

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)外套膜 一氧化氮合酶的研究*

孙虎山¹ 王宜艳¹ 王晓安¹ 孙修勤² 李光友²

(1. 鲁东大学生命科学学院 烟台 264025; 2. 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

提要 采用组织化学、免疫组化和生物化学方法对栉孔扇贝外套膜中的一氧化氮合酶(EC1.14.13.39, NOS)活性进行了研究。组织化学显示结果表明, 帆状部上皮细胞呈 NOS 强阳性, 血细胞和神经纤维呈阳性; 外套触手内有较多近圆形细胞和大量波浪形神经纤维呈 NOS 强阳性; 边缘膜内有大量神经细胞和神经纤维分别呈 NOS 强阳性和阳性, 外套环走肌束附近和血管内皮周围均有大量近圆形的强阳性细胞分布; 中央膜有大量近圆形阳性细胞聚集成团块或分散分布。免疫组化显示表明, 血细胞、帆状部和边缘膜上皮细胞呈神经型 NOS(nNOS)和内皮型 NOS(eNOS)弱阳性, 而呈诱导型 NOS(iNOS)阳性。生化测定结果表明, 总 NOS(tNOS)活力和一氧化氮(NO)含量均为中央膜最高, 边缘膜次之, 外套触手较低, 帆状部最低, 其中结构型 NOS(cNOS)活力也是帆状部的最低, 而 iNOS 活力则是外套触手的最低。栉孔扇贝外套膜可能是其神经系统中 NOS 的发生中心, NO-NOS 体系可在其免疫防御和调节等方面发挥重要的作用。

关键词 栉孔扇贝, 外套膜, 一氧化氮合酶, 一氧化氮, 酶活性

中图分类号 Q26

近年来, 国外关于贝类体内的一氧化氮(Nitric Oxide, NO)和一氧化氮合酶(Nitric Oxide Synthase, NOS; EC1.14.13.39)的研究报道较多也较深入。Moroz 等早在 1993 年即报道静水椎实螺 NOS 阳性细胞定位于口球神经节的取食调节区, 并证实 NO 作为信息分子参与取食运动调节和呼吸过程的调节(Moroz *et al.*, 1993)。Moroz 等(1995)对多板纲、腹足纲、双壳纲和头足纲的 20 多种贝类的 NO 和 NOS 进行了比较研究。大量研究表明, 贝类体内的 NO 具有神经传导(Fossier *et al.*, 1999)、运动调节(Kobayashi *et al.*, 2000)、学习记忆(Robertson *et al.*, 1996)、免疫防御(Gourdon *et al.*, 2001)等多种生理功能, 并且贝类体内 NO 生理功能主要通过精氨酸-NO-cGMP 信号转导途径来实现。Korneev 等(1998)测定了静水椎实螺 NOS 的氨基酸序列。目前, 国内对贝类 NO 和 NOS 的研究较少。梁幼生等(2001)对钉螺 NOS 的分布进行

了研究。王晓安等(2003)对中国蛤蜊和嫁槭 2 种贝类神经系统 NOS 进行了定位研究。孙虎山等(2005)对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)神经节和血淋巴中 NOS 进行了研究, 发现其中枢神经中只有大量神经纤维呈 NOS 阳性, 推测 NOS 阳性细胞的细胞体应该分布在外周器官中。水生贝类的皮肤即外套膜的上皮细胞直接与外界的水接触, 这些细胞本身应具备很强的抗感染的能力, 有关贝类外套膜内 NO 和 NOS 及其在免疫防御中的作用的研究, 国内外均未见报道。作者采用组织化学、免疫组化和生物化学技术, 对栉孔扇贝外套膜中 NOS 活性及 NO 的含量进行了研究, 以期为贝类外周器官外套膜等在抗感染免疫反应中的作用及贝类神经-内分泌-免疫调节的机制等研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)为烟台芝罘湾内

* 国家 973 计划项目资助, G1999012005 号。孙虎山, 博士, 教授, E-mail: s_hushan@163.com

收稿日期: 2004-12-20; 收修改稿日期: 2005-04-25

人工养殖的 3 龄贝, 壳长 45—50mm, 水族箱中暂养。每日换水一次, 水温为 20—21 。

1.2 试剂

兔抗大鼠神经型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、兔抗人诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和兔抗人内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的多克隆抗体均为 Santa Cruz 公司产品, ABC 试剂盒为福州迈新生物技术开发公司(Maixin-Bio)产品。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅酶, NADPH)、葡萄糖氧化酶、二盐酸联苯胺、硝酸盐还原酶、葡萄糖-6-磷酸、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、对氨基苯磺酰胺、N-(1-萘基)-乙二胺购自 Sigma 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 组织化学

切断栉孔扇贝的闭壳肌, 去掉一片贝壳, 用新鲜海水将内脏团冲洗干净, 取下外套膜, 用 0.1mol/L、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(2% NaCl; PBS)配制 4%多聚甲醛 4 固定 24h, 用 0.05mol/L pH7.4 PBS 漂洗 3 次, 每次 10min。切下部分外套膜, 滴加包埋剂后迅速冻结, 冰冻切片 10 μ m。切片入含有 1mg/ml β -NADPH、0.1mg/ml 氯化硝基氮蓝四唑(NBT)、0.05mol/L PBS、0.3% Triton X-100 的 NOS 反应液, 37 , 30min。染色反应的材料经 0.05mol/L, pH 7.4 PBS 漂洗 3 次, 每次 10min。另切下部分带少量边缘膜的中央膜用于整体染色, 直接入 NOS 反应液中 2h, 同样用 PBS 漂洗 3 次, 每次 30min。梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。镜检并拍照记录结果。实验中设 -NADPH 空白对照(Moroz *et al*, 1995)。

1.4 免疫组化

取材、固定、漂洗和冰冻切片等同组织化学方法。切片厚度为 10 μ m。切片用 0.3%过氧化氢-甲醇处理 30min, 10%正常绵羊血清孵育 30min。nNOS、iNOS 和 eNOS 一抗室温湿盒孵育 1—4h, PBS 漂洗 3 次, 每次 10min。1 200 生物素标记羊抗兔 IgG 室温湿盒孵育 1h, PBS 漂洗 3 次, 每次 10min。1 200 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶复合物室温湿盒孵育 1h, PBS 漂洗 3 次, 每次 10min。二盐酸联苯胺法显色。切片经脱水、透明和封固后光镜观察并拍照。实验中以抗体 1 200 稀释液代替一抗作为空白对照。

1.5 NOS 生化测定

取栉孔扇贝外套膜的帆状部、外套触手、边缘膜和中央膜各 2g 左右, 各加 5ml 预冷的(4) 2% NaCl, 玻璃匀浆器放冰块上匀浆, 4500r/min 的转速离心 10min, 取上清液用于酶活力的测定。NOS 生化测定采用格氏试剂法, 0.1ml 待测样品液加入 0.4ml 含与不含 2mmol/L Ca^{2+} 的孵育液(内含 50mmol/L tris-HCl, pH 7.4, 100mmol/L NADPH, 30 μ mol/L L-精氨酸), 以分别代表总 NOS(tNOS)和 iNOS 活性, 25 , 30min; 加入 0.1ml 冷终止液(内含 20mmol/L 醋酸钠, 1mmol/L L-瓜氨酸, 2mmol/L EDTA, 0.2mmol/L EGTA)终止反应; 然后再加入 0.3ml 1%对氨基苯磺酰胺(溶于 5%磷酸)和 0.3ml 0.1% N-(1-萘基)-乙二胺, 10min; 0.5cm 光径比色皿 550nm 下测各管吸光度值(Gourdon *et al*, 2001)。酶活力单位定义: 每毫克蛋白每分钟生成 1nmol NO 为一个酶活力单位(U)。

1.6 NO 生化测定

样品的制备同 NOS 生化测定。NO 生化测定采用硝酸盐还原酶偶联法, 0.1ml 待测样品液或 100 μ mol/L KNO_3 标准品液中加入 0.2ml 2.5 μ mol/L NADPH 和 0.2ml 基质液(含 1.25mmol/L 葡萄糖-6-磷酸, 400U/L 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和 200U/L 硝酸盐还原酶), 25 , 60min; 加入 0.2ml 200mmol/L $ZnSO_4$ 和 0.1ml 440mmol/L NaOH, 10min, 4000r/min 离心 10min; 取离心上清 0.5ml, 加入 0.3ml 1%对氨基苯磺酰胺(溶于 5%磷酸)和 0.3ml 0.1% N-(1-萘基)-乙二胺, 10min; 蒸馏水调零, 0.5cm 光径比色皿 550nm 下测各管吸光度值(Gourdon *et al*, 2001)。NO 含量按下列公式计算。 $NO(\mu\text{mol/g prot}) = (\text{样品管吸光度} - \text{空白管吸光度}) / (\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度})$

\times 标准品浓度(100 μ mol/L) \div 样品的 g 蛋白/L

1.7 蛋白含量测定

蛋白含量的测定采用 Lowry 等(1951)的 Folin-酚试剂法, 以牛血清蛋白为标准蛋白。本文中所有实验均重复 3 次以上。

2 结果

2.1 外套膜 NOS 组织化学定位

组织化学方法显示栉孔扇贝外套膜内的 NOS, 阳性物质呈浅蓝色。NOS 阳性物质在外套膜不同部位的分布差异较大。

帆状部的上皮细胞呈 NOS 强阳性(+++), 尽管该部分的上皮细胞内多有棕色色素颗粒, 但仍掩盖不了其细胞质中的蓝色阳性物质, 酶活性强的细胞近呈黑色。内上皮的酶活性较外上皮更强一些。内外上皮间厚的结缔组织细胞和肌纤维呈阴性(-)或弱阳性(+), 其内的少量血细胞和神经纤维呈阳性(++) (图 1a)。

外套触手内有较多分散分布且多为近圆形的呈 NOS 强阳性的细胞(+++)。阳性细胞在较短的触手中较多, 在较长的触手中较少。触手内还有大量沿触手伸出方向分布的神经纤维呈强阳性(+++), 从触手整体装片可以看到, 呈强阳性的神经纤维多为波浪状。长触手内神经纤维的酶活性较短触手更强一些(图 1b—图 1d)。

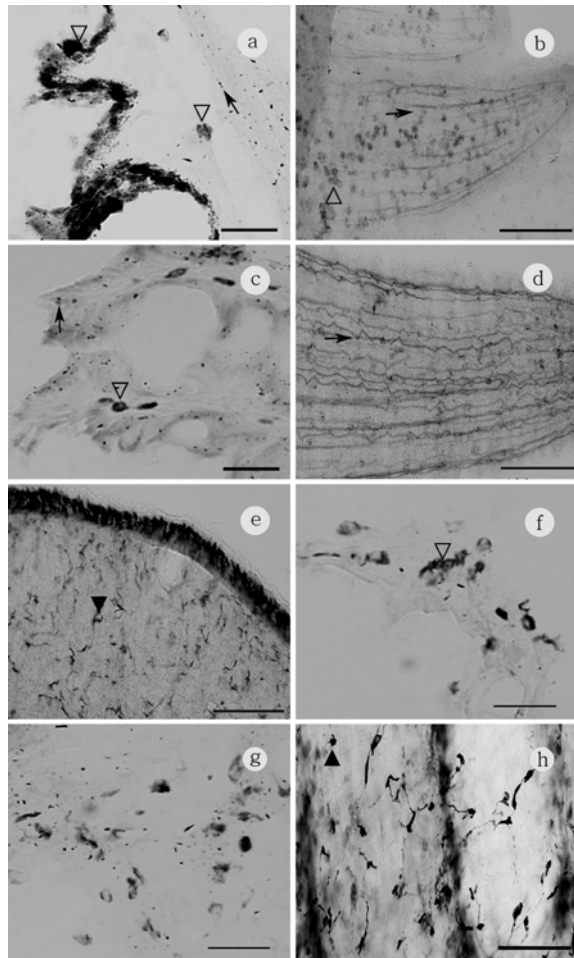


图 1 栉孔扇贝外套膜 NOS 组织化学()

Fig.1 Histochemical localization of the NOS in the mantle of *C. farreri* ()

a. 帆状部外上皮; b. 外套小触手; c. 外套触手切片局部; d. 外套大触手; e. 边缘膜外上皮; f. 边缘膜内上皮; g. 边缘膜结缔组织; h. 外套附着肌处。比例尺: a、c、f、g 为 20 μm , b、d、e 为 100 μm , h 为 200 μm , 示阳性细胞, 示阳性神经纤维, 示阳性神经元

除去帆状部和触手后的边缘膜部分内, NOS 阳性细胞较多且细胞的种类和形态最为复杂。外套触手基部的边缘膜部分, 靠近上皮的结缔组织内有大量的神经细胞呈强阳性(+++), 神经纤维呈阳性(++), 每个神经细胞一般发出 1—3 条神经纤维(图 1e)。边缘膜中部阳性细胞相对较少(图 1f—图 1g)。靠近外套环走肌附着于贝壳区域也即边缘膜与中央膜的分界线的一段边缘膜, 是边缘膜中也是整个外套膜中阳性细胞密度最高种类最多的部分, 肌纤维束周围有大量强阳性细胞(+++), 常聚集成堆, 细胞形状多近圆形(图 1h); 血管内皮细胞和血细胞也呈强阳性(+++), 细胞也多近圆形; 此部分内还有密度较大并较分散分布的神经细胞呈强阳性(+++), 有大量的神经纤维呈阳性(++), 细神经纤维染色后呈串珠状(图 1h, 图 2a—图 2b)。

中央膜很薄, NOS 阳性细胞的分布在不同部位差异较大, 但呈阳性的细胞的形状多近圆形。有的区域阳性细胞大片集中分布(图 2c); 有的区域阳性细胞聚集成大小不等的团块(图 2e—图 2f); 有的区域阳性细胞则较分散分布(图 2g); 还有的区域阳性细胞很少, 近空白。有血管分布的区域酶活性较强, 血管内皮细胞、血细胞及血管周围的部分细胞均呈强阳性(图 2d)。在接近外套环走肌附着区的部分, 分布有少量神经细胞和神经纤维也呈阳性。

2.2 外套膜 NOS 免疫组化定位

免疫组化显示栉孔扇贝外套膜内的 3 种类型的 NOS, 血细胞、帆状部和边缘膜上皮细胞呈 nNOS 和 eNOS 弱阳性(+), 其他细胞呈极弱的阳性或阴性(-), 神经细胞、神经纤维和血管内皮细胞均呈阴性(-)。血细胞、帆状部和边缘膜上皮细胞呈 iNOS 阳性(++), 其他细胞呈 iNOS 弱阳性(+)或阴性(-), 神经细胞、神经纤维和血管内皮细胞也均呈阴性(-)。iNOS 阳性反应明显较 nNOS 和 eNOS 强一些。

2.3 外套膜中 NOS 活力和 NO 含量

栉孔扇贝外套膜的帆状部、外套触手、边缘膜和中央膜各部分中 tNOS、结构型 NOS(cNOS, 即 nNOS+eNOS)和 iNOS 活力及其 NO 含量的测定结果见表 1。由表 1 可以看出: tNOS 活力和 NO 含量均为中央膜最高, 边缘膜次之, 外套触手较低, 帆状部最低, 与 NOS 组织化学定位在上

表 1 栉孔扇贝外套膜中 NOS 活力和 NO 含量
Tab.1 Activity of NOS and quantity of NO in the mantle of *C. farreri*

类别	tNOS(U/mg prot)	cNOS(U/mg prot)	iNOS(U/mg prot)	NO($\mu\text{mol/g prot}$)
帆状部	0.79 \pm 0.07	0.28 \pm 0.04	0.51 \pm 0.05	7.16 \pm 0.55
外套触手	0.96 \pm 0.07	0.75 \pm 0.05	0.21 \pm 0.02	9.23 \pm 0.67
边缘膜	1.23 \pm 0.08	0.62 \pm 0.06	0.61 \pm 0.05	15.54 \pm 1.33
中央膜	2.39 \pm 0.13	0.92 \pm 0.10	1.47 \pm 0.11	23.25 \pm 2.12

注: 表中数值均为平均值 \pm 标准差($n=5$)

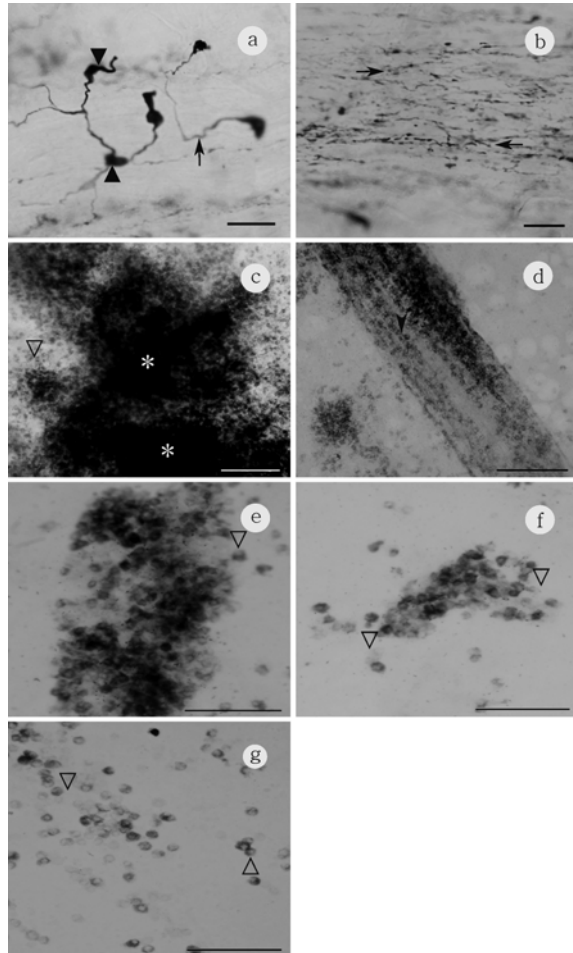


图 2 栉孔扇贝外套膜 NOS 组织化学()

Fig.2 Histochemical localization of the NOS in the mantle of *C. farreri* ()

a—b. 外套附着肌处; c—d. 中央膜近附着肌处局部; e—g. 中央膜局部。比例尺: a, b 为 20 μm , c, d 为 100 μm , e, f, g 为 50 μm , \blacktriangledown 示阳性细胞, \blacktriangleright 示阳性神经纤维, \blacktriangle 示阳性神经元, * 示阳性细胞集中区域, \blacktriangleright 示血管内皮细胞

述各部位中阳性细胞数量从多到少的循序一致。最高的中央膜的 tNOS 活力和 NO 含量均是最低的帆状部的 3 倍以上。其中 cNOS 活力也是帆状部的最低, 而 iNOS 活力则是外套触手的最低。中央膜和帆状部中的 iNOS 活力高于 cNOS 活力,

其内的 NOS 以 iNOS 为主; 边缘膜中 iNOS 活力和 cNOS 活力相近; 而外套触手中的 iNOS 活力远低于 cNOS 活力, 其内的 NOS 则以 cNOS 为主。

3 讨论与结语

已有的研究表明, 动物体内的 NO 具有舒张血管、作为神经系统的信息物质、作为白细胞的效应器分子参与抗感染免疫反应等多种生理功能, 内源性 NO 是由 L-精氨酸通过 NOS 的作用而产生的, 形成了一个 NO-NOS 体系, NOS 的分布可提示组织中 NO 的分布情况(Gourdon *et al*, 2001)。本研究组织化学显示结果表明, 栉孔扇贝外套膜有大量神经细胞、神经纤维、上皮细胞、血细胞和血管内皮细胞呈 NOS 强阳性; 生化测定结果表明, 其外套膜的不同部位均含有 NO 和 NOS, 且 NO 含量较高, NOS 活力较强, 提示 NO-NOS 体系在外套膜完成其各种生理功能包括抗感染免疫反应中可能发挥重要的作用, 这与外套膜表皮细胞直接与外界水环境接触本身必须具备抵抗病原体感染的能力的要求相适应。在作者以往的研究中, 对栉孔扇贝中枢神经系统 NOS 的组织化学定位时, 发现其中枢神经中神经元均呈 NOS 阴性, 而有大量的神经纤维呈 NOS 阳性; 对其他组织 NOS 的组织化学定位时, 发现只有个别器官组织内有少量 NOS 阳性神经元, 本研究中发现其外套膜中存在大量的 NOS 阳性神经元, 说明栉孔扇贝神经系统内存在并传递运输的大量 NOS 可能主要是在外套膜产生的, 或者说外套膜可能是其神经系统中 NOS 最主要的发生部位, 有待于进一步的研究证实。与栉孔扇贝同属双壳贝类的中国蛤蜊的脑、足、脏神经节中都存在 NOS 阳性神经元(王晓安等, 2003), 而栉孔扇贝 NOS 阳性神经元不分布于中枢神经而分布于外周器官, 说明栉孔扇贝在动物的神经进化上是非常低等的。

NOS 存在于动物体内许多脏器细胞中, 是一类复杂的酶系。它至少有 3 种同工酶, NOS1 主要在神经细胞中, 即 nNOS; NOS2 主要在细胞因子诱导的巨噬细胞中, 即 iNOS; NOS3 主要在内皮细胞中, 即 eNOS。本研究免疫组化显示结果表明, 外套膜中只有血细胞和部分上皮细胞呈 nNOS、eNOS 弱阳性和 iNOS 阳性, 而神经元和神经纤维等均呈阴性, 与组织化学定位结果不一致, 可能与实验所用的试剂有关, 3 种 NOS 一抗是用人或

大鼠 NOS 在进化上较保守的氨基酸序列片段制作的, 而栉孔扇贝在动物进化上非常低等与人或大鼠亲缘关系很远, 其 NOS 的分子组成差异较大。目前由于无脊椎动物 NOS 已被纯化并了解其分子组成的很少, 相关的免疫组化定位大多采用高等脊椎动物相关试剂, 扇贝的 nNOS、iNOS 和 eNOS 还均未被纯化, 其分子组成、结构、性质和功能作用等均未知或所知甚少, 都是有待于深入研究的课题。

高等动物具有一完善的神经-内分泌-免疫调节网络, 神经内分泌系统通过神经递质和激素抑制或促进免疫应答, 病毒等感染后的免疫细胞产生的干扰素、内啡肽等又会影响神经内分泌系统, 通过共同的活性肽将神经、内分泌和免疫系统联系起来, 形成了一完整的调节环路。贝类作为进化上较低等的动物, 对其神经、内分泌和免疫 3 方面均所知甚少。已有的研究表明, 贝类神经系统结构简单, 中枢神经比较分散, 缺乏专门的内分泌器官, 神经系统具有内分泌作用, 即神经内分泌(Nieto-Fernandez *et al*, 2000); 因无淋巴细胞而无特异性免疫(孙虎山等, 2000), 但是, 贝类体内却具有内啡肽、脑啡肽、白细胞介素 1(IL-1)、IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)等活性肽和细胞因子(Ottaviani *et al*, 1995), 并对其免疫防御起重要的调节作用, 说明贝类也具备神经-内分泌-免疫调节网络(Smith *et al*, 2000)。这些活性肽和细胞因子均能通过 NOS 并通过 NO 对贝类的免疫防御起调节作用(Stefano *et al*, 2000)。本研究结果表明栉孔扇贝神经系统内有大量 NOS, 作者也已证实扇贝体内存在白细胞介素等细胞因子及其受体, 说明栉孔扇贝也具有上述神经内分泌-免疫调节网络, 并可通过 NOS 和 NO 发挥调节作用, 其调节机制需要进一步的研究。

参 考 文 献

- 王晓安, 刘 丽, 郑哲民, 2003. 两种软体动物神经系统一氧化氮合酶的组织化学定位. 动物学杂志, 38(3): 14—21
- 孙虎山, 王宜艳, 王晓安等, 2005. 栉孔扇贝神经节一氧化氮合酶的组织化学和免疫组化定位. 中国水产科学, 12(1): 20—23
- 孙虎山, 李光友, 2000. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究. 海洋与湖沼, 31(3): 259—265
- 梁幼生, 戴建荣, 朱荫昌等, 2001. 钉螺一氧化氮合酶分布的酶组织化学研究. 中国血吸虫病防治杂志, 13(4): 196—197
- Fossier P, Blanchard B, Ducrocq C *et al*, 1999. Nitric oxide transforms serotonin into an inactive form and this affects neuromodulation. *Neuroscience*, 93(2): 597—603
- Gourdon I, Guerin M C, Torreilles J *et al*, 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide*, 5(1): 1—6
- Kobayashi S, Sadamoto H, Ogawa H *et al*, 2000. Nitric oxide generation around buccal ganglia accompanying feeding behavior in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci Res*, 38(1): 27—34
- Korneev S A, Piper M R, Picot J *et al*, 1998. Molecular characterization of NOS in a mollusc: expression in a giant modulatory neuron. *J Neurobiol*, 35(1): 65—76
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al*, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265—275
- Moroz L L, Gillette R, 1995. From polyplacophora to cephalopoda: comparative analysis of Nitric oxide signaling in mollusca. *Acta Biol Hung*, 46(2—4): 169—182
- Moroz L L, Park J H, 1993. Nitric oxide modulates the central respiratory patterns in *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci*, 473: 188
- Nieto-Fernandez F E, Alcide K, Rialas C, 2000. Heavy metals and neuroimmunomodulation in *Mytilus edulis*. *Acta Biol Hung*, 51: 325—329
- Ottaviani E, Franchini A, 1995. Immune and neuroendocrine responses in mollusks: the role of cytokines. *Acta Biol Hung*, 46: 341—349
- Robertson J D, Bonaventura J, Kohm A *et al*, 1996. Nitric oxide is necessary for visual learning in *Octopus vulgaris*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 263(1377): 1739—1743
- Smith K L, Galloway T S, Depledge M H, 2000. Neuro-endocrine biomarkers of pollution-induced stress in marine invertebrates. *Sci Total Environ*, 262: 185—190
- Stefano G B, Bilfinger T V, Rialas C M *et al*, 2000. 2-arachidonyl-glycerol stimulates nitric oxide release from human immune and vascular tissues and invertebrate immunocytes by cannabinoid receptor 1. *Pharmacol Res*, 42: 317—322

ACTIVITIES OF NITRIC OXIDE SYNTHASE IN THE MANTLE OF SCALLOP *CHLAMYS FARRERI*

SUN Hu-Shan¹, WANG Yi-Yan¹, WANG Xiao-An¹, SUN Xiu-Qin², LI Guang-You²

(1. College of Life Science, Ludong University, Yantai, 264025; 2. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061)

Abstract The nitric oxide synthase (EC1.14.13.39; NOS) in the mantle of scallop *Chlamys farreri* (obtained from Zhifu Bay, of the north of Yellow Sea; shell length 45—50mm) were studied with methods of histochemical localization, immunohistochemical localization and spectrophotometric assay. The aim of this study is to determine the role of NOS in the immune response of molluscs.

The histochemical analysis results were as follow. In the inner mantle fold, the epithelial cells were strongly NOS-positive, the haemocytes and nerve fibers in the connective tissue were NOS-positive, the muscle fibers were weakly NOS-positive. In the mantle tentacle, many round cells and wavelike nerve fibers presented strongly NOS-positivity. In the margin of mantle, there were many strongly NOS positive nerve cells and positive nerve fibers, abundant strongly NOS-positive round cells were detected near the pallial retractor muscle and inner epithelia of blood vessel. In the center of mantle, the distribution of NOS-positive cells were very different in different parts, abundant round NOS-positive cells distributed in gathering or scattering in the epithelial tissue, there were many round NOS-positive cells near the inner epithelia of blood vessel too.

The immunohistochemical analysis showed that the haemocytes and epithelial cells of the inner mantle fold and margin of mantle presented weakly positive reaction of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and presented positive reaction of inducible nitric oxide synthase (iNOS). The nerve cells, nerve fibers and inner epithelial cells of blood vessel presented nNOS, eNOS and iNOS negative reaction.

The biochemical test showed that both NOS and NO were detected in each parts of mantle. The enzyme activity level of total nitric oxide synthase (tNOS) and contents of NO in center of mantle were the highest in all parts of the mantle, the tNOS activity and contents of NO in mantle margin were higher than the mantle tentacle or the inner mantle fold, and the lowest part was the inner mantle fold. In both the central mantle and inner mantle fold, the iNOS activity was higher than cNOS activity; in the margin of mantle, the iNOS activity level was close to the cNOS activity level; in the mantle tentacle, the iNOS activity level was much lower than the cNOS activity level.

The results suggested that the NO-NOS system in mantle of *C. farreri* may play an important role in its immunological defense and immunoregulation, and the mantle may be the produce center of NOS.

Key words Scallop *Chlamys farreri*, Mantle, Nitric oxide synthase, Nitric Oxide, Enzyme activity