

DOI: 10.12264/JFSC2022-0141

南海北部黄鳍金枪鱼幼鱼和成鱼鳃的组织学比较研究

符文雅¹, 邹莹¹, 刘飞¹, 潘帅¹, 黄海², 马振华³, 郭志强¹

1. 海南大学生命科学学院, 南海海洋资源利用国家重点实验室, 海南 海口 570228;
2. 热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室, 海南省热带海洋渔业资源保护与利用重点实验室, 海南热带海洋学院水产与生命学院, 海南 三亚 572022;
3. 中国水产科学研究院南海水产研究所热带水产研究开发中心, 海南 三亚 572018

摘要: 本研究运用光学显微镜、扫描电镜以及透射电镜技术研究了南海北部黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)幼鱼和成鱼鳃的显微组织结构、鳃表面超微结构和鳃小片内部超微结构特点。结果表明, 黄鳍金枪鱼鳃丝顶端弯曲, 鳃弓、鳃丝和鳃耙表面具有不同类型的细胞。表面超微结构研究显示黄鳍金枪鱼的鳃具有高的片层密度、独特的斜向血流模式以及鳃的融合特性, 幼鱼和成鱼鳃结构之间存在显著不同。鳃小片内部超微结构研究显示鳃扁平上皮细胞覆盖于鳃丝和鳃小片表面, 顶端存在微绒毛或微脊结构, 相对幼鱼, 成鱼具有高的细胞质密度; 离子细胞主要分布于鳃小片以及鳃小片基部, 幼鱼离子细胞顶端开口为微绒毛, 成鱼为小坑状。本研究阐明了黄鳍金枪鱼幼鱼和成鱼鳃的组织结构, 丰富了黄鳍金枪鱼鳃的基础生物学资料, 为研究高速游泳鱼类鳃的形态特征与其高速游泳习性之间的关系提供了参考。

关键词: 南海; 黄鳍金枪鱼; 鳃; 组织结构; 扁平上皮细胞; 离子细胞; 显微观察

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2022)10–1475–12

鳃是鱼类的主要呼吸器官, 同时, 鳃还承担着渗透调节、酸碱平衡、氮废物排泄、血液循环激素水平调节和免疫调节等功能^[1-4]。近年来, 鳃的组织学特征引起了越来越多研究者的关注。研究发现, 不同鱼类鳃组织结构的适应性变化与生活习性紧密相关^[5-7]。例如, Turko 等^[5-6]发现占据广泛生态位的鲮形目(Cyprinodontiformes)鱼类鳃丝钙化普遍存在, 这种现象支持其离开水面生存并促进对氧的吸收。Long 等^[7]对深海生存的科芬鱼(Lophiiformes: Chaunacidae)进行研究, 发现科芬鱼可形成巨大的鳃室, 使得鱼的体积增大20%~30%, 在视觉上具有一定的威胁性, 而不容易被捕食; 同时, 巨大的鳃室可减少呼吸所消耗的能量。此外, 由于鳃的许多功能主要通过上皮细胞实现, 为更好认识鳃的功能, 学者对鳃上皮

不同类型细胞进行了研究^[8-10]。例如, 扁平上皮细胞顶端的微脊结构与气体交换^[11], 离子细胞顶端窝陷类型与生境适应^[12], 都是目前所关注的研究课题。

然而, 鳃并非一经形成就可发挥各种作用。随着鱼类的生长, 幼鱼与成鱼鳃所承担的功能会出现差异性。在鱼类发育早期, 鳃往往并不具备行使全部功能的条件, 在鳃小片出现之前, 鱼体主要通过表皮来维持呼吸等生命活动^[13]。随着鳃的发育完善, 鳃开始发挥更多功能。离子细胞形成后通过控制 Na^+ 、 K^+ 进出, 维持正常的渗透压和离子浓度^[14], 直至成年时期, 鳃发挥更全面的功能^[15]。因此, 对幼鱼和成鱼鳃的形态结构进行研究, 进一步加深对鱼类鳃功能的认识具有指导意义。

收稿日期: 2022-04-15; **修订日期:** 2022-06-27.

基金项目: 海南大学 C 类人才科研启动基金项目(KYQD(ZR)1803); 2021 年海南省研究生创新科研课题(Qhys2021-236).

作者简介: 符文雅(1998–), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类生物学研究. E-mail: fuwenyaay@163.com

通信作者: 郭志强, 教授, 主要从事鱼类生境生物学研究. E-mail: guozq@hainanu.edu.cn

黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鲭亚目(Scombroidei), 鲭科(Scombridae), 金枪鱼属(*Thunnus*)。黄鳍金枪鱼是一种具有大洋洄游行为的高速游泳鱼类, 通常生活在温暖的上层海域, 在中国分布于南海、东海和台湾沿海^[16-17]。黄鳍金枪鱼的高速游动往往需要消耗大量的能量, 这使得鳃具有适应性进化, 以保证鳃承受高速水流的冲击, 维持鳃结构的完整性。同时也提高了鳃对于氧的吸收与利用, 为高速游动提供能量^[18]。目前, 有关黄鳍金枪鱼鳃的研究较少^[15,18-19], 也未见有关黄鳍金枪鱼幼鱼鳃的组织学研究。因此, 本研究对南海北部的黄鳍金枪鱼幼鱼和成鱼鳃的结构进行比较分析, 旨在丰富幼鱼和成鱼鳃的表观以及微观结构数据, 并提供关于鳃丝和鳃小片上皮扁平上皮细胞和离子细胞超微结构的相关信息, 为高速游动鱼类鳃的组织学特征与其高速游动习性关系提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2021 年 8 月, 于中国南海(17°24'N, 110°36'E)利用延绳钩采集黄鳍金枪鱼幼鱼和成鱼, 共采集 3 尾幼鱼(叉长 36.34 cm±3.63 cm; 体重 0.96 kg±0.15 kg), 3 尾成鱼(叉长 119.94 cm±7.03 cm; 体重 30.42 kg±4.74 kg)。黄鳍金枪鱼幼鱼用 1 g/L 的 MS-222 (纯度 98%, 购于上海麦克林生化科技有限公司)麻醉 30 s, 成鱼直接放血。

1.2 整鳃观察

黄鳍金枪鱼经过前期处理后, 首先用剪刀小心剪取完整的鳃结构, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)轻轻冲洗表面物质, 随后置于干净白磁盘中拍照观察。

1.3 光学显微镜和成像

剪取黄鳍金枪鱼第一对鳃用于形态特征分析。幼鱼和成鱼经过前期处理后, 5 min 之内完成鳃的采集工作。首先剪取长为 2 cm 的鳃, 在 4% 多聚甲醛固定液中固定 24 h 后, 将鳃弓转移至 EDTA 脱钙液中进行恒温摇床脱钙。随后鳃丝和鳃弓转移到 75%乙醇中, 进行梯度乙醇(75%,

85%, 90%, 95%, 100%)逐级脱水, 再二甲苯中透明, 并浸渍和包埋在石蜡中。随后冷冻切割制成 4 μm 切片, 将其放置于载玻片上进行苏木精-伊红染色, 并通过 Nikon Eclipse E100 (尼康, 日本)正置光学显微镜对鳃的形态结构进行观察, 使用 Nikon DS-U3(尼康, 日本)成像。

1.4 扫描电镜制片

剪取黄鳍金枪鱼第二对鳃用于鳃表面超微结构分析。取面积大小为 2 mm² 的鳃于 2.5%的戊二醛固定液(pH 7.4) 4 °C 条件下固定过夜, 并通过 1%锇酸(pH 7.4)室温避光进行 2 h 的后固定。随后取出样本通过 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗, 样本依次 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇脱水, 并使用 Quorum K850 临界点干燥仪进行干燥, 然后用离子溅射仪涂覆样本并使用 HITACHI SU8100 扫描电子显微镜在真空模式下对鳃表面超微结构进行成像。

1.5 透射电镜样品制备

剪取幼鱼和成鱼第二对鳃用于鳃小片内部超微结构分析。取鳃时尽量减小牵拉、挫伤与挤压等机械损伤。在 1~3 min 取样, 鳃样本面积为 1 mm²。然后将其固定在 2.5%戊二醛固定液中, 在 4 °C 下保存过夜, 并在 1%锇酸(pH 7.4)中进行 2 h 后固定。取出样本后每隔 15 min 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗, 共 3 次。然后在室温条件下梯度乙醇(30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%)脱水, 渗透包埋于树脂块中, 从每个鳃样本块中切下大小为 60~80 nm 的切片。最后, 经 2.6%柠檬酸铅溶液和 2%醋酸铀饱和乙醇溶液双重染色后, 利用 HITACHI HT7800 型透射电子显微镜观察鳃小片内部超微结构特征并成像。

1.6 数据分析

用图像分析软件 ImageJ (National Institutes of Health, 美国)测量黄鳍金枪鱼幼鱼和成鱼鳃耙长度、范围, 细胞直径。并利用软件统计分析鳃小片片层距离、片层密度、斜向角度和内外缘通道厚度, 实验数据以平均值±标准差(mean±SD)表示。

采用单因素方差分析(one-way ANOVA)来检验黄鳍金枪鱼幼鱼和成鱼鳃之间的显著性, 差异显著度为 $P<0.05$ 。使用 IBM SPSS statistics²³ 统

计软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 黄鳍金枪鱼鳃的形态结构特征

黄鳍金枪鱼幼鱼和成鱼均可观察到 4 对全鳃, 每一对鳃包括鳃弓(gill arch, GA)、鳃丝(filament, F)和鳃耙(gill raker, GR)三部分(图 1)。幼鱼及成鱼的鳃弓呈乳白色, 表面存在棘状小刺。在鳃弓上的鳃间隔两侧有丝状突起, 即鳃片。黄鳍金枪鱼

可观察到前后两个鳃片, 鳃片由无数平行排列的鳃丝组成。幼鱼及成鱼的鳃丝呈鲜红色, 成鱼鳃丝存在明显的融合现象(图 1a, b)。幼鱼及成鱼鳃丝两侧依次紧密排列着许多薄片状突起, 即鳃小片(lamellae)。鳃耙位于鳃弓的凹陷侧, 呈长锥形, 质地坚硬, 幼鱼第一鳃弓鳃耙长度范围为 1.2~2.7 cm, 鳃耙间距为 0.21~0.26 cm (图 1a); 成鱼第一鳃弓鳃耙长度范围为 2.1~4.2 cm, 间距为 0.42~0.89 cm (图 1b)。

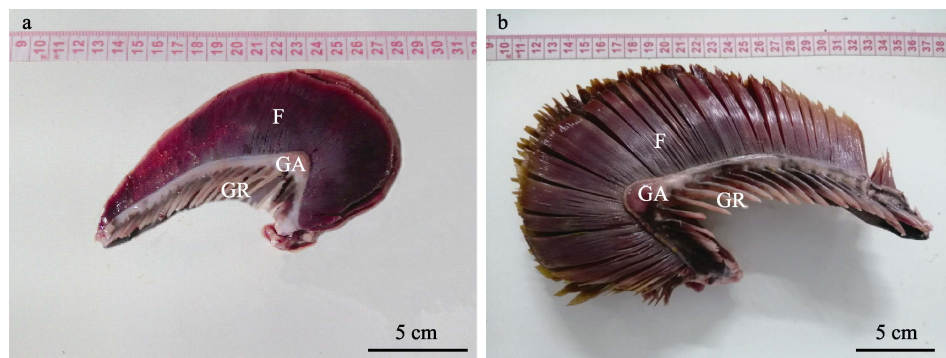


图 1 黄鳍金枪鱼幼鱼(a)及成鱼鱼鳃(b)

F: 鳃丝; GA: 鳃弓; GR: 鳃耙。

Fig. 1 The gills of juvenile(a) and adult(b) in *Thunnus albacares*
F: filament; GA: gill arch; GR: gill raker.

光镜结果表明, 黄鳍金枪鱼幼鱼及成鱼鳃丝顶端均呈现一定的弯曲(图 2a, a₁)。鳃丝顶端表层和上层存在大量的杯状细胞(goblet cell, GC), 这些细胞疏松地分布于上皮细胞之间, 细胞呈上大下小的形态, 似高脚杯状, 细胞核集中在细胞基部, 呈空泡状(图 2b, 图 2b₁)。幼鱼杯状细胞直径范围为 3.73~10.78 μm (图 2b), 成鱼杯状细胞直径范围为 5.67~14.47 μm (图 2b₁)。鳃丝顶端上皮细胞广泛分布(图 2), 该细胞呈现多种形态, 如扁平、椭圆等, 细胞核较大, 占细胞一半以上(图 2b, b₁)。

幼鱼及成鱼鳃丝中部均存在层间融合和片层融合(图 2c, 图 2c₁)。此外, 中部存在多种细胞的集合。其中, 扁平上皮细胞(pavement cell, PVC)广泛分布于鳃丝和鳃小片的表层, 细胞呈扁平状(图 2d, d₁)。血细胞(blood cells, BC)分布于鳃小片基底膜内侧的血管中。柱细胞(pillar cell, PC)是支持细胞的一种, 两端附着在基底膜上, 分布于鳃小片血管之间(图 2d, d₁)。

鳃弓处骨骼呈圆弧形, 其间充斥着大量的软骨细胞(chondrocyte)。软骨细胞椭圆形, 单个分布, 细胞核为椭圆形或圆形。成鱼鳃弓处的软骨细胞分布较幼鱼密集(图 2e, e₁)。鳃耙呈锯齿状整齐排列, 骨基质为其主要组成成分。幼鱼鳃耙上分布有成骨细胞(osteoblasts, OB)和骨细胞(osteocytes, OC)。成骨细胞位于骨基质边缘, 细胞呈梭形排列, 细胞核位于细胞的一端, 核仁明显。钙化骨基质中存在骨细胞, 细胞呈椭圆形突起, 骨细胞内陷形成一个独立的椭圆形腔室, 被称为骨陷窝(bone lacuna, BL) (图 2f)。成鱼鳃耙上存在大量的结缔组织(图 2f₁), 其细胞类型为成纤维细胞和纤维细胞。

2.2 黄鳍金枪鱼鳃的表面超微结构

通过扫描电镜观察, 发现黄鳍金枪鱼幼鱼鳃丝边缘薄, 在鳃丝顶端观察到鳃小片(图 3a); 成鱼鳃丝边缘较厚, 鳃丝顶端无鳃小片分页, 且存在大量的上皮细胞粘连(图 3b)。黄鳍金枪鱼鳃小

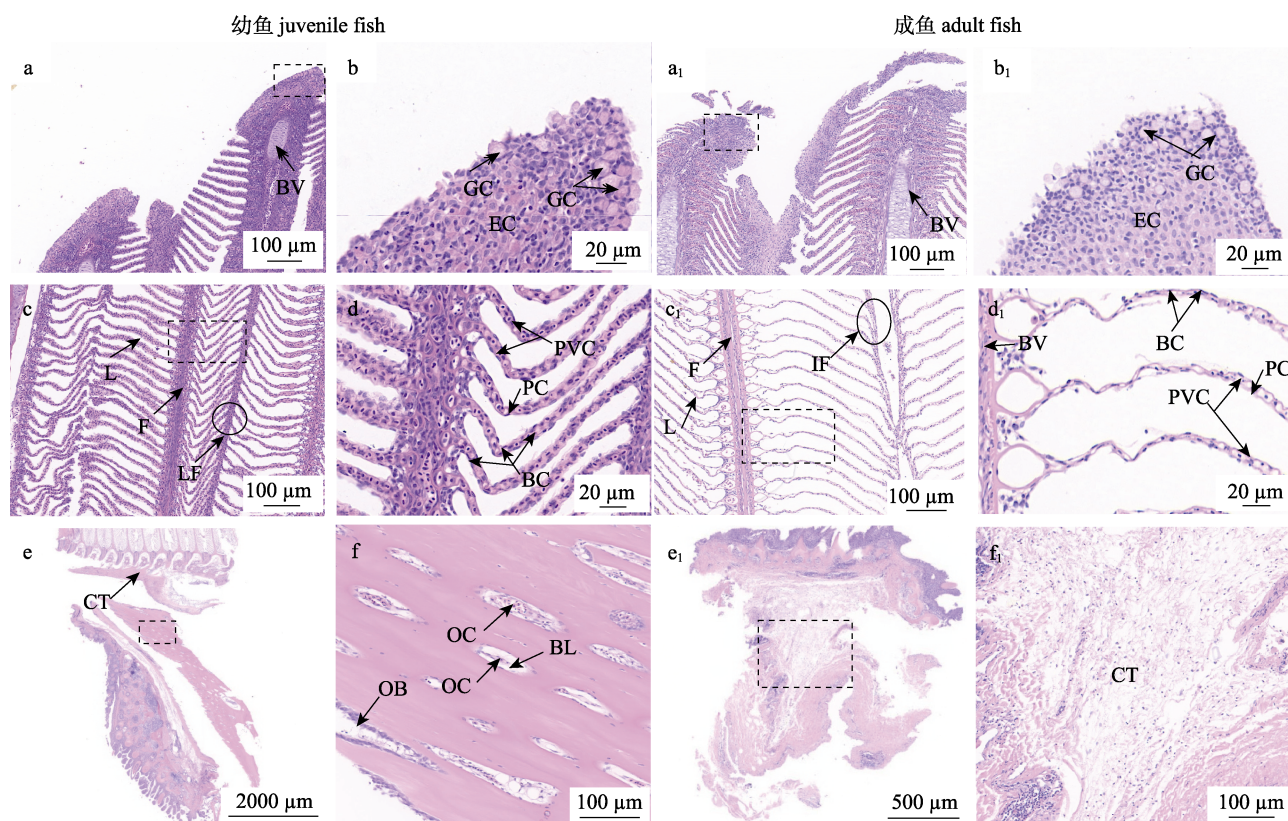


图 2 黄鳍金枪鱼鳃的光学显微镜图

a, a₁: 鳃丝顶端; b, b₁: a, a₁ 的局部放大; c, c₁: 鳃丝中部; d, d₁: c, c₁ 的局部放大;

e, e₁: 鳃弓鳃耙; f, f₁: 鳃耙局部放大。所示结果切片方向为纵切。

BC: 血细胞; BL: 骨陷窝; BV: 血管; CT: 结缔组织; EC: 上皮细胞; F: 鳃丝;

GC: 杯状细胞; IF: 层间融合; L: 鳃小片; LF: 片层融合; OB: 成骨细胞; OC: 骨细

胞; PC: 柱细胞; PVC: 扁平上皮细胞。

Fig. 2 Light microscopy images of the gills in *Thunnus albacares*

a, a₁: the tip of filament; b, b₁: the magnified views of a, a₁; c, c₁: the middle part of filament;

d, d₁: the magnified views of c, c₁; e, e₁: gill arch and gill raker; f, f₁: the magnified views of gill raker.

The section directions shown are longitudinal sections. BC: blood cells; BL: bone lacuna;

BV: blood vessels; CT: connective tissue; EC: epithelium cell; F: filament; GC: goblet cell;

IF: inter-lamellae fusion; L: lamellae; LF: lamellae fusion; OB: osteoblasts;

OC: osteocytes; PC: pillar cell; PVC: pavement cell.

片呈矩形, 有规则地排列于鳃丝两侧。幼鱼和成鱼鳃小片末端均存在层间融合, 其上覆盖着大量的扁平上皮细胞(图 3c, d)。相邻鳃丝之间的鳃小片末端通过扁平上皮细胞连接在一起, 形成片层融合(图 3c)。

黄鳍金枪鱼鳃小片处血流为斜向层状血流模式。首先, 传入鳃丝动脉(afferent filamental artery, AFA)的血液由鳃丝沿着鳃小片的外缘通道(outer marginal channels, OMCs)进入片层, 到达毛细血管, 在此进行气体交换, 然后以相对片层成一定角度斜向穿出片层, 穿出片层的血液由内缘通道

(inner marginal channel, IMC)汇集到传出鳃丝动脉(efferent filamental artery, EFA) (图 3e, f)。幼鱼和成鱼的血流角具有显著差异($P < 0.05$, 表 1)。相比幼鱼, 成鱼鳃小片的外缘通道和内缘通道显著增厚($P < 0.05$)。

对黄鳍金枪鱼鳃进行测量, 发现其片层密度较高(一般鱼类片层密度为 15~25 片/mm), 幼鱼片层密度可达 45 片/mm。与幼鱼相比, 成鱼鳃小片的片层距离显著增大($P < 0.05$, 表 1)。幼鱼和成鱼的鳃小片厚度也存在显著性差异, 幼鱼鳃小片厚度显著小于成鱼($P < 0.05$)。

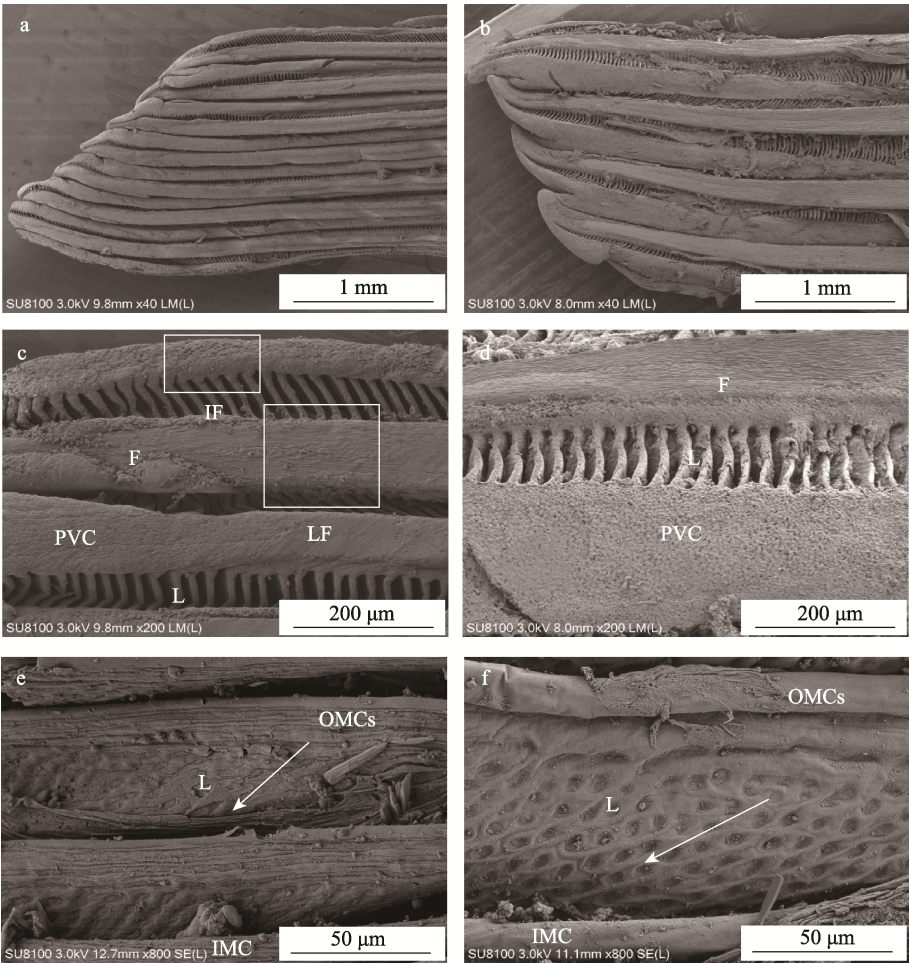


图 3 黄鳍金枪鱼鳃的扫描电镜图

a: 幼鱼鳃丝顶端; b: 成鱼鳃丝顶端; c: 幼鱼鳃小片; d: 成鱼鳃小片; e: 幼鱼血流模式; f: 成鱼血流模式. 所示结果切片方向为纵切.
F: 鳃丝; IF: 层间融合; IMC: 内边缘通道; L: 鳃小片; LF: 片层融合; OMCs: 外边缘通道; PVC: 扁平上皮细胞; 箭头表示血流途径.

Fig. 3 Scanning electron microscopy images of the gills in *Thunnus albacares*
a: the tip of filament of juvenile fish; b: the tip of filament of adult fish; c: lamellae of juvenile fish; d: lamellae of adult fish; e: microvascular-cast gill lamellae from juvenile fish; f: microvascular-cast gill lamellae from adult fish. The section directions shown are longitudinal sections.
F: filament; LF: lamellae fusion; IMC: inner marginal channel; L: lamellae; IF: inter-lamellae fusion; OMCs: outer marginal channels; PVC: pavement cell; white arrows indicate the pathway of blood flow.

表 1 黄鳍金枪鱼幼鱼和成鱼鳃相关数据的测量

Tab. 1 Measurement of gill-related data of juvenile and adult in *Thunnus albacares*

$n = 3; \bar{x} \pm SE$

	层间距离/ μm interlamellar distances	片层密度(片/mm) lamellar densities	鳃小片厚度/ μm lamellar thickness	血流角 blood-flow angle	外缘通道/ μm outer marginal channels	内缘通道/ μm inner marginal channel
黄鳍金枪鱼幼鱼 juvenile yellowfin tuna	12.65 ± 0.44^a	43–45	8.40 ± 0.46^a	$48.39^\circ \pm 1.04^{oa}$	17.87 ± 0.63^a	14.05 ± 0.58^a
黄鳍金枪鱼成鱼 adult yellowfin tuna	15.75 ± 0.50^b	33–35	10.13 ± 0.25^b	$66.04^\circ \pm 2.87^{ob}$	21.70 ± 0.44^b	15.89 ± 0.54^b

注: 同一列的不同上标表明, 幼鱼和成鱼鳃的相关数据存在显著差异($P < 0.05$).
Note: Different superscripts in the same column indicate that there are significant differences in gills data between juvenile and adult fish ($P < 0.05$).

进一步对黄鳍金枪鱼幼鱼及成鱼鳃丝和鳃小片上的扁平上皮细胞和离子细胞进行观察,发现幼鱼及成鱼鳃丝和鳃小片表面布满了扁平上皮细胞,这些细胞紧密排列但间隙明显,细胞表面具有大量的环形微嵴结构,无规则分布,微嵴之间间隙不一,进而形成棱形或方形的迷宫状纹路(图 4a, b)。幼鱼扁平上皮细胞长径范围为 6.75~11.13 μm , 短径范围为 3.88~5.53 μm (图 4c); 成鱼扁平上皮细胞长径范围为 6.87~10.57 μm , 短径

范围为 3.05~4.94 μm (图 4d)。成鱼扁平上皮细胞长宽比大于幼鱼。对于离子细胞来说,其与扁平上皮细胞紧密相连,形成相对不透离子的屏障。离子细胞与扁平上皮细胞顶端接口处存在一小开口,该顶端开口将细胞与外界环境连接(图 4e, f)。幼鱼离子细胞顶膜开口具有突起的微绒毛结构,突起部分所占面积较小(图 4e); 成鱼离子细胞顶端狭长而凹陷,顶端边缘具有许多细小颗粒,相较表面边缘,中间凹陷处占比小(图 4f)。

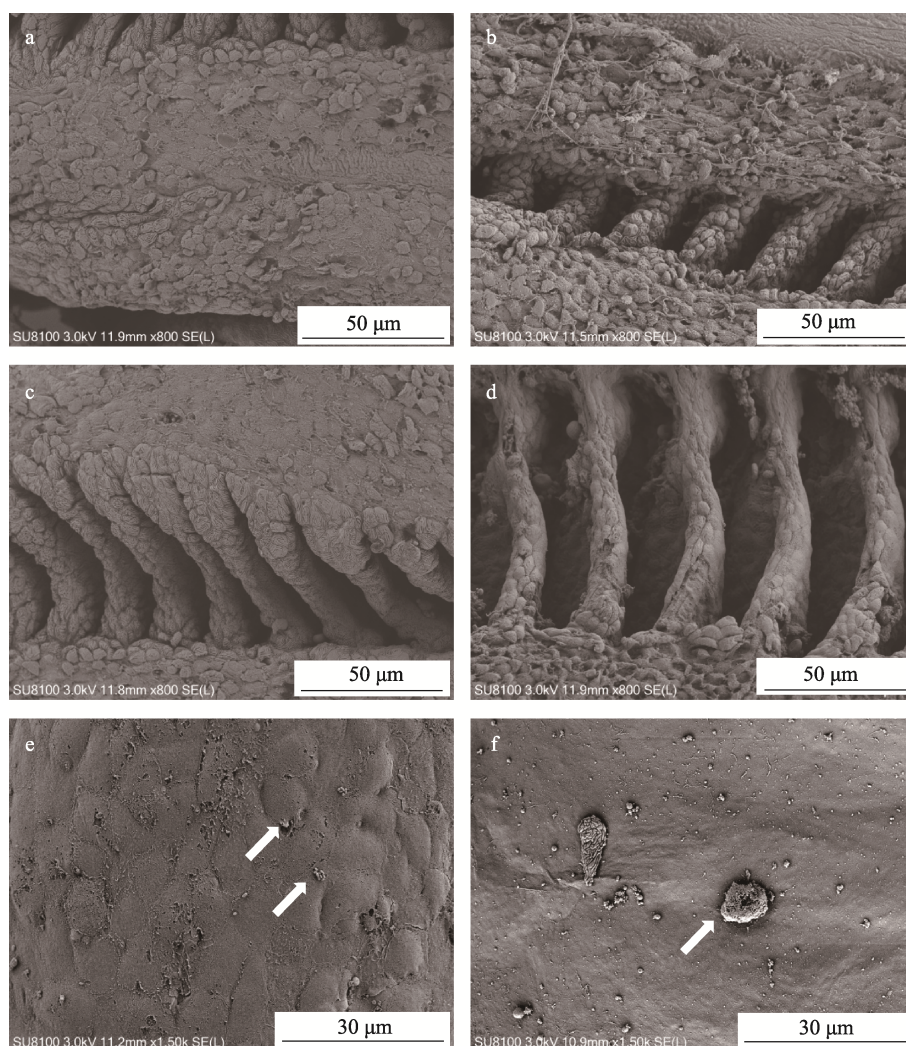


图 4 通过扫描电镜观察黄鳍金枪鱼鳃中的扁平上皮细胞(PVC)和离子细胞

a: 幼鱼鳃丝扁平上皮细胞; b: 成鱼鳃丝扁平上皮细胞; c: 幼鱼鳃小片扁平上皮细胞;

d: 成鱼鳃小片扁平上皮细胞; e, f: 幼鱼、成鱼离子细胞; 箭头所示为离子细胞。所示结果切片方向为纵切。

Fig. 4 Scanning electron microscopy images of pavement cell (PVC) and ionocyte in the gills of *Thunnus albacares*

a: pavement cell of filament in juvenile fish; b: pavement cell of filament in adult fish;

c: pavement cell of lamellae in juvenile fish; d: pavement cell of lamellae in adult fish;

e, f: ionocyte of juvenile and adult fish; white arrow shows the ionocyte.

The section directions shown are longitudinal sections.

2.3 鳃小片内部超微结构

利用透射电镜观察,发现黄鳍金枪鱼幼鱼及成鱼鳃小片内部细胞主要有扁平上皮细胞、离子细胞、柱细胞、血细胞(图 5a, b)。此外,鳃小片还存在庞大的毛细血管,允许血细胞通过血管腔。扁平上皮细胞覆盖于整个鳃小片的表面,细胞质内有高尔基体、内质网、溶酶体等物质。幼鱼的远位扁平上皮细胞扁长,近位扁平上皮细胞呈椭圆形,细胞质密度低(图 5c);成鱼扁平上皮细

胞多为长椭圆形,细胞质内物质密度较高(图 5d)。

离子细胞主要分布于鳃小片的基部和表面。细胞质中有大量线粒体,线粒体形态多样。此外,细胞中还有内质网、微管系统以及一些液泡。细胞核位于细胞的一端。细胞核大且呈圆形或椭圆形(图 5e, f)。离子细胞与外界环境接触的表面顶端开口处凹陷,在幼鱼和成鱼中均可观察到丰富的管状-卵泡系统(图 5e, f)。幼鱼鳃小片中离子细胞大,线粒体分布较分散,细胞质密度低,较明

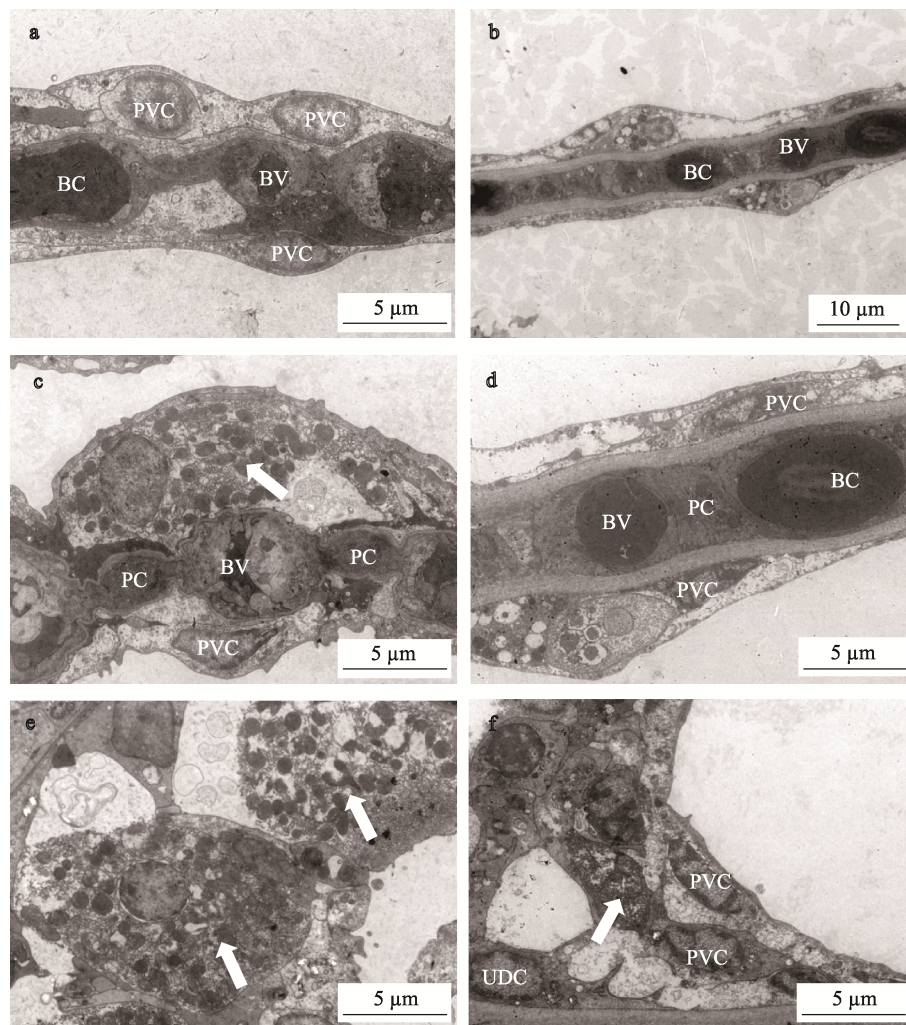


图 5 黄鳍金枪鱼鳃小片的透射电镜观察

a, b: 幼鱼、成鱼鳃小片结构; c, d: 幼鱼、成鱼鳃小片中部; e, f: 幼鱼、成鱼鳃小片基部.

BC: 血细胞; BV: 血管道; PC: 柱细胞; PVC: 扁平上皮细胞; UDC: 未分化细胞;

箭头所示为离子细胞. 所示结果切片方向为纵切.

Fig. 5 Transmission electron microscopy images of lamellae in *Thunnus albacares*

a, b: the lamellae of juvenile and adult fish; c, d: the middle part of lamellae of juvenile and adult fish; e, f: the base part of lamellae of juvenile and adult fish.

BC: blood cells; BV: blood vessels; PC: pillar cell; PVC: pavement cell; UDC: undifferentiated cell; white arrow shows the ionocyte. The section directions shown are longitudinal sections.

亮(图 5c, e); 成鱼离子细胞小, 线粒体分布密集, 细胞质密度较高, 较灰暗(图 5f)。

鳃小片通过基底膜将内外分隔开, 中间分布有大量的微血管系统(图 5c, d)。鳃小片的血管腔大小不同, 小的血管腔只能通过一个红细胞, 大的血管腔可同时容纳多个红细胞, 血管腔的左右包裹着血管内皮细胞, 形成血管内壁, 是血管腔内血液和其他血管壁的接口。幼鱼和成鱼血管腔大小无明显差别。柱细胞呈圆柱状, 分布在血管腔周围, 支持血管系统, 在电镜下观察到柱细胞与血管腔相间分布(图 5c, d)。

黄鳍金枪鱼鳃中存在一种未分化细胞, 是扁平上皮细胞、离子细胞等功能细胞的母体。鳃小片基部可见未分化细胞。细胞呈椭圆形, 细胞核大, 核质比大。靠近细胞表面的细胞质密度较高。细胞内可观察到内质网、溶酶体、囊泡以及液泡等细胞器(图 5f)。

3 讨论

3.1 幼鱼和成鱼鳃形态结构与生活习性

鱼鳃的形态结构与其生活习性密切相关。黄鳍金枪鱼具有四对全鳃, 与欧洲无须鳕(*Merluccius merluccius*)、金头鲷(*Sparus aurata* L.)等硬骨鱼的鳃结构一样^[20-22]。本研究, 黄鳍金枪鱼幼鱼和成鱼第一鳃弓鳃耙可观察到长的鳃耙, 而第二到第四鳃弓鳃耙未见明显的鳃耙结构, 只在鳃弓底下见棘状突起, 这与欧洲鳕鳃弓鳃耙结构类似^[20]。由于黄鳍金枪鱼能量需求高, 而自然资源有限, 因此其捕食种类具有广泛性^[23-24]。第一鳃弓鳃耙上长的鳃耙结构可能起到捕食作用, 通过长的鳃耙可以准确的捕食多样性的猎物^[24-26]。相对黄鳍金枪鱼幼鱼, 成鱼鳃耙更长并更加坚硬(图 1), 坚硬的鳃耙结构可在较短时间内消化食物, 满足高的能量需求^[24]。此外, 黄鳍金枪鱼鳃弓鳃耙以及鳃丝均存在大量的黏液, 可能参与润滑、帮助食物顺利通过咽部以保护上皮免受机械损伤^[25]。

本研究发现, 黄鳍金枪鱼鳃小片呈矩形结构, 很好地适应了高速水流的冲击, 保持鳃结构的完整性^[27-29]。同时, 矩形片层也可显著减小鳃小片的厚度, 有助于形成极薄的片层^[27], 但本研究中

鳃小片的厚度较厚(一般高速游泳鱼类的片层厚度为 5~6 μm ^[29]), 因本次采样时间为 8 月份, 推测受夏季生存环境影响, 使黄鳍金枪鱼易于感染寄生虫、细菌等, 进而使得鳃形态发生变化。本研究中, 黄鳍金枪鱼具有高的片层密度(>30 片/mm, 幼鱼可达 45 片/mm), 而一些中等活动海洋鱼类片层密度在 15~25 片/mm, 高的片层密度可以通过减缓水流速度和最大限度地减少生理死角来提高气体传输效率^[28,30-31]。相比成鱼, 黄鳍金枪鱼幼鱼层间距离小, 鳃小片厚度薄, 拥有高的片层密度(表 1), 推测是幼年时期鳃的组织还未发育完全, 未能很好地进行氧的输送, 通过增加片层密度可以提高幼鱼的气体传输效率。此外, 黄鳍金枪鱼鳃小片上存在斜向血流模式。本研究中黄鳍金枪鱼成鱼血流角可达 $66.04^\circ \pm 2.87^\circ$; 而在其他较慢游泳鱼类, 如鲆鳎(*Coryphaena hippurus*)、沙氏刺鲃(*Acanthocybium solandri*)等鱼类中未发现该种血流模式^[32]。该血流模式极大地降低了片层血管阻力, 加快了血流速度, 进一步促进了气体交换^[18]。黄鳍金枪鱼成鱼血流角更大, 可能是由于其有更大的氧需求, 以满足自身持续游动的需要。本研究中, 黄鳍金枪鱼的鳃小片存在片层融合和层间融合, 该现象在金枪鱼属(如大西洋蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、太平洋蓝鳍金枪鱼(*Thunnus orientalis*)、青干金枪鱼(*Thunnus tonggol*)等)以及鲹(*Katsuwonus pelamis*)和鲐(*Euthynnus affinis*)的鳃中均有发现^[18,33]。在黄鳍金枪鱼幼年时期该融合现象已存在, 且随着个体的发育, 鳃小片的融合并未发生太大变化^[18,34]。片层融合和层间融合相互支撑, 防止在高速水流冲击下黄鳍金枪鱼鳃的变形。黄鳍金枪鱼鳃复杂的形态结构以及幼鱼和成鱼时期鳃的差异变化为与其觅食以及在高速水流中的生活习性相适应, 支撑了金枪鱼的高速游泳。

3.2 扁平上皮细胞与功能

扁平上皮细胞是鳃表面上皮主要的细胞, 占鳃上皮表面积的 90%以上, 主要行使气体交换的功能^[1]。扁平上皮细胞顶膜存在微绒毛或微脊, 不同物种之间细胞顶膜形态具有不同的排列^[35]。本研究发现, 黄鳍金枪鱼鳃扁平上皮细胞存在环状

微脊和凹陷结构, 这种结构增加了鳃小片的呼吸表面积, 促进水分子的机械黏附, 提高了高速水流冲击下鱼鳃的气体交换效率; 此外, 该结构可将粘液锚定到细胞表面, 减少游动过程中水流的阻力。同时, 微脊结构作为一层保护膜, 可防止外界物质进入鱼体, 起到保护作用^[1]。本研究黄鳍金枪鱼成鱼扁平上皮细胞长椭圆形的细胞结构可以容纳更多数量的细胞器, 更好的发挥功能作用。除了气体交换、保护功能外, 扁平上皮细胞在其他硬骨鱼中还发现具有离子吸收以及酸碱平衡等功能^[36]。例如, 褐首鲈(*Ictalurus nebulosus*) 鳃的扁平上皮细胞的顶膜附近有星状排列的 V-ATPase 小泡, 具有离子调节的作用^[37]。而虹鲢(*Onchorynchus mykiss*) 和红罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*) 的扁平上皮细胞在钠摄取和酸排放中起到积极作用^[38-40]。本研究中, 黄鳍金枪鱼扁平上皮细胞本身排列紧密, 且与相邻细胞广泛连接, 此结果与底鳉(*Fundulus heteroclitus*)、白斑角鲨(*Squalus acanthias*)、大西洋盲鳗(*Myxine glutinosa*) 的分布类似^[41-42], 这使得鳃表面形成一个不透离子的屏障, 控制离子进出细胞。因此, 黄鳍金枪鱼鳃扁平上皮细胞的不同功能为其在多变的海环境生存呼吸提供了保障。

3.3 离子细胞与渗透调节

离子细胞是高度专门化、极化的卵圆形细胞, 具有明显的离子转运细胞超微结构特征, 即细胞质中存在高密度的线粒体, 它们分布在广泛而发达的管状-卵泡系统(tubular-vesicular system)上, 密集的管状网络与基底外侧膜相连, 导致细胞顶端发生内陷, 形成顶端开口^[43-44]。这些管状系统遍布细胞质的大部分, 该系统还是 Na^+/K^+ -ATPase 的表达位点, 间接刺激细胞排放 NaCl ^[45]。本研究中, 黄鳍金枪鱼鳃离子细胞中存在大量的线粒体, 可产生 ATP 用于离子转运过程的能量供给。幼鱼离子细胞顶端开口为微绒毛, 开口处被扁平上皮细胞覆盖, 仅可见细小的一部分; 成鱼离子细胞顶膜为小坑状结构, 开口较大, 离子细胞顶端暴露的微绒毛和内陷的小坑以极高的速度进行 NaCl 排放, 这是黄鳍金枪鱼可能的离子运输的调节机制^[34], 与欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*) 和

褐首鲈的研究结果一致^[46-48]。本研究中, 黄鳍金枪鱼鳃离子细胞顶端与扁平上皮细胞紧密连接, 形成屏障, 使离子不能随意进出^[49], 进而保持自身的低渗性和低离子性; 鳃离子细胞顶端与辅助细胞之间连接不紧密, 为离子外流提供途径, 如 Na^+ 的排出^[49-50]。有学者认为, 幼鱼鳃在行使呼吸功能之前已具备离子调节功能, 但还没有确切的证据证明^[51]。Muir 等^[33]观察了黄鳍金枪鱼幼鱼离子细胞在不同发育时期的分布和形态, 发现标准体长(standard length, SL) <3.3 cm 时, 离子细胞大量分布于皮肤上, 行使渗透调节功能, 少量分布于鳃; SL>3.3 cm 之后, 鳃离子细胞顶端形态发生变化, 由微绒毛状的大开口转变成小坑状, 渗透调节部位由皮肤转向鳃。SL>3.3 cm 时, 鳃小片才开始出现。这表明, 黄鳍金枪鱼的鳃首先发挥离子调节功能再行使气体交换功能。黄鳍金枪鱼作为海洋高速游泳鱼类, 幼鱼鳃中首先出现的离子细胞为鱼体早期代谢发育提供了保障, 细胞中大量的线粒体为离子转运蛋白提供了能量, 同时为黄鳍金枪鱼的高速游动提供大量的能量。

4 结论

本研究利用光镜和电镜技术, 探究了黄鳍金枪鱼幼鱼和成鱼鳃的形态结构。研究发现, 幼鱼和成鱼鳃片层距离、片层密度等数据存在显著差异, 这些数据明确了幼鱼和成鱼之间存在明显的不同, 也是黄鳍金枪鱼适应高速水流冲击的结果。我们从表观到微观观察鳃的结构, 发现扁平上皮细胞大量覆盖于鳃表面, 离子细胞在幼鱼时期就已存在。此外, 扁平上皮细胞主要承担的呼吸功能以及离子细胞所承担的离子调节功能为黄鳍金枪鱼的高速游泳提供了能量保障。我们的研究结果丰富了黄鳍金枪鱼幼鱼和成鱼鳃的基础数据, 为研究高速游泳鱼类鳃的组织学特征与其高速游动习性关系提供了基础依据。

参考文献:

- [1] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste[J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(1): 97-177.

- [2] Guh Y J, Hwang P P. Insights into molecular and cellular mechanisms of hormonal actions on fish ion regulation derived from the zebrafish model[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 251: 12-20.
- [3] Koppang E O, Kvellestad A, Fischer U. Fish Mucosal Immunity: Gill[M]//Mucosal Health in Aquaculture. Amsterdam: Elsevier, 2015: 93-133.
- [4] Plaul S E, Díaz A O, Barbeito C G. Gill morphology and morphometry of the facultative air-breathing armoured catfish, *Corydoras paleatus*, in relation on aquatic respiration[J]. *Journal of Fish Biology*, 2021, 99(4): 1318-1327.
- [5] Wright P A, Turko A J. Amphibious fishes: Evolution and phenotypic plasticity[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2016, 219(Pt 15): 2245-2259.
- [6] Turko A J, Cisternino B, Wright P A. Calcified gill filaments increase respiratory function in fishes[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2020, 287(1920): 20192796.
- [7] Long N P, Farina S C. Enormous gill Chambers of deep-sea coffinfishes (Lophiiformes: Chaunacidae) support unique ventilatory specialisations such as breath holding and extreme inflation[J]. *Journal of Fish Biology*, 2019, 95(2): 502-509.
- [8] Zhao F, Wu B B, Yang G, et al. Adaptive alterations on gill Na^+ , K^+ -ATPase activity and mitochondrion-rich cells of juvenile *Acipenser sinensis* acclimated to brackish water[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(2): 749-756.
- [9] Zhao F, Yang G, Zhang T, et al. Characters of morphology, distribution and quantity of branchial chloride cells of juvenile *Acipenser sinensis* acclimated in freshwater and brackish water[J]. *Marine Fisheries*, 2016, 38(1): 35-41. [赵峰, 杨刚, 张涛, 等. 淡水和半咸水条件下中华鲟幼鱼鳃上皮泌氯细胞的形态特征与数量分布[J]. *海洋渔业*, 2016, 38(1): 35-41.]
- [10] Monteiro S M, Oliveira E, Fontainhas-Fernandes A, et al. Fine structure of the branchial epithelium in the teleost *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of Morphology*, 2010, 271(5): 621-633.
- [11] Goss G G, Laurent P, Perry S F. Gill morphology during hypercapnia in brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*): Role of chloride cells and pavement cells in acid-base regulation[J]. *Journal of Fish Biology*, 1994, 45(5): 705-718.
- [12] Fridman S, Rana K J, Bron J E. Structural differentiation of apical openings in active mitochondria-rich cells during early life stages of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) as a response to osmotic challenge[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(5): 1101-1114.
- [13] Liu Y, Wen H S, Huang J S, et al. Histological and morphological observations of the gill and swim bladder development of *Lateolabrax maculatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(12): 2476-2484. [刘阳, 温海深, 黄杰斯, 等. 花鲈鳃与鳔器官发育的组织学与形态学观察[J]. *水产学报*, 2019, 43(12): 2476-2484.]
- [14] He T, Xiao Z Z, Liu Q H, et al. Ontogeny of the gill and Na^+ , K^+ -ATPase activity of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4): 520-525. [何滔, 肖志忠, 刘清华, 等. 条石鲷鳃的组织发育及鳃上钠钾三磷酸腺苷酶活性的早期变化[J]. *水产学报*, 2013, 37(4): 520-525.]
- [15] Rombough P. The functional ontogeny of the teleost gill: Which comes first, gas or ion exchange? [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 148(4): 732-742.
- [16] Sun R X, Sun Y, Xie X D, et al. Bioaccumulation and human health risk assessment of DDT and its metabolites (DDTs) in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and their prey from the South China Sea[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, 158: 111396.
- [17] FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2020[R]. FAO Fisheries Report, 2020: 6-8.
- [18] Wegner N C. Morphology, function, and evolution of the gills of high-performance fishes[J]. California Sea Grant College Program, 2009: 54-65.
- [19] Wegner Nicholas C S C A G J B. Gill specializations in high-performance pelagic teleosts, with reference to striped marlin (*Tetrapturus audax*) and wahoo (*Acanthocybium solandri*)[J]. *Bulletin of Marine Science*, 2006, 79(3): 747-759.
- [20] Hanafy B G. Morphological studies on the gills of the European Hake (*Merluccius merluccius*, Linnaeus, 1758)[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2020, 83(5): 531-540.
- [21] Xiang Q Q, Ding L Y, Zhang C, et al. Histology and ultrastructure of the gill in the teleost *Schizothorax nukiangensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(6): 1183-1193. [向乾乾, 丁刘勇, 张超, 等. 怒江裂腹鱼鳃的显微和超微结构[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(6): 1183-1193.]
- [22] Elsheikh E H. Scanning electron microscopic studies of gill Arches and rakers in relation to feeding habits of some fresh water fishes[J]. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 2013, 66(3): 121-130.
- [23] Varghese S P, Somvanshi V S. Feeding ecology and consumption rates of yellowfin tuna *Thunnus albacares* (Bonnaterre, 1788) in the eastern Arabian Sea[J]. *Indian Journal of Fisheries*, 2016, 63(1): 16-26.
- [24] Olson R J, Duffy L M, Kuhnert P M, et al. Decadal diet shift in yellowfin tuna *Thunnus albacares* suggests broad-scale

- food web changes in the eastern tropical Pacific Ocean[J]. Marine Ecology Progress Series, 2014, 497: 157-178.
- [25] Kumari U, Yashpal M, Mittal S, et al. Morphology of the pharyngeal cavity, especially the surface ultrastructure of gill Arches and gill rakers in relation to the feeding ecology of the catfish *Rita rita* (*Siluriformes*, Bagridae)[J]. Journal of Morphology, 2005, 265(2): 197-208.
- [26] Smith J C, Sanderson S L. Mucus function and crossflow filtration in a fish with gill rakers removed versus intact[J]. The Journal of Experimental Biology, 2007, 210(Pt 15): 2706-2713.
- [27] Hughes G M. Morphological measurements on the gills of fishes in relation to their respiratory function[J]. Folia Morphologica, 1970, 18(2): 78-95.
- [28] Hughes G M, Morgan M. The structure of fish gills in relation to their respiratory function[J]. Biological Reviews, 1973, 48(3): 419-475.
- [29] Wegner N C. Ventilation and animal respiration gill respiratory morphometrics[J]. Encyclopedia of Fish Physiology, 2011, 225: 803-811.
- [30] Hughes G M. The dimensions of fish gills in relation to their function[J]. The Journal of Experimental Biology, 1966, 45(1): 177-195.
- [31] Hughes G M. Morphometrics of fish gills[J]. Respiration Physiology, 1972, 14(1-2): 1-25.
- [32] Muir B S, Brown C E. Effects of blood pathway on the blood-pressure drop in fish gills, with special reference to tunas[J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1971, 28(7): 947-955.
- [33] Muir B S, Kendall J I. Structural modifications in the gills of tunas and some other oceanic fishes[J]. Copeia, 1968, 1968(2): 388.
- [34] Kwan G T, Wexler J B, Wegner N C, et al. Ontogenetic changes in cutaneous and branchial ionocytes and morphology in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) larvae[J]. Journal of Comparative Physiology B, 2019, 189(1): 81-95.
- [35] Leguen I. Gills of the medaka (*Oryzias latipes*): A scanning electron microscopy study[J]. Journal of Morphology, 2018, 279(1): 97-108.
- [36] Wood C M, Pelster B, Giacomini M, et al. The transition from water-breathing to air-breathing is associated with a shift in ion uptake from gills to gut: A study of two closely related erythrinid teleosts, *Hoplerethrinus unitaeniatus* and *Hoplias malabaricus*[J]. Journal of Comparative Physiology B, 2016, 186(4): 431-445.
- [37] Laurent P, Goss G G, Perry S F. Proton pumps in fish gill pavement cells? [J]. Archives Internationales De Physiologie, De Biochimie et De Biophysique, 1994, 102(1): 77-79.
- [38] KÜml, Ltz D, Somero G. Osmotic and thermal effects on *in situ* ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*[J]. The Journal of Experimental Biology, 1995, 198(Pt 9): 1883-1894.
- [39] Reid S D, Hawkings G S, Galvez F, et al. Localization and characterization of phenamil-sensitive Na⁺ influx in isolated rainbow trout gill epithelial cells[J]. The Journal of Experimental Biology, 2003, 206(Pt 3): 551-559.
- [40] Sullivan G, Fryer J, Perry S. Immunolocalization of proton pumps (H⁺-ATPase) in pavement cells of rainbow trout gill[J]. The Journal of Experimental Biology, 1995, 198(Pt 12): 2619-2629.
- [41] Bartels H. The gills of hagfishes[M]//The Biology of Hagfishes. Dordrecht: Springer Netherlands, 1998: 205-222.
- [42] Maina J N, Icardo J M, Zaccane G, et al. Immunohistochemical and ultrastructural study of the immune cell system and epithelial surfaces of the respiratory organs in the bimodally breathing African sharp-toothed catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822)[J]. Anatomical Record (Hoboken, N J: 2007), 2022: 2022Feb9.
- [43] Monteiro S M, Oliveira E, Fontainhas-Fernandes A, et al. Fine structure of the branchial epithelium in the teleost *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of Morphology, 2010, 271(5): 621-633.
- [44] McCormick S D, Regish A M, Christensen A K. Distinct freshwater and seawater isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon[J]. The Journal of Experimental Biology, 2009, 212(Pt 24): 3994-4001.
- [45] Hiroi J, McCormick S D. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish[J]. Respiratory Physiology & Neurobiology, 2012, 184(3): 257-268.
- [46] Goss G G, Laurent P, Perry S F. Evidence for a morphological component in acid-base regulation during environmental hypercapnia in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*)[J]. Cell and Tissue Research, 1992, 268(3): 539-552.
- [47] Goss G G, Perry S F, Wood C M, et al. Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish[J]. Journal of Experimental Zoology, 1992, 263(2): 143-159.
- [48] Varsamos S, Diaz J, Charmantier G, et al. Location and morphology of chloride cells during the post-embryonic development of the European Sea bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. Anatomy and Embryology, 2002, 205(3): 203-213.
- [49] Wood C M, Eom J. The osmorepiratory compromise in the fish gill[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2021, 254: 110895.
- [50] Hsu H H, Lin L Y, Tseng Y C, et al. A new model for fish ion regulation: Identification of ionocytes in freshwater- and

seawater-acclimated medaka (*Oryzias latipes*)[J]. Cell and Tissue Research, 2014, 357(1): 225-243.

[51] Varsamos S, Nebel C, Charmantier G. Ontogeny of osmore-

gulation in postembryonic fish: A review[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2005, 141(4): 401-429.

Comparison of histological characteristics of the gills between juvenile and adult yellowfin tuna from the northern South China Sea

FU Wenya¹, ZOU Ying¹, LIU Fei¹, PAN Shuai¹, HUANG Hai², MA Zhenhua³, GUO Zhiqiang¹

1. College of Life Sciences, Hainan University; State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Haikou 570228, China;
2. Key Laboratory of Utilization and Conservation for Tropical Marine Bioresources; Hainan Key Laboratory for Conservation and Utilization of Tropical Marine Fishery Resources; College of Fisheries and Life Science, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China;
3. Tropical Aquaculture Research and Development Center, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Sanya 572018, China

Abstract: Tuna is a high-speed swimming species with migratory behavior. As rapid swimming often involves large amounts of energy consumption, the oxygen absorption efficiency of gills is crucial to tuna mobility. However, our current understanding of the histological characteristics of gills is far from sufficient to understand the cost-efficiency of oxygen uptake in tuna. In this study, the microstructure, surface ultrastructure, and internal ultrastructure of juvenile and adult yellowfin tuna in the northern South China Sea were studied using optical microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. The results showed that the top of the filaments of yellowfin tuna was bent, with different cell types on the surface of gill arch, filament, and gill rake. Surface ultrastructural studies showed that gills had high lamellar density, unique oblique blood flow patterns and gill fusion characteristics, and significant differences between juvenile and adult gills structures. The pavement cells (PVC) covered the filament epithelium and lamellae of the gills, with microvilli or microridges at the top. The gills of adult fish had higher cytoplasmic density than those of juvenile fish. Ionocytes were mainly distributed in the lamellae and the base of the lamellae. The top part of gills of the ionocytes of juvenile fish was comprised of microvilli, and adult fish were pit-shaped. Based on these results, the gills rake of juvenile and adult fish are likely to act as a selective barrier and play a role in predation. Rectangular gill lamella, an oblique blood flow pattern, and gill fusion all enable a greater supply of oxygen for yellowfin tuna, which promotes a high oxygen absorption efficiency, thereby meeting its energy requirements for high-speed swimming. In addition, the two main cells of gill epithelium, the pavement cells and ionocytes, provide a guarantee for the survival, respiration, and energy supply of yellowfin tuna in the ocean environment. Among them, a large number of micro-ridge structures on the surface of pavement cells increase the respiratory surface area of gill lamella and improve the gas exchange efficiency of the gills. A large number of mitochondria in ionocytes produce ATP for ion regulation and self-energy. In conclusion, this study elucidated the histological structure of the gills of juvenile and adult yellowfin tuna, enriching our access to the apparent and microstructure data of yellowfin tuna, as well as providing relevant information regarding the ultrastructure of pavement cells and ionocytes in gills filaments and lamella. Thus, this work provides a basis for the relationship between the specific morphological characteristics of high-speed swimming fish and their high-speed swimming habits.

Key words: South China Sea; yellowfin tuna; gills; organizational structure; pavement cells; ionocyte; microscopic observation

Corresponding author: GUO Zhiqiang. E-mail: guozq@hainanu.edu.cn