

文章编号:1005-8737(2001)04-0005-04

牙鲆的头肾免疫细胞

刘云¹, 姜国良¹, 张士瑾¹, 姜明², 连建华³

(1. 青岛海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 青岛海洋大学
测试中心, 山东 青岛 266003; 3. 威海华信海珍品有限公司, 山东 威海 264201)

摘要:对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)头肾印迹片、光镜片和电镜片的观察发现,其头肾主要集中于肾脏前部2个分叉部分。组织学研究证明,头肾是由基质组织网络着不同发育阶段的血细胞构成,具无肾小球等分泌结构。进一步超微观察表明,基质是由网状细胞和成纤维细胞等组成,各种免疫细胞由淋巴细胞、单核细胞、粒细胞(I型和II型)以及巨噬细胞等组成。头肾中免疫细胞丰富,其中淋巴细胞占36.6%,单核细胞占31.0%,粒细胞占19.7%。说明牙鲆的头肾免疫细胞种类比较丰富,是免疫细胞的主要生发中心,在鱼体免疫防御系统中占有相当重要的地位。同时对特殊颗粒细胞的分类进行了讨论。

关键词:牙鲆;头肾;免疫细胞

中图分类号:Q959.486

文献标识码:A

头肾是硬骨鱼类重要的造血器官^[1],同时又是重要的次级淋巴样器官^[2-3],与高等脊椎动物的骨髓类似,在造血、清除衰老细胞、吸收和贮藏抗体、参与特异性免疫反应等方面具有特殊作用。国外在鱼类头肾白细胞形态研究方面有一些报道^[4-6],认为其主要是由网状内皮系统支持下的淋巴造血组织构成。由于不同种的鱼类,甚至同种鱼类的外周和造血器官之间的白细胞的种类和数量都有所不同,因此,仍有许多问题未搞清楚,如颗粒细胞的分类及来源,黑色素巨噬中心的结构及功能,肾基质——网状内皮系统的构成等等。国内仅见对草鱼头肾的研究^[7],而对牙鲆头肾免疫细胞的研究,国内外均未见报道。鉴于牙鲆在我国海水养殖鱼类中的重要地位,研究其头肾结构和免疫细胞的基本类型,无疑对于促进鱼用疫苗的应用和推广,扩大鱼类养殖规模将起着重要作用。

收稿日期:2000-11-20

基金项目:国家重点基础研究发展规划973资助项目(G1999012005);国家自然科学基金资助项目(30000129)

作者简介:刘云(1969-),女,讲师,从事海洋生物学研究。

1 材料和方法

1.1 实验鱼

正常养殖的活牙鲆,体长 (11.9 ± 1.2) cm,体重 (15.013 ± 2.636) g,共10条,2000年9月取自山东威海华信海珍品有限公司。同时在2000年4~9月间,还对牙鲆头肾从孵化到幼鱼期的形态学变化进行了研究。

1.2 光镜组织切片

解剖牙鲆,取出肾,观察形状,测量长度并称重,然后将肾前部,特别是分叉处剪下并切成小块,用Bouins液固定,常规石蜡包埋,切片7 μ m, H-E染色,光镜观察。

1.3 正常组织涂片

牙鲆解剖后剪下头肾,先用PBS缓冲液将其表面血液冲洗干净,然后将头肾切开,将其横断面与擦净的载玻片轻轻涂抹,空气干燥后用Wright和Giemsa染液进行染色,油镜观察细胞形态,同时进行白细胞的分类计数。

1.4 电镜切片

头肾样品用2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定2 h,

然后用1%锇酸固定1 h,梯度乙醇脱水,Epon-812树脂包埋,经LKB超薄切片机进行超薄切片,常规电镜切片染色,在日立H-7000型透射电镜观察并摄影。

2 结果

2.1 头肾的形态位置及与体肾的关系

牙鲆的头肾位于体腔背面,紧贴于脊椎的下面。牙鲆没有鱼鳔,肾脏直接以1层腹膜与食道、胃等内脏分隔。肾脏前端在孵化后的55~60 d已经明显分叉,咽骨缩肌位于分叉的中间,分叉的部分向前深入鳃腔后缘;随着月份增长,腹膜从银白色转成红色,肾脏也从淡红色变成暗红色,质地更加松软,肾

脏前部分叉部分长度占总肾长度的7.4%~23.1%,重量占总肾重的12.1%~21.2%。头肾与体肾在形态上并没有明显的界限。组织学研究进一步表明(图版I-1,见附页),牙鲆的肾脏是由后部具肾小球的体肾与前方无肾小球的头肾两部分组成。分叉部分全部是由无肾小球的造血组织构成,而分叉后的造血组织间开始有零星的肾小管出现,因而可以认为分叉部为集中的头肾区域。

2.2 头肾印迹片免疫细胞的形态及其分类计数

牙鲆头肾印迹涂片中存在着大量不同发育时期的红细胞和白细胞(图版I-2,见附页),还可见噬黑色素细胞和分散的黑色素颗粒。头肾内免疫细胞的分类计数结果见表1。

表1 头肾内免疫细胞的分类计数

Table 1 Differential leucocyte counts (DLC) in head kidney of *Paralichthys olivaceus*

红细胞系/% Erythrocytes lineage	白细胞系/% Leucocytes lineage	淋巴细胞系/% Lymphocytes lineage	单核细胞系/% Monocytes lineage	颗粒细胞系/% Granulocytes lineage	血栓细胞系/% Thrombocytes lineage
44.2	55.8	36.6	31.0	19.7	12.7

淋巴细胞系的细胞直径在5~8 μm 之间,平均为6.5 μm ;胞体较圆,少量有伪足;细胞核所占比例较大,位于细胞中间,多为圆形或椭圆形,平均直径在6.0 μm ,核染色质丰富,致密,紫红色;细胞质在核周围,染成深蓝色或浅蓝色,有的只在核凹陷处有少量胞质,部分细胞的细胞质内具有嗜天青颗粒。

单核细胞系的细胞比淋巴细胞系的细胞大,直径在6~10 μm 之间,平均8.0 μm ,呈圆形、椭圆形,偶见不规则形,有的具有伪足;细胞核形态多样,染成紫红色,圆形、半圆形、肾形、人字形及不规则形,一般偏位,核直径平均在6.0 μm ;核染色质疏松呈网状,细胞质呈深浅不一的蓝色,有的有空泡,所占比例要比淋巴细胞大。印迹片上还可见巨噬细胞,直径10~13 μm ,细胞体更大,核呈疏松网状。

颗粒细胞系的细胞直径6~8.5 μm ,平均7.5 μm ,比淋巴细胞稍大,细胞核紫红色,圆形或椭圆形,偏于细胞的一侧;细胞质淡蓝色或淡红色,比较均匀,有的含有较多的淡红色细小颗粒。

2.3 头肾免疫细胞的超微结构

2.3.1 淋巴细胞 圆形,有钝或细长的伪足,细胞核大体上为圆形,核膜呈波曲状,有的核在一侧凹入,核孔1~5个,核内有核仁1~3个,异染色质多沿核膜边缘分布,在核内呈网状或岛状分布;细胞质

较均匀,有圆形线粒体、粗面内质网和少量嗜天青颗粒,有的细胞质内有空泡(图版I-3,见附页)。

2.3.2 单核细胞 圆形或椭圆形,具短的突起,细胞核偏位,肾形、不规则形或分叶,核仁少见,染色质网状;细胞质丰富,有圆形或椭圆形的线粒体、粗面内质网以及游离核糖体,有的有嗜天青颗粒及空泡。巨噬细胞的胞体更大,极不规则,伪足多,细胞质内有溶酶体、粗面内质网,还有较多的圆形线粒体和大量的小泡(图版I-4、5,见附页)。

2.3.3 I型颗粒细胞 圆形或椭圆形,细胞核圆形、椭圆形或分叶,偏位,核内有1~2个核仁,异染色质较单核细胞丰富,细胞质内有数量不等的颗粒;第1种(G1)是电子密度中等的圆形或椭圆形颗粒;第2种(G2)颗粒有单位膜,其中央分布着低或高密度的芯,还有一些颗粒的电子密度从膜到中央逐渐降低;第3种颗粒(G3)为长椭圆形,内含丝状结晶样结构。细胞质中还有球形线粒体、粗面内质网和游离核糖体(图版I-6,见附页)。

2.3.4 II型颗粒细胞 圆形或长椭圆形,核一般偏位,椭圆形、马蹄形或分叶,胞质内有大小不一的颗粒,以电子密度较高的圆形颗粒居多,也有少数是长杆形、三角形或卵圆形(G1);还有一些长椭圆形颗粒(G4),似扫帚状,电子密度在一侧较高。细胞质

内还有发达的高尔基复合体、线粒体、粗面内质网和游离核糖体(图版 I - 7, 见附页)。

2.4 特殊颗粒细胞

细胞极圆,同时细胞核也极圆,核膜清晰,异染色质发达;细胞质电子密度极低,在细胞质内有黑色颗粒,有的颗粒似正从细胞核中排出(图版 I - 8, 见附页)。

3 讨论

肾脏是脊椎动物的主要排泄器官,其发展可分为 3 种类型:前肾、中肾和后肾。硬骨鱼的排泄器官是中肾,即由肾小体和肾小管构成具有泌尿机能的肾单位。然而,鱼类的头肾区失去泌尿功能,成为具有免疫机能的淋巴样组织。有关肾脏发生的研究资料极其有限。牙鲆是海水养殖的重要经济种类,为近岸型底栖鱼类,在其发育过程中有变态现象。解剖结果表明,牙鲆肾脏前面的分叉部等长,并不受变态的影响。牙鲆头肾实质是由许多血窦、网状细胞、少量的噬黑色素细胞和各种血细胞交织在一起构成的,其免疫细胞包括淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、I 型颗粒细胞和 II 型颗粒细胞。

与牙鲆外周血液^[8]和粘膜样淋巴组织^[9]相比,在细胞种类数量上,头肾内的白细胞数量与红细胞数量相当,是淋巴细胞和颗粒细胞产生的主要器官。因此,牙鲆头肾有造血和免疫两种功能,并且以免疫功能为主;在形态上,头肾内的各种白细胞还处于发育的早期阶段,表现为体积大,核仁明显,细胞核分叶少等特点。因此,牙鲆的头肾是免疫细胞的重要生发中心,在鱼体免疫中具有重要作用。

与草鱼^[7]头肾超微结构相比,相同之处在于它们都含有大量的免疫细胞;不同之处在于有关颗粒细胞的种类和形态差异较大。牙鲆只鉴定出 I、II 型 2 种类型的颗粒细胞,而草鱼有 I、II 和 III 型 3 种颗粒细胞;在形态上,草鱼的颗粒类型较牙鲆的颗粒细胞内的颗粒典型, I 型颗粒细胞的颗粒为具有棒状或圆形电子密度核心的圆形或椭圆形颗粒, II 型颗粒细胞的颗粒形态多样,以杆状颗粒为主, III 型颗粒细胞的颗粒则多为大且均质的圆形颗粒;然而,牙鲆的两种颗粒细胞内的颗粒都以均质的圆形颗粒为主。牙鲆 I 型颗粒细胞与南极冰鱼 (*Chionocephalus aceratus* Lonnerg)^[10]头肾的 I 型颗粒细胞、鳊鱼 (*Siniperca chuatsi* Basilewsky)^[11]的 II 型颗粒细胞相近,与金鱼 (*Carassius*

auratus)^[12]外周血液的嗜中性细胞相似,其共同特征是除含有均质的圆形颗粒外,还存在有膜包围的具电子密度核心的圆形颗粒;牙鲆的 II 型颗粒细胞与南极冰鱼肾部造血组织中的 II 型颗粒细胞、小点猫鲛 (*Scyliorhinus canicula*)^[13]的 I 型颗粒细胞相似,它们颗粒细胞内都有大小不一的均质圆形颗粒。所以,牙鲆头肾的颗粒细胞的类型及形态都与草鱼不同,这种情况可能是环境造成的,亦或只是种属的差异。

牙鲆头肾内的特殊颗粒细胞既与其头肾内的其他颗粒细胞不同,又未能在其他鱼类的资料中观察到。其特殊性在于:(1)该细胞极圆,细胞核也极圆,核膜完整,并且细胞质均匀,没有其他细胞器,因而不会是解体中的颗粒;(2)细胞核内异染色质电子密度均匀,但核孔处有相同密度的颗粒状物质排出,这或许揭示了颗粒的来源,如果是原始的颗粒细胞,它的分化潜能极大,正如有的作者^[14]认为的那样,颗粒细胞是由共同的细胞分化而来,嗜中性颗粒细胞与嗜酸性颗粒细胞是同一细胞系的不同发育时期。

参考文献:

- [1] Zapata A. Ultrastructural study of the teleost fish kidney[J]. Developmental and Comparative Immunology, 1979, 3:55 - 65.
- [2] Press C Mcl, Evensen φ. The morphology of the immune system in teleost fishes[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9:309 - 318.
- [3] Brattgjerd S, Evensen φ. A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in the head kidney phagocytes of experimentally infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L[J]. Veterinary Pathology, 1996, 33:55 - 65.
- [4] Temnick J H M, Bayne C J. Ultrastructural characterization of leucocytes in the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*, L.) [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1987, 11:125 - 137.
- [5] Tadashi Tsuji, Satmaru Seno. Melano-macrophage centers in the aglomerular kidney of the Sea Horse (Teleosts): morphologic studies on its formation and possible function [J]. Anatomical Record, 1990, 226:460 - 470.
- [6] Messeguer J, Lopez-Ruiz A, Garcia-Ayala A. Reticulo - endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): an ultrastructural and cytochemical study[J]. Anatomical Record, 1995, 241:303 - 309.
- [7] 卢全章. 草鱼头肾免疫细胞超微结构的观察[J]. 水生生物学报, 1997, 21(2):152 - 156.
- [8] 刘 云, 姜 明, 姜国良, 等. 牙鲆外周血细胞显微及亚显微结构的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2):141 - 152.

- [9] 刘云, 姜国良, 姜明, 等. 牙鲆肠淋巴样组织免疫细胞研究 II: 无颗粒白细胞的超微结构[J]. 海洋科学, 2000, 11: 45-48.
- [10] Barber D L, Millis Westermann J E, White M G. The blood cells of the Antarctic icefish *Chaenocephalus aceratus* Lonnberg: light and electron microscopic observations [J]. J Fish Biol, 1981, 19: 139-141.
- [11] 袁仕取, 张永安, 姚卫建, 等. 鳊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): 39-47.
- [12] Fujimaki Y, Isoda M. Finestructural study of leucocytes in the goldfish, *Carassius auratus* [J]. J Fish Biol, 1990, 36: 821-831.
- [13] Morrow W J W, Pulsford A. Identification of peripheral blood leucocytes of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) by electron microscopy[J]. J Fish Biol, 1980, 17: 461-475.
- [14] Rombout J H M M, Bot H E, Taverne-Thiele J J. Immunological importance of the second segment of carp II: Characterization of mucosal leucocytes[J]. J Fish Biol, 1989, 25: 167-178.

Immune cells in head kidney of bastard halibut, *Paralichthys olivaceus*

LIU Yun¹, JIANG Guo-liang¹, ZHANG Shi-cui¹, JIANG Ming², LIAN Jian-hua³

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

2. Center of Analysis, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

3. Weihai Fisheries Research Institute Huaxin Sea Rarities Co. Ltd, Weihai 264200, China)

Abstract: The samples of *Paralichthys olivaceus* were captured from a farm in Shandong Province, body weight (15.013 ± 12.63) g and body length (11.9 ± 1.2) cm. Under light microscope and electronic microscope (Hitachi H-7000), using super-slice and slice technique, the head kidney of *P. olivaceus* was observed. The results show that the haemopoietic tissues mainly concentrate to the foremost parts of the kidney, predominantly a lympho-myeloid compartment. The parenchyma of the head kidney is supported by the stroma of the kidney. The stroma consists of reticular cells and fibroblasts. The cells are responsible for the nonspecific and specific immune defences including lymphocytes, monocytes, granulocytes (two types) and macrophages. The percentages of the lymphocytes, monocytes and granulocytes are 36.6%, 31.0% and 19.7%, respectively, of the total immune cells in the head kidney. The immune cells in the head kidney are abundant, and the head kidney may be an important germinal center. Also, the special granulocyte found in the head kidney is discussed. The purpose for this research is to provide basic data for the application of fishery vaccine.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; head kidney; immune cells

快 报

根据中国科技信息研究所信息分析研究中心最新提供的 2001 年版《中国科技期刊引证报告》,《中国水产科学》2000 年影响因子为 0.314, 在水产类学术期刊中排名第 2 位, 在 1411 种统计源期刊中排名第 331 位。总被引频次为 165, 在水产类学术期刊中排名第 2 位, 在 1411 种统计源期刊中排名第 493 位。