

金鱼早期仔鱼体表的电镜观察

刘文生 郭锦 彭文伟 何秋燕 黄静文

(华南农业大学动物科学学院 广州 510642)

摘要 :应用扫描和透射电镜技术对金鱼(*Carassius auratus*) 孵出 1 d、3 d、9 d 龄仔鱼的体表进行了观察。仔鱼的上皮细胞呈扁平、多边形,彼此之间由增厚的边缘嵴状突紧密连接,细胞向内凹陷的表面有指纹状峭突。孵出 3 d 的仔鱼体表两侧各有一列间隔有序呈丘状突起的味蕾,外被单层上皮细胞,味蕾处有一根粗圆的感觉毛。粘液细胞出现在仔鱼头部、腹部、体侧的表皮上,并开口于多个相邻上皮细胞间的连接处。粘液细胞胞质比例大,内含丰富、平行排列的粗面内质网,旁边有大量大小不一、内含物液化状、近圆形的粘原颗粒。9 d 后仔鱼体表完全被粘液覆盖,初步建立了以粘液细胞为基础的防病和抗病机制,以机械和化学感觉为主的 I 型味蕾觅食方式。

关键词 :金鱼;体表;电镜;味蕾;粘液细胞

中图分类号 :Q954 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2006)02-81-06

An Electron Microscopic Study on the Skin Structure of Early Larval Fish in *Carassius auratus*

LIU Wen-Sheng GUO Jin PENG Wen-Wei HE Qiu-Yan HUANG Jing-Wen

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract :In this study, scanning and transmission electron microscopy was used to observe the skin structure of larval fish in *Carassius auratus* at 1 d, 3 d, and 9 d after hatching. The epithelial cells of larval fish were squamous, multilateral in shape, and tightly joined with each other by protrusions around cells. There were dactylogram-like protrusions on the invaginated surface. A tier of taste buds in monticule-protuberant shape ranging intermittently and orderly were found on the skin of both sides of the body in hatched 3 d larval fish. The taste bud was covered with a single layer of epithelial cells, except for receptor area where there was only one big and long sensory microvillus. Mucous cells mainly distributed in the larval fish skin of such parts as head, abdomen and body side as well as the opening between adjoining epithelial cells. Cytoplasm of mucous cells was rich in parallel rough endoplasmic reticulum and Golgi complexes. Beside, numerous primitive mucous granules with fluidified content were visible and they were in different sizes. By 9 d after hatching, the external skin of larval fish was wholly covered by mucous, suggesting that the anti-bacterial mechanism of the skin is preliminarily established. Type I taste buds have the functions of mechanoreception and chemoreception for feeding mainly.

Key words :*Carassius auratus*; Skin; Electron microscope; Taste bud; Mucous cell

鱼类体表在其生活的水环境中起着防御的重要作用,主要依靠粘液细胞大量分泌含有多种活性物质,如粘多糖、糖蛋白、免疫球蛋白及各种水解性酶类的粘液抵制病原体的入侵,并维持正常的生理功能^[1,2]。体表发达的味觉器

官与鱼类摄取饵料关系密切,味蕾是分布在硬

基金项目 广东省科技计划项目(No. 2001C20810)资助;
第一作者介绍 刘文生,男,在读博士生,副教授,主要从事鱼类生物学研究, E-mail: wslu@scau.edu.cn。

收稿日期 2005-06-01, 修回日期 2006-01-13

骨鱼类全身体表的味觉器官^[3],在仔鱼开口摄食时起重要的机械和化学感受作用,是决定鱼苗成活的关键^[4]。关于粘液细胞和味蕾的形态结构、生理生化研究的鱼类有鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)、淡水白鲳(*Colossoma brachypomum*)、胡子鲶(*Clarias fuscus*)、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)、鹦嘴鱼(*Sacrus vetula*)和非洲肺鱼(*Protopterus annectens*)等^[5-9],有关二者在早期发育的稚幼鱼的报道仅有鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和南方鲇(*Silurus meridionalis*)^[4,9]。金鱼(*Carassius auratus*)是原产我国的著名观赏鱼类,历来是各种研究的理想实验材料,对其早期仔鱼体表进行超微形态学研究分析,既补充了金鱼这方面的生物学资料,又增强了金鱼人工繁殖鱼苗培育的理论基础,也有助于推动名贵金鱼育种技术的发展。

1 材料与方法

选用市售的雌雄金鱼,挑选性腺成熟的亲鱼放在水族箱内饲养,待发现其发情追逐时,便捞出进行人工授精,获得的受精卵在实验室用净化自来水增氧孵化后,分别取孵出 1 d、3 d 和 9 d 龄的仔鱼若干尾整体用 4% 戊二醛前固定,1% 锇酸后固定 2 h,然后用磷酸缓冲液冲洗 3 次,梯度酒精脱水,再用乙酸异戊酯渗透 2 次, HCP-2 临界点干燥, JB-5 离子喷度,在 FEI-XL30 扫描电镜下观察拍照。透射电镜观察样品经固定、修块后,用环氧丙烷透明, Epon 812 包埋,采用横向超薄切片,常规染色,然后在 FEI-Tecna 12 分析型透射电子显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 体表上皮细胞 孵出 1 d 的金鱼仔鱼具巨大的球形卵黄囊(图版 I:1),体表被有一层上皮细胞,呈波浪纹状皱褶,上皮细胞为大小不一、形状不规则的多边形,相邻细胞彼此之间连成一张渔网状结构罩住仔鱼全身(图版 I:3)。孵出 3 d 的仔鱼呈细条状,全长 3.1 mm,卵黄囊变为细长(图版 I:2)。体表上皮充分伸展,多数上皮细胞呈六边形,细胞表面有许多微峭突

起,峭突粗细均匀、长短不一、表面光滑、迂回曲折呈指纹状密集分布(图版 I:4)。在上皮细胞边缘,峭突成为相邻细胞的连接处,细胞之间峭突并行呈拉链式紧密连接,连接处略微增厚,整个细胞表面向里凹陷(图版 I:5)。在透射电镜下可见上皮细胞游离端有短指样突起,为微峭的横断面,突起处有絮状物。上皮细胞较扁平,核大呈肾形,染色深,核仁 1 个,偏于胞核一端,常染色质和异染色质均匀分布(图版 I:6)。细胞质内线粒体丰富,呈长杆状或圆形,横峭明显(图版 I:7)。内质网附有核糖体,短管状分布,出现小池样,游离的核糖体多。在孵化腺细胞出现的表皮细胞中央向外鼓起形成棉花状突起,并汇集成堆(图版 I:8)。孵出 9 d 的仔鱼体表被粘液覆盖,上皮细胞表面看不到峭突(图版 I:9)。

2.2 味蕾 孵出 3 d 的仔鱼出现味蕾,自头部至尾部呈一系列丘状突起,高耸在体表上。味蕾在头部间隔较密,每侧除了 5 个排成一行外,还可以看到少数味蕾散布在头部周围(图版 II:1)。味蕾分布绕过眼后延伸到嘴,在唇瓣稀疏出现(图版 II:2)。鱼体两侧的味蕾以等距间隔有规律分布,位于每侧中央排列成一直线(图版 II:3)。每个味蕾呈半球形,表面有一层上皮细胞覆盖,只在味蕾的顶部留有开口,味孔处可见一根粗大圆形较长的感觉毛伸出(图版 II:4)。孵出 9 d 的仔鱼体侧见不到突起的味蕾,上皮细胞上移的同时味蕾高度下降,味孔与周围上皮等高。

2.3 粘液细胞 粘液细胞随着仔鱼的孵化而出现在头部、腹部、体侧的皮肤上,并开口于相邻多个上皮细胞间的连接处。孵出 3 d 的仔鱼上皮细胞表面峭突花纹清晰可见,表明粘液细胞尚未向外分泌粘液,此时的粘液细胞开口不明显。9 d 后仔鱼体表完全被一层粘液覆盖,上皮细胞表面的峭纹消失,粘液细胞在鱼体两侧的数量增加,开口处也明显增大(图版 II:5)。在透射电镜下,粘液细胞呈杯状,独立散布在单层上皮细胞之下,有竖立和横卧不同姿态,接近上皮细胞游离面。粘液细胞胞质比例大,内含

丰富的粗面内质网,在细胞内形成多段平行排列,核糖体明显。在粗面内质网旁边,有大量的粘原颗粒,形状近圆形,大小不一,互相紧挨在一起,连接处有间断形成空隙。颗粒染色深,内含物较为均匀,呈液化状(图版 II :6)。粘原颗粒数量在不同细胞中不一致,有的粘液细胞几乎被粘原颗粒充满(图版 II :7)。此外,胞质内还有线粒体、高尔基体(图版 II :8)。细胞核不规则,染色浅,核膜向内突入,延伸呈短管样。此处还可看到上皮细胞之间以桥粒的形式连接(图版 II :9)。

3 讨论

刚孵出的金鱼仔鱼依靠相邻上皮细胞的紧密连接形成适应水中生活并保护机体的第一道防线。鱼类的上皮层普遍存在粘液细胞^[2],鲤的粘液细胞在受精卵孵化前 1 d 出现,以后主要分布在皮肤、口腔、鳃、消化道等部位^[9]。Kitzan 等最早根据 PAS 反应的不同颜色把非洲肺鱼上皮组织中的粘液细胞分为 3 种类型, Sibbing 等按不同形态将鲤鱼咽部的粘液细胞分为囊状、梨状和杯状 3 种类型^[9]。这 3 种细胞被认为处于不同发育期,其中杯状细胞为成熟期^[2]。金鱼仔鱼体表在孵出 3 d 出现的粘液细胞呈杯状,属于成熟期,孵化 9 d 后有大量粘液覆盖整个上皮细胞外表面,对加强鱼体外表防护线起到重要作用。粘液由于上皮细胞外表面嵴状突起形成指纹样结构的粗糙面而得到支持和固定,仔鱼上皮细胞表面特有的内凹也起着容纳大量粘液、增加细胞表面积及表皮弹性的作用,结果延长粘液在微表面的滞留时间,使体表润滑,从而防止仔鱼机械损伤、维持渗透压和建立更有效的防御机制。鱼类是较低等的脊椎动物,以血清免疫球蛋白为中心的特异性免疫机制刚刚出现,粘液细胞有着比较重要的免疫功能。例如, Lemaitre 等从鲤皮肤粘液中分离纯化出抗菌离子通道形成蛋白^[10], Videler 等发现鹦嘴鱼皮肤粘液中存在一些抗菌物质,对许多著名热带鱼类病原菌具有抗性,并且对人类病原菌也具有一定的杀菌活性^[8]。另外,从早

期发育金鱼的组织器官中,发现蛋白水解酶从孵化期就开始表达,在仔鱼期共检出 8 条酶带活性较弱的蛋白水解酶,且大部分为金鱼组织所共有的蛋白水解酶^[11]。水中的病原菌和体表粘液层接触时,还可以被粘液粘连在一起,从而阻止病原体的移动起着屏障作用。同时,还因为粘液中含有特异性 Ig 而对鱼类更具重要意义^[12]。以上表明金鱼仔鱼初步建立了以粘液细胞为基础的防病和抗病机制,有助于金鱼的生长发育和自我保护。

鱼类的味蕾分为 3 种类型:Ⅰ型味蕾顶部显著高于表皮;Ⅱ型味蕾顶部仅略高于表皮;Ⅲ型味蕾与表皮处同一水平^[5]。金鱼的味蕾最早发现于孵出 3 d 的仔鱼的头部、唇瓣和鱼体两侧,数量不多,但排列有规律,属同类型的Ⅰ型味蕾。多数学者认为Ⅰ型味蕾主要为机械感觉,兼受化学刺激^[4]。Reutter 等通过扫描电镜观察研究了剑尾鱼味蕾形态、分布多样性,认为隆起的Ⅰ型和Ⅱ型味蕾除了具有化学感受作用外,还兼有机械感受作用,能识别食物软硬等物理性质^[7]。Davenport 和 Caprio 采用电生理方法研究了沟鲈味觉神经感受特性,证实存在同时对化学刺激和机械刺激敏感的味觉传入神经纤维^[5]。据报道,南方鲈孵出 4 d 的仔鱼唇瓣和口咽腔的Ⅰ型味蕾发生特别迅速,呈花蕾状,Ⅰ型味蕾在仔鱼的摄食中起重要的机械和化学感受作用,是决定鱼苗成活的关键^[4]。金鱼仔鱼Ⅰ型味蕾具有 1 根粗大突出的感觉毛,表明味蕾的机械作用是主要的,当感觉毛碰撞到合适的食物就能引起仔鱼的注意。黎会平用神经组织化学方法研究支配鳃咽部味蕾的神经属性,证实Ⅰ、Ⅱ型味蕾与胆碱能型神经纤维相联系,除了化学感受器作用外,高出周围上皮的微绒毛兼有机械感受功能^[13]。因此,建议在金鱼仔鱼培育阶段,投料时给周围环境创设适当的动感或水流,能提高仔鱼捕食能力,特别在投喂开口饵料时,保证每一尾仔鱼都能进食很重要。仔鱼的游动能力较差,只有在及时获得食物后才能使各种组织器官及机能得到发育完善,最终提高鱼苗期培育的成活率。

参 考 文 献

[1] 杨桂文,安利国. 鱼类粘液细胞研究进展. 水产学报, 1999, 23(4):403~408.

[2] 尹苗,杨桂文,安利国,胡子鲇粘液细胞类型及其在消化道中的分布. 动物学报, 2001, 47(专刊):116~119.

[3] 龙天澄,黄溢明. 革胡子鲇触须味蕾及其味觉反应的研究. 水生生物学报, 1994, 18(4):316~326.

[4] 杨桂枝,张耀光,姜希泉等. 南方鲇的皮肤和味蕾结构研究. 西南师范大学学报(自然科学版), 1998, 23(6):695~699.

[5] 梁旭方. 鳊鱼口咽腔味蕾和行为反应特性及其对捕食习性的适应. 动物学报, 1996, 42(1):22~26.

[6] 袁金铎,张明,王钦东等. 淡水白鲢粘液细胞类型和分布的研究. 细胞生物学杂志, 1997, 1(增刊):70~72.

[7] Reutter K, Breipohl W, Bijvank G J. Taste bud types in fishes, II. Scanning electron microscopical investigations on *Xiphophorus helleri* Heckel (Poeciliidae, Cyprinodontiformes,

Teleostei). *Cell Tissue Res*, 1974, 153:151~165.

[8] Videler H, Gertjes G J, Videler J J. Biochemical characteristics and antibiotic properties of the mucous envelope of the queen parrotfish. *J Fish Bio*, 1999, 54:124~127.

[9] 安利国,孟广勋,杨桂文等. 鲤稚幼体早期发育过程中粘液细胞的发生和变化. 水生生物学报, 2001, 25(2):191~194.

[10] Lemaitre C, Orange N, Saglio P, et al. Characterisation and ion channel activities of novel antibacterial proteins from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). *Europ J Biochem*, 1996, 240:143~149.

[11] 李效宇,夏民,李莉等. 金鱼不同组织器官及胚胎发育不同时期蛋白水解酶的种类和活性变化. 水生生物学, 2000, 24(2):128~136.

[12] 王长法,安利国,杨桂文等. 鱼类免疫球蛋白研究进展. 中国水产科学, 1999, 16(2):105~107.

[13] 黎会平,赵雅心,张训浦等. 鳊咽部味蕾神经组织化学的研究. 华中农业大学学报, 1997, 16(3):296~298.

图版 I 说明

1. 金鱼孵出 1 d 仔鱼 × 50 ; 2. 孵出 3 d 仔鱼外观 × 32 ; 3. 初孵仔鱼体表呈皱折的上皮 × 800 ; 4. 3 d 仔鱼体表皮细胞呈多边形 × 800 ; 5. 上皮细胞表面呈指纹状峭突(↑) × 2 000 ; 6. 上皮细胞透射电镜照片 × 6 800 ; 7. 长杆状的线粒体 × 23 000 ; 8. 孵化腺细胞在表皮细胞形成突起(↑) × 3 200 ; 9. 孵出 9 d 仔鱼被分泌粘液覆盖的体表 × 200.

Explanation of Plate I

1. The hatched 1 d larval fish of *Carassius auratus* × 50 ; 2. The outlook of hatched 3 d larval fish × 32 ; 3. The epithelium in the skin of newly hatched larval fish × 800 ; 4. The skin of 3 d larval fish showing multilateral epithelial cells × 800 ; 5. The epithelial cell showing dactylogram-like protrusions(↑) on the surface × 2 000 ; 6. The TEM picture of an epithelial cell × 6 800 ; 7. The long pole shape mitochondria × 23 000 ; 8. The salience(↑) on the surface of the epidermal cell in hatching gland cells region × 3 200 ; 9. Hatched 9 d larval fish with its skin covered by excreted mucous × 200.

图版 II 说明

1~4 示味蕾超微结构 ; 5~9 示粘液细胞超微结构。

1. 孵出 3 d 仔鱼头部分布的味蕾(↑) × 258 ; 2. 仔鱼唇瓣出现味蕾(↑) × 800 ; 3. 仔鱼体侧间隔排列的味蕾(↑) × 258 ; 4. 耸立在体表的半圆形味蕾放大 × 4 133 ; 5. 被分泌粘液覆盖的上皮细胞 × 1 600 ; 6. 发育中的粘液细胞超微结构 × 6 800 ; 7. 充满粘原颗粒的粘液细胞 × 6 800 ; 8. 平行排列的粗面内质网及高尔基体(↑) × 23 000 ; 9. 两个上皮细胞之间的连接 × 18 500.

N 细胞核 ; G 粘原颗粒 ; E 粗面内质网 ; J 胞间连接 ; S 分泌口。

Explanation of Plate II

No. 1~4 showing ultrastructure of taste buds ; No. 5~9 showing mucous cells.

1. Hatched 3 d larval fish has taste bud(↑) on its head × 258 ; 2. Taste bud(↑) are found on the lip parts of larval fish × 800 ; 3. Taste buds(↑) on both sides of the body of larval fish × 258 ; 4. An enlarged taste bud in semicircle shape on the skin × 4 133 ; 5. The epithelial cells covered by excreted mucous × 1 600 ; 6. Ultrastructure of a developing mucous cell × 6 800 ; 7. A mucous cell containing primitive mucous granules × 6 800 ; 8. Rough endoplasmic reticulum in parallel and Golgi complex(↑) × 23 000 ; 9. The junction of two epithelial cells × 18 500.

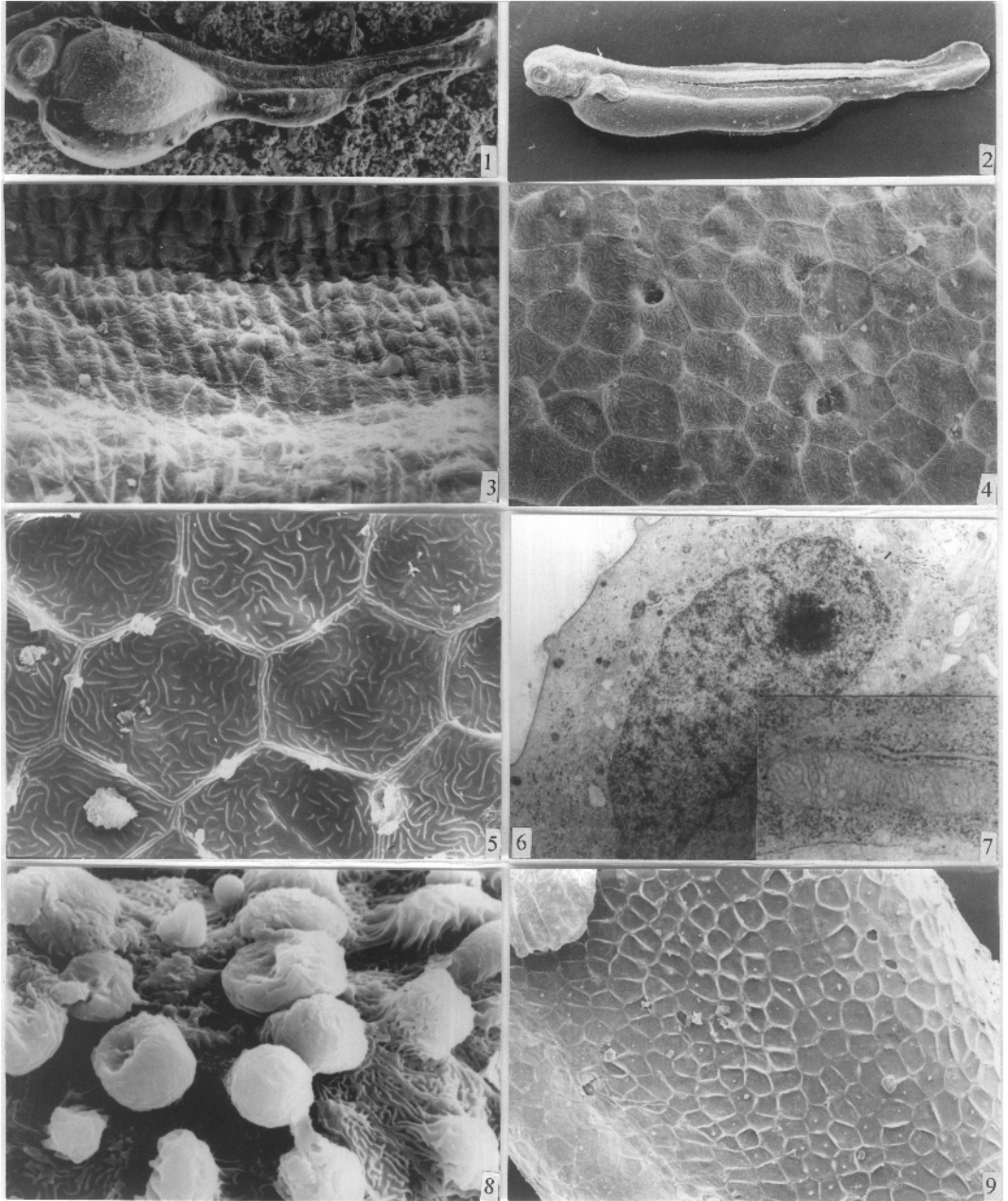
N nucleus ; G primitive mucous granule ; E rough endoplasmic reticulum ; J junction between cells ; S secreting orifice.

刘文生等 金鱼早期仔鱼体表的电镜观察

图版 I

LIU Wen-Sheng *et al.* :An Electron Microscopic Study on the Skin Structure of Early Larval Fish in *Carassius auratus*

Plate I



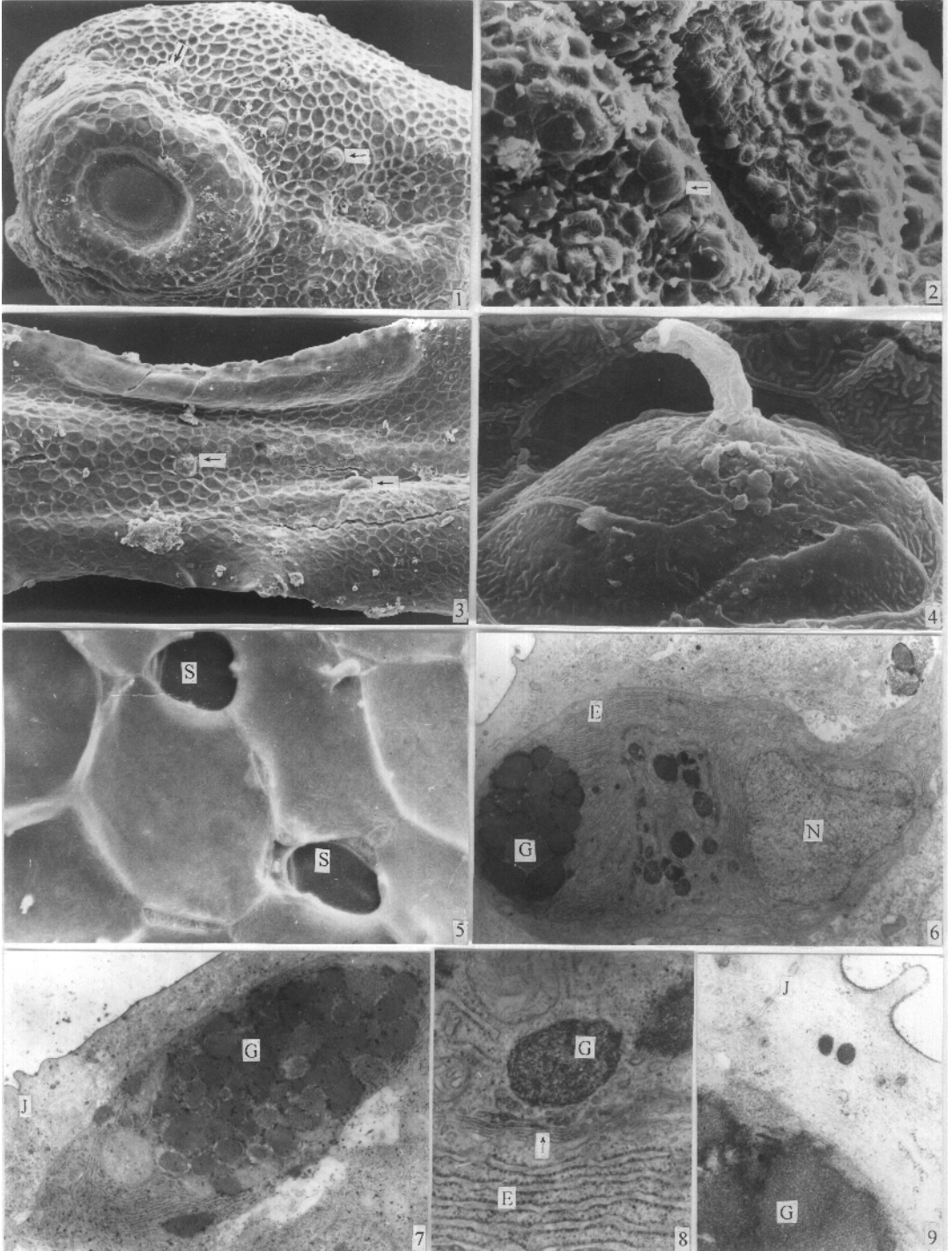
图版说明见文后

刘文生等 金鱼早期仔鱼体表的电镜观察

图版 II

LIU Wen-Sheng *et al.* :An Electron Microscopic Study on the Skin Structure of Early Larval Fish in *Carassius auratus*

Plate II



图版说明见文后