

研究简报

日本绒螯蟹血淋巴细胞的研究

周 玉

(解放军军需大学军事兽医系, 长春 130062)

STUDIES ON THE HAEMOCYTE OF *ERIOCHEIR. JAPONICA* DE HAAN

ZHOU Yu

(Faculty of Military Veterinary, The Quartermaster University of PLA, Changchun 130062)

关键词: 日本绒螯蟹; 血淋巴细胞; 超微结构

Key words: *Eriocheir. japonica* de Haan Haemocyte; Ultrastructure

中图分类号: S968.25 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)06-0664-03

甲壳动物血淋巴细胞具有吞噬异物的功能, 其种类、数量与其免疫功能密切相关。对甲壳动物血淋巴细胞进行研究, 无论在理论上还是在实践上, 都具有十分重要的意义。有关甲壳动物血淋巴细胞形态、结构及其分类的研究, 国内外已有文献报道^[1-8], 本文对经济价值较高、肉质鲜美、风味独特、营养丰富的日本绒螯蟹 (*Eriocheir. japonica* de Haan) 的血淋巴细胞进行了分类和显微、超微结构观察; 对血淋巴细胞密度和分类进行了计数并进行了雌雄间的比较, 为进一步研究提供参考。

1 材料与方法

于2002年6月取二龄日本绒螯蟹雌雄各20尾, 体重100—150g。用1mL注射器先吸取10%海水甲醛0.1mL, 再从蟹围心腔抽取等量淋巴液。混均后, 一部分样品按常规方法涂片。另一部分样品经1500r/min离心10min; 弃掉上清液, 4℃2.5%戊二醛固定, PBS漂洗2—3次, 切成1mm³小块, 1%酸固定2h, 4℃2.5%戊二醛固定, 乙醇逐级脱水, Epon812环氧树脂浸透、包埋、聚合。NOVA-LKB超薄切片机切片, 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色, JEM-1200EXII透射电镜观察拍照。

血细胞的染色和计数分别按于建平^[1]和蔡雪峰^[2]方法。

2 结果

2.1 日本绒螯蟹血淋巴细胞光镜观察

在光镜下, 日本绒螯蟹血淋巴细胞可分为三类, 即无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞。

无颗粒细胞圆形或卵圆形, 长轴9.59—12.67μm, 短轴7.48—11.14μm, 核较大, 呈深灰色, 细胞质呈淡灰色, 没有发现颗粒状物质(图1)。

小颗粒细胞圆形或卵圆形, 大小介于无颗粒细胞和大颗粒细胞之间, 长轴6.82—11.86μm, 短轴4.11—7.11μm, 细胞质中有一些黑色的颗粒, 细小, 量少, 分布较均匀而使细胞质呈网状。细胞核深色, 清晰可见, 略偏于细胞一侧(图2)。

大颗粒细胞圆形或卵圆形, 在三类细胞中, 其体积最大, 长轴10.69—16.29μm, 短轴8.34—12.18μm。细胞质中含有大量较大的颗粒, 颗粒的折光性较强, 几乎掩盖了细胞核(图3)。

2.2 日本绒螯蟹血淋巴细胞电镜观察

无颗粒细胞 细胞质电子密度较低, 细胞器稀少, 内吞泡丰富, 偶见线粒体, 无电子致密颗粒, 细胞核较大, 核内异染色质较少, 呈带状分布在核内侧, 或岛状分布在核中央, 可见核孔(图4)。

小颗粒细胞 细胞圆形或卵圆形, 细胞质内含有数量不等、电子致密度不同的小颗粒, 颗粒外包被单层膜, 还可见粗面内质网、较大的线粒体和大量的游离核糖体, 内吞泡较多, 有的具有双层膜结构; 细胞核位于细胞中央, 核内异染色质丰富, 分布在细胞核内侧, 核膜清晰, 可见核孔(图5)。

大颗粒细胞 细胞质中含有大量电子致密的大颗粒, 颗粒完全被内吞物填充, 着色较深, 无电子透明边缘带, 可见较大的线粒体, 丰富的内质网、自由核糖体和大小不等的空泡, 细胞核较小, 位于细胞体中央, 核内异染色质丰富, 且呈岛状分布(图6)。

收稿日期: 2002-07-08; 修订日期: 2002-09-11

基金项目: 农业部重点科研项目(渔95-B97-06-01)资助

作者简介: 周玉(1969—), 男, 内蒙古赤峰市人; 博士, 讲师; E-mail: zhousy69@sina.com



1 无颗粒细胞示较大的细胞核(2000 \times)；2 小颗粒细胞示细胞质中较小的颗粒而使细胞质呈网状(2000 \times)；3 大颗粒细胞示较大的电子致密颗粒(2000 \times)；4 无颗粒细胞示较大的细胞核(12 000 \times)；5小颗粒细胞示较小的电子致密颗粒(12 000 \times)；6 大颗粒细胞示较大的电子致密颗粒(12 000 \times)。1 hyaline haemocyte showing large nucleus(2000 \times)；2 Small granular haemocyte showing small granules which look like reticulation(2000 \times)；3 Large granular haemocyte showing large granules which cover up nucleus almost(2000 \times)；4 hyaline haemocyte showing large nucleus(12 000 \times)；5 Small granular haemocyte showing small granules(12 000 \times)；6 Large granular haemocyte showing large granules(12 000 \times)

2.3 日本绒螯蟹血淋巴细胞密度、细胞分类计数和细胞大小的比较

雌、雄日本绒螯蟹血淋巴细胞密度、细胞分类计数和细胞大小的比较分别见表1和表2。

表1 雌、雄日本绒螯蟹血淋巴细胞数量的比较

Tab. 1 Comparison of haemocyte counts of *E. japonica* between female and male

	雌性(♀)		雄性(♂)		总值	
	X±SD	CV%	X±SD	CV%	X±SD	CV%
无颗粒细胞	2.61±0.82 ^{* *}	31.42	0.72±0.37	51.39	1.69±0.86	50.89
Agranular						
小颗粒细胞	79.17±2.68*	3.39	86.04±1.23	1.43	82.08±3.42	4.17
Small granular						
大颗粒细胞	18.22±1.27*	6.97	13.24±0.90	6.80	16.23±2.03	12.51
Large granular						
细胞密度	3.37±1.98	58.75	2.73±1.41	51.65	3.10±2.36	76.13
Hemocyte density (10 ³ 个/mm ³)						

注: X±SD 为平均数±标准差,CV 为变异系数,* 为差异显著($P<0.05$), ** 为差异极显著($P<0.01$)。

表2 雌、雄日本绒螯蟹各类血淋巴细胞大小的比较

Tab. 2 Comparison of size of different haemocyte of *E. japonica* between female and male

细胞(μm)	雌性(♀)		雄性(♂)		总值		
	X±SD	CV%	X±SD	CV%	X±SD	CV%	
C. L.	11.52±1.63	14.15	10.50±1.42	13.52	11.13±1.54	13.84	
无颗粒细胞	C. S.	9.05±2.22	24.53	9.72±1.14	11.73	9.31±1.83	19.66
Agranular	N. L.	9.32±1.31	14.06	9.21±2.38	25.84	9.24±1.63	17.64
	N. S.	9.02±1.84	20.40	8.95±1.78	19.89	8.88±1.38	15.54
小颗粒细胞	C. L.	11.03±2.62	23.75	11.93±1.51	12.66	11.54±2.19	18.98
Small granular	C. S.	9.32±2.99	32.08	9.44±0.45	4.77	9.34±2.52	26.98
	N. L.	6.52±1.71	26.23	6.85±1.82	26.57	5.61±1.50	26.74
	N. S.	5.48±1.52	27.74	5.44±1.12	20.59	5.43±1.43	26.34
大颗粒细胞	C. L.	13.00±1.29	9.92	14.61±2.18	14.92	13.49±2.80	20.76
Large granular	C. S.	9.82±1.93	19.65	10.33±1.82	17.62	10.26±1.92	18.71
	N. L.	6.90±0.65	9.42	7.73±1.42	18.37	7.33±1.36	18.55
	N. S.	5.36±0.92	17.16	6.27±1.14	18.18	5.94±1.34	22.56

注: X±SD 为平均数±标准差,CV 为变异系数。

3 讨论

甲壳动物血细胞的研究始于十九世纪,但由于不同的研究者所用的研究材料、手段和方法不同,导致对甲壳动物血细胞的分类无规范统一的标准。早期的研究者多采用光镜观察血涂片及染色反应。六十年代,Dall 和 Maynard 提出甲壳动物血细胞呈变形虫状^[3,4]。后来,通过固定液改进的快速固定,防止了血细胞突起的形成,较准确地反应了血细胞的自然状态。如 Cornick 等按形态染色及光学特点将美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)的血细胞分成原透明细胞、透明细胞、嗜酸性颗粒细胞和兼色粒细胞^[5]。Banchau 将甲壳动物的血细胞分为透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞^[6]。Martin 依据血细胞中特殊颗粒的性质、大小、形态和数量以及存在与否,把单肢虾(*Sicyonia ingentis*)和加洲对虾的血细胞分为小颗粒细胞、大颗粒细胞和无颗粒细胞^[7]。

目前甲壳类血细胞的分类及命名渐趋一致,其分类依据基本与 Martin^[7]的观点一致,其命名一般为:无颗粒细胞(或透明细胞)小颗粒细胞(或半透明细胞)、大颗粒细胞(或颗粒

细胞)。

日本绒螯蟹的血淋巴细胞以小颗粒细胞为主,高达 82.08%,其变异系数较小(4.17%),雌雄各体间存在显著差异。无颗粒细胞最少,仅占 1.69%,变异系数较大,高达 50.89%,雌雄间存在极显著差异。大颗粒细胞占 16.23%,雌性明显高于雄性。这种雌雄差异可能与繁殖有关,其所反应的生理意义,须研究各类血淋巴细胞的功能后,进一步探讨。日本绒螯蟹血淋巴细胞中,无颗粒细胞最少,大颗粒细胞次之,小颗粒细胞最多,与三疣梭子蟹^[8]相似。

日本绒螯蟹血淋巴细胞密度比鱼类小数十倍,雌雄间无显著差异,但不同个体间差异较大(变异系数达 76.13%)。

在细胞大小方面,无颗粒细胞最小($11.13\mu\text{m}^2 \times 9.31\mu\text{m}^2$),小颗粒细胞次之($11.54\mu\text{m}^2 \times 9.34\mu\text{m}^2$),大颗粒细胞最大($13.49\mu\text{m}^2 \times 10.26\mu\text{m}^2$),与中华绒螯蟹和虾类^[1,2]相似,即有颗粒细胞比无颗粒细胞大(表 3),这一点与鱼类也相似。雌雄间无显著差异,且变异系数均在 20% 左右,说明细胞大小相对稳定,个体间差异较小。

为了避免产卵过程生理条件对蟹血淋巴细胞的影响,本

表 3 日本绒螯蟹与其他甲壳动物血淋巴细胞的比较大小

Tab. 3 Comparison of size of hemocyte between *E. japonica* and other crustacean

种名	大颗粒细胞	小颗粒细胞	无颗粒细胞
日本绒螯蟹	$13.49\mu\text{m} \times 10.26\mu\text{m}$	$11.54\mu\text{m} \times 9.34\mu\text{m}$	$11.13\mu\text{m} \times 9.31\mu\text{m}$
<i>E. japonica</i>			
中华绒螯蟹 ^[10]	$13-18\mu\text{m}$	大小介于两者之间	$6-8\mu\text{m}$
<i>Eriocheir sinensis</i>			
三疣梭子蟹 ^[8]	$11.49\mu\text{m} \times 8.32\mu\text{m}$	$11.05\mu\text{m} \times 9.21\mu\text{m}$	$11.23\mu\text{m} \times 9.21\mu\text{m}$
<i>Portunus tiboculares</i>			
中国对虾 ^[11]	$17.5-32.5\mu\text{m}$	$15.0-22.5\mu\text{m}$	$17.5-20.0\mu\text{m}$
<i>Penaeus chinensis</i>			
日本对虾 ^[1]	$13.5\mu\text{m} \times 6.8\mu\text{m}$	$9.5\mu\text{m} \times 5.5\mu\text{m}$	$6.4\mu\text{m} \times 5.3\mu\text{m}$
<i>Penaeus japonicus</i>			

实验所用材料全为已性成熟,但未产过卵的蟹,细胞密度经统计学检验,虽差异不显著,但从平均值来看,却是雌性高于雄性,与三疣梭子蟹相似^[8],而与一般动物的生理规律明显不同,有关这一点,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Yu J P. Hemocyte classification, density and percentage of the prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1993, 23(1): 107-114[于建平. 日本对虾血细胞分类、密度及组成. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(1): 107-114]
- [2] Cai X F Luo L A preliminary study of haemocyte of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(3): 289-292[蔡雪峰, 罗琳. 日本沼虾血细胞的初步研究. 水生生物学报, 2000, 24(3): 289-292]
- [3] Dall W. Studies on the physiology of a shrimp, *Metapenaeus mastresii* (Haswell) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). I. Blood constituents [J]. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 1964, 25: 145-161
- [4] Waterman T. H. The Physiology of Crustacea [M]. New York: Acad. Pr., 1960, 1, 161-226
- [5] Cornick J W, Stewart J E. Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes: Classification, differential count and associated agglutinin activity [J]. *J. Invertebr. Pathol.*, 1978, 31: 194-203
- [6] Rajchel N. A. Rowley A F. Invertebrate Blood Cells [M]. New York: Acad. Pr., 1981, 2, 386-420
- [7] Martin G G, Gaves B L. Fine structure and classification of shrimp hemocytes [J]. *J. Morph.*, 1985, 185: 339-346
- [8] Zhou Y, Mu Z K, Yang Z G. Haemocyte morphology, classification and differential count of swimming crab, *Portunus trituberculatus* [J]. *Journal of Shanghai Fishery University*, 2001, (3): 279-281[周玉, 穆占昆, 杨振国. 三疣梭子蟹血淋巴细胞的形态、分类及计数. 上海水产大学学报, 2001, (3): 279-281]