

鳗弧菌对魁蚶血细胞形态及免疫功能的影响*

周丽青¹ 杨爱国^{1①} 王清印¹ 吕振明² 刘志鸿¹ 田吉腾¹ 吴彪¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071;
2. 浙江海洋学院 舟山 316000)

摘要 本研究采用快速瑞氏-吉姆萨染色法观察鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激后魁蚶(*Scapharca broughtonii*)几种血细胞的形态变化,研究不同种类血细胞的免疫功能。魁蚶血淋巴液中红细胞、白细胞和血栓细胞经免疫刺激后均发生形态改变,属于免疫防御的应激反应。经鳗弧菌免疫刺激后,红细胞无丝分裂现象增多,并参与病原菌的吞噬作用;白细胞变形运动、吞噬和融合现象普遍,细胞表面具有粘性,参与血栓的形成;血栓细胞主要表现出粘连和凝血的特性,偶有吞噬病原菌的现象;研究中检测了 2 种常规抗凝剂的抗凝效果,结果表明,2 种抗凝剂分别改变了血栓细胞和白细胞的表面粘连特性,从而阻止它们参与凝血,因而都具有抗凝效果。本研究结果表明,魁蚶血细胞分工明确,能共同防御病原菌的入侵,细胞免疫在魁蚶血淋巴液抗菌免疫中起极其重要的作用,血细胞的形态变化和免疫功能分析可为后期研究魁蚶抗菌机制和筛选抗凝剂奠定基础。

关键词 魁蚶;血细胞;鳗弧菌;抗凝剂

中图分类号 Q2, S917.4 doi: 10.11693/hyhz20130300009

商品规格魁蚶(*Scapharca broughtonii*)或鲜食,或加工为干制品,肉质鲜美,营养丰富。20 世纪以前,我国魁蚶野生资源丰富,但常年的滥采乱捕和环境污染,导致该贝野生资源骤减,虽然它的人工育苗及养成研究早有成功范例,但一直都不属于主流养殖物种。近年来,因适应性强、生态修复效果显著的特点,魁蚶人工养殖发展迅猛,为防止发生类似于扇贝、鲍鱼和牡蛎等长期单一品种高密度养殖模式下,水质恶化、养殖品种生长缓慢和病害暴发,我们开展了魁蚶种质资源和遗传多样性(吴彪等, 2012; 梁超等, 2010, 2011; 周丽青等, 2012; Tian *et al.*, 2012)、生长(吴彪等, 2012)、血细胞类型(周丽青等, 2013)及形态选育指标(吴彪等, 2010)等良种培育的研究,发现魁蚶对致病弧菌的抵抗能力强,具有很高的抗逆性能,为培育魁蚶抗病抗逆新品系,作者观察鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)免疫刺激前后血细胞形态变化及相应的

免疫功能,以期对魁蚶种质改良积累免疫参数。

1 材料和方法

1.1 实验动物

18 只 3 龄健康魁蚶购自山东青岛南山水产品市场,壳长 70—80mm,体重 110—150g。水温 18—22°C 暂养 1 周左右,投喂硅藻、扁藻和金藻,每天换水 1 次。

1.2 鳗弧菌免疫刺激魁蚶血细胞

鳗弧菌菌种由中国海洋大学海洋生命学院提供,2611E 海水培养基培养。魁蚶 3 只一组,采用一次性 1ml 注射器斧足注射 1×10^9 个/ml 鳗弧菌生理盐水溶液 0.1ml,3 只不注射的作为健康对照组,分别于注射 3—4h, 6—10h, 12—16h, 24—30h 和 48h 后取血淋巴液。

1.3 血细胞分类和形态观察

血淋巴液制片方法参照刘志鸿等(2003)。前闭壳肌血窦中抽取血淋巴液,选 Alserver 液(18.7g/L 葡萄

*山东省科技发展计划项目, 2010GHY10513 号; 浙江海洋学院“海洋渔业科学与技术”重中之重学科开放课题, 20110211 号; 国家科技基础条件平台项目, 2007DKA30470 号; 黄海所基本科研业务费项目, 20603022012003 号。周丽青, 副研究员, E-mail: zhouliq@ysfri.ac.cn

通讯作者: 杨爱国, 研究员, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-03-29, 收修改稿日期: 2013-08-01

糖, 8g/L 柠檬酸三钠, 0.5g/L 柠檬酸, 4.2g/L NaCl)和 MAS 液(20.8g/L 葡萄糖, 8g/L 柠檬酸三钠, 3.36g/L 乙二胺四乙酸二钠; 22.5g/L NaCl)为抗凝剂。制备的血涂片用南京建成科技有限公司快速瑞氏-吉姆萨染液染色, LeicaDM4000B 光学显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 红细胞形态变化及其免疫功能

魁蚶红细胞在显微镜下呈中间厚边缘薄圆形或椭圆形饼状, 胞质中黑色颗粒推测为血红蛋白颗粒;

经鳗弧菌免疫刺激后, 红细胞常见无丝分裂和不等缢裂(见图 1), 注射 12h 后更多见, 图 1a 为红细胞吞噬或胞吐血红蛋白颗粒; 图 1b 为刚完成分裂的红细胞, 血红蛋白近乎平分; 有时细胞核不等缢裂(图 1c), 有时细胞分裂为大小不等 2 个(图 1d); 有的细胞核不分裂, 胞质缢裂球中无细胞核, 血红蛋白颗粒不等分配(图 1e, 图 1f), 具细胞核的小分裂球有时小至 5 μ m 左右(图 1g), 有些小分裂球中不含血红蛋白颗粒(图 1h)。红细胞在 2 种抗凝剂及无抗凝剂的血淋巴液中的形态无明显差异。

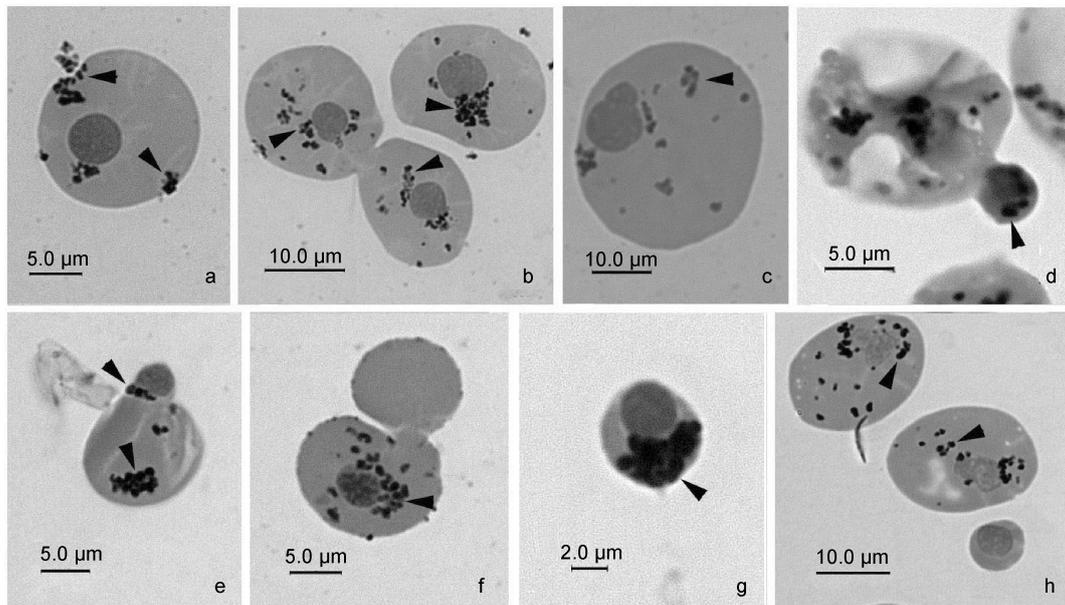


图 1 魁蚶红细胞的无丝分裂和缢裂

Fig.1 The amitosis and strangling division of red cells in hemolymph of *Scapharca broughtonii*

黑色箭头: 血红蛋白颗粒

魁蚶红细胞对侵入血淋巴液的病原菌有吞噬作用, 病原菌首先黏附在近旁的红细胞膜上(图2a), 红细胞吞噬病菌并形成包囊(图2b), 吞噬病原菌的部位常以缢裂方式从细胞母体中分离出来(图2c, 图2d, 图2e); 注射24h 后, 被吞噬的鳗弧菌以吞噬泡的形式悬挂于细胞膜表面(图2f); 注射12h 之前, 红细胞表面对病原菌有明显的免疫吸附功能, 注射3—4h 后即可见个别红细胞表面吸附大量病原菌(图2g), 随着血淋巴液中病原菌被吞噬减少, 很少见红细胞表面吸附病原菌, 制片过程可能会使细胞表面免疫吸附的病原菌脱落, 细胞表面呈现白色空洞(图2h)。

2.2 白细胞形态变化及其免疫功能

白细胞在抗菌免疫中起着极其重要的作用, 注

射病原菌12h 后白细胞数目明显增多。嗜碱性细胞吞噬大颗粒异物(图3a); 嗜酸性和嗜中性细胞则是吞噬病原菌的主力, 白细胞之间易粘连, 尤其 MAS 液中, 发生吞噬作用的白细胞易相互粘连甚至融合(图3b), 白细胞间的粘连常参与血栓的形成; 被白细胞吞噬的病原菌不能立即被消化分解, 它们在白细胞内仍能存活一段时间, 并企图从白细胞中挣脱出来, 致使细胞表面形成各种不规则突起(图3c); 白细胞具有变形运动能力(图3d), 可移动到病原菌附近实施吞噬; 注射24h 后, 病原菌被白细胞消化分解后呈细丝状或液化, 消化泡从白细胞中缢裂出来, 游离于血淋巴液中(图3e); 白细胞也有免疫吸附作用, 可吸附并快速吞噬大量病原菌(图3f, 图3g); 白细胞中的淋巴细胞一般不具备吞噬病原菌的作用, 可能会向血液中心分

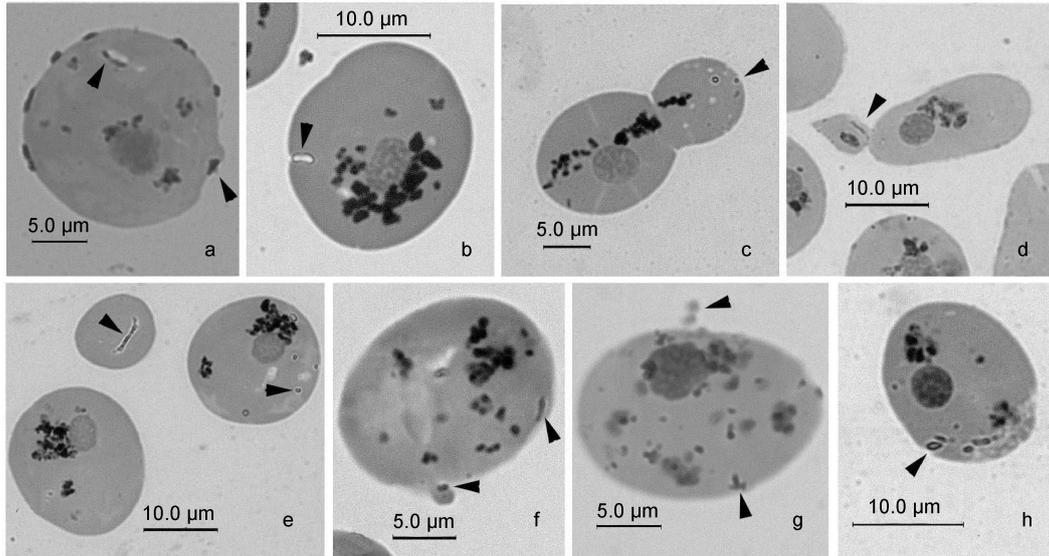


图 2 魁蚶红细胞对病原菌的免疫作用

Fig.2 The immune function for pathogen of red cells in hemolymph of *Scapharca broughtonii*

黑色箭头: 细菌

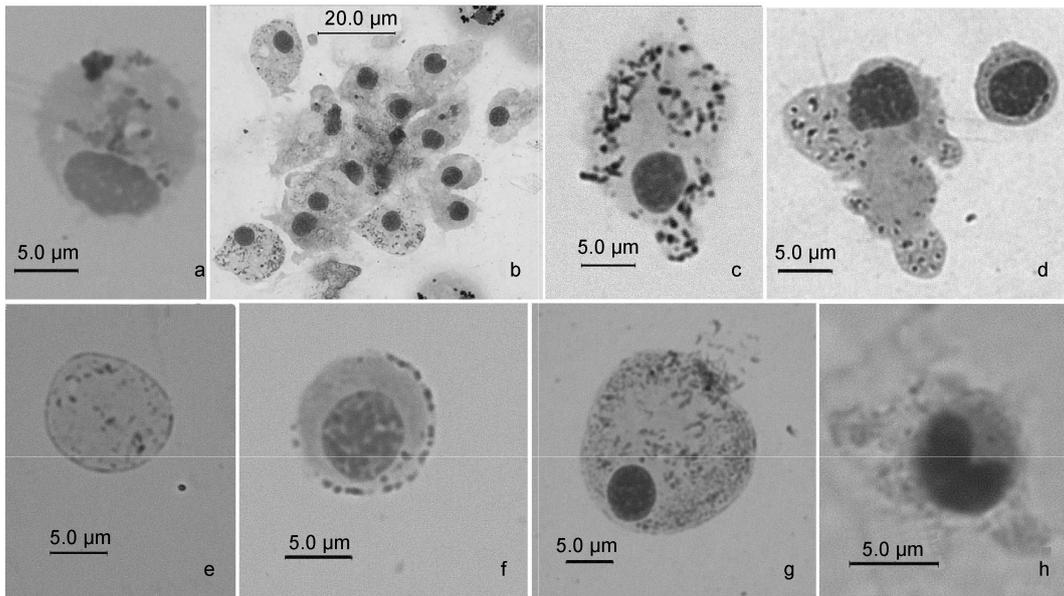


图 3 白细胞形态变化及其吞噬作用

Fig.3 The morphological change of white cells and their phagocytic function

泌抗体, 淋巴细胞核常见有缺刻(图 3h)。

2.3 血栓细胞形态变化及其功能

正常情况下血栓细胞呈长梭形, 细胞核呈圆梭形(图4a), 未抗凝或注射病原菌后, 血栓细胞之间容易相互粘连(图4b), 注射病原菌3—4h 后, 血淋巴中游离的血栓细胞数量急剧减少, 且形态变得极不规则, 多已参与凝血。血栓细胞启动凝血机制时细胞膜边缘不清晰, 细胞核周围出现大量细丝状物质类

似不溶性纤维蛋白(图4c), 逐渐弥散开来; 血栓细胞间相互交织粘连(图4d), 纤维蛋白弥散交织后, 有些细胞核会略有变形, 逐渐增多的纤维蛋白交织成网后网住周围的血细胞形成血栓块(图4e); 血栓细胞偶尔黏附或吞噬病菌(图4b, 图4f)。注射病原菌后, MAS 液中, 血栓细胞形态相对正常(图4a, 图4b), Alserver 液中血栓细胞的形态常发生改变, 细胞核形态膨胀弥散开来(图4c, 图4d, 图4e)。

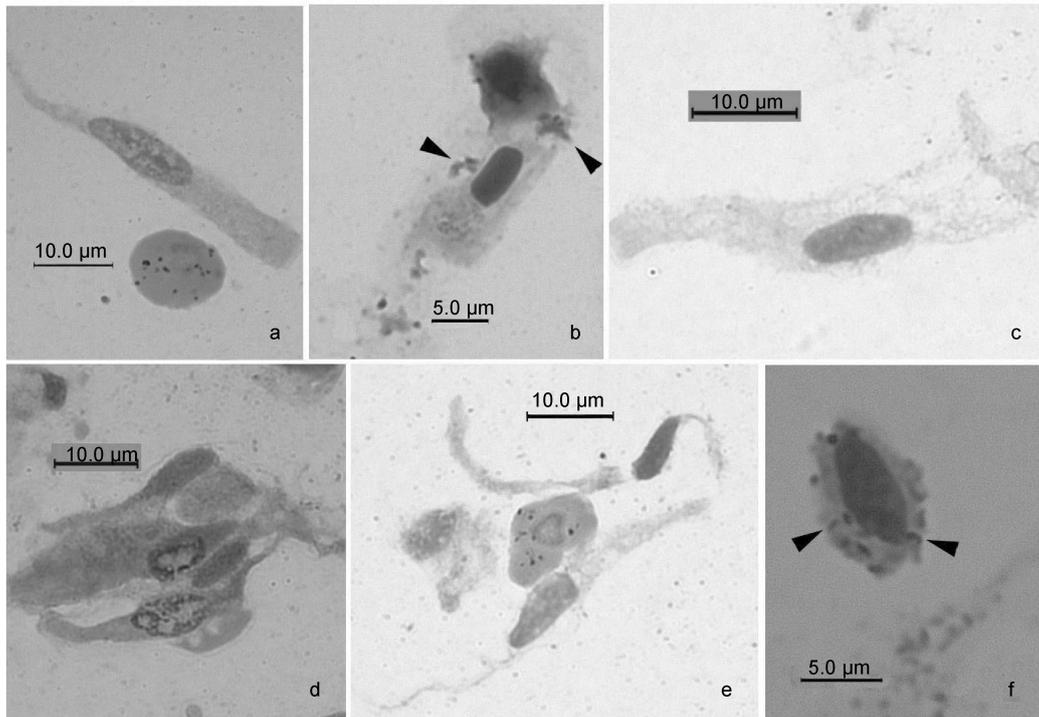


图4 血栓细胞形态变化

Fig.4 The morphological change of thrombocytes

黑色箭头: 细菌

3 讨论

3.1 血细胞的无丝分裂和缢裂

无丝分裂(amitosis)又称直接分裂,动物血细胞的无丝分裂存在以下4种情形:(1)细胞物质代谢旺盛,通过无丝分裂增大细胞核的表面积;(2)已分化细胞中无丝分裂多见;(3)不良环境与老化导致细胞发生无丝分裂;(4)组织再生时,细胞的无丝分裂会增多(张警愚,1989)。在本研究中,注射病原菌12h以后,红细胞无丝分裂和缢裂现象增多;注射24h之后,白细胞缢裂增多,说明不同血细胞分裂功能不同,红细胞的无丝分裂是为了增加运输氧气,增强机体抵抗病菌入侵的能力,同时补充因为吞噬病原菌而死亡的红细胞数目;白细胞的缢裂可能是为了减少负担,以便继续吞噬病菌。邹拓谜等(2011)认为多倍体的野生鲫(*Carassius auratus*)通过血细胞的无丝分裂来增加细胞数量,保证其总血红蛋白含量相对稳定,从而确保它们运输氧气的能力。胡知渊等(2005)推测较多的红细胞数量会刺激棘胸蛙(*Pana spinosa*)红细胞的无丝分裂。罗芬等(2010)认为疫苗能够诱导中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis* Bleeker)外周血红细胞、单核细胞和中性粒细胞等具有吞噬功能的细胞数量增加,

来增强其吞噬功能。注射12h后,鲢鳊白细胞数目明显增多,但未观察到白细胞分裂增生的过程,这是因为血细胞起源于造血干细胞,而单纯的形态学方法难以辨认造血干细胞(李长玲等,2009)。

3.2 鲢鳊血细胞对病原菌的免疫功能

鲢鳊血淋巴液中3大类细胞在受到鳗弧菌免疫刺激后都发生形态改变,笔者认为属于免疫防御的应激反应。多数研究人员认为吞噬作用主要由粒细胞完成(Carballal *et al.*, 1997; Moore, 1972; 李太武等, 2007),鲢鳊的红细胞、各种白细胞和血栓细胞都具有吞噬病原菌的功能,红细胞先表现出免疫黏附功能,与魏静等(2010)和张振冬等(2006)对鱼类红细胞免疫黏附功能的研究结果一致;注射鳗弧菌一段时间后,鲢鳊红细胞又表现一定的病原菌吞噬功能;白细胞是吞噬病原菌的主力军,血栓细胞偶有吞噬病原菌作用,且注射病原菌后,二者共同参与血液的凝固过程。Burrows等(2001)观察发现大菱鲃(*Psetta maxima*)血栓细胞除具有凝血功能外,还具有吞噬功能;路卫星等(2008)观察的几种变温脊椎动物血栓细胞形态及功能与鲢鳊的较为一致;绿海龟(*Chelonia mydas*)的血栓细胞细胞质边界模糊的特性也与鲢鳊的较为相似;贝类中除朱泽闻等(2011)和张维翥等(2005)推测

存在特化的血栓细胞起凝集作用外, 尚未见有血栓细胞的报道。本研究发现, 魁蚶血细胞分工明确, 能共同防御病原菌的入侵, 细胞免疫对病原菌免疫防御起极其重要的作用, 是否存在体液免疫或体液和细胞共同免疫有待进一步研究。今后可借鉴王日昕等(2009)构建的高质量血细胞 cDNA 文库进行 Expressed sequence tag (EST)序列分析, 深入研究魁蚶免疫相关因子和免疫机制。

3.3 2 种抗凝剂对魁蚶血细胞形态的影响

Hindriks 等(1992)认为血栓细胞形态变化受外界无机离子浓度影响较大, 本研究发现 Alserver 液和 MAS 液对阻止血液凝固都有一定的作用, Alserver 液中血栓细胞易变形, 细胞边缘不清晰, MAS 液中, 血栓细胞形态轮廓光滑可辨; 相反, Alserver 液中白细胞之间不粘连, 细胞外形圆滑; MAS 液中, 白细胞之间易粘连, 甚至融合, 且细胞外形不圆润, 常有各种形状突起。估计这 2 种抗凝剂改变了参与凝血的血细胞表面粘连特性, 使血液无法凝固, 因而起到抗凝作用。蒋琼等(2001)筛选中国对虾(*Penaeus chinensis*)血淋巴抗凝剂时, 以能够良好保持细胞的整体形态以及细胞器、细胞核形态为标尺。因此, 研究魁蚶血细胞形态及免疫功能需选择合适的抗凝剂。

参 考 文 献

- 王日昕, 廖 智, 刘 梅等, 2009. 厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)血细胞 cDNA 文库的构建及部分 EST 序列分析. 海洋与湖沼, 40(5): 603—607
- 朱泽闻, 徐立蒲, 吴信忠等, 2011. 泥蚶血细胞形态特征及部分免疫功能. 水产学报, 35(10): 1494—1504
- 刘志鸿, 张士瑾, 杨爱国等, 2003. 毛蚶血细胞的形态观察及吞噬性能研究. 高技术通讯, 13(10): 94—96
- 李太武, 李 晔, 苏秀榕, 2007. 杂色鲍的血细胞. 水产学报, 31(Suppl): 12—17
- 李长玲, 曹伏君, 黄翔鹤等, 2009. 绿海龟(*Chelonia mydas*)血细胞发育过程的观察. 海洋与湖沼, 40(4): 451—459
- 吴 彪, 杨爱国, 刘志鸿等, 2010. 魁蚶两个不同群体形态性状对体质量的影响效果分析. 渔业科学进展, 31(6): 54—59
- 吴 彪, 梁 超, 杨爱国等, 2012. 基于 SSR 标记的魁蚶(*Scapharca broughtonii*)不同群体遗传结构的分析. 海洋与湖沼, 43(4): 863—869
- 邹拓谜, 肖 俊, 刘少军等, 2011. 洞庭湖水域不同倍性野生鲫的血液相关特点. 水产学报, 35(10): 1488—1493
- 张振冬, 张培军, 莫照兰, 2006. 牙鲆红细胞免疫功能的初步研究. 高技术通讯, 16(12): 1312—1315
- 张维翥, 吴信忠, 李登峰等, 2005. 栉孔扇贝血液细胞的免疫功能. 动物学报, 51(4): 669—677
- 张警愚, 1989. 细胞的无丝分裂. 生物学通报, 9: 15—16
- 罗 芬, 张其中, 冯汉茹等, 2010. 灭活菌苗免疫的中华倒刺鲃外周血免疫指标的变化. 水产学报, 34(4): 626—634
- 周丽青, 杨爱国, 王清印等, 2012. 魁蚶 4 个地理群体 ITS 序列变异及系统发生分析. 渔业科学进展, 33(5): 109—115
- 周丽青, 杨爱国, 王清印等, 2013. 魁蚶血细胞分类及其免疫功能的初步分析. 水产学报, 37(4): 599—606
- 胡知渊, 来雅萍, 陈文静, 2005. 棘胸蛙、虎纹蛙、黑斑蛙血细胞的比较. 四川动物, 24(1): 5—8
- 梁 超, 杨爱国, 刘志鸿等, 2010. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)四个地理群体遗传结构的 RAPD 分析. 渔业科学进展, 31(1): 59—64
- 梁 超, 杨爱国, 刘志鸿等, 2011. 4 个地理群体魁蚶(*Scapharca broughtonii*)的形态差异及判别分析. 海洋科学, 35(11): 108—113
- 蒋 琼, 王 雷, 罗日祥, 2001. 中国对虾血淋巴抗凝剂的筛选. 水产学报, 25(4): 359—362
- 路卫星, 王 韞, 贾银涛等, 2008. 几种变温脊椎动物的血细胞比较. 动物学报, 54(2): 387—392
- 魏 静, 乔彦涛, 张小萍等, 2010. 全血体系下草鱼红细胞免疫黏附功能及其调控因素研究. 西南大学学报(自然科学版), 32(8): 53—57
- Burrows A S, Fletcher T C, Manning M J, 2001. Haematology of the turbot *Psetta maxima*(L.): Ultrastructural, cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. Journal of Applied Ichthyology, 17: 77—84
- Carballal M J, Lópes C, Azevedo C et al. 1997. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk Haemocytes. Fish & Shellfish Immunology, 7(6): 403—416
- Hindriks G, Ijsseldijk M J W, Sonnenberg A et al, 1992. Platelet adhesion to laminin: role of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions, shear rate, and platelet membrane glycoproteins. Blood, 79(4): 928—935
- Moore C A, Eble A F, 1977. Cytochemical aspects of *Mercenaria mercenaria* hemocytes. Biology Bulletin, 152(1): 105—119
- Tian J T, Liu Z H, Zhou L Q et al, 2012. Isolation and characterization of 48 polymorphic microsatellite markers for the blood clam *Scapharca broughtonii*(Arcidae). Genetics and Molecular Research, 2012, 11(4): 4501—4507

EFFECT OF *VIBRIO ANGUILLARUM* ON MORPHOLOGY AND IMMUNOLOGICAL FUNCTION OF BLOOD CELLS IN *SCAPHARCA BROUGHTONII*

ZHOU Li-Qing¹, YANG Ai-Guo¹, WANG Qing-Yin¹, LV Zhen-Ming²,
LIU Zhi-Hong¹, TIAN Ji-Teng¹, WU Biao¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract We studied morphological change of blood cells in hemolymph of *Scapharca broughtonii* after immunostimulation with pathogenic *Vibrio anguillarum* observed under oil immersion lens of Leica microscope in two regular anticoagulants. Morphological change of red blood cells, white blood cells, and thrombus cells were common in hemolymph due possibly to stress response of immune defense. Red cells often showed amitosis and split, and were often involved in phagocytosis. Deformation, phagocytosis, and fusion were common for white cells, and white cells were involved in the clots formation for their viscous mobility surface. Thrombocytes had adhesion and coagulation properties, and occasionally, they were found bacteria adhesion and phagocytosis. In addition, we tested the anticoagulation effect by the two anticoagulants, showing that the two anticoagulants could prevent white cells or thrombocytes from coagulation by changing their cell-surface characteristics. Therefore, they could be used as reliable anticoagulants. The immunological function played by each type of blood cells is very clear in cellular immunity. The morphological changes and immunological function enriched our understanding on blood immunological mechanism of *Scapharca broughtonii*, and may help develop anticoagulants.

Key words *Scapharca broughtonii*; *Vibrio anguillarum*; blood cells; anticoagulant