

DOI: 10.12264/JFSC2024-0383

三角帆蚌血淋巴细胞对插核刺激的响应及矿化功能

孙钧林¹, 陈逸文¹, 陈晓峰¹, 李家乐^{1,2}, 白志毅^{1,2}, 李文娟^{1,2*}

1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306

摘要: 为深入研究淡水珍珠贝三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)插核刺激对血淋巴细胞的影响及其在珍珠矿化中的功能, 本研究应用光学和电子显微镜, 观察了三角帆蚌血淋巴细胞的形态和分类特征, 并根据细胞复杂性、细胞大小、核质比将其分为 4 种类型。通过吉姆萨染色和流式细胞术分析发现, 插核刺激后血淋巴细胞的颗粒复杂度增加, 细胞直径变大, 颗粒细胞比例显著升高($P<0.05$), 透明细胞比例显著降低($P<0.05$), 同时通过组织切片观察发现, 插核部位附近有大量血淋巴细胞聚集且颗粒细胞在插核部位被招募。血淋巴细胞和血清中的 Ca^{2+} 含量在插核后 2 d、5 d 和 10 d 显著上升($P<0.05$), 20 d 和 50 d 显著下降($P<0.05$), 揭示了血淋巴细胞在数量组成、分布和 Ca^{2+} 水平上均响应插核育珠过程。通过体外碳酸钙结晶实验表明, 血淋巴细胞和血清能够影响方解石的形貌, 但未改变晶体晶型。综上所述, 血淋巴细胞对三角帆蚌插核刺激迅速响应且对生物矿化过程有调控作用, 本研究为进一步探究血淋巴细胞在贝类生物矿化中的调控作用奠定了理论基础。

关键词: 三角帆蚌; 血淋巴细胞; 插核响应; 生物矿化; Ca^{2+} 水平

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2025)05–0622–13

珍珠贝的贝壳和珍珠都是生物矿化的产物, 其进程受到多种因素的影响^[1]。三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)是重要的淡水珍珠贝之一, 其生产的珍珠占世界淡水珍珠产量的 95%以上^[2]。珍珠培育是由两只珍珠蚌相互作用而产生, 将供体蚌的外套膜组织切成小片, 移植到受体育珠蚌的外套膜中, 插入的外套膜小片逐渐分裂分化, 形成珍珠囊, 并在外套膜插核部位不断分泌珍珠质形成珍珠^[3], 其生物学机理是由外源刺激引起的免疫防御反应调控的生物矿化过程^[4]。贝类血淋巴细胞在免疫防御中起着重要的作用, 并参与珍珠贝插核育珠进程^[5]。研究发现贝类血淋巴细胞中含有大量免疫相关蛋白, 且部分与贝类的生物矿化反应相关, 如 C 型凝集素^[6]、Kunitz 蛋白酶抑制剂^[7]等, 由此推测血淋巴细胞能够参与生物矿化过程。

目前已使用多种技术研究了贝类血淋巴细胞

的形态和分类, 包括光学显微镜、电子显微镜和流式细胞术^[8–9]等。尽管对血淋巴细胞分类还存在争议, 但在贝类中通常根据细胞质是否存在颗粒来区分两种主要的血淋巴细胞类型——粒细胞和透明细胞^[10–11]。双壳类血淋巴细胞除了在宿主防御中发挥作用, 还执行各种重要的生理功能, 包括营养运输分配、伤口愈合和排泄等^[12–13]。对贝类血淋巴细胞形态与功能展开研究, 能够为深入了解血淋巴细胞的生物矿化功能提供理论基础。

近来的研究表明血淋巴细胞可能参与贝类贝壳的生物矿化过程。欧洲鲍(*Haliotis tuberculata*)的血淋巴细胞中合成了 Ca^{2+} 阳性颗粒内容物, 参与了贝壳的修复和再生过程^[14]。此外, 诱导壳再生修复的研究发现颗粒细胞中含有 CaCO_3 晶体且相较其他类型血淋巴细胞的丰度增加, 说明了粒细胞具有潜在 CaCO_3 合成与运输功能^[15]。同时,

收稿日期: 2024-12-22; 修订日期: 2025-01-16.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400105); 国家现代农业产业技术体系(CARS-49); 国家自然科学基金项目(31872565).

作者简介: 孙钧林(2000–), 男, 硕士研究生, 研究方向为贝类分子与细胞生物学. E-mail: tomasjl@163.com

通信作者: 李文娟, 副教授, 研究方向为水生生物分子及细胞生物学. E-mail: wjli@shou.edu.cn

Huang 等^[16]发现在合浦珠母贝壳损伤刺激后的再生过程中, 血淋巴细胞内 Ca^{2+} 代谢相关基因碳酸酐酶、钙调蛋白-2 和钙调蛋白-3 显著上调。Ivanina 等^[17]发现在牡蛎中与壳形成相关的酪蛋白激酶 I 和酪蛋白激酶 II 等基因在 H2 和 H3 血淋巴细胞(类似于粒细胞)中高度表达, 表明血淋巴细胞是贝壳矿化过程中的潜在参与者。

目前, 已有一些研究发现血淋巴细胞可能参与珍珠矿化, Kishore 等^[18]发现血淋巴细胞的过度积累会造成珍珠囊内凸起, 从而形成形状不规则的珍珠, Shen 等^[19]在珍珠囊腔中发现血淋巴细胞分泌有机基质覆盖在血淋巴细胞凝块上, 和囊泡构成珍珠的核心, 推测血淋巴细胞在珍珠形成过程中起到复杂而必要的作用, 但其机制尚不清楚。本研究为探索三角帆蚌血淋巴细胞对插核刺激的响应与矿化功能, 对血淋巴细胞进行分类, 评估了插核刺激对血淋巴细胞数量和分布情况的影响, 测定血淋巴细胞和血清中钙含量, 并且通过体外 CaCO_3 结晶实验证明血淋巴细胞和血清参与晶体的形成过程, 旨在进一步解析三角帆蚌血淋巴细胞参与珍珠矿化的机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与样本采集

实验用三角帆蚌购自浙江诸暨市淡水珍珠养殖基地, 随机选取 60 只同批次繁育、健康、大小均一且体型完整的 1 龄三角帆蚌, 长为 (4.81 ± 0.63) cm, 宽为 (1.09 ± 0.02) cm, 高为 (2.98 ± 0.14) cm; 体重为 (18.03 ± 0.84) g, 置于 $40 \text{ cm} \times 26 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$ 的水族箱暂养, 每日投喂小球藻两次并持续供氧, 实验期间养殖条件一致。

采用有核珍珠培育的方法进行插核育珠^[20], 以未插核蚌为对照组(Con 组), 插核后 2 d (H-2 组), 5 d (H-5 组), 10 d (H-10 组), 20 d (H-20 组) 和 50 d (H-50 组) 的三角帆蚌为实验组, 每组随机选取 6 只蚌, 并在闭壳肌处用注射器采集血淋巴样本, 新鲜样本立即进行实验, 其中血淋巴细胞通过血淋巴样本离心后获得。随后采用断裂闭壳肌方法处死实验动物, 采集对应插核组织部位样本, 置于 4% 多聚甲醛固定, 保存于 4 °C 冰箱, 用于后续实验。实验过程中操作人员严格遵守实验动物

伦理规范, 并按照上海海洋大学动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 血淋巴细胞形态观察

显微观察: 向采集到的新鲜血淋巴样本中加入等体积的 4% 多聚甲醛, 转移至 1.5 mL 离心管并震荡使其充分混匀, 将血淋巴混合液制成血涂片, 室温干燥, 甲醇固定 3~5 min, 使用改良吉姆萨染色液(碧云天, 上海)染色 25 min, 流水冲洗, 自然干燥后于光学显微镜下进行观察拍照。每张血涂片随机选择 50 个视野, 鉴定血淋巴细胞类型并计算各类血淋巴细胞比例及核质比。

超微观察: 将血淋巴细胞用 2.5% 戊二醛固定后, 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。然后在 1% 锇酸溶液室温固定 5 h, 0.1M PBS (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。脱水, 渗透后, 将样品插入包埋板中 37 °C 烤箱过夜, 60 °C 烤箱聚合 48 h。使用 Leica UC7 超薄切片机切片, 厚度为 60 nm。切片用铀铅双染色, 室温干燥过夜, 透射电子显微镜(TEM, hitachi HT7700)下观察, 并采集图像进行分析。

1.3 流式细胞术分析

向采集到的新鲜血淋巴样本中加入 4% 多聚甲醛, 经 200 目筛网过滤后使用流式细胞仪(BD LSRFortessa)进行流式细胞分析, 以前向散射(FSC)为横坐标, 侧向散射(SSC)为纵坐标做散点图和等高图, 根据不同类型细胞在 FSC 和 SSC 上的差异, 分析各类血淋巴细胞占比的变化趋势。

1.4 组织染色与观察

取以上 4% 多聚甲醛固定的插核组织样品, 采用组织石蜡切片技术进行石蜡切片的制作^[21], 切片厚度 4 μm , 使用苏木精和伊红(索莱宝, 北京)对切片进行染色并封片, 使用正置显微镜(Nikon Eclipse Ci-L)进行样本观察。

1.5 Ca^{2+} 含量测定

血淋巴样本经 3000 r/min 离心后, 获得血淋巴细胞与血清, 使用钙含量显色检测试剂盒(碧云天, 上海)测定血淋巴细胞与血清中的 Ca^{2+} 含量。

1.6 体外 CaCO_3 结晶

饱和 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 溶液制备: 向 50 mL 超纯水中加入 0.5 g CaCO_3 , 向溶液中持续通入 CO_2 , 同时不断使用磁力搅拌机进行搅拌, 6 h 之后, 用孔径为 0.22 μm 滤膜将溶液中多余 CaCO_3 沉淀除去。

血淋巴细胞实验组：将血淋巴细胞与饱和 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 溶液混匀；血淋巴细胞对照组：饱和 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 溶液。血清实验组：向 120 μL 饱和 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 溶液中加入 20 μL 血清并混匀；血清对照组：向 120 μL 饱和 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 溶液中加入 20 μL 超纯水并混匀。

每组滴加 20 μL 混合液至硅化盖玻片上，将其置于六孔板凹槽中，体外 CaCO_3 结晶实验将在这些盖玻片上进行。将六孔板置于培养箱中培养，过程中使用光学显微镜观察，培养 6 h 后，用超纯水洗去表面溶液，干燥后用扫描电镜(蔡司 Sigma300)观察和拉曼光谱(雷尼绍 inVia Qontor)分析。

1.7 数据统计与分析

数据采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示，采用 SPSS 17.0 数据软件进行统计分析，使用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Duncan 法进行多重比较， $P<0.05$ 时表示差异显著，采用 GraphPad

Prism 8.0 和 Origin 2018 进行作图。

2 结果与分析

2.1 血淋巴细胞分类及插核后各亚群比例变化

三角帆蚌血淋巴细胞经吉姆萨染液染色如图 1 所示，呈现出 4 种具有不同大小和形态的细胞群，分别为大颗粒细胞、小颗粒细胞、透明细胞和淋巴样细胞。4 种类型血淋巴细胞直径、核直径和核质比的测定和计算结果见表 1。大颗粒细胞体积较大，呈椭圆形，核质比低，细胞核偏心且呈圆形。细胞质内含有大量小颗粒。小颗粒细胞呈圆形或椭圆形，细胞核偏心分布，细胞内颗粒覆盖细胞核，且染色较深。透明细胞的核较大且偏离核心，细胞质透明，染色较浅，几乎不含颗粒，有少量伪足存在。淋巴样细胞为数量最少的细胞类型，体积较小，呈圆形，其细胞核染色较深，核质比大，且无颗粒。

表 1 三角帆蚌不同血淋巴细胞亚群的细胞特征分析

Tab. 1 Analysis of cell characteristics of different hemolymphocyte subpopulations in *Hyriopsis cumingii*

亚群 subpopulation	细胞直径/ μm cell diameter	核直径/ μm nuclear diameter	核质比 N/C ratio
大颗粒细胞 large granulocyte	18.42 ± 0.69^a	6.53 ± 0.37^b	0.35 ± 0.03^d
小颗粒细胞 small granulocyte	14.13 ± 0.77^c	5.38 ± 0.61^d	0.38 ± 0.04^c
透明细胞 hyalinocyte	16.08 ± 1.01^b	6.83 ± 0.21^a	0.43 ± 0.03^b
淋巴样细胞 lymphoidocyte	8.57 ± 0.55^d	5.55 ± 0.25^c	0.65 ± 0.05^a

注：同列数据上标字母不同表示组间存在显著差异($P<0.05$).
Note: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

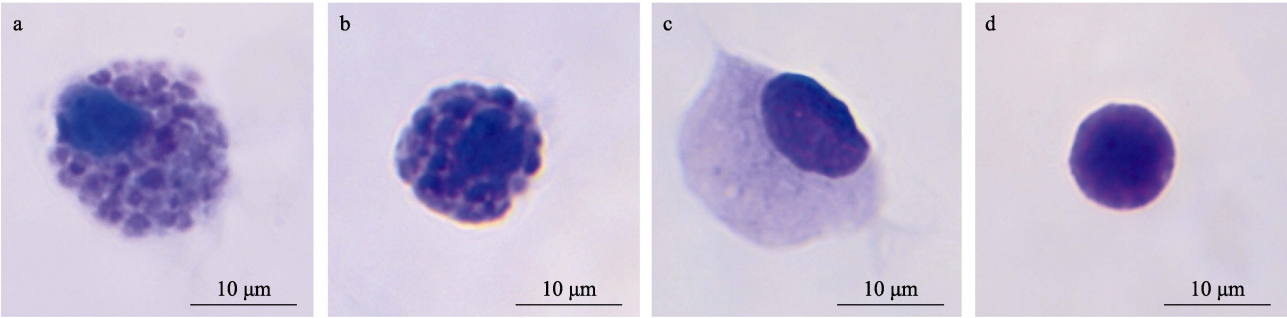


图 1 三角帆蚌血淋巴细胞光学显微镜观察

a. 大颗粒细胞; b. 小颗粒细胞; c. 透明细胞; d. 淋巴样细胞.

Fig. 1 Optical microscopic observation of hemolymphocytes of *Hyriopsis cumingii*

a. Large granulocyte; b. Small granulocyte; c. Hyalinocyte; d. Lymphoidocyte.

通过 TEM 对细胞器和细胞内容物的观察结果如图 2 所示，三角帆蚌血淋巴细胞也可分为上述 4 类。大颗粒细胞体积较大，细胞核相对较小，

胞质内含有大量的颗粒状物质，以及线粒体和高尔基体等细胞器，该类细胞的形状不规则，表面具有多处突起。小颗粒细胞的细胞核较大，胞浆

结构紧密, 包含大量的电子致密颗粒和电子透亮颗粒, 且胞质中可见多种细胞器。透明细胞具有丝状伪足, 细胞核较大, 但细胞质内细胞器相对

稀少, 仅观察到少量的线粒体和内质网。淋巴样细胞体积较小, 核质比高, 细胞表面具有较短的丝状伪足, 在胞质中仅有少量的线粒体。

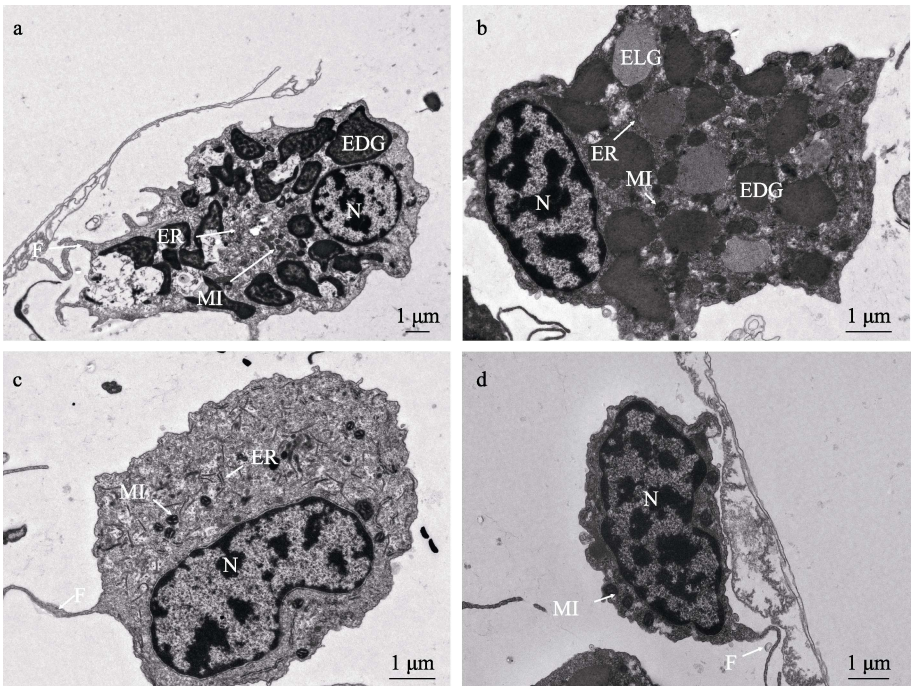


图 2 三角帆蚌血淋巴细胞透射电子显微镜观察

a. 大颗粒细胞; b. 小颗粒细胞; c. 透明细胞; d. 淋巴样细胞. N: 细胞核; MI: 线粒体; ER: 内质网; F: 丝状伪足; EDG: 电子致密颗粒; ELG: 电子透亮颗粒。

Fig. 2 Transmission electron micrographs observation of hemolymphocytes in *Hyriopsis cumingii*
a. Large granulocyte; b. Small granulocyte; c. Hyalinocyte; d. Lymphoidocyte. N: nucleus; MI: mitochondria; ER: endoplasmic reticulum; F: filopodia; EDG: electron-dense granule; ELG: electron-lucent granule.

各细胞亚群比例变化情况如图 3 所示。在血淋巴细胞组成上, 淋巴样细胞占比最少, 为 5.66%; 颗粒细胞占比最高, 为 62.48%(其中大颗粒细胞为 25.95%, 小颗粒细胞为 36.53%); 透明细胞占比为 31.85%。插核刺激后, 除淋巴样细胞外, 其他血淋巴细胞亚群比例均发生显著变化。具体来看, 透明细胞比例在插核刺激后显著下降($P<0.05$), H-50 组透明细胞比例由 Con 组的 31.85% 显著降低到了 16.33% ($P<0.05$)。大颗粒细胞比例逐渐上升, H-50 组显著高于其他处理组 ($P<0.05$), 为 47.83%。小颗粒细胞比例先上升后下降, H-5 组细胞比例达到最高值为 39.48%, 随后逐渐降低, H-50 组的比例最低为 30.95%。淋巴样细胞比例在插核刺激后没有显著差异。

2.2 流式细胞术分析

流式细胞术分析结果如图 4 所示。FSC 反映

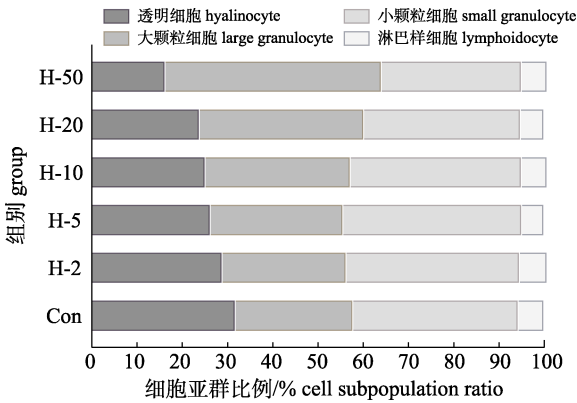


图 3 三角帆蚌插核处理后血淋巴细胞亚群比例变化

Con: 未插核蚌对照组, H-2, H-5, H-10, H-20 和 H-50 分别为插核后 2 d, 5 d, 10 d, 20 d 和 50 d 实验组。

Fig. 3 The variation of hemolymphocyte subpopulation ratio in *Hyriopsis cumingii* after nucleus insertion
Con: control group without nucleus insertion; H-2, H-5, H-10, H-20 and H-50 indicate trial groups after nucleus insertion for 2 d, 5 d, 10 d, 20 d and 50 d, respectively.

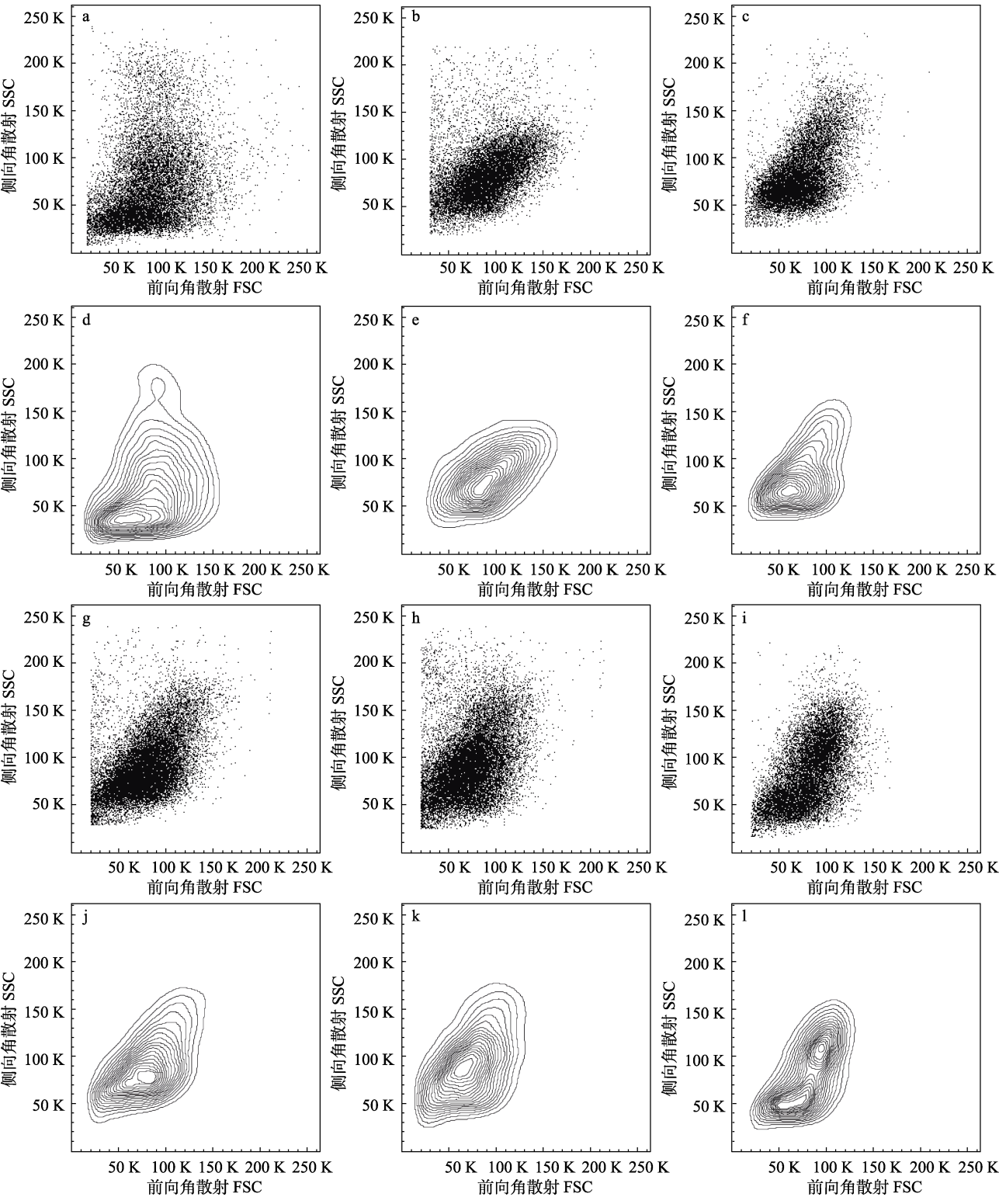


图 4 三角帆蚌血淋巴细胞流式分析散点图和等高线图

a-c 分别为未插核组, H-2 组和 H-5 组的散点图; d-f 分别为 a-c 的等高图,
g-i 分别为 H-10 组, H-20 组和 H-50 组的散点图; j-l 分别为 g-i 的等高图.

Fig. 4 Scatter plot and contour map of hemolymphocytes in *Hyriopsis cumingii* by flow analysis
a-c are the scatter plot of control, H-2, H-5; d-f are the contour map of a-c;
g-i are the scatter plot of H-10, H-20, H-50; j-l are the contour map of g-i.

了细胞的大小, SSC 反映了细胞的复杂性和颗粒度。结果显示插核后三角帆蚌血淋巴细胞大小和颗粒度发生了显著变化。在散点图中发现, 与 Con 组相比, 插核刺激后血淋巴细胞大小和颗粒度分布更加集中, 等高图显示插核刺激后血淋巴细胞的颗粒度和复杂性不断增加, 且细胞直径逐渐增大, 此外, 由图 5 可见, 插核刺激后颗粒细胞的数量显著增加, 透明细胞数量显著降低。

2.3 血淋巴细胞在插核组织部位的分布

外套膜组织切片 HE 染色结果如图 6 所示。Con 组血淋巴细胞主要分布在结缔组织, 组织间存在少量肌纤维, 与 Con 组相比, 插核刺激后各组插核部位附近血淋巴细胞数量呈现增加的趋势, 其中颗粒细胞数量明显增加并在插核部位被招募。H-2 组和 H-5 组尚未形成珍珠囊, 但在切口处观察到大量血淋巴细胞存在。H-10 组的插核部位已清晰可见部分扁平细胞, 并伴随组织增生现象, 其周围有大量血淋巴细胞聚集。H-20 组游离的血淋巴细胞在珍珠囊附近更为集中, 与周围结

缔组织相比分布更密集, 且肌纤维在珍珠囊周围大量分布。H-50 组血淋巴细胞主要聚集在珍珠囊附近的结缔组织中。

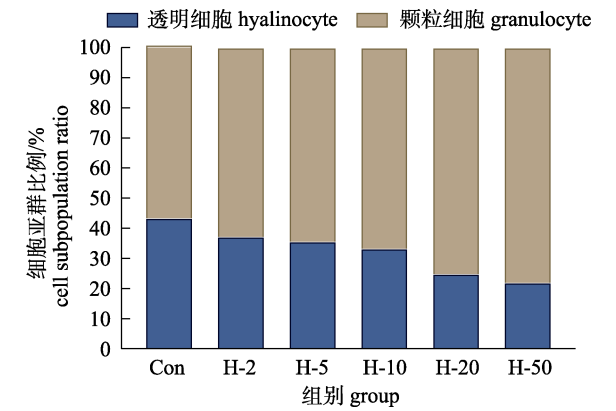


图 5 流式细胞术分析插核后血淋巴细胞亚群比例变化
Con: 未插核蚌对照组, H-2, H-5, H-10, H-20 和 H-50 分别为插核后 2 d, 5 d, 10 d, 20 d 和 50 d 实验组。
Fig. 5 Flow analysis of the variation of hemolymphocyte subpopulation ratio after nucleus insertion
Con: control group without nucleus insertion; H-2, H-5, H-10, H-20 and H-50 indicate trial groups after nucleus insertion for 2 d, 5 d, 10 d, 20 d and 50 d, respectively.

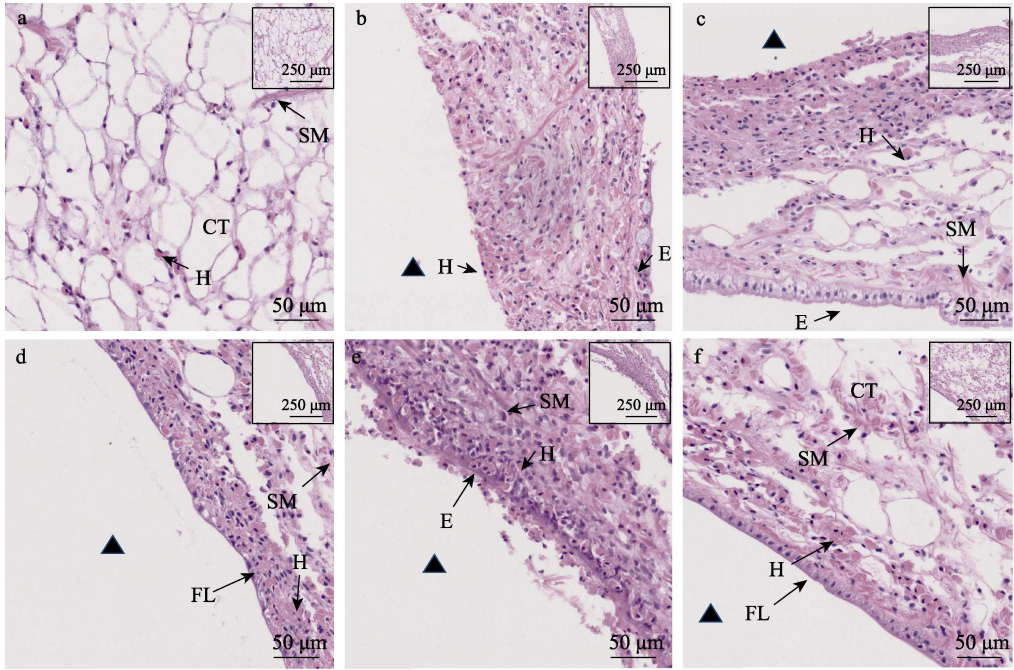


图 6 三角帆蚌插核组织部位血淋巴细胞分布
a-f 分别为 Con 组, H-2 组, H-5 组, H-10 组, H-20 组和 H-50 组插核部位的高倍放大图, 右上角黑色方框为概览图。
H: 血淋巴细胞; SM: 平滑肌细胞; CT: 结缔组织; E: 上皮组织; FL: 扁平细胞; 黑色三角形为插核位置。
Fig. 6 Distribution of hemolymphocytes in the nucleus insertion site of *Hyriopsis cumingii*
a-f are higher magnification views of insertion site of Con, H-2, H-5, H-10, H-20 and H-50 respectively. The black boxes on the upper right corner are the overviews. H: hemolymphocytes; SM: smooth muscle; CT: connective tissue; E: epithelium; FL: flat cell; The black triangle is the insertion position.

2.4 血淋巴细胞和血清 Ca^{2+} 测定

如图 7 所示, 插核刺激后血淋巴细胞中的 Ca^{2+} 含量先上升后下降, 与 Con 组相比, H-2 组和 H-5 组 Ca^{2+} 含量显著上升 ($P < 0.05$), H-10 组达到最高值, 随后显著下降 ($P < 0.05$), H-50 组达到最低点。血清中 Ca^{2+} 含量与血淋巴细胞具有类似的趋势, Ca^{2+} 含量先上升后下降, H-10 组达到最高值, 并且显著高于其他时间点, 随后 Ca^{2+} 含量显著下降 ($P < 0.05$)。

2.5 三角帆蚌血淋巴细胞和血清体外 CaCO_3 结晶

2.5.1 三角帆蚌血淋巴细胞体外 CaCO_3 结晶

血淋巴细胞体外结晶结果如图 8 所示, 通过光学显微镜观察可见(图 8a, 8d), 血淋巴细胞在实验过程中保持形态结构完整, 同时显著改变了方解石的形貌。扫描电镜结果显示, 对照组中沉积的晶体为单个形状规则的六面体(图 8b, 8c), 而加入血淋

巴细胞后(图 8e, 8f), 表现为侧边的向内收缩, 晶体表面出现粗糙结构, 呈现由多个方解石小晶体结合而成的晶貌。拉曼光谱的结果显示所有组别的晶体均为方解石晶体(图 8g, 8h)。综合上述实验结果, 推测血淋巴细胞能够参与方解石晶体的生长过程, 对晶体的形貌有调控作用, 但未改变晶体晶型。

2.5.2 三角帆蚌血清对体外 CaCO_3 结晶的影响

血清体外结晶结果如图 9 所示, 对照组晶体的形貌为正常的平行六面体形状(图 9b, 9c)。加入血清后晶体明显增大, 一些晶体面还出现凹槽样缺陷, 表面粗糙, 视野中的方解石晶体生长像是多个晶体结合在一起(图 9e, 9f)。拉曼光谱的结果显示所有组别的晶体均为方解石晶体(图 9g, 9h)。综合上述实验结果, 推测血清能够参与方解石晶体的生长过程, 对晶体的形貌产生影响, 但未改变晶体晶型。

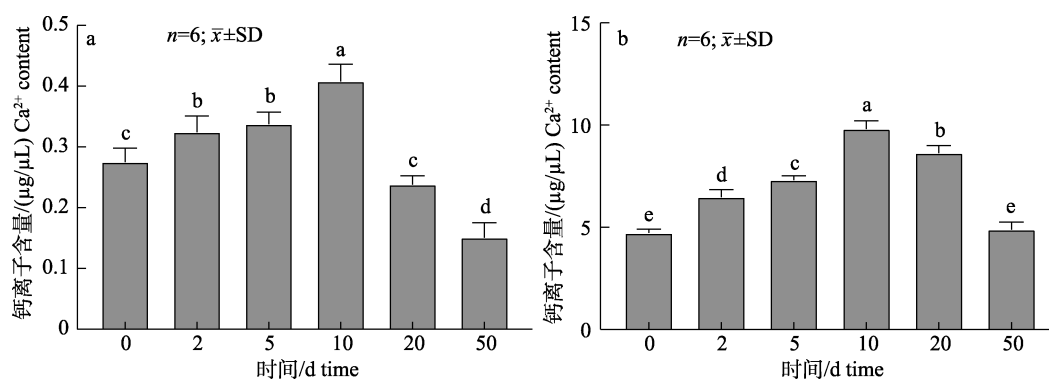


图 7 插核处理对三角帆蚌血淋巴细胞和血清 Ca^{2+} 含量的影响

a. 血淋巴细胞 Ca^{2+} 含量; b. 血清 Ca^{2+} 含量; 不同字母表示各组间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 7 Effect of nucleus insertion on Ca^{2+} content of hemolymphocytes and serum of *Hyriopsis cumingii*

a. Ca^{2+} content of hemolymphocytes; b. Ca^{2+} content of serum. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 三角帆蚌血淋巴细胞的分类

贝类血淋巴细胞的分类方式因人而异, 特别是不同贝类的血淋巴细胞在形态上存在较大差异, 贝类血淋巴细胞分类还没有一个统一标准^[22]。目前大多数研究将双壳贝类的血淋巴细胞分为颗粒细胞和透明细胞两种类型, 并在此基础上进行细化分类^[23-24]。本研究, 通过对三角帆蚌血淋巴细胞的形态学和超微结构观察, 发现除何秀娟等^[25]报道的颗粒细胞和透明细胞外, 还根据细胞内颗粒

大小, 将颗粒细胞进一步分为大颗粒细胞, 小颗粒细胞; 根据细胞大小和核质比, 将透明细胞分为透明细胞和淋巴样细胞。该分类与褶皱冠蚌 (*Cristaria plicata*)^[26]和橄榄蛭蚌 (*Solenia oleivora*)^[27]的血淋巴细胞分类一致。此外, 在部分贝类中还发现了其他类型血淋巴细胞, 石安静等^[28]在椭圆背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 中发现了无颗粒细胞和类淋巴细胞; 郭磊等^[29]在池蝶蚌 (*Hyriopsis schlegeli*) 中发现了浆液细胞、类淋巴细胞、梭形细胞和血栓细胞, 其中梭形细胞和血栓细胞被认

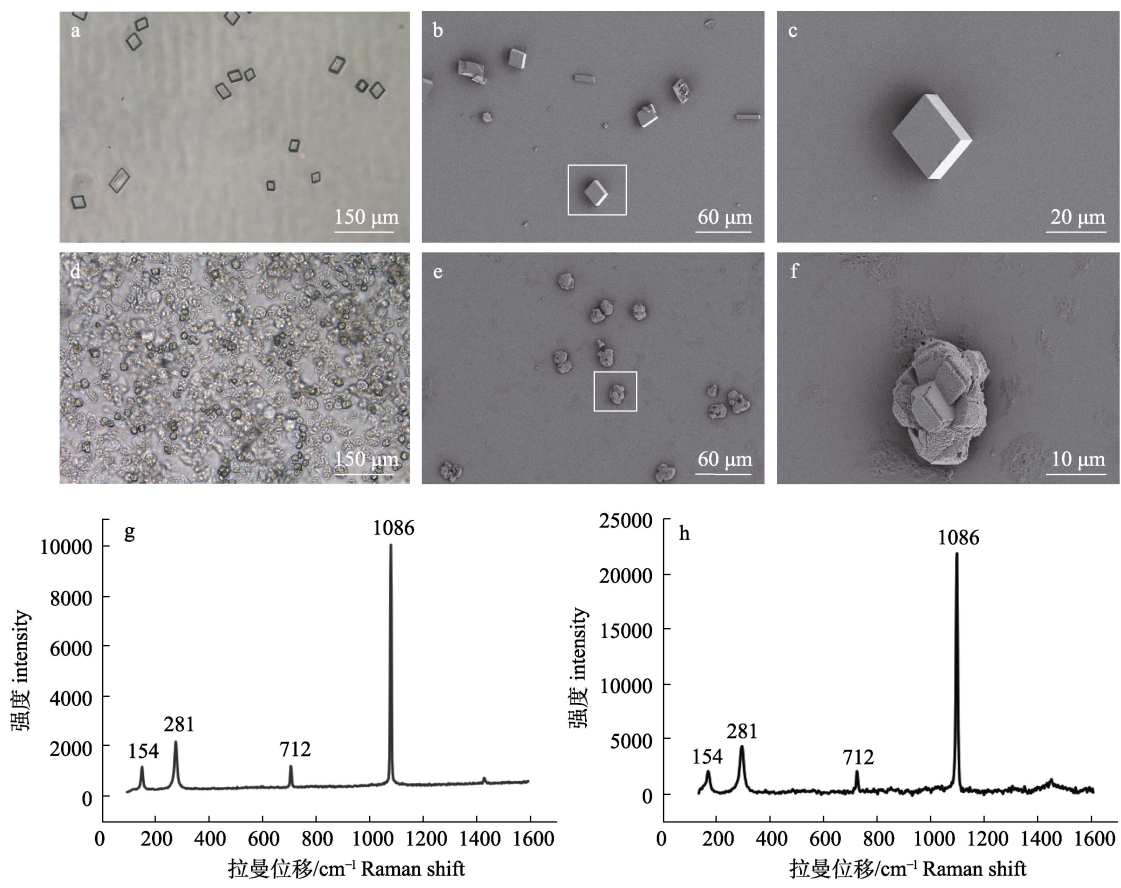


图 8 血淋巴细胞对方解石结晶的影响

a. 光学显微镜观察对照组晶体; b. 对照组晶体的 SEM 图; c 为 b 的放大图; d. 光学显微镜观察对照组晶体; e. 对照组晶体的 SEM 图; f 为 e 的放大图; g. 对照组 Raman 光谱图; h. 实验组 Raman 光谱图.

Fig. 8 Effect of hemolymphocytes on calcite crystallization

a. Optical microscopic observation of the control group crystals; b. SEM image of the control group crystals; c. The magnification view of b; d. Optical microscopic observation of the control group crystals; e. SEM image of the control group crystals; f. The magnification view of e; g. Raman spectra of the control group; h. Raman spectra of the experimental group.

为是透明细胞行使不同功能时的形态变化, 而浆液细胞与颗粒细胞具有相似的特征。Freire 等^[30]在牡蛎(*Crassostrea gasar*)中发现了母细胞样细胞和浆液性血淋巴细胞, Li 等^[31]在合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)中将透明细胞进一步细分为小透明细胞和大透明细胞。贝类血淋巴细胞的分类受到细胞形状、大小、内部结构、功能及外在条件变化等多种因素的影响^[32], 因此不同种类的贝类血淋巴细胞类型存在一定差异。三角帆蚌血淋巴细胞的超微结构观察发现颗粒细胞中含有大量颗粒物质、线粒体和高尔基体等细胞器, 而透明细胞中仅含有少量细胞器, 这表明颗粒细胞相较透明细胞具有更丰富的功能。

3.2 三角帆蚌血淋巴细胞对插核刺激的响应

本研究发现, 三角帆蚌在插核刺激后其血淋巴细胞组分比例发生显著变化, 其中颗粒细胞数量显著增加, 透明细胞数量显著减少, 这与何秀娟等^[25]报道的三角帆蚌在内脏团插核育珠后血淋巴细胞的反应结果一致。此外, 在插核组织部位观察到大量血淋巴细胞聚集, 颗粒细胞被大量招募, 有研究表明, 透明细胞主要参与营养吸收、消化、运输和携氧等功能^[33]; 颗粒细胞在橄榄蛱蚌(*Solenia oleivora*)^[27]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[34]和合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)^[16]中已被证明具有吞噬功能。因此, 三角帆蚌颗粒细胞比例显著增加可能与插核刺激后引起的组织损伤和炎症反应有关。贝类中不同的血淋巴细胞亚群可

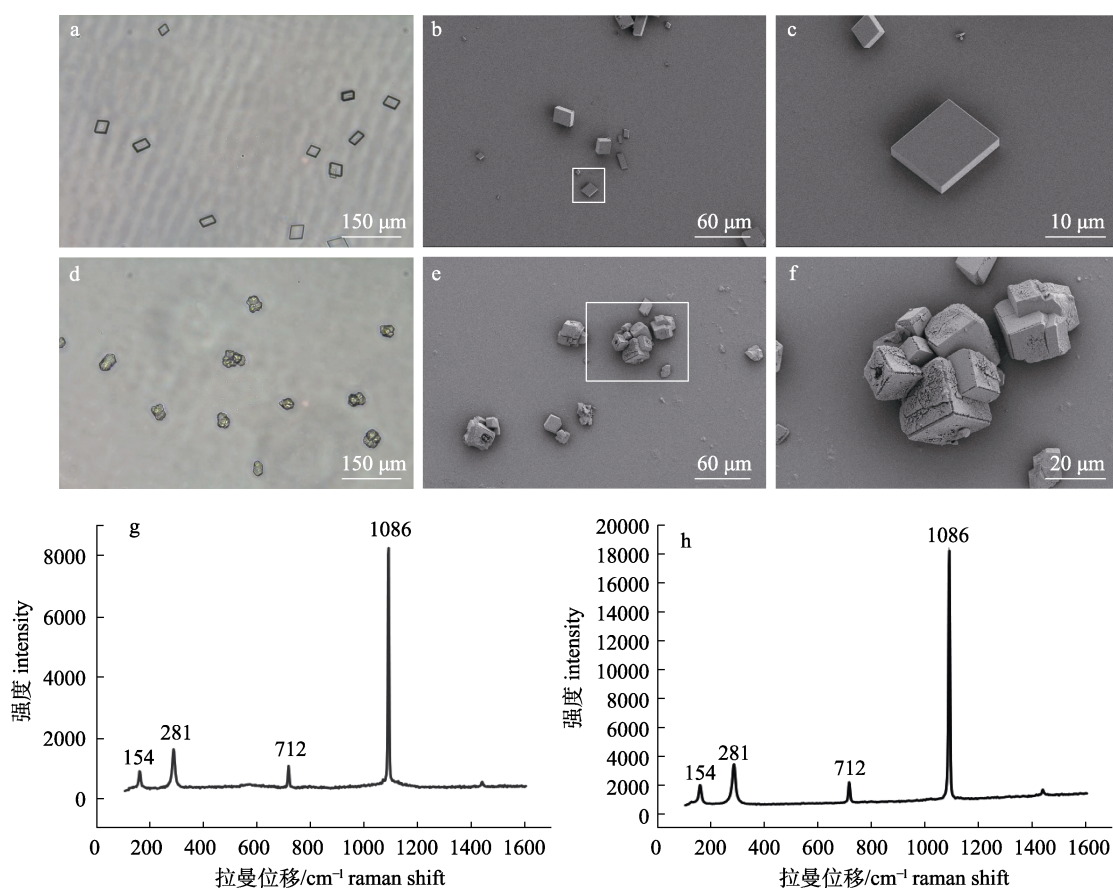


图 9 血清对方解石结晶的影响

- a. 光学显微镜观察对照组晶体; b. 对照组晶体的 SEM 图; c 为 b 的放大图; d. 光学显微镜观察对照组晶体; e. 对照组晶体的 SEM 图; f 为 e 的放大图; g. 对照组 Raman 光谱图; h. 实验组 Raman 光谱图.

Fig. 9 Effect of serum on calcite crystallization

- a. Optical microscopic observation of the control group crystals; b. SEM image of the control group crystals; c. The magnification view of b; d. Optical microscopic observation of the control group crystals; e. SEM image of the control group crystals; f. The magnification views of e; g. Raman spectra of the control group; h. Raman spectra of the experimental group.

能差异性地执行了特定的生物学和生理学功能,其组成比例可在一定程度上反映机体的生理和免疫状态^[9]。例如,张冬冬等^[35]发现栉孔扇贝在 11 °C 水温养殖时,颗粒细胞比例显著上升。龚秀琼等^[36]研究指出菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)在全氟辛酸暴露后,透明细胞的比例显著增加,而颗粒细胞的比例显著减少;Kadar 等^[37]的研究发现深海喷口贻贝(*Bathymodiolus azoricus*)贝壳损伤后,血淋巴细胞向外套膜边缘的外叶迁移,在损伤部位大量聚集。余燕萍等^[38]在圆角无齿蚌(*Anodonta woodia pacifica*)珍珠囊伤口修复过程中发现颗粒细胞发挥着重要作用,说明颗粒细胞在插核刺激后的免疫反应中具有关键作用,担负着主要的免疫功能。不仅如此,Johnstone 等^[39]的

研究发现,血淋巴细胞能够通过浸润金属圆盘表面在表面形成聚集体,并分泌细胞外基质以参与东部牡蛎(*Crassostrea virginica*)植入金属圆盘后的矿化过程^[15,40]。在海水贝类中,已有文献指出颗粒细胞可能参与贝类的生物矿化过程,因此在插核刺激后期颗粒细胞的比例显著上升,可能与其参与珍珠的矿化过程密切相关。

3.3 三角帆蚌血淋巴细胞矿化功能分析

贝类血淋巴细胞参与生物矿化的研究鲜有报道,现有研究主要集中于海水贝类,而针对淡水贝类血淋巴细胞的矿化功能的研究较为匮乏。有研究表明,海水贝类血淋巴细胞能够参与免疫反应和 Ca^{2+} 释放。王文琪等^[41]的研究发现,菲律宾蛤仔血淋巴细胞具有吞噬能力,可以参与炎症和

损伤部位的修复; 悉尼岩牡蛎(*Saccostrea glomerata*)的血淋巴细胞则能够通过包裹, 来隔离过大的病原体^[42]。此外, Huang 等^[16]研究表明合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)血淋巴细胞在壳再生过程中, 上调了钙代谢的基因, 并在颗粒细胞中发现富含钙的囊泡; 深海喷口贻贝(*Bathymodiolus azoricus*)的颗粒细胞同样能够在创伤修复中迁移到创伤部位并释放含钙的颗粒物质^[43]。

本研究发现, 在插核刺激后三角帆蚌血淋巴细胞和血清中 Ca^{2+} 含量在早期显著上升, 而后期显著下降。 Ca^{2+} 作为一种重要的第二信使, 在诸多生命过程中发挥着重要作用, 胞内 Ca^{2+} 浓度能够调节细胞的代谢、增殖、分化等环节, 也与自身免疫病、炎症反应等有直接关系^[44]。 Ca^{2+} 浓度的上升会激活蛋白酶 K^[45] 及 JNK 信号通路^[46], 贾志浩等^[47]指出, 血淋巴细胞中较高水平的钙离子参与维持其吞噬及溶酶体的活性, 从而参与免疫调节反应。马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)在贝壳损伤后, 血淋巴细胞内 Ca^{2+} 含量显著上调, 同时刺激血淋巴细胞的免疫系统活性^[48]。因此认为, 插核刺激引起了三角帆蚌血淋巴细胞 Ca^{2+} 含量显著变化, 从而可能引发了免疫响应。

珍珠主要由 95% 的 CaCO_3 和 5% 的有机基质组成^[49], Ca^{2+} 的供应是 CaCO_3 沉淀过程中一个重要的制约因素, 珍珠通过贝类的钙代谢, 以碳酸钙结晶的形式逐步沉积而成^[50], 且 Ca^{2+} 对珍珠质沉积具有促进作用^[51]。在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)贝壳损伤后发现其总血浆 Ca^{2+} 含量增加^[52], 合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)贝壳损伤后, 血淋巴细胞大量表达钙离子吸收和转运相关的基因, 从而加速贝壳再生^[53], 本研究发现, 插核刺激显著增强了三角帆蚌血淋巴细胞 Ca^{2+} 转运能力, 为碳酸钙晶体形成提供物质基础。

体外 CaCO_3 结晶实验能够清楚地观察物质对于晶体形貌或者晶型上的改变, 是探究物质是否参与生物矿化的常用方法。本研究通过扫描电镜观察发现, 血淋巴细胞改变了方解石晶体形貌, 同时, 结合光镜可以发现血淋巴细胞在实验过程中维持着完整的细胞形态, 且细胞内结构保持良好, 并未发生破裂现象, 由此推测血淋巴细胞可

能通过分泌胞外分泌物来影响方解石的形貌。在 Kong 等^[54]的研究中发现外套膜细胞的细胞分泌物能改变天然方解石晶体的形貌, 并促进晶体的生长及融合, 说明了血淋巴细胞直接参与三角帆蚌的生物矿化, 这为贝类生物矿化进程提供了新的见解。

4 结论

本研究对三角帆蚌血淋巴细胞进行分类, 并探究血淋巴细胞对插核刺激的响应及在矿化中的作用。结果表明三角帆蚌血淋巴细胞主要分为 4 类, 插核刺激后血淋巴细胞在数量、分布和 Ca^{2+} 水平上迅速响应。此外, 血淋巴细胞能控制方解石晶体的形貌。以上结果说明了血淋巴细胞能够响应插核刺激并且参与到 CaCO_3 晶体的形成过程, 这为进一步探究血淋巴细胞在贝类生物矿化中的调控作用提供了研究基础。

参考文献:

- [1] Xie L. Microstructure and formation mechanism of nacre of *H. Cumingii* Lea shell and the growth of nacreous coatings[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009. [谢雷. 三角帆蚌珍珠质微观结构、矿化机制以及珍珠质涂层生长的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.]
- [2] Li W J, Yang J Y, Feng S L, et al. Analysis of proteomic differences and immune factors between *Hyriopsis cumingii* mantle and pearl sac[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(2): 344-354. [李文娟, 杨婧漪, 冯上乐, 等. 基于蛋白质组学的三角帆蚌珍珠囊形成相关免疫因子研究[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(2): 344-354.]
- [3] Wang M F, Yu X Y. Research progress on cell slices and treatment techniques of pearl mussel[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2010, 30(4): 86-91. [王梅芳, 余祥勇. 育珠贝细胞小片及处理技术研究进展[J]. 广东海洋大学学报, 2010, 30(4): 86-91.]
- [4] Shen X Y, Chen Y G, Jia L, et al. Transcriptome and digital gene expression analysis reveal immune responses of mantle and visceral mass pearl culturing in *Hyriopsis cumingii*[J]. Frontiers in Marine Science, 2023, 10: 1251251.
- [5] He X J, Shi Z Y, Li W J. Effects of pearl-nucleus-inserting operation on three immune factors in *Hyriopsis cumingii* Lea[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(6): 859-867. [何秀娟, 施志仪, 李文娟. 插核手术对三角帆蚌血淋巴中 3 种免疫防御因子的影响[J]. 中国水产科学,

- 2009, 16(6): 859-867.]
- [6] Chen X F, Shen X Y, Liu S J, et al. A c-type lectin *HcLec1* with dual function of immunology and mineralization from the freshwater oyster (*Hyriopsis cumingii* Lea)[J]. *Frontiers in Immunology*, 2025, 15: 1530732.
- [7] Jin C, Liu X J, Li J L. A Kunitz proteinase inhibitor (HcKuPI) participated in antimicrobial process during pearl sac formation and induced the overgrowth of calcium carbonate in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 89: 437-447.
- [8] Li J, Zhang Y H, Mao F, et al. The first morphologic and functional characterization of hemocytes in Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 81: 423-429.
- [9] Zhang X X, Wang D M, Li J T, et al. Application perspectives of flow cytometry in researches on shellfish haemocytes[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2021, 34(3): 83-90. [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.]
- [10] Castellanos-Martínez S, Prado-Alvarez M, Lobo-da-Cunha A, et al. Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 44(1): 50-58.
- [11] Donaghy L, Volety A K. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: *in vitro* impacts of temperature[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 808-814.
- [12] Donaghy L, Lambert C, Choi K S, et al. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects[J]. *Aquaculture*, 2009, 297(1-4): 10-24.
- [13] Matozzo V, Ballarin L, Pampanin D M, et al. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, 41(2): 163-170.
- [14] Fleury C, Marin F, Marie B, et al. Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: A histological and microstructural study[J]. *Tissue and Cell*, 2008, 40(3): 207-218.
- [15] Mount A S, Wheeler A P, Paradkar R P, et al. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster[J]. *Science*, 2004, 304(5668): 297-300.
- [16] Huang J L, Li S G, Liu Y J, et al. Hemocytes in the extrapallial space of *Pinctada fucata* are involved in immunity and biomineralization[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): Article No.4657.
- [17] Ivanina A V, Falfushynska H I, Beniash E, et al. Biomineralization-related specialization of hemocytes and mantle tissues of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2017, 220(18): 3209-3221.
- [18] Kishore P, Southgate P C. Development and function of pearl-sacs grown from regenerated mantle graft tissue in the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 567-573.
- [19] Shen W Y, Hu Y W, He Z K, et al. Histological and comparative transcriptome analyses provide insights into the immune response in pearl sac formation of *Hyriopsis cumingii*[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2020, 7: 256.
- [20] Li W J, Huang K, Li Q, et al. Effects of different tissue sites insert-nucleus on pearl-sac formation in visceral mass of *Hyriopsis cumingii*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(6): 1098-1107. [李文娟, 黄凯, 李倩, 等. 三角帆蚌内脏团不同部位插核育珠对珍珠囊形成的影响[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(6): 1098-1107.]
- [21] Cardiff R D, Miller C H, Munn R J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014, 2014(6): 655-658.
- [22] Matozzo V, Bailo L. A first insight into haemocytes of the smooth venus clam *Callista chione*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 494-502.
- [23] Rolton A, Delisle L, Berry J, et al. Flow cytometric characterization of hemocytes of the flat oyster, *Ostrea chilensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 97: 411-420.
- [24] Wang Y J, Hu M H, Chiang M W L, et al. Characterization of subpopulations and immune-related parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(3): 381-390.
- [25] He X J, Shi Z Y, Chen X W, et al. Effect pearl-nucleus-inserting operation in visceral mass on haemocytes in *Hyriopsis cumingii* Lea[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(2): 410-417. [何秀娟, 施志仪, 陈晓武, 等. 内脏团插核术刺激对三角帆蚌血细胞的影响[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(2): 410-417.]
- [26] Xie Y H, Hu B C, Wen C G, et al. Morphology and phagocytic ability of hemocytes from *Cristaria plicata*[J]. *Aquaculture*, 2011, 310(3-4): 245-251.
- [27] Li Q K, Zhang G R, Wei K J, et al. A preliminary study on morphology and phagocytic ability of hemocytes from *Solenia oleivora* (Bivalvia: Unionidae)[J]. *Journal of Hydroecology*, 2012, 33(3): 116-121. [李乾坤, 张桂蓉, 魏开建, 等. 橄榄蛭蚌血细胞形态及吞噬能力的初步研究[J].

- 水生生态学杂志, 2012, 33(3): 116-121.]
- [28] Shi A J, Qiu A D, Sun Q Z. Observation of living hemocyte of freshwater pearl mussel *Anodonta woodiana elliptica* heude[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 1999, 36(2): 332-336. [石安静, 邱安东, 孙奇志. 椭圆背角无齿蚌血细胞的活体观察[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1999, 36(2): 332-336.]
- [29] Guo L, Sheng J Q, Hong Y J, et al. Microscopic observing on hemocytes of *Hyriopsis schlegeli*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(6): 839-844. [郭磊, 盛军庆, 洪一江, 等. 池蝶蚌(贝)血细胞显微观察[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 839-844.]
- [30] Freire J M S, Farias N D, Hégaret H, et al. Morphological and functional characterization of the oyster *Crassostrea gasar* circulating hemocytes: Cell types and phagocytosis activity[J]. Fish and Shellfish Immunology Reports, 2023, 4: 100089.
- [31] Li S G, Liu Y J, Liu C, et al. Morphology and classification of hemocytes in *Pinctada fucata* and their responses to ocean acidification and warming[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(1): 194-202.
- [32] Zhang W, Wu X Z, Wang M Z. Morphological, structural, and functional characterization of the haemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*[J]. Aquaculture, 2006, 251(1): 19-32.
- [33] Zhang W Z, Wu X Z, Wang M. Surface and ultrastructural characterization of the haemocytes in the scallop *Argopecten irradians*[J]. Acta Zoologica Sinica, 2005, 51(3): 486-494. [张维翥, 吴信忠, 汪明. 海湾扇贝血细胞的表面结构及超微结构[J]. 动物学报, 2005, 51(3): 486-494.]
- [34] Wang W L, Li M J, Wang L L, et al. The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 67: 221-228.
- [35] Zhang D D, Xing J, Zhan W B. Influence of temperature shock on the numerical variation of scallop hemocytes and granulocytes[J]. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(5): 40-45. [张冬冬, 邢婧, 战文斌. 温度骤变对栉孔扇贝全血细胞和颗粒血细胞数量的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(5): 40-45.]
- [36] Gong X Q, Zhou Y, Li F L, et al. Toxicity effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) on *Ruditapes philippinarum* hemocytes[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(4): 270-283. [龚秀琼, 周扬, 李凤铃, 等. 全氟辛酸(PFOA)对菲律宾蛤仔血淋巴的毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(4): 270-283.]
- [37] Kadar E, Lobo-da-Cunha A, Azevedo C. Mantle-to-shell CaCO_3 transfer during shell repair at different hydrostatic pressures in the deep-sea vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae)[J]. Marine Biology, 2009, 156(5): 959-967.
- [38] Yu Y P, Shi A J. Functions of hemocytes of *Anodonta woodiana Pacifica* (Heude) during the process of wound healing both in vitro and in vivo[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(3): 234-240. [余燕萍, 石安静. 圆背角无齿蚌血细胞在体内和体外损伤修复过程中的功能[J]. 水生生物学报, 2000, 24(3): 234-240.]
- [39] Johnstone M B, Gohad N V, Falwell E P, et al. Cellular orchestrated biomineralization of crystalline composites on implant surfaces by the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2015, 463: 8-16.
- [40] Li S G, Liu Y J, Liu C, et al. Hemocytes participate in calcium carbonate crystal formation, transportation and shell regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 51: 263-270.
- [41] Wang W Q, Xu S B, Zhang Y N, et al. Study on type and function of haemocytes of *Ruditapes philippinarum*[J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 2006, 23(3): 165-169. [王文琪, 徐申波, 张玉娜, 等. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)血细胞分类及其功能初探[J]. 莱阳农学院学报, 2006, 23(3): 165-169.]
- [42] Aladaileh S, Nair S V, Birch D, et al. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 96(1): 48-63.
- [43] Kádár E. Haemocyte response associated with induction of shell regeneration in the deep-sea vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2008, 362(2): 71-78.
- [44] Trebak M, Kinet J P. Calcium signalling in T cells[J]. Nature Reviews Immunology, 2019, 19(3): 154-169.
- [45] Asaoka Y, Nakamura S I, Yoshida K, et al. Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1992, 17(10): 414-417.
- [46] Li Z, Jiang H P, Xie W, et al. Roles of PLC- β 2 and - β 3 and PI3K γ in chemoattractant-mediated signal transduction[J]. Science, 2000, 287(5455): 1046-1049.
- [47] Jia Z H. Characterization of hematopoietic tissue and hematopoietic regulatory mechanism of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2018. [贾志浩. 中华绒螯蟹造血组织及造血作用机理的研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2018.]
- [48] Li Z X. Isolation and functional investigation of serum exosomes from the *Pinctada fucata martensii*[D]. Zhanjiang:

- Guangdong Ocean University, 2023. [李智鑫. 马氏珠母贝 (*Pinctada fucata martensii*) 血清外泌体的分离和功能探讨 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2023.]
- [49] Bai Z Y, Yuan L, Liu X J, et al. Research progress of matrix proteins in *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(6): 982-991. [白志毅, 袁立, 刘晓军, 等. 三角帆蚌贝壳基质蛋白研究进展[J]. 水产学报, 2021, 45(6): 982-991.]
- [50] Shi Z Y, Li Y, Xie X Z. Relations between alkalinity phosphatase and calcium metabolism in mantle of *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(3): 291-297. [施志仪, 李勇, 谢先中. 三角帆蚌外套膜碱性磷酸酶与钙代谢的关系[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(3): 291-297.]
- [51] Tang M, Shi A J. Studies of environmental calcium concentration effect on the calcium metabolism of the mantle and pearl sac of the freshwater pearl mussel[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2000, 37(5): 741-747. [唐敏, 石安静. 环境钙浓度对淡水育珠蚌外套膜及珍珠囊钙代谢的影响[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2000, 37(5): 741-747.]
- [52] Sillanpää J K, Ramesh K, Melzner F, et al. Calcium mobilisation following shell damage in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Marine Genomics, 2016, 27: 75-83.
- [53] Huang J L. The functions of the mantle tissue and hemocytes in the shell growth of *Pinctada fucata*[D]. Beijing: Tsinghua University, 2019. [黄敬亮. 合浦珠母贝外套膜组织和血细胞在贝壳生长中的作用研究[D]. 北京: 清华大学, 2019.]
- [54] Kong W, Li S G, Xiang L, et al. Calcium carbonate mineralization mediated by *in vitro* cultured mantle cells from *Pinctada fucata*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 463(4): 1053-1058.

Responses of hemolymphocytes to nucleus-inserting stimulation and biomineralization function of *Hyriopsis cumingii*

SUN Junlin¹, CHEN Yiwen¹, CHEN Xiaofeng¹, LI Jiale^{1,2}, BAI Zhiyi^{1,2}, LI Wenjuan^{1,2*}

1. National Experimental Teaching Demonstration Center of Aquatic Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In order to elucidate the effect of nucleus insertion stimulation on hemolymphocytes and their function in pearl mineralization of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis cumingii*, the present study explored the morphology and classification of hemolymphocytes, including four types by means of light and electron microscopy based on cellular complexity, cell size, and nucleo-cytoplasmic ratio. Giemsa staining and flow cytometry analysis showed that the granularity complexity of hemolymphocytes increased significantly, cell diameter became larger after nucleus insertion, the proportion of granulocytes increased significantly ($P < 0.05$), and the proportion of hyalinocyte decreased significantly ($P < 0.05$). The results of histological observation showed that a large number of hemolymphocytes gathered near the insertion site and granulocytes were recruited. Ca^{2+} content in hemolymphocytes and serum continued to significantly increase 2, 5, and 10 d after insertion ($P < 0.05$) and then significantly decreased 20 and 50 d after insertion ($P < 0.05$), which revealed that the number composition, distribution, and Ca^{2+} level of hemolymphocytes all respond to nucleus insertion. *In vitro* calcium carbonate crystallization experiments showed that hemolymphocytes and serum were able to influence the morphology of calcite but did not change the crystal shape. In summary, hemolymphocytes respond rapidly to the stimulation of nucleus insertion and can regulate biomineralization. This study lays a theoretical foundation for further research on the regulatory role of hemolymphocytes in shellfish biomineralization.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; hemolymphocytes; nucleus-inserting response; biomineralization; Ca^{2+} level

Corresponding author: LI Wenjuan. E-mail: wjli@shou.edu.cn