

杂色鲍血细胞分类、结构和免疫功能的流式细胞术分析

洗健安^{1,2}, 钱坤², 郭慧³, 王冬梅¹, 张秀霞¹, 苗玉涛², 潘训彬², 王安利²

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101; 2. 华南师范大学 生命科学学院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室, 生态与环境科学广东普通高校重点实验室, 广东 广州 510631; 3. 广东海洋大学 水产学院, 南海水产经济动物增养殖广东普通高校重点实验室, 广东 湛江 524025)

摘要: 应用流式细胞术对杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)血细胞的分类、结构和免疫功能进行分析。根据细胞前向角散射光(FSC)和侧向角散射光(SSC)强度的不同, 可将血细胞分为三个亚群: 透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞, 组成比例分别为 32.71%、58.17%和 8.55%。血细胞的平均总凋亡和死亡率为 3.76%。血细胞对荧光微球的总吞噬率为 63.67%, 其中吞噬 1 个、2 个、3 个及以上荧光微球的血细胞分别占 22.31%、16.39%、24.96%。线粒体数量、溶酶体数量、非特异性酯酶活性和非诱导性活性氧(ROS)含量均在大颗粒细胞中最高, 透明细胞最低。结果表明, 杂色鲍三类血细胞在结构和功能上均存在差异, 两类颗粒细胞可能在鲍类免疫过程中发挥着更为重要的作用。

关键词: 杂色鲍; 流式细胞术; 血细胞; 免疫

中图分类号: S917.4; Q952 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)12-0008-07

doi: 10.11759/hyhx20150120001

杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)是我国南方重要的名贵海水水产品。近年来, 由于鲍类疾病的肆虐, 鲍类养殖业遭受严重的经济损失, 迫切需要对鲍类的免疫及病理学进行深入研究。鲍类只有先天性异性免疫功能, 血细胞在其细胞免疫和体液免疫过程中均起着十分重要的作用, 如对病原体进行吞噬和包裹, 释放各类抗菌因子等^[1]。目前鲍类血细胞的研究仍相对滞后, 主要还集中在血细胞的分类和结构研究上^[2-5], 对各类血细胞的具体功能和相互作用仍知之甚少。研究滞后的其中一个主要原因是受限于研究技术, 对血细胞在细胞水平上的研究一直依赖于各类显微镜。流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)是早在 20 世纪 70 年代发展起来的, 对细胞的物理和化学性质进行快速检测的技术, 具有客观准确、快速、同时测定多个指标等优点, 在临床上的应用已十分广泛, 近年来已逐步应用到水产无脊椎动物如虾类^[6-8]和双壳类^[9-12]的研究中, 但在鲍类血细胞上的研究仍甚少^[13-14]。本研究应用 FCM 分析杂色鲍血细胞的分类、结构和免疫功能, 为进一步研究鲍类血细胞免疫以及病害防治研究提供基础资料, 并建立一套快捷、准确的鲍类血细胞指标的 FCM 检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)购自广州黄沙水产品市场, 规格为壳长 6~7cm, 于实验室海水(盐度 30, 温度 20~22℃)中充气暂养 1 周, 暂养期间定时投喂海带, 清理残饵和粪便。

二乙酸荧光素(FDA)和 2', 7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA)购自 Sigma 公司, Annexin V-FITC/PI(碘化丙啶)凋亡检测试剂盒、LysoTracker Red、MitoTracker Green 和黄绿色荧光微球(yellow-green fluorescent carboxylate-modified FluoSpheres® beads, 直径 1 μm)购自 Invitrogen 公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.2 血细胞悬液的制备

采用腹足创伤法取鲍血淋巴, 用过滤无菌海水

收稿日期: 2015-01-20; 修回日期: 2015-04-27

基金项目: 广东省自然科学基金项目(S2012040008093); 中国热带农业科学院热带生物技术研究所基本科研业务费专项资金(ITBB2015ZY01 和 ITBB2015ZD03)

作者简介: 洗健安(1983-), 男, 博士, 助理研究员, 主要研究方向: 水产养殖生态及毒理学, 水产动物营养与饲料学, 电话: 0898-66892338, E-mail: xian-ja@163.com; 王安利(1957-), 通信作者, 男, 博士, 教授, 主要研究方向: 水产健康养殖, 电话: 020-85210141, E-mail: wanganl@scnu.edu.cn.

以 1:1 稀释, 此时细胞密度约为 10^6 个/mL。共测定 10 只鲍, 每个个体的稀释血淋巴作为一单独样品进行测定。

1.3 流式细胞仪

流式细胞仪为美国 BD(Becton Dickinson)公司 FACSCalibur, 应用 CellQuest 软件进行实验数据的获取和分析。前向角散射光(Forward light scatter, FSC)反映细胞大小, 侧向角散射光(Side light scatter, SSC)反映细胞颗粒复杂度; FITC(异硫氰酸荧光素)、MitoTracker Green、黄绿色荧光微球、FDA 和 DCF(2', 7'-二氯荧光黄)的绿色荧光用第一荧光通道(FL1)检测, PI 和 LysoTracker Red 的红色荧光用第二荧光通道(FL2)检测。

1.4 血细胞分类与组成比例

稀释血淋巴用 200 目筛网过滤后直接上机进行检测, 每个样品的细胞获取数为 10 000 个。以 SSC 为横坐标、FSC 为纵坐标作散点图, 在 SSC-FSC 散点图上设门划分各个细胞亚群, 分析各类血细胞所占的比例。

1.5 血细胞凋亡率

以 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测血细胞的自然凋亡率。血淋巴取出后, 立即进行离心然后重悬于 1x Annexin V 结合缓冲液中, 调整细胞浓度约 3×10^6 个/mL, 每 100 μ L 血细胞悬液加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI 工作液, 避光染色 15 min, 再加入 400 μ L 1x Annexin V 结合缓冲液, 200 目筛网过滤后立即上机检测, 每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 Annexin V-FITC 荧光强度(FL1)为横坐标, PI 荧光强度(FL2)为纵坐标的散点图显示。如图 2, 用十字门划分各类细胞的区域: 活细胞(Annexin V-FITC-/PI-)位于象限 a, 前期凋亡细胞(Annexin V-FITC+/PI-)位于象限 b, 后期凋亡细胞和死细胞(Annexin V-FITC+/PI+)位于象限 c, 分析各象限细胞占总细胞数的比例。细胞总凋亡和死亡率为前期凋亡、后期凋亡和死亡细胞(象限 b+c)所占的比例。为避免血细胞离体时间过长对结果造成影响, 从样品制备到上样的整个过程应尽量控制在 30 min 以内。

1.6 吞噬活性

以黄绿色荧光微球作为被吞噬物测定血细胞的吞噬活性。分别取血细胞悬液 400 μ L, 加入 10 μ L

浓度为 1/10 的微球稀释液, 室温避光孵育 1 h, 用 200 目筛网过滤后上机检测, 每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 FL1 荧光量为横坐标, 细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示, 以标尺划定吞噬微球的区域, 分析吞噬不同数量微球的细胞占总细胞数的比例。

1.7 线粒体数量

应用 MitoTracker Green 作为线粒体的特异性荧光探针, MitoTracker Green 对于线粒体的染色不依赖于线粒体膜电位。取血细胞悬液 200 μ L, 加入 50 nmol/L MitoTracker Green 室温避光孵育 30 min, 用 200 目筛网过滤后上机检测, 每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 MitoTracker Green 荧光量(FL1)为横坐标, 细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示。根据 SSC-FSC 散点图中划分的血细胞亚群, 作不同类型血细胞的 MitoTracker Green 直方图, 分析不同类型血细胞的 MitoTracker Green 平均荧光量, 细胞的 MitoTracker Green 荧光量与线粒体数量成正比。

1.8 溶酶体数量

应用 LysoTracker Red 作为溶酶体的特异性荧光探针, 它是 DND99 进行了荧光标记的带有弱碱性的荧光探针, 可以选择性地滞留在偏酸性的溶酶体中, 从而实现对于溶酶体的特异性荧光标记。取血细胞悬液 200 μ L, 加入 50 nmol/L LysoTracker Red 室温避光孵育 60 min, 用 200 目筛网过滤后上机检测, 每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 LysoTracker Red 荧光量(FL2)为横坐标, 细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示。根据 SSC-FSC 散点图中划分的血细胞亚群, 作不同类型血细胞的 LysoTracker Red 直方图, 分析不同类型血细胞的 LysoTracker Red 平均荧光量, 细胞的 LysoTracker Red 荧光量与溶酶体数量成正比。

1.9 非特异性酯酶活性

以 FDA 为标记探针检测非特异性酯酶活性的变化。取血细胞悬液 200 μ L, 加入 5 μ mol/L FDA 室温避光孵育 30 min, 经 200 目筛网过滤后上机检测, 每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 FDA 荧光量(FL1)为横坐标, 细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示。根据 SSC-FSC 散点图中划分的血细胞亚群, 作不同类型血细胞的 FDA 直方图, 分析不同类型血细胞的 FDA 平均荧光量, 细胞的 FDA 荧光量与非特异性酯酶活性成正比。

1.10 活性氧(ROS)含量

以 DCFH-DA 为标记探针检测 ROS 含量的变化。取血细胞悬液 200 μ L, 加入 10 μ mol/L DCFH-DA 室温避光孵育 30 min, 经 200 目筛网过滤后上机检测, 每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 DCF 荧光量 (FL1) 为横坐标, 细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示。根据 SSC-FSC 散点图中划分的血细胞亚群, 作不同类型血细胞的 DCF 直方图, 分析不同类型血细胞的 DCF 平均荧光量, 细胞的 DCF 荧光量与 ROS 含量成正比。

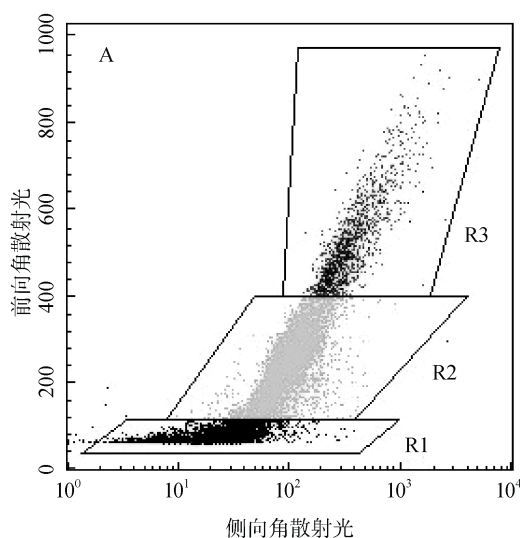
1.11 统计分析

结果显示为平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD), 实验数据利用 SPSS 13.0 进行 Tukey 单因素方差分析, $P < 0.05$ 确认为差异性显著。

2 结果

2.1 血细胞分类与组成比例

图 1A 为血细胞散点图, 图 1B 为等高图。在等



高图中, 细胞密度相同的点连成一环线, 处于中央位置的闭合等高线圈为某类细胞最集中的区域, 据此定义为一类细胞, 将该区域进行划定。如图 1 所示, 根据血细胞 FSC 和 SSC 特征的不同, 可把杂色鲍血细胞划分为三个亚群: R1, R2 和 R3。亚群 R1 的 FSC 和 SSC 值都相对最小, 表明该亚群的细胞最小, 颗粒复杂度也最低, 为透明细胞; R3 亚群细胞的 FSC 和 SSC 值都相对最大, 表明该亚群的细胞最大, 颗粒复杂度也最高, 为大颗粒细胞。R2 亚群的细胞大小和颗粒复杂度处于 R1 和 R3 亚群之间, 为小颗粒细胞。各类细胞的 FSC 和 SSC 强度见表 1, 不同个体的大颗粒细胞的比例有较大的差异, 如图 1 所示, A 图的大颗粒细胞(R3)较少, B 图的较多; 其组成比例的结果见表 2, 顺序为: 小颗粒细胞>透明细胞>大颗粒细胞, 三类细胞之间的比例存在显著差异 ($P < 0.05$)。

2.2 细胞凋亡率

图 2 为杂色鲍新鲜血细胞 Annexin V-FITC/PI 凋

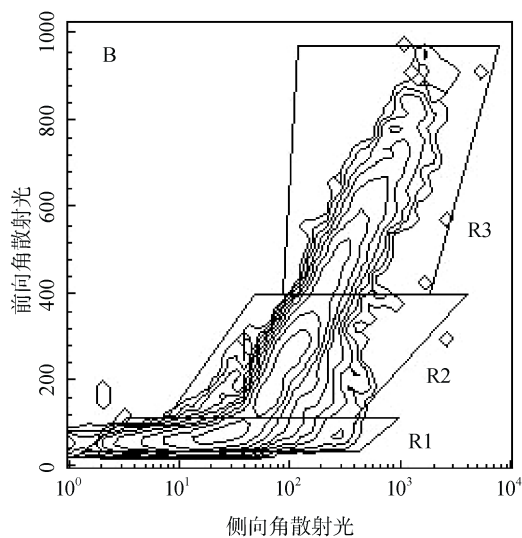


图 1 杂色鲍血细胞 SSC-FSC 散点图(A)和等高图(B)

Fig.1 SSC-FSC dot plot (A) and contour plot (B) of *H. diversicolor* hemocytes

R1. 透明细胞; R2. 小颗粒细胞; R3. 大颗粒细胞
R1. Hyalinocyte; R2. Small granulocyte; R3. Large granulocyte

表 1 杂色鲍 3 类血细胞的大小和颗粒复杂度(A.U.)

Tab.1 Size and granular complexity of three hemocyte subpopulations from *H. diversicolor* (A.U.)

细胞类型	大小(FSC 强度)			颗粒复杂度(SSC 强度)		
	平均值	最小值	最大值	平均值	最小值	最大值
透明细胞(R1)	77.98 \pm 2.00 ^c	75.13	81.02	28.24 \pm 4.35 ^c	20.03	33.62
小颗粒细胞(R2)	224.73 \pm 11.15 ^b	203.93	236.47	106.98 \pm 9.81 ^b	96.38	128.04
大颗粒细胞(R3)	509.42 \pm 11.95 ^a	493.86	527.23	439.04 \pm 42.46 ^a	372.61	512.40

注: 同一列数值右上方的不同字符表示差异性显著($P < 0.05$), $n = 10$ 。下同

表 2 杂色鲍 3 类血细胞的组成比例(%)

Tab.2 Proportion of three hemocyte subpopulations from *H. diversicolor* (%)

细胞类型	平均值	最小值	最大值
透明细胞(R1)	32.71±7.18 ^b	23.21	47.12
小颗粒细胞(R2)	58.17±5.53 ^a	48.91	64.85
大颗粒细胞(R3)	8.55±2.68 ^c	4.20	12.16

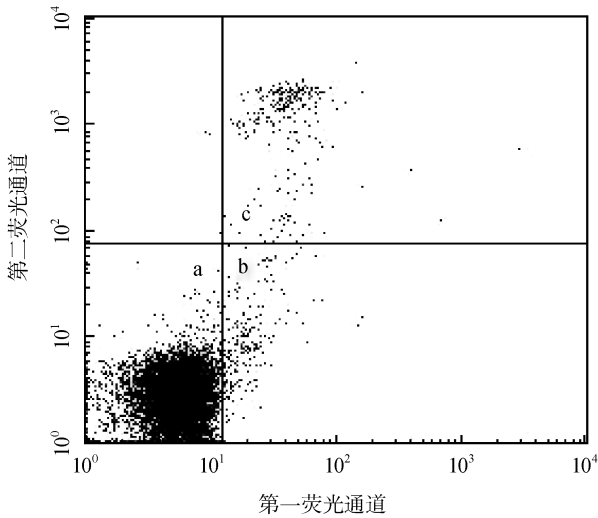


图 2 杂色鲍血细胞 Annexin V-FITC/PI 染色凋亡散点图
Fig.2 Apoptosis dot plot of *H. diversicolor* hemocytes stained with Annexin V-FITC and PI

象限 a(Annexin V-FITC-/PI-). 活细胞; 象限 b(Annexin V-FITC+/PI-). 前期凋亡细胞; 象限 c (Annexin V-FITC+/PI+). 后期凋亡和死亡细胞

Quadrant a (Annexin V-FITC-/PI-) live cells; quadrant b (Annexin V-FITC+/PI-) early apoptotic cells; quadrant c (Annexin V-FITC+/PI+) late apoptotic and necrotic cells

亡染色散点图。测定了 10 只杂色鲍的血细胞自然凋亡率, 结果见表 3, 其平均总凋亡和死亡率为 3.76%。

表 3 杂色鲍血细胞凋亡率(%)

Tab.3 Apoptotic ratio of *H. diversicolor* hemocytes (%)

细胞类型	平均值	最小值	最大值
前期凋亡细胞(象限 b)	1.27±0.47	0.68	1.93
后期凋亡和死亡细胞(象限 c)	2.49±0.75	1.35	3.57
总凋亡和死亡细胞(象限 b+c)	3.76±1.10	2.17	5.49

注: n=10

2.3 吞噬活性

杂色鲍血细胞吞噬荧光微球的直方图如图 3 所示, 从图上可以清晰区分吞噬 1 个、2 个、3 个及以上荧光微球的血细胞, 第一个峰为吞噬 1 个荧光微球的血细胞(记为 M1), 第二个峰为吞噬 2 个荧光微

球的血细胞(记为 M2), 其后为吞噬 3 个及以上荧光微球的血细胞(记为 M3), M4 为吞噬了 1 个及以上荧光微球的血细胞。血细胞的吞噬活性如表 4 所示, 吞噬 1 个微球的血细胞占 22.31%; 吞噬 2 个微球的血细胞占 16.39%, 个体差异较大, 最低只有 8.17%, 最高可达 21.76%; 吞噬 3 个及以上微球的血细胞占 24.96%; 总吞噬率为 63.67%。

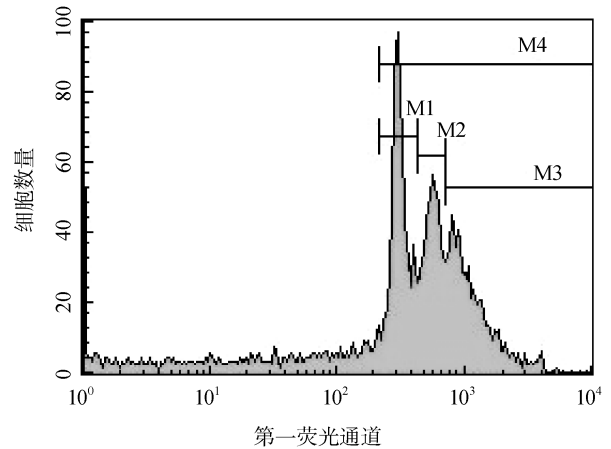


图 3 杂色鲍血细胞吞噬荧光微球的直方图

Fig.3 Distribution histogram of *H. diversicolor* hemocytes phagocytosed fluorescent beads

M1. 吞噬 1 个荧光微球的血细胞区域; M2. 吞噬 2 个荧光微球的血细胞区域; M3. 吞噬 3 个及以上荧光微球的血细胞区域; M4. 吞噬 1 个及以上荧光微球的血细胞区域

M1, region of one hemocyte phagocytosed fluorescent bead; M2, region of two hemocytes phagocytosed fluorescent beads; M3, region of three or more hemocytes phagocytosed fluorescent beads; M4, region of one or more hemocytes phagocytosed fluorescent beads

表 4 杂色鲍血细胞的吞噬活性(%)

Tab.4 Phagocytic activity of *H. diversicolor* hemocytes (%)

吞噬活性	平均值	最小值	最大值
吞噬 1 个微球(M1)	22.31±4.73	15.74	28.80
吞噬 2 个微球(M2)	16.39±4.60	8.17	21.76
吞噬 3 个及以上微球(M3)	24.96±4.57	20.03	31.64
总吞噬率(M4)	63.67±8.51	54.32	75.17

注: n=10

2.4 线粒体数量和溶酶体数量

结果如表 5 所示, 线粒体和溶酶体的数量均在大颗粒细胞中最多, 小颗粒细胞次之, 透明细胞最少。大颗粒细胞的线粒体数量约为小颗粒细胞的 3.4 倍, 透明细胞的 10.4 倍; 大颗粒细胞的溶酶体数量约为小颗粒细胞的 3.7 倍, 透明细胞的 10.2 倍。三类细胞线粒体数量和溶酶体数量均存在显著差异 ($P<0.05$)。

表 5 杂色鲍 3 类血细胞的生理特征

Tab.5 Physiological characteristics of three hemocyte subpopulations from *H. diversicolor* (A.U.)

细胞类型	线粒体数量	溶酶体数量	非特异性酯酶活性	ROS 含量
透明细胞(R1)	16.15±4.45 ^c	18.28±7.40 ^c	32.04±5.71 ^c	16.72±4.31 ^c
小颗粒细胞(R2)	50.08±2.89 ^b	50.28±8.04 ^b	142.08±14.98 ^b	105.39±11.10 ^b
大颗粒细胞(R3)	167.83±49.77 ^a	187.17±15.55 ^a	170.36±16.08 ^a	286.30±18.36 ^a

2.5 非特异性酯酶活性和 ROS 含量

结果如表 5 所示, 酯酶活性在大颗粒细胞中最高, 小颗粒细胞次之, 透明细胞最低; 大颗粒细胞约为小颗粒细胞的 1.2 倍, 透明细胞的 5.3 倍。ROS 含量在大颗粒细胞中最多, 小颗粒细胞次之, 透明细胞最少; 大颗粒细胞约为小颗粒细胞的 2.7 倍, 透明细胞的 17.1 倍。三类细胞线粒体数量和溶酶体数量均存在显著差异($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 鲍类血细胞的分类

对于鲍类血细胞的分类, 目前仍没有统一的标准。根据细胞含有颗粒的情况以及细胞大小, 可以基本分为两大类: 颗粒细胞和无颗粒细胞(或称透明细胞)。王江勇等^[5]根据细胞大小、颗粒组成特征等将杂色鲍血细胞分为颗粒细胞和无颗粒细胞。张剑诚等^[15]也将皱纹盘鲍(*H. discus hannai*)血细胞分为颗粒细胞和透明细胞两大类。Sahaphong 等^[16]应用光镜和电镜观察认为耳鲍(*H. asinina*)血细胞可分为颗粒细胞和透明细胞。饶小珍等^[3]把九孔鲍(*H. diversicolor supertexta*)血细胞分为大细胞、中等细胞和小细胞; 透射电镜下血细胞可分为两类: 颗粒细胞对应于光镜下的大细胞和中等细胞; 无颗粒细胞对应于光镜下的小细胞。有的学者根据血细胞的一些超微结构特征, 将血细胞类型分得更细致。李太武等^[2]观察杂色鲍血细胞的超微结构, 认为除了颗粒细胞和透明细胞外, 还有一种胞质电子密度高、数量最少的小细胞。陈全震等^[4]通过对皱纹盘鲍血细胞的超微结构的观察, 将颗粒细胞分为大颗粒细胞、小颗粒细胞和特殊颗粒细胞, 无颗粒细胞分为透明细胞和淋巴样细胞。一些外国学者只观察到少量颗粒细胞, 有的研究甚至没有发现颗粒细胞。Travers 等^[17]应用显微观察和流式细胞术对欧洲鲍(*H. tuberculata*)血细胞进行了分类研究, 均认为其血细胞主要由透明细胞和浆样细胞组成, 只发现有极少量的颗粒细胞, 其中浆样细胞占 10%。Donaghy 等^[14]也应用显微观察和流式细胞术对盘鲍(*H. discus discus*)血细胞分类

进行了研究, 结果认为血细胞由透明细胞和浆样细胞组成, 应用此两种方法得出浆样细胞所占比例分别为 3.82%和 6.75%。本研究应用流式细胞术, 根据血细胞大小和颗粒复杂度的差异, 可将血细胞清晰地分为三个类群: 大颗粒细胞、小颗粒细胞和透明细胞, 与饶小珍等^[3]对九孔鲍研究的结果相似。比较流式细胞术和显微观察两种分类方法, 显微观察需要对血细胞进行染色处理, 染色效果对后续观察有较大的影响, 血细胞类型的鉴定也受观察者的主观判定影响。相对而言, 流式细胞术检测量大, 数据较为客观、准确, 还具有快速简便、可同时进行计数或荧光分析等优点, 但关于血细胞类型的划定, 对研究人员的分析水平要求也较高。

3.2 鲍类血细胞的组成比例

对于鲍类血细胞的组成比例, 以往的研究结果也存在一定的差异。王江勇等^[5]研究认为杂色鲍的颗粒细胞和无颗粒细胞分别占 55.1%和 44.9%; 张剑诚等^[15]测得皱纹盘鲍的颗粒细胞和透明细胞分别占 40%和 60%; 饶小珍等^[3]观察得出九孔鲍的大细胞(颗粒细胞)、中等细胞(颗粒细胞)和小细胞(无颗粒细胞)分别占 3.6%、91.7%和 4.7%; 本研究分析得出杂色鲍的大颗粒细胞、小颗粒细胞和透明细胞分别占 8.55%、58.17%和 32.71%。

不同类型的血细胞在功能上存在一定的差异, 血细胞组成比例可能反映了机体的不同生理和免疫状态。研究发现杂色鲍经病毒注射感染后, 其颗粒细胞比例从初始的 55%到感染 6 h 后增加至 67%, 然后逐渐下降, 至感染 36 h 降到 45%; 而无颗粒细胞从初始的 45%下降到感染 6 h 的 33%, 然后逐渐增加, 至感染 36 h 升至 55%^[18]。因此, 以往的研究得到差异较大的结果, 可能与物种种类、大小、环境因素和健康状态等有关。

3.3 血细胞的结构

血细胞结构的差异是区分不同类型血细胞的主要依据之一。李太武等^[2]应用电镜观察发现杂色鲍颗粒细胞的胞质电子密度较高, 含有较多颗粒以及细胞器, 如线粒体、内质网、高尔基体、溶酶体等, 而

透明细胞的细胞器较少。饶小珍等^[3]也发现九孔鲍的颗粒细胞胞质含有丰富的细胞器, 有较多的线粒体、内质网等, 而无颗粒细胞则只有少量线粒体和粗面内质网。本研究中, 应用特异性的探针对血细胞的线粒体和溶酶体进行标记从而分析其数量, 结果显示这两类细胞器均在大颗粒细胞中最多, 小颗粒细胞次之, 透明细胞中最少, 与以往超微观察的研究报道一致^[2-3]。细胞器的多寡从侧面反映了各类血细胞在功能上也存在差异。两类颗粒细胞的线粒体较多, 表明它们的生理代谢过程更为活跃, 包括免疫酶类的合成、吞噬作用以及脱颗粒等耗能过程; 较多的溶酶体表明两类颗粒细胞对异物、病原体以及坏死细胞等的清除能力更强, 在免疫过程中担当更为重要的角色。

3.4 血细胞的免疫功能

细胞凋亡是机体正常细胞在受到生理和病理性刺激后出现的一种自发的死亡过程。本研究发现, 正常杂色鲍的血细胞中也可检测到一定的凋亡细胞, 这是机体正常新陈代谢的表现, 在虾类的研究中有相似的结果^[7]。另有研究发现, 贝类在受到环境污染胁迫后, 血细胞会受到毒性损伤, 从而被诱导发生凋亡^[12, 19], 虽然细胞凋亡是机体清除损伤细胞的重要过程, 但血细胞凋亡率的持续上升可能会引起血细胞数量的下降, 从而导致机体免疫力下降, 甚至危及生命^[20]。可见, 血细胞凋亡在环境毒理学和免疫学研究中都是一个重要的敏感指标, 在往后的研究中可加以重视。

吞噬作用是血细胞的主要免疫功能之一, 对异物、病原体以及自身的坏死细胞、碎片等进行清除。由于流式细胞术具有准确、快捷、重复性高等优点, 已被应用于多种贝类血细胞吞噬作用研究中^[9, 13-14, 21]。本研究根据预实验所建立的测定条件, 对杂色鲍血细胞的总体吞噬情况进行分析, 结果显示总吞噬率为 54.32%~75.17%, 吞噬一个微球的血细胞占 15.74%~28.80%。有的国外学者认为为了减少非特异性粘附所带来的误差, 应以吞噬三个及以上微球的血细胞的比例来衡量吞噬活性^[9, 14, 21], 本研究中测得该比例达到了 20.03%~31.64%, 可见本研究的测定条件同样适用于此衡量标准。大部分贝类研究报告认为吞噬作用主要由颗粒细胞完成, 透明细胞也具有一定的吞噬能力^[22-23]。在本研究中, 由于血细胞进行吞噬作用, 细胞发生了变形, 其大小和颗粒度发生不同程度的改变, 另外由于吞噬过程被激活, 血细胞的脱颗粒免疫反应也可能被进一步激活, 也对血细胞的大小和颗粒复杂度产生影响, 从而在

FSC-SSC 散点图中难以区分各类血细胞, 因此本研究未能对不同类型血细胞的吞噬活性进行分析。

非特异性酯酶普遍存在于各类细胞中, 是溶酶体酶类之一, 参与对异物、病原体的杀伤及清除。细胞化学研究显示九孔鲍各类血细胞中均含有非特异性酯酶, 总阳性率达 86.3%^[3]。本研究通过流式细胞术分析, 也表明杂色鲍各类血细胞均具有非特异性酯酶活性, 且在各类血细胞中存在差异, 两类颗粒细胞显著高于透明细胞, 此结果与溶酶体数量的结果相吻合。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)包括超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基($\cdot OH$)等, 是机体进行防御杀菌的重要物质。血细胞在自然生理条件下也存在一定量的 ROS, 当病菌入侵时, ROS 含量会迅速上升, 以进行免疫杀菌, 此过程称为呼吸爆发^[23]。研究表明鲍类血细胞经细菌、病毒或抗原物质刺激后, 均会产生大量的 ROS 进行免疫防御^[15, 18, 24]。本研究对自然生理状态下杂色鲍各类血细胞的非诱导性 ROS 含量进行比较, 结果显示大颗粒细胞的 ROS 含量最多, 小颗粒细胞次之, 透明细胞最少。线粒体数量、溶酶体数量、非特异性酯酶以及 ROS 含量均得到了一致的结果, 表明两类颗粒细胞在鲍类的免疫防御过程中可能发挥更为重要的作用。

参考文献:

- [1] 黄勇超, 刘志昕. 鲍非特异性免疫研究进展[J]. 水产科学, 2008, 27(1): 51-54.
- [2] 李太武, 李晔, 苏秀榕. 杂色鲍的血细胞[J]. 水产学报, 2007, 31(增刊): 12-17.
- [3] 饶小珍, 陈寅山, 林岗, 等. 九孔鲍血细胞的研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2007, 23(3): 71-76.
- [4] 陈全震, 杨俊毅, 王小谷, 等. 皱纹盘鲍血细胞的亚显微结构及分类研究[J]. 水产学报, 2001, 25(6): 492-494.
- [5] 王江勇, 郭志勋, 冯娟, 等. 杂色鲍血细胞的分类及显微与超微结构研究[J]. 台湾海峡, 2008, 27(2): 156-160.
- [6] 洗健安, 苟妮娜, 陈晓丹, 等. 流式细胞术检测虾类血细胞活性氧含量方法的建立[J]. 海洋科学, 2012, 36(2): 29-33.
- [7] 洗健安, 王安利, 苗玉涛. 流式细胞术在克氏原螯虾血细胞的分类、活性和免疫功能中的应用[J]. 淡水渔业, 2012, 42(1): 9-14.
- [8] 洗健安, 王安利. 饲料中铜离子对斑节对虾血细胞组成、活性和免疫功能的影响[J]. 海洋科学, 2013, 37(2): 40-46.
- [9] Bado-Nilles A, Gagnaire B, Thomas-Guyon H, et al. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22(6): 1610-1617.
- [10] Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, et al. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure

- to heavy metals[J]. *Toxicology*, 2000, 142: 145-156.
- [11] Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16: 501-512.
- [12] 王清, 杨红生, 王晓宇. 镉和苯并芘胁迫对文蛤血细胞功能的影响[J]. *海洋科学*, 2010, 34(9): 82-86.
- [13] 李进寿, 陈军, 唐艳霞, 等. 利用流式细胞仪技术研究杂色鲍血细胞的吞噬率[J]. *台湾海峡*, 2010, 29(4): 460-465.
- [14] Donaghy L, Hong H, Lambert C, et al. First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28: 87-97.
- [15] 张剑诚, 张峰, 王吉桥. 皱纹盘鲍血细胞分类及活性氧产生机理的研究[J]. *大连水产学院学报*, 2004, 19(3): 182-188.
- [16] Sahaphong S, Linthong V, Wanichano C, et al. Morphofunctional study of the hemocyte of *Haliotis asinina*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2001, 20(1): 51-54.
- [17] Travers M, da Silva P M, Goic N L, et al. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24: 400-411.
- [18] 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.
- [19] 刘静, 潘鲁青, 朱现晔. 苯并(a)芘对栉孔扇贝血细胞损伤与凋亡的研究[J]. *海洋环境科学*, 2011, 30(2): 153-157.
- [20] Xian J A, Wang A L, Chen X D, et al. Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis[J]. *Aquaculture*, 2011, 317: 240-244.
- [21] Donaghy L, Kim B, Hong H, et al. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27: 296-301.
- [22] 马洪明, 麦康森. 贝类血细胞的吞噬作用和非我识别[J]. *海洋科学*, 2003, 27(2): 16-18.
- [23] 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.
- [24] 张峰, 李光友, 张培军. 皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的研究[J]. *中国水产科学*, 1999, 6(3): 36-40.

Classification, structure, and immune functions of abalone (*Haliotis diversicolor*) hemocytes using a flow cytometric analysis

XIAN Jian-an^{1, 2}, QIAN Kun², GUO Hui³, WANG Dong-mei¹, ZHANG Xiu-xia¹, MIAO Yu-tao², PAN Xun-bin², WANG An-li²

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2. Key Laboratory of Ecology and Environmental Science of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 3. Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guang-dong Higher Education Institutes, College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Received: Jan., 20, 2015

Key words: *Haliotis diversicolor*; flow cytometry; hemocyte; immunity

Abstract: The classification, structure, and immune functions of abalone (*Haliotis diversicolor*) hemocytes were analyzed using flow cytometry. Based on the differences of forward light scatter (FSC) and side light scatter (SSC), hemocytes could be divided into three subpopulations, hyalinocyte, small granulocyte, and large granulocyte in the proportions of 32.71%, 58.17% and 8.55%, respectively. The average apoptotic ratio in all hemocytes was 3.76%. The total phagocytic ratio of hemocytes was 63.67%, and the percentages of cells that internalized one, two, and three or more fluorescent beads were 22.31%, 16.39%, and 24.96%, respectively. Mitochondria mass, lysosome mass, non-specific esterase activity, and non-induced reactive oxygen species (ROS) production were highest in the large granulocyte and lowest in the hyalinocyte. These results indicate that structure and immune functions are different between the three hemocyte subpopulations, and that small granulocytes and large granulocytes may play a more important role in the immune response of *H. diversicolor*.

(本文编辑: 康亦兼)