

高原林蛙不同部位皮肤组织结构比较

张湑泽^{①②} 彭飞^① 侯业茂^① 付林^③ 沈迎芳^{①②} 刘晶^{①②} 孙玉奇^①
庞礴^③ 都玉蓉^④ 郭松长^{⑤*}

① 青海民族大学生态环境与资源学院 西宁 810007; ② 青海省生物技术与分析测试重点实验室, 青藏高原蕨麻研究中心 西宁 810007; ③ 中国科学院西北高原生物研究所 西宁 810008; ④ 青海师范大学生命科学院 西宁 810001; ⑤ 湖南农业大学动物科学技术学院 长沙 410128

摘要: 高原林蛙 (*Rana kukunoris*) 是青藏高原特有的两栖类动物, 已适应青藏高原高海拔低温、缺氧、强紫外线的自然环境。采用石蜡切片技术和 H.E 染色及扫描电镜技术对青藏高原东北部地区高原林蛙头部、背部、腹部、侧部皮肤结构进行观察。高原林蛙各部位皮肤均由表皮和真皮组成, 表皮是角质化的复层扁平上皮, 不同部位表皮层厚度接近, 真皮层厚度不同, 头部真皮层的厚度最厚, 为 $(197.86 \pm 29.73) \mu\text{m}$, 侧部最薄, 为 $(55.33 \pm 5.22) \mu\text{m}$ 。高原林蛙真皮疏松层中分布有颗粒腺、黏液腺和嗜酸腺。颗粒腺主要分布于头背部; 黏液腺在头部数目最多, 侧部最少; 嗜酸腺在机体各部位均匀分布。高原林蛙头部、背部、侧部色素细胞含量丰富, 腹部色素细胞含量较少。毛细血管分布于真皮疏松层腺体周围, 表皮中也有少量分布。这些结构特征可能是高原林蛙对青藏高原环境的适应策略。

关键词: 高原林蛙; 皮肤; 组织切片; 扫描电镜

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2018) 04-582-07

Comparison of Different Skin Tissue Structures in Different Parts of *Rana kukunoris*

ZHANG Xu-Ze^{①②} PENG Fei^① HOU Ye-Mao^① FU Lin^③ SHEN Ying-Fang^{①②} LIU Jin^{①②}
SUN Yu-Qi^① PANG Bo^③ DOU Yu-Rong^④ GUO Song-Chang^{⑤*}

① College of Eco-Environment & Resources, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007; ② Qinghai Provincial Biotechnology and Analytical Test Key Laboratory, Tibetan Plateau Juema Research Centre, Xining 810007; ③ Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008; ④ College of Life Science, Qinghai Normal University, Xining 810001; ⑤ College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: *Rana kukunoris*, a unique amphibian inhabited on the Qinghai-Tibet plateau, has adapted to the natural environment of high altitude, hypoxia and strong ultraviolet radiation in the long term. The skin

基金项目 青海民族大学校级理工自然科学基金项目 (No. 2016XJQ04), 青海民族大学大学生创新创业项目训练计划, 环境保护部生物多样性保护专项;

* 通讯作者, E-mail: guo_ast@126.com;

第一作者介绍 张湑泽, 男, 硕士研究生; 研究方向: 高原土著动物进化适应; E-mail: zxz1904@126.com.

收稿日期: 2018-01-06, 修回日期: 2018-04-02 DOI: 10.13859/j.cjz.201804009

structure produces a series of specific changes to make living organisms be survival to the environment. The morphological and histological observation on the skin of *R. kukunoris* was conducted by optical and scanning electron microscopy. Measurements were performed using image software Image-Pro Plus 6.0. All statistical tests were performed using software SPSS 19.0. All values given were shown as Mean \pm SE. $P < 0.05$ was considered significant in t test. The skin of *R. kukunoris* consisted of epidermis and dermis (Fig. 1, 2). The epidermis was keratinized stratified squamous epithelium (Fig. 2c, f), and its thicknesses were basically consistent at various positions. The thicknesses of dermis were different at different positions of the body (Table 2). The dermis of the back head was the thickest ($197.86 \pm 29.73 \mu\text{m}$) and that of the lateral side of body was the thinnest ($55.33 \pm 5.22 \mu\text{m}$). There were three types of cutaneous glands, mucous glands, granular glands and eosinophil glands in the stratum spongiosum (Fig. 1b). The mucous glands of dorsal was the most, and the granular glands were mostly distributed in the dorsal skin in a cluste. The epidermis contained a few capillaries and rich chromatophores, capillaries were evenly distributed in the dorsal-ventral skin, chromatophores were distributed in the dorsal skin, and a few in ventral skin, which is probably the strategy of *Rana kukunoris* adaption to Qinghai-Tibet plateau.

Key words: *Rana kukunoris*; The skin; Histology; Scanning electron microscope

高原林蛙 (*Rana kukunoris*) 原属中国林蛙 (*R. chensinensis*), 隶属于两栖纲 (Amphibia) 无尾目 (Anura) 蛙科 (Ranidae) 林蛙属, 是青藏高原特有的两栖类动物, 主要分布于甘肃、青海、四川和西藏等地, 海拔分布范围 2 000 ~ 4 400 m (谢峰等 2000)。主要生活于高原地区的水域及其附近的湿润环境中。低温、高海拔、强紫外辐射是其生境的重要特点。皮肤作为两栖类动物抵御外来有害物质侵袭、调节渗透压、维持体内环境稳定的主要器官 (Daly 1995), 对两栖类适应生态环境具有重要的意义 (Barra et al. 1995)。目前国内外许多学者对两栖类动物皮肤结构做了大量的研究 (林文达等 2008, 吴文英等 2011, 米志平等 2016), 但有关青藏高原东北部地区高原林蛙的研究还未见诸报道。我们拟通过形态学石蜡切片, H.E 染色的方法进行光学显微观察, 同时利用扫描电子显微镜进行观察, 以研究高原林蛙不同部位皮肤的形态结构特点和组织结构的差异。为探讨两栖类动物形态学特征与青藏高原环境适应进化之间的关系提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

高原林蛙 10 只 (7 雌, 3 雄), 体长 38.32 ~ 52.00 mm, 体重 5.8 ~ 16.4 g, 2016 年 8 月采自青海门源县海北高寒草甸生态系统定位研究站周边 (北纬 $37^{\circ}36'57.80''$, 东经 $101^{\circ}18'47.57''$, 海拔 3 200 m)。

1.2 实验方法

1.2.1 组织学观察 捕捉后双毁髓, 迅速取头部背侧 (头部)、躯干背部 (背部)、躯干侧部 (侧部) 和躯干腹部 (腹部) 4 处皮肤, 大小约 0.8 ~ 1.0 cm^2 , 将各部分皮肤分别置 Bouin's 液固定 24 h 后蒸馏水冲洗干净, 梯度酒精脱水, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。剪取大小为 1.5 mm \times 2.5 mm 形态规则的长方形样块展平。二甲苯透明, 石蜡包埋, Leica RM2245 石蜡切片机连续横切片 (切片方向与身体长轴垂直), 切片厚度 5 μm , 每隔 10 张切片选取 1 张切片, 每一个个体头部、背部、腹部、侧部各选取 10 张切片。经 H.E 染色后, Nikon DS-Ri2 显微镜观察, 拍照。

1.2.2 扫描电镜观察 皮肤取材大小约 0.1 cm \times 0.1 cm, 固定后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。标本定位后用 JEOL JMC-6000 扫描电子显微镜观察并

拍照。

1.2.3 数据处理 采用 Image-Pro-Plus6.0 图像软件进行测量, SPSS19.0 软件进行统计分析。高原林蛙头部、背部、腹部及侧部 4 个部位各取 10 张切片, 每张切片选取 3 个不同的视野观察统计腺体数、色素细胞数、毛细血管数及钙化层的有无。并对其中 5 个个体进行腺体测量, 测量 3 个位点处的表皮层厚度、真皮层厚度, 并测量颗粒腺、黏液腺、嗜酸腺长短径和面积。实验所得数据均以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示。采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 差异显著。

2 结果

2.1 皮肤结构

高原林蛙皮肤结构包括表皮层和真皮层。高原林蛙表皮结构包括角质层、颗粒层、棘细胞层、生发层。高原林蛙真皮结构包括疏松层、黏液腺、颗粒腺、嗜酸腺、致密层。黏液腺在背部和腹部皮肤内基本分布均匀, 形态似泡状, 经 H.E 染色后呈现淡紫色; 颗粒腺散布在体背皮肤中, 多以团状形式存在, 腺体较大, 经 H.E 染色呈红色; 嗜酸腺位于接近表皮层的一侧真皮层内, 大小与黏液腺基本一致, 大多内空, 腺体边缘被染成红色, 是林蛙体内发现的一种特殊腺体; 色素细胞主要位于表皮和真皮中间位置, 呈黑色, 点状分布 (图 1); 毛细血管主要位于真皮疏松层, 在表皮层也有少量分布, 经 H.E 染色后可观察到内部半空的结构, 其中非空的一半为红色。

2.2 皮肤中腺体数量的比较

统计数据显示 (表 1), 高原林蛙头部的黏液腺数目最多, 显著高于侧部的黏液腺数目 ($P < 0.05$), 而与其他部位无明显差异; 高原林蛙头、背部颗粒腺数目明显高于腹部和侧部的颗粒腺数目 ($P < 0.05$); 高原林蛙不同部位嗜酸腺数目无明显差异。高原林蛙头背部的色素细胞数量较多, 皮肤颜色较深, 侧部次之, 腹部的色素细胞较其他部位少。对高原林蛙的表皮毛细血管数目统计表明, 侧部毛细血管最少,

与其他部位差异显著 ($P < 0.05$), 头背部、腹部皮肤都含有较多的毛细血管, 可作为辅助呼吸器官。

2.3 皮肤中腺体大小的比较

统计分析表明 (表 2), 高原林蛙不同部位表皮层厚度差异不明显; 头、背部的真皮层厚度显著高于侧、腹部的真皮层厚度; 不同部位不同腺体的长径、短径的分布情况与面积分布情况基本一致。不同部位颗粒腺和嗜酸腺的面积无明显差异; 高原林蛙头背部皮肤黏液腺面积大于其他部位, 其中, 头部与其他部位差异明显。

2.4 扫描电镜观察

取高原林蛙背部表皮样品在扫描电镜下观察, 皮肤表层细胞多呈不规则多边形扁平表皮细胞, 细胞间具有明显界限, 细胞大小不一, 细胞间连接处形成微型隆起。细胞游离面的细胞膜形成许多蜂窝状小凹陷 (图 2a); 颗粒腺分泌大量的颗粒 (图 2b, c); 腺体位于真皮疏松层, 毛细血管分布于腺体周围 (图 2d), 还有相对致密的真皮致密层 (图 2e); 在皮肤表面发现角质层和鳞片状结构 (图 2f)。

3 讨论

高原林蛙属于陆栖性较强的物种 (费梁等 2001)。在适应青藏高原高寒、低氧、强紫外线环境的过程中, 皮肤结构随着生境的变化也发生了适应性变化。其体背和体腹侧皮肤都出现了角质层, 角质层可以防止体内水分的散失, 还具有一定透气性。高原林蛙头背部有较多的颗粒腺及黏液腺, 颗粒腺可以合成并分泌多种活性物质, 从而抵御外源细菌或真菌的侵袭, 黏液腺能够分泌黏液覆盖于体表, 使体表形成一层黏液膜, 保持皮肤的光滑与湿润, 具有防御、保湿、皮肤呼吸、温度调节、pH 调节等作用。黏液腺在高原林蛙身体头部、背部、腹部中基本均匀分布, 但不同部位黏液腺大小不同; 颗粒腺主要在头背部分布, 腹侧部分布较少。本研究中, 高原林蛙表皮层厚度在不同部位间

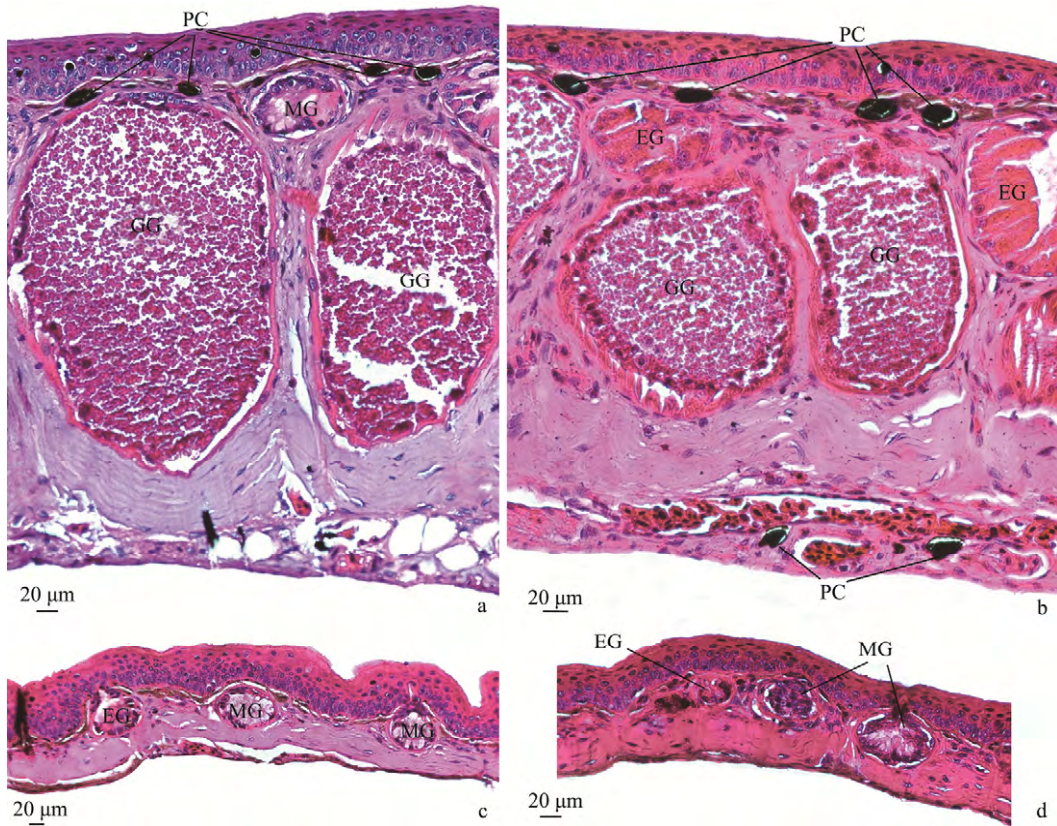


图 1 高原林蛙皮肤组织学观察

Fig. 1 Histological structure of *Rana kukunoris* skin system

a. 头部背侧切片 ($\times 20$); b. 背部切片 ($\times 20$); c. 腹部切片 ($\times 20$); d. 侧部切片 ($\times 20$).

a. The head ($\times 20$); b. Dorsal ($\times 20$); c. Ventral ($\times 20$); d. Lateral ($\times 20$).

EG. 嗜酸腺; GG. 颗粒腺; MG. 黏液腺; PC. 色素细胞。

EG. Acidophilic gland; GG. Granular gland; MG. Mucous gland; PC. Chromocyte.

表 1 高原林蛙不同部位表皮腺体数比较

Table 1 Skin glands and related parameters in different parts of *Rana kukunoris*

取样部位 Position	色素细胞 Chromocyte	颗粒腺 Granular gland	黏液腺 Mucous gland	嗜酸腺 Acidophilic gland	毛细血管 Capillary
头部 Head	9.57 ± 1.13^a	1.16 ± 0.28^a	1.32 ± 0.21^a	0.97 ± 0.13^a	0.59 ± 0.13^a
背部 Dorsal	9.13 ± 0.92^a	1.52 ± 0.33^a	0.86 ± 0.28^a	1.05 ± 0.20^a	0.61 ± 0.14^a
侧部 Lateral	7.18 ± 0.89^a	0.64 ± 0.19^b	0.48 ± 0.15^a	0.70 ± 0.07^a	0.26 ± 0.06^b
腹部 Ventral	0.55 ± 0.14^b	0.20 ± 0.05^b	0.68 ± 0.26^a	0.81 ± 0.14^a	0.49 ± 0.12^a

数据以平均值 \pm 标准误表示。不同部位相同皮肤层比较, 不同标记的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Data are expressed as Mean \pm SE. Values with different letter superscripts in the same row or column mean significant difference ($P < 0.05$).

表 2 高原林蛙不同部位皮肤厚度及腺体大小比较

Table 2 Skin thickness and gland size in different parts of *Rana kukunoris*

取样部位 Position	表皮层厚度 Epidermis thickness (μm)	真皮层厚度 Dermis thickness (μm)	颗粒腺面积 Granular gland areas (μm ²)	黏液腺面积 Mucous gland areas (μm ²)	嗜酸腺面积 Acidophilic gland areas (μm ²)
头部 Head	63.23 ± 4.74 ^a	197.86 ± 29.73 ^a	18 254.39 ± 5 154.47 ^a	7 018.88 ± 1 274.82 ^a	8 632.09 ± 4 123.27 ^a
背部 Dorsal	56.61 ± 3.27 ^a	161.84 ± 23.84 ^a	17 417.26 ± 2 749.60 ^a	2 696.96 ± 620.39 ^b	5 964.87 ± 1 499.29 ^a
侧部 Lateral	44.25 ± 2.79 ^b	55.33 ± 5.22 ^b	8 618.91 ± 2 246.05 ^a	1 318.00 ± 272.53 ^b	2 302.02 ± 383.81 ^a
腹部 Ventral	60.63 ± 3.54 ^a	64.40 ± 7.90 ^b	8 851.43 ± 0.00 ^a	2 904.97 ± 484.01 ^b	1 905.84 ± 294.47 ^a

数据以平均值 ± 标准误表示。不同部位相同皮肤层比较，不同标记的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Data are expressed as Mean ± SE. Values with different letter superscripts in the same row or column mean significant difference ($P < 0.05$).

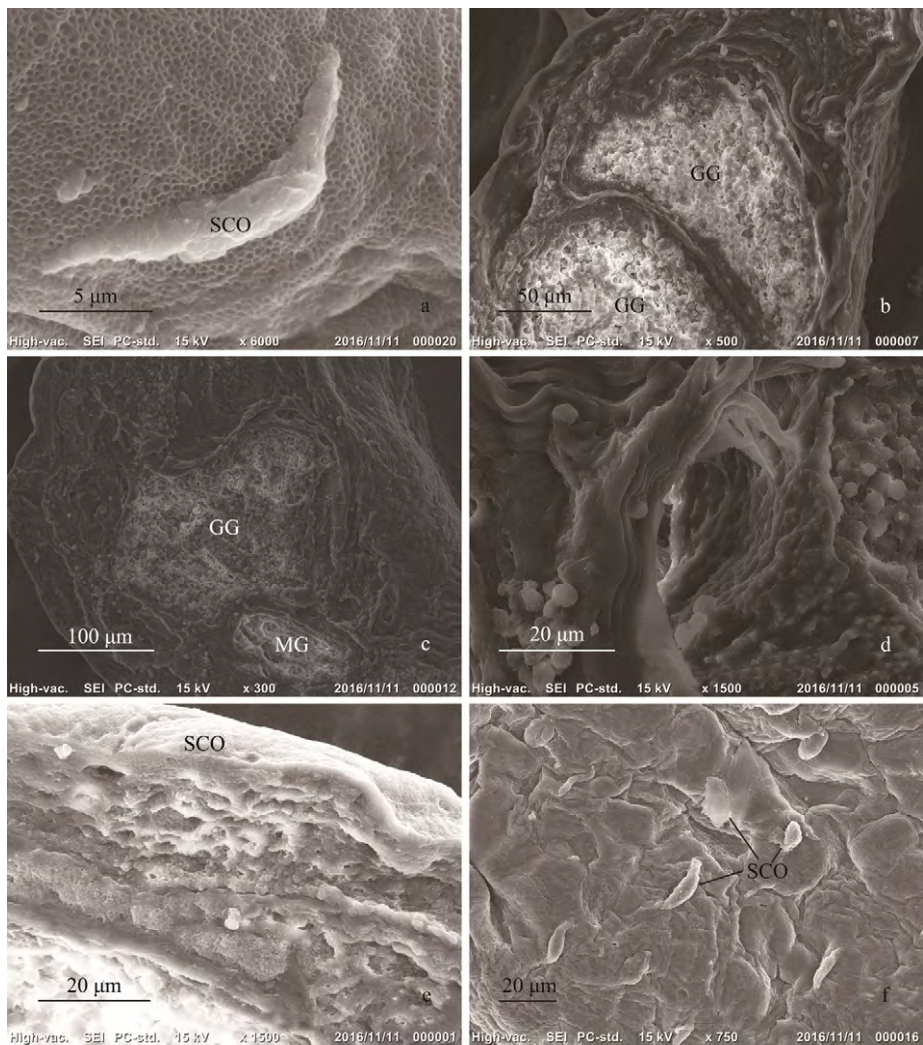


图 2 高原林蛙皮肤扫描电镜观察

Fig. 2 Scanning electron microscope structures of *Rana kukunoris* skin system

a. 蜂窝状凹陷; b. 颗粒腺; c. 躯干背侧; d. 毛细血管; e. 真皮层; f. 鳞片状表皮结构。

a. Honeycomb cavity; b. Granular gland; c. Dorsal; d. Capillary; e. Dermis; f. Scaly epidermis.

GG. 颗粒腺; MG. 黏液腺; SCO. 角质层。GG. Granular gland; MG. Mucous gland; SCO. Stratum corneum.

差别不明显，但真皮层厚度在不同部位间存在差异，这种差异主要由黏液腺大小差异造成。头、背部皮肤中黏液腺面积较大则皮肤较厚，腹、侧部黏液腺面积较小则皮肤较薄。在高原林蛙的体背和体腹皮肤疏松层内还观察到一种特殊的腺体，其腺细胞呈高柱状，细胞分界较明显，细胞核扁圆形，位于基部，细胞质经 H.E 染色染成淡红色，细胞质内未见分泌颗粒，这与米志平等（2016）对高原林蛙皮肤的组织结构研究发现的嗜酸腺描述一致。这些腺体在高原林蛙皮肤中的分布可能是其对高海拔低氧、低温和强紫外线辐射生境的适应策略。

两栖动物是动物由水生到陆生的过渡类群，其呼吸系统并不完善，两栖类皮肤的辅助呼吸作用在整体氧气供应中有着重要的作用（高凤娟等 2016）。已报道的部分有尾目和蝾螈目物种中表皮和真皮疏松层均发现毛细血管（黄静等 2017），无尾目的中华大蟾蜍（*Bufo gargarizans*）（张贤芳等 2002）、隆肛蛙（*Paa quadranus*）（梁刚等 2004）、刺胸齿突蟾（*Scutiger mammatus*）和胸腺齿突蟾（*S. glandulatus*）（曹燕等 2011）表皮内和真皮疏松层中也发现了毛细血管的存在。高原林蛙表皮层和真皮疏松层中均发现有毛细血管分布，进一步证实了皮肤对两栖类呼吸的重要性。此外，高原林蛙表皮中角质层具有透气性，可以使毛细血管气体交换效率提高，增强高原林蛙呼吸效率，这也是高原林蛙在长期系统演化中形成的适应青藏高原高海拔环境的皮肤交换气体的适应机制。

高原林蛙皮肤中有发达的色素细胞，且头背部皮肤色素细胞远多于腹部的皮肤色素细胞，这与隆肛蛙（梁刚等 2004）、多疣狭口蛙（*Kaloula verrucosa*）、黑斑蛙（*R. nigromaculata*）（林文达等 2008）、昭觉林蛙（*R. chaochiaoensis*）、峨眉林蛙（*R. omeimontis*）（米志平等 2016）研究结果一致。高原林蛙皮肤除真皮疏松层内有发达的色素细胞层外，在表皮内还有大量的色素细胞分布。皮肤中大量的色

素细胞交叉形成一定厚度的色素层，吸收部分紫外辐射，达到减轻紫外辐射对皮肤及机体内器官损伤的作用；由于本地区昼夜温差大，作为变温动物的高原林蛙需通过皮肤中黑色素细胞内的黑色素颗粒聚集或扩散来吸收或散失热量，这也是高原林蛙对其生活的低温和强紫外线环境的适应策略。此外，由于高原林蛙所处的生境有金露梅（*Potentilla fruticosa*）灌丛、高寒草甸、高寒湿地，不同生境基底颜色不尽相同，高原林蛙的体色会随所处生境的不同而变化，导致不同高原林蛙个体体色有明显不同，这与东北林蛙（*R. dybowskii*）皮肤颜色变化的结果一致（刘满樱等 2007）。对基底颜色的匹配可以降低动物在活动时被捕食者或猎物发现的可能性（Vignieri et al. 2010，童浩杰等 2016），提高动物对环境的适应能力。

本研究在高原林蛙皮肤中没有发现钙化层结构。目前在无尾两栖类皮肤中已报道 11 个科的部分物种皮肤中存在钙化层的结构（雷飞宙等 2012）。皮肤钙化层是皮肤内骨骼的一种类型，对维持个体的水平衡具有重要意义，完整的钙化层有利于减少水分散失，限制皮肤物质交换（Toledo et al. 1993，Vickaryous et al. 2009）。高原林蛙生活环境水分不易蒸发，钙化层作用较小，高原林蛙皮肤中未发现明显的钙化层结构。

对高原林蛙背部表皮的扫描电镜观察发现，其皮肤表层为一层角质层，表层细胞多呈不规则多边形扁平表皮细胞。细胞游离面的细胞膜形成许多蜂窝状小凹陷，该形态符合两栖类动物表皮形态。对金佛拟小鲵（*Pseudohynobius jinfo*）幼体皮肤的观察，发现不同部位的皮肤呈现明显的差别（黄静等 2017）。由于我们只对高原林蛙背部表皮做了扫描电镜观察，识别出一些细胞及特殊形态结构组成，但是对于高原林蛙皮肤形态结构及细胞组成的生物学意义，还需进一步的研究。

总之，高原林蛙在适应青藏高原严酷环境的过程中，表皮出现了角质层，皮肤色素细胞

背侧比腹侧更加发达, 颗粒腺在头、背部皮肤中数量最多, 黏液腺在头部皮肤中数量更多, 皮肤真皮层中发现有毛细血管, 这些重要特征使高原林蛙能更好地生活在高原环境中。而对于高原林蛙皮肤形态结构变化的内在分子机制, 不同生境下高原林蛙表皮黑色素细胞分布的变化, 钙化层能否形成的机制等相关问题还需科研工作者继续研究发掘。

参 考 文 献

- Barra D, Simmaco M. 1995. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends in Biotechnology*, 13(6): 205–209.
- Daly J W. 1995. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(1): 9–13.
- Toledo R C, Jared C. 1993. The calcified dermal layer in anurans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Comparative Physiology*, 104(3): 443–448.
- Vickaryous M K, Sire J Y. 2009. The integumentary skeleton of tetrapods: origin, evolution, and development. *Journal of Anatomy*, 214(4): 441–464.
- Vignieri S N, Larson J G, Hoekstra H E. 2010. The selective advantage of crypsis in mice. *Evolution*, 64(7): 2153–2158.
- 曹燕, 谢锋, 江建平. 2011. 齿突蟾属四个物种皮肤的组织学观察. *四川动物*, 30(2): 214–219.
- 费梁, 叶昌媛. 2001. 四川两栖类原色图鉴. 北京: 中国林业出版社, 166–173.
- 高凤娟, 李丕鹏, 王译唱, 等. 2016. 西藏蟾蜍皮肤的组织学观察. *四川动物*, 35(3): 444–451.
- 黄静, 赵书, 王霞, 等. 2017. 金佛拟小鲵幼体皮肤的显微结构观察. *动物学杂志*, 52(4): 620–627.
- 雷飞宙, 江建平, 李成, 等. 2012. 角蟾亚科 3 物种皮肤的组织学观察. *动物学杂志*, 47(3): 20–27.
- 梁刚, 王琼霞. 2004. 隆肛蛙皮肤及其腺体的显微结构特征. *动物学杂志*, 39(4): 73–76.
- 林文达, 朱静, 郭爱伟, 等. 2008. 云南昆明地区三种蛙皮肤显微结构的比较. *四川动物*, 27(3): 420–423.
- 刘满樱, 肖向红, 许佳佳, 等. 2007. 东北林蛙皮肤及其腺体组织形态学观察. *野生动物*, 28(4): 6–9.
- 米志平, 廖文波. 2016. 林蛙属 3 物种皮肤的组织结构比较. *动物学杂志*, 51(5): 844–852.
- 童浩杰, 张凯龙, 刘宇航, 等. 2016. 基底颜色对两种沙蜥体色变异的影响. *生物多样性*, 24(9): 1039–1044.
- 吴文英, 李丕鹏, 陆宇燕, 等. 2011. 黑龙江繁殖期两性皮肤组织结构的差异比较. *野生动物*, 32(3): 141–145.
- 谢锋, 叶昌媛, 费梁, 等. 2000. 中国西北地区中国林蛙各居群的分类学研究(两栖纲: 蛙科). *动物分类学报*, 25(2): 228–235.
- 张贤芳, 张耀光, 王志坚, 等. 2002. 中华蟾蜍皮肤的组织学观察. *西南大学学报: 自然科学版*, 24(5): 454–457.