

DOI: 10.13376/j.cblls/2017156

文章编号: 1004-0374(2017)11-1174-11

无脊椎动物免疫记忆研究进展

曾新洋¹, 张子平², 王艺磊^{1*}

(1 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 厦门 361021;

2 福建农林大学动物科学学院, 福州 350002)

摘要: 无脊椎动物没有适应性免疫是目前流行的观点。然而, 越来越多的研究表明, 无脊椎动物在遭遇病原微生物的重复感染时存在类似脊椎动物免疫记忆的现象, 被称作天然性免疫记忆或免疫致敏。首先回顾了传统的免疫记忆及其发生机制, 之后介绍了无脊椎动物免疫记忆现象及其研究进展, 总结了无脊椎动物免疫记忆的几种可能发生机制, 并对将来的研究提出了一些初步的设想。

关键词: 无脊椎动物; 适应性免疫; 免疫记忆; 免疫致敏; 分子机制

中图分类号: Q939.91

文献标志码: A

Progress in immunological memory of invertebrates

ZENG Xin-Yang¹, ZHANG Zi-Ping², WANG Yi-Lei^{1*}

(1 Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2 College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The current opinion is that invertebrates do not have adaptive immunity. However, more and more studies have shown that invertebrates have a similar phenomenon to vertebrate immune memory when they are infected with pathogenic microorganisms repeatedly, which is known as “specific memory within innate immune systems” or “immune priming”. In this paper, we firstly reviewed the occurrence and mechanism of traditional immunological memory, then introduced the phenomenon and progress in the immune priming in invertebrates, summarized several kinds of possible mechanisms for invertebrate immune memory, and finally provided some preliminary ideas for future research.

Key words: invertebrate; adaptive immunity; immune memory; immune priming; molecular mechanism

认为无脊椎动物缺乏脊椎动物所具有的与适应性免疫相关的关键分子和效应细胞, 故没有适应性免疫 (adaptive immune) 是目前流行的观点。无脊椎动物能成功抵御环境中各种病原物的侵染并顺利延续后代, 得益于其发达且复杂的天然免疫系统 (innate immune system)。然而, 越来越多的研究表明, 无脊椎动物在遭遇病原微生物的重复感染时存在着类似脊椎动物免疫记忆的现象^[1-4], 被称作天然性免疫记忆^[5](specific memory within innate immune systems)、免疫致敏^[6](immune priming) 或特异性免疫致敏^[7](specific immune priming) 或类免疫反应^[8](quasi-immune response)。本文试图回顾这些对传统免疫学理论提

出了挑战的无脊椎动物免疫致敏方面的研究进展, 总结无脊椎动物免疫记忆的几种可能存在机制, 并对其将来的发展趋势提出一些初步的设想。

1 免疫记忆及其发生机制

免疫记忆 (immunological memory) 是机体首次接触某一抗原, 对其产生特异性识别及应答, 并同时记住该抗原, 在下一次遭受同一抗原刺激时, 会

收稿日期: 2017-04-14; 修回日期: 2017-09-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672681, 41676161, 31472266)

*通信作者: E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

发生更快速、更强烈的免疫应答现象^[9]。免疫记忆是脊椎动物特异性免疫的重要特征, 它使得特异性免疫具有长效性, 是脊椎动物疾病免疫防治的基础, 也是脊椎动物防止同一疾病重复发生的一种生存策略^[10]。

经典的免疫记忆形成机理包括基因组重排及抗原特异性淋巴细胞的克隆增殖。免疫记忆的主体是适应性和抗原特异性, 免疫记忆在免疫保护中的作用和机制是可变的, 其依赖于特定的病原体或抗原^[11]。例如 B 细胞发挥免疫记忆主要是通过克隆增殖特异性抗体产生细胞的方式来实现的。其建立记忆需要 B 细胞和 T 细胞的相互协作, B 细胞表面存在的 B 细胞受体 (B cell receptor, BCR) 能够特异性地结合细菌或寄生虫等的抗原决定簇。结合后的抗原被内吞进入细胞, 切成小肽段并与 MHC II 类分子一起递呈于 B 细胞表面, 同源的 CD4⁺ T 细胞能向 B 细胞发出刺激信号, 致使 B 细胞增殖并形成克隆群^[12]。B 细胞在进入脾脏等外周淋巴器官后, 经抗原刺激迁至淋巴小结形成发生中心 (germinal centers, GCs)。在发生中心, BCR 发生高频的体细胞突变, 以及抗体的亲和力成熟和类别转换, 最后分化成为成熟浆细胞 (plasma cell) 或记忆 B 细胞。但是, 产生特异性抗体的成熟浆细胞是短寿命的, 只能存活几天, 而记忆 B 细胞则能存活数年之久, 一旦再次遭遇同一病原体感染, 记忆 B 细胞能迅速激活浆细胞产生特异性抗体, 从而发挥血清记忆^[13]。

记忆 T 细胞在抗微生物病原体中有重要作用。机体在被病原体感染后, T 细胞能分化为多种效应 T 细胞群, 去介导病原体的清除。随后, 大量效应 T 细胞死亡, 但其中一部分能分化为长期存活的成熟记忆 T 细胞。记忆性 CD8⁺ T 细胞是抵抗胞内寄生病原体 (如病毒等) 的主力军, 通常分为组织定居型记忆 T 细胞 (tissue-resident memory, T_{RM})、效应型记忆 T 细胞 (effector memory, T_{EM}) 和中央型记忆 T 细胞 (central memory, T_{CM})。T_{RM} 细胞位于黏膜部位, 其特点是高表达 CD69 和 CD103 分子, 此外还能作为继发感染时的效应细胞, 以及发挥激活其他免疫细胞的功能; T_{EM} 细胞可在组织和次级淋巴器官之间迁移, 发挥免疫监视和一部分效应功能, 但不表达 CD62L 和 CCR7 等分子; T_{CM} 细胞存在于二级淋巴器官, 是 CD62L 和 CCR7 的典型表达体, 当重复感染时, 其在记忆 T 细胞亚群中具有最大的增殖分化潜能^[14]。记忆性 CD8⁺ T 细胞有独特的代谢途径, 其依赖于脂肪酸氧化, 而增殖的效应细胞

则依赖于有氧糖酵解^[15-16], 有研究表明, 抑制 CD8⁺ T 细胞的糖酵解过程有利于其记忆性 T 细胞的形成^[17], 而调节性 CD4⁺ T 细胞 (regulatory CD4⁺ T, T_{Reg}) 对记忆 CD8⁺ T 细胞的形成是必要的。T_{Reg} 细胞向效应细胞或记忆细胞分化的方向是由其激活前的染色质修饰状态决定的^[18]。

2 无脊椎动物免疫记忆现象

现有研究表明, 在无脊椎动物中不存在上述适应性免疫系统关键的免疫分子和关键细胞, 如免疫球蛋白、TCR、MHC、重组活化基因 (recombination activating gene, RAG) 和效应细胞 (B 细胞和 T 细胞), 故而普遍认为, 适应性免疫是在有颌类中突然出现的^[2-3], 在无脊椎动物中不存在。新近的一些研究对此提出了挑战。

最初, 无脊椎动物的天然性免疫记忆只在海星 (*Dermasterias imbricata*)、纽虫 (*Lineus sanguineus*)、蚯蚓 (*Lybricus terrestris*) 和蟑螂 (*Periplaneta americana*) 中被发现, 且常通过同种异体间组织的多次移植, 继而出现更快速、更强烈的免疫排斥现象来证明^[19-22]。然而得到的结果往往是有争议的, 因为在实验中使用的动物基因型不能确定。这一因素阻碍了当时无脊椎动物免疫记忆研究的进步。后来, 无脊椎动物免疫记忆的研究集中在了宿主与寄生虫 (菌) 的相互作用, 发现裂头绦虫 (*Schistocephalus solidus*) 能诱导大剑水蚤 (*Macrocylops albidus*) 产生免疫记忆^[23]。此后, 相似的实验结论分别在欧洲熊蜂 (*Bombus terrestris*) 和类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* spp.)^[24]、大型蚤 (*Daphnia magna*) 和巴斯德氏芽菌 (*Pasteuria ramosa*)^[25] 中被报道。随后也有人提出质疑, 认为此类免疫致敏过度依赖于实验条件^[26-27], 且大部分文献只评估了宿主的存活率和繁殖力, 而不是检测免疫基因的表达量或寄生虫/病原菌的感染率等指标^[28-30]。近年来, 无脊椎动物的组学研究揭示, 一些高可变 (highly variable) 的受体分子可能参与了无脊椎动物的特异性免疫反应, 如富含半胱氨酸的清道夫受体 (scavenger receptor cysteine-rich, SRCR) 或 185/333^[31-33]、唐氏综合征细胞黏附分子 (Down syndrome cell adhesion molecule, Dscam)^[34-37] 和纤维蛋白原相关蛋白 (fibrinogen-related proteins, FREPs)^[38-40]。特别是光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*) 的 FREPs, 被证明可与曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) 的黏蛋白 (SmPoMucs) 相互作用形成免疫复合物, 这是无脊椎动物宿主/病原体模型多样性免疫受体与抗

原变异之间相互作用的一个重要证据^[41]。最近, Coustau 等^[42]的指出, 光滑双脐螺和曼氏血吸虫的相互作用是个极其复杂的免疫过程, 其中涉及到众多的抗原、免疫受体、效应物和抗效应系统, 这些分子信号的整合结果将决定双脐螺个体和与其作用的血吸虫之间的特异性相互作用。

无脊椎动物的免疫致敏现象具有遗传性, 能在亲代与子代中发生垂直传播 (trans-generational immune priming, TGIP)。无脊椎动物虽然缺乏像脊椎动物那样能传递的母源抗体, 却也能通过其他未知的途径发生母源性免疫 (maternal transfer of immunity), TGIP 的发生可以明显提高后代整体免疫水平, 增加暴露于致敏病原体条件下子代的存活率。TGIP 在节肢动物上的研究非常多, 目前已发现多种节肢动物在微生物或寄生虫致敏下都能发生 TGIP 现象, 且在各个生命阶段中都能被检测到, 如在欧洲熊蜂^[43]和黄粉虫 (*Tenebrio molitor*)^[44]中发现, 经致敏后的虫卵抗菌活性显著提高; 粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 经致敏后, 其幼虫血淋巴相关蛋白呈现高表达状态, 尤其是天蚕抗菌肽 (attacin)^[45]; 油葫芦 (*Teleogryllus oceanicus*) 经致敏后, 其雄性后代成虫的抗菌能力显著提升^[46]。尽管其表现形式可能取决于后代所处发育阶段, 但亲本提供给后代的免疫保护也会表现出不同程度的特异性。此外, 还有研究表明, 免疫致敏还能在一些社会性昆虫中通过社会性行为进行水平传播, 如弓背蚁 (*Camponotus pennsylvanicus*) 能通过口道交哺 (stomodaeal trophallaxis) 或相互喂食提升社会群体的免疫水平^[47]。

除此之外, 应激也能导致无脊椎动物产生免疫致敏现象, Eggert 等^[48]在赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) 中的研究表明, 温度刺激也能导致其后代对苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 产生特异性免疫致敏, 特别是寒冷刺激, 能明显提高后代

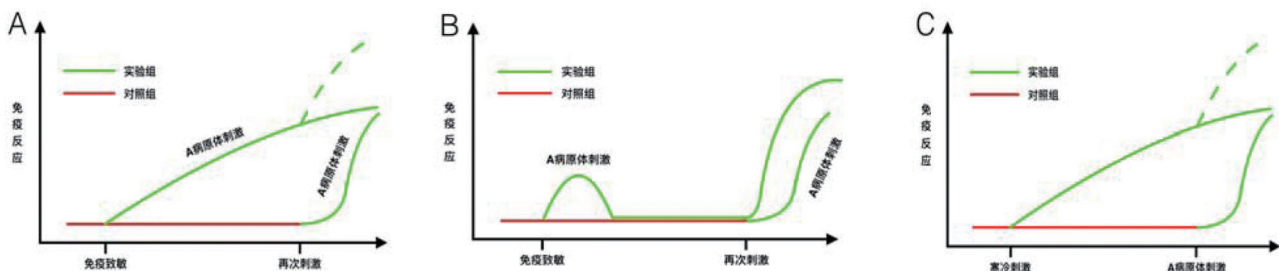
酚氧化酶的活性, 而酚氧化酶是一种具有重要免疫功能的酶类, 是无脊椎动物黑化反应的重要参与者, Eggert 等指出应激反应和免疫系统之间的相互作用可能在 TGIP 上发挥了重要作用。

值得注意的是, 并不是所有寄生虫或病原菌都能导致无脊椎动物产生免疫记忆^[7,49-52], 与脊椎动物的免疫记忆相比, 或许无脊椎动物的免疫记忆更局限于天然存在的相关病原体, 然而这方面的研究目前还相对匮乏。

3 无脊椎动物免疫记忆的可能机制

脊椎动物的免疫记忆是通过重排免疫球蛋白 V(D)J 基因片段进而产生丰富的淋巴细胞受体库, 依赖 TCR、BCR、MHC 等的共同作用而实现。但因无脊椎动物缺乏这些核心元件, 所以, 其免疫致敏的机制可能与脊椎动物不同。到目前为止, 证明无脊椎动物具有免疫致敏的依据仍集中在表型研究^[19-22,49]以及一些吞噬细胞吞噬率和酶活力变化的研究^[7,53-58], 但这些研究都缺乏对一些明确的或潜在的分子、细胞机制的阐述。

现有三种假说来解释无脊椎动物中存在的免疫致敏现象^[27](图 1)。(1) 免疫持续效应 (a long lasting response), 即动物经 A 病原致敏后, 相应的免疫保护会被诱导激活且贯穿整个感染过程, 再次刺激后, 实验组表现出的存活率上升可能是初次致敏激活了免疫持续效应的结果。此外, 新激活的免疫反应 (即第二次注射 A 病原诱导的反应) 可能与初次致敏的免疫持续反应相结合, 导致机体产生更强的免疫反应 (虚线所示), 下文提及的 (在整个免疫致敏过程中上调表达的) 模式识别受体类、酚氧化酶类、溶酶酶类及大多数抗菌肽等就符合该假说; (2) 免疫记忆 (a true memory), 类似于脊椎动物的适应性免疫系统的特异性免疫记忆, 经 A 病原致敏后, 最初



A: 免疫持续效应; B: 免疫记忆; C: 免疫应激效应

图1 3种无脊椎动物免疫致敏现象假说图^[27]

的免疫反应会随着时间慢慢减弱, 但机体会对 A 病原存在潜在的记忆, 当同一类病原菌二次刺激时会引发机体更强和 / 或更快的免疫反应, 下文提及的果蝇抗菌肽 *drosomycin* 和 *metchnikowin* 可能就符合该假说; (3) 免疫应激效应, 即用 B 刺激致敏机体, 会激活机体内的对 A 的反应, 譬如用寒冷刺激赤拟谷盗导致其后代酚氧化酶活性的明显提高, 能对苏云金芽孢杆菌发生特异性免疫致敏^[48]。在现实中, 免疫致敏可以是基于上述三种假说的结合。此外, 三种免疫致敏假说在特异性程度上可能会有所差异, 如第三种可能是由环境压力引起的, 导致其特异性程度低; 而第一和第二种是由特定病原体触发引起的, 所以其特异性程度会稍高 (特别是第二种, 有时甚至能区分同一细菌属的不同菌株^[24])。

3.1 多元化的模式识别受体及免疫效应物的参与

无脊椎动物虽没有产生免疫球蛋白的基因, 但能通过多元化的模式识别受体 (PRRs) 来对保守的病原相关分子模式 (PAMPs) 进行识别, 从而快速应对众多类型的病原微生物的感染, 其强大的识别和结合能力可能有助于无脊椎动物实现免疫记忆^[5,59-60]。此外, 无脊椎动物中的研究表明: 当机体受到病原重复感染时, C-型凝集素 (C-type lectins)、185/333 转录子、含 V 结构域的几丁质结合蛋白 (V region-containing chitin-binding proteins, VCBPs)、Dscam、FREPs 等模式识别受体类基因的 mRNA 表达量显著上调^[36,42,61-67]; 免疫效应物, 如酚氧化酶体系^[68]、溶酶体体系^[53]等也会呈高表达状态, 这暗示无脊椎动物体内的这类模式识别分子及效应物能协助其免疫系统快速、准确地对非己成分进行识别。

在众多的模式识别分子中, 一些分子通过外显子的可变剪接产生丰富的受体库, 以识别种类繁多的抗原, 提高抗原识别反应的特异性^[59]。目前主流的免疫致敏机制研究也集中在研究这类免疫受体基因的剪接多样性上, 涉及的分子主要有: 光滑双脐螺的 FREPs、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 的 Dscam、紫海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 吞噬细胞表达的 185/333 转录子、文昌鱼 (*Botryllus schlosseri*) 的 VCBPs 族等。

3.1.1 FREPs

FREPs 由 200 个左右的氨基酸组成, 与纤维蛋白原 β 和 γ 亚基 C 端有很高的同源性, 其广泛存在于动物体内, 是一个庞大的超家族^[69]。

FREPs 在脊椎动物中的研究很深入, 是人体一

种十分重要的凝血因子, 在凝血反应中发挥着重要的作用^[70]。而在无脊椎动物中, FREPs 的 C 端含有纤维蛋白原样结构域, N 端通常含有一个或两个免疫球蛋白超家族结构域 (immunoglobulin super family, IgSF), 具有与脊椎动物 Ig 相似的功能和不同的分化方式^[5]。光滑双脐螺在感染曼氏血吸虫后, 其血淋巴的 FREPs 基因会高表达^[5], FREPs 蛋白具有凝集素活性, 能识别和沉淀寄生虫的衍生分子^[40], 且其在宿主体细胞中呈现高多态性^[71-72]。FREPs 能结合血吸虫表面的糖基化蛋白, 形成的复合物 FREP-SmPoMucs 含硫酯结构, 可能参与了血细胞识别后的吞噬或包裹作用^[41]。此外, 光滑双脐螺中的 FREPs^[73]、中华蜃 (*Tachyleptus tridentatus*) 中的 tachyleptins^[74]、白腹丛蚊 (*Armigeres subalbatus*) 中的 aslectin^[75]、海鞘 (*Halocynthia roretzi*) 中的 ficolins^[76] 和文昌鱼中的 tachyleptin 类似物^[77], 被证明同属于 FREPs 超家族, 这些 FREPs 可能在无脊椎动物对抗病原微生物的免疫防御中发挥了重要的作用^[38,41-42,73]。

3.1.2 Dscam

细胞黏附分子 Dscam 首先在脊椎动物中被发现, 是一种相对分子质量比较大的蛋白 (约 220 kDa), 含有 Ig 结构域。在人体内主要发挥神经传导的功能。作为通过可变剪切产生的超变量蛋白 (a hypervariable protein created by alternative splicing) 的 Dscam 陆续在果蝇 (*Drosophila*)、冈比亚按蚊、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、赤拟谷盗、意蜂 (*Apis mellifera ligustica*)、烟草天蛾 (*Manduca sexta*)、豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*)、人虱 (*Pediculus humanus*)、对虾 (*Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Marsupenaeus japonicus*)、水蚤 (*Daphnia pulex*, *D. magna*)、克氏原螯虾 (*Pacifastacus leniusculus*)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 中被发现^[36]。果蝇的 Dscam 主要表达在血淋巴和脂肪体内, 与先天性免疫有关, 暗示 Dscam 分子可能不仅具有神经传导功能, 还能参与免疫反应^[36]。有研究发现, 按蚊体内的 Dscam 能在病原体侵入时, 通过 Ig 区域编码基因的可变剪接迅速产生约 31 000 种高度分化的亚型以发挥免疫防御功能。此外, 不同类别的病原可诱导产生不同的 Dscam 来识别和结合相对应病原物的不同株系。Dong 等^[35]猜测, Dscam 很可能是通过这种可变剪接产生多样性的蛋白来参与对病原的免疫致敏反应。Dscam 与免疫的联系在节肢动物门中表现得尤为突出, 在对虾体内注射脂多糖 (LPS)、肽聚糖 (PG) 和 β -1,3-葡聚糖或者不同的病原菌后都可以诱导

Dscam 的表达量上调, 这暗示 Dscam 基因可能在无脊椎动物的免疫防御中发挥重要的作用。但是现有研究表明, 无脊椎动物体产生细胞重组的机制可能与脊椎动物产生多样性 Ig 的机制完全不同, 并且其免疫反应的特异性调控可能也不像脊椎动物那样精细 (图 2)。

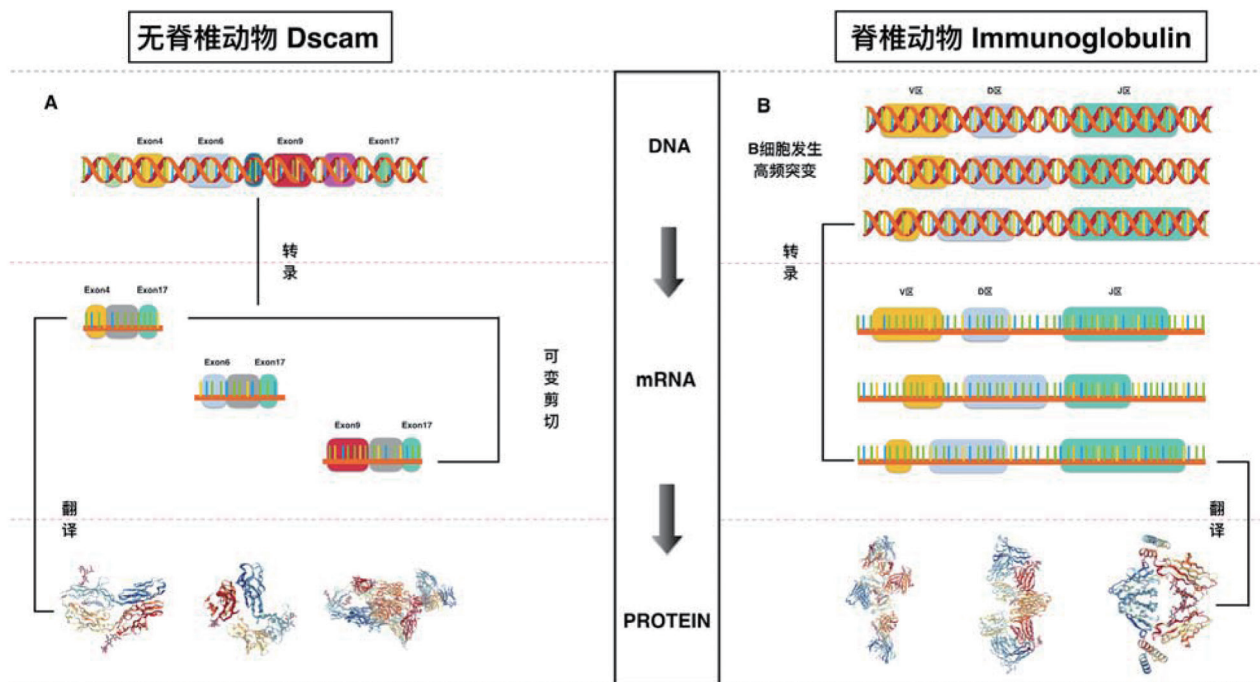
典型的 Dscam 基因包含一个跨膜结构域、一个胞外结构域和一个胞质尾区, 胞外结构域通过可变剪切能产生不同的亚型, Dscam 的 3 个 Ig 结构域 (Ig2、Ig3 和 Ig7) 都是可变的, 这三个结构域的可变剪切最多可产生 38 016 种以上的组合^[78]。这些研究陆续在果蝇、螯虾、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、对虾和中华绒螯蟹上得到了验证, 但最终实际产生的 Dscam 亚型与推测的不尽一致^[57]。当然, 这种多样性的推论仅仅停留在理论层面, 并没有充足的证据来证明。目前仅有南美白对虾和对虾白斑症病毒 (WSSV) 的模型证明, 丝氨酸 / 精氨酸富集蛋白 B52 与 mRNA 形成和成熟有关, B52 的沉默会降低 Dscam 基因 Ig7 域的可变性, 并且 B52 基因可以正向调控 Dscam 等基因的可变剪切^[79]。

目前的研究发现, 按蚊的 Dscam 产生的免疫记忆是短期的, 而其他无脊椎动物上的研究证明特

异性记忆最长能够维持终生^[59], 因此, 目前还不能确定 Dscam 是否真的与免疫致敏有关。此外, Dscam 与病原体结合的作用机理、其表达动力学以及如何形成众多的亚型的机制目前也仍然未知。

3.1.3 185/333、SRCR和VCBP_s

紫海胆在受到病原菌重复刺激时, 一种表达于吞噬细胞^[67]命名为 185/333 的 mRNA 家族强烈上调。185/333 基因为小片段基因 (< 2 kb), 仅含 2 个外显子, 紫海胆 185/333 基因的第二外显子区域变异性很大, 并且该基因是紧密连锁的, 两侧接短重复序列。这些重复序列可游离在 185/333 的基因内外, Buckley 和 Smith^[80]推测这些重复序列可能通过参与基因转换、重组等方式促进 185/333 的多元化, 从而让多元化的 185/333 参与对病原微生物的识别与防御。随后, 对紫海胆用 PAMPs (细菌的脂多糖和肽聚糖) 刺激后的蛋白组分析显示, Sp185/333 蛋白可以针对不同的 PAMPs 进行特异性免疫反应^[31]。Smith^[33]用不同细菌 (*Vibrio diazotrophicus*、*Bacillus cereus* 和 *Bacillus subtilis*) 分别对紫海胆进行刺激, 发现海胆表达了不同相对分子质量的 Sp185/333 蛋白, 再次验证了海胆的免疫特异性。此外, 还有研究显示, 对紫海胆注射不同的细菌或



A: 果蝇Dscam多样性机制。Exon4产生Ig2结构域, Exon6产生Ig3结构域, Exon9产生Ig7结构域, Exon17产生跨膜域。B: 人IgG多样性机制。B细胞在发生中心发生高频体细胞突变, 产生不同的效应B细胞, 分泌不同的IgG。

图2 无脊椎动物Dscam和脊椎动物Ig的多样性产生机制

真菌, 发现其体腔细胞 (coelomocyte) 能表达 1 200 种不同的 SRCR^[31], 推测可能与特异性免疫反应有关。

文昌鱼和海鞘的 VCBP 基因包含 2 个 IgV 型结构域和 1 个几丁质结构域, 其中 2 个 IgV 域具有高度的多态性^[81]。有研究指出 VCBPs 的 IgV 域是其结合细菌并发挥免疫调理作用的基础^[63], 几丁质结构域的存在可能也对其免疫功能起到强化作用^[63-64]。Cannon 等^[81]发现文昌鱼中 VCBP 分子在单个个体内由 5~6 个多基因家族编码, 该基因编码的蛋白能够分泌到肠中发挥阻止微生物入侵的作用。

3.1.4 免疫效应物

在无脊椎动物的免疫致敏研究中, 相关的免疫效应物主要有酚氧化酶体系、溶酶体体系和一些抗菌肽或抗菌蛋白。Fu 等^[68]在南美白对虾和枯草杆菌 (带 WSSV 包膜基因) 的研究中发现, 二次刺激 WSSV 的虾, 其酚氧化酶原基因的 mRNA 显著上调, 提示酚氧化酶原参与了免疫致敏过程。Cong 等^[53]在栉孔扇贝和鳗弧菌模型上发现, 用活菌通过短期浸泡致敏扇贝, 可明显增强扇贝抵抗弧菌二次侵染, 后发现吞噬作用和酸性磷酸酶主要参与了这一过程, 因此认为抗菌作用在此免疫应答过程中发挥了主要的作用。Mcnamara 等^[46]向油葫芦注射活的沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*), 发现当后代再次接受该菌刺激时, 其死亡率会显著下降, 并且酚氧化酶和溶菌酶活性会明显升高, 因此认定抗菌作用在遗传性免疫致敏中发挥了重要作用。在甲壳动物中, 研究人员先后从滨蟹 (*Carcinus maenas*) 和对虾等中分离得到 Penaeidin、Crustin 和抗 ALF (anti-lipopolysaccharide factor) 等多种抗菌肽^[82-90], 发现它们在甲壳动物对抗病原微生物的免疫防御中发挥着重要作用。

Bulet 等^[91]在果蝇上的研究显示, 在注射大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 后, 果蝇体内抗菌肽类 (drosomycin、metchnikowin) 水平呈现出先升高后降低的趋势, 且在刺激后 24 h 产物全部降解并恢复到正常水平, 因此, 作者暗指增强的抗菌肽类不是参与免疫致敏的主要因素。但笔者认为, 因 Bulet 的实验设计缺乏二次注射细菌这一环节, 或许, 相关抗菌肽可能恰巧符合前文提及的免疫记忆假说模型。

3.2 血细胞的参与

无脊椎动物血细胞的免疫功能主要包括细胞黏附、吞噬、包裹和形成结节等。血细胞一般是通过

吞噬作用来清除进入血液中的病原微生物, 但当入侵的病原体 (如真菌、寄生虫) 个体较大时, 则会以多个血细胞的形式, 通过包裹作用或结节作用来执行免疫功能^[92-93]。目前已发现多种细胞黏附分子, 包括 Peroxinectin^[94-95]、Integrin^[96]、Hemomucin^[97]、Hemolin^[98-99] 等。虽然在探索无脊椎动物的免疫致敏机制中, 研究某些关键分子是十分重要的, 但研究动物整体的生理功能也许更有意义^[100]。吞噬作用在动物的先天性免疫中占有重要作用, 是无脊椎动物和脊椎动物用来控制和清除病原侵染的重要手段。近年来研究显示, 无脊椎动物血细胞的吞噬作用在软体动物和节肢动物的免疫致敏中发挥着主要作用。Cong 等^[53]用活鳗弧菌 (*Listonella anguillarum*) 通过短时间浸泡致敏栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*), 发现扇贝的血细胞吞噬活性在二次刺激中显著升高, 被认为与免疫致敏保护作用有关, 相似的研究结果在太平洋牡蛎和灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 模型中得到了验证^[56]。Pham 等^[7]对黑腹果蝇注射半致死剂量的肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 致敏, 随后用致死剂量刺激发现, 果蝇免疫致敏的发生与吞噬细胞有关, 且抑制其吞噬作用后, 免疫致敏现象消失且死亡率与对照组相同。Roth 和 Kurtz^[54]注射热灭活的苏云金芽孢杆菌致敏鼠妇虫 (*Porcellio scaber*), 随后用活芽孢杆菌作刺激, 发现接受同种菌再次刺激后吞噬细胞的比例上升, 且抑制其吞噬活性后, 致敏反应被阻碍, 推测血细胞吞噬作用在无脊椎动物的特异性免疫中起作用, 并显示出了高度的特异性, 甚至能区分同种细菌的不同菌株。Fu 等^[68]饲喂南美白对虾带 WSSV 包膜基因的枯草杆菌 (*B. subtilis*), 随后用 WSSV 感染发现, 经致敏的虾存活率明显提升, 且前期的致敏能促进虾血液里的吞噬细胞去吞噬 WSSV。类似的研究结果在昆虫中的家蚕和蜡螟 (*Galleria mellonella*) 上也得到了验证^[57-58]。以上现象表明吞噬作用在无脊椎动物的免疫致敏中发挥着重要的作用, 而关于免疫致敏与吞噬细胞的联系, 笔者推测类似于脊椎动物, 无脊椎动物的吞噬细胞表面存在各种各样的受体, 而免疫致敏的抗原起到了激活其中部分受体的功能, 在第二次刺激后, 血细胞会选择性地扩增与病原相对应的受体的细胞, 从而以一定的方式, 更高效清除侵入的病原体, 表现出一定程度的特异性。

3.3 信号通路的参与

有人在细菌感染秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的研究中^[101-102]指出, 其免疫机制可能与

p38 MAPK、insulin/IGFR 及 β -catenin 通路有关。果蝇的 Toll 和 Imd (immune deficiency) 是目前在无脊椎动物中被深入研究的通路。有研究^[103-105]指出, 2 种通路控制的大多数基因在受细菌或真菌刺激时都会表达上调, 因此有人认为, 信号通路可能也参与了无脊椎动物免疫的调控。Weavers 等^[106]用果蝇做材料研究巨噬细胞的吞噬作用时, 指出巨噬细胞的记忆机制可能是由钙诱导 JNK 信号通路触发的。Pham 等^[7]用部分缺失的突变体分别封闭 Toll 通路、PGRP-SA (peptidoglycan recognition protein SA) 以及 Dif, 发现缺失了 Imd 通路, 果蝇仍可产生致敏反应, 但是 Toll 通路的缺失却影响了其免疫致敏效果。这说明在果蝇的免疫致敏中, Toll 通路比 Imd 通路起着更为关键的作用。Boutros^[104]认为, Toll、Imd 等表达水平可持续升高的信号转导通路, 均可能是因为针对某种特定病原而产生的特异性反应。在南美白对虾上的研究表明, 用 WSSV 刺激后, 对虾体内信号转导成分 STAT (signal transducer and activator of transcription) 明显受到抑制, 而 STAT 是脊椎动物干扰素应答反应的一个核心组件, 在果蝇中与抗病毒反应有关^[107]。

3.4 表观遗传修饰的参与

表观遗传学认为: 在基因组 DNA 序列不发生变化的条件下, 基因功能发生可遗传的遗传信息变化, 并最终导致可遗传的表型变化, 其机理包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰作用和 RNA 编辑等^[108]。在小鼠模型上, 有研究指出, 组蛋白的修饰作用可能参与了免疫记忆的形成, 导致在二次刺激时相关基因更强的转录和表达^[109]。目前从表观遗传学角度去研究无脊椎动物免疫记忆的文章非常少见, Christoph 等^[110]用寄生蜂 (*Diaeretiella rapae*) 和蚜虫 (*Myzus persicae*) 模型研究免疫致敏时发现, 受寄生蜂攻击后未死的蚜虫, 其后代再次遭受寄生蜂攻击时会有更强的抵抗力, Christoph 等在排除了母源性物质影响后对这一现象的解释为: 宿主生活环境对后代抵抗力是有影响的, 特别是在生存压力大的环境下, 其机理可能涉及表观遗传学范畴, 但遗憾的是, 作者并未深入探究其机理。Norouzitallab 等^[111]在卤虫 (*Artemia franciscana*) 和坎氏弧菌 (*V. campbellii*) 模型上的研究指出, 组蛋白 H4 的乙酰化和 H3K4 的甲基化在卤虫 TGIP 中发挥着重要作用。

4 结语

综上所述, 由于目前无脊椎动物免疫记忆机制

的研究仍处于起步阶段, 而关于免疫记忆的许多假设还缺乏比较可靠的实验支持。当前判断无脊椎动物是否具有免疫记忆的依据仍集中在经历两次刺激后, 宿主存活率或繁殖力的变化。而针对其特异性机理的研究主要集中在模式识别受体类、酚氧化酶类、溶酶体类及部分抗菌肽类, 虽然新近的文章加入了组学研究, 但因绝大部分无脊椎动物没有参考基因组, 能挖掘到的差异基因非常有限, 所以针对其特异性机理问题的解释比较模糊。现有的研究表明: (1) 无脊椎动物与脊椎动物之间不存在直接的同源性免疫分子^[112-113], 且目前尚未发现 1 种免疫分子是普遍参与了无脊椎动物免疫记忆过程的; (2) 无脊椎动物的适应性免疫程度低, 且目前还只是在部分动物和部分病原体的免疫反应中被证实^[114]。CRISPR 的发现证实了连单细胞的细菌都具有免疫记忆功能^[115], 提示多细胞的无脊椎动物也应有免疫记忆, 只不过不一定像脊椎动物那样通过淋巴细胞或淋巴因子介导, 很可能通过不同的 DNA 或 RNA 剪切, 或 miRNA 及其他 ncRNA, 乃至 DNA 甲基化等表观遗传学机制来介导。所以, 笔者认为未来无脊椎动物免疫记忆的研究应该是: 规模化地对无脊椎动物的基因组测序, 辅助结合转录组、蛋白质组或代谢组, 通过对不同组学技术间的交叉使用和数据关联, 筛选出与免疫记忆相关的基因、分子和通路等, 并经后期的传统分子生物学手段验证支持。相信随着对大量无脊椎动物免疫记忆的深入研究, 将使我们对无脊椎动物免疫系统的结构与功能及其演化有更深入的认识。

[参 考 文 献]

- [1] Kurtz J. Memory in the innate and adaptive immune systems. *Microbes Infect*, 2004, 6: 1410-7
- [2] Netea MG, Quintin J, Jw VDM. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*, 2011, 9: 355-61
- [3] Criscitiello MF, De FP. Fifty shades of immune defense. *Plos Pathog*, 2013, 9: e1003110
- [4] Contreras-Garduño J, Lanz-Mendoza H, Franco B, et al. Insect immune priming: ecology and experimental evidences. *Ecol Entomol*, 2016, 41: 351-66
- [5] Kurtz J. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol*, 2005, 26: 186-92
- [6] Little TJ, Kraaijeveld AR. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends Ecol Evol*, 2004, 19: 58-60
- [7] Pham LN, Dionne MS, Shirasu-Hiza M, et al. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog*, 2007, 3: e26

- [8] Venegas CA, Nonaka L, Mushiaki K, et al. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis Aquat Organ*, 2000, 42: 83-9
- [9] 吴长有. 免疫记忆与疫苗研究开发. *中国免疫学杂志*, 2005, 21: 4-7
- [10] Durlanik S, Thiel A. Requirement of immune system heterogeneity for protective immunity. *Vaccine*, 2015, 33: 5308-12
- [11] Weisel F, Shlomchik M. Memory B cells of mice and humans. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35: 255-84
- [12] Janeway CA. Immunobiology: the immune system in health and disease. *Q Rev Biophys*, 2005, 46: 160-2
- [13] Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15: 149-59
- [14] Laidlaw BJ, Craft J, Kaech SM. The multifaceted role of CD4(+) T cells in the regulation of CD8(+) T cell memory maturation. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16: 102-11
- [15] Gijzen VDW, Everts B, Chang CH, et al. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8(+) T cell memory development. *Immunity*, 2012, 36: 68-78
- [16] Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, et al. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*, 2013, 342: 1242-45
- [17] Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, et al. Enhancing CD8 T cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*, 2009, 460: 103-7
- [18] Wei G, Wei L, Zhu J, et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4⁺ T cells. *Immunity*, 2009, 30: 155-67
- [19] Karp RD, Hildemann WH. Specific allograft reactivity in the sea star *Dermasterias imbricata*. *Transplantation*, 1976, 22: 434-9
- [20] Langlet C, Bierne J. Immune characteristics of graft rejection in nemerteans of the genus *Lineus*. *Eur J Immunol*, 1982, 12: 705-8
- [21] Cooper EL, Roch P. Second-set allograft responses in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Kinetics and characteristics*. *Transplantation*, 1986, 41: 514-20
- [22] George JF, Howcroft TK, Karp RD. Primary integumentary allograft reactivity in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Transplantation*, 1987, 43: 514-9
- [23] Kurtz J, Franz K. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, 2003, 425: 37-8
- [24] Sadd BM, Schmid-Hempel P. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr Biol*, 2006, 16: 1206-10
- [25] McTaggart SJ, Wilson PJ, Little TJ. *Daphnia magna* shows reduced infection upon secondary exposure to a pathogen. *Biol Lett*, 2012, 8: 972-5
- [26] Tate AT, Graham AL. Trans-generational priming of resistance in wild flour beetles reflects the primed phenotypes of laboratory populations and is inhibited by co-infection with a common parasite. *Funct Ecol*, 2015, 29: 1059-69
- [27] Milutinović B, Peuß R, Ferro K, et al. Immune priming in arthropods: an update focusing on the red flour beetle. *Zoology*, 2016, 119: 254-61
- [28] Hauton C, Smith VJ. Adaptive immunity in invertebrates: a straw house without a mechanistic foundation. *Bioessays*, 2007, 29: 1138-46
- [29] Little TJ, Colegrave N, Sadd BM, et al. Studying immunity at the whole organism level. *Bioessays*, 2008, 30: 404-5
- [30] Rowley AF, Powell A. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific? *J Immunol*, 2007, 179: 7209-14
- [31] Pancer Z. Dynamic expression of multiple scavenger receptor cysteine-rich genes in coelomocytes of the purple sea urchin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13156-61
- [32] Dheilly NM, Nair SV, Raftos DA. Highly variable immune-response proteins (185/333) from the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*: proteomic analysis identifies diversity within and between individuals. *J Immunol*, 2009, 182: 2203-12
- [33] Smith LC. Innate immune complexity in the purple sea urchin: diversity of the sp185/333 system. *Front Immunol*, 2012, 3: 70
- [34] Watson FL, Püttmann-Holgado R, Thomas F, et al. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science*, 2005, 309: 1874-8
- [35] Dong Y, Taylor HE, Dimopoulos G. AgDscam, a hyper-variable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biol*, 2006, 4: e229
- [36] Armitage SA, Peuss R, Kurtz J. Dscam and pancrustacean immune memory - a review of the evidence. *Dev Comp Immunol*, 2015, 48: 315-23
- [37] Peuß R, Wensing KU, Woestmann L, et al. Down syndrome cell adhesion molecule 1: testing for a role in insect immunity, behaviour and reproduction. *R Soc Open Sci*, 2016, 3: 160138
- [38] Dong Y, Dimopoulos G. Anopheles fibrinogen-related proteins provide expanded pattern recognition capacity against bacteria and malaria parasites. *J Biol Chem*, 2009, 284: 9835-44
- [39] Hanington PC, Cooper MD. Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 21087-92
- [40] Portela J, Duval D, Rognon A, et al. Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail. *J Innate Immun*, 2013, 5: 261-76
- [41] Moné Y, Gourbal B, Duval D, et al. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4: e813
- [42] Coustau C, Gourbal B, Duval D, et al. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: a review of research progress over the last decade. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 46: 5-16
- [43] Sadd BM, Schmidhempel P. Facultative but persistent trans-generational immunity via the mother's eggs in bumblebees. *Curr Biol*, 2007, 17: R1046-7
- [44] Moreau J, Martinaud G, Troussard JP, et al. Trans-genera-

- tional immune priming is constrained by the maternal immune response in an insect. *Oikos*, 2012, 121: 1828-32
- [45] Freitak D, Heckel DG, Vogel H. Dietary-dependent trans-generational immune priming in an insect herbivore. *Proc Biol Sci*, 2009, 276: 2617-24
- [46] Mcnamara KB, Van LE, Simmons LW. The effect of maternal and paternal immune challenge on offspring immunity and reproduction in a cricket. *J Evol Biol*, 2014, 27: 1020-8
- [47] Hamilton C, Lejeune BT, Rosengaus RB. Trophallaxis and prophylaxis: social immunity in the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus*. *Biol Lett*, 2011, 7: 89-92
- [48] Eggert H, Diddensde Bühr MF, Kurtz J. A temperature shock can lead to trans-generational immune priming in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Ecol Evol*, 2015, 5: 1318-26
- [49] Roth O, Sadd BM, Schmid-Hempel P, et al. Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proc Biol Sci*, 2009, 276: 145-51
- [50] Miyashita A, Takahashi S, Ishii K, et al. Primed immune responses triggered by ingested bacteria lead to systemic infection tolerance in silkworms. *PLoS One*, 2014, 10: e0130486
- [51] Dubuffet A, Zanchi C, Moret Y, et al. Trans-generational immune priming protects the eggs only against gram-positive bacteria in the mealworm beetle. *PLoS Pathog*, 2015, 11: e1005178
- [52] Fisher JJ, Hajek AE. Maternal exposure of a beetle to pathogens protects offspring against fungal disease. *PLoS One*, 2015, 10: e0125197
- [53] Cong M, Song L, Wang L, et al. The enhanced immune protection of Zhikong scallop *Chlamys farreri* on the secondary encounter with *Listonella anguillarum*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008, 151: 191-6
- [54] Roth O, Kurtz J. Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Dev Comp Immunol*, 2009, 33: 1151-5
- [55] Pope EC, Powell A, Roberts EC, et al. Enhanced cellular immunity in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after 'vaccination'. *PLoS One*, 2011, 6: e20960
- [56] Zhang T, Qiu L, Sun Z, et al. The specifically enhanced cellular immune responses in pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Dev Comp Immunol*, 2014, 45: 141-50
- [57] Wu G, Li M, Liu Y, et al. The specificity of immune priming in silkworm, *Bombyx mori*, is mediated by the phagocytic ability of granular cells. *J Insect Physiol*, 2015, 81: 60-8
- [58] Wu G, Yi Y, Lv Y, et al. The lipopolysaccharide (LPS) of *Photobacterium luminescens* TT01 can elicit dose- and time-dependent immune priming in *Galleria mellonella* larvae. *J Invertebr Pathol*, 2015, 127: 63-72
- [59] Kurtz J, Armitage SA. Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends Immunol*, 2006, 27: 493-6
- [60] Kvell K, Cooper EL, Engelmann P, et al. Blurring borders: innate immunity with adaptive features. *Clin Exp Immunol*, 2007, 2007: 83671
- [61] Gestal C, Castellanos-Martínez S. Understanding the cephalopod immune system based on functional and molecular evidence. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 46: 120-30
- [62] Wang L, Feng Y, Song X, et al. Maternal immune transfer in mollusc. *Dev Comp Immunol*, 2015, 48: 354-9
- [63] Robalino J, Carnegie RB, O'Leary N, et al. Contributions of functional genomics and proteomics to the study of immune responses in the pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 128: 110-8
- [64] Dishaw LJ, Giacomelli S, Melillo D, et al. A role for variable region-containing chitin-binding proteins (VCBPs) in host gut-bacteria interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 16747-52
- [65] Wang J, Wang L, Yang C, et al. The response of mRNA expression upon secondary challenge with *Vibrio anguillarum* suggests the involvement of C-lectins in the immune priming of scallop *Chlamys farreri*. *Dev Comp Immunol*, 2013, 40: 142-7
- [66] Wang XW, Wang JX. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34: 981-9
- [67] Majeske AJ, Oren M, Sacchi S, et al. Single sea urchin phagocytes express messages of a single sequence from the diverse Sp185/333 gene family in response to bacterial challenge. *J Immunol*, 2014, 193: 5678-88
- [68] Fu LL, Wang Y, Wu ZC, et al. *In vivo* assessment for oral delivery of *Bacillus subtilis*, harboring a viral protein (VP28) against white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2011, 322: 33-8
- [69] Wang X, Qin Z, Christensen BM. Identification and characterization of the fibrinogen-like domain of fibrinogen-related proteins in the mosquito, *Anopheles gambiae*, and the fruitfly, *Drosophila melanogaster*, genomes. *BMC Genomics*, 2005, 6: 114
- [70] Doolittle RF, Mcnamara K, Lin K. Correlating structure and function during the evolution of fibrinogen-related domains. *Protein Sci*, 2012, 21: 1808-23
- [71] Adema CM, Hertel LA, Miller RD, et al. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 8691-6
- [72] Litman GW, Dishaw LJ, Cannon JP, et al. Alternative mechanisms of immune receptor diversity. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19: 526-34
- [73] Zhang SM, Adema CM, Kepler TB, et al. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science*, 2004, 305: 251-4
- [74] Gokudan S, Muta T, Tsuda R, et al. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 10086-91
- [75] Wang X, Rocheleau TA, Hillyer JF, et al. A novel lectin with a fibrinogen-like domain and its potential involvement in the innate immune response of *Armigeres subalbatus*, against bacteria. *Insect Mol Biol*, 2004, 13: 273-82

- [76] Miyazawa S, Azumi K, Nonaka M. Cloning and characterization of integrin α subunits from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J Immunol*, 2001, 276: 1710-5
- [77] Ju L, Zhang S, Liang Y, et al. Identification, expression and antibacterial activity of a tachylectin-related homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri* with implications for involvement of the digestive system in acute phase response. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26: 235-42
- [78] Armitage SA, Freiburg RY, Kurtz J, et al. The evolution of Dscam genes across the arthropods. *BMC Evol Biol*, 2012, 12: 53
- [79] Chiang, YA, Hung HY, Lee CW, et al. Shrimp Dscam and its cytoplasmic tail splicing activator serine/arginine;(S-R)-rich protein B52 were both induced after white spot syndrome virus challenge. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34: 209-19
- [80] Buckley KM, Smith LC. Extraordinary diversity among members of the large gene family, 185/333, from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *BMC Mol Biol*, 2007, 8: 68
- [81] Cannon JP, Haire RN, Litman GW. Identification of diversified genes that contain immunoglobulin-like variable regions in a protochordate. *Nat Immunol*, 2002, 3: 1200-7
- [82] Schnapp D, Kemp GD, Smith VJ. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur J Biochem*, 1996, 240: 532-9
- [83] Bartlett TC, Cuthbertson BJ, Shepard EF, et al. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar Biotechnol*, 2002, 4: 278-93
- [84] Rojtinnakorn J, Hirono I, Itami T, et al. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 13: 69-83
- [85] Vargasalbores F, Yepizplascencia G, Jiménezvega F, et al. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2004, 138: 415-22
- [86] Barracco MA, Lorgeteril JD, Gueguen Y, et al. Molecular characterization of penaeidins from two Atlantic brazilian shrimp species, *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus schmitti*. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 250: 117-20
- [87] Chiou TT, Wu JL, Chen TT, et al. Molecular cloning and characterization of cDNA of penaeidin-like antimicrobial peptide from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mar Biotechnol*, 2005, 7: 119-27
- [88] Gueguen Y, Garnier J, Robert L, et al. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. *Dev Comp Immunol*, 2006, 30: 283-8
- [89] Imjongjirak C, Amparyup P, Tassanakajon A, et al. Antilipopolysaccharide factor (ALF) of mud crab *Scylla paramamosain*: molecular cloning, genomic organization and the antimicrobial activity of its synthetic LPS binding domain. *Mol Immunol*, 2007, 44: 3195-203
- [90] Yedery RD, Reddy KV. Identification, cloning, characterization and recombinant expression of an anti-lipopolysaccharide factor from the hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata*. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27: 275-84
- [91] Bulet P, Uttenweiler-Joseph S, Moniatte M, et al. Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 11342-7
- [92] Lanzmendoza H, Bettencourt R, Fabbri M, et al. Regulation of the insect immune response: the effect of hemolin on cellular immune mechanisms. *Cell Immunol*, 1996, 169: 47-54
- [93] Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol*, 1997, 42: 611-43
- [94] Johansson MW, Söderhäll K. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *Cell Bio*, 1988, 106: 1795-803
- [95] Schmidt O, Söderhäll K, Theopold U, et al. Role of adhesion in arthropod immune recognition. *Annu Rev Entomol*, 2010, 55: 485-504
- [96] Theopold U, Dorian C, Schmidt O. Changes in glycosylation during *Drosophila* development. The influence of ecdysone on hemomucin isoforms. *Insect Biochem Mol Biol*, 2001, 31: 189-97
- [97] Hagen HE, Kläger SL. Integrin-like RGD-dependent cell adhesion mechanism is involved in the rapid killing of *Onchocerca* microfilariae during early infection of *Simulium damnosum* s.l. *Parasitology*, 2001, 122: 433-8
- [98] Lee KY, Horodyski FM, Valaitis AP, et al. 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*, 2002, 32: 1457-67
- [99] Kanost MR, Jiang H, Yu XQ. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol Rev*, 2004, 198: 97-105
- [100] Chambers MC, Schneider DS. Pioneering immunology: insect style. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24:10-4
- [101] Anyanful A, Easley KA, Benian GM, et al. Conditioning protects *C. elegans* from lethal effects of enteropathogenic *E. coli* by activating genes that regulate lifespan and innate immunity. *Cell Host Microbe*, 2009, 5: 450-62
- [102] Kim Y, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain NCFM enhances gram-positive immune responses. *Infect Immun*, 2012, 80: 2500-8
- [103] Lemaitre B, Kromer-Metzger E, Michaut L, et al. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 9465-9
- [104] Boutros M, Agaisse H, Perrimon N. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell*, 2002, 3: 711-22
- [105] Gregorio ED, Spellman PT, Tzou P, et al. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J*, 2002, 21: 2568-79

- [106] Weavers H, Evans IR, Martin P, et al. Corpse engulfment generates a molecular memory that primes the macrophage inflammatory response. *Cell*, 2016, 165: 1658-71
- [107] Robalino J, Almeida JS, Mckillen D, et al. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiol Genomics*, 2007, 29: 44-56
- [108] 尤媛媛, 郝长付, 姚武. 表观遗传学及其应用研究进展. *现代预防医学*, 2012, 39: 715-7
- [109] Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 2014, 345: 1250684
- [110] Christoph V, Silvine G, Giulia R, et al. Limited scope for maternal effects in aphid defence against parasitoids. *Ecol Entomol*, 2008, 33: 189-96
- [111] Norouzitallab P, Baruah K, Biswas P, et al. Probing the phenomenon of trained immunity in invertebrates during a transgenerational study, using brine shrimp *Artemia* as a model system. *Sci Rep*, 2016, 6: 21166
- [112] Hughes AL. Protein phylogenies provide evidence of a radical discontinuity, between arthropod and vertebrate immune systems. *Immunogenetics*, 1998, 47: 283-96
- [113] Klein J. Homology between immune responses in vertebrates and invertebrates: does it exist? *Scand J Immunol*, 1997, 46: 558-64
- [114] Aralachaves M, Sequeira T. Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates?. *Aquaculture*, 2000, 191: 247-58
- [115] Rath D, Amlinger L, Rath A, et al. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 2015, 117: 119-28