

文章编号: 1004-7271(2007)03-0242-06

病毒感染对栉孔扇贝血细胞类型和功能的影响

许秀芹^{1,2}, 王宜艳², 孙虎山²

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;
2. 鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025)

摘要:用从胶州湾大规模死亡栉孔扇贝体内分离出来的球状病毒注射感染栉孔扇贝(*Chlamys farreri*), 分别于病毒感染后8 h、24 h、48 h、72 h和128 h取血, 采用流式细胞仪技术研究了病毒对栉孔扇贝血细胞类型及死亡率的影响, 采用荧光显微技术研究了病毒感染的栉孔扇贝血细胞的体外吞噬和包裹化作用的变化。结果表明, 病毒感染的扇贝血细胞各类型的比例同对照组相比有显著的差异, 在24 h、48 h和72 h, 实验组透明细胞比例显著高于对照组, 并呈逐渐升高趋势, 在8 h、24 h、48 h、72 h, 实验组大颗粒细胞比例显著低于对照组。在24 h、48 h、72 h和128 h, 实验组血细胞的死亡率显著高于对照组。病毒感染后, 实验组扇贝血细胞的体外吞噬率和包裹化率都显著高于对照组。

关键词:栉孔扇贝; 球状病毒; 血细胞; 流式细胞术

中图分类号: S 944.3 文献标识码: A

The effect of spherical virus on populations and functions of haemocytes in *Chlamys farreri*

XU Xiu-qin^{1,2}, WANG Yi-yan², SUN Hu-shan²

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
2. College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: Haemocyte characterization of *Chlamys farreri* was assayed in this study after injection of the spherical virus isolated from the infectious tissues of the scallop collected in the period of massive death in Jiaozhou Bay. At 8 h, 24 h, 48 h, 72 h and 128 h after injection with spherical virus, population proportion and mortality of haemocytes from *C. farreri* were assayed by flow cytometry, and effect of virus on haemocyte functions, including phagocytosis and encapsulation *in vitro*, was studied by fluorescence microscope. The result showed there was significant difference between subpopulation proportion of experimental groups and control. After infection with virus, the hyalinocyte proportion of haemocytes of experimental groups was significantly higher than that of control groups at 24 h, 48 h and 72 h. But the big granulocyte proportion was significantly lower than that of control at 8 h, 24 h, 48 h and 72 h. Mortality of haemocytes of experimental groups was significantly higher than that of control at 24 h, 48 h, 72 h and 128 h. The phagocytosis and encapsulation rate of haemocytes of experimental groups was significantly higher than that of control.

Key words: *Chlamys farreri*; spherical virus; haemocyte; flow cytometry

收稿日期: 2006-05-28

基金项目: 国家“九七三”计划资助项目(G1999012005); 鲁东大学基金资助项目(20053303)

作者简介: 许秀芹(1978-), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 专业方向为水产病害与免疫防治。E-mail: xqxu2004@163.com

通讯作者: 孙虎山, E-mail: s_hushan@163.com

贝类血细胞是其体内抵御外来病原微生物的主要屏障。在受到病原微生物的感染时,贝类血细胞会发生形态结构、类型数量等变化。Hine^[1]指出,双壳贝类的血细胞数目甚至血细胞的组成都会随着环境温度、地理位置、动物独特的病史而有所变化。流式细胞术是近年来发展起来的一种高技术,由于其分析速度快,可在数秒钟内分析上千个细胞,同时分析准确性高,不受人为主观性影响,并可同时进行多参数分析,所以现已广泛地应用于生物医学研究领域。国内外已有部分学者应用流式细胞术进行贝类血细胞分类研究^[2-3],而有关栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血细胞在受到病原微生物侵袭时血细胞类型比例及死亡率的变化在国内未见报到。本文用引起胶州湾扇贝大规模死亡的病原非包涵体球状病毒人工感染栉孔扇贝^[4],采用流式细胞仪技术研究了栉孔扇贝血细胞类型及其死亡率的变化,同时应用荧光显微技术观察了受病毒感染栉孔扇贝血细胞吞噬功能和包囊化作用。以期为贝类病理学研究积累资料。

1 材料和方法

1.1 材料

栉孔扇贝为烟台崆峒岛扇贝养殖场的3龄贝,壳长为55~65 mm,暂养于充气的水族箱内,每日换水一次,水温为20~21℃,每天分上下午两次混合投喂角毛藻和小球藻。

实验所用病毒由中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室赠送,是从胶州湾大批量死亡期的患病栉孔扇贝体内分离提取的一种非包涵体球状病毒^[4]。吞噬靶细胞是一种小杆菌,由鲁东大学贝类免疫实验室从海水中分离得到。包囊化的靶细胞是茶花花粉。碘化丙锭(Propidium iodide, PI)为Fluka公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法与步骤

1.2.1 病毒感染

选择健康无伤的栉孔扇贝140只,随机分成实验组和对照组,每组70只,分别养于室内水族箱中。暂养两天后,取经分离纯化的球状病毒上清液,用2%氯化钠溶液稀释100倍,按每个个体注射100 μL的剂量用微量进样器从栉孔扇贝闭壳肌背后缘注射,对照组注射等量无菌的2%氯化钠溶液。

1.2.2 流式细胞术分析血细胞类型及死亡率

分别于注射后8 h、24 h、48 h、72 h和128 h在实验组和对照组水族箱里随机各取10只扇贝,分别用5 mL的注射器从闭壳肌血窦中取血于测试管中,加2% NaCl稀释至 10^6 /mL细胞的数量级浓度,即可上机分析。同时再取数个测试管事先加入15 μL的1 mg/mL PI,再加200 μL的扇贝血样,置于4℃冰箱内孵育20 min,混合均匀上机获取数据,分析细胞死亡率。

实验所用流式细胞仪为美国BD公司生产的BD FACS Calibur,应用Cell Quest软件进行实验数据获取和分析。应用488 nm的氩离子气体激光器,以经0.2 μm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,以FSC和SSC为横纵坐标的点图以及FSC-H的直方图获取数据,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^[5-7],而细胞死亡率的实验以FL2-H的直方图获取和分析数据^[5],M1代表死亡细胞数,M2代表活细胞数(图1)。实验所用FSC电压为E00,SSC电压为315,每个血样收集10 000个细胞。

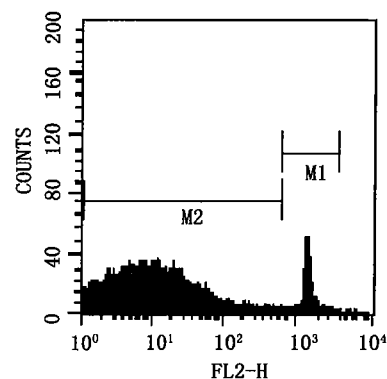


图1 栉孔扇贝血细胞死亡率 FL2 直方图
Fig. 1 The FL2 distribution histogram of haemocyte from *C. farreri* for mortality

1.2.3 血细胞吞噬实验

吞噬实验所用小杆菌用无菌的过滤海水洗下,镜检计数,并用无菌海水调至 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 。取 $200 \mu\text{L}$ 的杆菌液和 $100 \mu\text{L}$ 的血淋巴混合,作用 30 min 后涂片、室温下空气干燥。95% 的酒精固定 10 min , 空气干燥,0.1% 醋酸酸化 30 s ,0.01% 吖啶橙(AO)染色 10 min ,0.07 mol/L KH_2PO_4 洗 3 次,每次 1 min , CaCl_2 分化 30 s ,然后滴一滴 0.01 mol/L KH_2PO_4 ,加盖玻片,荧光显微镜下观察,计数吞噬杆菌的血细胞数并计算吞噬率。

1.2.4 血细胞包裹化实验

茶花花粉用无菌的过滤海水清洗,镜检计数,并用无菌海水调至浓度为 $1.0 \times 10^4/\text{mL}$,取 $20 \mu\text{L}$ 的花粉液和 $200 \mu\text{L}$ 的血淋巴在试管中混合作用 30 min ,涂片,染色制片和观察方法同吞噬实验,计数包裹化的花粉数并计算包裹化率。

2 结果

2.1 病毒感染对血细胞类群的影响

实验通过流式细胞仪技术进行病毒感染和对照组栉孔扇贝血细胞分群,同时计算各个细胞类群所占比例。结果发现病毒感染后栉孔扇贝血细胞仍由透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞三个类群组成^[5-7],但实验组血细胞各类群的比例同对照组相比有显著的差异。病毒感染以后,在 24 h 、 48 h 和 72 h 时,实验组透明细胞占血细胞总数比例逐渐升高,且都极显著高于对照组透明细胞的比例,在 8 h 和 128 h 时实验组透明细胞比例都低于对照组,且在 128 h 时实验组显著低于对照组,而在 8 h 时两者差异不显著。实验组大颗粒细胞所占比例在 8 h 、 24 h 、 48 h 和 72 h 四个时间段显著低于对照组大颗粒细胞的比例。实验组和对照组小颗粒细胞在整个实验过程中差异不显著(表 1)。

表 1 病毒感染后栉孔扇贝血细胞中各类细胞比例的变化
Tab.1 Population percentages of haemocytes from *C. farreri* challenged by virus

时间(h)	分组	透明细胞	小颗粒细胞	大颗粒细胞
8	对照组	61.75 ± 5.77	29.25 ± 5.61	9.19 ± 2.58
	实验组	59.84 ± 4.57	33.50 ± 6.61	6.78 ± 3.35
	P	> 0.05	> 0.05	< 0.05
24	对照组	58.80 ± 5.76	29.98 ± 1.28	10.32 ± 2.16
	实验组	65.50 ± 5.85	30.64 ± 3.49	4.98 ± 2.80
	P	< 0.01	> 0.05	< 0.01
48	对照组	57.33 ± 2.46	31.73 ± 4.46	10.05 ± 2.94
	实验组	65.87 ± 5.60	29.56 ± 4.26	5.60 ± 3.37
	P	< 0.01	> 0.05	< 0.05
72	对照组	60.09 ± 4.31	29.68 ± 5.69	10.34 ± 2.07
	实验组	66.96 ± 7.05	31.39 ± 4.44	7.33 ± 4.18
	P	< 0.01	> 0.05	< 0.05
128	对照组	59.08 ± 6.00	30.87 ± 4.56	8.12 ± 3.33
	实验组	56.73 ± 5.58	32.53 ± 2.58	10.81 ± 3.22
	P	< 0.05	> 0.05	< 0.01

注:以上数值均为平均值 ± 标准差, n = 10。下表同

2.2 病毒感染后血细胞死亡率的变化

注射病毒后,在 8 h 、 24 h 、 48 h 、 72 h 和 128 h 各个不同时间段所测定的实验组和对照组扇贝血细胞死亡率的变化见表 2。结果显示在整个实验过程中实验组血细胞死亡率均高于对照组,且在 24 h 、 48 h 和 128 h 时差异极显著, 72 h 时差异显著。

表 2 病毒感染后栉孔扇贝血细胞死亡率的变化
Tab. 2 Mortality of haemocytes from *C. farreri* challenged by virus

时间(h)	8	24	48	72	128	%
对照组	8.75 ± 1.21	10.95 ± 2.78	11.49 ± 1.05	10.23 ± 0.79	9.51 ± 2.31	
实验组	9.33 ± 0.98	12.14 ± 2.07	13.96 ± 3.22	12.91 ± 1.52	12.15 ± 3.04	
P	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.01	

2.3 病毒感染对血细胞吞噬活性的影响

在荧光显微镜下观察,可以看到血细胞的细胞核被染成绿色,细胞质是黄色,杆菌被染成红色,一个血细胞可以吞噬一到多个杆菌。实验组和对照组不同时间段的吞噬率见图 2。由图 2 可以看出,在 8 h、24 h 和 48 h 时,实验组血细胞吞噬率越来越高,在 48 h 达最高值 60.61%,而在 72 h 和 128 h 又逐渐下降,但在任何时间段实验组血细胞吞噬率都比相对应时间段对照组血细胞吞噬率高。对照组血细胞吞噬率也呈现逐渐升高又降低的趋势。

2.4 病毒感染对血细胞包裹化花粉的影响

在荧光显微镜下观察,花粉呈橙红色,多个或大量呈黄绿色的血细胞伸出伪足把花粉包裹住。在不同时间段实验组和对照组的扇贝血细胞包裹化率见图 3,注射病毒后 8 h、24 h、48 h、72 h 和 128 h 时实验组血细胞包裹化率都高于对照组,在 24 h 时包裹率最高,达到 68.06%,几乎是对照组的两倍,而对照组在 72 h 时的包裹率最低,其它时间段没有明显变化。

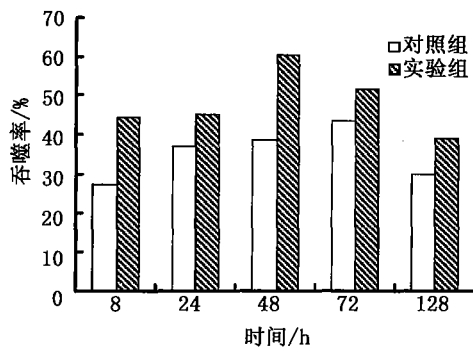


图 2 病毒对扇贝血细胞吞噬率的影响

Fig. 2 Effect of virus on phagocytosis of haemocytes

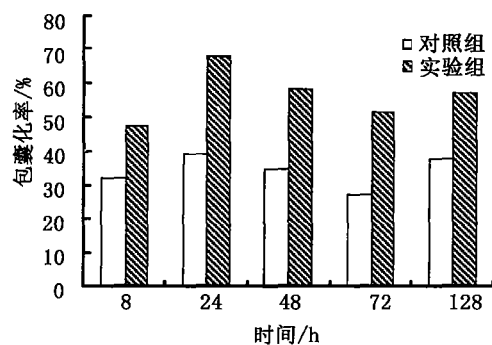


图 3 病毒对扇贝血细胞包裹化率的影响

Fig. 3 Effect of virus on encapsulation of haemocytes

3 讨论

3.1 贝类血细胞类型及其在不同状态下的变化

利用流式细胞术进行血细胞的分类已在几种双壳贝类有报道。在食用牡蛎 (*Ostrea edulis*)^[8] 和美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*)^[2,9] 中,用流式细胞仪技术区分出三类血细胞,而同样的方法在贻 (*Mytilus galloprovincialis*)^[10] 和菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 以及硬壳蛤 (*Mercenaria mercenaria*)^[2] 中区分出两类细胞。在本实验中,栉孔扇贝血细胞被区分为三类,它们的特征分别是:低颗粒度小细胞,中等颗粒度中等大小细胞,高颗粒度大细胞。Friedl 等^[11] 报道美洲牡蛎只有 1 种血细胞群, Fisher 等^[12] 的研究则显示有 4 种不同的血细胞;而 Allam 等^[2] 则认为在该贝类中有 3 种不同的血细胞,因此在研究中对流式细胞仪测定数据进行比较时,统一的处理方法是一个至关重要的前提。在实验过程中必须严格操作,扇贝经过暂养一段时间稳定扇贝应激状态,并且血淋巴是从扇贝闭壳肌中抽取,这里有扇贝大的血窦,血淋巴不仅丰富而且较为稳定。另一方面,在实验过程中发现在其它双壳贝类血细胞研究中使用的有效的抗凝剂^[1] 不能有效地抑制栉孔扇贝血细胞的聚集,因此,实验过程中,血细胞样品制备包括

抽血、稀释、镜检,必须迅速,而且所有用于盛放血细胞器皿包括离心管、流式细胞仪测试管以及进行血细胞稀释用的 2% NaCl 必须提前在 0~4 °C 冷冻 10 min 左右,从而来降低血细胞伪足的伸展进而来防止血细胞聚集。

Ford 等^[13]用尼氏单孢子虫(*Haplosporidium nelsoni*)人工感染美洲牡蛎,从中挑选出易感个体和抗感染个体,发现在抗感染个体中血细胞的浓度随着感染强度的增加而增加,而在易感个体中却是相反的,同时他们还发现易感个体的颗粒细胞显著低于抗感染个体,与本实验病毒感染过程中颗粒细胞比例下降的结果相类似,这可能是组织损伤和炎症反应过程中脱颗粒作用的结果。Oubella 等^[14]和 Allam 等^[15]在对感染弧菌的菲律宾蛤仔血细胞研究时同样发现血细胞总浓度升高,透明细胞比例升高,并观察到血细胞死亡率逐渐升高,显著高于对照组,这与本实验结果很相似。相关研究表明贝类等无脊椎动物血细胞在受到免疫促进剂刺激或病原微生物感染时,其血细胞的数量、各亚群血细胞的比例都可能发生变化。在本研究中我们还发现对照组血细胞死亡率也有所提高,但差异并不显著,这可能与注射刺激有关。

3.2 血细胞吞噬和包囊化作用在贝类免疫防御中的作用

血细胞的吞噬作用是贝类最基本的防御机制,当异物较小时,血细胞可以对异物进行吞噬,细菌、酵母及可溶性蛋白等异物进入机体,很快被血细胞吞噬,形成吞噬泡,并与初级溶酶体结合成为次级溶酶体,在次级溶酶体内被水解酶消化降解。当异物较大(大于 10 μm)时,血细胞对异物进行包囊化,大量血细胞就会一起伸出伪足包裹在大分子颗粒的外层形成包囊,然后释放水解酶将异物分解。有研究表明,细菌等异物进入贝类体内,被清除的过程包括识别、贴附、吞噬和降解几个重要的步骤。本实验也观察到相同的步骤,异物首先必须被血细胞识别并贴附于其表面。同时本实验观察到多个或大量的血细胞伸出伪足包裹在花粉颗粒的周围,还有的血细胞通过花粉沟进入花粉的内部。若延长实验时间,继续观察,应该可以观察到花粉被分解的过程,有待于进一步的研究证实。本实验表明,在病毒感染初期扇贝血细胞的吞噬能力和包囊化能力都增强了,但随着病毒进一步感染,吞噬率和包囊化率又有降低趋势。由此可见,扇贝在受到外源异物刺激时,机体会迅速产生应激性免疫反应,及时将异物清除和杀灭,从而保障自身系统的稳定性。Mortensen 等^[16]同样用荧光显微镜观察了大扇贝(*Pecten maximus*)体外吞噬细菌的实验,发现随着孵育时间的延长血细胞的吞噬率升高,Ottaviani 等^[17]用细菌注射刺激蜗牛(*Planorbium corneus*)后,发现在注射后 2 h 内吞噬率最高,达到 76%。本研究发现栉孔扇贝在感染 48 h 时吞噬率最高,包囊化率在 24 h 时最高。这说明感染初期扇贝对病毒积极防御,而后期由于感染强度的增强,其免疫系统受到破坏,免疫力下降。

参考文献:

- [1] Hine P M. The inter-relationships of bivalve haemocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9:367-385.
- [2] Allam B, Ashton-Alcox K A. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve mollusks[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 13:141-158.
- [3] 许秀芹,王宜艳,孙虎山. 流式细胞术研究 4 种双壳贝类血细胞的分群[J]. *海洋湖沼通报*, 2006, (1):46-50.
- [4] 王崇明,宋微波,宋晓玲,等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J]. *水产学报*, 2002, 26(2):180-184.
- [5] Washington C, John R. Flow cytometric analysis of crayfish haemocytes activated by lipopolysaccharide[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 17:223-233.
- [6] Scharsack J P, Steinhagen D. The haemoflagellate *Trypanoplasma borreli* induces the production of nitric oxide, which is associated with modulation of carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte functions[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 14:207-222.
- [7] 许秀芹,孙虎山,王宜艳. 酵母聚糖和甘氨酸锌对栉孔扇贝血细胞的影响[J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(2):150-155.
- [8] Renault T, Xue Q G, Chilmonczyk S. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, 11:269-274.
- [9] Ashton-Alcox K A, Ford S E. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study[J]. *Tissue & Cell*, 1998, 30(2):195-204.
- [10] Ottaviani E, Franchini A, Barbieri D, et al. Comparative and morphofunctional studies on *Mytilus galloprovincialis* Haemocytes: presence of two-age related Haemocyte stages[J]. *Italian Journal of Zoology*, 1998, (65):349-354.

- [11] Friedl F E, Alvarez M A, Johnson J S, *et al.* Cytometric investigations on hemocytes of the American oyster, *Crassostrea virginica* [J]. *Tissue & Cell*, 1988, 20:933 - 939.
- [12] Fisher W S, Ford S E. Flow cytometry: a tool for cell research in bivalve pathology [J]. *American Fisheries Society Special Publication*, 1988, 18:286 - 292.
- [13] Ford S E, Kanaley S A, Littlewood D T J. Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1993, 61(1):49 - 57.
- [14] Oubella R, Paillard C, Auffret M, *et al.* Changes in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1994, 64(1):33 - 38.
- [15] Allam B, Paillard C, Auffret M. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000, 76(1):63 - 69.
- [16] Mortensen S, Glette J. Phagocytic activity of scallop (*Pecten maximus*) haemocytes maintained *in vitro* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1996, 6(2):111 - 121.
- [17] Ottaviani E, Aggazzotti G, Tricoli S. Kinetics of bacterial clearance and selected enzyme activities in serum and haemocytes of the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda, pulmonata) during the primary and secondary response to *Staphylococcus aureus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1986, 85(1):91 - 95.

会议预告

世界养殖水产品贸易大会

为加强水产养殖和贸易领域的交流与合作,为全球养殖水产品的生产和贸易的发展提供指导和帮助,联合国粮农组织和中华人民共和国农业部定于2007年5月29-31日在青岛联合主办世界养殖水产品贸易大会。届时,FAO助理总干事 Nemura 先生和农业部范小建副部长将出席大会。

秘书处联系人:王少华

地 址:北京市朝阳区麦子店街22号,邮编:100026

电 话:010-64194233,传真:010-64194231

E-mail: csfish@agri.gov.cn