

## 2 种病原菌感染海鳗后外周血白细胞的病理变化

谢嘉华 袁建军\* 王立萍 杨儒明

(泉州师范学院生物学系 福建 泉州 362000)

**摘要:**用鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)分别感染海鳗(*Muraenesox cinereus*) 48 h 后取其外周血液,瑞-吉(Wright-Giemsa)氏染色,光镜下观察,同时对其外周血液中的免疫细胞数量变化进行测定。鳗弧菌和嗜水气单胞菌感染组的单核细胞的伪足样突起与对照组比较明显增多,胞质内空泡增多、变大,数量明显增多,差异极显著;嗜中性粒细胞核多呈长杆状,数量与对照组比较明显增多,差异极显著;淋巴细胞伪足样突起明显,中、大型淋巴细胞较多,数量与对照组相比明显减少,差异极显著;血栓细胞的数量明显下降,差异极显著。

**关键词:**海鳗;外周血白细胞;病理变化

中图分类号:Q942.5 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)05-88-04

### Changes in Number and Structure of Peripheral Leucocytes of Pike Eel Infected with Two Species of Fish Bacterial Pathogens

XIE Jia-Hua YUAN Jian-Jun WANG Li-Ping YANG Ru-Ming

(Department of Biology, Quanzhou Normal University, Quanzhou Fujian 362000, China)

**Abstract:** The Pike Eel (*Muraenesox cinereus*) was infected separately by *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila* for the observation of changes in the number and structure of leucocytes. The numbers of lymphocytes, neutrophils, monocytes and the thrombocytes from the peripheral blood were measured 48 h after the infection. In both *V. anguillarum* and *A. hydrophila* infected Pike Eels, the monocytes had obviously vacuolated cytoplasm and pseudopodia, with its number increased remarkably when compared to the control. Most neutrophils had rod nucleus in the infected Pike Eels, and their number increased remarkably compared to the control. The lymphocytes had distinct pseudopodia, and much more large and medium-sized lymphocytes were present, while their number decreased significantly when compared to the control. The number of the thrombocytes also decreased drastically in the infected Pike Eels.

**Key words:** *Muraenesox cinereus*; Peripheral leucocytes; Pathological change

血液是动物体内的一种重要体液,也是鱼体内一项重要的生理生化指标,血液内各种免疫细胞能对外界环境和动物体本身生理状态的变化产生反应,因而是机体免疫的重要成分。关于鱼类血液细胞的形态学研究,国内外已有不少报道,但是对于其外周血细胞在病原菌感染后病理变化的资料却很少,尤其是海洋鱼类。鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)均为常见细菌类群,广泛分布于自然界各种水域,目前已成为我国水产

养殖动物的主要病原菌之一,严重危害了水产养殖业的发展<sup>[1,2]</sup>。本研究在海鳗正常外周血细胞形态特征观察的基础上<sup>[3]</sup>,用鳗弧菌和嗜水气单胞菌分别感染海鳗(*Muraenesox cinereus*),研究并分析海鳗外周血液中免疫细胞

基金项目 福建省泉州市科技计划项目(No.2004N24);

\* 通讯作者, E-mail: yuanjianjun2005@tom.com;

第一作者介绍 谢嘉华,女,硕士,教授,主要从事动物解剖和生理的教学和研究, E-mail: xjh921258@tom.com

收稿日期 2006-03-07,修回日期 2006-07-09

形态和数量的变化,探讨其免疫应答的规律,这对鱼类免疫学研究有一定的理论意义。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 实验用海鳗购于福建省泉州市农贸市场,共 15 尾,健康无病,体重 0.68 ~ 1.15 kg,体长 87 ~ 98 cm。实验分 3 组,每组 5 尾,均饲养在 150 cm × 60 cm × 50 cm 的水族箱中,水温 16.5 ~ 19℃,氧泵充氧,每日更换新鲜海水 1/3 ~ 1/2,不投饵,暂养一周后进行试验。

**1.2 病原菌制备** 鳗弧菌和嗜水气单胞菌(购自中国典型培养物保藏中心)经培养分离集菌 0.65% 生理盐水稀释,制备成  $1.98 \times 10^8$ /ml 的鳗弧菌悬液和  $1.55 \times 10^9$ /ml 的嗜水气单胞菌悬液。

**1.3 感染** 实验分 A、B、C 3 组。A 组按 2 ml/尾腹腔注射鳗弧菌悬液,B 组按 2 ml/尾腹腔注射嗜水气单胞菌悬液,C 组为对照组,等剂量腹腔注射生理盐水。

**1.4 采血观察** 感染 48 h 后用断尾法取血,血液直接在洁净的载玻片上涂片,晾干后,瑞吉氏染色法<sup>[4]</sup>染色(瑞氏粉 1 g,吉氏粉 1 g,甘油 100 ml,甲醇 400 ml)。

**1.5 数据处理** 每尾鱼选取 3 张血涂片,每片随机观察约 200 个白细胞,对单核细胞、嗜中性粒细胞(嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞数量很少,忽略不计)、淋巴细胞进行分类、计数、统计,并用 *t*-检验方法检测细胞数量变化的显著性差异。

## 2 结果

**2.1 病理变化** 海鳗经人工感染鳗弧菌和嗜水气单胞菌后,24 h 内无肉眼可见明显症状,反应迟钝而安静。48 h 后,经 2 种病原菌感染的海鳗均出现相似的症状,肌肉、肝、脾、肾等器官肿大,充血或出血,腹腔内有大量腹水,胃肠道肿胀充血,部分鱼胃盲囊破裂。

**2.2 外周血中白细胞的形态变化** 2 种病原菌感染后,对照组海鳗外周血中的单核细胞呈圆形、卵圆形或椭圆形,常有伪足样胞质突起。

核卵圆形或肾形,多偏于一侧,一般大于或等于整个细胞的 1/2。胞质较丰富,染成蓝色,其中有大小不等的空泡(图 1:a)。嗜中性粒细胞形态多样,以卵圆形居多。核较小,不超过整个细胞的 1/3,形状多样,多呈卵圆形,偏于细胞一侧。胞质丰富,染成浅蓝至浅粉红色,其中充满淡紫红色细小颗粒(图 1:b)。淋巴细胞是白细胞中个体较小的细胞,细胞呈圆形或不规则圆形。核圆形,中位或偏于一侧。核质比例大,核中染色质浓密,染成蓝紫色。胞质染成浅蓝色,呈一薄层围于核外,常向外伸出伪足样突起。

海鳗在分别感染了鳗弧菌和嗜水气单胞菌 48 h 后,外周血中的白细胞均较对照组出现了相似的形态变化,表现为单核细胞体积增大,形态不规则,伪足样突起增多且明显(图 1:c),胞质内空泡增多、变大(图 1:d),个别的还看到被吞噬进去的血栓细胞(图 1:e);嗜中性粒细胞形态较对照组更不规则,胞质中出现空泡,核多数呈长杆状(图 1:f);淋巴细胞伪足样突起明显,且中、大型淋巴细胞较对照组更多(图 1:g)。

**2.3 外周血中白细胞数量的变化** 2 种病原菌感染后,A、B 2 组海鳗在感染 48 h 后,外周血中的单核细胞和嗜中性粒细胞的数量均比对照组(C 组)明显增加,差异极显著。嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞因数量极少,未计入其中。淋巴细胞的数量比对照组明显减少,差异极显著。血栓细胞的数量较对照组明显下降,差异极显著。详见表 1。

表 1 2 种病原菌感染海鳗外周血中白细胞分类计数  
Table 1 DLC in the peripheral blood cells of Pike Eel 48 h after infection by two pathogens

组别 Group	白细胞分类计数 DLC (Mean ± SD)		
	单核细胞 Monocytes	嗜中性粒细胞 Neutrophils	淋巴细胞 Lymphocytes
A	25.88 ± 2.59**	51.70 ± 3.52**	22.42 ± 2.69**
B	22.97 ± 4.09**	53.11 ± 5.44**	23.92 ± 2.58**
C	12.92 ± 1.56	37.26 ± 2.29	49.82 ± 1.73

\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

\* Represents significant difference ( $P < 0.05$ );

\*\* Represents remarkably significant difference ( $P < 0.01$ ).

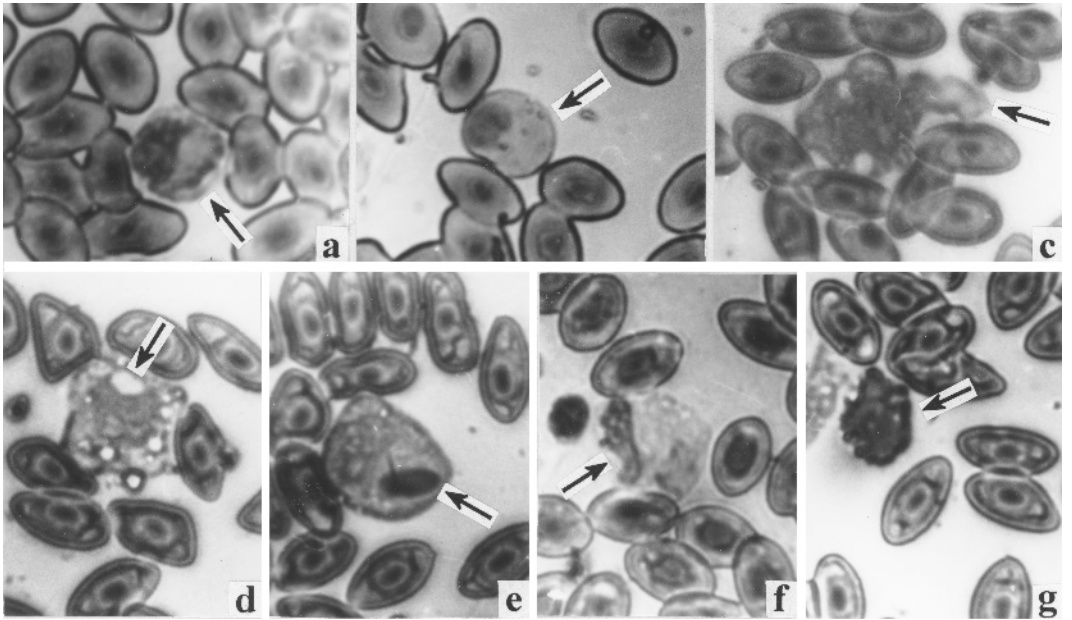


图 1 感染病原菌后海鳗外周血白细胞的显微图像 ×900

Fig.1 Micrograph of peripheral blood cells of Pike Eel infected by two pathogens

- a. 正常的单核细胞( ↑ ); b. 正常的嗜中性粒细胞( ↑ ); c. 病原菌感染后的单核细胞( ↑ 示伪足 ); d. 病原菌感染后的单核细胞( ↑ 示胞质空泡 ); e. 病原菌感染后的单核细胞( ↑ 示吞噬的血栓细胞 ); f. 病原菌感染后的嗜中性粒细胞( ↑ 示杆状核 ); g. 病原菌感染后的淋巴细胞( ↑ ).
- a. monocyte of control( ↑ ); b. neutrophil of control( ↑ ); c. monocyte infected by pathogens, showing pseudopodia( ↑ ); d. monocyte infected by pathogens, showing vacuole in the cytoplasm( ↑ ); e. monocyte infected by pathogens, showing phagocytosed thrombocyte( ↑ ); f. neutrophil infected by pathogens, showing rod nucleus( ↑ ); g. lymphocyte infected by pathogens( ↑ ).

### 3 讨论

鱼类免疫系统是鱼体内执行免疫防御功能的机构,包括免疫组织、免疫细胞和体液免疫因子三大类。凡参与免疫应答或与免疫应答有关的细胞均称为免疫细胞,免疫细胞分为两大类:一类是淋巴细胞,主要参与特异性免疫反应;另一类是吞噬细胞,主要参与非特异性免疫反应。鱼类免疫细胞主要存在于免疫器官和组织以及血液与淋巴液中。

单核细胞和粒细胞(包括嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)是鱼类吞噬细胞的主要组成成分。鱼类吞噬细胞又是组成非特异性防御系统的关键成分,尤其是在抵御病原生物感染中发挥着重要的作用。单核细胞和粒细胞等免疫细胞一方面可以破坏和降解血液及各器官与组织中的病原体;另一方面又会被活

化并产生更多的抗病因子<sup>[5]</sup>。

单核细胞能进行活跃的变形活动,具有较强的吞噬能力,可通过伪足样胞突捕捉并融合外来物质以及自身的衰老细胞,进行吞噬消化<sup>[6]</sup>。当机体发生急性炎症时,幼单核细胞能迅速增殖发育,产生速率提高 50% 左右。单核细胞还是重要的“抗原介绍细胞”<sup>[7]</sup>。经鳗弧菌和嗜水气单胞菌感染后,海鳗外周血液中单核细胞数量均有极显著的上升,出现了少量幼稚的单核细胞,同时细胞形状变化较大,胞突增加,胞内有一些大液泡和吞噬物,个别还看到被吞噬进去的血栓细胞,表明在病原菌感染后的较短时间内,造血器官加速了单核细胞的增殖发育和释放,使单核细胞数量迅速增加且吞噬能力增强,能对血液中的菌体和衰老细胞进行活跃的吞噬活动,这与周玉等<sup>[8]</sup>的结果一致。此外,在血涂片中还观察到少量开始解体的单

核细胞,推测随着感染时间的延长,单核细胞的数量因吞噬细菌后解体,而呈下降趋势,这与胡成钰等<sup>[5,9]</sup>、Suzuki<sup>[10]</sup>的研究结果一致。

鱼类的粒细胞包括嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞。在海鳗外周血中,嗜中性粒细胞占粒细胞中的大多数,嗜酸性粒细胞所占比例非常小,嗜碱性粒细胞在血涂片上很难找到<sup>[3]</sup>,故本文主要研究嗜中性粒细胞在感染后数量上的变化。嗜中性粒细胞数量多,功能活跃,因此也是鱼类十分重要的非特异性免疫细胞。弧菌和气单胞菌感染鱼后都会出现出血性溃疡现象,气单胞菌还会引起败血症<sup>[11]</sup>,而这些均将导致嗜中性粒细胞的增加。研究也表明,在鱼类腹腔中注入脂多糖、佐剂或接种病原生物后,其血液中嗜中性粒细胞的数量将会显著增加<sup>[12,13]</sup>。本研究中海鳗经鳃弧菌和嗜水气单胞菌感染 48 h 后,嗜中性粒细胞的数量与对照组比较有极显著的增加,这进一步证实了前人的结论。

淋巴细胞是鱼体内参与特异性免疫反应的免疫细胞,鱼类的淋巴细胞也像高等脊椎动物那样能被抗原激活而产生相应的抗体和淋巴因子,其中 T 淋巴细胞还具有直接杀伤细胞的作用<sup>[14]</sup>。但是淋巴细胞受抗原作用后的应答除正反应即激活外,还有负反应即麻痹。呈负反应时,淋巴细胞处于麻痹状态甚至死亡<sup>[7]</sup>。Evenberg 通过对鱼体注射产气单胞菌,对血液防御病理进行研究后认为,鱼的发病是由于鱼体本身免疫机能受抑制而成,产生鱼类免疫抑制作用的细胞是 T 细胞群<sup>[15]</sup>。本研究中,海鳗经鳃弧菌和嗜水气单胞菌感染 48 h 后,外周血液中的淋巴细胞数量表现出显著减少,差异极显著,推测是由于免疫抑制作用导致血液淋巴细胞数量的减少而对疾病的敏感性加强。

血栓细胞是鱼类中具有凝血作用的细胞,相当于哺乳类的血小板。海鳗经鳃弧菌和嗜水

气单胞菌感染后,全身多种器官出现充血或出血,同时观察到血栓细胞被单核细胞吞噬的现象,这可能与其外周血中血栓细胞的数量显著下降相关。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 郑天伦,王国良,金珊.海水养殖动物弧菌病防止的研究进展.台湾海峡,2002,21(3):372~378.
- [ 2 ] 范红结,黄国庆,陈怀青等.嗜水气单胞菌疫苗的检验及免疫效力试验.畜牧与兽医,1998,30(6):252~253.
- [ 3 ] 谢嘉华,陈朝阳.海鳗外周血细胞的显微结构.动物学杂志,2003,38(6):14~18.
- [ 4 ] 刘志洁,宗英.野生动物血液细胞学图谱.北京:科学出版社,2002,1~20.
- [ 5 ] 胡成钰,洪一江,林光华.柱状噬纤维菌免疫后兴国红鲤免疫细胞数量变化的研究.水生生物学报,2002,26(6):674~678.
- [ 6 ] 张永安,孙宝剑,聂品.鱼类免疫组织和细胞的研究概况.水生生物学报,2000,24(6):648~654.
- [ 7 ] 上海第一医学院主编.组织学.北京:人民卫生出版社,1983,126~160,525~563.
- [ 8 ] 周玉,郭文场,杨振国等.养殖欧洲鳗鲡“狂游病”外周血细胞的病理变化.上海水产大学学报,2000,9(4):369~372.
- [ 9 ] 胡成钰,洪一江,王军花等.兴国红鲤外周血细胞对不同抗原免疫反应的研究.水利渔业,2002,22(1):24~25.
- [ 10 ] Suzuki K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas) and carp, *Cyprinus carpio* L. *J Fish Biol*, 1986, 29:349~364.
- [ 11 ] 俞开康,战文斌,周丽.海水养殖病害诊断与防治手册.上海:上海科学技术出版社,2000,25~32.
- [ 12 ] Ellis A E. The leucocytes of fish: a review. *J Fish Biol*, 1977, 11:453~491.
- [ 13 ] Ellis A E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25:827~839.
- [ 14 ] 聂品.鱼类非特异性免疫研究的新进展.水产学报,1997,21(1):69~72.
- [ 15 ] 李亚南,陈全震,邵健忠等.鱼类免疫学研究进展.动物学研究,1995,16(1):83~94.