

文章编号: 1000- 0615(2000)05- 0399- 05

圆背角无齿蚌损伤后血细胞的吞噬活性

李 静, 石安静, 李 强
(四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064)

摘要: 模拟人工育珠手术对圆背角无齿蚌外套膜进行损伤后, 研究了其血细胞在 0~ 25d 对荧光极毛杆菌的吞噬活性的变化。结果发现, 圆背角无齿蚌 4 种血细胞中有吞噬能力的主要是颗粒细胞和无颗粒细胞。手术蚌血细胞的吞噬活性从手术后第 10 天起有了显著升高, 在第 20 天时达到最大, 而后开始下降; 血清对手术蚌和对照蚌血细胞的吞噬都具有调理作用。

关键词: 圆背角无齿蚌; 血细胞; 吞噬活性

中图分类号: S966. 22⁺ 4 文献标识码: A

Phagocytic activity of hemocytes from injured *Anodonta woodiana pacifica*

LI Jing, SHI An-jing, LI Qiang
(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Hemocytes of freshwater mussel (*Anodonta woodiana pacifica*) after injured in mantle were extracted from adductor, and the phagocytic activity against bacterium *Pseudomonas fluorescens* during 0- 25 days was studied *in vitro* assay. It was found that the granulocytes and agranulocytes of four type hemocytes had the ability of phagocytose. Phagocytic activity of hemocytes increased significantly from 10 days after mussel were injured, and came to the highest on 20 days, then reduced slowly. The serum from injured and control mussel showed an opsonization to the phagocytosis of hemocytes.

Key words: *Anodonta woodiana pacifica*; hemocyte; phagocytic activity

在贝类中, 由于特异性免疫功能还未得到良好发育, 它们对外来病原生物的防御, 主要是由巨噬性血细胞和多种非免疫性球蛋白性的血清因子介导的非特异性免疫^[1]。血细胞的吞噬作用是控制和清除病原生物侵扰的重要手段, 但环境条件的改变、外来物质的刺激会在一定程度上影响血细胞的活性^[2], 而机体损伤后对贝类血细胞活性的影响目前国内外尚无报道, 本文模拟人工育珠手术, 损伤圆背角无齿蚌外套膜后, 研究其血细胞吞噬活性的变化, 旨在探索贝类的免疫防御机理, 为人工育珠和贝类病害防治提供理论依据。

收稿日期: 1999- 03- 24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39770586)

作者简介: 李 静(1971-), 女, 四川资阳人, 讲师, 主要从事贝类生物学研究。Tel: 028- 5413989

1 材料和方法

1.1 材料

圆背角无齿蚌(*Anodonta woodiana pacifica* Heude)取自成都市大面铺池塘。
荧光极毛杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)由中科院水生生物研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 蚌的损伤

取大小相近的圆背角无齿蚌36只,分为实验组和对照组。实验组蚌分别用6号针头在其左右外套膜边缘各扎30~40个小孔,然后放入养蚌池中喂养,对照组蚌也放入同一池中。于手术后0、5、10、15、20、25d分别从实验组和对照组各取蚌3只,从闭壳肌抽血进行实验。

1.2.2 吞噬菌悬液的制备

荧光极毛杆菌于液体培养基中培养24h后,3 000 r·min⁻¹离心20min集菌,沉淀用蚌BSS稀释至一定浓度菌悬液,备用。

1.2.3 血细胞丢失的检测

血细胞的贴壁情况进行吞噬实验的基础,因此有必要检测用BSS洗去血清是否造成细胞的大量丢失。取健康蚌一只,用无菌注射器于闭壳肌抽血后,立即滴于玻片上,每张玻片滴5滴。10~15min待血细胞贴于玻片上后,一部分玻片立即用甲醇固定,姬姆萨染色,干燥后再用1%美兰复染,另一部分玻片用蚌BSS小心清洗2次,除去血清后再固定、染色。玻片于20倍光镜下观察,每张玻片计数5个视野,每个视野的血细胞数按其平均值计。

1.2.4 吞噬实验

吞噬实验参照Noda^[3]的方法,用无菌注射器于蚌闭壳肌抽血,迅速将血液滴于玻片上,每张玻片5~8滴,每只蚌滴8张片。10~15min待其贴壁后,取其中4张玻片滴加菌悬液2~3滴,进行吞噬;另外4张玻片则用蚌BSS小心清洗两次,洗去血清,然后再加菌悬液;将玻片置于湿盒中,于25℃孵育1h。固定、染色的方法同1.2.3。将玻片置于油镜下观察、计数,按李静等^[4]的方法判定血细胞的吞噬活性。

吞噬百分比(PP) = (100个血细胞中参与吞噬的细胞数/100) × 100

吞噬指数(PI) = 100个吞噬细胞内的细菌总数/100

2 结果

2.1 BSS清洗过程中细胞的丢失

圆背角无齿蚌血细胞贴附于玻片上形成一细胞层,多数细胞的细胞质铺展,末端伸出伪足,相互连接在一起,仅有少数凝集成团(图版-1)。经BSS清洗的玻片上,每个视野中血细胞平均数为(432 ± 21)个,而未经清洗的玻片上,血细胞数为(487 ± 32)个,t-检验显示,二者无显著差别(P > 0.05),这表明圆背角无齿蚌血细胞具有很强的贴附能力,经BSS清洗后,细胞无明显丢失。

2.2 圆背角无齿蚌血液中的吞噬细胞

圆背角无齿蚌血细胞可分为四类:

① 颗粒细胞,细胞核圆形或卵圆形,略偏位,细胞质染色较深,内有大小不等的颗粒(图版-2, 4)。这类细胞吞噬能力强(图版-6, 7)。

② 无颗粒细胞,细胞核圆形或椭圆形,染色质中度凝集,细胞质染色浅,内无颗粒(图版-2)。这

类细胞随手术时间延长吞噬能力逐渐增强(图版- 5, 6, 7)。

③透明细胞, 细胞核较其它细胞大, 染色质疏松, 细胞质十分铺展, 染色浅, 内无颗粒。这类细胞无吞噬能力(图版- 2)。

④类淋巴细胞, 细胞核较其它小, 可达细胞直径的 $1/2 \sim 2/3$, 染色质高度凝集, 细胞质少。这类细胞在血细胞中所占比例最少, 无吞噬能力(图版- 3)。

2.3 血细胞的吞噬活性

对照蚌和损伤蚌在 0~ 25d 内, 血细胞的吞噬百分比(PP)的变化如图 1 所示。由图可知, 手术蚌的 PP 随手术时间延长而逐渐增加。从第 10 天起检测到吞噬百分比显著高于实验当天和第 5 天(t - 检验, $P < 0.05$), 第 20 天最高, 达到 49.59%; 与对照组相比, 损伤蚌在 0~ 10d 的吞噬百分比与对照蚌并无显著差别(t - 检验, $P > 0.05$), 从第 15 天起, PP 显著高于了对照组(t - 检验, $P < 0.01$); 用 BSS 清洗除去血清后, 血细胞吞噬百分比的变化趋势与血清存在时相近。从第 10 天起 PP 有显著升高, 在第 20 天时最高, 约 31.06%, 从第 15 天起 PP 显著高于对照蚌(t - 检验, $P < 0.01$)。无论是损伤蚌还是对照蚌, 血清存在时的 PP 都高于无血清的情况。

对照蚌和损伤蚌在 0~ 25d 内, 平均每个血细胞吞噬的细菌数量(PI)变化如图 2 所示。由图可知, 损伤蚌 PI 随术后时间延长而逐渐增加。第 10 天起与前面有了显著差别(t - 检验, $P < 0.05$), 而 15~ 25d, PI 始终维持较高水平; 从第 10 天起, 损伤蚌 PI 显著高于了对照蚌(t - 检验, $P < 0.05$), 而对照蚌 PI 始终较低。与吞噬百分比不同的是, 血清存在时血细胞吞噬菌体的量与无血清时并无显著差别(t - 检验, $P > 0.05$)。

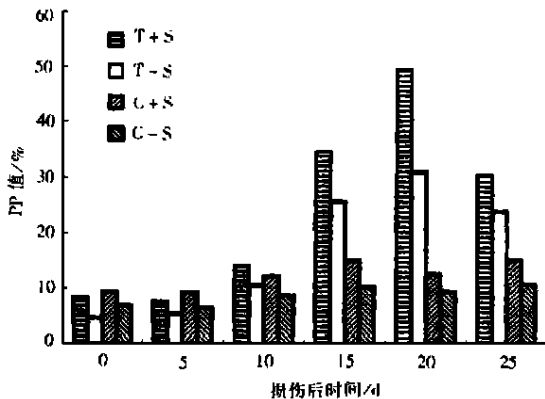


图 1 损伤蚌和对照蚌血细胞对荧光极毛杆菌的吞噬百分比(PP)

Fig. 1 Phagocytic percentage of hemocytes against *P. fluorescens* in injured and control mussel

T+ S: 损伤蚌含血清; T- S: 损伤蚌无血清; C+ S: 对照蚌含血清; C- S: 对照蚌无血清。

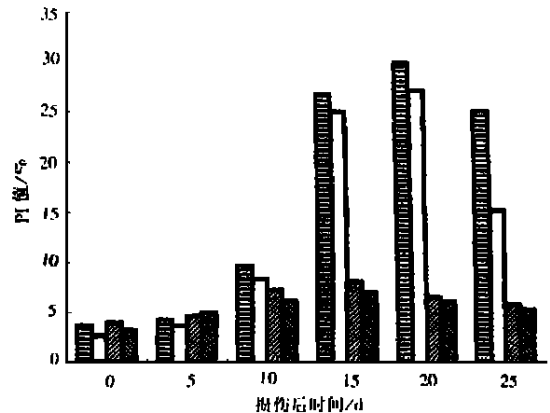


图 2 损伤蚌和对照蚌每个血细胞对荧光极毛杆菌的吞噬量(PI)

Fig. 2 Phagocytic index of each hemocyte against *P. fluorescens* in injured and control mussel

3 讨论

贝类血细胞在体外由于极易凝结在一起, 使得离体的检测不易进行; 而使用化学试剂抗凝又往往造成血细胞的形态乃至功能的改变, 因而对贝类血液中吞噬性细胞的划分至今尚无定论。本研究利用血细胞贴附于玻片的特性, 待贴壁后观察其吞噬, 并将蚌血细胞分为颗粒细胞、无颗粒细胞、透明细胞和类淋巴细胞 4 类, 这一划分与石安静^[5]的研究一致, Chenery^[6]曾将瓣鳃纲软体动物血细胞分为 8 类, 并认为其中的普通白细胞具有吞噬功能。和田浩尔^[7]和 Moore^[8]发现贝类血细胞中的颗粒细胞具有吞噬功能, 而我们发现血细胞中具有吞噬能力的主要是颗粒细胞和无颗粒细胞, 其中无颗粒细胞随着手术时间延长, 参与吞噬的量逐渐增多。在平常的情况下, 完成机体的一般吞噬功能

可能是颗粒细胞,因而和田浩尔和 Moore 在研究中,只发现颗粒细胞有吞噬作用;而当机体侵入大量病原微生物或异物时,所产生的某种强烈刺激使无颗粒细胞逐渐发挥吞噬功能,所以我们发现,随着手术时间延长,参与吞噬的无颗粒细胞逐渐增多,这可能是贝体免疫防御功能的一种应激反应。

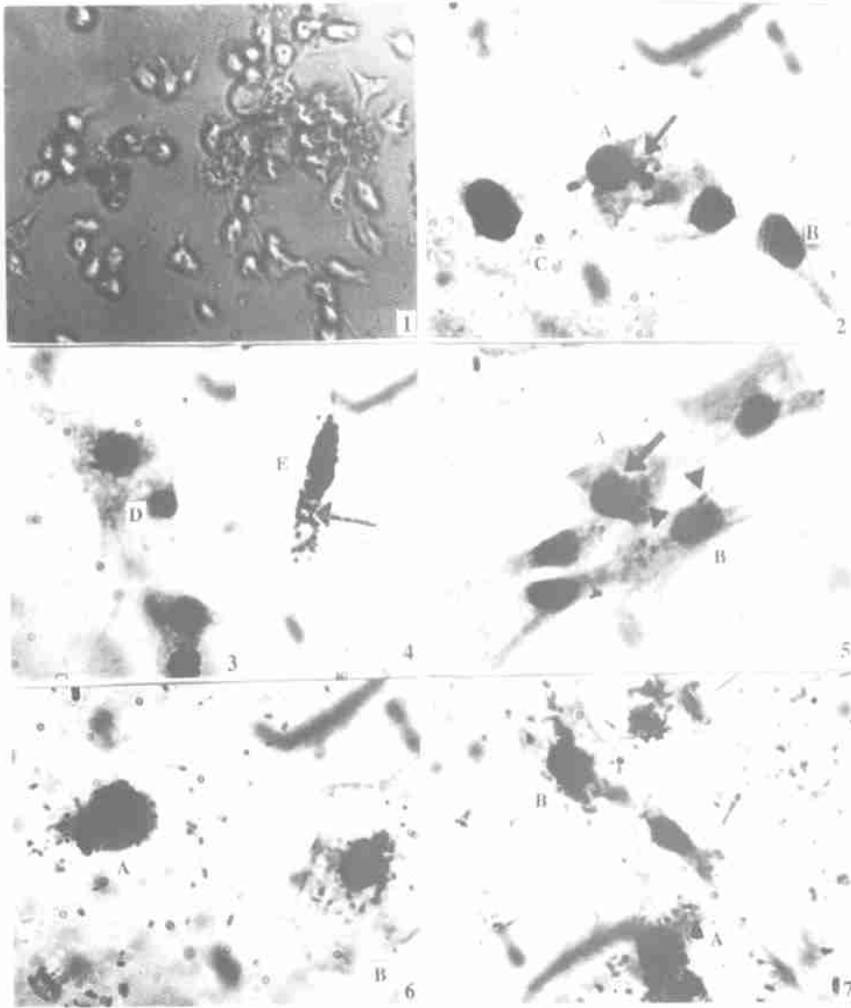
血细胞是贝体内抵御病原生物侵袭的主要屏障,在其防御机制中起着重要作用,血细胞吞噬活性的高低在一定程度上反映了机体的防御水平。本实验结果表明,手术蚌血细胞的吞噬活性随手术时间而逐渐上升,第 20 天达到最大,这表明在应激条件下,即蚌体受伤后,伤口暴露于水体,在病原生物大量进入的刺激下,蚌调动了机体所有的防御系统来控制 and 清除病原生物,因而免疫功能出现了一定的增强。在生产实践中,育珠蚌外套膜即使因手术植片而大面积受伤,伤口暴露于水体中,也不易感染病菌,其原因即在于此。由于是一种应激反应,血细胞活性的提高,也可作为一种病理检验指标。

蚌体受伤后,在 44h 内就可观察到血细胞大量渗入受伤组织,并凝聚成团,发挥止血和修复伤口的作用^[9]。而本研究发现手术蚌血细胞的活性直到第 10 天才有显著增高,在此之前都较低。这可能是由于受伤后,血细胞大量聚集到伤口处,堵塞伤口,起止血作用,使得循环系统中血细胞数量减少,而需经过一段时间才能恢复正常,即存在血细胞增生现象^[10],而这些新生的血细胞吞噬能力较弱,需经一段时间才能恢复;另一方面也可能是由于河蚌属于低等无脊椎动物,其血细胞对外界环境的变化不甚敏感的缘故。

本研究还表明,无论是损伤蚌还是对照蚌,其血清都具有调理活性,能有效促进血细胞的吞噬作用。杨军等^[11]也证明,经血清孵育后,血细胞对大肠杆菌的吞噬百分比显著增加。Sharon 等^[12]发现贝类血清及血细胞膜表面均有外源凝集素;Suzuki 等^[13]推测这些凝集素除了凝集病原生物,使之失去活动力外,还可以起调理素的作用。由于缺乏脊椎动物血清所具有的抗体、补体等调理因子,蚌血清的调理活性可能来自于凝集素,但血清中的凝集素是先天性的,不能经诱导而产生,因而本实验中,血清对对照蚌和损伤蚌的调理作用几乎是相同的。

参考文献:

- [1] Anderson R S. Effects of anthropogenic agents on bivalve cellular and humoral defense mechanism[J]. Am Fish Soc Spec Public, 1988, 18: 238- 242.
- [2] Anderson R S. Inducible hemolytic activity in *Mercuraria mercenaria* hemolymph[J]. Dev Com Immunol, 1981, 5: 575- 585.
- [3] Shinichi Noda, Eric S. Loker Phagocytic activity of hemocytes of M-line *Biomphalaria glabrata* snail: effect of exposure to the trematode *Echinostoma paraensei*[J]. Am Soc Parasitol, 1989, 75(2): 261- 269.
- [4] 李 静,陈昌福.低温季节草鱼离体白细胞吞噬活性的研究[J].水生生物学报,1998, 22(增刊):132- 137.
- [5] 石安静,邱安东,孙奇志.椭圆背角无齿蚌血细胞的活体观察[J].四川大学学报,1999, 36(2)332- 335.
- [6] Cheney D P. A summary of invertebrate leucocyte morphology with emphasis on blood elements of the manila clam, *Tapes semileuciscarta* [J]. Biol Bull, 1971, 140(3): 353- 368.
- [7] 和田浩尔.插核手术と真珠贝の生体防御反应[A].全真连技术研究会撮[C],1985,(1): 5- 29.
- [8] Moore C A. Cytochemical aspects of *Mercuraria mercenaria* hemocytes[J]. Biol Bull, 1972, 152:105- 119.
- [9] Sparks A K. Inflammation and wound repair in bivalve molluscs[J]. Am Fish Soc Spec Public, 1988, 18: 139- 152.
- [10] Feng S Y. Heart rate and leucocyte circulation in *Crassostrea virginica*[J]. Biol Bull, 1965, 128: 198- 210.
- [11] 杨 军,邱安东,石安静.圆背角无齿蚌血细胞吞噬作用的研究[J].动物学杂志,1999, 34(6): 5- 8.
- [12] Sharon N, Pollard M. Lectins: Cell agglutinating and sugar-specific proteins[J]. Science, 1972, 7: 949- 959.
- [13] Suzuki T, Mori K. Hemolymph lectin of the pearl oysters *pinctada fucata martensii*: a possible non-self recognition system[J]. Dev Comp Immunol, 1990, 14: 175- 184



1. 血细胞贴附于玻片的情况; 2~4. 血细胞类型, A: 颗粒细胞(箭头示颗粒), B: 无颗粒细胞, C: 透明细胞, D: 类淋巴细胞, E: 有的颗粒细胞中充满粗大颗粒(箭头示颗粒); 5. 颗粒细胞(A)和无颗粒细胞(B)吞噬少量细菌(损伤后 10d, 箭头示颗粒, 三角形示细菌); 6. 颗粒细胞(A)大量吞噬细菌, 无颗粒细胞(B)吞噬量少(损伤后 15d); 7. 颗粒细胞(A), 无颗粒细胞(B)皆大量吞噬细菌(损伤后 20d)(图 1 为相差显微镜活体摄影, $\times 360$; 图 2~7 为固定, 染色, 油镜摄影, $\times 1200$)。