

条斑星鲈免疫器官个体发生的组织学观察

肖志忠¹, 于道德^{1,2}, 孙真真³, 徐世宏¹, 马道远¹, 李 军¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039; 3. 青岛市渔业技术推广站 266000)

摘要:应用石蜡切片技术和显微观察法,对从孵化后到变态完成(55~60日龄)的条斑星鲈(*Verasper moseri* Jordan et Gilbert)仔稚幼鱼早期发育中免疫系统的组织结构进行了研究,描述了个体发育过程中的组织学结构特征。实验表明:在13~15日龄,条斑星鲈免疫器官原基出现的先后顺序为肾脏、脾脏和胸腺。孵化后即出现肾脏原基,8日龄和12日龄分别出现脾脏和胸腺原基;而免疫器官淋巴化的先后顺序较为特殊,首先淋巴化的器官是头肾,其次为胸腺和脾脏,不同于大多数海水鱼类。在其免疫器官发生后除头肾和脾脏外,在胸腺中同样出现黑色素巨噬细胞中心,虽然在数量和形态上不如头肾和脾脏丰富。作者通过对条斑星鲈免疫器官发生过程研究,初步了解了其免疫器官发生、成熟过程以及特点,为进一步开展条斑星鲈的规模化养殖,以及人工疫苗的应用提供理论依据。

关键词:条斑星鲈(*Verasper moseri*);免疫器官;头肾;黑色素巨噬细胞中心

中图分类号:Q133

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2008)07-0088-05

鱼类免疫系统是机体识别和消除“异物”的防卫系统,是鱼类防止病原入侵的第一防线,参与鱼类免疫应答的免疫器官主要是肾脏(尤其是头肾)、脾脏、胸腺。它们是鱼类免疫细胞(主要是T细胞和B细胞)发生、分化、成熟和增殖的主要场所。因此,研究鱼体的淋巴器官个体发生,是深入认识鱼体免疫活性何时建立的基础;同时也对鱼类健康养殖的苗种生产有着重要的指导意义。

对鱼类免疫学的研究可追溯到1903年,Riegler等^[1]首先发现一种叫丁鳎(*Tina vulgaris*)的鱼可产生凝集抗体,但是关于鱼类免疫器官个体发生的研究工作却始于上世纪80年代,早期的大部分工作主要集中于淡水鱼类^[2~5]。而后随着海水养殖业的兴起及鱼类免疫学的迅速发展,国外相继报道了海水鱼类免疫器官发生的研究工作^[6~8]。国内有关鱼类免疫器官发生的研究不多,仅对鲑鱼^[9]、斜带石斑鱼^[10]和大黄鱼^[11]等进行了研究。

条斑星鲈,隶属鲈形目(Pleuronectiformes),鲈科(Pleuronectidae),星鲈属(*Verasper*)。为太平洋西北部冷温性底层鱼类^[12]。在日本被列为高档鱼类,市场售价为5000~10000日元/kg,具有较高的经济价值。近年来,中国从日本引进条斑星鲈,并于2007年取得该鱼种的人工繁育的成功。继牙鲆、大菱鲆之后有望成为中国北方海水养殖业中一个新兴的鲈鲆类养殖品种。但是在条斑星鲈苗种培育生产

过程中,早期发育过程中的仔稚幼鱼的畸形率和死亡率很高,造成苗种生产不稳定,生产成本升高,严重制约了条斑星鲈养殖业的发展。因此,对条斑星鲈免疫学的研究显得尤为重要,关于条斑星鲈免疫器官个体发生的研究国内外尚未见报道,而鲈鲆类相关的报道,仅见Chantanachookhin等^[13]和Liu等^[14]对牙鲆的研究及Padrón^[15]1996年对大菱鲆的研究。作者对条斑星鲈免疫器官个体发育进行了研究,提供其早期发育的组织形态学资料,同时了解作为冷温性底层鱼类的条斑星鲈其免疫器官原基出现顺序和免疫器官淋巴化的顺序的特点,从而为条斑星鲈早期病害的免疫防治研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 仔稚幼鱼的培育

条斑星鲈(*Verasper moseri*)仔稚幼鱼于2007年3~6月取自薛家岛育苗场,条斑星鲈受精卵在8~10‰盐度33左右、强充气的条件下,经过8~9d孵化出膜。孵出后的仔稚鱼培育水温在14~15℃,幼

收稿日期:2007-11-29;修回日期:2008-05-04

基金项目:青岛市科技计划项目(06-2-3-18-hy)

作者简介:肖志忠(1968-),男,山东青岛人,研究方向:海洋生物学,电话:0532-82898729, E-mail: xzz68@qingdaonews.com;李军,通讯作者,研究员,理学博士, E-mail: junli@ms.qdio.ac.cn

鱼培育水温在 16~17℃。前期仔鱼投喂轮虫,同时加入小球藻净化水质,后期仔鱼和稚鱼添加卤虫无节幼体,幼鱼给予鱼糜及配合饲料。轮虫和卤虫无节幼体分别进行营养强化(康克 A,青岛森森公司) 12 h 后进行投喂。

1.2 样品的采集

育苗孵化后,前 10 天每天取样 1 次,11~30 d 每 2 天或 3 天取样 1 次,31 d 到实验结束,每 5 天取样 1 次,取样样本数为 60 尾。MS-222 麻醉,30 尾用于生长测量;另 30 尾样品用于组织切片观察:样品首先用 Bouin 氏液室温固定 24 h 后,50%乙醇洗脱,70%乙醇保存备用。常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,分别进行横、纵和水平三个方向的连续切片,切片厚度 3~10 μm, H. E. 染色,中性树胶封片, Nikon 显微镜观察和照相。

2 结果

2.1 肾脏的发生

肾脏是条斑星鲷仔鱼最先形成的淋巴器官。孵化后 1 日龄仔鱼的肾脏由一对简单的直管构成。3 日龄肾脏延伸,从口咽腔背部沿脊椎直到躯干后部,开口于肛门。7 日龄肾管的前部分化成前肾管,在前肾管之间可见未分化的干细胞,这些干细胞较管壁细胞大而圆,核明显。12 日龄,前肾管进一步分化出许多前肾小管,在前肾小管间的淋巴母细胞进一步增多(图 1-1)。21 日龄,处于头肾位置的前肾小管较多,细胞数量相对增多,细胞变小,可见淋巴细胞的生成。此时标志着头肾淋巴化的开始。29 日龄,头肾进一步增大,前肾小管间及周边出现数量较多,染色较深的小淋巴细胞,心脏中循环的血液中亦有相当数量的淋巴细胞的分布。35 日龄,前肾小管十分发达,前肾管间组织也分布大量的淋巴细胞和血细胞。

45 日龄,前肾小管集中于头肾的中部区域,数量明显减少。肾间组织进一步淋巴化,形成中央动脉,动脉间可见大量的血细胞。血管周围出现黑色素巨嗜细胞中心(melano-macrophage centers, MMCs)。此时主要以分散的形式存在,细胞数量不一,排列松散,在黑色素巨嗜细胞群周围没有上皮细胞围绕。而此时与体肾结构上的差别是:体肾的肾小管仍然十分发达,且门静脉充斥着大量的血细胞(图 1-4)。55 日龄,条斑星鲷头肾的 MMCs 以散在分布和聚集成团两种形式存在(图 1-5)。其中聚集成团者的特

征是:中心呈球形,内含少量的淋巴细胞和大量的黑色素细胞。此时前肾小管,结构退化,此后随着发育进一步进行,头肾逐渐失去了分泌和排泄的功能,成为真正意义上的免疫器官。

2.2 胸腺的发生

12 日龄条斑星鲷仔鱼,胸腺原基出现,位于鳃盖与背肌交接的背上角处,为两侧对称的一对实质性器官。胸腺由一层扁平上皮与鳃腔分离。胸腺由未分化的嗜碱性淋巴母细胞组成,染色较深,此时胸腺与头肾脏靠拢(图 1-2)。17 日龄仔鱼,胸腺无内区(髓质)和外区(皮质)之分。形态变化不明显,仅仅是淋巴母细胞变小,结构紧密。29 日龄仔鱼的胸腺出现血管,中间可见血细胞的存在,淋巴母细胞进一步变小,增多。与头肾脏相比,其小淋巴细胞体积相对较大,染色较浅,数量较少(图 1-6)。

35 日龄,胸腺由一层分泌样上皮包裹,可见其上分泌细胞的存在,此时胸腺分为内区和外区,但不明显(图 1-7)。内区染色浅,淋巴细胞分布稀疏,且有大量毛细血管渗入其中,富含红细胞。外区染色深,淋巴细胞分布密集,结缔组织不发达,血细胞含量少,在髓质和皮质交界处出现色素含有细胞。45 日龄,胸腺进一步增大,内区(髓质)和外区(皮质)分区明显(图 1-3)。55 日龄,此时幼鱼的胸腺与成鱼相似,外区和内区的淋巴细胞分布更加密集,结缔组织发达,网状细胞形成大量间隔将胸腺分割成许多胸腺小叶,小叶间的髓质相通。此时胸腺和头肾仍然靠拢。形成 MMCs 不如头肾和脾脏的明显。

2.3 脾脏的发生

条斑星鲷仔鱼孵化后 7 日龄出现脾脏原基。脾脏原基位于前肠的肠壁背侧并被部分胰脏组织包围,椭圆形。此时脾脏由疏松的间充质细胞索组成,内有少量微嗜碱性细胞。随着仔鱼的进一步发育,脾脏增大,同时向消化腔的腹部移动,12 日龄移至靠近食道后段与前肠交界处,仍然由胰脏包裹(图 1-8)。14 日龄,微嗜碱性细胞增多,同时出现少量红细胞。29 日龄,微血管形成,红细胞数量迅速增多。35 日龄,脾脏中仍然以红细胞为主,微血管发达,形成原始的脾窦,可见少量分散的淋巴细胞(图 1-9)。45 日龄,脾脏内网状细胞形成椭圆体,脾窦间分散着含黑色素的巨嗜细胞,此时网状内皮系统已十分发达。55 日龄脾脏的结构与成体类似,在脾窦附近可见大量 MMCs 形成(图 1-10)。

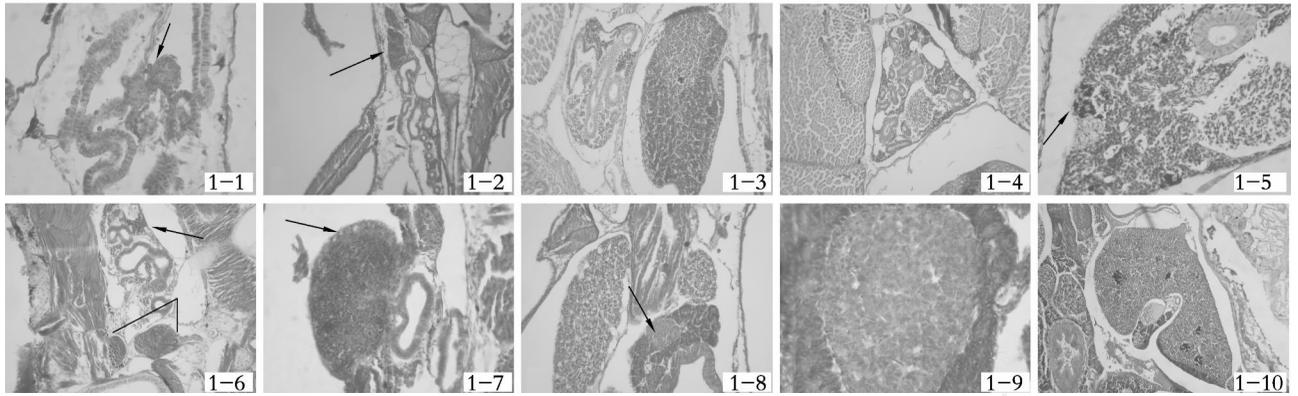


图1 条斑星鲈免疫系统发育图

Fig. 1 Theontogeny of the immune system in barfin flounder

1-1. 7 日龄仔鱼, 示头肾未分化的干细胞(箭头)及前肾小管。×400; 1-2. 12 日龄仔鱼, 示胸腺原基(箭头)及与头肾的位置关系。×100; 1-3. 45 日龄幼鱼, 示明显分区的胸腺(黑色素巨噬细胞中心出现)及与头肾的位置关系。×100; 1-4. 45 日龄幼鱼, 示体肾的结构。仍然发达的体肾管区别于头肾。×100; 1-5. 55 日龄幼鱼, 示头肾中的黑色素巨噬细胞中心(箭头)及散布的含黑色素巨噬细胞。×400; 1-6. 29 日龄仔鱼, 示成对胸腺(T), 胸腺淋巴母细胞及其间的成肌细胞, 已部分淋巴化的头肾组织(箭头)。×100; 1-7. 35 日龄稚鱼, 头肾发达的前肾小管及头肾和胸腺的位置关系。淋巴化的胸腺典型结构及粘膜分泌样细胞(箭头)。×100; 1-8. 12 日龄仔鱼, 示脾脏(箭头)在消化道中的位置及周边的胰脏(L: 肝脏)。×100; 1-9. 35 日龄稚鱼, 示脾脏大量红细胞生成。×400; 1-10. 55 日龄幼鱼, 示脾脏形态、中央血管及黑色素巨噬细胞中心分布。×100

1-1. 7 dph larva, showing the undifferentiated stem cells (arrow) in head kidney and the pronephric tubules. ×400; 1-2. 12 dph larva, showing the thymus anlage (arrow) and the relationship with the head kidney. ×100; 1-3. 45 dph juvenile, showing the zoned thymus (presence of MMCs) and the relationship with the head kidney. ×100; 1-4. 45 dph juvenile, showing the structure of kidney and the difference with head kidney with still strong nephric tubes. ×100; 1-5. 55 dph juvenile, showing the MMCs (arrow) in the head kidney and diffused melanin-containing cells. ×400; 1-6. 29 dph larvae, showing the pairs of thymus (T), lymphoblasts and myoblast in the thymus, and part lymphoid head kidney tissue (arrow). ×400; 1-7. 35 dph larva, showing the strong pronephric tubules the relationship between head kidney and thymus. The classic structure of lymphoid thymus and the secreting-like cells. ×400; 1-8. 12 dph larva, showing the location of spleen in the abdominal cavity and the surrounding pancreatic tissue (L: liver). ×100; 1-9. 35 dph larva, showing the abundant red blood cells. ×400; 1-10. 55 dph juvenile, showing the architecture of spleen, the diffused of central blood vessel and MMCs. ×100

3 讨论

3.1 条斑星鲈免疫器官原基及淋巴化发生顺序

关于硬骨鱼类免疫器官的研究大部分基于解剖和组织学观察个体发生研究结果表明: 海水鱼类在免疫器官原基的出现顺序上与淡水鱼类有所不同, 海水鱼类在免疫器官原基的出现顺序为头肾、脾脏和胸腺, 如牙鲆, 真鲷^[13]等。淡水鱼类免疫器官原基的出现顺序为胸腺、头肾和脾脏, 如虹鳟, 鲤鱼^[2,3]等; 而在免疫器官淋巴化的顺序上, 海水鱼类和淡水鱼类确是一致的, 皆为胸腺、头肾和脾脏^[11]。

本实验研究结果表明: 条斑星鲈免疫器官原基出现的先后顺序为肾脏、脾脏和胸腺; 与其它大部分海水硬骨鱼类是相同的; 但是条斑星鲈免疫器官淋巴化的顺序却较为特殊, 首先淋巴化的免疫器官是头肾(21 日龄), 29 日龄条斑星鲈稚鱼的胸腺才出现少量的小淋巴细胞(图 1-6)。头肾明显早于胸腺, 而最后为脾脏。1989 年 O' Neill^[16] 对南极鳕鱼 (*Harpagifer antarcticus*) 的研究发现: 头肾在孵化后一天出现淋巴细胞, 而胸腺则在 28 日龄后出现淋巴细胞, 头肾

也是首先淋巴化的免疫器官。与此类似的结果还包括 Schroder 等^[17] 对大西洋鳕鱼 (*Gadus morhua*) 的研究, 大西洋鳕仔鱼的头肾和脾脏在孵化时就成为淋巴器官, 而胸腺的淋巴化却发生在 9 mm 仔鱼期。大西洋鳕属于冷水性鱼类, 其早期发育水温不超过 8~10℃, 条斑星鲈为冷温性底层鱼类, 前期培育水温相对较低(本实验鱼卵孵化温度为 8~10℃, 仔鱼的培育水温为 13~15℃), 由此看来, O' Neill^[16] 将这种特性解释为鱼类对冷水域环境的适应, 还需要深入研究。

3.2 黑色素巨嗜细胞中心

MMCs 是遍布于真骨鱼类免疫器官如肾脏、脾脏, 而在软骨鱼类和原始的真骨鱼类中则主要分布于肝脏中的一种结构^[18], 但没有报道在胸腺中发现此类结构。Agius 等^[19] 报道 MMCs 有贮藏铁血黄素的作用。Herraez 等^[20] 观察到红细胞和颗粒细胞的碎片常位于 MMCs 内, 认为它与红细胞的凋亡有关。45 日龄的条斑星鲈胸腺、头肾和脾脏均开始形成 MMCs, 但是数量及形态差异明显。其中以脾脏形成 MMCs 最为丰富, 形态多样, 其次为头肾, 胸腺

MMCs 数量最少,黑色素的含量也最少。Chantanachookhin^[14]的实验表明:牙鲆和真鲷幼鱼期出现 MMCs,以肾脏比脾脏丰富,且胸腺中没有出现 MMCs。MMCs 在淋巴器官发育过程中出现的较晚,一般在鱼类幼鱼阶段,淋巴器官发育成熟后,然而也有的出现的较早,如鲑鳟鱼中,仔鱼开口摄食时就出现 MMCs^[21]。为何条斑星鲈 MMCs 也会出现在胸腺中,是否仍然是对低温的适应? MMCs 在不同鱼类的不同免疫器官的差异分布,以及在不同时期其具体形态的变化,究竟预示着什么?它在鱼类免疫系统进化的过程中究竟起到什么作用?亟待进一步研究。

3.3 条斑星鲈头肾和胸腺的关系

在条斑星鲈个体发育的过程中,胸腺一直维持与鳃腔和咽腔的浅表关系,有利于在抗口腔和抗鳃感染中发挥防御作用^[11]。胸腺原基出现后,与头肾组织靠拢,同时也观察到细胞桥的存在(图 1-3)。但是其靠拢的程度和细胞桥并不如大西洋庸鲈^[22]明显;细胞迁移数量也很少,同时也无法确认细胞迁移的方向性,此结果与 Liu 等^[10]报道的在牙鲆中发现的情况类似。而 J Öfsson 等报道金头鲷胸腺和头肾之间有细胞桥,在发育的过程中胸腺与头肾靠拢,并与头肾相连,伴有明显的细胞迁移。因此 J Öfsson 等人为头肾的淋巴细胞是从胸腺迁移来的^[22,23],此与本实验结果不尽相同。

致谢:本文的部分实验得到了中国海洋大学绳秀珍老师的热心指导和帮助,在此表示衷心的感谢。

参考文献:

- [1] 李亚南,陈全震,邵健忠,等. 鱼类免疫学研究进展[J]. 动物学研究, 1995, 16(1):83-94.
- [2] Grace M F, Manning M J. Histogenesis of lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich., 1836 [J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 1980, 4: 255-264.
- [3] 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]. **Journal of Fish Biology**, 1981, 19:403-414.
- [4] 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 immunohistochemical study [J]. **Journal of Fish Biology**, 1990, 36:159-173.
- [5] Fishelson L. Cytological and morphological ontogenesis and involution of the thymus in cichlid fishes(Cichlidae, Teleostei) [J]. **Journal of Morphology**, 1995, 223: 175-190.
- [6] Bly J E. The ontogeny of the immune system in viviparous teleost *Zoarcetes viviparous* L. [A]. Manning M J, Tatner M F. **Fish Immunology** [C]. London:Academic Press Inc Ltd, 1985. 327-341.

- [7] Nakanishi T. Ontogeny of the immune system in *Sebasticus marmoratus*: histogenesis of the lymphoid organs and effect of thymectomy [J]. **Environmental Biology of Fishes**, 1991, 30: 135-145.
- [8] Watts M, Kato K, Munday B L, et al. Ontogeny of immune system organs in northern bluefin tuna (*Thunnus orientalis* Temminck and Schlegel 1884) [J]. **Aquaculture research**, 2003, 1: 13-21.
- [9] 钟明超,黄浙. 鲑鱼淋巴样器官的发育[J]. 水产学报, 1995, 3(3):258-262.
- [10] 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, 9(6): 819-828.
- [11] 徐晓津,翁朝红,王军,等. 大黄鱼早期发育过程中免疫器官的发生[J]. 海洋学报, 2007, 29(3):105-113.
- [12] 李思忠,王惠民. 中国动物志《硬骨鱼纲—鲈形目》[M]. 北京:科学出版社, 1995. 223-227.
- [13] 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.
- [14] Liu Y, Zhang S C, Jiang G L, et al. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months [J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2004, 16: 621-632.
- [15] Padr s F, Crespo S. Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus maximus*: a light and electron microscope study [J]. **Aquaculture**, 1996, 144: 1-16.
- [16] O'Neill J G. Ontogeny of the lymphoid organs in an antarctic teleost *Harpagifer antarcticus* (Notothenioidei, Perciformes) [J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 1989, 13: 25-33.
- [17] Schroder M B, Villena A J, Jorgensen T O. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod(*Gadus morhua* L.) [J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 1998, 22, 507-517.
- [18] Agius C, Roberts R J. effect of starvation on the melano-macrophage centres of fish [J]. **Journal of Fish Biology**, 1981, 19: 161-169.
- [19] Agius C. The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish [J]. **Journal of Fish Diseases**, 1979, 2: 337-343.
- [20] Herraiz M P. Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus* [J]. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 1986, 12: 117-126.
- [21] Agius C. Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophages of teleost haemopoietic tissues and age-related changes [J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 1991, 15: 1-10.

- parative Immunology, 1981, 5: 597-606.
- [22] Bowden T J, Cook P, Rombout J H W M. Development and function of the thymus in teleosts [J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2005, 19: 413-427.
- [23] J sefsson S, Tater M F. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 1993, 3: 35-49.

Ontogeny of immune organs during early development stage of barfin flounder

XIAO Zhi-zhong¹, YU Dao-de^{1,2}, SUN Zhen-zhen³, XU shi-hong¹, MA dao-yuan¹, LI Jun¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Qingdao Fishery Technology Spread Station, Qingdao 266000, China)

Received: Nov. , 29, 2007

Key words: barfin flounder (*Verasper moseri*); immune organ; head kidney; melano-macrophage centers

Abstract: A histological examination was made on the ontogenetic development of immune organs (thymus, kidney and spleen) from hatching to the 60th day after hatching (DAH) in barfin flounder. The sequences of appearance of the immune organs' anlage were kidney, spleen and thymus, similar to those of other marine teleosts previously documented. The first functional lymphoid organ was head kidney, different from that of other marine teleosts: thymus was the first lymphoid organ normally. During the larval period, the head kidney and thymus were always closed with each other, but the cell bridge was not apparent. During the posterior developmental period of the immune organs, the melano-macrophage centers (MMCs) were seen in all the three immune organs, also including the thymus, although the structure and abundance are different within them. Through the study on immune organs in barfin flounder, we could have a basic acquaintanceship with the ontogeny, maturation and its characteristics of immune organs. And all data from this study would provide a theoretical basis of the further intensive aquaculture of the barfin flounder as well as the application of artificial vaccine.

(本文编辑:刘珊珊)