

四种对虾血细胞组成及超微结构*

陈平 黄槐¹⁾ 池信才¹⁾ 吴定虎¹⁾ 陈细法

(厦门大学测试中心 361005)

¹⁾ (厦门市水产研究所 361005)

摘要 本文应用电镜超薄切片技术,对中国对虾、日本对虾、长毛对虾和草虾的血细胞进行超微结构的研究,根据血细胞形态、超微结构特点,特别是胞质中特征性颗粒的大小和内部结构,区分为四类:①透明细胞,其胞质不含特征性颗粒,具有较强吞噬能力;②小颗粒细胞,其胞质含有高电子密度的小圆形颗粒和条纹状大颗粒,在对虾防御反应中起着关键性作用;③大颗粒细胞,其胞质中含有高电子密度均质大颗粒,在宿主防御反应中起着细胞协同作用;④“浆样细胞”,其胞质充满板层状糙面内质网,但不含特殊颗粒,它是否由透明细胞转化而来,尚待确证。

关键词 对虾,血细胞,免疫功能

早在1885年国外已应用各种染色技术,在光镜下对甲壳动物血细胞进行了研究。由于对虾种类繁多,染色技术各异,血细胞离体后与实验器皿接触而变形,因此研究得不多。尽管近年来应用电镜、组化、放射自显影和免疫技术对对虾血细胞进行了研究,也未能使血细胞分类获得统一的标准。其功能更是众说纷云,尚无定论。本课题组改进了制样技术和观察方法,不仅验证前人的分类标准,而且提出自己的见解。众所周知,甲壳动物免疫学是一门新兴学科,对虾免疫防御反应已是热点课题,免疫防御反应主要依赖于血细胞的吞噬、包囊、形成细胞结、凝集和溶菌等作用来完成的,因此,对对虾血细胞的研究,可望寻找某些药物或制剂,以调动虾体自身免疫功能,抵御外来病原的侵袭,防止疾病,特别是病毒病的发生和蔓延。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用的中国对虾(*Penaeus chinensis*)、日本对虾(*Penaeus japonicus* Bate)、长毛对虾(*Penaeus penicillatus* AlcocR)和草虾(*Penaeus monodon* Fabricius)采集于厦门市郊、海沧和漳浦县。用无病症对虾各25尾,作为健康组,而发病虾池肉眼可见病症的对虾各62尾作为患病组。虾体长10cm以上,全部用不经速冻的活体固定。实验

* “八五”国家科技攻关和福建省水产厅资助项目。

1995-03-11收到;1997-11-17修回。

连续重复三年。

1.2 方法 用注射器插入跳动的心脏内吸取血,固定后离心;为了保持血细胞自然形态,部分样品直接固定结扎的心脏;另一部分样品观察组织中游离的血细胞。上述三种方法获得的血细胞都用 3% 戊二醛-福马林混合液前固定 2h,1% 锇酸后固定 2h,环氧树脂 618 包埋,醋酸铀块染 12h,用 LKB8800 型超薄切片机切得 800A°以下的片子,再用柠檬酸铅片染 5min,用 JEM100CXII 透射电镜观察和拍片。

2 观察结果

依据血细胞质中颗粒存在与否,数量多寡、体积大小、外部形态和内部结构,把上述 4 种对虾的血细胞分成四类:透明细胞、小颗粒细胞、大颗粒细胞和“浆样细胞”。

2.1 透明细胞 多数细胞呈卵圆形,偶见球形,表面光滑无突起,在病毒感染较严重的器官中游离的透明细胞数量略有增加,并常有少量伪足伸出。胞核卵圆形,体积颇大,居中位置,常染色质占据大部分,均匀细密,异染色质仅分布于核周成一圈。胞质稀少,成一圈围绕核,形似哺乳类动物的淋巴细胞,其间有少量线粒体、糙面内质网、滑面内质网和核糖体,高尔基复合体不多见,未见维管束,但可见数个分布在细胞周边的空泡。由于该细胞的细胞器稀少,电子密度低,呈透明状而得名,也由于胞质中无高电子密度的颗粒存在,故又称无颗粒细胞(图版 I:1)。

2.2 小颗粒细胞 细胞为卵圆形或纺锤形,多数细胞表面无伪足,偶尔有小伪足伸出。细胞核卵圆形或肾形,体积比透明细胞小,常染色质减少,而异染色质相对增多。胞质中有大量的线粒体和核糖体,内质网比透明细胞多,并常见高尔基复合体,在细胞周边有大量空泡和一些微管束。然而,具有特征性结构的是胞质中有大量体积小的高电子密度颗粒(图版 I:2)。该细胞由此而得名。颗粒外裹着单位膜,核心与被膜之间有狭窄的空晕隔开,颗粒直径约为 250—270nm;另一种颗粒中充满高电子密度的条纹,条纹有的成螺旋状排列,有的平行排列,有的无规则散在,它们与被膜间无空晕存在(图版 I:3,4),条纹状颗粒的直径较大,都在 300nm 以上。在病毒感染的组织中不仅其数量增多,分布范围也由结缔组织扩展到上皮细胞之间,而且多数聚集在靶细胞,特别在坏死的靶细胞周围。

2.3 大颗粒细胞 是 4 种细胞中体积最大的一种,呈卵圆形,无伪足伸出。胞核卵圆形,体积较小颗粒细胞小,常居中位置,常染色质明显多于异染色质,核仁偶见。胞质有少量线粒体、内质网、核糖体和空泡,胞质外周有微管束分布,未见高尔基复合体(图版 I:5)。其特征性结构是胞质中有较多体积大的颗粒,该细胞也因此而得名。颗粒由单位膜包被,其间充满均质的高电子密度物质,包被膜与充填物之间无空晕,其直径可比小颗粒细胞中的致密小颗粒大 1 倍以上。

2.4 “浆样细胞” 这是首次发现的细胞,其超微结构特点类似于哺乳动物的浆细胞,故暂称之。该细胞卵圆形或短梭形,表面有少量微绒毛伸出。胞核与胞体形态相应,常偏中位置,其特点是异染色质明显多于常染色质,且呈放射状排列,形似车轮状。线粒体大而圆,核糖体丰富,多数呈串珠状、螺旋状或簇状,排列在内质网上,少数游离于胞质中,高尔基复合体较发达,附近常有数量不多的高电子密度颗粒(图版 I:6)。“浆样细胞”最大特点是胞质充满糙面内质网,且以胞核为轴心,呈现圈状排列,因此有着强烈的轮状感。在

患病毒病的草虾和日本对虾的结缔组织中较常见此细胞,而且内质网腔略有扩张,腔中充满絮状合成物,表明其蛋白质合成旺盛。

2.5 血细胞分布 在观察的四种对虾中,无论是健康的或患病的均可见到透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞。但是,不同虾种之间,同种血细胞的超微结构略有不同,如细胞大小、颗粒多寡和伪足长短等,但都没有特征性的差异。然而,只在草虾和日本对虾的结缔组织、淋巴样组织和组织间隙腔中观察到“浆样细胞”,未在中国对虾和长毛对虾相应的组织中找到。上述四种细胞的数量以小颗粒细胞为最多,“浆样细胞”最少,都与病毒和细菌感染程度有着某些关系。

3 讨论

3.1 对虾血细胞分类依据

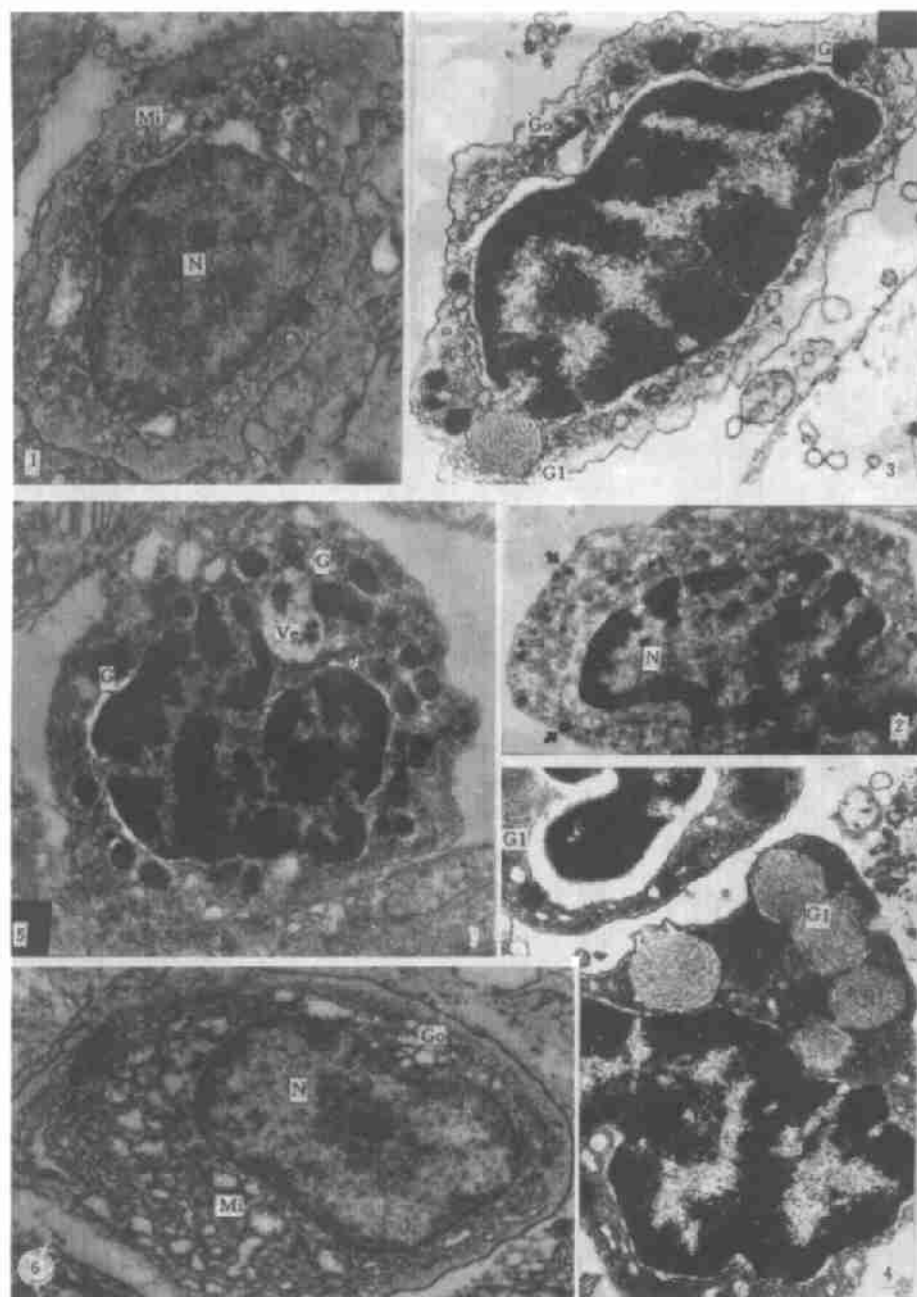
虾类血细胞分类至今无统一的标准,亦无定论,Cornick 等^[1]把螯龙虾血细胞分成 4 类:原透明细胞、透明细胞、嗜酸性颗粒细胞和嫌色细胞。Banchau^[2]将甲壳动物血细胞分成三类:透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞。Martin^[3]依据血细胞质中特殊颗粒存在与否,性质、大小、形态和数量,把单肢虾和加州对虾的血细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞。本文对上述四种养殖对虾血细胞超微结构的观察结果认为 Martin 分类依据较充分,且反映出血细胞结构的特异性和功能的一致性,也与于建平^[4]和叶燕铃^[5]对日本对虾和中国对虾血细胞的分类标准相一致。这为日后其他虾类血细胞分类标准的统一和功能状态的研究提供有价值的参考资料。

文献上未见长毛对虾和草虾血细胞分类的报道,本文也是依据胞质颗粒特性进行分类,发现同样存在着上述几种血细胞,这提示着不同种对虾有着类同的血细胞种类和超微结构特性,可能存在着相似的免疫防御机制。

3.2 血细胞结构与功能的关系

血细胞质中特殊颗粒有两种超微结构形式:均质颗粒和条纹颗粒,而且体积大小和存在数量变化颇大,Hearing 等^[6]认为上述两种颗粒和空泡代表着颗粒形成过程中成熟和释放的不同阶段,并指出条纹颗粒中的条纹是微管,其出现与凝血过程有关联。Bodammer^[7]则持相反意见,认为条纹非微管,而是不连续小颗粒组成,与凝血过程无关。Martin 则认为颗粒内部超微结构变化是血细胞退化过程的表征。作者不完全同意上述见解,而认为不同结构的颗粒可能含有不同的化学成份,起着完全不同或者协同的免疫功能。条纹颗粒中的条纹并非微管,也非不连续小颗粒组成,而是由细纤维盘绕而成,其组织形式类似哺乳类动物(如豚鼠)嗜碱性特殊颗粒^[8]。在光镜下小颗粒细胞质强嗜碱性佐证了我们的观察。在患病虾体内,其出现频率明显高于健康虾体,且常集中在病毒靶细胞附近。这提示着其功能与哺乳类动物粒细胞系有相似之处,在对虾血细胞防御反应中起着关键性作用。

大颗粒细胞中高密度的特殊颗粒含有大量的酚氧化酶原,它可以作为衡量对虾免疫功能的定性指标。虽然大颗粒细胞无吞噬能力,附着及扩散力也较弱,但用活化的酚氧化酶原组分处理后,其胞吞作用增强,释放出更多的酚氧化酶,在宿主防御反应中可能起着细胞协同作用。与此相反,透明细胞则具有较强的吞噬能力,在细胞崩解的区域,或者细菌与病毒混合感染的腺腔中,较易见到这种细胞可作为其活跃吞噬功能的佐证。



图版I

图版说明

图版 I

1. 透明细胞, 呈梭形, 胞质中的线粒体(Mi)和内质网等各种细胞器较少, 也无均质或条纹状颗粒。胞核(N)卵圆形, 居中位置。×10800; 2. 小颗粒细胞, 呈卵圆形, 胞质有大量体积小的高电子密度颗粒(→)。胞核(N)肾形。×10800; 3. 小颗粒细胞, 胞中条纹状颗粒(G_1)和均质颗粒(G), 均质核心与被膜之间有一狭窄的空晕, 高尔基复合体(G_0)可见。×10000; 4. 小颗粒细胞, 两个细胞的胞质中都有条纹颗粒(G_1), 条纹由纤细丝盘绕而成。×15000; 5. 大颗粒细胞, 呈卵圆形, 胞质中有大量体积大的均质颗粒(G), 空泡(Ve)数量不多, 体积较大。×10000; 6. “浆样细胞”胞核(N)偏心位置, 胞质中充满板层状的糙面内质网, 线粒体(Mi)大而圆, 高尔基复合体(G_0)发达。×8700。

1. The hyaline hemocytes are spear shape without homogeneous and striated granules in the cytoplasm, but there are few mitochondrion(Mi) and endoplasmic reticulum. ×10800; 2. The small-granular hemocytes are ellipsoid and contain numerous high electron dense cytoplasmic granules (→). ×10800; 3. The homogeneous (G) and striated granules(G_1) and golgi complex (G_0) exist in the cytoplasm of the small-granular cells. The cramped space between dense core and envelop in homogeneous granules is exposed. ×10000; 4. There are the striated granules (G_1) which composed of microfilaments in the cytoplasm of two small-granules hemocytes. ×15000; 5. The large-granules hemocytes are ovoid and contain numerous large volume homogeneous granules(G) and few vesicula with large volume (Ve). ×10000; 6. The plasma-like cell, which did not contain cytoplasmic characteristic granules, but is filled with laminal rough endoplasmic reticulum. The mitochondrion (Mi) are circular and large volume. Golgi complex (G_0) well development. ×8700.

Soderhall^[9]的研究指出, 小颗粒细胞是节肢动物所特有的, 在外源物质刺激下极易脱颗粒, 释放酚氧化酶原组份, 从而对细胞免疫反应发生作用。这些观察结果给寻找提高对虾免疫功能药物以有益的启迪。

3.3 “浆样细胞”的结构与功能初探

一般认为甲壳动物的血淋巴中没有免疫球蛋白, 也不存在 T、B 两种淋巴细胞, 因此其免疫防御系统具有独特的性质, 但目前尚不清楚。作者发现的“浆样细胞”有着发达的内质网, 丰富的多聚核糖体和发育良好的高尔基复合体, 是一种具有旺盛合成外输性蛋白细胞的特点, 十分类似哺乳动物结缔组织固有细胞成分中的浆细胞。在病毒或病毒与细菌混合感染的组织中, 不仅其数量增多, 而且内质网多呈扩张状态。浆细胞是体内合成抗体的主要场所, 能产生和暂时储存免疫球蛋白, 这是否提示着对虾体内某些细胞能合成原始的免疫球蛋白, 具有体液免疫的萌芽, 尚需进一步确证。哺乳类动物的浆细胞是 B 细胞受抗原刺激后, 经幼稚型淋巴细胞发育而来的^[8], 在某些物质(如植物血凝素等)刺激下, 小淋巴细胞也可转化成浆细胞^[10]。对虾透明细胞的某些结构和功能类似于淋巴细胞, 在异物(包括病原)刺激下能否转化成“浆样细胞”, 尚待用放射自显影技术予以证实。

参 考 文 献

- [1] Conick J W, et al. Hemocytes: classification, differential count and associated agglutinin activity. *J. Invertebr. Pathol.*, 1978, 31: 194—203.
- [2] Bauchau A G, et al. *Invertebrate Blood Cells*, New York: Acad Pr. 1981, 2: 386—420
- [3] Martin G G, et al. Fine structure and classification of shrimphemocytes. *J. Morph.*, 1985, 185: 339—348
- [4] 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
- [5] 叶燕铃、陈宽智. 中国对虾血细胞超微结构、分类及计数. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(2): 35—42
- [6] Hearing V, et al. Fine structure of the blood cells of the lobster. *Chesapeake Science*, 1967, 8(3): 170—186

- [7] Bodammer J E. Cytological observations on the blood and hemopoietic tissue in the crab. *Cell and Tissue Res.*, 1978, **187**: 79—96
- [8] 钟慈声、陈细法. 细胞和组织的超微结构, 北京: 人民出版社, 1984, 50, 88, 112
- [9] Soderhall K, et al. Humoral and cellular Immunity in Arthropods. New York: Joim Wiley and Sons Lid, 1986, 251—285
- [10] 陈细法、钟慈声. 转化淋巴细胞的电镜观察初步报告. 上海医科大学学报, 1979, **1**(35): 114—116

THE COMPOSITION AND ULTRASTRUCTURE OF HAEMOCYTES IN FOUR SPECIES OF PENAEID SHRIMPS

Chen Ping, Huang Huai¹⁾, Chi Xincai¹⁾, Wu Dinghu¹⁾ and Chen Xifa

(Test Centre, Xiamen University¹⁾, Xiamen Fishery Institute, Xiamen, 361005)

Abstract The ultrastructure of hemocytes of *Penaeus chinensis*, *P. japonicus*, *P. penicillatus* and *P. monodon* was studied. Four Kinds of blood cells were distinguished according to their morphology, structure and the ultrastructure of granules. The hyaline hemocytes contain characteristic granules, and may be active in phagocytoses. The small-granule hemocytes which contained small rounded electrondense-granule and large striated granules may play a Key role in the immune reaction of the prawns. The large-granule hemocytes which contained large electrondense homogeneous granules may be involved in the defence of the host. The plasma-like cell which did not contain granules is brimmed with laminal rough endoplasmic reticulum.

Key words Prawn, Hemocytes, Immunofunction