

中华鳖(*Amyda sinensis*)脾脏在 HRP 刺激下 形态结构的变化

简纪常 吴婷婷

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

聂其灼

(南京农业大学, 210095)

摘 要 辣根过氧化物酶(HRP)免疫中华鳖后, 刺激其脾脏的组织结构发生变化。免疫后第五天, 动脉周围淋巴鞘(PALS)内嗜派若宁细胞增多, 主要为淋巴母细胞, 髓质周围淋巴鞘(PELS)和红髓则未见变化。免疫后第十天, 白髓增殖显著, 嗜派若宁细胞增多到整个免疫过程中的最高峰, 尤其是PELS内嗜派若宁细胞数量几乎与PALS持平。免疫后第十五天, 白髓比例明显减少, 可见许多处于不同排空程度的淋巴鞘, 嗜派若宁细胞也开始减少, PELS尤为显著, 浆细胞增加。免疫后第二十天, 白髓恢复正常, 但PALS附近红髓中浆细胞增加明显。免疫后第二十九天, 脾脏的结构趋于正常。整个免疫过程中, 未见到淋巴小结和生发中心。

关键词 中华鳖(*Amyda sinensis*), 脾脏, 辣根过氧化物酶(HRP), 嗜派若宁细胞

前 言

脾脏是爬行动物的主要淋巴器官之一, 在其免疫系统尤其在体液免疫中起着重要作用。Kroese 等^[6]用副伤寒疫苗(PTV)免疫锦龟(*Chrysemys scripta elegans*), 其脾脏白髓增殖, 大量的淋巴细胞母细胞化, 但不形成生发中心; Borysenko^[2]在 30℃ 条件下, 用钥孔贼血蓝素(KLH)刺激鳄龟(*Chelydra serpentina*), 发现脾脏中有大量的淋巴细胞增殖, 并形成嗜派若宁细胞滤泡, 一定时间后, 脾脏结构恢复正常。Borysenko^[2]还发现红髓中有处于不同发育阶段的 B 细胞, 可进一步分化成具有合成和分泌抗体能力的浆细胞。Kanakambika 等^[5]用绵羊红细胞(SRBC)免疫变色树蜥(*Calotes versicolor*), 脾脏中发现大量的空斑形成细胞。Sidky 等^[9]用鳄龟脾脏碎片与 SRBC 或小鼠红细胞在一定条件下培养, 脾脏碎片能产生特定的凝集素。以上实验证明, 爬行动物的脾脏在体液免疫反应中起着重要作用。

收稿日期: 1995-06-26。

对中华鳖的脾脏仅有陈秋生进行了研究^[1],认为脾脏由白髓和红髓组成,而白髓又由 PALS 和 PELS 组成,红髓则包括脾窦和脾索。但对中华鳖脾脏在抗原刺激下的反应过程尚未进一步探讨。本研究旨在用 HRP 作为抗原刺激中华鳖,研究其脾脏组织结构变化,进一步了解爬行动物脾脏在免疫过程中的作用,为其疾病的防治和比较免疫学提供依据。

材 料 和 方 法

(一)实验动物

五月初,自农贸市场购得体重为 250—400 克健康的中华鳖十七只,养于水族箱中,给予日常饲养管理。

(二)免疫方法、取材及标本制备

称取 HRP 9.6mg,溶于 1.5ml 无菌生理盐水中,与等量福氏完全佐剂混合均匀,于后腿肌肉注射 0.2ml。对照组注射无菌生理盐水。免疫后第五、十、十五、二十一和二十九天分别于颈动脉放血将鳖杀死,迅速取其脾脏固定于 10% 的中性甲醛中,石蜡切片,厚约 5 μ m,再分别用苏木精—伊红和甲基绿—派若宁染色和常规制片。

(三)观察

1. 在 Olympus 显微镜下观察脾脏组织结构的变化。
2. 用图象分析仪检测白髓的面积。

结 果

(一)白髓面积的变化 图象分析仪测得免疫过程中脾脏白髓的面积如表 1:

表 1 白髓与红髓面积及其百分比(单位:mm²)

Table 1 The areas of the white pulp and the red pulp and their percentages

	一个标准视野面积 A Standard view area	白髓平均面积 Average area of the white pulp	红髓平均面积 Average area of the red pulp	白髓所占百分比 Percentage of the white pulp	红髓所占百分比 Percentage of the red pulp
I ₅	0.32	0.11	0.21	34.38%	65.62%
I ₁₀	0.32	0.17	0.15	53.12%	46.88%
I ₁₅	0.32	0.06	0.26	18.75%	81.25%
I ₂₁	0.32	0.11	0.21	34.38%	65.62%
I ₂₉	0.32	0.11	0.21	34.38%	65.62%
对照组 Control	0.32	0.10	0.22	31.38%	68.62%

注:①一个标准视野面积为 0.32mm²。

A Standard view area = 0.32mm²

②I₅, I₁₀, I₁₅, I₂₁ 和 I₂₉ 分别代表免疫后第五、十、十五、二十一和二十九天。

I₅, I₁₀, I₁₅, I₂₁ and I₂₉ represent the fifth, tenth, fifteenth, twenty-first and twenty-ninth days post-immunization respectively.

从表中可知,免疫后第五天,白髓面积变化不明显;免疫后第十天,白髓与红髓面积最

大,亦即白髓的增殖在此时期最为显著;免疫后第十五天,白髓与红髓面积最小,即白髓缩减最明显,几乎只有第十天时的三分之一;免疫后第二十一、二十九天,白髓面积趋于正常。

光镜下观察到免疫后第五天,淋巴鞘断面的数量变化不明显。免疫后第十天,淋巴鞘断面明显增多,尤其是 PALS 的断面增多极为显著,直径也有所增大。免疫后第十五天,淋巴鞘断面的数量继续增多,但其厚度变薄,有许多排空程度不同的淋巴鞘[见图 1]。免疫后第二十一天,还可见到为数不多的半排空的淋巴鞘。免疫后第二十九天,淋巴鞘断面趋于正常。

(二)嗜派若宁细胞的变化

1. 免疫后第五天,PALS 内嗜派若宁细胞明显增加,基本上是淋巴母细胞[见图 2-3],其细胞质相对的较多,呈玫瑰红色,细胞核相对较少,呈绿色。嗜派若宁细胞数量在 PELS 和红髓中未见明显变化。

2. 免疫后第十天,嗜派若宁细胞继续增殖,其数量达到整个免疫过程的最高峰,不仅在 PALS,而且在 PELS、脾窦和脾索中均有分布,特别是在 PELS 内,嗜派若宁细胞数几乎与 PALS 持平[见图 4],脾窦中的嗜派若宁细胞数多于脾索。浆细胞数有所增加,主要位于 PALS 附近的脾窦中。

3. 免疫后第十五天,嗜派若宁细胞开始减少,在 PELS 内尤为明显。淋巴鞘附近的红髓中嗜派若宁细胞多于其它部位红髓中的嗜派若宁细胞,而且 PALS 附近红髓中的数量又多于 PELS 附近红髓中的数量。浆细胞增加,主要分布于 PALS 外区及其附近的红髓中。

4. 免疫后第二十一天,嗜派若宁细胞数量虽然进一步减少,但 PALS 内仍较多,而 PELS 和红髓中嗜派若宁细胞的数量已接近正常水平[见图 5]。浆细胞继续增多,并且从 PALS 内区到外区以及 PALS 附近的红髓中,浆细胞逐渐增加[见图 6]。

讨 论

本研究中,中华鳖脾脏白髓反应强烈,但未观察到由嗜派若宁细胞组成的小滤泡,也未见到淋巴小结和生发中心[图 2、图 3、图 4]。与锦龟脾脏^[6]和鳄龟脾脏^[2]在免疫过程中的反应相一致;而且中华鳖正常脾脏结构只有 PALS 和 PELS^[1]。因而认为中华鳖的脾脏在正常生理状态下或免疫过程中均不出现淋巴小结和生发中心。

在抗原刺激下,中华鳖脾脏中虽未发现淋巴小结和生发中心,但图像分析仪检测的结果表明,其脾脏有类似于哺乳类和鸟类脾脏一样的增殖反应,也同鳄龟的反应相一致^[2],表现出淋巴细胞大量母细胞化等。免疫后第五天,白髓占有的面积无明显增大,到第十天,增大到最大,随后明显减少,趋于正常。光镜下观察到,白髓增殖主要是淋巴鞘的数量增多,尤其是 PALS 增多异常明显,其直径也有所增大[图 1],而白髓面积的缩减,可能是由淋巴鞘变薄和出现不同程度的排空现象所引起的,这种排空现象可能是淋巴细胞母细胞化经过增殖、分化后迁移到它处的结果。

免疫过程中,PALS 内嗜派若宁细胞出现早,数量多,减少的速度缓慢,而 PELS 中嗜派若宁细胞出现迟,数量始终少于 PALS 中的数量,消失快。浆细胞数量的增加及其所处位置又常在 PALS 的边缘和附近的红髓中,这些现象可能与 PALS 和 PELS 内淋巴细胞的类型和数量存在差异有关。陈秋生^[3]认为 PALS 的淋巴细胞中酸性非特异性酯酶(ANAE)阳性细胞不超过 30%,嗜派若宁细胞约占 20%,而 PELS 的淋巴细胞中,ANAE 阳性细胞约占 60-70%,嗜派若宁细胞不到细胞总数的 5%。由此可见,PALS 可能是中华鳖脾脏白髓的

非胸腺依赖的 B 细胞居留区,而 PELS 则是胸腺依赖的 T 细胞居留区。

Claassen^[4]和 Rooijen 等^[7]分别发现,小鼠和兔脾脏中的抗体形成细胞(AFC)主要分布于 PALS 外区和环绕终末小动脉的小淋巴鞘。Rooijen^[8]又发现,当抗原刺激时,哺乳类脾脏中淋巴小结的 B 细胞发生母细胞化,并迁移到紧邻边缘区的 PALS 外区,进一步分化成 AFC,再经环绕终末小动脉的淋巴鞘到达红髓后离开脾脏。中华鳖脾脏白髓由 PALS 和 PELS 组成,脾脏中的 AFC 转移途径可能与哺乳类动物存在差异。免疫之初,PALS 内的嗜派若宁细胞数量增加明显,分布也较均匀,其后,PALS 外区的嗜派若宁细胞总是多于内区,脾窦中的数量多于脾索,浆细胞逐渐增加,主要分布于 PALS 边缘及其附近的红髓中。但在 PELS 的周缘及其附近的红髓中很少,而 PALS 又多与脾索直接相贴,因此可推测,中华鳖在体液免疫应答中,嗜派若宁细胞能从 PALS 内区逐渐向外区迁移,其记忆细胞和 AFC 可直接进入脾窦或经脾索进入脾窦再离开脾脏。中华鳖脾脏髓球内皮细胞之间有淋巴细胞存在^[1],表明中华鳖脾脏的髓球可允许淋巴细胞通过。因而 PELS 中的免疫应答细胞可能还通过髓球壁进入鞘毛细血管到达脾窦后离开脾脏。



图1 免疫后第15天,不同排空程度的淋巴鞘↑。甲基绿-派若宁染色(10×)。

Fig.1 At day 15 post — immunization, Lymphoid sheaths in various stages of emptiness (↑). Methylgreen — pyronine stain (10×).

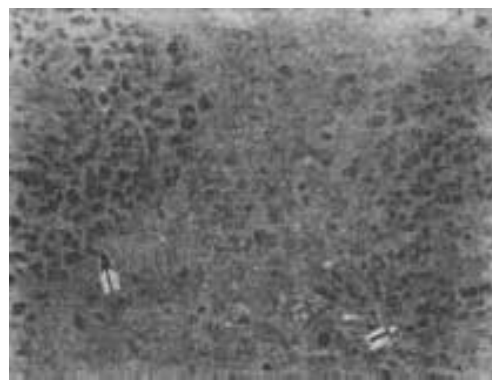


图2 免疫后第5天,PALS(↑)中嗜派若宁细胞增加,而PELS(↑)变化不明显。甲基绿-派若宁染色(40×)。

Fig.2 At day 5 post — immunization, pyroninophilic cells were increased apparently in PALS (↑), but not in PELS (↑). Methylgreen — pyronine stain (40×).

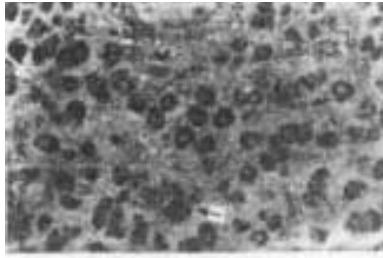


图 3 免疫后第 5 天, PALS 中浆细胞很少基本上是嗜派若宁淋巴母细胞(↑), 甲基绿—派若宁染色(100×)。

Fig. 3 At day 5 post — immunization, few plasma cells in PALS (↑). Methylgreen — pyronine stain (100×).

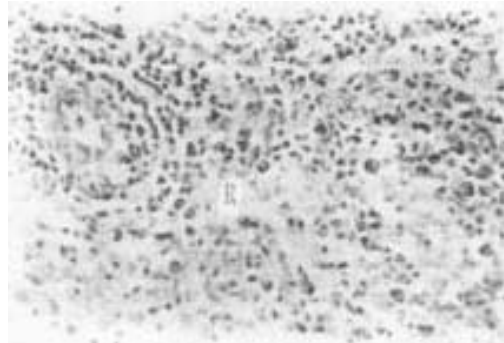


图 4 免疫后第 10 天, PELS(左)中嗜派若宁细胞增加明显, 红髓(R)中也增加。甲基绿—派若宁染色(100×)。

Fig. 4 At day 10 post — immunization, pyroninophilic cells were increased markedly in PELS (left), and did also in Red pulp (R). Methylgreen — pyronine stain (100×).

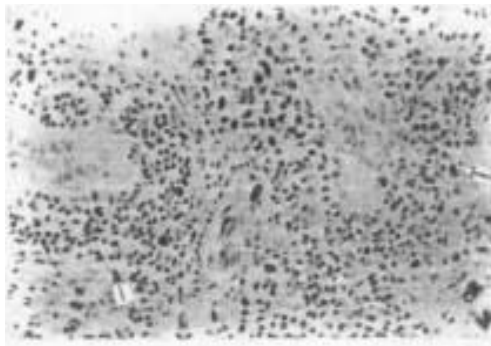


图 5 免疫后第 21 天, PELS(↑)中嗜派若宁细胞接近正常水平, 但 PALS(↑)中则较多。甲基绿—派若宁染色(40×)。

Fig. 5 At day 21 post — immunization, pyroninophilic cells reached nearly normal level in PELS (↑), but more those in PALS (↑). Methylgreen — pyronine stain (40×).

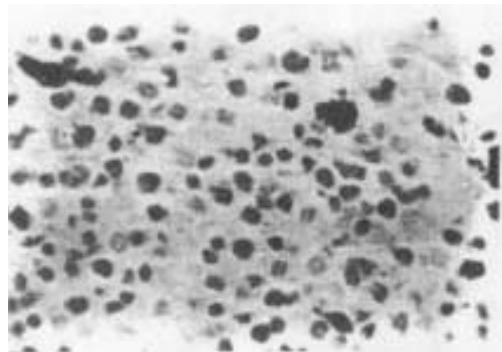


图 6 免疫后第 21 天, PALS 中浆细胞(↑)数增加。甲基绿—派若宁染色(100×)。

Fig. 6 At day 21 post — immunization, plasma cells were increased in PALS (↑). Methylgreen — pyronine stain (100×).

参 考 文 献

- [1] 陈秋生, 1991. 中华鳖胸腺和脾脏的显微和亚显微结构研究. 南京农业大学硕士研究生论文集.
- [2] Borysenko M., 1976a. Changes in Spleen Histology in Response to Antigen Stimulation in the Snapping Turtle, *Chelydra serpentina*. J. Morph., 149: 223—243.
- [3] Borysenko M., 1976b. Ultrastructural Analysis of Normal and Immunized Spleen of the Snapping Turtle, *Chelydra serpentina*. J. Morph., 149: 243—264.

- [4] Claassen E. et al., 1986. Influence of Carriers on the Development and Localization of Anti-trinitrophenyl Antibody-forming cells in the Murine Spleen. Eur. J. Immunol., 16: 271—276.
- [5] Kanakambika P. et al., 1972. The Immune Response to sheep Erythrocytes in the Lizard, *Calotes versicolor*. J. Immunol., 109, No: 3.
- [6] Kroese F. G. M. and N. van Rooijen, 1982. The Architecture of the Spleen of the Red—slider, *Chrysemys scripta elegans*. J. Morph., 173: 279—280.
- [7] Rooijen N. et al., 1984. The Development of Specific Antibody—containing Cells in the Spleen of Rabbits During the secondary Immune Response Against Free or Liposome—A Associated Albumin Antigen. The Anatomical Record., 208: 579—587.
- [8] Rooijen N. et al., 1986. Is there a single differentiation pathway for all antibody—forming cells in the spleen? Immunology Today., Vol Nos, 788, 193—196.
- [9] Sidky Y. A. and R. Auerbach, 1977, Tissue Culture Analysis of Immunological Capacity of Snapping Turtle. J. Exp., 167: 187—196.

CHANGES IN SPLEEN STRUCTURE OF *AMYDA SINENSIS* WITH STIMULATION OF HRP

Jian Jichang Wu Tingting

(Freshwater Fishery Research Centre of Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

Nie Qizhuo

(Nanjing Agricultural University, 210019)

ABSTRACT Changes of the structure of the spleen in the *Amyda sinensis* immunized with HRP (horseseradish peroxidase) were observed. By day 5 post—immunization, the increase of the phroninophilic cell, which was mainly lymphoblast, was apparent in the periarteriolar sheath (PALS), but not in the periellipsoidal sheath (PELS) and the red pulp. By day 10, the white pulp proliferated markedly, the number of pyroninophilic cells maxmized during the whole immunization, particularly in the PELS, pyroninophilic cells were nearly equal to those in the PALS. By day 15, the white pulp reduced markedly, the large number of lymphoid sheaths in various stages of emptiness were obsevered, the amount of pyroninophilic cells started to fall, particularly obvious in the PELS. Plasma cells increased. By day 21, the amount of plasma cells rised apparently in the red pulp near the PALS. By day 29, the structure of the spleen of *Amyda sinensis* tended to normal level. Lymph nodules and germinal centers were not found during the whole immunization.

KEYWORDS *Amyda sinensis*, Spleen, Horseseradish peroxidase (HRP), Pyroninophilic cell