

中华绒螯蟹血细胞的显微、亚显微形态结构及其分类

陆宏达

(上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

摘要: 通过相差显微镜和电镜观察, 根据中华绒螯蟹血细胞胞质内有无颗粒以及颗粒大小、染色反应、折光性和形成方式的特点, 血细胞分为胞质内无颗粒的无颗粒细胞、胞质内只有具折光性和呈淡红色反应大颗粒的大颗粒细胞、胞质内只有无折光性和呈淡蓝色染色反应小颗粒的小颗粒细胞以及胞质内同时具有大颗粒和小颗粒二种颗粒特性的大小颗粒中间型细胞。小颗粒的形成方式是高尔基体成熟面小泡脱离后直接成为小颗粒, 而大颗粒的形成方式是高尔基体成熟面小泡脱离后, 数个小泡逐渐聚集成蜂窝状大颗粒, 进一步发育成熟为均质大颗粒。实验结果表明: 三种有颗粒的细胞是互相独立的, 可能分别由无颗粒细胞分化而成。

关键词: 中华绒螯蟹; 血细胞; 形态结构; 分类

中图分类号: S968.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)05-0494-07

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis* Milner Edwards)简称河蟹, 属甲壳类动物。要对河蟹免疫学等方面的深入研究, 尤其是细胞介导免疫的研究, 对其血细胞的正确分类和各类血细胞正确形态结构特点的确定是十分必要的基础工作。作者采用相差显微镜和电子显微镜相结合的观察方法, 根据血细胞内颗粒有无和颗粒大小、染色特性、折光性以及形成方式对血细胞的形态结构进行观察和分类。

1 材料与方法

1.1 实验材料 健康河蟹于2000年6月上旬购自上海市奉贤县, 蟹体健康, 大小为48—52g, 在水深为28cm的80×35×40cm室内玻璃水族箱中驯养一周, 驯养期间进行充气、投食、换水等日常管理, 河蟹无异常现象。

1.2 取血方法 为了减少血凝过程对血细胞形态结构的影响, 将洗净装有16号针尖的1mL注射器精确吸取预冷4℃磷酸缓冲液的4%戊二醛固定液0.6mL(pH=7.4)后, 针尖直接从擦净的河蟹步足基部关节的软膜处插入, 深度为0.5cm左右, 在蟹的胸部精确吸取0.4mL的血液, 随即取出注射器, 吸入少量空气并上、下翻转使固定液与血液充分混匀。再把混合液缓慢地注入1.5mL塑料离心管内, 在4℃冰箱中保存, 充分固定后备用。

1.3 相差显微镜和电子显微镜观察 直接从摇匀的固定血液中吸取样品滴在干净的玻

收稿日期: 2001-10-01; 修订日期: 2002-01-30

基金项目: 上海市农委重点攻关项目[农科攻字(97)第6—01]; 上海市教委重点学科项目(B991601)资助

作者简介: 陆宏达(1960—), 男, 江苏省启东市人; 副教授; 主要从事水产动物疾病以及相关方面的工作

片上,在相差显微镜下观察拍照。取摇匀的固定血液约 0.5mL,于 1.5mL 塑料离心管中离心 5min, 1000r/min, 倒去上层的固定液,将溶化后尚未凝固的 2.5% 琼脂滴加到沉淀的血细胞中进行包埋,切成 0.5mm 大小的包埋块,为了避免切口处的血细胞可能脱离包埋块,再沉入未凝固的 2.5% 琼脂中后立即取出,包埋块再放入 4% 戊二醛中保存备用。样品经缓冲液冲洗,再用 1% 酸固定 2h,酒精、丙酮脱水, Epon812 树脂包埋,超薄切片机切片,用醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色,在 JEM-100CX II 透射电镜下观察拍照。

1.4 染色方法 选择取过血的河蟹另一个步足,擦净后,用剪刀剪断步足,迅速将流出的血滴到洗净的载玻片上,用另一片载玻片的边缘接触血滴进行涂片,待干后用叶民刚^[1]的 Wright 染色法和 Giemsa 染色法进行染色,因染色效果差,对二种染色法的染液进行了改良,改良后的 Giemsa 染色法其染色效果未得到改善,而改良后的 Wright 染色法其染色效果好,在光学显微镜下观察细胞大颗粒呈淡红色,而小颗粒呈淡蓝色。Wright 染色法的染液改良方法为美蓝—伊红与甲醇的比例由原来 1g: 600mL 改为 1g: 150mL。本文中提及的染色反应均为改良后的 Wright 染色法染色反应。

2 结果

经相差显微镜和电子显微镜对河蟹血细胞的观察,根据血细胞有无颗粒和颗粒大小、染色特性、折光性以及形成方式,河蟹血细胞分为四种类型:无颗粒细胞、小颗粒细胞、大小颗粒中间型细胞和大颗粒细胞。

2.1 无颗粒细胞

无颗粒细胞(图版 I: 1, 2)通常近圆形或椭圆形,绝大多数为椭圆形,细胞很少出现突起的伪足。细胞核近圆形或椭圆形,有些细胞核呈轻微的波浪形,细胞质少,核与胞质比对比其它类型血细胞的核与胞质比都要大,细胞核占整个细胞体积的 60—80%。异染色质相对较多,主要分布在核膜边缘,一般可见到 1 个核仁,分布在近核膜处,核外膜无或很少有核糖体颗粒附着表面。细胞质内粗糙型内质网和光滑型内质网极少,出现的内质网稀疏分散,呈单纯的小管小囊状。细胞质内无任何电子密度深的颗粒,高尔基体很少发现。线粒体和溶酶体也相当少见,出现的线粒体较小,圆形状,嵴较少,但细胞质内游离的核糖体较多。

2.2 小颗粒细胞

小颗粒细胞(图版 I: 3, 4)通常为椭圆形或长椭圆形,可在细胞的多处伸出伪足,细胞可呈月牙形、棱形、梨形或星状形等形状。细胞核以长椭圆形居多,大多数细胞核核膜呈轻微的波浪形,核外膜出现核糖体颗粒,细胞质相对较多,核与胞质比对比无颗粒细胞要小,异染色质尽管也分布于核膜边缘,但量较少,一般可见 1—2 个核仁分布在近核膜处。细胞质内粗糙型内质网和光滑型内质网明显比无颗粒细胞多而密,长管扁囊状的内质网比例增加。细胞质中有电子密度深而均匀的小颗粒(简称均质小颗粒),其数目不等,少的只有 1 个,多的可达上百个,颗粒大小其长、短轴的范围一般为 $0.2—1.0\mu\text{m} \times 0.15—0.6\mu\text{m}$,在相差显微镜下这些颗粒无折光性,染色后颗粒呈淡蓝色,颗粒有多种形状:圆形、椭圆形、长棒形以及处在分裂状态的哑铃状等。线粒体数目比无颗粒细胞中的线粒体更多,且以近卵圆形居多,溶酶体也明显增加。高尔基体靠近核膜处,1—2 个。

2.3 大颗粒细胞

大颗粒细胞(图版 I : 5, 6, 7) 以椭圆形为主, 伪足的出现使得大颗粒细胞具有多形性: 月牙形、棱形、牛头形、星形以及其它不规则形。核与胞质对比无颗粒细胞小, 胞核有卵圆形、棒形以及其它不规则形, 异染色质少, 分布在核膜边缘, 一般可见 1—2 个核仁, 核膜腔较大, 核外膜分布核糖体颗粒。细胞质内粗糙型内质网和光滑型内质网比小颗粒细胞少, 但内质网的囊腔较大, 粗糙型内质网多于光滑型内质网, 分散的核糖体较多, 高尔基体 1—2 个。细胞质内有许多大颗粒, 颗粒大小其长、短轴的范围一般为 $1.2—2.5 \mu\text{m} \times 0.8—1.6 \mu\text{m}$, 在相差显微镜下大颗粒具有强的折光性, Wright 染色后颗粒染成淡红色, 大颗粒有较多的形状: 圆形、椭圆形、长棒形、棱形、梨形、月牙形等。这些大颗粒在电子显微镜下可明显地分为二种类型, 一种为电子密度深而均匀的大颗粒(简称均质大颗粒), 胞质内绝大部分大颗粒属于这一类; 另一种为电子密度深、浅交替而如蜂窝状的大颗粒(简称蜂窝状大颗粒)(图版 I : 11), 这种颗粒在不同的大颗粒细胞质中的数量不等, 有的可多达 4—5 个。大颗粒细胞胞质内线粒体、溶酶体数量均较少, 无小颗粒细胞胞质内的那种无折光性、染成淡蓝色的小颗粒。

2.4 大小颗粒中间型细胞

大小颗粒中间型细胞(图版 I : 8, 9, 10) 以椭圆形为主, 但细胞可伸出伪足, 常可见月牙形、棱形、星形的细胞。细胞核形态不规则形居多, 核膜轻微的波浪形, 核仁 1—2 个, 分布在异染色质中, 靠近核膜处, 核膜腔较大。胞质分布丰富的粗糙型内质网和光滑型内质网, 呈 7—9 个平行排列的致密长管扁囊状, 有的细胞绝大部分胞质内充满内质网。线粒体数量接近于小颗粒细胞, 但线粒体大, 且形状除卵圆形外, 还有棒形、哑铃形, 嵴较多。而溶酶体数量也和小颗粒细胞相近。胞质内同时具有无折光性、淡蓝色染色反应的小颗粒和折光性强、淡红色染色反应的大颗粒, 大颗粒和小颗粒的数目不等, 有的细胞胞质内只有一个折光性强、染成淡红色的大颗粒(图版 I : 9)。电镜下细胞质内的大颗粒除有均质大颗粒外, 还有蜂窝状大颗粒(图版 I : 8), 但这种蜂窝状大颗粒数量和出现的机率明显比大颗粒细胞要少。

2.5 高尔基体和颗粒的形成

无颗粒细胞中很少见有高尔基体, 其它三种颗粒细胞都有 1 个以上的高尔基体, 高尔基体由几个潴泡相叠而成, 高尔基体凸出一面为形成面, 而凹陷的一面为成熟面, 每个潴泡腔从中央区到边缘区的管腔逐渐膨大, 近成熟面的潴泡其囊腔内出现与细胞质中颗粒电子密度相近的物质, 中央区电子密度略浅, 越近潴泡腔外的小泡腔边缘区, 电子密度越深。细胞中的颗粒是由高尔基体产生的, 但小颗粒形成方式与大颗粒截然不同。小颗粒在高尔基体成熟面形成, 成熟面潴泡边缘的小泡脱离后直接成为小颗粒(图版 I : 12), 而大颗粒尽管也在高尔基体成熟面形成, 但成为细胞质中的均质大颗粒还需经过蜂窝状大颗粒阶段, 成熟面潴泡边缘的小泡脱离后, 几个小泡在成熟面逐渐聚集, 同时在其外围逐渐形成包膜, 成为电子密度深、浅交替的蜂窝状大颗粒(图版 I : 13), 进一步成熟后成为均质大颗粒。小颗粒的形成方式只出现在小颗粒细胞和大小颗粒中间型细胞中, 而大颗粒形成方式只出现在大颗粒细胞和大小颗粒中间型细胞中。

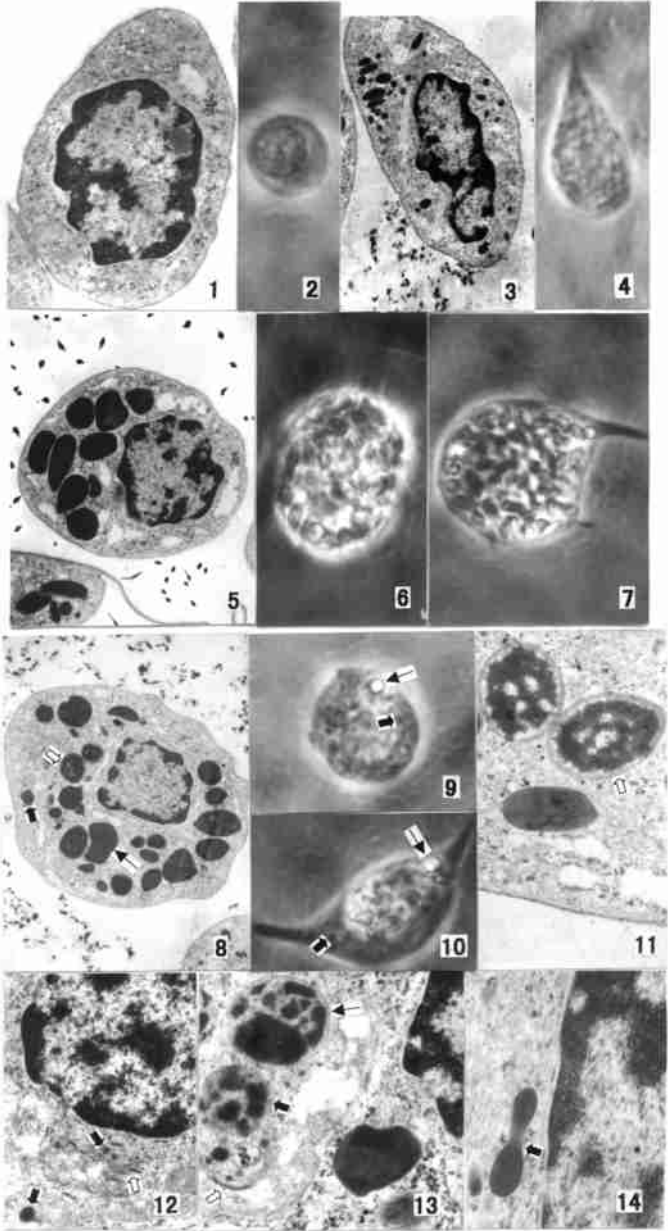
3 讨论

本文根据颗粒有无、染色特性、折光性以及颗粒形成方式等特性, 把河蟹血细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞、大小颗粒中间型细胞和大颗粒细胞 4 种类型。有关甲壳类血细胞的分类命名有许多报道, 但由于其分类标准不统一, 有的根据细胞质内的颗粒大小, 有的根据颗粒的染色特性, 有的根据颗粒折光性, 有的根据细胞的分化程度等分类标准, 而出现血细胞分类和名称的复杂性。尽管 Bauchau^[2] 参照他在 1972 年对河蟹血细胞研究的标准^[3] 把不同名称的细胞归纳为三种类型的细胞, 即透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞, 但不能概全, 各种类型细胞间作为分类依据的某些特征出现互串现象。比如透明细胞主要是根据在观察时细胞质是否呈现透明状态为依据, 实际上一些细胞由于细胞质中颗粒只有 1—2 个, 且相当小, 光镜下不易看清, 同样呈现透明状态, 常把这些细胞也看作透明细胞。而半颗粒细胞以及颗粒细胞主要以颗粒为标准, 那么这些只有几个小颗粒的所谓透明细胞应属半颗粒细胞范畴, 导致透明细胞和半颗粒细胞间出现混淆现象。Bauchau 等把河蟹有颗粒的血细胞主要分为二种类型, 即半颗粒细胞和颗粒细胞。根据本文对河蟹血细胞的观察, 依照颗粒大小、染色特性、折光性以及颗粒形成方式, 有颗粒的细胞存在三种类型, 一种是细胞质中只有具折光性、呈淡红色染色反应大颗粒的大颗粒细胞, 大颗粒中大多数是均质大颗粒, 少量是蜂窝状大颗粒, 均质大颗粒的形成必须经过蜂窝状大颗粒的阶段; 另一种是细胞质中只有无折光性, 呈淡蓝色染色反应小颗粒的小颗粒细胞, 小颗粒的形成方式与大颗粒不同, 小泡脱离后直接形成小颗粒, 小颗粒细胞中无蜂窝状的大颗粒结构; 第三种为大小颗粒中间型细胞, 这种细胞胞质中同时具有大、小两种颗粒, 大颗粒具有大颗粒细胞中的大颗粒特性, 而小颗粒具有小颗粒细胞中的小颗粒特性, 形成大颗粒和小颗粒的二种方式同时存在。

Bruntz^[4] 和 Bauchau 等一些作者认为甲壳类血液中的各种类型血细胞是血细胞连续发育过程中的不同发育阶段, 而大颗粒细胞是发育成熟最后阶段的血细胞。本文中河蟹的血细胞分为无颗粒细胞和三种有颗粒的细胞。根据小颗粒细胞、大小颗粒中间型细胞和大颗粒细胞的形态结构特点以及颗粒折光性、染色反应和形成方式等特性, 这三种有颗粒的细胞并非是连续发育过程中血细胞发育的不同阶段, 而是互相独立的三种有颗粒血细胞类型。无颗粒细胞小而近圆形, 核与胞质比对比其它类型血细胞都要大, 胞质内的粗糙型内质网和光滑型内质网极少且呈单纯的小管小囊状以及线粒体和溶酶体等细胞器也相当少等特征表明: 无颗粒细胞处于细胞发育的早期阶段, 它可能是三种有颗粒细胞的共同母细胞。无颗粒细胞在循环血细胞中所占的比例很低, 绝大部分无颗粒细胞分布在造血组织内, 可能分别分化成小颗粒细胞、大小颗粒中间型细胞和大颗粒细胞后再释放到循环血液中。在循环血液中未发现正在分裂的血细胞。

甲壳类血细胞在免疫防御中起着十分重要的作用, 不同种类以及同种甲壳类的不同类型血细胞免疫防御作用有较大的差异。Johansson 等^[5] 报道了螯虾 (*Pacifastacus leniusculus*) 的透明细胞具有吞噬作用, 半颗粒细胞对外源物质具有包被 (Encapsulation) 作用, 颗粒细胞具有贮存和释放酚氧化酶的作用; 而 Sung 等^[6] 用脂多糖 (Lipopolysaccharide) 进行处理后, 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的三种血细胞都能够吞噬外源物质, 但透明细胞

的吞噬能力要低于半颗粒细胞和颗粒细胞。本研究中河蟹的小颗粒细胞、大小颗粒中间型细胞和大颗粒细胞都能伸出较多的伪足,这些细胞的形态和大小随着伪足的伸缩有所变化,具备细胞进行吞噬活动的形态结构特点,而无颗粒细胞很少见有伪足,从形态结构特点上显示了河蟹无颗粒细胞的吞噬能力即使有可能也是相对较弱的。



图版 I

1. 细胞质内无颗粒,胞质少,核与胞质比大(电镜), $\times 6000$; 2. 细胞和核近圆形,胞质内无颗粒,核与胞质比大(相差显微镜), $\times 1500$; 3. 胞质内分布许多电子密度深的小颗粒,核与胞质比较小(电镜), $\times 4800$; 4. 胞质内分布许多无折光性的小颗粒,细胞的一端伸出伪足,细胞呈梨形(相差显微镜), $\times 1800$; 5. 胞质内分布许多电子密度深的大颗粒

粒,核与胞质比较小(电镜), $\times 4000$; 6. 胞质内分布许多具折光性的大颗粒(相差显微镜), $\times 2280$; 7. 胞质内分布许多具折光性的大颗粒,细胞伸出伪足(相差显微镜), $\times 2280$; 8. 胞质内分布着电子密度深的大颗粒(←)、电子密度深的小颗粒(↔)和电子密度深、浅交替的蜂窝状大颗粒(⇒),核与胞质比小(电镜), $\times 4800$; 9. 胞质内分布具折光性的大颗粒(←)和无折光性的小颗粒(↔)(相差显微镜), $\times 2280$; 10. 胞质内分布许多具折光性的大颗粒(←)和无折光性的小颗粒(↔),细胞的两端伸出伪足(相差显微镜), $\times 2280$; 11. 蜂窝状大颗粒(⇒): 外包被膜,颗粒内物质呈现电子密度深、浅交替的蜂窝状结构(电镜), $\times 14400$; 12. 小颗粒细胞内高尔基体(⇒)成熟面的小泡脱离后直接成为小颗粒(↔)(电镜), $\times 11200$; 13. 大颗粒细胞内高尔基体(⇒)成熟面的小泡脱离后正在聚集成为蜂窝状大颗粒(↔)和已形成外包有膜的蜂窝状大颗粒(←)(电镜), $\times 14400$; 14. 小颗粒细胞胞质内的小颗粒正在一分为二(↔)(电镜), $\times 22400$

1. No granular in cytoplasm, ratio of cytoplasm to nucleus was high(EM), $\times 6000$; 2. Cell and nucleus were near sphere, no granular in the cytoplasm, ratio of cytoplasm to nucleus was high(PCLM), $\times 1500$; 3. Many even electron dense small granulars in cytoplasm, ratio of cytoplasm to nucleus was low(EM), $\times 4800$; 4. Many non refractile small granulars in cytoplasm, cell exhibits pseudopodium and becomes pear shape(PCLM), $\times 1800$; 5. Many even electron dense large granulars in cytoplasm, ratio of cytoplasm to nucleus was low(EM), $\times 4000$; 6. Many refractile large granulars in cytoplasm(PCLM), $\times 2280$; 7. Many refractile large granulars in cytoplasm, cell exhibits pseudopodia(PCLM), $\times 2280$; 8. even electron dense large granulars(←), even electron dense small granulars(↔) and reticulate dense large granulars(⇒) in cytoplasm, ratio of cytoplasm to nucleus was low(EM), $\times 4800$; 9. refractile large granular(←) and non refractile small granular(↔) in cytoplasm(PCLM), $\times 2280$; 10. refractile large granular(←) and non refractile small granular(↔) in cytoplasm, cell exhibits pseudopodia(PCLM), $\times 2280$; 11. Reticulate dense large granulars(⇒): reticulate dense structure were surrounded by membrane in cytoplasm(EM), $\times 14400$; 12. The small vacuoles which were released from the Golgi organelle(⇒) directly become the small granulars(↔)(EM), $\times 11200$; 13. The small vacuoles which were released from the Golgi organelle(⇒) first gathered together(↔), then formed reticulate dense bodies(←)(EM), $\times 14400$; 14. Small granular was dividing from one to two(↔)(EM), $\times 22400$

与大颗粒大小相似只在大颗粒细胞和大小颗粒中间型细胞中出现的蜂窝状大颗粒(Reticulate dense bodies 或 Reticulate dense large granules), 这种颗粒最早在 *Carcinus maenas* 的血细胞研究中是由 Johnston 等^[7]描述的, 认为是均质大颗粒的另一种形式, 但未提及蜂窝状大颗粒与均质大颗粒间的内在关系问题。Bodammer^[8]在 *Callinectes sapidus* 中发现的这种蜂窝状大颗粒看作为与其它颗粒无关而独立存在的一种颗粒形式。本文电镜观察结果表明, 这种蜂窝状大颗粒是均质大颗粒前期阶段的颗粒形式, 由高尔基体形成且由膜包被的蜂窝状大颗粒, 进一步成熟后成为均质大颗粒。

在小颗粒细胞和大小颗粒中间型细胞中常出现一种呈长哑铃状小颗粒(图版 I : 14), Bodammer^[8]认为这种哑铃状小颗粒是两个颗粒正在融合成一个较大颗粒的现象, 本实验电镜观察认为这种哑铃状小颗粒从形态特点表明正处于分裂状态的小颗粒, 哑铃状小颗粒进一步拉长, 最后形成两个更小的颗粒。而在大小颗粒中间型细胞和大颗粒细胞中未发现大颗粒处于分裂状态的这种现象。小颗粒的数量增加主要通过高尔基体产生, 产生的小颗粒可进一步通过分裂增加数量; 而大颗粒的数量增加只有通过高尔基体产生蜂窝状大颗粒, 成熟后成为均质大颗粒一条途径。

参考文献:

- [1] 叶民刚. 血液病手册[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1982
- [2] Ratcliffe N A, Bowley A F. Crustaceans[A]. Invertebrate Blood Cells. Volume 2 [M]. London: Academic press, 1981, 385—420
- [3] Bauchau A G, De Brouwer M. Ultrastructure des lémyocytes d'*Eriocheir sinensis*, Crustacé Decapode Brachyoure[J]. *J Microsc.*, 1972, 15: 171—180

- [4] Bruntz L. Etudes sur les organes lymphoïdes, phagocytaires et excréteurs des crustacés supérieurs[J]. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 1907, **7**: 1—67
- [5] Johansson M W, Keyser P, Sritunyaluksana K, Soderhall K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. *Aquaculture*, 2000, **199**(1—3): 45—52
- [6] Sung H H, Kuo P A, Kao W Y. Effect of lipopolysaccharides on in vitro phagocytosis by hemocytes from giant freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. *Fish Pathol.*, 2000, **35**(3): 109—116
- [7] Johnston M A, Elder H Y, Davies P S. Cytology of *Caranus* haemocytes and their function in carbohydrate metabolism[J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1973, **46**: 569—581
- [8] Bodammer J E. Cytological observations on the blood and hemopoietic tissue in the crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Cell Tiss. Res.*, 1978, **187**: 79—96

CLASSIFICATION AND MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS OF HAEMOCYTES IN *ERIOCHEIR SINENSIS* BY LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIES

LU Hong-da

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

Abstract: By observations of phase contrast light and electron microscopies, according to granular existence and granular size, refraction, staining reaction, forming way, haemocytes were classified into four type cells: agranular cell in whose cytoplasm there was no granular; large granular cell in whose cytoplasm there were refractile and red-stained large granulars; small granular cell in whose cytoplasm there were non-refractile and blue-stained small granulars; large and small granular intermediate cell in whose cytoplasm there were large and small types granulars. The forming way of small granulars was that the small vacuoles which were released from the Golgi organelle directly became the small granulars. The forming way of large granulars was that the small vacuoles which were released from the Golgi organelle first gathered together, then formed reticulate dense bodies, and finally matured into even dense large granulars. The experimental results showed that three types granular cells independently developed, could respectively be differentiated from agranular cells.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Haemocyte; Morphology; Classification