

# 黄缘盒龟血细胞亚显微结构的电镜观察分析

罗曼<sup>①</sup> 蒋立科<sup>①\*</sup> 甘雅玲<sup>②</sup> 宋祥芬<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>安徽农业大学生物工程系 合肥 230036; <sup>②</sup>中国科学院动物研究所 北京 100080)

**摘要:** 通过电镜对黄缘盒龟血细胞亚显微形态结构的扫描和透射观察,并与中华鳖比较,发现这一较古老的爬行动物红细胞均呈椭圆形形态,与后者具类似性,但细胞的大小存在差异,反映在不同深度水域中载氧能力的显著不同;虽然具有成群的凝血细胞,但后者的这类细胞尚无明显形态特征,反映凝血功能的不完全性;前者粒细胞外周形态的不规则,而后者的彼此无差异,提示不同环境下免疫力的不同。

**关键词:** 黄缘盒龟;血细胞;亚显微结构;生理功能

**中图分类号:** Q247 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2001)05-09-05

## Observations and Analyses of *C. flavomarginata* Blood Cell's Submicroscopic Structure by Electron Microscopy

LUO Man<sup>①</sup> JIANG Li-Ke<sup>①</sup> GAN Ya-Ling<sup>②</sup> SONG Xiang-Fen<sup>②</sup>

<sup>①</sup> Department of Biological Engineering, Anhui Agriculture University Hefei 230036;

<sup>②</sup> Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080, China)

**Abstract:** *Cistoclemmys flavomarginata* blood cell's submicroscopic morphostructure was scanned and observed in perspective by an electron microscope. Compared with the older reptile (*Trionyx sinensis*) morphological character of red cells is similar, i. e. elliptocyte. However, dimensions of the cells are different. It suggests that ability of carrier oxygen of the red cells is obviously different.

**Key words:** *Cistoclemmys flavomarginata*; Blood cell; Submicroscopic structure; Physiological function

爬行类血细胞是机体免疫的重要成分,国内外对爬行类细胞形态结构的研究有过报道。Szarki 等对两爬动物血细胞大小进行过研究<sup>[1]</sup>,吴孝兵等也研究了 4 种龟类血细胞显微形态参数<sup>[2]</sup>;对于鳖的血细胞研究来说,刘恩勇等<sup>[3]</sup>、王兵<sup>[4]</sup>等对其形态及细胞化学进行光镜水平的描述。但对其亚细胞水平及结构、系统发生还只局限于显微观察,无电镜水平的比较研究。

本文通过光学显微镜、扫描电镜和透射电镜不同角度对黄缘盒龟血细胞的观察,发现黄缘盒龟血细胞形态及亚显微结构的差异,阐述血细胞结构与生理功能的相互关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与仪器

**1.1.1 材料来源** 黄缘盒龟 (*Cistoclemmys flavomarginata*) 采自安徽省歙县清凉峰,雄性。

**1.1.2 仪器** 光镜 OLYMPUS (Japan), 扫描电镜 PHILIPS-XL30 (Netherlands), 透射电镜 TEM-2000EX (USA)。

\* 通讯联系人;

第一作者介绍 罗曼,女,37岁,博士,副教授;研究方向:生物化学与分子生物学;

收稿日期:2000-03-27,修回日期:2001-06-19

## 1.2 方法

**1.2.1 显微分析** 断爪取血,制成涂片并用瑞氏染色剂染色,在光镜下观察,拍照,进行常规项目分析、血细胞计数(用医疗护理技术常规检验方法进行)和统计凝血时间。

**1.2.2 扫描电镜的观察** 颈动脉取血,加1%肝素经3 000 r/min离心10 min,去血清,再用0.1 mol/L、0.15 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.8)分别洗涤血球2~3次,用3%戊二醛固定1周后,1%锇酸固定1周,挑取血细胞经做常规脱水,真空干燥并喷金,扫描观察。

**1.2.3 透射电镜观察** 血细胞结构分析:0.15 mol/L PBS缓冲液(pH 7.2)洗涤后,经含多聚甲醛的戊二醛固定后再用锇酸固定,脱水、包埋、超薄切片、铀铅染色,然后进行透射电镜观察。对于白血球,需在取血后立即用2倍蒸馏水处理,利用渗透压原理破坏红血球,离心去溶液,然后按前述方法固定。

## 2 结果

**2.1 红细胞(erythrocyte, EC; 图版 I:1, 图版 II:1)** 该种龟细胞呈长椭圆形,表面光滑,长径为18.00  $\mu\text{m}$ ,短径12.40  $\mu\text{m}$ ,核卵圆形或圆形,中位,常含1~2颗蓝紫色粒。核内含有致密的染色质团块,DNA显示染色时,团块呈阳性反应。无核仁,核周与胞浆交界处有一透明的薄环,胞浆染色为灰白色,呈均质状,细胞边界分明,与蒋立科<sup>[5]</sup>等报道的鳖红细胞相比无明显区别,只是后者的核较前者小,这与栖息水的底层载氧有关。

**2.2 凝血红细胞(thrombocyte, TC; 图版 I:2, 图版 II:2)** 该类细胞是龟鳖类具有凝血作用的细胞,外周血中一般成群分布,呈纺锤体形或泪滴状、裸露状等不规则状态。Rowley等<sup>[6]</sup>解释这是由于涂片过慢或在此之前血样已有部分凝固所致。核质比例大,染成深蓝紫色,胞质染成淡灰蓝色。核居中央,染色质均匀而致密,胞质中未出现白细胞中颗粒状物,提示该类细胞仍保留红细胞结构特点,但有了功能的分化。

**2.3 淋巴细胞(lymphocyte, LC; 图版 I:3, 图版**

**II:3)** 黄缘盒龟明显分大小两种,小淋巴细胞圆形或不规则圆形,核大而圆且占比例大,位于细胞中央或与质膜相切,无核仁。胞膜极薄,胞质天蓝色,位于两端,总是向外引伸出伪足样突起。疏散着若干嗜天青颗粒。黄缘盒龟血细胞在扫描电镜下,观察到一种淋巴细胞表面比较光滑,似T淋巴细胞;另一种淋巴细胞表面有许多波动膜状的突起,似B淋巴细胞,呈大小不同;而鳖的此类细胞虽也有大小之分但其表面却不明显。该龟单核细胞占8.80%,鳖为12%~28%。扫描电镜下,龟鳖淋巴细胞的胞体偏小,大小变化明显,大多为中、小型球体。核体大而浓染,偏位于侧,多有缺刻。相邻胞质区透明,若干嗜天青颗粒散在。核表面有较深的凹陷,细胞不多,少量卵圆形线粒体和核糖体,胞膜呈毛玻璃状,有短绒毛。细胞器较少,胞质内散有棒状和大小不同嗜铁颗粒状物,常染色质与异染色质几乎相同,有少量圆形核糖体和线粒体。

**2.4 粒细胞(图版 I:4~6, 图版 II:4~6)** 粒细胞比红细胞的量少,体积小。细胞表面不光滑,有许多皱褶及突起,这些突起呈不规则状、球状,易脱落。在黄缘盒龟与中华鳖血液中,无粒型白细胞(单核淋巴细胞)和粒型白细胞都有胞突,成球状突起或为波动膜状的皱褶,说明白细胞具有运动和吞噬能力。粒细胞包括:

嗜酸性粒细胞(eosinophil, EC; 图版 I:4, 图版 II:4):数量极少,占白粒细胞总数的2%~3%,细胞圆形或不规则形,细胞大,核圆形、分叶、较小、偏一侧,染色质颗粒大,染成紫红色。胞质内充满红色粗大颗粒,散在一侧,颗粒呈圆形或不规则。颗粒内有电子密度高的结晶体。

嗜碱性粒细胞(basophil, BC; 图版 I:5, 图版 II:5):占白细胞总数的比例不定,细胞圆形或呈不规则,核染成紫红色,胞质中含有圆形着深色颗粒,大小不等,分布不匀,常覆盖在核上,胞质表面伸出伪足。当染色剂浓度相同时,鳖与龟相比,鳖嗜碱颗粒较龟易着色。染色质粗糙,胞质中有深浅不同的嗜天青和嗜铁颗粒。嗜碱性颗粒覆盖于核上。

嗜中性粒细胞:即一些研究者们所称的嗜异性细胞(neutrophil, NC;图版 I:6;图版 II:6),占白细胞总数的 57%~58%,与鳖相近。在白细胞中,龟占 52%,鳖占 58%,细胞圆形或卵圆形,边缘平整。核不规则,占整个细胞的 1/4~1/3,偏于一端的中央,而鳖偏于一侧,规则,但染色质着色均与单核细胞相仿,胞质几乎不着色,其中有淡蓝色颗粒状不均匀地分布在胞质边周的囊泡内,有时看不清。异染色质呈蜂窝状,富含粗厚而着色较深的嗜天青颗粒,电子密度高,其大小变化幅度大。

**2.5 巨噬细胞(单核细胞)(macrophage, MC;图版 I:7;图版 II:7)** 细胞体比一般红细胞大,数量少,外形不规则,细胞表面不同,有许多大型的球状突起,经常伸出伪足和大小不一的短突,把其它细胞包围起来。在鳖类中与红细胞尚无明显区分。胞质内散落着较多的核糖体和线粒体,异染色质多密集与周边,细微而疏松,可见粗面内质网、游离核糖体和少量线粒体。

### 3 讨论

**3.1 红细胞** 红细胞发育经历了下列几个阶段:第一,红细胞幼稚期,细胞呈圆形或近圆形,核质比例大;第二,红细胞未成熟期,细胞由圆形逐渐长为椭圆形,核质比例变小,细胞核染色质疏松;第三,红细胞成熟期。与蛇类相似,在黄缘盒龟与中华鳖血涂片中,可观察到红细胞直接分裂即无丝分裂相。说明红细胞的生成途径除造血器官中产生外,另一条途径即通过外周血细胞直接分裂而来。由于龟鳖类体内缺乏与哺乳动物体内的红骨髓和淋巴结那样完善的造血器官,因而,与哺乳动物不同,部分幼稚型红细胞会进入外周血液中完成其分化成熟过程。而在哺乳动物的外周血液中,血细胞全是缺乏分裂能力的、已经分化了的细胞,也没有幼稚型的血细胞。与蟾蜍相比,蟾蜍具有初期的两个循环系统,大部分幼稚型红细胞仍进入外周血细胞中,说明了龟鳖类外周血液中的血细胞虽较蟾蜍有了分化,但分化程度仍较低。

#### 3.2 白细胞

**3.2.1 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞** 龟初步出现淋巴细胞免疫功能的分化,较鳖抗病力增强。与龟相比,鳖的淋巴细胞无明显大小之别,不易区分,呈不规则状,提示尚无明显“识别”和“捕获”免疫功能的分化。Polliack 根据细胞表面形态的特点识别两种淋巴细胞,指出龟 T 淋巴细胞表面较光滑, B 淋巴细胞表面有较多微绒毛,同时又把龟与鳖的淋巴细胞区别开来。Lin 等人用扫描电镜观察淋巴细胞的玫瑰花集结,支持这一观点;但是与此相反,Newell 等人在大量实验基础上,对以往扫描电镜观察提出质疑<sup>[7]</sup>。洪涛<sup>[8]</sup>认为微绒毛是淋巴细胞表面的恒常特点,但这不足以鉴别两种淋巴细胞。细胞表面微绒毛是一种动态性的细胞器,淋巴细胞受到各种不同的刺激时,其绒毛长度、厚度、形态和分布都会发生明显的改变,因而对以往结果持否定态度。另外,经过体外培养转化的淋巴细胞在形态上发生较大变化,在扫描电镜下依靠表面形态区别 T、B 两种淋巴细胞还存在不同意见。

**3.2.2 白细胞与免疫反应** 单核细胞存在于所有脊椎动物中,担负着非特异性免疫的重要作用,单核细胞具有活跃的变形运动,明显的趋化性和一定的吞噬功能。在哺乳动物外周血液中,单核细胞实际上是结缔组织中巨噬细胞的前身细胞,是巨噬细胞的后备力量。当它穿出血管进入组织后就变成巨噬细胞,吞噬作用活跃时,细胞体积增大,可达 25  $\mu\text{m}$ 。与哺乳动物不同的是龟鳖外周血液中,单核细胞在血管内就可变成巨噬细胞,细胞表面常有球状突起,伸出伪足包围其它外来异源细胞。单核细胞和巨噬细胞都能消灭侵入机体的细菌,吞噬异物颗粒,消除体内衰老而损伤的细胞,杀伤肿瘤细胞,并参与免疫反应。因而,可以认为,龟类外周细胞中,单核细胞的结构与功能分化程度较高,基本上与哺乳动物相似。

两栖类蟾蜍与其相比(待发表),单核细胞不仅通过心脏不完全隔膜,穿出血管进入组织而成巨噬细胞,伸出伪足细胞包围其它异源细胞,而且能从显微镜下观察到,从皮肤分泌物中

分离出的蟾素可强烈抑制甚至歼灭肿瘤细胞也可得到证明。

淋巴细胞与其它脊椎动物具有相似的形态特征,因此可以说淋巴细胞作为免疫防御的基础,其结构在物种的系统发生过程中改变不大。

### 参 考 文 献

[1] Szarki, H., G. Czopek. Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles. *Bull. Acad. Polonaise Ser. Sci. Biol.*, 1966, **14**:433 ~ 437.

[2] 吴孝兵,张盛周,杨红. 16种爬行动物血细胞参数研究. *动物学杂志*, 1998, **33**(1):29 ~ 32.

[3] 刘恩勇等. 中华鳖外周血细胞形态学观察. *南京农业大*

学学报, 1991, **14**(3):91 ~ 96.

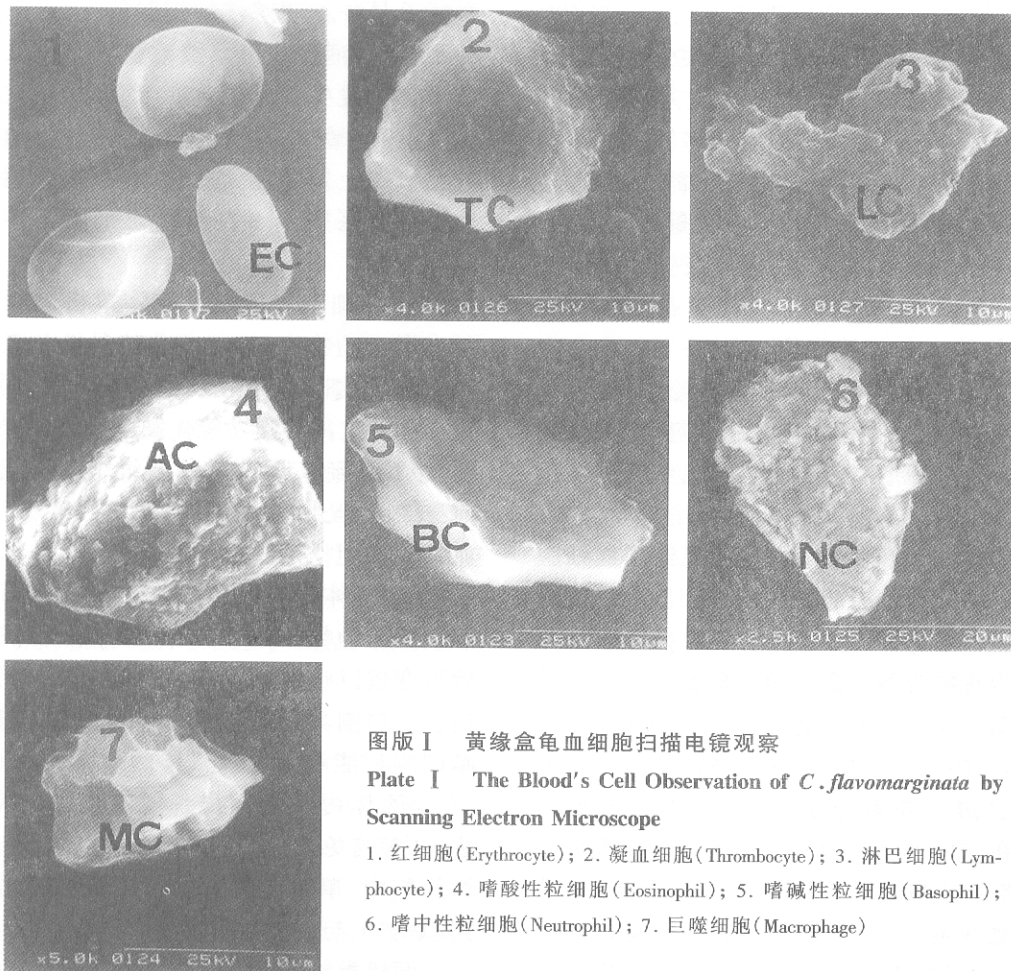
[4] 王兵. 鳖外周血细胞显微形态及细胞化学. *动物学杂志*, 1995, **30**(1)16 ~ 18.

[5] 蒋立科,宋祥芬,齐跃敏. 鳖血细胞结构及功能的初步研究. *动物学报*, 1996, **42**(3):327 ~ 329.

[6] Rowley, A. F., T. C. Hunt, M. Page *et al.* *Fish. In: Rowley A., Fand Ratcliffe N. A. ed. Vertebrate Blood Cells. Cambridge University Press, 1988. 119 ~ 127.*

[7] Morrow, W. J. W., A. Pulsford. Identification of peripheral blood leukocytes of the dogfish (*Syliorhinus canicula* L.) by electron microscopy. *J. Fish Biol.*, 1980, **17**:461 ~ 475.

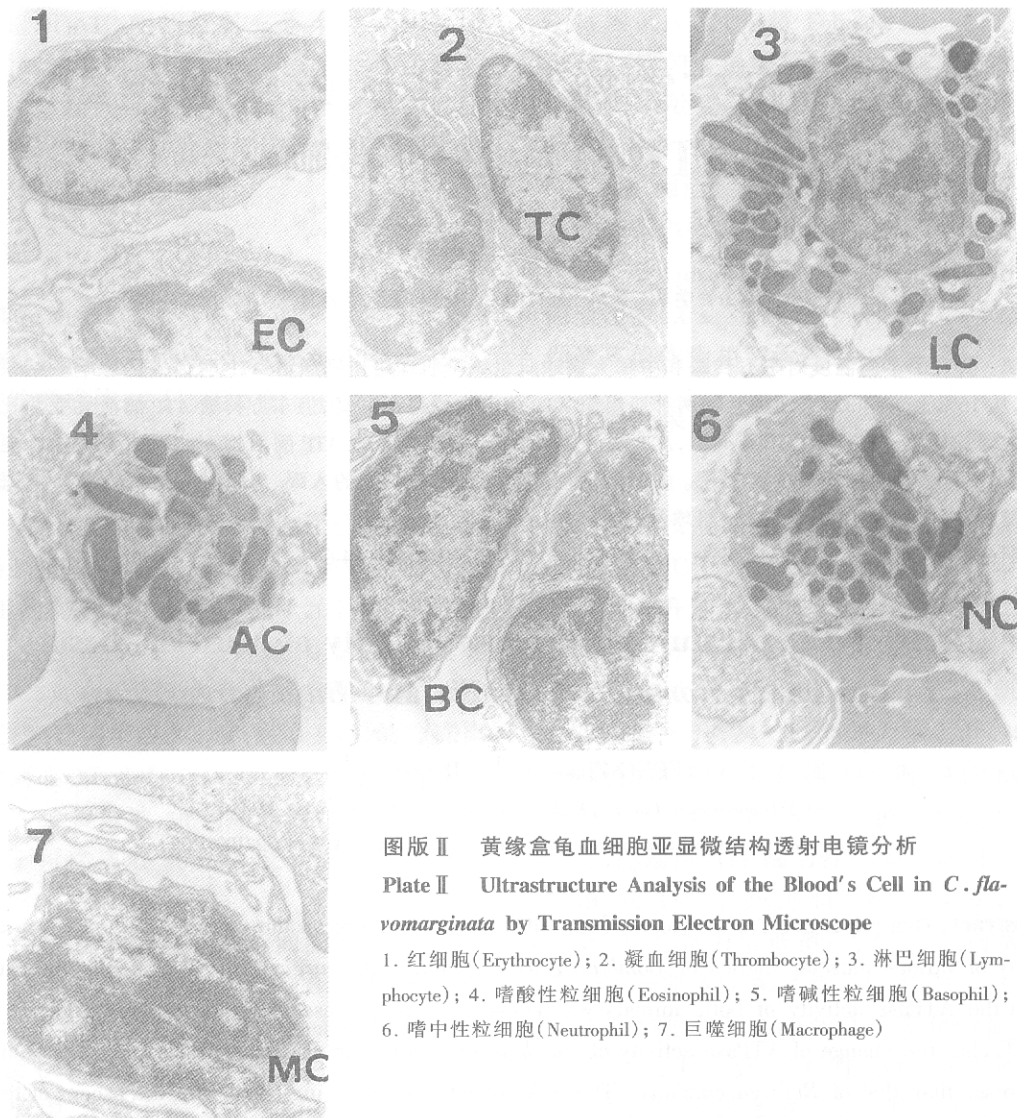
[8] 洪涛主编. *生物医学超微结构与电子显微镜技术*. 北京: 科学出版社, 1980.



图版 I 黄缘盒龟血细胞扫描电镜观察

Plate I The Blood's Cell Observation of *C. flavomarginata* by Scanning Electron Microscope

1. 红细胞(Erythrocyte); 2. 凝血细胞(Thrombocyte); 3. 淋巴细胞(Lymphocyte); 4. 嗜酸性粒细胞(Eosinophil); 5. 嗜碱性粒细胞(Basophil); 6. 嗜中性粒细胞(Neutrophil); 7. 巨噬细胞(Macrophage)



图版 II 黄缘盒龟血细胞亚显微结构透射电镜分析

Plate II Ultrastructure Analysis of the Blood's Cell in *C. flavomarginata* by Transmission Electron Microscope

1. 红细胞(Erythrocyte); 2. 凝血细胞(Thrombocyte); 3. 淋巴细胞(Lymphocyte); 4. 嗜酸性粒细胞(Eosinophil); 5. 嗜碱性粒细胞(Basophil); 6. 嗜中性粒细胞(Neutrophil); 7. 巨噬细胞(Macrophage)