

中国对虾血细胞及其免疫研究*

李光友 王青

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

摘要 于1991年3月—1992年4月在青岛近海及一养虾场捕集中国对虾亲虾和越冬亲虾,以扫描电镜和透射电镜观察中国对虾的血细胞形态及其亚显微结构;研究定量测定细胞吞噬活性的方法。结果表明,中国对虾血细胞分3种:无颗粒细胞,呈球形或梭形,胞质不含颗粒;小颗粒细胞及颗粒细胞,卵球形或椭圆形,胞质含有电子致密颗粒,颗粒可分均匀、非均匀的;小颗粒细胞胞质富含线粒体,可能与它对异物敏感易发生胞吐作用有关,该细胞是识别外源异物的关键细胞。可以观察到高尔基器,它可能与酶原颗粒的形成有关。还表明姬姆萨染色细胞为紫红色,细胞核与颗粒染色较深,呈蓝紫色,与人白细胞中的粒细胞染色结果相近,这或许与两者功能相似有关。

应用医学上的化学发光法定量测定中国对虾血细胞的吞噬活性,加入脂多糖及弧菌悬液的血细胞的发光值较只加菌液未加脂多糖的血细胞和对照组的发光值高。实验表明,脂多糖($<10\mu\text{g}/\text{ml}$)对中国对虾血细胞的吞噬活性具有激活加强作用。本研究的测定方法,可为监测对虾免疫机能的强弱提供定量指标。

关键词 中国对虾 血细胞 形态 亚显微结构 免疫 方法

无脊椎动物免疫学是一门新兴学科,甲壳动物免疫学是其中的一个分支。目前,国外从事甲壳动物免疫研究的,主要有 Söderhäll 等 (1987;1984;1983a;1979;1990), Wago (1991)。在这个新领域内,国内对中国对虾的免疫研究也刚刚起步(孟庆显等,1983;叶孝经,1990)¹⁾。叶燕玲²⁾将中国对虾血细胞区分为透明细胞、小颗粒细胞、大颗粒细胞。本文报告中国对虾血细胞形态及其亚显微结构,探讨血细胞免疫功能及其测定方法,为研究中国对虾免疫功能及作用机制,丰富发展无脊椎动物免疫学,提供科学依据。

1 材料与方法

中国对虾 (*Penaeus chinensis*), 为1991年3月青岛近海海捕亲虾;1991年9月—1992年1月,青岛附近养虾场的养成虾及越冬亲虾;1992年4月青岛近海亲虾。

1.1 观察形态及亚显微结构的样品制备 扫描电镜样品制备:5%戊二醛与等量中国对虾血液混合 ($\text{pH} = 7.4$), 固定,喷金,观察。透射电镜样品制备:5%戊二醛与等量中国对虾血液混合 ($\text{pH} = 7.4$), 进行前固定,锇酸后固定,树脂包埋,超薄切片,醋酸铀染色后观察。

1.2 染色反应 用注射器直接从中国对虾心脏抽血,制成涂片,采用姬姆萨染液染色

* 中国科学院“八五”重大项目, A0892081312号。李光友,男,出生于1940年1月,研究员。

收稿日期:1992年5月,接受日期:1995年5月20日。

1) 孟庆显等,1983,海洋渔业,3: 110—116。叶孝经,1990,海洋水产研究丛刊,32: 13—18。

2) 叶燕玲,1989,中国对虾循环系统的研究。

15—30min,磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH = 6.8) 分色,光镜下观察并进行彩色拍照。

1.3 细胞免疫反应 采用化学发光法定量研究吞噬反应。生理盐水配制:生理盐水组成见表1(Smith et al., 1978), pH = 7.4。经预实验台盼蓝排除法和黄色曙红排除法证明,96%的血细胞在这种生理盐水中,于10—20℃时,能保持活性4h,且血液不凝固。

表1 生理盐水的组成(g)

Tab. 1 Component of physiological saline

NaCl	33.700
KCl	0.940
CaCl ₂ · 6H ₂ O	2.830
MgCl ₂ · 6H ₂ O	5.386
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.193
Tris methylamine	6.060
1mol/L HCl	42.5ml
蒸馏水	加到 1L

抽血:注射器装有含抗凝剂半胱氨酸(50mg/ml)的生理盐水0.5ml,从中国对虾心脏抽血,之后再加生理盐水与血液等量。实验时每瓶加2ml这种稀释的血液。

弧菌:使用的吞噬刺激物为弧菌87-1,由病虾肝胰脏分离出(由中科院海洋所微生物实验组提供)。使用前,从培养的弧菌悬液中离心收集弧菌,用磷酸缓冲液(pH = 7.0)洗涤2次,菌含量用比浊法计算。

脂多糖的配制:用蒸馏水配,实验时反应体系中脂多糖(LPS)的浓度低于10μg/ml。

鲁米诺的配制与中国对虾细胞吞噬活性的测定:取1ml贮藏液(贮藏液:0.618g硼酸,0.78g氢氧化钾,0.14g鲁米诺溶于10ml蒸馏水)溶于50ml Hanks缓冲液中,实验时每组各加3ml稀释的鲁米诺溶液,再将洗涤后的菌液分别加入含有脂多糖和不含脂多糖的小瓶中。对照组补以生理盐水使之与实验组反应体积相等。然后测定,每5min测一次,共测35min。

酵母聚糖的配制及对中国对虾血细胞吞噬活性影响的测定:用蒸馏水配制,浓度为50mg/ml。测定酵母聚糖对血细胞的吞噬活性的影响时,将0.15ml酵母聚糖悬液加入已装有血液和鲁米诺的小瓶中,对照组加入等量的生理盐水,然后测定,间隔为5min,共测35min。

仪器:液体闪烁计数器,LS-9800(Beckman公司),使用时,机器处于测定状态。所有实验至少重复两次。

2 结果

2.1 血细胞的形态及亚显微结构 经光镜观察记数,中国对虾血细胞数量为: 4.16×10^6 — 2.70×10^7 cell/ml。

扫描电镜观察表明,中国对虾血细胞的大小为:(4.8—5.8)μm × (7.7—11.5)μm,形状有梭形(图版I:1)、圆球形(图版I:2)、卵形(图版I:3)和椭球形(图版I:4)等不一。细胞表面有不明显的突起和凹陷。如果固定液浓度偏低,固定不好则细胞变形较大,细胞表面有明显的突起(图版I:5)。

透射电镜观察表明,中国对虾3种血细胞的亚显微结构有很大差别。无颗粒细胞,胞

质不含电子致密颗粒,核大(N),居中(图版 III:1)。小颗粒细胞(图版 III:2'),胞质内含许多小的电子致密颗粒,有丰富的线粒体(M)。颗粒细胞,胞质内含较大的电子致密颗粒,颗粒的电子致密度不同,有的密,有的疏;有的均匀,有的不均匀(图版 III:2c,2d,5e,5f)。3种细胞的细胞核中均可区分出常染色质与异染色质(图版 III:1—4)。还可以看到高尔基器(图版 III:6G)。

2.2 血细胞染色结果 无颗粒细胞呈紫红色,细胞核染色较深(图版 II:1)。小颗粒细胞与颗粒细胞中的颗粒着色较深,呈蓝紫色;细胞核染色较深,亦呈蓝紫色(图版 II:2)。

2.3 定量测定细胞免疫反应结果 使用鲁米诺作为荧光放大剂的化学发光法测定细胞吞噬活性,测定结果表明,中国对虾血细胞的适宜含量为 $6.93 \times 10^5 - 4.50 \times 10^6 \text{ cell/ml}$;含有脂多糖的实验组,其血细胞吞噬活性较未加脂多糖的实验组大,这说明脂多糖对中国对虾血细胞的吞噬反应具有加强作用。其吞噬活性在 15min 时达到最大值(发光值约 24×10^2),随后下降。见图 1a。弧菌与血细胞的适当比例为 200:1。

酵母聚糖对血细胞的吞噬活性的测定结果表明,酵母聚糖不能引发中国对虾血细胞的吞噬活性,其反应曲线见图 1b。

测定温度在 15—20℃ 时,有利于吞噬反应的发生。研究表明,血细胞在离体条件下,经适当处理,能发生吞噬反应,选用不同药饵养殖对虾,测血细胞的吞噬活性,即测定其免疫机能的强弱,从而可判定药饵对防治虾病,提高虾的抵抗力是否有效。

3 讨论与结论

3.1 中国对虾血细胞形态、结构及结构同功能的关系 讨论如下。

3.1.1 血细胞形态、结构 研究表明,中国对虾血细胞分为 3 种,即:无颗粒细胞,呈球形或梭形,胞质不含颗粒;小颗粒细胞和颗粒细胞,卵球形或椭球形,胞质含有电子致密颗粒,颗粒可分为均匀、非均匀的;小颗粒细胞富含线粒体。可以观察到高尔基器。Toney (1958), Hearing 等 (1967), Cornick 等 (1978)先后对美洲螯龙虾 (*Chmarus americanus*) 血细胞分类进行了研究,得出不尽相同的结果。原因可能有:血细胞离体后易变形;与实验器皿接触后变形;生理状况不同导致细胞形态的改变等。日后日渐统一。Bauchau (1981) 将血细胞分为 hyaline cell (透明细胞), semigranular cell (半颗粒细胞), granular cell (颗粒细胞); Person 等 (1987)和 Kobayashi 等(1990)遵从这种分类和命名。这种分类和命名是根据血细胞颗

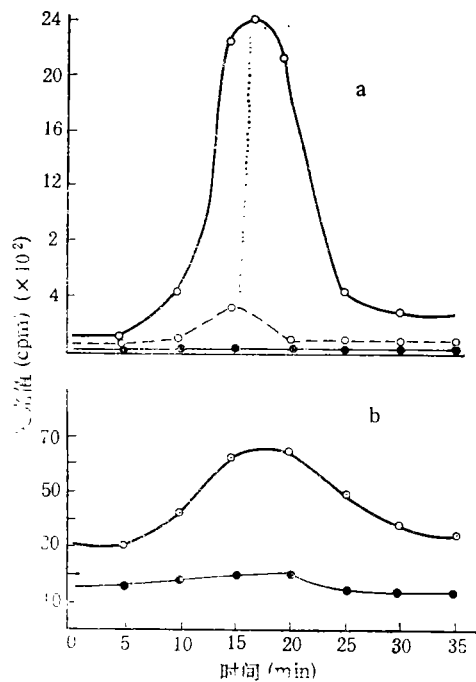


图 1 弧菌(a)和酵母聚糖(b)引起中国对虾血细胞的化学发光反应

Fig. 1 Luminol-enhanced-chemiluminescent response of *P. chinensis* whole haemocytes to *Vibrio* (a) and zymosan (b)

· · · 对照组; ○--○ 加入弧菌未加 LPS; ○—○ 加入弧菌同时也加 LPS(a); ○—○ 加入酵母聚糖

粒的有无和直径大小。叶燕玲(1989)¹⁾通过对中国对虾的实验后对血细胞颗粒的命名,除透明细胞外,将半颗粒细胞改称为小颗粒细胞,颗粒细胞称为大颗粒细胞。将半颗粒细胞称为小颗粒细胞,就比 Bauchau 等前进了一步,更为合乎实际。Bauchau 的“semigranular cell”是指该细胞比“granular cell”的直径小了一半之意,其颗粒内含物与颗粒细胞是完全相同的,而并非是颗粒细胞的一半,所以若将“semigranular cell”直译为半颗粒细胞,既不符合实际,也容易产生歧义。日本学者森勝義(1992),对甲壳动物血细胞分类和命名的报道是:无颗粒细胞(即透明细胞)、小颗粒细胞(即半颗粒细胞)、颗粒细胞。他比叶燕玲又完善了一步,尤其将透明细胞改称为无颗粒细胞,这就完全符合以有无颗粒来分类的标准。本研究根据以扫描电镜、透射电镜为手段的观察结果,认为以在显微镜下有无颗粒、颗粒多少及颗粒大小为依据来分类血细胞,更为客观。这与 Bauchau (1981) 和森勝義(1992)对甲壳动物血细胞的分类相一致。但在命名上,则认为森勝義的更为符合实际。见表 1。这有待组织化学方法的测定进一步验证。

表 2 甲壳类动物血细胞的分类与命名

Tab. 2 Classified and named of Crustacea haemocytes

生 物	血细胞颗粒大小与命名			作 者
甲壳类与螯虾	透明细胞 (无颗粒)	半颗粒细胞 (颗粒直径为 0.4 μ m)	颗粒细胞 (颗粒直径 0.8 μ m)	Bauchau (1981) Person 等(1987) Kobayashi 等(1990)
中国对虾	透明细胞	小颗粒细胞	颗粒细胞	叶燕玲(1989)
甲壳类动物	无颗粒细胞	小颗粒细胞	颗粒细胞	森勝義(1992)
中国对虾	无颗粒细胞	小颗粒细胞	颗粒细胞	本文作者(1995)

从扫描电镜照片中可以看出,细胞长短轴的平均长度都小于 10 μ m,这与曾经报道的 3 种血细胞长短轴的平均长度都大于 20 μ m¹⁾有所不同,固定后的血细胞会收缩变小,但结果相差之大,难以以此解释。图版 I:1 所示的梭形细胞,未见报道过,在此认为可能是无颗粒细胞中的一种,因为在光镜下观察发现这种细胞内亦不含颗粒。

3.1.2 血细胞的结构与功能的关系 采用 Bauchau 的分类名称, Söderhäll 等(1986)的研究表明,无颗粒细胞具有吞噬能力,这一特性或许与它在光滑表面上强烈的附着及扩散能力有关,它不受外来溶解物(例如脂多糖)的影响,但在体外活化的酚氧化酶原系统的组分可以激活这种细胞的吞噬能力。

本研究表明(图版 III: 2),中国对虾的小颗粒细胞中除含有大量的小电子致密颗粒外,还富含线粒体,线粒体是细胞能量的来源,小颗粒细胞在防御反应中活跃的胞吐作用与识别异物的能力(Söderhäll et al., 1986)可能与之有关。小颗粒细胞在离体条件下对外源物质敏感,极易脱颗粒。大多数动物的小颗粒细胞只有脱颗粒之后方具有吞噬活性(Söderhäll et al., 1986)。本研究认为,正是由于小颗粒细胞的敏感性,因此它是防御

1) 叶燕玲,1989,中国对虾循环系统的研究。

反应中的关键细胞。

本研究用化学发光法测定吞噬活性的实验中, 由于加入了脂多糖使吞噬活性上升从而高于不加脂多糖的实验组, 很可能就是通过这种细胞合作而实现的。颗粒细胞内有大量的颗粒, 其中含有大量的酚氧化酶原。这类细胞无吞噬能力, 附着及扩散力均弱, 经脂多糖处理不发生胞吐作用, 但用活化的酚氧化酶原系统的组分处理则可以迅速使之发生胞吐作用, 释放出更多的有活性的酚氧化酶。因此, 在甲壳动物宿主防御反应中可能存在着细胞合作现象。小颗粒细胞对外来物敏感, 例如脂多糖等使之释放酚氧化酶原系统的组分这种信号直接作用透明细胞使之吞噬, 同时使颗粒细胞放出更多的酚氧化酶原系统的组分, 从而对细胞免疫反应发生作用 (Söderhäll et al., 1986)。

本研究发现, 颗粒有的均匀, 有的不均匀; 有的致密度高, 有的低(图版 III: 2,5)。Hearing 等(1967)在美洲螯龙虾的嗜酸性细胞及卵形嗜碱性细胞中亦观察到均质颗粒与层化颗粒。这些不同可能是处于颗粒的不同形成阶段。高尔基器(图版 II: 6G) 可能与酶原颗粒的形成有关。

姬姆萨染色结果表明, 中国对虾 3 种血细胞的着色情况与哺乳动物白细胞中的粒细胞相近, 这或许与两者在防御反应中具有相似的功能有关。

3.2 影响化学发光法测定的因素 本实验认为, 影响化学发光法的重要因素之一就是离体血细胞的活性。如果血细胞凝集或破裂则不能发生吞噬反应, 因而不能或较少产生荧光, 测得的吞噬性必然下降。这与 Söderhäll 等人(1979)结果相一致。

本实验的结果表明, 反应体系中脂多糖浓度低于 $10\mu\text{g/ml}$ 时, 对中国对虾的血细胞的吞噬作用有激活和加强作用, 这与 Alexander 等(1971), Kaplan 等(1977), Weinberg 等(1978)的结果相一致, 但浓度高于 $10\mu\text{g/ml}$ 时, 对对虾血细胞有毒性。

本实验中虽使用了酵母聚糖, 但未能得到引发加强吞噬反应的效果, 原因可能是未经中国对虾的血清调理 (Söderhäll et al., 1986) 或是酵母聚糖在反应体系中的含量不当。酵母聚糖对无脊椎动物的作用机制还有待于进一步研究。

本实验测得的发光数值与其他文章中的相比较, 数值偏低, 原因可能是使用的检测系统不同, 如果采用单光子检测系统, 数值会大。实验中使用的弧菌应是处于对数生长期的生长良好的弧菌, 因为失去了运动能力或是热杀死的菌都会使吞噬过程中发出的荧光下降 (Tomita et al., 1981)。

综上所述, 虽然由于某些原因影响化学发光法的测定, 但在加入脂多糖及弧菌悬液的细胞的发光值较只加菌液未加脂多糖的血细胞和较对照组的发光值高; 同时, 脂多糖浓度小于 $10\mu\text{g/ml}$ 时对中国对虾血细胞的吞噬活性具有激活加强作用的重要结果, 可以说, 化学发光法可以用来定量测定中国对虾血细胞的吞噬活性, 从而为监测对虾免疫机能的强弱提供定量指标。

3.3 结论 本研究运用扫描电镜、透射电镜观察结果表明, 中国对虾血细胞为无颗粒细胞、小颗粒细胞、颗粒细胞 3 种。3 种血细胞的免疫功能, 小颗粒细胞富含线粒体这可能使其在防御反应中具活跃的胞吐作用和识别异物的能力, 因而是防御反应之关键细胞; 颗粒细胞无吞噬能力, 但用活化的酚氧化酶原系统的组分处理后可迅速使之发生胞吐作用, 释放出更多的有活性的酚氧化酶, 这可能是无颗粒细胞、小颗粒细胞合作产生免疫反应的结果。

果。本研究经改进了的化学发光法可以为监测对虾免疫机能的强弱提供定量指标。吞噬反应或许普遍存在于无脊椎动物,这可能意味着吞噬细胞的激活是原始的免疫机制,而在进化中得以保留。

参 考 文 献

- 森勝義,1992,无脊椎动物の生体防御,学会出版ヤンター(東京),182—198。
- Alexander, P. and Evans, R., 1971, Endotoxin and doublestranded RNA Render macrophages cytotoxic, *Nature New Biol.*, **232**: 76—79.
- Bauchau, A. G., 1981, Crustaceans, *In Invertebrate Blood Cells*, ed. by Ratcliffe, N. A. et al., Academic Press (London, New York), pp. 2385—2420.
- Cornick, J. W. and Stewart, J. E., 1978, Lobster (*Homarus americanus*) haemocytes: classification, differential counts, and associated agglutinin activity, *J. Invert. Pathol.*, **31**: 194—203.
- Hearing, Vincent and Vernick, Sanford H., 1967, Fine Structure of the blood cells of the lobster, *Homarus americanus*, *Chesapeake Science*, **3**: 170—186.
- Kaplan, G. and Morland, B., 1977, Properties of a murine monocytic tumor cell line J-T14 *in vitro* I. Morphology and endocytosis, *Exp. Cell Res.*, **115**: 53—61.
- Kobayashi et al., 1990, The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation *in vitro*, *Cell Tissue Res.*, **260**: 13—18.
- Person, M. et al., 1987, Encapsulation of foreign particles *in vitro* by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*, *Cell Tissue Res.*, **247**: 409—415.
- Smith, V. J. and Ratcliffe, N. A., 1978, Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) *in vitro*, *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **53**: 367—379.
- Smith, V. J. and Söderhäll, K., 1983, β 1, 3-glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*., *Biol. Bull. Mar. Bid. Lab. Woods Hole*, **164**: 299—314.
- Söderhäll, K. and Unestam, T., 1979, Activation of crayfish serum prophenoloxidase: the specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoprotein, *Can. J. Microbiol.*, **25**: 404—416.
- Söderhäll, K., Vey, A. and Ramstedt, M., 1984, Hemocyte lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish hemocytes, *Devl. Comp. Immunol.*, **3**: 23—30.
- Söderhäll, K., Smith, V. J. and Johansson, M. W., 1986, Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular cooperation in the defence reactions of arthropods, *Cell Tissue Res.*, **245**: 43—49.
- Söderhäll, K., Aspan, A. and Duvic, B., 1990, The proPOsystem and associated proteins role in cellular communication in arthropods, *Res. Immunol.*, **141**: 896—907.
- Tomita, T., Blumenstock, E. and Kanegasaki, s., 1981, Phagocytic and chemiluminescent responses of mouse peritoneal macrophages to living and killed *Salmonella typhimurium* and other bacteria, *Infect. Immun.*, **32**: 1242—1248.
- Toney, M. E. Jr., 1958, Morphology of the blood cells of some crustacea, *Growth*, **22**: 35—50.
- Wago, Haruhisa, 1991, Phagocytic recognition in *Bombyx mori* *In Immunology of insects and other arthropods*, pp. 215—235.
- Weinberg, J. B., Chapman, H. A. Jr. and Hibbs, J. B. Jr., 1978, Characterization of the effects of endotoxin on macrophage tumor cell killing, *J. Immunol.*, **121**: 72—80.

STUDIES ON HAEMOCYTES AND CELLULAR IMMUNITY IN PRAWN *PENAEUS CHINENSIS*

Li Guangyou, Wangqing

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

ABSTRACT

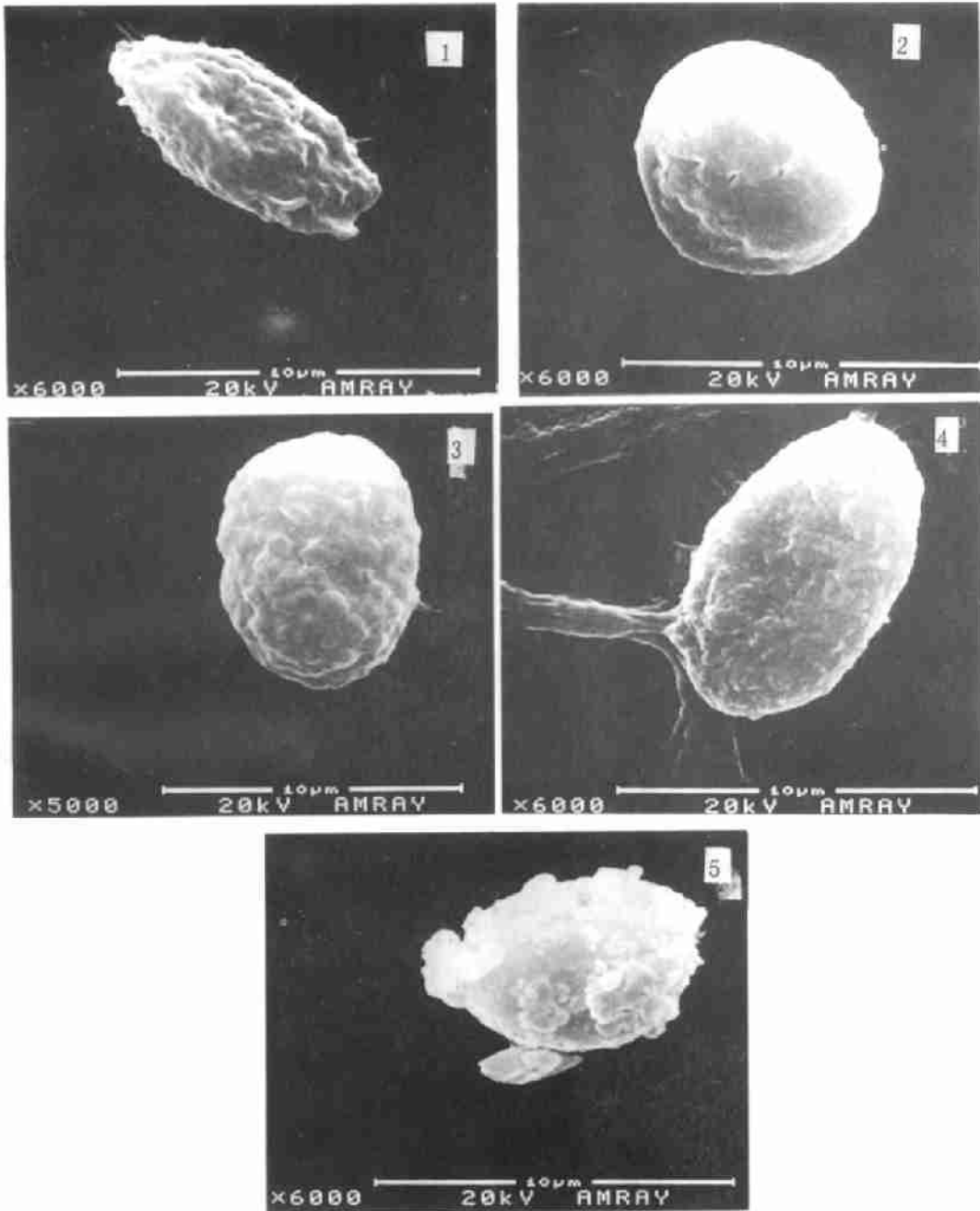
This paper reports studies on the morphology, submicroscopic structure and the quantitative method of testing phagocytic activity of *P. chinensis* collected in Qingdao coast from March 1991 to April 1992.

Results showed that *P. chinensis* has three distinct populations of circulating haemocytes: hyaline cells, semigranular cells, and granular cells; the hyaline cells are round without cytoplasmic granules inside; the semigranular cells and the granular cells are ovoid or ellipsoid and contain cytoplasmic granules; the semigranular cells play critical roles in recognizing foreign objects and have plenty of mitochondria, which is perhaps related to their sensitivity to foreign particles and easy degranulation. Golgi apparatus probably associated with the forming of granules can be seen in the granular cells.

Gimesa stain results showed that the above three kinds of cells were purplish red, and the nuclei and granules were much deeper, purplish blue, and their being similar to human granular cells. That indicates they have similar functions in host defence reactions.

The Luminol-enhanced-chemiluminescence (CL) method widely applied in studying phagocytosis kinetics was used to test phagocytic activity of haemocytes quantitatively. The result of CL response, counts per minute (cpm), can be read from a Beckman scintillation counter. The cpm of the haemocytes mixed with lipopolysaccharide (LPS) and *Vibrio* suspension were higher than the cpm of haemocytes with only *Vibrio* suspension and the cpm of the control. It is suggested that LPS can stimulate and enhance the phagocytosis of blood cells in *P. chinensis*. Zymosan induced wear phagocytosis. This method can give quantitative criterion to monitor the immune function of prawns and will have many applications in aquaculture.

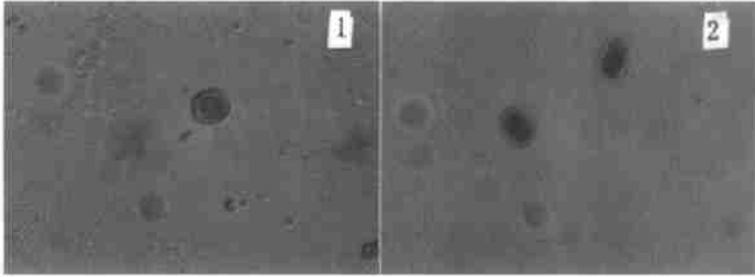
Key words *Penaeus chinensis* Haemocytes Morphology Submicroscopic structure Immune Method



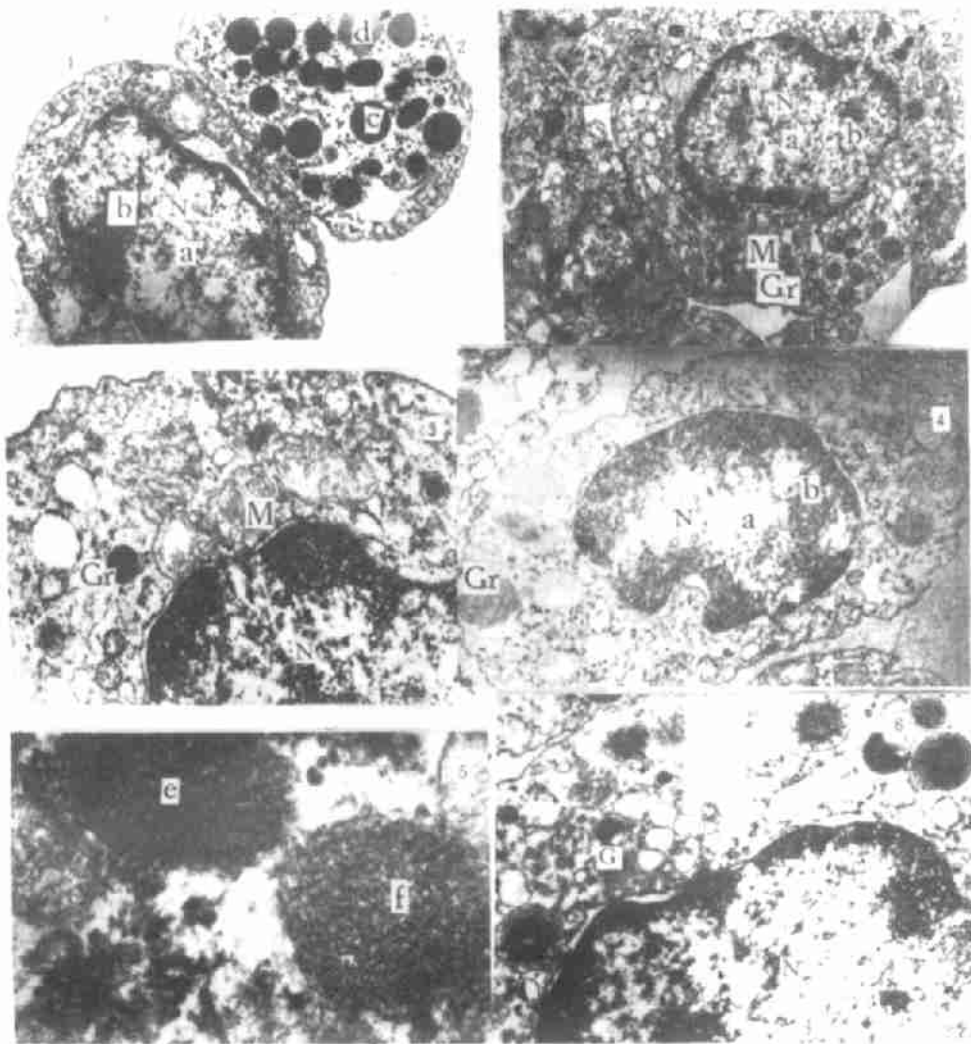
图版 I 中国对虾血细胞形态扫描电镜观察结果

Plate I Morphology of haemocytes in *Penaeus Chinensis* under scanning electron microscope

1.梭形, $\times 6\ 000$; 2.球形, $\times 6\ 000$; 3.卵形, $\times 5\ 000$; 4.长椭圆形, $\times 6\ 000$; 5.变形, 血细胞表面有明显的突起, $\times 6\ 000$ 。



图版 II 中国对虾血细胞姬姆萨染色结果 Plate II Gimesa stain of *Penaeus chinensis* haemocytes
1. 无颗粒细胞；2. 颗粒与小颗粒细胞。



图版 III 中国对虾血细胞亚显微结构(透射电镜观察结果)

Plate III Submicroscopic structure of haemocytes in *Penaeus chinensis* under transmission electron microscope

1. 无颗粒细胞, $\times 7\ 000$: a. 核常染色质; b. 核异染色质。2. 颗粒细胞, $\times 7\ 000$: c. 均匀颗粒; d. 非均匀颗粒; 2. 小颗粒细胞, $\times 6\ 000$: N. 核; Gr. 颗粒; M. 线粒体。3. 小颗粒细胞, $\times 21\ 000$ 。4. 颗粒细胞, $\times 10\ 000$ 。5. 颗粒细胞, $\times 60\ 000$: e. 电子致密度高的颗粒; f. 电子致密度低的颗粒。6. 小颗粒细胞, $\times 18\ 000$; 高尔基器(G)。