

## 草鱼头肾发生组织学与免疫组织化学观察

雷雪彬<sup>1,2</sup>, 常藕琴<sup>1</sup>, 石存斌<sup>1</sup>, 付小哲<sup>1</sup>, 王亚军<sup>1</sup>, 吴淑勤<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 为研究草鱼头肾的组织发生发育, 应用组织学技术, 对 1~103 dph (day post hatching) 的草鱼头肾进行观察分析, 描述了头肾的组织结构变化及免疫球蛋白 M (IgM) 阳性细胞及过碘酸雪夫氏 (PAS) 阳性细胞的发生和分布。结果显示, 6 dph, 出现头肾原基, 原基中原肾管分化形成的肾小管之间出现散在的干细胞。7 dph 至 16 dph, 造血干细胞逐渐分化成不同类型的细胞, 免疫细胞数量逐渐增加; 17 dph 至 103 dph, 肾小管逐渐退化至完全消失, 网状内皮系统支持下的淋巴造血组织构成头肾的主要部分。40 dph 肾上腺细胞团开始出现。65 dph 与成鱼头肾的组织结构接近, 作为淋巴—肾上腺组织存在。PAS 阳性细胞最早在 7 dph 出现; IgM 阳性细胞最早出现于 17 dph; 之后, IgM 阳性细胞及 PAS 阳性细胞逐渐增多, 分布于整个头肾组织。研究表明, 65 dph 草鱼头肾在组织上发育基本成熟; 头肾作为草鱼免疫器官的早期发育可以分为 3 个阶段: 无参与免疫反应的细胞、只具有参与非特异性免疫反应的细胞以及参与非特异性免疫反应及特异性免疫反应的细胞组织结构逐步发育完善。

**关键词:** 草鱼; 头肾; 组织发生; 免疫组织化学; PAS 阳性细胞

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 属硬骨鱼纲 (Osteichthyes)、鲤形目 (Cypriniformes)、鲤科 (Cyprinidae) 是我国重要的淡水养殖鱼类之一。食品安全和绿色食品逐渐成为人们关心的热点, 因此疫苗应用成为草鱼病害防治的主要措施之一<sup>[1]</sup>。但是, 免疫程序、免疫时间、免疫方式以及免疫过早易产生免疫耐受, 成为疫苗防治的关键问题。要解决这些问题必须对草鱼免疫系统发育进行研究。免疫器官个体发育研究可以为免疫能力出现及有效免疫提供时间参考<sup>[2]</sup>。只有理解草鱼免疫系统发育才能为草鱼免疫时间提供依据, 从而进行有效的免疫指导<sup>[3]</sup>。

硬骨鱼类的免疫器官主要包括胸腺、脾、头肾及粘膜淋巴组织<sup>[4]</sup>。头肾是硬骨鱼类重要的免疫器官和造血器官, 含有丰富的血管、血窦和血细胞, 介导和参与免疫反应<sup>[5]</sup>。头肾作为初级的淋

巴器官, 不仅是免疫细胞发生、分化和增殖的重要场所, 还是捕获抗原和产生抗体的主要场所<sup>[6]</sup>。研究头肾的发育是深入认识鱼类发育过程中免疫功能建立时期的基础<sup>[7]</sup>。近年来, 硬骨鱼类头肾个体发育相关的研究逐渐增多, 如鳊 (*Siniperca chuatsi*)<sup>[8]</sup>、黄颡鱼 (*Pseudobagrus fulvidraco*)<sup>[5]</sup>、牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[9]</sup>、长体多锯鲈 (*Polyprion oxygeneios*)<sup>[10]</sup>、斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)<sup>[11]</sup>、鲤 (*Cyprinus carpio*)<sup>[12]</sup> 等鱼类的头肾发生发育均见报道。其中, 研究 B 淋巴细胞在头肾中的发生分布, 有助于认识头肾在体液免疫中的重要性。到目前为止, 硬骨鱼类 B 细胞及浆细胞的研究基本集中在 IgM 产生细胞及分泌 IgM 细胞的发生和分布, 而在 IgD 或分泌 IgT/IgZ 产生细胞的个体发育方面的研究很少<sup>[13]</sup>。近年来, 学者们进行了不同鱼类 B 淋巴细胞个体发育相关

收稿日期: 2013-01-07 修回日期: 2013-03-13

资助项目: 国家科技支撑计划 (2012BAD25B00); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46)

通信作者: 吴淑勤, E-mail: wushuqin001@21cn.com

的研究,如黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)<sup>[14]</sup>、鳊<sup>[15]</sup>、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)<sup>[16]</sup>、长体多锯鲈<sup>[10]</sup>、斑马鱼<sup>[11,17,18]</sup>及鲤<sup>[19-20]</sup>等,表明头肾是最早免疫球蛋白 Ig 产生细胞的器官;相比于日龄 IgM 表达的出现更依赖鱼体大小<sup>[19-20]</sup>。

目前,草鱼头肾的研究仅限于组织结构及细胞组成、1 龄以上草鱼免疫器官免疫细胞数量的变化<sup>[21]</sup>以及免疫相关基因发育<sup>[22]</sup>,草鱼 IgM 产生细胞及草鱼幼鱼头肾发育的研究尚未见报道。基于草鱼在我国淡水养殖中的重要地位,实验采用组织学和免疫组化方法分析了草鱼头肾的组织发生,并通过免疫组化方法对 IgM 阳性细胞(IgM 产生细胞)在头肾中的分布进行研究,从而为进一步了解头肾在免疫系统中的作用及地位,并为深入研究草鱼免疫反应的机制奠定基础,并可能为草鱼疾病防控策略特别是疫苗免疫的完善提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**实验动物** 草鱼鱼苗取自广东省清远市百容水产良种有限公司清远一场及三场。1~21 dph(day post hatching),1 d/次;22~29 dph,2 d/次;30~55 dph,5 d/次。65~85 dph,10 d/次;103 dph,1 次。1~35 dph 取草鱼整体;40~103 dph 单独取头肾;每次取 5 尾,取样水温为 22~30 ℃。取样前,用标准直尺(精确度 1 mm)对每尾草鱼全长进行测量。样品取出后立即置于 Bouins 氏液中固定 24 h,以备后续实验。

**主要试剂** 草鱼血清免疫球蛋白 M(IgM)单克隆抗体由中国科学院水生生物研究所提供;两步法免疫组化检测试剂盒购自武汉博士德生物有限公司,DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司;阿利新蓝过碘酸雪夫氏(AB-PAS)试剂盒购自厦门迈威生物科技有限公司。

### 1.2 方 法

**常规石蜡切片制作** 将固定后的样品依次进行常规乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋;然后在 Leica RM2135 型石蜡切片机进行 4 μm 纵向连续切片,H. E 染色,中性树胶封片。然后将切片置于 Nikon Eclipse 80i 型显微镜下观察,Nikon Ds-Fil 型摄像头下拍照。

**免疫组化染色** 固定后的样品依照常规石蜡切片,切片常规脱蜡至水;用双氧水孵育 10 min

以除去内源性过氧化物酶,在 0.02 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中热修复抗原 10~15 min;5% BAS 封闭液封闭 20 min。滴加 1 000 倍稀释的草鱼血清免疫球蛋白单克隆抗体,37 ℃孵育 1 h;滴加聚合 HRP 标记抗小鼠 IgG,37 ℃孵育 30 min;用 DAB 显色 3~5 min;苏木素轻度复染,脱水、透明、封片,显微镜观察。试验中用 PBS 代替一抗(草鱼血清 IgM 单克隆抗体),其他步骤相同作阴性对照实验。在 40×10 倍镜下,每张切片选取 5 个视野,拍照并用 Image Pro Plus 测量 IgM 阳性细胞的总面积及图片面积(IgM 阳性细胞着染棕黄色),计算 IgM 阳性细胞面积百分比,用 SPSS 17.0 软件分析日龄与 IgM 阳性细胞面积百分比的关系。

**PAS 染色** 固定后的样品常规石蜡切片,切片常规脱蜡至水;然后进行阿利新蓝过碘酸雪夫氏(AB-PAS)染色;梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。在 40×10 倍镜下,每张切片选取 5 个视野,细胞质红染的细胞为 PAS 阳性细胞,用 Image Pro Plus 测量 PAS 阳性细胞及面积,计算 PAS 阳性细胞面积百分比用 SPSS 17.0 软件分析日龄与 PAS 阳性细胞面积百分比的关系。此外,根据显微镜观察结果,选取 7、25 及 103 dph 的切片进行 PAS-苏木素染色,对 PAS 阳性细胞着色情况进行分析。

## 2 结 果

### 2.1 草鱼日龄与全长的关系

用 SPSS 17.0 软件中的 Curve Estimation 对全长与日龄进行模型分析与参数估计,其中 Cubic 函数关系式的  $R^2$  值最大(0.995),故草鱼全长与日龄的最佳函数关系式:

$$y = 0.026x^2 + 0.217x + 6.186 \text{ (图 1)}。$$

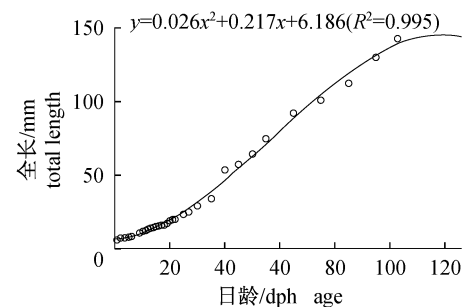


图 1 全长与日龄的最佳拟合曲线(Cubic)

Fig. 1 Best fitting curve between total length and age

## 2.2 草鱼头肾的组织发生

**头肾发育的解剖学观察** 40 dph 后解剖观察:草鱼头肾位于胸腔内咽退缩肌上方两侧,围绕心腹隔膜前面的食道两侧和背面分布;头肾呈扁平状,分左右两叶,呈暗红色,两叶头肾在基部相连;头肾基部组织与腹腔内肾脏组织的最前端相连接,心腹隔膜前为头肾,心腹隔膜后为肾脏。

**头肾发育的显微观察** 水温 22~23 °C 条件下,1 dph [全长(TL)6.0 mm],胸腺原基和脾脏原基均未形成,肾由一对简单的、直的原肾管沿着脊椎直抵躯干后部(图版 I-1)。2 dph 至 5 dph (TL 7.0~8.0 mm),原肾管开始分化,肾管的前部形成若干个前肾管,前肾管由单层锥状细胞和立方上皮细胞组成,细胞质呈淡粉红色(图版 I-2)。3 dph (TL 7.5 mm)头肾外围有髓性红细胞分布(图版 I-3)。

6 dph (TL 8.5 mm),前肾管之间出现散在的未分化的造血干细胞,这些细胞圆而大,细胞质染色淡,核明显;前肾管部分管壁细胞胞质内可见一些深红色的团块,细胞核位于细胞一侧;头肾位置与大血管相邻(图版 I-4)。7 dph (TL 9.0 mm),头肾部位的造血干细胞及淋巴母细胞数量增多并成团或成链状分布于前肾管之间及前肾管与外膜上皮之间;前肾管管间可见少量红细胞及原粒细胞分布(图版 I-5)。

8 dph (TL 10.2 mm),头肾中红细胞增多,淋巴母细胞围绕微静脉呈放射状分布,形状不一,呈多角形、椭圆形及扁平状(图版 I-6)。9 dph (TL 11.0 mm),头肾中的淋巴母细胞大幅增加并可见许多直径较小核深染的淋巴细胞散布;肾小管主要分布于头肾外周,管腔增大(图版 I-7)。11 dph (TL 12.5 mm)淋巴细胞形成明显的集中区,肾小管逐渐由外周集中到头肾中央,肾小管管壁上皮的立方上皮细胞比例增多(图版 I-8,9)。

17 dph (TL 16.0 mm),肾小管开始退化(图版 I-10),粒细胞不同程度地散布于整个头肾。18 dph (TL 16.0 mm),细胞分化明显,淋巴母细胞比例逐渐变小,淋巴细胞比例逐渐增大,血窦及头肾静脉大幅增多(图版 I-11)。25 dph 至 35 dph (TL 23.4~34.3 mm),微静脉丰富,血管中可见大量的红细胞。35 dph,仍可见少量肾小管,管壁上皮细胞胞质呈红色深染。40 dph (TL 53.6 mm),头肾内出现少量肾上腺上皮细胞团(图版

I-12)。之后,微静脉和血窦呈相间分布,微静脉与血窦间分散着淋巴细胞聚集区和粒细胞聚集区(图版 I-13)。55 dph (TL 74.9 mm),仍可见肾小管退化残迹。65 dph (TL 92.0 mm)以后,肾小管基本退化完全消失,头肾已经与成鱼的头肾形状组织结构接近(图版 I-14):头肾无被膜,外周仅有一层胶原纤维包裹;头肾实质中无肾单位,完全属于网状淋巴组织;头肾中有动脉、静脉和丰富的血窦,窦腔较大,与静脉相通;头肾中分散肾上腺细胞群。根据 H. E 染色可将头肾分为苏木精染色深的淋巴细胞聚集区、染色稍浅的粒细胞聚集区及染色浅的内分泌组织区。

## 2.3 头肾中 IgM 阳性细胞及 PAS 阳性细胞的个体发育

最先出现于 17 dph (16.0 mm),在微静脉周围及免疫细胞集中区均可见(图版 II-1)。20 dph (TL 19.0 mm),IgM 阳性细胞形态多样,主要散布于头肾外周(图版 II-2),细胞核大而蓝染,细胞核偏于一侧,可判断 IgM 阳性细胞为淋巴细胞。IgM 阳性细胞细胞质及细胞膜表面可见不同程度棕黄色着染(图版 II-3)。随着日龄增加着染细胞逐渐增多,主要围绕静脉散布。IgM 阳性细胞在肾上腺细胞索的外围免疫细胞间及肾上腺细胞间分布。最后 IgM 阳性细胞淋巴细胞集中区分布密集(图版 II-4)。阴性对照无棕黄色着染(图版 II-5,6)。

7 dph (TL 9.0 mm)开始,在头肾中可见 PAS 阳性细胞分布(图版 III-1)。14 dph (TL 14.5 mm),头肾中不同程度地散布 PAS 阳性细胞,PAS 阳性细胞在头肾外周较密集(图版 III-3)。16 dph (TL 15.5 mm)以后,头肾血管中偶见 PAS 阳性细胞(图版 III-4)。19~30 dph (TL 17.0~29.0 mm),PAS 阴性细胞区域面积比例增大(图版 III-5)。40~103 dph (TL 53.6~142.7 mm),可见肾上腺细胞团周围有较多 PAS 阳性细胞分布,头肾中 PAS 阳性细胞密集区呈网格状分布(图版 III-6)。PAS-苏木素染色:7 dph (TL 9.0 mm),细胞质红染,红染区域呈多角形,细胞核呈椭圆形蓝染,偏于夹角内或沿边界分布,界限清晰,核质比小,判断此时 PAS 阳性细胞为粒细胞(图版 III-2);25 dph (TL 23.4 mm),PAS 阳性细胞与 8 dph 类似,主要为粒细胞(图版 III-7);103 dph (TL 142.7 mm),可判断 PAS 阳性细胞大多数为粒细

胞,但有少量深红色着染的巨噬细胞及淡染的核大质少的淋巴细胞(图版Ⅲ-8)。

用 SPSS 17.0 软件中的 Curve Estimation 对 IgM 阳性细胞, PAS 阳性细胞与日龄进行模型分析与参数估计,各函数的  $R^2$  值均小于 0.9。头肾中 IgM 阳性细胞面积与总细胞面积比随草鱼日龄变化及 PAS 阳性细胞面积与总细胞面积比与草鱼日龄关系详见图 2。7 ~ 103 dph (TL 9 ~ 142.7 mm), IgM 阳性细胞的比例小于 PAS 阳性细胞; 22 dph (TL 19.9 mm) 以前, IgM 阳性细胞比例缓慢增大, PAS 阳性细胞面积比先增高后降低; 22 ~ 103 dph (TL 19.9 ~ 142.7 mm), IgM 阳性细胞与 PAS 阳性细胞随日龄变化规律基本一致, 随日龄增加上下波动。

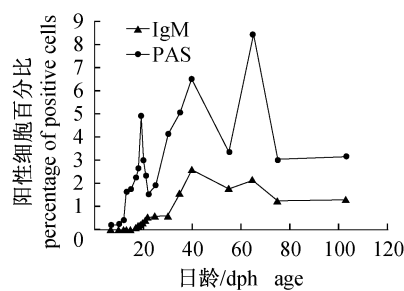


图 2 草鱼头肾 IgM 阳性细胞百分比与日龄的关系和 PAS 阳性细胞百分比与日龄的关系  
Fig. 2 Relationship between percentage of positive cells in head kidney of *C. idella* and different age

### 3 讨论

鱼类头肾在系统发生上属前肾,只在胚胎时期及幼体时期具有排泄功能<sup>[5]</sup>。在发育过程中,头肾失去了排泄功能,保留了造血和内分泌功能而成为造血器官和免疫器官,在功能上相当于脊椎动物的脊髓<sup>[6]</sup>。草鱼头肾在 2 dph 出现肾小管,6 dph 可见造血干细胞及淋巴母细胞样细胞,肾小管在 85 dph 完全消失。草鱼的头肾在发育初期分布有大量肾小管,随着发育的推进,淋巴细胞在数量上占据主导,肾小管逐渐退化消失并出现肾上腺组织。总之,草鱼头肾的个体发育过程,大致可分为 3 个阶段:1 ~ 5 dph,作为原始肾脏实行单纯泌尿功能;6 ~ 40 dph,作为混合型肾脏及分泌组织,产生血细胞及肾上腺细胞;40 dph 以后,作为免疫及分泌器官,产生血细胞并进行内分

泌功能,与鲤<sup>[12]</sup>和鳊<sup>[8]</sup>类似。

最新有关斑马鱼和鲤免疫系统发育的研究报道表明,受精后 2 d 开始,背大动脉腹侧的髓性血细胞迁移进入头肾中<sup>[19,23]</sup>。3 dph,草鱼头肾外围有髓性红细胞分布,但肾小管间未见红细胞分布。与鲤<sup>[12]</sup>相比,鲤头肾在发育早期可见肾小管及肾小球<sup>[12]</sup>,因此具备功能性的肾结构,而在草鱼头肾中未观察到肾小球,观察到的肾小管也在发育后期退化,草鱼与鲤同属鲤科,但与鳊一样,头肾中未发现肾小球<sup>[8]</sup>,可能早期头肾并无滤过作用。草鱼头肾肾小管出现的时间为 2 ~ 85 dph,而鳊头肾在 1 dph 即可观察到肾原基,在 45 dph 头肾中的肾单位已经完全消失;斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)<sup>[7]</sup> 10 dph 出现头肾原基,25 dph 出现小淋巴细胞,50 dph 肾小管开始退化。草鱼和鳊(淡水鱼)头肾开始淋巴化的时间早于斜带石斑鱼(海水鱼),草鱼头肾发育成熟比鳊鱼及斜带石斑鱼慢。由此可见,由于物种、产卵条件和孵化环境的差异,不同鱼类的胚胎发育时间和胚后淋巴器官的发育状况均有较大差异。此外,草鱼与黄颡鱼<sup>[5]</sup>、鳊、南方鲇 (*Silurus meridionalis*)<sup>[24]</sup> 及大西洋鲑 (*Salmo salar*)<sup>[25]</sup> 一样,头肾血管周围散布着肾上腺细胞群。鱼类头肾中的肾上腺组织(肾间组织细胞和嗜铬细胞),具有分泌参与水盐代谢及应激反应的儿茶酚胺类激素和皮质类固醇激素的功能。

在鱼类早期发育中,鱼体的特异性免疫系统受到限制,非特异性免疫及母源的免疫物质在鱼类抵御病原方面占有重要地位<sup>[7]</sup>。在胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*)<sup>[26]</sup>、南方鲇<sup>[27]</sup> 及长吻鮠 (*Leiostomus xanthurus*)<sup>[28]</sup> 的血细胞 PAS 染色中不同发育期的红细胞及原始白细胞 PAS 反应均呈阴性;幼稚期白细胞 PAS 反应开始出现阳性,随着细胞的不断发育,反应逐渐增强,到成熟细胞 PAS 反应达到最强,其中粒细胞及单核细胞阳性较强,淋巴细胞及血栓细胞较弱。卢全章等<sup>[29]</sup> 观察草鱼脾肾印迹片 PAS 阳性细胞的免疫细胞有不同发育阶段的粒细胞,幼单核细胞及单核细胞,幼淋巴细胞及淋巴细胞,在本实验中,PAS 阳性免疫细胞最早在头肾中出现于 7 dph,此时 IgM 阳性细胞尚未出现,间接表明草鱼在 7 dph 前,可能依靠母源免疫物质或非特异性免疫机制保护机

体。7~16 dph, PAS 阳性细胞中偶尔可见细胞质较小呈狭长的三角形,核质比较大,中等大小的弱阳性细胞,可能为淋巴细胞,但仍未见 IgM 阳性细胞,因此这段时期草鱼头肾并无产生 IgM 的功能,而 IgM 是系统发生和个体发育最早出现的抗体<sup>[30]</sup>,可以推断草鱼这段期间免疫防御机能仍由非特异性免疫系统执行。B 淋巴细胞表面受体之一的抗原受体化学本质是细胞表面免疫球蛋白,就草鱼的 B 细胞来说,已知的有 IgM、IgD 和 IgZ<sup>[31]</sup>,本实验观察的 IgM 阳性细胞为表达 IgM 的淋巴细胞。本实验免疫组化结果显示草鱼 IgM 阳性细胞最先于 17 dph(平均全长为 16mm)在头肾中散布,18 dph 体肾中亦可见少量 IgM 阳性细胞在肾小管间质之间分布。这与牙鲆<sup>[9]</sup>中膜 IgM 阳性细胞和 IgM 分泌细胞在检测到 IgM mRNA 表达后的 2~4 周出现与在鲤中用抗免疫球蛋白的多克隆抗体检测全鱼的细胞悬浮液,在受精后 14 d 的头肾中发现 IgM 阳性细胞<sup>[2]</sup>的时间相近。说明 17 dph 开始,草鱼头肾具有参与特异性免疫的细胞基础,而且非特异性免疫细胞与特异性免疫细胞共同发育。本实验中 20 dph 左右 PAS 阳性细胞面积百分比降低,可能由于血窦及微静脉的大量增多造成。而 60 dph 左右 PAS 及 IgM 阳性粒细胞面积百分比降低,可能因为肾上腺组织的增多及其他单核细胞、血细胞数量的增多。总之,依据头肾中血细胞的发育及分布情况可以分为 3 个阶段:1~6 dph,头肾无参与免疫反应的细胞;7~16 dph 头肾只具有参与非特异性免疫反应的细胞基础;17 dph 以后,不但具有非特异性免疫反应细胞而且具有参与特异性免疫反应的细胞基础,两者共同增殖。

Becker 等<sup>[12]</sup>研究表明同属鲤科的鲤头肾的发育不同于恒温动物,不只受到日龄的影响,其他内外环境因素对器官生理的影响也至关重要,因而用全长或体质量等形态学指标作为头肾发育的参考十分必要。本实验用曲线估计对草鱼全长与日龄的关系进行分析,得出全长与日龄呈 Cubic 函数关系,这与条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)<sup>[32]</sup>早期发育一致。这个关系函数可以为头肾发育与全长的关系提供依据。

头肾作为草鱼免疫器官的早期发育可以分为 3 个阶段:无参与免疫反应的细胞、只具有参与非特异性免疫反应的细胞以及参与非特异性免疫反

应及特异性免疫反应的细胞组织结构逐步发育完善;草鱼在 65 dph 后,头肾的组织形态发育与成鱼接近。本研究不仅深入了对免疫系统的认识,而且对其头肾发育成熟时间也有进一步认识,为了解草鱼的免疫系统的功能以及制定免疫接种的方案提供了科学依据。但是草鱼免疫时间的确定,需要脾脏,胸腺等免疫器官及鳃和肠的免疫相关组织的发育的理论支持,及不同日龄草鱼的免疫试验的验证。

感谢在取样过程中海大集团百容水产良种有限公司清远一场和清远二场的大力支持,同时中国科学院水生生物研究所聂品研究员为本实验提供草鱼 IgM 单抗特此感谢!

#### 参考文献:

- [1] 王方华,李安兴.草鱼病毒性出血病研究进展[J].南方水产,2006,2(3):66-71.
- [2] Zapata A, Diez B, Cejalvo T, et al. Ontogeny of the immune system of fish [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(2):126-136.
- [3] Salinas I, Zhang Y A, Sunyer J O. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2011, 35(12):1346-1365.
- [4] Meseguer J, Lopez-Ruiz A, Garcia-Ayala A. Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): An ultrastructural and cytochemical study [J]. Anatomical Record, 1995, 241(3):303-309.
- [5] 刘小玲,葛海燕,顾泽茂.黄颡鱼头肾的组织发生与组织结构研究[J].水生态学杂志,2009,2(3):108-110.
- [6] 张永安,孙宝剑,聂品.鱼类免疫组织和细胞的研究概况[J].水生生物学报,2000,24(6):648-654.
- [7] 吴金英,林浩然.斜带石斑鱼淋巴器官个体发育的组织学[J].动物学报,2003,49(6):819-828.
- [8] 田敬云,谢海侠,姚卫建,等.鳊鱼头肾的组织发生及成鱼头肾 B 淋巴细胞的分布[J].动物学报,2005,51(3):440-446.
- [9] Liu Y, Zhang S, Jiang G, et al. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 16(5):621-632.
- [10] Parker S, La Flamme A, Salinas I. The ontogeny of

- New Zealand groper (*Polyprion oxygeneios*) lymphoid organs and IgM [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 38(2): 215 - 223.
- [11] Lam S H, Chua H L, Gong Z, *et al.* Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: A gene expression profiling, *in situ* hybridization and immunological study [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, 28(1): 9 - 28.
- [12] Becker K, Fishelson L, Amselgruber W M. Cytological ontogenesis and involution of the thymus and head-kidney in juvenile and old domestic carp: Is ageing in fish a chronological or growth-related phenomenon? [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2001, 17(1): 1 - 13.
- [13] Solem S T, Stenvik J. Antibody repertoire development in teleosts-a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30(1 - 2): 57 - 76.
- [14] Dos Santos N M S, Romano N, de Sousa M, *et al.* Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2000, 10(7): 583 - 596.
- [15] Tian J Y, Xie H X, Zhang Y A, *et al.* Ontogeny of IgM-producing cells in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* identified by *in situ* hybridisation [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, 132(2 - 4): 146 - 152.
- [16] Petrie-Hanson L, Ainsworth A J. Ontogeny of channel catfish lymphoid organs [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2001, 81(1 - 2): 113 - 127.
- [17] Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, *et al.* The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: Identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z [J]. *Nature Immunology*, 2005, 6(3): 295 - 302.
- [18] Danilova N, Steiner L A. B cells develop in the zebrafish pancreas [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 2002, 99(21): 13711 - 13716.
- [19] Huttenhuis H B, Romano N, Van Oosterhoud C N, *et al.* The ontogeny of mucosal immune cells in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Anatomy and Embryology*, 2006, 211(1): 19 - 29.
- [20] Rombout J H W M, Huttenhuis H B T, Picchiatti S, *et al.* Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 19(5): 441 - 455.
- [21] 卢全章. 草鱼头肾免疫细胞组成和数量变化 [J]. *动物学研究*, 1998(1): 11 - 16.
- [22] 张琼宇, 范嗣刚, 罗琛. 草鱼 RAGs 的克隆及不同发育阶段的表达分析 [J]. *水生生物学报*, 2009, 33(5): 795 - 803.
- [23] Huttenhuis H B, Romano N, Van Oosterhoud C N, *et al.* The ontogeny of mucosal immune cells in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Anatomy and Embryology*, 2006, 211(1): 19 - 29.
- [24] 王志坚, 岳兴建, 张耀光. 南方鲇头肾的组织学和超微结构 [J]. *动物学研究*, 2004(4): 327 - 333.
- [25] Breau-nesj R, Bertheussen K, Kaplan G, *et al.* Salmonid macrophages: separation, *in vitro* culture and characterization [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1981, 4(2): 141 - 151.
- [26] 卢全章, 郭琼林. 草鱼肾脏、脾脏血细胞发育过程超微结构与细胞化学的研究 [J]. *水生生物学报*, 1994, 18(3): 240 - 246.
- [27] 陈晓耘. 南方鲇幼鱼血细胞发生的研究 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2000(3): 281 - 287.
- [28] 金丽, 张耀光. 长吻鮠血细胞发生的研究 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31(6): 807 - 816.
- [29] 金丽, 赵娜, 黄林, 等. 胭脂鱼外周血细胞的显微、超微结构与细胞化学观察 [J]. *水生生物学报*, 2011, 35(3): 550 - 556.
- [30] 田敬云. 鳊 B 淋巴细胞的发生和 T 淋巴细胞受体基因的克隆 [D]. 武汉: 水生生物研究所, 2007.
- [31] 严伟, 肖凡书, 聂品. 草鱼 IgM, IgD 和 IgZ 的抗体制备与组织表达分析 [J]. *水生生物学报*, 2012, 36(1): 35 - 40.
- [32] 何滔, 肖志忠, 刘清华, 等. 条石鲷早期发育阶段的生长模式 [J]. *水产学报*, 2012, 36(8): 1242 - 1248.

## Histological and immunohistochemical observations on the early development of head kidney in *Ctenopharyngodon idella*

LEI Xuebin<sup>1,2</sup>, CHANG Ouqin<sup>1</sup>, SHI Chunbin<sup>1</sup>, FU Xiaozhe<sup>1</sup>, WANG Yajun<sup>1</sup>, WU Shuqin<sup>1\*</sup>

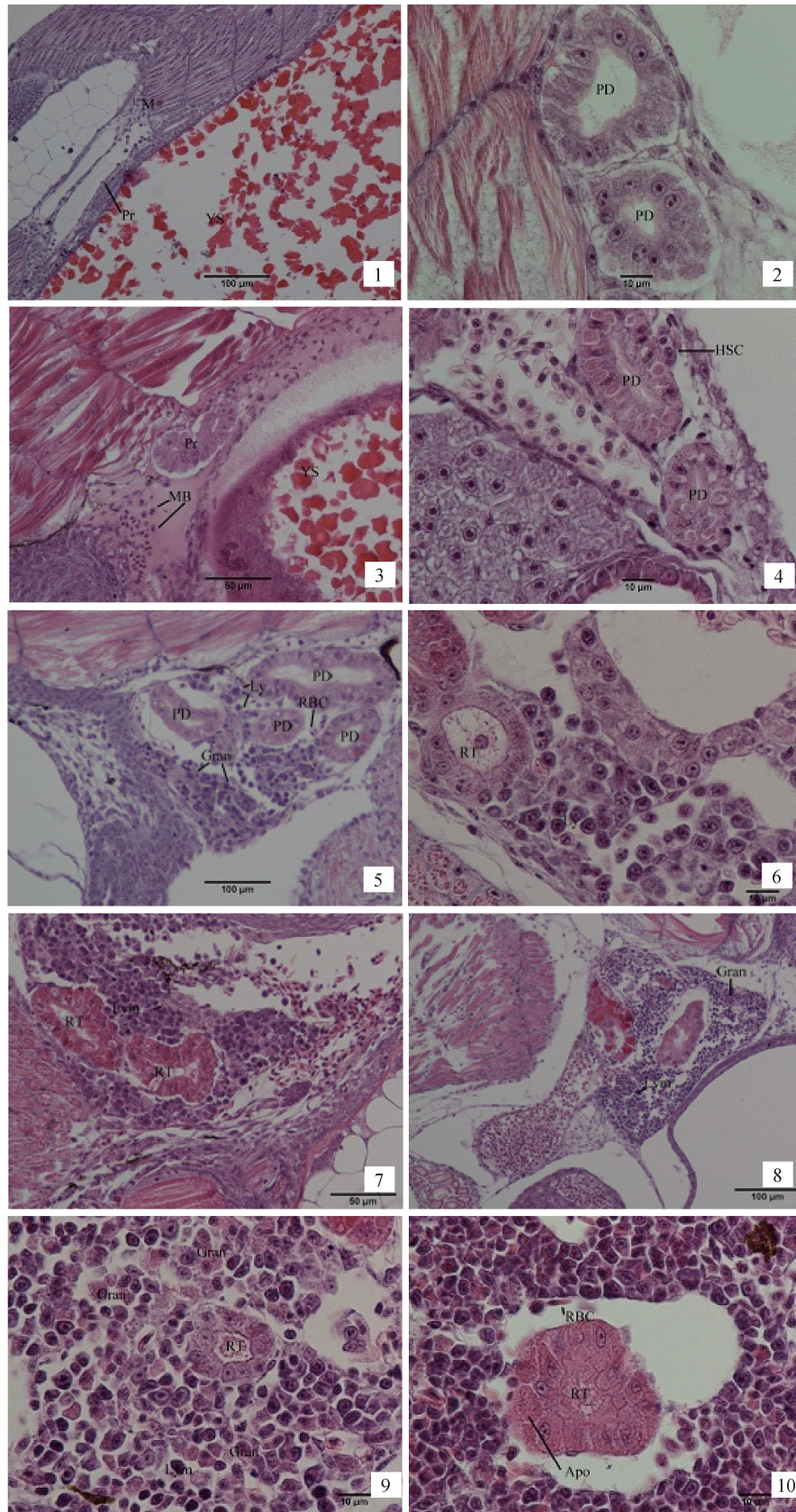
(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

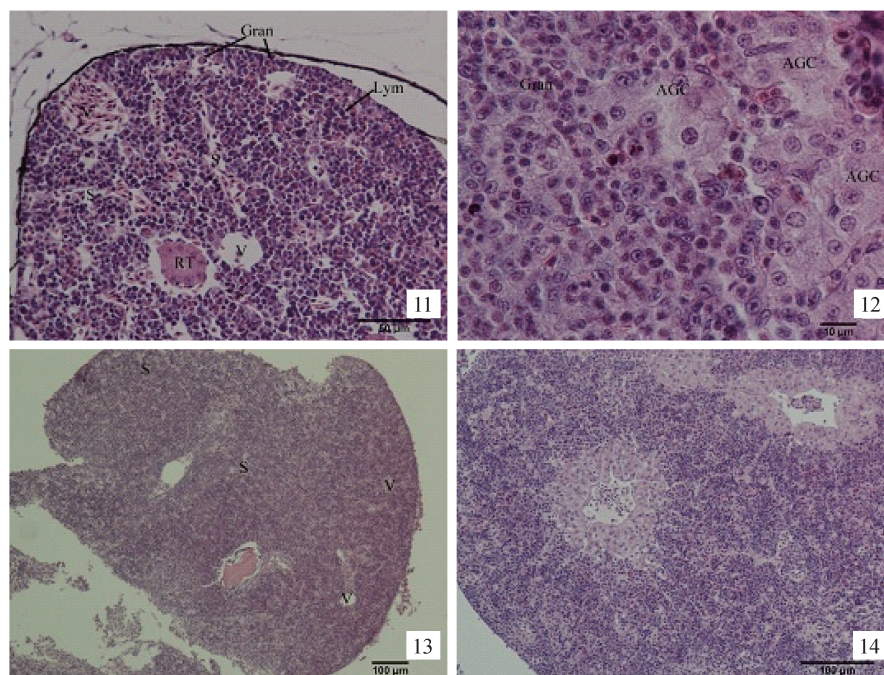
**Abstract:** Histogenesis of the head kidney was examined in the collected grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) from 1 to 103 days post hatching (dph). Histological technology was applied to learn the change of the structure of the head kidney and the changes in the distribution of IgM (immunoglobulin M) positive cells and PAS (periodic acid schiff reaction) positive cells in head kidney. The primordium of the head kidney formed at 6 dph. And in the primordium several undifferentiated hemopoietic stem cell spread among the renal tubules which were derived from the protonephridia. Then, the immune cells increased gradually due to the hemopoietic stem cells' differentiation from 7 dph to 16 dph. Between 17 dph and 103 dph, the renal tubules degenerated gradually and the lymph and haematogenous tissues sustained by the reticulo-endothelial system (RES) became the major component of the head kidney. By 65 dph, the head kidney was histologically similar to mature fishes, formed as a lymphoid-adrenergic tissue. Cells producing IgM as lymphocytes were detected by immunohistochemistry (IHC) stain. A few PAS positive cells were observed by 7 dph while several IgM positive cells were occasionally first detected at 17 dph. PAS positive cells and IgM positive cells were both increased with age and finally scattered all over the head kidney. In short, the head kidney in grass carp was almost mature histologically by 65 dph; as an immune organ, the development of the head-kidney in juvenile grass carp can be divided into three stages characterized by the I-absence of cells involved in immunity, II-presence of cells only involved in nonspecific immunity, and III-emergence and proliferation of cells involving in both nonspecific and specific immunity.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; head kidney; histogenesis; immunohistochemistry; PAS positive cells

**Corresponding author:** WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com







图版 I 草鱼头肾的发育

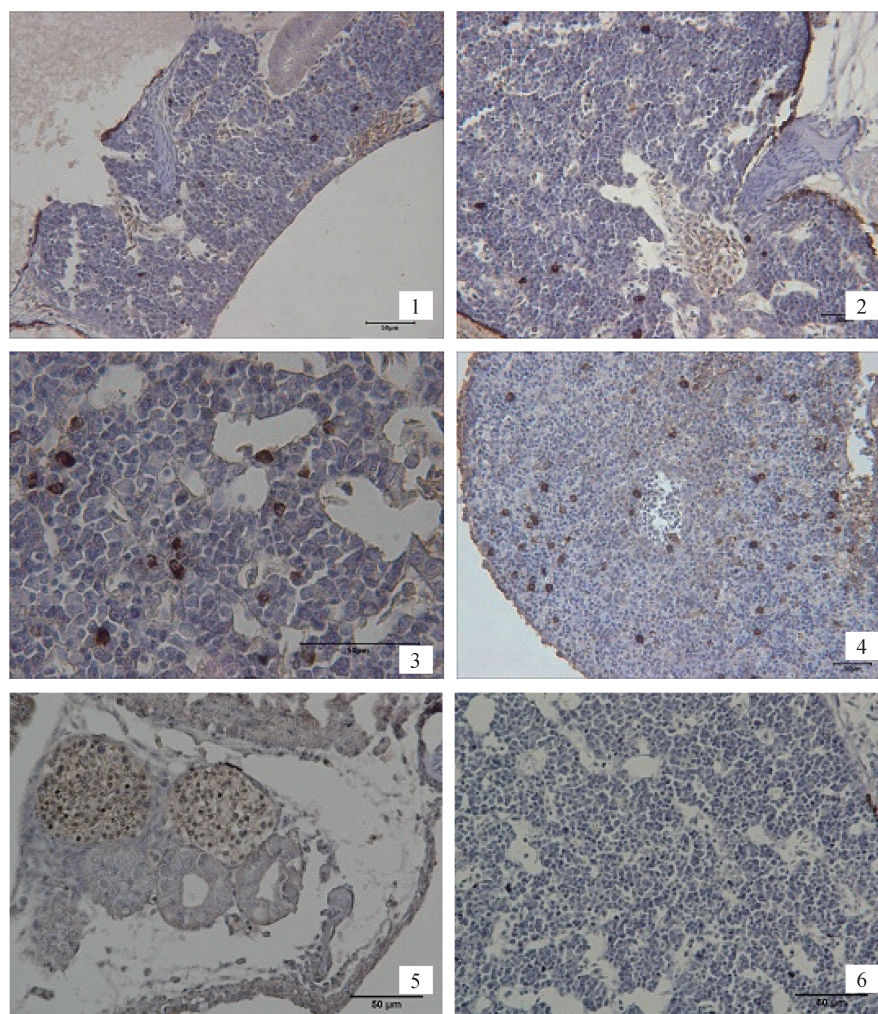
1. 1 dph(出膜后日龄)(TL 6.0 mm), 示原肾管沿着脊椎直抵躯干后部。标尺:100  $\mu\text{m}$ 。2. 2~5 dph(TL 7.0~8.0 mm), 示前肾管。标尺:10  $\mu\text{m}$ 。3. 3 dph(TL 7.5 mm), 示头肾外围有髓性红细胞分布。标尺:50  $\mu\text{m}$ 。4. 4.6 dph(TL 8.5 mm), 示造血干细胞及前肾管管壁细胞。标尺:10  $\mu\text{m}$ 。5. 5.7 dph(TL 9 mm), 示淋巴母细胞、红细胞及原粒细胞。标尺:100  $\mu\text{m}$ 。6. 6.8 dph(TL 10.2 mm), 示围绕微静脉放射状分布的淋巴母细胞。标尺:10  $\mu\text{m}$ 。7. 7.9 dph(TL 11.0 mm), 示直径较小核深染的淋巴细胞及肾小管上皮细胞。标尺:50  $\mu\text{m}$ 。8. 11 dph(TL 12.5 mm), 示淋巴细胞形成明显的集中区, 肾小管管壁上皮的立方上皮细胞比例增多。标尺:100  $\mu\text{m}$ 。9. 11 dph(TL 12.5 mm), 示粒细胞增多。标尺:10  $\mu\text{m}$ 。10. 17 dph(TL 16.0 mm), 示肾小管开始退化。标尺:10  $\mu\text{m}$ 。11. 18 dph(TL 16.0 mm), 示淋巴母细胞比例逐渐变小, 淋巴细胞比例逐渐增大, 血窦及头肾微静脉大幅增多。标尺:50  $\mu\text{m}$ 。12. 40 dph(TL 53.6 mm), 示肾上腺细胞团。标尺:10  $\mu\text{m}$ 。13. 40 dph以后, 微静脉和血窦呈相间分布, 微静脉与血窦间分散着淋巴细胞聚集区及粒细胞聚集区。标尺:100  $\mu\text{m}$ 。14. 85 dph及103 dph(TL 112.3~142.7 mm), 示肾小管退化完全消失, 头肾已经与成鱼的头肾形状组织结构接近。标尺:100  $\mu\text{m}$ 。

AG: 肾上腺; AGC: 肾上腺细胞; AGran: 粒细胞聚集区; Apo: 凋亡细胞; ALy: 淋巴细胞集中区; Gran: 粒细胞; HSC: 造血干细胞; Ly: 淋巴母细胞; Lym: 淋巴细胞; M: 肌肉; MB: 髓性红细胞; Pr: 原肾管; PD: 前肾管; RBC: 红细胞; RT: 肾小管; S: 血窦; V: 微静脉; YS: 卵黄囊。

### Plate I Ontogenetic development of *C. idella* head kidney

1. 1 day post hatching (dph) (total length (TL) 6.0 mm), showing the pronephridia along the spine stretching to the back of the torso. Bar = 100  $\mu\text{m}$ . 2. 2-5 dph (TL 7.0-8.0 mm), showing pronephric ducts. Bar = 10  $\mu\text{m}$ . 3. 3 dph (TL 7.5 mm), showing myeloid blood cells' distribution in periphery of head kidney. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . 4. 4.6 dph (TL 8.5 mm), showing hemopoietic stem cells and pronephric ducts wall's cells. Bar = 10  $\mu\text{m}$ . 5. 5.7 dph (TL 9 mm), showing lymphocytoblasts, red blood cells and granulocytes. Bar = 100  $\mu\text{m}$ . 6. 6.8 dph (TL 10.2 mm), showing lymphocytoblasts distributed around venules in a radialized pattern. Bar = 10  $\mu\text{m}$ . 7. 7.9 dph (TL 11.0 mm), showing lymphocytes with minor diameter and deep-dyeable nucleus and renal tubular epithelial cells. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . 8. 11 dph (TL 12.5 mm), showing lymphoid accumulation and increase in the percentage of cubical epithelium cells in renal tubules. Bar = 100  $\mu\text{m}$ . 9. 11 dph (TL 12.5 mm), showing increase in granulocytes' number. Bar = 10  $\mu\text{m}$ . 10. 17 dph (TL 16.0 mm), showing degeneration of renal tubules. Bar = 10  $\mu\text{m}$ . 11. 18 dph (TL 16.0 mm), showing decrease in the proportion of lymphocytoblasts and increase in the proportion of lymphocytes and sinusoids and venules. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . 12. 40 dph (TL 53.6 mm), showing adrenal gland cell clusters. Bar = 10  $\mu\text{m}$ . 13. After 40 dph, head kidney venules and sinusoids showed an alternating distribution, between which accumulation areas of lymphocytes and granulocytes were found. Bar = 100  $\mu\text{m}$ . 14. 85 dph and 103 dph (TL 112.3-142.7 mm), showing complete regression of renal tubules, and organizational structure of the head kidney similar to the adult fish. Bar = 100  $\mu\text{m}$ .

AG: adrenal gland; AGC: adrenal gland cells; AGran: granulocytes accumulation; Apo: apoptotic cell; ALy: lymphocytes accumulation; Gran: granulocyte; HSC: hemopoietic stem cell; Ly: lymphocytoblast; Lym: lymphocyte; M: muscle; MB: Myeloid blood cell; Pr: pronephridia; PD: pronephric duct; RBC: red blood cell; RT: renal tubule; S: sinusoid; V: venule; YS: yolk sac.

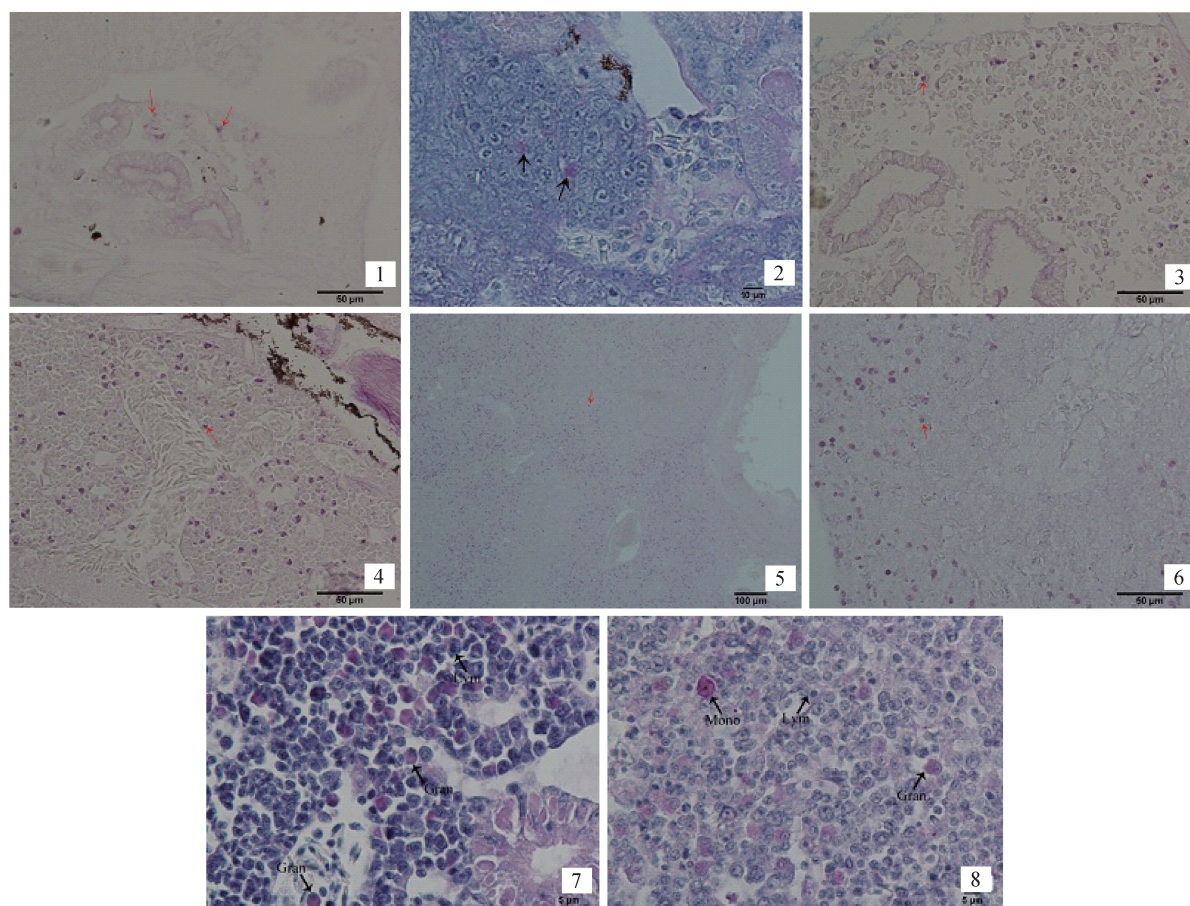


图版 II 草鱼 IgM 阳性细胞的发育

1. 17 dph (TL 16.0 mm), 示 IgM 阳性细胞分布在微静脉周围及免疫细胞集中区。2. 20 dph (TL 19.0 mm), 示 IgM 阳性细胞形态多样, 主要散在分布于外周。3. 示细胞质及细胞膜表面可见不同程度棕黄色着染的 IgM 阳性细胞。4. 示 IgM 阳性细胞在淋巴细胞集中区分布密集。5. 8 dph (TL 10.0 mm), 示阴性, 无阳性细胞。6. 30 dph (TL 29.0 mm), 示阴性对照。图中标尺为 50  $\mu\text{m}$ 。

**Plate II Ontogenetic development of *C. idella* IgM positive cells**

1. 17 dph (TL 16.0 mm), showing IgM positive cells distributed around venules and in accumulation area of immune cells. 2. 20 dph (TL 19.0 mm), different shaped positive cells distributed in the periphery. 3. IgM positive cells was stained with different degrees of claybank in the cytoplasm and membrane. 4. IgM positive cells distributed densely in accumulation area of lymphocytes. 5. 8 dph (TL 10.0 mm), negative section, no positive cells were seen. 6. 30 dph (TL 29.0 mm), showing the negative control. Bar = 50  $\mu\text{m}$ .



图版Ⅲ 草鱼 PAS 阳性细胞的发育

1. 7 dph(TL 9.0 mm), 示 PAS 阳性细胞。标尺: 50  $\mu\text{m}$ 。2. 8 dph(TL 10.0 mm), 示苏木素轻度复染的 PAS 阳性细胞。标尺: 10  $\mu\text{m}$ 。3. 14 dph(TL 14.5 mm), 示 PAS 阳性细胞在头肾外周较密集。标尺: 50  $\mu\text{m}$ 。4. 16 dph(TL 15.5 mm), 示头肾血管中 PAS 阳性细胞。标尺: 50  $\mu\text{m}$ 。5. 19 ~ 30 dph(TL 17.0 ~ 29.0 mm), 示无 PAS 阳性细胞区域面积比例增大。标尺: 100  $\mu\text{m}$ 。6. 40 ~ 103 dph(TL 53.6 ~ 142.7 mm), 示肾上腺细胞团间的 PAS 阳性细胞, PAS 阳性细胞密集区在头肾呈网格状分布。标尺: 50  $\mu\text{m}$ 。7. 25 dph(TL 23.4 mm), 示 PAS-苏木素染色的阳性细胞, 主要为粒细胞。标尺: 5  $\mu\text{m}$ 。8. 103 dph(TL 142.7 mm), 示 PAS-苏木素染色的阳性细胞包括粒细胞, 淋巴细胞和单核细胞。标尺: 5  $\mu\text{m}$ 。

Gran: 粒细胞; Lym: 淋巴细胞; Mono: 单核细胞。

### Plate III Ontogenetic development of *C. idella* PAS positive cells

1. 7 dph(TL 9.0 mm), showing periodic acid-Schiff(PAS) positive cells. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . 2. 8 dph(TL 10.0 mm), showing PAS positive cells slightly counter-stained with haematoxylin. Bar = 10  $\mu\text{m}$ . 3. 14 dph(TL 14.5 mm), showing PAS positive cells distributed densely in the periphery of head kidney. 4. 16 dph(TL 15.5 mm), showing PAS positive cells distributed in the vessel of the head kidney. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . 5. 19 ~ 30 dph(TL 17.0 ~ 29.0 mm), showing the increase of PAS negative cells area. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . 6. 40 ~ 103 dph(TL 53.6 ~ 142.7 mm), showing PAS positive cells distributed among adrenal gland cell clusters, and a latticed distribution of PAS positive cell accumulation. Bar = 100  $\mu\text{m}$ . 7. 25 dph(TL 23.4 mm), showing PAS positive cells slightly counter-stained with haematoxylin, mainly constituted by granulocytes. Bar = 5  $\mu\text{m}$ . 8. 103 dph(TL 142.7 mm), showing PAS positive cells slightly counter-stained with haematoxylin, mainly constituted by granulocytes, lymphocytes and monocytes. Bar = 5  $\mu\text{m}$ .

Gran: granulocyte; Lym: lymphocyte; Mono: monocyte.