

# 流式细胞术在双壳贝类免疫研究中的应用

龚秀琼<sup>1,2</sup>, 李霄霞<sup>3</sup>, 耿倩倩<sup>1</sup>, 谭志军<sup>1</sup>, 姚琳<sup>1</sup>, 江艳华<sup>1</sup>, 曲梦<sup>1</sup>, 李凤铃<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 青岛 266071;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 3. 青岛大学青岛医学院, 基础医学院, 青岛 266071)

**摘要:** 双壳贝类作为重要的水产品经济物种和生态指示物种在全球范围内得到广泛养殖, 由于其具有重要的经济价值及在生态毒理学中的环境指示作用, 其免疫能力逐渐受到越来越多的关注。血细胞作为双壳贝类先天免疫的主要参与者, 其细胞活力、吞噬能力、粘附能力、总血细胞数量及过氧化物酶活性等的检测成为探索双壳贝类免疫研究的重要内容。其中, 流式细胞术(flow cytometry, FCM)具有分析速度快、灵敏度高、检测量大、客观性强等技术特点, 是一种较为理想的细胞学研究工具。本文结合国内外近年来关于 FCM 在双壳贝类免疫研究中的应用, 介绍了 FCM 的发展历史、双壳贝类免疫学的研究进展及 FCM 在双壳贝类免疫研究的应用, 总结了 FCM 在样品处理和检测中亟待解决的问题, 以期 FCM 在未来贝类免疫学研究中不断完善和发展, 并在贝类食品质量安全评估中发挥重要作用。

**关键词:** 流式细胞术; 贝类; 免疫; 血细胞

## Application of flow cytometry in researches on bivalves immune

GONG Xiu-Qiong<sup>1,2</sup>, LI Xiao-Xia<sup>3</sup>, GENG Qian-Qian<sup>1</sup>, TAN Zhi-Jun<sup>1</sup>, YAO Lin<sup>1</sup>,  
JIANG Yan-Hua<sup>1</sup>, QU Meng<sup>1</sup>, LI Feng-Ling<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;  
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. School of Basic Medicine, Qingdao Medical School, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**ABSTRACT:** Bivalves are widely cultured worldwide as an important economic species of aquatic products and ecological indicator species, and their immunity is gradually receiving more and more attention due to their economic importance and their environmental indicator role in ecotoxicology. As a major player in the innate immunity of bivalve shellfish, the detection of cell viability, phagocytosis, adhesion capacity, total blood cell count and peroxidase activity has become an important part of the research to explore the immunity of bivalve shellfish. Among them, flow cytometry (FCM) is a more ideal tool for cytological research because of its technical characteristics such as fast analysis, high sensitivity, large detection volume and objectivity. This paper introduced the development history of FCM, the research progress of bivalve shellfish immunology and the application of FCM in bivalve shellfish immunology, and summarized the problems to be solved in sample processing and detection, with a view to

**基金项目:** 山东省自然科学基金项目(ZR2020MD087)、现代农业产业技术体系专项(CARS-49)、中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD71)

**Fund:** Supported by the Shandong Provincial Natural Science Foundation of China (ZR2020MD087), the Earmarked Fund for CARS (CARS-49), and the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund of China Academy of Fishery Sciences (2020TD71)

\***通信作者:** 李凤铃, 博士, 副研究员, 主要研究方向为新污染物的安全评价及防控技术。E-mail: lifl@ysfri.ac.cn

\***Corresponding author:** LI Feng-Ling, Ph.D, Associate Professor, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China. E-mail: lifl@ysfri.ac.cn

improving and developing FCM in future shellfish immunology research and playing an important role in shellfish food quality and safety assessment. The results showed that FCM can play an important role in shellfish quality and safety assessment.

**KEY WORDS:** flow cytometry; shellfish; immune; hemocytes

## 0 引言

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一种可单个快速检测流动中的细胞或颗粒物质的细胞分析技术<sup>[1]</sup>, 主要用于许多科学领域, 尤其是生物技术和医学<sup>[2]</sup>, FCM 可以从混合物中识别多个表型子集, 选择单个细胞, 甚至通过细胞分选分离不同细胞, 是开展细胞学研究的重要分析工具。历经初级的流式荧光技术、流式细胞分选技术、流式细胞荧光分选技术(fluorescence activated cell sorting, FACS)等阶段<sup>[3]</sup>。其中, FACS 技术是通过流式细胞仪快速检测并识别被荧光标记后的抗体, 从而在混合细胞中分选和富集出单一类型的细胞<sup>[4]</sup>, 已被大量用于许多领域的单细胞分离, 成为分析单细胞的首选技术, 并在人类基因组计划开展过程中做出了重大贡献。自 20 世纪 80 年代以来, FCM 开始向高精尖、易操作化、小型化、用途多样化和低成本几个方向发展, 流式细胞仪的检测性能、多参数测量能力和分选能力也随之得到显著发展<sup>[5-6]</sup>, 尤其伴随着荧光染色技术的日益成熟, FCM 在多个研究领域得到广泛应用, 对脊椎动物免疫学的研究起到了重要的推动作用<sup>[7]</sup>。

双壳贝类作为重要的水产品经济物种和生态指示物种在全球范围内得到广泛养殖, 由于其具有重要的经济价值及在生态毒理学中的环境指示作用, 其免疫能力逐渐受到越来越多的关注。双壳贝类属于底栖生物, 滤食性动物, 相比于其他海洋生物, 更容易蓄积自然界中难以降解的且易于在生物体内蓄积的污染物, 严重影响贝类食品质量与安全。双壳贝类受到污染物的胁迫, 将激发免疫防御反应, 免疫指标随之发生变化, 如吞噬、包囊及免疫黏附、氧化应激等, 甚至导致免疫损伤。众所周知, 双壳贝类作为无脊椎动物, 只有先天免疫, 无特异性免疫; 免疫防御依靠细胞和体液成分介导, 由细胞免疫和体液免疫共同组成免疫防御系统以抵御外界刺激。研究表明, 在贝类免疫防御中抵御外界刺激并做出相应反应的主要承担者是血细胞, 血细胞承担了吞噬、包囊及免疫黏附等主要的生物学功能<sup>[8-10]</sup>。同时, 由于血细胞及血淋巴可释放凝集素、抗菌肽、调理素及多种水解酶等参与体液免疫的活性因子, 所以血细胞在体液免疫中也具有非常重要的作用<sup>[11]</sup>。双壳贝类的血液循环为开管式循环, 其血液直接暴露于水环境中, 在污染物的运输和防御机制中发挥生理作用<sup>[12]</sup>, 因此, 检测双壳贝类血细胞免疫参数, 对进一步评估贝类食品质量安全及环境风险具有实际意义。在早期研究中, 贝类血细胞的观察

及鉴定主要是在光学或电子显微镜下直接观察, 或者采用组织化学染色技术。直至 20 世纪 90 年代, 随着 FCM 的发展, 贝类生物学家开始应用该技术对贝类血细胞进行研究, 但当时也仅限于细胞的分类、亚型的鉴定及活性分析等研究。目前, 随着 FCM 的日益成熟及荧光染色技术的发展, 逐渐扩展到血细胞计数、吞噬能力、凋亡鉴定及 DNA、蛋白质含量分析等<sup>[13]</sup>。然而, 关于 FCM 应用于贝类免疫学的研究虽已有一些报道, 但在贝类免疫学的研究领域, 它仍然是一种相对较新的技术, 规范化的操作流程、样品前处理、荧光染色及免疫指标的验证仍较为缺乏。因此, 建立完善的、规范的、系统的流式细胞检测技术有利于推动贝类免疫学的进一步研究, 为贝类产业的健康发展提供理论依据, 并为食品安全评估提供可供选择的技术手段。

## 1 FCM 检测原理及类型

由于 FCM 灵敏度和精确度较高, 且随着仪器设备、软件操作和荧光染色、光电测量等技术的不断提升, 可对细胞或类似细胞大小的颗粒状物质进行单个连续快速检测, 因而逐渐被应用于血液学<sup>[14-15]</sup>、食品工业<sup>[16]</sup>、病毒学<sup>[17]</sup>、病理学<sup>[13]</sup>、植物生物学<sup>[18]</sup>、微生物学<sup>[19]</sup>、海洋生物学<sup>[20]</sup>和分子生物学<sup>[21]</sup>。目前也成为了免疫学研究中的重要工具。

FCM 的基本原理是被荧光染色标记的细胞或颗粒通过流体系统的运输, 单个排列并进入激光照射的检测点, 通过激光照射后细胞内会产生荧光信号, 这些荧光信号被流式细胞仪收集并进行测量、转换和分析, 最后将分析结果以直方图或点阵图的形式直观地呈现出来。流式细胞仪可分为分析型流式细胞仪和分选型流式细胞仪两种类型。分析型流式细胞仪通常由液流系统、光电系统和计算机系统组成, 分选型流式细胞仪在分析型流式细胞仪的基础上增加了具备分选功能的分选系统<sup>[22]</sup>。流式细胞仪所检测的散射光分为前向散射光(forward scattering, FSC)和侧向散射光(side scattering, SSC)。FSC 能够反映细胞大小, 与细胞大小成正相关, FSC 越强则细胞直径越大, FSC 越弱则细胞直径越小; 而 SSC 反映细胞内颗粒复杂程度, 与细胞内颗粒复杂程度成正相关, SSC 越强则细胞内颗粒结构越复杂, SSC 越弱则细胞内颗粒结构越简单。而荧光信号的强度则与所待测细胞与荧光染料结合程度有关<sup>[23]</sup>。在贝类免疫学分析中, 传统的方法是依靠显微镜进行观察分析的, 而这一方法无疑是耗时耗力且受主观因素影响较大的, FCM 与之相比更为适用于贝类的免疫研究之中。

## 2 FCM 在贝类免疫生物学中的应用

双壳贝类的循环系统属于开放式循环系统,对疾病等应激源的反应主要由血细胞介导,免疫防御主要依靠以血细胞为基础的非特异性免疫。为深入认识贝类免疫防御机制,研究血细胞的形态、结构及功能具有必要性。近年来,FCM 作为一种现代新兴技术被国内外贝类生物学家引入到贝类血细胞免疫功能的研究中,从简单的细胞总数和细胞活力研究到描述细胞亚群的特征,并进一步扩展到 DNA 含量、吞噬作用、氧化应激和凋亡的分析<sup>[12]</sup>,推动了贝类免疫学的发展。

### 2.1 FCM 在贝类总血细胞计数和血细胞分类中的应用

#### 2.1.1 血细胞总数

血细胞作为贝类主要的免疫效应细胞,在贝类的先天免疫系统中扮演着至关重要的角色。在进行贝类免疫学分析时,血细胞数量是衡量贝类免疫状态的一个重要指标<sup>[24]</sup>。血细胞总数的变化可反映贝类是否受到环境压力或病原体的侵袭。因此,血淋巴中总血细胞计数(total haemocyte count, THC)在贝类免疫学中可作为反映贝类健康状态的重要免疫学参数。显微镜观察法是血细胞计数的经典计数方法,但这一方法容易受到主观因素的影响,导致计数不准确等问题,且操作相对费时费力。而 FCM 作为一种高效、快速、准确的检测手段,为研究者们提供了更为便捷、高效、快速的总血细胞计数方法。SOUDANT 等<sup>[25]</sup>利用 FCM 测定了不同季节和饲养地点的菲律宾蛤仔(*Venerupis philippinaru*)总血细胞数量,发现 THC 既受生长地域的影响也受季节变化的影响。KIM 等<sup>[26]</sup>在研究产卵应激对贝类免疫能力的影响时利用 FCM 检测血蛤(*Tegillarca granosa*)产卵后的 THC,发现产卵作为一种应激活动会导致血液中的免疫能力下降。DUCHEMIN 等<sup>[27]</sup>使用 FCM 检测了不同季节的二倍体和三倍体太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)血细胞的 THC,结果显示,THC 具有明显的季节性变化,三倍体太平洋牡蛎对环境胁迫的敏感性低于二倍体太平洋牡蛎。不同研究的检测结果显示,FCM 提供了一种快速、简单、方便的血细胞计数方法,为检测双壳贝类在受外界刺激或环境改变的影响下其血细胞总数的变化提供了便利手段,同时也为评估贝类健康状态提供依据。另外,THC 也常与其他参数,如细胞活性、细胞凋亡及吞噬活性、活性氧等,共同评估贝类的健康状态。

#### 2.1.2 血细胞分类

在贝类免疫分析中,为进一步研究血细胞的免疫功能,血细胞的分类、细胞亚群的鉴定常作为学者们研究的重要内容,但至今没有统一的分类标准。FCM 鉴定细胞亚群是根据反映不同类型细胞大小的 FSC 和反映细胞内颗粒复杂程度的 SSC 两个重要的形态学参数特性的不同而

在 FSC-SSC 散点图中形成不同的细胞亚群,根据血细胞的 FSC-SSC 散点图即可判断血细胞的不同亚群。因此,FCM 能快速地分辨出贝类血细胞的大小和颗粒性,而传统的显微镜观察法则容易受主观因素的影响产生实验假象或不稳定性。国内外已有大量学者采用流式细胞仪对多种贝类的血细胞进行分类,如国外学者研究的美洲牡蛎、贻贝、太平洋牡蛎等<sup>[28-30]</sup>,国内学者研究的中国蛤蜊、贻贝、扇贝等<sup>[31-34]</sup>。根据以上报道,通过流式细胞仪可将贝类血细胞基本分为透明细胞和颗粒细胞,其中颗粒细胞还可以进一步细化,分为大、中、小 3 种类型的颗粒细胞。如 KLADCHENKO 等<sup>[35]</sup>和 ROLTON 等<sup>[36]</sup>将贻贝(*Mytilus galloprovincialis* Lmk)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* L)的血细胞分为粒细胞和透明细胞两个主要亚群细胞,刘东武等<sup>[37]</sup>将菲律宾蛤仔的血细胞分为透明细胞、小颗粒细胞、中颗粒细胞和大颗粒细胞 4 类,许秀芹等<sup>[38]</sup>将太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的血细胞分为透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞 3 类。可见,虽然贝类血细胞的类型及分类标准目前尚不统一,但 FCM 已以其快速精确的优势在血细胞亚型鉴定和免疫功能研究中发挥出重要的作用。

### 2.2 FCM 在贝类血细胞免疫功能研究中的应用

#### 2.2.1 细胞活性与细胞凋亡

细胞活性即血细胞样品中健康细胞所占的比例,是评估贝类健康状况的重要参数。在测定细胞活性时,由于活细胞的细胞膜完整且具有选择透过性,染料无法穿过细胞膜进入健康细胞内部,而死细胞相反,染料可以轻松进入细胞到达细胞核。因此,研究者们常使用细胞核染色法以评估细胞的活性。目前来说,常用的细胞活性测定方法有台盼蓝染色法、噻唑兰(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)比色法、四唑氮氢氧化物(xtt sodium, XTT)比色法等。其中,台盼蓝染色法需要利用显微镜进行计数,相比 FCM,显微计数耗时较多且易因主观判断波动而造成误差;MTT、XTT 比色法测定结果虽相对准确,但不同样品的细胞数量难以达到一致,统计结果仍有一定的误差;而 FCM 法检测量大、速度快、计数准确、结果更为客观,因而更适合进行细胞活性分析。另外,FCM 法还可进行 annexin V-FITC/PI 双染色法,即测定细胞活性的同时,可鉴定细胞凋亡的状态。洗健安等<sup>[39]</sup>通过碘化丙啶(propidium iodide, PI)对血细胞进行染色后,使用 FCM 对血细胞活性进行了检测,结果表明各类重金属污染均会引发细胞毒性,导致细胞死亡率增加,严重影响贝类健康,增加疾病感染风险。CHOI 等<sup>[40]</sup>采用 FCM 发现受感染牡蛎和健康牡蛎之间的血细胞活力没有明显差异。ATON 等<sup>[41]</sup>利用 FCM 检测了在人工海水中培养的血细胞,结果显示血细胞活力得到增强。除此之外还通过 FCM 检测了经除草剂暴露处理的太平洋牡蛎血细胞活力发现除草剂对牡蛎

血细胞活力无明显影响。NGUYEN 等<sup>[42]</sup>通过 FCM 发现不健康贻贝的血细胞死亡率和凋亡率均高于健康贻贝。可见, 细胞活性的分析可用于评估贝类血细胞在不同应激条件下的生存能力。在较低的环境胁迫压力下, 血细胞的细胞活性无明显变化, 但当环境压力超过一定范围, 细胞成活率及细胞活性均显著降低, 使用 FCM 测量双壳类血细胞活性的变化有助于评估宿主的免疫状态, 从而确定其健康状况。

细胞凋亡与细胞死亡不同, 细胞凋亡是一种程序性细胞死亡, 分为由线粒体介导的细胞凋亡和死亡受体 (death receptor) 介导的细胞凋亡<sup>[43]</sup>, 是机体清理异常细胞和受损细胞的重要免疫途径以及机体正常新陈代谢的表现。一定程度的细胞凋亡不会影响机体健康, 但是凋亡率太高则会引发血细胞数量缩减、机体免疫力下降等风险。annexin V-FITC/PI 双染色法是一种利用核酸染料 PI 与异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 偶联的磷脂结合蛋白 (annexin V) 标记细胞膜表面的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 位点从而检测细胞凋亡的 FCM 检测方法。在细胞凋亡早期, 细胞膜的结构发生改变, 原本在细胞膜内侧的 PS 外翻到细胞膜表面, annexin V 对 PS 具有高亲和力, 早期凋亡的细胞便可被 annexin V-FITC 标记发出绿色荧光。晚期凋亡细胞虽然也可被 annexin V-FITC 标记, 但由于此时期的细胞膜通透性大大增加, 核酸染料 PI 已能够进入细胞与 DNA 结合发出红色荧光。因此, annexin V-FITC/PI 双染色法可以区分早调、晚调及坏死细胞。此外, 细胞凋亡的 FCM 检测方法还包括 AO/EB (吖啶橙/溴化乙啶) 荧光染色法, 刘甜雨等<sup>[44]</sup>通过 FCM 的 AO/EB 荧光染色法发现栉孔扇贝受热刺激诱导后其血细胞凋亡率显著上升; LI 等<sup>[45]</sup>利用 FCM 测定了牡蛎血细胞的凋亡率, 发现  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 可明显抑制其凋亡。NGUYEN 等<sup>[42]</sup>使用 FCM 评估健康和 unhealthy 贻贝血细胞的活力、氧化应激和凋亡发现不健康贻贝中血细胞的死亡率和凋亡率要显著高于健康贻贝。由此可见, 血细胞凋亡在贝类免疫学研究中是一个敏感指标, 可用于评估各种环境中贝类的健康状态, 具有一定环境指示意义, 同时也为贝类食品安全评估提供一定参考价值。

### 2.2.2 细胞吞噬

吞噬作用是贝类血细胞参与细胞免疫的主要方式。吞噬功能主要由粒细胞完成, 当贝类受到外源异物或病原体侵袭时, 血细胞将会通过吞噬作用清除异物、病原体以及自身的坏死细胞和细胞碎片等<sup>[46]</sup>。研究吞噬作用的方法主要有显微镜计数法、光密度法及 FCM 等。直接计数法和光密度法易造成误差; 相比之下, 由于 FCM 是一种非常强大的细胞分析方法, 具有快速、准确、易于使用、同时可测量多个细胞参数的特点, 是生物医学领域的主要研究手段之一<sup>[47]</sup>。近年来, 由于独特的优势, FCM 也被许多学

者应用于贝类血细胞的吞噬功能研究中。其原理是利用直径为 1  $\mu\text{m}$  和 2  $\mu\text{m}$  的表面结合了羧基团的黄绿色聚苯乙烯荧光微球 (carboxylate-modified fluorescent microspheres) 作为被吞噬物, 在一定条件下被具有吞噬能力的细胞所吞噬, FCM 可检测被吞噬颗粒标记的荧光素信号, 计算其百分比以确定血细胞的吞噬率。BADO-NILLES 等<sup>[48]</sup>利用 FCM 发现多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 胁迫太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 后, 显著降低了太平洋牡蛎血细胞的吞噬活性, PAHs 污染可能会破坏牡蛎的免疫防御, 导致疾病感染风险的增加; DONAGHY 等<sup>[49]</sup>使用 FCM 对盘鲍 (*Haliotis discus discus*) 和角蝶螺 (*Turbo cornutus*) 血细胞的吞噬功能进行了比较, 发现相比于角蝶螺, 盘鲍表现出了更高的吞噬活性, 表明不同物种的吞噬能力具有一定差异, 为贝类养殖业针对不同物种的疾病预防提供一定参考; 石芳芳等<sup>[50]</sup>利用 FCM 研究了不同缓冲体系对扇贝血细胞吞噬能力的影响, 为建立 FCM 检测贝类血细胞吞噬活性的样品处理提供了一定参考; XUE 等<sup>[51]</sup>使用 FCM 检测并比较了不同牡蛎的血细胞吞噬能力, 发现牡蛎的吞噬能力与品种有关; DONAGHY 等<sup>[49]</sup>和 ALADAILEH 等<sup>[52]</sup>利用 FCM 分别研究了亚洲牡蛎 (*Crassostrea ariakensis*) 和悉尼岩牡蛎 (*Saccostrea glomerata*) 的透明细胞和粒细胞的吞噬功能, 结果表明粒细胞和透明细胞都具有吞噬功能和氧化活性, 但粒细胞表现更为活跃, 应该是主要的吞噬细胞。综上, FCM 为进行贝类免疫参数检测或评估贝类健康状况提供了精确的结果, 应该将其应用推广。

### 2.2.3 呼吸爆发与活性氧含量

呼吸爆发即指在吞噬过程中, 免疫细胞消耗大量氧气, 快速产生并释放大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 成分的过程。ROS 是生物体氧化代谢的副产物, 包括超氧阴离子 ( $\text{O}_2^-$ )、过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 和羟自由基 [ $\text{OH}\cdot$ ] 等<sup>[53]</sup>, 在吞噬外源刺激物的免疫防御过程中具有重要作用。然而, 当 ROS 含量过高, 则对生物体的组织器官会产生一定程度的毒性效应。因此, 呼吸爆发水平的变化可作为评价生物体免疫机能的重要指标之一<sup>[54]</sup>。根据已有研究, 单细胞水平的呼吸爆发活动可以被 FCM 准确测量, 测试过程中, 过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 可将细胞内 2',7'-二氯荧光素 (2',7'-dichlorofluorescein, DCFH) 氧化为绿色荧光二氯荧光素; 荧光强度与细胞内 ROS 水平成正比, 流式细胞仪通过检测该绿色荧光进而测定 ROS 含量, 评估呼吸爆发活力<sup>[55]</sup>。LAMBERT 等<sup>[56]</sup>利用 FCM 探究牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 血细胞的氧化活性时, 使用基于细胞内 DCFH 氧化为 DCF 的方法评估了 4 株弧菌的 DCFH 氧化抑制能力。ANDREYEVA 等<sup>[57]</sup>通过 FCM 发现缺氧对紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 血细胞参数具有影响, 发现与粒细胞相比, 软体动物的透明细胞产生的 ROS 明

显较少, 颗粒细胞在双壳类的细胞免疫中起着重要作用; HEGARET 等<sup>[58]</sup>检测到粒细胞中的呼吸爆发激活率最高, 且随着温度上升, ROS 含量不断升高, 吞噬能力逐渐下降, 血细胞的死亡率也随之大大增加; 后来任加云等<sup>[59]</sup>的研究中也报道了类似的研究结果。推测原因可能是呼吸爆发引起 ROS 含量增加对机体细胞产生了毒害作用, 导致血细胞发生凋亡和坏死。因此, 在评价血细胞免疫功能时, 往往结合细胞活性、吞噬活性、细胞凋亡等多项免疫参数共同分析。

#### 2.2.4 溶酶体数量及非特异性酯酶

溶酶体是各类真核生物细胞中普遍存在的含有多种水解酶的细胞器, 非特异性酯酶是其中一类可在水解过程中把酯类分解成酸和醇的溶酶体酶。溶酶体酶由血细胞合成并分泌到血淋巴中参与免疫防御, 在贝类体液免疫中发挥对异物、病原体和坏死细胞的消化、杀伤和清理作用。溶酶体酶含量的高低在一定程度上能反映贝类对外源刺激物的免疫防御状态。FCM 检测非特异性酯酶活性是使用非特异性脂溶性底物二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FDA)测定的, FDA 经细胞内酯酶水解为绿色强荧光产物, 荧光素聚集在活细胞内, 从而被流式细胞仪捕获到荧光信号。WANG 等<sup>[60]</sup>利用此方法检测到高浓度的二氧化钛纳米粒子(TiO<sub>2</sub>NPs)暴露会降低贻贝血细胞非特异性酯酶活性, 表明 TiO<sub>2</sub>NPs 可能会影响贻贝的生理机能。BADO-NILLES 等<sup>[48]</sup>使用 FCM 检测到受多环芳烃胁迫后的牡蛎血细胞非特异性酯酶活性、酚氧化酶活性、溶酶体含量和细胞死亡率都显著提高, 并由此推测多环芳烃污染可能会导致贝类疾病发生率提高。采用 FCM 监测双壳类血细胞死亡率、吞噬作用、活性氧含量、非特异性酯酶和溶酶体数量, 可帮助进一步评估贝类健康、环境污染及食品质量安全等。

#### 2.2.5 DNA 含量与染色体倍性分析

贝类生物的 DNA 含量不仅随细胞周期发生变化, 而且在一定程度上还会受到环境污染的影响。环境污染可导致 DNA 损伤、基因组异常、倍性变异以及细胞周期发生变化等, 最终影响贝类的免疫功能。测定贝类血细胞中的 DNA 含量可以鉴定 DNA 损伤程度、细胞周期变化以及倍性的变化。由于 FCM 操作简便, 且灵敏度和分辨率较高, 被认为是测定 DNA 含量的最权威的技术<sup>[61]</sup>。FCM 检测 DNA 含量的方法一般是采用已知 DNA 含量的细胞群作为参照, 用特异性荧光染料对细胞核进行染色, 通过捕获激发后的荧光强度进而开展 DNA 定量分析、细胞周期研究和染色体倍性鉴定等。PARK 等<sup>[62]</sup>通过 FCM 检测了包括菲律宾蛤仔、文蛤在内的 15 种双壳类物种的 DNA 含量; BIHARI 等<sup>[63]</sup>发现细胞周期的改变能够反映环境对贻贝血细胞 DNA 的遗传毒性效应。越来越多的研究发现, ROS、溶酶体、酯酶在血细胞内的含量对 DNA 损伤也有一定的联系, DNA 损伤也会直接影响血细胞的凋亡和存活率。贝类在环境污染的影响下, 随着时

间和污染物浓度的变化, DNA 损伤程度十分明显<sup>[64-65]</sup>。

### 3 结束语

近年来, FCM 已被证明是分析双壳类软体动物血细胞的有效工具, 主要集中在对贝类血细胞免疫功能的研究中, 不仅可以对血细胞进行分类, 还可以确定其功能和代谢特征<sup>[32]</sup>。FCM、样品处理技术、荧光染色技术、数据分析技术以及流式细胞仪等相关仪器的不断提升和改进, 为贝类免疫学研究的不断深入提供了良好的条件。然而, 目前这些技术手段仍然不够完善, 还具有很多亟待解决的问题。如在样品处理阶段的细胞凝集问题, 目前常用的抗凝剂如肝素钠、Alsever 等溶液对不同血液样本均有一定程度的影响, 因此, 抗凝剂的种类或浓度的选择非常重要。另外, 荧光染色过程中需要考虑荧光染料对样品是否会产生细胞毒性。同时, 荧光染料信号的强度是 FCM 最关键的参数之一, 而驱动信号强度通常需要提高激光功率; 但提高激光功率不仅会提高仪器成本, 而且对荧光染料或细胞功能是否具有潜在影响, 还有待考量。除了对荧光染料的开发和选择外, 荧光染料的保存也是必须需要考虑的问题。目前, 在贝类的免疫学研究过程中, 除 FCM 外, 其他高新技术如蛋白质组学、代谢组学、转录组学等也逐渐得到应用<sup>[66]</sup>。已有学者将二者综合利用开展相关研究<sup>[67]</sup>。这将大大推动贝类免疫学的进一步发展。总之, FCM 与其他高新技术的结合应用将成为未来水产生物包括贝类的免疫学技术的发展趋势。随着 FCM 的不断改进和发展, 将会在水产品质量安全、水产养殖及渔业环境修复等领域发挥重要作用。

### 参考文献

- [1] GUCKER JR FT, O'KONSKI CT, PICKARD HB, *et al.* A photoelectronic counter for colloidal particles [J]. *J Am Chem Soc*, 1947, 69(10): 2422-2431.
- [2] ROBINSON JP. Flow cytometry: Past and future [J]. *Biotechniques*, 2022, 72(4): 159-169.
- [3] SHAPIRO HM. Practical flow cytometry [M]. America: Wiley-liss, 2005.
- [4] HULETT HR, BONNER WA, BARRETT J, *et al.* Cell sorting: Automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence [J]. *Science*, 1969, 166(3906): 747-749.
- [5] 杭海英, 刘春春, 任丹丹. 流式细胞术的发展, 应用及前景[J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(9): 68-83.  
HANG HY, LIU CC, REN DD. Development, applications and prospects of flow cytometry [J]. *Chin Biotechnol*, 2019, 39(9): 68-83.
- [6] LANHAM DF. Lot-to-lot reproducibility, stability and life cycle management of antibody reagents for flow cytometry [J]. *Bioanalysis*, 2021, 13(10): 745-759.
- [7] DER SB, LONGDIN R, GEERLINGS M, *et al.* Best practices in performing flow cytometry in a regulated environment: Feedback from experience within the European bioanalysis forum [J]. *Bioanalysis*, 2017, 9(16): 1253-1264.
- [8] NURIA R, MARESCA F, CAO A, *et al.* Bivalve haemocyte subpopulations: A review [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 826-255.
- [9] ANDREYEVA AY, KLADCHENKO ES, VYALOVA OY, *et al.*

- Functional characterization of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Bivalvia: ostreidae), hemocytes under normoxia and short-term hypoxia [J]. Turk J Fish Quat Sci, 2021, 21(3): 125–133.
- [10] GÜNAL AAM, KATALAY S, GÜNAL AÇ. How pollution effects the immune systems of invertebrate organisms (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819) [J]. Mar Pollut Bull, 2021, 172: 112750.
- [11] 吴刚, 张志江, 黄亚冬, 等. 贝类血细胞分类及其功能研究进展[J]. 河北渔业, 2018, (4): 52–55.
- WU G, ZHANG ZJ, HUANG YD, *et al.* Progress in the study of shellfish blood cell classification and its function [J]. Hebei Fish, 2018, (4): 52–55.
- [12] BARJHOUS I, RIOULT D, GEFFARD A, *et al.* A new protocol for the simultaneous flow cytometric analysis of cytotoxicity and immunotoxicity on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes [J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 98: 224–235.
- [13] VAN NT, ALFARO A. Capplications of flow cytometry in molluscan immunology: Current status and trends [J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 94: 239–248.
- [14] YAN S, YUAN D. Continuous microfluidic 3D focusing enabling microflow cytometry for single-cell analysis [J]. Talanta, 2021, 221: 121401.
- [15] WANG M, LIANG H, CHEN X, *et al.* Developments of conventional and microfluidic flow cytometry enabling high-throughput characterization of single cells [J]. Biosensors, 2022, 12(7): 443.
- [16] COMA-SRIU JRN. Flow cytometry applications in the food industry [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009, 36(8): 999–1011.
- [17] ZAMORA JLR, AGUILAR HC. Flow virometry as a tool to study viruses [J]. Methods, 2018, 134: 87–97.
- [18] ROBINSON JP. Spectral flow cytometry—Quo vadimus? [J]. Cytometry Part A, 2019, 95(8): 823–824.
- [19] HEINRICHS ME, CORTE D, ENGELEN B, *et al.* An advanced protocol for the quantification of marine sediment viruses via flow cytometry [J]. Viruses, 2021, 13(1): 102.
- [20] HUBÁLEK M, FLAŠŠANS M. Simple field storage of fish samples for measurement of DNA content by flow cytometry [J]. Cytometry Part A, 2021, 99(7): 743–752.
- [21] HUH D, GU W, KAMOTANI Y, *et al.* Microfluidics for flow cytometric analysis of cells and particles [J]. Physiol Measur, 2005, 26(3): R73.
- [22] 赵书涛, 武晓东, 王策, 等. 流式细胞仪的原理、应用及最新进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(22): 4378–4381.
- ZHAO ST, WU XD, WANG C, *et al.* Principles, applications and latest developments of flow cytometer [J]. Prog Mod Biomed, 2011, 11(22): 4378–4381.
- [23] 刘婷婷. 流式细胞术在微生物检测中应用研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2021.
- LIU TT. Application of flow cytometry in microorganism detection [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2021.
- [24] 杨东敏, 张艳丽, 丁鉴锋, 等. 高温、低盐对菲律宾蛤仔免疫能力的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(3): 302–309.
- YANG DM, ZHANG YL, DING JF, *et al.* Effects of high temperature and low salt on the immunity of *Ruditapes philippinarum* [J]. J Dalian Fish Univ, 2017, 32(3): 302–309.
- [25] SOUDANT P, PAILLARD C, CHOQUET G, *et al.* Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis (Tapes, Ruditapes) philippinarum* [J]. Aquaculture, 2004, 229(1–4): 401–418.
- [26] KIM JH, LEE HM, CHO YG, *et al.* Effects of spawning stress on the immune capacity of blood cockle *Tegillarca granosa* occurring on the south coast of Korea [J]. Fish Shellfish Immunol, 2022, 120: 15–22.
- [27] DUCHEMIN MB, FOURNIER M, AUFFRET M. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. Aquaculture, 2007, 264(1–4): 73–81.
- [28] ASHTON-ALCOX KA, FORD SE. Variability in molluscan hemocytes: A flow cytometric study [J]. Tissue Cell, 1998, 30(2): 195–204.
- [29] GOEDKEN M, GUISE S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16(4): 539–552.
- [30] ROLTON A, RAGG NLC. Green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) hemocytes: A flow cytometric study of sampling effects, sub-populations and immune-related functions [J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 103: 181–189.
- [31] 潘辉, 高如承, 吴丽云, 等. 利用流式细胞术研究 3 种贝类的血细胞分类[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2011, 27(4): 127–130.
- PAN H, GAO RC, WU LY, *et al.* Blood cell classification of three shellfish species using flow cytometry [J]. J Fujian Norm Univ (Nat Sci Ed), 2011, 27(4): 127–130.
- [32] 王有基, 林江兴, 李琼珍, 等. 翡翠贻贝血淋巴细胞亚群鉴定及相关免疫功能的流式细胞分析[J]. 水产学报, 2014, 38(3): 385–399.
- WANG YJ, LIN JX, LI QZ, *et al.* Flow cytometric analysis of blood lymphocyte subpopulations and related immune functions in the emerald mussel (*Mytilus edulis*) [J]. J Fish China, 2014, 38(3): 385–399.
- [33] 洗健安, 钱坤, 郭慧, 等. 杂色鲍血细胞分类、结构和免疫功能的流式细胞术分析[J]. 海洋科学, 2015, 39(12): 8–14.
- XIAN JAN, QIAN K, GUO H, *et al.* Flow cytometry analysis of the classification, structure and immune function of *Abalone hemocytes* [J]. J Mar Sci, 2015, 39(12): 8–14.
- [34] 任星潮, 李荣, 张宁, 等. 文蛤和菲律宾蛤仔血细胞的图像流式分类分析[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(8): 98–101.
- REN XC, LI R, ZHANG N, *et al.* Image flow classification analysis of blood cells of clams and *Philippine clams* [J]. J Anhui Agric Sci, 2020, 48(8): 98–101.
- [35] KLADCHENKO ES, ANDREYEVA AY, VYALOVA OY, *et al.* Effect of hypoxia on hemocyte parameters of mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* L.) cultivated on shellfish farm (salt Lake Donuzlav, Crimea) [J]. Limnol Freshwater Biol, 2020. DOI: 10.31951/2658-3518-2020-A-4-793
- [36] ROLTON A, DELISLE L, BERRY J, *et al.* Flow cytometric characterization of hemocytes of the flat oyster, *Ostrea chilensis* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 97: 411–420.
- [37] 刘东武, 王宜艳, 孙虎山. 菲律宾蛤仔、中国蛤蚧、文蛤和紫石房蛤血细胞的分类研究[J]. 水产科学, 2005, (10): 5–7.
- LIU DW, WANG YY, SUN HS. Taxonomic study on the blood cells of *Philippine clam*, Chinese clam, clam and purple rock house clam [J]. Fish Sci, 2005, (10): 5–7.
- [38] 许秀芹, 王宜艳, 孙虎山. 流式细胞术比较研究 4 种双壳贝类血细胞的分群[J]. 海洋湖沼通报, 2006, (1): 46–50.
- XU XQ, WANG YY, SUN HS. Comparative flow cytometry study of hematocrit in four species of bivalve shellfish [J]. Transact Oceanol Limnol, 2006, (1): 46–50.
- [39] 洗健安, 苗玉涛, 潘训彬, 等. 重金属对杂色鲍离体血细胞活性的影响[J]. 四川动物, 2013, 32(3): 415–418.
- XIAN JAN, MIAO YT, PAN XB, *et al.* Effect of heavy metals on the activity of isolated blood cells of *Abalone miscellanea* [J]. Sichuan J Zool, 2013, 32(3): 415–418.
- [40] CHOI HJ, HWANG J, CHOI DL, *et al.* Non-specific defensive factors of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* against infection with *Marteilioides chungmuensis*: A flow cytometric study [J]. Korean J Parasitol, 2011, 49(3): 229–234.
- [41] ATON E, RENAULT T, GAGNAIRE B, *et al.* A flow cytometric approach to study intracellular-free Ca(2+) in *Crassostrea gigas* haemocytes [J].

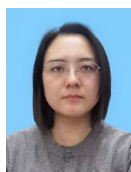
- Fish Shellfish Immunol, 2006, 20(4): 493–502.
- [42] NGUYEN TV, ALFARO AC. Metabolomics investigation of summer mortality in New Zealand Greenshell™ mussels (*Perna canaliculus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 106: 783–791.
- [43] TERAHARA K, TAKAHASHI KG. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs [J]. Curren Pharm Design, 2008, 14(2): 131–137.
- [44] 刘甜雨, 王清, 陈慕雁. 热刺激对栉孔扇贝免疫功能和热休克蛋白表达的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2017, 47(8): 31–43.  
LIU TY, WANG Q, CHEN MY. Effects of heat stimulation on immune function and heat shock protein expression of *Chlamys farreri* [J]. J Ocean Univ Chin (Nat Sci Ed), 2017, 47(8): 31–43.
- [45] LI M, QIU L, WANG L, et al. The inhibitory role of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on immunomodulation of Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 52: 16–22.
- [46] 谢彦海, 胡宝庆, 文春根. 褶纹冠蚌血细胞吞噬能力研究[C]. 中国动物学会、中国海洋湖沼学会贝类学会分会第十四次学会研讨会, 2009.  
XIE YH, HU BQ, WEN CG. Study on the phagocytosis of hemocytes in *Hyriopsis plicata* [C]. The 14th Society Seminar of the Chinese Zoological Society and the Branch of the Shellfish Society of the Chinese Marine and Limnological Society, 2009.
- [47] 于森, 邹明强, 何昭阳. 高分子荧光微球在生物医学领域中的某些应用[J]. 分析测试学报, 2006, (3): 115–119, 125.  
YU M, ZOU MQ, HE ZY. Some applications of polymer fluorescent microspheres in biomedical field [J]. J Instrum Anal, 2006, (3): 115–119, 125.
- [48] BADO-NILLES A, GAGNAIRE B, THOMAS-GUYON H, et al. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. Toxicol In Vitro, 2008, 22(6): 1610–1617.
- [49] DONAGHY L, HONG HK, LAMBERT C, et al. First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(1): 87–97.
- [50] 石芳芳, 李成华, 宋林生, 等. 用流式细胞仪测定扇贝血细胞吞噬活性[J]. 生物技术通报, 2006, (S1): 430–433.  
SHI FF, LI CH, SONG LS, et al. The phagocytic activity of scallop blood cells was measured by flow cytometry [J]. Biotechnol Bull, 2006, (S1): 430–433.
- [51] XUE QG, RENAULT T, CHILMONCZYK S. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11(7): 557–567.
- [52] ALADAILEH S, NAIR SV, BIRCH D, et al. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function [J]. J Invert Pathol, 2007, 96(1): 48–63.
- [53] DONAGHY L, KIM BK, HONG HK, et al. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the *Suminoe* oyster, *Crassostrea ariakensis* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(2): 296–301.
- [54] 张秀霞, 王冬梅, 李军涛, 等. 流式细胞术在贝类血细胞研究中的应用进展[J]. 水产学杂志, 2021, 34(3): 83–90.  
ZHANG XX, WANG DM, LI JT, et al. Application progress of flow cytometry in shellfish blood cell research [J]. Chin J Fish, 2021, 34(3): 83–90.
- [55] BASS DA, PARCE JW, DECHATELET LR, et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation [J]. J Immunol, 1983, 130(4): 1910–1917.
- [56] LAMBERT C, SOUDANT P, CHOQUET G, et al. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of *Pathogenic vibrios* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15(3): 225–240.
- [57] ANDREYEVA AY, EFREMOVA ES, KUKHAREVA TA. Morphological and functional characterization of hemocytes in cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and effect of hypoxia on hemocyte parameters [J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 89: 361–367.
- [58] HEGARET H, WIKFORS GH, SOUDANT P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. haemocyte functions: Aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2003, 293(2): 249–265.
- [59] 任加云, 夏江宝, 尚帅. 镉暴露对文蛤和四角蛤蚧血细胞功能及 DNA 损伤影响[J]. 海洋湖沼通报, 2021, 43(3): 98–106.  
REN JY, XIA JB, SHANG S. Effects of cadmium exposure on hemocyte function and DNA damage in clam *Meretrix meretrix* and *Mactra veneriformis* [J]. Transact Oceanol Limnol, 2021, 43(3): 98–106.
- [60] WANG Y, HU M, LI Q, et al. Immune toxicity of TiO<sub>2</sub> under hypoxia in the green-lipped mussel *Perna viridis* based on flow cytometric analysis of hemocyte parameters [J]. Sci Total Environ, 2014, 470: 791–799.
- [61] BENABDELMOUNA A, LEDU C. The mass mortality of blue mussels (*Mytilus* spp.) from the Atlantic coast of France is associated with heavy genomic abnormalities as evidenced by flow cytometry [J]. J Inverteb Pathol, 2016, 138: 30–38.
- [62] PARK IS, CHOI HJ. Nuclear DNA content determinations in 15 seawater shellfish species in Korea [J]. J Environ Bion, 2020, 38(3): 343–349.
- [63] BIHARI N, MICIC M, BATEL R, et al. Flow cytometric detection of DNA cell cycle alterations in hemocytes of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) off the Adriatic coast, Croatia [J]. Aquat Toxicol, 2003, 64(2): 121–129.
- [64] AKCHA F, IZUEL C, VENIER P, et al. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo [a] pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis* [J]. Aquat Toxicol, 2000, 49(4): 269–287.
- [65] 宛立, 王玉兴, 李清波. 铜对菲律宾蛤仔鳃细胞 DNA 的损伤研究[J]. 水产科学, 2012, 31(7): 425–428.  
WAN L, WANG YX, LI QB. DNA damage on gill cells of Japanese carpet shell (*Ruditapes philippinarum*) [J]. Fisheries Sci, 2012, 31(7): 425–428.
- [66] NGUYEN TV, ALFARO AC. Applications of omics to investigate responses of bivalve haemocytes to pathogen infections and environmental stress [J]. Aquaculture, 2020, 518: 734488.
- [67] NGUYEN TV, ALFARO AC, MERIEN F, et al. Copper-induced immunomodulation in mussel (*Perna canaliculus*) haemocytes [J]. Metallomics, 2018, 10(7): 965–978.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

## 作者简介



龚秀琼, 硕士研究生, 主要研究方向  
为新污染物的安全评价及防控技术。  
E-mail: 2324601201@qq.com



李风铃, 博士, 副研究员, 主要研究方  
向为新污染物的安全评价及防控技术。  
E-mail: lifl@ysfri.ac.cn