

综述

12

Q94
Q959.4

648-654

鱼类免疫组织和细胞的研究概况

张永安 孙宝剑[✓] 聂品

(中国科学院水生生物研究所;淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉 430072)

IMMUNE TISSUES AND CELLS OF FISH: A REVIEW

ZHANG Yong-an, SUN Bao-jian and NIE Pin

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences; State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology Wuhan 430072)

关键词: 鱼类; 免疫组织; 免疫细胞

Key words: Fish; Immune tissue; Immune cell

中图分类号: Q939.91 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2000)06-0648-07

近几十年来,随着世界人口的增长和消费水平的提高,世界渔业也得到了长足的发展。但与此同时,高密度养殖模式也引起水产动物病害的频繁发生,并造成一定的环境污染。作为主要水产养殖对象的鱼类,在其与病原和环境之间相互作用的过程中,主要是靠其免疫系统来抵御外来病原生物的危害,通过非特异性和特异性的免疫防御机制来维持机体内环境的稳定。因此,对鱼类免疫系统的研究,不仅可以认识鱼体同病原间的作用方式,反映鱼类赖以生存的水环境的质量,还可用以研究脊椎动物免疫系统的进化规律。

鱼类免疫系统是鱼体执行免疫防御功能的机构,包括免疫组织、免疫细胞和体液免疫因子三大类。体液免疫因子作为免疫应答的效应分子对病原具有直接的防御作用,但是免疫组织和细胞是鱼类防御系统的基础,为鱼体防止病原侵入提供了最初的防线。本文着重就鱼类免疫组织和细胞的研究进展作一概述。

1 免疫组织和器官

免疫组织是免疫细胞发生、分化、成熟、定居和增殖以及产生免疫应答的场所。鱼类与哺乳动物在免疫器官组成上的主要区别在于前者没有骨髓和淋巴结。胸腺、肾脏和脾脏是鱼类最主要的免疫器官;粘膜淋巴组织(Mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)同样是其免疫系统的重要组成部分^[1]。

收稿日期:2000-05-15;修订日期:2000-07-14

基金项目:中国科学院“九五”重大B资助项目(KZ951-B1-111)

作者简介:张永安(1972—),男,陕西省西安市人,在读博士研究生,主要从事鱼类免疫学研究

1.1 胸腺

鱼类胸腺起源于胚胎发育的咽囊,在免疫组织的发生过程中最先获得成熟淋巴细胞,一般认为是鱼类的中枢免疫器官。鱼类胸腺在发育过程中与头肾逐渐靠拢,并伴随有明显的细胞迁移发生^[2]。胸腺位于鳃腔后方,表面有一层上皮细胞膜与咽腔相隔,有效地防止了抗原性或非抗原性物质通过咽腔进入胸腺实质^[3]。鱼类胸腺可分为内区、中区和外区,其中内区和中区在组织结构上分别类似于高等脊椎动物胸腺的髓质和皮质^[4]。硬骨鱼类胸腺中血管的排列结构与高等脊椎动物的十分相似,提示硬骨鱼类胸腺中同样可能存在形态学上的“血胸屏障”^[5]。鱼类胸腺是由淋巴细胞、淋巴母细胞、浆母细胞、分泌样细胞以及其它游离间充质细胞(巨噬细胞、肌样细胞和肥大细胞等)组成,它们分布于由网状上皮细胞形成的基质网孔中^[4-7]。在鲤(*Cyprinus carpio*)个体发育过程中,自受精4周以后,胸腺“皮质”比“髓质”出现更多的编程性死亡细胞,显示了“皮质”中胸腺细胞的连续选择^[8]。胸腺在鱼类免疫应答中的作用可能是参与T淋巴细胞的成熟,主要承担细胞免疫的功能^[4,6,9]。另外,鱼类胸腺随着性成熟和年龄的增长或在环境胁迫和激素等外部刺激作用下可发生退化^[4,10],在一年内各月间胸腺细胞的数量、胸腺大小及其各区间的比例也呈现出规律性的变化^[11]。

1.2 肾脏

鱼类肾脏分为头肾(Pronephros)、中肾(Mesonephros)和后肾(Opisthonephros)三部分。在肾脏的发育过程中,头肾失去排泄功能而成为免疫器官和造血器官;后肾作为排泄器官,其管间区在造血和免疫方面也具有一定作用^[6]。鱼类头肾一般是继胸腺之后第二个发育的免疫器官^[12],不依赖抗原刺激可以产生红细胞和B淋巴细胞等细胞,是免疫细胞的发源地,相当于哺乳动物的骨髓;另一方面,受抗原刺激后,头肾和后肾造血实质细胞出现增生,而且存在抗体产生细胞,表明头肾是硬骨鱼类重要的抗体产生器官,相当于哺乳动物的淋巴结。因此可以说,硬骨鱼类头肾具有类似哺乳动物中枢免疫器官及外周免疫器官的双重功能^[6,9,13]。在鱼类头肾中,B淋巴细胞总是散布于造血细胞和粒细胞生成细胞群中,并与黑色素巨噬细胞中心(Melanomacrophage center, MMC)和血管紧密相连,提示它们在免疫防御中协同作用^[14]。

1.3 脾脏

有颌鱼类才出现真正的脾脏。软骨鱼类的脾脏较大,内含椭圆体,主要是一个造血器官,分化为红髓和白髓。硬骨鱼类脾脏没有分化为明显的红髓和白髓,但同时具有造血和免疫功能。与头肾相比,脾脏在体液免疫反应中处于相对次要的地位,而且受抗原刺激后其增殖反应以弥散的方式发生在整个器官上^[12,15]。大多数硬骨鱼类脾内均有明显的椭圆体,具有捕集各种颗粒性和非颗粒性物质的功能^[1]。硬骨鱼类受到免疫接种后,其脾、肾和肝等器官中的黑色素巨噬细胞增多,并与淋巴细胞和抗体生成细胞聚集在一起形成黑色素巨噬细胞中心,其作用是:(1)参与体液免疫和炎症反应;(2)对内源或外源异物进行贮存、破坏或脱毒;(3)作为记忆细胞的原始生发中心;(4)保护组织免除自由基损伤。这与高等脊椎动物脾脏中的生发中心在组织与功能上相似^[6,14,16,17]。

1.4 粘膜淋巴组织

粘膜淋巴组织(MALT)在鱼类体液和细胞免疫中的作用,目前已引起免疫学家的重

视。作为 MALT, 鱼类皮肤、鳃和消化道是病原侵入鱼体的门户, 在其上皮组织中存在淋巴细胞、巨噬细胞和各类粒细胞等。当鱼体受到抗原刺激时, 巨噬细胞可以对抗原进行处理和呈递, 抗体分泌细胞 (Antibody secreting cell, ASC) 会分泌特异性抗体, 与粘液中溶菌酶和补体等非特异性的保护物质一道组成抵御病原微生物感染的有效防线^[1,6]。

鱼类粘膜免疫系统 (Mucosal immune system) 相对于系统免疫系统 (Systemic immune system) 具有一定的自主性, 不同的免疫接种途径决定着两者体液免疫应答显示出不同的动态规律。这在养殖鱼类免疫接种方法的选择和改进方面具有实际意义^[6,18,19]。鱼体经口腔免疫后, 头肾、血液和肠中都出现 ASC, 但是鳃中几乎没有, 而且在血清中可检测到的特异性抗体在皮肤粘液中检测不到^[18-20]。经肛门插管注射抗原可诱导肠和皮肤粘液以及胆汁中产生特异性抗体, 而血清中没有^[18]。经腹腔免疫 4 周后, 头肾、血液和鳃中抗体分泌细胞数量同时达到峰值, 而直到第 7 周, 肠中才有显著反应^[18,19]。在用颗粒抗原进行浸泡免疫时, 皮肤摄取抗原的能力远大于鳃; 免疫 24d 后, 大部分颗粒抗原仍停留在皮肤和鳃中, 只有少数抗原被转运到头肾和脾中^[21,22]。由此说明, 经口腔和腹腔免疫可明显刺激系统免疫应答, 而经浸泡免疫和肛门插管注射抗原更适宜于诱导机体粘膜免疫反应。

2 免疫细胞

凡参与免疫应答或与免疫应答有关的细胞均称为免疫细胞。免疫细胞分为两大类: 一类是淋巴细胞, 主要参与特异性免疫反应, 在免疫应答中起核心作用, 另一类是吞噬细胞。鱼类免疫细胞主要存在于免疫器官和组织以及血液和淋巴液中。

2.1 淋巴细胞

在哺乳动物中参与特异性免疫应答的淋巴细胞主要有两类, 即 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞。T 细胞主要介导细胞免疫并在免疫应答中起调节作用; 而 B 细胞在体液免疫中与抗体的合成有关。T 细胞和 B 细胞具有不同的膜表面标志 (包括表面受体和表面抗原), 这是鉴别两类淋巴细胞的结构基础。即, B 细胞能表达膜表面免疫球蛋白 (Surface membrane immunoglobulin, SmIg) 作为抗原受体和表面抗原, 而 T 细胞则不能产生免疫球蛋白; T、B 细胞的有丝分裂原受体也不同, 植物血凝素 (PHA) 和刀豆蛋白 A (ConA) 可刺激 T 细胞, 而脂多糖 (LPS) 等只能刺激 B 细胞, 使之转化为淋巴母细胞。

鱼类是否也具有两类淋巴细胞? 这个问题在 70 年代提出来以后, 有关的研究工作陆续展开。Sizemore 等^[23]用抗斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 免疫球蛋白的抗体从外周血细胞中分离出 SmIg⁺ 细胞, 能与 LPS 作用, 而 SmIg⁻ 细胞只有当辅佐细胞存在时才能对 ConA 或 LPS 产生应答。Ellsaesser 等^[24]用 ConA 刺激斑点叉尾鲷胸腺细胞, 在辅佐细胞存在情况下增生, 但也有少数细胞对 LPS 产生应答。以上报道中, “SmIg⁺ 细胞”或“胸腺细胞”对 LPS 产生应答, 反映了细胞分离技术不够成熟, 或是胸腺中滞留有少量的 B 细胞。Blaxhall^[25]用 Percoll 不连续梯度对褐鳟 (*Salmo trutta*) 外周血淋巴细胞进行分离, 发现分布于低密度的淋巴细胞表面光滑, 对 PHA 的刺激较敏感, 可能相当于人类的 T 细胞; 分布于高密度的淋巴细胞大多表面被毛, 电镜下其胞质内具有较多的线粒体, 可能相当于人类的 B 细胞。然而人类 T 细胞的密度却高于 B 细胞。另外, 当使用抗鱼类免疫球

蛋白的多抗时,几乎所有的淋巴细胞都呈现 SmIg⁺ 反应,这可能是由于多抗具有抗碳水化合物活性,与所有淋巴细胞非特异性地发生了反应^[26,27]。因此,对鱼类表型不同的淋巴细胞进行分离似乎只能通过更精确的方法来实现。所幸的是,近年来单克隆抗体技术、分子生物学技术和流式细胞术等新技术的应用,为淋巴细胞的辨别和分离提供了有效的手段和有力的证据,从而证实了鱼类同样存在相当于哺乳动物 T、B 细胞的两类淋巴细胞^[28-32]。

针对免疫球蛋白或 T、B 细胞的单克隆抗体,现已被用来研究个体发育中各组织不同淋巴细胞的分布和组成。鲤在孵化后几周内, T 细胞在胸腺中达到 70%, 在头肾中也有分布。但是以后除胸腺外,其余免疫器官中的 T 细胞逐渐减少甚至消失;孵化后第二周 B 细胞在头肾中出现,随后出现在脾和血液中,但是在胸腺和肠道中却很少^[33]。在成体鱼类的头肾、脾和外周血中 B 细胞达到 22—40%, 而胸腺中仅有 2—5%^[34,35]。在大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[14] 和海鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[36] 的肠粘膜和粘膜下层分布有较多的 T 细胞,而 B 细胞主要在固有层中参与粘膜免疫应答。

2.2 吞噬细胞

鱼类吞噬细胞除作为辅佐细胞具有特异性免疫功能外,也是组成非特异性防御系统的关键成分,在抵御微生物感染的各个阶段发挥重要作用:粘膜吞噬细胞构成抗感染的第一道屏障;单核细胞和粒细胞等血细胞作为第二道防线可以破坏出现在循环系统中的病原生物;最后,器官和组织中具有吞噬活性的细胞能够摄取和降解微生物及其产物。受到微生物侵扰时,机体炎症反应的核心细胞是巨噬细胞和粒细胞,它们能够被微生物的有害产物激活并产生更多更有效的抗微生物因子^[1]。鱼类的吞噬细胞主要有单核细胞、巨噬细胞和各种粒细胞。

2.2.1 单核细胞 单核细胞存在于所有脊椎动物中,环境污染或疾病感染都能引起鱼类血液中单核细胞数目显著增加^[37]。与哺乳动物的相似,鱼类单核细胞也有较多的胞质突起,细胞内含有较多的液泡和吞噬物,可进行活跃的变形运动,具有较强的粘附和吞噬能力,能够在血流中对异物和衰老的细胞进行吞噬消化^[38-40]。单核细胞是在造血组织中产生并进入血液的分化不完全的终末细胞,它还可以随血流进入各组织并在适宜的条件下发育成不同的组织巨噬细胞。

2.2.2 巨噬细胞 巨噬细胞在不同组织中有多种类型,在同一组织也有不同亚类,如 Neumannl 等^[41] 在鲫 (*Carassius auratus*) 头肾白细胞培养物中分离出形态、细胞化学和杀菌机制不同的三类巨噬细胞。在免疫应答过程中,当病原微生物表面覆盖有免疫球蛋白和补体成分时,巨噬细胞可以通过这些因子的特异性受体识别并杀伤微生物。巨噬细胞膜表面的碳水化合物受体同样有助于对入侵微生物的识别和吞噬。在诸如炎症反应中,巨噬细胞可以分泌许多生物活性物质,包括酶、防卫素、氧代谢物、廿碳四烯酸代谢物和细胞分裂素等。巨噬细胞接触病原微生物后,还能够生成肿瘤坏死因子 α , 增强巨噬细胞呼吸激增作用,从而促进活性氧离子和氮离子的释放来杀死微生物^[42]。另外,巨噬细胞可以通过对其表面组织相容性复合体分子中抗原的呈递、对淋巴细胞功能的调节、对自身及其它细胞生长复制的控制等途径来操纵机体的免疫应答。现已发现多种物质,包括干扰素、某些多肽和蛋白质、脂多糖及 $\beta(1,3)$ -葡聚糖等,可使巨噬细胞形态特征改变、分泌

物增多、吞噬和胞饮能力增强^[11]。值得注意的是,对鱼类巨噬细胞凝集(Macrophage aggregates, MAs)或黑色素巨噬细胞中心的检测,可望作为衡量鱼体健康水平及环境污染状况的生物标志^[16]。

2.2.3 粒细胞 粒细胞在鱼类中,根据其来源、形态及功能,可分为三类,即嗜中性、嗜酸性和嗜碱性粒细胞。软骨鱼类粒细胞生成的主要部位是脾脏和其它淋巴髓样组织,如薄壁囊器(Epigonal organ)和莱狄希器(Organ of Leydig);脾和肾是硬骨鱼类粒细胞生成的主要场所。

嗜中性粒细胞是硬骨鱼类中最常见的粒细胞。其超微结构在各种鱼类间大不相同,主要表现在其胞质颗粒的形态结构上。多数硬骨鱼类嗜中性粒细胞颗粒内具有晶体样或纤维状的内涵物,而有些硬骨鱼类相应细胞颗粒内却并不存在这样的亚结构。因此,纤丝等亚结构并非所有硬骨鱼类嗜中性粒细胞颗粒内的鉴别性特征,这种结构差异可能与细胞的成熟度有关,而并非细胞亚类的不同^[43,44]。鱼类嗜中性粒细胞具有活跃的吞噬和杀伤功能,但其吞噬能力一般比单核细胞的弱^[45]。另外,在适当刺激下,鱼类嗜中性粒细胞也显示出化学发光性和趋化性^[46]。

鱼类是否同时具有嗜酸性和嗜碱性粒细胞,争议较大。有些鱼类这两种细胞均未见到;而大多数鱼类仅具前者;只有少数鱼类才有嗜碱性粒细胞。徐豪等^[37]认为嗜碱性颗粒在制片过程中极易解体,因此很难观察到嗜碱性粒细胞。鱼类嗜碱性粒细胞的功能目前尚难定论。

嗜酸性粒细胞的前体产生于造血淋巴器官,随着血液循环进入不同器官如鳃和肠道,然后分化成为粒细胞,但仍然具有有丝分裂的能力^[47,48]。电镜下,鱼类嗜酸性粒细胞颗粒内的晶状结构及核心是其形态鉴定的可信依据。鱼类的嗜酸性粒细胞和哺乳动物的肥大细胞在细胞染色、分化途径以及免疫功能上存在着相似性,在急性组织损伤和细菌感染的情况下能够脱颗粒,释放颗粒中的活性成分。鱼类嗜酸性粒细胞也具有吞噬能力,在寄生虫长期感染的情况下能够聚集在寄生部位,参与机体抵御寄生虫的免疫反应^[49-51]。

参考文献:

- [1] Dalmo R A, Ingebrigtsen K, Bogwald J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES) [J]. *J Fish Dis*, 1997, 20: 241—273
- [2] Jósefsson S, Tatner M F. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol*. 1993, 3: 35—49
- [3] Castillo A, Razquin B, Villena A J, et al. Thymic barriers to antigen entry during the post-hatching development of the thymus of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, 8: 157—170
- [4] Chilmarczyk S. The thymus in fish: development and possible function in the immune response [J]. *Ann Rev Fish Dis*, 1992, 2: 181—200
- [5] Zapata A G. Lymphoid organs of teleost fish. I. Ultrastructure of the thymus of *Rutilus rutilus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 1981, 5: 427—436
- [6] Manning M J. Fishes. In: Turner R J ed. *Immunology: A Comparative Approach* [M]. Britain: John Wiley & Sons Ltd., 1994. 69—99
- [7] Bigaj J, Dulak J, Pezytycz B. Lymphoid organs of *Gasterosteus aculeatus* [J]. *J Fish Biol*. 1987, 31 (Suppl A): 233—234

- [8] Romano N, Taverner-Thiele A T, Fanelli M, *et al.* Ontogeny of the thymus in a teleost fish, *Cyprinus Carpio* L.: developing thymocytes in the epithelial microenvironment [J]. *Dev Comp Immunol*, 1999, 23: 123—137
- [9] 钟明超,黄浙. 鲑鱼淋巴样器官的发育[J]. 水产学报,1995,19(3):258—262
- [10] 卢全章. 草鱼胸腺组织学的研究. 水生生物学报[J].1991,15(4):327—332
- [11] Álvarez F, Razquin B E, Villena A J, *et al.* Seasonal changes in the lymphoid organs of wild brown trout, *Salmo trutta* L.: A morphometrical study [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, 64:267—278
- [12] Grace M F, Manning M J. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo Gairdneri* Rich. 1836 [J]. *Dev Comp Immunol*, 1980, 4: 255—264
- [13] Imagawa T, Hashimoto Y, Kon Y, *et al.* Immunoglobulin containing cells in the head kidney of carp (*Cyprinus carpio* L.) after bovine serum albumin injection [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1991, 1: 173—185
- [14] Fournier-Betz V, Quentel C, Lamour, F, *et al.* Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, 10: 187—202
- [15] 杨先乐. 鱼类免疫学研究的进展[J]. 水产学报,1989,13(3):272—284
- [16] Secombes C J, Manning M J. Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen location in the carp *Cyprinus carpio* L [J]. *J Fish Dis*, 1980, 3: 399—412
- [17] Wolke R E. Piscine macrophage aggregates: a review [J] *Ann Rev Fish Dis*, 1992, 2:91—108
- [18] Davidson G A, Ellis A E, Secombes C J. Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1993, 17: 373—376
- [19] Davidson G A, Lin S H, Secombes C J, *et al.* Detection of specific and 'constitutive' antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1997, 58: 363—374
- [20] Rombout J H W M, van den Berg A A, Berg C T G A, *et al.* Immunological importance of the second gut segment of the carp. III. Systemic and/or mucosal immune responses after immunization with soluble and particulate antigens [J]. *J Fish Biol*, 1989, 35: 179—186
- [21] Zapata A G, ChibóA, Varas A. Cells and tissues of the immune system of fish. In: Iwama G, Nakanishi T, eds. *The Fish Immune System* [M]. London: Academic press. 1996. 1—62
- [22] Moore J D, Ototake M, Nakanishi T. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: the effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, 8: 393—407
- [23] Sizemore R G, Miller N W, Cuchens M A, *et al.* Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: The cellular requirements for *in vitro* mitogenic responses of channel catfish leukocytes [J]. *J Immunol*, 1984, 133: 2920—2924
- [24] Ellsaesser C F, Bly J E, Clem L W. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: The thymus of the channel catfish [J]. *Dev Comp Immunol*, 1998, 12: 787—799
- [25] Blaxhall P C, Sheard P R. Preliminary investigation of the characteristics of fish lymphocytes separated on a percoll discontinuous gradient [J]. *J Fish Biol*. 1985, 26: 209—216
- [26] Kaattari S L. Fish B lymphocytes: defining their form and function [J]. *Ann Rev Fish Dis*, 1992, 2: 161—180
- [27] 夏春,川合研儿,楠田理一. 鳗鲡淋巴细胞表面存在不同表型的免疫球蛋白. 水产学报,1996,20(4): 361—364
- [28] Secombes C J, van Groningen J J M, Ebgerts E. Separation of lymphocyte subpopulations in carp *Cyprinus carpio* L. by monoclonal antibodies: Immunohistochemical studies [J]. *Immunol*, 1983, 48:165—175
- [29] Xia C, Kusuda R. Studies on the heterogeneity of lymphocyte population in eel, *Anguilla japonica* [J]. *Suisanzoshoku*, 1993, 41: 119—123
- [30] Rombout J H W M, Taverner-Thiele A J, Villena M I. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): An immunohistochemical analysis [J]. *Dev Comp Immunol*, 1993, 17: 55—66
- [31] Partula S. Surface markers of fish T-cells [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, 9: 241—257

- [32] Scapugliati G, Romano N, Abelli L, *et al.* Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 2000, **10**: 329—341
- [33] Romano N, Taverne-Thiele J J, Van Maanen J C, *et al.* Leucocyte subpopulations in developing carp (*Cyprinus carpio* L.): immunocytochemical studies [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 1997, **7**: 439—453
- [34] Thuvander A, Fossum C, Lorenzen N. Monoclonal antibodies to salmonid immunoglobulin, characterization, and applicability in immuno-assays [J]. *Dev Comp Immunol.* 1990, **14**: 415—423
- [35] Navarro V, Quesada J A, Abad M E, *et al.* Immuno(cyto)chemical characterisation of monoclonal antibodies to gilt-head seabream (*Sparus aurata*) immunoglobulin [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 1993, **3**: 167—177
- [36] Abelli L, Picchietti S, Romano N, *et al.* Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 1996, **6**: 235—245
- [37] 徐豪, 张志宇. 四种淡水养殖鱼类血细胞的细微结构. 水生生物学集刊. 1983, **8**(1): 85—91
- [38] Morrow W J W, Pulsford A. Identification of peripheral blood leucocytes of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) by electron microscopy [J]. *J Fish Biol.* 1980, **17**: 461—475
- [39] Suzuki Y. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L [J]. *J Fish Biol.* 1986, **29**: 349—364
- [40] Doggett T A, Wrathmell A B, Harris J E. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae [J]. *J Fish Biol.* 1987, **31**: 147—153
- [41] Neumann N F, Barreda D R, Belosevic M. Generation and functional analysis of distinct macrophage sub-populations from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney leukocyte cultures [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 1999, **9**: 1—20
- [42] Tahir A, Secombes C J. Modulation of dab (*Limanda limanda* L.) macrophage respiratory burst activity [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 1996, **6**: 135—146
- [43] Roubal F R. Blood and other possible inflammatory cells in the sparid *Acanthopagrus australis* (Günther) [J]. *J Fish Biol.* 1986, **28**: 573—593
- [44] Page M, Rowley A F. A cytochemical, light and electron microscopical study of the leucocytes of the adult river lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L. Gray) [J]. *J Fish Biol.* 1983, **22**: 503—517
- [45] Siwicki A, Studnicka M. The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L [J]. *J Fish Biol.* 1987, **31**: 57—60
- [46] Ainsworth A J. Fish granulocytes: morphology, distribution, and function [J]. *Ann Rev Fish Dis.* 1992, **2**: 123—148
- [47] Llano E, Lopez-Fierro P, Razwuin B E, *et al.* In vitro differentiation of eosinophilic granular cells in Renibacterium salmoninarum-infected gill cultures from rainbow trout [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 1996, **6**: 173—184
- [48] Llano E, Lopez-Fierro P, Razwuin B E, *et al.* In vitro proliferation of eosinophilic granular cells in gill cultures from rainbow trout [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 1997, **7**: 519—521
- [49] Powell M D, Briand H A, Wright G M, *et al.* Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) intestinal eosinophilic granule cell (EGC) response to *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* extracellular products [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 1993, **3**: 279—289
- [50] Reite O B. Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 1997, **7**: 567—584
- [51] 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