

鳊淋巴器官的个体发育

马红^{1,2}, 常藕琴¹, 石存斌¹, 潘厚军¹, 吴淑勤¹, 李湘林³

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380; 2. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090; 3. 广东省江门市蓬江区荷塘镇农业办公室, 广东 江门 529095)

摘要:运用连续石蜡切片技术和组织学观察方法,对常规孵化出膜后1~33日龄鳊(*Siniperca chuatsi*)淋巴器官个体发育过程的组织学特点进行研究。结果表明,水温23~25℃时,出膜后第4天,部分仔鱼开始摄食并逐渐转入外源性营养阶段。同样水温条件下,出膜后第3天,出现胸腺原基,然后胸腺迅速淋巴化,能明显分为外区、中区和内区。鳊在出膜时已存在原肾管,原肾管前部分发育为头肾原基,由一些造血干细胞和肾小管组成;后部分发育为中肾和后肾,主要由肾小管组成。随着个体发育,头肾的淋巴细胞数量增多,肾小管数量减少,头肾逐渐由排泄器官转化为淋巴器官。出膜后第5天,观察到脾脏原基,脾脏主要由造血细胞和淋巴细胞组成,淋巴化速度较慢。至出膜后30天左右,体形和淋巴器官的发育情况基本与成鱼相似。鳊淋巴器官原基出现的顺序是头肾、胸腺、脾脏;而这些器官淋巴化的顺序是胸腺、头肾和脾脏。[中国水产科学,2007,14(5):756-761]

关键词:鳊;淋巴器官;个体发育;组织学

中图分类号:Q959

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)05-0756-06

鳊(*Siniperca chuatsi*),俗称桂鱼、桂花鱼等,隶属鲈形目、鲈科、鳊属,是中国具有很高经济价值的淡水养殖鱼类。珠三角地区是中国鳊的主要养殖基地,自1985年引进、苗种繁育攻关和生产试验取得成功,进行了大面积推广。随着鳊养殖产业的迅速发展,病害问题严重,尤其是在苗种培育阶段,仔、稚、幼鱼的死亡率很高,造成苗种生产不稳定,严重制约了鳊养殖业的发展,亟待科学工作者研究和探讨。

硬骨鱼类的淋巴器官(组织)主要是胸腺、头肾、脾和黏膜淋巴组织,它们是免疫细胞发生、分化、成熟、定居、增殖以及产生免疫应答的场所。淋巴器官(组织)和细胞是鱼类防御系统的基础,为鱼类防止病原侵入提供了最初的防线,因而对鱼体的淋巴器官(组织)发育的研究,是深入认识鱼体免疫活性建立时间的基础,也是疫苗使用的前提。

关于鱼类淋巴器官个体发育研究方面,国外从20世纪80年代开始见相关报道,主要集中在淡水鱼类,如虹鳟(*Salmo gairdneri*)^[1]、鲤(*Cyprinus carpio* L.)^[2]、罗非鱼(*Oreochromis mossambi-*

cus)^[3]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[4]等。而国内此方面的研究资料较少,主要有鲤^[5]、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[6]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[7]等方面的报道。基于鳊在中国珠江三角洲地区淡水养殖中的重要地位以及此方面资料的欠缺,本研究对人工繁育条件下出膜后1~33日龄的健康苗种进行取样,试图通过观察鳊淋巴器官个体发育过程,探讨淋巴器官发育情况与病害防治之间的关系,为鱼类淋巴器官形态学和组织学提供基础资料,为疫苗的使用以及养殖生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用鱼取自广东省江门市蓬江区荷塘镇荷塘鱼苗场,取样时间为鳊孵化出膜后1~33 d,取样时水温23~25℃。

鳊苗1~15日龄每天取样,15~33日龄隔天取样。1~15日龄每次取样15~20尾,15~33日龄取样尾数酌情减少。实验用鱼经肉眼观察、一般镜检及PCR检测,确定无虫无病毒。

收稿日期:2007-01-23; 修订日期:2007-03-20.

基金项目:广东省科技计划项目(2001B20501); 国家科技支撑计划课题(2006BAD03B05).

作者简介:马红(1980-),女,硕士研究生,主要从事水产动物免疫学方面的研究. Tel:020-81617592; E-mail:mahong006@126.com

通讯作者:吴淑勤. E-mail:wushuqin001@21cn.com

1.2 方法

鳃苗整体放入 Bouin's 液中固定,以备测量和切片使用。

1~5 日龄鳃显微镜下用标准直尺测量,6~33 日龄鳃直接用标准直尺测量,记录全长和体质量,标准直尺精确度为 1 mm。切片组织梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,Leica RM2135 型切片机 5 μm 作纵向切片,HE 染色,Olympus 显微镜观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 鳃个体发育过程中的生物学特性

刚出膜的鳃苗身体细小,全身透明,卵黄囊较大,鸡蛋形,卵黄囊前端有一个大油球。此时的仔鱼以自身卵黄为营养源。2 日龄仔鱼卵黄囊逐渐缩小,眼球大,黑色素很深,口裂已形成,鳃盖能闭合,肠管开始出现。水温 23~25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,出膜第 4 天,口咽腔明显,消化道不时蠕动,食道与肠道开始分化。部分仔鱼已开始摄食而进入混合营养期,并逐渐转入外源性营养阶段,生长加快。发育至出膜后 30 d 左右,体形和各器官的形态基本与成鱼相似。

2.2 鳃淋巴器官发育过程中的组织学特点

2.2.1 胸腺 出膜第 3 天,观察到胸腺原基出现(图版 I-1),位于鳃腔背侧,由 4、5 层嗜碱性且胞体较大的干细胞组成。胸腺原基下连肌样细胞,原基与肌样细胞之间观察到色素细胞聚集。原基的最外层有一层较弱嗜碱性的内皮样细胞,把它与鳃腔隔开。

出膜第 7 天,胸腺原基细胞已经分化,原基位置观察到大量的淋巴母细胞,细胞呈圆形或不规则形,深蓝色;靠近背侧的淋巴母细胞趋向于圆形且形状一致,染色较深。胸腺外层上皮细胞已隐约可见,明显区别于淋巴细胞(图版 I-2)。

出膜第 8 天,与第 7 天最明显的区别是胸腺外层上皮细胞变得清晰可见(图版 I-3)。

出膜第 11 天,胸腺基本形成 3 个分区:外区、中区和内区(图版 I-4)。外区位于腹侧,内区位于背侧,中区和内区大致相当于哺乳动物的皮质区和髓质区。外区的上皮细胞数量增多,呈扁平状或不规则状,胞核明显;中区小淋巴细胞生成活跃,细胞圆形,蓝色深染;此外,内区观察到网状纤维分布,淋巴细胞排列稀疏,散在分布于网状纤维交织成的网孔内(图版 I-5)。

出膜第 15 天,胸腺外区上皮细胞间观察到黏液细胞,黏液细胞内充满了黏液,空泡状,镜下观察比其他细胞大很多。

出膜第 17 天,胸腺内区观察到哈氏小体样结构(图版 I-6),哈氏小体是由一层扁平上皮细胞环绕细胞残体而成的环状结构。

出膜第 25 天,胸腺外区、中区和内区这 3 个分区更加明显。外区主要由黏液细胞和上皮细胞组成,内区和中区由网状组织和淋巴细胞组成。

出膜第 33 天,胸腺的形状已接近成鱼胸腺,解剖观察呈三角形、半透明色,微向外突起,镜下观察呈长椭圆状、向鳃腔突出(图版 I-7)。从解剖学位置观察,胸腺与头肾仅隔一层鳃腔膜,镜下观察到胸腺与头肾之间有淋巴细胞存在(图版 I-8)。胸腺内区淋巴细胞圆、小,形状规则,蓝色深染,形态上观察基本为成熟淋巴细胞。此外,胸腺中区还观察到黑色素巨噬细胞。

2.2.2 头肾 出膜第 1 天,镜下观察到 1 条直的原肾管沿着体腔背侧从前通到后,开口于肛门(图版 I-9)。

出膜第 2 天,原肾管开始分化,头肾部分分化成若干个肾小管,肾小管由扁平立方上皮组成,管腔内隐约可见淡红色的嗜酸性物质。肾小管之间观察到造血干细胞和嗜碱性的淋巴母细胞,胞体很大(图版 I-10)。

出膜第 5 天,头肾的淋巴细胞变得清晰,数量增多。头肾外层淋巴细胞深染,较内层分布密集,管间观察到红细胞分布(图版 I-11)。

出膜第 6 天,淋巴细胞形状不规则,呈多角状、椭圆状或扁平状。头肾中的红细胞增多,形成血窦。此外,油镜下观察到单核细胞,蓝色,具分叶核。

出膜第 9 天,头肾中首次观察到肾上腺细胞,肾上腺细胞胞体较大,胞质嗜酸性,呈索状排列,血窦和细胞索相间分布(图版 I-12)。

出膜第 13 天,淋巴细胞数量继续增多,肾小管数量减少。油镜下频繁观察到淋巴细胞的有丝分裂相,此时的淋巴细胞正处于分化状态,胞内可见染色体(图版 I-13)。

出膜第 17 天,头肾中充满大量淋巴细胞,血管丰富,血管内可观察到大量血细胞(图版 I-14)。

出膜第 25 天,头肾体积继续增大,肾小管成退化状态,上皮细胞之间界限模糊,管腔内似有细胞残体样物质(图版 I-15)。

出膜第33天,血管中观察到大量血细胞聚集,组织学结构和之前相比无明显变化。

2.2.3 脾脏 出膜第5天,观察到脾脏原基,紧贴肠壁,被胰脏组织包围或与胰脏组织相连,近圆形(图版I-16)。脾脏原基主要由疏松的间充质细胞和少量嗜碱性淋巴母细胞组成。此外,少量红细胞分布在脾脏中间部分。

出膜第7天,脾脏细胞数量增多,组织变得致密,体积增大。明显位于肠系膜上,紧贴胰脏,成为独立的器官(图版I-17)。

出膜第11天,毛细血管丰富,红细胞增多。网状组织发达,细胞位于网眼内,组织更加致密。油镜下观察,细胞密度明显低于头肾和胸腺,细胞大小形状很不规则(图版I-18),且能清晰地观察到脾脏外表面被膜,被膜细胞核被染成蓝色、细长,紧贴脾脏实质组织。

出膜第13天,整个脾脏组织四周部分淋巴细胞排列比较紧密,中间疏松,且中间部分形成很多脾血窦,和淋巴细胞相间排列。中间部分似乎正在形成椭圆体(图版I-19)。

出膜第17天,网状组织越来越丰富,毛细血管发达,其中红细胞数量占优势,小淋巴细胞分散在红细胞之间。

出膜第29至33天,镜下观察脾脏呈长条状,紧贴在肠系膜上(图版I-20)。脾脏组织学结构和29天之前相比无明显变化。

3 讨论

一般来讲,对于淡水鱼类,头肾是第一个出现并开始发育的淋巴器官,随后是胸腺和脾脏。从本实验结果可见:鳃淋巴器官出现的顺序依次为头肾、胸腺和脾脏,这与淡水鱼类虹鳟(*Salmo gairdneri*)^[1]、鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)^[2]、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[3]和斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)^[4]等相同。在23~25℃水温条件下,鳃在出膜后第3天出现胸腺原基,胸腺原基主要由一些未分化的淋巴母细胞组成,胸腺淋巴化的速度很快,迅速充满很多淋巴细胞;在孵化时已存在原肾管,随后原肾管逐渐发育,前部发育为头肾原基,由一些造血干细胞和肾小管组成,后部发育为中肾和后肾,头肾淋巴化的速度慢于胸腺;出膜后第5天观察到脾脏原基,主要由疏松的间充质细胞和少量嗜碱性淋巴母细胞组成,脾脏淋巴化的速度最慢。由

此可见,像大多数淡水鱼类一样,鳃淋巴器官淋巴化的顺序依次为胸腺、头肾、脾脏。海水鱼类淋巴器官出现的顺序依次为头肾、脾脏、胸腺,如金头鲷(*Sparus aurata* L.)^[8]、褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)^[9]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[10]、大西洋鳕(*Gadus morhua*)^[11]等。海水鱼类的胸腺原基虽然最迟出现,但迅速淋巴化,成为第一个淋巴化的器官,随后是头肾和脾脏,笔者推测导致区别的原因可能与海水鱼类孵化出膜后要经过渗透压的调节及经历变态期等因素有关,也有学者认为可能与海水鱼类免疫机制存在差别有关^[7]。

鳃孵化出膜时即观察到原肾管,随后形成头肾原基,早期的头肾中有大量的肾小管,随着机体发育,肾小管的数量明显减少,淋巴细胞数量增多,头肾由排泄器官转化为淋巴器官。到出膜后第33天,头肾中仍有少量肾小管存在,但很明显已呈退化状态,说明此时的头肾仍然具有部分排泄功能,并非完全意义上的淋巴器官;而中肾和后肾几乎全部由肾小管组成,执行排泄功能。出膜后第3天出现胸腺原基,然后胸腺迅速淋巴化,充满淋巴细胞。此外,胸腺中还观察到哈氏小体和黑色素巨噬细胞,这些都说明胸腺作为机体中枢淋巴器官功能的逐步完善。在其淋巴器官发育的过程中,鳃胸腺和头肾始终是独立的,未发现彼此细胞迁移现象。Grace和Manning^[12]报道虹鳟(*Salmo gairdneri* Richardson, 1836)的胸腺在淋巴化的同时,胸腺附近的淋巴细胞和胸腺实质内的淋巴细胞形态上非常相像;Jósefsson and Tatner^[8]也曾报道在金头鲷(*Sparus aurata* Linnaeus)头肾淋巴化的同时,胸腺和头肾之间的“cell bridge(细胞桥)”;另据Nakanishi^[13]报道对1.5月龄的褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)进行胸腺切除术后,发现头肾和脾脏淋巴细胞数量的明显减少,推测胸腺可能作为头肾和脾脏淋巴细胞的来源。鳃胸腺发育早期未发现胸腺向头肾靠拢,但是出膜后33日龄,观察到胸腺与头肾之间存在淋巴细胞,而此时的头肾和胸腺在解剖学位置上仅一层鳃腔膜之隔,其间可能存在细胞迁移,但是目前没有足够的证据说明鳃胸腺与头肾之间确实存在细胞迁移现象。

由于物种、产卵条件和孵化环境的差异,不同鱼类的胚胎发育时间和胚后淋巴器官的发育状况具有较大差异。但总的来说,鱼类淋巴器官的发育是相

当迟的,而免疫功能的完善则更迟。如 Razquin^[14]通过免疫酶标技术,发现虹鳟出膜后 4~5 天[水温 (14 ± 1) °C]在头肾中出现 IgM⁺细胞,在出膜后 30 天脾脏和胸腺才出现 IgM⁺细胞;Ellis^[15]使用荧光标记技术观察到鲑在出膜后 45 天才在淋巴器官中出现 IgM 阳性细胞。鱼类发育早期阶段用于抵抗外来病原的免疫机制除了非特异性免疫物质,如巨噬细胞、网状内皮细胞、溶菌酶、凝集素、沉淀素等,已有学者提出母源免疫的概念,即通过亲鱼将 IgM 直接垂直传递给仔鱼^[16]。如 Fuda^[16]已从大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 成熟卵母细胞中分离纯化到 IgM,它能与哺乳动物抗大麻哈鱼血清 IgM 抗体产生免疫沉淀反应。关于鳊是否存在母源免疫尚需进一步研究,笔者认为如果能够通过母源免疫来提高鳊苗免疫力,将是一个非常有意义的课题,对于育苗生产有非常重要的现实意义。

通过鳊胸腺、头肾、脾脏的个体发育过程研究发现,水温 23~25 °C 时,从孵化出膜到 30 日龄左右,各淋巴器官形态上基本发育完善。胸腺内区观察到小淋巴细胞,分区明显,接近成鱼胸腺;头肾基本完成了从排泄器官到淋巴器官的转化;脾脏毛细血管发达,组织致密。一般认为疫苗的使用必须要在淋巴器官形态和功能上都发育成熟之后,即免疫细胞能对外来抗原进行免疫应答时。疫苗的太早使用会造成鱼体对某种抗原的免疫耐受现象,因此确定免疫细胞何时具有免疫活性,以及淋巴器官发育到何时能进行疫苗使用就显得至关重要。因此笔者认为今后有必要对此进行更加深入的研究。

致谢:本实验在取样过程中得到了广东省江门市蓬江区荷塘镇荷塘鱼苗场和本实验室吴会民同学的大力支持,特此感谢!

参考文献:

- [1] Grace M F, Manning M J. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout *Salmo gairdneri* [J]. Dev Comp Immunol, 1980, 4: 255 - 264.
- [2] Botham J W, Manning M J. The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity [J]. Fish Biol, 1981, 19: 403 - 414.
- [3] Fishelson L. Cytological and morphological ontogenesis and involution of the thymus in cichlid fishes (Cichlidae, Teleostei) [J]. J Morphol, 1995, 223: 175 - 190.
- [4] Petrie-hanson L, Ainsworth A J. Ontogeny of channel catfish lymphoid organs [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2001, 81: 113 - 127.
- [5] Meng G X, An L G. Ontogeny of immune related organs during early development of carp (*Cyprinus Carpio* L.) [J]. Devel Reprod Biol, 1999, 8: 33 - 39.
- [6] 吴金英, 林浩然, 斜带石斑鱼淋巴器官个体发育的组织学 [J]. 动物学报, 2003, 49: 819 - 828.
- [7] Liu Y, Zhang S C. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16: 621 - 632.
- [8] J sefsson S, Tater M F. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3: 35 - 49.
- [9] Nakanishi T. Ontogeny of the immune system in *Sebasticus marmoratus*: histogenesis of the lymphoid organs and effect of thymectomy [J]. Environ Biol Fish, 1991, 30: 135 - 145.
- [10] Chantanachookhin C, Seikai T, Tanaka M. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish [J]. Aquaculture, 1991, 99: 143 - 155.
- [11] Schroder M B, Villena A J, Jrgensen T O. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. Dev Comp Immunol, 1998, 22 (5/6): 507 - 517.
- [12] Grace M F, Manning M J. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. [J]. Dev Comp Immunol, 1980, 4: 255 - 264.
- [13] Nakanishi T. Ontogeny of the immune system in *Sebasticus marmoratus*: Histogenesis of the lymphoid organs and effect of thymectomy [J]. Environ Biol Fish, 1991, 30: 135 - 145.
- [14] Razquin B E, Castillo A, Lopez-Fierro P, et al. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno- and enzymi-histochemical study [J]. Fish Biol, 1990, 36: 159 - 173.
- [15] Ellis A E. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*: Histogenesis of lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity [J]. Dev Immunobiol, 1977, 225 - 231.
- [16] Fuda H, Hara A, Yamazaki F, et al. A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) [J]. Dev Comp Immunol, 1992, 16: 415 - 423.

Ontogeny of lymphoid organs in mandarinfish *Siniperca chuatsi*

MA Hong^{1,2}, CHANG Ou-qin¹, SHI Cun-bin¹, PAN Hou-jun¹, WU Shu-qin¹, LI Xiang-lin³

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China; 2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 3. Agriculture Office of Hetang Town, Pengjiang District, Jiangmen 529095, China)

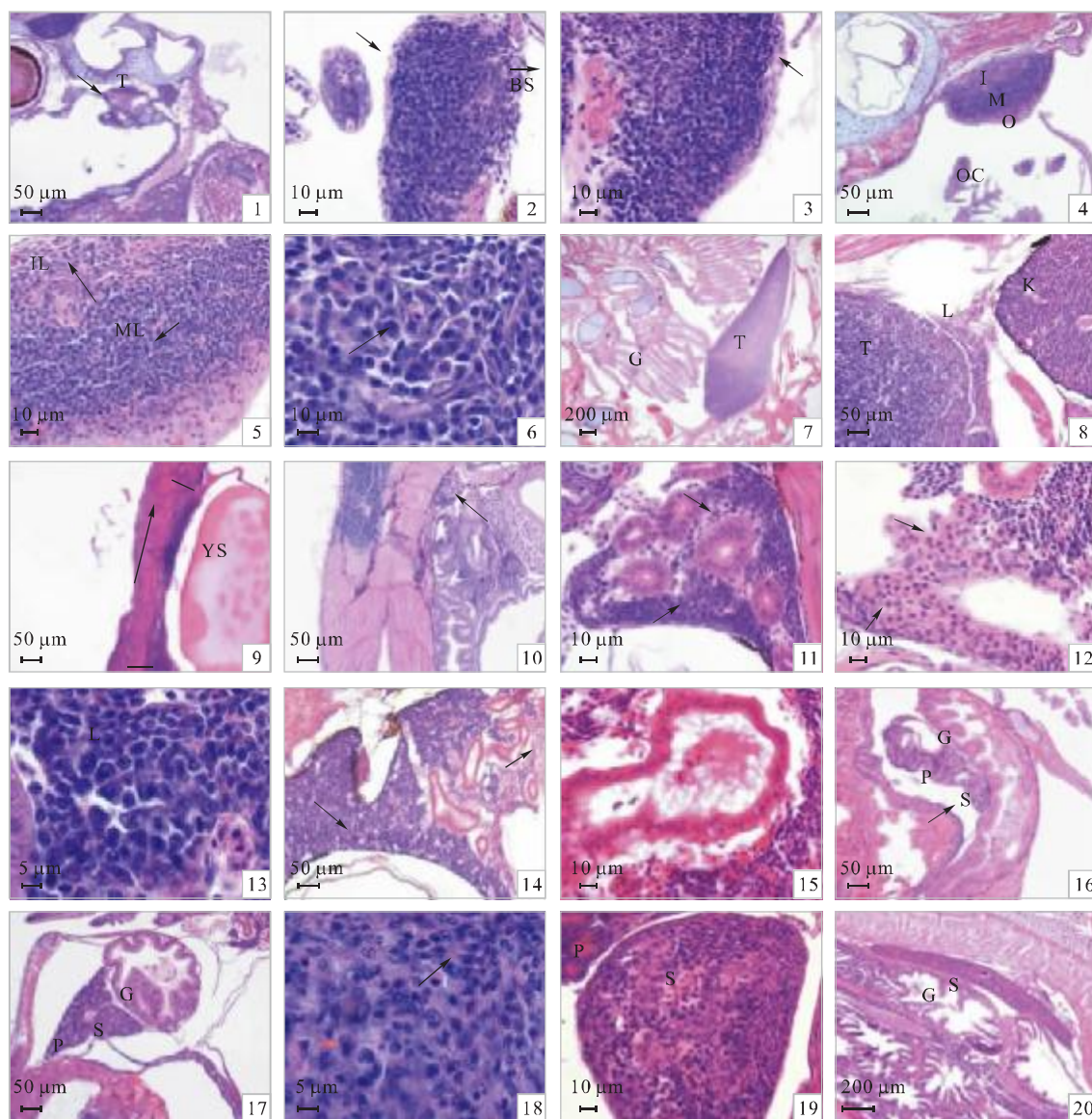
Abstract: A histological investigation for development of thymus, kidney, and spleen in mandarinfish, *Siniperca chuatsi* was made from the first day to the 33rd day after hatching. At 23–25 °C, on the fourth day after hatching, some larvae began to feed, and then switched to exterior nutrition period gradually. At the same temperature, thymus was first observed on the third day after hatching, and subsequently became lymphoid organ rapidly. It could not be made out outer zone, middle zone and inner zone clearly until the 25th day after hatching. The pronephric duct was already present just after hatching, and then the anterior part of it developed into primodium of pronephric kidney, which mainly consisted of haemopoietic stem cells and pronephric tubules. The posterior part of it developed into mesonephros and metanephros, which were mostly composed of pronephric tubules. With the development of mandarinfish, the amount of lymphocytes increased and pronephric tubules reduced, the pronephric kidney changed to immune organ from excretory organ gradually. The spleen appeared firstly on the fifth day after hatching, mainly consisted of haemopoietic cells and lymphocytes, and it became lymphoid organ slowly compared with the thymus and pronephric kidney. About 30 days after hatching, the morphology and histological structure of lymphoid organs were similar to those of the adult fish. The appearance order of lymphoid organ primordia was pronephric kidney, thymus and spleen, while these organs became lymphoid organs in the order of thymus, pronephric kidney and spleen during larval development. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (5): 756–761]

Key words: *Siniperca chuatsi*; lymphoid organs; histology; ontogeny

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com

马红等: 鳊淋巴器官的个体发育

MA Hong et al: Ontogeny of lymphoid organs in mandarinfish *Siniperca chuatsi*



图版 I 说明

1. 胸腺原基(箭头所示); 2. 胸腺上皮细胞(箭头所示), BS—背部方向(箭头所示方向); 3. 清晰的上皮细胞(箭头所示); 4. O—外区; M—中区; I—内区, OC—鳃腔; 5. IL—内区淋巴细胞, ML—中区淋巴细胞; 6. 哈氏小体样结构(箭头所示); 7. T—胸腺, G—鳃; 8. T—胸腺, K—头肾, L—淋巴细胞; 9. YS—卵黄囊, 沿着箭头走向, 两直线之间为原肾管; 10. 肾小管(箭头所示); 11. 淋巴细胞(箭头所示); 12. 肾上腺细胞(箭头所示); 13. L—分化状态的淋巴细胞(箭头所示); 14. 血细胞(箭头所示); 15. 退化状态的肾小管; 16. S—脾脏, P—胰腺, G—肠; 17. S—脾脏, P—胰腺, G—肠; 18. 排列较疏松的脾细胞; 19. P—胰腺, S—脾脏; 20. 紧贴肠系膜的脾脏, G—肠。

Explanation of Plate I

1. thymus primordium (arrow); 2. epithelium of thymus (arrow), BS—backside; 3. clear epithelium (arrow); 4. O—out zone; M—middle zone; I—inner zone, OC—opercular cavity; 5. IL—lymphocyte of inner zone, ML—lymphocyte of middle zone; 6. similar to Hassall's corpuscle (arrow); 7. T—thymus, G—gill; 8. T—thymus, K—kidney, L—lymphocyte; 9. YS—yolk sac, original nephridium is located between the two beelines, along with the arrow; 10. kidney tube (arrow); 11. lymphocyte (arrow); 12. adrenal gland cell (arrow); 13. L—lymphocyte being differentiating (arrow); 14. red blood cell (arrow); 15. degenerative kidney tube; 16. S—spleen, P—pancreas, G—gut; 17. S—spleen, P—pancreas, G—gut; 18. loose spleen cells; 19. P—pancreas, S—spleen; 20. spleen cling to mesentery, G—gut.