

锯缘青蟹血细胞的形态及分类

周 凯, 房文红, 乔振国

(中国水产科学研究院 东海水产研究所, 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090)

摘要:对锯缘青蟹(*Scylla serrata*)血细胞染色的抗凝剂、染色方法进行筛选。蟹样品体质量约250 g。采用亚甲基蓝、瑞氏法染色后,在Olympus油镜下观察、记数、测量,再结合电镜超薄切片观察结果对锯缘青蟹血细胞进行分类。根据血细胞质中颗粒的有无、大小、折光性、染色特性及细胞的大小、核质比等,将锯缘青蟹血细胞分为4种:(1)无颗粒细胞,细胞质中无颗粒;(2)小颗粒细胞,细胞质中有深蓝色小颗粒;(3)中间型细胞,细胞质中既有深蓝色小颗粒,又有折光性红色大颗粒;(4)大颗粒细胞,细胞质中充满了具有折光性的红色大颗粒。4种血细胞的大小顺序从小到大依次为无颗粒细胞、小颗粒细胞、中间型颗粒细胞、大颗粒细胞;核质比则相反,分别为54.01%、37.13%、25.37%、17.49%;其数量百分比分别占20.92%、40.30%、19.39%、19.39%。根据仿足的多少,对4种血细胞在机体的免疫防御机制中所起的不同作用进行了简单探讨。[中国水产科学,2006,13(2):211-216]

关键词:锯缘青蟹;血细胞;形态结构;分类

中图分类号:Q959.223 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)02-0211-06

锯缘青蟹(*Scylla serrata*)俗称青蟹,属甲壳纲,十足目,梭子蟹科,青蟹属,广泛分布于温带、亚热带和热带海域。其肉质含有多种氨基酸,营养丰富,口味鲜美;其甲壳可提取甲壳素、壳聚糖、几丁质、饲用蛋白质等特点,锯缘青蟹是目前甲壳类中优良的养殖品种。近年来,随着人工育苗技术的日趋成熟,锯缘青蟹养殖规模不断扩大,对其深入研究,尤为重要。

高等动物特别是人类的血液循环系统,对血细胞的分类、功能及其免疫功能与免疫机理等,已有一定的研究与认识^[1-2],但相对低等的甲壳动物血细胞的相关研究不够深入。甲壳动物的免疫防御反应主要依赖于血细胞的吞噬、包裹、形成细胞结、凝集和溶菌等作用来完成的^[3],因此,对甲壳动物的血细胞的研究,了解其免疫机理,可帮助寻找某些药物或制剂,以增强机体的免疫能力,抵御外来病原的侵袭,预防疾病,特别是病毒病的发生和蔓延。

国外对甲壳动物血细胞的研究起步较早。1981年Bauchau^[4]对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)血细胞进行了研究,并将甲壳动物血细胞分为无颗粒细胞、半颗粒细胞、颗粒细胞。这种分类和命名的依据

是血细胞质中颗粒的有无、直径大小和核质比大小。1985年,Martin等^[5]提出严格依赖颗粒的有无来区分血细胞的方法,将中国对虾(*Penaeus chinensis*)血细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞等3类。

1993年叶燕玲等^[6]通过研究中国对虾将其血细胞命名为:无颗粒细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞。另外,陈平等^[3]研究4种对虾血细胞,增加了一种“浆样细胞”,该细胞质充满半层状糙面内质网,但不含颗粒;于建平等^[7]利用电镜把日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的血细胞分成无颗粒、小颗粒和大颗粒细胞,并对血细胞比例进行了研究;陆宏达^[8]通过光镜、电镜对中华绒螯蟹血细胞的研究,分为:无颗粒细胞、小颗粒细胞、大颗粒细胞和大小中间型细胞;并对颗粒的形成方式进行了探讨;龙思思等^[9]通过瑞氏染色法将罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)血细胞分为无颗粒细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞。

由此可见,国内外学者在甲壳动物血细胞分类方法上认识基本一致,即根据颗粒情况进行分类,这为作者研究锯缘青蟹血细胞提供了技术基础。

收稿日期:2005-03-31; 修订日期:2005-10-24.

基金项目:中国水产科学研究院基金项目(2003-4-3).

作者简介:周 凯(1969-),男,助理研究员,主要从事水产养殖及病害研究.

通讯作者:房文红. E-mail: whfang@sh163.net

锯缘青蟹的血细胞分类研究目前尚未见报道。本研究通过光镜与电镜观察,对其血细胞进行研究,力求寻找一种简单、迅捷、可靠的方法对细胞进行分类,为锯缘青蟹免疫学方面的研究提供基础性的资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 锯缘青蟹 购自上海奉贤某养殖场,体质量约250 g。在实验室暂养于盐度5~6、水温25℃的人工配制的海水中,1周后选择健康蟹5只,用于实验。

1.1.2 试剂 0.1%瑞氏(Wright's)染色液(0.5%瑞氏染液用1/15 mol/L磷酸盐缓冲液稀释5倍);0.5%亚甲基蓝染色液;ACD血液抗凝固定液(7份ACD抗凝剂+1份40%甲醛溶液);4%戊二醛固定液。

1.2 方法

1.2.1 血样采取与固定 先用干净纱布擦干锯缘青蟹体表的水,用无菌注射器插入锯缘青蟹步足长节和腕节之间的关节软膜内,针头插入长度大约5 mm。精确抽取0.1 mL血液,立即注入已装有0.4 mL ACD血液抗凝固定液的离心管中,轻轻振荡使其充分混匀,置于4℃冰箱中备用。

1.2.2 血涂片的制作并染色

(1)亚甲基蓝浸片法:取按1.2.1制备好的血液样品15 μ L于洁净的载玻片上,再加上15 μ L亚甲基蓝染液,充分混匀二者,在室温下静置3 min,轻轻盖上盖玻片,于Olympus油镜下观察。

(2)瑞氏染色法:取一滴血液于载玻片上,涂开并用吹风机凉风吹干,0.1%瑞氏染液滴2~3滴于血涂片上,染色15~20 min,而后用蒸馏水冲洗干净,Olympus油镜下观察。

1.2.3 血细胞测量和核质比计算 在光学显微镜下测量血细胞和细胞核的大小,平均核质比按下列公式计算:核质比=(平均核长轴×平均核短轴)/(平均细胞长轴×平均细胞短轴)。

1.2.4 电镜超薄切片制作 取血方法同1.2.1,抽取0.2 mL血液,注入已装有0.3 mL 4%戊二醛溶液的塑料离心管中,轻轻振荡充分混匀,1 000 r/min离心5 min,将上清液轻轻吸掉,再用牙签轻轻将底部沉淀挑出,用温热的4%琼脂包埋,待琼脂凝固后

再用刀片切去多余部分,制成5 mm³的小方块,将其投入到戊二醛溶液中保存备用。

样品经PBS漂洗,2%四氧化锇后固定1.5 h,梯度酒精与丙酮脱水,Epon812包埋,LKB超薄切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染,JEM-1200型透射电镜观察并摄影。

2 结果

通过对亚甲基蓝浸片结合瑞氏染料血涂片染色的油镜下的观察、记录、测量、拍照,并对电镜照片进行仔细观察分析,根据血细胞质中颗粒的有无、颗粒大小、染色特性、折光性及细胞的大小、核质比,将锯缘青蟹血细胞分为无颗粒细胞、小颗粒细胞、中间型细胞和大颗粒细胞4种。

2.1 血细胞的比例

采用亚甲基蓝染色,在油镜(1 500倍)下随机选择视野计数,共计数196个细胞,其中无颗粒细胞41个,占20.92%;小颗粒细胞79个,占40.30%;中间型细胞38个,占19.39%;大颗粒细胞38个,占19.39%。

2.2 无颗粒细胞(图版I-1、5、9)

光镜下观察此类细胞通常为圆形、椭圆形,偶尔也有梨形、三角形。椭圆长轴在7.5~11.0 μ m,短轴6.0~9.5 μ m,平均长轴为9.2 μ m,平均短轴为7.8 μ m;圆形直径为7.5~9.5 μ m,平均直径为8.8 μ m,未见或偶见伪足。核的大小范围是(5.0~9.0) μ m×(4.0~8.5) μ m,平均6.8 μ m×5.7 μ m。核质比最大,平均核质比为54.01%。核圆形或椭圆形,大多位于细胞中央,亚甲基蓝浸片中核染色成深蓝色,瑞氏染色为紫红色。细胞质稀少,仅成薄薄一层围绕在核周围,亚甲基蓝、瑞氏染色分别为淡蓝色和淡红色,没有颗粒。

超微结构显示核质比大,占据细胞大部分体积,异染色质分布在核膜周围成一圈,通常可见一个核仁,椭圆或圆形,紧靠着核膜处。细胞质中没有颗粒或有很少的几个小颗粒,细胞质内内质网极少,线粒体也较少,椭圆或圆形,体积较小。

2.3 小颗粒细胞(图版I-2、6、10)

光镜下观察此类细胞大多为椭圆形,也常有梨形、瓜子形,偶有三角形。大小范围在(7.0~12.0) μ m×(8.5~15.0) μ m,平均长轴为10.7 μ m,平均短轴为8.7 μ m。核质比比无颗粒细胞略小,平均核质比为37.13%。常见到伪足,使得细胞呈梨形或瓜子形;

核椭圆形居多,也有圆形,多稍微偏离细胞中央,大小范围为 $(3.2\sim 5.0)\mu\text{m}\times(3.0\sim 7.5)\mu\text{m}$,平均 $4.8\mu\text{m}\times 5.8\mu\text{m}$,亚甲基蓝染色为深蓝色,瑞氏染色为紫红色。细胞质较无颗粒细胞略丰厚,细胞质中有深蓝色、大小均匀、分布均匀的深色颗粒,没有折光性。

电镜下异染色质分布在核膜周围,通常可见1~2个核仁分布在靠近核膜处,细胞质中有大小均匀、电子密度深的小颗粒,其数量一般为十几到几十个,颗粒有椭圆形、圆形、棒状、肾形、花生形等,颗粒长、短轴范围分别为 $(0.4\sim 0.9)\mu\text{m}$ 、 $(0.25\sim 0.77)\mu\text{m}$;细胞质中核周围有丰富的长管状内质网;线粒体较无颗粒细胞中的多且大,嵴较多。

2.4 中间型细胞(图版I-3、7、11)

光镜下观察该类细胞体积明显偏大,多为椭圆形、眼形,也有瓜子形、扇形,大小范围 $(7.5\sim 13.0)\mu\text{m}\times(10.0\sim 16.5)\mu\text{m}$,平均 $9.6\mu\text{m}\times 13.6\mu\text{m}$ 。偶尔见到伪足,使细胞呈瓜子形。核大小范围是 $(5.0\sim 8.5)\mu\text{m}\times(3.0\sim 6.0)\mu\text{m}$,平均 $4.8\mu\text{m}\times 6.9\mu\text{m}$ 。核质比较小,平均核质比为25.37%。核多为椭圆形或肾形,常偏于细胞一极,亚甲基蓝染色成深蓝色,瑞氏染色为紫红色。细胞质较丰厚,亚甲基蓝染色为淡蓝色,细胞膜周围有一圈黄绿色的折光性强、较粗大的颗粒,核附近一般没有此类颗粒。瑞氏染色中:细胞质呈紫红色,既有深蓝色小颗粒,又有红色具折光性的大颗粒。

电镜下异染色质分布在核膜周围,较前两种细胞少,断断续续,不能形成完整的一圈。可见1~2个核仁分布在靠近核膜处,细胞质中有两种颗粒,小颗粒与大颗粒,分别与小颗粒细胞及大颗粒细胞中的颗粒相似,数量约20多个或更多。

2.5 大颗粒细胞(图版I-4、8、12)

光镜下观察细胞体积偏大,大多为椭圆形,也有圆形,偶见三角形、楔形,大小范围是 $(7.5\sim 13.5)\mu\text{m}\times(12.0\sim 17.5)\mu\text{m}$,平均 $9.8\mu\text{m}\times 13.8\mu\text{m}$ 。偶见伪足,使细胞呈不规则形状。核大小范围是 $(4.5\sim 7.5)\mu\text{m}\times(3\sim 6.5)\mu\text{m}$,平均 $4.3\mu\text{m}\times 5.5\mu\text{m}$ 。核质比最小,平均核质比为17.49%。核相对于细胞而言太小,圆形或肾形,常偏于细胞的一极,甲基蓝染色成深蓝色,瑞氏染色为紫红色。细胞质非常丰厚,亚甲基蓝浸片中,细胞质充满了折光性强,具黄绿色折光的较粗大颗粒。折光性大有时甚至遮盖了部分细胞核,使其形状很多,影响观察测量。瑞氏染色中,细

胞质中充满了红色、粗大、具折光性的颗粒。

电镜下异染色质分布在核膜周围,可见1~2个核仁分布在靠近核膜处。细胞质中有一种电子密度深的大颗粒,其大小差不多为小颗粒细胞中小颗粒的两倍,数量由几个到十几个不等,有椭圆形、长椭圆形、圆形和梨形等。

4类细胞之间遵循着以下规律:核质比从无颗粒细胞、小颗粒细胞、中间型细胞到大颗粒细胞的顺序是依次减小;而细胞大小刚刚相反,是依次增大。

3 讨论

3.1 抗凝剂筛选

在抗凝剂筛选时,尝试了常用经典方法,如肝素、生理盐水、福尔马林等,但效果均不理想。使用以上抗凝剂,用瑞氏染色法比较河蟹与青蟹的血细胞:前者血涂片染色后的效果较好,核、质均清晰;但青蟹染色背景颜色太重,并有深蓝色树枝状物质来干扰细胞的观察,且血细胞质、核染色模糊不清晰。推测二者血液血清中蛋白质成分有所差异,抗凝剂使青蟹血清中蛋白质大量沉淀,蛋白质易吸收瑞氏染料颗粒,从而导致其染色效果很差。采用离心法去上清再加入新的抗凝剂,以去除血清中的蛋白质,但发现经过处理后,细胞变形严重甚至有破损、体积胀大现象,与其原始自然形态相距甚大。比较理想的血液抗凝固定液是ACD-福尔马林混合液(体积比7:1)。使用该混合液,血液中蛋白质沉淀明显减少,背景颜色大大减轻,而且没有树枝状蛋白质晶体生成。

3.2 染色方法的筛选

在染色方法的筛选中,先后尝试了不同浓度的吉姆萨、革兰氏、伊红、亚甲基蓝、瑞氏等染色方法。吉姆萨染色,核红色或蓝色,细胞质未染出颜色;革兰氏染色中,细胞质、核均为红色,但二者界限不清晰;伊红染色时,背景太红,有树枝状晶体,影响观察,细胞质红色,核未染出。叶民刚^[1]的瑞氏染色效果也不佳,一是背景颜色太深,紫红色,影响观察;二是有时核染的比较清晰,而细胞质未染出或4种细胞没有太大差别;有时细胞质染的效果较好,明显可区分淡蓝色、蓝色、紫红色和红色,但核未染出或不清晰。

本实验中用0.1%瑞氏染液染15~20 min,效果较佳。细胞质和细胞核界限清晰,能较明显地区分出青蟹的4种血细胞。大颗粒细胞胞质红色,内

含折光性大颗粒、细胞体积偏大;中间型细胞胞质紫红色,中有深蓝色小颗粒和红色大颗粒,细胞体积偏大,椭圆形或梨形;小颗粒细胞与无颗粒细胞胞质染色均为淡红色,细胞质中有少量深蓝色小颗粒,显著的区别是前者细胞较大,椭圆形或梨形居多,而后者以圆形、椭圆居多,核质比大。但其最大缺陷就是核染色不太清晰。

另一种方法是0.5%亚甲基蓝浸片法,经多次试验验证,是一种简便、稳定、比较理想的血细胞染色方法。细胞质、核、膜染色都比较清晰,颗粒的折光性明显,而且解决了背景问题。此法操作简单,细胞处于水溶液中受损少,故细胞能保持自然形态,能很方便地测量细胞的大小。再通过比较核质比,很容易区分血细胞,因此可以解决由于颜色单一而不易区分颗粒大小的缺点。

3.3 血细胞分类

目前对甲壳动物血细胞的分类主要有两种:一种是无颗粒细胞、小颗粒细胞、大颗粒细胞3类;另一种分4类:无颗粒细胞、小颗粒细胞、大颗粒细胞和浆样细胞。陈平等^[3]研究对虾时增加了一种“浆样细胞”,发现此细胞有着发达的内质网,具有旺盛的合成外输性蛋白质功能,十分类似于哺乳动物的浆细胞。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,这提示了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,这尚需进一步研究确认^[10]。陆宏达^[8]在研究中华绒螯蟹时,在3类细胞基础上,增加了大小颗粒中间型细胞,认为此细胞介于小颗粒与大颗粒细胞之间,瑞氏染色中细胞质中有淡蓝色小颗粒与折光性强、淡红色大颗粒。

本研究结果与陆宏达的观点相近,从几种细胞中可以明显看出,锯缘青蟹血细胞除无颗粒细胞、大颗粒细胞和小颗粒细胞外,存在一种介于大、小颗粒细胞间的中间型细胞,光镜观察能说明此种细胞的存在。关于中间型细胞是否是小颗粒或大颗粒细胞发育而来以及还有4种血细胞之间的生成关系如何等问题尚待进一步研究。

3.4 其他

甲壳动物血细胞在免疫防御作用中起着极其重

要的作用,不同种类以及同种甲壳类的不同种血细胞在免疫防御作用下有很大的差异。Huang^[11]和Sung^[12]分别报道了蟹(*Pacifastacus leniusculus*)和罗氏沼虾的血细胞均具有不同能力的吞噬作用。本研究中锯缘青蟹的小颗粒细胞较多见到伪足,使细胞形态呈梨形、瓜子形、三角形等,说明该细胞具有较强的吞噬活动能力,在锯缘青蟹的免疫防御中占有重要地位,起关键性作用。大颗粒和中间型细胞有时也有伪足伸出。但无颗粒细胞未见有伪足,表明了锯缘青蟹的无颗粒细胞的吞噬能力没有或很弱。

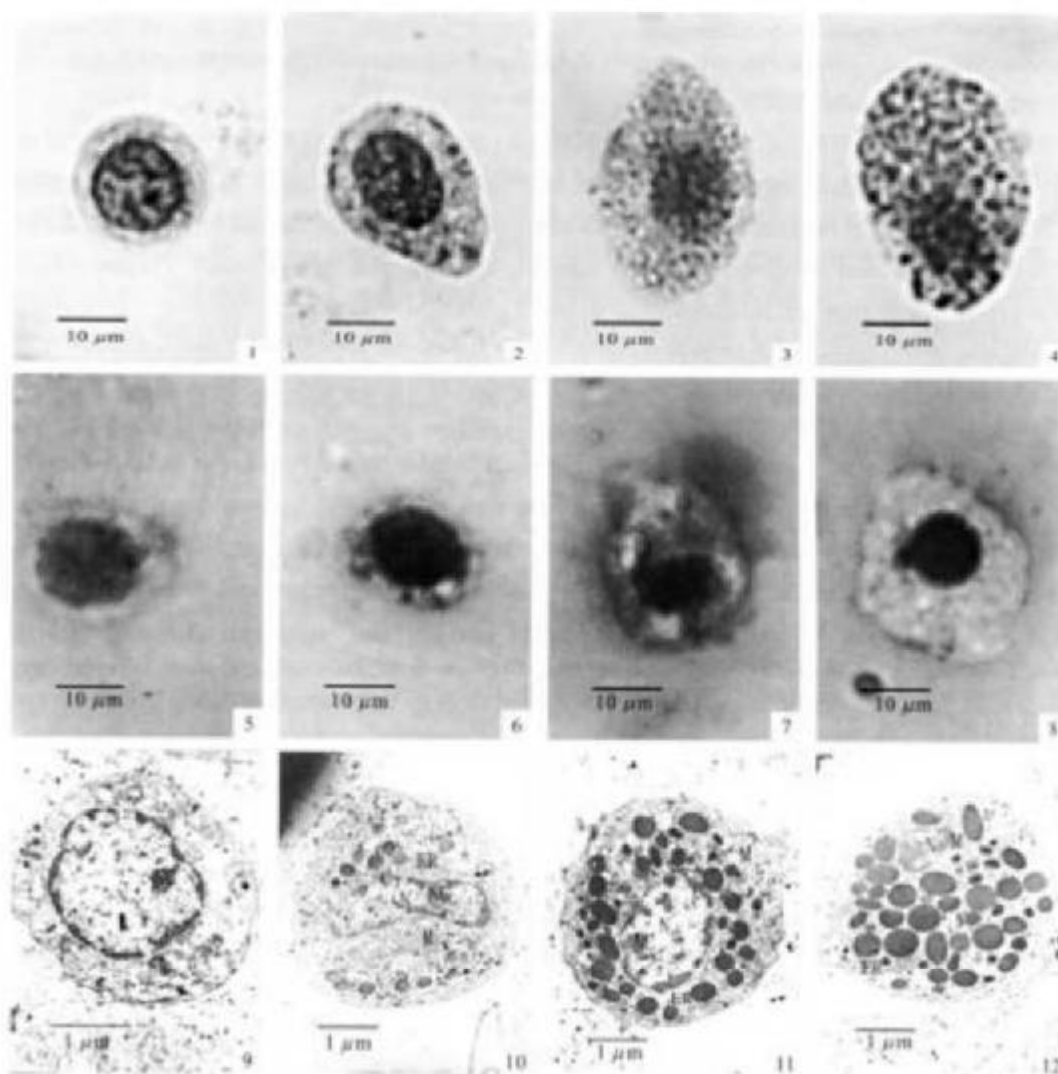
致谢:本文承蒙东海水产研究所郑国兴研究员悉心指导和审阅,在此谨表诚挚谢意!

参考文献:

- [1] 叶民刚. 血病手册[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1982.
- [2] 朱志勇. 实用医学检验学[M]. 北京:人民军医出版社,1992.
- [3] 陈平,黄槐,他信才,等. 四种对虾血细胞组成及超微结构[J]. 水生生物学报,1998,22(2):158-163.
- [4] Bouchau A G. Invertebrate Blood Cells[M]. New York: New York Acad Press, 1981.
- [5] Martin G G. Graves. Fine structure and classification of shrimp hemocytes[J]. Morphol, 1985,185.
- [6] 叶燕玲,陈宽智. 中国对虾血细胞超微结构、分类及计数[J]. 青岛海洋大学学报,1993,23(2):35-42.
- [7] 于建平. 日本对虾血细胞分类、密度及组成[J]. 青岛海洋大学学报, 1993,23(1):107-114.
- [8] 陆宏达. 中华绒螯蟹血细胞的显微、亚显微形态结构及分类[J]. 水生生物学报,2002,26(5):494-500.
- [9] 龙恩恩,谢数涛,周晖. 罗氏沼虾血细胞的分类研究与组成[J]. 暨南大学学报,2003,24(5):117-120.
- [10] 钟惠声,陈旭法. 细胞和组织的超微结构[M]. 北京:人民出版社,1984. 50,88-112.
- [11] Tien-sheng Huang, Haiyao Wang, SoYong Lee, et al. A cell Adhesion protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Serine Proteinase Homologue Similar to *Drosophila* Maskerin[J]. Biol Chem, 2000,275(14):9996-10001.
- [12] Hung-Hung Sung, Wei-Yi Kao. Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquatic Toxicol, 2003,64(1):25-67.

周 凯等:锯缘青蟹血细胞的形态及分类

ZHOU Kai et al: Classification and morphological observation on haemocytes in mud crab *Scylla serrata* by light and electronic microscope



图版 I 锯缘青蟹的 4 种血细胞

1,5,9:无颗粒细胞. 2,6,10:小颗粒细胞. 3,7,11:中间型颗粒细胞. 4,8,12:大颗粒细胞.

C—染色质;ER—内质网;M—线粒体;N—细胞核;NC—核仁

(1~4:亚甲基蓝浸片光镜照片;5~8:瑞氏染色光镜照片;9~12:电镜照片)

Plate I Four kinds of haemocytes of mud crab *Scylla serrata*

1,5,9: Agranular hemocyte (AG). 2,6,10: Small granular hemocyte (SG). 3,7,11: Large granular hemocyte (LG). 4,8,12: Intermediate granular hemocyte (IG).

C—chromatin;ER—endoplasmic reticulum;M—mitochondria;N—nucleus;NC—nucleolus

(1~4:LM, methylene blue staining. 5~8:LM, Wright's staining. 9~12:EM)

Classification and morphological observation on haemocytes in mud crab *Scylla serrata* by light and electronic microscope

ZHOU Kai, FANG Wen-hong, QIAO Zhen-guo

(Key Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: The mud crab *Scylla serrata* is a species of well-cultured crab for its daintiness and nutritious. But the diseases frequently happened with the expanded scale of culture. This paper reported the haemocytes of *Scylla serrata* and its classification by selecting a simple and reliable way. The purpose of this study is to provide basic data for immunological research of *Scylla serrata*.

By carefully observation under light and electronic microscopies, four kinds of haemocytes were classified according to their haemocytes size, morphology, nuclear size and granular existence, granular refraction, staining characters: (1) agranular hemocyte (AG) contains no granular, and a few mitochondria and endoplasmic reticulum, usually round or oblong; (2) small granular hemocyte (SG) is oblong, usually pyriform for the pseudopods, in the cytoplasm of which there are small size and blue-stained granulars and profuse mitochondria and endoplasmic reticulum; (3) intermediate granular hemocyte (IG) is usually oblong or round, having both small and large granulars and red-stained large granulars and profusing mitochondria and endoplasmic reticulum; (4) large granular hemocyte (LG) is usually oblong, containing refractile and red-stained large granulars. In the hemocytes, the number rates of AG, SG, IG and LG are 20.92%, 40.30%, 19.39% and 19.39%, respectively. The rate of nucleus to cytoplasm (N/C) from big to small is AG (54.01%), SG (37.13%), IG (25.37%) and LG (17.49%), but the size was contrary that they are $(6.0-9.5) \mu\text{m} \times (7.5-11.0) \mu\text{m}$, $(7.0-12.0) \mu\text{m} \times (8.5-15) \mu\text{m}$, $(7.5-13.0) \mu\text{m} \times (10.0-16.5) \mu\text{m}$ and $(7.5-12.5) \mu\text{m} \times (12.0-17.5) \mu\text{m}$, respectively. Different haemocytes have different functions in the crustacean immune response based on the numbers of the pseudopods. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 211-216]

Key words: *Scylla serrata*; haemocyte; morphology; classification

Corresponding author: FANG Wen-hong. E-mail: whfang@sh163.com