

长蛸墨囊的组织学及其墨腺超微结构

王亚, 王春琳*, 詹萍萍, 宋微微, 母昌考, 邵楚, 刘帅

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 分析了长蛸墨囊组织学及墨腺细胞的超微结构。结果表明, 墨囊由墨囊体、导管和墨腺3部分组成, 墨囊壁和导管壁分为外膜、肌肉层、粘膜下层和粘膜层, 墨囊壁与肝脏外膜紧密相连, 墨囊导管开口于直肠末端近肛门处; 墨腺集中在墨囊底部靠近肝脏的一侧, 由粘膜上皮细胞向囊腔内增生形成, 呈索状, 腺体中部含丰富的结缔组织; 墨腺细胞分为具有无分泌功能的A型细胞和有分泌功能的B型细胞, 微绒毛分布于B型细胞的顶端; 墨汁颗粒在墨腺细胞囊泡中形成, 并以胞吐或细胞破碎的形式将墨汁颗粒排出。

关键词: 长蛸; 墨囊; 组织学; 超微结构

中图分类号: Q 954.5; S 917

文献标志码: A

长蛸 (*Octopus variabilis* Cuvier, 1797) 俗称章鱼、望潮, 隶属于头足纲、八腕目、蛸科、章鱼属, 广泛分布于黄海、渤海、东海和南海海域的内湾和浅海中, 是我国重要的海洋经济种^[1]。由于过度捕捞和环境恶化导致了长蛸资源逐渐衰退, 自然海区中的长蛸已不能满足人们的需求。因此, 许多学者开始对长蛸的养殖技术和人工育苗技术进行研究, 刘瑞义^[2]对长蛸进行了装瓶养殖试验, 并在福建等地推广, 郑伟^[3]、李来国等^[4]进行了长蛸的人工育苗技术的研究并取得了成功。在养殖和人工育苗过程中发现, 长蛸具有一特殊的墨囊结构, 内含墨汁, 长蛸遇到刺激后会喷墨。国内外已有对墨囊和墨腺进行研究的报道, 但主要集中在乌贼^[5-8]和章鱼^[9-10], 而对长蛸的墨囊研究较少。章鱼与乌贼虽然都具有墨囊结构, 但两者存在着较大的差别, 如: 章鱼墨囊镶嵌于肝脏中, 且在进化中不断的缩小^[9], 甚至消失^[10], 而乌贼的墨囊独立存在^[5]; 章鱼墨湿而滑漉, 具有麻痹鳃的嗅觉和蟹的触觉作用; 乌贼墨干而粘稠, 具有防腐、抗肿瘤, 促进胃液分泌作用^[11-14], 并参与三级卵膜的形成^[15]。本研究对长蛸的墨囊组织学和墨腺的超微结构进行观察, 并与曼氏无针乌贼 (*Sepiella maindroni*) 墨囊结构进行比较, 以解析

两者墨囊结构的差异, 为头足类分类学的研究提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用 10 只长蛸于 2010 年 12 月购于浙江省宁波市水产大世界, 体质量为 120 ~ 150 g。

1.2 方法

解剖观察 参考陈海燕^[16]的方法, 对长蛸进行整体解剖, 描述墨囊的位置及形态。

组织学研究 参考芮菊生等^[17]的方法, 取长蛸墨囊, 经 Bouin 氏液固定, 石蜡包埋, H. E 染色后用 Olympus BX-60 显微镜观察并拍照。

超微结构观察 取长蛸墨腺, 切成 1 mm³ 左右的小块, 海水配制的 2.5% 戊二醛 (4 ℃) 固定, 然后用 1% 锇酸 (4 ℃) 后固定。乙醇梯度浓度脱水, 低粘度 Spurr 树脂包埋剂渗透、包埋, 醋酸铀及柠檬酸铅双重染色, LKB-II 型超薄切片机切片, JEM-1200EX 型透射电镜观察并拍照。

2 结果

2.1 墨囊基本形态

墨囊呈长袋状, 墨囊体镶嵌在肝脏内, 以一导

收稿日期: 2011-06-07 修回日期: 2011-09-13

资助项目: 国家科技支持计划项目 (2007BAD43B05)

通讯作者: 王春琳, E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn

管在直肠末端近肛门处开口,墨囊中储存着大量的墨汁颗粒(图1,图版 I-1)。

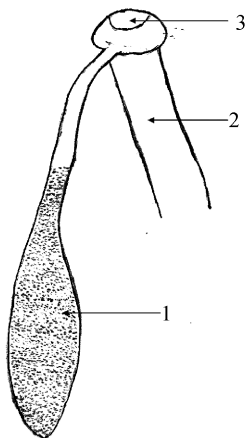


图1 长蛸墨囊示意图

1. 墨囊; 2. 直肠; 3. 肛门。

Fig.1 The ink sac of *O. variabilis*

1. ink sac; 2. rectum; 3. anus.

2.2 墨囊组织结构特征

墨囊壁 墨囊壁与肝脏紧密相连,由明显的四层组成(图版 I-4):粘膜层,粘膜下层,肌肉层和外膜。粘膜层由单层柱状上皮细胞构成,核为卵圆形,位于细胞基部;粘膜下层很薄,由疏松的结缔组织构成,结缔组织伸入墨腺中形成墨腺的髓质;肌肉层由内外纵行肌和中环行肌构成,内外纵行肌纤维的纵切面呈长梭形,细胞界限不清楚,中环肌纤维的纵切面呈不规则形,很难观察到细胞核,环行肌层约为纵行肌层的2倍;外膜由单层扁平上皮构成,紧贴于肝脏的外膜。

导管 导管在直肠末端近肛门处开口(图版 I-5,6),从内到外可分为粘膜层、粘膜下层、肌肉层和外膜(图版 I-7,9)。粘膜层的上皮细胞由假复层柱状纤毛上皮细胞构成(图版 I-8),即由一层高矮且形状不同的上皮细胞构成,胞核分布在上皮不同水平面上,柱状细胞可达游离面,细胞核的位置较高,细胞向基部伸入时,胞体逐渐变细,锥体细胞紧靠基膜,细胞核位置较低,梭形细胞位于柱状和锥体细胞之间,细胞核位于中部;粘膜下层很薄,连接着粘膜层与肌肉层;肌肉层较厚,内外层均为纵行肌,中层为环行肌,内外纵行肌较薄,环形肌较厚,肌束间富有胶原纤维和弹性纤维。外膜为浆膜,由间皮和结缔组织构成,浆膜内有血管分布,为两个上皮细胞构成的毛细血管(图版 I-10)。在靠近肛门处,导管的外膜与直肠

的外膜紧密相连。

墨腺 墨腺位于墨囊腔的底部靠近肝脏的一侧(图版 I-2,3),墨腺体呈索状,索状体的空腔及墨囊腔中储存有大量墨汁颗粒(图版 I-11)。墨腺细胞附着在结缔组织上,位于索状体外缘的细胞有较强的同一性,细胞有一个不规则的细胞核和密度均一的细胞质。靠近索状体内部的腺上皮细胞,数量较少,细胞核呈圆形。索状体中部为结缔组织,细胞呈不规则的多边形,细胞核较小,位于细胞中部(图版 I-12)。

2.3 墨腺细胞超微结构

透射电镜观察长蛸墨腺,可以观察到两类细胞,A型细胞位于腺体基底,数量较少,呈卵圆形,具有一个大而明显的圆形细胞核,此类细胞中没有黑色素囊泡,不具有分泌黑色素的功能(图版 II-1)。B型细胞位于墨腺顶端,细胞排列紧密,呈高柱状,细胞底部有一个不规则的细胞核,约占整个细胞的1/2,在细胞质中布满了大小不同的囊泡,大部分囊泡集中于细胞顶部,囊泡中充满着黑色素颗粒,黑色素颗粒大小、多少及颜色存在一定的差别,说明黑色素正处于形成过程中的不同时期,细胞的顶端有微绒毛分布(图版 II-2)。

2.4 墨汁形成过程

在B型细胞中观察到细胞质中分布着大量的粗面内质网和线粒体(图版 II-3~5),内质网周围有较多的黑色素颗粒(图版 II-3),合成的黑色素颗粒集中于囊泡中,囊泡与线粒体相连(图版 II-5),并通过线粒体不断的供给能量,逐渐向细胞膜移动,最后囊泡以胞吐或细胞破碎的方式将黑色素颗粒释放到细胞外,在此过程中,囊泡中黑色素颗粒的颜色不断的加深(图版 II-3~5,7)。排出的黑色颗粒具有两层结构,即高密度的内核和低密度的外壳(图版 II-6)。

3 讨论

3.1 长蛸墨囊与乌贼墨囊的差异

曼氏无针乌贼的墨囊已经报道^[5],根据组织切片及透射电镜,本研究发现,长蛸墨囊与曼氏无针乌贼墨囊结构存在差异(表1)。

长蛸和乌贼的墨囊结构的差异与生理上的差异相吻合。长蛸的墨囊壁较薄,而曼氏无针乌贼的墨囊壁较厚,肌肉层较发达,这很好的解释了曼氏无针乌贼在受到轻微刺激时,会用喷射墨汁来

掩护自己^[18],而长蛸只有在受到强烈刺激时才会喷射墨汁^[4];长蛸墨囊壁的外膜由单层扁平上皮细胞构成,有助于减小与肝脏的摩擦,而曼氏无针

乌贼墨囊的独立存在,势必要求墨囊壁的外膜具有保护作用,同时曼氏无针乌贼的墨囊的形状游离于肝脏,拥有更多的空间去承载较多的墨汁。

表 1 长蛸墨囊与曼氏无针乌贼墨囊结构的差异

Tab. 1 The differences between ink sac structure from *O. variabilis* and that from *S. maindroni*

		长蛸 <i>O. variabilis</i>	曼氏无针乌贼 <i>S. maindroni</i>
墨囊 ink sac	形状	长袋状	梨形
	位置	镶嵌于肝脏内	独立存在
墨囊壁 ink sac wall	外膜	由单层扁平上皮细胞构成	由复层扁平上皮细胞构成
	肌肉层	平滑肌:内纵肌,中环肌,外纵肌	平滑肌:内纵肌,外环肌
导管 in sac tube	导管壁	粘膜层由假复层柱状上皮细胞构成	粘膜层由单层柱状上皮细胞构成
墨腺 ink gland	大小	占墨囊腔的 1/4	占墨囊腔的 1/2
	位置	囊状体底部,靠近肝脏的一侧	囊状体底部
墨腺细胞 ink gland cell	A 型细胞	卵圆形	不规则
	细胞核	不规则,有核内陷现象	椭圆形
	B 型细胞	有	无
	微绒毛	有	无
	墨汁颗粒外排方式	胞吐或细胞破碎	胞吐

3.2 索状腺体

从组织学上观察到长蛸与曼氏无针乌贼的墨囊中均有一个特殊形状的墨腺,这种腺体既不同于常见的泡状腺体^[19],也不同于“书页状”的缠卵腺^[20-21]和“管道状”的副缠卵腺^[22]。PALUMBO^[8]认为这种墨腺是由一系列的隔间构成的,随着个体的生长而不断的向墨囊腔中延伸,王春琳等^[5]将这种腺体称为索状腺体,其腺细胞的游离面朝向腺体外,腺体不围成管状腔面,此种组织形式可以增加腺细胞的分泌面积,同时也增加了分泌物的贮存容积。

3.3 墨腺细胞

目前头足类墨腺细胞及黑色素形成系统的研究主要集中在乌贼科,而对蛸科的研究较少。在乌贼墨腺超微结构的研究中发现乌贼墨腺由基底的圆柱形细胞和顶端的分泌细胞组成^[6-7];王春琳等^[5]在曼氏无针乌贼墨囊的研究中也发现了这两种细胞,并认为 A 型墨腺细胞不能分泌黑色素,其与肝脏的胚细胞相似^[23],B 型墨腺细胞具有分泌形成墨汁功能,这与本研究结果相似。PALUMBO^[8]在研究乌贼的墨腺细胞中发现分泌细胞中有一个椭圆形的细胞核位于细胞的底部,约占细胞核的 1/2,囊泡集中在细胞的顶端,而本研究发现长蛸墨腺中的分泌细胞的细胞核形状不规则且多存在核内陷现象,在分泌细胞的顶端分布着直径约为 0.1 μm ,长约为 1 μm 的微绒毛,为分泌细胞游离面的细胞质突起,主要有保护细胞,

减少细胞与墨汁颗粒的摩擦,增大分泌面积的作用。这种具有微绒毛的墨腺细胞在以往的研究中未有报道。

3.4 墨汁颗粒的形成过程

墨汁颗粒中的主要成分是黑色素,王岩等^[24]发现黑色素的形成与酪氨酸有关,并认为黑色素一般具有吲哚型和邻苯二酚型,动物的黑色素多属于吲哚型,是酪氨酸在酪氨酸酶的作用下形成多巴,进一步氧化后而形成的,如乌贼^[25-26]。在乌贼墨腺细胞的研究中报道,黑色素形成于囊泡中,囊泡的主要作用是吞并酪氨酸^[27],黑色素随着囊泡向细胞膜移动而不断的积累,最终以胞吐的方式排入细胞间隙中或墨囊腔中^[5,28]。我们在长蛸分泌细胞的观察中发现,长蛸墨囊中墨汁形成过程与乌贼相同(图版 II-3~5),但在墨汁外排过程中,发现部分分泌细胞游离面的细胞膜破碎,其墨汁颗粒及其内含物全部排入墨囊腔中(图版 II-7),认为细胞是 PALUMBO 等^[28]所提到的成熟细胞,即细胞从内向外迁移,从未成熟向成熟转变,随后出现破裂,墨汁颗粒排到胞外。因此,长蛸墨囊中墨汁颗粒排出胞外的方式有胞吐和细胞破碎。分泌细胞衰老死亡后,无分泌功能的细胞便会分裂形成分泌细胞,代替衰老的细胞(图版 II-7),关于此分泌细胞的寿命有待进一步研究。

参考文献:

[1] 董正之. 中国动物志[M]. 北京: 科学出版社,

- 1988;181-182.
- [2] 刘瑞义. 长蛸装瓶养殖试验[J]. 齐鲁渔业, 2006(10):14.
- [3] 郑伟. 长蛸人工育苗研究[J]. 齐鲁渔业, 2009(4):176-178.
- [4] 李来国, 王春琳, 张晓梅. 长蛸人工育苗研究[J]. 中国水产, 2010, 3(21):48-49.
- [5] 王春琳, 樊晓旭, 余红卫, 等. 曼氏无针乌贼墨囊组织学及墨汁形成的超微结构[J]. 动物学报, 2008, 54(2):366-372.
- [6] 松江一, 高谷芳明, 内ヶ尺 秀光, 等. イカ墨を科学する[J]. バイオサイエンスとイングストリ. 1995, 53(5):31.
- [7] GIROD P. Recherches sur la poche du noir des *Cephalopodes* des cotes de France[J]. Archs Zool Experiment Générale, 1882, 10:1-100.
- [8] PALUMBO A. Melanogenesis in the ink gland of *Sepia officinalis* [J]. Pigment Cell Research, 2003, 16:517-522.
- [9] HUFFARD C L, CALDWELL R L. Inking in a Blue-Ringed octopus, *Hapalochlaena lunulata*, with a vestigial ink sac[J]. Pacific Science, 2002, 56:255-257.
- [10] NORMAN M D. *Ameloctopus litoralis*, gen. et. sp. nov. (Cephalopoda: Octopodidae), a new shallow water octopus from Australian waters [J]. Invertebrate Taxonomy, 1992, 6:567-582.
- [11] FITZPATRICK T, SEIJI M, Simpson R, et al. Studies of melanin biosynthesis in the ink sac of the squid (*Loligo pealii*) [J]. Biological Bulletin, 1961, 121(2):389-390.
- [12] SASAKI J, ISHITA K, TAKAYA Y, et al. Antitumor activity of squid ink [J]. The Journal of nutrition Science Vitaminol (Tokyo), 1997, 43(4):455.
- [13] SZABO G, SIMS R. Studies of melanin biosynthesis in the ink sac of the squid (*Loligo pealii*), II. Histology, autoradiography, tissue culture and *in vivo* inhibition of ink gland [J]. Biological Bulletin, 1962, 123(2):513.
- [14] SZABO G, WILGRAM G. Studies of melanin biosynthesis in the ink sac of the squid (*Loligo pealii*), IV. Biochemical studies of the ink gland and the ink [J]. Biological Bulletin, 1963, 125(2):394.
- [15] WANG C L, FANG X X, JING X M, et al. Characteristics of the tertiary egg membrane of cuttlefish *Sepiella maindroni* de Rochebrune [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(06):1206-1212.
- [16] 陈海燕. 乌贼生殖系统标本的制作[J]. 丽水师专学报:自然科学版, 1991, 12(1):31.
- [17] 芮菊生, 杜懋琴, 陈海明, 等. 组织切片技术[M]. 上海:人民教育出版社, 1982:98-106.
- [18] 张炯, 吴伟成. 曼氏无针乌贼繁殖习性的初步观察[J]. 水产学报, 1965, 2(2):35-44.
- [19] 商冠宁, 郑珂. 腺泡状软组织肉瘤的临床治疗分析[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2007, 6(5):278-279.
- [20] LUM-KONG A. A histological study of the accessory reproductive organs of female *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae) [J]. Journal of Zoology, 1992, 226:469-490.
- [21] 王津伟, 王春琳, 余红卫. 曼氏无针乌贼缠卵腺组织学及超微结构的研究[J]. 水产科学, 2010, 29(2):87-90.
- [22] 王春琳, 王津伟, 余红卫, 等. 曼氏无针乌贼副缠卵腺的组织学及超微结构[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(3):391-395.
- [23] BOUCAUD E, YIM M. Fine structure and function of the digestive cell of *Sepia officinalis* Mollusca: Cephalopoda [J]. Zool, 1980, 191:89-105.
- [24] 王岩, 刘学惠, 陆懋荪, 等. 几种天然黑色素分子结构的红外光谱表征研究[J]. 分析试验室, 1966, 15(6):63-65.
- [25] RESCIGNO A, SANJUST E, SODDU G, et al. Effect of 3-hydroxamhranilic acid on mushroom tyrosinase activity [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1384:268-276.
- [26] CHEN L, WER M, WANG K, et al. Copper transfer and activation of the streptomyces apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its trans-activator MeIC₁ [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267:20100-20107.
- [27] PALUMBO A, MARCO D, GIOVANNA M. A new dopachrome-rearranging enzyme from the ejected ink of the cuttlefish *Sepia officinalis* [J]. Biochemical Journal, 1994, 229:839-849.
- [28] PALUMBO A, DI COSMO A, Gesualdo I, et al. Subcellular localization and function of melanogenic enzymes in the ink gland of *Sepia officinalis* [J]. Biochemical Journal, 1997, 323:749-756.

Histological and ultrastructural observation of the ink sac of *Octopus variabilis*

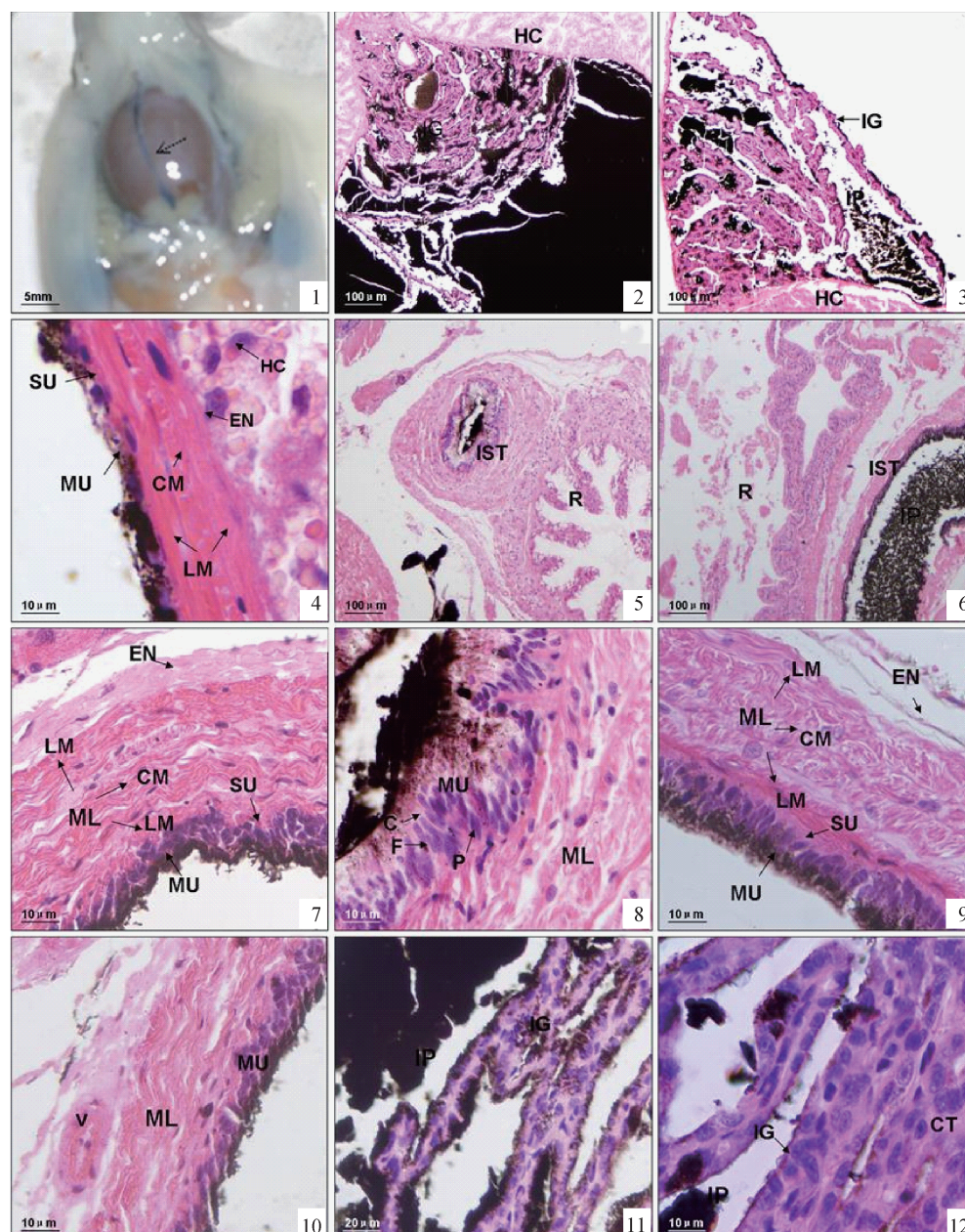
WANG Ya, WANG Chun-lin^{*}, ZHAN Ping-ping, SONG Wei-wei,
MU Chang-kao, SHAO Chu, LIU Shuai

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: *Octopus variabilis* has become one of the most popular seafood for its delicious taste, which has large market demand in China and is advantaged in marine products exports. However, due to the over fishing and water pollution, the natural resource of *Octopus variabilis* declined rapidly. For this reason, the industry of artificial culturing got rapid development. The *Octopus variabilis* will spurt the ink when meeting the stimulation originally. The peculiar ink defence system of *Octopus variabilis* is based on the activity of the highly specialized ink gland which is deputed to the continuous production of the black insoluble melanin pigment that is stored in the ink sac. This organ has been studied in other cephalopod, but the ink gland in *Octopus variabilis* is different from the others. Therefore, the histology of the ink sac and ultrastructural structure of the ink gland of *Octopus variabilis* was studied using light microscopy and electron microscopy in this paper. The observed results showed that the ink sac was composed of ink sac body, pipe and ink glands. The ink sac of *Octopus variabilis* opened into the end of the recta near the anus by pipe. The wall of the ink sac and pipe were both composed of epicardial, muscular layer, submucosa layer and mucosa layer. And the epicardial of ink sac wall were stratified squamous epithelium. The ink glands concentrated at the bottom of the ink sac, were formed by the hyperplasia of the mucosa epithelium to the cavity of the ink sac, shaped as rope with abundant connective tissue in the centre, there was cavity between branch of ink gland; Type A cells which can not secrete melanin and type B cells which can secrete melanin were observed. Microvillus were located in apex of the type B cells, and the ink particles adhered to the rough endoplasmic reticulum were formed in the melanin vesicles. The vesicles were released with exocytosis and cell disruption finally.

Key words: *Octopus variabilis*; ink sac; histology; ultrastructure

Corresponding author: WANG Chun-lin. E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn



图版 I

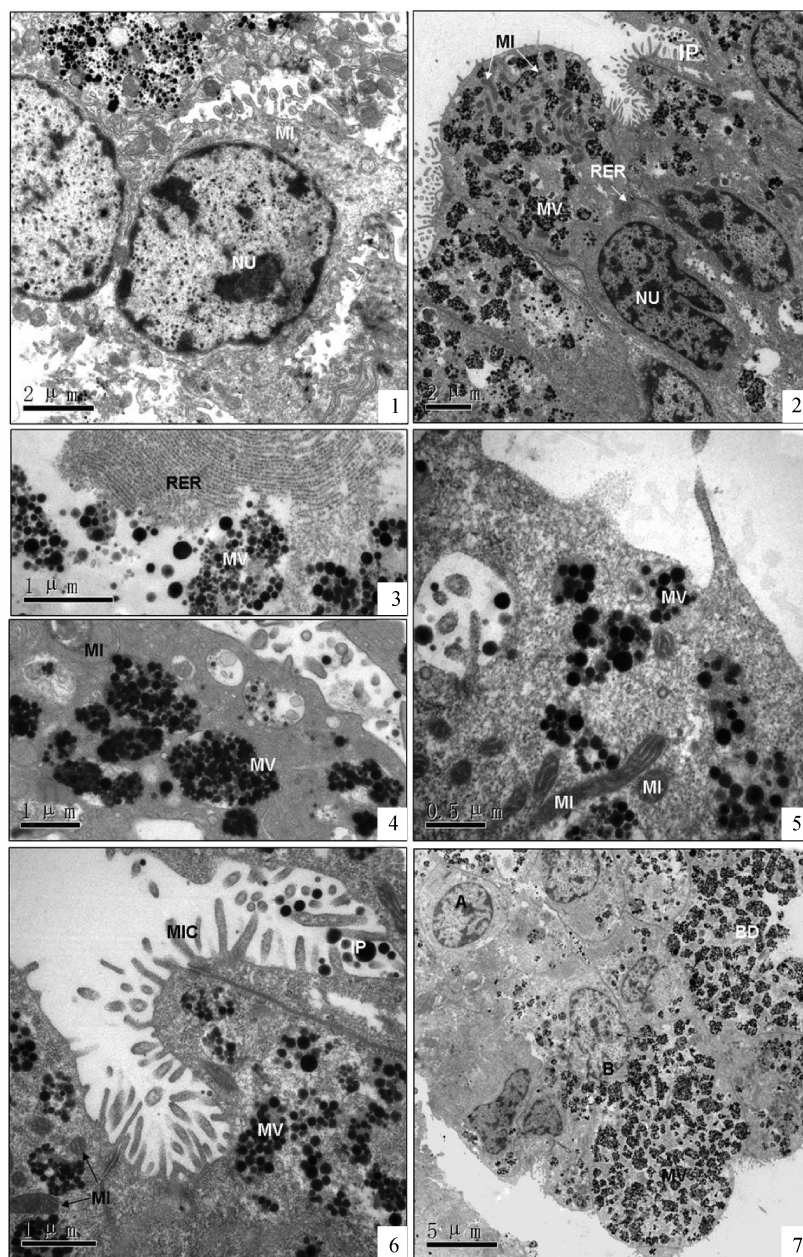
1. 箭头示墨囊镶嵌在肝脏中; 2. 墨囊纵切面; 3. 墨囊纵切面; 4. 墨囊壁纵切; 5. 墨囊导管与直肠的横切面; 6. 墨囊导管与直肠的纵切面; 7. 墨囊导管壁横切; 8. 墨囊导管壁的真复层柱状纤毛上皮(收缩状态); 9. 墨囊导管壁纵切; 10. 墨囊导管壁外膜中的血管; 11. 索状腺体中的墨汁; 12. 索状腺体及结缔组织。

EN:外膜层; ML:肌肉层; MU:黏膜层; V:血管; IG:墨腺; CT:结缔组织; IP:墨汁颗粒; IW:墨囊壁; CM:环肌; LM:纵肌; SU:黏膜下层; R:直肠; IST:墨囊导管; HC:肝细胞; C:柱状细胞; F:梭形细胞; P:锥体细胞。

Plate I

1. Ink sac in the liver position; 2. Vertical section of the ink sac; 3. Vertical section of the ink sac; 4. Vertical section of wall of the ink sac; 5. Cross section of the ink sac tube and the rectum; 6. Vertical section of the ink sac tube and the rectum; 7. Cross section of the ink sac tube; 8. pseudostratified columnar epithelium in the wall of the ink sac tube; 9. Vertical section of the ink sac tube; 10. Vascular in the wall of the ink sac tube; 11. Ink gland and Ink Particles in the ink sac; 12. Ink gland epithelium cell and connective tissue.

En:Endocardium; ML:Muscle layer; Mu:Mucosal layer; V:Vascular; IG:Ink gland; CT:Connective tissue; IP:Ink Particle; IW:Ink sac wall; CM:Circular muscle; LM:Longitudinal muscle; SU:Submucosa; R:Rectum; IST:Ink sac tube; HC:Hepatic cell; C:Columnar cell; F:Fusiform cell; P:Pyramidal cell.



图版 II

1. A 型墨腺细胞; 2. B 型墨腺细胞; 3. 内质网周围的囊泡; 4. 囊泡移向细胞膜; 5. 囊泡即将移出细胞膜; 6. B 型墨腺细胞的微绒毛及排出的墨汁颗粒; 7. A 型, B 型及衰老死亡的墨腺细胞。

N: 细胞核; NU: 核仁; MI: 线粒体; MV: 黑色素囊泡; RER: 粗面内质网; IP: 墨汁颗粒; A: A 型细胞; B: B 型细胞; BD: 衰老死亡的 B 细胞; MIC: 微绒毛。

Plate II

1. Type cell A; 2. Type cell B; 3. Ink particle in the vicinity of the endoplasmic reticulum; 4. Melanin vesicle move to the cell wall; 5. Melanin vesicle will secrete out of the cell; 6. Microvillus in apical of cell B and ink particles out of the cell; 7. Type cell A, Type cell B and the death of cell B.

N: Nucleus; NU: Nucleolus; MI: Mitochondria; MV: Melanin vesicle; RER: Rough endoplasmic reticulum; IP: Ink particles; A: Type cell A; B: Type cell B; BD: The death of cell B; MIC: Microvillus.