

文章编号:1000-0615(2007)03-0400-05

·研究简报·

牙鲆消化道发育的组织学观察

陈晓武, 施志仪, 顾一峰

(上海水产大学生物技术研究中心, 上海 200090)

关键词: 牙鲆; 消化道; 发育; 免疫组织化学

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Development of the digestive tract in larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

CHEN Xiao-wu, SHI Zhi-yi, GU Yi-feng

(Research Center of Biotechnology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Histological changes of the digestive tract were studied in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) from hatching until day 50. Samples were taken after hatching, then of 5, 8, 15, 30 and 50 days post-hatch. During the first 3 day after hatching, the digestive tract was lengthened and coexisted with the sac-yolk. The mocosae began to proliferate and differentiate. The yolk became smaller and smaller after the time of mouth opening. The liver is situated on top of the intestine. From the 15th day, they were metamorphosing. At the beginning of the metamorphosis, the digestive tract could be divided into buccal cavity, pharynx, oesophagus, post-oesophgeal swelling, intestine, and rectum. The exocrine pancreas is located within the intestinal loop. Goblet cells were present in most places of the tract. Very few endocrine cells could be detected. By day 30, the posterior zone of the oesophagus had a marked increase in goblet cells density and mucosal folding. Gastric gland, columnar epithelium of the post-oesophgeal swelling allowed it to be defined as a stomach. Goblet cells also disappeared in the post-oesophgeal swelling. Pyloric caeca extended from the anterior intestine. Many endocrine cells could be found in stomach and intestine. These cells were brown staining. Some cells were round like a finger ring, and others were long, opening via a duct to the digestive lumen. By day 50, the structure of the digestive tract was mature like that of adult fish. Serotonin cells were distributed in the stomach, gastrin and P substance cells were distributed in the pyloric caeca and foregut.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; digestive tract; development; immunohistochemistry

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)肉质鲜美、营养价值高,是我国重要的海水养殖鱼类之一,同时,牙

鲆二次变态显著,是研究硬骨鱼类变态发育很好的模式生物。在其变态过程前后,外型上最大的

收稿日期:2006-09-16

资助项目:国家自然科学基金项目(30271017);高等教育博士项目科研基金(20040264001);上海市教委重点科研项目(052252)

作者简介:陈晓武(1976-),男,安徽六安人,博士研究生,主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail:chenxw0218@hotmail.com

通讯作者:施志仪, Tel:021-65710284, E-mail:zyshi@shfu.edu.cn

变化是其右眼的移位,内部器官如脑颅骨、骨骼肌等都发生结构和功能上的改变^[1],而消化道的发育和分化,特别是其胃在变态前后有显著的变化^[2]。消化系统的发育关系到饵料的选择,与仔鱼成活率有直接关系,有较为重要的研究价值。

分泌 5-羟色胺(serotonin)、胃泌素(gastrin)和 P 物质(P substance)的细胞属于胃肠道中分布的内分泌细胞,同时,它们也具有神经细胞的特征,发挥着复杂的生理功能。目前认为其主要调节胃肠消化吸收,还影响一些内分泌腺的活动和控制摄食行为^[3]。从上世纪 90 年代至今,人们通过免疫组化技术观察了许多鱼类胃肠内分泌细胞的分布规律,积累了大量的资料,但是关于仔鱼发育过程中这些细胞分布的报道还比较少。

本文采用 H.E 和免疫组织化学染色法,通过光学显微镜观察了牙鲆消化道在孵化期、变态期和变态完成期的组织学特征,包括上述 3 种内分泌细胞的分布。旨在为牙鲆人工养殖提供一些参考,同时为鱼类消化道发育生物学提供新的资料。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

牙鲆受精卵购自北戴河牙鲆养殖场,空运到上海水产大学自动水循环系统人工喂养,室温 19℃~20℃,过滤海水盐度 29.9,每天换水 1/2 并且清除污物。孵化期早晚取材一次。变态期按照 Minami 的划分方法^[1],在变态前、中和后 3 个时期取材。所有组织材料均用不含冰醋酸的 Bouin 氏液固定,24 h 后转入 70% 酒精于 4℃ 保存。serotonin(5-HT)、gastrin(Gas)和 P substance 抗体(实验浓度为 5%)、SP 系列检测试剂盒均购自北京中杉生物技术公司,DAB 显色剂(实验浓度为 0.05%)购自武汉博士德生物技术公司。BCIP/NBT 显色试剂盒购自上海华美生物技术公司。

1.2 染色方法和观察拍照

固定的组织经过梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片,厚度为 8 μm,常规 H.E 染色。免疫组织化学染色方法参照 SP 检测试剂盒说明书,过程如下:切片脱蜡至水后以 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶 10 min,洗净后在室温下与山羊抗血清孵育 15 min,再进入一抗 37℃ 中孵育 2 h,然后分别在生物素化二抗和辣根酶标记链

霉卵白素工作液中 37℃ 下孵育 15 min,最后以 DAB 显色。全部过程均在 pH 7.3 环境和湿盒中进行。每种抗体反应时均以相邻切片作为阴性对照。阴性对照除一抗以 PBS 替代之外,其余步骤均同实验组。在 Olympus 连续变倍双筒解剖镜下对仔鱼观察解剖并拍照。Olympus 显微镜和 Motic image 自动分析测量软件观察拍照,对结果进行测量分析。

2 结果

2.1 出膜后 3 d 内仔鱼

出膜后 2 d 仔鱼全长 3.5 mm 左右,运动能力弱,随水流浮动。出膜后 3 d 内,口腔未开启,消化道先形成单层柱状上皮细胞,上皮细胞排列紧密,极性不明显,细胞被染成深蓝色(图版-1),消化管紧靠卵黄上方,直径约 60 μm,后来口和肛门也逐渐形成,卵黄依然存在,但是其体积逐渐缩小。肛门位于卵黄后。

2.2 出膜后 3~9 d 仔鱼

出膜 3 d 后仔鱼逐渐开口,初始口腔上皮表面为单层鳞状上皮,5 d 后逐渐发育成复层细胞。以后,口咽腔可见结缔组织和肌细胞。食道表面的细胞也从单层的细胞发育成复层的细胞。投喂轮虫后,仔鱼开始进食。出膜 4 d 仔鱼,全长平均为 3.7 mm。静止时倒置在水中。5 d 后仔鱼全长达 4.0 mm 左右。消化道进一步发育,不同部分差异不大,肠出现皱襞,消化道壁增厚,可以见很薄的肌层(图版-2),其机械消化能力弱,卵黄进一步缩小,出膜后 5 d 基本消失(图版-3)。9 d 时消化道已经分化出不同的部分,但是个部分差异不明显(图版-4)。此时尚不能检测到 3 种内分泌细胞的分布。

2.3 出膜后 15 d 仔鱼

长度在 8 mm 左右,两眼对称,体色很浅,仍倒置在水中,仔鱼 3 个冠状幼鳍出现,标志变态开始。解剖镜下可见消化道初步分化为口咽腔、食道、肠,食道下部形成膨大成胃前体,胃和食道内表面形成皱襞,并且有一些杯状细胞出现在消化道各段,未见胃盲囊的分化,肠前后分化不明显,肠壁很比较薄。serotonin 细胞(图版-5)、gastrin 细胞(图版-6)和 P substance 细胞(图版-7)在出膜 15 d 的仔鱼消化道内有零星分布,形态亦不规则,免疫反应非常微弱。

2.4 出膜后 30 d 的仔鱼

右眼移到头顶,全长在 15 mm 左右,已经进行底栖生活,体左侧向上,始向幼鱼期转变。解剖镜下,可见胃和胃盲囊出现。食道和胃表面形成粗大的纵行皱襞,胃进一步增大呈圆柱状,胃腺出现,并且在上皮中可见杯状细胞,以及少量的 gastrin 细胞(图版-8)。肠内表面则形成网状的皱襞。消化道分化已经完成,各部分肌层明显增厚,出膜 30 d 可见 serotonin 细胞和 gastrin 细胞在胃肠中分布,前者一般分布在胃黏膜层中,后者一般在前肠,但个体间有一定的差异,在少数个体中发现,这些细胞还没有明显的位置上的分化(图版-9),这是和变态结束后的仔鱼有所区别的地方。

2.5 出膜后 50 d 幼鱼

右眼移到左侧,体色深,为幼鱼期,外型似成鱼。口咽腔发育完全,食道和胃中有粗大的纵行皱襞,杯状细胞主要分布在食道和肠中,且后肠多于前肠。3 种内分泌细胞分布规律和成鱼类似,gastrin 细胞主要集中在胃盲囊和前肠中(图版-10),主要分布在上皮层中,大多 gastrin 细胞都可以看到有一长的胞突。而 serotonin 细胞(图版-11)和 P substance(图版-12)细胞集中分布在胃中,serotonin 细胞数量最多,在胃上皮和胃腺中均有分布,一些细胞可见有突起伸向消化腔,一些细胞由于观察的方向不同而呈现圆型,细胞核圆位于细胞体中央,淡染,所以一些细胞如指环状。P substance 细胞数量最少,见于胃上皮,免疫反应也比较弱,所以细胞形状没有成鱼体内那样规则。

2.6 肝胰脏的发育

肝胰脏首先出现在卵黄囊的上方,消化道的背部。初期肝脏是一个不分叶的器官,发育比较迟缓,细胞着深蓝色,卵黄消失后,肝脏和消化道关系开始密切,可以看到胆囊的出现,胆囊为一个由单层柱状上皮构成的中空的中空的囊,形状由于脱水的原因而不规则。肝脏细胞的深蓝色也逐渐变浅,可能是由于细胞贮存的脂肪开始增多。胰脏初期位于肝和消化道之间,和肝脏界限不是很明显。强嗜碱性,呈深蓝色。到变态完成的仔鱼肝脏中仍然不能清楚的看到胰腺细胞群,这是和成鱼的肝胰腺有所区别的地方,表明仔鱼肝胰脏尚未发育成熟。

3 讨论

目前,已经有一些鱼类消化道发育的报

道^[4-12]。而仔鱼消化道发育也有较多成果^[13-16]。总的来说,仔鱼的消化道在形态、组织和生理上都没有成鱼研究得详细。大多数硬骨鱼发育都经历一个由内源性营养过渡到外源性营养的阶段。不同种类硬骨鱼消化系统的发育模式有一定的差异。牙鲆仔鱼消化道发育可分为 3 个阶段:1. 早期发育时期,即仔鱼期,此时消化系统逐渐形成,由内源性营养转入外源性营养。2. 变态期,这个时期是仔鱼向稚鱼转变的时期,即是消化系统成熟期,同时又是仔鱼成活的关键时期。3. 变态完成期,此时消化系统结构和功能都接近成鱼水平。

出膜 3~4 d 内,仔鱼尚处于内源营养期,但是消化道逐渐形成,分化为不同的部分,这些都为进食做准备。其功能的完善可以从其组织学结构中得到验证。肠道最先出现在卵黄的上方,口和肛门还没有形成,但是消化道中出现的绒毛和一些颗粒状物质,提示消化道早期可能参与卵黄的吸收。因为在尼罗罗非鱼^[17]、达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)和南方大口鲶(*Silurus soldatovi meridionalis*)^[18]有类似报道。但是其机理还需要进一步研究。肠上皮细胞质中高密度颗粒物质也是细胞功能活跃的标志,推测其通过内吞作用消化营养物质。这在其它硬骨鱼如大西洋牙鲆(*Paralichthys dentatus*)等有此报道^[19]。可以认为,这种比较原始的消化机制在胃肠发育成熟前非常重要。

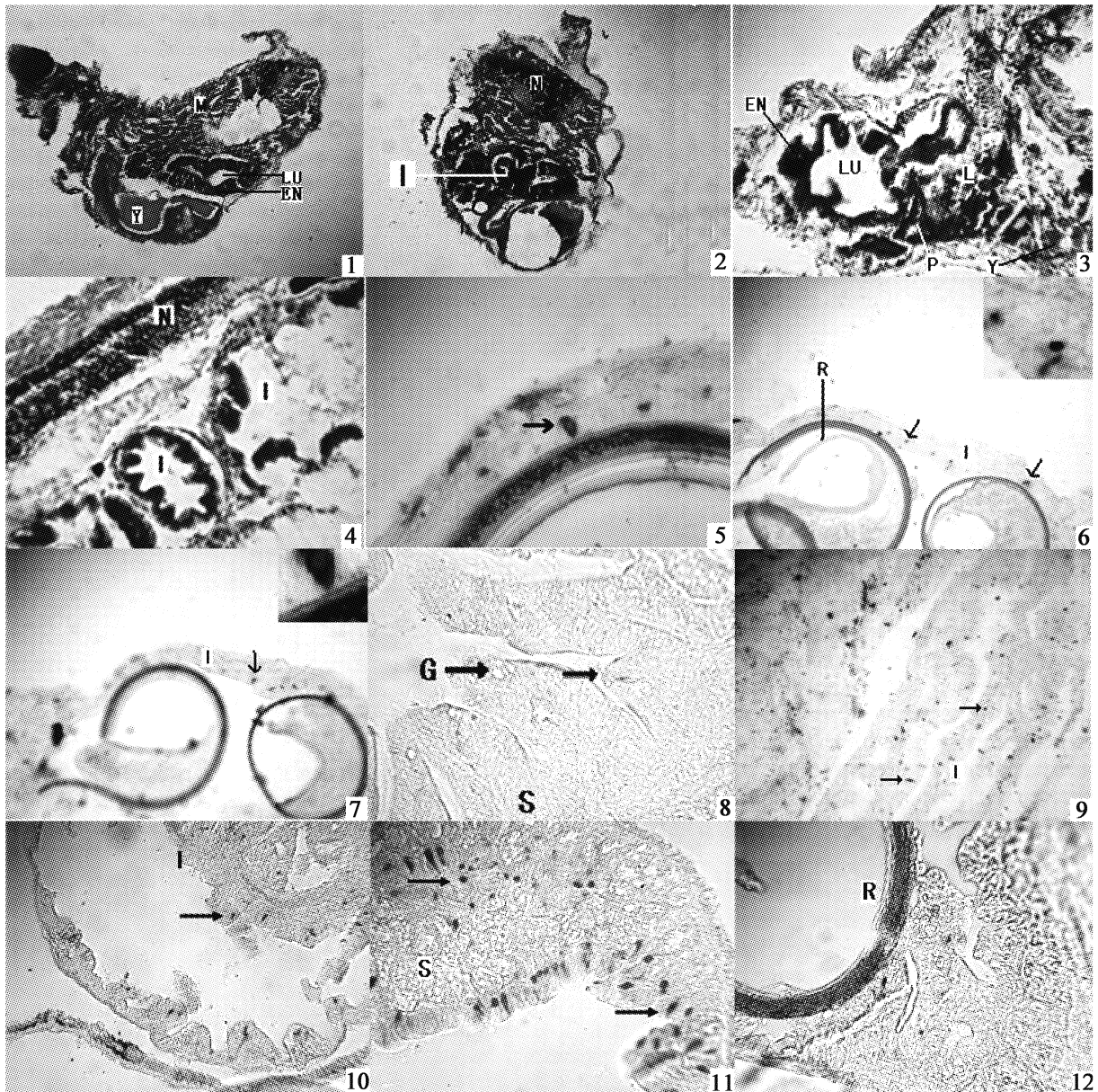
牙鲆仔鱼消化道随发育的时间不断成熟,这种成熟不仅表现在消化道的分化和延长,也表现在管壁的增厚,特别是肌层的增加,消化管壁肌层的厚度决定食糜的机械消化效率^[20]。胃盲囊可以认为是前肠的延伸,因为从组织学上分析其和前肠非常类似。胃腺、胃盲囊的出现是其成熟的重要标志,胃腺、肝胰腺的出现意味化学消化功能的主导地位。杯状细胞也从少到多,从消化道中的分散分布到最后集中在食道和肠,特别是在后肠中。目前,已经发现约有 15 种内分泌细胞分布在鱼类胃肠道中^[21],包括 5-羟色胺(serotonin)、胃泌素(gastrin)和 P 物质(P substance)等。本实验仅仅检测了上述 3 种细胞的发生与分布规律,在这些细胞出现的初期,其细胞数量比较少,免疫反应也很微弱,在消化道中的分布也不是很集中,如在变态中期仔鱼小肠中也可以看到一些 5-羟色胺细

胞,在成鱼体内,胃泌素主要分布在前肠和胃盲囊中,5-羟色胺细胞主要在胃中^[22]。随着仔鱼的发展,这些内分泌细胞的分布和特征开始和成鱼接近。

在牙鲆的人工养殖中,用配合饲料代替活饵料能节约生产成本,消化道发育成熟是摄入配合饲料的必要条件,对其消化道发育进行研究将对牙鲆的养殖有着重要的参考价值,而消化系统中各种消化酶的分泌和内分泌细胞的发育,饵料和消化系统发育关系,也有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Minami T. The early life history of a flounder *Paralichthys olivaceus* (in Japanese)[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1982,48:1581 - 1588.
- [2] Miwa S, Yamano K, Inui Y. Thyroid hormone stimulates gastric development in flounder larvae during metamorphosis[J]. J Exp Zool, 1992, 261:424 - 430.
- [3] 王志均,梅懋华,朱文玉.胃肠激素[M].北京:科学出版社, 1985:137 - 312.
- [4] Tanaka M. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae II. Characteristics of the digestive system in larvae at the stage of first feeding[J]. Jap J Ichthyol, 1969,16:41 - 49.
- [5] Iwai T. The comparative study of the digestive tract of teleost larvae II. Ciliated cells of the gut epithelium in pond smelt larvae[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1967, 33:1116 - 1119.
- [6] Iwai T. Fine structure and absorption patterns of intestinal epithelial cells in rainbow trout alevins[J]. Zellforsch Mikrosk Anat, 1968,91:366 - 379.
- [7] Iwai T. Fine structure of gut epithelial cells of larval and juvenile carp during absorption of fat and protein[J]. Arch Histol, 1969,30:183 - 199.
- [8] Sarasquete M C, Polo A, Yúfera M. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. [J]. Aquaculture, 1995,130:79 - 92.
- [9] Calzada A, Medina A, González de Canales M L. Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae[J]. J Fish Biol, 1998, 53: 340 - 365.
- [10] Ribeiro L, Sarasquete C, Dinis M T. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* larvae[J]. Aquaculture, 1999, 171:293 - 308.
- [11] 黄峰等,严安生,张桂蓉,等.大口鲈仔鱼消化道的组织学观察[J].华中农业大学学报, 2000,19(1): 59 - 63.
- [12] 龚启祥,王文格.草鱼消化道发育的组织学观察[J].浙江水产学院学报, 1999,9(3):85 - 94.
- [13] Bisbal G A, Bengtson D A. Development of the digestive tract in larval summer flounder[J]. Journal of Fish Biology, 1995,47:277 - 291.
- [14] Segner H, Storch V, Reinecke M, et al. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus* [J]. Marine Biology, 1994,119(3):471 - 486.
- [15] Chantal C, José Z I. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae [J]. Aquaculture, 2001,200(1 - 2):161 - 180.
- [16] Gisber E, Piedrahita R H, Conklin D E. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices[J]. Aquaculture, 2004,232(4):455 - 470.
- [17] 赵宝生,孙建富,毕宁阳,等.尼罗罗非鲫(*Tilapia nilotica*)仔鱼前期器官发育与分化的组织学观察[J].大连水产学院学报, 1989,4(2):21 - 26.
- [18] 刘建虎,叶元土,王学文,等.南方大口鲈消化管胚后发育组织学研究[J].中国水产科学, 1999,6(1):18 - 23.
- [19] Govoni J,Boehlert G W,Watanabe Y. The physiology of digestion in fish larvae[J]. Environmental Biology of Fishes, 1986,16:59 - 77.
- [20] Trevor A. Histological and cytological structure of the gastrointestinal tract of the luderick, *Girella tricuspidata*, in relation to diet[J]. J Morphol, 1986, 190:109 - 119.
- [21] 何敏,方静.鱼类消化管内分泌细胞的研究进展[J].水产科学, 2005,24(6):46 - 49.
- [22] 施志仪,陈晓武,顾一峰.牙鲆消化道组织学观察与内分泌细胞分布[J].中国水产科学, 2006,13(5):851 - 854.



图版说明 Explanation of Plates

1. 出膜 2 d 的仔鱼消化道, H.E, $\times 40$; 2. 出膜 3 d 的仔鱼消化道, H.E, $\times 40$; 3. 出膜 5 d 的仔鱼消化道, H.E, $\times 100$; 4. 出膜 9 d 的仔鱼消化道, H.E, $\times 200$; 5. 变态前仔鱼消化道中 serotonin 细胞(\uparrow), $\times 200$; 6. 变态前仔鱼消化道中 gastrin 细胞(\uparrow), $\times 100$; 7. 变态前仔鱼消化道中 P substance 细胞(\uparrow), $\times 100$; 8. 变态中期仔鱼胃中 gastrin 细胞(\uparrow), $\times 200$; 9. 变态中期仔鱼肠中 serotonin 细胞(\uparrow), $\times 40$; 10. 变态后期仔鱼肠中 gastrin 细胞(\uparrow), $\times 40$; 11. 变态后期仔鱼胃中 serotonin 细胞(\uparrow), $\times 100$; 12. 变态后期仔鱼胃中 P substance 细胞(\uparrow), $\times 100$; 图版 4 和 9 是纵切, 其余均为横切; Y, 卵黄囊; EN, 肠道细胞; G, 杯状细胞; S, 胃; LU, 消化腔; I, 肠; R, 卤虫; N, 脊索; L, 肝; P, 胰腺

1. Japanese flounder larvae digestive tract, 2 days after hatching, H.E, $\times 40$; 2. Japanese flounder larvae digestive tract 3 days after hatching, H.E, $\times 40$; 3. Japanese flounder larvae digestive tract 5 days after hatching, H.E, $\times 100$; 4. Japanese flounder larvae digestive tract 9 days after hatching, H.E, $\times 200$; 5. serotonin cells(\uparrow) in larvae digestive tract before metamorphosing, $\times 200$; 6. gastrin cells(\uparrow) in larvae digestive tract before metamorphosing, $\times 100$; 7. P substance cells(\uparrow) in larvae digestive tract before metamorphosing, $\times 100$; 8. gastrin cells(\uparrow) in larvae digestive tract at the onset of metamorphosing, $\times 200$; 9. serotonin cells(\uparrow) in larvae digestive tract at the onset of metamorphosing, $\times 40$; 10. gastrin cells(\uparrow) in larvae digestive tract after metamorphosing, $\times 40$; 11. serotonin cells(\uparrow) in larvae digestive tract after metamorphosing, $\times 100$; 12. P substance cells(\uparrow) in larvae digestive tract after metamorphosing, $\times 100$. Fig. 4 and Fig. 9 were longitudinal transverse section, the others were transverse section. Y, yolk sac; EN, enterocytes; G, goblet cells; S, stomach; LU, digestive lumen; I, Intestine; R, *Artemia salina*; N, notochord; L, liver; P, pancreas