

甲壳动物造血机制研究进展

杨丰, 李钊

(自然资源部第三海洋研究所、海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要:血细胞是甲壳动物的免疫细胞, 可通过吞噬、包囊、结节、黑化, 以及分泌免疫活性分子等方式杀死和清除入侵的病原体。活跃的造血机能对更新和补充损耗的循环血细胞、维持一个稳定有效的免疫系统是至关重要的。相对脊椎动物而言, 人们对包括甲壳动物在内的无脊椎动物的造血机制了解比较有限。本文总结了近年来在甲壳动物造血机制方面的研究进展, 主要介绍了血细胞的类型和功能、造血组织的结构和细胞组成、血细胞的分化途径、造血的调控机制, 以及相关的细胞模型和体外实验技术等。并在此基础上分析了已有研究存在的缺陷, 提出了需要进一步探究的问题。

关键词:海洋生物学; 甲壳动物; 造血; 血细胞分化; 免疫

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2019. 04. 004

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2019)04-0484-06

血细胞是甲壳动物的免疫细胞, 负责执行体液免疫和细胞免疫, 抵御和清除入侵的病原。保证循环系统中血细胞的稳态是维持一个有效免疫系统的基础。成熟血细胞均具有一定的寿命, 在正常生理条件下需要不断更新; 在发生感染的情况下, 血细胞被大量招募用于清除病原, 会在短时间内产生较多的损耗; 此外, 由于甲壳动物好斗的特性, 常常会发生外伤导致血细胞流失; 以上情况都需要造血组织 (hematopoietic tissue) 产生新的血细胞来加以补充。因此活跃的造血能力, 对保证机体的健康乃至存活都是非常重要的。相对脊椎动物而言, 人们对无脊椎动物造血 (hematopoiesis) 机制的认识很有限, 本文对近年来在甲壳动物造血机制的研究上取得的进展进行了总结。

1 甲壳动物血细胞的类型与功能

1.1 血细胞的类型

甲壳动物的血细胞根据形态特征可大致分成3类: 透明细胞 (hyaline/agranular cell, HC), 半颗粒细胞/小颗粒细胞 (semigranular cell/small granular cell, SGC) 和颗粒血细胞/大颗粒细胞 (granular cell/large granule cell, GC)^[1-2]。其中 HC 体积最小, 核质比最大, 细胞中不含或者含有少量的胞质颗

粒; GC 体积最大, 核质比最小, 细胞质中充满了体积较大的颗粒; SGC 体积中等, 核质比较小, 含有较多胞质颗粒, 但是其颗粒的体积小于 GC^[3]。研究表明, 在不同的物种中, 血细胞的类型组成以及不同类型细胞的丰度存在一定的差异。在螯虾和对虾中, SGC 和 GC 是主要的血细胞, 而 HC 含量较低, 研究者认为其可能是提前被释放的未充分分化的细胞^[3-5]; 但对一些蟹类的研究表明 HC 是主要的血细胞^[6]。这种根据形态学特征来区分细胞类型的方法比较原始、主观性强, 因此研究者对不同物种血细胞类型的判别, 甚至不同研究者针对同一物种的血细胞类型判别均可能存在差异。

1.2 血细胞功能

血细胞是甲壳动物的主要免疫细胞, 负责执行细胞免疫和体液免疫反应。其中细胞免疫主要包括对外来异物的吞噬、包囊、结节作用^[1, 7]; 体液免疫主要包括酚氧化酶原系统参与的黑化过程、凝固蛋白参与的凝血反应, 以及抗菌肽对病原的杀伤等^[8-10]。已有的研究表明, 不同类群的细胞在免疫反应中扮演不同的角色。其中 HC、SGC 和 GC 均可参与对异物的吞噬; SGC 负责执行对较大异物的包囊作用; GC 是酚氧化酶系的主要储存细胞, 在一定条件下 GC 中的酚氧化酶系被释放并活化, 启

收稿日期: 2019-07-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31672675)

作者简介: 杨丰 (1963—), 男, 研究员; E-mail: yangfeng@tio.org.cn

通讯作者: 李钊 (1977—), 女, 研究员; E-mail: lifang@tio.org.cn

动黑化反应;此外,GC 还负责储存和释放抗菌肽、蛋白酶抑制剂等免疫活性物质^[1, 10]。

1.3 有待解决的问题

目前对血细胞功能的研究主要以血细胞的形态学分类为基础。然而,同样的形态学类群中可能还存在不同的功能亚群^[5]。对血细胞功能亚群的鉴定,以及准确的血细胞分型,将有赖于血细胞分子标记的发现,以及基于分子标记的细胞功能分析。近年来有研究者依据血细胞的形态学分类,从 mRNA 和蛋白水平对相应的分子标记进行了筛选,获得了一些在不同血细胞中特异性表达的标记分子,为研究甲壳动物血细胞功能分型奠定了基础^[11-13]。但这些标记分子与血细胞功能亚群的对应关系,以及在不同甲壳动物中的适用性还有待进一步研究。

2 甲壳动物的造血组织

造血指的是从造血干细胞/前体细胞分化产生成熟血细胞并释放到血液循环的过程。人们对甲壳动物造血机制的探索可追溯到 18 世纪末,早期的研究者凭借显微观察在多种甲壳动物中发现了造血组织存在的证据^[3]。近年来的研究主要集中在十足目甲壳类动物特别是淡水螯虾中^[3, 14-19],此外在对虾^[20-23]、蟹类^[24-26]、龙虾^[27]中也进行了一些探索。十足目甲壳动物的造血组织通常位于胃部背侧,是一薄片状组织,造血干细胞/前体血细胞被包裹在由结缔组织构成的小叶中。

2.1 造血组织细胞的类型

研究者根据造血组织小叶中细胞的形态学特征(包括细胞大小、胞质颗粒以及细胞器发育情况等),对其进行了初步的分类,并对细胞所处分化阶段进行了推测。

Chaga 等(1995)认为,螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)的造血组织包括了 5 种类型的细胞^[14]。其中 1 型和 2 型细胞均具有分裂能力,可分化为 SGC 与 GC。1 型细胞可能是造血干细胞,占 8% 左右,这类细胞排列紧密的分布于小叶背侧,可进一步发育为 2 型细胞;2 型细胞占总数 30% 左右,紧邻 1 型细胞层分布在小叶内侧,细胞的组织比较松散,这类细胞增殖最为旺盛。3 型和 4 型细胞含有与 GC 类似的颗粒,可能是 GC 的前体,其中 3 型细胞含量最高,占 55%。5 型细胞含有很多细小的胞质颗粒,可能是 SGC 的前体。3、4、5 型细胞均不具备分裂能力。

Martin 等(1993)认为,龙虾(*Homarus americanus*)的造血组织中包含了两个谱系的干细胞和成熟血细胞^[27]。其一为透明细胞谱系,包括透明型干细

胞,以及处于不同分化阶段的透明细胞;其二是颗粒细胞谱系,根据不同的分化阶段,分为颗粒型干细胞、小颗粒型干细胞、小颗粒细胞、颗粒细胞。每个小叶通常同时包含两个谱系的细胞。在造血组织中透明细胞谱系占 9.5%,颗粒细胞谱系占 90.5%。

Van de Braak 等(2002)认为,对虾(*Penaeus monodon*)的造血组织包含了 4 种主要的细胞类型^[20]:1 型细胞是前体细胞,可进一步分化为 2 型(未成熟 SGC)和 3 型(未成熟 GC)细胞,而 4 型细胞为间质细胞。其中 1~3 型细胞均可分裂。作者认为造血组织中的 2、3 型细胞与传统意义上血液循环中的 HC 类似,推测 2、3 型细胞以 HC 的形式被释放后,在循环中成熟为 SGC 和 GC。其中部分 GC 可能在结缔组织中分化成熟并储存。需要指出的是,早期研究认为类淋巴器是对虾的造血组织,后来这个观点被证明是错误的,类淋巴器可能是一个血淋巴的过滤器官,负责过滤收集循环血中的病原,并通过活跃的吞噬作用将其清除^[28]。

2.2 造血组织中细胞的组织形式

根据对螯虾^[14]、对虾^[20]、龙虾^[27]等的研究,十足目甲壳动物造血组织小叶中细胞的组织形式存在类似的规律。造血组织小叶结构具有极性,在其一侧存在开口(结缔组织缺失)。小叶中的细胞按分化程度呈梯度分布:分化程度低的细胞紧密排列于远离开口的一侧(在螯虾中描述为小叶的背侧,在对虾中描述为小叶的外周);分化程度较高的细胞松散排列于小叶的内部;即将成熟的血细胞位于小叶开口附近,并可能由此处释放到循环中。此外,对螯虾的研究表明,位于造血组织不同部位的细胞存在差异,螯虾造血组织的前端与大脑相邻的部位存在一个复制中心(anterior proliferation center, APC)^[29]。与造血组织后部相比,APC 细胞分化程度较低、增殖旺盛。从该部位分离的细胞在体外培养实验中也与来源于造血组织后部的细胞存在差异,细胞因子 Astakine 1 在体外无法诱导 APC 细胞的分化。推测 APC 可能是造血干细胞集中分布之处。

2.3 有待解决的问题

已有的研究仅是基于形态学特征对甲壳动物的造血组织细胞进行了类型区分,并根据其胞质颗粒的有无和多少以及细胞器发育情况等将其与循环血细胞对应关联。至于这些细胞之间以及它们与循环血细胞类型之间的关系还缺乏直接的证据。

3 血细胞的分化途径

甲壳动物血细胞的分化途径目前是不明确的。

研究者推测,螯虾和对虾的血细胞可能是双向分化,即:造血干细胞先分别分化为 SGC 和 GC 的前体,然后再进一步发育为 SGC 和 GC^[14, 20],但是这一推测尚缺乏实验证据。根据我们的研究,螯虾血淋巴中 GC 的比例通常小于 35%,但体外培养的螯虾造血组织细胞中有 60% 以上具有分化为 GC 的能力,而且未成熟 GC 的形态特征与循环中的 SGC 非常类似^[17]。上述发现提示血细胞也存在单向分化的可能,即只有一种细胞谱系,分化途径是造血干细胞-前体血细胞-SGC-GC。此外,对螯虾^[14]、对虾^[20]和龙虾^[27]造血组织的形态学研究表明,该组织中不含(或仅含有极少量的)成熟 GC,且这些极少量的 GC 可能是由血淋巴携带进组织的。因此,GC 应该是分化到一定阶段就被释放到血液循环并在其中逐步发育成熟的。血淋巴中含有多大比例的未成熟 GC,这些细胞如何进一步发育也是未知的。因此甲壳动物血细胞的分化途径到底如何还需要更深入的研究。

4 甲壳动物造血的调控机制

4.1 参与造血调控的分子

甲壳动物的造血过程受到蜕皮周期^[27, 30]、病原感染^[20, 31-33]、失血^[20, 34]以及昼夜节律等因素^[35]的影响。目前已经发现了一些蛋白可能参与了甲壳动物造血的调控,其中最重要的是细胞因子 Astakine。Astakine 是一类与脊椎动物 Prokineticin 同源的蛋白。Prokineticin 类蛋白参与了脊椎动物的血管生成、神经生成,以及昼夜节律调节等过程^[19]。目前在甲壳动物中发现了两种 Astakine 亚型, Astakine1 和 Astakine2 (简称 AST1, AST2)。AST1 是一类造血组织生长因子,主要由 SGC 产生并分泌到血淋巴中。AST1 在体外可以促进造血组织细胞的增殖,注射 AST1 则可以引起循环血细胞的增加,而抑制 AST1 的表达则会阻碍新血细胞的产生^[33]。内外实验均表明,AST1 可能具有诱导造血组织细胞分化为 SGC 的能力^[36]。不仅如此,AST1 还可以通过上调甲壳动物造血因子 (crustacean hematopoietic factor, CHF) 的表达来抑制造血组织细胞的凋亡^[37]。因此 AST1 可通过促增殖和抑凋亡两个途径来增强机体的造血能力。此外,其他一些造血调节因子可能通过与 AST1 相互作用来发挥功能,例如:AST1 和 β 胸腺素都能结合细胞表面的 ATP 合成酶,AST1 可以促进胸腺素的分泌,胸腺素又可以促进 AST1 的表达,二者通过复杂的相互作用影响造血组织细胞的增殖、迁移和释放^[38-39];抗菌肽 Crustin Pm4 以及转谷氨酰胺酶 (Transglutaminase, TGase) 可以通过

结合 AST-1 的 3'-UTR 抑制 AST1 蛋白的翻译^[23];五羟色胺可以通过促进血细胞分泌 AST1 来调节造血组织细胞的增殖^[18]。

与 AST-1 不同,AST2 不能促进血细胞的增加,但它可以引起血淋巴中 GC 比例的上升,因此该蛋白可能与 GC 分化成熟有关^[36]。此外,AST2 在造血组织中的表达受昼夜节律影响显著,并可以介导褪黑素对生物钟的调节,可能参与调控造血的昼夜节律变化^[35]。

此外在对虾中还发现了一个血细胞稳态调节因子 (hemocyte homeostasis-associated protein, HHAP), 该蛋白在造血组织中高表达,敲低其表达会导致血细胞发生严重损伤,并导致对虾在 30 h 之内迅速死亡^[21]。说明 HHAP 对维持对虾循环血细胞稳态非常重要,可能与造血能力的维持有关。不过在螯虾发现的 HHAP 同源蛋白并不具有上述功能^[40]。

4.2 胞外基质与造血的关系

对脊椎动物的研究表明,胞外基质参与调节造血组织/器官的微环境,影响造血干细胞/前体血细胞的增殖、更新与分化等过程^[41]。螯虾的造血组织细胞是由结缔组织包裹,胞外基质的主要成分包括胶原蛋白^[3, 14]和凝血蛋白^[42]等,它们共同维持造血组织的微环境,影响造血干细胞/前体血细胞的分化状态。TGase 在调节胞外基质结构中扮演了重要的角色。TGase 是一类负责催化甲壳动物凝血过程的酶,它能催化蛋白质赖氨酸上的 ϵ -氨基和谷氨酸上的 γ -酰胺基结合,从而使蛋白质之间发生共价交联。TGase 在甲壳动物的造血组织中高表达^[16, 22],在对螯虾造血组织块的体外培养中研究者发现,组织内部的 TGase 表达量很高,而从组织块外迁的细胞 TGase 表达量显著降低;而抑制 TGase 表达会引起原代造血组织细胞的形态发生改变^[16]。上述发现说明 TGase 在维持造血组织细胞干性方面可能有一定的作用。进一步的研究表明,AST1 可以非竞争性抑制 TGase 的活性,导致胞外基质结构松散,从而促进造血组织细胞的分化和新生血细胞释放^[19]。此外,血小板生成因子/血管内皮生长因子 (platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor) 家族的蛋白也可以通过抑制 TGase 来调节胞外基质的结构,从而促进血细胞的分化^[43]。

4.3 有待解决的问题

在上述对甲壳动物造血调控机制的研究中,研究者主要是根据原代造血组织细胞的贴壁铺展和迁移情况来判断其是否分化,缺乏直接证据。此外,在上述研究中,对于有新血细胞产生的判断标准是循环血

细胞数量的增加,无法排除固着血细胞^[44-47]释放产生的影响。因此,到底哪些因子在血细胞分化、成熟和释放的过程中起到调控作用还有待进一步证实。

5 造血组织细胞的体外培养与诱导分化

2005 年瑞典学者建立了螯虾造血组织细胞体外培养的方法^[33]。他们利用胶原酶将造血组织消化,得到单细胞悬液,并于添加了螯虾血浆的 L15 培养基中贴壁培养。造血组织细胞存活时间可达 8 ~ 12 周。随后,他们从螯虾血浆中分离出能够促进造血组织细胞增殖和分化的细胞因子 AST1^[33]。Liu 等(2007)利用组蛋白 H2A 为转染试剂,建立了适用于螯虾造血组织细胞的 RNA 干扰技术^[48]。此后原代培养的螯虾造血组织细胞被广泛用于造血机制和免疫功能的研究^[16, 37, 49-51]。Shi 等(2018)建立了基于这一原代培养细胞的外源基因转染方法^[52],进一

步为开展基因功能研究提供了便利。本课题组 Li 等(2019)利用螯虾肌肉提取液成功的诱导体外培养的造血组织细胞分化为 GC^[17],建立了甲壳动物血细胞分化的体外模型,为深入研究甲壳动物血细胞分化扫除了技术障碍。

6 展望

虽然近年来对甲壳动物造血机制的研究取得了较大的进展,但是还有许多基本的问题悬而未决。比如:造血组织中到底存在哪些不同分化阶段的细胞,它们与循环血细胞之间到底是什么关系?血细胞的分化途径是怎样的,受哪些因子的调控?血细胞分化成熟及新旧更替的速度如何?病原感染对造血过程有何影响?对这些问题的探究将深化我们对甲壳动物造血机制的认识,并有助于了解动物造血机制的演化过程。

参考文献:

- [1] CERENIUS L, JIRAVANICHPAISAL P, LIU H P, et al. Crustacean immunity[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010, 708: 239-259.
- [2] LEE S Y, SODERHALL K. Early events in crustacean innate immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(5): 421-437.
- [3] SODERHALL I. Crustacean hematopoiesis[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 58: 129-141.
- [4] MARTIN G G, GRAVES B L. Fine structure and classification of shrimp hemocytes[J]. *Journal of Morphology*, 1985, 185(3): 339-348.
- [5] LI F, CHANG X, XU L, et al. Different roles of crayfish hemocytes in the uptake of foreign particles[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 77: 112-119.
- [6] LV S, XU J, ZHAO J, et al. Classification and phagocytosis of circulating haemocytes in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and the effect of extrinsic stimulation on circulating haemocytes *in vivo*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 415-422.
- [7] JIRAVANICHPAISAL P, LEE B L, SODERHALL K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization[J]. *Immunobiology*, 2006, 211(4): 213-236.
- [8] SODERHALL K, CERENIUS L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10(1): 23-28.
- [9] FREDRICK W S, RAVICHANDRAN S. Hemolymph proteins in marine crustaceans[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, 2(6): 496-502.
- [10] SRICHAROEN S, KIM J J, TUNKIJJANUKIJ S, et al. Exocytosis and proteomic analysis of the vesicle content of granular hemocytes from a crayfish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2005, 29(12): 1 017-1 031.
- [11] WU C, SODERHALL I, KIM Y A, et al. Hemocyte-lineage marker proteins in a crustacean, the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*[J]. *Proteomics*, 2008, 8(20): 4 226-4 235.
- [12] SODERHALL I, JUNKUNLO K. A comparative global proteomic analysis of the hematopoietic lineages in the crustacean *Pacifastacus leniusculus*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 92: 170-178.
- [13] KOIWAI K, ALENTON R R, SHIOMI R, et al. Two hemocyte sub-populations of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Molecular Immunology*, 2017, 85: 1-8.
- [14] CHAGA O, LIGNELL M, SODERHALL K. The haematopoietic cells of the fresh water crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. *Animal Biology*, 1995, 4: 59-70.
- [15] LIN X, SODERHALL I. Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines[J]. *Blood*, 2011, 117(24): 6 417-6 424.
- [16] LIN X, SODERHALL K, SODERHALL I. Transglutaminase activity in the hematopoietic tissue of a crustacean, *Pacifastacus*

- leniusculus, importance in hemocyte homeostasis[J]. BMC Immunology, 2008, 9:58. DOI: 10.1186/1471-2172-9-58.
- [17] LI F, XU L, HUI X, et al. Directed differentiation of granular cells from crayfish hematopoietic tissue cells[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 88: 28-35.
- [18] NOONIN C. Involvement of Serotonin in crayfish hematopoiesis[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2018, 86: 189-195.
- [19] SIRIKHARIN R, JUNKUNLO K, SODERHALL K, et al. Role of astakine1 in regulating transglutaminase activity[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 76: 77-82.
- [20] VAN DE BRAAK C, BOTTERBLOM M, LIU W, et al. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12(3): 253-272.
- [21] PRAPAVORARAT A, VATANAVICHARN T, SODERHALL K, et al. A novel viral responsive protein is involved in hemocyte homeostasis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(28): 21 467-21 477.
- [22] HUANG C C, SRITUNYALUCKSANA K, SODERHALL K, et al. Molecular cloning and characterization of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transglutaminase[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2004, 28(4): 279-294.
- [23] CHANG Y T, LIN C Y, TSAI C Y, et al. The new face of the old molecules: crustin Pm4 and transglutaminase type I serving as RNPs down-regulate astakine-mediated hematopoiesis[J]. PLoS ONE, 2013, 8(8): e72793.
- [24] JIA Z, KAVUNGAL S, JIANG S, et al. The characterization of hematopoietic tissue in adult Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 60: 12-22.
- [25] GHIRETTI-MAGALDICI A, MILANESIG C, TOGNON G. Hemopoiesis in crustacea decapoda: origin and evolution of hemocytes and cyanocytes of *Carcinus maenas*[J]. Cell Differentiation, 1977, 6(3): 167-186.
- [26] JIA Z, WANG M, WANG X, et al. The receptor for activated C kinase 1 (RACK1) functions in hematopoiesis through JNK activation in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 57: 252-261.
- [27] MARTIN G G, HOSE J E, CHOI M, et al. Organization of hematopoietic tissue in the intermolt lobster, *Homarus americanus* [J]. Journal of Morphology, 1993, 216(1): 65-78.
- [28] RUSAINI, OWENS L. Insight into the lymphoid organ of penaeid prawns; a review[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(3): 367-377.
- [29] NOONIN C, LIN X, JIRAVANICHPAISAL P, et al. Invertebrate hematopoiesis: an anterior proliferation center as a link between the hematopoietic tissue and the brain[J]. Stem Cells and Development, 2012, 21(17): 3 173-3 186.
- [30] HOSE J E, MARTIN G G, TIU S, et al. Patterns of hemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*[J]. The Biological Bulletin, 1992, 183: 185-199.
- [31] SODERHALL I, BANGYEEKHUN E, MAYO S, et al. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2003, 27(8): 661-672.
- [32] HAMMOND J A, SMITH V J. Lipopolysaccharide induces DNA-synthesis in a sub-population of hemocytes from the swimming crab, *Liocarcinus depurator*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2002, 26(3): 227-236.
- [33] SODERHALL I, KIM Y A, JIRAVANICHPAISAL P, et al. An ancient role for a prokineticin domain in invertebrate hematopoiesis[J]. The Journal of Immunology, 2005, 174(10): 6 153-6 160.
- [34] ROULSTON C, SMITH V J. Isolation and *in vitro* characterisation of prohaemocytes from the spider crab, *Hyas araneus* (L.) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2011, 35(5): 537-544.
- [35] LIN X, NOVOTNY M, SODERHALL K, et al. Ancient cytokines, the role of astakines as hematopoietic growth factors[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(37): 28 577-28 586.
- [36] WATTHANASUROROT A, SODERHALL K, JIRAVANICHPAISAL P, et al. An ancient cytokine, astakine, mediates circadian regulation of invertebrate hematopoiesis[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(2): 315-323.
- [37] LIN X, SODERHALL K, SODERHALL I. Invertebrate hematopoiesis: an astakine-dependent novel hematopoietic factor[J]. The Journal of Immunology, 2011, 186(4): 2 073-2 079.
- [38] SAELEE N, NOONIN C, NUPAN B, et al. β -thymosins and hemocyte homeostasis in a crustacean[J]. PLoS ONE, 2013, 8(4): e60974.
- [39] LIN X, KIM Y A, LEE B L, et al. Identification and properties of a receptor for the invertebrate cytokine astakine, involved in hematopoiesis[J]. Experimental Cell Research, 2009, 315(7): 1 171-1 180.

- [40] APITANYASAI K, NOONIN C, TASSANAKAJON A, et al. Characterization of a hemocyte homeostasis-associated-like protein (HHAP) in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 429-435.
- [41] AHMED M, FFRENCH-CONSTANT C. Extracellular matrix regulation of stem cell behavior[J]. *Current Stem Cell Reports*, 2016, 2:197-206.
- [42] JUNKUNLO K, SODERHALL K, SODERHALL I. Clotting protein-An extracellular matrix (ECM) protein involved in crustacean hematopoiesis[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 78: 132-140.
- [43] JUNKUNLO K, SODERHALL K, NOONIN C, et al. PDGF/VEGF-related receptor affects transglutaminase activity to control cell migration during crustacean hematopoiesis[J]. *Stem Cells and Development*, 2017, 26(20): 1 449-1 459.
- [44] MARKUS R, LAURINYEZ B, KURUCZ E, et al. Sessile hemocytes as a hematopoietic com-partment in *Drosophila melanogaster*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(12): 4 805-4 809.
- [45] KOIWAI K, KONDO H, HIRONO I. The immune functions of sessile hemocytes in three organs of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* differ from those of circulating hemocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 109-113.
- [46] ACCORSI A, OTTAVIANI E, MALAGOLI D. Effects of repeated hemolymph withdrawals on the hemocyte populations and hematopoiesis in *Pomacea canaliculata*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 38(1): 56-64.
- [47] SIGLE L T, HILLYER J F. Mosquito hemocytes associate with circulatory structures that support intracardiac retrograde hemolymph flow[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1 187. DOI: 10.3389/fphys. 2018. 01187.
- [48] LIU H, SODERHALL I. Histone H2A as a transfection agent in crayfish hematopoietic tissue cells[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31(4): 340-346.
- [49] LIU H, JIRAVANICHPAISAL P, SODERHALL I, et al. Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication *in vitro* and *in vivo* in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(21): 10 365-10 371.
- [50] LIU H P, CHEN R Y, ZHANG Q X, et al. Differential gene expression profile from haematopoietic tissue stem cells of red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in response to WSSV infection[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(7): 716-724.
- [51] HUANG J, LI F, WU J, et al. White spot syndrome virus enters crayfish hematopoietic tissue cells via clathrin-mediated endocytosis[J]. *Virology*, 2015, 486: 35-43.
- [52] SHI H, RUAN L, SODERHALL I, et al. Transfection of crayfish hematopoietic tissue cells[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 88: 70-76.

Progress in the research of crustacean hematopoiesis

YANG Feng, LI Fang

(Key Laboratory of Marine Genetic Resources, Third Institute of Oceanography, MNR, Ximan 361005, China)

Abstract: Hemocytes are the major immune cells of crustaceans. They remove invading pathogens by phagocytosis, encapsulation, nodulation and releasing of immune reactive molecules. Hematopoiesis is important for renewal and replenishment of circulating hemocytes and maintenance of a functional immune system. Compared with the hematopoiesis of vertebrates, which has been intensively studied, the knowledge of the invertebrate hematopoiesis is limited. In this review, we summarize the current knowledge of crustacean hemocyte lineages and their function, the structure and cell content of hematopoietic tissue, the differentiation procedure of hemocytes, and the regulation of hematopoiesis. We also introduce the *in vitro* methods developed for the study of crustacean hematopoiesis. Finally, we raise the questions needed for the future study.

Key words: marine biology; crustacean; hematopoiesis; hemocyte differentiation; immunity

DOI: 10.3969/J. ISSN.2095-4972.2019.04.004

(责任编辑:肖 静)