

大黄鱼头肾免疫细胞研究

徐晓津^{1,2}, 王 军¹, 谢仰杰², 苏永全¹

(1. 厦门大学 海洋与环境学院, 海洋生物重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)头肾印迹片、光镜片和电镜片进行观察。结果表明, 大黄鱼头肾包括淋巴细胞聚集区和颗粒细胞聚集区, 但无肾小球结构。头肾免疫细胞丰富, 包括淋巴细胞、颗粒细胞(I型和II型)、单核细胞和巨噬细胞, 分别占 57.94%、36.43%、5.63%, 表明头肾是大黄鱼免疫细胞的生发中心, 在免疫防御系统中具有重要作用。

关键词: 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*); 头肾; 免疫细胞

中图分类号: Q959.486

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)11-0024-05

头肾既是硬骨鱼类的主要免疫器官, 又是重要的造血器官, 在功能上相当于高等脊椎动物的脊髓^[1]。头肾是免疫细胞如巨噬细胞、颗粒细胞、B淋巴细胞发生、分化和增殖的重要场所, 也是捕获抗原和产生抗体的主要器官^[2], 对鱼体的免疫具有重要作用。目前对鱼类头肾发育的研究, 主要集中在重要经济鱼类, 如大西洋鳕(*Gadus orhua*)^[3]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[4]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[5]、金枪鱼(*Thunnus orientalis*)^[6]等。硬骨鱼类具有丰富的物种多样性, 不同鱼类头肾的发育存在一定差异^[1]。国外在鱼类头肾白细胞形态方面已有一些研究^[7-9], 但迄今为止国内外未见大黄鱼头肾免疫细胞的研究报道。鉴于大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)在中国养殖中的重要地位和养殖病害频发的现状, 深入研究其头肾组织的组织结构、免疫细胞的基本类型, 无疑对促进大黄鱼养殖病害的免疫防治具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验用鱼于 2004 年 6 月至 2005 年 6 月取自福建漳浦重诚水产科技有限公司育苗场。3 月龄鱼体长 5.6 cm ± 0.2 cm, 体质量 3.3 g ± 0.5 g; 6 月龄鱼体长 9.1 cm ± 1.0 cm, 体质量 20.3 g ± 2.4 g; 9 月龄鱼体长 12.6 cm ± 0.9 cm, 体质量 48.3 g ± 2.8 g; 12 月龄鱼体长 19.2 cm ± 2.1 cm, 体质量 104.2 g ± 5.6 g, 每批次取样均为 15 尾。

1.2 方 法

1.2.1 组织涂片及免疫细胞计数

取出头肾, 用 PBS 缓冲液冲洗表面血液, 切开头肾, 将其横断面与干净的载玻片轻轻涂抹, 空气干燥后用 Wright 和 Giemsa 液染色, 制成头肾印迹片。参照卢全章^[10]的方法, 在 Leica DM 4500B 自动数码显微镜油镜下观察细胞形态, 按印迹片自然分布计数 2 000 个免疫细胞, 用 SPSS 软件统计并拍照。

1.2.2 光镜组织标本制作、观察

将 12 月龄大黄鱼头肾剪成小块, Bouin's 液固定, 石蜡包埋, Leica RM2128 型切片机横、纵向连续切片(厚 4~5 μm), Leica AUTOSTAINER XL 染色机中进行 HE 染色, 中性树胶封片。Leica DM 4500B 自动数码显微拍照系统观察和拍照。

1.2.3 电镜组织标本制作、观察

以 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定 12 月龄大黄鱼头肾组织小块, 环氧树脂包埋, 切片后醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, JEM 100CX II 电镜观察并拍照。

收稿日期: 2008-06-12; 修回日期: 2008-09-01

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2006AA10A405); 国家行业公益专项资助项目(200803051); 国家自然科学基金资助项目(40776083); 厦门市科技资助项目(3502Z20063022)

作者简介: 徐晓津(1969), 女, 福建人, 博士研究生, 主要从事海洋生物学研究, E-mail: xxj@jmu.edu.cn; 苏永全, 通讯作者, E-mail: yqsu@xmu.edu.cn

2 结果

2.1 头肾的形态位置

大黄鱼头肾位于围心腔隔膜前背方,通过一狭窄的过渡区与体肾相连。头肾呈扁平状,分左右2叶,2叶头肾的基部相连,心腹隔膜前为头肾,心腹隔膜后为体肾。体肾位于体腔背面,紧贴脊椎下面,以一层腹膜与内脏器官分隔。

2.2 头肾印迹片免疫细胞的形态及其分类计数

头肾的细胞分类计数见表1。由表1可见头肾免疫细胞主要由淋巴细胞和粒细胞组成,其中淋巴细胞占57.94%,粒细胞占36.43%,单核细胞和巨噬细胞占5.63%。头肾印迹涂片中也可见许多粒细胞和淋巴细胞(图1-1,1-2)。表1为不同月龄大黄鱼头肾免疫细胞的种类和所占比例,表中可见,随大黄鱼生长,头肾组织的淋巴细胞呈增多趋势,其他细胞呈下降趋势,SPSS软件统计其差异均极其显著($P < 0.01$)。

淋巴细胞:胞体较圆,细胞核较大,多为圆形或椭圆形,位于细胞中间。核染色质丰富,致密,紫红色;细胞质在核周围,染成浅蓝色,有的只在核凹陷处有少量胞质(图1-1)。

粒细胞:胞体为圆形或椭圆形,比淋巴细胞大。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,细胞质丰富,含较多的细小颗粒(图1-2)。

表1 大黄鱼头肾免疫细胞种类

Tab. 1 Kinds of immune cells in head kidney of *Pseudosciaena crocea*

月龄	免疫细胞数(个)	各种免疫细胞所占比例(%)		
		淋巴细胞	粒细胞	单核细胞和巨噬细胞
3	1 955	49.71	44.11	6.18
6	1 751	52.31	39.94	7.75
9	1 548	67.36	28.87	3.77
12	1 970	62.36	32.81	4.83
均值		57.94	36.43	5.63

2.3 头肾的显微结构

12月龄大黄鱼头肾无被膜,外周仅有一层胶原纤维包裹。头肾实质中无肾单位,属于网状淋巴组织。主要由网状细胞、淋巴细胞、粒细胞、单核细胞等组成,还有少量黑色素巨噬细胞。头肾中有动脉、静脉及其形成的分枝,有丰富的血窦。血窦的窦

腔较大,与静脉相通。根据淋巴细胞和颗粒细胞的分布,头肾可分为淋巴细胞聚集区和粒细胞聚集区。

淋巴细胞聚集区(图1-3):具有大量被染为深蓝紫色、细胞质少的淋巴细胞,胞质嗜碱性。这些细胞紧密聚集于网状结构中,其间为大小不一的血窦。

粒细胞聚集区(图1-3):分散分布于淋巴细胞聚集区周围,区域相对较小、狭窄。粒细胞胞体为圆形或椭圆形,粒细胞染色较浅。血窦腔隙较淋巴细胞的腔隙小,有一些淋巴细胞。淋巴细胞聚集区和粒细胞聚集区之间是连续的,两者无明显界限。

2.4 头肾的超微结构

2.4.1 粒细胞

根据头肾组织的粒细胞内所含特殊颗粒的形态和大小,12月龄大黄鱼头肾粒细胞可分为I型、II型粒细胞。

I型粒细胞:头肾I型粒细胞胞体圆形、胞核偏于一侧,核为卵圆形或马蹄形,极少数有分叶。异染色质约占核区的50%,主要分布在核周缘。细胞质内含有数量中等、大小不等的特殊颗粒,可分为2类:一类是具有棒针状电子致密核心的圆形或椭圆形的颗粒,另一类具有电子致密核心的圆形或椭圆形颗粒,少数颗粒完全失去核心而呈空泡状。细胞质内还有少量呈椭圆形、嵴不明显的线粒体和少量含有丰富的游离核蛋白颗粒的粗面内质网(图1-4)。

II型粒细胞:细胞圆形或长椭圆形,核一般偏位,椭圆形、马蹄形或分叶,胞质内有许多特殊颗粒,其形态大小不一。绝大多数颗粒为杆状,也有少数是三角形、半圆形、鼓锤形、椭圆形和圆形的颗粒。颗粒内电子密度不均匀,有电子致密度较高的粗线状或杆状的核心,位于边缘或中间的杆状颗粒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1-5)。

2.4.2 黑色素巨噬细胞

黑色素巨噬细胞内分散有黑色素颗粒,细胞胞体不规则,伪足多,具1个大的细胞核,胞核形状不规则,内有异染色质,核仁1个,细胞质中有大小不同、密度不同的溶酶体、内质网、线粒体、大量的小泡等(图1-6)。

2.4.3 单核细胞

多为圆形、卵圆形或不规则形,细胞核常偏位,肾形,不规则形或分叶,核仁少见,细胞质和胞器丰富,具有较多的圆形或椭圆形线粒体、粗面内质网以及游离核糖体,高尔基复合体发达,胞质内还具有嗜天青颗粒及空泡,圆形或卵圆形(图1-7)。

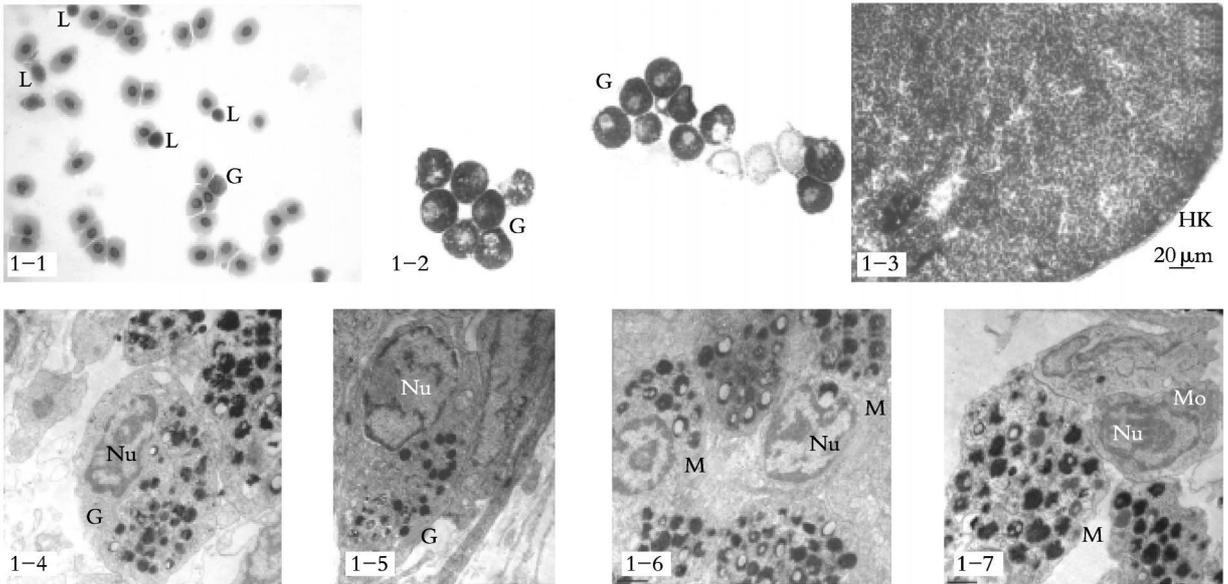


图 1 大黄鱼头肾的免疫细胞

Fig. 1 Immune cells in head kidney of *Pseudosciaena crocea*

1. 头肾组织涂片, 示淋巴细胞、粒细胞; 2. 头肾组织涂片, 示粒细胞; 3. 12月龄纵切片, 示头肾; 4, 5. I型和II型粒细胞; 6. 黑色素巨噬细胞; 7. 单核细胞; 标尺为1 μm

1. Lymphocytes (L) and granulocytes (G) imprint of head kidney; 2. Granulocytes imprint of head kidney; 3. Longitudinal section of head kidney (HK) in 12 month sample; 4, 5. I and II granulocyte (Gc); 6. melanomacrophage (M); 7. Monocyte (Mo); bar = 1 μm

3 讨论

3.1 头肾印迹片免疫细胞的形态及其分类计数

肾脏是脊椎动物的重要泌尿器官, 许多硬骨鱼类头肾在生长发育过程中逐渐失去泌尿功能, 成为次级淋巴器官^[11]。大黄鱼头肾无肾小球, 无泌尿功能。由表 1 可见大黄鱼头肾免疫细胞主要由淋巴细胞和不同类型的粒细胞组成。其中淋巴细胞占头肾免疫细胞总数的 57.94%, 粒细胞数量仅次于淋巴细胞, 表明大黄鱼头肾是淋巴细胞、粒细胞发生的主要器官。3 种南极鱼类 (*Trematomus nicolai*, *Chionodraco hamatus* 和 *Trematomus bernacchii*)、鳕 (*Theragra chalcogramma*)、鲤 (*Cyprinus carpio*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 的有关研究也证明了头肾是重要免疫器官, 是 B 淋巴细胞、粒细胞与巨噬细胞发育和增殖的主要场所^[3, 10, 12~17]。

随着年龄的增长, 大黄鱼头肾重量增加, 头肾白细胞数呈增长的趋势, 与牙鲆、草鱼头肾白细胞的发育相同^[5, 10]。随头肾重量的增加, 不同月龄大黄鱼头肾淋巴细胞、粒细胞、单核细胞和巨噬细胞数量也发生了变化, 差异极其显著 ($P < 0.01$)。作者的研究结果表明, 这种差异与大黄鱼发育的相关性表现为头肾淋巴细胞随个体发育呈增多趋势, 其他头肾细胞呈下降趋势。

3.2 头肾的显微结构

不同鱼类的头肾组织结构有一定的差异。鲤头肾主要为淋巴细胞聚集区^[18]。莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 淋巴细胞聚集区构成淋巴小囊^[19]。草鱼头肾组织类似莫桑比克罗非鱼, 包括淋巴细胞聚集区和粒细胞聚集区, 但淋巴细胞聚集区不形成囊状结构^[20]。硬头鳟 (*Salmo gairdneri*) 头肾组织结构包括淋巴细胞聚集区和内分泌区^[21]。南方鲇 (*Silurus soldatovi meridionali*) 头肾可分为淋巴细胞聚集区、粒细胞聚集区和内分泌区^[22, 23]。大黄鱼头肾有丰富的静脉和血窦, 窦腔较大, 头肾有淋巴细胞聚集区和粒细胞聚集区。淋巴细胞主要分布在门静脉及血窦附近, 有利于捕捉外来物质和抗原呈递。粒细胞主要分布在周围有许多腺细胞的头肾静脉及血窦的周围。这表明大黄鱼的头肾是既不同于肾实质, 也不同于肾间质的典型的淋巴组织, 具有造血和免疫功能。

3.3 头肾的超微结构

根据粒细胞细胞质内所含特殊颗粒的形态和大小, 分为 I 型、II 型和 III 型粒细胞, 其中 II 型粒细胞内特殊颗粒最多, I 型次之, III 型最少。大黄鱼头肾仅有 I 型和 II 型 2 种粒细胞。大黄鱼头肾 I 型粒细胞, 与鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 和南极冰鱼

(*Chaenocephalus lusaceratus lonnerg*) 的头肾 I 型颗粒细胞相近^[9,15], 与金鱼(*Carassius auratus*) 外周血液的嗜中性细胞也相似^[16], 其共同特征是除了含有均质的圆形颗粒外, 还存在有膜包裹的具电子密度核心的圆形颗粒; 大黄鱼的 II 型颗粒细胞与南极冰鱼、小点猫鲨(*Scyliorhinus anicula*) 肾造血组织中的 II 型颗粒细胞相似^[12], 颗粒细胞内有大小不一的均质圆形颗粒。草鱼头肾中含有 3 种颗粒细胞^[19], 大黄鱼与牙鲆一样, 只有 I 型、II 型 2 种颗粒细胞。头肾细胞超微结构的差异可能与环境有关, 亦可能是种属差异。

头肾是产生抗体, 黑色素巨噬细胞聚集的主要场所, 可能在免疫记忆方面起作用^[24]。南极鱼 *T. bernacchii* 淋巴细胞集中区分离的黑色素巨噬细胞具有吞噬功能^[15], 能吞噬外部颗粒或老化细胞(如衰老红细胞)。在鳗鱼(*Engraulis japonicus*) 头肾巨噬细胞较多区域可发现细胞碎片, 表明巨噬细胞能吞噬各种老化细胞^[24,25]。大黄鱼头肾中也发现较多黑色素巨噬细胞。但仍有许多问题有待深入研究, 如黑色素巨噬细胞中心的结构和功能等。

综上所述, 大黄鱼头肾是免疫细胞的重要生发中心, 具有种类较齐全的免疫细胞如淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞和颗粒细胞等, 在免疫防御系统中具有重要作用。

参考文献:

- [1] Press C M, Evensen I. The morphology of the immune system in teleost fishes [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 1999, 9: 309-318.
- [2] 张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况[J]. 水生生物学报, 2000, 24(6): 648-654.
- [3] Schröder M B, Fløe E, Pilstrom L. Localisation of Ig heavy chain mRNA positive cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L) tissues identified by in situ hybridization [J]. **Fish Shellfish Immunol**, 1998, 8: 45-50.
- [4] Grace M F, Manning M J. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson [J]. **Dev Comp Immunol**, 1980, 4: 255-264.
- [5] Yun L, Shicui Z, Guoliang J, et al. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2004, 16: 624-632.
- [6] Watts M, Kato K, Munday B L, et al. Ontogeny of immune system organs in northern blue tuna (*Thunnus orientalis*) [J]. **Aquaculture Research**, 2003, 34: 13-22.
- [7] Temmick J H M, Bayne C J. Ultrastructural characterization of leucocytes in the prohepatos of carp (*Cyprinus carpio* L) [J]. **Developmental and Comparative Im-**

munology, 1987, 11: 125-137.

- [8] Tadashi T J, Satimaru S. Melanophage 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.
- [9] Messegue J, Lopez Ruiz A, Gareir 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.
- [10] 卢全章. 草鱼头肾免疫细胞组成和数量变化[J]. 动物学研究, 1998, 1: 11-16.
- [11] Press C. M, Evensen O. The morphology of the immune system in teleost fishes[J]. **Fish & Shellfish Immunol**, 1999, 9(4): 309-318.
- [12] Romano N, Ceccariglia S, Mazzini M, et al. Lymphomyeloid organs of the Antarctic *Trematomus nicolai* and *Chionodraco hamatus* (Teleostei: Nototheniidae): a comparative histological studies [J]. **Polar Biol**, 2000, 23: 323-328.
- [13] Botham J W, Manning M J. The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L and ontogenetic development of allograft reactivity[J]. **J Fish Biol**, 1981, 19: 403-414.
- [14] Romano N, Ceccariglia S, Mastrolia L, et al. Cytology of lymphomyeloid head kidney of Antarctic fishes *Trematomus bernacchii* (Nototheniidae) and *Chionodraco hamatus* (Channichthyidae) [J]. **Tissue & Cell**, 2002, 34(2): 63-72.
- [15] Romano N, Tavernier Thiele J J, Maanen J C, et al. Distribution of leucocyte subpopulations in developing carp (*Cyprinus carpio* L.): Immunocytochemical studies[J]. **Fish Shellfish Immunol**, 1997a, 7: 439-453.
- [16] Press C M, Evensen J. The morphology of the immune system in teleost fishes[J]. **Fish & Shellfish Immunol**, 1999, 4: 309-318.
- [17] Abelli L, Gallo V P, Civinini A, et al. Immunocytochemical and ultrastructural evidence of adrenal chromatin cell subtypes in sea bass *Dicentrarchus labrax* (L) [J]. **Gen Comp Endocrinol**, 1996, 101: 113-122.
- [18] 龚宁, 聂其灼. 鲤鱼头肾显微结构研究. 山地农业生物学报, 2001, 20(1): 20-24.
- [19] 岳兴建, 张耀光, 敖磊, 等. 南方鲷头肾的组织学和超微结构[J]. 动物学研究, 2004, 25(4): 327-333.
- [20] Ribelin W E, Migaki G. The Pathology of Fishes [M]. Translated by Hua D K, Li Y Z. Beijing: Agricultural Publishing House. 1981, 16, 205-220.
- [21] Sailendri K, Muthukappapan V R. Morphology of lymphoid organs in cichlid teleost, *Tilapia mossambica* [J]. **J Morphol**, 1975, 147: 109-121.
- [22] Fishelson L. Cytological and morphological ontogene-

- sis and involution of the thymus in cichlid shes (*Cichlidae, Teleostei*)[J]. **J Morphol**, 1995, 228: 175-190.
- [23] Zapata A, Chibá A, Varas A. Cell and Tissue of the Immune System of the Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment[M]. San Diego: Academic Press, 1996. 255-287.
- [24] Fishelson L. Comparative gonad morphology and sexuality of the Muraenidae (Pisces, Teleostei) [J]. **COPEIA**, 1992, 192: 147-209.
- [25] Ellis A E. Antigen trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* [J]. **J Fish Dis**, 1980, 3: 413-426.

Investigation on immune cells in head kidney of *Pseudosciaena crocea*

XU Xiaojin^{1, 2}, WANG Jun¹, XIE Yangjie², SU Yongquan¹

(1. College of Oceanography and Environmental Science, Key Laboratory of Marine Biology, Xiamen University, 361005, 2. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021)

Received: Jun., 12, 2008

Key words: *Pseudosciaena crocea*; head kidney; immune cell

Abstract: The head kidney of *Pseudosciaena crocea* was observed by super slice and slice technique in the present paper. The results showed that head kidney was composed of two regions, i. e., lymphocyte aggregate and granulocyte aggregate. The kidney glomerulus was absent, and the immune cells including lymphocytes, granulocytes (I and II type), monocytes and macrophages were abundant in the head kidney, accounting for 57.94%, 36.43% and 5.63% respectively. It seems that the head kidney is a germinal center of the immunocytes and plays the significant roles for immunologic defences.

(本文编辑: 谭雪静)