分离纯化出三种蛋白酶抑制剂。一种为含一个多肽链的 155kD 的胰蛋白酶抑制剂,能有效地抑制 ppA 的活性;一种为  $\alpha_2$ -巨球蛋白,只能部分抑制 ppA 的活性;还有一种低分子量的枯草菌素蛋白酶抑制剂,分子量约 23kD,对 ppA 无作用,但可抑制枯草菌素和链霉菌蛋白酶,还可抑制某些寄生菌(如 *Aphanomyces astaci*) 分泌的蛋白酶。Kobayashi 等 (1990) 发现 76kD 蛋白可被一种不同于 ppA 的内源蛋白酶降解为一种不同于 ppA 的内源蛋白酶降解为一种 30kD 的片段并丧失大部分活性,从而甲壳动物可通过控制 76kD 蛋白的活性而控制 proPO 系统的激活 (Aspán *et al.*, 1990)。关于甲壳动物中的 proPO 系统的激活模式见图 1。

#### 4 甲壳动物 proPO 系统中某些活性物质及其活性

##### 4.1 黑色素

甲壳动物在受伤或遭受病原体入侵时,可迅速在伤口附近和病原体周围产生黑色素,来抑制或杀死病原体,这在一定程度上类似于高等动物发生感染时产生的红、肿、热等反应。此黑色素由 proPO 系统中具有决定性作用的 proPO 转化而来 (Aspán *et al.*, 1991), proPO 在活性形式时为一氧化还原酶,可氧化酚生成醌,醌自发生成最终产物——黑色素。黑色素及其形成过程中的中间产物均为高活性物质,它们可抑制病原体胞外蛋白酶和几丁质酶的活性,从而在伤口愈合、抑制甚至杀死病原体方面发挥着重要作用。

产生黑色素,来抑制或杀死病原体,这在一定程度上类似于高等动物发生感染时产生的红、肿、热等反应。此黑色素由 proPO 系统中具有决定性作用的 proPO 转化而来 (Aspán *et al.*, 1991), proPO 在活性形式时为一氧化还原酶,可氧化酚生成醌,醌自发生成最终产物——黑色素。黑色素及其形成过程中的中间产物均为高活性物质,它们可抑制病原体胞外蛋白酶和几丁质酶的活性,从而在伤口愈合、抑制甚至杀死病原体方面发挥着重要作用。

##### 4.2 76kD 蛋白

Johansson 等 (1988) 从螯虾 (*P. leniusculus*) 中发现一种血细胞附着因子,可促进颗粒细胞或半颗粒细胞附着于玻片上(此作用需  $Ca^{2+}$  存在)。该因子是分子量为 76kD 的单一蛋白,以非活化状态存在于颗粒细胞与半颗粒细胞中,伴随着 proPO 系统的激活而活化。活化的 76kD 蛋白具有多种功能,除可作为血细胞附着因子外,还可作为调素或促包囊因子,起到增强血细胞结合、吞噬病原体的作用,并且可通过胞吐作用引起颗粒细胞与半颗粒细胞的脱颗粒。Rantamaki 等 (1991) 运用螯虾 (*P. leniusculus*) 血细胞中 76kD 蛋白的

单一特异性抗血清发现在蟑螂 (*Blaberus craniifer*) 血细胞中一种 90kD 蛋白能与该抗血清发生交叉反应, 进一步实验发现 76kD 蛋白能介导蟑螂血细胞的脱颗粒和附着作用, 同样, 蟑螂血细胞中的 90kD 蛋白也能介导螯虾血细胞的上述作用。这表明甲壳动物中 proPO 系统及其生物活性因子在结构和功能上可能和其他节肢动物中的类似。

#### 4.3 $\beta$ -1,3-葡聚糖结合蛋白(BGBP)

1993 年, Duvic 等在几种螯虾 (*A. astacus*, *Procambarus clarkii*) 的血浆中检测到 BGBP 的存在。在 *P. clarkii* 中其分子量为 100kD, 而在 *A. astacus* 中发现两种 BGBP, 分子量分别为 105kD 和 95kD, 等电点 (pI) 分别为 6.1 和 6.4。迄今为止, 发现的来自螯虾中的 BGBP 都为酸性蛋白质。Cerenius 等 (1994) 还报道了对来自螯虾 *P. leniusculus* 中的 BGBP 的分子克隆及其碳水化合物组成, 其氨基酸顺序大约含 1339 个残基, 同哺乳动物中存在的识别因子如甘露聚糖结合蛋白、LPS 结合蛋白在结构上没有显著的相似性; 其顺序中的某些重要特征为: 缺乏信号肽, 近邻半胱氨酸残基缺失, 几个短重复序列, 如 Glu-Asn-Phe-Glu-Thr, Asp-Ile-Asn-Ile-Ser, Glu-Gly-Lys-Leu-Val 和 Asp-Lys-Val-X-Thr-Leu。这 4 种短序结构在 BGBP 的开放阅读框中都两次出现, 有待进一步的实验证实这是否为活性中心。BGBP 本身不具任何酶活性, 但与  $\beta$ G 结合后, 便可通过增强 ppA 与 PO 的活性而激活 proPO 系统。其结合  $\beta$ G 后, 可同颗粒细胞的表面联结, 促进颗粒细胞扩张和部分脱颗粒 (Barracco *et al.*, 1991)。Barracco 等 (1991) 还发现,  $\beta$ G 对颗粒细胞无作用, BGBP 本身对颗粒细胞毫不显示其生物学活性, 相反还有稳定细胞的作用。由此可见, BGBP 与  $\beta$ G 结合后主要具有两个功能, 首先是引起颗粒细胞中 proPO 系统的释放和介导血细胞在病原体表面上的扩张; 其次是激活 proPO 系统的活性。Cerenius 等 (1994) 的实验显示 BGBP-L 还可作为一种调理素, 刺激离体血细胞吞噬吸收酵母颗粒。

#### 4.4 $\alpha_2$ -巨球蛋白 ( $\alpha_2$ -M)

$\alpha_2$ -M 为高分子量抑制剂, 可部分抑制 ppA 的活性。它的单体分子量为 190kD, 通常以二聚体形式存在, 而多数哺乳动物中的为四聚体。 $\alpha_2$ -M 多肽链中的硫醇酯 (thiolester) 区具有高度保守性, 在亲缘关系较远的生物如螯虾、马蹄蟹以至于人类中都几乎相同 (Hall *et al.*, 1989), 该区可能为蛋白的活性区。Hall 等 (1989) 研究发现螯虾中  $\alpha_2$ -M 和补体蛋白 C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 具有类似的氨基酸顺序。在马蹄蟹 (*Limulus polyphemus*) 中,  $\alpha_2$ -M 具有类补体活性, 其同一些尚未探明的血浆因子一起参与对抗异物入侵, 能够溶解外源细胞 (Enghild *et al.*, 1990)。对纯化的  $\alpha_2$ -M 的进一步研究将大大有助于阐明该抑制剂在甲壳动物免疫系统中的作用。

### 5 proPO 系统成分参与细胞间信息传递

1983 年, Söderhäll 等建立了体外分离处理甲壳动物完整细胞的方法, 这为深入研究 proPO 系统成分在细胞间信息传递中的作用提供了可能。研究发现, 与 proPO 系统有关的两种蛋白 (即 76kD 蛋白和 BGBP-L) 直接参与细胞间信息传递, 通过一系列反应使原始信号得到放大, 从而可使宿主有效的调动免疫系统对抗异物入侵。对 76kD 蛋白和 BGBP-L 细胞膜受体的研究将有助于更深入地了解这些过程的分子机制。Söderhäll (1992) 首次分离纯化出一种 BGBP-L 的细胞膜受体, BGBP 用  $\beta$ G 预处理后, 只与此受体结合。

在甲壳动物中, 虽然尚有大量疑问有待解决, 但基于 76kD 蛋白多功能特异性的发现,

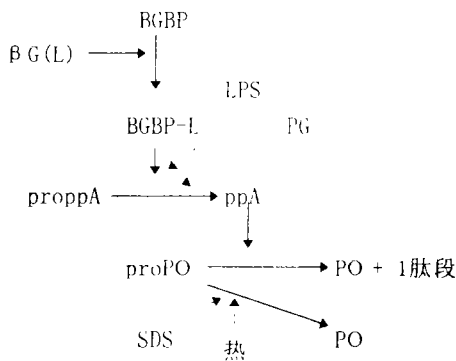


图2 甲壳动物中的细胞间信息传递模型  
Fig.2 Model for the cell communication in crustaceans

$\beta G(L)$ 为 $\beta$ -1,3-glucan, BGBP为 $\beta$ -1,3-glucan binding protein, BGBP-L为结合有 $\beta$ -1,3-glucan的 $\beta$ -1,3-glucan binding protein, LPS为lipopolysaccharide, proppA为非活性的prophenoloxidase activating enzyme, ppA为被激活的prophenoloxidase activating enzyme, proPO为prophenoloxidase, PO为phenoloxidase. SGC为semigranular cell, GC为granular cell. 图中虚线表示激活细节尚不清楚。(根据文献 Söderhäll, 1992; Aspán *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1990, 综合而来)

关于细胞间信息传递的模型已初步建立起来(图2)。可以看出,仅半颗粒细胞(SGC)与外源物质直接反应。通过胞吐作用释放 proPO 系统。颗粒细胞(GC)则通过细胞膜上特异性受体(M)与 BGBP-L 结合,使颗粒释出,由此可导致更多的 proPO 系统释放到胞外,然后被微生物多糖激活。伴随该系统被激活,76kD 因子获得其生物学活性,作为细胞附着因子促使血细胞附着在异物上,并且介导 GC 与 SGC 脱颗粒,从而使 proPO 系统中因子的释放得到放大,最后作为调理素刺激血细胞包裹并清除异物(如寄生虫)。细胞外还存在调节因子(155kD 胰蛋白酶抑制剂和螯虾  $\alpha_2$ -M)能抑制 ppA(36kD 蛋白酶)的活性。这样可避免 proPO 系统自发释放后的激活,从而起到保护宿主的作用。

### 6 结语

综上所述,甲壳动物的免疫反应机制特别是 proPO 系统在识别、防卫及细胞间信息传递中的地位已渐露端倪;在甲壳动物中,与 proPO 系统有关的因子正在被逐步纯化出来;proPO 可由内源蛋白酶转化成活性形式,存在调节因子调节 proPO 系统的激活,这些也日益明确;分离甲壳动物血细胞

方法的建立使研究纯化的蛋白质成分对离体细胞的作用成为可能;关于甲壳动物中细胞间信息传递的分子细节问题也逐步得到阐明。这必然会大大促进养殖虾蟹类疾病的防治工作。但由于 proPO 系统激活机制的复杂性,不明之处甚多,仍需进行大量的工作。

致谢 本文部分资料由中国科学院海洋研究所刘恒博士提供,谨致谢忱。

### 参 考 文 献

Ashida M, Söderhäll K, 1984. The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp Biochem Physiol*, 77B(1):21-26

Ashida M, Yamazaki H I, 1990. Biochemistry of the Phenoloxidase System In Insects: With Special Reference to its Activation. In: Ishizaki H ed. *Molting and Metamorphosis*. Springer Verlag Berlin: Japan Sci Soc Press, 239-263

Aspán A, Söderhäll K, 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochem*, 21: 363-373

Aspán A, Sturtevant J, Smith V J *et al.*, 1990. Purification and characterization of a prophenoloxidase activating enzyme from crayfish blood cells. *Insect Biochem*, 20:709-718

Barracco M A, Duvic B, Söderhäll K, 1991. The  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein from the crayfish

*Pacifastacus leniusculus*, when reached with a  $\beta$  43 man, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell Tissue Res*, 266:491—497

Cerenius L, Liang Z, Duvic B *et al*, 1994. Structure and biological activity of a 1,3- $\beta$ -glucan-binding protein in crustacean blood. *J Biol Chem*, 269:29 462—29 467

Duvic B, Söderhäll K, 1993.  $\beta$ -1, 3-glucan-binding protein from plasma of the fresh water crayfishes *Astacus astacus* and *Procambarus clarkii*. *J Crustacean Biology*, 13(3):403—408

Enghild J J, Thogersen I B, Salvesen G *et al*, 1990.  $\alpha_2$ -macroglobulin from *Limulus polyphemus* inhibits proteinase inhibitory activity and participates in hemolytic system. *Biochemistry*, 29:10 070—10 080

Hall M, Söderhäll K, Sottrup-Jensen L, 1989. Amino acid sequence around the thiolester of  $\alpha_2$ -macroglobulin from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *FEBS Lett*, 254:111—114

Johansson M W, Söderhäll K 1988. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J Cell Biol*, 106:1 795—1 803

Kobayashi M, Johansson M W, Söderhäll K, 1990. The 76kD cell adhesion factor from crayfish haemocyte promotes encapsulation *in vitro*. *Cell Tissue Res*, 260:13—18

Rantamäki J, Durrant H, Liang Z *et al*, 1991. Isolation of a 90kD protein from haemocytes of *Blaberus craniifer* which has similar functional and immunological properties to the 76kD protein from crayfish haemocytes. *J Insect Physiol*, 37:627—634

Söderhäll K, 1992. Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Boll Zool*, 59: 141—151

Söderhäll K, Hall L, 1984. Lipopolysaccharide induced activation of the prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte. *Biochem Biophys Acta*, 797:99—104

Söderhäll K, Smith V J, 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev Comp Immunol*, 7:229—239

Söderhäll K, Smith V J, 1986. The Prophenoloxidase Activating Cascade as a Recognition and Defence System in Arthropods. In: *Humoral and Cellular Immunity in Arthropods*. New York: John Wiley & Sons, 251—285

## THE RESEARCH REVIEW OF PROPHENOLOXIDASE ACTIVATING SYSTEM IN CRUSTACEAN

MENG Fan-lun, ZHANG Yu-zhen, KONG Jian, MA Gui-rong

(*State Key Laboratory of Microbiological Technology, Shandong University, Jinan, 250100*)

**Abstract** Based on 1980's and 1990's data of the immunity system in crustaceans, the prophenoloxidase system is assessed in order to help the scientific researchers prevent and control crustacean diseases in China. Recent progress shows that the prophenoloxidase activating system in crustaceans can be activated by very few microbial polysaccharides. Several components are produced during the activation and involved in host defence. Some proteins associated with the prophenoloxidase system have been possible to be isolated and purified. It is clear that prophenoloxidase can be turned into its active form by an endogenous proteinase and the regulatory factors are present which will regulate prophenoloxidase system activation. The 76kD protein and  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein are involved in the communication between different blood cells. The prophenoloxidase system plays an important role in the host recognition, defence and cell-to-cell communication.

**Key words** Crustacean immunity    Prophenoloxidase activating system    Proteinase inhibitors  
Cell communication

**Subject classification number** S945.4