

葡萄牙牡蠣血球細胞化學與免疫的研究

張素容¹ · 曾淑敏² · 周信佑^{2*}

¹行政院農業委員會水產試驗所淡水繁養殖研究中心

²國立台灣海洋大學水產養殖學系

摘 要

本研究的目的是探討葡萄牙牡蠣 (*Crassostrea angulata*) 血球在防禦機制中所扮演的角色，並建立評估細胞免疫能力的方法。化學染色結果發現，顆粒血球與非顆粒血球皆呈 PAS 陽性反應，而少量的顆粒血球也呈蘇丹黑 B 陽性反應，顯示血球的細胞質含多醣類，而部分顆粒具有脂質成分。酸性磷酸酶、鹼性磷酸酶、 β -葡糖苷酸酶、 α -奈酚乙酸酯酶、奈酚 AS-D 氯化乙酸酯酶和過氧化酶等六種酵素活性均存在顆粒血球內。評估血球免疫的反應發現，顆粒血球與非顆粒血球皆具有吞噬能力，可吞噬螢光乳珠和酵母多醣，並可產生超氧根離子來對抗外來物。血球中，顆粒血球攝取中性紅較為活躍、吞噬能力較強，其中以嗜鹼顆粒血球的吞噬螢光乳珠能力最強。

關鍵字：葡萄牙牡蠣、血球、酵素活性、吞噬作用、超氧離子

前 言

葡萄牙牡蠣 (*Crassostrea angulata*) 為臺灣重要的養殖貝類，具有悠久的養殖歷史，其產值與產量在國內養殖貝類中均名列前茅。由於牡蠣是變溫、滲透壓順應型的生物，因此代謝與生理活動明顯受到環境因子影響，尤其處於淺海環境的貝類特別明顯，變動幅度也特別大。近年來，除了氣候變遷對水生生物影響的議題外，養殖牡蠣也因經濟快速發展造成河川及沿岸河口環境日趨惡化，導致天然附苗率銳減，或時而發生不明原因大量死亡的情形，因此環境因素對貝類生理、免疫反應之影響亟待探討。其中，貝類的血球，不僅協助調節體內各種生理反應與恒定 (Cheng, 1981, 1996; Fisher, 1986)，更是抵抗外來病原生物侵入的重要屏障。

非特異性的細胞性免疫 (nonspecific cellular immunity) 是貝類主要的防禦機制，包括發炎反應、傷口修復、包圍和吞噬作用等。血球在辨識

外來物質、黏附後，以進行包圍或吞噬 (Moore and Lowe, 1977; López *et al.*, 1997a)。被吞噬的物質可被細胞內溶酶體 (lysosome) 的水解酵素所分解 (Huffman and Tripp, 1982; Carballal *et al.*, 1997b)，水解酵素包括酸性磷酸酶 (acid phosphatase)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase)、 β -葡糖苷酸酶 (β -glucuronidase)、酯酶 (esterase) 等 (Moore and Gelder, 1985; López *et al.*, 1997b)。某些狀況下，這些水解酵素也可能會釋放到細胞外殺菌 (Mohandas *et al.*, 1985)。此外，吞噬作用還可能伴隨著呼吸爆 (respiratory burst)，其所產生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 具有很高的殺菌活性 (Pipe, 1992; Carballal *et al.*, 1997a)。

在先前的研究中，Chang *et al.* (2005) 已觀察台灣地區養殖牡蠣的血球形態與特徵，並將其分類為嗜伊紅顆粒血球、嗜鹼性顆粒血球以及非顆粒血球。而本研究則進行牡蠣血球的細胞化學染色，不僅可作為血球分類的參考，更有助於了解各種血球在防禦機制中的功能。同時觀察血球對中性紅的攝取、吞噬作用與胞內超氧離子的產生，並探討血球種類和功能之間的關聯，期能建立評估牡蠣血球免疫能力的方法，協助探討環境對貝類免疫的影響。

*通訊作者 / 基隆市北寧路 2 號； TEL: (02) 2462-2192
轉 5214; FAX: (02) 2463-4176; E-mail: hychou@mail.ntou.edu.tw

材料與方法

一、試驗動物

試驗用之葡萄牙牡蠣購自雲林縣台西地區私人養殖戶，在飼養桶中以海水（鹽度 30 psu；溫度 25~28 °C）流水飼養 3 天後，再進行實驗。

二、血淋巴抽取以及血球玻片製作

牡蠣開殼後，以 23G 無菌注射針筒插入圍心腔抽取血淋巴，加入等體積無菌人工海水（鹽度 30 psu）混合後滴置於玻片上，並以倒立顯微鏡 (Olympus IMT-2) 觀察血球的攤附情形。待血球攤附後，完成牡蠣血球玻片之製作。

三、血球化學染色觀察

(一) 過碘酸－希夫氏 (Periodic acid-schiff, PAS) 染色

參考 Sigma 395B 試劑套組建議之流程，並修改流程如下，以 1% 戊二醛溶液（溶於無菌人工海水）於 4°C 下將血球固定 30 min 後，以蒸餾水洗去固定液，然後固定的血球在室溫下再以 1% 過碘酸溶液 (periodic acid solution, Sigma) 浸泡 5 min。經水潤洗，以希夫氏試劑 (Schiff's reagent, Sigma) 作用 15 min，再以流水洗 5 min，最後以蘇木紫溶液 (Gill 3 hematoxylin, Sigma) 對照染色後，以封片膠 (Entellan, Merk) 封片後觀察。

(二) 蘇丹黑 B (Sudan black B) 染色

以 10% 福馬林溶液（溶於無菌人工海水）在室溫下固定血球 10 min。以水去固定液，並經 50% 酒精浸泡 1 min 後，將玻片浸泡於 0.5% 蘇丹黑 B 溶液（溶於 70% 酒精）20 min (Bancroft and Stevens, 1982)，再經 50% 酒精潤洗，隨後以 0.1% 核牢紅 (nuclear fast red) 溶液進行核染色後，以甘油凝膠封片。

(三) 酸性磷酸酶 (Acid phosphatase)

參考 Sigma 91-5 試劑套組建議之流程，並修

改流程如下，以 CAF 固定液 [25 ml 檸檬酸溶液 (Sigma 91-5)、65 ml 丙酮、8 ml 福馬林] 在室溫下將血球固定 30 min 後，以水洗去固定液，固定的血球在 37 °C 下黑暗的環境中在酸性磷酸酶試劑 (Sigma 181-A) 中反應 5 h。經水洗，再以蘇木紫溶液對照染色，以甘油凝膠封片。

(四) 鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase)

參考 Sigma 86-R 試劑套組建議之流程，並修改流程如下，以 1% 戊二醛溶液將血球固定 30 分鐘後、以水洗去固定液後，固定的血球在室溫下黑暗的環境中在鹼性磷酸酶試劑 (Sigma 86-R) 中反應 15 min。水洗 2 min 後，再以蘇木紫溶液對照染色，以甘油凝膠封片。

(五) β -葡糖苷酸酶 (β -Glucuronidase)

參考 Sigma 181-C 試劑套組建議之流程，並修改流程如下，以 1% 戊二醛溶液將血球固定 30 min 後，洗去固定液後，固定的血球在 37 °C 下黑暗的環境中在 β -葡糖苷酸酶試劑 (Sigma 181-C) 反應 90 min。經水洗，再以 0.14% 甲基藍 (methylene blue) 溶液對照染色。以甘油凝膠封片。

(六) 奈酚 AS-D 氯化乙酸酯酶 (Naphthol AS-D chloroacetate esterase)

參考 Sigma 91-C 試劑套組建議之流程，並修改流程如下，以 1% 戊二醛溶液將血球固定 30 min 後，以水洗去固定液後，固定的血球在 37 °C 下黑暗的環境中在奈酚 AS-D 氯化乙酸酯酶試劑 (Sigma 91-C) 中反應 15 min。經水洗，再以蘇木紫溶液對照染色，以甘油凝膠封片。

(七) α -奈酚乙酸酯酶 (α -Naphthyl acetate esterase)

參考 Sigma 91-A 試劑套組建議之流程，並修改流程如下，以 1% 戊二醛溶液將血球固定 30 min 後，以水洗去固定液後，固定的血球在 37°C 下黑暗的環境中在 α -奈酚乙酸酯酶試劑 (Sigma 91-A) 反應 30 min。經水洗，再以蘇木紫溶液對照染色，以甘油凝膠封片觀察。

(八) 過氧化酶 (Peroxidase)

參考 Sigma 391 試劑套組建議之流程，並修改流程如下，以 1% 戊二醛溶液將血球固定 30 min 後，洗去固定液後，固定的血球在室溫的環境中在過氧化酶試劑 (Sigma 391) 中反應 45 sec，水洗 30 sec 後，置於硝酸銅溶液 (copper nitrate, Sigma) 搖晃作用 2 min，水洗 30 sec，再以蘇木紫溶液對照染色，以封片膠封片。

四、血球免疫反應的評估

(一) 中性紅 (neutral red) 攝取

以本文材料方法二製備血球玻片，在玻片上滴入 60 μ l 8 ppm 中性紅溶液 (溶於無菌人工海水)，蓋上蓋玻片後直接在光學顯微鏡下觀察。

(二) 吞噬作用

以本文材料方法二製備血球玻片，在玻片上滴入 0.0025% (W/V) 螢光乳珠 (fluoresbrite carboxylate microspheres, 直徑 0.5 μ m; Funakoshi Co., Ltd) 溶液 (溶於無菌人工海水)，置於室溫下遮光培育 30 min 後，在 4 $^{\circ}$ C 下以 1% 戊二醛溶液固定 30 min，再以 May-Grünwald-Giemsa 染色，在螢光顯微鏡 (Olympus BX 50) 下觀察血球吞噬螢光乳珠的情形。

(三) 細胞內超氧離子 (O_2^-) 之產生

以本文材料方法二製備血球玻片，在玻片上滴入 NBT 溶液 [2% 氯化鈉、0.1% nitroblue tetrazolium salt (NBT, Sigma)、1% 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma)、0.03% 氯化鈣、0.15% 酵母多醣 (zymosan A, Sigma)]，在室溫下遮光培育 60 min 後，以無菌人工海水洗去未作用之 NBT。在 4 $^{\circ}$ C 下以 1% 戊二醛溶液將血球固定 30 min，再以 0.1% 核牢紅溶液進行核染色，以封片膠封片觀察。

牡蠣血球的化學染色、中性紅攝取和超氧離子產生等試驗皆在光學顯微鏡 (Olympus BH-2) 下觀察，所有試驗皆為計算視野下 100 顆血球中具活性或呈色反應的血球數。

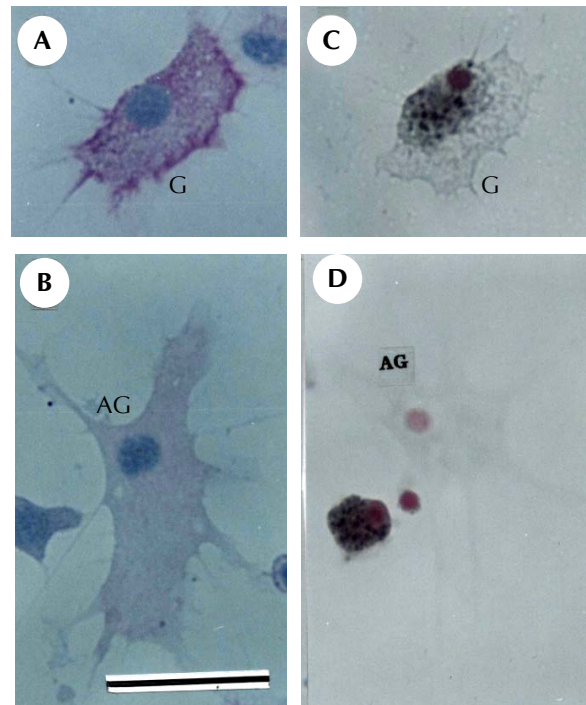


Fig. 1 Cytochemical staining in *C. angulata* hemocytes. (A, B) Periodic acid-schiff reaction; (C, D) Sudan black B reaction. G: granulocyte, AG: agranulocyte. Scale bar = 20 μ m.

結果

一、血球化學染色觀察

PAS 為多醣類的染色法，所有牡蠣血球的細胞質都呈紅色的 PAS 陽性反應，其中顆粒血球部分細胞質呈色較深，但顆粒並無呈色反應，而無顆粒血球細胞質呈色較淺且較均勻 (Fig. 1A & B)。蘇丹黑 B 可將含脂質的部分染成黑色，少量的牡蠣顆粒血球細胞質中可染出大小不一的黑色顆粒，非顆粒血球則呈陰性反應 (Fig. 1C & D)。Fig. 2 為血球酵素染色的觀察結果：六種酵素活性均存在顆粒血球內。酸性磷酸酶活性的反應呈紅棕色 (Fig. 2A)，約有 15% 血球具此酵素活性。鹼性磷酸酶的活性反應呈紅色 (Fig. 2B)，約 1% 血球中具此酵素活性反應的顆粒。 β -葡糖苷酸酶的活性反應呈紅色 (Fig. 2C)，約 3% 血球中具此酵素活性反應的顆粒。奈酚 AS-D 氯化乙酸酯酶的活性反應呈色為紅色 (Fig. 2D)，約 40% 血球具有活性反應的紅色顆粒， α -奈酚乙酸酯酶的活性反應呈色為黑色 (Fig. 2E)，約 10% 血球具有活性反應的黑

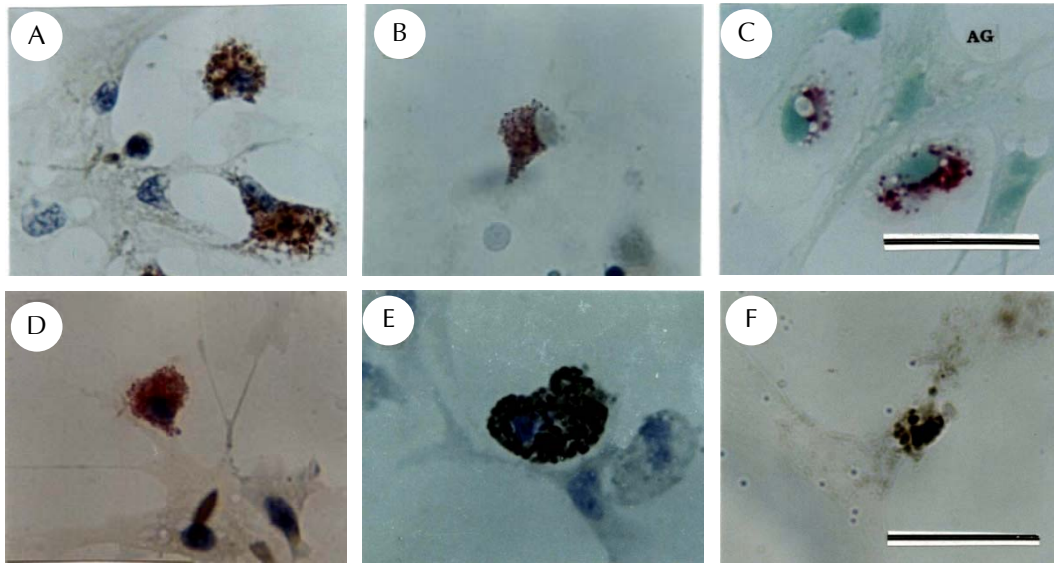


Fig. 2 Light micrographs of *C. angulata* hemocytes showing deposit of reaction of different enzymes. (A) Acid phosphatase; (B) Alkaline phosphatase; (C) β -glucuronidase; (D) Naphthol AS-D chloroacetate esterase; (E) α -naphthyl acetate esterase and (F) peroxidase. Scale bars = 20 μ m.

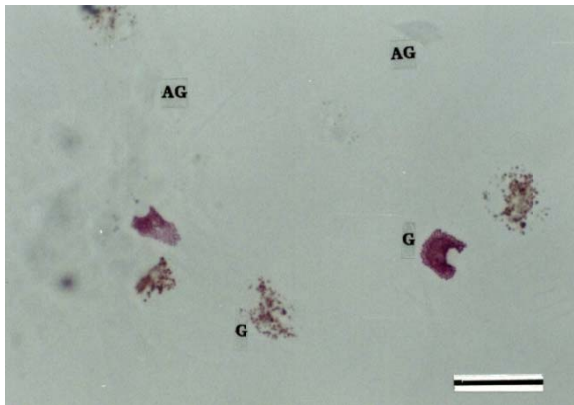


Fig. 3 Light micrographs of *C. angulata* hemocytes adhering on glass slide and showing *in vitro* uptake of neutral red. G: granulocyte; AG: agranulocyte. Scale bar = 50 μ m.

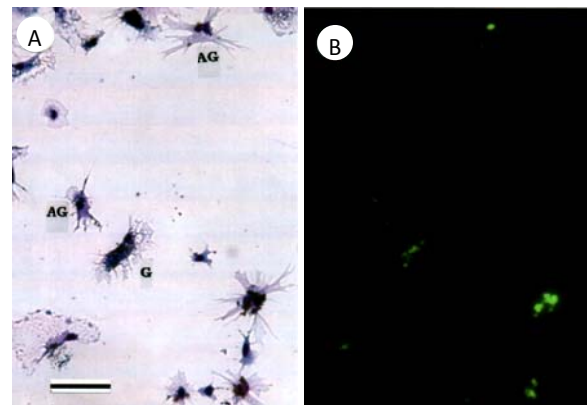


Fig. 4 Phagocytosis of *C. angulata* hemocytes. (A) Hemocytes stained with May-Grünwald-Giemsa phagocytosed fluorescent latex beads and (B) the same area under fluorescence microscopic observation. G: granulocyte; AG: agranulocyte. Scale bar = 20 μ m.

色顆粒。過氧化酶活性的呈色反應為褐黑色，只有少量的血球中出現具此酵素顆粒 (Fig. 2F)。牡蠣各種血球的化學染色呈色反應與所占比例結果彙總於 Table 1。

二、血球免疫反應的評估

中性紅為可以蓄積在溶酶體的陽離子染劑，可用來評估細胞的胞飲作用 (pinocytosis)。牡蠣的顆粒血球內有明顯的紅色顆粒存在，而非顆粒血

球中則較少或沒有呈色反應 (Fig. 3)。以螢光顯微鏡觀察血球吞噬作用的情形，於明視野下觀察血球種類 (Fig. 4A)，而在暗視野下觀察被吞噬之螢光乳珠的位置 (Fig. 4B)，在對比觀察下發現 100 顆血球中有 22 顆血球具吞噬螢光乳珠的能力，其中 9 顆為嗜鹼顆粒血球，13 顆為非顆粒血球。嗜鹼顆粒血球所吞噬的乳珠量可達十數個；非顆粒血球所吞噬的乳珠為一到數個；而嗜伊紅顆粒血球則沒有觀察到吞噬作用的發生。當血球受到酵母多醣的刺激而進行吞噬作用時，同時會產生超氧離

Table 1 Cytochemical staining and enzymatic reactions in each hemocytes types and percentages of positive cells in *C. angulata*. The number of positive hemocytes was determined after observing 100 hemocytes in microscope fields randomly chosen

Treatment	Granulocytes	Agranulocytes	Percentages of hemocytes
Periodic acid-schiff	+	+	100%
Sudan black B	+	—	Rare
Acid phosphatase	+	—	15%
Alkaline phosphatase	+	—	1%
β -glucuronidase	+	—	3%
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	+	—	40%
α -naphthyl acetate esterase	+	—	12%
Peroxidase	+	—	Rare

Table 2 Immune function in each hemocytes types and percentages of reactive cells in *C. angulata*. The number of reactive hemocytes was determined after observing 100 hemocytes in microscope fields randomly chosen

Assay	Granulocytes		Agranulocytes	Percentages of hemocytes
	EG	BG		
Neutral red uptake		+	—	36%
Phagocytosis				
fluorescent latex beads	—	+ (36%)	+ (20%)	22%
zymosan particles		+	+	85%
Superoxide anion production		+	+	85%

EG, eosinophilic granulocyte; BG, basophilic granulocyte

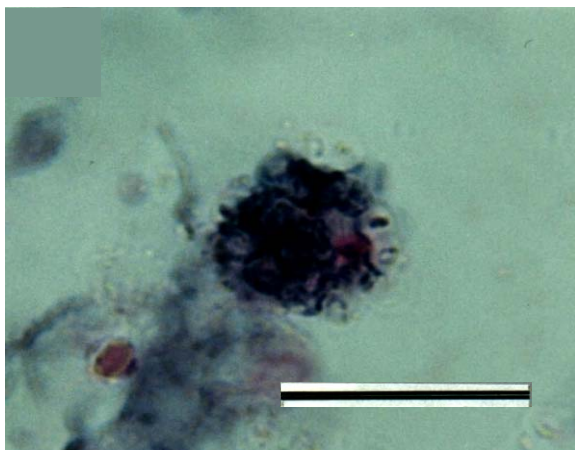


Fig. 5 The generation of superoxide anion in *C. angulata* hemocytes incubated with zymosan *in vitro* is indicated by the reduction of NBT formazan. Scale bar = 20 μ m.

子而將 NBT 還原成藍色不溶性的 formazan，因此會有藍色的呈色反應。大約有 85% 牡蠣血球具吞噬酵母多醣的能力且產生超氧離子，而這些細胞大多在聚集的細胞團裡 (Fig. 5)。牡蠣各種血球的免疫的活性反應與所佔比例結果彙總於 Table 2。

討 論

Chang *et al.* (2005) 已將台灣地區養殖的牡蠣血球分為嗜伊紅顆粒血球、嗜鹼性顆粒血球和非顆粒血球，其比例分別占總血球數量的 11%、25% 和 64%。本研究的多醣類染色結果顯示所有牡蠣血球的細胞質都呈 PAS 陽性反應，非顆粒血球的呈色反應分佈均勻，而顆粒血球的呈色不均勻且顏色較深。一些研究報告則指出顆粒血球會吞噬外來物質 (López *et al.*, 1997a; Lambert and

Nicolas, 1998), 外來物質的碳水化合物成分則被分解、聚合成肝醣 (Mohandas, 1985; Carballal *et al.*, 1997b), 肝醣顆粒會集結成團, 最後可能會被釋放到血淋巴中 (Carballal *et al.*, 1997b)。而 Wootton and Pipe (2003) 認為淺溝蛤 (*Scrobicularia plana*) 血球中呈 PAS 陽性反應的肝醣是能量的蓄積, 此能量可協助顆粒血球積極進行吞嚥作用。此二種說法皆間接證實了顆粒血球為主要執行吞嚥作用的血球。而在脂質染色中, 發現極少量的牡蠣顆粒血球呈陽性反應, Durliat (1985) 認為蝦類中顆粒呈蘇丹黑陽性反應的部分是凝血蛋白原 (coagulogen), 然而貝類並無凝血系統, 且多數貝類血球都觀察不到脂質的存在 (Barracco *et al.*, 1999), 因此其功能有待進一步的探討。

貝類血球酵素的生物學作用應具有防禦和消化雙重作用。除了探討其在防禦機制上的角色外, 這些血球內酵素的種類也常被用來區分二枚貝不同類型或不同發展階段的血球 (Granath and Yoshino, 1983; Cheng and Downs, 1988; Pipe, 1990)。葡萄牙牡蠣的血球含有鹼性磷酸酶、酸性磷酸酶、 β -葡糖苷酸酶、奈酚 AS-D 氯化乙酸酯酶和 α -奈酚乙酸酯酶等水解酵素, 而這些酵素主要位於牡蠣的顆粒血球中。

酸性磷酸酶是典型的溶酶體酵素 (de Duve *et al.*, 1963), Barracco *et al.* (1999) 也觀察到火腿殼菜蛤 (*Perna perna*) 顆粒血球的溶酶體 (lysosomal system) 含酸性磷酸酶, 其功能為分解細胞所吞嚥的外來物質。大多數的二枚貝中如溝紋蛤 (*Ruditapes decussatus*) (López *et al.*, 1997b)、地中海殼菜蛤 (*Mytilus galloprovincialis*) (Carballal *et al.*, 1997b)、美國牡蠣 (*C. virginica*) (Cheng and Downs, 1988) 和歐洲牡蠣 (*Ostrea edulis*) (Auffret, 1989) 的血球都含有高比例的酸性磷酸酶, 葡萄牙牡蠣也有 15% 血球具有酸性磷酸酶的活性。鹼性磷酸酶同樣被認為是貝類血球中溶酶體酵素的一種 (Pipe, 1990), 雖然許多貝類血球未觀察到具鹼性磷酸酶的活性 (Pampanin *et al.*, 2002; Wootton and Pipe, 2003), 而葡萄牙牡蠣 1% 的血球則發現具有鹼性磷酸酶的活性。

β -葡糖苷酸酶可水解細菌細胞壁成分中的酸性黏多醣, 被認為是重要的非特異性液性免疫分子 (Cheng, 1975), 而且多數貝類血球都有 β -葡糖

苷酸酶存在 (Cima *et al.*, 2000; Wootton and Pipe, 2003)。本試驗觀察到僅 3% 的血球具有 β -葡糖苷酸酶活性, 這些 β -葡糖苷酸酶活性反應出現在顆粒血球所含的顆粒中, 類似的結果也在 *R. decussatus* 中發現, 僅有 7% 的血球呈 β -葡糖苷酸酶陽性反應 (López *et al.*, 1997a)。而 Carballal *et al.* (1997b) 則利用電子顯微鏡觀察 *M. galloprovincialis* 血球, 證實了 β -葡糖苷酸酶確實存在於顆粒血球的顆粒中。

奈酚 AS-D 氯化乙酸酯酶 (Naphthol AS-D chloroacetate esterase) 為特異性酯酶, 人類的嗜中性白血球 (neutrophil) 和早期的顆粒血球則具有其活性, 而 α -奈酚乙酸酯酶為非特異性酯酶, 通常存在人類的單核血球 (monocyte) 中 (Li *et al.*, 1973)。本試驗發現, 葡萄牙牡蠣血球含有此二種酵素的比率相當高, 分別為 40% 與 12%, 且位於顆粒血球中。López *et al.* (1997a) 也發現 *R. decussatus* 中具有奈酚 AS-D 氯化乙酸酯酶和 α -奈酚乙酸酯酶活性的血球分別為 62% 和 59%。而 Carballal *et al.* (1997b) 利用電子顯微鏡觀察 *M. galloprovincialis* 血球, 發現奈酚 AS-D 氯化乙酸酯酶和 α -乙酸萘酚酯酶皆位於顆粒血球中。其他血球含非特異性酯酶的貝類如西洋海螂蛤 (*Mya arenaria*) (Huffman and Tripp, 1982) 和菲律賓蛤 (*Tapes philippinarum*) (Cima *et al.*, 2000) 等, 但不等殼毛蚶 (*Scapharca inaequalvis*) (Holden *et al.*, 1994) 則無。

過氧化酶為氧化酵素 (oxidase) 的一種, 存在脊椎動物和無脊椎動物的白血球中, 主要功能為分解吞嚥過程所產生的過氧化氫。Carballal *et al.* (1997b) 年利用電子顯微鏡觀察 *M. galloprovincialis* 血球, 發現酵素的活性反應在顆粒血球中顆粒的周圍或是中央處, 且在細胞膜上亦會有酵素活性的反應, 在透明球中則沒有酵素活性反應。在紫殼菜蛤 (*M. edulis*) (Coles *et al.*, 1994) 與 *S. inaequalvis* (Holden *et al.*, 1994) 也都是顆粒血球中觀察到過氧化氫的活性。雖然牡蠣的顆粒血球和非顆粒血球都具有吞嚥能力, 但卻只觀察到少量的顆粒血球具過氧化酶活性, 而且其染色性並不強, 此與 *S. plana* (Wootton and Pipe, 2003) 結果相似。

中性紅可藉由胞飲作用通過細胞膜, 然後在

溶酶體中累積，因此計算細胞所攝取中性紅的累積量可作為胞飲作用的指標 (Coles *et al.*, 1995)。而 Matozzo and Marin (2010) 也應用菲律賓簾蛤 (*Ruditapes philippinarum*) 血球對中性紅的攝取來探討雌雄貝之胞吞作用 (endocytosis) 能力的差異性。本試驗中，在牡蠣血球對中性紅攝取的觀察中發現，顆粒血球具有較多的紅色顆粒，而非顆粒血球的紅色顆粒較少或沒有呈色反應，顯示顆粒血球對外來物質的攝入較為活躍。此外，由於貝類暴露在污染的環境中，血球溶酶體膜的通透性因而改變，因此貝類血球的中性紅保持時間分析 (neutral red retention assay, NRR) 也常做為監測環境污染的指標 (Koukouzika and Dimitriadis, 2005; Matozzo *et al.*, 2012)。

吞嚥作用是二枚貝主要的防禦機制之一，許多報告指出二枚貝的血球可吞嚥細菌、藻類、酵母、人工酵母、乳珠等 (Moore and Gelder, 1985; Feng, 1988; Hinsch and Hunte, 1990; La Peyre *et al.*, 1995; Cheng, 1996; López *et al.*, 1997a)，但貝類對於各種外來物質的吞嚥能力並不相同，應與凝集素 (lectin) 協助血球對外來物質的辨識有關 (Adema *et al.*, 1991)。Wootten and Pipe (2003) 發現 *S. plana* 可吞嚥細菌，卻不會吞嚥酵母多醣。Carballal *et al.* (1997a) 卻發現 *M. galloprovincialis* 吞嚥酵母多醣的能力較強而對弧菌的吞嚥能力較低。而葡萄牙牡蠣的血球則對於酵母多醣的吞嚥能力很強，約有 85% 血球具吞嚥能力，卻僅 22% 血球會吞嚥螢光乳珠。

比較在不同種類血球的吞嚥能力發現，雖然許多非顆粒血球也具有吞嚥能力，但多數貝類中，如菲律賓簾蛤 (Cima *et al.*, 2000)、硬殼蛤 (*Mercenaria mercenaria*) (Tripp, 1992)、*P. perna* (Barracco *et al.*, 1999) 和 *R. decussatus* (López *et al.*, 1997b) 等，顆粒血球仍是較活躍的細胞。葡萄牙牡蠣 3 種血球中，嗜鹼顆粒血球吞嚥活性與能力最強，約 36% 細胞具吞嚥活性，所吞嚥的乳珠量可達數十個；其次為非顆粒血球具吞嚥活性的細胞約 20%，吞嚥的乳珠為一到數個；並未發現嗜伊紅顆粒血球具有現吞嚥乳珠的現象。但 *M. galloprovincialis* 的嗜酸性顆粒血球的吞嚥能力卻較嗜鹼性顆粒血球強，而非顆粒血球的吞嚥能力為最低 (Carballal *et al.*, 1997a)。雖然 Cheng (1981)

認為貝類血球的次族群可能處於不同成熟階段，但不論由形態或功能的探討，至今各種貝類間仍無一致性。

血球在吞入病原體後，會在細胞內產生活性氧以殺死所吞入的病原體，此時細胞耗氧量會突然升高，而稱為呼吸爆。在呼吸爆過程中，超氧離子是最早的產物，因此超氧離子的定量分析，可作為吞嚥作用的指標。許多貝類如 *M. edulis* (Pipe, 1992)、*M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997a) 和 *C. virginica* (Fisher *et al.*, 1996) 的血球都會產生超氧離子。而試驗也發現牡蠣在外源刺激 (酵母多醣) 下，可觀察到 formazan 的產生，由此了解牡蠣血球在行吞嚥作用時，也可利用活性氧以達到殺菌作用。但某些貝類卻觀察不到活性氧的產生，也可能與採樣的時間與方法或外來刺激物有關。如 *M. mercenaria* 和 *R. decussatus* 的血球可以吞嚥酵母多醣，但卻沒有發現活性氧的產生 (Anderson, 1994; López *et al.*, 1994)。而 Nakayama and Maruyama (1998) 利用 phorbol myristate acetate (PMA) 刺激圓碑碟蛤 (*Tridacna crocea*) 的血球，並不會產生活性氧。類似的結果也在 *M. arenaria* 和 *M. mercenaria* 的研究中發現，但 PMA 卻促進 *C. virginica* 血球產生活性氧的作用 (Anderson, 1994)。此外，活性氧的產生也常被用來評估污染物質對二枚貝血球免疫能力 (Winston *et al.*, 1996; Donaghy *et al.*, 2010) 的影響。

綜合上述，利用螢光乳珠的吞嚥作用和超氧離子的測定，發現非顆粒血球與顆粒血球皆有吞嚥能力，由於吞嚥作用後可能會在細胞質中留下肝醣，因此牡蠣血球皆呈 PAS 陽性。顆粒血球除了被觀察到胞飲作用較活躍、吞嚥能力較強、且 PAS 染色較深外，也呈現 6 種酵素陽性反應，顯示顆粒血球應為葡萄牙牡蠣體內執行細胞性免疫功能的主要血球。另外，葡萄牙牡蠣血球對中性紅的攝取、吞嚥螢光乳珠和酵母多醣的能力、以及吞嚥作用後超氧離子的產生，應可作為評估環境影響貝類免疫的參數。

參考文獻

- Adema, C. M., W. P. W. van der Knaap and T. Sminia (1991) Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity:

- the role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquat. Sci.*, 4: 201-223.
- Anderson, R. S. (1994) Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 89-96.
- Auffret, M. (1989) Comparative study of the hemocytes of two oyster species: the European flat oyster, *Ostrea edulis*, Linnaeus, 1750 and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *J. Shellfish Res.*, 8: 367-373.
- Bancroft, J. D. and A. Stevens (1982) Theory and practice of histological techniques (J. D. Bancroft and A. Stevens eds.), Churchill Livingstone, London.
- Barracco, M. A., I. D. Medeiros and F. M. Moreira (1999) Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 387-404.
- Carballal, M. J., M. C. López, C. Azevedo and A. Villalba (1997a) In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 403-416.
- Carballal, M. J., M. C. López, C. Azevedo and A. Villalba (1997b) Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 70: 96-105.
- Chang, S. J., S. M. Tseng and H. Y. Chou (2005) Morphological characterization via light and electron microscopy of the hemocytes of two cultured bivalves: a comparison study between hard clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Zool. Stud.*, 44: 144-153.
- Cheng, T. C. (1975) Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 266: 343-379.
- Cheng, T. C. (1981) Bivalves. *In Invertebrate Blood Cells* (N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley eds.), Academic Press, New York, 233-300.
- Cheng, T. C. (1996) Hemocytes: forms and functions. *In The Eastern Oyster Crassostrea virginica* (R. I. E. Newel, V. S. Kennedy and A. F. Eble eds.), Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland, 299-334.
- Cheng, T. C. and J. C. U. Downs (1988) Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 52: 163-167.
- Cima F, V. Matozzo, M. G. Marin and L. Ballarin (2000) Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum*: morphofunctional characterization. *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 677-693.
- Coles, J. A., S. R. Farley and R. K. Pipe (1994) Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.*, 30 (4): 367-379.
- Coles, J. A., S. R. Farley and R. K. Pipe (1995) Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Org.*, 22: 59-65.
- Durliat, M (1985) Clotting processes in Crustacea Decapoda. *Biol. Rev.* 60: 473-498.
- Donaghy, L., H. K. Hong, H. J. Lee, J. C. Jun, Y. J. Park and K. S. Choi (2010) Hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* a year after the Hebei Spirit oil spill oV the west coast of Korea. *Helgol. Mar. Res.*, 64:349-355.
- de Duve. (1963) The lysosome. *Sci. Am.* 208: 64-72.
- Feng, S. Y. (1988) Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, 18: 153-168.
- Fisher, W. S. (1986) Structure and functions of oyster hemocytes. *In Immunity in Invertebrates* (M. Brehélin, ed.), Springer-Verlag, Berlin, 25-35.
- Fisher, W. S., J. T. Winstead, L. M. Oliver, H. L. Edmiston and G. O. Bailey (1996) Physiological variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. *J. Shellfish Res.*, 15: 543-553.
- Granath, W. O. and T. P., Yoshino (1983) Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. *J. Exp. Zool.* 226(2): 205-210.
- Hinsch, G. W. and M. Hunte (1990) Ultrastructure of phagocytosis by hemocytes of the American oyster. *In Pathology in Marine Science* (F.O. Perkins and T.C. Cheng eds.), Academic Press, San Diego, 479-488.
- Holden, J. A., R. K. Pipe, A. Quagliua and G. Ciani (1994) Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequivalvis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 14: 287-299.
- Huffman, J. E. and M. R. Tripp (1982) Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clams (*Mya arenaria*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 40: 68-74.
- Koukouzika, N. and V. K. Dimitriadis (2005) Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: 'lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress'. *Ecotoxicol.*, 14: 449-463.

- Lambert, C. and J. L. Nicolas (1998) Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. J. Invertebr. Pathol., 71: 53-63.
- La Peyre, J. F., F. L. E. Chu and J. M. Meyers (1995) Haemocytic and humoral activities of eastern oyster and Pacific oyster following challenge by the protozoan *Perkinsus imarinus*. Fish Shellfish Immunol., 5: 179-190.
- Li, C. Y., K. W. Lam and L. T. Yam (1973) Esterases in human leukocytes. J. Histochem. Cytochem., 21:1-12.
- López, C., M. J. Carballal, C. Azevedo and A. Villalba (1997a) Enzyme characterization of the circulating haemocytes of *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). Fish Shellfish Immunol., 7: 595-608.
- López, C., M. J. Carballal, C. Azevedo and A. Villalba (1997b) Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). Dis. Aquat. Org., 30: 209-215.
- López, C., A. Villalba and E. Bachère (1994). Absence of generation of active oxygen radicals coupled with phagocytosis by the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). J. Invertebr. Pathol., 64: 188-192.
- Matozzo, V. and M. G. Marin (2010) First evidence of gender-related difference in immune parameters of the clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia). Mar. Biol., 157:1181-1189.
- Matozzo, V. A. Costa Devoti and M. G. Marin (2012) Immunotoxic effects of triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. Ecotoxicol., 21: 66-74.
- Mohandas, A. (1985) An electron microscope study of endocytosis mechanisms and subsequent events in *Mercenaria mercenaria* granulocytes. In Parasitic and Related Diseases (T. C. Cheng ed.), Plenum, New York, 143-161.
- Mohandas, A., T. C. Cheng and J. B. Cheng (1985) Mechanism of lysosomal enzyme release from *Mercenaria mercenaria* granulocytes: a scanning electron microscope study. J. Invertebr. Pathol., 46: 189-197.
- Moore, M. N. and D. M. Lowe (1977) The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. J. Invertebr. Pathol., 29: 18-30.
- Moore, C. A. and S. R. Gelder (1985) Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes. Trans. Am. Microsc. Soc., 104: 242-249.
- Nakayama, K. and T. Maruyama (1998) Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalve. Dev. Comp. Immunol., 22: 151-159.
- Pampanin, D. M., M. G. Marin and L. Ballarin (2002) Morphological and cytoenzymatic characterization of haemocytes of the Venus clam *Chamelea gallina*. Dis. Aquat. Org. 49(3): 227-234.
- Pipe, R. K. (1990) Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem. J., 22: 595-603.
- Pipe, R. K. (1992) Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev. Comp. Immunol., 16: 111-122.
- Tripp, M.R. (1992). Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. J. Invertebr. Pathol., 59: 222-227.
- Winston, G. W., M. N. Moore, M. A. Kirchin and C. Soverchia (1996) Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: Lysosomal localization and effect of xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol., 113C: 221-229.
- Wooten, E. C and R. K. Pipe (2003) Structural and functional characterisation of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana*. Fish Shellfish Immunol., 15:249-262.

Cytochemical and Immunological Studies of Hemocytes in Portuguese Oyster, *Crassostrea angulata*

Su-Jung Chang¹, Su-Min Tseng² and Hsin-Yiu Chou^{2*}

¹Freshwater Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute

²Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

The aims of this study were to examine the role of Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) hemocytes in the defense mechanism and to establish hemato-immunological parameters. Following cytochemical staining, the granulocytes and the agranulocytes exhibited a PAS positive reaction for polysaccharides; however, a lipid positive reaction was only observed in the granulocytes. The activities of acid phosphatase, alkaline phosphatase, β -glucuronidase, naphthol AS-D chloroacetate esterase, α -Naphthyl acetate esterase and peroxidase were observed in the granulocytes. In immunological assays, both of the granulocytes and the agranulocytes were able to phagocytose fluorescent latex beads and zymosan particles and produce superoxide anion against foreign agents. Moreover, the granulocytes exhibited greater phagocytic ability and more activity in the uptake of neutral red than agranulocytes. The basophilic granulocytes showed the strongest phagocytotic activity of fluorescent latex beads.

Key words: *Crassostrea angulata*, hemocytes, enzymatic activity, phagocytosis, superoxide anion

*Correspondence: Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University, 2, Pei-Ning Rd., Keelung 20224, Taiwan. TEL: (02)2462-2192 Ext. 5214; FAX: (02)2463-4176; E-mail: hychou@mail.ntou.edu.tw