

文章编号: 1004 - 7271(2007)06 - 0518 - 06

鳊胸腺组织学结构及抗体分泌细胞的免疫组织化学

马红^{1,2}, 常藕琴¹, 石存斌¹, 潘厚军¹, 吴淑勤¹, 李湘林³

- (1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;
2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;
3. 广东省江门市蓬江区荷塘镇农业办公室, 广东 江门 529095)

摘要:使用常规组织学和免疫组织化学方法对鳊胸腺进行研究。观察到鳊胸腺位于鳃盖与背的联合处,呈三角形,对称分布;胸腺实质随年龄增长分叶逐渐明显,大体可分三个区,外区、中区和内区,中区和内区分别相当于哺乳动物的皮质区和髓质区。外区主要由扁平上皮细胞和粘液细胞组成,中区可观察到大量网状纤维和淋巴细胞,内区主要由排列较疏松的淋巴细胞组成。此外,光镜下还观察到哈氏小体和髓质上皮囊的存在。免疫组织化学结果显示胸腺中抗体分泌细胞主要分布在外区和中区,胸腺分叶部位尤为明显。阳性细胞胞膜着色明显,呈清晰棕黄色。

关键词: 鳊;胸腺;组织学;免疫组织化学
中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

Histology structure of thymus and immunohistochemistry of antibody secreting cell in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)

MA Hong^{1,2}, CHANG Ou-qin¹, SHI Cun-bin¹, PAN Hou-jun¹, WU Shu-qin¹, LI Xiang-lin³

- (1. Pearl River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China;
2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
3. Agriculture Office of Hetang Town, Pengjiang District, Jiangmen 529095, China)

Abstract: The thymus of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) was studied by general histology method and immunohistochemical method. The thymus is located on the edge of the gill cover close to the opercular cavity, triangle, is distributed symmetrically. Lobules of thymus are more evident along with increasing age. The parenchyma of thymus is divided into outer zone, middle zone and inner zone, with middle zone and inner zone being equal to cortex and medulla of mammal thymus respectively. The outer zone chiefly consists of squamous epithelium cells and mucous cells. Large numbers of reticulate fibres and lymphoid cells are shown in middle zone, and the inner zone is full of deep-blue staining lymphoid cells which are distributed loosely. Furthermore, Hassal's corpuscles and epithelial cysts are observed under light microscope. The result of immunohistochemistry shows that B lymphoid cells of thymus are mostly distribute in the outer zone and middle

收稿日期: 2006-09-06

基金项目: 广东省科技计划项目(2002A20510); 广东省自然科学基金项目(04001503)

作者简介: 马红(1980-), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 主要从事水产动物免疫学方面的研究。Tel: 020-81617592, E-mail: mahong006@126.com

通讯作者: 吴淑勤, E-mail: wushuqin001@21cn.com

zone, especially between the two lobules. cell membrane is positive evidently, brownish yellow.

Key words: mandarin fish (*Siniperca chuatsi*); thymus; histology; immunohistochemistry

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是我国具有很高经济价值的淡水养殖鱼类, 俗称桂鱼、桂花鱼等, 隶属鲈形目、鮨科、鳊属, 主要分布于中国、俄罗斯、朝鲜、韩国、日本、越南等国, 在国际市场上被誉为“淡水石斑”。胸腺是大多数鱼类最早发育的中枢免疫器官, 也是产生功能性 T 淋巴细胞的主要免疫器官。胸腺切除实验表明, 胸腺在免疫系统功能方面起着重要作用^[1-2]。而研究鱼类的胸腺组织学结构, 是深入研究鱼类胸腺的基础。在胸腺组织学结构方面, 国外有大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*)^[3]、黑鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[4]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[5] 等报道, 国内有草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[6]、齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*)^[7] 和黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)^[8] 等, 而鳊胸腺方面尚未见报道。鳊是珠江三角洲地区的主要养殖鱼类, 近年来爆发性流行病频发, 给养殖生产带来巨大损失, 所以搞清胸腺的结构为免疫防治提供基础理论依据是很有必要的。因此, 笔者采用常规组织学切片技术对鳊胸腺的基本结构进行了观察, 为鳊胸腺基本组织结构研究提供参考依据; 并在国内首次利用特异性单克隆抗体, 通过免疫组化方法对抗体分泌细胞 (B 淋巴细胞) 在胸腺中的分布进行研究, 为进一步研究鳊胸腺的免疫机理和免疫防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

实验用鳊取自广东省南海市山根鳊养殖场, 共 10 尾, 体长 11.9 ~ 26.7 cm, 体重 26.41 ~ 584.23 g, 约从两月龄到成鳊 (1⁺), 做组织学研究。取成鳊, 做免疫组织化学研究。经肉眼及一般镜检, 均健康无病。

1.2 试剂

鳊血清免疫球蛋白单克隆抗体 7F12-F6 株由福建省农业科学院畜牧兽医研究所和本研究所合作制备^[9]; 多聚赖氨酸、即用型 SABC 试剂盒均为武汉博士德公司产品。

1.3 常规石蜡切片制备

打开鳃盖, 取出胸腺, Bouin's 液固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 常规石蜡包埋, Leica RM2135 型切片机 4 ~ 5 μm 连续切片, 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干备用。常规 H. E 染色, 显示胸腺的组织结构; PAS 染色显示粘液细胞。Olympus 显微镜观察、拍照。

1.4 免疫组织化学 SABC 法染色

经多聚赖氨酸处理玻片, 切片常规脱蜡至水, 3% 双氧水孵育 10 min 以去除内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗涤 3 次; 滴加 5% BSA 封闭液室温 20 min; 弃去封闭血清, 滴加鳊血清免疫球蛋白单克隆抗体, 室温孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 2 min; 滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 室温 20 min, PBS 洗涤 2 min, 3 次; 加 ABC 复合物, 室温下孵育 20 min; PBS 洗涤 5 min, 4 次; DAB 显色, 苏木素轻度复染, Olympus 显微镜观察并拍照。用 PBS 代替一抗, 其他步骤相同作阴性对照试验。

2 结 果

2.1 解剖学观察

鳊胸腺左右对称分布, 位于鳃盖与背的联合处 (图 1), 紧贴鳃腔膜, 呈三角形薄片状, 乳白色, 微向外突起, 表面光滑, 质地松软, 为典型的淋巴器官。胸腺表面有被膜包裹, 下连结缔组织。

2.2 组织学观察

鳊胸腺随年龄的变化结构存在差异, 幼鳊胸腺分叶不明显, 仅有少量的结缔组织深入胸腺实质形成

不明显的小叶;随着年龄的增长,胸腺表面的结缔组织深入胸腺内部,形成明显的分叶(图版-1)。成熟胸腺总体可分三个区,外区、中区和内区(图版-2)。外区主要由大量的粘液细胞、上皮细胞组成,中区和内区大致相当于哺乳动物的皮质区和髓质区。

2.2.1 外区

鳊胸腺外区即外皮层是咽腔上皮和鳃腔上皮的延续,主要由粘液细胞、扁平上皮细胞、网状纤维组织等组成。光镜下观察,可见大量 H. E 染色呈空泡状的粘液细胞, PAS 染色粘液细胞呈紫红色,与上皮细胞相互交错分布在外区的最外层(图版-3)。少量淋巴细胞散在分布在网状纤维组织之间,位于外区的内层。上皮细胞间还散在分布有微血管,管内有少量血细胞。一龄鳊胸腺分叶明显,结缔组织向实质内延伸,形成许多不规则的结缔组织间隔,把中区分隔成若干小叶,且分叶处细胞淡染,从外区到内区零星分布少量血细胞(图版-1)。

2.2.2 中区

胸腺中区相当于哺乳动物的皮质区,由大量淋巴细胞和少量网状上皮细胞组成。淋巴细胞排列紧密,个体较小,呈圆形,细胞核质比较大,整个细胞嗜碱性,被染成蓝色。网状上皮细胞散在分布在淋巴细胞之间,细胞个体较大,呈网状或不规则状,细胞核相对较少,胞质较多,染色较淡,相对淋巴细胞为嗜酸性。

2.2.3 内区

内区相当于哺乳动物的髓质区,主要由大量深染的淋巴细胞、网状上皮细胞组成,淋巴细胞排列比中区疏松,数量较少,且内区淋巴细胞圆、小,形状规则,蓝色深染。上皮性网状细胞交织相连,淋巴细胞分布在网孔间(图版-4)。

2.2.4 胸腺特殊结构

胸腺外区观察到髓质上皮囊,由多细胞复合体围绕一个大空腔,囊壁内表面似有微绒毛向囊腔伸展(图版-5)。髓质上皮囊结构与鱼的发育阶段有关,幼鳊围成囊腔的上皮细胞呈高柱状,随着进一步发育,上皮细胞变成立方状或扁平状,囊腔内填充着一些细胞残体或无定型物质。胸腺中区有黑色素巨噬细胞中心存在,聚集分布,棕黄色(图版-6)。在胸腺内区观察到哈氏小体(图版-7),哈氏小体由数层上皮细胞环绕一个或几个肥大细胞或细胞残体而成。

2.3 免疫组织化学

免疫组化结果表明鳊胸腺中抗体分泌细胞(B淋巴细胞)主要分布在外区(图版-8)和中区,聚集或单个分布在结缔组织间,胞膜着色明显,在苏木素衬染的背景下呈清晰棕黄色(图版-10、图版-11)。在胸腺分叶处阳性细胞数量增多,密度增大(图版-9)。此外,阳性细胞较密集聚集在髓质上皮囊和微血管周围。阴性对照显示为空白。

3 讨论

同高等脊椎动物一样,鱼类也是通过自身免疫系统来抵制外来病原生物的伤害。硬骨鱼类免疫器官(组织)主要包括胸腺、头肾、脾脏和粘膜淋巴组织,它们是免疫细胞发生、分化、成熟、定居和增殖以及产生免疫应答的场所。而胸腺作为大多数硬骨鱼类的中枢免疫器官,在鱼类免疫过程中发挥着重要作用。

鳊胸腺位于鳃盖与背的联合处,通过一层被膜与外界水环境相通,因此易受外界水环境的影响。另一角度来看,因为胸腺的保护作用,一定程度上能使机体免受外来抗原的侵扰。

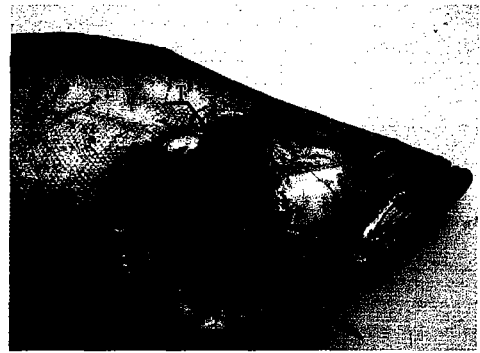


图1 鳊胸腺解剖学位置图

Fig. 1 Thymus of *S. chuatsi*

T - 胸腺

组织学观察鳊胸腺大体可分为三个区,即外区、中区和内区,这和国内报道的黄颡鱼、齐口裂腹鱼等相似。外区的上皮细胞主要有扁平上皮、立方上皮和部分柱状上皮,上皮细胞具有支持作用,而粘液细胞分泌粘液,保护胸腺,防止异物进入实质部分。此外,在组织学观察中也发现黑色素巨噬细胞的聚集,这些都为保护胸腺实质起到了重要作用。

髓质上皮囊和哈氏小体是胸腺上皮的衍生物,是高等脊椎动物胸腺的典型结构。少数鱼类曾有髓质上皮囊和哈氏小体的报道^[11]。在鳊的胸腺外区观察到数个髓质上皮囊,囊腔内可见无定形物,推测为髓质上皮囊吞噬的异物或变性坏死的胸腺细胞。关于鱼类哈氏小体,在喉盘鱼^[12]和丽鱼^[13]中曾有类似报道,具体功能有待进一步研究。

鳊胸腺中区与内区的基本结构与哺乳动物和鸟类的皮质区和髓质区相似,同时也有高等脊椎动物胸腺的典型结构—髓质上皮囊和哈氏小体,提示鳊已具有高等脊椎动物胸腺的基本结构,推测可能具有高等脊椎动物胸腺的基本功能;鳊胸腺中髓质上皮囊形态与两栖类、爬行类相似^[14-15],对研究脊椎动物进化规律可能有一定价值。

一龄鳊胸腺分叶明显,结缔组织向实质内延伸,形成许多不规则的结缔组织间隔,这与报道的胸腺被膜小孔相似。Chilmonczyk 描述过虹鳟幼鱼胸腺上皮部分有不同大小的小孔,他认为,这些小孔可能是抗原进入的通道^[10]。笔者发现,分叶处从外区到内区零星分布少量血细胞,因此说明分叶处有微血管的存在,在内区的营养供给及物质代谢方面发挥一定的作用。此外,分叶处观察到免疫组化呈强阳性,说明分叶处淋巴细胞密集,这似乎和“小孔是抗原进入的通道”说法相吻合,但尚需足够的证据。

胸腺的免疫能力在个体发育过程中,会随着年龄增长逐步退化,出现生理性萎缩、凋亡。黄颡鱼胸腺在 2 龄后开始退化,且以脂肪退化为主^[8];虹鳟在 15 月龄时胸腺开始退化^[16];李玉谷也曾报道鸭胸腺细胞的自然凋亡^[17],笔者此次未发现鳊胸腺的退化现象。分析可能和实验鱼的取样时间有关,即所取实验鱼还未发育到胸腺退化阶段,相关方面的研究有待进一步报道。

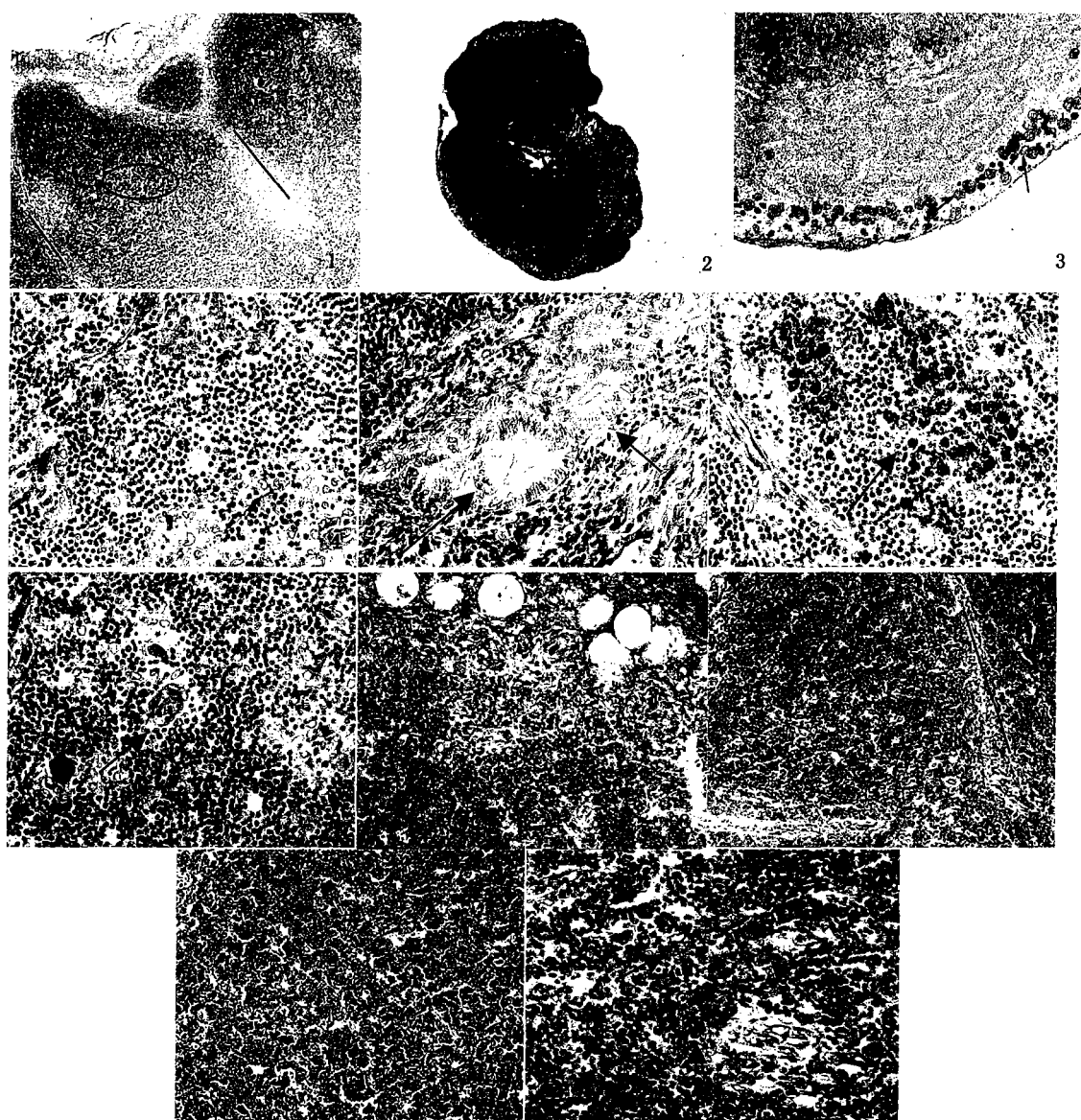
免疫组织化学技术是利用抗原抗体反应在微观世界原位地确定组织及细胞结构、化学成分,其特点是:定性可靠、定位准确、定量可能。而特异性单克隆抗体的制备使免疫组织化学技术更加准确和精确,可用来检测未知抗原。在水产方面利用特异性单抗,对免疫器官中淋巴细胞进行定位和粗略的定量,国外已有很多相关报道^[18-23],在国内还未见报道。本文使用鳊血清免疫球蛋白单克隆抗体,对鳊胸腺中抗体分泌细胞的分布情况进行研究。结果发现胸腺抗体分泌细胞主要分布在外区,黑色素巨噬细胞及微血管的周围,与曾报道的大菱鲆^[3]、黑鲈^[4]相似。免疫组化结果表明的鳊抗体分泌细胞主要在胸腺外区分布,也为保护胸腺实质,有效防止抗原进入提供了依据。

利用特异性抗体检测胸腺淋巴细胞的分布、成熟与否以及确定鱼类胸腺的发育成熟时间,不仅丰富了鱼类免疫学资料,更重要的是可为疫苗接种时机的确定提供参考依据。今后关于胸腺的研究应朝这个方向进行。

参考文献:

- [1] Nakanishi T. Effects of X-radiation and thymectomy on the immune response in the marine teleost *Sebasticus maraoratus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 1986, 10: 519 - 528.
- [2] Tatner M F. Natural changes in the immune system of fish [M] // wama Q, Nakanishi T. The fish immune system: organism, pathogen and environment. San Diego, US: Academic Press, 1996: 255 - 287.
- [3] Fournier-betz V, Quentel C, Lamour F, et al. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, 10: 187 - 202.
- [4] Scapigliati G, Romano N, Picchiatti S, et al. Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1996, 6: 383 - 401.
- [5] Jansson E, Grönvik Kjell-Olov, Johannisson A. Monoclonal antibodies to lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 14: 239 - 257.
- [6] 卢全章. 草鱼胸腺组织学研究 [J]. *水生生物学报*, 1991, 15(4): 327 - 331.
- [7] 潘康成. 齐口裂腹鱼胸腺组织学研究 [J]. *四川农业大学学报*, 2002, 20(9): 262 - 266.

- [8] 黄艳青. 黄颡鱼胸腺显微结构的观察[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(4): 236 - 240.
- [9] 王凡, 林天龙, 潘厚军, 等. 鳊血清免疫球蛋白单克隆抗体的制备及其特性分析[J]. 水产学报, 2006, 30(2): 285 - 288.
- [10] Chilmonczyk S. The Thymus of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) a light and microscopic study[J]. Dev Comp Immunol, 1983, 7: 56 - 58.
- [11] Finge R, Pulsford A. The thymus of the angler fish *Lophius piscatorius* (Pisces: Teleostei): a light and electron microscopic study [M]// Manning M J, Tatner M F. Fish immunology. London: Academic Press, 1985: 293 - 311.
- [12] Gorgollón P. Fine structure of the thymus in the adult cling fish *Sicyases sanguineus* (Pisces, Gobiesocidae) [J]. J Morphol, 1983, 177: 25 - 40.
- [13] Fishelson L. Cytological and morphological ontogenesis and involution of the thymus in cichlid fishes (Cichlidae, Teleostei) [J]. J Morphol, 1995, 223: 175 - 190.
- [14] 李丕鹏, 王平. 爬行类胸腺的发育及形态功能研究进展[J]. 动物学杂志, 1999, 34(2): 48 - 53.
- [15] Wunschmann A, Sieben U, Frese K. Thymic cysts in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German North Sea, Baltic Sea, and waters of Greenland [J]. Vet Pathol, 1999, 36: 391 - 396.
- [16] Tatner 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.
- [17] 李玉谷, 辛朝安, 李楚宣, 等. 鸭胸腺细胞自然凋亡的电镜观察[J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(6): 571 - 575.
- [18] Abelli L, Picchiatti S, Romano N, et al. Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 1997, 7: 235 - 246.
- [19] Dos santos N M S, Taverne N, Taverne-Thiele A J, et al. Characterisation of monoclonal antibodies specific for sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) IgM indicates the existence of B cell subpopulations [J]. Fish Shellfish Immunol, 1997, 7: 175 - 191.
- [20] Este'vez J, Leiro J, Santamarina M T, et al. Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1994, 41: 353 - 366.
- [21] Magnadóttir B, Kristjánsdóttir H, Gudmundsdóttir S. Characterisation of monoclonal antibodies to separate epitopes on salmon IgM heavy chain [J]. Fish Shellfish Immunol, 1996, 6: 185 - 198.
- [22] Navarro V, Quesada J A, Abad M E, et al. Immunocytochemical characterization of monoclonal antibodies to *Sparus aurata* (Teleost). immunoglobulin [J]. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3: 167 - 177.
- [23] Rombout J H W M, Taverne-Thiele A J, Villena M I, et al. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical study [J]. Dev Comp Immunol, 1993, 17: 55 - 66.



图版 Plate

1. 一龄鳃胸腺小叶(椭圆标注位置);被膜小孔(直线标注位置);H E 染色 $\times 100$;
2. O-外区;M-中区;I-内区,H E 染色 $\times 40$;
3. 粘液细胞(箭头所示);PAS 染色 $\times 100$;
4. 内区,充满了蓝色深染、疏松排列的淋巴细胞.H E 染色 $\times 400$;
5. 髓质上皮囊(箭头所示H);H E 染色 $\times 400$;
6. 黑色素巨噬细胞中心(箭头所示)H E 染色 $\times 400$;
7. 哈氏小体(箭头所示)H E 染色 $\times 400$;
8. Ig + 细胞(棕黄色)主要分布在胸腺外区;免疫组织化学染色 $\times 400$;
9. Ig + 细胞(箭头标注)在胸腺分叶处(直线标注位置)分布密集.免疫组织化学染色 $\times 400$;
10. Ig + 细胞(棕黄色)散在分布在淋巴细胞间.免疫组织化学染色 $\times 400$;
11. 细胞膜呈阳性(箭头所示).免疫组织化学染色 $\times 400$.