

虾夷马粪海胆体腔细胞的类型及功能

李霞, 王斌, 刘静, 孙健

(大连水产学院, 农业部海洋水产增养殖与生物技术重点开放实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要:取平均壳径分别为1.9 cm和4.4 cm 虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)进行实验观察。结果表明, 海胆体腔有2种类型的细胞, 即变形吞噬细胞和色素细胞。变形吞噬细胞形状不定, 能伸出伪足, 核较大, 线粒体、溶酶体等细胞器丰富。色素细胞具突起, 内有紫红色颗粒, 颗粒溶于酒精等多种溶剂中, 使得电镜下细胞内含有大量空泡, 细胞核很少见, 细胞器较少。变形细胞离体后可凝集, 具吞噬酵母的能力, 吞噬能力与温度成正相关。色素细胞具有辅助的免疫功能。

关键词: 虾夷马粪海胆; 体腔细胞; 亚显微结构; 免疫功能

中图分类号: Q959.468

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)05-0381-05

近年来, 海胆养殖业已逐渐成为水产养殖的重要产业之一。尤其是虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*), 又称中间球海胆, 自1989年由日本引入我国后, 在辽宁、山东等地广泛养殖。不论在原产地日本还是在中国, 随着海胆养殖规模的扩大, 病害问题也日趋严重^[1-3], 海胆免疫学研究开始得到重视。

国内外关于无脊椎动物体液及细胞免疫的研究较多, 主要集中在贝类^[4]和甲壳动物^[5]。海胆免疫的相关研究较少, Edds^[6]用蔗糖梯度离心紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)体腔液, 根据细胞分带进行分类和特性研究。Gross^[7]提出紫海胆体腔变形吞噬细胞能产生补体C3。本研究采用光学显微镜和电子显微镜技术对我国主要养殖的虾夷马粪海胆体腔细胞的显微和亚显微结构及其功能进行了初步探讨, 以期在海胆的病害防治提供科学依据, 同时为海胆细胞免疫特性的深入研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

虾夷马粪海胆取自大连碧龙海珍品有限公司, 为海上吊笼式人工养殖。取回后在实验室暂养, 每

日投喂新鲜海带, 沙滤海水流水培育。用做1.2.1~1.2.7试验用海胆30个, 平均壳径4.4 cm, 试验时间为2002年4~6月, 水温为16℃。做1.2.8试验用海胆280个, 平均壳径1.9 cm, 实验时间为2002年7~8月, 水温23℃。

1.2 方法

1.2.1 体腔细胞收集 用灭菌注射器从海胆围口膜处斜插入海胆体腔内, 吸取体腔液, 放于10 mL无菌试管中, 或以1 000 r/min离心, 沉淀细胞用做电镜观察。

1.2.2 细胞计数 用血球计数板常规细胞计数方法, 记录相关细胞数。

1.2.3 Wright's 染色 将新鲜体腔液2~3滴, 加在载玻片上, 涂匀, 自然干燥, 加数滴Wright's 染液, 染10 min, 后加入1:1蒸馏水, 染15 min, 冲洗, 用Olympus 显微镜观察、拍照。

1.2.4 电镜样品制备 将离心后沉淀的细胞团取出, 放入3%戊二醛中固定, 再用锇酸后固定, 逐级酒精脱水, EPON812包埋, LKB超薄切片机切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, JEM-1200型透射电镜观察和拍照。

1.2.5 酵母悬液的制备 将海胆体腔液以2 000 r/min离心10 min, 取上清液调理干酵母2 h, 后以1 000 r/min离心, 倒出上清液, 再用无菌海水将沉淀部分配制成0.25 mg/mL的悬液。

收稿日期: 2003-01-07; 修订日期: 2003-06-11.

作者简介: 李霞(1961-)女, 教授, 从事发育与细胞生物学研究。

E-mail: dbewq@mail.dlptt.ln.cn

1.2.6 细胞体外吞噬功能的观察 将酵母悬液 400 μL 及等量无菌海水加入无菌试管中,再将用无菌海水 1:1 稀释的体腔液加入,混匀,分别在 15、45、60 min 时进行镜检。Olympus 显微镜观察、拍照及计数。

1.2.7 温度对细胞吞噬功能的影响 设 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 $^{\circ}\text{C}$ 、18 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 5 个温度组。将体腔液 200 μL 加等量海水分别放入 15 只试管中,每组 3 只,在事先设置好的 5 个温度环境中预处理 10 min,之后向每只试管中加入 400 μL 酵母悬液和等量无菌海水,混匀后在设定的温度条件下进行反应。统计 100 个变形吞噬细胞,计算吞噬百分率。

吞噬百分率 = (已吞噬酵母菌的变形吞噬细胞个数/被计数的变形吞噬细胞总数) $\times 100\%$

1.2.8 色素细胞释放色素实验 将分离、纯化的引起海胆“紫斑病”的鳃弧菌用 0.85% 的生理盐水从斜面上洗脱,并用海水稀释到 1 000 mL 的烧杯中。实验设为 0、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 /mL 共 7 个浓度组,每组有 2 个平行组,每组 10 只海胆,采用受伤浸泡和不受伤浸泡 2 种方法。受伤浸泡是用镊子将海胆表面约 1 cm^2 范围的棘、管足拔去,形成一个创面,浸泡于菌液中。浸泡时间为 2 h。在 23 $^{\circ}\text{C}$ 条件下流水培育。试验重复 2 次。

2 结果

2.1 体腔细胞形态及亚显微结构

通过活体、涂片、光镜及电镜观察,将海胆体腔细胞分为 2 种类型即变形吞噬细胞和色素细胞。

2.1.1 变形吞噬细胞 细胞形状不定,有伪足伸出,运动缓慢, $\phi = (6.7 \pm 0.2) \mu\text{m}$,Wright's 染色为浅粉色。电镜下细胞核大,核质均匀,核周隙较大,细胞内含有丰富的线粒体、高尔基体、溶酶体(图版 1-1,2),数量为 $(6.87 \times 10^6)/\text{mL}$ 。

2.1.2 色素细胞 细胞有突起,外表不规则, $\phi = (7.2 \pm 0.2) \mu\text{m}$,活体观察时可见细胞内含有大量红色和蓝色颗粒,当颗粒为红色时,细胞核清晰可见,当颗粒为蓝色时,细胞核消失。故前者为年轻细胞,而后者为衰老细胞。将细胞放入海水、酒精、戊二醛等物质中,颗粒释出,使得上述溶液呈紫红色。电镜下,细胞内充满空泡(颗粒内涵物已溶解),线粒体等细胞器很少,核也少见(图版 1-3,4)。数量为 $(6.30 \times 10^5)/\text{mL}$ 。

2.2 细胞的功能

2.2.1 吞噬反应 变形吞噬细胞可吞噬酵母菌(图版 1-5)。变形细胞先伸出伪足,逐渐包围酵母菌,然后细胞膜融合,将酵母菌吞噬,一个变形吞噬细胞可吞噬多个酵母菌,最多可见吞噬 7 个。酵母菌被吞噬后,变形吞噬细胞破裂。温度对变形细胞的吞噬能力有直接的影响。在吞噬反应开始 15、45、60 min 后检查不同温度下变形细胞的吞噬百分率,见表 1。

表 1 温度对变形细胞吞噬百分率的影响
Table 1 Influence of temperature on phagocyte rate of ameobocyte %

时间/min Time	温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature				
	4	10	18	25	30
15	2	4	10	20	22
45	2	12	24	28	34
60	2	12	38	50	—
75	2	12	—	—	—

“—”示凝集反应

“—” means agglutinating reaction

从表 1 可看出吞噬百分率随温度的升高而增加。经过 15 min 和 45 min,30 $^{\circ}\text{C}$ 组吞噬百分率最高,60 min 时由于 30 $^{\circ}\text{C}$ 组细胞发生凝集而无法计数,其他 4 组以 25 $^{\circ}\text{C}$ 最高。4 $^{\circ}\text{C}$ 和 10 $^{\circ}\text{C}$ 下,大多数变形细胞活性受到抑制,伪足缩回,呈圆形,处于静止状态。

2.2.2 凝集反应 离体的变形细胞能发生凝集,表现在大量变形细胞集中,并聚集成团(图版 1-6),已吞噬酵母菌的变形细胞也发生凝集,在凝集块中常见色素细胞。用灭菌海水 1:1 稀释体腔液,凝集现象减少。离体后细胞发生凝集反应的时间与温度有关,温度越高凝集反应越快,30 $^{\circ}\text{C}$ 下 60 min 发生凝集,18 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 下 75 min 发生凝集,而 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 $^{\circ}\text{C}$ 温度下,变形细胞不发生凝集现象。见表 1。

2.2.3 色素细胞释放色素颗粒 将海胆划伤后浸泡于 0、 10^3 /mL、 10^4 /mL、 10^5 /mL、 10^6 /mL、 10^7 /mL、 10^8 /mL 浓度的引起海胆“紫斑病”的鳃弧菌液中,色素颗粒从划伤处释放,使该处外壳呈现紫红色斑点。紫红色斑点出现频率与菌液浓度的关系见表 2。

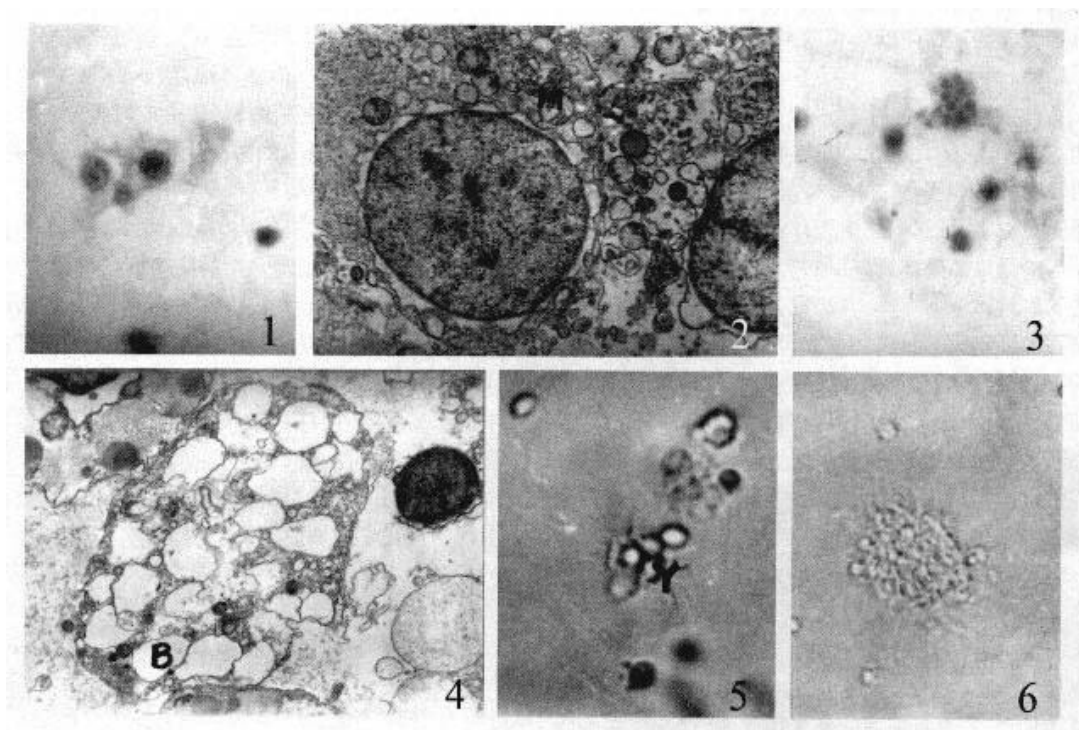
表2 不同菌液浓度与紫红色斑点出现频率的关系(23℃)
Table 2 Frequency of purple spot under different vibrio concentration(23℃) %

时间/h Time	对照 Control	菌液浓度 Concentration of vibrio					
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
12	0	30	60	60	60	65	65
24	0	65	95	80	85	85	90
48	0	85	100	90	90	100	100
72	0	60	65*	70*	70	65	65

* 35%、30%个体死亡

* 35% and 30% of individuals dead

海胆被划伤后放入 10⁷/mL、10⁸/mL 浓度菌液时,立即向外释放色素,整个菌液很快呈现紫红色。在其他低浓度的菌液中海胆没有变化。被菌液浸泡感染 2 h 后,流水培育中,实验组海胆伤口处逐渐出现紫红色斑点,48 h 出现该现象的个体达 85% 以上。没有划伤的个体无一有紫红色色素释出,划伤后放入正常海水中的海胆,也没有色素释出。72 h 后 10⁴/mL、10⁵/mL 浓度组有 35%、30% 个体死亡,其余各组海胆紫红色斑点逐渐消失,伤口愈合。



图版 1 虾夷马粪海胆体腔细胞结构和功能

Plate I Structure and function of coelomocyte in *Strongylocentrotus intermedius*

1. 变形吞噬细胞, wright's 染色, ×400
 2. 变形吞噬细胞, 电镜照片, ×70 000
 3. 色素细胞, wright's 染色, ×400
 4. 色素细胞, 电镜照片, ×70 000
 5. 变形吞噬细胞吞噬 4 个酵母菌, 活体, ×400
 6. 变形吞噬细胞凝集, 活体, ×400
- M - 线粒体; B - 空泡; Y - 酵母

1. Amoeboid phagocyte, weight's stain, ×400
 2. Amoeboid phagocyte, electromicroscopy, ×70 000
 3. Pigment cell, weight's stain, ×400
 4. Pigment cell, electromicroscopy, ×70 000
 5. Amoeboid phagocyte swallowed 4 yeasts, living, ×400
 6. Amoeboid phagocyte agglutinated, living, ×400
- M: mitochondria; B: bubble; Y: yeast

3 讨论

3.1 体腔细胞的类型

海胆体腔中充满无色透明体腔液,其内的细胞

称为体腔细胞。高绪生等^[8]提出在海胆体腔中有一种变形细胞,可游走于各组织和器官之间。Edds 和 Gross 等^[6-7]对紫海胆体腔液进行梯度离心发现有 4 条带,即有 4 种类型的体腔细胞,即变形吞噬细胞、红色球形细胞、无色球形细胞和纤毛游走细胞,

而变形吞噬细胞又有3个亚型,表现为梯度离心的位置和C3的表达不同。其中的变形吞噬细胞和红色球形细胞与本实验观察一致。实验中也曾在光镜下有一种周身具纤毛,运动速度极快的细胞,但在电镜下可清楚地观察到这类细胞具鞭毛和淀粉核等细胞器,应为一种纤毛虫类的原生动。该细胞与Gross等^[7]提出的纤毛游走细胞是否为一种,还有待进一步研究。实验中未发现无色球形细胞。在贝类和甲壳类血细胞分类中都有变形细胞和颗粒细胞的存在,但由于海胆的颗粒细胞有色素,故形态上有别于其他动物中的颗粒细胞。

3.2 细胞吞噬功能

已报道的贝类、甲壳类血细胞大多具有吞噬功能。李光友等^[9]提出对虾小颗粒细胞在失去颗粒后具有吞噬功能。中华绒螯蟹的颗粒细胞能伸出伪足吞噬,利用细胞内的溶酶体进行细胞内消化,并向血清中释放溶酶体酶,在吞噬和消化过程中产生大量的能量^[10]。本实验的研究发现海胆体腔中的变形吞噬细胞具有贝类和甲壳类吞噬细胞相似的结构特点,能够吞噬酵母菌,其吞噬能力随温度的升高而加强,所以变形吞噬细胞应为海胆免疫细胞之一。Takahiro等^[11]报道胡萝卜素等物质可提高海胆吞噬酵母菌的活性,所描述的吞噬过程在本实验中变形吞噬细胞也观察到。

3.3 细胞凝集反应

血细胞凝集是贝类血液学研究中一种常见现象,也是贝类防御反应中的重要过程,贝类软组织受伤后,血细胞很快凝集形成血栓,在伤口修复中起重要作用^[12]。当有细菌等外来物质入侵时,血细胞能将这些外来物凝集成包裹。在凝集过程中,首先是细胞通过细长突起相连,以后,突起缩短变粗,将细胞积聚在一起,可修复贝类受伤的伤口。尚未见甲壳类血细胞凝集的报道。海胆中发现离体的变形细胞有明显的凝集现象,且凝集过程同贝类相似。发生凝集的细胞少则4~5个,多则几十个,肉眼即可见凝集的细胞团。Bubb等^[13]提出海胆变形细胞形态的改变是由于一种profilin的细胞内机动蛋白数量增加引起的,若海胆体表受伤或向体内注射脂多糖,这种蛋白数量均会增加。所以可认为变形细胞的凝集反应至少具有同贝类一样的伤口修复功能。

3.4 色素细胞的作用

已有的研究主要是探讨海胆变形吞噬细胞的功能,尚未见对海胆体腔色素细胞功能的报道。试验

中发现,将海胆划伤后放入从患“紫斑病”海胆体液中分出的鳃弧菌菌液中,海胆表面会形成紫色斑点,这是因为弧菌从伤口处进入到体腔内,引起色素细胞释放颗粒。没有受伤的个体,弧菌不能进入体腔内,而受伤的个体没有这种弧菌的诱发,色素细胞也不会释放颗粒。在高浓度的菌液中($10^6 \sim 10^8$ /mL),海胆没有死亡,并且能将伤口修复,而 10^4 /mL和 10^5 /mL浓度的海胆死亡率分别为35%和30%, 10^3 /mL浓度下海胆也具有修复的能力。将菌液浓度、色素颗粒数量、海胆死亡率结合起来分析可看出菌液浓度越高,释放的颗粒越多,海胆死亡率反而降低,在 10^4 /mL、 10^5 /mL菌液浓度诱导释放的色素颗粒较少,不能抑制细菌的繁殖,造成海胆死亡。在实际生产中患“紫斑病”的海胆死亡率为30%~40%,许多海胆在患病后的几天内可恢复正常,与本实验结果相符。推测其机理为,在海胆体表受伤并受细菌侵袭时,鳃弧菌细胞表面的脂多糖、磷壁酸等物质是海胆免疫级联的启动物质,诱导变形吞噬细胞向创伤处趋化、凝集并吞噬细菌,同时红色颗粒细胞释放色素颗粒,覆盖创面,形成紫红色粘性斑点;在高浓度细菌感染时,红色颗粒细胞通过迅速大量的分泌阻止细菌在创面的黏附,以防止细菌进一步的入侵。这一功能可通过分离、提取体腔细胞以及和微生物的相互作用来证实。

参考文献:

- [1] Kenichi T, Takahiro H, Motohiro S, et al. Isolation and pathogenicity of causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* [J]. Fish Sci, 1997, 63(2): 249~252.
- [2] Kenichi T, Motohiro S, Kouki M, et al. Seasonal fluctuations of *Flexibacter* sp. the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* in the culturing facilities and coastal area [J]. Fish Sci, 1998, 64(1): 6~9.
- [3] Kenjiro T, Kenichi T, Mohammed M, et al. Taxonomical and serological studies on the causative bacteria of the disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* occurring at low water temperatures [J]. Fish Sci, 1999, 65(2): 264~268.
- [4] 周永灿, 潘金培. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展 [J]. 水产学报, 1997, 21(4): 449~452.
- [5] 徐海圣. 甲壳动物细胞及体液免疫机理的研究进展 [J]. 大连水产学院学报, 2001, 16(1): 50~55.
- [6] Edds K T. Cell biology of echinoid coelomocytes. I. Diversity and characterization of cell types [J]. J Invert Pathol, 1993, 61: 173~178.
- [7] Gross P S, L A Clow, L C Smith. SpC3, the complement homolog from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is

- expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes [J]. Immunogenet, 2000, 51: 1 034 - 1 044.
- [8] 高绪生, 常亚青. 中国经济海胆及其增殖[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [9] 李光友, 王青. 中国对虾血细胞及其免疫研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(6): 591 - 596.
- [10] 陆宏达. 中华绒螯蟹血细胞的显微、亚显微形态结构及其分类[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 494 - 500.
- [11] Takahiro k, Miyuki T, Yasushi K. Effect of β -echinenone, astaxanthin, fucoxanthin, vitamin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus* [J]. J Exp Marine Bio, 1998, 226: 165 - 174.
- [12] 翟玉梅, 丁秀云, 李光友. 软体动物血细胞及体液免疫研究进展[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(5): 558 - 562.
- [13] Bubb M R, Baines I C, Korn E D. Localization of actobindin, Profilin I, Profilin II and phosphatidylinositol-4, 5-bis-phosphate (PIP2) in *Acanthamoeba castellanii* [J]. Cell Motilityskeleton, 1998, 39: 134 - 146.

Type and function of coelomocyte in sea urchin

Strongylocentrotus intermedius

LI Xia, WANG Bin, LIU Jing, SUN Jian

(Key Laboratory of Mariculture & Biotechnology, Agriculture Ministry, Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

Abstract: The *Strongylocentrotus intermedius* individuals were divided into two groups for two different trials, for which the average diameters were 1.9 cm and 4.4 cm, respectively. The results show that there are two kinds of cells in the coelom, which are amoeboid phagocytes and pigment cells. The amoeboid phagocytes are unshaped, which contains big nucleus, many mitochondria and lysosome. The nucleus and cell organelle can't be observed in the pigment cells under the electron microscopy because there are many purple pigment granules which can dissolve in many kinds of solutions like sea water and alcohol, that leads to the appearance of empty bubbles in the pigment cells. The amoeboid phagocytes have the abilities to agglutinate in vitro and swallow yeast. The relationship between the swallowing ability and temperature is consistent. The pigment cells have the character of supplementary immune function.

Key words: *Strongylocentrotus intermedius*; coelomocyte; submicrostructure; immune function

欢迎订阅 2004 年《水利渔业》

《水利渔业》是由水利部中国科学院水库渔业研究所主办的水产技术性刊物, 主要栏目包括: 研究与探索、名特优新、增殖养殖、资源与环境、营养与饲料、病害防治、捕捞加工、水产综述、渔业经验、水产信息等。以实用技术为主, 技术与经济并重, 兼顾信息交流, 对水产科研、渔业开发、技术推广、知识更新、渔业致富有实用价值, 适合广大科研、推广、教学、生产和管理的水产工作者阅读。

本刊系中国水产核心期刊, 湖北省一级优秀期刊, 水利部优秀期刊, 全国水产系统优秀期刊, 中国自然科学核心期刊, 并被《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》、《中国学术期刊综合评价数据库》全文收录。本刊为双月刊, 大 16 开本, 每期 72 页, 国内外发行, 国际标准刊号 ISSN1003 - 1278, 国内统一刊号 CN42 - 1247/S, 欢迎广大新老朋友到邮局订阅。邮发代号: 38 - 76, 每期定价 5 元, 全年 6 期 30 元。本刊欢迎读者汇款到编辑部邮购。汇款地址: 湖北省武汉市雄楚大街 578 号《水利渔业》编辑部, 邮政编码: 430079, 联系电话: 027 - 87189555, <http://SCAN.chinajournal.net.cn>, E-mail: SCAN.chinajournal.net.cn

欢迎刊登广告。