

红螯螯虾血细胞分类、结构与免疫特性研究

洗健安¹, 张秀霞¹, 潘训彬², 鲁耀鹏², 李军涛¹, 段瑞军¹, 郑佩华², 王冬梅¹

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所,

海南省海洋生物资源功能性成分研究与利用重点实验室, 海南 海口 571101;

2. 华南师范大学生命科学学院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东 广州 510631)

摘要: 血细胞在甲壳动物免疫过程中起重要作用, 探讨红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)不同类型血细胞结构与免疫特性有助于其病害防治。应用流式细胞术(FCM), 根据前向角散射光(FSC)和侧向角散射光(SSC)的强度差异对血细胞进行分类, 利用特异性荧光染料进行标记, 分析血细胞总数(THC)、线粒体数量、溶酶体数量、吞噬活力、活性氧(ROS)含量、一氧化氮(NO)含量和非特异性酯酶活力。结果显示, 应用 FCM 可以区分透明细胞(HC)、半颗粒细胞(SGC)和颗粒细胞(GC)三类血细胞, 其占比分别为 9.82%、61.11% 和 25.24%; 红螯螯虾平均血细胞总数(THC)为 $(8.43 \pm 0.87) \times 10^6$ 个/mL; GC 含有最多数量的线粒体和溶酶体, HC 中含量最少; HC、SGC 和 GC 的吞噬率分别为 2.54%、14.45% 和 6.98%, SGC 吞噬活力最强, HC 最弱; HC、SGC 和 GC 的活性氧(ROS)含量分别为 7.80、45.95 和 134.69 AU, GC 的 ROS 含量最高, HC 最低; HC、SGC 和 GC 的一氧化氮(NO)含量分别为 8.20、79.78 和 344.31 AU, GC 的 NO 含量最高, HC 最低; HC、SGC 和 GC 的非特异性酯酶活力分别为 86.59、121.84 和 236.91 AU, GC 的酯酶活力最高, HC 最低。研究表明, 红螯螯虾三类血细胞在形态结构、数量及免疫特性上均存在差异, SGC 的数量最多、吞噬活力最强, 而 GC 含有最多与能量供应、免疫防御相关的细胞器, 并拥有最强的氧化活力和酯酶活力, 表明 GC 和 SGC 是红螯螯虾免疫防御过程中发挥主要作用的血细胞类型。

关键词: 红螯螯虾; 流式细胞术; 血细胞; 免疫力

中图分类号: Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2019)05-0084-07

红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)又称澳洲淡水龙虾, 20世纪90年代引入我国试养, 由于种苗限制, 优势不如凡纳滨对虾, 其养殖没能得到大范围推广。近年来, 凡纳滨对虾的病害问题严重、养成率低下, 且罗非鱼价格低迷, 很多养殖户希望寻求新的替代养殖品种; 另一方面, 克氏原螯虾的市场需求量越来越大, 其人工养殖业发展十分迅猛, 在出肉率和经济价值等方面更具优势的红螯螯虾开始作为替代品种之一重新回到公众视野。

虾类的免疫学研究是其病害防控技术的理论基础。虽然已知血细胞在虾类免疫过程中发挥重要作用, 但由于技术手段的限制, 虾类血细胞的功能研究仍不够深入, 针对红螯螯虾血细胞的研究更是缺乏。

虾类血细胞一般可分为透明细胞、半颗粒细胞(小颗粒细胞)和颗粒细胞(大颗粒细胞)三类(陈孝煊等, 2002; 洗健安等, 2012)。以往借助于显微观察技术的研究发现, 颗粒细胞和半颗粒细胞是储存和释放酚氧化酶原系统的细胞类型, 各类血细胞在吞噬活力上也存在差异(Hose et al, 1990; Johansson et al, 2000; Liang et al, 2011)。流式细胞术(FCM)是细胞水平上进行快速定性或定量的检测技术, 在临床检测以及高等动物研究中得到广泛的应用, FCM的引入可为虾类血细胞结构和功能研究提供准确、快速、便捷的检测手段, 促进虾类血细胞的深入研究(洗健安等, 2015; 2016; 汪蕾等, 2017)。对于红螯螯虾, 目前仅见其血细胞分类和吞噬过程的研究(陈孝煊等, 2002; 段虎, 2014), 其血细胞免疫功能方面的研究甚少。本研究应用流式细胞术(FCM)方法分析红螯螯虾血细胞的分类、结构和免疫功能, 以期为其免疫学和病害防治提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

红螯螯虾购自海南省琼海市某养殖场, 平均体

收稿日期: 2017-09-30

基金项目: 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630052016011, 1630052019013); 海南省重点研发计划项目(ZDYF2016084)。

作者简介: 洗健安, 1983年生, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为水产养殖生态及毒理学、水产动物营养与饲料学。E-mail: xian-ja@163.com

通信作者: 王冬梅。E-mail: wdmei1969@126.com

重(13.93 ± 1.43) g。在实验室环境条件下进行驯养,水体 pH 为 7.9~8.0,温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,保持曝气,并进行循环过滤。驯养 1 周后,选取健康无病患、附肢完整、处于蜕皮间期的螯虾进行实验。

1.2 血细胞悬液制备

用 2.5 mL 一次性注射器吸取 600 mL 预冷的抗凝剂(葡萄糖 20.5 g/L,柠檬酸钠 8 g/L,氯化钠 4.2 g/L,pH 7.5),然后从螯虾的围心腔抽取等量的血淋巴,直接用于血细胞总数(total haemocyte count, THC)测定。测定其它指标时,加预冷的抗凝剂调整细胞浓度约为 1×10^6 个/mL。每尾螯虾的血淋巴作为单独样品进行测定,每个指标测定 15 尾螯虾。

1.3 流式细胞仪

所用流式细胞仪为美国 BD 公司的 FACSCalibur,应用 CellQuest 软件(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)进行实验数据的获取和分析。激发光源为 488 nm 氩离子光,前向角散射光(FSC)反映细胞大小,侧向角散射光(SSC)反映细胞颗粒复杂度。用第一荧光通道(FL1)获取 SYBR GreenI、MitoTracker Green、黄绿色荧光微球、DCF、DAF-FM 以及 FDA 荧光;第二荧光通道(FL2)获取 LysoTracker Red 荧光。

1.4 血细胞总数、分类及组成比例测定

1.4.1 血细胞总数 THC 根据先前的实验方法进行测定。取血细胞悬液 200 μL ,加入终浓度为 $10 \times$ 的 SYBR GreenI(Sigma, 货号 S9430),室温避光孵育 60 min,经 200 目筛网过滤后上机,每个样品上样 1 min,根据划定的完整细胞区域分析记录完整细胞的个数,每个样品读取 3 次。根据仪器上样速度和公式计算 THC(洗建安等, 2015)。

1.4.2 血细胞分类及组成比例 稀释血淋巴用 200 目筛网过滤后直接上机检测,每个样品的细胞获取数为 10 000 个。以 FSC 为横坐标、SSC 为纵坐标作散点图,根据不同类型细胞在 FSC 和 SSC 上的差异,在 FSC-SSC 散点图上设门划分各个细胞亚群,分析各类血细胞所占的比例。

1.5 血细胞细胞器数量分析

1.5.1 线粒体数量 应用 MitoTracker Green(Molecular Probes, Invitrogen, 货号 M7514)作为线粒体的特异性荧光探针。取血细胞悬液 200 μL ,加入 50 nmol/L 的 MitoTracker Green 室温避光孵育 30 min,用 200 目筛网过滤后上机检测,每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 MitoTracker

Green 荧光量(FL1)为横坐标,细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示,细胞的 MitoTracker Green 荧光量与线粒体数量成正比。

1.5.2 溶酶体数量 应用 LysoTracker Red(Molecular Probes, Invitrogen, 货号 L7528)作为溶酶体的特异性荧光探针。取血细胞悬液 200 μL ,加入 50 nmol/L 的 LysoTracker Red 室温避光孵育 60 min,用 200 目筛网过滤后上机检测,每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 LysoTracker Red 荧光量(FL2)为横坐标,细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示,细胞的 LysoTracker Red 荧光量与溶酶体数量成正比。

1.6 血细胞免疫活力分析

1.6.1 吞噬活力 以荧光微球(Fluorospheres[®] carboxylate-modified microspheres, 黄绿色荧光,直径 1 μm , Molecular Probes, Invitrogen, 货号 F8823)作为被吞噬物测定血细胞的吞噬活力。分别取血细胞悬液 400 μL ,加入 10 μL 浓度为 1/10 的微球稀释液,室温避光孵育 1 h,用 200 目筛网过滤后上机检测,每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 FL1 荧光量为横坐标,细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示,以标尺划定吞噬微球的区域,吞噬 3 个或以上荧光微球的血细胞定义为吞噬阳性,计算吞噬率。

1.6.2 活性氧(ROS)含量 以 DCFH-DA(Sigma, 货号 D6883)作为特异性荧光探针检测活性氧(Reactive oxygen species, ROS)含量的变化。取血细胞悬液 200 μL ,加入 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 室温避光孵育 30 min,经 200 目筛网过滤后上机检测,每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 DCF 荧光量(FL1)为横坐标,细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示,细胞的 DCF 荧光量与 ROS 含量成正比。

1.6.3 一氧化氮(NO)含量 以 DAF-FM DA(Sigma, 货号 D2321)作为特异性荧光探针检测 NO 含量的变化。取血细胞悬液 200 μL ,加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DAF-FM DA 室温避光孵育 60 min,经 200 目筛网过滤后上机检测,每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 DAF-FM 荧光量(FL1)为横坐标,细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示,细胞的 DAF-FM 荧光量与 NO 含量成正比。

1.6.4 非特异性酯酶活力 以 FDA(Sigma, 货号 F7378)为标记探针检测非特异性酯酶活力的变化。取血细胞悬液 200 μL ,加入 5 $\mu\text{mol/L}$ FDA 室温避

光孵育 30 min,经 200 目筛网过滤后上机检测,每个样品的细胞获取数为 10 000 个。结果以 FDA 荧光量(FL1)为横坐标,细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示,细胞的 FDA 荧光量与非特异酯酶活力成正比。

1.7 统计分析

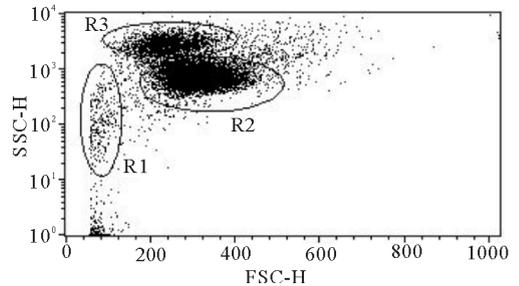
本次统计结果为 15 尾虾的平均值±标准差(Mean ± SD)。应用 SPSS 18.0 对实验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Tukey 多重检验, $P < 0.05$ 确认为差异性显著。

2 结果

2.1 血细胞总数、分类及组成比例

THC 平均值为 $(8.43 \pm 0.87) \times 10^6$ 个/mL。如图 1 所示,根据细胞大小(FSC)和颗粒复杂度(SSC)的差异,可将红螯螯虾血细胞分为 R1、R2 和 R3 共 3 个细胞亚群,分别为透明细胞(hyaline cells, HC)、半颗粒细胞(semigranular cells, SGC)

和颗粒细胞(granular cells, GC)。各类血细胞的 FSC 和 SSC 强度见表 1。SGC 和 GC 显著大于 HC ($P < 0.05$),GC 的颗粒复杂度显著大于 SGC 和 HC ($P < 0.05$)。各类血细胞的占比如表 2 所示,HC、SGC 和 GC 占比分别为 $(9.82 \pm 2.57)\%$ 、 $(61.11 \pm 4.94)\%$ 和 $(25.24 \pm 4.48)\%$,三类血细胞之间存在显著性差异($P < 0.05$)。



R1: 透明细胞; R2: 半颗粒细胞; R3: 颗粒细胞

图 1 红螯螯虾血细胞 FSC-SSC 散点图

R1: hyaline cells; R2: semigranular cells; R3: granular cells

Fig.1 FSC-SSC plot for the three haemocyte types of *C. quadricarinatus*

表 1 红螯螯虾三类血细胞的大小和颗粒复杂度

Tab.1 Size and granular complexity of the three haemocyte types of *C. quadricarinatus*

细胞类型	大小 (FSC 强度)/AU			颗粒复杂度 (SSC 强度)/AU		
	最小值	最大值	平均值	最小值	最大值	平均值
HC(R1)	73.52	102.24	88.39±8.66 ^c	148.84	216.76	178.42±19.30 ^c
SGC(R2)	281.84	395.82	327.71±33.09 ^a	682.15	786.91	731.39±31.91 ^b
GC(R3)	202.71	271.46	243.36±20.34 ^b	2737.31	3264.48	2956.51±152.73 ^a

注:同列数值肩标不同小写字母表示差异性显著($P < 0.05$), $n = 15$ 。

Note: Different superscript lowercases in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$), $n = 15$.

表 2 红螯螯虾三类血细胞的比例

Tab.2 Percentages of the three haemocyte types of *C. quadricarinatus*

细胞类型	最小值/%	最大值/%	平均值/%
HC(R1)	6.61	14.31	9.82±2.57 ^c
SGC(R2)	52.49	68.92	61.11±4.94 ^a
GC(R3)	17.46	31.58	25.24±4.48 ^b

注:同列数值肩标不同小写字母表示差异性显著($P < 0.05$), $n = 15$ 。

Note: Different superscript lowercases in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$), $n = 15$.

2.2 血细胞细胞器数量

红螯螯虾三类血细胞的细胞器测定结果见表 3。线粒体和溶酶体的数量均在 GC 中最多,SGC 次之,HC 最少;三类血细胞的线粒体和溶酶体数量均互相存在显著性差异($P < 0.05$)。GC 的线粒体数量为 SGC 的 1.46 倍,为 HC 的 3.03 倍;GC 的溶酶体数量为 SGC 的 2.79 倍,为 HC 的 11.86 倍。

2.3 血细胞免疫活力

2.3.1 吞噬活力 红螯螯虾三类血细胞的吞噬活力如表 4 所示。SGC 的吞噬率最高,GC 次之,HC 最低;三类血细胞之间的 ROS 含量互相存在显著性差异($P < 0.05$)。SGC 的吞噬率为 GC 的 2.07 倍,为 HC 的 5.69 倍。

表 3 红螯螯虾三类血细胞的线粒体数量和溶酶体数量

Tab.3 Mitochondria mass and lysosome number of the three haemocyte types of *C. quadricarinatus*

细胞类型	线粒体数量/AU	溶酶体数量/AU
HC(R1)	26.89±5.11 ^c	28.81±4.13 ^c
SGC(R2)	55.75±5.90 ^b	122.29±10.31 ^b
GC(R3)	81.37±7.96 ^a	341.55±20.31 ^a

注:同列数值肩标不同小写字母表示差异性显著($P < 0.05$), $n = 15$ 。

Note: Different superscript lowercases in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$), $n = 15$.

2.3.2 ROS 含量 红螯螯虾三类血细胞的 ROS 含量、NO 含量和酯酶活力如表 5 所示。ROS 含量在 GC 中最高,SGC 次之,HC 最少;三类血细胞之间的 ROS 含量互相存在显著性差异($P < 0.05$)。GC 的 ROS 含量为 SGC 的 2.93 倍,为 HC 的 17.27 倍。

表 4 红螯螯虾三类血细胞的吞噬活力

Tab.4 Phagocytic activity of the three haemocyte types of *C. quadricarinatus*

细胞类型	最小值/%	最大值/%	平均值/%
HC(R1)	1.36	3.89	2.54±0.76 ^c
SGC(R2)	11.42	18.49	14.45±1.96 ^a
GC(R3)	4.51	9.74	6.98±1.55 ^b
总血细胞	19.5	31.51	23.96±3.89

注:同列数值肩标不同小写字母表示差异性显著($P < 0.05$), $n = 15$ 。

Note: Different superscript lowercases in the same column indicate significant differences($P < 0.05$), $n = 15$.

表 5 红螯螯虾三类血细胞的 ROS、NO 含量和酯酶活力

Tab.5 ROS production, NO production and esterase activity in the three haemocyte types of *C. quadricarinatus*

细胞类型	ROS 含量/AU	NO 含量/AU	酯酶活力/AU
HC(R1)	7.80±1.77 ^c	8.20±1.51 ^c	86.59±11.34 ^c
SGC(R2)	45.95±4.94 ^b	79.78±10.57 ^b	121.84±15.15 ^b
GC(R3)	134.69±11.99 ^a	344.31±25.34 ^a	236.91±35.18 ^a

注:同列数值肩标不同小写字母表示差异性显著($P < 0.05$), $n = 15$ 。

Note: Different superscript lowercases in the same column indicate significant differences($P < 0.05$), $n = 15$.

2.3.3 NO 含量 红螯螯虾三类血细胞的 NO 含量如表 5 所示。NO 含量在 GC 中最高,SGC 次之,HC 最少;三类血细胞之间的 ROS 含量互相存在显著性差异($P < 0.05$)。GC 的 NO 含量为 SGC 的 4.32 倍,为 HC 的 41.99 倍。

2.3.4 非特异性酯酶活力 红螯螯虾三类血细胞的非特异性酯酶活力如表 5 所示。酯酶活力在 GC 中最高,SGC 次之,HC 最低;三类血细胞之间的酯酶活力互相存在显著性差异($P < 0.05$)。GC 的酯酶活力为 SGC 的 1.94 倍,为 HC 的 2.74 倍。

3 讨论

3.1 不同虾类血细胞总数的差异比较

THC 是指循环血淋巴中的血细胞密度,是衡量虾类免疫状态的重要指标,在胁迫或病理状态下,THC 往往表现出下降的趋势。以往的研究显示,在健康状态下,红螯螯虾、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)(陈孝煊等,2002)和格鲁西东欧螯虾(*Astacus leptodactylus*)(Yildiz & Benli, 2004)的 THC

分别为 1.65×10^6 个/mL、 7.02×10^6 个/mL 和 $(49.33 \pm 1.81) \times 10^4$ 个/mL;日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)(王国江,2008)和罗氏沼虾(*M. rosenbergii*)(洗健安等,2016)的 THC 分别为 $(1.13 \pm 0.50) \times 10^6$ 个/mL 和 $(36.41 \pm 3.48) \times 10^5$ 个/mL;日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)(Jiang et al, 2004)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)(Tseng & Chen, 2004)和斑节对虾 *P. monodon*)(Xian et al, 2011)的 THC 分别为 $(4.9 \pm 0.4) \sim (5.5 \pm 0.6) \times 10^7$ 个/mL、 $(196.8 \pm 11.5) \sim (202.0 \pm 2.5) \times 10^5$ 个/mL 和 $(156.9 \pm 6.2) \times 10^5$ 个/mL。

本次测定显示,体重(13.93 ± 1.43) g 的红螯螯虾平均 THC 水平为 $(8.43 \pm 0.87) \times 10^6$ 个/mL,与之前的研究结果接近(陈孝煊等,2002;段虎,2014)。比较各种虾类的 THC 可以发现,淡水螯虾和沼虾的 THC 数量级在 $10^5 \sim 10^6$ 个/mL;而海水虾类的 THC 数量级为 10^7 个/mL,高于淡水种类。除了病理、环境和物种差异等因素会影响虾类的 THC 外,虾龄可能也是影响 THC 的重要因素之一,其变化规律还有待进一步的研究。

3.2 虾类血细胞的分类及组成比例

应用显微观察的方法,根据细胞的大小、含有颗粒情况、染色情况等,可将虾类血细胞分为透明细胞、半颗粒细胞(小颗粒细胞)和颗粒细胞(大颗粒细胞)三类(陈孝煊等,2002;段虎,2014)。FCM 对细胞进行分类分群的原理也是根据细胞大小(FSC)和颗粒复杂度(SSC)的差异。在本研究中,应用 FCM 也可将红螯螯虾血细胞清晰地分为三个类群;其中 GC 最大,含有的颗粒最多;HC 最小,含有的颗粒最少;而 SGC 的大小则与 GC 接近,但颗粒度与 HC 接近。应用 FCM 分析得到红螯螯虾血细胞的 HC、SGC 和 GC 的比例分别为 9.82%、61.11%和 25.24%,显示 SGC 的数量最多,达到了 60%以上,而 HC 最少。陈孝煊等(2002)测得 HC、SGC 和 GC 的占比在红螯螯虾(♂:101~121 mm;♀:81~100 mm)中分别为 13.72%、68.84%和 17.54%,与本文研究结果较接近,同样得出 SGC 占比最高,HC 最低的结论。段虎(2014)研究显示,红螯螯虾血细胞中,HC、SGC 和 GC 的占比分别为 20.1%、37.9%和 42.0%,与本研究结果存在一定的差异。

针对克氏原螯虾,不同的研究也存在一定的差异,陈孝煊等(2002)应用显微计数测得克氏原螯虾

(♂:60~82 mm; ♀:77~89 mm)的 HC、SGC 和 GC 比例分别为 10.21%、74.41% 和 15.48%; 陆剑锋等(2009)研究规格为 8.3~12.0 cm/28.1~48.5 g 的克氏原螯虾,测定比例分别为 19.9%、46.1% 和 34.1%; Ding 等(2012)研究结果显示,克氏原螯虾(42.5±3.7)mm/20 g 的 HC、SGC 和 GC 的比例分别为 16.3%、55.8% 和 27.9%; 冼健安等(2012)应用 FCM 分析体长 8~10 cm 的克氏原螯虾,测得组成比例分别为 26.25%、51.44% 和 11.20%。由于不同类型血细胞的功能不同,其组成比例的差异可能与虾类处于不同生长时期或处于不同的生理、免疫状态有关。斑节对虾经脂多糖注射刺激后,HC 的比例先上升后下降,SGC 和 GC 的比例先下降后恢复(Xian et al, 2017)。罗氏沼虾经螺原体感染后,SGC 的比例显著提高(Du et al, 2012)。在硫化物胁迫作用下,日本囊对虾的 HC 数量逐渐下降,SGC 和 GC 的数量没有显著变化(Cheng et al, 2007)。这些研究结果表明,病理或环境因素均能引起虾类血细胞组成比例的改变。

3.3 虾类不同类型血细胞的线粒体和溶酶体数量

细胞内所含细胞器的多少与其功能密切相关。在本研究中,应用特异性的荧光探针对三类血细胞的线粒体和溶酶体数量的分析结果显示,GC 含有最多的线粒体,SGC 次之,HC 最少,表明 GC 是三类血细胞中能量代谢最为活跃的细胞类型,为其各类免疫反应提供能量,如脱颗粒、吞噬作用以及产生 ROS 和 NO、释放酯酶等;SGC 的线粒体数量也较多,GC 是 SGC 的 1.46 倍,这些结果与免疫功能研究的结果相符,GC 和 SGC 的能量供应较强,反映其为较为活跃的血细胞类型,可能与其参与较多的免疫响应过程有关。

李光友和王青(1995)研究显示,中国对虾的 SGC 富含线粒体,认为这可能与其对异物敏感易发生胞吐作用有关;电镜观察结果显示,多种对虾的 SGC 的胞质中含有大量的线粒体,而 HC 和 GC 的线粒体较少(陈平等, 1998);有研究则认为克氏原螯虾 HC 含有大量的线粒体,SGC 含有少量的线粒体(陆剑锋等, 2009);这些研究与本研究中红螯螯虾的结果均存在一定差异,可能与不同物种有关。溶酶体在降解胞内被吞噬物和病原体的过程中发挥重要作用。与线粒体数量相似,溶酶体数量也在 GC 中最多,HC 中最少,暗示 GC 和 SGC 是起到胞内降解作用的主要血细胞类型。

3.4 虾类不同类型血细胞的免疫功能

吞噬作用是血细胞清除病原体的主要免疫功能之一,但目前关于哪类血细胞承担主要的吞噬作用这一问题仍存在争议。Smith & Söderhall(1983)研究认为,在甲壳动物血细胞中,HC 起主要的吞噬作用,SGC 的吞噬活力有限,而 GC 不具备吞噬功能;但一些学者的研究结果则相反,认为 SGC 和 GC 呈现活跃的吞噬活力,而 HC 的吞噬活力有限(Hose et al, 1990; Liang et al, 2011)。本研究结果与后者一致,SGC 和 GC 的吞噬活力较强,其中 SGC 是主要负责吞噬功能的血细胞类型;段虎(2014)研究也认为红螯螯虾的 GC 是一类吞噬细胞。造成这些差异可能是各研究所选取的被吞噬物、检测方法、检测条件差异所致;另外,在吞噬过程中,某些被吞噬物可能刺激了 SGC 和 GC 进行脱颗粒,从而造成了血细胞类型的误判。

作为毒性氧化物 ROS,如 O_2^- 、 H_2O_2 等,在杀灭病原体的过程中发挥重要作用,同时也在清除受损细胞及其它非己物质中发挥作用。NO 也有类似与 ROS 的作用,对病原微生物进行氧化杀灭(Raman et al, 2008)。三类血细胞的胞内 ROS 和 NO 含量均存在显著差异,ROS 和 NO 含量均在 GC 中最高,在 HC 中最少,表明 GC 和 SGC 是产生 ROS 和 NO 发挥抗菌灭菌防御功能的主要血细胞类型。早前的研究已发现奥斯塔欧洲螯虾(*Astacus astacus*)的 GC 和 SGC 存在细胞毒活性,能够致使哺乳动物的肿瘤细胞和非肿瘤细胞溶解(Soderhall et al, 1985)。因此,结合本研究结果,推测 GC 和 SGC 存在细胞毒活性,可能是由于其具备了产生大量 ROS 和 NO 的能力。

酯酶是溶酶体酶的一种,在胞内降解病原体 and 外来物质过程中发挥作用(Mottin et al, 2010)。本次研究结果显示,GC 呈现出较强的非特异性酯酶活力,而 HC 最低,这与溶酶体数量的结果相符,表明三类血细胞均可以通过释放酯酶发挥免疫防御作用,而 GC 在其中是最主要的血细胞类型,这与克氏原螯虾和凡纳滨对虾的研究结果相似(冼健安等, 2012a; 2012b)。

综上所述,红螯螯虾血细胞中,SGC 占比最高,吞噬活力最强;而 GC 在氧化活力和酯酶活力上均最强,表明 SGC 和 GC 相互配合,在免疫响应过程中发挥主要的作用。SGC 和 GC 的线粒体和溶酶体数量也从另一侧面证明了这一推论。

参考文献

- 陈平, 黄槐, 池信才, 等, 1998. 四种对虾血细胞组成及超微结构[J]. 水生生物学报, 22(2): 158-163.
- 陈孝煊, 吴志新, 蔡灿东, 2002. 克氏原螯虾与红螯螯虾血相的比较研究[J]. 华中农业大学学报, 21(5): 458-461.
- 段虎, 2014. 红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)血细胞培养及细胞免疫学研究[D]. 北京: 中国科学院大学.
- 李光友, 王青, 1995. 中国对虾血细胞及其免疫研究[J]. 海洋与湖沼, 26(6): 591-597.
- 陆剑锋, 万全, 吴旭干, 等, 2009. 克氏原螯虾血细胞及免疫功能的初步研究[J]. 水产学报, 33(6): 1018-1025.
- 王国江, 2008. 氨氮和亚硝酸盐胁迫对日本沼虾血淋巴的影响[D]. 石家庄: 河北大学.
- 冼健安, 王安利, 苗玉涛, 2012a. 流式细胞术在克氏原螯虾血细胞的分类、活性和免疫功能研究中的应用[J]. 淡水渔业, 42(1): 9-14.
- 冼健安, 王安利, 李彬, 等, 2012b. 凡纳滨对虾不同类型血细胞的活性氧水平和酯酶活性[J]. 水生态学杂志, 33(4): 132-137.
- 冼健安, 张秀霞, 郭慧, 等, 2015. 应用流式细胞术检测虾类血细胞总数方法的建立[J]. 水生态学杂志, 36(3): 89-94.
- 冼健安, 张秀霞, 郭慧, 等, 2016. 亚硝酸盐胁迫对罗氏沼虾血细胞及其抗氧化酶活力的影响[J]. 生物安全学报, 25(4): 300-307.
- Cheng S Y, Hsu S W, Chen J C, 2007. Effect of sulfide on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 22: 16-26.
- Ding Z, Du J, Ou J, et al, 2012. Classification of circulating hemocytes from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and their susceptibility to the novel pathogen *Spiroplasma eriocheiris* in vitro[J]. Aquaculture, 356-357: 371-380.
- Du J, Zhu H, Ren Q, et al, 2012. Flow cytometry studies on the *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes sub-populations and immune responses to novel pathogen spiroplasma MR-1008 [J]. Fish & Shellfish Immunology, 33: 795-800.
- Hose J E, Martin G G, Gerard A S, 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function[J]. Biology bulletin, 178: 33-45.
- Jiang G, Yu R, Zhou M, 2004. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus[J]. Aquaculture, 241: 61-75.
- Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, et al, 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. Aquaculture, 191: 45-52.
- Liang T, Li X, Du J, 2011. Identification and isolation of a spiroplasma pathogens from diseased freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*, in China; a new freshwater crustacean host[J]. Aquaculture, 138: 1-6.
- Mottin E, Caplat C, Mahaut M L, et al, 2010. Effect of in vitro exposure to zinc on immunological parameters of hemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 29: 846-853.
- Raman T, Arumugam M, Mullainadhan P, 2008. Agglutinin-mediated phagocytosis-associated generation of superoxide anion and nitric oxide by the hemocytes of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 24: 337-345.
- Smith V J, Soderhall K, 1983. Induction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus*, by components of the prophenoloxidase activating system in vitro[J]. Cell and tissue research, 233: 295-303.
- Soderhall K, Wingren A, Johansson M W, et al, 1985. The cytotoxic reaction of hemocytes from the freshwater crayfish, *Astacus astacus* [J]. Cell Immunology, 94: 3326-3332.
- Tseng I T, Chen J C, 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 17: 325-333.
- Xian J A, Wang A L, Chen X D, et al, 2011. Cytotoxicity of nitrite on hemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis[J]. Aquaculture, 317: 240-244.
- Xian J A, Zhang X X, Wang D M, et al, 2017. Various cellular responses of different shrimp hemocyte subpopulations to lipopolysaccharide stimulation[J]. Fish & Shellfish Immunology, 69: 195-199.
- Yildiz H Y, Benli A C K, 2004. Nitrite toxicity to crayfish, *Astacus leptodactylus*, the effects of sublethal nitrite exposure on hemolymph nitrite, total hemocyte counts, and hemolymph glucose[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 59: 370-375.

Classification, Structure and Immunological Characterization of Haemocytes in Red Claw Crayfish, *Cherax quadricarinatus*

XIAN Jian-an¹, ZHANG Xiu-xia¹, PAN Xun-bin², LU Yao-peng², LI Jun-tao¹,
DUAN Rui-jun¹, ZHENG Pei-hua², WANG Dong-mei¹

- (1.Hainan Provincial Key Laboratory for Functional Components Research and Utilization of Marine Bio-resources, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, P.R.China;
2.Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, P.R.China)

Abstract: Haemocytes play vital role in the immunological response of crustaceans and our study of the structure and immune characteristics of haemocytes in red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) supports disease control. In this study, we classified haemocytes by flow cytometry (FCM) based on difference in the intensity of forward scattered light (FSC) and side scattered light (SSC). Total haemocyte count (THC), mitochondria number, lysosome number, phagocytosis, production of reactive oxygen species (ROS) and NO, and non-specific esterase activity of haemocytes were determined using specific fluorescent dyes for labeling. The study provides basic data for immunology and disease control in red claw crayfish. Three types of haemocytes were identified by FCM: hyaline cells (HC, 9.82%), semigranular cells (SGC, 61.11%) and granular cells (GC, 25.24%). The mean THC was $(8.43 \pm 0.87) \times 10^6$ cells/mL in *C. quadricarinatus*. The masses of mitochondria and lysosomes were highest in GC and lowest in HC. Phagocytic rates of HC, SGC and GC were, respectively, 2.54%, 14.45% and 6.98%. ROS production, NO production and non-specific esterase activity of HC, SGC and GC were, respectively: 7.80, 45.95 and 134.69 AU; 8.20, 79.78 and 344.31AU; 86.59, 121.84 and 236.91AU. In summary, the three haemocyte types of *C. quadricarinatus* displayed variation in morphologic structure, amount and immunological characteristics. The number and phagocytic activity of SGC were highest, while GC contained the most organelles in relation to energy supply and immune response, and has the highest oxidative and esterase activities. These findings indicate that GC and SGC are the primary haemocyte types involved in the immunological response of *C. quadricarinatus*.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; flow cytometry; haemocyte; immunity