

文蛤血球的細胞化學特性與免疫功能評估

張素容¹ · 陳鴻議² · 周信佑^{3*}

¹行政院農業委員會水產試驗所海水繁養殖研究中心

²行政院農業委員會水產試驗所海水繁養殖研究中心台西試驗場

³國立台灣海洋大學水產養殖學系

摘要

本研究的目的為探討文蛤 (*Meretrix lusoria*) 不同種類的血球在防禦機制中所扮演的角色，並建立其細胞免疫參數。文蛤兩種顆粒球與透明球都呈 periodic acid-Schiff 陽性反應，所有血球細胞都不帶 Sudan black B 陽性顆粒。在八種水解酶的染色，四種呈陽性反應，其中 acid phosphatase、 β -glucuronidase 和 naphthol AS-D chloroacetate esterase 等三種酵素存在於文蛤的顆粒球內； α -naphthyl butyrate esterase 則存在透明球中。98% 血球呈現 peroxidase 的陽性反應；37% 血球具有 phenoloxidase，但無法判定為何種血球所帶有。評估血球免疫反應，可觀察到血球的胞飲作用、吞噬作用，並可產生超氧陰離子來對抗外來物。其中，顆粒球攝取 neutral red 較為活躍，兩種顆粒球和透明球皆可吞噬螢光乳珠和 zymosan，但以嗜伊紅性小顆粒球吞噬能力較強。

關鍵詞：文蛤、血球、酵素活性、吞噬作用、超氧陰離子

前言

文蛤 (*Meretrix lusoria*) 為臺灣重要的養殖經濟貝類，主要養殖地區為臺灣西南沿海。自民國五十八年以來，每年農曆三、六、九月間，經常發生文蛤季節性大量死亡現象，死亡率高達 70~90%；近年來，更不時傳出養殖文蛤暴斃的情形，造成產業界重大的損失。推測文蛤大量死亡的原因，可能與環境緊迫、工業廢水及農藥的污染或病原菌的感染有關 (胡, 1974; 曾, 1976; 鄭, 1976; Kou *et al.*, 1989)，但至今仍無定論。Chou *et al.* (1994, 1998) 研究發現，溫度驟昇與重金屬的緊迫，會提高文蛤對低病原性的文蛤病毒之感受性，但是環境緊迫因子影響文蛤防禦能力的作用機制仍不清楚，亟待探討。

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。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。血球在辨識外來物質後，可進行包圍或吞噬 (Moore and Lowe, 1977; López *et al.*, 1997a)。被吞噬的物質可被細胞內溶酶體 (lysosome) 的水解酶所分解 (Huffman and Tripp, 1982; Carballal *et al.*, 1997a)，水解酶包括 acid phosphatase、alkaline phosphatase、 β -glucuronidase、esterase 等 (Moore and Gelder, 1985; López *et al.*, 1997b)。某些狀況下，這些水解酶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.*, 1997b)。

在先前的研究中，Chang *et al.* (2005) 已觀察臺灣養殖文蛤血球形態與特徵，並將其分類為嗜伊紅性大顆粒球 (large eosinophilic granulocyte, LEG)、嗜伊紅性小顆粒球 (small eosinophilic granulocyte, SEG)、透明球 (hyalinocyte, H) 和

*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

blast-like cell (BLC)。本研究進行文蛤血球的細胞化學染色，同時觀察不同種類血球對 neutral red 的攝取、吞噬作用與胞內超氧陰離子產生的差異，不僅可作為貝類血球分類的參考，更有助於了解各種血球在防禦機制中的功能，期能建立評估文蛤血球免疫能力的方法，可協助究明環境因子對貝類免疫的影響。

材料與方法

一、試驗動物

試驗用文蛤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，再進行試驗。

二、血淋巴抽取和血球玻片製作

以 26G 無菌注射針筒插入文蛤圍心腔抽取血淋巴，加入等體積滅菌人工海水（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，完成文蛤血球玻片之製作。

三、血球化學染色觀察

(一) Periodic acid-Schiff (PAS) 染色

參考 Sigma 395B 試劑套組之建議步驟，並修改如下，以 1% glutaraldehyde 溶液（溶於滅菌人工海水）於 4 °C 下固定血球 30 min，以蒸餾水洗去固定液，室溫下再以 1% periodic acid solution 浸泡 5 min。經水潤洗，以 Schiff's reagent 作用 15 min，流水洗 5 min，最後以 Gill 3 hematoxylin 對比染色後，Entellan 封片後觀察。

(二) Sudan black B 染色

在室溫下，以 10% formalin 溶液（溶於滅菌人工海水）固定血球 10 min，水洗去固定液，並經 50% 酒精浸泡 1 min 後，將玻片置於 0.5% Sudan black B 溶液（溶於 70% 酒精）作用 20 min (Bancroft and Stevens, 1982)，經 50% 酒精潤洗，隨後以 0.1% nuclear fast red 溶液進行核染色後，glycerin jelly 封片。

(三) Acid phosphatase (ACP)

參考 Sigma 181A 試劑套組建議之步驟，並修改如下，以 CAF 固定液 [25 ml citrate solution (pH3.6)、65 ml acetone、8 ml formalin] 在室溫下固定血球 30 min 後，水洗去固定液，固定的血球在 37 °C 黑暗環境下於 acid phosphatase 試劑中反應 5 hr。經水洗，再以 Gill 3 hematoxylin 對比染色，以 glycerin jelly 封片。

(四) Alkaline phosphatase (ALP)

參考 Sigma 86R 試劑套組建議之步驟，並修改如下，以 1% glutaraldehyde 溶液固定血球 30 min 後、水洗去固定液，固定的血球在室溫黑暗環境下於 alkaline phosphatase 試劑中反應 15 min。水洗 2 min 後，再以 Gill 3 hematoxylin 溶液對比染色，以 glycerin jelly 封片。

(五) β -Glucuronidase (β -GLU)

參考 Sigma 181C 試劑套組建議之步驟，並修改如下，以 1% glutaraldehyde 溶液固定血球 30 min 後，水洗去固定液，固定的血球在 37 °C 黑暗環境下於 β -glucuronidase 試劑中反應 90 min。經水洗，再以 0.14% methylene blue 溶液對比染色，以 glycerin jelly 封片。

(六) Naphthol AS-D chloroacetate esterase (NASDCE)

參考 Sigma 91C 試劑套組建議之步驟，並修改如下，以 1% glutaraldehyde 溶液固定血球 30 min 後，水洗去固定液，固定的血球在 37 °C 黑暗環境下於 naphthol AS-D chloroacetate esterase 試劑中反應 15 min。經水洗，再以 Gill 3 hematoxylin 對比染色，以 glycerin jelly 封片。

(七) α -Naphthyl acetate esterase (α -NAE)

參考 Sigma 91A 試劑套組建議之步驟，並修改如下，以 1% glutaraldehyde 溶液固定血球 30 min 後，水洗去固定液，固定的血球在 37 °C 黑暗環境下於 α -Naphthyl acetate esterase 試劑中反應 30 min。經水洗，再以 Gill 3 hematoxylin 對比染色，以 glycerin jelly 封片觀察。

(八) α -Naphthyl butyrate esterase (α -NBE)

參考 Sigma 181B 試劑套組建議之步驟，並修改如下，以 1% glutaraldehyde 溶液固定血球 30 min 後，水洗去固定液，固定的血球在 37 °C 黑暗環境下於 α -naphthyl butyrate esterase 試劑中反應 60 min。經水洗，再以 Gill 3 hematoxylin 對比染色，以 glycerin jelly 封片觀察。

(九) Arylsulphatase (ARS)

以 1% glutaraldehyde 溶液固定血球 30 min，水洗去固定液，固定的血球放入 0.1 M sodium acetate buffer (pH5.2) 10 min 後，在 37 °C 下於 arylsulphatase 溶液 (Goldfischer, 1965) 中反應 2 hr。經蒸餾水沖洗，再於 2.1% ammonium sulphide 溶液作用 2 min，經水洗、風乾後，以 glycerin jelly 封片觀察。

(十) 5'-Nucleotidase (5'-NT)

以 1% glutaraldehyde 溶液固定血球 30 min，水洗去固定液，固定的血球放入 0.2 M Tris-maleate buffer (pH7.2) 10 min 後，在 37 °C 下於 AMP 溶液 (Wachstein & Meisel, 1957) 中反應 2 hr。經蒸餾水沖洗，再於 2.1% ammonium sulphide 溶液作用 2 min，經水洗、風乾後，以 glycerin jelly 封片觀察。

(十一) Peroxidase (POD)

參考 Sigma 391 試劑套組建議之步驟，並修改如下，以 1% glutaraldehyde 溶液固定血球 30 min，水洗去固定液，固定的血球在室溫環境下於 peroxidase 試劑中反應 45 sec，水洗 30 sec 後，置於 copper nitrate 溶液搖晃作用 2 min，水洗 30 sec，再以 Gill 3 hematoxylin 對比染，以 Entellan 封片。

(十二) Phenoloxidase (PO)

以 1% glutaraldehyde 溶液固定血球 30 min，水洗去固定液，固定的血球在 L-dopa 溶液 (0.5 ppb L-dihydroxyphenyl-L-alanine/ 0.1 M phosphate buffer, pH7.2) 中反應 16 hr，水洗 30 sec 後風乾，以 Entellan 封片觀察。

四、血球免疫反應的評估

(一) Neutral red 攝取

在血球玻片上滴入 60 μ l 8 ppm neutral red 溶液 (溶於滅菌人工海水)，蓋上蓋玻片後直接在光學顯微鏡下觀察。

(二) 吞噬作用

1. 螢光乳珠 (fluorescent latex bead)

在血球玻片上滴入 0.0025% (W/V) 螢光乳珠 《fluoresbrite carboxylate microspheres (商品名)，直徑 0.5 μ m；Funakoshi Co., Ltd》溶液 (懸浮於滅菌人工海水)，於室溫下遮光培養 30 min 後，在 4 °C 下以 1% glutaraldehyde 溶液固定 30 min，再以 Wright's 染色，於螢光顯微鏡 (Olympus BX 50) 下觀察血球吞噬螢光乳珠的情形。

2. Zymosan

在血球玻片上滴入 0.1% zymosan A 溶液 (懸浮於滅菌海水)，於室溫培養 30 min 後，在 4 °C 下以 1% glutaraldehyde 溶液固定血球 30 min，再以 Wright's 染色，於光學顯微鏡下觀察血球吞噬 zymosan 的情形。

(三) 細胞內超氧陰離子 (O_2^-) 之產生

在血球玻片上滴入 NBT 溶液 [2% NaCl, 0.1% nitroblue tetrazolium salt (NBT), 1% Bovine serum albumin (BSA), 0.03% $CaCl_2$, 0.15% zymosan A]，於室溫下遮光培養 60 min 後，以滅菌人工海水洗去未作用之 NBT。在 4 °C 下以 1% glutaraldehyde 溶液固定血球 30 min，再以 0.1% nuclear red 溶液進行核染色，以 Entellan 封片觀察。

文蛤血球的化學染色、neutral red 攝取、對 zymosan 的吞噬作用和超氧陰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 300 顆血球中具活性或呈色反應的血球數。

結 果

一、血球化學染色觀察

Table 1 Cytochemical staining and enzymatic reaction in each hemocyte type and percentages of the positive cells in *Meretrix lusoria*. The number of positive hemocytes was determined after observing 300 hemocytes in randomly chosen microscope fields. LEG: large eosinophilic granulocyte, SEG: small eosinophilic granulocyte, H: hyalinocyte, BLC: blast-like cell. ND: not distinguishable

treatment	granulocyte		agranulocyte		percentage of hemocyte (%)
	LEG	SEG	H	BLC	
periodic acid-Schiff	+	+	+	—	97
Sudan black B	—	—	—	—	—
acid phosphatase	—	+	—	—	60
alkaline phosphatase	—	—	—	—	—
β -glucuronidase	+	—	—	—	3
naphthol AS-D chloroacetate esterase	—	+	—	—	1
α -naphthyl acetate esterase	—	—	—	—	—
α -naphthyl butyrate esterase	—	—	+	—	2
arylsuphatase	—	—	—	—	—
5'-Nucleotidase	—	—	—	—	—
peroxidase	+	+	+	—	98
phenoloxidase	ND	ND	ND	ND	37

PAS 為多醣類的染色法，大部分文蛤血球的細胞質都呈現紅色的 PAS 陽性反應。其中透明球呈色較淺但較均勻；顆粒球中有些血球則在細胞質部分較深染，而有些血球則是偽足的部份有特別深染的情形；只有 BLC 呈陰性反應 (Fig. 1 A, B)。Sudan black B 可將含脂質的部分染成黑色，四種文蛤血球細胞都不帶有脂質成分的顆粒 (Fig. 1C)。Fig. 2 為血球酵素染色的觀察結果：ACP 活性的反應呈紅棕色 (Fig. 2A)，約有 60% 血球具此酵素活性。 β -GLU 的活性反應呈紅色 (Fig. 2B)，約 3% 血球中具此酵素活性反應的顆粒。 α -NBE 的活性反應呈色為紅色 (Fig. 2D)，約 2% 血球具有活性反應的紅色顆粒， α -NBE 的活性反應呈色為紅色 (Fig. 2D)，約 2% 血球具有活性反應。POD 活性的呈色反應為黑褐色，98% 血球具有細小黑褐色酵素顆粒 (Fig. 2E)。PO 的呈色反應為黑色，約 37% 血球細胞核旁的區域呈陽性反應，而非形成顆粒狀。由於此種染色法不能對比染，因而無法進一步判定呈陽性反應的血球是顆粒球或非顆粒球 (Fig. 2F)。文蛤血球中並無 ALP、 α -NAE、ARS 和 5'-NT 陽性反應。文蛤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。

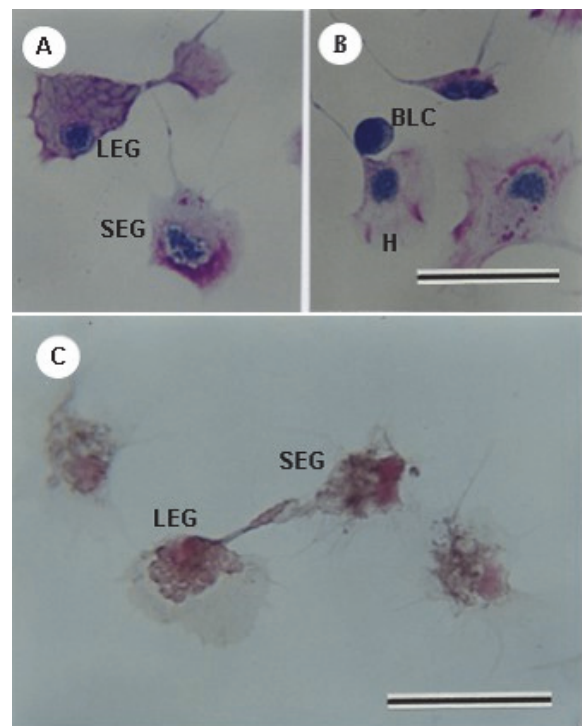


Fig. 1 Cytochemical staining in *Meretrix lusoria* hemocytes. (A, B) Periodic acid-Schiff reaction, (C) Sudan black B reaction. LEG: large eosinophilic granulocyte, SEG: small eosinophilic granulocyte, H: hyalinocytes, BLC: blast-like cell. Scale bar = 20 μ m.

Table 2 Immune function in each hemocyte type and percentages of the reactive cells in *Meretrix lusoria*. The number of reactive hemocytes was determined after observing 300 hemocytes in randomly chosen microscope fields. LEG: large eosinophilic granulocyte, SEG: small eosinophilic granulocyte, H: hyalinocyte, BLC: blast-like cell. ND: not distinguishable

assay	granulocyte		agranulocyte		percentage of hemocyte (%)
	LEG	SEG	H	BLC	
neutral red uptake	+	+	+	—	82
phagocytosis					
fluorescent latex beads	+	+	+	—	48
zymosan particles	+	+	+	—	79
superoxide anion production	ND	ND	ND	ND	23

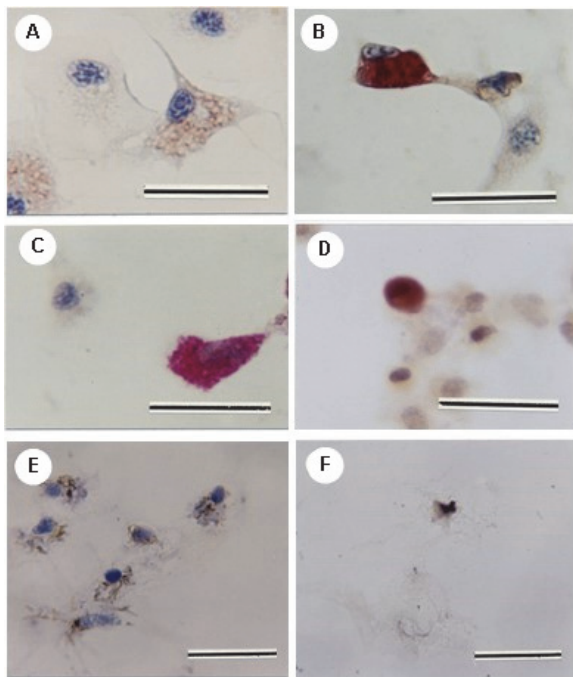


Fig. 2 Enzyme activity of *Meretrix lusoria* hemocytes. (A) acid phosphatase, (B) β -glucuronidase, (C) naphthol AS-D chloroacetate esterase, (D) α -naphthyl butyrate esterase, (E) peroxidase, and (F) phenoloxidase. Scale bars = 20 μ m.

二、血球免疫反應的評估

Neutral red 為可以蓄積在溶酶體的陽離子染料，可用來評估細胞的胞飲作用 (pinocytosis)。文蛤的顆粒球內有明顯的紅色顆粒存在，而非顆粒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)。觀察 300 顆血球細胞，

約有 48% 的血球具吞噬螢光乳珠的能力，其中以 SEG 的吞噬能力最強，可觀察到細胞內吞噬多顆螢光乳珠的情形；僅有極少量的 H 與 LEG 具吞噬能力，吞噬的螢光乳珠量也較少；而 BLC 則不具吞噬能力。

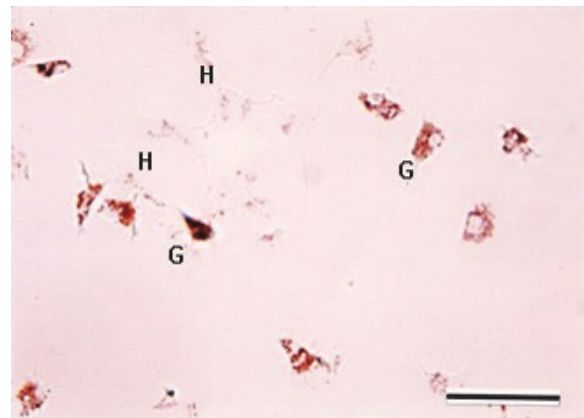


Fig. 3 Lysosomes of *Meretrix lusoria* hemocytes were vitally stained with neutral red. G: granulocyte, H: hyalinocyte. Scale bar = 50 μ m.

Zymosan 為酵母細胞壁上的一種多醣，可刺激血球的吞噬作用。在血球吞噬 zymosan 的結果則發現約 79% 血球細胞具吞噬能力，其中仍以 SEG 的吞噬比例最高，每個血球中所含的 zymosan 數量也較多；H 次之；而僅有極少量的 LEG 會吞噬 zymosan，所吞噬的也僅有 1~2 顆。相同地，BLC 亦不具吞噬 zymosan 的能力 (Fig. 4C)。當血球受到 zymosan 的刺激而進行吞噬作用時，同時會產生超氧陰離子而將 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 23%

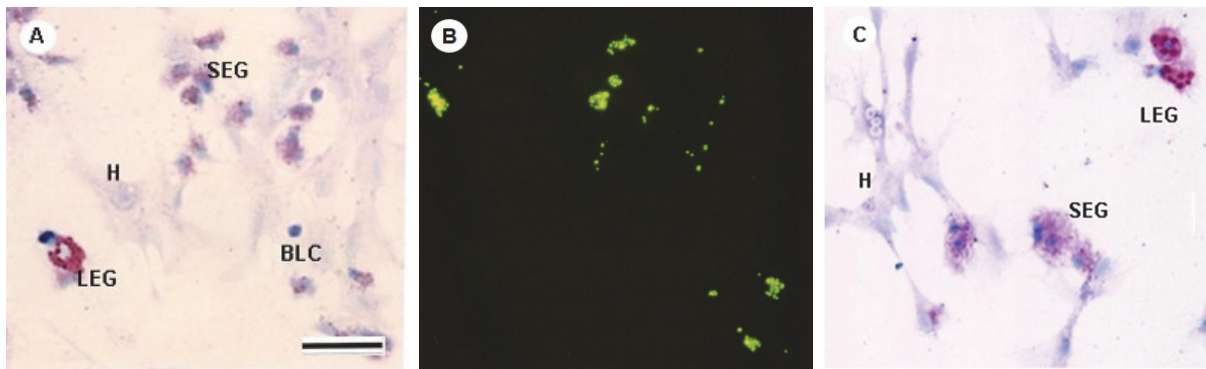


Fig. 4 Phagocytosis by *Meretrix lusoria* hemocytes. (A) Wright's stained hemocytes phagocytosed fluorescent latex beads; (B) the same area under fluorescence microscopic observation; and (C) Wright's stained hemocytes phagocytosed zymosan. LEG: large eosinophilic granulocyte, SEG: small eosinophilic granulocyte, H: hyalinocyte, BLC: blast-like cell. Scale bar = 20 μm .

文蛤血球具吞噬 zymosan 的能力且產生超氧陰離子 (Fig. 5)，而這些血球大多在聚集的細胞團裡。文蛤各種血球的免疫活性反應與所佔比例結果彙總於 Table 2。

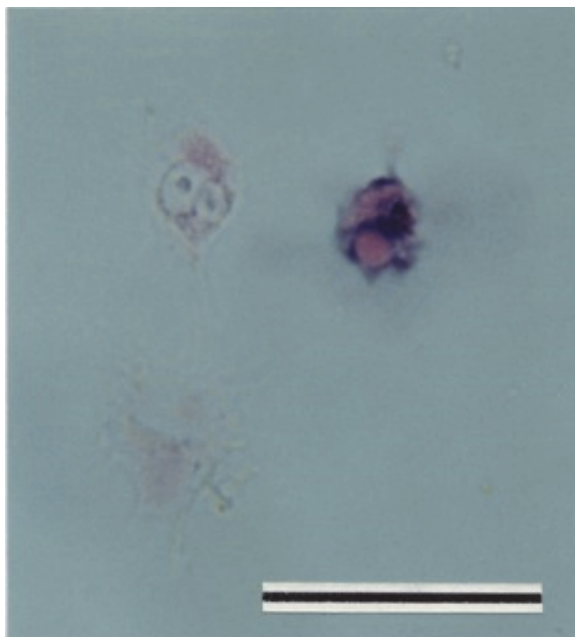


Fig. 5 Superoxide anion generation in *Meretrix lusoria* hemocytes incubated in vitro with zymosan, through the reduction of NBT to the blue insoluble pigment formazan. Scale bar = 20 μm .

討 論

Chang *et al.* (2005) 將文蛤血球分為顆粒球和非顆粒球，其中顆粒球可再分為 LEG 和 SEG，而

非顆粒球則分為 H 和 BLC，四種血球比例分別占總血球數量的 3%、64%、28% 和 5%。本研究的多醣類染色結果顯示除了 BLC 之外，其他血球的細胞質都呈 PAS 陽性反應，透明球的呈色反應分佈均勻，而顆粒球的呈色不均勻且顏色較深。一些研究報告則指出顆粒球會吞噬外來物質 (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)，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.*, 1997a)。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，此能量可協助顆粒球積極進行吞噬作用。而在 Sudan black B 染色中，文蛤血球和多數貝類相同，都觀察不到脂質顆粒的存在 (Barracco *et al.*, 1999)，雖然張等 (2013) 在葡萄牙牡蠣 (*Crassostrea angulata*) 血球中觀察到 Sudan black B 陽性反應的顆粒，而蝦類血球中顆粒呈 Sudan black B 陽性反應的部分是凝血蛋白原 (coagulogen) (Durliat, 1985)，但貝類並無凝血系統。

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)。文蛤血球的 8 種水解酶染色中，可觀察到 β -GLU 存在於 LEG、ACP 和 NASDCE 位於 SEG， α -NBE 主要位於 H 中，而各種血球都觀察不到 ALP、 α -NAE、ARS 和 5'-NT 的存在。 β -GLU 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體液性免疫分子 (Cheng, 1975)，Carballal *et al.* (1997a) 利用電子顯微鏡證實了 β -GLU 存在地中海殼菜蛤 (*Mytilus galloprovincialis*) 顆粒球的顆粒中。本試驗觀察文蛤血球細胞其中約有 3% 含有 β -GLU，且主要是出現在 LEG 中，由此可佐證 SEG 與 LEG 是兩種型態的血球。ACP 則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*) 顆粒球的溶酶體 (lysosomal system) 含 ACP，其功能為分解細胞所吞噬的外來物質。文蛤有 60% 血球具有 ACP 的活性，比例與 SEG 相似，顯示 ACP 出現 SEG 中且所佔比例相當高，因此推測 SEG 主要的酵素為 ACP。儘管 López *et al.* (1997b) 發現溝紋蛤 (*Ruditapes decussatus*) 中具有 NASDCE、 α -NAE 和 α -NBE 活性的血球比例相當高，分別為 62%、59% 和 11%，而這些酵素存在文蛤血球的比例則相當少或缺乏。1% 文蛤血球中有 NASDCE 的活性，NASDCE 為特異性酯酶，人類的嗜中性白血球 (neutrophil) 和肥大細胞 (mast cell) 具有其活性。 α -NBE 通常存在人類的單核血球 (monocyte) 和巨核細胞 (megakaryocyte) 中 (Li *et al.*, 1973)，2% 文蛤血球含有 α -NBE，且位於透明球中。

過氧化酶 (POD) 為氧化酵素 (oxidase) 的一種，存在脊椎動物和無脊椎動物的血球中，主要功能為分解吞噬過程所產生的過氧化氫。Carballal *et al.* (1997a) 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。而紫殼菜蛤 (*M. edulis*) (Coles *et al.*, 1994) 與不等殼毛蚶 (*Scapharca inaequalvis*) (Holden *et al.*, 1994) 也都是在顆粒球中觀察到過氧化酶的活性。大部分的文蛤血球細胞質都出現褐黑色過氧化酶活性的細小點狀沉澱，可能與 80% 文蛤血球都有吞噬能力有關。

酚氧化酶 (PO) 參與節肢動物的免疫是眾所皆知的，具有黑色素的形成和傷口的修復等功能 (Leonard *et al.*, 1985; Söderhäll *et al.*, 1994)，但在二枚貝免疫機制中所扮演的角色仍未知。並非所有貝類都可觀察到 PO 的存在 (Wootton and Pipe, 2003)，

但 *M. edulis* (Coles *et al.*, 1994; Holden *et al.*, 1994) 和紫貽貝 (*M. galloprovincialis*) (Carballal *et al.*, 1997b) 等貝類的血球都可觀察到 PO，Asokan *et al.* (1997) 也發現到翡翠貽貝 (*Perna viridis*) 具有 prophenoloxidase (pro PO) 系統，顯示此系統確實存在某些二枚貝中。貝類 PO 的功能包括可能參與菲律賓簾蛤 (*Ruditapes philippinarum*) 對抗 brown ring disease (BRD) 的病原 *Vibrio P1* (Paillard *et al.*, 1996)。Friebel & Renwartz (1995) 觀察 PO 存在 *M. edulis* 的嗜伊紅性顆粒球中。本試驗中觀察到 37% 的文蛤血球中具有 PO 的活性，由於此種染色法不建議對比染，因而無法進一步辨識帶有 PO 活性的是何種血球。而與本試驗結果相似地，López *et al.* (1997b) 也發現 *R. decussatus* PO 活性出現在血球細胞核的周圍而非呈顆粒狀。因此是否文蛤真的具有 pro PO 系統？另外 PO 在文蛤中免疫機制中究竟扮演何種角色？都需要更進一步的探討。

Neutral red 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 neutral red 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 *R. philippinarum* 血球對 neutral red 的攝取來探討雌雄貝之胞吞作用 (endocytosis) 能力的差異性。本試驗在文蛤血球對 neutral red 攝取的觀察中發現，顆粒球具有較多的紅色顆粒，而非顆粒球的紅色顆粒較少或沒有呈色反應，顯示顆粒球對外來物質的攝取較為活躍。此外若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 neutral red retention (NRR) 分析也常做為監測環境污染的指標 (Koukouzika and Dimitriadis, 2005; Matozzo *et al.*, 2012)。

吞噬作用是二枚貝重要的防禦機制，一般認為主要是由顆粒球參與及行細胞內物質的分解 (Cheng, 1975; Auffret, 1989)。雖然美國牡蠣 (*Crassostrea virginica*)、硬殼蛤 (*Mercenaria mercenaria*) 和 *R. decussatus* 的透明球和顆粒球皆有吞噬的能力，但顆粒球的吞噬能力比透明球來的好 (Foley and Cheng, 1975; Lopez *et al.*, 1997a; Tirpp, 1992)。觀察文蛤血球吞噬螢光乳珠與 zymosan 情形，文蛤除了 BLC 不具吞噬活性外，其餘 LEG、SEG 與 H 皆有吞噬能力，但以

SEG 吞噬活性與能力最佳。而文蛤血球對於各種外來物質的吞噬能力也不相同，約有 79% 血球會吞噬 zymosan，只有 48% 血球會吞噬螢光乳珠。Wootten and Pipe (2003) 發現 *S. plana* 可吞噬細菌，卻不會吞噬 zymosan，但 Carballal *et al.* (1997b) 卻發現 *M. galloprovincialis* 吞噬 zymosan 的能力較強而對弧菌的吞噬能力較低，可能與凝集素 (lectin) 協助血球對外來物質的辨識有關 (Adema *et al.*, 1991)。

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，超氧陰離子是最早的產物，因此超氧陰離子的定量分析，可作為吞噬作用的指標。許多貝類如 *M. edulis* (Pipe, 1992)、*M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997b) 和 *C. virginica* (Fisher *et al.*, 1996) 的血球都會產生超氧陰離子。而本試驗也發現文蛤在 zymosan 的外源刺激下，可觀察到 formazan 的產生，由此了解文蛤血球在行吞噬作用時，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和方法或外來刺激物有關。如 *M. mercenaria* 和 *R. decussatus* 的血球可以吞噬 zymosan，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) 刺激圓碑礫蛤 (*Tridacna crocea*) 的血球，並不會產生活性氧。類似的結果也在海蜆 (*Mya 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的影響 (Winston *et al.*, 1996; Donaghy *et al.*, 2010)。

綜合上述，應用吞噬作用的觀察和超氧陰離子的產生，發現非顆粒球的透明球 (H) 與 LEG 和 SEG 兩種顆粒球皆有吞噬能力，並可在細胞內觀察到過氧化酶的存在。由於吞噬作用後可能會在細胞質中留下肝醣，因此文蛤血球皆呈 PAS 陽性。顆粒球中的 SEG 除了被觀察到胞飲作用較活躍、吞噬能力較強、且 PAS 染色較深外，也呈現 2 種水解酶陽性反應；LEG 顆粒內含的水解酶和 SEG 不同，應為兩種型態的血球。文蛤血球具有酚氧化酶活性，其功能則需進一步探討。另外，分析文蛤

血球對 neutral red 的攝取、吞噬螢光乳珠和 zymosan 的能力、以及吞噬作用後超氧陰離子的產生，應可作為評估環境變化影響貝類免疫的參數。

參考文獻

- 胡華興 (1974) 臺灣西南沿海養殖貝類斃死調查研究。臺灣省水產試驗所試驗報告, 23: 1-19.
- 張素容, 曾淑敏, 周信佑 (2013) 葡萄牙牡蠣血球細胞化學與免疫的研究。水產研究, 21 (1): 25-34.
- 曾文陽 (1976) 臺灣西南沿岸養殖貝類大量死亡原因之研究。臺灣省水產試驗所試驗報告, 26: 1-35.
- 鄭森雄, 王松賓 (1976) 臺灣中部海岸之水質與養殖貝類之大量死亡。臺灣水產學會刊, 5(1): 61-70.
- 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.
- Asokan, R., M. Arumugam and P. Mullainadhan (1997) Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. Dev. Comp. Immunol., 21: 1-12.
- 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) Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. J. Invertebr. Pathol., 70: 96-105.
- Carballal, M. J., M. C. López, C. Azevedo and A. Villalba (1997b) In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk haemocytes. Fish Shellfish Immunol., 7: 403-416.
- 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.
- Chou, H.Y., S.J. Chang, H.Y. Lee and Y.C. Chiou (1998) Preliminary evidence for the effect of heavy metal cations on the susceptibility of hard clam, *Meretrix lusoria*, to clam birnavirus infection. Fish Pathol., 33: 213-219.
- Chou, H.Y., H.Y. Lee and C.F. Lo (1994) Pathogenicity of a birnavirus to hard clam, *Meretrix lusoria*, and effect of temperature stress on its virulence. Fish Pathol., 29: 171-175.
- 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.
- 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.
- Foley, D.A. and T.S. Cheng (1975) A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. J. Invertebr. Pathol., 25: 189-197.
- Friebel, B. and L. Renwranz (1995) Application of density gradient centrifugation for separation of eosinophilic and basophilic hemocytes from *Mytilus edulis* and characterization of both cell groups. Comp. Biochem. Physiol., 112A: 81-90.
- Goldfischer, S. (1965) The cytochemical demonstration of lysosomal arylsulfatase activity by light and electron microscopy. J. Histochem. Cytochem., 13: 520-523
- 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.
- 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.
- Kou, G. H., S. N. Chen and C. F. Lo (1989) Fish and shellfish viral disease research in Taiwan. J. Fish. Soc. Taiwan, 16: 303-312.
- 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.
- Leonard, C., N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley (1985) The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. J. Insect Pathol., 31(10): 789-799.
- 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) 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., M. J. Carballal, C. Azevedo and A. Villalba (1997b) Enzyme characterization of the circulating haemocytes of *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 595-608.
- 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.*, 58: 219-230.
- 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 photosymbiotic and non-symbiotic bivalve. *Dev. Comp. Immunol.*, 22: 151-159.
- Paillard, C., K. A. Ashton-Alcox and S. E. Ford (1996) Changes in bacterial densities and hemocyte parameters in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease. *Aquat. Living Resour.*, 9: 145-158.
- 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.
- Söderhäll, K., L. Cerenius and M. W. Johansson (1994) The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 712: 155-161.
- Tripp, M. R. (1992) Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Invertebr. Pathol.*, 59: 222-227.
- Wachstein, M. and E. Meisel (1957) Histochemistry of hepatic phosphatase at a physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Pathol.*, 27: 13-23.
- 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.
- Wootton, 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 Functional Characterization of Hemocytes in Hard Clam (*Meretrix lusoria*)

Su-Jung Chang¹, Hung-Yee Chen² and Hsin-Yiu Chou^{3*}

¹Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

²Taishi station, Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

³Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

This study examined the role of hard clam (*Meretrix lusoria*) hemocytes in the immune defense mechanism, and sought to establish the hemato-immunological parameters. In cytochemical staining, two types of granulocytes (large and small eosinophilic granulocytes) and the hyalinocyte exhibited the periodic acid-Schiff positive reaction for polysaccharides, and all four types of hemocytes contained no granule with a Sudan black B positive signal. Acid phosphatase, β -glucuronidase, and naphthol AS-D chloroacetate esterase activity was found in the granulocytes, while only α -naphthyl butyrate esterase activity was found in hyalinocytes. 98% of the hemocytes tested positive for peroxidase activity. Approximately 37% of the cells exhibited a positive reaction for phenoloxidase, but which type of hemocyte the enzyme was located in was uncertain. In immunological assays, pinocytosis, phagocytosis and superoxide anion generation of the hemocytes were observed. The granulocytes have more activity than hyalinocytes in the uptake of neutral red. While the granulocytes and hyalinocytes were able to phagocytose fluorescent latex beads and zymosan particles, small eosinophilic granulocyte had a stronger phagocytic ability.

Key words: *Meretrix lusoria*, hemocyte, enzyme 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