

绿海龟(*Chelonia mydas*)血细胞发育过程的观察*

李长玲 曹伏君 黄翔鹄 刘楚吾 黄庆嘉

(广东海洋大学水产学院 湛江 524025)

提要 采用 Wright's 液染色方法,对绿海龟的外周血、骨髓、脾脏和肝脏等几种组织的印片和涂片进行观察研究。结果表明,骨髓和脾脏是绿海龟的主要造血器官,红血细胞、粒细胞、单核细胞等血细胞主要在骨髓中发生,淋巴细胞主要在脾脏中发生;脾脏中可以发现晚幼红血细胞,脾脏可能是红血细胞的成熟场所;肝脏中无原始型的血细胞,可能不是其造血器官。红血细胞的发育经历了 5 个阶段:原红血细胞、早幼红血细胞、中幼红血细胞、晚幼红血细胞和红血细胞等阶段,其胞体体积经历了由小到大,由大到小、再到大的发育过程;粒细胞的发育经历了 5 个阶段:原粒细胞、早幼粒细胞、中幼白细胞、晚幼白血细胞和白细胞等阶段,胞体体积均由大到小变化,核分叶可能是粒细胞的衰老的标志;淋巴细胞和单核细胞的发育各经历了 3 个阶段。各细胞发育均经历了由有细胞核仁到无细胞核仁的变化过程。原血细胞和幼血细胞在造血器官中可以进行有丝分裂,部分成熟的红血细胞可以在外周血中进行直接分裂。

关键词 绿海龟, 血细胞, 血细胞发育, 造血器官

中图分类号 Q954.56

绿海龟(*Chelonia mydas*)隶属于爬行纲(Reptile)、龟鳖目(Testudoformes)、海龟科(Cheloniidae)、海龟属(*Chelonia*),为我国二级保护动物(张孟闻等,1998;张金泉,1996)。国内外学者对爬行类血细胞形态结构的研究已有所报道。Szarski 等(1966)对两栖爬行动物血细胞大小进行过研究,吴孝兵等(1998)也研究了四种龟类血细胞显微形态学参数,王石泉(1995)对中华鳖外周血细胞的显微形态结构也进行了研究,曹伏君等(2001)、李长玲等(2000,2001)进行了乌龟外周血细胞的显微和超微结构以及血细胞发育的研究,江剑平等(2003)对中华鳖的红血细胞的发育进行了研究,Yuka 等(2007)对红海龟(*Caretta caretta*)发育过程前 40 个月的红血细胞和白细胞数量变化进行了研究。

众所周知,哺乳动物血细胞的发生器官是骨髓、胸腺、脾脏、淋巴结,在某些特殊情况下肝脏也有一定的造血功能(上海第一医学院,1978)。关于绿海龟血细胞的大小和数量与季节和种群特征的关系已有报道(Frari,1997;Bolten *et al.*,1992)。但对绿海龟的血

细胞发育未见报道,为此,作者对绿海龟的骨髓、脾脏、肝脏等器官的涂片和印片进行了观察与研究,旨在为研究绿海龟的造血器官、血细胞的发育规律,肝脏的有无造血功能,丰富爬行动物的血液学研究的内容,为脊椎动物的系统演化及爬行类血液学的研究提供基础资料,也为爬行动物的免疫学积累资料。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

实验所用的绿海龟(*Chelonia mydas*)购自海南,共 4 只,雌雄各 2 只,体重为 5000—9200g。活体运回实验室,经检查、鉴定无明显病变。暂养在水族箱,水温为 22—28℃,盐度为 22—30,直到采样。

1.2 制片方法

解剖后,迅速取出肝脏、脾脏、骨髓。将肝脏和脾脏于 0.85% PBS 生理盐水中洗去器官表面的血渍,用滤纸吸干,在用灭菌的解剖刀将每个器官切 4 个断面,每个断面在洁净的载玻片上轻轻印 6 个印迹面,

* 国家科技支撑计划资助项目,2007BAD29B03 号。李长玲,硕士,副教授, E-mail: ybcl@tom.com

通讯作者: 刘楚吾,教授, E-mail: liucw@gdou.edu.cn

收稿日期: 2008-03-15, 收修改稿日期: 2008-05-18

再进行涂片;骨髓取股骨,挤出骨髓,进行涂片;外周血尾静脉取血,常规血涂片,空气中干燥后甲醇固定,进行常规 Wright's 染液染色,充分水洗,干燥后用中性树胶封片(芮菊生等,1980),在德国蔡氏 AXIOSKOP40FL 数码显微成像系统下观察并拍照。每种细胞随机取样 50—100 个,用显微量尺测定血细胞的直径,取其平均值和标准差(S.D)等统计处理。

1.3 结果判定标准

各系统、各发育阶段细胞形态标准的划分,参照《血细胞学图谱》(王凤计,1980)和《组织胚胎学》(上海第一医学院,1978)上的标准,即一般将血细胞按照成熟过程分为 3 个阶段:原始阶段、幼稚阶段和成熟阶段。由于幼稚阶段的红血细胞系和粒细胞系在成熟过程中形态变化较大,可将其幼稚阶段再分为早幼、中幼、晚幼三个时期,粒细胞系根据其特殊颗粒出现的特点,可将其幼稚阶段分为早幼(无特殊颗粒)、中幼和晚幼(有特殊颗粒)3 个阶段,因此其发育分为 5 个阶段:原始阶段、早幼阶段、中幼阶段、晚幼阶段、成熟阶段。

2 结果

2.1 红血细胞系各发育阶段的形态特点

2.1.1 原红血细胞 胞体较大,圆形或椭圆形,长径为 $(15.60\pm 1.39)\mu\text{m}$,短径为 $(13.98\pm 1.44)\mu\text{m}$ 。胞浆染成深蓝色,围绕着细胞核的周围,边缘着色加深,胞核周围有浅色环带区存在,无任何颗粒。胞核卵圆形或圆形,居中或偏位,时与边缘相切,占细胞的绝大部分,长径为 $(12.43\pm 0.53)\mu\text{m}$,短径为 $(11.58\pm 0.94)\mu\text{m}$,核膜清晰;核染色质染成深紫色,稍粗,副染色质染成红色,使得染色质整体似深紫色,无空白感。核仁 2—4 个,染成蓝色,与周围无明显界限,较平坦或有凹陷感(图 1a)。在骨髓涂片上,偶尔可见原红血细胞分裂的现象(图 1b)。

2.1.2 早幼红血细胞 细胞圆形或椭圆形,长径为 $(18.28\pm 1.87)\mu\text{m}$,短径为 $(16.48\pm 1.38)\mu\text{m}$ 。体积比原红血细胞稍大,胞浆有时稍多,有时稍少,相对与原红血细胞多,蓝色稍淡,但色调均匀一致,无颗粒,有的细胞有伪足状突起。胞核圆形,仍占细胞绝大部分,长径为 $(13.38\pm 1.84)\mu\text{m}$,短径为 $(12.48\pm 1.83)\mu\text{m}$,紫红色的染色质开始凝聚,但尚未成块状,而成若断若续、较粗重的网状结构。核仁小,不够清晰,有时欠缺(图 1c)。

2.1.3 中幼红血细胞 细胞圆形或椭圆形,长径

为 $(13.58\pm 1.21)\mu\text{m}$,短径为 $(11.70\pm 1.38)\mu\text{m}$,体积同早幼红血细胞或稍小。核圆形,居中或稍偏,仍占细胞大部分,核长径为 $(9.98\pm 0.69)\mu\text{m}$,短径为 $(8.55\pm 0.92)\mu\text{m}$,染色质着色淡,开始出现小块状,可见其间的空白区,间隙清晰发白。胞浆所占的比例比前期稍多,或略少于核,或核与胞浆各半,由嗜碱的深蓝色,到嗜多色性的浅蓝色或灰蓝色,绕于核周,色调均匀(图 1d)。

2.1.4 晚幼红血细胞 细胞圆形或略呈椭圆形,长径为 $(16.20\pm 1.29)\mu\text{m}$,短径为 $(14.55\pm 1.23)\mu\text{m}$;核圆形,居中,核长径为 $(6.08\pm 0.76)\mu\text{m}$,短径为 $(5.25\pm 0.71)\mu\text{m}$;紫褐色染色质开始聚集成块,间隙模糊不清,着色较浅。胞浆多,呈浅灰色或橘红色绕于核周(因胞质含有血红蛋白所致)(图 1e)。在骨髓的涂片中,幼红血细胞的三个期,都偶尔可见直接分裂的现象(图 1f)。

2.1.5 红血细胞 成熟的细胞长椭圆形,表面光滑,长径为 $(18.87\pm 1.62)\mu\text{m}$,短径为 $(12.78\pm 1.20)\mu\text{m}$,核卵圆形或圆形,一般位于细胞中央,核长径为 $(6.41\pm 0.81)\mu\text{m}$,短径为 $(4.55\pm 0.56)\mu\text{m}$;核内含有致密的染色质团块,染成绛紫红色。胞质染成砖红色,颜色均匀(图 1g)。此外,在外周血中除了成熟的红血细胞外,还有正在成熟的红血细胞,比较少,有时会成群出现或单独出现。与正常的红血细胞相比,细胞较小,细胞为近圆形,其核为圆形,较大,染色质结构疏松,着色较浅;胞质被染成均匀的灰紫蓝色(图 1g)。在绿海龟的外周血细胞中,有时可见到正在进行直接分裂的红血细胞,在红血细胞的直接分裂中可以看到,细胞核中间出现缢痕,分成两个等大小的细胞核(图 1h)。

2.2 粒细胞系各发育阶段的形态特点

各种粒细胞的形态在发育的各阶段基本为圆形或椭圆形。

原粒细胞 细胞的长径为 $(16.35\pm 1.47)\mu\text{m}$,短径为 $(13.73\pm 1.74)\mu\text{m}$ 。胞浆量较少,天蓝色,围绕与核的周围,均匀一致或周边加深、近核处稍淡,常有钝伪足出现,无任何颗粒。胞核圆形或椭圆形,居中或偏位,占细胞大部分,长径为 $(12.13\pm 0.73)\mu\text{m}$,短径为 $(10.35\pm 0.76)\mu\text{m}$,淡紫色的染色质细粒成网,副染色质着色浅淡,似有空白感。分布均匀,可见核仁,核仁周界明显,有向外突感(图 1i)。在骨髓的涂片中,偶尔可见原粒细胞分裂的现象(图 1j)。

早幼粒细胞 细胞圆形或卵圆形,细胞的长

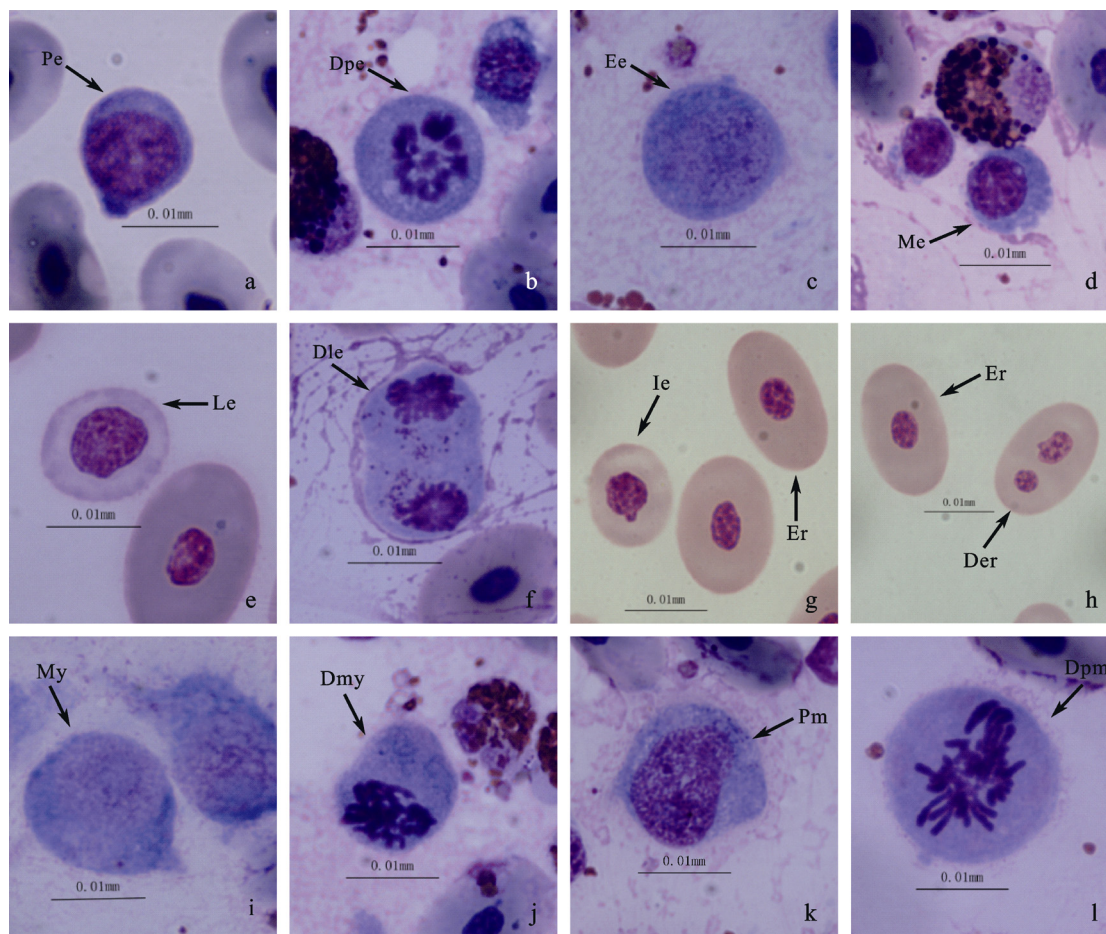


图 1 绿海龟血细胞发育过程的观察()

Fig.1 Observation on the development of blood cells of *C. mydas* ()

a. 原红血细胞(Pe)(骨髓涂片); b. 分裂的原红血细胞(Dpe)(骨髓涂片); c. 早幼红血细胞(Ee)(骨髓涂片); d. 中幼红血细胞(Me)(骨髓涂片); e. 晚幼红血细胞(Le)(骨髓涂片); f. 分裂的晚幼红血细胞(Dle)(骨髓涂片); g. 未成熟的红细胞(Ie), 红细胞(Er)(血涂片); h. 分裂的红血细胞(Der)(血涂片); i. 原始粒细胞(My)(骨髓涂片); j. 分裂的原粒细胞(Dmy)(骨髓涂片); k. 早幼粒细胞(Pm)(骨髓涂片); l. 分裂的早幼粒细胞(Dpm)(骨髓涂片)

径为 $(17.50 \pm 1.52) \mu\text{m}$, 短径为 $(15.75 \pm 1.79) \mu\text{m}$; 胞核圆形或椭圆形, 偏于一侧, 长径为 $(11.48 \pm 1.44) \mu\text{m}$, 短径为 $(9.78 \pm 1.25) \mu\text{m}$, 染色质细粒状或粗粒网状, 核仁没有原粒细胞清晰。胞浆稍多, 淡蓝色, 含有嗜天青颗粒, 开始少, 逐渐增多, 至后期散布于整个胞浆内, 这种颗粒大小不均匀, 呈鲜艳的暗紫红色, 有时也可分布于核上(图 1k)。在骨髓的涂片中, 偶尔可见早幼粒细胞分裂的现象(图 1l)。

中性中幼粒细胞 细胞圆形或椭圆形, 细胞的长径为 $(15.70 \pm 1.39) \mu\text{m}$, 短径为 $(13.93 \pm 1.26) \mu\text{m}$; 胞核偏于一侧, 长径为 $(12.30 \pm 1.02) \mu\text{m}$, 短径为 $(9.70 \pm 1.28) \mu\text{m}$, 多为椭圆形、肾形。紫红色的染色质粗粒网状或有小的凝聚。核仁不清或消失。胞浆稍多或核浆各半, 呈淡蓝色, 有黄色嗜中性颗粒或不明显,

嗜天青颗粒逐渐减少(图 2a)。在骨髓的涂片中, 偶尔可见中性中幼粒细胞分裂的现象(图 2b)。

中性晚幼粒细胞 细胞圆形或略椭圆形, 细胞的长径为 $(15.18 \pm 1.82) \mu\text{m}$, 短径为 $(12.80 \pm 1.53) \mu\text{m}$; 胞核呈肾形或近圆形, 呈淡蓝色, 常偏于细胞一侧, 长径为 $(12.05 \pm 0.75) \mu\text{m}$, 短径为 $(7.20 \pm 0.69) \mu\text{m}$, 染色质粗条状, 排列紧密, 胞质染成粉红或淡红色, 嗜中性颗粒细小, 充满整个胞质(图 2c)。

中性粒细胞 细胞的长径为 $(16.24 \pm 1.15) \mu\text{m}$, 短径为 $(15.34 \pm 1.15) \mu\text{m}$; 边缘较平整。在海龟外周血细胞中嗜中性粒细胞的比例较多, 细胞呈圆形。细胞中核的形状不规则, 有圆形的, 有呈肾形的, 也有分叶的(图 2d, e), 但出现分叶的细胞数量很少。核多偏在细胞的一侧, 约占细胞体积的 $1/3—1/2$, 长径为

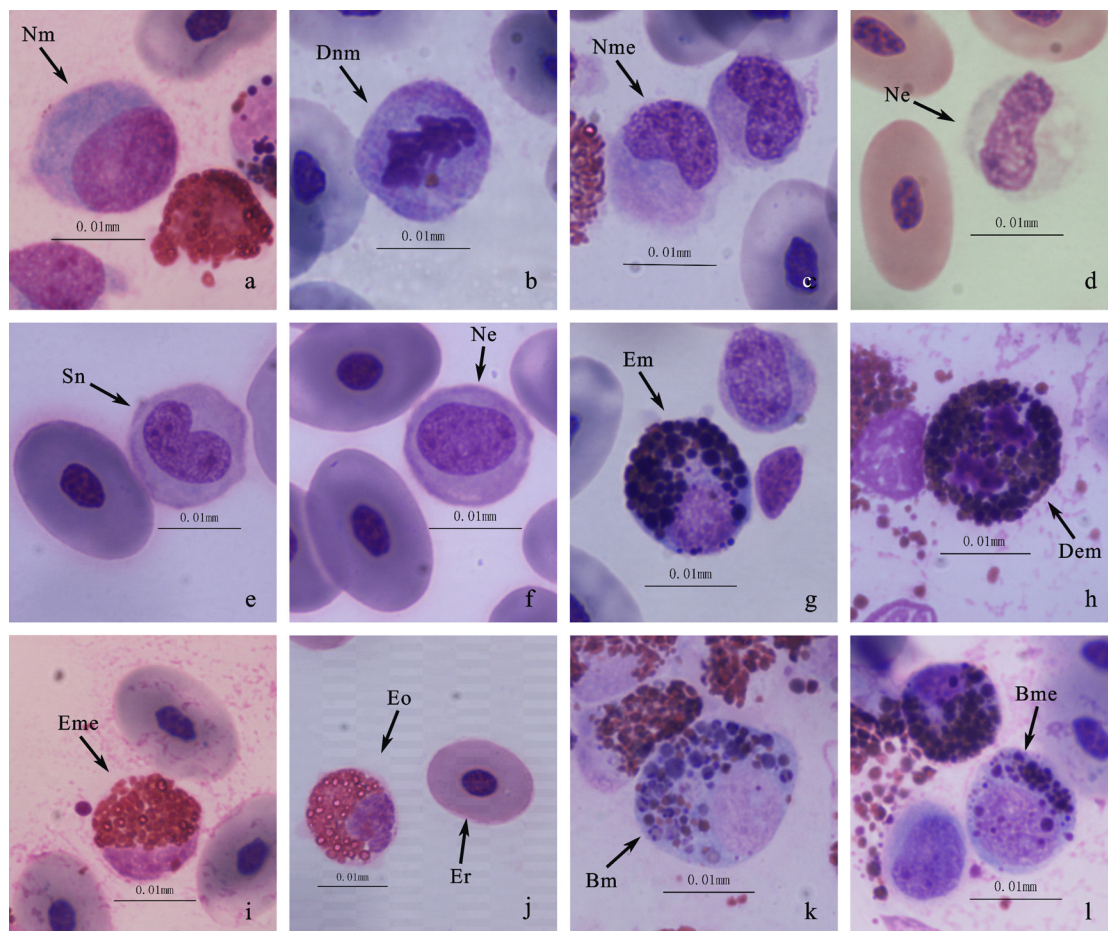


图2 绿海龟血细胞发育过程的观察()

Fig.2 Observation on the development of blood cells of *C. mydas* ()

a. 嗜中性中幼粒细胞(Nm)(骨髓涂片); b. 分裂的中性中幼粒细胞(Dnm)(骨髓涂片); c. 嗜中性晚幼粒细胞(Nme)(骨髓涂片); d. 嗜中性粒细胞(Ne)(血涂片); e. 具有分叶核的嗜中性粒细胞(Sn)(血涂片); f. 晚幼嗜中性粒细胞(Ne)(血涂片); g. 嗜酸性中幼粒细胞(Em)(骨髓涂片); h. 分裂的嗜酸性中幼粒细胞(Dem)(骨髓涂片); i. 嗜酸性晚幼粒细胞(Eme)(骨髓涂片); j. 嗜酸性粒细胞(Eo)(血涂片); k. 嗜碱性中幼粒细胞(Bm)(骨髓涂片); l. 嗜碱性晚幼粒细胞(Bme)(骨髓涂片); N: 核

(12.13 ± 1.04) μm , 短径为(8.71 ± 1.17) μm ; 染色质斑块状, 着色深浅不均。胞质染成粉红色, 胞质中有细小的、染成淡蓝色的嗜中性颗粒和少量不均匀分布的嗜天青颗粒, 在细胞质的边沿有不明显的小囊泡, 在外周血的涂片上可以观察到晚幼中性粒细胞(图 2f)。

酸性中幼粒细胞 细胞圆形或略椭圆形, 细胞的长径为(15.73 ± 2.10) μm , 短径为(13.55 ± 1.66) μm ; 胞核椭圆形, 常偏于细胞一侧, 长径为(9.50 ± 1.38) μm , 短径为(6.65 ± 1.37) μm ; 染色质粗粒网状, 核仁不清晰或消失。胞浆淡蓝色或灰蓝色, 内有圆形、大小一致、有折光性、状如剥开的石榴子状的颗粒, 早期的颗粒有淡黄色、暗红色、蓝黑色和橘黄色, 当细胞非常幼稚时, 所含颗粒少, 随着细胞逐渐成熟, 所含嗜酸性颗粒越多, 直至充满胞浆, 颜色趋于一致

的橘黄色(图 2g)。在骨髓的涂片中, 偶尔可见分裂的现象(图 2h)。

酸性晚幼粒细胞 细胞圆形, 细胞的长径为(13.16 ± 2.39) μm , 短径为(12.05 ± 2.12) μm ; 胞核圆形, 偏于细胞一侧, 长径为(8.17 ± 1.26) μm , 短径为(5.25 ± 1.06) μm ; 染色质粗条状, 排列紧密, 胞浆内充满嗜酸性颗粒, 染成橘红色, 大小一致, 呈米粒状(图 2-i)。

嗜酸性粒细胞 嗜酸粒细胞呈圆形, 细胞的长径为(15.24 ± 1.74) μm , 短径为(14.34 ± 1.52) μm ; 核质比较小, 核不规则, 有分叶现象, 常偏于细胞的一侧, 长径为(7.94 ± 1.81) μm , 短径为(4.98 ± 1.05) μm 。染色质颗粒粗大, 染成紫红色。细胞质粗糙, 呈橘红色。胞质中充满较大的特殊颗粒, 颗粒呈圆形, 大小均匀, 为嗜酸性, 染成亮红色, 分散在细胞的一侧,

细胞内特殊颗粒量多时,可散落在胞核上(图 2j)。

嗜碱性中幼粒细胞 细胞圆形,细胞的长径为 $(14.38\pm 1.11)\mu\text{m}$,短径为 $(13.08\pm 1.36)\mu\text{m}$;胞核圆形或椭圆形;紫红色的染色质呈束状,较为纤细,长径约为长径为 $(9.38\pm 1.02)\mu\text{m}$,短径为 $(7.33\pm 1.04)\mu\text{m}$;核仁模糊不清或消失。胞浆淡蓝色,含有大小不等、分布散乱的、呈暗紫色的嗜碱性颗粒,常覆盖于核上(图 2k)。

嗜碱性晚幼粒细胞 细胞圆形或椭圆形,细胞的长径约为 $(14.55\pm 1.00)\mu\text{m}$,短径约为 $(13.00\pm 0.62)\mu\text{m}$;胞浆逐渐增多,胞核半圆形或椭圆形,中位或偏位,胞核长径约为 $(9.75\pm 0.51)\mu\text{m}$,短径约为 $(8.98\pm 0.55)\mu\text{m}$,染色质粗糙,核仁消失,胞浆淡蓝色,其间稀疏地散布有大小不等、染成深蓝色的嗜碱性颗粒,并常覆盖于胞核上面(图 2l)。

嗜碱性粒细胞 细胞呈圆形,细胞的长径约为 $(17.05\pm 0.78)\mu\text{m}$, $(15.98\pm 1.05)\mu\text{m}$;胞质中含有特殊颗粒很大,呈圆形或不规则形,分布不均匀,多聚集于细胞核周围,颗粒嗜碱性,被染成紫红色。细胞核多呈圆形,体积较小,偏心位,常为嗜碱性颗粒所覆盖,长径约为 $(7.12\pm 0.94)\mu\text{m}$, $(5.18\pm 0.78)\mu\text{m}$;核染成紫红色,染色质呈块状,染成紫蓝色。胞质疏松,染成淡红色或毛玻璃样无色胞质表面伸出伪足(图 3a)。

2.3 淋巴细胞系各发育阶段的形态特点

原淋巴细胞 细胞圆形或略呈圆形,细胞的长径为 $(14.98\pm 1.88)\mu\text{m}$, $(13.10\pm 1.19)\mu\text{m}$;细胞核圆形或椭圆形,居中或偏位,核周界明显,核的长径为 $(12.48\pm 1.72)\mu\text{m}$, $(10.88\pm 1.34)\mu\text{m}$;深紫色的染色质在各系细胞中最粗糙,正副染色质间不透明,列成粗

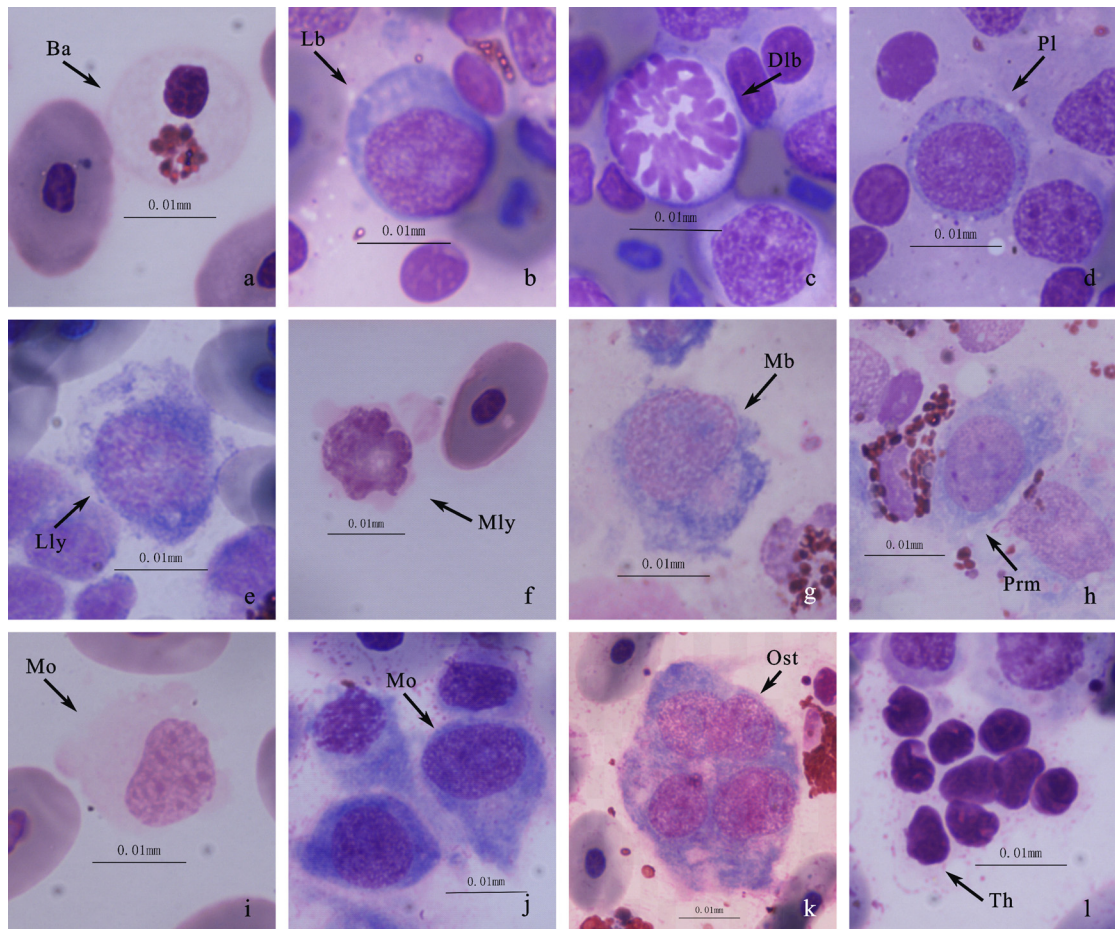


图 3 绿海龟血细胞发育过程的观察()

Fig.3 Observation on the development of blood cells of *C. mydas* ()

a. 嗜碱性粒细胞(Ba)(血涂片); b. 原淋巴细胞(Lb)(脾脏涂片); c. 分裂的原淋巴细胞(Dlb)(脾脏涂片); d. 幼淋巴细胞(Pl)(脾脏涂片); e. 大淋巴细胞(Lly)(血涂片); f. 小淋巴细胞(Mly)(血涂片); g. 原单核细胞(Mb)(骨髓涂片); h. 幼单核细胞(Prm)(骨髓涂片); i. 单核细胞(Mo)(血涂片); j. 成骨细胞(Os)(骨髓涂片); k. 破骨细胞(Ost)(骨髓涂片); l. 血栓细胞(Th)(骨髓涂片)

网状。核仁 1—3 个, 蓝色周界明显, 似凹陷小洞, 无突感。胞浆极少, 深蓝色或鲜蓝色, 胞核周围有浅色环带区存在, 无颗粒; 核偏于细胞的一边, 其细胞质中有一个似空泡、圆形的浅色区(图 3b)。在脾脏的涂片中, 偶尔可见分裂的现象(图 3c)。

幼淋巴细胞 大小与原淋巴细胞相似, 细胞的长径为 $(15.38 \pm 1.66) \mu\text{m}$, 短径 $(13.90 \pm 1.51) \mu\text{m}$; 胞核圆形或椭圆形, 居中或偏位, 或偶尔有小凹陷, 仍占细胞的大部分; 长径为 $(12.85 \pm 1.77) \mu\text{m}$, 短径 $(10.68 \pm 1.11) \mu\text{m}$; 染色质粗糙、较致密; 核仁不明显或消失。胞浆鲜蓝色或淡蓝色(比原淋巴细胞色浅), 无颗粒或有嗜天青颗粒(图 3d)。

淋巴细胞 细胞圆形或不规则形, 细胞的长径为 $(13.80 \pm 3.62) \mu\text{m}$, 短径为 $(11.90 \pm 3.28) \mu\text{m}$; 根据淋巴细胞的大小可细分为小淋巴细胞和大淋巴细胞。小淋巴细胞体积较小, 在淋巴细胞中所占的比例大, 大淋巴细胞体积较大, 核所占的比例大, 位于细胞中央或与质膜相切, 着色较浅, 长径为 $(11.27 \pm 2.73) \mu\text{m}$, $(8.80 \pm 2.29) \mu\text{m}$; 核外的细胞质浅染, 胞浆染成深蓝色, 在核外围呈环核带或仅在胞核凹陷处可见, 胞质总是向外伸出伪足样的突起; 核中染色质较稠密, 着色较深, 被染成紫色(图 3e, f)。

2.4 单核细胞系各发育阶段的形态特点

原单核细胞 细胞圆形或不规则形状, 细胞的长径为 $(18.05 \pm 1.91) \mu\text{m}$, 短径为 $(13.58 \pm 2.10) \mu\text{m}$; 胞核形态多样, 常呈不规则形, 长径为 $(12.13 \pm 1.02) \mu\text{m}$, 短径为 $(10.28 \pm 0.77) \mu\text{m}$ 。紫红色的染色质呈纤细的网状, 分布不均匀; 有核仁, 一般 1—3 个, 较清晰; 胞浆较丰富, 浅蓝色或灰蓝色, 不发亮, 如毛玻璃样, 常有钝伪足突出(图 3g)。

幼单核细胞 细胞体常较原单核细胞大, 细胞的长径为 $(16.85 \pm 2.25) \mu\text{m}$, 短径为 $(12.93 \pm 1.17) \mu\text{m}$; 圆形或椭圆形, 有时非常不规则; 胞核形状不一, 长径为 $(11.88 \pm 0.81) \mu\text{m}$, 短径为 $(9.60 \pm 1.20) \mu\text{m}$; 染色质仍较纤细, 已开始聚集, 直至呈细网状。核仁可见或不清晰。胞浆增多, 灰蓝色, 常有伪足出现, 并散有许多细小而呈砂粒状的嗜天青颗粒(图 3h)。

单核细胞 细胞圆形或卵圆形或不规则形, 细胞的长径为 $(19.34 \pm 2.12) \mu\text{m}$, 短径为 $(14.75 \pm 1.81) \mu\text{m}$; 核圆形或椭圆形或不规则形, 较大, 占整个细胞的 $1/3$ — $1/2$, 位于细胞中央, 长径为 $(12.19 \pm 0.98) \mu\text{m}$, 短径为 $(9.30 \pm 1.06) \mu\text{m}$; 核中染色质的分布比较疏松, 染成红紫色, 比淋巴细胞的染色质染色

浅。胞质丰富, 染成灰蓝色, 表面常伸出许多伪足状突起, 可见分散、细小的嗜天青颗粒和大小不一的空泡。单核细胞与较大的淋巴细胞较相似, 但前者体积较大, 核质比例较小, 胞质更丰富(图 3i)。

2.5 其他细胞

2.5.1 成骨细胞 常数个一起出现, 细胞为长椭圆形, 细胞的长径为 $(24.60 \pm 2.39) \mu\text{m}$, 短径为 $(12.20 \pm 1.57) \mu\text{m}$; 核圆形, 常偏于一侧, 长径为 $(12.08 \pm 1.12) \mu\text{m}$, 短径为 $(10.45 \pm 1.61) \mu\text{m}$; 染色质粗糙, 排列呈网状, 可见核仁。胞浆灰蓝色, 不均匀, 呈泡沫状, 距核较远处, 常有一淡染色区, 可见少许嗜天青颗粒(图 3j)。

2.5.2 破骨细胞(颗粒多核网状细胞) 是骨髓中最大的固定多核网状细胞, 其形状不规则, 周边不整, 最大者长径可达 $42.5 \mu\text{m}$, 短径为 $37.5 \mu\text{m}$, 有 2 个或数 10 个圆形或椭圆形的胞核, 每个核各有 1—2 个明显的蓝色核仁, 从细粒网状(幼稚型)到粗糙网状, 胞浆极为丰富, 淡蓝色至蓝灰色, 其间散布有很多粗重的嗜天青颗粒(图 3k)。

2.5.3 血栓细胞 细胞体积较小淋巴细胞小, 长径为 $(10.94 \pm 1.30) \mu\text{m}$, 短径为 $(6.35 \pm 0.88) \mu\text{m}$; 圆形、椭圆形或纺锤形, 核质比大, 细胞核圆形或椭圆形, 染成暗紫红色, 比淋巴细胞核染色深, 细胞质极薄或核零星分布, 甚至呈裸核状, 细胞质边界模糊, 显浅蓝色, 在造血器官中集群现象不明显, 造血器官中也没有发现血栓细胞的前体细胞, 未找到其发育的证据(图 3l)。

3 讨论

3.1 血细胞的来源与增殖

血细胞起源于造血干细胞, 造血干细胞具有高度自我更新能力和多向分化潜力, 是不均一的细胞群体, 由不同年龄等级的干细胞组成, 在细胞大小、比重、形状、行为特征、表面抗原、细胞周期及调控机制等方面均存在较大差异, 缺乏直接的形态学鉴别特征(裴雪涛, 2004)。因此单纯的形态学方法难以辨认造血干细胞。造血干细胞的分裂有不均一性, 通常通过不对称有丝分裂形成两个子代细胞, 其中一个仍维持造血干细胞的全部特征, 即自我更新, 另一个子细胞则进一步分化, 成为造血祖细胞。造血祖细胞是部分特化的细胞, 它可以分裂并产生某种类型的细胞(两个祖细胞或两个分化细胞), 但是这些细胞都失去了自我复制能力。造血干细胞的分化是一个逐

级放大的过程, 这些细胞逐步分化成熟经由造血祖细胞到形态可辨认的前体细胞, 最终分化为成熟的各種功能血细胞和免疫活性细胞, 并最终走向死亡(裴雪涛, 2004)。本实验观察到各类前体血细胞的有丝分裂现象。CD34 抗原是与造血干细胞相关的一个阶段特异抗原, 主要存在于幼稚的造血干/祖细胞(裴雪涛, 2004), 目前对于哺乳类造血干/祖细胞的识别、分离、纯化和鉴定等研究多是建立在其表面抗原为标志的基础上, 利用抗体介导的细胞分离技术和单克隆抗体对其进行分离纯化。到目前为止, 对爬行动物血细胞发生的研究仅限于从前体细胞到成熟细胞, 对之前的干/祖细胞和之后的衰老过程的研究仍是空白。鉴于造血干细胞的不均一特点, 单纯从形态学特征上来鉴别是远远不够的, 必须借助于细胞学、免疫学、分子生物学等技术和方法, 才能在爬行动物血细胞发生研究方面有大的进展和突破。

3.2 血细胞的发生场所

细胞发生是指血细胞起源、增生、分化及发育成熟的过程。现代研究证实, 哺乳类胚胎时期各器官的造血功能都是由于卵黄囊的造血干细胞通过血流依次种植到肝脏、脾脏、骨髓、淋巴结, 引起造血, 到骨髓后这种造血功能终生维持(江剑平等, 2003)。低等脊椎动物造血部位是肾脏和脾脏, 其次是肠黏膜下组织、肝脏、胰脏等。爬行动物是在陆地繁殖的变温羊膜动物, 在脊椎动物进化中有承上启下的作用。爬行动物已具有骨髓, 已成为成体动物的一种主要造血器官(Tavassoli *et al*, 1983; 陆宇燕等, 1996)。

在绿海龟肝脏涂片和印片中虽然观察到各类血细胞的幼稚细胞, 但未发现各类血细胞的原始细胞, 笔者认为, 确定一种器官是否为造血器官, 应该以其是否存在有原始血细胞和幼稚血细胞为标准, 一个器官中只有幼稚的血细胞, 而没有原始的血细胞只能是血细胞发育成熟的场所, 因此肝脏不是绿海龟的血细胞发生的场所, 与乌龟的研究结果相似(曹伏君等, 2001; 李长玲等, 2000, 2001)。

龟鳖类不同血细胞分别由相同或不同的造血器官产生。本研究在观察绿海龟血细胞发育过程中发现: 在骨髓涂片上能见到各个发育时期的红血细胞、粒细胞和单核细胞, 说明骨髓是红血细胞、粒细胞和单核细胞的主要发育场所; 在脾脏的涂片上能见到各个发育时期的淋巴细胞, 同样可以说明脾脏是淋巴细胞的主要发育场所。这一点与哺乳动物的红血细胞、粒细胞和单核细胞主要在骨髓中发育的结果相

似(上海第一医学院, 1978; 王凤计, 1980)。而与乌龟的不同, 乌龟的粒细胞主要发育场所在骨髓, 淋巴细胞和单核细胞的主要发育场所在脾脏(李长玲等, 2001)。另外, 在脾脏涂片上也可以找到晚幼红血细胞、红血细胞、晚幼粒细胞、成熟粒细胞、幼单核细胞, 说明脾脏可能是红血细胞、粒细胞单核细胞的成熟场所。而在肝脏涂片上, 找不到各种原始细胞, 很少看到各种幼稚细胞。故可说明绿海龟的造血组织主要在骨髓和脾脏, 和大鲵的血细胞发育场所相同(牛泽清, 2000)。

乌龟和中华鳖的红细胞发育场所在骨髓, 脾脏可能是红血细胞成熟的场所之一(曹伏君等, 2001; 李长玲等, 2001; 江剑平等, 2003); 在乌龟和中华鳖的血涂片观察中都可见红细胞的有丝分裂(曹伏君等, 2001), 绿海龟在外周血涂片中也到红血细胞分裂的现象。说明其红细胞的生成途径除造血器官中产生外, 另一条途径即通过外周血细胞有丝分裂而来。但是绿海龟的细胞分类为直接分裂, 不是有丝分裂, 可以推论, 绿海龟可能比乌龟和中华鳖的分类位置低。绿海龟的血细胞发育一般规律与哺乳动物相似, 即在造血器官内, 在一定的微环境和某些因素的作用下, 经历一个连续的过程, 定向地发育成红细胞和各种粒白细胞。红细胞的发育从原红细胞经幼红细胞发育至成熟的红细胞, 与哺乳动物不同的是细胞核始终存在。

在脾脏的涂片上, 各种淋巴细胞的分布有集群现象, 在涂片的有些部位很多, 而在有些部位几乎没有发现; 这种现象可能与脾脏的结构和功能有关, 即在脾脏的不同部位分化不同的细胞, 可能与人骨髓中的造血岛相似(上海第一医学院, 1978; 王凤计, 1980)。

3.3 血细胞发育的变化过程

各种血细胞的寿命是有限的, 新生的血细胞是在造血器官内, 在一定的造血微环境和某些因素的作用下, 经历一个连续变化的过程, 最后定向地发育成各种血细胞。绿海龟的血细胞的发育过程经历了原始阶段、幼稚阶段和成熟阶段, 各阶段的特点与其他爬行动物有相似之处, 也有不同的地方。

红血细胞发育 在红血细胞发育的成熟过程中, 其细胞的变化比较复杂, 其胞体体积经历了由小到大, 由大到小、再到大的发育过程; 与乌龟和中华鳖的由小到大, 由大到小有所不同(李长玲等, 2001; 江剑平等, 2003)。细胞核有大到小, 核仁由有到逐渐

消失,核染色质逐渐固缩。胞质嗜碱性由强到弱,再到嗜酸性的变化,是红血细胞质中的血红蛋白的出现和含量逐渐丰富的过程,反映了其携带、运输氧气和二氧化碳的能力逐渐增强。在脾脏的涂片和印片中衰老的红血细胞数量较多,这可能与脾脏破坏衰老红血细胞的功能有关,与长吻鲢(金丽等,2007)的研究结构一致。

粒细胞的发育 粒细胞的发育过程中,细胞的体积有小到大,由大到小,胞核由大到小,由圆形到逐渐变为半圆形,到不规则形,这与乌龟(李长玲等,2001)的发育过程相似;在早幼粒细胞质中嗜天青颗粒最早出现,后逐渐消失,胞浆嗜碱性逐渐减弱,特殊颗粒开始出现;外周血中很少见到分叶的、各种的粒细胞,在外周血中可见发育中的晚幼粒细胞,外周血是其发育的最后场所,这与乌龟(李长玲等,2001)和花尾胡椒鲷(李长玲等,2002)的发育情况相似。

哺乳动物嗜酸性粒细胞在外周血与组织中的比例为 1:300,嗜酸性粒细胞从造血器官中释放后在外周血中停留的很短时间就进入到组织中,执行生理功能,在消化道和呼吸道固有层结缔组织中较多(上海第一医学院,1978)。在观察绿海龟造血器官涂片与印片和血涂片时嗜酸性粒细胞的分布也出现类似的特点。嗜碱性粒细胞在组织中执行功能,在外周血中停留的时间很短,且嗜碱性粒细胞极易溶于水(李长玲等,2001),制片过程中易解体,因此,在外周血中很难找到,在绿海龟的造血器官骨髓中,可以发现许多幼稚的嗜碱性粒细胞,在外周血中嗜碱性粒细胞很少。

单核细胞的发育 单核细胞在发育过程中,细胞体积由大到小,再由小到大,胞核有大到小,由圆形或椭圆形到不规则形,核仁由有到逐渐消失,核染色质由纤细网状到细网状,逐渐凝固,胞质由蓝色到灰蓝色,胞质中的嗜天青颗粒由无到有,与乌龟的发育情况相似(李长玲等,2001)。

淋巴细胞的发育 淋巴细胞的发育过程中,细胞的体积有小到大,由大到小,胞核逐渐变小,核质比稍大,核仁从有到无,嗜天青颗粒从无到有,小淋巴细胞的细胞质嗜碱性较幼淋巴细胞和幼淋巴细胞强(蓝颜色较两者深),但比原淋巴细胞较弱,与乌龟的发育情况相似(李长玲等,2001)。绿海龟淋巴细胞和单核细胞在整个发育过程中只有一种颗粒——嗜天青颗粒的出现。在哺乳动物,这两类细胞中的嗜

天青颗粒内的化学成分存在差异,前者只含有酸性磷酸酶,后者则含有酸性磷酸酶、过氧化物酶和非特异性酯酶,在绿海龟中这两系细胞有无上述差异,尚需进一步的研究。

参 考 文 献

- 上海第一医学院,1978. 组织胚胎学. 北京:人民卫生出版社, 118—145, 158—183, 230—209
- 王风计,1980. 血细胞学图谱. 天津:天津科学技术出版社, 1—45
- 王石泉,1995. 鳖外周血细胞显微形态及细胞化学. 动物学杂志, 30(1): 16—18
- 牛泽清,2000. 大鲵血细胞发育的初步研究. 山西中医学院学报, 1(1): 35—37
- 江剑平,黄 键,林 玮,2003. 中华鳖红血细胞发育过程的观察. 福建师范大学学报(自然科学版), 19(4): 67—71
- 芮菊生,杜懋琴,陈海明等,1980. 组织切片技术. 北京:人民教育出版社, 94—95
- 李长玲,曹伏君,刘楚吾等,2000. 乌龟红血细胞发生的研究. 湛江海洋大学学报, 20(1): 1—4
- 李长玲,曹伏君,刘楚吾等,2001. 乌龟白血细胞发生的研究. 水生生物学报, 25(5): 491—497
- 李长玲,曹伏君,刘楚吾等,2002. 花尾胡椒鲷肾脏和脾脏血细胞发育的研究. 热带海洋学报, 21(3): 7—13
- 吴孝兵,张盛周,吴海龙等,1998. 16 种爬行动物血细胞形态学参数研究. 动物学杂志, 33(1): 29—32
- 张金泉,1996. 港口国家级自然保护区及其海龟的生态生物学特性. 中国生物圈保护区, 3(4): 3—5
- 张孟闻,宗 愉,马积藩,1998. 中国动物志,爬行纲(第一卷). 北京:科学出版社, 75—84
- 陆宇燕,李丕鹏,1996. 鳖骨髓造血作用的研究. 见:姚 远编著. 跨世纪论文集. 西安:陕西科学技术出版社, 346—348
- 金 丽,张光耀,2007. 长吻鲢血细胞发生的研究. 水生生物学报, 31(6): 807—816
- 曹伏君,李长玲,刘楚吾等,2001. 乌龟外周血细胞的显微和超微结构. 水生生物学报, 25(3): 261—267
- 裴雪涛,2004. 干细胞生物学. 北京:科学出版社, 25—34
- Bolten A B, Biorndal K A, 1992. Blood profiles for wild population of green sea turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahama: Size-specific and sex-specific relationships. Journal of Wildlife Diseases, 28(3): 407—413
- Frari W, 1997. Turtle red blood cell packed volumes, size and numbers. Herpetologica, 33: 167—190
- Szarski H, Czopek C, 1966. Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles. Bull Acad Polonaise Ser Sci Bial, 14: 433—437
- Tavassoli M, Yoffoy J M, 1983. Bone Marrow. Alan R Liss Inc. New York, 17—28, 139—254
- Yuka Kakizoe D V M, Ken Sakaoka, 2007. Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 38(1): 77—84

OBSERVATION ON THE DEVELOPMENT OF BLOOD CELLS OF *CHELONIA MYDAS*

LI Chang-Ling, CAO Fu-Jun, HUANG Xiang-Hu, LIU Chu-Wu, HUANG Qing-Jia
(Fisheries Collage, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025)

Abstract The blood cells of *Chelonia mydas* was studied through observation on stained imprint and smear of the peripheral blood, the bone marrow, the spleen and the liver etc. The stain method used is Wright's. The results show that the bone marrow and spleen were the main hemopoietic organs in *C. mydas*. Erythrocytes, monocyte and granulocytes developed mainly in the bone marrow; and lymphocytes developed mainly in the spleen. The spleen with late immature erythrocytes could be the place of maturation of erythrocytes. No primitive blood cells were observed in liver, which implies that the liver was not the hemopoietic organ in *C. mydas*.

The development of erythrocytes includes 5 stages: primitive, early, middle, late, and mature. The body sizes of these cells increased first, then decreased, and increased in the end. The development of granulocytes includes 5 stages also: myeloblast, promyelocyte, meddle immature granulocytes, late immature granulocytes, and mature granulocytes. The body sizes of them decreased; and the sublobe of the nuclear may indicate the aging. All the four types of blood cells changed from with-nucleolus to without-nucleolus. Mitosis may take place in the primitive blood cells and immature ones, and direct division may occur in some mature red blood cells in the peripheral blood system.

Key words *Chelonia mydas*, Blood cell, Development of blood cells, Blood-making organs