

日本鳗鲡消化道肥大细胞组织化学的研究

林 旋, 林树根, 张伟妮, 王全溪, 王寿昆, 吴小凤

(福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

摘 要: 研究日本鳗鲡 (*Anguilla Japonica*) 消化道组织中的肥大细胞组织化学性质, 观察肥大细胞胞浆颗粒的异质性。采用改良甲苯胺蓝 (MTB)、阿利新蓝-沙黄 O (AB/SO)、甲基绿-派洛宁 (MG-P)、和天青 II-伊红-瑞氏混合液等 4 种组化染色法。用阿利新蓝-沙黄 O 染色法显示日本鳗鲡消化道的肥大细胞效果较好; 甲基绿-派洛宁 (MG-P)、和天青 II-伊红-瑞氏混合液染色效果一般, 被染的肥大细胞数量很少; 改良甲苯胺蓝甚至观察不到肥大细胞。日本鳗鲡肥大细胞数量不多, 主要分布于食管、胃和肠道等部位黏膜层的黏膜上皮下方、固有层结缔组织, 少量分布在黏膜下层结缔组织, 并且有沿血管周围分布的特点; 肥大细胞体积小, 且多呈圆形、椭圆形、梭形及不规则形。AB/SO 染色法效果最好, 适用于日本鳗鲡肥大细胞的鉴定; 改良甲苯胺蓝染色法不适合于日本鳗鲡肥大细胞的鉴定。

关键词: 日本鳗鲡; 肥大细胞; 组织化学

中图分类号: S 912

文献标识码: A

Study on histochemistry of the mast cell in the digestive tract of *Anguilla Japonica*

LIN Xuan, LIN Shu-gen, ZHANG Wei-ni, WANG Quan-xi, WANG Shou-kun, WU Xiao-feng

(College of animal science, Fujian agriculture and forestry university, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: The purpose of this experiment was to investigate the histochemical property of the mast cells in the digestive tract tissue of *Anguilla Japonica* and observe the heterogeneity of cytoplasm granules of mast cells. This experiment used improved toluidine blue staining (MTB), Alcian blue Safranin O staining (AB/SO), methyl green - Pyronine staining (MG-P) and Azure II - Eosin - Wright mixture staining. The mast cells in the digestive tract of *A. Japonica* were displayed better by Alcian blue Safranin O staining. The effect of methyl green - Pyronine staining (MG-P) and Azure II - Eosin - Wright mixture staining was generic, and few mast cells were dyed. Even the improved toluidine blue staining couldn't show the mast cells. Small amount of mast cells mostly distributed in connective tissues of lamina propria and under mucosa epithelium in mucous layer of esophagus, stomach and intestine. While less lied in connective tissues of submucosa, and intended to be around blood vessels. The shapes of the mast cells which were small in size were circular, ellipse, spindle and irregular. The effect of Alcian blue Safranin O staining was the best, which was applicable to identification of the mast cell of *A. Japonica*. The improved toluidine blue staining was not applicable.

Key words: *Anguilla Japonica*; mast cell; histochemistry

自 Ehrlich (1878 年) 在大白鼠结缔组织中首次发现并命名肥大细胞 (mast cell, MC) 以来, 人们已证实肥大细胞广泛分布于鱼类、两栖类、家禽和哺乳动物的多种组织器官中^[1-9]。肥大细胞的胞浆颗粒中含有生物胺、蛋白多糖及中性蛋白酶等多种生物活性物质, 肥大细胞就是通过脱颗粒释放这些生物活性物质对动物的健康起着重要作用^[10-11]。研究证实, MC 在不同动物、不同组织

器官中存在着形态、分布、颗粒化学成分、染色特性及超微结构和功能等方面的差异性^[12]。其中, MC 的分布异质性与细胞类型、功能以及其分化成熟密切相连。因此, 对动物不同组织器官中逐个研究 MC 分布规律及组织化学性质已成为 MC 生物学研究的重要课题之一^[13]。

20 世纪 20 年代起, 国外的一些研究者就证实了某些硬骨鱼的多种组织中肥大细胞的存在, 之

收稿日期: 2009-02-02 初稿; 2009-03-29 修改稿

作者简介: 林旋 (1979-), 男, 硕士, 助教; 研究方向: 水产动物疾病学 (E-mail: linkaixuan79@hotmail.com)

通讯作者: 林树根 (1950-), 男, 教授, 主要从事动物组织学研究 (E-mail: Lin1950@sina.com)

基金项目: 福建省自然科学基金 (2008J0249)

后不同的研究者采用不同的组织化学、光镜及电镜技术,在多种硬骨鱼类肠道、鳃、肠系膜、头肾和胸腺组织中发现 MC^[6-8,14-16]。日本鳗鲡 (*Anguilla Japonica*) 隶属硬骨鱼纲 (Osteichthyes) 鳗鲡目 (Anguilliformes) 鳗鲡科 (Anguillidae)、鳗属 (*Anguilla* Shaw)。日本鳗鲡是一种名贵的经济鱼类,素有“水中人参”之称,是一种高级食用鱼类,肉质细嫩、味美,蛋白质和脂肪含量丰富,是福建省出口创汇的主要养殖品种。虽然这几年来,许多学者对养殖鳗鲡的病害及免疫学进行深入研究,但对日本鳗鲡肥大细胞的生物学以及灰抗感染中的作用未见报道。本文采用 Carnoy 氏液固定,改良甲苯胺蓝 (MTB)、阿利新蓝-沙黄 (AB/SO)、甲基绿-派洛宁 (MG-P)、和天青 II-伊红-瑞氏混合液等 4 种组化染色法,分别对日本鳗鲡消化道内 (食管、胃体和肠道) 的肥大细胞进行组织化学及形态学初步研究。

1 材料与方 法

1.1 组织化学试剂

甲苯胺蓝、阿利新蓝、番红 O、派洛宁 Y、天青 II 和伊红为 Amresco 产品,甲基绿和瑞特氏染料为 Sigma 产品。其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 试验材料及处理

取市售健康的成年罗非鱼 5 尾 (体重平均为 500 克左右),处死,立即取消化道食管、胃 (胃体、幽门、贲门)、肠 (前肠、中肠、后肠),固定于 Carnoy 氏液 (60% 无水乙醇,30% 氯仿和 10% 冰醋酸),石蜡包埋,6 μm 厚度连续切片,进行染色及观察。

1.3 常规组织化学染色

改良甲苯胺蓝染色法 (MTB) 参考文献[17]的方法进行;阿利新蓝-沙黄 O 复染法 (AB/SO) 参考文献[10]的方法进行;甲基绿-派洛宁 (Methyl Green-Pyronine, MG-P) 染色参考文献[16]的方法进行;天青 II-伊红-瑞氏混合液染色参考文献[19]的方法进行。

2 结 果

通过显微镜的观察,经 Carnoy 氏液固定,改良甲苯胺蓝 (MTB)、阿利新蓝-沙黄 (AB/SO)、甲基绿-派洛宁 (MG-P) 和天青 II-伊红-瑞氏混合液等 4 种组化染色法的染色效果不同。AB/SO

染色效果最好,日本鳗鲡消化道各段被染上肥大细胞数量较多;MG-P 和天青 II-伊红-瑞氏混合液染色效果也较好,但被染上的肥大细胞数量很少;改良甲苯胺蓝染色染不出肥大细胞。日本鳗鲡肥大细胞主要分布在消化道各段的黏膜层和黏膜下层的结缔组织。从分布的数量看,日本鳗鲡消化道各段的肥大细胞数量均较少,且各段之间数量上没有明显差别,而分布在黏膜层明显比黏膜下的结缔组织多。

2.1 阿利新蓝-沙黄 (AB/SO) 染色

AB/SO 染色,切片观察日本鳗鲡消化道中的食管、胃和肠道等组织的肥大细胞,胞浆颗粒被染成蓝色,胞核呈淡褐色,染色效果较好,细胞的轮廓清楚,多数细胞胞质颗粒清晰。消化道各段的肥大细胞数量均不多,肥大细胞体积大小均比周围其他细胞大 (约 14~18 μm)。日本鳗鲡消化道内的肥大细胞主要分布于食管、胃和肠道等部位的黏膜层的上皮细胞下方、腺体之间和固有层结缔组织,少量分布于黏膜下层结缔组织 (图 1-1~4);并有沿血管周围分布的特点 (图 1-1~4),数量较少,细胞形状多样,有圆形、椭圆形、梭形或不规则形。

2.2 甲基绿-派洛宁 (MG-P) 染色

MG-P 染色,肥大细胞胞浆颗粒呈鲜红色,细胞核为紫蓝色,细胞界限和胞质颗粒较清楚。被染上的肥大细胞数量较 AB/SO 染色少。肥大细胞主要分布在食管、胃和肠道各部分的黏膜固有层中,肌层和黏膜下层结缔组织分布很少。肥大细胞主要成圆形和椭圆形,有的分布在肠道上皮下方的肥大细胞呈梭形 (图 1-5~7),也有沿血管分布的特性 (图 1-7)。

2.3 天青 II-伊红-瑞氏混合液染色

天青 II-伊红-瑞氏混合液染色,肥大细胞成紫红色,胞核为淡紫蓝色;细胞轮廓清楚,胞质颗粒也可看到,从切片观察,被染上的肥大细胞数量也比 AB/SO 染色少。经过天青 II-伊红-瑞氏混合液染色后的肥大细胞也主要分布在消化道的黏膜固有层中,黏膜下层的结缔组织分布很少 (图 1-8~10)。也具有沿血管分布的特性 (图 1-9~10),呈圆形和椭圆形。

2.4 改良甲苯胺蓝染色 (MTB)

MTB 染色经多次染色,在日本鳗鲡消化道各段的组织中均不能染出肥大细胞。

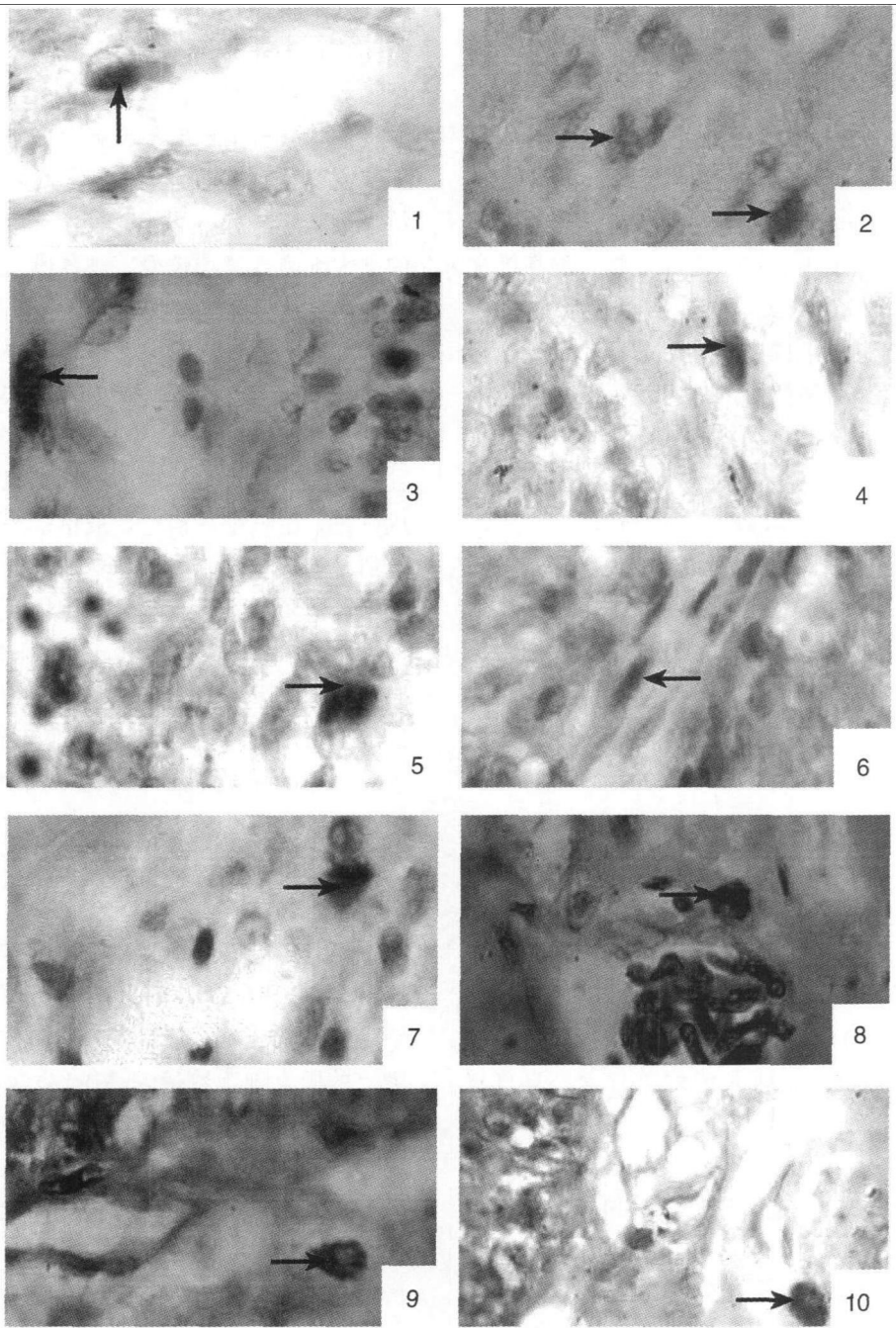


图 1 不同染色法对日本鳗鲡消化道肥大细胞的染色效果

Fig. 1 Staining effects of different stainings on the mast cell in the digestive tract of *Anguilla Japonica*

注：1. 食管固有膜血管周围肥大细胞（AB/SO 染色）×1000；2. 贲门腺体之间肥大细胞（AB/SO 染色）×1000；3. 中肠黏膜上皮下方肥大细胞（AB/SO 染色）×1000；4. 后肠固有膜肥大细胞（AB/SO 染色）×1000；5. 胃体固有膜肥大细胞（MG-P 染色）×1000；6. 前肠黏膜上皮下方肥大细胞（MG-P 染色）×1000；7. 中肠固有膜肥大细胞（MG-P 染色）×1000；8. 食管固有膜肥大细胞（天青Ⅱ-伊红-瑞氏混合液染色）×1000；9. 贲门固有膜肥大细胞（天青Ⅱ-伊红-瑞氏混合液染色）×1000；10. 后肠固有膜肥大细胞（天青Ⅱ-伊红-瑞氏混合液染色）×1000。（标尺=20 μm）

3 讨 论

本研究通过 Carnoy 氏液固定，采用改良甲苯胺兰法（MTB）、阿利新兰-番红 O 复染法（AB/SO）、甲基绿-派洛宁染色法（MG-P）和天青Ⅱ-伊红-瑞氏混合液染色法等 4 种组化染色技术对日

本鳗鲡消化道组织中的肥大细胞组化性质进行研究，其中 AB/SO 显示的 MC 效果较好，肥大细胞轮廓清楚，胞质颗粒较清晰；与国内外一些学者在硬骨鱼类肥大细胞研究相似的是，日本鳗鲡肥大细胞也类似于哺乳动物的黏膜肥大细胞（MMC）^[6-8,14-16]。采用申姜颖等^[16]介绍的 MG-P

染色法,也能鉴定出肥大细胞,但被染的肥大细胞数量很少,日本鳗鲡肥大细胞胞浆颗粒都呈红色,即肥大细胞胞浆主要含肝素,不含组胺。进一步验证日本鳗鲡肥大细胞的组化性质类似于哺乳动物黏膜型肥大细胞(MMG)。天青Ⅱ-伊红-瑞氏混合液染色也能染出肥大细胞,但被染的肥大细胞也很少;而用MTB染色,经数次反复实验在消化道各段组织中,均未能鉴定出肥大细胞,与许乐仁等^[20]采用甲苯胺蓝-藏红O复染法,对草鱼(*Ctempharyngodon idella*)淋巴器官进行染色,在所有组织中均未能鉴定出肥大细胞结果一样。而杨筱珍^[7]、Romieu^[13]、Temkin^[21]、Chiarini-Gareia^[20]及 Reite^[14]等采用甲苯胺蓝染色对胡子鲇(*Claris fuscus lacepeda*)、太阳鱼(*Orthogoriscus mola*)、鲫(*Carassius auratus*)、虎利齿脂鲤(*Hoplias malabaricus*)及狗鱼(*Esox lucin*)均能在结缔组织和肠道中观察到对甲苯胺蓝异染性的肥大细胞,说明在硬骨鱼的不同种类之间,肥大细胞的组织化学特性可能存在着一定的差异,或者说硬骨鱼的肥大细胞染色性质不稳定,采用不同的组织化学技术进行染色条件的摸索,还需进一步研究。

从试验结果来看,日本鳗鲡消化道各段组织中的肥大细胞大多分布于浅层的黏膜上皮下方、固有层或血管、腺体周围的结缔组织等与抗原易接触部位,而黏膜下层的结缔组织中肥大细胞很少。在其他动物的不同器官中,MC也有类似的分布特征^[22,24]。由此可见,动物MC的分布特点与防御作用有关。日本鳗鲡MC主要分布在消化道各段的黏膜层中,少量分布在黏膜下层的结缔组织中。根据肥大细胞的分类,分布于粘膜固有层中的MC为“粘膜MC(Mucosal mast cell, MMC)”,其主要功能是参与宿主的免疫反应,故又称“免疫相关型MC”;而分布于粘膜下层结缔组织中的MC为“结缔组织MC(Connective tissue mast cell, CT-MC)”^[1],其主要功能是参与血管生成和组织代谢,又称“非免疫相关型MC”^[25]。本研究中日本鳗鲡食管、胃和小肠壁内肥大细胞主要分布在粘膜固有层,与张文学等^[9]报道蟾蜍胃壁的MC在粘膜下层比较多,小肠壁内的MC在粘膜固有层比较多的结果不一样,说明不同动物MC分布也存在差异。

日本鳗鲡消化道粘膜层结缔组织中的肥大细胞与大多数脊椎动物(哺乳动物、禽类和两栖类)的肥大细胞一样,具有沿血管分布的特性,该结果和杨筱珍等^[7]所报道的胡子鲇肥大细胞分布特点一

致,说明硬骨鱼的肥大细胞如哺乳动物肥大细胞一样与血管有着密切的关系。它们有可能是从血管内向血管外迁移^[26]或是参与血管反应^[27-28]。据报道,MC释放的组织胺和肝素可能影响血管内皮细胞的生长和血液循环的组成。在人皮肤中MC所释放的肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)可诱导血管内皮白细胞黏附因子,它能吸引淋巴细胞等黏附在微血管内壁从而对血流进行监视^[13]。可见,围绕血管分布的MC对血管反应起重要作用。

4 结 论

以上4种组织化学方法对正常日本鳗鲡消化道组织中肥大细胞胞浆颗粒组织化学性质的研究,AB/SO染色法效果最好,适用于日本鳗鲡肥大细胞的鉴定。可在此基础上进一步研究日本鳗鲡疾病状态下肥大细胞数量的变化及肥大细胞颗粒成分的病理变化,有助于对鱼类肥大细胞免疫功能的理解,对于阐明鱼类疾病的发生机理和采取合理的防治手段具有重要的意义。

参考文献:

- [1] GALLI S L. New insight into “The riddle of the mast cells” micro environmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity [J]. Lab Invest, 1990, 60: 146—157.
- [2] BLOOM G, RINGERTZ N R. Acid polysaccharides of peritoneal mast cells of the rat and mouse [J]. Ark Kemi, 1960, 16 (1): 51—59.
- [3] WIGHT P L. The mast cells of Gallus domestics. I distribution and ultrastructure [J]. Acat Anat, 1970, 75 (2): 263—275.
- [4] 李玉谷, 李楚宣, 陈元音, 等. 鹅胸腺肥大细胞的超微结构特征 [J]. 华南农业大学学报, 1999, 20 (1): 41—44.
- [5] XU L R, OU D Y, GAO D Y. Histochemistry and morphology of mast cells of primary lymphoid organs in chicken [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2001, 10 (4): 449—455.
- [6] XU L R, YANG X Z, GAO D H, et al. Mast cells in two species of freshwater fishes, grass fish (*Ctempharyngodon idella*) and cat fish (*Claris fuscus lacepede*) [J]. J Anim Vet Adv, 2003, 2 (3): 191—195.
- [7] 杨筱珍, 高登慧, 许乐仁. 胡子鲇肥大细胞的组织化学及形态学 [J]. 中国水产科学, 2003, 10 (2): 106—110.
- [8] JULIANA S R, HE L C G. Mast cell heterogeneity between two different species of *Hoplias* sp. (Characiformes; Erythrini-dae): Response to fixatives, anatomical distribution, histochemical contents and ultrastructural features [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22: 218—229.

- [9] 张文学, 赵良真, 赵艳红, 等. 蟾蜍消化道肥大细胞的观察 [J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2005, 33 (4): 176-182.
- [10] XU L R, CARR M M, BLAND A P, et al. Histochemistry and morphology of porcine mast cells [J]. *Histochem J*, 1993, 25: 516-522.
- [11] 江萍, 许乐仁. 六种动物含类胰蛋白酶肥大细胞的酶组化分析 [J]. 畜牧兽医学报, 1997, 28 (5): 416-421.
- [12] 呼格吉乐图, 苏布达, 王志, 等. 肥大细胞的组织化学与超微结构的异质性 [J]. 解剖学杂志, 2007, 29: 840-844.
- [13] 呼格吉乐图, 余锐萍, 阿拉坦其其格. 家兔消化道中肥大细胞的定位研究 [J]. 科学技术与工程, 2004, 4 (9): 768-770.
- [14] MICHELS N A. The mast cell in the lower vertebrates [J]. *Cellule*, 1923, 33: 338-462.
- [15] ROMIEU M. Contribution a l'étude des mastocytes des poissons osseux [C]. Societe de Biologie, Paris: Comptes Rendus, 1924, 91: 655-657.
- [16] REITE O B. The mast cell nature of granular cells in the digestive tract of the pike, *Esox lucius*; similarity to mammalian mucosal mast cells and globule leucocytes [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1996, 6: 363-369.
- [17] 李美燕, 陈耀星, 王子旭. 三种饲料添加剂对肉鸡小肠肥大细胞数量分布的影响 [J]. 动物医学进展, 2006, 27 (2): 65-68.
- [18] 申姜颖, 柳雅玲, 黄庆玉, 等. 肥大细胞三种染色法的比较研究 [J]. 泰山医学院学报, 1997, 18 (4): 255-256.
- [19] 张爱子, 王仲涛, 赵春芳. 改良的天青Ⅱ-伊红-瑞氏染色应用 [J]. 河北医学院学报, 1995, 16 (2): 93.
- [20] 许乐仁, 杨筱珍, 高登慧. 草鱼淋巴器官中的肥大细胞 [J]. 水产学报, 2003, 27 (3): 233-237.
- [21] TEMKIN R J, MCMILLAN D B. Gut-associated lymphoid tissue (GALT) of the goldfish, *Carassius auratus* [J]. *J Morphol*, 1986, 190: 9-26.
- [22] CHIAIRINI-GARCIA H, FERREIRA R M A. Histochemical evidence of heparin in granular cells of *Hoplias malabaricus* bloch [J]. *J Fish Biol*, 1992, 41: 155-157.
- [23] 王彤, 景雅, 杨琳, 等. 人胃粘膜肥大细胞的分布与超微结构 [J]. 解剖学杂志, 1998, 21 (6): 538-541.
- [24] 贾雪梅, 贾友苏, 齐威琴, 等. 小鼠下颌下腺中肥大细胞异质性研究 [J]. 解剖学杂志, 1996, 19 (4): 344-346.
- [25] CHURCH M K, LEVI-SCHAFFER F. The human mast cell [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1997, 99 (2): 155-160.
- [26] POWELL M D, WRIGHT G M, BURKA J F. Eosinophilic granule cells in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: evidence of migration [J]. *J Fish Biol*, 1990, 37: 495-497.
- [27] IRANI A A, SCHWATZ L B. Mast cell heterogeneity [J]. *Clin Exp Allergy*, 1989, 19: 143-155.
- [28] REITE O B. Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish; a review focusing on staining properties and functional responses [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, 8: 489-513.

(责任编辑: 翁志辉)