

贝类生态免疫研究进展^{*}

陈慕雁^{1 2} 杨红生¹

(¹中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(²中国科学院研究生院, 北京 100039)

几十年来, 我国海水贝类养殖业取得了巨大的成就, 2005 年贝类的养殖产量接近 1000 万[†], 占中国海水养殖总产量的 80%。到目前为止, 我国已开发利用贝类 20 多种, 建立了良种培育、人工育苗、养成和贝类引种等关键技术。但亟待解决的种质、病害与环境等关键问题也日趋严重, 包括: 缺乏系统研究和海岸带整体战略意识; 养殖环境恶化, 局部生态系统失衡; 过度密集养殖区病害肆虐; 种质衰退, 抗逆能力不足等。特别是病害方面目前仍未找到十分有效的防治手段。从有机体本身的免疫系统入手, 研究有机体的免疫防御机制与环境之间的相互作用, 探究联系整个系统的内在作用机制及有机体在生态免疫应答过程中的能量分配模式, 从生态免疫的角度来探究贝类大规模死亡的原因, 为病害的防治及种质的优化提供长久的生态良策, 具有重要的理论和实践意义。

生态免疫学 (Ecological Immunology) 是一个正在迅速兴起的将生态和免疫相结合的交叉领域, 主要研究的是生态因子引起和保持有机体免疫系统的变异以及协调宿主和病原体的内在作用机制的整个微进化过程。生态免疫的基本原则是宿主对免疫应答要付出昂贵的代价, 包括保持和利用免疫系统所付出的生理成本和宿主在对抗病原体时所付出的代价 (Rolff et al., 2003)。生态免疫学的快速发展将为人类开展疾病免疫防治提供新的思路。

目前, 生态免疫领域的研究重点开始从脊椎动物转向具有更广的生态内涵的无脊椎动物的生态免疫 (Rolff et al., 2002; Schmid-Hempel et al., 2003)。由于无脊椎动物天然免疫系统内在机制简单, 其免疫系统对生态环境的改变和生理扰动具有高度的敏感性, 从而成为重要的研究对象, 其中贝类就很有代表性。已有大量的研究发现影响贝类免疫系统的生物及环境因子包括原生动物感染 (Anderson et al., 1995)、细菌感染 (Bramble et al., 1997)、盐度和温度的改变 (Abele et al., 2002; Hegaret et al., 2003; Liu et al., 2004; Monari et al., 2006; Gagnaire et al., 2006) 以及缺氧 (Abele-Oeschger and Oeschger, 1995; Panpanin et al., 2002; Matozzo et al., 2005; Monari et al., 2005) 等, 贝类已经成为生态免疫研究很好的模式动物 (Chu et al., 2000)。

通信作者: 杨红生, 男, 博士生导师, 现从事海洋水产与海洋环境研究; Email: hshyang@ms.qdio.ac.cn

一、贝类免疫系统对环境胁迫因子的响应

贝类为活动性较差的动物,环境的任何改变,不管是暂时的、重复性的还是长期的变化一般都会对其产生影响。胁迫因子通常有双重作用:一方面干扰生物体的内稳态;另一方面激发生物体产生一系列的生理和行为反应并通过这些反应来适应或克服这一威胁(Chrousos et al., 1992)。事实上,任何有机体本身所拥有的能量是有限的,对胁迫所产生的应激反应势必会消耗其中的部分能量,降低其对免疫应答的成本的投入,从而影响整个免疫系统的功能。此时,脆弱的免疫系统为病原体的入侵和繁殖提供了好时机,贝类的疾病往往与环境胁迫并发,最终导致了贝类的大规模死亡。

1. 应激激素与免疫抑制

内分泌系统、神经系统和免疫系统之间的相互调节关系同时存在于低等和高等的脊椎动物体内。神经内分泌免疫轴是保持动物内稳态的关键因素,能够保证当认知刺激被中央神经系统识别后,信息通过神经递质传递到免疫细胞,之后出现了免疫功能的适应性(Chrousos et al., 1992; Blalock et al., 1994)。贝被称作是“流动脑子”的贝类血细胞则同时兼容了免疫内分泌反应(Ottaviani et al., 1997 a),在贝类接受非特异性刺激时,首先引发促肾上腺皮质释放激素(CRH)促肾上腺皮质激素(ACH)生物胺神经内分泌轴的调控作用,分泌以儿茶酚胺类物质为主的应激激素(主要由去甲肾上腺素,肾上腺素和多巴胺组成,属单胺类神经递质)(Ottaviani et al., 1997 b)。这些信号物质在血细胞的微环境中循环,直接或间接作用于免疫系统,影响各免疫效应因子的活性,刺激或抑制其免疫功能。

目前关于儿茶酚胺类物质对贝类免疫系统的影响的内在机制的研究还很少,国内几乎未见相关的报道。Lacoste等(2001 a, b)研究发现,生理浓度在 $0.1 \mu\text{M}$ 以上的去甲肾上腺素对血细胞的吞噬作用和呼吸爆发活性均具有剂量依赖性的抑制作用,并且去甲肾上腺素是通过 β 肾上腺受体-cAMP蛋白激酶 A 信号途径来调节这一作用的。此外,去甲肾上腺素还能够诱导牡蛎血细胞体外的凋亡(Lacoste et al., 2002)以及上调热休克蛋白(HSPs)基因的表达(Lacoste et al., 2001 c)。

2. 环境胁迫因子与免疫成本之间的联系

贝类对免疫系统部分成本的投入是以其负面生理影响为代价的(Moret et al., 2000; Fellowes et al., 2000; Poulsen et al., 2002)。虽然这些成本产生的内在机制目前还不明了(Zera et al., 2001),但无疑环境胁迫是产生负面影响的主要途径。环境胁迫可诱导应激激素的产生,使其作用于有机体,将能量从生理功能(包括繁殖、生长和免疫)中转移到可以帮助其克服威胁和生存的代谢和行为适应中去。由于有机体本身所拥有的能量是有限的,因而对免疫应答的成本投入随之降低,脆弱的免疫系统为病原体的入侵和繁殖提供了良机,从而诱导了疾病的发生,最终导致生物体的大规模死亡(Chrousos et al., 1992; Wendelaar et al., 1997)。

1) 环境胁迫对贝类血细胞免疫功能的影响

贝类血细胞在营养运输、伤口修复以及代谢产物和污染物的清除等方面都具有重要的作用 (Feng 1988)。其细胞免疫系统的主要防御手段是血细胞的吞噬作用, 并且贝类血细胞如同哺乳动物的吞噬细胞一样可利用呼吸爆发对刺激 (包括免疫诱导剂的诱导) 做出响应, 这已在许多贝类的血细胞研究中报道过 (Roch et al., 1999; Arumugam et al., 2000; Tafalla et al., 2003)。

贝类对环境胁迫的应激反应能力在很大程度上取决于血细胞的浓度、成活率及血细胞免疫功能。大量的研究表明, 血细胞浓度和血细胞吞噬活性对温度的变化很敏感 (Monari et al., 2006; Gagnaire et al., 2006)。无论是慢性或急性升温胁迫都会诱导血细胞浓度的升高并降低血细胞的吞噬活性 (Fisher 1987; Cheng et al., 2004; Liu et al., 2004; Monari et al., 2006)。这些研究表明高温胁迫有可能通过控制细胞表面的受体数量来影响其吞噬活性。美洲牡蛎血细胞的死亡率在升温胁迫下也呈升高的趋势, 而血细胞的凝集作用却没有显著改变 (Hégaré et al., 2003); 这可能是由于温度胁迫致使存活细胞清除死亡细胞碎片的能力有所下降造成的。同样血细胞的呼吸爆发产物也在高温胁迫下呈现升高的趋势 (Abele et al., 2002)。Hégaré等 (2003) 利用流式细胞仪的研究结果还进一步发现了以颗粒细胞的呼吸爆发活性的变化最为明显。

血细胞的浓度还会随着盐度的升高而升高, 这也许是因为盐度的升高所导致的细胞增生, 或是血淋巴中水分的流失以补充渗透压调节所需的媒介所造成的 (Pipe 1995)。Cheng等 (2004 b) 研究表明, 血细胞的呼吸爆发、吞噬活性和清除效率等功能在低盐和高盐的情况下均呈显著的降低趋势。马洪明等也研究发现, 栉孔扇贝对急性降盐胁迫的耐受性较差, 盐度突降会严重损害栉孔扇贝抵抗感染的能力 (Ma et al., 2006)。

贝类养殖环境的恶化以及长时间的运输过程, 往往会导致其处于缺氧状态, 而严重的缺氧会对贝类的整个健康状况产生负面影响 (Justic et al., 1987; Degobbis et al., 1989)。在缺氧胁迫下, 贝类血细胞的比容, 吸附能力以及吞噬活性都会出现显著的降低 (Pampanin et al., 2002; Matozzo et al., 2005)。血细胞的比容是细胞增殖的标识, 而缺氧胁迫所导致的细胞溶解严重影响了血细胞的增殖能力, 同时加快了血细胞进入组织的速度 (Marigomez et al., 1990; Suresh et al., 1990; Pipe et al., 1995)。血细胞的吸附能力通常是与细胞膜的完整性和细胞骨骼的构成相关的 (Alvarez et al., 1992)。吸附作用需要来源于吸附分子和配合基相互作用的信号的转导, 进而引发能量依赖性的细胞形态的改变 (Hynes et al., 1999), 因而血细胞吸附能力的降低反应了缺氧胁迫下血细胞的低能储备。同样地, 缺氧胁迫下吞噬作用所需要的 ATP 的缺失以及循环吞噬细胞浓度的降低, 则是导致血细胞吞噬活性显著降低的原因 (Pampanin et al., 2002)。如果适当时间内的胁迫被解除后, 各项免疫指标则会恢复到初始的水平 (Pannunzio et al., 1998; Pampanin et al., 2002; Matozzo et al., 2005)。

机械胁迫是养殖贝类在其生长和运输过程中经常遇到的, 当贝类遭遇机械胁迫时, 由于占血细胞绝大多数的透明细胞的大批死亡, 血细胞浓度呈明显的降低趋势 (Lacoste et al., 2001; Hégaré et al., 2003), 并且可迁移的细胞, 吞噬细胞以及细胞内外超氧

化物阴离子的浓度也出现了显著的降低, 在胁迫解除后各项免疫指标均又出现了一个明显的恢复过程 (Lacoste et al., 2001 d)。这在 *Chamelea gallina* 的研究中也有相同的发现 (Ballarin et al., 2003)。此外, 生殖压力也会导致牡蛎血细胞吞噬活性的迅速降低 (Dittman et al., 2001), 并且生殖胁迫能够抑制 *Ch. gallina* 血细胞的免疫活性及其对干露的耐受力 (Matozzo et al., 2005)。

对于环境因子所造成的免疫抑制, 有假设认为是这些血细胞在应激过程中重新分配了生物能量资源, 大部分血细胞离开主要的血淋巴管而输送营养进入与适应环境和生存息息相关的特定的组织中。在胁迫解除后, 贝类首先经历了一段免疫抑制期, 而后免疫活性又重新显著地升高, 这可能是生物体对能量的又一次重新分配, 对免疫系统重新投入成本, 作为对免疫抑制期成本降低的一种补偿 (Lacoste et al., 2002; Malham et al., 2003)。

2) 环境胁迫对贝类体液免疫因子的影响

贝类只有非特异性免疫系统即天然免疫系统, 而大多数体液因子是由血细胞分泌到血浆中后起防御作用的, 所以贝类的细胞免疫和体液免疫是相互联系, 不可分割的。体液免疫的手段主要包括溶酶体酶、凝集素、外源凝集素和抗菌肽等。其中溶酶体酶 (β 葡萄糖苷酸酶, 酸性、碱性磷酸酶, 脂肪酶, 氨基肽酶等) 主要存在于血细胞的颗粒中, 并在吞噬过程中通过脱颗粒的方式从血细胞中释放到血清中 (Pipe 1990)。

目前这方面的研究主要集中在酸性磷酸酶和 β 葡萄糖苷酸酶的测定上。酸性磷酸酶和 β 葡萄糖苷酸酶是后生动物体内典型的溶酶体酶, 并且它们的活性水平受到胁迫状态的调控, 在慢性的升温胁迫下, 海湾扇贝和栉孔扇贝的血清中碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性升高并在 25℃ 时达到峰值, 随后降低 (Liu et al., 2004), 这和血细胞的浓度变化趋势相同。在缺氧胁迫下, 酸性磷酸酶呈阳性的血细胞的数量显著的降低, 而具有 β 葡萄糖苷酸酶的血细胞的数量则显著增加, 酸性磷酸酶活性的降低可能是由于缺氧胁迫所引起的溶酶体完整性的改变导致代谢作用受到抑制所造成的。相反, β 葡萄糖苷酸酶活性的升高则可能是其对厌氧菌增殖的响应 (Matozzo et al., 2005)。Ballarin 等 (2003) 研究发现在机械胁迫下, 这两种酶均表现出了和缺氧胁迫下相似的变化趋势。

过多的呼吸爆发产物对寄主细胞和组织都造成了很大的伤害, 因而需氧有机体在进化过程中产生了一套抗氧化剂系统以保护有机体免受超氧化物的伤害, 在这套系统中, SOD 是第一道也是最重要的防线。缺氧胁迫能够严重地影响 NADPH 氧化酶复合体, 引起蛤仔血细胞中超氧化物的降低, 最终导致 *C. gallina* 血细胞溶胞产物中的 (Cu/Zn)-SOD 和 Mn-SOD 的活性均显著地降低 (Monari et al., 2005)。作者在研究中还发现, 在缺氧胁迫初期, 栉孔扇贝血细胞溶胞产物中 SOD 酶活性略呈升高趋势, 这可能是急性胁迫下的一种应激反应 (Chen et al., 2006)。

二、贝类免疫系统与病原生物之间的相互关系

1. 贝类免疫系统对病原体胁迫的直接响应

目前在此方面多数以贝类-帕金森之间模式的研究为主

许多研究发现, 感染帕金虫的血细胞的构造和功能形态上的改变导致了血细胞吞噬酵母细胞的能力受损 (Beckmann et al., 1992)。然而, 要确定帕金虫的感染对贝类血细胞浓度的影响是困难的, 其影响随种类和感染程度而定。研究表明, 被帕金虫 *P. marinus* 感染的牡蛎, 其血淋巴中的血细胞浓度有增加的趋势 (Anderson et al., 1992, 1995; La Peyre et al., 1995 a), 而在严重感染 *P. atlanticus* 的蛤仔体内, 循环血细胞的数量却有降低的趋势 (Ordas et al., 2000)。这可能是由于帕金虫细胞能够在寄主的血细胞内生长和增殖, 最终导致血细胞膜的破裂, 或是大量血细胞聚集到感染的组织中以形成包囊而被消灭, 从而导致循环血细胞的浓度下降 (Perkins, 1996)。

同样地, 帕金虫感染对贝类体内溶酶体酶的影响也因不同的寄主 寄生虫模式而异, 并且不同学者的研究结果也不尽一致。有学者研究表明, 在感染了 *P. atlanticus* 和未感染的毯壳蛤体内, 其溶酶体酶的浓度几乎不存在差异, 这在感染了 *P. marinus* 的牡蛎体内也有相同的发现 (Chu et al., 1989, 1993 b)。然而另有一些学者却发现感染的牡蛎体内溶酶体酶呈现轻微的降低趋势 (La Peyre et al., 1995 a)。但也有报道被 *P. marinus* 感染的牡蛎血清中溶酶体酶浓度的升高 (Ordas et al., 2000), 这种升高的趋势可能是由于帕金虫在血细胞内的增殖, 从而导致积聚在血细胞吞噬小体内的溶酶体酶因血细胞破裂而释放进入血清中 (Maginot et al., 1989; Beckmann et al., 1992)。

目前已经在许多软体动物体内发现凝集素, 其主要存在于贝类血淋巴和血细胞膜中, 它们对贝类的防御机制具有一种特殊的调理作用, 能够提高血细胞对外来细胞的识别能力 (Chu et al., 1988)。贝类体内血清中的凝集素水平, 无论是体外的 (Fisher et al., 1992), 还是体内的 (Chu et al., 1993 a, b), 都与帕金虫 *P. marinus* 的感染程度无关。然而, 被 *P. atlanticus* 感染的毯壳蛤的血细胞的凝集效价以及抗菌肽的活性却明显的高于未感染个体 (Ordas et al., 2000)。

2. 环境胁迫对贝类 病原体之间作用机制的调节

海洋无脊椎动物疾病的流行是受各种环境因子的控制的, 在环境胁迫下, 贝类重新调整内在的能量用以特殊的生理功能可能会削弱有机体对先前就存在的威胁的防御能力, 如潜伏的病原体或侵入的微生物, 在这些环境因子中, 温度是影响疾病时空分布的主要因素 (Harvell et al., 1999)。然而目前温度对贝类 病原体之间的相互作用的内在调节机制尚不明了, 并且这种调节机制随着不同的寄主和病原体的模式而改变。

较高的环境温度会影响和调节血细胞及其体内激素的活性水平, 同时加快寄生虫的代谢活性。因此, 宿主对寄生虫的杀伤率往往难以和寄生虫的增殖速度相匹配 (Chu et al., 1993 b)。这在美洲牡蛎 *Crassostrea virginica* 和病原体 *Perkinsus marinus* 以及 *H. diversicolor superfecta* *V. parahaemolyticus* 的模式研究中得到了证实 (Chu et al., 1993 b; Cheng et al., 2004 a), 表明了高温下免疫能力的降低是导致寄主抗病力下降的主要因素 (Cheng et al., 2004 a)。而菲律宾蛤仔 *Vibrio tapetis* 模式却表现出不同的变化趋势; *Vibrio tapetis* 是一种对温度极其敏感的冷水性病原体, 在较高温下 (21℃) 其繁殖能力和发育速度受到严重抑制, 并且在此温度下, 菲律宾蛤仔血淋巴中的水解酶 (主要是亮氨酸氨基肽酶和溶酶体酶) 的活性较强, 血细胞的成活率较高, 吞噬功能较强, 具有较好的抗击病原

体的防御能力, 机体也更容易恢复, 使得病原体不再具备诱导宿主疾病的爆发和大规模死亡的能力, 从而为宿主对抗病原体提供了保障。

进一步的研究还发现, 在较高的环境温度下热休克蛋白 (HSPs) 表达的多样性也是促进 *P. marinus* Cr. virginica 模式中致病性的重要影响因子 (Tizard et al., 1995), 并可作为寄主免疫反应的激动剂 (Tamura et al., 1997; Zugel et al., 1999)。由于升温胁迫导致了呼吸爆发产物的升高, 其中羟基自由基、过氧化氢和过氧化亚硝酸盐在蛋白质变性过程中起着非常重要的作用, 多肽链的破坏引发了寄主和病原体内 HSP 的合成, 用以修复变性的蛋白质和保护各自的蛋白库免遭变性, 其中以 HSP70 对环境的扰动最为敏感。M. galloprovincialis 血细胞在吞噬 *Vibrio alginolyticus* 过程中发现显著的 70 kDa 的 HSP 的合成, 然而在吞噬 *Escherichia coli* 过程中却只能合成少量的 HSP70。这些结果表明, 软体动物和来自于不同环境的细菌之间的不同行为导致了不同的吞噬率, 并由此确认吞噬作用和 HSP 产物之间存在着联系 (Tiscar et al., 1998)。

在各种环境因素中, 盐度同样是贝类病害发生的重要控制因子。据报道, 由暖冬, 干旱以及潮流的剧烈运动等异常的气候导致的沿岸海域海水的盐度的异常, 可加剧贝类病害的发生 (Allan et al., 2001), 并且正常环境条件下的盐度变化对贝类寄生虫的毒性也有显著的影响 (Cheng et al., 2004 b)。盐度的改变通常是通过影响寄主的防御系统来诱导疾病的爆发 (Cheng et al., 2004 b), 在 *Vibrio parahaemolyticus* 感染实验中发现, 杂色鲍对 *Vibrio parahaemolyticus* 的易感性在低盐 (20‰, 25‰) 和高盐 (35‰) 的情况下均有明显的升高。

通常在养殖水体中由于未耗尽的食物和粪便等有机质的分解造成较高浓度的氨氮, 以及细菌对氨氮进行硝化作用的中间产物亚硝酸氮的积聚, 造成养殖水体低氧含量甚至缺氧 (Cheng et al., 2004 c)。据报道, 高浓度的氨氮对感染了 *Vibrio tapetis* 的杂色鲍的各免疫参数 (血细胞数目、酚氧化酶活性、吞噬活性和细菌清除率) 均表现出剂量依赖性的抑制作用, 并引起了疾病的爆发, 加剧感染个体的死亡率; 而浓度低至 0.96 mg/L 的亚硝酸氮就足以削弱感染细菌的杂色鲍的免疫系统 (Cheng et al., 2004 d)。在缺氧胁迫下 (尤其是在静态的系统中) 则能够诱导贝类体内细菌的增殖 (De Zwaan et al., 2001 a, b), 从而加剧寄主对病原体的易感性。

3 贝类免疫系统与病原体之间的内在作用机制

La Peyre 等 (1995 b) 在体外培养的 *P. marinus* 分泌的细胞外蛋白中发现了一种类似于糜蛋白酶的丝氨酸蛋白酶, 它在细胞培养不久就能产生, 且在较高 pH 下十分稳定。研究表明这些蛋白酶参与了帕金虫感染贝类组织的坏死反应, 能够诱导血细胞膜的特性如渗透性和构造的改变, 降解基质和基膜的胞外成分, 消化血淋巴蛋白, 为寄生虫提供适当的营养, 便利寄生虫入侵, 危及寄主的防御系统 (La Peyre et al., 1996; Garreis et al., 1996; Anderson et al., 1996)。事实证明, 帕金虫的胞外产物能够降低毯壳蛤和贻贝血细胞的成活率 (Ordas et al., 1999)。但有一个问题值得思考, 即寄生虫在体外培养所分泌的产物是否等同于寄生虫侵入寄主组织后在与寄主的防御系统相互作用过程中所释放的物质。

胞外产物对血细胞的免疫功能同样具有显著的影响, *P. atlanticus*的胞外产物对缢壳蛤和贻贝的吞噬活性具有抑制作用 (Ordas et al., 1999)。同样 *P. marinus*的胞外产物和蛋白酶可以抑制牡蛎血细胞的运动能力, 而 *P. marinus*本身却能刺激血细胞的运动能力 (Garreis et al., 1996)。这种明显的矛盾, 可能是由于细胞表面的影响因子促进帕金虫识别并进入到血淋巴中, 且在血淋巴细胞内进行繁殖 (Vasta et al., 1995)。牡蛎在经过 *P. marinus*的胞外产物处理后, 感染程度加深 (Garreis et al., 1996)。

*P. atlanticus*胞外产物中酶活最显著的是酸性磷酸酶, 它能够通过引起磷蛋白质的分解和抑制超氧化物阴离子产物来改变寄主的细胞防御反应, 通过干扰寄主氧依赖性的杀伤机制, 帮助寄生虫存活 (Anderson et al., 1996)。这在其他的一些寄生虫的研究中有相同的发现 (Remaley et al., 1984; Hervio et al., 1991; Volev et al., 1994, 1996)。

寄主对细菌类寄生虫的易感性同样取决于许多不同的因素, 包括避免和吞噬血细胞的接触, 抑制吞噬细胞的活性, 或者产生能够杀伤血细胞的成分 (Cheng et al., 1975)。细菌的大多数胞外产物也都含有蛋白酶, 能够通过引起寄主组织的严重损伤来便利其繁殖, 从而降解寄主的蛋白以提供细菌生长所需的营养。此外, 胞外产物还能够通过降解免疫球蛋白和补体系统的组分来对抗寄主的防御系统 (Maeda et al., 1996)。

*V. anguillarum*和 *V. anguillarum*细胞能够诱导贻贝 *Mytilus edulis*血细胞伪足的缺失并使细胞圆化 (Notorge et al., 1990; Lane et al., 1999)。同样 Choque 等 (2003)将菲律宾蛤仔 *R. philippinarum*的血细胞以 *V. anguillarum*活细胞抚育 3 h 后, 可导致血细胞吸附能力的显著降低; 这在 *V. anguillarum*胞外产物对牡蛎血细胞吸附能力和吞噬活性影响的研究中有相同的发现 (Bayne et al., 1990)。

贝类的呼吸爆发产物通常是和血细胞的吞噬作用相联系的 (Chu et al., 2000; Torreilles et al., 1996), 因而, 血细胞吞噬活性被抑制的过程同样会导致随后的呼吸爆发产物的降低。许多已知是贝类致病菌的不同品系的 *Vibrio*能够抑制由酵母诱导的血细胞的呼吸爆发活性 (Lambert et al., 2003)。然而在 *V. anguillarum*的胞外产物对寄主免疫功能作用机制的研究中却有与之前的研究相矛盾的发现, 其胞外产物对牡蛎血细胞呼吸爆发产物具有明显的剂量依赖性的激活作用。这可能是由于呼吸爆发产物的过度激活提高了细胞中的细胞毒素, 这就允许 *V. anguillarum*细胞攻克牡蛎的细胞防御系统, 从而便利寄生虫在寄主组织中的发育和分布 (Yannick et al., 2005)。

过多的呼吸爆发产物同样对细菌细胞也会表现出相同的毒性。然而, 大部分细菌具有以酶的形式存在的抗氧化剂 (如超氧化物歧化酶, 过氧化物酶) (Yannick et al., 2005)。许多好氧菌通过制造过氧化氢酶来中和升高的过氧化氢。Bramble 等 (1997)同样认为 *V. anguillarum*产生的过氧化氢酶能够抑制牡蛎血细胞呼吸爆发产生的化学发光反应。

进一步的研究还发现将血细胞暴露在活细菌的诱导下, 其血细胞参数并非一定发生改变。如 *V. anguillarum*只有在细菌的快速生长期才能分泌血细胞吸附和吞噬活性的抑制因子 (Yannick et al., 2005)。

三、研究展望

生态免疫学的研究引发了许多重要的生物学问题的探索，对贝类的研究能使我们进一步地了解生态免疫学的内在作用机制，因而本项目将会围绕以下几个科学问题系统地展开。

1. 神经内分泌 免疫网络对环境胁迫的应答

免疫响应是细胞之间相互作用的综合反应。整个神经内分泌 免疫网络对环境胁迫的应答值得关注，包括环境胁迫对宿主神经内分泌激素水平和细胞、体液免疫因子的影响，神经内分泌激素变化对免疫调控的介导途径和作用机制，以及环境胁迫前后免疫相关基因（如 β 葡糖苷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶、酸性磷酸酶与酚氧化酶基因等）的表达与调控。构建环境胁迫因子 应激激素 免疫效应因子三者之间的耦合关系。

2. 环境胁迫中有机体能量的重新分配机制

有机体在面临环境胁迫时能量的重新分配机制，包括对免疫功能的成本投入，以及免疫功能和其他生理功能之间的能量互补机制等。如不同年龄段、生殖周期（如性腺成熟期、产卵期等）亲贝免疫力的差异及其内在作用机制，养殖密度对养成期扇贝免疫力以及能量代谢的影响及其两者之间的内在联系，建立有机体在环境胁迫下的能量分配模式。

3. 贝类寄主的免疫启动效应 (Immunological Priming)

所谓免疫启动效应，是指遭遇过病原体感染的无脊椎动物或者其后代在再次遭遇相同的病原体时，其抵御该病原体的免疫力有所提高。这种病害防御机制在功能上非常类似于脊椎动物的获得性免疫反应。而这种机制是否同样存在于贝类体内，这一效应如何作用于病原体，以及环境因子在这一过程中所起的作用，将是今后贝类生态免疫研究的一个重要方向。

参考文献

- 马洪明, 刘晓伟, 麦康森等. 2006. 盐度突降对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 抗病力指标的影响. 高技术通信, 16(7): 746 ~ 751
- Abele D, Heise K, Bärner H, Q. Puntaulo S. 2002. Temperature dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. J. Exp. Biol., 205: 1831 ~ 1841
- Abele-Oeschger D, Oeschger R. 1995. Hypoxia-induced autooxidation of haemoglobin in the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulphide. J. exp. Mar. Biol. Ecol., 187: 63 ~ 80
- Allen B, Ashm-Alcox K A, Ford S E. 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. Comp. Dev. Comp. Immunol., 25: 365 ~ 375
- Alvarez M R, Friedl F E. 1992. Effects of fungicide on *in vitro* hemocyte viability, phagocytosis and attachment in the

- American oyster *Crassostrea virginica* Aquaculture **107**: 135 ~ 140
- Anderson R S 1996 Interaction of *Perkinsus marinus* with humoral factors and hemocytes of *Crassostrea virginica* J Shellfish Res, **15**: 127 ~ 134
- Anderson R S, Burreson E M, Paynter K T 1995 Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus* J Invertebr Pathol, **66**: 82 ~ 89
- Anderson R S, Paynter K T, Burreson E M 1992 Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus* Biol Bull, **183**: 476 ~ 481
- Arumugam M, Rameshbabu B, Torrealba J, Roch P 2000 In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes upon incubation with FMA or laminarin or during yeast phagocytosis Eur J Cell Biol, **79**: 513 ~ 519
- Balalari L, Pampani D M, Marini M G 2003 Mechanical disturbance affects haemocyte functionality in the venus clam *Chamelea gallina*, Comp Biochem Phys A **136**: 631 ~ 640
- Bayne C J 1990 Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates: Phagocytosis appears to be an ancient line of defence Bioscience **40**: 723 ~ 731
- Beckmann N, Morse M P, Moore C M 1992 Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria* J Invertebr Pathol, **59**: 124 ~ 132
- Black J E 1994 The syntax of immune neuroendocrine communication Immunol Today **15**: 504 ~ 511
- Bramble L, Anderson R S 1997 Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum* Dev Comp Immunol, **21**: 337 ~ 348
- Chen M Y, Yang H S, Delaporte M, Zhao S J, Xing K, 2006 Immune responses of Zhikong scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures IX international congress on medical and applied malacology Qingdao China
- Cheng T C 1975 Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes Ann NY Acad Sci, **266**: 343 ~ 379
- Cheng W, Hsiao I S, Hsu C H, Chen J C 2004a Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* Fish Shellfish Immunol, **17**: 235 ~ 243
- Cheng W, Hsiao I S, Hsu C H, et al 2004c Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* Fish Shellfish Immunol, **17**: 193 ~ 202
- Cheng W, Hsiao I S, Hsu C H, et al 2004d Effect of nitrite on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* Dis Aquat Org, **60**: 157 ~ 164
- Cheng W, Juan F M, Chen J C 2004b The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels Fish Shellfish Immunol, **16**: 295 ~ 306
- Choquet G, Soudant P, Lambert C, et al 2003 Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis* Dis Aquat Organ, **57**: 109 ~ 116
- Christine P, Basson A, Radouane O 2004 Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* Dis Aquat Org **59**: 249 ~ 262
- Chrousos G P, Gold P W 1992 The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioural homeostasis J Am Med Assoc, **267**: 1244 ~ 1252
- Chu F L 1988 Humoral defense factors in marine bivalves In Disease processes in marine bivalve mollusks Ed Fisher W S American fisheries society special publication **18**: 178 ~ 188
- Chu F L, E Defense mechanisms of marine bivalves In Fingerman M Nagabhushanam R editors 2000 Recent Advances in Marine Biotechnology Immunobiology and Pathology Vol 5, Enfield NH Plymouth UK Science Publishers 1 ~ 42
- Chu F L, E, La Peyre J F 1993b *Perkinsus marinus* susceptibility and defense related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica* temperature effects Dis Aquat Org, **16**: 223 ~ 234

- Chū F L E, La Peyre J F, Bureson C S 1993 a. Perkinsus marinus infection and potential defense-related activities in Eastern oysters *Crassostrea virginica*: salinity effects. *J Invertebr Pathol*, **62**: 226 ~ 232
- Chū F L E, Peyre J F 1989. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). *J Invertebr Pathol*, **54**: 224 ~ 232
- De Zwaan A, Baharç J M F 2001 b. Studies on the causes of mortality of the estuarine bivalve *Macoma balthica* under conditions of (near) anoxia. *Mar Biol*, **138**: 1021 ~ 1028
- De Zwaan A, Cattani O, Vitaji G, Corresi P 2001 a. Influence of incubation conditions on the anoxic survival of marine bivalves: Static and semi-static incubations. *Mar Ecol Prog Ser*, **211**: 169 ~ 179
- DeGobbiş D 1989. Increased eutrophication of the Northern Adriatic Sea. *Second Act Mar Poll Bull*, **20**: 452 ~ 457
- Ditman D E, Ford S E, Padilla D K 2001. Effects of *Perkinsus marinus* on reproduction and condition of the eastern oyster *Crassostrea virginica* depend on timing. *J Shellfish Res*, **20**: 1025 ~ 1034
- Fellowes M D E, Godfrey H C J 2000. The evolutionary ecology of resistance to parasites by *Drosophila*. *Heredity* **84**: 1 ~ 8
- Feng S Y 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. In W. S. Fisher (ed.), *Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs*. Fisheries Society Special Publication 18. Bethesda Maryland: 153 ~ 168
- Fisher W. S, Auffret M, Babuet G 1987. Response of European flat oyster (*Ostrea edulis*) haemocytes to acute salinity and temperature changes. *Aquaculture* **67**: 179 ~ 190
- Fisher W. S, Gauthier J D, Winstead J T 1992. Infection intensity of *Perkinsus marinus* disease in *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) from the Gulf of Mexico maintained under different laboratory conditions. *J Shellfish Res*, **11**: 263 ~ 269
- Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, et al 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol*, **20**: 536 ~ 547
- Garreis K A, La Peyre J F, and Faisal M 1996. The effects of *Perkinsus marinus* extracellular products and purified proteases on oyster defence parameters in vitro. *Fish Shellfish Immunol*, **6**: 581 ~ 597
- Harvell C D, Kirk K, Burkholder J M, Colwell R, and 9 others 1999. Emerging marine diseases—climate links and anthropogenic factors. *Science* **285**: 1505 ~ 1510
- Hervio D, Chagot D, Godin P, Grizel H, Mialhe E 1991. Localization and characterization of acid phosphatase activity in Bonamia ostreae (Ascaesporax) an intrahemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Dis Aquat Org*, **12**: 67 ~ 70
- Hynes R O 1999. Cell adhesion: old and new questions. *TIBS* **24**: 33 ~ 37
- Hegaret H, Wikfors G H, Soudant P 2003. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters *Crassostrea virginica* subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis and respiratory burst. *J Exp Mar Biol Ecol*, **293**: 249 ~ 265
- Justic D, 1987. Long term eutrophication of the Northern Adriatic Sea. *Mar Poll Bull*, **18**: 284 ~ 287
- La Peyre J F, Chū F L E, Meyers J M 1995 a. Haemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish Shellfish Immunol*, **5**: 179 ~ 190
- La Peyre J F, Faisal M 1995 b. *Perkinsus marinus* produces extracellular proteolytic factor(s). *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, **15**: 1 ~ 4
- La Peyre J F, Yamaji H A, and Faisal M 1996. Contribution of *Perkinsus marinus* extracellular products in the infection of Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J Invertebr Pathol*, **68**: 312 ~ 313
- Lacoste A, Cuff A, Poulet S A 2002. P35-sensitive caspases, MAP kinase and Rho GTPase β -adrenergic induction of apoptosis in mollusk immune cells. *J Cell Sci*, **115** (4): 761 ~ 768
- Lacoste A, Mallham S K, Cuff A, et al 2001 a. Noradrenaline modulates oyster haemocyte phagocytosis via β -adrenergic receptor/cAMP signalling pathway. *Gen Comp Endocr*, **122**: 252 ~ 259
- Lacoste A, Mallham S K, Cuff A, et al 2001 b. Noradrenaline modulates haemocyte reactive oxygen species production

- vibrio-adrenergic receptor in the oyster *Crassostrea gigas*. *Gen. Comp. Endocr.*, **25**, 285~289
- Lacoste A., Malhan S. K., Cueff A., et al. 2001c. Noradrenaline and β -adrenergic signaling induce the hsp70 gene promoter in mollusk immune cells. *J. Cell Sci.*, **114** (19): 3557~3564
- Lacoste A., Malhan S. K., Cebart F., et al. 2001d. Stress induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.*, **26**, 1~9
- Lambert C., Soudant P., Chopuet G., et al. 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* haemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.*, **15**, 225~240
- Lane E., Birkbeck T. H. 1999. Toxicity of bacteria towards haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Living Resources*, **12**, 343~350
- Liu S. L., Jiang X. L., Hu X. K., et al. 2004. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farrieri* (Jones & Preston 1904). *Aquat. Res.*, **35** (7): 678~682
- Maeda H., Yanamoto T. 1996. Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **377**, 217~226
- Magnot N., Samain J. F., Daniel J. Y., et al. 1989. Kinetic properties of lysozyme from the digestive glands of *Ruditapes philippinarum*. *Oceanis*, **15**, 451~464
- Malhan S. K., Lacoste A., Cebart F., et al. 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusk *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Zool.*, **295A**, 136~144
- Margomez I., Cañaville M. P., Anzueto E. 1990. Histopathology of the digestive gland/gonad complex of the marine probranch *Littorina littorina* exposed to cadmium. *Dis. Aquat. Org.*, **9**, 229~238
- Mauro V., Da Rós L., Ballarín L., et al. 2003. Functional responses of haemocytes in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice: fishing impact and seasonal variations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **60**, 949~958
- Mauro V., Monari M., Foschi J., et al. 2005. Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina* I: Effects on immune responses. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **325**, 163~174
- Monari M., Mauro V., Foschi J., et al. 2006. Effects of high temperature on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish Shellfish Immunol.*, 1~17
- Monari M., Mauro V., Foschi J., et al. 2005. Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina* II: Modulation of superoxide dismutase activity and expression in haemocytes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **325**, 175~188
- Moret Y., Schmid-Hempel P. 2000. Survival for immunity: The Price of Immune System Activation for Bumblebee Workers. *Science*, **290**, 1166~1168
- Nottaz A., S. Birkbeck T. H. 1990. Interactions between different strains of *Vibrio* alginolyticus and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*. *J. Invert. Pathol.*, **56**, 15~19
- Ordaş M. C., Novoa B., Figueras A. 1999. Phagocytosis inhibition of clam and mussel haemocytes by Perkinsus atlanticus secretion products. *Fish Shellfish Immunol.*, **9**, 491~503
- Ordaş M. C., Ordaş A., Beşoş C., et al. 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol.*, **10**, 597~609
- Ottaviani E., Franceschi C. 1997a. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunol. Today*, **18** (4): 169~174
- Ottaviani E., Casagrandi E., Kleiss D. 1997b. Effect of PDGF and TGF- β on the release of biogenic amines from invertebrate immunocytes and their possible role in the stress response. *FEBS Letters*, **403**, 236~238
- Paillet C., Allam B., Oubella R. 2004. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.*, **59**, 249~262
- Pampanin D. M., Ballarín L., Carotenuto L., et al. 2002. Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* haemocytes: effects on haematocrit, adhesion, phagocytosis and enzyme contents. *Comp. Biochem. Physiol.*, **131A**, 605~614

- Pannunzio T M, Storey K B 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J Exp Mar Biol Ecol*, **221**: 277~292
- Perkins F O 1996. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin Owen and Collier 1950). Levine 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *J Shellfish Res*, **15**: 67~87
- Pipe R K 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem J*, **22**: 595~603
- Pipe R K, Coles J A 1995. Environmental contaminants in influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol*, **5**: 581~595
- Poulsen M, Bøt A, Nielsen M, et al 2002. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antimicrobial metapleural gland secretion in leaf cutting ants. *Behav Ecol Sociobiol*, **52**: 151~157
- Remaley A T, Kuhns D B, Basford R E, et al 1984. Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O₂⁻ production. *J Biol Chem*, **259**: 11173~11175
- Roch P 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, **172**: 125~145
- Rolff J 2002. Bateman's Principle and immunity. *Proc R Soc London Ser B*, **269**: 867~872
- Rolff J 2003. Invertebrate Ecological Immunology. *Science*, **301**: 472~475
- Schmid-Hempel P 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc R Soc London Ser B*, **270**: 357~366
- Suresh K, Mohandas A 1990. Effect of sublethal concentrations of copper on haemocyte number in bivalves. *J Invertebr Pathol*, **55**: 325~331
- Tafajla C, Gomez-Leon J, Novoa B, et al 2003. Nitric oxide production by caprellid shell clam (*R. decussatus*) haemocytes. *Dev Comp Immunol*, **27**: 197~205
- Tamura Y, Peng P, Liu K, et al 1997. Immunotherapy of tumors with autologous tumor derived heat shock protein preparations. *Science*, **278**: 117~120
- Tirol C, Grossfeld R, Voley A, et al 1995. Heat shock proteins of the oyster parasite *P. marinus*. *Dis Aquat Org*, **22**: 147~151
- Tiscar P G, Marsilio F, Torrelli M E, et al 1998. The 70 kDa heat shock proteins expression in mussel (*M. galloprovincialis*) haemocytes is not only related to heat treatments but also to the phagocytosis of bacteria. *Bollettino Società Italiana Patologia Ittica*, **24**: 29~38
- Torreilles J, Guenè M C, Roch P 1996. Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. *C R Acad Sci III*, **319**: 209~218
- Vasquez G R, Gauthier J D, Marsh A G 1995. Molecular and biochemical adaptations of the protozoan pathogen *Perkinsus marinus* for its host *Crassostrea virginica*: current research and future perspectives (or "the best defense is a good offense"). *J Mar Biotech*, **3**: 35~41
- Voley A K, Chu F E 1994. A comparative study of acid phosphatase in the parasite *Perkinsus marinus* and its host *Crassostrea virginica*. *J Shellfish Res*, **13**: 297
- Voley A K, Chu F E 1996. Acid phosphatase: a virulence factor of the protistan parasite *Perkinsus marinus* against host oyster's defense. *J Shellfish Res*, **15**: 517
- Wendelaar B S E 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev*, **77**: 591~625
- Yannick L, Philippe S, Madeleine G, et al 2005. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarii* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*, **30**: 1~13
- Zera A, Harshman L 2001. The physiology of life-history trade-offs in animals. *Annu Rev Ecol Syst*, **32**: 95~126
- Zugel U, Kaufmann S H E 1999. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, **12**: 19~39

MOLLUSCAN ECOLOGICAL IMMUNOLOGY REVIEW AND PROSPECT

CHEN MuYan² YANG Hongsheng

(¹ Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences Qingdao 266071)

(² Graduate School Chinese Academy of Sciences Beijing 100039)

ABSTRACT

The recent progress derived largely from the mechanism analysis of molluscan ecological immunology is reviewed in this paper. The immune suppression effect of stress hormones on the molluscan immunity has been analyzed and the relationship between the cost investment in immune system and ecological factors was expounded. Furthermore, the future studies in molluscan ecological immunology for inspiring the new thoughts in controlling molluscan disease are discussed.