

草鱼肾脏、脾脏血细胞发育过程超微结构与细胞化学的研究

郭琼林 卢全章

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

本文报告了草鱼肾脏、脾脏血细胞各系统发育各阶段细胞超微结构与某些细胞内的化学成分如糖原、脂类、酸性磷酸酶、酸性非特异性酯酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶(PAS、SB、AcP、ANAE、AIP、Pox)的变化规律。讨论了草鱼造血的特点、方式以及超微结构、细胞内化学成分变化与携氧、免疫功能的关系和意义。草鱼肾脏、脾脏造血基质细胞主要包括三大类:纤维细胞可分为功能活跃的成纤维细胞及不活跃的纤维细胞;网状细胞和毛细血管内皮细胞可分为非吞噬性及吞噬性两型的。初步探讨了造血基质细胞与造血微环境的作用。

关键词 血液细胞学, 血细胞发生, 超微结构, 细胞化学, 造血基质细胞

鱼类血液细胞学是鱼类免疫学的一个重要组成部分。目前,国内外的研究大多限于外周血细胞的结构与细胞化学方面,有关血细胞发育的研究则很少。作者曾经报道过草鱼肾脏、脾脏血细胞的发育过程大致经历三个阶段,描述了各系统各发育阶段细胞的显微形态特征并对血细胞发育各阶段细胞的命名问题及其发育规律等进行了初步的探讨^[1]。为进一步了解这些与机体免疫有关细胞的发育、特性和功能,作者对草鱼肾脏、脾脏血细胞发育过程的超微结构、某些细胞化学成分及其变化以及与血细胞发育过程有关的基质细胞超微结构进行了进一步的观察。

1 材料与方 法

实验用鱼系本所试验场正常养殖条件下健康的 I 龄、II 龄、III 龄草鱼,共 80 尾。将新鲜肾脏、脾脏组织块固定于 2.5% 戊二醛溶液(4℃)和 1% 锇酸中,丙酮脱水,EPon 812 包埋。LKB-5 型超薄切片机切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色。H-300 透射电镜观察。

肾脏、脾脏印迹涂片 PAS、SB、AIP、AcP、Pox、ANAE 染色分别参照过碘酸-雪夫氏反应法^[2]、苏丹黑染脂类法^[3]、AIP 偶氮偶联法、Gomori 氏硫化铅法、碘化钾过氧化物染色法^[4]及 ANAE 偶氮偶联法^[5]。淋巴细胞内 PAS 反应结果判定标准:十、胞浆中有 1—9 个红色颗粒;卅、胞浆中有 10 个以上红色颗粒;卅、胞浆中有许多红色颗粒并有红色团

块。单核细胞和粒细胞内 PAS 阳性反应判定:十、红色颗粒分散于胞浆中;卅、红色颗粒或团块物占据胞浆 1/2 左右面积;卅、红色颗粒或团块物占据胞浆 2/3 或更多面积。淋巴细胞内 AcP 反应结果判定标准:十、胞浆中有 1—2 个棕黑色颗粒;卅、胞浆中有 5 个左右棕黑色颗粒;卅、胞浆中出现块状反应物。单核细胞和粒细胞内 AcP 反应结果判定标准同 PAS。单核细胞和粒细胞内 Pox 反应结果判定标准:十、黑色絮状或团块物占据胞浆 1/4 以下面积;卅、黑色絮状或团块物占据胞浆 1/4 以上面积。单核细胞内 ANAE 反应结果判定标准:十、阳性反应物占据 1/2 以下胞浆面积;卅、阳性反应物占据 1/2 以上胞浆面积。

2 结果

2.1 造血细胞各系统的各发育阶段细胞超微结构

2.1.1 红细胞系发育各阶段细胞超微结构 **原红细胞** 体积较大,呈不规则圆形或卵圆形。核大,一般呈圆形,常染色质丰富,着色淡,少量异染色质在核周凝集,核仁明显,一个或数个。胞浆内有丰富的游离核糖体。线粒体相当多,常呈圆形、卵圆形或杆状,基质密度高。粗面内质网较少,呈细长条状。高尔基复合体不甚发达。细胞表面开始出现吞饮小泡。胞浆内无颗粒(图版 I:1)。**幼红细胞** 体积较原红细胞小,多呈不规则卵圆形。核较大,圆形或椭圆形。异染色质明显多于原红细胞,常凝聚成粗网状,无核仁。线粒体数目较原红细胞少。由于胞浆中血红蛋白不断增加,因此电子密度也不断增高。粗面内质网较少。游离核糖体呈减少趋势。早期的幼红细胞有发育尚好的高尔基复合体,细胞表面可见较多的吞饮小泡(图版 II:9)。**红细胞** 体积进一步减小,呈圆橄榄形或椭圆形。核较小,卵圆形,居细胞中央,电子密度较幼红细胞高,核膜内缘常凝集大量异染色质。游离核糖体和线粒体较少,偶见高尔基复合体,胞浆电子密度随血红蛋白的增多而加大。吞饮小泡相应减少或基本消失。

2.1.2 粒细胞系发育各阶段细胞超微结构 **原粒细胞** 圆形或卵圆形,一般较原红细胞小。胞核大、圆形、偶见较浅的凹陷,富于常染色质,在近核膜处可见异染色质呈薄层凝集,核仁一至数个,较明显。胞浆中有较多的游离核糖体。线粒体较多,常呈卵圆形,嵴呈扁平膜板状,基质电子密度高。高尔基复合体不发达。在向早幼粒细胞发育过程中偶有极少量颗粒(图版 II:7)。**早幼粒细胞** 较原粒细胞大。核圆形或卵圆形,核周边部分出现异染色质。游离核糖体丰富,线粒体较多,粗面内质网形态特征为池扩大并可见其内的絮状物质。胞质中逐渐出现颗粒。颗粒呈圆杆状,外有单位膜包围,基质电子密度较低,近中央处有杆状小体,其结构为板层状的结晶体(图版 II:8)。**中性中幼粒细胞** 体积较早幼粒小。核呈卵圆形及肾形、有切迹。异染色质明显增多,不见核仁。线粒体较小,常呈短小棒状,基质电子密度较高。粗面内质网、游离核糖体减少,糖原颗粒及圆杆状颗粒增多。偶见发育完好的高尔基复合体。**中性晚幼粒细胞** 细胞体积进一步减小。核变小且形态多样,常呈卵圆形、半圆形、不规则肾形等,偏于细胞一侧。异染色质较中幼粒进一步增多。细胞器减少,糖原颗粒及圆杆状颗粒明显增加(图版 I:6)。I 龄草鱼肾脏的电镜标本中,粒细胞系各发育阶段细胞较少,而且比较分散。II 龄、III 龄草鱼肾脏标本中,细

胞较多,通常聚集一起。

2.1.3 单核细胞系发育各阶段细胞超微结构 原单核细胞 原单核细胞较原粒细胞大,圆形或卵圆形。核较大、圆形或卵圆形,可有凹陷。核内常染色质丰富,异染色质较原粒细胞多,且常薄层排布在核周边。核仁清晰、常有数个。胞质中线粒体较多、圆形或卵圆形。游离核糖体丰富。粗面内质网较少、呈细长管状。高尔基复合体较小,有3—5层扁平囊。在原单核细胞向幼单核细胞的发育过程中,胞浆可见有界膜的小颗粒,常位于高尔基复合体附近,数量较少(图版 I:2)。**幼单核细胞** 体积较大、圆形或不规则形。细胞核出现明显印痕。随着幼单核细胞的发育过程,核凹陷不断加深,并逐渐趋向马蹄形、肾形或不规则形,异染色质增多。细胞器逐渐减少,偶见发育尚好的高尔基复合体。胞浆中出现少量基质密度不高的小圆形颗粒。此外尚可见一些未成熟的颗粒,其界膜与基质间空隙较大,横切面上常呈外包界膜的大空隙(未切到基质的缘故)(图版 I:4)。**单核细胞** 体积较大、椭圆形或不规则形。细胞核常偏位且形态多样,呈肾形、马蹄形或不规则形,核染色质纤细而疏松。胞质丰富,可见少量粗面内质网、游离核糖体和分散、细小、基质密度不高的圆形或椭圆形颗粒。

2.1.4 淋巴细胞系发育各阶段细胞超微结构 原淋巴细胞 体积较其它原始细胞小,圆形或类圆形。细胞核可有浅的凹陷、常染色质丰富、核仁清晰。胞质中有丰富的游离核糖体。线粒体卵圆形、数量不多。粗面内质网较少,高尔基复合体不发达,一般无颗粒(图版 I:3)。**幼淋巴细胞** 体积较原淋巴细胞大,类圆形。细胞核出现明显凹陷、异染色质增多,偶见核仁。胞质中游离核糖体丰富,线粒体及粗面内质网很少,偶见发育尚好的高尔基复合体,有少量有界膜的小颗粒,其基质密度较幼单核细胞胞质颗粒高(图版 I:5)。**淋巴细胞** 体积明显变小、圆形或类圆形,细胞核比例较大、核内异染色质凝集成块。胞质中除可见少量线粒体、糖原颗粒、游离核糖体、胞质颗粒外,其它细胞器及包含物极少。

2.2 造血基质细胞超微结构

2.2.1 成纤维细胞与纤维细胞 成纤维细胞呈梭形或不规则形,有突起。核为卵圆形,常染色质丰富、着色淡,核仁明显。胞质内含丰富的粗面内质网及游离核糖体(图版 II:11)。高尔基复合体发达。线粒体呈椭圆形。靠近细胞膜处的胞质中偶见微丝及微管结构。纤维细胞胞体较小,常呈梭形。胞核长卵圆形,异染色质较成纤维细胞多。胞质中细胞器较少。可见散在的游离核糖体,高尔基复合体不发达。

2.2.2 吞噬性与非吞噬性网状细胞 非吞噬性网状细胞体积通常较成纤维细胞大,外形似巨噬细胞、不规则,有较长的突起。胞质中含较多的粗面内质网、游离核糖体及发育良好的高尔基复合体。线粒体呈椭圆形,膜板状嵴清楚。吞噬性网状细胞外形同非吞噬性网状细胞,但胞质中粗面内质网及核糖体较少,线粒体较少。胞质中可见溶酶体、吞噬体(图版 II:10)。

2.2.3 血窦内皮细胞 肾脏造血组织处、脾脏毛细血管大多为血窦型。内皮细胞是一个扁平而狭长的细胞,含核部分较厚。胞质中可见一些线粒体、游离核糖体及糖原颗粒,边缘部分有吞饮小泡,粗面内质网较少,高尔基复合体不发达。窦壁有孔或无孔,基膜不连续或缺乏。相当一部分的内皮细胞胞质中有溶酶体及吞噬体(图版 II:12)。

2.3 造血细胞各系统的各发育阶段细胞某些细胞化学成分变化特征(表 1)

表 1 草鱼肾脏、脾脏造血细胞各系各发育阶段细胞的细胞化学变化特征

Tab.1 Some cytochemical changes in the development of haematic cells in the kidney and spleen of the grass carp.

细胞名称 Cell types	PAS	SB	Ac.phos	Alk.phos	Pox	ANAE
原红细胞 Proerythroblast	—	—		—	—	
幼红细胞 Erythroblast	—	—		—	—	
红细胞 Erythrocyte	—	—		—	—	
原粒细胞 Myeloblast	—	—	—	—	—	
中性早幼粒细胞 Promyelocyte	(+)	—	(+) ND	—	—	
中性中幼粒细胞 Myelocyte	(+→卅)	—	(+→卅) D.G	—	—	((+)) G
中性晚幼粒细胞 Metamyelocyte	(+→卅) D.G	—	(+→卅) D.G	—	((+)) ND	((+)) G
中性杆状核细胞 Neutrophil rod	(+→卅) D.G	—	(+→卅) D.G	—	((+)) ND	
原单核细胞 Monoblast	—	—	(+) ND	—	—	—
幼单核细胞 Promonocyte	(+)	—	(+→卅)	—	—	+ D
单核细胞 Monocyte	(+→卅) D.G	—	(+→卅) D.G	—	((+)) ND	+→卅 D
原淋巴细胞 Lymphoblast	—	—	—	—	—	—
幼淋巴细胞 Prolymphocyte	(+)	—	(+→卅)	—	—	(+)
淋巴细胞 Lymphocyte	(+→卅) D.G	—	(+→卅) D.G	—	—	(+) G

注: 符号说明 (): 部分细胞阳性反应; D: 阳性反应物为弥散状; (()): 个别细胞阳性反应; G: 阳性反应物为颗粒状; →: 阳性反应变化范围; ND: 不能确定。

3 讨论

3.1 红细胞、粒细胞在发育过程中的超微结构变化及其与功能关系的意义

红细胞系发育过程的电镜观察表明:原红细胞粗面内质网、高尔基复合体发育良好,游离核糖体较多,胞浆中出现吞饮小泡。这些吞饮小泡主要吞饮铁蛋白,供细胞合成血红蛋白之需。随着细胞的发育,胞浆中血红蛋白增多(电子密度增高),红细胞携氧功能逐渐完善,此时粗面内质网、游离核糖体减少,线粒体数目也减少,且由圆形变为长卵圆形,产生血红蛋白功能也相继减弱。草鱼肾脏、脾脏造血组织中红细胞超微结构类似于高等动物晚幼红细胞,与徐豪等学者^[6]报道草鱼外周血红细胞结构相符合。因此,草鱼红细胞的超微结构在造血组织中已基本形成,离开造血组织后不再继续出现形态上的明显变化。

中性粒细胞在发育过程中,除了细胞核及细胞器的变化外,一个主要特征就是长杆状颗粒由少增多,在肾、脾脏造血组织中几乎所有幼稚阶段基本上只有这种形态的颗粒。徐豪等^[6]在草鱼外周血液中中性粒细胞电镜观察中发现胞浆中有两种颗粒:一种为在浅色的基质中央或一侧有浓黑的小粒;另一种与作者观察的长杆状颗粒相近,不同的是肾、脾脏内中性粒细胞幼稚阶段的这种长杆状颗粒中杆状小体的纵行微管结构不明显。故作者称之为板层状结晶体。作者曾经报道草鱼肾、脾脏印迹涂片标本中性粒细胞在发育过程中明确地显示有两种颗粒的存在^[1]。产生这种形态差异的原因可能在于:(1)肾脏、脾脏造血组织中的幼稚粒细胞并不是发育的最后阶段。可以设想:草鱼肾、脾脏造血组织中这种仅含一种颗粒的幼稚粒细胞能穿过血窦壁进入血流,在血流中继续发育、分化,使其原有的颗粒完善化并再获得第二种颗粒,以达到功能上的逐渐成熟。(2)肾、脾脏印迹涂片中显示的细胞成分应包括器官固有的组织细胞(含造血组织)和经切面处破裂血管溢出的血液细胞。因此,在印迹涂片上观察到的形态及其变化基本上是血液细胞发育的全过程。而电镜标本观察重点为造血细胞密集部位,仅反映细胞在造血器官中的形态变化。可以证实:粒细胞在造血器官内的发育是很不完全的。

3.2 与血细胞发育有关的基质细胞和造血微环境关系的初探

造血组织包括造血细胞和基质细胞。基质细胞及其产生的物质和微循环一起构成的造血微环境对造血细胞的定向发育是至关重要的。电镜观察表明:草鱼肾、脾脏造血基质细胞类型主要有纤维细胞、网状细胞和内皮细胞三大类。成纤维细胞和网状细胞(非吞噬性)有极强的产生纤维的能力。这些细胞与其产生的纤维一起构成造血组织的支架。电镜下,内皮细胞内含有许多吞饮小泡,内皮细胞壁很薄且周围的基膜不连续或缺乏,一部分内皮细胞胞质上尚有孔,这些结构特点表明:毛细血管内皮细胞是位于血液与造血细胞之间的传递营养物质的媒介,同时也是使造血细胞顺利进入血流的门户。此外,造血细胞常分布在血窦周围的现象证实了草鱼造血器官内血细胞发育是以血管外造血方式进行的。造血组织内发育不良、受损及衰老的红细胞的吞噬消化过程很可能是在具溶酶体特征的网状细胞中进行的。血红蛋白被分解消化成铁蛋白,以供幼红细胞再合成血红蛋白。具有吞噬作用的细胞还包括含溶酶体的内皮细胞(可能还有毛细血管周围的巨噬细胞)。其吞噬作用是监测与清除血流中的异物(包括病原体)并维持造血器官内血细胞发

育的内环境的重要条件。

3.3 发育过程中细胞化学变化与血细胞功能的关系及意义。

PAS 反应主要反映细胞内糖原(包括多糖)的含量。酸性磷酸酶(AcP)和酸性非特异性酯酶(ANAE)为溶酶体酶。从表 1 来看,这些反应变化与哺乳动物基本相似。淋巴细胞是一个极为复杂的群体。1975 年以来,国内、外在对人和小鼠所进行的许多实验表明:绝大多数成熟的处于休止期的 T 细胞显示 ANAE 活性。由韩敬淑^[5]、吴景兰^[7]等用 ANAE 与 E 玫瑰花结重叠试验均值显示:有 E 受体的淋巴细胞 95.9%含 ANAE,并认为 ANAE 染色可以用来替代 E 玫瑰花结试验。尽管在鱼类仍尚缺乏足够的证据^[8],但本实验所显示的结果至少是从细胞化学角度提供了鱼类淋巴细胞存在着分化差异的事实。李春海等^[9]在观察人类骨髓标本时发现:晚幼粒、带状核细胞内含有 ANAE 阳性颗粒,在其它发育阶段中均未发现。此结果与作者从草鱼观察结果相吻合。关于 AcP 的作用比较明确,但有关 ANAE 生物学意义目前尚不十分清楚。大多数学者认为对 T 淋巴细胞杀伤靶细胞有促进作用。

表 1 所示:在极少数晚幼粒细胞和单核细胞内发现有不甚明显的过氧化物酶(Pox)阳性反应,粒细胞各阶段脂类(SB)、碱性磷酸酶(AIP)反应均为阴性,这些结果与哺乳类相差甚远。有学者曾经观察到某些欧洲鳗鲡晚幼粒细胞及外周血液粒细胞 Pox 为弱阴性和阳性^[10]、中华鳖碱性磷酸酶(AIP)为阳性*。这种差异反映了鱼类之间发育分化是不相同的。碱性磷酸酶存在于特殊颗粒中,然而在草鱼体内:究竟是特殊颗粒中缺乏 AIP,还是缺乏特殊颗粒?值得注意的是电镜下观察到的草鱼白细胞(主要为粒细胞)颗粒的形态结构与其它某些鱼类是不完全相同的^[6,11,12]。因此,这些颗粒性质及所含物质尚需电镜细胞化学技术进一步证实。

草鱼白细胞发育中过氧化物酶、碱性磷酸酶(可能还包括其它酶等)的缺乏,有可能直接影响吞噬细胞杀伤病原体及异物的功能。有实验表明^[13]:给某些鱼注射病原菌后,其病原菌通常在被吞噬的中性粒细胞内分裂,最后安然无恙地被排泄到细胞外去。作者认为:草鱼肾脏、脾脏内白细胞发育的不完善和某些酶类的缺乏也许是草鱼为什么易遭受病毒、细菌、寄生虫等病原体侵袭的原因之一。

参 考 文 献

- [1] 郭琼林、卢全章。草鱼肾脏、脾脏血细胞发育过程的观察。水生生物学报,1993,17(1):40—45。
- [2] 沈阳医学院临床血液学及细胞学图谱编绘小组。临床血液学及细胞学图谱(导论及图谱说明部分。)北京:人民卫生出版社。1967:18。
- [3] 徐福燕等。临床血液细胞学。上海:上海科技出版社。1965:144。
- [4] 龚懋明等。碘化钾过氧化物酶染色法及其在急性白血病鉴别诊断上的应用。中华血液学杂志,1987,10:624。
- [5] 韩敬淑等。正常人外周血淋巴细胞及胸腺细胞酸性非特异性酯酶的变化。中华血液学杂志,1982,4:206。
- [6] 徐豪等。四种淡水养殖鱼类血细胞的细微结构。水生生物学集刊,1983,8(1):85—96。
- [7] 吴景兰等。结合酸性非特异性酯酶组化染色的活性、非活性及总玫瑰花的比较观察。中华微生物学和免疫学

* 刘恩勇,1990,中华鳖外周血细胞学研究,南京农业大学动物比较病理学专业硕士论文。

- 杂志, 1983, 2: 146—151.
- [8] Blaxhall, P. C. Cytochemical enzyme staining of fish lymphocytes separated on a Percoll gradient. *J. Fish Biol.*, 1985, 27: 749—755.
- [9] 李春海等. 人血液和造血组织淋巴细胞非特异性酯酶活性的观察. 中华血液学杂志, 1982, 4: 201—205.
- [10] Kreutzmann H. L. Untersuchungen Zur morphologie des Blutes Von europaischen Aal (*Anguilla anguilla*). II. Untersuchungen Zur Granulopoese. *Folia haemat. Lpz.*, 1976. 103: 686—700.
- [11] Hine P. M. Light and electron microscopic studies on the enzyme cytochemistry of leucocyte of eel, *Anguilla* species. *J. Fish Biol.*, 1986. 29: 721—735.
- [12] _____. Composition and ultrastructure of elasmobranch granulocyte. I—III. *J. Fish Biol.*, 1987. 30: 547—576.
- [13] Bach R. Changes in the spleen of the channel catfish *Ictalurus punctatus* Rafinsque induced by infection with *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.*, 1978. 1: 205—217.

ULTRASTRUCTURAL AND CYTOCHEMICAL STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF HAEMETIC CELLS IN THE KIDNEY AND SPLEEN OF THE GRASS CARP

Guo Qionglin and Lu Quanzhang

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences Wuhan 430072)

Abstract

This paper reports the changes of ultrastructure and some cytochemical contains (PAS, Sudan Black B, Acid phosphatase, Alkaline phosphatase, α -naphthyl acetate esterase, Peroxidase) in the development of the haematic cells of kidney and spleen in the grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, The characters and ways of haematopoiesis, and the relationships between these changes and functions of haematic cells have been discussed.

The haematopoietic matrix cells of kidney and spleen in the grass carp include three types of cells: fibrocytes which can be divided into active fibroblasts and inaction fibrocytes, reticular cells and endothelium cells of blood capillary, The latter two types of cells can be divided into phagocytosis and non-phagocytosis types. A preliminary investigation was made on the functions of the haematopoietic matrix cells and the microenvironment of haematopoiesis.

Key words Haemocytology, Development of blood cells, Ultrastructure, Cytochemistry, Haematopoietic matrix cells