

文章编号:1000-0615(2006)04-0454-09

中华绒螯蟹血细胞数及离体后形态学变化

陆宏达¹, 张明辉²

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 上海市水产研究所, 上海 200433)

摘要:中华绒螯蟹循环血液中血细胞总数为 (13357 ± 7196) cells·mm⁻³, 其中大颗粒细胞所占 $(49.8 \pm 7.5)\%$, 其长轴 (16.6 ± 1.1) μm, 短轴 (10.2 ± 0.6) μm; 大颗粒中间型细胞所占比例 $(20.6 \pm 5.3)\%$, 其长轴 (13.1 ± 1.2) μm, 短轴 (8.4 ± 0.5) μm; 小颗粒细胞所占比例 $(29.3 \pm 4.8)\%$, 其长轴 (12.4 ± 1.2) μm, 短轴 (8.1 ± 0.4) μm; 无颗粒细胞所占比例 $(0.2 \pm 0.2)\%$, 其长轴 (11.3 ± 1.3) μm, 短轴 (8.9 ± 1.1) μm。血液离体后, 在血液完全凝固的 (97.7 ± 25.3) s 时间内, 只有无颗粒细胞和小颗粒细胞形态结构发生变化, 细胞及其胞核立即膨大, 核质比迅速增大, 细胞膜破损崩解, 胞浆溢出, 血液完全凝固后这些细胞形态结构继续变化, 主要表现为胞质内线粒体、内质网等细胞器扩张溶解消失, 小颗粒细胞中的小颗粒内含物渗出或溢出, 颗粒空泡化或崩解, 细胞核固缩等变化过程。而大小颗粒中间型细胞和大颗粒细胞形态结构的变化明显慢于前两种血细胞, 在细胞离体后 5 min 时, 细胞和细胞核才开始出现膨大, 并逐渐出现细胞膜、线粒体、内质网溶解消失, 颗粒空泡化或崩解以及细胞核固缩等形态结构的变化。从血液离体后血细胞形态结构随时间变化的特点, 推测无颗粒细胞和小颗粒细胞可能类似于脊椎动物的血小板, 通过释放胞内凝血物质参与血凝的级联反应。

关键词:中华绒螯蟹, 血细胞, 计数, 形态学变化, 血凝

中图分类号: Q 461.5 917 文献标识码: A

Counting and morphological changes *in vitro* of haemocytes in *Eriocheir sinensis*

LU Hong-da¹, ZHANG Ming-hui²

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract: The number of haemocytes per cubic milliliter haemolymph in *Eriocheir sinensis* was (13357 ± 7196) . The percentage of large granular cell (LGC) was 49.8% and its size was (16.6 ± 1.1) μm × (10.2 ± 0.6) μm; The percentage of large and small granular intermediate cell (LSGC) was 20.6% and its size was (13.1 ± 1.2) μm × (8.4 ± 0.5) μm; The percentage of small granular cell (SGC) was 29.3% and its size was (12.4 ± 1.2) μm × (8.1 ± 0.4) μm; The percentage of agranular cell (AGC) was 0.2% and its size was (11.3 ± 1.3) μm × (8.9 ± 1.1) μm. The complete coagulation time of haemolymph in *Eriocheir sinensis* was (97.7 ± 25.3) s, during which only AGC and SGC displayed cytolysis. The main morphological and structural changes of AGC and SGC were that they and their nuclei swelled immediately after haemolymph leaving body, the ratio of nucleus to cytoplasm increased rapidly, membranes ruptured and the cytoplasm moved out from the inside of cell. After the complete coagulation of haemolymph, the main changes of AGC and SGC were that their mitochondria and endoplasmic reticulum ruptured, dissolved and disappeared gradually, the substance in the small granules of SGC moved out, the electron density in small granules decreased, the granules vacuolated and disappeared gradually, and nucleus became pyknosis. The cytolysis of LSGC and LGC started 5 min later

收稿日期: 2005-09-13

资助项目: 上海市自然科学基金(02NK05); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 陆宏达(1960-), 男, 江苏启东人, 教授, 主要从事水产动物病害等方面的研究。Tel: 021-65710526, E-mail: hdlu@shfu.

edu.cn

after haemolymph leaving body and was slower than the cytolysis of AGC and SGC. The main morphological and structural changes of LSGC and LGC were that they and their nuclei swelled, membrane, mitochondria and endoplasmic reticulum ruptured, dissolved and disappeared gradually, large granules in LSGC and LGC vacuolated and disappeared gradually, and nucleus became pyknosis. From the characteristics of AGC and SGC morphological changes after haemolymph leaving body, it was inferred that they released some coagulative factors to get into the coagulative reactions which might be similar to that of vertebrate platelets.

Key words: *Eriocheir sinensis* haemocyte counting morphological changes coagulation

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)简称河蟹,属甲壳类动物,河蟹养殖业发展迅速,它已成为我国特有的养殖品种。但有关河蟹血液学方面的研究报道很少。本作者在河蟹血细胞的显微、亚显微形态结构及分类研究的基础上^[1],进行了河蟹血细胞数和各种血细胞所占百分比等方面的测定,它不仅丰富河蟹血液学的内容,而且作为河蟹疾病诊断的血液学指标对河蟹健康状况进行判断等方面也有重要的意义。血液凝固在抵抗病原生物侵入等方面起到防御和协助愈合的作用,在高等脊椎动物中,血液凝固与血小板有关。通过对河蟹血细胞离体后形态结构随时间变化特点的观察,探讨河蟹血液凝固是否与血细胞有关,以及与哪种类型血细胞有关,将有助于对发病河蟹、蓝蟹(*Callinectes sapidus*)、美洲龙虾(*Homarus americanus*)和对虾等甲壳类动物血液离体后,血液出现不凝固或凝固时间明显延长^[2-6]病理机理等问题的更深入了解。

1 材料和方法

1.1 实验材料

健康河蟹购自上海市奉贤,体质量为 48~52 g,在水深为 28 cm 的 80 cm×35 cm×40 cm 室内玻璃水族箱中驯养 1 周,驯养期间进行充气、投食、换水等日常管理,河蟹无异常现象。

1.2 各种血细胞计数、所占百分比和长、短轴大小的测定

取血和固定方法采用陆宏达^[1]的方法,即将装有 16 号针头的 1 mL 注射器精确吸取 4℃ 预冷的磷酸缓冲液配制的 4% 戊二醛固定液 0.6 mL (pH 为 7.4)后,针尖直接从擦净的河蟹第 3 步足基部关节软膜处插入,深度为 0.5 cm 左右,在蟹的胸部精确吸取 0.4 mL 的血液,随即取出注射器,吸入少量空气并上、下翻转使固定液与血液充分混匀后,注入 1.5 mL 塑料离心管内,在 4℃ 冰箱中保存,该血液中的血细胞离体时就被固定,保持原有的形态结构状态,血细胞称为原形血细胞。取固定的原形血细胞的血液样品,用相差显微镜

测定血细胞单位体积里的数量、各种类型血细胞所占百分比和长、短轴的大小,平均值、标准差和标准误等数据统计采用薛仲三^[7]的方法。共对 32 只河蟹的血细胞进行统计分析,每只蟹单位体积血细胞数采用血球计数板法,结果为 2 次计数的平均数;每只蟹各种类型血细胞百分比是随机观察千个以上血细胞中所占的比例;血细胞长、短轴大小的测定用目测微尺在相差显微镜下随机选择细胞进行测定,除无颗粒细胞长、短轴大小测定的细胞样本数(n)为 1~8 个外,其它 3 种有颗粒细胞测定的细胞样本数(n)均为 30 个(表 1)。

1.3 血液完全凝固时间

用洗净的 16 号针头注射器直接从擦净的河蟹第 3 步足基部关节软膜处插入蟹的胸部,深度约为 0.5 cm 左右,针尾向下,血液从针尾向下自然流淌在干净的玻片上,流淌起开始计时,通过玻片翻转以及塑料细棒触动,肉眼观察血液凝固状况,至完全凝固成果冻状时为血液完全凝固的时间。数据统计采用薛仲三^[7]的方法。

1.4 离体血细胞亚显微观察

与测定血液完全凝固时间同样的方法取血,血液从针尾向下分别自然流淌 2 滴于 1.5 mL 塑料离心管内,从流淌起计时,并分别在 45 s、1 min 30 s、5 min、15 min、30 min、45 min 和 1 h 时滴入 4℃ 预冷的磷酸缓冲液配制的 4% 戊二醛固定液 (pH 7.4)进行固定,作为不同时间血细胞亚显微形态结构观察的样品。对滴入固定液时尚未凝固的血液样品,在 1.5 mL 塑料离心管中离心 ($1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min, 4℃),倒去上层的固定液,将溶化后尚未凝固的 2.5% 琼脂滴加到沉淀的血细胞中进行包埋,切成 $0.5\ \text{mm}^3$ 大小的包埋块,再放入 4% 戊二醛中保存备用;已凝固的血液,加入固定液后随即切成 $0.5\ \text{mm}^3$ 大小的血凝块,再放入 4% 戊二醛中保存备用。样品经缓冲液冲洗,1% 锇酸后固定 2 h,酒精、丙酮脱水,Ep812 树脂包埋,超薄切片机切片,用醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色,在 JEM-100CX II 透射电镜下对血液离

体后不同时间的血细胞形态结构进行观察拍照,以原形血细胞亚显微形态结构^[1]为对照,进行比较,探讨离体的血细胞形态结构变化规律。

1.5 离体血细胞显微连续观察

与测定血液完全凝固时间同样的取血方法,血液从针尾向下自然流滴在干净的玻片上,在相差显微镜下定点进行连续观察,流滴起计时,分别在45 s、3 min、10 min、20 min、30 min、45 min和60 min时定时拍照,并以原形血细胞显微形态结构^[1]为对照,进行比较。为能反应血细胞形态结构随时间连续变化影像,整个显微拍摄过程中摄影焦点聚焦在载玻片上方同一个固定的平面上。

2 结果

2.1 血细胞数和各种血细胞所占百分比及大小

根据血细胞内颗粒有无和颗粒特性,河蟹血细胞分为4种类型:无颗粒细胞、小颗粒细胞、大小颗粒中间型细胞(简称中间型细胞)和大颗粒细胞^[1]。单位体积血液中血细胞的数量以及各种类型血细胞的百分比和长、短轴大小统计结果见表1(2)。血细胞数量为 $(13\,357 \pm 7\,196)$ cells·mm⁻³。大颗粒细胞在血细胞中所占比例最高,为 $(49.8 \pm 7.5)\%$,是最大的一种血细胞,其长轴 (16.6 ± 1.1) μm,短轴 (10.2 ± 0.6) μm;大小颗粒中间型细胞所占的比例 $(20.6 \pm 5.3)\%$,其长轴 (13.1 ± 1.2) μm,短轴 (8.4 ± 0.5) μm;小颗粒细胞所占的比例 $(29.3 \pm 4.8)\%$,其长轴 (12.4 ± 1.2) μm,短轴 (8.1 ± 0.4) μm;无颗粒细胞所占的比例是最少的一种血细胞,只占 $(0.2 \pm 0.2)\%$,其长轴 (11.3 ± 1.3) μm,短轴 (8.9 ± 1.1) μm。

2.2 血液完全凝固时间

从离体时血液尚未凝固经过不完全凝固阶段到完全凝固是一个连续的过程,血液完全凝固时间为 (97.7 ± 25.3) s(表3)。

2.3 离体血细胞形态结构变化

4种类型原形血细胞的显微、亚显微形态结构已有详细描述^[1]。概括地说,各种类型血细胞形状都以椭圆形为主,因可在细胞的多处伸出伪足,部分细胞可呈月牙形、棱形、梨形、牛头形、星状形等不规则形,不规则形在各种类型的细胞中所占的比例是不同的,无颗粒细胞中不规则形细胞所占的比例最少。本实验经显微、亚显微观察,河蟹各种类型血细胞离体后,它们的形态结构都随着

时间的变化而变化,尽管极少数同种类型的血细胞形态结构变化存在时间上的差异,但绝大部分同种类型血细胞的变化是同步的。无颗粒细胞和小颗粒细胞(简称无、小颗粒细胞)在显微、亚显微形态结构变化上以及在变化的时间上相似,而中间型细胞和大颗粒细胞(简称中、大颗粒细胞)在显微、亚显微形态结构变化上以及在变化的时间上相似。

离体的血细胞亚显微形态结构的变化:无颗粒、小颗粒细胞离体后形态结构立即发生变化,细胞膨大,椭圆形形态的血细胞逐渐趋向圆形,梭形等不规则形血细胞的伪足突起逐渐缩短,直至完全消失,形态也由梭形等不规则形变成椭圆形,逐渐趋向圆形,细胞核出现同样的逐渐膨大现象,且膨大的速度明显快于整个细胞的膨大速度,核质比迅速增大,核内染色质边集;45 s时,少数细胞的细胞膜有些部位已有破裂,细胞膜外出现溢出以及渗出的胞质,细胞及细胞核的膨大现象还在继续进行,但膨大的速率减慢,核质比进一步扩大,胞质内的线粒体、内质网等细胞器因受细胞核挤压出现位置和形状的改变(图版I-1);1 min 30 s时,细胞膜较大区域出现破损、崩解,胞浆溢出,出现细胞器随胞浆流出细胞外现象,细胞和细胞核的膨大速度减慢,膨大现象不明显,少数线粒体、内质网腔扩张,小颗粒细胞中的小颗粒电子密度无明显变化(图版I-2);5 min时,细胞膜破损崩解区域进一步扩大,更多的胞浆流出细胞膜外,大多数线粒体、内质网腔扩张,细胞和细胞核不再膨大,细胞和细胞核膨大、趋向圆形的过程一般约在5 min内结束(图版I-3);15 min时,细胞膜破损、崩解更为严重,细胞膜内更多胞浆与细胞外的血浆混溶,线粒体、内质网腔扩张并出现溶解,而细胞核出现固缩(图版I-4),有些细胞核的外膜与内膜已出现分离,形成核周池(perinuclear cisternae)(图版I-5);30 min时,绝大部分细胞由于细胞膜破损溶解而失去原有的细胞形态,大部分线粒体、内质网失去原有的结构,溶解消失,小颗粒细胞中的小颗粒出现电子密度降低,内含物渗出或溢出而发生空泡化,细胞核固缩(图版I-6);45 min时,细胞质内只残留线粒体、内质网、小颗粒溶解后的物质,细胞核进一步固缩(图版I-7);60 min时,只残留固缩的细胞核,细胞的其它部分呈现一片无形态结构的物质(图版I-8)。

中、大颗粒细胞形态结构的变化明显慢于无、小颗粒细胞,细胞离体后的 5 min 内形态结构变化不明显,在 5 min 时,细胞和细胞核开始出现膨大,伪足逐渐收缩,胞质内颗粒和线粒体等细胞器尚无变化(图版 I-9),在 15 min 时,细胞和细胞核的膨大现象已停止,细胞膜破裂,胞质轻微溢出(图版 I-10);30 min 时,进一步发展为大部分细胞膜崩解,胞质外溢,胞质内线粒体、内质网等细胞器有轻微的溶解,颗粒电子密度无变化,细胞核开始出现固缩(图版 I-6),有些细胞核的外膜与内膜

已出现分离,形成核周池;45 min 时,细胞膜溶解而出现大部分膜界限模糊不清,线粒体、内质网腔扩张,大部分线粒体、内质网失去原有的结构,溶解消失,颗粒因内含物渗出或溢出而出现颗粒空泡化,电子密度降低,较多颗粒已崩解消失,而细胞核进一步固缩(图版 I-11);60 min 时,细胞膜崩解而失去膜结构和整个细胞的形态,只有少数线粒体、内质网尚未溶解消失,绝大部分空泡化的大颗粒崩解消失,细胞核继续固缩,但固缩速率减慢(图版 I-12)。

表 1 中华绒螯蟹单位体积血液中血细胞数和各种类型血细胞所占的百分比

Tab.1 Total number of haemocytes per cubic milliliter haemolymph and percentages of different type haemocytes in *E. sinensis*

编号 no.	性别 sex	血细胞数 (cells·mm ⁻³) number of haenocyte	大颗粒细胞 large granular cell		中间型细胞 intermediate cell		小颗粒细胞 small granular cell		无颗粒细胞 agranular cell		4 种血细胞 总计数量 total
			个数 ind.	%	个数 ind.	%	个数 ind.	%	个数 ind.	%	
4	♀	4487	659	65.0	112	11.0	240	23.7	3	0.3	1014
5	♂	4416	607	56.0	170	15.7	304	28.0	3	0.3	1084
7	♀	23750	510	49.5	195	18.9	321	31.2	4	0.4	1030
8	♀	4150	620	61.1	160	15.8	227	22.4	8	0.8	1015
9	♀	7875	661	65.4	117	11.6	229	22.7	3	0.3	1010
10	♀	7925	550	54.0	186	18.3	274	26.9	8	0.8	1018
11	♀	13800	505	49.0	298	28.9	226	21.9	2	0.2	1031
12	♀	29875	446	43.1	286	27.6	300	29.0	3	0.3	1035
13	♀	9200	507	50.2	216	21.4	284	28.1	2	0.2	1009
14	♀	24375	486	47.5	247	24.1	290	28.3	1	0.1	1024
15	♀	22625	477	46.7	238	23.3	306	29.9	1	0.1	1022
16	♀	13750	457	44.5	206	20.1	362	35.2	2	0.2	1027
17	♀	25250	494	49.1	231	22.9	279	27.7	3	0.3	1007
18	♂	9500	645	58.2	204	18.4	257	23.2	2	0.2	1108
19	♂	8200	435	42.9	227	22.4	351	34.6	1	0.1	1014
20	♀	18125	445	43.7	211	20.7	359	35.2	4	0.4	1019
21	♀	13000	412	40.2	270	26.3	342	33.3	2	0.2	1026
22	♀	12550	582	55.2	219	20.8	253	24.0	1	0.1	1055
23	♀	19300	471	46.1	255	25.0	295	28.9	1	0.1	1022
24	♀	20625	508	50.3	148	14.7	350	34.7	3	0.3	1009
25	♀	23250	520	50.1	164	15.8	352	33.9	1	0.1	1037
26	♂	5400	634	62.3	173	17.0	207	20.4	3	0.3	1017
27	♂	12000	529	52.4	153	15.2	326	32.3	1	0.1	1009
28	♂	13750	474	45.1	286	27.2	288	27.4	2	0.2	1050
29	♀	5750	534	52.1	169	16.5	318	31.1	3	0.3	1024
30	♂	4900	617	59.8	174	16.9	240	23.3	1	0.1	1032
31	♂	8025	446	43.9	274	27.0	294	29.0	1	0.1	1015
32	♂	14625	482	46.8	174	16.9	371	36.1	2	0.2	1029
33	♀	7675	356	35.2	337	33.4	315	31.2	2	0.2	1010
34	♀	7525	459	44.6	214	20.8	353	34.3	2	0.2	1028
35	♂	16375	422	41.4	202	19.8	394	38.6	2	0.2	1020
36	♀	15375	425	42.2	263	26.1	319	31.6	2	0.2	1008
平均值 ± 标准差 mean ± SD		13357 ± 7196	49.8 ± 7.5		20.6 ± 5.3		29.3 ± 4.8		0.2 ± 0.2		

显微形态结构的变化:各种细胞在相差显微镜下经定点进行 60 min 的连续观察表明,各种血细胞形态结构变化与亚显微观察的结果吻合,中、大颗粒细胞形态结构的变化明显慢于无、小颗粒细胞,各种血细胞都经过了细胞和细胞核膨大,细胞膜破裂、胞质溢出、细胞垮塌失去原有形态以及

细胞溶解等变化,有颗粒的血细胞因细胞崩解、垮塌,部分颗粒随胞质流出,原立体分布在胞质内的颗粒随细胞崩塌而分布在载玻片的同一个平面上,此时所有颗粒正好处在拍摄的焦点上而十分清晰,颗粒内含物渗出或溢出、颗粒崩解、逐渐溶解消失等过程(图版 II -1 ~ 7)。

表 2 中华绒螯蟹各种类型血细胞的长轴、短轴大小
Tab.2 Sizes of different type haemocytes in *E. sinensis*

编号 no.	性别 sex	大颗粒细胞 large granular cell		中间型细胞 intermediate cell		小颗粒细胞 small granular cell		无颗粒细胞 agranular cell	
		长轴(μm) (n=30)	短轴(μm) (n=30)	长轴(μm) (n=30)	短轴(μm) (n=30)	长轴(μm) (n=30)	短轴(μm) (n=30)	长轴(μm) (n=1~8)	短轴(μm) (n=1~8)
4	♀	18.4±3.2	10.8±1.5	12.8±2.0	8.0±0.9	10.7±1.8	7.7±1.1	11.2±0.8	8.8±0.5
5	♂	16.6±2.6	9.3±1.4	12.3±2.4	7.7±1.0	12.2±2.1	7.5±1.2	10.2±1.7	8.9±0.6
7	♀	17.1±2.4	10.7±1.9	12.2±1.7	8.4±1.2	11.1±1.5	7.9±0.8	11.3±0.8	8.7±0.5
8	♀	14.5±2.2	10.8±1.2	10.4±1.4	8.5±1.0	10.0±1.5	8.2±0.9	10.0±0.7	9.2±0.9
9	♀	17.0±2.5	10.8±1.6	11.7±1.2	8.2±1.0	12.1±2.4	8.6±1.1	10.0±0.7	9.1±1.0
10	♀	16.6±2.7	9.8±1.6	14.6±3.1	8.6±1.5	13.9±3.2	9.1±1.4	12.5±1.3	9.8±1.2
11	♀	16.5±2.0	10.6±1.7	13.2±1.8	8.9±1.6	12.0±2.0	8.2±1.1	13.7±0.7	10.2±1.4
12	♀	16.1±2.3	10.2±1.6	12.9±2.2	8.7±1.0	11.4±1.7	7.7±1.2	9.5±0.7	8.2±0.2
13	♀	16.2±2.3	9.2±1.2	13.5±2.3	8.3±1.2	11.1±2.1	7.9±0.9	10.1±1.8	8.6±0.8
14	♀	16.5±3.2	9.8±1.4	12.9±1.8	8.4±1.3	12.6±1.8	8.4±1.1	10.2*	10.2*
15	♀	16.2±2.1	9.9±1.9	12.6±1.8	8.3±1.0	11.7±2.5	8.1±1.2	10.2*	10.2*
16	♀	15.5±3.1	9.0±1.4	12.2±1.6	8.1±1.2	11.8±1.8	8.0±1.2	11.1±0.1	7.8±0.8
17	♀	17.7±2.6	9.9±1.6	14.8±2.4	8.5±1.0	14.2±2.1	8.5±1.4	12.5±0.6	8.9±1.2
18	♂	17.3±2.9	10.9±1.7	12.5±1.4	8.2±1.2	11.1±1.7	7.4±1.3	9.7±0.7	8.2±0.2
19	♂	17.4±2.4	9.7±1.7	13.9±2.0	8.8±1.3	14.4±2.4	8.1±0.9	11.2*	11.2*
20	♀	15.8±2.6	10.0±1.3	12.0±1.4	8.5±1.2	12.0±1.8	8.3±1.3	10.6±0.6	8.0±0.4
21	♀	16.7±1.8	10.8±1.6	14.4±1.8	8.7±1.0	14.5±2.5	8.3±1.2	12.2±2.8	9.7±2.1
22	♀	15.9±2.5	9.6±1.4	13.7±1.6	8.0±1.0	12.3±1.6	8.0±1.0	11.2*	7.2*
23	♀	18.8±2.8	10.5±1.9	14.9±2.0	8.3±1.0	13.4±1.4	8.6±1.6	11.2*	9.2*
24	♀	16.1±2.7	9.8±1.6	12.9±1.8	8.1±1.2	11.7±1.6	7.8±0.9	10.2±1.0	7.6±0.5
25	♀	15.6±2.2	9.9±1.3	12.4±2.5	8.0±1.2	12.7±2.4	7.6±1.0	11.2*	9.2*
26	♂	14.8±2.9	9.9±1.3	11.4±1.6	8.3±1.0	10.6±1.8	7.9±1.0	10.9±1.2	9.2±1.0
27	♂	17.4±2.8	10.8±1.7	12.6±1.4	8.6±0.9	12.8±1.6	8.4±0.8	12.4*	11.2*
28	♂	16.3±1.8	9.8±1.9	12.1±2.0	7.7±1.2	12.6±1.7	8.2±1.6	10.7±0.7	9.7±0.7
29	♀	13.8±1.5	10.1±2.4	11.9±1.2	8.4±1.5	11.4±1.0	8.3±2.0	10.1±0.6	7.9±2.0
30	♂	17.9±2.0	11.3±2.3	12.0±1.8	8.7±0.9	11.8±2.3	8.5±1.2	11.2*	10.2*
31	♂	16.5±2.6	9.7±1.8	14.3±2.1	7.9±1.1	13.1±2.0	7.1±1.1	11.2*	7.2*
32	♂	18.8±3.0	11.7±1.6	15.0±2.0	10.3±1.5	14.1±2.3	8.8±1.9	11.5±1.2	9.2±0.3
33	♀	16.1±2.7	11.0±1.3	14.6±2.3	9.4±1.5	13.3±2.3	8.8±1.1	12.7±0.6	8.3±0.7
34	♀	17.5±2.5	9.5±1.6	13.3±1.9	7.9±1.0	12.1±2.1	7.9±1.1	14.3±1.6	8.3±1.6
35	♂	15.8±2.4	9.6±1.2	14.4±2.0	8.9±1.1	14.1±1.5	7.9±1.3	15.1±0.9	6.8±1.6
36	♀	17.1±2.7	9.7±1.5	14.4±2.4	8.1±1.5	14.1±1.9	7.5±1.4	11.2±0.8	7.6±0.4
总平均值 ± 标准误 mean ± SD		16.6±1.1	10.2±0.6	13.1±1.2	8.4±0.5	12.4±1.2	8.1±0.4	11.3±1.3	8.9±1.1

注:* 为一个无颗粒细胞长、短轴测定的结果

Notes:* the result of one agranular cell

表 3 中华绒螯蟹血液完全凝固的时间

Tab.3 Time of coagulation of blood in *E. sinensis*

编号 no.	凝固时间 coagulation time	编号 no.	凝固时间 coagulation time	编号 no.	凝固时间 coagulation time	编号 no.	凝固时间 coagulation time
1	1 min 38 s	6	1 min 44 s	11	1 min 8 s	16	1 min 58 s
2	1 min 30 s	7	1 min 6 s	12	1 min 7 s	17	1 min 43 s
3	2 min 12 s	8	1 min 50 s	13	1 min 36 s	18	2 min 31 s
4	1 min 12 s	9	1 min 15 s	14	2 min 30 s	19	1 min 47 s
5	1 min 25 s	10	1 min 24 s	15	1 min 23 s	20	1 min 35 s
平均值 ± 标准差 mean ± SD				(97.7 ± 25.3) s			

3 讨论

甲壳类不同种类以及同种不同个体间的单位体积血液中血细胞数量变动很大,常受到机体的性腺发育、脱壳、环境温度和寄生物的感染等许多因素的影响^[8]。罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)单位体积血液中血细胞数量受到不同季节和不同投饲率的影响而变动,但不受性别和个体大小的影响^[9]。本实验中的河蟹循环血液中的血细胞数量平均值 ± 标准差为(13 357 ± 7 196) cells·mm⁻³,这批在相同的时间、采自同一个池塘、大小相似的健康实验蟹出现个体间血细胞数量较大的差异,可能是由于不同个体的河蟹处于不同的性腺发育阶段和不同的脱壳时期等不同生理状态因素作用的结果。

人类以及其他高等脊椎动物的单位体积血液中血细胞数量以及各种血细胞所占比例等常作为健康还是疾病状态的血液指标,并在疾病诊断上已得到广泛的应用,在无脊椎动物的甲壳类中已发现中国对虾(*Penaeus chinensis*)在受到白斑综合征病毒(WSBV)感染后,其单位体积血液中血细胞数量以及颗粒细胞的数目显著减少^[10],表明无论高等脊椎动物还是低等无脊椎动物患某些疾病后,会发生血液指标的变动,河蟹循环血液中的血细胞数量、各种类型血细胞所占百分比和长、短轴大小的数据建立,不仅可以丰富河蟹血液学的内容,而且可作为健康河蟹的血液指标,提供疾病诊断的依据。

在已有的甲壳动物研究中,血液凝固有许多酶等因子尤其血细胞内因子的参与,最后由存在于血浆中的凝固蛋白原(coagulogen)变成凝固蛋白(coagulin)通过铰链使血液凝固。

尽管甲壳类血液凝固生化过程的许多中间环节尚有争议^[11],但许多研究者认为,血液凝固需

要血细胞内物质^[11-13],其中存在于血细胞内的转谷氨酰胺酶(transglutaminase)是促进血液凝固的主要酶^[13]。在日本龙虾 Spiny lobster(*Panulirus japonicus*)透析过的血浆中加入不同种类的血细胞,只有类似于河蟹无颗粒细胞、小颗粒细胞的透明细胞(hyline cells)和半颗粒细胞(semigranular cells)能使血浆重新凝固,而且这些血细胞经超声波破碎后血浆凝固时间显著缩短,表明蟹的透明细胞和半颗粒细胞直接参与了血凝^[13]。本文通过对离体后河蟹血细胞形态结构随时间变化的观察,发现血液离体后至完全凝固(97.7 ± 25.3) s 时间内,只有无、小颗粒细胞形态结构发生了变化,细胞及细胞核逐渐膨大,核质比迅速增大,细胞膜破损溶解,胞浆中的物质进入血浆中,而中、大颗粒细胞形态结构在血液离体 5 min 后才有变化,此时离体的血液已完全凝固。在对河蟹血液的抗凝剂筛选研究中,发现在保持血细胞活性的前提下,抗凝效果与保持血细胞原有形态结构的程度呈正相关(待发表)。因此作者认为河蟹的无、小颗粒细胞如同蟹的透明细胞和半颗粒细胞一样直接参与了血液凝固,通过细胞膨大以及破裂等形态结构的改变,使存在于无、小颗粒细胞内的血液凝固必要物质释放到血浆中而导致血液发生凝固,但这些血液凝固必要物质是否和其它甲壳动物一样是转谷氨酰胺酶,还有待于进一步的研究。尽管血液在刚离体时无、小颗粒细胞的细胞膜尚未破损溶解,但细胞及细胞核立即膨大,细胞核膨大速率快于细胞的膨大速率,核质比迅速增大,此过程在细胞质内产生内压,血液在刚离体时血细胞通过细胞质内的这种内压作用将血液凝固必要物质释放到血浆,所以血液凝固在血液刚离体时就已经开始。45 s 时尤其 1 min 30 s 时,

细胞膜的部分区域破损,崩解,胞浆溢出,此时较多的血液凝固必要物质进入血浆可加速血液凝固。是什么因子激发河蟹无、小颗粒细胞形态变化和胞膜破裂以及血液凝固,其机理可能类似于脊椎动物的血凝,脊椎动物的血液接触受伤血管壁内的胶原或基底膜,或接触带负电荷的异物(如玻璃等)后,相继激活了一系列的凝血因子,血小板在一些被激活的血浆凝血因子作用下发生变形,释放出各种血小板因子参与凝血的级联反应^[14,15],河蟹可能以同样的方式,通过被激活的血浆凝血因子作用,使无、小颗粒细胞发生形态结构的变化,释放凝血物质导致凝血。在血细胞形态结构发生变化过程中,小颗粒细胞中颗粒的变化远晚于血液完全凝固的时间,约在血液离体后30 min才开始变化,表现为颗粒电子密度降低,随着时间的推移,内含物渗出或溢出而出现颗粒空泡化或崩解后,逐渐消失溶入到胞浆中,颗粒的滞后变化说明了从小颗粒细胞胞质中释放的血液凝固必要物质不存在于小颗粒内。

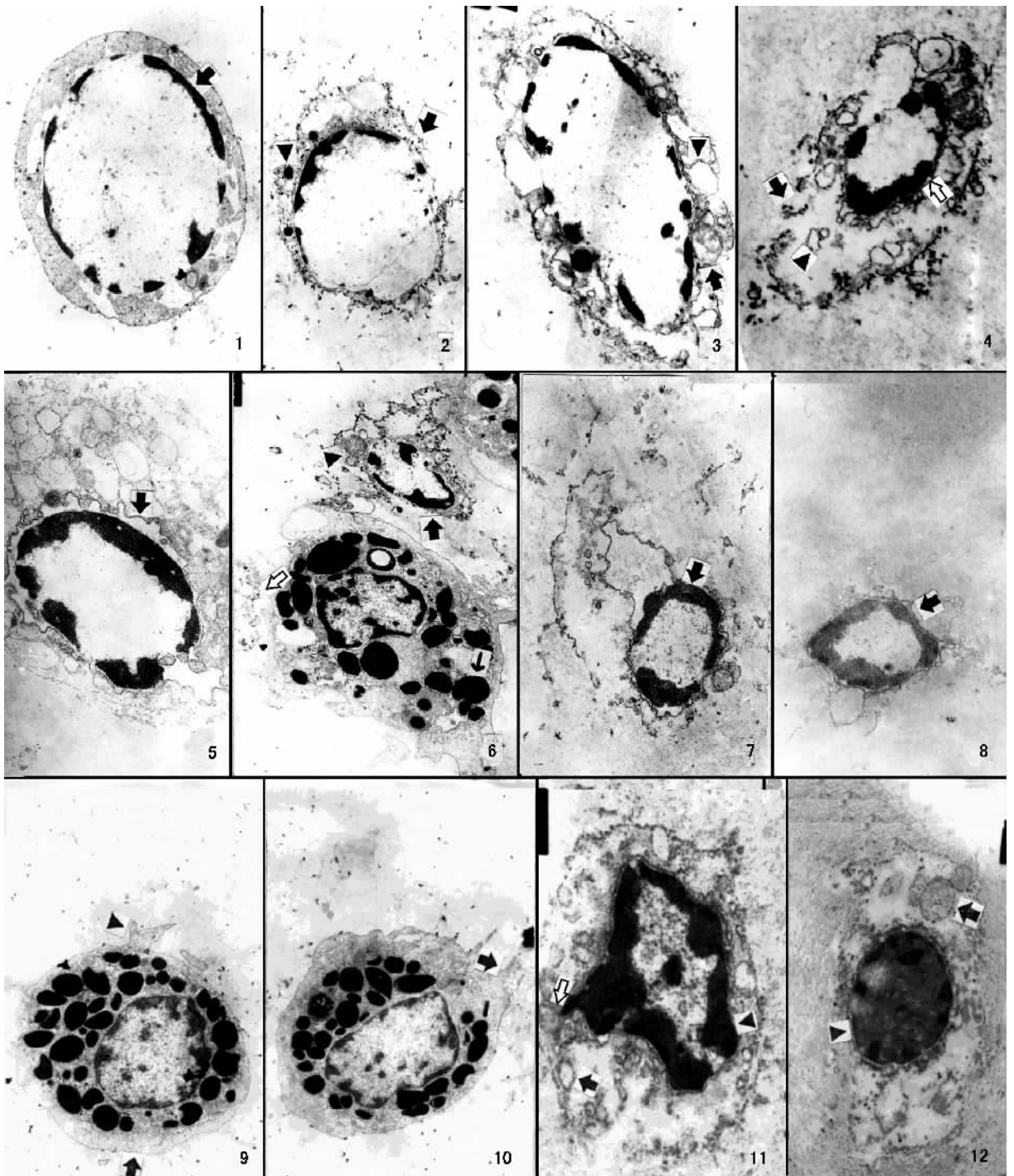
虾蟹类血细胞的分类大多采用形态学的方法,获得血细胞的方法直接影响形态结构观察的正确性。朱宁宁等^[16]以中华绒螯蟹血淋巴凝固后的血块为材料,对血块中血细胞的超微结构观察后进行分类,其结果因血凝固后血细胞形态结构已发生了变化,不能正确反映血细胞在蟹体内原有的形态结构特点,因此不能用血块中已发生变化的血细胞形态结构特点作为血细胞分类依据。

在许多有关患病虾蟹类离体的血液出现不凝固或凝固时间明显延长病理变化的报道中,都未同时涉及到血细胞数量变化的研究^[2-5],只有在患病的美洲龙虾研究中报道了在出现血液不凝固的同时还研究发现了血细胞数量减少的症状,但也未涉及到血液不凝固与血细胞数量变化间的关系问题^[6],本实验从血细胞形态结构变化的角度,显示了无颗粒细胞和小颗粒细胞通过细胞的膨大和破裂释放胞浆物质,这些胞浆物质参与了血凝过程,推测许多甲壳动物得病后血液出现不凝固或凝固时间明显延长病理变化是与血细胞数量的减少,导致进入血浆的血液凝固必要物质数量达不到应有水平有关,同时认为血液凝固时间长短与血细胞在一定范围内的数量呈负相关关系。

有些细胞核的外膜与内膜分离形成核周池,在细胞核开始固缩时已出现,这种现象不仅在中、小颗粒细胞形态结构变化中存在,而且还出现在中、大颗粒细胞中,核周池的出现是一种变性的表现^[17],而细胞核固缩是细胞死亡的特征。血细胞形态结构变化表明,约在血液离体后15 min时无、小颗粒细胞以及30 min时中、大颗粒细胞的细胞核开始固缩,分别进入不可逆的细胞死亡过程。

参考文献:

- [1] 陆宏达. 中华绒螯蟹血淋巴细胞的显微、亚显微形态结构以及分类[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 89-95.
- [2] 陆宏达, 范丽萍, 薛美. 中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理学[J]. 水产学报, 1999, 23(1): 61-68.
- [3] 黄琪琰. 水产动物疾病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 93.
- [4] 郑国兴, 耿隆坤, 沈亚林, 等. 东海区养殖对虾暴发性流行病病原及防疫对策[J]. 海洋科学, 1995(2): 1-3.
- [5] 王书锦, 国际翔, 薛得林, 等. 辽宁沿海中国对虾常见病多发病原菌及防治[J]. 海洋科学, 1995(1): 8-11.
- [6] Stang-Voss G. Zur ultrastructure der blutzellen wirbelloser tiere I. über die haemocyten der larve des mahlkafers *Tenebrio molitor* L. [J]. Zeitschrift für Zellforschung, 1970, 103: 589-605.
- [7] 薛仲三. 医学统计方法和原理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 47-69, 263-295.
- [8] Invertebrate blood cells. (Volume 2) [M] Ratcliffe N A, Bowley A F Eds. London: Academic Press, 1981: 385-420.
- [9] Cheng W, Chen J. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2001, 11(1): 53-63.
- [10] Kim Y J, Choi W C, Kim H R, et al. Changes in *Penaeus chinensis* haemocytes during white spot baculovirus (WSBV) infection [J]. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 1999, 19(5): 213-215.
- [11] Durliat M. Clotting processes in crustacea decapoda [J]. Biol Rev, 1985, 60: 473-498.
- [12] Ghidalia W, Vendrely R, Montmory C, et al. Coagulation in decapod Crustacea. comparative study of the clotting process in species from groups A, B and C [J]. J Comp Physiol, 1981, B 142: 473-478.
- [13] Aono H, Mori, K. Interaction between hemocytes and plasma is necessary for hemolymph coagulation in the spiny lobster, *Panulirus japonicus* [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 113A(3): 301-305.
- [14] 陈文杰, 陆道培. 血液学进展[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 128-135.
- [15] Bang F B. A factor in crab amoebocytes which stimulates *in vitro* clotting of blood [J]. J Invertebr Pathol, 1971, 18: 280-283.
- [16] 朱宁宁, 王文, 顾志峰, 等. 中华绒螯蟹血淋巴细胞的超微结构[J]. 中国水产科学, 2002, 19(2): 114-116.
- [17] Stewart J, Arie B, Zwicker B M, et al. Gaffkemia, a bacterial disease of the lobster, *Homarus americanus*: effects of the pathogen, *Gaffkyn homari*, on the physiology of the host [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1969, 15: 925-932.



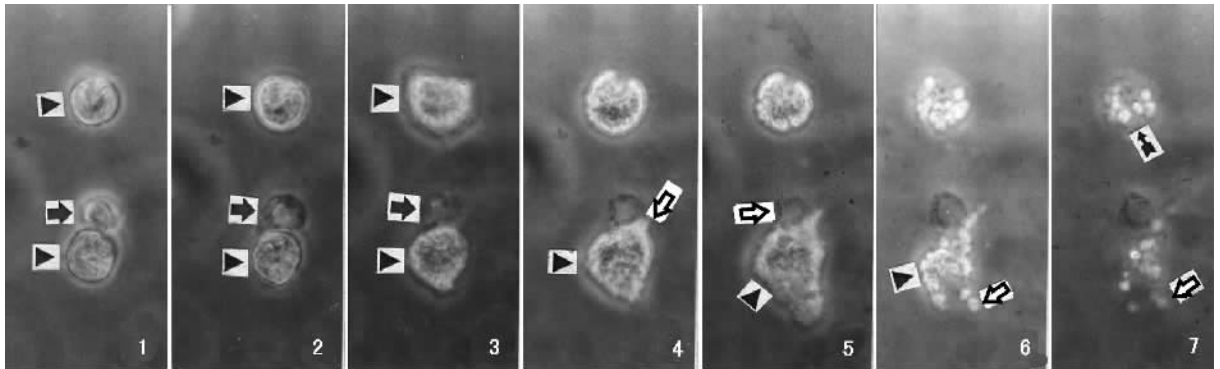
图版 I 离体的无颗粒、小颗粒细胞、中间型细胞和大颗粒细胞亚显微形态结构的变化

Plate I Morphological and structural changes of AGC, SGC, LSGC and LGC in electron microscopy *in vitro*

1.45 s 时 无颗粒细胞及细胞核(→)膨大 核质比增大,在细胞膜外出现细胞的渗出物,×5400 2.1 min 30 s 时,小颗粒细胞膜较大区域出现破损、崩解(→)胞浆溢出 小颗粒无变化(▶),×3600 3.5 min 时,小颗粒细胞细胞膜破损崩解区域进一步扩大 线粒体(→)内质网(▶)腔扩张,×4800 ;4.15 min 时,无颗粒细胞更严重的细胞膜破损、崩解(→)线粒体、内质网(▶)腔扩张和轻微的溶解,细胞核开始出现固缩(⇨),×4200 ;5. 无颗粒细胞核的内、外膜分离,形成核周池(→),×4800 ;6.30 min 时 小颗粒细胞(→)由于细胞、线粒体、内质

网破损溶解而失去原有的形态结构,小颗粒出现电子密度降低(▶);而中间型细胞细胞膜破裂,胞质轻微溢出(⇨),颗粒电子密度无变化(→),×3600;7.45 min时,小颗粒细胞核进一步固缩(➡),×3600;8.60 min时,无颗粒细胞只残留固缩的细胞核(➡),核外呈现一片无形态结构的物质,×3600;9.5 min时,中间型细胞和细胞核开始出现膨大(➡),伪足逐渐收缩(▶),×3600;10.15 min时,中间型细胞细胞膜破裂,胞质轻微溢出(➡),×3600;11.45 min时,中间型细胞细胞膜破损、崩解更为严重,大部分线粒体、内质网(➡)腔扩张或溶解消失,颗粒出现空泡化或崩解消失,残留的颗粒电子密度降低(⇨)细胞核进一步固缩(▶),×5400;12.60 min时,大颗粒细胞只有少数线粒体、内质网尚未溶解消失,大部分空泡化的大颗粒崩解消失,少数残留颗粒的电子密度降低(➡)细胞核继续固缩(▶),×3600

1. At 45 second , AGC cell and nucleus(➡)swell , ratio of nucleus to cytoplasm is increasing , substance from cytoplasm appears in the outside of cell , × 5400 ;
2. At 1 minute 30 second , SGC membrane ruptures and dissolves(➡)and cytoplasm seeps , small granules do not change(▶) , × 3600 ;
3. At 5 minute , SGC membrane further ruptures and dissolves , mitochondria(➡) and endoplasmic reticulum(➡) expand , × 4800 ;
4. At 15 minute , AGC membrane ruptures and dissolves more severely(➡) , mitochondria and endoplasmic reticulum(▶) expand and slightly dissolve , nucleus becomes pyknotic(⇨) , × 4200 ;
5. Separation between inside and outside membranes of AGC nucleus forms perinuclear cisternae(➡) , × 4800 ;
6. At 30 minute , cells of SGC(➡) , mitochondria and endoplasmic reticulum lose their original structures due to their rupture and dissolution , electron density decreases in small granules(▶) ; membranes of LSGC rupture to cause cytoplasm slightly seeping(⇨) , in which granules do not change(→) , × 3600 ;
7. At 45 minute , SGC nucleus is further pyknotic(➡) , × 3600 ;
8. At 60 minute , AGC become no structural substance excepting its pyknotic nucleus (➡) , × 3600 ;
9. At 5 minute , LSGC cell and nucleus start to swell(➡) , pseudopodia shrink(▶) , × 3600 ;
10. At 15 minute , LSGC membrane rupture causes cytoplasm slightly seeping(➡) , × 3600 ;
11. At 45 minute , LSGC membrane rupture and dissolve more severely , mitochondria and endoplasmic reticulum(➡) expand or dissolve and disappear , granules vacuolate and dissolve , electron density decreases in the remaining granules (⇨) , nucleus is further pyknotic(▶) , × 5400 ;
12. At 60 minute , most of LGC mitochondria and endoplasmic reticulum dissolve , large granules vacuolate and dissolve , electron density decreases in few of the remaining granules(➡) , nucleus become pyknosis continually(▶) , × 3600



图版 II 离体的血细胞显微形态结构的变化

Plate II Morphological and structural changes of haemocytes
in light microscopy *in vitro*

1.45 s时,无颗粒细胞膨大(➡);大颗粒细胞无变化(▶),×1072;2.3 min时,进一步膨大的无颗粒细胞(➡)破损崩解,大颗粒细胞无明显变化(▶),×1072。3.10 min时,无颗粒细胞破损崩解(➡);大颗粒细胞膨大后已有破裂,细胞失去膨大时的近圆形(▶),×1072;4.20 min时,无颗粒细胞破损崩解更为严重,大颗粒细胞(▶)细胞膜进一步破裂(⇨),×1072;5.30 min时,无颗粒细胞溶解,固缩核明显(⇨);大颗粒细胞细胞膜破损更为严重,细胞开始垮塌(▶),×1072;6.45 min时,无颗粒细胞固缩核明显;大颗粒细胞细胞膜崩解(▶)后,大颗粒随胞质溢出(⇨)部分颗粒已溶解消失,×1072;7.60 min时,无颗粒细胞固缩核明显;大颗粒细胞内的颗粒进一步溶解消失(⇨)而数量减少,×1072

1. At 45 second , AGC swell(➡); no changes appear in LGC(▶) , × 1072 ;
2. At 3 minute , further swollen AGC(➡)rupture and dissolve ; no distinct changes appear in LGC(▶) , × 1072 ;
3. At 10 minute , AGC further rupture and dissolve(➡); LGC rupture and lose round shape (➡) , × 1072 ;
4. At 20 minute , AGC rupture and dissolve more severely ; LGC(▶)further rupture(⇨) , × 1072 ;
5. At 30 minute , AGC dissolve and their nuclei have become pyknosis(⇨); LGC rupture more severely and collapse(▶) , × 1072 ;
6. At 45 minute , AGC nuclei are pyknosis ; membranes of LGC rupture(▶) , large granules run out with cytoplasm(⇨) and some of them have dissolved and disappeared , × 1072 ;
7. At 60 minute , AGC nuclei are pyknosis ; the number of large granules in LGC decrease due to their further dissolution and disappearance(⇨) , × 1072