

达氏鲢外周血细胞的形态学研究

周 玉, 潘风光, 李岩松, 阎广谋

(吉林大学 农学部畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062)

摘要:利用光镜和透射电镜技术研究达氏鲢(*Kaluga, Huso dauricus*)外周血细胞的显微和超微结构、分类和计数。结果表明,在外周血细胞中可区分出红细胞、单核细胞、大淋巴细胞、小淋巴细胞、粒细胞和血栓细胞。红细胞卵圆形,大小为 $(11.22 \pm 0.56) \mu\text{m} \times (7.92 \pm 1.01) \mu\text{m}$;细胞质内可见到线粒体;单核细胞为圆形,大小为 $(10.55 \pm 1.61) \mu\text{m} \times (9.38 \pm 2.04) \mu\text{m}$;胞质内空泡较多,有的直接与细胞外相通;大淋巴细胞有指状胞凸,大小为 $(8.09 \pm 1.14) \mu\text{m} \times (7.22 \pm 1.65) \mu\text{m}$;小淋巴细胞有伪足样胞凸,大小为 $(7.22 \pm 1.35) \mu\text{m} \times (6.31 \pm 1.24) \mu\text{m}$;血栓细胞圆形,大小为 $(4.82 \pm 0.68) \mu\text{m} \times (4.03 \pm 0.81) \mu\text{m}$;核质比较大,未发现任何细胞器。嗜中性粒细胞的大小为 $(11.84 \pm 1.38) \mu\text{m} \times (10.34 \pm 1.31) \mu\text{m}$,含有多种形态的细胞核及着色和大小不同的颗粒。嗜酸性粒细胞的大小为 $(11.26 \pm 1.35) \mu\text{m} \times (10.16 \pm 1.29) \mu\text{m}$,嗜酸性颗粒数量较多,个体较大。红细胞密度为 $82.16 \times 10^4/\text{mm}^3 \sim 106.90 \times 10^4/\text{mm}^3$,白细胞密度为 $1.91 \times 10^4/\text{mm}^3 \sim 4.55 \times 10^4/\text{mm}^3$ 。大淋巴细胞、小淋巴细胞、粒细胞和单核细胞所占百分比分别为:0.12%~8.78%、26.35%~107.43%、3.22%~29.42%、0.69%~23.99%;各类血细胞从大到小依次为:粒细胞、单核细胞、红细胞、大淋巴细胞、小淋巴细胞和血栓细胞。[中国水产科学,2006,13(3):480~484]

关键词:达氏鲢;血细胞;显微结构;超微结构

中图分类号:Q959.46

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2006)03-0480-05

达氏鲢(*Kaluga, Huso dauricus*)是黑龙江的主要经济鱼类之一,不仅个体大,肉质鲜美,也是中国仅有的两种鱼卵可用于鱼籽酱生产和出口的鲟形目种类之一。达氏鲢不仅具有较高的经济价值,还是最原始的脊椎动物之一,被誉为活化石,具有很高的学术研究价值。

血细胞在动物的生命活动中起着重要的作用,是动物体对自身生理状态变化和对外界环境因子刺激非常敏感的细胞,是机体免疫的重要成分。鱼类的血细胞不仅具有吞噬、分泌等功能,还可参与机体的伤口修复、防御等生理机制^[1]。但不同动物的血细胞的形态、结构和功能也不尽相同。因此,对动物血细胞的观察,不仅在动物的演化和分类等学术领域具有重要的意义,同时也为动物的健康养殖、病理、疾病诊断和预防提供基础资料和理论依据。关于鱼类外周血细胞的研究,已有文献^[2~4]报道,但有关达氏鲢血细胞的研究尚未见报道。本研究对达氏鲢的外周血细胞进行了形态学观察,旨在填补和丰富相关研究领域的资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康达氏鲢 10 尾,购自黑龙江,体质量 250~300 g。

1.2 方法

1.2.1 血样 活体心脏采血。

1.2.2 光镜样品制备 玻片法涂片,空气中挥动迅速干燥,甲醇固定 3~5 min, Giemsa 氏染色 20~30 min,自来水冲洗,室温空气自然干燥。用 Dacie 液,在 Neubauer 计数板上光镜下计数红细胞(RBC);用醋酸龙胆紫稀释液,在 Neubauer 计数板上光镜下计数白细胞(WBC);白细胞分类计数(DLC);每尾鱼涂血涂片 4 张, Olympus 显微镜下光镜下观察 100 个白细胞,用血细胞分类计数仪记录细胞分类计数值,同时进行拍照;油镜下测定血细胞(核)大小。

1.2.3 电镜样品制备 取血 2 mL, 12~15 g/L EDTA 二钠抗凝, 1 500 r/min 离心 10 min;除去上清液, 4℃ 2.5%戊二醛固定,挑取白细胞层, PBS 漂洗

收稿日期:2005-03-26; 修订日期:2005-05-31。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200210)。

作者简介:周 玉(1969-),男,博士,副教授,研究方向:水生动物免疫学与病害诊治学。E-mail: zhouyu69@sina.com

2~3次,切成1 mm³小块,1%戊酸固定2 h,乙醇逐级脱水,Epon812 环氧树脂浸透、包埋、聚合。NO-VA-LKB超薄切片机切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色,JEM-1200EXII透射电镜观察拍照。

2 结果

2.1 达氏鲱血细胞光镜观察

2.1.1 细胞计数与体积 红细胞数和白细胞数分别为 $(94.53 \pm 12.37) \times 10^4/\text{mm}^3$ 和 $(2.73 \pm 0.82) \times$

$10^4/\text{mm}^3$;白细胞分类计数(DLC)值及各类血细胞大小见表1。

2.1.2 红细胞 血涂片中主要以红细胞为主,呈卵圆形,表面光滑。核圆形或椭圆形,着色较深,位于细胞中间或偏向细胞一侧。胞质内着色较淡,呈均匀的淡红色(图版I-1)。达氏鲱外周血涂片中还可见到早期成红细胞,细胞圆形,直径与正常红细胞的长轴相近,细胞质着色比成熟红细胞深,核圆形,较大,位于中央(图版I-1A)。

表1 达氏鲱各种血细胞的大小(长径×短径)和白细胞分类计数值

Tab.1 Size (long diameter×short diameter) of different blood cells and differential leucocyte counts (DLC) of *Kaluga, H. dauricus*

项目 Item	红细胞 Erythrocyte	小淋巴细胞 Small lymphocyte	大淋巴细胞 Large lymphocyte	中性粒细胞 Neutrophil	酸性粒细胞 Eosinophils	单核细胞 Monocyte	血小板 Thrombocyte
白细胞分类计数/% DLC		66.89±40.54	4.45±4.33	15.29±13.10	1.03±0.81	12.34±11.65	
Number of leukocyte							
细胞长径/ μm Cell long diameter	11.82±0.75	7.22±1.35	8.09±1.14	11.84±1.38	11.26±1.35	10.55±1.6	14.82±0.68
细胞短径/ μm Cell short diameter	7.92±1.01	6.31±1.24	7.22±1.65	10.34±1.31	10.16±1.29	9.38±2.04	4.03±0.81
核长径/ μm Nuclei long diameter	4.63±0.64	4.93±0.81	6.16±1.01	8.01±2.33	7.92±2.31	7.56±1.39	3.34±0.75
核短径/ μm Nuclei short diameter	2.35±0.50	4.46±0.93	5.52±1.04	5.42±0.74	5.38±0.87	5.72±0.99	2.65±0.72

2.1.3 淋巴细胞 光镜下可分成大淋巴细胞和小淋巴细胞两种。

大淋巴细胞 呈圆形或椭圆形,表面有许多微绒毛样突起。细胞长径为6.95~9.23 μm ,短径为5.57~8.87 μm 。核较大,位于中央几乎占满整个胞质(图版I-1B)。

小淋巴细胞 细胞体圆形,有明显的伪足样胞突而使细胞呈不规则形状。核较大,占整个细胞的3/5以上,被染成蓝紫色。胞质呈弱碱性而被染成浅蓝色(图版I-2)。

2.1.4 血栓细胞 胞体圆形,常常2个或数个胞体聚集在一起(图版I-3)。偶尔也可见到核致密,被染成深紫色,胞质极少,或无胞质而成裸核状态的血栓细胞(图版I-4)。

2.1.5 单核细胞 圆形,核圆形或肾形,较大,占整个细胞的1/2~2/3,位于细胞中央或偏心位。胞质淡蓝色,内有许多大小不等的空泡,部分空泡直接与

胞外相通,空泡间有蓝紫色颗粒散布(图版I-5)。

2.1.6 粒细胞 光镜下的粒细胞可分成两种类型,即嗜中性粒细胞和酸性粒细胞。

嗜中性粒细胞 呈圆形或椭圆形,边缘平整,细胞质着色较浅。核呈螺旋形或多叶形,着色为深紫色[图版I-(6~7)]。

酸性粒细胞 呈圆形,细胞表面布满了较大的、着色较深的圆形颗粒而使细胞表面呈“草莓”样(图版I-8)。

2.2 达氏鲱血细胞透射电镜观察

2.2.1 红细胞 因切面位置不同而呈长椭圆形或圆形不规则形,细胞表面光滑,胞质均匀,可见少量较大的椭圆形或圆形线粒体,核膜清晰,核孔宽阔。异染色质在核膜内侧呈带状分布,在核中央呈岛状分布(图版I-9)。

2.2.2 大淋巴细胞 胞核较大,居中,核内异染色质丰富。核孔宽阔,核周隙明显。细胞质中含有少

量内吞泡。粗面内质网丰富。线粒体较多,个体较大(图版I-10)。

2.2.3 小淋巴细胞 圆形、椭圆形,有明显的伪足样细胞质突起,核较大,核膜清晰,核孔可见。异染色质着色较深,占细胞核的2/3以上,带状分布在核膜内侧,或呈岛状分布在核中央。胞质中含有丰富的游离核糖体(图版I-11)。

2.2.4 血栓细胞 圆形或椭圆形,核较大,圆形,核内异染色质较少,呈点状分布在细胞核内。细胞质很少,除了分布一些自由核糖体外,未发现任何细胞器(图版I-12)。

2.2.5 单核细胞 圆形或椭圆形,核因切面位置不同而呈马蹄形、肾形、或双叶,核膜清晰,核周隙宽阔,可见核孔。异染色质着色为深黑色,且含量丰富,占细胞核的2/3以上。线粒体数量较少,个体较小。内吞泡较多,大小不一,有的内吞泡直接与胞外相通。自由核糖体丰富,均匀分布在细胞质中(图版I-13)。

2.2.6 粒细胞

嗜中性粒细胞 椭圆形或圆形,核因切面位置不同而呈马蹄形、肾形、或双叶,稍偏位。异染色质带状分布在核膜周围,核中央异染色质较少。核膜清晰,核孔可见。线粒体丰富,但个体较小。细胞质内的颗粒不多,着色较淡,因切割角度不同而呈圆形、卵圆形或短棒状。微管、游离核糖体丰富。偶见滑面内质网和高尔基复合体。(图版I-14)。核膜清晰。异染色质主要分布在核膜内侧。细胞质内自由核糖体含量丰富。着色较深的特殊颗粒散在分布在细胞质中(图版I-15)。

酸性粒细胞 圆形或椭圆形,胞质中颗粒较大,着色较深,除一些空泡外,几乎占满整个细胞质,其他细胞器很少(图版I-16)。

3 讨论

3.1 血细胞的形态结构

在有些动物的红细胞内,未发现线粒体等细胞器^[5],而有些动物的红细胞内则有发现线粒体或空泡的报道^[2,6]。达氏鳢的红细胞中很容易发现线粒体,且线粒体的个体较大,结构明显。在欧洲鳢^[2]及其他一些鱼类^[3-4]的外周血涂片中,曾有发现正在分裂的血细胞的报道,在达氏鳢的外周血涂片及作者曾研究的某些甲壳动物^[7-8]的血淋巴细胞中,未见这种现象。

3.2 粒细胞的种类

鱼类的粒细胞有3种类型,即嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。嗜中性粒细胞存在于所有硬骨鱼类中,而嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的存在因鱼种类而异,一龄达氏鳢外周血中未见嗜碱性粒细胞。关于这一问题,作者曾进行过论述^[2]。

3.3 淋巴细胞的分类

Ellis^[9]认为:将淋巴细胞分成大小两类是不准确的,因为它们可能代表了同一种细胞的不同功能状态,而不大可能是具有不同功能的2种细胞。因此,很多学者^[10-11]将其归为一类进行描述。但也有些学者^[2,12]将其分为大小两类,认为它们是具有不同功能的两类细胞。

一龄达氏鳢的淋巴细胞不仅有“大”与“小”的区别,其形态、结构也明显不同:大淋巴细胞表面有较多指状突起,胞质内线粒体和粗面内质网丰富,核孔和核周隙宽阔;而小淋巴细胞表面有明显的伪足样突起,胞质内线粒体和粗面内质网相对较少,核孔和核周隙相对较窄。因此,作者将一龄达氏鳢的淋巴细胞分成大小两类,这也与作者对一龄欧洲鳢^[2]外周血细胞的观察结果相似。这种形态和结构明显不同的大小两类淋巴细胞是否在功能上也有明显不同,有待进一步研究。

3.4 单核细胞与粒细胞的区分

在光镜下,通常是可以分辨出粒细胞的特殊颗粒和单核细胞的内吞泡。在电镜下,单核细胞和粒细胞是很容易区分的,单核细胞的主要特征是细胞质中有大量的内吞泡,且有的内吞泡直接与胞外相通,而其他的细胞器较少。粒细胞的主要特征是细胞质中含有特殊颗粒,很少有内吞泡,偶尔发现,也是数量极少,个体很小,其他细胞器相对较丰富。

3.5 血细胞的大小与组成

一龄达氏鳢的粒细胞和单核细胞较大,小淋巴细胞和血栓细胞最小,与怀头鲂(*Silurus soldatovi*)^[13]等其他鱼类一致。与欧洲鳢^[14]等多数鱼类一样,在外周血中,未发现嗜碱性粒细胞。关于鱼类白细胞的组成存在的主要分歧是血栓细胞的归属问题。林光华等^[15]把鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)的血栓细胞列为白细胞系以外的一种血细胞;袁仕取等^[4]把斑鳢的血栓细胞列为一种白细胞。本研究对一龄达氏鳢的白细胞分类时,暂将血栓细胞列为白细胞系以外的

另一类细胞。作者认为,将血栓细胞归属为白细胞还是列为白细胞系以外的另一种细胞,其本身并不重要,重要的是采用统一的分类标准,以便于学术界的交流,避免由此而产生的不必要的误解。

参考文献:

- [1] 周玉,郭文场,杨振国. 鱼类血细胞研究进展[J]. 动物学杂志, 2001, 36(6): 55-57.
- [2] 周玉,郭文场,杨振国,等. 欧洲鲟外周血细胞的显微和超微结构[J]. 动物学报, 2002, 48(3): 393-401.
- [3] 吴维宁. 团头鲂血细胞发生的研究[J]. 水产学报, 1990, 14(4): 328-335.
- [4] 袁仕取,张永安,姚卫建,等. 鲟鱼外周血细胞显微和亚显微结构的观察[J]. 水生生物学报, 1988, 22(1): 39-45.
- [5] 颜桂利,黄健,江道提. 四种脊椎动物血细胞亚显微结构的比较研究[J]. 解剖学报, 1996, 27(1): 100-103.
- [6] 袁仕取,张永安,姚卫建. 鲟鱼外周血细胞显微和亚显微结构的观察[J]. 水生生物学报, 1998, 22(1): 39-45.
- [7] 周玉,穆占昆,杨振国. 三疣梭子蟹血淋巴细胞的形态、分类及计数[J]. 上海水产大学学报, 2001, (3): 279-281.
- [8] 周玉. 日本鳗鲡血淋巴细胞的研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(6): 664-666.
- [9] Ellis A E. The leukocytes of fish: A review[J]. J Fish Biol, 1977, 11: 453-491.
- [10] 冯怀亮,李文武,王铁恒. 鲟鱼血细胞显微和亚显微结构的观察[J]. 水产学报, 1991, 15(3): 241-244.
- [11] Roibal F R. Blood and other possible inflammatory cells in the spard *Acanthopagrus australis* (Günther) [J]. J Fish Biol, 1986, 28: 573-593.
- [12] Parrott D M V, Deous M A B. Thymus-dependent and thymus-independent populations. Origins, migratory patterns and life span[J]. Clin Exp Immunol, 1971, 8: 663-684.
- [13] 周玉,朱世成,曹青兰,等. 团头鲂血细胞常数的测定[J]. 湖北农业科学, 2001, (4): 77-78.
- [14] 周玉,郭文场,杨振国,等. 欧洲鲟血液指标的研究[J]. 水产科学, 2001, (2): 21-24.
- [15] 林光华,张丰旺,洪一江,等. 二龄鲟和鲟血液的比较研究[J]. 水生生物学报, 1988, 22(1): 9-16.

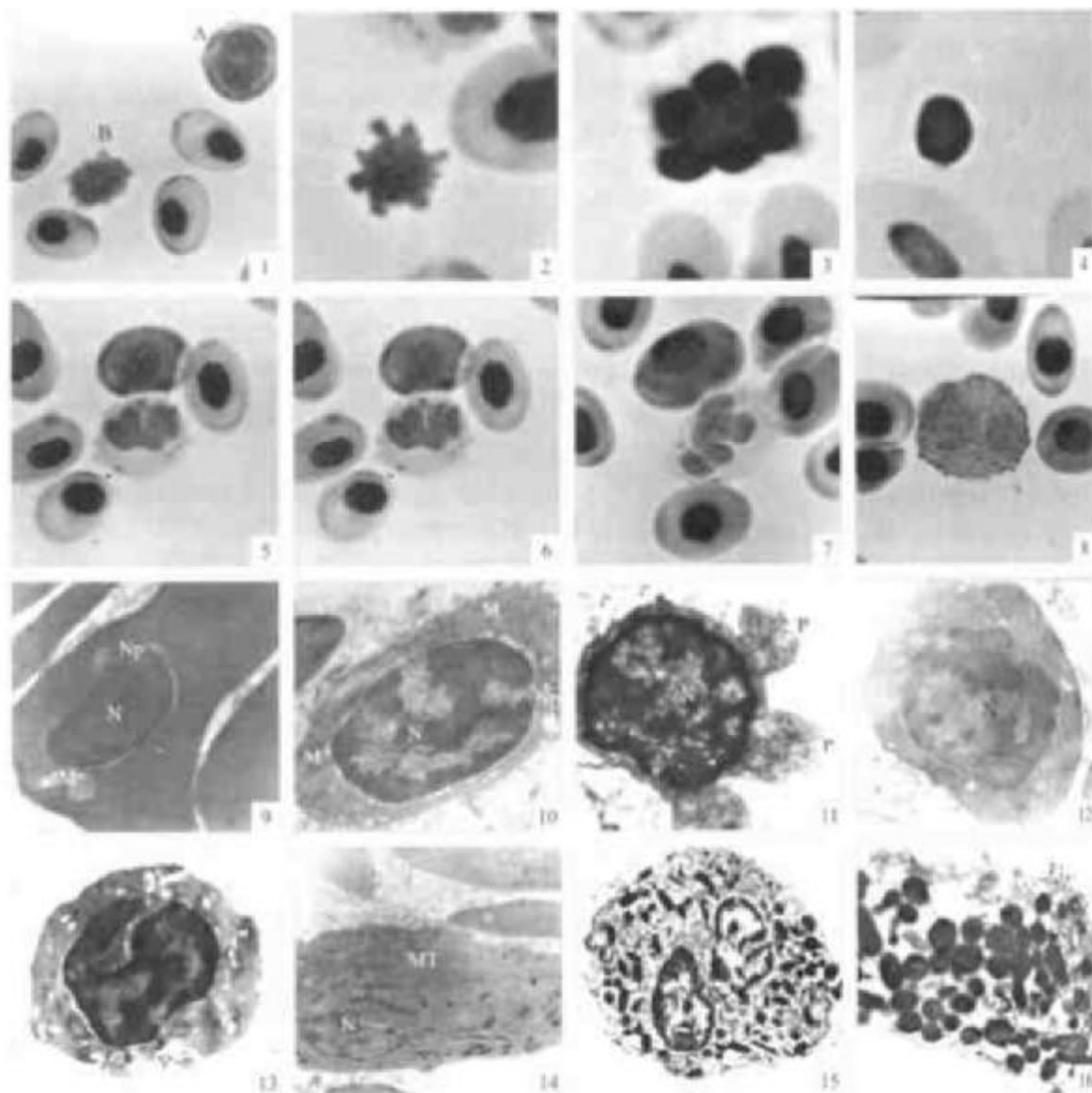
Morphological study on peripheral blood cells of kalugaa, *Huso dauricus*

ZHOU Yu, PAN Feng-guang, Li Yan-song, YAN Guang-mou

(Institute of Farming and Veterinary, Agriculture Ministry of Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: The peripheral blood cells of one year old Kalugaa (*Huso dauricus*) were studied by light microscopy and transmission electron microscopy. For morphology, peroxidase-Giemsa was used. The morphological results revealed that there were following cell types in the peripheral blood: erythrocytes are $(11.22 \pm 0.56) \mu\text{m}$ in length and $(7.92 \pm 1.01) \mu\text{m}$ in width, oval shape, oval nuclei and dark gray cytoplasm. Erythrocytes are almost completely devoid of organelle, except for some mitochondrion. Monocytes are $(10.55 \pm 1.61) \mu\text{m}$ in length and $(9.38 \pm 2.04) \mu\text{m}$ in width, round or oval nuclei. A greater number of vacuoles and few organelle were observed in cytoplasm. Large lymphocytes are $(8.09 \pm 1.14) \mu\text{m}$ in length and $(7.22 \pm 1.65) \mu\text{m}$ in width, many microvillus on the membrane. Small lymphocytes are $(7.22 \pm 1.35) \mu\text{m}$ in length and $(6.31 \pm 1.24) \mu\text{m}$ in width, with pseudopod-like cytoplasm bulge. Thrombocytes are $(4.82 \pm 0.68) \mu\text{m}$ in length and $(4.03 \pm 0.81) \mu\text{m}$ in width, nearly no cytoplasm and organelle. Neutrophils are $(11.84 \pm 1.38) \mu\text{m}$ in length and $(10.34 \pm 1.31) \mu\text{m}$ in width, round or oval shape, bilobed trilobed or multilobed nuclei and whitish cytoplasm. Eosinophils are $(11.26 \pm 1.35) \mu\text{m}$ in length and $(10.16 \pm 1.29) \mu\text{m}$ in width, and there are many big special granules, dark stained. The concentration of erythrocytes and leukocyte are $82.16 \times 10^4 - 106.90 \times 10^4/\text{mm}^3$ and $1.91 \times 10^4 - 4.55 \times 10^4/\text{mm}^3$. The percentage of large lymphocyte, small lymphocyte, monocyte, and granule cells are 0.12% - 8.78%, 26.35% - 107.43%, 3.22% - 29.42% and 0.69% - 23.99% respectively. The size of blood cells from large to small follows the order of granule cells, monocyte, erythrocyte, large lymphocyte, small lymphocyte and thrombocyte. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 480-484]

Key words: *Huso dauricus*; blood cell; microstructure; ultrastructure



图版 I

1:早期成红细胞(A)和大淋巴细胞示微绒毛样突起(B), $\times 2\,000$ 。2:小淋巴细胞示伪足样突起, $\times 4\,000$ 。3:血栓细胞, $\times 4\,000$ 。4:“裸露形”血栓细胞, $\times 4\,000$ 。5:单核细胞示细胞质空泡, $\times 2\,000$ 。6:粒细胞示螺旋形核, $\times 2\,000$ 。7:粒细胞示多叶形核, $\times 2\,000$ 。8:嗜酸性粒细胞示较大的颗粒, $\times 2\,000$ 。9:红细胞示线粒体(M)和核孔(Np), $\times 12\,000$ 。10:大淋巴细胞示线粒体(M)和核孔(Np), $\times 16\,000$ 。11:小淋巴细胞示细胞质突起(P), $\times 30\,000$ 。12:血栓细胞, $\times 38\,000$ 。13:单核细胞示细胞质空泡, $\times 12\,000$ 。14:中性粒细胞示较小的、着色较淡的特殊颗粒和微管, $\times 14\,000$ 。15:中性粒细胞示较小的、着色较深的特殊颗粒, $\times 14\,000$ 。16:嗜酸性粒细胞示较大的、着色较深的特殊颗粒, $\times 14\,000$ 。

Plate I

1: The early stage of growth in the development of erythroblast (A) and large thrombocyte showing pseudopodia (B) $\times 2\,000$. 2: Small thrombocyte showing pseudopodia $\times 4\,000$. 3: Thrombocyte $\times 4\,000$. 4: "Bare shape" thrombocyte $\times 4\,000$. 5: Monocyte showing cytoplasmic vacuoles $\times 2\,000$. 6: Neutrophil showing "screw shape" nucleus $\times 2\,000$. 7: Neutrophil showing "multilobed shape" nucleus $\times 2\,000$. 8: Eosinophil showing large special granules $\times 2\,000$. 9: Erythrocyte showing mitochondria (M) and nuclear pore (Np) $\times 12\,000$. 10: Large lymphocyte showing mitochondria (M) and nuclear pore (Np) $\times 16\,000$. 11: Small lymphocyte showing pseudopodia (P) $\times 30\,000$. 12: Thrombocyte $\times 38\,000$. 13: Monocyte showing cytoplasmic vacuoles (V) $\times 12\,000$. 14: Neutrophil showing small and light stained special granules and microtubules (MT) $\times 14\,000$. 15: Neutrophil showing small and dark stained special granules $\times 14\,000$. 16: Eosinophil showing large and dark stained special granules $\times 14\,000$.