

昆虫类免疫球蛋白结构和功能研究进展

姚慧鹏, 吴小锋*

(浙江大学动物科学学院 杭州 310029)

摘要: 类免疫球蛋白是在无脊椎动物体内发现的唯一的免疫球蛋白家族成员,它对鳞翅目昆虫自身的免疫起着重要的作用。已有研究表明:类免疫球蛋白只存在于鳞翅目昆虫体内,有可溶性和不溶性两种存在方式,在昆虫体内分别具有不同的功能。可溶性类免疫球蛋白通过一些酶和蛋白的作用对入侵昆虫的细菌和病毒进行免疫防御,而不溶性类免疫球蛋白(即以膜结合蛋白的形式出现)对细胞和细胞黏着以及病毒和细菌入侵细胞有着延缓作用。

关键词: 昆虫;鳞翅目;类免疫球蛋白;免疫球蛋白;结构;功能

中图分类号:Q966 文献标识码:A 文章编号:0454-6296(2008)05-0530-07

Advances in insect hemolin structure and function

YAO Hui-Peng, WU Xiao-Feng* (College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Hemolin is the only member of the immunoglobulin superfamily in invertebrates so far. It plays an important role in Lepidoptera immunity. Based on more than 40 literatures on hemolin, we found that hemolin appears only in Lepidoptera, and exists in the two modes, dissoluble and infusible, which show different biological functions. Dissoluble hemolin could resist invading pathogens, such as bacterium and virus by some enzymes and proteins, while the infusible hemolin may have catabatic effect on cell-cell adhesion and virus or bacterium invading cell.

Key words: Insect; Lepidoptera; hemolin; immunoglobulin; structure; function

昆虫纲属节肢动物门,是当今地球上种类最丰富的生物类群,已经发现的有100多万种,理论估计在600多万到1000多万种,占动物界的2/3,整个生物界的一半以上(Erwin, 1997; Novotny *et al.*, 2002; Chapman, 2006)。昆虫在自然界长期演化过程中,进化形成许多优于其他生物种群的生存策略。在遭遇到细菌等外源微生物入侵时,昆虫体内能够产生各种各样的免疫蛋白,这就是昆虫重要的防御及自然免疫功能。

40多年以来,人们一直在研究有关昆虫的自然免疫,研究它们是如何利用相关的免疫机制抵挡入侵的寄生生物(Stevens, 1962, 1963)。在昆虫的血淋巴中,人们发现类免疫球蛋白(hemolin)、肽聚糖识别蛋白、 β -1,3葡聚糖识别蛋白以及C型凝集素等免疫蛋白都是通过将其自身结合到外源微生物表面的分子(像肽聚糖、脂多糖、脂磷壁酸、 β -1,3葡聚糖、豆蔻酰佛波醇乙脂)而发挥作用的(Kanost *et al.*,

2004)。类免疫球蛋白是在细菌侵染过程中,昆虫为应答细菌表面分子脂多糖而被诱导合成的,也是迄今为止唯一的一个非脊椎动物的免疫球蛋白家族成员。当类免疫球蛋白从几个鳞翅目昆虫物种中分离出来后,在研究的过程中人们陆续发现,它是一个多功能蛋白,涉及到昆虫的免疫(程家安和唐振华, 2001)、昆虫的信号调控(Lanz-Mendoza *et al.*, 1996)、昆虫发育时期的快慢(Sun *et al.*, 1990)以及下一代胚胎的生长情况等(Bettencourt *et al.*, 2002)。

本文在综合类免疫球蛋白相关文献的基础上,得出了类免疫球蛋白出现的昆虫物种类别,在昆虫中出现的时期和存在的部位,以及该蛋白的合成调控方式。除此以外,本文还概述了该蛋白在昆虫体内存在的形式以及不同形式出现的蛋白的生物功能,总结了昆虫在微生物侵染状态下是如何产生类免疫球蛋白的,并且分析了产生的类免疫球蛋白是如何发挥它的免疫功能而杀死病原微生物的机理,

基金项目:国家“863”项目(2007AA10Z159);教育部“新世纪人才计划”项目(NCET-06-0524)

作者简介:姚慧鹏,男,1980年生,博士研究生, E-mail: yaohuipeng0921@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0571-86971658; E-mail: wuxiaofeng@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2007-10-29; 接受日期 Accepted: 2008-04-15

对于理解昆虫抵抗外界微生物的入侵具有重要的科学参考意义。

1 昆虫类免疫球蛋白的基因结构和蛋白结构

1.1 类免疫球蛋白的基因结构

Faye 等(1975)在惜古比天蚕 *Hyalophora cecropia* 中发现类免疫球蛋白(Faye *et al.*, 1975),然而其基因的发现却比较晚。直到1990年,Sun 等才在该昆虫中克隆了类免疫球蛋白的基因(Sun *et al.*, 1990)。此后,Ladendorff 和 Kanost(1990)把类免疫球蛋白基因从烟草天蛾 *Manduca sexta* 中克隆出来;Shin 等(1998)和 Lee 等(2002)分别发现美国白蛾 *Hyphantria cunea* 和舞毒蛾 *Lymantria dispar* 中含有类免疫球蛋白基因。迄今为止,蓖麻蚕(或称眉纹天蚕蛾) *Samia cynthia*、家蚕 *Bombyx mori*、毛虫 *Lonomia oblique*、印度谷螟 *Plodia interpunctella*、柞蚕 *Antheraea pernyi*、桑树桑野蚕 *Bombyx mandarina* 等鳞翅目昆虫的基因序列(包括 cDNA 或 DNA)都已被测定并登录到国际核酸序列库。鳞翅目昆虫类免疫球蛋白的转录一般发生在胚胎的滞育期、幼虫时期、成虫时期和蛹的滞育期(Kanost *et al.*, 1994; Dunn *et al.*, 1994; Lanz-Mendoza *et al.*, 1996; Bettencourt *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002)。在大多数情况下,鳞翅目昆虫的类免疫球蛋白一般产生于滞育期中期,产生于哪一个发育阶段的滞育期则因昆虫的不同而各异(Lee *et al.*, 2002)。类免疫球蛋白基因转录的部位一般比较确定,在微生物侵染昆虫机体过程时,产生的主要部位是昆虫的脂肪体(Sun *et al.*, 1990; Ladendorff and Kanost, 1990; Wang *et al.*, 1995; Lanz-Mendoza and Faye, 1999);然而,在没有感染时,胚胎和中肠中也能进行少量转录(Lindstrom-Dinnetz *et al.*, 1995; Trenzcek, 1998; Bettencourt *et al.*, 2000)。

昆虫的类免疫球蛋白基因组序列在1995年就从惜古比天蚕和烟草天蛾中克隆得到(Wang *et al.*, 1995; Lindstrom-Dinnetz *et al.*, 1995)。我们利用信息学的方法并结合已经完成的家蚕基因组草图(Wu *et al.*, 2005)以及其他昆虫的类免疫球蛋白的基因组序列,预测到家蚕内也可能存在类似的蛋白(Xia *et al.*, 2004)随后我们从家蚕体内克隆到类免疫球蛋白的 mRNA 并进行了序列分析(Wu *et al.*, 2005)。各种不同昆虫的类免疫球蛋白基因尽管大小不同,但是它们均是由单基因控制,且基因序列的结构非常接近。一般状况下,昆虫的类免疫球蛋白

的基因结构主要由具有调控作用的上游序列、启动子区域、6 个外显子和 5 个内含子组成。类免疫球蛋白基因上游区域包含具有增强转录功能的 κ B 片段和 sf1 片段。以惜古比天蚕的类免疫球蛋白为例子,其上游调控序列 1 433、1 123 和 - 789 处都含有 κ B 片段,而在 243 处含有 sf1 片段(Lindstrom-Dinnetz *et al.*, 1995)。昆虫的类免疫球蛋白基因尽管长度不同,像惜古比天蚕的该基因包含 32 603 bp (Lindstrom-Dinnetz *et al.*, 1995);家蚕的此基因的长度短一些,只有 7 232 bp(Wu *et al.*, 2005);而烟草天蛾的基因长度更短,只有 3 127 bp(Wang *et al.*, 1995)。但他们都含有 1 个位于起始密码子上游的前导序列、2 个含有信号肽基因序列的外显子以及 4 个蛋白功能域基因序列的外显子。其中 1 个外显子中既含有部分信号肽的序列,又含有功能区的一部分序列。另外,它们的基因所含的第三个内含子通过生物信息学预测发现一般都包含有几个与 κ B 片段类似的区域位点(Roxstro-lindquist *et al.*, 2002)。

类免疫球蛋白基因在大多数的鳞翅目昆虫中发现,说明该基因可能是鳞翅目昆虫进化过程中对于细菌等微生物入侵采取免疫时,免疫系统选择适应的产物。在该基因中发现含有信号肽基因序列的现象,这和类免疫球蛋白是分泌性蛋白这一结论是一致的。在基因上游和内含子中共同发现具有增强转录功能的调控序列丰富了基因表达调控的理论。

1.2 类免疫球蛋白的蛋白结构

Faye 等(1975)年从细菌感染的惜古比天蚕滞育蛹中发现昆虫蛋白类免疫球蛋白后,仅仅过了 4 年,Rasmuson 和 Boman(1979)便对该蛋白进行纯化、命名(免疫蛋白 P4)和蛋白质分析,从而获得了关于该蛋白的一些性质。由于蛋白质测序技术的复杂程度使得直接对蛋白质测序很难,而蛋白质的一级结构也就是蛋白质氨基酸序列和 cDNA 的序列密切相关,因此测定昆虫类免疫球蛋白的 cDNA 序列可以推测得到该蛋白的氨基酸序列。以惜古比天蚕、烟草天蛾和家蚕的类免疫球蛋白为例,前两种昆虫的该蛋白分子量约为 48 kDa(Lanz-Mendoza *et al.*, 1996),家蚕的分子量约为 44.8 kDa(Wu *et al.*, 2005)。这 3 种昆虫的类免疫球蛋白的前体都含有 18 个氨基酸残基组成的信号肽序列。昆虫类免疫球蛋白的氨基酸序列中的第 18 和第 19 个氨基酸是信号肽酶的作用位点。一旦该信号肽合成完成,相应的核糖体即被信号肽识别蛋白(signal recognition particle, SRP)识别,停止继续合成该蛋白,随即被信

号肽识别蛋白引向含有能够和信号肽识别蛋白结合的停靠蛋白(docking protein, DP)的内质网膜上。结合过停靠蛋白的信号肽识别蛋白随后被释放出来。在内质网膜上,已经合成了信号肽的核糖体在 GTP 参与的作用下打开了一个通往膜内的通道。昆虫类免疫球蛋白上含有 18 个氨基酸的信号肽能够穿过通道和其受体结合后,核糖体继续合成类免疫球蛋白,在合成完成之前,内质网中的信号肽酶会切去信号肽。成熟的类免疫球蛋白在合成完成之后,通过内质网分泌到细胞外,因而在血淋巴中发现的类免疫球蛋白都是不含信号肽的成熟蛋白。此时成熟的类免疫球蛋白在惜古比天蚕、蓖麻蚕和烟草天蛾的氨基酸残基数都是 395 个氨基酸(程家安和唐振华, 2001; Bao *et al.*, 2007),而家蚕的成熟蛋白质中含有 392 个氨基酸(Wu *et al.*, 2005)。前两种昆虫该蛋白的同源性达到 62%(Ladendorff and Kanost, 1991),而家蚕与前两种昆虫的蛋白质同源性则分别是 47%和 49%(Wu *et al.*, 2005)。昆虫的类免疫球蛋白和哺乳动物的免疫球蛋白结构类似,都是由 4 个免疫球蛋白结构域组成。例如,惜古比天蚕的该蛋白是由 4 种 I 型的免疫球蛋白结构域组成(Faye and Kanost, 1998),而烟草天蛾的该蛋白结构域主要有 4 个 C2 型免疫球蛋白结构域组成(Yu *et al.*, 1999)。我们得到的家蚕中的该蛋白同样含有 4 个蛋白质结构域(Wu *et al.*, 2005),经过软件同源对比估测的 4 个蛋白结构域都属于免疫球蛋白家族成员。如图 1、图 2 所示,在预测的结果中,有的是普通的免疫球蛋白结构域,有的是细胞黏着蛋白(或称细胞黏着分子)结构域,有的是 C2 型免疫球蛋白结构域,有的是类免疫球蛋白结构域(Wu *et al.*, 2005)。但是,它们都属于广义的免疫球蛋白家族成员。在昆虫类免疫球蛋白的 4 个结构域中,第 3 个蛋白结构域的天冬酰胺位点一般都连接着糖基化位点,有的昆虫在其他蛋白结构功能域也含有一些糖基化位点,例如在惜古比天蚕类免疫球蛋白的第一功能区近氨基酸末端含有共有的糖基化位点(程家安和唐振华, 2001; Ladendorff and Kanost, 1990)。然而昆虫所含碳水化合物的数量在其一生中并不是不变的,从昆虫中得到的类免疫球蛋白随生长阶段不同,含有的碳水化合物的数量以及碳水化合物在蛋白质上所处的位置也有所不同。一些研究发现,未感染的烟草天蛾幼虫的血淋巴中得到的该蛋白是不含糖的,而在感染后的幼虫和未感染的成虫的血淋巴中得到的该蛋白却是含糖的(虽然在两者中含

有糖的数目以及所处的位置并不相同)(Yu and Kanost, 1999)。另外,烟草天蛾的该蛋白虽然含有能和伴刀豆凝集素结合的一种碳水化合物(Ladendorff *et al.*, 1990),但在它的蛹和成虫中却分离不到含此碳水化合物的该蛋白(程家安和唐振华, 2001)。这些研究结果表明类免疫球蛋白翻译后的修饰既受到昆虫发育调控,又受到昆虫对异物入侵时自身免疫的调控。

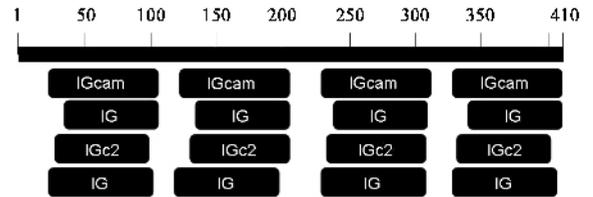


图 1 利用 CDDv2.05-PSSMs 程序软件分析家蚕 hemolin 类免疫球蛋白结果结构和功能

Fig. 1 Structure-function analysis of silkworm hemolin using the program of CDDv2.05-PSSMs



图 2 利用软件程序软件分析家蚕 hemolin 结果类免疫球蛋白的结构和功能

Fig. 2 Structure-function analysis of silkworm hemolin

利用圆形二色性谱学(circular dichroism spectroscopy)分析昆虫类免疫球蛋白的二级结构发现它几乎全部是由 β 折叠组成(Kanost and Zhao, 1996)。例如,我们得到家蚕的该蛋白二级结构预测结果显示 α 螺旋仅占 3.17%(Yu and Kanost, 1999)。在二级结构中, α 螺旋很少,以 β 折叠为主的蛋白称为全 β 蛋白(all- β proteins)。它是形成免疫球蛋白折叠(immunoglobulin fold)的一种重要特征或者说免疫球蛋白折叠只是普通的全 β 蛋白折叠(all- β proteins fold)(Sun *et al.*, 1990; Su *et al.*, 1998)。

Su 等(1998)发现惜古比天蚕类免疫球蛋白 4 个蛋白质结构域的空间结构呈马蹄形。

类免疫球蛋白在昆虫体内以两种状态的形式存在,一种是可溶性或者分泌的形式,一种是以不溶性(即以膜结合蛋白)的形式存在(图 3)。

2 类免疫球蛋白的功能

2.1 类免疫球蛋白具有细胞黏着的功能

果蝇中不含类免疫球蛋白,与此蛋白同源性最

高的是神经细胞黏着蛋白,它们的同源性的 38% (Sun *et al.*, 1990; Lindstrom-Dinnetz *et al.*, 1995)。类免疫球蛋白包含的蛋白结构域和免疫球蛋白家族的细胞黏着蛋白包含的蛋白结构域大多相似(Kanost *et al.*, 1994)而类免疫球蛋白和细胞黏着蛋白的基因结构同样大多类似(Lindstrom-Dinnetz *et al.*, 1995)。从一级结构的相似性上说明类免疫球蛋白和免疫球蛋白家族的细胞黏着蛋白亲缘关系较近,奠定了类免疫球蛋白具有和细胞黏着蛋白相似功能的基础。

细胞黏着蛋白是指那些位于细胞的表面,通过和别的细胞上细胞黏着蛋白或者细胞外基质(extracellular matrix)进行黏着而把细胞和细胞黏着在一起的蛋白。如果是同种细胞通过细胞表面的细胞黏着蛋白结合在一起,称之为“同种结合”或者“同嗜性黏着(homophilic binding)”。如果是不同种类的蛋白通过细胞黏着蛋白结合在一起,则称之为“异种结合”或者“异嗜性黏着(heterophilic binding)”。Bettencourt 等(1997)利用流动式激活细胞分类(flow-activated cell sorting)技术、膜蛋白提取技术和生物素标签的方法从昆虫血淋巴细胞的细胞膜分离得到分子质量为 52 kDa 的类免疫球蛋白。这个结果首先说明了类免疫球蛋白可以结合在血淋巴细胞的细胞膜上,其次说明出现在血淋巴细胞膜上的类免疫球蛋白,不仅在结构上发生了变化,而且通过分子量的增加说明它还结合了另外一些未知成分。Bettencourt 等(1997)还利用类免疫球蛋白外涂微球(hemolin-coated microspheres)的方法揭示了膜形式出现的类免疫球蛋白是在 Ca^{2+} 的参与下进行同嗜性黏着。Lanz-Mendoza 等(1996)在试验中也同样证明了这一结论。综合上述的试验结论,我们可以推测:在 Ca^{2+} 的存在下,类免疫球蛋白在结构变形后以结合在血淋巴细胞的表面膜上,在这个过程中,结合了一些未知的成分,推测应该是跨膜结构域(membrane domain)或者信号传递结构域,也称为细胞质结构域(cytoplasmic domain),也可能是细胞外结构域的成分。这种以膜结合蛋白的形式存在的类免疫球蛋白,通过同嗜性黏着的方式把含有同样的膜结合形式的类免疫球蛋白的血淋巴细胞结合在一起,从而使得血淋巴细胞发生聚集。这个结论同在类免疫球蛋白所在的基因组序列和 cDNA 中不能找到的跨膜结构域、信号传递结构域或者细胞外结构域的序列这个事实(Sun *et al.*, 1990; Lindstrom-Dinnetz *et al.*, 1995)并不矛盾。

一些实验表明可溶性细胞黏着蛋白通过和血淋巴细胞表面的受体运脂蛋白(lipophorin)结合,从而起到调节血淋巴细胞黏着的作用(Coodin and Caveney, 1992; Eleftherianos *et al.*, 2007)。在感染的伤口发炎过程中,细胞黏着蛋白对机体免疫也起到辅助性的作用(Kanost *et al.*, 1994)。在脊椎动物发炎或者患病的过程中,很多细胞黏着蛋白的可溶性异构体被发现(Gearing and Newman, 1993),而在昆虫发现的类免疫球蛋白也同样发现了可溶性异构体的形式。

2.2 类免疫球蛋白具有识别病菌、促进免疫的功能

类免疫球蛋白是在细菌、细菌表面分子 LPS 以及 PMA 诱导下大量合成的,说明它在对防御各种病菌入侵方面有着特定的功能(Yu and Kanost, 2002)。用 RNAi 方法敲除类免疫球蛋白基因的烟草天蛾更容易受到发光杆菌 *Photobacterium luminescens* TT01 的攻击有力说明类免疫球蛋白具有重要的免疫作用(Eleftherianos *et al.*, 2006a, 2006b)。另外,烟草天蛾类免疫球蛋白能提高血淋巴细胞对大肠杆菌的吞噬作用(Zhao and Kanost, 1995; Eleftherianos *et al.*, 2006b; Eleftherianos *et al.*, 2007),惜古比天蚕类免疫球蛋白能提高血淋巴细胞和果蝇肿瘤样血淋巴细胞 mbn-2 对酵母菌的吞噬作用(Lanz-Mendoza *et al.*, 1996)。不含类免疫球蛋白的血淋巴会严重减少在侵入细菌周围形成微团聚体(microaggregates)的能力(Eleftherianos *et al.*, 2007)。这些实验都反复证明了类免疫球蛋白在昆虫自身免疫中的作用。Lanz-Mendoza 等(1996)的研究表明昆虫类免疫球蛋白与 LPS 或者 PMA 结合不仅能增强惜古比天蚕血淋巴细胞的吞噬作用,增加胞质内的磷酸激酶的活性,而且能增强胞内细胞的传递如蛋白激酶(PCK)的活性,磷酸化或者去磷酸化不同蛋白的酪氨酸。

综上所述,昆虫被细菌感染后,血淋巴中的可溶性类免疫球蛋白可以识别细菌的表面成分,从而先和细菌结合,然后与血淋巴细胞结合而组成类免疫球蛋白、细菌和血淋巴细胞的复合体结构。此时的类免疫球蛋白开始促进细菌和血淋巴细胞融合,刺激血淋巴细胞发挥吞噬作用,从而杀灭血淋巴细胞中的细菌。

2.3 其他作用

第一, Lee 等(2002)的研究表明中肠产生的类免疫球蛋白是受发育控制的,推测类免疫球蛋白可能有保护其不受病原微生物在“冬眠期”对它侵染的功能。

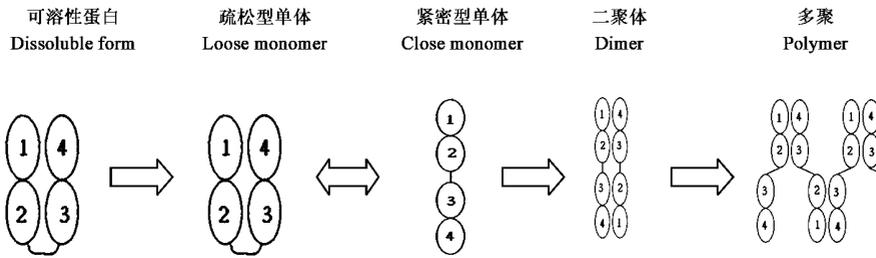


图 3 膜形式存在的类免疫球蛋白结构的在昆虫身体内存在的形式方式的变化 [根据 Sun 等(1990)绘制的模式图]

Fig. 3 The change of the form of hemolin in insect (Adapted from Sun *et al.*, 1990)

第二,利用 RNAi 的方法,即把类免疫球蛋白的 dsRNA 注射到雌性惜古比天蚕的蛹中发现类免疫球蛋白能阻碍下一代的胚胎的生长 (Bettencourt *et al.*, 2002)。

第三, Hiral 等(2004)的研究表明类免疫球蛋白在某些昆虫中具有抗病毒的功能。

3 类免疫球蛋白的反应机制

3.1 类免疫球蛋白在昆虫存在的形式

昆虫的血淋巴存在着下面几种形式的类免疫球蛋白 (Su *et al.*, 1998), 第一种是可溶性的类免疫球蛋白, 呈马蹄形, 它主要由昆虫的脂肪体大量合成 (胚胎、中肠、蛹和成虫中也可以少量合成), 然后分泌到家蚕的血淋巴中来发挥作用, 因而昆虫的血淋巴中存在着许多可溶性类免疫球蛋白, 此种蛋白的分子量一般会比膜形式存在的此类类免疫球蛋白的质量会少一些, 例如巨型蛾子 *Hyalophora cecropia* 的血淋巴中存在的可溶性类免疫球蛋白的分子量只有 48 kDa (Lanz-Mendoza *et al.*, 1996), 而在该昆虫血淋巴细胞膜上发现的类免疫球蛋白也就是不可溶的膜形式存在的类免疫球蛋白单体却有 52 kDa (Bettencourt *et al.*, 1997)。第二种是在血淋巴细胞膜上以单体类免疫球蛋白 (图 3), 它一般存在于没有病原菌感染或者没有外界刺激下正常发育的昆虫血淋巴细胞膜上。血淋巴中可溶性的该蛋白结合了一些特殊的基团使得它的分子量增加的同时, 也具备了结合到血淋巴细胞膜上的能力。膜上存在的类免疫球蛋白有两种方式存在 (如图 4 所示), 一种是直链状, 大多数是马蹄形, 其中两种形式可以互相转换 (如图 3 所示)。第三种是二聚体形式存在的类免疫球蛋白 (图 3), 在病原菌入侵昆虫身体的初期, 或者是体表受伤引起病原菌入侵或者病毒离子进入血腔的初期, 这些现象会引发 Ca^{2+} 的升高。在一定浓度的 Ca^{2+} 存在下, 血淋巴中的血淋巴细胞会通过直

链状类免疫球蛋白和其他的血淋巴细胞膜上的直链状类免疫球蛋白发生同嗜性结合, 从而把血淋巴细胞两两结合在一起 (图 5 左图)。第四种是多聚体形式存在的免疫球蛋白 (图 3)。在形成第三种类免疫球蛋白后不久, 血淋巴细胞就会和血淋巴细胞通过细胞膜表面的二聚体以及还没有结合的直链状的单体继续发生聚合生成多聚体 (图 5 右图), 从而将血淋巴细胞凝结成块状而延缓病原菌对血淋巴细胞的入侵。

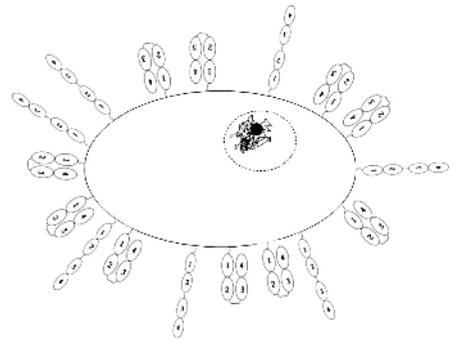


图 4 昆虫细胞以及细胞膜上存在的类免疫球蛋白单体

Fig. 4 Hemolin monomer attached to the membrane of insect cell

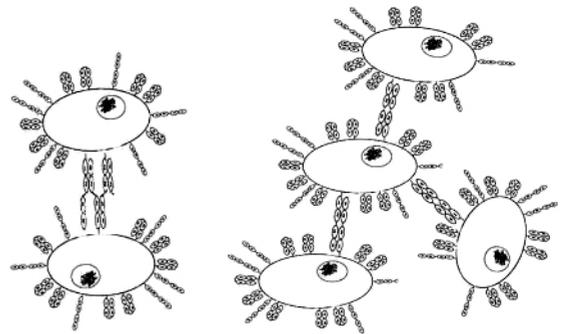


图 5 在 Ca^{2+} 存在的情况下, 昆虫血细胞血淋巴细胞之间通过细胞膜上的类免疫球蛋白同嗜性粘着作用形成二聚体 (左) 或者多聚体 (右) 而相互聚集凝结

Fig. 5 Insect hemocytes clotting by homophilic binding of hemolin dimer (left) or hemolin polymer (right) on the cell membrane with the present of Ca^{2+}

3.2 和类免疫球蛋白相关的免疫反应机制

昆虫免疫主要包括体液免疫和细胞免疫两种。昆虫没有单独的淋巴,所以它的体液(通常指的是细胞外液)主要指的是血淋巴和组织液。

在健康昆虫的血淋巴中, Ca^{2+} 浓度较低,昆虫合成分泌到血淋巴中的类免疫球蛋白呈马蹄形,这些可溶性蛋白中的一部分蛋白在结合一些特殊的基团后,结合在血淋巴细胞的细胞膜上。血淋巴细胞膜上的类免疫球蛋白的两种单体形式,直链形和马蹄形可以相互转换。随着已有类免疫球蛋白的缓慢消耗,而新的可溶性类免疫球蛋白缓慢的生成,使得昆虫血淋巴中所有的免疫球蛋白包括血淋巴细胞细胞膜上的类免疫球蛋白和血淋巴中的可溶性类免疫球蛋白处于动态平衡状态,而无论哪一种形式的类免疫球蛋白在昆虫血淋巴中的含量都比较低。

病原菌进入昆虫的血腔时,昆虫通过将血淋巴中 Ca^{2+} 浓度升高进行体液免疫。细胞膜上的直链的类免疫球蛋白是一种 Ca^{2+} 依赖蛋白(Lanz-Mendoza *et al.*, 1996),它在高浓度 Ca^{2+} 的条件下彼此之间会同嗜性结合,首先形成二聚体,然后形成多聚体而将血淋巴细胞凝结成块状。由于类免疫球蛋白直链型单体转化成二聚体、二聚体转化成多聚体的反应是不可逆的(Su *et al.*, 1998),所以一旦血淋巴细胞凝结成块状,就不可恢复成原来的有生物功能的血淋巴细胞,而最终被清除出昆虫体外。当昆虫通过血淋巴细胞凝结的方式来抵挡细菌等微生物入侵时,细菌等微生物通过将其表面的脂多糖(LPS)或者细胞壁上的肽聚糖以及嗜麦芽寡养单胞菌表面的豆蔻酰佛波醇乙脂(PMA)和血淋巴细胞表面的类免疫球蛋白结合而竞争性抑制血淋巴细胞和血淋巴细胞之间黏着,从而阻碍血淋巴细胞的凝结,最终促进细菌或者嗜麦芽寡养单胞菌等微生物的入侵。病毒粒子同样是通过其表面的物质结合和类免疫球蛋白结合而阻止血淋巴细胞凝结,例如,当我们用出芽型病毒(BV)粒子、无囊膜核型多角体病毒粒子(NPV)以及有囊膜的NPV通过血腔接种的方法感染家蚕,前者的感染性高于后者。其原因很可能是BV离子囊膜上的、NPV核衣壳上的、NPV囊膜上的能够和类免疫球蛋白结合的蛋白的结合能力在依次减弱,而使得抑制血淋巴细胞的凝结的程度依次减弱,从而使得病毒粒子通过胞饮的方式穿过细胞膜进入细胞,繁殖子代病毒粒子的能力也就是病毒的感染力依次下降。昆虫通过血淋巴细胞凝结过程阻挡病原菌入侵血淋巴细胞的同时,还可能像和它同源性很高的其他免疫球蛋白家族的分子ICAM-1、CD155等分子一样通过自身酶解脱落的方式(Baury *et al.*, 2003),

把血淋巴细胞膜上以单体存在的类免疫球蛋白转变可溶性类免疫球蛋白,这些可溶性类免疫球蛋白一方面可以重新结合到其他还没有凝结的血淋巴细胞上继续促使血淋巴细胞凝结。如果侵染的是细菌,昆虫可以通过自身产生大量的抗菌肽来杀灭结合了可溶性类免疫球蛋白的细菌。如果侵染的是病毒,昆虫通过把结合在可溶性免疫球蛋白的没有感染力病毒利用颗粒细胞包埋然后利用溶酶体把病毒溶解或者激活酚氧化酶黑化(Terenius *et al.*, 2007)。

4 小结与展望

本文在最近几年的文献以及相关知识的基础上提出类免疫球蛋白免疫反应机制,但是要完全揭示昆虫的抗病毒和抗菌的机制还是不够的,其中主要的问题是已经发现的和鳞翅目昆虫相关的蛋白质数目太少,而要完全理解类免疫球蛋白的整个免疫过程,需要知道和免疫相关的大量的蛋白以及他们之间的关系。未来研究的方向只能从已经得到基因组序列的鳞翅目昆虫模式生物家蚕着手,通过蛋白质组学的方法,系统分析和免疫相关所有基因以及蛋白质才能完全揭示家蚕以及其他昆虫的免疫反应机制。

参 考 文 献 (References)

- Bao Y, Yamano Y, Morishima I, 2007. Induction of hemolin gene expression by bacterial cell wall components in eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 146(1): 147 - 151.
- Baury B, Masson D, McDermott BMJ, Jarry A, Blottière HM, Blanchardie P, Christian L, Laboisse CL, Lustenberger P, Racaniello VR, Denis MJ, 2003. Identification of secreted CD155 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309(1): 175 - 182.
- Bettencourt R, Assefaw-Redda Y, Faye I, 2000. The insect immune protein hemolin is expressed during oogenesis and embryogenesis. *Mech. Dev.*, 95(1-2): 301 - 304.
- Bettencourt R, Lanz-Mendoza H, Lindquist KR, Faye I, 1997. Cell adhesion properties of hemolin, an insect immune protein in the Ig superfamily. *Eur. J. Biochem.*, 25: 630 - 637.
- Bettencourt R, Terenius O, Faye I, 2002. Hemolin gene silencing by dsRNA injected into *Hyalophora cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. *Insect Mol. Biol.*, 11: 267 - 271.
- Chapman AD, 2006. Numbers of Living Species in Australia and the World, 60. Australian Biodiversity Information Services, Toowoomba.
- Cheng JA, Tang ZH, 2001. *Insect Molecular Science*. Science Press, Beijing. 84 - 87. [程家安, 唐振华. 2001. 昆虫分子生物学. 北京: 科学出版社. 84 - 87]
- Coodin S, Caveney S, 1992. Lipophorin inhibits the adhesion of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes *in vitro*. *J. Insect Physiol.*, 38: 853 - 862.

- Dunn PE, Bohnert TJ, Russell V, 1994. Regulation of antibacterial protein-synthesis following infection and during metamorphosis of *Manduca sexta*. *Ann. NY Acad. Sci.*, 712(1):117–130.
- Eleftherianos I, Manduca J, Millichap PJ, Hodgkinson AJ, Scribbonert A, 2006a. Prior infection of *Manduca sexta* with non-pathogenic *Escherichia coli* elicits immunity to pathogenic *Photographus luminescens*: Roles of immune-related proteins shown by RNA interference. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(6):517–525.
- Eleftherianos I, Manduca J, Millichap PJ, Hodgkinson AJ, Scribbonert A, 2006b. RNAi suppression of recognition protein mediated immune responses in the tobacco hornworm *Manduca sexta* causes increased susceptibility to the insect pathogen *Photographus*. *Dev. Comp. Immunol.*, 30(12):1099–1107.
- Eleftherianos I, Gökçen F, Felföldi G, Millichap PJ, Trenczek TE, Hffrench-Constant R, Reynolds SE, 2007. The immunoglobulin family protein Hemolin mediates cellular immune responses to bacteria in the insect *Manduca sexta*. *Cellular Microbiology*, 9(5):1137–1147.
- Erwin TL, 1997. Biodiversity at its utmost: tropical forest beetles. Joseph Henry Press, Washington, D.C. 27–40.
- Faye I, Pye A, Rasmuson T, Boman HG, Boman IA, 1975. Insect immunity II, Simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infect. Immunol.*, 12:1426–1438.
- Faye I, Kanost MR, 1998. Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. Chapman and Hall, London. 173–188.
- Gearing AJH, Newman W, 1993. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol. Today*, 14(10):506–512.
- Hiral M, Terenius O, Li W, Faye I, 2004. Baculovirus and dsRNA induce hemolin, but no antibacterial activity in *Antheraea pernyi*. *Insect Mol. Biol.*, 13(4):399–405.
- Kanost MR, Zepp MK, Ladendorff NE, Andersson LA, 1994. Isolation and characterization of a hemocyte aggregation inhibitor from hemolymph of *Manduca sexta* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 27(2):127–136.
- Kanost MR, Zhao L, 1996. Insect hemolymph proteins from the immunoglobulin superfamily. *Adv. Comp. Environ. Physiol.*, 23:185–197.
- Kanost MR, Jiang H, Yun XQ, 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, 198:97–105.
- Ladendorff NE, Kanost MR, 1990. Isolation and characterization of bacteria-induced protein P4 from hemolymph of *Manduca cecropia*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 15(1):33–41.
- Ladendorff NE, Kanost MR, 1991. Bacteria-induced protein P4 (Hemolin) from *Manduca sexta*: a member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 18(4):285–300.
- Lanz-Mendoza H, Bettencourt R, Fabbri M, Faye I, 1996. Regulation of the insect immune response: The effect of hemolin on cellular immune mechanisms. *Cell Immunol.*, 168:47–54.
- Lanz-Mendoza HL, Faye I, 1999. Physiological aspects of the immunoglobulin superfamily in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.*, 23(4):359–374.
- Lee KY, Horodyski FM, Valaitis AP, Denlinger DL, 2002. Molecular characterization of the insect immune protein hemolin and its high induction during embryonic diapause in the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(11):1457–1467.
- Lindström-Dinnetz I, Sun SC, Faye I, 1995. Structure and expression of hemolin, an insect member of the immunoglobulin gene superfamily. *Eur. J. Biochem.* 230(3):920–925.
- Novotny V, Basset Y, Miller SE, Weiblen GD, Bremer B, Cizek L, Drozd P, 2002. Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. *Nature*, 416:841–844.
- Rasmuson T, Boman HG, 1979. Insect immunity. Purification and some properties of immune protein P4 from haemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae. *Insect Biochem.*, 9:259–264.
- Roxström-Lindquist I, Lindström-Dinnetz I, Olesen J, Faye I, 2002. An intron enhancer activates the immunoglobulin-related hemolin gene in *Hyalophora cecropia*. *Insect Mol. Biol.*, 11(5):505–515.
- Shin SW, Park SS, Park DS, Kim MG, Kim SC, Brey PT, Park HY, 1998. Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28:827–837.
- Stevens JM, 1962. Bactericidal activity of the blood of actively immunized wax moth larvae. *Can. J. Microbiol.*, 8:491–499.
- Stevens JM, 1963. Protective effects of several immunizing preparations that produce active immunity in *Galleria mellonella*. *J. Insect Pathol.*, 5:129–139.
- Sun SC, Boman HG, Faye I, Schmidt O, 1990. An insect immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science*, 250:1729–1732.
- Su XD, Gastinel LN, Vaughn DE, Faye I, Poon P, Bjorkman PJ, 1998. Crystal structure of hemolin: A horseshoe shape with implication for homophilic adhesion. *Science*, 281:991–995.
- Terenius O, Berencourt R, Lee SY, Li W, Soderhall K, Faye I, 2007. RNA interference of Hemolin causes depletion of phenoloxidase activity in *Hyalophora cecropia*. *Dev. Comp. Immunol.*, 31(6):571–575.
- Trenczek T, 1998. Endogenous defense mechanisms of insects. *Zoology*, 10(4):298–315.
- Wang Y, Willott E, Kanost MR, 1995. Organization and expression of the hemolin gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta*. *Insect Mol. Biol.*, 4(2):113–123.
- Wu XF, Krishnaiah G, Cao CP, Yao HP, 2005. *Bombyx mori* hemolin mRNA, GenBank Accession DQ096295.
- Xia Q, Zhou Z, Lu C *et al.*, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306(5703):1937–1940.
- Yu XQ, Kanost MR, 1999. Developmental expression of *Manduca sexta* hemolin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 42:198–212.
- Yu XQ, Kanost MR, 2002. Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid: An immunoglobulin superfamily member from insects as a pattern-recognition receptor. *Eur. J. Biochem.*, 269:1827–1834.
- Zhao L, Kanost MR, 1995. In search of a function for hemolin, a hemolymph protein from the immunoglobulin superfamily. *J. Insect Physiol.*, 42:73–79.