

文章编号:1000-0615(2009)06-1018-08

## 克氏原螯虾血细胞及免疫功能的初步研究

陆剑锋<sup>1,2</sup>, 万全<sup>3</sup>, 吴旭干<sup>2</sup>, 杨筱珍<sup>2</sup>, 赵维信<sup>2</sup>, 成永旭<sup>2</sup>

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036;)

**摘要:**甲壳动物血细胞在宿主免疫应答中发挥着重要的作用,其中包括识别、吞噬、包囊黑色素形成、胞毒作用和胞间的信息传递。不同类型的血细胞其防御机制不同,因此血细胞的形态和分类是甲壳动物免疫学的基础。通常情况,十足目甲壳动物的血细胞类型主要依据细胞质中颗粒物质的有无和颗粒物质的相对大小进行分类。研究采用 Giemsa 染色法、H. E 染色法和电子显微技术法对克氏原螯虾血细胞进行分类,观察到3类血细胞:透明细胞、小颗粒细胞、大颗粒细胞,它们所占的比例分别为19.9%, 46.1%, 34.1%。在电镜下,这3类血细胞的超微结构极为容易辨识。透明细胞通常在3类细胞中最小,核质(N/C)比最高,但无明显的颗粒;相比之下,小颗粒细胞和大颗粒细胞内部的颗粒数量逐渐增多。利用体内和体外培养技术研究克氏原螯虾血细胞对外源体(以 Sephadex A-25 色谱硅珠作为抗原)的包囊作用,初步探讨克氏原螯虾血细胞在对外源体免疫应答过程中的识别机理。将 Sephadex A-25 色谱硅珠植入克氏原螯虾体内,抗原物周围被大量血细胞包囊,通过切片技术观察到抗原物周围的血细胞绝大部分为小颗粒细胞,证实在包囊过程中起主要作用的血细胞是小颗粒细胞,即小颗粒细胞在包囊反应中比较活跃。研究结果为以后进一步研究克氏原螯虾的细胞免疫机制和提高其抗病能力提供了科学依据。

**关键词:**克氏原螯虾;血细胞;免疫;包囊

**中图分类号:**S 917

**文献标识码:**A

甲壳动物的机体防御系统与脊椎动物一样,主要包括细胞和体液免疫因子。由于部分体液免疫因子在细胞内产生并储藏在各自细胞中发挥作用,所以严格区分两种免疫防御因子较为困难。因此,研究甲壳动物的血细胞分类及各类血细胞的作用,以及血细胞对外源体作用的机理显得非常重要。

甲壳动物血细胞免疫主要包括识别、吞噬、包囊、黑色素形成、胞毒作用和胞间的信息传递等<sup>[1]</sup>。对十足目动物的免疫功能研究,不仅关系着虾、蟹养殖过程中的病害防治问题,而且对认识动物免疫功能的进化过程 also 具有重要意义<sup>[2-3]</sup>。虾、蟹免疫以非特异的细胞免疫为主,因此血细胞

在虾、蟹类免疫防御机制中扮演着关键的角色<sup>[4-5]</sup>。本文通过对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)血细胞及其免疫功能的初步研究,为进一步探讨血细胞在宿主免疫应答过程中的识别机理提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

克氏原螯虾取自巢湖市水产技术推广中心,体长8.3~12.0 cm,体重28.1~48.5 g,肝胰腺重1.32~3.58 g,性腺重0.06~0.27 g,共40余尾。实验前将螯虾在室内暂养一周左右,每天定时投喂颗粒饲料和换水排污两次,实验时需挑选活力

较强、体表完好无损的螯虾作为研究对象,每组至少选取 5 尾螯虾,分别进行血涂片制作、血细胞石蜡和电镜切片、血细胞体内和体外培养等操作。

## 1.2 实验方法

**血涂片制作及 Giemsa 染色** 取两片洁净的载玻片置于玻片台上,在克氏原螯虾大螯处剪断关节膜,将渗出的血液迅速滴在其中一张玻片的一端,用另一张玻片斜置血滴左端(角度以  $45^\circ$  为宜),向右均匀推进至末端,滴两滴甲醇于玻片上固定 2 min, Giemsa 染液染色 15 ~ 30 min,用蒸馏水将染液洗去并晾干,中性树胶封片,在显微镜下观察和拍照。

**血细胞 H. E 染色观察** 将血细胞用 Bouin 氏液固定,按照常规石蜡切片程序,采用苏木精与伊红对比染色法(简称 H. E 对染法),经过 H. E 染色后,细胞核常被苏木精染成蓝紫色,而细胞质被伊红染色呈粉红色。

**血细胞电镜切片观察** 将血液滴入预冷的 Eppendorf 离心管中(含  $4^\circ\text{C}$  的 2% 戊二醛), 3 000 r/min 离心 5 ~ 10 min,弃去上层离心后的固定液,添加新鲜的戊二醛固定过夜,再用 1% 锇酸固定 2 h, 丙酮梯度脱水, Epon812 树脂包埋, ULTKACUT-E 切片机切片(厚度 50 nm),醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色, JEM-1005A 透射电镜观察和拍照<sup>[6]</sup>。

**血细胞计数** 吸取 80  $\mu\text{L}$  抗凝剂(柠檬酸 2.101 4 g, 葡萄糖 0.990 9 g, EDTA $\text{Na}_2$  0.186 1 g, NaCl 1.490 2 g, 柠檬酸三钠 0.441 1 g, 定容至 50 mL)于 Eppendorf 离心管中,注入螯虾血液 20  $\mu\text{L}$ ,迅速混匀,用 XB-K-25 型 Neubauer 氏血球计数板(沪西光)进行计数<sup>[7]</sup>。

**Sephadex A-25 色谱硅珠染色** 取一小匙 Sephadex A-25 色谱硅珠与离心管中, 70% 的酒精浸泡 30 min, PBS 漂洗 3 ~ 5 次, 0.1% 的刚果红染色约 3 h,再用 PBS 漂洗 3 ~ 5 次,置于滤纸上风干,并在紫外灯下照射灭菌 30 min,最后用离心管分装保存,使用时用 PBS 稀释至一定浓度备用<sup>[6]</sup>。

**血细胞免疫功能的体外培养** 取 1 mL 抗凝剂加入离心管中,注入克氏原螯虾的血液,充分摇匀制成血细胞悬液。用移液枪吸取少量硅珠(3 ~ 5 颗),添加至 96 孔细胞培养板的小孔中,注入 200  $\mu\text{L}$  M199 培养基,数滴青霉素和链霉素混

合液(1:1)、苯基硫脲(PTU)和血细胞悬液,用移液枪充分混匀,在超净工作台中培养 3 ~ 6 h<sup>[7]</sup>。将色谱硅珠固定于 Eppendorf 管(含预冷的戊二醛)中待显微观察。

**血细胞免疫功能的体内培养** 先用 75% 酒精擦拭螯虾附肢关节膜处进行消毒,用玻璃毛细管吸取少量色谱硅珠稀释液(约 10  $\mu\text{L}$ ),用玻璃毛细管对准关节膜处轻轻扎入,将硅珠移植进体内,用青霉素和链霉素混合液(1:1)涂抹被扎的附肢部位,然后放回水族箱中隔离饲养<sup>[7]</sup>。待 12 h 和 24 h 后,在解剖镜下将硅珠从移植部位取出,用戊二醛固定后在显微镜下观察。

**血细胞免疫包囊的切片观察** 色谱硅珠包裹的石蜡和电镜切片制作过程与血细胞的切片制作过程基本相似,但血凝小块需用擦镜纸包裹后进行,以防止包裹硅珠表面的血细胞在脱水、透明、浸蜡和包埋的过程中脱落。

## 2 结果与分析

### 2.1 血涂片 Giemsa 染色

在显微镜下观察染色后的血涂片,根据胞质中颗粒的数量、大小及细胞染色情况对血细胞进行分类,将克氏原螯虾的血细胞分为 3 大类:无颗粒细胞或透明细胞(hyaline cell, HC),小颗粒细胞或半颗粒细胞(semi-granular cell, SGC),大颗粒细胞或颗粒细胞(granular cell, GC)(图 1)。

**透明细胞** 通常近圆形或椭圆形,染色后细胞核淡蓝色,胞核居中或偏离,细胞质几乎透明,无颗粒或仅有极少量的红色小颗粒。

**小颗粒细胞** 多为椭圆形细胞,细胞质无色,细胞质中含少量红色,黑色,紫红色小颗粒或大颗粒,分布不均匀,多数集中在细胞两端,染色后细胞核紫红色。

**大颗粒细胞** 多为长椭圆形,细胞质淡红,具有大量紫红色颗粒,颗粒在细胞中分布均匀。染色后细胞核呈深蓝色,细胞质淡红色。胞核有时受颗粒的挤压,常不居中。质膜易形成伪足,成辐射状突起。

### 2.2 血细胞的 H. E 染色

血细胞经常规石蜡切片和 H. E 染色后,细胞核被苏木精染成蓝色,细胞质被伊红染成红色,但种类不同的细胞在显微镜下呈现深浅不同的染色效果(图 2)。

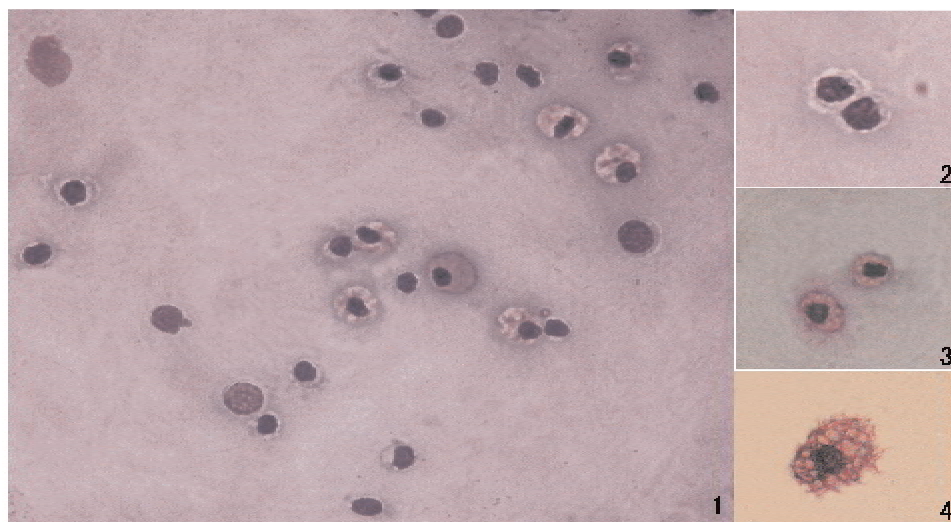


图1 克氏原螯虾血淋巴涂片的 Giemsa 染色观察(×400)

1. 血涂片; 2. 透明细胞(无颗粒细胞); 3. 小颗粒细胞; 4. 大颗粒细胞

Fig. 1 Giemsa-stained images of *P. clarkii* haemolymph films(×400)

1. haemolymph films; 2. hyaline cell (agranular cell); 3. semi-granular cell; 4. granular cell

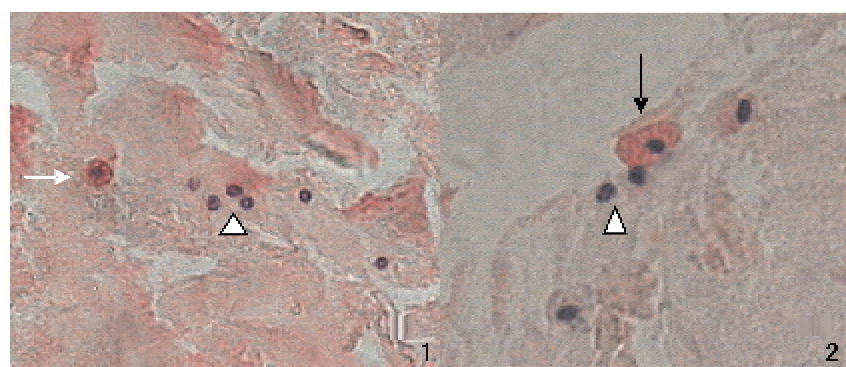


图2 克氏原螯虾血淋巴切片的 H.E 染色观察(×400)

1. 透明细胞(白箭头)和小颗粒细胞(三角); 2. 大颗粒细胞(黑箭头)和小颗粒细胞(三角)

Fig. 2 H.E-stained slice images of *P. clarkii* haemolymphs(×400)

1. hyaline cell (white arrow) and semi-granular cell (triangle); 2. granular cell (black arrow) and semi-granular cell (triangle)

通过比较细胞的大小和着色的深浅状况可以看出,细胞体积相对最小,胞核颜色较深,周边胞质不可见,几乎全被染成蓝色的是透明细胞;中间胞核被染成深蓝色,周边胞质被染成浅红或深红色,胞质中有少量深色颗粒,且体积相对较大的是小颗粒细胞;细胞体积最大,中间胞核被染成蓝色,周边胞质被染成深红色,且胞质中有大量深色颗粒的是大颗粒细胞。

### 2.3 血细胞的超微结构观察

在透射电镜下,通过辨识不同的超微结构将更容易区分3种血细胞类型(图3),但由于戊二醛固定后离心的原因,血细胞形态经常会发生不同程度的改变。

小颗粒细胞(图3-1) 含有大量的颗粒,

颗粒大小不均一,有少量的线粒体和内质网等细胞器,并有少量小空泡存在。

大颗粒细胞(图3-2) 含有较多的大颗粒,颗粒大小比小颗粒细胞大,颗粒大小分布不均一,形状也不规则,有个别空泡的存在。

透明细胞(图3-3,4) 核质比较大,胞质中无明显的颗粒状物质,但存在大量的线粒体和内质网等细胞器。

### 2.4 血细胞大小和计数

在显微镜下观察并测量血细胞大小,对3种不同类型的细胞进行计数。克氏原螯虾透明细胞、小颗粒细胞、大颗粒细胞直径分别为 $(8.75 \pm 1.21) \mu\text{m}$ 、 $(9.50 \pm 2.08) \mu\text{m}$ 和 $(12.25 \pm 1.38) \mu\text{m}$ ,3类血细胞所占百分比分别为19.9%,46.1%

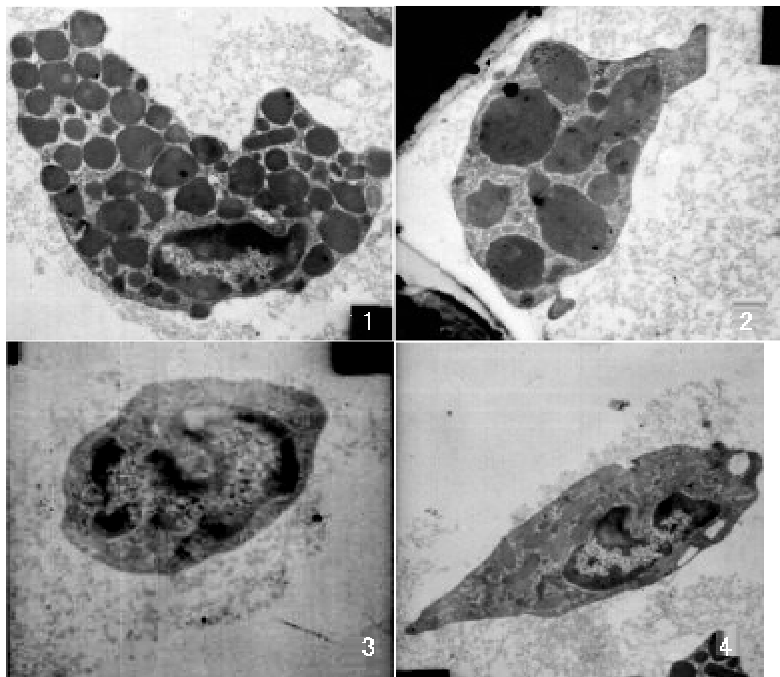


图3 克氏原螯虾血淋巴的透射电镜观察(×10 000)  
1. 小颗粒细胞; 2. 大颗粒细胞; 3. 透明细胞(椭圆形); 4. 透明细胞(纺锤形或梭形)  
Fig.3 Transmission electron microscopy images of *P. clarkii* haemolymphs(×10 000)  
1. semi-granular cell; 2. granular cell; 3. hyaline cell (oval); 4. hyaline cell (spindle or shuttle)

表1 各类血细胞的直径、百分比和细胞总数  
Tab.1 Percentages, diameters and total counts of different types of haemocytes

血细胞类型 types of haemocytes	血细胞直径(μm) diameters of haemocytes	占百分比(%) percentages of haemocytes	血细胞总数 (×10 <sup>7</sup> /mL) total haemocytes counts(THC)
透明细胞 hyaline cell	8.75±1.21	19.9	1.83±0.13
小颗粒细胞 semi-granular cell	9.50±2.08	46.1	
大颗粒细胞 granular cell	12.25±1.38	34.1	

和34.1%,血细胞总数为每毫升 $(1.83\pm0.13)\times 10^7$ (表1)。

2.5 血细胞免疫功能的体外培养

被刚果红染成红色的硅珠(图4-1)与血细胞混合培养3~6 h后,显微镜下观察到硅珠周围被少量的血细胞吸附,形成一个类似于囊鞘的多层结构(图4-2),证明克氏原螯虾血细胞在体外对异物仍然有识别作用。

2.6 血细胞免疫功能的体内培养

硅珠植入体内后12 h培养,可见硅珠被周围少量血细胞包埋,形成较薄的血细胞层,包囊厚度一般小于硅珠半径(图5-1);经体内24 h培养后,体内大量血细胞开始逐渐包围硅珠,形成较厚的

血细胞层(图5-2),包囊厚度一般大于硅珠半径,甚至可以超过硅珠直径(图5-3)。

硅珠在体内经过不同时间的包埋,产生了不同程度的包埋效果。随包埋时间的延长,血细胞包埋的厚度也逐渐增加(表2)。体内移植实验表明,培养时间越长,包囊效果将越好。

表2 不同时间血细胞体内形成囊鞘的厚度  
Tab.2 Thickness of capsule formed *in vivo* by *P. clarkii* haemocytes at different time

培养时间(h) incubation time	囊鞘厚度(μm) thickness of capsule
12	21.50±3.57
24	37.62±5.11

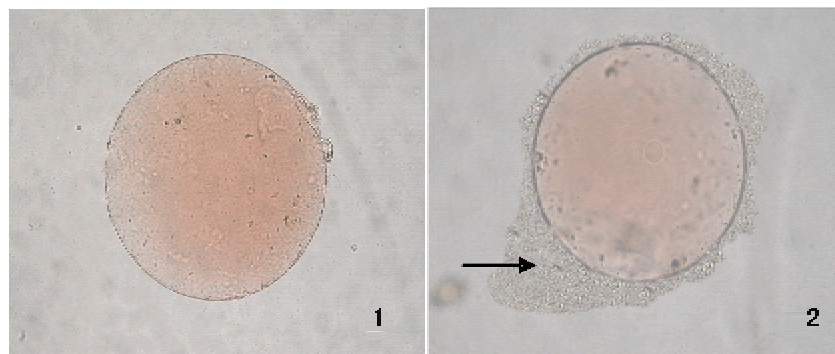


图4 血细胞对 Sephadex A-25 硅珠的体外包裹 (×200)

1. 色谱硅珠(0.1% 刚果红染色); 2. 血细胞重叠形成的囊鞘(黑箭头)

Fig. 4 *In vitro* encapsulation of Sephadex A-25 beads by *P. clarkii* haemocytes (×200)

1. chromatography beads (stained with 0.1% Congo red); 2. capsule (black arrow) comprised of overlapping layers of haemocytes

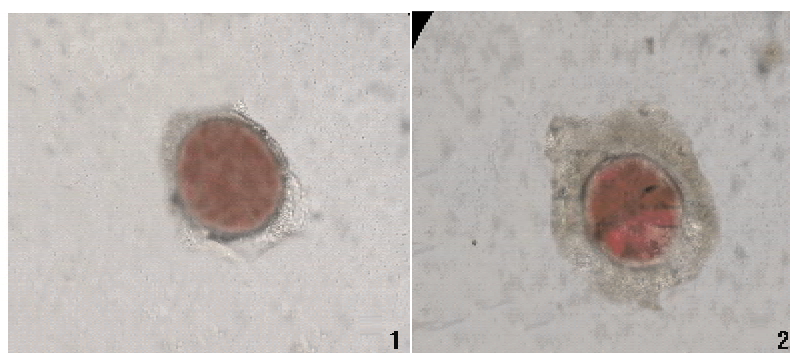


图5 血细胞对 Sephadex A-25 硅珠的体内包裹 (×100)

1. 体内培养 12 h; 2. 体内培养 24 h

Fig. 5 *In vivo* encapsulation of Sephadex A-25 beads by *P. clarkii* haemocytes (×100)

1. *In vivo* incubation for 12 h; 2. *In vivo* incubation for 24 h

## 2.7 血细胞免疫包裹切片

包裹的硅珠经石蜡切片和 H. E 染色后, 可见大量的血细胞聚集在硅珠周围, 血细胞排列紧密, 呈同心圆状包裹, 大部分血细胞为小颗粒血细胞 (图 6-1), 有时也可见少量的大颗粒血细胞。此

外, 电镜切片的观察进一步表明小颗粒血细胞是参与包裹的主要血细胞 (图 6-2)。因此, 在克氏原螯虾血细胞包裹过程中, 对外源物产生识别和免疫应答的血细胞主要为小颗粒细胞, 大颗粒血细胞可能起辅助识别或促进包裹作用。

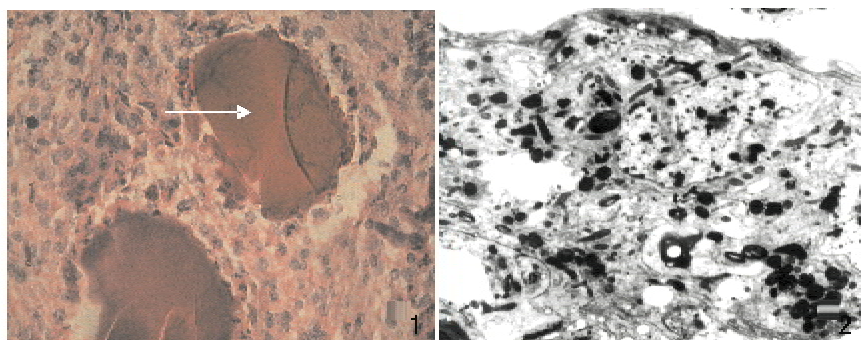


图6 血细胞囊鞘的切片观察

1. 被血细胞包裹色谱硅珠(白色箭头, ×200); 2. 黏附在硅珠上的血细胞超微结构 (×10 000)

Fig. 6 Slice images of haemocyte capsules

1. Chromatography beads (white arrow) encapsulated by haemocytes, ×200; 2. ultrastructure of haemocytes adhered on the surface of the beads (×10 000)

### 3 讨论

对不同血细胞形态的观察能为我们提供有关虾类免疫防御的重要信息<sup>[1]</sup>。最常用的方法是依据血细胞中是否存在颗粒及颗粒大小而分为3大类,即:将完全没有颗粒或者只有极少数颗粒的血细胞称为无颗粒细胞或透明细胞(HC),能看到小型颗粒的细胞称为小颗粒细胞或半颗粒细胞(SGC),能观察到大量大型颗粒的细胞称为大颗粒细胞或颗粒细胞(GC)。其中,透明细胞是几种细胞中最小的一种,但核质比较高,有一个或两个非常大的核。本研究采用 Giemsa 染色和 H. E 染色等多种染色法相结合,将克氏原螯虾血细胞大致也分为3类:透明细胞,小颗粒细胞,大颗粒细胞,3种细胞所占的比例分别为19.9%、46.1%、34.1%,与周晖等<sup>[8]</sup>的研究结果相似,但各类细胞的比例上略有差异,其原因可能与实验中使用的螯虾所处的发育阶段或生理状态不同有关。在透射电镜下,这3类血细胞的特征尤为明显,因此通过辨识血细胞的超微结构,将更容易区分不同的血细胞类型。

包裹作用是指当异物大于吞噬细胞时,许多吞噬细胞联合将异物包围起来,形成类似于包裹的结构,从而将异物隔离的现象<sup>[1,6]</sup>。包裹作用一般在机体受细菌、真菌或寄生虫感染时可以被经常观察到<sup>[9-10]</sup>。色谱硅珠因其表面结构简单,具有惰性表面特征,不像生物有机体那样复杂,所以常用于无脊椎动物(如昆虫等)免疫学的诱导实验<sup>[11]</sup>。将外源体硅珠植入克氏原螯虾体内,通过显微观察和切片制作证实克氏原螯虾血细胞对色谱硅珠同样具有强烈的包裹作用。移植的硅珠经过不同时间的包埋,呈现出不同的包埋效果。随移植时间的增加,硅珠包埋的厚度也逐渐增加,即血细胞对硅珠包埋的效果也越好。但克氏原螯虾血细胞在体外包裹的效果不是特别理想,只有少量血细胞吸附到硅珠表面且吸附部位不均匀,推测可能是由于血细胞受体外培养条件的限制,在体外对硅珠的包裹不能如体内培养那样存在各种信号分子的精确调节,所以体外培养的效果没有体内培养好。此外,被注入到细胞培养板小孔中的血细胞,采取的是静止培养方式,血细胞无法模拟在体内循环流动的状态,因此培养板小孔中的血细胞分布不均匀,这样也将容易导致血细胞

聚集形成细胞簇。这一结果与亚洲玉米螟幼虫的血细胞在体外的包裹作用相似<sup>[7,12]</sup>。

通过观察克氏原螯虾血细胞对外源体硅珠形成的包裹结构,发现产生识别外源体和免疫应答的血细胞主要为小颗粒细胞,推测小颗粒血细胞在细胞防御过程中起关键作用。甲壳动物透明细胞主要起吞噬作用<sup>[13]</sup>,而大颗粒血细胞可能起辅助识别或促进包裹作用<sup>[14]</sup>。但大颗粒细胞也一直被认为是免疫防御的一线细胞,在大颗粒细胞中存在大量酶反应的活性位点,如溶菌体酶,该酶经常被观察存在于反面高尔基体囊泡或小泡中,而不是颗粒中<sup>[15]</sup>。目前,已发现在促包裹作用中起重要作用的物质为存在于颗粒细胞中的一种76 ku 蛋白,该因子伴随酚氧化酶原(proPO)系统的激活而活化,是 proPO 系统的主要蛋白<sup>[16]</sup>。由于 proPO 系统主要存在于颗粒细胞内,因此,76 ku 因子就成为控制 proPO 系统释放的重要物质,proPO 系统作为一种识别和防御系统发挥重要作用<sup>[17]</sup>。Johansson 等<sup>[18]</sup>认为这种76 ku 蛋白是一种血细胞附着因子,可作为调理素或促包裹因子,起到增强血细胞结合,吞噬病原体的作用,并通过胞吐作用引起颗粒细胞与半颗粒细胞的脱颗粒。据此,我们推测克氏原螯虾的大颗粒血细胞可能参与识别外源体(如色谱硅珠)的作用,并诱导小颗粒血细胞产生强烈的免疫应答,将大量的小颗粒血细胞吸附到外源体周围,从而进一步导致包裹的逐步形成。关于克氏原螯虾血细胞在早期如何对病原微生物或病原体的识别机制仍有待进一步的深入研究。

### 参考文献:

- [1] Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis [J]. *Aquaculture*, 2000, 191: 45-52.
- [2] 魏克强,许梓荣. 对虾的免疫机制及其疾病预防策略的研究[J]. *中国兽药杂志*, 2004, 38(9): 25-28.
- [3] 陈昌福,陈 萱,陈超然,等. 水产甲壳动物的免疫防御机能及其免疫预防研究进展[J]. *华中农业大学报*, 2003, 22(2): 197-203.
- [4] 刘雪兰,俞为一. 甲壳动物免疫因子的研究进展[J]. *水生生物学报*, 2003, 27(4): 418-421.
- [5] 陆宏达,刘 凯. 中华绒螯蟹对体内细菌的清除作用[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(1): 113-121.

- [6] Lu J F, Hu J, Chen X X, *et al.* Encapsulation of foreign bodies by haemocytes in *Ostrinia furnacalis* (Lepitera: Pyralidae) larvae[J]. J Zhejiang Univ: Agric & Life Sci, 2007, 33(2): 129–136.
- [7] Lu J F, Feng C J, Hu J, *et al.* Extraembryonic membrane of the polyembryonic parasitoid *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae) is essential for evasion of encapsulation[J]. J Appl Entomol, 2007, 131(7): 472–477.
- [8] 周 晖, 谢数涛, 骆育敏. 罗氏沼虾与克氏原螯虾血细胞的比较研究[J]. 生态科学, 2004, 23(1): 9–11.
- [9] Persson M, Vey A, Söderhäll K. Encapsulation of foreign particles *in vitro* by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*[J]. Cell Tissue Res, 1987, 247: 409–415.
- [10] 邓 欢, 陈 隼, 刘卫东, 等. 中国对虾血细胞包掩作用和超微结构的组织化学观察[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(3): 296–299.
- [11] Lu J F, Hu J, Fu W J. Levels of encapsulation and melanization in two larval instars of *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) during simulation of parasitization by *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae) [J]. J Appl Entomol, 2006, 130(5): 290–296.
- [12] 胡 建, 符文俊. 亚洲玉米螟幼虫血细胞的包裹作用[J]. 动物学研究, 2003, 24(6): 435–440.
- [13] Söderhäll K, Smith V J, Johansson M W. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular cooperation in the defence reactions of arthropods [J]. Cell Tissue Res, 1986, 245: 43–49.
- [14] Söderhäll K, Cerenius L. Crustacean immunity[J]. Annu Rev Fish Dis, 1992, 2: 3–23.
- [15] Hose J E, Martin G G, Ngugen V A, *et al.* Cytochemical features of shrimp haemocytes [J]. Biol Bull, 1987, 53: 335–346.
- [16] Kobayashi M, Johansson M W, Söderhäll K. The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation *in vitro* [J]. Cell Tissue Res, 1990, 260: 13–18.
- [17] Johansson M W, Söderhäll K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system [J]. Parasitol Today, 1985, 5: 171–176.
- [18] Johansson M W, Söderhäll K. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells [J]. J Cell Biol, 1988, 106: 1795–1803.

## A preliminary study on haemocytes and immune functions of the crayfish, *Procambarus clarkii*

LU Jian-feng<sup>1,2</sup>, WAN Quan<sup>3</sup>, WU Xu-gan<sup>2</sup>,  
YANG Xiao-zhen<sup>2</sup>, ZHAO Wei-xin<sup>2</sup>, CHENG Yong-xu<sup>2</sup>

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** Crustacean haemocytes play important roles in the host immune response including recognition, phagocytosis, encapsulation melanization, cytotoxicity and cell-cell communication. The various types of haemocytes are responsible for a number of defense mechanisms. Thus, the morphology and classification of haemocytes are the basis of crustacean immunology. Generally, classification of the haemocyte types in decapod crustaceans is based mainly on the presence of cytoplasmic granules and relative size of granules. In this paper, Giemsa's staining, hematoxylin and eosin (H-E) staining and electron microscope techniques were used to classify the haemocytes of *Procambarus clarkii*. And three types of haemocytes, including hyaline cell (HC), semi-granular cell (SGC) and granular cell (GC), were observed, accounting for 19.9%, 34.1%, 46.1% respectively. In addition, the ultrastructures of haemocytes turned out to be most easily recognized under the electron microscope. The hyaline cells were generally the smallest cells with the highest nuclear-cytoplasmic (N/C) ratio, containing few granules, while the semi-granulocytes and the granulocytes had increasing amount of granules inside their cells. Afterwards using *in vivo* and *in vitro* incubation methods, the haemocyte immunology responses of *P. clarkii* were investigated, with Sephadex A-25 chromatography beads as the antigens. Meanwhile, the cellular recognition mechanism during the immune responses was also preliminarily discussed. When the Sephadex A-25 beads were transplanted into the body of *P. clarkii* for a certain period of time, a large number of haemocytes, which were almost recognized as semi-granular cells with slice technique, encapsulated the antigens. It was proved that semi-granular cells played a prominent role during the encapsulation process. Therefore, the semi-granular cells were the cells active in encapsulation responses. Besides, the results also laid a scientific foundation for the further study of cellular immunological mechanism and anti-disease ability of *P. clarkii*.

**Key words:** *Procambarus clarkii*; haemocytes; immunity; encapsulation