

文章编号: 1000-0615(2017)08-1213-10

DOI: 10.11964/jfc.20161210639

中华绒螯蟹的血细胞组成、分类及免疫学功能

洪宇航^{1,2}, 杨筱珍^{1*}, 成永旭¹, 徐敏杰¹,
黄根勇¹, 杨志刚¹, 黄毅²

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心,
农业部淡水水产种质资源重点实验室, 农业部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306;

2. 西昌学院动物科学学院, 四川 西昌 615000)

摘要: 为了解中华绒螯蟹血细胞组成、分类及其在免疫应答过程中起到的重要作用, 本研究通过细胞化学和细胞酶学分析, 并结合细胞形态观察, 对中华绒螯蟹血细胞的组成、分类进行了研究。同时, 通过人工感染嗜水气单胞菌后血液的总血细胞数(THC)和不同类型血细胞数(DHC)的变化, 研究不同类型血细胞在免疫应答过程中所发挥的作用。结果显示, 依据本实验分类方法, 中华绒螯蟹血细胞可以分为4类: 大颗粒细胞(G)、中间型颗粒细胞(IG)、小颗粒细胞(SG)和透明细胞(H)。其中小颗粒细胞数量最多, 约占 $33.54\% \pm 0.98\%$, 中间型颗粒细胞最少, 仅占 $15.31\% \pm 2.01\%$ 。4种类型细胞中均含有多糖成分而不含脂质, 只有大颗粒细胞在酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶以及酚氧化酶染色中发现阳性反应。此外, 嗜水气单胞菌感染后中华绒螯蟹总血细胞数在3 h后明显升高, 在6 h达到峰值, 约 9.57×10^6 个/mL, 并显著高于未处理组和生理组; 在感染过程中, 大颗粒细胞数量明显下降而透明细胞数量明显上升, 这种现象在6 h时达到顶峰并随着时间延长而逐渐恢复至正常水平。研究表明, 在中华绒螯蟹非特异性免疫应答过程中, 透明细胞主要通过大量增殖执行吞噬功能来参与免疫应答, 而大颗粒细胞主要通过裂解释放胞质中所含免疫相关酶参与免疫反应。其中, 各类型细胞之间可能存在相互转化作用, 而中间型颗粒细胞为这种转化中的过渡类型。

关键词: 中华绒螯蟹; 血细胞; 细胞化学分析; 细胞酶学分析; THC; DHC; 嗜水气单胞菌; 免疫功能

中图分类号: S 945.6

文献标志码: A

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国主要的水产甲壳动物养殖品种, 具有极其重要的经济价值。但随着养殖年份的增加, 养殖规模的扩大, 加上部分地区养殖管理的不善, 导致多种疾病的暴发, 对养殖产业造成了巨大的冲击^[1]。因此, 中华绒螯蟹病害防治以及免疫机制成为目前研究的热点。和其他无脊椎动物相比, 由于甲壳动物缺乏真正意义上的后天免疫系统, 所以只能依赖于一个非常有效的非特异性免疫

机制来应对病原物质的入侵。其中, 血细胞为主要参与者, 具有防止血淋巴流失、清除异物颗粒、通过形成血块以防止有机体入侵等作用^[2]。因此, 对于甲壳动物血细胞组成、功能的研究是掌握甲壳动物非特异性免疫机制及抗病药物研发的重要基础。但是截止目前, 关于甲壳动物血细胞的起源尚未明确, 血细胞的分类以及不同类型细胞在免疫应答中的作用尚存争议。例如在美国蓝蟹(*Callinectes sapidus*)体内, 拟变

收稿日期: 2016-12-14 修回日期: 2017-05-10

资助项目: 国家自然科学基金(31272677, 31472287); 水产动物遗传育种中心上海协同创新中心(ZF1206); 上海市科委项目(16DZ2281200)

通信作者: 杨筱珍, E-mail: xzyang@shou.edu.cn

形虫(*Paramoeba pernigosa*)只能被透明细胞吞噬,而革兰氏阴性菌则能被透明细胞和大颗粒细胞吞噬^[3-4]。在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)体内,Gargioni等^[5]发现大颗粒细胞和小颗粒细胞离体时能吞噬酵母而透明细胞则不能。但最近一项关于中华绒螯蟹的研究显示,离体状态下各类型细胞对聚苯乙烯微粒均有吞噬作用,但以透明细胞为主导,占88.7%^[6]。因此,甲壳动物不同类型血细胞数量的变化可以直观反映其在免疫应答中的角色,在关于美洲螯虾(*Homarus americanus*)^[7]、美国蓝蟹^[8]等大部分甲壳动物免疫的研究中,都作为主要指标来衡量其免疫水平的变化。本研究通过细胞化学和细胞酶学方法,对中华绒螯蟹血细胞进行相关组分和免疫相关酶的染色定位,将中华绒螯蟹血细胞进行分类;通过人工感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)并测定中华绒螯蟹血液的总血细胞数(THC)、不同类型血细胞数(DHC)变化,反映病原菌入侵后不同类型血细胞在免疫应答过程中的作用表现,以期为进一步研究其免疫机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及药品

中华绒螯蟹采自上海崇明上海海洋大学产学研基地,体质量约(120±13)g,均为性成熟个体,已完成生殖蜕壳,雌雄不限。实验在上海海洋大学循环水养殖间进行,实验动物放入含30个每个规格为75 cm×45 cm×55 cm塑料水族箱的循环水养殖系统中暂养7 d以上,24 h气泵增氧。保持系统内各水族箱水温为20~22 °C,pH 7.0~7.4,溶解氧>5 mg/L,氨氮<0.5 mg/L,亚硝酸盐<0.15 mg/L。挑选肢体健全,活力良好的健康蟹供实验用。实验中所用萘酚AS-BI-磷酸盐、萘酚AS-BI-β-乙酰氨基葡萄糖苷酶购自美国Sigma-Aldrich公司,其余化学试剂均购自上海国药集团化学试剂有限公司,分析纯。

1.2 血淋巴抽取和血细胞收集

取健康中华绒螯蟹,用浸泡75%酒精的脱脂棉球擦拭体表。用1 mL无菌注射器从第五步足基膜处抽取0.5 mL血淋巴,与等体积抗凝剂(柠

檬酸三钠30 mmol/L、氯化钠338 mmol/L、葡萄糖115 mmol/L、EDTA 10 mmol/L,pH 7.0)混合均匀。收集的血淋巴液4 °C条件下1000 r/min离心5 min,收集沉淀的血细胞,重悬浮于蟹生理盐水(NaCl 496 mmol/L,KCl 10 mmol/L,CaCl₂ 16 mmol/L,NaHCO₃ 6 mmol/L,MgSO₄·6H₂O 12 mmol/L,MgCl₂·6H₂O 8 mmol/L,HEPES 20 mmol/L)中。

1.3 细胞学分析

调整收集的血细胞密度至 5×10^5 个/mL,将60 mL细胞悬液放置于细胞爬片(Corning,美国)上,28 °C孵育30 min,让血细胞贴壁。细胞贴壁后,加入固定剂(含1%蔗糖和1%戊二醛),4 °C下固定30 min。按照下列方法对细胞进行染色。在光学显微镜(Leica,美国)下观察染色后细胞,拍照并计数分析。

Gimesa染色 血细胞在10% Gimesa染液(1 g Gimesa染料加入66 mL甘油,研磨均匀60 °C溶解2 h,然后加入66 mL甲醇混匀作为Gimesa母液储存待用;染色时用PBS稀释10倍作为10% Gimesa染液)中染色5 min,然后蒸馏水清洗。染色后的细胞核呈蓝色,胞质被染成淡蓝色。含嗜酸性颗粒的胞质被异染为橙红色。

迈格吉(MGG)染色 血细胞在May-Grunwald染液(1 g May-Grunwald染料加入100 mL甲醇中充分研磨,37 °C温箱孵育4 h,棕色瓶内室温保存待用;临用前取40 mL上清液,加入20 mL甲醇为May-Grunwald染液)中染色3 min,蒸馏水冲洗后在10% Gimesa染液中染色5 min。嗜碱性颗粒被着染为蓝色,而嗜酸性颗粒着染为橙红色。

PAS染色 固定后的血细胞经1%过碘酸作用10 min,蒸馏水冲洗。然后在暗处使用Schiff's试剂(1 g碱性品红溶于200 mL,过滤后加入1 mol/L HCl 20 mL和偏重亚硫酸钠1 g,放置暗处24 h后过滤,装入棕色瓶中4 °C保存待用)作用30 min,分色液(0.6%偏重亚硫酸钠溶于0.02 mol/L HCl) 2 min/次,作用3次。最后用蒸馏水清洗。细胞中多糖成分被着染为粉红色。

中性红染色 血细胞在中性红染液(商品染液购自建成生物工程研究所,南京)中作用5 min,蒸馏水清洗。酸性成分被着染为红色。

苏丹黑染色 细胞贴壁后,将爬片立刻浸入70%酒精30 s,苏丹黑饱和溶液(0.15 g苏丹黑溶于100 mL 70%酒精) 70 °C下染色15 min。

70%酒精洗涤后再用蒸馏水清洗。黑斑表示脂类物质的存在。

1.4 细胞酶学分析

酸性磷酸酶染色 固定后的血细胞用0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液(SAB, pH 5.2)清洗。在混合液[10 mg 萘酚AS-BI-磷酸盐溶于250 μ L 二甲基甲酰胺(DMF); 400 μ L 溶液A (0.4 g 新碱性品红, 2 mL 36% HCl, 8 mL 蒸馏水); 400 μ L 溶液B(4%亚硝酸钠); 20 mL 0.1 mol/L SAB, 将上述4种溶液混合, 为染色混合液]中37 $^{\circ}$ C 孵育2 h。然后SAB洗涤10 min, 阳性反应结果呈红色, 表明细胞内有酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)活性物质。

碱性磷酸酶染色 固定后血细胞在0.1 mol/L Tris-HCl (pH 9.0)中洗涤10 min., 在混合液(10 mg 萘酚AS-BI-磷酸盐溶于400 μ L DMF; 400 μ L 溶液A; 400 μ L 溶液B; 20 mL Tris-HCl)中37 $^{\circ}$ C 孵育2 h。阳性反应呈红色, 表明细胞内有碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活性物质。

β -葡萄糖醛酸酶染色 固定后的血细胞同ACP染色方法在混合液中孵育2 h, SAB洗涤10 min。此混合液将底物由10 mg 萘酚AS-BI-磷酸盐换为4 mg 萘酚AS-BI- β 乙酰氨基葡萄糖苷酶。阳性反应呈红色, 表明细胞内有 β -葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase)活性物质。

酚氧化酶染色 固定后的血细胞用PBS清洗10 min。37 $^{\circ}$ C下, 在含有5 mg/mL L-DOPA的0.1 mol/L PBS溶液中孵育2 h。设置2个对照组: 其中一个将孵育液中加入10 mmol/L 苯基硫脲作为抑制剂, 另一个在不含有L-DOPA的PBS溶液中单独孵育。阳性反应呈棕色, 表明细胞内有酚氧化酶(phenoloxidase, PO)活性物质。

1.5 人工感染嗜水气单胞菌后中华绒螯蟹血细胞数的变化

将实验用中华绒螯蟹随机分为3组, 包含人工感染组、生理组和未处理组, 每组50只, 每5只分别放入一个“实验动物及药品”所述循环水系统水族箱内, 保证每个水族箱内水温及各项水质指标一致。其中, 人工感染组每只从第五步足基膜处注射嗜水气单胞菌液(1×10^9 CFU/mL) 100 μ L^[9], 生理组注射等量蟹生理盐水作为对照。注射后的蟹放回养殖缸中, 间隔1.5、3、6、12和24 h分别取各组血淋巴并收集血细胞。

收集方法同“血淋巴抽取和血细胞收集”, 对不同时段各组血细胞THC、DHC进行计数。

1.6 数据统计与分析

每个实验重复3次, 数据以mean \pm SD表示。每个实验在40倍物镜或油镜下随机至少选取10个视野中共计200个细胞进行计数统计, 细胞微尺测量细胞大小, 以长径(μ m) \times 短径(μ m)表示。采用SPSS 13.0软件对实验数据进行统计分析, 用Levene法进行方差齐性检验, 不满足齐性方差时对百分比数据进行反正弦或者平方根处理, 采用ANOVA对实验结果进行方差分析, 采用Tukey'S法进行多重比较, 取 $P < 0.05$ 为差异显著, 在Graph-Pad Prism 5上绘制相关图表。

2 结果

2.1 细胞学分析

细胞形态观察及分类 通过对中华绒螯蟹血细胞的显微观察, 依据细胞大小和形态差异以及所含颗粒物大小和嗜酸碱性差异, 将中华绒螯蟹血细胞分为4类。

大颗粒细胞(granulocyte, G): 大小为(14.05 \pm 2.60) μ m \times (8.97 \pm 1.40) μ m, 占总血细胞数量的30.05% \pm 1.11%, 多呈圆形或纺锤形, 富含折光性较强的大颗粒物。Gimesa和MGG染色结果显示, 这些颗粒物均为嗜酸性颗粒(图1-a, e)。

中间型颗粒细胞(intermediate granulocyte, IG): 在大颗粒细胞与小颗粒细胞之间通过细胞学染色发现一类中间型颗粒细胞, 在普通光镜下, 中间型颗粒细胞形态介于二者之间, 但不易与大颗粒细胞区分。MGG染色结果显示, 中间型颗粒细胞中同时存在嗜酸性颗粒和嗜碱性颗粒, 但其含有的嗜酸性大颗粒物远远少于大颗粒细胞(图1-b, f)。这一类型细胞大小约为(13.77 \pm 2.13) μ m \times (7.45 \pm 1.83) μ m, 在各类型血细胞中数量最少, 约占15.31% \pm 2.01%。

小颗粒细胞(semigranulocyte, SG): 大小为(13.94 \pm 3.98) μ m \times (7.20 \pm 1.20) μ m, 较其他3种类型细胞相比, 数量最多, 约占33.54% \pm 0.98%, 多呈纺锤形, 含有大量折光性较弱的小颗粒物, 均为嗜碱性颗粒(图1-c, g)。小颗粒细胞具有一定的延展性, 贴壁后可伸出伪足。

透明细胞(hyalinocyte, H): 透明细胞体型在

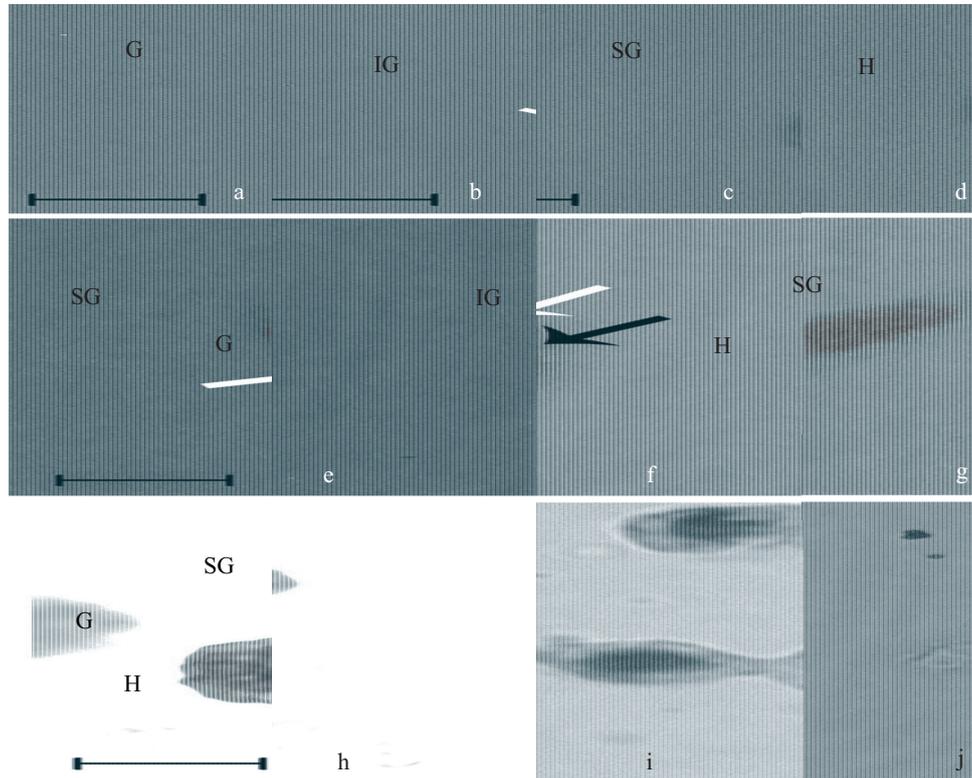


图1 光学显微镜下中华绒螯蟹血细胞形态

a-d. Gimesa染色; a. 大颗粒细胞, b. 中间型颗粒细胞, c. 小颗粒细胞, d. 透明细胞; e-g. MGG染色; h. PAS染色; i. 中性红染色; j. 苏丹黑染色; G. 大颗粒细胞; IG. 中间型颗粒细胞; SG. 小颗粒细胞; H. 透明细胞; 黑色箭头表示折光性较强的嗜酸性大颗粒物质, 白色箭头表示折光性较弱的嗜碱性小颗粒物质; 比例尺=10 μm

Fig. 1 Cellular morphology of hemocytes from *E. sinensis* under light microscope

a-d. Gimesa staining; a. granulocyte, b. intermediate granulocyte, c. semigranulocyte, d. hyalinocyte; e-g. MGG staining; h. PAS staining; i. Neutral Red staining; j. Sudan black staining; G. granulocyte; IG. intermediate granulocyte; SG. semigranulocyte; H. hyalinocyte; black arrows indicate the large refractile granules with eosinophilic materials and white arrow indicate the small granules with basophilic materials; scale bar=10 μm

4类细胞中最小, 大小约为 $(9.49\pm 3.40)\mu\text{m}\times(6.02\pm 0.88)\mu\text{m}$, 数量约占总血细胞数的 $21.11\%\pm 1.61\%$ 。透明细胞中几乎不含任何颗粒物质(图1-d, g), 并且具有较小颗粒细胞更强的延展性。

细胞组成分析 大颗粒细胞、中间型颗粒细胞、小颗粒细胞以及透明细胞均能被PAS染液着色, 表明其均含有多糖成分(图1-h)。中性红染色结果显示, 所有类型细胞均能被着色, 主要显色部位在细胞核, 表明含有大量核酸物质(图1-i)。4种类型细胞均不能被苏丹黑染色, 表明其均不含脂类成分(图1-j)。

2.2 细胞酶学分析

4种类型细胞中, 只有大颗粒细胞在ACP、AKP、 β -葡萄糖醛酸酶以及PO染色中显示阳性反应, 而其余3种细胞均为阴性。大颗粒细胞在ACP染色中显示红色的阳性反应(图2-a), 着色细

胞比例约为70.18%。同样, 大颗粒细胞在AKP、 β -葡萄糖醛酸酶染色中显示红色的阳性反应(图2-b, c), 着色比例分别为66.42%和68.37%。在PO染色中, 能观察到大颗粒细胞呈明显棕色的阳性反应(图2-d), 而添加了苯基硫脲的对照组大颗粒细胞则没有阳性反应(图2-e), 单独在PBS中孵育的空白组同样也没有出现阳性反应(图2-f)。其中, 大颗粒细胞的染色比例约为65.23%。

2.3 人工感染嗜水气单胞菌后THC数量和DHC组成的变化

中华绒螯蟹总血细胞数在正常情况下约为 5.06×10^6 个/mL。在注射1.5 h后, 人工感染组和生理组均有轻微上升。3 h后, 人工感染组显著上升, 并于6 h达到峰值, 约为 9.57×10^6 个/mL。此时人工感染组THC显著高于未处理组和生理组($P<0.05$), 且显著高于其0 h水平($P<0.05$), 而未

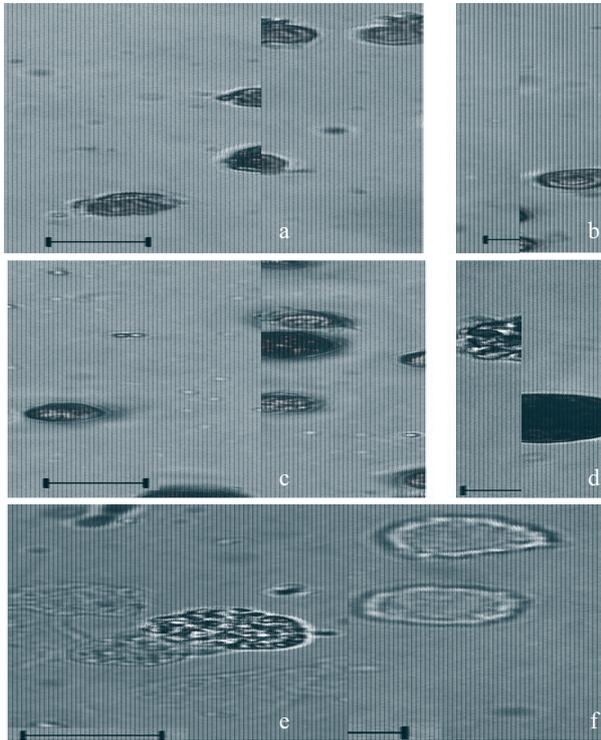


图2 中华绒螯蟹血细胞酶活性定位

a. ACP染色; b. AKP染色; c. β -葡萄糖醛酸酶染色; d. PO染色; e. 添加苯基硫脲作为抑制剂的对照组; f. 单独在PBS中孵育的空白对照组; 比例尺=10 μ m

Fig. 2 Localization of enzymatic activities in *E. sinensis*

a. ACP staining; b. AKP staining; c. β -glucuronidase staining; d. PO staining; e. control incubated with phenylthiourea as inhibitor; f. blank control incubated in PBS alone; scale bar=10 μ m

处理组和生理盐水处理组间并无显著差异($P>0.05$)。此后, 人工感染组和生理组均有所下降, 至24 h后基本趋于正常水平(图3)。

注射后1.5 h开始, 大颗粒细胞数量持续减少。1.5 h时所占血细胞比例约为26.95%, 而3 h后降为约20.59%, 12 h后降至最低, 约13.09%, 至24 h后又有所恢复。在注射后各时间点, 人工感染组大颗粒细胞比例均显著低于未处理组和生理组, 且在3、6和12 h人工感染组大颗粒细胞下降最明显, 显著低于0 h初测值(图4)。

透明细胞数量有显著增加, 从1.5 h的24.62%增至6 h的38.99%, 达到最大值。除0 h外, 人工感染组各时间点透明细胞比例均显著高于其余2组(图5)。与此同时, 生理组和人工感染组小颗粒细胞比例均有所上升, 其中人工感染组更加明显, 在3、6、12和24 h均显著高于0 h初测水平(图6)。此外, 中间型颗粒细胞则有少量减少。

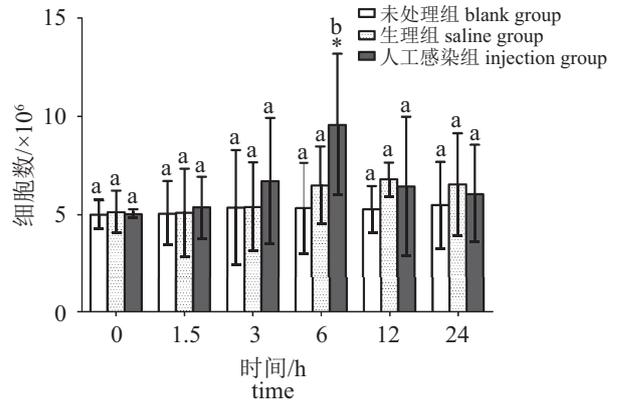


图3 注射嗜水气单胞菌后中华绒螯蟹 THC数量的变化

不同字母表明同一时间点组间差异显著($P<0.05$), 星号表示不同时间点组内差异显著($P<0.05$), 下同

Fig. 3 The changes of THC after injection of

A. hydrophilia

Different letters present the significant difference among different groups at same time ($P<0.05$), * presents the significant difference between initial value and values at each time in same group ($P<0.05$), the same below

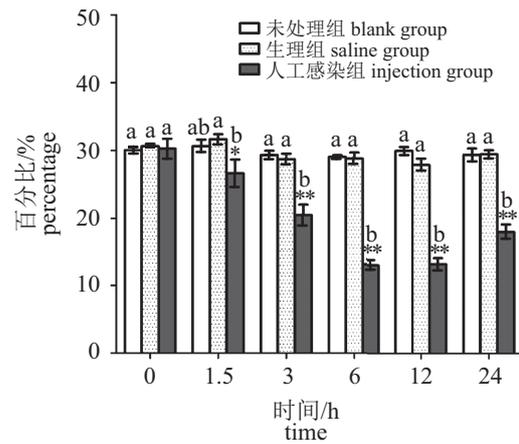


图4 注射嗜水气单胞菌后中华绒螯蟹 大颗粒细胞比例变化

Fig. 4 The proportional changes of granulocytes after injection of *A. hydrophilia*

3 讨论

本研究分析了中华绒螯蟹血细胞形态、组成及其在非特异性免疫应答中的功能和作用。在多数甲壳动物中, 根据其细胞形态和功能, 主要将血细胞分为3类: 透明细胞、小颗粒细胞以及大颗粒细胞。除了表现出不同的形态结构外, 不同类型血细胞在免疫应答中的具体作用

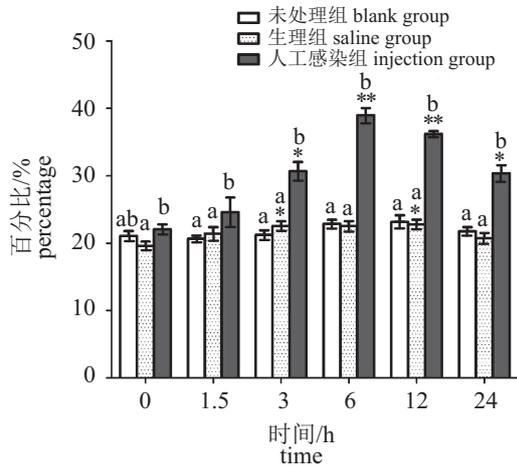


图5 注射嗜水气单胞菌后中华绒螯蟹透明细胞比例变化

Fig. 5 The proportional changes of hyalinocytes after injection of *A. hydrophilia*

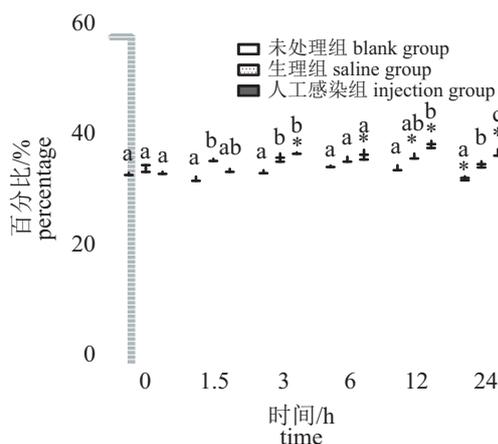


图6 注射嗜水气单胞菌后中华绒螯蟹小颗粒细胞比例变化

Fig. 6 The proportional changes of semigranulocytes after injection of *A. hydrophilia*

也不相同。透明细胞被多数学者认为是血细胞中主要的吞噬细胞；小颗粒细胞被认为主要具有包裹作用；而大颗粒细胞在离体培养时容易自发颗粒脱落，主要参与酚氧化酶原(proPO)系统的激活^[10]。但是，不同学者在甲壳动物血细胞分类的研究中也存在不同的见解。多数学者支持传统的分为三类的观点，但有的学者根据其功能作用或者是结构组成将血细胞分为4类或5类^[11-12]。周晖^[13]在对中华绒螯蟹等12种常见虾蟹类血细胞分类的研究中，认为总体上可以把虾蟹类血细胞分为3类，但不同种类又有一定程度的差异。例如中华绒螯蟹的大颗粒细胞又被分

为2类：大型颗粒细胞及普通大颗粒细胞。其中普通大颗粒细胞细胞质微红，含有很多一般大小的颗粒物质；而大型颗粒细胞含有很多超大颗粒物质。周凯等^[14]在血细胞形态及分类的研究中认为锯缘青蟹(*Scylla serrata*)血细胞可以分为4类：大颗粒细胞、中间型颗粒细胞、小颗粒细胞及无颗粒细胞。本研究根据细胞形态及胞质内颗粒大小、性质以及细胞核质比，也将中华绒螯蟹血细胞分为4类：大颗粒细胞(G)、中间型颗粒细胞(IG)、小颗粒细胞(SG)和透明细胞(H)。这与陆宏达等^[11]关于中华绒螯蟹血细胞的研究结果相似，但该研究中，各类型细胞比例与本研究相比差异较大。如大颗粒细胞数量最多，占总血细胞数的49.8%±7.5%，透明细胞数量最少，仅占总血细胞数的0.2%±0.2%；而Lv等^[6]在中华绒螯蟹血细胞分类的研究中，利用相差显微技术、透射电镜技术及细胞化学染色技术结合，将中华绒螯蟹血细胞只分为传统的3类，且透明细胞数量最多而大颗粒细胞数量最少。但是在本研究中，大颗粒细胞只占30.50%，而小颗粒细胞数量最多，达到33.54%。造成这种差异的原因，可能是由于实验中华绒螯蟹处于不同发育阶段或状态引起的。陆宏达等^[11]所用中华绒螯蟹为48~52 g幼蟹，Lv等^[6]实验中并未交代中华绒螯蟹发育情况，而本研究所用中华绒螯蟹均为已完成生殖蜕壳的成蟹。大颗粒细胞和小颗粒细胞已被证实是来自同一祖细胞的不同分化类型^[15]，可能会根据机体需要而出现数量上的转化从而造成细胞比例的不一致。而由于颗粒数和颗粒大小不恒定，大颗粒细胞和小颗粒细胞很有可能处于分化的不同阶段。Bodammer^[16]认为不同类型血细胞表现出了其处于细胞发生的不同阶段，这一假说也被Brouwer等^[17]所认同。他们认为，中间型细胞是小颗粒细胞和大颗粒细胞之间转化的一种表现形式。因此，本研究中的中间型颗粒细胞完全可能是处于小颗粒细胞向大颗粒细胞分化过程中的一个亚型，其胞质中既有嗜酸性大颗粒，也有嗜碱性小颗粒物质便是证明。因此，推测在不同发育阶段或者不同的生境下，甲壳动物血细胞存在不同类别的目的性分化及转化以适应不同的需求。这也许是造成甲壳动物血细胞分类至今没有定论的原因之一。后续关于血细胞在个体不同发育阶段的比例分布以及分化过程的研究或许将揭示此答案。

通过细胞化学分析, 观察到中华绒螯蟹血细胞中含有大量多糖成分, 但不含脂类物质; 根据细胞酶学分析, 发现中华绒螯蟹血细胞中, 仅有大颗粒细胞在4种免疫相关酶染色中呈阳性反应, 这与Mattozzo等^[18]和Gallo等^[19]的研究结果相同。但Gallo等^[19]将螳螂虾姑(*Squilla mantis*)的血细胞分为3类, 并认为小颗粒细胞中同样有4类酶的存在。这可能是由于种间差异造成的。这一结果表明, 中华绒螯蟹血细胞中大颗粒细胞主要功能是提供免疫相关酶, 并参与到免疫应答反应中, 而其余3类细胞的功能在本研究中未知。酚氧化酶广泛存在于甲壳动物血淋巴中, 是组成甲壳动物非特异性免疫应答的重要氧化酶, 陆宏达等^[20]的研究表明, 中华绒螯蟹血淋巴中的酚氧化酶活性物质不存在于血浆中, 主要来自于血细胞, 这与本研究的结论相符。酸性磷酸酶、碱性磷酸酶是甲壳动物重要的水解酶, 其活性也常作为甲壳动物在免疫应答中的非特异性免疫水平指标^[21-23]。本研究表明, 酸性磷酸酶和碱性磷酸酶仅在中华绒螯蟹大颗粒细胞中存在, 其均由大颗粒细胞合成。 β -葡萄糖醛酸酶是细胞内溶酶体中的一种水解酶, 具有参与体内细胞物质代谢, 水解类固醇、葡萄糖醛酸酯、蛋白聚糖以及解毒等生理功能^[24]。目前, 在螳螂虾姑和艾氏滨蟹(*Carcinus aestuarii*)血细胞研究中, 已经证实其血细胞中含有 β -葡萄糖醛酸酶。本研究表明, 在中华绒螯蟹大颗粒血细胞中, 也存在 β -葡萄糖醛酸酶, 但其在非特异免疫应答中的作用机理需进一步研究。

对于多数甲壳动物来说, 不同物种间THC和DHC指标差异较大^[25]。本研究结果显示, 正常状况下, 中华绒螯蟹THC均值约为 5.06×10^6 个/mL, 较接近于艾氏滨蟹的THC水平。在注射嗜水气单胞菌和生理盐水后, 1.5 h内人工感染组THC有小幅度升高, 3 h后上升幅度增加, 在6 h后THC水平达到最高的 9.57×10^6 个/mL, 显著高于未处理组与生理组。注射了生理盐水的中华绒螯蟹THC也有一定的升高, 但其程度远低于人工感染组。至12 h后, 人工感染组和生理组THC均有所降低, 在24 h后基本恢复至正常值。这一结果说明, 病原菌的入侵能显著影响中华绒螯蟹体内总血细胞数水平, 血细胞参与了机体的免疫应答反应。本研究的结论也与Gallo等^[19]的结论相似。外源注射藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)

后, 螳螂虾姑血细胞THC在1 h后显著上升, 在3 h后就明显恢复。在本研究中, DHC变化数据显示, 在感染过程中, 大颗粒细胞数量持续降低, 在6 h达到最低值, 约只占总血细胞数的12.74%; 而透明细胞数量持续显著增加, 并在同一时间达到峰值37.96%。与此同时, 中间型颗粒细胞数量有小幅度减少, 而小颗粒细胞数量则有小幅度增加。虽然6 h后各细胞数量有所回落, 但大颗粒细胞数量较注射前显著降低, 而透明细胞则仍保持较高的数量水平。根据以往对血细胞功能的研究可以推断, 在嗜水气单胞菌入侵导致机体免疫应答的过程中, 透明细胞作为主要的吞噬细胞, 其数量有明显上升。而大颗粒细胞主要依靠脱颗粒来释放并激活酚氧化酶原系统和其他免疫相关酶, 以及产生胞毒作用杀灭细菌。因此, 大颗粒细胞数量有明显的下降。至6 h后, 随着机体机能的恢复, 各类型血细胞也逐渐回复至正常值。在这一过程中, THC数量显著上升, 但小颗粒细胞数量和中间型颗粒细胞数量却保持较稳定的状态。在以往的研究报道中, Hose等^[26]通过对血细胞形态、细胞化学以及细胞功能的研究认为, 透明细胞和大颗粒细胞表现出2种完全不同的细胞谱系, 大颗粒细胞主要从含有不完善的小颗粒物质的颗粒细胞进化而来。Li等^[27]通过对加勒比刺龙虾(*Panulirus argus*)血细胞离体培养发现, 在培养初期, 透明细胞与小颗粒细胞之间存在相互转化的现象。根据这些结论, 推测在血细胞发生过程中, 存在着透明细胞与小颗粒细胞相互转化, 中间型细胞与大颗粒细胞相互转化的现象。在机体免疫应答过程中, 出于对不同类型细胞的需要, 这种转化或加快或减慢, 使得机体能更快处理外源物质的入侵。

在已有的报道中, THC和DHC一直作为衡量甲壳动物免疫机能的重要指标之一。罗氏沼虾体内注射致死剂量的气单胞菌后, 4~24 h时虾体内THC显著下降, DHC的组成也发生显著变化, 透明细胞在注射开始阶段显著增加, 随后降低^[28]。濒死的西岩龙虾(*P. cygnus*)与健康个体相比, 其THC与颗粒细胞比例均为最低^[29]。结果表明, 与其他甲壳类动物相似, 中华绒螯蟹血细胞在机体免疫应答过程中也出现THC、DHC大幅度的变化。但是, 其变化机制只是根据其他研究结论进行推测, 还需要进一步研究来证

实。此外,有研究发现,甲壳动物THC和DHC水平易受到正常蜕皮周期、理化条件以及营养水平等因素的影响。而本研究只选取了生殖蜕壳后的中华绒螯蟹进行研究,并未考虑其余影响因素。因此,还需后续的工作来进一步阐明中华绒螯蟹血细胞在非特异性免疫过程中的功能与作用。

参考文献:

- [1] 陈光芸,王晓峰.中华绒螯蟹常见疾病综述[J].水产养殖,2003,33(3):46-48.
Chen G Y, Wang X F. Common diseases in *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Aquaculture, 2003, 33(3): 46-48(in Chinese).
- [2] 段虎.红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)血细胞培养及细胞免疫研究[D].青岛:中国科学院海洋研究所,2014.
Duan H. Studies on cell culture of hemocytes and cellular immunology of red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2014 (in Chinese).
- [3] Johnson P T. Paramoebiasis in the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1977, 29(3): 308-320.
- [4] Johnson P T. Bacterial infection in the blue crab, *Callinectes sapidus*: course of infection and histopathology[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1976, 28(1): 25-36.
- [5] Gargioni R, Barracco M A. Hemocytes of the Palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*[J]. Journal of Morphology, 1998, 236(3): 209-221.
- [6] Lv S J, Xu J H, Zhao J, et al. Classification and phagocytosis of circulating haemocytes in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and the effect of extrinsic stimulation on circulating haemocytes *in vivo*[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 39(2): 415-422.
- [7] Battison A, Cawthorn B, Horney B. Classification of *Homarus americanus* hemocytes and the use of differential hemocyte counts in lobsters infected with *Aerococcus viridans* var. *homari* (Gaffkemia)[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2003, 84(3): 177-197.
- [8] Ikerd J L, Burnett K G, Burnett L E. Effects of salinity on the accumulation of hemocyte aggregates and bacteria in the gills of *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab, injected with *Vibrio campbellii*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 2015, 183: 97-106.
- [9] Qin C, Chen L, Qin J G, et al. Characterization of a serine proteinase homologous (SPH) in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(1): 14-18.
- [10] Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. Aquaculture, 2000, 191(1-3): 45-52.
- [11] 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.
Lu H D, Zhang M H. Counting and morphological changes *in vitro* of haemocytes in *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(4): 454-462(in Chinese).
- [12] Clare A, Lumb G. Identification of haemocytes and their role in clotting in the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Marine Biology, 1994, 118(4): 601-610.
- [13] 周晖.常见虾蟹血细胞染色观察及分类研究[D].广州:暨南大学,2004.
Zhou H. The dying observation and classification on haemocytes of familiar shrimp and crabs[D].Guangzhou: Jinan University, 2004 (in Chinese).
- [14] 周凯,房文红,乔振国.锯缘青蟹血细胞的形态及分类[J].中国水产科学,2006,13(2):211-216.
Zhou K, Fang W H, Qian Z G. Classification and morphological observation on haemocytes in mud crab *Scylla serrata* by light and electronic microscope[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 211-216(in Chinese).
- [15] Lin X, Söderhäll I. Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines[J]. Blood, 2011, 117(24): 6417-6424.
- [16] Bodammer J. Cytological observations on the blood and hemopoietic tissue in the crab, *Callinectes sapidus*[J]. Cell and Tissue Research, 1978, 187(1): 79-96.
- [17] Brouwer M, Brouwer T H, Grater W, et al. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper(haemoeyanin)for oxygen transport[J]. Biochemical Journal, 2003, 374(1): 219-228.
- [18] Matozzo V, Marin M G. The role of haemocytes from

- the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: a first survey[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 28(4): 534-541.
- [19] Gallo C, Schiavon F, Ballarin L. Insight on cellular and humoral components of innate immunity in *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda)[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 31(3): 423-431.
- [20] 陆宏达, 刘凯, 张明辉. 中华绒螯蟹血淋巴中酚氧化酶的部分生化特性[J]. *上海水产大学学报*, 2007, 16(3): 237-241.
- Lu H D, Liu K, Zhang M H. The partial biochemical characteristics of phenoloxidase in *Erocheir sinensis* hemolymph[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2007, 16(3): 237-241(in Chinese).
- [21] 李义, 张雷明. 复方中药添加剂对罗氏沼虾免疫功能的增强作用[J]. *饲料工业*, 2002, 23(7): 45-47.
- Li Y, Zhang L M. The effect of multi-component Chinese herbal additives on immunity enhancement from *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Feed Industry*, 2002, 23(7): 45-47(in Chinese).
- [22] 李长红, 金珊. 三疣梭子蟹血淋巴免疫功能的初步研究[J]. *水产科学*, 2008, 27(4): 163-166.
- Li C H, Jin S. Preliminary study on immune function of the haemolymph in crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Fishery Science*, 2008, 27(4): 163-166(in Chinese).
- [23] 王洪斌, 宋秀梅, 郑金龙, 等. 日本蠍对水环境中草甘膦致毒胁迫的生理应答[J]. *农药*, 2013, 52(7): 515-518.
- Wang H B, Song X M, Zheng J L, et al. Physiological response of *Charybdis japonica* on glyphosate toxicity stress in the water environment[J]. *Pesticides*, 2013, 52(7): 515-518(in Chinese).
- [24] 张弘, 杨波, 宦大为. 血清 β -葡萄糖醛酸酶活性测定及临床意义[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2007, 21(2): 127-136.
- Zhang H, Yang B, Huan D W. The measurement of beta-glucuronic activity and its clinical significance[J]. *Journal of Practical Oncology*, 2007, 21(2): 127-136(in Chinese).
- [25] Sung H H, Sun R. Use of monoclonal antibodies to classify hemocyte subpopulations of tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2002, 22(2): 337-344.
- [26] Hose J L, Martin G G, Gerard A S. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function[J]. *Biology Bulletin*, 1990, 178(1): 33-45.
- [27] Li C W, Shields J D. Primary culture of hemocytes from the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, and their susceptibility to *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1)[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2007, 94(1): 48-55.
- [28] Sung H H, Wang S F, Tasi F M. Responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aetomonas* spp[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000, 76(4): 278-284.
- [29] Jussila J, Jago J, Tsvetnenko E, et al. Total and differential haemocyte counts in western rock lobsters (*Panulirus Cygnus* George) under post-harvest stress[J]. *Marine and Freshwater Research*, 1997, 48(8): 863-867.

The composition and classification of hemocytes from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and primary research on immunological functions

HONG Yuhang^{1,2}, YANG Xiaozhen^{1*}, CHENG Yongxu¹, XU Minjie¹,
HUANG Genyong¹, YANG Zhigang¹, HUANG Yi²

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture,
Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of the Ministry of Agriculture,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. School of Animal Science, Xichang College, Xichang 615000, China)

Abstract: To study the classification, composition and the role of different types of hemocytes in immune response in *Eriocheir sinensis*, we researched the composition and classification of hemocytes from *E. sinensis* using cytochemical assays, cytoenzymatic assays and morphological observation in this investigation. Meanwhile, total hemocyte counts (THC) and different hemocyte counts (DHC) were performed. Our results showed that hemocytes from *E. sinensis* were divided into four types: granulocytes (G), intermediate granulocytes (IG), semigranulocyte (SG) and hyalinocytes (H). SG got the highest percentage about 33.54% while IG got the lowest only about 15.31%. Only granulocytes showed positivity to acid phosphatase, alkaline phosphatase, β -glucuronidase and phenoloxidase and all types of hemocytes contain polysaccharide but no lipid. In addition, the THC increased obviously at 3 h after the injection of *Aeromonas hydrophila* and reached a peak at 6 h, which was significantly higher than blank and saline groups. The numbers of granulocytes declined dramatically and hyalinocytes increased at the same time during the infection of bacteria, and this phenomenon recovered to their normal level 6 h later. Therefore, we concluded that hyalinocytes perform phagocytosis with large numbers of proliferation while granulocytes perform release of the immune-related enzymes with cell lysis during the response in non-specific immunity in *E. sinensis*. In addition, there might be transformations between various types of hemocytes and intermediate granulocytes were the interim types during the transformation. Hemocyte classification in crustacean had been studied by several researchers but there was no final conclusion in this field. The method of three categories was adopted by most researchers. However, the author found that there was one intermediate type of hemocytes and it would be helpful to the research of hemocytogenesis and immune function of different types of hemocytes.

Key words: *Eriocheir sinensis*; hemocyte; cytochemical assay; cytoenzymatic assay; THC; DHC; *Aeromonas hydrophila*; immunological function

Corresponding author: YANG Xiaozhen. E-mail: xzyang@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31272677, 31472287); Genetics and Breeding of Aquatic Animals Center, Shanghai Collaborative Innovation Center (ZF1206); Shanghai Committee of Science and Technology Project (16DZ2281200)