

橄榄蛭蚌血细胞形态及吞噬能力的初步研究

李乾坤¹, 张桂蓉¹, 魏开建¹, 王亚妮¹, 郭向召¹, 陈在林², 鄢国新²

(1. 华中农业大学水产学院 农业部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070;

2. 湖北省天门市水产局, 湖北 天门 431700)

摘要:对橄榄蛭蚌(*Solenia oleivora*)血细胞的形态特征和吞噬作用进行了初步研究。基于瑞氏染色后血细胞的形态、颜色、大小等特征,可将橄榄蛭蚌的血细胞分为大颗粒细胞、小颗粒细胞、透明细胞、类淋巴细胞共4种类型。透明细胞的直径最大,小颗粒细胞次之,类淋巴细胞最小;透明细胞的胞核直径最大,小颗粒细胞次之,大颗粒细胞最小。类淋巴细胞的核质比最大(0.67),其他3种细胞的核质比为0.37~0.48。4种血细胞所占比例以小颗粒细胞最高(43.6%),透明细胞次之(36.6%),类淋巴细胞最低(7.0%)。橄榄蛭蚌平均血细胞浓度为 $(4.21 \pm 1.51) \times 10^5$ 个/mL,个体的血细胞浓度与体重(或壳长)不相关($P > 0.05$),不同体重组(或壳长组)的平均血细胞浓度无显著差异($P > 0.05$)。在37℃体外吞噬试验中,橄榄蛭蚌血细胞对金黄色葡萄球菌的吞噬比例为 $(43.6 \pm 7.0)\%$,吞噬指数为 (0.743 ± 0.145) 。4种血细胞中,小颗粒细胞的吞噬比例最大 (0.288 ± 0.061) ,类淋巴细胞不具吞噬能力。

关键词:橄榄蛭蚌;血细胞;形态;吞噬能力

中图分类号:Q175 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2012)03-0116-06

贝类的循环系统为开放式循环,无免疫球蛋白及淋巴细胞,不存在特异性体液免疫,其免疫防御功能依赖于天然免疫机制(马洪明和麦康森,2003)。贝类血细胞在发挥内分泌作用的同时,还兼容了免疫反应,在宿主免疫防御机制中发挥着重要作用(陈慕雁和杨红生,2007);其免疫功能主要体现在吞噬作用、异己识别、呼吸爆发,在伤口修复、炎症反应及神经免疫反应过程中也起着重要作用(孙敬锋和吴信忠,2006)。由于贝类非特异性免疫主要由血细胞完成,因此研究贝类血细胞的形态、分类及吞噬能力对于阐明其免疫和防病机制具有重要意义,迄今为止国内外对贝类血细胞的分类尚存争议,没有统一的分类标准(周永灿和潘金培,1997)。Bayne等(1979)将加洲贻贝的血细胞分为嗜酸性颗粒细胞、小嗜碱性透明细胞和大嗜碱性透明细胞共3种类型;Cheng(1981)将长牡蛎和硬壳蛤的血细胞分为颗粒细胞、透明细胞和纤维细胞共3类;而疣鲍的血细胞几乎全是透明细胞(Travers et al, 2008)。

收稿日期:2012-02-16

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(项目批准号2011PY116);农业部水生生物自然保护区专项资金(项目批准号2008165)。

通讯作者:魏开建,副教授,主要从事水产动物种质资源与遗传育种研究。E-mail: kjwei@mail.hzau.edu.cn

作者简介:李乾坤,1986年生,男,硕士研究生,主要从事水生动物保护生物学研究。E-mail: likun3068@sina.com

在贝类血细胞研究方面,国内对海洋双壳类血细胞及吞噬作用报道较多(张维翥等,2005;Zhang et al, 2006;饶小珍等,2007);对淡水双壳类的研究报道较少(郭磊等,2008;Xie et al, 2011)。

橄榄蛭蚌(*Solenia oleivora*)隶属于双壳纲(Bivalvia)、蚌科(Unionidae)、蛭蚌属(*Solenia*),是我国特有的淡水珍稀蚌类,具有较高的经济价值(许巧情等,2003)。橄榄蛭蚌对栖息地的水质和底质要求较高,主要分布于长江流域、淮河流域的部分河段、支流、河口与湖泊相连处。近年来,由于水域环境污染、栖息地被破坏、过度捕捞等原因,鄱阳湖、洞庭湖、巢湖、太湖等湖泊及支流的橄榄蛭蚌资源日益枯竭,现存生物量极少,亟待开展其生物学及资源保护研究。目前,国内已有橄榄蛭蚌的营养成分、同工酶电泳特性、耗氧率和排氨率、滤水率等相关研究报道(许巧情等,2003;2005;2006;2008),但对其血细胞形态和吞噬能力未见报道;为此,本试验对橄榄蛭蚌血细胞形态特征及其吞噬作用进行了初步研究,旨在了解橄榄蛭蚌的生物学,为开展贝类免疫学研究积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

橄榄蛭蚌样本于2011年10-11月采自湖北省天门市橄榄蛭蚌自然保护区。挑选外壳完整的个体运回实验室,暂养于55 cm × 45 cm × 40 cm的水族

箱中,水深 20 cm,20 个/箱,增氧泵充气保持水中溶解氧达到 5.0 mg/L。每日从池塘捞取浮游植物作为饵料投喂,试验期间水温(22 ± 2)℃。随机选取 91 个闭壳喷水有力、腹足伸缩灵活的个体抽取血液进行试验,壳长 80 ~ 180 mm。

1.2 血细胞形态观测

用注射器从橄榄蛭蚌的前闭壳肌采血,各个体血液样品先置于 Alsever's 溶液(pH 7.2)润洗过的离心管(以下同)中备用。取 400 μL 上述血液于 1.5 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 15 min,弃上清;摇匀后吸取 100 μL 余液,滴于载玻片上涂片,瑞氏溶液染色后,置于 Nikon 80i 光学显微镜下观察。

对 91 个蚌体共 120 个涂片中血细胞的形态特征、种类进行观察,并随机对 120 个视野(600 ×)中血细胞总数及各类血细胞个数进行计数,计算各类血细胞所占比例。测定各类血细胞的直径(Cell diameter, C)及细胞核直径(Nuclear diameter, N),计算核质比(N/C)。

1.3 血细胞浓度测定

自橄榄蛭蚌活体取 100 μL 血样于 1.5 mL 离心管中,加入 900 μL PBS 溶液(pH 6.8),摇匀后用微量移液枪吸取适量稀释血样于血细胞计数板的计数池中,置 600 × 光镜下,参照杨秀平(2004)的血细胞计数方法进行计数,将计数结果换算成个体的血细胞浓度(个/mL)。

1.4 血细胞体外吞噬试验

从活体取 300 μL 血液样本于 1.5 mL 离心管中,加入等量灭活的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)溶液(浓度 10⁷ ~ 10⁸ 个/mL)混匀,进行体外血细胞吞噬细菌试验。血液-细菌混合液在 37℃ 孵育 1.5 h 后,将离心管置冰上 20 min,3 000 r/min 离心 15 min,弃上清,按 1.2 的方法涂片并进行瑞氏染色,置于油镜(1 000 ×)下观察。以 5 个视野为单位记录吞噬细胞(即含有金黄色葡萄球菌的血细胞)的个数及类型,并记录每种吞噬细胞中所吞噬

细菌的个数。参照郭磊等(2008)的公式计算血细胞对金黄色葡萄球菌的吞噬比例和吞噬指数:

$$\text{吞噬比例} = \text{噬菌的血细胞数} / \text{视野血细胞总数}$$

$$\text{吞噬指数} = \text{吞噬的细菌数} / \text{视野血细胞总数}$$

1.5 数据统计与分析

采用 STATISTICA 6.0 软件对不同类型血细胞大小、核质比的差异作单因素方差分析。制作不同个体血细胞浓度的次数分布图,对个体血细胞浓度与体重、壳长的相关性进行分析。对参试个体的体重、壳长进行分组整理,计算各体重组、壳长组的平均血细胞浓度,采用单因素方差分析对各体重组或壳长组的平均血细胞浓度进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 血细胞类型与形态特征

显微观察表明,橄榄蛭蚌的血细胞分为粒细胞和无粒细胞 2 大类;其中,粒细胞又分为大粒细胞(瑞氏染色嗜酸性)和小粒细胞(嗜酸性或嗜碱性),无粒细胞分为透明细胞(嗜酸性)和类淋巴细胞(嗜碱性)(图 1)。4 种血细胞的大小、所占比例及形态特征见表 1。透明细胞的直径最大,小粒细胞次之,类淋巴细胞最小;核质比(N/C)以类淋巴细胞最大,小粒细胞和透明细胞次之,大粒细胞最小。4 种类型血细胞的直径之间、细胞核直径之间以及核质比之间均存在极显著性差异($P < 0.01$)。

2.2 血细胞浓度及其次数分布

橄榄蛭蚌 91 个个体的血细胞浓度范围为(1.37 ~ 8.25) × 10⁵ 个/mL,平均血细胞浓度为(4.21 ± 1.51) × 10⁵ 个/mL。对全部个体血细胞浓度分组整理,其次数分布如图 2 所示;其中,血细胞浓度在(2.90 ~ 3.67) × 10⁵ 个/mL 的个体最多(22 个),占总数的 24.18%。个体的血细胞浓度主要在(2.14 ~ 5.96) × 10⁵ 个/mL,其个体出现总次数为 74,占总数的 81.32%。

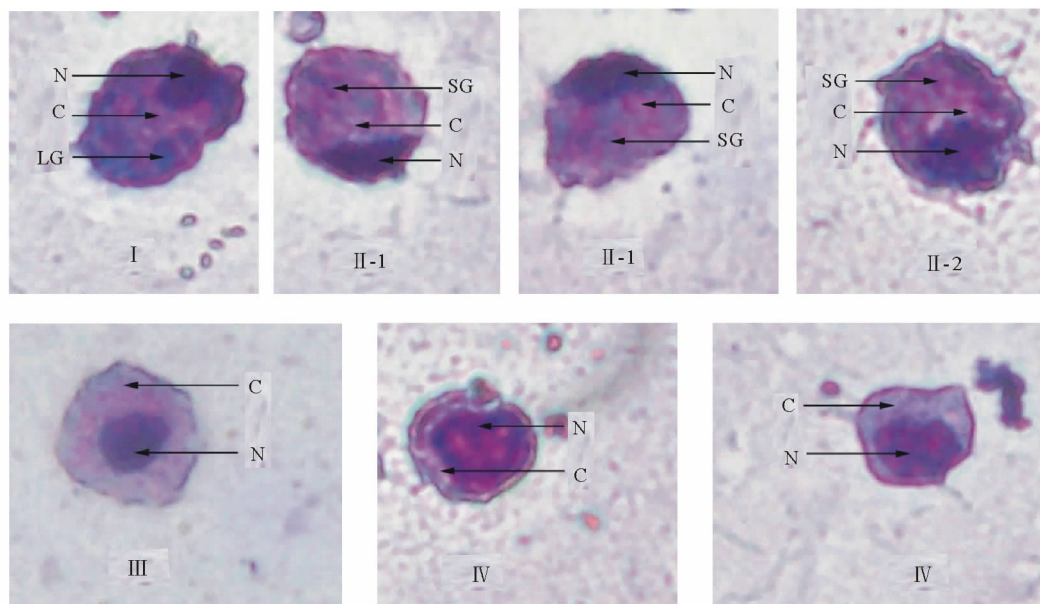
表 1 橄榄蛭蚌 4 种血细胞的大小参数、所占比例及形态特征

Tab. 1 Parameters of size, proportion and morphological characteristics for various types of hemocytes in *S. oleivora*

血细胞类型	细胞直径 (C)/μm	细胞核直径 (N)/μm	核质比 (N/C)	细胞比例/ %	主要形态特征
大粒细胞	6.98 ± 0.25 ^b	2.61 ± 0.28 ^a	0.37 ± 0.03 ^a	12.8	细胞略呈圆形,核圆形
小粒细胞	8.70 ± 0.41 ^c	4.18 ± 0.19 ^c	0.48 ± 0.04 ^c	43.6	嗜酸性细胞呈略圆形,核圆形; 嗜碱性细胞多圆形,核月牙状
透明细胞	10.92 ± 0.65 ^d	4.43 ± 0.25 ^d	0.41 ± 0.03 ^b	36.6	个体较大,内无颗粒,核肾形
类淋巴细胞	4.38 ± 0.30 ^a	2.92 ± 0.20 ^b	0.67 ± 0.03 ^d	7.0	细胞较小,不规则,核较大

注:同列数据的不同字母表示有极显著差异($\alpha = 0.01$)。

Note: The different letters in the same column of table show significant difference ($\alpha = 0.01$).



I. 大颗粒细胞; II -1. 小颗粒细胞(嗜碱性); II -2. 小颗粒细胞(嗜酸性); III. 透明细胞; IV. 类淋巴细胞;
N:细胞核;C:细胞质;LG:大颗粒细胞;SG:小颗粒细胞

图1 橄榄蛭蚌4种血细胞的瑞氏染色显微照片(600×)

I. Large granulocyte; II -1. Small granulocyte (basophilic granule); II -2. Small granulocyte (eosinophilic granule);
III. Hyalinocyte; IV. Lymphoid hemocyte; N: Nucleus; C: Cytoplasm; LG: Large granulocyte; SG: Small granulocyte

Fig.1 Light micrograph showing four types of hemocytes of *S. oleivora* with Wright's staining (600 ×)

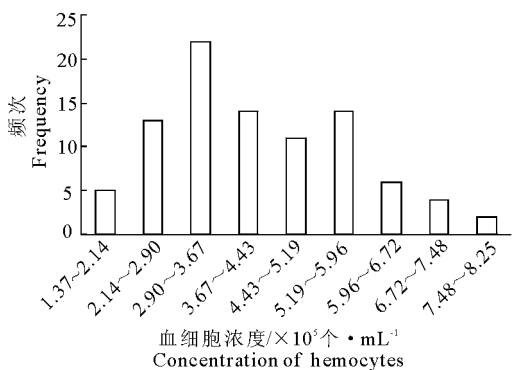


图2 橄榄蛭蚌血细胞浓度的频次分布
Fig.2 Frequency distribution of hemocyte concentration of *S. oleivora*

2.3 血细胞浓度与体重和壳长的关系

相关分析表明,橄榄蛭蚌不同个体的血细胞浓度(个/mL)与体重(g)之间线性相关不显著($r=0.0797, P=0.4528$),个体血细胞浓度(个/mL)与壳长(mm)之间线性相关也不显著($r=0.0683, P=0.5202$)。

91个蚌体的体重范围为8.87~93.75g,均重38.88g。以10g为组距对体重进行分组整理,将全部个体分为9组;其中,28~38g体重组的个体数最多(33个),占个体总数的36.26%。各体重组的血细胞浓度均值为(2.96~4.62) $\times 10^5$ 个/mL;其中,

8~18g体重组的血细胞浓度最小(图3),但各体重组的平均血细胞浓度无显著差异($P>0.05$)。

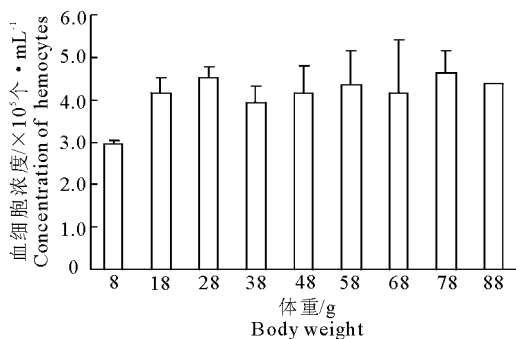


图3 不同体重组橄榄蛭蚌的血细胞浓度
Fig.3 Concentration of hemocytes for different body weight groups of *S. oleivora*

91个蚌体的壳长范围为80~180mm,平均壳长131.3mm。以12mm为组距对壳长进行分组整理,将全部个体分为9组;其中,126~138mm壳长组的个体数最多(34个),占个体总数的37.36%。各壳长组的血细胞浓度平均值为(3.00~4.66) $\times 10^5$ 个/mL;其中,78~90mm壳长组的血细胞浓度最低(图4),但各壳长组的平均血细胞浓度无显著差异($P>0.05$)。

2.4 血细胞对细菌的吞噬比例及吞噬系数

在37℃体外试验条件下,橄榄蛭蚌血细胞对金

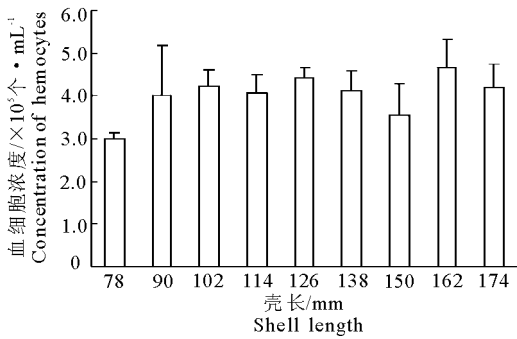


图4 不同壳长组橄榄蛭蚌的血细胞浓度

Fig. 4 Concentration of hemocytes for different shell length groups of *S. oleivora*

黄色葡萄球菌的吞噬比例为 $(43.6 \pm 7.0)\%$, 吞噬指数为 (0.743 ± 0.145) ; 大颗粒细胞、小颗粒细胞和透明细胞的吞噬比例分别为 $(8.8 \pm 5.5)\%$, $(28.8 \pm 6.1)\%$ 和 $(6.0 \pm 4.4)\%$ 。小颗粒细胞的吞噬比例占总吞噬比例的66.1%。类淋巴细胞没有吞噬作用。

3 讨论

3.1 贝类的血细胞类型和浓度

本次试验表明, 橄榄蛭蚌血液中没有红细胞, 与其他淡水蚌类一致(周永灿和潘金培, 1997)。橄榄蛭蚌的血细胞可分为大颗粒细胞、小颗粒细胞、透明细胞及类淋巴细胞4类, 与褶皱冠蚌的血细胞类型相同(Xie et al, 2011), 但少于池螺蚌的血细胞类型(郭磊等, 2008)。紫贻贝和加州贻贝等海洋双壳类的血细胞分为颗粒细胞和透明细胞2类(Bayne et al, 1979); 一些海洋双壳类的颗粒细胞和透明细胞按大小又可细分4~5种类型(张维翥等, 2005; Zhang et al, 2006), 在血细胞类型划分上与蚌科的淡水双壳类存在一定差异。贝类血细胞的分类受到细胞形状、大小、内部结构、功能及外在条件变化等多种因素的影响, 其差异的原因尚不清楚(Zhang et al, 2006)。本试验对橄榄蛭蚌血细胞的形态和类型作了初步描述, 不同蚌科种类血细胞类型的异同是否与贝类的系统发育相关, 有待进一步的研究。

贝类血细胞的浓度可能因种类、年龄、生理状态和研究方法的不同而变化, 因而贝类循环系统中的血细胞总数存在较大的变异(Zhang et al, 2006)。据报道, 九孔鲍、池螺蚌和褶皱冠蚌的血细胞浓度相近, 变化范围为 $(1.08 \sim 2.37) \times 10^6$ 个/mL(饶小珍等, 2007; 郭磊等, 2008; Xie et al, 2011)。本次试验中, 橄榄蛭蚌平均血细胞浓度为 $(4.21 \pm 1.51) \times 10^5$ 个/mL, 明显低于九孔鲍、池螺蚌和褶皱冠蚌的

血细胞浓度, 与南美蛤(*Quadrula pustulosa*)的血细胞浓度处于同一水平(Burkhard et al, 2009)。橄榄蛭蚌个体的血细胞浓度与壳长或体重之间无明显的相关性; 其血细胞的主要类型(表1)为小颗粒细胞(43.6%)和透明细胞(36.6%), 与褶皱冠蚌的优势血细胞类型(小颗粒细胞56.6%, 透明细胞36.8%)相近(Xie et al, 2011); 但与海湾扇贝(颗粒细胞44.7%, 透明细胞55.3%)存在差异(Zhang et al, 2006)。

3.2 贝类血细胞的吞噬能力

吞噬作用是贝类血细胞免疫的主要防御手段(Roch, 1999; Tafalla et al, 2003)。贝类血细胞的吞噬能力随种类的不同而存在差异, 同种贝类的不同类型血细胞吞噬能力也有很大差异(López et al, 1997)。在不同类型血细胞中, 颗粒细胞的吞噬作用是贝类抵御外物入侵的主要防线(Bayne et al, 1979; Cheng, 1981; Zhang et al, 2006; 郭磊等, 2008; Xie et al, 2011; 裴鹏祖等, 2011); 透明细胞也具有一定的吞噬能力, 但不是主要的吞噬细胞(马洪明和麦康森, 2003; Zhang et al, 2006); 而中华圆田螺的透明细胞无吞噬能力(裴鹏祖等, 2011)。

本试验中, 橄榄蛭蚌血细胞的吞噬能力(吞噬比例43.6%, 吞噬指数0.743)略高于同一温度下褶皱冠蚌血细胞对酵母菌和枯草芽胞杆菌的吞噬能力(Xie et al, 2011)。橄榄蛭蚌血液中的大颗粒细胞、小颗粒细胞和透明细胞都具有吞噬能力, 其中小颗粒细胞的吞噬能力最强, 其次为大颗粒细胞, 透明细胞的吞噬作用最弱, 而类淋巴细胞没有吞噬能力; 表明颗粒细胞是主要的吞噬细胞并含有丰富的水解酶, 而透明细胞内的水解酶水平较低且吞噬能力有限, 许多双壳类均有类似报道(Zhang et al, 2006; Xie et al, 2011)。

志谢: 在采样过程中得到湖北省天门市橄榄蛭蚌自然保护区管理处的大力帮助, 特致谢忱!

参考文献

- 陈慕雁, 杨红生. 2007. 贝类生态免疫研究进展[J]. 海洋科学集刊, 48: 140-152.
- 郭磊, 盛军庆, 洪一江, 等. 2008. 池螺蚌(贝)血细胞显微观察[J]. 水生生物学报, 32(6): 839-844.
- 马洪明, 麦康森. 2003. 贝类细胞的吞噬作用和自我识别[J]. 海洋科学, 27(2): 16-18.
- 裴鹏祖, 胡宝庆, 谢彦海, 等. 2011. 中华圆田螺血细胞的分

- 类和吞噬性[J]. 南昌大学学报, 35(1): 83-94.
- 饶小珍, 陈寅山, 林岗, 等. 2007. 九孔鲍血细胞吞噬能力的研究[J]. 海洋水产研究, 28(2): 56-62.
- 孙敬锋, 吴信忠. 2006. 贝类血细胞及其免疫功能研究进展[J]. 水生生物学报, 30(5): 601-607.
- 许巧情, 刘俊, 贺利容. 2003. 橄榄蛭蚌含肉率及肌肉营养成分分析[J]. 淡水渔业, 33(4): 28-30.
- 许巧情, 刘俊, 冯抗抗. 2005. 温度对橄榄蛭蚌滤水率的影响[J]. 中国水产科学, 12(2): 207-210.
- 许巧情, 刘俊, 黄华伟. 2006. 温度对橄榄蛭蚌耗氧率和排氨率的影响[J]. 水生生物学报, 30(6): 697-701.
- 许巧情, 张琴, 李兵. 2008. 橄榄蛭蚌不同组织乳酸脱氢酶(LDH)和苹果酸脱氢酶(MDH)同工酶的电泳分析[J]. 长江大学学报, 5(1): 39-46.
- 杨秀平. 2004. 动物生理学实验[M]. 北京: 高等教育出版社: 91-94.
- 张维翥, 吴信忠, 李登峰, 等. 2005. 栉孔扇贝血液细胞的免疫功能[J]. 动物学报, 51(4): 669-677.
- 周永灿, 潘金培. 1997. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展[J]. 水产学报, 21(4): 449-454.
- Bayne C J, Moore M N, Carefoot T H, et al. 1979. Hemolymph functions in *Mytilus californianus*: the cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and hemolymph factors in phagocytosis[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 34(1): 1-20.
- Burkhard M J, Leavell S, Weiss R B, et al. 2009. Analysis and cytologic characterization of hemocytes from freshwater mussels[J]. Veterinary Clinical Pathology, 38(4): 426-436.
- Cheng T C. 1981. Bivalves. In: Ratcliffe N A, Rowley A F (eds.), Invertebrate blood cells[M]. Vol 1. Academic Press, London: 231-300.
- López C, Carballal M J, Azevedo C, et al. 1997. Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia)[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 30: 209-215.
- Roch P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates[J]. Aquaculture, 172: 125-145.
- Tafalla C, Gómez-León J, Novoa B, et al. 2003. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes[J]. Developmental and Comparative Immunology, 27: 197-205.
- Travers M A, Silva P M, Nelly L G, et al. 2008. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes[J]. Fish & Shellfish Immunol, 24: 400-411.
- Xie Y H, Hu B C, Wen C G, et al. 2011. Morphology and phagocytic ability of hemocytes from *Cristaria plicata*[J]. Aquaculture, 310: 245-251.
- Zhang W Z, Wu X Z, Wang M. 2006. Morphological, structural, and functional characterization of the haemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*[J]. Aquaculture, 251: 19-32.

(责任编辑 万月华)

A Preliminary Study on Morphology and Phagocytic Ability of Hemocytes from *Solenia oleivora* (Bivalvia: Unionidae)

LI Qian-kun¹, ZHANG Gui-rong¹, WEI Kai-jian¹, WANG Ya-ni¹,
GUO Xiang-zhao¹, CHEN Zai-lin², YAN Guo-xin²

- (1. College of Fisheries, Key Laboratory of Freshwater Organism Breeding of Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, P. R. China;
2. Fisheries Bureau of Tianmen City, Tianmen 431700, P. R. China)

Abstract: The morphology and phagocytosis of hemocytes from *Solenia oleivora* were preliminarily studied in this paper. Based on the characteristics in morphology, colour and size of hemocytes with Wright's staining, four types of hemocytes were recognized, including large granulocyte, small granulocyte, hyalinocyte and lymphoid hemocyte. The results showed that the hyalinocytes had the largest cell diameters, followed by the small granulocytes, while the lymphoid hemocytes were the smallest. The nuclear diameters of the hyalinocytes were the largest, followed by the small granulocytes, and the large granulocytes were the smallest. The N/C ratio (Nuclear diameter/Cell diameter) of the lymphoid hemocytes was the highest (0.67), and those for other three hemocytes ranged from 0.37 to 0.48. The small granulocytes had the highest proportion to total hemocytes (43.6%), followed by the hyalinocytes (36.6%), and the proportion of the lymphoid hemocytes was the smallest (7.0%). The mean concentration of hemocytes in *S. oleivora* was $(4.21 \pm 1.51) \times 10^5$ cells/mL. No correlations were observed between individual hemocyte concentration and body weight (or shell length), and no significant differences were found among mean hemocyte concentrations in different body weight groups (or shell length groups) ($P > 0.05$). In an in vitro phagocytic experiment at 37°C, the hemocytes of *S. oleivora* could phagocytize *Staphylococcus aureus*, and their phagocytic ratio and phagocytic index were $(43.6 \pm 7.0)\%$ and (0.743 ± 0.145) , respectively. Of four hemocytes, the small granulocytes had the highest phagocytic ratio (0.288 ± 0.061) and appeared to be more efficient in phagocytosis than other hemocytes, while the lymphoid hemocytes exhibited no phagocytic ability for *S. aureus*.

Key words: *Solenia oleivora*; hemocyte; morphology; phagocytic ability