

黑斑原鲃特殊器官-腹腔外肝*

谢从新** 李红敬 李大鹏 柴毅 刘鸿艳 樊启学 朱邦科

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 在黑斑原鲃 *Glyptosternum maculatum* (Regan) (鲃形目, 鲃科) 体内发现一个特殊器官——腹腔外肝, 即该鱼除在腹腔内具有正常肝脏外, 在皮肤与体壁肌肉之间还有一与腹腔内肝脏连接的附属组织(腹腔外肝)。腹腔外肝的组织学结构与腹腔内肝脏完全一样, LDH, EST, MDH 和 ADH 同工酶带无差异, 表明这一特殊器官确为肝脏组织。深入研究黑斑原鲃腹腔外肝可为研究鲃科鱼类的系统发生和进化提供线索。

关键词 黑斑原鲃 腹腔外肝 形态 组织 同工酶

黑斑原鲃 *Glyptosternum maculatum* (Regan) 属鲃形目 Siluriformes、鲃科 Sisoridae、原鲃属 *Glyptosternum*。原鲃属有 3 个种, 分别为黑斑原鲃、网纹原鲃 *Glyptosternum reticulatum* McClelland 和连鳍原鲃 *Glyptosternum akhtari* Silas。网纹原鲃分布于印度河上游、喀布尔河上游、阿姆河和锡尔河; 连鳍原鲃分布于阿富汗的巴米安河; 黑斑原鲃分布于中国西藏的雅鲁藏布江(进入印度称 Indus River)和锡金, 主要分布在雅鲁藏布江波密至日喀则江段的干流及支流中, 是雅鲁藏布江 7 种鲃科鱼类中唯一分布到中、上游的种^[1]。黑斑原鲃主要生活于石隙中, 以昆虫卵或幼鱼为食^[2,3]。黑斑原鲃的染色体数目 $2n=48$, 同时还存在 $2n=42$ 与 $2n=44$ 两种核型^[4,5]。其他生物学特性未见报道。有研究者认为, 黑斑原鲃的进化发展和青藏高原的几次隆升有关^[6,7]。

通过研究采自雅鲁藏布江中游的黑斑原鲃样本发现, 黑斑原鲃除在腹腔内具有正常肝脏外, 在皮肤与体壁肌肉之间还有一与腹腔内肝脏连接的块状类肝组织, 暂命名为“腹腔外肝”。对鱼类的肝脏已经有比较深入的认识, 肝脏的形态多种多样, 位于腹腔内, 前端由系膜悬系在围心腹腔隔膜上^[8]。

“腹腔外肝”是否是肝脏组织, 通过形态学、组织学和同工酶的研究来求证。

1 材料与方法

2005 年 4—5 月在西藏雅鲁藏布江中游林芝(尼羊河)、拉萨(拉萨河)和日喀则(年楚河)流域用三层刺网采集到黑斑原鲃 156 尾; 其中, 雌性 92 尾, 雄性 64 尾, 样本体长范围 116—311 mm, 体重范围 20—455 g。采样点水深 0.01—3.2 m, 坡度 5° — 30° , pH 范围 6—7.2, 水温 6.5—11.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

鲃 *Bagarius bagarius* (Hamilton)、黄斑褶鲃 *Pseudechensis sulcatus* (McClelland)、青石爬鲃 *Euchiloglanis davidi* (Sauvage)、贡山鲃 *pareuchiloglanis gongshanensis* Chu、凿齿鲃 *Glaridoglanis andersonii* (Day)、藏鲃 *Exostoma labiatum* (McClelland)、福建纹胸鲃 *Glyptothorax fukiensis fukiensis* (Rendahl)、中华纹胸鲃 *Glyptothorax sinense sinense* (Regan)、细尾异齿鲃 *Oreoglanis delacouri* (Pelleggrin)、拟鲃 *Pseudexostoma yunnanensis yunnanensis* (Tchang)、异齿裂腹鱼 *Schizothorax oconnori* Lloyd、长丝裂腹鱼 *Schizothorax dolichonema* Herzenstein、拉萨裸裂尻

2007-01-05 收稿, 2007-02-01 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30471324)

** E-mail: conxinx@sohu.com

Schizopygopsis younghusbandi Regan 和西藏高原鳅 *Triplophysa (Triplophysa) tibetana* (Regan) 来自中国科学院水生生物研究所。

所有鱼类样本用常规手术器械解剖, Nikon coolpix 4500 数码相机拍照。

取黑斑原鲢腹腔内肝脏、腹腔外肝脏和两者的连接组织, 用 Bouin 氏液固定, 酒精二甲苯脱水, 石蜡包埋, Leica RM2135 切片连续切片, H-E 染色, 中性树胶封片, Nikon Eclipse E600 显微镜观察。

另取黑斑原鲢腹腔内肝脏、腹腔外肝脏和两者的连接组织, 以生理盐水洗净, -70°C 保存以待同工酶分析使用。用时以 1:5 (W/V) 比例加入磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 冰浴研磨, 4°C 离心 20 min (15000 r/min), 取上清液, 转移到细小有盖的离心管中, 以体积比 4:1 加入甘油 (40%) 溴酚蓝 (0.25%) 溶液, 混匀, -70°C 超低温冰箱中保存。取上述抽提液, 垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

(分离胶浓度为 7.7%, 浓缩胶浓度为 2.5%), 电泳、染色方法见文献 [10—12]。染色后, gene genius Bio Imaging system 电泳凝胶成像系统拍照。同工酶命名采用 Shaklee 方法 [13]。

2 结果

2.1 形态学

黑斑原鲢新鲜肝脏呈红褐色, 位于体腔前端, 借系膜悬挂在心腹隔膜的后方。腹腔内的肝脏分为两叶, 左右对称, 蝶状, 前后端尖, 中间较为宽阔。左右两叶肝脏中部外侧向外伸出一束状组织 (连接带), 该组织穿过腹侧肌肉后, 在胸鳍基后方的肌肉和皮肤之间扩展为块状组织, 形成腹腔外肝 (图 1(a))。腹腔外肝外侧面凸起, 中部有一裂缝将其分为两叶 (图 1(b))。内侧面凹陷, 平滑, 紧邻体侧肌肉。据此黑斑原鲢的肝脏有 3 部分组成, 腹腔内正常肝脏、腹腔外肝和连接带。

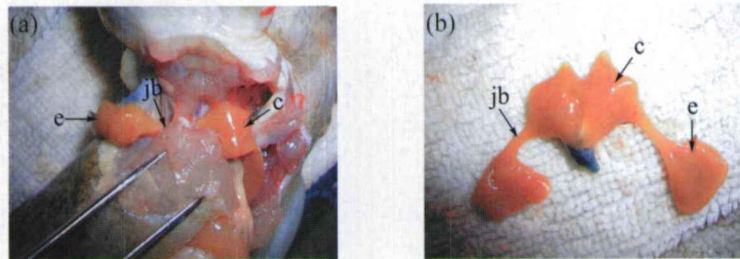


图 1 黑斑原鲢肝脏形态结构图

(a) 黑斑原鲢腹面观 (示腹腔内肝和腹腔外肝); (b) 剥离出来的肝脏

jb: 连接带; c: 腹腔内肝; e: 腹腔外肝

总体上, 11 种鲢科鱼类的正常肝脏均位于腹腔前部, 分为两叶, 除黑斑原鲢左右两叶对称外, 其他鱼类左右两叶均不对称, 且较大的一叶常呈薄片状, 随腹腔形状而曲卷。共有 5 种鱼类有腹腔外肝脏结构: 黑斑原鲢的腹腔外肝脏呈菱形, 黄斑褶鲢呈匙状, 青石爬鲢、贡山鲢、藏鳅的呈薄片状结构。5 种鱼的连接带均呈带状, 背侧微突, 腹侧微凹; 其中, 黄斑褶鲢的连接带粗大, 其他 4 种鱼连接带细小。

异齿裂腹鱼、长丝裂腹鱼、拉萨裸裂尻和西藏高原鳅没有腹腔外肝脏。

2.2 组织学

2.2.1 腹腔内肝脏的组织学 黑斑原鲢的腹腔内肝脏最外层是浆膜层, 浆膜层由一层扁平浆膜上皮和浆膜下结缔组织构成。浆膜深部的结缔组织含有丰富的弹性纤维。结缔组织从肝门伸入肝实质内, 把肝组织分隔成许多小叶。该结缔组织在有的部位伸入到肝脏与肝脏汇管区的结缔组织相连。汇管区内有动脉、静脉与胆管分布其中。肝细胞彼此相连, 排列成索状, 以中央静脉为中心向外呈放射状排列。肝细胞呈不规则的多边形, 体积较小。肝小叶间结缔组织较少, 因而肝小叶的轮廓不甚清楚。还有一些较大的脂泡散落可见, 无色素细胞分布

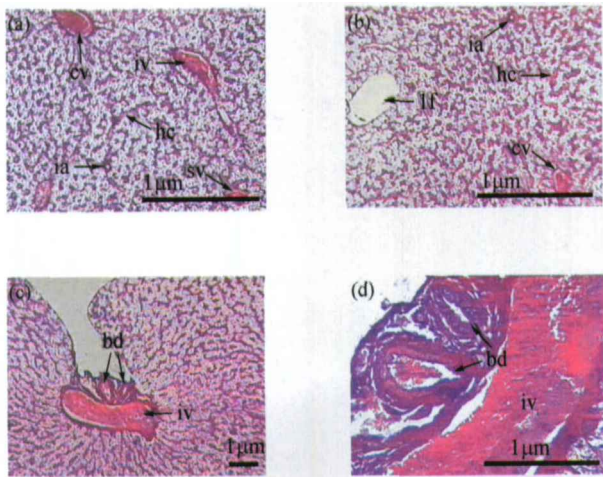


图2 黑斑原鲢肝脏组织结构图

(a) 腹腔内的肝×400; (b) 右侧腹腔外肝×400; (c) 连接带×100; (d) 连接带凹陷处×400。lf: 脂泡; ia: 小叶间动脉; hc: 肝细胞索; cv: 中央静脉; iv: 小叶间静脉; sv: 叶下静脉; bd: 胆管

2.2.2 腹腔外肝的组织学 腹腔外肝的组织与腹腔内正常肝脏的组织结构基本一致。肝细胞彼此相连, 排列成索状, 以中央静脉为中心向外呈放射状排列。肝细胞呈不规则的多边形, 体积较小。肝小叶间结缔组织较少, 因而肝小叶的轮廓不甚清楚。还有一些较大的脂泡散落可见, 无色素细胞分布(图2(b))。

2.2.3 连接带的组织学 连接带的外表无肌肉层包裹。在凹陷处有一条大的小叶间静脉和2—3个胆管(图2(c)和(d))。与腹腔内肝和腹腔外肝的组织结构基本一致。

2.3 同工酶

LDH, EST, MDH 和 ADH 同工酶分析显示(图3), 黑斑原鲢腹腔内肝与腹腔外肝同工酶酶带无差异, 依染色情况可知腹腔内肝与腹腔外肝同工酶活性基本一致。

2.3.1 乳酸脱氢酶 LDH LDH 为四聚体, 是由相对分子量为 35000 的 A, B 两种亚基聚合成 5 种不同形式的四聚体(B_4 , AB_3 , A_2B_2 , A_3B , A_4)。由图3(a)可知, 黑斑原鲢肝脏 LDH 有两条酶带, 靠近负极的是 LDH- A_1 , 靠近正极、活性稍强的是 LDH- B_1 。

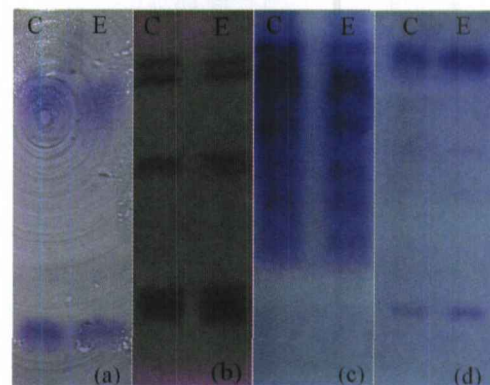


图3 黑斑原鲢腹腔内肝与腹腔外肝 LDH, MDH, ADH 和 EST 同工酶图谱
(a) LDH; (b) EST; (c) MDH; (d) ADH
“C” 腹腔内肝; “E” 腹腔外肝

2.3.2 酯酶 EST EST 是催化酯类化合物的水解酶类, 为二聚体, 由多基因控制合成, 在酶代谢和生物膜结构方面发挥重要作用。黑斑原鲢肝脏组织 EST 有 4 条带(图3(b)), 活性较强、分布广。

2.3.3 苹果酸脱氢酶 MDH MDH 为二聚体酶, 分上清液型(s-MDH)和线粒体型(m-MDH)^[14], m-MDH 靠近负极。如图3所示, MDH 分布较广, 这与肝脏旺盛的代谢功能密切相关, 但活性较低。黑斑原鲢肝脏未见 s-MDH, 检测到的 6 条 m-MDH 酶带多于理论上二聚体由两基因编码最多形成 3 条酶带(图3(c)), 可能与 m-MDH 存在基因编码后的化学修饰有关^[15]。

2.3.4 醇脱氢酶 ADH ADH 为二聚体酶, 生理作用是适应厌氧醇解的需要, 如果酶活性好, 氧气不足的情况下不会造成丙酮酸过量积累致死。黑斑原鲢肝脏组织 ADH 有 3 条酶带(图3(d)), 活性较高, 这说明黑斑原鲢肝脏组织乙醇代谢旺盛, 与其生活水层溶氧情况密切相关。

3 讨论

研究表明, 命名为“腹腔外肝”的腹腔外块状组织在形态学与腹腔内的肝脏具有密切联系, 组织学特征与腹腔内的肝脏完全一样, 连接带的血管和胆管连通“腹腔外肝”与腹腔内肝。由此, 可以初步认定“腹腔外肝”为肝脏组织。进一步分析发

现, 黑斑原鲑腹腔内肝与“腹腔外肝”同工酶带无差异, 腹腔内肝与“腹腔外肝”同工酶活性基本一致, 表明“腹腔外肝”与腹腔内肝脏具有同样的生理功能. 由此, 可以确定“腹腔外肝”为肝脏组织. 另外, 分布于林芝(尼洋河)、拉萨(拉萨河和日喀则(年楚河))的 156 尾黑斑原鲑均有相同的腹腔外肝结构, 这排除了腹腔外肝的出现是由疾病或个体发育产生畸形的可能性, 腹腔外肝应是黑斑原鲑正常的形体结构. 由此, 可得出结论: 黑斑原鲑除在腹腔内具有正常肝脏外, 在皮肤与体壁肌肉之间分生出一个与腹腔内肝脏连接的同功组织——腹腔外肝.

腹腔外肝是不是黑斑原鲑的特有结构. 考察分布于西藏雅鲁藏布江及其支流包括黑斑原鲑在内的鲑科鱼类 10 属 11 种, 余种均和黑斑原鲑亲缘关系较近; 黑斑原鲑、黄斑褶鲑、青石爬鲑、贡山鲑、凿齿鲑和藏鲑内发现腹腔外肝脏, 而鲑、福建纹胸鲑、中华纹胸鲑、细尾异齿鲑和拟鲑则无. 其中, 黄斑褶鲑、贡山鲑、凿齿鲑、细尾异齿鲑、藏鲑和拟鲑与黑斑原鲑的生活环境相似, 而鲑、福建纹胸鲑、中华纹胸鲑和青石爬鲑则生活于低海拔或中国东部平原区域. 激流和海拔与鲑科腹腔外肝的出现并无一致性.

另外, 生活于同一高原地区的鲤科裂腹鱼亚科的异齿裂腹鱼, 长丝裂腹鱼和拉萨裸裂尻, 高原鳅属的西藏高原鳅没有腹腔外肝的出现, 说明腹腔外肝的出现可能是某些鲑科鱼类的特有现象.

综上所述, 本研究证实腹腔外肝确是黑斑原鲑肝脏器官的一部分, 这种腹腔外肝的结构可能仅存在于某些鲑科鱼类中. 鲑科鱼类腹腔外肝的形成在其系统发育中的意义是什么? 它的出现与长期适应高原特殊生活环境有无关系? 这些问题值得我们通过系统发育学或细胞生物学的进一步研究获得答案.

致谢 感谢美国华盛顿卡耐基研究院 Donald Brown 和蔡理全博士修改全文, 中国科学院武汉水

生生物研究所何舜平研究员提供鱼类标本, 华中农业大学水产学院 Khalid Abbas、刘海平、季强和西藏农牧厅蔡斌给予的帮助.

参 考 文 献

- 褚新洛. 鳅鲑鱼类的系统分类及演化谱系. 动物分类学报, 1979, 4(1): 72—82
- 褚新洛, 郑葆珊, 戴定远, 等. 中国动物志硬骨鱼纲鲑形目. 北京: 科学出版社, 1999, 159—160
- 西藏自治区水产局. 西藏鱼类及其资源. 北京: 中国农业出版社, 1995, 134—136
- 伍云飞, 康 斌, 门 强, 等. 西藏鱼类染色体多样性的研究. 动物学研究, 1999, 20(4): 258—264
- 任修海, 崔建勋, 余其兴. 黑斑原鲑的染色体组型及 NOR 单位性. 遗传, 1992, 14(6): 10—11
- 何舜平, 陈永久, 张亚平. 鳅鲑鱼类细胞色素 b 基因片段序列测定及其系统发育的初步研究. 动物学研究, 1999, 20(2): 81—87
- 何舜平, 曹文宜, 陈宜瑜. 青藏高原的隆升与鳅鲑鱼类(鲑形目, 鳅科)的隔离分化. 中国科学, C 辑, 2001, 31(2): 185—192
- Harder W. Anatomy of Fishes Part 1 Text. Stuttgart; E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Naegle U. Obermillier), 1975
- 王 平, 曹 焯, 樊启昶, 等. 简明脊椎动物组织与胚胎学. 北京: 北京大学出版社, 2004, 220—225
- 周宗汉, 林金榜, 朱婉华. 介绍鱼类组织中蛋白质及同工酶的电泳方法. 淡水渔业, 1983, 2: 35—40
- Soltis DE, Haugler CH, Darrow DC, et al. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. American Fern Journal, 1983, 73: 9—27
- Wendel JF, Weeden NF. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis DE, Soltis PS, eds. Isozymes in Plant Biology, Portland, OR: Dioscorides Press, 1989, 5—45
- Shaklee JB, Allendorf FW, Morizot DC, et al. Genetic nomenclature for protein-coding in fish: Proposed guidelines. Transaction of the American Fisheries Society, 1979, 118: 218—227
- Kirpichnikov VS. Genetic Bases of Fish Selection. Berlin: Springer-Verlag, 1981, 43—200
- 邓思平, 刘楚吾. 黄鳍鲷不同组织同工酶的研究. 海洋通报, 2004, 23(2): 92—96