



棘胸蛙脾脏的进化水平分析与血脾屏障的组成及功能

任思宇^{1,2}, 王雯慧^{1*}, 汪开毓³, 耿毅³, 陈德芳⁴

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070;

2. 重庆三峡职业学院动物科技学院, 重庆 万州 404155;

3. 四川农业大学鱼病研究中心, 四川 成都 611130;

4. 四川农业大学动物科技学院, 四川 成都 611130)

摘要: 为明确棘胸蛙脾脏的进化水平及血脾屏障的组成与功能, 采用组织学与电镜技术, 酸性 α -乙酸钠酚酯酶、酸性磷酸酶及碱性磷酸酶染色, 并结合活体注射台盼蓝染液对棘胸蛙脾脏进行了研究。结果显示, 棘胸蛙脾脏出现了红髓与白髓的分化, 但边界不清, 无边缘区结构, 未形成动脉周围淋巴鞘与生发中心; 椭球体少量分布于红髓与白髓的边界区, 未形成椭球周围淋巴鞘。由黑色素巨噬细胞聚集而成的黑色素巨噬细胞中心分散在白髓内部, 或包裹于白髓四周。脾脏内细胞对酸性 α -乙酸钠酚酯酶染色呈阴性。超微结构观察与台盼蓝活体染色实验结果显示, 棘胸蛙的血脾屏障由脾索中的网状细胞及游离的巨噬细胞组成, 吞噬过程中酸性磷酸酶呈现出规律性的变化。研究表明, 棘胸蛙脾脏的进化处于中等水平, 脾脏内已具备血脾屏障结构保障着白髓内环境的稳定。实验结果完善了棘胸蛙脾脏结构与功能的相关研究资料, 为深入探索无尾类两栖动物的免疫应答机制提供了依据。

关键词: 棘胸蛙; 血脾屏障; 黑色素巨噬细胞; 网状细胞; 椭球体

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

棘胸蛙 (*Quasipaa spinosa*), 俗称石棒、石蛙等, 属叉舌蛙科 (Dicroglossidae) 棘胸蛙属 (*Quasipaa*), 主要分布在我国南部山区的溪流生境中^[1]。随着全球环境气候的改变, 棘胸蛙的自然栖息环境受到了严重破坏, 野生数量大幅缩减, 国际自然保护联盟 (IUCN) 已在 2004 年将其列为全球性易危物种^[2]。2020 年 5 月末, 《农业农村部、国家林业和草原局关于进一步规范蛙类保护管理的通知》明确了棘胸蛙将由渔业主管部门纳入水生动物进行管理, 这为人工养殖提供了重要依据, 更有利于保护物种的延续性与多

样性。

尽管无尾类两栖动物的经济价值高, 但养殖中易发生高致死的传染病, 故生长性能与疾病防控是眼下关注的重要领域^[3-9], 而针对免疫器官结构与功能的研究却相对缺乏, 这导致人们在探索不同无尾类两栖动物免疫系统与免疫机制的差异时捉襟见肘, 严重制约了高效免疫措施的深入研发。在国外, 人们发现不同无尾类两栖动物的脾脏结构与功能差异巨大。例如, 黄背条蟾 (*Bufo calamita*) 与非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的脾脏中已出现边缘区, 并将红髓与白髓彻底

收稿日期: 2020-08-30 修回日期: 2020-11-11

资助项目: 国家自然科学基金 (31960693, 31760723); 教育部“畜牧兽医高水平专业群建设”项目; 重庆市教委“双基地建设”项目

第一作者: 任思宇 (照片), 从事水生动物疾病病理学与免疫学研究, E-mail: youbuzhangpeng@163.com

通信作者: 王雯慧, E-mail: ww777@126.com



分开,而尾蟾(*Ascaphus trurri*)与锄足蟾(*Scaphiopus couchi*)的淋巴细胞仍弥散地分布于脾脏内,未见白髓的分化^[10]。在国内,研究无尾类两栖动物脾脏进化水平的资料很少,仅见中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*)与黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)的些许报道^[11-12]。棘胸蛙作为中国南方特有的大型食用蛙类,这方面的研究资料仍较缺乏。因此,本实验采用系统的组织学方法与台盼蓝活体染色实验,结合电镜与免疫组化技术,明确了棘胸蛙脾脏的进化水平,并探索了血脾屏障(blood-spleen barrier, BSB)的组成与功能,旨在为今后免疫学与病理学的拓展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

从重庆市彭水县某棘胸蛙养殖场购入体质量(130±20)g的健康棘胸蛙150余尾,其中雄蛙10尾,剩余为雌蛙,置于玻璃缸(1.0 m×0.5 m×0.5 m)中暂养1周后使用。玻璃缸底部约1/3的面积用光滑的砖石铺设干养区。每日换水1次,保持湿养区内水深约为1 cm,维持环境温度为(25±2)℃。每日8:00和18:00投喂养殖场自繁的黄粉虫,自由采食。

实验所用台盼蓝(T8075-5 g)与肥大细胞染色液(甲苯胺蓝法, G3670-100 mL)购于Solarbio公司,酸性磷酸酶染液(偶氮偶联法)、碱性磷酸酶染液(偶氮偶联法)与酸性 α -乙酸萘酚酯酶染色液(ANAE法)购于北京雷根生物技术有限公司,2.5%戊二醛固定液(电镜专用)与Bouin氏液购于PHYGENE公司,10%中性甲醛固定液购于浙江金华同和生物技术有限公司。

1.2 组织学研究

随机选取25尾健康棘胸蛙(其中雌性20尾,雄性5尾),三卡因(MS-222)麻醉后毁髓取脾脏,将脾脏分为两部分固定于Bouin氏液与10%中性甲醛中,分别用于苏木素-伊红(H.E)与肥大细胞染色。参照贺扬^[13]报道的masson三色法染色观察脾脏内胶原纤维的分布。

1.3 酸性 α -乙酸萘酚酯酶染色(ANAE法)

随机选取15尾健康棘胸蛙(其中雌性10尾,雄性5尾),参照“组织学研究”中的方法取出脾脏,采集少量作为电镜样品,剩余部分用于ANAE

染色;选用健康小鼠的脾脏作为阳性对照。制作的冰冻切片(Leica CM1520),经ANAE固定液处理10 min后水洗;再放入ANAE孵育液中20℃避光孵育1 h;最后,经甲基绿染色液复染10 min,短暂水洗后观察。

1.4 透射电镜与扫描电镜观察

电镜样品用浓度为2.5%的戊二醛于4℃条件下固定48 h。透射电镜样品经中性磷酸缓冲液(PBS)洗涤后放入1%锇酸中4℃固定2~4 h;丙酮梯度脱水后,放入1:1的环氧树脂和丙酮中置换2 h;再置于100%的环氧树脂中置换2 h(40℃);包埋固化后用醋酸双氧铀-柠檬酸铅进行染色,透射电子显微镜(日立H-600IV)观察。扫描电镜样品用PBS洗涤2次后,再用4%的蔗糖溶液洗涤5 min;梯度酒精脱水后黏附于导电胶上;经临界点干燥,真空喷镀处理后,扫描电镜(Inspect, 美国FEI)观察。

1.5 血脾屏障研究

因雄蛙在养殖群体中的比例非常低,体质量相似的雄蛙无法满足雌雄各半的要求,且雌雄之间的生长速率差别较大,为排除不同发育阶段所造成的干扰,也因雄蛙数量的制约,本实验选择体质量相似的健康雌蛙来研究血脾屏障的相关特征。实验组共65尾,每尾腹腔内注射0.1 mL 1%的台盼蓝溶液,分别于注射前与注射后的0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、16 h、24 h、48 h、72 h、5 d、8 d和10 d随机选取5尾,按照“组织学研究”中的方法取脾脏后均分,用于石蜡切片与冰冻切片。对照组共36尾,每尾腹腔注射0.1 mL的灭菌生理盐水,于相同时间点随机选取3尾,取脾脏后制作冰冻切片。此外,另选10尾棘胸蛙,MS-222麻醉后再使用盐酸利多卡因(规格:2 mL, 4 mg)进行胸区局麻,打开胸腔后心脏内注射0.1 mL 1%的台盼蓝,于0.5和1 h时各选取5尾,剖解后取脾脏制作石蜡切片。

石蜡包埋的组织均选择连续的2张切片,一张用于H.E染色,另一张常规脱蜡后直接封片,观察脾脏组织内台盼蓝的分布。对腹腔注射后动态采集的样品,制作冰冻切片后采用偶氮偶联法检测脾脏内酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)与碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)含量的动态变化。

2 结果

2.1 棘胸蛙脾脏的形态与脾体指数

棘胸蛙脾脏位于肠系膜上, 为深红色的椭圆状器官, 长 0.6~0.8 cm, 宽 0.5~0.7 cm, 厚 0.4~0.6 cm。脾体指数为 0.06%~0.13%, 脾门位于脾脏一侧的近中线处(图 1)。

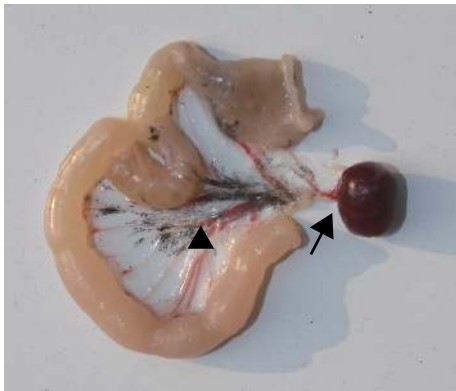


图 1 棘胸蛙脾脏

脾脏位于肠系膜上(▲), 脾脏一侧近中线处为脾门(→)

Fig. 1 Spleen of *Q. spinosa*

The spleen was attached to the mesentery (▲), the hilus lienis was closed to the midline on one side of the spleen (→)

2.2 棘胸蛙脾脏组织学结构

雌性棘胸蛙与雄性棘胸蛙的脾脏组织学结构完全一致, 脾脏被膜厚 20.01~33.29 μm , 由间皮与薄层结缔组织构成。间皮为单层扁平上皮, 被覆于表面(图版 I-1, 2), 未见被膜向脾实质内延伸形成小梁。脾脏实质分为红髓与白髓两部分, 二者之间边界模糊, 未发现边缘区结构(图版 I-1)。红髓由脾索与脾窦组成。靠近边界区的红髓血液充盈, 索状结构明显, 由网状细胞与弥散的淋巴细胞组成。脾窦位于脾索之间, 窦内有大量的红细胞, 少量的浆细胞与单核细胞。光镜下, 脾窦的内皮细胞不易观察。在边界区可见少量的椭球体(图版 I-1, 3), 内皮为立方状上皮, 周围分布有淋巴细胞与网状细胞, 但未形成椭球体周围淋巴鞘(periellosoidal lymphatic sheaths, PELS)(图版 I-1, 4)。白髓由密集的淋巴细胞与少量的网状细胞聚集而成, 未发育出动脉周围淋巴鞘(periarterolar lymphatic sheath, PALS)与生发中心(germinal centre, GC)。白髓内部亦可见小静脉及少量血窦的分布(图版 I-5),

四周及内部靠近血管的区域常分布有个体较大的黑色素巨噬细胞, 它们通常聚集在一起, 形成黑色素巨噬细胞中心(melano-macrophage centres, MMCs)(图版 I-6), 大量的色素沉积于细胞内, 亦可见明显细胞残体及其他降解产物(图版 I-7, 8)。被膜及动脉血管的管壁上有大量的胶原纤维, 脾索中亦有少量分布, 起支架作用(图版 I-9, 10)。

2.3 肥大细胞与 ANAE 染色

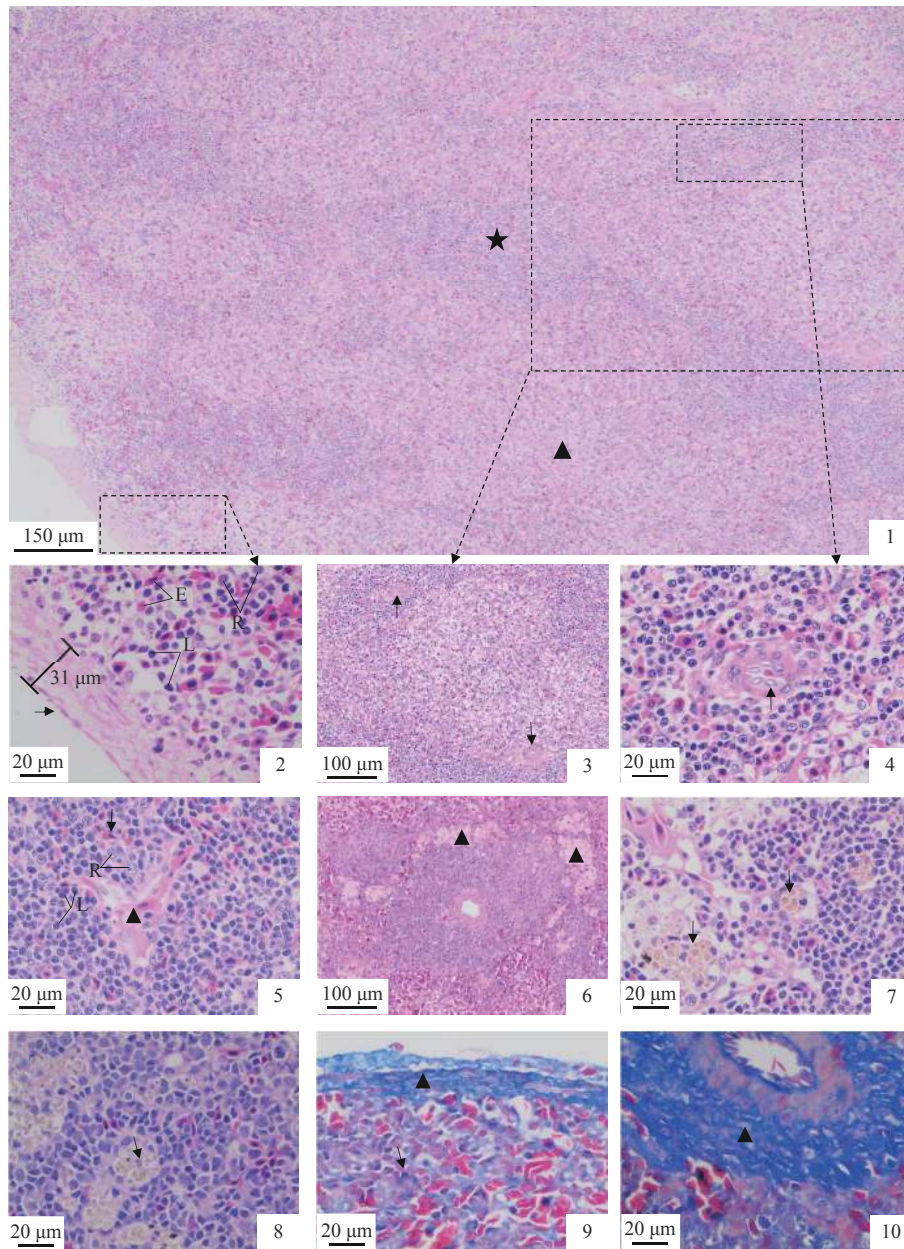
甲苯胺蓝染色显示血管附近及脾索中零散分布有含蓝色颗粒的肥大细胞(图版 II-1, 2)。ANAE 染色结果显示, 棘胸蛙脾脏内细胞的胞浆中未出现任何红色的颗粒信号, 均呈阴性(图版 II-3); 对照组小鼠脾脏内的白髓有大面积的阳性信号, 尤其动脉周围淋巴鞘四周的红色信号更为显著(图版 II-4)。

2.4 棘胸蛙脾脏的超微结构观察

透射电镜观察显示, 胶原纤维与网状细胞相互嵌合构成脾索的主体, 特殊延长的单层扁平细胞紧贴着脾索形成血窦(图版 III-1)。脾索中的网状细胞有两种类型, 在血液丰富的区域, 网状细胞具有明显的细胞突起, 可与血窦内及微通道中的血细胞直接接触, 内部可见少量的溶酶体(图版 III-2); 当具有细胞突起的网状细胞衰老时, 胞内溶酶体增加, 可见些许沉积的色素颗粒(图版 III-3)。在血液含量较少的区域, 网状细胞无细胞突起, 电子密度适中, 其内脂滴和内质网明显(图版 III-4)。血窦中的淋巴细胞有明显的突起(图版 III-5), 浆细胞中有大量的粗面内质网(图版 III-6), 静脉血管内可见核分为两叶的嗜中性粒细胞(图版 III-7)。弥散分布于脾索的巨噬细胞内可见明显的溶酶体, 细胞核呈肾型(图版 III-8)。成熟的黑色素巨噬细胞突起消失, 细胞内髓鞘样结构明显, 伴有大量的色素颗粒沉积, 溶酶体严重肿胀, 可见明显的代谢残片(图版 III-9)。扫描电镜观察显示纤维与细胞相互交织构成脾索, 不规则的血窦相互连通位于脾索之间(图版 III-10)。

2.5 棘胸蛙脾脏的血脾屏障结构

腹腔注射台盼蓝染色液 1 h, 首次观察到少量蓝色信号分布于红髓内游离的巨噬细胞中(图版 IV-1); 2 h 时, 红髓内吞噬有台盼蓝颗粒的

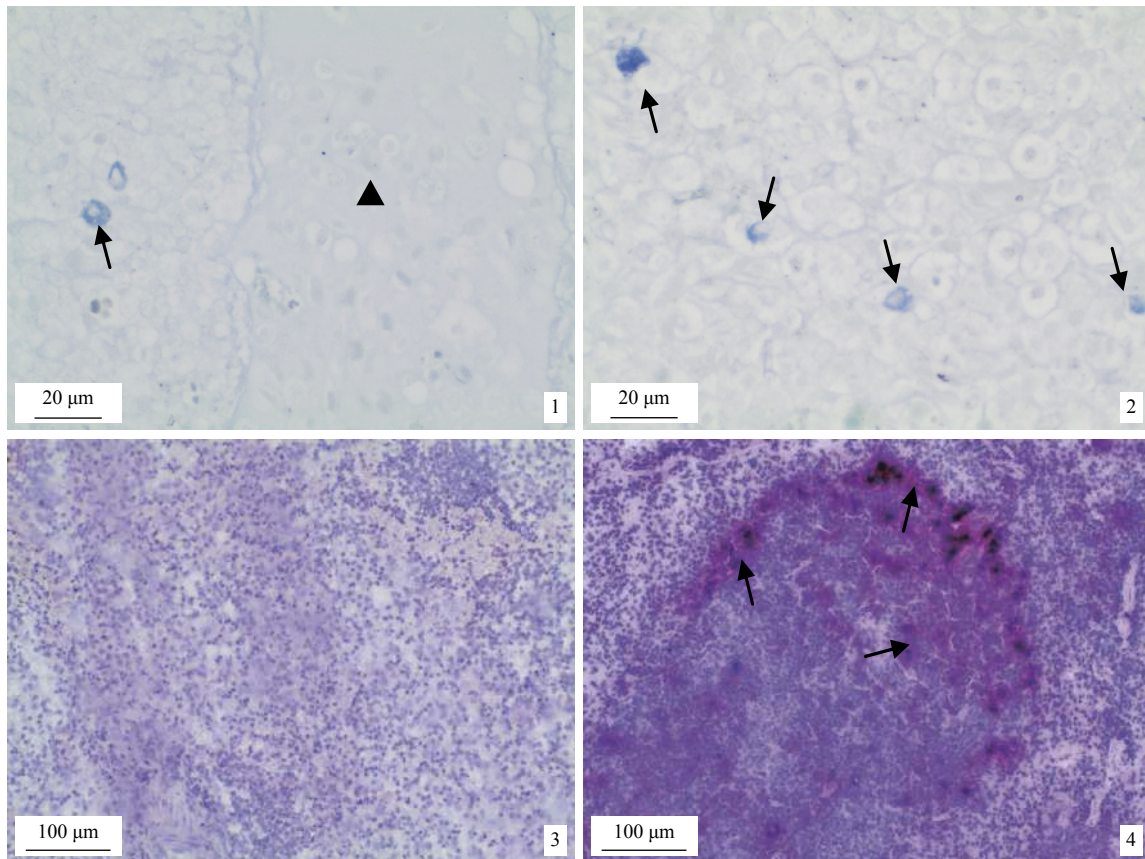


图版 I 棘胸蛙脾脏正常组织结构

1. 淋巴细胞聚集形成白髓, 未见动脉周围淋巴鞘与生发中心 (★. 白髓, ▲. 红髓), H.E; 2. 被膜结构 (→. 间皮, 被膜厚约 31 μm , L. 淋巴细胞, E. 红细胞, R. 网状细胞), H.E; 3. 边界区可见椭球体 (→), 缺乏边缘区, H.E; 4. 椭球体内皮为立方状上皮 (→), H.E; 5. 白髓内分布有小静脉与少量血窦 (→. 血窦, ▲. 小静脉, L. 淋巴细胞, R. 网状细胞), H.E; 6. 白髓周围的 MMCs (▲), H.E; 7. 白髓内的 MMCs (→), H.E; 8. MMCs 内的细胞残片 (→), H.E; 9. 被膜 (▲) 与脾索 (→) 中的胶原纤维, Masson 三色法; 10. 脾脏内动脉血管壁上分布有大量的胶原纤维 (▲), Masson 三色法

Plate I Histological structure of *Q. spinosa* spleen

1. the lymphocytes were clustered to form the white pulp without periarterial lymphatic sheath and germinal center (★ showing the white pulp, ▲ showing the red pulp), H.E; 2. the splenic capsule (→ showing mesothelium, the thickness of the splenic capsule was 31 μm , L showing lymphocyte, E showing erythrocyte, R showing reticular cell), H.E; 3. two ellipsoids were located at the boundary region, which lack the marginal zone (→ showing ellipsoids), H.E; 4. the ellipsoids were composed of the cub-shaped cells (→ showing cub-shaped cells), H.E; 5. the smaller splenic vein (▲) and blood sinus (→) existed in white pulp (L showing lymphocyte, R showing reticular cell), H.E; 6. the white pulp was surrounded by MMCs (▲), H.E; 7. MMCs were dispersed in white pulp (→), H.E; 8. cell debris in MMCs (→), H.E; 9. the green collagen fibers existed in splenic capsule and splenic cord (▲ showing the splenic capsule, → showing splenic cord), Masson; 10. the green collagen fibers existed in the wall of arteriole (▲), Masson



图版 II 甲苯胺蓝染色与 ANAE 染色

1. 少量的肥大细胞 (→) 分布于静脉周围 (▲), 甲苯胺蓝染色; 2. 脾索中弥散分布有少量的肥大细胞 (→), 甲苯胺蓝染色; 3. 棘胸蛙脾脏呈阴性, ANAE 染色; 4. 阳性信号包围着小鼠的动脉周围淋巴鞘 (→), ANAE 染色

Plate II Mast cell stain and ANAE

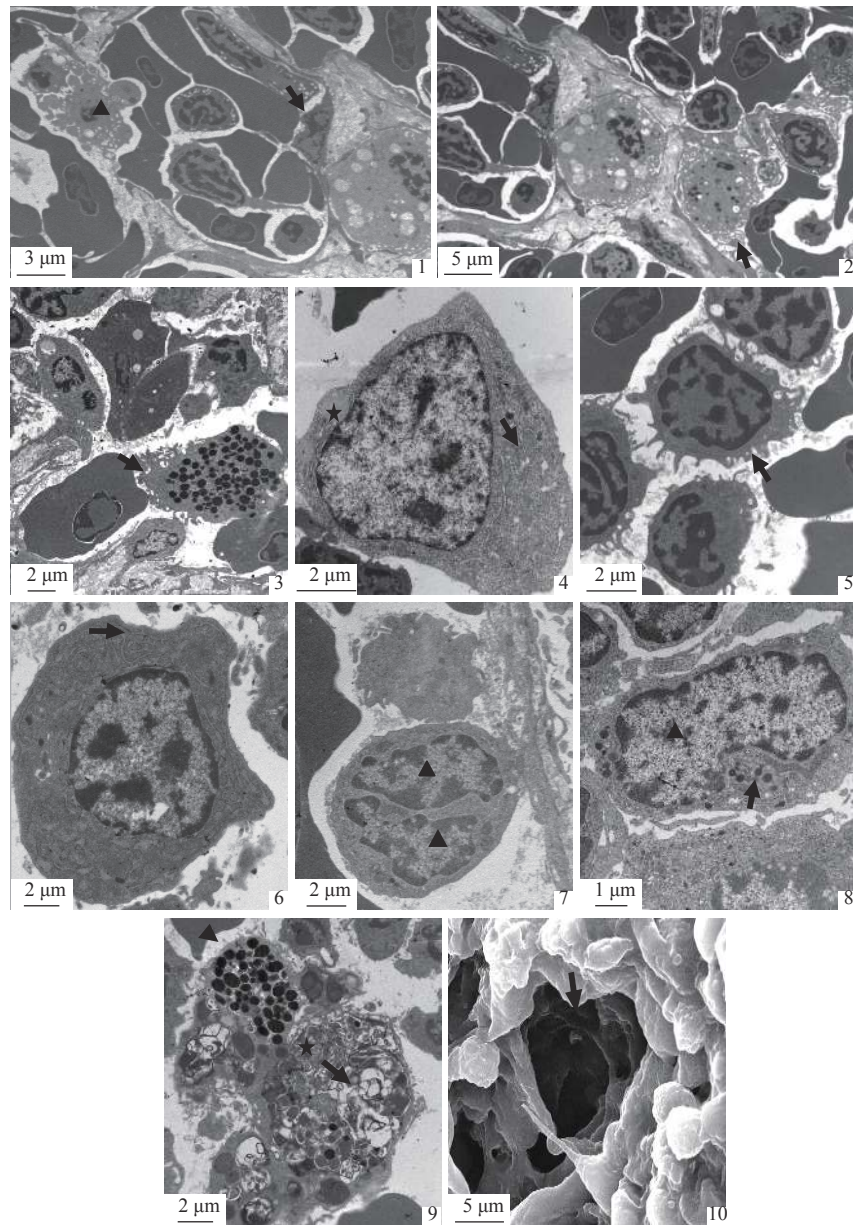
1. a few of mast cells were distributed nearby the veins (→ showing the mast cells, ▲ show the vein), toluidine blue staining; 2. several mast cells were dispersed in red pulp (→), toluidine blue staining; 3. the result was negative in *Q. spinosa* spleen, ANAE; 4. positive signals were distributed around the PALS in mice spleen (→), ANAE

巨噬细胞数量增加; 同时, 脾索网状细胞出现微弱的蓝色信号 (图版 IV-2)。4~16 h, 红髓中蓝色信号弥漫性地分布于脾索的网状细胞内, 台盼蓝颗粒粒径增大, 颜色加深 (图版 IV-3, 4)。白髓内的血管中偶见局限于细胞内的蓝色信号 (图版 IV-5)。24~48 h, 弥漫性分布的蓝色信号减弱, 白髓内依旧未见蓝色信号 (图版 IV-6)。72 h, 红髓中弥散分布的蓝色信号消失, 但散在的台盼蓝颗粒依然在吞噬细胞内可见 (图版 IV-7)。10 d 时, 脾脏内仅存少量的蓝色信号 (图版 IV-8)。实验过程中, 白髓内淋巴细胞聚集的区域从未发现蓝色信号, MMCs 与椭圆体上皮及相关细胞内也从未见台盼蓝的沉积 (图版 IV-9, 10)。心脏途径注射的棘胸蛙在 0.5 h 时即可在脾脏中发现蓝色信号, 吞噬台盼蓝的细胞类型与出现位置和

腹腔注射途径一致 (图版 IV-11)。

2.6 棘胸蛙脾脏 ACP 与 AKP 的变化

正常状态下, 棘胸蛙脾脏内仅 MMCs 含有极少的 ACP (图版 V-1)。腹腔注射台盼蓝后 2 h, ACP 含量逐步增加, 脾索内阳性信号增强 (图版 V-2); 4 h 时, 脾索与靠近血管的 MMCs 内 ACP 含量骤然升高, 棕红色的阳性信号显著 (图版 V-3); 8~16 h, 被膜下与白髓内 MMCs 的 ACP 含量升高 (图版 V-4, 5)。24 h 时, 脾索 ACP 的含量有所下降, 但 MMCs 内红色信号依然明显 (图版 V-6)。48 h 起, ACP 含量逐步恢复常态 (图版 V-7)。整个过程中, 对照组 ACP 未出现动态变化, 与注射前的正常蛙一致, 仅可见微量的红色信号 (图版 V-8)。正常蛙脾脏内 AKP 的染色结果为阴性 (图版 V-9), 实验组与对照组的 AKP 均未发生

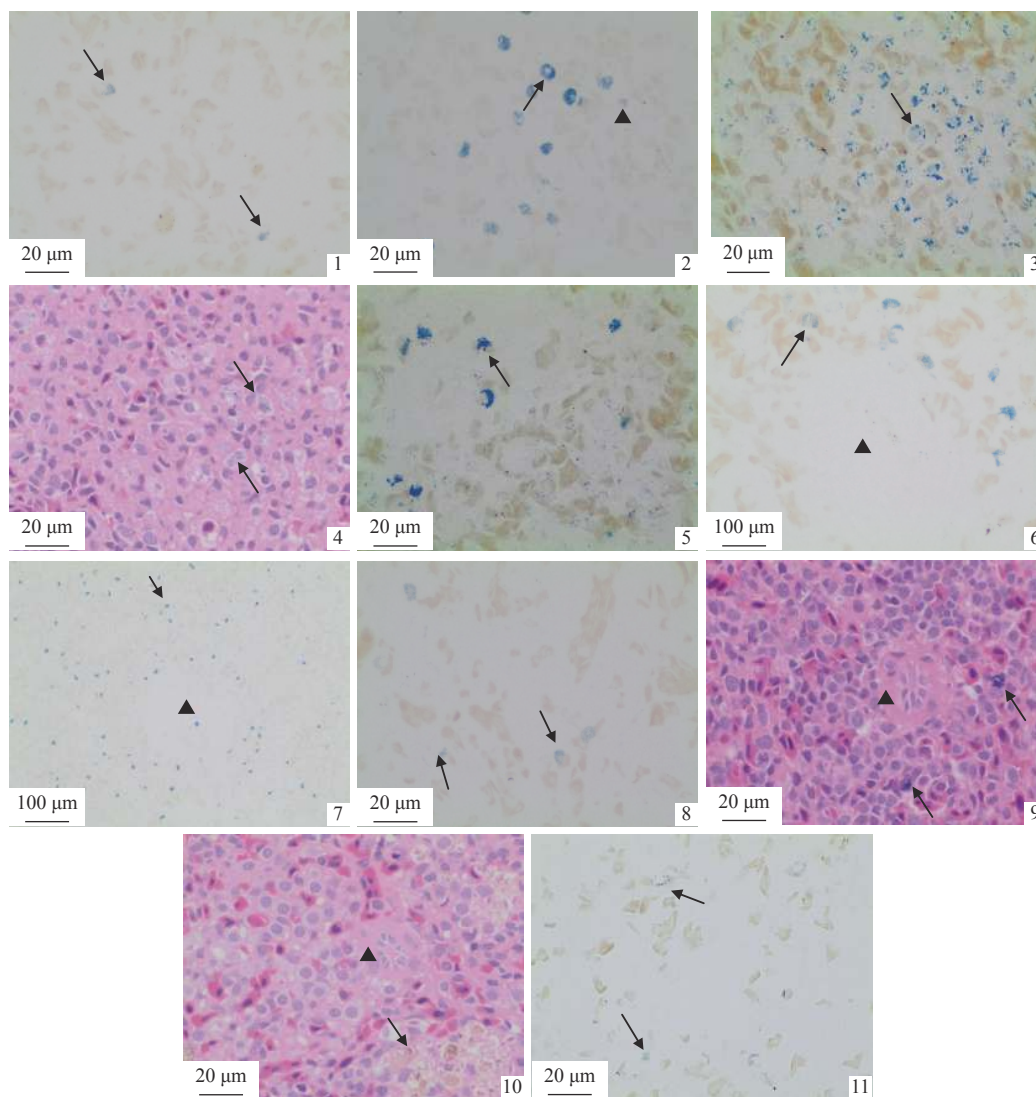


图版 III 棘胸蛙脾脏的透射电镜与扫描电镜观察

1. 特殊延长的单层扁平上皮细胞组成血窦内皮 (→), 具有细胞突起的网状细胞 (▲) 直接接触血细胞; 2. 脾索上带有细胞突起的网状细胞 (→); 3. 衰老的网状细胞内溶酶体增加, 间杂有色素颗粒 (→); 4. 无细胞突起的网状细胞, 内含脂滴 (→) 与内质网 (★); 5. 淋巴细胞 (→); 6. 浆细胞粗面内质网明显 (→); 7. 静脉血管内的嗜中性粒细胞, 核分为两叶 (▲); 8. 巨噬细胞的胞核呈肾型, 内含大量的溶酶体 (▲. 细胞核, →. 溶酶体); 9. 黑色素巨噬细胞, 色素颗粒大量沉积, 髓鞘样结构明显, 溶酶体严重肿胀 (→. 肿胀的溶酶体, ▲. 色素颗粒, ★. 髓鞘样结构); 10. 细胞与纤维交织构成脾索, 血窦相互连通, 位于脾索之间 (→. 脾窦)

Plate III Transmission electron microscope and scanning electron microscope observation of *Q. spinosa* spleen

1. the sinus endothelial cells had a specially elongated simple squamous epithelium (→), the reticular cell with processes was in contact with blood cells (▲); 2. the phagocytic reticular cell with numerous processes in splenic cord (→); 3. the accumulation of lysosomes in aging phagocytic reticular cell (→) with some pigments; 4. lipid droplets (→) and endoplasmic reticulum (★) in the reticular cell without processes; 5. lymphocyte (→); 6. plasma cell with a lot rough endoplasmic reticulum (→); 7. neutrophilic granulocytes had a segmented nucleus (▲) in the smaller vein; 8. macrophage cells with renal shape of nuclei (▲) had many lysosomes (→); 9. a lot of pigments (▲) accumulated in melano-macrophage which had extremely swollen phagolysosomes (→) and some myelin figures (★); 10. the splenic cord was composed of clustered cells and fibers, the blood sinuses (→) formed a network of interconnection between the splenic cords

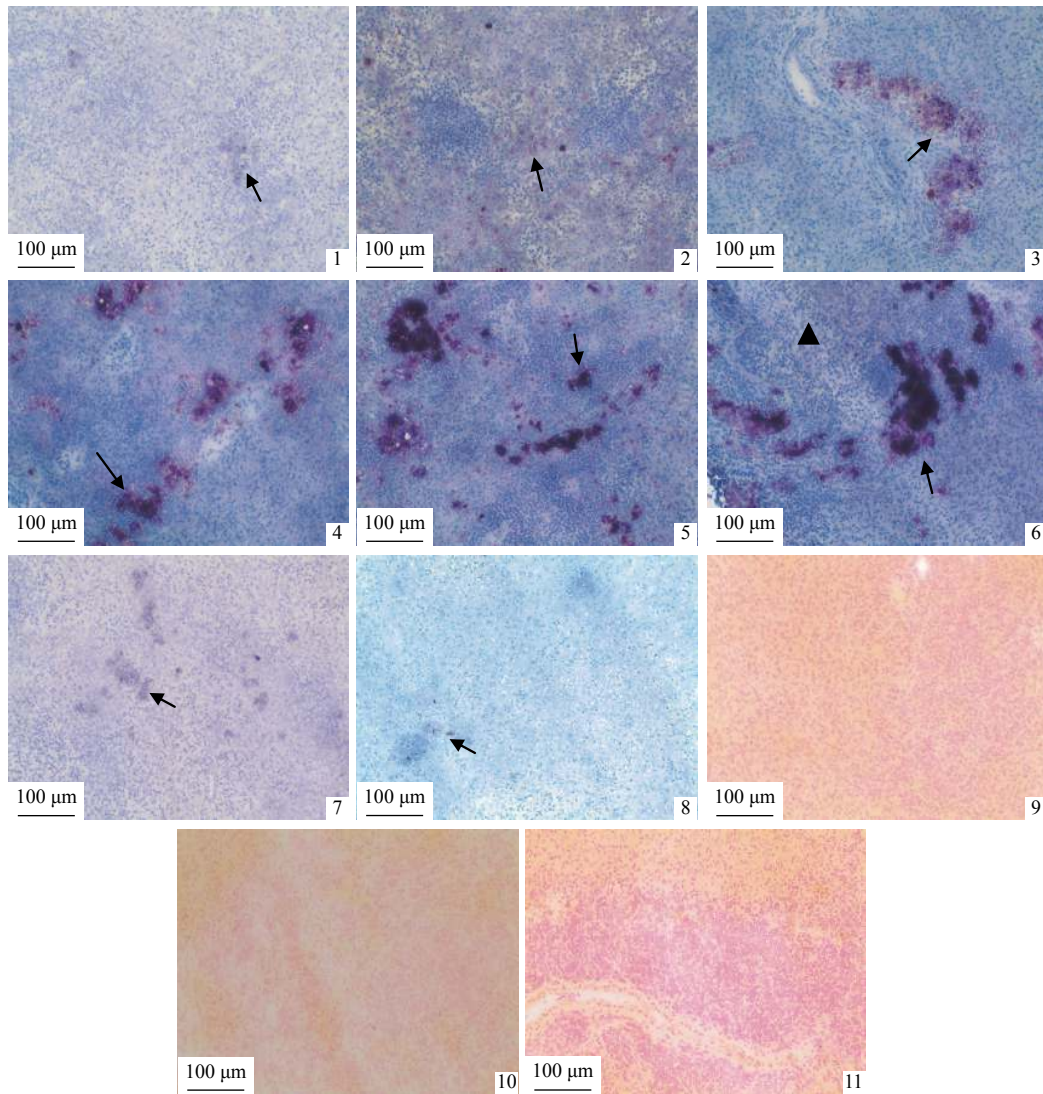


图版 IV 注射台盼蓝后的石蜡切片观察与 H.E 染色

1. 腹腔注射 1 h, 红髓中游离的巨噬细胞出现蓝色信号 (→); 2. 腹腔注射 2 h, 巨噬细胞内蓝色信号增多 (→), 脾索中蓝色颗粒微弱可见 (▲); 3. 腹腔注射 4 h, 脾索网状细胞内大量沉积台盼蓝, 信号呈弥漫性分布 (→); 4. 腹腔注射 4 h, 脾索网状细胞内出现大量的台盼蓝颗粒 (→), H.E; 5. 腹腔注射 16 h, 白髓血管内可见蓝色信号 (→); 6. 腹腔注射 24 h, 白髓未见蓝色信号 (▲), 弥漫性的台盼蓝颗粒减弱 (→); 7. 腹腔注射 72 h, 白髓未见蓝色信号 (▲), 可见散在分布于胞内的台盼蓝 (→), 弥漫的蓝色信号微弱; 8. 腹腔注射 10 d, 局部可见少量的蓝色信号 (→); 9. 腹腔注射 16 h, 椭球体未出现蓝色信号 (▲), 周围巨噬细胞内的蓝色信号明显 (→), H.E; 10. 腹腔注射 72 h, MMCs (→) 与椭球体 (▲) 内未发现蓝色信号, H.E; 11. 心脏注射 0.5 h, 少量的游离巨噬细胞内可见台盼蓝颗粒 (→)

Plate IV Paraffin sections and H.E staining of spleen after injection of trypan blue

1. 1 h post intraperitoneal injection, the blue signal located in free macrophagocyte in red pulp (→); 2. 2 h post intraperitoneal injection, mass blue signals distributed in macrophagocyte (→), and little trypan blue existed in splenic cord (▲); 3. 4 h post intraperitoneal injection, plentiful of trypan blue dispersed in reticular cell of splenic cord (→); 4. 4 h post intraperitoneal injection, plentiful of trypan blue dispersed in reticular cell of splenic cord (→), H.E; 5. 16 h post intraperitoneal injection, blue signals existed in free macrophagocyte in the vein of white pulp (→); 6. 24 h post intraperitoneal injection, the trypan blue of diffuse distribution was weakened (→) without blue signal in the white pulp (▲); 7. 72 h post intraperitoneal injection, the trypan blue of diffuse distribution was weakened without blue signal in the white pulp (▲), trypan blue existed in phagocytes (→); 8. 10 d post intraperitoneal injection, less blue signal distributed in spleen (→); 9. 16 h post intraperitoneal injection, no trypan blue was detected in ellipsoids (▲) with several blue signals around it (→), H.E; 10. 72 h post intraperitoneal injection, no trypan blue found in MMCs (→) and ellipsoids (▲), H.E; 11. 0.5 h post intracardiac injection, trypan blue found in less free macrophagocyte (→)



图版 V 脾脏 ACP 与 AKP 的分布与变化

1. 正常脾脏中 ACP 信号微弱 (→); 2. 腹腔注射后 2 h, 脾索内 ACP 含量逐步增加 (→); 3. 腹腔注射后 4 h, 靠近血管的 MMCs 的阳性信号显著增强 (→); 4. 腹腔注射后 8 h, 被膜下 MMCs 的 ACP 含量升高 (→); 5. 腹腔注射后 16 h, 白髓内 MMCs 的 ACP 含量大增 (→); 6. 腹腔注射后 24 h, 脾索 ACP 阳性信号减弱 (▲), MMCs 的 ACP 信号依然明显 (→); 7. 腹腔注射后 48 h, ACP 逐步恢复常态 (→); 8. 对照组 16 h, 脾脏内 ACP 信号微弱 (→); 9. 正常蛙脾脏内的 AKP 呈阴性; 10. 腹腔注射后 8 h, 脾脏内的 AKP 呈阴性, 无变化; 11. 对照组 16 h, AKP 呈阴性, 无动态变化

Plate V Distributions and change of ACP and AKP in spleen

1. less ACP distributed in normal spleen (→); 2. 2 h post intraperitoneal injection, more ACP existed in spleen cord (→); 3. 4 h post intraperitoneal injection, the positive signals were significantly enhanced in MMCs nearby the blood vessel (→); 4. 8 h post intraperitoneal injection, the ACP was obviously accumulated in the MMCs under capsule (→); 5. 16 h post intraperitoneal injection, the ACP was obviously accumulated in MMCs in white pulp (→); 6. 24 h post intraperitoneal injection, the positive signals in MMCs (→) were still clearly but weakened in splenic cords (▲); 7. 48 h post intraperitoneal injection, the ACP returned to normal level (→); 8. 16 h, less ACP distributed in the control group (→); 9. the result of AKP was negative in normal spleen; 10. 8 h post intraperitoneal injection, the AKP was negative; 11. 16 h, the AKP remained negative in control group

动态变化(图版 V -10, 11)。

3 讨论

脊椎动物的脾脏随着物种的进化而不断完

善, 尽管这一过程复杂且存在反复, 但进化出的各种精细结构使脾脏拥有了愈加丰富的功能区区域, 更有利地支撑机体适应复杂多变的生存环境。两栖动物的进化程度介于鱼类和爬行动

物之间, 因此脾脏结构也明显地表现出从低级到高级, 由简单到精细的进化趋势。在两栖动物中, 人们对无尾类脾脏的研究最为广泛和深入, 这可能与种群规模大, 分布范围广有一定关系。例如, 与大多数硬骨鱼类相似, 尾蟾与锄足蟾未分化出白髓, 淋巴细胞弥散地分布于脾脏内^[10]; 而国内报道的中华大蟾蜍与黑斑蛙虽出现了红髓和白髓的分化, 但二者之间界限不清, 未见 PELS、PALS、边缘区及生发中心等结构^[11-12], 这与国外关于豹蛙 (*R. pipiens*) 及鲍氏蟾 (*B. powerri*) 的研究类似^[10]。Huwait^[14] 报道的新变态小蟾 (*B. regularis*) 虽依然未见脾脏小梁结构, 但红髓和白髓之间界限明显, 并有一层由淋巴细胞、结缔组织及巨噬细胞组成的过渡区。当发展到非洲爪蟾、黄背条蟾与黄腹蟾 (*Bombina variegata*) 等种类时, 脾脏结构更接近于爬行动物, 可见典型的边缘区将红髓与白髓彻底分开^[10, 15]。本研究中, 棘胸蛙脾脏可见红髓与白髓的分化, 但边界不清, 缺乏 PALS 与边缘区, 虽未形成 PELS, 但已出现少量的椭球体结构。因此, 从脾脏精细结构的多样性考虑, 棘胸蛙脾脏的进化程度在已报道的无尾类中处于中等水平, 高于尾蟾与锄足蟾^[10], 低于新变态小蟾^[14]、黄背条蟾及黄腹蟾^[10, 15] 等。

在棘胸蛙脾脏组织中发现了大量的黑色素巨噬细胞, 它们大多聚集在一起形成 MMCs。MMCs 广泛地分布于变温脊椎动物的肝脏、脾脏和肾脏等组织内^[16], 一般认为参与物质的降解与再循环。研究表明, 营养状况^[17]、疾病^[18]、环境因子^[19-22] 等可直接引起 MMCs 的变化, 因此如今已将鱼类脾脏或肾脏 MMCs 数量与面积的变化作为评价健康状态与环境优良的重要指标。有关 MMCs 的细胞来源, 目前还没有统一的认识。Spazier 等^[21] 通过观察莱茵河中的欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*), 认为 MMCs 源于脾脏内具有吞噬作用的网状细胞; 但 Furukawa 等^[23] 认为 MMCs 可能来源于椭球体结构, 并具备类似原始生发中心的功能。此外, 张耀光等^[24] 对长吻鲩 (*Leiocassis longirostris*) 的肾细胞进行超微观察, Tsujii 等^[25] 对海马腹腔注射无抗原活性碳粒的研究, 均认为 MMCs 是由同一类型的巨噬细胞逐渐发育而来。本研究发现, 棘胸蛙椭球体结构稀少, 仅分布于白髓与红髓的边界区附近, 但 MMCs

却常大量的出现在白髓内部; 此外, 腹腔注射台盼蓝的动态取样表明, 脾脏内 MMCs 中从未发现蓝色信号, 也未发生含有台盼蓝的吞噬细胞与 MMCs 融合的现象, 与 Tsujii 等^[25] 的研究结果不一致。与此同时, 电镜下发现脾脏内具有吞噬作用的网状细胞有溶酶体增加、色素物质不断沉积的趋势。据此推测, 棘胸蛙 MMCs 来源于具有吞噬作用的网状细胞, 这与 Spazier 等^[21] 的研究结果相符合。MMCs 中始终未发现蓝色信号, 推测其原因, 可能是由于具有吞噬作用的网状细胞发展为衰老的黑色素巨噬细胞时, 失去了吞噬能力而导致, 这与张耀光等^[24] 对长吻鲩 MMCs 的研究结果类似。

与其他的生物屏障相比, 血脾屏障的研究起步较晚, 目前仅明确它是存在于脾脏动脉与静脉之间的组织结构, 在抗原吞噬、提呈的过程中发挥作用^[26]。不同动物血脾屏障的组成与分布位置有所区别。朱安龙等^[27] 证实大鼠的血脾屏障位于边缘区, 由巨噬细胞、基底膜、脾窦周血管内皮细胞及纤维组成; Zhang 等^[28] 发现鸡的血脾屏障结构位于椭球体和 PELS 中, 由椭球体相关细胞、立方状内皮细胞、网状细胞、巨噬细胞和网状纤维组成, 且在吞噬异源物质时, AKP 有显著地变化。在鱼类中, Furukawa 等^[23] 指出星康吉鳗 (*Conger myriaster*) 的血脾屏障结构由巨噬细胞中心、脾索及椭球体周围巨噬细胞组成; 贺扬^[13] 通过腹腔注射与静脉注射台盼蓝的方法, 发现尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 的血脾屏障结构由椭球体内皮细胞和网状纤维组成, 且吞噬过程中 ACP 变化显著, AKP 无变化。关于无尾类两栖动物血脾屏障的研究目前还未见报道。比较腹腔注射途径与心脏内注射途径的结果后发现, 除心脏内注射途径的蓝色信号出现时间较早外, 其余结果均一致。动态取样发现, 台盼蓝颗粒被全部阻挡在白髓外, 游离的巨噬细胞与脾索网状细胞完成了吞噬台盼蓝的功能, 白髓内始终保持稳定, 表明棘胸蛙存在明显的血脾屏障。棘胸蛙脾脏内椭球体与 MMCs 从未出现蓝色信号, 这与对尼罗罗非鱼和星康吉鳗的研究结果不同^[13, 23], 可能是生物进化的一种表现。此外, 棘胸蛙脾脏内 ACP 含量在吞噬过程中有明显的变化, 这与贺扬^[13] 的研究结果一致, 但与 Zhang 等^[28] 报道的鸡脾脏

内 AKP 全程参与的结果相反, 表明可能在鱼类与无尾类两栖动物的脾脏中, 由 ACP 参与异源物质的吞噬及处理, 而进化至禽类时演变为 AKP 全程参与。

参考文献 (References):

- [1] Yu D N, Zheng R Q, Lu Q F, *et al.* Genetic diversity and population structure for the conservation of giant spiny frog (*Quasipaa spinosa*) using microsatellite loci and mitochondrial DNA[J]. *Asian Herpetological Research*, 2015, 7(2): 75-86.
- [2] 叶容晖. 棘胸蛙微卫星分子标记筛选及其种群遗传分析 [D]. 金华: 浙江师范大学, 2009.
- Ye R H. SSR isolation and population genetic analysis of *Paa spinosa*[D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2009 (in Chinese).
- [3] Lei X P, Yi G, Wang K Y, *et al.* *Elizabethkingia miricola* infection in Chinese spiny frog (*Quasipaa spinosa*)[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(2): 1049-1053.
- [4] 吕耀平, 金晶, 施倩, 等. 棘胸蛙致病性蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及病理组织观察[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(1): 26-32.
- Lü Y P, Jin J, Shi Q, *et al.* Isolation and identification of bacillus cereus and pathological observation from rotten-skin disease of *Quasipaa spinosa*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(1): 26-32(in Chinese).
- [5] 刘悦, 詹忠根, 朱兵, 等. 棘胸蛙抗菌肽 Spinosan-C 的串联表达与活性检测[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(1): 132-139.
- Liu Y, Zhan Z G, Zhu B, *et al.* Tandem expression and activity determination of antibacterial peptide Spinosan-C from *Quasipaa spinosa*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(1): 132-139(in Chinese).
- [6] 雷雪平, 耿毅, 余泽辉, 等. 棘胸蛙脑膜炎败血伊丽莎白菌的分离鉴定及其感染的病理损伤[J]. *浙江农业学报*, 2018, 30(3): 371-377.
- Lei X P, Geng Y, Yu Z H, *et al.* Isolation and identification of *Elizabethkingia meningoseptica* from Chinese spiny frog (*Quasipaa spinosa*) and pathological lesions of its infection[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, 30(3): 371-377(in Chinese).
- [7] 邹文政, 张俊杰, 鄢庆枇, 等. 嗜水气单胞菌感染后牛蛙血清中抗菌物质的初步研究[J]. *水产学报*, 2007, 31(1): 62-67.
- Zou W Z, Zhang J J, Yan Q P, *et al.* Studies on antibacterial protein of bullfrog serum infected by *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(1): 62-67(in Chinese).
- [8] 皇康康, 张春晓, 王玲, 等. 饲料蛋白质和脂肪水平对牛蛙生长性能的影响[J]. *水产学报*, 2014, 38(6): 877-887.
- Huang K K, Zhang C X, Wang L, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on growth of bullfrog (*Rana catesbeiana*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(6): 877-887(in Chinese).
- [9] 雷存科, 陈中元, 张奇亚. 三种水生动物细胞系对两株蛙病毒敏感性的比较[J]. *水产学报*, 2016, 40(10): 1643-1647.
- Lei C K, Chen Z Y, Zhang Q Y. Comparative susceptibility of three aquatic animal cell lines to two ranaviruses[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1643-1647(in Chinese).
- [10] Barrutia M S G, Leceta J, Fonfría J, *et al.* Non-lymphoid cells of the anuran spleen: an ultrastructural study in the natterjack, *Bufo calamita*[J]. *American Journal of Anatomy*, 2010, 167(1): 83-94.
- [11] 郝家胜, 聂其灼. 中华大蟾蜍脾脏的显微和超微结构研究[J]. *安徽师范大学学报(自然科学版)*, 1999, 22(4): 317-320.
- Hao J S, Nie Q Z. Studies on microstructure and ultrastructure of the spleen of *Bufo gargarizans*[J]. *Journal of Anhui Normal University (Natural Science Edition)*, 1999, 22(4): 317-320(in Chinese).
- [12] 李朝波. 黑斑蛙器官组织结构和肥大细胞组织化学研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2008.
- Li C B. Research on the histological structure of *Rana nigromaculata*'s organs and the histochemistry of the frog's mast cells[D]. Guiyang: Guizhou University, 2008 (in Chinese).
- [13] 贺扬. 感染无乳链球菌尼罗罗非鱼脾脏的病理学研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2017.
- He Y. Histopathology of the spleen in Nile tilapia infected by *Streptococcus agalactiae*[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [14] Huwait E A H. Histological and ultrastructural studies of

- spleen in an amphibian animal: an evolutionary perspective[J]. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 2015, 7(1): 59-64.
- [15] Dulak J. The architecture of the spleen of the yellow-bellied toad, *Bombina variegata*[J]. *Journal of Zoology*, 1990, 221(3): 489-498.
- [16] Macchi G J, Romano L A, Christiansen H E. Melanomacrophage centres in whitemouth croaker, *Micropogonius furnieri*, as biological indicators of environmental changes[J]. *Journal of Fish Biology*, 1992, 40(6): 971-973.
- [17] Seol D W, Hur J W, Kim D S, *et al.* Effect of starvation on kidney melano-macrophage centre in sub-adult rock bream, *Oplegnathus fasciatus* (temminck and schlegel)[J]. *Fisheries and Aquatic Science*, 2009, 12(1): 49-53.
- [18] Gregori M, Miragliotta V, Leotta R, *et al.* Morphometric evaluation of interrenal gland and kidney macrophages aggregates in normal healthy rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and after bacterial challenge with *Yersinia ruckeri*[J]. *Veterinary Medicine International*, 2014, 2014: 210625.
- [19] Balamurugan S, Deivasigamani B, Kumaran S, *et al.* Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bio-indicator of environmental change[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2012, 2(2): S635-S638.
- [20] Fournie J W, Summers J K, Courtney L A, *et al.* Utility of Splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2001, 13(2): 105-116.
- [21] Spazier E, Storch V, Braunbeck T. Cytopathology of spleen in eel *Anguilla anguilla* exposed to a chemical spill in the Rhine River[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1992, 14: 1-22.
- [22] Adeboyejo A O, Fagbenro A O, Adeparusi Y E, *et al.* Eco-histopathology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*) from industrially contaminated locations of Ologe lagoon, South-Western, Nigeria[J]. *Environment and Natural Resources Research*, 2013, 3(2): 28-36.
- [23] Furukawa T, Nakamura O, Suzuki Y, *et al.* Entrapment and transport of foreign material in the spleen and kidney of Japanese conger *Conger myriaster*[J]. *Fisheries Science*, 2010, 68(6): 1219-1225.
- [24] 张耀光, 罗泉笙, 钟明超. 长吻鮠肾脏黑色素巨噬细胞发育过程的超微结构变化[J]. *水生生物学报*, 1997, 21(2): 187-189.
- Zhang Y G, Luo Q S, Zhong M C. Ultrastructural change of the melano-macrophage cellular development process of kidney in *Leiocassis longirostris* Gunther[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, 21(2): 187-189(in Chinese).
- [25] Tsujii T, Seno S. Melano-macrophage centers in the glomerular kidney of the sea horse (teleosts): morphologic studies on its formation and possible function[J]. *Anatomical Record*, 2010, 226(4): 460-470.
- [26] Vigliano F A, Bermúdez R, Quiroga M I, *et al.* Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 21(4): 467-471.
- [27] 朱安龙, 姜洪池, 刘连新, 等. 血脾屏障形态学的实验研究[J]. *中华外科杂志*, 2005, 43(9): 591-594.
- Zhu A L, Jiang H C, Liu L X, *et al.* The study on the morphology character of blood-spleen barrier[J]. *Chinese Journal of Surgery*, 2005, 43(9): 591-594(in Chinese).
- [28] Zhang Q, Chen B, Yang P, *et al.* Identification and structural composition of the blood-spleen barrier in chickens[J]. *The Veterinary Journal*, 2015, 204(1): 110-116.

Composition and function of the blood-spleen barrier in *Quasipaa spinosa* and the evolutionary level of spleen

REN Siyu^{1,2}, WANG Wenhui^{1*}, WANG Kaiyu³, GENG Yi³, CHEN Defang⁴

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. College of Animal Science and Technology, Chongqing Three Gorges Vocational College, Wanzhou 404155, China;

3. Fisheries Department of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

4. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: This study aimed to explore the splenic histology and evolutionary level of *Quasipaa spinosa*, and also aimed to identify the existence and function of blood-spleen barrier. Histologic technology, transmission electron microscopy, immunohistochemistry, injection of trypan blue, acid phosphatase(ACP) and alkaline phosphatase(AKP) reaction were used in the study. The results showed that spleen without periarterial lymphatic sheaths (PALS) and germinal centres (GC) had two clearly distinguishable areas including the white pulp and the red pulp with fuzzy boundary. In addition to that, there was no evidence for the presence of a marginal zone, and less ellipsoids were located in the boundary region without periellipsoidal lymphatic sheaths (PELS). The white pulp was surrounded by melano-macrophage centres (MMCs) which was formed by numerous melano-macrophages and MMCs were also located in the white pulp occasionally. A few of mast cells existed in the red pulp and close to the vein. The collagen fibers existed in splenic capsule and splenic cord, especially in the wall of arteriole. The result in the detection by Alpha-naphthyl acetate esterase(ANAE) was negative. The dynamic histology of *Q. spinosa* after injection of trypan blue showed the blue signal was first discovered in free macrophagocyte in the red pulp after one hour post intraperitoneal injection, and then gradually congregated in splenic cord. The blue signal of diffuse distribution in reticular cells in splenic cord was weakened after twenty-four hours post intraperitoneal injection. No trypan blue was detected in the white pulp, ellipsoids and MMCs throughout the whole course of the dynamic study. Meanwhile, the result of dynamic histology post intracardiac injection was similar to that of intraperitoneal injection, except that the positive signal was discovered half an hour earlier. The result of the detection AKP and ACP on the basis of dynamic histology post intraperitoneal injection showed less ACP was detected in normal spleen, but the ACP content in splenic cords and MMCs had a trend of increasing initially and then decreasing afterwards. In contrast, the AKP remained negative in the whole study.

Key words: *Quasipaa spinosa*; blood-spleen barrier; melano-macrophage; reticular cell; ellipsoid

Corresponding author: WANG Wenhui. E-mail: wwh777@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(31960693, 31760723); High Level Professional Group Construction for Animal Husbandry and Veterinary of Chinese Ministry of Education; Double Base Construction of Chongqing Municipal Education Commission