

# 花背蟾蜍蝌蚪皮肤的结构与发育

李妍<sup>①</sup> 李丕鹏<sup>①</sup> 崔惠生<sup>①</sup> 段婷婷<sup>①</sup> 王晓旭<sup>①</sup> 王健<sup>②</sup> 陆宇燕<sup>①\*</sup>

① 沈阳师范大学两栖爬行动物研究所 辽宁省生物进化与生物多样性重点实验室 沈阳 110034;

② 烟台大学海洋学院海洋生物技术系 烟台 264005

**摘要:** 为研究花背蟾蜍(*Bufo raddei*)蝌蚪在变态发育期皮肤的显微结构特点,选取 G19、G22、G26、G36、G41、G43 和 G46 共 7 个发育期蝌蚪的连续石蜡切片及成体的背部皮肤切片,采用 H. E 和 AB-PAS 染色方法,观察了皮肤各层结构的发育时序并进行了相应的测量。结果表明,在 G19、G22 和 G26 蝌蚪表皮均为 1 层细胞;G36 蝌蚪皮肤细胞形态和层数在背腹部出现了显著的区别;在 G41 基本完成了表皮 2 层细胞的构建;G43 期完成完整的真皮构建,其中分布有毛细血管和 2 种皮肤腺。G46 皮肤在厚度、腺体和毛细血管分布等方面表现出了明显的区域性差异,并与成体皮肤结构有明显的差别,显示出蝌蚪在发育过程中皮肤结构的变化与其生存环境之间紧密的关联性。

**关键词:** 花背蟾蜍;蝌蚪;皮肤;变态发育;显微结构

**中图分类号:** Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2013)04-588-09

## The Structure and Development of Larval Skin in *Bufo raddei*

LI Yan<sup>①</sup> LI Pi-Peng<sup>①</sup> CUI Hui-Sheng<sup>①</sup> DUAN Ting-Ting<sup>①</sup>

WANG Xiao-Xu<sup>①</sup> WANG Jian<sup>②</sup> LU Yu-Yan<sup>①\*</sup>

① Center for Chinese Endemic Herp-breeding and Conservation Research and Liaoning Key Lab of Evolution and Biodiversity, Shenyang Normal University, Shenyang 110034; ② Department of Marine Biotechnology, Yantai University,

Yantai 264005, China

**Abstract:** In order to reveal the skin microstructure characteristics during metamorphosis of *Bufo raddei* tadpoles, we observed the continuous paraffin sections of skin from seven developmental stages of the tadpoles (including stages 19, 22, 26, 36, 41, 43 and 46) and the dorsal skin paraffin sections of the adult toad. The structural development timing of different skin layers was observed by H. E staining and AB-PAS methods. The results showed that one layer of cells existed at stage 19, stage 22 and stage 26 skin epidermis, and the cell morphology and the number of layers between the dorsal skin and the belly skin showed significant difference at stage 36. The structure of cells in two layers of the skin epidermis was basically completed at stage 41, and the dermis structure was completed at stage 43, in which the micro-vessels (capillaries) and two types of the skin glands could be observed. The skin thickness and numbers of glands and micro-vessels showed significant difference in different regions at stage 46, and were significantly different from the skin structure of the adult toad. The results indicated a close correlation between the development of the tadpole skin structure and its living environment.

**Key words:** *Bufo raddei*; Tadpole; Skin; Metamorphosis; Microstructure

**基金项目** 国家自然科学基金项目(No. 30870276);

\* 通讯作者, E-mail: luyuyan1962@163.com;

**第一作者介绍** 李妍,女,硕士研究生;研究方向:两栖爬行动物环境毒理学;E-mail: liyansunnyeveryday@163.com。

**收稿日期:** 2013-01-19, **修回日期:** 2013-06-01

两栖动物是脊椎动物演化过程中由水生到陆生的过渡类型,其皮肤除作为体表的保护结构外,还在呼吸、调节体内水分平衡、调节温度和繁殖等多方面发挥着不可忽视的作用(Rinaldi 2002, Gomes et al. 2007, 林文达等 2008)。对两栖动物成体皮肤的显微结构有较多的报道(耿欣莲 1959, 吴翠蘅等 1983, 吴淑辉等 1994, Schwinger et al. 2001, Brizzi et al. 2002, 张贤芳等 2002, 陆宇燕等 2004, 吴文英 2011),但两栖类个体发育过程中,尤其变态发育过程中皮肤结构的构建和演化至今鲜有报道。花背蟾蜍(*Bufo raddei*)是中国北方的广布种,在发育生物学和环境污染检测等方面已被广泛作为实验动物(龙静等 2004, 何米雪等 2006, 魏仲梅等 2008)。本研究从组织学水平,观察了花背蟾蜍蝌蚪变态发育过程中皮肤结构的变化及各主要结构的演化时序,旨在了解花背蟾蜍蝌蚪皮肤组织学结构的变化特征,为两栖动物皮肤组织学及比较组织学积累基础资料。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 将采自沈阳北陵公园的抱对花背蟾蜍带回实验室,置于 60 cm × 40 cm × 25 cm 的整理箱内,其内放置少量曝气 2 d 以上的自来水和 1 ~ 2 枚石块,用于蟾蜍产卵时卵带缠绕。待其产卵 1 h 后,移除成体,让受精卵继续发育,整理箱内盛有 15 cm 高曝气的自来水。孵化后的蝌蚪投以水丝蚓(*Limnodrilus hoffmeisteri*)、熟蛋黄、菜叶等,饲养期间整理箱水温为(24 ± 3)℃。整理箱放置于室内的试验台上,避免阳光直射而导致的皮肤色素部分变化及水温大幅度波动。

**1.2 方法** 按 Gosner 分期标准(Gosner 1960),选取 G19(孵化前,心搏动期)、G22(孵化后,尾血循环期)、G26(变态发育开始,后肢芽出现)、G36(后肢芽分化出四趾,后肢发育高峰期)、G41(前肢伸出前)、G43(前肢伸出后)、G46(变态发育完成,幼蟾期)蝌蚪各 3 ~ 5 只,以 Bouin's 液固定,常规石蜡包埋、整只蝌蚪进行连续切片,厚 7 μm, H. E 及 AB-PAS(阿利新

蓝-过碘酸雪夫氏反应法)染色,显示皮肤基本结构及基底细胞基膜与黏液细胞中成分的变化。取成体花背蟾蜍躯干背部皮肤用上述同样方法处理制成皮肤玻片标本, H. E 染色。利用奥林巴斯 BX51-DP71 显微镜观察并照相, Image-Pro Express 6.0 进行相关测量,随机选取不同个体、相同部位进行相关结构的测量,同一测量指标收集 20 个数据。测量数据均以平均数 ± 标准差(Mean ± SD)表示。采用 SPSS 16.0 软件包对实验数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

**1.3 观察部位的界定** 各发育期蝌蚪自眼中部向后至前肢前的区间,称头部; G43 与 G46 的前肢之后至后肢之前的区间,称躯干部;背部与腹部交界区,称侧部。

**1.4 相关计算公式** 腺体面积的确定:在各部位皮肤连续切片中,在一个腺体的所有切面中选取面积最大者,即过直径的面积,确定为该腺体的面积。腺体个数的确定:在观察的皮肤中,腺体最大面积的个数,即腺体个数。

$$\text{腺体密度(个/}\mu\text{m}^2\text{)} = \frac{\text{腺体个数}}{\text{皮肤面积}(\mu\text{m}^2)} \quad (\text{王丽等 2010});$$
$$\text{皮肤面积}(\mu\text{m}^2) = \text{切片厚度}(\mu\text{m}) \times \text{连续切片片数} \times \text{观察部位皮肤长度}(\mu\text{m}),$$

本实验切片厚度为 7 μm, 连续切片数为 10 张; 毛细血管相对长度值 =  $\frac{\text{平行于皮肤切面的毛细血管管径长度之和}(\mu\text{m})}{\text{皮肤横切面的长度}(\mu\text{m})}$  (陆宇燕等 2004)。

## 2 结果

**2.1 G46(幼蟾)皮肤结构** G46 幼蟾皮肤结构具有一般两栖类皮肤的结构特征,但皮肤厚度和腺体的分布存在显著的区域性差异,头背部(包括眼睑处)皮肤厚度和腺体体积与腹部有明显差异;头背部眼睑处皮肤厚度及腺体体积与头背部其他部位有明显差异;头侧部皮肤厚度和腺体体积与背部及腹部有明显差异;而躯干侧部与躯干背部仅在表皮总厚度和疏松层厚上有差异(表 1)。以下结构表述均为头部背

(不包括眼睑处)、腹部皮肤结构。

G46 幼蟾皮肤表面可见一层基本没有细胞结构的薄膜,即角质膜。角质膜 H. E 染色呈淡红色,AB-PAS 染色中呈淡蓝色,其中可见明显的色素颗粒和少量淡染的梭形胞核。此膜与表皮连接并不紧密,在切片中常可见局部与表皮脱离的现象(图版 I:1)。

表皮层大多由 3 层细胞构成,在皮肤疣粒或突起处最多可达 5 层细胞。基底细胞呈柱状或矮柱状,排列较紧密,但随着皮肤的突起和凹陷,也有排列不规则的现象,即此层细胞有“竖立”的柱状和“倒伏”柱状之分。基底细胞中体积是表皮层细胞中体积最大的,其核柱状或圆形、深染,周围有一圈明显的淡染区;胞质弱嗜酸性,量少。每一个基底细胞均可见其附着于连续的基膜上。基膜 H. E 染色呈淡粉色,AB-PAS 染色呈蓝色。

角质细胞层位于表皮的最外侧、角质膜下方,细胞呈扁平状、排列紧密。胞核着色明显较基底细胞深,胞质强嗜酸性。偶见此层细胞之间有清晰的间隙。

在基底细胞与角质化细胞之间有 1~2 层不规则的过渡细胞,其呈圆形、椭圆形、多边形和梭形。从细胞特征看,很难真正区分出棘细胞和颗粒细胞的结构特点,故统称其为中间层细胞。此层细胞在皮肤突起处较多。

G46 幼蟾真皮疏松层中有较多的色素细胞分布,可见其有少量的突起在疏松层中伸展,但未见其突破基膜进入表皮。疏松层中还分布有大量的毛细血管,均在基底细胞基膜的内侧。致密层由大量的胶原纤维构成,由于疏松层中的腺体和致密层下血管的存在,成束的胶原纤维呈波浪状延伸,其间可见有较多具梭形核的成纤维细胞分布。

G46 幼蟾皮肤疏松层分布着一定数量的皮肤腺,即黏液腺和颗粒腺。黏液腺呈圆形、椭圆形或不规则形。在皮肤较薄的区间大多为椭圆形,而由于固定时的捉拿或固定液的刺激排空的腺泡多呈不规则形。腺泡外缘光滑,偶见有类肌细胞包绕。腺细胞呈高柱状,排列紧密,腺

腔大小不等。胞核强嗜碱性,柱状,位于腺细胞的近中部;胞质弱嗜酸性,浓厚,未见成体黏液腺细胞胞质中所呈现的网格状淡染胞质。AB-PAS 染色时,大多数腺细胞呈紫红色,但也存在一定数量呈蓝色的腺细胞。颗粒腺基本上呈圆形和椭圆形,体积明显大于黏液腺。腺细胞胞核大,椭圆形,位于腺细胞的基底部,其中可见明显的核仁。胞核上方充满了大小不一的弱嗜伊红颗粒,颗粒的分布呈垂直于皮肤表面的束状,束间有清晰的分隔,即腺体细胞呈高柱状。腺泡外缘也可偶见类肌细胞的存在。AB-PAS 染色时颗粒呈淡紫色(图版 I:1,2)。

G46 幼蟾皮肤腺的分布存在着明显的区域性差异(表 1),在背部眼睑处皮肤中的黏液腺密度和颗粒腺的密度分别大于背部这两种腺体的总密度,且均呈极显著性差异。腹部皮肤腺体分布较均匀,但两种腺体面积均小于背部,且呈极显著性差异。腹部黏液腺总密度大于背部,呈显著性差异;而颗粒腺总密度小于背部,呈显著性差异。侧部皮肤黏液腺面积大于腹部、小于背部,且均呈极显著性差异;颗粒腺面积小于背部,呈显著性差异,大于腹部,呈极显著性差异。侧部黏液腺总密度大于腹部及背部黏液腺总密度,且均呈极显著性差异;侧部颗粒腺总密度小于腹部总密度及背部总密度,且均呈极显著性差异。

对 G46 幼蟾不同部位皮肤厚度进行比较分析(表 2),由数据可见,第一,G46 头部皮肤各层厚度明显大于躯干部皮肤相应结构的厚度,且呈极显著性差异。第二,G46 头部皮肤的背、腹和侧部三个区域中,腹部各层厚度均为三者中最小,其与背部相应结构之间均呈极显著性差异。头侧部的表皮总厚度和致密层厚度均大于背部相应结构,且呈极显著性差异;疏松层厚度大于背部,呈显著性差异;基底细胞略高于背部,但两者之间无显著性差异。第三,G46 躯干腹部皮肤各层结构厚度均小于背部和侧部相应结构厚度,除腹部致密层厚度与背部呈显著性差异外,其余相应结构间均呈极显著性差异。躯干侧部表皮总厚度和疏松层厚度小于背部相

表 1 花背蟾蜍蝌蚪变态阶段头部皮肤腺体测量数据

Table 1 The head skin glands measurement data during metamorphosis of <i>Bufo raddei</i> tadpole								
皮肤腺 Skin gland	发育期 Develop- mental stage	背部 Dorsal			腹部 Ventral		侧部 Lateral	
		腺体面积 Gland area ( $\mu\text{m}^2$ )	总密度 Total density ( $\times 10^{-4}$ 个 $/\mu\text{m}^2$ )	眼睑部密度 Density of the eyelid ( $\times 10^{-4}$ 个 $/\mu\text{m}^2$ )	腺体面积 Gland area ( $\mu\text{m}^2$ )	总密度 Total density ( $\times 10^{-4}$ 个 $/\mu\text{m}^2$ )	腺体面积 Gland area ( $\mu\text{m}^2$ )	总密度 Total density ( $\times 10^{-4}$ 个 $/\mu\text{m}^2$ )
黏液腺 Mucous glands	43	418.42 $\pm$ 14.60	1.00	1.06	352.01 $\pm$ 10.77 <sup>A</sup>	0.63 <sup>A</sup>	—	—
	46	925.94 $\pm$ 10.23	0.67	1.59 <sup>C</sup>	602.73 $\pm$ 9.24 <sup>A</sup>	0.75 <sup>a</sup>	855.16 $\pm$ 24.62 <sup>AB</sup>	1.06 <sup>AB</sup>
颗粒腺 Particles glands	43	657.87 $\pm$ 11.70	0.27	0.36 <sup>C</sup>	631.66 $\pm$ 17.23 <sup>a</sup>	0.25	—	—
	46	2 068.40 $\pm$ 10.56	0.37	0.80	1 758.60 $\pm$ 15.09 <sup>A</sup>	0.31 <sup>a</sup>	2 054.50 $\pm$ 10.23 <sup>AB</sup>	0.21 <sup>AB</sup>

A、a 表示同一测量指标腹部及体侧部与背部之间的显著性差异分析;B,b 表示同一测量指标体侧部与腹部之间的显著性差异分析;C,c 表示眼睑部密度与背部总密度的显著性差异分析。大写字母表示极显著性差异,小写字母表示显著性差异,未标注代表无显著性差异,“—”表示 G43 蝌蚪侧部与背部和腹部不存在显著性差异。

A,a indicates comparison of the same index among the ventral ,the lateral and the dorsal ;B,b indicates comparison of the same index between the lateral and the ventral; C,c indicates comparison between eyelid density and total dorsal density. Capital letters indicate a very significant difference, and lowercase letters indicate a significant difference; unlabeled represents no significant difference, “—” indicates no significant difference between the lateral and the dorsal or the ventral at stage 43.

应结构,且呈极显著性差异;致密层厚度小于背部,呈显著性差异;基底细胞高略小于背部,但无显著性差异。第四,在表皮总厚度方面,头侧部表皮总厚度约是头背部的 1.4 倍,是躯干侧部的 3 倍,这点可以从其基底细胞高和表皮细胞层数两个方面找到佐证。在真皮致密层厚方面,头背部致密层厚度是头腹部的 1.3 倍,是躯干背部的 3 倍。在此需要强调的是,表皮与皮肤总厚度的比值的最大值(0.41)与致密层与皮肤总厚度的比值的最大值(0.40)十分接近。第五,从毛细血管相对长度的比值看(表 3),腹部皮肤中毛细血管分布明显低于背部,仅为背部的 67%。第六,花背蟾蜍成体躯干背部皮肤各层厚度远大于 G46 的相应结构,且均呈极显著性差异。但在表皮与皮肤总厚度的比值上,成体(0.11)明显小于 G46(0.37),而成体致密层厚与皮肤总厚度的比值(0.53)明显大于 G46(0.24)。

**2.2 发育期蝌蚪皮肤结构** 胚胎发育期(G19、G22)的花背蟾蜍蝌蚪分别处于孵化期(G20)的前后,在解剖镜下可见整体呈黑色;光镜下,蝌蚪皮肤中聚集着大量的色素颗粒,只是 G22 蝌蚪色素颗粒略少,且集中于胞核体表一侧。此两期蝌蚪的皮肤均由 1 层细胞构成,细胞多呈矮柱状,也有圆形和椭圆形;胞质少且着

色浅,尤其在胞核周围呈明显的淡染区;胞核大而圆,位于细胞中央,着色均匀,细胞附着于其内侧基膜上。基膜隐约可见,H. E 染色呈淡伊红色;AB-PAS 染色呈淡蓝色。G19 蝌蚪基膜呈细线状,G22 蝌蚪基膜呈较致密的“粗线”状,并以松散的薄雾状向皮肤深层扩散(图版 I:3,4)。G26 蝌蚪皮肤多由一层细胞构成,细胞圆形,附着于波浪状连续的基膜上。胞质嗜伊红,淡染,在核周更有几乎透明的区域。胞核主要为圆形,也有一些不规则胞核出现,多呈半圆形,也有似月牙状,胞核均深染,胞核基本排列在一条线上。皮肤细胞基膜 H. E 染色时呈淡红色,AB-PAS 染色呈淡蓝色,在近基底细胞一侧染色较深。此时的基膜已可见清晰的胶原纤维束,作平行波浪状延伸,且较 G22 时明显增宽(图版 I:5,6)。

G36 蝌蚪皮肤细胞形态和层数在背部出现了显著的区别。背部皮肤细胞基本与 G26 相同,但在大而圆的细胞中间偶尔有较小的倒梨状细胞镶嵌在其中,故总体上看胞核的排列呈上下两层,但大细胞和小细胞基本还是以基膜相连,即出现了类似于假复层细胞的状态。在腹部皮肤中上述现象更加普遍,经显微镜下观察并粗略计算大概有 30% ~ 40% 腹部皮肤

表 2 花背蟾蜍蝌蚪不同发育期皮肤各层厚度比较

Table 2 The thickness of the skin layers at different developmental stages of *Bufo raddei* tadpoles

		表皮 Epidermis					真皮 Dermis		
发育期 Develop- mental stages	观察部位 Observed region	细胞 层数 Cell layers	基底细胞高 Basal cell height ( $\mu\text{m}$ )	表皮厚度 Thickness ( $\mu\text{m}$ )	表皮厚度/ 皮肤总 厚度 Epidermal thickness/ Total thickness		疏松层厚 ( $\mu\text{m}$ ) Looselayer thickness	致密层厚 ( $\mu\text{m}$ ) Denselayer thickness	致密层厚/ 皮肤总 厚度 Denselayer/ Total thickness
G19	头 Head	背部 Dorsal	1	6. 76 $\pm$ 0. 34	6. 76 $\pm$ 0. 34	1. 00	—	—	0. 00
		腹部 Ventral	1	6. 58 $\pm$ 0. 45	6. 58 $\pm$ 0. 45	1. 00	—	—	0. 00
G22	头 Head	背部 Dorsal	1	9. 52 $\pm$ 0. 29 <sup>A</sup>	9. 52 $\pm$ 0. 29 <sup>A</sup>	0. 87	—	1. 39 $\pm$ 0. 28	0. 13
		腹部 Ventral	1	9. 12 $\pm$ 0. 46 <sup>A</sup>	9. 12 $\pm$ 0. 46 <sup>A</sup>	0. 87	—	1. 42 $\pm$ 0. 22	0. 12
G26	头 Head	背部 Dorsal	1~2	8. 52 $\pm$ 0. 29 <sup>AB</sup>	13. 39 $\pm$ 0. 36 <sup>AB</sup>	0. 88	—	1. 81 $\pm$ 0. 22 <sup>A</sup>	0. 12
		腹部 Ventral	1~2	8. 15 $\pm$ 0. 52 <sup>AB</sup>	13. 38 $\pm$ 0. 98 <sup>AB</sup>	0. 88	—	1. 91 $\pm$ 0. 23 <sup>A</sup>	0. 12
G36	头 Head	背部 Dorsal	1~2	6. 37 $\pm$ 0. 32 <sup>aB</sup>	14. 43 $\pm$ 0. 52 <sup>AB</sup>	0. 80	—	3. 71 $\pm$ 0. 24 <sup>AB</sup>	0. 20
		腹部 Ventral	1~2	6. 20 $\pm$ 0. 51 <sup>B</sup>	14. 28 $\pm$ 0. 46 <sup>AB</sup>	0. 80	—	3. 68 $\pm$ 0. 35 <sup>AB</sup>	0. 20
G41	头 Head	背部 Dorsal	1~2	7. 08 $\pm$ 0. 40 <sup>B</sup>	14. 15 $\pm$ 0. 47 <sup>A</sup>	0. 68	—	6. 53 $\pm$ 0. 20 <sup>AB</sup>	0. 32
		腹部 Ventral	1~2	7. 08 $\pm$ 0. 26 <sup>aB</sup>	14. 02 $\pm$ 0. 35 <sup>A</sup>	0. 68	—	6. 61 $\pm$ 0. 28 <sup>AB</sup>	0. 32
G43	头 Head	背部 Dorsal	2~4	8. 05 $\pm$ 0. 48 <sup>AB</sup>	14. 00 $\pm$ 0. 40 <sup>A</sup>	0. 39	9. 76 $\pm$ 0. 67 <sup>AB</sup>	12. 60 $\pm$ 0. 30 <sup>AB</sup>	0. 35
		腹部 Ventral	2~4	7. 81 $\pm$ 0. 38 <sup>AB</sup>	13. 84 $\pm$ 0. 39 <sup>A</sup>	0. 40	9. 19 $\pm$ 0. 59 <sup>AB</sup>	11. 31 $\pm$ 0. 35 <sup>ABC</sup>	0. 33
G46	头 Head	背部 Dorsal	3~4	9. 68 $\pm$ 0. 63 <sup>AB</sup>	17. 50 $\pm$ 0. 62 <sup>AB</sup>	0. 32	15. 21 $\pm$ 0. 40 <sup>AB</sup>	22. 03 $\pm$ 1. 04 <sup>AB</sup>	0. 40
		腹部 Ventral	3~4	8. 22 $\pm$ 0. 53 <sup>ABC</sup>	14. 87 $\pm$ 0. 45 <sup>ABC</sup>	0. 34	12. 31 $\pm$ 0. 40 <sup>ABC</sup>	17. 10 $\pm$ 0. 50 <sup>ABC</sup>	0. 39
		侧部 Lateral	3~5	10. 04 $\pm$ 0. 82 <sup>AB</sup>	24. 39 $\pm$ 1. 05 <sup>ABC</sup>	0. 41	15. 60 $\pm$ 0. 33 <sup>ABc</sup>	19. 79 $\pm$ 1. 05 <sup>ABC</sup>	0. 33
G46	躯干 Body	背部 Dorsal	2~3	5. 38 $\pm$ 0. 33 <sup>D</sup>	11. 22 $\pm$ 0. 33 <sup>D</sup>	0. 37	12. 24 $\pm$ 0. 62 <sup>D</sup>	7. 34 $\pm$ 0. 50 <sup>D</sup>	0. 24
		腹部 Ventral	2~3	4. 84 $\pm$ 0. 43 <sup>CD</sup>	7. 37 $\pm$ 0. 66 <sup>CD</sup>	0. 32	9. 14 $\pm$ 0. 55 <sup>CD</sup>	6. 87 $\pm$ 0. 45 <sup>cD</sup>	0. 29
		侧部 Lateral	2~3	5. 24 $\pm$ 0. 42 <sup>D</sup>	8. 44 $\pm$ 0. 44 <sup>CD</sup>	0. 34	10. 99 $\pm$ 0. 62 <sup>CD</sup>	7. 21 $\pm$ 0. 32 <sup>D</sup>	0. 27
成体 Adult	躯干 Body	背部 Dorsal	5~8	18. 00 $\pm$ 0. 72 <sup>AB</sup>	60. 99 $\pm$ 1. 53 <sup>AB</sup>	0. 11	195. 94 $\pm$ 1. 77 <sup>AB</sup>	288. 91 $\pm$ 2. 80 <sup>AB</sup>	0. 53

A、a 表示首次出现的结构与其他发育时期相同结构的显著性差异分析;B、b 表示后一期与前一期的显著性差异分析;C、c 表示腹部和侧部皮肤各层厚度与背部皮肤相应结构的显著性差异分析;D、d 表示幼蟾躯干部皮肤各层厚度与头部皮肤相应结构的显著性差异分析;不同大写字母表示差异极显著,不同小写字母表示差异显著;未标注代表无显著性差异。“—”表示尚未出现此结构。

A, a indicates comparison between firstly appeared structure and the same structure appeared at other developmental stages; B, b indicates comparison between two adjacent stages; C, c indicates comparison between the belly skin and the side skin; D, d indicates comparison between the body skin and the head skin of the tadpoles; Capital letters indicate a very significant difference, and lowercase letters indicate a significant difference; unlabeled represents no significant difference. “—” indicates that this structure has not yet appeared.

表 3 花背蟾蜍蝌蚪头部皮肤毛细血管相对长度的比较

Table 3 The comparison of relative length of the head skin capillary of *Bufo raddei* tadpole

发育期 Developmental stages	皮肤毛细血管相对长度 relative length of the skin capillary	
	背部 Dorsal	腹部 Ventral
G43	0. 31	0. 16
G46	0. 49	0. 33

形成了真正的双层细胞排列。内层细胞(即基底细胞)较大,圆形,排列整齐;胞核深染,不规则;胞质淡染、云雾状,仅在近质膜处有薄层深染胞质。外层细胞大小仅为基底细胞的 1/4 左

右,多为扁椭圆形或梭形。胞核多为梭形,着色与基底细胞相近,胞质淡染。表皮基底细胞基膜在 AB-PAS 染色时,呈淡蓝色与玫红色交织。背部基膜较厚,在胶原纤维之间有明显的间断性裂隙,故基膜染色不均匀;腹部基膜中的裂隙更加明显,出现的频率也较背部高,裂隙中有淡染而稀薄的云雾状物质(图版 I:7,8)。

G41 蝌蚪背腹部皮肤基本均由两层细胞构成,基底细胞较 G36 更大,与基膜接触的面积明显增加。此期基底细胞的基膜表现突出,不同部位的结构表现出了多样性。主要有以下几

种情况:有的区域基膜仍紧贴于基底细胞内侧,但在基膜中或近基底细胞处有较多的胞核呈长梭形的成纤维细胞出现;有的区域基膜中的裂隙增大、加长,其中有稀疏的疏松结缔组织出现,并有少量毛细血管分布;有的区域虽然疏松结缔组织不明显,但偶尔可见有小的黏液腺出现(图版 I:9,10)。

G43 蝌蚪具有了真正意义上的皮肤结构,可清晰地辨认表皮层和真皮层。表皮层一般由 2~3 层细胞构成,在背部皮肤的突起处细胞层数可达 4 层之多。最外层细胞具轻度的角质化,即角化细胞,表现为胞质嗜伊红较弱,胞核较小、深染,个别地方有脱离皮肤表面的现象。真皮中的疏松层明显增厚,其中有较丰富的毛细血管和黏液腺及颗粒腺的分布;致密层有较多的成纤维细胞分布,胶原纤维排列整齐而紧密,呈波浪状延伸(图版 I:11,12)。

除 G46 外,其他各发育期均未观察到头部和躯干部皮肤结构具有明显差异。从 G19 至 G43 皮肤各层结构测量值的变化可见以下几点:第一,花背蟾蜍蝌蚪表皮厚度随着发育期的增长呈上升趋势,由 G19 的  $(6.76 \pm 0.34) \mu\text{m}$  快速增长至 G26 的  $(13.39 \pm 0.36) \mu\text{m}$ ,G26 至 G43 为  $(14.00 \pm 0.40) \mu\text{m}$ ,为稳定期,到 G46 达到  $(17.50 \pm 0.62) \mu\text{m}$ ,骤然升高。第二,蝌蚪表皮基底细胞高度有较强的波动,G22 和 G46 的基底细胞几乎等高,在 G26 至 G43 之间基底细胞的高度呈先降后升的变化趋势。G46 背部表皮基底细胞均明显高于腹部,两者之间呈极显著性差异。第三,由于腺体的出现,真皮疏松层在 G43 骤然增厚,但该期背腹之间尚无显著性差异;由于背部增长速度大于腹部,到 G46 时,不论是头部还是躯干部,腹部疏松层仅是背部的 80%,两者之间均呈极显著性差异。第四,真皮致密层在疏松层明显增厚(G43)之前很难与基底细胞基膜相区分,G19 仅作为基膜处理,从 G22 测量时将两者合二为一,至 G41 致密层表现出快速的增厚,而背腹部厚度基本相似。G43 之后背部致密层厚度明显大于腹部,两者之间呈极显著性差异,其中 G46 腹部致密层厚

度仅为背部的 78%。第五,在毛细血管大量出现的 G43,毛细血管的分布在头部的背、腹部皮肤间存在明显差异,腹部皮肤中毛细血管相对长度(0.16)仅为背部(0.31)的 52%。

### 3 讨 论

**3.1 表皮结构与机能的关系** 两栖类由受精卵开始到完成变态发育经历了多重的环境变迁,受精卵至 G19 由于有卵胶膜的保护,所处的生存环境比较稳定;G20 是花背蟾蜍胚胎发育中的孵化期,此时的蝌蚪挣破卵胶膜进入水环境生活,即 G21 至 G42 蝌蚪的生活完全依赖于水,此时水环境中的各种理化因子均可通过其通透性较好的皮肤进入体内(李贞等 2010),从而影响蝌蚪的生长发育;由于 G42 蝌蚪前肢的伸出,蝌蚪开始尝试登陆、用肺呼吸,至 G46 完成变态发育的最后阶段,基本摆脱水环境的制约,即脱离了各种水环境因子的作用,适应潮湿的陆地生活。由于在不同生境中花背蟾蜍所承受的环境因子不同,在更换生境之前皮肤组织结构也需要作出适当的调整和完善,以适应变化了的环境。

在所观察 7 个发育期中,表皮细胞层数与蝌蚪发育期有着密切的关联。G19、G22 和 G26 皮肤均由 1 层细胞组成,G19 皮肤细胞基膜较薄且松散,与其较稳定的卵胶膜内环境及较小的活动范围对皮肤的牵张力较小相适应。G22 蝌蚪已进入水中自由生活,但由于其运动器官——尾还不很发达,其活动力度有限,躯体皮肤所承担的牵张力有限。此期蝌蚪皮肤细胞的基膜虽略为增厚,但大部分还是呈疏松状态。G36 蝌蚪处于后肢发育和尾部机能状态的高峰期,蝌蚪游泳频度和强度是整个变态发育过程中最强盛时期,此期蝌蚪腹部皮肤中出现了由两层细胞构成的区域,即开始构建具有分裂、分化能力的基底细胞层和执行功能的角化细胞层;同时腹部增厚的基膜近基底细胞部分出现明显的区域性裂隙,推测是真皮疏松层构建的开始。基膜近腹腔部分可见粗壮的胶原纤维束呈平行波浪状排列,大大增强了皮肤的抗牵张

能力,适应高强度的游动,以保护整个躯体的完整性。G41 表皮层的构建基本完成,并出现了明显的区域性疏松层,其中还有毛细血管和极个别的腺体,即开始组建完整的真皮结构,为适应登陆后环境改变作初步的准备;G43 基本完成了皮肤各部分的构建,表皮由 2~3 层细胞构成,可划分为角质层和基底细胞层,真皮有疏松层和致密层组成,其中含有大量的毛细血管和皮肤腺,以提供登陆后皮肤的辅助呼吸和防御功能所需要的结构基础。G46 皮肤各组分结构和功能进一步完善,完成了适应陆地生活环境变化的皮肤组织学结构的构建。

**3.2 皮肤腺的发生与生境的关系** 在两栖类成体的皮肤疏松层中分布有大量的皮肤腺,主要有两种:黏液腺和浆液腺(也称颗粒腺),其分布特点与个体生活环境和繁殖行为方式有着密切的关系。由于两栖类成体时常暴露于干燥的空气中,加之其肺呼吸的不完善,皮肤呼吸具有重要的补充氧供应的作用。黏液腺的分泌物一方面可以在体表形成一层良好的保湿层,并为形成充足的溶解态氧提供了湿润的体表;另一方面两栖类黏液腺在躯体不同部位的丰富程度有着明显区别,这与繁殖期雌雄抱对行为有着密切的关系(梁刚等 2004,林文达等 2008)。两栖类成体皮肤裸露、湿润,是微生物生存的良好环境,但皮肤颗粒腺分泌物中所含有的神经肽、毒素、麻醉剂、激素、抗微生物和抗真菌等物质增强了两栖类皮肤的防御能力(梁刚等 2004,王丽等 2010)。花背蟾蜍蝌蚪在前肢伸出前的 G41 期背部皮肤中已能偶见黏液腺的存在,在前肢伸出后的 G43 期皮肤背腹均有了一定的腺体,且两种腺体在大小和密度上蝌蚪背部均占优势,以适应背部是幼蟾初次登陆暴露面积最大、最易受到攻击的特点。在完成变态发育的 G46 期两种腺体的密度都有了明显的降低,但腺体大小却较 G43 期增加了一倍左右。说明在 G43 期主要是腺体的发生,而 G46 期的腺体在结构和功能方面得到了进一步的完善。由此可见,皮肤腺体在蝌蚪的发育过程中具有良好的程序性结构构建和功

能完善,为其即将面临的生境改变做好了充分的准备。

**3.3 皮肤毛细血管的发生与生境的关系** 在两栖类整个呼吸过程中,皮肤呼吸有着不可忽视的作用。有研究指出在鱼类、两栖类的皮肤真皮疏松层中有大量毛细血管的分布,个别物种在表皮中也有毛细血管的分布(Schwinger et al. 2001,张贤芳等 2002,陆宇燕等 2004,梁刚等 2004),但未见有关两栖类个体发育过程中皮肤毛细血管发生、分布的报道。花背蟾蜍幼体发育至 G42 时,发育完好的前肢撑破鳃腔的皮肤伸出体外,幼体凭借着并不强健的四肢开始尝试登陆。登陆即意味着要离开溶氧量远大于空气的水环境,同时幼蟾需要更多的氧气来提供各项生理功能适应陆地生活的需要。由于两栖类心脏为两心房一心室,属于不完全双循环,除了初步启动的肺呼吸外,还需要皮肤提供一定的氧气供应。故在前肢伸出来之前,皮肤就开始了相应的结构构建。在前肢伸出后的 G43,背腹部表皮下均可见较多的毛细血管分布,且背部毛细血管的相对值(0.31)是腹部(0.16)的 194%,以适应初步登陆后背部承担从空气中吸收氧气的需要。完成变态发育的 G46,幼蟾基本可以脱离水域在岸边活动,此时背部毛细血管相对值(0.49)仅是腹部(0.33)的 148%。提示幼蟾真正登陆后,皮肤呼吸功能有所调整,有趋于以腹部为主的态势,以保证背部为了防止水分的流失而角质化加剧后对氧气的需要。

**3.4 基膜成分变化与生境的关系** 在 AB-PAS 法(阿利新蓝-过碘酸雪夫氏反应法)中,由于酸性黏多糖中含有羧基(-COOH)、硫酸基(-SO<sub>3</sub>H)和磷酸基(-OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>),可被 AB(pH 为 2.6)着色呈蓝绿色;而 PAS 可使中性黏多糖呈玫红色(Zaccone 1973,楚德昌等 2006)。有研究指出:中性黏多糖在体外具有抗氧化和清除氧自由基的作用,而酸性黏多糖能够有效的防止病原微生物的侵入(丁素菊等 1994)。花背蟾蜍蝌蚪在 G26 之前的皮肤细胞基膜在 AB-PAS 染色中均呈蓝色,而从 G36 开始均呈现以玫红色为主,其中夹杂着少量的蓝色。提示花

背蟾蜍皮肤细胞基膜在不同的发育期中,其构成成分有着明显的变化。这是否是对环境改变的适应还需要进一步探讨。

参 考 文 献

Brizzi R, Delfino G, Pellegrini R. 2002. Specialized mucous glands and their possible adaptive role in the males of some species of *Rana* (Amphibia, Anura). *Journal of Morphology*, 254(3): 328–341.

Gomes A, Giri B, Saha A, et al. 2007. Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(7): 579–593.

Gosner K L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3): 183–190.

Rinaldi A C. 2002. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(6): 799–804.

Schwinger G, Zanger K, Greven H. 2001. Structural and mechanical aspects of the skin of *Bufo marinus* (Anura, Amphibia). *Tissue and Cell*, 33(5): 541–547.

Zaccone G. 1973. Morphochemical analysis of the mucous cells during the development of the respiratory tract in *Mollienisia sphenops* Cuv. and Val. (Teleostei: Poeciliidae). *Acta Histochem*, 47(2): 233–243.

楚德昌, 邓振旭, 杨恩昌. 2006. 几种脊椎动物消化道黏液细胞的类型与分布. *动物学杂志*, 41(6): 109–114.

丁素菊, 郑惠民, 史荫绵, 等. 1994. 中性粘多糖体外抗超氧阴离子自由基的研究. *第二军医大学学报*, 15(5): 464–467.

耿欣莲. 1959. 大蟾蜍(*Bufo Bufo gargarizans* Cantor)皮肤在不同季节中的组织学观察. *动物学报*, 11(3): 313–325.

何米雪, 陈沃洪, 刘木养, 等. 2006. 几种化学物质对蟾蜍蝌蚪生存及生长发育的影响. *生命科学研究*, 10(2): 156–161.

李贞, 李丕鹏, 徐齐艳, 等. 2010. 农药和化肥对无尾两栖类蝌蚪的毒性效应研究进展. *生态毒理学报*, 5(2): 287–294.

梁刚, 王琼霞. 2004. 隆肛蛙皮肤及其腺体的显微结构特征. *动物学杂志*, 39(4): 73–76.

林文达, 朱静, 郭爱伟, 等. 2008. 云南昆明地区三种蛙皮肤显微结构的比较. *四川动物*, 27(3): 420–421, 423.

刘炯宇, 江建平, 谢锋, 等. 2004. 两栖动物皮肤结构及皮肤抗菌肽. *动物学杂志*, 39(1): 112–116.

龙静, 张迎梅, 赵东芹, 等. 2004. 铅对花背蟾蜍受精卵出膜及蝌蚪生长的影响. *甘肃科学学报*, 16(2): 47–49.

陆宇燕, 王健, 刘新海, 等. 2004. 爪鲵皮肤的显微结构和呼吸作用. *四川动物*, 23(3): 178–182.

王丽, 徐珂, 李晏宇, 等. 2010. 金线侧褶蛙和黑斑侧褶蛙皮肤显微结构. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 38(6): 116–120.

魏仲梅, 陈玉琴, 俞诗源. 2008. 花背蟾蜍肺发生及转化生长因子- $\beta$ 的表达. *解剖学报*, 39(4): 566–572.

吴翠衡, 高武. 1983. 中国大鲵的皮肤和肌肉系统解剖. *两栖爬行动物学报*, 2(4): 13–14.

吴淑辉, 吕九全. 1994. 商城肥鲵皮肤的组织学观察. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 22(3): 109–112.

吴文英, 李丕鹏, 陆宇燕, 等. 2011. 黑龙江林蛙繁殖期两性皮肤组织结构的差异比较. *野生动物*, 32(3): 141–145.

张贤芳, 张耀光, 王志坚, 等. 2002. 中华蟾蜍皮肤的组织学观察. *西南农业大学学报: 自然科学版*, 24(5): 454–457.

图 版 说 明

1. G46 侧部(H. E); 2. G46 腹部(H. E); 3. G19(AB-PAS); 4. G22(AB-PAS); 5. G26(H. E); 6. G26(AB-PAS); 7. G36 背部(H. E); 8. G36 腹部(AB-PAS); 9. G41 背部(AB-PAS); 10. G41 腹部(H. E); 11. G43 背部(H. E); 12. G43 腹部(H. E)。标尺 = 10  $\mu\text{m}$ 。

Explanation of Plate

1. Lateral part of G46(H. E); 2. Ventral part of G46(H. E); 3. G19(AB-PAS); 4. G22(AB-PAS); 5. G26(H. E); 6. G26(AB-PAS); 7. Dorsal part of G36(H. E); 8. Ventral part of G36(AB-PAS); 9. Dorsal part of G41(AB-PAS); 10. Ventral part of G41(H. E); 11. Dorsal part of G43(H. E); 12. Ventral part of G43(H. E). Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

EP. 表皮; BM. 基膜; BC. 基底细胞; DL. 致密层; SG. 小的腺体; FC. 成纤维细胞; MG. 黏液腺; MA. 微血管; PG. 颗粒腺; CU. 角质膜。

EP. Epidermis; BM. Basement membrane; BC. Basal cell; DL. Dense layer; SG. Small glands; FC. Fibroblast cell; MG. Mucous gland; MA. Microvascular; PG. Particles gland; CU. Cuticle.

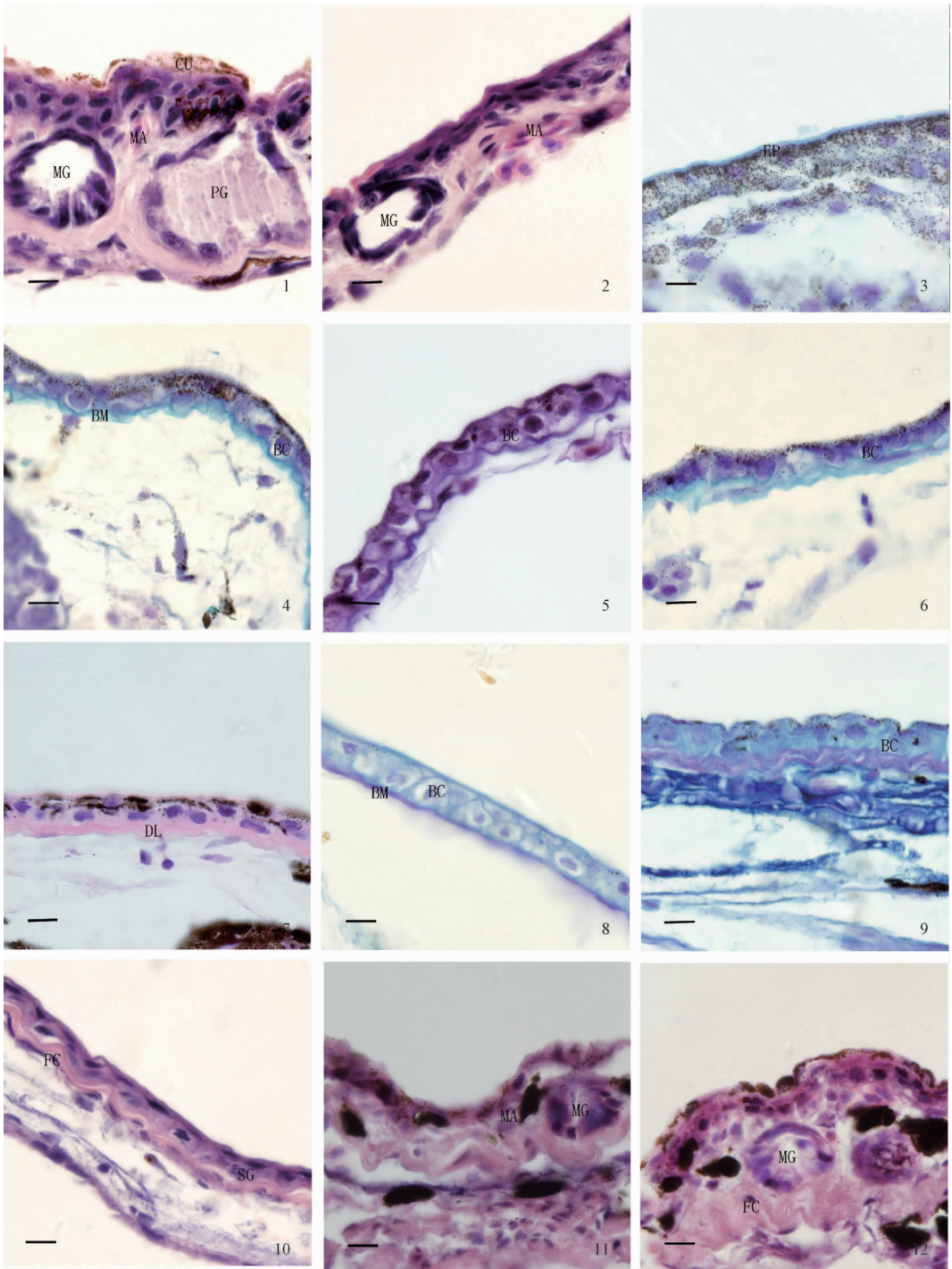


李 妍等:花背蟾蜍蝌蚪皮肤的结构与发育

图版 I

LI Yan *et al.*: The Structure and Development of Larval Skin in *Bufo raddei*

Plate I



图版说明见文后