

贝类血细胞研究进展*

余燕萍 石安静

(四川联合大学生物系 成都 610064)

关键词 贝类 血细胞

贝类血细胞研究始于1934年。在70年代中期,贝类血细胞又重新引起了研究者的兴趣,原因之一,是一些经济贝类时常遭受一些寄生虫或病菌的侵袭引起疾病,而贝类的血细胞在防御疾病中扮演了极重要的角色,所以研究血细胞的形态、结构、功能,将帮助我们更好的了解它们的防御机制。近年来,广大研究者应用现代免疫学和生物化学及物理学的新技术、新方法,发现贝类血细胞通过浸润、凝集、细胞吞噬及增生来防御外来异物及参与伤口修复,并具有消化作用和物质运输的功能。本文综述了近年来贝类血细胞的形态、功能研究领域内的

概况及新进展,以期有关研究提供一些参考资料。

1 贝类血细胞的形态分类及相关特征

1.1 血细胞的形态与分类

随着对血细胞防御功能更深入的研究,研究者们急待解决的问题就是对血细胞的分类命名,以往依细胞形态、染色为根据的分类标准,

* 国家自然科学基金资助项目 编号 39770586;

第一作者介绍:余燕萍,女,28岁,讲师,硕士;

收稿日期:1997-04-25,修回日期:1997-10-20

造成了贝类血细胞分类上的复杂化,有人将血细胞分为八类,甚至几十类。但迄今被广泛接受的仍基于 Cheng^[1]的分类法,他将胞质中的颗粒作为主要的形态、染色指标,把血细胞分为二类:(1)透明细胞 几乎不含颗粒或含微量颗粒;(2)颗粒细胞 含少量颗粒或大量颗粒。立足于以上最基本的分类法,近年来不少研究者应用新技术、新方法,提出了新的见解。Ford^[2]应用 Coulter 计数器和流式细胞计数器,测量的结果,将血细胞分为二种颗粒细胞和一种无颗粒细胞三个亚群。Russell - Pinto^[3]发现不同血细胞类型对绵羊细胞有不同反应,并用光镜、电镜及酶细胞化学法研究后,也将血细胞分为三个类型:Ⅰ型为大的伸展细胞,呈酯酶和酸性磷酸酶阳性,能吞噬绵羊红血球;Ⅱ型细胞球形,细胞器少,与绵羊红细胞形成 E 花环;Ⅲ型细胞圆形,胞质中充满含颗粒性物质的泡。Noel 等^[4]应用单克隆抗体技术,对贻贝血细胞的亚群从其抗原性特征进行了研究,通过免疫染色鉴定了 4 种单抗。从免疫染色的结果来看,贻贝至少可以区分出三种不同类型的血细胞。

基于上述研究结果,现今较普遍接受的是将贝类血细胞分为三类:无颗粒透明细胞、大颗粒细胞、小颗粒细胞。实质上是将颗粒细胞分为二个亚类。Mix^[5]的研究认为透明细胞是血细胞中最原始的类型,它可以分化为不同类型的颗粒细胞,在电镜下观察还发现了一类具有极微颗粒的透明细胞,经研究后认为颗粒的分化与高尔基体的作用有关,推测它是透明细胞中颗粒的产生者。

1.2 血细胞的其它参数特征及影响因素

在研究血细胞形态、功能的同时,其它细胞参数也引起了研究者的兴趣。McCormick^[6]研究发现血细胞的运动速度以及颗粒细胞的百分数受季节影响。Sami^[7]通过环境污染中残留的多芳类物质对血细胞的影响,观察到两类颗粒细胞数量的周期性变化,在污染的环境中小颗粒细胞的百分数增加,大颗粒细胞的百分数减少。用去污剂处理一种产于美国的牡蛎

(*Crassostrea virginica*),发现小颗粒细胞减少,而大颗粒细胞的数目有所增加。这些研究表明,血细胞的参数特征是可以诱导的。怎样来利用这些参数特征来进行环境监测,是很有研究意义的课题。

2 血细胞的功能研究

血细胞的功能与维持体内各种生理环境的稳定性有密切关系,它参与伤口修复、营养、防御等报道较多,以下综述血细胞的主要功能研究概况。

2.1 贝类血细胞防御反应及相关机制

血循环中的血细胞在贝类免疫反应中充当了关键角色,这些细胞借助凝集素的作用,对病原体加以区别,并具有化学趋化性使之向病原体移动,伴随着吸附作用最终将病原体吞噬。吞噬作用是无脊椎动物体内最重要的防御机制。Oubella^[8]用弧菌 P1 菌株和饥饿来诱导血细胞密度的改变,72 小时后两种贝(*Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*)的血细胞数目都有所增加,并且在胞质颗粒中发现有吞噬的细胞,这一事实也证明了血细胞参与了贝类的病理反应。

贝类血细胞对外源物质的杀伤、清除,目前认为存在着两种不同的机制:(1)血细胞释放了溶酶体酶和其它一些溶细胞因子;(2)血细胞由呼吸作用释放了有高活性的氧化代谢产物,包括过氧化物、单体氧及羟基基团,这些物质均具有解毒作用。

2.1.1 血细胞吞噬反应中溶酶体酶类释放机制 血细胞在吞噬反应中释放溶酶体酶与颗粒细胞中颗粒成分含有水解酶类有关。Pipe^[9]应用细胞化学、免疫细胞化学方法将硫酸酯酶、 β -葡萄糖苷酸酶以及弹性蛋白酶定位于颗粒细胞的大颗粒中,由此看出颗粒细胞中的大颗粒行使了溶酶体的作用。关于小颗粒成分在细胞杀伤中的功能目前还不清楚,推测它可能参与了细胞毒作用,可有的解释是因为抗细胞松弛素 G 的抗体只特异性的与小颗粒结合。细胞松弛素 G 是一种丝氨酸蛋白酶,在哺乳类中它

是细胞毒淋巴细胞颗粒中的主要蛋白质成分。细胞吞噬反应中这些溶酶体酶的释放在细胞中最显著的反应是伴随颗粒细胞的脱颗粒作用。Pipe^[10]通过电镜观察,发现血细胞在玻片粘附过程中有脱颗粒的现象。目前的研究显示粘附的血细胞中溶酶体酶活性的减少是由于脱颗粒作用,使溶酶体酶从颗粒中释放了出来。由于脱颗粒作用,铺展成单层的血细胞内的 β -葡萄糖苷酸酶的反应产物仅为血细胞悬液的1/3,而硫酸酯酶反应产物为细胞悬液的2/3。

2.1.2 血细胞中氧细胞毒类型的形成机制

贝类防御机制的另一种类型是由于在呼吸中释放了“ O_2^- ”,从而达到解毒作用。Root^[11]发现在外源物质或体液物质的刺激下,哺乳类的吞噬细胞可以产生 O_2^- ,并认为 O_2^- 为免疫的定向防御分子。Motoichi^[12]首次在扇贝离体的吞噬性血细胞中用大肠杆菌、Con A等加以刺激,发现血细胞有 O_2^- 的释放。现今在有吞噬作用的血细胞中, O_2^- 的产生作为一种细胞毒机制已有了大量文献报道。这种 O_2^- 的产生可以用二种方法加以检测:一是氨基苯二酰肼依赖性的化学发光反应,有此反应的血细胞,可以用流式闪烁计数器计数,从而测量其反应水平。另一种方法是利用组化的NBT试验测量血细胞杀菌过程中耗氧量的增加。Anderson^[13]在研究中指出 O_2^- 的产生在静止血细胞和通过刺激具有吞噬作用的血细胞都可以用化学发光反应进行定量分析,他发现重度感染的贝的血细胞其化学发光反应水平明显高于轻度感染的血细胞。因此他认为这种氧细胞毒类型的细胞在贝类防御机制中占据了重要地位。

Keisuke^[14]用密度梯度离心法分别将无颗粒细胞、大颗粒细胞、小颗粒细胞分离出来,在适当条件下测定了它们产生 O_2^- 的能力,结果发现大、小颗粒细胞均能产生 O_2^- ,而小颗粒细胞强于大颗粒细胞。

以上研究结果表明,两类颗粒细胞在贝类的防御反应中具有不同的作用。大颗粒细胞以溶酶体酶释放来杀伤病原体,而小颗粒细胞则

产生高活性的 O_2^- 来抵御外源物质对机体的损害。

2.1.3 防御反应中的识别机制 在对牡蛎极易感染并引起大量死亡的寄生虫病(MSX病)的研究中发现,是由于血细胞不能吞噬这种寄生虫,缩时摄影记录显示颗粒细胞接触该病原体后很快避开。无颗粒血细胞运动速度也很慢。原因是血细胞无法识别这种病原体。现研究表明寄生虫在与贝类长期寄生的关系中,细胞表面结构有趋向同一性的变化,因此血细胞无法完成对它们的识别而阻碍了吞噬反应的进行^[15]。由此可以看出吞噬反应发生的基础是免疫识别。现大多数人认为结合糖蛋白的凝集素参与了无脊椎动物的细胞、体液免疫识别。Pipe^[16]应用前包埋和后包埋技术研究了贻贝血细胞超微结构的凝集素结合位点,用胶体金、铁标记或用生物素——金联合标记发现血细胞表面凝集素有4类受体。Kanaley^[17]由实验得出血细胞表面的受体成分类似于N-L酰氨基葡萄糖、2-甲基-吡喃甘露糖。血细胞的这些表面结构有效地参与了细胞识别。Suzuki^[18]还发现血清中的凝集素也能参与对非自身物质的识别,它与无颗粒细胞、颗粒细胞质膜表面的凝集素的糖链成分有显著差异。血清中的凝集素成分的存在可能解释为:有的贝类血细胞只有在血清中才能识别病原微生物,血清对识别作用有趋化性、介导性。这种现象还需要进一步研究,但大量的实验已表明血清对血细胞的识别能力有趋化影响。

2.2 贝类血细胞参加伤口修复

抗感染的防御反应和清除组织碎片是免疫系统在损伤发生后的主要反应,另一方面伤口处的组织再生是细胞之间、细胞与胞外基质之间相互作用的器官发生。因为贝类没有体液凝固因子、血小板、血管,因此它们的伤愈系统与脊椎动物是有区别的。在形态学水平上损伤的修复在很多贝类都进行过描述,其中共同过程是血细胞阻止了血液流失,并产生了胞外基质。Tohru Suzuki^[19]利用培养的珍珠贝的血细胞,证明了无颗粒细胞具有形成细胞鞘产生胞外基

质的能力。目前由生化研究证明基质中除含有胶原外,还可能其它糖蛋白成分。Suzuki 基于上述研究结果,提出育珠贝伤口修复模式:当育珠贝受伤时,无颗粒细胞侵入伤口区域移走组织碎片,然后形成细胞鞘以阻止血液流失。细胞鞘形成后开始产生胞外基质,而胞外基质则作为上皮细胞再生的模板。这种推测早已有研究报告,如石安静等^[20]在三角帆蚌珍珠囊形成的研究中,将石蜡核与外套膜小片同时植入受体蚌的结缔组织中,在手术初期也观察到多层无颗粒细胞层形成的细胞鞘,以及在此基础上产生了珍珠囊上皮的再生。Tohru Suzwki 等^[21]研究了无颗粒细胞分泌的胞外基质在上皮细胞再生中的作用,通过超微结构观察发现无颗粒细胞是伤口修复的关键细胞、它分泌的胞外基质影响着上皮细胞的迁移和再生。

2.3 贝类血细胞参加神经免疫反应

Ottaviani 等^[22]在贝类血细胞膜上发现促肾上腺激素释放因子和白细胞介素-2 的受体,而它们在免疫系统中起着重要作用,由此他推测血细胞可能参加免疫神经反应。Ottaviani^[23]将贝类血细胞用含促肾上腺激素释放因子的血清孵育,在 15 分钟后,可刺激血细胞向血清中释放肾上腺素,在此反应中,酪氨酰脱氢酶、多巴胺脱氢酶参与了生物胺在血细胞体内的合成。这些结果表明无脊椎动物的原始应激反应与哺乳动物的吞噬细胞中出现的反应是相同的,这类细胞的基本功能是参与免疫、神经内分泌反应。目前大量的研究事实表明,哺乳类动物的一些神经肽分子、细胞激动素分子以及它们相关的片断,如阿片肽、内啡肽、细胞激动素、白细胞介素-1 α 、白细胞介素-1 β 均能影响血细胞的运行和吞噬的不同生理功能^[24,25]。

关于血细胞对营养物质的消化、运输功能的报道还很少。陈蜀娜等^[26]在河蚌外套膜钙的组织化学定位及运输途径的研究中以及胡曦璇等^[27]在背角无齿蚌珍珠囊形成过程中钙代谢的研究中都发现血细胞具有运输 Ca 的能力。血细胞是否参与了营养物质的消化和运输等功能是有待进一步研究的课题。

参 考 文 献

- 1 Cheng T. C. Bivalves. In: *Invertebrate Blood Cells*. Academic Press, New York. 1981, 1:233~330.
- 2 Ford, S. S., K. A., Ashkon-Alsox, S. A., Kanaleys. Comparatiye cytometric and microscopic analyses of oyster hemocyte. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1994, 64 (2):114~122.
- 3 Russell-Pinto, F., R. Reimao. Distinct cell types engage in different responses to sheep erythrocyte. *Fish & Shellfish Immunology*, 1994, 4(5):387~397.
- 4 Noel, D., R. Pipe, R. Elston, E. Bachere, E. Mialhe. Antigenic characterization of hemocyte subpopulations in the mussel *Mytilus edulis* by means of monoclonal antibodies. *Marine Biology*, 1994, 119(4):549~556.
- 5 Mix, M. C. A. general model for leucocyte cell renewal in bivalve mollusks. *Mar. Fish. Rev.*, 1976, 38:37~41.
- 6 McCormick-Ray, M. G., T. Howard. Morphology and mobility of oyster hemocytes. *J. Invertebra, Pathol.*, 1991, 58(2):219~230.
- 7 Sami, E. M. Alteration in cytometric characteristics of hemocyte from the American oyster *Crassostrea virginica* exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated environment. *Mar. Biol.*, 1991, 113(2):247~252.
- 8 Oubella, R., P. Maes, C. Paillard. Experimentally induced variation in hemocytes density for *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatas* (Mollusca: Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.*, 1993, 5(3):193~197.
- 9 Pipe, R. K. Differential binding of lectins to hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.*, 1990, 26(2):261~268.
- 10 Pipe, R. K. Generation of reactive oxygen metabolites by hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 1991, 16(2/3):111~122.
- 11 Root, R. K., J. Metcalf, N. Oshins. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. I: Documentation, quantitation, and some regulating factors. *J. clin. Invest.*, 1975, 55:945~952.
- 12 Motoichi, N. In Vitro production of hydrogen peroxide by the amebocyte of the scallop. *Development and Comparative Immunology*, 1985, 9:407~417.
- 13 Anderson, R. S. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev. Comp. Immunol.*, 1994, 18(2):89~96.
- 14 Keisuke, T., Takaaki. Superoxide anion generation by pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemocytes; identification by electron spin resonance spin trapping and chemiluminescence analysis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993, 105B(1):35~41.
- 15 Ford, S. E., A. Kathryn. In vitro interactions between bivalve hemocytes and oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *J. Parasitol.*, 1993, 79(2):255~265.
- 16 Pipe, R. K. Lecting binding characteristics of hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.*, 1990, 26(2):261~168.

- 17 Kanaley, S. A., S. E. Ford. Lecting binding characteristics of hemocytes and parasites in the oyster, *Crassostrea virginica*, infected with *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *Parasite. Immunol.* (OXF), 1989, 12(6):633~646.
- 18 Suzuki, T., K. Mori. Hemolymph lectin of the pearl oyster a *Pinctada fucata martinsii*: a possible non-self recognition system. *Dev. Comp. Immunol.*, 1990, 14(2): 161~173.
- 19 Suzuki, T. Functions of hemocytes during the wound healing process in the pearl oyster. NOAA Technical Report NMFS, 1991, 111:109~112.
- 20 石安静, 张予, 吴宗文. 三角帆蚌珍珠囊形成的研究. *水产学报*, 1985, 9(3):247~254.
- 21 Suzuki, T., R. Yoshinaka, S. Moshinaka, S. Mizta. Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Cell Tissue Res.*, 1991, 226:75~82.
- 22 Ottaviani, E., A. Franchini. Relations between corticotropin-releasing factor and interleukin-2. Evolutionary Evidence. *FFBS Letters*, 1994, 351(1):19~21.
- 23 Ottaviani, E., E. Caselgrand, A. Franchini. CRF provokes the release of morepinephrine by hemocyte of *Viviparus ater*(Gastropoda, prosobranchia): Further evidence in favour of evolutionary hypothesis of the "mobile immune-brain". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 193(1):446~452.
- 24 Genedani, S., M. Bernardi, P. Fontanili, E. Ottaviani, C. Franceschi. Influence of endorphins on the migration of molluscan hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology C: pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 1994, 107(1):79~81.
- 25 Ottaviani, E., A. Franchini, C. Franchini. Presence of several cytokine-like molecules (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, INF-2) in molluscan hemocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, 2:984~988.
- 26 陈蜀娜, 石安静. 河蚌外套膜的组织化学定位及运输途径的研究. *四川大学学报(自然科学版)*, 1994, 31:175~178.
- 27 胡曦璇, 石安静. 椭圆背角无齿蚌珍珠囊形成过程中钙代谢的初步研究. *四川大学学报(自然科学版)*, 1994, 31:145~148.