

文章编号: 1000- 0615(2003)03- 0233- 05

草鱼淋巴器官中的肥大细胞

许乐仁, 杨筱珍, 高登慧
(贵州大学动物医学系, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 通过组织化学与形态学研究首次在草鱼的胸腺和头肾等淋巴器官中证实了肥大细胞的存在。草鱼肥大细胞的染色性质在某些方面似乎类似于哺乳动物的粘膜肥大细胞。Carnoy 氏液及阿尔新蓝分别是优良的固定剂及染料, 而中性缓冲甲醛却完全阻断草鱼肥大细胞的着染。值得注意的是一些曾被用于鉴定硬骨鱼肥大细胞(或嗜酸性粒细胞)的组织化学技术在本研究中未能检出草鱼肥大细胞。电镜下证实, 草鱼肥大细胞中含有大量特征性的胞浆颗粒, 其中充满无定形颗粒状基质, 基质电子密度有的较高, 有的较低, 但未见特殊的亚微结构。

关键词: 草鱼; 淋巴器官; 肥大细胞; 组织化学; 形态学

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Mast cells in the lymphoid organs of *Ctenopharyngodon idella*

XU Le-ren, YANG Xiao-zhen, GAO Deng-hui
(Department of Animal Medicine, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Mast cells were identified first in lymphoid organs including thymus, head kidney and the splenic sinus of grass fish (*Ctenopharyngodon idella*) histochemically and morphologically. It seemed that the staining properties of grass fish mast cells were similar to mammalian mucosal mast cells in some aspects. Carnoy's fluid and Alcian blue proved to be the good fixative and excellent dye for grass fish mast cell, respectively, but neutral buffered formalin (NBF) completely blocked the staining of the cells. It was noticed that some other histochemical methods previously used to detect mast cells, or so called eosinophilic granule cell (EGC) in teleostean fish, failed to identify grass fish mast cells in present study. Under electron microscopy a great deal of characteristic cytoplasmic granules were observed in the grass fish mast cells. The granules contained amorpholous granular matrix but electron density of the matrix from low to high. Special substructures were not observed in the cytogramules.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; lymphoid organs; mast cell; histochemistry; morphology

自 Ehrlich^[1] 在大白鼠结缔组织中首次发现并命名肥大细胞(mast cell, MC) 以来, 人们已证实, 肥大细胞广泛存在于哺乳动物、人类及家禽的多种组织之中。肥大细胞多分布于皮肤、粘膜及结缔组织中, 并与血管和外周神经有着密切的关系^[2-5]。在多种动物的胸腺髓质中也见有大量的肥大细胞^[3-5]。肥

收稿日期: 2002-05-27

资助项目: 国家自然科学基金资助(No. 30060065)

作者简介: 许乐仁(1944-), 男, 山东日照人, 教授, 主要从事动物病理学和细胞生物学的教学与科研工作。Tel: 0851- 6810042, E-mail: xuleren@yahoo.com

大细胞特征性的胞浆颗粒中含有生物胺、蛋白多糖及中性蛋白酶等多种生物活性物质。通过脱颗粒释放上述生物活性物质而在动物的健康和疾病中发挥重要作用^[2]。肥大细胞的基础生物学研究已引起免疫学家们的广泛关注。

20世纪20年代起,国外的一些研究者就证实了某些硬骨鱼的多种组织中肥大细胞的存在,之后不同的研究者采用不同的组织化学技术,在多种硬骨鱼中鉴定出肥大细胞^[6-11]。但似乎硬骨鱼肥大细胞类似于哺乳动物的粘膜肥大细胞(mucosal mast cell, MMC),它们对某些固定液(如福尔马林)比较敏感,对染料及染色条件有较大的选择性且染色效果不很稳定^[11-14]。一些研究者注意到硬骨鱼肥大细胞胞浆颗粒的所谓“嗜酸性”性质,特别是可被伊红着染呈红色。因此,有人使用“嗜酸性粒细胞”(eosinophilic granule cell, EGC)或肥大细胞/嗜酸性粒细胞(MC/EGC)来命名那些在形态学和某些组化性质上与肥大细胞相似,而H-E染色时呈红染颗粒的细胞^[9-11]。因此,同一细胞的几种命名,肥大细胞(MC)、EGC、或MC/EGC常被同时或分别出现在不同的研究报告中^[9-11]。硬骨鱼种类繁多,种间的MC(或EGC)的差异性的存在也毋庸置疑^[11]。总之,硬骨鱼MC(或EGC)的基础细胞生物学还有许多问题有待进一步阐明,而在这一研究领域国内至今尚未见相关报道。草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲤鱼目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)是我国重要的淡水养殖鱼类之一。卢全章^[13]对草鱼生物学及其主要淋巴器官形态学已做过一些研究,但有关草鱼肥大细胞(或EGC)的研究还未见报道,本研究试图采用作者前期在哺乳动物和禽类肥大细胞研究中采用过的实验技术及国外学者研究硬骨鱼肥大细胞(或EGC)常用的一些组织化学技术与形态学方法,对草鱼肥大细胞进行了初步的组织化学及形态学研究^[3-13]。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与处理

2001年6月市售健康草鱼8尾(每尾平均体重1.5 kg),断尾处死后,立即取胸腺、头肾、脾,修切至1cm²,分别固定于Camoy氏液(60%无水乙醇,30%氯仿和10%冰醋酸)、Bouin氏液、10%中性缓冲甲醛(NBF),MFAA(甲醇:甲醛:醋酸=85:10:5)及80%乙醇,石蜡包埋,6μm连续切片,供组织化学染色。

1.2 组织化学染色

阿尔新兰-藏红O复染法(AB/SO),甲苯胺兰-藏红O复染法(TB/SO)参考文献[3]的方法进行。80%乙醇硫堇染色法参考文献[9]的方法进行,苏木素伊红(H-E)染色法按照H-E常规染色法进行。Wright氏染色法按参考文献[15]的方法进行。

1.3 透射电镜技术

组织块修切至1mm³大小,先后经3%戊二醛和1%锇酸固定,丙酮系列脱水,环氧树脂618包埋,LKB-5型超薄切片机切片,硝酸铅和醋酸铅染色,日本产JEOL-2000EX透射电镜观察、拍照。

2 结果

2.1 组织化学与光镜检查

在采用Camoy氏液固定,阿尔新兰-藏红O复染(AB/SO)的草鱼胸腺和头肾的切片中鉴定出呈现异染颗粒的肥大细胞,但脾的切片中未发现着染细胞。肥大细胞多分布于胸腺被膜,并散布于胸腺外区和中区的实质中。肥大细胞也见于头肾实质中(图版1),这些肥大细胞被染呈兰色,呈圆形或椭圆形,胞核位于中央或偏于一侧。高倍电镜下可见胞浆内充满大量异染颗粒,胞核常被颗粒掩盖而轮廓不清。

Camoy氏液固定,甲苯胺兰-藏红O复染(TB/SO),以及NBF固定,AB/SO或TB/SO在所有组织

中均未能鉴定出肥大细胞。

曾被一些研究者用于硬骨鱼肥大细胞(或 EGC)染色的一些组织化学技术^[6-11],如 MFAA 固定, AB/ SO 染色; Bouin 氏液固定, AB/ SO 染色; 80% 乙醇固定, 80% 乙醇硫堇染色以及在不同固定条件下采用 H-E 染色, 在所检的草鱼组织中均未能鉴定出草鱼肥大细胞(或 EGC)。

2.2 透射电镜观察

在透射电镜下, 分别观察了胸腺内的 5 个、头肾中的 14 个肥大细胞。肥大细胞呈圆形或不规则形, 位于中央或偏中央, 胞浆内含有大量特征性的、有单位膜包裹的胞浆颗粒(图版-2), 胞浆颗粒内含有无定形颗粒状基质, 其电子密度及颗粒粗细有一定差异, 少量胞浆颗粒的一侧可见高电子密度区(图版-3), 未见到在人和绵羊肥大细胞中描述的特殊显微结构^[2, 14]。

一个有趣的发现是在脾的血窦内也见有肥大细胞的存在(图版-4), 它们与在胸腺和头肾实质中分布的肥大细胞具有相同的形态学特征。

3 讨论

通过组织化学技术(Carnoy 氏液固定, AB/ SO 染色)及透射电镜技术, 首次在草鱼的胸腺和头肾中证实了肥大细胞的存在, 与国外一些学者在硬骨鱼肥大细胞(或 EGC)研究上相似的是, 草鱼肥大细胞的组化性质在某些方面也类似于哺乳动物的粘膜肥大细胞(MMC)^[8, 11], Carnoy 氏液固定, AB/ SO 染色可较好地显示草鱼肥大细胞, 而 NBF 固定时, AB/ SO 及 TB/ SO 均未能使草鱼肥大细胞着染。在过去 10 余年的工作中, 曾反复地证实 Carnoy 氏液固定, AB/ SO 染色是鉴定各种哺乳动物和禽类肥大细胞的优良的组织化学技术, 它可使多种动物的肥大细胞都得到良好的固定和染色, 且 AB/ SO 的染色效果一般优于 TB/ SO。而 NBF 固定却不同程度地阻断多种动物的肥大细胞, 特别是 MMC 对碱性染料的着染力^[3-5]。本研究证实, 该染色技术也同样适用于草鱼肥大细胞的鉴定。

在已有的研究中, 硬骨鱼的肥大细胞(或 EGC)曾被采用不同的组织化学技术证实。Michels^[9]采用乙醇固定, 乙醇硫堇染色在鲤(*Cyprinus carpio*)和雅罗鱼(*Leuciscus* sp.)的鳃和肠系膜铺片中证实肥大细胞的存在。Romieu^[6]采用 Bouin 氏液固定, 甲苯胺兰染色在太阳鱼(*Lepomis* sp.)的结缔组织中鉴定出肥大细胞。Reite^[8]采用大鼠肥大细胞的经典染色技术(MFAA 固定, 甲苯胺兰或阿尔新兰染色)在白斑狗鱼(*Esox lucius*)的肠道中也证实大量肥大细胞的存在。当采用 H-E 染色时, 这些细胞可被染成红色。因此, 硬骨鱼的肥大细胞可获得 EGC 或 MC/EGC 的名称^[9-11]。在本研究中, 反复使用上述组织化学技术试图使草鱼肥大细胞(或 EGC)着染, 但均未获得成功, 且 Carnoy 氏液固定, TB/ SO 染色也未能鉴定出草鱼肥大细胞。因此, 在硬骨鱼的不同种类之间, 肥大细胞的组织化学性质是否存在差异, 及由于硬骨鱼的肥大细胞染色性质不稳定, 采用不同的组织化学技术进行染色所需条件的是否应不同, 还需进一步研究。关于草鱼的肥大细胞在胸腺和头肾之外的其他淋巴网状组织及其他器官中的分布情况也有待于进一步明确。

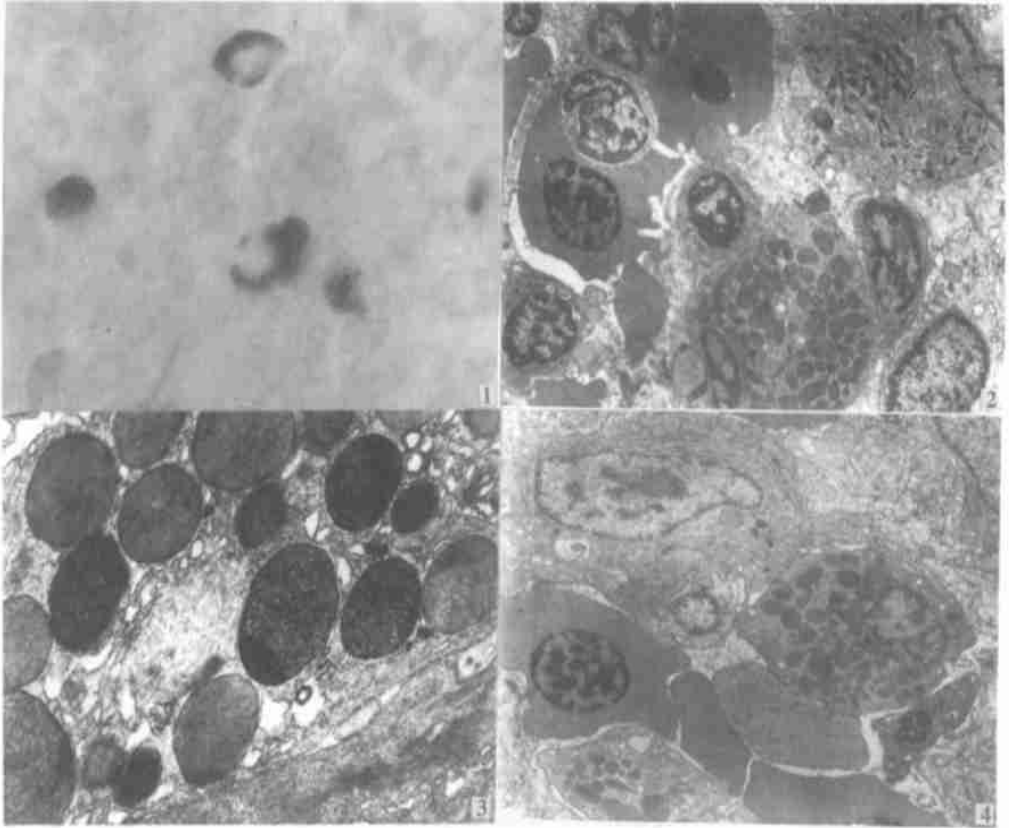
在透射电镜的观察中, 草鱼的肥大细胞与已有的有关其他硬骨鱼的肥大细胞(或 EGC)超微结构研究的报告似乎没有太大的差别, 特征性的胞浆颗粒中充满无定形的颗粒状基质, 但其电子密度及颗粒粗细有一定差异, 尚未见到在人类^[2]及绵羊^[14]肥大细胞胞浆颗粒中所描述过的特殊亚微结构。卢全章^[13]曾对草鱼头肾进行了超微结构的观察, 他所描述的所谓 II 型颗粒细胞(嗜碱性粒细胞), 实际上就是肥大细胞。在透射电镜下, 一个有趣的发现是在脾的血窦内也发现有肥大细胞的存在, 它们与在胸腺和头肾实质中分布的肥大细胞间无形态学上的差异。这一发现与 Powell 等^[16]在虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)鳃的血管内及血管外均发现 EGC 的报道十分相似, 当时这一发现被作为 EGC 从血管内向血管外迁移的证据。最近作者们在鸡肥大细胞的研究中, 也曾经发现肥大细胞不但存在于血管外结缔组织, 也可见于血管内^[4]。鉴于头肾和胸腺是硬骨鱼主要的造血器官和淋巴器官, 胸腺与 T 细胞的发生有关, 而头肾是多种血细胞发育的器官^[17, 18]。草鱼淋巴器官微血管内发现肥大细胞这一现象提示了这样一

种可能性,即头肾很可能也像哺乳动物的骨髓一样是硬骨鱼肥大细胞(或 EGC)的早期发育地。硬骨鱼的肥大细胞可能源于头肾中的干细胞。其早期分化发育可能在头肾中完成并释放进入血液循环,再离开血管进入到不同的组织中完成其成熟过程并发挥其生理功能。一些研究者发现在硬骨鱼的肠道中(特别是有寄生虫感染的肠道)可见到嗜碱性的肥大细胞从固有膜向肠上皮层迁移时,其嗜碱性逐渐减弱而嗜酸性逐渐增强,从而获得 EGC 的典型组化性质,类似于某些哺乳动物肠道 MMC 进入肠上皮时形成的所谓“球形白细胞”(globe leucocyte)^[9, 11]。Jordan^[19]甚至认为硬骨鱼的肥大细胞(MC)和 EGC 可被称为是不同发育阶段的同一种细胞,前者是后者的未成熟阶段而后者是前者的成熟阶段。Bergeron^等^[20]也曾得出硬骨鱼的肥大细胞的成熟阶段是在肠组织中完成的推论。

肥大细胞胞浆颗粒中所含的生物活性物质的组分及其变化,是肥大细胞组织化学及形态学表型及功能表达的基础。对人类及啮齿动物肥大细胞中的生化介质已有了比较深入全面的研究^[2]。但硬骨鱼肥大细胞(或 EGC)的生化介质的研究还十分薄弱^[11],进一步的研究将有助于阐明其组织化学特点及其在鱼类健康与疾病中的生物学或病理生物学意义。

参考文献:

- [1] Ehrlich P. Beitrage zur und praxis der Histologischen Farbung [D]. University of Leipzig, Germany, 1878.
- [2] Irani A A, Schwartz L B. Mast cell heterogeneity[J]. Clin Exp Allergy, 1989, 19: 143- 155.
- [3] Xu L R, Carr M M, Bland A P, et al. Histochemistry and morphology of porcine mast cells[J]. Histochem J, 1993, 25: 516- 522.
- [4] Xu L R, Ou D Y, Gao D H. Histochemistry and morphology of mast cells of primary lymphoid organs in chicken [J]. Chinese J Histochem Cytochem, 2001, 10: 449- 455.
- [5] Jiang P, Xu L R. Enzyme-histochemical analysis of tryptase-containing mast cells in six species of animal[J]. Acta Vet Zootech Sin, 1997, 28: 416- 421. [江萍, 许乐仁. 六种动物含类胰蛋白酶肥大细胞的酶组化分析[J]. 畜牧兽医学报, 1997, 28: 416- 421.]
- [6] Michels N A. The mast cells in the lower vertebrates [J]. Cellule, 1923, 33: 338- 462.
- [7] Romieu M. Contribution à l'étude des mastocytes des poissons osseux [M]. Paris: Societe de Biologie, Comptes Rendus, 1924. 91: 655- 657.
- [8] Reite O B. The mast cells nature of granular cells in the digestive tract of the pike, *Esox lucius*; similarity to mammalian mucosal mast cells and globule leucocytes[J]. Fish & Shellfish Immunol, 1996, 6: 363- 369.
- [9] Reite O B. Mast cells/ eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents[J]. Fish & Shellfish Immunol, 1997, 7: 567- 584.
- [10] Roberts R J, Young H, Mille J A. Study on the skin of plaice (*Pleuronectus platessa* L) I. The structure and ultrastructure of normal plaice skin [J]. J Fish Biol, 1971, 4: 87- 98.
- [11] Reite O B. Mast cells/ eosinophilic granule cells of teleostean fish, a review focusing on staining properties and functional responses[J]. Fish & Shellfish Immunol, 1998, 8: 489- 513.
- [12] Bielec E, Bigai J, Chadzinska M, et al. Depletion of head kidney neutrophils and cells with basophilic granules during peritoneal inflammation in the goldfish, *Carassius auratus*[J]. Folia Biol, 2000, 47: 33- 42.
- [13] Lu Q Z. An ultra-structural observation of immunity cells in head-kidney of grass fish[J]. Acta Hydrobiol Sin, 1997, 21: 152- 155. [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: 152- 155.]
- [14] Gao D H, Xu L R, Wang K G. An ultra-structural study of ovine mast cells[J]. J Guizhou Agric Coll, 1995, 14: 19- 22. [高登慧, 许乐仁, 王开功. 绵羊肥大细胞的超微结构研究[J]. 贵州农学院学报, 1995, 14: 19- 22.]
- [15] Dai H J. A simple method for mast cells staining[J]. Chinese J Zool, 1989, 24: 38. [戴惠娟. 显示肥大细胞的一种简易染色法[J]. 动物学杂志, 1989, 24: 38.]
- [16] Powell M D, Wright G M, Burka J F. Eosinophilic granule cells in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: evidence of migration[J]. J Fish Biol, 1990, 37: 495- 497.
- [17] Willett C E, Cortes A, Zuasti A, et al. Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish[J]. Dev Dyn, 1999, 214: 323- 336.
- [18] Zuasti A, Ferrer G. Granulopoiesis in the head kidney of *Sparus auratus*[J]. Arch Histol Cytol, 1998, 51: 425- 431.
- [19] Jordan H E. On the nature of the basophilic granulocytes of the blood and the tissues[J]. Anat Rec, 1926, 33: 89- 106.
- [20] Bergeron T, Woodward B. The development of the stratum granulosum of the small intestine of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Can J Zool, 1982, 60: 1513- 1516.



图版说明

Explanation of Plate

1. 头肾实质中的少量肥大细胞, 石蜡切片, Carnoy 氏液固定, AB/ SO 染色, $\times 1\ 500$; 2. 胸腺实质中 1 个肥大细胞的透射电镜图, $\times 20\ 500$; 3. 胸腺实质中 1 个肥大细胞中的胞浆颗粒, $\times 105\ 000$; 4. 脾窦中 1 个肥大细胞的透射电镜图, 细胞中充满大量的特征性胞浆颗粒, $\times 20\ 500$

1. A few mast cells in the parenchyma of head kidney. Paraffin section of Carnoy-fixed tissue, stained with AB/ SO, $\times 1\ 500$; 2. Transmission electron micrograph of a mast cell in the parenchyma of thymus, $\times 20\ 500$; 3. Transmission electron micrograph of cytoplasmic granules of a mast cell in the parenchyma of thymus, $\times 105\ 000$; 4. Transmission electron micrograph of a mast cell in the splenic sinus of spleen. Notice that numerous characteristic cytoplasmic granules in the cell, $\times 20\ 500$