

棉铃虫血细胞对葡聚糖凝胶珠的包囊反应^{*}

郭旭 苏振林 钟淑芳 袁媛 刘绪生^{**}

(华中师范大学生命科学学院 武汉 430079)

Encapsulation of sephadex beads by hemocytes from *Helicoverpa armigera*. GUO Xu, SU Zhen-Lin, ZHONG Shu-Fang, YUAN Yuan, LIU Xu-Sheng^{**} (College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract The encapsulation of sephadex beads by hemocytes from *Helicoverpa armigera* (Hübner) was investigated. The encapsulation mechanism differed for different kinds of sephadex beads. *H. armigera* hemocytes have strong ability to encapsulate sephadex A-25; encapsulation began rapidly and ended 12 h post-injection.

Key words *Helicoverpa armigera*, encapsulation, hemocytes, sephadex beads

摘 要 研究了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 血细胞对葡聚糖凝胶珠的包囊反应。结果表明:棉铃虫血细胞对不同类型的葡聚糖凝胶珠具有不同的包囊能力,其中对 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠具有很强的包囊能力;棉铃虫血细胞启动对 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠的包囊反应是较迅速的,而包囊的完成大概是在凝胶珠进入棉铃虫体内 12 h 之后;在离体的情况下,棉铃虫血细胞仍然能包囊葡聚糖凝胶珠。

关键词 棉铃虫, 包囊作用, 血细胞, 葡聚糖凝胶珠

昆虫依靠先天性免疫来防卫病原物的入侵。先天性免疫分为体液免疫和细胞免疫两种方式。其中的细胞免疫则包括由血细胞参与的吞噬作用、形成结节、包囊作用等反应^[1]。当较大的入侵物(如寄生蜂卵、线虫、葡聚糖凝胶珠等)进入昆虫血腔后,昆虫主要通过调控血细胞来包囊并杀死这些外源入侵物^[2]。

目前研究者主要利用葡聚糖凝胶珠来研究昆虫血细胞包囊作用的机理^[3]。如已研究了大豆夜蛾 *Pseudoplusia includens*^[4]、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*^[5, 6] 等昆虫对葡聚糖凝胶珠的包囊行为。但到目前为止,还未见详细研究棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 血细胞对葡聚糖凝胶珠的包囊行为的报道。本文开展了这方面的研究,以期将来深入研究棉铃虫血细胞包囊作用的机理打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫虫卵由湖北省农科院 Bt 中心提供,在室温条件下(26 ± 1)℃ 孵化后饲养直至所需虫龄。

1.2 实验方法

1.2.1 体内包囊分析

1.2.1.1 棉铃虫对 G-200 和 Sephadex A-25 二种葡聚糖凝胶珠的包囊反应 用 0.1% 的刚果红将葡聚糖凝胶珠染色 2 h,然后用昆虫生理盐水冲洗干净,在紫外灯下消毒后待用。使用时将凝胶珠悬浮于昆虫生理盐水中。用注射器吸取 10 ~ 15 粒凝胶珠从 4 龄末期棉铃虫幼虫腹足基部(用医用碘伏消毒)注入其体腔内。每种凝胶珠各注射 10 头。24 h 后解剖棉铃虫取出凝胶珠,在相差显微镜下观察并照相。

1.2.1.2 棉铃虫对 Sephadex A-25 葡聚糖凝

^{*} 资助项目:武汉市晨光计划项目(200750731284)。

^{**} 通讯作者, E-mail: xshliu76@hotmail.com

收稿日期:2009-10-10,修回日期:2009-11-09

胶珠包裹过程的观察 向一批 4 龄末期棉铃虫幼虫体内注射 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠。分别在注射后的 2、4、6、8、12、24 h 解剖棉铃虫取出凝胶珠,在相差显微镜下观察并照相。每个时间点观察 10 头棉铃虫。

1.2.2 体外包裹分析

1.2.2.1 血淋巴的采集 在冰块上铺一层医用 PE 手套,取 5 龄棉铃虫幼虫,消毒后剪去一个腹足,将血淋巴滴在手套上冷却约 1 min,然后用移液器移取 10 μ L 血淋巴加入到冰浴的含 40 μ L 昆虫生理盐水的离心管中,混匀后待用。

1.2.2.2 96 孔板法 在无菌条件下,向 96 孔板每孔中加入 1% 琼脂糖 70 μ L,待其凝固后加入血淋巴 50 μ L 和 20~60 个 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠。将孔板用 Parafilm 膜封好后置于 26℃ 室温下培养。2 h 后将 96 孔板放于相差显微镜下观察血细胞的包裹情况,并进行拍照。

1.2.2.3 载玻片法 滴几滴血淋巴于载玻片上,再加入 3~5 个 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠。2 h 后将载玻片放于相差显微镜下观察血细胞的包裹情况,并进行拍照。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫对 2 种葡聚糖凝胶珠的包裹反应

从图 1 可以看出,棉铃虫对 G-200 葡聚糖凝胶珠包裹程度较弱,只在凝胶珠表面形成了很薄的细胞鞘(图 1:A);而对 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠则有很强的包裹反应,在凝胶珠表面形成了很厚的细胞鞘(图 1:B)。这表明棉铃

虫对不同的凝胶珠的包裹反应程度可能是不一样的。

2.2 棉铃虫对 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠体内包裹过程的观察

观察了注射后不同时间点凝胶珠被包裹的情况(图 2)。当凝胶珠被注射进棉铃虫体内后,棉铃虫的血细胞可迅速将其包裹。注射后 2 h,已可见有约两三层血细胞将凝胶珠子包裹住了。注射后 4 h,包裹的厚度有所增加。在随后的实验里,随着时间的推移,包裹的厚度越来越大,直至 12 h,包裹的厚度达到最大,此后厚度不再增加。从这些结果可以看出,棉铃虫启动对 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠的包裹反应是较迅速的,而包裹的完成大概是在 12 h 之后。

2.3 棉铃虫对 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠体外包裹的观察

利用 96 孔板法和载玻片法研究了棉铃虫血细胞体外包裹的能力(图 3)。结果表明,在离体的情况下,棉铃虫血细胞仍然能包裹 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠。

3 讨论

目前研究者多用凝胶珠来研究昆虫血细胞包裹作用的机理。选用合适的凝胶珠,是开展这方面研究的前提。不同的葡聚糖凝胶珠,由于其理化结构的不同,昆虫血细胞对其包裹与否及包裹的程度是不一样的^[3]。本研究也证实了这一点:棉铃虫血细胞对 Sephadex A-25 葡

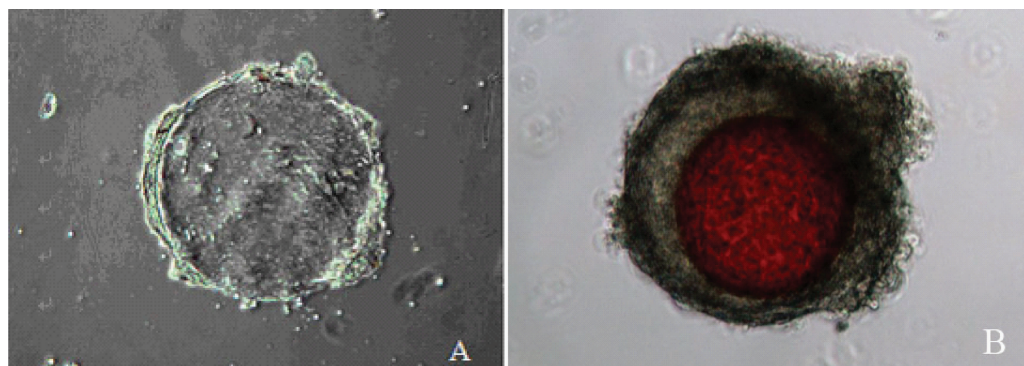


图 1 棉铃虫血细胞对 G-200(A) 和 Sephadex A-25(B) 2 种葡聚糖凝胶珠的包裹情况

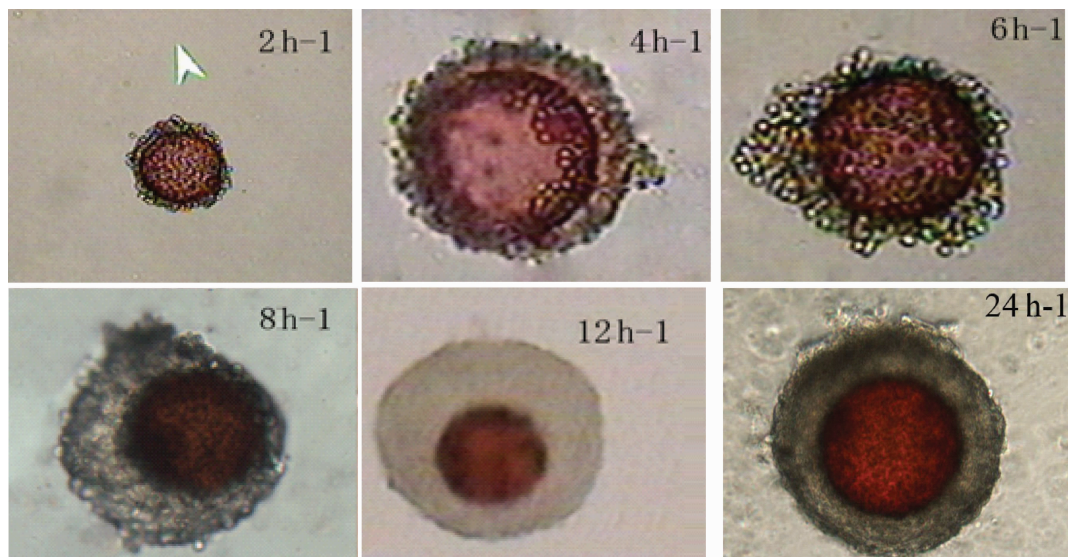


图2 棉铃虫血细胞体内包裹 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠的过程

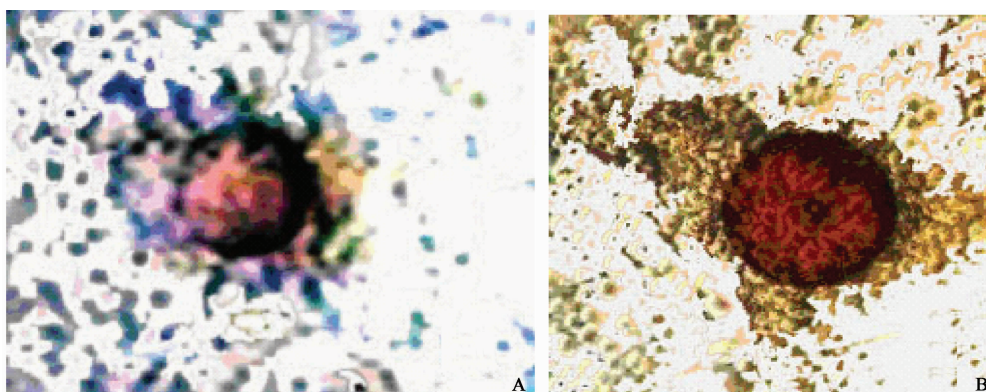


图3 棉铃血细胞对 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠体外包裹反应

A:96 孔板法 B:载玻片法

聚糖凝胶珠则有很强的包裹反应,而对 G-200 葡聚糖凝胶珠只有较弱的包裹反应。因此, Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠适合用于开展棉铃虫血细胞包裹作用的研究。

本实验还观察了棉铃虫体内包裹 Sephadex A-25 葡聚糖凝胶珠过程的。这一研究成果为将来深入开展棉铃虫血细胞包裹作用机理的研究(如研究包裹作用不同阶段的调控基因等)打下了基础。

在开展昆虫血细胞包裹作用机理的研究时,体外包囊分析也是一种常用的方法。本文尝试了2种体外包囊分析的方法,结果表明这

两种方法都可以用于分析棉铃虫血细胞的体外包裹反应。但这些方法也存在一些问题:96孔板法中,凝胶珠较难从琼脂糖层的表面取出拍照;两种方法中血细胞都不能长时间培养存活。在后续的工作中,我们将对这些体外包囊分析的方法进行改进以达到更好的效果。

参 考 文 献

- 1 Lavine M. D. , Strand M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 2002, **32** (10) : 1 295 ~ 1 309.
- 2 Schmidt O. , Theopold U. , Strand M. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *Bioessays*, 2001, **23** (4) :344 ~ 351.

3

Lavine M. D. , Strand M. R. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. *J. Insect. Physiol.* , 2001, **47** (9): 965 ~ 974.

4

Pech L. L. , Strand M. R. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J. Cell Sci.* , 1996, **109** (8):2 053 ~2 060.

5

胡建, 符文俊. 亚洲玉米螟幼虫血细胞的包裹行为. 动物学研究, 2003, **24** (6):435 ~440.

6

赵华福, 刘佳, 胡建. 一种体外分析亚洲玉米螟幼虫血细胞包裹的改进方法. 动物学研究, 2007, **28** (6):675 ~ 680.