

中华蟾蜍蝌蚪变态过程中消化系统的重构

王 念, 吴民耀, 王宏元, 李忻怡

(陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

【摘 要】 【目的】研究中华蟾蜍变态过程中肠、肝和胰腺的形态及其显微结构的变化。【方法】采用解剖学和组织学方法,取变态前后 5 期(27,35,38,42 期和 46 期)的中华蟾蜍蝌蚪各 10 只,解剖后观察,并测量体质量、消化管质量等数据。再分别取 38 和 42 期蝌蚪数只,制作石蜡组织切片观察组织结构的变化,利用 Spss13.0 分析所得数据。【结果】在 38 期,中华蟾蜍蝌蚪消化管最长,在 38~42 期消化管的长度平均缩短 75% 左右。体质量在 38 期前呈增加趋势,38~46 期则迅速下降;肠比重(I/B)在 38 期最大;在整个试验期内,肝胰比重(LP/B)变化不显著;变态高峰后与变态高峰前相比,胃壁厚度显著减小,肝细胞密度显著增大,肠壁厚度变化不显著。【结论】中华蟾蜍消化系统组织结构的变化与变态发育过程中食性的变化相适应。

【关键词】 中华蟾蜍; 消化系统; 变态发育

【中图分类号】 Q959.5⁺30.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)12-0007-06

Digestive system remodeling during metamorphosis of *Bufo gargarizans* Tadpoles

WANG Nian, WU Min-yao, WANG Hong-yuan, LI Xin-yi

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: 【Objective】 The morphology and microstructure changes of intestine, liver and pancreas of *Bufo gargarizans* in metamorphosis were researched. 【Method】 Anatomical and histological methods were used in this study, 10 tadpoles were taken from every five different stages before and after metamorphosis (stage 27, stage 35, stage 38, stage 42 and stage 46), and body weight, digestive tract weight and other data were measured after dissection, then several tadpoles at stage 38 and stage 42 were selected for paraffin tissue section, and the changes in organizational structure were observed, the data were analysed by spss13.0. 【Result】 The results showed that the digestive tract was the longest at stage 38, and the length of digestive tract between the stage 38—stage 42 had an average reduction of about 75%. The body weight showed an upward trend before stage 38, while it dropped rapidly between stage 38—stage 46; and the maximum of intestinal weight compare with body weight(I/B) appeared at stage 38. Throughout the trial period, the total weight of liver and pancreas compare with body weight(LP/B) did not change significantly; the gastric wall thickness decreased significantly before and after metamorphosis, but the intestine wall thickness did not change significantly; the liver cell density increased significantly. 【Conclusion】 The changes in organization and structure showed that the characteristics of the digestive system adapted to the changes in feeding habits during metamorphosis.

Key words: *Bufo gargarizans*; digestive system; metamorphosis

* [收稿日期] 2010-07-16

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(SJ08C101); 中央高校基本科研业务一般项目(GK200902039)

[作者简介] 王 念(1986—), 男, 陕西乾县人, 在读硕士, 主要从事发育生物学研究。E-mail: wangnian_qx@163.com

[通信作者] 李忻怡(1977—), 女, 陕西西安人, 讲师, 博士, 主要从事发育生物学研究。E-mail: lixinyi001@hotmail.com

中华蟾蜍隶属两栖纲,无尾目,蟾蜍科,蟾蜍属,在我国分布于东北、华北、华东、华中、西北、西南多个省区。在无尾两栖类发育的短时间内,其要完成从水栖蝌蚪到陆栖成体的变态。变态过程中,因为大多数无尾两栖类要从植食性蝌蚪转变为肉食性成体^[1-2],摄食方式发生变化,消化系统各个器官的形态和生理功能也会发生相应变化,这称为消化系统重构^[3-4]。北方狭口蛙(*Kaloula borealis*)在变态过程中消化系统的形态变化说明,蝌蚪的消化管长度与食性相关,植物性食物与较长的消化道相适应,动物性食物与较短的消化道相适应^[5]。唐晓玲等^[6]对不同发育时期牛蛙(*Rana catesbeiana*)蝌蚪消化管的组织结构进行了观察,结果发现消化管结构在变态过程中变化最大。本试验利用解剖学、组织学和统计学方法,研究了中华蟾蜍消化系统在变态过程中的重构,初步探讨了无尾两栖类消化系统的发育过程及其与摄食机能之间的关系,以期为深入研究无尾两栖类消化系统的结构和机能在胚后发育中逐渐适应陆生的机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2009-03,于西安市长安区西安邮电学院人工湖采集中华蟾蜍卵带,室温(20±2)℃下孵化为蝌蚪。首先在解剖镜下判断发育时期^[7],整体固定,选取变

态高峰期前后共 5 期(27,35,38,42 和 46 期)的个体为研究材料。

1.2 研究方法

1.2.1 生长指标的变化 每期随机选取健康活泼个体各 10 只,解剖观察,并用电子游标卡尺(桂林广陆电子数显游标卡尺,测量范围 150 mm)测量消化管长度,用电子天平测定肠道质量、肝胰总质量和体质量,计算肠比重(I/B)、肝胰比重(LP/B),比较所选各期样本体质量、消化管长度和肠质量的变化及 I/B、LP/B 的变化。

1.2.2 肝细胞密度和胃肠壁厚度的变化 取 5 期已固定的个体制备常规石蜡切片,沿体轴方向背腹纵切,横断切片厚 5~7 μm,HE 染色,中性树胶封片,Leica DMLB2 型光学显微镜观察、测量并拍照。选取变态高峰前后的典型组织切片,在肝组织处随机选取 5 个区域进行肝细胞计数,在胃肠组织处随机选 5 点测量胃肠壁厚度。

1.3 数据处理

用 Spss13.0 分析软件对原始数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 中华蟾蜍蝌蚪消化系统的解剖学观察

中华蟾蜍蝌蚪消化系统的解剖学观察结果见图 1。

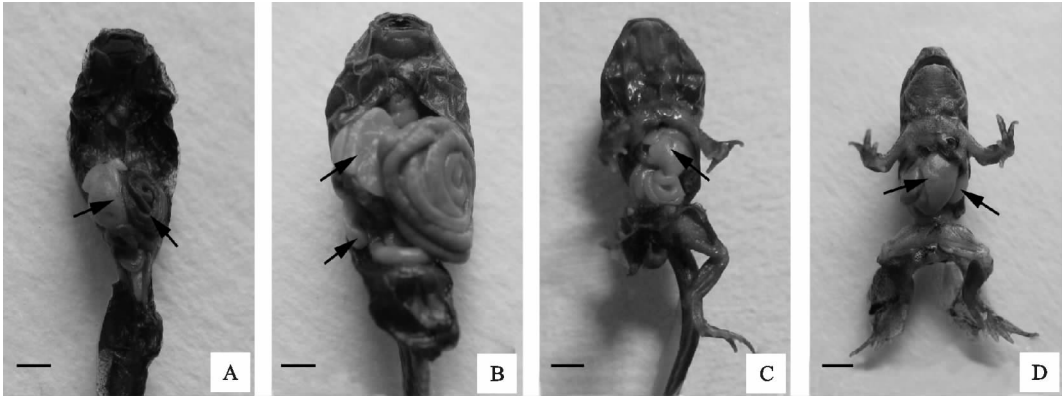


图 1 中华蟾蜍蝌蚪 27~46 期消化系统发育的解剖学观察(bar=1 mm)

A. 27 期,左边箭头示肝,右边箭头示肠;B. 38 期,上边箭头示肝,下边箭头示胰;C. 42 期,箭头示肝;D. 46 期,左边箭头示肝,右边箭头示胃
Fig. 1 Anatomy observation of digestive system development of *Bufo gargarizans* Tadpoles at stage 27-46(bar=1 mm)

A. Stage 27,the left arrow indicates liver,the right indicates instine;B. Stage 38,the toparrow indicates liver, the below arrow shows pancreas;C. Stage 42,the arrow shows liver;D. Stage 46,the left arrow indacates liver,the right indicates stomach

观察结果显示,27 期时,腹部占体长的近 2/3,消化管细而透明(图 1A),在腹腔内盘绕 2.5 圈,几乎占据整个腹腔,平均长度为 30.4 mm;肝和胰腺可以辨别。35 期时,肠管盘绕 5 圈,管径加粗,小肠

和直肠的界限分明,直肠较小肠粗大,肠壁颜色发白,平均长度为 40.4 mm;肝明显增大,有鲜红色的血管分布;胆囊出现,大小似米粒,透明;胰腺变化不明显。38 期时,肠道增长,平均长度达 110.6 mm;

肝和胰的质量随体质量的增长而显著增大(图 1B)。42 期时,肠管盘绕的圈数减少为 2 圈,平均长度 25.9 mm,管径较粗,胃开始膨大;由于胃的膨大和肝体积的增大,肠管逐渐被推移至腹腔左侧,进而又至腹腔左下方,此时拨开肝叶可见膨大的胃(图 1C)。46 期时,肠管盘绕减少至 1 圈,长度继续缩短,平均为 17.6 mm,肠管直径明显增粗,胃膨大为一个囊状器官,位于腹腔左侧,在位置和形态上与成蛙相似,胃和肝的膨大使肠管的螺旋逐渐减少,在腹腔中所占体积缩小,并移至腹腔左后侧;肝可分 3 叶;胆囊增大为一薄壁球形囊,呈墨绿色;胰腺位于胃和十二指肠之间,为不规则的叶形(图 1D)。

2.2 中华蟾蜍蝌蚪消化系统的组织学观察

38 期的组织切片观察发现,胃肠分化成熟(图

2A),在肠胃中均发现有初步的层次结构,包括黏膜层、黏膜下层、肌层和外膜。胃壁较厚,黏膜层已出现杯状细胞,固有层有密集排列的管泡状腺体,有胃小凹(图 2B);小肠上皮杯状细胞分布相对较多,肌层清晰(图 2C)。

42 期的组织切片观察发现,肠胃分化成熟(图 2E),胃壁变薄,但 4 层结构分化特征更明显,黏膜层有大量表面黏液细胞,呈空泡状,固有层分布有管状腺体,黏膜下层有比较丰富的血管等结构,肌层清晰(图 2F);小肠绒毛分化更清晰,增加了吸收面积,其中心固有层分布有血管,黏膜下层到外膜厚度较小(图 2G)。肝脏从形态上观察与 38 期差异不明显,但肝细胞排列比 38 期紧密(图 2D,H)。

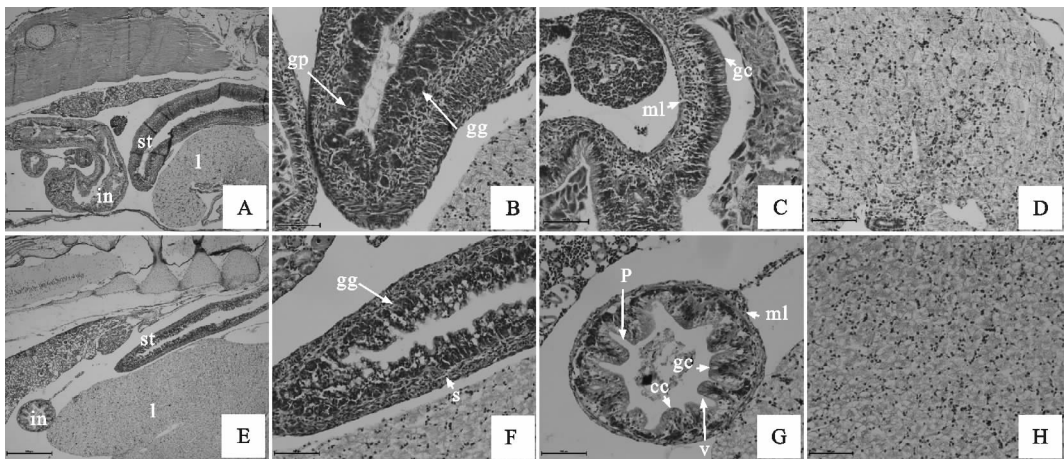


图 2 38 期和 42 期中华蟾蜍蝌蚪消化系统的组织学观察

A. 38 期(bar=500 μm); B. 38 期胃(bar=100 μm); C. 38 期肠(bar=100 μm); D. 38 期肝(bar=100 μm); E. 42 期(bar=500 μm); F. 42 期胃(bar=100 μm); G. 42 期肠(bar=100 μm); H. 42 期肝(bar=100 μm); In. 肠; st. 胃; l. 肝; gp. 胃小凹; gg. 胃腺; ml. 肌层; gc. 杯状细胞; s. 黏膜下层; p. 皱襞; cc. 柱状或立方上皮细胞; v. 小肠绒毛

Fig. 2 Histological observation of digestive system of *Bufo gargarizans* Tadpoles at stage 38 and 42

A. Stage 38(bar=500 μm); B. Stage 38 stomach(bar=100 μm); C. Stage 38 intestine(bar=100 μm); D. Stage 38 liver(bar=100 μm); E. Stage 42(bar=500 μm); F. Stage 42 stomach(bar=100 μm); G. Stage 42 intestine(bar=100 μm); H. Stage 42 liver(bar=100 μm); In. Intestine; st. Stomach; l. Liver; gp. Gastric pits; gg. Gastric glands; ml. Muscule layer; gc. Cup-shaped cells; s. Submucosa; p. Fold; cc. Columnar or cuboidal cells; v. Intestinal villi.

2.3 中华蟾蜍蝌蚪变态过程中相关指标的变化

2.3.1 体质量及 I/B、LP/B 从图 3 可见,在 38 期前,随着蝌蚪的生长其体质量不断增大,在 38 期时达到最大,之后呈下降趋势;38 和 46 期个体之间体质量差异较大,这和蝌蚪生长过程的营养等影响因素有关,属于正常现象。从图 4 可以看出,LP/B 在变态过程中变化平稳,随着体质量的增加而增大;而 I/B 在变态过程中变化较大,在 38 期前总体呈增加趋势,在 38 期后迅速减小。

2.3.2 消化管长度和胃肠壁厚度 由图 5 可知,蝌

蚪消化管长度在 38 期前持续增长,在 38 期后急剧缩短,其变化趋势与 I/B 相同。选择 38 期作为变态高峰期前的典型时期,选择 42 期作为变态高峰期后的典型时期,比较其胃肠壁厚度的变化,从图 6 可知,变态高峰前后肠壁厚度没有显著变化($P > 0.05$),而胃壁厚度在变态高峰后显著减小($P < 0.05$)。

2.3.3 肝细胞密度 肝细胞计数(400 倍下)后进行统计分析,结果(图 7)显示,变态高峰期后肝细胞密度显著增大($P < 0.05$)。

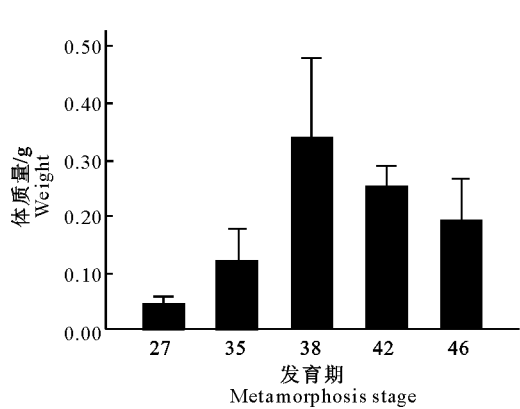


图 3 27~46 期中华蟾蜍蝌蚪体质量的变化
Fig. 3 The body weight changes of *Bufo gargarizans* Tadpoles at stage 27—stage 46

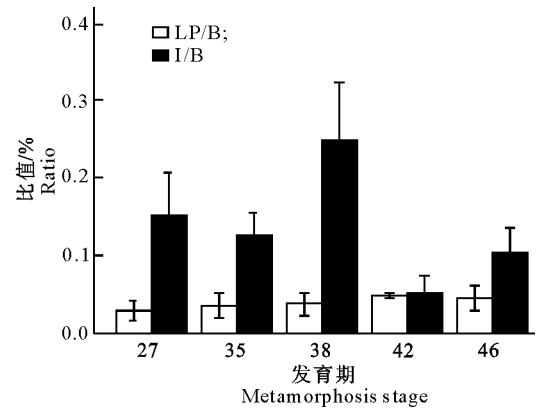


图 4 27~46 期中华蟾蜍蝌蚪 I/B、LP/B 的变化
Fig. 4 The I/B and LP/B changes of *Bufo gargarizans* Tadpoles at stage 27—stage 46

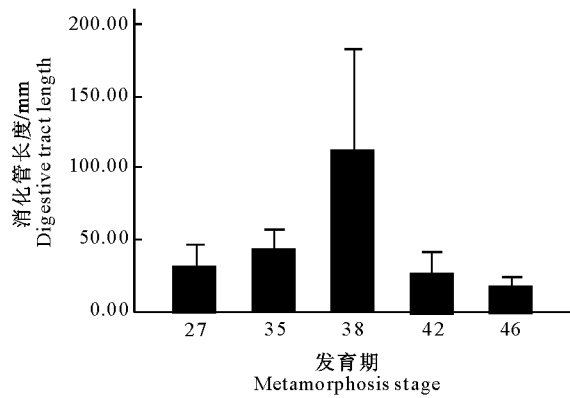


图 5 27~46 期中华蟾蜍蝌蚪消化管长度的变化
Fig. 5 The digestive tract length changes of *Bufo gargarizans* Tadpoles at stage 27—stage 46

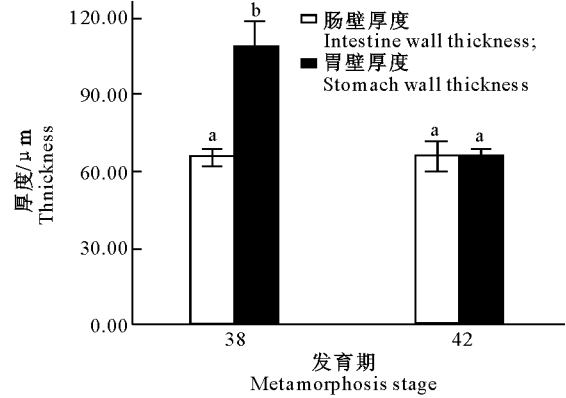


图 6 38~42 期中华蟾蜍蝌蚪胃肠壁厚度的变化
同一指标上标不同小写字母表示差异显著。图 7 同
Fig. 6 The intestine and stomach wall thickness changes of *Bufo gargarizans* Tadpoles at stage 38—42

Different small letters means significant difference. The same as table 7
关性分析,结果见图 8。由图 8 可以看出,消化管质量和消化管长度呈线性相关,相关性系数为 0.896。

2.3.4 肠质量和消化管长度的相关性分析 对各期的消化管质量和消化管长度取平均值,然后做相

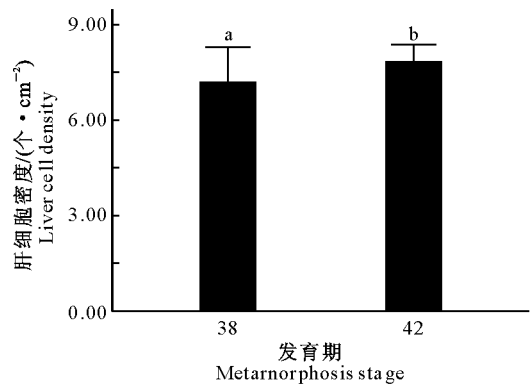


图 7 38~42 期中华蟾蜍蝌蚪肝细胞密度的变化
Fig. 7 The liver cell density changes of *Bufo gargarizans* Tadpoles at stage 38—42

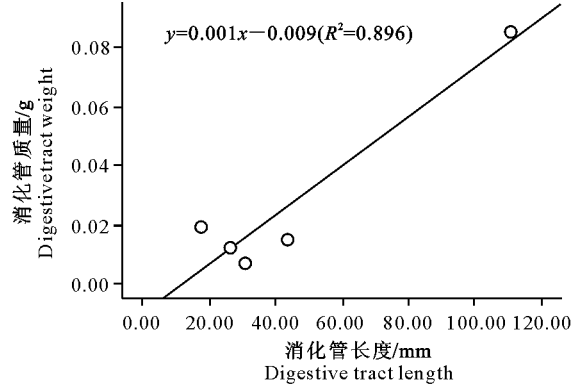


图 8 中华蟾蜍蝌蚪消化管长度和消化管质量的相关性分析
Fig. 8 The relevance of digestive tract length and weight of *Bufo gargarizans* Tadpoles

3 讨 论

3.1 中华蟾蜍蝌蚪消化管的重构及其功能适应

消化管的重构发生在变态发育的高峰期,是发生在蝌蚪体内最剧烈的变化之一,在变态发育高峰期的 5 d 之内,消化管的整个长度缩短 75%,小肠壁厚度变化不显著,胃壁厚度减小,但结构分化更加成熟,形成典型的脊椎动物的胃和小肠。消化管长度和消化管质量呈线性相关,当消化管长度剧烈缩短时,其质量也急剧减小,这种变化在几天之内迅速发生。在变态过程中,必然有大量细胞凋亡^[8-9],对肠重构基因调控机制的研究还有一些争议,目前存在几种不同的认识。一部分研究者认为,成熟表皮细胞是由一群特定的成熟前体细胞分化而来,Donald 等^[10]发现,蝌蚪功能表皮细胞是成熟功能表皮的前体;Ishizuya-Oka 等^[11]认为,细胞间的相互作用在肠重构中发挥着一定作用,在胚胎发生过程中肠的形成也是这样。因此重构可能再次利用胚胎发生过程中与器官形成有关的基因,这类基因在蝌蚪中是由甲状腺激素(TH)控制的,在尾巴和肠中很多同类基因都是由 TH 诱导的,这说明重构和重吸收程序有相同的基因路径。有研究发现,甲状腺激素受体(TR)只在表皮中表达,并抑制肠间质和肌肉层的变态发育变化,表皮中表达的异丙肾上腺素(TRDN)不抑制肠道缩短^[12-13]。

本研究结果表明,在 27 到 38 期,中华蟾蜍蝌蚪随着个体的不断生长,体质量不断增加,肠质量和肠道的长度也随之增加,这样可以适应整体新陈代谢水平的提高以及食量的增加,使个体可以不断生长。38 期时肠胃肌层发达,胃的排空和肠蠕动能力较强,但 38 期肠内皱襞不明显,表面积小,导致消化吸收的效率不高,这和植食性阶段相适应。42 期时,胃壁变薄,但黏膜层有大量黏液细胞,腺体的分布增多,这可以增加各种酶的分泌,同时小肠绒毛明显增多,肠道的吸收面积增大,使肠道吸收效率提高,适合肉食的消化吸收。

3.2 中华蟾蜍蝌蚪肝和胰腺的重构及其功能适应

中华蟾蜍蝌蚪肝在变态高峰期重构,LP/B 变化平稳,随着体质量的变化,肝胰总质量在 38 期前呈增加趋势,在 38 到 42 期间肝胰组织收缩,细胞计数分析发现,变态高峰期前后肝组织细胞密度显著增加,细胞排列更加紧密,质量也有所减小。Paik 等^[14]研究发现,在蛙蝌蚪变态成青蛙时,其排泄物由 NH_3 变成尿素,肝是尿素循环的场所;Atkinson

等^[15]证实,在蛙中 TH 等相关基因的表达是在转录水平调节的。在蝌蚪阶段的后期,肝中的白蛋白合成上调,外源 TH 能诱导肝实质细胞的这些变化。在变态高峰期,胰腺收缩,形状改变,最后在变态末期呈典型的细长型,和十二指肠比邻,具有其他脊椎动物胰腺的特征。

在 38 期前,中华蟾蜍蝌蚪体质量和肝胰总质量不断增加,以适应不断提高的代谢水平,补充能量的消耗。42 期前后正是中华蟾蜍从水生蝌蚪到陆栖成体的过渡阶段,而在陆地生存能量消耗更大,故此时肝胰组织细胞密度增大,这一方面可以使蟾蜍个体维持较高的代谢水平,比如肝细胞密度增加,相应的糖原储存量增加,从而可以满足陆地生存糖代谢的需求;另一方面细胞紧密后组织中的水分减少,蟾蜍个体体质量减轻,使其在陆地上的活动更加灵活,从而减小被捕食的危险,增加生存的机会,有利于其物种的延续。

[参考文献]

- [1] Ikuzawa M, Yasumasu S, Inokuchi T, et al. Stomach remodeling-associated changes of H^+/K^+ -ATPase beta subunit expression in *Xenopus laevis* and H^+/K^+ -ATPase-dependent acid secretion in tadpole stomach [J]. *Exp Zool A Comp Exp Biol*, 2004, 301: 992-1002.
- [2] 陈伟庭, 范玉琴, 李东风. 中国林蛙胚胎后期发育观察 [J]. 华南师范大学学报: 自然科学版, 2007, 1(1): 104-118.
Chen W T, Fan Y Q, Li D F. Observation of the postembryonic development of *Rana chensinensis* [J]. *Journal of South China Normal University: Natural Science Edition*, 2007, 1(1): 104-118. (in Chinese)
- [3] Luis E, Castaneda, Roberto F, et al. Digestive plasticity in tadpoles of the Chilean giant frog (*Caudiverbera caudiverbera*): factorial effects of diet and temperature [J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2006, 79(5): 919-926.
- [4] Rehfeld J F. A centenary of gastrointestinal endocrinology [J]. *Horm Metab Res*, 2004, 36(11/12): 735-741.
- [5] 林志春, 李汝祺. 北方狭口蛙个体发育的研究: 食物对消化系统发育的影响 [J]. 北京大学学报: 自然科学版, 1959(1): 75-94.
Lin Z C, Li R Q. Studying the development of *Kaloula borealis* individuals: the influence of food on the development of digestive system [J]. *Journal of Peking University: Natural Science Edition*, 1959(1): 75-94. (in Chinese)
- [6] 唐晓玲, 刘振湘. 不同发育期的牛蛙蝌蚪消化道组织学观察 [J]. 湖北农学院学报, 2001, 21(4): 332-334.
Tang X L, Liu Z X. Observation of digestive tract of histology of bullfrog tadpole in different period [J]. *Journal of Hubei Agriculture College*, 2001, 21(4): 332-334. (in Chinese)
- [7] Gosner K L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes in identification [J]. *Herpetologica*, 1960, 16:

183-190.

[8] 张盛周,张 帅,刘婷婷,等. 中华蟾蜍消化道内分泌细胞的分布与形态 [J]. 解剖学杂志,2008,31(4):519-521.
Zhang S Z,Zhang S,Liu T T,et al. Distribution and morphology of endocrine cells in the digestive tract of *Bufo gargarizans* [J]. Chinese Journal of Anatomy, 2008,31(4):519-521. (in Chinese)

[9] Ishizuya-Oka A,Hasebe T,Ueda S,et al. Shh/BMP-4 signaling pathway is essential for intestinal epithelial development during *Xenopus* larval-to-adult remodeling [J]. Dev Dyn, 2006, 235:3240-3249.

[10] Donald D,Brown,Liquan C. Amphibian metamorphosis [J]. Developmental Biology,2007,306:20-33.

[11] Ishizuya-Oka A,Shi Y B. Molecular mechanisms for thyroid hormone induced remodeling in the amphibian digestive tract: a model for studying organ regeneration [J]. Dev Growth Differ,2005,47:601-607.

[12] Norris J L. The normal histology of the esophageal and gastric mucosae of the frog, *Rana pipiens* [J]. Exp Zool,1959,141:155-173.

[13] 岳兴建,张耀光,王志坚. 中华蟾蜍消化道组织学及组织化学研究 [J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2002,27(3):384-389.
Yue X J,Zhang Y G,Wang Z J. The histology and histochemistry studies of the digestive tract of the toad in *Bufo gargarizans* [J]. Journal of Southwest China Normal University:Natural Science,2002,27(3):384-389. (in Chinese)

[14] Paik W K,Cohen P P. Biochemical studies on amphibian metamorphosis:I. The effect of thyroxine on protein synthesis in the tadpole [J]. Gen Physiol,1960,43:683-696.

[15] Atkinson B G,Warkman A S,Chen Y. Thyroid hormone induces a reprogramming of gene expression in the liver of premetamorphic *Rana catesbeiana* tadpoles [J]. Wound Repair Regen,1998,6:323-337.

(上接第 6 页)

[14] Nathans R,Chu C Y,Serquina A K,et al. Cellular microRNA and P bodies modulate host-HIV-1 interactions [J]. Molecular Cell,2009,34(6):696-709.

[15] 郜玉峰,余 莉,李家斌,等. 靶向 ASGPR1 的外源性 microRNA 对 HBV 表达和复制的抑制作用 [J]. 世界华人消化杂志,2009,17(7):699-704. .
Gao Y F,Yu L,Li J B,et al. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA targeted ASGPR1 [J]. World Chinese Journal of Gastro Enterology,2009,17(7):699-704. (in Chinese)

[16] Shimizu S,Takehara T,Hikita H,et al. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Hepatology,2010,52(5):698-704.