

鲇鱼 (*Silurus asotus*) 头肾中含色素的巨噬细胞集结的发生

钟明超

(中山大学生物系, 广州, 510275)

摘 要 以实验诱导方法研究了鲇鱼头肾中含色素的巨噬细胞集结 (PMA) 的发生。结果表明鲇鱼头肾中巨噬细胞 (mΦ) 存在不均一性, 含色素的巨噬细胞 (PM) 是由网状/纤维状 mΦ 经过梭状 mΦ、圆形红色 mΦ 和圆形黄红色 mΦ 等中间阶段发育而来的, 实际上是一种已丧失吞噬功能的衰老 mΦ, PMA 是由 PM 形成的细胞集结, PMA 的形成与 PM 的数量紧密相关。并对 PMA 的功能进行了讨论, 认为 PMA 的发生是许多 mΦ 高度活动的结果, 它本身不具备从血液循环中清除异物和清除组织降解代谢产物的功能, 也不是生发中心的类似物, 但它可以作为反映水污染和鱼体健康状况的指示物。

关键词 鲇, 含色素的巨噬细胞集结, 发生

在鱼类淋巴髓样组织普遍存在着含色素的巨噬细胞 (PM), 且多聚集呈小结状, 即含色素的巨噬细胞集结 (pigmented macrophage aggregate, PMA)。目前的研究表明, 疾病^[9,12]、饥饿^[2]、水污染^[3,14]均可使 PMA 的大小和数量增加, 年龄^[3,4]和物种^[2,15]差异也可引起 PMA 大小和数量的变化。

以往的许多研究者认为 PMA 具有从血液中清除可溶性和颗粒状物质^[2,12]、贮存铁供红细胞发生时再利用、清除组织降解代谢产物^[2,9]和加工提呈抗原^[2,5,9]等功能, 并认为它是鱼类淋巴细胞原始的生发中心。然而, 关于 PMA 的功能近来出现了不同意见^[11]。关于 PMA 发育的资料则极少, 仅见于 Agius^[1]对硬头鳟 *Salmo gairdneri* 和罗非鱼 *Tilapia zilli* PMA 个体发育的简要描述和 Vogelbein 等对拟鲤 *Rivulus marmoratus* 肝中 PMA 诱导发生的简要描述^[12]。

PMA 应归属于单核吞噬细胞系统, 近来有证据表明鱼类淋巴样组织中同样存在 MΦ 的不均一性^[8]。哺乳动物普遍存在 mΦ 的不均一性应是同一细胞系的细胞处于不同成熟阶段或功能状态的结果^[13]。然而, 以往的许多研究都忽略了 PMA 与其它 mΦ 可能的潜在联系。鉴于上述背景, 作者以鲇鱼为材料, 系统地研究了头肾中 PMA 的诱导发生过程, 并特别注意分析它与其它 mΦ 的关系。

材 料 与 方 法

鲇成鱼购自济南鱼市, 体重 120~250g, 暂养于实验室, 实验过程中不喂食, 水温

16–22℃。20日龄幼鱼为人工繁殖、饲养的幼鱼，在实验过程中一直投喂充足的适口饵料。将成鱼暂养数小时或1~2天即取材，作为正常对照；另将部分成鱼分别饥饿14、28天后取材，作为饥饿对照。

实验组成鱼分别从腹腔注射不同剂量的牛血清白蛋白（BSA）或中华牌墨汁以刺激mφ活动。注射BSA的成鱼设400和1200mg/尾两个组，注射墨汁的成鱼分5.5、45和228mg（干物质）/尾3个组。各组均在注射2、7、14天后各取2–3尾取材。对出膜第20天的幼鱼以20%BSA作连续多次腹腔注射，每3日一次，其注射量以幼鱼腹腔所能容纳的液量为限，共注射10次。在第1、2、4、6、8次注射2天后以及第10次注射2、7、14和28天后分别取材固定，取材时幼鱼的累积BSA剂量见表3。

对照成鱼、注射BSA的成、幼鱼，材料以中性F–Ca固定液在4℃固定24小时，低温石蜡包埋。一部分切片作常规HE染色以检查PMA；另一部分作α–萘戊酯酶染色以显示mφ^[6]。注射墨汁的成鱼，头肾以Bouin液固定，常规制片、HE染色，部分切片染色前以20%过氧化氢处理24小时，以除去头肾内色素细胞和PM内的色素，便于鉴别吞噬有碳粒的mφ。

注射墨汁14日后的成鱼，统计了头肾中饱含碳粒的圆形mφ的数量。对照成鱼，注射BSA的成、幼鱼，则以酯酶染色的切片统计了各种圆形mφ的总数量。计数时随机取10个切面，每个切面随机取1mm²的面积计数，并计算其均值和标准误。

结 果

应用α–萘戊酯酶染色并结合HE染色，可将头肾中的mφ分为5种类型：（1）网状/纤维状mφ，有细长的突起呈网状，或向两端延长呈纤维状，酯酶染色呈较浅的红色；（2）梭状mφ，细胞较小略呈梭状，长径4–6μm，酯酶染色较网状/纤维状mφ深；（3）圆形的红色mφ，细胞较大，胞内有吞噬的颗粒状物，无脂色素，胞质被伊红染为深红色，酯酶染色呈深红色；（4）圆形黄红色mφ，胞质已出现脂色素但尚可被伊红染色而呈黄红色，酯酶阳性反应更强，呈暗红色；（5）PM，胞内有大量脂色素等色素，不被伊红染色而呈黄色，酯酶染色呈暗红色。

正常对照成鱼，PM数量较少，或弥散分布于淋巴样细胞中，或形成由数个PM形成的小PMA。圆形mφ的总数量也较低（表1）。饥饿14和28天后，PMA和圆形mφ的总数量均未出现明显变化（表1），但在HE染色的切片中，圆形红色mφ数量增多而较易观察到。

注射400mg BSA2天后，m和PMA的分布与对照相似。注射7天后，纤维状mφ、梭状mφ和圆形红色mφ的数量增加，但PMA无明显变化。注射14天后，小PMA数量多而易观察到，有时在PMA中还有圆形黄红色mφ。圆形mφ的总数量较对照明显增加（表1）。

注射1200mg BSA2天后，PMA和PM的数量、分布与对照相似，但可见许多梭状mφ和一些圆形红色mφ。注射7天后，圆形红色mφ、黄红色mφ和PM数量增多，并常可见到小PMA，有的还夹杂有圆形红色mφ和黄红色mφ。注射14天后，PMA与注射7天后相似，但其中已不易发现圆形红色mφ和黄红色mφ（表1）。

表1 鲇鱼成鱼注射BSA后头肾中mφ的变化

Table 1 Changes of mφs in head kidney of adults of *Silurus asotus* L. after receiving BSA injection

剂量 (mg/鱼)	取材时间 (注射N天后)	网状/纤维 状 mφ	梭状 mφ	圆形 红色 mφ	圆形黄 红色 mφ	含色素 mφ	巨噬 细胞 集结	含色素 巨噬细 胞集结	圆形巨噬细 胞的总数量 (1)
Dosage (mg/fish)	Sampling time (after N days of injection)	Reticular/ Fibrous mφ	Shuttle mφ	Round red mφ	Round yellow- red mφ	PM	MA	PMA	Amount of total round mφs (1)
0 (对照) (Controls)	0	+	±	±	±	+	-	+	78.5 ± 19.3
	14	+	±	±	±	+	-	+	71.4 ± 9.1
	28	+	+	+	+	+	±	+	77.6 ± 14.0
400	2	+	±	±	±	+	-	+	68.7 ± 11.8
	7	+	+	+	±	+	-	+	93.2 ± 14.5
	14	+	±	+	+	+	-	+	106.4 ± 14.0
1200	2	+	+	+	+	+	-	+	110.0 ± 19.7
	7	+	±	+	+	+	-	+	148.9 ± 13.3
	14	+	±	+	+	+	-	+	177.2 ± 22.8

(1)圆形巨噬细胞的总数量以“平均值±标准误”个/mm²。+: 观察到; -: 未观察到; ±: 观察到但数量极少。

The amount of round mφs (round red mφ, round yellow-red mφ PM) is expressed as “means ± standard error”/mm². +: observed; -: not observed; ±: observed but rare.

表2 鲇鱼成鱼注射墨汁后头肾中集结(由饱含碳粒的圆形巨噬细胞组成)的发生

Table 2 Induced development of MA (composed of round, carbon-laden mφ) in adult of *Silurus asotus* L. after receiving Indian ink injection

剂量 (mg/鱼)	取材时间 (注射N天后)	网状/纤维 状 mφ	梭状 mφ	圆形 mφ	巨噬细 胞集结	饱含碳粒的圆形巨噬细胞 的数量(平均值±标准误) (个/mm ²)
Dosage (mg/fish)	Sampling time (after N days of injection)	Reticular/ Fibrous mφ	Shuttle shaped mφ	Round mφ	MA (1)	Amount of round, carbon-laden mφ (M. ± S.E.)(n/mm ²)
5.5	2	+	+	±	-	
	7	+	+	+	-	
	14	+	+	+	-	24.6 ± 5.0
45	2	+	+	±	-	
	7	+	+	+	-	
	14	+	+	+	-	144.0 ± 21.0
228	2	+	+	+	-	
	7	+	+	+	+	
	14	+	+	+	+	8731.2 ± 959.3

本表所列巨噬细胞仅指吞噬有碳粒者, 由于饱含碳粒的圆形巨噬细胞在注射2, 7天后数量相对很稀少, 故未计数。+, -和±同表1。

The mφs listed in this table were all carbon loaded. The amount of round carbon-laden mφ was not examined since it was not dominate and rare compared with the other carbon-loaded mφs after 2 or 7 days of the injection. +, - and ± are same as in Table 1.

表 3 鲢鱼幼鱼连续多次注射 BSA 后头肾中 PMA 的发生

Table 3 Development of PMA in head kidney of juvenile of *Silurus asotus* L. after

BSA injections receiving repeated

取材时间: 第 X 次注射 Y 天后	取材时年龄 (出膜第 N 天)	累积剂量 (mg/鱼)	网状/纤维 状 mφ	梭状 mφ	圆形红 色 mφ	圆形黄 红色 mφ	P	M	A	PMA	圆形 mφ 数量: 平均值 ± 标准误 (个/mm ²)
Sampling time: after Y days of the X-th injection	Age at sampling: on Day N post- hatch	Total dosage (mg/fish)	Reticular/ fibrous mφ	Shuttle- shapped mφ	Round red mφ	Round yellow- red	P	M	A	PMA	Amount of round mφ: M. ± S.E. (n/mm ²)
第 1 次; 2 天后 2 days; 1st	22	4	+	+	+	-	-	-	-	-	13.9 ± 9.4
第 2 次; 2 天后 2 days; 2nd	25	12	+	+	+	-	-	-	-	-	38.7 ± 7.3
第 4 次; 2 天后 2 days; 4th	31	44	+	+	+	+	+	+	-	-	99.9 ± 22.9
第 6 次; 2 天后 2 days; 6th	37	104	+	+	+	+	+	+	-	-	181.4 ± 35.3
第 8 次; 2 天后 2 days; 8th	43	172	+	+	+	+	+	+	-	-	199.4 ± 33.3
第 10 次; 2 天后 2 days; 10th	49	256	+	+	+	+	+	+	+	+	237.0 ± 50.2
第 10 次; 7 天后 7 days; 10th	54	256	+	+	+	+	+	+	+	+	439.2 ± 55.9
第 10 次; 14 天后 14 days; 10th	61	256	+	+	+	+	+	-	+	+	342.0 ± 62.9
第 10 次; 28 天后 28 days; 10th	75	256	+	+	±	±	+	-	+	+	227.1 ± 49.8

成鱼注射 5.5mg 的碳墨汁 2 天后, 可见许多纤维 mφ、网状 mφ 吞噬有碳粒而呈黑色, 而饱含碳粒的圆形 mφ 则很罕见; 原已存在的 PMA、PM 和黄红色 mφ 均不吞噬注射的碳粒。注射 7 天后, 可见许多吞噬有碳粒的梭状 mφ。注射 14 天后, 可见一些饱含碳粒的圆形 mφ, 但因数量极少, 未形成巨噬细胞集结 (MA) 而呈弥散分布 (表 2)。

成鱼注射 45mg 的碳墨汁 2 和 7 天后, 吞噬有碳粒的各种 mφ 的分布与 5.5mg 组相似。注射 14 天后, 出现许多饱含碳粒的圆形 mφ, 它们还形成结构疏散的 MA。

成鱼注射 228mg 碳墨汁 2 天后, 头肾中出现大量吞噬有碳粒的网状/纤维状 mφ、梭状 mφ 和一些圆形 mφ。注射 7 天后, 饱含碳粒的圆形 mφ 数量很多, 形成大的 MA, 可达 $310 \times 260 \mu\text{m}$ 。大 MA 常位于血管附近, 有的环绕小的血管。注射 14 天后; MA 进一步增加, 有的数个小 MA 迁移、合并形成一巨大而松散的 MA。

在幼鱼第 1 次注射 2 天后和第 2 次注射 2 天后, 圆形 mφ 的总数量很低, 未见 PM (表 3)。第 4 次注射 2 天后, 圆形红色 mφ 和黄红色 mφ 数量明显增加, 并形成小 MA

(达 $45 \times 26 \mu\text{m}$)。PM 极稀少, 未见 PMA。第 6、8 次注射 2 天后, MA 数量和大小、圆形 m ϕ 的总数量均明显增加。PM 数量增多而较易见, 但仍未见有典型的 PMA。第 10 次注射 2 天后, PM 超过圆形红色 m ϕ 和黄红色 m ϕ , 典型的 PMA 很常见。第 10 次注射 7 天后, PMA 的数量、大小进一步增加, 结构趋于紧凑, 很少夹杂有其它细胞。第 10 次注射 14 天后, PMA 结构很紧凑且常位于血管附近; MA 已不易见。圆形 m ϕ 的总数量明显下降。第 10 次注射 28 天后, 圆形红色 m ϕ 、黄红色 m ϕ 明显减少而不易见, PM 极普遍, 但圆形 m ϕ 的总数量进一步减少。PMA 与第 10 次注射 14 天后相似。

讨 论

1. PMA 的发生 电镜观察表明大鳞鲃脾内椭圆体 m ϕ 能向 PMA 迁移^[5]。给海马腹腔注射铁蛋白后, 发现血窦内皮 m ϕ 吞噬大量铁蛋白后向 PMA 迁移, 或彼此聚集形成新的 MA^[11]。但这些 m ϕ 是否转变成 PM 则不清楚。Vogelbein 等分析了溪鳞感染球虫后肝中 PMA 的发生过程, 发现 PMA 来源于血液中的单核细胞, 并观察到 PMA 中的色素是逐渐积累的^[12]。作者对成鱼采用腹腔注射不同剂量的 BSA 和墨汁, 对无 PMA 的 20 日龄幼鱼采用多次注射 BSA 以刺激 m ϕ 活动、然后追踪观察 PMA 和各种 m ϕ 变化的方法, 发现鲇鱼头肾中 PM 是由网状/纤维状 m ϕ 经过梭状 m ϕ 、圆形红色 m ϕ 和圆形黄红色 m ϕ 等阶段发育而来的。圆形 m ϕ 均能迁移、聚积形成 MA 或 PMA。PM 的密度越高, 则越易形成 PMA; 在 PM 数量过低时, 则不易形成 PMA (表 1-3)。

关于 PMA 的最终命运, 在多次注射 BSA 的幼鱼头肾, 可观察到 PM 的退化和解体, 这与人描述^[11]相同。但更多的情况是 PM 有沿大血管的结缔组织向外迁移出头肾的趋势, 其结果是在停止注射 BSA 后, 圆形 m 的总数量显著下降 (表 3)。

2. 关于 PMA 的功能 由于 PMA 具有小结样的结构、注射进鱼体内的胶质碳、可溶的蛋白质抗原和不溶的细胞抗原最后可聚集在 PMA 中并可使 PMA 大小增加, 许多研究者认为 PMA 具有从血液循环中清除异物和加工、提呈抗原的功能, 并认为它是高等动物生发中心的类似物^[1,2,5,7,9,12]。

Tsujii 和 Seno^[11]发现海马肾中原已存在的 PMA 不吞噬注射进体内的铁蛋白, 他们认为形成 PMA 仅仅是为了更有效地消化被吞噬物。作者发现鲇鱼头肾中 PMA、PM 和圆形黄红色 m ϕ 均不吞噬注射的胶质碳; 而幼鱼头肾中典型的 PMA 在第 10 次注射 BSA 2 天后才出现, 说明幼鱼吞噬血液中的 BSA 不依赖于 PMA, 并且在实验后期, PMA 有向外迁移出头肾淋巴样组织的趋势。这些均表明 PMA 不具备从血液循环中清除异物的功能, PMA 内积聚的物质是当这些 PM 处于网状/纤维状 m ϕ 、梭状 m ϕ 或圆形红色 m ϕ 等发育阶段时吞噬的; 作者认为形成 PMA 可能和限制 PM 与头肾淋巴样有关。

Tsujii 和 Seno^[11]还强调他们未能在海马肾 PMA 中观察到细胞增殖或有丝分裂相, 认为它不是生发中心的类似物。从本实验结果并结合以前的研究来分析, 作者赞同 Tsujii 和 Seno 的观点, 其理由是: (1) PMA 的生发过程已解释了它在接受抗原刺激后增大增多的原因, 显然与高等动物外周淋巴器官的发生中心有质的差别。免疫标记显示注射的抗原最初不是出现在 PMA 中^[10]。(2) Lammers^[7]在鲤鱼 PMA 周围观察到小淋巴细胞, Tsujii 和 Seno 在海马肾 PMA 四周则未观察到淋巴细胞。产生这种差异的原因可

能是 PMA 处于不同的发育时期, 在注射胶质碳的鲇成鱼和多次注射 BSA 的幼鱼其 PMA (MA) 的诱导生发实验已清楚地表明了这一点。(3) 在个体发育上, PMA 随鱼类年龄增加而增加, 且在老年个体大量累积^[1,3,4]。而高等动物的生发中心不应随衰老而增加。(4) 在系统发育上, 从圆口类、软骨鱼类到硬骨鱼类, PM 相应从弥散分布到出现小结状结构, 这被当作 PMA 是生发中心类似物的又一证据^[2]。然而, 近年来的研究表明硬骨鱼类体液免疫系统的分化程度还低于软骨鱼类。作者推测硬骨鱼类 PMA 结构的复杂化与其体液免疫系统相对不发达、 $m\phi$ 功能相应活跃有关。

此外, 一些作者认为 PMA 具有清除组织降解代谢产物的功能, 因疾病、伤口感染和长期饥饿均使 PMA 增加^[9]。作者认为在上述情况下 PMA 的增加是组织降解代谢产物增加、进而刺激 $m\phi$ 旺盛活动的结果, 因此不应认为 PMA 具有清除组织降解代谢产物的功能。

3. 从 PMA 的发育看 PMA 的应用意义 由于疾病、长期饥饿和水污染可使 PMA 增加, 因此它被认为是反映鱼体健康的状况^[9,14] 和水污染^[3,14] 的灵敏指示物。作者对鲇鱼头肾 PMA 的诱导发生实验表明, PMA 的大量发生是许多 $m\phi$ 高度活动的结果。显然, 疾病、饥饿和水污染均可直接或间接地增加组织降解代谢产物, 从而刺激 $m\phi$ 活动、引起 PMA 增加。因此 PMA 可以作为反映鱼体健康和水污染的指示物。但在实际应用时, 应注意 PMA 的出现与旺盛的 $m\phi$ 活动有一定时间的迟滞期。

致谢: 本文实验工作系作者在山东大学攻读博士学位时完成, 承黄浙教授悉心指导, 张红卫教授曾给予指导和帮助, 谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Agius, C., 1981. Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophage of teleost haemopoietic tissues and age-related changes. *Dev. Comp. Immunol.*, 5: 597-606.
- [2] Agius, C., 1985. The melano-macrophage centres: a review. In: *Fish Immunology*, M.J. Manning & M.F. Tatner eds, pp. 85-105. Academic Press.
- [3] Blazer, V.S., Wolke, R.E., Brown, J. & Powell, C.A., 1987. Piscine macrophage aggregate parameters as health monitors: effect of age, sex, relative weight, season and site quality in large mouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquatic Toxicol.*, 10: 199-215.
- [4] Brown, C.L. & George, C. J., 1985. Age-dependent accumulation of macrophage aggregates in the yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchill). *J. Fish Dis.*, 8: 135-138.
- [5] Ferguson, H.W., 1976. The relationship between ellipsoids and melano-macrophage centres in the spleen of trubot (*Scophthalmus maximus*). *J. Comp. Pathol.*, 86: 377-380.
- [6] Kaplow, L.S., 1981. Cytochemical identification of mononuclear macrophages. In: *Manual of Macrophage Methodology: Collection, Characterization and Function*. H.B.Herscovitz, H.T.Holden, J.A.Bellanti & A. Chaffar eds, pp.199-207. Marcel Dekker, Inc.
- [7] Lammers, C.H.J., 1986. Histophysiology of a primary immune response against *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Exp. Zool.*, 238: 71-80.
- [8] Mesquer, J., Esteban, M.A. & Agulleiro, B., 1991. Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): An ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.*, 54: 299-309.
- [9] Roberts R.J., 1975. Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. In: *The Pathology of Fishes*, W.E.Ribelin & G. Migaki eds, pp. 399-428. The University of Wisconsin Press.

- [10] Secombes, C.J. & Manning, M.J., 1980. Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen localization in the carp *Cyprinus carpio* L. J. Fish Dis., 3: 399-412.
- [11] Tsujii T. & Seno, S., 1990. Melano-macrophage centres in the aglomerular kidney of the sea horse (Teleosts): Morphologic studies on its formation and possible function. Anat. Rec., 226: 460-470.
- [12] Vogelbein, W.K., Fournie, J. W., & Overstreet, R. M., 1987. Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melano-macrophage centres in *Rivulus marmoratus*. J. Fish Biol., 31(suppl. A): 145-153.
- [13] Walker, W. S., 1976. Functional heterogeneity of macrophages. In: Immunobiology of the Macrophages, D.S.Nelson eds, pp. 91-110. Academic Press.
- [14] Wolke, R.E., Murchelano, R.A., Dickstein, C.D. & George, C. J., 1985. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 35: 222-227.
- [15] Woodhead, A.D., Pond, V. & Dailey, K., 1983. Aging changes in the kidneys of two poeciliid fishes, the guppy *Poecilia reticulatus* and the Amazon molly *P. formosa*. Experimental Gerontology, 18: 211-221.

DEVELOPMENT OF PIGMENTED MACROPHAGE AGGREGATE (PMA) IN THE HEAD KIDNEY OF THE FRESHWATER CATFISH, *SILURUS* *ASOTUS* L.

Zhong Mingchao

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

ABSTRACT The development of pigmented macrophage aggregate (PMA) in the head kidney of adult and juvenile of the freshwater catfish *Silurus asotus* L. was investigated by peritoneally injecting Indian ink or bovine serum albumin with different dosages to stimulate macrophages (m ϕ) activity. It was found that the m ϕ heterogeneity existed in head kidney, and pigment macrophage (PM) originated from reticulum / fibrous m ϕ through the intermediate developmental stages of elongate m ϕ , round red m ϕ and round yellow-red m ϕ . The PMA was only a kind of cell aggregate composed of PMs which had already lost phagocytotic ability, and its formation was closely related with the amount of PM. The functions of PMA were discussed, and it was suggested that the materials accumulated in PMA are uptaken by PM's precursors and the increase of PMA is derived from highly activities of other m ϕ s. Therefore, PMA can neither clear the injected materials from circulation nor scavenge the tissue degradation products; PMA should not be the primitive germinal centre. However, PMA may be used as indicators for water pollution and fish health.

KEYWORDS *Silurus asotus*, Pigmented macrophage aggregate, Development