

圆背角无齿蚌血细胞吞噬作用的研究*

杨 军 邱安东 石安静

(四川大学生命科学学院 成都 610064)

摘 要 初步研究了蚌血细胞离体条件下的吞噬作用以及血清因子对其的影响。发现蚌血细胞在无血清的条件下能独立完成对大肠杆菌的识别、吞噬。蚌血清对大肠杆菌有调理作用,能促进蚌血细胞对其的吞噬。但蚌血细胞不能识别、吸附和吞噬鸡红细胞,显示出蚌免疫防御能力的局限性。还发现 EDTA 能有效地抑制蚌血细胞凝集,其凝集作用可能与 Ca^{2+} 等阳离子有关。

关键词 圆背角无齿蚌 吞噬作用 蚌血细胞

贝类与其他无脊椎动物一样,只有细胞免疫而无体液免疫,即不能产生免疫球蛋白^[1]。但很多实验结果表明,贝类血细胞能特异性地识别异己成分^[2],这与贝类产生的识别因子有关。许多学者认为,这些识别因子通常是具有凝集活性的调理素,并通过其特异的糖连接活性参与血细胞识别和吞噬异己成分^[3]。对调理素存在的部位,有不同的看法。多数学者认为,调理素有血细胞膜结合和血清游离型两种形式,就象脊椎动物的抗体存在形式一样^[4~7]。然而 Suzuki(1990)的研究却发现血清中的调理素与血细胞膜上的并不相同,二者很可能具有不同的异己识别方式。本文以圆背角无齿蚌为实验材料,研究了蚌血细胞的吞噬作用以及血清因子对其的影响,以探讨圆背角无齿蚌血细胞和血清因子在异己识别中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材 料

3~3 龄的圆背角无齿蚌(*Anodonta woodiana pacifica*)。

1.2 方 法

(1)制备大肠杆菌悬液:用 0.5% 石碳酸生理盐水洗下培养基上的大肠杆菌,2000 r/min 离心 10 分钟,除去上清液。然后加入 6% 多聚甲醛与蚌 TBS 1:1 的混合液固定 1 小时。最后

用蚌 TBS 离心洗二次,制成大肠杆菌的悬液,4℃ 保存。

(2)血细胞的凝集与抗凝:圆背角无齿蚌的血细胞在体外易凝集,凝集指 5 个以上的血细胞聚成团块,且这种团块在血液中大量出现。用蚌 TBS 配成以下浓度梯度的 EDTA 溶液:4、10、20、40、50、100、120、160、200、300、400 mmol/L。分别加入蚌血细胞以检测何种浓度能有效地抑制血细胞的凝集。

(3)制备血清和血细胞悬液:在蚌闭壳肌抽血,血液于 1000 r/min 离心 5 分钟,收集上清液即为血清,在 4℃ 保存。注射器吸取 1ml 蚌 TBS/200mmol/L EDTA,在闭壳肌抽血 3~4ml,在 400 r/min 下用蚌 TBS 离心洗一次(3 分钟)。最后用蚌 TBS 制成浓度约为 10^6 个细胞/ml 悬液。

(4)制备鸡红细胞悬液:取鸡血 10ml 与 40ml 阿氏液混合,用 0.85% NaCl 溶液(0.01mol/L 磷酸缓冲液(PB)配制, pH7.2)于 500~800 r/min 离心洗二次,除去上清液。再用 0.14 mol/L NaCl 溶液在 500 r/min 离心洗二次。然后用 2% 戊二醛(0.1 mol/LPB 配制)于 4℃ 固定。最后用蚌 TBS/1% 甘氨酸悬浮,在

* 国家自然科学基金项目 No 39770586;

第一作者介绍:杨 军,男,42 岁,硕士;

收稿日期:1997-12-29,修回日期:1999-01-05

4℃ 保存。使用前用蚌 TBS 离心洗二次。

(5) 蚌血细胞对大肠杆菌的吞噬: 实验组是 0.5 ml 大肠杆菌悬液与 0.5 ml 蚌血清混合, 25℃ 下静置 1 小时(对照组用蚌 TBS 代替蚌血清, 以后的处理方法与实验组相同)。然后 1000 r/min 离心一次(5 分钟), 除去上清液。用蚌 TBS 洗涤一次, 再制成含杆菌的蚌 TBS 悬液, 0.5 ml 该悬液与 0.5 ml 蚌血细胞悬液混合, 25℃ 下孵育 1 小时, 再加入 6% 多聚甲醛(0.1 mol/LPB 配制, pH7.4) 固定 1 小时, 用蚌 TBS 在 500 r/min 离心二次, 以除去未被吸附和未被吞噬的杆菌。滴片, 晾干后, 用吕氏碱性美蓝染色 2~3 分钟, 用水冲净染液。晾干后, 在光学显微镜下观察吸附和吞噬情况。由于经过离心处理, 游离的大肠杆菌被除去, 若有大肠杆菌与蚌血细胞表面接触就认为是吸附。吕氏碱性美蓝能有效地使大肠杆菌染上色, 而对蚌血细胞内的细胞器则不易染上色, 当蚌血细胞内出现染上色的大肠杆菌样结构, 就认为是发生了吞噬作用。随机选择 100 个蚌血细胞计算吸附百分率和吞噬百分率。

(6) 血细胞对鸡红细胞的吞噬: 实验组是用 0.5 ml 鸡红细胞悬液与 4.5 ml 蚌血清混合, 25℃ 下静置 0.5~3 小时(见表 1), 对照组用蚌 TBS 代替血清, 以后的处理方法与实验组相同。然后用蚌 TBS 离心洗一次, 制成含鸡红细胞的蚌 TBS 悬液。其后用 1 ml 该悬液与 1 ml 蚌血细胞悬液混合, 25℃ 下孵育 1~18 小时(见表 1)。然后加入 6% 多聚甲醛(0.1 mol/L PB 配制, pH7.4) 固定细胞。滴片, 在相差显微镜下观察吸附和吞噬情况。吸附应是蚌细胞与鸡红细胞表面相接触, 并在振动时不分离, 因此滴片前振摇溶液以避免在滴片过程中这两种细胞随机相接触而引起的误差。由于鸡红细胞已被固定, 若被吞噬, 仍能保持原有的大致形态, 而且鸡红细胞体积约为蚌血细胞体积的 1/2, 因此可以认为当蚌血细胞内出现鸡红细胞样结构, 就发生吞噬作用。随机选择 100 个蚌血细胞计算吸附百分率与吞噬百分率。

从蚌闭壳肌抽取血液 4.5 ml, 不经任何溶

液离心洗涤直接与 0.5 ml 鸡红细胞悬液混合, 25℃ 孵育 2 小时后, 观察计数吸附和吞噬情况。

2 结果

2.1 不同浓度梯度的 EDTA 溶液对蚌血细胞凝集的影响 研究结果发现, EDTA 抑制蚌血细胞凝集的作用。从 4 mmol/L EDTA 开始, 随着 EDTA 浓度增大, 对蚌血细胞凝集作用也增强, 浓度达到 200 mmol/L 时抑制效果已经很好, 当进一步增大浓度到 300、400 mmol/L 时, 抑制效果并没有提高。为了保证血细胞在以后的处理不凝集以及在离心时尽量除去 EDTA, 因此在进行吞噬实验时用 200 mmol/L EDTA 的溶液。

2.2 蚌血细胞对大肠杆菌的吞噬

(1) 实验组(即大肠杆菌经蚌血清孵育后再与蚌血细胞混合)和对照组(即大肠杆菌不经蚌血清孵育就与蚌血细胞混合)中, 大肠杆菌均能被蚌血细胞吸附和吞噬。每个吸附有大肠杆菌的蚌血细胞吸附的数目 1 至多个不等。多数蚌血细胞具有胞质突起, 但杆菌吸附在胞体上, 而不是胞质突起上。进行吞噬的蚌血细胞吞噬的杆菌数目不定, 有 1 至多个。

(2) 吞噬百分率检测: 用 7 只圆背角无齿蚌做了 a~g 共七个组实验, 分别对每组实验中的实验组和对照组随机统计 100 个蚌血细胞中进行吞噬的细胞数, 得到吞噬百分率(即 100 个蚌血细胞中吞噬杆菌的血细胞数除以 100 再乘以 100%)(见图 1)。

用 Student 的 *t* 检测, 比较实验组与对照

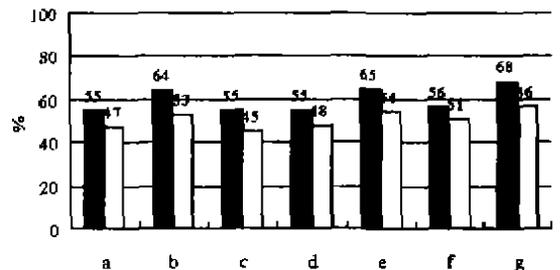


图 1 圆背角无齿蚌血细胞对大肠杆菌的吞噬百分率

■ 实验组 □ 对照组

组的吞噬百分率。结果表明,在 0.999 可信度下,实验组与对照组的吞噬百分率之间有显著差异,即实验组的蚌血细胞吞噬百分率显著高于对照组。

(3) 吸附百分率检测: 分别对 a~g 共七个组实验中的实验组和对照组随机统计 100 个蚌血细胞中进行吸附的蚌血细胞数, 得到吸附百分率(即 100 个蚌血细胞中吸附杆菌的血细胞数除以 100 再乘以 100%(见图 2))。

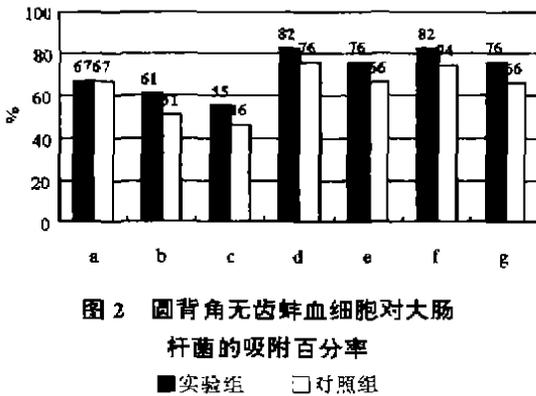


图 2 圆背角无齿蚌血细胞对大肠杆菌的吸附百分率
■ 实验组 □ 对照组

表 1 鸡红细胞与蚌血清、血细胞孵育后吞噬结果

组别	鸡红细胞与蚌血清 孵育时间*(小时)	鸡红细胞与蚌血细胞 孵育时间(小时)	吞噬百分率 (%)**
1	0.5	2	0
2	1	1	0
3	1	2	0
4	2	2	0
5	2	2.5	0
6	3	18	0

* 每组实验都分为对照组和实验组, 对照组中的鸡红细胞不与蚌血清孵育、与蚌血细胞孵育时间和相应实验组相同。

** 吞噬百分率 =

$$\frac{100 \text{ 个蚌血细胞中吞噬鸡红细胞的蚌血细胞数}}{100 \text{ (蚌血细胞数)}} \times 100\%$$

用 Student 的 *t* 检测, 比较实验组与对照组的吸附百分率。结果表明, 在 0.99 可信度下, 实验组与对照组的吸附百分率之间存在显著差异, 实验组蚌血细胞吸附百分率显著高于对照组。

2.3 蚌血细胞对鸡红细胞的吞噬 根据鸡红细胞与蚌血清混合进行孵育的时间不同以及鸡红细胞与蚌血细胞孵育时间不同, 共设计了 6 个组, 孵育温度 25℃, 观察吞噬情况。实验结

果发现鸡红细胞不能被蚌血细胞吞噬(表 1)。为进一步证实这一结果, 用含蚌 TBS/200 mmol/L EDTA 液的注射器抽取蚌血液, 将蚌全血与鸡红细胞悬液混合, 25℃ 孵育 2 小时后, 仍然没有发现吞噬现象。表明蚌血细胞不能吞噬鸡红细胞。

3 讨论

3.1 圆背角无齿蚌的血细胞在离体条件下易凝集, 在本实验中经阳离子(Ca²⁺、Mg²⁺等)螯合剂 EDTA 处理后, 凝集现象明显减弱, 这可能是蚌血细胞的凝集与 Ca²⁺、Mg²⁺等离子子的存在密切相关。众多资料表明, 贝类血细胞在离体条件下, 接触异物易发生凝集、脱颗粒和变形, 这些现象很可能就是其在体内修复伤口、消除异物在体外的表现, 其中贝类血细胞的凝集反应在堵塞伤口和包围异物中起着重要作用^[2,8,9]。关于贝类血细胞的凝集机理, Shozawa^[10]认为贝类血细胞凝集与血清中的 Ca²⁺和血细胞膜上的钙调蛋白有关, 用含 EDTA 的溶液或钙调素阻止剂处理贝类血细胞能阻止其凝集。本实验在制备圆背角无齿蚌血细胞悬液过程中, 也发现较高浓度的 EDTA 能阻止蚌血细胞凝集, 而不加 EDTA 溶液直接抽取蚌血液, 血细胞很快凝集成块状。因为 EDTA 将 Ca²⁺螯合, 降低了蚌血液中 Ca²⁺的浓度因此可以推测, 圆背角无齿蚌血细胞的凝集与血清中的 Ca²⁺密切相关。

3.2 当不同异己成分入侵机体时, 贝类血细胞所进行的免疫防御反应的程度是不完全相同的^[16], 在一定程度上表现出对异己成分的识别能力。本实验发现圆背角无齿蚌血细胞对经过以及未经过血清处理的鸡红细胞均不能吞噬, 而能吞噬大肠杆菌, 这显示出这种蚌的免疫防御能力是有限的。贝类的免疫能力是无法与脊椎动物相比拟的, 这可以从凝集素的角度来探讨一些原因。凝集素作为贝类的异己识别因子与免疫球蛋白相比, 凝集素识别特异性不高, 只能根据糖链的糖基组成, 特异性地区别“自己”和“异己”, 并且凝集素是组成性的, 不经诱导就

存在^[1,7]。两者既没有演替的同源性,也没有结构上的相似性^[11]。在进化的历程中,这种凝集素类识别因子被看作是脱离了发展主流而独立发展的一支^[12]。今后从免疫比较学角度出发,研究贝类异己识别因子的种类、分子结构等,以探索免疫系统在生物中的起源和演化也是十分有意义的。

参 考 文 献

- 1 陈竞春,石安静.贝类免疫生物学研究概况.水生生物学报,1996,20(1):74~7
- 2 Lackie, A. M. Invertebrate immunity. *Parasitology*, 1980, 80:393~142
- 3 Renwrauts, L., A. Stahmer. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of Leucocytes from *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol.*, 1983, 149:535~546
- 4 Fryer, S. E., J. H. Charles, B. Christopher. Phagocytosis of yeast by *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate specificity of hemocyte receptors and a plasma opsoinin. *Developmental and Comparative Immunology*, 1989, 13:19~16
- 5 Suzuki, T., K. Mori. A galactose-specific lectin from the hemolymph of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1989, 92B:455~462
- 6 Yoshino, T. P., R. R. Lother, T. C. Cheng. Binding and Redistribution of surface membrane receptors for concanavalin A on oyster hemocytes. *J. Exp. Zool.*, 1979, 207:439~450
- 7 Vasta, G. R., T. C. Cheng, J. M. John. A lectin on the hemocyte membrane of oyster (*Crassostrea virginica*). *Cellular Immunology*, 1984, 88:475~488
- 8 禾田浩尔.淡水産二枚貝の同种外套膜移植および異种外套膜移植.貝類, VENUS, 1989, 48(3):174~190
- 9 和田浩尔.插核手术と真珠貝の生体防禦反応.全真连接木研究会报第1号.1985,5~29
- 10 Shozawa, A., C. Suto. Hemocytes of *Pomacea canaliculata*: I. reversible aggregation induced by Ca^{2+} . *Developmental and Comparative Immunology*, 1990, 14:175~184
- 11 Yeaton, R. W. Invertebrate lectin: II diversity of specificity, biological synthesis and function in recognition. *Developmental and Comparative Immunology*, 1981, 5:535~545
- 12 Vasta, G. R., J. J. Marchalonis. Invertebrate agglutinins and the evolution of humoral and cellular recognition factors. In: "Greeberg A. H., ed. Invertebrate models: cell receptors and cell communication. Basel: S. Kurger. 1987. 104~117"