

幼龄皱纹盘鲍消化道粘膜上皮的 超微结构与组织化学

卞建春^{1,2}, 崔龙波^{2,3}, 周雪莹³, 陆瑶华³

(1. 扬州大学 畜牧兽医学院, 江苏 扬州 225009;

2. 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

3. 烟台大学 生物化学系, 山东 烟台 264005)

摘要:以透射电镜与组织学方法研究45日龄皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*, 壳长2.30~2.40 mm, 壳宽1.80~2.10 mm)的消化道。结果表明:①食道分为前、中、后3段;中段分为食物通道和食道侧囊,食道侧囊的分泌细胞含大量的囊泡和分泌颗粒,呈强的蛋白酶和非特异性酯酶活性;食道前段、食物通道及食道后段粘膜上皮由纤毛细胞和粘液细胞组成。②嗦囊粘膜上皮只有1种细胞,细胞游离缘具有长达4.0 μm的密集微绒毛。③胃粘膜上皮由纤毛细胞和微绒毛细胞组成。④肠和直肠粘膜上皮由5种细胞组成,即纤毛细胞、微绒毛细胞、分泌细胞、颗粒状腺细胞和粘液细胞,分泌细胞基部有少量的分泌颗粒。⑤存在于消化道各部位的微绒毛细胞游离缘均具密集的微绒毛,游离端质膜呈碱性磷酸酶活性;食道和肠的粘液细胞分泌粘多糖;食道、胃和肠的纤毛细胞游离缘具纤毛。

关键词:皱纹盘鲍;幼鲍;消化道;粘膜上皮;超微结构;组织化学

中图分类号:Q959.215

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)01-0010-04

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)属珍贵经济贝类,目前已在我国北方沿海大量养殖。其幼鲍以单细胞藻为食,成鲍则以褐藻、红藻等大型藻类为食。与其食性相适应,皱纹盘鲍的消化道甚长^[1]。在人工育苗过程中,当生长至45 d左右时,幼鲍吃完最初附在藻板上的藻类时,需将之从藻板上剥离,改投干的藻类饵料饲喂,这是皱纹盘鲍在人工育苗、养殖过程中最重要的一次生活环境的改变。周雪莹等^[2]对45日龄幼鲍的消化道进行了组织学研究,崔龙波等^[3]对成鲍的嗦囊和胃进行了超微结构和功能的研究。本文通过透射电镜和组织化学方法对幼鲍消化道粘膜上皮进行观察,以期了解此时幼鲍消化道的发育程度及其对环境变化的适应情况,旨在为皱纹盘鲍的人工育苗和养殖提供理论依据。

收稿日期:2001-07-02.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39470351).

作者简介:卞建春(1965-),男,博士生,讲师,主要从事动物营养代谢与疾病防治方面的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

45日龄皱纹盘鲍取自烟台隆海海珍品养殖场,尚未从藻板上剥离,壳长2.30~2.40 mm,壳宽1.80~2.10 mm。解剖取出消化道待用。

1.2 方法

1.2.1 超微结构观察 组织块用2.5%戊二醛液和1%锇酸液双固定,梯度丙酮脱水,Epon 812环氧树脂包埋,切片厚50~70 nm,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。JEM-1200EX型透射电镜观察。

1.2.2 组织化学观察 组织块分别置于10%中性福尔马林液、Bouin氏液或Carnoy氏液固定,石蜡包埋,切片厚5~8 μm,进行以下染色: PAS反应显示多糖,唾液消化后PAS反应显示糖原, Alcian蓝-PAS反应区分中性与酸性粘多糖, 汞溴酚蓝法显示蛋白质。

另取新鲜组织块直接于恒冷冰冻切片机上切

片,切片厚 6~10 μm , 分别进行以下染色: Cunnigham 氏明胶薄膜法显示蛋白酶, Gomori 氏吐温(40 和 80)法显示酯酶, 酸性乙酸- α -萘酯-六偶氮对品红法显示非特异性酯酶, Gomori 氏硝酸铅法显示酸性磷酸酶, Gomori 氏钙钴法显示碱性磷酸酶, 苏丹黑 B 法显示脂类。

每种组织化学方法均做阴性对照。以上组织化学方法见文献[4]。

2 结果

2.1 超微结构

2.1.1 食道 食道分前、中、后 3 段。中段又分为食物通道和食道侧囊。食道前段、食物通道及食道后段粘膜上皮由纤毛细胞和粘液细胞组成, 食道侧囊粘膜上皮由微绒毛细胞、分泌细胞和纤毛细胞组成^[2]。纤毛细胞游离缘具较密集的纤毛, 另有较稀疏的微绒毛, 纤毛基体和纤毛小根清晰可辨, 纤毛小根深插入细胞内部, 细胞顶端及纤毛小根之间含有许多线粒体, 细胞中部有少量次级溶酶体(图版 I-1)。粘液细胞内含丰富的粗面内质网及大量的粘原颗粒。微绒毛细胞游离缘具密集的、长约 1.5 μm 的微绒毛, 质膜下有少量的内吞泡, 顶端细胞质含有大量的线粒体(图版 I-2)。分泌细胞游离缘有长约 0.7 μm 、较稀疏的微绒毛, 细胞游离端膨胀、外突, 顶端细胞质含有大量大小不等的囊泡, 囊泡内容物无定形结构, 电子密度不等; 顶端细胞质还含有高尔基体及许多平均直径为 0.15 μm 的分泌颗粒, 分泌颗粒电子致密(图版 I-3), 细胞游离端常崩解而释放出分泌颗粒。

2.1.2 嗦囊 嗦囊粘膜上皮只有 1 种细胞, 细胞游离缘具有长达 4.0 μm 的密集微绒毛, 质膜下见少量内吞泡, 顶端细胞质含大量线粒体(图版 I-4), 细胞中部有较多脂滴, 基底端质膜内折形成许多内褶(图版 I-5)。

2.1.3 胃 胃粘膜上皮由纤毛细胞和微绒毛细胞组成^[2]。纤毛细胞游离缘具发达纤毛, 纤毛排列整齐, 无微绒毛, 顶端细胞质含大量线粒体(图版 I-6)。微绒毛细胞游离缘具长约 1.5 μm 的密集微绒毛, 顶端细胞质亦含大量线粒体(图版 I-7)。部分微绒毛细胞的核上方具发达的高尔基体和许多直径为 0.3 μm 的分泌颗粒, 分泌颗粒电子密度较致密(图版 I-8)。

2.1.4 肠和直肠 肠和直肠粘膜上皮由 5 种细胞

组成: 纤毛细胞、微绒毛细胞、分泌细胞、颗粒状腺细胞和粘液细胞^[2]。肠纤毛细胞和粘液细胞的超微结构与食道的相类似。微绒毛细胞游离缘具长约 2.0 μm 的微绒毛, 质膜下方有少量的内吞泡, 顶端细胞质含较多的线粒体, 亦见少量次级溶酶体, 高尔基体位于核上方(图版 I-9), 细胞中基部见较多的脂滴(图版 I-10), 基底端质膜形成许多内褶。分泌细胞游离端亦有微绒毛, 但其特征性的结构是细胞核下方有数个大小不等的分泌颗粒, 分泌颗粒的电子密度不一, 分泌颗粒常聚集成团, 再由共同的质膜围绕(图版 I-11)。颗粒状腺细胞内充满大量平均直径为 0.7 μm 的圆形分泌颗粒, 多数颗粒电子致密(图版 I-12)。

2.2 组织化学

2.2.1 PAS 反应 食道和肠粘液细胞的细胞质、食道侧囊分泌细胞的分泌颗粒和囊泡、胃部分微绒毛细胞的分泌颗粒, 以及肠分泌细胞和颗粒状腺细胞的分泌颗粒呈紫红色, 表明含糖。

2.2.2 唾液消化后 PAS 反应 仅胃部分微绒毛细胞的细胞质紫红色消失, 表明含糖原。

2.2.3 Alcian 蓝 - PAS 反应 食道和肠粘液细胞的细胞质呈蓝色或紫红色(图版 II-1), 表明分泌酸性和中性混和粘多糖。此外, 食道侧囊分泌细胞的囊泡亦呈蓝色或紫红色。

2.2.4 汞溴酚蓝法 食道侧囊分泌细胞及肠分泌细胞和颗粒状腺细胞的分泌颗粒呈蓝色, 表明含蛋白质。食道侧囊分泌细胞的囊泡几乎不着色。

2.2.5 Cunnigham 氏明胶薄膜法 食道侧囊分泌细胞游离端及侧囊腔、胃部分微绒毛细胞游离端以及肠分泌细胞游离端呈透明(图版 II-2), 表明具蛋白酶活性。但后 2 种细胞的酶活性较弱。

2.2.6 Gomori 氏吐温法 食道前、中、后段的纤毛细胞顶端细胞质含棕黄色颗粒(图版 II-3), 表明具酯酶活性。

2.2.7 酸性乙酸- α -萘酯-六偶氮对品红法 除粘液细胞外, 消化道其他粘膜上皮细胞顶端细胞质均呈棕红色(图版 II-4、5), 表明具非特异性酯酶活性。

2.2.8 Gomori 氏硝酸铅法 消化道粘膜上皮细胞均呈阴性, 表明不具酸性磷酸酶活性。

2.2.9 Gomori 氏钙钴法 食道纤毛细胞、微绒毛细胞和分泌细胞、嗦囊上皮细胞、胃微绒毛细胞以及肠纤毛细胞和微绒毛细胞的游离端质膜均呈黑色

(图版 II-6), 表明具碱性磷酸酶活性。

2.2.10 苏丹黑 B 法 嗦囊上皮细胞、胃微绒毛细胞和肠微绒毛细胞内含有黑色颗粒, 表明含脂类。

3 讨论

(1) 周雪莹等^[2]以组织学方法将幼龄皱纹盘鲍的消化道粘膜上皮细胞分为 5 种: 微绒毛细胞、分泌细胞、颗粒状腺细胞、粘液细胞和纤毛细胞。本研究认为这 5 种细胞具有不同的超微结构和组织化学性质, 表明它们分别具有不同的功能。

(2) 存在于消化道各器官的微绒毛细胞尽管部位不同、细胞高低不等, 但具有类似的超微结构和组织化学性质。细胞游离缘均具长短不一的密集微绒毛, 质膜下有少量的内吞泡, 顶端细胞质含许多线粒体, 细胞内含有贮存物质(脂类), 这些都是吸收细胞的超微结构特征^[5-7]。组织化学研究表明, 微绒毛细胞的游离端质膜具碱性磷酸酶活性, 而此酶与物质的跨膜转运有关^[7], 因此微绒毛细胞以吸收食物为主要功能。此外, 嗦囊和肠微绒毛细胞的基部质膜形成内褶, 这是进行水和离子转运的结构特征^[6,8]。

(3) 食道侧囊的分泌细胞具有双重功能。该细胞游离缘具微绒毛, 游离端质膜具碱性磷酸酶活性, 细胞内含大量大小不等的囊泡, 这些囊泡的内容物被认为是内吞进来的食物^[9], 因此分泌细胞具吸收功能。同时分泌细胞含许多分泌颗粒, 并呈现蛋白酶和非特异性酯酶活性, 因此又具分泌功能。在帽贝(*Patella vulgata*)食道, 分泌细胞呈吸收和分泌 2 个时相^[9]。

(4) 肠的分泌细胞基部有少量的分泌颗粒, 但与成鲍肠分泌细胞比较^[10], 分泌颗粒的数量很少, 且蛋白酶活性较低。肠颗粒状腺细胞内充满大量的分泌颗粒, 其分泌物可能与包裹粪便有关^[5]。胃部分

微绒毛细胞内亦含有分泌颗粒, 并具蛋白酶活性, 但与成鲍比较^[3], 酶的活性也比较低。粘液细胞主要分泌中性和酸性混合粘多糖, 起润滑作用。

(5) 消化道各器官粘膜上皮存在大量的纤毛细胞, 该细胞游离缘具纤毛, 纤毛小根间含有大量的线粒体, 因此纤毛细胞通过纤毛的摆动, 便于食物在消化道内的运送和分选, 这对消化道管壁缺乏肌层的幼鲍更具有意义^[2]。

(6) 尽管幼鲍与成鲍消化道的超微结构和组化性质有所差异^[3,10], 但研究表明, 45 日龄幼鲍消化道粘膜上皮细胞基本具备了正常的消化、吸收功能, 可以适应环境的改变。

参考文献:

- [1] 蔡英亚, 张英, 魏若飞. 贝类学概论[M]. 上海: 上海科技出版社, 1979. 50-54.
- [2] 周雪莹, 崔龙波, 陆瑶华. 幼龄皱纹盘鲍消化系统的组织学研究[J]. 烟台大学学报, 2001, 14(2): 125-130.
- [3] 崔龙波, 刘传琳, 刘迅, 等. 皱纹盘鲍嗦囊和胃的超微结构与功能[J]. 水产学报, 2000, 24(1): 7-10.
- [4] Pearse A G E. Histochemistry, theoretical and applied[M]. London: Churchill Livingstone, 1983.
- [5] Bush M S. The ultrastructure and function of the intestine of *Patella vulgata* [J]. J Zool Lond, 1988, 215: 685-702.
- [6] Boer H H, Kits K S. Histochemical and ultrastructural study of the alimentary tract of the freshwater snail *Lymanaea Stagnalis* [J]. J Morphol, 1990, 205: 99-111.
- [7] Franchini A, Ottaviani E. Intestine cell types in the freshwater snail *Planorbis corneus*: histochemical, immunocytochemical and ultrastructural observation[J]. Tissue Cell, 1992, 24: 387-396.
- [8] Payne C M, Crisp M. Ultrastructure and histochemistry of the posterior oesophagus of *Nassarius reticulatus* (L.) [J]. J Moll Stud, 1989, 55: 313-321.
- [9] Bush M S. The ultrastructure and function of the oesophagus of *Patella vulgata* [J]. J Moll Stud, 1989. 55: 111-124.
- [10] 崔龙波, 刘传琳, 刘迅, 等. 皱纹盘鲍肠粘膜上皮的结构与功能[J]. 动物学报, 2001, 47(3): 324-328.

Ultrastructure and histochemistry of alimentary canal mucosal epithelium of larval abalone *Haliotis discus hannai*

BIAN Jian-chun^{1,2}, CUI Long-bo^{2,3}, ZHOU Xue-ying³, LU Yao-hua³

(1. Veterinary College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

3. Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: The alimentary canal mucosal epithelium of 45-day-old larval abalone *Haliotis discus hannai* (body length 2.30–2.40 mm and body width 1.80–2.10 mm) were observed under transmission electronic microscope and by histochemical method. The results show that: ① The esophagus consists of three sections which are anterior section, middle section and rear section; the middle section consists of food canal and lateral pouch; the cells secreted from the lateral pouch contain large numbers of vesicles and secretory granules which show strongly positive activities of protease and non-specific esterase; the mucosal epithelium of esophagus anterior section, food canal and esophagus rear section consists of ciliated cells and mucous cells. ② There is only one kind of cell on the crop mucosal epithelium, and there are dense microvilli as long as 4.0 μm at the free end of the cell. ③ The stomach mucosal epithelium consists of ciliated cells and microvilli. ④ The intestine and intestine rectum mucosal epithelium consist of five types of cells, i. e. ciliated cell, microvillus, secretory cell, granular gland cell and mucous cell. The secretory cells contain a few of secretory granules in the basal region. ⑤ The microvilli cells in every section of alimentary canal have dense microvilli and the plasmalemma at the free ends shows ALK activity, and the mucous cells of food canal and intestine secrete mucopolysaccharide, also, in the alimentary canal, stomach and intestine, there exist some cilia at the free ends of the ciliated cells.

Key words: *Haliotis discus hannai*; larvae; alimentary canal; mucosal epithelium; ultrastructure; histochemistry