

鱼类体液免疫研究进展

DEVELOPMENT OF THE HUMORAL IMMUNOLOGY IN FISH

李 凌 吴灶和

(中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)

同其他的脊椎动物一样,鱼类的免疫系统包括体液免疫和细胞免疫。鱼类的体液免疫系统还包括非特异性免疫(主要由体液因子参与)和特异性免疫(主要由抗体分子参与)两个部分。本文就近阶段鱼类体液免疫方面的重要进展作一综述。

1 鱼类的非特异性体液免疫

鱼类的非特异性体液免疫的主要作用物质是血液或黏液中的体液因子,这些体液因子主要针对病原感染的早期阶段,是鱼类抵抗病原感染的第一防线。鱼类主要的非特异性体液因子有以下几种。

1.1 溶菌酶

溶菌酶是存在于许多鱼类的体表黏液、肠道黏液、血清和巨噬细胞中的一种水解酶。实验证明,溶菌酶参与了血清的非特异性防御过程,1973年 Fletcher 和 1987年 Siwicki 等分别在鲷科鱼类和鲤科鱼类中发现,溶菌酶的含量和活性都在免疫后大幅提高。溶菌酶还可与几丁质酶一起作用于细菌或其他病原的细胞壁,更有效地攻击病原。

血清中的溶菌酶来源于大量的中性粒细胞,单核细胞和吞噬细胞之中。Fänge 在 1976 年的研究中还发现溶菌酶存在于软骨鱼类造血组织白细胞的溶酶体之中。

1992 年, Takahashi 在鱼类的黏液中发现大量溶菌酶,同年 Itami 在

鱼类体表分离出两种类型不同的溶菌酶。但杨先乐认为黏液溶菌酶的来源尚不十分清楚。

1.2 补体

补体是机体非特异性免疫的重要部分。鱼类的补体大约有 11 种: C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9, 因子 D 和因子 B^[17]。鱼类补体对热敏感, 42 ~ 45 °C 下即失活。1988 年, Matsuyama 发现鱼类的抗原-抗体复合物不能激活哺乳动物的补体,说明鱼类补体在生物化学性质上与哺乳动物的补体并不一致。

鱼类的补体系统分为经典途径和旁路途径两种。Yano 等在 1988 年的实验证明, 鳟科, 鲤科等养殖鱼类的旁路途径的活性比哺乳动物的高出 5 ~ 60 倍,说明旁路途径可能对鱼类这样的变温动物更为重要,因其所处的环境(尤其是温度)可能不利于抗体产生所必须的蛋白质合成过程,而旁路途径不需要抗体即可激活补体反应,从而能更有效地发挥这一系统的非特异性免疫功能。

Yano 认为补体成分的发展有类似系统进化的特点。在无颌类中,如盲鳗,七鳃鳗,补体的主要成分只有旁路途径中的 C3 成分;在一些软骨鱼类中,则不存在经典途径,补体成分只含有旁路途径中的若干成分;而在硬骨鱼类中,经典和旁路途径的存在已为许多实验所证实,但硬骨鱼类的补体成分少

于哺乳动物的补体成分(哺乳类的补体成分有 30 多种)。

硬骨鱼类的补体在非特异性体液免疫中发挥重要作用:它能与抗体或细胞外毒素结合,促进溶菌;促进白细胞吞噬;促进炎症反应和淋巴细胞的趋化作用。

1.3 天然溶血素

天然溶血素是一种小分子量的蛋白质,能溶解异源红细胞,有广谱的抗原识别能力。天然溶血素存在于多种鱼类的天然血清中,对温度敏感,在冷、热条件下都可能失活。Ingram 认为,天然成分的溶血素和异源红细胞诱导的溶血素有相似的分子量,二者无法完全分离;而 Sakai 在分析了多种鱼类血清的溶血素后,发现随着进化程度的增加,血清中的天然溶血素的含量与补体的含量呈负相关关系,很可能说明不依赖抗体的溶血素和依赖抗体的“溶血素”(即补体)之间有着类似的性质和进化上的相关性。

1.4 C 反应性蛋白

C 反应性蛋白(CRP)是鱼类血清中的正常成分,它能使多种真菌、细菌和寄生虫中的含有糖类、磷酸酯的分子发生沉淀,有助于降低病原毒性,促进吞噬作用。1996 年, Srimal 等发现肢口纲中的蜃的

收稿日期:2000-08-09;

修回日期:2001-01-08

血清 CRP 分子可以结合在细菌外膜多糖成分中的磷酸乙醇胺 (PE) 和磷酸胆碱 (PC) 之上,而且鱼类血清中的 CRP 成分还可以利用 Ca^{2+} 依赖性的磷酸胆碱和 A 蛋白亲和层析技术分离^[6,8],CRP 的分子量约为 25 kD。

1.5 干扰素-1

血清中的 1- 型干扰素是鱼类主要的抗病毒感染因子, Alexander 在 1992 年的研究表明 1- 型干扰素主要由巨噬细胞分泌,可以被脂多糖 (LPS)、病毒和革兰氏阴性细菌等诱导。干扰素在血清中的含量极少,因此主要的分析方法多采用基因技术。1993 年, Tamai 测定了比目鱼的干扰素序列,发现其与哺乳动物的干扰素极不相似。利用 PCR 和同源克隆^[15]的方法,同样可以证明鱼类的 IF1 缺乏哺乳动物特有的 ICE 切割位点。

2 鱼类的特异性体液免疫

鱼类经抗原(病毒、细菌、寄生虫等)感染刺激后,会产生特异性的体液免疫反应。在特异性体液免疫中最重要的是体液中的免疫球蛋白分子(Ig)和 Ig 分泌细胞(B 细胞)。

2.1 免疫球蛋白(Ig)的系统演化

鱼的种类多样,演化地位十分复杂。有关鱼类免疫球蛋白的演化 Corbel 在 1975 曾作过阐述,但到目前为止,尚无最后结论。

在板鳃亚纲(Elamobranch)中,发现有两种不同类型的抗体分子: 7 S 和 19 S。它们的电泳性质和分子结构类似哺乳动物的 IgM。从个体发育的观点上发现 19 S 抗体只存在于鲨鱼的幼鱼阶段,而 7 S 抗体则在成鱼中占很大的比例。利用不同种类鲨鱼的 Ig 基因的可变区和恒定区,也可以分析鲨鱼抗体分子的演化和进化^[10]。

在软质目(Chondrostea)中, Pollara 分析匙嘴鲟的免疫球蛋白,发现完整 Ig 的分子量为 870 kD,用胍或尿素可分解成 H 链(75.3 kD)和 L 链(23.5 kD),H 链和 L 链的氨基酸顺序相似,而且 κ 链的组装类似于高等脊椎动物。Partula 在 1993 年运用电泳和免疫印迹技术,发现鲟鱼血清的 Ig 是由 (H₂L₂)₂ 组成的单体或多聚体。

在全头亚纲(Holostean)中,泥鱼的 Ig 有 14 S(643 kD) 和 6.5 S(146 kD) 两种分子,二者的抗原性相似,并且 14 S 分子可能是 7 S 分子的四聚体。Kobayashi 在 1984 年也报道在斑鳉的血清中分离出两种 Ig: 高分子量免疫球蛋白(18 S, 分子量 840 kD),类似于哺乳动物的 IgM; 低分子量的免疫球蛋白(8.9 S, 分子量 320 kD),被认为是不同于 IgM 的第二类免疫球蛋白。二者 H 链上有不同的抗原决定簇,显然不是同一分子。

硬骨鱼类(Teleost)免疫球蛋白的研究较为完善。目前所知,硬骨鱼类的血清中只存在一种 Ig: 即类似于哺乳动物 IgM 的抗体分子,它由两条 H 链, 两条 L 链组成一单体,再通过“J”链连成四聚体,沉淀系数为 19 S,16 S,还有 7 S 和 6.4 S 的单体类型,几乎所有的硬骨鱼类的类 IgM 抗体活性都受到 2- 巯基乙醇的影响。

另外,鱼类还存在有黏液免疫系统,但黏液 Ig 和血清 Ig 之间的关系以及黏液 Ig 的来源至今尚无定论。利用放射免疫标记,证明黏液 Ig 与血清 Ig 无代谢关系。Rombout 等在 1993 年也利用单克隆抗体技术证明皮肤黏液 Ig 和血清 Ig 在抗原特异性上不完全相同。但 Itami 1988 年的实验却证明黏液 Ig 和血清 Ig 具有一致性。Corbel 早在 1975 年就认为如果在黏液抗体中检测出分泌链(Fchain),很可能证明鱼

类黏液抗体在进化上是高等脊椎动物分泌型 IgA 和 IgM 系统的祖先。

2.2 鱼类免疫球蛋白分析技术的发展

鱼类的抗体存在于鱼类的血清、黏液当中,含量极少。在 20 世纪 70 年代之前多采用间接方法检测抗体分子的存在,如: 抗体凝集效价测定,双向琼脂扩散实验,免疫电泳,火箭免疫电泳等方法。但 these 方法都有不足之处: 如分辨率低,灵敏度差,只能检测沉淀抗体等。

70 年代后,分子生物学的实验技术被引入鱼类免疫球蛋白的分析当中,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE, PAGE)为测定免疫球蛋白的分子量提供了方法。在鲤鱼、鲫鱼、日本鲷^[1]等鱼类中,已经利用离子交换层析法,凝胶层析技术,等电聚焦电泳等方法,证明了不同的鱼类血清的 Ig 的理化性质类似于哺乳动物的 IgM。

80 年代后,酶联免疫吸附实验(ELISA)和单克隆抗体(MAb)技术开始发展,1987 年, Thuvander 等利用直接 ELISA 检测虹鳟中的抗弧菌抗体;而间接 ELISA 技术在检测鳗鱼、海鲈^[3]等鱼类的血清抗体中都得到了应用;间接 ELISA 技术 1996 年还被 Leiro 等人用于检测大比目鱼的抗寄生虫抗体。

鱼类的单克隆抗体在 1982 年开始出现,到目前为止,已经发展到将近 30 多种^[14]。鱼类的单克隆抗体多采用纯化的 Ig 或血清免疫小鼠,形成杂交瘤而得到,并且鱼类的 MAb 多数针对免疫球蛋白的重链。由于单克隆抗体的特异性, MAb 与 ELISA 技术的结合,在很大程度上提高了鱼类 Ig 分析的灵敏度和特异性。例如: 利用 MAb 的夹心 ELISA 技术,可以检测到虹鳟血清中的 0.12 mg/L 的抗体量和大比



目鱼血清中 0.16 mg/L 的抗体含量。1996 年, Magnadottir 等利用 Mab 检测鲑鱼血清 Ig 的表位多样性。Mab 还可用于分析血清 Ig 和黏液 Ig 的代谢相关性。1991 年, Waterstrat 等利用 Mab 与 ELISA 技术的结合发展出了新的 ELISAPLAQUE 技术, 以及 ELISPOT 技术^[4], 这些技术可以专一性地检测特定的 Ig 分泌 B 细胞的性质, 以及 B 细胞在胸腺、肾脏、鳃、肠等处的密度分布。

另外, 免疫印迹技术和 WEST BLOT(蛋白质杂交) 技术与 ELISA 的结合可以用来分析抗原-抗体的相互作用^[5]。

90 年代后, 鱼类免疫球蛋白的研究向基因方面发展, 有关鱼类 Ig 的基因结构和基因组特征的研究受到研究者的重视。Rast 等^[12]总结软骨鱼类免疫球蛋白的重链基因结构和特征时指出: IgH 基因由可变区(V_H), 特异区(D_H), 连接区(J_H) 和恒定区(C_H) 4 个独立功能区组成, 可以形成 3 个特定的基因簇: (1) 基因不连接的 V_H D_H J_H 基因; (2) 相互连接的 V_H, D_H, J_H 基因; (3) 不连接的 V_H 基因。硬骨鱼类中, Ghaffari 和 Loss^[7]利用 PCR 方法得到鲈鱼的 IgM 分子的轻链全长 cDNA, 指出硬骨鱼类的轻链基因有两种类型。而 Andersson E.^[12]研究了 Arctic charr 和虹鳟 IgM 重链基因家族, 认为二者具有进化上的稳定性。Magnadottir 等^[9]利用 SDS-PAGE 和 FACE 技术分析了鲑鱼 IgM 分子的糖链基因结构, 证明的糖链分子大都分布于 Ig 重链上, 并且都是 N 连接。此外, Ross 等还研究了鱼类 Ig 分子的重链基因转录过程^[13]。

2.3 B 细胞

B 细胞能分泌特异性的免疫球蛋白分子, 并且细胞表面还有 Ig₊ 的分子存在。抗 Ig 的单克隆抗体发展

后, 利用 Mab 作为探针, 可以成功地定位和定量淋巴或非淋巴器官中的 B 细胞。Havarstein 等 1988 年的实验证明 B 细胞分泌的 Ig 在分子量、分子结构和抗原性方面有很大的差别。Lobb 和 Olson 等人证明鲈鱼的 Ig 至少有两种不同类型的轻链分子和 4 种不同类型的重链分子。最近还发现类似 IgD 的重链分子的存在^[16]。

Ryczyn 等在 1996 年利用 B 细胞表面的 Ig₊ 分子的单克隆抗体检测到 B 细胞表面有类似于哺乳动物 CD₂₀, CD₄₀ 等与特异传导有关的信号分子。Vallejo 等认为 B 细胞本身还可以作为抗体传递细胞, 并参与受体介导的细胞内吞作用。

鱼类 B- 细胞不仅存在于鱼类的肾脏、脾脏中, 还存在于心脏、肠道和血液等处^[1]。Scapigliati 等^[14]全面阐述了 B- 细胞的个体发育。利用鼠抗鲤鱼免疫球蛋白的 Mab 和流式细胞仪技术, 可以证明膜 Ig₊ 的 B- 细胞最早出现于肾, 而后是胸腺、脾脏等处。运用荧光激活细胞分类技术 (FACS) 和抗 Ig 的单克隆抗体证明 Ig₊ 的 B- 细胞最早出现于头肾 (大约 2 周左右), 尔后出现于脾 (大约 4 周) 和外周血液中 (PBL, 大约 6~11 周)。说明体液免疫的完全成熟发生在两个月左右^[14]。

3 小结

随着我国集约化养殖的不断发展, 水产病害已经成为制约养殖业进一步发展的障碍, 深入研究鱼类的体液免疫机理, 可以为病害防治提供理论依据; 不仅如此, 在基础研究方面, 对体液免疫分子和细胞水平的深入研究, 也可以进一步完善和发展生物界的免疫进化。

当然, 鱼类体液免疫的研究还有许多尚未解决的问题, 例如: 血清和黏液的免疫球蛋白的代谢相

关性; 鱼类体液免疫的发展和进化; 鱼类体液免疫在细胞水平上的激发和传递过程以及鱼类免疫系统的基因研究等, 也许将成为今后鱼类免疫学的研究重点。🌿

参考文献

- 1 聂品. 水产学报, 1997, 21(1): 69~73
- 2 Andersson E. & Matsunaga T. Immunogenetics, 1998, 47: 272~277
- 3 Coeurdacier J. L. et al. Fish Shellfish Immunol., 1997, 7: 151~160
- 4 Davidson G. A. et al. Vet. Immunol. and Immunopathol., 1997, 58: 363~374
- 5 Dos Santos N. M. S. et al. Fish Shellfish Immunol., 1997, 7: 175~191
- 6 Funke C. et al. Vet. Immunol. Immunopathol., 1997, 59: 151~161
- 7 Ghaffari S. H. & Lobb C. J. J. Immunol., 1997, 159: 250~258
- 8 Lund V. & Olsson J. A. Dev. Comp. Immunol., 1998, 22: 185~194
- 9 Magnadottir B. et al. Comp. Biochem. and Physiol., 1997, 116B: 423~430
- 10 Marchalonis J. J. Immunol. Rev., 1998, 166: 103~122
- 11 Nishida H. Dev. Comp. Immunol., 1999, 17: 515~524
- 12 Rast J. P. et al. Immunogenetics, 1998, 47: 234~245
- 13 Ross D. A. et al. Immunol. Rev., 1998, 166: 143~151
- 14 Scapigliati G. et al. Aquaculture, 1999, 172: 3~28
- 15 Secombes C. J. et al. Fish Shellfish Immunol., 1999, 9: 335~343
- 16 Wilson M. R. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1997, 94: 4593~4597
- 17 Yano T. Nippon Suisan Gakkaishi, 1999, 65: 386~390

(本文编辑: 刘珊珊)