

## 成年日本新糠虾血细胞组成、形态及其 不同发育阶段的免疫活性酶

赵柳兰, 杨筱珍, 吴旭干, 王金锋, 王小艳, 成永旭\*

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:**采用光镜和电镜的方法,以血细胞所含颗粒与否,颗粒多少和核质比等将成年日本新糠虾血细胞进行分型,并对各型血细胞所占比例进行统计。利用生化分析的方法,对不同发育阶段(新孵后0、10、20和30 d)日本新糠虾全组织中磷酸酶(酸性磷酸酶和碱性磷酸酶)、溶菌酶和酚氧化酶的活性进行测定。结果表明,日本新糠虾血细胞可为3种类型,它们分别为透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞。它们的胞体大小依次增大,核质比依次降低。对此3种类型血细胞比例分别统计后发现,颗粒细胞所占比例最多约为 $47.53\% \pm 0.02$ ,其次是半颗粒细胞约为 $31.23\% \pm 0.01$ ,最少的是透明细胞约为 $21.24\% \pm 0.02$ 。日本新糠虾体内磷酸酶(酸性磷酸酶和碱性磷酸酶)、溶菌酶和酚氧化酶的活性均有随个体发育而呈降低的趋势。3种酶中以溶菌酶的活性最高,平均约为 $305.20 \text{ U/mg}$ 蛋白,其次是酸性磷酸酶约为 $0.2365 \text{ U/mg}$ 蛋白,而酚氧化酶和碱性磷酸酶在成体中的活性基本一致,约为 $0.1295 \text{ U/mg}$ 蛋白。研究表明,日本新糠虾血细胞组成中,以颗粒细胞为主。溶菌酶是其主要的免疫活性物质。日本新糠虾体内磷酸酶(酸性磷酸酶和碱性磷酸酶)、溶菌酶和酚氧化酶活性有随其个体发育而逐渐降低的趋势。

**关键词:**日本新糠虾;血细胞;组成;形态;磷酸酶;溶菌酶;酚氧化酶

**中图分类号:** S 966.1

**文献标识码:** A

糠虾隶属于节肢动物门(Arthropoda),甲壳纲(Crustacea),软甲亚纲(Malacostraca),糠虾目(Mysidacea),是维持水环境生态平衡的重要生物,也是众多海洋生物的天然饵料。目前将其作为进行生物监测的一种很好的模式动物,已被国内外广泛接受<sup>[1-4]</sup>。日本新糠虾(*Neomysis japonica*)为糠虾科(Mysidae),新糠虾属(*Neomysis Czerniavsky*),是我国广为分布的糠虾类型。目前对其生物学特性及环境监测方面的研究还较少<sup>[5-7]</sup>。

免疫功能是甲壳动物抵抗污染或传染病的重要途径,也是个体维持其正常发育的重要系统。目前有关甲壳类动物免疫功能的研究,主要集中在具有较高经济价值的十足目动物,如锯缘青蟹

(*Scylla serrata*)和中国对虾(*Penaeus chinensis*)<sup>[8-9]</sup>,而对糠虾的研究较为少见。血淋巴是甲壳动物重要的免疫组织,且已证明不同的甲壳动物血细胞形态存在差异<sup>[10-13]</sup>。但由于糠虾个体较小,如成年日本糠虾全长仅为7~10 mm,对其血淋巴的采集较为困难,因此,目前尚未见有此类研究。磷酸酶、溶菌酶和酚氧化酶是甲壳动物重要的免疫活性物质。磷酸酶(ACP和AKP)参与动物体多种生理活动,如蛋白质或脂类的代谢<sup>[14]</sup>,甲壳动物甲壳素的形成<sup>[15]</sup>和免疫功能的发挥<sup>[16]</sup>等。溶菌酶是甲壳动物非特异性免疫系统的主要成分,是血细胞胞质中溶酶体的主要组分<sup>[17-18]</sup>;酚氧化酶原激活系统(prophenoloxidase activating system, proPO系统)

是一种与脊椎动物补体系统类似的酶级联系统,该系统中的因子常以非活化状态存在于血细胞的颗粒中<sup>[19]</sup>,而有关这些酶在糠虾体内的研究还未见有报道。

本课题组及其它已有的对糠虾生长发育的研究业已证明,糠虾虽然新孵幼体从外形上与成年个体相似,但其性征出现时间及性成熟时间仍然需要经历较长时间<sup>[7,20]</sup>。因此,本研究将对日本新糠虾从新孵至性成熟免疫活性指标变化进行测定,并对其成年后血细胞组成及形态进行研究,这将有助于全面了解糠虾免疫发育过程,也为此动物作为环境监测的模型动物提供理论资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 养殖与取材

试验前收集 24 h 内新孵出的日本新糠虾幼体(亲本为本试验室连续培养数代的日本新糠虾),放入 5 L 白色塑料箱(100 只/箱),恒温(25.0±1.0)℃。养殖光照周期为 12 h:12 h,盐度为 15,pH 为 7.6~8.6,24 h 充气泵增氧,溶解氧控制在 6.0~7.0 mg/L。每天 8:00 吸污换水 1/5,换水时分别加入曝气好了的相同条件的养殖用水,并投喂卤虫无节幼体(*Artemia nauplii*)1 次。试验共进行 30 d,每隔 10 天取样一次,共取 4 次(0、10、20、30 d)。取样时,将样品用吸水纸吸干后,每个样品重约为 0.4 g(40~120 只),此样用于日本新糠虾免疫活性酶的测定。第 30 天(此时日本新糠虾基本性成熟)<sup>[21]</sup>取虾心脏中的血液做血涂片。

### 1.2 血涂片的制备及染色

拭干成年日本新糠虾体表,并将其置于载玻片上,滴上固定剂 1% 戊二醛和抗凝剂<sup>[22]</sup>(pH 7.0,柠檬酸钠 30 mmol/L,NaCl 338 mmol/L,葡萄糖 115 mmol/L,EDTA 10 mmol/L),并于解剖镜下迅速用镊子刺破心脏使血液流出,流出血液散布于载玻片上,将此载玻片放在 4℃ 冰箱,30 min 后取出,室温晾干,用 Wright 氏染色法染色。

### 1.3 血细胞大小的测量与各型细胞计数

取性成熟的日本新糠虾(即约为新孵后 30 d),约 20 只虾,血细胞进行涂片和染色后,随机取不同视野观察,每只统计约 200 个细胞,计算每种类型细胞所占比例,并测量各型细胞以及细胞核长径、短径和核质比(Image-Pro Express 6.0 软

件)。核质比的计算公式<sup>[23]</sup>:核质比=核长径/胞体长径。血细胞分型参照虾蟹类常用的分型标准<sup>[10,24-26]</sup>。

### 1.4 酶的提取及酶活性的测定

取日本新糠虾 0.4 g 左右(40~120 只),加入 10 倍体积预冷重蒸水冰浴匀浆,9 000 r/min,4℃ 冷冻离心 30 min,上清液用于酶活性和可溶性蛋白含量的测定。

**磷酸酶活力** 用 ACP 和 AKP 测定试剂盒(购自南京建成生物生物工程研究所)进行测定。酸(碱)性磷酸酶分解磷酸苯二钠,产生游离酚和磷酸,酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物,后经分光光度计据其颜色来判定其酶活力的高低。

**溶菌酶活力** 用溶菌酶检测试剂盒(购自南京建成生物生物工程研究所)进行测定。在一定浓度的混浊菌液中,由于溶菌酶能水解细菌细胞壁上黏多糖使细菌裂解而浓度降低,透光度增强,用分光光度计判断此溶液浊度,来测定溶菌酶的含量。最终酶活力以比活力为单位,即相应温度下,每毫克可溶性蛋白质所含酶活力单位数为酶的比活力(U/mg 蛋白)。

**酚氧化酶活力** 参照 Ashida<sup>[27]</sup>方法进行,并作了部分改进,试验组将 80 μL 0.1 mg/mL 上清液与 100 μL mg/mL 胰蛋白酶混匀,37℃ 或室温水浴 15 min,然后加入 3 mL 0.1 mol/L pH 6.0 磷酸钾缓冲液,并与 100 μL 0.01 mol/L L-Dopa(L-二氢基丙氨酸,L-dihydrophenylalanine)混匀,每隔 1 min 读取 490 nm 波长下的光密度值,以试验条件下每分钟  $A_{490\text{ nm}}$  增加 0.001 为 1 个酶活力单位,最终酶活力以每毫克可溶性蛋白质所含酶活力单位数为酶的比活力(U/mg 蛋白)表示。

**可溶性蛋白** 用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物制剂公司)进行测定。棕红色考马斯亮蓝染料能够与蛋白标准液和样品中蛋白质-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>相结合,使溶液变为蓝色,从而通过吸光度计算出蛋白的含量。

### 1.5 数据分析

采用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行统计分析,采用 ANOVA 对实验结果进行方差分析,采用 Tukey 氏法进行多重比较,取  $P < 0.05$  为差异显著,在 EXCEL 上绘制相关图表。

## 2 结果

### 2.1 成年日本新糠虾血细胞组成与形态

成年日本新糠虾的血细胞主要由3种类型细胞组成,它们分别为透明细胞(hyaline cell, H)、半颗粒细胞(semigranular cell, SG)和颗粒细胞(granular cell, G)。比较此3种细胞在血细胞中所占比例后发现,3种血细胞以颗粒细胞所占比例最多,约占细胞总数的一半,约为48%,其次为半颗粒细胞,其比例约为31%。比例最小的是透明细胞,仅约为21%,3组间均有显著性差异( $P < 0.05$ ) (图1)。

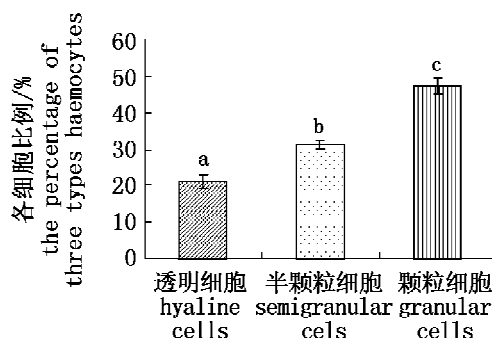


图1 三种血细胞的比例

不同字母代表组间差异显著( $P < 0.05$ )

Fig. 1 The percentage of three types haemocytes

The columns with different labels were significantly different from each other ( $P < 0.05$ )

成年日本糠虾的3种血细胞即透明细胞、半

颗粒细胞和颗粒细胞的大小(细胞长径×细胞短径),分别为( $10.2 \pm 0.39$ )  $\mu\text{m}$  × ( $6.82 \pm 0.20$ )  $\mu\text{m}$ 、( $11.17 \pm 0.40$ )  $\mu\text{m}$  × ( $7.40 \pm 0.26$ )  $\mu\text{m}$  和 ( $13.10 \pm 0.47$ )  $\mu\text{m}$  × ( $7.17 \pm 0.28$ )  $\mu\text{m}$ ,其胞体大小依次增大,核质比依次降低(表1)。透明细胞多呈圆形或者椭圆形,少数呈不规则形,在瑞氏染液着染下其细胞核呈深蓝色,胞质呈淡蓝色(图版-1),有的细胞质很少(图版-1c),其中少见或者仅见少数颗粒。在3种类型细胞中,透明细胞胞体最小,细胞长径仅约为( $10.2 \pm 0.39$ )  $\mu\text{m}$ ,细胞核所占的比例较大,核质比约为( $0.70 \pm 0.01$ )。透射电镜观察,其胞核不规则,胞浆中除少量的线粒体外,细胞器稀少,胞浆中少见颗粒分布(图版-2)。半颗粒细胞多呈椭圆形或圆形,胞体比透明细胞大,其长径约为( $11.17 \pm 0.40$ )  $\mu\text{m}$ ,瑞氏染色下其颗粒为淡蓝色较为清晰,核深蓝色呈椭圆形或者圆形,也有呈马蹄形(图版-1a),透射电镜下,其胞质中颗粒密度较低(图版-3)。颗粒细胞多呈椭圆形或圆形(图版-1b),少量呈梭形,核仁多为椭圆,少量的呈现马蹄形,光镜下3种血细胞中以颗粒细胞中的胞质中淡蓝色颗粒最为清晰丰富,透射电镜观察下,其胞核多呈椭圆形,胞浆中有线粒体,囊泡和大量电子密度较高的颗粒(图版-1,4)。颗粒细胞是3种类型细胞中,胞体最大的细胞,其胞体长径约是半颗粒细胞的1.2倍,约为( $13.10 \pm 0.47$ )  $\mu\text{m}$ ,而核质比仅约为半颗粒细胞的90%,约为( $0.54 \pm 0.01$ )  $\mu\text{m}$ 。

表1 不同类型血细胞细胞核、细胞大小和核质比

Tab. 1 The size of nucleus and cells, nucleus/cytoplasm (N/C) ratio with different types

细胞类型 haemocytes types	细胞核长径( $\mu\text{m}$ ) the long diameter of cell nucleus	细胞核短径( $\mu\text{m}$ ) the short diameter of cell nucleus	细胞长径( $\mu\text{m}$ ) the major diameter of haemocytes	细胞短径( $\mu\text{m}$ ) the minor diameter of haemocytes	核质比 (N/C)
透明细胞 hyaline cells	$7.15 \pm 0.25^a$	$4.90 \pm 0.18^a$	$10.2 \pm 0.39^a$	$6.82 \pm 0.20^a$	$0.70 \pm 0.01^a$
半颗粒细胞 semigranular cells	$6.72 \pm 0.28^{ab}$	$5.14 \pm 0.19^a$	$11.17 \pm 0.40^a$	$7.40 \pm 0.26^a$	$0.60 \pm 0.01^{ab}$
颗粒细胞 granular cells	$7.01 \pm 0.21^a$	$5.05 \pm 0.21^a$	$13.10 \pm 0.47^{ab}$	$7.17 \pm 0.28^a$	$0.54 \pm 0.01^{ab}$

注:同一列数据右上角的不同字母代表组间差异显著( $P < 0.05$ )

Notes: Within the same column different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

### 2.2 不同发育阶段日本新糠虾免疫活性酶变化

对不同发育阶段(发育0、10、20和30d)日本新糠虾磷酸酶(ACP和AKP)、溶菌酶和酚氧化酶的水平进行分析后发现:3种酶的活性均有

随其个体发育的逐渐成熟而逐渐降低的趋势。这种趋势以磷酸酶(ACP和AKP)的变化最为明显。ACP和AKP分别由0d的( $0.4197 \pm 0.0043$ ) U/mg蛋白和( $0.3559 \pm 0.0386$ ) U/mg

蛋白降至 30 d 的 $(0.1274 \pm 0.0070)$  U/mg 蛋白和 $(0.0614 \pm 0.0049)$  U/mg 蛋白,分别下降了 69.64% 和 82.75%,两组间有极显著差异( $P < 0.01$ )。10 d 时 ACP 和 AKP 的下降最为显著分别下降了 0 d 的 49.42% 和 55.35%,它们的水平分别约为 $(0.2123 \pm 0.0140)$  U/mg 蛋白和 $(0.1589 \pm 0.0119)$  U/mg 蛋白;溶菌酶水平在 10 d 时有显著升高,从 0 d 的 $(324.66 \pm 19.50)$  U/mg 蛋白升至 10 d 的 $(442.62 \pm 16.18)$  U/mg 蛋白,此后下降至 $(219.26 \pm 32.43)$  U/mg 蛋白并维持至性成熟;0 d 时酚氧化酶的活力为 $(0.2228 \pm 0.0025)$  U/mg 蛋白,此活力一直维持至 20 d,从 20 d 至 30 d 时才有显著下降,至 30 d 时酚氧化水平约为 $(0.1316 \pm 0.0119)$  U/mg 蛋白( $P < 0.05$ )。

不同发育阶段日本新糠虾磷酸酶(ACP 和 AKP)、溶菌酶和酚氧化酶的含量有明显差异。其中各阶段均以溶菌酶含量为最高,平均约为 305.20 U/mg 蛋白,其次是 ACP 和酚氧化酶,平均分别约为 0.2365 U/mg 蛋白和 0.2086 U/mg 蛋白,含量最低的是 AKP,各阶段平均仅约为 0.1649 U/mg 蛋白。但成熟阶段的日本新糠虾酸性磷酸酶(ACP)含量与酚氧化酶的含量基本接近为 0.1295 U/mg 蛋白(图 2)。

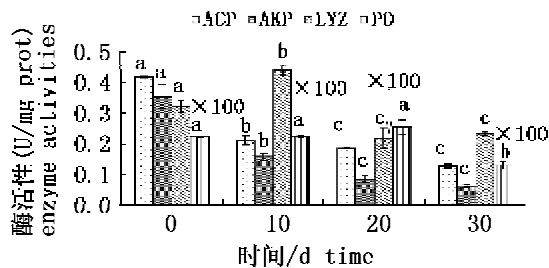


图 2 不同天数糠虾全组织中磷酸酶(ACP 和 AKP)、溶菌酶(LYZ)和酚氧化酶(PO)含量的变化  
同一列数据右上角的不同字母代表组间差异显著( $P < 0.05$ )

Fig 2 The enzyme activities of ACP, AKP, LYZ and PO of the different days

Different labels with the same group were significantly different from each other( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

#### 3.1 血细胞的分类、组成和形态

目前有关甲壳动物血细胞的分型,多采用光镜和电镜进行观察,以血细胞所含颗粒与否,颗粒多少、核质比和血细胞着色特性等将其分型的方法<sup>[10,26]</sup>。本研究也是通过这样的方法对日本新

糠虾血细胞加以分型的,本研究发现日本新糠虾血细胞主要有 3 种类型,分别为透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞。虽然不同学者对不同甲壳动物血细胞分类有所差异,如 Cornick<sup>[11]</sup>将螯龙虾(*Homarus americanus*)的血细胞分为 4 类:前透明细胞、透明细胞、嗜伊红颗粒细胞和嫌色细胞;Vogan 等<sup>[12]</sup>将食用黄道蟹(*Cancer pagurus*)的血细胞分为 4 类:透明细胞(hyaline, H)、嗜酸性颗粒细胞(eosinophilic granular, EG)、嗜碱性颗粒细胞(basophilic granular, BG)和嗜双性颗粒细胞(basophilic and eosinophilic granular, BEG)。但将甲壳动物血细胞分为透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞已被普遍接受<sup>[10,24-25]</sup>。

实验还发现日本新糠虾血细胞比例以颗粒细胞最多,其次是半颗粒细胞,而透明细胞最少,这与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)<sup>[28]</sup>、黑斑口虾蛄(*Oratosquilla kempfi*)<sup>[29]</sup>和日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)<sup>[13]</sup>3 种比例相似,而克氏原螯虾(*Procam barusclarkii*)和中国对虾(*Penaeus chinensis*)<sup>[26]</sup>3 种类型细胞中(无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞)却以小颗粒细胞比例最多。而在多种甲壳动物血细胞比例的研究中如斑节对虾(*Penaeus monodon*)<sup>[30]</sup>、南美蓝对虾(*Penaeus stylirostris*)<sup>[22]</sup>常以透明细胞的比例最多,其次是半颗粒细胞,最少的为颗粒细胞。这说明血细胞比例在甲壳动物中具有种属特异性。

不同甲壳动物 3 种血细胞大小有所不同,本研究发现成年日本糠虾血细胞大小(细胞长径×细胞短径),透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞依次增加,且各型血细胞大小均明显小于日本沼虾透明细胞 $(11.3 \pm 1.6) \mu\text{m} \times (9.8 \pm 1.7) \mu\text{m}$ ,半颗粒细胞 $(14.7 \pm 2.3) \mu\text{m} \times (10.9 \pm 2.6) \mu\text{m}$ ,颗粒细胞 $(17.6 \pm 3.7) \mu\text{m} \times (12.6 \pm 2.5) \mu\text{m}$ <sup>[13]</sup>。虽然日本新糠虾体长(7~10 mm)明显小于日本沼虾(平均为 5.04 cm),但比日本沼虾体型更大的黑斑口虾蛄(9.47~13.35 cm)3 种血细胞(无颗粒细胞、小颗粒细胞和颗粒细胞)的平均大小分别为 $(10.1 \times 9.0) \mu\text{m}$ 、 $(10.8 \times 10.0) \mu\text{m}$ 和 $(14.5 \times 13.4) \mu\text{m}$ 却与日本新糠虾相似,说明血细胞的大小与甲壳动物体型无关。

#### 3.2 溶菌酶、酚氧化酶和磷酸酶活性与甲壳动物生长发育

溶菌酶、酚氧化酶和磷酸酶是参与甲壳动物

免疫活动的重要分子<sup>[9,17]</sup>,目前对它们的研究多集中于对甲壳动物血淋巴中其含量的研究,其次,多见于外源刺激<sup>[9]</sup>或疾病过程中其活性的改变,而有关它们在动物不同发育阶段含量变化如何报道很少。由于日本糠虾个体规格很小,成年全长也仅为7~10 mm,血淋巴很难收集,因此对这几类免疫活性物质的测定,仅通过全组织匀浆来完成。本研究发现日本新糠虾新孵后全组织溶菌酶水平有明显增高,10 d时达到最高,随后其浓度明显降低,这与马贵华测得的中华绒螯蟹的大眼幼体匀浆上清液中的酶活大于成年血清的结果有一定的相似性,说明日本新糠虾在生长的不同的阶段其体内溶菌酶含量不同,这可能与在不同生长阶段执行非特异性免疫的途径不同<sup>[31]</sup>。我们发现日本新糠虾各阶段全组织中溶菌酶的平均含量很高,这比检测许多甲壳动物血淋巴此酶的含量要高,如克氏原螯虾<sup>[32]</sup>和中华绒螯蟹<sup>[33]</sup>,这可能是由于我们测的样品是全组织,溶菌酶除血浆外还有其它组织来源有关。磷酸酶除了参与免疫活动外,还直接参与蛋白质、脂质等代谢及钙质吸收、骨骼形成、甲壳素分泌等过程。本试验的研究发现,随着时间的延长,ACP与AKP酶活性均呈不同程度的下降趋势,说明随着日本新糠虾不同的生长阶段其磷酸酶活性不同,究其原因可能是因为生长的过程中需要不断的蜕壳,从而需要更多的磷酸基团参与形成ATP来完成,磷酸酶活力出现随个体发育而逐渐降低的趋势。

本研究发现,日本新糠虾酚氧化酶总体水平明显低于溶菌酶和磷酸酶,这可能与其主要存在于血淋巴中有关<sup>[34]</sup>。对日本新糠虾不同发育阶段酚氧化酶活性测定后发现,酚氧化酶活性随着个体的逐渐成熟,而呈下降趋势。这与王雷等<sup>[9]</sup>对口服免疫药物后中国对虾免疫功能研究的两个试验中,其对照组随着时间的推移,PO活力逐渐降低趋势具有一定的相似性。这可能与酚氧化酶除参与免疫活动外,在甲壳动物生长蜕皮过程中,其甲壳的硬化作用有关<sup>[35]</sup>,也有可能是正常生理条件下酚氧化酶酶原的激活机制与入侵物引发的激活不同引起的<sup>[36]</sup>。

#### 参考文献:

[1] Oertzen J A, Wulf D, Brüggmann L. Ecotoxicological effect of two mercury compounds on mysids

*Neomysis integer* and fish *Pomatoschistus microps* [J]. Kieler meresforsch (Sonderh), 1988, 6: 414 - 423.

- [2] McKenny C L, Matthews E. Alterations in the energy metabolism of an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) as indicators of stress from chronic pesticide exposure [J]. Mar Environ Res, 1990, 30: 1 - 19.
- [3] Verslycke T, Fockedeij N, McKenney Jr C L, et al. Mysids crustaceans as potential test organisms for the evaluation of environmental endocrine disruption [J]. Environ Toxicol Chem, 2004, 23 (5): 1219 - 1234.
- [4] 窦亚卿, 成永旭, 唐伯平, 等. Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>对黑褐新糠虾(*Neomysis awatschensis*)的毒性作用[J]. 海洋环境科学, 2008, 27(1): 33 - 36.
- [5] 吴志强, 姜国良, 项鹏. 日本新糠虾消化系统组织学研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2007, 37(5): 781 - 784.
- [6] 窦亚卿. 重金属 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>对糠虾的毒性作用[D]. 上海: 上海水产大学, 2005.
- [7] 王金锋, 杨筱珍, 吴旭干, 等. 水体中组织胺对黑褐新糠虾生长与发育的影响[J]. 海洋渔业, 2008, 30(2): 157 - 162.
- [8] 陈宇锋, 艾春香, 林琼武, 等. 盐度胁迫对锯缘青蟹血清及组织、器官中PO和SOD活性的影响[J]. 台湾海峡, 2007, 26(4): 569 - 575.
- [9] 王雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(1): 34 - 41.
- [10] Martin G G, Graves B L. Fine structure and classification of shrimp hemocytes [J]. Journal of Morphology, 1985, 185: 339 - 348.
- [11] Cornick J W, Stewart J E. Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes: classification, differential counts and associated agglutinin activity [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1978, 31(2): 194 - 203.
- [12] Vogan C L, Rowley A. F. Effects of shell disease syndrome on the haemocytes and humoral defences of the edible crab, *Cancer pagurus* [J]. Aquaculture, 2002, 205 (3 - 4): 237 - 252.
- [13] 王国江, 张亚娟, 王军霞, 等. 白洋淀日本沼虾血细胞的初步研究[J]. 河北渔业, 2007, 8: 17 - 20.
- [14] Hoylaerts M F, Manes T, Milán J L. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes [J]. J Biol Chem, 1997, 272: 22781.
- [15] 陈清西, 张喆, 庄总来, 等. 锯缘青蟹碱性磷酸酶分离纯化及部分理化性质研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(4): 362 - 367.

- [16] 陈竞春,石安静. 贝类免疫生物学研究概况[J]. 水生生物学报,1996,20(1):74-78.
- [17] 刘树青,江晓路,牟海津,等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. 海洋与湖沼,1999,30(3):278-283.
- [18] Darnell J E, Lodish H F, Baltimore D. Molecular Cell Biology[M]. New York and Oxford: Scientific American Books, Inc, 1986:1192.
- [19] Ashida M, Söderhäll K. The prophenoloxidase activating system in crayfish [J]. Comp Biochem Physiol, 1984, 77B: 21-26.
- [20] Fockedey N, Mess J, Vangheluwe M, et al. Temperature and salinity effects on post-marsupial growth of *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2005, 326(1): 27-47.
- [21] 杨丽娜. 日本新糠虾性腺发育的研究[D]. 上海: 上海水产大学, 2007.
- [22] Gilles L E, Marc L E, Dominique A, et al. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus tylosistris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1997, 7: 227-234.
- [23] 周晖, 谢数涛, 骆育敏. 罗氏沼虾和克氏原螯虾血细胞的比较研究[J]. 生态科学, 2004, 23(1): 9-11.
- [24] Hose J E, Martin G G, Nguyen V A, et al. Cytochemical features of shrimp hemocytes [J]. Biol Bull, 1987, 173: 178-187.
- [25] Tsing A, Arcier J M, Brehélin M. Hemocytes of Penaeid and Palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1989, 53: 64-77.
- [26] 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.
- [27] Ashida M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silk worm *Bombyx mori* [J]. Archs Biochem Biophys, 1971, 144: 749-762.
- [28] 陆宏达, 张明辉. 中华绒螯蟹血细胞数及离体后形态学变化[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 454-462.
- [29] 廖永岩, 周友广, 叶富良, 等. 斑节对虾与黑斑口虾蛄血相的比较研究[J]. 中山大学学报, 2000, 39(增刊): 271-277.
- [30] Sung H H, Wu P Y, Song Y L. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte subpopulations of tiger shrimp (*Penaeus monodon*): immunochemical differentiation of three major haemocyte types [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9: 167-179.
- [31] 马贵华, 钟青, 曹义虎, 等. 中华绒螯蟹免疫因子—溶菌酶的初步研究[J]. 淡水渔业, 2006, 36(1): 25-27.
- [32] 谭树华, 何艳, 谢佳, 等. 高浓度  $Zn^{2+}$  对克氏原螯虾几种免疫学相关指标的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2007, 23(4): 67-71.
- [33] 艾春香, 陈立侨, 刘晓玲, 等. 维生素 E 对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 酚氧化酶、抗菌力和溶菌酶活性的影响[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(2): 119-123.
- [34] 李国荣, 张士瑾, 李红岩, 等. 酚氧化酶研究概况 I · 特性、功能、分布和在胚胎发育中的变化[J]. 海洋科学, 2003, 27(4): 4-8.
- [35] Ross S J, Adomako T Y. Diphenoloxidase in the crayfish cuticle. Localization and changes in activity during the moulting cycle [J]. Journal of Insect Physiology, 1967, 13(12): 1803-1811.
- [36] Söderhäll K, Unestam T. Activation of crayfish serum prophenoloxidase in arthropod immunity and the specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins [J]. Can J Microbiol, 1979, 25: 406-414.

**Study on the morphology and classification of haemocytes in adult *Neomysis japonica* and the immune enzyme activities at different developmental stages in *Neomysis japonica***

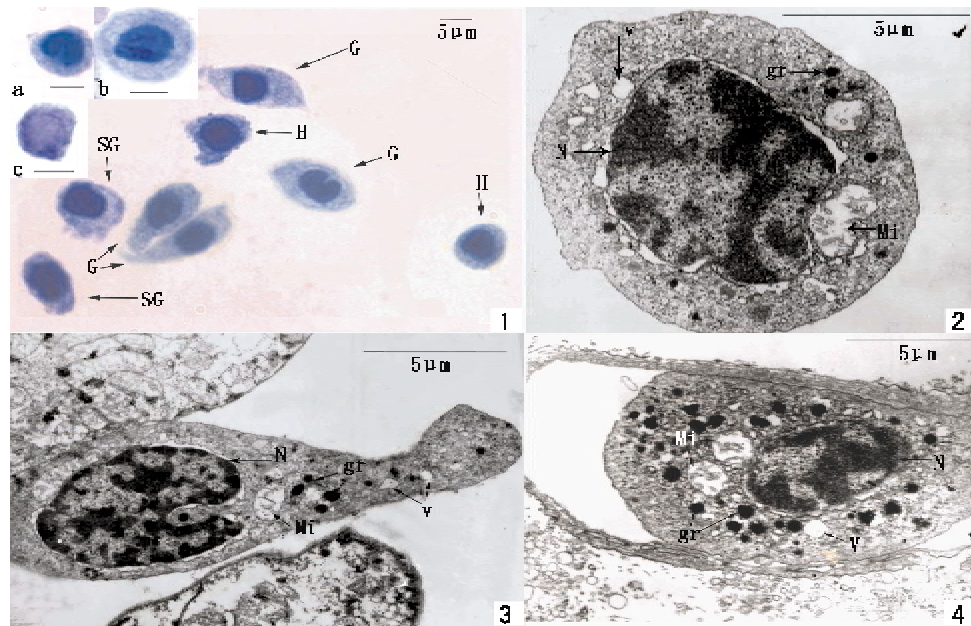
ZHAO Liu-lan, YANG Xiao-zhen, WU Xu-gan, WANG Jin-feng,  
WANG Xiao-yan, CHENG Yong-xu \*

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources,  
Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to classify the haemocytes of adult *Neomysis japonica*, light and electron microscopical studies were carried out. According to the presence or the absence of cytoplasmic granules, nucleus/cytoplasm(N/C) ratio, the number of granules with different sizes and electron-density of their cytoplasmic granules, three types of haemocytes were recognized in adult *Neomysis japonica*: type 1 hyaline cells (no cytoplasmic granule), type 2 semigranular cells (a few cytoplasm granule), type 3 granular cells (abundant granules in cytoplasm). The proportion of the three types were analyzed depending on Wright's smears, and the result indicated that the proportion of haemocytes (47.53%  $\pm$  0.02) was the largest, while that of hyalinocytes (21.24%  $\pm$  0.02) the smallest. The size was increased from type 1 to type 3, however, the N/C rate was decreased. The activities of acid Phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), lysozyme (LYZ), and phenoloxidase (PO) were analyzed by biological and chemistry methods in total body of *Neomysis japonica* on 0 d, 10 d, 20 d, 30 d after being hatched, respectively. The activities of ACP, AKP, LYZ, PO were decreasing with the growth of individuals. The activity of LYZ was 305.20 U/mg Prot on average, the highest in the three enzymes; the second is ACP, at 0.2365 U/mg Prot; The activities of PO and ACP were almost the same at 0.1295 U/mg Prot in adult *N. japonica*. In conclusion, hyaline cells were mainly haemocytes type in adult *N. japonica*. In addition, lysozyme played a significant role in immune process of *N. japonica*. The activities of ACP, AKP, LYZ, PO were decreasing gradually with the individual development.

**Key words:** *Neomysis japonica*; haemocytes; morphology; classification; phosphatase; lysozyme (LYZ); phenoloxidase (PO)

**Corresponding author:** CHENG Yong-xu. E-mail: xycheng@shou.edu.cn



### 图版 成年日本新糠虾的血细胞

1. Wright 氏染色的光镜下观察的马蹄核颗粒细胞,带尾的颗粒细胞,透明细胞和半颗粒细胞(1-a. 马蹄核的半颗粒细胞,1-b. 圆形的颗粒细胞,1-c. 胞浆很少的透明细胞,比例尺:5  $\mu\text{m}$ ); 2. 透射电镜下的透明细胞;3. 透射电镜下的马蹄核的半颗粒细胞;4. 透射电镜下的颗粒细胞(H:透明细胞,SG:半颗粒细胞,G:颗粒细胞,N:细胞核,V:空泡,gr:胞浆颗粒,Mi:线粒体)

### Plate The haemocytes of adult *Neomysis japonica*

1. Light micrograph showing granular cells with a horseshoe nucleus, granular cells with pseudopodia, hyaline cell and semigranular cell stained with wright, stain; (1-a. the semigranular cell with a horseshoe shape nucleus, 1-b. the round granular cell, 1-c. the hyaline cell hardly with cytoplasm, scale: 5  $\mu\text{m}$ ) 2. Transmission electron micrograph showing a hyaline cell; 3. Transmission electron micrograph showing a semigranular cell with a bell shape nucleus; 4. Transmission electron micrograph showing a granular cell (H: hyaline cell, SG: semigranular cell, G: granular cell, N: nucleus, V: vacuoles, gr: granules of cytoplasmic, Mi: mitochondria)