

## 大菱鲂体表粘液细胞组化研究及高温胁迫对其类型和分布的影响

黄智慧<sup>1,2</sup>, 马爱军<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071;  
2. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:**以体重(150±10)g,体长(18±2)cm的大菱鲂为研究对象,利用阿利新蓝-过碘酸希夫氏试剂(AB-PAS,AB染液pH 2.5,pH 1.0)染色方法,研究高温23和(27±0.5)℃胁迫对大菱鲂体表粘液细胞分布与类型的影响。结果显示,在温度不断升高的外界刺激下,体表皮肤不同部位粘液细胞的分布与数目发生着显著的变化,与对照组[常温(16±0.5)℃]相比,II型粘液细胞增幅最大,IV型次之,I型变化不显著,而III型增幅呈现出无规律性。研究认为,体表粘液中含丰富的溶菌酶、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)等水解酶类,其酸性环境可以溶解寄生物从而保护机体,但是,随着水温不断增加,病原微生物活力提高,对鱼体构成威胁,而II型和IV型粘液细胞均为使AB呈阳性的酸性粘多糖,随温度的升高其分泌的酸性粘液成分而显著增加,可有效地防止病原菌侵入,为体表粘液的免疫防御功能提供证据。

**关键词:**大菱鲂;粘液细胞;体表;温度

**中图分类号:**S 942.5

**文献标识码:**A

鱼类粘液细胞是普遍存在于鱼体上皮中的一种腺体细胞,主要分布在鱼类的皮肤、鳃及消化道上皮中,能分泌大量粘液<sup>[1]</sup>。粘液中含有多种有机物质,如粘多糖、糖蛋白、免疫球蛋白及各种水解性酶类,对鱼的多种生理功能有着至关重要的影响<sup>[2]</sup>。而鱼类皮肤上皮组织中分布着大量的粘液细胞,分泌的粘液广泛覆盖在鱼体表面构成了鱼体与外界直接接触的第一道门户。作为影响鱼类正常生理机能的重要因素之一,温度对鱼类体表粘液的影响更是直接的,重要的。近年来国内外有关于温度胁迫研究大都局限在鱼类摄食,标准代谢和内源氮排泄,血液免疫,及生长和发育等方向<sup>[3-5]</sup>,而关于体表粘液细胞生理变化的研究尚无报道。

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)为原产于欧洲沿海的冷水性鲆科鱼类,其较高的经济价值使之成为欧洲重要的海水养殖良种之一<sup>[6]</sup>。目前

大菱鲂已在我国北方沿海大规模养殖,发展前景十分广阔,但由于其养殖温度阈值范围较窄,有较大的地域局限性。实验以大菱鲂为材料,采用组织学和组织化学的方法,对其体表粘液细胞开展研究,该方法在国外开展较早<sup>[7-8]</sup>,国内自二十世纪九十年代开始开展,并取得了一定成果<sup>[9-11]</sup>。本研究旨在了解大菱鲂体表粘液细胞的结构特点及其在温度影响下发生的生理变化,为今后利用粘液细胞在鱼类耐温选育和病害防治中发挥作用提供科学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

试验用大菱鲂饲养于烟台市天源水产养殖厂,均为人工繁育的健康幼鱼。随机挑选平均体重为(160±10.2)g,长度为(15±2.7)cm在实验用玻璃水缸(1m直径,1m深)内暂养一周,驯

收稿日期:2009-09-12 修回日期:2009-12-21

资助项目:国家科技支撑计划(2006BAD01A12012);农业公益性行业科研专项经费项目(nyhyzx07-046);现代农业产业技术体系建设专项资金资助(nycytx-50)

通讯作者:马爱军, Tel:0532-85835103, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

养与实验期间每日早晚各投喂一次自制人工饵料,换水一次。升温方法参考 Diegane 等<sup>[12]</sup>稍作改动:设计3个试验温度,即16(常温)、23和27℃,从正常水温(16±0.5)℃按每12小时增加1℃的速度升高至实验水温,每个温度设3个平行组,每组投放15尾大菱鲂幼鱼。采用静水法,自动恒温加热器控温,保证各温度组同时进行。实验鱼在试验温度下喂养48h后取体表组织,以备后续实验。

## 1.2 方法

**组织化学染色** 将实验鱼活体解剖,分别取有眼侧与无眼侧各部位的体表组织(鳃部,背部,尾部),Bouin氏固定液固定24h,乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,纵切,切片厚度为7μm,阿利新蓝(AB,pH 2.5,pH 1.0)和过碘酸希夫氏(PAS)反应染色<sup>[13]</sup>。

**粘液细胞计数** 利用Olympus显微镜,在10×100视野下,每个部位随机选择10个视野进行观察,对大菱鲂皮肤在不同温度下不同部位的上皮中的粘液细胞数目、类型进行观察和统计。然后使用测微尺换算出0.01mm<sup>2</sup>粘液细胞数,并拍照记录。

**数据处理** 本实验数据采用SPSS 11.0进行单因素方差分析和多重比较法进行分析处理,差异显著水平为 $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

根据AB-PAS粘液染色结果不同,参考文献[10,14]的分类方法,可将大菱鲂体表粘液细胞分为四型:I型,AB-PAS染色呈玫红色,含有PAS阳性的中性粘多糖;II型,AB-PAS染色呈蓝

色,含有AB阳性的酸性粘多糖;III型,AB-PAS染色呈紫红色,主要含有PAS阳性的中性粘多糖,同时含有少量AB阳性的酸性粘多糖;IV型,AB-PAS染色呈蓝紫色,主要含有AB阳性的酸性粘多糖,同时含有少量PAS阳性的中性粘多糖。在pH 2.6阿利新蓝溶液染色时显示酸性粘液蓝色,pH 1.0阿利新蓝溶液染色仅显示弱的和强的硫酸化酸性粘液蓝色。

在正常水温(16±0.5)℃下(表1),体表各部位的粘液细胞主要是以I型玫红色为主,含量极其丰富;其次是III型紫红色粘液细胞,主要分布于表皮中间层;II型和IV型分布极少,而且大都分布于粘液细胞开口处;其中颌部及背部粘液细胞总数相对较高,而无眼侧皮肤粘液细胞又比无眼侧皮肤粘液细胞总数多;不同部位在不同温度下,粘液细胞类型与分布都有显著差异( $P < 0.05$ )(图1,图版-1~16);而pH 1.0阿利新蓝染色粘液细胞均呈阴性反应。

### 2.1 颌部皮肤粘液细胞

AB-PAS染色,有眼侧颌部粘液细胞随着温度的升高,I型细胞数目含量有所降低,但差异性并不显著( $P > 0.05$ );II型,III型细胞数量显著增加( $P < 0.05$ ),其中II型细胞主要积聚在粘液细胞开口;IV型变化不显著;但总的粘液细胞类型中仍然是I型为主。而无眼侧颌部体表在温度升高的情况下,I型粘液细胞数目同样不断的减少,变化显著;II型细胞数目则显著增加,到27℃时含量超过I型;III型细胞数目不断增加,在27℃时处成为主要的粘液细胞类型;但与有眼侧不同的是IV型细胞数目随着温度的升高也略有增加(图版-1,5,9,13)。

表1 常温下大菱鲂皮肤粘液细胞的类型与分布

Tab.1 The types and the density of the mucous cell in the epidermis of turbot at the normal temperature

分布 distribution		细胞类型 cell type				ind/mm <sup>2</sup>
		I	II	III	IV	
有眼侧 ocular side	颌部皮肤 mental skin	92.4±8.2	16.7±1.4	51.2±4.7	14.8±1.7	
	背部皮肤 dorsal skin	80.4±5.2	15.0±1.6	66.2±4.0	15.9±1.4	
	腹部皮肤 ventral skin	75.6±6.0	14.5±1.3	68.1±4.3	18.9±1.5	
	尾部皮肤 tail skin	81.8±5.4	15.7±1.5	45.6±4.3	13.3±1.5	
无眼侧 blind side	颌部皮肤 mental skin	97.0±4.8	18.6±1.2	56.9±4.2	17.7±1.3	
	背部皮肤 dorsal skin	82.4±4.7	15.1±1.4	69.6±4.3	17.8±1.5	
	腹部皮肤 ventral skin	82.6±4.6	15.7±1.3	72.5±4.5	20.2±1.7	
	尾部皮肤 tail skin	79.0±4.7	21.7±1.3	38.1±4.3	11.2±1.4	

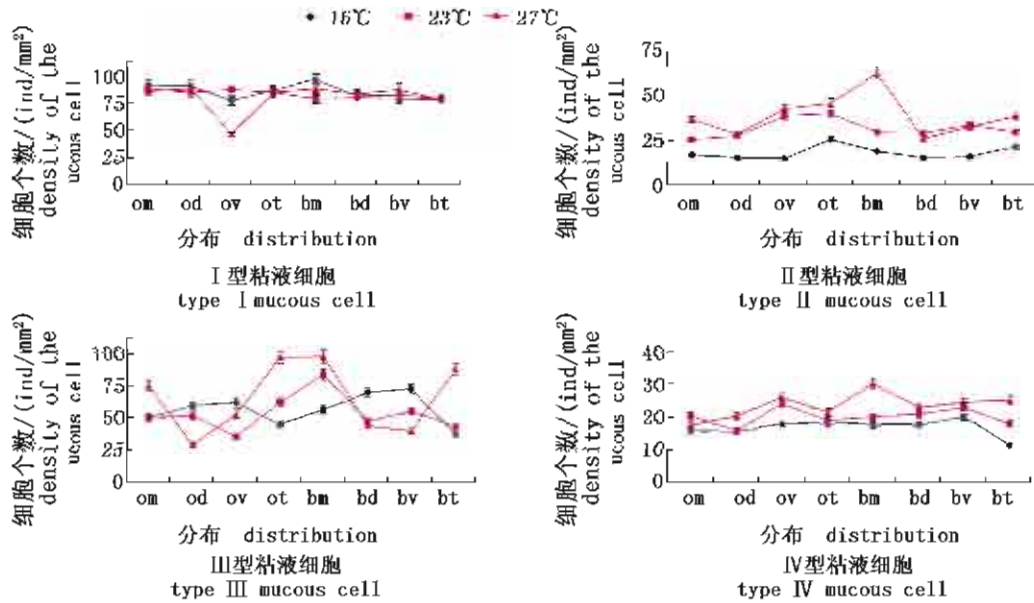


图1 温度对粘液细胞在大菱鲆体表分布的影响

om, od, ov, ot, bm, bd, bv, bt 分别表有眼侧颌部、背部、腹部、尾部皮肤以及无眼侧颌部、背部、腹部、尾部皮肤。

Fig. 1 The effect of different temperature on the distribution of the turbot skin

Om, od, ov, ot, bm, bd, bv, bt respectively represent mental skin, dorsal skin, ventral skin and tail skin of the ocular, also the same as the blind skin.

## 2.2 背部皮肤粘液细胞

随着温度的增加,有眼侧背部 I 型粘液细胞的含量缓慢减少; II 型细胞显著增加; III 型细胞出现显著降低; IV 型在 23 °C 时没有变化, 27 °C 数量增加。但无眼侧 I 型粘液细胞, 结果却显示细胞数目随着温度的升高缓慢增加; II 型细胞数目则显著增加; III 型细胞出现显著降低; IV 型细胞数目显著增加(图版-2, 6, 10, 14)。

## 2.3 腹部皮肤粘液细胞

有眼侧腹部 I 型粘液细胞, 在 23 °C 处增加, 而在 27 °C 处却显著减少; II 型细胞数目则随着温度的升高而显著增加, 在 27 °C 与 I 型含量相当; III 型细胞在 23 °C 数目减少, 后在 27 °C 处明显增加, 并超过 I 型粘液细胞, 成为含量最丰富的类型; IV 型细胞数目在 23 °C 增加, 之后没有显著变化。无眼侧粘液细胞的变化与有眼侧相似, 即: I 型粘液细胞随着温度的增加而增加; II 型细胞随着温度的升高细胞数目显著增加; III 型细胞则不断的缓慢减少; IV 型细胞数目在 23 °C 增加, 之后没有显著变化(图版-3, 7, 11, 15)。

## 2.4 尾部皮肤粘液细胞

有眼侧尾部的 AB-PAS 染色结果显示: I 型粘液细胞随着温度的增加含量减少; II 型细胞的

数目在 23 °C 显著增加, 但是在 27 °C 时大量减少, 恢复到常温下水平; III 型细胞在 27 °C 处数目增加, 并多于 I 型粘液细胞; IV 型细胞数目在 27 °C 略有增加。无眼侧 I 型粘液细胞随着温度的升高, 却没有显著变化; II 型细胞数目显著增加; III 型细胞数目不断增加, 而在 27 °C 处多于 I 型粘液细胞; IV 型细胞数目显著增加(图版-4, 8, 12, 16)。

## 3 讨论

环境胁迫会对鱼体的生理机制产生重要的影响。胁迫能引发鱼体内的生理状态呈阶段性变化, 导致体内激素水平升高, 生理生化指标发生变化<sup>[15]</sup>。大菱鲆作为冷水性鱼类, 温度对其影响至关重要, 尤其是高温。

从实验结果看, 常温 16 °C 条件下, 颌部与背部的粘液细胞总量较多, 而且无眼侧较之有眼侧粘液细胞总量多, 由于大菱鲆有眼侧皮肤有突起的骨质鳞覆盖, 而无眼侧没有鳞片, 与先前研究<sup>[16]</sup>的结果一致, 即: 鱼体不同部位其粘液细胞的数目不同, 无鳞区粘液细胞数比有鳞区多, 鱼体前部比后部多。

在温度不断升高的外界刺激下, 体表皮肤不

同部位粘液细胞的分布与数目发生着显著的变化,与对照组(常温 16 ℃)相比,Ⅱ型粘液细胞增幅最大,Ⅳ型次之,Ⅰ型略有减少,但变化并不显著,而Ⅲ型增幅呈现出无规律性。因为体表粘液中含丰富的溶菌酶、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)等水解酶类,其酸性环境可以溶解寄生物从而保护机体,但是随着水温不断增加,病原微生物活力提高,对鱼体构成威胁,而Ⅱ型和Ⅳ型粘液细胞均为使 AB 呈阳性的酸性粘多糖,其分泌的酸性成分随温度的升高而显著增加,可有效地防止病原菌侵入,为体表粘液的免疫防御功能提供证据。从细胞发育角度,将表皮细胞发育分为形成、成熟、功能、退化 4 个阶段<sup>[17]</sup>:(1)形成阶段,粘液细胞只存在于表皮的生发层(马氏层)中,其形态学特征是,细胞为圆形,体积小,强烈 PAS 阳性反应;(2)成熟阶段,形成的粘液细胞经过粘液颗粒的不断融合,整个细胞变长变大,细胞位于粘膜的中间层, PAS 阳性反应;(3)功能阶段,粘液细胞不断向上皮表层迁移,为将粘液分泌到表皮外做准备,此时与 PAS 反应为阳性;(4)退化阶段:当细胞释放出粘液以后,细胞变空,最后退化消失, PAS 反应,着色很弱;通过结果分析:随着温度的增加,加速了粘液细胞的发育过程,并在较短的时间内接近成熟,使Ⅱ型粘液细胞大量增加,Ⅳ型也有显著增加,这也说明表皮中粘液细胞对温度比较敏感,通过改变粘液细胞的密度、类型以及发育速度,从而适应外界环境的变化。

从显微镜下观察到,温度升高对粘液细胞层次和排列也有影响,与对照组相比,粘液细胞层次不断变少,排列相对紧密,表皮中较大的空腔减少,粘液细胞的开口逐渐增多,释放大量粘液物质,当温度升高至 27 ℃时,体表表皮组织发生断裂,而且大的空腔消失。这一结果显示,温度升高条件下,粘液细胞发生巨大的变化,迅速分泌粘液物质,从而抵抗海水中病原微生物的附着与侵入。

pH 1.0 阿利新蓝染色粘液细胞均呈阴性反应,说明体表各部位均为涎酸性粘液细胞,而不含有硫酸化酸性粘液细胞。这个结果可能由于若体表酸性太强,很难与外界环境的 pH 达到平衡,完成各项生理活动,而且粘液中含有的多种生物活性物质可能会在此强酸环境下降低活性。

本研究通过耐高温性试验,从组织学角度,对大菱鲆体表粘液细胞进行深入探究,体表粘液作为鱼体与外界直接接触的第一道门户,对外界理化因子变化的反应是最直接,也是最敏感的,而粘液分泌的源头——粘液细胞的变化,为今后大菱鲆高温抗病研究提供了理论依据。通过试验结果比较分析,发现Ⅱ型粘液细胞的变化是最为明显的,故将Ⅱ型粘液细胞的变化作为耐温指标,将为鱼类耐温选育体系提供一种新思路。而随着温度的升高,体表粘液细胞分泌活动增强,但调控粘液细胞分泌活动的因子目前还不清楚。若加强体表粘液细胞分泌功能,将为预防与治疗鱼类疾病提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 杨桂文,安利国. 鱼类粘液细胞研究进展[J]. 水产学报,1999,23(4):403-408.
- [2] Shephard K L. Functions for fish mucus[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries. Springer,1994,4:401-429(DOI:10.1007/BF00042888).
- [3] 孙耀,张波,郭学武,等. 温度对黑鲷(*Sparus macrocephalus*)能量收支的影响[J]. 生态学报,2001,21(2):186-190.
- [4] 邓思平,吴天利,王德寿,等. 温度对南方鲈幼鱼生长与发育的影响[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2000,25(6):674-679.
- [5] 尹家生,邱岭泉,徐伟,等. 水温变化对黑龙江野鲤繁殖的影响[J]. 上海水产大学学报,2002,11(3):253-258.
- [6] 陈慕雁,张秀梅,连建华,等. 大菱鲆仔稚鱼期消化酶及碱性磷酸酶活性的变化[J]. 中国海洋大学学报,2005,35(3):483-486.
- [7] Kitzen S M, Sweeny P R. A light and electron microscope study of the structure of *Protopterus annectens* epidermis. I [J]. Mucus production CanJ Zool, 1968, 46:767-772.
- [8] Sibbing F A, Uribe R. Regional specializations in the oro-pharyngeal wall and food processing in the carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Netherlands J Zool, 1985, 35(3):377-422.
- [9] 尹苗,安利国,杨桂文,等. 鲤鱼黏液细胞类型的研究[J]. 动物学杂志,2000,35(1):8-10.
- [10] 安利国,孟广勋,杨桂文,等. 鲤稚幼体早期发育过程中黏液细胞的发生和变化[J]. 水生生物学报,2001,25(2):191-194.
- [11] 刘怀如,张耀光. 南方鲇消化道杯状细胞分布及类

- 型探讨[J]. 四川动物, 2002, 21(1): 6-8.
- [12] Ndong D, Chen Y Y, Lin Y H, *et al.* The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(6): 686-694.
- [13] Jones R, Reid L. The effect of pH on Alcian blue staining of epithelial acid glycoproteins[J]. *Hist J*, 1973, 5: 9-18.
- [14] 袁金铎, 张明, 王钦东, 等. 淡水白鲟粘液细胞类型和分布的研究[J]. *细胞生物学杂志*, 1997, 1(增刊): 70-72.
- [15] 洪磊, 张秀梅. 环境胁迫对鱼类生理机能的影响[J]. *海洋水产研究*, 2004, 22(1): 114-121.
- [16] Harris J E, Hunt S. The fine structure of the epidermis of two species of salmonid fish the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the brown trout (*Salmo trutta*) [J]. *Cell Tiss Res*, 1975, 163: 535-545.
- [17] Sinha G M. A histochemical study of the mucous cells in the bucco-pharyngeal region of four Indian freshwater fishes in relation to their origin, development, curarencence and probable functions[J]. *Acta Histochem*, 1975, 53(2): 217-233.

## Effects of high temperature on the type and distribution of turbot (*Scophthalmus maximus*) skin mucous cells

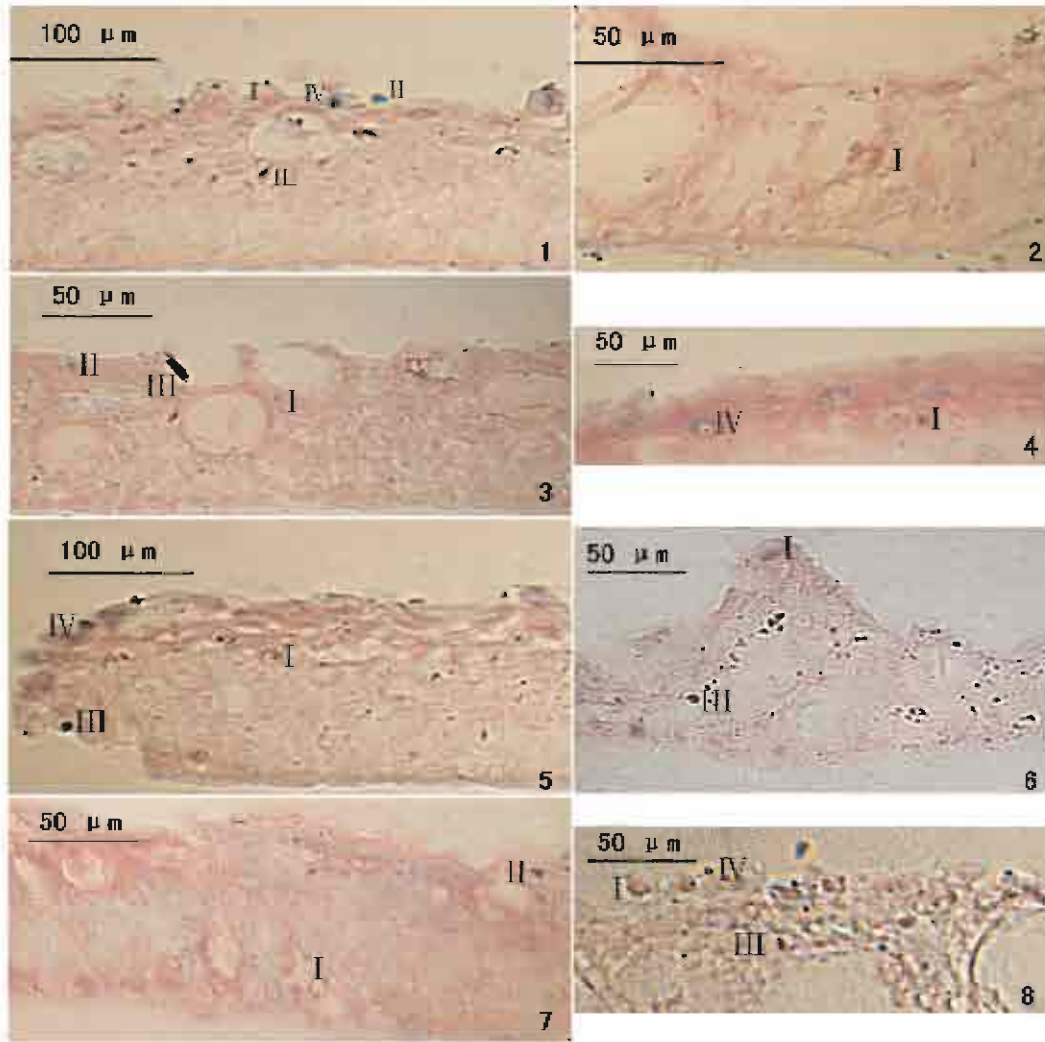
HUANG Zhi-hui<sup>1,2</sup>, MA Ai-Jun<sup>1\*</sup>

(1. Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;  
2. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Studies were carried out on the effect of high temperature (20, 23, 25, 27 and 28 °C) on mucous cells of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) by method of AB-PAS (AB pH 25, pH 1.0) combined staining. Results showed that significant changes in the distribution, numbers and type of skin mucus cells occurred following high temperature treatment. Compared to the control group (16 °C), the number of type II mucus cells had the maximum increasing, type IV second, type I showed no significant change, and type III presented no regularity change. The skin mucus comprising a number of hydrolase such as lysozyme, acid phosphatase, alkaline phosphatase and so on, which create an acidic environment to protect the fish from damage. With the temperature increasing, pathogenic microorganisms become more active and have a greater threat to the health of the fish. In order to prevent pathogen invasion, the acidic mucus has a significant increase at high temperature. Type II and IV mucus cells were AB-positive and containing acidic mucopolysaccharide, and the increase in the number may create mucus for the skin to defend pathogenic intrusion.

**Key words:** *Scophthalmus maximus*; mucous cell; epidermis; temperature

**Corresponding author:** MA Ai-jun. E-mail: maaj@ysfri.ac.cn



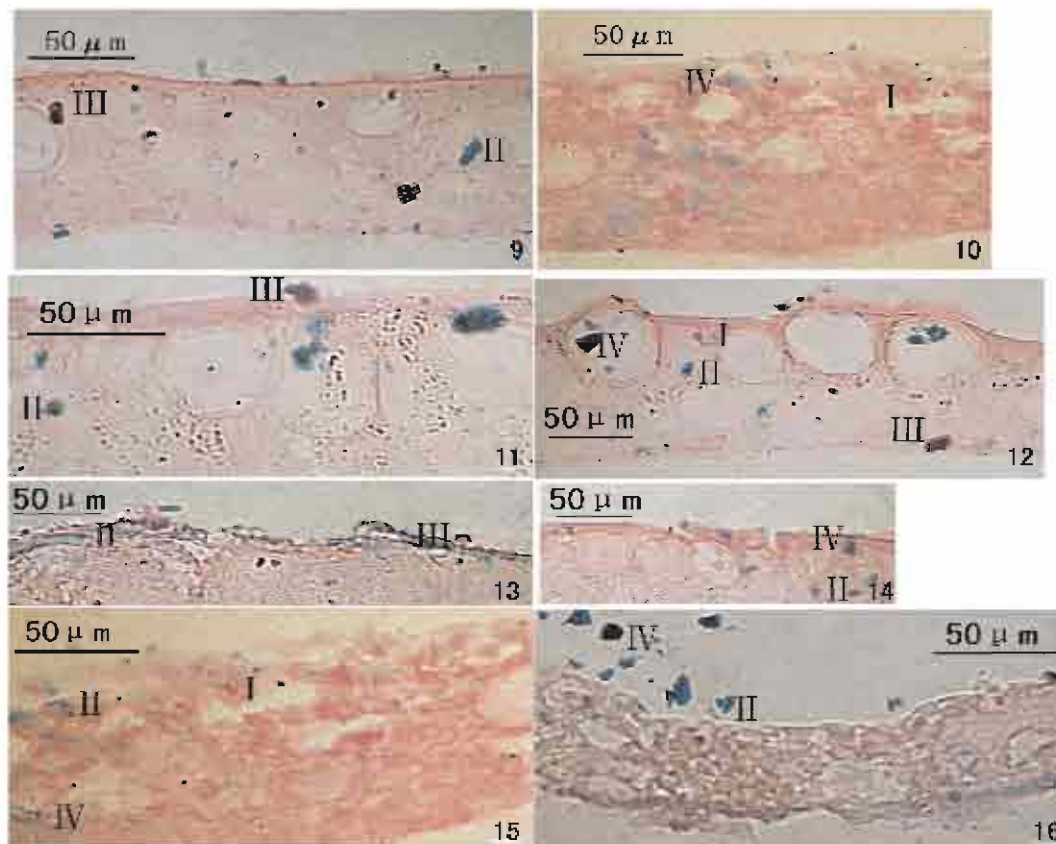
### 图版

1,2,3,4,5,6,7,8 分别示常温下有眼侧颌部、背部、腹部、尾部体表上皮,无眼侧颌部、背部、腹部、尾部体表上皮; I: I 型粘液细胞; II: II 型粘液细胞; III: III 型粘液细胞; IV: IV 型粘液细胞。

### Plate

1,2,3,4,5,6,7,8 respectively represent mental skin, dorsal skin, ventral skin, tail skin of the ocular and the blind skin at normal temperature. I: mucus cells of type I; II: mucus cells of type II; III: mucus cells of type III; IV: mucus cells of type IV.





### 图版

9,10,11,12,13,14,15,16 分别示 27 ℃有眼侧颌部、背部、腹部、尾部体表上皮,无眼侧颌部、背部、腹部、尾部体表上皮; I : I 型粘液细胞; II : II 型粘液细胞; III : III 型粘液细胞; IV : IV 型粘液细胞。

### Plate

9,10,11,12,13,14,15,16 respectively represent mental skin, dorsal skin, ventral skin, tail skin of the ocular and the blind skin at 27 ℃.

I : mucus cells of type I ; II : mucus cells of type II ; III : mucus cells of type III ; IV : mucus cells of type IV .