

文章编号:1005-8737(2000)02-0032-05

中华鳖嗜中性粒细胞吞噬功能的研究

潘连德, 邹玉蓉

(上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

摘要:运用吖啶橙检测法研究中华鳖(*Trionyx sinensis*)嗜中性粒细胞吞噬功能。试验测定了中华鳖嗜中性粒细胞对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)的吞噬和杀伤能力。结果发现,中华鳖嗜中性粒细胞分别和金黄色葡萄球菌、大肠杆菌温育30~180 min,吞噬百分率分别由15%增加到65%、由9%增加到63%,杀伤百分率由6%增加到62%、由2%增加到64%,吞噬指数由0.56增加到11.92、由0.14增加到10.77,杀伤指数由0.32增加到0.95、由0.20增加到0.95。温育180 min以内,中华鳖嗜中性粒细胞对2种细菌的吞噬和杀伤能力随着时间的延长而增强,并且对金黄色葡萄球菌的吞噬和杀伤能力强于对大肠杆菌的。180 min以后,中华鳖嗜中性粒细胞对2种细菌的吞噬和杀伤能力达到最大值,两者的数值相近。240 min后数值下降。

关键词:中华鳖;嗜中性粒细胞;吞噬功能;吖啶橙检测法

中图分类号:Q959.63

文献标识码:A

白细胞的吞噬作用是机体免疫功能的重要组成部分。测定机体嗜中性粒细胞对抗原的吞噬和杀伤能力,对于了解机体免疫机能的状态和作为疾病诊断的佐证,都具有重要意义。以往关于鱼类白细胞的吞噬作用研究及其方法报道较多,而关于中华鳖(*Trionyx sinensis*)嗜中性粒细胞吞噬功能方面的研究尚未见到报道。仅见有中华鳖外周血细胞形态结构^[1]及其数量的季节变化^[2],以及浸润肝组织炎症细胞及其结构^[3]等基础研究。对中华鳖非寄生性肝病的组织与细胞病理学的研究^[3,4]发现,其嗜中性粒细胞的免疫活性强并起到主要作用,但缺乏细胞免疫学依据。本试验运用吖啶橙检测法(简称AO检测法)对中华鳖嗜中性粒细胞的吞噬和杀菌功能进行初步探索,旨在建立快速、直观、准确的试验方法,并定量的检测中华鳖嗜中性粒细胞的吞噬

和杀菌功能。

1 材料与方法

1.1 试验鳖

1998~1999年从江苏射阳县某农场采得池塘养殖、体重450~650 g的雄、雌健康中华鳖若干只。

1.2 试剂及其配制

淡水鱼用生理盐水(PSF),参照森真朗^[5]配方配制;0.28%吖啶橙染液(AO-PSF);1%肝素钠;2%台盼兰染液;Wright-Giemsa混合染色液等。

1.3 试验用菌株及其制备

病原性金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*),由本教研室保存。将2种菌分别接种于普通营养琼脂培养基上,置37℃恒温箱中培养24 h后,用PSF分别洗涤,用比浊法调节菌悬液的密度,使两者相近,约为 $1.2 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$,经平板菌落计数法测得,金黄色葡萄球菌悬液的密度约为 $1.29 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$,大肠杆菌悬液的密度约为 $1.20 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 。用台盼兰排除法证实,制备后的2种细菌,在PSF中,4 h内存活率均为

收稿日期:1999-04-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970582);上海市教委重点科学基金部分资助(科97-31)

作者简介:潘连德(1960-),男,吉林长春人,上海水产大学渔业学院副教授,从事水产动物病害和药理学研究。

99%以上。

1.4 血液采集、嗜中性粒细胞的分离和检查

参照森真朗^[5]的方法,用2.5 ml的注射器吸取1%的肝素钠溶液少许,从鳖的颈静脉采血2 ml,加入等量的PSF,混匀。在注射器中,室温静置3 h,取富含嗜中性粒细胞的上清液,用PSF稀释2倍。用台盼兰排除法证实制备后的细胞存活率为99%以上。将嗜中性粒细胞悬液制作血涂片,Wright-Giemsa混合液染色,检查证实其中主要为嗜中性粒细胞时即可用,嗜中性粒细胞悬液的密度为 $1.0 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 。

1.5 嗜中性粒细胞的吞噬作用试验

参照杜爱芬^[6]和饭田贵次^[7]的方法,在6 ml的指形管中加入稀释后的嗜中性粒细胞悬液2 ml,再分别加入金黄色葡萄球菌、大肠杆菌悬液2 ml,混匀后置26.7℃多功能振荡培养箱中振荡温育。每隔30、60、80、120、180、240 min,取其混合液0.5 ml,加入冷生理盐水1 ml混匀。2 000 r/min离心3 min,弃上清液。

1.6 染色、观察、计数与拍照条件

取上述吞噬物沉淀,加入0.5 ml的0.28%AO-PSF染液,充分混匀,染色1 min,2 000 r/min离心3 min,弃上清液,置冰浴待检。

在荧光显微镜(Olympus BH)下计数100个嗜

中性粒细胞,记录嗜中性粒细胞的活性(即吞噬了细菌的和没有吞噬细菌的嗜中性粒细胞数量),以及被嗜中性粒细胞吞噬并杀死的(红色)和活的(绿色)细菌数量。

每次试验平行3组(管),结果取两个相近数值的2组平均数,同一试验重复1次,实验结果见表1。

用Kodak400度彩色胶卷,紫色和绿色两种光源拍照,曝光时间30 s~6 min,扩印条件略。

1.7 判定结果的4个指标

吞噬百分率 = 有吞噬作用的嗜中性粒细胞数 ÷ 被计数的嗜中性粒细胞总数 × 100% ;

杀伤百分率 = 含杀死细菌的嗜中性粒细胞数 ÷ 被计数的嗜中性粒细胞总数 × 100% ;

吞噬指数 = 嗜中性粒细胞内总菌数(死菌 + 活菌) ÷ 计数100个嗜中性粒细胞;

杀伤指数 = 100个嗜中性粒细胞内死菌数 ÷ 100个嗜中性粒细胞内总菌数(死菌 + 活菌)。

2 结果

2.1 AO检测法的荧光显微镜观察

吖啶橙染色的原理:死细胞和活细胞对吖啶橙的摄入量不同,通过荧光显微镜观察,死的细胞、细菌呈红色,活的细胞、细菌呈绿色^[7]。

表1 嗜中性粒细胞吞噬功能的4项指标

Table 1 Four items of phagocytosis neutrophilic granulocytes on bacterium in vitro

指标 Item	组别 Group	时间/min Time					
		30	60	90	120	180	140
吞噬百分率/% Percent phagocytosis	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	15	26	36	54	65	65
	大肠杆菌 <i>E. coil</i>	9	21	30	51	63	62
杀伤百分率/% Percent killing	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	6	10	23	41	62	60
	大肠杆菌 <i>E. coil</i>	2	5	21	33	59	62
吞噬指数/% Phagocyte index	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	0.56	1.78	4.32	7.56	11.92	11.34
	大肠杆菌 <i>E. coil</i>	0.14	0.59	2.79	7.87	10.77	10.21
杀伤指数/% Killing index	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	0.32	0.51	0.63	0.57	0.94	0.92
	大肠杆菌 <i>E. coil</i>	0.20	0.35	0.50	0.64	0.95	0.90

试验中分离得到嗜中性粒细胞悬浮液中含有少量红细胞,并不影响试验结果。在荧光显微镜下,适当选择滤光片,可见嗜中性粒细胞为圆球形,细胞核大小不等且形状各异,胞浆很少(彩页图版I-1);红细胞呈椭圆形、细胞核位于细胞中间也呈椭圆形、胞浆很多且均匀(彩页图版I-2)。没有吞噬细菌的嗜中性粒细胞的细胞核、质染色均匀(彩页图版I

-1),吞噬了细菌的嗜中性粒细胞中常含有多个球形、大小相近的吞噬泡(彩页图版I-1)。被吞噬的细菌在细胞内是活的则呈绿色(彩页图版-I 3,4,7),是死的则呈桔红色或红色(彩页图版-I 1,4,5,7,8),图版上的桔黄色在显微镜下观察为红色。计数细菌时,把光源变为绿色光,可清楚地数出嗜中性粒细胞中被吞噬的活菌和死菌的个数(彩页图版I

-6)。随着吞噬时间延长,吞噬细胞吞噬细菌的数量由少到多(彩页图版 I-7,8)。

2.2 嗜中性粒细胞吞噬功能的 4 项指标

嗜中性粒细胞对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的吞噬百分率、吞噬杀伤百分率、吞噬指数、杀伤指数见表 1。

由表 1 可知,中华鳖的嗜中性粒细胞对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的吞噬百分率、杀伤百分率及吞噬指数、杀伤指数,在 180 min 以前,随着时间的延长而增加,而且嗜中性粒细胞对金黄色葡萄球菌的 4 项指标都大于对大肠杆菌的。温育 180 min,嗜中性粒细胞对 2 种细菌的 4 项指标分别接近或达到最大值。温育 240 min,这 4 项指标不再有较大的增加,甚至有下降趋势。

3 讨论

3.1 实验方法的选择

人类临床医学运用检测嗜中性粒细胞的吞噬和杀伤能力的方法,来检验人体非特异性免疫水平。鱼类和其它水产动物嗜中性粒细胞功能研究已见有显微镜观察法^[8,9]、电镜观察法^[10]、化学发光法^[11]、硝基四氮唑实验法^[12]。还有吖啶橙检测法^[6,7]以及细菌薄层法^[13]来测定吞噬细胞的吞噬和杀伤能力。

吖啶橙检测法的优点在于简便而直观。经过吖啶橙染色,有荧光显微镜就可直接、迅速的辨别嗜中性粒细胞活性,还可以得出被吞噬、杀伤细菌的数量。一个试验可以同时得出吞噬百分率、杀伤百分率、吞噬指数和杀伤指数 4 个检验指标,而运用显微镜检测法、电镜观察法、化学发光法只能测定嗜中性粒细胞的吞噬能力,仅得出吞噬百分率和吞噬指数 2 个指标,而无法测定嗜中性粒细胞的杀伤能力。细菌薄层法仅定性表现了嗜中性粒细胞发生吞噬的现象。吖啶橙检测法方法的正确性和可靠性已经在中国对虾血细胞吞噬能力的检测中得到了充分的证实^[6]。笔者做鲫的嗜中性粒细胞对 2 种菌吞噬预试验,结果与日本鳊^[7]一致。但采用玻片进行吞噬作用^[7]检测操作困难、误差大,笔者改为用 6 ml 指形管进行,效果较好,研究认为吖啶橙检测法将有广泛的运用前景。

3.2 吖啶橙检测法的观察方法和拍照条件的确定

在荧光显微镜 40 倍物镜下观察较为方便。用紫色光源,很容易分辨出红细胞、嗜中性粒细胞,以及嗜中性粒细胞是否吞噬了细菌、被吞噬细菌的死、

活状况(彩页图版 I-1,2)。但在计数时,用绿色光源,使细菌的个数更容易分辨(彩页图版 I-6)。

当选择绿色光源拍照时,曝光时间可以由照相机自动控制调节,拍摄出来的效果和荧光显微镜中观察到的一样(彩页图版 I-6)。但是选择紫色光源拍照时,很容易造成自动曝光系统失灵,从而必须依靠手动调节曝光时间,我们设定了几个不同的曝光时间,发现在选择紫色光源的条件下,曝光时间应为 32 s(彩页图版 I-4),照片颜色与在荧光显微镜下观察相同,吞噬泡呈红色(彩页图版 I-4),此时分辨不出吞噬泡的形状和数量;曝光时间 3~6 min,则照片颜色与镜下不同,吞噬泡呈桔黄色,但能够清晰分辨吞噬泡的形状和数量(彩页图版 I-1,5,7,8)。曝光时间长与短,根据实验目的来确定。

3.3 中华鳖嗜中性粒细胞吞噬功能

中华鳖的外周血细胞有红细胞、单核细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、血栓细胞和浆细胞,无血小板^[1]。由于鳖的嗜中性粒细胞的胞浆中具有大量嗜酸性或嗜天青颗粒,有人称之为嗜异性粒细胞或嗜天青细胞。从外周血和浸润炎症病灶的嗜中性粒细胞的发育和亚显微结构以及功能分析,还应统一称为嗜中性粒细胞^[3]。健康鳖的嗜中性粒细胞在白细胞中所占的比例为 48%^[2],而在发生炎症时,血细胞组成发生巨大改变,嗜中性粒细胞和单核细胞数量剧增并发挥较强的吞噬作用^[3,14],其它白细胞作用微弱。鱼类在运输、触摸、饥饿等应激状态下,嗜中性粒细胞增多,以提高机体非特异性免疫力的现象,已被证实。

在吞噬实验 30 min 以前,中华鳖嗜中性粒细胞就已被激活,表现出一定的吞噬和杀伤能力。在 3 h 内,中华鳖嗜中性粒细胞对 2 种细菌的吞噬和杀伤能力迅速达到最大值,2 种细菌的最大杀伤指数分别为 94% 和 95%,这说明中华鳖嗜中性粒细胞的杀伤能力很强,但是还没有达到 100%,这可能是因为 2 种细胞对嗜中性粒细胞的杀伤能力具有一定的耐受性。这和致病力强的杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)对大西洋鲑的巨噬细胞的杀伤具有耐受性相似^[10],而这种细菌的耐受性^[15,16]成为重要的致病性。中华鳖嗜中性粒细胞吞噬指数与日本鳊^[17]相近。

在未达到最大值前,中华鳖的嗜中性粒细胞对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的吞噬和杀伤能力随着时间的延长而增加,这种现象和鲤^[14]、鲢、草鱼^[9]、虹

鳟^[18]的嗜中性粒细胞在 20℃ 时, 1h 内被激活, 吞噬吸收率随着时间的延长而渐渐增加相似。而中华鳖嗜中性粒细胞对 2 种细菌的吞噬和杀伤能力不同, 可能与其病原性不同有关。但经过 240 min 后, 对 2 种细菌的吞噬能力和杀伤能力达到最大值, 两者之间并无大的差异。

3.4 红细胞吞噬细菌假象的认证

哺乳类和鱼类的红细胞除具有呼吸功能外, 其表面的 C_{3b}受体具有一定的免疫功能, 但没有吞噬功能。但也有关于人类、两栖类和鱼类的红细胞具有吞噬功能的报道。这是酵母或细菌附着在呈圆盘状的红细胞表面时所形成的被吞噬假象。在本实验过程中, 也经常发生类似现象, 但通过调节微调, 连续观察, 可见红细胞无吞噬泡结构, 细菌附着于红细胞的表面, 还能观察到活细菌的移动、旋转, 据此不难发现细菌并未被红细胞吞噬。此时将视野拍照后, 形成的中华鳖红细胞吞噬假象(彩页图版 I ~ 2, 6), 在相片上无法辨认真伪。

参考文献:

- [1] 蒋立科, 等. 鳖血细胞结构及功能的初步研究[J]. 动物学报, 1996, 42(3): 327 - 329.
- [2] 程备久, 等. 鳖血细胞数量和季节变化及形态结构研究[J]. 应用生态学报, 1996, 7(4): 411 - 418.
- [3] 潘连德. 中华鳖肝组织炎症性细胞的浸润及其结构观察[J]. 中国水产科学, 1998a, 5(3): 47 - 52.
- [4] 潘连德. 中华鳖非寄生性肝病组织病理研究[J]. 水产学报, 1998b, 22(2): 129 - 135.
- [5] 森真朗. 鱼类血液からの白血球分离について[J]. 鱼病研究, 1981, 16(3): 145 - 149.
- [6] 杜爱芬, 等. 中国对虾血细胞吞噬功能的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(2): 1 - 5.
- [7] 饭山贵次, 三浦 薫, 若林久嗣, 等. アクジンリ. オレヨニンシ染色によるワナギ好中球内杀菌活性の測定[J]. 鱼病研究, 1993, 28(1): 49 - 50.
- [8] Yoshiaki Nagamure, Hisatsugue Wakabayashi. Changes in glycogen content of neutrophils in eel, *Anguilla japonica* by bacterial infection[J]. Fish Pathology, 1995, 20(2/3): 389 - 394.
- [9] 张 峰, 等. 不同温度鲤鱼、鲢鱼和草鱼嗜中性粒细胞吞噬作用的研究[J]. 大连水产学院学报, 1996, 9(3): 302 - 305.
- [10] Lams J, Ellis A E. Electron microscopic Observations of the phagocytosis and subsequent fate of *Aeromonas* by Atlantic salmon neutrophils in vitro[J]. Fish & Shell fish Immunology, 1994, 4, 539 - 546.
- [11] Stave J W, Roberson B S, Hetrick F M. Factors affecting the chemiluminescent response of fish phagocytes[J]. J Fish Biol, 1984, 25: 197 - 206.
- [12] Siwicki A, Studnicka M, ryka B. Phagocytic ability of neutrophils in carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Bamiodgah Bull Fish Cult Israe, 1986, 37, 123 - 128.
- [13] 中易千早, 舞田正志, 冈本信明, 等. 细菌薄层を用いた鱼类白血球の貪食能の解析[J]. 鱼病研究, 1995, 30(4): 218 - 282.
- [14] 安田恒雄, 延东真, 橘正, 等. 炎症時のコイ顆粒白血球に関する組織化学的研究[J]. 日本水产学会志, 1984, 50(8): 1 375 - 1 380.
- [15] Oliver G, Moore A R, Fildes J. Toxicity of *Aeromonas salmonicida* cells to Atlantic salmon, *Salmo Salar*, peritoneal macrophages, developmental and Comparative[J]. Fish and Shellfish Immunology, 1992, 16: 49 - 61.
- [16] Sharp G J E, Tadaaki Moritomo, et al. Chemiluminescence of neutrophils isolated from peripheral blood of eel[J]. Fish Pathology, 1998, 23(1): 49 - 53.
- [17] Song Y L, Kou G H. Immune response of eels (*Anguilla japonica*) against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella anguillimortiferum* (*E. tarda*) infection[A]. Proc Repub of China U S Coop Sci Seminar on Fish Dis Nat Sci Conn Series[C], 1981, 3: 107 - 115.
- [18] Secombes C J. The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas* by rainbow trout macrophages[J]. Fish and Shellfish Immunology, 1993, 4, 19 - 129.

Phagocytosis of neutrophilic granulocytes in *Trionyx sinensis* in vitro

PAN Lian-de, ZOU Yu-rong

(Department of Aquaculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Acridine orange (AO) method was employed to measure the phagocytic activity of neutrophilic granulocyte in *Trionyx sinensis*. The method could be used to assay both phagocytosis and bactericidal function simultaneously through fluorescence microscopy. The results show that when incubated in medium temperature of 26.7℃ for 30~240 min with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively, the neutrophilic granulocytes increased from 15% to 65% (at 180th minute, the same below); 49% to 63%; the percent killing in-

creased from 6% to 62% and 2% to 64%; the phagocytic index increased from 0.56 to 11.92 and 0.14 to 10.77, respectively, and the killing indexes increased from 0.32 to 0.95 and from 0.20 to 0.95, respectively. Within 180 min of the incubation, the phagocytic and bactericidal capacity of *Trionyx sinensis* neutrophilic granulocytes increased with time and the phagocytic and bactericidal capacity of neutrophilic granulocytes to *Saphylococcus aureus* was larger than to *Escherichia coli*. At 180 th minute, the phagocytic and bactericidal capacity of neutrophilic granulocytes to the 2 strains reached the peak. There was little difference between them. At 240 th minute all the values decreased.

Key words: *Trionyx sinensis*; neutrophilic granulocyte; phagocytosis, acridine orange method

《中国水产科学》编委座谈会在北海召开

4月10~14日院第五届学术委员会第二次工作会议在广西北海召开期间,《中国水产科学》也借机召开了只有本院系统的编委座谈会。在编委会主任委员雷茂良院长主持下,听取了编辑部的工作汇报,同时征求了与会编委们的意见,并讨论了本刊今后的发展方向。本次会上,大家一致认为,《中国水产科学》创刊至今6年来,得到了三届编委委员的热心指导和水产界许许多多专家学者的真诚帮助,在编辑部新老同志的努力下,本刊的学术水平、编辑规范化和标准化程度、编辑质量、印刷出版质量一年比一年有了明显的提高。尤其是:(1)为了严格执行国家新的标准,与国际接轨,1999年将本刊的开本增大为标准16开;(2)《中国水产科学》被中国科学文献计量评价研究中心认定为《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国科学引文数据库》来源期刊,以及由《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》和(Chinainfo)数字化期刊群全文收录,并作为国家科技论文统计系统的统计源期刊;(3)对编委会进行了调整,增加了6位院士,从有关学科中选取新秀组成新一届编委会。这些都表明《中国水产科学》在全国水产界已得到越来越广泛的专家、作者、读者的认同和欢迎,已经产生了一定的影响力,发挥了重要作用。院领导和编委们对本刊给予充分肯定的同时,提出了许多中肯的意见和不少有益的建议。根据编委们的意见和建议,认为本刊今后的工作重点是:(1)进一步全面提高质量(论文质量、编辑质量、校对质量、印刷质量);(2)面向全国水产界扩大收稿范围,加强低质量稿件的把关力度,把握审稿专家研究学科,以确保稿件的高水平、高质量;(3)保证较大比例的基金项目论文,适当减少应用性研究论文,增加基础研究文章,以提高文章的引用率;(4)将逐步取消研究简报,控制综述文章,主要刊载研究论文;(5)拓宽发行渠道,努力扩大发行量,加强对外交流,扩大大本的国际影响;(6)加强与作者的密切联系,提高其校样质量和校样周转速度,并收集、总结论文发表后的反馈信息。最后,雷茂良院长明确指出,作为我院的重点学术期刊,院将继续在经费、办刊条件等方面大力支持,以保《中国水产科学》健康快速发展。

《中国水产科学》编辑部

2000年6月