

池蝶蚌(贝)血细胞显微观察

郭磊 盛军庆 洪江 汪勇飞 郭红军 王军花

(南昌大学生命科学学院,南昌 330031)

摘要: 本文对池蝶蚌血细胞的形态结构及其动态变化进行了研究。根据血细胞形态、大小和密度等特征,把血细胞分为 6 类: 颗粒细胞、透明细胞、浆液细胞、类淋巴细胞、梭形细胞和血栓细胞; 并对各种血细胞显微结构予以描述,统计了血细胞胞体大小、细胞核大小、核质比、密度及所占比例,其中颗粒细胞所占比例最大,透明细胞次之,类淋巴细胞最少,颗粒细胞和透明细胞是两种主要的细胞类型,约占总数的 82%,担负着最基本的代谢和免疫功能; 通过对池蝶蚌血细胞形态的连续观察,发现血细胞存在形态变化现象,推测细胞间可能存在相互转化的情况。

关键词: 池蝶蚌; 血细胞; 形态结构; 动态变化

中图分类号: Q174 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)06-0839-06

贝类没有免疫球蛋白和淋巴系细胞,其免疫防御功能依赖于非特异性免疫^[1],主要由血细胞来行使,而目前,研究者对贝类血细胞分类的看法仍不一致。Pipe et al.^[2]将贻贝(*Mytilus edulis*)的血细胞分成透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞 3 类; Altamirano et al.^[3]将三种双壳类(clams *Ruditapes philippinarum*, *Mercenaria mercenaria* and the oyster *Crassostrea virginica*)的血细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞和颗粒细胞 3 类; 石安静^[4]将椭圆背角无齿蚌血细胞分为颗粒细胞、无颗粒细胞、透明细胞和类淋巴细胞 4 种类型; 沈亦平^[5]对皱纹冠蚌(*Grisstaria plicata* Leach)血细胞的初步研究后认为其血细胞分为透明细胞、A 型颗粒细胞、B 型颗粒细胞和浆细胞 4 类; 杨军等^[6]研究进一步发现,在无颗粒细胞与颗粒细胞之间存在着中间类型细胞,这些中间类型细胞兼具无颗粒细胞与颗粒细胞的某些特征。

池蝶蚌(*Hyriopsis schlegeli*)是日本特有种,原产于日本滋贺县的琵琶湖,它与我国的三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)为同属不同种。对其抗病性等方面的研究表明,池蝶蚌对三角帆蚌蚌瘟病具有较强的抵抗力^[6]。虽然有关贝类血细胞形态的研究报道较多,但池蝶蚌血细胞的分类研究未见报道。为此,

本实验对池蝶蚌血细胞的形态结构、细胞密度和形态变化进行观察,为池蝶蚌免疫学研究和贝类的血细胞研究提供有价值的参考资料。

1 材料与方法

池蝶蚌取自抚州市洪门水库开发有限公司,无病无伤、健康的 1—4 龄蚌各 20 只。

血样制备方法参照文献[8]。血细胞大小测量、血细胞计数和 Gimsa 染色参照文献[9]方法并略作改进。取血后立即滴片,待血细胞贴壁后,用滤纸将上清小心吸干,甲醇固定后空气干燥, Gimsa 染色, LEICA DM 5000 B 显微镜观察并拍照。

活体观察时,取血后立即滴片,加盖玻片后直接进行观察其形态及动态变化过程。

2 结果

2.1 血细胞的数量和密度

1—4 龄池蝶蚌血细胞密度略有差别,但幅度不大(表 1)。

2.2 血细胞分类

根据染色结果和活体观察,可将池蝶蚌的血细胞分为 6 种类型。不同的细胞大小、细胞核大小、核质比以及百分率(表 2)。

收稿日期: 2007-06-13 修订日期: 2008-03-28

基金项目: 农业部 948 项目(2004-T9)资助

作者简介: 郭磊(1980—),男,汉族,山东潍坊人; 硕士; 研究方向为水生动物遗传育种学。E-mail: guolei2345@163.com

通讯作者: 洪一江, Tel 0791-3969530 E-mail: yjhong2008@163.com

表 1 1—4 龄池蝶蚌血细胞密度
Tab. 1 Density of the hemocytes in *H. schlegelii* from age one to four

蚌龄 Age	1龄 1-year-old	2龄 2-year-olds	3龄 3-year-olds	4龄 4-year-olds	平均密度 Mean density
血细胞密度 Density of the hemocytes (× 10 ⁶ 个/mL)	1. 08 ±0. 23	1. 52 ±0. 43	1. 91 ±0. 93	2. 08 ±0. 67	1. 68 ±0. 78

颗粒细胞 (Granulocyte): 分 I、II 两种类型, 胞体较大, 椭圆形, 两种类型的细胞直径都为 13.8—23.1μm, 细胞核呈圆形或椭圆形, 直径 6.1—10.5μm, I 型胞体中有许多折光性的圆形粗大颗粒, II 型胞体中颗粒比较小, 约占细胞总数的 45%—50%, 染色时着色较浅, 细胞核染成浅红色 (图版 I: 1—4)。

透明细胞 (Hyalinocyte): 胞体较小, 圆形, 直径 10.0—17.2μm, 细胞核直径 4.4—10.3μm, 胞质少且均匀, 无明显的颗粒, 核居中或偏离一侧。约占细胞总数的 35%—40%, 染色时着色较深, 细胞核染成深红色, 细胞质透明 (图版 I: 5—6)。

浆液细胞 (Serosus cell): 分为 I 型和 II 型, 细胞都呈圆形, 胞体大, 细胞直径 15.2—25.9μm, 细胞核直径 5.4—10.1μm, 基本不变形。I 型细胞内, 大小不等的具折光性的颗粒分布其中, II 型细胞几乎无颗粒, 颜色较浅。约占细胞总数的 5%—6%。染色时着色较浅, 细胞核染成浅红色, 细胞质呈淡蓝色 (图版 I: 7—10)。

类淋巴细胞 (Lymphoid cell): 此类细胞具脊椎

动物典型的淋巴细胞形态, 细胞呈圆形, 胞体极小, 直径约为 5.4—8.2μm, 细胞核大, 直径 3.4—5.6μm, 核质比大, 细胞核周围仅有一薄层细胞质。此类细胞也可变形, 但变化不大, 伪足也很短, 数量少, 仅占 2%—3%。染色时着色较深, 细胞核染成深红色, 细胞质透明 (图版 I: 11—12)。

梭形细胞 (Spindly cell): 细胞变形大, 取血后约 15—20min 后变形为梭形或梨形, 胞体长 10.2—19.1μm, 宽 5.3—10.4μm, 细胞核直径 3.9—6.8μm。约占细胞总数的 4.5%—5.5%。染色时着色较深, 细胞核染成深红色, 细胞质透明 (图版: 13—14)。

血栓细胞 (Thrombocyte): 体积较小, 类似透明细胞, 细胞直径 9.5—12.6μm, 细胞核直径 5.0—7.1μm, 细胞变形能力强, 取血后一侧伸出大量长的伪足, 形状不规则, 大小同透明细胞相差不大。细胞间的伪足相互交联, 使细胞由几个到多个再到大量细胞聚在一起, 引起血液凝固。约占细胞总数的 3.5%—4.5%。染色时着色较深, 细胞核染成深红色, 细胞质透明 (图版 I: 15—16)。

表 2 池蝶蚌不同血细胞类型的细胞大小、细胞核大小、核质比以及百分率
Tab. 2 Cell sizes, nucleolus size, N/C ratios and percentages of the differential haemocyte types in *H. schlegelii*

血细胞类型 Haemocyte type	细胞直 Cell diameter (μm)	细胞核直径 Nuclear diameter (μm)	核质比 N/C Ratio	百分率 Percentages (%)	主要特征 Main character
颗粒细胞 Granulocyte	18.43 ±2.29	8.14 ±0.99	0.11 ±0.05	45.84 ±2.20	具颗粒, 数量最多
透明细胞 Hyalinocyte	13.19 ±1.87	7.24 ±1.27	0.22 ±0.10	36.36 ±3.47	胞质均匀, 无颗粒
浆液细胞 Serosus cell	19.41 ±2.57	8.02 ±1.12	0.08 ±0.03	5.80 ±1.65	胞体最大, 不变形
类淋巴细胞 Lymphoid cell	4.45 ±0.69	2.85 ±0.77	0.37 ±0.09	2.77 ±1.27	胞体最小, 核质比大
梭形细胞 Spindly cell	13.95 ±2.21	4.92 ±0.77	0.24 ±0.07	5.13 ±2.48	细胞呈梭形
血栓的细胞 Thrombocyte	11.05 ±0.90	6.21 ±0.46	0.24 ±0.12	4.09 ±2.07	具长纤维状伪足

表 2 可以看出, 颗粒细胞和透明细胞占血细胞的多数, 约占总数的 82%, 梭形细胞、血栓细胞和浆液细胞所占比例相差不大, 类淋巴细胞数量最少, 仅为 2.77% 左右。浆液细胞体积最大, 胞体直径最大可达 25.9μm, 但核质比最小, 仅为 0.08 左右, 核质比最大的是类淋巴细胞, 可达 0.46。透明细胞、梭形细胞和血栓细胞的核质比相差不几。

2.3 细胞形态变化

对池蝶蚌血细胞连续观察发现, 血细胞刚取出时全为圆球形, 而在体外较短时期内, 绝大部分细胞要伸出伪足和棘突, 并逐渐加长增多, 只有少数细胞一直保持球形。约 30min 后, 部分血细胞的伪足又会变少, 甚至有的细胞伪足完全消失, 细胞重新变的圆滑 (图版 II: 17—20)。约 1—1.5h 后, 细胞拉长, 膜破裂, 细胞死亡。死亡后的细胞大都聚集成团, 颗

粒分布在细胞周围。在这个过程中, 部分细胞颗粒会逐渐减少, 甚至消失(图版 II: 21—24); 而部分细胞的颗粒会逐渐增多(图版 II: 25, 26); 此外, 连续观察发现, 血细胞形态也可以变化(图版 II: 27, 28)。

伴随吞噬作用, 贝类血细胞可向血浆中释放溶酶体酶, 即所谓的脱颗粒作用^[10]。观察结果(图版 II: 29, 30)显示: 脱颗粒时, 细胞内的颗粒都在不停的运动, 颗粒从细胞的一侧脱出, 相互之间有黏着力束缚, 随着颗粒的不断运动, 部分颗粒开始在细胞的周围, 这些游离的颗粒不再运动, 脱颗粒作用是一种主动过程, 通常不破坏细胞, 脱出的颗粒分布在细胞的周围, 脱颗粒完成后形成一种无颗粒细胞。

3 讨 论

根据池蝶蚌血细胞的密度、形态、大小, 可将池蝶蚌的血细胞分为 6 类: 颗粒细胞、透明细胞、浆液细胞、类淋巴细胞、血栓细胞、梭形细胞。颗粒细胞分为 I 型和 II 型颗粒细胞, 虽然在颗粒分布上有十分明显的区别, 但其他的许多重要特征, 如胞体大小、形态及着色特性等均相同, 另有一小部分细胞形态结构介于这两者之间, 即胞体内同时存在大小不等的颗粒, 因此推测 I 型和 II 型颗粒细胞可能是属于同一类细胞的不同形式或处于不同的发育阶段。透明细胞、血栓细胞和梭形细胞, 在形态上差别很大, 但细胞大小、核质比和着色特性等相差无几, 因此推测血栓细胞和梭形细胞, 可能是透明细胞行使不同功能时, 胞体的变化形态, Chen 和 Bayne^[11]认为双壳类的透明细胞在血细胞凝集中具有重要作用, 类似于脊椎动物鱼类的血栓细胞和哺乳动物的血小板。而有关浆液细胞和类淋巴细胞的研究报道较少, 可能与这两类细胞在血液中占的比例较小, 贴壁能力差, 容易从玻片上被洗掉, 而且浆液细胞常常被认为与颗粒细胞有关。本研究表明, 池蝶蚌的浆液细胞也可分两种形态, 且这两种形态之间能相互转化。类淋巴细胞除体积稍大, 数量较少外, 其余特征与石安静等^[4]报道的拟淋巴细胞基本相同。鉴于一些贝类和池蝶蚌的血细胞仍存分类差异的现象, 因此, 我们对这些细胞的免疫功能正在进一步研究中。

贝类血细胞的数量可能因种类的不同而存在较大的差异, 即使同一类也可能因为生理状态、环境胁迫和不同的研究而出现较大的差异^[8]。本研究表明, 池蝶蚌的血细胞密度为 $(1.68 \pm 0.78) \times 10^6$ cell/

mL, 这与 Wootton E C, et al.^[12]发现的 *Mytilus edulis*、*Cerastodema edule* 和 *Ensis siliqua* 3 种贝类的血细胞数处于同一数量级。其中颗粒细胞占的比例最大, 透明细胞次之, 浆液细胞、梭形细胞和血栓细胞所占比例差不多, 类淋巴细胞最少。颗粒细胞和透明细胞是两种主要的细胞类型, 占血细胞总数的 82%, 说明它们担负着最基本的代谢和免疫功能。

通过对池蝶蚌血细胞变化的连续观察, 发现细胞间存在相互转化的情况, 我们认为可能是血细胞存在不同的形式或处于不同的发育阶段, 这可能与池蝶蚌的免疫机能相关。因为贝类没有体液凝固因子、血小板和血管, 因此损伤修复主要靠血细胞变长、凝集和吞噬来完成^[1]。池蝶蚌血细胞球形和梭形之间的转化和血细胞伪足的变化进一步证明了这种观点, 这也进一步证明了前面对血栓细胞、梭形细胞和透明细胞这 3 种细胞的关系的阐述。M K^[13]的研究认为透明细胞是血细胞中最原始的, 它可以分化为不同类型的颗粒细胞。本研究表明, 细胞脱颗粒以后并不会死亡, 会形成一种无颗粒细胞, 而且细胞内的颗粒也有减少和增多的情况, 因此难以说明哪种细胞更原始。Cajaraville^[14]对 *M. edulis* 进行的超微结构观察则认为吞噬和脱颗粒可能分别由不同的粒细胞完成, 这与本研究 I 型浆液细胞脱颗粒的结论相吻合。我们在观察中还发现, 细胞在体外变形的速度和存活时间与所处温度有一定关系, 温度较低时, 细胞形态变化较慢, 存活时间也较长, 这与石安静等^[4]研究的椭圆背角无齿蚌 (*Anodonta Woodiana Elliptica Heude*) 血细胞的活体观察结果一致。

参考文献:

- [1] Liu S L, Mai K S. The progress of studies mollusks immunological system and mechanism: a review. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003, 32(2): 95—105 [刘世良, 麦康森. 贝类免疫系统和机理的研究. 海洋学报, 2003, 32(2): 95—105]
- [2] Pipe R K, Lingstone D R. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1993, 3: 221—233
- [3] Allam B, Ashton-Alex K A, Ford S E. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve mollusks [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, (13): 141—58
- [4] Shi A J, Qiu A D, Sun Z Q. Observation of living hemocyte of freshwater pearl mussel *Anodonta Woodiana Elliptica Heude* [J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 1999, 36(2): 332—336 [石安静, 邱安东, 孙志奇. 椭圆背角无齿蚌血细胞的活体观察. 四川大学学报(自然科学版), 1999

- 36(2): 332—336]
- [5] Shen Y P, Ma L J Preliminary observations on haemocytes of freshwater pearl oyster *Cristaria plicata* Leach [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, 17(2): 190—192 [沈亦平, 马丽君. 淡水育珠蚌褶冠蚌血细胞的初步研究. 水生生物学报, 1993, 17(2): 190—192]
- [6] Yang J, Shi A J Study on the classification in hemocytes of three kind of freshwater pearl clams [J]. *Journal of Sichuan University* (Natural Science Edition), 2002, 39(1): 68—72 [杨军, 石安静. 3种淡水育珠蚌血细胞类型的研究. 四川大学学报 (自然科学版), 2002, 39(1): 68—72]
- [7] Xu M X, Hong Y J *et al* Preliminary study on disease resistance of pearl bivalves (*Hyriopsis schlegelii* L.) to disease-causing Sources of the *Hyriopsis cumingii* L. [J]. *Journal of Nanchang University* (Natural Science), 2004, 28(3): 262—269 [徐毛喜, 洪一江, 等. 池螺蚌 (*Hyriopsis schlegelii*) 对三角帆蚌病源的抗病性. 南昌大学学报 (理科版), 2004, 28(3): 262—269]
- [8] Zhang W X, Wu X Z, *et al* Immunological functions of blood cells in the scallop *Chlamys farreri* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(4): 669—677 [张维鑫, 吴信忠, 等. 栉孔扇贝血液细胞的免疫功能. 动物学报, 2005, 51(4): 669—677]
- [9] Xing J, Zhan W B *et al* Determination of hemocyte types and antibacterial activities for scallop (*Chlamys farreri*) [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2003, 33(1): 41—46 [邢静, 占文斌, 等. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 血细胞类型及抗菌力的研究. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(1): 41—46]
- [10] Ma H M, Mai K S. Phagocytosis and non-self recognition of molluscan blood cells: a review [J]. *Marine Sciences*, 2003, 27(2): 16—18 [马洪明, 麦康森. 贝类血细胞的吞噬作用和非我识别作用. 海洋科学, 2003, 27(2): 16—18]
- [11] Chen J H, Bayne C J Bivalve mollusc hemocyte behaviors: characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in California mussel (*Mytilus californianus*) [J]. *Biol Bull*, 1995, 188: 255—266
- [12] Wootton E C, Dyrnyda E A, Ratcliffe N A. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastodema edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 15: 195—210
- [13] McKim C A. General model for leucocyte cell renewal in bivalve mollusks [J]. *Mar. Fish Rev*, 1976, 38: 37—41
- [14] Cajaville M P, Pal S G, Robledo Y. The light and electron microscopic localization of lysosomal acid hydrolases in bivalve haemocytes by enzyme cytochemistry [J]. *Acta Histochem Cytochem*, 1995, 28(5): 409—416

MICROSCOPIC OBSERVING ON HEMOCYTES OF *HYRIOPSIS SCHLEGELI*

GUO Lei, SHENG Jun-Qing, HONG Yi-Jiang, WANG Yong-Fei, GUO Hong-Jun and WANG Jun-Hua

(The Life College of Nanchang University, Nanchang 330031)

Abstract Mussels do not possess an adaptive immune system as vertebrates do. The defence systems of mussels are often described as based only in innate immunity which includes the cellular immunity and lymph immunity. A universal classification scheme of the circulating haemocytes is a prerequisite for comparative functional studies, but by now, it has been still not available for haemocytes of mussels. In hope of knowing about the defending system of mussel and try to improve the defense capability of the mussel, the classification and the dynamic variation of the mussel haemocytes were researched.

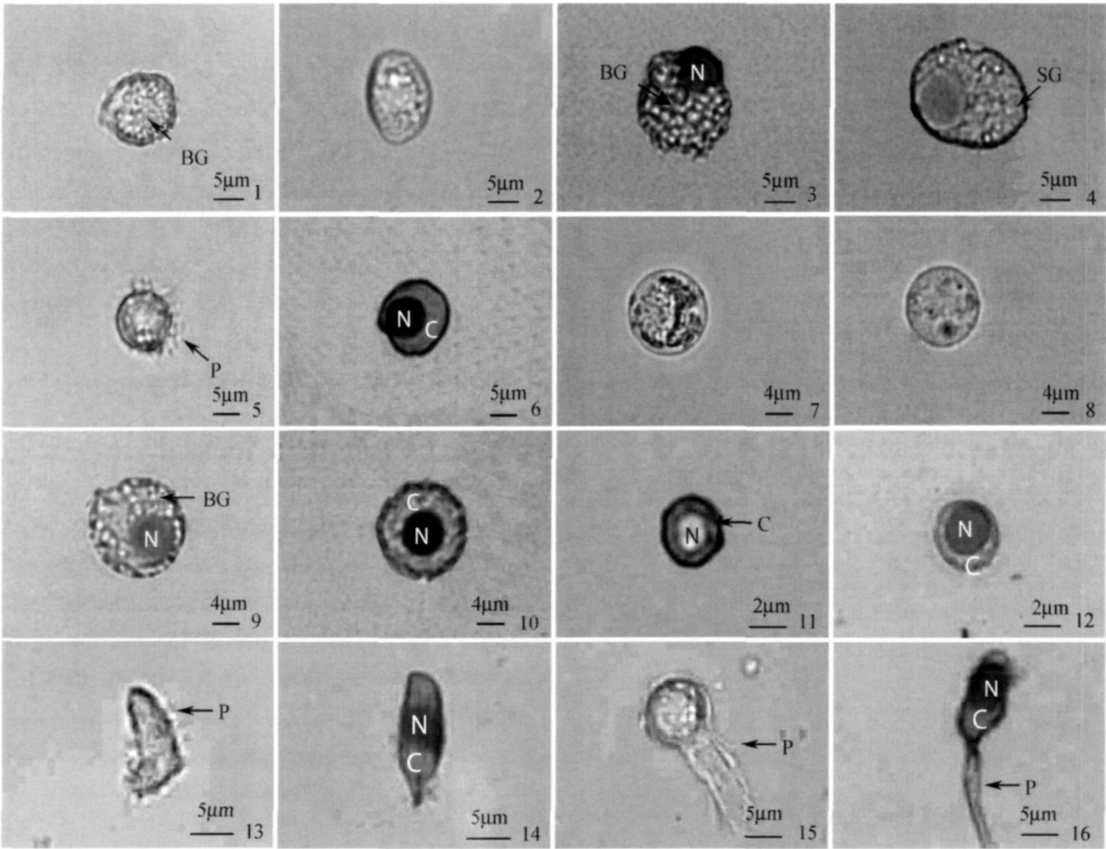
The haemocytes of *H. schlegelii* which was stained purple by Giemsa were observed by light microscope. At the same time, the morphology of living haemocytes was also observed. The haemocytes were classified as 6 types based on the characteristics: amount of granule and its relative size, the nucleolus/plasm (N/P) ratio. They are granulocyte, hyalinocyte, serous cell, lymphoid cell, spindly cell and thrombocyte. A abundant big or small bright granules can be observed in the granulocyte which has the most number. The hyalinocytes were showed central nucleus surrounded by relatively lucent. Filopodia of the granulocyte and hyalinocyte stretched out from any direction. The size of granulocyte ($(18.43 \pm 2.29) \mu\text{m}$) was larger than that of the hyalinocyte ($(13.19 \pm 1.87) \mu\text{m}$), but the N/C ratio of granulocyte (0.11 ± 0.05) was lower than hyalinocyte (0.22 ± 0.10). The lymphoid cell was the smallest ($(4.45 \pm 0.69) \mu\text{m}$) with a relatively big nucleus which is (2.85 ± 0.77) μm , and the serous cell was the biggest ($(19.41 \pm 2.57) \mu\text{m}$). The filopodia of thrombocyte stretched out usually from one side of the cell body. The sizes and N/P ratio of the spindly cell were similar with the hyalinocyte and the thrombocyte.

The percentage of the 6 kinds of haemocyte was counted. The average number of the hemolymph was (1.68 ± 0.78) $\times 10^6$ /mL, the granulocyte (45.84 ± 2.20)%, the hyalinocyte (36.36 ± 3.47)%, the serous cell (5.80 ± 1.65)%, the

lymphoid cell (2.77 ± 1.27)%, the spindly cell (5.13 ± 2.48)%, and the thrombocyte was about (4.09 ± 2.07)%. Results indicate that the granulocyte and hyalinocyte may take the basal metabolism and immunological function.

The dynamic variation *in vivo* of the haemocytes was observed under the LEICA DM 5000 B M icroscope, namely the morphology of haemocytes underwent manifest changes by dipping them on the slides for a short time. The hemocytes just taken out from the shell were all round-shape, and 1—2 minutes later, most of them formed pseudopods. After about 30 minutes, the pseudopods withdrew and haemocytes became round. In this experiment, we found the hyalinocyte and the spindly cell can transform each other. The spindly cell transform to hyalinocyte was completed about 1 hour. The degranulation from one side of cell body was a voluntary and harmless process. When the granules moved out of haemocytes, they would be dissociative and actionless. All the haemocytes began to die and disintegrate within 1h to 1.5h.

Key words *Hyriopsis schlegelii*; Haemocyte; Morphology; Dynamic variation



图版I 池蝶蚌血细胞分类照片 (× 400)

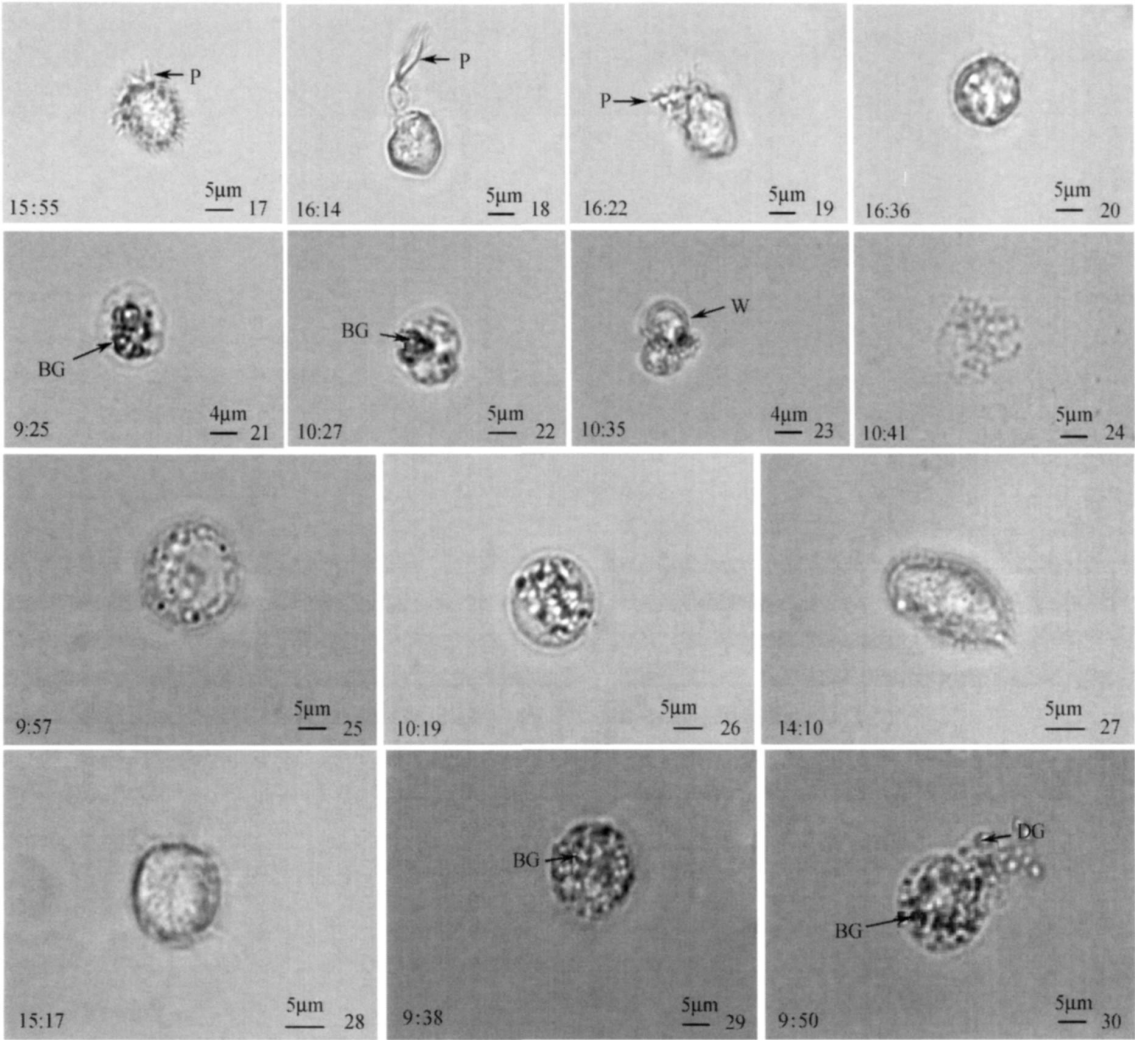
PlateI Morphology of all kinds of the haemocytes in the *H. schlegelii* (× 400)

1—4. 颗粒细胞; 5, 6. 透明细胞; 7—10. 浆液细胞; 11, 12. 类淋巴细胞; 13, 14. 梭形细胞; 15, 16. 血栓细胞

1—4. Show the Granulocyte; 5, 6. Hyalinocyte; 7—10. Serous cell; 11, 12. Lymphoid cell; 13, 14. Spindly cell; 15, 16. Thrombocyte

N: 细胞核; C: 细胞质; BG: 粗大颗粒; SG: 细小颗粒; P: 伪足

N: Nucleus; C: Cytoplasm; BG: Big granule; SG: Small granule; P: Pseudopod



图版 II 池蝶蚌血细胞伪足、颗粒及形态变化过程 (× 400)

Plate II Transformation of the pseudopods, the granules and morphology in the *H. schlegelii* (× 400)

17—20. 细胞伪足变化过程; 21—24. 浆液细胞颗粒减少过程; 25, 26. 浆液细胞颗粒增多过程; 27, 28. 梭形细胞变化过程;
29, 30. 细胞脱颗粒过程
17—20. show the transformation of the pseudopods; 21—24. Decrease of granule in serous cell; 25, 26. Increase of granule in serous cell;
27, 28. Transformation of spindle cell; 29, 30. Process of cell degranulation
BG: 粗大颗粒; DG: 游离颗粒; P: 伪足; W: 花环样结构
BG: Big granule; DG: Dissociative granule; P: Pseudopod; W: Structure as wreath