

文章编号: 1000-0615(2005)02-0145-05

栉孔扇贝稚贝造血组织的研究

邢婧, 战文斌

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 采用石蜡切片和单克隆抗体的免疫组化方法, 研究栉孔扇贝稚贝血细胞的分布和造血组织的定位。两种方法所得结果一致: 在稚贝的外套膜、鳃、消化盲囊、闭壳肌、肾等处观察到大量血细胞, 心脏位于消化腺与闭壳肌之间, 闭壳肌、消化盲囊、肾等附近有血窦, 血管分布于消化腺、胃、肾、直肠等处, 有二个血窦, 闭壳肌附近有一膨大突出的囊状组织, 外被一层致密的结缔组织薄膜, 其内壁血细胞密布层叠, 分裂增生, 形态多样, 腔内充满了基质, 靠近闭壳肌一侧有管道相通, 并向闭壳肌等器官不断输送成熟的血细胞, 该组织结构特点类似血细胞生发中心, 并随着扇贝的生长发育逐渐膨大增生, 据其结构特点及内部血细胞的形态、分布及免疫特性可初步定为栉孔扇贝稚贝的造血组织。

关键词: 栉孔扇贝; 稚贝; 单克隆抗体; 造血组织

中图分类号: S917; Q954.6

文献标识码: A

Localization of hematopoietic tissue of scallop, *Chlamys farreri*

XING Jing, ZHAN Wen-bin

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: There is no immunoglobulin in hemolymph of mollusc, and the internal defense system is dependent on circulating blood cells, which develop a number of functions including wound and shell repair, transport and digestion of nutrients. Haemocyte could not mitose and was renewed by hematopoietic tissue. In this paper hematopoietic tissues of juvenile scallop were studied by microstructural observation. Monoclonal antibodies are highly specific molecular probes, which allow identification based on molecular level and are very effective in characterizing cell types and functions in the vertebrate immune system. Monoclonal antibodies were produced against hemocyte of scallop (*Chlamys farreri*) (1E7, 1F12, 2C6, 2H5). Tested by IIFAT, immunoenzyme stain, Flow cytometry (FCM) and western-blotting, the four Mabs were specific for hemocyte of scallop. Here they were used to localize hematopoietic tissue of juvenile scallop. Paraffin method and immunohistochemistry were employed to observe distribution of hemocyte and localization of hematopoietic tissue in juvenile scallop. For paraffin method, the juvenile scallop (shell length 2 mm, 4 mm, 8 mm, 1 cm, 1.5 cm) were fixed in Davidson's solution for 24 h, and dehydrated in ethanol, then embedded in paraffin separately, then the paraffin embedded tissues were cut into 5 μ m sections and stained with hematoxylin eosin. For immunohistochemical method, the visceral mass of the juvenile scallop were absorbed with sieve paper and embedded in Jung tissue freezing medium (Leica), then the frost embedded tissue were cut into 5 μ m sections. Crysections were airdried, fixed in acetone, and blocked with 10% albumin bovine for 1 h at room temperature, then washed three times for 5 min with PBS-T, after that the slices were incubated in primary antibody (mixture of Mabs 1E7, 1F12, 2C6, 2H5) for 1 h at 37°C and washed again as above. The Mabs binding was detected with goat anti-mouse Ig serum conjugated with AP (1:20 000) for 1 h at 37°C and washed three times with AP buffer (100 mmol·L⁻¹ NaCl, 100 mmol·L⁻¹ Tris-Cl, 5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, pH 9.5). The reaction was developed with freshly prepared substrate solution, 66 μ L nitroblue tetrazolium (NBT) and 33 μ L 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) (Sigma) in 10 mL AP buffer for 5 min, and then observed color development. Paraffin method showed that haemocytes were distributed in mantle, gill, stomach, kidney, digestive gland, adductor etc. Heart was located between digestive gland and adductor, the vessel distributed in digestive, stomach and kidney. There were three main haemocyte sinuses full of haemocyte: one was between digestive gland and kidney, the other two were around adductor. Additionally, it was found that there were vesicle tissues laid aside adductor, and it was surrounded by

收稿日期: 2003-12-02

资助项目: 国家自然科学基金资助(30271016); 教育部海水养殖重点实验室开放课题(200425)

作者简介: 邢婧(1974-), 女, 黑龙江佳木斯人, 讲师, 博士研究生, 主要从事水产动物病害与免疫学研究。

通讯作者: 战文斌, Tel: 0532-2032284, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

connective tissue membrane, hyperplastic and dense haemocyte located around the inner wall, and it was like the nidus of haemocyte. Immunohistochemical results showed haemocyte in different forms-dissociative, in sinus or in some organ of tissue, were positive. Reactions in kidney and vesicle tissues were stronger because of dense haemocyte. Two methods got same results, and characters of the vesicle tissue are like the place that haemocytes occurred. In conclusion, morphological and immune features were accordant, the vesicle tissues around adductor may be the hemoatopoiesis tissue in juvenile scallop.

Key words: *Chlamys farreri*; juvenile scallop; monoclonal antibodies; hematopoietic tissue

软体动物不具有特异的免疫球蛋白,对机体的保护作用主要是由血细胞和体液中的活性酶来承担的。血细胞随着血液循环分布到全身各处,发挥着吞噬、结节、包囊等免疫防御功能^[1]。血细胞不能进行有丝分裂,它们的更新补充是由造血组织来完成的。有关软体动物血细胞的形态、分类、细胞化学、免疫功能等均有报道^[2,3],但双壳贝类造血组织和血细胞起源的研究资料较少,甲壳类对造血组织的研究相对多,且大多都采用光镜和电镜观察^[4]。本研究组已进行了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血细胞类型^[5]、血细胞内源酶^[6]及血细胞抗菌力^[7]等方面的研究。本文通过石蜡切片、组织化学法、单克隆抗体的免疫组化法,研究了栉孔扇贝稚贝血细胞的分布和造血组织的定位,以期阐明扇贝血细胞的发生、分化、成熟过程、贝类细胞免疫机制及抗病力等的研究提供资料。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

栉孔扇贝稚贝采集于烟台扇贝养殖场,测量稚贝的壳长,分别将壳长 2 mm, 4 mm, 8 mm, 1 cm, 1.5 cm 的稚贝分开,采用石蜡切片法的稚贝放入 Davidson 氏液中固定 24 h,固定后贝壳在固定液中脱落,取出内脏团,脱水包埋,壳长 8 mm 以下的稚贝经滤纸滤过后,分离出内脏团,再脱水包埋。采用冰冻切片法的稚贝剥离贝壳取出内脏团,吸掉水分,入冰冻包埋剂包埋,壳长 8 mm 以下的稚贝在解剖镜下剥离贝壳取出内脏团,再吸掉水分,入冰冻包埋剂包埋。

鼠抗栉孔扇贝血细胞的单克隆抗体是以扇贝血细胞悬液(2×10^7 cells·mL⁻¹)为抗原免疫 Balb/C 小白鼠,3 次加强免疫后,被免疫鼠的脾细胞与 P3-XG3-Ag8U1 小鼠骨髓瘤细胞以聚乙二醇为融合剂融合,HAT 选择培养液培养,应用免疫荧光抗体技术(IFAT)检测出 21 株具有较高分泌能力的杂交瘤细胞。有限稀释法克隆了其中 4 株

(1E7, 1F12, 2C6, 2H5),得到单克隆抗体,经免疫细胞化学法、流式细胞仪和 Western-blotting 分析其特性,证明这 4 株抗体具有抗栉孔扇贝血细胞的特异性,应用这 4 株单抗观察扇贝稚贝血细胞的分布及造血组织的定位。

碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗小鼠 IgG(稀释比例 1:30 000)购自 Sigma 公司。底物 NBT/BCIP 购自 Amersco 公司。

1.2 方 法

组织切片 分别将固定的壳长为 2 mm, 4 mm, 8 mm, 1 cm, 1.5 cm 的稚贝进行系列乙醇梯度脱水,石蜡包埋,连续切片厚度 5 μm,二甲苯脱脂、乙醇脱水,苏木精·曙红染色,梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜观察,拍照。

免疫组化 分别将冰冻包埋的壳长为 2 mm, 4 mm, 8 mm, 1 cm, 1.5 cm 的稚贝冰冻切片,连续切片厚度 5 μm,丙酮固定 20 min,风干后经 0.01 mol 的磷酸盐缓冲液(PBS)(pH7.4)浸洗 5 min,稚贝冰冻切片用 10% 牛血清白蛋白 37℃ 封闭 1 h,经 PBS 浸洗 3 次,每次 5 min;加第一抗体(1E7、1F12、2C6、2H5 四种单抗的混合抗体),37℃ 孵育 1 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min;加第二抗体(AP 标记的羊抗小鼠 IgG),37℃ 孵育 45 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;再用碱性磷酸酶缓冲液浸洗 3 次,每次 5 min,NBT/BCIP 底物发色 15 min,自来水冲洗,室温干燥,中性树胶封片,显微镜观察,拍照。

2 结 果

2.1 组织化学观察

石蜡切片组织染色观察稚贝的内脏团主要由外套膜、鳃、胃和消化腺、心脏、肾以及闭壳肌组成。外围是外套膜(图版-1),为两叶薄膜,包被内脏团,其背缘相连。紧接外套膜的是鳃(图版-2),鳃为新月形,位于内脏团的一侧,前端从口的末端开始,一直向后延伸到肛门的后方。闭壳肌(图版-2,3)位于内脏团中央,约占内脏团的 1/3,可明显分为两部分:第一部分横纹肌极大,靠近前背部,

另一部分平滑肌较小位置靠后。胃和消化腺(图版-2)位于闭壳肌上方,胃背腹扁平,略呈椭圆形,消化腺环绕其周围。肠出自胃的腹面近中后部的位置,始部较为宽广稍呈囊形,肛门位于闭壳肌的后腹缘。

扇贝为开管式循环,血细胞分布于全身各处,循环系统主要包括:心脏、血管和血窦。心脏位于消化腺与闭壳肌之间(图版-2);血管分布于消化腺、胃、肾(图版-4)、直肠等处;主要有3个大型的血窦:第1个血窦在消化腺和肾的周围,其余两个血窦在闭壳肌腹缘的左右侧(图版-5),血窦中含有大量的血液。另外,在闭壳肌基部观察到一膨大的囊状组织(图版-3,6),该组织外被一层致密的结缔组织薄膜,其内壁血细胞密布层叠,分裂增生,形态多样,呈现为圆形、柱形、梭形,并有透明细胞和颗粒细胞同时存在,腔内充满基质,有血管通向外部组织,管道中有游离的血细胞。该组织中血细胞无论形态或类型都与游离血细胞、血窦中的血细胞及其它组织中的血细胞有很大差别,类似血细胞的造血组织。连续切片壳长为2 mm、4 mm、8 mm、1 cm、1.5 cm的稚贝,该组织随着扇贝的长大逐渐膨大增生。

2.2 免疫组化观察

以扇贝血细胞的混合单抗为第一抗体,免疫组化观察到几种状态的血细胞都呈阳性反应,第1种,游离的血细胞,数目多,均匀分布于全身各处;第2种,血窦中的血细胞,均匀地分布于窦腔内壁,有血管与之相通,运输血细胞;第3种,组织中的血细胞,因功能不同而各异:消化盲囊中的血细胞承担吞噬消化的功能,有的细胞质中有食物颗粒;肾中的血细胞流动于肾管中,呈游离状,并在此进行物质交换(图版-7);在闭壳肌附近的囊状组织,其内壁血细胞密布层叠,分裂增生,形态多样,腔内充满基质,有管道通向外部组织,管道中有游离的血细胞存在(图版-8)。本实验结果与石蜡切片形态观察的结果相吻合,证实所观察的细胞为血细胞。

在这几种血细胞中,肾和闭壳肌附近的囊状组织中的血细胞因数量多、密度大而呈强阳性反应。肾内肾管中游离的血细胞(图版-7)呈游离状,因在此进行物质交换,流动快,密度大,呈强阳性反应(图版-9)。闭壳肌附近的囊状组织(图版-8,10)由结缔组织包裹,贴在闭壳肌一侧,其内壁

血细胞数量多,大小不一,呈多形态,并且相互紧密连接,层叠增生。组织内的血细胞密度不均匀:膨大部分血细胞大量聚集,层叠增生,在与闭壳肌交界的部位通过血管向闭壳肌输送血细胞(图版-10);其它部分血细胞相对少,密度小;组织内基质中不含血细胞,呈阴性反应。因此在免疫组化中,囊状组织内周边血细胞数量的由少到多,呈现出阳性反应由弱到强。综合组织切片观察和免疫组化反应,靠近闭壳肌侧的囊状膨大组织(图版-6,8)结果一致,证实二者为同一组织,其形态结构及内部血细胞的形态、分布、免疫特性都近似于血细胞的造血组织。

3 讨论

以前有关栉孔扇贝血细胞分布的研究报道都集中于成体,认为扇贝血细胞分布于全身各处,在外套膜上有1个大的血管系统,致密的血管网几乎布满于整个外套膜上。有3个大型的静脉窦:第1个静脉窦在消化腺和围心腔膜的下面,与两侧的左右肾相通;其余两个静脉窦在闭壳肌腹缘的左右侧^[8]。本研究以扇贝稚贝为材料观察的结果与上述成体基本一致,说明扇贝的稚贝与成体血细胞分布差异不大。

以往对造血组织的观察大多采用形态学的方法,该方法不能定性的研究血细胞除形态以外的其它特性。单克隆抗体能特异性的同相应抗原决定簇反应,其高灵敏度及特异性应用于血细胞的分类及发生分化中是准确、客观的。Van de Braak等^[9]已应用血细胞单抗研究对虾造血组织、血细胞发生及血细胞免疫反应,并对不同类型血细胞在幼体及成体中的发生情况作了描述。本文采用H.E染色和免疫组化方法互相对照,印证结果更具说服力。

免疫组化和石蜡切片H.E染色观察血细胞的形态不太一致,是由于石蜡切片的处理过程尽量保持其形态完整性,更接近于细胞的生活状态之形态。而免疫组化为了保持血细胞的抗原性采用了新鲜样品冰冻切片,处理过程中会有缩水现象,所以结果可见细胞聚集或有空洞现象。

本文中单抗的免疫组化结果显示,造血组织中并非所有的血细胞都显示为阳性,有的部位呈阴性反应,可能是因为扇贝血细胞的单克隆抗体是抗成熟血细胞,在造血组织中处于未成熟或分

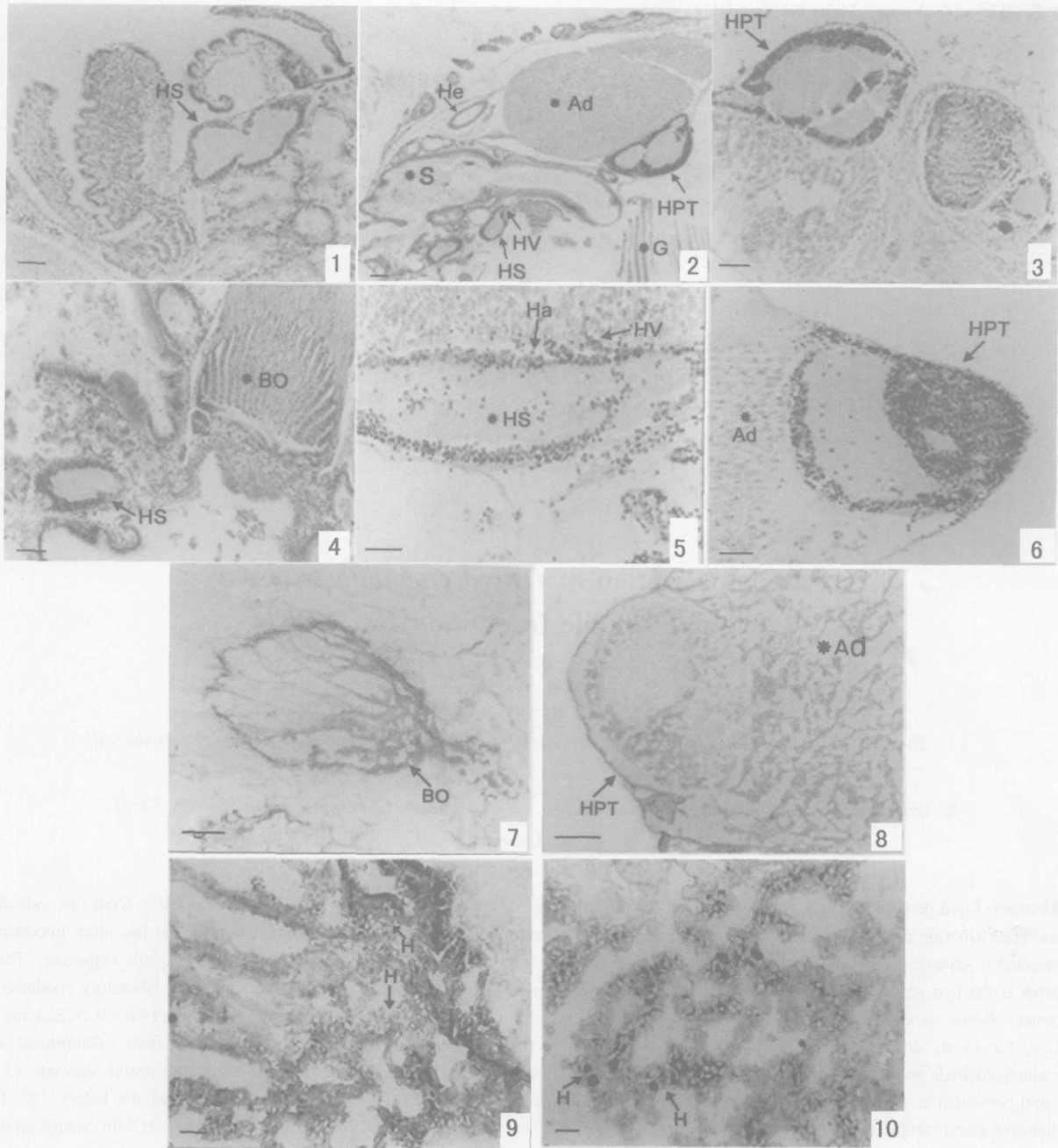
裂增生阶段的血细胞的抗原决定簇不与单抗反应,或切片的角度并未暴露其抗原决定簇所致

关于双壳贝类造血组织的研究还未见报道。无脊椎动物中研究得比较多的是甲壳类的造血组织。Martin发现美洲龙虾(*Homarus americanus*)的造血组织发生在前肠的背面两侧,认为造血组织是一对薄薄的组织块,呈卵圆形,有结缔组织和肌肉纤维支持^[9]。一般来说,甲壳类的造血组织是零散分布于头胸部的,造血器官是发达的管状系统,或者是实质的组织块,其外周均有结缔组织和肌肉纤维支撑^[10]。在造血组织内血细胞始终处于一种高度有丝分裂状态,所以常常聚堆,幼小的血细胞重叠在一起,细胞形状无法展开,相连成堆,血细胞被造血组织释放到邻近血窦中,从而进入循环系统。本文组织切片结果显示,在稚贝闭壳肌附近的囊状结构外被结缔组织膜包裹,贴在闭壳肌外侧,内部血细胞密集增生,分裂快,并通过管道与闭壳肌相通输送血细胞,类似于血细胞的生发中心,免疫组织化学染色时,该组织表现为强阳性反应。鉴于单抗高特异性的识别和整体切片的完整性,可初步定为栉孔扇贝闭壳肌附近的囊状组织是其造血组织。但血细胞在造血组织内

部发生、成熟过程及机制还须进一步研究

参考文献:

- [1] 翟玉梅, 丁秀云, 李光友. 软体动物血细胞及体液免疫研究进展[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(5): 558-562
- [2] Carballal M J, Carmen M, Carlos A, et al. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Disease of Aquatic Organisms, 1997, 29: 127-135
- [3] 张一峰, 李光友, 张培军. 皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 36-40
- [4] Martin G G, Hose J E. Organization of hematopoietic tissue in the intermolt lobster, *Homarus americanus* [J]. J Morphol, 1993, 216: 65-78.
- [5] Xing J, Zhan W B, Zhou L. Hemocyte type of Chinese scallop (*Chlamys farreri*) [C]. American Fisheries Society Symposium, 2003, 33:301-307
- [6] Xing J, Zhan W B, Zhou L. Endoenzymes associated with the hemocyte types of scallop (*Chlamys farreri*) [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2002, 13(4): 271-278
- [7] 邢一婧, 战文斌, 周丽. 栉孔扇贝血细胞(*Chlamys farreri*)类型及抗菌力的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(1): 11-16
- [8] 王如才, 王昭萍, 张建中. 海水贝类繁殖学[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1998
- [9] Van de Braak C B T, Botterblomm H A, Liu W, et al. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2002, 12: 253-272
- [10] 战文斌, 王一姝, 张利峰, 等. 中国对虾有丝造血组织分布的研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 574-576



图版 Plate

1. 外套膜; 2. 闭壳肌、肾及造血组织; 3. 肾及附近的血窦; 4. 造血组织; 5. 稚贝横切图; 6. 闭壳肌侧的血窦; 7. 造血组织; 8. 造血组织中呈阳性反应的血细胞; 9. 肾; 10. 肾管中呈阳性反应的血细胞。标尺 = 40 μm

1. mantellum; 2. adductor, bojanus organ and haematopoietic tissue; 3. Bojanus organ and haemocyte sinus around it; 4. haematopoietic tissue; 5. transverse section of scallop; 6. haemocyte sinus around adductor; 7. haematopoietic tissue; 8. positive haemocyte in hemoatopoiesis tissue around adductor; 9. Bojanus organ; 10. positive haemocyte in Bojanus organ Bar = 40 μm

HS: 血窦; HPT: 造血组织; BO: 肾; Ha: 血细胞; HV: 血管; Ad: 闭壳肌; G: 鳃; S: 胃; He: 心脏

HS: haemocyte sinus; HPT: haematopoietic tissue; BO: Bojanus organ; Ha: haemocyte; HV: haemocyte vessel; Ad: adductor; G: gill; S: stomach; He: heart