

饥饿胁迫下大鳞副泥鳅外周红细胞的形态变化

杜良, 钟爱华*, 周兵飞, 姚海富, 江新琴 (浙江海洋学院水产学院, 浙江舟山 316004)

摘要 [目的] 为研究饥饿胁迫下鱼类的生理生化变化提供参考。[方法] 采用传统瑞氏染色法研究饥饿胁迫下大鳞副泥鳅外周红细胞的形态变化。[结果] 大鳞副泥鳅的成熟红细胞逐渐发生变化, 先出现核膜溶解, 然后出现细胞形变, 接着出现核质扩散和细胞膜溶解, 最后整个成熟红细胞膜完全溶解, 核染色反应由紫黑色变为紫红色最后变为粉红色。大鳞副泥鳅的幼稚红细胞则明显增多。[结论] 在饥饿胁迫下大鳞副泥鳅外周红细胞出现核异常, 主要表现为核膜溶解和核质扩散, 因此红细胞核异常可以作为饥饿胁迫的指标。

关键词 饥饿胁迫; 大鳞副泥鳅; 红细胞; 形态

中图分类号 S912 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)23-07761-03

Morphological Changes of Peripheral Erythrocyte in *Paramisgurnus dabryanus* under Starvation Stress

DU Liang, ZHONG Ai-hua et al (Fishery School of Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022)

Abstract [Objective] The research aimed to provide references for studying the physiological and biochemical changes of fishes under starvation stress. [Method] Using traditional Wright's staining method, the morphology changes of peripheral erythrocyte in *Paramisgurnus dabryanus* under starvation stress were studied. [Result] The morphology of mature erythrocyte in *P. dabryanus* gradually changed. First, the nuclear membrane was dissolved, then the cell deformation occurred and the nucleoplasm diffused and cytomembrane began to dissolve, finally the membrane of mature erythrocyte completely dissolved. The staining reaction of nuclear was from purple-black to purple-red, and finally turned to pink. The number of immature erythrocyte in *P. dabryanus* was significantly increased. [Conclusion] The nuclear anomalies of peripheral erythrocyte in *P. dabryanus* under starvation stress occurred, and their manifestations were the dissolution of karyolemma and diffusion of karyoplasm. Therefore the nuclear anomalies of erythrocyte could be used as the index of starvation stress.

Key words Starvation; *Paramisgurnus dabryanus*; Erythrocyte; Morphology

大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*), 隶属鲤形目 (Cypriniformes)、鳅科 (Cobitidae)、花鳅亚科 (Cobitinae)、副泥鳅属 (*Paramisgurnus*), 我国除青藏高原外, 各地的河川、沟渠、水田、池塘都有大鳞副泥鳅的分布。大鳞副泥鳅肉质细嫩, 味道鲜美, 是一种高蛋白、低脂肪类的高档营养珍品, 被人们称为“水中人参”; 大鳞副泥鳅还具有较高的药用价值, 对肺炎、皮肤搔痒、跌打损伤、手指疔疮、小便不畅和乳腺癌等均有一定的疗效, 因此泥鳅是一种生产潜力大、很有发展前景的养殖品种, 国内外市场的需求量较大^[1]。

饥饿是鱼类在自然水域生态系中所必须面对的一种生理胁迫现象, 产生饥饿胁迫的原因有自然界中食物分布在空间上的不均匀性、季节更替或环境剧变等, 即使在养殖条件下由于养殖密度过大、个体间相互竞争、投饵不足、投喂技术不当等原因导致鱼类出现因食物短缺而引起的饥饿胁迫^[2]。饥饿胁迫既是鱼类中经常面临的生理胁迫现象, 也是影响鱼类正常生长、发育和生存的重要环境因子之一, 对鱼类正常生长、发育和生存产生重要影响。研究表明, 饥饿可以影响鱼类代谢、行为、组织结构、存活、繁殖、肌体组成成分、酶活性和恢复生长^[3-5]。在自然环境下, 因季节更替大鳞副泥鳅在冬季出现自然停食而处于饥饿状态。目前, 饥饿胁迫下大鳞副泥鳅红细胞形态的变化尚未见报道。笔者研究大鳞副泥鳅饥饿胁迫下红细胞的形态变化, 以期能为饥饿胁迫下鱼类的生理生化变化提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验鱼 试验用鱼是由浙江省舟山台岛鳅业有限公司提供的同批次大鳞副泥鳅, 共 82 尾。试验开始前, 将试验鱼放入特定的养殖箱内, 养殖箱为 400 L HDPE 水箱, 对试验鱼暂养 7 d, 以使其适应试验环境。

1.2 试验设计及养殖管理 在获得试验用鱼后, 将试验鱼平均分到 3 个平行养殖箱内 (水体体积 250 L), 试验鱼体长 (10 ± 2) cm, 初始体重为 (15 ± 3) g, 每日中午 12:00 准时投喂由浙江省舟山台岛鳅业有限公司提供的颗粒饲料, 至鱼恰好饱食, 进行为期 10 d 的适应性暂养, 以消除其应激性。

适应性暂养期间, 室温控制在 22 ℃; 光照条件为弱光环境, 在白天试验室内关闭窗帘, 晚上打开窗帘; 养殖用水为学校自来水系统提供的自来水, 经过 48 h 的曝气后注入养殖箱内, 每 48 h 换水 1 次, 每次换水 125 L; 因大鳞副泥鳅所需氧气量不像其他鱼类那么多且其喜静不喜动, 因此不放置充氧设备, 以免试验鱼受惊死亡, 只通过换水的方式来提供其生存所需的氧气。

经过适应性暂养后, 便开始饥饿试验。饥饿试验期间, 温度、光照和氧气等条件维持不变, 仅停止投喂; 每日观察 2 次 (早 12:00 和晚 19:00), 每周二上午 10:00 进行采样。饥饿时间为 42 d。

1.3 样本采集 使用断尾椎取血法采集样本。样本采集时, 从 3 个平行养殖箱中各取 2 条体表完整、行为正常的大鳞副泥鳅, 解剖后剪断尾椎, 取血。

1.4 血涂片制作 取 2 片准备好的载玻片, 将断尾处的血液挤出 1 滴, 滴落在载玻片的左端; 血滴半径一般为 2 mm; 取推片置于玻片的近中心侧, 使推片和玻片间成 45° ~ 80° 角, 血膜两边留出一定的空隙; 将推片向左移动, 与血滴相接触; 当血液沿推片的边缘分散后, 以稍用力而平稳的速度向

基金项目 浙江海洋学院大学生科技创新项目 (浙海院团 [2013] 38 号); 浙江省教育厅科研项目 (Y201328411)。

作者简介 杜良 (1991 -), 男, 山东济宁人, 本科生, 专业: 水产养殖。
* 通讯作者, 讲师, 硕士, 从事水生生物基础生物学研究。

收稿日期 2014-07-07

右推。因为是全血涂片,第1次涂片时血膜较厚,因此进行第2次涂片,将推片上的残血迅速擦干并在玻片上将血膜再次由左向右复推1次,此时血膜变得薄而均匀;将涂片置于试验台上自然风干。

1.5 染色 采用传统的瑞氏染色法进行染色。使用瑞氏染色液(杭州天和微生物试剂有限公司出品)分别对8片血涂片进行染色,其中甲液(对氨基苯磺酸0.8 g溶解于100 ml 2.5 mol/L乙酸中)染色45 s,乙液(甲萘胺0.5 g溶解于100 L 2.5 mol/L乙酸溶液)染色7.5 min,然后流水冲洗并干燥。

1.6 红细胞形态观察 将染色后的涂片进行干燥并置于光镜下观察。随机选取大鳞副泥鳅血涂片的视野,观察红细胞细胞质、细胞核的染色情况;记录细胞膜、细胞质、细胞核及核膜的形态,将观察到的结果进行备注并先使用Canon A3100彩色照相机进行拍照。同时,将染色效果好的涂片,置于奥林巴斯倒置显微镜下进行拍片。

2 结果与分析

2.1 成熟红细胞的形态 大鳞副泥鳅血涂片的有形成分中,红细胞占绝大多数,红细胞主要分为成熟红细胞和幼稚红细胞。大鳞副泥鳅成熟的红细胞形态呈椭圆形或长椭圆形,表面光滑。细胞质不能被染色或出现极淡的蓝色。核呈小椭圆形,核小而致密,位于细胞中央,染色反应为紫红色或紫黑色(图1)。

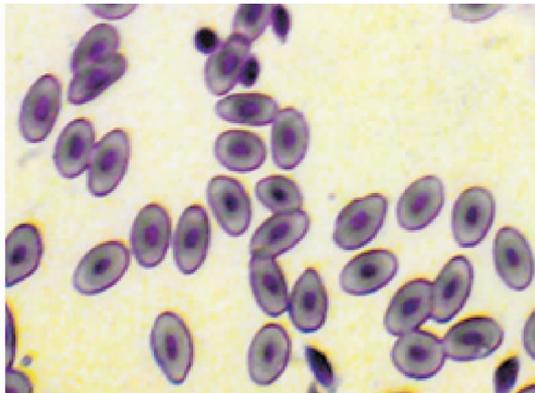


图1 大鳞副泥鳅成熟的红细胞形态

2.2 幼稚红细胞的形态 泥鳅幼稚红细胞形态不规则,多呈圆形或椭圆形,表面不光滑,部分有不规则突起。细胞质不能被染色或出现极淡的蓝色。核圆形,位于细胞中央或稍偏向一侧,染色反应为紫红色或紫黑色(图2)。

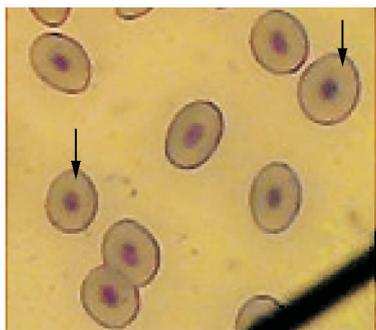


图2 大鳞副泥鳅幼稚红细胞的形态

2.3 饥饿过程中红细胞的形态变化 饥饿至第7天,可观察到大量成熟的红细胞,细胞规则,界限清晰;还能观察到少量的幼稚红细胞,圆形,染色反应为紫黑色,直径略小于成熟红细胞的长径。同时,观察到少量的成熟红细胞细胞核开始出现模糊现象,染色反应呈淡紫红色(图3)。

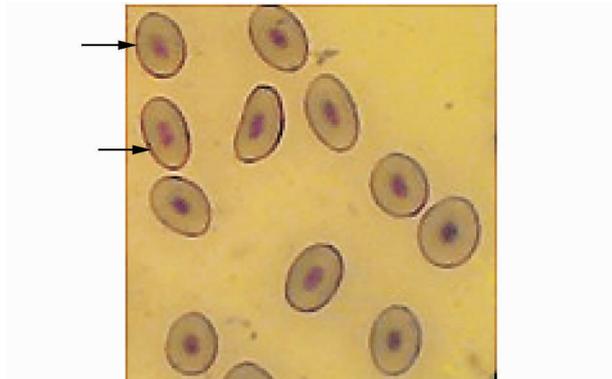
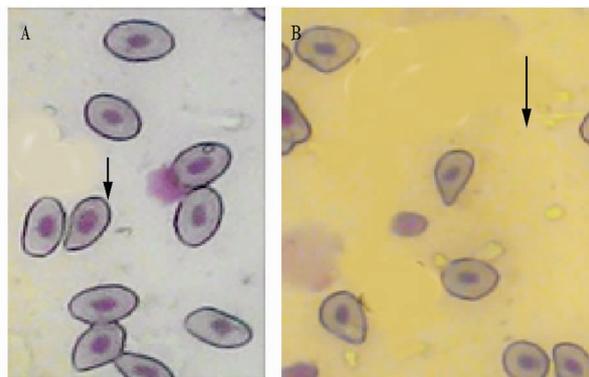


图3 饥饿第7天大鳞副泥鳅的红细胞形态

饥饿至第14天,依然可以观察到大量的成熟红细胞以及少量的幼稚红细胞。但是,核膜溶解现象开始增多,部分红细胞的细胞核开始扩散,溶解扩散的核染色反应为紫红色(图4A),出现极少量完全溶解的细胞。同时,部分成熟红细胞已经发生形变,不再维持椭圆形或长椭圆形,呈现雨滴状或豌豆状(图4B)。



注:A.核膜溶解;B.细胞形变。

图4 饥饿第14天大鳞副泥鳅的红细胞形态

饥饿至第21天,依然能够观察到大量成熟红细胞及少量幼稚红细胞。但是,出现核膜溶解现象的成熟红细胞开始大量出现,且部分成熟红细胞核膜已经完全溶解,核质已经扩散,细胞体积增大,核呈现不规则形状,染色反应为浅紫色或粉红色。细胞形变进一步加剧,细胞膜溶解增加(图5)。

饥饿至第28天,成熟红细胞数量明显减少,圆形幼稚红细胞数量开始增多(图6A)。核膜完全溶解,核质扩散的成熟红细胞急剧增多,细胞已不能维持正常形状,并且能明显观测到完全溶解的成熟红细胞的核质,染色反应为浅紫色或粉红色(图6A)。另一方面,发生形变的细胞也急剧增多,多呈现雨滴状,少数呈豌豆状,且大部分发生形变的细胞细胞膜开始溶解(图6B)。

饥饿至第35天,成熟红细胞已急剧减少,且大部分都已发生形变,与此同时幼稚红细胞含量出现明显上升。完全溶解的

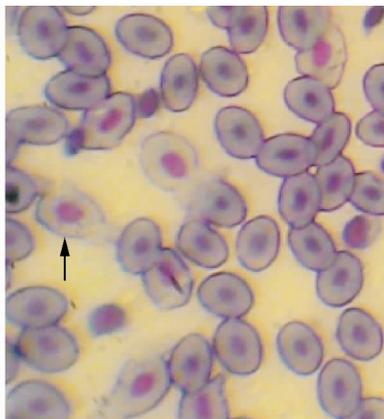
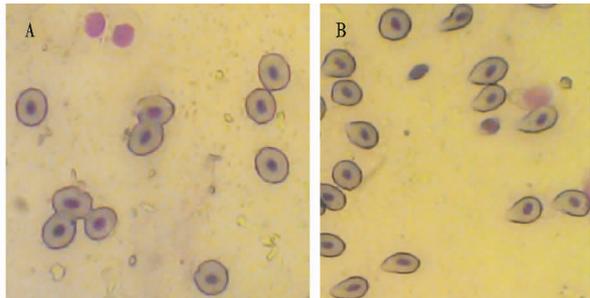


图5 饥饿第21天大鳞副泥鳅的红细胞形态

成熟红细胞数量也明显增加,染色反应为粉红色(图7)。

饥饿至第42天,成熟的红细胞含量进一步减少,只能观测到少量未发生形变的细胞,同时能观察到明显增多的幼稚红细胞(图8)。完全溶解的成熟红细胞大量出现,染色反应为粉红色。

通过观察发现,大鳞副泥鳅成熟红细胞含量随着饥饿时间的延长而不断下降,泥鳅的幼稚红细胞相对数量明显增多;形态上,泥鳅的成熟红细胞形态变化表现为:先出现核膜溶解,然后出现细胞变形,接着出现核质扩散和细胞膜溶解,最后整个成熟红细胞膜完全溶解,核染色反应由紫黑色变为紫红色最后变为粉红色。



注:A. 细胞膜完全溶解和核扩散;B. 细胞膜溶解。

图6 饥饿第28天大鳞副泥鳅的红细胞形态

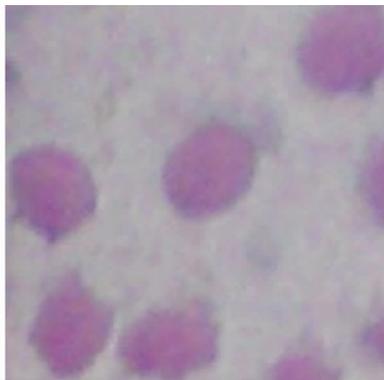


图7 饥饿第35天大鳞副泥鳅的红细胞形态

3 讨论

在鱼类中,除短腹冰鱼等极少数南极目鱼类没有红细胞或红细胞含量很少外,绝大多数鱼类的红细胞含量均占其血细胞总量的90%以上^[6];该细胞呈椭圆形或长橄榄形,表面

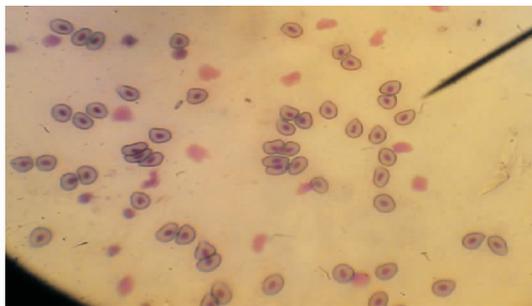


图8 饥饿第42天大鳞副泥鳅的红细胞形态

光滑,成熟红细胞中央有1个圆形或椭圆形细胞核,与哺乳类的无核成熟红血细胞显著不同^[6-7]。在大鳞副泥鳅外周血中能观察到大量成熟红细胞,正常生理状态下其外形呈椭圆形,表面光滑,中央有1个圆形或椭圆形细胞核。然而,随着饥饿时间的延长,其成熟红细胞的形态发生了显著变化,首先出现核膜溶解和细胞变形现象,然后核膜完全溶解核质扩散和细胞膜溶解,最后细胞膜完全溶解,只剩下扩散的核质,称为核影^[7],染色反应呈粉红色。脾脏是鱼类造血、过滤血液和破坏衰老红细胞的中心场所。随着饥饿时间的延长,大鳞副泥鳅外周血中出现大量的红细胞核影,可能是因为饥饿不仅影响了红细胞的形态,还影响了大鳞副泥鳅的脾脏功能,使其过滤血液和破坏衰老红细胞的功能下降,导致大量被破坏的红细胞无法自然清除。

鱼类红细胞与哺乳动物的红细胞一样,其主要机能为运输 O_2 和 CO_2 ,同时缓冲机体产生的酸碱物质以及维护体内离子平衡等。随着饥饿时间的延长,大量成熟红细胞遭到破坏,为了维持运输氧气和二氧化碳等生理功能,大鳞副泥鳅外周血中幼稚红细胞的数量不断增加。鱼类造血器官除了脾脏外,还有肾脏等器官参与造血。在饥饿胁迫下,真正参与造血的器官还需进一步研究。

由于某些因素造成红细胞膜破裂和胞质外溢,而其核仍能在血液中存在一段时间,这种主要是核质的红细胞被称为“核影”红细胞,由成熟红细胞到“核影”红细胞的过渡类型为分解红细胞,“核影”红细胞是红细胞衰老过程中的形态表现,主要与鱼体自身的生理状态有关^[8]。笔者发现在饥饿胁迫下随着饥饿时间的延长,能观察到成熟红细胞、分解红细胞和“核影”红细胞。1982年,Hooftman^[9]等首次证实化学诱变剂甲醛磺酸乙酯(EMS)能诱发泥鳅鱼外周红细胞微核形成及核异常。笔者也发现在饥饿胁迫下大鳞副泥鳅外周红细胞出现核异常,主要表现为核膜溶解,核质扩散,因此红细胞核异常可以作为饥饿胁迫的指标。

参考文献

- [1] 朱兴国,叶永兴,赵后会,等. 泥鳅无公害高产高效养殖新技术[J]. 内陆水产,2007(1):38.
- [2] KIM M K,LOVELL R T. Effect of restricted feeding regimens on compensatory weight gain and tissue changes in channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds[J]. Aquaculture,1995,135(4): 285-293.
- [3] LVAREZ A,GARCÍA B,GARRIDO M D,et al. The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage[J]. Aquaculture,2008,284(1/4):106-114.

木薯生物质能产业的发展。云南《生物产业发展规划纲要(2006-2020)》、《云南省人民政府关于加快推进生物产业发展的意见》等指导性文件也显示了云南省政府对木薯产业发展的支持。

1.4 挑战

1.4.1 市场竞争加剧。目前,云南木薯种植、加工技术水平低下,木薯及其产品在市场上不具优势,且产品附加值低。同时,木薯的主要产品燃料乙醇受国际油价波动的影响明显,将使利用木薯发展燃料乙醇丧失价格优势;而且随着生物燃料产业技术的日益成熟,以农林废弃物为原料的生物燃油产业的不断推进,木薯价格将会减低,也影响农户种植木薯的积极性^[7]。另外,随着我国木薯及其制品的市场需求增加,我国也成为木薯的最大进口国。与周边的广西及东盟国家相比,云南省木薯产业的发展不具优势,这将是云南省木薯产业发展的严峻挑战。

1.4.2 粮食安全的影响。随着全球粮食危机的加剧,国家对粮食安全的重视更加突出,从而影响对木薯产业发展的扶持力度,同时由于土地资源和增产潜力的限制,利用木薯发展燃料乙醇的空间不大^[8]。另外,云南地处山区,种植技术落后,组织化程度低,基本依靠农民自产自销,抗市场风险能力弱。

2 云南木薯产业发展的政策

2.1 科学规划,合理布局 政府应加强对木薯产业发展的政策指导,制订合理的产业发展目标。合理规划 and 布局木薯种植业和加工业,使加工能力与原料供应相匹配;在确保粮食安全的前提下,大力引导在荒山、荒地等边际土地开发种植木薯;发展精深加工实现产业化经营,以木薯加工企业为龙头带动销售、加工和种植,从而推进木薯产业化进程。同时,因地制宜地突出区域特色,开发新产品,满足市场多元化和优质化需求。

2.2 加大对木薯的科学研究

2.2.1 提高木薯种植技术水平。云南地处西部高原,立体气候明显,地形地貌复杂多样。木薯的生产和研究基础薄弱,应因地制宜地加强木薯新品种的引进,特别是高产、耐寒的木薯品种的适应性研究,扩大种植范围。同时,加强木薯新品种和栽培技术研究,提高种植技术水平,增加山区农户的收入。积极推进工厂主导型“农民参与式”种植模式,通过企业建设木薯标准化示范生产基地,推广木薯新品种和新技术,辐射带动周边区域木薯生产。同时,采用适合云南山区运用的小型农机具以及木薯种茎还田技术,也可大大提高生产效率,农户增收,企业增效。

2.2.2 提高木薯加工水平。目前云南省的木薯加工水平低于广西、广东,主要是酒精及淀粉加工企业。产品品类少,技术水平低下,必须不断加强新产品、新工艺技术研发,进行技术创新,延长产业链,提高产品附加值。

2.3 实施“走出去”战略,加强与东盟国家的国际合作 首先,引进、吸引国外先进的技术、装备及管理方法等,促进云南木薯产业的改造升级,以降低生产成本,提高产品品质,同时为周边的富余劳动力提供就业机会,增加农民收入。其次,与东盟木薯生产国家进行经济与技术合作,发展境外木薯替代种植,这样既有利于促进边贸经济发展,也有利于提高农民收入,从而带动周边国家的经济发展,实现区域合作共赢的发展格局^[9]。

3 结语

从新时期农业产业化结构调整和新农村建设以保护生态环境的角度出发,利用木薯发展燃料乙醇产业,不仅有利于保障粮食安全,保护生态环境,还有利于促进农业产业结构调整,促进县域经济的发展和提高农民收入。木薯作为生产燃料乙醇的首选非粮作物,符合国家“因地制宜,非粮为主”、“不与人争粮,不与粮争地”的生物燃料乙醇的发展原则。综合考虑国家能源安全、粮食安全和生产成本,新能源产业的发展应成为云南经济社会发展的一个重要方面。因此,云南发展具有一定优势的木薯产业可以促进农民增收,企业增效,还能增加财政税收等综合效益。应抓住目前的发展机遇,在合理规划的前提下,通过政府制订政策,促进云南木薯产业持续稳定健康发展具有重要的现实意义。

参考文献

- [1] 韦本辉. 中国木薯栽培技术与产业发展[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [2] 郭容琦, 刘光华, 程金焕, 等. 云南木薯产业化发展前景分析[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(34): 19803-19804.
- [3] 胡强, 刘振环, 罗红, 等. 云南生物能源作物资源概述[J]. 云南农业科技, 2006(3): 59-63.
- [4] 熊彬, 白丽华. 云南木薯产业的现状及发展战略[J]. 云南民族大学学报: 哲学社会科学版, 2008, 25(6): 85-88.
- [5] 刘成兰, 邓国军, 杨青松, 等. 云南南亚热带生态气候区特点与滇南木薯育种目标探讨[J]. 热带农业科学, 2014, 34(1): 27-30.
- [6] 陈立胜, 潘瑞坚. 木薯酒精产业的社会效益和经济效益分析[J]. 广西轻工业, 2007, 23(1): 24-25.
- [7] 李宁辉, 詹玲, 冯献. 我国木薯产业发展的 SWOT 分析及对策建议[J]. 农业展望, 2010, 6(5): 28-32.
- [8] 田宜水, 孙丽英, 孟海波, 等. 中国木薯燃料乙醇原料供需现状和预测[J]. 农业现代化研究, 2011, 32(3): 340-343.
- [9] 周永刚. 云南省木薯产业可持续发展研究[J]. 云南农业大学学报: 社会科学版, 2013, 7(2): 18-21.

(上接第 7763 页)

- [4] JIMÉNEZA P, GUEDES M J, MORALES A E, et al. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition[J]. Aquaculture, 2007, 265(1/4): 325-335.
- [5] 谢小军, 邓利, 张波. 饥饿对鱼类生理生态学影响的研究进展[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 181-187.
- [6] SCAPIGLIATI G, ROMANO N, ABELLI L, et al. Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10: 329-341.

- [7] 袁仕取, 张永安, 姚卫建, 等. 鳃鱼外周血细胞显微和亚显微结构的观察[J]. 水生生物学报, 1998, 22(1): 39-47.
- [8] 高泽霞, 王卫民. 鱼类外周血红细胞研究进展[J]. 水利渔业, 2008, 28(2): 1-3.
- [9] HOOFMAN R N, DE RAAT W K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate [J]. Mutation Res, 1982, 104: 147-152.