

鲎血淋巴中的先天性免疫系统

The innate immune system in horseshoe crab hemolymph

欧阳高亮, 鲍仕登

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

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2004)09-0066-04

鲎(horseshoe crab)是一种生活在海洋中的大型底栖节肢动物,从早古生代的奥陶纪出现至今已有4亿多年的历史,是动物界具有独特进化地位的“活化石”之一。鲎隶属于节肢动物门(Arthropoda)、有螯肢亚门(Chelicerata)、肢口纲(Merostomata)、剑尾目(Xiphosurida)、鲎科(Limuloidea)。现存的鲎种类很少,仅存2亚科3属4种,这4种鲎分别为美洲鲎(*Limulus polyphemus*)、东方鲎(*Tachypleus tridentatus*,又称中国鲎或日本鲎)、南方鲎(*Tachypleus gigas*)和圆尾鲎(*Carcinoscorpius rotundicauda*),其地理分布也较为狭隘,仅限于北美与东亚及东南亚一带。除具有动物“活化石”称号外,鲎又冠有“无脊椎动物献血冠军”的美誉,其体内拥有大量的血淋巴。一只成年鲎可制备100~300 mL血,血淋巴采集也较为便利,而且鲎的凝血系统与哺乳动物的非常相似,因此鲎是无脊椎动物血液学研究的绝好材料,也是目前鲎资源开发利用和鲎试剂研制的主要原材料,一直受到日、美等国学者的高度重视^[1]。近年来,随着对鲎血淋巴的免疫功能研究及其与其它无脊椎动物血淋巴的免疫学比较研究,尤其是从鲎血淋巴中分离出许多具有抗菌、抗病毒的活性物质,鲎血淋巴研究已成为当前无脊椎动物免疫学研究的重要热点领域。作者拟就鲎血淋巴先天性免疫系统中的免疫应答细胞和免疫应答因子及其参与的免疫应答进行综述。

1 鲎血淋巴中的免疫应答细胞

鲎血淋巴内含免疫应答细胞和许多免疫活性物质,是鲎抵御入侵病原的先天性免疫系统。鲎血淋巴呈蓝色,由血浆和血细胞组成。血浆内含有以可溶形式存在的起呼吸作用的血蓝蛋白,该蛋白占整个血浆蛋白总量的90%~95%。鲎血细胞一般可分为无颗粒

细胞和颗粒细胞。无颗粒细胞又称蓝细胞,仅占血细胞总数的1%左右,可合成并分泌血蓝蛋白;颗粒细胞又称变形细胞或阿米巴样细胞,呈卵圆形板层状结构,最大直径可达15~20 μm,占血细胞总数的99%以上,内含大、小两种分泌性颗粒,大颗粒直径约1.5 μm,小颗粒直径约0.6 μm。鲎血细胞大小颗粒内含有许多免疫活性物质,目前人们已从大、小颗粒内分离到40多种蛋白组分,其中大颗粒含有与凝血有关的凝固因子、凝固蛋白原、蛋白酶抑制剂、凝集素以及少量抗菌性组分如tachyplectins等;小颗粒则含有大量的抗菌活性物质以及一些具有凝集细菌作用的组分,这些组分是一类富含半胱氨酸的碱性蛋白,即抗菌肽,如tachyplepsins、tachycitin、tachystatins等;big defensin则为大、小颗粒所共有。颗粒细胞既无粘附性,也不具备运动能力,但当鲎在外渗作用或外伤情况下,颗粒细胞被激活,从而导致细胞获得粘附性,并通过胞吐作用释放颗粒,同时伸出伪足从而具有运动能力。因此当外来病原侵入鲎血液时,血细胞通过胞吐作用将大、小颗粒释放出来,在大、小颗粒及血浆中的各种抗菌活性物质的协同作用下,杀死外来病原,构成一个有效的防御系统^[1-3]。

2 鲎血淋巴中的免疫应答因子

鲎先天性免疫系统完全依赖于一套独特且非常

收稿日期:2003-02-24;修回日期:2003-05-20

基金项目:国家自然科学基金(30170463);福建省青年科技人才创新项目(2003J017);厦门大学科学研究基金资助项目
 作者简介:欧阳高亮(1971-),男,副教授,博士,研究方向:肿瘤细胞分子生物学, E-mail:oyglz@yahoo.com.cn

有效的宿主防御系统和凝血系统。目前人们已从鲎血淋巴的血细胞和血浆中分离纯化了多种参与鲎凝血反应和宿主防御的免疫应答因子。

2.1 凝固因子 (coagulation factors)

鲎血淋巴进行快速凝血对宿主防御和止血均非常重要^[4,5]。该凝血级联反应由 4 种凝固因子和 1 种凝固蛋白原 (coagulogen) 组成。其中凝固因子包括 C 因子、G 因子、B 因子及前凝固酶 (proclotting enzyme), 这些因子都属于丝氨酸蛋白酶原家族。

2.1.1 C 因子

C 因子为糖蛋白, 是鲎凝血反应中由细菌内毒素 (LPS) 激活的凝血级联反应的起始点。分子质量为 123 ku, 由轻、重二链通过二硫键组成, 其重链 N 端可以与 LPS 特异结合, 而轻链 C 端有催化活性。在 LPS 作用下 C 因子被活化, 活化的 C 因子有酰基化酶活性, 可激活 B 因子。B 因子进一步将前凝固酶活化为凝固酶。这一丝氨酸蛋白酶的级联活化最后使凝固蛋白原转化为凝固蛋白凝胶。

基于该原理利用鲎血细胞崩解物制成的鲎试剂, 已被广泛应用于 LPS 检测。这种细菌内毒素检测方法即“鲎试验法”自 1968 年提出后, 已被陆续纳入各国药典^[6]。

2.1.2 B 因子

B 因子是 C 因子的靶因子, 分子质量约 64 ku, 在活化的 C 因子的激活下, B 因子可将前凝固酶活化为凝固酶。

2.1.3 G 因子

G 因子是鲎凝血反应的另一起始点, 是一种特殊的丝氨酸蛋白酶原, 为异二聚体, 可被真菌细胞壁组分(1-3)-D-葡聚糖特异性激活^[7]。

2.1.4 前凝固酶

前凝固酶分子质量约 38 ku, 由 346 个氨基酸组成。可被活化的 B 因子或 G 因子激活为凝固酶, 凝固酶可进一步活化凝固蛋白原, 形成不可溶的凝固蛋白凝胶。

2.1.5 凝固蛋白原 (coagulogens)

目前已从美洲鲎、中国鲎及 2 种东南亚鲎体内获得 4 种凝固蛋白原。凝固蛋白原是鲎凝血系统的核心, 是凝血级联反应的靶蛋白, 与脊椎动物的纤维蛋白原功能相似, 但不同的是凝固蛋白原是在血细胞的大颗粒内而不存在于血浆中。凝固蛋白原是碱性多

肽链, 由 3 个片段 (A、B、C) 组成。在凝胶化过程中, C 肽被释放出来, 最终形成的凝固蛋白凝胶分子由 A、B 二条链以二硫键连接而成。

2.2 蛋白酶抑制剂 (protease inhibitors)

鲎血细胞大颗粒中含抑制蛋白酶活性的物质, 包括丝氨酸蛋白酶抑制因子 (serpins) 和半胱氨酸蛋白酶抑制因子 (cystatin)。

2.2.1 丝氨酸蛋白酶抑制因子

目前已从东方鲎的血细胞中分离得到 3 种丝氨酸蛋白酶抑制因子: LIC1、LIC2 和 LIC3, 三者的同源性较高, 与哺乳动物血浆的丝氨酸蛋白酶家族的结构、功能相近。LIC1 家族通过与丝氨酸蛋白酶形成 1:1 的复合物来抑制其活性。其中 LIC1 特异抑制 C 因子, LIC2 及 LIC3 则抑制 C 因子、G 因子及凝固酶的活性, 但 LIC2 对凝固酶的抑制作用较强, 而 LIC3 对 G 因子的抑制作用较强。由于凝血级联反应中活化的 C、G 因子以及凝固酶都是丝氨酸蛋白酶, 因此 LIC1 可能是作为凝血过程的调节因子, 防止不必要的凝血。

2.2.2 半胱氨酸蛋白酶抑制因子

鲎半胱氨酸蛋白酶抑制因子是一由 114 个氨基酸组成的单链蛋白, 相对分子量约为 12.6 ku, 可通过与半胱氨酸蛋白酶形成 1:1 非共价复合物而抑制其酶活性。cystatin 可能通过影响胞内外的蛋白质及多肽的分解代谢, 调节酶原、激素原的水解, 抵御微生物侵入正常组织, 对革兰氏阴性菌有强烈抑制作用。

2.3 凝集素 (lectins)

除通过凝固因子 C、G 等来识别外来入侵病原外, 鲎也可通过凝集素特异性地结合病原外露的糖链来识别入侵病原, 从而引发相应的凝血反应或免疫反应。目前人们已从鲎血淋巴中分离到大量的凝集素, 如 tachylectins、limunectin、limulin、polyphemins、LCRP 等, 其中对 tachylectins 的结构与功能研究的较为清楚。tachylectins 是一种从鲎血细胞或血浆中分离到的凝集素, 具有结合 LPS 及凝集细菌的特性。目前发现的 tachylectins 可分 5 种类型, 分别简称为 TL-1、TL-2、TL-3、TL-4、TL-5, 前四种分布于血细胞内, TL-5 分布于血浆中。除 TL-1 无凝血活性外, 其它 4 种 tachylectins 均对人 A 型红细胞具有凝血作用, 尤其是 TL-5 (又分为 A 和 B 两种亚型) 可凝集人所有类型的红细胞, 同时也是 5 种 tachylectins 中细菌凝集活性最

强的一种^[2, 8-10]。

2.4 抗菌肽

抗菌肽是动植物体内组成性表达或诱导产生的天然免疫物质,是机体先天性免疫的重要组成部分。抗菌肽对病原微生物具有选择性毒性,杀菌快速,广谱抗菌且微生物不易产生抗性^[11]。目前人们已从鲎血淋巴中分离得到多种抗菌肽。

2.4.1 tachypleins 与 polyphemus

tachypleins 与 polyphemus (统称为鲎素)是存在于鲎血淋巴颗粒细胞的小颗粒中的一族小分子多肽,由 17~18 个氨基酸组成,相对分子质量约 2.3 ku。tachyplein I 是 Nakamura 等于 1988 年从东方鲎血细胞酸性抽提物中分离得到的,随后的研究中又相继发现了 tachyplein II、III 以及存在于美洲鲎中的 tachypleins 类似物 polyphemus I、II。它们都是含 C 末端 - 精氨酸的阳离子肽,具两亲性,有 3 个串联的四肽重复,并在相同的位置,以 2 个分子内二硫键形成独特的刚性稳固结构。tachyplein I、II、III 及 polyphemus I、II 之间有很高的同源性和相似的抗菌、抗病毒作用,可强烈抑制革兰氏阴性菌、阳性菌和真菌的生长,对囊泡口炎病毒、流感病毒 A、人艾滋病病毒 HIV-1 等病毒也有强烈的抑制作用。其抗菌特性与其它一些抗菌肽如蝎毒 (magainins) 相类似,可能与其引发膜通透泄漏有关^[11, 12]。因此,基于鲎素独特的抗菌、抗病毒特性,目前国内外正着手以鲎素为先导化合物开发新的抗菌、抗病毒、抗肿瘤药物^[11, 13]。

2.4.2 tachycitin

tachycitin 是 Kawabata 等于 1996 年从鲎血细胞小颗粒中分离到的抗菌肽,对革兰氏阴性及阳性细菌的生长都有抑制作用。该抗菌肽由 73 个氨基酸组成,具几丁质结合活性,相对分子质量约为 8.5 ku,有 5 个分子内二硫键。tachycitin 自身的抗菌作用并不强,但可协同增强 big defensin 的抗菌活性^[2, 14]。

2.4.3 tachystatins

tachystatins 是一族分离自鲎血细胞小颗粒中的抗菌肽,相对分子质量约 6.5 ku,可分为 A、B、C 3 种类型,均具有几丁质结合能力,对革兰氏阴性菌、阳性菌以及真菌的生长均有抑制作用,其中以 tachystatin C 的抗菌活性最强^[2, 15, 16]。

2.4.4 抗 LPS 因子

抗 LPS 因子存在于大颗粒中,是 1982 年分离到

的抗菌性蛋白,由 128 个氨基酸组成,分子质量约 15 ku,可通过结合 LPS,特异性抑制 LPS 介导的 C 因子的激活,从而抑制凝血反应的激活,对革兰氏阴性细菌生长有抑制作用。

2.4.5 big defensin

big defensin 是 Saito 等于 1995 年从鲎血细胞大、小颗粒中分离到的抗菌肽,广泛存在于鲎的各种组织中,具有抗革兰氏阴性菌、阳性菌以及真菌的活性。big defensin 由 79 个氨基酸组成,其 C 末端的 37 个氨基酸序列与哺乳动物嗜中性粒白细胞的防御素相似,N 末端则有一个由 35 个氨基酸组成的疏水序列。这 2 个末端序列的抗菌活性有很大差异,前者具有更强的抗革兰氏阳性菌的活性,而后者则抗革兰氏阴性菌更为有效。研究表明, big defensin 很可能是在微生物入侵的情况下,作为防御分子与抗 LPS 因子、tachypleins 一起被分泌到细胞外体液中起协同抗菌作用^[2, 17, 18]。

2.5 其它防御分子

除以上免疫活性因子以外,还有许多其它防御分子参与了鲎先天性免疫应答反应和凝血反应,如 α_2 -巨球蛋白、C 反应蛋白 (CRPs)、D 因子、PAP、hemocyanin 等^[2]。

3 鲎血淋巴参与的免疫应答

与其它无脊椎动物相类似,鲎也缺乏获得性免疫系统,但具有多种属于先天性免疫的防御系统。该防御系统一般也分为细胞免疫和体液免疫,主要包括血淋巴凝聚、酚氧化酶原激活、细胞凝集、释放抗菌物质产生抗菌反应、活性氧形成以及吞噬反应,共同构成鲎的先天性免疫系统。该系统可对潜在病原表面的抗原作出免疫应答。因此需要有对各种病原上结构稍有不同的多种类型的抗原表位具有足够特异性识别能力的生物传感器,同时该传感器也必须能够区别“自己”和“异己”的抗原表位。在长期的生物演化历程中,鲎血细胞发展出了以丝氨酸蛋白酶原 C 因子和 G 因子为生物传感器的凝血系统。它们分别在革兰氏阴性细菌细胞壁主要成分 LPS 或真菌细胞壁主要组分 (1-3)-D-葡聚糖的作用下发生自催化活化。即当细菌或真菌侵入血淋巴时,血细胞探测到其表面的 LPS 或 (1-3)-D-葡聚糖,血细胞迅速进行胞吐作用,释放大、小颗粒内含物。C 因子或 G 因子这两个生物传感器被相应激活物激活,启动凝

血级联反应,最终使凝固蛋白原形成凝固蛋白凝胶。这种受病原激发的凝血反应不仅对止血非常重要,对宿主防御也非常关键。同时,鲎血细胞也可通过释放主要储存在大颗粒中的各种凝集素来识别病原上的不同的糖链,引发血细胞凝集,将入侵病原固定下来。另外鲎血细胞可从各个方向伸出伪足,将入侵病原吞噬。这些被免疫化的外源入侵者最终均被由血细胞释放的 tachyplexins、tachycitin、tachystatins 和 big defensin 等抗菌物质以及血浆中的类似哺乳动物补体系统的 CRPs 和 α_2 -巨球蛋白所杀灭,从而有效地防御外来病原的入侵^[1-5,10,18]。

4 结语

无脊椎动物血淋巴研究虽已有一百多年的历史^[1],但对其参与的免疫应答机制了解很少,也很不系统^[19,20]。唯一例外的是人们对鲎凝血系统及其先天性免疫系统的基础理论研究较为深入,而且以鲎凝血系统为基础建立的鲎试验法在细菌内毒素检测上应用非常广泛。另外从鲎血淋巴中分离的大量抗菌肽也是目前开发新型抗菌、抗病毒、抗肿瘤药物的研究热点。因此有关鲎血淋巴中的先天性免疫系统研究对当代免疫学研究及其应用具有重要意义。

参考文献:

[1] Sekiguchi K, Yamamichi Y, Seshimo H, *et al.* Biology of Horseshoe Crabs[M]. Tokyo: Science House, 1988.

[2] Iwanaga S. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab[J]. *Curr Opin Immunol*, 2002, **14**(1): 87- 95.

[3] Iwanaga S, Kawabata S. Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab [J]. *Front Biosci*, 1998, **3**:973- 984.

[4] Muta T, Iwanaga S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity[J]. *Curr Opin Immuno*, 1996, **8**:41 - 47.

[5] Muta T, Iwanaga S. Clotting and immune defense in Limulidae[J]. *Prog Mol Subcell Biol*, 1996, **15**:154- 189.

[6] Ding J L, Ho B. A new era in pyrogen testing[J]. *Trends Biotech*, 2001, **19**(8):277- 281.

[7] Takaki Y, Seki N, Kawabata S S, *et al.* Duplicated binding sites for (1-3)-beta-D-glucan in the horseshoe crab coagulation factor G: implications for a molecular basis of the pattern recognition in innate immunity[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(16):14 281- 14 287.

[8] Gokudan S, Muta T, Tsuda R, *et al.* Horseshoe crab acetyl group - recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(18):10 086- 10 091.

[9] Kawabata S, Iwanaga S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab[J]. *Develop Compara Immuno*, 1999, **23**(4- 5):391- 400.

[10] Kawabata S, Tsuda R. Molecular basis of non - self recognition by the horseshoe crab tachylectins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1572**:414- 421.

[11] Matsuzaki K. Why and how are peptide - lipid interactions utilized for self - defense? Mga gainins and tachyplexins as archetypes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1462**(1- 2):1- 10.

[12] Matsuzaki K, Yoneyama S, Fujii N, *et al.* Membrane permeabilization mechanisms of a cyclic antimicrobial peptide tachyplexin I, and its linear analog[J]. *Biochemistry*, 1997, **36**(32):9 799- 9 806.

[13] Chen YX, Xu XM, Hong S G, *et al.* RGD - tachyplexin inhibits tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2001, **61**(6): 2 434- 2 438.

[14] Suetake T, Tsuda S, Kawabata S, *et al.* Chitin - binding proteins in invertebrates and plants comprise a common chitin - binding structural motif[J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(24):17 929- 17 932.

[15] Osaki T, Omotezako M, Nagayama R, *et al.* Horseshoe crab hemocyte - derived antimicrobial polypeptides, tachystatins, with sequence similarity to spider neurotoxins [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(37):26 172- 2 6178.

[16] Fujitani N, Kawabata S, Osaki T, *et al.* Structure of the antimicrobial peptide tachystatin A[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(26):23 651- 23 657.

[17] Kawabata S, Saito T, Saeki K, *et al.* cDNA cloning, tissue distribution, and subcellular localization of horseshoe crab big defensin[J]. *Biol Chem*, 1997, **378**(3- 4): 289- 292.

[18] Iwanaga S, Kawabata S, Muta T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structure and functions[J]. *J Biochem*, 1998, **123**(1):1- 15.

[19] 章跃陵, 王三英, 彭宣宪. 虾类免疫学的基础和应用研究[J]. *海洋科学*, 2000, **24**(12):26- 29.

[20] 孙虎山, 李光友. 双壳贝类参与免疫防御的体液因子[J]. *海洋科学*, 2001, **25**(4):34- 36.

(本文编辑:张培新)