

文章编号:1000 - 0615(2004)06 - 0645 - 06

光镜及扫描电镜下波纹龙虾血淋巴细胞的形态及其分类

黄翔鹄, 李长玲, 刘楚吾

(湛江海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要:光镜及扫描电镜下,研究波纹龙虾血淋巴细胞的组织学结构、形态学特征和数量。根据细胞质中颗粒存在与否,颗粒数量的多少,细胞体积的大小及外部形态,对波纹龙虾的血淋巴细胞进行分类。结果表明,光镜下波纹龙虾的血淋巴细胞有 3 种类型:无颗粒细胞,小颗粒细胞,大颗粒细胞;这 3 种血淋巴细胞不是连续发育过程中血淋巴细胞的不同阶段,而是彼此独立的。3 种血淋巴细胞的数量占循环血淋巴细胞总量的比例分别为:无颗粒细胞占 57.1%,大颗粒细胞占 24.9%,小颗粒细胞占 18.0%;在扫描电镜下,细胞表面不平,有各种突起,揭示细胞具有活跃的变形运动和吞噬能力。血淋巴细胞形态有球形、卵圆形和椭圆形。

关键词:波纹龙虾;血淋巴细胞;显微结构;扫描电镜

中图分类号:Q246;S917

文献标识码:A

Classification and morphological observation of haemocytes of *Panulirus homarus* by LM and SEM

HUANG Xiang-hu, LI Chang-ling, LIU Chu-wu

(Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The kind and quantity of hemocytes in crustaceans are very important for immune defense. There is prominent difference of immune mechanism in the different species and types of hemocyte of crustaceans. It is very important to study the form structure and function of hemocyte for practice. Histology structure, morphology characters and quantity of hemocyte of *Panulirus homarus* are studied by light microscope (LM) and scanning electron microscope (SEM). The hemocytes of *Panulirus homarus* are classified on the basis of whether there are granules in the cytoplasm, how many granules in it, and the size and the forms on the outside of the cells. The results show that there are three types of blood cells on the stained smears: agranular hemocyte, small granular hemocyte and large granular hemocyte. The size of them are $8.65\mu\text{m} \times 8.08\mu\text{m}$, $12.80\mu\text{m} \times 11.30\mu\text{m}$ and $15.90\mu\text{m} \times 13.50\mu\text{m}$ respectively. The nucleus-cytoplasm ratio is 4.88, 2.03 and 0.89 respectively. There are many shapes of hemocyte such as sphere, oval and ellipse. According to the morphology characters, a granular hemocyte, small granular hemocyte and large granular hemocyte are not the blood cells during the different growth periods in the sequence development process of hemocyte, but separate development. The counts of different hemocytes are performed by light microscope. The percentage of agranular hemocyte, small hemocyte and large hemocyte is 57.1%, 18.0%, 24.9% respectively. There are different percentages of the three types of hemocytes in circulation hemocyte of various crustaceans respectively. The differences relate close with the various species, the different physiological capabilities, the different growth and development periods of

收稿日期:2003-07-03

资助项目:湛江海洋大学自然科学基金项目(0312023)

作者简介:黄翔鹄(1962-),男,四川宜宾人,副教授,从事水生生物学的研究。Tel:0759-2339186, E-mail: ybcl@163.net

crustaceans. The pigmentation of three types of hemocytes shows analogy with human white cells by Wright and Geimsa. By the scanning electron microscope observation, all types of hemocytes are not smooth on the surface, where there are a lot of protuberances. It is analogous with the hemocyte and granular hemocyte of humanity. This suggests that the cell structure changes actively and implies their functions with phagocytosis and encapsulation. The granular hemocyte of *Panaeus chinensis* and other crustaceans have the functions of immune defense. Thus, agranular hemocyte, small granular hemocyte and large granular hemocyte of *Panulirus homarus* are similar to humanity's white cells and the other crustaceans in immune mechanism.

Key words: *Panulirus homarus*; hemocyte; microstructure; scanning electron microscope

波纹龙虾 (*Panulirus homarus*) 属于甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、爬行亚目 (Reptantia)、龙虾科 (Palinuridae)、龙虾属 (*Panulirus*)^[1]。龙虾类不仅是最大型的名贵食用虾类,而且还可入药,作装饰品,其经济价值较高。在福建、浙江、海南、广西、台湾和广东等近海是深受重视的渔业资源之一。甲壳动物血淋巴细胞的种类、数目,在免疫防御中起着十分重要的作用,不同种类的甲壳类以及同种甲壳类的不同类型血细胞其免疫防御作用有较大的差异,了解其血淋巴细胞的形态结构和功能,在理论及实践中都具有重要意义^[2]。甲壳动物血淋巴细胞形态学研究开始于 19 世纪,早期工作多是用光镜观察血液涂片及其染色反应,近几十年来,应用电镜观察报导尤多,其研究范围涉及甲壳动物血淋巴细胞的组织学构造、组织化学、超微结构、分类及数量等方面,为后来研究者提供了丰富的文献资料。目前,国内外学者研究对象主要集中于对虾和蟹类等甲壳动物^[3-13],关于波纹龙虾的血淋巴细胞的形态结构及其分类未见报道。本研究通过光镜和扫描电镜,对波纹龙虾血淋巴细胞组织学结构、形态学特征、数量和分类等方面作了初步探讨,旨在丰富这方面的资料,为进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的波纹龙虾购于湛江市霞山区东风水产品市场。选取附肢完整,活力强、健康无病害,大小为 140~190g 的雄、雌龙虾数尾,放在室内玻璃水族箱中暂养 1d,暂养期间进行充气、投食、换水等日常管理,龙虾无异常现象。

1.2 实验方法

光镜样品的制备 血涂片的制作和染色参考文献[3-6,11,14]的方法进行,取血之前先将

龙虾体表的水分用滤纸吸干,用无菌并润有抗凝剂 2mL 的注射器,从龙虾心脏抽血,然后迅速制成血涂片,用 Wright 染色法,Geimsa 染色法及 Wright-Geimsa 混合染色法对血涂片进行染色。Wright 和 Geimsa 两种染色液按杨景山^[14]的方法配制,常规方法封片。Olympus 显微镜下观察并拍照,随机选样进行各种类型血淋巴细胞的测量统计。

扫描电镜样品制备 扫描电镜样品制备参考李光友和王青^[6]、管华诗^[11]的方法,用灭菌的注射器,将 5% 戊二醛与等量的龙虾血混合 (pH 为 7.4),4℃ 下固定 2h,1% 锇酸后固定,常规脱水,真空干燥,喷金,Philips XL30 扫描电镜观察并摄影。

1.3 血淋巴细胞核质比的计算方法

核质比 = 细胞核 / (细胞长径 - 细胞短径)

1.4 各种血淋巴细胞形态判断的标准

在光镜下,根据细胞质中颗粒存在与否,数量的多少,体积的大小及外部形态,对波纹龙虾的血淋巴细胞进行分类,各种血淋巴细胞形态判断的标准及命名参考文献[3-6,11-13]。

2 结果

2.1 血淋巴细胞的观察及血淋巴细胞分类

对波纹龙虾血涂片上血淋巴细胞形态、大小、核质比进行了测定,并比较细胞内颗粒的有无、大小及多少,对血淋巴细胞进行分类。细胞大小取 50 次测定的平均值;随机选取其血涂片的视野,对 50 张血涂片上 302 个视野,809 个血淋巴细胞进行分类计数。各类血淋巴细胞占循环血液的比例是:无颗粒细胞所占比例最大,平均值为 57.1%,大颗粒细胞平均值为 24.9%,小颗粒细胞所占比例最小,平均值为 18.0%。

表 1 波纹龙虾血淋巴细胞分类计数和各类血细胞大小
Tab.1 Different hemocyte counts (DHC) and the size of all types of blood cell

种 类 kind	大颗粒细胞 large granular hemocyte	小颗粒细胞 small granular hemocyte	无颗粒细胞 agranular hemocyte
细胞大小(μm) size of cell	(15.9 \pm 0.78) \times (13.5 \pm 0.54)	(12.8 \pm 0.41) \times (11.3 \pm 0.46)	(8.65 \pm 0.60) \times (8.08 \pm 0.52)
胞核大小(μm) size of nucleus	(7.50 \pm 0.58) \times (6.13 \pm 0.48)	(8.58 \pm 0.45) \times (7.54 \pm 0.47)	(7.18 \pm 0.43) \times (6.63 \pm 0.43)
核质比 N/P	0.89	2.03	4.88
分类计数(%) different counts	24.9	18.0	57.1

注:表中除血淋巴细胞分类计数以外,其余各数据均为平均值 \pm 标准差(S.D)

Noets: Data in the table are all shown as means \pm S.D. except the hemocyte of the *Panulirus homarus* counts

2.2 血淋巴细胞的显微结构

无颗粒细胞 一般为卵圆形(图版-1),有的呈梭形(图版-2),细胞相对较小(8.65 μm \times 8.08 μm),是3类细胞中体积最小的;细胞核形状比较规则,卵圆形或球形,体积大,中位或偏位,占据了细胞内大部分空间,致密的染色质团块染成深紫色;整个细胞染成紫色或紫褐色;胞质只有薄薄一层围绕在核的周围,胞质无颗粒或颗粒不明显;核质比最大,平均值为4.88。

小颗粒细胞 一般为卵圆形或圆形(图版-3,4),比无颗粒细胞稍大(12.80 μm \times 11.30 μm);细胞核呈椭圆形或卵圆形,居中位置,核染成紫色或紫褐色,染色不均匀,有块状;胞质中有染成淡紫色或紫红色颗粒,细小、量少、分布均匀;核质比介于无颗粒细胞和大颗粒细胞之间,平均值为2.03。

大颗粒细胞 细胞卵圆形或椭圆形(图版-5,6),是三类细胞中体积最大(15.90 μm \times 13.50 μm)的;核质比最小,平均值为0.89;核为椭圆形或肾形,被染成紫色或紫褐色;胞质中有染成淡紫色或紫红色颗粒,比小颗粒细胞中的颗粒略粗、量多,颗粒越成熟,染色越深。颗粒细胞对外界刺激相当敏感,是3种细胞中最易破裂者,颗粒细胞破裂后,释放大量颗粒(图版-5,6)。大颗粒细胞有集群现象(图版-6)。

2.3 血淋巴细胞的扫描电镜下结构

结果表明,波纹龙虾血淋巴细胞的大小为(15.89 \pm 0.63) μm \times (6.66 \pm 0.46) μm ,形状卵形(图版-7)、圆球形(图版-8)和椭球形(图版-9)等不一。细胞表面不平,有不明显的各种突起和凹陷,表明血淋巴细胞具有活跃的变形运动和吞噬能

力。如果固定液浓度偏低,固定不好则细胞变形明显,细胞表面有明显的突起(图版-10)。

3 讨论

3.1 波纹龙虾血淋巴细胞的命名

Bauchau^[13]将甲壳类动物血淋巴细胞分为透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞,这种分类和命名的根据是血淋巴细胞颗粒的有无、直径大小和核质比;而Hose等^[12]将甲壳类动物血淋巴细胞分为透明细胞和颗粒细胞,他们是从血淋巴细胞的形态学特征、细胞化学和细胞功能进行分类的;叶燕玲等^[3]将中国对虾(*Penaeus chinensis*)的血淋巴细胞分为透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞;森腾羲^[15]和李光友和王青^[6]将透明细胞称为无颗粒细胞,将血淋巴细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞和颗粒细胞。目前甲壳动物血淋巴细胞的分类与命名渐趋一致,依据血淋巴细胞质中颗粒的有无、颗粒的多少和颗粒大小^[6],而命名为:无颗粒细胞/透明细胞、小颗粒细胞/半颗粒细胞、大颗粒细胞/颗粒细胞^[3-13,15,16]。本文在此采用李光友和王青^[6]的分类方法,将波纹龙虾的血淋巴细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞。

3.2 波纹龙虾血淋巴细胞形态结构与功能

用Wright和Geimsa染色法结果表明,波纹龙虾3种血淋巴细胞的着色情况与人的白细胞相近;从扫描电镜照片中可以看出,血淋巴细胞长短轴的平均长度都小于15.89 \sim 6.66 μm ,细胞表面不平,有不明显的各种突起和凹陷,与脊椎动物及人^[17]的淋巴细胞和颗粒细胞表面结构相似,具有活跃的变形运动和吞噬能力。因此,波纹龙虾的

血淋巴细胞与人的白血细胞有相似的防御功能,在免疫防御中起着十分重要的作用。Hose 等^[12]认为甲壳类十足目血淋巴细胞的功能与其形态学性质是相关联的,透明细胞的功能是参与启动血淋巴细胞的凝固,颗粒细胞质内有大量的酚氧化酶原和水解酶,通过吞噬作用参与自体对异物的识别。李光友和王青^[6]认为中国对虾的无颗粒细胞具有吞噬能力,但其吞噬能力是依赖于活化的酚氧化酶原系统的组分来激活;小颗粒细胞在防御反应中有活跃的胞吐作用和识别异物的能力,对外物敏感性高;大颗粒细胞内的颗粒含有大量的酚氧化酶原。波纹龙虾血淋巴细胞中的无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞与其它甲壳动物一样,也可能具有相似的免疫机制。

3.3 各类血淋巴细胞所占比例

甲壳动物的无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞占循环血淋巴细胞比例,中国对虾为 25.32%、61.79% 和 12.89%,斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 为 47.3%、13.1% 和 39.6%,黑斑口虾蛄 (*Oratosquilla kempfi*) 为 29.6%、31.7%、38.7%,三疣梭子蟹 (*Portunes trituberculatus*) 为 1.87%、84.22% 和 13.45%^[3,8,16];日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 和日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 中这 3 种细胞的比例也各不相同^[4,5];Hose 等^[12]指出,不同种类的甲壳动物其各类血淋巴细胞的比例不同;于建平^[4]指出,日本对虾不同生理和病理条件下,血淋巴细胞密度和这 3 种细胞的比例变化很大;Sequeira 等^[18]报道,日本对虾蜕皮期间雌雄不同个体各种血淋巴细胞含量比例不同。本实验结果显示,波纹龙虾无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞分别占循环血淋巴细胞 57.1%、18.0% 和 24.9%。甲壳类的 3 种血淋巴细胞所占比例存在明显的差异,哪一种细胞所占的比例最大亦有所不同。作者认为,甲壳动物种的特异性、不同的生理状态、不同生长时期和不同发育阶段等因素均可导致血淋巴细胞比例的差异,这种差异还与不同作者的研究方法有密切关系。

3.4 关于波纹龙虾的血淋巴细胞发生

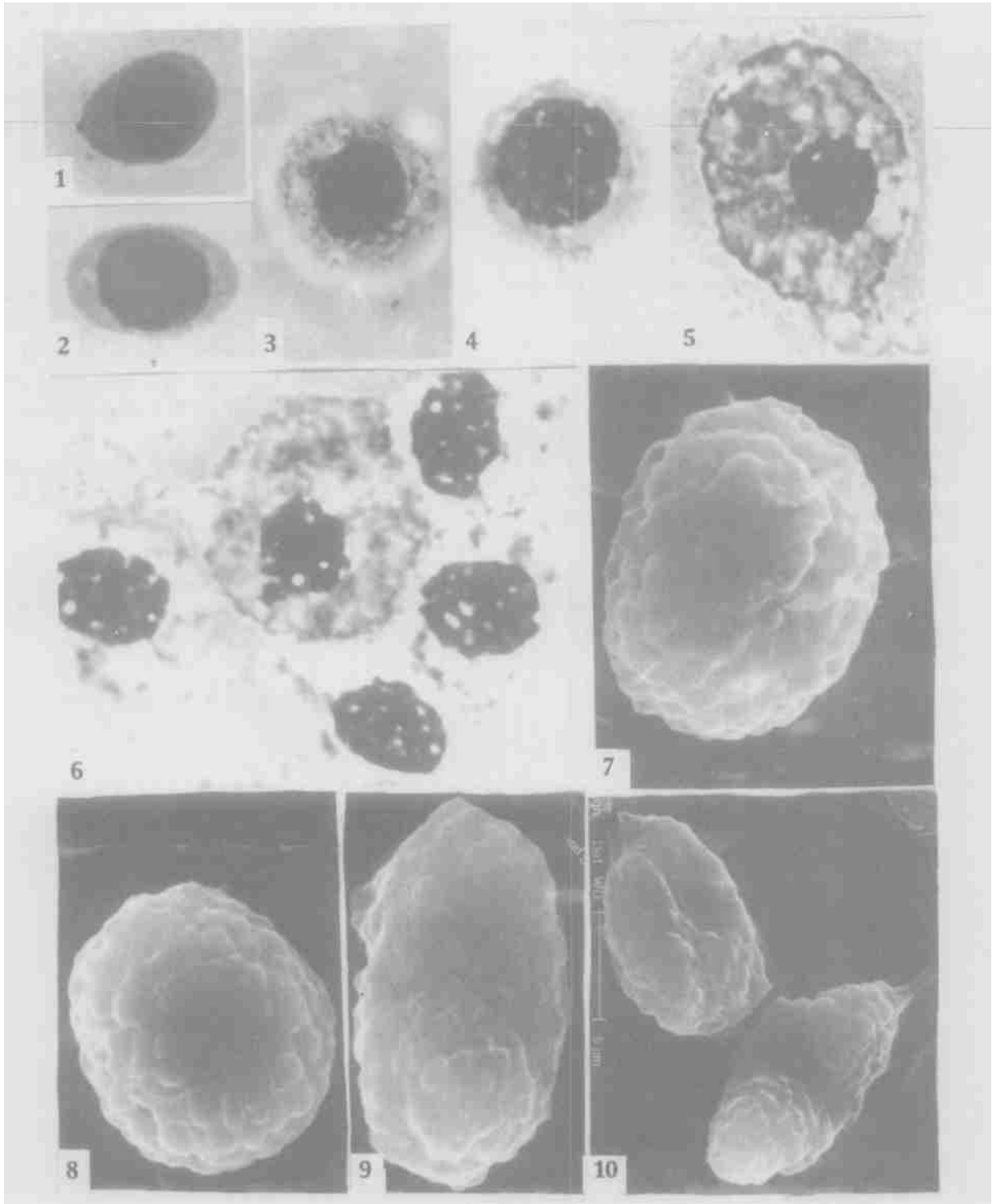
Bauchau^[13]认为甲壳类各种类型血淋巴细胞是连续发育过程中的不同阶段,而大颗粒细胞是发育成熟最后阶段的血淋巴细胞。陆宏达^[9]将中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 血淋巴细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞、半颗粒细胞和大颗粒细胞 4

种类型,根据 3 种颗粒细胞的形态结构特点以及颗粒折光性、染色反应和形成方式等特性,认为这 3 种颗粒细胞不是连续发育过程中血淋巴细胞的不同阶段,而是互相独立的 3 种有颗粒血淋巴细胞类型。本文中波纹龙虾的血淋巴细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞,根据其形态学特点,这 3 种细胞也不是连续发育过程中血淋巴细胞的不同阶段,而是彼此独立的。有作者认为,在甲壳类血淋巴细胞中,梭形细胞是一种较早出现而未经分化的幼稚细胞^[16],本实验在波纹龙虾血液里也发现梭形细胞(图版-2),不过数量极少。梭形细胞两端渐尖呈梭形,细胞核大,异染色质化,与浆细胞相似,应属于 G₀ 期细胞,但在波纹龙虾循环血液中未发现正在分裂的血淋巴细胞。关于波纹龙虾的血细胞发生还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Dong Y M, Wang B Y. A preliminary investigation on lobster in China[J]. Donghai Marine Science, 1984, (9): 57 - 62. [董聿茂,汪宝永. 中国龙虾类的初步调查[J]. 东海海洋, 1984, (9): 57 - 62.]
- [2] Du N S. Crustacenology (Volume 1) [M]. Beijing: Beijing Science and Technology Press, 1987. 32 - 34. [堵南山. 甲壳动物学(上册) [M]. 北京: 科学出版社, 1987. 32 - 34.]
- [3] Ye Y L, Chen K Z. Studies on the circulating hemocytes of *Penaeus chinensis* [J]. J Ocean Univ Qingdao, 1993, 23 (2): 35 - 42. [叶燕玲, 陈宽智. 中国对虾血细胞超微结构、分类及计数[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23 (2): 35 - 42.]
- [4] Yu J P. Haemocyte classification, density and differential count of hemocytes of *Penaeus japonicus* [J]. J Ocean Univ Qingdao, 1993, 23 (1): 107 - 113. [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 - 113.]
- [5] Cai X F, Luo L, Li Q, et al. A preliminary study of haemocyte of *Macrobrachium nipponense* [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2000, 24 (3): 289 - 292. [蔡雪峰, 罗琳, 李权, 等. 日本沼虾血细胞的初步研究[J]. 水生生物学报, 2000, 24 (3): 289 - 292.]
- [6] Li G Y, Wang Q. Studies on haemocytes and cellular immunity in prawn *Penaeus chinensis* [J]. Oceanol et Limnol Sin, 1995, 26 (6): 591 - 597. [李光友, 王青. 中国对虾血细胞及其免疫研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26 (6): 591 - 597.]
- [7] Chen P, Huang H, Chi X C, et al. The composition and ultrastructure of haemocytes in four species of penaeid shrimps [J]. Acta Hydrobiol Sin, 1998, 22 (2): 158 - 163. [陈平, 黄槐, 池信才, 等. 四种对虾血细胞组成及超微结构[J]. 水生生物学报, 1998, 22 (2): 158 - 163.]
- [8] Zhou Y, Mu Z K, Yang Z G. Haemocyte morphology, classification and differential count of swimming crab, *Portunes*

- trituberculatus* [J]. J Shanghai Fish Univ, 2001, 10 (3) : 279 - 281. [周玉, 穆占昆, 杨振国. 三疣梭子蟹血淋巴细胞的形态、分类及计数[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10 (3) : 279 - 281.]
- [9] Lu H D. Classification and morphological observations of haemocytes in *Eriocheir sinensis* by electron microscopies [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2002, (26) : 7 - 15. [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) : 7 - 15.]
- [10] Cheng Y X, Du N S, Lai W. Observations of haemocytes in *Eriocheir sinensis* by electron microscopies [J]. Journal of East China Normal University (Natural Science), 1998, (3) : 110 - 112. [成永旭, 堵南山, 赖伟. 河蟹血淋巴细胞超微结构观察[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 1998, (3) : 110 - 112.]
- [11] Guan H S. Immunity, cell culture and disease researches on seawater aquaculture animals [M]. Jinan : Shandong Science and Technology Press, 1999. 1 - 22. [管华诗. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病害研究[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999. 1 - 22.]
- [12] Hose J E, Martin G G, Gerard A S. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function [J]. Biol Bull, 1990, 178, (1) : 33 - 45.
- [13] Bauchau A G. Crustaceans [A]. Invertebrate Blood Cells [M]. London, New York : Academic Press, 1981. 2385 - 2420.
- [14] Yang J S. Medical cytochemistry and cellular biotechnology [M]. Beijing : Peking Medical College Press & Peking Union Medical College Press, 1990. 6 - 8. [杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术[M]. 北京: 北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1990. 6 - 8.]
- [15] Sen T X. The body defense of invertebrates [M]. Tokyo : Institute Press, 1992. 182 - 198. [森腾羲. 无脊椎动物的生体防御[M]. 东京: 学会出版・ソク, 1992. 182 - 198.]
- [16] Liao Y Y, Zhou Y G, Ye F L. Comparative study on blood indices of *Penaeus monodon* and *Oratosquilla kempfi* [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2000, 39 (3) : 271 - 277. [廖永岩, 周友广, 叶富良. 斑节对虾与黑斑口虾蛄血相的比较研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39 (3) : 271 - 277.]
- [17] Wang F J. Blood cytology [M]. Tianjing : Tianjing Science and Technology Press, 1980. [王凤计. 血液细胞学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1980.]
- [18] Sequeira T, Vilanova M, Lobo-darcunha A, et al. Flow cytometric analysis of molt-related changes in hemocyte type in male and female *Penaeus japonicus* [J]. Boil Bull, 1995, 189 : 376 - 380.



图版 Plate

1. 无颗粒细胞(血涂片), $\times 2030$; 2. 无颗粒细胞(血涂片), $\times 2030$; 3. 小颗粒细胞(血涂片), $\times 2030$; 4. 小颗粒细胞(血涂片), $\times 2030$; 5. 大颗粒细胞(血涂片), $\times 2030$; 6. 集群的大颗粒细胞(血涂片), $\times 2030$; 7. 卵形, $\times 6184$; 8. 球形, $\times 5411$; 9. 椭球形, $\times 6184$; 10. 变形的血淋巴细胞, $\times 3479$

1. agranular hemocyte (the smear of blood), $\times 2030$; 2. agranular hemocyte (the smear of blood), $\times 2030$; 3. small granular hemocyte (the smear of blood), $\times 2030$; 4. small granular hemocyte (the smear of blood), $\times 2030$; 5. large granular hemocyte (the smear of blood), $\times 2030$; 6. gathering large granular hemocyte (the smear of blood), $\times 2030$; 7. oval hemocyte, $\times 6184$; 8. spherical hemocyte, $\times 5411$; 9. elliptical hemocyte, $\times 6184$; 10. deformed hemocyte, $\times 3479$