

台灣人工飼養鬯血細胞相

謝明昌¹·黃丁士²·陳彥伶³·張志堅¹·陳其欽²
蔡萬生²·陳文義³·林金榮¹

¹行政院農業委員會水產試所水產養殖組

²行政院農業委員會水產試所澎湖海洋生物研究中心

³行政院農業委員會水產試所東部海洋生物研究中心

摘要

本研究從野外捕獲經人工馴養 4~7 年的三棘鬯 (*Tachypleus tridentatus*)，採集 126 個血液檢體 (66 雄鬯和 60 雌鬯)，經 2 種抗凝劑 (0.02 M theophylline 或 0.01 M NEM) 及 3 種固定液 (100% methanol、95% ethanol、10% formalin) 測試後，以血球計數器計算血中的血細胞數量，血液抹片染色分析各種血細胞的比例。結果發現以 0.02 M 的 theophylline 抗凝血劑及 20 倍 10% 福馬林固定血細胞效果最佳，利用 DIFF Quik Stain 染色對鬯血細胞相可從胞內顆粒染色性作形態區分。血細胞量平均雄鬯為 $24,955 \pm 15,968/\mu\text{L}$ ，雌鬯 $19,004 \pm 13,755/\mu\text{L}$ ，染色後血細胞可區分為顆粒細胞 (granular flattened cells)，皺縮型細胞 (contract flattened cells)，脫顆粒細胞 (degranulated flattened cells)，其比例分別為 95:3:2。

本研究突破過去因鬯血細胞離體後易產生破裂 (explosion) 現象，細胞破裂釋出顆粒凝集而無法進行血液抹片染色情形，提供鬯血細胞另一種分類方式。

關鍵詞：鬯、三棘鬯、血細胞

前言

鬯又稱為馬蹄蟹 (Horseshoe crab) 是一種海洋底棲無脊椎動物，屬於節肢動物門 (Arthropoda)、肢口綱 (Merostomata)、劍尾目 (Xiphosura)。全世界現存的鬯科 (Limuroidea) 只有 4 種，包括美洲鬯 (*Limulus polyphemus* Linnaeus, 1758)、南方鬯 (*Tachypleus gigas* Muller, 1875)、三棘鬯 (*T. tridentatus* Leach, 1819)、和圓尾鬯 (*Carcinoscorpius rotundicauda* Latreille, 1802) (黃, 1994; 劉, 1991)，其中三棘鬯又稱為中國鬯，在地理上主要分布於中國東南沿海及日本南部沿岸，台灣金門、澎湖也有分布 (廖等, 2006)。

1956 年，科學家 Bang 首先發現，美洲鬯受革

蘭氏陰性菌感染後，會引發全身性血液凝固機制 (Bang, 1953; Bang, 1956; Levin *et al.*, 1964)；之後，鬯在醫療上的價值，不斷地被提出，目前世界各國對於鬯血液的成分，以及其在抗癌、抗菌、診斷等方面的應用已有相當多的研究報告 (Chen, 1985; Hurley, 1995; Smith, 2002; 謝等, 2006; Jinsong *et al.*, 2007)。台灣因為海洋環境汙染、棲息地破壞及大量捕捉等因素，造成鬯的生存危機，有識之士遂開始倡議積極保育 (譚等, 1997; Liao *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2009)。農委會水產試驗所澎湖海洋生物研究中心因此進行鬯的繁養殖研究 (黃等, 2009)，對於鬯的棲地保種、人工繁養殖與相關的應用研究也於焉展開。

鬯雖然存活於地球上超過 4 億年，有活化石之稱 (Rudkin *et al.*, 2009)。然而，人們對於牠的生活史、生理、生態研究部分仍有待進一步了解。1983 年吳等曾指出野生鬯的血細胞主要是變形細胞 (amebocyte)，細胞數目的報告也曾有發表 (吳,

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 3462-8138; E-mail: mchsieh02@mail.tfrin.gov.tw

1983; 吳等, 1983), 然而野生蟹經過人工飼養後, 其血液血球是否產生變化, 過去尚未發表 (Smith, 2006)。蟹的血細胞種類, 過去以來一直持續有爭議, 因為蟹血細胞在染色過程中, 難免接觸到空氣中的細菌, 常在染色完成固定前, 即已崩解, 造成血細胞破裂凝集現象, 使得血細胞形態無法判讀。為了瞭解其中的結構, 過去研究曾利用細胞培養方式, 以光學顯微鏡或電子顯微鏡進行分析 (梁等, 1983; Chen *et al.*, 1989; Yoshihiro *et al.*, 1991; Hurton, 2003; 翁, 2003)。本研究嘗試應用二種抗凝劑乙基馬來胺 (N-Ethylmaleimide; NEM) (Chen *et al.*, 1991) 和茶鹼 (theophylline) (吳, 1983; 吳等, 1983; Chen, 1991); 並利用甲醇 (methyl alcohol)、乙醇 (ethyl alcohol) 及福馬林 (formalin) 三種固定液和劉氏染色劑等四種血球染色法測試, 應用不同染色性區別細胞的形態及比例。對於細胞數量計算, 經過抗凝和固定處理, 應用無熱原可棄式細胞計數盤測定。

材料與方法

一、蟹

(一) 來源

供試蟹係原棲息於澎湖海域及內灣, 因漁民用底刺網採捕螃蟹時偶獲之大型野生三棘蟹成體, 或於 4~9 月產卵期, 在澎湖各地沙灘上岸產卵時為漁民所拾獲。

(二) 檢疫處理

收購後蓄養於檢疫預備槽, 先使用淡水沖刷蟹身上之寄生蟲及汙泥, 並使用 30 ppm 福馬林浸泡 30 分鐘, 以去除身上之各種寄生蟲後再移入蓄養桶。

(三) 飼養環境

4 噸 FRP 玻璃纖維桶, 水位 90~100 cm, 養殖用水取自澎湖青灣海域, 海水經過濾淨化、蛋白除沫後使用。水溫 11~30.5 °C, 鹽度 29~35 psu。

(四) 飼料及投餵

每 2 天投餵 1 次解凍後的下雜鮮魚、小卷、烏賊、牡蠣、文蛤及帶殼蝦子等飼料。

(五) 供試蟹

經行政院農業委員會水產試驗所澎湖海洋生物研究中心飼養 4~7 年的三棘蟹作為供作試驗, 計雄蟹 33 隻, 體重介於 670~1,770 g, 雌蟹 30 隻, 體重介於 1,170~30,870 g, 於 2、3 月各採 1 次, 每次 10~25 ml, 血液檢體計採雄蟹 66 件, 雌蟹 60 件。

二、玻璃儀器之處理

本實驗使用的玻璃容器, 以界面活性劑刷洗後, 用超音波震盪清洗 1 小時, 再以自來水沖洗數次, 復經過二次蒸餾水沖洗多次、瀝乾, 以鋁箔紙包好, 於 180 °C 乾熱滅菌 4 小時。

試驗中所使用的染色用玻片, 均以新購玻片 (Microscope slides lames porte-object, Thermo Scientific, Germany), 每片外包覆鋁箔紙, 於 180 °C 乾熱滅菌 4 小時。

三、血液處理

(一) 採血部位與保定

蟹頭胸甲部與腹甲背部交接關節韌帶中央 (Fig. 1), 採血時先將腹甲貼近採血保定架, 由保定人員將頭胸甲與腹部關節折屈, 兩手扣壓固定住頭胸甲背部前緣, 使蟹不致掙脫, 露出交接關節韌帶中央, 穿透韌帶膜即可直達蟹心臟。



Fig. 1 A horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) is in fixed position that exposes the arthrocardial membrane for blood extraction. A 15 or 18 gauge needle is used to insert through the membrane and into cardiac sinus.

(二) 採血方式

採血部位先以優碘及 70% 酒精 (以無熱原水配製, LAL reagent water, cape cod, U.S.A.) 棉棒消毒, 再以 15 G 或 18 G 針頭、50 ml 針筒採血, 加入抗凝劑 0.02 M Theophylline (WAKO, Japan) 或 0.01 M NEM (N-Ethylmaleimide, CALBIOCHEM, Germany), 血液與抗凝劑以 1:1 比例混合均勻成抗凝鰲血, 置無熱原離心管中。

(三) 血球計數固定混合液

抗凝鰲血分別以 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍及 20 倍 10% 中性福馬林 (formalin dehyde solution, 10%(v/v) in aqueous phosphate buffer, OSAKA, Japan), 溫和混合均勻, 分別作為血細胞計數用稀釋固定液進行測試。

(四) 血細胞計數

將前項血細胞計數固定混和液滴 10 μL 到無熱原拋棄式血球計數盤 (Disposable Hemocytometer, Digital Bio C-Chip, South Korea), 置於光學顯微鏡下 (Measuring microscope mm-800, Nikon, Japan), 計算後, 再依說明書還原每 μL 細胞數量。

四、血液抹片染色

(一) 固定液

甲醇 (100% Methanol)、乙醇 (95% Ethanol)、10% 中性福馬林 (Formalin dehyde solution, 10% (v/v) in Aqueous Phosphate Buffer, OSAKA, Japan)。

(二) 染色劑

商用劉氏染色 (ASK 東耀劉氏染色液, Taiwan, 簡稱 L-stain)、Diff Quik Stain (SYSMEX, USA, 簡稱 Q-stain)、Wright Stain (Kanto chemical, Japan, 簡稱 W-stain)、Giemsa Stain (SIGMA-Aldrich, USA, 簡稱 G-stain) 染色。

(三) 方法

在經完成乾熱滅菌的玻璃片上滴入 20 μL 的前項固定液或 10 μL 10% 中性福馬林, 取鰲含抗凝血

劑且無自發性凝集反應的血液 10 μL 混合後, 塗抹成約 10 mm \times 30 mm 薄層, 置於室溫陰乾, 依各染色劑的使用說明進行染色、鏡檢。

五、統計方法

所得雌鰲與雄鰲血細胞數, 以獨立 t 檢定比較兩組血細胞球檢體樣本間的平均值是否存在差異。

結 果

鰲血液以等比例的抗凝劑稀釋成為抗凝血後, 再分別以 1、2、5、10 及 20 倍的中性福馬林稀釋固定後計數, 測試結果如 Table 1。以 1、2 及 5 倍的福馬林稀釋固定, 仍有血細胞產生破裂、凝集現象或因數量過多產生細胞重疊現象 (Fig.2), 影響血細胞的計數判讀。福馬林 10 倍稀釋適用於鰲血細胞低於 20000/ μL 的檢體, 具有好的固定稀釋效果, 並無破裂、凝集和細胞重疊現象; 但對於數量超過 20000/ μL 鰲血細胞檢體仍有重疊或凝集現象, 而以 20 倍的福馬林處理則鰲血細胞可以在計數盤上可使細胞分散 (Fig.3), 利於細胞數量的計算。鰲血細胞經過福馬林固定後, 至少可以保存 30 日以上, 血細胞會產生沉澱現象, 只要經過混合均勻, 可作為血細胞計數或染色使用。

血液抹片的細胞型態與各種固定液有關 (Table 2), 以甲醇和乙醇固定時, 因固定液會揮發很快, 鰲血液與甲醇和乙醇互不相溶, 抗凝血液在固定前, 會形成油滴樣聚集在固定液的邊緣, 經過攪拌乾燥後細胞無法充分固定, 易產生破裂、皺縮、變形, 細胞重疊, 塗抹片的背景顏色過深影響判讀現象。經福馬林固定的鰲血液, 抗凝血液可與固定液充分均勻混和, 塗抹後形成均勻薄膜, 使用兩倍的中性福馬林固定, 有保存細胞形態, 提高固定效果, 可降低血細胞破裂或重疊現象。血細胞重疊現象易出現於血細胞數多的血液中, 必要時需要再加以稀釋, 以利於血細胞相的判讀。

血液抹片染色結果與染色液的不同有相關性 (Table 3), 血細胞乾燥後, 細胞形狀會產生皺縮變化, 以 W-stain 和 G-stain 染色液染色, 鰲血細胞細胞質的染色性呈現較強藍紫色, 細胞質內的顆

Table 1 Comparison of fix effects of times (X) different dilution of formalin on *Tachypleus tridentatus* hemocytes

Hemocytes calculate diluted 10% formalin	Cells overlap	Exploded hemocyte	Preservation 30 days
1X 10%formalin	+++	++	Yes/No
2X 10%formalin	+	+/-	Yes
5X 10%formalin	+	+/-	Yes
10X 10%formalin	+/-	-	Yes
20X 10%formalin	-	-	Yes

- : 10 views under magnification 100X, not found cells overlap or hemocyte explode.

+/- : under ten field of vision by magnification 100X, 1-2 views found cells overlap or exploded hemocyte.

+: under ten field of vision by magnification 100X, 3-4 views found cells overlap or exploded hemocyte.

++: under ten field of vision by magnification 100X, 5-6 views found cells overlap or exploded hemocyte.

+++ : under ten field of vision by magnification 100X, over 6 views found cells overlap or exploded hemocyte.

Table 2 Comparison of fix effects of *Tachypleus tridentatus* blood smear test solution

Fixative	Background distortion	Cells overlap	Exploded hemocyte
Methanol	Yes	+++	+++
95% alcohol	Yes	+++	+++
1X 10% formalin	Yes	+++	++
2X 10% formalin	Yes/No	+	+/-
Fixative	Background distortion	Cells overlap	exploded hemocyte

+/- : under ten field of vision by magnification 100X, 0 or 1 views found cells overlap or exploded hemocyte.

+: under ten field of vision by magnification 100X, 2 views found cells overlap or exploded hemocyte.

++: under ten field of vision by magnification 100X, 3 views found cells overlap or exploded hemocyte.

+++ : under ten field of vision by magnification 100X, over 4 views found cells overlap or exploded hemocyte.

Table 3 The discrimination for *Tachypleus tridentatus* hemocytes by different stain methods

Stain method	Nucleus	Granular of cytoplasm		Membrane	Background
		Blue	Red		
Q-Stain	++	+	++	+	++
W-stain	+	++++	++++	+	++
G-stain	+	++	++	+	++++
L-stain	++	++	++	+	++++

Q-Stain: Diff Quik Stain; W-stain: Write Stain; G-stain: Giemsa Stain; L-stain: Liu's Stain.

+: Easy interpretation.

++: A little difficult to distinguish individual differences.

++++: Difficulties in interpretation of background or other color too dark.

粒可明顯染出，細胞核染色性則呈較淡藍紫色而混濁。藍色的背景為血清蛋白染色後形成，血清蛋白濃度較高時，背景顏色較深，易造成判讀上的困擾，經過福馬林稀釋後，可以降低背景染色濃度。L-stain 對於細胞質內的顆粒，紅色染色效果較佳，但經福馬林固定後的細胞則呈現藍紫色，與細胞核相近，未經福馬林固定的細胞核則

較易區別，但血細胞容易破裂，影響血細胞於形態學上的判讀。以 Q-stain 染色 (Skipper, 1989)，細胞核呈藍色，顆粒型細胞 (granular flattened form) 約占 95%，細胞呈橢圓型，長徑約 14 ~ 23 μm ，短徑 10 ~ 15 μm ，可從顏色可區分為兩種，其中濃染顆粒細胞 (deep granular cells) 佔 23 ~ 25%，細胞質內顆粒濃染，顆粒呈現紫藍色或紫紅

Table 4 The number and shape of *Tachypleus tridentatus* hemocytes

	Male (N=66)	Female (N=60)
Number Mean \pm Std/ μ L	24,955 \pm 15,968 ^a	19,004 \pm 13,755 ^b
Form for Q-stain (%)	Mean (Min-Max)	Mean (Min-Max)
Granular flattened	95 (91-99)	95 (91-99)
Deep granular	23 (16-30)	25 (13-37)
Pale granular	62 (51-73)	60 (52-79)
Degranulated flattened	3 (0-4)	3 (0-4)
Contract	2 (0-4)	2 (0-4)

* Value with different superscripts in the same raw are significantly different (t-test, $p \leq 0.05$).

色密度高 (Fig. 4a, b)；淡顆粒細胞 (pale granular cells) 佔 60 ~ 62%，其細胞質內顆粒則呈現灰色透明或淡藍色透明樣 (pale pink granular form)；脫顆粒細胞 (degranulated flattened cells)，則細胞質中顆粒量很少或全無顆粒，約有 0 ~ 3%。皺縮形細胞 (contract cells) 細胞質量少，染色後成藍色，顆粒較小，細胞大小約 7 ~ 9 μ m (Fig. 4)。

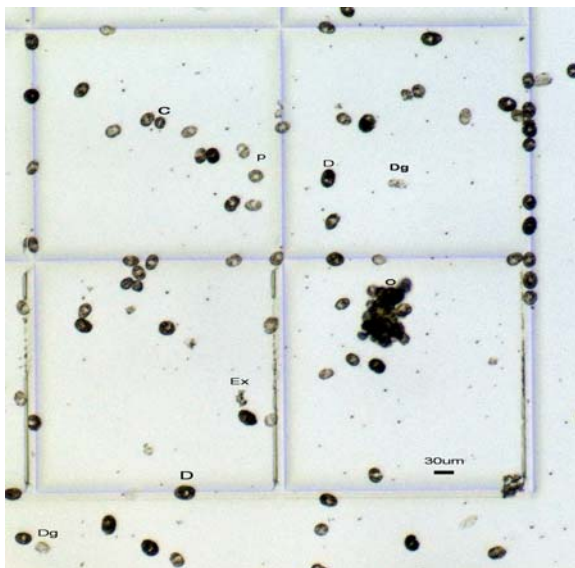


Fig. 2 *Tachypleus tridentatus* hemocytes with 2X diluted formalin observed on hemocytometer 100X, O.some hemocytes overlape, Dg. Degranulated flattened (completely flattened cells attached to the surface without or a little granules presented), D. Deep granular flattened (partially flattened cells attached to the surface with refractive many deep granules), P. Pale granular flattened (partially flattened cells attached to the surface with refractive many light granules), C. Contract hemocyte (relatively spherical cells with little attachment), Ex. Explosion of hemocytes .

血細胞含量 (Table 4)，雄蟹的血細胞量介於 4,020 ~ 90,780/ μ L 之間，平均 24,955 \pm 15,968/ μ L，高低值相差 22.6 倍， ζ VI 值=63.99；雌蟹平均血細胞量 19,004 \pm 13,755/ μ L，數量介於為 3,360 ~ 73,000/ μ L 之間，高低值相差 21.7 倍， ζ VI 值=72.38。蟹血細胞經福馬林固定，在位相差顯微鏡可見細胞質內顆粒有較濃密與較淡者，另外可見無顆粒的脫顆粒細胞 (Fig. 3)。血細胞經由 t-test 分析後，在臨界值為 0.05% 假設下，雄蟹與雌蟹的血細胞數有顯著差異 ($p \leq 0.05$)。

蟹採血後，部分有自發性凝集反應的血液，立即產生白色絮狀或膠狀物很快沉澱在離心管底部者，均捨棄不用，其餘蟹血細胞經 20 倍中性福馬林固定，細胞計數以血液計數盤在位相差顯微鏡下觀察計數 (Fig. 2)，固定後的血細胞形狀大致呈橢圓形，長徑約 16.99 \pm 3.36 μ m，短徑約 12.28 \pm 3.2 μ m。脫顆粒細胞長、短徑分別為 20.31 \pm 3.46 μ m、15.49 \pm 3.06 μ m。皺縮形細胞大致呈圓形，直徑 7.34 \pm 2.23 μ m。

討 論

蟹血細胞使用 0.02 M theophylline 或 0.01 M NEM 作為抗凝劑，均能達成抗凝效果，但因 NEM 口服有毒，皮膚接觸易產生過敏反應或灼傷情形，基於生物安全性考量，本研究後期已避免使用。

血細胞抹片先用福馬林固定，染色時以 2 倍固定，可減少蟹血液中血清蛋白所造成血清蛋白乾裂，降低背景顏色過深影響觀察的缺點，並且可留下部分血清蛋白使細胞附著固定於玻片上，此法適用於 4 種染色劑。而作為細胞計數至少需

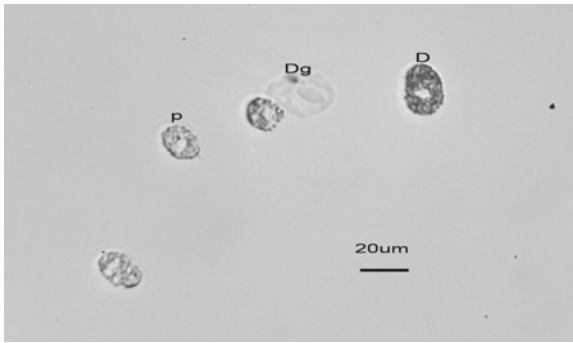


Fig. 3 Forms of *Tachypleus tridentatus* hemocytes by inverted microscope observed on hemocytometer 600X, Dg, degranulated flattened, D, deep granular flattened, P, pale granular flattened.

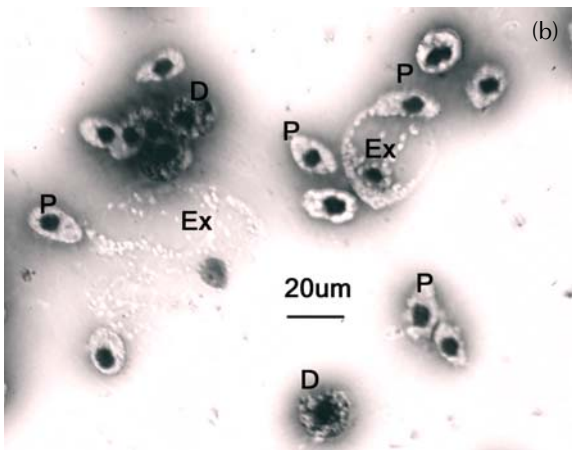
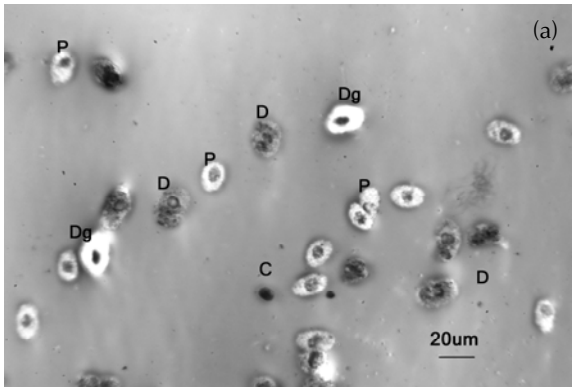


Fig. 4 Forms of *Tachypleus tridentatus* hemocytes observed with Q-staining. Dg, Degranulated flattened (completely flattened cells to the cytoplasm without or a little red granules present); D, Deep granular flattened (partially flattened cells attached to the surface with refractive many deep red granules present); P, Pale granular flattened (partially flattened cells attached to the surface with refractive many gray to light blue granules present); C, Contract hemocytes (relatively spherical cells with little blue cytoplasm attachment to the nucleus surface); Ex, Hemocytes release small particles after the explosion.

要 10 倍以上，本研究使用 20 倍，可以將血清蛋白稀釋，使血細胞充分浸潤於固定液中充分固定，使血細胞均勻分布於計數盤上，避免細胞過度擁擠，有利於細胞數的計算。

成蟹血細胞中的顆粒細胞於離體後會像變形蟲形成偽足，所以又稱為變形細胞 (amebocyte)，其形態類似哺乳動物的嗜中性球，禽類、兩棲、爬蟲或魚類血中的異嗜球 (Heterophils)，具有吞噬及凝血功能 (Chen *et al.*, 1989; Bang *et al.*, 1953)，Chen、Hurton 等將蟹的變形細胞進行培養觀察 (Chen *et al.*, 1989; Hurton, 2003)，該細胞會隨著培養時間延長而產生形狀變化或有偽足產生、有時會因外界環境改變而破裂，因此無法長期保存作為形態上的研究。本研究所使用福馬林固定方法可突破細胞保存期限，適合作蟹血細胞形態學上的觀察研究。

脊椎動物製作血液塗抹片以甲醇或乙醇固定，因具有揮發性且快速乾燥效果。但在本研究中發現，蟹的血細胞若經過甲醇或乙醇固定後，易造成細胞破裂，可能因為這兩類溶劑在常溫就會揮發，在製造過程中無法去除內毒素所致，且此二者會快速揮發，尚未達成固定效果就已揮發，無法做為檢體保存，因此不適合使用。

過去認為蟹血細胞中有 99% 為變形細胞，這種細胞在內毒素作用下會脫去顆粒並產生凝集反應 (Murer *et al.*, 1975)。本研究發現蟹血細胞不易透過染色來判讀其形態學，進而參考 Sung 等對草蝦血液以福馬林來固定的方法 (Sung *et al.*, 1999) 以進行試驗。Chen *et al.* (1989) 及 Hurton (2003) 在培養蟹變形細胞時，將該等細胞區分為顆粒細胞、皺縮形與脫顆粒細胞，但細胞存活時間有限，且經過 3 天後與原來細胞形態有相當大差異，不適合繼續作為形態上的辨識。本研究細胞保存法發現血細胞可保存一個月以上，對於研究型態學上極方便。蝦類血細胞可區分為顆粒球、半顆粒球與透明球 (Sung *et al.*, 1999)，蟹血細胞在本研究中發現在形態上與同屬節肢動物的蝦類相似，濃染顆粒細胞大致上與蝦顆粒細胞相似，淡顆粒細胞與半顆粒細胞所含顆粒較為透明，脫顆粒細胞相當於透明球，其細胞質內顆粒的染色性較差，另外還有一小部分皺縮形細胞於蝦則無此類細胞，形態上類似哺乳動物血液中的小淋巴球。其功能是否相似，則待進一步研究。

本次染色觀察顆粒細胞使用 Diff-Quik Stain，細胞質內的藍紫色顆粒深淺比較容易區別，而 L-Stain 則較無法區別，因此可依此染色性作為不同細胞間的區別。過去對於三棘蟹細胞顯微構造的研究，認為有凝固原或凝固酶參與其中，以致於即使用從電子顯微鏡觀察在形態學上無法區別 (梁, 1983; Saddaki, 2002)，但由本研究染色性的差異，未來可進一步探討其對於凝血機制作用的生理機能間的差異。蟹的血細胞中可以分離出 Tachyplesin、Coagulogen、Tachylectin-1、Tachylectin-2、Tachylectin-3、Tachylectin-4 及 Tachylectin-5 等 7 種免疫化學物質 (Robert *et al.*, 1992; Sadaaki, 2002)，並且各參與不同的免疫機制，其染色性亦是否各有差異性，有待進一步確認。

日本蟹 (三棘蟹) 的新鮮血液中被認為約有 1% 無顆粒細胞，型態上細胞質中幾乎不含顆粒 (Yoshihiro *et al.* 1991; Shun-ichiro *et al.* 1996) 與本研究中的脫顆粒細胞相當。而本研究發現經過人工飼養 4~7 年的三棘蟹，其脫顆粒細胞約占 2%，一般約 0~4%，數量較 Yoshihiro 研究結果多。Peter *et al.* (1996) 的研究指出，蟹的無顆粒細胞相當於其他節肢動物的透明球，有一個大而清晰的細胞核，細胞質中內質網發達，核糖體和粒腺體較多，免疫化學染色法測不出凝固蛋白顆粒，數量有 1~3% 的漿細胞 (plasmotocyte) 主要與本研究脫顆粒細胞數量接近，可能就是同一種細胞。

過去三棘蟹的血細胞數目的檢測很少被探討。在製備蟹試劑試驗過程中，曾發現蟹雄性較雌性的血細胞數目較多，雄性平均每 μL 的血液中含有血細胞數為 42,000 ~ 46,000，雌蟹則為 30,000 ~ 41,000，且因採血月份不同而有所差異 (吳, 1983; 吳等, 1983)。本研究中發現，在人工室內池飼養 4~7 年的蟹，其血細胞數量雄性較雌性多，且因個體而差異極大，血細胞量相差達 20 倍以上。在本試驗中從抽出來的血液中即可發現呈淡藍乳白色的血液其血細胞含量較濃，若外觀清澈或淡藍清澈液體，則其中血細胞的含量偏低。有報告指出，飼養超過一年的蟹，如果被採血過多次，會出現貧血，血細胞數下降，若再繼續予以採血，則容易導致死亡 (Rudloe, 1983; 吳等, 1983)。因為吳等 (1983) 未敘明蟹血細胞的計數方法，故無從比較，未來可以進一步進行試驗以驗證之。然而，如果蟹血細胞會因飼養時間長，

造成採血後不易恢復，則未來在人工飼養環境下，如何採取適當的採血間隔時間及採血量，以期能維持其基本的生理機能並兼顧飼養經濟效益，需更進一步探討。

結 論

蟹血細胞中以變形細胞的顆粒細胞含量比例最高，顆粒細胞內容物釋出後萃取可以進一步製造檢測內毒素的蟹試劑，從蟹血顆粒型變形細胞比例可以了解蟹血品質優劣，本研究突破過去因蟹血細胞離體後容易產生破裂 (Explosion) 的現象，細胞破裂後釋出凝集顆粒而無法進行血細胞抹片染色判讀情形，或以培養方式保存而形成變形細胞或有偽足狀態而無法保存與在蟹體內相同的形狀，並對蟹血細胞固定染色性進行另一種方式分類，提前瞭解蟹血品質，以作為蟹試劑製作品質篩選的參考。

謝 辭

本研究承蒙國立台灣大學生農學院附設動物醫院檢驗室姜吉鴻醫師在血液學臨床診斷方面的協助指導，使試驗得以順利完成，謹此致謝。

參考文獻

- 吳傳洪, 魏達成 (1983) 用人工飼養的蟹製備蟹試劑. 蟹與蟹試驗法論文匯編, 廈門市醫藥研究所蟹研究室, 中國, 25-27.
- 吳傳洪 (1983) 蟹試劑質量和中和試驗工藝研究. 蟹與蟹試驗法論文匯編 (二), 廈門市醫藥研究所蟹研究室, 中國, 25-27.
- 梁平, 倪子綿 (1983) 中國蟹血細胞的超微結構觀察. 蟹與蟹試驗法論文匯編, 廈門市醫藥研究所蟹研究室, 中國, 72-74.
- 翁朝紅, 謝仰杰, 洪水根 (2003) 蟹血淋巴系統的特點及其功能. 集美大學學報, 8(1): 16-21.
- 黃丁士, 陳其欽 (2009) 中國蟹之室內自然產卵及培育. 水產研究, 17(1): 15-24.
- 黃宗國 (1994) 中國海洋生物種類與分布. 國家海洋局管理監測司, 海洋出版社, 北京, 中國.
- 劉瑞玉 (1991) 蟹. 中國大百科全書中國大百科全書出版社, 北京, 中國, 562-563.
- 廖永岩, 劉金霞 (2006) 亞洲海域蟹的種類和分布. 海洋熱帶學報, 125(6) 6: 85-90.
- 謝海傳, 代建國, 郭勇 (2006) 海洋遠古生物蟹體內活性物質的研究. 安徽農業科學, 34(24): 6512-6515.

- 譚志宜, 陳朝金, 陳章波 (1997) 鯤. 金門 (國家公園) 濱海潮間帶動物相調查研究期末報告, 6-1-18.
- Armstrong, P. B., R. Melchior and J. P. Quigley (1996) Humoral immunity in long-lived Arthropods. *J. Insect Physiol.*, 42(1): 53-64.
- Bang, F. B. (1953) The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. *Biological Bull. (Woods Hole)*, 105: 361-362.
- Bang, F. B. (1956) A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 98: 325-351.
- Chen, I. J., S. J. Hwang and Y. M. Chen (1991) Studies on anti-aggregating drugs of horseshoe crab amebocytes. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 7: 376-381.
- Chen, S. S., H. Y. Chen and Y. Yang (1989) Cultivation of horseshoe crab amebocytes. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 5: 516-521.
- Chen, I. J., Y. J. Fang, J. J. Cheng and H. Y. Hsu (1985) *Limulus* test for detection of endotoxin in C. S. F. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 2: 168-174.
- Chen, C. P., H. L. Hsieh, A. Chen, H. Y. Yeh, P. F. Lin and W. Wang (2009) The Conservation Network of horseshoe crabs in Taiwan. *Biology and Conservation of Horseshoe Crabs*, 543-557.
- Eugene, D. C. and J. Levin (1985) The fine structure of the amebocyte in the blood of *Limulus polyphemus* I. Morphology of normal cell. *Biol. Bull.*, 169: 449-457.
- Hurley, J. C. (1995) Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8(2): 268-92.
- Hurton, L. (2003) Reducing post-bleeding mortality of horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) used in the biomedical industry. Master Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, 53-60.
- Iwanga, S. (2002) The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Current opinion Immunol.*, 14(5): 87-95.
- Jingsong, G. U., Y. U. Jiang, G. U. Wei and Y. A. N. Runhu (2007) The research advancement in anti-bacterial and anti-lipopolsaccharide protein from horseshoe crabs. *Sciencepaper Online*. 2(11): 802-807.
- Levin, J. and F. B. Bang (1964) The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Hopkins Hosp.*, 115: 265-274.
- Liao, Y. Y. and X. M. Li (2001) Present situation of horseshoe crab resources in the sea area of China and Tactics of Preservation. *Resources Sci.*, 23(2): 53-57.
- Mikkelsen, T. (1988) The secret in the blue blood. *Science*, Beijing, China, 125 PP.
- Murer, E. H., J. Levin and R. Holme (1975) Isolation and studies of the granules of the amebocytes of *Limulus polyphemus*, the horseshoe crab. *J. Cell Physiol.*, 86: 533-542.
- Norvitsky, T. J. (1984) Discovery to commercialization: The blood of the horseshoe crab. *Oceanus*, 27: 13-18.
- Roth, I. R. and J. Levin (1992) Purification of *Limulus polyphemus* proclotting enzyme. *J. Biol. Chem.*, 267(33): 24097-24102.
- Rudloe, J. (1983) The effect of heavy bleeding on mortality of horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, in the natural environment. *J. Invertebrate Pathol.*, 42: 167-176.
- Rudkin, D. M. and G. A. Young (2009) Horseshoe crabs - an ancient ancestry revealed, biology and conservation of horseshoe crabs. Springer Pub., New York, USA, 25-44.
- Sadaaki, I. (2002) The molecular basis of innate immunity in the Horseshoe crab, *Current opinion immunol.*, 14(1): 87-95.
- Shun-ichiro, K., N. Ranko and H. Michimasa (1996) Tachycitin, a small granular component in horseshoe crab hemocytes, is an antimicrobial protein with chitin-binding activity. *J. Biochem.*, 120: 1253-1260.
- Skipper, R. and D. B. DeStephan (1989) A Rapid Stain for *Campylobacter pylori* in gastrointestinal tissue sections using Diff-Quik. *J. Histotechnol.*, 12: 303-304.
- Smith, S. A. (2006) Horseshoe Crab. *Invertebrate Med.*, 133-142.
- Smith, S. A., J. M. Berkson and R. A. Barrate (2002) Horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) hemolymph, biochemical and immunological parameters. *Proc. Int. Assoc. Aquatic Animal Med.*, 33: 101-102.
- Sourek, J., M Tichý and J. Levin (1978) Effects of certain cations (Fe, Zn, Mg, and Ca) on bacterial endotoxins. *Infect Immu.*, 21(2): 648-54 7.
- Sung, H. H., P. Y. Wu and Y. L. Song (1999) Characterization of monoclonal antibodies to haemocyte subpopulations of tiger shrimp (*Penaeus monodon*): immunochemical identification of three major haemocyte types. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 167-179.
- Yoshihiro, T., A. Mizutani and F. Tokunaga (1991) Morphology of the granular hemocytes of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* and immunocytochemical localization of clotting factors and antimicrobial substance. *Cell Tissue Res.*, 266: 137-147.

Comparison of Fixed and Stained Hemocytes from Cultivate Horseshoe Crab in Taiwan

Ming-Chang Hsieh^{1*}, Ting-Shih Huang², Yen-Ling Chen³, Chi-Chin Chang², Chi-Kin Zhang¹,
Wen-Yie Chen³, Wann-Sheng Tasi² and King-Jung Ling¹

¹Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

²Penghu Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute

³Eastern Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

We studied 126 blood samples of wild horseshoe crabs (*Tychopleus tridentatus*) that have been kept in captivity for 4-7 years. The blood was tested with two kinds of anticoagulant (0.02 M theophylline or 0.01 M NEM) and three kinds of fixatives (methanol, 95% ethanol and 10% formalin). The number of hemocyte was calculated by disposable hemocytometer, and stained hemocyte blood smear were analyzed. The best results of treatments were with 0.02 M theophylline anticoagulant and 20X formalin to fix hemocyte. The types of hemocyte were discriminated by the staining property of hemocyte intracellular particles through DIFF Quik Stain. The hemocytes counts were $24,955 \pm 15,968/\mu\text{L}$ for male and $19,004 \pm 13,755/\mu\text{L}$ for female. Stained hemocyte was classed into granule flattened cells, degranulated flattened cells, and contract flattened cells with a ratio of 95:3:2.

In the past staining blood cell smears of horseshoe crab was difficult. Hemocyte easily explodes in vitro, which in turn releases agglutinating particles. Our method makes staining possible and provides a new way to classify horseshoe crab blood cells.

Key words: Horseshoe crab, *Tychopleus tridentatus*, hemocytes

*Correspondence: 199 Hou-ih Road, Keelung 202, Taiwan. TEL:(02)2462-2101 ext 2804; FAX: (02)2462-8138;
E-mail: mchsieh02@mail.tfrin.gov.tw