

综 述

# 甲壳动物免疫因子的研究进展

刘雪兰 余为一

(安徽农业大学畜牧水产学院, 合肥 230036)

## A REVIEW ON IMMUNE FACTORS OF CRUSTACEANS

LIU Xue-Lan and YU Wei-Yi

(College of Animal Science and Fisheries, Anhui Agriculture University, Hefei 230036)

**关键词:** 甲壳动物; 免疫因子; 非特异性免疫

**Key words:** Crustaceans; Immune factors; Non-specific immunity

**中图分类号:** S966.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)04-0418-004

无脊椎动物缺乏后天获得的特异性免疫功能, 不产生免疫球蛋白, 但是它们有先天性的非特异性免疫系统, 能够识别和有效清除入侵的微生物和寄生虫等异物, 保持体内外平衡。甲壳动物是无脊椎动物中的一个类群, 近40年来, 国外广泛地开展甲壳动物免疫的研究, 而国内有关报道则较少。在甲壳动物免疫研究中, 鲎是最常用的动物, 它在地球上已存活20多亿年。其次是虾和蟹。研究发现, 它们体内存在着非常有效的防御系统<sup>[1]</sup>, 其中最主要的是血淋巴。血淋巴含多种细胞和体液免疫因子, 它们互相协同, 对异物产生凝固作用(Coagulation), 黑化作用(Melanization), 溶解杀菌, 吞噬等免疫反应。本文主要介绍血淋巴中凝固系统(Clotting system)、凝集素(Lectin)和酚氧化物酶原系统(ProPO system)等免疫因子在甲壳动物免疫防御中的作用和研究进展。

### 1 血淋巴的主要组分及其作用

甲壳动物血淋巴由血细胞和浆液组成。血细胞至少有2种, 即颗粒细胞和非颗粒细胞, 其中颗粒细胞占99%<sup>[2]</sup>。早在1968年, Levin等<sup>[3]</sup>就发现鲎体内游走血细胞中含有颗粒物质。1975年, Mürer等<sup>[4]</sup>分离到L颗粒(大颗粒)。1993年, Shigenaga等人成功地分离到两种颗粒:L颗粒和S颗粒(小颗粒)<sup>[5]</sup>。在这些颗粒中贮存着多种具有免疫活性的蛋白分子。L颗粒包含20多种蛋白分子, 分子量大多介于8—123kDa之间; S颗粒中至少有6种分子量小于30kDa的蛋白分子。这些蛋白分子包括凝固因子, 可凝蛋白(胶固酶原), 蛋白酶抑制因子, 凝集素, 溶血素, 抗菌肽等<sup>[6]</sup>。此外, 在某些甲壳动物血细胞中还有酚氧化物酶原系统(ProPO system)<sup>[8]</sup>。血淋巴浆液中主要含有溶血素, 凝集素和 $\alpha$ 2-巨球蛋

白等蛋白分子<sup>[6]</sup>。

甲壳动物循环血细胞具有吞噬和包裹入侵异物的作用。这种吞噬作用还可被凝集素、ProPO等蛋白调理<sup>[9]</sup>。比如, 凝集素和ProPO能对入侵的细菌、真菌表面脂多糖(LPS)或真菌细胞壁成分1,3- $\beta$ -D-葡聚糖进行识别结合, 促进吞噬细胞的吞噬。从淡水螯虾血细胞中提取出来的76kDa蛋白、从沙滩蟹的血淋巴浆液中提取到110kDa的1,3- $\beta$ 葡聚糖结合蛋白( $\beta$ GBP)和一种80kDa蛋白, 也具有调理素作用。它们能诱导血细胞游走和部分去颗粒作用, 这种作用类似于哺乳动物的调理素, 具有增强细胞的吞噬作用。

### 2 凝固反应系统(Clotting system)

Mürer等在1975年就报道了在鲎颗粒细胞中含有凝固反应的全部因子。八十年代初, 一些研究人员还发现鲎体内有对LPS和1,3- $\beta$ -D-葡聚糖敏感的凝固连锁反应(Coagulation cascade)<sup>[10,11]</sup>。因为这两种分子分别是革兰氏阴性菌和真菌细胞壁的主要成分, 所以, 连锁反应在甲壳动物对细菌性病原免疫中具有非常重要的作用。

#### 2.1 LPS介导的凝固连锁反应

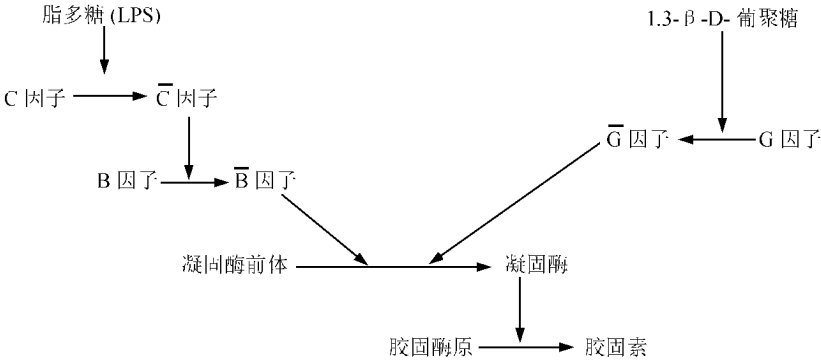
参与LPS介导的凝固连锁反应的有胶固酶原(Coagulogen)和3种丝氨酸蛋白酶原:C因子、B因子、凝固酶前体(Proclotting enzyme)。凝固酶前体是54kDa单链糖蛋白, 由346个氨基酸组成。C因子是一种分子量为123kDa的糖蛋白, 它由一条80kDa的重链和一条43kDa的轻链组成。C因子重链上有5个重复的片段, 每个片段大约有60个氨基酸, 这与哺乳动物补体系统的蛋白分子相似。B因子是一种单链的糖蛋白, 分子量大约为64kDa。

收稿日期: 2002-09-06; 修订日期: 2002-09-20

基金项目: 安徽省自然科学基金, (编号: 99041355)资助

作者简介: 刘雪兰(1973—), 女, 安徽省宿州市人; 硕士生; 研究方向为预防兽医学和微生物学。

革兰氏阴性菌的外膜中含有大量的 LPS, 当它们侵入蜚体内时, 循环血细胞能对其识别、黏附和凝聚, 并产生去颗粒作用。随着血细胞的去颗粒作用, 血淋巴的凝固反应被启动<sup>[12]</sup>。LPS 可激活 C 因子为  $\bar{C}$  活性因子,  $\bar{C}$  活性因子进一步激活 B 因子, 活化的  $\bar{B}$  因子使凝固酶前体转变为凝固酶, 凝固酶进一步使可溶性的胶固酶原转变成不溶的胶固素凝胶,



2.3 凝固连锁反应的调控

与哺乳动物的凝固反应和补体系统激活过程相似, 甲壳动物体内这两种途径的凝固连锁反应也可通过限制性蛋白水解酶的水解作用进行传递。起调控作用的是凝固反应抑制因子(Serinin 家族成员)<sup>[13]</sup>。这些抑制因子可与靶丝氨酸蛋白酶结合形成稳定的复合体, 从而抑制  $\bar{C}$  因子、 $\bar{G}$  因子及凝固酶前体的激活, 防止不必要的凝胶块的形成。

2.4 甲壳动物的凝固连锁反应与哺乳动物的补体系统的关系

有资料表明一些无脊椎动物体内也存在补体系统, 如 1998 年, AL-Sharif<sup>[14]</sup>和 Smith<sup>[15]</sup>分别报道了棘皮动物门的海胆(Sea urchin)体内有类似于哺乳动物 C<sub>3</sub> 结构蛋白 SpC<sub>3</sub> 及与 B/C<sub>2</sub> 相同的结构域。甲壳动物蜚体内的 C 因子与哺乳动物的补体因子 C1r、C1s, 都具有苏希结构域(Sushi domain)和表皮生长因子(Epidermal growth factor, 简称 EGF)结构域, 并且这三者都是连锁反应的初始物<sup>[16]</sup>, 所以有人认为蜚的凝固反应系统和哺乳动物的补体系统可能有共同的起源, 即进化会合点。

3 凝集素(Lectin)家族

凝集素也是甲壳动物免疫系统的重要组成部分, 存在于血淋巴液和血细胞中。凝集素是一些糖蛋白或结合糖的蛋白, 它们选择凝集脊椎动物的红血球、病原微生物和沉淀某些复杂的碳水化合物; 其凝集活性常被糖类所抑制。各种凝集素通过结合方式识别、凝集外来细胞, 并调理血细胞吞噬, 协同完成防御任务。

研究人员已经从多种甲壳动物体内发现凝集素。Cassels 等<sup>[17]</sup>于 1994 年研究报道了美洲蓝蟹(Callinectes sapidus)血清中有 2 种凝集素, 命名为 CSL-I、CSL-II, 经过 SDS-PAGE 电泳, 它们分别具有 2 个亚基, 且这 2 种凝集素能够特异性识别和凝集蓝蟹病原菌(Vibrio parahaemolyticus)。彭其胜等<sup>[18]</sup>采

包围吞没病原菌, 阻止细菌的扩散, 并最终杀灭细菌。

2.2 1,3-β-D-葡聚糖介导的凝固连锁反应

Kakinuma 等人发现蜚血细胞溶解产物中存在一种对 1, 3-β-D-葡聚糖敏感的蛋白酶-G 因子<sup>[11]</sup>。G 因子能被 1, 3-β-D-葡聚糖激活, 成为  $\bar{G}$  因子,  $\bar{G}$  因子直接激活凝固酶前体, 并最终导致胶固素凝胶的形成。

用盐析、凝胶层析、离子交换层析从中国对虾(Penaeus chinensis)血淋巴液中分离出 1 种具有 2 个亚基的凝集素, 此凝集素能凝集牛等多种动物和人的红血球, 且凝集活性不被 D-甘露糖等 8 种糖抑制。迄今为止, 研究报道最多的是蜚凝集素。蜚体内有多种凝集素, 最新资料表明, 日本蜚(Tachyplesus tridentatus)的血淋巴含有 5 种重要的凝集素<sup>[2]</sup>, 分别命名为 TL-1、TL-2、TL-3、TL-4、TL-5。前 4 种位于血细胞 L 颗粒中, TL-5 位于血淋巴液中。

3.1 TL-1

TL-1 是一种由 221 个氨基酸组成的单链蛋白质, 可通过亲和和层析法从蜚血细胞 L 颗粒中提取。其分子量为 27 kDa, 含有 3 个二硫键和一个游离的半胱氨酸基, 等电点为 9.69。TL-1 单链最突出的一个结构特征是它含有 6 个串联的重复片段, 每个片段有 33—38 个氨基酸。TL-1 具有广谱结合的特性, 与琼脂糖、葡聚糖、脂多糖等多糖结合。此外研究还表明, 当革兰氏阴性细菌入侵时, TL-1 从血细胞中被释放出来, 识别细菌外膜中由脂 A 和 2-keto-3-deoxyctonate (KDO) 组成的 LPS 核心部位, 进行结合, 达到抑菌的作用。

3.2 TL-2

TL-2 是由 236 个氨基酸组成的单链蛋白质, 可采用离子交换层析和凝胶过滤等方法进行提取, 分子量为 27 kDa。最显著的结构特征是由 47 个氨基酸组成的 5 个串联的重复序列。TL-2 能够凝集人 A 型血的红细胞, 凝集所需 TL-2 的最小浓度(MAC)为 1.6 μg/mL, 凝集作用能被 N-乙酰-D 葡萄糖胺酶(D-GlcNAc)特异性地抑制。此外, TL-2 还具有凝菌的作用, 其机制是通过与暴露在细菌表面的 D-GlcNAc 基团结合, 识别革兰氏阳性菌如葡萄球菌的磷壁酸及某些革兰氏阴性菌的 LPS。

3.3 TL-3

在 SDS-PAGE 电泳中 TL-3 为 15kDa 的条带。超速离心后, 它以二聚物形式存在。能凝集人 A 型血的红细胞, 但不

凝集 B 型、C 型血的红细胞。TL-3 凝集细菌的机理同 TL-2。

### 3.4 TL-4

TL-4 是分子量为 470kDa 的低聚糖蛋白分子。可用亲和层析、凝胶过滤层析法从 L 颗粒中提取,经 SDS-PAGE 电泳可将 TL-4 分成 30kDa、31.5kDa 的两个条带。TL-4 不仅能凝集人 A 型血的红细胞,而且能凝集 B 型、C 型血的红细胞,但其 MAC 的值不同。后两者所需的 TL-4 的浓度比前者的大。 $\text{Ca}^{2+}$  不是 TL-4 血凝作用所必需的,但是它能提高 TL-4 的血凝作用。

### 3.5 TL-5

TL-5 存在于血淋巴液中,是一种  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性凝集素,可通过 N-乙酰类固定树脂亲和层析法提取。TL-5 可分解为 2 个片段,分别命名为 TL-5A、TL-5B。在 SDS-PAGE 电泳中 TL-5A 和 TL-5B 均含有一条 40kDa 的主蛋白带,凝胶层析所测的分子量分别为 210kDa 和 260kDa<sup>[19]</sup>。已经证实,TL-5 可凝集人 A、B、O 型的红细胞、革兰氏阴性菌及革兰氏阳性菌(其有效的凝菌作用所需的 TL-5 浓度介于  $10\text{ng/mL}$ — $10\mu\text{g/mL}$  之间),是血淋巴浆液中凝集作用的主导分子。TL-5 能特异性识别非碳水化合物的乙酰类物质。TL-5 的 cDNA 序列表明,它们含有一个能够结合半胱氨酸的短臂的 N-末端和一个类似于血纤维蛋白折叠的 C-末端,该末端与哺乳动物血纤维蛋白序列有 51% 的同源性,但是 TL-5 缺少哺乳动物血纤维蛋白中一种“花束样排列”(Bouquet arrangement)的胶原蛋白结构域。已经证实 TL-5A 和 TL-5B 在蜆体内的功能是识别非自身物质,因此推测,哺乳动物的血液纤维蛋白原可能起源于具有识别非自身物质的功能蛋白质。

## 4 酚氧化物酶原激活系统(proPO)

酚氧化物酶(PO)是一种含铜的氧化还原酶,酚氧化物酶原激活系统(proPO system)在甲壳动物中起识别和防御作用<sup>[20]</sup>。它在甲壳动物血细胞内以酚氧化物酶原(proPO)的形式存在的,能够被一些蛋白或多糖激活,而转变成活性的 PO,例如,淡水螯虾的 proPO 可以被一种内源性丝氨酸蛋白酶激活。PO 能够黏附在细菌或寄生虫、真菌的表面,产生黑色素,介导黑化反应,在病原物的表面形成小结块,最终杀死病原物;在体外,proPO 可被 LPS、肽聚糖、 $\beta$  GBP 激活<sup>[21,22]</sup>。莫照兰、李会荣等人研究报道气味黄杆菌的胞外糖蛋白可增强螯虾血淋巴的酚氧化物酶活力<sup>[23]</sup>

## 5 甲壳动物体内其他一些防御分子

在甲壳动物血淋巴中被发现了一些免疫分子<sup>[6]</sup>,如抗菌蛋白(抗 LPS 因子),抗菌肽(Tachyplesin),多肽类的大分子防御因子(Big defensin)等,此外还有类似于哺乳动物的  $\alpha 2$  巨球蛋白( $\alpha 2\text{MS}$ )的  $\alpha 2$  巨球蛋白( $\alpha 2\text{M}$ )。

## 6 展望

近年来,我国的淡水养蟹、养虾业发展很快,如何有效防控疫病,是提高经济效益的关键所在,也是保证水产养殖健

康发展的关键所在。但是对于虾、蟹免疫系统的组成、特点,免疫物质的产生规律及免疫防病的作用机理尚未清楚。这在很大程度上制约了免疫预防的工作。所以甲壳类免疫研究主要在以下两方面将有所突破。

甲壳类非特异性免疫机理的研究。如上所述,甲壳类水生动物的免疫是建立在非特异性基础上的生理反应,其过程是通过凝集、凝固异己物质和酶类反应,固定并排除异物(包括病原体)。但是,这种非特异性识别异物的机理是什么?在分子水平有什么结构特点?比如凝集素与异物的结合是否建立在针对某一类结构相似的分子基础上的?在对不同病原体的识别和排除中,在特异性与非特异性识别之间是否存在中间状态,如存在类似 MHC 分子的识别结构?如存在,其结构和结合的机理又是什么?这些问题的研究将有助于进一步明确动物在进化过程中免疫功能的演变,尤其是 MHC 分子等的起源和演变过程。

提高甲壳类免疫机能的研究。已经清楚甲壳类有完整的非特异免疫系统和组分(如上述的凝集素等),它们在清除异物中有重要作用。在生产实践中,提高体内非特异性免疫组份如凝集素的量,就能提高动物机体的免疫防御能力。所以,研究影响甲壳动物这些免疫组份分泌或产生的因素将具有重要的意义。

## 参考文献:

- [1] Muta T, Iwanaga S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 1996, **8**(1): 7—41
- [2] Kawabata S, Iwanaga S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab [J]. *Dev Comp Immunol*, 1999, **23**(4-5): 391—400
- [3] Levin J, Bang F B. Clottable protein in limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin [J]. *Thrombos Diathes Haemorrh*, 1968, **19**: 186—197
- [4] Mürer E H, Levin J, Holme R. Isolation and studies of the granules of the amoebocytes of *Limulus polyphemus*, the horseshoe crab [J]. *J. Cell Physiol*, 1975, **86**: 533—542
- [5] Shigenaga T, Takayenoki Y, Kawasaki S. Separation of large and small granules from horseshoe crab (*Tachyleus tridentatus*) amoebocytes and characterization of their components [J]. *J. Biochem*, 1993, **114**: 307—316
- [6] Iwanaga S, Kawabata S, Muta T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions [J]. *J. Biochem*, 1998, **123**: 1—5
- [7] Johansson M W, Söderhäll K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system [J]. *Parasitol*, 1985, **31**: 171—176
- [8] Johansson M W, Söderhäll K. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells [J]. *J. Cell. Biol*, 1988, **106**: 1795—1803
- [9] Thornquist P O, Johansson M W, Söderhäll K. Opsonic activity of cell adhesion proteins and beta-1,3-glucan binding proteins from two crustaceans [J]. *Dev Comp Immunol*, 1994, **18**(1): 3—12
- [10] Morita T, Tanaka S, Nakamura T, et al. A new (1,3)- $\beta$ -glucan mediated coagulation pathway found in *limulus* amoebocytes [J]. *FEBS*

- Lett. 1992, **129**, 318—321
- [11] Kakinuma A, Asano T, Torii H, et al. Gelation of limulus amebocyte lysate by an antitumor (1, 3)- $\beta$ -glucan [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, **101**, 434—439
- [12] Iwanaga S, Morita T, Miyata T, et al. The hemolymph coagulation system in invertebrate animals [J]. *J. Protein Chem.* 1986, **5**, 225—268
- [13] Lal Agarwala K, Miura Y, Kawamura T, et al. Limulus Intracellular coagulation inhibitor type-3; Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization [J]. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**, 23768—23774
- [14] AL-Sharif W Z, Sunger J O, Lambris J D, et al. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3 [J]. *J. Immunol.* 1998, **160**, 1983—2997
- [15] Smith LC, Shin C-S, Dachenhausen S G. Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system [J]. *J. Immunol.* 1998, **161**, 6784—6793
- [16] Iwanaga S. The limulus clotting reaction [J]. *Current Opinion in Immunology*. 1993, **5**, 74—82
- [17] Cassels F J, Odom E W, Vasta G R. Hemolymph lectins of the blue crab, *Callinectes sapidus*, recognize selected serotypes of its pathogen *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Ann N Y Acad Sci.* 1994, **712**, 324—326
- [18] Peng Q S, Guo W C, Yang Z G, et al. Agglutinin in hemolymph of *Penaeus chinensis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, **7**(4): 14—18. [彭其胜, 郭文场, 杨振国等. 中国对虾血淋巴液中的凝集素 [J]. 中国水产科学, 2000, **7**(4): 14—18]
- [19] Seki N, Mizunoe Y, Wai S N, et al. Horseshoe crab acetyl group recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1999, **96**(18): 10086—10091
- [20] Ratcliffe NA. Immunity—a primer for the nonspecialist [J]. *Immunol. Lett.* 1985, **10**, 253—270
- [21] Rinkevich B, Müller W E G. Invertebrate immunology [M]. New York: Springer. 1995, 46—66
- [22] Wang L, Li G Y, Mao Y X. Studies on the activities and characteristics of the antibacterial, bacteriolysis and phenoloxidase in the haemolymph of *Penaeus chinensis* [J]. *Ocean et Limn Sin.* 1995, **26**(2): 179—185. [王雷, 李光友, 毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化物酶活力的测定及其特性研究 [J]. 海洋与湖沼, 1995, **26**(2): 179—185]
- [23] Mo ZL, Li HR, Yu Y, et al. Effect of bacterial glycoprotein on immune factors in *Procambarus clarkii* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, **7**(3): 28—32. [莫照兰, 李会荣, 俞勇等. 细菌糖蛋白对螯虾免疫因子的影响 [J]. 中国水产科学, 2000, **7**(3): 28—32]