

军曹鱼黏膜免疫组织发育的形态学研究

苏友禄^{1,2}, 郭志勋¹, 徐力文¹, 孔小明², 于博², 王江勇¹, 冯娟¹

(1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 运用组织学及组织化学的染色方法, 对出膜后第1~44天 (days post-hatch, dph) 的军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 黏膜免疫组织的发育过程进行研究。结果显示, 白细胞在黏膜免疫组织出现的时间顺序由早到晚依次为鳃、皮肤、胃、肠, 同大量抗原接触鱼体组织时白细胞出现的时间顺序相符。军曹鱼胃固有层中丰富的白细胞说明胃可能在黏膜免疫中发挥着很大的作用。黏液细胞最早出现在胃; 其后是皮肤和肠道; 鳃最晚。在胃肠、皮肤内的黏液细胞几天后就可分泌中性至酸性黏液物质, 且分泌量随鱼体发育而增多, 但在鳃组织内, 黏液的分泌早于黏液细胞的出现。在采样的时间段里, 黏膜免疫组织未发现浆细胞, 可能是由于B细胞还没有发育成熟并具备免疫功能。从白细胞在军曹鱼黏膜组织内发育及分布的状况, 可见黏膜组织具有完成免疫应答的细胞基础。[中国水产科学, 2008, 15(4): 644~651]

关键词: 军曹鱼; 黏膜免疫组织; 发育; 组织学; 组织化学

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)04-0644-08

军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 亦称海鲷, 属于鲈形目 (Perciformes)、军曹鱼科 (Rachycentridae)、军曹鱼属, 生长在热带、亚热带海洋水域, 为暖水性鱼类, 近年来已经成为南方主要的名优海水养殖品种, 是目前海水网箱养殖中生长速度最快, 个体最大, 最有推广前景的鱼类^[1]。在人工繁育生产过程中, 早期发育的仔、稚、幼鱼的死亡率比较高, 给养殖军曹鱼的企业带来了一定的经济损失。由于海水鱼类在早期发育过程中淋巴器官通常在出膜后才陆续出现, 淋巴器官发育相对滞后, 其内淋巴细胞功能的成熟则更迟^[2], 为了弄清海水鱼类在发育过程中依赖于何种防御机制抵御外界病原微生物的入侵, 越来越多的学者投入到对鱼类黏膜免疫组织的研究。鱼类黏膜免疫组织主要包括消化道、皮肤和鳃等, 其生活在水环境中, 大面积的黏膜包括消化道、皮肤、鳃等是病原侵入鱼体的门户, 在其上皮组织中存在淋巴细胞、巨噬细胞和各类粒细胞等白细胞, 当鱼体受抗原刺激时, 巨噬细胞可以对抗原进行处理和呈递, 抗体分泌细胞会分泌特异性抗体^[3]。在消化道、皮肤和鳃内也广泛分布黏液细胞, 其分泌的黏液能防止机械损伤、保持湿润和维持渗透压, 黏液内含有溶菌酶和补体等

非特异性的物质可抑菌和杀菌^[4]。在20世纪80年代, Hart等^[5]对小点猫鲨 (*Scyliorhinus canicula* L.) 肠道相关淋巴组织的发育状况进行研究, 发现其在出膜时, 肠道黏膜固有层就出现了淋巴细胞样和巨噬细胞样细胞, 随着小点猫鲨开口摄入外源性食物后, 此两种细胞开始增多, 有的聚集在一起, 直到6个月后才观察到浆细胞。之后国内外学者没有对鱼类黏膜免疫组织的发育做进一步的报道, 大部分主要集中在对成年鱼黏膜相关免疫组织内免疫细胞的研究^[6], 如Abell等^[7]用免疫组织化学的方法对海鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 肠相关淋巴组织进行研究, 揭示了肠道的后段免疫细胞强阳性。Lin等^[8]利用鳃腔灌注和组织化学的方法从比目鱼和大西洋鲑的鳃中分离细胞, 用光镜、电镜和组织化学染色等方法对其进行研究, 发现其鳃内除了红细胞外还分布有多种具有免疫功能的细胞, 有细胞能产生和分泌一种化学趋化物质, 能引起白细胞向鳃的局部迁移, 然后白细胞则驻留在黏膜组织内。在组织形态学方面, 罗晓春等^[9]对斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 黏膜免疫组织做了详细的研究, 观察到黏膜组织中存在杯状细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜曙红细胞、嗜中性细胞等, 还

收稿日期: 2007-07-25; 修订日期: 2008-01-10.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务专项资金项目 (2007ZD10); 广东省重点项目 (2003B21502).

作者简介: 苏友禄 (1981-), 男, 研究实习员, 硕士, 主要从事渔业生物病害防治研究. E-mail: vetsyl@163.com

通讯作者: 冯娟. E-mail: juanf@21cn.com

拍摄到皮肤表皮对异物的吞噬过程。本实验主要针对免疫相关的白细胞和黏液细胞在军曹鱼的消化道、皮肤和鳃内发育及分布状况进行研究,揭示军曹鱼黏膜免疫组织发育的规律和形态学特征,以期为开发口服和浸泡疫苗提供科学的生物学基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼苗的养殖及采集

鱼苗为中国科学院大亚湾海洋生物综合实验站人工繁殖的苗种,养殖期水温 26~29 °C。样品采集从刚孵化出膜至 44 dph,其中 1~9 dph 每 3 天取样 1 次,每次 10 尾;10~44 dph,每 5 天取样 1 次,每次 10 尾;每批样测量体质量、体长后,随机取出 3 尾固定。

1.2 样品的固定及切片

1~29 dph 的军曹鱼由于鱼体较小需进行整体固定,而对 34~44 dph 的鱼苗,则将鱼解剖,分别取鳃、胃、肠和腹部皮肤固定,用中性甲醛液固定 24 h 后进行横向或纵向的 5 μ m 连续石蜡切片。切片经下述染色后,用中性树胶封片,LEICA BME 生物显微镜观察。

1.3 苏木素—伊红(Hematoxylin Eosin, HE)染色

组织切片通过 HE 染色,细胞核被染成蓝色,细胞浆被染成红色或粉红色。

1.4 天青 II—伊红染色

主要显示组织内的浆细胞,细胞核呈深蓝色,胞质深蓝至灰蓝色。

1.5 AB—PAS染色

主要显示分泌的黏液物质,中性黏液物质呈红色,酸性黏液物质呈蓝色,中性和酸性黏液的混合性物质呈紫红色。

1.6 汞—溴酚蓝染色

主要显示组织内的蛋白质,染色呈鲜蓝色。

2 结果与分析

2.1 消化道黏膜相关免疫组织发育的过程

在 6 dph,胃黏膜上皮层的柱状细胞间开始出现黏液细胞,黏膜固有层中有少量淋巴细胞(图版 I-1)。到 9 dph,黏液细胞开始分泌黏液,黏液染色呈紫红色(图版 I-2)。发育至 14 dph,黏膜上皮层中开始出现少量的白细胞,黏液细胞数量剧增(图版 I-3)。29 dph,固有层中出现成群分布的淋巴细胞,有的积聚成灶状(图版 I-4),以及少量

的黏液细胞。在 34 dph,分泌的黏液物质排列紧密,位于胃黏膜上皮的外侧(图版 I-5);发育至 44 dph,黏膜上皮内分泌物质排列更加紧密,整个上皮层 AB-PAS 染色呈蓝色。通过汞—溴酚蓝染色,对胃黏膜层、黏膜下层和肌层进行观察,可见黏膜下层的蛋白含量较低,染色较浅。

在 9 dph,肠道黏膜固有层有少量的淋巴细胞分布,但未观察到黏液细胞。发育至 14 dph,肠道黏膜开始形成皱褶,黏膜上皮内有少量的黏液细胞(图版 I-6)。至 19 dph,黏膜层发育较快,固有层里有少量的淋巴细胞和巨噬细胞分布(图版 I-7)。到 24 dph,肠黏膜上皮的黏液细胞增多,固有层内的毛细血管扩张,有红细胞、淋巴细胞和吞噬细胞分布。发育至 34 dph,肠绒毛比较发达,而且肠腺丰富,在黏膜层没有观察到 AB-PAS 染色呈阳性的物质(图版 I-8);到 39 dph,没有发现类似哺乳动物的 Payer 氏淋巴集结,但有大量的淋巴细胞分布(图版 I-9),而黏膜上皮周围有一些 AB-PAS 染色呈红色的分泌物质(图版 I-10)。发育至 44 dph,观察到肠黏膜上皮区域有类似胃黏膜层的分泌物质,AB-PAS 染色呈红色和紫红色,也有少量呈蓝色(图版 II-1)。在胃肠黏膜未见浆细胞分布。

2.2 皮肤相关免疫组织发育的过程

在 6 dph,发现表皮内有巨噬细胞和淋巴细胞(图版 II-2);至 14 dph,发现真皮层内有淋巴细胞、红细胞及一些吞噬细胞,表皮外侧有少量的黏液细胞(图版 II-3)。发育至 34 dph,观察到表皮的外侧黏液细胞逐渐增大(图版 II-4),表皮层的 AB-PAS 染色呈红色,阳性度强于真皮层及其以下的组织。至 39 dph,黏液细胞由 1 层增加为 3 层以上,腺腔逐渐增大,染色呈紫红色,而且在黏液细胞的外侧可以观察到分泌的颗粒状、染色呈紫红色的物质(图版 II-5),在黏液腺腔的下层有丰富的淋巴细胞和吞噬细胞。天青 II—伊红染色结果显示军曹鱼表皮层和真皮层都没有染色呈阳性的浆细胞。

2.3 鳃相关免疫组织发育的过程

在 3 dph,发现鳃血窦腔内有少量的巨噬样细胞,在 6 dph,观察到鳃窦腔里大部分为红细胞,仅有少量的巨噬细胞和淋巴细胞分布(图版 II-6)。发育至 24 dph,鳃窦腔血细胞增多,淋巴细胞和吞噬细胞所占比例较高(图版 II-7)。在 34 dph,发现鳃丝的顶部有 AB-PAS 染色呈紫色的颗粒状物质(图版 II-8);而到 44 dph,在鳃丝基部的血窦区

域和鳃小片的外侧有大量的 AB-PAS 染色呈紫色的颗粒状物质分布 (图版 II-9)。另外发现, 44 dph 的鳃部结构与较早阶段的有些异同, 观察到鳃小片基部和鳃小片间有腺泡状结构的黏液细胞 (图版 II-10)。在鳃部未见浆细胞分布。

2.4 白细胞和黏液细胞在黏膜相关免疫组织中分布状况

通过 HE 和几种组织化学染色, 比较白细胞和黏液细胞在黏膜相关免疫组织内的分布的相对数量, 结果见表 1 和表 2。

表 1 白细胞在军曹鱼黏膜免疫组织发育过程中的分布

Tab.1 Relative quantity of immune cells distribution in the development of mucosal immune tissues of *R.canadum*

出膜后天数 /dph Days post-hatch	分布组织 Tissue distribution			
	皮肤 Skin	鳃 Gill	胃 Stomach	肠 Intestine
3	-	+	-	-
6	+	++	+	-
9	+	++	+	+
14	+++	++++	++	+
19	++	++++	+++	++
24	++	++++	+++	+++
29	+++	++++	++++	+++
34	+++	+++	++++	+++
39	+++	+++	+++	++++
44	++	+++	+++	++++

注: 表中“-”表示未观察到此细胞; “+”表示该细胞的相对量。

Note: “-” means cells haven't been observed; the number of “+” means relative quantity of mucous cells.

表 2 黏液细胞在军曹鱼相关免疫组织发育过程中的分布

Tab.2 Relative amount of mucous cells distribution in the development of mucosal immune tissues of *R.canadum*

出膜后天数 dph Days post-hatch	分布组织 Tissue distribution			
	皮肤 Skin	鳃 Gill	胃 Stomach	肠 Intestine
3	-	-	-	-
6	-	-	++	-
9	-	-	++	-
14	+	-	+++	+
19	+	-	+++	++
24	+	-	+++	++
29	++	-	++++	+++
34	++	-	++++	+++
39	++++	-	++++	++++
44	++++	++++	++++	++++

注: 表中“-”表示未观察到此细胞; “+”表示该细胞的相对数量。

Note: “-” means cells haven't been observed; the number of “+” means relative amount of mucous cells.

3 讨论

3.1 军曹鱼黏膜组织内白细胞发育及分布规律

实验中观察到军曹鱼在 3 dph 开口摄食, 在此日龄, 最先在鳃内发现巨噬细胞样的白细胞, 3 d 后在皮肤和胃的黏膜内也发现了以淋巴细胞和巨噬细胞为主的白细胞, 9 dph 后肠道黏膜才出现少

量的淋巴细胞, 同大量抗原接触鱼体组织时白细胞出现的时间顺序相符。可见白细胞在军曹鱼黏膜组织内出现的时间要晚于 Hart 等研究的小点猫鲨^[5], 可能是种的差异的缘故。同已报道的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 一样^[10], 在胃肠道黏膜固有层内没有发现类似哺乳动物的 Payer 氏淋巴集

结,发育至 29 dph 后,发现胃肠道黏膜固有层中淋巴细胞和吞噬细胞明显增多,特别是在胃固有层内,有成群分布呈灶状的淋巴细胞,但未形成淋巴结。大多数抗原首先接触到的是黏膜组织,军曹鱼胃固有层有成群的白细胞和肠固有层内有丰富的白细胞,在摄取和呈递抗原发挥作用,因为研究发现胃肠道的上皮细胞可以通过内吞方式摄取并转移大分子抗原,转送到胃肠道固有层的巨噬细胞和血液循环系统中^[11]。大多数的学者在研究消化道黏膜组织时侧重于研究肠道,认为肠道摄取抗原的主要部位在后肠,抗体分泌细胞也主要分布在后肠固有层中^[10,12],但通过对军曹鱼肠道和胃黏膜观察比较,发现白细胞在胃黏膜内出现要早于肠黏膜,随着鱼体的发育,胃黏膜内的白细胞也丰富于肠道,本研究是从每批取样的 10 尾中随机取出 3 尾来切片观察的,而且结果一致,因此认为军曹鱼胃黏膜在黏膜免疫中应当发挥很大作用,今后还将对此继续研究。总体来看,军曹鱼鳃内的白细胞比皮肤、胃和肠道丰富。有学者在检测鳃及外周血的抗体分泌细胞时,发现鳃上的抗体分泌细胞占鳃细胞总数明显高于外周血抗体分泌细胞所占比例^[13],这可能是鳃最先与外界环境接触,抵御外来抗原和气体交换时所需要的。在发育的早期阶段,军曹鱼皮肤的表皮层和鳃血窦内有巨噬细胞分布。Moore 等^[14]通过实验证实,皮肤和鳃上的抗原颗粒主要靠巨噬细胞摄取的。所以在此阶段,当其他白细胞未出现时,巨噬细胞在抵抗外来物质侵袭中应发挥一定的作用。

3.2 军曹鱼黏膜组织内黏液细胞分布及在非特异性免疫中的作用

军曹鱼胃黏膜是最早有黏液细胞分布的组织,8 d 后,皮肤和肠道黏膜内也有黏液细胞分布,而到 44 dph,在鳃丝基部才发现黏液细胞。黏液细胞并不是在其出现时就开始分泌黏液物质,通过 AB-PAS 染色证实,胃内的黏液细胞在其出现后 3 d 后才开始分泌黏液,皮肤和肠道则更迟。在 34 dph,虽然没有发现黏液细胞,但在鳃丝的顶部确发现有酸性黏液物质分泌,可能鳃丝内此时已经存在黏液细胞,由于鳃丝结构特殊,利用显微镜没有观察到。通过比较发现,军曹鱼黏液细胞一般分布在黏膜的表层,随着鱼体发育,逐渐增多,且排列有致,分泌的黏液物质也越来越丰富。国内外有一些学者研究鱼类黏液细胞形态学时把黏液细胞分为 3 种类

型,即球状、囊状和椭圆形^[15],但另外一些学者则认为,黏液细胞的 3 种类型只是黏液细胞发育过程中不同阶段表现形态及不同阶段合成不同物质造成的^[16],在军曹鱼黏膜组织中发现的黏液细胞同样存在 3 种形态。笔者认为,存在不同的形态,应当是其不同阶段的表现。Hellio 等^[17]证实,鱼类的黏液细胞分泌的黏液具有一些酶的活性和一些广谱性的抗菌、真菌成分,并且黏液中的蛋白酶的活性在病原体的感染后有显著增强,Fast 等^[18]用虹鳟、银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 和大西洋鲑 (*Salmo salar*) 3 种鱼进行研究,证实其分泌液具有蛋白酶、碱性磷酸酶及溶菌酶的活性,能防御病原对机体的入侵。可见鱼类黏液细胞所分泌的蛋白酶、溶菌酶、酸性的糖类物质等在鱼类非特异性免疫过程中扮演重要的角色,是鱼类相当重要的防御机制之一。

3.3 军曹鱼黏膜免疫组织在特异性免疫中作用的探讨

发育到 44 dph 仍没有观察到浆细胞,可能是在此阶段浆细胞已经存在,但数量太少,不能在切片中观察到,也可能是 B 淋巴细胞此时还不具备免疫功能,不能分化增殖到浆细胞这个阶段,本实验组做了军曹鱼淋巴免疫组织的发育观察,也没有观察到浆细胞(另文待发表)。文献报道的鱼类浆细胞在黏膜组织内首次出现的时间比较晚,甚至有的鱼类到 6 个月后才出现^[5,19]。从白细胞在军曹鱼黏膜组织内发育及分布的状况,可见黏膜组织具有完成免疫应答的细胞基础。在哺乳动物,当抗原接触黏膜时,可以引起局部的免疫应答,并可分泌特异性抗体。有很多学者都想通过实验来证实鱼类是否能够在黏膜局部独立完成免疫应答,通过浸泡免疫研究时发现,抗原摄取的部位主要是皮肤和鳃,并且摄取后的抗原主要停留在局部,只有少部分转移到了头肾和脾脏^[14];还对鲢进行多子小瓜虫免疫,然后取其皮肤体外培养,发现其培养液中具有聚集、阻动及致死小瓜虫的抗体存在,而且培养液的抗体在 2~3 天抗体分泌达到高峰^[20]。对消化道黏膜组织研究时发现,浸泡免疫引起的免疫应答有时很弱,但在黏膜局部可检测到较强的免疫应答;经肠道贯注可溶性抗原后,肠道黏膜的抗体水平出现高峰的时间早于血清^[9],Press 等^[21]通过口服疫苗和肛门灌注的方法能有效地引起肠道的免疫应答,并产生有效的免疫保护。这些实验可证明黏膜

组织具有局部免疫特异性反应,如果军曹鱼的黏膜组织也能完成局部免疫应答,要关注的是黏膜组织发育到何时才具有这种功能。笔者之前也对军曹鱼淋巴器官发育进行过研究(尚未发表),发现其淋巴器官原基出现要晚于黏膜组织内的白细胞和黏液细胞,所以在早期发育阶段,当淋巴免疫器官尚未完善时,通过白细胞和黏液细胞在黏膜组织内的分布规律和特点,可研制针对黏膜免疫组织的口服和浸泡疫苗来抵抗外来物质的侵袭。

参考文献:

- [1] 苏友禄,徐力文,冯娟,等. 军曹鱼稚鱼外周血细胞及其形态学观察[J]. 南方水产,2007,3(1): 48-53.
- [2] 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(6): 819-828.
- [3] 肖克宇. 水产动物免疫与应用[M]. 北京: 科学出版社,2007: 156-157.
- [4] 安利国,孟广勋,杨桂文,等. 鲤稚幼体早期发育过程中粘液细胞的发生和变化[J]. 水生生物学报,2001,25(2): 191-194.
- [5] Hart S, Wrathmell A B, Harris J E. Ontogeny of gut-associated lymphoid tissue (GALT) in the dogfish *Scyliorhinus canicula* L.[J]. Vet Immunol Immunopathol,1986,7,12(1-4): 107-116.
- [6] Cain K D, Jones D R, Raison R L. Characterisation of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance[J]. Fish Shellfish Immunol,2000,10: 651-666.
- [7] Abelli L, Picchietti S, Romano N, et al. Immuno-histochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea-bass *Dicentrarchus labrax* [J]. Fish Shellfish Immunol,1997,7(2): 235-245.
- [8] Lin S H, Davidson G A, Secombes C J, et al. Morphological study of cells isolated from the perfused gill of dab and Atlantic salmon[J]. Fish Biol,1998,53: 560-568.
- [9] 罗晓春,李安兴,谢明权. 斜带石斑鱼粘膜免疫系统结构的研究[J]. 水生生物学报,2005,29,3: 193-198.
- [10] McMillan D N, Secombes C J. Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity [J]. Fish Shellfish Immunol,1997,7: 527-541.
- [11] Strand H K, Dalmo R A. Absorption of immunomodulating $\beta(1,3)$ -glucan in yolk sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus* (L.) [J]. Fish Dis,1997,20: 41-49.
- [12] Fournier-betz V, Quentel C, Lamour F, et al. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Fish Shellfish Immunol,2000,10: 187-202.
- [13] Davidson G A, Lin S H, Secombes C J, et al. Detection of specific and constitutive antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*) [J]. Vet Immunol Immunopathol,1997,58: 363.
- [14] Moore J D, Ototake M, Nakanishi T. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: the effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill[J]. Fish Shellfish Immunol,1998,8: 393-407.
- [15] 袁金铎,张明,王钦东,等. 淡水白鲢粘液细胞类型和分布的研究[J]. 细胞生物学杂志,1997,1: 70-72.
- [16] Sinha G M. A histochemical study of the mucous cells in the bucco-pharyngeal region of four Indian freshwater fishes in relation to their origin, development, cureance and probable functions[J]. Acta Histochem Bd,1975,53: 217-233.
- [17] Hellio C, Pons A M, Beaupoil C, et al. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus[J]. Antimicrob Ag,2002,20: 214-219.
- [18] Fast M D, Sims D E, Burka J F, et al. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and atlantic salmon [J]. Comp Biochem phys A,2002,132: 645-657.
- [19] Rombout J H W M, Huttenhuis H B T, Picchietti S, et al. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes [J]. Fish Shellfish Immunol,2005,19: 441-455.
- [20] Fournier-betz V, Quentel C, Lamour F, et al. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Fish Shellfish Immunol,2000,10: 187-202.
- [21] Press C M, Evensen O. The morphology of the immune system in teleost fishes[J]. Fish Shellfish Immunol,1999,9: 309-318.

Morphological studies on development of mucosal immune tissues in cobia *Rachycentron canadum*

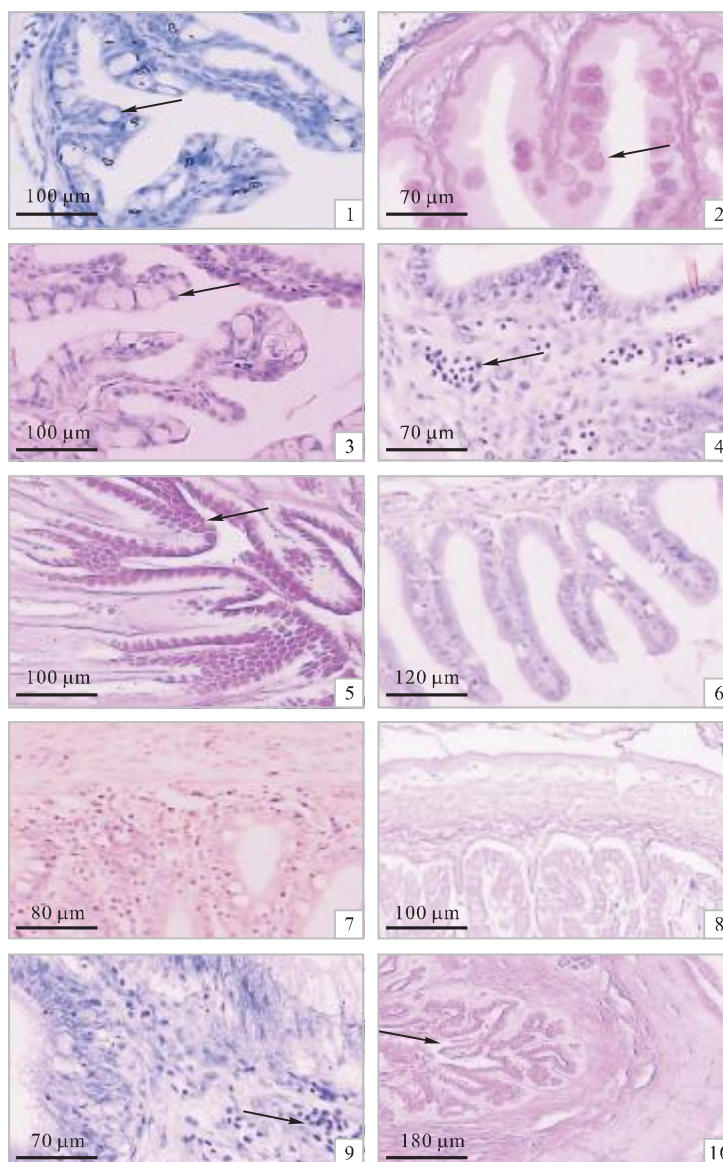
SU You-lu^{1,2}, GUO Zhi-xun¹, XU Li-wen¹, KONG Xiao-ming², YU Bo², WANG Jiang-yong¹, FENG Juan¹

(1.South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. School of Veterinary Medicine, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Methods of histology and histochemistry were applied to study the development of the mucosal immune tissues in cobia (*Rachycentron canadum*), from the first to the 44th day post-hatchery (dph). The results showed that the leucocytes appeared in mucosal immune tissues in the order of gill, skin, stomach and intestine. At 3rd dph, macrophage-like cells were first detected in the base of gill filament and lamella, and 3 days later, macrophages or lymphocytes appeared in the lamina propria of stomach and the epidermis dermis of skin. However, only a few lymphocytes were found in the lamina propria of intestines after 9th dph. When the fish were exposed to a great deal of antigen, the leucocytes appeared in the mucosal immune tissues followed the same time order as above. Abundant leucocytes distribution in gastric lamina propria suggested stomach play an important role in mucosal immunity just like intestines. The mucous cells were first observed in stomach at 6th dph, but they were not observed in skin and intestines until 8 days later, and the gill was the last mucosal immune tissues where mucous cells appeared. In addition, a large number of mucous cells like gland on the base of gill lamella were observed at 44th dph. It was proved by AB-PAS staining that mucous cells in stomach began to secrete mucus 3 days later than those cells appeared. Similarly, the mucus was secreted much later in skin and intestines. Unlike stomach, skin and intestines, the mucus had been secreted before the mucous cells appeared in gill lamell. The neutral or acidic mucus was detected on the base of gill lamell at 34th dph, but the mucous cells were not found then. The quantity of mucus increased gradually with the development of the fish. Plasma cells were not observed in mucosal immune tissues among the samples we collected. Although B lymphocytes were not mature, the mucosal tissues had possibly acquired immunity. It was suggested that the mucosal tissues possess the cell base of immune response according to the development of leucocytes distribution in them. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (4): 644-651]

Key words: *Rachycentron canadum*; mucosal immune tissues; development; histology; histochemistry

Corresponding author: FENG Juan. E-mail: juanf@21cn.com

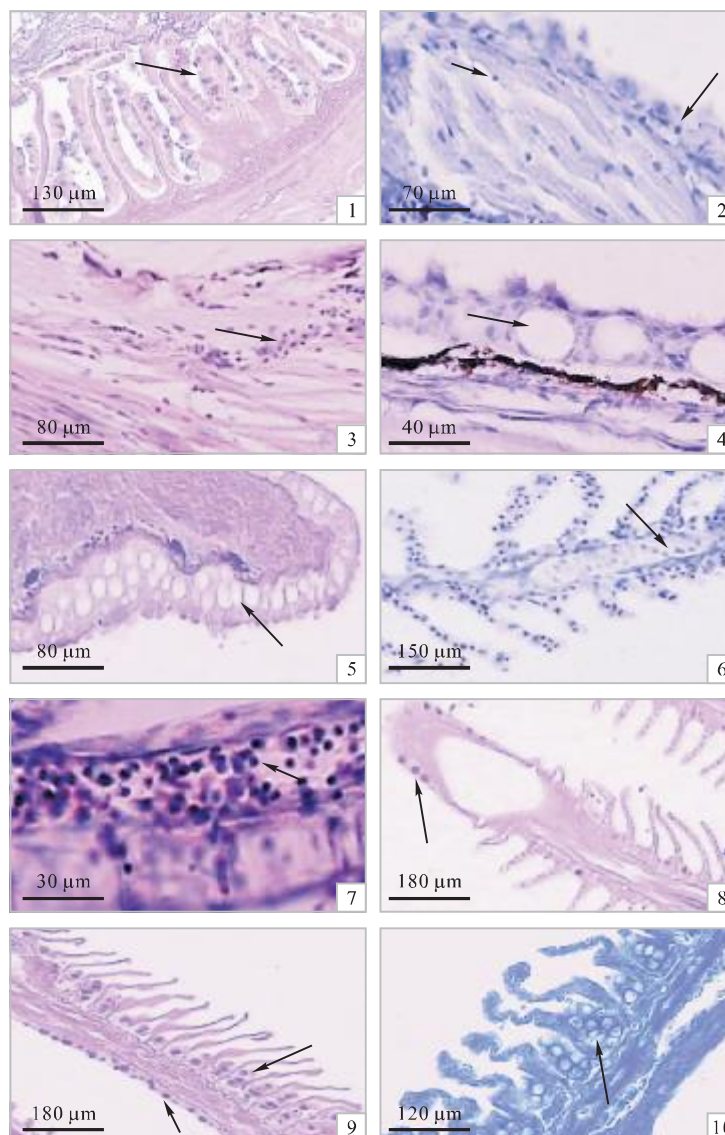


图版 I

1. 第 6 天的胃, 箭头示黏液细胞, HE, $\times 200$; 2. 第 9 天的胃, 箭头示染色呈紫红色的分泌物, AB-PAS 染色, $\times 400$; 3. 第 14 天的胃, 箭头示黏液细胞, HE, $\times 200$; 4. 第 29 天的胃, 箭头示成群分布的淋巴细胞, HE, $\times 400$; 5. 第 34 天的胃, 箭头示染色呈紧密排列的黏液物质, AB-PAS, $\times 200$; 6. 第 14 天的肠, 肠道形成皱褶, 少量的黏液细胞, HE, $\times 200$; 7. 第 19 天的肠, 固有层里的淋巴细胞和巨噬细胞, HE, $\times 400$; 8. 第 34 天的肠, 染色呈阴性, AB-PAS, $\times 200$; 9. 第 39 天的肠, 箭头示固有层内的白细胞, HE, $\times 400$; 10. 第 39 天的肠, 箭头示肠黏膜上皮的黏液物质, AB-PAS, $\times 100$.

Plate I

1. Stomach 6 dph, showing mucous cells (arrow), HE, $\times 200$; 2. Stomach 9 dph, showing mauve secretion (arrow), AB-PAS staining, $\times 400$; 3. Stomach 14 dph, showing mucous cells (arrow), HE, $\times 200$; 4. Stomach 29 dph, more lymphocytes, HE, $\times 400$; 5. Stomach 34 dph, showing more mauve secretion, AB-PAS staining, $\times 200$; 6. Intestine 14 dph, showing fold in intestinal lamina and few mucous cells, HE, $\times 200$; 7. Intestine 19 dph, few lymphocytes and macrophages in lamina propria, HE, $\times 400$; 8. Intestine 34 dph, showing negative staining, AB-PAS staining, $\times 200$; 9. Intestine 39 dph, leucocytes in lamina propria (arrow), HE, $\times 400$; 10. Intestine 39 dph, showing secretion in lamina epithelialis (arrow), AB-PAS staining, $\times 100$.



图版 II

1. 第 44 天的肠, 箭头示染色呈红色和紫红色的黏液物质, AB-PAS, $\times 200$; 2. 第 6 天的皮肤, 短箭头示淋巴细胞, 长箭头示巨噬细胞, HE, $\times 400$; 3. 第 14 天的皮肤, 箭头示真皮层内的白细胞, HE, $\times 400$; 4. 第 34 天的皮肤, 箭头示黏液细胞, HE, $\times 400$; 5. 第 34 天的皮肤, 箭头示腺体外侧染色呈紫红色, AB-PAS, $\times 200$; 6. 第 6 天的鳃, 箭头示鳃血窦内的吞噬细胞, HE, $\times 200$; 7. 第 24 天的鳃, 示鳃血窦内红细胞、淋巴细胞和巨噬细胞, HE, $\times 400$; 8. 第 34 天的鳃, 箭头示鳃丝顶部有紫色的黏液物质, AB-PAS, $\times 100$; 9. 第 44 天的鳃, 短箭头示鳃丝基部的紫色黏液物质, 长箭头示鳃小片基部外侧紫色黏液物质, AB-PAS, $\times 100$; 10. 第 44 天的鳃, 箭头示鳃小片基部外侧的腺泡状结构; 汞-溴酚蓝染色, $\times 100$.

Plate II

1. Intestine 44 dph, showing red and mauve secretion, AB-PAS staining, $\times 200$; 2. Skin 6 dph, showing lymphocytes (short arrow), macrophages (long arrow), HE, $\times 400$; 3. Skin 14 dph, showing leucocytes in dermis (arrow), HE, $\times 400$; 4. Skin 34 dph, showing mucous gland (arrow), HE, $\times 400$; 5. Skin 34 dph, showing mauve staining out of mucous gland (arrow), AB-PAS staining, $\times 200$; 6. Gill 6 dph, phagocytes in gill sinusoid (arrow), HE, $\times 200$; 7. Gill 24 dph, erythropoietic cells, lymphocytes and macrophages in gill sinusoid, HE, $\times 400$; 8. Gill 34 dph, purple secretion on the top of gill filament (arrow), AB-PAS staining, $\times 100$; 9. Gill 44 dph, purple secretion on the base of gill filament (short arrow), purple secretion on the base of gill lamella (long arrow), AB-PAS staining, $\times 100$; 10. Gill 44 dph, mucous gland on the base of gill lamella (arrow), Hg-Bromophenol Blue staining, $\times 100$.