

中华鳖血液细胞的分层鉴定与转录组比较分析

陈静怡 屈彦福*

南京师范大学生命科学学院 南京 210023

摘要: 本研究以中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 为研究对象, 利用 Percoll 分离法, 成功从 Percoll 分离液不同密度层 (浓度大于 60%、20%~40% 和 50%~60%) 中分别获得血液红细胞、淋巴细胞和血栓细胞。本研究对中华鳖血液细胞类型进行了更精确的鉴别和描述, 并展示这 3 种类型细胞的转录组中重要标记基因的表达。转录组结果显示, 淋巴细胞与红细胞间、血栓细胞与红细胞间以及血栓细胞与淋巴细胞间, 分别筛选出 1 701、1 570 和 1 280 个差异表达基因。GO 富集分析显示, 红细胞上调基因具有溶菌酶活性和转移酶活性, 参与活性氧代谢过程的调控; 淋巴细胞上调差异基因与细胞因子活性有关, 参与免疫反应调节细胞表面受体信号过程和对病毒的响应; 血栓细胞差异基因主要参与髓样白细胞活化、粒细胞激活和防御反应。KEGG 富集分析显示, 淋巴细胞与红细胞的差异基因富集到 NF- κ B 信号、EB 病毒感染、T 细胞受体信号等通路; 血栓细胞与红细胞的差异基因富集到血小板激活和造血细胞谱系等; 淋巴细胞和血栓细胞的差异基因富集于 IL-17 信号通路、病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体的相互作用等过程。同时, 血液分层转录组的聚类分析结果为中华鳖血液红细胞、淋巴细胞和血栓细胞提供了潜在标记基因。

关键词: 中华鳖; 血液细胞; 细胞分离; 转录组学

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2024) 05-729-14

Stratified Identification and Bulk Transcriptome Comparison of Blood Cells of *Pelodiscus sinensis*

CHEN Jing-Yi QU Yan-Fu*

Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

Abstract: [Objectives] Transcriptome sequencing was performed on the samples collected after blood discontinuous density gradient centrifugation to explore the key functions of the blood cells of Chinese Soft-shelled Turtle *Pelodiscus sinensis* and to find out the marker genes related to immune function. **[Methods]** Blood samples of *P. sinensis* were stained with DQ to further characterize and describe the cell types. We used Percoll separation method to isolate erythrocytes, lymphocytes and thrombocytes of *P. sinensis* from whole blood with densities greater than 60%, 20% - 40% and 50 - 60% for bulk transcriptome sequencing, with 3 biological replicates per sample. **[Results]** DQ staining showed the morphological characteristics of 7 blood

* 通讯作者, E-mail: quyanfu@njnu.edu.cn;

第一作者介绍 陈静怡, 女, 硕士研究生; 研究方向: 进化和生理生态学; E-mail: chenjingyi@njnu.edu.cn.

收稿日期: 2023-12-12, 修回日期: 2024-03-30 DOI: 10.13859/j.cjz.202423227

cells of *P. sinensis* (Fig. 1). Venn diagram analysis results showed that coexpressed and specifically expressed genes were screened based on expression levels between the two groups, among which 274, 628 and 295 specific genes were expressed in erythrocytes, lymphocytes and thrombocytes, respectively (Fig. 2a). 1 701, 1 570 and 1 280 differentially expressed genes (DEGs) were screened between lymphocyte and erythrocyte groups, between thrombocyte and erythrocyte groups, and between thrombocyte and lymphocyte groups, respectively ($P_{\text{-adjust}} < 0.001$) (Fig. 2b). GO enrichment showed that the up-regulated gene of erythrocytes had lysozyme activity and transferase activity, and was involved in the regulation of active oxygen metabolism (Fig. 3a). The up-regulated differential genes of lymphocytes were related to cytokine activity, and participated in the immune response to regulate the signaling process of cell surface receptors and the response to viruses (Fig. 3b). The up-regulated differential genes of thrombocytes were mainly involved in myeloid leukocyte activation, granulocyte activation and defense response (Fig. 3c). KEGG enrichment showed that the differential genes of lymphocytes and erythrocytes were enriched to NF- κ B signaling, EB virus infection, T cell receptor signaling pathway, etc (Fig. 4a). The differential genes of thrombocytes and erythrocytes were enriched to platelet activation and hematopoietic cell lineage (Fig. 4b). Differential genes of thrombocytes and lymphocytes were enriched to the IL-17 signaling pathway, the interaction of viral protein with cytokines and cytokine receptors in lymphocytes and thrombocytes cells (Fig. 4c). The cluster analysis results of stratified blood bulk transcriptome revealed important potential marker genes of three types of cells screened from single-cell transcriptome (Fig. 5). **[Conclusion]** We further explored the function of blood cells of *P. sinensis* turtle by using discontinuous density gradient centrifugation combined with bulk transcriptome sequencing. The high expression of specific genes in the three cell types provided a basis for cell marker gene screening and antibody development of *P. sinensis*.

Key words: *Pelodiscus sinensis*; Blood cells; Cell segregation; Transcriptomics

血液细胞在生物的循环系统中承担着物质运输、生理免疫等维持生命活动的重要作用 (Dessauer et al. 1970, Overgaard et al. 2002)。如红细胞主要负责氧气的运输交换 (Dessauer et al. 1970), 参与控制全身一氧化氮代谢 (Kuhn et al. 2017)。血液中的免疫细胞则有助于维持生物体的内稳态 (Overgaard et al. 2002)、调节抗原受体信号传导和影响淋巴细胞的活化发育等 (Hermiston et al. 2003, Saunders et al. 2010)。红细胞也具有一定的免疫功能, 通过产生抗菌活性氧来抵御微生物的入侵, 并促进病理性炎症和自身免疫反应 (Anderson et al. 2018)。此外, 血液细胞还可以反映种群间的进化关系 (王军萍 2001, Sykes et al. 2008, Stacy et al. 2020)。与非哺乳类脊椎动物相比, 哺乳动物血液中的

红细胞和血小板失去了细胞核, 更有利于维持有效的气体交换 (Ji et al. 2011)。而保留了细胞核的其他脊椎动物红细胞可能有除气体运输交换外的其他功能 (Claver et al. 2009), 如通过调节病毒应答基因、产生细胞因子以及表面吞噬等方式参与免疫应答 (Passantino et al. 2002, 2007, Workenhe et al. 2008)。血液中不同细胞的数量及基因表达量的变化都有助于个体免疫、疾病诊断以及种群进化的研究 (吴孝兵等 1998, Arian et al. 2010, Stacy et al. 2020)。但是, 因细胞核的存在, 非哺乳类脊椎动物中红细胞与淋巴细胞和单核细胞的形态及质量都更加相似, 使得细胞在分离和分型上存在较大的技术难题。

目前, 爬行动物的血细胞类型多采用形态

和细胞化学技术进行鉴定，血细胞类型尚存在一些争议(Arikan et al. 2014, Stacy et al. 2020)。如中性粒细胞和嗜酸性粒细胞在低等脊椎动物和哺乳动物中被普遍认为是两种不同类型的血细胞，但在红耳龟 (*Chrysemys dorbignii*) 中被鉴定为成熟和未成熟的两种嗜酸性粒细胞 (Azevedo et al. 2003)。此外，嗜天青粒细胞自蛇类中首次被报道后，一直被认为是爬行动物中特有的细胞类型 (Montali 1988, Dotson et al. 1995)。之后，在阿根廷蜥蜴 (*Tupinambis merianae*)、红泰加蜥 (*T. rufescens*)、绿鬣蜥 (*Iguana iguana rhinolopha*)、西池龟 (*Emys marmorata*)、卡罗莱纳箱龟 (*Terrapene carolina carolina*) 和金花蛇 (*Chrysopelea ornata*) 等物种中也被相继报道 (Carlos et al. 2011, Troiano et al. 2011, Way et al. 2011, Keller et al. 2012, Pejřilová et al. 2014, Pengsakul et al. 2023)。关于嗜天青粒细胞的起源缺少深入的研究，Rosskopf (2000) 推测它是由单核细胞分化而来。因此，有必要结合现代高通量测序技术和传统细胞化学鉴别技术对爬行动物血液中的细胞类型做出更明确的鉴别和表征。

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 隶属于龟鳖目，是研究爬行动物免疫学、生理学和毒理学的模式物种 (Shi et al. 2019, Mu et al. 2023, Xiang et al. 2023)。中华鳖血液中存在红细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、异嗜性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞和血栓细胞 (王津津等 2011)。其中，单核细胞被认为与淋巴细胞具有更加相似的功能 (Stacy et al. 2020)。尽管对中华鳖血液细胞类型有了初步的判断和表征，但因血液中细胞分离存在很大难度，关于这些细胞类型的标记基因和功能缺少深入的研究。本研究以中华鳖为研究对象，采用 Percoll 不连续密度梯度离心分离得到血液细胞后进行转录组测序，旨在探索和揭示中华鳖血液细胞的功能和潜在重要标记基因，为中华鳖血液中生态免疫学研究提供重要基础。

1 材料方法

1.1 实验动物

实验所需的中华鳖购自江苏省宿迁水产养殖基地，将中华鳖运至实验室后，饲养在恒温室 (27.63 ± 0.53) °C 的塑料水箱 (750 mm × 560 mm × 400 mm) 中，水深约为 20 cm，驯化 3 周以上。恒温室的光照时间设置为 7:00 ~ 19:00 时。实验过程中对动物的处理操作始终符合南京师范大学动物伦理审查 (No. LACUC-20230221)。

1.2 血液样本的采集

从中华鳖的颈动脉采集 5 ml 的血液到 EDTA 抗凝管，暂存于 4 °C 冰箱中，并在 24 h 内完成细胞的分离实验。血液细胞分离前，新鲜的血液与无菌 1 × PBS (Solarbio 公司) 进行 1 : 1 稀释。共采集了 20 只 (均重 0.290 kg) 刚达到成熟的个体和 8 只 (均重 1.017 kg) 成熟个体的血液样本。

1.3 血液细胞的分离和鉴定

使用不连续的 Percoll 细胞梯度分离液 (北京索莱宝科技有限公司, 1 131 g/L) 分离中华鳖血液不同类型细胞。按照配比说明书，取 9 ml 的 Percoll 细胞梯度分离原液，加入 1 ml 的 10 × PBS，配制成 100% Percoll，再经 1 × PBS 稀释成两组不同密度组成的分离液。第一组稀释成：20%、30%、40%、50% 和 60%；第二组稀释成：25%、35%、45%、55% 和 65%。取每组不同密度的稀释液各 10 ml，按密度梯度从高到低的顺序依次缓慢贴壁加入 50 ml 离心管中。然后，血液与 1 × PBS 按 1 : 3 的比例稀释后取 10 ml 液体缓慢加到离心管的最上层。在 4 °C 下以 850 g 离心 40 min，将离心机的加速度和减速度调至最低，以避免破坏边界层。离心的不同密度分离液层之间出现白色分界。逐层收集不同分界处的细胞样本到 15 ml 离心管中，用 PBS 在 350 g 条件下离心洗涤 3 次。因细胞数量稀少，进行了多组重复实验，之后将同一密度梯度收集的样本合并。洗涤后的细胞样本用少量 PBS 重悬后，取微量细胞涂抹在载玻片上，用

迪夫快速染色液 (Diff-Quik Stain, 北京索莱宝科技有限公司, G1540) 对不同密度层中分离的细胞进行染色鉴定, 用奥林巴斯 CX33 (Olympus) 光学显微镜观察细胞形态。

1.4 总 RNA 提取

每个样本细胞数量均大于 5×10^6 个, 加入 1 ml 总 RNA 提取裂解液 (Total RNA Extractor) [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 后置于液氮中速冻, 之后保存在 -80°C 冰箱, 送到上海美吉生物医药科技有限公司, 样品放置于冰上缓慢解冻后采用氯仿磁珠法提取 RNA。使用核酸蛋白测定仪 (Nanodrop 2000, 赛默飞世尔科技公司) 对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 生物分析仪 (Agilent 2100, 安捷伦科技有限公司) 测定 RNA 完整值 (RNA integrity number, RIN)。所有样本的 RNA 总量均不低于 $1 \mu\text{g}$, 浓度不低于 35 mg/L , 经核酸蛋白测定仪检测后的吸光度 $A_{260/280} \geq 1.8$, $A_{260/230} \geq 1.0$, RIN 值不低于 6.5, 均达到建库要求。

1.5 文库构建

基于 Illumina Novaseq 6000 测序平台, 对细胞样本中转录出来的所有 mRNA 进行测序, 采用 Illumina TruseqTM RNA 样本准备试剂盒 (Invitrogen 公司) 构建 cDNA 文库。首先, 真核生物 mRNA 3' 末端具有 polyA 尾结构, 利用带有 Oligo (dT) 的磁珠与 polyA 进行 A-T 碱基配对, 可以从总 RNA 中分离出 mRNA, 然后加入片段裂解缓冲液将 mRNA 随机断裂, 通过磁珠筛选分离出 300 bp 左右的小片段。之后, 使用 SuperScript 双链 cDNA 合成试剂盒 (Invitrogen 公司) 和随机六聚体引物 (Illumina) 合成双链 cDNA。根据 Illumina 文库构建方案对合成的 cDNA 加入末端修复混合液补成平末端, 在 3' 末端加上 “A” 碱基用于连接 “Y” 字形的接头。使用 2% 琼脂糖胶回收目的片段, 经 TBS380 微型荧光计 (北京原平皓生物技术有限公司) 进行定量, 在 cBot 固相载体上进行桥式 PCR 扩增, 产生 DNA 簇, 采

用 Illumina NovaSeq 6000 测序仪进行测序。

1.6 转录组质控和组装

测序数据用 FASTQ (v0.19.5) 进行质控 (Chen et al. 2018)。将质控后的高质量数据 (clean data) 与中华鳖的参考基因组 PelSin_1.0 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/14578?genome_assembly_id=44853) 进行比对, 获得用于后续分析的 mapped data, 同时对本次测序的比对结果进行质量评估。采用 HISAT2 (v2.1.0) 软件进行序列比对分析, 将质控后的读长 (reads) 与参考基因组序列 (GCF_000230535.1) 进行匹配 (Kim et al. 2019)。RSeQC (v2.3.6) 用以评估整体测序质量 (Wang et al. 2016)。在已有的参考基因组基础上, 使用软件 StringTie (v2.1.2) 将映射到基因的读长 (mapped reads) 进行组装拼接, 与已知转录本进行比对, 获得没有注释信息的转录本, 并对其中潜在的新转录本进行功能注释 (Pertea et al. 2015)。

1.7 基因表达定量和功能富集分析

RSEM (v1.3.3) 用于对基因和转录本的表达水平进行定量分析 (Li et al. 2011)。基于表达量定量结果, 采用 FPKM 作为指标, 获得两组间的差异表达基因。我们使用 DEGseq (v1.38.0) 对样本间表达定量进行差异分析 (Wang et al. 2010)。经过校正的 P 值 (P_{adjust}) 小于 0.001 和 $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 2$ 的基因被视作差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。Goatools (v0.6.5) 用于基因本体论 (gene ontology, GO) 富集分析 (Klopfenstein et al. 2018), 经过校正的 P 值小于 0.05 时, 则认为此 GO 功能存在显著富集情况。KOBAS (v2.1.1) 用于京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析 (Bu et al. 2021), 当 $P_{\text{adjust}} < 0.05$ 时, 则认为此 KEGG 通路存在显著富集情况。

2 结果

2.1 中华鳖血液细胞的分离和鉴定

中华鳖血液细胞见图 1, 其中占比最高的

是有核红细胞，胞体偏大，整体偏椭圆形（图 1a）。成熟的红细胞核和细胞质着色比未成熟红细胞深。其次是嗜碱性粒细胞，其细胞核位于细胞一侧，细胞质中分布少量可见的较小嗜酸性颗粒（图 1b）。嗜酸性粒细胞的细胞核偏向细胞一侧，细胞质中遍布红色的嗜酸性颗粒（图 1c）。嗜碱性粒细胞最不常见，颗粒漫布核区，使细胞核不明显（图 1d）。单核细胞的细胞核占比大，偏向细胞一侧，细胞质中略呈嗜碱性（图 1e）。淋巴细胞相较于单核细胞更小，细胞质占比更低，基本只有核（图 1f）。血栓细胞常常几个到十几个成团分布，呈椭圆形，细胞质偏向细胞核两端（图 1g）。

根据细胞化学染色的镜检结果收集不同的样本用于转录组测序，其中红细胞来自第一组中大于 60% 密度浓度的 Percoll 液，淋巴细胞主要来自 20%~40% 之间的 Percoll 密度浓度，血栓细胞主要来自 50%~60% 之间的 Percoll 密度浓度。嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、异嗜性粒细胞和单核细胞这 4 种细胞类型的分层效果不理想，无法获得足够的细胞数量用于后续转录组分析。

2.2 转录组测序质控结果

细胞经分层离心后收集，并经化学染色和

光学显微鉴定后，对相同类型的细胞样本进行合并。共获得 9 个样本用于进行转录组测序，其中包含红细胞、淋巴细胞和血栓细胞各 3 个生物学重复（附录 1）。样本基于 Illumina Novaseq 6000 测序平台检测，下机后共获得 68.64 Gb 的原始数据，经去接头、重复和低质量过滤质控后得到 63.50 Gb 的有效数据，每个样本的有效数据平均可以达到 6.52 Gb 以上。Q30（碱基正确率在 99.9%）碱基百分比均在 91.75% 以上，GC 含量在 49.14%~54.40% 之间，测序碱基平均错误率均在 0.03% 以下。各样本质控后的读长与中华鳖参考基因组进行序列比对，比对率在 72.35%~80.39% 之间。结果表明，文库构建质量较好，可以用于后续的分析。

2.3 不同细胞类型差异表达基因的 GO 富集分析

为了探究中华鳖血液中分离得到的红细胞、淋巴细胞和血栓细胞的特异性基因，对其进行两两比较。韦恩图分析结果显示两组间基于表达量筛选的特异性表达和共表达的基因，其中，红细胞、淋巴细胞、血栓细胞分别表达 274、628 和 295 个特异性基因，11 163 个共表达基因（图 2a）。之后，对中华鳖上述三种类型血液细胞间的 DEGs 进行比较分析，三种类

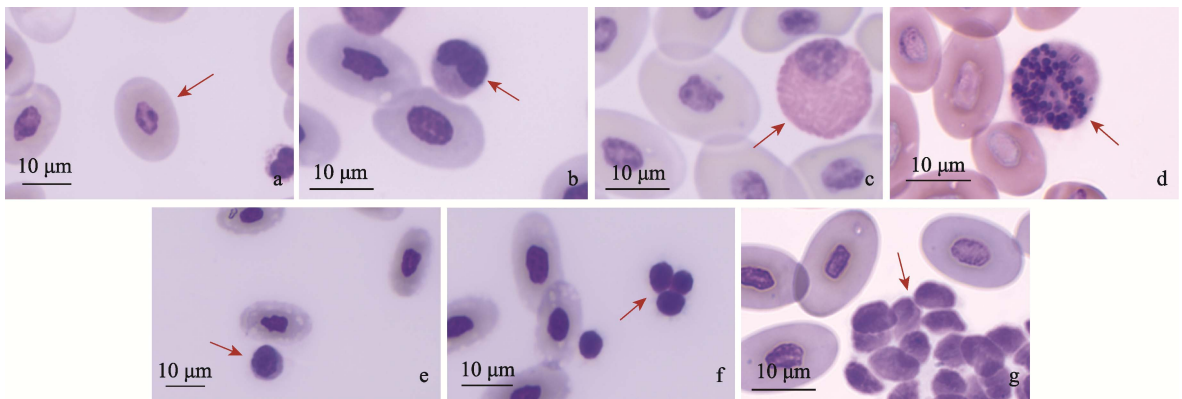


图 1 中华鳖血液细胞类型的显微结构

Fig. 1 Microstructure of blood cell types of *Pelodiscus sinensis*

a. 红细胞; b. 嗜碱性粒细胞; c. 嗜酸性粒细胞; d. 异嗜性粒细胞; e. 单核细胞; f. 淋巴细胞; g. 血栓细胞。
a. Erythrocytes; b. Basophils; c. Eosinophils; d. Heterophils; e. Monocytes; f. Lymphocytes; g. Thrombocytes.

型细胞共鉴定出 1 197 个 DEGs (图 2b)。其中, 与红细胞相比, 淋巴细胞中有 1 013 个上调基因, 688 个下调基因, 血栓细胞中有 946 个上调基因, 624 个下调基因; 与血栓细胞相比, 淋巴细胞中有 704 个上调基因, 576 个下调基因 (图 2b)。与淋巴细胞相比, 红细胞中上调差异基因的生物过程主要富集在溶菌酶活性 (GO0003796)、转移酶活性、转移烷基或芳基 (甲基除外) (GO0016765)、肽聚糖水解活性 (GO0061783)、阴离子跨膜转运蛋白活性 (GO0008509) 和酶结合 (GO0019899); 参与细胞过程的差异基因主要富集在核内体 (GO0005768)、血红蛋白复合体 (GO0005833)、全膜 (GO0098805)、线粒体外膜 (GO0005741) 和囊泡 (GO0031982); 参与分子过程的上调差异基因主要富集在四吡咯代谢过程 (GO0033013)、对化学物质的反应 (GO0042221)、活性氧代谢过程的调控 (GO2000377)、含卟啉化合物的代谢过程 (GO0006778) 和对营养水平的反应

(GO0031667) 等过程 (图 3a)。

与红细胞相比, 淋巴细胞中上调差异基因的生物过程主要富集在趋化因子活动 (GO0008009)、细胞因子活性 (GO0005125) 和趋化因子受体结合 (GO0042379); 参与细胞过程的上调基因主要富集在胶原蛋白三聚物 (GO0005581); 参与分子过程的上调基因主要富集在抗原受体介导的信号过程 (GO0050851)、免疫反应调节细胞表面受体信号过程 (GO0002768)、对病毒的反应 (GO0009615)、免疫反应调节信号通路 (GO0002764) 和细胞激活 (GO0001775) (图 3b)。血栓细胞中上调差异基因的生物过程主要富集在粘着斑 (GO0005925)、细胞基质结 (GO0030055) 及锚定连接 (GO0070161); 参与细胞组分的上调差异基因主要富集在髓样白细胞活化 (GO0002274)、中性粒细胞激活 (GO0042119)、粒细胞激活 (GO0036230)、对其他生物的防御反应 (GO0098542) 和防御反应 (GO0006952) (图 3c)。

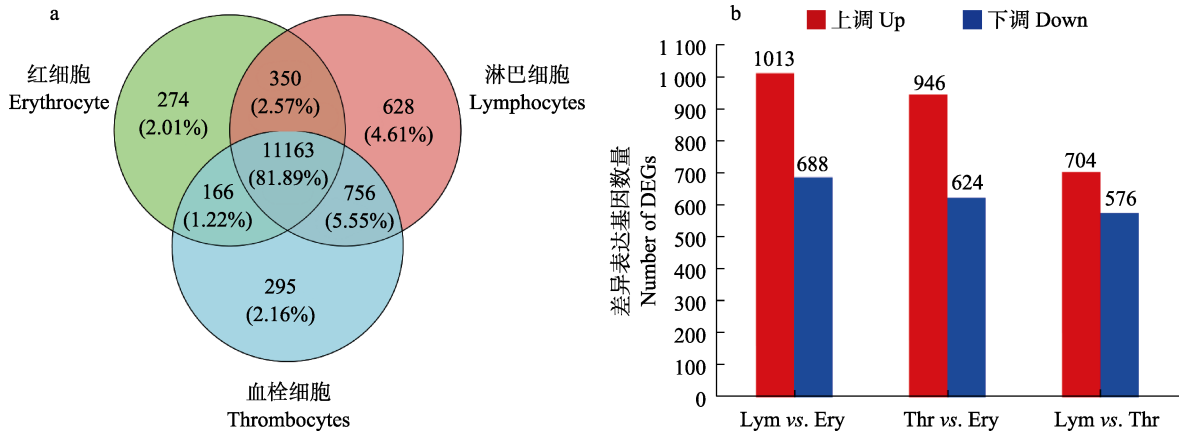


图 2 中华鳖红细胞、淋巴细胞和血栓细胞之间的差异表达基因

Fig. 2 Differentially expressed genes among erythrocytes, lymphocytes and thrombocytes of *Pelodiscus sinensis*

a. 韦恩图, 显示三种细胞中共表达和特异性表达的基因数量; b. 三种细胞类型间差异基因的统计。Ery. 红细胞; Lym. 淋巴细胞; Thr. 血栓细胞

a. The Venn diagram describes the number of genes co-expressed and specifically expressed by the three types of cells; b. Statistics of differential genes among three different cell types. DEGs. Differentially expressed genes; Ery. Erythrocytes; Lym. Lymphocytes; Thr. Thrombocytes

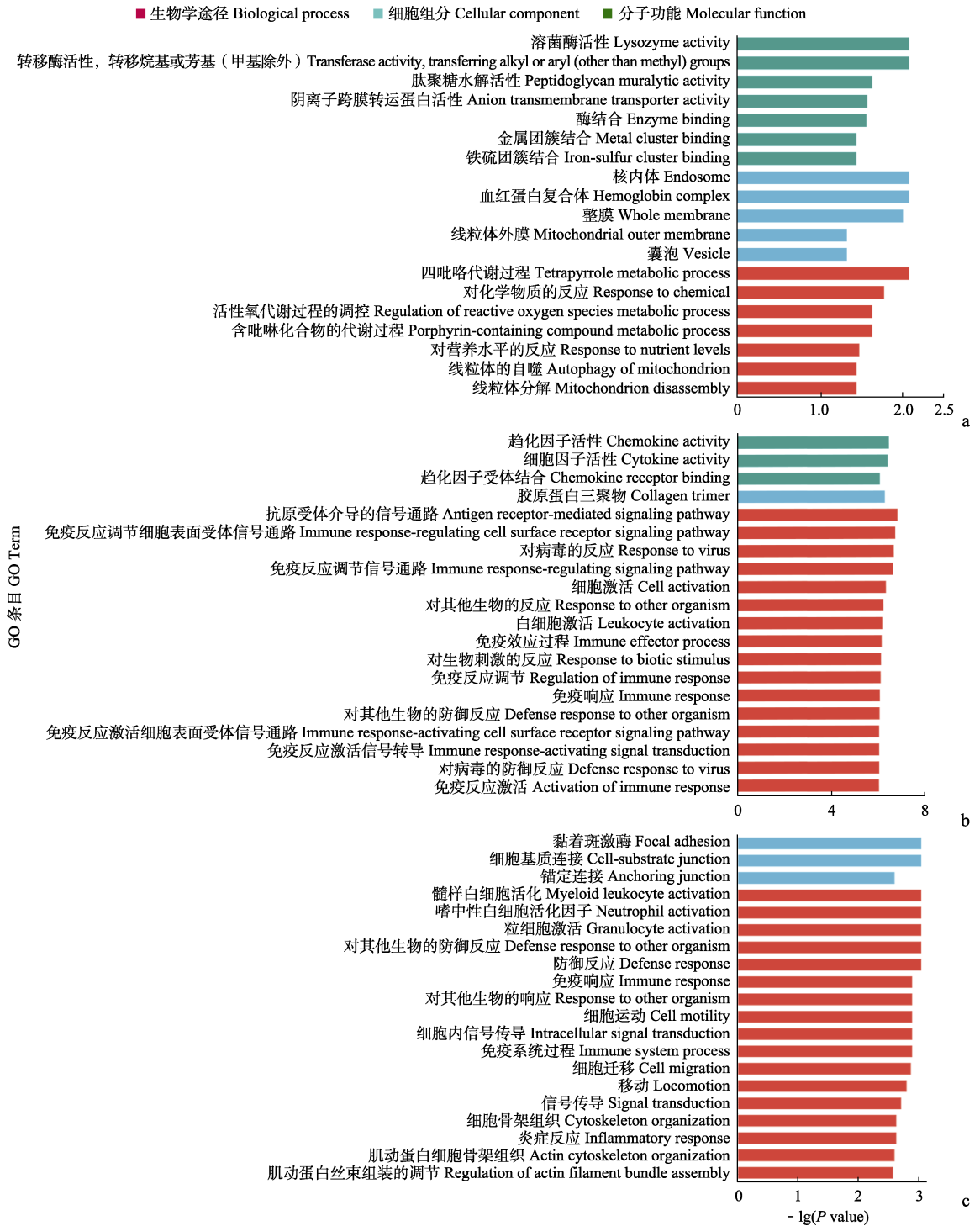


图 3 中华鳖红细胞、淋巴细胞和血栓细胞间上调差异基因的 GO 富集功能分析

Fig. 3 GO enrichment function analysis of up-regulated differential genes among erythrocytes, lymphocytes and thrombocytes of *Pelodiscus sinensis*

a. 红细胞 vs. 淋巴细胞; b. 淋巴细胞 vs. 红细胞; c. 血栓细胞 vs. 红细胞。

a. Erythrocytes vs. lymphocytes; b. Lymphocytes vs. erythrocytes; c. Thrombocytes vs. erythrocytes.

2.4 不同细胞类型差异表达基因的 KEGG 富集分析

为进一步表征红细胞、淋巴细胞和血栓细胞之间的差异基因,对上述差异基因进行了 KEGG 功能富集分析。淋巴细胞与红细胞之间的差异基因富集到 298 条通路,主要富集在: NF- κ B 信号通路 (ko04064)、EB 病毒感染 (ko05169)、T 细胞受体信号通路 (ko04660)、金黄色葡萄球菌感染 (ko05150) 和类风湿性关节炎 (ko05323) (图 4a)。血栓细胞与红细胞之间的差异基因富集到 299 条通路,主要富集在: 血小板激活 (ko04611)、类风湿性关节炎 (ko05323)、造血细胞谱系 (ko04640)、病毒性心肌炎 (ko05416) 和阿米巴病 (ko05146) (图 4b)。淋巴细胞和血栓细胞之间的差异基因富集到 262 条通路,主要富集在: 核糖体 (ko03010)、IL-17 信号通路 (ko04657)、Th17 细胞分化 (ko04659)、病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体的相互作用 (ko04061)、NF- κ B 信号通路 (ko04064) 和 T 细胞受体信号通路 (ko04660) (图 4c)。

2.5 不同细胞类型标记基因的预测

在中华鳖的血液单细胞测序中获得红细胞、淋巴细胞和血栓细胞的重要潜在标记基因 (未发表),并将基因在分层血液转录组中进行聚类 (图 5)。结果显示,三种细胞根据潜在标记基因很好地聚成了三类。其中,红细胞特异性高表达 *Hemgn*、*Spaca4*、*Tspo2*、*Epb41*、*Bpgm*、*Synm*、*Tfrc*、*Sptb*、*Smarca1*、*Epor*、*Ca2* 和 *Ca1*; 血栓细胞特异性高表达 *Myh9*、*Actb*、*Rasgrp2*、*Pmp22*、*Trem1*、*F10*、*Thbs1*、*Thy1*、*Dnase1b3*、*Rbpms2*、*Tmsb4x*、*Tmsb15b* 和 *Rap1b*; 淋巴细胞特异性高表达 *Rps7*、*Ddx21*、*CD74*、*Eef1g*、*Rpl3*、*Brcal*、*Satb1*、*Ddit4*、*Ptrrc*、*Cxcr4*、*Klf2*、*Rgs1*、*Il16*、*Rps9* 和 *Eef1b2*。

3 讨论

过去有研究采用另一种常用的 Ficoll 淋巴细胞分离液,离心过程中发现有核的血栓细胞

会随着红细胞一起沉降,对鸡 (*Gallus gallus*) 的研究中有过相似的报道 (Noble et al. 1967)。故而本研究采取了 Percoll 不连续密度梯度离心法对中华鳖血细胞进行分层。本研究采用 Percoll 细胞分离液进行不连续密度梯度离心过程中发现,中华鳖的血液在 EDTA 抗凝管中静置后会产生分层现象,由管口自上到下,依次为血浆层、血沉棕黄层和红细胞层,这与四爪陆龟 (*Testudo horsfieldii*) 的报道一致 (Fontes et al. 2018)。血沉棕黄层中的细胞在光学显微镜下染色后观察主要是白细胞,但种类分层不清晰,且分层后的未成熟红细胞以及各类粒细胞仍存在于所有的分层中 (Fontes et al. 2018)。本研究结果显示,经过不连续密度梯度离心后,并没有很理想地分离出中华鳖的血液细胞类型,比如嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞以及淋巴细胞中的 T 细胞和 B 细胞,都难以细分进行转录组分析,这可能是因为这些细胞在血液细胞中的占比较低。

本研究在分层的中华鳖血液细胞中观察到红细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、异嗜性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和血栓细胞,没有观察到嗜天青粒细胞,这与 Arikan 等 (2010) 报道一致。中华鳖血液中的嗜酸性粒细胞和异嗜性粒细胞的细胞质中均含有嗜酸性颗粒,但异嗜性粒细胞中嗜酸性颗粒更小。一般认为,血液中的细胞组成具有季节相关性。本研究取样时间主要集中在 2022 年的 4 和 5 月份,细胞化学染色观察到异嗜性粒细胞是除红细胞外占比最高的细胞类型,嗜碱性粒细胞尽管占比较低,但也能通过细胞化学染色发现鉴定,这与过往研究相似 (王津津等 2011)。中华鳖中细胞体积无明显差异 (王津津等 2011),这也可能导致了不连续密度梯度离心得到的分层效果不佳。但是我们仍成功分离出了红细胞、淋巴细胞和血栓细胞,可为后续中华鳖免疫细胞的抗体研究提供参考。

与淋巴细胞相比,红细胞的差异基因 GO 富集结果显示,上调差异基因具有溶菌酶活性

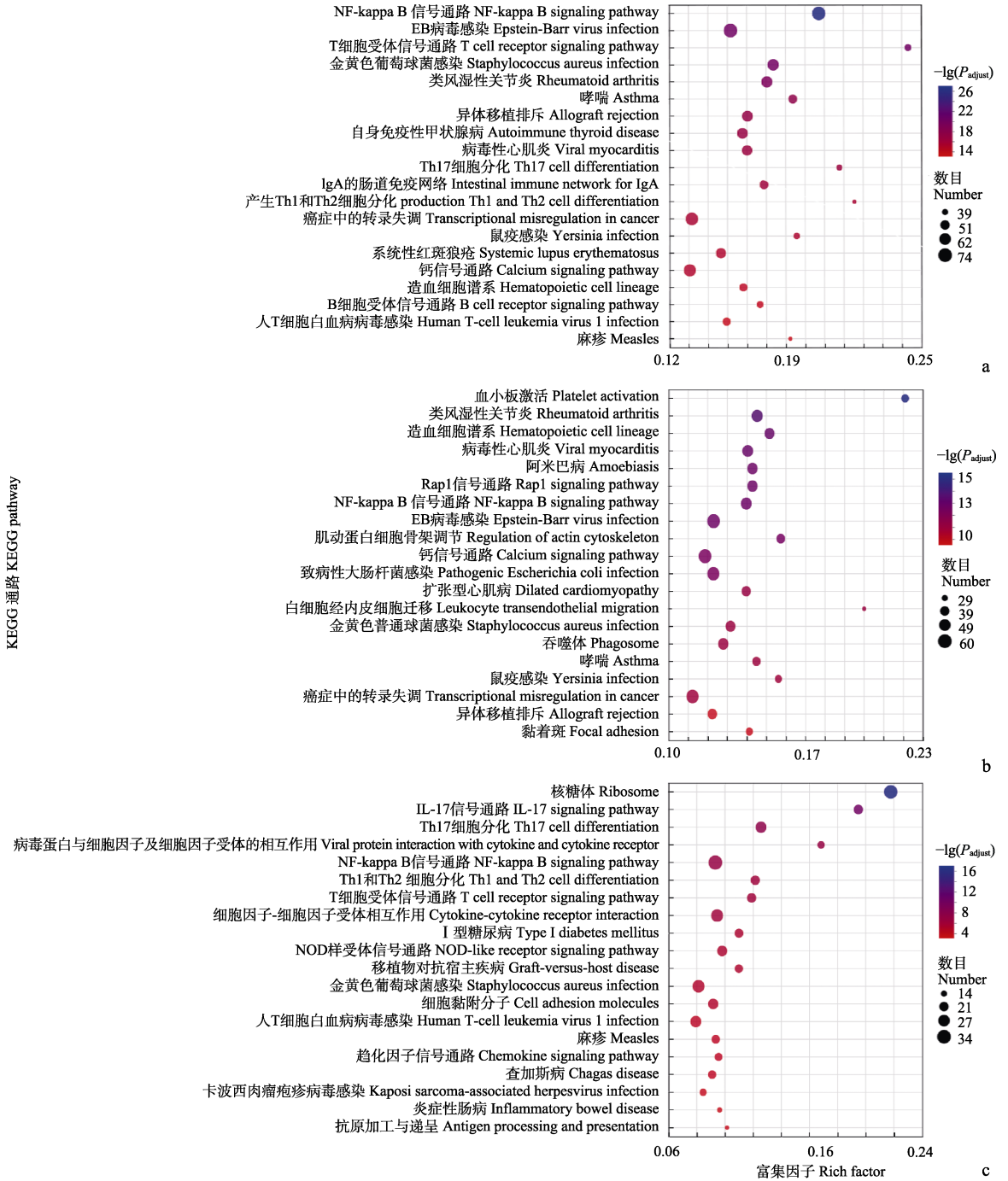


图 4 中华鳖红细胞、淋巴细胞和血栓细胞间上调差异基因的 KEGG 通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of up-regulated differential genes among erythrocytes, lymphocytes and thrombocytes of *Pelodiscus sinensis*

a. 淋巴细胞 vs. 红细胞; b. 血栓细胞 vs. 红细胞; c. 淋巴细胞 vs. 血栓细胞。

a. Lymphocytes vs. erythrocytes; b. Thrombocytes vs. erythrocytes; c. Lymphocytes vs. thrombocytes.

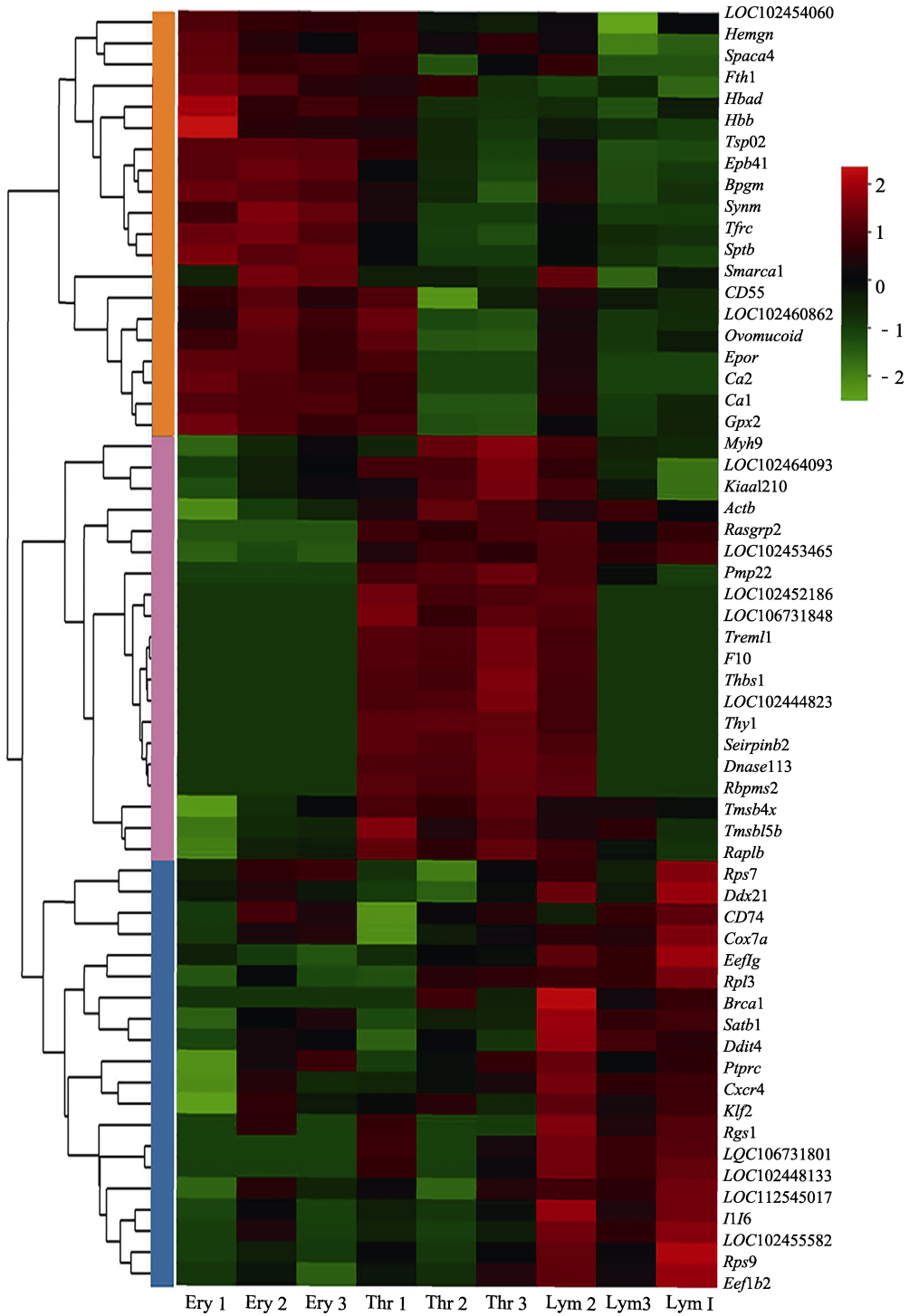


图 5 中华鳖红细胞、淋巴细胞和血栓细胞的潜在标记基因的聚类热图

Fig. 5 Clustering heatmap of potential marker genes in erythrocytes, lymphocytes and thrombocytes of *Pelodiscus sinensis*

Ery. 红细胞; Lym. 淋巴细胞; Thr. 血栓细胞 Ery. Erythrocytes; Lym. Lymphocytes; Thr. Thrombocytes

和转移酶活性，参与活性氧代谢过程的调控，验证了早期研究认为有核红细胞除了参与气体交换和运输外，还通过产生细胞因子和抗菌肽等方式参与到对病原体的免疫反应中的看法（Chico et al. 2018）。但一般研究认为，红细胞的去核化和线粒体消失会导致活性氧产生来源及作用靶点的消除，有利于生物对外界氧化应激反应的抵御（Zhang et al. 2011, Di Giacomo et al. 2015），这与低等脊椎动物中有核红细胞的终身存在似乎相悖。因此，关于中华鳖中有核红细胞的功能有待进一步探索和揭示。

关于中华鳖血液中淋巴细胞的作用已有诸多研究，如 Chen 等（2007）发现，随着养殖密度的增加，中华鳖血液中异嗜性粒细胞与淋巴细胞的比例增加，说明发生了免疫应答响应。Zhang 等（2023）发现，患有白腹病的中华鳖血液中淋巴细胞显著增加，这都提示了中华鳖血液中淋巴细胞的适应性免疫系统反应。本研究中的分层血液转录组显示，淋巴细胞功能主要与细胞因子活性、趋化因子功能相关，参与免疫反应调节细胞表面受体信号过程和对病毒的响应，证明了中华鳖血液淋巴细胞多样的免疫功能。但是不同于哺乳动物中丰富的血液细胞亚型，目前在中华鳖中仅发现了 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的存在（Guo et al. 2022），关于 B 细胞和 T 细胞是否存在更多的细胞亚型去支持中华鳖适应性免疫系统功能的发挥仍有待进一步深入研究探索。

中华鳖的血栓细胞与哺乳动物的血小板相比较，执行着相似但又更丰富的功能。过去已知哺乳动物中的血小板主要在凝血和伤口修复中起着至关重要的作用（Andrews et al. 2004）。而中华鳖中的血栓细胞差异基因主要参与髓样白细胞活化、粒细胞激活和防御反应，同时参与到血小板激活、造血细胞谱系等。这可能与血栓细胞的起源有关。已知爬行动物的血栓细胞起源于骨髓和脾，而哺乳动物中的血小板起源于骨髓的巨核细胞，血浆中的巨核细胞经过一系列复杂的过程，弯曲并融合形成盘状血小

板（Ferdous et al. 2015）。

综上所述，Percoll 分离液的不连续密度梯度离心在一定程度上可以分离中华鳖的红细胞、淋巴细胞和血栓细胞，但在其他细胞类型的分离上存在着一定的困难。红细胞的转录组差异基因富集表明，中华鳖的有核红细胞执行一定的免疫功能。聚类分析的结果验证了单细胞转录组中筛选出的基因是红细胞、淋巴细胞和血栓细胞这三类细胞的潜在重要标记基因。通过传统的不连续密度梯度离心联合高通量转录组测序，对中华鳖血液细胞的功能做了进一步探索。同时，3 种细胞类型的高表达特异性基因为中华鳖细胞标记基因筛选和抗体研发提供了一定的研究基础。

参 考 文 献

- Anderson H L, Brodsky I E, Mangalmurti N S. 2018. The evolving erythrocyte: red blood cells as modulators of innate immunity. *Journal of Immunology*, 201(5): 1343–1351.
- Andrews R K, Berndt M C. 2004. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis Research*, 114(5/6): 447–453.
- Arikan H, Çiçek K. 2010. Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish herpetofauna. *Acta Herpetologica*, 5: 179–198.
- Arikan H, Çiçek K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-Western Journal of Zoology*, 10(1): 190–209.
- Azevedo A, Lunardi L O. 2003. Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of the turtle (*Chrysemys dorsalis*). *Acta Histochemica*, 105(1): 99–105.
- Bu D C, Luo H T, Huo P P, et al. 2021. KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. *Nucleic Acids Research*, 49(W1): W317–W325.
- Carlos T J, Gould E, Gould I. 2011. Hematology in an Argentine lizard *Tupinambis merinae* (Sauria, Teiidae). *Russian Journal of Herpetology*, 16: 11–15.
- Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, et al. 2018. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17): i884–i890.
- Chen X R, Niu C J, Pu L J. 2007. Effects of stocking density on

- growth and non-specific immune responses in juvenile soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Aquaculture Research*, 38(13): 1380–1386.
- Chico V, Nombela I, Puente-Marín S, et al. 2018. *Immune Response Activation and Immunomodulation*, London: Books on Demand Press, 39–52.
- Claver J A, Quaglia A I E. 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(2): 87–97.
- Dessauer H C. 1970. Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. *Biology of the Reptilia*, 3(1): 1–72.
- Di Giacomo G, Campello S, Corrado M, et al. 2015. Mature erythrocytes of *Iguana iguana* (Squamata, Iguanidae) possess functional mitochondria. *PLoS ONE*, 10(9): e0136770.
- Dotson T K, Ramsay E R, Bounous D I. 1995. A color atlas of blood cells of the yellow rat snake. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 17: 1013–1016.
- Ferdous F, Scott T R. 2015. A comparative examination of thrombocyte/platelet immunity. *Immunology Letters*, 163(1): 32–39.
- Fontes Pinto F, Lopes C, Malhão F, et al. 2018. Unraveling avian and reptilian hematology: an optical and electron microscopic study of the buffy coat. *Veterinary Clinical Pathology*, 47(3): 407–414.
- Guo R, Ma G W, Zhai X F, et al. 2022. Comparison of the single-cell immune landscape of testudines from different habitats. *Cells*, 11(24): 4023.
- Hermiston M L, Xu Z, Weiss A. 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual Review of Immunology*, 21: 107–137.
- Ji P, Murata-Hori M, Lodish H F. 2011. Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation. *Trends in Cell Biology*, 21(7): 409–415.
- Keller K A, Guzman D S M, Paul-Murphy J, et al. 2012. Hematologic and plasma biochemical values of free-ranging western pond turtles (*Emys marmorata*) with comparison to a captive population. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 22(3): 99–106.
- Kim D, Paggi J M, Park C, et al. 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8): 907–915.
- Klopfenstein D V, Zhang L S, Pedersen B S, et al. 2018. GOATOOLS: a Python library for Gene Ontology analyses. *Scientific Reports*, 8(1): 10872.
- Kuhn V, Diederich L, Keller IV T C S, et al. 2017. Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, Anemia. *Antioxidants & Redox Signaling*, 26(13): 718–742.
- Li B, Dewey C N. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12: 323.
- Montali R J. 1988. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of Comparative Pathology*, 99(1): 1–26.
- Mu Y Q, Lan M Y, Li Y L, et al. 2023. Effects of florfenicol on the antioxidant and immune systems of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 140: 108991.
- Noble P B, Cutts J H. 1967. Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *The Canadian Veterinary Journal*, 8(5): 110–111.
- Overgaard J, Wang T. 2002. Increased blood oxygen affinity during digestion in the snake *Python molurus*. *The Journal of Experimental Biology*, 205(21): 3327–3334.
- Passantino L, Altamura M, Cianciotta A, et al. 2002. Fish immunology. I. binding and engulfment of *Candida albicans* by erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 24(4): 665–678.
- Passantino L, Massaro M A, Jirillo F, et al. 2007. Antigenically activated avian erythrocytes release cytokine-like factors: a conserved phylogenetic function discovered in fish. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 29(1): 141–152.
- Pejřilová S, Knotková Z, Knotek Z, et al. 2004. Age-related changes of the haematological profile in green iguana (*Iguana iguana* rhinolopha). *Acta Veterinaria Brno*, 73(3): 305–312.
- Pengsakul T, Senarat S, Sukparangsi W, et al. 2023. Morphometric analysis and characterization of peripheral blood cells in the golden tree snake *Chrysopelea ornata* (Shaw, 1802). *Russian Journal of Herpetology*, 30(1): 11–19.
- Pertea M, Pertea G M, Antonescu C M, et al. 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads.

- Nature Biotechnology, 33(3): 290–295.
- Roskopf W J. 2000. Disorders of reptilian leucocytes and erythrocytes. Philadelphia: Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets, 198–204.
- Saunders A E, Johnson P. 2010. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. Cellular Signalling, 22(3): 339–348.
- Shi N N, Cai S S, Gao J X, et al. 2019. Roles of polymorphic cathelicidins in innate immunity of soft-shell turtle, *Pelodiscus sinensis*. Developmental and Comparative Immunology, 92: 179–192.
- Stacy N I, Harr K E. 2020. Infectious Diseases and Pathology of Reptiles. 2nd Edition, Boca Raton: CRC Press, 267–330.
- Sykes IV J M, Klaphake E. 2008. Reptile hematology. The Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice, 11(3): 481–500.
- Troiano J C, Gould E G. 2011. Interspecific differences in the haematological reference intervals in *Tupinambis* genus from Argentina (*Sauria*-Teiidae). Comparative Clinical Pathology, 20(4): 309–312.
- Wang L G, Nie J F, Sicotte H, et al. 2016. Measure transcript integrity using RNA-seq data. BMC Bioinformatics, 17: 58.
- Wang L K, Feng Z X, Wang X, et al. 2010. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. Bioinformatics, 26(1): 136–138.
- Way Rose B M, Allender M C. 2011. Health assessment of wild eastern box turtles (*Terrapene carolina* Carolina) in East Tennessee. Journal of Herpetological Medicine and Surgery, 21(4): 107–112.
- Workenhe S T, Kibenge M J T, Wright G M, et al. 2008. Infectious salmon anaemia virus replication and induction of alpha interferon in Atlantic salmon erythrocytes. Virology Journal, 5: 36.
- Xiang J, Wu H, Gao J W, et al. 2023. Niclosamide exposure disrupts antioxidant defense, histology, and the liver and gut transcriptome of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 260: 115081.
- Zhang P, Liu N C, Xue M Y, et al. 2023. Pathological characteristics of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) with white abdominal disease. Aquaculture Reports, 31: 101670.
- Zhang Z W, Cheng J, Xu F, et al. 2011. Red blood cell extrudes nucleus and mitochondria against oxidative stress. IUBMB Life, 63(7): 560–565.
- 王津津, 赵海泉, 林锋, 等. 2011. Diff-Quik 染色法在中华鳖血细胞染色中的应用. 水产养殖, 32(7): 8–12.
- 王军萍. 2001. 龟鳖类血液学研究概述. 动物学杂志, 36(2): 47–51.
- 吴孝兵, 张盛周, 吴海龙, 等. 1998. 16 种爬行动物血细胞形态学参数研究. 动物学杂志, 33(1): 29–31.

附录 1 中华鳖血液细胞分层转录组的测序结果

Appendix 1 Sequencing results of bulk transcriptome of blood cells of *Pelodiscus sinensis*

样本 Sample	原始读长数 Raw reads	原始碱基 Raw bases (bp)	高质量读长数 Clean reads	高质量碱基 Clean bases (bp)	错误率 Error rate (%)	碱基正确率在 99%的占比 Q20 (%)	碱基正确率在 99.9%的占比 Q30 (%)	GC 含量 GC content (%)	能定位到基因组上的 高质量读长数目 (数目占比) Total mapped (%)	在参考序列上有多个比 对位置的读长数 (数目占比) Multiple mapped (%)	在参考序列上有唯一比 对位置的读长数 (数目占比) Uniquely mapped (%)
Ery_1	47 912 630	7 234 807 130	45 984 806	6 749 295 965	0.03	97.55	93.17	54.04	35 768 687 (77.78%)	3 572 883 (7.77%)	32 195 804 (70.01%)
Ery_2	46 945 230	7 088 7297 30	45 097 280	6 594 048 778	0.03	97.22	92.45	50.89	36 036 463 (79.91%)	2 129 830 (4.72%)	33 906 633 (75.19%)
Ery_3	51 861 914	7 831 149 014	49 744 108	7 278 227 826	0.03	97.14	92.19	50.90	39 593 864 (79.6%)	2 445 125 (4.92%)	37 148 739 (74.68%)
Lym_1	48 504 762	7 324 219 062	46 268 620	6 786 557 004	0.03	96.98	91.87	50.92	37 194 332 (80.39%)	1 969 978 (4.26%)	35 224 354 (76.13%)
Lym_2	48 586 114	7 336 503 214	46 455 160	6 871 497 619	0.03	96.89	91.75	51.79	35 964 610 (77.42%)	1 617 619 (3.48%)	34 346 991 (73.94%)
Lym_3	55 053 210	8 313 034 710	52 882 702	7 729 973 981	0.03	97.06	92.10	54.40	38 262 183 (72.35%)	2 668 875 (5.05%)	35 593 308 (67.31%)
Thr_1	48 933 626	7 388 977 526	44 790 310	6 515 892 676	0.03	97.00	91.99	49.19	35 885 265 (80.12%)	2 036 179 (4.55%)	33 849 086 (75.57%)
Thr_2	56 475 514	8 527 802 614	54 340 026	7 917 128 695	0.03	97.42	92.93	54.22	40 141 468 (73.87%)	2 945 433 (5.42%)	37 196 035 (68.45%)
Thr_3	50 296 336	7 594 746 736	48 201 804	7 059 753 363	0.03	96.91	91.78	53.98	34 909 599 (72.42%)	2 037 209 (4.23%)	32 872 390 (68.2%)

Ery. 红细胞; Lym. 淋巴细胞; Thr. 血栓细胞 Ery. Erythrocytes; Lym. Lymphocytes; Thr. Thrombocytes