

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00410

## 内脏团插核术刺激对三角帆蚌血细胞的影响

何秀娟 施志仪 陈晓武 程千千

(上海海洋大学生物技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 为了探讨三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii* Lea)血细胞的类型及内脏团插核手术刺激对血细胞形态结构和数量的影响, 研究利用相差显微镜、光学显微镜、透射电子显微镜和流式细胞仪对三角帆蚌血细胞进行了形态学研究。流式细胞术光散射图谱显示血细胞被分两类, 一类为颗粒度高的大细胞, 另外一类为颗粒度低的小细胞; 相差显微镜观察显示, 血细胞可分为胞体暗、折光性差和胞体明亮、折光性强的两类; Giemsa 和 H.E 染色显示细胞分为胞质染色不均一、胞内颗粒明显和胞质染色均一、胞内颗粒不明显的两类; 透射电镜超薄切片观察显示, 颗粒明显的细胞胞质内线粒体、高尔基体等细胞器较丰富, 颗粒不明显的细胞胞质内细胞器较少; 负染结果表明血细胞主要分为表面不光滑、突起明显和细胞表面光滑、突起较不明显的两类。综合上述实验结果可见, 三角帆蚌血细胞分为颗粒明显的细胞和颗粒不明显的透明细胞两大类。内脏团插核术刺激后, 血细胞的形态和比例均发生显著变化。血细胞形态更多样, 伪足状突起更明显, 细胞内囊泡状物质增多, 血细胞密度显著增高( $P<0.01$ ), 颗粒细胞数量相对增加, 透明细胞数量相对减少, 并且手术刺激后两类细胞所占比例的变化在相差显微镜观测中差异极显著( $P<0.01$ )。研究表明, 作为三角帆蚌免疫系统重要组成部分的血细胞, 在插核手术后, 其类型、形态结构和数量均产生明显变化, 这是机体对外界刺激产生的免疫防御反应, 其中颗粒细胞担负着主要的免疫功能。

**关键词:** 三角帆蚌; 插核手术; 血细胞; 形态

中图分类号: Q256 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)02-0410-08

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii* Lea)是我国培育淡水珍珠的主要蚌种。珍珠生产中无核珍珠的培育大多产生不规则且小型珍珠, 因此近年来淡水有核珍珠的培育随之发展起来。目前有核珍珠培育大多采用外套膜内插核的方法, 但外套膜比较薄, 容易插破, 不适宜于插大核来培育大颗粒的珍珠; 然而内脏团空间很大, 如果在内脏团插核培育有核珍珠能成功, 培育的产品可与大型的南洋珍珠相媲美<sup>[1]</sup>。三角帆蚌插核手术后通常需要两年左右时间才能收获珍珠, 这大大增加了疾病感染的风险率, 而插核手术后贝的死亡率又较高, 给育珠生产造成很大的经济损失。所以如何增强插核手术后河蚌的免疫力, 提

高手术河蚌的成活率成为当前迫切需要解决的问题。

双壳类的免疫系统与脊椎动物相比, 没有体液免疫, 不产生免疫球蛋白。血细胞在双壳类机体的防御机制中起着重要作用, 血细胞形态特征的鉴别是研究双壳类免疫学的基础。关于双壳类血细胞形态研究已有报道, 但多为海水贝类, 淡水贝类研究很少<sup>[2]</sup>。三角帆蚌血细胞的研究已有一些报道, 但对于其分类仍存有争论, 而对于插核手术后的血细胞研究尚未见报道。本文利用光学显微镜和电子显微镜以及流式细胞术对插核手术刺激与未刺激的三角帆蚌血细胞进行了比较分析, 以期为育珠生产提供参考价值。

收稿日期: 2008-07-28; 修订日期: 2009-04-29

基金项目: 上海市科委基础重大项目(06aj14003); 上海市属高校自然科学研究重大项目(01H02); 上海市重点学科建设项目(Y1101)资助

作者简介: 何秀娟(1980—), 女, 汉族, 河北石家庄人; 硕士研究生; 主要从事三角帆蚌免疫机制调节方面的研究。E-mail: hxj116688@163.com

通讯作者: 施志仪(1954—), E-mail: zyshi@shou.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

三角帆蚌由浙江诸暨市实验基地提供, 贝龄为2—3龄, 选择贝体规格基本一致(壳高6—7 cm)的个体进行实验。

### 1.2 实验方法

实验分为对照组和实验组, 分别于室内玻璃缸中暂养, 充氧, 以小球藻投喂, 每2天换水一次。实验组模拟内脏团插核, 在三角帆蚌唇瓣右下面, 内脏背侧, 斧足与内脏团交界插入直径为8 mm的灭菌处理的珠核, 每蚌插入一颗珠核。手术后第5天用1 mL一次性塑料注射器小心地从闭壳肌血窦抽取血淋巴。对照组不进行任何处理, 也按同一时间相同方法抽取血淋巴。为防止血细胞凝聚, 在注射器中预先吸入0.5 mL的2.5%的戊二醛, 分别采集实验组和对照组各5只三角帆蚌的等量的血淋巴, 立即混匀, 4℃保存备用。用于相差显微镜观察的血细胞抽取时不加戊二醛, 抽取后立即加到载玻片上进行观察。

**相差显微镜观察** 取一滴(20  $\mu$ L)新鲜抽取的血淋巴到干净的载玻片上, 轻轻盖上盖玻片以免产生气泡。将玻片置于室温温育2 min, 使血细胞在玻片上伸展, 通过相差显微镜观察血细胞伸展特征。

**Giemsa染色和H.E染色光学显微镜观察** 抽取的血淋巴混合液制成血涂片, 室温干燥, 甲醇固定3—5 min, Giemsa染色15—30 min, 流水冲洗自然干燥后于光学显微镜下进行观察拍照。制得血涂片经乙醇固定10—15 min, 苏木素染色10—15 min, 流水冲洗, 盐酸酒精分化0.5—1 min, 伊红染色3—5 min, 自来水冲洗, 自然晾干后光学显微镜下观察拍照。

**显微镜观察的血细胞各亚群比例的变化** 取血淋巴混合液滴到血球计数板上于相差显微镜下观察, 计算每毫升血淋巴中血细胞总数, 每样品计数3次后取平均值。对血细胞相差显微镜观察, H.E染色和Giemsa染色的观察中每种研究方法计数5次, 每次随机选取20个视野, 鉴定并计数各细胞亚群的比例。数据统计及显著性检验通过BioMedCalc 2.7软件进行分析。

**电镜观察** 抽取的血淋巴混合液经3000 r/min离心后获得血细胞, 2.5%的戊二醛悬浮固定,

用磷钨酸对铺展在载网上的细胞进行染色, 样品干燥后对负染结果进行透射电子显微镜(JEM-100CX II, 日本)观察拍照。

血细胞经2.5%的戊二醛固定, 铁酸固定, 漂洗液漂洗, 梯度酒精脱水, 树脂包埋, 干燥, 超薄切片, 双染色后透射电子显微镜(JEM-100CX II, 日本)下进行观察拍照。

**流式细胞术分析** 抽取的血淋巴混合液经3000 r/min离心后获得血细胞, 血细胞经PBS溶液悬浮后通过FACSCalibur流式细胞仪检测。血细胞通过流式细胞仪的激光束时, 正散射光(FSC)指示细胞大小, 数值越高细胞越大; 侧散射光(SSC)指示细胞结构的复杂性, 质地或细胞的颗粒度, 数据越高表明细胞内部的颗粒物质越多。数据用CellQuest软件进行分析。结果表现为点阵图。

## 2 结果

### 2.1 相差显微镜观察结果

血细胞在载玻片上充分伸展后在相差显微镜下进行观察(图版I-1), 结果显示, 三角帆蚌的血细胞分为两种类型: 第一类是颗粒细胞, 第二类是透明细胞。颗粒细胞胞体比较暗, 折光性比较差, 形态多为不规则形, 细胞伸展能力很强, 一般细胞表面都能观察到长短不一的各种形态的伪足, 细胞内颗粒有的明显有的不明显。透明细胞胞体明亮, 折光性比较强, 形态多样, 有圆形的, 椭圆形的, 梨形的, 细胞内无颗粒, 伸展能力较弱, 多数没有伸出伪足, 伸出伪足的有从细胞一端伸出, 有从细胞各个方向伸出的。手术刺激后三角帆蚌的血细胞(图版I-2)。颗粒细胞变形较大, 伪足状突起更明显, 但与正常细胞相比突起相对纤细, 透明细胞的伸展能力较弱。手术后的两类细胞内均可见大小不一的各种空泡。颗粒细胞数目明显增多, 透明细胞相对减少。

### 2.2 吉姆萨染色和H.E染色的光学显微镜观察

三角帆蚌血细胞Giemsa染色(图版I-3)后被染成紫色, H.E染色(图版I-5)后被染成粉红色。结果显示, 血细胞也分为两类: 颗粒细胞和透明细胞。颗粒细胞一般为圆形或椭圆形, 细胞质中密布细小的颗粒, 颗粒有的非常明显, 有的隐约可见, 细胞核一般位于中央, 偶见双核。透明细胞较少, 一般为椭圆形, 有的为圆形或梭形, 细胞质染色均一, 看不到颗粒, 细胞核着色较深, 细胞核一般位于细胞一

侧。手术刺激后的血细胞(Giemsa 染色见图版 I -4, H.E 染色见图版 I -6)与正常三角帆蚌血细胞相比, 颗粒细胞和透明细胞中囊泡状物质明显增多, 并可见大的空泡。并且颗粒细胞数量增加, 透明细胞数量相对减少。

### 2.3 负染后电镜下观察

负染后电镜观察(图版 II)。三角帆蚌血细胞明显可分为两类, 一类是表面光滑型血细胞, 另一类是表面不光滑型血细胞。表面光滑型血细胞, 表面比较规则, 细胞相对较小, 数量较少。表面不光滑型血细胞, 细胞形态多样, 数量较多, 表面上有不规则伪足状突起, 突起有的细小, 有的粗大。手术刺激后的血细胞和手术前相比表面较规则的细胞数量明显减少, 视野中几乎很难见到; 表面不光滑型细胞伪足状突起明显增多, 突起形态各异, 有细长的, 有粗短的, 有的呈纤维状密布在细胞周围。

### 2.4 透射电镜下观察

依据电镜下细胞内颗粒的有无和大小, 三角帆蚌的血细胞(图版 II)可以分为两类: 颗粒细胞和透明细胞。颗粒细胞最典型的特征就是细胞质中密布

着大小不一的各种颗粒, 胞质中含有丰富的细胞器, 细胞形态多样, 核一般呈椭圆形或圆形, 位于一侧, 核染色质致密, 细胞表面有伪足状突起。透明细胞数量相对较少, 细胞质中颗粒很少, 细胞核位于中央, 细胞核一般为圆形, 偶见双核, 胞质中细胞器含量较少, 线粒体比较丰富。手术刺激后三角帆蚌血细胞和正常三角帆蚌血细胞相比, 形态更多样, 外边缘多不规则, 细胞表面伪足状突起明显增多, 细胞质中囊泡状物质明显可见, 透明细胞数量很少。

### 2.5 血细胞各亚群的比例变化

血细胞计数结果显示对照组三角帆蚌血淋巴中血细胞密度为  $3.44 \times 10^7$ , 手术刺激组三角帆蚌的血细胞密度为  $4.08 \times 10^7$ , 手术刺激后血细胞数量具有显著性差异(*t*-检验,  $P < 0.01$ )。手术刺激后血细胞相差显微镜观察、H.E 染色、Giemsa 染色观察的各细胞亚群比例变化情况(表 1)。统计结果显示, 在 3 种研究方法中, 手术刺激后颗粒细胞所占比例均表现为相对升高, 透明细胞所占比例均表现为相对下降, 此变化在相差显微镜观察中差异极显著( $P < 0.01$ )。

表 1 三种研究方法中插核手术刺激后血细胞各亚群比例变化情况(%)

Tab. 1 Proportional Changes of cell subsets after pearl-nucleus-inserting operation by three research methods (%)

研究方法	Research methods	颗粒细胞	Granulocyte	透明细胞	Hyalinocyte
相差显微镜观察	对照组		52.08 $\pm$ 4.48 <sup>a</sup>		47.92 $\pm$ 3.49 <sup>a</sup>
	Control group				
	手术刺激组		93.41 $\pm$ 2.15 <sup>b</sup>		6.59 $\pm$ 2.24 <sup>b</sup>
	Experimental group				
H.E 染色观察	P		$P < 0.01$		$P < 0.01$
	对照组		77.14 $\pm$ 4.46		22.86 $\pm$ 3.38
	Control group				
	手术刺激组		78.85 $\pm$ 4.75		21.15 $\pm$ 3.21
Giemsa 染色观察	Experimental group				
	P		$P > 0.05$		$P > 0.05$
	对照组		82.22 $\pm$ 5.20		17.78 $\pm$ 2.82
	Control group				
Giemsa staining	手术刺激组		83.15 $\pm$ 5.39		16.85 $\pm$ 2.75
	Experimental group				
	P		$P > 0.05$		$P > 0.05$

注: 平均值 $\pm$ 标准差,  $N = 5$ ; 相同研究方法中同列数据上标字母 a, b 不同表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Mean  $\pm$ S.D.,  $N = 5$ ; Within the same raw, values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ) in the same research method

### 2.6 流式细胞仪分析结果

细胞流式术分析结果以点阵图(图 1)表示。X 轴(正散射光 FSC)反映了细胞的大小, Y 轴(侧散射光 SSC)反映了细胞颗粒度和内部结构的复杂性。如图所示, 三角帆蚌的血细胞主要有两个大的类群组成, 第 I 类直径小, 胞内颗粒物质较少, 具较

低的 SSC 和 FSC; 第 II 类细胞直径较大, 胞内颗粒物质较多, 具较高的 FSC 和 SSC 值。第 II 类细胞在对照组内又可以细分为两群细胞, 在手术刺激的实验组表现为一个细胞群。整体来看第 II 类细胞细胞直径和颗粒度跨度很大, 在点阵图上显著分散。

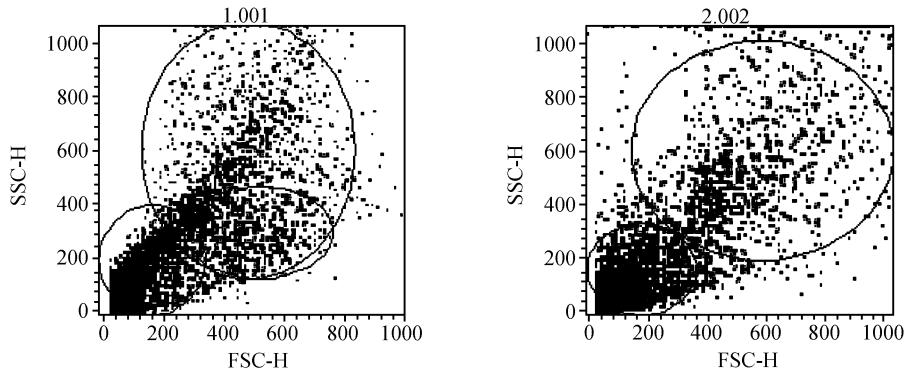


图 1 三角帆蚌血细胞流式细胞点阵图

Fig. 1 Dot plot of size versus cell granularity of haemocytes in *Hyriopsis cumingii* through flow cytometry

1.001 为对照组三角帆蚌血细胞分类点阵图; 2.002 为手术刺激组的血细胞分类点阵图

1.001. Haemocyte in static status; 2.002. Haemocyte challenged through pearl-nucleus-inserting operation

### 3 讨 论

#### 3.1 三角帆蚌血细胞的类型

贝类血细胞在免疫防御中起着重要的作用, 其形态特征的鉴别是研究双壳类免疫机制的基础, 许多学者依据血细胞中的颗粒大小来区分双壳类血细胞。本实验中, 显微镜观察结果显示, 不同染色方法的细胞都表现出一致的结果, 即细胞表现为胞质内颗粒比较明显和胞质染色均一的两种形态。透射电镜观察结果与其相同, 胞质中颗粒复杂程度高的那类细胞在细胞染色中表现为颗粒比较明显, 胞质中颗粒少的细胞表现为胞质染色均一。相差显微镜下, 由于胞质中颗粒的有无或数量多少表现为不同的折光性, 颗粒物质多的细胞折光性低, 颗粒物质相对较少的细胞折光性强。综合以上不同研究方法的结果, 三角帆蚌的血细胞分为颗粒细胞和透明细胞。该结果与细胞流式仪观察的结果一致, 细胞流式仪观察到的第 I 类细胞对应透明细胞, 第 II 类细胞对应颗粒细胞。第 II 类细胞在对照组表现为两群细胞, 与显微镜观察到的颗粒细胞中, 有的颗粒明显, 有的不明显, 其结果是一致的; 与 Ford<sup>[3]</sup>应用 Coulter 计数器和流式细胞计数器, 将血细胞分为二种颗粒细胞和一种无颗粒细胞三个亚群的结论一致。手术刺激后表现为一个细胞群, 主要是颗粒明显的细胞, 说明手术后颗粒细胞增多。负染观察中从细胞数量和特征看, 表面不光滑型细胞对应颗粒细胞, 表面光滑型细胞对应透明细胞。

#### 3.2 插核手术对三角帆蚌血细胞数量和形态的影响

有学者<sup>[4]</sup>认为透明细胞可能主要参与营养吸

收、消化、运输和携氧等功能, 颗粒细胞是血淋巴中主要的免疫防御功能细胞, 具有吞噬、胞饮作用, 分泌水解酶类, 降解、消化和摒弃废物等功能。双壳类在受到外界刺激或病原微生物感染时, 其细胞的数量, 各亚群的比例都有可能发生变化。Oubella, et al.<sup>[5]</sup>观察到: 细菌可提高蛤血淋巴中血细胞的数量, 但只是颗粒细胞数量增加, 透明细胞却降低。本试验手术刺激后两类细胞数量变化与此一致, 这可能与三角帆蚌对手术刺激引起的组织损伤和炎症反应所做出的免疫反应有关。伸展行为观察中, 抽取的血细胞充分伸展后直接进行观察计数, 手术刺激后颗粒细胞所占比例升高, 具有极显著差异; 在吉姆萨染色和 H.E 染色观察中, 固定的血细胞经一系列染色步骤后进行观察计数, 手术刺激后颗粒细胞所占比例略有升高, 差异不显著。从整体来看, 手术后颗粒细胞所占比例增高, 透明细胞所占比例下降, 说明颗粒细胞担负着主要的免疫功能, 这与有研究报道<sup>[6]</sup>在珍珠囊构建的伤口修复中, 颗粒细胞发挥重要作用的观点是一致的。至于颗粒细胞中大小不等颗粒的具体功能, 杨军等<sup>[2]</sup>通过对三种淡水蚌血细胞中酸性磷酸酶(ACP)活性, 酸性非特异性酯酶(NE)活性, 过氧化物酶(PO)活性进行测定, 结果显示表现出很强 ACP 活性的细胞几乎都是颗粒细胞, 表现出 NE 活性的细胞主要是颗粒细胞以及少量的无颗粒细胞, 表现出 PO 活性的都是颗粒细胞。ACP 是溶酶体的标志酶, NE 主要分布于微体, 颗粒细胞有颗粒表现出 ACP 活性, 也有颗粒显示出 NE 活性, 这表明有的颗粒可能是溶酶体, 有的颗粒可能是微体。

从细胞形态来看, 颗粒细胞比透明细胞形态多

样, 有明显的伪足状突起, 细胞伸展性较强。手术刺激后颗粒细胞的伪足状突起明显增多, 伸展能力增强, 这与颗粒细胞具有吞噬、胞饮作用是一致的。至于研究发现不同类型的细胞胞质中都有囊泡类似物存在, 并且手术刺激后数量明显增加, 推测其在三角帆蚌机体的免疫反应中也有一定作用, 具体功能还有待于进一步研究。

#### 4 小 结

目前淡水珍珠生产盲目扩张, 重视数量、忽视质量, 导致珍珠质量普遍不高。淡水珍珠产品结构比较单一, 无核珠供过于求, 有核珠生产滞后<sup>[7]</sup>。提高珍珠质量始终是育珠业的方向, 如何创造性地改革和完善淡水有核珍珠, 特别是大直径有核珍珠的手术工艺, 提高固核率和圆珠率, 减少珠蚌死亡率, 使之推广应用到商业化生产, 已成为育珠业的重要课题<sup>[8]</sup>。目前淡水河蚌的内脏团插核工艺为大家所关注, 但由于该部位较之外套膜要深, 引起的创伤更大, 因此调节蚌体内的免疫机制, 减少珠蚌死亡率是关键<sup>[1]</sup>。本研究模拟内脏团插核手术对三角帆蚌进行刺激, 根据插核手术后休养期第一周内蚌死亡率最高的特点, 观测了第 5 天时手术刺激对三角帆蚌血细胞的影响情况, 至于对整个休养期内不同时间点插核手术对三角帆蚌血细胞的影响情况还有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Shi Z Y, Xie X Z, He X J. Study on the biological characteristic of part culturing pearl in Visceralmass of *Hyriopsis cumingii* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008, 3: 178—181 [施志仪, 谢先中, 何秀娟. 三角帆蚌内脏团珍珠培育部位的生物性状研究. 生物技术通报, 2008, 3: 178—181]
- [2] Yang J, Shi A J. Study on the classification in Hemocytes of three kind of freshwater pearl clams [J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2002, 39(1): 68—72 [杨军, 石安静. 三种淡水育珠蚌血细胞类型的研究. 四川大学学报, 2002, 39(1): 68—72]
- [3] Ford S E, Alcox K A, Kanaley S A. Comparative cytometric and microscopic analyses of oyster hemocyte [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1994, 64(2): 114—122
- [4] 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. 动物学报, 2005, 51(3): 486—494]
- [5] Oubella R, Paillard C, Maes P, et al. Changes in hemolymph parameters in the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1994, 64: 33—38
- [6] Yu Y P, Shi A J. Functions of hemocytes of *Anodonta woodiana pacifica* 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. 水生生物学报, 2000, 24(3): 234—240]
- [7] Luo Y M, Wei K J, Hu L. The present research situation on freshwater pearl culturing through *Hyriopsis cumingii* [J]. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(1): 33—35 [罗玉敏, 魏开建, 胡莲. 三角帆蚌培育淡水珍珠的研究现状. 水利渔业, 2007, 27(1): 33—35]
- [8] Zhang G F, Fang A P. Sustainable development of Chinese freshwater pearl industry in 21<sup>st</sup> century [J]. *Journal of Jinhua College of Profession and Technology*, 2003, 3(4): 24—29 [张根芳, 方爱萍. 21 世纪中国淡水珍珠产业的发展态势. 金华职业技术学院学报, 2003, 3(4): 24—29]

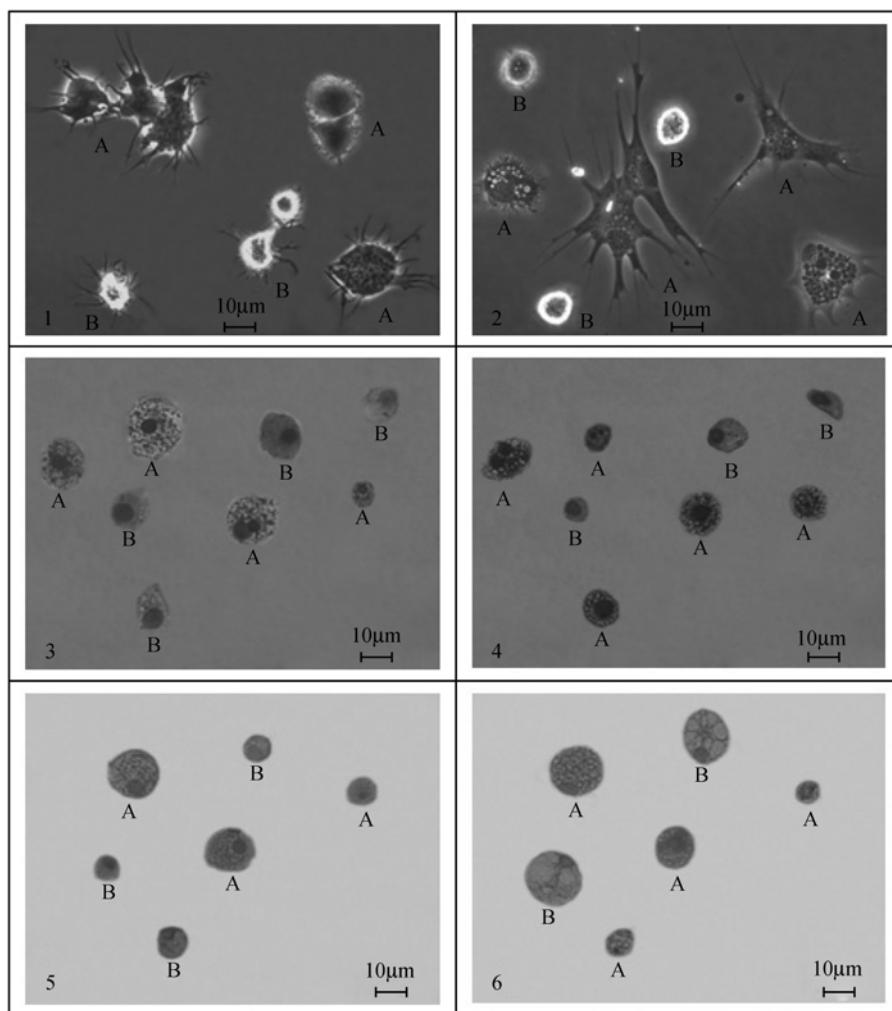
## EFFECT PEARL-NUCLEUS-INSERTING OPERATION IN VISCERAL MASS ON HAEMOCYTES IN *HYRIOPSIS CUMINGII* LEA

HE Xiu-Juan, SHI Zhi-Yi, CHEN Xiao-Wu and CHENG Qian-Qian

(Research Center of Biotechnology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract:** In order to investigate the haemocyte types and the effect pearl-nucleus-inserting operation in visceral mass on haemocytes in *Hyriopsis cumingii* Lea, haemocyte morphology were studied by phase contrast microscope, optical microscope, transmission electron microscope and flow cytometry FCM. The present studies showed that two cell populations were found in haemocytes: large cell with high granularity and small cell with low granularity by flow cytometry FCM on light scattering pattern. Two distinct cell types were identified based on phase contrast microscope: one type of cell was dark and dioptric aberration, while the other was bright and dioptric strong. By Giemsa and H.E staining, cytoplasmic staining were heterogeneous and internal particles were obvious in one type of cell, while cytoplasmic staining were homogeneous and internal particles were inexistent in the other type of cell. By transmission electron microscope, we found that the mitochondria, Golgi apparatus organelles were rich and internal particles were obvious in one type of cells, and contrary to the another cells. The results showed that the surface was unsmooth and pseudopodium was obvious in one type of haemocyte, while smooth and unobvious in another by negative staining. All of these indices indicated that the haemocytes were divided into two types: granulocyte and hyalinocyte in *Hyriopsis cumingii*. When stimulated by pearl-nucleus-inserting operation in visceral mass, the proportion and morphology of haemocytes underwent manifest changes: more haemocyte morphologies, more protuberances, more vesicle-like material, significant increase for density of haemocytes and quantity of granulocytes ( $P<0.01$ ) and significant decrease quantity of hyalinocytes ( $P<0.01$ ) post-operation. The present research indicated that there were obvious changes in the morphology, structures and proportion of populations of haemocyte by pearl-nucleus-inserting operation in visceral mass, which implied immune defense was enhanced after the operation, and the granulocyte played an important role in immune system.

**Key words:** *Hyriopsis cumingii* Lea; Pearl-nucleus-inserting operation; Hemocyte; Morphology

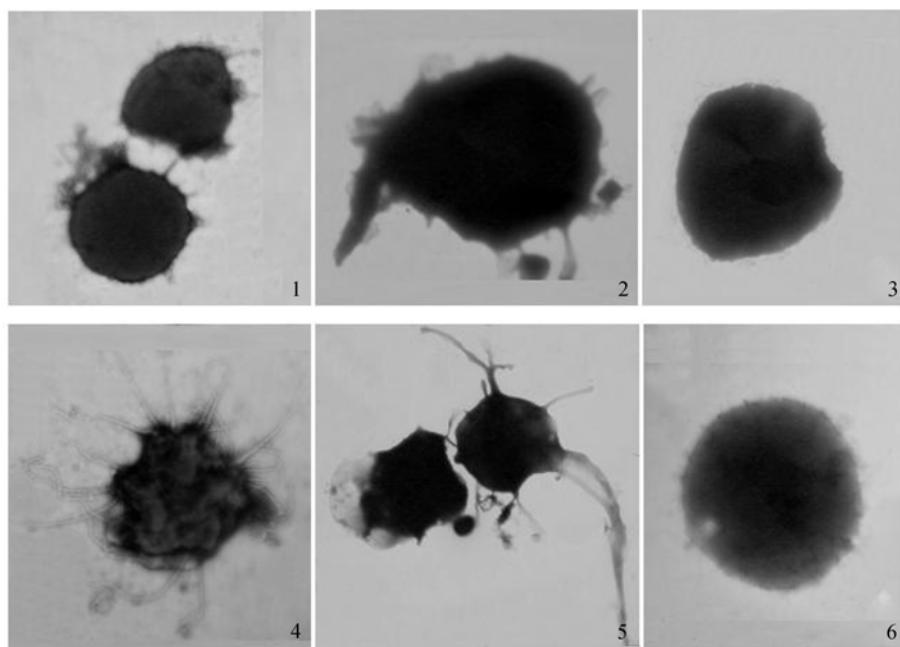


图版 I Plate I

1、2 为三角帆蚌的血细胞相差显微镜观察结果; 3、4 为三角帆蚌的血细胞吉姆萨染色光学显微镜观察结果; 5、6 为 H.E 染色光学显微镜观察结果; 1、3、5 为对照组血细胞; 2、4、6 为手术刺激后血细胞

1, 2. Phase contrast micrograph of haemocytes in *Hyriopsis cumingii*; 3, 4. Giemsa staining micrograph of haemocytes in *Hyriopsis cumingii*; 5, 6. H.E staining micrograph of haemocytes in *Hyriopsis cumingii*. 1, 3, 5. Haemocytes in static status; 2, 4, 6. Haemocytes challenged through pearl-nucleus-inserting operation

A: 颗粒细胞; B: 透明细胞 A: Granulocyte. B: Hyalinocyte

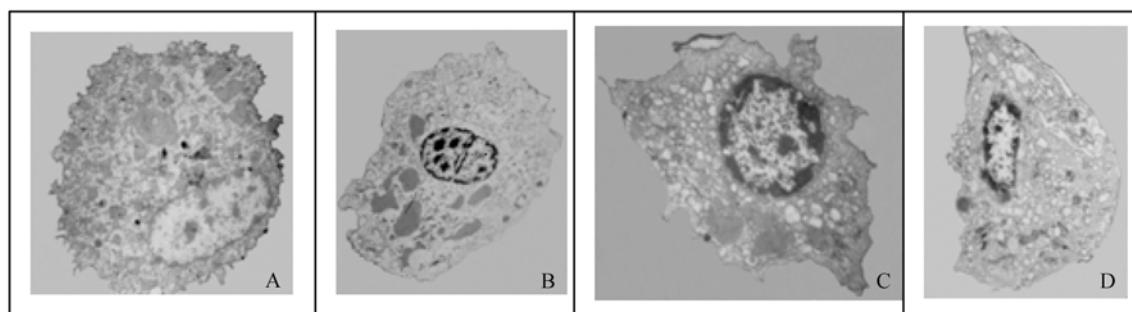


图版II 三角帆蚌血细胞的负染结果

Plate II Negative staining micrograph of haemocyte in *Hyriopsis cumingii*

1( $\times 1000$ )、2( $\times 2900$ )、3( $\times 4800$ )为对照组血细胞; 4( $\times 1000$ )、5( $\times 1400$ )、6( $\times 1400$ )为手术刺激后血细胞。1、2、4、5 为表面不光滑型血细胞; 3、6 为表面光滑型血细胞

1( $\times 1000$ ), 2( $\times 2900$ ), 3( $\times 4800$ ). Haemocytes in static status; 4( $\times 1000$ ), 5( $\times 1400$ ), 6( $\times 1400$ ). Haemocytes challenged through pearl-nucleus-inserting operation. 1, 2, 4, 5. Unsmooth haemocyte; 3, 6. Smooth haemocyte

图版III 三角帆蚌血细胞透射电子显微镜图 ( $\times 5800$ )Plate Transmission electron micrograph of haemocytes in *Hyriopsis cumingii*

A、B 为对照组血细胞; C、D 为手术刺激组血细胞; A、C 为颗粒细胞; B、D 为透明细胞

A, B. Haemocytes in static status; C, D. Haemocytes challenged through pearl-nucleus-inserting operation; A, C: Granulocyte; B, D: Hyalinocyte