

日本螯血细胞及血液生化指标的研究

许星鸿¹, 阎斌伦¹, 郑家声², 邵营泽¹, 徐加涛¹, 徐国成¹, 周 盟¹, 周 黎¹

(1. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛, 266003)

摘要: 以光镜和电镜观察了日本螯(*Charybdis japonica*)血细胞的形态结构, 分析了各类血细胞的大小、数量比例及功能, 并测定了不同发育时期及饥饿状态的日本螯血清主要生化指标。结果表明: 日本螯血细胞可分为 4 种类型, 从小到大依次为: 无颗粒细胞、小颗粒细胞、中间型细胞和大颗粒细胞; 其核质比分别为: 53.23%、33.64%、24.50%和 19.45%; 数量比例分别为: 4.78%、42.69%、36.57%和 15.96%。雌蟹血细胞密度显著高于雄蟹, 而细胞大小在不同性别之间差异不显著。吞噬能力从强到弱依次为中间型细胞、大颗粒细胞和小颗粒细胞, 无颗粒细胞无吞噬能力。鳃中血细胞表现出更为活跃的吞噬作用。生长期雌蟹血清中总蛋白、葡萄糖和总胆固醇含量均高于雄蟹, 成熟期雄蟹血清总蛋白含量高于雌蟹。雌蟹抱卵后, 血清中维持较高的总蛋白和总胆固醇水平。饥饿 7 d 的日本螯血细胞密度及血清总蛋白、葡萄糖、总胆固醇含量明显下降, 谷丙转氨酶、碱性磷酸酶等酶活性显著降低, 而肌酐和尿素氮含量明显增加, 日本螯血清中含有球蛋白。

关键词: 日本螯(*Charybdis japonica*); 血细胞; 血液生化指标; 吞噬能力; 饥饿

中图分类号: Q959.223

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)08-0051-07

甲壳动物缺乏脊椎动物的特异性免疫机制, 其免疫防御反应是通过血细胞的吞噬、包掩、凝集和溶菌等作用作用于病原体, 同时血细胞受此激发而释放出多种免疫因子于血浆中, 在两者共同作用下达到免疫效果^[1-2]。因此, 甲壳动物血淋巴的研究对于养殖生产中的病理诊断及病害防治工作具有重要的参考意义。日本螯(*Charybdis japonica*)隶属于甲壳纲(Crustacea)梭子蟹科(Portunidae), 俗称靠山红、石闸蟹等, 广泛分布于中国各海区^[3], 为经济价值较高的海产蟹类^[4]。关于日本螯血液学的研究已有一些报道, 赵青松等^[5]对东海产日本螯血细胞的形态及数量做了初步研究, 张红霞等^[6]分析了重金属离子对日本螯血淋巴抗氧化酶活力的影响, 樊廷俊等^[7]分离纯化了日本螯血蓝蛋白, 并研究了脂多糖等免疫促进剂对日本螯酚氧化酶活性及血细胞的影响^[8]。本实验采用光镜和电镜对日本螯血细胞进行了细致观察, 分析了各类血细胞的大小、数量比例及功能, 并对不同发育时期及饥饿状态的日本螯血清主要生化指标进行了测定, 以丰富该领域的基础资料, 为日本螯的组织病理、病害防治及繁殖生理等研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验用日本螯分批购买于连云港海产品市场: 生长期雌、雄各 10 只, 取材于 3 月上旬, 体质量(69.53 ± 8.47)g; 成熟期雌、雄各 60 只, 取材于 5 月上旬, 体质量(110.28 ± 13.39)g; 抱卵蟹 10 只, 取材于 5 月下旬, 体质量(93.72 ± 7.15)g。发育分期方法另文发表^[9]。采用生态闭路循环养殖系统暂养 7 d 后用于实验, 盐度 25, pH8.0, 水温 15 ℃, 连续充气, 一日投喂 2 次鲜活贝类。饥饿实验组选取成熟期日本螯, 雌雄各半, 除不投喂外, 其他暂养条件相同。下述实验材料未标明发育时期者均取自成熟期。

1.2 方 法

1.2.1 血样采取与计数

用无菌注射器先吸取 10% 海水甲醛^[5]0.2 mL,

收稿日期: 2010-06-26; 修回日期: 2011-08-21

基金项目: 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题(Z2007HS006); 江苏省科技厅苏北科技发展计划项目(BN2010026)

作者简介: 许星鸿(1970-), 女, 江苏省泰兴人, 副教授, 硕士, 主要从事海洋动物发育生物学研究, 电话: 0518-85835092, E-mail: xhxu119@163.com

再从日本蟬第三步足基关节处抽取等量血液,充分混匀后,用血球计数板计数,计算出血细胞密度。雌蟹、雄蟹及饥饿实验组测定数均为 10 只。

1.2.2 血涂片制作、观察与测量

以抗凝剂和血液的等量混合液按常规法涂片。采用 ACD-福尔马林混合液^[10]作抗凝剂,瑞-姬混合染色液^[11]染色 10 min,血涂片于 Nikon E1000 显微镜下观察、摄影。雌、雄蟹测定数均为 10 只,每只蟹制作血涂片 3 张。每张涂片随机选取约 200 个血细胞进行分类计数^[10],对不同的血细胞随机选取 20 个,进行细胞体和细胞核的测量。核质比按下列公式计算:核质比 = (平均核长径 × 平均核短径)/(平均细胞长径 × 平均细胞短径)。

1.2.3 超微结构观察

电镜观察材料取自成熟期雌蟹。取血方法同 1.2.1,抽取 0.5 mL 血液,注入已装有 0.5 mL 4%戊二醛的离心管中,轻摇使其混匀,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,再加入新的 4%戊二醛预固定(4),1%锇酸后固定,梯度乙醇脱水, Epon812 环氧树脂包埋。LKB-Nova 超薄切片机制片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,日本电子 JEM-1200EX 型透射电镜观察、摄影。另取鳃,切成 1 mm³ 组织块,制作超薄切片,透射电镜观察血细胞在机体器官内的自然生理状态。

1.2.4 血细胞吞噬能力的研究

实验用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和节杆菌 (*Arthrobacter*) 由淮海工学院微生物实验室提供。将菌种分别接种在营养琼脂培养基上,30 培养 48 h,无菌生理盐水洗下后,配成浓度为 10⁸ 个/mL 的菌悬液,4 贮存备用。取雌、雄蟹各 5 只,以 ACD 为抗凝剂等比分别从各蟹取 0.5 mL 血液后混合均匀。取 1 mL 该混合液,加入 100 μL 菌悬液,混匀后于 30 孵育 1 h。常规涂片,镜检计数。吞噬率 = 有吞噬作用的血细胞数/随机选取的 100 个血细胞 × 100%, 各类血细胞吞噬率 = 有吞噬作用的各类血细胞数/随机选取的 100 个有吞噬作用的血细胞总数 × 100%。

1.2.5 血液生化指标测定

分别对生长期、成熟期、已抱卵和饥饿 7 d 的日本蟬血液生化指标进行测定,各期测定数均为 10 只(饥饿实验组为雌、雄各 5 只)。用无菌注射器于每只蟹各抽取 1.5 ~ 2 mL 血液,4 放置 1 h 后,5 000 r/min 冷冻离心 15 min,取上清液,采用 BECKMAN CX5 全自动生化分析仪测定。

1.3 数据处理

各实验均重复 3 次,实验数据用“平均数 ± 标准差”表示。采用 SPSS16.0 软件进行数据处理,并进行 *t* 检验或单因子方差分析(One-way ANOVA),LSD 多重比较和 Duncan 检验。

2 结果

2.1 日本蟬的血细胞密度

成熟期雌性日本蟬血细胞密度为 $(3.75 \pm 0.56) \times 10^7$ 个/mL,显著高于雄蟹的 $(2.48 \pm 0.43) \times 10^7$ 个/mL,平均 $(3.11 \pm 0.81) \times 10^7$ 个/mL。饥饿 7 d 后,雌、雄蟹的血细胞密度均明显下降,分别为 $(1.33 \pm 0.36) \times 10^7$ 个/mL 和 $(0.79 \pm 0.24) \times 10^7$ 个/mL,平均 $(1.06 \pm 0.41) \times 10^7$ 个/mL。

2.2 日本蟬血细胞的分类及形态

通过对光镜和透射电镜所观察到的图像分析,根据细胞质中颗粒的有无、大小、折光性、染色特性及核质比,将日本蟬血细胞分为 4 种类型:无颗粒细胞、小颗粒细胞、中间型细胞和大颗粒细胞。

2.2.1 无颗粒细胞

光镜下无颗粒细胞多为圆形或椭圆形,核质比大,平均可达 53.23%。一薄层淡蓝色细胞质围绕着蓝紫色细胞核,胞质中没有明显颗粒,但含有一些深蓝色絮状物(图 1-1)。

电镜观察可见,细胞核内异染色质呈斑块状,紧贴核膜内侧,核仁 1 ~ 2 个、体积较大。胞质中有少量体积较小的线粒体和液泡,游离核糖体含量丰富(图 1-2)。

2.2.2 小颗粒细胞

光镜下观察,小颗粒细胞以椭圆形为主,也见有近三角形。细胞质比无颗粒细胞略多,核质比平均为 33.64%。胞质中有少量蓝色小颗粒,没有折光性(图 1-3)。

超微结构显示,细胞质中的颗粒形状各异,有圆形、椭圆形、棒状及哑铃状等;大小不等,多介于 0.1 ~ 0.3 μm。小颗粒电子密度较低。胞质中有较多的液泡,线粒体体积较大。异染色质也多靠近核膜分布,但没有无颗粒细胞的集中(图 1-4)。

2.2.3 中间型细胞

光镜下中间型细胞体积较大,多为椭圆形,也有呈梨形、梭形。细胞核常偏于细胞一侧,且核质比较小,平均 24.50%。细胞质中既有较大的蓝色颗粒,

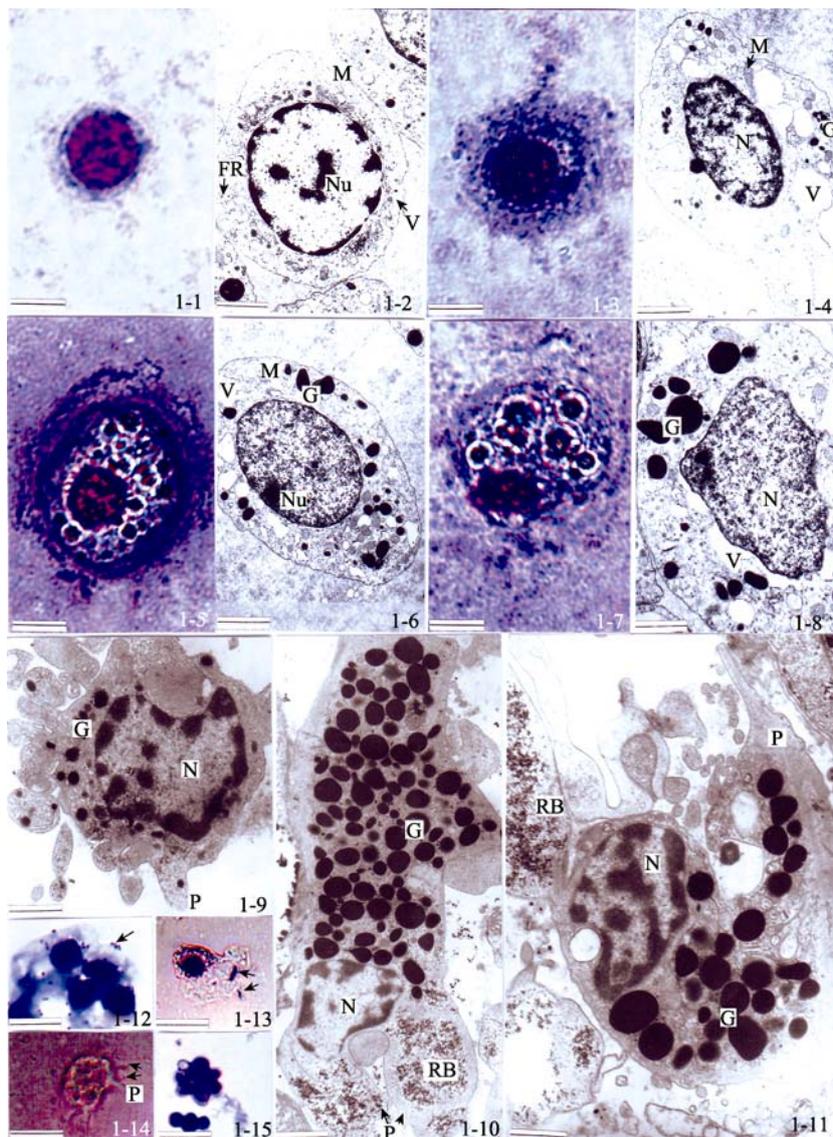


图1 日本螯血细胞的光镜及电镜观察

Fig. 1 Hemocytes in crab *Charybdis japonica* under light and electron microscope

1-1、1-2. 无颗粒细胞; 1-3、1-4、1-9. 小颗粒细胞; 1-5、1-6、1-10. 中间型细胞; 1-7、1-8、1-11. 大颗粒细胞; 1-12、1-15. 示血细胞的凝集及对细菌的吸附; 1-13、1-14. 示血细胞对细菌的吞噬作用, “↑”示细菌(1-1、1-3、1-5、1-7、1-12~1-15. 光镜照片; 1-2、1-4、1-6、1-8~1-11. 透射电镜照片; 1-1、1-3、1-5、1-7. 标尺 7.5 μm; 1-2、1-4、1-6、1-8. 标尺 2 μm; 1-9~1-11. 标尺 1.5 μm; 1-12. 标尺 20 μm; 1-13、1-14. 标尺 10 μm; 1-15. 标尺 40 μm); FR. 游离核糖体; G. 颗粒; M. 线粒体; N. 细胞核; Nu. 核仁; P. 伪足; RB. 残余体; V. 液泡

1-1 and 1-2. Agranular hemocyte (AG); 1-3, 1-4, and 1-9. Small granular hemocyte (SG); 1-5, 1-6, and 1-10. Intermediate granular hemocyte (IG); 1-7, 1-8, and 1-11. Large granular hemocyte (LG); 1-12 and 1-15. Showing the aggregation of hemocytes and adsorbing bacteria; 1-13 and 1-14. Showing the phagocytosis of hemocytes, “↑” showing the bacteria (1-1, 1-3, 1-5, 1-7, 1-12~1-15. LM; 1-2, 1-4, 1-6, 1-8~1-11. TEM; 1-1, 1-3, 1-5, and 1-7. Bar=7.5 μm; 1-2, 1-4, 1-6, 1-8. Bar=2 μm; 1-9~1-11. Bar=1.5 μm; 1-12. Bar=20 μm; 1-13, 1-14. Bar=10 μm; 1-15. Bar=40 μm; FR. Free ribosome; G. Granule; M. Mitochondrion; N. Nucleus; Nu. Nucleolus; P. Pseudopodia; RB. Residual body; V. Vacuole

也有红棕色的小颗粒, 多数颗粒具有折光性(图 1-5)。

电镜下观察, 细胞质中的颗粒数量比小颗粒细胞多, 大小从 0.1~0.9 μm 不等, 大、小颗粒的数量比例相当。胞质中还含有丰富的线粒体、液泡及游离核糖体, 糙面内质网主要分布在核外膜附近。核内染色质以常染色质为主, 核仁 1 个、位置靠近核膜(图

1-6)。

2.2.4 大颗粒细胞

光镜下观察, 大颗粒细胞形态多样, 有椭圆形、子弹形及不规则形。细胞核偏于细胞一侧, 平均核质比仅 19.45%。细胞质中的颗粒多数染成蓝色, 体积大且折光性强, 也含有少量红色小颗粒(图 1-7)。

超微结构显示, 细胞质中的颗粒绝大多数在 0.5 μm 以上, 最大颗粒长径可达 1.1 μm。其他特征类似于中间型细胞, 但胞质中的液泡体积较大(图 1-8)。

2.2.5 鳃中的血细胞形态

鳃中的血细胞也能明显分成上述 4 种类型, 但与抽取外周血离心得到的血细胞相比, 除无颗粒细胞形态相似外, 3 种有颗粒细胞的形态结构均有一定差异。小颗粒细胞(图 1-9)形状不规则, 向四周伸出数个短小的伪足, 部分伪足中也包含着小颗粒; 核质分布特点与前述相同, 但核形状较不规则。中间型细胞(图 1-10)和大颗粒细胞(图 1-11)均伸出粗大的伪足, 进行着吞噬作用。这两类细胞的胞质中基本不含有的液泡, 但有体积较大的残余体; 颗粒明显

增多, 尤其中间型细胞中的颗粒数量增加了近两倍, 占据了细胞大部分空间。

2.3 日本蟳血细胞的大小与数量比例

从表 1 可见, 日本蟳 4 种类型血细胞从小到大依次为: 无颗粒细胞、小颗粒细胞、中间型细胞和大颗粒细胞, 除了雄蟹无颗粒细胞的长径明显大于雌蟹之外, 细胞大小在不同性别之间差异不显著。4 类血细胞所占的数量比例从大到小依次为: 小颗粒细胞、中间型细胞、大颗粒细胞和无颗粒细胞, 雌蟹的小颗粒细胞明显少于雄蟹, 而大颗粒细胞比雄蟹的多, 无颗粒细胞和中间型细胞数量比例的性别差异不显著。

表 1 日本蟳血细胞的大小与数量比例

Tab. 1 The sizes and percentages of hemocytes in *Charybdis japonica*

项目	雌性()	雄性()	平均值
无颗粒细胞	长径(μm)	8.63±1.00	9.38±1.04*
	短径(μm)	7.05±1.00	7.33±1.05
	比例(%)	4.85±1.32	4.71±0.92
小颗粒细胞	长径(μm)	9.83±1.35	10.55±1.39
	短径(μm)	6.93±0.83	7.15±1.49
	比例(%)	41.37±3.18	44.02±2.89**
中间型细胞	长径(μm)	12.73±1.29	13.45±1.58
	短径(μm)	8.85±1.24	9.65±1.38
	比例(%)	36.06±2.76	37.08±2.45
大颗粒细胞	长径(μm)	15.18±1.36	14.93±1.40
	短径(μm)	10.25±1.50	9.65±1.60
	比例(%)	17.72±2.72	14.19±3.18**

注: *表示雌、雄两组间差异显著($P<0.05$); **表示雌、雄两组间差异极显著($P<0.01$)

2.4 日本蟳血细胞的吞噬能力

在血细胞和细菌体外孵育实验中, 可以观察到在细菌的刺激下, 日本蟳血细胞对细菌的吸附(图 1-12)、吞噬(图 1-13, 1-14)及血细胞之间的凝集现象(图 1-12, 1-15)。没有观察到无颗粒细胞的吞噬现象。

在 30、1 h 的反应时间内, 日本蟳血细胞对大肠杆菌和节杆菌的菌悬液的吞噬率分别为 62.33% 和 52.93%。以中间型细胞吞噬能力最强, 在所有发生吞噬作用的血细胞中, 对两种菌悬液的吞噬率分别为 54.87% 和 52.13%; 其次是大颗粒细胞, 吞噬率分别为 27.40% 和 29.54%; 小颗粒细胞的吞噬能力相

对较低, 吞噬率分别为 17.73% 和 18.33%。

2.5 日本蟳的血液生化指标

由表 2 可知, 日本蟳从生长期到成熟期, 血清中总蛋白、葡萄糖、总胆固醇、肌酐和尿酸等含量升高, 谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性增强, 而尿素氮含量减少, 碱性磷酸酶活性有所下降。在生长期, 雌蟹血清的总蛋白、葡萄糖和总胆固醇含量均高于雄蟹。当发育至成熟期, 雄蟹血清的总蛋白含量反而高于雌蟹, 但雌蟹血清的葡萄糖和总胆固醇含量依然显著高于雄蟹。雌蟹抱卵后, 血清中葡萄糖、甘油三酯、高密度脂蛋白含量显著降低, 而总蛋白、低密度

脂蛋白、肌酐含量升高。饥饿 7 d 的日本螯血清总蛋白、葡萄糖、总胆固醇含量明显下降, 谷丙转氨酶、

碱性磷酸酶等酶活性显著降低, 而肌酐和尿素氮含量明显增加。

表 2 不同性别和发育阶段及饥饿 7 d 的日本螯血液生化指标

Tab. 2 Blood biochemical indices of male and female at different development stages in *Charybdis japonica* and the effects of starvation(mean±S.D)

指标	雄性()		雌性()			饥饿 7 d
	生长期	成熟期	生长期	成熟期	抱卵蟹	
总蛋白(g/L)	39.15±1.84 ^c	87.24±17.00 ^a	65.70±4.33 ^b	71.34±21.10 ^{ab}	82.56±12.29 ^{ab}	37.80±6.51 ^c
白蛋白(g/L)	4.08±0.22 ^b	7.76±1.50 ^a	6.78±0.56 ^a	7.14±1.88 ^a	7.94±1.05 ^a	3.68±0.64 ^b
球蛋白(g/L)	35.08±1.65 ^c	79.48±15.52 ^a	58.92±3.88 ^b	64.20±19.24 ^{ab}	74.62±11.26 ^{ab}	34.12±5.88 ^c
白球比	0.12±0.01 ^a	0.10±0.01 ^d	0.12±0.01 ^{ab}	0.11±0.01 ^{abc}	0.11±0.01 ^{cd}	0.11±0.01 ^{abc}
葡萄糖(mmol/L)	35.26±0.58 ^{cd}	37.64±0.44 ^{bcd}	41.00±1.54 ^b	50.10±8.40 ^a	39.14±1.00 ^{bc}	33.56±0.89 ^d
总胆固醇(mmol/L)	0.26±0.09 ^{bc}	0.38±0.08 ^b	0.34±0.89 ^b	0.84±0.18 ^a	0.84±0.05 ^a	0.16±0.05 ^c
甘油三酯(mmol/L)	0.11±0.02 ^c	0.18±0.04 ^c	0.26±0.10 ^c	1.28±0.30 ^a	0.91±0.28 ^b	0.09±0.02 ^c
高密度脂蛋白(mmol/L)	0.03±0.10 ^c	0.05±0.12 ^c	0.09±0.02 ^{bc}	0.34±0.18 ^a	0.18±0.09 ^b	0.02±0.01 ^c
低密度脂蛋白(mmol/L)	0.04±0.01 ^d	0.13±0.02 ^{bc}	0.11±0.04 ^c	0.15±0.02 ^b	0.23±0.03 ^a	0.02±0.01 ^d
谷丙转氨酶(U/L)	3.32±0.29 ^c	27.90±3.40 ^b	5.96±3.35 ^c	28.74±4.53 ^{ab}	35.18±11.04 ^a	2.14±0.43 ^c
谷草转氨酶(U/L)	8.16±0.43 ^d	92.26±7.80 ^a	14.76±7.91 ^d	75.02±13.26 ^b	49.52±14.99 ^c	4.48±0.57 ^d
谷草/谷丙	2.44±0.13 ^b	3.32±0.48 ^a	2.60±0.62 ^b	2.58±0.08 ^b	1.40±0.16 ^c	2.14±0.30 ^b
碱性磷酸酶(U/L)	5.30±1.20 ^b	2.30±0.67 ^b	19.90±8.42 ^a	3.00±1.22 ^b	5.20±1.04 ^b	1.50±0.50 ^b
谷氨酰氨转移酶(U/L)	0.44±0.05 ^b	0.34±0.05 ^{bc}	0.38±0.04 ^b	0.46±0.05 ^b	2.04±0.40 ^a	0.12±0.04 ^c
肌酐(μmol/L)	23.26±2.79 ^c	28.62±5.18 ^b	24.36±2.93 ^{bc}	27.02±4.79 ^{bc}	35.44±1.80 ^a	36.36±0.90 ^a
尿素氮(mmol/L)	0.76±0.15 ^b	0.30±0.12 ^d	0.46±0.11 ^c	0.24±0.05 ^d	0.24±0.05 ^d	1.06±0.15 ^a
尿酸(μmol/L)	56.48±4.37 ^{cd}	144.98±19.01 ^b	66.24±11.83 ^c	225.60±21.70 ^a	215.03±20.69 ^a	43.36±9.30 ^d

注: 单因子方差分析, 表中同一行数字上标不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 日本螯血细胞的类型、结构与功能

目前对甲壳动物血细胞的分类方法主要有两种: 一种是分 3 类^[12-14] - 透明细胞(或无颗粒细胞)、半颗粒细胞(或小颗粒细胞)和颗粒细胞(或大颗粒细胞); 另一种是分 4 类^[10,15] - 无颗粒细胞、小颗粒细胞、中间型细胞和大颗粒细胞。赵青松等^[5]通过显微观察, 将东海产日本螯的血细胞分成了无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞 3 种类型, 本研究认为黄海产日本螯的血细胞除了这 3 类血细胞外, 还存在着一种中间型细胞, 其颗粒大小从 0.1~0.9 μm 不等, 分别与小颗粒细胞和大颗粒细胞中的颗粒相似, 同周凯等^[10]对锯缘青蟹及陆宏达等^[15]对中华绒螯蟹的血细胞研究结论一致。

脊椎动物 B 淋巴细胞在接触抗原后, 会多次分裂并分化为浆细胞, 产生免疫球蛋白, 参与机体体液免疫^[16]。陈平等^[17]在研究对虾时发现了类似细胞的存在, 称之为“浆样细胞”, 认为其能合成原始的

免疫球蛋白, 具有体液免疫的萌芽。日本螯无颗粒细胞“核质比大”的特征类似于脊椎动物的淋巴细胞, 同时又具有浆细胞的特点 - 细胞核内异染色质呈斑块状、核糖体丰富, 且缺乏吞噬能力, 其功能值得深入研究。

3 类颗粒细胞均具有吞噬功能。从体外的血细胞和细菌孵育实验结果看, 以中间型细胞吞噬能力最强, 其次是大颗粒细胞、小颗粒细胞的吞噬能力相对较低。小颗粒细胞伸出的伪足较短小, 说明其主要是吞噬较小的物质。中间型细胞和大颗粒细胞的伪足粗大, 且胞质内含较多的液泡和消化残体, 结构特征与其较强的吞噬功能相符。

在细菌的刺激下, 可以观察到日本螯血细胞对细菌的吸附及血细胞凝集成团的现象。Smith 等^[18]认为甲壳类动物的血细胞在未受到感染等刺激的情况下, 大多数免疫因子如抗细菌蛋白、酚氧化酶等在血细胞内处于非活性状态, 受到感染等刺激后通过调节血细胞内物质的释放, 使这些免疫因子激活, 从而影响着血细胞团的形成和包裹的作用。日本螯

通过血细胞的凝集,对细菌进行吸附、包裹和吞噬,使细菌得以清除,显示了日本螯血细胞具有的非特异性免疫功能。

与从步足基部取得的血细胞相比,日本螯鳃中的血细胞表现出更为活跃的吞噬作用。鳃作为呼吸器官,鳃腔中的血窦与外界水环境只隔着一层上皮细胞,极易受到水体中细菌等病原的侵袭,所以鳃中血细胞较强的吞噬功能构成了蟹体抗感染的重要防线。

3.2 日本螯血液生化指标

对甲壳动物血液生化指标的研究报道较少。和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[19]相比,日本螯血清中的总蛋白、血糖和肌酐等含量较高,酶活性较低,两者总胆固醇、尿素氮的含量相近。

血浆中总蛋白及白蛋白等指标可反应机体营养和代谢状态^[20];胆固醇是皮质类激素和性激素的前体,和机体物质代谢、性腺发育密切相关^[21];血糖水平则受栖息环境、活动性及饵料等多种因素的影响^[22]。处于生长期的雌性日本螯血清中总蛋白、葡萄糖和总胆固醇含量均高于雄蟹,表明雌蟹性腺发育时,机体的代谢比雄蟹旺盛,且需要更多的营养物质,这和卵母细胞发育、卵黄大量合成积累有关。发育至成熟期,由于卵母细胞内对蛋白质的贮存,造成雄蟹血清的总蛋白含量反而高于雌蟹,但雌蟹较高的血糖和总胆固醇含量可以保证其繁殖活动对能量的需求及较高的激素水平。日本螯为分批产卵类型,雌蟹抱卵后,血清维持较高的总蛋白和总胆固醇含量可以给卵巢的进一步发育提供充足的营养来源。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)雌性血淋巴总蛋白水平成熟后会显著下降^[23],而本研究发现雌性日本螯成熟后的血清总蛋白会略有升高,可能与种类差异有关。一般认为甲壳动物体液不具有免疫球蛋白,缺乏抗体介导的免疫反应^[2]。本实验在日本螯血清中测出了球蛋白,三疣梭子蟹的血清中也发现有球蛋白^[19]。随着生长发育的进展,日本螯血清中球蛋白含量有一定升高,其球蛋白特性及免疫机制有待于进一步研究。

3.3 饥饿对日本螯血液的影响

日本螯饥饿 7 d 后,血清总蛋白、球蛋白、葡萄糖、总胆固醇含量及血细胞密度等明显下降,谷丙转氨酶、碱性磷酸酶等酶活性亦显著降低,表明其代谢

强度及免疫力均减弱。鱼类饥饿后的血液生化指标变化规律有一定差异,奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)饥饿 1 周后红细胞、葡萄糖和甘油三酯含量下降显著,但血清总蛋白下降不明显,至饥饿 2 周后才显著下降^[24];而鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)饥饿 1 周后的血清总蛋白甚至有所增加,第 2 周回落,至第 4 周才显著下降^[25]。这可能是因为鱼类比蟹类贮存有较多的糖原和脂肪,饥饿时动物首先动用的是血糖,然后是脂类,最后是蛋白,所以饥饿初期鱼类的血清总蛋白含量没有明显下降。肌酐是肌酸和磷酸肌酸代谢最终产物,其含量与肌肉活动量相关^[20]。饥饿后的日本螯血清中肌酐含量升高,可能是其觅食活动增加所致。

致谢:中国海洋大学海洋生命学院姜明老师和青岛医学院电镜室谭金山老师对本工作给予大力支持和帮助,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] Soderhall K, Cerenius L. Crustacean immunity[J]. Ann Rev Fish Dis, 1992, 2: 3-23.
- [2] 徐海胜,徐步进. 甲壳动物细胞及体液免疫机理的研究进展[J]. 大连水产学院学报, 2001, 16(1): 49-56.
- [3] 梁象秋,方纪祖,杨和荃. 水生生物学[M]. 北京:中国农业出版社, 1996: 360.
- [4] 王春琳,陈建青,叶晓园,等. 日本螯的营养成分组成分析[J]. 营养学报, 2005, 27(1): 81-83.
- [5] 赵青松,陈惠群,王春琳,等. 日本螯血淋巴细胞的初步研究[J]. 水利渔业, 2005, 25(3): 13-14.
- [6] 张红霞,潘鲁青,刘静. 重金属离子对日本螯血淋巴抗氧化酶(SOD, CAT, GPx)活力的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(增刊): 49-53.
- [7] Fan T J, Zhang Y N, Yang L L, et al. Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenoloxidase from the crab *Charybdis japonica*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 2009, 152: 144-149.
- [8] 樊廷俊,于苗苗,杨玲玲,等. 四种免疫促进剂对日本螯酚氧化酶和血细胞的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(3): 421-428.
- [9] 许星鸿,阎斌伦,郑家声,等. 日本螯的性腺发育和生殖周期[J]. 海洋湖沼通报, 2010, 39(3): 29-36.
- [10] 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): 212-216.
- [11] 周晖,陈刚. 鱼类和虾蟹血细胞染色方法[J]. 海洋与渔业, 2006, 7: 14-36.
- [12] Bauchau A G. Crustaceans. Invertebrate blood cells[M]. New York: Academic Press, 1981: 2 385-2 420.
- [13] 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.
- [14] 李广友, 王青. 中国对虾血细胞及其免疫研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 22(6): 591-560.
- [15] 陆宏达. 中华绒螯蟹血细胞的显微、亚显微形态结构及分类[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 494-500.
- [16] 李霞. 水产动物组织胚胎学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 33, 54.
- [17] 陈平, 黄槐, 池信才, 等. 四种对虾血细胞组成及超微结构[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 158-163.
- [18] Smith V J, Brown J H, Hauton C. Immunostimulation in crustacean: does it really protect against infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 15: 71-79.
- [19] 陈惠群, 金珊, 王国良, 等. 三疣梭子蟹血淋巴细胞及血液生化指标的初步研究[J]. 水产科学, 2004, 23(6): 1-4.
- [20] 刘红柏, 黄江, 马爱枝, 等. 中草药复方添加剂对施氏鲟生长及血液生化指标的影响[J]. 水产学杂志, 2009, 22(3): 14-19.
- [21] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. //北京: 高等教育出版社, 1996. 200.
- [22] 张涛, 章龙珍, 赵峰, 等. 基于血液生化指标判别分析西伯利亚鲟性别及卵巢发育时期[J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 236-246.
- [23] 吴敏嘉, 姜耀新. 中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺的总蛋白含量与性早熟的关系[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 306-311.
- [24] 骆作勇, 王雷, 王宝杰, 等. 不同投喂模式对奥利亚罗非鱼血液生化指标与生长性能的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 743-748.
- [25] 钱云霞, 陈惠群, 孙江飞, 等. 饥饿对养殖鲈鱼血液生理生化指标的影响[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 133-137.

Hemocytes and blood biochemical characterization of *Charybdis japonica*

XU Xing-hong¹, YAN Bin-lun¹, ZHENG Jia-sheng², SHAO Ying-ze¹, XU Jia-tao¹, XU Guo-cheng¹, ZHOU Meng¹, ZHOU Li¹

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Jun., 26, 2010

Key words: *Charybdis japonica*; hemocyte; blood biochemical value; phagocytic capacity; starvation

Abstract: In order to provide data for tissue pathology, disease control, and reproductive physiological research of *Charybdis japonica*, this paper reported the hemocytes and the blood biochemical characterization of *Charybdis japonica*. With light and electronic microscopes, four types of hemocytes, including agranular hemocyte (AG), small granular hemocyte (SG), intermediate granular hemocyte (IG) and large granular hemocyte (LG), were classified according to their granular existence, granular size, refractivity, staining characters, and nuclear-cytoplasmic ratio. The nuclear-cytoplasmic ratios were 53.23%(AG), 33.64%(SG), 24.50%(IG) and 19.45% (LG), respectively. Among these hemocytes, the percentages of AG, SG, IG and LG were 4.78%, 42.69%, 36.57%, and 15.96%, respectively. The female crab had higher density of hemocytes than the male, but there was no significant difference in cell size. The phagocytic capacity of hemocytes from strong to weak were IG, LG and SG. AG had no phagocytic capacity. The hemocytes in gill had big pseudopodia and abundant residual body suggesting they could be more active in phagocytosis. In the developing phase, the values of total protein(TP), glucose(GLU) and cholesterol(CHOL) of female were higher than those of male, but the male crabs in maturation had more TP than the female. After spawning, the female crabs could maintain high levels of TP and CHOL. After starvation for seven days, the values of density of hemocytes, TP, GLU, and CHOL decreased obviously and there were lower activities of alanine aminotransferase(ALT) and alkaline phosphatase(ALP) than before, but the levels of creatinine(CREA) and urea nitrogen(BUN) increased. Globin was found in the blood serum of *Charybdis japonica*.

(本文编辑: 谭雪静)