

齐口裂腹鱼血细胞的发生

杨 淞 颜 涛 赵柳兰* 符红梅 肖 青 蒲 粟

杜宗君 何 智 严太明

四川农业大学动物科技学院 雅安 625014

摘要: 为了探讨齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) 血细胞发生发育的模式, 采用 Wright's、碘酸雪夫氏 (PAS) 和苏丹黑 B (SBB) 染色方法对齐口裂腹鱼的头肾、中肾、脾和肝组织印片进行染色, 了解其发生的具体组织和发育的一般过程。结果表明: 齐口裂腹鱼血细胞可分为红细胞系、淋巴细胞系、单核细胞系、粒细胞系和其他细胞, 且这些细胞系的发育均经过 3 个阶段, 即原始阶段、幼稚阶段、成熟阶段。通过观察和统计不同阶段各种血细胞的形态、大小、比例及染色特征, 发现原始阶段的血细胞体积较大, 其中原始单核细胞最大, 大小为 $(18.90 \pm 1.59) \mu\text{m} \times (16.32 \pm 0.70) \mu\text{m}$, 在 4 种组织中原始阶段的红细胞和单核细胞在头肾中所占比例最大, 分别为 0.64% 和 0.59%, 原粒细胞和原淋巴细胞分别在中肾和脾中比例最大, 在肝中少量存在, 此外在各组织印片中均发现血栓细胞的存在, 在肝中发现巨噬细胞。因此头肾、中肾和脾是齐口裂腹鱼的主要造血组织, 少量细胞在肝中产生。粒细胞发育过程中, 除原始粒细胞 PAS 染色阴性外, 其他阶段均呈阳性, 且阳性随不断成熟逐渐增强; 单核细胞从原单核细胞到成熟的单核细胞, PAS 阳性逐渐增强; 而 SBB 染色发现, 粒细胞、淋巴细胞及单核细胞均呈阳性, 未成熟的细胞染色程度不一致, 成熟的细胞阳性染色最为强烈。在红细胞系发育过程中经历了细胞由大变小再变大的过程, 而粒细胞和淋巴细胞发育过程仅出现由大变小的过程, 在红细胞的发育过程中还出现了染色质固缩和血红蛋白增加。

关键词: 齐口裂腹鱼; 血细胞; 发生; 过碘酸雪夫氏染色; 苏丹黑 B 染色

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 02-231-12

Morphogenesis of Blood Cell Lineages in Ya-fish (*Schizothorax prenanti*)

YANG Song YAN Tao ZHAO Liu-Lan* FU Hong-Mei XIAO Qing PU Su

DU Zong-Jun HE Zhi YAN Tai-Ming

College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: In order to clarify the possible patterns of haemopoiesis in Ya-fish (*Schizothorax prenanti*), the method of Wright's, Periodic acid-Schiff (PAS) and Sudan back B (SBB) staining were used to stain the head

基金项目 四川农业大学“双支计划”项目 (No. 03570202), 四川省农业厅水产局项目;

* 通讯作者, E-mail: zhaoliulan2007@163.com;

第一作者介绍 杨淞, 男, 博士; 研究方向: 水产养殖动物疾病及健康养殖; E-mail: ysys210@tom.com.

收稿日期: 2014-08-25, 修回日期: 2014-11-12 DOI: 10.13859/j.cjz.201502009

kidney, trunk kidney, spleen and liver imprints. The present study aimed to understand the location and process of haemopoiesis in Ya-fish. The data analysis was performed by the software of Microsoft Excel 2010 and all shown as Mean \pm SD (standard deviation). The results showed that haemopoiesis had the following series: erythropoiesis, granulopoiesis, monopoiesis and lymphopoiesis, consisted of precursor, young and mature stages. According to the morphology, size and proportions of blood cell lineages, monoblasts were the largest in the precursors and the size was about $18.90 \pm 1.59 \mu\text{m} \times 16.32 \pm 0.70 \mu\text{m}$ (Table 1). Proerythroblasts and monoblasts were the predominant cells in head kidney, accounting for 0.64% and 0.59%, respectively. Granuloblasts and lymphoblasts were regularly present in trunk kidney and spleen, while rare in liver (Table 1). Furthermore, thrombocytes were observed in four tissues imprints and macrophagocytes could be discovered in liver (Fig. 1). Thus, haemopoietic tissue was found mainly in head kidney, trunk kidney and spleen, and only a small amount in liver. In the granulocytes lineage, except for the blast cells, the young and mature cells were PAS-positive. and staining intensity of PAS was increased with the maturation process of monocytes. Lymphocytes, granulocytes and monocytes were SBB-positive, and there was a difference of staining intensity in immature stage cells, while the mature cells stained intensely with SBB (Fig. 2). During maturation process, the size of erythrocytes decreased first and then increased again, while the sizes of lymphocytes and granulocytes consistently decreased. Gradual chromatin condensation and the increase in haemoglobin content were observed during erythropoiesis (Fig. 3).

Key words: *Schizothorax prenanti*; Blood cell; Morphogenesis; Periodic acid-Schiff; Sudan black B

鱼类与高等脊椎动物存在许多差异,但是鱼类造血组织的基本结构及其作用机制与高等脊椎动物均起源于多功能的造血干细胞 (Fijan 2002a, b)。鱼类是脊椎动物中种类最多的一个类群,截止 2014 年 8 月全世界记录有鱼类 32 900 种 (Froese et al. 2014)。所有鱼类都缺乏骨髓和淋巴结,其免疫造血功能及自身稳定依靠进化出的独特造血组织来维持 (Campbell et al. 1990)。然而鱼类造血组织并不一致 (Catton 1951, Homechaudhuri et al. 2001, 陈刚等 2005, 2006, 张健东等 2007),血细胞发生过程的不确定及在个体发育中的功能资料匮乏,直接阻碍了鱼类血细胞进化的研究进程 (Claver et al. 2009)。

裂腹鱼类,主要分布在青藏高原及周边区域,这些地区常年低温低氧,为适应环境,裂腹鱼形成了一些特殊进化特征,如强的抗逆性和免疫力 (Wang et al. 2011)。齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) 隶属鲤科 (Cyprinidae)

裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae),在四川雅安地区俗称“雅鱼”,为青藏高原特有的冷水性鱼类 (Liang et al. 2011),是中国极具经济价值的鱼类之一。其肉质鲜嫩,营养价值高,目前已能进行人工养殖 (董艳珍等 2011)。随着集约化养殖程度提高,齐口裂腹鱼疾病频发,如小瓜虫病 (陈礼强等 2007)、败血症 (耿毅等 2004) 等,但关于其免疫方面的研究甚少。血细胞在免疫系统中占据重要地位,对环境变化或其他应激十分敏感,能够在不同造血组织间高效流通 (Kondera 2011),在鱼类疾病发生和防治中起着重要作用 (Blaxhall et al. 1973)。目前仅见关于齐口裂腹鱼外周血细胞的报道 (杨淞等 2011),血细胞发生的具体组织及过程仍不明了。本研究对齐口裂腹鱼的头肾、中肾、脾及肝组织中的血细胞进行观察和统计,并且辅以过碘酸雪夫氏 (periodic acid-Schiff, PAS) 和苏丹黑 B (Sudan black B, SBB) 染色,以期探讨齐口裂腹鱼血细胞发生的一般过程,为齐

口裂腹鱼血液学提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用齐口裂腹鱼均购自雅安芦山养殖场, 活体运回实验室, 分别置于水族箱 (1.75 m × 1.00 m × 0.75 m) 内, 24 h 不间断充气, 水温 18℃ 左右暂养 7 d 后, 挑选体色正常, 反应灵敏的健康个体 20 尾进行实验, 平均体重为 (300 ± 9) g, 雌雄比为 1 : 1。

1.2 方法

1.2.1 血细胞染色及观察 拭干鱼体表, 立即解剖, 迅速取出头肾、中肾、脾及肝, 用生理盐水冲洗后, 吸水纸吸干, 横切, 其横截面为 1 mm × 1 mm 正方形, 将切面轻轻与玻片接触, 迅速制取印片, 每尾鱼每种组织制作 18 张印片, 晾干后分别进行 Wright's、PAS 及 SBB 染色。

Wright's 染色, 将印片甲醇固定, Wright's 染液染色 4 ~ 5 min, pH 6.8 的磷酸缓冲液中静置 6 ~ 8 min, 用蒸馏水轻轻冲洗干净, 晾干。

PAS 染色显示糖原, 阴性对照采用唾液淀粉酶消化处理; SBB 染色显示脂类物质, 阴性对照用丙酮处理 (Fijan 2002a, Tavares-Dias 2006)。

所有玻片均用中性树脂封片, 在 Nikon Eclipse 50i 油镜下观察并拍照。

1.2.2 细胞发育阶段及类型的判定 细胞形态、发育阶段及类型的判定参照 Fijan (2002a, b) 推荐的标准。

1.2.3 各类细胞大小及计数 每张组织印片上随机取 10 个视野, 对其中的各类细胞都分为原始、幼稚及成熟型进行统计, 各类细胞均统计总计 5 000 个细胞, 分别计算其所占的百分比, 并测量印片上细胞的大小, 不同类型细胞分别测量 200 个, 用 Excel 2010 软件分析, 其细胞大小用平均值 ± 标准差表示。

2 结果

2.1 血细胞大小

头肾、中肾、脾和肝 4 种组织印片中各类血细胞大小测量结果见表 1, 其中, 偶见巨噬

表 1 齐口裂腹鱼各种血细胞的大小 (平均值 ± 标准差)

Table 1 Cell and nucleus sizes of various haematopoietic cells in *Schizothorax prenanti* (Mean ± SD)

	细胞类型 Cell types	胞体大小 Size of volumes		胞核大小 Size of nuclei		
		长径 (μm) Major-axis	短径 (μm) Minor-axis	长径 (μm) Major-axis	短径 (μm) Minor-axis	
红细胞系 Erythroid lineage	原红细胞 Proerythroblast	15.00 ± 0.56	13.53 ± 0.51	12.01 ± 0.41	9.89 ± 0.28	
	早幼红细胞 Basophilic erythrocyte	14.32 ± 0.36	12.10 ± 0.78	11.19 ± 0.56	9.01 ± 0.49	
	中幼红细胞 Polychromatic erythroblast	13.14 ± 0.46	10.54 ± 0.80	9.74 ± 0.76	8.24 ± 0.42	
	晚幼红细胞 Orthochromic erythroblast	8.81 ± 0.76	7.19 ± 0.72	5.52 ± 0.58	4.35 ± 0.78	
	红细胞 Erythrocyte	13.69 ± 0.63	7.74 ± 0.52	6.10 ± 0.46	2.83 ± 0.23	
粒细胞系 Granuloid lineage	原粒细胞 Granuloblast	15.05 ± 0.77	13.79 ± 0.69	11.55 ± 0.90	9.47 ± 1.30	
	早幼粒细胞 Young neutrophilic progranulocyte	14.21 ± 0.50	12.10 ± 0.34	11.78 ± 1.34	9.63 ± 0.85	
	中幼粒细胞 Progranulocyte	中性 Neutrophilic	13.64 ± 0.71	12.05 ± 0.62	11.46 ± 1.66	6.87 ± 1.41
		碱性 Basophilic	14.18 ± 1.51	13.20 ± 2.38	11.93 ± 1.90	7.01 ± 1.20
		酸性 Eosinophilic	12.16 ± 0.57	12.13 ± 1.15	10.99 ± 0.64	6.68 ± 0.90
	晚幼粒细胞 Metagranulocyte	中性 Neutrophilic	11.26 ± 0.29	10.33 ± 0.88	10.07 ± 1.12	6.94 ± 1.30
		碱性 Basophilic	11.67 ± 0.71	10.97 ± 0.91	9.14 ± 0.39	5.95 ± 1.01
	酸性 Eosinophilic	11.19 ± 0.13	10.29 ± 0.98	9.21 ± 0.77	6.69 ± 0.78	
粒细胞 Granulocyte		11.99 ± 1.04	10.59 ± 1.21	8.23 ± 1.29	4.19 ± 0.64	
单核细胞系 Monocytoid lineage	原单核细胞 Monoblast	18.90 ± 1.59	16.32 ± 0.70	13.29 ± 1.07	10.01 ± 1.05	
	幼单核细胞 Promonocyte	13.02 ± 0.36	11.78 ± 0.14	11.15 ± 0.96	8.16 ± 1.17	
	单核细胞 Monocyte	14.53 ± 0.94	12.87 ± 0.83	10.98 ± 1.09	8.94 ± 1.23	
淋巴细胞系 Lymphoid lineage	原淋巴细胞 Lymphoblast	11.85 ± 0.54	10.73 ± 0.95	9.90 ± 0.75	8.11 ± 0.55	
	幼淋巴细胞 Prolymphocyte	11.17 ± 0.73	10.02 ± 0.58	9.33 ± 0.53	7.53 ± 0.91	
	淋巴细胞 Lymphocyte	9.97 ± 0.74	7.83 ± 0.72	8.37 ± 0.55	6.94 ± 0.77	
血栓细胞 Thrombocyte		4.60 ± 0.41	3.27 ± 0.29			
巨噬细胞 Macrophagocyte		23.03 ± 0.31	17.81 ± 1.27	8.77 ± 0.40	8.24 ± 0.04	

细胞，其大小 $(23.03 \pm 0.31) \mu\text{m} \times (17.81 \pm 1.27) \mu\text{m}$ ，白细胞中单核细胞体积最大，血栓细胞体积最小。

2.2 四种组织中各种血细胞比例

头肾、中肾、脾和肝 4 种组织中，各种血细胞原始、未成熟和成熟阶段数量占总数的比例见表 2。其中，原红细胞在头肾中比例最大，为 0.64%，其次是中肾和脾，分别为 0.56% 和 0.50%，肝中未见；原始粒细胞则在中肾和头肾中的比例较大，分别为 1.35% 和 1.02%，脾和肝中也存在原粒细胞，但是比例均较低；原淋巴细胞则在脾中的比例较其他组织高，为 1.60%，其次为头肾和中肾；原单核细胞在头肾中的比例较其他组织高，为 0.59%。成熟红细胞在肝中占绝大部分，比例高达 68.09%；成熟粒细胞在头肾和中肾中占比例较多，而在肝和脾较少，仅为头肾的 29.5%；成熟淋巴细胞在中肾中最多，为 42.05%。因此齐口裂腹鱼的红细胞、粒细胞和单核细胞的发生主要在头肾和中肾，淋巴细胞主要发生在脾。在各组织印

片中均发现血栓细胞的存在，在肝中偶见巨噬细胞。

2.3 齐口裂腹鱼血细胞各发育阶段的形态学特点

血细胞分类及发育阶段参照 Fijan (2002a, b) 所推荐的标准，其将血细胞主要分为红细胞系、粒细胞系、单核细胞系、淋巴细胞系及其他细胞。

2.3.1 红细胞系 原红细胞 (proerythroblast, PEB) (图 1a)，近圆形，表面光滑，无胞突。胞质较少但浓密而不均匀，呈深蓝色，在胞核周围细胞质着色较浅，形成核周淡染环带区。胞核为圆形，占据细胞的绝大部分，位置居中或稍偏于细胞一侧，但不与胞膜相切，核内染色质成网状，深紫红色，有核仁但边界不清。

幼红细胞 (图 1b~d) 可以分为 3 个阶段，即早幼红细胞 (basophilic erythrocyte, BEB)、中幼红细胞 (polychromatic erythroblast, POE) 和晚幼红细胞 (orthochromic erythroblast,

表 2 组织中各种类型细胞占细胞总量百分比

Table 2 The percentages of different blood cells in four tissues (%)

组织 Tissues	细胞类型 Cell types	红细胞系 Erythroid lineage	粒细胞系 Granuloid lineage	单核细胞系 Monocytoid lineage	淋巴细胞系 Lymphoid lineage	血栓细胞 Thrombocytes	巨噬细胞 Macrophag-ocyte	其他 Others
头肾 Head kidney	原始 Primitive	0.64 ± 0.01	1.02 ± 0.02	0.59 ± 0.06	1.13 ± 0.08			
	未成熟 Immature	4.18 ± 0.39	0.91 ± 0.07	0.43 ± 0.05	1.61 ± 0.09			
	成熟 Mature	41.37 ± 3.17	8.09 ± 1.05	3.32 ± 0.91	32.32 ± 3.91			
	总计 Total	46.19 ± 3.92	10.02 ± 1.99	4.34 ± 0.96	35.06 ± 3.76	4.07 ± 0.12		0.32 ± 0.04
中肾 Trunk kidney	原始 Primitive	0.56 ± 0.05	1.35 ± 0.06	0.27 ± 0.01	1.12 ± 0.05			
	未成熟 Immature	2.46 ± 0.19	1.63 ± 0.04	0.79 ± 0.09	0.88 ± 0.02			
	成熟 Mature	34.29 ± 4.87	4.18 ± 0.99	3.35 ± 1.02	42.05 ± 3.98			
	总计 Total	37.31 ± 3.98	7.16 ± 0.89	4.41 ± 1.18	44.05 ± 3.87	6.37 ± 0.54		0.70 ± 0.01
脾 Spleen	原始 Primitive	0.50 ± 0.04	0.60 ± 0.05	0.30 ± 0.01	1.60 ± 0.03			
	未成熟 Immature	4.47 ± 0.87	1.09 ± 0.07	0.45 ± 0.08	2.73 ± 0.09			
	成熟 Mature	43.91 ± 3.19	2.73 ± 0.63	1.04 ± 0.06	33.23 ± 2.09			
	总计 Total	48.88 ± 3.99	4.67 ± 0.99	1.79 ± 0.09	37.56 ± 2.18	6.66 ± 0.88		0.45 ± 0.03
肝 Liver	原始 Primitive	0.00 ± 0.00	0.43 ± 0.06	0.07 ± 0.01	0.76 ± 0.09			
	未成熟 Immature	3.41 ± 0.61	0.17 ± 0.02	0.10 ± 0.02	1.11 ± 0.03			
	成熟 Mature	68.09 ± 5.91	2.39 ± 0.98	0.76 ± 0.05	19.80 ± 1.93			
	总计 Total	71.50 ± 6.65	2.99 ± 1.05	0.93 ± 0.08	21.67 ± 1.96	1.79 ± 0.23	0.60 ± 0.01	0.51 ± 0.04

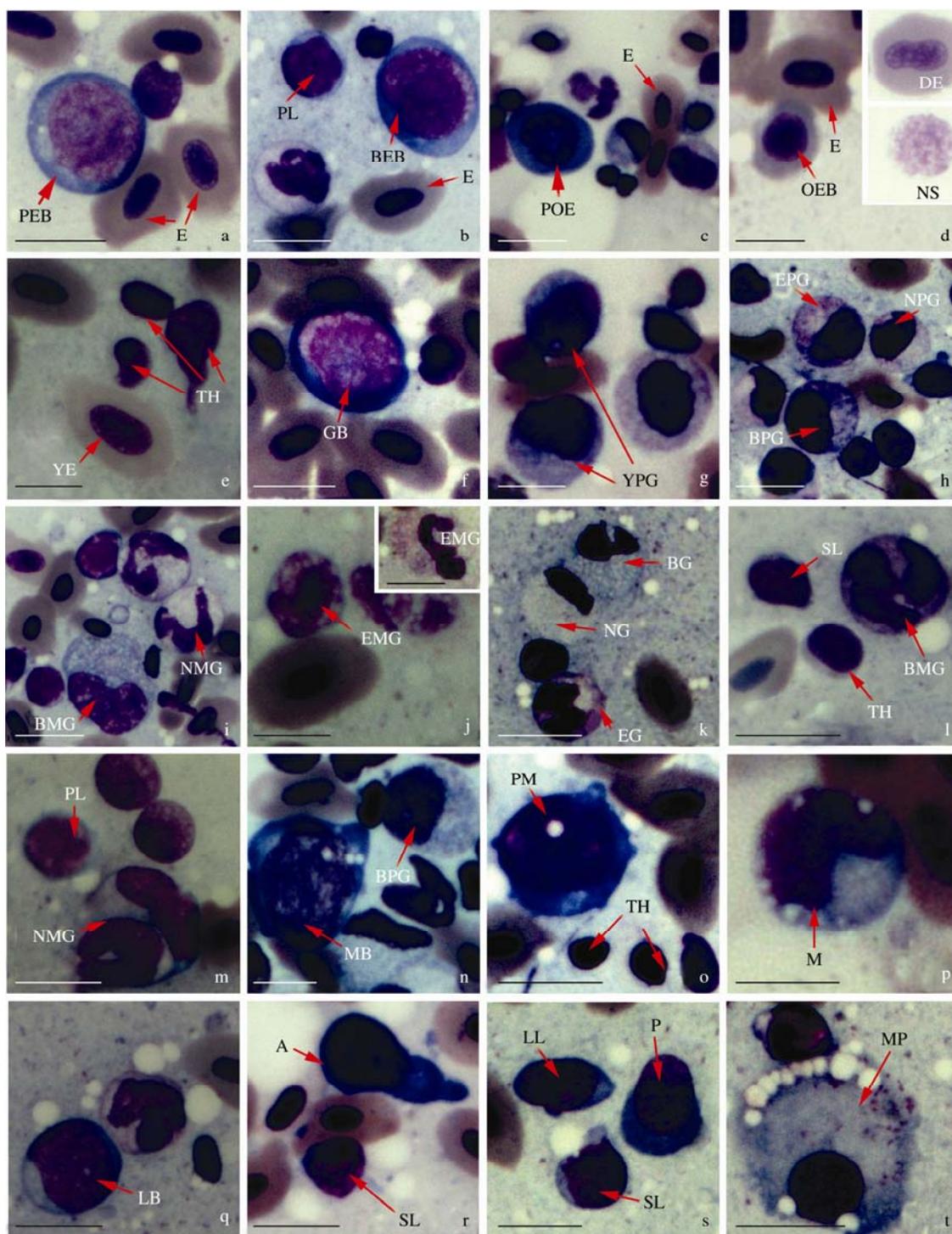


图 1 齐口裂腹鱼 4 种组织中血细胞

Fig. 1 Blood cells in four tissues of *Schizothorax prenanti*

a、c、g、l、o、p. 头肾印片；b、j、k、m、n. 中肾印片；d、e、q、r、s. 脾印片；f、h、i、t. 肝印片；标尺 = 10 μm。

a, c, g, l, o, p. Head kidney imprints; b, j, k, m, n. Trunk kidney imprints; d, e, q, r, s. Spleen imprints; f, h, i, t. Liver imprints; Bar = 10 μm.

(转下页)

(接上页) A. 未知细胞; BEB. 早幼红细胞; BG. 嗜碱性粒细胞; BMG. 嗜碱性晚幼粒细胞; BPG. 嗜碱性中幼粒细胞; DE. 分裂的红细胞; E. 成熟红细胞; EG. 嗜酸性粒细胞; EMG. 嗜酸性晚幼粒细胞; EPG. 嗜酸性中幼粒细胞; GB. 原粒细胞; LB. 原淋巴细胞; LL. 大淋巴细胞; M. 单核细胞; MB. 原单核细胞; MP. 巨噬细胞; NG. 嗜中性粒细胞; NMG. 嗜中性晚幼粒细胞; NPG. 嗜中性中幼粒细胞; NS. 核影细胞; OEB. 晚幼红细胞; P. 浆细胞; PEB. 原红细胞; PL. 幼淋巴细胞; PM. 幼单核细胞; POE. 中幼红细胞; SL. 小淋巴细胞; TH. 血栓细胞; YE. 幼红细胞末期细胞; YPG. 早幼粒细胞。

A. Unknown cell; BEB. Basophilic erythrocyte; BG. Basophilic granulocyte; BMG. Basophilic metagranulocyte; BPG. Basophilic progranulocyte; DE. Dividing erythrocyte; E. Erythrocytes; EG. Eosinophilic granulocyte; EMG. Eosinophilic metagranulocyte; EPG. Eosinophilic progranulocyte; GB. Granuloblast; LB. Lymphoblast; LL. Large lymphocyte; M. Monocyte; MB. Monoblast; MP. Macrophagocyte; NG. Neutrophilic granulocyte; NMG. Neutrophilic metagranulocyte; NPG. Neutrophilic progranulocyte; NS. Nuclear-shadow cell; OEB. Orthochromic erythroblast; P. Plasmocyte; PEB. Proerythroblast; PL. Polymphocyte; PM. Monoblast; POE. Polychromatic erythroblast; SL. Small lymphocyte; TH. Thrombocyte; YE. Young erythrocyte; YPG. Young neutrophilic progranulocyte.

OEB)。早幼、中幼和晚幼红细胞的胞体及胞核均较原红细胞小, 细胞椭圆形, 早幼红细胞体积是幼红细胞发育过程中最大的, 晚幼红细胞早期阶段最小。这 3 种幼红细胞均表面光滑, 偶有不规则突起, 细胞核近圆形或椭圆形, 均为中位或者稍偏于一侧, 核内染色质逐渐聚集, 核仁逐渐消失。随着红细胞发育成熟, 血红蛋白含量慢慢增加, 胞质颜色逐渐变浅, 由深蓝色到灰蓝色。晚幼红细胞末期阶段的细胞 (young erythrocyte, YE), 胞质中血红蛋白丰富, 染色与成熟红细胞相似 (图 1e), 呈淡砖红色, 胞体及胞核体积逐渐变大。晚幼红细胞在 4 种组织中均能观察到。

红细胞 (erythrocyte, E) (图 1a ~ d), 成熟红细胞多呈椭圆形, 部分呈长椭圆形, 表面光滑, 胞质内充满血红蛋白, 并染成颜色均匀的砖红色。胞核居中, 多呈椭圆形, 偶有圆形, 染色质浓密, 被均匀染成紫红色, 无核仁。偶见正在分裂的红细胞 (dividing erythrocyte, DE) 及核影细胞 (nuclear-shadow cell, NS) (图 1d)。

2.3.2 粒细胞系 原粒细胞 (granuloblast, GB) (图 1f) 圆形或卵圆形, 表面光滑; 胞质蓝色; 胞核椭圆形或圆形, 一侧与质膜靠近或相切, 染色质疏松, 呈细粒状, 分布均匀。

幼粒细胞 (图 1g ~ n), 根据核质比及细胞核形态分为早幼 (young neutrophilic progranulocyte, YPG)、中幼 (progranulocyte,

PG) 和晚幼 (metagranulocyte, MG) 粒细胞 3 种类型。齐口裂腹鱼原始粒细胞胞浆内出现嗜天青颗粒时即为早幼粒细胞, 其核成卵圆形, 偏于一侧, 核质比大于 1/2。核质比接近 1/2, 胞质出现不同染色特性的颗粒即为中幼粒细胞, 胞质中出现粉红色颗粒的为嗜酸性中幼粒细胞 (eosinophilic progranulocyte, EPG), 出现蓝色颗粒的为嗜碱性中幼粒细胞 (basophilic progranulocyte, BPG), 出现无色或者透明颗粒的为嗜中性中幼粒细胞 (neutrophilic progranulocyte, NPG)。胞核进一步浓缩但无固定的形状特点时即为晚幼粒细胞 (图 1i, j), 核呈不规则圆形、椭圆形、肾形或粗杆状, 也有马蹄形, 常偏位与质膜相切, 胞质内含有清晰的不同嗜性颗粒 (图 1i, j)。在 4 种组织切片上均可观察到正在进行有丝分裂的晚幼粒细胞 (图 1l, m)。

成熟粒细胞 (图 1k), 嗜中性粒细胞 (neutrophilic granulocyte, NG) 胞体圆形或卵圆形。胞质有近乎无色透明的细小颗粒, 细胞核椭圆形或者叶状或杆状, 约占整个细胞的 1/4, 偏于细胞一侧, 常与质膜相切。嗜酸性粒细胞 (eosinophilic granulocyte, EG) 胞质呈淡粉红色, 内含有红色的颗粒, 颗粒大小相等, 分布较均匀。常见细胞核形态为两个逗点呈八字排列, 中间有核丝相连, 八字开口多向细胞中央, 也有反方向的。染色质致密显紫红色。

与原粒细胞及幼粒细胞相比, 细胞明显变小。嗜碱性粒细胞 (basophilic granulocyte, BG) 圆形, 数量极少, 细胞质中充满蓝色的颗粒物质, 核不规则, 呈马蹄铁状或分叶状圆形或者卵圆形, 偏于细胞一侧, 染色质致密呈粗块状。

2.3.3 单核细胞系 原单核细胞 (monoblast, MB) (图 1n) 是齐口裂腹鱼白细胞中体积最大的一种, 多为近圆形或不规则形, 细胞表面不光滑, 胞质呈网状结构, 偶有少量空泡出现, 呈灰蓝色或淡蓝色。核近圆形或不规则圆形, 有时折叠状或扭转状, 占整个细胞的绝大部分, 染色质纤细, 分布不均匀, 呈网状, 染成紫红色。

幼单核细胞 (promonocyte, PM) (图 1o) 椭圆形或不规则圆形, 胞体较原单核细胞小。胞浆中分布的沙粒状颗粒物质增多, 染成蓝色。核形状不一, 多居中或偏于细胞一侧, 染色质开始聚集, 但仍较纤细, 形成疏松的紫红色网状结构。

单核细胞 (monocyte, M) (图 1p) 圆形或不规则形。胞质着色不均匀且着色较浅, 呈灰蓝色, 偶见大小不等的空泡, 胞浆散乱分布若干淡蓝色颗粒。胞核呈不规则, 有大肠状、马蹄状, 或折叠, 或扭转, 或分叶等, 位于细胞的一侧, 核质比大于 1/2。染色质疏松, 紫红色, 无核仁。

2.3.4 淋巴细胞系 原淋巴细胞 (lymphoblast, LB) (图 1q) 近圆形, 表面光滑。胞质仅一窄条环绕于核周围, 颜色呈天蓝色。核为不规则圆形, 居中或略偏一旁, 几乎占据整个细胞。染色质呈疏松粗粒状, 较原粒细胞和原单核细胞的染色质粗糙, 染成深紫红色。细胞为几种原始细胞中最小的一种。

幼淋巴细胞 (prolymphocyte, PL) (图 1b, m) 呈圆形或椭圆形, 或不规则圆形。胞质较原淋巴细胞稍增多, 偶有小凹陷, 但核仍占细胞的绝大部分, 显淡天蓝色, 偶有伪足出现。染色质粗糙紧密染成紫红色, 核仁模糊不清。

淋巴细胞 (lymphocyte, L) (图 1r, s) 圆

形或呈蚕豆状, 分为大淋巴细胞和小淋巴细胞, 两者经常可观察到胞突, 或呈丝状、指状。细胞质少, 有些仅见轮廓或几乎未见, 显深蓝色。核圆形或不规则形状, 致密成团状, 胞核占细胞的绝大部分。染色质凝集显暗紫红色。

2.3.5 其他细胞 巨噬细胞 (macrophagocyte, MP) (图 1t) 为圆形或不规则圆形, 胞体大。细胞质中有很多大小不等空泡。核较小, 呈圆形, 常偏于一侧。染色质染色浅, 呈淡蓝色。这类细胞在肝中有发现。

血栓细胞 (thrombocyte, TH) (图 1e, o), 体积小, 常为纺锤形、长椭圆形或泪滴状, 表面光滑。胞质极少, 显淡蓝色或无色不可见。核质比大。染色质致密, 染成紫红色。还发现与蝌蚪形血栓细胞类似的未知细胞 A (图 1r)。

浆细胞 (plasmocyte, P) (图 1s) 为长椭圆形。细胞核卵圆形, 位置多偏于一侧, 占细胞的大部分, 部分核可离开细胞, 裸露于细胞外, 处于细胞一极。细胞质较少, 深蓝色。

2.4 PAS 和 SBB 染色分布特点

PAS 和 SBB 染色的各组织印片中, 染色分布特点一致, 因此以头肾组织为例, 进行详细描述。

PAS 染色后, 粒细胞和单核细胞呈阳性, 其他细胞均呈阴性, 而粒细胞中原始细胞呈阴性, 早幼粒细胞阳性最弱, 中幼粒细胞阳性其次, 晚幼粒细胞及成熟粒细胞阳性最为强烈 (图 2a, b, e)。单核细胞中原单核细胞, 幼单核细胞, 成熟的单核细胞均呈阳性, 原单核细胞阳性最弱, 成熟单核细胞及幼单核细胞阳性较强 (图 2c, d)。

SBB 染色后, 粒细胞、单核细胞及淋巴细胞呈阳性, 其他细胞均呈阴性 (图 2f~g)。粒细胞中原粒细胞和中幼细胞粒细胞阳性较弱, 早幼粒细胞和晚幼粒细胞呈阳性, 成熟粒细胞阳性最为强烈; 单核细胞中原单核细胞、幼单核细胞及成熟单核细胞阳性较为强烈。小淋巴细胞呈阳性 (图 2f)。偶见核分裂的红细胞呈弱阳性 (图 2f)。

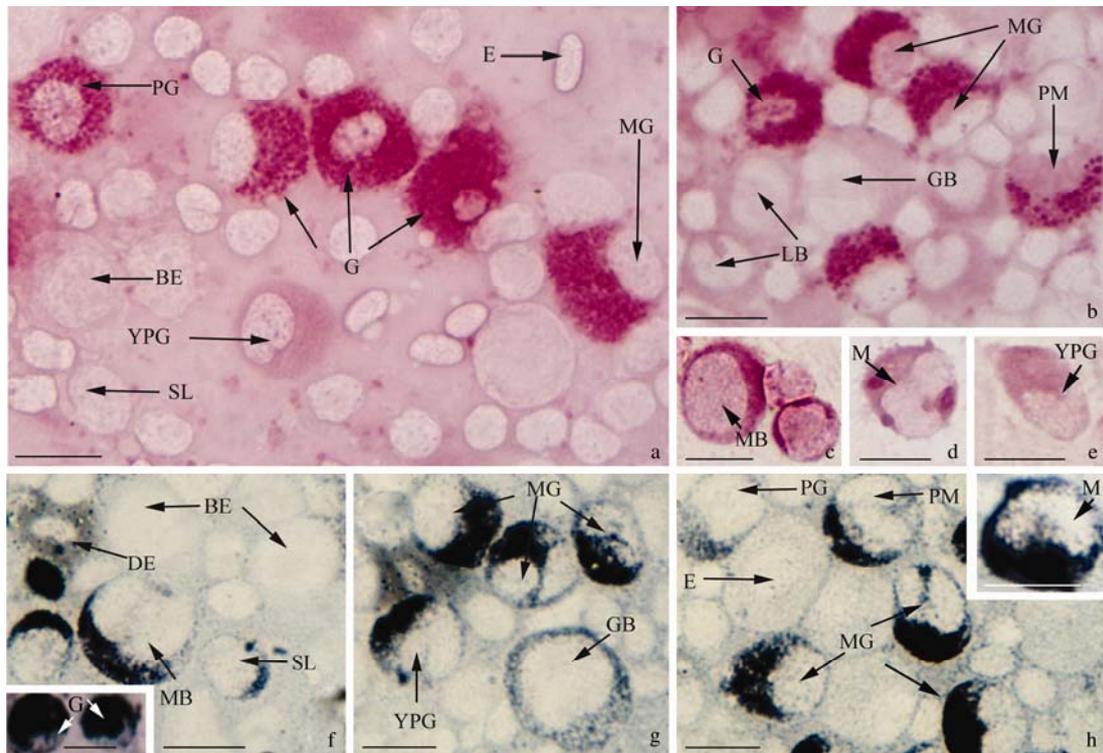


图 2 齐口裂腹鱼头肾印片 PAS 和 SBB 染色

Fig. 2 Blood cells in head kidney imprint as revealed by PAS and SBB staining in *Schizothorax prenanti*

a ~ e. PAS 染色; f ~ h. SBB 染色; 标尺 = 10 μm。 a - e. PAS staining; f - h. SBB staining; Bar = 10 μm.

BE. 早幼红细胞; DE. 分裂红细胞; E. 成熟红细胞; G. 成熟粒细胞; GB. 原粒细胞; LB. 原淋巴细胞; M. 单核细胞; MB. 原单核细胞; MG. 晚幼粒细胞; PG. 中幼粒细胞; PM. 幼单核细胞; SL. 小淋巴细胞; YPG. 早幼粒细胞。

BE. Basophilic erythrocyte; DE. Dividing erythrocyte; E. Erythrocyte; G. Granulocyte; GB. Granuloblast; LB. Lymphoblast; M. Monocyte; MB. Monoblast; MG. Metagranulocyte; PG. Progranulocyte; PM. Promonocyte; SL. Small lymphocyte; YPG. Young neutrophilic progranulocyte.

3 讨论

3.1 血细胞发生场所

对于鱼类血细胞发生场所的研究, 不同鱼类结果不一, 但多数鱼类血细胞发生的主要场所是由头肾、中肾(体肾)和脾共同组成的, 如长吻鲢 (*Leiocassis longirostris*) (金丽等 2007)、淡水石斑 (*Cichlasoma managuense*) (顾曙余等 2008)、美国红鱼 (*Sciaenops ocellatus*) (陈刚等 2006)、日本黄姑鱼 (*Nibea japonica*) (苑淑宾等 2011) 等。本研究发现齐口裂腹鱼红细胞、粒细胞和单核细胞发生的主要场所是头肾和中肾, 淋巴细胞主要是脾, 与上述研究

结果一致。对于肝是否存在造血功能则结论不一。本研究发现, 齐口裂腹鱼肝能够产生少量粒细胞和淋巴细胞, 具有弱的造血功能, 这与军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) (陈刚等 2005)、美国红鱼 (陈刚等 2006)、斜带石斑 (*Epinephelus coioides*) (周晖等 2006) 等的结果一致。有研究表明, 卵形鲳鲅 (*Trachinotus ovatus*) 肝中有单核细胞的发生 (张健东等 2007)。那么, 肝是否仅具有产生白细胞的作用? 在卵形鲳鲅 (张健东等 2007)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) (吴维宁 1990) 肝中发现了红细胞的发生, 并且发现肝的窦状隙为主要的造血部位。然而, 在长吻鲢 (金丽

等 2007)、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) (肖义军等 2001)、淡水石斑 (顾曙余等 2008)、日本黄姑鱼 (苑淑宾等 2011) 等的肝印片中均未观察到各类原始血细胞, 因此认为肝可能不是造血器官的说法也存在。究竟肝是否是造血器官, 可能需要通过更多技术追踪, 才能够得出确定结论。

3.2 血细胞发生过程

3.2.1 红细胞的发育 齐口裂腹鱼红细胞的成长过程, 先由原红细胞发育到幼红细胞, 此时胞体由大变小, 再由小变大 (图 3), 这与长吻鲮 (金丽等 2007)、军曹鱼 (陈刚等 2005)、日本黄姑鱼 (苑淑宾等 2011) 的过程相同, 与泥鳅 (肖义军等 2001)、团头鲂 (吴维宁 1990) 的发育过程相反。研究表明, 红细胞形状越趋于椭圆, 血红蛋白含量越高 (张玉蓉等 2013)。齐口裂腹鱼红细胞成熟过程中, 细胞形态从原红细胞的近圆形到幼红细胞的近椭圆形至最终成熟红细胞的椭圆形, 其血红蛋白含量不断增加, 血液载氧能力增强。胞浆由少变多, 颜色由蓝色到砖红色发育成为成熟红细胞 (图 3), 说明成熟红细胞的血红蛋白含量较高, 载氧能力明显较强 (Graham et al. 1985), 这可能与属于氧调节型鱼类, 能够在溶氧水平下降过程中仍保持相对稳定的耗氧率有关 (蔡露等 2013)。

齐口裂腹鱼的肝和脾印片上可以观察到晚幼红细胞, 其特点是胞核缩小, 染色质进一步凝集, 胞浆颜色呈灰色, 偶见正在进行直接分裂的红细胞。Ellis (1984)、Benfey 等 (1984) 认为这种现象是红细胞的一种衰老形式, 可能与实验鱼的大小、种类和生存环境有关。

3.2.2 粒细胞的发育 齐口裂腹鱼粒细胞的发育过程胞体由大到小 (图 3), 细胞核由圆形, 后逐渐变形缩为椭圆形、肾形、分叶型和杆型, 并且核质比也逐渐变小, 这与长吻鲮 (金丽等 2007)、军曹鱼 (陈刚等 2005)、日本黄姑鱼 (苑淑宾等 2011) 一致。齐口裂腹鱼早幼粒细胞胞质中最先出现嗜天青颗粒, 进一步出现 3 种特

殊颗粒, 即嗜酸性颗粒、嗜中性颗粒和嗜碱性颗粒, 这与日本黄姑鱼 (苑淑宾等 2011) 一致, 而长吻鲮 (金丽等 2007)、泥鳅 (肖义军等 2001) 中未见嗜碱性粒细胞, 军曹鱼 (陈刚等 2005) 未见嗜酸性粒细胞。由此可见, 不同鱼类粒细胞的发育存在差异。嗜中性粒细胞具有活跃的运动能力和吞噬功能, 嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞对刺激 (如疾病感染) 产生反应, 也具有吞噬作用 (Fijan 2002a)。齐口裂腹鱼粒细胞胞质由 1 种染色颗粒逐渐发育至 2 种或 3 种颗粒细胞, 也是其免疫功能不断发育完善的过程, 这与金丽等 (2007) 对长吻鲮粒细胞发生的研究结果一致。嗜碱性颗粒和嗜酸性颗粒在头肾组织中较多, 而在外周血中未见 (杨淞等 2011), 这可能与嗜碱性颗粒在制片过程中容易降解, 而嗜酸性粒细胞在外周血中停留时间短暂就进入组织有关 (陈刚等 2005, 金丽等 2007)。通过 PAS 和 SBB 染色发现, 粒细胞除原始细胞外, 其他阶段均呈 PAS 阳性反应, 所有阶段均呈 SBB 阳性反应, 且均在成熟的粒细胞中阳性反应强烈, 这与 Fijan (2002a) 对斑点叉尾鲌 (*Ictalurus punctatus*) 和金丽等 (2007) 对长吻鲮血细胞 PAS 和 SBB 染色的研究结果一致, 说明随着细胞的发育成熟, 其糖原物质和脂类物质不断积累, 从而为血细胞的吞噬作用提供更多的能量物质。

3.2.3 单核细胞的发育 齐口裂腹鱼的单核细胞由原始发育至成熟过程中, 胞体和胞核变化一致, 均是由大变小再变大, 胞质颜色则由深蓝色变浅至天蓝色, 而染色质是由细疏松网状到粗疏松网状, 这与军曹鱼 (陈刚等 2005)、长吻鲮 (金丽等 2007)、日本黄姑鱼 (苑淑宾等 2011) 中单核细胞的发育描述一致, 并且上述结果均认为单核细胞可能进一步发育成为巨噬细胞 (图 3)。本实验发现齐口裂腹鱼的巨噬细胞存在于肝中, 而不是脾, 这可能与肝除了造血功能还具有消化及解毒功能相关 (苑淑宾等 2011)。至于单核细胞的转化过程, 则需进一步研究。

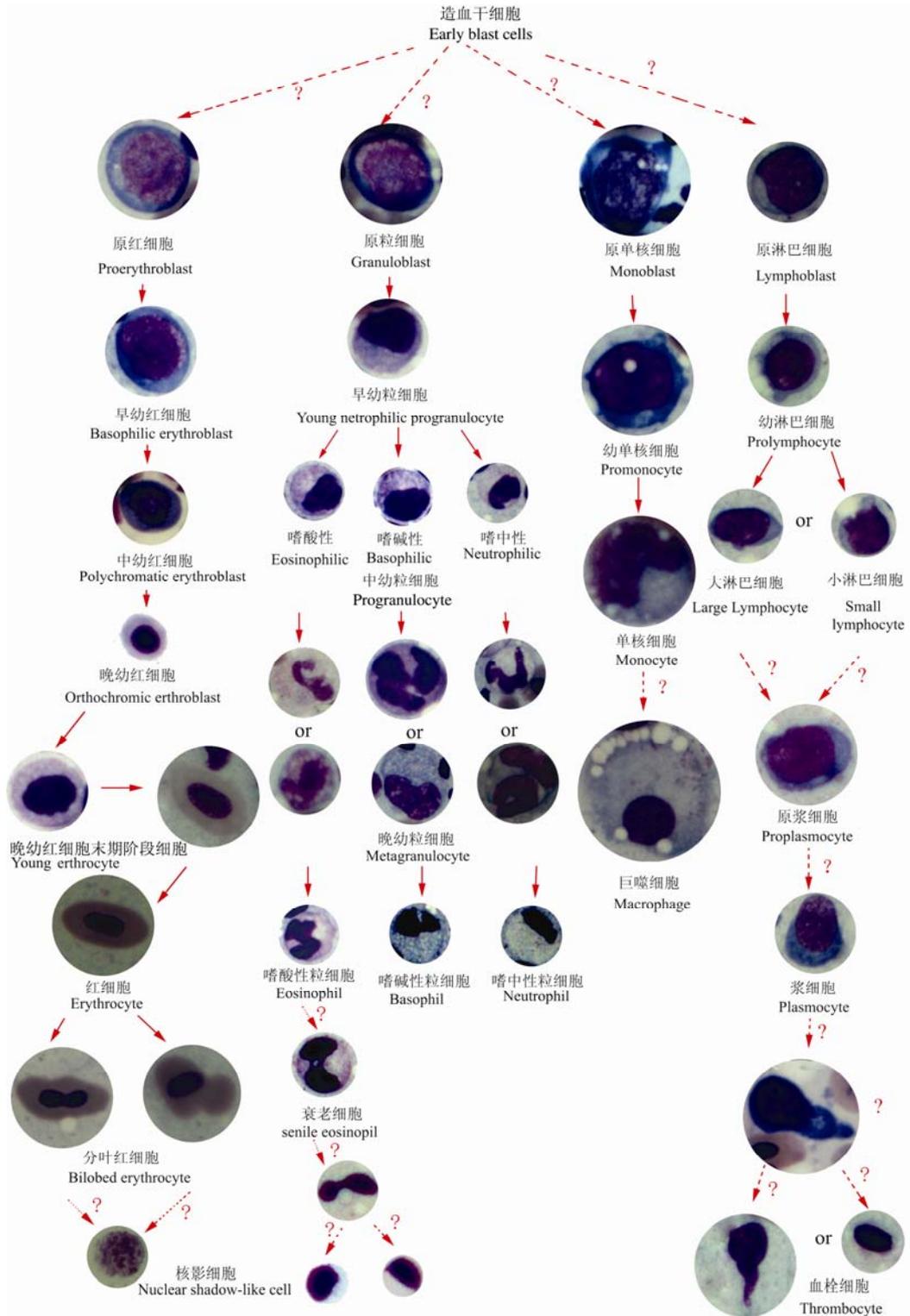


图 3 齐口裂腹鱼血细胞发育过程

Fig. 3 The development of blood cells lineages in *Schizothorax prenanti*

“？”代表发育过程未知。“？” shows that the process is unknown.

3.2.4 淋巴细胞的发育 齐口裂腹鱼淋巴细胞的发育经历了原淋巴细胞、幼淋巴细胞和大小淋巴细胞 3 个阶段(图 3), 且在中肾中非常丰富, 比例高达 44.45%, 这与鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 头肾中 39.00% (Kondera 2011)、长吻鲢 42.00% (金丽等 2007)、日本黄姑鱼 40.44% (苑淑宾等 2011) 类似, 与军曹鱼 28.24% (陈刚等 2005)、泥鳅 7.61% (肖义军等 2001) 存在较大差异。在淋巴细胞发生过程中, 许多学者认为浆细胞是由淋巴细胞发育而来, 也常将淋巴细胞和浆细胞的发生系统称为“Lymphoplasmopoietic series”(淋巴浆细胞发生系) (Fijan 2002a, Abdel-Aziz et al. 2010, Kondera 2011)。在本研究的齐口裂腹鱼头肾中也发现了类似的原浆细胞和浆细胞, 至于淋巴细胞是否能够转化成浆细胞, 有待进一步证实。

3.2.5 其他细胞 血栓细胞常聚集于脾中, 其数量明显多于其他组织中, 在长吻鲢 (金丽等 2007)、日本黄姑鱼 (苑淑宾等 2011) 等的血涂片中存在血栓细胞, 其他组织中均未发现血栓细胞的发生, 推测其可能是由其他细胞转化而来。

本实验发现, 不同组织中均存在血栓细胞, 其形态及染色特性与浆细胞类似, 且在头肾组织印片中发现细胞 A, 其形态和染色特征介于浆细胞与血栓细胞之间, 并且与罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 头肾组织中描述的原始血栓细胞类似 (Abdel-Aziz et al. 2010)。由于血栓细胞发育的相关资料的匮乏, 其具体发育过程仍不明了。

参 考 文 献

- Abdel-Aziz E S H, Abdu S B S, Ali T E S, et al. 2010. Haemopoiesis in the head kidney of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae): a morphological (optical and ultrastructural) study. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(3): 323–336.
- Benfey T J, Sutterlin A M. 1984. Binucleated red blood cells in the peripheral blood of an Atlantic salmon, *Salmo salar* L., alevin. *Journal of Fish Diseases*, 7(5): 415–420.
- Blaxhall P C, Daisley K W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5(6): 771–781.
- Campbell T, Murru F. 1990. An introduction to fish hematology. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 12(4): 525–532.
- Catton W T. 1951. Blood cell formation in certain teleost fishes. *Blood*, 6(1): 39–60.
- Claver J A, Quaglia A I E. 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(2): 87–97.
- Ellis A E. 1984. Bizzare forms of erythrocytes in a specimen of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Diseases*, 7(5): 411–414.
- Fijan N. 2002a. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 60(4): 999–1014.
- Fijan N. 2002b. Composition of main haematopoietic compartments in normal and bled channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 60(5): 1142–1154.
- Froese R, Pauly D. 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version. [EB/OL]. [2014-08-20]. <http://www.fishbase.org/>.
- Graham M S, Haedrich R L, Fletcher G L. 1985. Hematology of three deep-sea fishes: a reflection of low metabolic rates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 80(1): 79–84.
- Homechaudhuri S, Jha A. 2001. A technique to evaluate the erythropoietic efficiency in fish. *Asian Fisheries Science*, 14(4): 453–455.
- Kondera E. 2011. Haematopoiesis in the head kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.): a morphological study. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(3): 355–362.
- Liang J J, Liu Y, Zhang X F, et al. 2011. An observation of the loss of genetic variability in pregnant's schizothoracin, (*Schizothorax prenanti*), inhabiting a plateau lake. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(4/6): 361–370.
- Tavares-Dias M. 2006. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 68(6): 1822–1833.
- Wang Z F, Yonezawa T, Liu B, et al. 2011. Domestication relaxed selective constraints on the yak mitochondrial genome. *Molecular Biology and Evolution*, 28(5): 1553–1556.
- 蔡露, 房敏, 林少明, 等. 2013. 溶氧对齐口裂腹鱼幼鱼呼吸代谢的影响. *三峡大学学报: 自然科学版*, 35(1): 81–84.
- 陈刚, 周晖, 张健东, 等. 2005. 军曹鱼血液指标及血细胞发生的观察. *水生生物学报*, 29(5): 564–570.
- 陈刚, 周晖, 叶富良, 等. 2006. 美国红鱼血细胞观察. *热带海洋学报*, 25(2): 59–65.
- 陈礼强, 朱成科, 唐江芳, 等. 2007. 齐口裂腹鱼稚鱼小瓜虫的防治. *科学养鱼*, (4): 58.
- 董艳珍, 邓思红. 2011. 齐口裂腹鱼的人工繁殖与苗种培育. *水产科学*, 30(10): 638–640.
- 耿毅, 汪开毓, 吴麟, 等. 2004. 齐口裂腹鱼败血症的病原分离与鉴定. *水利渔业*, 24(4): 71–73.
- 顾曙余, 杜寅. 2008. 淡水石斑鱼血细胞发生的观察. *水产科学*, 27(4): 179–183.
- 金丽, 张耀光. 2007. 长吻鲢血细胞发生的研究. *水生生物学报*, 31(6): 807–816.
- 吴维宁. 1990. 团头鲂血细胞发生的研究. *水产学报*, 14(4):

- 328–335.
- 肖义军, 金雅平, 郑翠芳, 等. 2001. 泥鳅头肾、脾和肝中血细胞发生的观察. 福建师范大学学报: 自然科学版, 17(3): 65–69.
- 杨淞, 杨世勇, 肖拉, 等. 2011. 养殖齐口裂腹鱼外周血细胞显微观察. 四川动物, 30(2): 202–206.
- 苑淑宾, 朱爱意, 江丽华, 等. 2011. 日本黄姑鱼血细胞发生的观察. 水产学报, 35(9): 1374–1383.
- 张健东, 周晖, 陈刚, 等. 2007. 卵形鲳鲹血细胞发生的观察. 水生生物学报, 31(6): 780–787.
- 张玉蓉, 黄庆达, 刘书婷, 等. 2013. 不同大小草鱼血液学指标研究. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 30(1): 38–41.
- 周晖, 陈刚, 张健东, 等. 2006. 斜带石斑血细胞发生的观察. 湛江海洋大学学报, 26(4): 3–7.

云南老君山发现福建华珊瑚蛇

Kellogg's Coral Snake (*Sinomicrurus kelloggi*) Found in Laojunshan, Yunnan, China

2014年4月20日, 在云南省麻栗坡县老君山的季风常绿阔叶林 (22°57'0.97"N, 104°36'17.27"E, 海拔1 218 m) 采集到蛇类标本1号, 经鉴定为福建华珊瑚蛇 (*Sinomicrurus kelloggi*, 图1)。该物种国内已知分布于安徽、浙江、福建、江西、湖南、海南、广东、广西、贵州和重庆, 国外分布于越南和老挝。本次发现为云南省首次发现。标本现保存在国家林业局昆明勘察设计院标本室。

标本全长617 mm, 尾长72 mm, 头长10.85 mm, 头宽10.79 mm, 头高6.13 mm。吻端钝圆, 头小, 与颈区分不明显。身体圆柱形, 圆滑而细长。无颊鳞; 眶前鳞1, 眶后鳞2; 颞鳞1 + 2/3; 左侧颊鳞第二列3枚鳞片两两相切呈倒“品”字形排布; 上唇鳞7 (2-2-3); 下唇鳞7 (4), 第一对在颞鳞与前颌片之间, 彼此相切, 前4枚与颌片相切; 颌片2对, 左右对称排列; 背鳞平滑, 通身15行; 腹鳞191, 第42枚腹鳞只有其他腹鳞一半; 肛鳞二分; 尾下鳞双行, 33对。头背黑色, 有两道横纹, 前端黄白色横纹道细, 横跨两眼, 背视沿前额鳞前缘至侧视沿鼻鳞与眶前鳞之间至第3枚上唇鳞前缘, 之后沿上唇缘第3、4、5枚上唇鳞; 后端白色横纹道较粗, 呈倒V形, 交叉起点在额顶鳞后端, 之后沿顶鳞、颞鳞向两侧分布至与下颌鳞白色区相接; 体背棕红色, 具有一个鳞片宽黑色横纹, 在体背有21条, 前3条与腹部黑色条斑连接成环, 其中, 第20条分布在体左侧长度只占体背一半, 尾背有4条。腹面颜色从身体前段橙黄色至后段橙红色, 具有形状及大小不同的黑色横条斑或块斑, 体腹面39个, 尾腹7个。



图1 福建华珊瑚蛇 (标本号: MLP1404033R)

a. 侧面; b. 背面 a. Lateral view; b. Dorsal view

孙国政 罗伟雄 王继山*

国家林业局昆明勘察设计院 昆明 650216

基金项目 麻栗坡老君山自然保护区综合科学考察项目;

* 通讯作者, E-mail: wangjishan@live.cn;

第一作者介绍 孙国政, 男, 博士; 研究方向: 野生动物研究与保护; E-mail: sunguo Zheng_2003@163.com.

收稿日期: 2014-09-29, 修回日期: 2015-01-09 DOI: 10.13859/j.cjz.201502022