

紫彩血蛤鳃的组织化学和扫描电镜研究*

孙虎山 王晓安

(烟台师范学院生物系 烟台 264025)

摘要 紫彩血蛤(*Nuttallia olivacea*)的鳃上皮细胞核多为椭圆形,核内染色质呈丝状;结缔组织细胞的核多为圆形,部分核内有块状 Feulgen 阳性颗粒。RNA 在鳃丝上皮细胞中最丰富,有的形成直径 $0.52\mu\text{m}$ 的颗粒。结缔组织和鳃丝上皮细胞内均有直径 $0.63\mu\text{m}$ 左右的 PAS 阳性颗粒。吞噬细胞呈极强的 ANAE 阳性,鳃丝上皮细胞呈较弱的阳性。ACP 和 AKP 在吞噬细胞和外缘上皮细胞中活性较强,其它部位较弱。MPOD 只在鳃丝基部呈强阳性。扫描电镜观察,鳃表面密生纤毛,主鳃丝处形成沟,18~21 条鳃丝形成一条状隆起。鳃纤毛间夹着许多杯状细胞,有的杯状细胞外可见圆形分泌泡。

关键词 紫彩血蛤 鳃 组织化学 扫描电镜

双壳类软体动物的鳃是非常重要的呼吸和滤食器官,很早就得到贝类学者的重视,但有关的研究多在形态解剖、发生、一般结构和生理方面^[1-3],关于鳃的组织化学和扫描电镜观察报道甚少^[4]。紫彩血蛤广泛分布于我国沿海,生长快,肉味鲜,尤其是对泥沙有极显著的净化作用,每个成贝可使其埋栖穴周围约 $30\text{cm} \times 20\text{cm}$ 范围的泥沙保持洁净,是一种很有发展前途的滩涂养殖贝类^[5-8]。本文采用普通组织学、组织化学和扫描电镜技术,对紫彩血蛤鳃进行了研究,并对其功能进行了初步探讨。

1 材料和方法

材料为采自烟台牟平港西沙滩的 2~3 龄贝。用 Bouin 氏液固定,石蜡包埋,作 Heidenhain 铁明矾苏木素-伊红染色;Carnoy 液固定,石蜡包埋,作核酸及多糖组织化学显色;新鲜组织冰冻切片,进行酶组织化学显色反应。切片

厚度均为 $6\sim 8\mu\text{m}$ 。组织化学显色方法:显示 DNA 用 Feulgen 反应;同时显示 DNA 和 RNA 用 Brachet 的甲绿-派洛宁法;显示多糖用高碘酸-雪夫氏(PAS)反应;酸性非特异性酯酶(ANAE)用 Mueller 的偶氮偶联法;酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)用 Gomori 的锍铅法和钙钴法^[9];髓性过氧化物酶(MPOD)用 Kaplow 的方法^[10]。显示酶时,均以人血涂片做为阳性对照,不加底物做阴性对照。

扫描电镜标本制备:取新鲜的鳃用 2.5% 戊二醛(0.1mol/L pH7.0 PB 配制)固定 12 小时,经 0.1mol/L PB 洗 1 小时以上(中间换 2~3 次新液),再用 1% 的锇酸固定 2 小时,用 PB 洗 1 小时以上,酒精脱水,常规临界点干燥,

* 山东省科委资助项目 No. 941515;

第一作者介绍:孙虎山,男,36 岁,副教授,博士;

收稿日期:1997-10-08,修回日期:1998-04-14

IB-离子溅射镀铂, S-570 扫描电镜(日立)观察并拍照。

2 结果

2.1 鳃的普通组织学 鳃间隔间由 18~21 条鳃丝组成。主鳃丝横切面呈三角形, 基部较宽约 52 μm , 而外缘较尖, 高约 36 μm ; 普通鳃丝横切面为长方形, 宽约 21 μm , 高约 52 μm ; 移行鳃丝与普通鳃丝无明显差别。鳃丝上皮细胞在外缘排列比较整齐, 细胞与细胞核均较大, 核多呈椭圆形, 约 9.1 μm × 3.1 μm 。鳃丝两侧有丰富的肌纤维, 并延伸到丝间联系中。靠近鳃内腔还具有与其身体纵轴平行的肌纤维。丝间联系中有少量的结缔组织, 细胞核多为圆形, 直径约 2.6 μm 。鳃丝内、丝间联系及鳃间隔中均有丰富的血管(图版 I : 1, 2, 见封 3, 下同)。

2.2 鳃的组织化学

(1)核酸 鳃上皮细胞核内染色质呈丝状, 且有少量深紫红色细小的 Feulgen 阳性颗粒。结缔组织细胞的核较小, 大部分圆形, 核内染色质也呈丝状, 少部分细胞的核内有较大的块状阳性颗粒并靠近核膜, 后一种细胞在靠近鳃内腔处较多。另有极少量的细胞核甚小, 呈均匀的深紫红色(图版 I : 3)。用甲绿-派洛宁法同时显示 DNA 和 RNA, 观察到的 DNA 阳性颗粒与 Feulgen 反应一致。派洛宁显示的 RNA 在鳃丝上皮细胞内较强, 并有大量直径约 0.52 μm 的红色颗粒。肌细胞和血管壁细胞也呈深红色, 但细胞内均无红色颗粒。结缔组织着色很浅(图版 I : 4)。

(2)多糖 PAS 反应显示鳃丝上皮细胞及结缔组织内有直径约 0.63 μm 的红色阳性颗粒。鳃丝上皮细胞的外缘部分及血管壁细胞内有强的阳性团块, 着色最深。纤毛也呈较弱的 PAS 阳性, 而肌细胞着色最浅, 且无颗粒(图版 I : 5)。

(3)酸性非特异性酯酶(ANAE) 吞噬细胞的 ANAE 活性极强, 多数细胞被深红色的强阳性团块充满, 核被遮盖。鳃丝上皮细胞呈较弱的阳性, 为弥散的橙红色。结缔组织和肌细

胞均为 ANAE 阴性(图版 I : 6, 7)。

(4)酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP) ACP 和 AKP 在鳃组织中的分布相似。吞噬细胞两种酶的活性较强, 细胞内有大量黑棕色阳性颗粒。鳃丝外缘上皮细胞内也有少量酶颗粒。其它组织则呈较弱的阳性, 酶弥散状分布, 无明显颗粒。

(5)髓性过氧化物酶 鳃丝基部 MPOD 活性很强, 有大量蓝色阳性颗粒。外缘上皮细胞活性弱。其它部位则呈阴性(图版 I : 8)。

2.3 鳃的扫描电镜观察 鳃间隔较短, 主鳃丝处在鳃瓣表面内陷形成沟, 表面难以看到主鳃丝。普通鳃丝突出形成条状隆起, 每一隆起从表面可看到 12~13 条鳃丝, 对照组织学切片, 两主鳃丝间有 18~21 条鳃丝, 说明有 7 条左右的鳃丝陷入沟内, 表面无法看到(图版 II : 1, 见封 4 上, 下同)。鳃丝宽约 20 μm , 诸鳃丝呈波浪状, 平行排列, 排列较规则, 鳃丝上密生纤毛, 使鳃表面呈麦茎状^[4](图版 II : 2)。鳃丝的不同部位均可见到直径约 3.3 μm 的杯状细胞, 杯状细胞表面无纤毛而密生微绒毛, 有的杯状细胞外还可看到细胞排出的不同大小的圆形分泌泡, 说明杯状细胞即是鳃纤毛间的分泌细胞(图版 II : 3)。纤毛直径约 0.17 μm , 末端略为变细, 最末端常有很小的弯曲, 纤毛间常有细丝相连(图版 II : 4)。

3 讨论

3.1 鳃的滤食功能 紫彩血蛤鳃表面的纤毛极为丰富, 纤毛的摆动推动进入外套腔的水流通过鳃, 并把悬浮在泊水中的颗粒过滤下来。普通鳃丝的纤毛摆动将食物颗粒从背部运送到鳃腹部的食物运送沟内, 再沿食物运送沟向前方的唇瓣运送; 主鳃丝的纤毛运送方向与普通鳃丝相反, 先将食物颗粒运到鳃的基部, 再沿鳃的基部向唇瓣方向移动, 后者是运送食物颗粒的主要途径^[11]。紫彩血蛤鳃的组织学切片及扫描电镜观察可看到, 鳃间隔较短, 主鳃丝处凹陷形成沟, 有利于食物颗粒的集中和运送。鳃丝两侧有丰富的肌纤维, 有助于鳃丝的运动, 可

能对食物的运送也起积极的作用。PAS 反应显示糖元在鳃丝上皮细胞内最丰富,糖元可为纤毛的运动贮存充足的能量。腺细胞可分泌粘液物质,将食物颗粒包起来有利于食物的运送^[11]。扫描电镜观察可看到鳃丝表面在纤毛间夹着许多无纤毛而微绒毛较丰富的杯状细胞,有的正在向外形成分泌泡。Feulgen 反应显示鳃上皮细胞核较大,染色质量丝状,甲绿-派洛宁法显示 RNA 和 PAS 反应显示多糖均在鳃上皮细胞中阳性颗粒最多,说明了鳃上皮细胞代谢旺盛,合成的蛋白质与多糖结合可形成粘液中的主要成分粘多糖。从单个上皮细胞看,其外缘的 RNA 和多糖阳性颗粒比靠近鳃丝基部部分的多,说明合成的外输性蛋白质(分泌用)比细胞内需用的蛋白质多。

3.2 鳃的呼吸功能 鳃表面丰富的纤毛,推动含氧量高的新鲜海水不断流经鳃,利于气体交换。与进行气体交换相适应,在鳃丝内有丰富的血管。组织切片可看到,丝间联系和鳃间隔中也均有大量的血管,尤其在鳃内腔四周的组织中具有较粗大的血管,说明鳃内血量较大,利于氧的交换与运输,同时也说明,经鳃小孔进入鳃内腔后流经鳃水管出鳃至鳃上腔的过程中,鳃内腔周围组织细胞也可捕获大量的氧气。

3.3 鳃的防御作用 外界环境的海水进入蛤体内,首先遇到的重要器官即是鳃,海水带来了食物和氧,同时也带来了病原菌等致病因子,鳃的防御作用显得极为重要。本研究表明,鳃组织内有大量吞噬细胞,分布于鳃丝内、丝间联系、鳃间隔及结缔组织中,在结缔组织中吞噬细胞更集中。吞噬细胞内 ANAE、ACP 和 AKP 三种水解酶活性均较强,ANAE 活性尤为突出。而在高等哺乳动物巨噬细胞中,ANAE 呈弥散状分布,颗粒不明显,与此相比,紫彩血蛤吞噬细胞 ANAE 活性要强得多,这对于异物的吞噬、消化分解起重要的作用^[9]。过氧化物酶(POD)催化各种物质被 H_2O_2 氧化,具有杀菌

能力^[10]。鳃上皮细胞内 MPOD 活性很高,也有一定的 ANAE、ACP 和 AKP 活性,在紫彩血蛤体内吞噬作用的实验中我们还发现鳃上皮细胞也有很强的吞噬能力,上述现象说明鳃上皮细胞也参与机体的防御,在鳃表面形成了一个重要的防御屏障。为确定鳃组织中 ANAE 等活性强的细胞是吞噬细胞,除了细胞形态学观察外,我们作了体内吞噬墨汁实验而得到了证实,并用注射器从其心耳中取血涂片,显示 ANAE 等,结果血细胞均呈很强的阳性,说明组织内的吞噬细胞与血细胞具有相似的结构与功能,两者的来源是相同的。有关双壳类吞噬细胞及血细胞的来源、分类及免疫机理等问题还有待于进一步的探讨。

参 考 文 献

- 1 李孝绪. 牡蛎鳃的发生与研究. 海洋科学, 1990(2): 14-17
- 2 山元克一. マガキ, クマサルホー, タイラギの鳃のほぶく速度しニ及ぼす低酸素と水温の影響. 水産増殖, 1993, 41(4): 435-438
- 3 Morton, B. The biology and functional morphology of *Periploma (Offadcsma) angasaki* (Bivalvia: Anomalodesmata: Periplomatidae). *J. zool. Lond.* 1981, 193: 39-70
- 4 丛宁, 袁莉民. 背角无齿蚌外套膜和鳃瓣的扫描电镜初步观察. 水生生物学报, 1993, 17(3): 288-289
- 5 孙虎山, 王宜艳. 过氧化氢诱导紫彩血蛤排放精卵及其胚胎发育的研究. 水产科学, 1992, 11(9): 10-13
- 6 孙虎山, 王宜艳, 郭志清. 紫彩血蛤的性腺发育和生殖周期. 齐鲁渔业, 1994, 11(1): 13-15
- 7 孙虎山, 王为纲, 王宜艳等. 温度对紫彩血蛤胚胎及幼虫发育的影响. 海洋湖沼通报, 1997(2): 54-58
- 8 孙虎山, 郝刚锋, 王为纲等. 紫彩血蛤幼虫适宜饵料的研究. 海洋科学, 1997(4): 4-6
- 9 Bancroft, J. D. et al. Theory and Practice of Histological Techniques. Second Edition. Churchill Livingstone Inc., London. 1981, 379-405
- 10 Kaplow, L. S. Simplified Myeloperoxidase Stain Using Benzidine Dihydrochloride. *Blood*, 1965, 26(2): 215
- 11 蔡英亚, 张英, 魏若飞. 贝类学概论. 上海: 科学技术出版社, 1979. 108-109

图版 II 说明

图 1 鳃瓣表面的沟和条状隆起 * 示沟 图 2 条状隆起的局部放大 示鳃丝(GF) 图 3 鳃丝局部放大 示纤毛(Ci)、杯状细胞(Gb)和分泌泡(SG) 图 4 鳃丝纤毛放大 ↑ 示纤毛间有细丝相连

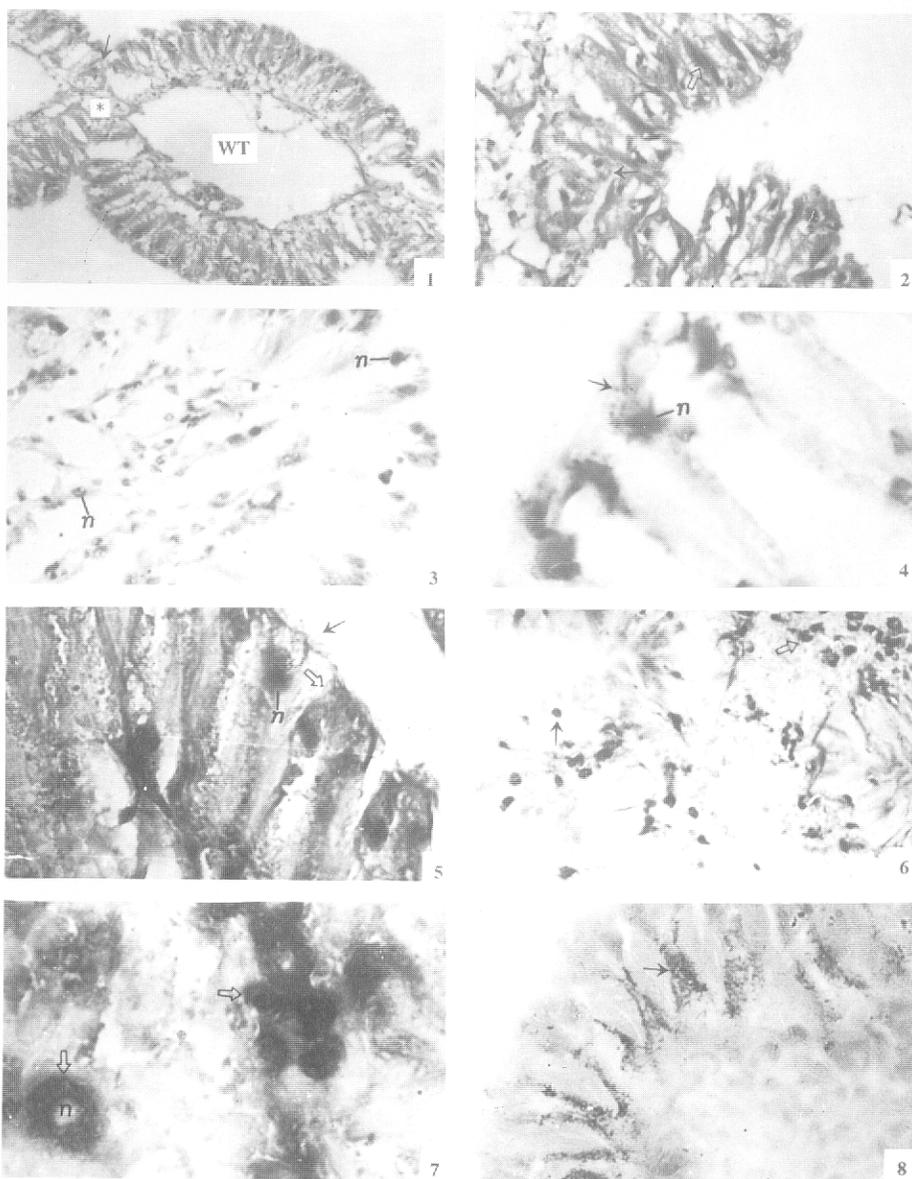
HISTOCHEMICAL AND ELECTRON SCANNING MICROSCOPIC STUDIES ON THE GILLS OF *NUTTALLIA OLIVACEA*

SUN Hu-Shan WANG Xiao-An

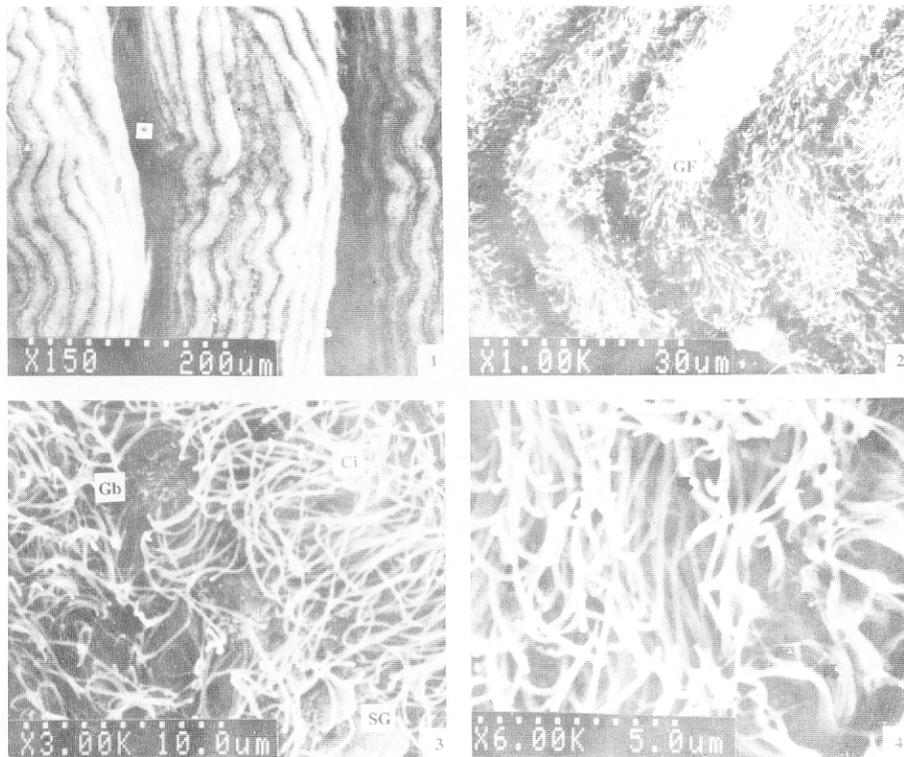
(Yantai Normal College, 264025, China)

ABSTRACT Most epithelial nuclei of *Nuttallia olivacea* are elliptic in shape and the chromatin is filiform. Most nuclei of connective tissue are round and have Feulgen positive granules. RNA is rich in the epithelial cells of gill filaments. RNA granules $0.52\mu\text{m}$ in diameter are observed. There are PAS positive granules about $0.63\mu\text{m}$ in diameter in the cells of connective tissue and the epithelial cells of filaments. Phagocytes present very strong ANAE positivity while the epithelial cells present weak positivity. The activeness of ACP and AKP are strong in phagocytes and outer epithelial cells but weak in other cells. MPOD is strong positive only at the bases of filaments. Scanning electron microscopic observations show that cilia grows densely on the surface of gill. Gullis are located in the main filaments. 18~21 filaments form a ridge. There are many cupped cells among cilia of gill and some round secretory vacuoles outside of some cupped cells.

KEY WORDS *Nuttallia olivacea* Gill Histochemistry Scanning electron microscope



1. 鳃瓣的一部分 示主鳃丝(↑)、鳃间隔(*)和鳃水管(WT) ×100 2. 主鳃丝及两侧的鳃丝 ↑示主鳃丝, ◊示鳃丝两侧的肌纤维 ×200 3. Feulgen 反应 ×400 4. 甲绿-派洛宁反应 ↑示 RNA 颗粒 ×1000 5. PAS 反应 ↑示纤毛, ◊示鳃丝外缘上皮 PAS 强阳性团块 ×1000 6. ANAE ↑和◊分别示鳃丝和结缔组织中的吞噬细胞 ×400 7. ANAE ◊同6 ×1000 8. mPOD ↑示鳃丝基部大量的酶颗粒 ×800 图版中 n 均示细胞核



图版说明(见文后)