

河蚌血细胞对细菌趋化移动的初步研究^{*}

李 静 石安静 刘克武 袁志刚

(四川大学生命科学学院 成都 610064)

摘要: 采用改进的毛细管法,研究了圆背角无齿蚌(*Anodonta woodiana pacifica*)和三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)两种淡水河蚌离体血细胞对两种水体中常见病原细菌的趋化移动作用,及血清对其的影响。结果显示,两种河蚌的离体血细胞对细菌都具有趋化移动作用,产生趋化移动的血细胞数量都显著高于无细菌的对照组($P < 0.05$)。在有血清时,血细胞对荧光极毛杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)的趋化移动活性略高于肠型点状气单胞菌(*Aeromonas punctata f. intestinalis*),圆背角无齿蚌离体血细胞的趋化移动能力显著高于三角帆蚌($P < 0.05$)。血清对河蚌离体血细胞的趋化移动作用有显著的促进作用($P < 0.05$)。

关键词: 河蚌;离体血细胞;细菌;趋化移动

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)05-02-04

A Preliminary Study on the Chemotaxis of Hemocytes from Freshwater Mussels Stimulated by Bacteria

LI Jing SHI An-Jing LIU Ke-Wu YUAN Zhi-Gang

(Life Science College, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: The chemotactic migration of hemocytes from *Anodonta woodiana pacifica* and *Hyriopsis cumingii* as well as the effect of serum were reported. The chemotaxis was measured by capillary technique using *Pseudomonas fluorescens* and *Aeromonas punctata f. intestinalis* as chemotactic stimuli. Hemocytes from both mussels showed chemotaxis to the bacteria. Chemotactic activity was significantly higher in groups with bacteria than that of controls without bacteria ($P < 0.05$). *A. w. pacifica* hemocytes showed significantly stronger ability of chemotactic migration than *Hyriopsis cumingii* (t -test, $P < 0.05$). There were more hemocytes migrated in the group with *P. fluorescens* than that with *A. punctata f. intestinalis*. The chemotaxis of mussels hemocytes to bacteria was significantly enhanced by serum ($P < 0.05$).

Key words: Mussel; Hemocytes *in vitro*; Bacteria; Chemotaxis

在贝类中,由于特异性免疫功能还未得到良好发育,它们对外来病原生物的防御主要是由巨噬性血细胞介导的非特异性免疫^[1]。研究表明,当贝类组织受到损伤或病原微生物入侵后,血细胞会迅速迁移至受损部位,并凝集成团,进行吞噬或修复作用^[2,3]。因此血细胞在病原或组织损伤刺激下的趋化移动是其发挥免疫

反应、形成珍珠囊等重要生理活动的前提条件。目前国内尚无关于贝类血细胞趋化移动的报

^{*} 国家自然科学基金资助项目(No. 39970577);

第一作者介绍 李静,32岁,女,硕士,副教授;研究方向:贝类生物学;E-mail: lijing@email.scu.edu.cn.

收稿日期:2003-02-10,修回日期:2003-06-05

道,大多数的研究都集中在血细胞的吞噬活性方面。本研究采用毛细管法研究了圆背角无齿蚌和三角帆蚌离体血细胞对两种水体病原菌的趋化移动活性及其血清的影响作用,旨在探讨贝类的细胞免疫功能,为揭示淡水贝类的免疫机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 圆背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana pacifica*) 取自成都市大面铺池塘,三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 取自四川安岳县珍珠养殖研究所,为身体健康的 2 龄蚌。

荧光极毛杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*, P. f)、肠型点状气单孢菌 (*Aeromonas punctata* f. *intestinalis*, A. f) 由中国科学院水生生物研究所提供。河蚌平衡盐溶液 (BSS) 配方参考文献 [4], 蚌血抗凝剂为 200 mmol/L EDTA 的 BSS 溶液。

1.2 细菌悬液的制备 荧光极毛杆菌和肠型点状气单孢菌接种于牛肉蛋白胨液体培养基 (pH 7.2) 中培养 24 h 后, 3 000 r/min 离心 20 min 集菌, 沉淀用蚌 BSS 液稀释为 2.8×10^7 /ml 和 5.1×10^7 /ml 的菌悬液, 备用。

1.3 蚌血细胞悬液的制备 每只河蚌于闭壳肌抽取血液约 10 ml, 加入 1 ml 蚌血抗凝剂, 立即于 800 r/min 下离心 3 min, 沉淀即为血细胞层。弃上清, 细胞层用无菌的蚌 BSS 液清洗 2 次, 并调整细胞悬液的浓度为 $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ /ml。每只蚌另于闭壳肌抽取血液 3 ml, 直接于 800 r/min 下离心 8 min, 收集上清, 即为该蚌的血清。

1.4 血细胞的趋化移动实验 参考余澳^[5] 的方法, 并进行改进。用内径为 0.5 mm 的玻璃毛细管吸取细胞悬液, 酒精灯上熔封一端, 800 r/min 水平离心 3 min 后, 自液体与细胞界面处截断毛细管, 将有细胞的一段固定于凹玻板孔内, 每孔内加入无菌 BSS 溶液 250 μ l 或蚌血清 150 μ l 和 BSS 溶液 100 μ l, 最后滴加菌悬液 50 μ l, 并将凹玻板置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 湿润环境下孵育, 定时观察毛细管中细胞移动情况。设只加 BSS 溶液

和只加血清的对照组。共同孵育 18 h 后, 将凹玻板取出置于倒置相差显微镜下观察, 并分别计数毛细管口、左、右及前方共 4 个视野中移动出来的细胞总数。每次实验取 3 只河蚌, 每一实验组设 5 个重复, 实验数据以 15 孔的平均值计, 用 *t*-检验检测不同实验组间差异的显著性。

2 结果

2.1 不同孵育时间蚌血细胞的趋化移动 为了解检测河蚌血细胞的趋化移动的最适时间, 作者对不同孵育时间下血细胞的移动做了观察, 结果如图 1 所示。在添加血清的条件下, 血细胞和细菌共同孵育 5 h 后, 可以观察到沉积在管底的细胞开始松动, 自表面向毛细管口移动 (图 1:1); 孵育后 10 h, 可观察到大量细胞聚集在管口, 呈辐射状, 并开始向四周的细菌逸散 (图 1:2,3); 孵育至 18 h 时, 可观察到血细胞基本均匀地散布在整个孔内, 细胞圆形或伸出伪足, 细胞核清晰可见, 细胞质透明或充满颗粒 (图 1:4); 血细胞孵育至 24 h 时, 则由于细菌的大量繁殖, 孔内液体变得浑浊, 血细胞数量减少, 随处可见细胞碎片。因此 18 h 为观察趋化移动的最适孵育时间。

2.2 河蚌血细胞对不同细菌的趋化移动 圆背角无齿蚌和三角帆蚌离体血细胞对两种病原菌的趋化移动作用及血清的影响见表 1。由表 1 可见, 两种河蚌的离体血细胞对病原细菌都具有趋化移动作用, 趋化移动的血细胞数量都显著高于无细菌的对照组 ($P < 0.05$)。在有血清时, 离体血细胞对 P. f 菌的趋化移动活性略高于 A. f 菌, 圆背角无齿蚌离体血细胞的趋化移动能力显著高于三角帆蚌 ($P < 0.05$)。血清对河蚌离体血细胞的趋化移动作用存在显著的促进作用, 血清存在时, 产生趋化移动的血细胞都显著高于无血清的对照组 ($P < 0.05$), 甚至没有添加细菌的血细胞在有血清存在时, 也显示出一定的移动活性, 而既无血清又无细菌的对照组血细胞则完全不发生移动。

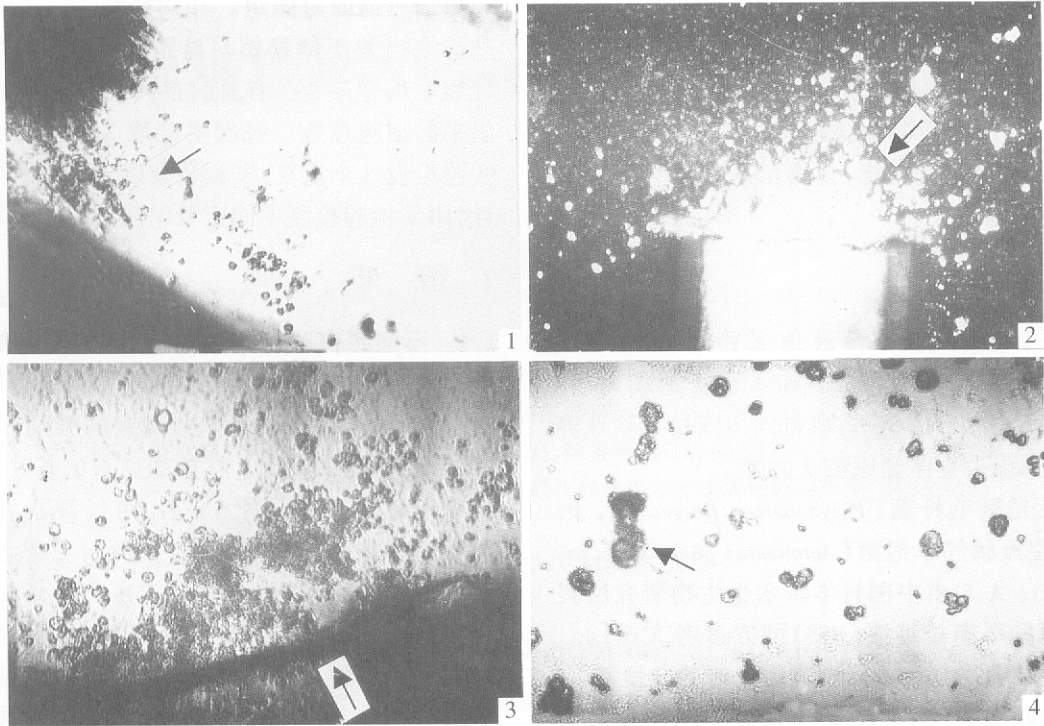


图 1 不同孵育时间下圆背角无齿蚌血细胞对 *P. fluorescens* 的趋化移动

1. 孵育后 5 h, 沉积在毛细血管底的血细胞从管底松动, 开始向管口移动 × 300; 2, 3. 孵育 10 h 后, 血细胞移动到管口呈辐射状向四周弥散 × 120, × 300, 箭头分别示血细胞及毛细血管口; 4. 孵育 18 h 后, 血细胞移动到毛细管外, 散布在凹孔内 × 300

表 1 圆背角无齿蚌和三角帆蚌离体血细胞对病原菌的趋化移动作用

	圆背角无齿蚌(个/4 视野)		三角帆蚌(个/4 视野)	
	加血清	无血清	加血清	无血清
P.f 菌	106 ± 17.3 ^{ABCD}	18.5 ± 10.7 ^A	58.5 ± 8.1 ^{AC}	11.5 ± 1.6
A.f 菌	61.5 ± 12.6 ^{ACD}	6.2 ± 3.7 ^A	40.5 ± 5.0 ^{AC}	10.8 ± 6.3
对照	30.5 ± 11.8 ^E	0	19.7 ± 5.7 ^E	1.1 ± 0.3

χ² 检验, $P < 0.05$; A: 有细菌时河蚌血细胞与无细菌的对照组间差异显著; B: 同种河蚌血细胞对不同细菌的趋化移动差异显著; C: 加血清的实验组与无血清的实验组对同一种细菌的趋化移动差异显著; D: 圆背角无齿蚌离体血细胞对同种细菌的趋化移动活性显著高于三角帆蚌; E: 有无血清的对照组间血细胞移动差异显著

3 讨论

贝类血细胞对病原菌的趋化移动是贝类抵御外界病原微生物侵袭, 产生免疫反应的前提和基础。早在 20 世纪 70 年代, 国外便有人报道腹足纲肺螺亚纲 *Viviparus malleatus* 的血细胞对灭活的金黄色葡萄球菌具有趋化性^[5]。此后, Font 等又证明美洲牡蛎 (*Crsaaostrea virginica*) 血细胞对多种细菌或其提取物具有趋化性^[6]。尽管对于贝类血细胞的趋化机制还不完

全清楚, 但这一过程显然是建立在异己识别的基础之上。Howland 曾认为引起血细胞趋化移动的有效引诱剂是细菌的细胞壁或细胞膜上的一种蛋白质, 分子量约 10 ku, 不含糖类和脂类^[7]。而 Vasta 则认为血细胞表面存在能与糖基特异性结合的凝集素是参与异己识别并促使趋化移动的因素^[8]。本文首次证实了淡水河蚌离体血细胞对病原细菌能产生趋化移动, 在细菌刺激下, 血细胞的移动显著强于对照。这表明 A.f 和 P.f 菌的细胞壁或细胞膜上, 或者菌

体的某些代谢产物能被河蚌血细胞识别,并诱导血细胞对其产生趋化移动,最终发挥吞噬作用,达到消灭病原之目的。因此,和血细胞的吞噬一样,贝类血细胞的趋化活性也可作为衡量贝类防御功能的指标之一,作者用这一指标检测了两种淡水河蚌的防御反应,发现圆背角无齿蚌血细胞对同种细菌的趋化移动能力高于三角帆蚌。这表明这两种河蚌对水体病原菌的抵抗能力存在差异,在机体受损或病原入侵时,圆背角无齿蚌的血细胞能更迅速地迁移至损伤处,消灭病原、修复机体。这也是圆背角无齿蚌较三角帆蚌分布更广泛、抗病力更强的原因之一。

血清是影响贝类血细胞活性的重要成分,已有研究证明贝类血清中存在类似哺乳动物调理素的分子,能显著促进血细胞的吞噬活性^[9]。本研究进一步证明河蚌血清也能显著促进离体血细胞的趋化移动活性,血清存在时血细胞的趋化移动活性显著高于无血清的条件,且仅在无血清时血细胞才能正常移动,而即使是无血清时血细胞也具有一定程度的吞噬活性^[9]。这说明蚌血清中存在一套与调理素不完全相同的系统,能将病原细菌的信号传递给血细胞,并引起血细胞的趋化移动。那么血清中决定血细胞产生趋化移动的因素究竟是什么?有人发现影响细胞骨架的一些离子:Ca²⁺、Mg²⁺等能影响血细胞的趋化移动^[10],但BSS溶液中已有足够的离子浓度,这不应该是主要原因;Suzuki认为血清中的一类凝集素能参与非自身物质的识别,它可能作为一种非免疫球蛋白分子识别外来异己成分,并具有化学趋化性使血细胞向病原微生物移动^[12]。但凝集素只能识别糖链上的糖基组成,因此贝类血清中应该还存在其它成分参与异己分子的识别,从而促使血细胞的趋化移动,这有待于进一步研究证实。

本研究还发现河蚌血细胞对两种病原菌的趋化移动存在一定的差异,对P.f的趋化移动活性高于A.f。这表明血细胞对两种病原菌具有不同程度的识别,即两种细菌的胞壁或细胞膜上存在不同的有效识别域。由于P.f是水生动物的体表寄生菌,而A.f是消化系统的内寄生菌,前者可能更容易被贝类血细胞识别而具有更强的趋化诱导作用。

参 考 文 献

- [1] Anderson R S. Effects of anthreopgeic agents on bivalve cellular and humoral defense mechanism. *Am Fish Soc Spec Public*, 1988, **18**:238 ~ 242.
- [2] Feng S Y. Cellular defense mechanism of oysters and mussels. *Am Fish Soc Spec Public*, 1988, **18**:153 ~ 168.
- [3] 石安静,余燕萍,孙奇志.河蚌血细胞在异物入侵中的作用.四川大学学报,1998, **35**(增刊):106 ~ 109.
- [4] 石安静,余燕萍,町井昭.河蚌体液渗透压测定及新设计的平衡盐溶液的组织培养.四川大学学报,1994, **31**:189 ~ 191.
- [5] 余滨,谢少文,杨桂贞等.临床免疫技术.上海:科学技术出版社,1982.348 ~ 352.
- [6] Schmid L S. Chemotaxis of hemocytes from the snail *Viviparus molleatus*. *Invertebr Pathol*, 1975, **25**:736 ~ 756.
- [7] Font W F. Effects of hemolymph of the American oyster *Crassostres virginica*, on marine cercariae. *Invertebr Pathol*, 1980, **36**:41 ~ 47.
- [8] Howland K H. Identification of bacterial chemoattractants for oyster *Crassostres virginica*, hemocytes. *Invertebr Pathol*, 1982, **39**:123 ~ 132.
- [9] Vasta G R, Cheng T C, John J M. A lectin on the hemocyte membrane of oyster *Crassostres virginica*. *Cellular Immunology*, 1984, **88**:475 ~ 488.
- [10] 李静,石安静,李强.圆背角无齿蚌损伤后血细胞的吞噬活性.水产学报,2000, **24**(5):399 ~ 402.
- [11] 杨军,邱安东,石安静.圆背角无齿蚌血细胞吞噬作用的研究.动物学杂志,1999, **34**(6):5 ~ 8.
- [12] Suzuki T Morik. Hemolymph lectin of the pearl oyster *Pinetadafucata martensii*: a possible non-self recognition system. *Dev Comp Immunol*, 1990, **14**:161 ~ 173.