

流式细胞术结合组织学方法对柄海鞘血细胞的分类

王岳 孙虎山* 王宜艳 王海娜

(鲁东大学生命科学学院 烟台 264025)

摘要: 用流式细胞术研究柄海鞘 (*Styela clava*) 血细胞的分类, 依据细胞大小及颗粒的复杂程度将血细胞分为 5 类: 即类群 $R_1 \sim R_5$, 各类群分别占血细胞总数的 $37.15\% \pm 1.01\%$ 、 $15.85\% \pm 2.91\%$ 、 $16.15\% \pm 1.58\%$ 、 $23.65\% \pm 3.05\%$ 、 $5.87\% \pm 0.31\%$, 上机血样品的密度约 10^6 个/ml。组织学方法依据细胞大小、所含颗粒的情况及细胞的染色特征将血细胞分为 5 类: 成血细胞、透明细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞及吞噬细胞。对两种方法各自所分 5 类细胞的对应关系进行了讨论。

关键词: 柄海鞘; 流式细胞术; 组织化学; 血细胞; 分类

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)01-87-05

Classification of Haemocytes in *Styela clava* by Flow Cytometry and Histology Method

WANG Yue SUN Hu-Shan* WANG Yi-Yan WANG Hai-Na

(Department of Biology, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The classification of haemocytes in *Styela clava* was studied with flow cytometer. On the basis of cell size and presence of granules, five types of haemocytes were recognized: R_1 is the smallest with a few granules; R_2 is bigger with fewer granules; R_3 is the medium-sized cells with more granules; R_4 is the medium-sized with a few granules; R_5 is the largest cells with more granules. The total amount of haemocytes on the average was about 1×10^6 cells/ml of haemolymph. The R_1, R_2, R_3, R_4 and R_5 cells constituted $37.15\% \pm 1.01\%$, $15.85\% \pm 2.91\%$, $16.15\% \pm 1.58\%$, $23.65\% \pm 3.05\%$, $5.87\% \pm 0.31\%$ of the total haemocytes, respectively. Histology study revealed that haemocytes could be divided into haemoblast, hyaline cells, eosinophilic granulocytes, basophilic granulocytes and phagocytes according to cell size and the presence of granules. We also discussed the relations among the cells.

Key words: *Styela clava*; Flow cytometry; Histochemistry; Hemocytes; Classification

柄海鞘 (*Styela clava*), 俗称海茄子, 属脊索动物门 (Chordates) 尾索动物亚门 (Urochordata) 海鞘纲 (Ascidacea) 单海鞘目 (Monascidia)。尾索动物因外被一层特殊的被囊 (tunic), 也称为被囊动物。被囊动物在分类地位上十分特殊, 介于无脊椎动物与脊椎动物间的过渡阶段, 有原始的宿主防御系统, 这个系统被认为是脊椎动物先天免疫系统的原型^[1,2]。无脊椎动物的

血细胞常常被认为是免疫系统中主要的防御因子^[3-5]。Munoz 等人研究发现被囊动物的血细

基金项目 国家“九七三”计划项目 (No. G1999012005);

* 通讯作者, E-mail: s-hushan@163.com;

第一作者介绍 王岳, 女, 硕士研究生; 研究方向: 海洋动物;

E-mail: yueyidier@163.com.

收稿日期: 2008-06-27, 修回日期: 2008-09-16

胞参与了机体的炎症反应且内含物抗菌肽对机体有免疫促进作用^[6~9]。研究柄海鞘血细胞不仅对了解柄海鞘的免疫机制具有重要作用,对研究动物的免疫系统进化也具有重要的意义。柄海鞘血细胞的研究开始于 20 世纪 30 年代,但其血细胞分类一直不很明确^[10]。1993 年, Sawada 等人通过组织化学、电镜技术等形态学研究将柄海鞘的血细胞分成嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、透明细胞、成血细胞^[10]。笔者通过流式细胞术结合组织学方法对正常状态下柄海鞘的血细胞分类进行了观察。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用柄海鞘购于烟台上尧农贸市场,共 28 个,体长 43~112 mm,10~15 条件下在水深为 20 cm 的 70 cm ×30 cm ×30 cm 室内玻璃水族箱中驯养 2 d,驯养期间进行充气、投喂小球藻 (*Chlorella zofingiensis*)、换水等日常管理,未发现柄海鞘水孔长时间紧闭等异常现象。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术对血细胞的分类 取柄海鞘用无菌海水冲洗体表,剪断柄海鞘基部,用加入约 10 倍于血量(约 4.5 ml)无菌海水的离心管收集血液,以防止非特异性血细胞凝结。用 300 目的筛绢过滤血细胞,加 2% NaCl 稀释,血细胞计数法观察的浓度数量级约为 10^6 个/ml,测试 18 个个体。实验所用流式细胞仪为美国 BD 公司生产的 BD FACSCalibur,应用 CellQuest 软件进行实验数据的获取和分析。应用 488 nm 的氩离子气体激光器,以经 0.2 μ m 过滤膜过滤的双蒸水为鞘液,前向角散射光 (forward scatter, FSC) 和侧向角散射光 (side scatter, SSC) 为主要参数,FSC 和 SSC 为横纵坐标的点图获取数据,其中 FSC 反映细胞的大小,SSC 反映细胞颗粒的复杂程度,数据分析是在 FSC 和 SSC 点图上圈出各细胞类群,统计各细胞类群占整个血细胞总数的比例。实验所用 FSC 电压为 E00 1.35,SSC 电压为 300,每个血样收集 10 000 个细胞。

1.2.2 组织学方法对血细胞的分类 取柄海鞘用抽滤的无菌海水冲洗体表,剪断柄海鞘的基部,血液直接在洁净载玻片上涂片,干燥后,用 Wright 染液染色,1 min 后滴加 1.5 倍于染液的磷酸缓冲液,静置 10 min,用蒸馏水洗去染液,彻底干燥后封片。Olympus 显微镜观察、测量。

2 结果

2.1 流式细胞术对血细胞的分类 实验通过流式细胞术对柄海鞘血细胞进行分群,同时计算各个细胞类群所占比例,实验结果以血细胞的 FSC 和 SSC 双参数点图 (dot plot) 和等高线图 (contour plot) 的形式表示(图 1)。其中 FSC 表示细胞的大小,SSC 表示细胞颗粒的复杂程度。结果显示其血细胞由 5 个类群 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 组成。类群 R_1 的细胞最小,颗粒程度较为复杂;类群 R_2 的细胞稍大,颗粒程度较简单;类群 R_3 细胞较 R_2 大,细胞颗粒程度复杂;类群 R_4 细胞大小与 R_3 相似,细胞颗粒复杂程度介于 R_2 与 R_3 之间;类群 R_5 细胞最大,颗粒的复杂程度与 R_3 相似。

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 5 个细胞类群占血细胞总数的百分比分别为:37.15% \pm 1.01%、15.85% \pm 2.91%、16.15% \pm 1.58%、23.65% \pm 3.05%、5.87% \pm 0.31%。

2.2 组织学方法对血细胞的分类 根据细胞大小、所含颗粒情况及细胞的染色特征,将柄海鞘的血细胞大致分为 5 种。

成血细胞:细胞近圆形,直径 2~2.3 μ m,细胞质极少,细胞核大,被 Wright 染料染成深紫色(图 2A),此类细胞约占血细胞总数的 5.14%。

透明细胞:细胞近圆形,直径 12~15 μ m,核异态,被 Wright 染料染成淡紫红色,细胞质透明、不易着色,细胞伸展性较好,在玻片上平铺为一薄层细胞。在光镜下,此种细胞易聚集,有时 3~5 个细胞聚集,有时几十个细胞聚集(图 2B),此类细胞约占血细胞总数的 10.6%。

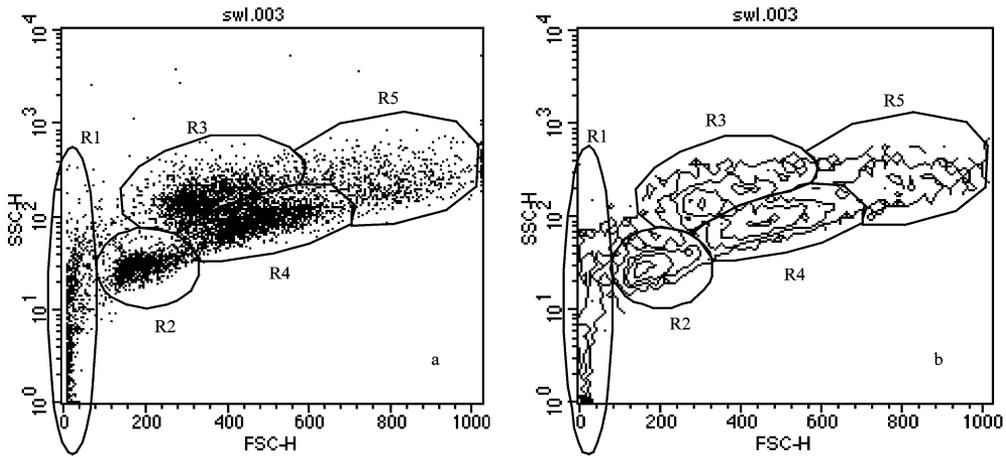


图 1 柄海鞘血细胞流式细胞术分类的散点图与等高线图

Fig. 1 Classification of haemocytes in *Styela clava* by flow cytometer

a. 柄海鞘血细胞的 FSC 和 SSC 双参数点图; b. 柄海鞘血细胞的等高线图。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ 分别代表一个细胞类群。a. Dot plot; b. Contour plot。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ represent five groups of haemocytes.

嗜碱性颗粒细胞:细胞形状不规则,直径约 7~8 μm,核椭圆形、紫红色,常被嗜碱性颗粒遮盖,胞浆中充满大小不均、排列不整齐的,圆形、菱形及长椭圆形深紫色颗粒,胞膜不明显(图 2C),此类细胞约占血细胞总数的 22.3%。

吞噬细胞:细胞形状不规则,直径约为 10 μm,细胞核近圆形,胞内颗粒物多,被 Wright 染料染成紫红色(图 2D),此类细胞约占血细胞总数的 2.7%。

嗜酸性颗粒细胞:细胞多圆形或椭圆形,直径约 6~7 μm,细胞核常椭圆形,位于细胞中央或偏向一边,明显被 Wright 染料染成紫红色。胞浆中充满均匀整齐、紧密排列的圆形或椭圆形桔红色嗜酸性颗粒,颗粒多少不等,分布呈现中空的现象或环状,这大概是由于颗粒中央与四周密度不同所致。光镜下细胞有时呈多角形(图 2E)。此类细胞约占血细胞总数的 59.8%。

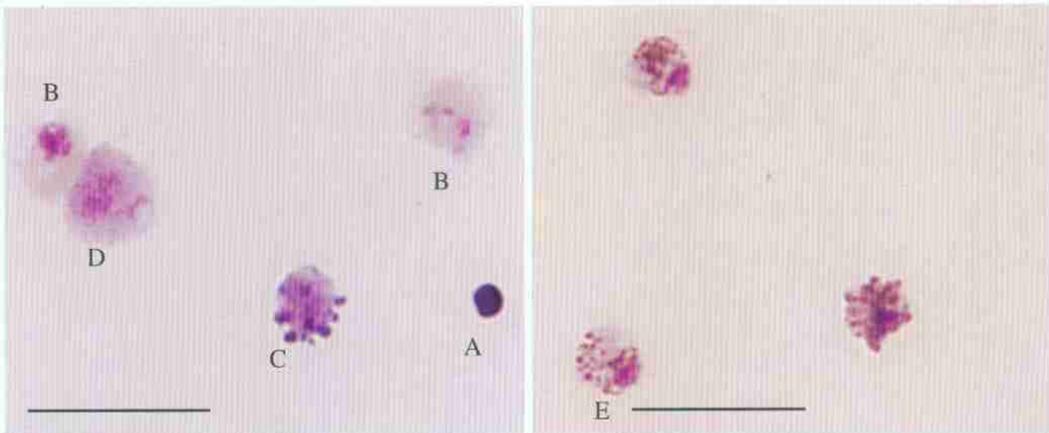


图 2 柄海鞘血细胞组织学方法分类的显微结构图

Fig. 2 Classification of haemocytes in *Styela clava* by histological method

A. 成血细胞; B. 透明细胞; C. 嗜碱性颗粒细胞; D. 吞噬细胞; E. 嗜酸性颗粒细胞。×40,标尺=20 μm。
A. Hemoblast; B. Hyaline cells; C. Basophilic granulocytes; D. Phagocytes; E. Eosinophilic granulocytes. ×40, Bar = 20 μm.

3 讨 论

流式细胞术对柄海鞘血细胞的分类结果显示,柄海鞘的血细胞可分为5类。类群 R_1 细胞最小,颗粒程度较为复杂,占血细胞总数的比例最大;类群 R_2 的细胞稍大,颗粒程度较简单,占血细胞总数的比例居第四位;类群 R_3 细胞较 R_2 大,细胞颗粒程度复杂,占血细胞总数的比例居中;类群 R_4 细胞大小与 R_3 相似,细胞颗粒复杂程度介于 R_2 与 R_3 之间,占血细胞总数的比例居第二位;类群 R_5 细胞最大,颗粒程度最复杂,占血细胞总数的比例最小。组织学方法对血细胞的分类实验中,依据细胞大小、所含颗粒情况及细胞的染色特征,我们将血细胞分为5类,其中成血细胞胞体直径最小,细胞颗粒程度较复杂,占血细胞总数的比例居第四位,我们推测其为 R_1 类群细胞,但是此类细胞在两个实验中占血细胞总数的比例不相符合,可能由于成血细胞不易在玻片上附着,洗片过程中部分丢失所致,这与Sawada等人^[10]提到成血细胞不易在玻片上附着,因此所占比例较少的结论相吻合。透明细胞的胞体直径较大,细胞颗粒程度较简单,占血细胞总数的比例居第三位,排除成血细胞在两个实验中占血细胞总数比例不一致的影响,我们推测其为 R_2 类群细胞,但此类细胞的大小在两个实验中不相符合。在组织学实验中,我们观察到此类细胞有伪足,可以在玻片上展开,但在流式细胞仪的检测中,伪足不易展开致使胞体直径变小,因此两种结果存在差异。嗜碱性颗粒细胞胞体直径约 $7 \sim 8 \mu\text{m}$,细胞颗粒程度复杂,占血细胞总数的比例居第二位,排除成血细胞在两个实验中占血细胞总数比例不一致的影响,推测其为 R_3 类群细胞,但是此类细胞的大小在两个实验中不相符合。在组织学实验中,我们观察到此类细胞形态多变,外形极不规则,可能是细胞内颗粒的分布影响细胞直径的大小,这与Sawada等人^[10]提到嗜碱性颗粒细胞平均直径要小于嗜酸性颗粒细胞的平均直径相吻合。嗜酸性颗粒细胞胞体直径约

$6 \sim 7 \mu\text{m}$,细胞颗粒程度复杂,占血细胞总数的比例最大,排除成血细胞在两个实验中占血细胞总数比例不一致的影响,推测其为 R_4 类群细胞。吞噬细胞胞体直径约为 $10 \mu\text{m}$,排除透明细胞在组织学实验中伪足伸展影响细胞真实大小的问题,此类细胞胞体直径最大,细胞颗粒程度最复杂,占血细胞总数的比例最小,因此推测其为 R_5 类群细胞。

被囊动物中的很多种类的血细胞都通过光学显微镜或电子显微镜进行过分类^[11],但是迄今仍然没有形成一个公认的分类标准,这在一定程度上反映了被囊动物血细胞本身组成的复杂性。George总结前人的研究成果:非洲大纽鳃樽(*Salpa africana maxima*)的血细胞可分为淋巴细胞、小室细胞、指环状细胞和绿细胞^[11],双尾纽鳃樽(*S. democratica mucronata*)的血细胞可分为星状细胞、颗粒噬菌细胞、桑椹细胞、肾原细胞^[11]等,在此基础上,他依据被囊动物血细胞的结构功能及细胞内涵物将血细胞分为5类:淋巴细胞、巨噬细胞、液泡细胞、肾原细胞、色素细胞^[11]。笔者对柄海鞘血细胞的显微观察表明,虽然在合适的染色条件下可以观察到血细胞,但血细胞各类群的比例、是否有血细胞丢失,与染色时分色时间长短有很大的关系(如分色时间过长可能导致部分细胞丢失)。因此笔者以流式细胞术对柄海鞘血细胞的分类为依据,而组织学特征作为一个辅助特征,对柄海鞘血细胞进行分类。实验用流式细胞仪FSC和SSC强度即依据细胞大小和颗粒复杂程度来进行柄海鞘血细胞的分类,得到比较理想的结果,血细胞非常明显地分为5类 $R_1 \sim R_5$ 。依据细胞的大小、数量、颗粒程度等特征,我们将其与组织学特征比较,推测 $R_1 \sim R_5$ 分别对应成血细胞、透明细胞、嗜碱性颗粒细胞、嗜酸性颗粒细胞及吞噬细胞。这与Sawada等^[10]通过组织化学、电镜技术等形态学研究将柄海鞘的血细胞分成嗜酸性颗粒细胞、嗜碱性颗粒细胞、透明细胞、成血细胞的结果相似,同时笔者证明了吞噬细胞的存在。

组织学实验中我们选取了Wright染料作为

染色剂,采取直接采血后迅速在玻片上涂片的方法,有效防止了非特异性血细胞的凝结,同时避免了固定剂对血细胞造成的凝缩等影响。各类血细胞大小与 Sawada 等人^[10]的测量数据相比,直径皆小于其测量结果,可能与固定方法不同有关。

参 考 文 献

- [1] Shida K, Terajima D, Uchino R, *et al.* Hemocytes of *Ciona intestinalis* express multiple genes involved in innate immune host defense. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **302**:207 ~ 218.
- [2] Azumi K, De Santis R, De Tomaso A, *et al.* Genomic analysis of immunity in a urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: “ waiting for Godot ”. *Immunogenetics*, 2003, **55**(8) :570 ~ 581.
- [3] Leippe M, Renwranz L. Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. *Dev Comp Immunol*, 1988, **12**(2) :297 ~ 308.
- [4] Toh Y, Mizutani A, Tokunaga F, *et al.* Morphology of the granular hemocytes of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* and immunocytochemical localization of clotting factors and antimicrobial substances. *Cell Tissue Res*, 1991, **266**:137 ~ 147.
- [5] Tincu J A, Taylor S W. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, **48**(10) : 3 645 ~ 3 654.
- [6] Munoz M, Vandembulcke F, Saulnier D, *et al.* Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur J Biochem*, 2002, **269**(11) :2 678 ~ 2 689.
- [7] Menzel L P, Lee H, Sjostrand B, *et al.* Immunolocalization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 2002, **26**:505 ~ 515.
- [8] Raftos D A. Exocytosis of a complement component C3-like protein by tunicate hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, **28**:181 ~ 190.
- [9] Vizzini A, Pergolizzi M, Vazzana M, *et al.* FACIT collagen (I -chain) is expressed by hemocytes and epidermis during the inflammatory response of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, **32**:682 ~ 692.
- [10] Sawada T, Zhang J, Cooper E L, *et al.* Classification and characterization of hemocytes in *Styela clava*. *Biol Bull*, 1993, **184**:87 ~ 96.
- [11] George W C. A comparative study of the blood of the tunicates. *Quart J Micr Sci*, 1939, **81**:391 ~ 431.