

# 海南原指树蛙皮肤腺体的组织学结构观察

何巧玲<sup>①②</sup> 邓可<sup>①\*</sup> 崔建国<sup>①\*</sup>

① 中国科学院成都生物研究所 成都 610041; ② 中国科学院大学 北京 100049

**摘要:** 两栖动物皮肤的显著特征之一是外分泌腺体遍布全身, 这些腺体释放的分泌物在繁殖、交流和防御等方面起重要作用。本研究利用组织学技术, 对海南原指树蛙 (*Kurixalus hainanus*) 头部、背部、体侧、颈部以及腹部的皮肤样本进行了显微结构 (包括 H.E、AB-PAS 和 Masson 三色染色方法) 和超微结构的观察, 并利用线性混合效应模型对皮肤厚度、腺体分布和大小进行了统计分析。显微结构的观察和分析结果显示, 海南原指树蛙的皮肤中仅有黏液腺 (I 型黏液腺和 II 型黏液腺) 和颗粒腺, 未发现特化腺体。皮肤腺体的种类未发现性别差异, 但同性别个体的皮肤厚度、腺体的分布和大小存在部位差异, 且这些指标在特定部位存在性别差异。皮肤厚度的差异可能与海南原指树蛙的运动方式和繁殖方式相适应, 腺体分布和大小的差异可能与防御功能和性别二态性有关。超微结构观察结果显示, 黏液腺含有中、高电子密度的黏液颗粒; 颗粒腺的分泌颗粒有接触相融的现象, 可能是一种物质成熟的阶段性反应。本研究为蛙类皮肤结构、腺体种类和分布提供了基础资料, 为后续开展海南原指树蛙挥发性分泌物的化学成分研究提供了形态学基础。

**关键词:** 蛙类; 石蜡切片; 透射电镜; 颗粒腺; 黏液腺

**中图分类号:** Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 06-840-13

## Histology Structure of Cutaneous Glands in Hainan Frilled Treefrogs *Kurixalus hainanus*

HE Qiao-Ling<sup>①②</sup> DENG Ke<sup>①\*</sup> CUI Jian-Guo<sup>①\*</sup>

① *Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041;*

② *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*

**Abstract: [Objectives]** Exocrine glands distributed throughout the skin are one of the conspicuous characteristics in amphibians. The secretions of these glands play a vital role in reproduction, communication, and defense. In order to investigate the types, distribution, and ultrastructure of the glands in treefrogs, we used histological techniques to observe the microstructure (including Hematoxylin-Eosin, Alcian Blue-Periodic Acid Schiff and Masson staining methods) and ultrastructure of skin samples from cephalic,

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 32000313), 两栖爬行动物行为学四川省青年科技创新团项目 (No. 2022JDTD0026), 四川省自然科学基金项目 (No. 2022NSFSC1736);

\* 通讯作者, E-mail: dengke@cib.ac.cn, cuijg@cib.ac.cn;

**第一作者介绍** 何巧玲, 女, 硕士研究生; 研究方向: 蛙类的通讯行为; E-mail: heql@cib.ac.cn.

收稿日期: 2022-12-01, 修回日期: 2023-05-15 DOI: 10.13859/j.cjz.202322304

dorsal, lateral, mental and ventral regions of Hainan Frilled Treefrogs (*Kurixalus hainanus*). [Methods] A linear mixed effect model was used to analyze differences in thickness of skin, distribution of glands and size of glands among body regions in sex-specific individuals where body regions were used as a fixed factor and individuals were used as a random factor, and sex differences of those metrics in specific body regions where sex was used as a fixed factor and individuals were used as a random factor. All statistics were performed in SPSS 22.0. [Results] Ordinary mucous glands (I MG & II MG), serous glands, but not specialized glands were found in most areas (Fig. 1). Microstructure analysis revealed that both male and female frogs had the same type of glands, but there were significant differences in the skin thickness, the distribution of glands, and the size of glands among body regions in sex-specific individuals (Fig. 2, 3). In addition, there was a significant sex difference in these metrics in specific body regions (Fig. 2, 3). The differences in skin thickness might result from an adaptation to the locomotive and reproductive patterns of *K. hainanus*. The differences in distribution and size of the glands might be related to defensive function and sexual dimorphism. Ultrastructural analysis showed that there were different sizes and densities of vesicles in mucous glands (Fig. 4), and the aggregate serous vesicles indicated a staged reaction of substance maturation (Fig. 5). [Conclusion] This study provides fundamental information on skin structure, types of glands, and distribution of glands in anurans. Moreover, this study contributes to further study on the chemical component of volatile secretions from *K. hainanus* with a morphological basis.

**Key words:** Anurans; Paraffin section; Transmission electron micrographs; Mucous glands; Serous glands

两栖动物皮肤的显著特征之一是全身广泛分布外分泌腺体 (Fox 1986, Toledo et al. 1995, Mailho-Fontana et al. 2017)。两栖动物皮肤腺体主要包括 4 种类型: 黏液腺 (mucous glands)、颗粒腺或浆液腺 (granular or serous glands)、混合腺 (mixed glands) 和脂腺或蜡腺 (lipid or wax glands) (Toledo et al. 1995, Brizzi et al. 2002)。有尾类 (鲩、蝶螈) 的皮肤腺主要包括黏液腺、颗粒腺和混合腺, 而无尾类 (蛙、蟾蜍) 的皮肤腺主要为黏液腺和颗粒腺, 少数物种具有混合腺 (Seki et al. 1995, Antoniazzi et al. 2022) 和脂腺 (Warburg et al. 2000, Antoniazzi et al. 2013, Rota et al. 2017)。两栖动物的腺体特化现象十分普遍 (Brunetti et al. 2012, Sever 2017, Luna et al. 2019), 与普通腺体相比, 特化腺体单元通常会变大、拉长, 且紧密堆叠形成肥大的丛集 (voluminous clusters) (曾一唯等 2018)。在某些物种中, 腺体会成簇聚集在特定的身体部位, 在体表形成褶皱或突起, 即

宏腺 (macro glands), 如蟾蜍 (*Bufo ictericus*) 的耳后腺 (parotoid glands) (Mailho-Fontana et al. 2018)、*Gephyromantis ranjomavo* 的胫腺 (tibial glands) (Glaw et al. 2011) 以及滇蛙 (*Nidirana pleuraden*) 的肩腺 (postaxillary gland) (Gong et al. 2020) 等。有些物种的腺体虽在特定位置聚集, 体表却无明显宏观增生 (Prates et al. 2012), 仅有小颗粒密集分布, 如颞腺 (mental glands) 和体侧腺 (lateral glands) (Brunetti et al. 2015a), 需通过组织学方法进行鉴定和辨别。

无尾类的腺体分泌物包括非挥发性物质 (如蛋白质或多肽) 和挥发性小分子化合物。这些腺体分泌物在个体的繁殖、交流和防御等方面起重要作用 (Fox 1986, Daly 1995, Toledo et al. 1995)。例如, 在侏儒爪蟾 (*Hymenochirus* sp.) 的二向选择实验中发现, 相较于清水或去除肩腺的雄性个体, 雌蛙对雄性肩腺匀浆表现出显著偏好 (Pearl et al. 2000)。对细趾蟾

(*Leptodactylus fallax*) 的研究发现, 雄性的皮肤分泌物对雌蛙的行为没有显著影响, 但能吸引雄性个体, 并显著激发争斗行为, 如高耸身体或跳跃 (King et al. 2005)。另一方面, 某些蛙类 (如 *Trachycephalus venulosus*) 能分泌有毒的皮肤分泌物, 该分泌物像胶水一样能使树叶等碎屑物粘附在捕食者的下巴和嘴上, 帮助自身逃跑 (Vitt et al. 2014)。此外, Poth 等 (2012) 在曼蛙 (*Mantidactylus multiplicatus*) 雄性的股腺中首次检测到了非肽类挥发性物质 (大环内酯类和醇类化合物), 并通过实验证实了其具有种内交流的作用。相似地, 在饰纹澳拟蟾 (*Pseudophryne bibronii*) 的气味选择实验中, 相较于无气味对照, 雌性对雌性或雄性气味均表现出显著的偏好, 而雄性仅偏好雌性气味, 对雄性气味表现出显著的排斥 (Byrne et al. 2007)。Brunetti 等 (2015b) 利用气相色谱-质谱分析法 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 对两种雨蛙 (*Hypsiboas pulchellus* 和 *H. riojanus*) 的挥发性物质进行了检测, 分别鉴定出 40 种和 37 种化学物质。Brunetti 等 (2016) 进一步对 *H. pulchellus* 的皮肤进行了组织化学及超微结构观察, 并通过实验证实了其皮肤分泌的挥发性物质来源于颗粒腺。

海南原指树蛙 (*Kurixalus hainanus*) 隶属于无尾目 (Anura) 树蛙科 (Rhacophoridae) 原指树蛙属 (Li et al. 2008), 在我国分布于海南、广东、广西和贵州等地区 (Yu et al. 2017)。野外观察发现, 当海南原指树蛙被抓握时会迅速发出应激气味。行为学实验表明, 这种应激气味能使雄蛙显著减少鸣叫频次 (Deng et al. 2021), 且能显著引起雌蛙的回避行为 (Deng et al. 2022), 证实了海南原指树蛙的应激气味对同类具有警戒作用。进一步的研究发现, 这种应激气味能使福建竹叶青 (*Trimeresurus stejnegeri*) 的吐舌频次显著增加 (He et al. 2023), 暗示了福建竹叶青能利用海南原指树蛙的应激气味感知猎物。这些研究表明, 海南原

指树蛙在应激条件下释放的挥发性物质具有种内警戒和种间交流的作用。然而, 关于该物种化学通讯的研究, 尚缺乏组织学信息。本研究以海南原指树蛙为研究对象, 利用石蜡切片技术和组织化学技术, 对可能含特化腺体的头部、背部、体侧、颈部和腹部皮肤进行了显微结构的观察, 利用电镜技术对其背部皮肤进行了超微结构的观察, 并记录比较了皮肤厚度、腺体分布和大小的部位差异及性别差异, 旨在探究海南原指树蛙皮肤结构、腺体分布和大小与功能的适应关系, 为后续开展挥发性分泌物的化学成分研究提供形态学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物采集

实验动物于 2021 年 8 月采自于海南省东南部的吊罗山国家森林公园 (18°43'12" N, 109°52'12" E, 海拔 933 m), 共 9 只雄蛙和 3 只雌蛙。

### 1.2 显微结构观察

将实验动物带回实验室, 安乐死后用蒸馏水洗净体表, 立即取其头部、背部、体侧、颈部和腹部皮肤, 取皮肤样品约 8 mm × 8 mm。将取好的皮肤置于装有 4% 多聚甲醛溶液的 5 ml 保存管中固定至少 24 h, 并编号。常规脱水透明, 石蜡包埋, 切片, 厚度为 4 μm, 贴片, 烘干备用。分别用三种方法染色: H.E (苏木素-伊红) 染色, 染色后细胞核呈蓝色, 细胞质呈红色; Masson 三色染色, 胶原纤维呈蓝色, 肌纤维和红细胞呈红色; AB-PAS 染色, 染色后酸性黏液物质呈蓝色, 糖原和中性黏液物质呈紫红色, 混合黏液物质呈紫蓝色或蓝紫色。染色后用树胶封片。

### 1.3 超微结构观察

将显微结构观察阶段处理好的 3 只雄蛙和 3 只雌蛙的背部皮肤分别放入透射电镜固定液 (2.5% 戊二醛) 中常温固定 2 h, 再转移至 4 °C 保存。随后, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 PB (pH 7.4) 配制的 1% 锇酸避光室温进行后固定 2 h,

0.1 mol/L 磷酸缓冲液 PB (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。漂洗结束后, 依次用 30%、50%、70%、80%、95%、100%、100% 酒精对组织进行脱水, 每次 20 min。最后, 用 100% 丙酮脱水 2 次, 每次 15 min。皮肤组织经过后固定和脱水后, 用环氧树脂包埋。用超薄切片机 (Leica EM UC7) 进行切片, 超薄切片厚度为 70 nm, 用 150 目方华膜铜网捞片。铜网依次于 2% 醋酸铀饱和酒精溶液避光染色 8 min 和 2.6% 枸橼酸铅溶液避二氧化碳 8 min; 铜网切片放入铜网盒内室温干燥过夜。切片制成后, 用透射电子显微镜 (Hitachi HT7800/HT7700) 进行观察, 采集图像分析。

#### 1.4 皮肤厚度、腺体分布和大小测量

为了比较海南原指树蛙皮肤厚度、腺体分布和大小的部位差异, 以及这些指标在特定部位的性别差异, 我们使用 Nikon E200 显微镜和软件 ImageJ 进行测量和拍照。以 H.E 染色切片进行测量, 6 只雄蛙各部位的切片共 30 张, 3 只雌蛙各部位的切片共 15 张。每张切片随机选取 6 个点, 测量皮肤总厚度、表皮厚度、真皮厚度 (包括疏松层厚度和致密层厚度); 测量每张切片的皮肤组织实际长度及所有黏液腺和颗粒腺的短径和长径, 记录和统计腺体种类及数量, 并将其换算成 1 cm 长的皮肤组织的相对腺体数量 (曹燕等 2011, 雷飞宙等 2012)。腺体近似椭圆形, 根据椭圆面积 ( $S$ ) 公式 ( $S = \pi \times \text{长径} \times \text{短径} / 4$ ) 计算出每个腺体切面的相对面积 (米志平等 2016)。

#### 1.5 统计分析

采用 SPSS 22.0 统计分析软件, 利用线性混合效应模型方法 (linear mixed models, LMM) 进行统计分析。比较同性别在不同皮肤部位的皮肤厚度、腺体的分布和大小的差异, 以部位作为固定因子, 以个体编号作为随机因子; 然后比较特定皮肤部位的皮肤厚度、腺体大小和分布的性别差异, 以性别作为固定因子, 以个体编号作为随机因子。所有统计差异显著度为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 皮肤基本结构和腺体种类

海南原指树蛙的皮肤由表皮和真皮构成。表皮一般由 1 层基细胞、1 或 2 层扁平上皮细胞和 1 层角质层构成。真皮包含疏松层和致密层, 疏松层内含有单泡状腺体和大量色素细胞, 色素细胞具有斑块状和弥散状两种分布状态, 主要集中在分布于头部和背部 (图 1); 致密层含丰富的呈波浪状的胶原纤维, 平行于表皮。在 H.E 染色条件下可以看到皮肤结构中的疏松层与致密层之间有一条明显的蓝色条带, 为钙化层 (图 1a, c), 且在头部、背部、体侧、颈部和腹部皮肤均观察到。真皮层下方有易脱落的脂肪层 (图 1a, g)。

海南原指树蛙的皮肤腺体主要为普通黏液腺和普通颗粒腺, 未发现这些腺体存在任何特化现象。根据分泌细胞形态及其分泌物组织化学特征, 黏液腺可细分为 I 型黏液腺和 II 型黏液腺。海南原指树蛙雌雄个体的皮肤组织化学特征相似, 腺体种类相同。

### 2.2 皮肤厚度、腺体分布和大小

海南原指树蛙的皮肤厚度存在部位差异, 且皮肤厚度在特定部位存在性别差异 (图 2)。具体来看, 雄蛙不同部位的皮肤总厚度 ( $F = 3.693$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.05$ )、表皮厚度 ( $F = 4.912$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.01$ )、疏松层厚度 ( $F = 3.755$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.05$ ) 以及致密层厚度 ( $F = 3.530$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.05$ ) 均存在显著差异 (图 2)。其中, 雄蛙皮肤总厚度腹部显著大于头部、背部、体侧和颈部 ( $P < 0.05$ ), 而体侧的疏松层厚度显著小于头部、背部、颈部和腹部的疏松层厚度 ( $P < 0.05$ )。雌蛙不同部位的疏松层厚度 ( $F = 3.550$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.05$ ) 和致密层厚度 ( $F = 4.797$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.05$ ) 均存在显著差异 (图 2)。其中, 雌蛙体侧和腹部的致密层厚度均显著大于头部和颈部的致密层厚度 ( $P < 0.05$ )。在性别差异上, 雄蛙体侧的疏松层厚度显著小于雌蛙体侧的疏松层厚度 ( $F = 11.852$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.01$ ), 而雄蛙颈部的疏松层厚度显著大于

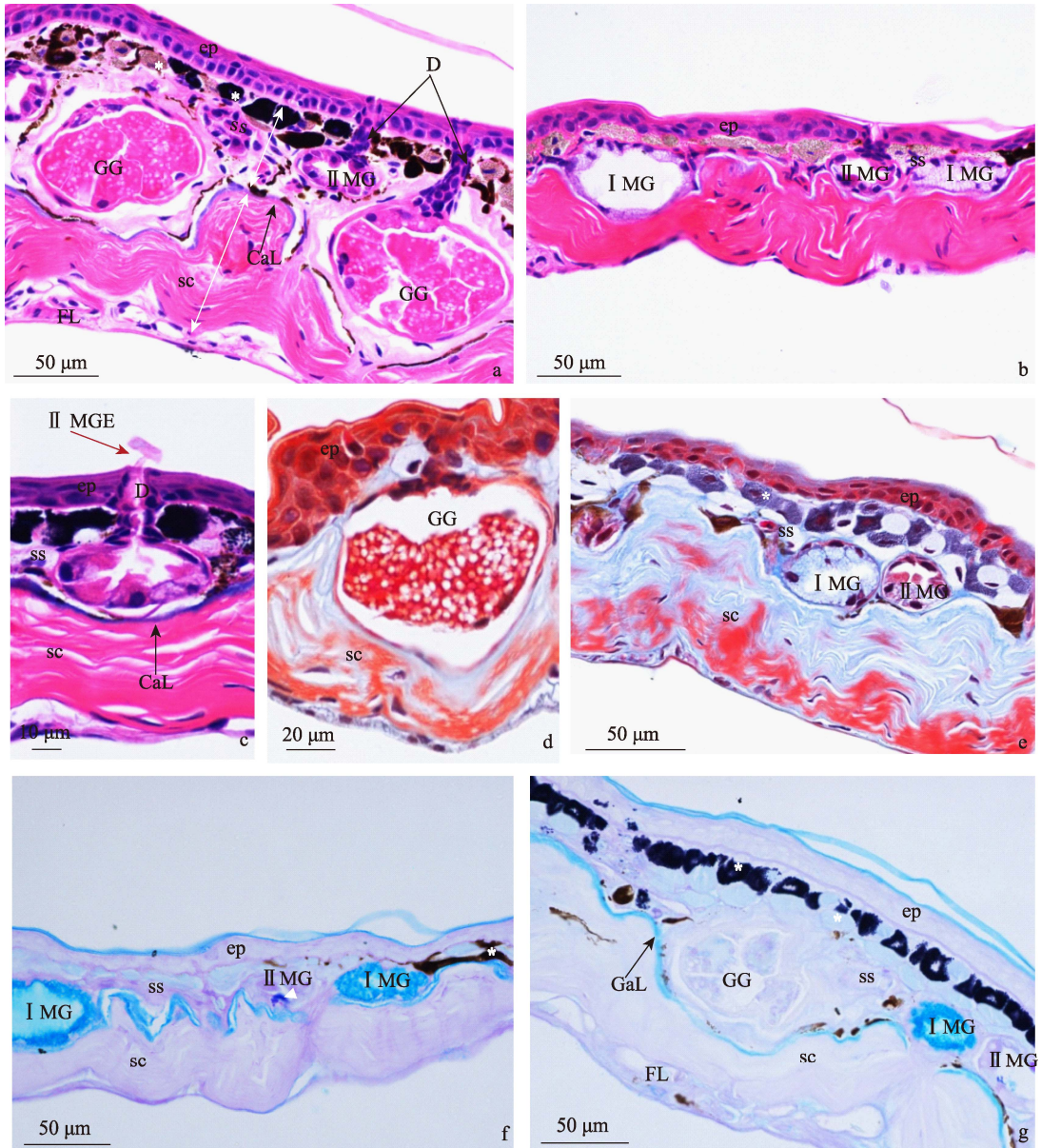


图 1 海南原指树蛙皮肤腺体的显微结构

Fig. 1 Microstructure of cutaneous glands of *Kurixalus hainanus*

a. 雌蛙头部皮肤 (H.E); b. 雌蛙颊部皮肤 (H.E); c. 雄蛙背部皮肤 (H.E); d. 雄蛙颊部皮肤 (Masson); e. 雄蛙头部皮肤 (Masson); f. 雌蛙颊部皮肤 (AB-PAS); g. 雌蛙背部皮肤 (AB-PAS)。I MG. I 型黏液腺; II MG. II 型黏液腺; II MGE. 黏液腺分泌物; CaL. 钙化层; D. 导管; ep. 表皮; FL. 脂肪层; GG. 颗粒腺; sc. 结缔组织致密层; ss. 结缔组织疏松层; 白色\*. 色素细胞; 白色箭头. 结缔组织的致密层或疏松层的范围; 黑色△. II 型黏液腺的细胞顶端呈 PAS 染色阳性

a. Cephalic region of females (H.E); b. Mental region of females (H.E); c. Middorsal region of males (H.E); d. Mental region of males (Masson); e. Cephalic region of males (Masson); f. Mental region of females (AB-PAS); g. Middorsal region of females (AB-PAS). I MG. I type mucous gland; II MG. II type mucous gland; II MGE. II type mucous gland excreta; CaL. Calcified layer; D. Duct; ep. Epidermis; FL. Fat layer; GG. Granular glands; sc. Stratum compactum; ss. Stratum spongiosum; White \*. Chromocyte; White arrow. The range of stratum compactum or stratum spongiosum; Black △. The tip of II type mucous gland cell showed positive in PAS staining

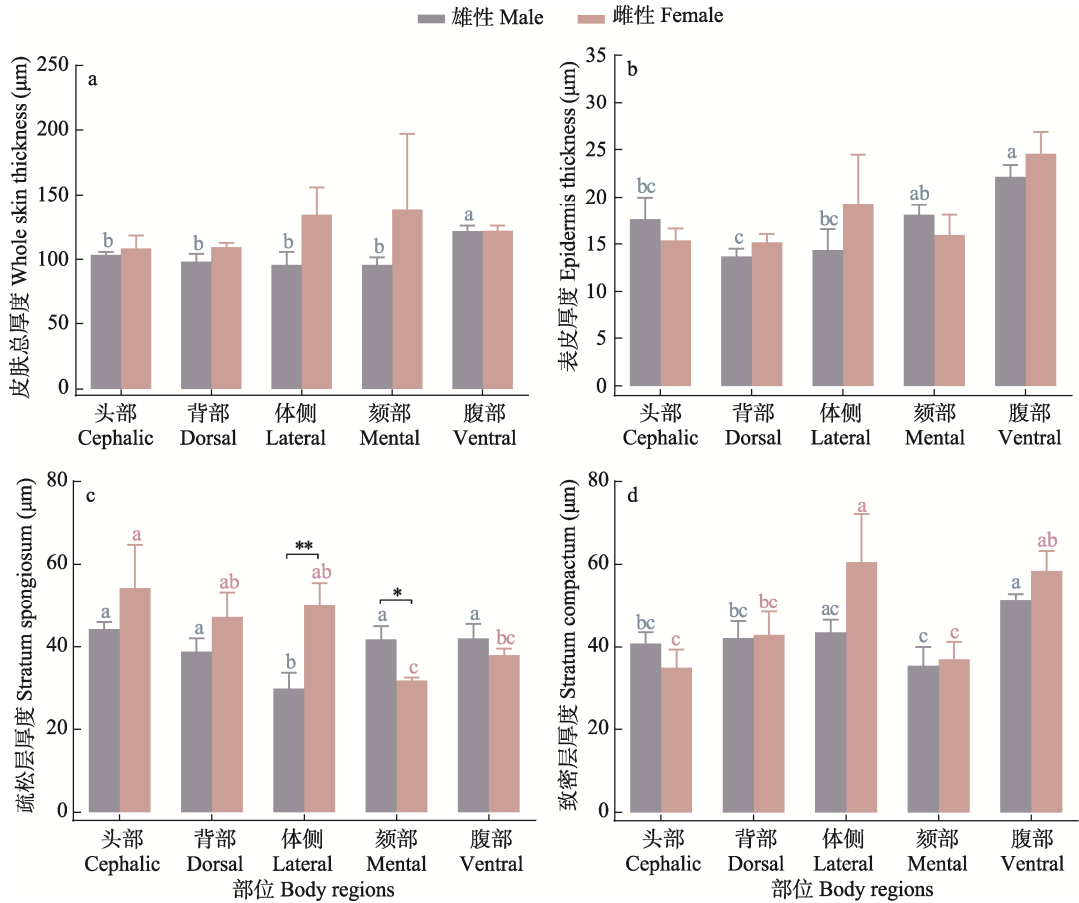


图 2 海南原指树蛙的皮肤厚度比较

Fig. 2 Comparison of skin thickness of *Kurixalus hainanus*

a. 皮肤总厚度；b. 表皮厚度；c. 疏松层厚度；d. 致密层厚度。同性别个体不同部位的皮肤厚度比较，标记不同小写字母数据之间表示差异显著 ( $P < 0.05$ )；同部位不同性别的皮肤厚度比较，\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )，\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

a. Whole skin thickness; b. Epidermal thickness; c. Stratum spongiosum; d. Stratum compactum. Comparison of skin thickness among different body regions in the specific sex, lowercase letters of different marks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ); comparison of skin thickness between males and females in the specific body region, \* indicates significant differences ( $P < 0.05$ ), \*\* indicates extremely significant differences ( $P < 0.01$ ).

雌蛙颈部的疏松层厚度 ( $F = 5.725$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.05$ )。

海南原指树蛙皮肤腺体的数量和大小存在部位差异，这些指标在特定部位存在性别差异 (图 3)。具体来看，雄蛙不同部位的 I 型黏液腺 ( $F = 4.797$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.05$ ) 和 II 型黏液腺 ( $F = 4.238$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.05$ ) 数量均存在显著差异；雌蛙不同部位的 I 型黏液腺 ( $F = 9.491$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.05$ ) 和颗粒腺 ( $F = 12.568$ ,

$df = 4$ ,  $P < 0.001$ ) 数量亦均存在显著差异 (图 3)，其中雌蛙头部的颗粒腺数量最多 ( $P < 0.05$ )。在性别差异上，雌蛙颈部的 II 型黏液腺数量显著多于雄蛙颈部的 II 型黏液腺数量 ( $F = 7.014$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.05$ )。雌蛙头部 ( $F = 87.803$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ )、体侧 ( $F = 5.769$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.05$ ) 和颈部 ( $F = 9.742$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.05$ ) 的颗粒腺数量显著多于雄蛙相应部位的颗粒腺数量 (图 3)。



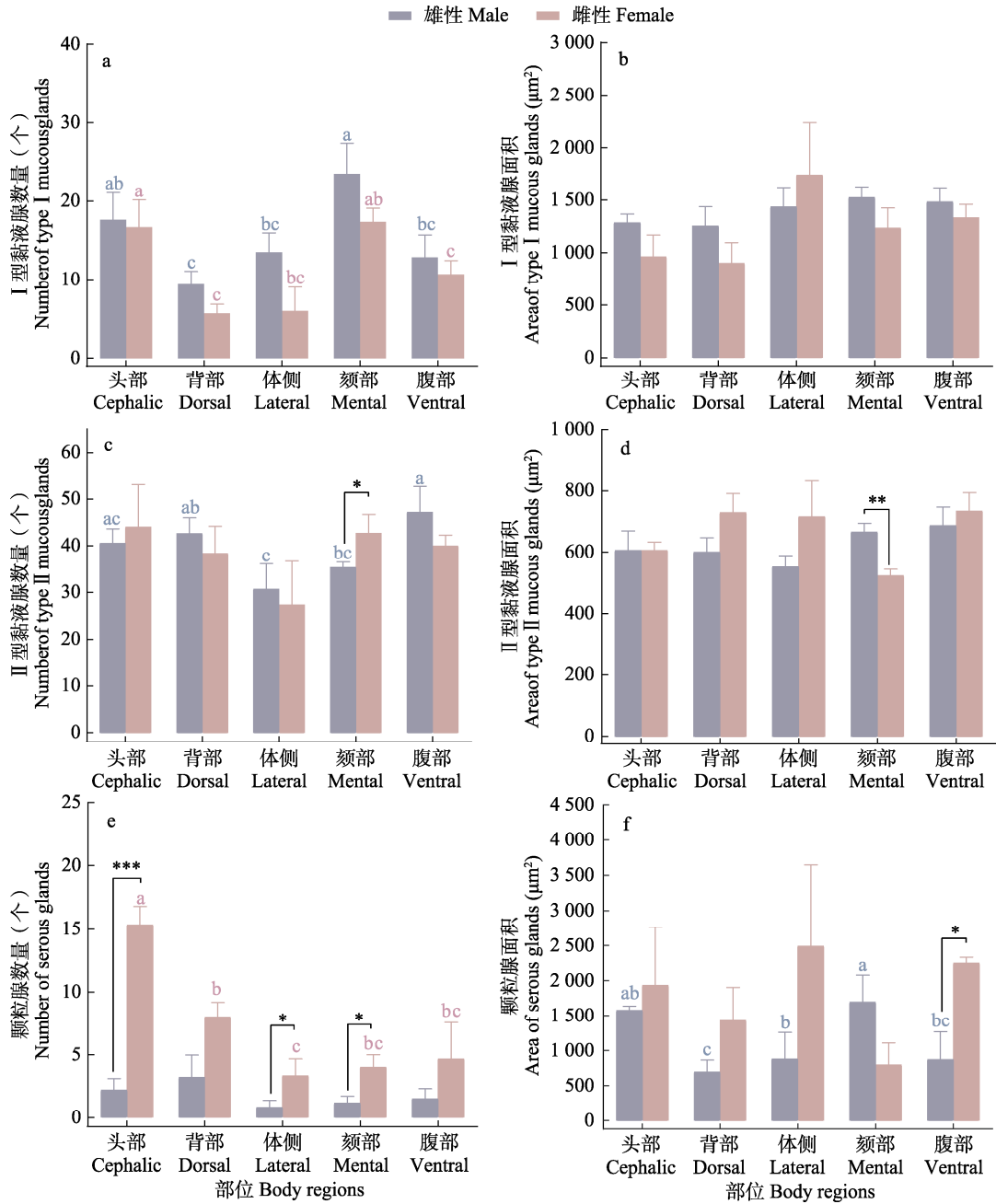


图3 海南原指树蛙皮肤腺体比较

Fig. 3 Comparison of cutaneous glands in *Kurixalus hainanus*

a. I型黏液腺数量; b. I型黏液腺面积; c. II型黏液腺数量; d. II型黏液腺面积; e. 颗粒腺数量; f. 颗粒腺面积。同性别个体不同部位的皮肤腺体比较, 不同标记的小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); 同部位不同性别的皮肤腺体比较, \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 或 \*\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。

a. Number of type I mucous glands; b. Area of type I mucous glands; c. Number of type II mucous glands; d. Area of type II mucous glands; e. Number of serous glands; f. Area of serous glands. Comparison of cutaneous glands among different body regions in the specific sex, lowercase letters of different marks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ); comparison of cutaneous glands between males and females in the specific body region, \* indicates significant differences, \*\* or \*\*\* indicates extremely significant differences ( $P < 0.01$  or  $P < 0.001$ ).

雄蛙不同部位的 I 型黏液腺 ( $F = 2.222$ ,  $df = 4$ ,  $P > 0.05$ ) 和 II 型黏液腺 ( $F = 1.644$ ,  $df = 4$ ,  $P > 0.05$ ) 面积的差异不显著, 而雄蛙不同部位的颗粒腺 ( $F = 3.952$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.05$ ) 面积存在显著差异 (图 3)。雌蛙不同部位的 I 型黏液腺 ( $F = 7.950$ ,  $df = 4$ ,  $P > 0.05$ )、II 型黏液腺 ( $F = 2.962$ ,  $df = 4$ ,  $P > 0.05$ ) 和颗粒腺 ( $F = 1.833$ ,  $df = 4$ ,  $P > 0.05$ ) 面积的差异均不显著 (图 3)。在性别差异上, 雄蛙颈部的 II 型黏液腺面积显著大于雌蛙颈部的 II 型黏液腺面积 ( $F = 13.667$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.01$ ), 雄蛙腹部的颗粒腺面积显著小于雌蛙腹部的颗粒腺面积 ( $F = 11.773$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.05$ , 图 3)。

### 2.3 皮肤腺体的组织化学和超微结构

**2.3.1 组织化学观察** I 型黏液腺、II 型黏液腺和颗粒腺具有相似的基本结构: 表皮内导管、颈部以及被肌上皮细胞收缩鞘包围的分泌部分, 但 3 种腺体的分泌细胞形态及其分泌物成分因腺体类型而异。I 型黏液腺的分泌细胞主要为矮柱状或扁平状, 细胞核位于细胞基底, 腔内含大量絮状分泌物或中空 (图 1b); 其腺泡细胞及分泌物经 AB-PAS 染色呈 AB 阳性 (图 1f, g), 表明分泌细胞及其分泌物主要是糖原、胶原蛋白及酸性黏多糖物质。II 型黏液腺的分泌细胞为短柱状, 位于细胞中心; 其分泌细胞及分泌物在 AB-PAS 染色中呈 PAS 弱阳性, 主要为酸性黏多糖或者透明质酸, 一些黏液细胞顶部经 AB-PAS 染色呈 PAS 强阳性 (图 1f), 显深紫蓝色 (图 1f, g)。部分 II 型黏液腺在 Masson 染色中可以观察到蓝色和红色两种分泌细胞类型 (图 1e)。黏液腺的腺体颈部的黏液细胞会发生扁平化, 堆叠成覆瓦状, 并通过导管间隙将分泌物释放到表皮外 (图 1c)。颗粒腺的腺泡细胞不见明显的细胞界限, 为合胞体, 其包围分泌部分的肌上皮细胞层比黏液腺的肌上皮细胞层厚 (图 1a, d)。颗粒腺不含有空腔, 其内部储存了大量嗜酸性颗粒分泌物。颗粒腺的分泌物在 AB-PAS 染色下呈弱阳性, 显淡紫色和浅蓝色 (图 1g), 主要为酸性黏蛋

白及少量中性黏蛋白或糖蛋白。腺泡细胞在腺体颈部聚集, 导管间具有许多高核质比的细胞, 颈腔与腺管相连, 延长变细直到表皮 (图 1a)。

**2.3.2 超微结构观察** 黏液腺为单泡状腺体, 中空腔或充满絮状、颗粒状到无定形的分泌物, 并表现出一些特殊的超微结构 (图 4)。黏液细胞分泌产物主要有低电子密度的絮状分泌物、较大的中等电子密度的椭圆形颗粒以及在细胞核附近形成的许多较小的高电子密度的圆形颗粒 (图 4a)。细胞核周围密集分布了线粒体、粗面内质网、光滑内质网和高尔基体等细胞器 (图 4b)。

颗粒腺分泌部的外面有椭圆形和长梭形的肌上皮细胞包绕, 在肌上皮细胞之间存在桥粒, 在肌上皮细胞外面有神经纤维分布 (图 5a)。颗粒腺产物储存在合胞体中, 其特有的分泌小泡与含有它们的细胞基质形成鲜明对比 (图 5b)。不同密度的颗粒通过相互接触相融来交换其致密物质 (图 5b, c)。在分泌部分中观察到了粗面内质网、光滑内质网、线粒体和高尔基体, 其中高尔基体活跃的堆叠, 末端膨大的囊泡含致密物质 (图 5c, d)。

## 3 讨论

显微结构观察发现, 海南原指树蛙的皮肤包括表皮和真皮 (疏松层和致密层), 其结构与其他蛙类皮肤的一般结构相似 (Fox 1986, Toledo et al. 1995)。疏松层上层广泛分布大量色素细胞, 形成色素层。色素层主要有 3 种功能: 减少强紫外线对皮肤深层组织的损害 (Blaustein et al. 2003); 吸收外界热量, 满足代谢需要 (梁刚等 2004); 通过调节体色达到伪装或警戒的作用 (Hunsaker et al. 1959)。疏松层和致密层之间具有在 H.E 染色呈蓝色的钙化层, 且无细胞结构。钙化层被认为是由祖先真皮层中的骨骼残骸形成 (Mangione et al. 2011), 具有钙质平衡、防止水分散失和维持渗透压平衡的作用 (Toledo et al. 1993, 1995)。大量色素细胞和钙化层的存在可能是海



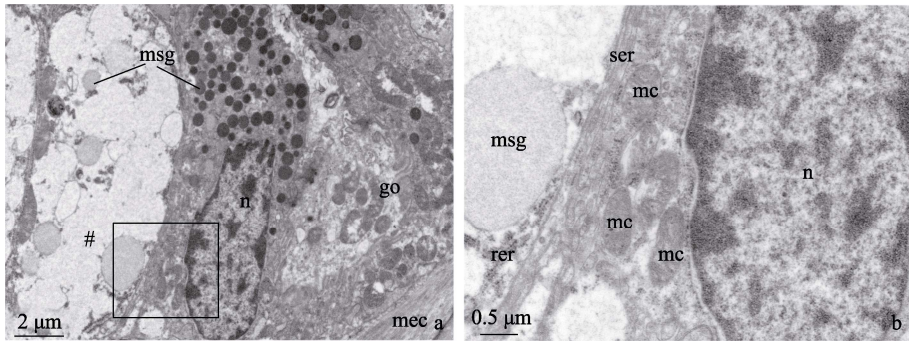


图 4 海南原指树蛙黏液腺的超微结构

Fig. 4 Ultrastructure of mucous glands of *Kurixalus hainanus*

a. 黏液细胞核附近的细节，黏液腺包含大小和密度不同的分泌颗粒；b. 图 a 中黑色方框的放大细节图。go. 高尔基体；mc. 线粒体；mec. 肌上皮细胞；msg. 黏液分泌颗粒；n. 细胞核；rer. 粗面内质网；ser. 光滑内质网；#. 絮状分泌物  
 a. The details around the nucleus of mucous glands. Note there were different sizes and densities of mucous secretory granules; b. The details of black rectangular in Fig. a. go. Golgi apparatus; mc. Chondriosome; mec. Myoepithelial cells; msg. Mucous secretory granules; n. Nucleus; rer. Rough endoplasmatic reticulum; ser. Smooth endoplasmatic reticulum; #. Flocculant granules

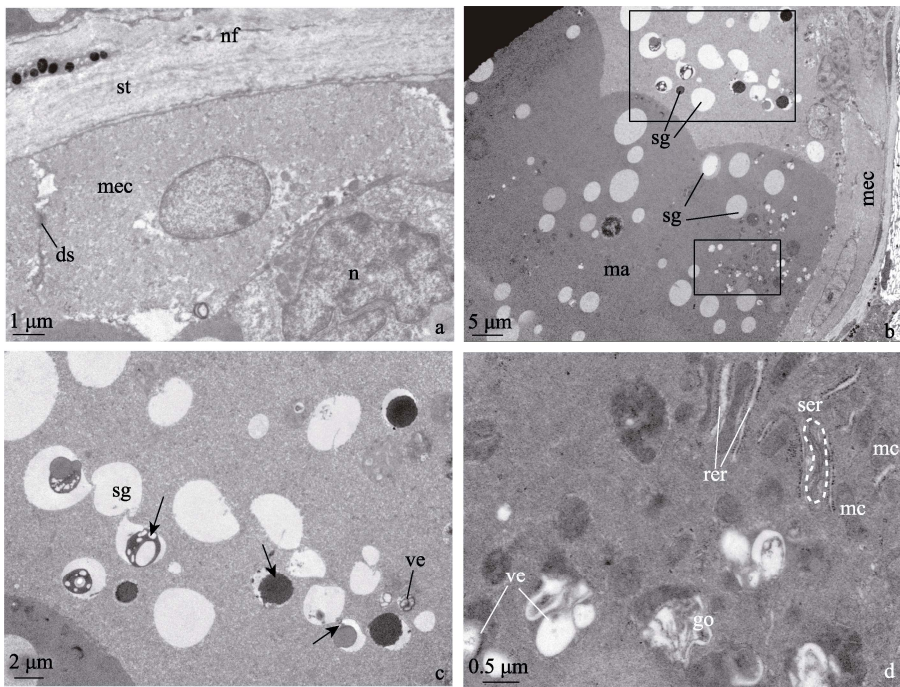


图 5 海南原指树蛙颗粒腺的超微结构

Fig. 5 Ultrastructure of serous glands of *Kurixalus hainanus*

a. 肌上皮细胞与分泌部分接触的细节图；b. 颗粒腺内部结构；c, d. 图 b 中黑色方框放大的细节图。图 c 中黑色箭头指示致密物质。ds. 桥粒；go. 高尔基体；ma. 腺体不透明基质；mc. 线粒体；mec. 肌上皮细胞；n. 细胞核；nf. 神经纤维；rer. 粗面内质网；ser. 光滑内质网；sg. 浆液颗粒；st. 基质；ve. 囊泡  
 a. The details of myoepithelial cells (mec) surrounding the secretory portion; b. General view of the serous gland; c, d. The details of black rectangular in Fig. b. The black arrows in Fig. c indicate the dense material. ds. Desmosomes; go. Golgi apparatus; ma. Matrix; mc. Chondriosome; mec. Myoepithelial cells; n. Nucleus; nf. Nerve fibre; rer. Rough endoplasmatic reticulum; ser. Smooth endoplasmatic reticulum; sg. Serous granule; st. Stroma; ve. Vesicle

南原指树蛙对热带雨林生境中较大昼夜温差和较强紫外线的适应。

海南原指树蛙的皮肤厚度、腺体的分布和大小存在部位差异,且这些指标在特定部位存在性别差异。雄蛙腹部的皮肤总厚度最厚,且致密层也较厚,可能与其树栖生活和运动方式的抗磨损保护有关(曹燕等 2011)。雄蛙腹部的皮肤总厚度显著大于其他部位,这与对西藏蟾蜍(*Bufo tibetanus*) (高凤娟等 2016)、峨眉林蛙(*Ranidae omeimontis*) (米志平等 2016)和帕米尔漠蟾蜍(*Bufo taxkorensis*) (燕鹏等 2022)的观察结果一致。雌蛙体侧和腹部皮肤的致密层厚度均显著大于头部和颈部的致密层厚度,可能与其繁殖方式有关。雌蛙皮肤较厚的致密层可能用于抵抗背负雄蛙去往产卵场的运动中雄蛙前肢与其体侧以及雌蛙腹部与地面的摩擦(高凤娟等 2016)。腺体主要分布在疏松层,真皮层的厚度可能与腺体的分布和大小有关(贾丽丽等 2013)。雌蛙头部的颗粒腺数量分布最多,可能是一种对捕食者正面攻击的适应策略(Toledo et al. 1995)。

雄蛙体侧皮肤的疏松层厚度小于雌蛙体侧的疏松层厚度,而雄蛙颈部的疏松层厚度大于雌蛙颈部的疏松层厚度,可能是腺体的数量或面积差异所致。雄蛙颈部的 II 型黏液腺和颗粒腺数量少于雌蛙颈部的 II 型黏液腺和颗粒腺数量,可能与雄蛙鸣叫求偶行为有关。雌蛙头部和体侧的颗粒腺数量均显著多于雄蛙相应部位的颗粒腺数量,而颗粒腺的数量和分布与防御功能有关(Toledo et al. 1995, Jared et al. 2009),这暗示了雌蛙可能面临更强的选择压力。有研究发现树栖攀蟾(*Aneides lugubris*)的颗粒腺大小存在性别二态性,雄性的颗粒腺显著大于雌性的颗粒腺(Staub et al. 1997)。此外,最近的研究发现,雌雄巨雨滨蛙(*Litoria infrafrenata*)的皮肤厚度的差异除了功能差异,也与性别二态性有关(Vanburen et al. 2019)。真皮层厚度与腺体的大小密切相关,雄蛙腹部颗粒腺面积显著小于雌蛙腹部颗粒腺面积,一

定程度上可能是由雌雄体型大小差异造成的,该结论需进一步的分析和验证。

组织化学观察发现,海南原指树蛙的黏液腺具有 I 型黏液腺和 II 型黏液腺两种类型。这两种普通黏液腺的划分符合此前在黑龙江林蛙(*Rana amurensis*)皮肤(吴文英等 2011)、阔褶水蛙(*Sylvirana latouchii*)背部皮肤及背侧褶(曾一唯等 2018)、滇蛙背部皮肤及肩腺(Gong et al. 2020)以及牛蛙(*Lithobates catesbeianus*)皮肤(Mancinelli et al. 2021)中的相应描述。此外,海南原指树蛙的 II 型黏液腺的分泌细胞及分泌物在 AB-PAS 染色中呈 PAS 弱阳性,仅少数细胞顶端或间隙在 AB-PAS 染色下呈 PAS 强阳性,暗示了 II 型黏液腺可能含有不同的分泌物质。类似的结果在叶泡蛙(*Phyllomedusa distincta*)和牛蛙的黏液腺中也有发现(Antoniazzi et al. 2013, Mancinelli et al. 2021)。Delfino 等(2015)通过对南美泡蟾(*Physalaemus pustulosus*)颗粒腺的形态观察,将其分为了 I a 型、I b 型和 II 型三种类型,海南原指树蛙的颗粒腺符合 II 型的形态描述。

在透射电镜下观察到黏液腺含有絮状物质和中、高等电子密度黏液颗粒,这与在滑趾蟾(*Leiopelma pakeka*) (Melzer et al. 2011)、雨滨蛙(*Litoria ewingii*) (Melzer et al. 2013)和 *Dermatonotus muelleri* (Antoniazzi et al. 2022)的黏液腺中观察到的不同电子密度的黏液颗粒结果一致。在颗粒腺肌上皮细胞的外部基质中观察到了神经纤维的存在,可能与促进快速释放腺体分泌物有关(Sjöberg et al. 1976, Brunetti et al. 2016)。海南原指树蛙的颗粒腺分泌颗粒与其他蛙类高等电子密度的分泌颗粒不同,它是半透明或者中等电子密度的,与南美泡蟾和鲨皮蟾蜍(*Bufo granulosus*)的颗粒腺超微结构相似(Delfino et al. 1999, 2015)。此外,颗粒腺的分泌颗粒还有接触相融的现象,其中的致密物质在两个颗粒接触后有转移的现象,可能是一种物质成熟的阶段性反应。这种现象在箭毒蛙(*Phyllobates bicolor*) (Delfino et al.

2010)、细趾蟾 (*Lithodytes lineatus*) (Prates et al. 2012) 和 *D. muelleri* (Antoniazzi et al. 2022) 的颗粒腺超微结构中均有报道。在透射电镜下观察到黏液腺和颗粒腺都有光滑内质网、粗面内质网、高尔基体和线粒体等细胞器, 其中活跃的高尔基体产生的大量囊泡可能与物质的分泌有关, 光滑内质网对类固醇的生物合成有重要作用 (Antoniazzi et al. 2013, Brunetti et al. 2016), 可能与释放小分子物质有关。

综上, 本研究为海南原指树蛙皮肤及其腺体与功能和环境适应关系提供有价值的基础资料, 为后续开展挥发性分泌物的化学成分研究提供了形态学基础。同一类型腺体分泌不同的生物活性物质, 暗示了这些腺体可能起调节和防御的作用。此外, 结合行为学、组织学和化学物质成分分析的研究, 有助于我们更加全面系统地理解蛙类挥发性物质的生物学功能。

**致谢** 本研究得到中国科学院成都生物研究所江建平课题组在显微镜使用方面的帮助, 以及张淑君女士对采集和固定标本工作的帮助, 在此致以衷心的感谢!

## 参 考 文 献

- Antoniazzi M M, Mailho-Fontana P L, Nomura F, et al. 2022. Reproductive behaviour, cutaneous morphology, and skin secretion analysis in the anuran *Dermatonotus muelleri*. *iScience*, 25(4): 104073.
- Antoniazzi M M, Neves P R, Mailho-Fontana P L, et al. 2013. Morphology of the parotoid macroglands in *Phyllomedusa* leaf frogs. *Journal of Zoology*, 291(1): 42–50.
- Blaustein A R, Belden L K. 2003. Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation. *Evolution & Development*, 5(1): 89–97.
- Brizzi R, Delfino G, Pellegrini R. 2022. 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.
- Brunetti A E, Hermida G N, Faivovich J. 2012. New insights into sexually dimorphic skin glands of anurans: The structure and ultrastructure of the mental and lateral glands in *Hypsiboas punctatus* (Amphibia: Anura: Hylidae). *Journal of Morphology*, 273(11): 1257–1271.
- Brunetti A E, Hermida G N, Iurman M G, et al. 2016. Odorous secretions in anurans: morphological and functional assessment of serous glands as a source of volatile compounds in the skin of the treefrog *Hypsiboas pulchellus* (Amphibia: Anura: Hylidae). *Journal of Anatomy*, 228(3): 430–442.
- Brunetti A E, Hermida G N, Luna M C, et al. 2015a. Diversity and evolution of sexually dimorphic mental and lateral glands in Cophomantini treefrogs (Anura: Hylidae: Hylinae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 114(1): 12–34.
- Brunetti A E, Merib J, Carasek E, et al. 2015b. Frog volatile compounds: Application of in vivo spme for the characterization of the odorous secretions from two species of *Hypsiboas* treefrogs. *Journal of Chemical Ecology*, 41(4): 360–372.
- Byrne P G, Keogh J S. 2007. Terrestrial toadlets use chemosignals to recognize conspecifics, locate mates and strategically adjust calling behaviour. *Animal Behaviour*, 74(5): 1155–1162.
- Daly J W. 1995. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(1): 9–13.
- Delfino G, Brizzi R, Alvarez B B, et al. 1999. Secretory polymorphism and serous cutaneous gland heterogeneity in *Bufo granulatus* (Amphibia, Anura). *Toxicon*, 37(9): 1281–1296.
- Delfino G, Giachi F, Malentacchi C, et al. 2015. Ultrastructural evidence of serous gland polymorphism in the skin of the tungara frog *Engystomops pustulosus* (Anura Leptodactylidae). *The Anatomical Record*, 298(9): 1659–1667.
- Delfino G, Giachi F, Nosi D, et al. 2010. Serous cutaneous glands in *Phyllobates bicolor* (Anura: Dendrobatidae): an ontogenetic, ultrastructural study on secretory product biosynthesis and maturation. *Copeia*, 2010(1): 27–37.
- Deng K, Zhou Y, He Q L, et al. 2021. Conspecific odor cues induce different vocal responses in serrate-legged small treefrogs, but only in the absence of acoustic signals. *Frontiers in Zoology*, 18(1): 28.
- Deng K, Zhou Y, Zhang H D, et al. 2022. Conspecific disturbance odors act as alarm cues to affect female mate choice in a treefrog. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 76(4): 58.
- Fox H. 1986. *Dermal Glands. Biology of the Integument*. Berlin:

- Springer, 116–135.
- Glaw F, Vences M. 2011. Description of a new frog species of *Gephyromantis* (subgenus *Laurentomantis*) with tibial glands from Madagascar. *Spixiana*, 34(1): 121–127.
- Gong Y, Zeng Y, Zheng P, et al. 2020. Structural and bio-functional assessment of the postaxillary gland in *Nidirana pleuraden* (Amphibia: Anura: Ranidae). *Zoological Letters*, 6(1): 7.
- He Q L, Deng K, Wang X P, et al. 2023. Heterospecific eavesdropping on disturbance cues of a treefrog. *Animal Cognition*, 26(2): 515–522.
- Hunsaker D, Johnson C. 1959. Internal pigmentation and ultraviolet transmission of the integument in amphibians and reptiles. *Copeia*, 1959(4): 311–315.
- Jared C, Antoniazzi M M, Jordao A E, et al. 2009. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defence. *Toxicon*, 54(3): 197–207.
- King J D, Rollins-Smith L A, Nielsen P F, et al. 2005. Characterization of a peptide from skin secretions of male specimens of the frog, *Leptodactylus fallax* that stimulates aggression in male frogs. *Peptides*, 26(4): 597–601.
- Li J T, Che J, Bain R H, et al. 2008. Molecular phylogeny of Rhacophoridae (Anura): A framework of taxonomic reassignment of species within the genera *Aquixalus*, *Chiromantis*, *Rhacophorus*, and *Philautus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(1): 302–312.
- Luna M C, Vasquez-Almazan C R, Faivovich J, et al. 2019. Gland composition in sexually dimorphic skin structures of two species of Hylid frogs: *Plectrohyla guatemalensis* and *Ptychohyla hypomykter*. *Amphibia-Reptilia*, 40(4): 523–529.
- Mailho-Fontana P L, Antoniazzi M M, Rodrigues I, et al. 2017. Parotoid, radial, and tibial macroglands of the frog *Odontophrynus cultripes*: differences and similarities with toads. *Toxicon*, 129(2017): 123–133.
- Mailho-Fontana P L, Antoniazzi M M, Sciani J M, et al. 2018. Morphological and biochemical characterization of the cutaneous poison glands in toads (*Rhinella marina* group) from different environments. *Frontiers in Zoology*, 15(1): 46.
- Mancinelli S A M, Cóceres A R, Pozzi A G, et al. 2021. Sexually dimorphic skin glands in the invasive species *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae). *Amphibia-Reptilia*, 42(2): 459–469.
- Mangione S, Garcia G, Cardozo O M. 2011. The Eberth-katschenko layer in three species of ceratophryines anurans (Anura: Ceratophryidae). *Acta Zoologica*, 92(1): 21–26.
- Melzer S, Clerens S, Bishop P J. 2011. Differential polymorphism in cutaneous glands of archaic *Leiopelma* species. *Journal of Morphology*, 272(9): 1116–1130.
- Melzer S, Clerens S, Bishop P J. 2013. Skin gland morphology and secretory peptides in *Naturalized litoria* species in New Zealand. *Journal of Herpetology*, 47(4): 565–574.
- Pearl C A, Cervantes M, Chan M, et al. 2000. Evidence for a mate-attracting chemosignal in the dwarf African clawed frog *Hymenochirus*. *Hormones and Behavior*, 38(1): 67–74.
- Poth D, Wollenberg K C, Vences M, et al. 2012. Volatile amphibian pheromones: macrolides from mantellid frogs from Madagascar. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(9): 2187–2190.
- Prates I, Antoniazzi M M, Sciani J M, et al. 2012. Skin glands, poison and mimicry in dendrobatid and leptodactylid amphibians. *Journal of Morphology*, 273(3): 279–290.
- Rota E, Tanteri G, Montori G, et al. 2017. Skin of the red eye tree frog *Agalychnis callidryas* (Hylidae, Phyllomedusinae) contains lipid glands of the type described in the genus *Phyllomedusa*. *The Anatomical Record*, 300(3): 503–506.
- Seki T, Kikuyama S, Yanaiharu N. 1995. Morphology of the skin glands of the crab-eating frog (*Rana cancrivora*). *Zoological Science*, 12(5): 623–626.
- Sever D M. 2017. Ultrastructure of the mental gland of the red-backed salamander, *Plethodon cinereus* (Amphibia: Plethodontidae). *Acta Zoologica*, 98(2): 154–162.
- Sjöberg E, Flock Å. 1976. Innervation of skin glands in the frog. *Cell and Tissue Research*, 172(1): 81–91.
- Staub N, Paladin J. 1997. The presence of modified granular glands in male and female *Aneides lugubris* (Amphibia: Plethodontidae). *Herpetologica*, 53(3): 339–344.
- Toledo R C, Jared C. 1993. The calcified dermal layer in anurans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 104(3): 443–448.

- Toledo R C, Jared C. 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 111(1): 1–29.
- Vanburen C S, Norman D B, Frobisch N B. 2019. Examining the relationship between sexual dimorphism in skin anatomy and body size in the white-lipped treefrog, *Litoria infrafrenata* (Anura: Hylidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 186(2): 491–500.
- Vitt L J, Caldwell J P. 2014. Defense and Escape. // *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 4th ed. San Diego: Academic Press, 319–351.
- Warburg M R, Rosenberg M, Roberts J R, et al. 2000. Cutaneous glands in the Australian Hylid *Litoria caerulea* (Amphibia, Hylidae). *Anatomy and Embryology*, 201(5): 341–348.
- Yu G, Rao D, Matsui M, et al. 2017. Coalescent-based delimitation outperforms distance-based methods for delineating less divergent species: the case of *Kurixalus odontotarsus* species group. *Scientific Reports*, 7(1): 16124.
- 曹燕, 谢锋, 江建平. 2011. 齿突蟾属四个物种皮肤的组织学观察. *四川动物*, 30(2): 214–219.
- 高凤娟, 李丕鹏, 王译唱, 等. 2016. 西藏蟾蜍皮肤的组织学观察. *四川动物*, 35(3): 444–451.
- 贾丽丽, 川田, 李淑兰. 2013. 繁殖期东北林蛙两性皮肤组织结构的差异性比较. *中国农学通报*, 29(2): 23–26.
- 雷飞宙, 江建平, 李成, 等. 2012. 角蟾亚科 3 物种皮肤的组织学观察. *动物学杂志*, 43(3): 20–27.
- 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.
- 米志平, 廖文波. 2016. 林蛙属 3 物种皮肤的组织结构比较. *动物学杂志*, 51(5): 844–852.
- 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.
- 燕鹏, 江建平, 石胜超, 等. 2022. 帕米尔漠蟾蜍皮肤、肾和肝的组织结构. *动物学杂志*, 57(2): 256–268.
- 曾一唯, 谢锋. 2018. 蛙科物种背侧褶组织形态特征. *动物学杂志*, 53(5): 723–732.