

凡纳滨对虾血细胞图像流式检测与病原感染分析

李 荣¹, 任星潮¹, 张 宁¹, 王 媛¹, 刘逸尘¹,
张亦陈^{1*}, 耿绪云², 孙金生^{1*}

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387;

2. 天津市水产研究所, 天津 300221)

摘要: 血细胞是机体免疫系统的核心, 为了对其进行精细的类群划分和功能分析, 了解动物免疫防御的机制, 实验以体质量为 17~23 g 的凡纳滨对虾为对象, 分别根据显微观察的胞内可辨颗粒结构和流式测量的细胞侧向散射特征探讨了其血淋巴的细胞类群, 并进一步探讨了在副溶血性弧菌和白斑综合征病毒两种病原感染早期, 主要响应的血细胞类群及其数量变化等特征。结果显示, 两种方法都能从凡纳滨对虾血淋巴中辨识出无颗粒、小颗粒、中颗粒以及大颗粒四种血细胞, 其中无颗粒细胞占比都接近 70%, 另外 3 种颗粒细胞合计占比均为 30% 左右, 但细分比例统计有差异。脂质染料 DID 显示胞内颗粒普遍被膜, 中颗粒和大颗粒细胞内的颗粒大小较均匀, 提示了其内源性的形成机制; 大颗粒细胞大小分布区间最窄且充满颗粒, 表明其可能处于发育终末阶段, 功能与分泌相关。通过测量发现, 在两种病原感染早期, 承担吞噬功能的无颗粒细胞和小颗粒细胞是主要响应类群, 总体趋势均表现为细胞计数先降后升, 推测感染后大量血细胞由于被用于清除病原而导致短时间内损失较多。副溶血性弧菌感染 24 h 后细胞总数降至低点, 而白斑综合征病毒感染后的低点出现在 36~48 h, 相较略有延后并持续较长时间, 可能与病毒需先入胞并进行复制等过程有关。研究表明, 甲壳动物的血细胞可以用相近的量化标准分群, 它们通过不同的方式参与病原刺激的免疫应答。

关键词: 凡纳滨对虾; 血细胞; 图像流式细胞术; 副溶血性弧菌; 白斑综合征病毒; 感染
中图分类号: S 945.1 **文献标志码:** A

虾类养殖是水产业的重要支柱, 中国是全球最大的对虾养殖国家, 且虾类养殖面积和产量快速上升^[1]。凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 又称南美白对虾, 因其生长快、肉质鲜美, 且广温广盐的特性, 养殖经济效益显著, 与中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 和斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 并列为世界三大养殖对虾品种^[2]。随着对虾养殖规模的不断扩大, 其病害也日趋严重,

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、鳃弧菌 (*V. anguillarum*) 和哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 等多种细菌性病原以及白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV)、黄头病毒 (yellow-head virus, YHV) 和桃拉综合征病毒 (Taura syndrome virus, TSV) 等各种病毒性病原导致病害频发, 制约了对虾养殖业的快速发展^[3-4]。水产动物的免疫机制以及病害检控技术等理论和应用研究显得尤为重要。

收稿日期: 2020-10-30 修回日期: 2021-01-30

资助项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (19JCYBJC29700, 15JCZDJC33800); 天津市水产生态及养殖重点实验室开放基金 (TJAE2015005); 国家自然科学基金 (31472299)

第一作者: 李荣 (照片), 从事水生生物学研究, E-mail: 2395933219@qq.com

通信作者: 张亦陈, 从事水生生物学研究, E-mail: skyzyc@tjnu.edu.cn;

孙金生, 从事水生生物学研究, E-mail: skysjs@tjnu.edu.cn



虾、蟹等甲壳动物不具备完善的获得性免疫能力, 但依然能够抵抗很多病原的感染, 表明其自身的先天免疫系统也具备十分强大的防御能力。血细胞是机体免疫功能的核心承担者, 其种类和数量等特征及变化可以直接反映机体的健康状况。晋伟等^[5]提出有必要将新的技术和方法引入水生动物血液分析等领域, 以提升目前监测能力和水平, 因此建立一种基于定量测量的“验血”方法将有助于完善甲壳动物健康监测体系, 把监测时间点提前, 满足防重于治的要求, 也可进一步服务于免疫学研究。

流式测量是常用的血细胞量化分析策略, 针对甲壳动物已经有多种流式分析方法的报道, 大部分可以将血细胞分为 2~3 个类群^[6-9], 胡锦涛等^[10]利用新型图像流式细胞仪将中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 血细胞清晰地分为 4 类。准确区分血细胞的精细类群是系统分析其功能和检测健康状况的前提。本研究以凡纳滨对虾为对象, 针对虾类开展血细胞定量测量的分类分析研究, 并探讨常见病原感染后血细胞类群与数量的变化, 以了解各类细胞在应对病原感染过程中的作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料、试剂与仪器

实验动物 凡纳滨对虾体长 13~15 cm, 体质量 17~23 g, 由天津市水产研究所提供, 置于实验室循环养殖系统暂养 4 d, 水温 (25±1) °C, 盐度 1~2, 每天投喂 2 次。

实验试剂 抗凝剂 (柠檬酸钠 27 mmol/L、氯化钠 336 mmol/L、葡萄糖 115 mmol/L、乙二胺四乙酸二钠 9 mmol/L, pH=7.4), 4% 多聚甲醛固定液购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 脂质染料 DID 购自英潍捷基 (上海) 贸易有限公司, 其他试剂均为国产分析纯级。

实验仪器 Leica DM 5000 型荧光显微镜, Merck Millipore FlowSight 型图像流式细胞仪等。

1.2 实验方法

血细胞样品制备 用无菌吸水纸擦拭采血部位的残留水分, 用一次性 1 mL 无菌注射器吸取 500 μL 预冷的抗凝剂, 从凡纳滨对虾的附肢基部抽取等体积血淋巴, 迅速转移到预冷的 1.5 mL 离心管中后颠倒混匀。4 °C、500×g 离心 10 min,

弃上清液。用 4% 多聚甲醛重悬细胞, 冰浴固定 10 min 后用预冷的 PBS 缓冲液洗去固定液并重悬细胞, 用 Hausser 亮线计数板测定其血细胞密度。亲脂性荧光染料 DID 的染色按试剂盒手册流程操作。

血细胞的显微观察和图像流式细胞术测量

随机取 10 尾凡纳滨对虾, 将按前述方法制备的血细胞悬液经 70 μm 细胞筛过滤后, 分别进行显微观察和图像流式细胞术测量分析。显微观察依据明场和荧光视场中细胞内可分辨颗粒结构的大小、数量等特征进行类群区分; 流式方法针对每个样品, 采集 30 000 个样点的明场 (BF) 通道和侧向散射 (SSC) 通道的数据以及图像, 经 IDEAS Application 软件处理和分析后, 分别以侧向散射强度 (intensity) 和侧向散射面积 (area) 为横、纵坐标做散点图, 依据图中单细胞样点的分布和形成的聚集类群划分细胞种类, 并与显微镜观察结果对比。

病原刺激对血细胞影响的分析 从实验室循环水养殖系统中取体表无伤、附肢完整、活力正常的凡纳滨对虾进行注射感染实验。分别设置每个采样时间点 3 组各 10 尾的平行实验组以及对照组。感染所用的病毒病原为 WSSV (本实验室保存), 细菌病原为副溶血性弧菌 (天津市水产研究所馈赠)。病毒和细菌感染实验组每尾对虾分别注射 10 μL 的 WSSV 或副溶血性弧菌悬液, 感染量参考 10 d 的半致死剂量。各对照组每尾对虾则分别注射等体积的用于悬浮病毒的 TN 缓冲液 (Tris/HCl 50 mmol/L, NaCl 10 mmol/L, pH=7.4) 或悬浮细菌的 PBS 缓冲液 (氯化钠 137 mmol/L、氯化钾 2.6 mmol/L、磷酸二氢钾 1.5 mmol/L、磷酸氢二钠 8 mmol/L, pH=7.4)。按“血细胞样品制备”中的方法采集注射病原后 6、12、24、36、48、60 和 72 h 各组及对照的血细胞样本, 进行显微观察和流式测量, 并分析病原感染对血细胞的影响。

2 结果

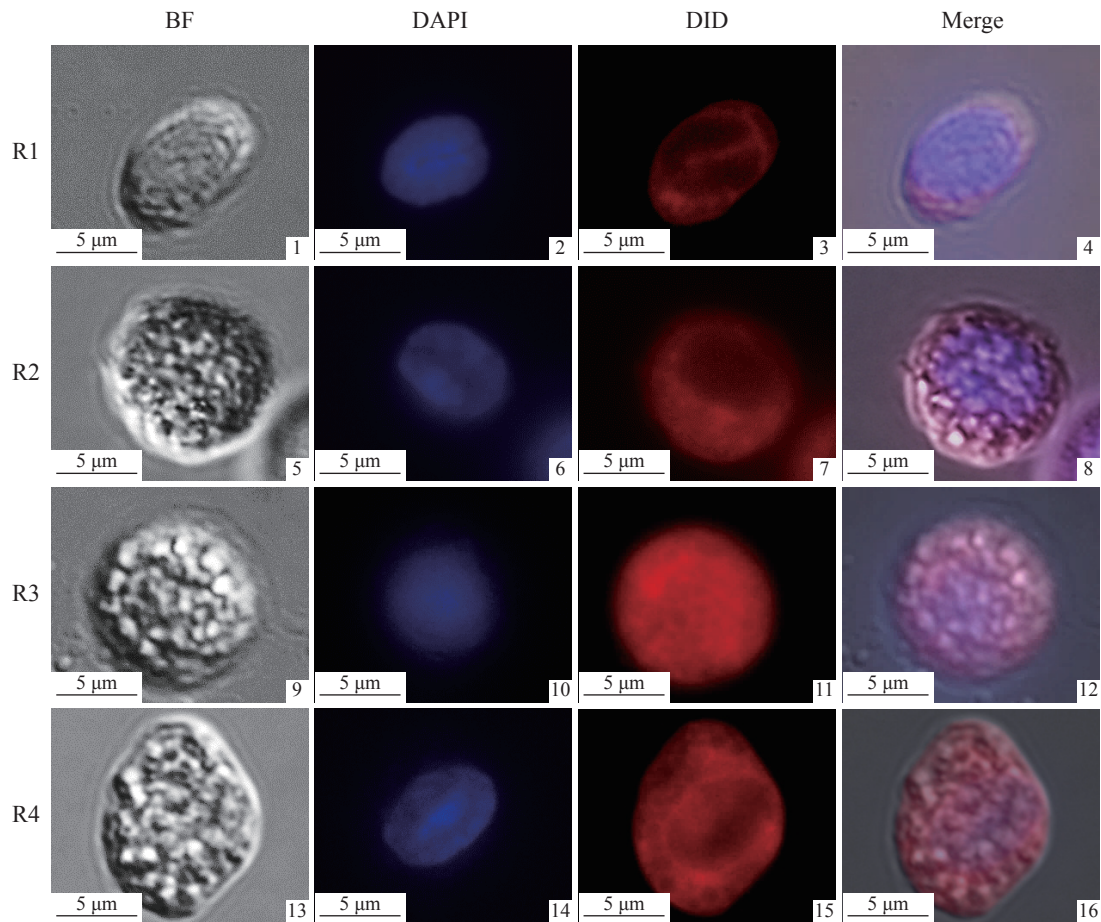
2.1 显微观察和流式测量的血细胞分类结果

显微观察依据胞内可辨识颗粒结构的大小、数量及分布等特征对血细胞类型进行区分, 流式测量则参考侧向散射特征的差异划分类群。两种方法都可将凡纳滨对虾血细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞、中颗粒细胞和大颗粒细胞, 在本研究中依次以 R1~R4 标识。显微观察的辨识参考了

明场和暗场(荧光视场)显示的颗粒特征, 各类细胞的主要辨识特点: 大颗粒细胞内部一般都充满大小相近的大型球状的高折光性颗粒结构, 颗粒直径普遍可达 $1\ \mu\text{m}$ 左右, 通过脂质染料的荧光图像可见颗粒具有清晰的被膜, 表明颗粒系胞内的大型囊泡状结构(图版); 由于大量颗粒的遮挡, 明场观察难以看到细胞核; 另外, 实验中也观察到虽然大颗粒细胞的体积普遍较大, 但也有一些体积较小的细胞, 内部同样充满直径约 $1\ \mu\text{m}$ 的大型颗粒, 根据辨识特征也将其划入大颗粒细胞, 该类型细胞比例很低。中颗粒细胞内同样具有体积彼此接近的球形颗粒, 折光性略低于前者, 通过脂质染料增强显示, 能分辨出与明场图像对应的近球形膜结构, 其大小约为前述类群胞内大型颗粒的 $2/3$ (图版); 此外, 由于颗粒遮挡, 该类细

胞的核通常也不能完整显示。与前两类细胞的胞质颗粒大小较均匀的特征相比, 小颗粒细胞内的颗粒则具有碎且不匀的特点, 即内部颗粒大小不一, 细碎结构占比较大, 而且颗粒总体数量不多, 细胞核通常可见。无颗粒细胞主要特征是核质比很大, 胞质少且几乎不含有明显可辨的颗粒, 虽然明场观察到一些细胞内仍可见少量不规则凹凸结构, 但基本不具有清晰完整的颗粒形态。

与显微观察不同, 流式细胞仪通过定量测量侧向散射强度和面积等参数, 并依据这些特征的差异来划分细胞类群, 因此其反映的是各个细胞中所有颗粒结构的在复杂程度和总量分布方面的总体差异。图1显示细胞样点在散点图中可聚集成4个类群, 边界清晰。R1类群属于无颗粒细胞, 其样点分布于散点图底部, 表明胞内缺乏复杂的



图版 凡纳滨对虾血细胞的显微观察分类(1 000×)

R1.无颗粒细胞; R2.小颗粒细胞; R3.中颗粒细胞; R4.大颗粒细胞; BF.明场通道图像; DAPI. DAPI 染料通道图像; DID. DID 染料通道图像; Merge.拟合图像, 下同

Plate Classification of *L. vannamei* hemocytes by micro-observation (1 000×)

R1. non-granular hemocyte; R2. small-granular hemocyte; R3. intermediate-granular hemocyte; R4. large-granular hemocyte; BF. image from bright field channel; DAPI. image from DAPI channel; DID. image from DID channel; Merge. merged image, the same below

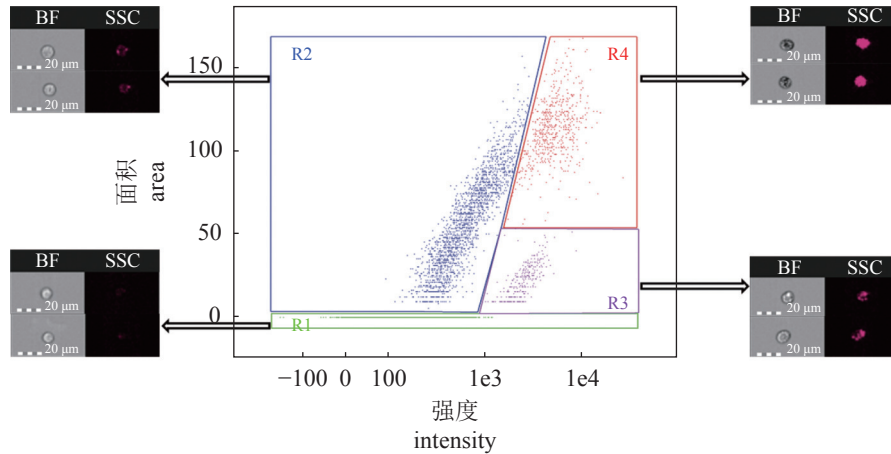


图 1 凡纳滨对虾血细胞的图像流式分类分析

SSC. 图像流式细胞仪的侧向散射通道图像

Fig. 1 Classification of *L. vannamei* hemocyte by imaging flow cytometry

SSC. Image from side scatter channel of imaging flow cytometer

颗粒, 而且折光物质总体含量非常低, 同步采集的图像也显示胞内没有折光信号。R2 类群是小颗粒细胞, 样点分布在左侧, 说明其中含有一定的折光物质, 但结构不太复杂, 图像通道显示有较弱的侧散信号。位于散点图右下角的 R3 类群归属中颗粒细胞, 其分布区间提示胞内具结构较复杂的折光物质, 但总量并不多, 图像呈现出清晰的侧向散射信号也佐证了胞内具有明显的颗粒结构。R4 类群集中在散点图右上角, 显示该类群细胞内含有大量复杂的颗粒结构, 属于大颗粒细胞, 同步细胞侧散图像呈现最显著的信号, 且信号在胞内分布面积最大, 明场通道的高反差图像也提示了其颗粒的总体特征。从无颗粒细胞和各种含有颗粒细胞的合计占比来看, 两种方法的结果较接近, 即无颗粒细胞比例都在 70% 左右。但颗粒细胞的细分类别比例有差异。

进一步测量了经流式区分的 4 群细胞的大小, 从 R1 到 R4 类群, 血细胞大小的分布区间和均值都逐渐右移, R4 类群细胞最大, 但分布范围最小(图 2)。表 1 对不同方法区分血淋巴细胞的类型和比例进行了对比。

2.2 注射感染后血细胞浓度变化结果

凡纳滨对虾注射感染副溶血性弧菌后 72 h 内血细胞浓度波动范围较大, 感染后 24 h, 血淋巴细胞总量降至低点, 随后缓慢回升至略高于对照组, 在此期间, 各类血细胞中波动最大的是 R1 和 R2 类群, 无颗粒细胞在注射病原后 24 h 降至最低, 相比对照组下降 47%, 随后开始回升, 并

在感染 48 h 之后回升至高点。感染最初 6 h, 血细胞计数总量变化不大, 但小颗粒细胞占比出现一个陡升, 接着逐步下降, 至 24 h 为低点, 而后再回升至初始水平附近, 总体呈现出一种快速反应的趋势。与前两类细胞相比, 颗粒含量较多、颗粒较大的两类细胞在数量上对感染的响应则不够显著, 感染后各个时间点波动不大(图 3)。

对比弧菌感染, 注射病毒感染后血细胞计数的下降时程略有延后, 在 36~48 h 呈现低值, 随后回升。WSSV 感染后血细胞总量变化结果显示, 在注射病毒后 2 天之内呈现显著下降的趋势, 随后又快速回升。分别从各类细胞计数变化来看, R1 和 R2 类群细胞变化最为显著, 总体趋势也较接近, 都呈现先略升高, 再下降, 后期持续回升的模式。其中 R1 波动最大, 在感染后 36~48 h 下降近 80%, 由于该类群占比最大, 所以直接导致血细胞计数的整体降低。与此同时, R2 降幅也近 70%。R3 类群的数量在应答病毒感染过程中波动最小。R4 类群的数量变化在 36 h 时有明显降低, 其他各时间点数量仅有小幅波动(图 4)。

3 讨论

血细胞遍及动物全身, 是免疫系统的核心。它们一方面通过吞噬等方式完成细胞免疫, 另一方面还可通过合成并向血淋巴中分泌各种免疫相关酶类及杀伤因子等成分支撑甲壳动物的体液免疫防御^[21-24]。因此深入解析血细胞的类群构成, 以及病原入侵过程中的响应机制等, 有助于全面、

表 1 甲壳动物血细胞的不同分类方法和结果

Tab. 1 Different methods and results of hemocyte classification of crustacean

物种 species	分类方法 classification methods	不同种类细胞的比例/% proportion of different hemocyte types				文献 references
		无颗粒细胞 non-granular hemocyte	小颗粒细胞 small-granular hemocyte	中颗粒细胞 intermediate-granular hemocyte	大颗粒细胞 large-granular hemocyte	
墨吉对虾 <i>Penaeus merguiensis</i>	流式测量	26.30±2.60	49.31±4.17		12.42±1.66	[11]
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	流式测量	28.69±2.79	45.70±4.55		10.15±1.20	
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	流式测量	27.21±2.67	48.75±3.92		10.59±1.28	
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	显微观察	47.3	13.1		39.6	[12]
中国明对虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	显微观察	25.32	61.79		12.89	[13]
日本对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	显微观察	0.6~2.7	79.2~84.4		14.8~20.1	[14]
加州对虾 <i>Penaeus coliforniensis</i>	显微观察	12.1±4.3	78.6±6.8		9.3±4.6	[15]
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	显微观察	21.11±1.61	33.54±0.98	15.31±2.01	30.05±1.11	[16]
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	显微观察	18.70±3.92	76.03±3.34		5.27±0.42	[17]
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	流式测量	26.25±5.29	51.44±7.02		11.20±1.82	[18-19]
罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	显微观察	17.05±1.35	55.09±1.79		27.86±1.75	
罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	流式测量	13.76±1.73	58.54±1.93		23.68±2.17	
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	显微观察	18.31±4.12	38.21±10.73	20.10±7.78	23.37±3.24	[20]
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	流式测量	54.33±3.38	27.63±2.10	5.43±0.35	12.51±3.38	
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	显微观察	69.88±4.71	9.04±5.06	11.13±7.02	9.96±1.31	
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	流式测量	74.88±3.97	20.75±4.07	2.94±0.72	1.25±0.58	

系统地了解甲壳动物各类免疫细胞的功能以及整个免疫系统的防御机制。

显微观察是简便、常用的一种细胞分类辨识方法，通过直接观察或染色对比血细胞之间的差异划分类别，但缺乏统一的判定依据，因此主观性较强，4种对虾的血细胞都可划分为三类(表1)，而比例差异却非常显著，尤其在缺乏颗粒的细胞的占比方面^[12-15]，非染色条件下对颗粒的边界和大小的准确辨识较困难，本研究利用脂质染料增强显示了颗粒的被膜结构，有利于了解胞内颗粒的更多形态细节和差异。参考镜下可辨的颗粒结构在形态和数量方面的差异，可从凡纳滨对虾血

淋巴中区分出4类血细胞，其中无颗粒细胞占比最大，胞内不含有明显的颗粒结构，小颗粒细胞的颗粒以散、碎为特征，另外两种颗粒细胞分别含有形态较均匀的中型和大型颗粒结构。从细胞大小分布来看，大颗粒细胞的形态最大，但体积分布区间最小，推测一方面与其占比较低有关，另一方面由于其内部充满颗粒结构，因此可能处于发育的终末阶段，胞内物质大量积累，体积逐步接近上限。陆宏达^[25]认为颗粒系由高尔基体逐步融合形成，本研究证实这些颗粒可被脂质染料着色，表明其普遍具有膜包裹特性。值得关注的是，这些结构尤其是大颗粒和中颗粒细胞中的颗

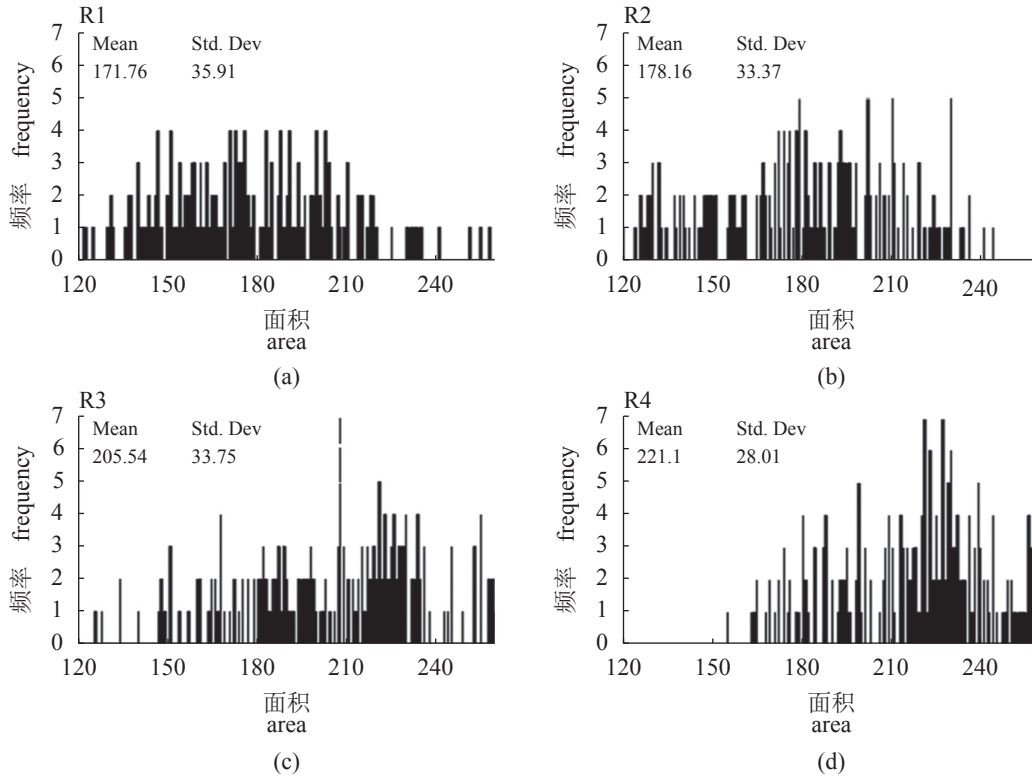


图 2 凡纳滨对虾体内 4 种血细胞大小分布

Fig. 2 Size distribution of 4 hemocyte populations from *L. vannamei*

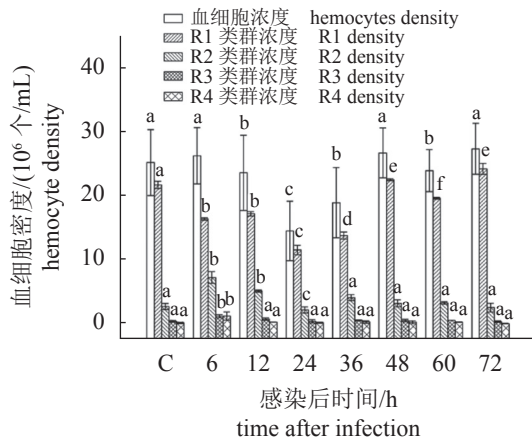


图 3 凡纳滨对虾感染副溶血性弧菌后不同类型血细胞浓度的变化

不同小写字母表示各组之间的差异显著 (P < 0.05), C. 对照, 下同

Fig. 3 Hemocytes concentration of *L. vannamei* infected by *V. parahaemolyticus*

Different small letters above the columns indicate significant difference between each groups (P < 0.05), C. control, the same below

粒都比较均匀, 也提示其内源性生成机制, 颗粒中可能储存多种重要的功能分子, 并通过脱颗粒等方式将积累的物质释放到血淋巴中, 从而在体液免疫中发挥作用。Smith 等^[26]发现颗粒中的组

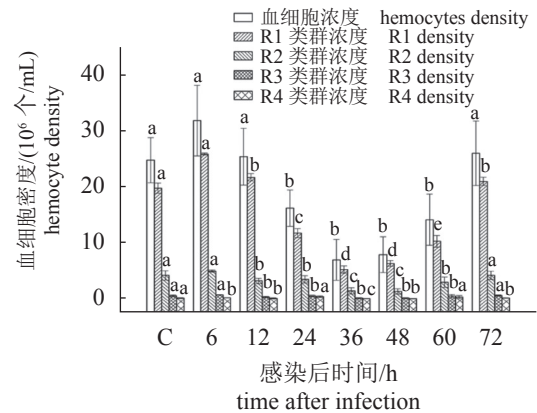


图 4 凡纳滨对虾感染 WSSV 后不同类型血细胞浓度的变化

Fig. 4 Hemocytes concentration of *L. vannamei* infected by WSSV

分具有酚氧化酶活性。胡锦涛等^[10]证实中华绒螯蟹的无颗粒和小颗粒细胞是主要的吞噬细胞类群, 承担细胞免疫功能, 而大颗粒细胞仅具有微弱的吞噬功能。目前大多数研究认为甲壳动物血细胞可以辨识出 3~4 种类型, 但甲壳动物种类众多, 各有特点, 因此对其血细胞类群划分和比例也存在差异, Martin 等^[27]发现卤虫只有一种圆盘状血

细胞。Jacobsen 等^[28]认为蜆 (*Tachypleus tridentatus*) 含有两种血细胞, 其中含有颗粒的细胞占比约 97%。van de Braak 等^[29]通过曙红染色差异将斑节对虾血细胞分为 5 种。另一方面, 甲壳动物在不同发育阶段及生存环境中, 其血淋巴各类细胞的计数 (differential haemocyte counts, DHC) 也存在差异^[8, 27, 30]。由于缺乏统一的标准, 研究者对不同物种血细胞类型的判别, 甚至不同研究者针对同一物种的血细胞类型判别均可能存在差异^[31]。

显微观察以形态学特征的异同来区分细胞类型的主观性较强, 流式测量以单个细胞为对象, 采用精密的测量模块对细胞物理特征的参数进行高通量分析可以获得相对客观的结果。流式细胞术通过折光结构的总体侧向散射情况来呈现胞内颗粒信息, 与利用显微镜探查可辨颗粒结构的大致数量与分布特征之间既有一定的相关性又有差异。对比本研究中显微观察和流式测量结果, 在无颗粒细胞占比方面较接近, 在其他各种含有颗粒的细胞细分比例方面有所不同, 流式测量的大颗粒细胞占比较小。常规流式细胞仪的测量模块可从甲壳动物血淋巴中区分出 2~3 种血细胞^[6-9]。近年来, 一些新型流式细胞仪改进了管路设计, 对样品的适应性更广, 而且增加了测量模块, 有些还选用了独特的 785 nm 激光器分析侧向散射参数, 提升了测量精度, 可以利用更多特征对细胞进行类群区分。胡锦涛等^[10]通过 785 nm 模块测量胞内全部折光物质侧向散射强度等特征的差异, 首先利用量化标准将中华绒螯蟹血细胞清晰分为 4 个类群, 本研究进一步证实类似的测量方式也可将凡纳滨对虾血细胞分为 4 个类群, 而且类群分布特征与中华绒螯蟹一致。由于流式散点图显示各类群之间有清晰的界限, 提示在外周血中, 细胞类群之间可能没有连续的转换关系。上述结果表明多种甲壳动物血细胞在胞内折光物质总量及分布特征等方面具有相似的模式, 但从各类细胞占比来看, 不同物种又存在明显的差异。另一方面, 同一物种采用不同的分群参数所获得的结果也会有明显差异, 孙敬锋等^[11]通过常规流式细胞仪测量前向散射高度 (FSC-H) 与侧向散射高度 (SSC-H) 这组与本研究不同的参数, 可将凡纳滨对虾等三种对虾的血细胞分为 3 类 (表 1)。

血细胞的流式定量分类分析可以服务于科学研究和健康监测等多种需求。胡锦涛等^[10]利用荧光微球模拟病原等异物, 测量了中华绒螯蟹各类

血细胞的吞噬效率, 也证明无颗粒和小颗粒细胞是主要吞噬类群。周鲜娇等^[31]用副溶血性弧菌感染凡纳滨对虾, 并在更长的时间内分析血细胞计数变化, 发现在有噬菌体保护的情况下, 凡纳滨对虾血细胞计数在感染后 10 h 内也呈现先降低后回升的趋势, 但未指明单独的细胞类群如何应答。本研究测量了不同病原感染后 72 h 内, 凡纳滨对虾各类血细胞的变化情况。从血细胞响应类群来看, 两种病原感染后各类细胞计数都有先降后升的趋势, 但无颗粒和小颗粒细胞波动最大。杨丰等^[32]认为感染后, 大量血细胞被用于清除病原, 是短时间内损失较多的原因。从血细胞数量变化的响应时间来看, 两种病原感染早期都会引起血细胞数量下降, 但 72 h 内可逐步回升。另外, 注射病毒感染组的血细胞计数低谷较细菌组滞后约 12 h, 并持续较长时间, 可能与病毒需要经历入胞、复制、释放以及宿主免疫系统响应清除等复杂过程有关。显微观察和流式测量等细胞水平的检测方法可以快速、直观地呈现细胞水平的免疫应答特征, 而对其中更深入的响应机制的解析, 还需要进一步挖掘与上述特征相关的基因及其表达变化规律。

本研究探讨了一种适用于凡纳滨对虾血细胞的高通量分类分析方法, 通过测量证实病毒和细菌两种病原感染早期, 血细胞的主要响应类群以及响应方式具有一定的相似性, 提示甲壳动物血细胞分化程度不高, 可能以吞噬等较为简单的天然免疫方式应对病原和异物的早期入侵。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 孙松, 孙琛. 我国对虾养殖净收益影响因素分析[J]. 海洋开发与管理, 2019, 36(3): 94-99.
Sun S, Sun C. Analysis on the influencing factors of net income of shrimp aquaculture in China[J]. Ocean Development and Management, 2019, 36(3): 94-99 (in Chinese).
- [2] 李春艳, 白晓慧, 刘义, 等. 致病性副溶血弧菌 VP0630 株的分离鉴定及其对凡纳滨对虾免疫酶活力的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(4): 502-508.
Li C Y, Bai X H, Liu Y, et al. Isolation, identification and effect of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* VP0630 strain on non-specific immune enzyme activit-

- ies of Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2020, 35(4): 502-508 (in Chinese).
- [3] 贾丹, 史成银, 黄捷, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 103-111.
- Jia D, Shi C Y, Huang J, *et al.* Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 103-111 (in Chinese).
- [4] Tran L, Nunan L, Redman R M, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 45-55.
- [5] 晋伟, 刘逸尘, 张树花, 等. 鱼类血细胞研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(12): 27-30.
- Jin W, Liu Y C, Zhang S H, *et al.* Research progress on fish haemocyte[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(12): 27-30 (in Chinese).
- [6] Koiwai K, Alenton R R R, Shiomi R, *et al.* Two hemocyte sub-populations of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Molecular Immunology*, 2017, 85: 1-8.
- [7] Havanapan P O, Taengchaiyaphum S, Ketterman A J, *et al.* Yellow head virus infection in black tiger shrimp reveals specific interaction with granule-containing hemocytes and crustinPm1 as a responsive protein[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 54(1): 126-136.
- [8] Du J, Zhu H X, Ren Q, *et al.* Flow cytometry studies on the *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes sub-populations and immune responses to novel pathogen spiroplasma MR-1008[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 795-800.
- [9] Denis M, Thayappan K, Ramasamy S M, *et al.* Opsonic function of sialic acid specific lectin in freshwater crab *Paratelphusa jacquemontii*[J]. *SpringerPlus*, 2015, 4: 601.
- [10] 胡锦涛, 任星潮, 刘逸尘, 等. 图像流式细胞仪在中华绒螯蟹血细胞分群及吞噬功能研究中的[J]. 水产学报, 2019, 43(3): 563-572.
- Hu J L, Ren X C, Liu Y C, *et al.* Application of imaging flow cytometry in studies of the classification and phagocytic function of *Eriocheir sinensis* blood cell[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(3): 563-572 (in Chinese).
- [11] 孙敬锋, 冼健安, 张铁军, 等. 流式细胞术比较研究三种对虾血细胞的分群[J]. 淡水渔业, 2008, 38(3): 18-22.
- Sun J F, Xian J A, Zhang T J, *et al.* Flow cytometric comparison of haemocyte classification in three species of shrimps[J]. *Freshwater Fisheries*, 2008, 38(3): 18-22 (in Chinese).
- [12] 廖永岩, 周友广. 黑斑口虾蛄血细胞的显微观察及与斑节对虾血细胞的比较[J]. 海洋科学, 2000, 24(10): 14-17.
- Liao Y Y, Zhou Y G. Microscopic observation and comparison of hemocyte of *Oratosquilla kempfi* (Schmitt) and *Penaeus monodon*[J]. *Marine Sciences*, 2000, 24(10): 14-17 (in Chinese).
- [13] 叶燕玲, 陈宽智. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)血细胞超微结构、分类及计数[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(2): 35-42.
- Ye Y L, Chen K Z. Studies on the circulating hemocytes of *Penaeus chinensis*[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1993, 23(2): 35-42 (in Chinese).
- [14] 于建平. 日本对虾血细胞分类、密度及组成[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(1): 107-114.
- Yu J P. Hemocyte classification, density and percentage of the prawn *Penaeus japonicus*[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1993, 23(1): 107-114 (in Chinese).
- [15] Martin G G, Graves B L. Fine structure and classification of shrimp hemocytes[J]. *Journal of Morphology*, 1985, 185(3): 339-348.
- [16] 洪宇航, 杨筱珍, 成永旭, 等. 中华绒螯蟹的血细胞组成、分类及免疫学功能[J]. 水产学报, 2017, 41(8): 1213-1222.
- Hong Y H, Yang X Z, Cheng Y X, *et al.* The composition and classification of hemocytes from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and primary research on immunological functions[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(8): 1213-1222 (in Chinese).
- [17] Zhou Y L, Gu W B, Tu D D, *et al.* Hemocytes of the mud crab *Scylla paramamosain*: cytometric, morphological characterization and involvement in immune responses[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 459-469.
- [18] 冼健安, 王安利, 苗玉涛. 流式细胞术在克氏原螯虾血

- 细胞的分类、活性和免疫功能研究中的应用[J]. *淡水渔业*, 2012, 42(1): 9-14,57.
- Xian J A, Wang A L, Miao Y T. Application of flow cytometry in studies of classification, viability and immune parameters of *Procambarus clarkii* Haemocytes[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(1): 9-14,57 (in Chinese).
- [19] 洗健安, 王安利. 流式细胞术和显微观察对罗氏沼虾血细胞的比较研究[J]. *水生态学杂志*, 2009, 2(5): 90-94.
- Xian J A, Wang A L. Comparison of flow cytometry and light microscopy on the analysis of *Macrobrachium rosenbergii*, haemocytes[J]. *Journal of Hydroecology*, 2009, 2(5): 90-94 (in Chinese).
- [20] 胡锦涛, 刘逸尘, 任星潮, 等. 图像辅助流式细胞仪在中华绒螯蟹血细胞分析中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(24): 145-148,204.
- Hu J L, Liu Y C, Ren X C, et al. Application of image-based flow cytometry in hemocyte analysis of *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(24): 145-148,204 (in Chinese).
- [21] Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1-3): 45-52.
- [22] 吴芳丽, 王月, 尚跃勇, 等. 水生无脊椎动物血淋巴细胞分类及免疫研究进展[J]. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(6): 696-704.
- Wu F L, Wang Y, Shang Y Y, et al. Current progress of research on classification and immunity of hemocytes in aquatic invertebrates: a review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, 31(6): 696-704 (in Chinese).
- [23] 谢鹏. 脂多糖、多巴胺对凡纳滨对虾血细胞作用机制的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- Xie P. Effects of lipopolysaccharide and dopamine on haemocytes of shrimp *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010 (in Chinese).
- [24] Li M, Li C W, Wang J F, et al. Immune response and gene expression in hemocytes of *Portunus trituberculatus* inoculated with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium*[J]. *Molecular Immunology*, 2015, 65(1): 113-122.
- [25] 陆宏达. 中华绒螯蟹血细胞的显微、亚显微形态结构及其分类[J]. *水生生物学报*, 2002, 26(5): 494-500.
- Lu H D. Classification and morphological observations of haemocytes in *Eriocheir sinensis* by light and electron microscopies[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(5): 494-500 (in Chinese).
- [26] Smith V J, Söderhäll K. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*[J]. *Cell and Tissue Research*, 1983, 233(2): 295-303.
- [27] Martin G G, Lin H M, Luc C. Reexamination of hemocytes in brine shrimp (Crustacea, Branchiopoda)[J]. *Journal of Morphology*, 1999, 242(3): 283-294.
- [28] Jakobsen P P, Suhr-Jessen P. The horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* has two kinds of hemocytes: granulocytes and plasmatocytes[J]. *The Biological Bulletin*, 1990, 178(1): 55-64.
- [29] van de braak C B T, Fober R, Boon J H. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph[J]. *Comparative Haematology International*, 1996, 6(1): 194-203.
- [30] Li C C, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(6): 701-709.
- [31] 周鲜娇, 邱德全. 亚硝酸氮胁迫下噬菌体防治凡纳滨对虾弧菌病[J]. *水产科学*, 2011, 30(7): 378-382.
- Zhou X J, Qiu D Q. Biological control of vibriosis in pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* under stresses of nitrite nitrogen by bacteriophages[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(7): 378-382 (in Chinese).
- [32] 杨丰, 李钊. 甲壳动物造血机制研究进展[J]. *应用海洋学报*, 2019, 38(4): 484-489.
- Yang F, Li F. Progress in the research of crustacean hematopoiesis[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2019, 38(4): 484-489 (in Chinese).

Imaging flow cytometry measurement and pathogens infection analysis of *Litopenaeus vannamei* hemocytes

LI Rong¹, REN Xingchao¹, ZHANG Ning¹, WANG Yuan¹, LIU Yichen¹,
ZHANG Yichen^{1*}, GENG Xuyun², SUN Jinsheng^{1*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science,

Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Tianjin Fisheries Research Institute, Tianjin 300221, China)

Abstract: Blood cells play an important role in animal immune system. Accurate classification and functional analysis will facilitate the understanding of immune response mechanism. In this research, hemocyte populations from *Litopenaeus vannamei* of 17-23 g in weight were identified through micro-observation and flow cytometry, which referred to distinguishable intracellular partical structures and measurable side scattering characteristics of cells separately. Further analyses of verifying the response hemocyte groups and their quantitative changes in early stage of bacteria or virus infection were also carried out. Four hemocyte populations of non-granular, small-granular, intermediate-granular and large-granular hemocyte could be identified by micro-observation and flow cytometry, accounting for (69.88%±4.71%)/(74.88%±3.97%), (9.04%±5.06%)/(20.75%±4.07%), (11.13%±7.02%)/(2.94%±0.72%) and (9.96%±1.31%)/(1.25%±0.58%) of the total hemocytes respectively. In both methods, non-granular hemocyte accounted for about 70%, but proportions of other 3 granular hemocytes were different depending on the method. Lipophilic tracer DID staining showed intracellular granules were covered by lipid membrane. Size similarity of granules in both intermediate-granular hemocyte and large-granular hemocyte inferred an endogenous mechanism, supporting granules were derived from golgi apparatus. The size distribution range of large-granule hemocytes was narrower and their cytoplasm was full of granules, indicating they might be at a mature stage. Further results from low intensity challenging of bacterial or virus pathogens showed that in the early time of *Vibrio parahaemolyticus* or WSSV infection, total cell counting reflected a similar trend of “down and up”; non-granular and small-granular hemocytes, the two major phagocytic populations, were main response groups. The low point of cell counting in *V. parahaemolyticus* infection experiment was observed at 24 h; but for WSSV infection, low counting period was between 36 and 48 h, which should be related to the longer time required by virus for entering cell and replicating. These support that a large number of hemocyte could be lost in a short period of time after infection. On the other hand, full of granules and showing little count fluctuation after infection, both intermediate-granular hemocyte and large-granular hemocyte might participate in immune defense through secreting bioactive molecular other than phagocytosis. Above results indicated that hemocytes populations from different crustacean species can be distinguished with similar quantitative criteria and they respond to pathogen invasion in different ways after infection.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; hemocyte; imaging flow cytometry; *Vibrio parahaemolyticus*; WSSV; infection

Corresponding authors: ZHANG Yichen. E-mail: skyzyc@tjnu.edu.cn;

SUN Jinsheng. E-mail: skysjs@tjnu.edu.cn

Funding projects: Natural Science Foundation of Tianjin (19JCYBJC29700, 15JCZDJC33800); Open Research Funding of Tianjin Key Lab on Aqua-Ecology and Aquaculture (TJAE2015005); National Natural Science Foundation of China (31472299)