

栉孔扇贝血细胞吞噬和包囊化作用 实验方法的改进

韩强 孙虎山* 王宜艳 冉镇 黄清荣

(鲁东大学生命科学学院 烟台 264025)

摘要:为了建立一种快速、准确观察血细胞吞噬和包囊化作用的实验方法,通过抽取栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血淋巴,与杆菌或茶花花粉作用 30 min,制片,吡啶橙染色,用荧光显微镜观察吞噬或包囊化现象。结果表明,在荧光显微镜下可以明显看到扇贝血细胞呈现绿色,杆菌和茶花花粉呈现红色,两者颜色反差大,易于观察和计数。是研究血细胞吞噬和包囊化作用一种效果更好的实验方法。

关键词:血细胞;吞噬作用;包囊化作用

中图分类号:Q952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)06-72-04

A Modified Method for Evaluating Phagocytosis and Encapsulation in Haemocytes of *Chlamys farreri*

HAN Qiang SUN Hu-Shan WANG Yi-Yan RAN Zhen HUANG Qing-Rong

(College of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The aim of this study is to establish a kind of fast and accurate method for evaluating phagocytosis and encapsulation of haemocytes *in vitro*. The haemolymph of scallop *Chlamys farreri* was aspirated from adductor muscle with a syringe. Haemocytes were incubated with bacilli or camellia farinas for 30 min at room temperature, then dyed with Acridine Orange (AO). The phagocytosis and encapsulation of haemocytes were observed with a fluorescent microscope. The results showed that haemocytes were green and the bacilli or camellia farinas were red under the fluorescent microscope, and that the color contrast between haemocytes and bacillus or camellia farinas was great, which makes the evaluation of phagocytosis or encapsulation easier and more accurate.

Key words: Haemocyte; Phagocytosis; Encapsulation

血细胞的吞噬作用是动物一种基本的原始的防御机制,对体内没有产生抗体机构的无脊椎动物的免疫防御具有更为重要的意义^[1,2]。传统的吞噬功能检测实验,以鸡血红细胞为吞噬材料^[3],Giemsa-Wright 染色,普通光学显微镜下观察,效果较好,但无脊椎动物血细胞较小,鸡血或羊血红细胞保存时间短,且实验操作较繁琐,效果差。用大肠杆菌和金色葡萄球菌等实验室常用菌作吞噬材料,Giemsa-Wright^[4,5]或吡啶橙(AO)染色^[6]后,细菌与血细胞反差小,不易观察。研究中发现栉孔扇贝(*Chlamys*

farreri)血液中有的一种杆菌,AO染色后呈现红色,与呈现绿色的血细胞形成明显的反差,易于观察,并有助于提高实验结果的准确性。观察血细胞包囊化现象的实验材料,我们选择了茶

基金项目 国家“九七三”计划项目(No. G1999012005),鲁东大学大学生科技创新基金项目;

* 通讯作者 E-mail: s_hushan@163.com;

第一作者介绍 韩强,男,硕士研究生,研究方向:海洋动物生物学 E-mail: hanqqqq@126.com.

收稿日期 2006-03-07,修回日期 2006-07-02

花花粉和月季花粉经 AO 染色亦呈现红色,效果较好。

1 材料与方法

1.1 材料 栉孔扇贝为烟台芝罘湾人工养殖 2 龄贝,室内水族箱砂滤海水暂养,充气泵供氧;大肠杆菌、枯草杆菌和啤酒酵母由鲁东大学生命科学学院微生物实验室提供,小杆菌自栉孔扇贝血淋巴中分离纯化,茶花花粉、油菜花粉和玉米花粉购自蜂农,月季花粉采自校园。AO 为 Fluka 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。荧光显微镜型号为 Olympus BX50,数码摄像系统为 Olympus DP70。

1.2 方法

1.2.1 杆菌分离纯化 血细胞样本的处理:用注射器从栉孔扇贝闭壳肌血囊中取血,4 000 r/min 离心 10 min,去上清,在沉淀中注入蒸馏水破碎细胞,4 000 r/min 离心 10 min,取上清。培养基:1 000 ml 砂滤海水,牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,琼脂 15~20 g, pH 6.5~7.0。分离纯化:利用平板培养血细胞样本,24 h 后挑出单菌落涂片,AO 染色,荧光显微镜观察,选择 AO 染色后为红色的菌落进行斜面划线培养 12 h、24 h、36 h、48 h 和 60 h。

1.2.2 吞噬实验 用 7 号针头和 10 ml 注射器从栉孔扇贝闭壳肌血囊中取血。细菌经高压灭菌的过滤海水洗下,镜检计数,用无菌海水调至浓度为 9.3×10^8 个/ml。血样和杆菌的体积比 20:1,作用 30 min,涂片 4℃ 95% 的酒精固定 15 min,空气干燥,0.1% 的醋酸酸化 30 s,0.1% AO 染色 10 min,1/15 mol/L KH_2PO_4 洗 3 次,每次 1 min,1/10 mol/L 的 CaCl_2 分化 30 s,滴一滴 1/15 mol/L 的 KH_2PO_4 ,加盖玻片,荧光显微镜下进行观察。

1.2.3 包囊化实验 花粉用高压灭菌的过滤海水反复冲洗,镜检计数,用无菌海水调至浓度为 12.5 万个/ml。血样和花粉的体积比 20:1,作用 30 min。涂片、制片和染色方法同上,荧光显微镜下观察包囊化现象。

2 结果和讨论

2.1 杆菌分离纯化 成功分离纯化所需的杆菌(图版 I:1),并传代保存。杆菌涂片用 AO 染色后,荧光显微镜观察,多数杆菌呈红色,其中杆菌的培养时间为 12~24 h 时,呈红色杆菌的比例最高。在此杆菌的分离过程中,还得到多株海洋酵母菌,经 AO 染色后,细胞质呈橙红色,细胞壁呈绿色(图版 I:2)。而大肠杆菌、枯草杆菌和啤酒酵母等实验室常用细菌和酵母涂片经 AO 染色后均呈绿色。

杜爱芳等^[6]研究认为,金色葡萄球菌经 AO 活体染色,呈绿色的是活菌,呈红色的是死亡的细菌。本实验 AO 染色前均经 95% 的酒精固定,细菌已全部死亡,但大肠杆菌、枯草杆菌和啤酒酵母经 AO 染色后均不呈红色而仍呈绿色,自扇贝血淋巴分离得到的小杆菌也有部分呈绿色,可能与所用菌的种类及其染色条件不同有关,如:染液的浓度、pH 和染色步骤等,这有待进一步的研究。在杆菌分离和纯化过程中发现,不同培养时间的杆菌在荧光下呈现的颜色不同,染色后呈现的颜色与培养时间可能有一定的关联,当培养时间在 12~24 h 时,多数杆菌呈现红色,适合用于血细胞的吞噬实验。同时发现的胞质呈现红色的酵母,与呈现绿色的啤酒酵母着色差别较大(图版 I:3),利用其做吞噬实验可以达到与小杆菌同样明显的实验结果。此种杆菌和酵母在分类学上处于何种地位,有待于深入研究。

2.2 吞噬作用 用荧光显微镜观察,可以看到扇贝血细胞的细胞核呈亮绿色,细胞质呈淡绿色(图版 I:4、5),细胞内的大肠杆菌、枯草杆菌和啤酒酵母也呈绿色,而筛选分离的小杆菌则呈现鲜艳的红色。血细胞吞噬杆菌的过程为杆菌首先附着于血细胞的表面,然后具吞噬能力的血细胞即伸出伪足将杆菌包围,形成吞噬泡进入血细胞内部(图版 I:6~9)。

观察血细胞的吞噬作用,经典的方法是采用鸡血红细胞作为吞噬材料,因鸡血红细胞有血红蛋白呈红色且有细胞核,在吞噬细胞内反

差较大,易于观察,而且既可以活体观察,也可以用瑞士-吉姆萨染色法染色后观察,效果较好,但用于贝类等无脊椎动物血细胞的吞噬实验效果不好,因贝类的血细胞很小,大多数细胞的直径在 $10\ \mu\text{m}$ 以下,直径 $5\ \mu\text{m}$ 以下的细胞所占比例很大,因此难以吞噬鸡血红细胞。用大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和酵母菌作为吞噬材料,用瑞士-吉姆萨染色法染色,也常用于高等动物的吞噬实验的观察,但用于无脊椎动物血细胞的吞噬实验,菌与血细胞的反差很小,效果不好。许多作者对吞噬实验方法进行了改进,得到了较好的效果。刘志鸿等^[7]改用白色念珠菌(*Candida albicans*)作为毛蚶血细胞的吞噬材料,吉姆萨染料染色,念珠菌着色较好。杨军等^[2]采用吕氏碱性美蓝染色,对被河蚌血细胞吞噬的大肠杆菌着色较深,而血细胞着色较浅,反差较大。近年来,有学者利用流式细胞仪检测血细胞的吞噬率^[8,9],以荧光微球或异硫氰酸荧光素(FITC)标记的细菌作为吞噬材料,计数数量大,减少了人为的影响,准确性较高,但费用较高,不易推广普及。本实验利用微生物分离纯化方法和荧光显微技术成功地分离和筛选出了吞噬实验所用的一种杆菌,AO染色后呈鲜红色,在绿色的血细胞中反差大,易于观察计数,为研究动物血细胞吞噬作用提供了一种效果好的实验材料和染色方法。

2.3 包囊化现象 在荧光显微镜下进行观察,油菜花粉和玉米花粉呈黄绿色,与血细胞间反差小,不易区分,而茶花花粉和月季花粉呈现红色(图版 I :10),多个或大量的呈绿色的血细胞伸出伪足包裹在花粉颗粒的外面,可包围 1 层到多层血细胞,花粉与血细胞间反差大,易于区分(图版 I :11,12),实验中还观察到血细胞可通过花粉沟进入花粉内部,吞噬并分解花粉壁内的内容物。

当血细胞遇到较小的异物时,血细胞能够产生吞噬作用,当异物颗粒的直径较大时,就不能通过单个细胞的吞噬作用将其摄入,而通过

大量细胞包被在异物的外层,发生包囊化作用,由大量血细胞释放水解酶等因子将较大的异物杀死并消化分解^[10]。本研究证实栉孔扇贝血细胞也具有进行包囊化作用的功能,此功能在杀死和清除寄生虫等进入动物体内的大型异物方面可发挥重要作用。筛选到的 AO 染色呈红色的茶花花粉和月季花花粉是贝类血细胞包囊化实验的好材料,此 2 种花粉及其荧光染色方法也可以应用于其他类动物血细胞包囊化作用实验研究。

参 考 文 献

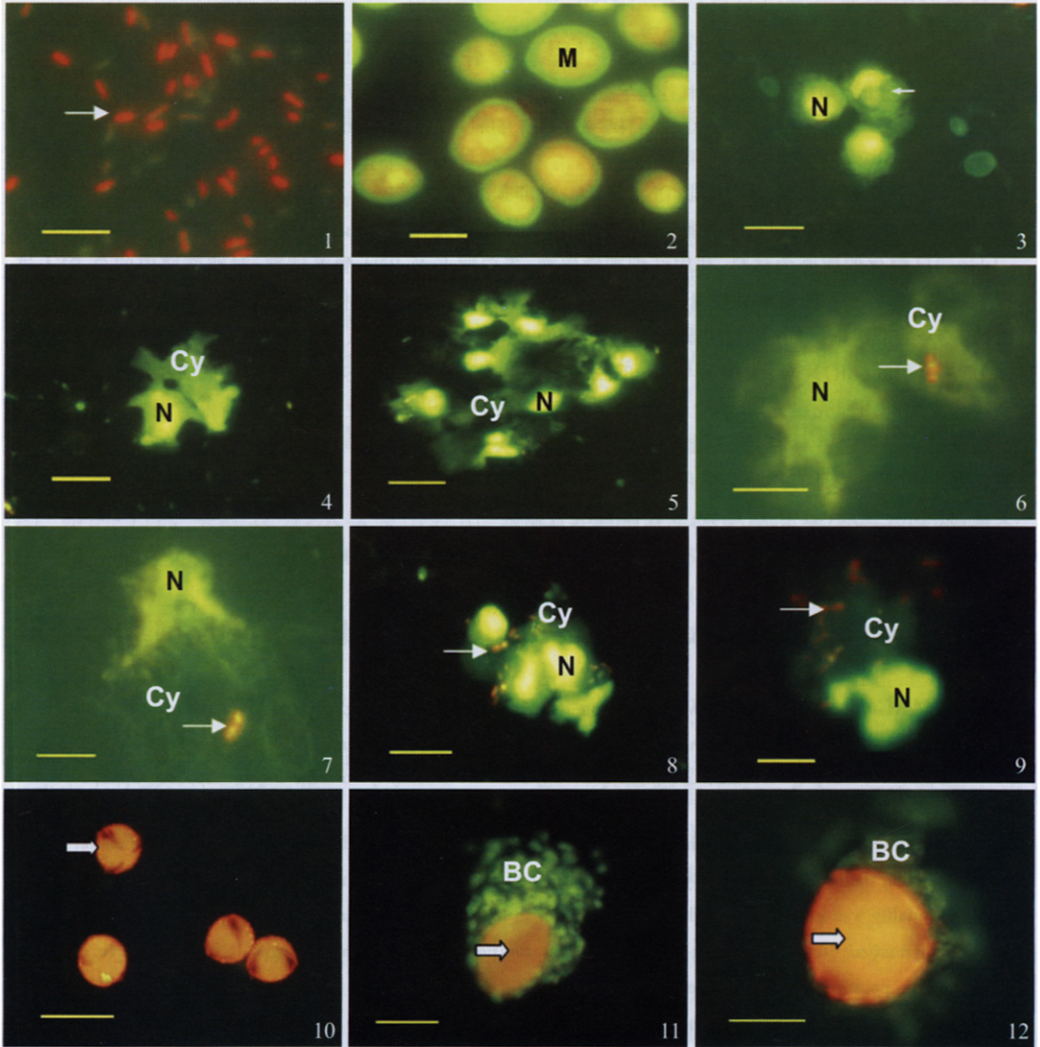
- [1] 徐海圣,徐步进. 甲壳动物细胞及体液免疫机理的研究进展. 大连水产学院学报, 2001, 16(1): 49~56.
- [2] 孙虎山,李光友. 栉孔扇贝血细胞的吞噬作用及其扫描电镜研究. 高技术通讯, 2001, 11(4): 16~19.
- [3] 杨军,邱安东,石安静. 圆背角无齿蚌血细胞吞噬作用的研究. 动物学杂志, 1999, 34(6): 5~8.
- [4] Pincikova T, Bucova M, Slobodnikova L. Influence of recombinant human procalcitonin on phagocytic and candidacidal ability of polymorphonuclear leukocytes and on killing mechanisms of serum and blood against bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Vnitř Lek*, 2005, 51(12): 1365~1370.
- [5] 余萍,李京培. 紫外线照射对人外周血细胞凋亡及吞噬功能的观察. 安徽医科大学学报, 2002, 37(5): 377~379.
- [6] 杜爱芳,蔡渭明,于连. 中国对虾血细胞吞噬功能的研究. 中国水产科学, 1997, 4(2): 1~6.
- [7] 刘志鸿,张士瑾,杨爱国等. 毛蚶血细胞的形态观察及吞噬性能研究. 高技术通讯, 2003, 13(10): 94~96.
- [8] Wenisch C, Biffignandi P M. Effect of bioflavonoids (trihydroxyethylrutin and disodium flavodate) *in vitro* on neutrophil reactive oxygen production and phagocytic ability assessed by flow cytometry. *Curr Med Res Opin*, 2001, 17(2): 123~127.
- [9] 赵修春,姚春艳,李柏青等. 流式细胞术检测小鼠中性粒细胞吞噬功能的方法学探究. 蚌埠医学院学报, 2004, 29(5): 388~390.
- [10] 孙虎山,李光友. 双壳贝类参与免疫防御的体液因子. 海洋科学, 2001, 25(4): 34~36.

韩 强等:栉孔扇贝血细胞吞噬和包裹化作用实验方法的改进

图版 I

HAN Qiang *et al.*: A Modified Method for Evaluating Phagocytosis and Encapsulation
in Haemocytes of *Chlamys farreri*

Plate I



1. 分离的杆菌; 2. 分离的酵母菌; 3. 栉孔扇贝血细胞吞噬啤酒酵母; 4~5. 栉孔扇贝血细胞; 6~9. 栉孔扇贝血细胞吞噬杆菌; 10. 茶花花粉; 11~12. 栉孔扇贝血细胞包裹茶花花粉。

→示分离的杆菌; M 示分离的酵母; ←示啤酒酵母; N 示血细胞细胞核; Cy 示血细胞伪足; ⇨示茶花花粉; BC 示血细胞。图 1~12 的标尺分别为: 17.5、3.5、65、10、15、6.5、6.5、15、6.5、10、20 和 25 μm。