

泥蚶血细胞的形态结构特征及部分免疫功能

朱泽闻¹, 徐立蒲², 吴信忠^{1*}, 张振国², 吴刘记¹, 娄绘芳¹

(1 浙江大学动物科学学院, 浙江 杭州 310029;

2. 北京市水产技术推广总站, 北京 100025)

摘要: 利用光镜、透射电镜、扫描电镜及流式细胞仪技术对泥蚶血细胞形态结构以及吞噬活性进行了研究。根据细胞大小、形态结构、颗粒特点, 光镜下可将血细胞区分为红色颗粒细胞(占89.67%)、嗜碱性颗粒细胞(占7.05%)、透明细胞(占3.28%)3种主要类型。健康泥蚶血淋巴中血细胞平均密度为 $(3.29 \pm 0.82) \times 10^6/\text{mL}$ 。透射电镜下观察到颗粒细胞Ⅰ型、颗粒细胞Ⅱ型、无颗粒细胞; 扫描电镜观察下, 细胞表面光滑, 部分细胞表面有小的突起物。用流式细胞仪检测出P1(13.13%)亚群和P2(78.83%)两个细胞亚群以及没有固定形态的细胞(近8%)。利用APIZYM试剂盒对健康泥蚶血细胞及血清中的19种酶进行检测, 在血细胞中检测到11种酶, 在血清中检测到了13种酶, 经酵母聚糖刺激后, 碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、类脂酶、N-乙酰葡萄糖胺酶在血细胞和血清中的水平大幅升高。体外吞噬实验观察显示, 红色颗粒细胞对酵母聚糖具有明显的吞噬能力, 嗜碱性颗粒细胞和透明细胞吞噬作用不显著; 在经嗜水气单胞杆菌刺激后, 嗜碱性颗粒细胞出现大量聚集现象, 透明细胞能吸附颗粒物。吞噬活性研究表明, 温度、盐度对泥蚶血细胞的吞噬活性有显著的影响, 在泥蚶适宜生长温度(13~30℃)区间和最适盐度 $(20.0 \sim 26.2) \times 10^{-12}$ 区间, 血细胞吞噬活性达到最高值。

关键词: 泥蚶; 血细胞; 显微结构; 酶活性; 吞噬活性; 颗粒细胞; 透明细胞

中图分类号: Q 178.1; S 917.4

文献标志码: A

泥蚶(*Tegillarca granosa*), 隶属瓣鳃纲(Lamellibranchia), 蚶目(Arcoida), 蚶科(Arcidae), 泥蚶属(*Tegillarca*), 为我国重要的海产经济贝类。但近年来, 养殖泥蚶病害问题日益突出, 大规模死亡现象频繁发生, 造成较大经济损失。化学药物防治对环境和食品安全存在潜在的危害, 因此, 免疫预防作为一种经济、安全的防治手段成为发展的趋势。

由于贝类没有基于淋巴细胞和抗体的获得性免疫机制, 血细胞和非特异的体液因子构成了贝类抵抗病害感染的主要防线^[1]。血细胞通过参与吞噬、包裹、结节形成、细胞凝块、伤口修复等过程起到免疫防御作用^[2], 同时血细胞内水解酶、过氧化酶、酚氧化酶、凝集素等免疫因子的生物活

性水平影响着贝类免疫防御能力^[3]。因此, 贝类血细胞在免疫防御中发挥着关键作用。目前, 国内外对牡蛎(*Ostrea edulis*)、扇贝(*Chlamys farreri*)、贻贝(*Mytilus edulis*)、硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)、鲍(*Haliotis discus hanai*)等贝类血细胞分类及免疫防御功能进行了较多报道^[1]。但泥蚶免疫研究还处于起步阶段。近年来一些研究揭示了泥蚶血细胞对细菌和酵母的吞噬作用以及血清、凝集素等的抑菌和免疫调节功能^[4-6], 但针对泥蚶血细胞的形态结构特点和免疫功能尚没有系统的研究报道。

本文利用光镜、透射电镜、扫描电镜和流式细胞仪对泥蚶血细胞的形态结构、吞噬活性以及血淋巴中酶活性进行了研究, 了解泥蚶血细胞免疫

收稿日期: 2011-05-25 修回日期: 2011-07-21

资助项目: 国家自然科学基金项目(39970581, 30170741); 浙江省自然科学基金项目(20080123)

通讯作者: 吴信忠, E-mail: wuxz@zju.edu.cn

功能及其防御机制,为泥蚶免疫防治提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物及血淋巴

泥蚶样品购自北京东郊海鲜市场(产地浙江)。采集无伤、健康泥蚶共 300 只,其中 1 龄 30 只(壳长 15~18 mm,体质量 1.9~2.2 g)、2 龄泥蚶 30 只(壳长 20~23 mm,体质量 4.1~5.8 g)、3 龄 240 只(壳长 24~28 mm,体质量 6.2~8.2 g)。选取健康泥蚶,撬开贝壳,蒸馏水冲洗后用滤纸吸干,割开闭壳肌,用配 6 号针头的一次性注射器,先吸入 1 mL 抗凝缓冲剂 Alserver 液(20.8 g/L 葡萄糖;8 g/L 柠檬酸钠;3.36 g/L EDTA;22.5 g/L NaCl),再从闭壳肌伤口中吸取等量的血淋巴,立即混合,置入 5 mL 离心管中,4℃下保存备用。

1.2 血细胞活体观察及计数

加 50 μ L 血淋巴至载玻片上,加 10 μ L Giemsa 染色液,加盖玻片,5 min 后观察血细胞形态及动态变化,并在光镜 10×100 倍下随机取 20 个视野,鉴定和计数血细胞类型,计算各类血细胞比例,每种类型随机取 30 个血细胞,用 Image-pro Express 软件测量细胞形态参数。1、2、3 龄各取 5 个泥蚶样品,血淋巴用 Alserver 液稀释 1 倍后,用 Neubauer 氏血球计数板,光镜 10×40 倍下计数,计算每毫升血淋巴中血细胞总数,每样品取 5 次平均数。

1.3 血涂片及 Giemsa 染色观察

取两片洁净载玻片,将 50 μ L 血淋巴滴至载玻片,用另一个载玻片 45°推成均匀血薄膜,晾干后甲醇固定 2 min, Giemsa 染液在 38℃下染色 30 min,蒸馏水洗去染液并晾干,中性树脂封片后,显微镜下观察和拍照。

1.4 透射电镜和扫描电镜观察

用 PBS 配制的 2.5% 戊二醛固定血淋巴,750×g 离心 10 min,弃去上层固定液,2.5% 戊二醛溶液 4℃下固定过夜。弃上层固定液, PBS 漂洗 3 次,1% 锇酸溶液固定 2 h,乙醇、丙酮梯度脱水, Epon 812 树脂包埋, Reichert 超薄切片机切片(厚度 70 nm),柠檬酸铅—醋酸双氧铀双重染色, JEM-1230 型透射电镜观察拍照。

用 PBS 配制的 2.5% 戊二醛固定血淋巴,倒

掉固定液, PBS 漂洗 1 h,1% 锇酸溶液固定 2 h,乙醇、醋酸异戊酯梯度脱水处理,临界点干燥,镀膜, Philips XL30 扫描电镜观察拍照。

1.5 流式细胞仪

取 6 个健康泥蚶,每个泥蚶取 1 mL 血淋巴,经 200 目筛绢过滤,用 2% NaCl 调整血细胞浓度为 1×10^6 /mL,上机分析。用 Becton Dickinson FACSORT 流式细胞仪,应用 CellQuest 软件获取和分析实验数据。应用 488 nm 的氩离子气体激光器,前向角散射光(FSC)和侧向角散射光(SSC)为主要测试参数,以 FSC 反映细胞的大小,SSC 反映细胞的颗粒度,以 FSC 设阈值去掉碎片,细胞获取数为 5 000 个,分别以 FSC 和 SSC 为横、纵坐标获取散点图,以门圈出各个细胞亚群,计算各细胞亚群在整个细胞总数中的比例^[7]。

1.6 血细胞吞噬活性

酵母聚糖(Zymosan A, Sigma)和嗜水气单胞杆菌(*Aeromonas hydrophila*)用于血细胞吞噬实验。按 BACHÈRE 等^[8]的方法配制酵母聚糖的悬浮液。酵母聚糖(40 mg/10 mL)悬浮于用蒸馏水和氯化钠调制的无菌海水中,煮沸 30 min,后洗两次再悬于无菌海水中。取 100 μ L 酵母聚糖悬浮液和 100 μ L 血淋巴在 28℃下培育 60 min 后,取 50 μ L 混合液于载玻片上,盖上盖玻片后,在光镜 10×100 倍下观察并计算吞噬率(随机 20 个视野,计算比例)。嗜水气单胞杆菌来自北京市水产技术推广总站检疫实验室,活化后用生理盐水配成 10^8 /mL 浓度的菌悬液。取 100 μ L 血淋巴悬液与 40 μ L 嗜水气单胞杆菌悬液混合均匀,28℃下培育 30 min 后,取 50 μ L 混合液于载玻片上,盖上盖玻片后,在光镜 10×100 倍下观察血细胞吞噬作用。

盐度对吞噬率的影响 蒸馏水和氯化钠配制 10×10^{-12} 、 18×10^{-12} 、 24×10^{-12} 、 30×10^{-12} 等 4 个盐度梯度的无菌海水,分别与酵母聚糖制成酵母聚糖悬浮液。取健康泥蚶血淋巴对酵母聚糖 28℃下分别在上述 4 种盐度条件下进行吞噬实验,每组设 3 个重复,方法如上,分别计算各实验组的吞噬率。

温度对吞噬率的影响 健康泥蚶血细胞与酵母聚糖悬浮液(24×10^{-12} 无菌海水配制)混合,分别在 10、19、28、37℃条件下进行吞噬实验,每组设 3 个重复,方法如上,分别计算各实验组的吞

噬率。

1.7 血淋巴中酶的测定

用半定量酶谱试剂盒 APIZYM (Bio-Merieux)检测泥蚶血细胞及血浆中 19 种酶。将 Alserver 液稀释的未经抗原刺激的血淋巴离心分离(3 000 r/min,10 min),分别收集血清和血细胞用于酶谱分析。血细胞重悬于 1.4 mL 灭菌蒸馏水中,然后取 65 μL 血细胞悬液分别加入试剂条中的每个孔内,在 37 ℃作用 4 h 后,加入显色液。反应强度(即酶含量)根据试剂盒提供的色谱标准确定。取吞噬活性实验中,经酵母聚糖刺激的血淋巴,分别收集血清和血细胞用于酶活性测定分析,方法同上。

1.8 数据统计

不同组间的血细胞大小、浓度、吞噬率的数据统计及差异显著性检验(ANOVA)用 SPSS 软件,显著性检验水平为 $P < 0.05$ 。所有数据以平均值 ± 标准差表示。

2 结果

2.1 血细胞光镜观察及计数

血细胞活体染色及 Giemsa 染色观察,发现有 3 种类型细胞。

红色颗粒细胞(图版 I -1,2,9) 细胞呈圆

形或椭圆形,细胞直径 7 ~ 14 μm;细胞质颜色较深,呈暗红色;细胞核为单核,呈圆形或椭圆形,位置居中。在 Giemsa 染色的血涂片下,细胞核清晰,呈蓝紫色;细胞质内有大量深蓝色嗜碱性颗粒以及少量粉红色嗜酸性颗粒和折光性颗粒。

嗜碱性颗粒细胞(图版 I -3,4,10) 细胞呈圆形,细胞直径约 6 ~ 10 μm;细胞质色浅,呈灰白色,有大量极易被 Giemsa 染成蓝紫色的嗜碱性颗粒;细胞核为单核,呈圆形,位置居中。

透明细胞(图版 I -5 ~ 8,11) 细胞呈圆形,细胞直径约 3 ~ 15 μm,大小差别较大;细胞质透明,没有或极少有颗粒;细胞核为单核,呈圆形,通常位于细胞一侧。

在 Giemsa 染色血涂片上,观察到红色颗粒细胞以及片状伪足结构,没有发现其他类型细胞(图版 I -9,18)。

血细胞计数结果表明,1 龄、2 龄、3 龄泥蚶血细胞浓度分别为 $(3.18 \pm 0.92) \times 10^6/\text{mL}$ 、 $(3.26 \pm 0.92) \times 10^6/\text{mL}$ 、 $(3.44 \pm 0.79) \times 10^6/\text{mL}$ 。经检验,1 到 3 龄泥蚶之间血细胞浓度无显著的差异。泥蚶血细胞平均浓度为 $(3.29 \pm 0.82) \times 10^6/\text{mL}$ 。其中,红色颗粒细胞占 89.67%、嗜碱性颗粒细胞占 7.05%、透明细胞 3.28%。不同类型的血细胞形态参数、百分比以及主要特点见表 1。

表 1 泥蚶不同类型血细胞大小、血细核大小、百分比及主要特征
Tab.1 Cell sizes, nucleolus size, percentage and main characteristic of haemocytes in *T. granosa*

血细胞类型 haemocyte type	细胞直径/μm cell diameter	细胞核直径/μm nuclear diameter	百分比/% percentage	主要特征 main characteristic
红色颗粒细胞 red granulocyte	10.29 ± 1.85	2.58 ± 0.51	89.67	具颗粒,色红,数量最多
嗜碱性颗粒细胞 basophil granulocyte	8.08 ± 2.05	2.51 ± 0.55	7.05	具颗粒,色浅,易着色
透明细胞 hyalinocyte	8.14 ± 3.20	1.50 ± 0.06	3.28	无颗粒,透明,大小变化大

2.2 超微结构观察

透射电镜观察,可区分出 3 种类型细胞。

颗粒细胞 I 型(图版 II -1,2) 细胞呈圆形或椭圆形,大小 10 ~ 12 μm;细胞质含有较多颗粒物(0.4 ~ 0.7 μm),根据电子密度的差异,可分为高电子密度颗粒、中等电子密度颗粒和低电子密度颗粒 3 种,许多高电子密度颗粒周围有中等电子密度的包膜,观察到类似外源物质水解后形成的残体结构,细胞边缘有许多透明空泡;细胞核形态多变,有时圆形,有时为蚕豆型,位置居中,大小约 3 ~ 5 μm。

颗粒细胞 II 型(图版 II -3) 细胞呈圆

形,大小 8 ~ 10 μm;细胞质相对稀薄,细胞质中存在或多或少颗粒物,颗粒大小 0.3 ~ 0.5 μm,只含有低电子密度颗粒,细胞边缘有透明空泡;细胞核圆形或蚕豆型,位置居一边,大小约 2 ~ 4 μm。

无颗粒细胞(图版 II -4) 呈圆形,细胞质很少观察到细胞器,无颗粒或极少颗粒存在。细胞核一般呈圆形,居一侧。

扫描电镜观察结果表明,血细胞呈圆形或椭圆形,血细胞大小相近,直径 8 ~ 12 μm,无伪足。细胞表面光滑,但部分细胞表面有小的突起物(图版 II -5,6)。

2.3 流式细胞仪

图 1 为 FSC 和 SSC 双参数点图。从图谱中可以看到泥蚶血细胞主要聚集形成 P1 和 P2 两个细胞亚群。P1 亚群和 P2 亚群的 SSC 值较高,P1 亚群只略低 P2 亚群,表明都有较高的颗粒度。P1 亚群 FSC 值较 P2 亚群小许多,表明 P1 亚群细胞个体小于 P2 亚群。从检测的 6 个样品看,P1 亚群细胞的比率为 $13.13\% \pm 4.30\%$,而 P2 亚群细胞 $78.83\% \pm 7.07\%$ 。P1 亚群和 P2 亚群细胞占检测血细胞总量的 91.46% ,还有近 8% 的血细胞分散在 P1 和 P2 两个亚群外。

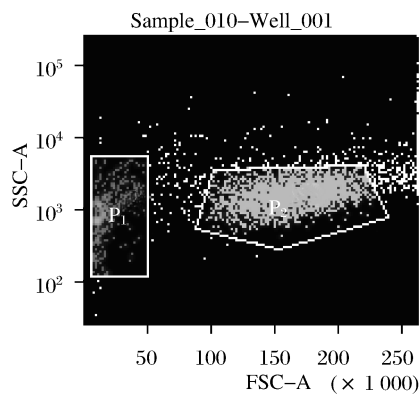


图 1 泥蚶血细胞 FSC 和 SSC 双参数散点图
Fig.1 The dot plots of FSC & SSC on haemocytes of *T. granosa*

2.4 血细胞的吞噬活性

在对酵母聚糖的吞噬实验中,显微镜下观察到红色颗粒细胞在体外对酵母聚糖明显的吞噬作用,图 2 显示了红色颗粒细胞对酵母聚糖吞噬步骤为:酵母聚糖粘附在血细胞膜外,血细胞膜在酵母聚糖附着处形成凹陷,内陷逐渐加深,将酵母聚糖摄入细胞内,被吞噬的酵母聚糖变成蓝色。嗜碱性颗粒细胞和透明细胞吞噬作用不显著,但观察到嗜碱性颗粒细胞吸附酵母聚糖(图 2-4)。在对嗜水气单胞杆菌吞噬实验中,在光镜下难以鉴别泥蚶血细胞的吞噬作用,但观察到嗜碱性颗粒细胞出现了显著聚集及相互粘附现象(图版 I-13,14),以及透明细胞对颗粒物的粘附现象(图版 I-12)。另外,活体观察中还发现了泥蚶血细胞对大颗粒异物吸附现象(图版 I-17),但吸附的血细胞种类有待进一步研究。

在经嗜水气单胞杆菌或酵母聚糖刺激后,还观察到柱形细胞(图版 I-7)和血栓细胞(图版 I-

8)两种特殊形态的细胞。柱形细胞呈长方形,胞体大小与嗜碱性颗粒细胞相近,细胞质色浅,存在大量易被 Giemsa 染液染成蓝紫色的嗜碱性大颗粒或液泡(图版 I-16)。血栓细胞呈球形,胞体较小,胞质中具有许多颗粒,具有变形能力(图版 I-15)。两种细胞数量极少,所占比例低于 1%。另外,还观察到一些血细胞的特殊形态。在经酵母聚糖刺激后红色颗粒细胞出现丝状伪足结构(图版 I-19),在经嗜水气单胞杆菌刺激后出现红色颗粒细胞的脱颗粒作用(图版 I-20)。

泥蚶血细胞对酵母聚糖在不同温度和盐度的条件下的吞噬结果表明,温度 10、19、28、37 ℃ 时,吞噬率分别为 $38.56\% \pm 4.45\%$ 、 $62.03\% \pm 6.16\%$ 、 $67.91\% \pm 3.19\%$ 、 $38.38 \pm 4.68\%$,统计检验表明不同温度下吞噬率存在显著差异($P < 0.05$)。盐度 16×10^{-12} 、 24×10^{-12} 、 32×10^{-12} 时,吞噬率分别为 $51.92\% \pm 3.66\%$ 、 $67.91\% \pm 3.19\%$ 、 $44.74\% \pm 4.68\%$,统计检验表明,不同盐度下吞噬率存在显著差异($P < 0.05$)。

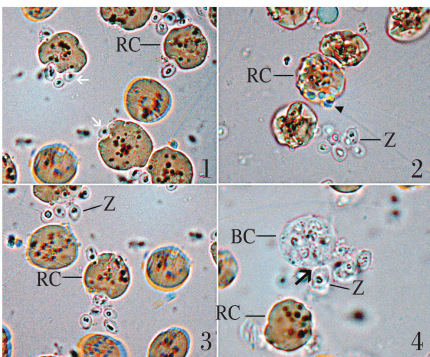


图 2 泥蚶细胞的吞噬和吸附作用

RC 示红色颗粒细胞,BC 嗜碱性颗粒细胞,Z 示酵母聚糖,白箭头示红色颗粒细胞内吞酵母聚糖,黑箭头示嗜碱性颗粒细胞吸附酵母聚糖,三角箭头示被吞噬酵母聚糖变成蓝色。

Fig.2 Phagocytosis and adsorption of haemocytes of *T. granosa*

RC shows red granulocyte; BC shows basophil granulocyte; Z shows zymosan A; white arrow shows red granulocyte endocytose zymosan A; Black arrow shows basophil granulocyte absorb zymosan A; arrowhead shows endocytosed zymosan A.

2.5 血淋巴酶的测定

在未经酵母聚糖刺激的血淋巴中,血细胞检出 11 种酶,血清检出 13 种酶,其中胱氨酸芳胺酶(CAA)和 N-乙酰葡萄糖胺酶(AGLA)只在血清中被检测出;亮氨酸芳胺酶、缬氨酸芳胺酶、 β -半

乳糖苷酶、 β -糖醛酸苷酶在血细胞和血清中保持水平较高,为主要功能性酶类。除 α -葡萄糖苷酶外,其他 10 种酶在血细胞中酶水平总体上低于血清中的酶水平。在经酵母聚糖刺激的血淋巴中,血细胞中检测到 11 种酶,血清中也检测到了 11 种酶。碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、类脂酶、N-乙酰葡萄糖胺酶在血细胞水平大幅升高,类脂酶(C8)在血清中水平也较大提高。缬氨酸芳胺酶、胱氨酸芳胺酶、 β -果糖酶在血清中的水平明显下降。

表 2 泥蚶血细胞及血清中的酶的检测结果
Tab.2 Results of the records in APIZYM tests corresponding to enzyme levels in haemocyte and serum of *T. granosa* haemolymph

测定的酶 enzymes	未经刺激的血淋巴 normal haemolymph		经酵母聚糖刺激的血淋巴 haemolymph stimulated by Zymosan	
	血细胞 cell	血清 serum	血细胞 cell	血清 serum
1 对照 control	0	0	0	0
2 碱性磷酸酶 ALP	1	2	5	3
3 脂酶(C4) EST(C4)	2	3	3	3
4 类脂酶(C8) ELIP(C8)	1	1	5	4
5 类脂(C14) LIP(C14)	0	0	0	0
6 亮氨酸芳胺酶 LAA	4	5	5	5
7 缬氨酸芳胺酶 VAA	4	5	4	3
8 胱氨酸芳胺酶 CAA	0	2	0	0
9 胰肽酶 TR	0	0	0	0
10 胰凝乳肽酶 CTR	0	0	0	0
11 酸性磷酸酶 ACP	1	4	4	5
12 萘酚-AS-BI 磷酸水解酶 PH	1	2	0	3
13 α -半乳糖苷酶 α -GAL	0	0	0	0
14 β -半乳糖苷酶 β -GAL	5	4	5	4
15 β -糖醛酸苷酶 β -GLU	5	5	5	5
16 α -葡萄糖苷酶 α -GLC	5	1	5	0
17 β -葡萄糖苷酶 β -GLC	0	0	0	0
18 N-乙酰葡萄糖胺酶 AGLA	0	3	5	5
19 α -甘露糖酶 α -MAN	0	0	0	0
20 β -果糖酶 β -FUC	3	4	4	2

3 讨论

3.1 泥蚶血细胞分类和数量

对贝类血细胞分类有的按形态分类,有的按内源酶、抗原性和凝集素分类^[9],但至今仍然没有统一的分类方法。本研究结果显示,光镜下根据泥蚶血细胞大小、形态、颗粒度,可区分出红色颗粒细胞、嗜碱性颗粒细胞、透明细胞等 3 种主要类型,分别与透射电镜下观察到的颗粒细胞 I 型、颗粒细胞 II 型、无颗粒细胞在形态和结构特征上基本相对应。Giemsa 染色的血涂片上只观察到红色颗粒细胞,这可能与其它类型细胞粘片能力差、易脱落有关,这与张维翥等^[10]在栉孔扇贝血细胞研究时的情况相似。另外,流式细胞仪检出

P1(13.13%)、P2(78.83%)两个细胞亚群以及分散于两个亚群外的无统一形态的血细胞(近 8%)。P1 和 P2 亚群细胞都具有较高颗粒性(SSC 值较高),其颗粒特点和比例基本上与光镜下嗜碱性细胞(7.05%)、红色颗粒细胞(89.67%)相对应。而 8% 无统一形态的血细胞推测是大小差异较大的透明细胞,以及形态变化了的红色颗粒细胞和嗜碱性颗粒细胞。因此,不同分类方法的研究结果基本一致。本研究将泥蚶血细胞分为红色颗粒细胞、嗜碱性颗粒细胞、透明细胞等 3 种主要类型,与目前较为公认的将贝类血细胞分为颗粒细胞和无颗粒细胞的分类方式相一致^[11]。

双壳贝类中,红细胞仅存在于蚶科贝类的血

淋巴液中^[12]。刘志鸿等^[13]将蚶科毛蚶的血细胞分为红细胞、颗粒细胞、透明细胞、未知小细胞四种类型。许秀芹等^[7]用流式细胞仪检出颗粒细胞(90.87%)和透明细胞(7.27%)两个细胞类型,并且颗粒细胞呈红色。这些毛蚶研究结果表明,毛蚶血细胞在分类组成上与泥蚶十分相似。从形态上看,虽然毛蚶红细胞(18.04 ± 0.97) μm ^[13]比泥蚶的红色颗粒细胞(10.29 ± 1.85) μm 大许多,但结构相似,都含有血红蛋白。因此,可以推测泥蚶和毛蚶的血细胞在系统发生上存在同源性。

血细胞数量是重要的生理指标,而种类、年龄、生态状态、环境胁迫等都会对贝类血细胞数量产生影响^[14]。本研究测得泥蚶血细胞密度为 $(3.29 \pm 0.82) \times 10^6/\text{mL}$,不同龄期泥蚶血细胞密度不存在显著差异。与已报道池螺贝(*Hyriopsis schlegeli*)(1.68 ± 0.78) $\times 10^6/\text{mL}$ ^[15]、杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)(1.52 ± 0.5) $\times 10^6/\text{mL}$ ^[16]等差异不大,但与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(3.03 ± 0.11) $\times 10^7/\text{mL}$ ^[10]、牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)(2.06 ± 0.20) $\times 10^7/\text{mL}$ ^[17]等相比差异较大,这可能与不同种类血细胞的功能差别有关。

3.2 泥蚶血细胞免疫功能

贝类血细胞具有吞噬、包裹、伤口修复、炎症反应、参与神经免疫反应等多种功能,不同类型细胞在免疫防御反应中发挥不同作用^[18]。

本研究表明,红色颗粒细胞具有较强吞噬能力,而嗜碱性颗粒细胞、透明细胞吞噬活性不显著。这与吞噬作用主要由颗粒细胞完成的报道相一致^[19]。但刘志鸿等^[13]在毛蚶血淋巴中观察到透明细胞吞噬作用,这可能与刺激抗原的种类和强度有关,有报道认为透明细胞只有在大量抗原入侵、产生强烈刺激时才会表现出参与吞噬作用^[20]。本研究在红色颗粒细胞中观察到许多大小相近的嗜碱性、嗜酸性、折光性颗粒,透射电镜下可区分为高等、中等和低等电子密度3种颗粒。相似的颗粒特点在牡蛎(*Crassostrea virginica*)^[21]和海湾扇贝(*Argopecten irradians*)^[10]有报道。张维焄等^[22]推测高电子密度颗粒是细胞吞噬的异物或消化后残留物,低电子密度颗粒是溶酶体的分泌颗粒,中等电子密度颗粒是次级溶酶体。本研究支持上述观点,并发

现在多数高电子密度颗粒周围有中等电子密度的包膜(图版Ⅱ-1)和类似外源物质水解后形成的残体结构(图版Ⅱ-1),推测是高电子密度颗粒是外源颗粒内化后形成了吞噬小体,而含有水解酶类的胞质颗粒与吞噬小体相融合后,形成了中等电子密度的包膜结构。而光镜下的嗜碱性颗粒可能为细胞吞噬的异物,嗜酸性颗粒可能是溶酶体酶类分泌的酸性水解酶形成的胞质颗粒。本研究还观察到,红色颗粒细胞伸展的片状、丝状伪足结构(图版Ⅰ-18,19)和细胞外质中大量的吞饮小泡(图版Ⅱ-1,2),这些结构与细胞的吞噬作用有密切的联系。

包裹作用是贝类血细胞在清除大颗粒异物时($>10 \mu\text{m}$)的主要方式,通常先是大量细胞聚集于异物,细胞扁平化形成细胞层,然后释放水解酶来分解异物^[23]。陈振英等^[24]报道了栉孔扇贝血细胞对月季花粉的包裹作用。本研究观察到泥蚶血细胞对大颗粒异物吸附现象,但没有观察到细胞的扁平化趋势(图版Ⅰ-17),相关机制有待进一步的研究。

趋化作用是吞噬的重要步骤。SCHMID等^[25]发现了田螺(*Viviparus malleatus*)的粒细胞可以被金黄色葡萄球菌以及细菌胞壁物质N-乙酰葡萄糖胺吸引。本研究也发现类似的趋化行为,如嗜碱性颗粒细胞和透明细胞对酵母聚糖和细菌有较强粘附能力(图版Ⅰ-5,6,图2-4),在细菌刺激下嗜碱性颗粒细胞大量聚集(图版Ⅰ-13),因此推测这与泥蚶血细胞在离体条件下能迅速凝集成团状^[4]机制有密切的关系。

3.3 泥蚶血淋巴的酶活性

水解酶类在贝类血细胞的吞噬、包裹、移植、消化、异物清除等免疫过程中发挥重要协同作用^[26]。本研究在用APIZYM试剂盒在未经抗原刺激的泥蚶血细胞和血清中检测到11种和13种酶。检测结果与用同样方法在贻贝(*Mytilus alloprovincialis*)^[27]、牡蛎(*Ostrea edulis*)^[28]、扇贝(*Chlamys farreri*)^[10]酶种类基本一致,表明泥蚶血淋巴中具有免疫防御所必需的生化酶系。酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、脂酶(C4)、半乳糖苷酶、糖醛酸苷酶、葡萄糖苷酶、N-乙酰葡萄糖胺酶等为重要水解酶^[26,29],在本研究中检出较高的水平。在经酵母聚糖刺激后,碱性磷酸酶、类脂脂酶(C8)、酸性磷酸酶、N-乙酰葡萄糖胺酶等4种功

能性酶类在血细胞中水平大幅升高,在血清中也显著提高,表明血细胞在经抗原刺激后吞噬作用显著增强。本研究还观察到,红色颗粒细胞的脱颗粒作用(图版 I-20),水解酶可能通过脱颗粒的方式从血细胞中释放到血清中^[1],从而解释了血清中水解酶的增加。

3.4 血细胞吞噬活性

血细胞的吞噬活性可受到温度、盐度等多种环境因素的影响^[27]。刘志鸿等^[13]报道了毛蚶血细胞在体外吞噬率与温度在一定范围内呈正相关,但温度超过一定范围对血细胞产生胁迫作用,吞噬率明显下降。在盐度对贝类血细胞吞噬活性的胁迫作用的研究中也发现了类似的现象^[10,30]。本研究中温度、盐度对泥蚶血细胞吞噬率的影响与上述的报道结果基本一致。在泥蚶适宜生长温度 13~30℃和最适盐度 20.0~26.2^[31],血细胞吞噬活性达到最高值,而在低温(<10℃)和高温(>37℃)条件下或在低盐(<16×10⁻¹²)和高盐(>32×10⁻¹²)条件下会使其吞噬活性明显下降。泥蚶病害的流行病学调查研究也表明,高温和高盐是泥蚶大规模死亡的环境诱因,这与本研究的高温和高盐的胁迫作用的研究结果相一致。

参考文献:

- [1] 孙敬锋,吴信忠. 贝类血细胞及其免疫功能研究进展[J]. 水生生物学报,2006,30(5):601-607.
- [2] DYRYNDA E A, PIPE R K, RATCLIFFE N A. Host defence mechanisms in marine invertebrate larvae [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1995, 5(8): 569-580.
- [3] PIPE R K, PORTE C, LIVINGSTONE D R. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1993, 3(3): 221-233.
- [4] 柯佳颖,陈寅山,戴聪杰. 泥蚶血清及血细胞免疫功能研究[J]. 水生态学杂志,2010,3(3):80-84.
- [5] 柯佳颖,陈寅山,戴聪杰. 泥蚶凝集素的抑菌作用和免疫学研究[J]. 海洋科学,2010,34(11):35-40.
- [6] 潘沙芳,李太武,苏秀榕. 泥蚶血细胞耐饥饿及抗菌力特性的研究[J]. 水产科学,2007,26(1):22-25.
- [7] 许秀芹,王宜艳,孙虎山. 流式细胞术比较研究4种双壳贝类血细胞的分群[J]. 海洋湖沼通报,2006(1):46-50.
- [8] BACHÈRE E D, MIALHE H E. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* [J]. Disease Aquatic Organism, 1991, 11: 173-180.
- [9] 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.
- [10] 张维翥,吴信忠,李登峰,等. 栉孔扇贝血液细胞的免疫功能[J]. 动物学报,2005,51(4):669-677.
- [11] CHENG T C. Bivalves invertebrate blood cells [M]. New York: Academic Press, 1981: 233-330.
- [12] CHENEY D C. A summary of invertebrate leucocyte morphology with emphasis on blood elements of the Manila clam, *Tapes semidecussatus* [J]. Biology Bulletin, 1971, 140: 353-368.
- [13] 刘志鸿,张士瑾,杨爱国,等. 毛蚶血细胞的形态观察及吞噬性能研究[J]. 高技术通讯,2003,13(10):94-96.
- [14] THOMPSON R J, BAYNE C J, MOORE M N, et al. Haemolymph volume, changes in the biochemical composition of the blood, and cytological responses of the digestive cells in *Mytilus californianus* Conrad, induced by nutritional, thermal and exposure stress [J]. Journal of Comparative Physiology, 1978, 127: 287-298.
- [15] 郭磊,盛军庆,洪一江,等. 池蝶蚌(贝)血细胞显微观察[J]. 水生生物学报,2008,32(6):839-844.
- [16] 王江勇,郭志勋,冯娟,等. 杂色鲍血细胞免疫特点及免疫功能的研究[J]. 热带海洋学报,2010,29(3):71-76.
- [17] SUN F, WU X Z, ZHANG W Z. Morphological, structural and functional characteristics of the hemocytes of the oyster, *Crassostrea ariakensis* [J]. Journal of Shellfish Research, 2006, 25(1): 55-64.
- [18] 余燕萍,石安静. 血细胞研究进展[J]. 动物学杂志,1998,33(5):40-44.
- [19] MOORE M N, LOWE D M. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1977, 29(1): 18-30.
- [20] 李静,石安静. 圆背角无齿蚌损伤后血细胞的吞噬活性[J]. 水产学报,2000,24(5):399-402.
- [21] FENG S Y, FENG J S, BURKE C N, et al. Light and electron microscopy of the leucocytes of *Crassostrea virginica* (Mollusca: Pelecypoda) [J]. Zeitschrift Für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie, 1971,

120(2):222–245.

[22] 张维翥,吴信忠,汪明. 海湾扇贝血细胞的表面结构及超微结构[J]. 动物学报, 2005, 51(3): 486–494.

[23] LACKIE A M. Invertebrate immunity [J]. Parasitology, 1980, 80:393–412.

[24] 陈振英,王宜艳,孙虎山. 甲硫氨酸脑啡肽对栉孔扇贝血细胞吞噬和包裹化作用的影响[J]. 水产科学, 2005, 24(5):8–10.

[25] SCHMID L S. Chemotaxis of hemocytes from the snail *Viviparus malleatus*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1975, 25(1):125–131.

[26] 刘世良,麦康森. 贝类免疫系统和机理的研究进展[J]. 海洋学报, 2003, 25(2):95–105.

[27] CARBALLAL M J, LÓPEZ C, AZEVEDO C. Enzymes Iinvolved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1997, 70:96–105.

[28] XUE Q G, RENAULT T. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2000, 76(3):155–163.

[29] 马子川,张英锋,郑晓珍,等. N-乙酰葡萄糖胺的性质、制备及用途[J]. 化学教育, 2010, 31(7):3,49.

[30] MARTELLO L B, FRIEDMAN C S, TJEERDEMA R S. Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on phagocytic and chemotactic function in two species of abalone[J]. Aquatic Toxicology, 2000, 49:213–225.

[31] 王如才,王昭萍,张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社, 1993:275–290.

图版 I

1. 光镜下活体的红色颗粒细胞; 2. 在 Giemsa 染色血涂片上观察到红色颗粒细胞; 3. 经 Giemsa 染色液微染后光镜下嗜碱性颗粒细胞; 4. 光镜下未染色的嗜碱性颗粒物质; 5. 活体观察的透明细胞; 6. 经嗜水气单胞杆菌刺激后观察到的透明细胞; 7. 经嗜水气单胞杆菌刺激后观察到柱形细胞; 8. 经酵母聚糖刺激后观察到的血栓细胞; 9. 在 Giemsa 染色血涂片光镜下观察红色颗粒细胞。N 示细胞核, B 示嗜碱性颗粒, A 示嗜酸性颗粒, R 示折光性颗粒; 10. 经 Giemsa 染色液微染后光镜下嗜碱性颗粒细胞。RC 示红色颗粒细胞, BC 嗜碱性颗粒细胞; 11. 活体观察的透明细胞; 12. 经嗜水气单胞杆菌刺激后透明细胞吸附颗粒物。小箭头示吸附在透明细胞上的颗粒物, RC 示红色颗粒细胞, BC 嗜碱性颗粒细胞, HC 示透明细胞; 13. 嗜水气单胞杆菌刺激后嗜碱性大颗粒大量聚集现象; 14. 嗜水气单胞杆菌刺激后嗜碱性颗粒细胞之间的粘附。RC 示红色颗粒细胞, BC 嗜碱性颗粒细胞, HC 示透明细胞。小箭头示嗜碱性颗粒细胞之间的粘附; 15. 酵母聚糖刺激后观察到的血栓细胞。白箭头示血栓细胞, 黑箭头变形的血栓细胞; 16. 经嗜水气单胞杆菌刺激后观察到柱形细胞。三角箭头示液泡, 小箭头示颗粒; 17. 泥蚶血细胞的包裹作用。BG 示大颗粒异物, 小箭头示吸附在颗粒上的血细胞; 18. 在 Giemsa 染色血涂片下观察到的片状伪足。小箭头示片状伪足; 19. 酵母聚糖刺激后红色颗粒细胞出现的丝状伪足。小箭头示丝状伪足; 20. 嗜水气单胞杆菌刺激后红色颗粒细胞的脱颗粒现象。小箭头示脱颗粒。

Plate I

1. Light microscopy of red granulocyte *in vivo*; 2. Light microscopy of red granulocyte observed on Giemsa staining blood smears; 3. Light microscopy of basophil granulocyte slightly stained by Giemsa; 4. Light microscopy of basophil granulocyte without Giemsa staining; 5. Light microscopy of hyalinocyte *in vivo*; 6. Light microscopy of hyalinocyte stimulated by *A. hydrophila*; 7. Light microscopy of cylindrical cells stimulated by *A. hydrophila*; 8. Light microscopy of thrombocyte stimulated by Zymosan A; 9. Light microscopy of red granulocyte observed on Giemsa staining blood smears. N shows nucleus, B shows basophilic granules, A shows eosinophilic granules, R shows refractive granules; 10. Light microscopy of basophil granulocyte slightly stained by Giemsa. RC shows red granulocyte, BC shows basophil granulocyte; 11. Light microscopy of hyalinocyte *in vivo*; 12. granules adsorbed by hyalinocyte after stimulated by *A. hydrophila*. Small arrow shows granules adsorbed by hyalinocyte, RC shows red granulocyte, BC shows basophil granulocyte, HC shows hyalinocyte; 13. Aggregation of basophil granulocytes stimulated by *A. hydrophila*; 14. Adhesion of basophil granulocytes stimulated by *A. hydrophila*. RC shows red granulocyte, BC shows basophil granulocyte, HC shows hyalinocyte, Small arrow shows adhesion of basophil granulocyte; 15. Light microscopy of thrombocyte stimulated by Zymosan. A. small arrow shows thrombocyte, arrowhead shows deformed thrombocyte; 16. Cylindrical cells stimulated by *A. hydrophila*. arrowhead shows vacuole, Small arrow shows granules; 17. Encapsulation of blood clam blood cells. BG shows large foreign granules, Small arrow shows blood cell round large foreign granules; 18. Sheet-like pseudopodium observed on Giemsa staining blood smears. Small arrow shows sheet-like pseudopodium; 19. Filopodia of red granulocyte observed after stimulated by Zymosan A. small arrow shows filopodia; 20. Degranulation of red granulocyte observed after stimulated by *A. hydrophila*. Small arrow shows degranulation.

Morphological, structural characteristics and phagocytic and enzymatic activities of haemocytes in blood clam *Tegillarca granosa*

ZHU Ze-wen¹, XU Li-pu², WU Xin-zhong^{1*}, ZHANG Zhen-guo², WU Liu-ji¹, LOU Hui-fang¹

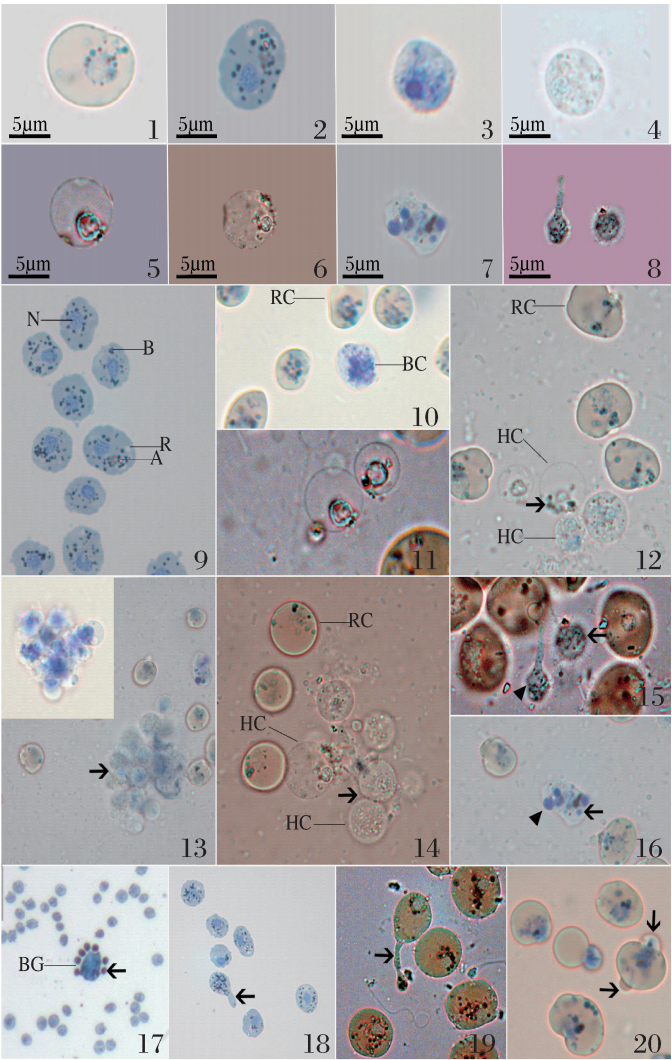
(1. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Fisheries Technical Extension Center of Beijing Municipality, Beijing 100025, China)

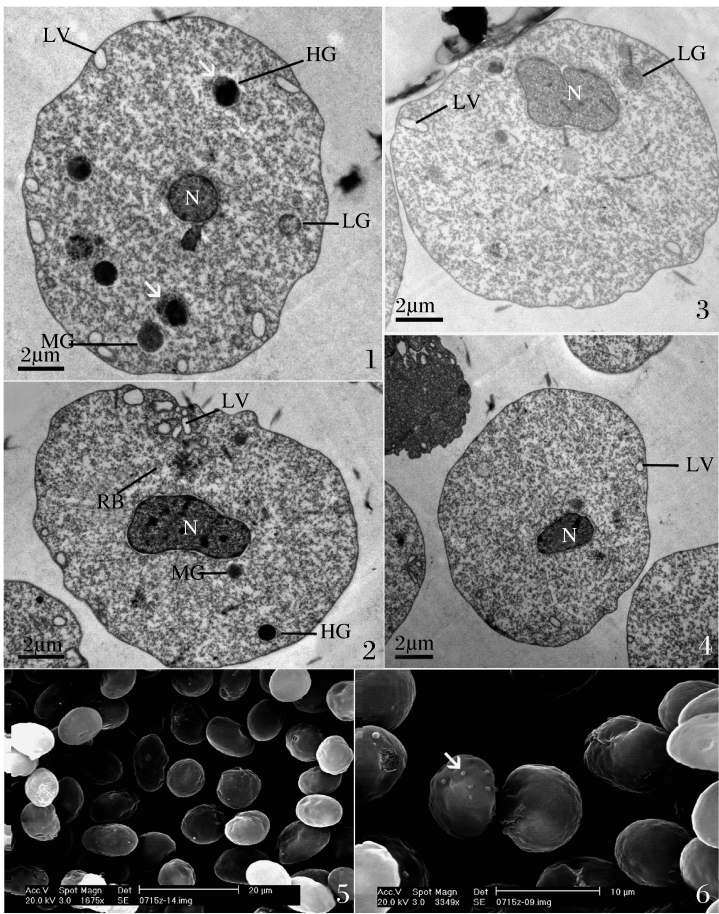
Abstract: Light, electron microscopic and flow cytometer studies were conducted to characterize morphology and structure and phagocytosis of haemocytes in blood clam *Tegillarca granosa*. Based on cell size, and microstructure and granular types of cell, blood clam haemocytes were divided into red granulocyte (89.67%), basophil granulocyte (7.05%) and hyalinocyte (3.28%) respectively under light microscopy. The haemocyte densities in healthy blood clam haemolymph were assessed $(3.29 \pm 0.82) \times 10^6$ cell/mL. Three kinds of haemocytes were respectively recognized by transmission electron microscope: granulocyte type I, granulocyte type II and agranulocyte. It was observed under scanning electron microscopy that haemocytes appear smooth-surface and some of them have knot-like projections in cell surface. APIZYM assays on enzymatic activities of 19 enzymes in haemolymph were performed and, of these, 13 and 10 enzymes were detected respectively in serum and cell. There were marked increases in the levels of ALP, ACP, ELIP (C8) and AGLA in serum and haemocytes after being stimulated by zymosan. Observation of phagocytosis *in vitro* revealed that there was phagocytic response in red granulocyte to zymosan and there was no significant phagocytic response in basophil granulocyte and hyalinocyte. It was observed that basophilic granulocyte accumulation and hyalinocyte adsorption after being stimulated by *Aeromonas hydrophila*. The study of environmental stress factors on phagocytosis activity revealed that the temperature and salinity have significant influence on phagocytosis activity. The phagocytosis percentage of blood clam reached the highest values with optimum growth temperature (13–30 °C) and salinity (20.0–26.2) $\times 10^{-12}$.

Key words: *Tegillarca granosa*; haemocyte; microstructure; enzymatic activity; phagocytosis; granulocyte; hyalinocyte

Corresponding author: WU Xin-zhong. E-mail: wuxz@zju.edu.cn



图版 I 光镜观察的泥蚶血细胞
Plate I Light microscopy of blood cells of the blood clam



图版 II 电镜观察的泥蚶血细胞

1. 透射电镜观察到的颗粒细胞 I 型。HG 示高电子密度颗粒, MG 示中等电子密度颗粒, LG 示低电子密度颗粒等三种类型, N 示细胞核, LV 示透明小泡; 2. 透射电镜观察到的颗粒细胞 I 型。HG 示高电子密度颗粒, MG 示中等电子密度颗粒, LG 示低电子密度颗粒等三种类型, N 示细胞核, LV 示透明小泡; 3. 透射电镜观察到的颗粒细胞 II 型。LG 示低电子密度颗粒等三种类型, N 示细胞核, LV 示透明小泡; 4. 透射电镜观察到的无颗粒细胞。N 示细胞核, LV 示透明小泡; 5. 扫描电镜观察到泥蚶血细胞; 6. 扫描电镜图片示泥蚶血细胞表面的小突起物。小箭头示突起物。

Plate II Electron microscopy of blood cells of the blood clam

1. Transmission electron microscopy of type I granulocyte. HG shows high electron density granules, MG shows medium electron density granules, LG shows low electron density granules, N shows nucleus, LV shows vesicles; 2. Transmission electron microscopy of type I granulocyte. HG shows high electron density granules, MG shows medium electron density granules, LG shows low electron density granules, N shows nucleus, LV shows vesicles; 3. Transmission electron microscopy of type II granulocyte. LG shows low electron density granules, N shows nucleus, LV shows vesicles; 4. Transmission electron microscopy of agranulocyte. N shows nucleus, LV shows vesicles; 5. Scanning electron microscopy of blood cells of the blood clam; 6. Scanning electron microscopy of small protrusion on the blood cell surface. Small arrow shows small protrusion.