

版纳鱼螈外周血细胞观察

李桂芬 蒙绍权 李涛 姚锦仙*

(玉林师范学院化学与生物学系 玉林 537000; 浦北县北通镇北通中学 浦北 535321;
北京大学生命科学院 北京 100871)

摘要:以濒危两栖动物版纳鱼螈 (*Ichthyophis bannanica*) 为材料,应用瑞氏-姬姆萨混合染色法与血细胞计数法观察并统计了版纳鱼螈各种外周血细胞的形态特征和数量比例。结果表明,版纳鱼螈的外周血液中红细胞数量较多,呈卵圆形、椭圆形、梭形和梨形,平均含量为 2.57×10^5 个/ mm^3 。白细胞数量较少,多呈近圆形,平均含量为 0.72×10^3 个/ mm^3 。白细胞中,淋巴细胞最多,其次为单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。血栓细胞数量较少,常数个集合在一起。同时,将此研究结果与鱼类、爬行类和其他两栖类的血细胞比较,进而探讨了版纳鱼螈的进化地位。

关键词: 版纳鱼螈; 血细胞; 显微结构

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)02-102-06

Peripheral Hematocytes in Caecilian *Ichthyophis bannanica*

LI Gui-Fen MENG Shao-Quan LI Tao YAO Jir-Xian*

(Department of Chemistry and Biology, Yulin Normal University, Yulin 537000;
Beitong Middle School in Pubei County, Pubei 535321;
College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: The present study analyzed morphology of the peripheral blood of *Ichthyophis bannanica* by the Wright-Giemsa staining. The peripheral blood of *I. bannanica* contained erythrocytes, thrombocytes, lymphocytes, monocytes, neutrophils, basophils and eosinophils. Erythrocytes were oval, elliptical, spindle- or pear-like cells, and their mean density was 2.57×10^5 cells/ mm^3 . Most leucocytes were round, and their mean density was 0.72×10^3 cells/ mm^3 . The lymphocytes were most rich leucocytes, followed by monocytes, neutrophils, basophils and eosinophils. Thrombocytes were less, and frequently appeared in groups. Meanwhile, we compared the peripheral blood of *I. bannanica* with that of fishes, reptiles or other amphibians. The results are discussed on the basis of the possible phylogenetic position of *I. bannanica*.

Key words: *Ichthyophis bannanica*; Blood cells; Microscopic structure

血细胞是血液中的有形成分,在气体的运输、机体的免疫和血液的凝固等方面起着重要作用,同时血细胞形态特征与动物分类、生理状况及系统演化均有一定的关系,因此对动物血细胞的观察研究是十分必要的,于是许多学者对动物血细胞的有形成分及其发生都很感兴趣。关于两栖类血液组织学的研究,已有对达岛鱼螈 (*Ichthyophis kohtaoensis*)^[1]、中国大鲵

(*Andrias davidianus*)^[2]、新疆北鲵 (*Ranodon sibiricus*)^[3]、东北小鲵 (*Hynobius leechii*)^[4]、黑斑

基金项目 广西科学基金项目 (No. 桂科自 0832285), 广西教育厅科研项目 (No. 200504219);

*通讯作者, E-mail: jxyao@pku.edu.cn;

第一作者介绍 李桂芬,女,副教授;研究方向:动物学;

E-mail: ylsygf@126.com.

收稿日期:2008-09-24,修回日期:2009-01-23

蛙 (*Rana nigromaculata*)^[5]、虎纹蛙 (*R. rugulosa*)^[6] 等动物血细胞的观察与发生的报道,而有关我国特有的濒危珍稀两栖纲无足目 (Apoda) 的仅有代表版纳鱼螈 (*Ichthyophis bannanica*)^[7] 血液组织学方面的研究尚未见报道。目前,国内外学者对版纳鱼螈的相关研究包括分布、境遇、外部形态、消化、呼吸、循环、染色体、线粒体 DNA、骨骼、侧线、生殖系统等方面^[8-17]。因此,本研究采用瑞氏-姬姆萨混合染色法与血细胞计数法观察并统计版纳鱼螈各种外周血细胞的形态特征和数量比例,并与鱼类、爬行类和其他两栖类的血细胞进行比较,探讨版纳鱼螈的亲缘关系,为进一步确定版纳鱼螈的进化地位提供理论依据,同时也可作为脊椎动物血细胞形态和生理的比较研究提供基础资料。

1 材料与方法

实验用 7 条版纳鱼螈均于 2006 年采自广西北流市六麻镇,具体数据见表 1。乙醚麻醉动物后,打开围心腔,用微量注射器从心脏抽血。血细胞观察采用血涂片经瑞氏-姬姆萨混合染色, Olympus 显微镜观察拍照,测量细胞大小。每个标本选择一片细胞分布均匀、染色效果好的楔形血涂片,从阅片区中均匀分布地取 24 (6 × 4) 个视野进行白细胞种类及比例的测定。用 Neubauer 计数板在显微镜下统计红细胞和白细胞的数量,其中红细胞计数用红细胞稀

释液 (Hayem 稀释液) 稀释,白细胞计数用醋酸龙胆紫稀释液稀释。

表 1 版纳鱼螈标本的测量值

Table 1 Samples measurement of *Ichthyophis bannanica*

标本号 Specimen No.	性别 Sex	体重 Weight (g)	体长 Length (mm)
1		11.6	192
2		12.7	201
3		10.5	195
4		15.8	283
5		20.5	300
6		12.8	204
7		15.3	237

2 结果

2.1 红细胞 在光镜下,红细胞表面光滑,细胞大小相差较大,其数量统计为 2.57×10^5 个/ mm^3 ,范围是 $(1.94 \sim 3.12) \times 10^5$ 个/ mm^3 。成熟红细胞多数为卵圆形和椭圆形,少数为梭形和梨形(图版 :1),其形态学参数见表 2。成熟红细胞核椭圆形,位于细胞中央,核中染色质密集,被染成深蓝色。细胞质嗜酸性,被染成粉红色。除成熟红细胞外,偶尔可见少量未成熟红细胞。与成熟红细胞相比,未成熟红细胞体积稍小,近圆形,核质比较大,核圆形,染色质结构较疏松,着色较浅。在血涂片中常可见到被染成淡红色的“核影”红细胞^[18](图版 :2),似裸核状,其结构不同于血液中其他有形成分,颜色随体积的增大而渐减。

表 2 红细胞形态学参数

Table 2 The morphological parameters of erythrocyte of *Ichthyophis bannanica* (Mean \pm SD, μm)

项目 Item	椭圆形红细胞 Ellipse-shaped erythrocyte	卵圆形红细胞 Oval-shaped erythrocyte	梭形红细胞 Spindle-shaped erythrocyte	梨形红细胞 Pear-shaped erythrocyte
红细胞长径 Ery major axis	32.30 \pm 5.08	28.33 \pm 2.13	48.06 \pm 8.84	33.26 \pm 5.37
红细胞短径 Ery minor axis	18.17 \pm 2.71	21.83 \pm 1.75	13.89 \pm 1.62	13.24 \pm 1.73
细胞核长径 Nuclei major axis	13.66 \pm 1.20	13.34 \pm 0.83	14.41 \pm 1.66	13.81 \pm 1.07
细胞核短径 Nuclei minor axis	7.24 \pm 0.91	9.14 \pm 0.77	7.16 \pm 1.21	7.21 \pm 1.16

2.2 白细胞 白细胞多为近圆形,表面不光滑,其数量统计为 0.72×10^3 个/ mm^3 ,范围是 $(0.57 \sim 0.83) \times 10^3$ 个/ mm^3 。根据其细胞质内

有无特殊颗粒可分为有粒白细胞和无粒白细胞。有粒白细胞根据其嗜色性可分为嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞和嗜碱性粒细胞。无粒白

表 3 版纳鱼螈白细胞的形态学参数和分类计数 (Mean \pm SD)Table 3 The morphological parameters of leucocyte and differential leucocyte counts (DLC) of *Ichthyophis bannanica*

项目 Item	嗜中性粒细胞 Neutrophil	嗜酸性粒细胞 Eosinophil	嗜碱性粒细胞 Basophil	单核细胞 Monocyte	大淋巴细胞 Large lymphocyte	小淋巴细胞 Small lymphocyte
白细胞分类计数 DLC (%)	14.9	1.3	10.9	19.1	5.9	47.9
细胞长径 Long axis (μm)	21.92 \pm 3.05	26.75 \pm 2.42	22.75 \pm 2.72	20.54 \pm 1.94	21.52 \pm 1.81	13.13 \pm 1.40
细胞短径 Short axis (μm)	19.66 \pm 2.39	23.84 \pm 2.60	19.84 \pm 1.40	12.68 \pm 1.42	20.23 \pm 1.73	12.06 \pm 1.35

细胞则包括淋巴细胞和单核细胞。白细胞的形态学参数和分类计数见表 3。

2.2.1 嗜酸性粒细胞 嗜酸性粒细胞的大小为(26.75 \pm 2.42) μm \times (23.84 \pm 2.60) μm ,数量最少,约占白细胞总数的 1.3%。细胞呈近圆形或不规则形,细胞质内颗粒大且分散,被染成紫红色,细胞核圆形或马蹄形,多数位于细胞中央(图版 :3)。

2.2.2 嗜中性粒细胞 嗜中性粒细胞的大小为(21.92 \pm 3.05) μm \times (19.66 \pm 2.39) μm ,约占白细胞总数的 14.9%。细胞多呈近圆形或马蹄形,也有少量呈不规则形。核质之间明显,细胞核较大常偏位,核有单叶核和分叶核,单叶核呈肾形、马蹄形和半圆形,分叶核多为 2~3 叶,少数为 4~6 叶,被染成蓝紫色。细胞质颗粒清晰,被染成紫红色(图版 :4)。

2.2.3 嗜碱性粒细胞 嗜碱性粒细胞的大小为(22.75 \pm 2.72) μm \times (19.84 \pm 1.40) μm ,约占白细胞总数的 10.9%。细胞呈近圆形或不规则形,细胞质内颗粒较嗜酸性粒细胞的小,而且集中,被染成深蓝色,细胞核近圆形,大多数位于细胞中央(图版 :5)。

2.2.4 淋巴细胞 淋巴细胞多呈近圆形,表面有许多伪足状突起,细胞核位于细胞中央,所占比例很大,核被染成深蓝色,胞质少且被染成蓝色。根据细胞的大小及内部结构特征,可将淋巴细胞分为大淋巴细胞和小淋巴细胞(图版 :6)。大淋巴细胞的大小为(21.52 \pm 1.81) μm \times (20.23 \pm 1.73) μm ,约占白细胞总数的 5.9%。大淋巴细胞近圆形,表面有许多粗大的伪足状突起,核较大,细胞质较少。小淋巴细胞大小为(13.13 \pm 1.40) μm \times (12.06 \pm 1.35) μm ,约占白

细胞总数的 47.9%。小淋巴细胞表面无明显伪足样的突起,细胞质极少。

2.2.5 单核细胞 单核细胞的大小为(20.54 \pm 1.94) μm \times (12.68 \pm 1.42) μm ,约占白细胞总数的 19.1%。单核细胞多呈椭圆形,细胞核较大,位于细胞的中央,被染成深蓝紫色,核多为椭圆形,少数呈肾形。细胞质较少,可见于细胞两端,被染成淡蓝灰色(图版 :7)。

2.3 血栓细胞 血栓细胞的大小为(16.87 \pm 2.96) μm \times (9.36 \pm 1.44) μm ,多呈不规则形,常数个聚在一起,也偶有 3~4 个连在一起,呈带状。细胞核较大,被染成深蓝紫色。细胞质少,呈蓝灰色(图版 :8)。

3 讨论

3.1 红细胞 红细胞是组成血液的主要有形成分,在气体运输中起重要的作用。众多研究表明,进化地位越高的动物红细胞越小,数目越多,而较低等的动物则相反^[2,19]。在两栖类中,有尾目(Urodela)的新疆北鲵的红细胞长径为 26~37 μm ^[3],无尾目(Anura)中黑斑蛙的红细胞长径为 21~26 μm ^[5],它们的红细胞长径都比大多数爬行类动物的(15.5~21.5 μm)大^[20],但却比无足目中版纳鱼螈的红细胞长径小。从进化的角度看,无足目是两栖动物中比较原始的类群,其系统地位目前仍有争议。Zapata 对达岛鱼螈血细胞和淋巴器官的研究结果提示,无足目与有尾目比与无尾目的亲缘关系更近^[1]。版纳鱼螈的红细胞比有尾类和无尾类的大,是否可以作为该物种在两栖类的进化中处于较原始地位的的证据之一?这还有待于分子证据的进一步研究。与鱼类相比,版纳鱼螈的进化地位

较高,但其红细胞却比大多数鱼类的大。鱼类中草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 红细胞长径为 $(12.93 \pm 0.75) \mu\text{m}$, 鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 红细胞长径为 $(12.20 \pm 0.42) \mu\text{m}$ ^[21]。从动物的新陈代谢和生活习性的角度分析,鱼类生活在水中,运动量相对较大,新陈代谢旺盛,需氧量较大;成体版纳鱼螈穴居生活,昼伏夜出,运动量较小,代谢率较低,需氧量较鱼类的小,因此版纳鱼螈的红细胞反而比大多数鱼类的大。

版纳鱼螈的红细胞呈卵圆形、椭圆形、梨形和梭形,尤其是梭形的红细胞非常特殊,在血细胞中数量不少,长径最长达 $56.90 \mu\text{m}$,相对表面积也较大。这种梭形的红细胞在鱼类、两栖类和爬行类的血液中十分罕见,在达岛鱼螈中亦未发现^[1]。在许多研究动物血细胞的资料中^[19~25],仅见吴友吕等发现南极金图企鹅 (*Gentoo penguin*) 有卵形和菱形或梭形红细胞^[23],李霖等发现扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 的红细胞是梭形的,并指出这可能是扬子鳄红细胞的特点^[24]。版纳鱼螈幼体水生,成体陆生穴居,穴内氧气含量较外界低,其梭形红细胞相对表面积较大,携氧能力较强,与其从水生过渡到陆生的两栖穴居的生活习性相适应。

在版纳鱼螈血涂片中,可观察到被染成淡红色的“核影”红细胞,其着色随着体积的变大而减淡。“核影”红细胞是红细胞衰老过程中的一种形态表现,是由于某些因素造成红细胞膜破裂,胞质外溢,而其核仍在血液中存在一段时间,同时在此过程中细胞核吸水膨胀,体积增大,逐渐分解,形成“核影”^[18]。

3.2 白细胞 白细胞是动物机体防御和保护功能的重要组成部分,不同的白细胞在机体内所起的作用不同,但其机能主要是变形运动和吞噬作用,并有免疫机能。版纳鱼螈各种白细胞的形态结构与达岛鱼螈的相似,但分类计数值不同,版纳鱼螈的淋巴细胞最多,其次是单核细胞、嗜中性粒细胞和嗜碱性粒细胞,嗜酸性粒细胞最少,达岛鱼螈也是淋巴细胞最多,但嗜碱性粒细胞最少^[1]。Ellis 等指出,将淋巴细胞分

为大小两类是武断的,因为它们可能代表了同一种细胞的不同功能状态,而不大可能是具有不同功能的两种细胞^[26]。Barber 等也认为许多淋巴细胞体积是连续变化的,不能用“大”、“小”界定^[27]。但是也有学者,如 Yoffey^[28] 和 Parrott^[29] 将其分为“大”、“小”两类,认为它们是具有不同功能的两类白细胞。本研究发现,版纳鱼螈的淋巴细胞大小差别确实很大,其形态结构也有差异,大小两类淋巴细胞在形态和结构上的不同可能与它们在免疫功能上的分工有关。版纳鱼螈的嗜中性粒细胞形态多样,核多分为 2~6 叶,叶间有染色质细丝相连,细胞核分叶多少标志着细胞所处的活动状态和年龄,分叶愈多,细胞愈老化。嗜中性粒细胞的形态多样,可推测它有很强的趋化特性以及变形运动和吞噬消化细菌的功能。嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的胞质内充满粗大的颗粒,与其具有较强的运动防御功能和吞噬能力有关。

3.3 血栓细胞 版纳鱼螈的血栓细胞多呈不规则形,达岛鱼螈的为纺锤形,但都是具有大的核,且成群出现^[1]。版纳鱼螈的血栓细胞的结构和功能与鱼类及其他两栖类的相似,与哺乳类血小板的功能相当,主要参与止血和凝血过程,是一种具有保护性作用的细胞。

参 考 文 献

- [1] Zapata A, Gmariz R P, Garrido E, et al. Lymphoid organs and blood cells of the caecilian *Ichthyophis kotoensis*. *Acta Zoologica*, 1982, **63**(1): 11 ~ 16.
- [2] 李丕鹏,何图湘,张育辉. 大鲵的血液学观察. 陕西师范大学学报(自然科学版), 1989, **17**(3): 50 ~ 53.
- [3] 侯水薇,王秀玲,王志勇. 新疆北鲵血液的组织学观察. 两栖爬行动物学研究, 1995, (4 - 5): 58 ~ 61.
- [4] 马德滨. 东北小鲵和极北鲵血细胞形态学参数研究. 哈尔滨学院学报, 2005, **26**(10): 123 ~ 124.
- [5] 潘玉芝. 青蛙血液的组织学研究. 北京大学学报(自然科学版), 1956, (1): 89 ~ 101.
- [6] 潘鸿春. 虎纹蛙外周血细胞的超微结构. 解剖学杂志, 2001, **24**(6): 565 ~ 567.
- [7] 汪松,解焱主编. 中国物种红色名录 第一卷 红色名录. 北京:高等教育出版社, 2004, 190.
- [8] 杨大同. 新种版纳鱼螈的发现及描述. 两栖爬行动物学

- 报,1984,3(2):73~75.
- [9] 温业棠. 版纳鱼螈的消化系统和呼吸系统. 见:赵尔宓主编. 从水到陆:蛇蛙研究丛书之一. 北京:中国林业出版社,1990,43~45.
- [10] 温业棠. 版纳鱼螈的循环系统. 见:赵尔宓主编. 动物科学研究:蛇蛙研究丛书之三. 北京:中国林业出版社,1991,98~100.
- [11] 温业棠,庞启平. 版纳鱼螈和双带鱼螈核型的比较研究. 动物学研究,1990,11(2):121~125.
- [12] 温业棠. 版纳鱼螈的境遇. 四川动物,1998,17(2):54.
- [13] Zhang P,Zhou H,Chen Y Q, et al. Mitogenomic perspectives on the origin and phylogeny of living amphibians. *Animal Science and Zoology*,2005,54(3):391~400.
- [14] 蒙绍权,李桂芬,黄鸿宣等. 版纳鱼螈的骨骼系统. 动物学杂志,2006,41(4):100~106.
- [15] 李桂芬,许崇任. 版纳鱼螈的侧线系统结构. 动物学报,2007,53(2):346~353.
- [16] 蒙绍权,贝永建,李毅等. 北流市六麻镇版纳鱼螈数量和分布初步调查. 玉林师范学院学报,2006,27(3):114~117.
- [17] 蒙绍权,李桂芬,宁秋梅等. 版纳鱼螈生殖系统解剖. 动物学杂志,2007,42(5):76~82.
- [18] 张丰旺,虞鹏程,马小平. 荷包红鲤等鱼类血液涂片中“核影”的研究. 中国水产科学,1996,3(2):113~115.
- [19] 黄敏毅,张育辉,王宏元. 北方山溪鲵外周血细胞的组织学观察. 陕西师范大学学报(自然科学版),2004,32(3):87~90.
- [20] 吴孝兵,张盛周,吴海龙等. 16种爬行动物血细胞形态学参数研究. 动物学杂志,1998,33(1):29~32.
- [21] 张奇亚,李正秋,罗晓春. 鳖、蛙、鱼血细胞的显微观察与比较. 水利渔业,1999,19(3):1~3.
- [22] 吾玛尔·阿不力孜,艾尼瓦尔·吐米尔. 四爪陆龟血细胞形态学参数的初步研究. 动物学杂志,2003,38(5):50~53.
- [23] 吴友吕,祝希雅. 南极企鹅红细胞的细微结构和血红蛋白的凝胶电泳. 东海海洋,1987,5(3):48~53.
- [24] 李霖,李伟,吴孝兵等. 扬子鳄外周血细胞的超微结构. 水生生物学报,2002,26(1):45~51.
- [25] 黄斌,杨霁虹,陆玉建. 巴西彩龟血细胞显微结构的观察研究. 动物科学与动物医学,2002,19(9):16~18.
- [26] Ellis A E. The leukocytes of fish:A review. *J Fish Biol*,1977,11:453~491.
- [27] Barber D L,Westermann J E M,White M G. The blood cells of the Antarctic icefish *Chaenocephalus aceratus* lonnberg: light and electron microscopic observations. *J Fish Biol*,1981,19:11~28.
- [28] Yoffey J M. The fourth circulation. In: Yoffey J M ed. The Lymphocyte in Immunology and Haemopoiesis. London:Edward Arnold Ltd,1967,1~10.
- [29] Parrott D M,De Sousa M. Thymus-dependent and thymus-independent populations; origins, migratory patterns and lifespan. *Clin Exp Immunol*,1971,8(5):663~684.

图 版 说 明

1. R₁:卵圆形的红细胞,R₂:椭圆形的红细胞,R₃:梭形的红细胞,R₄:梨形的红细胞;2. R₅:“核影”红细胞;3. A:嗜酸性粒细胞;4. N:嗜中性粒细胞;5. B:嗜碱性粒细胞;6. L₁:大淋巴细胞,L₂:小淋巴细胞;7. M:单核细胞;8. T:血栓细胞。

Explanation of Plate

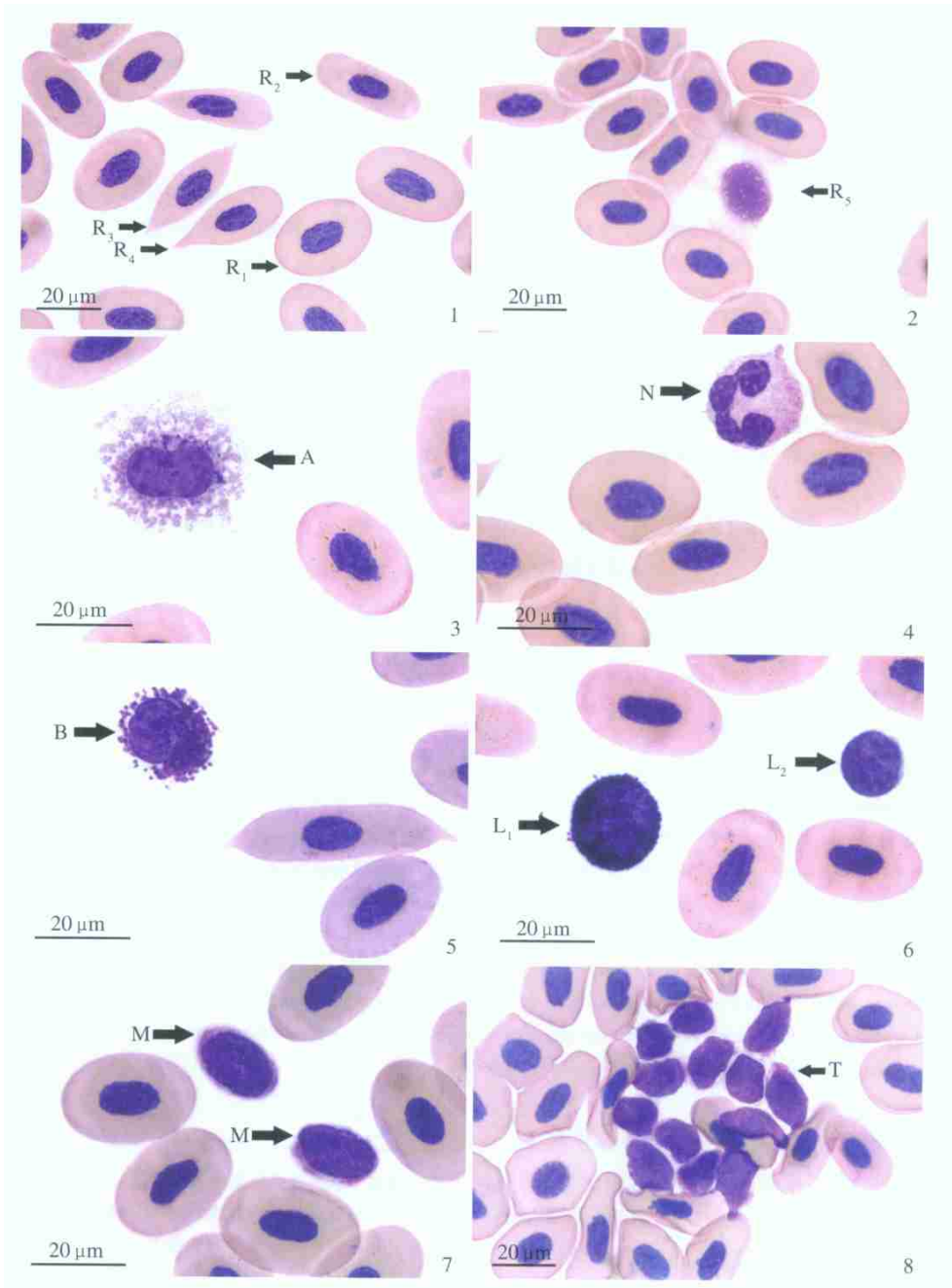
1. R₁:Oval-shaped erythrocyte,R₂:Ellipse-shaped erythrocyte,R₃:Spindle-shaped erythrocyte,R₄:Pear-shaped erythrocyte;2. R₅:Nuclear shadow erythrocyte;3. A:Eosinophil;4. N:Neutrophil;5. B:Basophil;6. L₁:Large lymphocyte,L₂:Small lymphocyte;7. M:Monocyte;8. T:Thrombocyte.

李桂芬等:版纳鱼螈外周血细胞观察

图版

LI Gui-Fen *et al.*: Peripheral Hematocytes in Caecilian *Ichthyophis bannanica*

Plate



图版说明见文后