

胡子鲇肥大细胞的组织化学及形态学

杨筱珍, 高登慧, 许乐仁

(贵州大学 生物技术学院, 动物医学系, 贵州 贵阳 550025)

摘要:以成年胡子鲇(*Claris fuscus lacepede*, 体重 1.5 kg)为研究材料, 通过组织化学与形态学研究证实, 肥大细胞在胡子鲇肠粘膜与粘膜下数量较多, 在头肾和胸腺中也有少量分布, 并有沿血管周分布的倾向。肥大细胞以 Carnoy 氏固定、AB/SO 染色效果最好。以 AB/SO 着色的肥大细胞胞质颗粒呈深蓝色, 胞核呈淡褐色; 以 TB/SO 着色的肥大细胞胞质颗粒呈紫红色, 胞核呈淡红色。而中性缓冲福尔马林固定对肥大细胞的着色有一定阻断作用。一些曾被国外学者用于鉴定硬骨鱼肥大细胞(或嗜酸性粒细胞)的组织化学技术在本研究中未能鉴定出胡子鲇的肥大细胞。电镜观察证实, 胡子鲇肥大细胞中含有大量特征性的胞浆颗粒, 胞浆颗粒基质电子密度较均匀, 个别颗粒中央呈空泡样。

关键词:肥大细胞; 组织化学; 形态学; 胡子鲇

中图分类号: S965.128; Q24

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2003)02-0106-05

肥大细胞广泛存在于哺乳动物、人类及家禽的多种组织中, 多分布于皮肤、粘膜及结缔组织中并与血管和外周神经有着密切的关系^[1-4]。在多种动物的胸腺髓质中也见有大量的肥大细胞^[2-4]。其特征性的胞浆颗粒中含有生物胺、蛋白多糖及中性蛋白酶等多种生物活性物质。肥大细胞通过脱颗粒释放上述生物活性物质而对动物的抗病能力发挥重要作用。根据其组织化学、形态学及其分布的明显差异, 某些哺乳动物的肥大细胞被区分为所谓粘膜肥大细胞(mucosal mast cell, MMC)与结缔组织肥大细胞(connective tissue mast cell, CTMC)^[1]。肥大细胞的基础生物学研究已引起免疫学家们的广泛关注。

20 世纪 20 年代起, 国外的一些研究者就证实了某些硬骨鱼的组织中肥大细胞的存在, 之后, 不同的研究者采用不同的组织化学技术, 在多种硬骨鱼的不同组织中鉴定出肥大细胞^[5-12]。但硬骨鱼肥大细胞有些类似于哺乳动物的粘膜肥大细胞

(MMC), 对某些固定液(如福尔马林)比较敏感, 对染料及染色条件有较大的选择性且染色效果不很稳定^[7-10]。一些研究者注意到硬骨鱼肥大细胞胞浆颗粒的“嗜酸性”性质, 特别是可被伊红着色呈红色, 因此有人使用“嗜酸性粒细胞”(eosinophilic granule cell, EGC)或肥大细胞/嗜酸性粒细胞(MC/EGC)来命名那些在形态学和某些组化性质上与肥大细胞相似, 而 HE 染色时呈红染颗粒的细胞^[8-10]。因此同一细胞有几种命名, 肥大细胞(MC, EGC, 或 MC/EGC)常同时或分别出现在不同的研究报告中^[5-10]。硬骨鱼种类繁多, 种间的肥大细胞差异性也毋庸置疑^[10]。

胡子鲇(*Claris fuscus lacepede*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鲇形目(Siuriformes), 胡子鲇科(Clariidae), 是我国重要的淡水养殖鱼类之一。国内外文献尚未见有关胡子鲇肥大细胞(或 EGC)的报道。本研究采用本实验室前期在哺乳动物和禽类肥大细胞研究中采用过的实验技术^[2-4]及组织化学^[5-10]与形态学技术, 对胡子鲇肥大细胞进行初步研究, 旨在为硬骨鱼肥大细胞的研究提供基础生物学依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与处理

收稿日期: 2002-07-18.

基金项目: 国家自然科学基金(30060065).

作者简介: 杨筱珍(1977-), 女, 硕士, 主要从事动物细胞生物学研究

工作. E-mail: zhy2358@sohu.com

通讯作者: 许乐仁, Tel: 0851-6810042, 0851-6838047.

E-mail: xuleren@yahoo.com

市售健康成年胡子鲶8尾(体重1.5 kg),断尾处死后,立即取胸腺、头肾、脾及各段肠,修切至1 cm³,分别固定于Carnoy氏液(60%乙醇,30%氯仿和10%冰醋酸)、Bouin氏液、MFAA(甲醇:甲醛:醋酸=85:10:5)、10%中性福尔马林(NBF)及80%乙醇,石蜡包埋,6 μm连续切片,供组织化学染色。

1.2 组织化学染色

阿尔新兰染色藏红O复染法(AB/SO):甲苯胺兰染色藏红O复染法(TB/SO):按许乐仁等^[2]的方法进行。80%乙醇硫堇染色法:按Reite^[8]的方法进行。苏木素伊红(HE)染色法:按常规HE染色法进行。Wright氏染色法:按戴惠娟^[13]的方法进行。

1.3 透射电镜技术

组织块修切至的1 mm³,先后经3%戊二醛和1%锇酸固定,丙酮系列脱水,环氧树脂618包埋,瑞士产LKB-5型超薄切片机切片,硝酸铅和醋酸铅染色,日本产JEOL-2000EX透射电镜观察。

2 结果

2.1 组织化学

采用Carnoy氏或NBF固定,AB/SO或TB/SO染色均能不同程度地显示胡子鲶的肥大细胞。但Carnoy氏固定AB/SO染色的效果最好。而NBF固定,TB/SO或AB/SO染色时,胡子鲶的肥大细胞虽然也可呈阳性反应,但肥大细胞染色较Carnoy氏液固定的淡染且着染的细胞数量较少(表1)。其染色性质在某些方面类似于哺乳动物的粘膜肥大细胞^[1-2]。AB/SO着染的肥大细胞胞质颗粒呈深蓝色,胞核呈淡褐色(图1~4),TB/SO着染的肥大细胞胞质颗粒呈紫红色,胞核则呈淡红色。

表1 不同的固定和染色时胡子鲶肥大细胞的着染力
Table 1 Stainability of cat fish mast cells in different fixation and stainings

试液 Solution	TB/SO	AB/SO
Carnoy氏液	+	++
NBF	-~+	+

着染程度:“-”不被着染,“+”着染力弱,“++”着染力中等。

Staining density:“-”negative,“+”weak staining,“++”medium staining.

在胡子鲶肠粘膜的固有膜与粘膜下,结缔组织及肌层中可见数量较多肥大细胞(图版I-1~2),头肾和胸腺的实质中也有少量分布(图版I-3~4),肥大细胞有沿血管周分布的倾向(图版I-2~

3)。

采用国外研究者常用于硬骨鱼肥大细胞染色的组织化学技术(如MFAA固定、AB/SO染色;Bouin氏液固定,AB/SO染色;80%乙醇固定,80%乙醇硫堇染色以及在不同固定条件下采用HE染色)^[5-10],在所检的胡子鲶组织中均未能鉴定出肥大细胞。

2.2 形态学

在低倍镜下观察,胡子鲶肥大细胞形态多呈椭圆形、圆形,在肠肌层呈梭形或长梭形,胞质中充满大量异染颗粒,胞核不明显(图版I-1~4)。

在透射电镜下,胡子鲶肥大细胞中含有大量特征性胞浆颗粒,呈圆形、椭圆形或短梭形,体积较大,外包有单位膜。胞浆颗粒基质电子密度较均匀,未见特殊的亚微结构(图版I-5~6)。少数颗粒中央呈空泡样(图版I-6)。此外胞质中还有少量的内质网和线粒体等细胞器。

3 讨论

本研究通过组织化学技术(Carnoy氏液固定,AB/SO染色)及透射电镜技术,首次在胡子鲶的肠道以及胸腺、头肾中观察到肥大细胞的存在。与国外一些学者在硬骨鱼肥大细胞研究上相似的是,胡子鲶肥大细胞的组织化学性质在某些方面也类似于哺乳动物的粘膜肥大细胞(MMC)^[7-10]。Carnoy氏液固定、AB/SO染色可较好地显示胡子鲶肥大细胞,而NBF固定时,对胡子鲶肥大细胞着染有一定阻断作用。AB/SO染色的效果较TB/SO好。在本实验室过去10余年的工作中,曾反复地证实Carnoy氏液固定、AB/SO染色是鉴定多种哺乳动物和禽类肥大细胞质量的组织化学技术,它可使多种动物的肥大细胞都得到良好的固定和染色,且AB/SO的染色效果一般优于TB/SO。而NBF固定却不同程度地阻断多种动物的肥大细胞,特别是MMC对碱性染料的着染力^[2-4]。本研究证实,该染色技术同样适用于胡子鲶肥大细胞的鉴定。

Michels^[5]采用乙醇固定、乙醇硫堇染色在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和白鲈(*Leuciscus* sp)的鳃和肠系膜铺片中证实肥大细胞的存在。Romieu^[6]采用Bouin氏液固定,甲苯胺兰染色在太阳鱼(*Orthogoriscus mola*)的结缔组织中鉴定出肥大细胞。Reite^[7]采用大鼠肥大细胞的经典染色技术(MFAA固定,甲苯胺兰或阿尔新兰染色)在狗鱼(*Esox lucin*)

的肠道中也证实大量肥大细胞的存在。当采用 HE 染色时,这些细胞可被染色为红色。因此,硬骨鱼的肥大细胞获得了 EGC 或 MC/EGC 的名称^[8-10]。在本研究中,反复使用上述组织化学技术试图使胡子鲇肥大细胞(或 EGC)着染,但均未获得成功。因此可说明在硬骨鱼的不同种类之间,肥大细胞的组织化学可能存在着一定的差异,或者说硬骨鱼的肥大细胞的染色性质很不稳定,采用不同的组织化学技术进行染色条件的摸索,仍是必要的。

在透射电镜的观察中,胡子鲇肥大细胞与许多硬骨鱼肥大细胞超微结构的形态相似,其中含有大量特征性的胞浆颗粒,但胞浆颗粒基质电子密度较均匀,空洞样胞浆颗粒可能与肥大细胞的脱颗粒有关^[11,10]。

与许多哺乳动物和禽类肥大细胞相似的是,胡子鲇的肥大细胞也有沿血管周分布的特点。这一发现说明硬骨鱼的肥大细胞如哺乳动物肥大细胞一样与血管有着密切的关系。它们有可能是从血管内向血管外迁移^[12]或是参与血管反应^[1,10]。

肥大细胞胞浆颗粒中所含的生物活性物质的组分及其变化,是肥大细胞组织化学、形态学表型及功能表达的基础。对人类及啮齿动物肥大细胞的生化介质及其意义已有比较深入全面的研究^[1]。有关硬骨鱼肥大细胞生化介质的研究还十分薄弱^[10]。虽然人类及啮齿动物肥大细胞的起源已有比较一致的认识^[1],但有关硬骨鱼等低等脊椎动物的肥大细胞的分化、发育及成熟过程却有待阐明^[10]。进一步的研究将有助于阐明硬骨鱼肥大细胞及其在鱼类健康与疾病中的生物学与病理生物学意义。

参考文献:

- [1] Irani A A, Schwartz L B. Mast cell heterogeneity [J]. Clin Exp Allergy, 1989, 19: 143 - 155.
- [2] Xu L R, Carr M M, Bland A P, et al. Histochemistry and morphology of porcine mast cells [J]. Histochem J, 1993, 25: 516 - 522.
- [3] Xu L R, Ou D Y, Gao D H. Histochemistry and morphology of mast cells of primary lymphoid organs in chicken [J]. Chin J Histochem Cytochem, 2001, 10: 449 - 455.
- [4] 江 萍, 许乐仁. 六种动物含类胰蛋白酶肥大细胞的酶组化分析[J]. 畜牧兽医学报, 1997, 28: 416 - 421.
- [5] Michels N A. The mast cells in the lower vertebrates [J]. Cellule, 1923, 33: 338 - 462.
- [6] Romieu M. Contribution à l'étude des mastocytes des poissons osseux [A]. Société de Biologie [C]. Paris: Comptes Rendus, 1924, 91: 655 - 657.
- [7] Reite O B. The mast cells nature of granular cells in the digestive tract of the pike, *Esox lucius*; similarity to mammalian mucosal mast cells and globule leucocytes [J]. Fish Shellfish Immun, 1996, 6: 363 - 369.
- [8] Reite O B. Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids; staining properties and responses to noxious agents [J]. Fish Shellfish Immun, 1997, 7: 567 - 584.
- [9] Roberts R J, Young H, Milne J A. Study on the skin of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) 1. The structure and ultrastructure of normal plaice skin [J]. J Fish Biol, 1971, 4: 87 - 98.
- [10] Reite O B. Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish, a review focusing on staining properties and functional responses [J]. Fish Shellfish Immun, 1998, 8: 489 - 513.
- [11] Bielec E, Bigai J, Chadzinska M, et al. Depletion of head kidney neutrophils and cells with basophilic granules during peritoneal inflammation in the goldfish, *Carassius auratus* [J]. Folia Biol, 2000, 47: 33 - 42.
- [12] Powell M D, Wright G M, Burka J F. Eosinophilic granule cells in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: evidence of migration? [J]. J Fish Biol, 1990, 37: 495 - 497.
- [13] 戴惠娟. 显示肥大细胞的一种简易染色法[J]. 动物学杂志, 1989, 24: 38.
- [1] Irani A A, Schwartz L B. Mast cell heterogeneity [J]. Clin Exp

Histochemistry and morphology of mast cells in cat fish *Claris fuscus lacepede*

YANG Xiao-zhen, GAO Deng-hui, XU Le-ren

(Department of Animal Medicine, College of Biotechnology, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Mast cells were firstly identified in the tissues of cat fish (*Claris fuscus lacepede*) histochemically and morphologically. Numerous mast cells can be found in the mucosa and submucosa of the intestine and a few in the thymus and the head kidney of cat fish, and the mast cell intends to adjacent to blood vessels. It seems that the staining properties of the mast cells in cat fish are similar to the mucosal mast cells in mammals in some aspects. Carnoy's fluid and Alcian blue are good fixative and excellent dye for the mast cells, but fixation in neutral buffered formalin (NBF) was unsatisfactory. Some other histochemical methods previously used by researchers to detect mast cells (EGC) in teleostean fish are failed to identify the mast cells in cat fish in this study. Under electron microscopy, the mast cells in cat fish contain characteristic cytogranules and the electron density of the matrix in the granules is homogenous, but in a few granules a hole-like substructure can be seen occasionally.

Key words: mast cell; histochemistry; morphology; *Claris fuscus lacepede*

Corresponding author: XU Le-ren. E-mail: xuleren@yahoo.com

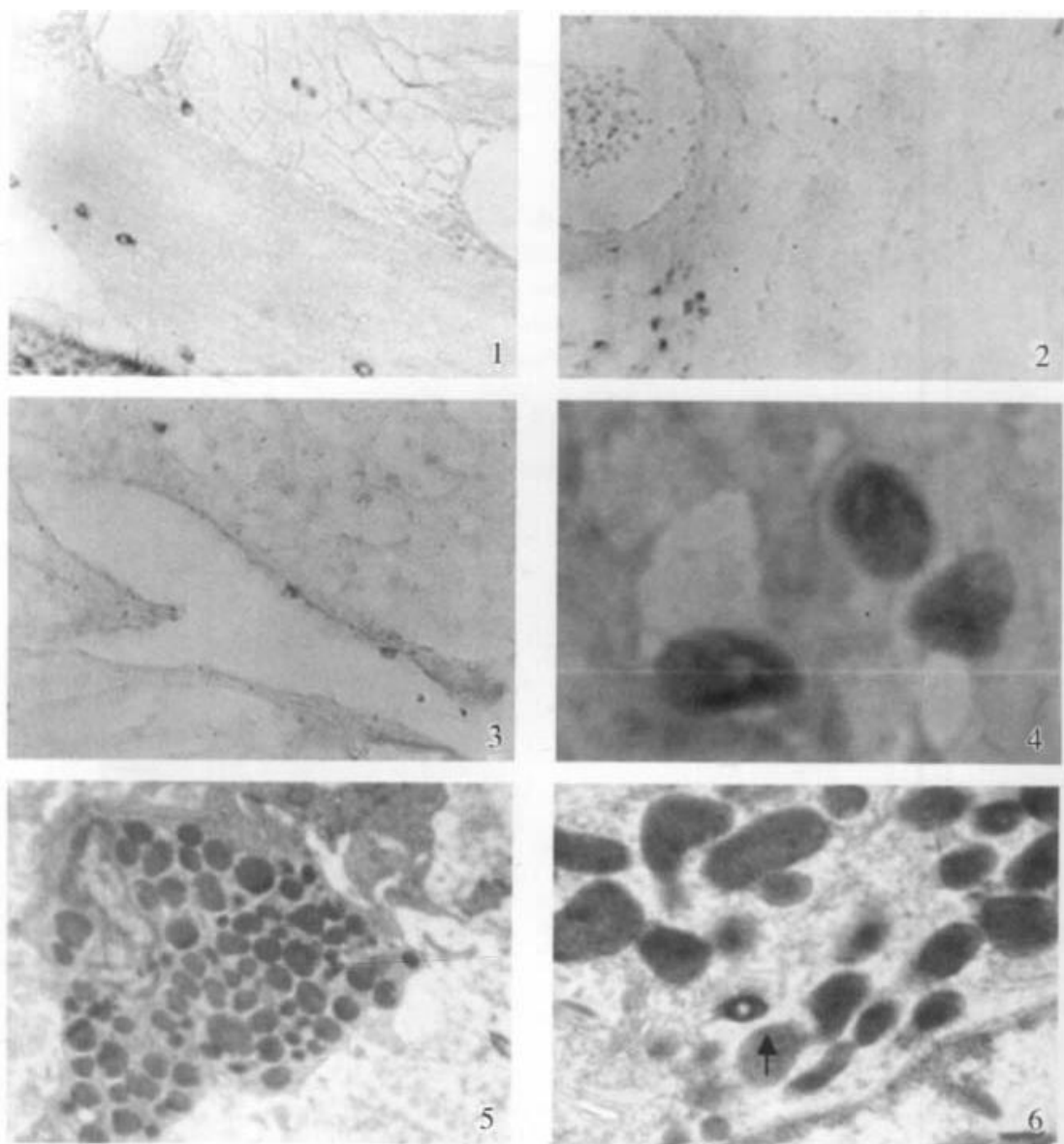
图版 I 说明

1. 胡子鲇肠中的肥大细胞。
石蜡切片, Carnoy 氏液固定, AB/SO 染色, $\times 400$ 。
2. 胡子鲇肠浆膜层血管周肥大细胞。
石蜡切片, Carnoy 氏液固定, AB/SO 染色, $\times 400$ 。
3. 胡子鲇头肾实质中的肥大细胞。
石蜡切片, Carnoy 氏液固定, AB/SO 染色, $\times 400$ 。
4. 胡子鲇头肾实质的肥大细胞。
石蜡切片, Carnoy 氏液固定, AB/SO 染色, $\times 1\ 000$ 。
5. 胡子鲇头肾实质中的一个肥大细胞的透射电镜图。 $\times 13\ 000$ 。
6. 胡子鲇头肾实质中一个肥大细胞中的一个空洞样胞浆颗粒(↑)。
 $\times 90\ 000$ 。

Explanation for Plate I

1. Mast cells in the gut of cat fish. Paraffin section of carnoy-fixed tissue, stained with AB-SO. $\times 400$.
2. Numerous mast cells adjacent to a blood vessel in serosa of the gut of cat fish. Paraffin section of carnoy-fixed tissue, stained with AB/SO. $\times 400$.
3. Mast cells in the parenchyma of the head kidney of cat fish. Paraffin section of carnoy-fixed tissue, stained with AB/SO. $\times 400$.
4. Mast cells in the parenchyma of the head kidney of cat fish. Paraffin section of carnoy-fixed tissue, stained with AB/SO. $\times 1\ 000$.
5. Transmission electron micrograph of a mast cell in the parenchyma of head kidney. $\times 13\ 000$.
6. Transmission electron micrograph of a hole-like cytogranules of a mast cell in the parenchyma of head kidney(↑). $\times 90\ 000$.

杨筱珍等:胡子鲶肥大细胞的组织化学及形态学
YANG Xiao-zhen et al; Histochemistry and morphology of mast cells in cat fish *Claris fuscus lacepede*



图版 I Plate I