

曼氏无针乌贼血细胞形态观察及吞噬性能的研究

张建设¹, 吴常文², 常抗美², 苏永全¹

(1. 厦门大学 海洋学系, 福建 厦门 361005; 2. 浙江海洋学院 海科学院, 浙江 舟山 316004)

摘要: 用组织学和免疫学方法对曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)的血细胞进行形态观察和免疫活性研究。根据血细胞大小和美兰染色结果, 将曼氏无针乌贼的血细胞分为 2 类: 较小的血细胞圆形, 直径 7.65 ~ 8.28 μm, 细胞核卵圆形, 核质比约 0.66, 约占细胞总数的 45.3%; 较大的血细胞圆形, 直径 9.58 ~ 10.42 μm, 细胞核肾形, 核质比约 0.40, 有些细胞具双核, 约占细胞总数的 54.7%。饥饿乌贼血细胞数量较正常乌贼有明显下降 (*t*-检验, $P < 0.05$), 较大血细胞的比例有所上升, 可达 70%。细菌吞噬试验结果表明, 较小血细胞对细菌无吞噬能力, 而较大血细胞具有较强的细菌吞噬能力。饥饿组曼氏无针乌贼血细胞吞噬活力稍低, 但并无显著差别 (*t*-检验, $P > 0.05$)。对曼氏无针乌贼血细胞形态和功能的研究, 为探索曼氏无针乌贼免疫防御机理提供了基础资料。

关键词: 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*); 血细胞; 形态观察; 吞噬活性

中图分类号: Q24 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2007) 11-0061-06

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*), 俗称墨鱼、日本无针乌贼等, 属头足纲 (Cephalopoda), 乌贼目 (Sepioidea), 乌贼科 (Sepiidae), 无针乌贼属 (*Sepiella*)。由于过度捕捞和生态恶化, 自 20 世纪 70 年代以来, 渔业资源先后出现了衰退现象。目前, 浙江海洋学院已成功突破曼氏无针乌贼的产业化育苗难关, 人工养殖在国内正逐步展开。

国内学者对曼氏无针乌贼的形态构造、胚胎发育、生态生理以及渔业资源等方面已开展了相应的研究^[1-5], 然而曼氏无针乌贼免疫方面的研究还未见报道。软体动物没有免疫球蛋白以及淋巴系细胞, 因此缺乏获得性免疫, 其免疫防御功能依赖于天然免疫的有关机制。这些免疫防御机制主要由血细胞来行使。当异物进入软体动物体内, 除非颗粒较大, 往往被血细胞吞噬。血细胞通过吞噬、包裹、形成细胞结等细胞免疫反应来达到清除和杀灭病原的效果^[6]。作者首次研究曼氏无针乌贼血细胞的形态, 比较分析不同状态下曼氏无针乌贼血细胞的吞噬活性的差异, 为曼氏无针乌贼的免疫学研究提供基础资料, 为曼氏无针乌

贼细胞免疫机制的深入研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验于 2006 年 9~11 月进行, 曼氏无针乌贼采自浙江省岱山县大海洋生态渔业有限公司, 养殖水温 21 ~ 22℃, 盐度 24.5 ~ 25.8。选取体长 12.5 cm ± 2.8 cm, 体质量 275 g ± 35 g 健康、活力好的乌贼用于实验。

1.2 实验用菌

实验用菌由浙江海洋学院微生物实验室提供。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和金黄色葡萄球菌

收稿日期: 2007-02-14; 修回日期: 2007-08-16

基金项目: 科技部重大国际科技合作项目(2006DFA32960); 浙江省对外合作重大专项(2006C14017)

作者简介: 张建设(1979-), 男, 山东泰安人, 博士研究生, E-mail: jszhang1979@sina.com.cn; 苏永全, 通讯作者, yqsu@xmu.edu.cn

(*Staphylococcus aureus*)培养 36 h 后, 用生理盐水洗脱, 加入终浓度为 1.0% 的甲醛, 25℃ 灭活 24 h, 离心集菌。后用生理盐水调整菌密度分别为 5×10^7 个/mL 和 1×10^8 个/mL, 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 血细胞形态观察

用 1 mL 注射器和 5 号针头从曼氏无针乌贼心室取血, 滴片在相差显微镜下进行活体观察。取血时先用 1 mL 一次性注射器吸取 0.1 mL 10% 甲醛, 然后从心室取 0.1 mL 血液, 血液取出后迅速制成血涂片, 于室温下干燥。碱性美兰染色 2~3 min, 水洗, 晾干, 常规方法封片, 尼康 (Nikon) DXM 1200F 数码显微成像系统观察并拍照。

测量血细胞和细胞核的大小, 平均核质比按下列公式计算:

核质比 = (平均核长轴 × 平均核短轴) / (平均细胞长轴 × 平均细胞短轴)。

1.4 血细胞悬液制备

配制 Alsever 抗凝缓冲液, 从乌贼心室抽取血液, 按 1:1 比例与抗凝缓冲液混匀, 制成血细胞悬液。

1.5 血细胞浓度和组成

将制备的血细胞悬液滴于血球计数板上, 显微镜观察、计数并折算单位体积的血细胞数目。血细胞悬液制成血涂片, 于室温下干燥。碱性美兰染色, 水洗, 晾干, 常规方法封片, 镜检计数各类血细胞的数目。

1.6 血细胞的吞噬作用

血细胞悬液 0.2 mL 于 96 孔凹孔板中, 分别加

入 0.02 mL 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 充分混匀, 22.5℃ 下作用 30 min。滴加 10% 甲醛固定, 混匀, 制备血涂片, 晾干。碱性美兰染色 2~3 min, 水洗, 晾干, 镜检。

1.7 饥饿状态下血细胞体外吞噬活性的影响

应用上述方法, 测定饥饿 3 d 的曼氏无针乌贼血细胞的浓度、组成和吞噬活性。

1.8 吞噬活性的计算

将玻片置于油镜下观察、计数, 按李静等^[7]的方法判定血细胞的吞噬活性。

吞噬百分比 = (100 个血细胞中参与吞噬的细胞数 / 100) × 100

吞噬指数 = 100 个吞噬细胞内的细菌总数 / 100

2 结果

2.1 血细胞形态观察

抽取血液滴几滴于载玻片上, 立即在相差显微镜下观察。此时血细胞均为球形, 在血液中滚动或浮动。3~7 min 时, 部分细胞先后伸出伪足, 附着于玻璃表面, 移动载片时不再晃动。10~15 min 后, 除少数血细胞仍呈球形、折光性很强而发亮外, 多数细胞伸出长的伪足和棘突, 相互连接。不贴壁的圆球形细胞直径约 8 μm, 中央有一个大的细胞核, 胞质极少 (图 1-1)。伸出伪足的细胞, 胞体为三角形、多角形, 其中部分细胞的胞质中含有大小不等的颗粒 (图 1-2, 1-3)。

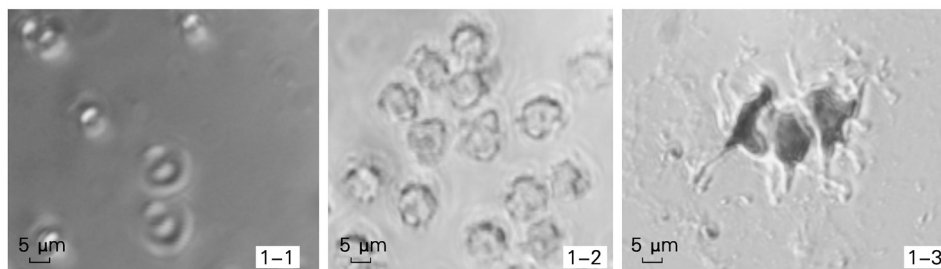


图 1 曼氏无针乌贼血细胞活体观察

Fig. 1 Observation of living haemocytes of the *Sepiella maindroni*

1-1. 活体悬浮血细胞; 1-2. 血细胞伪足棘突; 1-3. 血细胞变形

1-1. livings suspend haemocytes; 1-2. pseudopod of haemocytes; 1-3. distortion of haemocytes

经甲醛固定后的血细胞呈球形, 根据细胞大小 可分为 2 类细胞 (图 2-1)。直径较大的血细胞近圆

球形, 直径 9.58~10.42 μm ; 较小血细胞球形, 直径 7.65~8.28 μm。美兰染色结果显示直径较大细胞的细胞核呈梨形或肾形, 有的具 2 个细胞核, 核质比较小, 为 0.40±0.06; 直径较小细胞的细胞核圆形, 核质比

较大, 为 0.66±0.10 (图 2-2,2-3)。直径较大的血细胞约占血细胞总数的 54.7 %, 较小的血细胞约占血细胞总数的 45.3%。

2.2 血细胞密度和组成变化

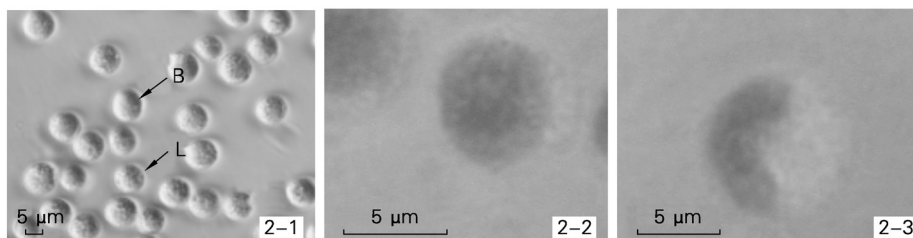


图 2 曼氏无针乌贼血细胞观察

Fig. 2 Morphologic observation of the haemocytes

2-1. 甲醛固定血细胞; 2-2. 较小血细胞; 2-3. 较大血细胞; B. 较大血细胞; L. 较小血细胞

2-1. fixed haemocytes by formaldehyde; 2-2. lesser haemocytes; 2-3. biggish haemocytes; B. biggish haemocytes; L. lesser haemocytes

对照组和饥饿组曼氏无针乌贼血细胞密度和各类血细胞组成如表 1 所示。饥饿组血细胞密度较对照组有明显下降 (*t*- 检验, $P < 0.05$), 血细胞密度为

$3.62 \times 10^6 \sim 6.12 \times 10^6$ 个/mL, 血细胞组成也有明显变化 (*t*- 检验, $P < 0.05$), 大血细胞的比例上升至 70% 左右 (图 3)。

表 1 不同状态曼氏无针乌贼血细胞密度和细胞组成变化

Tab. 1 Comparison of haemocytes density and composing of *S. maindroni* in different conditions

组别	血细胞密度 (个/mL)	血细胞组成 (%)	
		小血细胞	大血细胞
对照组 (样品数 40 个)	$8.90 \times 10^6 \sim 4.12 \times 10^7$	45.3	54.7
饥饿组 (样品数 40 个)	$3.62 \times 10^6 \sim 6.12 \times 10^6$	30	70

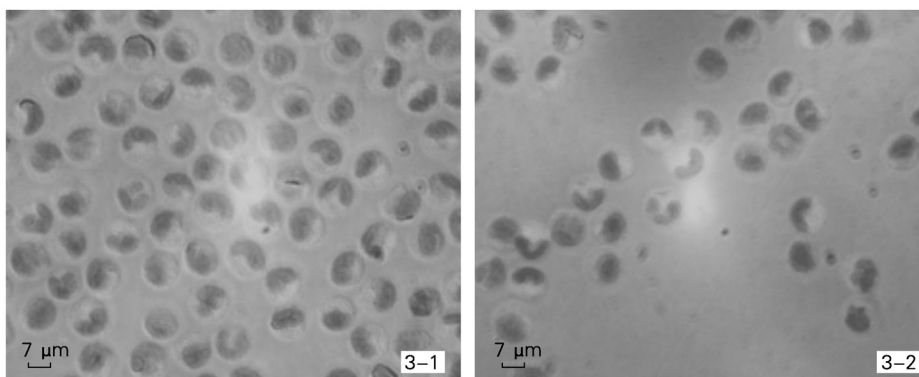


图 3 曼氏无针乌贼血细胞美兰染色

Fig. 3 Methylene blue staining of haemocytes of the *S. maindroni*

3-1. 正常乌贼血细胞; 3-2. 饥饿乌贼血细胞

3-1. natural haemocytes of the *S. maindroni*; 3-2. starved haemocytes of the *S. maindroni*

2.3 不同状态下血细胞体外吞噬活性

血细胞体外吞噬活性试验结果表明,曼氏无针乌贼血细胞中较小的细胞无吞噬活性,较大的血细胞对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有很强的吞噬能力。对照组曼氏无针乌贼血细胞对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的吞噬百分比分别为 28.6% 和 45.2%, 吞噬指数分别为 0.34 和 1.38。细菌首先附于血细胞的

表面,然后具吞噬能力的血细胞即伸出伪足将细菌包围,形成吞噬泡进入血细胞内部。一个血细胞一般只吞噬 1 个或 2 个大肠杆菌,但可吞噬多个金黄色葡萄球菌(图 4)。如表 2 所示,饥饿组曼氏无针乌贼较大血细胞也具有很强的细菌吞噬活性,相对于健康组其吞噬百分比和吞噬指数稍低,但并无显著差别 (t -检验, $P > 0.05$)。

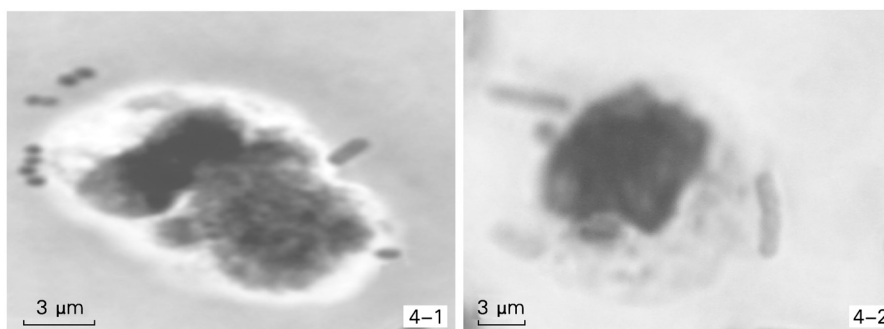


图 4 曼氏无针乌贼血细胞吞噬活性
Fig. 4 Phagocytosis property haemocytes of the *S. maindroni*

4-1. 吞噬金黄色葡萄球菌; 4-2. 吞噬大肠杆菌
4-1. Phagocytosis of haemocytes to *S. aureus*; 4-2. Phagocytosis of haemocytes to *E. coli*

表 2 不同状态曼氏无针乌贼血细胞的体外吞噬活性

Tab. 2 Phagocytosis property of the haemocytes of *S. maindroni* in different conditions

组别	吞噬百分比(%)		吞噬指数	
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
对照组(样品数 40 个)	28.6±3.58	45.2±4.64	0.34±0.06	1.38±0.13
饥饿组(样品数 40 个)	25.8±4.46	42.6±3.12	0.32±0.10	1.24±0.09

4 讨论

血细胞的吞噬作用过程大致可以分为趋化、黏附、内吞以及杀伤消化 4 个阶段。软体动物血细胞可以向外源颗粒趋化靠近,然后与异物发生黏附,随后血细胞伸出伪足对异物进行包裹,伪足相接触后细胞质膜融合,形成吞噬体进入细胞。对曼氏无针乌贼血细胞短期活体观察结果发现:多数血细胞伸出伪足和棘突,细胞体变为三角形、多角形,其中部分细胞的胞质中含有大小不等的颗粒;少数血细胞仍保持圆球形。通过活体观察可大致将曼氏无针乌贼血细胞分为

2 类,这与血细胞的染色结果一致。曼氏无针乌贼血细胞中的一类能够变形,伸出伪足或棘突,表明这类细胞可能具有吞噬功能。

血细胞的吞噬作用是一种基本的原始的防御机制,对体内没有产生抗体机构的软体动物的免疫防御具有更为重要的意义。血细胞吞噬活性的高低在一定程度上反映了机体的防御水平。曼氏无针乌贼血细胞吞噬研究中发现细菌首先附于血细胞的表面,然后具吞噬能力的血细胞即伸出伪足将细菌包围,形成吞噬泡进入血细胞内部。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别属于革兰氏阴性和阳性细菌,说明曼氏无针乌贼血细

胞对革兰氏阴性和阳性细菌均有吞噬能力。曼氏无针乌贼可以通过自身血细胞的免疫吞噬作用抵御外来细菌的侵袭。

在免疫防御方面,血细胞可以活跃地趋化到炎症和损伤部位,进行吞噬,是免疫防御的主要细胞类型^[15]。因此血细胞的数目和类型也反映了生物体的免疫防御能力的状态。血细胞的吞噬作用是控制和清除病原生物侵扰的重要手段,但环境条件的改变、外来物质的刺激会在一定程度上影响血细胞的活性^[16]。本研究比较分析了健康和饥饿状态下曼氏无针乌贼血细胞的数量、组成比例以及吞噬活力。饥饿的曼氏无针乌贼血细胞密度较对照组显著减少,这可能是由于造血原粒不足,造血机能下降所致。虽然能够进行吞噬的较大血细胞比例相对上升,但是其绝对数量下降,因此,这一结果暗示饥饿乌贼的抗病能力减弱。从对照组和饥饿乌贼血细胞的吞噬活性数值结果来看,饥饿乌贼的血细胞吞噬百分数和吞噬指数没有明显的变化,但由于饥饿乌贼的血细胞组成发生变化,因此饥饿乌贼抵抗细菌侵袭的能力较正常乌贼要差。

软体动物血细胞的吞噬作用和非我识别是其免疫防御的核心。对有关过程和机制的阐明,是软体动物免疫学研究的重要内容。本文首次分析曼氏无针乌贼血细胞组成以及在不同状态下的变化,研究其血细胞的吞噬活性,为进一步研究曼氏无针乌贼免疫系统结构和功能,揭示免疫学的基础问题,对解决养殖过程中病害的监测、预报、防治及新品种的培育等问题都有重要意义。

参考文献:

- [1] 吴耀泉,唐质灿. 黄河口及莱州湾哈曼氏无针乌贼的群体组成和洄游分布[J]. 水产学报, 1990,14 (2): 149-152.
- [2] 董正之. 头足类研究[A]. 曾呈奎,周海鸥,李本川. 中国海洋科学研究及开发[C]. 青岛:青岛出版社, 1993. 23-36.
- [3] 张宝琳,孙道元,毕洪生,等. 胶州湾及邻近水域曼氏无针乌贼的生长和季节分布[J]. 海洋科学, 1997, 5: 61-64.
- [4] 郑小东,王如才,刘维青. 华南沿海曼氏无针乌贼表型变异研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2002,32 (5): 713-719.
- [5] 尹飞,王春琳,宋微微. 曼氏无针乌贼幼体生态因子耐受性的研究[J]. 湛江海洋大学学报,2005, 8(4): 39-43.
- [6] 周永灿,潘金培. 贝类细胞核体液的防御机制研究进展[J]. 水产学报, 1997, 27(4): 449-454.
- [7] 李静,石安静,李强. 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): 132-137.
- [8] Foley D A, Cheng T C. Interaction of molluscs and foreign substances: The morphology and behavior of hemolymph-cells of the American oyster, *Crassostrea virginica*, *in vitro*[J]. **J Invertebr Pathol**, 1972, 19: 383-394.
- [9] Auffret M. Comparative of the hemocytes of two oyster species: the european flat oyster, *Ostrea edulis*, (linnaeus, 1750) and the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (thunberg, 1793) [J]. **J of Shellfish Research**, 1989, 2:367-373.
- [10] Renwranzl K, Yoshino T, Cheng T C, *et al*. Size determination of hemocytes from the American oyster, *Crassostrea virginica*, and the description of a phagocytosis mechanism [J]. **Zool J B Physiol**, 1979, 83: 1-12.
- [11] Cheng T C, Foley D A. Hemolymph cells of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*: a electron microscopical study [J]. **J Invertebr Pathol**, 1975, 26: 341-351.
- [12] Pipe R K, Livingstone D R. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis* [J]. **Fish Shellfish Immunol**, 1993, 3: 221-233.
- [13] Maria J C. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. **Diseases of aquatic organisms**, 1997, 29: 127-135.
- [14] Morre M N, Lowe D W. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their response to experimentally injected carbon particles [J]. **J Invertebr Pathol**, 1977,29:18-30.
- [15] Sninia T. Gastropods[A]. Ratcliffe N A, Rowley A F. Invertebrate blood cells [C]. London: Acad Press, 1981.191-232.
- [16] Anderson R S. Inducible hemolytic activity in *Mercenaria mercenaria* hemolymph[J]. **Dev Com Immunol**, 1981, 5: 575-585.

Morphologic observation and phagocytosis property of the haemocytes of *Sepiella maindroni*

ZHANG Jian-she¹, WU Chang-wen², CHANG Kang-mei², SU Yong-quan¹

(1.College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;2. Marine Science college, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China)

Received: Feb.,14,2007

Key words: *Sepiella maindroni*; haemocyte; morphologic observation; phagocytosis

Abstract: Morphological and phagocytosis properties of the haemocytes of the cuttlefish *Sepiella maindroni* were studied by histology and immunology methods. The results showed that the haemocytes of the *S. maindroni* could be divided into two types according to the characteristics of the haemocytes: the lesser haemocytes with the diameter of 7.65~8.28 μm , were round, the nucleolus were also round, surrounded by relatively small cytoplasm, there were little granules in cytoplasm, the ratio of nucleus/cytoplasm (N/C) was higher (0.66 ± 0.10), and the proportion of haemocytes was 45.3% in the total haemocytes; the biggish haemocytes with the size of 9.58~10.42 μm , were round, there were much granules in the endoplasm and the N /C ratio was lower (0.40 ± 0.06), some of the granulocytes had double nuclei, and the proportion of granulocytes was 54.7% in the total haemocytes. The density of haemocytes of starved *S. maindroni* was lower than that of the control ones (*t*- test, $P < 0.05$), the ratio of the biggish haemocytes to lesser haemocytes was rising to 70%. The phagocytosis test of haemocytes was performed at 22.5°C. It was shown that only the biggish haemocytes had the phagocytic ability to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. There was no difference between control and starved *S. maindroni* by the *t*-test ($P > 0.05$). This study laid the foundation for the research of immunity defence mechanism of *S. maindroni*.

(本文编辑: 刘珊珊)