

文章编号: 1004-7271(2006)02-0150-06

酵母聚糖和甘氨酸锌对栉孔扇贝 血细胞的影响

许秀芹^{1,2}, 孙虎山², 王宜艳²

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 烟台师范学院生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要:采用流式细胞术对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血细胞类群百分比的变化进行了研究,以探讨酵母聚糖和甘氨酸锌对贝类免疫防御影响的规律。体内注射酵母聚糖和甘氨酸锌后,分别于6 h、12 h、24 h、48 h、96 h和144 h测定其血细胞各类群的比例的变化。根据前向角散射光(FSC)和侧向角散射光(SSC)强度的不同,栉孔扇贝血细胞可明显地分为透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞3个类群。注射酵母聚糖后,在6 h、12 h、24 h和48 h时,实验组透明细胞占总血细胞的比例显著高于对照组,而实验组小颗粒细胞所占比例在6 h、12 h和24 h时显著低于对照组。注射甘氨酸锌后,在12 h、24 h和48 h时,实验组透明细胞所占比例显著高于对照组,而小颗粒细胞所占比例显著低于对照组。说明酵母聚糖和甘氨酸锌对栉孔扇贝血细胞的分群有明显的影
响,可显著刺激透明细胞的数量增多,同时颗粒细胞数量减少。

关键词:流式细胞术;酵母聚糖;甘氨酸锌;栉孔扇贝;血细胞

中图分类号:S 917 文献标识码:A

The effects of glycine-Zn and zymosan on haemocyte in *Chlamys farreri*

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

(1. College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. College of Life Science, Yantai Normal University, Yantai 264025, China)

Abstract: Haemocyte subpopulation percentage variety of *Chlamys farreri* was studied by light-scatter flow cytometry, and the aim is to determine the role of zymosan and glycine-Zn in the immune response of molluscs. After injection of zymosan and glycine-Zn, the subpopulation percentages variety of the haemocytes were assayed at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h and 144 h. Three haemocyte groups, hyalinocyte, small granulocyte and large granulocyte, were found in the haemolymph of *Chlamys farreri* by the analysis method of two parameter plots (FSC, Forward Scatter and SSC, Side Scatter). After injection with zymosan, the hyalinocyte percentage in haemocytes of experimental groups were significantly higher than that of control groups at 6 h, 12 h, 24 h and 48 h. But the small granulocyte percentage were significantly lower than that of control at 6 h, 12 h and 24 h. After injection with glycine-Zn, the hyalinocyte percentage in haemocytes was significantly higher than that of control groups at 12 h, 24

收稿日期:2005-05-25

基金项目:国家“973”计划资助项目(G1999012005)

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

h and 48 h. However, small granulocyte percentage was significantly lower than that of control groups at 12 h, 24 h and 48 h. These results indicated that zymosan and glycine-Zn had great effects on haemocyte subpopulation percentages variety of *Chlamys farreri*, and they could cause the increase of hyalinocyte and decrease of granulocyte.

Key words: flow cytometry; zymosan; glycine-Zn; *Chlamys farreri*; haemocyte

酵母聚糖作为免疫激活剂常用于免疫学研究^[1]。微量元素氨基酸螯合物是近年来发展起来的一种新型饲料添加剂,它是微量元素和氨基酸形成一类具有独特环状结构的螯合物,是一种类似于动物体内吸收形式和生物功能的微量元素补充剂^[2]。有关贝类血细胞特别是双壳贝类血细胞的分类虽然进行了大量的研究,但由于分类标准不一,特别是因不同种贝类的血细胞在形态上存在较大的差异,贝类血细胞的分类迄今为止仍存在较大的分歧,但透明细胞(hyalinocyte)和颗粒细胞(granulocyte)作为两种主要的细胞类群得到一致的公认^[3,4]。而有关栉孔扇贝血细胞的分类国内外报道很少^[3],本文应用流式细胞术对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血细胞进行了分类,并研究了酵母聚糖和甘氨酸锌对其血细胞类群百分比变化的影响,以期为贝类血细胞功能的进一步研究以及酵母聚糖和甘氨酸锌应用于贝类养殖业增强其免疫能力和预防病害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

栉孔扇贝于2005年3月28日购自烟台崆峒岛扇贝养殖场,壳高为60~75mm。实验所用酵母聚糖为Sigma公司产品,甘氨酸锌由国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室提供,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法与步骤

1.2.1 血细胞的分群

用注射器分别从扇贝的闭壳肌血窦中取血于测试管中,加2% NaCl稀释至 10^6 个/mL细胞的数量级浓度,即可上机分析,测试10个以上个体。

实验所用流式细胞仪为美国BD公司生产的BD FACSCalibur,应用CellQuest软件进行实验数据获取和分析。应用488 nm的氩离子气体激光器,以经 $0.2\ \mu\text{m}$ 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,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]。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。

1.2.2 酵母聚糖和甘氨酸锌对血细胞类群百分比变化的影响

用无菌的2% NaCl分别将酵母聚糖和甘氨酸锌配成0.2%的溶液或悬浊液,按每克体重 $5\ \mu\text{g}$ 的剂量用微量进样器从栉孔扇贝闭壳肌后缘注射酵母聚糖或甘氨酸锌悬浊液,对照组注射等量的2% NaCl,养于室内水族箱中,用小硅藻和小球藻混合投喂,水温 $16\sim 18\ ^\circ\text{C}$ 。分别于注射后6 h、12 h、24 h、48 h、96 h和144 h各从10只扇贝闭壳肌血窦中取血于测试管中,加2% NaCl稀释至 10^6 个/ml细胞的数量级浓度,按1.2.1的方法上机分析。数据分析方法为,在对照组的一个FSC强度与细胞数的直方图上,用标尺(Marker)标出各个细胞类群,并将此标尺复制到各个FSC直方图上,统计分析各细胞类群占整个血细胞总数比例的变化^[6,7](图1)。

2 结果

2.1 血细胞的分群

实验首先通过流式细胞仪对未经注射处理的栉孔扇贝血细胞进行分群,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 2,3)。结果发现其血细胞由三个类群 R_1 、 R_2 和 R_3 组成。类群 R_1 的 FSC 和 SSC 值都最小,细胞最小,颗粒也最少,为透明细胞,类群 R_3 则细胞最大,颗粒也最多,为大颗粒细胞,类群 R_2 则处于他们两群之间,为小颗粒细胞。

透明细胞(R_1)、小颗粒细胞(R_2)和大颗粒细胞(R_3)三个类群占血细胞总数的百分比分别为: 49.97 ± 9.23 , 40.07 ± 6.10 和 10.02 ± 3.69 ,透明细胞数量最多,所占比例几乎达到整个血细胞总数的一半,而大颗粒细胞所占比例最少。

2.2 酵母聚糖对血细胞类群百分比变化的影响

注射酵母聚糖后,在各个不同时间段所测定的扇贝血细胞三个类群的比例变化见表 1。结果表明,注射酵母聚糖后,在 6 h 和 12 h 时,透明细胞比

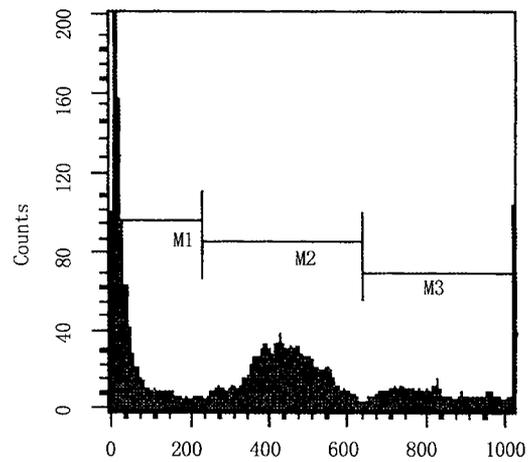


图 1 栉孔扇贝血细胞各类群比例 FSC 直方图
Fig. 1 The FSC distribution histogram of haemocyte from *C. farreri*

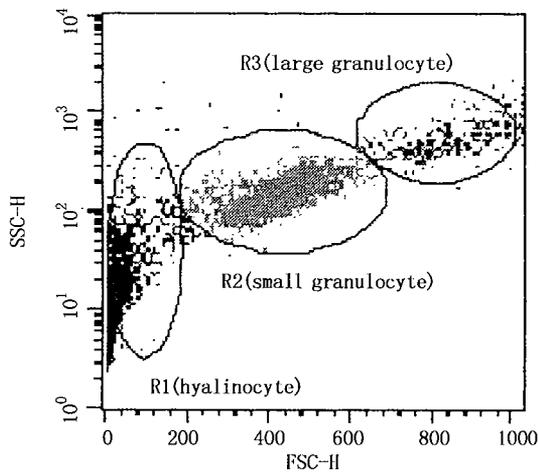


图 2 栉孔扇贝血细胞 FSC 和 SSC 双参数点图
Fig. 2 The dot plot of FSC & SSC on haemocytes of *C. farreri*

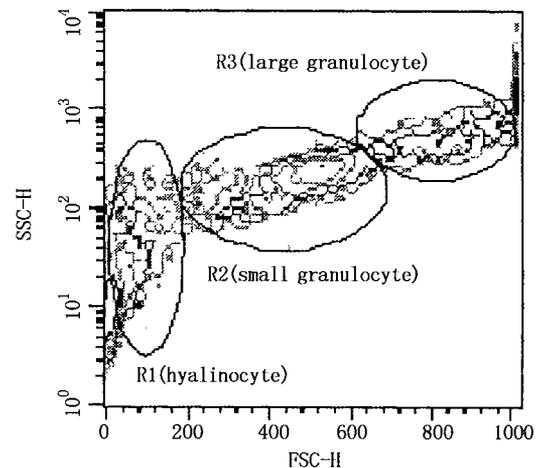


图 3 栉孔扇贝血细胞 FSC 和 SSC 双参数等高线图
Fig. 3 The contour plot of FSC & SSC on haemocytes of *C. farreri*

例逐渐升高,在 24 h 和 48 h 时比例又逐渐下降,但都显著高于对照组,且在 6 h、12 h 和 24 h 极显著高于对照组,在 96 h 和 144 h 时,虽然实验组也高于对照组,但差异不显著;实验组小颗粒细胞占血细胞总数比例在所有时间段都低于对应时间段的对照组小颗粒细胞比例,在 6 h、12 h 和 24 h,逐渐降低又升高,但都显著低于对照组,且在 12 h 时极显著低于对照组,在 48 h、96 h 和 144 h 时,虽然也低于对照组,但差异不显著;大颗粒细胞比例在 6 h 和 48 h 极显著低于对照组,在 24 h 显著低于对照组,在 12 h 低于对照组,在 96 h 和 144 h 高于对照组,但差异都不显著。

2.3 甘氨酸锌对血细胞类群百分比变化的影响

注射甘氨酸锌后,在各个不同时间段所测定的扇贝血细胞三个亚群的比例变化见表 2。结果表明,在 6 h、12 h、24 h 和 48 h 时,透明细胞占总的血细胞比例呈逐渐升高趋势,并都高于所对应时间段的对照组透明细胞的比例,且在 12 h、24 h 和 48 h 时,显著差异,而在 6 h、96 h 和 144 h 时实验组和对照组差

异不显著;小颗粒细胞占总的血细胞比例在 6 h、12 h、24 h、48 h 和 96 h 时都低于对照组,其中在 12 h、24 h 和 48 h 时差异显著,且在 12 h 时差异极显著;大颗粒细胞占血细胞总数比例在 6 h、12 h、96 h 和 144 h 时高于对照组,但差异并不显著,在 24 h 和 48 h 时低于对照组,并在 48 h 时极显著低于对照组。

表 1 注射酵母聚糖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* after injection of zymosan

时间(h)	分组	透明细胞	小颗粒细胞	大颗粒细胞
6	对照组	48.62 ± 7.58	39.81 ± 7.77	11.62 ± 2.94
	实验组	60.08 ± 8.76	32.71 ± 7.80	7.26 ± 2.94
	P	< 0.01	< 0.05	< 0.01
12	对照组	46.86 ± 5.78	43.04 ± 6.20	10.14 ± 3.26
	实验组	64.90 ± 11.67	26.67 ± 9.40	8.46 ± 3.53
	P	< 0.01	< 0.01	> 0.05
24	对照组	50.00 ± 11.42	40.49 ± 16.67	9.55 ± 2.61
	实验组	61.97 ± 11.74	31.00 ± 10.20	7.07 ± 2.86
	P	< 0.01	< 0.05	< 0.05
48	对照组	49.52 ± 9.96	39.03 ± 8.8	11.50 ± 2.75
	实验组	55.94 ± 11.12	35.99 ± 10.50	8.12 ± 2.01
	P	< 0.05	> 0.05	< 0.01
96	对照组	51.60 ± 9.26	39.69 ± 8.53	8.77 ± 2.2
	实验组	51.71 ± 9.07	39.37 ± 7.44	8.99 ± 3.81
	P	> 0.05	> 0.05	> 0.05
144	对照组	51.43 ± 11.97	39.48 ± 9.83	9.21 ± 2.5
	实验组	51.66 ± 16.02	37.34 ± 11.73	11.10 ± 5.67
	P	> 0.05	> 0.05	> 0.05

以上数值均为平均值 ± 标准差, n = 10

表 2 注射甘氨酸锌后栉孔扇贝血细胞中各类细胞比例的变化
Tab.2 Population percentages of haemocyte from *C. farreri* after injection of Gly-Zn

时间(h)	分组	透明细胞	小颗粒细胞	大颗粒细胞
6	对照组	48.62 ± 7.58	39.81 ± 7.77	11.62 ± 2.94
	实验组	50.47 ± 9.16	36.33 ± 6.58	13.25 ± 4.12
	P	> 0.05	> 0.05	> 0.05
12	对照组	46.86 ± 5.78	43.04 ± 6.2	10.14 ± 3.26
	实验组	52.88 ± 6.92	34.81 ± 3.82	12.35 ± 3.40
	P	< 0.05	< 0.01	> 0.05
24	对照组	50.00 ± 11.42	40.49 ± 16.67	9.55 ± 2.61
	实验组	56.99 ± 13.84	34.59 ± 12.40	8.48 ± 3.21
	P	< 0.05	< 0.05	> 0.05
48	对照组	49.52 ± 9.96	39.03 ± 8.8	11.50 ± 2.75
	实验组	57.21 ± 10.35	34.97 ± 9.60	7.84 ± 1.79
	P	< 0.05	< 0.05	< 0.01
96	对照组	51.60 ± 9.26	39.69 ± 8.53	8.77 ± 2.2
	实验组	51.41 ± 9.86	39.38 ± 10.31	9.28 ± 2.93
	P	> 0.05	> 0.05	> 0.05
144	对照组	51.43 ± 11.97	39.48 ± 9.83	9.21 ± 2.5
	实验组	46.01 ± 10.93	44.60 ± 10.82	9.49 ± 2.44
	P	> 0.05	> 0.05	> 0.05

以上数值均为平均值 ± 标准差, n = 10

3 讨论

流式细胞仪在细胞分类及其功能的研究上是一种快速而准确的工具,它不但计数量大,使统计数据更为准确,并且可避免实验过程中人为或一些主观性因素造成的不确定性和一些假象。本实验用流式细胞仪 FSC 和 SSC 强度即依据细胞大小和颗粒度来进行栉孔扇贝血细胞的分类,得到了比较理想的结果,血细胞非常明显的分为 3 类。这与 Pipe 等^[8]通过组织化学等形态学研究将贻贝 (*Mytilus edulis*) 的血细胞分成透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞 3 类的结果相一致。与 Michael 等^[9]利用流式细胞术的方法把美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 的血细胞分为透明细胞、中间型细胞和颗粒细胞 3 个类群;以及与 Cheng 等^[10]采用电镜技术将硬壳蛤 (*Mercenaria mercenaria*) 的血细胞分为透明细胞、成纤维细胞 (fibrocytes) 和颗粒细胞 3 类细胞的结果相似,只是命名略有不同。

本实验所采用的甘氨酸锌是微量元素锌和氨基酸中的氨基、羧基经配位键形成的一类具有独特环状结构的螯合物,是近几年发展起来的一种新型饲料添加剂,被称为第三代微量元素添加剂,克服了以往无机盐添加剂硫酸锌易变性、吸收率低以及有机盐添加剂富马酸锌易溶失、生物效价低的缺点^[2]。本实验结果表明,甘氨酸锌可明显地促进透明细胞的数量逐渐增多,96h 后趋于正常水平。本文所采用的酵母聚糖是从啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞壁中提取的 β -1,3-葡聚糖。酵母细胞壁主要由 D-葡萄糖聚糖和 D-甘露聚糖组成,前者主要是由葡萄糖以 β -D-(1 \rightarrow 3) 键结合的,但也有的酵母具有 α -D-(1 \rightarrow 3) 键结合的单位。其中 β -1,3-葡聚糖在免疫学中最为常用^[1]。酵母聚糖对扇贝血细胞类群百分比变化的影响和甘氨酸锌的作用很相似,但影响较大,透明细胞很快就上升到 60%。有关酵母聚糖激活无脊椎动物免疫系统的机理,Duvic 等^[11]观察到螯虾血浆中存在酵母聚糖的结合蛋白,在其血细胞膜上存在酵母聚糖结合蛋白受体,进入机体中的酵母聚糖与血浆中的结合蛋白结合,再与血细胞的受体结合,引发一系列的免疫反应。酵母聚糖起调理素的作用,增强血细胞对异物的识别能力,从而提高了其吞噬能力^[12],促进血细胞对真菌等较大异物的包围杀伤,引起血细胞凝结,有利于血细胞趋向和杀伤异物及对伤口的修复^[13]。孙虎山等研究了酵母聚糖等对栉孔扇贝血淋巴中两种抗氧化酶和水解酶活力的影响^[14,15],结果发现对扇贝免疫防御有显著的激活加强作用。Washington 等^[6]采用流式细胞术的方法体外实验脂多糖对螯蛄小龙虾 (*Procambarus zonangulus*) 血细胞大小的影响,发现随着孵育时间的延长小细胞越来越多,这与本实验结果一致。透明细胞和颗粒细胞是普遍存在于贝类中的两种血细胞,透明细胞几乎不含有或含有少量颗粒;颗粒细胞的颗粒度较高,具有吞噬、产生各种酶和抗菌物质等作用^[16]。透明细胞和颗粒细胞之间的关系一直存在很大的分歧,前后提出两种假说。其一是, Ottaviani 等^[17]认为,透明细胞是颗粒细胞的前体 (progranulocyte) 或称未成熟的颗粒细胞,透明细胞通过颗粒化来逐渐转化为颗粒细胞,颗粒细胞又可以通过脱颗粒转变为透明细胞, Cheng 等^[18]曾用电镜技术观察到在透明细胞中存在着一些空泡,似颗粒细胞中的吞噬溶酶体;其二是, Cheng 等^[19]指出透明细胞和颗粒细胞可能本身就是两种不同种类的细胞,他用密度梯度离心的方法分离出了两种细胞,并比较了这两种细胞对植物凝集素结合特性的不同。因贝类成体的细胞很少分裂,造血较慢,所以本实验结果支持第一种假说,颗粒细胞减少而透明细胞增多可能是部分颗粒细胞脱颗粒转化成了透明细胞的结果;但透明细胞也可能又分为几个亚群,有的亚群高度分化成血栓细胞等^[3]而不能转化成颗粒细胞,即部分透明细胞和颗粒细胞也可能适用第二种假说,有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 孙虎山,李光友. 免疫多糖对栉孔扇贝血淋巴中氧化酶活力的影响[J]. 高技术通讯, 2001, 5: 10-12.
- [2] 赵元凤,吕景才. 氨基酸微量元素螯合物的制备检测及应用[J]. 西南农业大学学报, 1994, 16(6): 577-580.
- [3] 孙虎山,李光友. 栉孔扇贝血细胞的分类[J]. 海洋学报, 2003, 25(增刊2): 51-57.
- [4] Cheng T C. Cellular defense mechanisms in oysters[J]. Immunology and Pathology, 2000, 5: 43-83.
- [5] 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.
- [6] Washington C, John R. Flow cytometric analysis of crayfish haemocytes activated by lipopolysaccharide[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17:223 - 133.
- [7] 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.
- [8] Pipe R K, Livingstone D R. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1993, 3:221 - 233.
- [9] Michael G, Sylvain D G. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003, 16:539 - 552.
- [10] Cheng T C, Foley D A. Hemolymph cells of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*: An electron microscopical study[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1975, 26:341 - 351.
- [11] Duvic B, Soderhall K. Purification and characterization of a β -1,3-glucan binding protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. Eur J Biochem, 1992, 207:223 - 228.
- [12] Soderhall K, Smith V J, Johansson M W. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: Evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods[J]. Cell Tissue Res, 1986, 245:43 - 49.
- [13] Hose J E, Martin G G. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*[J]. J Invertebr Pathol, 1989, 53:335 - 346.
- [14] 孙虎山, 李光友. 硒化卡拉胶和酵母聚糖对栉孔扇贝血淋巴中两种水解酶活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3):245 - 249.
- [15] 孙虎山, 李光友. 硒多糖和酵母聚糖对栉孔扇贝血淋巴中二种抗氧化酶活力的影响[J]. 中国海洋药物, 2000, 5:20 - 23.
- [16] Mita G, Vandenbulcke F. Mussel defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge [J]. Journal of Cell Science, 1999, 112:4233 - 4242.
- [17] Ottaviani E, Franchini A. Comparative and morphofunctional studies on *Mytilus galloprovincialis* haemocytes: presence of two age-related haemocyte stages[J]. Italian Journal of Zoology, 1998, 65:349 - 354.
- [18] Cheng T C, Cali A. An electron microscope study of the fate of bacteria phagocytosed by granulocytes of *Crassostrea virginica*[J]. Contemporary Topics in Immunobiology, 1974, 4:25 - 35.
- [19] Cheng T C, Huang J W, Karadogan H. Separation of oyster haemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1980, 36:35 - 40.

《上海水产大学学报》 文献计量指标统计(2002 - 2004 年度)

指标	中国科技期刊引证报告 (中国科技信息所)		
	2002 年	2003 年	2004 年
总被引频次	94	149	200
影响因子	0.160	0.217	0.287
即年指标	0.013	0.013	0.013
他引总引比	0.83	0.80	0.88
引用刊数	38	47	68
扩散因子	40.4	31.5	34
被引半衰期	3.75	4.69	5.1
来源文献量	80	77	75
参考文献量	911	954	909
平均引文数	11.39	12.39	12.12
平均作者数	3.25	3.62	3.36
地区分布数	10	12	9
机构数	25	16	19
基金论文比	0.30	0.65	0.65