



孙涛, 张婷婷, 王岩. 阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞形态学研究 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (4): 1061 - 1069.

阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞形态学研究

孙涛^{1 2}, 张婷婷², 王岩^{1 3 4*}

(1. 石河子大学医学院, 新疆维吾尔自治区石河子 832000;

2. 八师石河子总医院 (石河子大学第三附属医院, 石河子市人民医院), 新疆维吾尔自治区石河子 832000;

3. 石河子大学动物科技学院, 新疆维吾尔自治区石河子 832000; 4. 石河子大学畜牧学博士后流动站, 新疆维吾尔自治区石河子 832000)

摘要: 本研究采用 Wright-Giemsa 染色方法, 利用光学显微镜观察阿尔泰蝠蛾 *Hepialus altaicola* Wang 幼虫血细胞。根据鳞翅目昆虫血细胞形态特征对阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞进行鉴定, 计数并计算各类血细胞所占的比例。发现阿尔泰蝠蛾幼虫血淋巴中存在原血胞、浆血胞、粒血胞、类绛色细胞、珠血胞和囊血胞 6 种细胞类型, 所占比例分别为 3.7%, 29.9%, 55.4%, 2.3%, 5.8% 和 2.9%。阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞组成及其形态与其他鳞翅目昆虫基本一致, 但是与其它种属相比, 同种类型的血细胞大小和占比略有不同。粒血胞和浆血胞是阿尔泰蝠蛾幼虫血淋巴中的主要类型, 其中粒血胞占比最高。该研究为深入研究阿尔泰蝠蛾血细胞形态和功能提供理论依据和基础数据。

关键词: 阿尔泰蝠蛾; 血细胞; 血淋巴; Wright-Giemsa 染色

中图分类号: Q965; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 04-1067-09

Morphology of the hemocytes of *Hepialus altaicola* Wang (Lepidoptera: Hepialidae)

SUN Tao^{1 2}, ZHANG Ting-Ting², WANG Yan^{1 3 4*} (1. Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; 2. The Third Affiliated Hospital of Shihezi University (Shihezi People's Hospital), Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; 3. College of Animal Science and Technology, Shihezi University 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; 4. Animal Husbandry Post-doctoral of Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: Hemocytes of *Hepialus altaicola* Wang (Lepidoptera: Hepialidae) larvae were stained with Wright-Giemsa and observed under an optical microscope. The hemocytes were identify of *H. altaicola* larvae according to the morphological characteristics of lepidopteran insects and calculate the proportion of various types of hemocytes. The results revealed that there were prohemocytes, plasmacytes, granulocytes, oenocytoids, spherulocytes and cystocytes in *H. altaicola*, accounting for 3.7%, 29.9%, 55.4%, 2.3%, 5.8% and 2.9%, respectively. The composition and morphology of hemocytes of *H. altaicola* larvae were basically the same as those of other lepidopteran insects. But compared with other species, the size and proportion of hemocytes of the same type were slightly different. Granulocytes and

基金项目: 国家自然科学基金 (32060125, 81560614); 中国博士后科学基金 (2016M602907)

作者简介: 孙涛, 男, 1988 年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生物化学, E-mail: 526428326@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 王岩, 博士, 教授, 研究方向为医药昆虫及生化与分子生物学, E-mail: xueshengwangyan@126.com

收稿日期 Received: 2020-05-09; 接受日期 Accepted: 2021-03-18

plasmacytes were the main types of hemolymph in *H. altaicola* larvae, among which the granulocytes had the highest proportion. This study provided theoretical basis and basic data for in-depth study of the morphology and function of *H. altaicola* hemocytes.

Key words: *Hepialus altaicola*; hemocytes; hemolymph; Wright-Giemsa staining

生物体免疫系统分为固有免疫（又称先天免疫）和适应免疫（又称获得性免疫）。而昆虫体内缺乏脊椎动物所特有的获得性免疫，没有诱导产生高度专一性抗体的淋巴系统，只能依赖固有免疫来抵御细菌、真菌、病毒等外源病原物的侵袭（初源等, 2013; Hoffmann, 2013）。昆虫的血液兼有脊椎动物血液和淋巴液的特点，因此，称之为“血淋巴”。昆虫自身的免疫防御反应也主要由血淋巴承担，包括细胞免疫和体液免疫（Hillyer and Strand, 2014）。血细胞是细胞免疫应答（Cellular immune response）的主要执行者，主要包括吞噬（Phagocytosis）、形成结节（Nodule）、包裹（Encapsulation）、黑化（Melanization）等，其中浆血胞和粒血胞是参与这类反应的主要细胞，具有快速反应和抵御感染的功能，在发育过程中参与清除凋亡细胞，以及吞噬和包裹病原体（吴姍和凌尔军, 2009）。另外，在昆虫的新陈代谢和变态发育过程中，血液循环还担负着营养物质运输、昆虫蜕皮、羽化及处理自身组织降解和凋亡细胞更迭的重担（Marmaras and Lampropoulou, 2009; Hillyer, 2016）。

昆虫种类繁多，细胞形态多样，循环血细胞的数量和大小与昆虫的虫态和龄期密切相关，不同物种之间的细胞类型存在差异，即使相同的物种，因所观察昆虫的发育阶段和处理方式不同，各类细胞所占比例也有所不同（刘崇乐和傅贻玲, 1964; Ribeiro and Brehelin, 2006; 王强, 2012）。其中，作为昆虫血淋巴细胞中主要类型的浆血胞和粒血胞，在不同昆虫种类之间的占比也有所区别。比如直翅目的意大利蝗 *Calliptamus italicus*（何岚等, 2017）和黑翅痲蝗 *Bryodema nigroptera*（任彩虹等, 2014a）血细胞种类以粒血胞为主，分别占细胞总数的 42.04% 和 57.3%；而双翅目的黑水虻 *Hermetia illucens* 幼虫（毛敏等, 2017）和鞘翅目的巨型瓢虫 *Anisolemnia dilatata*（Majumder et al., 2017）则是浆血胞占主要优势，达到细胞总数的 50% 以上。在鳞翅目昆虫血淋巴中，粒血胞所占

比例较大，例如小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis* 幼虫粒血胞占比高达 62.5%（倪若尧等, 2018），亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 幼虫中的粒血胞占比 56%（梁子才和程振衡, 1991）。目前多数研究者普遍认同将鳞翅目昆虫血细胞分为原血胞、浆血胞、粒血胞、类绛色细胞和珠血胞 5 种常见的血细胞类型（Jones, 1977; 傅贻玲, 1982）。如亚洲玉米螟（梁子才和程振衡, 1991）、舞毒蛾 *Lymantria dispar*（Butt and Shields, 1996）、烟草天蛾 *Manduca sexta*（Beetz et al., 2008）、家蚕 *Bombyx mori*（Ling et al., 2003）、金银花尺蠖 *Heterolocha jinyinhuaphaga*（向玉勇等, 2014）和小金蝠蛾（倪若尧等, 2018）等，其中起免疫应答的主要是浆血胞和粒血胞（Jiang et al., 2010）。任彩虹（2014b）对中华稻蝗 *Oxya chinensis* 的研究发现除上述常见血细胞类型外还包括囊血胞、脂血胞、蠕形细胞、足形细胞、巨核血细胞等较为少见的细胞类型，这类细胞多数由浆血胞发育而来，但这些细胞类型又并不同时存在于所有昆虫中，而是有的来源于其它细胞的转化，有的则处于细胞崩解的前期（Gupta and Sutherland, 1966）。

此外，鳞翅目昆虫已成为评估病原微生物毒力或抗菌剂效果的普遍选择，如家蚕（Gong et al., 2014）、烟草天蛾（Dean et al., 2004）和大蜡螟 *Galleria mellonella*（Altuntaş et al., 2012; Kryukov et al., 2020）等模式生物被广泛用来研究不同种类细菌、真菌或其他病原体感染对血细胞基因表达、形态和数量的影响。当异源性物质进入昆虫体内后，细胞免疫反应也会使血细胞的数量、形态等发生变化。另外，昆虫的免疫系统与哺乳动物的固有免疫系统有许多相似之处，两者都有类似的吞噬特性（Hartenstein, 2006; Browne et al., 2013）。例如，昆虫的浆血胞和粒血胞通常被认为是哺乳动物固有免疫细胞中的巨噬细胞或中性粒细胞（Tojo et al., 2000）。Mukherjee 等（2013）用大蜡螟幼虫研究李斯特菌感染对大脑的影响，与在感染该细菌的哺乳动物身上观察到了

相似的病理学特征。这也许能进一步推进昆虫和哺乳动物之间免疫学的相似性研究,并随着研究的进展将更多的昆虫作为研究与人类相关疾病的模型。因此,有必要对更多种类的昆虫血细胞形态进行研究,在丰富其形态分类的同时为揭示其细胞免疫功能提供依据。

阿尔泰蝠蛾 *Hepialus altaicola* Wang 隶属于鳞翅目 Lepidoptera 蝠蛾科 Hepialidae 蝠蛾属 *Hepialus*, 是新疆虫草菌 *Ophiocordyceps gracilis* 的寄主昆虫,仅分布于海拔在 1 000 m 以上的阿尔泰山。二者形成的虫菌复合体即新疆虫草,其成分和主要功效与冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 近似,在经济和药用价值上具有重要地位(索菲娅等,2008)。目前,国内学者对阿尔泰蝠蛾的研究主要集中在生物学特性方面,包括生殖规律的观察(赵恒等,1998a)、幼虫的饲养(赵恒等,1998b)及活蛹的无损鉴别(王岩等,2018)等,对其血细胞的形态学研究尚未见报道。本研究采用 Wright-Giemsa 染色法,对阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞形态进行观察和分类计数,试图明确其细胞类型,以期为研究阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞分类和功能提供试验依据,同时也为其细胞免疫的研究奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

阿尔泰蝠蛾幼虫采自新疆阿勒泰地区布尔津县林场的芍药丛下(海拔 1 260 m)。发掘幼虫的同时收集栖身的土壤作为饲养土,一并带回实验室。幼虫饲养于光照培养箱中(MGC-250P 型,上海一恒),饲养温度为 $12 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度 50% ~ 60%,光周期 16 L:8 D。选取健康且头宽、体宽、体长及体重近似的 5 龄幼虫供试。

1.2 试剂和仪器

Wright-Giemsa 染色液(珠海贝索生物科技有限公司)、人造香柏油、无水甲醇、二甲苯、镊子、载玻片、推片、解剖针、微量毛细管、光学显微镜(蔡司 Zeiss AX-10,日本)。

1.3 阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞涂片制作与观察

取阿尔泰蝠蛾幼虫 5 头,无菌水清洗后吸水

纸巾擦干,用解剖针将其腹部刺破,一次性微量毛细管各取少量血淋巴($2 \sim 3 \mu\text{L}$),滴在洁净的载玻片上,每头幼虫制备 3 张血片。参照《全国临床检验操作规程》(第四版)(尚红等,2015)的血涂片制备的方法,用推片器涂成血膜,血涂片外观头、体、尾分明,分布均匀且薄厚适宜。先用无水甲醇固定,待自然干燥后用 Wright-Giemsa 染液 A 液将血膜面充分覆盖,稍等片刻(约 30 s)再按比例滴加缓冲液 B 液,洗耳球轻轻吹匀铺平,至膜面上染色液混合并形成表面张力,染色 10 ~ 15 min 后自来水缓缓冲洗,晾干封片,在光学显微镜下观察细胞形态。采用图像采集分析软件(Image view)进行拍照、计数、测量。再利用图像处理软件 Image J(National institutes of health, USA),根据标尺上单位长度的图像像素数量和测量体征长度所对应的像素数量进行等比换算,求出所测体征长度。

1.4 阿尔泰蝠蛾幼虫各类血细胞所占比例统计

将制备好的血涂片置于显微镜下,选取血涂片体尾交界处细胞展开良好、分散均匀的部位进行细胞分类计数。参照医疗卫生行业标准《白细胞分类计数参考方法》(WS/T 246-2005)和美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)颁发的有关血细胞分类计数参考方法(H20-A)的标准操作规程,按一定方向有规律的移动视野,采用“城垛式”进行观察(图 1),以避免重复或遗漏,同时避免主观选择视野。在油镜下根据细胞形态特征,每张血涂片计数 200 个细胞,然后分类求得各类细胞的比值(百分率)。

2 结果与分析

2.1 阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞形态

通过光学显微镜观察,阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞类型在形态学上可分为原血细胞(Prohemocyte, PR)、粒细胞(Granulocyte, GR)、浆血细胞(Plasmacyte, PL)、类绦色细胞(Oenocytoid, OE)、珠血细胞(Spherulocyte, SP)和囊血细胞(Cystocyte, CY);与其它鳞翅目幼虫相一致,只是不同个体间形态与数量略有变化。各类型血细胞大小见表 1。

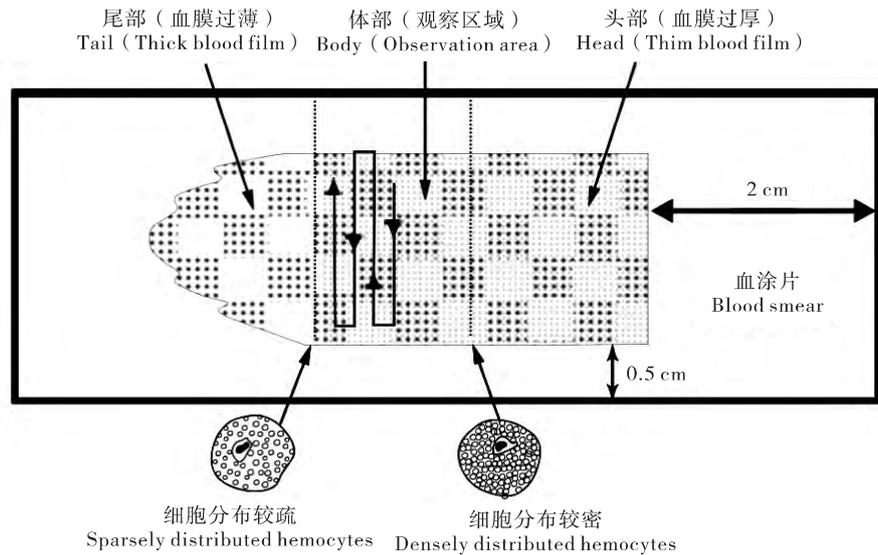


图1 外周血涂片制备及“城垛式”观察

Fig. 1 Preparation of peripheral blood smears and observation of “battlements”

注: 参照《白细胞分类计数参考方法》。Note: Refer to “Reference Leukocyte Differential Count Method”.

表1 阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞大小及比例 (平均值 ± SD)

Table 1 Size and percentage of various hemocytes in the larvae of *Hepialus altaicola* Wang (Mean ± SD)

血细胞类型 Hemocyte type	细胞直径 (μm) The cell diameter	细胞核直径 (μm) Nucleus diameter	细胞周长 (μm) Cell perimeter	细胞面积 (μm ²) Cell area	占细胞总数比例 (%) Percentage of the total cell numbers
原血胞 (PR)	-	4.92 ± 0.53	16.97 ± 2.06	18.31 ± 3.22	3.70 ± 1.00
浆血胞 (PL)	9.05 ± 1.01	5.28 ± 0.55	29.02 ± 3.02	56.24 ± 12.28	29.90 ± 3.48
粒血胞 (GR)	10.59 ± 2.13	7.13 ± 0.77	40.42 ± 5.76	104.50 ± 24.59	55.40 ± 2.48
类绦细胞 (OE)	16.96 ± 1.74	5.49 ± 0.62	56.50 ± 7.18	213.17 ± 50.57	2.30 ± 0.64
珠血胞 (SP)	19.66 ± 2.66	6.72 ± 0.54	61.20 ± 6.19	244.18 ± 31.20	5.80 ± 1.08
囊血胞 (CY)	8.98 ± 0.82	5.66 ± 0.72	31.50 ± 3.62	65.63 ± 10.66	2.90 ± 1.14

2.1.1 原血胞

数量较少的小型细胞, 直径约 4.5 ~ 5.5 μm; 细胞核大, 多呈圆形或卵圆形, 均质细腻, 经 Wright's-Giemsa 染色后呈紫红色, 几乎填满了整个细胞; 细胞质仅有很薄的一层, 有的原血胞细胞质几乎看不到, 无明显颗粒; 细胞轮廓清晰, 边缘完整 (图 2-A)。

2.1.2 浆血胞

多为中型细胞, 胞体大小不一, 直径 8 ~ 10 μm, 多为圆形或椭圆形。细胞核圆形, 呈深紫色, 约占胞体的 1/2 ~ 2/3, 常偏位, 核染色质成粗颗粒状。细胞质丰富, 经 Wright's-Giemsa 染色后, 呈油墨蓝色 (嗜碱性), 不透明, 部分可见空泡, 偶有少量大小均匀紫红色颗粒 (图 2-B)。浆

血胞贯穿于鳞翅目昆虫的各发育阶段, 也是常见有丝分裂的类型。有时可见双核, 细胞核被拉向两级, 赤道板处细胞膜向内凹陷, 核染色质呈块状, 副染色质较明显 (图 2-G)。这类细胞常聚集成堆 (图 2-H)。

2.1.3 粒血胞

粒血胞是阿尔泰蝠蛾幼虫血淋巴中普遍存在的一种优势血细胞, 形态多样, 有圆形、卵圆形、纺锤形和不规则形等, 细胞大小约为 9 ~ 13 μm。与浆血胞的明显区别是, 粒血胞内含数量不等、大小不一、分布不一的紫红色异质性溶酶体颗粒。其颗粒分布不均匀, 近核一侧较多, 有的将核质覆盖不易区分。四周衬以蓝色或淡蓝色的薄膜样胞质。细胞易破碎, 释放出内含的颗粒物质, 如

在开始形成结节或者包囊时 (图 2-C)。

2.1.4 类绛色细胞

类绛色细胞是一类较大型的血细胞, 单核, 核较小, 为圆形或卵圆形, 有时也有不规则形状, 数量较少, 直径约为 $15 \sim 20 \mu\text{m}$ 。Wright's-Giemsa 染色为嗜酸性, 核呈深紫红色, 质呈浅灰蓝色, 胞核染色质成浓缩状态, 细胞质浓厚混沌而均一, 其间有浅纹 (图 2-D)。

2.1.5 珠血细胞

此细胞多为中、大型细胞, 形态特征显著,

易于辨认, 直径约 $18 \sim 22 \mu\text{m}$ 。细胞边缘充满大小不等、突出的珠形内含物, 形似花瓣状; 细胞中央混沌一团, 隐约可见其中的珠形内含物, 细胞核不易观察 (图 2-E)。

2.1.6 囊血胞

囊血胞多为中型细胞, 直径约 $8 \sim 10 \mu\text{m}$, 细胞边缘光滑圆整, 呈近圆形。细胞质逐渐或有时骤然透明化。核、质内有大小不一的带有折光性的颗粒或块状物, 被染成紫红色; 细胞核外有一圈类似双层膜的透明环带环绕 (图 2-F)。

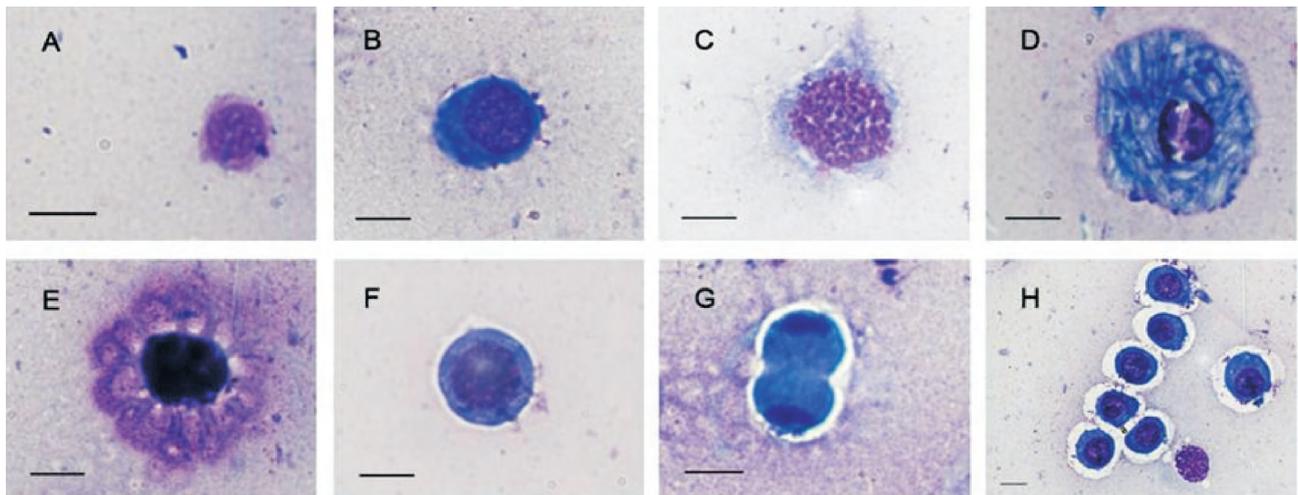


图 2 阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞光学显微镜图像

Fig. 2 Optical microscope's image of the hemocyte of larvae of *Hepialus altaicola*

注: A, 原血胞; B, 浆血胞; C, 粒血胞; D, 类绛色细胞; E, 珠血细胞; F, 囊血胞; G, 浆血胞的分裂; H, 浆血胞的聚集; 放大倍数, $\times 1\ 000$; 标尺 = $5 \mu\text{m}$ 。Note: A, Prohemocyte; B, Plasmatocyte; C, Granulocyte; D, Oenocytoid; E, Spherulocyte; F, Cystocyte; G, Mitosis of plasmatocyte; H, Aggregation of plasmatocytes; Magnification, $\times 1\ 000$; Scale bar = $5 \mu\text{m}$ 。

该观察结果基本符合 Lavine 和 Strand 对鳞翅目昆虫血细胞的分类和描述 (Lavine and Strand, 2002)。

2.2 阿尔泰蝠蛾幼虫各类血细胞所占比例

阿尔泰蝠蛾幼虫各类血细胞所占比例见表 1, 分别为原血胞 3.7%, 浆血胞 29.9%, 粒血胞 55.4%, 珠血细胞 5.8%, 类绛色细胞 2.3%, 囊血胞 2.9%。其中, 粒血胞所占比例最高, 其次为浆血胞, 两者所占比例之和高达 85.3%, 表明这两种血细胞可能在阿尔泰蝠蛾血淋巴的细胞免疫功能中发挥主要作用。

3 结论与讨论

本研究在血涂片制备过程中, 发现少部分血

片在观察时有细胞堆积的现象, 可看到不同类型细胞相互之间有部分重叠。分析可能是由于血膜制备的厚度不一, 也可能是观察部位选取的不恰当。一般推片与载玻片约成 45° , 但由于幼虫个体之间的差异, 所采集的血淋巴的量不完全一致, 在操作过程中适当调整推片角度, 如血淋巴量较少时可稍增大推片角度; 而当血淋巴量较多或相对粘稠时, 适当减小推片角度, 以达到血膜薄厚适宜, 头、体、尾明显, 分布均匀, 减少细胞重叠和变形的发生。另外, 在选择观察部位时, 由于各类血细胞体积和密度不同, 在涂片中分布不均匀。体积较小、密度较大的细胞分布在体部较多; 而体积较大、密度较小的细胞在尾部和两侧较多。因此, 一般选择涂片体尾交界处或片头至片尾的 $3/4$ 区域进行分类计数, 此区域细胞分布

相对均匀, 染色效果较好。

血涂片染色的质量直接影响细胞形态的识别, 选择一种合适的染色方法处理血细胞来观察其形态特征, 是研究昆虫血细胞的关键。目前昆虫血细胞研究常用的染色方法包括 Wright's、Giemsa 及 Wright's-Giemsa 染色等。王强等 (2011) 分别用这 3 种染色方法对中华稻蝗血细胞进行了染色比较, 发现 Wright's-Giemsa 染色具备了另外 2 种染液的优点, 弥补了单一成分染色的不足; 向玉勇等 (2014) 也运用 Wright's-Giemsa 染色法对鳞翅目金银花尺蠖幼虫血细胞的形态进行观察, 效果较好。参照此前文献中对各类昆虫血细胞的染色方法, 选用 Wright's-Giemsa 复合染色法对阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞进行染色观察。血细胞的胞质、颗粒、胞核等均获得了较满意的染色结果, 能够比较清晰的辨别各种类型的血细胞。

运用 Wright's-Giemsa 染色法, 在阿尔泰蝠蛾幼虫血涂片中观察到原血胞、浆血胞、粒血胞、类绦色细胞、珠血胞和囊血胞 6 种血细胞类型。除原血胞外, 其它各类型细胞均能看到比较明显的细胞核和胞质。从细胞直径大小来看, 阿尔泰蝠蛾幼虫浆血胞与亚洲玉米螟相似 (7.5 ~ 10 μm), 而相比小金蝠蛾 (10 ~ 12 μm)、家蚕 (8 μm × 22 μm) 和粘虫 *Pseudaletia separata* (11.9 ~ 16.66 μm) 的浆血胞偏小; 在观察中偶然可见浆血胞的分裂现象 (图 2-G), 有研究也将其划分为浆血胞中的双核细胞 (毛敏等, 2017), 对其分裂特征的研究还需结合不同分裂相染色体核型的观察进一步阐释。另外, 观察到浆血胞常有聚集现象 (图 2-H), 且细胞外环绕着一圈未被着色的空白区域, 区域内可见被染成紫红色的颗粒物, 但由于固定染色方法学的限制, 未能动态观察离体血细胞的变化反应, 这一现象是否为浆血胞发生的包囊和吞噬作用还有待进一步确认。粒血胞的大小比玉米螟 (7.5 μm) 和舞毒蛾 (7 ~ 9 μm) 稍大, 而与小金蝠蛾 (10 ~ 12 μm) 大小近似, 却小于粘虫 (9.52 ~ 23.8 μm); 粒血胞中存在数量不等且染色较深的嗜酸性颗粒物, 大部分细胞胞质内含有空泡, 有的粒血胞的胞质发生破裂, 其细胞形态介于浆细胞和粒细胞之间。这种现象可能是由于机体的免疫防卫发生吞噬作用而对细胞造成的损伤 (Kwon *et al.*, 2014), 也可能是浆细胞向粒细胞转化过程中发生胞质碎裂的过渡时期 (Gupta and Sutherland, 1966)。与

多数鳞翅目及其他种类昆虫幼虫有所不同的是, 通过染色固定的方法, 本研究所观察到的浆血胞多为近圆形或椭圆形, 细胞直径也比其他昆虫的浆血胞要小, 并且未观察到纺锤形或梭型等不规则形态的浆血胞, 也未发现其有延伸出伪足的现象。而这一现象在利用光学相差显微镜观察小金蝠蛾幼虫血细胞时有所发现 (倪若尧等, 2018), 这可能是由于观察方法和受贴壁时间的限制, 不能动态的观察到浆血胞贴壁一段时间后伪足的延伸和胞质的变形。阿尔泰蝠蛾幼虫的类绦色细胞直径 (15 ~ 20 μm) 小于小金蝠蛾幼虫 (20 ~ 30 μm), 而珠血胞的直径大小与其相似。此外, 还观察到了原血胞和囊血胞, 在小金蝠蛾幼虫中未见报道。阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞中粒血胞占细胞总数的 55.4%, 粒血胞和浆血胞所占比例高达 85.3%, 与小金蝠蛾 (89.0%)、玉米螟 (92.0%) 和舞毒蛾 (74.6%) 等鳞翅目昆虫的优势血细胞类型相同, 预示这两种细胞在阿尔泰蝠蛾幼虫血淋巴的免疫防卫中发挥主要作用。另外, 由于蝠蛾属是鳞翅目昆虫进化中最原始的种系 (Nielsen *et al.*, 2000), 故而推测粒血胞可能是鳞翅目昆虫细胞免疫系统出现最早的, 并且是对外源物具有防御和清除作用的主要血细胞类型之一。在光学显微镜下还观察到一类轮廓分明, 并极易崩解破裂的血细胞, 该细胞表面光滑圆整, 呈车轮状; 细胞核外围有一圈透明环带, 胞质逐渐透明化, 期间分散着大小不一的颗粒物, 这些颗粒物在核、质内具有折光性, 与傅贻玲 (1982) 所描述的囊血胞形态特征一致, 故判断此类血细胞为囊血胞。囊血胞直径和细胞形态与浆血胞类似, 但囊血胞的胞质较为透明化, 细胞核位于包体正中; 而浆血胞的胞质为不透明的油墨蓝色, 细胞核常偏位; 并且囊血胞内富含较多的带有折光性的颗粒物, 浆血胞中几乎不含颗粒, 偶可见极少的颗粒, 与其细胞的发育阶段相关。类绦色细胞和珠血胞较其他细胞类型的体积大, 形态特征明显, 易于辨认, 两者均无吞噬功能, 主要参与贮存、物质代谢和分泌作用。此外, 类绦色细胞还能分泌一种酚氧化酶, 可参与昆虫血淋巴的黑化反应 (谈娟等, 2011)。阿尔泰蝠蛾幼虫类绦色细胞平均细胞直径要稍小于珠血胞, 这一点与多数其它昆虫类型所观察到的现象略有差异。

此次研究阿尔泰蝠蛾幼虫共观察到 6 种血细

胞类型。其中原血胞是所观察血淋巴中最小的血细胞类型, 普遍认为原血胞是昆虫造血系统中的“祖细胞”或“干细胞”, 由造血器官或造血组织生成, 通过分裂来补充昆虫体内的血细胞, 并能分化为浆血胞、粒血胞和珠血细胞 (杨丽群等, 2015; Majumder *et al.*, 2017)。多数学者认为全变态昆虫如鳞翅目血细胞的转化随着昆虫的演化而表现为多种途径。Gupta 等 (1966) 通过对美洲大蠊 *Periplaneta americana*、黄粉虫 *Tenebrio molitor* 和大蜡螟的研究观察, 认为浆血胞是昆虫血细胞的基本形态, 粒血胞、类绦色细胞和珠血胞是由浆血胞胞质碎裂转化而来, 囊血胞也可由形态为圆形的浆血胞或粒血胞转化形成。傅贻玲 (1982) 认为原血胞是所有其他血细胞的原始类型, 各类血细胞多由此衍生而来; 浆血胞贯穿于昆虫的各个发育阶段, 并且可以观察到与其他多数类型血细胞之间的过渡型, 被视为主干细胞; 囊血胞由类绦色细胞离体后转化而来, 易爆破, 有时还会出现脱核现象, 并推测这类血细胞可能与昆虫血淋巴的凝集有关。

由于血细胞的发育是连续的, 在不同发育阶段细胞间包含增殖、分化、成熟、释放以及衰老和凋亡等多种生理变化过程, 有一些细胞类型可能是发育过程的中间和过渡状态。通过对阿尔泰蝠蛾血细胞的形态观察, 原血胞染色质均匀细腻, 胞核大, 几乎看不到细胞质, 胞质中无颗粒或有少许细小颗粒, 符合原始细胞的形态特征, 可能是血淋巴中最原始的血细胞 (图 2-A)。推测随着原血胞的发育和分化, 细胞表面扩大, 细胞质逐渐丰富, 进而环绕胞核逐渐形成具有嗜碱性的油墨蓝色, 胞核呈圆形或椭圆形, 常偏于一侧, 分裂、分化为轮廓清晰的浆血胞 (图 2-B)。浆血胞在分化和演变过程中, 形态和功能逐渐变化: 一部分浆血胞胞质碎裂, 胞质中出现数量不等、大小不一的紫红色 (嗜酸性) 颗粒, 演变为粒血胞 (图 2-C); 另一部分浆血胞胞质继续扩大, 逐渐变得浓厚混沌, 细胞核固缩变小, 转化为类绦色细胞 (图 2-D); 还有一部分浆血胞核染色质逐渐聚集呈紫黑色块状 (碳核), 细胞内被突出形似花瓣样的珠形内含物环绕而形成珠血胞 (图 2-E); 囊血胞则由圆形的浆血胞直接演变而来, 或由粒血胞进一步转化而来, 颗粒由靠近核的地方向胞质分散, 胞质逐渐透明, 胞体变得圆整光滑, 形成“车轮状” (图 2-F)。故推测阿尔泰蝠

蛾血细胞中的原血胞是造血“干细胞”, 经过发育、增殖分化逐渐演变成 6 种细胞类型: 原血胞、浆血胞、粒血胞、类绦色细胞、珠血胞和囊血胞, 其演化关系推测如下 (图 3):

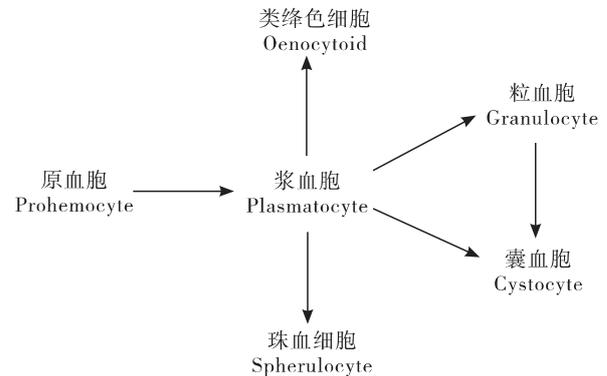


图 3 阿尔泰蝠蛾幼虫血细胞之间的演化关系

Fig. 3 Evolutionary relations between hemocytes of *Hepialus altaicola* larvae

本文初步明确了阿尔泰蝠蛾幼虫的血细胞形态和类型。然而, 昆虫血细胞种类和形态多样, 其过渡类型贯穿于昆虫的整个发育阶段。许多种类血细胞在发育过程中都有形态转化的现象, 需要连续性的观察才能发现一瞬间的转化过程, 而血涂片固定染色法只能观察到血细胞离体后某一特定时期的细胞形态。因此, 还需进一步对不同龄期阿尔泰蝠蛾幼虫的血细胞进行观察和研究, 从而更加准确地鉴定其血细胞的类型, 摸清其生长发育过程中的形态演变规律和免疫应答机制, 为后续研究阿尔泰蝠蛾与新疆虫草菌的免疫互作提供理论依据。

参考文献 (References)

- Altuntaş H, Kiliç AY, Uçkan F, *et al.* Effects of gibberellic acid on hemocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Environmental Entomology*, 2012, 41 (3): 688–696.
- Beetz S, Holthusen TK, Koolman J, *et al.* Correlation of hemocyte counts with different developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2008, 67 (2): 63–75.
- Browne N, Heelan M, Kavanagh K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes [J]. *Virulence*, 2013, 4 (7): 597–603.
- Butt TM, Shields KS. The structure and behavior of Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) hemocytes [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1996, 68 (1): 1–14.
- Chu Y, Zhou F, Zhang MM, *et al.* Frontiers of research on the innate immune response in insects [J]. *Chinese Journal of Applied*

- Entomology, 2013, 50 (2): 311–320. [初源, 周帆, 张明明, 等. 昆虫天然免疫反应研究前沿 [J]. 应用昆虫学报, 2013, 50 (2): 311–320]
- Dean P, Potter U, Richards EH, et al. Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2004, 50 (11): 1027–1036.
- Fu YL. Hemocytes of insect (I) [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 1982, 3: 45–47. [傅贻玲. 昆虫的血细胞 (一) [J]. 昆虫知识, 1982, 3: 45–47]
- Gong L, Chen X, Liu C, et al. Gene expression profile of *Bombyx mori* hemocyte under the stress of destruxin A [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (5): e96170.
- Gupta AP, Sutherland DJ. In vitro transformations of the insect plasmatocyte in some insects [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1966, 12 (11): 1369–1375.
- Hartenstein V. Blood cells and blood cell development in the animal kingdom [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006, 22 (1): 677–712.
- He L, Zhang YJ, Fan TS, et al. Study on morphology of hemocytes in *Calliptamus italicus* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2017, 39 (5): 1100–1104. [何岚, 张永军, 樊泰山, 等. 意大利蝗血细胞形态学研究 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (5): 1100–1104]
- Hillyer JF, Strand MR. Mosquito hemocyte-mediated immune responses [J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2014, 3: 14–21.
- Hillyer JF. Insect immunology and hematopoiesis [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 58: 102–118.
- Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila* [J]. *Nature*, 2003, 426 (6962): 33–38.
- Jones JC. The Circulatory System of Insects [M]. Springfield: Thomas Press, 1977, 144–170.
- Jiang H, Vilcinskas A, Kanost MR. Immunity in lepidopteran insects [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010, 708: 181–204.
- Kryukov VY, Kryukova NA, Tomilova OG, et al. Comparative analysis of the immune response of the wax moth *Galleria mellonella* after infection with the fungi *Cordyceps militaris* and *Metarhizium robertsii* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 141: 103995.
- Kwon H, Bang K, Cho S. Characterization of the hemocytes in larvae of *Protaetia brevitarsis seoulensis*: Involvement of granulocyte-mediated phagocytosis [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (8): e103620.
- Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32 (10): 1295–1309.
- Liang ZC, Cheng ZH. Immune response of haemolymph in larvae of *Ostrinia furnacalis* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1991, 34 (2): 141–145. [梁子才, 程振衡. 亚洲玉米螟幼虫血淋巴的免疫反应 [J]. 昆虫学报, 1991, 34 (2): 141–145]
- Ling E, Shirai K, Kanekatsu R, et al. Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2003, 120 (6): 505–511.
- Liu CL, Fu Y. Identification and pathological changes of hemocytes of *Pseudaletia separata* (Walk.) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1964, 13 (4): 542–551. [刘崇乐, 傅贻玲. 粘虫 *Pseudaletia separata* (Walk.) 血细胞的类型辨认和病态变化 [J]. 昆虫学报, 1964, 13 (4): 542–551]
- Majumder J, Ghosh D, Agarwala BK. Haemocyte morphology and differential haemocyte counts of giant ladybird beetle, *Anisolemnia dilatata* (F.) (Coleoptera: Coccinellidae): A unique predator of bamboo woolly aphids [J]. *Current Science*, 2017, 112 (1): 160–164.
- Mao M, Jiang CX, Liu MG, et al. Study on hemocytes classification of *Hermetia illucens* (L.) larve [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2017, 39 (6): 1342–1349. [毛敏, 蒋春先, 柳明刚, 等. 黑水虻幼虫血细胞类型的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (6): 1342–1349]
- Marmaras VJ, Lampropoulou M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity [J]. *Cellular Signalling*, 2009, 21 (2): 186–195.
- Mizerska-Dudka M, Andrejko M. *Galleria mellonella* hemocytes destruction after infection with *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54 (3): 232–246.
- Mukherjee K, Hain T, Fischer R, et al. Brain infection and activation of neuronal repair mechanisms by the human pathogen *Listeria monocytogenes* in the lepidopteran model host *Galleria mellonella* [J]. *Virulence*, 2013, 4 (4): 324–332.
- Nielsen ES, Robinson GS, Wagner DL. Ghost-moths of the world: A global inventory and bibliography of the Exoporia (Mnesarchaeoidea and Hepialoidea) (Lepidoptera) [J]. *Journal of Natural History*, 2000, 34 (6): 823–878.
- Ni RY, Meng Q, Zhang JH, et al. Types, morphology and cellular immune functions of hemocytes in larvae of *Thitarodes xiaojinensis* (Lepidoptera: Hepialidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2018, 61 (4): 432–438. [倪若尧, 孟茜, 张寰, 等. 小金蝇蛾幼虫血细胞的种类、形态及细胞免疫功能 [J]. 昆虫学报, 2018, 61 (4): 432–438]
- Ren CH, Li XY, Wu Z, et al. Morphology of the hemocytes of *Bryodemina nigroptera* Zheng [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2014a, 51 (2): 540–547. [任彩虹, 李小明, 吴哲, 等. 黑翅茄蝗血细胞形态学的研究 [J]. 应用昆虫学报, 2014a, 51 (2): 540–547]
- Ren CH. The Morphology Study on Hemocytes of *Oxya chinensis* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2014b. [任彩虹. 中华稻蝗血细胞形态学的研究 [D]. 太原: 山西大学, 2014b]
- Ribeiro C, Brehelin M. Insect haemocytes: What type of cell is that? [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2006, 52 (5): 417–429.
- Shang H, Wang YS, Shen ZY. National Guide to Clinical Laboratory Procedures [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015: 3–4. [尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 3–4]
- Suo FY, Su J, Jiang YC, et al. Comparative study on mannitol, polysaccharide and amino acid of Xinjiang *Cordyceps* and other *Cordyceps sinensis* [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2008,

- 45 (3): 517-521. [索菲娅, 苏俊, 姜彦成, 等. 新疆虫草与冬虫夏草中甘露醇、多糖和氨基酸的含量比较研究 [J]. 新疆农业科学, 2008, 45 (3): 517-521]
- Tan J, Zhou QM, Cui HJ. Progress in hematopoiesis and hematopoietic stem cells in insects [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2011, 54 (10): 1165-1171. [谈娟, 周其明, 崔红娟. 昆虫造血作用和造血干细胞研究进展 [J]. 昆虫学报, 2011, 54 (10): 1165-1171]
- Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, et al. Involvement of both granular cells and plasmacytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2000, 46 (7): 1129-1135.
- Wang Q, Cui ZF, Wang YL, et al. Comparison among three staining methods to hemocytes of *Oxya chinensis* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2011, 48 (4): 841-844. [王强, 崔智芳, 王云丽, 等. 中华稻蝗血细胞染色方法的比较 [J]. 应用昆虫学报, 2011, 48 (4): 841-844]
- Wang Q. Comparative Study on the Morphology of Hemocytes of Grasshoppers in Oedipodidae [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2012. [王强. 中华稻蝗不同龄期血细胞发育研究 [D]. 太原: 山西大学, 2012]
- Wang Y, Tao CC, Li Q, et al. Non-destructive methods for sex determination of the live pupae of *Hepialus altaicola* Wang (Lepidoptera: Hepialidae) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2018, 40 (1): 30-35. [王岩, 陶常诚, 李琪, 等. 阿尔泰蝠蛾 (鳞翅目: 蝠蛾科) 活蛹性别的无损鉴别方法 [J]. 环境昆虫学报, 2018, 40 (1): 30-35]
- Wu S, Ling EJ. Phagocytosis, nodulation and encapsulation in cellular immune responses in insect [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2009, 52 (7): 791-798. [吴姗, 凌尔军. 昆虫细胞免疫反应中的吞噬、集结和包裹作用 [J]. 昆虫学报, 2009, 52 (7): 791-798]
- Xiang YY, Zhu YM, Yin PF. Morphological observation on larva hemocytes of *Heterolocha jinyinhua* Chu [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53 (17): 4052-4055. [向玉勇, 朱园美, 殷培峰. 金银花尺蠖幼虫血细胞形态观察 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53 (17): 4052-4055]
- Yang LQ, Xu M, Cui HJ. Research progress in hemocyte of silkworm (*Bombyx mori*) [J]. *Science of Sericulture*, 2015, 41 (6): 973-978. [杨丽群, 徐曼, 崔红娟. 家蚕 (*Bombyx mori*) 血细胞研究进展 [J]. 蚕业科学, 2015, 41 (6): 973-978]
- Zhao H, Qu XL, Huang JH. Observation on the reproductive law of *Hepialus altaicola* Wang [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 1998a, 4: 181-183. [赵恒, 屈新兰, 黄吉海. 阿尔泰蝠蛾生殖规律的观察 [J]. 新疆农业科学, 1998a, 4: 181-183]
- Zhao H, Qu XL, Huang JH. Feeding of the larvae of *Hepialus altaicola* Wang [J]. *Economic Insects*, 1998b, 5: 17-18. [赵恒, 屈新兰, 黄吉海. 阿尔泰蝠蛾幼虫的饲养 [J]. 经济昆虫, 1998b, 5: 17-18]