

单环刺螈体腔液细胞的流式分布及抗菌活性研究

黄栋^{1,2}, 杨林彤^{2,3}, 焦绪栋², 秦松², 蒲洋^{1*}

(1. 鲁东大学农学院, 山东烟台 264025; 2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东烟台 264003; 3. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005)

摘要 通过不连续密度梯度离心结合流式细胞术对单环刺螈体腔液细胞进行聚类, 并对体腔液细胞抗菌活性进行测定。结果表明: 利用流式细胞术将不连续密度梯度离心获得的 Percoll 各细胞层与全部的体腔液细胞对比, 将单环刺螈体腔液细胞聚为 3 个亚群, 分别为白色透明细胞、红色颗粒细胞和半颗粒细胞。体外试验发现, 单环刺螈体腔液细胞具有一定的抑菌/杀菌能力, 可以减少大肠杆菌引发的溶血现象, 能通过呼吸爆发的方式抑制大肠杆菌的生长, 抑菌率为 22.36%; 但其对枯草芽孢杆菌的抑制效果甚微。单环刺螈体腔液细胞分类及抗菌活性的研究有助于丰富单环刺螈基础生物学内容, 完善单环刺螈的育苗、养殖的基础理论体系。

关键词 单环刺螈; 流式细胞术; 抗菌活性; 呼吸爆发

中图分类号 S917.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)03-0084-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.03.019



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Flow Distribution and Antibacterial Activity of *Urechis unicinctus* Coelomocytes

HUANG Dong^{1,2}, YANG Lin-tong^{2,3}, JIAO Xu-dong² et al (1. Agronomy College, Ludong University, Yantai, Shandong 264025; 2. Yantai Coastal Zone Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003; 3. College of Life Sciences, Yantai University, Yantai, Shandong 264005)

Abstract By the inconsequential density gradient centrifugation combined with flow cytometry, the coelomocytes were clustered, the antibacterial activity of coelomocytes was determined. The results showed that the cell layer obtained by Percoll discontinuous density gradient centrifugation was compared with all the coelomocytes by using flow cytometry, the coelomocytes were clustered into three subgroups, namely white hyalinocyte, red granulocyte and semi granular cells. In vitro experiment results showed that *U. unicinctus* coelomocytes had a certain bacteriological/bactericidal ability, which could reduce the hemolysis phenomenon caused by *E. coli*, and inhibit the growth of *E. coli* by the method of respiratory burst, with the antibacterial rate of 22.36%. The inhibition effect on *B. subtilis* was minimal. The classification and antibacterial activity study on *U. unicinctus* coelomocytes was helpful to enrich the basic biological content and improve the basic theoretical system of seedling and breeding of *U. unicinctus*.

Key words *Urechis unicinctus*; Flow cytometry; Antibacterial activity; Respiratory burst

据推测, 海洋无脊椎动物占海洋中动物总量的 90% 以上^[1], 大部分种类动物体内的体腔液或血液细胞尚未明确功能。目前普遍认为体腔液细胞是海洋无脊椎动物天然免疫防御系统的重要组成部分, 具有清除感染^[2]、吞噬异物^[3-4]、分泌免疫因子(如 C1q 凝菌因子^[5]、凝集素^[6]、棘色素-A^[7-8]等)、修复创伤组织^[9]等功能。

海洋无脊椎动物体腔液或血细胞尚缺乏统一的分类标准^[10]。在部分贝类^[11-13]、虾类^[14]、螃蟹^[15-16]血液细胞的研究中, 透明细胞(hyalinocyte)和颗粒细胞(granulocyte)被认为是普遍存在的主要细胞类群。刘东武等^[11]和许秀芹等^[12]将中国蛤蜊、太平洋牡蛎等 8 种常见双壳贝类的血淋巴细胞分为大颗粒细胞、小颗粒细胞和透明细胞; 李光友等^[14]和 Martin 等^[15]将中国对虾和 2 种单肢虾的血淋巴细胞分为大颗粒细胞、小颗粒细胞及透明细胞。Bodammer^[16]和胡锦丽等^[17]将蓝蟹和中华绒螯蟹的血淋巴细胞分为颗粒细胞、透明细胞及半颗粒细胞。

单环刺螈(*Urechis unicinctus*)是环渤海及北太平洋区域特有的一种海洋低等无脊椎动物。作为一种新兴的养殖品

种, 它具有较高的营养和经济价值^[18-19]。单环刺螈无心脏、血管等循环系统分化, 推测其体腔液及体腔液细胞具有营养物质输送、免疫防御等功能。目前对单环刺螈的研究较少。笔者利用密度梯度离心结合流式细胞术对单环刺螈体腔液细胞进行聚类分析, 并对其体腔液细胞的抗菌/杀菌活性进行测定, 旨在为单环刺螈育苗养殖过程中的病害防控提供基础理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料 购买市售活力较强、体表无明显损伤的单环刺螈, 平均体重(25.36±5.12)g; 置于 50 L 海水暂养池暂养 7 d, 池底铺设 15~20 cm 洁净海沙, 温度 18~20 ℃, 适量曝气, 不饲养。

1.2 体腔液细胞的流式分布 随机取单环刺螈 3 只, 先用 70% 乙醇擦拭体表消毒, 将含 EDTA-2K(0.1 mg/mL)的无菌注射器沿身体纵向刺入, 抽取 1 mL 红色体腔液并混匀。用无菌 PBS 缓冲液按说明书配制 Percoll 工作液, 在 10 mL 离心管中依次加入浓度 40%、35%、26%、20%、16% 的 1 mL Percoll 工作液, 形成不连续密度梯度。在最上层加入 1 mL 体腔液, 4 ℃、2 500 r/min 离心 30 min^[20-21]。离心结束后小心将形成的细胞层分别吸出并收集备用。

取不同梯度离心层, 使用流式细胞仪 FACS Aria(美国 BD, Becton Dickinson)进行检测, 检测前向角散射光(forward-scatter, FSC)和侧向角散射光(sidescatter, SSC)。试验数据使用 CELL Quest 软件处理。获取细胞数为 10 000 个, 分别以

基金项目 中国科学院青年创新促进会项目; 烟台市海洋经济创新发展示范城市项目(YHCX-SW-L-202004); 烟台市科技发展计划项目(2021YT06000426)。

作者简介 黄栋(1995—), 男, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向: 海水养殖及综合利用。* 通信作者, 讲师, 从事海岸带生物资源及开发利用研究。

收稿日期 2022-03-22

FSC 和 SSC 为横、纵坐标绘图,从门水平上圈出各个细胞亚群。

1.3 样品预处理

1.3.1 细菌悬浊液的制备。从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出实验室保存的枯草芽孢杆菌(ATCC W0825)、大肠杆菌(ATCC 25922)菌种,分别接种至 5 mL LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床培养过夜。将菌液 5 000 r/min 离心 5 min ,弃上清,沉淀用 PBS 洗涤,上述步骤重复 3 次,再用 PBS 重悬,并调节细菌浓度至 $1\times 10^7\text{ CFU/mL}$,备用。

1.3.2 体腔液细胞的制备。用 0.1 mg/mL 肝素钠浸润后的 1.5 mL 无菌注射器从海肠体腔中采集 1 mL 体腔液,将体腔液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 1 500 r/min 下离心 30 min ,弃上清,沉淀用无菌生理盐水(0.9 g NaCl , $100\text{ mL H}_2\text{O}$)洗涤,上述步骤重复 3 次,再用 L-15 液体培养基重悬,并调节细胞浓度至 $1\times 10^6\text{ CFU/mL}$,备用。

1.4 溶血试验 参照秦真东^[22]的方法测定枯草杆菌和大肠杆菌对体腔细胞的溶血情况。取 0.5 mL 的体腔细胞溶液,分别与 0.5 mL 枯草芽孢杆菌和大肠杆菌悬液混匀,室温孵育,分别于孵育后不同时间点取样, 3 800 r/min 离心 5 min 后取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 上清液加到 96 孔酶标板中,置于酶标仪 404 nm 处检测吸光值。

1.5 抗菌活性测定

1.5.1 呼吸爆发水平测定。

1.5.1.1 活性氧(ROS)水平的检测。参照单环刺螭呼吸肠 ROS 检测的方法^[23],取 0.5 mL 单环刺螭体腔细胞悬液与 0.5 mL 终浓度 $1\times 10^5\text{ CFU/mL}$ 的枯草芽孢杆菌和大肠杆菌悬液混匀, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 。按 1% 比例加入 DCFH-DA 探针, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 80 r/min 下避光孵育 60 min 。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 3 400 r/min 下离心 10 min ,用 PBS 缓冲液($\text{pH } 7.4$)洗涤 3 次,重悬后置于 96 孔荧光酶标板。使用荧光酶标仪(Fluoroskan Ascent FL, Thermo)设置激发波长 488 nm 、发射波长 525 nm ,检测吸光值。

取 0.5 mL 单环刺螭体腔细胞悬液分别与 0.5 mL 不同浓度($1\times 10^5\sim 3\times 10^5\text{ CFU/mL}$)的大肠杆菌悬液混合,按照同样方法测定吸光值。

1.5.1.2 一氧化氮水平的测定。参照张梦兰等^[24]对一氧化氮的检测方法,将单环刺螭体腔液细胞悬液与枯草芽孢杆菌、大肠杆菌(终浓度为 $1\times 10^7\text{ CFU/mL}$)按体积比 $1:1$ 加入 96 孔酶标板中,各 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min ;加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ gress A, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后再加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ gress B, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后,使用酶标仪检测 540 nm 处的吸光值。

取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 单环刺螭体腔细胞悬液分别与 $50\text{ }\mu\text{L}$ 不同浓度($1\times 10^7\sim 3\times 10^7\text{ CFU/mL}$)的大肠杆菌悬液混合,按上述同样方法测定吸光值。

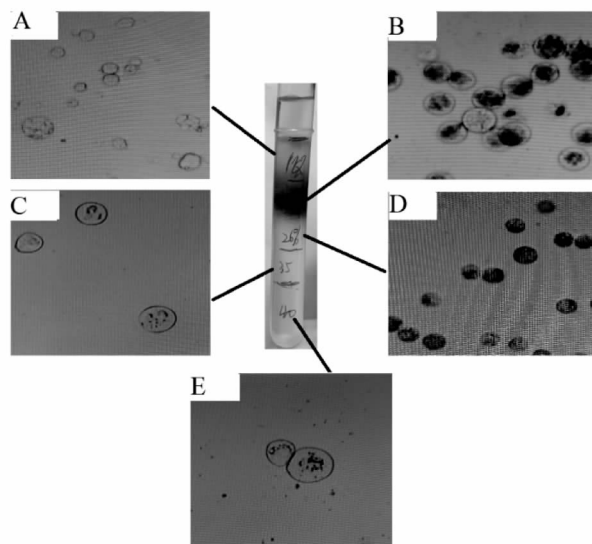
1.5.2 抗菌活性测定。参照 Du 等^[25]的方法将 1 mL 单环刺螭体腔液细胞悬液分别与枯草芽孢杆菌和大肠杆菌($1\times 10^5\text{ CFU/mL}$) $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min 。先将处理后的混合液进行 10 倍稀释,再涂布于 LB 固体培养基表面, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养后计算平皿上细菌菌落数量。以生理盐水作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 体腔液细胞分布 前期采用显微观察的方法分析单环刺螭体腔液细胞分布,发现单环刺螭体腔液细胞主要由红色颗粒细胞、白色透明细胞等构成。

利用 Percoll 不连续密度梯度离心可将单环刺螭体腔液细胞主要分为 3 层(图 1);红色颗粒细胞主要集中在 $20\%\sim 26\%$ 的 Percoll 工作液中; 20% 的 Percoll 工作液以近圆状、细胞内充满颗粒的红色细胞为主,内含少量无色透明细胞; 26% 的 Percoll 工作液以近圆状、充满颗粒的红色细胞为主,含少量的透明细胞;白色透明细胞主要分布在 16% 和 $35\%\sim 40\%$ 的 Percoll 工作液。 16% 的 Percoll 工作液以小型近圆状透明细胞为主,同时含有少量的红色颗粒细胞; 35% 和 40% 的 Percoll 工作液多为近圆状、大透明细胞及极少数红色颗粒细胞。

各密度层细胞群体的流式细胞分析结果如图 2 所示。通过与整体腔液细胞对比,根据其 FSC 和 SSC 特性,将体腔液细胞分为 3 个亚群(图 3):R1 亚群的 SSC 值最小,表明细胞的颗粒程度最低,主要为白色透明细胞;R3 亚群的 FSC 和 SSC 值均较大,表明细胞体积较大且含颗粒较多,主要为红色颗粒细胞;R2 亚群细胞的体积和颗粒程度处于 R1 和 R3 亚群之间,主要为半颗粒细胞。



注:A. 16%的 Percoll 工作液;B. 20%的 Percoll 工作液;C. 26%的 Percoll 工作液;D. 35%的 Percoll 工作液;E. 40%的 Percoll 工作液。

Note:A. 16% Percoll solution; B. 20% Percoll solution; C. 26% Percoll solution; D. 35% Percoll solution; E. 40% Percoll solution.

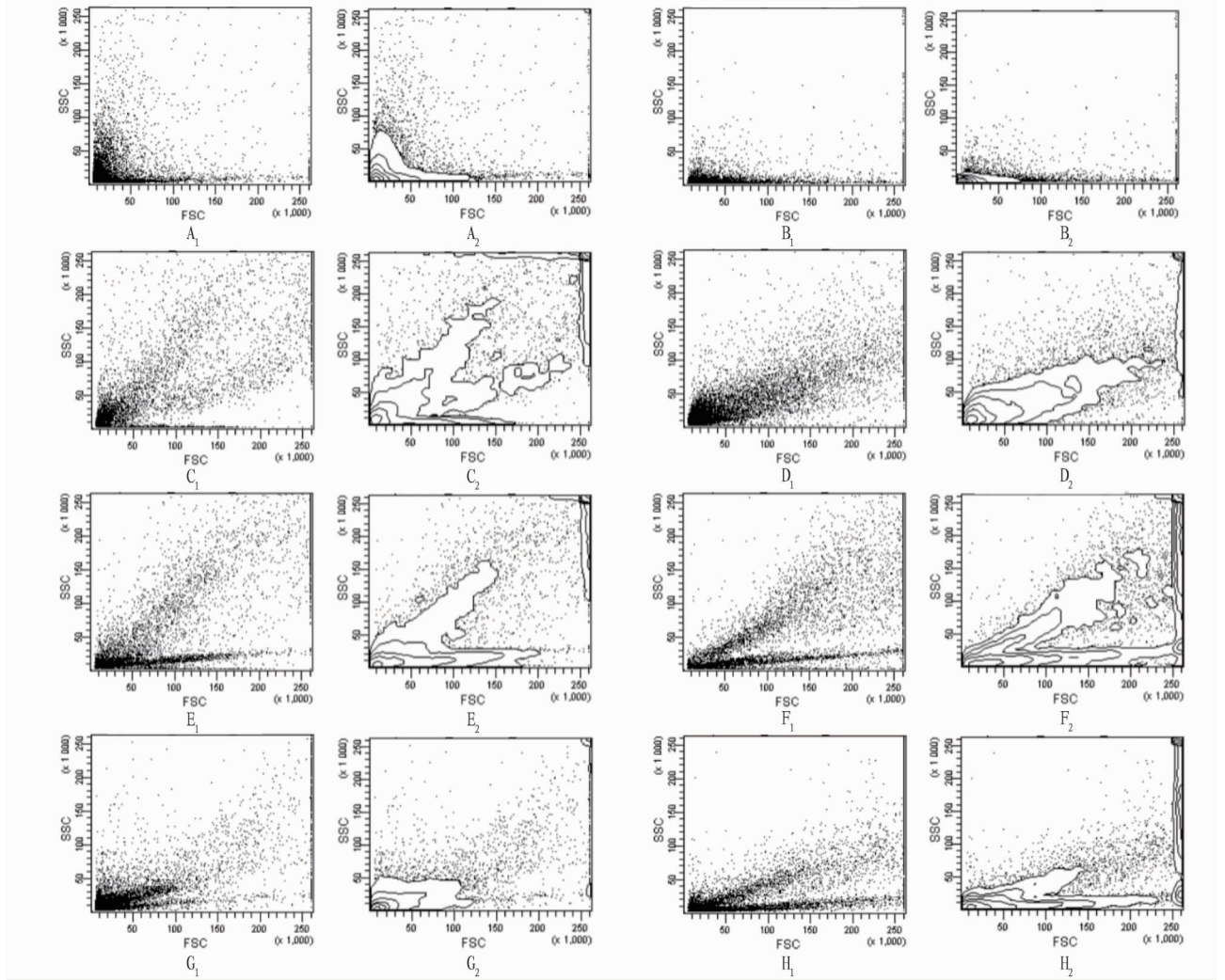
图 1 体腔液细胞 Percoll 不连续密度梯度离心图

Fig. 1 Percoll discontinuous density gradient centrifugation results of coelomocytes

2.2 溶血试验 试验结果表明,测试菌对体腔液细胞有一定的溶血效果。其中大肠杆菌引起的溶血现象较为迅速,混合后 10 min 即可形成明显的溶血现象,随着时间的延长,溶血现象受到抑制(图 4A);枯草芽孢杆菌引起的体腔液细胞溶血现象较为迟缓,但随着时间的延长,溶血现象持续发生

(图4B)。由此推测,单环刺螭体腔液细胞对大肠杆菌有一

定的耐受能力。



注:A₁和A₂分别为EDTA-2K溶液FSC和SSC双参数散点图和等高线图;B₁和B₂分别为Percoll工作液FSC和SSC双参数散点图和等高线图;C₁和C₂分别为体腔液细胞FSC和SSC双参数散点图和等高线图;D₁和D₂为16%Percoll工作液FSC和SSC双参数散点图和等高线图;E₁和E₂分别为20%Percoll工作液FSC和SSC双参数散点图和等高线图;F₁和F₂分别为26%Percoll工作液FSC和SSC双参数散点图和等高线图;G₁和G₂为35%Percoll工作液FSC和SSC双参数散点图和等高线图;H₁和H₂分别为40%Percoll工作液FSC和SSC双参数散点图和等高线图。

Note:A₁ and A₂ were FSC and SSC dual-parameter scatter plot and contour map of EDTA-2K respectively;B₁ and B₂ were FSC and SSC dual-parameter scatter plot and contour map of Percoll original solution respectively;C₁ and C₂ were FSC and SSC dual-parameter scatter plot and contour map of coelomic fluid cells respectively;D₁ and D₂ were FSC and SSC dual-parameter scatter plot and contour map of 16% Percoll solution respectively;E₁ and E₂ were FSC and SSC dual-parameter scatter plot and contour map of 20% Percoll solution respectively;F₁ and F₂ were FSC and SSC dual-parameter scatter plot and contour map of 26% Percoll solution respectively;G₁ and G₂ were FSC and SSC dual-parameter scatter plot and contour map of 35% Percoll solution respectively;H₁ and H₂ were FSC and SSC dual-parameter scatter plot and contour map of 40% Percoll solution respectively.

图2 不同Percoll工作液的流式细胞FSC和SSC双参数散点图和等高线图

Fig. 2 FSC and SSC dual-parameter scatter plot and contour map of flow cytometry in different Percoll solution

2.3 抗菌活性

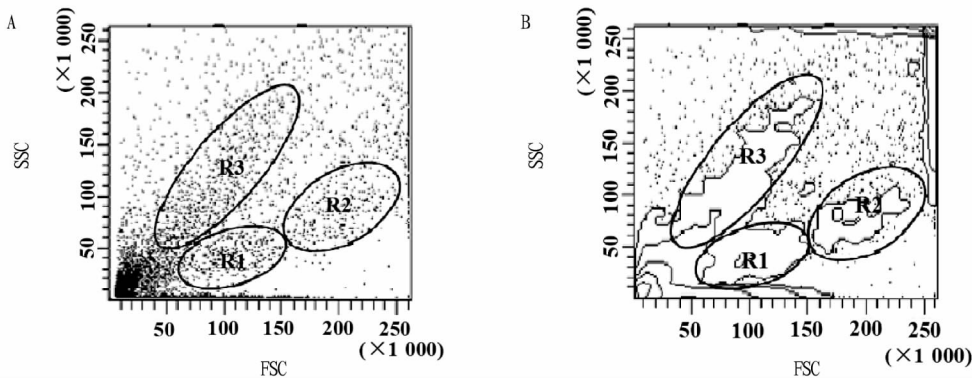
2.3.1 呼吸爆发水平测定。分别测定了大肠杆菌、枯草芽孢杆菌刺激后单环刺螭体腔液细胞呼吸爆发水平的变化,结果见图5。结果表明,在与2种细菌共培养后,单环刺螭体腔液细胞产生的活性氧(ROS)水平均高于对照(图5A),一氧化氮(NO)水平亦有所提高(图5B)。随着大肠杆菌浓度的升高,体腔液细胞产生的ROS变化不明显(图5A),但NO水平随着大肠杆菌浓度的增加而明显增加(图5B)。

2.3.2 抗菌活性分析。将待测菌与单环刺螭体腔液细胞共

培养1h后,利用平板计数法测定了2种细菌的菌落数量,结果见表1。结果显示,体腔液细胞对大肠杆菌有一定的杀伤效果,抑菌率为22.36%;体腔液细胞对枯草芽孢杆菌没有杀伤效果,反而促进了其生长。体腔液细胞组大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的存活率分别为77.64%和179.35%。

3 讨论与结论

该试验采用Percoll不连续密度梯度可将单环刺螭体腔液细胞初步可分为3层,但分离效果不明显,推测各层体腔液细胞间比重差异较小,后期有必要选择更好的分离方法或

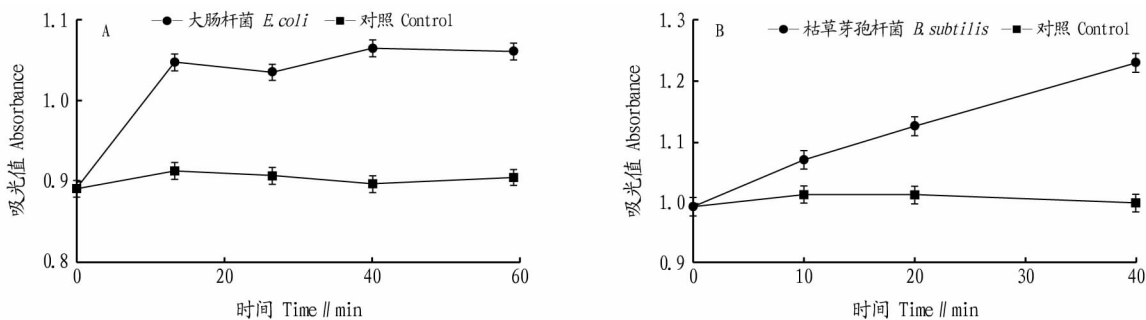


注: A. FSC 和 SSC 双参数散点图; B. FSC 和 SSC 双参数等高线图。

Note: A. FSC and SSC dual parameter scatter plot; B. FSC and SSC dual parameter contour map.

图 3 单环刺螈体腔液细胞 FSC 和 SSC 双参数散点图及等高线图

Fig. 3 FSC and SSC dual-parameter scatter plot and contour map of *U. uncinatus* coelomocytes

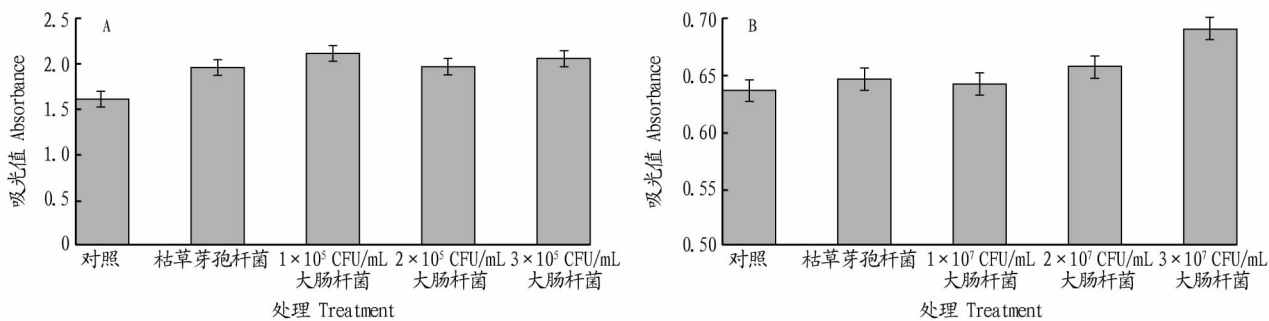


注: A. 大肠杆菌对单环刺螈体腔液细胞的溶血效果; B. 枯草芽孢杆菌对单环刺螈体腔液细胞的溶血效果。

Note: A. Hemolytic effect of *E. coli* on *U. uncinatus* coelomocytes; B. Hemolytic effect of *B. subtilis* on *U. uncinatus* coelomocytes.

图 4 细菌对单环刺螈体腔液细胞的溶血试验结果

Fig. 4 Hemolysis experiment results of bacteria on *U. uncinatus* coelomocytes



注: A. ROS 水平; B. NO 水平。

Note: A. ROS level; B. NO level.

图 5 2 种细菌对单环刺螈体腔液细胞呼吸爆发水平的影响

Fig. 5 The effects of two kinds of bacteria on the respiratory burst level of *U. uncinatus* coelomocytes

表 1 2 种细菌菌落数量的测定

Table 1 Determination of the colonies of two kinds of bacteria			
单位: CFU/mL			
组别 Group	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	
生理盐水组 Normal saline group	454.67±6.60	164.67±10.62	
体腔液细胞组 Coelomocytes group	353.00±12.83	295.33±4.64	

条件。流式细胞术用 FSC 反映细胞体积大小, SSC 反映细胞的颗粒度^[26-27]。该研究通过将不同浓度的 Percoll 细胞层与完整体腔液细胞流式分布图对比, 将单环刺螈体腔液细胞聚

为红色颗粒细胞、半颗粒细胞和白色透明细胞 3 个亚群, 与贝类、虾类、蟹类等物种分类结果类似^[11-12, 14-17]; 海洋无脊椎动物血细胞的种类及其细胞亚群随季节和地点的不同而不同^[28-29], 单环刺螈是否存在此现象值得进一步研究。

单环刺螈的体腔液存在一定的抑菌效果^[30]。溶血试验结果表明, 大肠杆菌可快速导致体腔液细胞呈现溶血现象, 但溶血现象随着时间的延长趋于平稳, 推测单环刺螈体腔液细胞对大肠杆菌具有一定的耐受性; 单环刺螈体腔液细胞对枯草芽孢杆菌的耐受性较差, 其溶血现象随着时间的延长而持续

增加。作为细胞非特异性免疫防御的机制之一,呼吸爆发的过程可产生 ROS、NO 等对细菌、病毒或其他外来物的刺激,产生应答反应^[31-32]。该试验结果显示,体腔液细胞可通过呼吸爆发对细菌进行杀灭,但杀菌效果随细菌浓度的增加而增大有限,而平板计数结果表明单环刺螠体腔液细胞对大肠杆菌具有明显的抑制作用,而对枯草芽孢杆菌的抑制效果不明显。

该研究结合不连续密度梯度离心和流式细胞术对单环刺螠体腔液细胞进行了聚类分析,并初步测试了其体腔液细胞对不同类型细菌的抑菌/杀菌效果。后续仍要对单环刺螠生活周期、时空变化下的体腔液细胞差异进行深入研究,并逐步明确不同类型体腔液细胞的生理功能,以期对单环刺螠的育苗、养殖提供基础理论支撑。

参考文献

- [1] 姜延午. 永不消失的生物标本[M]. 长春:吉林摄影出版社,2013.
- [2] SCHMID L S. Chemotaxis of hemocytes from the snail *Viviparus malleatus* [J]. Journal of invertebrate pathology, 1975, 25(1): 125-131.
- [3] DONAGHY L, KIM B K, HONG H K, et al. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis* [J]. Fish & shellfish immunology, 2009, 27(2): 296-301.
- [4] FLYE-SAINTE-MARIE J, SOUDANT P, LAMBERT C, et al. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle [J]. Journal of experimental marine biology & ecology, 2009, 377(1): 1-11.
- [5] KONG P F, ZHANG H, WANG L L, et al. AiC1qDC-1, a novel gC1q-domain-containing protein from bay scallop *Argopecten irradians* with fungi agglutinating activity [J]. Developmental & comparative immunology, 2010, 34(8): 837-846.
- [6] 金桥, 朱春芃, 佟长青, 等. 海绵 (*Craniella australiensis*) 凝集素抗 HIV 活性研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2014, 41(2): 290-293.
- [7] SERVICE M, WARDLAW A C. Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.) [J]. Comparative biochemistry and physiology part B: Comparative biochemistry, 1984, 79(2): 161-165.
- [8] COATES C J, MCCULLOCH C, BETTS J, et al. Echinochrome a release by red spherule cells is an iron-withholding strategy of sea urchin innate immunity [J]. Journal of innate immunity, 2018, 10(2): 119-130.
- [9] CAJARAVILLE M P, PAL S G. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment [J]. Cell structure and function, 1995, 20(5): 355-367.
- [10] 吴芳丽, 王月, 尚跃勇, 等. 水生无脊椎动物血淋巴细胞分类及免疫研究进展 [J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(6): 696-704.
- [11] 刘东武, 王宜艳, 孙虎山. 菲律宾蛤仔、中国蛤蜊、文蛤和紫石房蛤血细胞的分类研究 [J]. 水产科学, 2005(10): 5-7.

- [12] 许秀芹, 王宜艳, 孙虎山. 流式细胞术比较研究 4 种双壳类血细胞的分群 [J]. 海洋湖沼通报, 2006(1): 46-50.
- [13] 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.
- [14] 李光友, 王青. 中国对虾血细胞及其免疫研究 [J]. 海洋与湖沼, 1995(6): 591-597.
- [15] MARTIN G G, GRAVES B L. Fine structure and classification of shrimp hemocytes [J]. Journal of morphology, 1985, 185(3): 339-348.
- [16] BODAMMER J E. Cytological observations on the blood and hemopoietic tissue in the crab, *Callinectes sapidus* [J]. Cell and tissue research, 1978, 187(1): 79-96.
- [17] 胡锦涛, 任星潮, 刘逸尘, 等. 图像流式细胞仪在中华绒螯蟹血细胞分群及吞噬功能研究中的应用 [J]. 水产学报, 2019, 43(3): 563-572.
- [18] 黄栋, 秦松, 蒲洋, 等. 单环刺螠育苗养殖及综合利用研究进展 [J]. 海洋科学, 2020, 44(12): 123-131.
- [19] 吕慧超, 李秉钧, 焦绪栋. 单环刺螠的分子生物学研究进展 [J]. 生物学通报, 2020, 55(8): 1-4.
- [20] SMITH V J, SÖDERHÄLL K. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates [J]. Developmental & comparative immunology, 1991, 15(4): 251-261.
- [21] JOHANSSON M W, SÖDERHÄLL K. Separation of crustacean blood cells by continuous density gradient centrifugation [M]//STOLEN J S, FLETCHER T C, SMITH S A, et al. Techniques in fish immunology: Fish immunology technical communication 4. New Jersey: SOS Publications, 1995: 141-145.
- [22] 秦真东. 鱼类红细胞和虾类血淋巴细胞的免疫特性和抗菌机理研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [23] 李岳. 硫化物胁迫对单环刺螠 (*Urechis unicinctus*) ROS 介导的呼吸肠细胞凋亡初探 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- [24] 张梦兰, 卢志杰, 詹凡盼, 等. 草鱼 IgM 的表达及 B 淋巴细胞的抗菌活性 [J]. 水产学报, 2021, 45(1): 115-124.
- [25] DU H H, FU L L, XU Y X, et al. Improvement in a simple method for isolating white spot syndrome virus (WSSV) from the crayfish *Procambarus clarkii* [J]. Aquaculture, 2007, 262: 532-534.
- [26] FISHER W S, FORD S E. Flow cytometry: A tool for cell research in bivalve pathology [J]. American fisheries society special publication, 1988, 18: 286-292.
- [27] ASHTON-ALCOX K A, FORD S E. Variability in molluscan hemocytes: A flow cytometric study [J]. Tissue & cell, 1998, 30(2): 195-204.
- [28] MCCORMICK-RAY M G, HOWARD T. Morphology and mobility of oyster hemocytes: Evidence for seasonal variations [J]. Journal of invertebrate pathology, 1991, 58(2): 219-230.
- [29] OLIVER L M, FISHER W S. Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachicola Bay (Florida) [J]. Diseases of aquatic organisms, 1995, 22(3): 217-225.
- [30] 甘宏涛, 刘统昊, 丁子媛, 等. 单环刺螠体腔液抑菌特性研究 [J]. 水产科学, 2022, 41(3): 459-466.
- [31] CHANOCK S J, BENNA J E, SMITH R M, et al. The respiratory burst oxidase [J]. Journal of biological chemistry, 1994, 269(40): 24519-24522.
- [32] 胡文琴, 王恬, 孟庆利. 动物中活性氧的产生及清除机制 [J]. 家畜生态, 2004, 25(3): 64-67.

(上接第 83 页)

- [21] 韩冰. 男性也要巧用乌鸡白凤丸 [J]. 家庭医学, 2015(10): 17.
- [22] 曾杰. 泰和乌骨鸡特络细胞 (Telocytes) 鉴定及其与黑色素细胞的结构关系研究 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2020.
- [23] CHENG F Y, LAI T C, LIN L C, et al. The *in vitro* antioxidant properties of alcalase hydrolysate prepared from Silkie fowl (*Gallus gallus*) blood protein [J]. Animal science journal, 2016, 87(7): 921-928.
- [24] TIAN Y G, ZHU S, XIE M Y, et al. Composition of fatty acids in the muscle of Black-bone silky chicken (*Gallus gallus domesticus brissen*) and its bioactivity in mice [J]. Food chemistry, 2011, 126(2): 479-483.
- [25] TU Y G, SUN Y Z, TIAN Y G, et al. Physicochemical characterisation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe Black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus Brisson*) [J]. Food chemistry, 2009, 114(4): 1345-1350.
- [26] YAMAGUCHI S. Fundamental properties of umami taste [J]. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1991, 65(5): 903-906.
- [27] SOHN M, HO C T. Ammonia generation during thermal degradation of amino acids [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1995, 43(12): 3001-3003.

- [28] HWANG D F, CHEN T Y, SHIAU C Y, et al. Seasonal variations of free amino acids and nucleotide-related compounds in the muscle of cultured Taiwanese puffer *Takifugu rubripes* [J]. Fisheries science, 2000, 66(6): 1123-1129.
- [29] KATO H, RHUE M R, NISHIMURA T. Role of free amino acids and peptides in food taste [M]//Flavor chemistry. Washington, DC: American Chemical Society, 1989.
- [30] ZHENG J Y, TAO N P, GONG J, et al. Comparison of non-volatile taste-active compounds between the cooked meats of pre-and post-spawning Yangtze *Coilia ectenes* [J]. Fisheries science, 2015, 81(3): 559-568.
- [31] MOTTRAM D S. Flavour formation in meat and meat products: A review [J]. Food chemistry, 1998, 62(4): 415-424.
- [32] FARMER L J. Poultry meat flavor [M]//RICHARDSON R I, MEAD C C. Poultry meat science. New York: CAB International, 1999: 127-158.
- [33] CHO S H, SEONG P N, KIM J H, et al. Calorie, cholesterol, collagen, free amino acids, nucleotide-related compounds and fatty acid composition of Hanwoo steer beef with 1⁺⁺ quality grade [J]. Korean journal for food science of animal resources, 2008, 28(3): 333-343.
- [34] 王景升, 张时煌, 王彤, 等. 泰和乌鸡肉营养成分特征分析 [J]. 经济动物学报, 2019, 23(1): 23-28.