

斜带石斑鱼黏膜免疫系统结构的研究

罗晓春 李安兴 谢明权

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要: 对斜带石斑鱼皮肤、眼角膜、鳃、前肠及后肠等黏膜相关免疫组织结构进行了研究。通过组织切片的 H-E 染色及透射电镜的观察, 描述了黏膜组织的显微结构、主要免疫相关细胞在黏膜组织中的分布情况及各免疫细胞的超微结构。结果表明黏膜组织中存在杯状细胞、淋巴细胞、巨嗜细胞、单核细胞、嗜曙红细胞、嗜中性粒细胞等免疫相关细胞, 具有在黏膜局部独立完成免疫应答的细胞基础。另外, 还观察到了皮肤表皮对异物的吞噬过程。本文还就黏膜免疫组织的非特异和特异性免疫应答, 以及黏膜免疫是否独立于系统免疫等问题进行了讨论。

关键词: 斜带石斑鱼; 黏膜免疫组织; 显微结构; 亚显微结构

中图分类号: S965.334 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2005)02-0193-06

在哺乳动物中, 黏膜免疫的研究倍受重视, 并成为了近年来免疫学研究最活跃的领域之一^[1, 2]。在鱼类免疫学中, 系统免疫研究已取得很大的进展^[3-6], 然而黏膜免疫的研究则未引起足够的重视。近年来的研究表明鱼类的黏膜组织不仅是抵挡病原入侵的第一道屏障, 其局部的免疫应答对机体也有重要的保护作用^[7, 8]。本文将以斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 为材料, 对其主要黏膜组织, 包括皮肤、眼角膜、鳃、前肠、后肠的显微、亚显微结构进行观察, 描述各种免疫细胞在黏膜组织中的分布, 并对黏膜免疫组织的非特异性和特异性免疫应答, 以及黏膜免疫系统是否独立于系统免疫等问题进行讨论。

1 材料和方法

5月龄斜带石斑鱼, 取自大亚湾水产试验中心, 体重约 20—30g。取鱼体的黏膜组织, 包括背部皮肤、眼角膜、第二鳃弓、前肠(前三分之一部分)和后肠(后三分之一部分)各两份, 分别固定于 10% 中性甲醛及 2.5% 戊二醛, 4℃过夜, 制备切片样品后, 用于光镜观察及电镜观察。光镜观察的样品经石蜡包埋, 切片厚 5μm, 苏木精-曙红(H-E)染色。电镜样品经 1% 锇酸后固定 1h、梯度乙醇脱水、Epon-812 包

埋、切片、常规透射电镜切片染色后, 在日立 H-7000 型电镜下观察。

2 结果

2.1 皮肤及眼角膜

斜带石斑鱼的皮肤由表皮和真皮两层组成(图版 iv: 1)。图中可见表皮层主要由 5—7 层上皮细胞组成, 其间靠皮肤外侧分布有杯状细胞(即黏液细胞), 而在表皮底层中可观察到淋巴细胞; 真皮层主要由多层胶原纤维和弹性纤维紧密排列而成。在表皮和真皮层间, 也游离有些许红细胞、淋巴细胞及其他白细胞。

在皮肤切片中, 还观察到一组图片, 显示皮肤表皮吞噬异物的过程: 首先在杯状细胞周围的上皮细胞层开始内陷, 包裹外来异物(图版 iv: 2); 接着内陷腔扩大, 同时内陷腔口逐渐愈合(图版 iv: 3); 随着内陷腔的进一步扩大, 异物被完全吞噬在上皮细胞形成的腔内, 异物逐渐被消化, 并被周围的上皮细胞吸收(图 4); 上皮细胞逐渐往腔内拉伸, 腔体逐步消失, 最后形成梨形的实体(图 5)。在表皮吞噬腔下, 经常可见有淋巴细胞分布(图版 iv: 2—5)。

斜带石斑鱼的眼角膜结构与皮肤类似, 也是由表皮和真皮组成。其表皮较皮肤表皮薄, 由 2—4 层

收稿日期: 2003-12-18; 修订日期: 2004-11-18

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目(编号: 20023002); 广东省自然科学基金面上项目(编号: 031640)资助。本研究实验得到广东省海洋水产局大亚湾水产实验中心的大力协助, 特此致谢

作者简介: 罗晓春(1977—), 男, 福建省上杭县人; 博士研究生; 主要从事鱼类病害研究工作, E-mail: lxchsy@163.net

通讯作者: 李安兴副教授, 广州市新港西路 135#, Tel: 020-84115113, E-mail: ls58@zsu.edu.cn

上皮细胞构成, 其间未见有黏液细胞(图版 iv: 6)。

2.2 鳃

斜带石斑鱼鳃的鳃小片往外分化为细小的鳃丝, 在鳃丝的基部及鳃小片的基部有上皮细胞包围形成的血窦腔(图版 iv: 7), 在血窦腔中聚集有各种白细胞, 包括淋巴细胞、单核细胞、巨嗜细胞、嗜曙红细胞及中性粒细胞等, 白细胞的比例明显较外周血高(图版 iv: 8)。

2.3 前肠及后肠

斜带石斑鱼的肠道由内往外可分为3层: 黏膜层、肌黏膜层和浆膜层, 其中黏膜层又可分为两层: 肠上皮层和肠固有层(图版 iv: 9, 10)。肠道黏膜层往肠腔突出, 形成肠道皱褶, 增加肠道黏膜的表面积。肠上皮层中主要有柱状上皮细胞、杯状细胞, 也有少量淋巴细胞。肠固有层则由一些连接细胞及毛细血管网构成, 其间含有较多的淋巴细胞、单核细胞、巨嗜细胞、粒细胞等白细胞。前肠和后肠在整体结构上无明显差别, 但是其间分布的白细胞特别是淋巴细胞数量明显较后肠少。

2.4 免疫相关细胞的亚显微结构

杯状细胞(图版 ㉔ 11): 即黏液细胞, 大小约 $(6-10) \times (15-25) \mu\text{m}$, 细胞核质比很小, 细胞核位于整个细胞的边缘, 胞质则被黏液颗粒所充满, 胞质方向朝体表或肠腔。

淋巴细胞(图版 ㉔ 12): 近似圆形, 大小约 $3-4 \mu\text{m}$, 细胞核质比大, 胞质较少, 胞质中少见细胞器。淋巴细胞主要分布于鳃的血窦腔、后肠的固有层、皮肤的表皮底层及表皮与真皮之间。

单核细胞(图版 ㉔ 13): 多为圆形, 大小约 $5-6 \mu\text{m}$, 胞核形状多不规则, 胞质中有许多吞噬小泡。

巨嗜细胞(图版 ㉔ 14): 外形不规则, 常有伪足, 大小约 $7-9 \mu\text{m}$, 胞核形态不规则, 核质比较小, 胞质中有溶酶体泡和吞噬泡, 并且有丰富的线粒体。

嗜曙红细胞(图版 ㉔ 15): 外形不规则, 大小约 $3-5 \mu\text{m}$, 核周围的胞质中有丰富的着色均匀的嗜酸性颗粒。

嗜中性粒细胞(图版 ㉔ 16): 呈圆形或椭圆形, 大小约 $3-5 \mu\text{m}$, 核多有分页, 胞质中有着色较深的颗粒, 另外还有吞噬泡及线粒体。

2.5 免疫细胞在各黏膜免疫组织中的分布情况

各免疫相关细胞分布在黏膜免疫组织中的相对数量情况可见表1, 其中杯状细胞在皮肤、鳃及肠道上皮层中都观察到, 并且数量较多; 淋巴细胞在鳃的血窦腔及后肠黏膜层中较多, 在皮肤表皮底层及表皮与真皮之间可见少量淋巴细胞; 单核细胞、巨嗜细胞、嗜曙红细胞及嗜中性粒细胞的分布情况类似于淋巴细胞; 眼角膜上未见有免疫细胞存在。

表1 免疫相关细胞分布在各免疫组织中的相对数量

Tab.1 The relative quantity of immune cells distributing in different mucosal associated immune tissues

	杯状细胞	淋巴细胞	单核细胞	巨嗜细胞	嗜曙红细胞	嗜中性粒细胞
	Goblet cells	Lymphocytes	Monoocytes	Macrophages	Eosinophils	Neutrophils
皮肤 Skin	+++	+	+	+	+	+
眼角膜 Eye's corn	-	-	-	-	-	-
鳃 Gill	++	+++	++	++	+++	++
前肠 Foregut	++++	+	++	++	++	++
后肠 Hindgut	++++	++++	+++	+++	++++	++

注: 表中“-”表示未观察到此细胞, “+”的个数表示该细胞的相对数量多少。
Note: ‘-’ means these cells haven’t been observed. The number of ‘+’ means the relative quantity of these cells.

3 讨论

鱼类的黏膜免疫组织主要包括皮肤、鳃及肠道, 近年来, 鱼类黏膜免疫系统对疾病抵抗的重要性逐渐为人们所认识, 加之目前对口服疫苗及浸泡疫苗研究的需要, 黏膜免疫系统研究逐渐得到了越来越多学者的关注^[9]。

鱼类黏膜免疫组织结构的研究较详细的是虹鳟鱼和鲑鱼的黏膜组织。Fast 研究了虹鳟鱼和鲑鱼皮

肤的结构, 并发现皮肤黏液具有蛋白酶、碱性磷酸酶及溶菌酶的活性^[10]; Lin 对鲑鱼鳃的组织结构进行研究, 发现鲑鱼鳃上有多种具免疫功能的吞噬细胞及淋巴细胞^[9]; 鱼类肠道没有类似哺乳动物的 Peyer’s patch 的淋巴集结, Mcmillan 发现虹鳟鱼肠道中的白细胞主要分布在肠道皱褶的固有层中^[11], 进一步的研究还表明肠道对抗原的摄取主要部位是后肠, 抗体分泌细胞也主要分布在后肠固有层中^[12, 13]。

本研究的结果表明石斑鱼的皮肤、鳃及肠道中都有丰富的杯状细胞。鱼类杯状细胞分泌的黏液对抵御病原入侵有重要的作用, 其中具有一些酶的活性^[10] 以及一些广谱性的抗菌、真菌成分^[14], 并且黏液中蛋白酶的活性在病原体感染后有显著增强^[15]。另外, 在石斑鱼的鳃及后肠中观察到了丰富的单核细胞、巨嗜细胞及粒细胞等吞噬细胞, 并且在鳃血窦腔中的白细胞比例明显高于外周血(图版 iv: 8), 这些吞噬细胞能吞噬病原体, 并通过呼吸爆发过程, 产生超氧离子等活性物质杀灭病原体, 是鱼类非特异性免疫的重要机制^[7]。白细胞在鳃和后肠的聚集与引起白细胞迁移的化学因子有关, Lin 通过对白细胞迁移率的研究表明, 鳃上的白细胞对鳃化学吸引因子(Chemoattractants)敏感性低于头肾白细胞^[16], 这种现象类似于肠道白细胞的迁移^[17], 提示着白细胞容易迁移到黏膜组织, 而不易迁出。

另外, 在石斑鱼鳃、皮肤及后肠中都有相当数量的淋巴细胞, 暗示着黏膜免疫组织存在局部的特异性免疫应答。笔者也用抗石斑鱼血清免疫球蛋白重链的单抗, 通过免疫组化的方法, 证实石斑鱼鳃的血窦腔及后肠肠道皱褶的固有层中有抗体分泌细胞的存在(待发表), 这一现象与草鱼、大菱鲆、黑鲈等鱼的抗体分泌细胞分布类似^[12, 18, 19]。然而目前对黏膜组织的特异性免疫应答中的抗原提呈过程还不是很清楚。笔者在石斑鱼中观察到了皮肤对异物的吞噬, 并且还在吞噬腔下的表皮底层观察到了淋巴细胞; 在石斑鱼鳃的血窦腔及肠道的固有层中也都有丰富的吞噬细胞及淋巴细胞。一些学者在研究黏膜免疫组织对颗粒抗原的摄取时也发现, 皮肤主要是通过上皮细胞对抗原进行吞噬, 而鳃及后肠则主要由巨嗜细胞、单核细胞及粒细胞等吞噬细胞摄取抗原^[20, 21], 但是这些吞噬细胞如何将抗原提呈给淋巴细胞则还有待于进一步的研究。近年来研究还发现, 在鳃及后肠等黏膜组织中都有 MHC II 分子的表达, 并对抗原提呈有重要作用, 随着这些研究的进一步深入, 黏膜免疫系统特异性免疫应答的机制将得到更全面的阐释。

通过对石斑鱼黏膜组织结构的研究, 笔者认为皮肤、鳃及后肠是石斑鱼的主要黏膜免疫组织, 其中分布有单核细胞、巨嗜细胞、粒细胞、淋巴细胞等免疫细胞, 具有可以不依赖系统免疫而独立完成免疫应答的细胞基础。目前, 已经有越来越多的证据表明, 鱼类的黏膜免疫系统类似于哺乳动物的黏膜免疫系统, 是独立于系统免疫的。如浸泡免疫引起的

系统免疫应答有时很弱甚至检测不到, 而在黏膜局部可检测到较强的免疫应答; 经肠道贯注可溶性抗原后, 肠道黏膜的抗体水平出现高峰的时间早于血清; 离体培养的皮肤还具有分泌特异性抗体的能力, 说明体表黏液中的抗体至少部分是由皮肤上的抗体分泌细胞产生的, 并不一定依靠系统免疫; 在比较免疫学上也有证据表明黏膜免疫系统在进化上出现的时间早于系统免疫。这些现象都表明鱼类的黏膜免疫系统是独立于系统免疫的, 对其进一步深入的研究将对鱼类病害的防治及口服、浸泡疫苗的研制都有重要的意义。

参考文献:

- [1] Li G P, Yang T. Reviews on mucosal immune system [J]. *J Cell Mol Immunol* 2001, **17** (6): 594—597 [李国平, 杨恬. 黏膜免疫系统的研究进展. 细胞及分子免疫学杂志, 2001, **17** (6): 594—597]
- [2] Vancikova Z. Mucosal immunity—basic principles, ontogeny, cystic fibrosis and mucosal vaccination [J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disor*, 2002, **2** (1): 83—95
- [3] Li A H, Wu Y S, Cai T Z, et al. Development and immune efficacy of a bivalent anti-aeromonas hydrophila and anti-vibrio fluvialis vaccine in carassius auratus linnaeus [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26** (1): 52—26 [李爱华, 吴玉深, 蔡桃珍等. 嗜水气单胞菌和河弧菌二联疫苗对鲫的免疫效果. 水生生物学报, 2002, **26** (1): 52—26]
- [4] Luo X C, Li Z Q, Wang J H, et al. The humoral immune responses of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and the antibody producing cells [J]. *J Huazhong Agr U*, 2000, **19** (6): 581—584 [罗晓春, 李正秋, 王金虎, 等. 草鱼的体液免疫应答及抗体产生细胞. 华中农业大学学报, 2000, **19** (6): 581—584]
- [5] Luo X C, Li Z Q, Wang J H, et al. Separation and identification of different lymphocyte populations from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *J Huazhong Agr U*, 2001, **20** (1): 63—66 [罗晓春, 李正秋, 王金虎, 等. 草鱼不同类群淋巴细胞的分离及鉴定. 华中农业大学学报, 2001, **20** (1): 63—66]
- [6] Wu R Q, Li J, Zhang P J, et al. The lymphocytes transplant test and cell-mediated immune of *paralichthys olivaceus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27** (2): 127—131 [乌日琴, 李军, 张培军等. 牙鲈淋巴细胞转化和细胞免疫. 水生生物学报, 2003, **27** (2): 127—131]
- [7] Clerton P, Trouaud D, Deschaux P. The chemiluminescence response of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, **8**: 73—76
- [8] Press C. M, Evensen O. The morphology of the immune system in teleost fishes [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, **9**: 309—318
- [9] Lin S H, Dav Idson G A, Secombes, et al. A morphological study of cells isolated from the perfused gill of dab and Atlantic salmon [J]. *J Fish Biol*, 1998, **53**: 560—568
- [10] Fast M D, Sims D E, Burka, J F, et al. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow

- trout, coho and Atlantic salmon [J]. *Comp Biochem Phys A*, 2002, **132**: 645—657
- [11] McMillan D N, Secombes C J. Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1997, **7**: 527—541
- [12] 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
- [13] Strand H K, Dalmo R A. Absorption of immunomodulating, (1,3)-glucan in yolk sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.) [J]. *J Fish Dis*, 1997, **20**: 41—49
- [14] Hellio C, Pons A M, Beaupol C, *et al.* Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus [J]. *Int J Antimicrob Ag*, 2002, **20**: 214—219
- [15] Ross N W, Firth K J, Wang A P, *et al.* Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation [J]. *Dis Aquat Organ*, 2000, **41**(1): 43—51
- [16] Lin S H, Ellis A E, Davidson G A, *et al.* Migratory, respiratory burst and mitogenic responses of leucocytes isolated from the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, **9**: 211—226
- [17] Davidson G A, Ellis A E, Secombes C J. Cellular responses of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. *J Fish Dis*, 1991, **14**: 651—659
- [18] 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
- [19] Rombout J H W M, Taverne-Thiele A J, Villera M I. The gut associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1993, **17**: 55—66
- [20] Moore J. D, Ototake M, Nakanishi T. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, **8**: 393—407
- [21] Joosten P. H. M., Tiemersma A E., Threels, A., *et al.* Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1997, **7**: 471—485

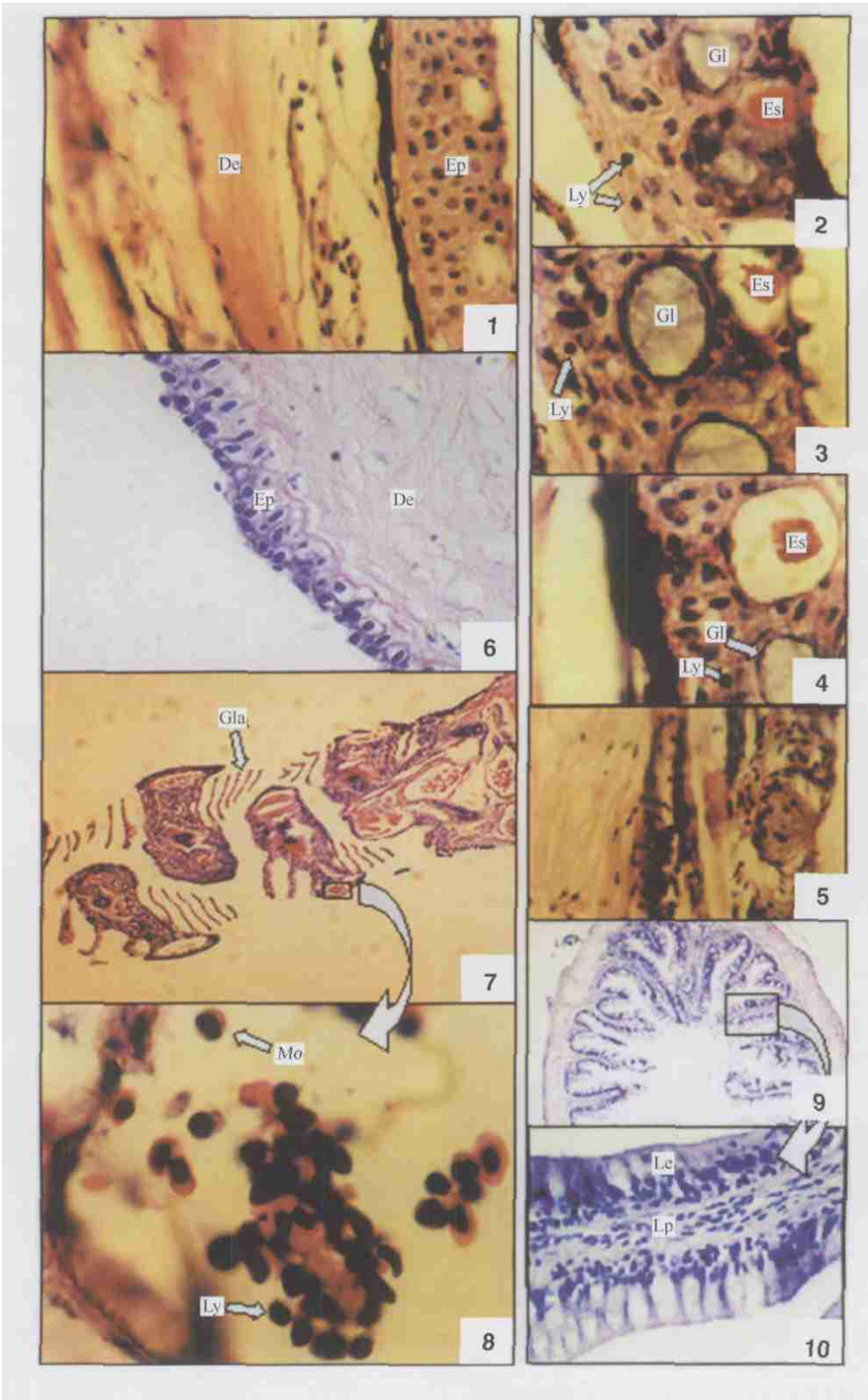
STUDIES ON THE MORPHOLOGY OF GROUPER (*EPINEPHELUS COIODES*) MUCOSAL IMMUNE SYSTEM

LUO Xiao-Chun, LI An-Xing and XIE Ming-Quan

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)

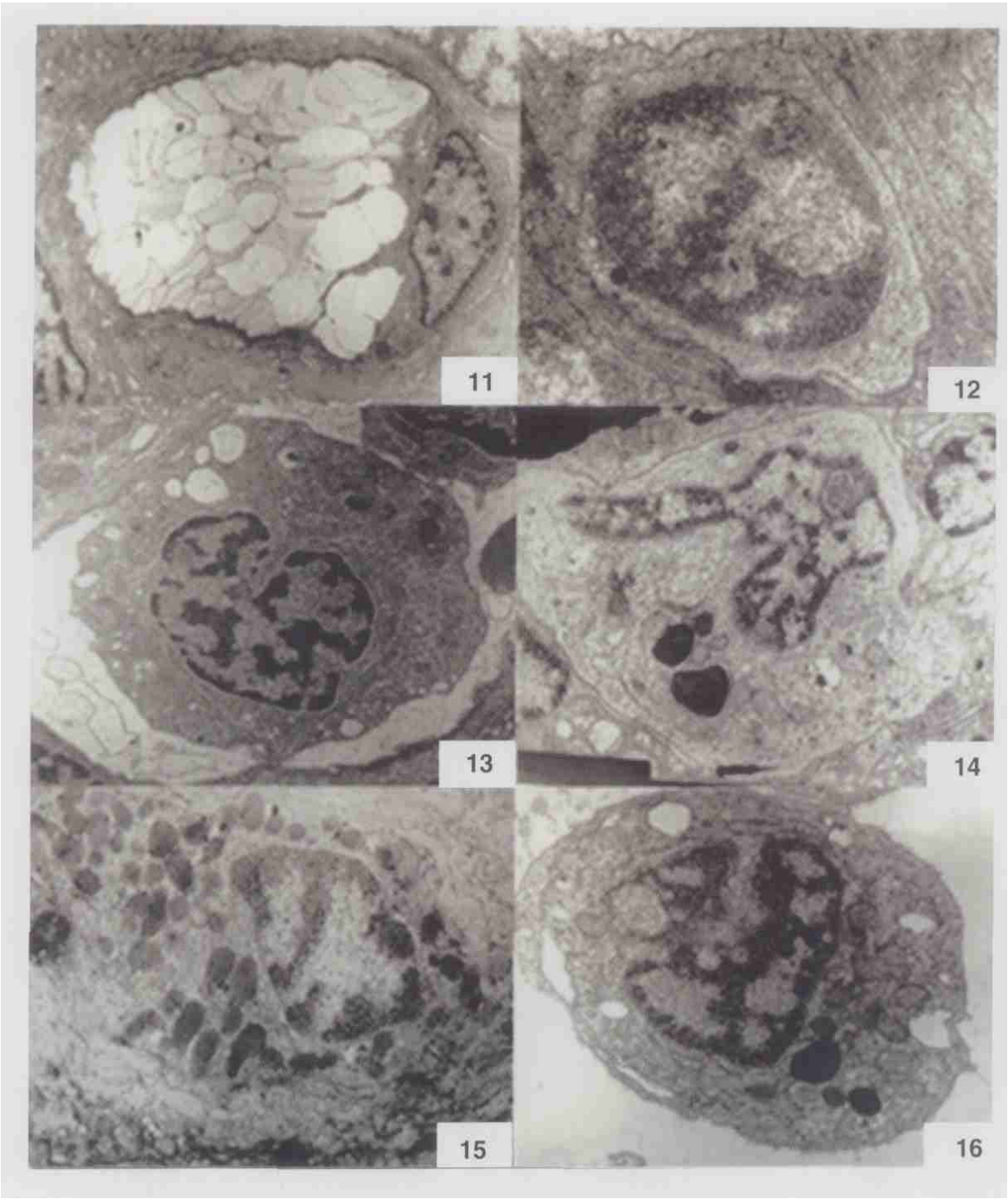
Abstract: Recent studies have shown fish mucosal immune system plays an important role in disease defense. In the present study, we examined the morphology of groupers (*Epinephelus coioides*) mucosa-associated immune tissues including skin, eye's corn, gill, foregut and hindgut. The microstructures of these tissues were observed on the tissue sections using H-E staining, and the ultrastructures of immune cells were described using transmission electron microscopic technology. The results show several kinds of immune cells existing in mucosa-associated tissues including goblet cells, lymphocytes, macrophages, monocytes, eosinophils and neutrophils. There are many Goblet cells in skin epidermis, gill epithelial layer and lamina epithelialis, where they secrete mucus to construct the first body defense line to pathogens intrusion. Lymphocytes are abundant in lamina propria of hindgut and gill sinusoids, and also observed in foregut lamina propria, basal layer of skin epidermis and between epidermis and dermis of skin. Lymphocyte's distribution in mucosal tissues indicates mucus antibody may be mainly secreted by local ASCs (Antibody secreting cells). Phage cells and granules distribute similarly as lymphocytes and function as non-specific immune cells and antigen presenting cells in local mucosal sites. Immune cells haven't been observed in grouper eye's corn. Density of immune cells in the gill sinusoids is significant higher than in peripheral blood. A series of interesting figures showing skin epithelia enveloping a substance has been described and speculated to a process of epithelia engulfing an exogenic substance. Antigen uptake and presentation of mucosa-associated immune tissue has been discussed. Immune cells distributed in mucosal tissues supply cell foundation for mucosal immune system to finish immune response independent of the systematic immune system. The non-specific and specific immune response of mucosal immune system, and whether the mucosal immune system is independent from the systematic immune system have also been discussed in this paper.

Key words: *Epinephelus coioides*; Mucosa-associated immune tissues; Microstructure; Ultrastructure



图版 iv

1. 皮肤, × 200; 2—5. 表皮对异物的吞噬, × 400; 6. 眼角膜, × 200; 7. 鳃丝, × 60; 8. 鳃丝血窦腔, × 100; 9. 肠道, × 60; 10. 肠道皱褶, × 200
1. Skin, × 200; 2—5. Epidermis engulfing an exogenic substance, × 400; 6. Eye's corn, × 200; 7. Gill filament, × 60; 8. Gill filament sinusoid, × 400;
9. Gut, × 60; 10. Gut folds, × 200;
De: dermis 真皮 Ep: epidermis 表皮 Gl: goblet cell 杯状细胞 Ly: lymphocyte 淋巴细胞 Es: exogenic substance 外源物质 Gla: gill lamellae 鳃小片 Mo: monocyte 单核细胞 Le: lamina epithelialis 肠上皮层 Lp: lamina propria 肠固有层)



图版⑤

11—16. 黏膜组织中的免疫细胞电镜图片。11. 杯状细胞($\times 8800$), $(6-10) \times (15-25) \mu\text{m}$ 胞质中有许多透明的黏液颗粒; 12. 淋巴细胞($\times 8900$), $3-4 \mu\text{m}$, 细胞核质比大, 胞质较少; 13. 单核细胞($\times 8900$), $5-6 \mu\text{m}$, 胞核形状多不规则, 胞质中有许多吞噬小泡。14. 巨嗜细胞($\times 8900$), $7-9 \mu\text{m}$, 细胞核形态不规则, 胞质中有溶酶体泡和吞噬泡, 并且有丰富的线粒体; 15. 嗜曙红细胞($\times 8900$), $3-5 \mu\text{m}$, 胞质中有丰富的着色均匀的嗜酸性颗粒; 16. 嗜中性粒细胞($\times 8900$), $3-5 \mu\text{m}$, 核多有分页, 胞质中有着色较深的颗粒、吞噬泡及线粒体。

11—16. Electron micrographs showing immune cells in mucosal tissues. 11. Goblet cells ($\times 8800$), $(6-10) \times (15-25) \mu\text{m}$, with electron-opaque mucus vesicles; 12. Lymphocytes ($\times 8900$), $3-4 \mu\text{m}$, with high ratio of nuclear to cytoplasmic material; 13. Monocytes ($\times 8900$), $5-6 \mu\text{m}$, with eccentric nucleus and engulfing vessels; 14. Macrophages ($\times 8900$), $7-9 \mu\text{m}$, with eccentric nucleus and lysosomes, engulfing vessels in cytoplasm; 15. Eosinophils ($\times 8900$), $3-5 \mu\text{m}$, with electron density granules; 16. Neutrophils ($\times 8900$), $3-5 \mu\text{m}$, with segmented nucleus and high density granules in cytoplasm