



贝类免疫生物学研究概况

陈竞春 石安静

(四川大学生物系, 成都, 610064)

MALACOZOAN IMMUNOBIOLOGY RESEARCH: A REVIEW

Chen Jingchun and Shi Anjing

(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu, 610064)

关键词 贝类, 免疫生物学, 概况

Key words Malacozoan, Immunobiology, Review

贝类, 即软体动物, 是无脊椎动物中的一大类。贝类的免疫生物学研究, 作为无脊椎动物免疫学研究的一部分, 在探索物种的起源与进化, 以及免疫系统的发生等方面有着重要的意义。另一方面, 贝类在生产上也有很高的经济价值^[1]。贝类免疫学是贝类病虫害研究的基础课题。尤其重要的是, 人工珍珠养殖技术要求育珠蚌接受由另一只蚌移植来的外套膜组织小片, 这一独特的异体移植过程涉及到免疫学的一些基本问题。比如石安静等^[2, 3]证实插片手术中普遍存在着细胞识别和排斥现象。但除此之外, 国内几乎再没有其它关于贝类免疫学研究的报道。本文主要从瓣鳃纲(双壳纲)的角度, 就已有的成果作一综述, 为国内研究提供资料。

1 贝类血细胞的分类

贝类血细胞在机体的防御机制中起着重要的作用^[4-6]。但到目前为止, 对于贝类的血细胞却还没有完善的系统的分类。Metchnikoff 在定义白细胞时, 就提到贝类和昆虫一样, 血液中有两种白细胞: 含大量粗糙颗粒的白细胞和含很少或不含颗粒的透明白细胞。Betances 则从形态学的角度将瓣鳃纲软体动物血细胞分为 76 种类型。以后, 随着电镜技术和细胞化学技术的发展, 出现了各种分类方法和命名系统。Chenery^[8]根据多种文献, 将瓣鳃纲软体动物的血细胞分为八大类:

1.1 红细胞 大量存在于蚶属的血液中, 大小约 $20 \times 30 \mu\text{m}$, 可能参与氧的运送。

1.2 普通白细胞 类似于哺乳动物的白细胞, 直径 $5-15 \mu\text{m}$ 。核卵圆形, 直径约

5 μm 。这种细胞具有吞噬功能。

1.3 透明白细胞 可在 7.5% 淡水贝的血涂片上观察到, 相当于脊椎动物的淋巴细胞。细胞核可达细胞直径的 $1/2$ — $2/3$ 。染色质凝集成团。

1.4 成白细胞 在血液的涂片和切片中均可见到, 大小约 $8 \times 12 \mu\text{m}$ 。细胞质呈狭长带状。

1.5 嗜酸性粒细胞 体积变化大, 直径范围 8 — $30 \mu\text{m}$ 。核为细胞直径的 $1/3$, 呈卵圆形, 稍微偏离中心, 通常可观察到核仁, 染色质轻度凝集。大量嗜曙红颗粒分布在核周围。

1.6 嗜碱性粒细胞 7 — 8% 淡水贝的血淋巴涂片上可观察到, 直径 7 — $12 \mu\text{m}$ 。细胞核圆形, 可达细胞直径的 $1/3$ — $1/2$, 染色质高度凝集。细胞质很少, 嗜碱性。

1.7 嗜中性粒细胞 大小约 $9 \times 13 \mu\text{m}$ 。核呈卵圆形, $3 \times 4 \mu\text{m}$ 。细胞质中含双折射颗粒, 颗粒颜色变化较大。

1.8 褐色细胞 存在于围心腔, 大小约 $11 \times 18 \mu\text{m}$ 。核呈贴花形, 约 $2.6 \times 4.4 \mu\text{m}$, 观察不到核仁。细胞质少, 大液泡内含褐色素。

2 贝类的异己识别

贝类和其它许多无脊椎动物一样, 能够识别“异己成分”(比如, 病毒、细菌、真菌、原虫和非生命物质), 并产生一定的生理反应^[9]。由于贝类血细胞不能产生免疫球蛋白, 因而不能对外来异物产生特异性的识别和反应, 但实验表明^[10], 贝类的血细胞确实可产生异己识别分子。那么, 这种分子是什么呢? Parish 曾提出一个可适用于所有无脊椎动物的异己识别模型, 设想一类由几种糖基转移酶组成的多聚体可作为异己识别因子, 但尚无证据表明这种因子存在于贝类血液中。相反, 另一种分子, 即凝集素, 倒有可能作为一类非免疫球蛋白分子识别外来异己成分。Sharon^[11]以及 Lakie^[9]指出, 外源凝集素 (Lectin) 可凝集表面具有糖链的细胞和其它物质。Gold 等报道在多种贝类的组织和血液中检测到凝集素活性。Vasta 等^[6]报道在弗吉尼亚牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 的血细胞微粒体中检测到外源凝集素的活性, 并且发现外源凝集素与微粒体高度共纯化, 因此可以确定血细胞凝集素是细胞膜上的一种整合蛋白。细胞膜上的这种凝集素可使血细胞微粒体与脊椎动物红细胞结合, 且这种结合可被某些糖链或糖蛋白所抑制。同时, 他们的实验还表明, 血细胞膜上的凝集素与血清中的凝集素密切相关。Renwrautz 等^[7]在贻贝 (*Mytilus edulis*) 的血细胞膜上也检测到凝集素活性, 并且可与抗血清凝集素的抗体发生免疫交叉反应。他们发现牛下颌腺粘蛋白 (BSM, 特异性抑制血清凝集素活性) 可以抑制血细胞对酵母细胞的吞噬, 表明血清凝集素和血细胞凝集素共同参与了对异物的识别和吞噬。一种可能的机制是: 血细胞合成凝集素, 一部分分泌到血液中, 一部分则整合到细胞膜上, 这相当于高等脊椎动物血液中的游离 Ig 和 B 细胞的膜表面 Ig, 从而起到异己识别的功能。

但是, 凝集素和 Ig 有两点重要的区别: ① Ig 的异己识别表现出高度的特异性, 而凝集素只能根据糖链的糖基组成非特异性地区分“自己”和“异己”。② 凝集素是组成性 (constitutive) 的, 即不经诱导就已存在, 而 Ig 则是可诱导的。尽管如此, 凝集素仍然代表

了一种有效的异己识别分子,在贝类机体的防御反应中发挥出相应的功能。

另一方面,凝集素并不是参与异己识别的唯一因子。早在 70 年代,一系列实验表明牡蛎 *C. virginica* 的血细胞对多种细菌具有趋化性^[5]。以后,Howland 确认,在这些实验中有效的化学引诱剂是细菌的细胞壁或者细胞膜上一种蛋白质,分子量约 10kD,不含糖类或脂类。由于凝集素只识别糖链上的糖基组成,因此可以预料,贝类的血液中还有别的因子参与了异己识别过程。

由此可见,贝类血液中存在着一个有效的非特异性异己识别体系。那么,识别完成以后,怎样消除这些异物呢?

3 异己成分消除

实验表明,贝类和其它无脊椎动物一样,其血细胞可攻击侵入体内的异己成分,如吞噬,包围(Encapsulation),血淋巴凝集,释放酚氧化酶和黑色素,以及溶酶体酶的水解作用。

吞噬作用是一种基本的原始的防御机制。Feng^[13]观察到牡蛎血细胞对外来异物及可溶性蛋白质的吞噬作用,并指出了这种吞噬作用在贝类防御机制中的重要意义。Gurski 等也观察到 *Mercenaria mercenaria* 血液中的颗粒细胞可吞噬酵母细胞。而 Moore 等^[15]则进一步证明酵母细胞被吞入细胞质液泡中,并发现小颗粒细胞的吞噬活性比大颗粒细胞的活性大。Foley 又证实这些颗粒细胞可吞噬细菌。可见,吞噬是贝类的一种重要的防御反应机制。

当外来异物的直径大于 10 μ m 时,白细胞的主要攻击行为则是“包围作用”。和田浩尔等^[12, 14]在研究珍珠贝插核手术后伤口的修复时,观察到受体贝的白细胞在手术后迅速迁移到伤口处,无颗粒细胞包围伤口,细胞间以伸出的细胞质突起相互间牢固联接而凝集,在伤口处形成 5—20 层细胞囊被。细胞同时还分泌出纤维状物质到细胞间隙处,最终完成伤口处的修复。相同的过程也可对外来异物进行包围和消灭^[9]。

攻击异物的另一重要机制是溶酶体酶的水解作用。溶酶体酶,尤其是溶菌酶和酸性、碱性磷酸酶,相继在弗吉尼亚牡蛎^[4],沙海螂(*Mya arenaria*)^[16],*M. mercenaria*^[4, 15],贻贝^[7]等多种贝类中发现。和田浩尔^[14]观察到珍珠贝插核手术后,伤口处的颗粒细胞将外来异物吞入细胞后,异物就与溶酶体融合,最终被各种水解酶消化。另一方面,某些溶酶体酶也存在于血液中,从而形成一个水解酶体系,破坏和消除侵入体内的异物。尤其是溶菌酶,在各种贝类的许多组织器官中广泛存在。Cheng 等^[4]认为溶菌酶最初起源于晶杆。高桥計介等^[17]也发现贻贝的消化器官中的溶菌酶活性最高。因此,从进化的观点看,细菌很可能是贝类(尤其是瓣鳃纲)的一类重要食物,则溶菌酶最初的功能是消化和营养。但环境的压力和自然选择的结果,使溶菌酶逐渐出现在血液和血细胞中,担负起机体防御的功能。

4 免疫反应的调节

Leung 等^[18]最初从贻贝的足神经节分离出脑啡肽,其止痛、镇静的功能以及活性对金属离子的依赖性都与哺乳动物体内的脑啡肽相似。这意味着贝类很可能具有与高等脊椎

动物相似的神经免疫调节系统。

进一步的证据来自 Stefano 等^[19]的实验, 证明贻贝体内存在阿片神经肽, 参与免疫调节, 特别是细胞粘附和细胞迁移。他们观察到阿片肽类物质不仅存在于血液中, 同时也存在于血细胞, 但在血液中的含量要高得多, 这可能是因为阿片肽类物质在细胞内合成以后就迅速释放到血液中。实验表明, 贻贝血液中的阿片肽物质可引起免疫活性细胞的定向迁移, 显著加快血细胞的粘附过程。由于纳络酮可大大抑制此粘附过程, 表明贻贝体内的阿片肽类物质也和哺乳动物体内的阿片肽一样, 是通过细胞表面的受体介导而起作用的。

Stefano 等进一步研究了贝类阿片神经肽的生理作用, 证明阿片肽通过免疫活性细胞表面的一种 δ —受体的介导^[20], 引起免疫细胞变扁、伸长、形成伪足, 这些阿米巴运动导致免疫细胞聚集成团, 失去免疫活性。可见贝类体内的阿片肽类物质具有明显的免疫抑制功能。

运用酶联免疫法, Hughes^[21]在贻贝的血液和血细胞中检测到白细胞介素-1 (IL-1) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的活性。IL-1 和 TNF- α 在贻贝体内相互作用, 参与免疫调节。有趣的是, Stefano 证明贻贝体内阿片肽的免疫抑制功能正是通过抑制 IL-1 和 TNF- α 的活性而实现的。

另外, Stefano^[22]又发现一种重要的免疫调节分子——中性内肽酶 (NEP) 并非脊椎动物所特有, 而是同样也存在于贝类体内。某些神经肽 (如阿片肽) 可促进免疫活性细胞分泌 NEP, 即正调节作用; 但高浓度的神经肽则起负调节作用。可以推测 NEP 是贝类免疫调节的又一途径。

5 研究展望

关于贝类免疫细胞的分类研究, Hughes 等^[23]发现贻贝的免疫细胞可对脂多糖 (LPS) 产生反应。LPS 在脊椎动物体内通常作为免疫激活剂诱导 IL-1 和 TNF- α 的产生。通过比较贻贝免疫细胞对 LPS 和 DAMA (D-Ala², Met⁵-脑啡肽酰胺) 产生反应的强弱程度, 他们将贻贝的免疫细胞分为两个亚群: 只对 LPS 起反应的亚群, 和对 LPS, DAMA 都起反应的亚群。在此之前的血细胞分类都以形态学观察为基础, 而这项研究打开了利用表面标志进行血细胞分类研究的大门。以后, Stefano 也发现贻贝的免疫细胞对人工合成的 HIV gp120 片段产生反应, 他认为细胞可能通过类似 CD₄ 或别的某种表面标志来识别这个肽片段的。由此可见, 利用细胞膜表面标志对贝类血细胞进行免疫学意义上的分类不仅是必要的, 而且也是可能的。可以预料, 免疫细胞的系统分类将成为贝类乃至所有无脊椎动物免疫学研究的突破口。

关于免疫分子与免疫调节, Hughes^[21]的研究表明诸如 IL-1, TNF- α 等分子是经过数百万年进化来的古老的信号分子。而象哺乳动物体内的粒细胞-单核细胞-巨噬细胞系统也同样有其进化的历史。可以肯定, 一个庞大的信号分子系统在贝类的免疫反应中发挥着重要而复杂的功能, 对这个系统的探索将是贝类免疫生物学的发展方向。

参 考 文 献

- [1] 蔡英亚等. 贝类学概论. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 16—20.
- [2] 石安静等. 三角帆蚌珍珠囊形成的研究. 水产学报, 1985, **9**(3): 247—252.
- [3] 胡曦璇, 石安静. 珍珠囊研究概况. 水生生物学报, 1994, **18**(1): 76—81.
- [4] Cheng T. C. et al. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *C. virginica* and *M. mercenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1975, **52B**: 443—447.
- [5] Howland K. H. et al. Identification of bacterial chemoattractants for oyster hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 1982, **39**: 123—132.
- [6] Vasta G. R. et al. A Lectin on the hemocytes membrane of the oyster. *Cell. Immunol.*, 1984, **88**: 475—488.
- [7] Hardy S. W. et al. Factors in the hemolymph of the mussel *Mytilus edulis* L., of possible significance of defense mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.*, 1976, **4**: 473—475.
- [8] Cheney D.P. A summary of invertebrate leucocyte morphology with emphasis on blood elements of the manila clam, *Tapes semidecussata*. *Biol. Bull.*, 1971, **140**(3): 353—368.
- [9] Lackie A. M. Invertebrate immunity. *Parasitology.*, 1980, **80**: 393—412.
- [10] Renwrand L. et al. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin molecules at the surface of leucocytes from *Mytilus edulis*. *Comp. Physiol.*, 1983, **149**: 535—546.
- [11] Sharon N. et al. Lectins, Cell agglutinating and sugar-specific proteins. *Science.*, 1972, **177**: 949—959.
- [12] 和田浩嗣. 淡水産二枚貝の同種外套膜移植および異種外套膜移植. 貝類, VENUS, 1989, **48**(3): 174—190.
- [13] Feng S. Y. Pinocytosis of proteins by oyster leucocytes. *Biol. Bull.*, 1965, **129**: 95—105.
- [14] 和田浩嗣. 插核手術と真珠貝の生体防禦反応. 全真珠技術研究会報第1号, 1985, 5—29.
- [15] Moore C. A. et al. Cytochemical aspects of *Mercenaria mercenaria* hemocytes. *Biol. Bull.*, 1972, **152**: 105—119.
- [16] Rodrick G. E. Selected enzyme activities in *Mya arenaria* hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1978, **62B**: 313—316.
- [17] 高橋計介等. 海産二枚貝にばシナノリゾチームの存在と特性. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 1986, **52**(5): 863—868.
- [18] Leung M. K. et al. Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**: 955—958.
- [19] Stefano G. B. et al. Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989, **86**: 626—630.
- [20] Stefano G. B. et al. Opioid-like substances in an invertebrate: an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1993, **90**: 11099—11103.
- [21] Hughes T. K. Jr. et al. Interaction of immunoactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990, **87**: 4426—4429.
- [22] Stefano G. B. et al. Autoimmunoregulation: Differential modulation of CD10 / neutral endopeptidase by tumor necrosis factor and neuropeptides. *J. Neuroimmunol.*, 1992, **41**(1): 9—14.
- [23] Hughes T. K. Jr. et al. Lipopolysaccharide and opioids activate distinct populations of *Mytilus edulis* immunocytes. *Cell. Tissue Res.*, 1991, **264**: 317—320.