

虾类血细胞的分类与功能研究进展

陈琪, 康翠洁

山东大学 生命科学学院, 山东 青岛 266237

陈琪, 康翠洁. 虾类血细胞的分类与功能研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(1): 53-66.

Chen Q, Kang CJ. Advancements in the study of the classification and immune function of shrimp hemocytes. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 53-66.

摘要: 血细胞在动物的免疫防御体系中扮演了重要的角色, 尤其是对缺少适应性免疫的无脊椎动物。在这些动物中, 血细胞既参与细胞免疫的吞噬、包裹、结节等作用, 还参与体液免疫中许多免疫因子的生成与储存。对不同动物类群的血细胞的不同亚群进行区分, 是深入了解其免疫机制与血细胞功能的基础。尽管国内外学者利用不同的方法, 针对虾类血细胞的不同亚群的区分和功能做了很多研究, 但是目前还未形成统一的标准。基于此, 文中将已有研究结果进行了梳理与总结, 提出了虾类血细胞的三亚群分类法, 并对不同亚群的形态特点、免疫学功能进行了详细叙述, 期望能为了解无脊椎动物血细胞组成、进行血细胞相关的功能与分子机理研究以及改进和研发新的动物细胞分离技术提供帮助。

关键词: 虾类, 血细胞, 分类, 免疫功能

Advancements in the study of the classification and immune function of shrimp hemocytes

Qi Chen, and Cuijie Kang

School of Life Sciences, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China

Abstract: Hemocytes play an important role in the immune defense system of animals, especially for invertebrates that have no adaptive immune system. In those animals, hemocytes not only participate in the cellular immunity including phagocytosis, encapsulation, and nodules formation, but also the humoral immunity via storage and release of immune factors. Identification of the components of hemocytes is the basis for understanding the immune mechanism and the function of hemocytes. Despite various researches have been done on distinguishing the composition and function of shrimp hemocytes, no standard is used uniformly until now. So, we analyze and summarize the results on shrimp hemocytes research and offer a three subgroups category in this review. We also introduce the morphological characters and immune function of three subgroups in detail. We hope this work will be beneficial for understanding the function and molecular mechanism of hemocytes in invertebrate.

Received: May 12, 2020; **Accepted:** July 29, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31572655), National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFD0900303-04).

Corresponding author: Cuijie Kang. Tel: +86-532-58630197; E-mail: cjkang@sdu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31572655), 国家重点研发计划 (No. 2018YFD0900303-04) 资助。

网络出版时间: 2020-08-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200810.1706.005.html>

bringing ideas for new separation technology development.

Keywords: shrimp, hemocytes, classification, immune function

虾类是重要的水生经济甲壳动物，它们缺乏获得性免疫系统，主要依赖先天性免疫系统防御病原^[1]。近年来，由于病害影响，我国的甲壳动物养殖业遭受巨大损失。使用抗生素等药物会引起抗药性增加的问题，也会对水环境产生不良影响。因此研究水生甲壳动物的免疫机制，提高其本身的抗病能力，越来越受到人们的重视。虾类的先天性免疫过程包括细胞免疫和体液免疫。细胞免疫包括吞噬作用、包裹作用、结节生成等。吞噬作用能够清除较小的病原；而当病原较大时，多个血细胞会共同作用，形成包裹或结节将病原包裹。体液免疫由血淋巴中多种免疫因子共同参加发挥作用，这些免疫因子包括酚氧化酶系统成分、凝集素、抗菌肽等^[2-3]。

血细胞在虾类的免疫防御体系中扮演了重要的角色，既是细胞免疫过程的执行者，还能合成和释放多种免疫因子，为体液免疫提供物质基础。近半个世纪，不少研究者利用不同方法，研究了多种虾类血细胞的组成与功能。如叶燕玲等^[4]通过显微观察，将对虾 *Penaeus chinensis* 血细胞分为 3 类，并研究了各自的形态特点；陈平等^[5]利用电镜技术对 4 种对虾的血细胞进行了超微结构的研究并且进行了亚群的区分；Sung 等^[6]制备了斑节对虾 *Penaeus monodon* 不同血细胞亚群的单克隆抗体，将斑节对虾的血细胞进一步分成了 6 种不同功能的细胞亚群；段虎等^[7]经过两次密度梯度离心，获得了红螯螯虾 *Cherax quadricarinatus* 3 种不同的血细胞；Dantas-Lima 等^[8]用碘克沙醇密度梯度离心法，将南美白对虾 *Penaeus vannamei* 血细胞分成 Sub1 至 Sub5 共 5 个亚群；Koiwai 等^[9]利用凝集素和磁激活细胞分选的方法，根据番茄凝集素 (*Lycopersicon esculentum lectin*, LEL) 对细胞染色的结果，将日本对虾 *Marsupenaeus japonicus* 的血细胞分成

2 类；冼建安等^[10]用流式细胞术将红螯螯虾血细胞分为 3 类，并测定了 3 类细胞成分上的差异；龙思思等^[11]利用 Wright 染色和光镜观察将罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii* 血细胞分成 3 个类群。

也有学者对虾类免疫系统组成与功能进行了专门的综述。如 2000 年王建平等^[12]综述了当时虾类血细胞及体液免疫的研究情况；黄旭雄等^[13]在 5 年后发表文章，进一步综述了虾类免疫系统的研究进展；Vazquez 等^[14]对 2009 年前国际甲壳动物免疫机制的研究进行了总结；2010 年田飞焱等^[15]综述了淡水螯虾免疫学研究的进展；Söderhäll 等^[16]综述了甲壳动物造血作用的研究进展；还有研究者 Song 等^[17]对一种重要的抗菌肽类免疫因子——对虾素的功能进行了综述。这些综述文章的出现，表明对虾类免疫学的研究已经取得了很大进展，正在逐渐深入。近年来，许多新的技术方法被应用于虾类免疫机制的研究中，对虾类血细胞的组成和功能也形成了多种新的发现与认识，因此急需进行总结与探讨，以便于该领域不同研究者之间的交流与研究发展。

基于此，我们对 2000 年后尤其是近 5 年国内外针对虾类血细胞分类与功能的研究工作进行了梳理、总结与归纳，提出了虾类血细胞三亚群分类的具体标准，并且对各类群在不同分类方法下的主要形态特征和免疫学功能进行了详细描述。希望通过本文的总结与分析，形成对虾类血细胞相关研究的系统认识，为深入了解虾类免疫的机制和病害防控提供帮助。

1 虾类血细胞的分类及特点

1.1 常见虾类血细胞亚群的分类方法及依据

虾类的血液由血浆和血细胞组成。血浆为血液的主要部分，含有血蓝蛋白，非氧合状态下为

白色或无色, 氧合状态下呈蓝色。血细胞为卵圆形或椭圆形。

关于虾类血细胞的分类和命名, 由于不同学者使用的虾种类、研究方法和手段, 以及研究目的不同, 一直没有统一的认识。最初, 由于实验技术及实验条件的限制, 对于虾类血细胞亚群的划分, 主要通过光镜和电镜下的形态学观察和/或细胞染色特征, 根据细胞大小、核质比、细胞质中的颗粒大小及数量将血细胞亚群进行分类。

例如, 叶燕玲等^[4]通过光镜和透射电镜观察将中国对虾血细胞分为透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞。Martin^[18]、李光友等^[19]在研究了锐脊单肢虾 *Sicyonia ingentis*、加州对虾 *Penaeus californiensis* 和中国对虾的血细胞后, 根据血细胞颗粒的有无和大小, 将虾的血细胞分为无颗粒细胞 (Agranular hemocyte)、小颗粒细胞 (Small-granule hemocyte) 和大颗粒细胞 (Large-granule hemocyte)。陈平等^[5]应用电镜超薄切片技术, 对 4 种对虾的血细胞进行超微结构的研究, 根据血细胞内部特点, 特别是一些颗粒的大小和结构, 在透明细胞、小颗粒细胞、大颗粒细胞的基础上, 增加了一类浆样细胞。浆样细胞超微结构的特点类似于哺乳动物的浆细胞, 仅在患有病毒病的斑节对虾和日本对虾的结缔组织、淋巴样组织和组织间隙腔中常见。其特征是细胞呈卵圆形或者短梭形, 表面有少量微绒毛伸出, 异染色质明显多余常染色质, 且呈放射状排列, 形似车轮状。胞质内核糖体丰富, 高尔基复合物较发达, 胞质内充满糙面内质网, 以胞核为中心呈现圈状排列, 但不含特殊颗粒。推测它可能由透明细胞转化而来。Cornick 等^[20]根据颗粒的特点、核质比和 Giemsa 染色特征, 将螯龙虾 *Homarus americanus* 的血细胞分为 4 类: 前透明细胞 (Prohyalocyte)、透明细胞 (Hyalocyte)、嗜伊红颗粒细胞 (Eosinophilic granulocyte) 和拒染颗粒细胞 (Chromophobic granulocyte)。Van de Braak 等^[21]通过对斑节对虾的血细胞进行 May-

Grunwald-Giemsa 染色和光镜及电镜观察后, 将血细胞分为 5 种类型: 具有嗜酸性细胞质的血细胞、胞质轻微嗜酸性的椭圆形血细胞、胞质无色的血细胞、具有嗜酸性小球的血细胞、低核质比的血细胞。Vazquez 等^[22]利用光镜和电镜观察了罗氏沼虾的血细胞, 并结合其部分生物活性, 将血细胞分成 3 类: 数量最多且不加抗凝剂时会自行溶解的一类为透明细胞、大小和密度不均且具有吞噬活性的为颗粒细胞、数量最少的为未分化细胞。通过上述形态学特征来区分不同的血细胞亚群, 具有主观性强、重复性差的特点。且不同的实验条件如温度、抗凝剂、保存时间都可能对血细胞的数量、占比、细胞内颗粒的数量等因素造成较大的差异。

随着实验技术和理论不断发展, 许多学者又利用更多的技术、从不同的角度开展了对虾血细胞亚群的分类研究。从本世纪开始, 陆续出现用单克隆抗体技术进行分类的报道。例如, Sung 等^[6]利用不同血细胞亚群的单克隆抗体, 将斑节对虾的 3 类血细胞进一步分成了 6 种不同功能的细胞亚群。战文斌等^[23-24]也制备了中国对虾不同血细胞亚群的单克隆抗体, 并结合蔗糖密度梯度离心和免疫磁珠法, 较好地将对虾的透明细胞和颗粒细胞分离出来。Seibert 等^[25]制备的凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 的单克隆抗体, 与 3 种血细胞亚型均有反应, 还能识别另外两种对虾和一种牡蛎的血细胞。

虽然单克隆抗体技术在鉴定血细胞类型时更灵敏, 但使用该技术进行分类的专一性还有待加强。从 2000 年前后开始, 就有许多学者在不同的虾中使用了 Percoll 密度梯度离心的方法, 得到了较好的分离效果^[7,26-27], 如段虎等^[7]经过两次密度梯度离心, 获得了红螯螯虾 3 种不同的血细胞。其中, 颗粒细胞在 65% Percoll 层, 纯度超过 99%; 第 2 次离心后, 半颗粒细胞主要位于下层, 即 35% Percoll 处, 比重约为 83%, 而在上层, 透明细胞

约占总数的 90%。Dantas-Lima 等^[8]用碘克沙醇 (Iodixanol) 密度梯度离心法, 根据血细胞在密度梯度条带中从上到下出现的顺序, 将南美白对虾血细胞分成了 Sub1 至 Sub5 共 5 个亚群, 其中 Sub1 具有透明细胞的典型特征, Sub4 具有半颗粒细胞的特征, Sub5 与颗粒细胞高度相似, 而 Sub2 和 Sub3 亚群的形态和染色特征处于颗粒细胞和半颗粒细胞之间; Sub2 细胞在体外存活时间最长, 半数可达到 96 h; Sub1 和 Sub4 亚群细胞还具有吞噬活性。Koiwai 等^[9]利用凝集素和磁激活细胞分选 (Magnetic-activated cell sorting, MACS) 的方法, 先根据麦胚凝集素 (Wheat germ agglutinin, WGA) 和番茄凝集素 (*Lycopersicon esculentum* lectin, LEL) 对血细胞染色, 再进一步 MACS 方法将血细胞亚群进行区分。

流式细胞仪可以快速测量、显示悬浮在液体中的单个活细胞的一系列特征参量, 并可以根据预选的参量范围将指定的细胞亚群分选出来。这些分选信息主要来自细胞受到激光照射后产生的非荧光散射信号或者特异性荧光信号。在测量中, 常用两种散射方向的散射光测量: ①前向散射 (Forward scatter, FSC), 即 0 度角散射。其信号强度取决于细胞的大小, 并与同一细胞类型的细胞截面积的大小成正比; ②侧向散射 (Side scatter, SSC), 又称 90 度角散射。其信号强度越大, 说明细胞内部成分越复杂, 通常用来了解细胞内部颗粒性质的相关信息。近几年来, 陆续有学者开始采用流式细胞技术进行不同虾类血细胞的分离与功能研究。如 Yang^[28]、Sun 等^[29]分别对凡纳滨对虾和南美白对虾血细胞进行了研究, 洗健安等对斑节对虾^[30]、克氏原螯虾 *Procambarus clarkia*^[31]血细胞进行了研究, Li 等^[32]对红螯螯虾进行了研究, Koiwai 等^[27]对日本对虾血细胞开展了研究。上述学者的研究结果显示, 大多数虾类血细胞都可以根据 FSC 和 SSC 的测定特征分为 3 个细胞亚群, 即 FSC 和 SSC 都最小的类群 (透

明细胞), FSC 和 SSC 都最大的类群 (颗粒细胞) 和介于两者中间的细胞群 (半颗粒细胞) (图 1)。Yang 等对使用流式细胞术分离出的 3 类凡纳滨对虾的血细胞亚群进行了染色与光镜观察分析, 结果发现, 用流式细胞仪分离出的 3 类与 Wright 染色得到的 3 类细胞的分类特征相同, 即透明细胞体积最小、胞内成分最简单, 颗粒细胞体积最大、胞内成分最复杂^[28]。

1.2 虾类血细胞三亚群分类法与鉴定特征

通过综合分析上述不同方法中对不同虾类血细胞的分类结果与命名方式, 结合其他无脊椎动物类群中血细胞分类方法与标准, 我们建议, 根据血细胞中颗粒的数量、细胞大小以及核质比, 把虾类的血细胞分为 3 个亚群, 透明细胞 (Hyaline cell,

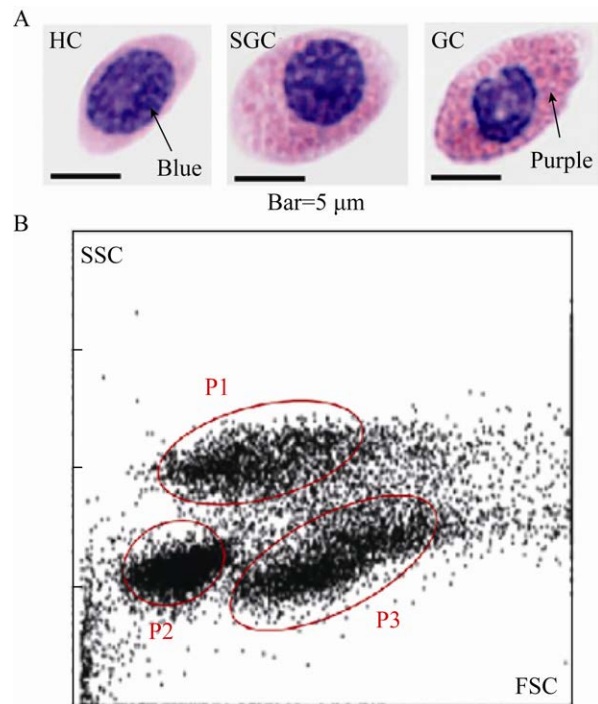


图 1 凡纳滨对虾 3 种血细胞的 HE 染色^[8] (A) 与流式细胞仪分析图^[28] (B)

Fig. 1 HE staining (A) and flow cytometric analysis (B) of three types of hemocytes from *Litopenaeus vannamei*. (A) HE staining^[8]. HC: hyaline cell; SGC: semi-granular cell; GC: granular cell. (B) Flow cytometric analysis^[28]. P1: granular cell; P2: hyaline cell; P3: semi-granular cell.




HC)、半颗粒细胞 (Semi-granule cell, SGC) 和颗粒细胞 (Granular cell, GC)。各亚群光镜下的外观特征模式图和主要特点^[33-34]见表 1, 3 类血细胞亚群的 Wright-Giemsa 染色特征^[35-36] (图 1A)、流式细胞仪分析^[28-29,37] (图 1B) 与电镜观察下^[4-5]主要特点如下: (1) 透明细胞染色后, 细胞核呈蓝色, 细胞质呈无色或淡紫色, 胞质中无明显颗粒或仅见 1 至数个红色小颗粒。流式细胞仪分析结果图中, 前向散射和侧向散射都最小。电镜观察会发现透明细胞含有少量线粒体、糙面内质网、滑面内质网和核糖体, 高尔基复合体不多见。(2) 半颗粒细胞染色后, 细胞核呈蓝色, 细胞质呈淡紫色, 胞质中含有少量红色小颗粒。流式细胞仪分析结果图中, 前向散射和侧向散射介于另外两种细胞之间。电镜观察会发现半颗粒细胞富含线粒体, 还含有核糖体、内质网、高尔基体等细胞器。(3) 颗粒细胞胞质中含有大量较大颗粒, 染色后颗粒呈

蓝紫色或紫红色, 颗粒越成熟, 染色越深。染色后细胞核呈蓝色, 细胞质呈淡紫色或淡红色。流式细胞仪分析结果图中, 前向散射和侧向散射都最大。电镜观察会发现颗粒细胞含有许多核糖体与内质网。

但是, 也有学者有不同的发现, 如洗健安等^[10]通过电镜观察发现, 在红螯螯虾中, 颗粒细胞含有最多的线粒体, 半颗粒细胞次之, 透明细胞最少; 溶酶体数量也在颗粒细胞中最多, 透明细胞中最少。这种差异可能由于研究的虾类所处的生理病理状态不同所致。例如, 汪小锋等^[38]发现, 在 β -葡聚糖和脂多糖刺激下, 中国对虾的半颗粒细胞和颗粒细胞内, 糙面内质网和游离核糖体数量明显增多、线粒体数量增加、胞内分泌颗粒的数量大幅度减少。而在脂多糖刺激后, 透明细胞中除糙面内质网及线粒体数量略有增加、核孔复合体数量明显增加外, 没有其他的显著差异。

表 1 虾类血细胞的 3 个亚群及主要特征

Table 1 The characteristics of three subpopulations of shrimp hemocytes

Characteristic	Hyaline cell (HC)	Semi-granule cell (SGC)	Granular cell (GC)
Size	Smallest; 4.4–20 μm in diameter	Medium; 15–22 μm in diameter	Largest; 17–32 μm in diameter
Shape	Oval or subround 	Mostly oval or ellipse 	Mostly ellipse 
Nuclear-cytoplasmic ratio	Largest; with little cytoplasm	Medium; nucleus is clear and on one side of the cell	Smallest; with abundant cytoplasm
Granules	No granules in cytoplasm	Small granules in cytoplasm, 0.2–0.4 μm in diameter	Large granules in cytoplasm, with strong refraction and even distribution, 1.2–1.8 μm in diameter
Wright-Giemsa stain	The nucleus is blue, the cytoplasm is colorless or mauve, with no visible granules or few red granules in cytoplasm	The nucleus is blue, the cytoplasm is mauve, with a few small red granules in cytoplasm	The nucleus is dark blue, the cytoplasm is mauve or red, with many large blue-purple or purplish red granules in cytoplasm. Mature granules are darker stained
Flow cytometry analysis	Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) are both minimal	FSC and SSC are between the other two types of cells	Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) are both maximum
Under electron microscope	Contain a small number of mitochondria, rough endoplasmic reticulum, smooth endoplasmic reticulum and ribosomes, and golgi apparatus is rare	Contain ribosomes, endoplasmic reticulum, and golgi apparatus, and rich in mitochondria	Contain many ribosomes and endoplasmic reticulum

1.3 虾类免疫反应中 3 种血细胞亚群发挥的功能

血细胞在宿主的免疫反应中主要参与体液免疫因子的储存与释放、吞噬作用、包裹与结节、凝结功能和伤口修复,如图 2 所示。

1.3.1 吞噬

吞噬作用是直径小于 10 μm 的异物入侵机体后,被血细胞识别和摄取,最终清除的过程^[14]。大多数学者研究发现,虾类透明细胞的主要功能是吞噬,而半颗粒细胞和颗粒细胞的吞噬活性相对有限^[12,39-40]。但是还有一些研究中发现,另外两类细胞,特别是半颗粒细胞也被认为是吞噬细胞。黄旭雄等^[13]认为,虾类的半颗粒细胞对外源物质非常敏感,只有在脱颗粒之后才具有吞噬活性。洗建安等^[10]

发现,红螯螯虾半颗粒细胞对 1 μm 荧光微球 (FMs) 的吞噬率最高,颗粒细胞次之,透明细胞最低。Giulianini 等^[41]在一种淡水螯虾 *Astacus leptodactylus* 中的研究也得到了相似的结果,即所有 3 种类型的血细胞都参与了外来颗粒的吞噬作用,其中半颗粒细胞是主要的吞噬细胞。此外,也有学者证明了颗粒细胞的吞噬活性。Duan 等^[42]发现红螯螯虾的颗粒细胞可以吞噬荧光珠和大肠杆菌。Li 等^[32]将 FMs 注射到红螯螯虾体内,结果发现,0.2 μm FMs 几乎完全被半颗粒细胞吸收,而颗粒细胞和半颗粒细胞都可以吸收 2 μm FMs,他们认为参与吞噬的细胞类型与病原的体积有关。这些不同的结果可能是由于所用虾的种类、外部条件的变化、外源物质的性质,或者对血细胞分类的依据有所不同。

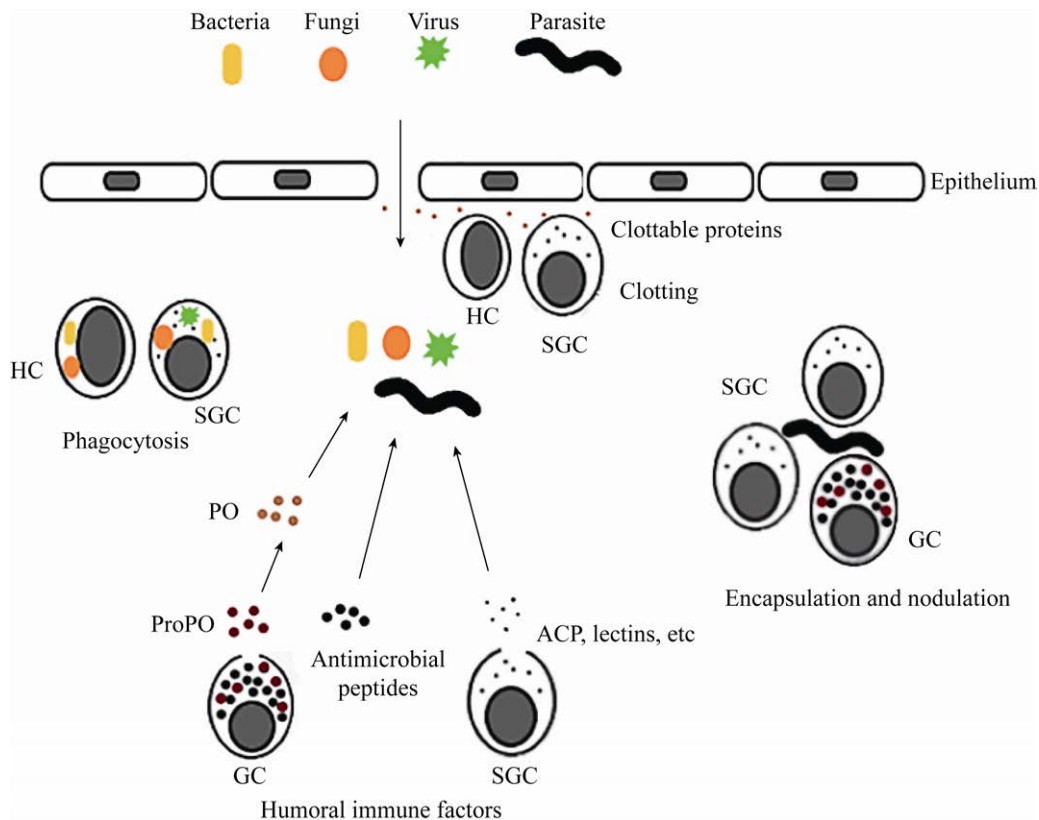


图 2 虾类血细胞的免疫功能

Fig. 2 Immune function of shrimp hemocytes. HC: hyaline cell; SGC: semi-granule cell; GC: granular cell; PO: phenoloxidase; proPO: prophenoloxidase; ACP: acid phosphatase.

1.3.2 形成包囊或结节

包囊是一种多细胞反应,当入侵的异物颗粒直径大于 10 μm 时,无法被单个细胞吞噬,多个血细胞会在病原表面聚集起来,形成包囊,从而杀死病原,此后再发生黑化作用而阻止异物的入侵^[15]。而当外源物质的体积过大、吞噬和包囊作用无法将其清除时,大量的血细胞会形成结节,防止机体受到伤害^[33]。目前认为,半颗粒细胞是包囊作用的主要执行细胞,其他细胞参与较少^[26,43],颗粒细胞参与了结节形成过程和随后的黑化过程^[33]。陆剑锋等^[44]通过观察克氏原螯虾血细胞对外源硅珠产生的包囊结构,发现识别外源体和形成免疫应答的血细胞主要为半颗粒细胞。蔡渭明等^[45]通过电镜观察,认为另外 2 类血细胞不能进行包囊作用,并且半颗粒细胞中的大量线粒体,很可能是其能够识别异物并发挥包囊作用的重要原因。而 Vazquez 等^[14]认为,包囊作用主要发生在含有折光性颗粒的半颗粒细胞中。邓欢等^[46]发现,在注射鳗弧菌的中国对虾体内,包囊产生于多种器官和组织;随着颗粒的释放,半颗粒和颗粒细胞的表面产生了变化,开始与周围细胞相粘接,并且胞内的细胞器趋于退化;含吞噬泡的透明细胞也常被包围在包囊内。

1.3.3 在体液免疫中的作用

血细胞通过合成和释放许多免疫相关因子,为体液免疫提供物质基础。这些体液免疫因子包含了多种生物活性分子,主要有溶菌酶、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、抗菌肽 (Antimicrobial peptides)、凝集素 (Lectin),以及酚氧化酶系统等,在甲壳类动物机体的免疫防御反应中具十分重要的作用。而不同类型的血细胞储存的体液免疫因子不尽相同。Zhu 等^[37]比较了中国对虾的透明细胞与含颗粒的细胞之间转录组分析结果的差异,发现与蛋白结合相关的基因在透明细胞中有高表达,而具有催化活性、酶调节活性和翻译调节活性的一些基因在含颗粒的血细

胞中表达较多,并且只存在于含颗粒的血细胞中。这些具有催化活性、酶调节活性和翻译调节活性的因子中,很多都是体液免疫中的重要成分。

在对虾中,与免疫反应有关的酶类了解较为深入的有:溶菌酶、碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP)、酸性磷酸酶 (Acid phosphatase, ACP)、过氧化物酶 (Peroxidase, PRX)、酚氧化酶 (Phenoloxidase, PO)、超氧化物歧化酶、消化酶等^[12]。Hose 等^[47]研究发现,在锐脊单肢虾的半颗粒细胞中,酸性磷酸酶位于胞内的小颗粒以及高尔基体的小囊泡内,而颗粒细胞中则很少,他们认为颗粒细胞中的酸性磷酸酶可能以非活性形式存在于胞内的大颗粒中。刘晓云等^[48]运用电镜酶细胞化学技术,对中国对虾的血细胞和血清中的酚氧化酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和过氧化物酶的酶活性部位进行标记,实验结果显示:这几种酶在半颗粒细胞和颗粒细胞中的含量不同,PO 主要由颗粒细胞分泌,ACP、ALP 和 PRX 主要由半颗粒细胞分泌,且 ACP 和 ALP 以酶原形式存在于半颗粒细胞的颗粒体中;透明细胞虽然也含有 ACP 和 ALP 等溶酶体酶,但它们主要用于胞内异物的吞噬,不会被分泌出去。赵柳兰等^[49]分析了不同发育阶段日本新糠虾 *Neomysis japonica* 的 ACP、ALP、PO 和溶菌酶的水平,发现随着个体的发育,4 种酶的活性都会逐渐降低,其中 ACP 和 ALP 的活性降低最显著。

超氧歧化酶是生物体中重要的抗氧化酶。可以将细胞呼吸代谢或者免疫反应中产生的具有毒性的活性氧成分 (Reactive oxygen species, ROS) 超氧阴离子转变为过氧化氢^[50]。在红螯螯虾和克氏原螯虾^[10,31]的研究中都发现,活性氧的含量在颗粒细胞中最多,透明细胞中最少,并且有显著差异。在斑节对虾中,也是颗粒细胞的 ROS 最多,透明细胞最少^[51]。近年来在美国信号螯虾 *Pacifastacus leniusculus* 颗粒细胞中发现 SOD 特异性表达,因此被认为可以成为颗粒细胞的标记

分子^[52]。

酚氧化酶原激活系统是一个涉及多种酶级联反应的系统。当细菌或真菌感染虾时,该系统会被激活,酚氧化酶原 (Prophenoloxidase, proPO) 被活化成为有活性的酚氧化酶。酚氧化酶是一种氧化还原酶,可将酚类氧化为醌类,醌自发形成黑色素,与包囊和结节过程共同发挥清除病原的功能^[53]。研究表明,虾类的酚氧化酶原主要以非活性的形式存在于颗粒细胞中,通过胞吐作用释放出来,进而转化成酚氧化酶^[32,54-55]。也有学者认为,虾类半颗粒细胞中也存在酚氧化酶原。如黄旭雄等^[13]认为 proPO 主要存在于颗粒细胞内,少量存在于半颗粒细胞内。Vazquez 等^[14]认为, proPO 存在于半颗粒细胞和含较大折光性颗粒的血细胞中。田飞焱等^[15]则认为,淡水螯虾的 proPO 激活系统存在于半颗粒细胞的颗粒中。

抗菌肽是一类小分子多肽,可以直接抑制或者杀死病原。在甲壳动物中,它包含多种功能不同的类型,如对虾素 (Penaeidin)、抗脂多糖因子 (Anti-lipopolysaccharide factors)、甲壳素 (Crustin) 等。在虾类中,抗菌肽主要储存场所是颗粒细胞^[14,56]。对虾素是抗菌肽的成员,在对虾中普遍存在,以储存形式存在于颗粒细胞中,具有抗真菌和革兰氏阳性细菌的特性,在微生物刺激后从血细胞中分泌出来^[17,57]。笔者实验室对中国对虾中对虾素的研究发现,该种抗菌肽主要在颗粒细胞和半颗粒细胞中表达,透明细胞中基本没有该基因的转录^[58]。甲壳素是广泛分布于甲壳类动物体内的富含半胱氨酸的抗菌肽, Bandeira 等^[59]研究发现,圣保罗对虾 *Farfantepenaeus paulensis* 中的 Crustin 由颗粒和半颗粒血细胞合成和储存,透明细胞中没有;有趣的是,并不是所有的颗粒状和半颗粒状血细胞对 Crustin 染色后都是阳性结果,这表明 Crustin 也许是由特定的含颗粒的血细胞亚群产生的。而 Koiwai 等^[27]对日本对虾的血细胞亚群进行了转录组分析,发现一种与 Crustin 高度同

源的基因,在颗粒细胞中的表达显著多于另外两种,他们认为这有望成为颗粒细胞的分子标记。

凝集素是一类能结合糖类的蛋白,包含一个碳水化合物识别域 (Carbohydrate recognition domain, CRD),能够专一性地识别并结合不同细胞表面特定的碳水化合物序列,然后相互交联,促进血细胞对异物的吞噬,引起细菌凝集并起到调理素作用^[53,56]。有学者^[13]认为,虾类除血清中有胞外凝集素外,细胞内的凝集素主要存在于透明细胞中。而另一些学者^[14]认为,凝集素存在于透明细胞、半颗粒细胞和含折光性颗粒的血细胞中。

1.3.4 凝结作用

当虾受到机械损伤时,损伤部位的血淋巴快速凝结是一个重要的免疫过程,可防止损伤后血淋巴的流失和微生物的入侵。凝结作用依赖于凝结蛋白 (Clottable protein, CP) 聚合物的形成,这种聚合物是由谷氨酰胺转胺酶 (Transglutaminase, TG) 催化形成^[53]。而 TG 在虾中主要由透明细胞和半颗粒细胞储存和释放^[13,60]。Yang 等^[28]研究发现,凡纳滨对虾中 TG 的 mRNA 在透明细胞中的表达水平是另外 2 类细胞中的 10-20 倍。还有一些学者认为,颗粒细胞参与了凝结过程。Vafopoulou 等^[61]研究发现,克氏原螯虾受到创伤后 48 h 内,透明细胞聚集在伤口下方,同时颗粒细胞会进行吞噬作用。Maningas 等^[62]认为,虾类凝血的过程存在一种级联机制,模式识别分子识别病原后,使含颗粒细胞中的抗菌肽活化,进而激活凝血系统,产生凝结蛋白。钱云霞等^[63]则认为,甲壳动物血液凝固反应所需的分子都储存在颗粒细胞内,会通过颗粒细胞的胞外分泌释放出来;甲壳动物识别病原并触发颗粒细胞的胞外分泌,是凝固反应发生的第一步。

1.3.5 抗病毒反应

目前认为,半颗粒细胞和颗粒细胞是发挥细胞免疫抗病毒反应的主要细胞类群^[57,64]。Xue 等^[65]

从分子水平, 分别在对虾白斑综合症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 感染前、感染早期、感染晚期, 对凡纳滨对虾进行转录组测序, 结果显示病毒感染早期宿主转录谱略有变化, 而感染晚期有较大差异。差异表达基因主要涉及模式识别基因和一些免疫应答因子, 如 Toll 受体、Crustin、C 型凝集素等。这些体液免疫相关因子主要存在于半颗粒细胞和颗粒细胞中, 因此可以推测这 2 类细胞在虾类抗病毒反应中发挥了重要作用。Li 等^[32]发现, 在红螯螯虾中, 大肠杆菌被半颗粒细胞和颗粒细胞摄取, 而 WSSV 主要被半颗粒细胞摄取。细菌细胞被迅速清除, 而 WSSV 颗粒逐渐内化并在细胞中停留较长时间。Havanapan 等^[66]发现, 在斑节对虾中, 黄头病毒 (Yellow head virus, YHV) 主要与含颗粒的血细胞相互作用并在其中进行复制, 而在透明细胞中几乎检测不到。张科红^[67]研究发现, 日本对虾中的蛋白 *MjVIG1* 主要在含有颗粒的细胞中表达, 并且随着 WSSV 感染时间的增加, 其表达量也增加。此外, WSSV 病毒感染对总血细胞数也有明显影响。笔者实验室研究表明^[68], WSSV 感染日本对虾后会诱导血细胞的凋亡现象, 在 56 h 内, 凋亡细胞总数由 3.6% 上升到 30%。Song 等^[69]研究发现, 凡纳滨对虾在感染桃拉综合症病毒 (Taura syndrome virus, TSV) 后, 其血细胞总数和颗粒细胞数分别只有正常组的 21% 和 17%。

综上所述, 我们将虾类不同亚群血细胞在免疫中的功能进行了总结, 见图 2。

2 总结与展望

对血细胞不同类群的分离, 是研究动物先天免疫过程与功能的基础。只有找到高效、便捷、重复性好和特异性强的血细胞亚群的分离和鉴定方法, 才能进行更深入的实验研究。但目前分离血细胞的主要技术都存在一定缺陷: 密度梯度离心法速度较快, 但分离出的细胞数量较少, 分离

后细胞的提取操作麻烦; 流式细胞术操作简单、细胞纯度高, 但流式细胞仪的使用成本高, 且分离过程耗时较长; 单克隆抗体技术分离灵敏度高, 但制备时间久、成本高。因此, 找到分离速度快、纯度高、成本低且能保持细胞高存活率的方法, 仍是无脊椎动物血细胞相关研究工作需要解决的问题。

综合不同学者对虾类血细胞分类的研究结果可以发现, 3 种血细胞亚群的数量、占比、功能等方面, 在不同文章中的结论存在一定差异, 甚至不同学者会得出完全相反的结论。例如, 暨南大学周晖^[36]对 12 种虾蟹均采用 Wright-Giemsa 染色结合光镜观察的方法进行研究, 结果表明, 海水虾的 3 类血细胞整体上比淡水虾的小, 不同品种虾类循环血细胞的总数差别较小, 范围在 0.4×10^7 – 2.5×10^7 个/mL。其他学者对不同虾类血细胞大小的研究中, 也发现淡水虾类血细胞较大的特点。如罗氏沼虾^[11]、红螯螯虾^[33]等淡水虾的透明细胞平均直径约为 10 μm 、半颗粒细胞约为 15 μm , 颗粒细胞则能达到 16 μm 以上; 而南美白对虾^[8]、斑节对虾^[70]等海水虾的透明细胞直径约为 8 μm , 半颗粒细胞约为 10 μm , 颗粒细胞不超过 15 μm 。然而, 冼建安等^[10]通过对 8 种虾类进行比较后提出, 海水虾的血细胞总数高于淡水虾, 淡水虾血细胞的数量级为 10^5 – 10^6 个/mL, 而海水虾则是 10^7 个/mL; 他同时指出, 遇到环境胁迫或疾病时, 血细胞总数会有下降的趋势, 具体的变化规律仍需深入研究。

除此之外, 多个研究发现, 环境因素、生理状态及发育时期等因素的变化均可能导致虾类血细胞的形态、细胞内颗粒数量和着色性、甚至免疫功能产生较大的差异。例如, Xu 等^[71]研究南美白对虾在低温和无水的运输状态中血细胞亚群的变化, 发现颗粒细胞和半颗粒细胞的百分比随运输时间增加而不断降低, 但透明细胞的比例却显著升高。Arshadi 等^[72]研究发现, 在凡纳滨对虾的

饲料中添加核苷酸后,血细胞总数和颗粒细胞数显著高于对照组,而透明细胞数则低于对照组。Da Silva 等^[73]则发现,在凡纳滨对虾的饲料中加入丁酸钠和聚羟基丁酸酯后,血细胞总数和颗粒细胞数有明显的增加,而透明细胞仅在添加丁酸钠后增加。此外,Tavabe 等^[74]发现,在日本沼虾 *Macrobrachium nipponense* 中,随着铅和镉浓度的增加,颗粒血细胞数量会增加,而半颗粒细胞则与之相反。因此,了解影响虾类 3 类细胞亚群变化的外在原因与内在机制也具有重大意义。解决好这一问题,不但能更好地统一虾类血细胞分类标准,还有助于用不同指标(如透明细胞占比、血细胞总数)评价虾的健康状态。

对不同血细胞类群中基因表达的分析,有助于更快地找出各类血细胞的特点,进而作为靶标进行功能分析或者对生产过程中的免疫状态进行检测或分析。最近,Sun 等^[75]利用 Percoll 梯度离心的方法将凡纳滨对虾 3 种血细胞亚群分离后进行了转录组测序分析。结果表明,不同类型的血细胞中基因的表达存在明显差异:吞噬受体、凝集素以及肌动蛋白细胞骨架等参与吞噬过程的基因在透明细胞中高表达;体液免疫信号途径相关的因子如 Toll 受体、TRAF6、Cactus、Relish 等在半颗粒细胞中高表达;而与 proPO 系统激活相关的酶,如 proPO 激活酶以及丝氨酸蛋白酶等基因在颗粒细胞中高表达。这为我们了解不同虾血细胞亚群在细胞免疫和体液免疫中发挥功能的分子基础提供了有价值的信息,但在其他种类的虾中是否有相同的实验结论,仍需进一步验证。

目前在人类血液的临床检测中,通常使用血细胞分析仪根据不同细胞表达的特征分子区分不同类型的血细胞。不仅可以将人类血细胞分为红细胞、白细胞和血小板,还可以将白细胞进一步区分为淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞以及不同的淋巴细胞亚群。未来可以在对无脊椎动物不同细胞亚群特征深入了解的基础上,建立并且应

用该类方法实现对动物细胞亚群的区分与疾病状态的评估。

REFERENCES

- [1] Lee SY, Söderhäll K. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 12(5): 421-437.
- [2] 姚翠鸾,王志勇,相建海. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能. *动物学研究*, 2006, 27(5): 549-557.
Yao CL, Wang ZY, Xiang JH. Crustacean haemocytes and their function in immune responses. *Zool Res*, 2006, 27(5): 549-557 (in Chinese).
- [3] 林颖博. 中国对虾血细胞发生、功能及其白斑综合征病毒受体蛋白研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
Lin YB. Study on ontogenesis and phagocytosis of Chinese shrimp haemocytes and its White Spot Syndrome Virus receptor[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009 (in Chinese).
- [4] 叶燕玲,陈宽智. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)血细胞超微结构、分类及计数. *青岛海洋大学学报*, 1993, 23(2): 35-42.
Ye YL, Chen KZ. Studies on the circulating hemocytes of *Penaeus chinensis*. *J Ocean Univ Qingdao*, 1993, 23(2): 35-42 (in Chinese).
- [5] 陈平,黄槐,池信才,等. 四种对虾血细胞组成及超微结构. *水生生物学报*, 1998, 22(2): 158-163.
Chen P, Huang H, Chi XC, et al. The composition and ultrastructure of haemocytes in four species of penaeid shrimps. *Acta Hydrobiol Sin*, 1998, 22(2): 158-163 (in Chinese).
- [6] Sung HH, Sun R. Use of monoclonal antibodies to classify hemocyte subpopulations of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J Crustacean Biol*, 2002, 22(2): 337-344.
- [7] 段虎. 红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)血细胞培养及细胞免疫学研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2014.
Duan H. Studies on cell culture of hemocytes and cellular immunology of red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*[D]. Qingdao: The University of Chinese Academy of Sciences (The Institute of

- Oceanology), 2014 (in Chinese).
- [8] Dantas-Lima JJ, Tuan VV, Corteel M, et al. Separation of *Penaeus vannamei* haemocyte subpopulations by iodixanol density gradient centrifugation. *Aquaculture*, 2013, 408/409: 128-135.
- [9] Koiwai K, Kondo H, Hirono I. Isolation and molecular characterization of hemocyte sub-populations in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Sci*, 2019, 85(3): 521-532.
- [10] 冼健安, 张秀霞, 潘训彬, 等. 红螯螯虾血细胞分类、结构与免疫特性研究. *水生态学杂志*, 2019, 40(5): 84-90.
Xian JA, Zhang XX, Pan XB, et al. Classification, structure and immunological characterization of haemocytes in red claw cray fish, *Cherax quadricarinatus*. *J Hydroecol*, 2019, 40(5): 84-90 (in Chinese).
- [11] 龙思思, 谢数涛, 周晖. 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)血细胞的分类与组成. 暨南大学学报(自然科学版), 2003, 24(5): 117-120.
Long SS, Xie ST, Zhou H. Hemocytes indices of the *Macrobrachium rosenbergii*. *J Jinan Univ: Nat Sci Med Ed*, 2003, 24(5): 117-120 (in Chinese).
- [12] 王建平, 吴雄飞. 虾类血细胞及体液免疫的研究现状. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2000, 19(4): 354-360.
Wang JP, Wu XF. Status of study on the haemocyte and humoral immunity of shrimps. *J Zhejiang Ocean Univ*, 2000, 19(4): 354-360 (in Chinese).
- [13] 黄旭雄, 周洪琪, 蔡生力. 虾类免疫系统组成及免疫机理探讨. 上海水产大学学报, 2005, 14(3): 301-306.
Huang XX, Zhou HQ, Cai SL. The composition of immune system and immune mechanism in shrimps. *J Shanghai Fish Univ*, 2005, 14(3): 301-306 (in Chinese).
- [14] Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G, et al. Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*, 2009, 15(3): 179-188.
- [15] 田飞焱, 贺刚, 胡火根. 淡水螯虾免疫学的研究进展. *安徽农业科学*, 2013, 41(10): 4404-4405, 4408.
Tian FY, He G, Hu HG. Research progress on immunology of freshwater crayfish. *J Anhui Agric Sci*, 2013, 41(10): 4404-4405, 4408 (in Chinese).
- [16] Söderhäll I. Crustacean hematopoiesis. *Dev Comp Immunol*, 2016, 58: 129-141.
- [17] Song YL, Li CY. Shrimp immune system-special focus on penaeidin. *J Mar Sci Tech*, 2014, 22(1): 1-8.
- [18] Martin GG, Graves BL. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *J Morphol*, 1985, 185(3): 339-348.
- [19] 李光友, 王青. 中国对虾血细胞及其免疫研究. *海洋与湖沼*, 1995, 26(6): 591-597.
Li GY, Wang Q. Studies on haemocytes and cellular immunity in prawn *Penaeus chinensis*. *Oceanol Limnol Sin*, 1995, 26(6): 591-597 (in Chinese).
- [20] Cornick JW, Stewart JE. Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes: Classification, differential counts, and associated agglutinin activity. *J Invertebr Pathol*, 1978, 31(2): 194-203.
- [21] van de Braak CBT, Faber R, Boon JH. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. *Comp Haematol Int*, 1996, 6(4): 194-203.
- [22] Vázquez L, Pérez A, Millán D, et al. Morphology of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J Morphol*, 1997, 234(2): 147-153.
- [23] Zhan WB, Xing J, Wei XM, et al. Characterization of monoclonal antibodies to haemocyte types of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Crustaceana*, 2008, 81(8): 931-942.
- [24] Xing J, Chang YH, Tang XQ, et al. Separation of haemocyte subpopulations in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by immunomagnetic bead using monoclonal antibody against granulocytes. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 60: 114-118.
- [25] Seibert CH, Gargioni R, Rosa RD, et al. A novel monoclonal antibody that binds to hemocytes from shrimps and oysters. *Hybridoma (Larchmt)*, 2011, 29(2): 161-167.
- [26] Vargas-Albores F, Gollas-Galván T, Hernández-López J. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. *Aquac Res*, 2005, 36(4): 352-360.

- [27] Koiwai K, Alenton RRR, Shiomi R, et al. Two hemocyte sub-populations of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Mol Immunol*, 2017, 85: 1-8.
- [28] Yang CC, Lu CL, Chen S, et al. Immune gene expression for diverse haemocytes derived from pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 44(1): 265-271.
- [29] Sun JF, Wang AL, Zhang TJ. Flow cytometric analysis of defense functions of hemocytes from the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *J World Aquacult Soc*, 2010, 41(1): 92-105.
- [30] 洗健安, 苟妮娜, 陈晓丹, 等. 流式细胞术检测虾类血细胞活性氧含量方法的建立. *海洋科学*, 2012, 36(2): 29-33.
Xian JA, Gou NN, Chen XD, et al. Measurement of reactive oxygen species (ROS) production in shrimp haemocyte by flow cytometry. *Mar Sci*, 2012, 36(2): 29-33 (in Chinese).
- [31] 洗健安, 王安利, 苗玉涛. 流式细胞术在克氏原螯虾血细胞的分类、活性和免疫功能研究中的应用. *淡水渔业*, 2012, 42(1): 9-14, 57.
Xian JA, Wang AL, Miao YT. Application of flow cytometry in studies of classification, viability and immune parameters of *Procambarus clarkii* haemocytes. *Freshwater Fish*, 2012, 42(1): 9-14, 57 (in Chinese).
- [32] Li F, Chang XF, Xu LM, et al. Different roles of crayfish hemocytes in the uptake of foreign particles. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 77: 112-119.
- [33] 傅蓉蓉. 红螯螯虾不同血细胞类群的分离及功能差异研究[D]. 厦门: 自然资源部第三海洋研究所, 2019.
Fu RR. Separation of crayfish hemocyte subpopulations and investigation of their function[D]. Xiamen: Third Institute of Oceanography, Ministry of natural resources, 2019 (in Chinese).
- [34] Pudgerd A, Chotiwatthanakun C, Kruangkum T, et al. The hematopoietic organ of *Macrobrachium rosenbergii*: Structure, organization and immune status. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 88: 415-423.
- [35] 赵柳兰, 杨筱珍, 范朋, 等. 黑褐新糠虾血细胞形态及其与日本新糠虾对溶藻弧菌敏感性的比较. *水产学报*, 2011, 35(11): 1711-1719.
Zhao LL, Yang XZ, Fan P, et al. The study on the haemocyte morphology of the adult *Neomysis awatschensis* and the different susceptibility to *Vibrio alginolyticus* compared with *Neomysis japonica*. *J Fish China*, 2011, 35(11): 1711-1719 (in Chinese).
- [36] 周晖. 常见虾蟹血细胞染色观察及分类研究[D]. 广州: 暨南大学, 2004.
Zhou H. The dying observation and classification on haemocytes of familiar shrimps and crabs[D]. Guangzhou: Jinan University, 2004 (in Chinese).
- [37] Zhu L, Chang YH, Xing J, et al. Comparative proteomic analysis between two haemocyte subpopulations in shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 72: 325-333.
- [38] 汪小锋, 樊廷俊, 丛日山, 等. 几种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量、形态结构以及酚氧化酶产量和活性的影响. *水产学报*, 2005, 29(1): 66-73.
Wang XF, Fan YJ, Cong RS, et al. Effects of several immunostimulants on the number, ultrastructure of hemocytes and the yield, activities of phenoloxidase in *Penaeus chinensis*. *J Fish China*, 2005, 29(1): 66-73 (in Chinese).
- [39] Matozzo V, Marin MG. The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: a first survey. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 28(4): 534-541.
- [40] Cerenius L, Jiravanichpaisal P, Liu HP, et al. Crustacean immunity//Söderhäll K, Ed. *Invertebrate Immunity*. Boston, MA: Springer, 2010, 708: 239-259.
- [41] Giulianini PG, Bierti M, Lorenzon S, et al. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: cell types and their role after *in vivo* artificial non-self challenge. *Micron*, 2007, 38(1): 49-57.
- [42] Duan H, Jin SJ, Zhang Y, et al. Granulocytes of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* can endocytose beads, *E. coli* and WSSV, but in different ways. *Dev Comp Immunol*, 2014, 46(2): 186-193.
- [43] 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. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(6): 696-704.
Wu FL, Wang Y, Shang YY, et al. Current progress

- of research on classification and immunity of hemocytes in aquatic invertebrates: a review. *J Dalian Fish Univ*, 2016, 31(6): 696-704 (in Chinese).
- [44] 陆剑锋, 万全, 吴旭干, 等. 克氏原螯虾血细胞及免疫功能的初步研究. *水产学报*, 2009, 33(6): 1018-1025.
Lu JF, Wan Q, Wu XG, et al. A preliminary study on haemocytes and immune functions of the crayfish *Procambarus clarkii*. *J Fish China*, 2009, 33(6): 1018-1025 (in Chinese).
- [45] 蔡渭明, 杜爱芳, 洪健, 等. 中国对虾血细胞及其吞噬活力的电镜研究. *浙江农业大学学报*, 1996, 22(4): 418-424.
Cai WM, Du AF, Hong J, et al. An electronic microscopic study of haemocytes of *Penaeus chinensis* and their phagocytic activities. *J Zhejiang Agric Univ*, 1996, 22(4): 418-424 (in Chinese).
- [46] 邓欢, 陈隼, 刘卫东, 等. 中国对虾血细胞包掩作用的超微结构和组织化学观察. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(3): 296-299.
Deng H, Chen Q, Liu WD, et al. Ultrastructural and histochemical observations on capsulation of hemocytes in Chinese shrimp *Penaeus chinensis*. *Chin J Appl Environ Biol*, 1999, 5(3): 296-299 (in Chinese).
- [47] Hose JE, Martin GG, Nguyen VA, et al. Cytochemical features of shrimp hemocytes. *Biol Bull*, 1987, 173(1): 178-187.
- [48] 刘晓云, 张志峰, 马洪明. 中国对虾血细胞酶细胞化学的初步研究. *青岛海洋大学学报*, 2002, 32(2): 259-265.
Liu XY, Zhang ZF, Ma HM. Study on enzyme cyto-chemistry of bleed cells in *Penaeus chinensis*. *J Ocean Univ Qingdao*, 2002, 32(2): 259-265 (in Chinese).
- [49] 赵柳兰, 杨筱珍, 吴旭干, 等. 成年日本新糠虾血细胞组成、形态及其不同发育阶段的免疫活性酶. *水产学报*, 2010, 34(1): 108-115.
Zhao LL, Yang XZ, Wu XG, et al. Study on the morphology and classification of haemocytes in adult *Neomysis japonica* and the immune enzyme activities at different developmental stages in *Neomysis japonica*. *J Fish China*, 2010, 34(1): 108-115 (in Chinese).
- [50] Lin YC, Chen JC, Morni WZW, et al. Vaccination enhances early immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* after secondary exposure to *Vibrio alginolyticus*. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e69722.
- [51] Xian JA, Zhang XX, Wang DM, et al. Various cellular responses of different shrimp haemocyte subpopulations to lipopolysaccharide stimulation. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 69: 195-199.
- [52] Wu CL, Söderhäll I, Kim YA, et al. Hemocyte-lineage marker proteins in a crustacean, the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Proteomics*, 2009, 8(20): 4226-4235.
- [53] Tassanakajon A, Somboonwivat K, Supungul P, et al. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 34(4): 954-967.
- [54] Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol*, 2008, 29(6): 263-271.
- [55] Panigrahi A, Sivakumar MR, Sundaram M, et al. Comparative study on phenoloxidase activity of biofloc-reared pacific white shrimp *Penaeus vannamei* and Indian white shrimp *Penaeus indicus* on graded protein diet. *Aquaculture*, 2020, 518: 734654.
- [56] 郭慧, 冼健安, 毕建柱, 等. 虾类免疫因子的研究进展. *饲料工业*, 2013, 34(22): 42-46.
Guo H, Xian JA, Bi JZ, et al. Research progress in immune factors of shrimp. *Feed Ind*, 2013, 34(22): 42-46 (in Chinese).
- [57] Zhang KH, Koiwai K, Kondo H, et al. White spot syndrome virus (WSSV) suppresses penaeidin expression in *Marsupenaeus japonicus* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 78: 233-237.
- [58] Kang CJ, Wang JX, Zhao XF, et al. Molecular cloning and expression analysis of Ch-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16(4): 513-525.
- [59] Bandeira PT, Vernal J, Matos GM, et al. A Type II crustin from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (crusFpau) is constitutively synthesized and stored by specific granule-containing hemocyte

- subpopulations. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 97: 294-299.
- [60] Bowden TJ. The humoral immune systems of the American lobster (*Homarus americanus*) and the European lobster (*Homarus gammarus*). *Fish Res*, 2017, 186: 367-371.
- [61] Vafopoulou X, Laufer H, Steel CGH. Spatial and temporal distribution of the ecdysteroid receptor (EcR) in haemocytes and epidermal cells during wound healing in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Gen Comparat Endocrinol*, 2008, 152(2/3): 359-370.
- [62] Maningas MBB, Kondo H, Hirono I. Molecular mechanisms of the shrimp clotting system. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(4): 968-972.
- [63] 钱云霞, 顾晓英. 甲壳动物血液凝固的分子机制. *生物技术通报*, 2011(6): 25-30.
Qian YX, Gu XY. Molecular mechanism of coagulation in crustacean. *Biotechnol Bull*, 2011(6): 25-30 (in Chinese).
- [64] Jiravanichpaisal P, Sricharoen S, Söderhäll I, et al. White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20(5): 718-727.
- [65] Xue SX, Liu YC, Zhang YC, et al. Sequencing and *de novo* analysis of the hemocytes transcriptome in *Litopenaeus vannamei* response to white spot syndrome virus infection. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e76718.
- [66] Havanapan PO, Taengchaiyaphum S, Ketterman AJ, et al. Yellow head virus infection in black tiger shrimp reveals specific interaction with granule-containing hemocytes and crustin *Pm1* as a responsive protein. *Dev Comp Immunol*, 2016, 54(1): 126-136.
- [67] 张科红. 日本囊对虾中的一种新型白斑综合征病毒诱导基因的表达和研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
Zhang KH. Identification of a novel white spot syndrome virus (WSSV)-induced gene (Mj VIG1) in *Marsupenaeus japonicus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [68] Xia WL, Kang LH, Liu CB, et al. Death associated protein 1 (DAP 1) positively regulates virus replication and apoptosis of hemocytes in shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 63: 304-313.
- [69] Song YL, Yu CI, Lien TW, et al. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 14(4): 317-331.
- [70] 廖永岩, 周友广. 黑斑口虾蛄血细胞的显微观察及与斑节对虾血细胞的比较. *海洋科学*, 2000, 24(10): 14-17.
Liao YY, Zhou YG. Microscopic observation and comparison of hemocyte of *Oratosquilla kempii* (Schmitt) and *Penaeus monodon*. *Mar Sci*, 2000, 24(10): 14-17 (in Chinese).
- [71] Xu ZH, Guan WL, Xie DD, et al. Evaluation of immunological response in shrimp *Penaeus vannamei* submitted to low temperature and air exposure. *Dev Comp Immunol*, 2019, 100: 103413.
- [72] Arshadi A, Yavari V, Oujifard A, et al. Dietary nucleotide mixture effects on reproductive and performance, ovary fatty acid profile and biochemical parameters of female Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult Nutr*, 2018, 24(1): 515-523.
- [73] Da Silva BC, Jatobá A, Schleder DD, et al. Dietary supplementation with butyrate and polyhydroxybutyrate on the performance of pacific white shrimp in biofloc systems. *J World Aquacult Soc*, 2016, 47(4): 508-518.
- [74] Tavabe KR, Abkenar BP, Rafiee G, et al. Effects of chronic lead and cadmium exposure on the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in laboratory conditions. *Comparat Biochem Physiol Part C: Toxicol & Pharmacol*, 2019, 221: 21-28.
- [75] Sun MZ, Li SH, Zhang XJ, et al. Isolation and transcriptome analysis of three subpopulations of shrimp hemocytes reveals the underlying mechanism of their immune functions. *Dev Comp Immunol*, 2020, 108: 103689.

(本文责编 陈宏宇)