

背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)血细胞的分类

谢彦海^{a, b}, 胡宝庆^a, 文春根^{a*}

(南昌大学 a.生命科学学院; b.实验动物科学部, 江西 南昌 330031)

摘 要: 用光学显微镜和透射电子显微镜对背角无齿蚌血细胞进行观察。结果发现, 体长 6~12 cm 的背角无齿蚌血细胞浓度为 $(2.42 \pm 0.38) \times 10^6/\text{mL}$ 。根据细胞质内颗粒出现情况, 将该蚌血细胞分为两大类, 即颗粒细胞和无颗粒细胞。颗粒细胞明显的特征是细胞质中存在许多颗粒, 无颗粒细胞的特征是细胞质中不含有或含有少量颗粒。根据颗粒细胞的体积和胞质内颗粒的大小还可以将其分为大颗粒细胞和小颗粒细胞(分别占 4.28% 和 59.28%)。根据无颗粒细胞的大小和核质比的不同将其分为透明细胞和淋巴样细胞(分别占 27.74% 与 8.70%)。4 种类型的血细胞对 Wrights 染料有不同的亲和性, 大颗粒细胞表现为嗜酸性, 小颗粒细胞与透明细胞均呈现嗜酸性和嗜碱性两种, 淋巴样细胞表现为嗜碱性。

关 键 词: 背角无齿蚌; 血细胞; 形态特征; 分类

中图分类号: Q952.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)01-0061-04

Classification of hemocytes of *Anodonta woodiana*

XIE Yan-hai^{a, b}, HU Bao-qing^a, WEN Chun-gen^{a*}

(a.College of Life Science; b.Department of Medical Laboratory Animal Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: The light microscope and transmission electron microscope were used to observe hemocytes of *A. woodiana*. The results shows that the total hemocyte content of *A. woodiana* was about $(2.42 \pm 0.38) \times 10^6/\text{mL}$ from 6 to 12 centimeters in shell length. Two types of hemocytes were recognized: granular hemocytes and agranular hemocytes, based on either presence or absence of granules in the cytoplasm. Granular hemocytes are distinguished from other hemocytes by a positive feature, the possession of numerous cytoplasmic granules, while agranular hemocytes have few or a few electron-dense cytoplasm granules. In addition, according to the diameter of granular hemocytes and granular size, granular hemocytes were further divided into two categories: large granular hemocytes and small granular hemocytes, about 4.28% and 59.28% in the hemocyte population, respectively. In accordance with the diameter of agranular hemocytes or N/C ratios, agranular hemocytes were further classified into two categories: hyalinocytes and lymphoid hemocytes, about 27.74% and 8.70% in the hemocyte population, respectively. Four types of hemocytes had different tinctorial properties for Wright's staining in smear. Large granular hemocytes were acidophils. Both small granular hemocytes and hyalinocytes had two tinctorial properties, acidophils and basophils. Lymphoid hemocytes were only basophils.

Key words: *Anodonta woodiana*; hemocytes; morphological features; classification

目前, 贝类免疫学研究主要集中在对其血细胞的分类及作用等方面^[1]。关于贝类血细胞分类的报道较多, 对血细胞种类和数量的描述却存在较大的分歧。软壳蛤(*Mya arenaria*)和菲律宾蛤仔

(*Ruditapes philippinarum*)的血细胞通常被分成 2 种类型^[2-3]; 圆砗磲(*Tridacna crocea*)和浅沟蛤(*Scrobicularia plana*)的血细胞则被分为三类^[4-5]; 海湾扇贝(*Argopecten irradians*)的血细胞被分成四

收稿日期: 2009-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960296)

作者简介: 谢彦海(1976—), 男, 江西赣州人, 博士研究生, 主要从事动物疾病与免疫学研究, yanhaixie@sina.com; *通讯作者, cgwen@ncu.edu.cn

类^[6]；栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的血细胞甚至被分为六类^[7]。另外，文献^[8-11]报道，淡水贝类褶纹冠蚌(*Cristaria*)、椭圆背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)和三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)均有4种类型的血细胞。背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)是淡水贝类中的优势种群，具有重要的经济价值^[12]。笔者通过活体血细胞观察、细胞化学染色及透射电镜观察，对背角无齿蚌的血细胞进行分类，旨在为贝类免疫学研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

背角无齿蚌于2008年10—12月分批采集于江西省鄱阳湖，体长6~12 cm。室温下，在水簇箱内暂养3~5 d后开始试验。

1.2 方法

1.2.1 血淋巴收集

取健康蚌，用2.5 mL(0.6×25 针头)注射器从后闭壳肌取血。血淋巴以1:2比例与Alsever's液(葡萄糖20.8 g/L,柠檬酸三钠8.0 g/L,氯化钠22.5 g/L, pH7.2)混合，备用。

1.2.2 活体血细胞观察

取血淋巴2.5 mL滴于载玻片上，盖上盖玻片，静置约20 min，用Olympus CX41显微镜观察。

1.2.3 Wrights 染色血细胞观察

取血淋巴2.5 mL滴于载玻片上，静置30 min，吸去上层清液，晾干，滴加Wright's染色液染色10 min，加入等量的PBS，染色10 min，PBS冲洗，50%乙醇分色，晾干，中性树胶封片后观察。

1.2.4 血细胞超微结构观察

取血淋巴20 mL，分装于2个10 mL的离心管内，3 000 r/min离心10 min，除去血清，加2.5%戊二醛，固定1~2 h，以0.1 mol/mL的二甲胍缓冲液洗涤，1% OsO₄后固定、酒精脱水，Epon包埋、Vltracut E型超薄切片机制片，在日立H-600型电子显微镜下观察。加速电压为60 kV。

1.2.5 血细胞计数

取30只健康蚌，每只蚌抽血1次，抗凝处理，用血球计数板计数。每毫升血细胞数=测得血细胞

数×50 000×稀释倍数。

1.2.6 血细胞大小测定

取抗凝血淋巴2.5 mL，滴于载玻片上，盖上盖玻片，在27℃培养箱内孵育20 min，用带目镜测微尺的光学显微镜测量血细胞直径和核直径，细胞直径以除伪足外的最长轴为准，核直径以核的最长轴为准。每种细胞各测100个。测量数据采用SPSS软件进行多层比较分析。

2 结果

显微镜下，背角无齿蚌明显有两大类型的血细胞：颗粒细胞和无颗粒细胞。颗粒细胞和无颗粒细胞又有不同的形态特征。根据细胞和胞质内颗粒的大小特征可以将颗粒细胞分为大颗粒细胞和小颗粒细胞。根据细胞大小和核质比的差异特征又可将无颗粒细胞分成透明细胞和淋巴样细胞。

2.1 颗粒细胞

颗粒细胞明显的特征是细胞质内含有许多颗粒，细胞核相对较小，核偏位，核质比低。

大颗粒细胞(Lg)：活体细胞为圆形或椭圆形，体积比其他血细胞大。细胞内有折光率高的大颗粒。细胞一般不伸出伪足或伸出很短的伪足。细胞核常被大颗粒所覆盖。大颗粒细胞通常易破裂，出现脱颗粒现象(封三图1-A)。Wright's染色后胞质内颗粒为嗜酸性，呈现紫红色或鲜红色，细胞核蓝紫色(封三图1-a)。电镜观察发现胞质内有许多电子密度高的大颗粒。细胞核呈椭圆形或圆形，染色质均匀。胞质内可见内质网和高尔基器等细胞器(封三图2-a)。

小颗粒细胞(Sg)：活体细胞呈圆形、椭圆形或不规则形状，细胞易变形，细胞伸出指状或根状伪足。小颗粒细胞明显小于大颗粒细胞，胞质内含有较多的小颗粒，折光率较高(封三图1-B)。Wright's染色后细胞表现出嗜酸性和嗜碱性两种，嗜酸性小颗粒细胞的胞质为淡红色，颗粒呈深红色，细胞核深蓝色。嗜碱性小颗粒细胞的胞质呈淡蓝色，颗粒呈深蓝色，细胞核蓝黑色(封三图1-b,c)。电镜观察发现胞质内有许多电子密度高的小颗粒，细胞核呈圆形或肾形，染色质较均匀。胞质内可见内质网、

高尔基器等细胞器(封三图 2-b)。

2.2 无颗粒细胞

无颗粒细胞明显的特征是胞质内不含有颗粒或含有少量的颗粒,细胞核较大,核质比高。

透明细胞(HC):活体细胞呈圆形或不规则形状,伸出的伪足呈片状或根状。胞质内无颗粒或有少量颗粒,细胞核呈圆形或椭圆形(封三图 1-C)。Wrights 染色发现部分细胞呈嗜酸性,胞质为淡红色,核为深蓝色;另一部分细胞呈嗜碱性,胞质为淡蓝色,核为深蓝色(封三图 1-d,e)。电镜观察到胞质内无明显的颗粒,但有高尔基体,内质网等细胞器。细胞核椭圆形,内有浓缩的染色质(封三图 2-c)。

淋巴样细胞(LY):活体细胞为圆形,很少伸出伪足,细胞体积相对其他血细胞的体积小,胞质内无颗粒,细胞核圆形,居中(封三图 1-D)。Wrights 染色发现细胞呈嗜碱性,胞质为淡蓝色,核为深蓝色(封三图 1-f)。电镜观察到细胞中电子密度低,无颗粒,细胞核为椭圆形或圆形,有浓缩的染色质。胞质内细胞器少(封三图 2-d)。

2.3 血细胞所占比例

测得背角无齿蚌血细胞浓度为 $(2.42 \pm 0.38) \times 10^6$ /mL,其中小颗粒细胞和透明细胞为主要的细胞类型,所占比例分别为 59.28%和 27.74%。大颗粒细胞和淋巴样细胞相对较少,所占比例分别为 4.28%和 8.7%。

2.4 血细胞大小

从表 1 可以看出,4 种血细胞中大颗粒细胞的直径最大,淋巴样细胞的直径最小。统计分析发现,4 种血细胞的直径存在显著差异。淋巴样细胞的细胞核直径最大,小颗粒细胞的细胞核直径最小,血细胞的核直径之间没有显著差异。另外,淋巴样细胞的核质比最大,大颗粒细胞的核质比最小。

表 1 背角无齿蚌 4 种血细胞、核的直径与核质比

血细胞	细胞直径/ μm	细胞核直径/ μm	核质比(N/C)
大颗粒细胞	(12.52±0.89)a	4.41±1.21	(0.35±0.09)a
小颗粒细胞	(9.44±0.98)b	3.94±0.90	(0.42±0.08)a
透明细胞	(8.29±0.96)c	4.19±0.72	(0.51±0.10)a
淋巴样细胞	(6.19±0.60)d	4.41±0.75	(0.71±0.10)b

3 讨论

贝类血细胞的分类通常依据血细胞的形态特征^[3-5]进行。由于其形态特征存在较大变化,因此,建议结合血细胞的生理生化特性及其功能进行分类^[13]。Cheng^[14]认为贝类血细胞胞质中含有许多颗粒的是颗粒细胞,胞质中没有或有少量颗粒的是无颗粒细胞。事实上,贝类血细胞存在许多过渡类型^[15]。根据血细胞和胞质内颗粒的大小,颗粒细胞还能够分成大颗粒细胞和小颗粒细胞^[3,6,16]。刘东武等^[17]利用流式细胞仪分析菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的血细胞,发现除了大颗粒细胞和小颗粒细胞外,还有介于两者之间的血细胞,称为中颗粒细胞。另外,根据细胞内颗粒的组织化学特性还能够将颗粒细胞分为大嗜酸性颗粒细胞和小嗜酸性颗粒细胞或嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞^[18]。

笔者发现背角无齿蚌的颗粒细胞除了细胞和颗粒大小有较大差异外,颗粒细胞的形态及伸展情况也存在较大的差别。有些细胞很少伸出伪足,而另一些则常伸出根状伪足,因此,笔者将背角无齿蚌的颗粒细胞分为大颗粒细胞和小颗粒细胞。Zhang 等^[6]和罗文等^[10]通过透射电子显微镜发现大颗粒细胞内含有电子密度高的大颗粒。在背角无齿蚌的大颗粒细胞中同样发现了许多直径较大的颗粒,电子密度也较高。Nakayama 等^[4]与沈亦平等^[8]描述的浆液细胞也具有大颗粒细胞的类似特征,可能与本研究中的大颗粒细胞是同一类细胞。此外,Zhang 等^[6]发现大颗粒细胞是多核细胞,而本研究与陈全震等^[16]仅观察到单核的大颗粒细胞,并且发现大颗粒细胞容易出现脱颗粒的现象。

小颗粒细胞是背角无齿蚌血细胞中数量最多的一类血细胞,细胞体积小于大颗粒细胞,胞质内含有大量的小颗粒,这与 Zhang 等^[6]发现的小颗粒细胞特征一致。笔者发现的小颗粒细胞吞噬细菌的能力强于其他 3 类血细胞,因此,认为小颗粒细胞是背角无齿蚌免疫防御的主要血细胞。

多数研究者认为,无颗粒细胞可以分为更多的亚群,其中一类亚群细胞的体积较大,细胞核较小,偏位,细胞数量也较多,细胞核内没有明显的颗粒,通常称之为透明细胞或大透明细胞^[4,6]。笔者观察到的透明细胞同样具有这些特征。此类细胞在背角无

齿蚌血细胞中的比例仅次于小颗粒细胞,并具有吞噬能力,可能也是背角无齿蚌免疫防御的主要血细胞之一。另外,在贝类血细胞中还有一类细胞体积较小,细胞核大,核居中,形态类似于哺乳动物的淋巴细胞,通常命名为小淋巴细胞^[19],也有称为类淋巴细胞^[9]、拟淋巴细胞^[7]、淋巴样细胞^[16]、小透明细胞^[6]。一般认为该类细胞是未成熟的血细胞^[19]。笔者也发现了该类细胞。由于贝类没有真正的淋巴系统,也无淋巴细胞,只有类似高等动物淋巴细胞的小型血细胞,因此,笔者根据该类细胞的特征称其为淋巴样细胞。

参考文献:

- [1] Hose J E , Martin G G . Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis* [J] . Journal of Invertebrate Pathology , 1989 , 53 : 335-346 .
- [2] Huffman J E , Tripp M R . Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes [J] . Journal of Invertebrate Pathology , 1982 , 40 : 68-74 .
- [3] Allam B , Ashton-Alcox K A , Ford S E . Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve mollusks[J] . Fish & Shellfish Immunology , 2002 , 13 : 141-158 .
- [4] Nakayama K , Nomoto A M , Nishijima M , et al . Morphological and functional characterization of hemocytes in giant clam *Tridacna crocea*[J] . Journal of Invertebrate Pathology , 1997 , 69 : 105-111 .
- [5] Wootton E C , Pipe R K . Structural and functional characterization of the blood cells of the bivalve mollusc , *Scrobicularia plana*[J] . Fish & Shellfish Immunology , 2003 , 15 : 249-262 .
- [6] Zhang W Z , Wu X Z , Wang M . Morphological , structural and functional characterization of the haemocytes of the scallop *Argopecten irradians*[J] . Aquaculture , 2006 , 251 : 19-32 .
- [7] 孙虎山 , 李光友 . 栉孔扇贝血细胞的分类[J] . 海洋学报 , 2003 , 25(2) : 51-57 .
- [8] 沈亦平 , 马丽君 . 淡水育珠蚌褶纹冠蚌血细胞的初步研究[J] . 水生生物学报 , 1993 , 17(2) : 190-192 .
- [9] 杨军 , 石安静 . 3种淡水育珠蚌血细胞类型的研究[J] . 四川大学学报 , 2002 , 39(增刊) : 68-72 .
- [10] 罗文 , 朱柳锋 , 郑大恒 . 三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)血细胞初步研究[J] . 绍兴文理学院学报 , 2005 , 25(10) : 35-37 .
- [11] 刘巧林 , 许宝红 , 钟蕾 , 等 . 三角帆蚌瘟病组织病理学动态变化[J] . 湖南农业大学学报 : 自然科学版 , 2009 , 35(4) : 406-411 .
- [12] 许宝红 , 肖调义 , 苏建明 , 等 . 南洞庭湖 15 种野生蚌类遗传多样性分析[J] . 湖南农业大学学报 : 自然科学版 , 2009 , 35(1) : 88-91 .
- [13] Noël D , Pipe R , Elston R , et al . Antigenic characterization of hemocyte subpopulations in the mussel *Mytilus edulis* by means of monoclonal antibodies [J] . Marine Biology , 1994 , 119 : 549-556 .
- [14] Cheng T C , Bivalves . Invertebrate Blood Cells [M] . London : Academic Press , 1981 : 233-300 .
- [15] Hine P M . The inter-relationships of bivalve haemocytes [J] . Fish & Shellfish Immunology , 1999 , 9 : 367-385 .
- [16] 陈全震 , 杨俊毅 , 王小谷 , 等 . 皱纹盘鲍血细胞的亚显微结构及分类研究[J] . 水产学报 , 2001 , 25(6) : 492-495 .
- [17] 刘东武 , 王宜艳 , 孙虎山 . 菲律宾蛤仔、中国蛤蜊、文蛤和紫石房蛤血细胞的分类研究[J] . 水产科学 , 2005 , 24 (10) : 5-7 .
- [18] Dyrnyda E A , Pipe R K , Ratcliffe N A . Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel *Mytilus edulis* , identified by use of monoclonal antibodies[J] . Cell Tissue Research , 1997 , 289 : 527-536 .
- [19] Moore M N , Lowe D M . The cytology and cytochemistry of the haemocytes of *Mytilus edulis* and their response to experimentally injected carbon particles [J] . Journal of Invertebrate Pathology , 1977 , 29 : 18-30 .

责任编辑: 苏爱华
英文编辑: 罗文翠