

研究简报

中国对虾仔虾造血组织分布的研究

战文斌 王 姝 张利峰 张志栋

(青岛海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003)

STUDIES ON DISTRIBUTION OF HEMATOPOIETIC TISSUE IN THE POSTLARVA (*Penaeus chinensis*)

ZHAN Wen bin, WANG Shu, ZHANG Li-feng and ZHANG Zhi-dong

(The Key Laboratory of aquaculture, Ministry of Education, Ocean University of

Qingdao, Qingdao 266003)

关键词: 中国对虾; 仔虾; 造血组织

Key words: *Penaeus chinensis*; Postlarva; Hematopoietic tissue

中图分类号: S966.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3207(2002)05-0574-03

甲壳动物不具有免疫球蛋白, 对机体的保护作用主要是由血细胞来承担的。血细胞随着血液循环分布到身体各处, 发挥着吞噬、结节、包囊等免疫防御功能。血细胞不能进行有丝分裂, 它们的更新补充是由造血组织来完成的^[1]。有关甲壳类血细胞的形态、分类、细胞化学、免疫功能等均有详细报道^[2], 但造血组织和血细胞起源的研究资料则较少, 对造血组织的研究大多都采用光镜和电镜观察。本研究使用抗中国对虾血细胞的单克隆抗体^[3], 在分子水平上, 通过冰冻切片和间接免疫荧光染色法, 对中国对虾仔虾的造血组织进行定位, 并比较分析了循环血细胞和造血细胞的差异。以期阐明免疫机制、血细胞的发生发育、循环血细胞和造血细胞相互关系等研究提供资料。

1 材料与方法

1.1 试剂及材料 异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠 IgG (以下简称 FITC IgG) 购自上海华美公司。鼠抗中国对虾三种血细胞亚型的单克隆抗体 3A3、3B3 和 3B6 由本实验室研制。

中国对虾(*Penaeus chinensis*) 仔虾采集于山东日照市对虾养殖场, 体长 5–6 mm, 实验之前, 经过细菌和病毒检测, 证实是健康的。而且血细胞的数量正常, 分布均匀, 没有吞噬发生的明显迹象。

1.2 冰冻切片 去除水分后, 组织冷冻包埋剂(Tissue freezing medium) 包埋仔虾整体, 冰冻切片。切片厚度 5 μ m。卡诺氏液固定 20 min, pH 7.4, 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS) 浸洗 5 min。

收稿日期: 2001-10-01; 修订日期: 2002-01-30

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(G 1999012002); 国家自然科学基金(39870110) 资助

作者简介: 战文斌(1960—), 男, 山东省莱阳人; 教授, 博导; 主要从事水产动物病毒与免疫

Email: wbzhan@ouqdl.edu.cn

1.3 间接免疫荧光染色 3A3、3B3 和 3B6 三种单抗, 37℃ 孵育 45min, 0.01mol/L PBS 浸洗三次, 每次 10min。加 FITC 标记的羊抗鼠抗体 (稀释比例 1:10), 37℃ 孵育 45min, 0.01mol/L PBS 浸洗三次, 每次 10min。甘油封片, 荧光显微镜观察, 拍照。

2 结果

2.1 中国对虾仔虾血细胞的分布与特点

间接免疫荧光染色结果显示: 各附肢(图版 I:2)、附肢基部(图版 I:5)、胃上部、胃前部(图版 I:3)、肝胰脏间隙(图版 I:7)、心脏(图版 I:4)、鳃、胸下动脉、腹下动脉(图版 I:1)、腹上动脉、尾垂动脉等部位, 呈现为阳性反应。躯干部的肌肉表现为阴性反应。另外, 动脉中的血细胞多呈椭圆形、粒状、游离分布, 附肢内的血细胞多呈圆形, 数目多, 几乎充满整个附肢。组织中的血细胞比循环血细胞小, 形态多样, 呈现为圆形、柱形、梭形, 并且均紧密的相互挤压在一起。

2.2 中国对虾仔虾的造血组织

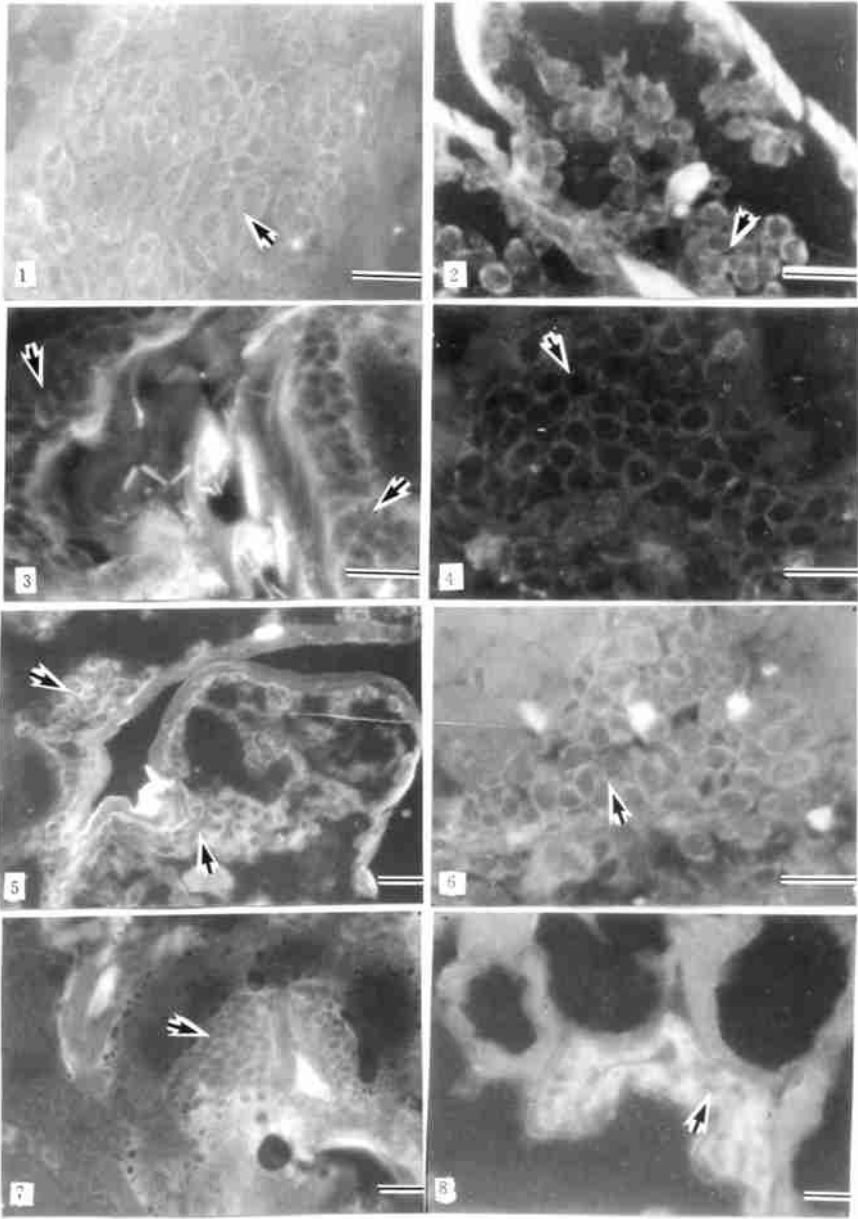
中国对虾仔虾的胃前部(图版 I:3)、心脏前方(图版 I:4)、肝胰脏的前部(图版 I:6)和间隙(图版 I:7)、颚足基部(图版 I:5)、第二触角的鳞片中心处(图版 I:8), 间接免疫荧光染色显示为强阳性反应。这些部位血细胞数量多, 大小不一, 呈多形态, 并且相互紧密连接。胃部呈强阳性反应的血细胞分布在胃与肝胰脏相接的部位, 这部分血细胞由被膜包裹, 贴在胃壁外侧。心脏和肝胰脏间隙的血细胞连接成片, 外周有结缔组织包裹支持。肝胰脏前部呈强阳性反应的实质组织块, 中央有一基轴, 血细胞紧密附着其上。颚足基部呈强阳性反应的部位在甲壳边缘。特别是在第二触角的鳞片中心处有呈强阳性反应的组织, 该组织呈扁管状, 中间有腔隙。

3 讨论

在血细胞的发生部位, 因细胞尚未发育成熟, 所以个体较小。又因造血组织始终处于一种高度有丝分裂状态, 所以血细胞常常聚堆。在造血组织内, 幼小的血细胞重叠在一起, 细胞形状无法展开, 相连成堆。做间接免疫荧光染色时, 这些组织表现为强阳性反应。鉴于单抗高特异性的识别和整体切片的完整性, 本文确证中国对虾仔虾的造血组织分散在胃、肝胰脏、心脏、附肢基部等部位, 特别是在第二触角鳞片中心处有管状的造血组织存在。Thomas 等用石蜡切片和 H.E 染色法对虾类的造血组织进行了定位, 提出虾类的造血组织处于头前部靠近甲壳边缘的动脉管外周; 第一颚足和第二颚足的基部以及胃的前部。Martin 发现龙虾 (*Homarus americanus*) 的造血组织发生在前肠的背面两侧, 造血组织是一对薄的组织块, 呈卵圆形, 有结缔组织和肌肉纤维支持。单肢虾 (*Sicyonia ingentis*) 的造血组织是一对高度分支盘绕的管状系统, 位于肝胰脏的背面, 管壁的中间层是造血细胞, 其间的血窦直接与通向心脏的血管相连。Hose 也认为在虾类 (*Sicyonia ingentis*) 中位于腹上部的成对造血结是由大量的管状系统组成的, 血细胞在管壁间产生并进入血窦。这些论点与本文所得结论有相同之处。但以前的研究都采用摘取造血组织直接观察的方法, 这会遗漏一些造血组织的分布部位。本实验采用整体切片, 通过组织器官的位置、甲壳的自发荧光等为参照, 可以很好的对各个部位进行定位。由此本文推断: 中国对虾仔虾的造血组织是零散分布于头胸部的, 造血器官是发达的管状系统, 或者是实质的组织块, 其外周均有结缔组织和肌肉纤维支撑。血细胞被造血组织释放到邻近血窦中, 从而进入循环系统。

参考文献:

- [1] Mats W J, Piu K, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. Aquaculture, 2000, 191: 45—52
- [2] Hose J E, Martin G G, Gerard A S. A Decapod Hemocyte Classification Scheme Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function[J]. Biol Bull. 1990, 178: 33—45
- [3] 战文斌, 等. 中国对虾血细胞单克隆抗体研制及对虾血细胞类型的鉴别[J]. 高技术通讯, 2001, 6: 19—22



图版 I

1. 腹下动脉中的循环血细胞, $\times 200$; 2. 附肢中的血细胞, $\times 200$; 3. 胃前部的造血组织, $\times 200$; 4. 心脏处的造血组织, $\times 200$; 5. 第三颚足内的造血组织, $\times 100$; 6. 肝胰脏间隙内的造血组织, $\times 200$; 7. 肝胰脏前部的造血组织, $\times 100$; 8. 第二触角鳞片中的造血组织, $\times 100$ 标尺= $40\mu\text{m}$

1. Haemocyte in ventral artery, $\times 200$; 2. Haemocyte in appendage, $\times 200$; 3. Hematopoietic tissue in the anterior segment of stom. ach, $\times 200$; 4. Hematopoietic tissue in heart, $\times 200$; 5. Hematopoietic tissue in the third Maxilliped, $\times 100$; 6. Hematopoietic tissue at the interval of hepatopancreas, $\times 200$; 7. Hematopoietic tissue in the anterior segment of hepatopancreas, $\times 100$; 8.

Hematopoietic tissue in the lepis of the second antenna, $\times 100$ bar= $40\mu\text{m}$