

孵化至12月龄大黄鱼免疫器官的发育变化

徐晓津^{1,2}, 谢仰杰^{1,2}, 王军², 苏永全^{2*}

(1. 集美大学水产学院,福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室,福建 厦门 361021;

2. 厦门大学海洋学系,厦门大学亚热带海洋研究所,福建 厦门 361005)

摘要: 研究孵化至12月龄大黄鱼的淋巴器官如头肾、胸腺、脾的生长发育和免疫细胞数量的变化,首先应用显微与超微技术研究大黄鱼初孵仔鱼至12月龄免疫器官——头肾、胸腺与脾脏的发育。3日龄仔鱼出现头肾原基,原始造血干细胞最早被发现于头肾,很快分化成不同类型的细胞。4日龄仔鱼出现脾脏原基和胸腺原基。脾脏靠近内脏,含大量窦状隙,有丰富的毛细血管、血细胞与血小板。胸腺是最迟出现的淋巴器官,但发育较快。胸腺位于鳃腔背上角,主要由胸腺细胞(淋巴细胞)和上皮细胞组成,分为外区和内区,二者虽没有明显界限,但容易区分。研究结果还表明,随着年龄和鱼体重量的增长,胸腺、头肾和脾脏的重量均有增长的趋势,脾脏重量与体重的关系要比与年龄的关系更为密切,头肾、胸腺重量与年龄的关系要比与体重的关系更为密切。胸腺、头肾和脾脏的白细胞总数随着年龄的增长不断增加。但每毫克胸腺、头肾和脾脏内白细胞数量与年龄间线性关系不明显。头肾比脾脏淋巴化程度高。在研究中发现,血液内各细胞组成与大黄鱼月龄及季节的变化没有明显的改变。

关键词: 大黄鱼; 免疫器官; 发育

中图分类号: Q 175; S 917

文献标识码: A

硬骨鱼类的淋巴器官包括胸腺、头肾和脾脏等。淋巴器官与鱼类的免疫和抗病机能直接相关,国内外不少学者对鱼类的淋巴器官进行研究,如HONMA等^[1]研究鱼类淋巴组织的组织学变化与年龄、季节和内分泌腺之间的关系,NAKANISHI^[2]研究褐菖鲈(*Sebastes marmoratus*)体液免疫反应的季节性变化,ALVAREA等^[3]研究野生鳟(*Salmo trutta*)淋巴器官的淋巴细胞数量的季节性变化,卢全章^[4]研究草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)头肾发育过程中淋巴细胞数量的变化。

从20世纪80年代开始有少数学者将鱼类淋巴器官作为整体进行生长发育的研究^[5],如TATNER等^[6]详尽地描述虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)1~15个月淋巴器官生长发育情况,LIU等^[7-8]分别详细报道了牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)从

孵化到13个月淋巴器官的生长发育。但有关鱼类淋巴器官发育的详细资料仍相对缺乏,淋巴器官发育的研究仍是鱼类免疫学研究的热点之一^[9]。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国最重要的海水养殖鱼类之一,关于大黄鱼的淋巴器官发育的研究尚未见报道。对从孵化至12月龄大黄鱼淋巴器官的生长发育和免疫细胞数量的变化进行了观察,并研究了大黄鱼免疫系统的成熟时间和免疫细胞数量的变动,为大黄鱼淋巴器官结构和功能的研究提供基础资料。研究结果不仅为全面了解大黄鱼免疫器官的发生以及结构和功能提供了良好的基础资料,而且为大黄鱼抗病机制研究以及大黄鱼养殖中的病害控制方法研究奠定了良好基础。

1 材料与方法

1.1 样本采集

实验用大黄鱼取自福建漳浦重诚水产科技有

收稿日期:2010-10-15 修回日期:2011-01-13

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A405);国家自然科学基金项目(40976096);集美大学科研基金资助(李尚大基金 C510056,博士启动金)

通讯作者:苏永全, E-mail: yqsu@xmu.edu.cn

限公司育苗场,在育苗场直接孵化并养殖一年。育苗期间水温 25.6~29.4 °C,盐度 31.7~32.3。池塘养殖。现场取样并固定样品。

2009年6月19日至7月19日,鱼苗孵化出膜至22日龄每天取样1次,每次取20尾,22~30日龄每2天取样1次,30~60日龄每5天取样1次。样品用于光镜、电镜组织标本制作和观察,样品保存方法如下。另外从2009年7月19日至2010年6月19日,于每月19或20日取样1次,分别取1~12月龄大黄鱼,每次取样15尾,用于后续观察。

1.2 组织学研究

光镜组织标本制作、观察 用 Bouin 氏液固定头肾、胸腺、脾组织块,石蜡包埋。通过 Leica RM2128 型切片机横、纵向连续切片(厚 3~5 μm),于 Leica AUTOSTAINER XL 染色机中进行 H. E 染色,中性树胶封片。Leica DM 4500B 自动数码显微摄影系统观察和摄影。

电镜组织标本制作、观察 以 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定大黄鱼头肾、胸腺、脾组织小块,环氧树脂包埋,切片后醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,JEM 100CX II 电镜观察并摄影。

1.3 淋巴器官白细胞数量的计数

参照卢全章^[4]、LIU 等^[7]、吴金英等^[8]的方法,稍作改良,实验方法如下:

(1) 称量鱼体重,测量鱼体长。再从尾静脉取血,滴 1 滴血于干净的载玻片上进行血涂片,共制作数片。

(2) 解剖活鱼,完整地取出胸腺、脾脏和头肾组织,分别称重,称重后分割,用于以下实验。

(3) 剪取少量淋巴组织,称重,用 Satus 电子天平精确称量至 0.000 1 g,放入装有 4 °C 预冷的、定量的磷酸缓冲液(PBS, pH 7.2)的离心管里,于碎冰上,用匀浆棒研磨,制成细胞悬液,立即用血球计数器在显微镜下计数白细胞的数量。

(4) 统计各个淋巴器官组织的白细胞总数量和每克器官组织内的细胞数量。

1.4 淋巴器官组织涂片

剪取以上称重后分割的少量淋巴组织进行涂片,用 Wright 与 Giemsa 染色,在显微镜下观察,计数红细胞、淋巴细胞、单核细胞、粒细胞和血栓细胞或其它白细胞。在血涂片上至少计数至 1500 个细胞,在脾及头肾等器官印迹片上至少计

数 100 个细胞。

2 结果

2.1 大黄鱼淋巴器官的形态学与组织学变化

头肾 1 日龄仔鱼,肾为 1 对简单的直肾管,3 日龄仔鱼,在 2 个大的心室之上出现网状的头肾组织,呈扁平状,分左右 2 叶,基部相连,肾小管盘绕卷曲。随着进一步的发育,60 日龄幼鱼,头肾各种淋巴细胞和粒细胞密集,而中肾组织主要由大量的肾管和红细胞占据,头肾内可见许多血窦和一些网状内皮细胞,肾小管数量减少,头肾在结构上与中肾有所不同(图版-1)。

在 2~12 月龄大黄鱼头肾的发育过程中,肾小管数量减少,结构退化,头肾逐渐失去泌尿功能。在头肾印迹片上可以看见较多的红细胞,以及各种类型的白细胞,如淋巴细胞、粒细胞。10 月龄大黄鱼头肾主要由网状内皮系统支持下的淋巴、造血组织构成,即含有许多血窦、各种血细胞、粒细胞和不同发育阶段的淋巴细胞(图版-2)。

脾 4 日龄仔鱼,脾脏原基出现,被胰脏组织包围。7 日龄仔鱼,脾脏呈球形或近乎椭圆形(图版-3)。41 日龄幼鱼,脾脏血管增多,网状细胞与巨噬细胞更丰富(图版-4)。脾脏发育速度较头肾和胸腺慢。脾脏具有椭圆体和黑色素巨噬细胞中心(图版-5)。

胸腺 4 日龄仔鱼,胸腺原基出现,为两侧对称的 1 对器官,位于鳃腔上角背侧,靠近鳃盖骨的背关节。胸腺腹面为 1 层扁平上皮与鳃腔分隔。17 日龄仔鱼,可见头肾与胸腺间的淋巴细胞,即连接头肾与胸腺的细胞“桥”。

随个体生长,大黄鱼胸腺体积进一步生长、扩大。60 日龄幼鱼,胸腺外形为长椭圆形,呈乳白色半透明状,表面光滑,质地松软,与成鱼胸腺外形相似。

在大黄鱼 30 日龄内,胸腺的内区(髓质)和外区(皮质)不明显,30~60 日龄大黄鱼胸腺内区(髓质)和外区(皮质)分区明显。大黄鱼 60 日龄之前许多细胞正在生长;5 月龄大黄鱼,胸腺由高密度的胸腺细胞(淋巴细胞)紧密排列着组成,小淋巴细胞占优势,胸腺正在不断地生长,淋巴细胞核大,染成浅蓝色。随着鱼体和胸腺的生长,胸腺内出现结缔组织的小梁,使胸腺呈维管化。8 月龄大黄鱼胸腺有许多结缔组织增生,胸腺表皮有

许多杯状细胞,可见内区和外区有囊状样细胞(cyst-like cells),存在上皮细胞和类肌细胞。1龄大黄鱼,仍有胸腺组织(图版-7)。

2.2 2~12月龄大黄鱼淋巴器官的生长

2~12月龄大黄鱼的淋巴器官重量和体重见表1,大黄鱼的胸腺和头肾均是成对出现的器官,

随着年龄和鱼体重量的增长,胸腺、头肾和脾脏的重量生长均显示出生长趋势。

脾脏重量随着年龄的增长而不断增加,8月龄以内大黄鱼,脾脏重量与体重的关系(图1-B, $r=0.995$)要比与年龄的关系(图1-A, $r=0.945$)更为密切。

表1 2~12月龄大黄鱼体长、体重和淋巴器官重量、细胞数量变化
Tab.1 Length, body weight, organs weight and numbers of lymphoid cells in the spleen, head kidney and thymus of *L. crocea* from 2 to 12 months

年龄 (months) age	日期 date	体长 (cm) body length	体重 (g) body weight	脾重 (mg) spleen weight	脾中的		头肾中的		肾重 (mg) kidney weight	胸腺重 (mg) thymus weight	胸腺中的		
					细胞数 $\times 10^4$ total no. cells of spleen	每毫克 脾细胞 数 $\times 10^4$ no. cells/ mg organ of spleen	细胞数 $\times 10^4$ total no. cells of head kidney	每毫克 头肾细 胞数 $\times 10^4$ no. cells/ mg organ of head kidney			细胞数 $\times 10^4$ total no. cells of thymus	每毫克 胸腺细 胞数 $\times 10^4$ no. cells/ mg organ of thymus	
2	2009-08-19	4.1 ± 0.2	2.1 ± 0.6	1.9 ± 0.3	515.9 ± 98.5	271.5 ± 141.2	2.7 ± 1.8	545.1 ± 204.5	201.9 ± 147.0	4.1 ± 0.9	6.8 ± 1.9	170.6 ± 97.2	170.6 ± 82.1
		5.6 ± 0.2	3.3 ± 0.5	2.5 ± 0.7	222.5 ± 162.3	92.7 ± 31.9	3.5 ± 2.1	666.1 ± 381.8	190.3 ± 105.3	7.2 ± 0.9	10.7 ± 1.5	1 081.2 ± 351.3	318.0 ± 198.2
3	2009-09-21	7.3 ± 0.4	8.1 ± 0.7	3.1 ± 1.1	556.3 ± 160.1	181.2 ± 189.9	6.1 ± 7.7	1 285.9 ± 805.1	210.8 ± 89.2	13.4 ± 1.0	19.5 ± 11	625.6 ± 214.7	120.3 ± 42.5
		8.6 ± 0.9	15 ± 2.3	7.2 ± 0.9	1 131.0 ± 580.6	159.3 ± 69.4	13.0 ± 1.9	1 979.9 ± 93.2	152.3 ± 41.5	33.9 ± 4.4	26.9 ± 4.4	2 559.4 ± 1 021.5	275.2 ± 127.2
4	2009-10-19	9.1 ± 1.0	20.3 ± 2.4	8.2 ± 1.0	1 931.1 ± 896.6	235.5 ± 59.2	15.0 ± 1.6	3 561 ± 4 156.4	237.4 ± 61.3	41.2 ± 3.6	56.2 ± 3.6	1 540.5 ± 2 070.4	118.5 ± 103.5
		10.9 ± 1.1	29.2 ± 2.9	12.7 ± 0.8	3 117.2 ± 940.7	247.4 ± 97.4	20.8 ± 1.9	4 540.6 ± 3 230.1	218.3 ± 81.7	79.4 ± 16.0	100.2 ± 16	2 479.8 ± 98.2	140.1 ± 115.6
5	2010-01-18	11.3 ± 0.6	35.2 ± 1.8	13.9 ± 1.2	2 211.5 ± 988.2	159.1 ± 37.6	22.1 ± 1.4	3 281.9 ± 4 005.8	148.5 ± 39.4	92.3 ± 4.5	114.4 ± 44.5	5 527.7 ± 357.2	272.3 ± 127.1
		12.6 ± 0.9	48.3 ± 2.8	18.5 ± 1.5	2 747.3 ± 2 189.6	148.5 ± 62.1	28.9 ± 1.6	5 990.9 ± 157.7	207.3 ± 73.2	132.9 ± 10.8	161.8 ± 140.8	2 593.7 ± 244.2	106.3 ± 42.1
6	2010-02-20	13.7 ± 1.7	61.7 ± 5.6	22.1 ± 3.1	7 010.1 ± 1 020.6	317.2 ± 101.8	33.4 ± 1.0	10 243.8 ± 9 114.7	306.7 ± 127.2	200.3 ± 8.8	233.7 ± 98.8	11 293.9 ± 102.3	331.2 ± 188.2
		15.1 ± 1.67	86.2 ± 2.8	30.1 ± 1.4	6 324.1 ± 1 290.9	210.1 ± 52.5	41.8 ± 1.9	11 507.6 ± 4 174.3	275.3 ± 139.2	247.3 ± 8.2	289.1 ± 138.2	5 320.4 ± 2 032.1	120.1 ± 42.3
7	2010-03-19	19.2 ± 2.1	104.2 ± 5.6	41.7 ± 2.4	13 227.2 ± 1 894.3	317.2 ± 241.8	67.7 ± 4.0	20 810.9 ± 1 947.2	307.4 ± 159.6	421.3 ± 17.5	489 ± 157.5	9 429.1 ± 1 005.3	170.2 ± 89.2

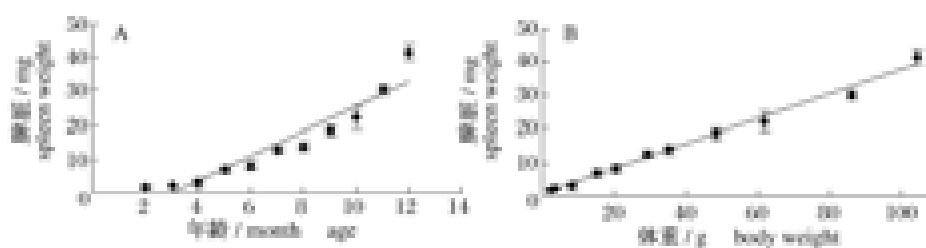


图1 大黄鱼年龄、体重与脾脏重量的关系

Fig.1 The age and body weight as a function of spleen weight in *L. crocea*

随着年龄的增长头肾也不断增长,但9~12月龄大黄鱼头肾的重量增长速度减缓(图2-A, $r=0.799$)。头肾重量与年龄的关系(图2-A, $r=0.945$)要比与体重的关系(图2-B, $r=0.781$)更为密切。

10月龄以内大黄鱼胸腺的重量增长与年龄呈现直线相关性($r=0.937$)。但10~12月龄鱼胸腺生长缓慢,胸腺的重量有所下降(图3-A)。

胸腺与体重增长的 r 值为 0.999。

每毫克脾脏内白细胞数量见表1,脾脏内总细胞数随着年龄的增长而不断增长,从 515.9×10^4 到 $13\,227.2 \times 10^4$ (图4-A, $r=0.853$)。每毫克脾脏内白细胞数量与年龄间线性关系不明显,范围是 271.5×10^4 至 317.2×10^4 (图4-B, $r=0.617$)。

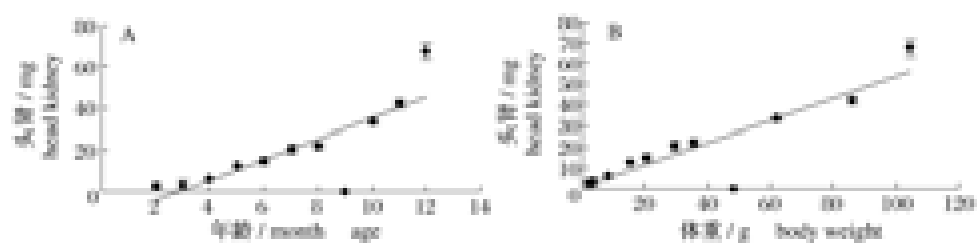


图2 大黄鱼年龄、体重与头肾重量的关系

Fig. 2 The age and body weight as a function of head kidney weight in *L. crocea*

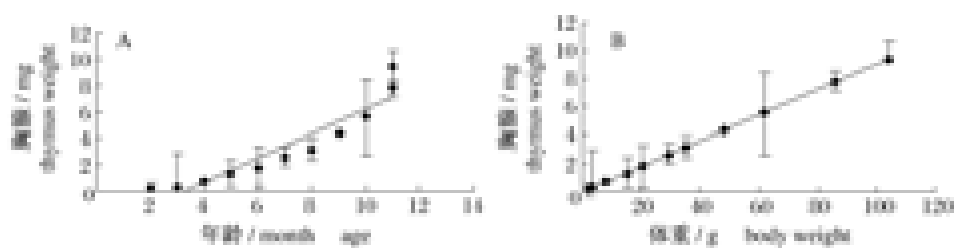


图3 大黄鱼年龄、体重与胸腺重量的关系

Fig. 3 The age and body weight as a function of thymus weight in *L. crocea*



图4 大黄鱼年龄与脾脏细胞数的关系

Fig. 4 The total number of spleen leucocytes in *L. crocea* of different ages

头肾白细胞总数和每克头肾重量内白细胞数量见图5,头肾白细胞的增长情况与脾脏的趋势相同。白细胞总数随着年龄的增长不断增加,在 270.4×10^4 到 $15\,212.8 \times 10^4$ 个细胞范围变动,头肾总白细胞的数量与年龄之间没有明显的线性相关关系(图5-A, $r=0.813$)。每毫克头肾细胞数目从 77.3×10^4 至 224.7×10^4 ,每克头肾重量内

白细胞的数量与年龄之间不呈明显的线性相关关系(图5-B, $r=0.666$)。

胸腺细胞总数与年龄的线性相关关系较弱(图6-A, $r=0.819$),并且每毫克胸腺所含有的细胞数量与年龄的线性相关关系也很弱(图6-B, $r=0.120$),随年龄增长而下降的趋势。

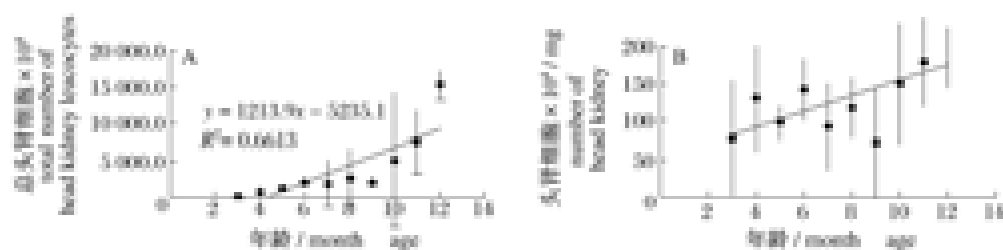


图5 大黄鱼头肾细胞与年龄的关系

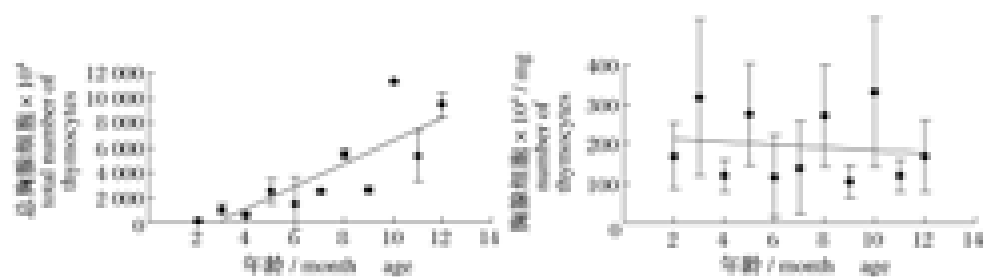
Fig. 5 Number of head kidney leucocytes in *L. crocea* of different ages

图6 大黄鱼胸腺细胞与年龄的关系

Fig. 6 Number of thymocytes in *L. crocea* of different ages

2.3 2~12月龄大黄鱼血液、脾脏、头肾细胞的组成

血液 红细胞都是最主要的细胞类型,占95.9%~98.3%,与季节变化及鱼生长年龄关系不大。白细胞占1.7%~4.1%,分为淋巴细胞、单核细胞、血栓细胞和颗粒细胞。淋巴细胞是最

主要的细胞类型,占37.4%~57.6%,但8月龄和9月龄大黄鱼血液中淋巴细胞数目较少。血液中单核细胞和颗粒细胞数量比淋巴细胞少,单核细胞为11.7%~39.7%,颗粒细胞为11.1%~26.6%。血栓细胞和其它白细胞最少,波动范围比较大,为2.7%~19.1%(表2)。

表2 2~12月龄大黄鱼血液印迹片上的不同细胞类型数量

Tab. 2 The different cells count on blood smears from *L. crocea* from 2 to 12 months

年龄 (months) age	整个细胞 数目(ind) total number of cells	红细胞 (%) erythrocytes	白细胞 (%) leucocytes	白细胞 leucocytes			
				单核细胞 (%) monocytes	淋巴细胞 (%) lymphocytes	颗粒细胞 (%) granulocytes	血栓细胞和 其它白细胞(%) thrombocytes and other leucocytes
2	2 034 ± 350	97.7 ± 23.1	2.3 ± 0.2	24.3 ± 13.8	42.9 ± 9.4	18.3 ± 3.7	14.5 ± 2.3
3	7 955 ± 881	98.3 ± 22.8	1.7 ± 0.1	22.4 ± 11.2	57.6 ± 9.8	11.1 ± 2.4	8.9 ± 1.7
4	8 054 ± 890	96.3 ± 20.9	3.7 ± 0.3	16.5 ± 10.8	54.3 ± 9.6	21.3 ± 4.5	7.9 ± 1.5
5	7 617 ± 659	97.8 ± 24.1	2.2 ± 0.2	23.1 ± 12.5	48.5 ± 9.5	21.2 ± 4.1	7.2 ± 1.4
6	7 111 ± 810	96.8 ± 23.2	3.2 ± 0.3	21.5 ± 11.8	49.3 ± 9.4	21.3 ± 3.8	7.9 ± 1.6
7	6 029 ± 773	96.1 ± 22.1	3.9 ± 0.3	14.7 ± 10.8	56.1 ± 9.6	26.5 ± 3.9	2.7 ± 0.5
8	3 185 ± 546	97.5 ± 20.8	2.5 ± 0.2	29.7 ± 17.1	37.4 ± 9.1	26.6 ± 3.8	6.3 ± 1.4
9	8 059 ± 897	96.8 ± 20.5	3.2 ± 0.3	39.7 ± 31.1	39.2 ± 9.2	14.5 ± 2.9	6.6 ± 1.5
10	4 819 ± 468	96.9 ± 21.1	3.1 ± 0.3	21.3 ± 10.8	52.1 ± 9.5	21.8 ± 3.6	4.8 ± 0.9
11	3 222 ± 321	95.9 ± 19.9	4.1 ± 0.4	20.1 ± 11.5	53.2 ± 9.6	22.3 ± 3.9	4.4 ± 0.8
12	1 814 ± 156	96.5 ± 20.7	3.5 ± 0.3	11.7 ± 11.1	43.8 ± 9.3	25.4 ± 3.8	19.1 ± 3.1

脾脏 在脾脏组织印迹片上最主要的细胞类型仍然是红细胞,占大多数,范围为74.6%~

88.6%,白细胞的比列占11.4%~25.4%。

在白细胞中,淋巴细胞数量最多,为40.8%~

73.1%,其次为颗粒细胞与单核细胞,颗粒细胞数量为12.7%~27.7%,单核细胞数量为13.4%~26.1%。各种类型的细胞均无明显的季节性变化(表3)。

头肾 头肾淋巴化程度比脾脏高,头肾组织印迹片红细胞比例为26.9%~59.4%,白细胞数量在40.6%~73.1%。在白细胞中,淋巴细胞数量最多,占33.6%~70.3%,其次是颗粒细胞与单核细胞,颗粒细胞数量变化范围为12.6%~

44.9%,单核细胞数量变化范围在9.6%~37.7%。各种类型的细胞均无明显的季节性变化(表4)。

头肾和脾脏组织印迹片计数结果支持了组织悬液的细胞计数和组织学的实验结果,头肾和脾脏皆是混合有红细胞和白细胞的器官,说明头肾和脾脏既是造血器官,又是淋巴器官;实验结果显示头肾比脾脏淋巴化程度高,主要表现在淋巴细胞数量和细胞种类丰富多样两方面。

表3 3~12月龄大黄鱼脾脏印迹片上的不同细胞类型数量

Tab.3 The different cells count on spleen imprints from *L. crocea* from 3 to 12 months

年龄 (months) age	整个细胞 数目(ind) total number of cells	红细胞 (%) erythrocytes	白细胞 (%) leucocytes	白细胞 leucocytes			
				单核细胞 (%) monocytes	淋巴细胞 (%) lymphocytes	颗粒细胞 (%) granulocytes	血栓细胞和 其它白细胞(%) thromocytes and other leucocytes
3	728 ±279	80.6 ±0.8	19.4 ±0.2	15.9 ±1.9	66.4 ±7.1	16.5 ±4.1	1.2 ±0.2
4	783 ±248	88.1 ±0.7	11.9 ±0.1	13.4 ±1.6	73.1 ±7.4	12.7 ±3.3	0.8 ±0.1
5	650 ±219	88.6 ±0.8	11.4 ±0.1	23.1 ±2.3	40.8 ±5.1	27.7 ±6.7	8.4 ±0.9
6	416 ±135	74.6 ±0.7	25.4 ±0.2	17.7 ±2.1	60.4 ±6.8	21.3 ±6.1	0.6 ±0.1
7	1 147 ±437	80.7 ±0.8	19.3 ±0.2	19.5 ±2.2	61.2 ±6.9	18.4 ±5.7	0.9 ±0.1
8	2 157 ±834	83.1 ±0.9	16.9 ±0.1	20.1 ±2.3	62.2 ±7.1	16.2 ±3.9	1.5 ±0.3
9	567 ±208	78.3 ±0.7	21.7 ±0.2	26.1 ±0.3	63.1 ±6.9	10.2 ±2.7	0.6 ±0.1
10	765 ±235	76.5 ±0.7	23.5 ±0.2	18.9 ±2.4	65.9 ±7.0	14.8 ±3.5	0.4 ±0.1
11	799 ±253	76.9 ±0.6	23.1 ±0.2	15.7 ±1.9	66.6 ±6.7	16.5 ±4.0	1.2 ±0.2
12	599 ±218	75.1 ±0.7	24.9 ±0.3	17.8 ±2.1	64.7 ±6.5	15.7 ±3.9	1.8 ±0.4

表4 3~12月龄大黄鱼头肾印迹片上的不同细胞类型数量

Tab.4 The different cells count on head kidney imprints from *L. crocea* from 3 to 12 months

年龄 (months) age	整个细胞 数目(ind) total number of cells	红细胞 (%) erythrocytes	白细胞 (%) leucocytes	白细胞 leucocytes			
				单核细胞 (%) monocytes	淋巴细胞 (%) lymphocytes	颗粒细胞 (%) granulocytes	血栓细胞和 其它白细胞(%) thromocytes and other leucocytes
3	7 955 ±3 036.6	59.4 ±0.8	40.6 ±0.9	14.3 ±1.8	49.7 ±4.5	27.7 ±2.3	8.3 ±0.2
4	1 911 ±421.3	38.2 ±0.6	61.8 ±1.2	31.1 ±3.7	47.1 ±4.3	20.2 ±1.9	1.6 ±0.1
5	1 786 ±405.6	36.5 ±0.5	63.5 ±1.3	33.1 ±3.9	33.6 ±3.2	31.8 ±3.3	1.5 ±0.1
6	1 751 ±403.2	40.5 ±0.7	59.5 ±1.1	37.7 ±4.1	45.3 ±4.1	16.2 ±1.8	0.8 ±0.1
7	660 ±240.4	57.9 ±0.7	42.1 ±0.9	12.4 ±1.5	70.3 ±6.9	14.8 ±1.1	2.5 ±0.2
8	925 ±315.6	50.7 ±0.6	49.3 ±0.9	20.1 ±2.5	34.9 ±3.4	44.9 ±3.8	0.1 ±0.1
9	1 548 ±384.3	45.7 ±0.5	54.3 ±1.1	13.7 ±1.2	67.4 ±5.9	18.5 ±1.7	0.4 ±0.1
10	657 ±231.5	51.1 ±0.6	48.9 ±0.9	14.9 ±1.7	64.8 ±6.1	19.7 ±1.9	0.6 ±0.1
11	321 ±165.4	35.2 ±0.4	64.8 ±1.4	9.6 ±0.7	62.1 ±5.9	27.8 ±2.9	0.5 ±0.1
12	197 ±87.6	26.9 ±0.3	73.1 ±1.6	20.8 ±2.3	62.4 ±5.8	12.6 ±1.4	4.2 ±0.2

3 讨论

3.1 大黄鱼免疫器官形态学与组织学变化

大黄鱼免疫器官原基出现的先后顺序是头肾

(出膜后第3天)、脾脏和胸腺(出膜后第4天),与其他海水硬骨鱼相同^[10-15]。头肾是第一个出现的器官,未分化的血液干细胞证实了头肾是干细胞的来源之一。脾脏最初由网状细胞和红细胞

构成,先于胸腺形成。胸腺的发育缓慢,2月龄大黄鱼胸腺达到相对体积的最大值。除了胸腺外,所有的淋巴器官都随着年龄的增长而增长。

胸腺参与细胞免疫和刺激淋巴细胞的成熟,据报道,鱼类胸腺在其性成熟期有退化现象^[7,19]。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[7]、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[16]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[17]、绵鳚(*Zoarces viviparus*)^[18]和鲤(*Cyprinus carpio*)^[5]的胸腺出现退化的现象。虹鳟、青鳉(*Oryzias latipes*)的胸腺也存在退化现象^[15]。ABELLI等^[16]认为在舌齿鲈发育早期即有胸腺细胞凋亡现象,孵化后35d检测有胸腺细胞凋亡,孵化后74d胸腺细胞凋亡数量有所增加。13月龄斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)也没有胸腺退化现象,但成鱼胸腺出现退化现象^[8]。据报道,鱼类胸腺在其性成熟期有退化现象^[17,19],胸腺也会因年龄、季节和环境压力和内分泌周期而退化,季节变化的环境因子主要是温度、光照和内源性的神经内分泌节律^[20-21]。本实验中大黄鱼受养殖条件等限制,鱼体生长较缓慢,但这是否会影响大黄鱼成熟,而导致12月龄大黄鱼的组织切片中仍可见胸腺组织,其原因还有待进一步研究。

大黄鱼的淋巴器官发育与其他鱼类相比有所差异。组织学研究表明,不管是幼鱼还是成鱼,大黄鱼的脾脏均无明显的红髓和白髓,胸腺也无明显内区和外区之分。与其他鱼类相比,大黄鱼头肾内的细胞类型和颗粒细胞种类都要少些。草鱼有3种不同类型的颗粒细胞^[4],金鱼有6种不同的颗粒细胞^[22]。

3.2 1~12月龄大黄鱼淋巴器官的生长

有关鱼类淋巴器官生长的研究很少^[5]。TAMER等^[6]研究1~15月龄虹鳟淋巴器官的生长和细胞数量组成时,发现2~3月龄虹鳟长的胸腺、肾和脾脏淋巴器官组织占体重百分比最大,指出这段时间是免疫淋巴系统活性增强和成熟的重要时期,与大黄鱼免疫淋巴系统发育相同。

大黄鱼每克淋巴器官中的白细胞数量除了胸腺随着大黄鱼月龄的增加略有所增加外,其头肾和脾脏的每克淋巴器官中的白细胞数量相对保持恒定(表1)。可能是胸腺通常以细胞增殖方式向外周淋巴器官输送淋巴细胞,以维持外周淋巴器官的淋巴细胞数量相对恒定^[5-6]。

大黄鱼的胸腺、头肾和脾脏器官均显示出随

着鱼体(年龄和体重)的增长而增长,三者的重量增长均与年龄和鱼体体重有关,皆存在线性相关关系,与体重的关系要比与年龄的关系更为密切,这与TATNER等^[5]研究虹鳟的结果相似。TAMER等^[6]认为与年龄相比,鱼体大小在决定免疫成熟方面起着更重要的作用,也即,鱼体淋巴器官重量的大小是免疫成熟的决定因子,而不是年龄起决定作用。

研究得知,大黄鱼血液、脾脏和头肾免疫细胞的组成与年龄或者季节没有明显的关系。在血液和脾脏的各种细胞中,红细胞的数量总是最多的;头肾内白细胞比例较高,且比脾脏淋巴化程度更高。这些结果与虹鳟、川鲮(*Platichthys stellatus*)、牙鲆和斜带石斑鱼相似^[6]。

3.3 免疫功能成熟与人工免疫

养殖生产中,当鱼类完成胚胎发育后,我们关注的就是养殖鱼成活率的问题。一般认为成活率与鱼类免疫功能是有必然联系的。然而鱼体的免疫功能成熟时间取决于淋巴器官的形态发育和生长,有学者认为鱼类免疫活性的启动是有条件的,即淋巴细胞在淋巴器官出现后,免疫活性细胞需要达到一定数量时,鱼体的免疫功能才能成熟,此时进行人工免疫,免疫效果最好^[5,12,23-27]。由此可见,幼鱼本身免疫系统在形态和功能上是否都完全成熟是应用疫苗的基础^[5,8,25,28],3~8月龄是大黄鱼免疫系统发育成熟的关键时期,这一期间可能也是对大黄鱼进行人工免疫的合适时期,其最合适的免疫时机还有待于进一步的研究探讨。

参考文献:

- [1] HONMA Y, TAMURA E. Histological change in the lymphoid system of fish with respect to age, seasonal and endocrine changes [J]. *Dev Comp Immunol*, 1984, (Supl. 3): 239-244.
- [2] NAKANISHI T. Seasonal changes in the humoral immune response the lymphoid tissue of the in the marine teleost, *Sebastiscus marmoratus* [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1986, 12: 213-21.
- [3] ALVAREA F, RAZQUIN B E, VILLENA A J, et al. Seasonal changes in the lymphoid organs of wild brook trout, *Salmo trutta* L.: a morphometrical study [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, 64: 267-278.
- [4] 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, 19(1): 11-16.
- [5] TATNER M F. Natural changes in the immune system

- of fish[M]// IWAMA G,NAKANISHI T.ed. The fish immune system organism, pathogen, and environment. New York:Academic Press,1996;255-287.
- [6] TAMER M F, MANNING M J. Growth of the lymphoid organs in rainbow trout from one to fifteen months of age[J]. J Zool,1983,199;503-520.
- [7] 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 & Shellfish Immunol,2004,16:621-632.
- [8] 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,2003,49(6):819-828.
- [9] 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.
- [10] PETERMAN A E, PETRIE H L. Ontogeny of American paddlefish lymphoid tissues [J]. J Fish Biol,2006(69):72-88.
- [11] WATTS M,KATO K,MUNDAY B L,*et al.* Ontogeny of immune system organs in northern bluefin tuna (*Thunnus orientalis* Temminck and Schlegel 1844)[J]. Aquaculture Research,2003,34:13-21.
- [12] NAKANISHI T. Ontogeny of the immune system in *Sebasticus marmoratus*:Histogenesis of the lymphoid organs and effect of thymectomy[J]. Environ Biol Fish,1991,30:135-145.
- [13] CHANTANACHOOKHIN C, SEIKAI T, TANAKA M. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish[J]. Aquaculture,1991,9:143-155.
- [14] JOSEFSSON S, TATNER M F. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.). [J]. Fish & Shellfish Immunol,1993,3:35-49.
- [15] TATNER M F, MANNING M J. Growth of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* from one to fifteen month of age [J]. J Zool,1983,199;503-520.
- [16] ABELLI L, BALDASSINI M R, MESCHINI R, *et al.* Apoptosis of thymocytes in developing sea bass *Dicentrarchus labrax*[J]. Fish & Shellfish Immunol,1998,8:13-24.
- [17] LAM S H, CHUA H L, GONG Z, *et al.* Development and maturation of immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study [J]. Dev Com Immunol,2004,28:9-22.
- [18] BLY J E. The ontogeny of the immune system in viviparous teleost *Zoarcetes viviparus* L [M] // MANNING M J, TATNER M F. ed. Fish Immunology. London: Academic Press Inc Ltd, 1985:327-341.
- [19] FISHELSON L. Cytological and morphological ontogenesis and involution of the thymus in cichlid fishes (Cichlidae, Teleostei) [J]. J Morphol,1995,223:175-190.
- [20] CHILMONCZYK S. The thymus in fish: development and possible function in the immune response [J]. Ann Rev Fish & Dis, 1992, 3:181-200.
- [21] PRESS C McL, EVENSEN Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes [J]. Fish Shellfish Immunol,1999,9(4):309-318.
- [22] FUJIMAKI Y, ISODA M. Fine structural study of leucocytes in the goldfish, *Carassius auratus* [J]. J Fish & Biol,1990,36:821-831.
- [23] NAKANISHI T. Ontogenetic development of the immune response in the marine teleost *Sebasticus marmoratus* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1986, 52:473-477.
- [24] SCAPIGLIATI G, ROMANO N, ABELLI L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T-and B-lymphocytes [J]. Aquaculture,1999,172:3-28.
- [25] KOUMANS-VANDIEPEN J C E, TAVERNE-THIELE J J, VAN RENS B T T M, *et al.* Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio* L.): an ontogenic study [J]. Fish & Shellfish Immunol,1994,4:19-28.
- [26] 谢海侠,聂品. 鱼类胸腺研究进展[J]. 水产学报,2003,27(1):91-96.
- [27] 肖书凡,聂品. 鱼类免疫球蛋白重链基因与基因座的研究进展 [J]. 水产学报,2010,34(10):1617-1628.
- [28] 肖凡书,许巧情,王欣欣,等. 草鱼的两种新型免疫球蛋白基因 IgZ-2 和 IgM-IgZ [J]. 水产学报,2010,34(12):1891-1900.

The development of the lymphoid organs of *Larimichthys crocea* from hatching to 12 months

XU Xiao-jin^{1,2}, XIE Yang-jie^{1,2}, WANG Jun², SU Yong-quan^{2*}

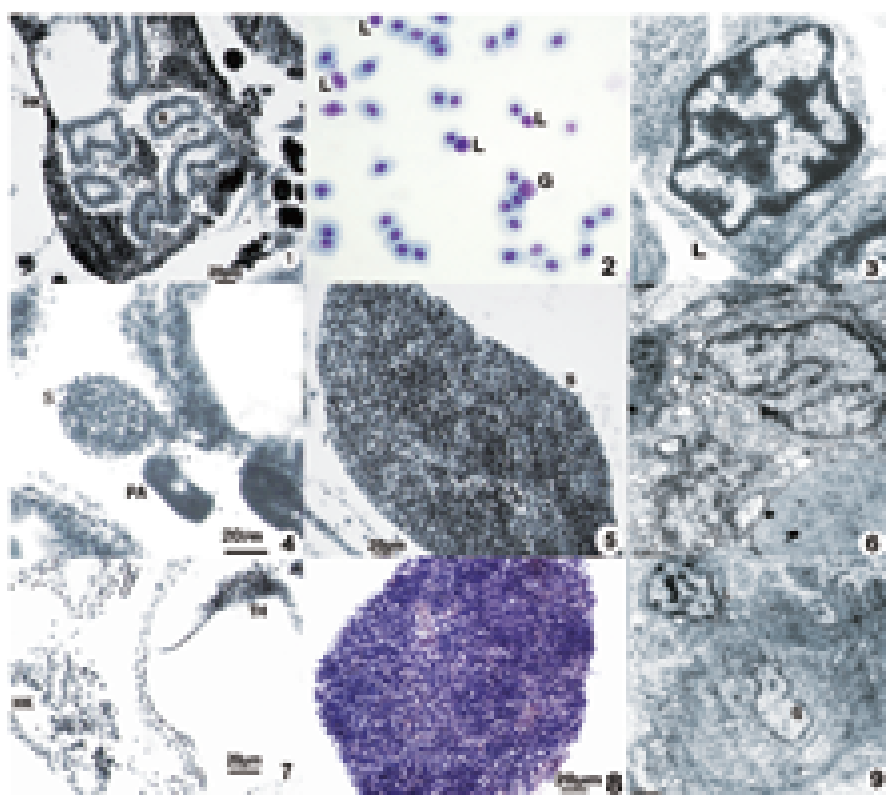
(1. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety,
Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The growth of the lymphoid organs, such as head kidney, spleen and thymus was studied in *Larimichthys crocea*, from hatching to 12 months of age. A histological and ultrastructural study was performed on the development of the head kidney, thymus and spleen aging from just hatching to the 12 months. Head kidney was first present on the 3rd day after hatching (DAH). Primordial haemopoietic stem cells were first observed in the head kidney and rapidly differentiated into different cellular types. Progenitor spleen was present on the 4th DAH, located close to the gut, soon becoming rich in blood capillaries, red blood cells and thrombocytes. The thymus occurred obviously on the 4th DAH, located on either side of the upper corner of the opercular cavity, closely under the membrane of the opercular cavity. The thymus was the last lymphoid organ appearing but showed quick development. The thymus consisted of outer thymocytic and inner epithelioid zones. There was no obvious demarcation between them, but both zones were visible. Head kidney, spleen and thymus grew as the fish grew. The spleen weight showed a closer correlation to body weight than they did to age. But head kidney and thymus weight showed a closer correlation to age. The total number of leucocytes in the lymphoid organs increased with age. But the number per milligram of lymphoid organ didn't show a closer correlation to age. The head kidney was more lymphoid than the spleen. The blood components had no obvious relationship with age or season during the period studied.

Key words: *Larimichthys crocea*; lymphoid organs; development

Corresponding author: SU Yong-quan. E-mail: yqsu@xmu.edu.cn



图版 大黄鱼的免疫器官

1. 60 日龄幼鱼纵切: 示头肾(HK)、肾小管(R); 2. 10 月龄鱼头肾涂片, 示淋巴细胞(L)、颗粒细胞(G); 3. 头肾内淋巴细胞(L); 4. 7 日龄仔鱼纵切: 示脾(S)、胰脏(PA); 5. 41 日龄幼鱼纵切: 示脾(S); 6. 脾脏内单核细胞(Mo); 7. 10 日龄仔鱼纵切: 示胸腺(TH)、头肾(HK); 8. 12 月龄鱼纵切: 示胸腺(TH); 9. 胸腺内淋巴细胞(L)、颗粒细胞(G)。
HK. 头肾; R. 肾小管; L. 淋巴细胞; GR. 颗粒细胞; S. 脾; PA. 胰脏; Mo. 单核细胞; TH. 胸腺。

Plate The immune organs of *L. crocea*

1. Longitudinal section of 60 DAH juvenile; showing the HK, head-kidney, R, renal tubules; 2. Imprint of the 10 month fish head kidney, the granulocytes(G) and the lymphocytes(L) can be seen clearly; 3. The lymphocytes(L) in the head kidney; 4. Longitudinal section of 7 DAH larva; showing the S, spleen; PA, pancreas; 5. Longitudinal section of 41 DAH juvenile; showing the S, spleen; 6. The monocyte (Mo) in the spleen; 7. Longitudinal section of 10 DAH larva; showing the TH, thymus; HK, head-kidney; 8. Longitudinal section of 12 month DAH fish; showing the TH, thymus; 9. The lymphocyte(L) and granulocyte(G) in the thymus.