



Y1870385

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在导师的指导下取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明并表示了谢意。

作者签名：吴文英 日期：5.23

学位论文使用授权声明

本人授权沈阳师范大学研究生处，将本人硕士学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索；有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，允许论文被查阅和借阅；有权可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。保密的学位论文在解密后适用本规定。

作者签名：吴文英 日期：5.23

环渤海九种无尾两栖动物皮肤的组织结构研究

摘 要

本文主要运用了组织学方法研究了分布于环渤海区域的无尾两栖类黑龙江林蛙 (*Rana amurensis*)、中国林蛙 (*Rana chensinensis*)、昆嵛林蛙 (*Rana kunyuensis*)、徂徕林蛙 (*Rana culaiensis*)、东北林蛙 (*Rana dybowskii*)、花背蟾蜍 (*Bufo raddei* Strauch)、中华蟾蜍 (*Bufo gargarizans*)、北方狭口蛙 (*Kaloula borealis*) 和陆泽蛙 (*Fejervarya multistriata*) 9 个种的皮肤的组织结构。结果如下:

一、除花背蟾蜍外, 其余 8 种无尾类的皮肤, 尤其是身体背部的皮肤中存在间断的条状钙化层, 以头背部的钙化层最宽最明显。中华蟾蜍皮肤中除了有条状钙化层外, 其头背部及耳后腺处皮肤中还有棉花团状钙化结构, 偶尔在前后肢也可见到。另外, 这五种林蛙两种蟾蜍的头背部表皮均较厚, 有时是全身各处表皮最厚的部位。

二、9 个动物的皮肤中均可观察到细杆状细胞, 细胞核位于表皮中, 细胞的基膜可以下伸到真皮之下, Linsenmair (1999) 报道这种细胞富含张力原纤维, 因此, 推测这种细胞潜在的功能应该是一种支持细胞。

三、繁殖期雄性黑龙江林蛙、中国林蛙和昆嵛林蛙的躯干部位均有特殊粘液腺。但 4 月份的雄性徂徕林蛙躯干部位皮肤中没有此腺体。雄性黑龙江林蛙躯干背部、体侧和腹部的皮肤中均含有特殊粘液腺, 且腹部腺体着色深于背部腺体, 而雄性中国林蛙和昆嵛林蛙皮肤中特殊粘液腺只分布于躯干背部。

四、本文研究了怀卵期 (出眠后, 3 月份) 和冬眠前期 (9 月份) 的中国林蛙雌性的皮肤结构, 二者在腺体形态和数目上存在很大差别。怀卵期躯干部位皮肤中颗粒腺饱满, 粘液腺大, 由一层高柱状分泌细胞构成, 细胞内和腺腔内均充满了嗜碱性的絮状物; 可见到随着嗜碱性分泌物的排出, 分泌细胞变短的情形, 这种形态大而富含分泌物的粘液腺在腹部密集分布。冬眠前期的雌性中国林蛙颗粒腺和粘液腺数目都少于怀卵期, 粘液腺多中空, 有退化现象。

五、花背蟾蜍、北方狭口蛙和陆泽蛙皮肤中粘液腺均与其它种类有较大差别, 狭口蛙皮肤中颗粒腺的形态和分布与其它 8 种无尾两栖动物完全不同, 泽蛙皮肤中未见到典型颗粒腺, 只是有少量的泡状腺体。

关键词: 环渤海, 无尾两栖类, 皮肤组织结构, 颗粒腺, 粘液腺, 钙化层

chensinensis females in the period of preceding hibernation, most mucous gland have clear lumen, and also have vestigial phenomenon.

Fifthly, mucous in the skin of *Bufo raddei* Strauch, *Kaloula borealis* and *Rana limnocharis* are much difference compared with other eight anurans. The shape and distribution of the granular glands in the skin of *Kaloula borealis* is also completely difference with other eight anurans. There are several vacuolated gland instead of typically granular glands in the skin of *Rana limnocharis*.

Keywords: anurans, histology of skin, granular gland, mucous gland, lamina calcarea

目 录

第一章 引言.....	1
一、两栖类皮肤的研究概况.....	1
二、环渤海无尾两栖动物的种类.....	9
三、中国分布的两栖类动物皮肤的研究现状.....	10
(一) 林蛙皮肤组织结构的研究.....	10
(二) 蟾蜍皮肤组织结构的研究.....	11
(三) 其它蛙类皮肤组织结构的研究.....	11
四、本研究论文所研究皮肤的环渤海区域无尾两栖动物的代表种类.....	12
五、研究意义.....	12
第二章 材料与方法.....	13
一、材料.....	13
二、方法.....	13
第三章 环渤海五种林蛙皮肤组织结构的研究.....	15
一、繁殖期黑龙江林蛙雌雄性皮肤组织结构研究.....	15
(一) 材料与方法.....	15
(二) 皮肤的基本结构.....	15
(三) 讨论.....	20
(四) 附图.....	21
二、中国林蛙皮肤组织结构的季节性比较.....	29
(一) 材料与方法.....	29
(二) 皮肤的基本结构.....	29
(三) 讨论.....	35
(四) 附图.....	37
三、雄性昆崙林蛙皮肤组织结构的初步研究.....	47
(一) 材料与方法.....	47
(二) 研究结果.....	47
(三) 讨论.....	49
(四) 图版.....	50
四、徂徕林蛙雄性皮肤组织结构的初步研究.....	53
(一) 材料与方法.....	53
(二) 研究结果.....	53
(三) 讨论.....	54
(四) 图版.....	55
五、东北林蛙雌性皮肤组织结构的初步研究.....	59
(一) 材料与方法.....	59
(二) 研究结果.....	59
(三) 讨论.....	61
(四) 图版.....	63
第四章 环渤海两种蟾蜍皮肤结构研究.....	68
一、花背蟾蜍皮肤组织结构研究.....	68
(一) 材料与方法.....	68
(二) 研究结果.....	68

(三) 讨论	73
(四) 图版	75
二、中华蟾蜍皮肤组织结构研究	82
(一) 材料与方法	82
(二) 研究结果	83
(三) 讨论	87
(四) 图版	89
第五章 环渤海狭口蛙和陆泽蛙皮肤组织结构研究	98
一、狭口蛙皮肤组织结构的初步研究	98
(一) 材料与方法	98
(二) 研究结果	98
(三) 讨论	99
(四) 图版	101
二、泽蛙皮肤组织结构的初步研究	104
(一) 材料与方法	104
(二) 研究结果	104
(三) 讨论	105
(四) 图版	106
结 论	110
参 考 文 献	112
简 历	118
致 谢	119

第一章 引言

两栖动物种类复杂多样,全球约有 5504 种,分属于 3 目 44 科 446 属 (Frost, 2002),中国约有 325 种,分属于 3 目 11 科 59 属 (费梁,叶昌媛等,2005)。两栖动物具有很强的适应性,分布遍及世界各地 (Savage et al, 1973; Duellman and Trueb, 1994)。有些种类生活于干旱的沙漠或淡水湖,有些种类终生生活于地下或热带雨林中、甚至有些可以在北极圈和阿尔比斯山地区结晶的环境中存活。

两栖类是从水生过渡到陆生的具有特殊进化和生态适应的脊椎动物,其皮肤作为直接与外界生态环境接触的器官,不仅具有保护、呼吸、离子运输、水盐调节、抗微生物等方面的重要作用,在排泄、温度调节、繁殖、伪装等方面具有重要作用,对于维持其适应复杂多样的环境具有重要的作用,具有复杂、精细、动态和高度组织化的结构,与外界环境具有高度的适应性。和其他大多数脊椎动物相比,两栖类的皮肤是裸露的,没有覆盖鳞片、羽毛和毛发等,分泌物使皮肤保持湿润。分泌这种分泌物的多细胞腺体广泛存在于两栖类皮肤中,是两栖类皮肤中的典型结构 (Sara, 2006)。另外,两栖类皮肤对水分具有渗透性,这一点对呼吸和渗透压调节很至关要,并在一定限度内调节着体温。

一、两栖类皮肤的研究概况

和所有的脊椎动物一样,两栖类的皮肤也包括两层,外层为表皮层,来源于外胚层。下面的一层为真皮层,该层的绝大部分来源于中胚层。但是,真皮中的色素细胞是由神经脊衍生而来,因此也是来源于外胚层。此外,镶嵌在真皮中的腺体也是来源于外胚层 (Duellman and Trueb, 1994)。两栖类的整体外观决定了皮肤的结构特点;色素细胞决定着体色和斑纹特征 (Duellman and Trueb, 1994)。

1 表皮

研究发现在变态过程中表皮细胞的细胞层数逐渐增加,细胞体积发生变化;接近变态的后期,较外层的细胞转变为扁平细胞并角质化,以形成角质层 (Budtz, 1977; Fox, 1985)。典型的成体两栖类表皮的结构是由多层上皮细胞构成,根据各层细胞的形态结构及功能,从外向内依次是角质层、角质替代层 (the replacement layers)、颗粒层和生发层 (Budtz, 1975),生发层之下是一层胶原纤维构成的基膜将表皮与真皮分开 (Duellman and Trueb, 1994)。角质层之上通常有一层由粘液构成的粘液膜 (Budtz, 1975; Linsenmair, 1999), Linsenmair (1999) 报道生活在干旱和湿润季节中的绿彩非洲树蛙 (*Hyperolius viridiflarius*), 皮肤结构及水平衡不同。生活于湿润季节的蛙表皮角质层外表面附有一层微绒毛,对 PAS 有较强的反应,显示有粘

多糖的存在；而生活干旱季节的蛙身体表面有一层薄的干燥粘液，将身体表面封住，以减少水分的丢失（Geise and Linsenmair, 1986）。

(1) 角质层及角质替代层 表皮的表层为角质层，由一层扁平细胞构成。角质层细胞在几乎所有的两栖类成体都是角质化的，但是在幼体蝾螈的皮肤中没有角质化，角化的角质层细胞与下面的一层角质替代层之间以相互连接的细丝或桥粒连接（Duellman and Trueb, 1994）。电镜下观察，角质层细胞膜具有不对称性，膜内侧的电子密度比外侧的电子密度大。角质层下是由2~3层紧密排列的扁平细胞构成的角质替代层，细胞角质化程度较低。电镜下观察，新形成的替代层细胞中含有丰富的纤维丝，纤维丝基本上松散地聚合在一起，但偶尔也可见致密的纤维束；这些细胞之间的连接基本上是桥粒结构（Budtz, 1975）。

(2) 颗粒层 颗粒层由2~3层较大的卵圆形颗粒细胞成层排列于角质替代层和生发层之间构成，颗粒细胞的胞核较大，呈卵圆形，位于细胞中央，颗粒环绕胞核分布（Duellman, 1994）。电镜下观察，下层的颗粒细胞胞质中的角蛋白丝松散地聚合在一起，而在紧接替代层的一层细胞内也能发现致密的纤维丝束和大量类似替代层的颗粒。小型中等电子密度的颗粒常散布在整个细胞质中，并经常和高尔基体相联系。颗粒层中颗粒细胞的存在是角化过程中的一个特征。

(3) 生发层 生发层通常包括一层长圆柱形细胞，排列相对较整齐，位于基膜之上，细胞较大彼此之间有较宽的细胞间隙（Linsenmair, 1999）。电镜下观察，细胞核的周围堆积了大量的张力丝和线粒体，生发层细胞的基部有指状突起深入基膜中，可能具有使得生发层细胞更牢固的附着在基膜上的功能。生活在干旱季节的个体的表皮生发层细胞排列紧密，细胞间隙小，而生活在湿润季节的个体的表皮生发层细胞排列不紧密，之间有较宽的空隙。

(4) 表皮中细胞多样性 除了组成表皮各层的细胞外，在表皮各层中还可发现三种类型的细胞。

瓶状细胞 瓶状细胞（Whitear, 1975），被认为是线粒体丰富的细胞（Farquhar and Palade, 1965）或是清理（clear）细胞（Lavker, 1971），是两栖类表皮中一类胞质中富含大量线粒体的瓶状形态的特殊细胞。瓶状细胞（图版1-2）的颈部与角质层的基部相接，细胞核大约位于表皮的第三层或第四层细胞层（Masoni and García-Romeu, 1979）。Linsenmair（1999）报道瓶状细胞较大，约占成体表皮所有细胞的10%，是仅位于角质层之下的一种细胞，细胞核的顶部富含线粒体，接近角质层的顶端含有细小的细胞膜皱褶。瓶状细胞起源于蝌蚪完成变态的时候，即表皮质膜（the epidermal plasma membrane）形成能行使机体渗透调节的功能的细胞化学特点的时候（Alvara and Moody, 1970；Villalba and Navas, 1989；Villalba et al, 1993）。瓶状细胞能分泌溶解间桥的物质（耿欣莲, 1959），在蜕皮阶段，瓶状细胞的形态多

样, 从高细条形到矮梨形都有。这种细胞与角质层或中层(角质替代层和颗粒层)的相邻细胞以普通桥粒相连。瓶状细胞中存在高水平的碳酸酐酶活性, 说明瓶状细胞也参与皮肤二氧化碳的消除, 使角质层之下的环境酸化, 以刺激钠离子通过下层的颗粒细胞运输 (Voute et al, 1975; Lewinson et al, 1982)。

细长柱状细胞 (long and slender pillar-like cells) 这种细胞很独特, 形态为十分细长的柱状, 亦位于角质层之下, 并且有根状基部穿过生发层细胞之间的空隙, 一直下沉到真皮层。细胞质中充满了大量的张力丝, 因此其潜在的功能应该是一种支持细胞。Linsenmair (1999) 报道该细胞内不含有脂滴, 同样对 PAS 也成阴性反应, 指出该细胞是 *Hyperolius viridiflavus* 皮肤中独特的, 在以前所报道的所有两栖类中都没见到过, 并推测这种细胞的功能可能是在频繁的蜕皮中起到固定表皮的作用。

黑色素细胞 耿欣莲 (1959) 报道了大蟾蜍表皮中有黑色素细胞及冬眠期、生殖期和生殖后期标本中表皮黑色素细胞的差别。我们在所观察的许多种类的表皮中也含有黑色素细胞。

(5) **蜕皮现象** 两栖类角质层会定期(周期性的)的脱落, 处于表皮不同层的细胞都会发生形态变化, 最后导致最外层的角质层脱落, 即来自生发层的表皮细胞向外迁移而转变成最后在蜕皮中脱落的角质层细胞。角质层只包括一层 (Budtz, 1975), 即表皮表层, 角质层的蜕皮均是一层, 从未见过两层的 (Schuberg, 1893; 耿欣莲, 1959)。蜕皮现象与瓶状细胞的高度活动有密切关系 (耿欣莲, 1959)。关于两栖类的蜕皮问题, 前人做过不少的研究, 对于蜕皮的周期问题的意见也不一致。有报道蟾蜍 (*Bufo bufo*) 在自然状况下每年 8 月份蜕一次皮。Bouwer (1953) 用两种蟾蜍和一种蛙用标记法做实验, 证明两栖类 4-6 天蜕一次皮, 最多需要 9 天, 最少要 3 天蜕一次皮。耿欣莲 (1959) 观察发现大蟾蜍在生殖期蜕皮, 生殖后期蜕皮减慢, 冬眠期不蜕皮。Wilder (据耿欣莲引述, 1925) 报道刺激物常引起蝾螈蜕皮, 一次机械刺激可引起一系列迅速而连续的蜕皮。耿欣莲认为不自然的生活条件可以引起蜕皮, 因为蛙类被拘禁在实验室内常常蜕皮。这说明两栖类动物在生活过程中皮肤结构根据外界环境的不断变化而进行调整, 进而产生适应性的改变。Linsenmair (1999) 报道干旱季节的树蛙有蜕皮现象, 但退去的角质层并不脱落; 但在湿润季节则没有见到蜕皮现象, 树蛙具有典型的两栖类表皮结构。实验室里的蛙类不断蜕皮, 而使环境完全干燥则身体紧缩又不蜕皮, 耿欣莲推测是干燥引起了皮肤的适应性反应, 以致蜕下的皮不脱落, 这可能是更深的角化以防止体内水分流失, 因为抗拒干旱的主要屏障是角质层 (Geise and Linsenmair, 1988)。

蝾螈和无尾类的皮肤角质层细胞都是从头背部中央开始脱离, 躯干背部皮肤角质层细胞的脱离随后进行。绝大多数两栖类都用四肢以碎片或是大块的形式挠松或

移除即将脱落的角质层，通常将其吃掉。在蜕皮周期中，角质层细胞与生发层细胞之间的细胞间隙充满了粘液，这种粘液被认为是富含线粒体的细胞分泌的(Duellman and Trueb, 1994)。蜕皮时，角质层下空隙一般很窄，含有一些中等电子密度的絮状物质。在瓶状细胞上方偶尔会发现一些小的缝隙。据 Budtz (1977) 报道，切去垂体的蟾蜍在蜕皮过程中，促肾上腺皮质激素 (ACTH) 和皮质类固醇 (Corticosteroids) 这两种激素是唯一促进切去垂体的蟾蜍蜕皮的激素，但是夏眠动物的茧的形成是许多角质碎片积累的结果。

(6) 表皮的功能 两栖类表皮具有离子运输的功能，是离子运输的主要场所，主要的钠泵就存在于这里 (Kirschner, 1983; Robinson and Mills, 1987)。三磷酸腺苷酶活性被限制在表皮细胞的较外层的细胞膜，如在 *Rana pipien*、*Rana catesbeiana* 和 *Bufo marinus* (Farquhar and Palade, 1966) 中有过这样的报道。表皮对于两栖类适应于水生和忍受干旱环境中均具有重要作用 (Warburg, 1997; Warburg and Rosenberg, 1990)。

2 真皮

真皮也包括两层，外层是海绵层，由疏松结缔组织组成，含有交错排列的纤维及各种类型的细胞，包括含有色素的色素细胞。下面一层是致密层，由紧密排列的胶原纤维组成，表皮来源的粘液腺和颗粒腺 (毒腺) 镶嵌在疏松层中，真皮中的其他结构包括毛细血管、神经纤维和平滑肌 (Duellman and Trueb, 1994)。无尾类皮肤与体壁之间的连接是独特的，它的皮肤很松弛地连接在体壁上，并具有一些离散的空间。皮肤与肌肉的连接和这些空间的形成如下：(1) 通过薄而透明的结缔组织小叶将皮肤与肌肉之间的区域分成一个个独立的空间，即淋巴囊。(2) 通过透明的结缔组织纤维聚集在一起形成皮肤紧贴体壁的一个特殊区域。(3) 通过皮肤和真皮底层的骨头共同骨化。(4) 通过皮肤与肌肉的直接连接，如一些雨蛙 (Tyler, 1971a) 的声带囊。(5) 通过皮肤肌肉，即插入皮肤中的肌肉。Burton (1980) 总结了以前有关皮肤肌肉的工作，提出有两种类型的皮肤肌肉，腹直肌和背皮肌 (*m.rectus abdominis pars anteroflecta* and the *m.cutaneus dorsalis*)，可能有助于对防御姿势和一些极小雨蛙皮肤腺分泌物的分泌的适应。

(1) 皮肤腺 两栖类皮肤的重要组成部分之一是皮肤腺，它们的分泌物具有丰富多样的功能 (Duellman and Trueb, 1994; Fox, 1994)，两栖类利用皮肤腺的分泌物来维持皮肤表面湿润粘滑以利气体交换并减少水分通过皮肤的散失和减小在水下时水与皮肤的摩擦力 (Quay, 1972)。分泌物也可以被用于防御的目的：使得表面滑溜以增加从逃脱捕食者捕捉的可能性 (Stebbins and Cohen, 1997)，或者使得皮肤表面很黏以完全固着住捕食者 (Duellman and Trueb, 1994; Evans and Brodie, 1994)。皮肤分泌物对粘膜如口腔粘膜能产生不愉快的味道或刺激，使得两栖类对于它们的

捕食者来说是难吃的 (Brandon et al., 1979; Brodie 1983; Duellman and Trueb, 1994)。一些两栖类的皮肤腺甚至可以产生足以毒害或杀死捕食者的有害或者有毒的物质 (Furlotti, 1910; Vialli, 1934; Nowak and Brodie, 1978; Brodie, 1983; Brodie and Smatresk, 1990; Erspamer, 1994; Daly, 1995; Delfino et al, 1995; Tsuruda et al, 2002; Daly et al, 2005)。有科学家 (Zasloff, 1987, 2002; Fredericks and Dankert, 2000) 对两栖类皮肤分泌物的防御作用进行了研究, 他们发现具有这一作用是蛙喜欢潮湿环境的重要特点, 分泌物以帮助它们避免病毒、细菌和真菌的侵袭。这样广泛多样的功能与真皮腺体分泌的大量具有生物活性的化学物质有关。其中生物活性多肽有 100 多种, Mangoni(2001)报道了蛙 (*Rana esculenta*) 皮肤中的抗菌肽是在微生物存在的情况下诱导合成的。目前, 已经从两栖类的皮肤分泌物中分离出了 30 多种生物胺 (Erspamer, 1994) 和 800 多种生物碱 (Daly et al, 2005)。这些皮肤分泌物是由真皮腺体粘液腺、颗粒腺 (浆液腺) 产生的 (Delfino, 1976; Hoffman and Dent, 1978; Delfino et al, 1993; Alvarez et al, 2005; Arifulova et al, 2007; et al)。

多细胞腺体广泛存在于两栖动物的皮肤中, 因此被认为是这种四足动物皮肤中的典型结构。两栖类皮肤腺体是位于真皮内的表皮结构, 粘液性的、蛋白质性的 (或称浆液性的) 或是混合性的 (当它们的分泌细胞联合在一起的时候) (Delfino et al, 1986)。这些结构来源于表皮母细胞, 细胞在下丘脑-垂体轴的控制下最终由甲状腺激素刺激进行有丝分裂发育分化而成 (Hayes and Gill, 1995)。在腺体的腺芽体下降过程中, 许多微环境的诱导影响起了很重要的作用 (Delfino et al, 1985)。一些细胞只是部分下降, 保持未分化状态, 形成成熟腺体颈部的通道 (Faraggiana, 1939; Delfino, 1980)。最终下降到真皮的细胞排列成内外两层, 并完成不同的细胞分化进程。外层的细胞在与之直接接触的轴突或者至少是神经递质的影响下转变成为成肌细胞, 最后分化成平滑肌细胞 (Delfino et al, 1987, 引自 Quagliata, 2006)。这些肌细胞因为其表皮来源和具有收缩功能而得名。根据它们所环绕的分泌腺体的类型 (粘液或浆液性), 表现出独特的特点 (Bani 1976)。内层细胞是表皮的成腺细胞, 构成分泌粘液和蛋白质的分泌腺。腺管实际上是穿过表皮的中空的结构, 是由处于角化状态的细胞呈直线状排列而成, 它允许外界环境穿过而不会发生缩水。

长期以来, 形态学家对两栖类皮肤腺进行了大量研究。对蝾螈皮肤腺的重要描述工作有: Dawson (1920) 对 *Necturus* 泥螈, Theis (1932) 对 *Salamandra* 蝾螈, 和 McManus (1937) 对 *Desmognathus* 脊口螈属。一些更早的工作 (Muhse, 1909) 认为在两栖类包括蟾蜍的皮肤中只存在一种类型的腺体。Fox (1986) 报道两栖类的皮肤腺一般情况下分为两种类型的腺体: 粘液腺和浆液腺或颗粒腺。所有的腺体都是泡状的。典型的粘液腺比颗粒腺小, 在疏松层中是完全封闭的。在一些蝾螈和无尾类, 粘液腺缺少明显的肌上皮, 但是在蚓螈目 (无足类) 中存在清晰的肌上皮

(Quagliata, 2006)。颗粒腺的基部可能深入到致密层中, 含有一种或两种肌上皮细胞; 此外, 至少在从蛙科的一些蛙, 颗粒腺的侧面和浅表还围绕有一层色素细胞 (Quagliata, 2006)。粘液腺在整个皮肤中分布的数量和范围比颗粒腺更多更广, 颗粒腺在许多种类中都是聚集在特定的区域内分布 (如, 在一些无尾类和一些蝾螈中主要集中在头和颈部, 在另外一些蝾螈中主要聚集在尾背部)。在两栖类皮肤中还发现另外三种皮肤腺体, 在盲螈真皮皱褶中存在相当大的细长腺体; Taylor (1968) 注意到这些腺体与真皮鳞片 (dermal scales) 相联系, 认为这些腺体的分泌物可能来自这些鳞片。Blaylock 等 (1976) 在叶泡蛙属 (*Phyllomedusa*), 雨蛙类 (hylid frogs) 皮肤中发现有脂腺, 分泌一种防水的外衣, 能防止水分的蒸发, 使这些蛙能适应干旱环境。脂腺比颗粒腺稍大, 通常基本上与角质层相连, 有明显的肌上皮。Conaway 和 Metter (1967) 描述了姬蛙科卡罗小口蛙 (*Gastrophryne carolinensis*) 胸部皮肤区域的繁殖腺; 在其他的姬蛙科蛙的皮肤中也注意到相同的腺体; 繁殖腺的大小如颗粒腺, 它的分泌物是通过这种腺体表面的分片 (fragmentation) 释放出来的。这种粘性分泌物能将雄性粘附到雌性的背部, 使二者抱对时雄性不至于从雌性的背部滑脱。组织化学分析, 繁殖腺的分泌物与粘液腺的分泌物相似, 但缺少粘液的硫酸盐特征 (Holloway and Dapson, 1971)。

Seki 等 (1995) 报道成体海蛙 (*Rana cancrivora*) 的背、腹部皮肤中有三种类型的腺体: 粘液腺、混合腺和含有小泡的腺体, 但是未见到在其他两栖类皮肤中存在的典型的颗粒腺。

颗粒腺 颗粒腺又称浆液腺, 形态比粘液腺大, 分布不如粘液腺广泛, 陆宇燕 (1999) 报道黑斑肥螈 (*Pachytriton brevipes*)、中国瘰螈 (*Paramedusa chinensis*)、东方蝾螈 (*Cynopus orientalis*) 皮肤中颗粒腺聚集形成背脊和耳后腺, 尾部颗粒腺非常丰富。颗粒腺分泌物中富含生物胺、生物碱和活性多肽 (Seki et al, 1989)。这些分泌物通常是有毒的, 在某些情况下会有剧毒, 具有重要的防御机制 (Duellman and Trueb, 1994)。非洲爪蟾属 (*Xenopus*) 和蟾蜍属 (*Bufo*) 皮肤中的颗粒腺直径约 150-200 μm (Fujikura et al, 1988; Moon et al, 1988), 而绿雨滨蛙 (*Litoria caerulea*) 皮肤中颗粒腺长径约为 143.3 \pm 21.6 μm , 短径约为 126.7 \pm 21.4 μm (Warburg, 2000)。颗粒腺腺腔内壁上排列有一层合胞体分泌单位 (Dapson et al, 1973)。另外, 颗粒腺显示出许多形态高度多样化的亚型 (Dominguez et al, 1981; Mills and Prum 1984; Delfino et al, 1994, 1998; Fujikura et al, 1988; Seki et al, 1989)。Bovbjerg (1963) 报道蛙属 (*Rana*) 皮肤中的颗粒腺腺泡较小, 腺泡内充满颗粒, 在电镜下观察这些颗粒的大小、形态、电子密度不同, 这种描述与 Obert 和 Schneider (1978) 报道的铃蟾皮肤颗粒腺形态一致。颗粒腺的分类依据之一是颗粒的大小 (Neuwirth et al, 1979)。然而, 颗粒腺中颗粒的大小及电子密度不仅是判断腺体类型的依据外, 还可

能代表分泌活动的不同阶段 (Kim et al, 1979, 1989)。颗粒腺的分泌只有在交感神经刺激或是体液刺激后才可以分泌。

绿雨滨蛙 (*Litoria caerulea*, Warburg M. R, 2000)、雨蛙 (*Hyla*, Grosse and Linnenbach, 1989) 皮肤颗粒腺中含有浆液性的小泡。

典型的颗粒腺腺体较大, 其分泌上皮为合胞体, 外包绕上皮肌细胞, 腺泡内充满了大小不一致的椭球形或圆球形颗粒。这些颗粒在 HE 染色下显示粉红色, 马氏三色法呈橙色, 对 PAS 呈阴性反应 (Melih, 2004)。但是并不是所有的两栖类皮肤中均可见到这种典型的颗粒腺, Seki 等 (1995) 报道在海蛙 (*Rana cancrivora*) 背部腹部皮肤中未见到典型的颗粒腺, 而是观察到一种泡状腺体, 泡状腺体的上皮细胞界限不明显, 其圆形细胞核位于腺腔的边缘, 因此认为它们形成一个合胞体。在 Azan 染色后腺腔内充满了小泡颜色较淡。Kramer 等 (1970) 也报道了安哥拉蛙 (*R. angolensis*) 皮肤中缺少颗粒腺。有报道光滑爪蟾 (*Xenopus laevis*) 皮肤中的颗粒腺的分泌上皮形成一个合胞体, 并且在某个阶段也成泡状 (Dockray et al, 1975)。因此, Seki 等认为泡状的腺体是否是颗粒腺还需要进一步的免疫组织化学研究。

粘液腺 粘多糖自发的分泌能使皮肤保持湿润 (Duellman, 1994)。Bovbjerg (1963) 和 Fox (1986) 对蛙属 (*Rana*) 皮肤及 Fujikura et al (1988) 对爪蟾属 (*Xenopus*) 皮肤的粘液腺进行了如下描述: 粘液腺多大而中空, 含有 PAS 阳性物质, 如乙二醇 (glycol)、羧基 (carboxyl) 和硫酸盐化合物 (sulphate groups)。其内缺少颗粒性物质 (Dominguez et al. 1981; Mills and Prum, 1984; Fujikura et al, 1988)。Fujikura 等 (1988) 发现当 *Xenopus* 处于干旱环境时其皮肤就通过分泌含水的粘液性物质来参与水平衡。因此这种皮肤腺体在减少干旱中具有作用。成体绿雨滨蛙 (*L. caerulea*) 皮肤中粘液腺短径约 $74.8 \pm 16.8 \mu\text{m}$, 长径约为 $93 \pm 22.0 \mu\text{m}$, 而在成体爪蟾属 (*Xenopus*) 粘液腺大小约为 $125 \mu\text{m}$ (Fujikura et al, 1988), 成体 *Bufo* 中为 $190 \mu\text{m}$ (Moon et al, 1988)。Lillywhite 等 (1997) 发现一种印度树蛙皮肤中的粘液腺直径约 $41-74 \mu\text{m}$ 并且含有脂质物质。海蛙 (*Rana cancrivora*) 粘液腺外面有上皮肌肉细胞包绕 (Seki et al, 1995)。

能够保持皮肤湿润, 分泌物能减少皮肤与水的摩擦, 粘液腺的这些功能都得到普遍接受 (Quay, 1972; Duellman and Trueb, 1994), 另外粘液腺已经被证明与离子运输有关 (Thompson, 1983)。现存两栖类真皮中的粘液腺具有相同的形态功能特点: 分泌单位在不同的分泌阶段包括不连续分布的粘液细胞。它们呈辐射状排列而围成一个空腔, 此空腔的大小取决于分泌细胞的高度 (Quagliata, 2006)。但是不同种类和同种的皮肤粘液腺形态也不很一致, 如 Melih (2004) 报道湖蛙 (*Rana ridibunda*) 皮肤中有两种类型的粘液腺, 第一种是较小并且它的分泌部包含低的立方细胞, 在它们的腔内不包括任何分泌物质, 一些细胞的细胞质中含有 PAS 阳性物

质；第二种类型的粘液腺较大一些。它们的分泌部包括立方柱状细胞 (cubical-cylindrical)，细胞质和腔内物质显示出絮状或是纤维状 (fibrillar)，并且对 PAS 呈阳性反应。它们的分泌物不能被 H-E 或 Masson's 三色法所染色。Seki 等 (1995) 报道粘液腺主要内衬有简单的鳞片状或立方形细胞，Azan 染色后细胞呈苍白的泡状；细胞核扁平，主要位于细胞的顶部。小一些的粘液腺的上皮细胞是高的三角形到圆柱形，细胞核有时位于基部，偶尔在苍白色泡状细胞的中分布有含有嗜卡红颗粒的细胞。粘液腺中的泡状细胞及腺腔中的分泌物在 PAS 染色下成浅粉红色，在 AB 染色下成蓝色。泡状细胞在两种染色下着色的均是细颗粒，而不是泡状内含物。Warburg (2000) 报道粘液腺腺腔周围的内壁上排列有一层分泌细胞，这些细胞含有线粒体、折叠的质膜、不同大小和电子密度的颗粒。这些粘液腺对 PAS 呈阳性反应。

粘液腺的肌上皮缺少直接的神经控制，是由数百纳米的神经末梢释放的神经递质控制其强烈收缩 (Whitaker 1974; Sjöberg and Flock 1976, 引自 Quagliata 2006)。

特化的大腺体 Conaway 等 (1967) 报道卡罗姬蛙 (*Microhyla carolinensis*) 皮肤中存在大腺体，并命名为生殖有关的腺体 (breeding glands)。这种腺体与 Warburg (2000) 报道在绿雨滨蛙 (*Litoria caerulea*) 头背部皮肤中有存在一种不同于粘液腺和颗粒腺的非常大的大腺体相似，大腺体呈长椭圆形，短径约为 $254 \pm 55.3 \mu\text{m}$ ，长径约为 $547 \pm 49.2 \mu\text{m}$ ，腺腔内充满了溶菌酶样物质，组织化学显示在这些腺体腔的边缘位置存在脂质。Thomas (1993) 等在几种无尾类皮肤中也报道了相似的腺体，这些腺体对 Sudan III 有反应，显示有脂质存在。绿雨滨蛙头背部的大腺体不存在两性差异，因此，与繁殖活动无关。Holloway 等 (1971) 认为这种腺体呈 PAS 阳性反应，而对 Alcian blue 不起反应，可能不是粘液腺。

Brizzi R 等 (2002) 报道蛙 (*Rana dalmatina*) 躯干背部存在一种特殊腺体，大小比典型的粘液腺大，而和颗粒腺相似，并定名为特殊粘液腺。这种腺体只存在于雄性躯干背部，被认为是与生殖有关的腺体。Thomas 等 (1993) 报道 12 种蛙皮肤中存在两性异型腺体。这些腺体呈中性粘液性物质和硫酸蛋白阳性，说明存在中性粘蛋白。但没有检测到酸性粘液物质和脂质的存在，作者认为是一种新型腺体，且与生殖有关。

蟾蜍耳后腺中存在大腺体。Jared (2009) 报道耳后腺的真皮疏松层和致密层不像其他背部皮肤那样区分明显，耳后腺中的大腺体下沉至致密层中，每个大腺体都通过衬在导管内部上皮的很窄的缝隙与外界相通。

混合腺 Seki 等 (1995) 报道成体海蛙 (*Rana cancrivora*) 背、腹部皮肤中存在混合腺体，混合腺体的腺泡部分由四种细胞构成，第一种位于导管基部及导管和腺泡的交接处，含有大量的被 azan 染成蓝色被 PAS 染成深玫瑰红色的大量的细胞质；第二种位于腺泡的颈部呈鳞片状或立方形细胞被染成浅洋红色；第三种是含有嗜卡

红颗粒位于腺泡的基部。第四种是位于腺泡的基部和侧部的细胞，其内含有许多大的小泡，被 PAS 染呈深玫瑰红色，被 AB 染成宝蓝色，也有一部分这种细胞位于腺泡的颈部区域。Seki 认为这种混合腺是海蛙对其耐盐生活环境的适应。

脂腺和脂质的分泌 Blaylock 等 (1976) 在叶泡蛙属 (*Phyllomedusa*)，雨蛙类 (hylid frogs) 和爪鲵 (*Onychodactylus fischeri*) (陆宇燕等, 2004) 皮肤中发现有脂腺，分泌一种防水的外衣，能防止水分的蒸发，使这些蛙能适应干旱环境。脂腺比颗粒腺稍大，通常基本上与角质层相连，有明显的肌上皮。除特殊的脂腺可以分泌脂质外，叶泡蛙属 (phyllomedusine) 颗粒腺及皮肤分泌物中都存在脂质 (Blaylock et al, 1976)，东部矮雨滨蛙 (*Litoria fallax*) 和佩氏雨滨蛙 (*Litoria peroni*) 皮肤中也存在脂质 (Amey and Grigg, 1995)，美国的几种蛙 (Withers et al, 1984) 和绿雨滨蛙 (*Litoria caerulea*) 皮肤中含有 5.1% 的中性脂，南部圆蟾 (*Cyclorana australis*) 皮肤中含有 9.8% 的中性脂 (Christian et al, 1997)。另外，Lillywhite 等 (1997) 报道一种树蛙科的蛙皮肤粘液腺也分泌脂质。以上研究证明，在浆液腺、大腺体和粘液腺中都可发现脂质，这说明有多于一种腺体参与脂质的分泌。也显示这是树蛙对干旱环境的适应，使得它们能持续暴露常年干旱的环境中。

(2) **色素** 两栖类皮肤中的色素细胞主要表皮之下疏松层的上层，排列成一层成为色素层。黑色素是一种突出的吡咯多聚物，是脊椎动物表层结构中的最主要色素，黑色素的结构还没完全弄清楚。黑色素能提供一些机械力而保护蛋白质不被降解，具有抗生素特性，对爬行动物的体温调节有作用，也起炫耀和伪装的作用，与许多神经系统疾病密切相关，还可防止一些病毒侵染，提高生物的竞争和生存能力 (王玉洁等, 2003)。

二、环渤海无尾两栖动物的种类

有关环渤海区域独特的地理位置、海洋性季风气候带来的温暖潮湿环境，在此分布的无尾两栖动物有 16 种。其中山东昆崙山分布有林蛙类群中特有的昆崙林蛙 (*Rana kunyuensis*) (陆宇燕和李丕鹏, 2002) 和徂徕山分布有徂徕林蛙 (*Rana culaiensis*) (李丕鹏等, 2008)，辽宁东部分布有桓仁林蛙 (*Rana huanrenensis*) 等。东方铃蟾 *Bombina orientalis*、中华蟾蜍 *Bufo gargarizans*、花背蟾蜍 *Bufo raddei*、黑斑侧褶蛙 *Pelophylax nigromaculatus* (费梁等, 2005) 等一些常见种类也有广泛分布。

表 1-1 环渤海无尾两栖动物的种类 (引自廉静, 2009)

物种名称	分布地区
东方铃蟾 <i>Bombina orientalis</i>	辽宁、山东、北京
史氏蟾蜍 <i>Bufo stejnegeri</i>	辽宁

花背蟾蜍 <i>Bufo raddei</i>	辽宁、河北、山东、北京、天津
中华蟾蜍 <i>Bufo gargarizans</i>	辽宁、河北、山东、北京、天津
中国林蛙 <i>Rana chensinensis</i>	河北、山东、北京、天津
东北林蛙 <i>Rana dybowskii</i>	辽宁
黑龙江林蛙 <i>Rana amurensis</i>	辽宁
桓仁林蛙 <i>Rana huanrenensis</i>	辽宁
昆嵛林蛙 <i>Rana kunyuensis</i>	山东
徂徕林蛙 <i>Rana culaiensis</i>	山东
东北雨蛙 <i>Hyla ussuriensis</i>	辽宁
泽蛙 <i>Rana limnocharis</i>	山东、江苏、浙江、安徽等南方城市
金线侧褶蛙 <i>Pelophylax plancyi</i>	辽宁、河北、山东、北京、天津
黑斑侧褶蛙 <i>Pelophylax nigromaculatus</i>	辽宁、河北、山东、北京、天津
东北粗皮蛙 <i>Rugosa emeljanovi</i>	辽宁
北方狭口蛙 <i>Kaloula borealis</i>	辽宁、河北、山东、北京、天津

三、中国分布的两栖类动物皮肤的研究现状

两栖动物皮肤主要包括表皮和真皮两大层(陆宇燕等, 2004; 刘剑, 2007), 真皮腺体主要包括粘液腺和颗粒腺以及近年来在叶泡蛙属(*phyllomedusa*)的一些物种及爪鲵(*Onychodactylus fischeri*) (陆宇燕等, 2004)中发现的脂腺; 两栖动物皮肤裸露富含抗菌肽等许多复杂多样的分泌物, 是其重要的防御机制(刘炯宇, 2004)。

(一) 林蛙皮肤组织结构的研究

刘满樱等(2007)对东北林蛙(*Rana dybowskii*)皮肤及腺体组织的显微结构进行了观察, 得出东北林蛙各部位皮肤基本结构相似, 真皮中富含颗粒腺和粘液腺, 皮肤厚度有所差异, 头背部皮肤最厚约 $224.4 \pm 5.46 \mu\text{m}$, 后肢腹部皮肤最薄, 约 $135.7 \pm 5.06 \mu\text{m}$ 。韩彤彤(2006)对东北林蛙皮肤分泌物抗菌肽抗病毒活性进行了研究, 金莉莉(2009)研究了东北林蛙皮肤抗菌肽及其生物学特性。

婚垫属于皮肤衍生物, 亦是由表皮和真皮构成, 真皮中含有色素细胞和婚腺(nuptial glands), 杨纯等(2005)报道了产于秦岭北坡及西安市长安区大峪水库附近的中国林蛙(*Rana chensinensis*)婚垫的显微结构的年周期变化, 得出婚刺突起的程度、婚垫的表皮厚度、婚腺腺泡的数量大小均随季节呈周期性变化。

林文达等(2008)报道雌性昭觉林蛙腹部表皮较厚、真皮中没有色素层; 雌性皮肤中均富含腺体, 尤其是雌性腹部。

（二）蟾蜍皮肤组织结构的研究

耿欣莲（1959）对大蟾蜍（*Bufo bufo gargarizans* Cantor）的皮肤在不同季节中组织结构进行了细致观察，并在表皮方面做了较为全面的描述，描述了表皮厚度、脱皮与瓶状细胞的关系、表皮细胞的补充及细胞核的运动及表皮中的血管和色素细胞等。向德超（1993）报道了大蟾蜍（*Bufo gargarizans*）休眠期和活动期耳后腺的显微结构没有差别即均为由导管和腺泡构成的单泡状腺体，分泌方式主要为顶浆分泌，兼有部分全浆分泌。中华蟾蜍各部位皮肤厚度不一，粘液腺颗粒腺均为单泡状腺，颗粒腺主要分布在躯干部和后肢的背侧皮肤中（张先芳，2002）。于洪川（2005）报道了蟾蜍皮肤中肥大细胞的形态及分布情况，即蟾蜍皮肤中的肥大细胞呈圆形、椭圆形及不规则性，成体大于幼体，主要分布在真皮层中，表皮中也有分布，并推测，两栖动物皮肤长期裸露，在进化过程中真皮中少量肥大细胞向表皮迁移，参与局部的免疫屏障。曹燕（2011）对4种齿突蟾的皮肤的组织结构进行了观察及描述，结果为4个物种不同部位皮肤厚薄不一，基本结构相同，表皮细胞的层数及表皮厚度均是体腹侧厚于体背侧，毛细血管及色素细胞的分布也有不同。

（三）其它蛙类皮肤组织结构的研究

于洪川（2005）亦报道了牛蛙肥大细胞为粘膜肥大细胞，但是数量少于蟾蜍皮肤中的肥大细胞，是构成皮肤粘膜免疫的第一道屏障。产于云南昆明东北郊区山丘的多疣狭口蛙（*Kaloula verrucosa*），背部颗粒腺比腹部丰富，背部皮肤色素层亦比腹部发达。颗粒腺腺泡内充满了颗粒繁殖前期、繁殖中期、繁殖后期皮肤结构无明显变化，粒状分泌物，主要位于躯干部和后肢背部，周围有丰富的毛细血管（林文达、朱静，2009）。黑斑蛙（*Rana nigranaculata*）背部皮肤比腹部厚，且色素层也是背部皮肤比腹部皮肤发达，在雄性背部表皮中有色素细胞，但腹部没有，且背部腺体排列为腺体团，而腹部腺体较扁几乎成线形，在表皮之下排列成一列（林文达、朱静，2008）。

李洋等（2009）对黑斑蛙、虎纹蛙和牛蛙皮肤的显微结构进行了比较，结果显示三种蛙皮肤组织结构相似，但皮肤厚度、皮肤各个层次的相对厚度及腺体密度有明显的种间差异和部位差异，得出虎纹蛙皮肤最厚，牛蛙次之，黑斑蛙最薄。邵世光等（1994）报道了采于徐州市郊区小河沟中金线蛙（*Rana Plancyi*）的冬眠期与冬眠后期皮肤角质层显微结构的差异，冬眠期金线蛙皮肤角质层厚且排列紧密，角质层外表面较光滑，冬眠后期金线蛙角质层薄且较疏松外表面粗糙。刘秀红（2008）报道了黑带蛙（*Rana nigrovittata*）皮肤抗菌肽的分子多样性、结构及功能。

四、本研究论文所研究皮肤的环渤海区域无尾两栖动物的代表种类

1 林蛙的代表种类

采于辽宁省本溪市的五月份抱对时期的雌雄性黑龙江林蛙；崂山产中国林蛙；圣经山产雄性昆崙林蛙；产于徂徕山的雄性徂徕林蛙；怀卵时期的东北林蛙雌性。

2 蟾蜍的代表种类

采于沈阳北陵公园的雌雄性花背蟾蜍和雌雄性中华蟾蜍。

3 其它蛙的代表种类

采于沈阳师范大学校园的北方狭口蛙等。

五、研究意义

本文主要研究了环渤海 9 种无尾两栖动物的皮肤的显微结构，有利于进一步揭示无尾两栖动物的皮肤粘液腺和颗粒腺的多样性，并为分类提供依据，并可初步了解不同时期皮肤组织结构变化，及同一时期雌雄个体皮肤组织结构。为进一步了解生物特性提供资料和依据。通过各种腺体的结构特点推测它们的功能，更好的解释生物学中结构与功能相适应的基本观点。

第二章 材料与方法

一、材料

1 标本 五种林蛙两种蟾蜍的头背部腹部，躯干半侧环剥，前后肢环剥皮肤。狭口蛙泽蛙躯干半侧环剥皮肤。在头背部两眼之间，头腹部取宽 3~5 mm，长 8-10 mm 的组织块。沿躯干背中线和腹中线将蟾蜍躯干部位半侧皮肤剥下宽约 5-8 mm，前后肢环剥皮肤，宽约 5-8 mm。

2 药品 福尔马林、Bouin's、各级浓度的酒精、HE 染色液、PAS 染色液、二甲苯、中性树胶。

二、方法

1 常规石蜡切片制作

(1) 取材固定 将固定于 10%福尔马林中 8 小时以上的组织块，放入 Bouin's 氏液后固定 24 小时以上；

(2) 洗涤 包埋前天用流水冲洗固定好的组织块 12 小时左右；

(3) 脱水 组织块依次经 50%、70%、80%、90%、95%乙醇脱水 30min，100%、100%乙醇脱水 45-60min；

(4) 透明 将组织块放入二甲苯：无水乙醇=1：1 的混合液中，30min 左右，再将组织块顺次放入二甲苯 I、二甲苯 II 中，时间根据透明程度而定（组织块的透明以光线基本能透过组织为度），约 3min 左右。透明期间要时常摇晃小瓶；

(5) 渗蜡 将已透明的组织块依次放入恒温箱（60℃）内的二甲苯和石蜡一比一混合液中 1h，石蜡 I、石蜡 II 各 90min；

(6) 包埋、切片、展片和烤片 包埋时要用烧热的镊子在蜡槽的液态蜡中匀速滑动，以赶走组织块附近的气泡，使蜡完全把组织包埋在内，以避免切片时组织块破碎。包埋后切成厚度为 7 μ m 的连续切片，将切好的石蜡条放入 47℃左右的水浴锅进行展片，展片时间不易太长，温度也不能太高，要慢慢地展开，防止组织被撕开。看到组织块完全展开时，用事先擦好的载玻片将石蜡条捞起，装入标本盒放入恒温箱烘干，约 8-12 小时，时间太长影响染色。

2 染色

(1) 脱蜡 经二甲苯 I、二甲苯 II 各 30min，二甲苯和无水乙醇按 1：1 的混合液 10min；

(2) 复水 依次 100%、95%、90%、80%、70%、50%无水乙醇各 5min；

(3) 染色 苏木精染液, 染色时间视染色情况而定, 经自来水冲洗蓝化后, 顺次 50%、70%、80%、90%无水乙醇各 5min, 再经伊红试剂, 染色时间视染色情况而定, 染完在 95%无水乙醇中沾几下, 出去浮色;

(4) 脱水透明 依次 100%、100%无水乙醇各 5min, 二甲苯和无水乙醇 1: 1 的混合液中 10min, 二甲苯 I、二甲苯 II 各 30min。

3 封片

染好的片子用盖玻片和加拿大树胶将其盖好, 放入烘箱 (37℃左右) 内烘干, 以备观察。

4 观察

用解剖镜观察皮肤表面结构, OLYMPUS-BX50 显微镜观察皮肤显微结构, DP71 摄像头摄像。

第三章 环渤海五种林蛙皮肤组织结构的研究

一、繁殖期黑龙江林蛙雌雄性皮肤组织结构研究

黑龙江林蛙 (*Rana amurensis*, Boulenger, 1886,) 隶属于两栖纲, 无尾目, 蛙科, 林蛙属的黑龙江林蛙种组, 分布于内蒙古、黑龙江、吉林、辽宁、俄罗斯、蒙古、朝鲜等地。其产卵季节为四月中旬到五月上旬, 六月中旬可见到变态小蛙, 九月下旬到次年三月为冬眠期(费梁, 胡淑琴等, 2009)。成年黑龙江林蛙雌性大于雄性, 背部体色较雄性浅, 雄蛙无声囊。黑龙江林蛙皮肤富含腺体, 能分泌数量巨大的生物活性物质, 是有待开发的药物宝库。有关黑龙江林蛙皮肤的组织学研究还未见报道, 本文对黑龙江林蛙雌雄性皮肤的显微结构进行了比较研究, 旨在进一步了解两栖类皮肤的结构及功能的适应性特点, 更好地解释生殖期雌雄性之间与信号交流有关的结构及行为特点, 并为林蛙的养殖、药物提取、提供一些基础的形态学资料。

(一) 材料与方法

1 材料

采于辽宁省本溪市黑龙江林蛙, 5 月份, 雌雄各 3 只, 雌性体长: 58.71mm~62.03mm, 雄性体长: 47.70mm~55.76mm。

2 方法

常规石蜡切片制作, HE 染色, OLYMPUS-BX50 显微镜观察与测量。

(二) 皮肤的基本结构

黑龙江林蛙的皮肤与其它两栖类的皮肤结构相似, 即包括表皮和真皮两部分。表皮由多层细胞构成, 真皮又分为两层, 上层为疏松层, 下层为致密层。

1 表皮

黑龙江林蛙雌雄蛙各部位的表皮结构与其他两栖类表皮基本结构相似, 都是复层扁平上皮, 由多层细胞组成一般 3-7 层。由上而下分别为角质层、颗粒层、和生发层, 颗粒层与棘细胞层不好区分, 有时表皮只有三层细胞, 内层为生发层中间为一层扁平的角质形成层最外层为角质层。观察发现角质层包括表皮表面一到三层细胞, 细胞之间没有间桥。表层表面的一层细胞核消失, 角化均匀, 彼此连成一水平十分扁平带状, 呈均质粉红色, 偶尔还会见到细胞核。表层的第二或第三层细胞处于角化状态中, 染色很深, 很明显呈深色的带状, 细胞核着色更深。最内层是生发层, 雌性躯干背部表皮中呈矮柱状细胞核近卵圆形, 腹部表皮中呈高柱状, 细胞核近长椭圆形, 在背腹交界处的表皮生发层细胞近圆形。雌雄蛙在各部位表皮厚度及

细胞层数等方面有些差异。雄蛙头背部、躯干背部、前肢腹部及后肢腹部表皮比雌蛙相应部位表皮厚且有极显著性差异 ($p < 0.01$), 这些部位的表皮细胞层数雄蛙也比雌蛙稍多 (表 3-1)。由数据统计知, 除躯干腹部表皮细胞层数雌蛙多于雄蛙, 其它各部位细胞层数都是雄蛙稍多于雌蛙。雄蛙躯干背、腹部表皮厚度差异不明显, 但雌蛙躯干腹部表皮比其背部表皮厚且有极显著性差异。雌雄性头背部皮肤的表皮比其它各部位都厚 (图版 3-1, 3-2)。

在表皮次外层中可见到透明梨形细胞, 该细胞胞质多透明、细胞内中空, 不见细胞核, 在细胞膜的内侧可见到少许絮状 PAS 阳性物质。细胞形态与耿欣莲在大蟾蜍的头背部表皮中观察到瓶状细胞相似, 推测其为瓶状细胞。

另外, 在各部位背部表皮中存在斑块状色素细胞, 多 4-5 个连续分布, 细胞内是成块分布的色素, 腹部没有观察到, 主要位于生发层, 少数可见于表皮的中层细胞。这种色素也可以弥散到相邻细胞中甚至弥散到角质层的下方。表皮中的这种斑块状色素细胞在雌雄蛙中有差异。雄蛙各部位背部表皮 (图版 3-1) 中这种斑块状色素细胞数目多于雌蛙 (图版 3-2) 相应部位的该数目。

表 3-1 雌雄性黑龙江林蛙不同部位皮肤各组织层厚度及皮肤总厚度 (μm)

		层数	表皮		真皮		皮肤
			厚度	疏松层厚度	致密层厚度	总厚度	
头背部	雌性	3-5	47.2±4.77 ^{aa}	76.7±27.26 ^{aa}	64.4±12.83 ^{aa}	192.4±39.82	
	雄性	4-6	53.1±4.6	133.1±24.97	45.2±7.19	233.0±29.3 ^{aa}	
头腹部	雌性	4-5	50.9±10.29	61.0±14.89	48.6±7.28 ^{aa}	152.2±15.62	
	雄性	5-7	48.6±4.26	87.2±12.51	27.2±7.50	172.6±12.66 ^{aa}	
躯干背部	雌性	3-5	29.1±4.97 ^{aa}	117.7±61.49 ^{aa}	56.3±10.5 ^a	207.1±75.96	
	雄性	5-7	43.4±4.73	211.5±56.49	47.2±12.79	299.2±50.48 ^{aa}	
躯干腹部	雌性	4-6	41.1±4.54 ^{bb}	46.1±12.74	47.0±7.81 ^{aa}	130.5±17.22	
	雄性	3-5	40.5±3.97	72.3±24.61	33.5±17.46	142.8±29.21	
后肢背部	雌性	3-7	33.9±8.06	84.4±32.28 ^a	47.5±5.04 ^{aa}	176.6±41.18	
	雄性	3-6	33.1±9.61	101.9±45.85	31.0±4.50	169.4±37.38	

后肢腹部	雌性	3-5	25.8±6058 ^{aa}	32.4±5.18	50.5±8.62 ^{aa}	111.1±7.04
	雄性	3-5	34.5±5.13	44.8±17.09	25.1±5.24	104.4±20.82
前肢背部	雌性	3-6	40.1±6.31	92.6±42.15 ^{aa}	56.3±12.41 ^{aa}	205.7±57.60
	雄性	4-6	44.9±8.18	156.9±66.00	24.0±6.26	219.2±71.22
前肢腹部	雌性	3-6	26.8±6.76 ^{aa}	39.5±14.42	44.8±10.21 ^{aa}	109.7±22.50
	雄性	3-6	35.0±4.10	61.9±19.27	24.8±5.22	124.7±20.82 ^{ac}

注：^a表示某指标在雌雄蛙皮肤中存在显著差异，^{aa}表示存在极显著性差异；^{bb}表示雌蛙躯干背部表皮和腹部表皮在厚度上存在极显著性差异，^c示雄蛙前肢腹部比其后肢腹部厚且有显著性差异。

2 真皮

黑龙江林蛙的真皮结构与其它两栖类的真皮结构亦相似。本研究观察到真皮疏松层中的色素细胞多呈斑块状（图版 3-3,3-4,3-5），位于表皮之下疏松层之上，形成一层，这在雌雄蛙中无差别。真皮厚度与其内腺体的大小和种类有关，雄蛙各部位背部真皮疏松层（图版 3-4）的厚度比雌蛙（图版 3-5）相应部位的厚，具有显著或极显著差异（表 3-1）。雌雄蛙真皮腺体的种类和形态表现亦不同（图版 3-4, 3-5）。

雌蛙各部位皮肤的致密层比雄蛙相应部位的致密层厚，除了躯干背部呈显著性差异，其余各部位都呈极显著性差异，且雌蛙真皮致密层排列更紧密，胶原纤维也较粗（图版 3-4, 3-5）。取材时也发现，雄蛙皮肤比雌蛙皮肤软。

3 雌雄性不同部位皮肤结构特点及比较

显微结构显示，黑龙江林蛙雌雄性躯干部位半侧环剥及前后肢环剥皮肤的横切面薄厚不一（图版 3-3,3-4,3-5），从背部到腹部有逐渐变薄的趋势。由于黑龙江林蛙皮肤表面有背侧褶和突起的疣粒，可以观察到相应部位的皮肤加厚，其内含有的腺体多且大。躯干背侧褶处皮肤（所观察雄性最厚约 620 μm ，雌性最厚约 358 μm ）最厚。数据统计显示，除后肢腹部，各部位皮肤均是雄蛙厚于雌蛙（表 3-1），且头背腹部、躯干背部呈极显著性差异，前肢腹部呈显著性差异。雌雄蛙均是躯干背部最厚（雄 299.2±50.48 μm ，雌 207.1±75.96 μm ），后肢腹部最薄（雄 104.4±20.82 μm ，雌 111.1±7.04 μm ）。前肢背部腺体含量也较多，因此皮肤厚度也相应较厚（雄 219.2±71.22 μm ，雌 205.7±57.60 μm ）。

4 皮肤腺体的种类、形态特点和分布

黑龙江林蛙皮肤中富含大量的多细胞真皮腺体，除在两栖类皮肤中普遍存在的颗粒腺和粘液腺，在雄蛙躯干背腹部还能观察到大量的另外一种粘液腺，所有这些

真皮腺体都是单泡状腺，由一个导管将腺腔与表皮之外的环境相通。腺泡之外都有一层上皮肌鞘包裹，颗粒腺腺泡周围的上皮肌鞘较厚且是连续的，粘液腺外的上皮肌鞘较薄且不连续。雌雄蛙躯干部位的皮肤腺体差别明显，雄蛙饱满圆润（图版 3-3, 3-4），雌蛙（图版 3-5）多有变扁的趋势，这也使得躯干背部皮肤雄蛙厚于雌蛙，并表现出极显著性差异。三种腺体大小比较如表 3-2。

(1) 颗粒腺 颗粒腺在两栖类皮肤中普遍存在且形态最大，腺泡内充满了大小均一、形态十分规则的圆形嗜酸性透明颗粒（图版 3-7-1、2），这些颗粒在 PAS 染色下基本上无色，即呈 PAS 阴性，在颗粒之间可以看到少量的蓝色絮状物质。腺泡外包绕了一层较厚的上皮肌鞘，有助于将其内的颗粒性物质分泌到体外。这种颗粒腺在雄（图版 3-3-3、4）、雌性（图版 3-5-2、3）背侧褶处、躯干、前后肢背部皮肤突起的各种疣粒中集中分布，在其它各部位皮肤中分散存在。背侧褶中的颗粒腺最大，且雄蛙背侧褶中颗粒腺比雌蛙背侧褶中的大。

(2) 粘液腺 粘液腺在两栖类皮肤中普遍存在，黑龙江林蛙皮肤中的粘液腺大小形态与性别有关。在雌雄蛙皮肤中均能观察到两种形态的普通粘液腺，第一种数量多、分泌细胞呈矮柱状，这种粘液腺在雄蛙各部位皮肤中形态都很小（图版 3-3; 3-6），在躯干部位最小，数量较雌蛙中的少。这种类型的粘液腺普遍存在于雌蛙各部位皮肤中，分泌细胞形状规则、排列十分整齐（图版 3-7-6），细胞核明显、位于细胞的中央呈卵圆形，腺泡多中空，有些有隐约的絮状物；雄蛙中分泌细胞排列不十分整齐（图版 3-4）。第二种粘液腺形态相对较大，分泌细胞呈中等高柱状，细胞核位于基部，细胞质较透明，在一些分泌细胞中有少许 PAS 阳性物质。雌蛙皮肤中很少见到，每个部位的横切面中只可见 1-2 个；在雄蛙中这种粘液腺的分泌细胞也较大（图版 3-10-E、G），但排列不如雌蛙中整齐。其分泌细胞的形态与特殊粘液腺的分泌细胞相似，但多呈中空状，或有些弱碱性物质，这种粘液腺在雄蛙前后肢的背腹部交界处大量分布（图版 3-10-E、G）。

(3) 特殊粘液腺 本研究观察到的特殊粘液腺（图版 3-3, 3-4, 3-8）是黑龙江林蛙雌雄性皮肤差异性最大的一个特点，这与 Brizzi R (2002) 等报道的现象类似。Brizzi R 通过对 *R. dalmatina*, *R. iberica*, *R. perezi* 的研究发现一种与普通粘液腺在分泌细胞结构和分泌物性质上不同的另外一种粘液腺，并称之为特殊粘液腺（图版 3-8）。并报道了这种特殊腺体只存在于雄蛙躯干背部皮肤中（图版 3-3），雄蛙其它部位皮肤和雌蛙（图版 3-5）各部位皮肤中都没有特殊粘液腺。本文通过对雌雄性黑龙江林蛙皮肤中腺体的观察和比较发现，在雄蛙躯干背部和腹部存在大量的特殊腺体（图版 3-3），这种腺体的颜色腹部（图版 3-4-3、4）较背部（图版 3-4-1、2）的更暗更浓些。该腺体与 2002 年 Brizzi R 报道的特殊粘液腺在形态及腔内分泌物的形态上相似，据此，本文也称之为特殊粘液腺，但二者在雄蛙躯干部位皮肤中的分布

位置有差别。特殊粘液腺大小与颗粒腺相差不大，在 H-E 染色下呈暗红色，分泌细胞呈高柱状围绕腺腔中心呈辐射状排列，细胞核位于细胞的基底部（图版 3-8）。分泌细胞内充满了极细的颗粒状物质，对 PAS 有极强的阳性反应（图版 3-8-1、3），HE 染色下着色较暗（图版 3-8-2、4）。但是位于躯干背部和腹部的特殊粘液腺的大小及分泌细胞中的分泌物的状态有些不同，位于背部的特殊粘液腺较大着色少淡（图版 3-8-1、2），而腹部的较小着色很深（图版 3-8-3、4），且躯干背部的特殊粘液腺分泌细胞内的分泌物呈细颗粒状（图版 3-8-1、2），位于腹部的皮肤的特殊粘液腺的分泌物质地较均一，似呈溶解状态。有时在腺腔内可见到呈溶解状态的分泌物，染色也相应淡一些。

表 3-2 黑龙江林蛙头躯干背、腹部雌雄性皮肤腺体的长短径 (μm) 及个数百分比

			长径	短径	百分比	个数均值
头背部	粘液腺	雌性	98.93±13.14	68.21±14.34	88.24%	15 ^{aa}
		雄性	85.66±19.93	55.94±15.29	92.46%	11.6
	颗粒腺	雌性	165±27.61	90.5±8.18	11.76%	2 ^a
		雄性	173.3±25.54	95±15.61	5.80%	0.7
头腹部	粘液腺	雌性	88.57±10.59 ^a	53.93±8.76	96.30%	19.1 ^{aa}
		雄性	126.52±29.74	61.20±14.69	93.41%	15.6
	颗粒腺	雌性	141.67±22.68	77.5±2.5	3.93%	0.78
		雄性	145±35.94	65±19.47	5.39%	0.9
躯干背部	粘液腺	雌性	90.63±15.55	49.67±18.78	76.92%	24 ^{aa}
		雄性	77.17±23.19	50.00±16.58	30.98%	10.5
	特殊粘液腺	雌性		无		
		雄性	172.02±49.44	134.42±36.84	46.86%	15.93
	颗粒腺	雌性	165.13±56.59	101.07±63.14 ^a	23.08%	7.2
		雄性	185.42±47.10	138.87±37.03	22.35%	7.6
躯干腹部	粘液腺	雌性	101.87±24.24 ^{aa}	41.40±9.57	93.67%	29.6 ^{aa}
		雄性	58.17±11.82	35.18±7.30	36.30%	10.6
	特殊粘液腺	雌性		无		
		雄性	105.00±18.73	78.33±20.17	57.53%	16.8
	颗粒腺	雌性	119.4±38.16	37.33±6.23 ^{aa}	6.33%	24
		雄性	142.42±51.37	79.17±23.62	6.16%	1.8

注：个数是测量的 5mm 长度的皮肤中含有的腺体数量；某腺体的百分数=该腺体数/腺体总数/5mm 皮肤长度×100%。a 某指标在雌雄性皮肤中存在显著性差异，aa 某指标在雌雄性皮肤中存在极显著性差异。

5 贯穿真皮的通道细胞及钙化层

在黑龙江林蛙各部位皮肤中都有贯穿真皮一直打到表皮的通道（图版 3-9），好像是有细胞从真皮向表皮移动，这种通道也与非洲芦苇蛙（*Hyperolius viridiflavus*）皮肤表皮中的长的细柱状细胞形态相似，也可能是同一种结构。在黑龙江林蛙各部位皮肤中尤其是体背侧存在间断的条状钙化层，头背部的钙化层条（图版 3-9-1）最宽最明显。

(三) 讨论

1 黑龙江林蛙皮肤基本结构及雌雄差异性的原因分析

黑龙江林蛙各部位皮肤的基本结构相似,但是雌雄蛙在表皮厚度和皮肤总厚度上都有差异。其原因可能是本研究所取的材料是处于繁殖季节中的雌雄蛙,雌蛙为怀卵状态,推测此时为雌雄蛙的抱对时期,雄蛙腹部紧贴雌蛙的背部,致使雌蛙躯干背部表皮变薄细胞层数相应变少,有利于背部皮肤呼吸及使其透气性增加。由于怀卵状态的雌蛙腹部膨大,腹部表皮与地面接触较近,其腹部表皮厚度及细胞层数稍多于雄蛙,这是表皮与地面摩擦增加的适应。抱对时期雄蛙前肢用力与雌蛙也产生摩擦,所以雄蛙前肢腹部比雌蛙前肢腹部厚且有显著性差异。本研究发现雌蛙各部位真皮致密层比雄蛙相应部位的真皮致密层厚,并有显著性或极显著性差别,这与雌蛙各部位的腺体不发达有关,因为疏松层中腺体的大小直接影响致密层的厚度(陆宇燕,2004)。另外,推测抱对时期雌蛙会驮着雄蛙跑或游动,使得雌蛙皮肤与体壁的摩擦及运动增多而使致密层加厚。

2 腺体种类及其与功能的适应

除了根据形态将皮肤腺体分为粘液腺、颗粒腺、脂腺和混合腺,还可以根据分泌单位的功能和分布区域将皮肤腺体分为普通腺体和特殊腺体(Brizzi R, 2004)。原则上讲特殊腺体涉及到群体活动,防御策略,和化学信号专递,及生殖机制。它们仅限于皮肤的特定区域,或是形成明显的赘疣(Brizzi R, 2004)。颗粒腺作为专门的防御腺体在有尾类和无尾类都有广泛的报道。粘液腺参与机体组织和环境之间的水盐平衡及控制陆上生活时水分流失及减少水中生活时水与身体的摩擦。颗粒腺粘液腺在两栖类皮肤中都普遍存在。

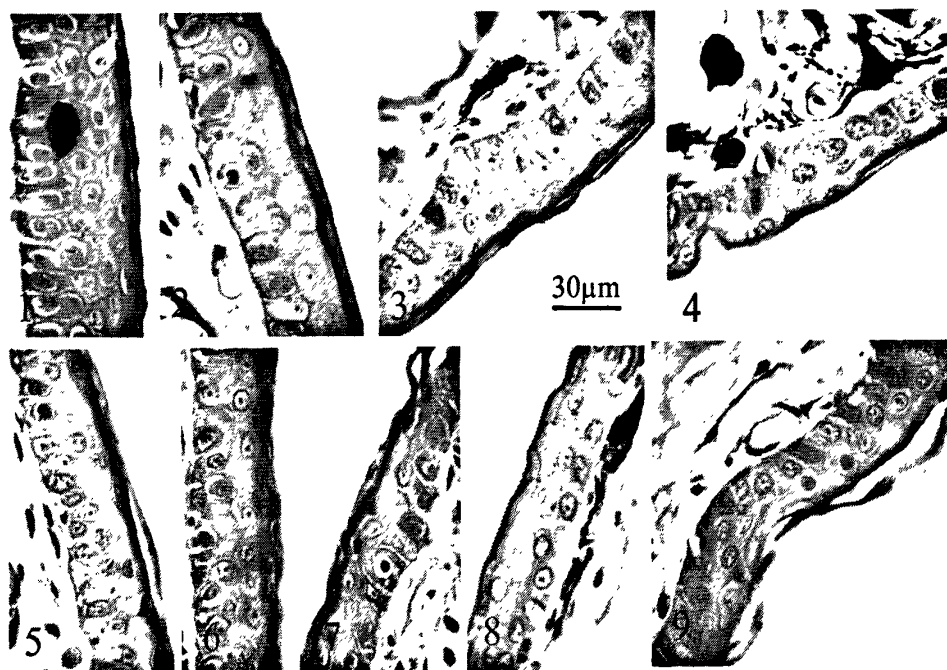
本研究在黑龙江林蛙皮肤中见到另外一种特殊粘液腺,这与前人对其他15种蛙的研究结果(Thomas, 1993),但特殊粘液腺的分布位置稍有差别,这可能属于种间差异。本研究中特殊粘液腺呈PAS强阳性反应与Brizzi R等报道的特殊粘液腺呈PAS阴性反应不同,而与Thomas等对6属12种蛙类皮肤腺体雌雄两型性现象中特殊粘液腺研究结果一致,分泌物均是PAS阳性;但腺体的组织结构则基本相似。Brizzi R等所研究的三种蛙(*R. dalmatina*, *R. iberica*, *R. perezi*)属于雄性无声囊的蛙类,因此,他们认为在这三种蛙特殊粘液腺的出现是对蛙缺乏声囊的一种适应性对策,粘液腺释放的化学信号可能替代了繁殖季节中声音通讯的作用,在吸引雌性和在领地占领方面起着重要作用(Brizzi R, 2004)。本研究中的黑龙江林蛙雄性也缺少声囊,因此,其躯干部位皮肤中的特殊粘液腺可能也会分泌一些在生殖行为中起作用的化学信号。雄性黑龙江林蛙皮肤特殊粘液腺的着色情况背腹不同,H-E, PAS染色均是躯干腹部深于背部。这可能因为腹部特殊粘液腺除了产生生殖过程中雌雄交流的信号分子外,还可能产生使雄蛙腹部和雌蛙背部紧紧粘在一起的胶状物质,防

止雄蛙滑落。这与姬蛙 (*Microhylid*) 胸部的皮肤型繁殖腺 (breeding gland) 相似, Conway 和 Metter (1967), 描述了姬蛙 (*Gastrophryne carolinensis*) 胸部的繁殖腺, 大小如颗粒腺, 它的分泌物能将雄蛙粘附到雌性的背部, 使二者在抱对时期雄性不至于从雌性背部滑脱。

3 黑龙江林蛙皮肤色素细胞的形态、分布及其雌雄性差异

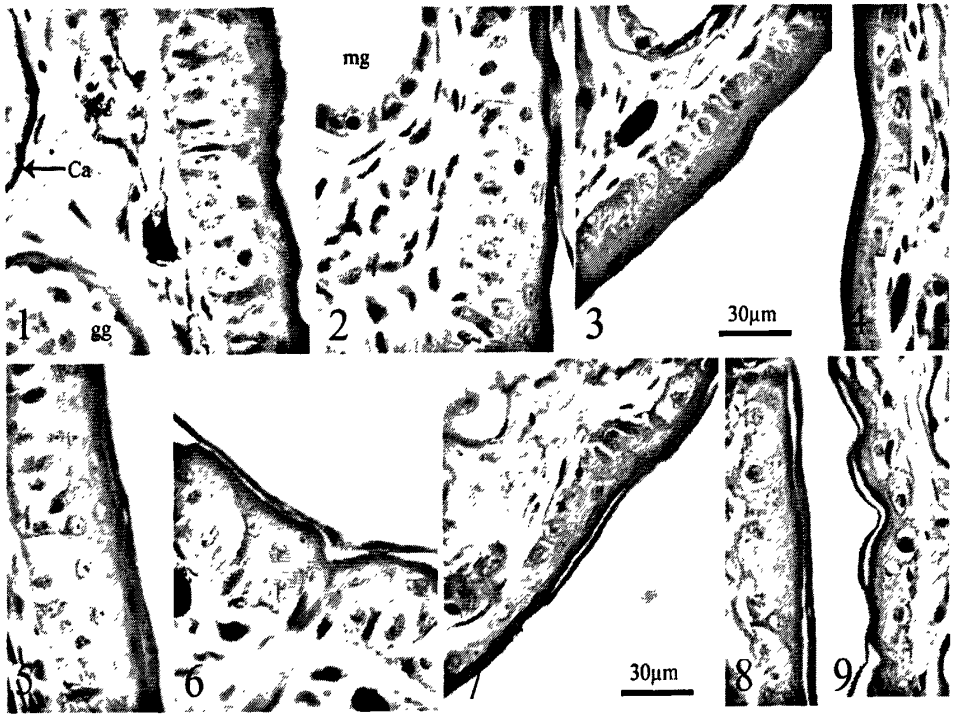
黑龙江林蛙皮肤颜色随季节及温度而改变, 冬季颜色较暗, 夏季较浅, 且雌雄蛙的体色也有差异, 一般雌蛙体色为棕黄色, 雄蛙为墨绿色或暗灰色。不同季节不同性别的黑龙江林蛙体色及其改变, 与其皮肤中的色素有关, 即神经-内分泌调控色素细胞的活动, 从而呈现不同的颜色 (刘满樱等, 2007)。本研究观察到的各部位真皮中色素细胞多呈斑块状, 很少有分支状突起, 这点雌雄蛙没有差别。除了真皮中的色素层, 本研究发现黑龙江林蛙背部表皮中也有色素细胞, 且雄蛙各部位背部表皮中的色素细胞多于雌蛙。认定雌雄蛙体色差异的原因可能是表皮中色素细胞的不同。哺乳动物表皮中的色素细胞能消除表皮各层细胞及朗格汉斯细胞的毒性氧, 在使表皮处于最佳平衡状态中具有重要意义 (成令忠等, 2003), 黑龙江林蛙表皮中的色素细胞的作用与其真皮中的色素细胞的作用是否一样, 以及雌雄蛙背部表皮中的色素细胞数量上的差异有什么意义, 尚需进一步研究。(吴文英等, 2011)

(四) 附图



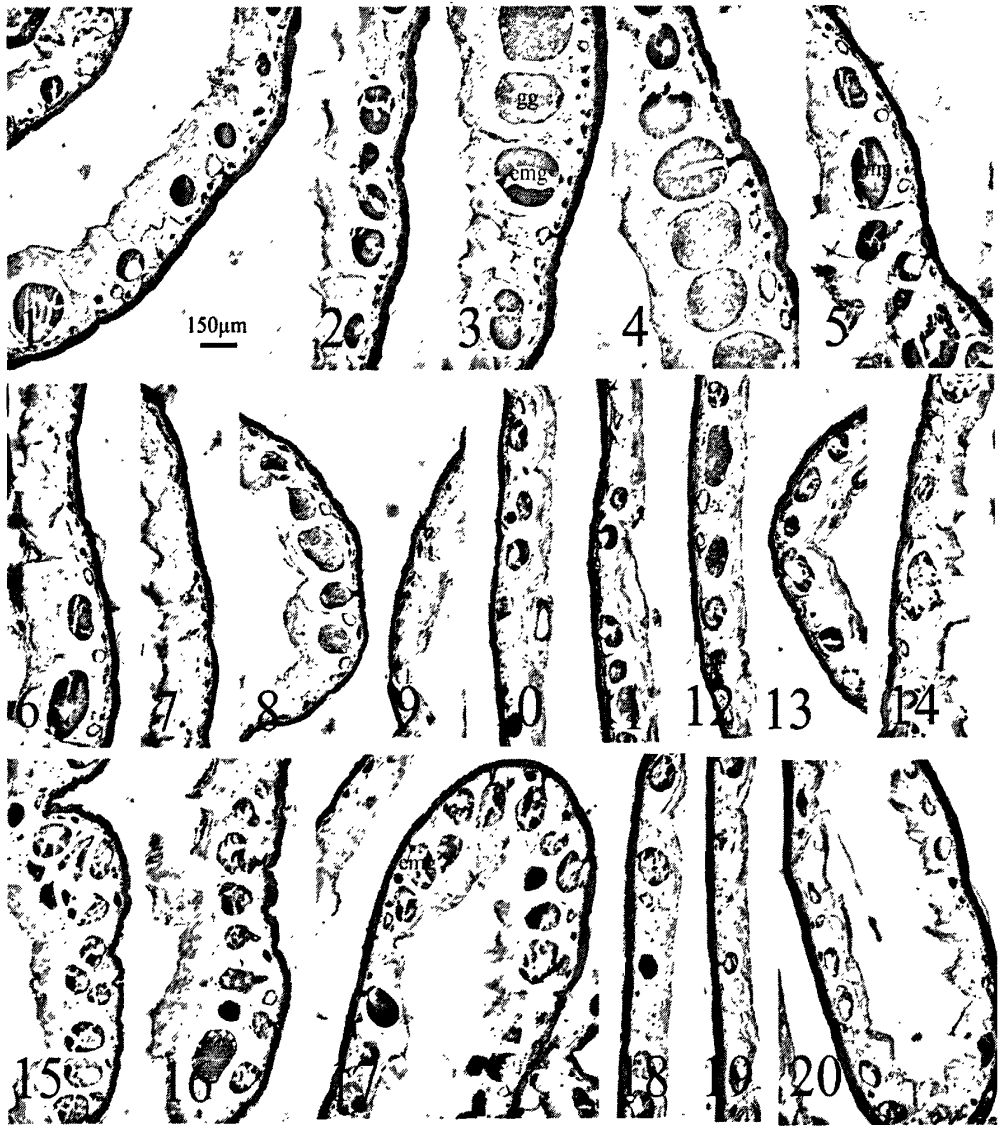
图版 3-1: 黑龙江林蛙雄性皮肤的表皮显微结构

- 1、2 分别为头背部腹部皮肤表皮; 3、4、5 分别为躯干背部侧部腹部皮肤表皮;
6、7 分别为前肢背部腹部皮肤表皮; 8、9 分别为后肢背部腹部表皮

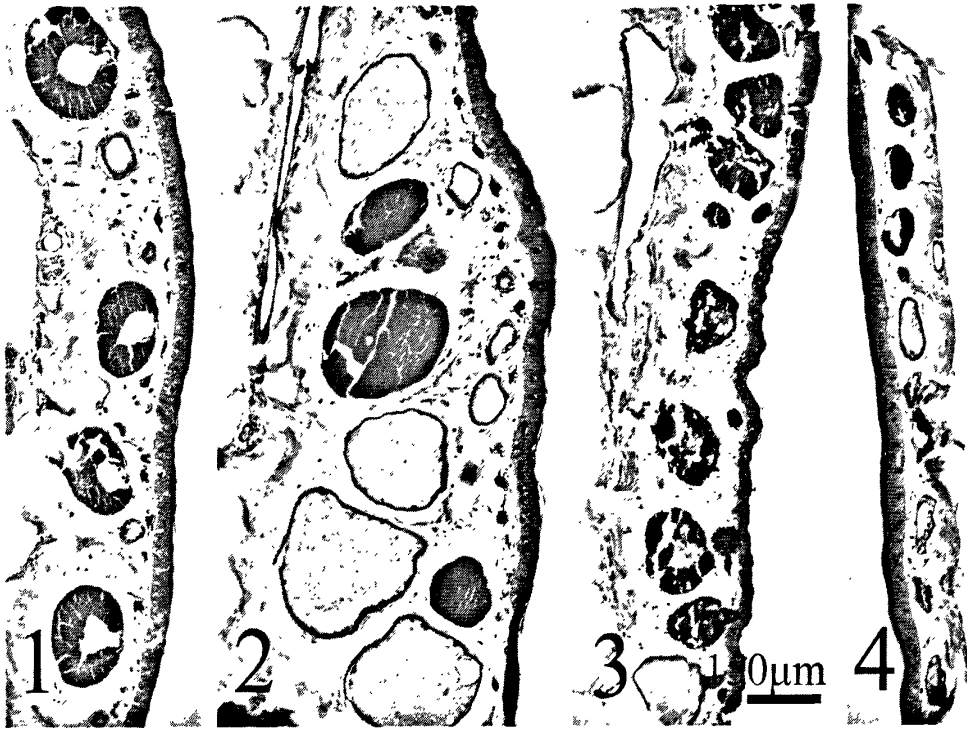


图版 3-2: 雌性皮肤的表皮显微结构

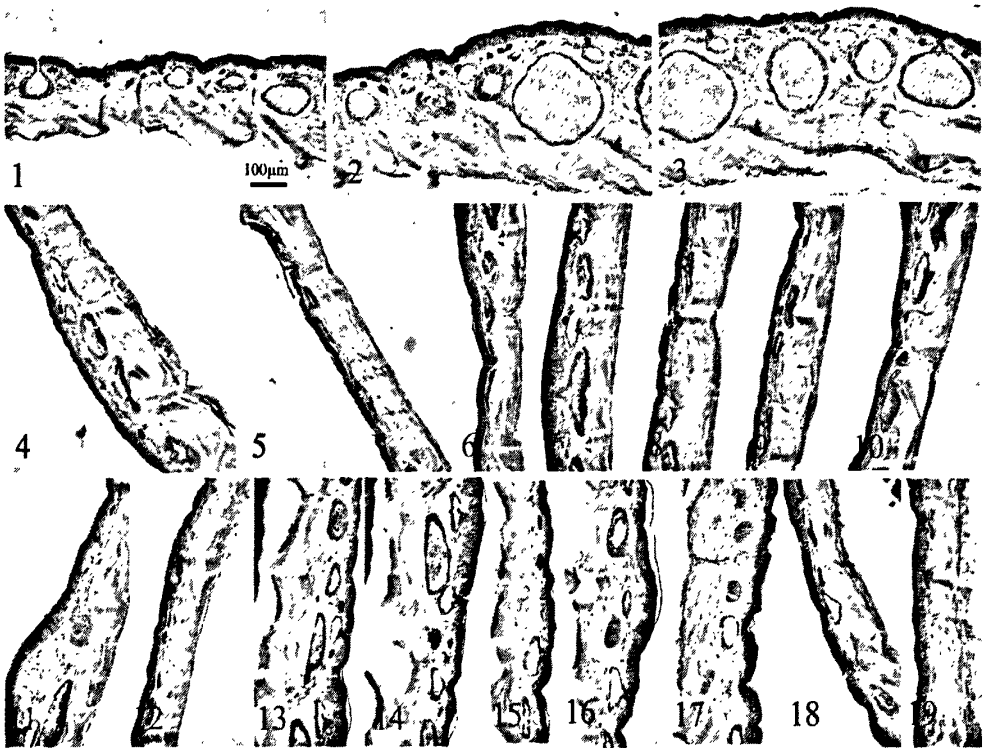
1、2 分别为雌性头背部腹部皮肤表皮；3、4、5 分别为躯干背、侧、腹部皮肤表皮；
6、7 分别为前肢背、腹部皮肤表皮；8、9 分别为后肢背腹部皮肤表皮



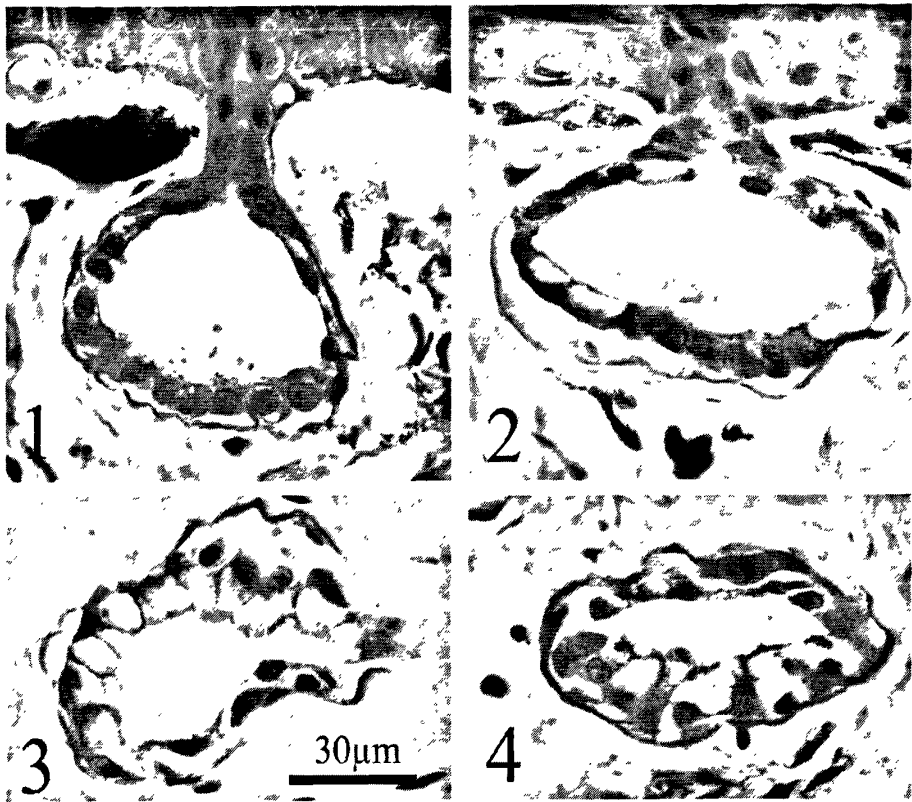
图版 3-3 雄性黑龙江林蛙躯干半侧环剥皮肤显微结构图 H.E 染色
1-2 为躯干背部；3-5 为背侧褶皱处；6-16 躯干侧部；17-20 躯干腹部



图版 3-4 黑龙江林蛙雄性躯干背部、背侧褶处、侧部和腹部皮肤显微结构图, PAS 染色
1、躯干背部皮肤; 2、背侧褶处皮肤; 3、体侧部皮肤; 4、腹部皮肤



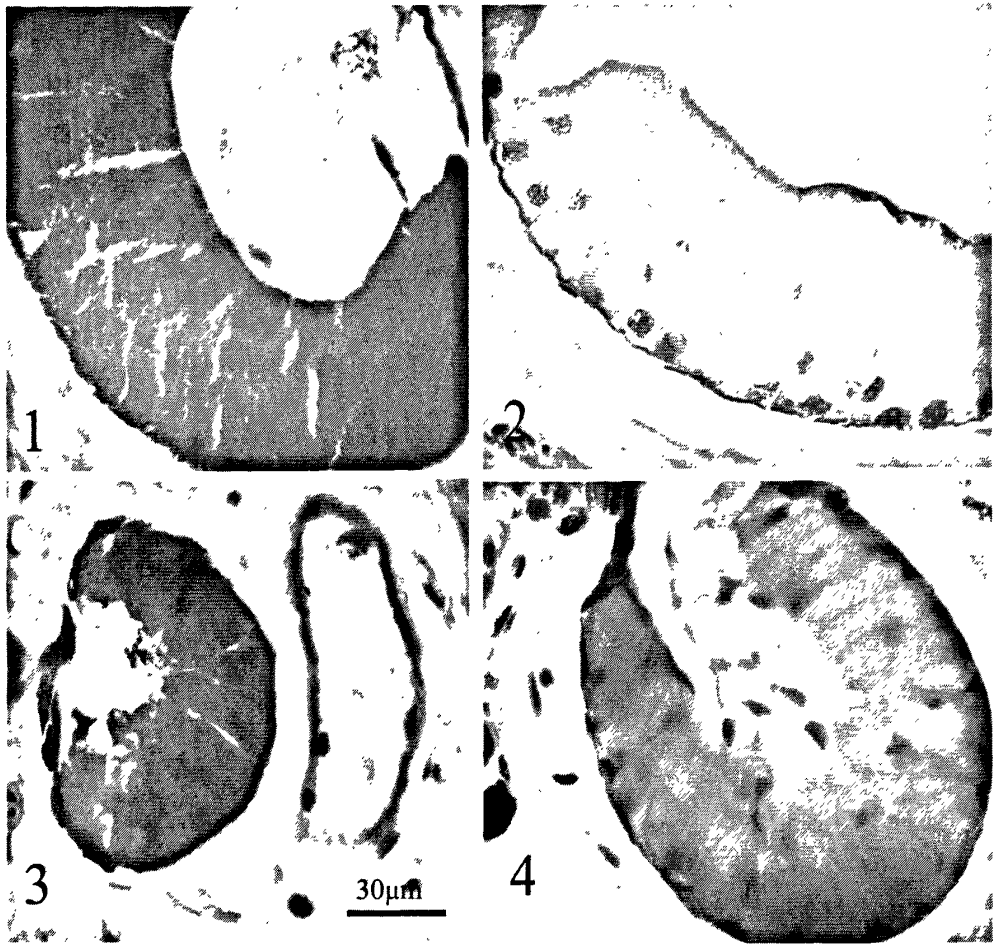
图版 3-5 黑龙江雌性躯干部位半侧环剥皮肤显微结构图, HE 染色
图 1 为躯干背部皮肤; 图 2、3 为背侧褶处皮肤;
图 4-15 为体侧部皮肤; 图 16-19 为躯干腹部皮肤



图版 3-6: 雄性黑龙江林蛙躯干部位皮肤粘液腺
 1、躯干背部粘液腺, PAS; 2、躯干侧部皮肤粘液腺, HE;
 2、3 (HE)、4 (PAS) 为躯干腹部皮肤粘液腺

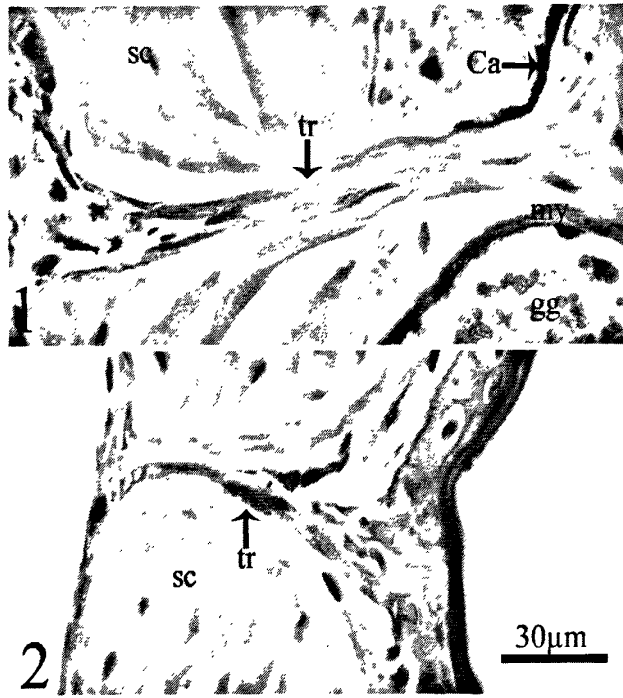


图版 3-7 雌性黑龙江林蛙皮肤腺体 HE
 1、2 为躯干背部颗粒腺; 3、4、5 分别为躯干腹侧背部皮肤粘液腺;
 6、7 分别为头背腹皮肤粘液腺

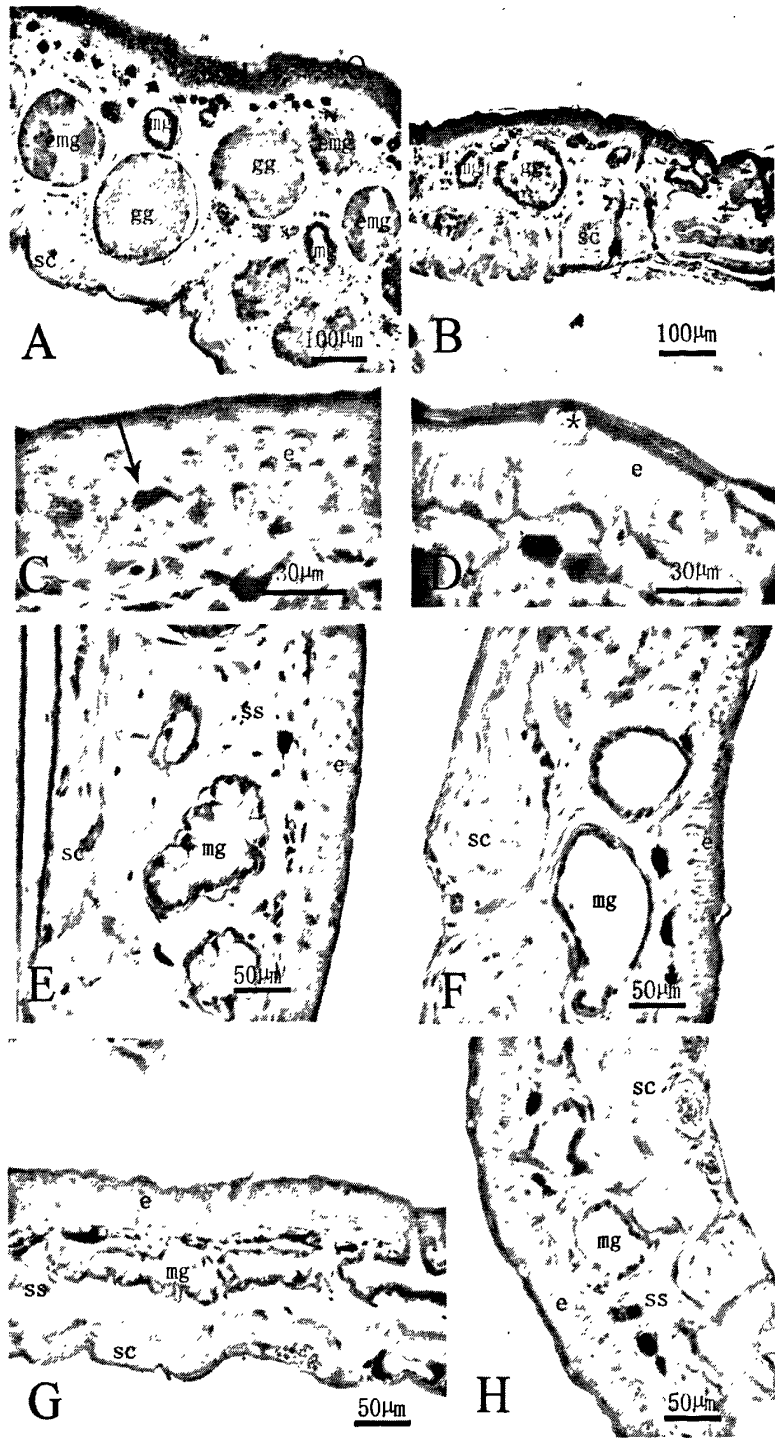


图版 3-8: 雄性黑龙江林蛙躯干部位皮肤中特殊粘液腺

1 (PAS)、2 (HE) 为躯干背部的特殊粘液腺; 3 (PAS)、4 (HE) 为躯干侧部特殊粘液腺



图版 3-9 头背部躯干侧部真皮通道
图 1 头背部皮肤通道；2 躯干体侧部真皮通道



图版 3-10: 繁殖期黑龙江林蛙雌雄性皮肤显微结构比较

A、B 分别为雄雌性躯干背侧褶处皮肤；C 雄性躯干背部表皮；
 B、D 雌性后肢侧部表皮；E、F 分别为雄雌性前肢桡骨棱处皮肤显微结构示粘液腺形态；
 C、G、H 分别为雄雌性后肢股骨棱处皮肤显微结构示粘液腺形态

二、中国林蛙皮肤组织结构的季节性比较

(一) 材料与方法

1 材料

崂山产中国林蛙, 3、6、9、12 四个月的雄性成年个体各三只, 3 月份的体长为 46.78~49.93mm; 6 月份的为 46.95~48.90mm; 9 月份的为 51.66~52.12; 12 月份的为 46.44~48.15; 以及 3 月份和 9 月份的雌性成年个体各一只, 体长分别为 54.55mm 和 55.13mm。

2 方法

常规石蜡切片制作, HE 染色, OLYMPUS-BX50 显微镜观察与测量。

(二) 皮肤的基本结构

和所有两栖类的皮肤一样, 中国林蛙的皮肤也包括两层, 外层是表皮层, 由复层扁平上皮构成。下面一层称为真皮层, 该层富含腺体、血管、色素、神经等。根据中国林蛙在一年中的生命活动, 可以把中国林蛙在 3、6、9、12 这四个月份的生活定为四个时期: 生殖期、活跃期、冬眠前期、冬眠期。

这四个时期的各部位皮肤的基本结构并无差异, 但是在表皮和真皮厚度 (表 3-3), 角质层细胞的形态、以及真皮腺体的大小及形态、色素层的细胞形态等方面都有差别。同月份雌雄的皮肤在上述组织结构方面也表现出一定的差异。

在这四个时期中的躯干半侧环剥皮肤中, 生殖期和活跃期背侧褶明显, 可见到相应部位皮肤变厚。且里面的颗粒腺饱满分泌颗粒多。冬眠前期和冬眠期的躯干半侧环剥皮肤中背侧褶不明显, 背侧褶内的颗粒腺不饱满, 其中嗜酸性颗粒少或者无分泌颗粒。四个时期雄性及两个时期雌性头背部及头腹部皮肤结构有很明显的差异 (图版 3-11)。

1 表皮

(1) 四个时期雄性个体皮肤表皮的比较

对于同一个时期的各部位表皮中头背部较厚, 躯干正背部表皮比正腹部表皮厚度稍厚, 躯干侧部皮肤最薄, 且表皮之下的毛细血管较多且向上突起使得表皮细胞细胞层数变少, 及表皮变薄。但是对于生殖期和冬眠前期标本的躯干半侧环剥皮肤来说, 躯干腹部的表皮最厚, 厚于躯干背部及侧部 (图版 3-12-1、2、3、4、5、6)。这四个时期的相应部位的表皮厚度、生发层细胞的高矮、角质层包含的细胞层数及角化程度都有差异。

生殖期——各部位皮肤的表皮中头背部皮肤最厚, 表皮比活跃期厚, 约有 4-5 层细胞层。生发层细胞呈矮柱状, 排列不十分整齐。表皮各层细胞相对稍大, 角质

层角化程度较浅，表皮表面两层细胞之间有缝隙存在，并可见到最外层细胞有脱落的现象。

活跃期——在这四个时期中该期头背部表皮最薄。表皮一般5层细胞，各层细胞都较扁，最内层的生发层细胞也呈矮柱状，最外面一层为角质层，细胞角化均匀，细胞之间未见间桥，次外层细胞角化程度十分浅与内层细胞相似。

冬眠前期——表皮相对较厚，生发层细胞呈高柱状，排列较整齐。此期的角质层角化程度最深（图版 3-12-3、7、11），角质层约包括3层角质细胞，前两层角化程度较深，基本上都呈粉红色条带状。表皮表面两层细胞之间也可见到缝隙。

冬眠期——表皮最厚（图版 3-12-4、8、12），角质层约包括2层，最外层角化程度相对冬眠前期浅，还可见到很扁的长椭圆形深蓝色的细胞核。次外层处于角化状态中。

表 3-3 四个月份雄性头背部和躯干背部及腹部表皮及真皮厚度 (μm)

	表皮厚度			真皮厚度		
	头背部	躯干背部	躯干腹部	头背部	躯干背部	躯干腹部
3月 范围	42.5~62.5	35~62.5	50~72.5	157.5~175	107.5~207.5	97.5~125
平均	50	49.2	58.8	162.9	144.2	112.5
6月 范围	10~15	10~12.5	8.8~12.5	80~105	80~87.5	37.5~45
平均	12.5	11.5	10.25	85	82	41.5
9月 范围	20~32.5	20~25	20~25	77.5~100	50~75	50~55
平均	27.1	21.4	22.5	88.6	56.8	51.8
12月 范围	25~57.5	25~33.8	35~57.5	100~125	77.5~137.5	62.5~70
平均	43.5	29.8	47.8	115.5	112	64.5

(2) 生殖期和冬眠前期雌性个体皮肤表皮及其比较

躯干部位表皮的比较 生殖期和冬眠前期的中国林蛙个体躯干部位的皮肤表皮变化趋势是一致的，从躯干背部到腹部，躯干正腹部是最厚（图版 3-13-3、6；），侧部最薄（图版 3-13-2、5）。3月份的雌性个体的躯干背部表皮厚度不均一，表面不平滑，呈凹凸不平的锯齿状，凹处厚约 $9\mu\text{m}$ ，凸处厚约 $17.1\mu\text{m}$ 。表皮细胞层数 2~5 层，一般为 3 层，角质层一般为 1 层，角化均匀，有脱落现象，次外层细胞角化程度十分浅。躯干腹部表皮厚度较均一约 42.2 微米，表皮细胞层数 5~6 层，一般 5 层，角质层包括表皮表面两层细胞，最外层角化较均匀有脱落现象，次外层角化程度较浅。3月份躯干腹部表皮厚于背部表皮（图版 3-14-5、1），一方面是腹部表皮细胞层数多于背部，另一方面躯干腹部表皮的生发层细胞呈高柱状，而背部表皮的生发层细胞呈矮柱状，中层细胞体积也是腹部大于背部。

9月份雌性个体的躯干背部表皮厚度均一（图版 3-15-1），表面平滑，厚约 $19.8\mu\text{m}$ ，表皮细胞数 3~5 层，一般为 4 层表皮细胞，角质层一般为 1~3 层细胞，最外层角化均匀，与次外层之间有缝隙，次外层或至第三层细胞的角化程度都较深，

细胞呈长带状。躯干腹部表皮厚度均一厚约 $48.3\mu\text{m}$ 。表皮细胞层数 4~6, 一般 6 层, 角质层 1~3 层, 角质层的角化现象与躯干背部相似。

前肢部位皮肤表皮的比较 3 月份前肢环剥皮肤的表皮厚度较均一, 前肢背部表皮厚度约为 $15.25\mu\text{m}$, 包括 3~4 层细胞, 一般 3 层, 角质层不明显, 最外层处于角化过程中。前肢腹部皮肤的表皮厚约 $11.5\mu\text{m}$, 包括 3~4 层细胞, 一般三层, 最外层为角质层细胞, 角化较均匀。

9 月份前肢环剥皮肤的表皮厚度也较均一, 前肢背部皮肤厚约 $22.8\mu\text{m}$, 包括 4~5 层, 一般为 5 层, 角质层包括 1~3 层, 角化程度较深。前肢腹部厚约 15.4 微米, 包括 3~5 层, 一般为 4 层。

后肢部位皮肤表皮的比较 3 月份后肢背部表皮稍有凸凹不平的锯齿状 (图版 3-16-1、2、3), 厚度约 $11.5\mu\text{m}$, 包括 2~3 层细胞, 一般是 3 层, 最外层为角质层角化均匀有脱落现象。后肢腹部表皮表面较平滑, 厚约 $15\mu\text{m}$, 包括 3~4 层细胞, 一般为 4 层, 角质层 1~2 层, 最外层角化均匀。

9 月份后肢背部腹部皮肤的表皮厚度较均匀 (图版 3-16-4、5、6), 表面较平滑, 背部表皮厚约 17 微米, 约包括 4 层细胞层, 角质层 1~3 层, 最外层角化均匀, 次外层和第三层处于角化过程中。后肢腹部表皮厚约 $24.8\mu\text{m}$ 微米, 一般为 5 层细胞, 角质层 3 层, 最外层角化均匀, 次外层和第三层的角质层处于角化过程中。

2 真皮

(1) 四个时期雄性真皮结构

包括两层上层为真皮疏松层, 其中包括颗粒腺和粘液腺、色素层、血管、神经等; 下层为真皮致密层, 致密层是由平行波浪状纤维组成, 在整个皮肤中这种平行波浪状胶原纤维并不是连续的而是被上接表皮下通到致密层一下的皮下组织的纵行管道分隔成一栏一栏的, 这种分隔的距离在头背部短, 即在一个视野中可见到好几个这样的栏。经过观察发现这种纵行管道是某种细胞从皮下组织移到表皮中的通道 (图版 3-12-9; 图版 3-13-5)。这四个时期的蛙标本的致密层的厚度及状态有些差异 (表 3-4)。生殖期标本各部位皮肤的致密层都较其他时期为厚且有极显著性差异, 其胶原纤维排列较紧密。从生殖期到冬眠期这四个时期中基本上呈先下降然后上升趋势, 但是到冬眠期也上升不到生殖期的厚度。四个时期躯干半侧环剥部位及前后肢环剥皮肤组织结构有较大差异 (图版 3-17; 3-18; 3-19; 3-20; 3-21; 3-22)。

表 3-4 四月份雄性头背部躯干背部及腹部致密层厚度 (μm)

	头背部致密层		躯干背部致密层		躯干腹部致密层	
	范围	平均	范围	平均	范围	平均
3 月	42.5~52.5	46.3	57.5~70	60.4	50~65	57.1
6 月	30~42.05	35.8	25~32.5	27.5	12.5~15	14.6
9 月	25~35	30	25~30	27	22.5~25	24

12月	25~37.5	29	32.5~52.5	44	25~37.5	30.5
-----	---------	----	-----------	----	---------	------

(2) 四个时期雄性真皮腺体

生殖期和活跃期皮肤中腺体较丰富，背侧褶很明显（图版 3-17；3-18），其内含有较多颗粒腺，且颗粒腺内充满了嗜酸性的伊红色的圆形颗粒。比较而言，生殖期个体皮肤中腺体最丰富，尤其是粘液腺。冬眠前期和冬眠期腺体有变扁退化的趋势，且背侧褶不明显（图版 3-19；3-20），即看不到很明显的有颗粒腺集中分布的背侧褶区域。中国林蛙皮肤中颗粒腺和粘液腺均为单泡状腺体。

粘液腺的形态及种类 在中国林蛙的皮肤中可见到三种类型的粘液腺，第一种腺体存在两性差异性，只存在于雄性躯干背部（图版 3-23-1），在这四个时期中生殖期（3月份）的雄性躯干背部大量存在，冬眠期（12月份）也可见到。形态较大，水平直径约 65~115 μm ，平均 87 μm ，垂直直径约 55~90 μm ，平均 69 μm 。腺泡外面的上皮肤很薄。腺腔内壁的分泌细胞呈高柱状，从皮肤的横切面上看，是底端稍宽顶端稍窄的长条形，细胞核位于高柱状分泌细胞的基底部。这种粘液腺的分泌细胞围绕腺腔中心呈辐射状排列，且分泌细胞中充满了嗜酸性呈较暗的玫瑰红色细颗粒。

第二种粘液腺也是普通粘液腺，在雌雄性躯干背腹部前后肢皮肤中都存在这种腺体。是中国林蛙各时期各部位皮肤中数量最多的一种粘液腺，其内有嗜碱性的网状物质（图版 3-23-3、4），形态较大，腺泡外的上皮肤很薄，腔内充满了嗜碱性的网状物质，或者腔内中空，只有分泌细胞处有一圈嗜碱性的物质，常不能见到分泌细胞及其细胞核。在雄性的这四个时期中生殖期（3月份）各部位皮肤中都有这种粘液腺，且腺腔内多存在嗜碱性网状分泌物质。其他三个时期（图 1、2、3、4）各部位皮肤中普通粘液腺数量少，且多中空（图版 3-18；3-19；3-20）。六月份和九月份各部位普通粘液腺最少，12月份普通粘液腺又稍多（图版 3-22）。

第三种粘液腺，形态较小，长径约 40~75 μm ，平均 58.2 μm ，短径约 25~37.5 μm ，平均 31.3 μm 。是中国林蛙皮肤中最小的腺体（图版 3-23-5、6、7），数量较少。腺泡外面的上皮肤也不明显分泌细胞也是高柱状，细胞核位于细胞的基底部，分泌细胞基部宽于顶部，有的大约呈三角形（图版 3-23-5、6）。细胞内充满了嗜酸性的粉红色物质。还可见到这种粘液腺的分泌细胞退化变矮，而使得腺腔变大（图版 3-23-7），在这四个时期的个体的各部位皮肤中都分散存在这种腺体。

四个时期雄性皮肤中颗粒腺的形态及差别 四个时期的颗粒腺基本结构相差不多，但是颗粒腺的形态、分泌物含量及数量，在有些差别，3月份（图版 3-17；3-24-1）和6月份（图版 3-18）皮肤中颗粒腺较饱满，分泌物含量较多，数量也稍多。冬眠前期和冬眠期中国林蛙皮肤颗粒腺形态较小，腺泡内分泌颗粒少或无（图版 3-24-3、4），腺泡外的上皮肤细胞厚。

(3) 生殖期和冬眠前期雌性皮肤腺体

基本结构相似，只是疏松层厚度与致密层厚度有差别，3月份疏松层中的腺体较多，较饱满，使得3月份（图版3-14）疏松层厚于9月份疏松层，致密层，三月份致密层的厚度也大于9月份（图版3-15）致密层的厚度。

生殖期和冬眠前期雌性皮肤腺体

生殖期个体各部位皮肤中的腺体比冬眠前期个体各部位皮肤中的腺体丰富，即数量多，形态也饱满。腺体中的内容物也是生殖期（图版3-14）远多于冬眠前期（图版3-15）。生殖期（3月份）个体的躯干背侧褶也明显于冬眠前期（9月份）。这两个时期的各部位皮肤中都有普通粘液腺和第三种粘液腺及颗粒腺，普通粘液腺的形态及数目在这两个时期中差别很大，第三种粘液腺没有差别，也是泡状腺体，位于皮肤的表皮之下，颗粒腺颈部或普通粘液腺的上部。

躯干部位——生殖期（3月份） 躯干背部皮肤中的腺体小或者变扁（图版3-14；3-25），除了背侧褶处的颗粒腺外，粘液腺多为中空，且变扁。躯干腹部腺体较大，且饱满（图版3-25-3）从躯干的下侧部到腹部，普通粘液腺很多，几乎一个挨一个（图版3-14-3、4、5）。在躯干半侧环剥中可见到149个普通粘液腺，20个第三种粘液腺，8个饱满颗粒腺，其中背侧褶处有3个。此期尤其是躯干腹部的普通粘液腺很大且饱满，腺泡外有较薄的上皮肤，腺腔壁上的分泌细胞呈细长高柱状（图版3-25-3），细胞内充满了嗜碱性絮状物质，发育到一定程度后分泌细胞就从顶部开始解体，解体后的区域的细胞分泌物变为水平网格状（图版3-25-3）。从躯干下侧部到腹部，普通粘液腺较大，一般垂直直径大于水平直径（表3-5），且从躯干下侧部到腹部普通粘液腺的垂直直径变大（图版3-14-4、5）。据观察躯干背部的粘液腺及颗粒腺几乎都是水平直径长于垂直直径，而腹部的粘液腺及颗粒腺（长径75~250 μm ，平均159 μm ；短径67.5~137.5 μm ，平均97 μm ）的垂直直径几乎均长于水平直径。

表3-5 3月、9月两个时期躯干背部普通粘液腺长短径比较（单位： μm ）

		长径		短径	
		范围	平均	范围	平均
躯干背部	3月份	70~85	78	30~53.75	40.8
	9月份	47.5~60	53.5	12.5~22.5	17
躯干腹部	3月份	122.5~145	131	75~130	103.5
	9月份	50~62.5	57.5	42.5~50	43.5

躯干部位——冬眠前期（9月份） 躯干背部粘液腺变扁（图版3-15-1），有时变成一条线即腺体颈部与基部的分泌细胞贴在一块，只有两层细胞构成，腺腔消失。粘液腺的长短径都变小，躯干腹部的普通粘液腺数目变少，分泌细胞完全退化，腺泡多为中空，形态也变小，且水平直径有大于水平直径的趋势（图版3-15-4），比3月份躯干腹部普通粘液腺的垂直直径小（表3-5）。在9月份躯干半侧环剥中，有普通粘液腺98个，第三种粘液腺22个，颗粒腺未见。

前后肢——3 月份 前肢的腺体除了桡骨处有较多腺体尤其是饱满颗粒腺外(图 11-11), 和前肢另外一处腺体较多处有稍多的普通粘液腺, 其他部位腺体较少, 也有第三种粘液腺存在。普通粘液腺分泌细胞多不能见到, 多在腺泡内壁上见到嗜碱性的网状分泌物。9 月份前肢, 在腺体分布较多的两个部位存在相对较多的普通粘液腺, 但此时的普通粘液腺中空, 未见颗粒腺(图版 3-22-13、14、15)。

后肢的变化如前肢(图版 3-16)。只是 3 月份后肢的颗粒腺不如前肢皮肤中多(图版 3-16-1、2、3)。

粘液腺的比较

两个时期的雌性个体各部位中都含有两种类型的粘液腺, 即普通粘液腺(图版 3-25-1、3)和在雄性那一部分提到的第三种粘液腺(图版 3-25-2、4)。主要差别就是普通粘液腺的形态大小和数目如上所述。

颗粒腺的比较

两个时期的雌个体各部位皮肤中的颗粒腺, 差别较大, 3 月份皮肤中的颗粒腺饱满, 充满了圆形嗜酸性颗粒, 腺泡外面的上皮肤较薄(图版 3-14-2), 构成上皮肤的上皮肌细胞界限不明显, 9 月份皮肤中的颗粒腺多中空, 腺腔内分泌颗粒很少, 有些裸核存在, 腺泡外的上皮肤很厚, 构成上皮肤的上皮肌细胞很厚, 且界限明显。

(4) 色素

色素在 H.E 染色下呈深棕黑色, 是由色素细胞产生的, 分布范围较广甚至遍及皮肤的各个结构中, 在表皮尤其在雄性各部位背部表皮细胞中都有色素颗粒存在。尤其集中在体背部和侧部表皮之下疏松层的上层, 排列成一层称为色素层, 除了这两处在皮下组织中也存在色素细胞(图版 3-14-3、4)。

这四个时期表皮之下的色素层的状态有所差别, 生殖期的个体皮肤中色素层的色素细胞呈团块状, 较少分支, 活跃期的色素层的色素细胞开始出现分支, 处于从团块状向分支装转变的过度状态。到冬眠前期这种色素细胞有分支并且相互连接成一层(图版 3-18), 冬眠期色素细胞这种分支更粗一些(图版 3-20), 色素细胞的分支彼此交织连成较厚的一层。在这四个时期的各部位皮肤中都可见到色素层细胞的这种分泌规律(图版 3-11; 3-17; 3-18; 3-19; 3-20)。

(5) 真皮钙化层

钙化层一般呈嗜碱性的条带状, 即是钙化的纤维集结成束, 还可以表现为钙化的纤维分散存在。钙化层位于真皮的疏松层和致密层之间, 即疏松层的下面或靠下面, 基本上位于二者分界位置。在这四个生活时期中的雄性中国林蛙各部位皮肤中都可见到钙化层, 只是不同的生活时期钙化层的存在状态有所不同。

生殖期一躯干背部有稍明显的不连续的弯曲的细条状钙化层存在(图版 3-17), 体侧部也有零星的不连续的钙化层存在, 腹部基本未见到。后肢背部有稍明显不连

续的钙化层，侧部几乎没有钙化层，腹部可见到少许钙化层。

生活期一躯干背部有基本连续的一层钙化层，背侧褶处在颗粒腺之间有少许钙化层存在，体侧部有零星的钙化层存在，躯干腹部也有很不连续的钙化层存在。

冬眠前期一躯干背部和腹部都有不连续的钙化层存在，但是这种钙化层呈分散存在的钙化的纤维，侧部也有少许存在。前后肢背部侧部和腹部没有明显的钙化层存在。

冬眠期一躯干背部条带状的钙化层基本连续，躯干侧部和腹部的也基本连续但是存在状态与躯干背部不同，不是呈致密的条带状而是由分散存在的钙化纤维组成。前后肢皮肤中的钙化层的存在形式与躯干半侧环剥皮肤中的存在形式大致相同。总之冬眠期的体背部的钙化纤维集结成束呈条带状，体侧部和体腹部皮肤中的钙化纤维多分散存在，范围较宽。

(三) 讨论

1 四个时期雄性各部位皮肤的差异的分析

中国林蛙与爪鲵(陆宇燕, 2004)相同, 其表皮厚度都随着部位不同有着明显变化。中国林蛙头背部表皮最厚, 这一点与本研究的其他林蛙及雄性东北林蛙(刘满樱等, 2007)相同, 这可能是由于头部暴露是易受攻击的部位。躯干部位皮肤中躯干侧部表皮最薄, 且表皮之下的毛细血管丰富且向上突入到表皮中使躯干侧部表皮变薄, 可能是因为体侧部皮肤呼吸旺盛, 这一特征亦与本研究的其它林蛙相似。四月份标本的表皮基本结构一致但是其厚度有差异, 角质层的角化程度以及生发层的排列状态有些不同。生殖期为生理活跃期, 由于繁殖期抱对行为使得这个时期的运动不如活跃期, 所以表皮比活跃期为厚。中国林蛙冬眠的习性决定了它与外界接触的皮膚有防止水滲入体内部的结构, 所以冬眠期表皮细胞层数多, 排列紧密。另一方面中国林蛙冬眠时完全靠皮肤呼吸, 冬眠期角质层的角化程度不如冬眠前期高。由于繁殖时期皮肤内真皮腺体十分发达, 所以繁殖期皮肤总厚度最厚。

2 两个时期雌性及其它怀卵期雌性林蛙躯干部位表皮的比较分析

3月份和9月份两个时期的雌性躯干部位皮肤中均是体侧部最薄, 这与雄性及其它林蛙一致, 表皮之下血细胞也多见。躯干正腹部表皮最厚, 尤其是3月份的, 在所研究的怀卵状态的东北林蛙躯干腹部的表皮也具有这样的特点, 即表皮最厚, 林文达等(2008)报道雌性昭觉林蛙腹部表皮也较厚。由于其标本为怀卵状态所以腹部表皮最厚, 这与怀卵期雌性黑龙江林蛙的腹部表皮也是最厚相一致, 这可能有利于膨大的腹部与地面摩擦。另外3月份的躯干背部和侧部皮肤表皮的角化程度远浅于9月份的, 且表皮细胞层数及表皮厚度均是3月份小于9月份, 3月份的与怀卵状态的雌性黑龙江林蛙躯干部位表皮形态相同。这可能与抱对时雌性的背部被雄性紧贴住而使得怀卵期的雌性的躯干背部和侧部表皮变薄, 且表皮表面不平滑, 而

有利于皮肤呼吸。

3 雄性个体四个时期腺体种类形态比较分析并与黑龙江林蛙皮肤腺体进行比较

粘液腺分泌的粘液主要成分为粘多糖和粘蛋白,覆盖在体表形成一层薄膜,具有免疫防御、保湿、呼吸等作用,颗粒腺是一种毒腺,分泌复杂的抗菌肽其免疫作用。所以,生殖期和活跃期皮肤腺体丰富,背侧褶明显,冬眠前期和冬眠期背侧褶不明显,腺体也不很发达,形态也小,颗粒腺数目少,粘液腺中空。在生殖期雄性背部皮肤中存在一种特殊粘液腺,Thomas (1993)和 Brizzi R (2002)曾做过相关报道,这种特殊粘液腺为两性异型腺体,可能在繁殖抱对过程中起作用。繁殖时期(3月份)的雄性躯干部位皮肤中见到颗粒腺、特殊粘液腺及另外两种粘液腺,活跃期(6月份)、冬眠前期(9月份)和冬眠期12月份均未见到特殊粘液腺而只有颗粒腺及两种粘液腺。这两种粘液腺大小相近,形态及腔内分泌细胞相差极大,一种是分泌细胞随着分泌物的排出而全部脱落不见,只在腔内壁看到一层嗜碱性的物质,另一种是有分泌细胞,且分泌细胞呈较高柱状,分泌细胞内有嗜酸性物质。中国林蛙皮肤中的粘液腺与黑龙江林蛙皮肤中的粘液腺也完全不同,黑龙江林蛙皮肤中普通粘液腺分泌细胞完整且多呈矮柱状,细胞核卵圆形。中国林蛙前两个时期的皮肤中颗粒腺形态大,内充满了嗜酸性颗粒,腺体外的上皮肌薄,后两个时期颗粒腺形态相对小,且腔内缺少颗粒,腺体外的上皮肌厚。中国林蛙和黑龙江林蛙皮肤中的颗粒腺相似,均是两栖类典型的颗粒腺。

4 雌性两个时期腺体差异的分析及与黑龙江林蛙皮肤腺体的比较

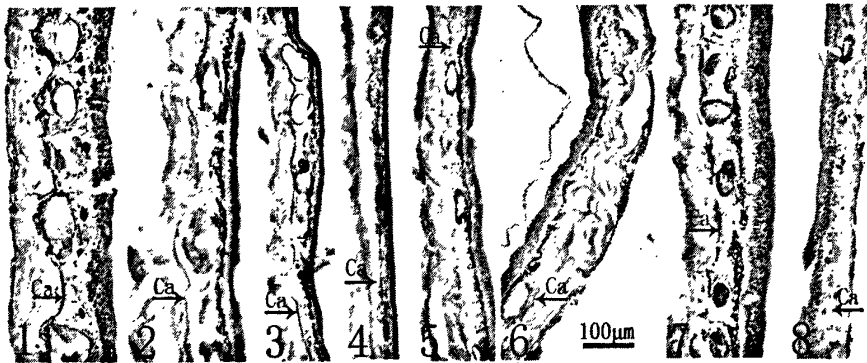
在中国林蛙雌性皮肤中的有两种粘液腺和颗粒腺这和非繁殖期的雄性相似,生殖期怀卵状态的雌性和冬眠前期雌性皮肤中腺体状态有很大差异,生殖期雌性皮肤粘液腺大而饱满且充满了嗜碱性分泌物,也可见到呈高柱状的分泌细胞,随着分泌物的释放逐渐变短的现象,而冬眠前期粘液腺分泌细胞为矮柱状,且腺腔中空,且躯干背部粘液腺有变扁萎缩的趋势。生殖期雌性皮肤中饱满状态的粘液腺的功能以及其它时期的粘液腺与生殖期完全不同有待于进一步研究。怀卵状态的中国林蛙和黑龙江林蛙皮肤中的颗粒腺差别不大均为典型的颗粒腺,粘液腺的形态主要是分泌细胞有很大差别,中国林蛙怀卵期的粘液腺饱满富含嗜碱性分泌物,尤其稠密分布于躯干腹部,但是黑龙江林蛙怀卵期雌性的粘液腺不饱满,甚至有退化现象,这可能与生活环境有关。且黑龙江林蛙皮肤中普通粘液腺只观察到一种。

5 钙化层连续程度在四个时期不同的分析

钙化层是钙化的胶原纤维,一般位于真皮疏松层和致密层之间,是对干旱环境的适应。四个时期都有钙化层存在且主要存在于体背部和侧部,腹部也有,但是在活动期和冬眠期体背部钙化层基本连续,生殖期和冬眠前期体背部的钙化层不连续,这说明在生殖期及冬眠期都需要防止水分丢失或进入,所以钙化层连续。而在活跃期和冬眠前期的生活环境易变化,所以自行

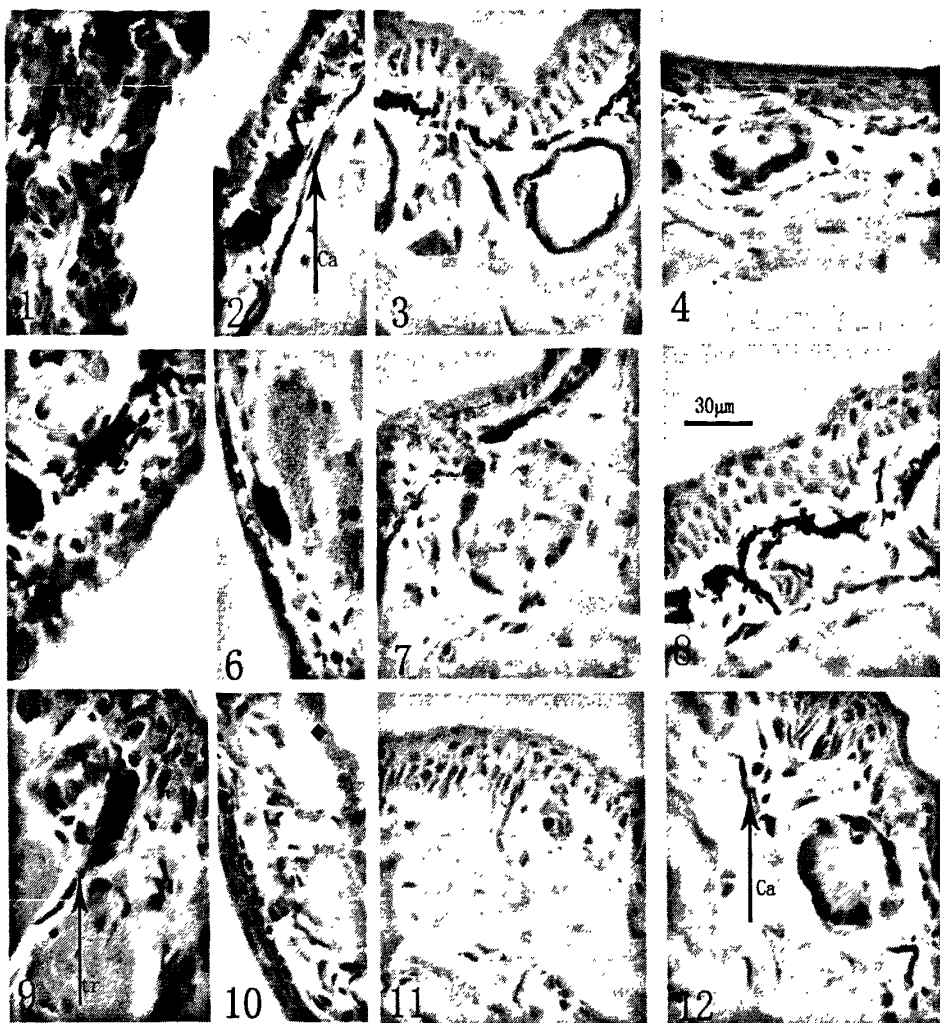
调节水平衡的能力强一些，所以钙化层不连续。黑龙江林蛙皮肤中的钙化层亦是间断条状与中国林蛙中的相似。

(四) 附图



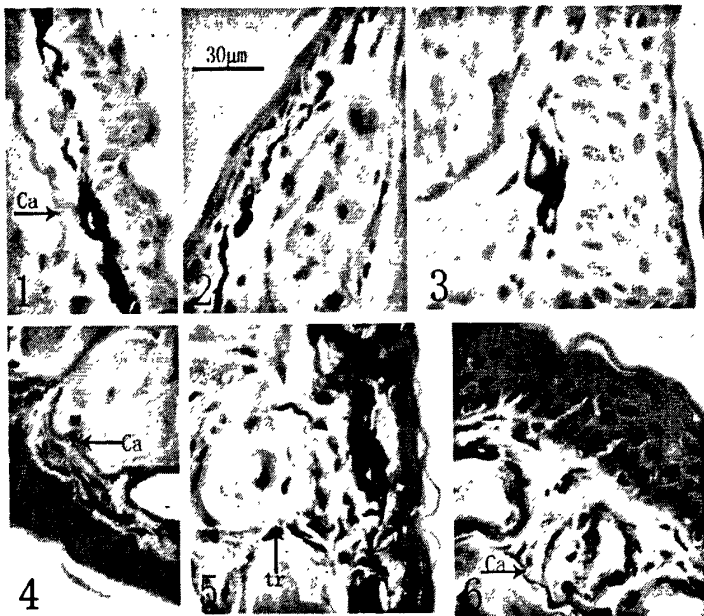
图版 3-11: 雌雄性中国林蛙头背部和腹部皮肤横切面结构图

- 1 示 3 月份中国林蛙雄性头背部皮肤组织结构;
- 2 示 3 月份中国林蛙雌性头背部皮肤组织结构;
- 3 和 4 分别示 6 月份中国林蛙雄性头背部和腹部皮肤组织结构;
- 5 示 9 月份中国林蛙雄性头背部皮肤组织结构; 6 示 9 月份中国林蛙雌性头背部皮肤组织结构;
- 7 和 8 分别示 12 月份中国林蛙头背部和腹部的组织结构

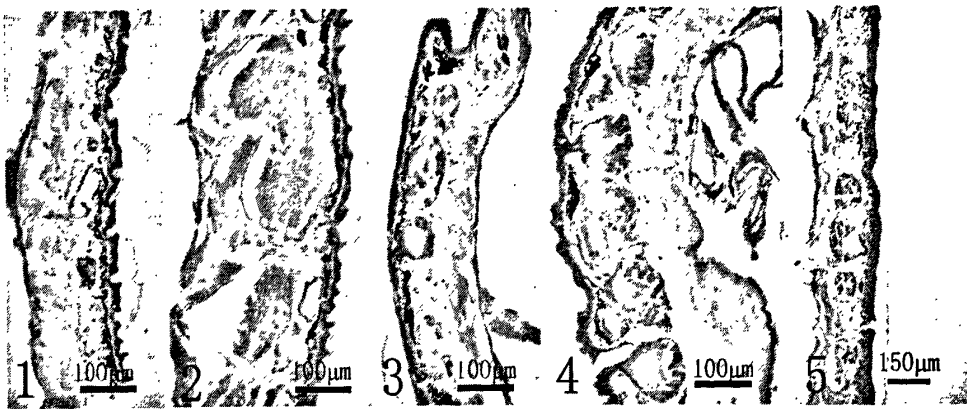


图版 3-12: 中国林蛙四月份皮肤重点示表皮比较

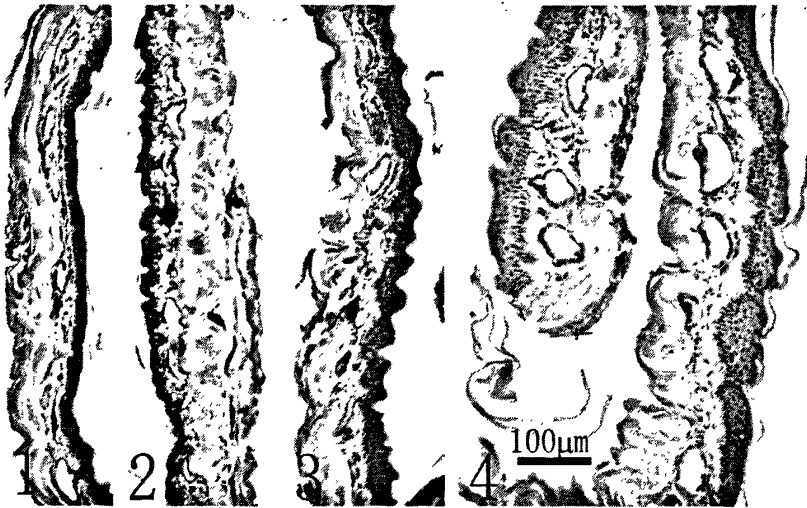
- 1、5、9 为 3 月份躯干背部、侧部和腹部表皮的组织结构图;
- 2、6、10 为 6 月份躯干背部、侧部和腹部表皮的组织结构图;
- 3、7、11 为 9 月份躯干背部、侧部和腹部表皮的组织结构图;
- 4、8、12 为 12 月份躯干背部、侧部和腹部表皮的组织结构图



图版 3-13: 3 月和 9 月雌性躯干背部、侧部和腹部表皮结构图
 1、2、3 为雌性躯干背部、侧部和腹部皮肤的结构图;
 4、5、6 为雌性躯干背部、侧部和腹部皮肤的结构图



图版 3-14: 3 月份躯干部位皮肤横切面结构图
 1 为 3 月躯干背部皮肤横切面结构图; 2 为 3 月躯干背侧褶皮肤横切面结构图;
 3 为 3 月躯干侧部皮肤横切面结构图; 4 为 3 月份雌性能够躯干近腹部皮肤横切面结构图;
 5 为 3 月份雌性腹部皮肤结构图



图版 3-15: 9 月份躯干部位皮肤横切面结构图

1 为 9 月份躯干背部皮肤; 2 为躯干侧部皮肤横切面结构图;
3 为躯干近腹部皮肤横切面结构图; 4 为躯干腹部皮肤横切面结构图



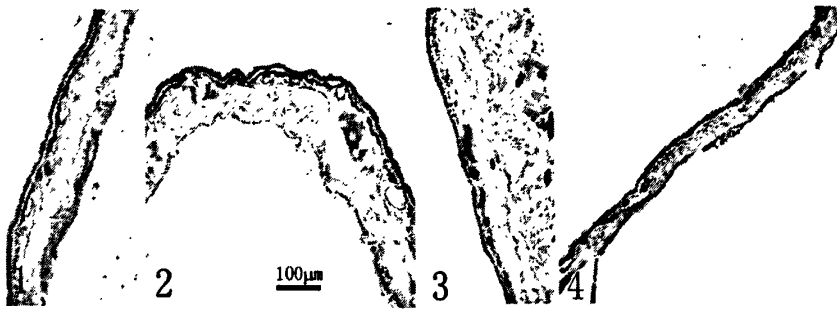
图版 3-16: 中国林蛙 3 和 9 月份的雌性后肢正背部、近背部腺体较多处、腹部皮肤的横切面结构

1-3 为 3 月份后肢背部、近背部和腹部皮肤的横切面结构;
4-6 为 9 月份后肢背部、近背部和腹部皮肤的横切面结构图



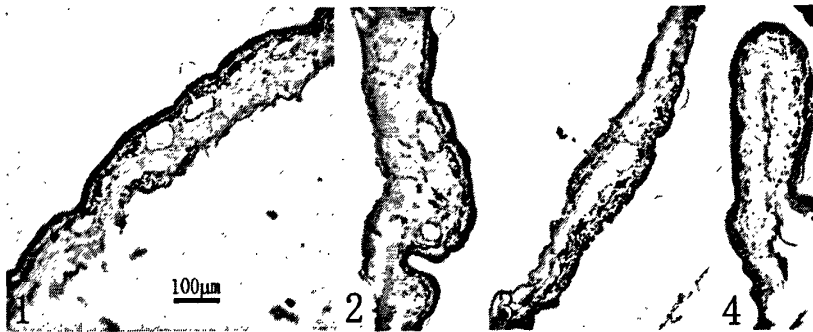
图版 3-17: 崂山产雄性中国林蛙 3 月份躯干部位整体结构图

1 为 3 月份躯干背部皮肤横切面图; 2 为 3 月份躯干背部近背侧褶处皮肤横切面;
3 为 3 月份躯干侧部皮肤横切面结构图; 4 为 3 月份躯干腹部皮肤横切面结构图



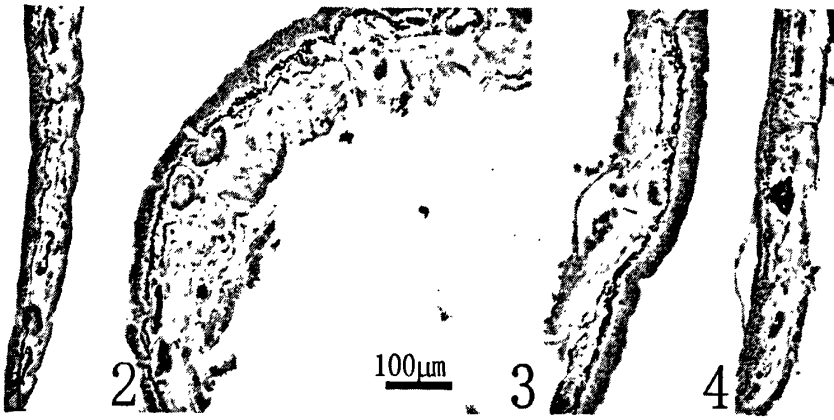
图版 3-18: 崂山产雄性中国林蛙 6 月份躯干部位整体结构图

1 为 6 月份躯干正背部皮肤结构; 2 为 6 月份背侧褶处皮肤横切面结构;
3 为 6 月份躯干侧部皮肤横切面结构; 4 为 6 月份躯干腹部横切面结构图



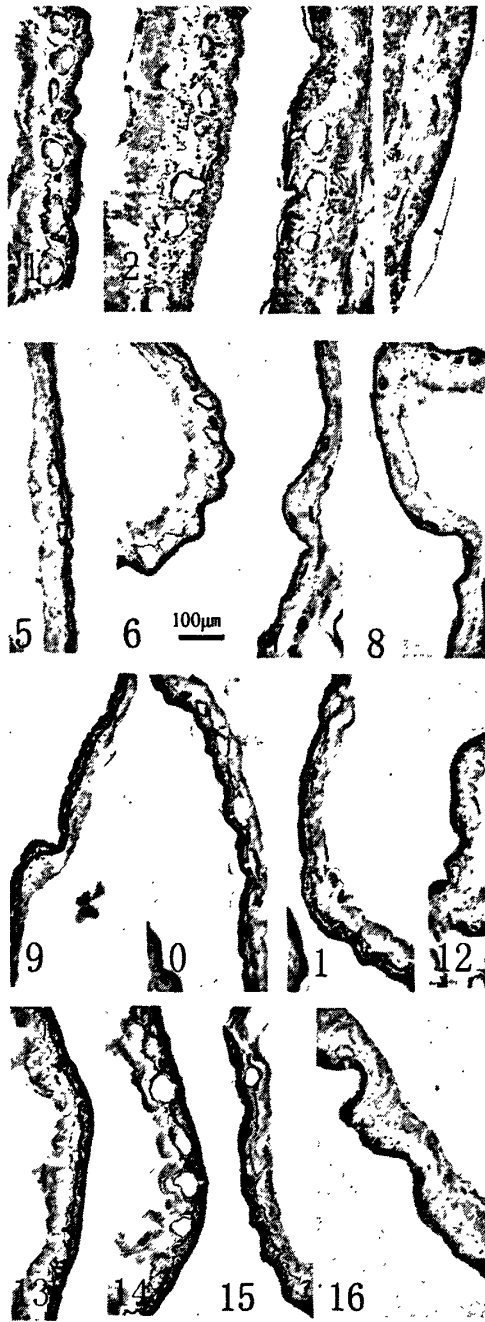
图版 3-19: 崂山产雄性中国林蛙 9 月份躯干部位皮肤横切面结构图

1 为 9 月份躯干背部皮肤横切面结构图; 2 为 9 月份躯干背侧褶处皮肤横切面结构图;
3 为 9 月份躯干侧部处皮肤横切面结构; 4 为 9 月份躯干腹部处皮肤横切面结构图



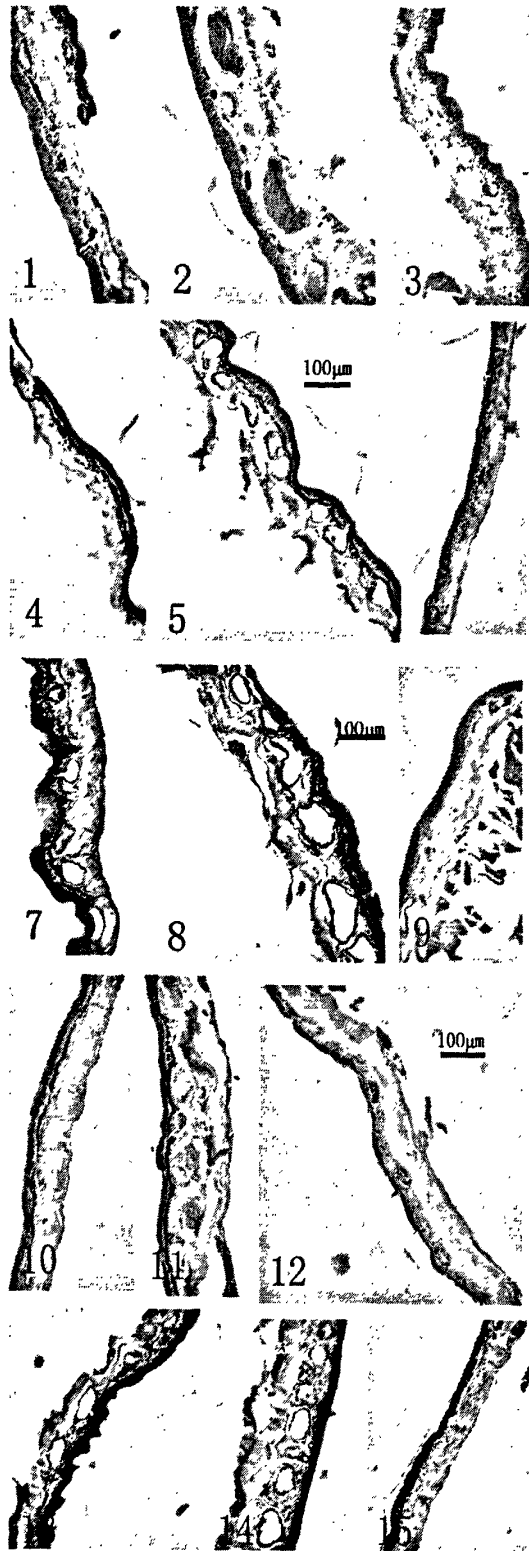
图版 3-20: 崂山产雄性中国林蛙 12 月份的躯干部位皮肤横切面结构图

1 为 12 月份躯干背部横切面结构图; 2 为 12 月份躯干背部近背侧褶呈处横切面结构图;
3 为 12 月份躯干侧部皮肤横切面结构; 4 为 12 月份躯干腹部皮肤横切面结构图

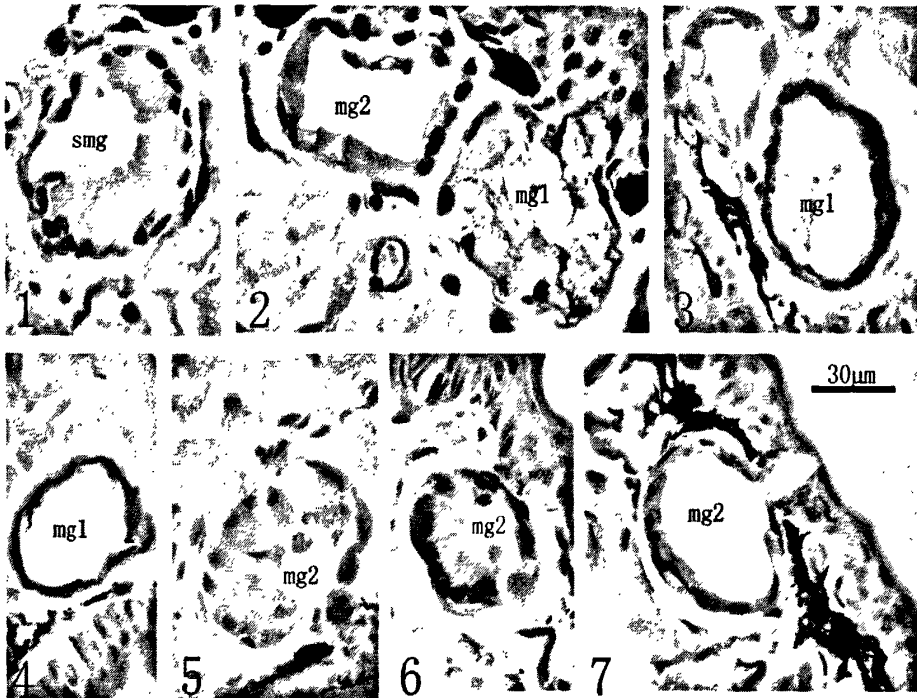


图版 3-21: 中国林蛙 3、6、9、12 月份后肢正背部、近背部粘液腺较多部位、近腹部、腹部处皮肤的横切面结构

1-4 为 3 月份后肢正背部、近背部粘液腺较多处、近腹部和腹部皮肤的横切面结构；
5-8 为 6 月份后肢正背部、近背部粘液腺较多处、近腹部和腹部皮肤的横切面结构图；
9-12 为 9 月份后肢正背部、近背部粘液腺较多处、近腹部和腹部皮肤的横切面结构图；
13-16 为 12 月份后肢正背部、近背部粘液腺较多处、近腹部和腹部皮肤的横切面结构图

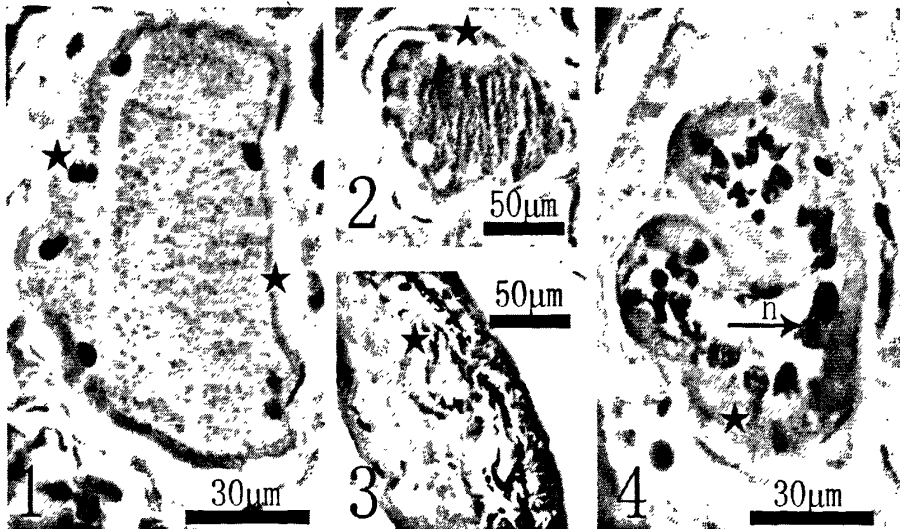


图版 3-22: 中国林蛙前肢正背部、近背部和腹部的皮肤结构比较
1-3 示 6 月份雄性前肢; 4-6 示 9 月份雄性前肢; 7-9 示 12 月雄性前肢;
10-12 示 3 月份雌性前肢; 13-15 示 9 月份雌性前肢



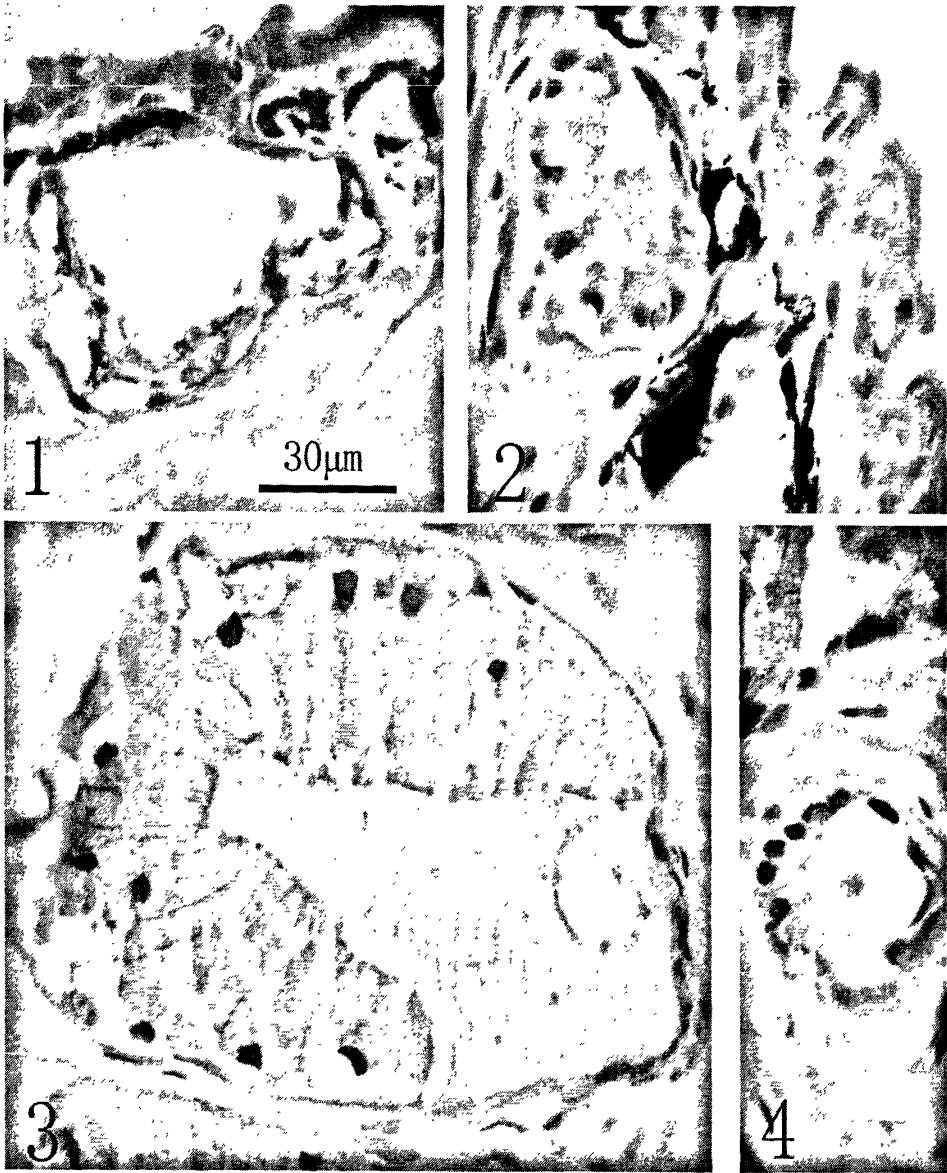
图版 3-23: 雄性中国林蛙皮肤粘液腺

- 1 示 3 月份雄性躯干背部特殊粘液腺; 2 示 3 月份雄性躯干背部的两种粘液腺;
 3 示 6 月份雄性头背部两种粘液腺; 4 示 12 月份后肢背部一号粘液腺;
 5 示 9 月份躯干背部二号粘液腺; 6 示 12 月份躯干腹部二号粘液腺;
 7 示 12 月份后肢背部二号粘液腺



图版 3-24: 中国林蛙皮肤颗粒腺

- 1 示 3 月份雄性躯干部位颗粒腺; 2 示 3 月份雌性躯干部位颗粒腺;
 3 示 9 月份雄性躯干部位颗粒腺; 4 示 12 月份躯干部位颗粒腺



图版 3-25: 3 月份雌性躯干背部和腹部的粘液腺
1、2 为 3 月份雌性躯干背部的两种形态的粘液腺;
3、4 为 3 月份雌性躯干腹部的两种形态的粘液腺

三、雄性昆嵛林蛙皮肤组织结构的初步研究

(一) 材料与方法

1 材料

采于圣经山的昆嵛林蛙，四月份雄性两只，体长分别为 45.44mm 和 46.23mm。

2 方法

常规石蜡切片制作，HE 染色，OLYMPUS-BX50 显微镜观察与测量。

(二) 研究结果

1 皮肤的基本结构

昆嵛林蛙和其他两栖类动物的皮肤结构相同，都是有表皮和真皮构成。表皮为复层扁平上皮，由多层细胞组成；真皮包括疏松层和致密层，上层为疏松层，下层为致密层。疏松层呈均质胶状，其中富含腺体、血管、神经、色素、成纤维细胞等，致密层由排列较紧密的胶原纤维构成。

(1) 表皮 躯干背部腹部皮肤表皮都多为 5 层，背部 $24 \pm 2.9 \mu\text{m}$ ，腹部 $36 \pm 5.2 \mu\text{m}$ 。背腹部皮肤表皮生发层细胞均呈矮柱状，背部表皮角质层多包括三层细胞，最外层完全角质化，原来细胞核的位置被染成粉红色，次外层和第三层细胞处于角化过程中，且第三层细胞角化程度最轻（图版 3-26-1）。躯干腹部表皮角质层多包括两层细胞，角质层的最外层细胞角化程度最深，和背部差不多即原来细胞核的位置还留有细胞核的痕迹，而被染成粉红色，次外层的角质层细胞角化程度于最外层相差不大（图版 3-26-2）。躯干背部皮肤表皮表面两层细胞之间有些缝隙，而腹部皮肤最外层脱落之前，表皮表面两层角质细胞之间很少存在缝隙。后肢背部腹部均约 4-5 层细胞，背部 $17 \pm 1.1 \mu\text{m}$ ，多 4 层，表面两层细胞为角质层，最外层角化较深，次外层细胞的角化程度稍次于最外层（图版 3-26-3）；腹部 $24.5 \pm 3.7 \mu\text{m}$ ，多 5 层，角质层包括 1-3 层细胞，最外层角化最深，次外层和第三层细胞处于角化过程中（图版 3-26-4）。

(2) 真皮 真皮厚度主要取决于真皮疏松层中腺体的种类和数目。观察发现，在圣经山产的昆嵛林蛙皮肤中除了普遍存在于两栖动物皮肤中的颗粒腺和粘液腺外，在其躯干背部还观察到另外一种新的腺体（图版 3-27-1~6），根据这种腺体的组织形式和分泌物的状态以及有关外文文献的报道，这里将这种腺体称为特殊粘液腺。色素细胞排列成一层位于表皮之下，疏松层的上层，称为色素层。

颗粒腺 颗粒腺在昆嵛林蛙各部位皮肤中都有分布。躯干半侧环剥皮肤中约能见到 30 个颗粒腺，颗粒腺主要分布于背侧褶及体侧部（图版 3-27-11~17），在其他部位分散分布。形状一般是球形或椭球形，一般垂直直径（ $131 \pm 29.7 \mu\text{m}$ ）大于水

平直径 ($98.5 \pm 32.3 \mu\text{m}$)，是典型的泡状腺体，在躯干部位也发现有不规则球形的颗粒腺，在皮肤的横切面中看到的是三角形或是呈不定形 (图版 3-27-17、3-28-3)。腺体内一般充满了嗜酸性的规则圆球形颗粒 (图版 3-28-2、3)，但是根据染色情况还见到着色较浅的颗粒腺 (图版 3-28-1)。在腺腔周围有一圈细胞核贴着腺泡壁排列 (图版 3-28-2)，推测为颗粒腺合胞体的细胞核。据观察腺泡壁有两层上皮肌细胞构成。外层上皮肌肉细胞的细胞核呈杆状，内层上皮肌肉细胞的细胞核呈杆形或长椭圆形。根据腺泡内颗粒的多少，内层上皮肌肉细胞的形态有所不同，当充满颗粒时，上皮肌肉细胞被拉伸，变扁 (图版 3-28-3)，当腺泡内的颗粒腺开始释放或是腺泡中空时，这层上皮肌肉细胞变厚 (图版 3-28-2)。

粘液腺 也是泡状腺，形态较小，数量较多。分散分布于各部位皮肤中，一般水平直径 ($57.5 \pm 8.8 \mu\text{m}$) 大于垂直直径 ($45 \pm 5 \mu\text{m}$)。在 HE 染色下，腺腔中空，分泌细胞规则地排列在腺腔周围，分泌细胞的细胞核呈卵圆形，约占整个细胞的 1/4、1/5 或 1/6，位于细胞的基底部或近基底部，分泌细胞的细胞质呈透明状。多数粘液腺的腺泡外能见到一圈上皮肌 (图版 3-29-3~5)。

特殊粘液腺 在雄性昆嵛林蛙的躯干背部观察到一种颗粒腺、粘液腺之外的另外一种腺体，称之为特殊粘液腺。特殊粘液腺只分布在躯干背部 (图版 3-27-1~6)，在其他部位皮肤没有。其内充满极细的颗粒状或网状的嗜酸性物质 (图版 3-29-1、2)，形态较大和颗粒腺相似，椭球形，一般垂直直径 ($134.5 \pm 10.5 \mu\text{m}$) 大于水平直径 ($109.5 \pm 18.0 \mu\text{m}$)。分泌细胞呈高柱状，围绕腺腔中心呈辐射状排列，细胞核卵圆形或者三角形或者是扁平的棒状 (图版 3-29-1、2)。腺泡外未见到明显的连续的上皮肌。

色素 色素细胞多数位于体背部和体侧部皮肤的真皮疏松层的上层，体腹部很少见到 (图版 3-27; 3-30) 表皮之下，形成一层，称为色素层。色素细胞呈团块状，几乎没有突起的分枝 (图版 3-27; 3-30)。色素细胞除了集中分布在疏松层的上层表皮之下，在其他部位也有可能分布。真皮下面的血管周围 (图版 3-27-8) 也经常有色素细胞存在。在颗粒腺或是真皮血窦周围也可见到色素细胞。在表皮各层中也有少数的色素细胞存在。但是在各层细胞中弥散性的色素颗粒不多见。

钙化层 钙化层呈嗜碱性较细条带状 (图版 3-26-5)，一般位于腺体下面，即疏松层的下层，约在真皮致密层和疏松层的交接处。在头背部和躯干背部 (图版 3-26-5) 及前后肢背部见到大致连续的钙化层，在体腹部可见到很少的钙化层。

贯穿真皮的细胞通道 在昆嵛林蛙各个部位皮肤中的都可见到从皮下组织开始，贯穿真皮致密层，到表皮之下的细胞通道 (图版 3-26-5、6)。似乎有细胞从真皮下面的组织中穿过真皮到达表皮 (图版 3-26-6)。

真皮致密层 真皮致密层是由波浪状的胶原纤维排列而成，观察发现没条胶原纤维像是羽毛状，在中心轴线两侧集结了密集排列的较短的纤维丝，整个结构约呈

羽毛状。

(三) 讨论

1 腺体种类的讨论与分析

在雄性昆嵛林蛙皮肤见到三种类型的腺体,其中普通粘液腺广范分布于全身各个部位;特殊粘液腺仅分布于躯干背部皮肤中,大小与颗粒腺相似;颗粒腺分散分布于全身各处,形态不规则,为圆球形或不规则形。昆嵛林蛙皮肤中特殊粘液腺与雄性中国林蛙皮肤中的特殊粘液腺分布位置相同,即均只位于雄性躯干背部,而与雄性黑龙江林蛙皮肤中特殊粘液腺在躯干背侧腹部均有分布不同。Brizzi 报道雄性 *Rana dalmatina*、*R. Iberica* 和 *R. perezi* 的特殊粘液腺只存在于躯干背部,并认为这种腺体释放的化学信号可能替代在繁殖季节的声音交流或者在吸引雌性和在领地占领方面起着重要作用,昆嵛林蛙的特殊粘液腺分布与上述三种蛙相同,提示这些蛙具有相类似的化学信号通讯。Thomas 等 (1993) 报道阉割的雄性特殊粘液腺形态变小,即会导致这种特殊粘液腺退化,对颗粒腺和普通粘液腺没有影响。普通粘液腺拥有低的和中等高度的上皮细胞围绕宽大的空腔周围。分泌细胞的细胞核规则的排列成与基质表面平行的一层 (Brizzi, 2002)。昆嵛林蛙皮肤中粘液腺,形态较大,分泌细胞呈中等高柱状,HE 染色较淡,分泌细胞及腺腔均中空,细胞核卵圆形,很明显。昆嵛林蛙各部位皮肤中仅发现一种形态的粘液腺,大致约为两栖类典型的粘液腺形态,与黑龙江林蛙皮肤中的粘液腺相似,与中国林蛙皮肤中普通粘液腺完全不同。颗粒腺为典型的两栖类皮肤颗粒腺,只是形态不规则,像是腺泡壁的支持作用很小,若要进一步研究昆嵛林蛙皮肤颗粒腺,还需要对其他月份雌雄性的皮肤组织结构进一步研究。

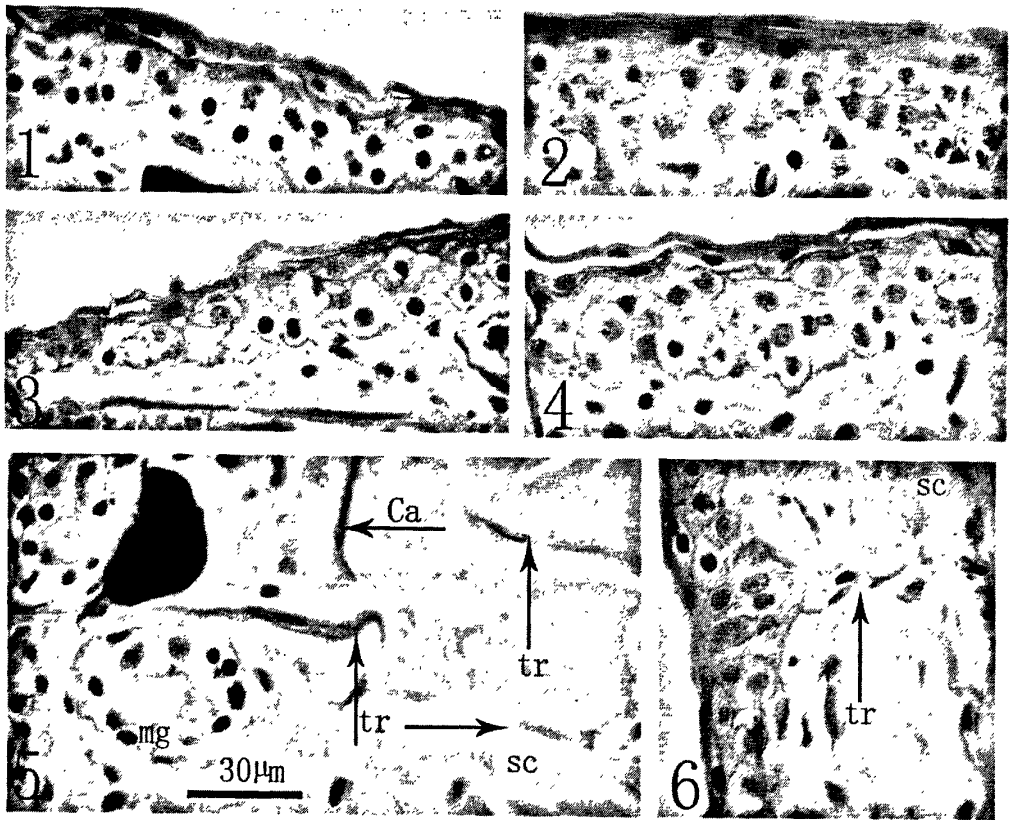
2 色素细胞分布的讨论与分析

昆嵛林蛙表皮中未见到色素细胞,真皮中的色素细胞不发出分支,呈斑块状,排列于体背部表皮之下的疏松层上层,在真皮之下的血管周围也有色素细胞。色素细胞呈这种状态与其体色较浅相关。昆嵛林蛙表皮中未见到色素细胞,这与黑龙江林蛙及中国林蛙不同,在这二者的体背部表皮中均存在色素细胞,且雄性躯干背部表皮中的色素细胞数目多于雌性。昆嵛林蛙皮肤表皮无色素细胞及真皮中的色素细胞呈稀疏板块状与其体色较浅相吻合。

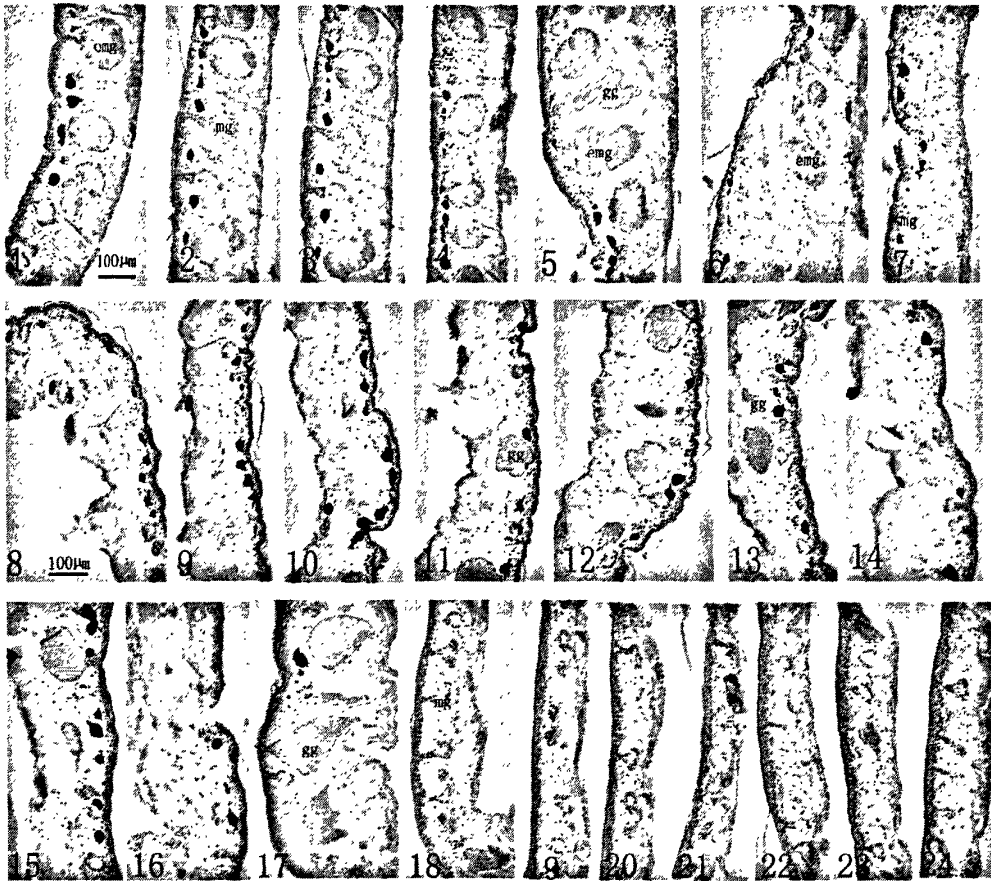
3 钙化层

在体背部有大致连续的钙化层,这是昆嵛林蛙对陆地生活的适应。钙化层的形状与分布与位于黑龙江林蛙及中国林蛙皮肤中的钙化层一致。

(四) 图版

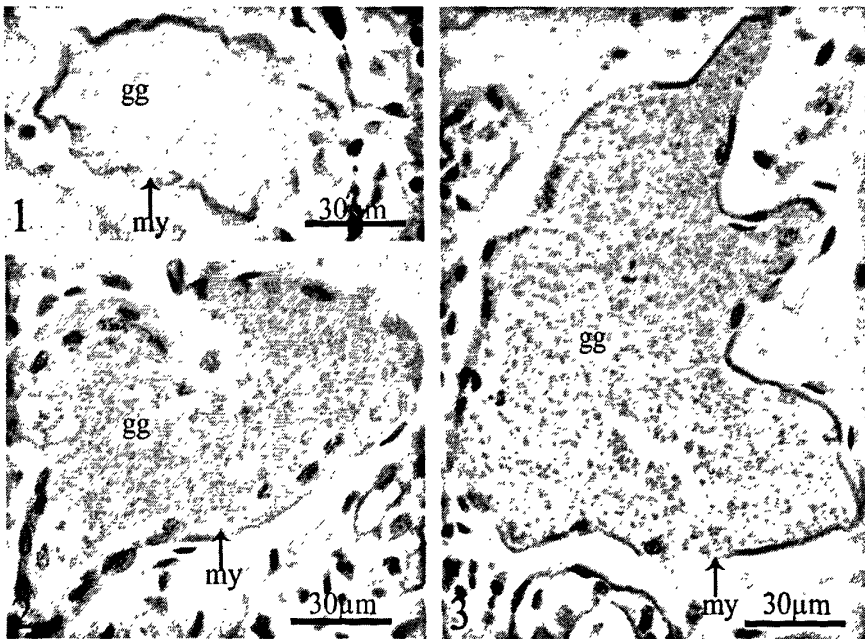


图版 3-26: 躯干背部、腹部, 后肢侧腹部表皮及躯干背部后肢腹部贯穿真皮的细胞通道
1、2 分别为躯干背部和腹部皮肤的表皮结构; 3、4 分别为后肢侧部和腹部皮肤的表皮结构;
5、6 分别为躯干背部和后肢腹部皮肤中贯穿真皮的细胞通道



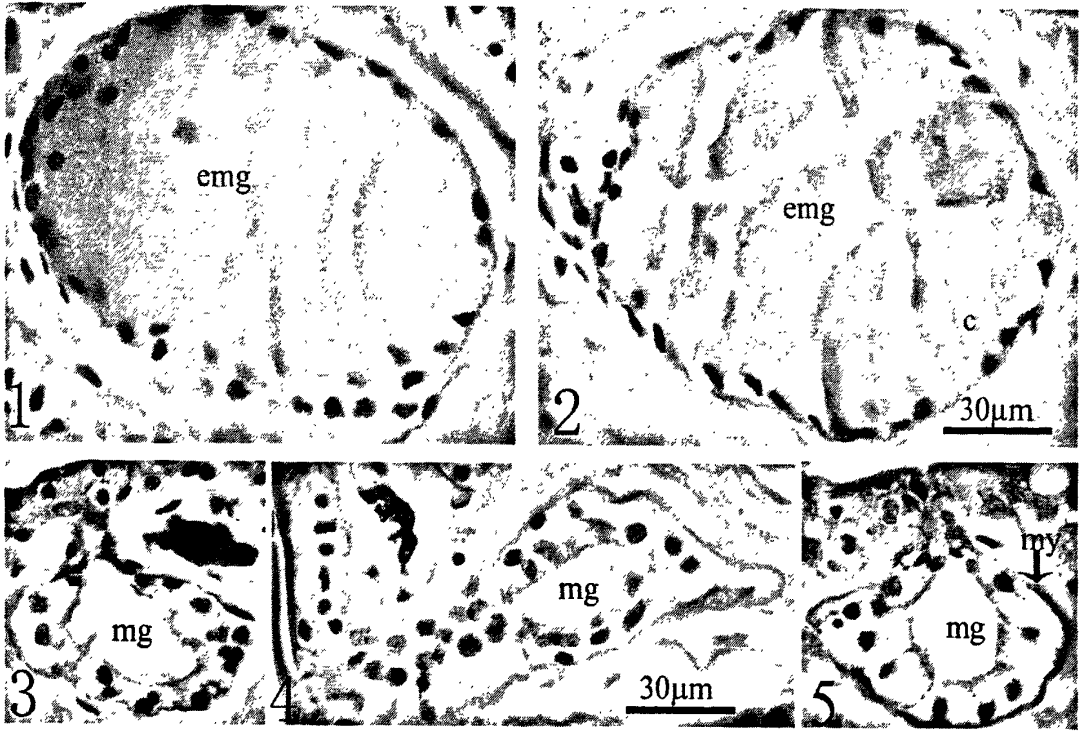
图版 3-27: 昆嵛林蛙躯干半侧环剥皮肤横切面结构图

图 1-4 躯干背部; 图 5、6 躯干背侧褶处; 图 7-17 躯干侧部; 图 18-24 躯干腹部



图版 3-28: 圣经山产昆嵛林蛙躯干部位皮肤中的颗粒腺

1 着色较淡的颗粒腺; 2、3 为典型的颗粒腺, 区别在与二者的上上皮肌厚薄不一



图版 3-29: 圣经山产昆嵛林蛙皮肤粘液腺

1、2 为躯干背部皮肤中的特殊粘液腺；3、4 为躯干背部皮肤中的普通粘液腺；
5 为后肢侧部普通粘液腺



图版 3-30: 产于圣经山的昆嵛林蛙后肢皮肤的显微结构

1-6 后肢背部皮肤显微结构；图 7-8 后肢侧部皮肤显微结构；
9-12 后肢腹部皮肤显微结构；IV 圣经山产昆嵛林蛙皮肤粘液腺

四、徂徕林蛙雄性皮肤组织结构的初步研究

(一) 材料与方法

1 材料

徂徕林蛙采集自5月份, 雄性, 一只, 体长 51.79mm。

2 方法

常规石蜡切片制作, HE 染色, OLYMPUS-BX50 显微镜观察与测量。

(二) 研究结果

徂徕林蛙各部位皮肤的基本结构与其他两栖类皮肤相似。基本结构亦包括表皮层和真皮层。观察发现, 5 月份徂徕林蛙各部位皮肤中粘液腺较小, 数量也较少, 如躯干部位(图版 3-32)和后肢部位(图版 3-33), 颗粒腺形态较大, 背侧褶明显(图版 3-32-7、8)。

1 表皮

各部位皮肤表皮结构都有些差异(图版 3-31), 躯干正腹部皮肤的表皮 $48.1 \pm 6.6\mu\text{m}$ 最厚。头背部次之 $41.5 \pm 1.6\mu\text{m}$, 约 6~7 层细胞, 角质层包括 2~3 层, 最外层还可见到一层角质膜。在表皮的中下层可见到色素细胞。头腹部较薄 $23.2 \pm 0.9\mu\text{m}$, 约 5 层, 也可见角质膜, 角质层约包括 2 层。躯干背部表皮厚 $33 \pm 1.4\mu\text{m}$, 约 4~5 层, 角质层 1~2 层, 体侧部厚约 $20.5 \pm 2.7\mu\text{m}$, 角质层约 3 层, 次外层和第 3 层细胞处于角化过程中, 角化程度较浅。躯干腹部厚约 $34 \pm 1.4\mu\text{m}$, 约 4~5 层, 角质层包括 2 层, 次外层处于角化过程中。后肢的背部 $21.5 \pm 2.2\mu\text{m}$ 侧部 $19.9 \pm 5.3\mu\text{m}$ 腹部 $24.3 \pm 1.9\mu\text{m}$ 表皮厚度相差不太大(图版 3-32-6、7、8), 包括 4~5 层细胞, 角质层包括 1~2 层, 次外层处于角化过程中。

2 真皮

真皮包括上层的疏松层, 以及下层的致密层。在 5 月份各部位皮肤的疏松层中只见到两种腺体, 即颗粒腺和粘液腺。粘液腺较小, 颗粒腺真皮疏松层还有色素层、钙化层、血管、神经等。

(1) 颗粒腺 为泡状腺和其他无尾两栖类动物皮肤中的颗粒腺相似, 约呈椭圆形, 形态较大, 长径约 $173.5 \pm 55.0\mu\text{m}$, 短径约 $130 \pm 60\mu\text{m}$ 其内含有规则圆形的嗜酸性分泌颗粒(图版 3-34), 不同的是其内的分泌颗粒较大约 $6.7 \pm 1.2\mu\text{m}$ 。主要位于躯干部位的背侧褶处, 以及前肢桡骨棱, 后肢的股骨棱处。腺泡外被上皮肌肉包绕, 当腺体内分泌颗粒很少时, 组成上皮肌的上皮肌细胞变厚(图版 3-34-2)。

(2) 粘液腺 亦为泡状腺, 本研究观察到的 5 月份的雄性材料中躯干部位皮肤中粘液腺的形态较小, 一般水平直径 $53 \pm 4.5\mu\text{m}$, 大于垂直直径 $41.5 \pm 5.5\mu\text{m}$ 。分泌细胞规则地在腺腔周围排列成一圈。细胞核相对较大, 约占整个分泌细胞的 2/3,

核仁明显(图版 3-34-3~5)。在多数粘液腺的腺泡周围可见到明显的连续的上皮肌(图版 3-34-3~5)。

(3) 色素层 色素细胞多数呈三角形多边形等形状不定的斑块状,除了体背部外体侧部和腹部都为没有分支的斑块,在躯干背部(图版 3-32-1~5)前后肢(图版 3-33-1~11)背部色素细胞有分支,且色素细胞之间相互连接。在真皮的其他部位也存在色素细胞,如真皮之下的血管周围(图版 3-32-18)、颗粒腺的周围(图版 3-34-2)。

(4) 贯穿真皮的通道 在各部位皮肤中都可见到,从真皮之下到表皮下面的一些纵行的通道(图版 3-35)。通道内像是有细胞通过。有这种通道的存在使得真皮致密层被分隔呈一栏栏许多区域。

(5) 钙化层 在各部位皮肤中都有薄的,不连续的钙化层存在,在头背部最明显,体背部次之,其他部位的断断续续的很薄。

(三) 讨论

1 雄性徂徕林蛙皮肤结构特点分析

表皮中可见到色素细胞及瓶状细胞且有蜕皮现象,这些均与黑龙江林蛙、中国林蛙相同。颗粒腺主要分布于背部,背侧褶明显,内含有 6-7 个大的颗粒腺,粘液腺形态较小,的分泌细胞呈矮柱状,腺腔中空。颗粒腺内的嗜酸性颗粒大比黑龙江林蛙、中国林蛙及昆嵛林蛙皮肤中颗粒腺中的颗粒要大直径约为 $6.7 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 。在躯干部没有见到特殊特殊粘液腺,这与黑龙江林蛙、中国林蛙及昆嵛林蛙不同可能是 5 月份的徂徕林蛙繁殖期已过,特殊粘液腺退化,也可能是徂徕林蛙雄性背部皮肤中不存在特殊粘液腺。所以进一步的对同时期雌雄性徂徕林蛙皮肤及雌雄不同生活时期的徂徕林蛙进行皮肤组织结构研究是必要的。徂徕林蛙皮肤中只见到一种普通粘液腺,形态与黑龙江林蛙皮肤中的粘液腺几乎相同,与昆嵛林蛙皮肤中的粘液腺相似,与中国林蛙皮肤中的两种普通粘液腺完全不同。

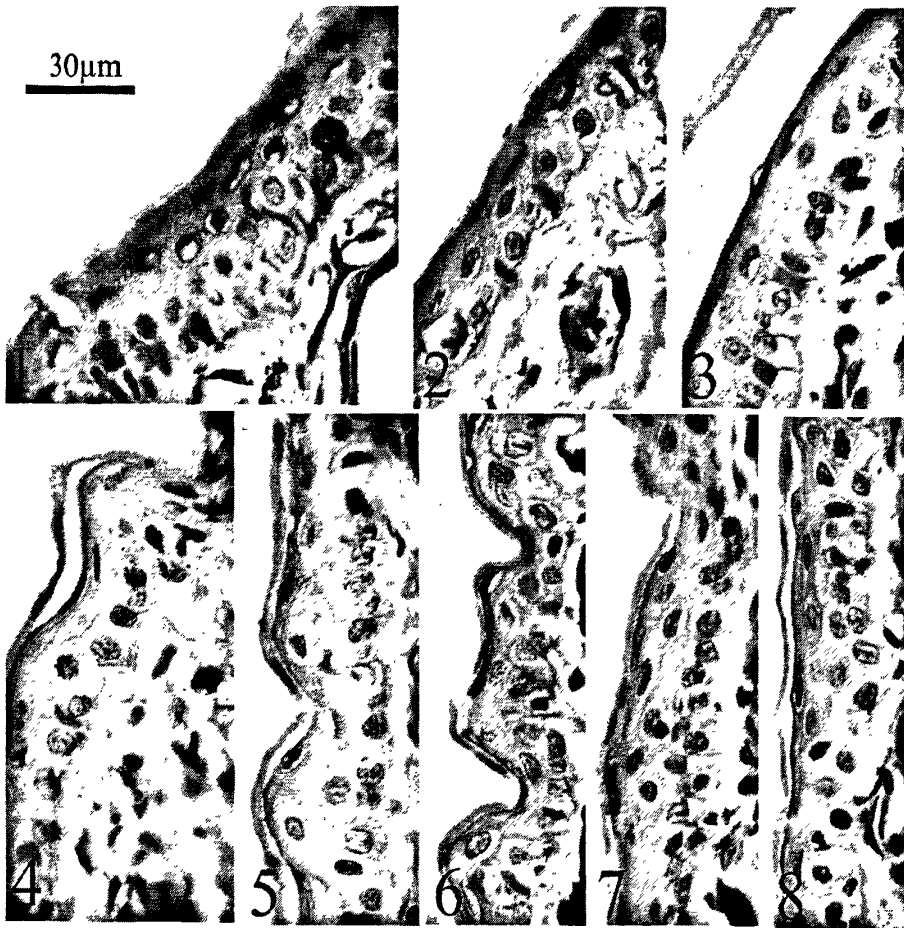
2 色素细胞的分布特点

真皮内的色素细胞有分支,彼此连接成一层位于表皮之下疏松层的上层,此外在表皮的中下层细胞中也有色素细胞存在,这与徂徕林蛙体色较黑相关系。

3 钙化层分布特点及分析

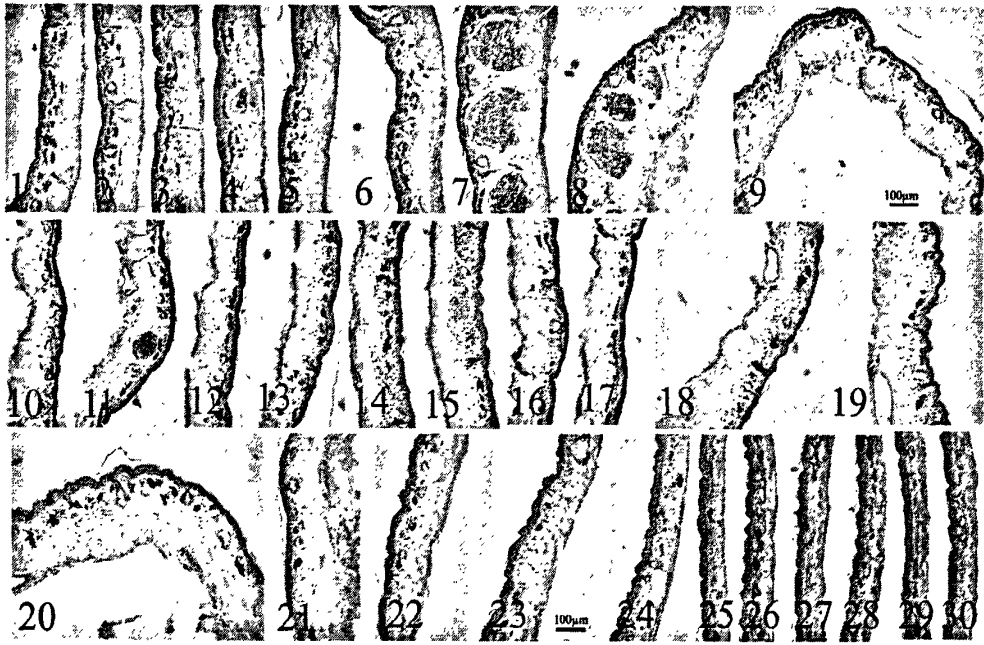
各部位皮肤中均有薄的不连续的钙化层,头背部最明显,这说明头背部是抵御干旱的主要部位。徂徕林蛙皮肤中的钙化层分布与黑龙江林蛙、中国林蛙、昆嵛林蛙皮肤中的相似。

(四) 图版



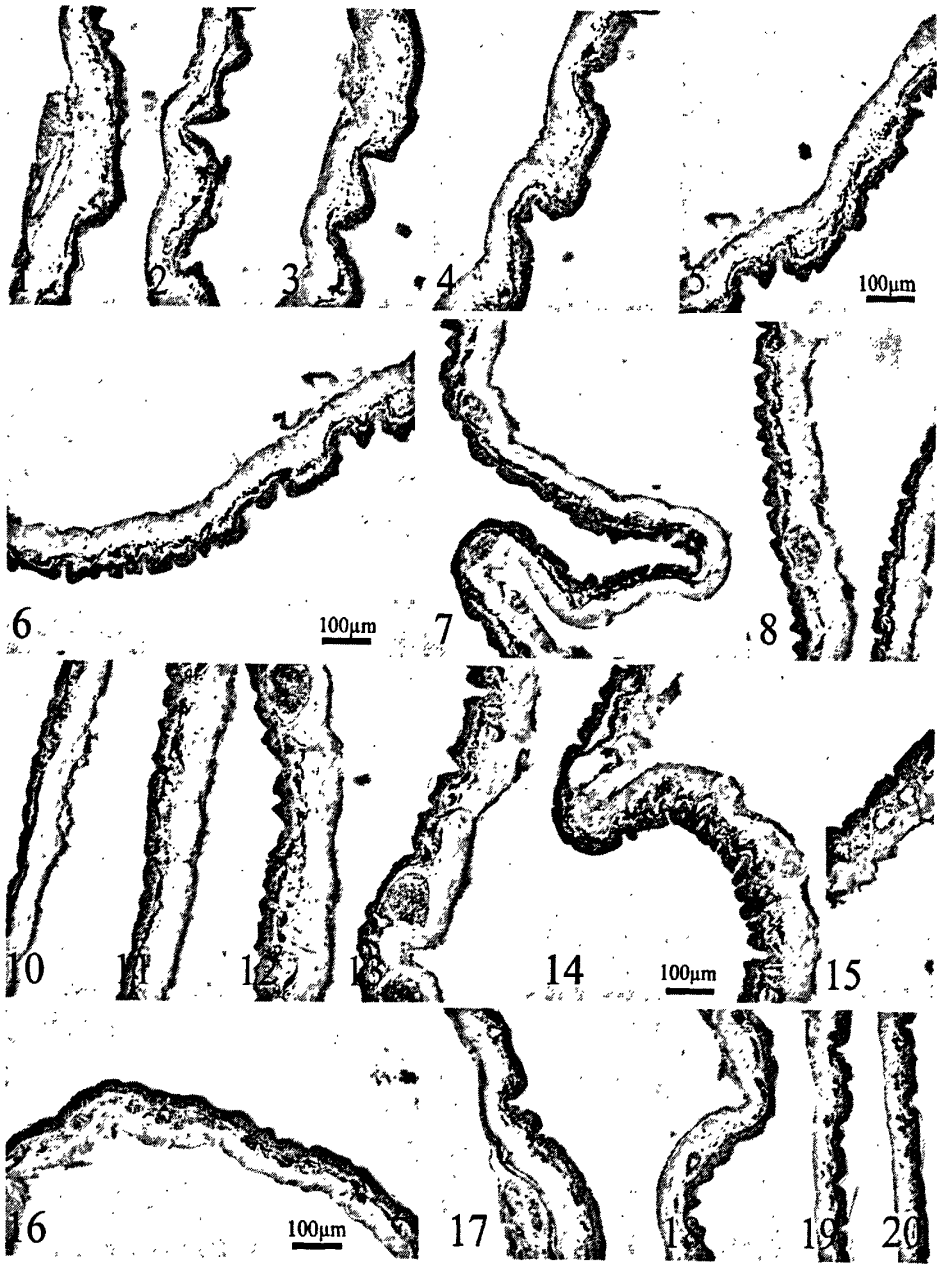
图版 3-31: 粗体林蛙头躯干后肢皮肤的表皮显微结构图

图 1、2 分别为头背部腹部表皮; 3~5 分别为躯干背部、侧部和腹部表皮;
图 6~8 分别为后肢背部侧部和腹部表皮图

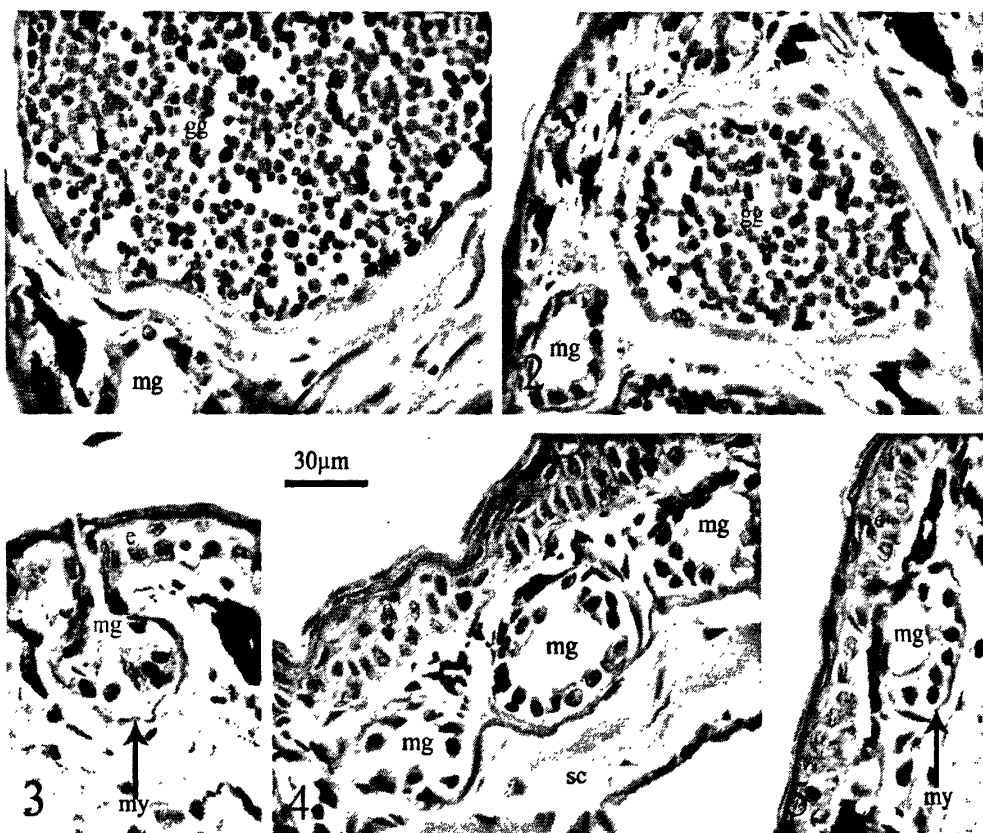


图版 3-32: 徂徕林蛙躯干部位半侧环剥皮肤显微结构图

1~6 为躯干背部皮肤; 7、8 为背侧褶处; 9-20 为体侧部皮肤; 图 21-30 为体腹部皮肤

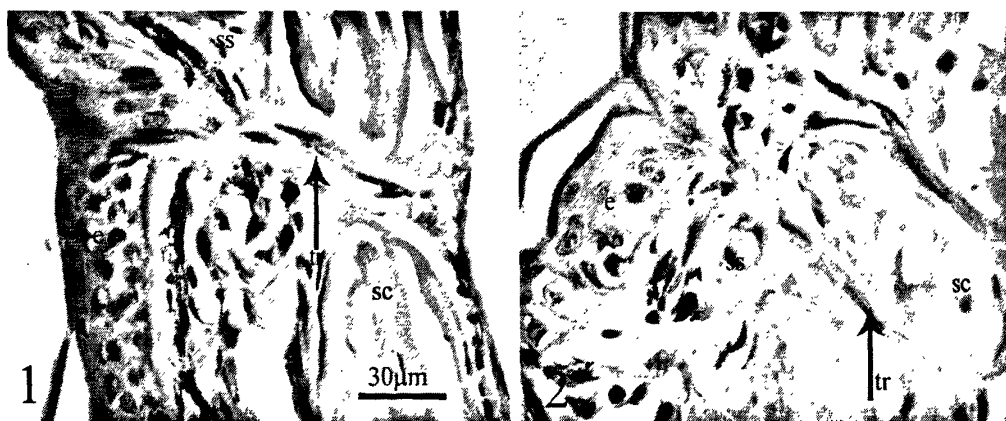


图版 3-33: 后肢环剥皮肤显微结构图
1~14 后肢背部皮肤; 15~20 后肢腹部皮肤



图版 3-34: 徂徕林蛙皮肤腺体结构图

- 1 躯干背部皮肤中颗粒腺; 2 躯干侧部皮肤中颗粒腺; 3 躯干背部粘液腺;
4 后肢侧部皮肤中粘液腺; 5 后肢腹部皮肤中粘液腺



图版 3-35: 徂徕林蛙头背部与躯干部位真皮通道

- 1 头背部皮肤中贯穿真皮的通道; 2 头腹部皮肤中贯穿真皮的通道

五、东北林蛙雌性皮肤组织结构的初步研究

(一) 材料与方法

1 材料

SYNU09030806 东北林蛙, 3 月份, 雌性, 体长 64.97mm, 怀卵状态, 死亡后固定。

2 方法

常规是蜡切片制作, HE 染色, OLYMPUS-BX50 显微镜观察与测量。

(二) 研究结果

1 表皮

观察发现, 躯干正腹部皮肤的表皮最厚 (图版 3-36-3), 约 $60.8 \pm 6.0 \mu\text{m}$, 约 7 层, 角质层 2-3 层, 第 3 层角化程度较浅。其次是头腹部厚约 $55.5 \pm 5.7 \mu\text{m}$, 包含 6 层细胞, 角质层约有 3 层。亦有少许角质膜。头背部厚约 $43.3 \pm 5.0 \mu\text{m}$, 约有 4-6 层细胞多为 5 层, 角质层 2 层, 有少许角质膜。躯干背部表皮厚约 $45 \pm 4.7 \mu\text{m}$, 约包含 5-7 层细胞, 角质层 1-3 层, 躯干侧部表皮最薄厚约 $14.3 \pm 3.5 \mu\text{m}$, 约 4 层角质层 2 层。躯干腹部表皮较厚后肢背部厚约 $41.5 \pm 4.3 \mu\text{m}$, 5 层细胞, 角质层约 2 层, 次外层处于角化过程中, 表层细胞外面还有一层角质膜。后肢侧部厚约 $26.8 \pm 3.7 \mu\text{m}$, 表皮约 4 层, 角质层两层, 次外层角化程度较深, 且表面两层细胞结合较紧密, 没有缝隙, 最外层角质层细胞之外未见有角质膜。后肢腹部厚约 $36.5 \pm 7.0 \mu\text{m}$ 约 5 层细胞, 角质层 2 层。最表面少有角质膜。前肢背部表皮厚约 $44.3 \pm 9.0 \mu\text{m}$, 多为 6 层细胞, 角质层为 3 层, 前肢腹, $32.8 \pm 4.5 \mu\text{m}$, 多为 6 层细胞, 角质层 2 层, 少见角质膜。另外在躯干半侧环剥皮肤中的侧部及腹部的交界处, 有两处表皮增厚现象 (图版 3-37-29~30; 3-37-42~44), 最厚处为近腹部 (图版 3-37-42~43), 厚约 $170.3 \pm 27.0 \mu\text{m}$, 约 10-19 层细胞。稍薄一些处 (图版 3-37-29~30) 厚约 $118.8 \pm 11.1 \mu\text{m}$, 约含有 10-13 层细胞。偶尔在表皮中可以看到 (图版 3-36-3)。在腹部表皮的增厚处的表皮中也可见到红细胞。

各部位皮肤的表皮厚度, 躯干正腹部最厚 (表 3-6), 头腹部次之, 头背部、躯干背部、前肢后肢的腺体多处的表皮厚度相差不大, 前肢腹部及后肢腹部稍薄 (表 3-7), 躯干侧部皮肤表皮最薄。

在体背部的表皮各层细胞之间可见到色素细胞 (图版 3-36-9), 但是数量极少。

不同部位皮肤结构特点 雌性东北林蛙各部位皮肤厚度、细胞层数、腺体大小及形态、色素细胞的分布均存在差异。通过观察及数据表明, 体背各部位皮肤总厚

度均比腹侧面厚。但是表皮及皮肤总厚度均是各部位侧部最薄（图版 3-37；3-38）。皮肤总厚度是后肢腹部最薄。

表 3-6 东北林蛙雌性头部和躯干部表皮及真皮厚度 (μm)

	头背部	头腹部	躯干背部	躯干侧部	躯干腹部
表皮厚度	43.3±5.0	55.5±5.7	45±4.7	14.3±3.5	60.8±6.0
皮肤厚度	289.2±22.2	218±18.0	282±49.2	112.5±29.6	201±12.9

表 3-7 东北林蛙雌性前后肢表皮及皮肤总厚度 (μm)

	前肢棱处	前肢腹部	后肢棱处	后肢腹部
表皮厚度	44.3±9.0	32.8±4.5	41.5±4.3	36.5±7.0
皮肤厚度	227±66.9	112±25.9	212.5±28.0	93±8.4

2 真皮

位于表皮之下，包括上面的真皮疏松层和下面的真皮致密层。疏松层基质呈均质胶状，其上部含有色素细胞，还富含腺体，只观察到两种腺体即颗粒腺和粘液腺，粘液腺数量尤其较多。在真皮疏松层的下部分，接近与致密层的交界处有不连续钙化层，主要是在体背侧钙化层明显。

(1) 皮肤腺 均为泡状腺，包括分泌部和导管部，分泌部即腺泡部下陷于真皮疏松层中，导管由上皮细胞组成，于表皮细胞相连开口于体表。根据腺体的组织形式及其分泌物的性质分为粘液腺和颗粒腺，粘液腺数量远多于颗粒腺数量。在雌性东北林蛙皮肤中只观察到普通粘液腺和颗粒腺两种腺体。

颗粒腺 形态较大，为合胞体结构，腺腔内充满了嗜酸性的圆球形的分泌颗粒。颗粒腺分散存在于各部位皮肤中，集中分布于背侧褶中，在各部位的背面皮肤中多于腹面，形态也稍大。本研究中所观察的雌性东北林蛙的各部位皮肤中的颗粒腺多数都缺少颗粒，腺泡外的上表皮较厚（图版 3-37-12；3-39-1）。有些颗粒腺内充满了分泌颗粒，其腺泡外的上表皮就薄（图版 3-39-2）。颗粒腺内的分泌颗粒大小不很一致，稍大些的直径大约为 $6.7 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 。

粘液腺 单泡状腺，多数腺泡外都可见到一圈连续的上表皮（图版 3-39-4、5、8），绝大多数的粘液腺均是水平直径 $132.7 \pm 40.7 \mu\text{m}$ 大于垂直直径 $86.7 \pm 17.5 \mu\text{m}$ 。躯干背部的粘液腺形态较小数量也较少，侧部形态较大，躯干腹部最小（图版 3-36），前后肢背部腹部皮肤中的粘液腺也少且小，在桡骨棱处皮肤中粘液腺大且多（图版 3-37-7~12）。可以观察到两种形态不同的粘液腺，第一种形态较小，分泌细胞中等高柱状，细胞核卵圆形约位于细胞的中部，大约占细胞的 $1/3$ （图版 3-39-7），主要位于表皮之下，大粘液腺及颗粒腺的颈部，数量较少。第二种粘液腺分泌细胞排列在腺腔周围，形态为高柱状，且细胞较宽，细胞核较扁位于分泌细胞的基底部分（图版 3-38-8、3-39-4）。分泌细胞中有弱嗜碱性的絮状物。在腺腔内也可见到染色较淡的絮状物（图版 3-39-5）这种形态的粘液腺的分泌细胞高矮不一致（图版 3-39-3、8）。

(2)色素层 雌性东北林蛙真皮中的色素细胞与其他无尾两栖类动物皮肤中的相似,主要位于体背部和侧部的疏松层上部,表皮之下(图版 3-37-1~36; 3-38-5~25),腹部很少有色素细胞(图版 3-37-37~51; 3-38-1~4, 23~28)。本研究中的色素细胞绝大多数为团块状,极少有分支的(图版 3-37; 3-38)。真皮的其他部位也可见到色素细胞,真皮下面的皮下组织中也有色素细胞(图版 3-37-24)。

(3)钙化层 位于疏松层的下部,多数位于真皮致密层和疏松层的交界处。在体背(图版 3-37-3、图版 3-38-9、12)部分布较明显,尤其是头背部。

(4)致密层 位于真皮疏松层的下面,由平行波浪状的胶原纤维紧密排列而成。各部位皮肤的真皮致密层中都可见到纵行的纤维束,将致密层分割成一栏一栏的。在每个纵行纤维束的中间都可见到一条通道(图版 3-40),这条通道从皮下通过致密层的纵行纤维束的中心位置,一直通向表皮之下,并可见到有细胞从真皮之下一直移向表皮(图版 3-40)。

(三) 讨论

在对黑龙江林蛙、中国林蛙研究的基础上,为了进一步了解林蛙怀卵期皮肤的结构特点和共性,选择了1只雌性东北林蛙进行了初步观察

1 雌性东北林蛙皮肤基本结构分析

怀卵状态的东北林蛙与黑龙江林蛙及中国林蛙相同,均是躯干腹部皮肤最厚。其次是头背部,另外位于在从体侧部到腹部皮肤表皮中有两处处于增生状态很厚,细胞层数达到10-19层。这可能与怀卵有关系,可以增加保护作用,只是在怀卵状态的黑龙林蛙及中国林蛙皮肤中没有发现表皮的增厚状态。真皮疏松层中有颗粒腺和粘液腺两种腺体,但是粘液腺的形态差别很大,有的分泌细胞呈较宽的中等高柱状,腺腔很大且中空,有的粘液腺的分泌细胞是较窄的中等高柱状,腺腔相对较小。有的粘液腺的分泌细胞呈矮柱状,这些都与其生活在潮湿的环境相关系。东北林蛙雌性中的粘液腺与黑龙江林蛙、昆嵛林蛙、徂徕林蛙皮肤中的粘液腺形态相似,但与中国林蛙皮肤中的两种普通粘液腺完全不同。也可能材料是死亡后固定的,所以腺体多中空。

2 色素的分布特点及分析

真皮中的色素细胞呈团块状,没有分支,形成一层排列在体背部和侧部的表皮之下疏松层的上部,另外,在表皮中也有很少数的色素细胞。呈斑块状的色素细胞可能是与3月份的怀卵状的东北林蛙的肤色较浅有关。但是怀卵状态的黑龙林蛙及中国林蛙真皮中的色素细胞均不是板块状而是有分支。这种斑块状分布与雄性昆嵛林蛙皮肤中真皮色素细胞的形态相似。

3 钙化层的分布及特点

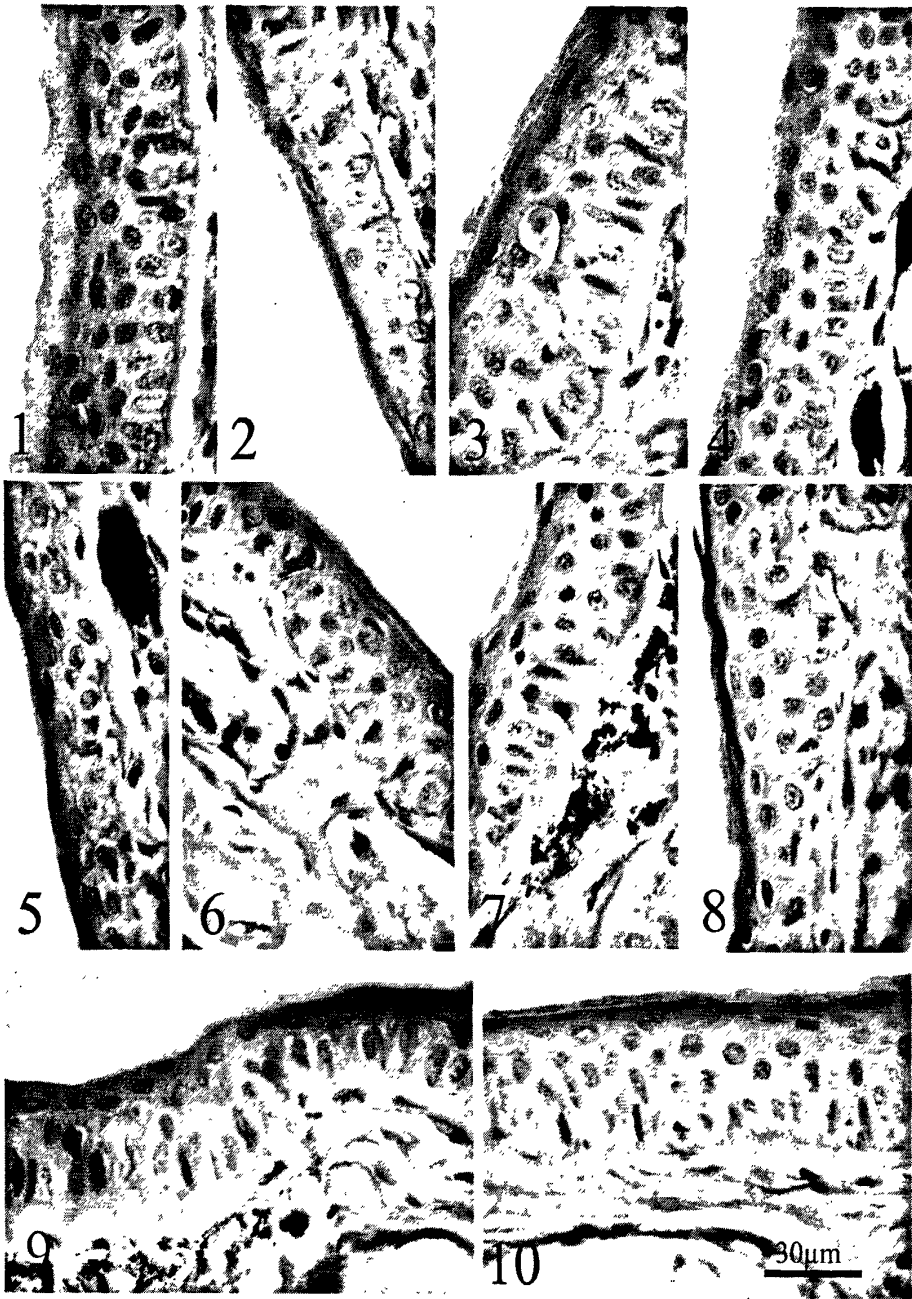
主要分布在体背部,头背部尤其明显,可能说明头背部是抵御干旱的主要部位。

与前面所述的黑龙江林蛙、中国林蛙、昆嵛林蛙、徂徕林蛙中的钙化层分布相似。

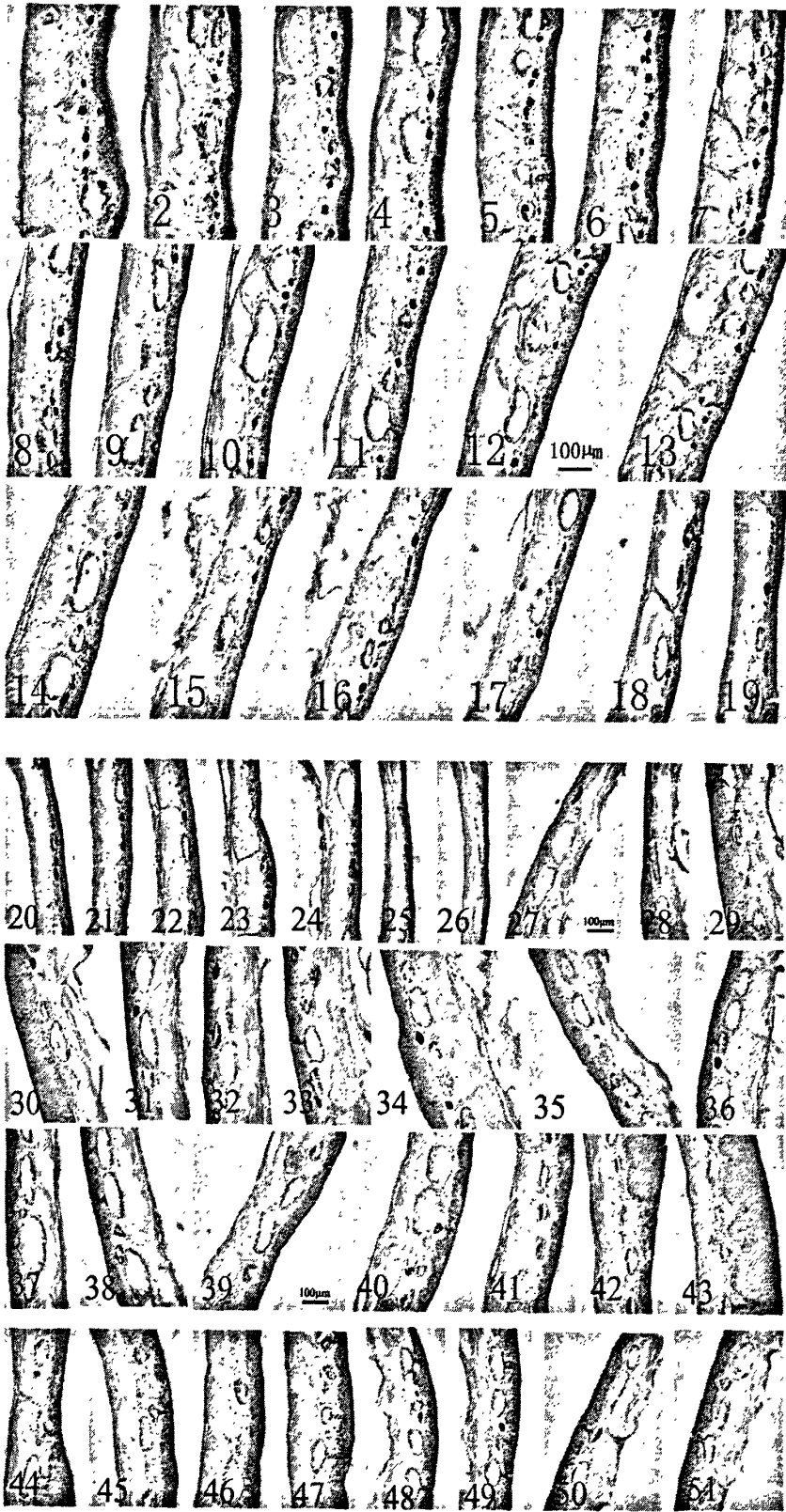
4 从真皮贯穿到表皮的细胞通道

在东北林蛙各部位皮肤中均有这种细胞通道样的结构，这样的通道在表皮处有一个大的细胞核，形状与非洲芦苇蛙 (*Hyperolius viridiflavus*) 皮肤表皮中的长的细柱状细胞形态相似，长的细柱状细胞位于角质层的下面，通过颗粒层、生发层、基膜延伸到真皮层，细胞富含张力原纤维，因此，推测这种细胞潜在的功能应该是一种支持细胞 (Linsenmair, 1999)。

(四) 图版

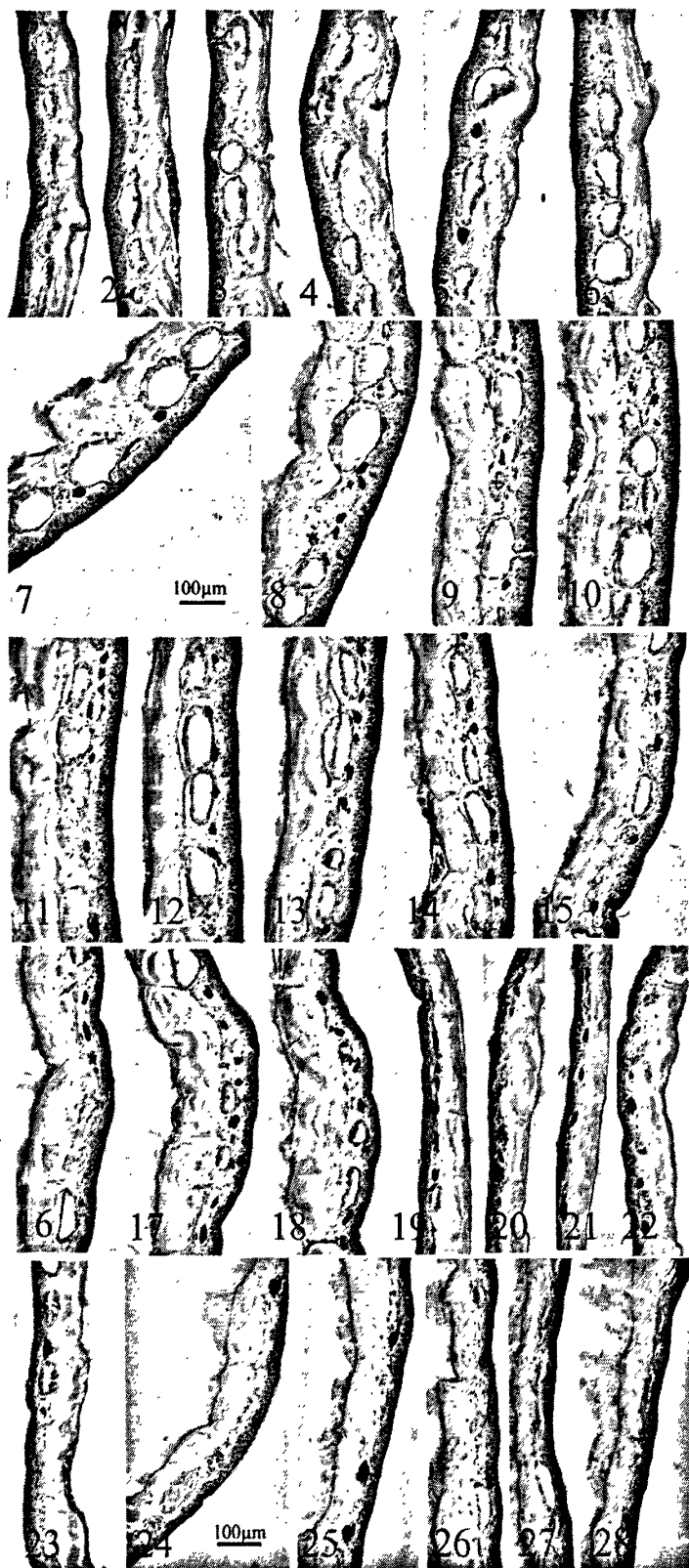


图版 3-36: 东北林蛙躯干、后肢、头部皮肤表皮结构
1、2、3 分别为躯干背部、侧部、腹部皮肤的表皮结构;
4、5、6 分别为后肢背部、侧部和腹部皮肤表皮结构;
7、8 分别为前肢背部和腹部皮肤表皮; 9、10 分别为头背部和腹部表皮结构



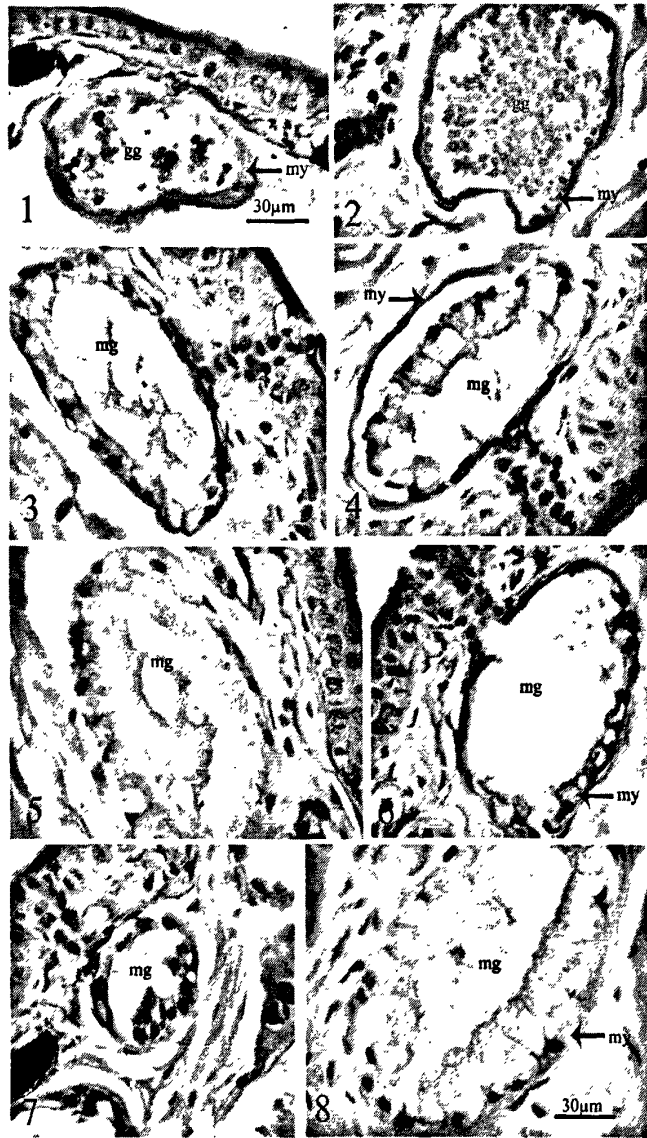
图版 3-37 东北林蛙躯干半侧环剥皮肤显微结构图

1~16 躯干背部皮肤组织结构；17~36 躯干侧部皮肤组织结构；37~51 躯干腹部皮肤组织结构



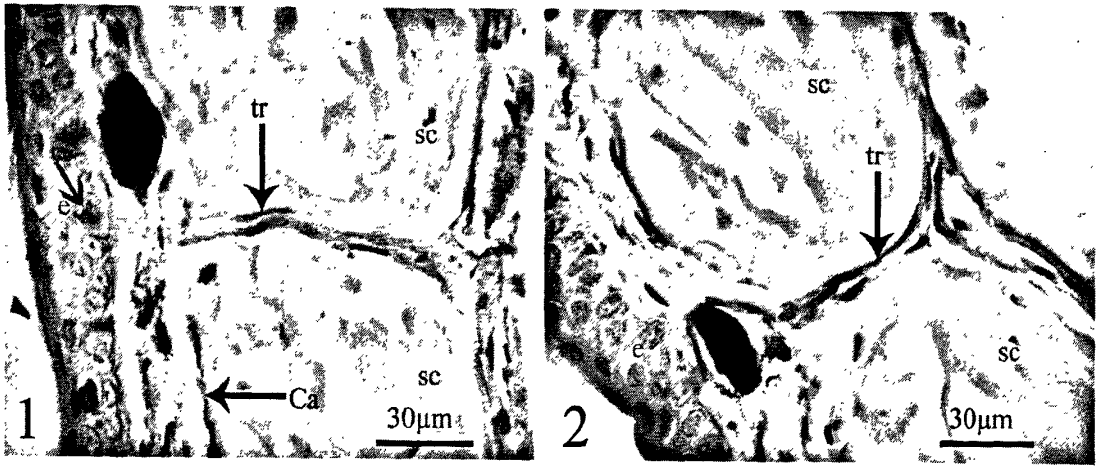
图版 3-38: 东北后肢皮肤整体图

1-4 为腹部; 5-14 为后肢侧部; 15-21 为后肢背部; 22-28 为后肢腹部



图版 3-39: 东北林蛙躯干部位皮肤腺体图

1、2 为躯干背部皮肤中含分泌颗粒不同的颗粒腺；3、4 躯干背部皮肤中粘液腺；
5、6 躯干侧部皮肤中粘液腺；7、8 躯干腹部粘液腺



图版 3-40: 图版 V 真皮通道

1 示躯干侧部真皮通道; 2 后肢背部真皮通道

第四章 环渤海两种蟾蜍皮肤结构研究

一、花背蟾蜍皮肤组织结构研究

花背蟾蜍 (*Bufo raddei* Strauch), 广布于我国长江以北地区, 国外主要分布在俄罗斯、蒙古和朝鲜半岛。已被列入中国国家林业局 2000 年 8 月 1 日发布的《国家保护的有益的或者有重要经济、科学研究价值的陆生野生动物名录》。在生物医学中有重要的科研价值, 其医学、药学价值越来越被科学家重视。花背蟾蜍全身是宝, 耳后腺和皮肤腺分泌的浆液性物质被制作蟾酥, 虽然花背蟾蜍不是蟾酥的基原动物, 但它也是民间蟾酥的来源之一。其干蟾皮、蟾衣、头、口舌胆等都有一定的药用价值。花背蟾蜍的饲养前景广阔, 其饲养技术也有一些探索 (赵建文等, 2007)。花背蟾蜍皮肤相对其他蟾蜍皮肤较光滑, 但是体表各部位皮肤表面都布满了小颗粒, 背面和侧面有大一些的小疣粒, 许多疣粒的顶点上有红点, 雄性背部的这种疣粒比雌性多。体背部皮肤较硬, 腹部皮肤较软。耳后腺较扁平。雌雄性体背部颜色明显不同, 体腹部均呈乳白色, 少数有分散存在有小黑色斑点。雌性体背呈淡绿色, 花斑很明显呈酱色, 雄性的体背面多为橄榄黄色, 有不规则的浅黄绿色的花斑。

有关花背蟾蜍皮肤的正常组织结构研究还没有报道。本文对花背蟾蜍的皮肤的显微结构进行研究。旨在为开发利用花背蟾蜍的科研价值药用价以及为研究花背蟾蜍的生物学特性提供资料。

(一) 材料与方法

1 材料

成体花背蟾蜍, 采于沈阳北陵公园, 雄性 3 只, 体长: 62.01mm, 53.21mm, 53.82mm; 雌性 3 只, 体长: 60.36mm, 54.31mm, 54.89mm。

2 方法

常规是蜡切片制作, HE、PAS 染色, OLYMPUS-BX50 显微镜观察与测量。

(二) 研究结果

1 皮肤的基本结构

花背蟾蜍皮肤的基本结构与其他两栖类皮肤相似, 都是由表皮和真皮构成。各部位皮肤厚度不均一。头背部厚于头腹部。对于躯干半侧环剥、前后肢环剥皮肤都是从腹部到背部有增厚趋势, 但是在皮肤的疏松层中有颗粒腺和粘液腺的存在, 使得相应部位厚度增加, 在皮肤横切面的显微结构显示出是一些弓形突起 (图版 4-1-5、6)。各部位皮肤的厚度都较薄, 表皮相对厚度较厚。

各部位皮肤各组织层厚度及皮肤总厚度数据如表 4-1。

表 4-1 花背蟾蜍各部位皮肤各组织层厚度及皮肤总厚度 (μm)

	层数	表皮厚度	真皮厚度	致密层厚度	疏松层厚度	总厚度
头背部	4~7	50.9±18.4	192.7±98.2	90.3±46.1	93.8±30.8	222.3±53.0
头腹	3~7	47.0±13.0	121.5±68.2	48.5±37.5	83.3±46.8	175.3±77.8
躯干背	4~6	34.6±10.0	138.2±65.8	64.4±29.8	82.3±47.6	184.2±58.4
躯干腹	4~6	44.4±16.0	109.8±44.7	55.8±43.0	60.7±26.1	157.6±53.3
前肢背	4~6	37.4±8.7	84.1±66.0	35.3±22.3	50.0±50.2	121.6±66.6
前肢腹	4~7	37.2±8.5	241.139.4	85.7±78.0	165.5±116.	277.3±140.2
后肢背	4~8	40.6±13.5	127.9±62.0	44.6±27.4	92.1±52.4	169.8±59.8
后肢腹	4~7	36.5±8.3	81.1±30.8	26.8±9.1	52.2±34.9	109.2±39.7

在真皮的下面可见到一层半透明的膜 (图版 4-1-4、5; 4-1-7~11) 厚度和皮肤相差不大, 是由立方形细胞组成 (图版 4-2-2、3), 细胞边界为 PAS 阳性的膜。

2 表皮

(1) 表皮的基本结构 表皮一般包括 3-7 层细胞, 从上到下依次是角质层、颗粒腺层、棘细胞层、生发层。生发层一般呈高柱状, 一般体背部皮肤的生发层细胞比体腹部更高, 且更细, 尤其头背部和头腹部的对比较明显。向上为棘细胞层, 棘细胞呈相对较规则的多边形, 多为六边形, 偶尔可见到五边形, 再向上到颗粒层细胞也是这种多边形, 但是更扁一些, 再向上就是角质层基本上呈长带状。对于花背蟾蜍, 各部位皮肤的表皮中多为 5 层, 角质层一般是 2 层。在角质层细胞下面的各层细胞的相邻细胞之间有间桥存在, 且间桥中有嗜酸性的细丝存在 (图版 4-3-2), 推测为胞间连丝。各层细胞的细胞质中充满了一些嗜酸性物质, 但是从下向上层细胞的细胞质中嗜酸性颗粒增多染色也稍有加深。尤其颗粒层细胞很明显比棘细胞层细胞中嗜酸性颗粒多。角质层的最外层是完全或是不完全角质化, 呈浅红色均质长带状, 有些可见到细胞核变小但是仍能看到轮廓, 被染成透明的粉红色。次外层处于角化状态中, 形态也趋于长带状, 在 H.E 染色下细胞核为嗜碱性物质被染成深蓝色。一般来说, 表皮表面两层细胞之间有缝隙存在 (图版 4-3-8)。在各部位皮肤的表皮中, 都可见到表面呈圆锥状突起的状态, 表面还常常看到一层角质膜, 比正常状态的将要脱落的角质膜厚, 且不能被染色, 而是呈现棕黄色, 呈暗黄叶子的颜色, 像是一个套子覆盖在圆锥的表面 (图版 4-4-3)。各层细胞从下向上细胞逐渐变扁, 在各部位均能看到生发层中正处于分裂状态的生发层细胞。花背蟾蜍各部位皮

肤表皮的各层细胞的垂直直径从下向上逐渐减小,水平直径逐渐增大,如表 4-2 所示为头、躯干背腹部皮肤的表皮各层细胞的垂直直径和水平直径数值。也反应了从生发层向角质层细胞逐渐变扁。观察发现蜕去的表皮角质层都是一层细胞,没有两层的。蜕的角质膜约 4-6um。

表 4-2 花背蟾蜍头、躯干背腹部表皮各层细胞的垂直和水平直径 (um)

	生发层		棘细胞层		颗粒腺		次外层		角质层
	垂直直径	水平直径	垂直直径	水平直径	垂直直径	水平直径	垂直直径	水平直径	高度
头背部	24.3±3.7	6.9±1.6	13±2.4	13±2.1	7.7±1.9	18±2.2	5.3±0.5	21±1.8	5.5±1.2
头腹部	16.1±2.5	8.6±2.1	10.3±2.9	11.4±1.2	7.5±2.0	16.5±1.0	5.1±0.4	17.8±1.9	6.1±2.4
躯干背	20.2±1.7	7.3±1.5	9.0±0.9	12.8±0.9	8.5±1.2	16.7±1.3	4.6±0.6	18.9±1.3	3.9±1.2
躯干腹	16±2.3	7.3±1.0	10.2±1.8	12.1±1.7	8±1.9	15.6±1.5	5.8±0.4	16.5±2.3	5.7±1.1

很明显头背部皮肤厚于头腹部,但是横切面的形态明显不一致。头背部表皮表面比头腹部表面平滑,头背部表皮之下有稍稍明显的真皮乳突,头背部的真皮乳突更明显一些。显得生发层下面的基膜不平滑(图版 4-2-1、4)。头腹部的角质层的角化较轻,也显得稍厚,一般能看到呈淡红色的细胞核,头背部的角质层角化程度较深。也能显示出头背部表皮最厚从数据上也可以证明。躯干背部侧部腹部皮肤的表皮厚度有差异,躯干正腹部表皮最厚背部次之躯干侧部表皮最薄(表 4-1、图版 4-3-3~5)。各部位的表皮多数为规则的多层细胞,也可见到好多不规则变形现象,有真皮腺体血管及疏松层内的一些细胞被表皮细胞包绕,并向外推移(图版 4-5-1);有表皮细胞下陷到真皮(图版 4-5-2、6);有表皮表面角质层细胞不脱落,表皮变厚现象(图版 4-5-4、5)。

(2) 表皮中的色素 表皮中的色素细胞主要位于体背部表皮中,观察发现雌雄性表皮中的色素分布有差异。雄性只是在体背部的表皮中色素细胞很少(图版 I-2)或者有零星存在的色素细胞,色素颗粒密集堆积成斑块,而雌性体背部的色素多成弥散性排列到相邻的一片细胞中。如图版 4-3-1、3 可见到这种色素颗粒弥散性排列的现象。雄性体背部表皮中色素较少(图版 4-3-6)。

(3) 表皮中瓶状细胞 表皮中可见到瓶状细胞,一般呈圆形中空状,内一般含有些许絮状的 PAS 阳性物质(图版 4-5-4、5)。在不规则变形的表皮中可见到瓶状细胞数目增多现象(图版 4-5-1、5)。并且在表皮细胞增生部位的内部可见到一些 PAS 阳性物质(图版 4-5-3)。

(4) 表皮的增生 本研究材料中的生发层细胞中均可见到处于分裂状态的细胞。尤其头部见到较多。且发现,生发层细胞的分裂,最终是形成两个水平细胞,一个细胞上移,一个细胞留在原位置。

3 真皮

在头背部看到的颗粒腺数目比在头腹部看到的多,且染色头背部的颗粒腺也更深一些。在真皮疏松层中富含粘液腺和颗粒腺。在花背蟾蜍的各部位包括耳后腺中均没有观察到钙化层。

(1) 真皮腺体 花背蟾蜍皮肤中的腺体的数量较少(表 4-3),均为泡状腺体,包括导管部和分泌部,导管由柱状上皮细胞构成,与表皮细胞相连,分泌部下陷于真皮疏松层中。颗粒腺和粘液腺的组织形式不同,颗粒腺为合胞体形式,粘液腺的腺腔周围排列有分泌细胞。

粘液腺 花背蟾蜍皮肤中粘液腺数目稍多,各部位皮肤中粘液腺的大小有差异(表 4-5),在躯干部位形态小,其他部位如头、前肢、后肢处皮肤中的粘液腺相对较大一些。花背蟾蜍皮肤中的真皮粘液腺呈泡状,在有些腺体外面可见到一圈薄的上皮肌(图版 4-6-2)。在另外一些粘液腺的腺泡周围看不到上皮肌,这可能是因为在包埋过程中人工处理的原因。所观察的头部背面和腹面、躯干部及四肢部位的皮肤中仅有一种类型的粘液腺,数量较多,无两性差异。构成腺体底部和体部的粘液细胞呈高柱状,围绕腺腔的中心呈辐射状排列,而腺泡靠近导管区域的粘液细胞则较矮,或扁平;胞核椭圆形,平卧于细胞基底部。胞质内含物略嗜酸性,腺泡腔内也偶见有和胞质染色相同的分泌物。此外,在辐射状排列的柱状细胞之间散布有窄长的柱状细胞,其顶端呈球状,PAS 染色胞质染成深紫红色(图版 4-6-2)。这类细胞的胞核呈长椭圆形,垂直立于细胞中部或基底部(吴文英等, 2011)。花背蟾蜍皮肤典型的粘液腺的分泌细胞为高柱状(图版 4-6-1、2),也可观察到高柱状分泌细胞变短的粘液腺体(图版 4-6-5)。

表 4-3 花背蟾蜍各部位皮肤中腺体的数目及颗粒腺和粘液腺的所占的百分比(μm)

	颗粒腺		粘液腺	
	数目	百分数	数目	百分数
头背部	1.5	22%	5.4	78%
头腹部	0.6	5%	10.5	95%
躯干背部	4	18%	17.7	82%
躯干腹部	0.9	5%	17.3	95%
躯干半环总数	6.7	13%	45.6	87%
前肢背部	3.8	18%	16.8	82%
前肢腹部	4.5	23%	15.2	77%
前肢环剥总数	8.3	21%	31	79%
后肢背部	5.8	30%	13.8	70%
后肢腹部	2.2	17%	10.8	83%
后肢总数	8	24%	24.7	76%

特殊的腺体 雄性花背蟾蜍头腹部观察到一个形态像粘液腺,但是可见到分泌细胞(图版 4-6-9★),其内有嗜酸性的圆球形分泌颗粒。在所取的花背蟾蜍各部位

皮肤中只在雄性头腹部观察到一个这种腺体。其形态与粘液腺相似，在粘液腺中很容易可见到一些细胞内含有嗜酸性细颗粒（图版 4-6-4、7、8）。

颗粒腺 颗粒腺分散分布于花背蟾蜍的各部位皮肤中，在前肢的桡骨的骨棱处的皮肤中集中分布（图版 4-7-1）且形态也很大长径约为 $434.2 \pm 216.9 \mu\text{m}$ ，短径约为 $255.8 \pm 150.9 \mu\text{m}$ ，在后肢的腓骨的骨棱处皮肤中也集中分布了颗粒腺（图版 4-8-1），各部位颗粒腺的长短径如表 4-4。颗粒腺包括导管部和分泌部，分泌部呈球状，为合胞体结构，腺泡外面有上皮肌鞘（图版 4-9-3、5）。当腺体内缺少颗粒时，腺泡外的上皮肌变厚，组成上皮肌的上皮肌细胞变厚，细胞界限明显（图版 4-9-1、2）。颗粒腺内的颗粒为嗜酸性的圆球形的颗粒，对 PAS 染色反应为阴性（图版 4-9-4），较大些的圆球形颗粒的直径约为 $4.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 。

表 4-4 头躯干前肢后肢四个部位皮肤中颗粒腺长短径 (μm)

	颗粒腺长径	长径平均值	颗粒腺短径	短径平均值
头	65.8-323.6	183.6 ± 78.9	46.3-168.2	91.7 ± 36.6
躯干	62.3-186.3	180.7 ± 80.1	49.3-257.0	114.4 ± 55.7
前肢	73.3-737.1	260.8 ± 187.5	41.6-436.7	155.5 ± 125.6
后肢	86.1-625.5	244.7 ± 180.2	56.9-321.2	152.7 ± 98.2

表 4-5 头躯干前肢后肢四个部位皮肤中粘液腺长短径 (μm)

	粘液腺长径	长径平均值	粘液腺短径	短径平均值
头	53.4-207.1	112 ± 38.5	38.8-98.2	60.5 ± 16.1
躯干	20.2-156.9	90.1 ± 29.5	36.2-81.2	59.3 ± 10.9
前肢	63.1-152.0	102.7 ± 27.8	36.8-96.5	67.6 ± 18.1
后肢	42.8-183.8	103.4 ± 38.5	39.3-139.5	67.0 ± 27.1

(2) 真皮中的色素细胞 真皮中的色素细胞主要分布在表皮之下，疏松层的上层。本研究中的花背蟾蜍真皮中的色素细胞大多都成团块状。很少数的色素细胞有些分支，这种斑块状的色素细胞排列挺紧密（图版 4-1；4-4；4-7；4-8）。

真皮细胞通道 真皮致密层由平行波浪状排列的胶原纤维组成，花背蟾蜍各部位皮肤中纵行纤维束不明显，几乎看不到，可以看到从真皮下面到表皮基膜处有一些细胞通道，好像是有细胞从真皮下面的皮下组织移向表皮（图版 4-2-3、5、6）。

4 花背蟾蜍耳后腺解剖学结构

花背蟾蜍耳后腺为腺状结构，形态较扁位于耳后位置。耳后腺表面有分布有小突起，小突起表面呈白色或者褐色，小突起的顶端很尖，在解剖镜下观察到耳后腺的表面分布有小孔（图版 4-10-1、2），小孔的直径约有 $0.1 \sim 0.25 \text{mm}$ 。当背侧皮肤去除时耳后腺很容易从身体上分离并取下来，将取下来的耳后腺反过来，可见到大些的血管，也可见到白色的大型颗粒（图版 4-10-3）。将耳后腺水平切开，

将上部的移走,可见到一个蜂窝状的结构,有许多巢房构成(图版 4-10-4),巢房内含有浅黄色面状分泌物,巢房壁是由半透明的薄膜构成的。耳后腺的横切面均显示每个巢房包含有一个很大的充满了分泌物的瓶状腺体,顶部很明显被一个很厚的导管上皮细胞形成的塞子封住(图版 XI-1)。

5 花背蟾蜍耳后腺组织学结构

耳后腺的横切面结构如图 XI-1,对其组织学分析显示,耳后腺就是背部皮肤增厚的部分,表皮之下有色素细胞存在,疏松层内除了存在粘液腺(图版 XI-5)和少量规则颗粒腺(图版 XI-1),真皮疏松层和致密层不像其他背部皮肤一样清楚,在致密层中有大的瓶状合胞体颗粒腺,称为大瓶状腺体(图版 4-11-1),其顶部的导管部位是上皮细胞形成的塞子(图版 4-11-2)。大瓶状腺体内含有嗜酸性的圆形分泌颗粒,这种分泌颗粒与皮肤中颗粒腺中的圆球形分泌颗粒腺相似,但是形态小很多(图版 4-11-3、4)。大瓶状腺体的组织形式为合胞体结构,腺腔周围有一圈细胞核,为合胞体的细胞核,细胞核外面为上皮肤,相邻大瓶状腺体的上皮肤之间有血细胞存在(图版 4-11-4)。

(三) 讨论

1 表皮结构与环境的适应

花背蟾蜍表皮厚度随部位不同而不同,一般头背部表皮相对最厚,雄性和雌性躯干正腹部表皮多厚于正背部,这可能是由于头背部是易受攻击的部位,躯干腹部是易受摩擦的部位,这些均是对生活行为方式的适应。躯干侧部皮肤较薄且表皮之下含有较多的血细胞。头背部的生发层细胞呈高柱状,且排列紧密,头腹部生发层细胞呈相对矮柱状,排列较松散。

2 瓶状细胞分布和功能分析

瓶状细胞形态多样,有椭圆形、梨形、不规则形等(耿欣莲,1959),其分泌物能溶解表皮表面两层之间的间桥,是最外层角质层蜕皮。电镜下观察瓶状细胞内含有丰富线粒体,还存在高水平的碳酸酐酶活性,对于刺激钠离子运输有重要作用(Villalba, 1993)。本文通过观察认为瓶状细胞对于正常蜕皮有重要作用。因为花背蟾蜍表皮中含有一些瓶状细胞,另外,在表皮表面形态不规则时,或是表皮加厚未正常脱落时,瓶状细胞就会增多,瓶状细胞内含有 PAS 阳性物质,通过本文观察发现使表皮细胞溶解的物质呈 PAS 阳性。

3 色素细胞分布的分析与讨论

真皮中的色素细胞多数呈斑块状,稠密地排列在体背部表皮之下疏松层之上,在体腹部有稀疏的色素细胞。此外,其它部位如真皮之下也有色素细胞,在雌性的体背部表皮中含有色素细胞或色素颗粒,雄性没有见到,这应该与雄性体色较浅有关系。

4 贯穿真皮的通道细胞

在花背蟾蜍各部位皮肤中都可见到通道细胞, 这种细胞又形状细长细胞核在表皮, 细胞的根部可以深入到真皮层之下, 有报道认为这种细胞在蜕皮过程中起固定各层细胞的作用。

5 真皮腺体的形态特点及分析

花背蟾蜍皮肤中含有颗粒腺粘液腺两种类型的腺体, 颗粒腺具有两栖动物皮肤中典型的颗粒腺的形态, 能分泌毒液起防御作用。但是花背蟾蜍皮肤中的粘液腺与典型的粘液腺有些不同, 也与上述各种林蛙皮肤中的粘液腺形态差别很大, 其分泌细胞呈高柱状, 并且可观察到至少两种类型的细胞, 粘液腺的腺腔较小。存在这种差别的原因有待于进一步研究。另外, 有时在粘液腺的高柱状分泌细胞中充满了嗜酸性的分泌颗粒, 这种情况在这所有组织片中只见到一个这样的粘液腺性状内还有嗜酸性分泌颗粒的腺体, 这又是一个很特别之处。Tatsunori (1995) 报道海蛙 (*Rana cancrivora*) 皮肤粘液腺中偶尔会出现嗜卡红颗粒, 并认为这与典型的粘液腺不同, 并且粘液腺具有离子运输的功能 (Thompson, 1983)。

6 无钙化层存在的原因分析

在花背蟾蜍包括头部的各部位中, 都没有钙化层存在, 这可能说明花背蟾蜍大多数时间都生活在水中, 不具有保水的问题。

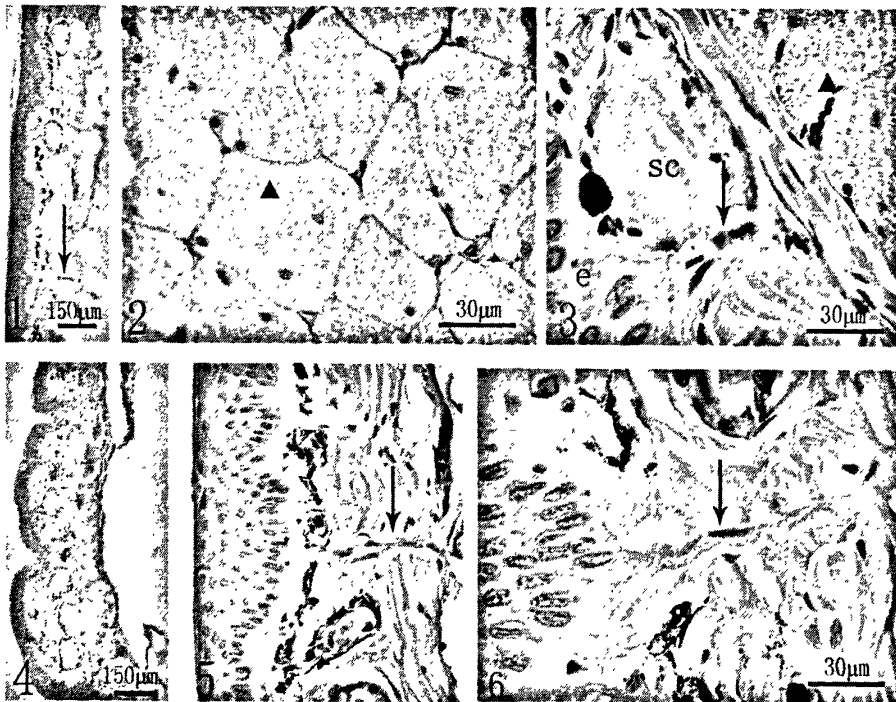
7 耳后腺结构与功能的相适应分析

花背蟾蜍耳后腺位于眼眶后对称分布, 耳后腺中瓶状大腺体也是合胞体形式, 腔内充满了极细的分泌颗粒, 与其它部位皮肤中的颗粒腺中的嗜酸性颗粒不同。耳后腺占据了身体中一个很显著的位置, 被认为是蟾蜍中与防御行为中相联系的一种结构。Carlos (2009) 报道了巴西蟾蜍 (*Rhinella jimi*) 耳后腺只有在具有叮咬压力时才释放毒液, 说明耳后腺是起被动防御作用, 花背蟾蜍耳后腺的释放机制也需要进一步的研究。

(四) 图版



图版 4-1: 雌性花背蟾蜍躯干半侧环剥皮肤的横切面:
1-11 依次是从躯干正背部到正腹部皮肤大致的连续横切面图, HE 染色;
▲示皮肤之下的一层膜, 其内还有色素和血管

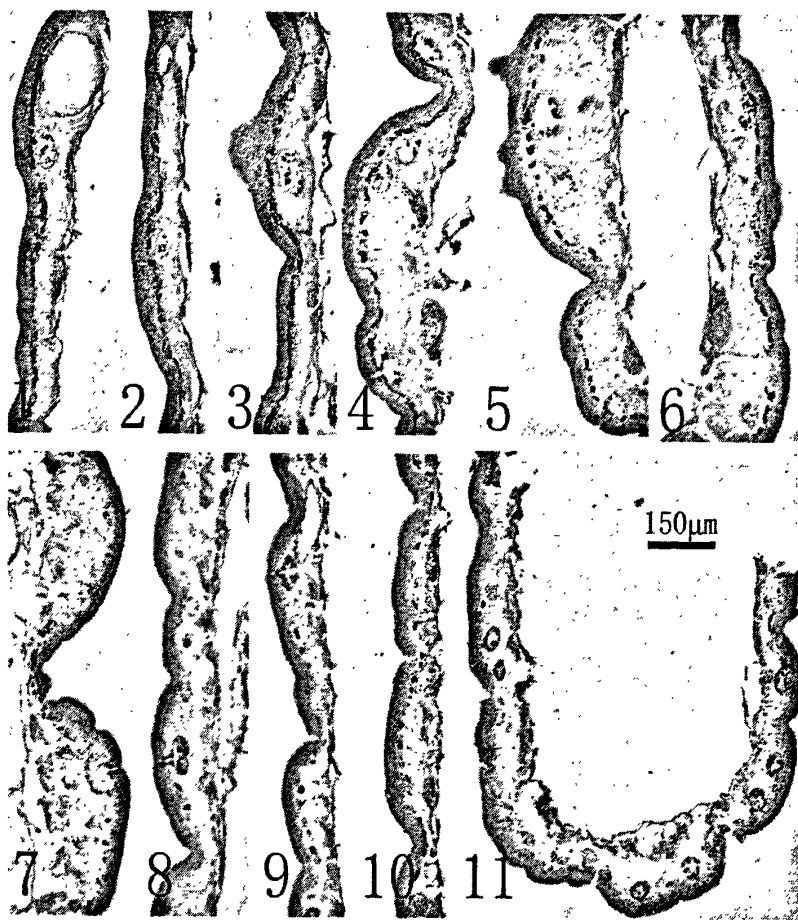


图版 4-2: 花背蟾蜍头背部和头腹部皮肤表皮的宏观比较及真皮中的一些结构
1 雄性头背部皮肤结构图, HE; 2 雌性躯干皮肤之下的一层半透明的与皮肤厚度相差不大的膜, PAS;
3 雌性躯干部位皮肤真皮结构, 主要是致密层结构, 示致密层不连续, HE;
4 雄性头腹部的宏观结构, HE; 5 雄性头背部皮肤, HE;
6 雄性头背部皮肤, 示贯穿真皮的通道

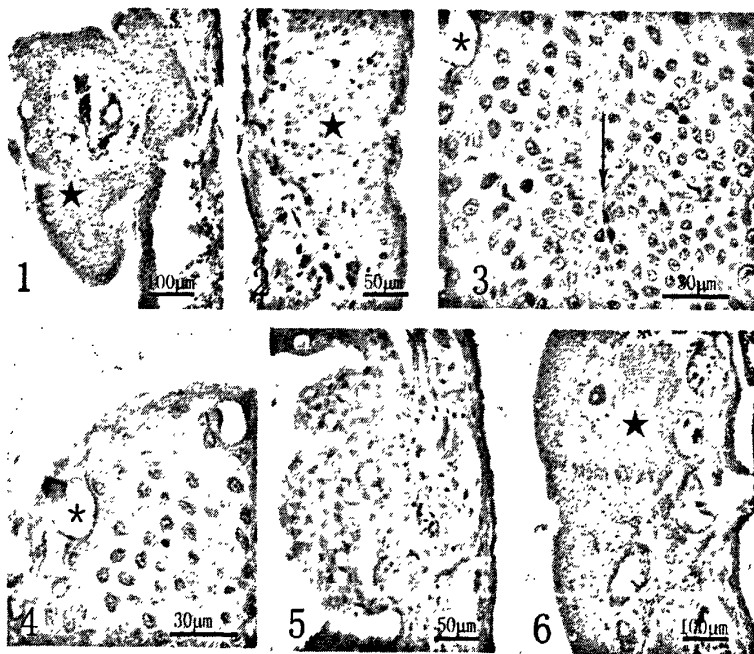


图版 4-3: 花背蟾蜍皮肤表皮结构对照

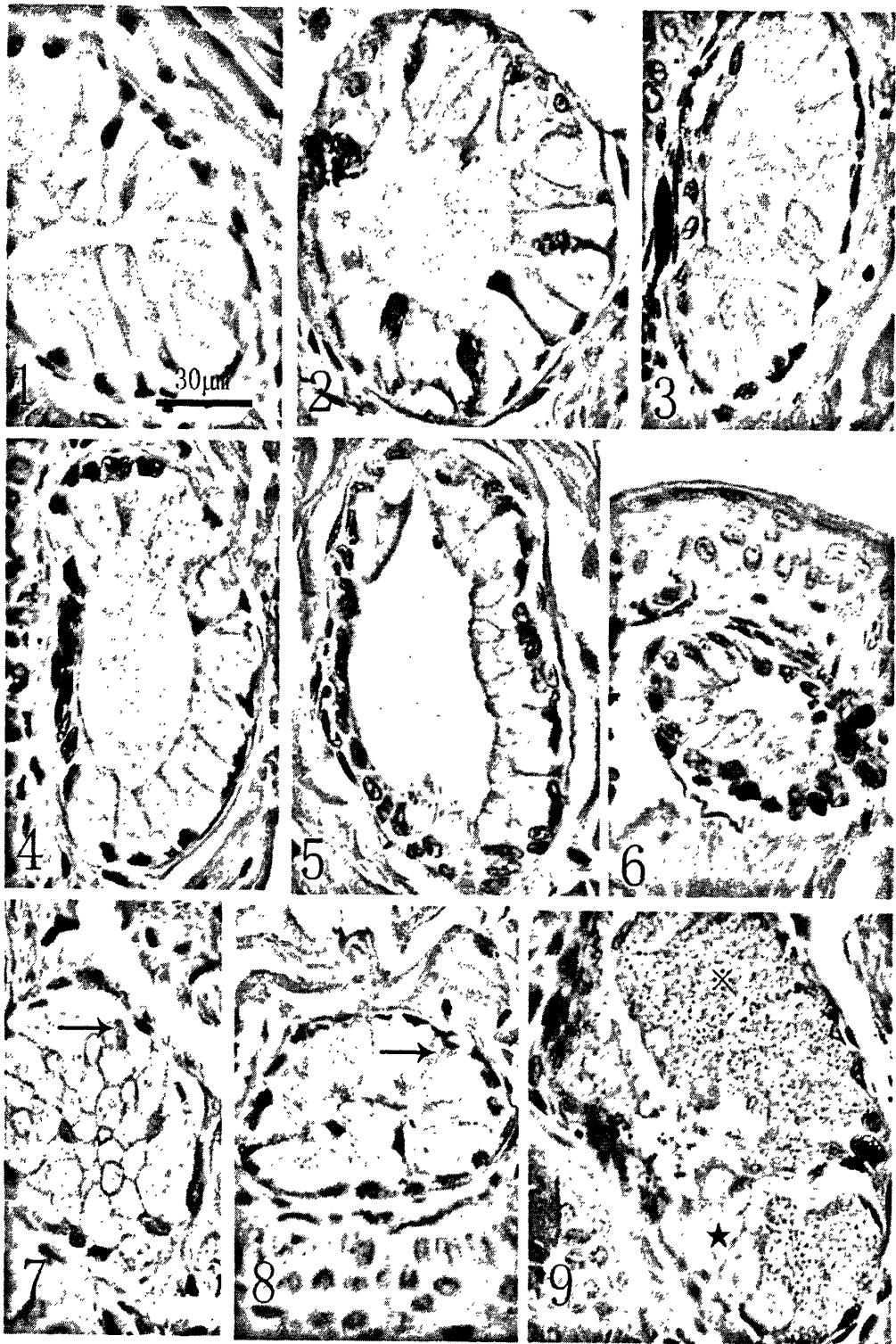
- 1 雌性头背部表皮, 示其中有弥散性色素颗粒;
- 2 雄性头背部表皮示其中没有弥散性色素颗粒, 此图中可清晰看到生发层细胞, 分裂是水平分开两个子细胞, 其中一个向上移;
- 3、4、5 分别为雌性躯干背部、侧部和正腹部皮肤的表皮, 示其正腹部皮肤最厚, 侧部最薄且表皮之下的毛细血管较多;
- 6、7、分别示雄性前肢背部和前肢腹部皮肤的表皮, 示它们表皮各层的差异, 尤其是细胞层数, 生发层和角质层的区别;
- 8 为雌性躯干腹部的表皮, 示其中有红细胞。也可见到表皮表面两层细胞之间有缝隙



图版 4-4: 花背蟾蜍雄性躯干半侧环剥皮肤横切面



图版 4-5: 表皮的各种形状

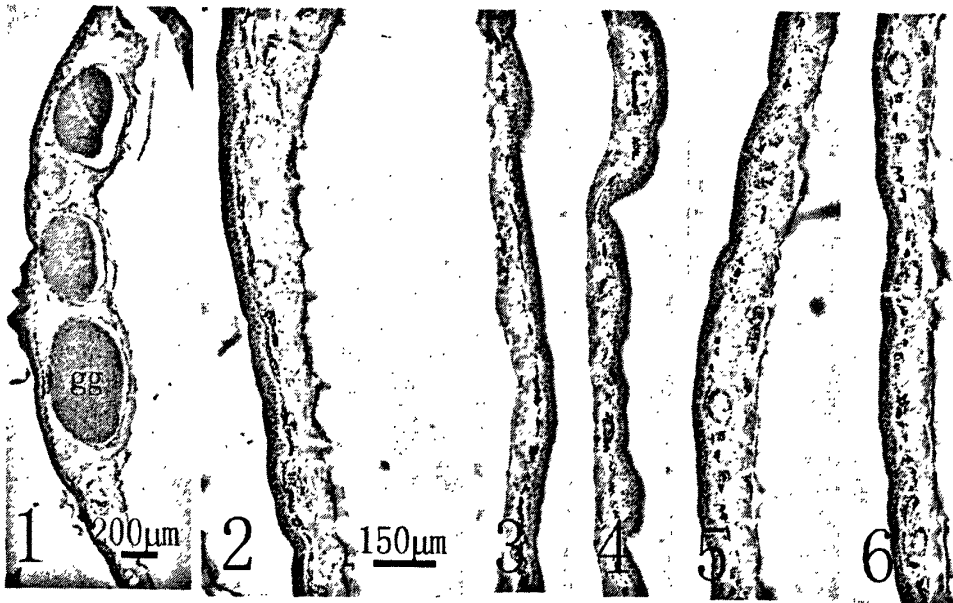


图版 4-6: 花背蟾蜍皮肤粘液腺

1、2 (PAS)、3 示分泌细胞呈高柱状的粘液腺; 4、5 (PAS) 示分泌细胞稍矮的粘液腺;

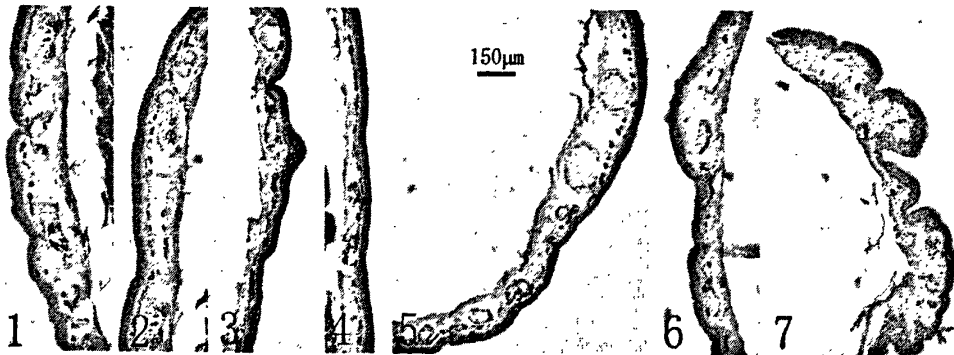
6、7、8 分别为粘液腺的不同切面;

9 雄性头腹部观察到的形态像粘液腺, 但分泌细胞内含有嗜酸性颗粒性物质的特殊腺体



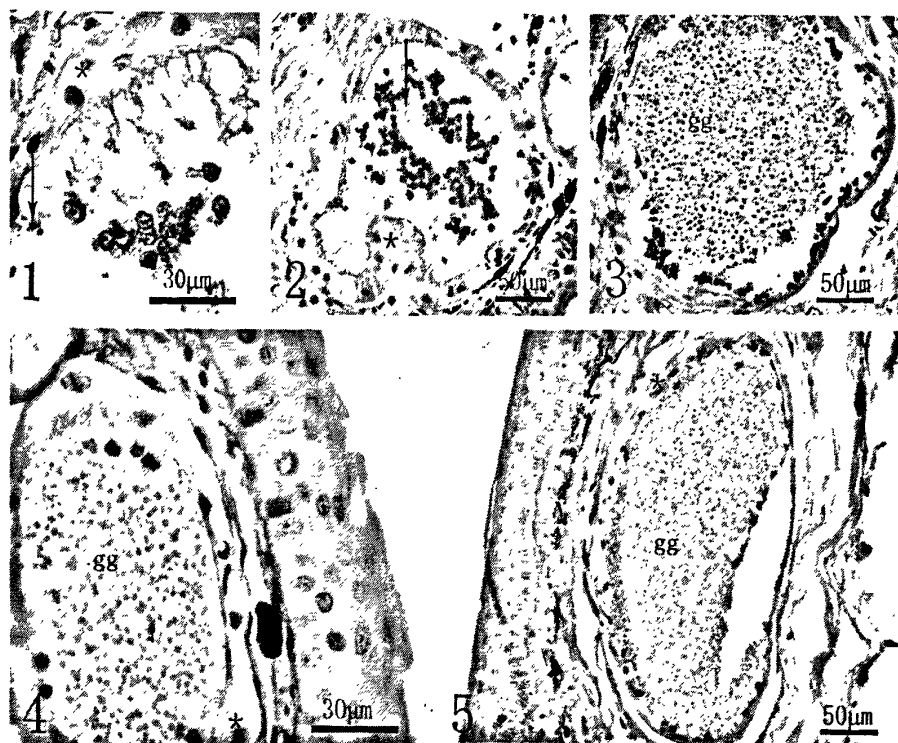
图版 4-7: 切口大约在雄性花背蟾蜍前肢背部大致连续的横切面图

1 为前肢桡骨外侧的上方的皮肤处具有大的颗粒腺, 所观察的所有花背蟾蜍的前肢此部位都有这种大的颗粒腺, 此处皮肤的真皮致密层很薄;
2 为前肢背部皮肤; 3、4 大约为前肢腹部处的皮肤。



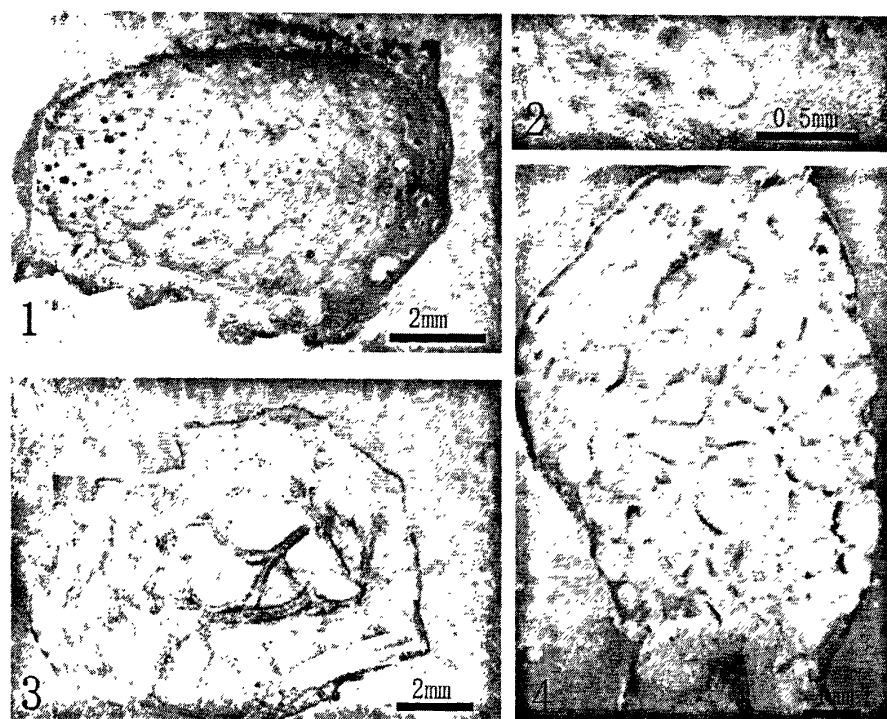
图版 4-8: 花背雄性后肢大致连续皮肤横切面图

1-7 依次为从背部到腹部的大致连续图切口约在背部腹部交界处



图版 4-9: 花背蟾蜍颗粒腺

图 1、2、4(PAS)、5 (PAS) 均是雌性躯干部位的颗粒腺, 3 是雄性前肢颗粒腺

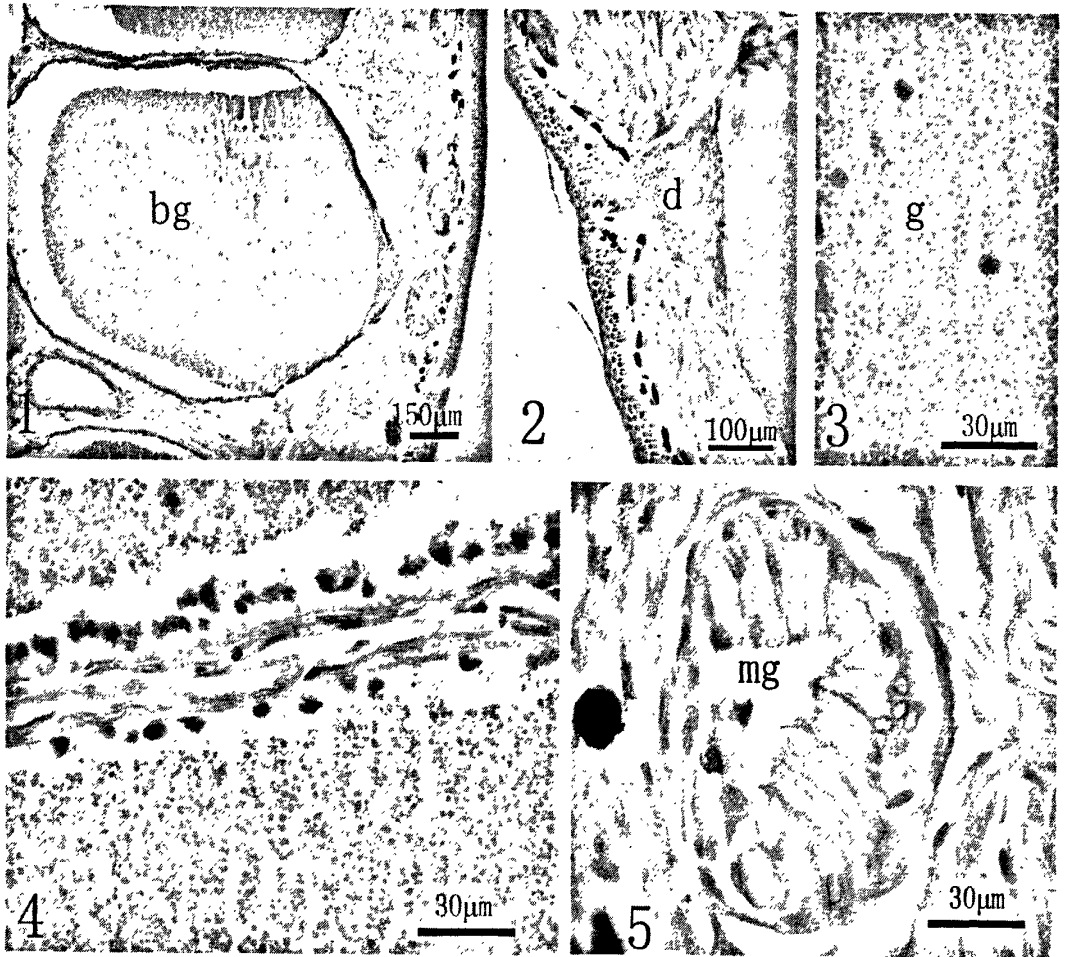


图版 4-10: 花背蟾蜍耳后解剖结构图

1 花背蟾蜍表面结构; 2 耳后腺表面有些圆孔;

图 3 示耳后腺下表面的结构, 重点示其有较大血管的分布;

4 将耳后腺水平切开后的内部结构示其内有蜂窝状的巢房存在



图版 4-11: 花背蟾蜍耳后腺显微结构图

- 1 花背蟾蜍耳后腺中大腺体其内含有大量的嗜酸性的圆球形颗粒;
- 2 耳后腺中大瓶状腺体的塞子样的导管; 3 示耳后腺中嗜酸性的圆球形分泌物颗粒;
- 4 示耳后腺中大瓶状腺体的边界; 5 耳后腺相对应的皮肤中的粘液腺

二、中华蟾蜍皮肤组织结构研究

中华蟾蜍 *Bufo gargarizans* 隶属于两栖纲, 无尾目, 蟾蜍科。是我国特产, 分布十分广泛, 在医学和生物学有重要用途。有关中华蟾蜍的大体解剖、繁殖、发生、生态、生化、血细胞观察等方面报道较多 (郭宪光, 2002)。有关皮肤研究也有一些 (耿欣莲, 1959; 张先芳, 2002; 于洪川, 2005)。

(一) 材料与方法

1 材料

采于沈阳北陵公园的成体中华蟾蜍, 雌雄性各两只。雌性体长: 71.57mm, 75.38mm; 雄性体长: 78.36mm, 76.25mm。

2 方法

常规是蜡切片制作, HE、PAS 染色, OLYMPUS-BX50 显微镜观察与测量, 用 SPSS 进行数据分析。

(1) 常规石蜡切片制作

取材固定 用注射酒精法将蟾蜍处死, 然后将其固定于福尔马林中 8 小时以上, 然后在标本的头背部、腹部取 3-5mm 宽, 8-10mm 长的组织块; 沿躯干背中线和腹中线将蟾蜍躯干部位半侧皮肤剥下宽约 5-8mm, 前后肢环剥皮肤, 宽约 5-8mm, 将取下的组织块入 Bouin's 氏液后固定 24 小时以上。

洗涤 包埋前天用流水冲洗固定好的组织块 12 小时左右。

脱水 组织块依次经 50%、70%、80%、90%、95%乙醇脱水 30min, 100%、100%乙醇脱水 45-60min。

透明 将组织块放入二甲苯: 无水乙醇=1: 1 的混合液中, 30min 左右, 再将组织块顺次放入二甲苯 I、二甲苯 II 中, 时间根据透明程度而定 (组织块的透明以光线基本能透过组织为度), 约 3min 左右。透明期间要时常摇晃小瓶。

渗蜡 将已透明的组织块依次放入恒温箱 (60℃) 内的二甲苯和石蜡一比一混合液中 1h, 石蜡 I、石蜡 II 各 90min。

包埋、切片、展片和烤片 包埋时要用烧热的镊子在蜡槽的液态蜡中匀速滑动, 以赶走组织块附近的气泡, 使蜡完全把组织包埋在内, 以避免切片时组织块破碎。包埋后切成厚度为 7 μ m 的连续切片, 将切好的石蜡条放入 47℃左右的水浴锅进行展片, 展片时间不易太长, 温度也不能太高, 要慢慢地展开, 防止组织被撕开。看到组织块完全展开时, 用事先擦好的载玻片将石蜡条捞起, 装入标本盒放入恒温箱烘干。

(2) 染色 染色剂: HE、PAS。

(二) 研究结果

中华蟾蜍皮肤的基本结构与其他两栖类相似,是由表皮和真皮组成。表皮由多层细胞构成,真皮的上层为疏松层,下层为致密层,疏松层中包括色素层、颗粒腺、粘液腺、血管、钙化层等(图版 4-12)。

1 不同部位皮肤及表皮厚度特点

中华蟾蜍各部位皮肤的表皮厚度有差异,头背部皮肤表皮(图版 4-13-1、2)相对最厚($63.8 \pm 11.0 \mu\text{m}$),和头腹部表皮(图版 4-13-3、4)相比有极显著性差异。躯干部位皮肤的表皮厚度也不一致(图版 4-14),躯干侧部表皮最薄,背部表皮厚于腹部表皮。前肢环剥皮肤中各部位皮肤表皮厚度也不一致,背部和侧部相当都比腹部厚且有极显著性差异,另外,在颗粒腺含量较多处所对应的表皮更厚些(图版 4-14-2)。后肢环剥皮肤的表皮厚度与前肢有相似变化的趋势,即背部和侧部都比腹部厚只是没有显著性差异(表 4-6)。各部位皮肤表皮相比,躯干侧部表皮最薄 $37.7 \pm 8.6 \mu\text{m}$ 。躯干背部皮肤的总厚度最厚($592.5 \pm 200.6 \mu\text{m}$),后肢腹部皮肤总厚度最薄($194.9 \pm 35.7 \mu\text{m}$)。各部位皮肤总厚度及表皮厚度均是背部大于腹部。

2 表皮

头背部表皮较厚,约包括 6-7 层细胞。头腹部表皮相对较薄,约包括 5 层细胞。生发层细胞头背部比头腹部排列整齐,细胞分层较明显。头背部生发层细胞呈高柱状头腹部的生发层细胞呈矮柱状(图版 4-13),从生发层向上,细胞逐渐变扁,生发层以上的各层细胞,越向上,细胞内 PAS 阳性颗粒越多(图版 4-13-3)。在角质层细胞层的下面常可见到瓶状细胞存在(图版 4-13),瓶状细胞内含有嗜酸性物质和少量色素颗粒(图版 4-13-1、4),瓶状细胞内的物质对 PAS 染色呈阳性(图版 4-13-2、3)。瓶状细胞的形态不很一致有梨形(图版 4-13-1、2)有椭圆形(图版 4-13-3、4)。躯干背部皮肤表皮、颗粒腺分布较多处对应的皮肤表皮、侧部、腹部皮肤的表皮厚度相比,颗粒腺分布较多处对应的皮肤表皮最厚(图版 4-14-2),其次是背部大于腹部表皮,侧部表皮最薄(图版 4-14-3),且有较多的血管从生发层之下凸向表皮,使得表皮变薄,细胞层数也变少(图版 4-14)。

在各部位皮肤的表皮中均可见到组成表皮的细胞变得不规则,有成团块状的细胞下沉入真皮疏松层(图版 4-15-1),有连同真皮疏松层及其内的血管、色素甚至粘液腺整个都被表皮细胞包围的,并有脱落的趋势(图版 4-15-2、6),有表皮角质层不脱落(图版 4-15-3、4、5)等表皮表面不平滑的形状。这种不规则的表皮形状多出现在前后肢躯干,头部很少。

表 4-6 中华蟾蜍各部位皮肤各组织层、及皮肤总厚度 (μm)

	表皮			真皮致密层			真皮疏松层			真皮			皮肤总厚度	
	厚度	厚度平均值	厚度	厚度	厚度平均值	厚度	厚度	厚度平均值	厚度	厚度	平均值	厚度	厚度	厚度平均值
头背部	43.4-89.2	63.8±11.0 ^{aa}	73.7-335.2	168.8±78.4	45.1-264.6	138.0±56.2	133.7-544.6	316.0±127.7	186.7-627.1	377.2±128.6 ^{aa}				
头腹部	23.1-60.6	41.2±9.8	55.6-223.6	117.8±39.2	30.0-159.1	100.0±40.4	135.6-384.2	234.7±77.3	167.2-448.8	276.7±79.2				
躯干背部	35.4-82.9	53.2±13.2 ^{aa}	109.4-257.2	168.7±32.7	114.7-570.8	336.7±159.9	298.1-953.6	537.3±188.7	330.8-1006.9	592.5±200.6 ^{aa}				
躯干侧部	19.4-50.6	37.7±8.6 ^{bb}	62.5-262.6	163.9±57.2	80.6-369.7	179.5±83.5	199.7-551.4	369.0±101.8	251.8-544.7	411.3±98.1 ^{bb}				
躯干腹部	33.4-50.6	42.2±5.2	47.0-254.7	125.9±52.0	48.5-193.5	110.7±41.4	117.2-463.1	240.2±76.9	150.0-498.5	280.3±72.4				
前肢背部	32.6-80.0	49.7±12.6	43.5-142.9	89.8±25.8	32.9-284.0	163.1±75.9 ^{aa}	114.2-394.1	242.2±71.8	171.3-466.1	302.8±78.9 ^{aa}				
前肢侧部	36.3-72.3	49.2±10.0 ^{bb}	59.1-265.8	124.8±41.6	115.7-501.7	299.4±121.2 ^{bb}	207.7-633.5	445.4±125.8	238.6-665.9	491.3±129.2 ^{bb}				
前肢腹部	24.9-64.9	38.5±8.3	68.5-222.8	116.4±42.1	57.8-215.1	130.0±52.1	177.6-358.0	256.8±45.8	169.2-352.5	289.8±47.9				
后肢背部	25.8-70.0	45.0±10.0	63.7-192.6	118.4±35.1	52.7-547.3	197.6±117.7	135.1-662.5	323.5±131.4	201.3-687.0	371.8±128.8 ^a				
后肢侧部	24.4-63.7	45.5±10.3	57.3-153.9	99.8±26.2	40.5-602.5	136.2±107.3	146.1-720.4	241.4±111.8	134.8-814.3	276.5±128.7 ^{bb}				
后肢腹部	23.3-70.5	38.7±13.2	38.5-135.4	76.3±25.4	27.2-123.5	73.7±25.6	77.7-252.3	159.3±36.5	109.2-293.8	194.9±35.7				

a 或 aa:表示头背部表皮厚度及皮肤总厚度与头腹部相比,及躯干、前肢、后肢的背部皮肤和侧部皮肤相应指标的厚度相比有显著性差异或极显著性差异;

b 或 bb 表示躯干、前肢、后肢侧部某些指标的厚度与相应部位的腹部皮肤相比有显著性差异或极显著性差异。

3 真皮

真皮分为两层，上层紧贴于表皮之下，为疏松层，下层为致密层，也可见到贯穿真皮一直到表皮之下的一些通道细胞（图版 4-16-7），在中华蟾蜍各部位都存在钙化层。

(1) 真皮腺体 蟾蜍各部位皮肤中都存在真皮腺体，包括粘液腺和颗粒腺，均为单泡状腺体。但是数量不是很多（表 4-7），从图版 4-15；4-17；图版 4-18，也可看出，蟾蜍皮肤中腺体较稀少。

颗粒腺 中华蟾蜍皮肤颗粒腺形态较大，腺腔内含有嗜酸性的圆球形颗粒，紧贴腺腔壁的分泌细胞为典型的合胞体，分泌细胞之外有一层上皮肌细胞。颗粒腺周围常有血细胞和色素包绕（图版 4-16-1、2、3、4）。腺泡内含有嗜酸性的圆球形颗粒，这基本上是所报道的两栖动物皮肤颗粒腺的共同特点。但是在中华蟾蜍皮肤中见到颗粒腺内的嗜酸性颗粒有呈溶解状态的（图版 4-16-2、3），在中华蟾蜍各部位皮肤中均可见到呈两种形态的颗粒腺。第一种是腺泡饱满，内充满嗜酸性圆形颗粒，且上皮肌细胞很薄（图版 4-16-3、5）的典型的颗粒腺，第二种形态的颗粒腺腺泡内没有或缺少嗜酸性圆形颗粒，而形态较小，腺泡内可见到一些泡状或网状物质，上皮肌细胞很厚（图版 4-16-1、2、4）。各部位皮肤中颗粒腺的长短径如表 4-8。

表 4-7 中华蟾蜍各部位 5mm 长度的皮肤中颗粒腺粘液腺的数量（个）

	颗粒腺百分数	粘液腺百分数	总数
头背部	28.16%	71.84%	8.4
头腹部	36.76%	63.24%	8.6
躯干半环	25.66%	74.34%	55
躯干背部	26.60%	73.40%	8.3
躯干侧部	32.94%	67.06%	12.9
躯干腹部	23.61%	76.39%	6
前肢环剥	27.70%	72.30%	28.6
前肢背部	21.67%	78.33%	5
前肢侧部	36.80%	63.20%	10.4
前肢腹部	15.52%	84.48%	4.8
后肢环剥	31.90%	68.10%	27.2
后肢背部	37.10%	62.90%	5.2
后肢侧部	35.87%	64.13%	7.7
后肢腹部	10.34%	89.66%	4.8

粘液腺 为单泡状腺体，腺腔内一般中空，腺腔内壁衬有一层分泌细胞，因为这层分泌细胞呈中等高柱状、矮柱状及鳞片状而使得腺体的形态也有所不同（图版 3-19-1、5、7）。粘液腺外的上皮肌层，在有些粘液腺中这层上皮肌是连续的（图版 3-19-1、2、6），而在另一些是不连续不明显的（图版 3-19-3、4、7、8）。在 HE 染色下腺泡内中空，分泌细胞呈着色十分淡，在 PAS 染色下，有些粘液腺所有分泌细胞均成玫瑰红色（图版 3-19-2），有粘液腺的几个分泌细胞

呈 PAS 阳性 (图版 3-19-6、8、9)。粘液腺的细胞核或位于分泌细胞的基部 (图版 3-19-1、2、5), 或者位于分泌细胞的顶部 (图版 3-19-3、6、7、8)。各部位粘液腺长短径如表 4-9。

表 4-8 中华蟾蜍各部位皮肤颗粒腺的长短径 (μm)

	颗粒腺长径		颗粒腺短径	
	长径	平均值	短径	平均值
头背部	119.7-268.4	190.1±62.8	82.8-174.8	124.0±45.0
头腹部	62.2-229.1	122.8±51.5	42.8-136.7	82.6±33.9
躯干背部	86.7-677.0	287.1±179.5**	64.1-619.3	205.1±162.3*
躯干腹部	78.8-222.5	124.0±51.5	36.6-134.8	73.2±25.9
前肢背部	135.2-539.8	273.0±139.4*	89.0-408.8	164.3±94.1
前肢腹部	79.1-229.8	128.9±56.3	57.2-193.2	91.7±48.6
后肢背部	76.1-681.8	251.6±179.1	64.8-437.7	162.4±112.1
后肢腹部	102.3-159.5	127.9±22.3	35.3-107.5	72.2±26.5

表 4-9 中华蟾蜍各部位皮肤中粘液腺长短径 (μm)

	粘液腺长径		粘液腺短径	
	长径	平均值	短径	平均值
头背部	63.2-146.4	107.6±23.7	41.6-98.0	66.6±17.9
头腹部	58.5-143.0	93.1±25.9	21.7-100.0	56.2±19.7
躯干背部	66.6-128.1	98.1±16.3	57.3-109.2	73.6±14.0**
躯干腹部	53.7-117.9	96.2±18.5	27.9-68.9	55.5±11.7
前肢背部	81.1-142.5	112.6±20.5**	51.9-101.3	73.3±14.5*
前肢腹部	50.1-105.6	87.3±16.8	30.4-104.4	56.3±20.1
后肢背部	53.7-121.2	95.7±19.4	38.6-82.3	62.5±14.9
后肢腹部	56.6-110.7	85.7±14.8	31.9-73.0	54.0±14.1

(2) 真皮色素层 除了表皮中分布有少量的色素细胞外, 绝大多数色素细胞位于真皮疏松层的上部表皮之下。在体背部色素层较厚, 色素细胞伸出树枝状突起彼此连接成一层 (图版 4-13-1; 版 4-12-1、3、4; 版 4-17-1、2、4、5), 在体腹部 (图版 4-13-4; 图版 4-12-2; 图版 4-17-3、6) 色素细胞一般呈团块状, 分支较少, 或没有分支。色素层往往还分布在颗粒腺的周围 (图版 4-16-1), 以及致密层之下的血窦周围 (图版 4-16-8)。在皮肤发生异常时也常常有色素细胞 (图版 4-15-1、6; 图版 4-18-2)。

(3) 真皮中的血管 中华蟾蜍真皮中分布有大量的血管, 尤其在表皮之下, 亦可看到血细胞的存在, 在有些部位血管可以向上凸入到表皮中, 如在躯干侧部皮肤中更为明显 (图版 4-14-3)。在真皮中疏松层 (图版 4-15-3) 或致密层 (图版 4-15-2) 中可见到大的血窦穿过。在颗粒腺的周围也常常有血管包绕 (图版 4-17-2), 在致密

层之下也分布有血管(图版 4-18-1)。

(4) 真皮中的钙化层 钙化层是一层连续的钙化嗜碱性结构平行于表皮层下面,位于真皮疏松层和真皮致密层之间。在中华蟾蜍各部位皮肤中都可见到钙化层,尤其在头背部更明显(图版 4-12-1、2、4),除了这一层平行于表皮的钙化层,在头背部皮肤疏松层中还存在团块状的钙化结构(图版 4-12-4),其它部位很少有这种团块状的钙化层,偶尔在前后肢可见到。另外在耳后腺大腺体的颈部可看到这种棉花团状的钙化结构(图版 4-20-1、4)。

4 中华蟾蜍耳后腺

(1) 解剖结构 耳后腺呈蚕豆状位于眼眶后方,是很明显的腺状结构,当其周围的背侧皮肤去掉后,很容易从身体上分离并取下来。表面凹凸不平,有大小不一的小孔(图版 4-21-1),直径约 0.3-1 mm。在较大的孔的周围还有较小的孔分布于大孔周围(图版 4-21-2)。分离取下的耳后腺的下面也不平滑,除了有大的血管分布,还可通过下面的膜看到腺体内有许多分泌物质(图版 4-21-3)。如果一与身体表面平行的面将耳后腺水平切开,可见到其内呈蜂窝状结构(图版 4-21-4)。蜂窝是由很多巢房构成的,每个巢房都含有膏状分泌物质(图版 4-21-4、5),如果用手捏耳后腺,膏状物质就会从耳后腺表面的小孔处挤出来(图版 4-21-4),释放了分泌物的巢房就空了,可见到巢房的内壁呈肉红色(图版 4-21-5)。

(2) 显微结构 耳后腺的显微结构显示,它们就是背部皮肤增厚的部分,在其中除了存在粘液腺和规则颗粒腺,在整个真皮中可见到很大的腺体,形态像瓶状,成为瓶状大腺体(图版 4-20-1),下沉至致密层。这种瓶状大腺体内充满了网状嗜碱性物质(图版 4-20-1、2、5)。显微结构显示瓶状大腺体和颗粒腺一样为合胞体形式,在腺泡周围包绕有上皮肤(图版 4-20-6),顶部很明显被一个很厚的导管上皮细胞形成的塞子封住(图版 4-20-2),中央部位可见到很窄的缝隙。在塞子样的大导管周围分布有一种与粘液腺及颗粒腺不同的腺体,在此称为差别腺体(图版 4-20-2、3)。差别腺体也是单泡状腺体,腺腔内壁衬有一层分泌细胞,分泌细胞呈高柱状,围绕腺腔中心呈辐射状排列,分泌细胞内的有呈嗜酸性的物质。在表皮之下有普通的粘液腺(图版 4-20-4),只见到很少的规则颗粒腺。除了大瓶状腺体其它结构与体背侧皮肤显微结构相似,也有色素层、血管、颗粒腺、粘液腺等。此外,在表皮之下,大瓶状腺体顶部有团块状钙化层存在(图版 4-20-1、4)。

(三) 讨论

1 中华蟾蜍皮肤结构特点

中华蟾蜍表皮随部位不同其厚度不同,头背部表皮相对较厚,躯干背部,及富含颗粒腺处皮肤的表皮厚,体背部表皮和真皮中的色素细胞远远多于体腹部,还有体背部表皮的厚度也大于体腹部表的,这些对背部和腹部结构的差异具有很重要的

生态意义,背侧皮肤处于暴露状态,角质层角化程度深,形成保护层,防止体内水分蒸发。光线和温度会影响体背部色素的扩展和聚合,从而引起体色变化,因为能适应周围的生活环境防御和抵抗有害物的侵袭。在各部位表皮中经常存在表皮异常现象,如一团表皮细胞下陷到真皮疏松层、或表皮将疏松层包起来,或者表皮表面锯齿样不平,这些可能是对干旱的适应也可能是微生物侵入引起的。中华蟾蜍皮肤中血管和血窦较多,在表皮之下有大量血管,尤其是体侧部,在致密层中会有血窦穿过,血窦周围常有色素细胞。这些血管和血窦对中华蟾蜍皮肤提供丰富的营养,在血窦和颗粒腺的周围常有色素的存在,这为研究色素的功能可以提供资料。在中华蟾蜍的各部位表皮中也存在细杆状的细胞,这种细胞对蜕皮过程中固定表皮结构有一定的作用。中华蟾蜍中的粘液腺和颗粒腺的密度不大,这可能与中华蟾蜍体表不滑溜相一致。其粘液腺形态为典型的两栖动物皮肤粘液腺且只见到一种类型,与黑龙江林蛙、昆嵛林蛙、徂徕林蛙皮肤中的粘液腺相似,颗粒腺为两栖动物典型的颗粒腺。

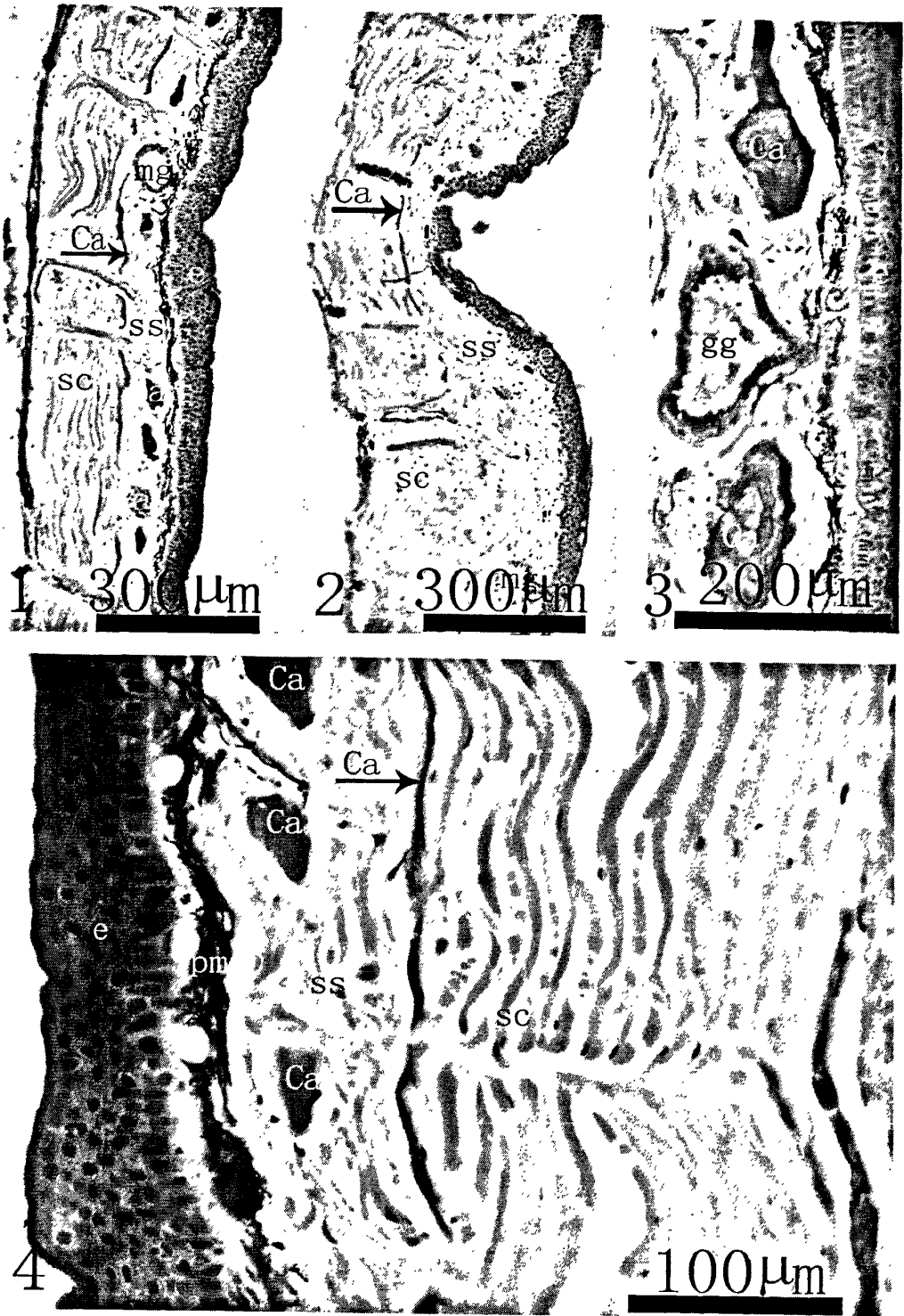
2 钙化层的存在及功能

钙化层有两种存在形式,一种是长条状平行于表皮位于疏松层和致密层之间,另外一种呈棉团状,位于疏松层中和腺体处于相似的位置。在中华蟾蜍的各部位尤其背部均存在长条状的钙化层,在头背部除了有条状的还有棉花团状的,偶尔也会在前后肢见到小的棉团状的钙化层。这说明中华蟾蜍适应于在少水的环境中生活,头背部是抵御干旱的主要部位。

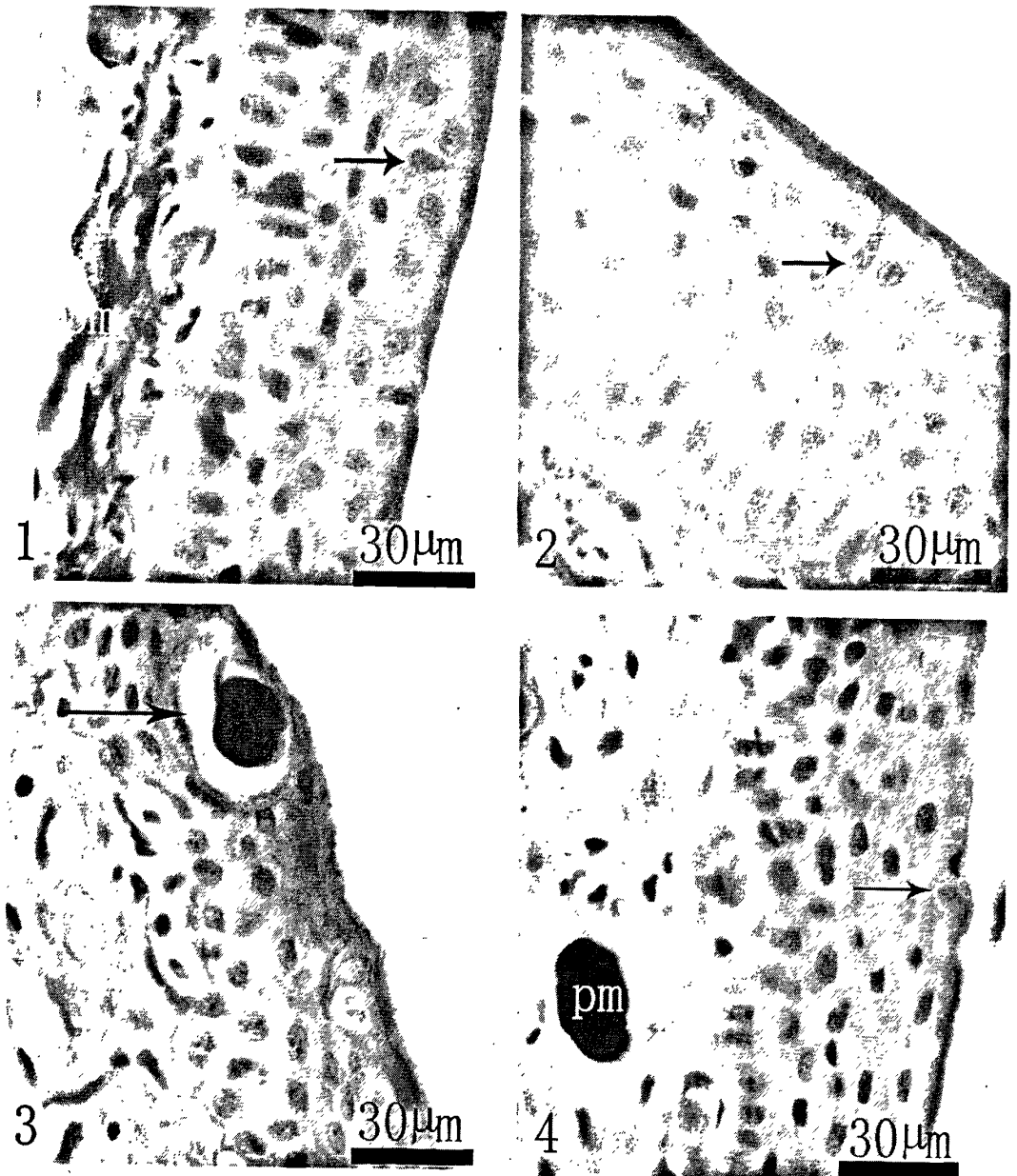
3 耳后腺的结构及适应性功能

中华蟾蜍的耳后腺与 Carlos 等在 *Rhinella jimi* 的耳后腺中观察到的大瓶状腺体及导管的形状相似。大瓶状腺体导管内部厚的上皮细胞可以被比作一个小的喷嘴。平时导管看起来是堵塞的,Carlos (2009) 等根据对 *Rhinella jimi* 的耳后腺的组织观察认为外力或者是叮咬压力是使单个巢泡内大瓶状腺体的毒液因为压迫导管内衬的上皮细胞而通过导管内部的狭缝喷射而出的原因,没有受到直接压力的耳后腺巢泡,保持相当的完整,并准备在下一次攻击中释放毒液。中华蟾蜍耳后腺与 *Rhinella jimi* 的耳后腺导管结构相似,故也认为中华蟾蜍耳后腺内毒液的释放也是在有外力时才发生。中华蟾蜍与 *Rhinella jimi* 一样在耳后腺表皮下方大瓶状腺体上方有钙化层的存在,无尾类皮肤一般情况下这层钙化层都位于腺体之下,本研究中这一层钙化层在耳后腺皮肤中不寻常的浅表位置,使得大瓶状腺体有一个更紧张的表面机械阻力,可能有助于当叮咬的瞬间打通内部毒液朝向导管的压力,迫使毒液通过裂缝释放。

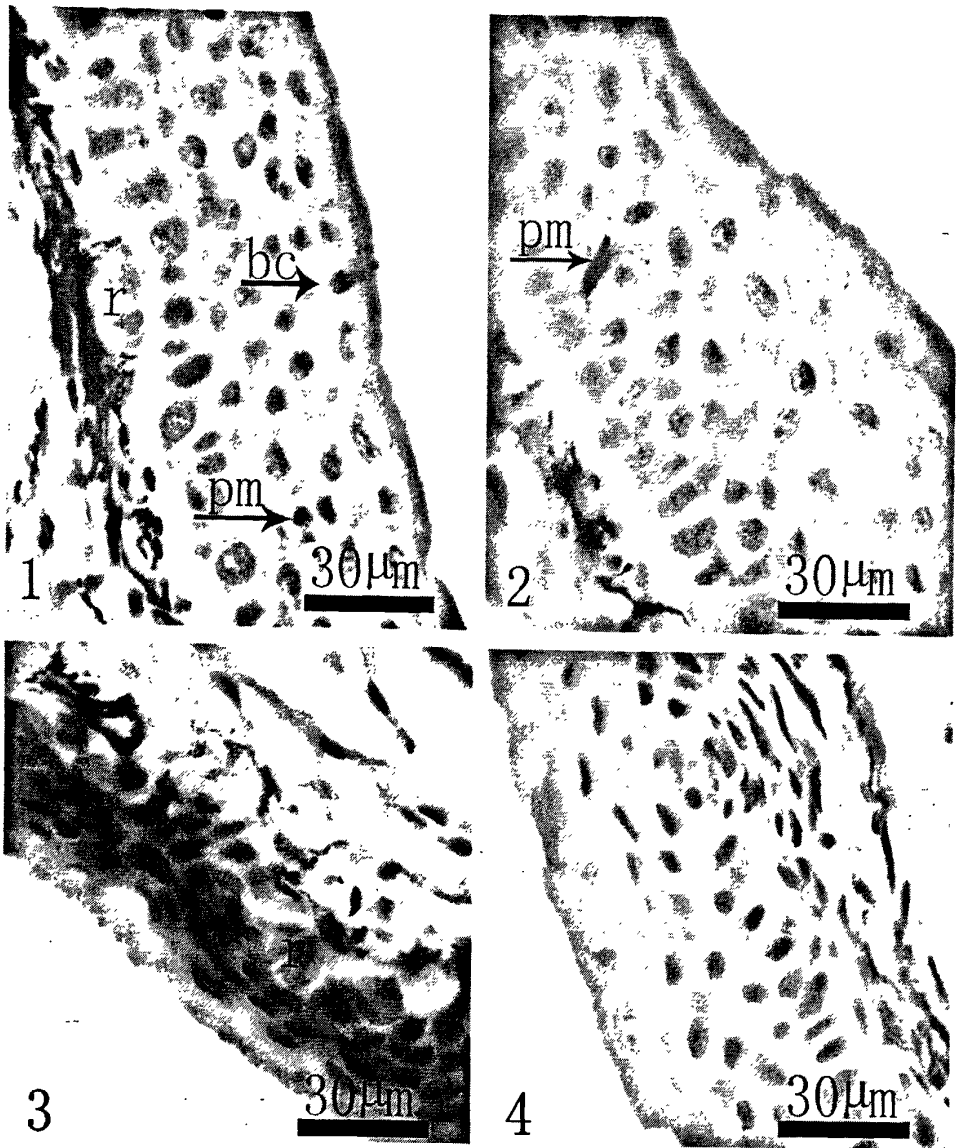
(四) 图版



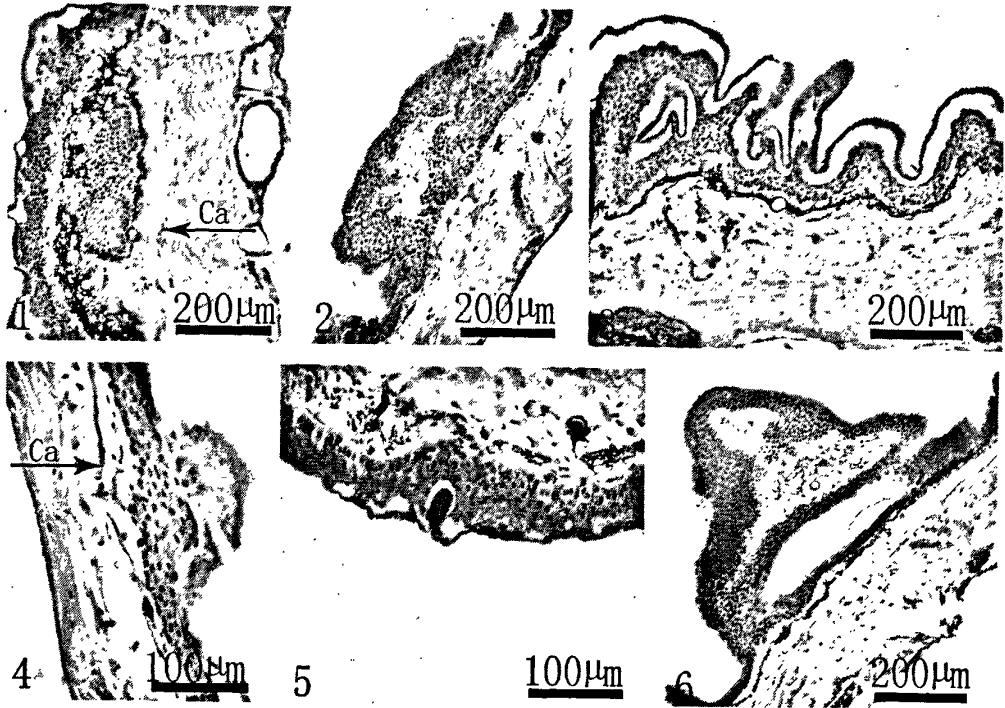
图版 4-12: 中华蟾蜍头部皮肤整体概况及钙化层
1、2 分别为头背部和头腹部皮肤结构图; 3(PAS)、4(HE)分别为头背部中钙化层的结构图



图版 4-13: 中华蟾蜍头部表皮示瓶状细胞及头背腹部的色素形态
1 (HE) 2(PAS) 中华蟾蜍头背部表皮示瓶状细胞;
3 (PAS) 4 (HE) 中华蟾蜍头腹部表皮示瓶状细胞

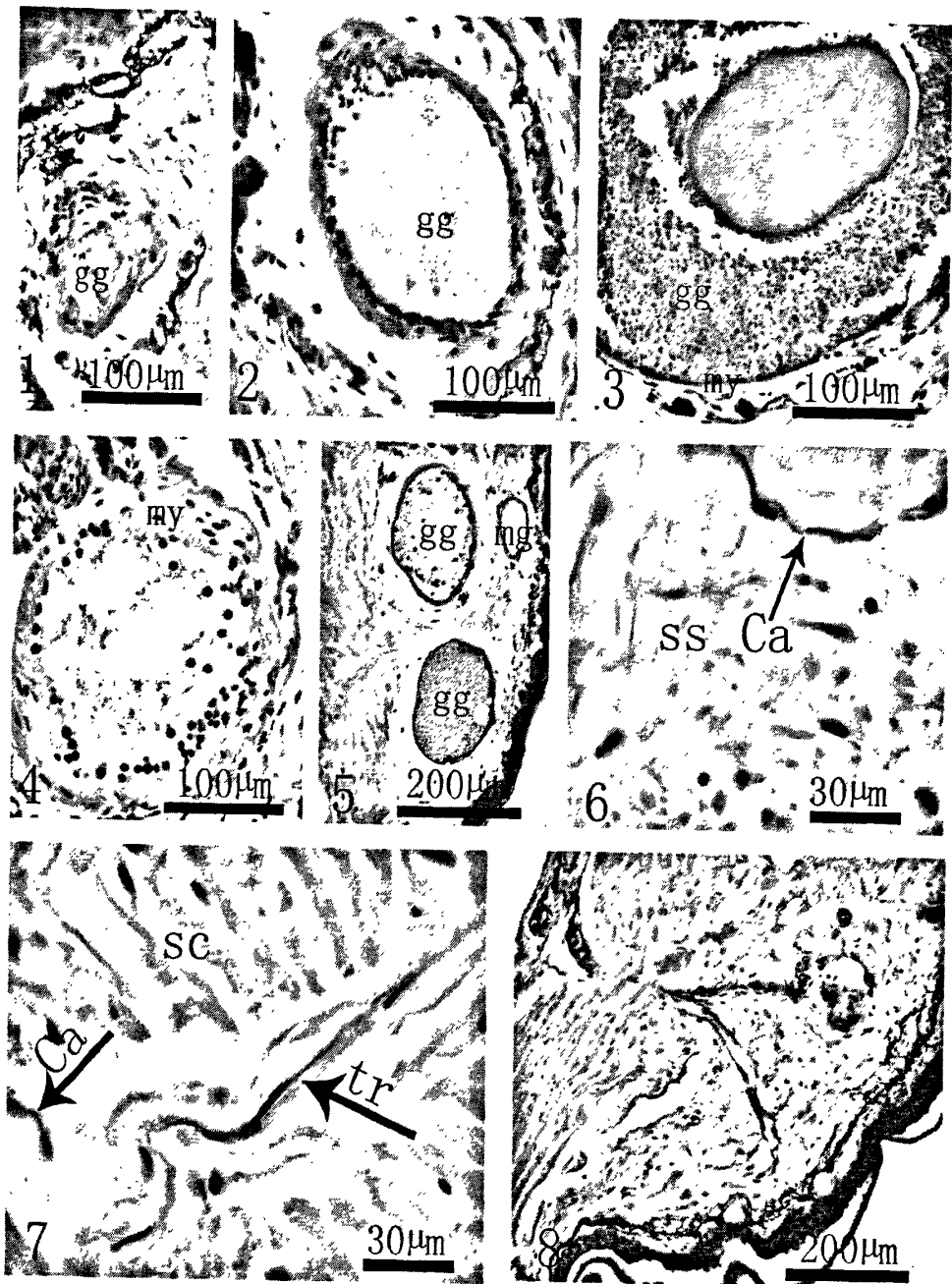


图版 4-14: 中华蟾蜍躯干背部、侧部和腹部表皮示其厚度有异
1 躯干背部表皮; 2 躯干背部颗粒腺含量较多的相对应的表皮;
3 躯干侧部表皮 4 躯干腹部表皮



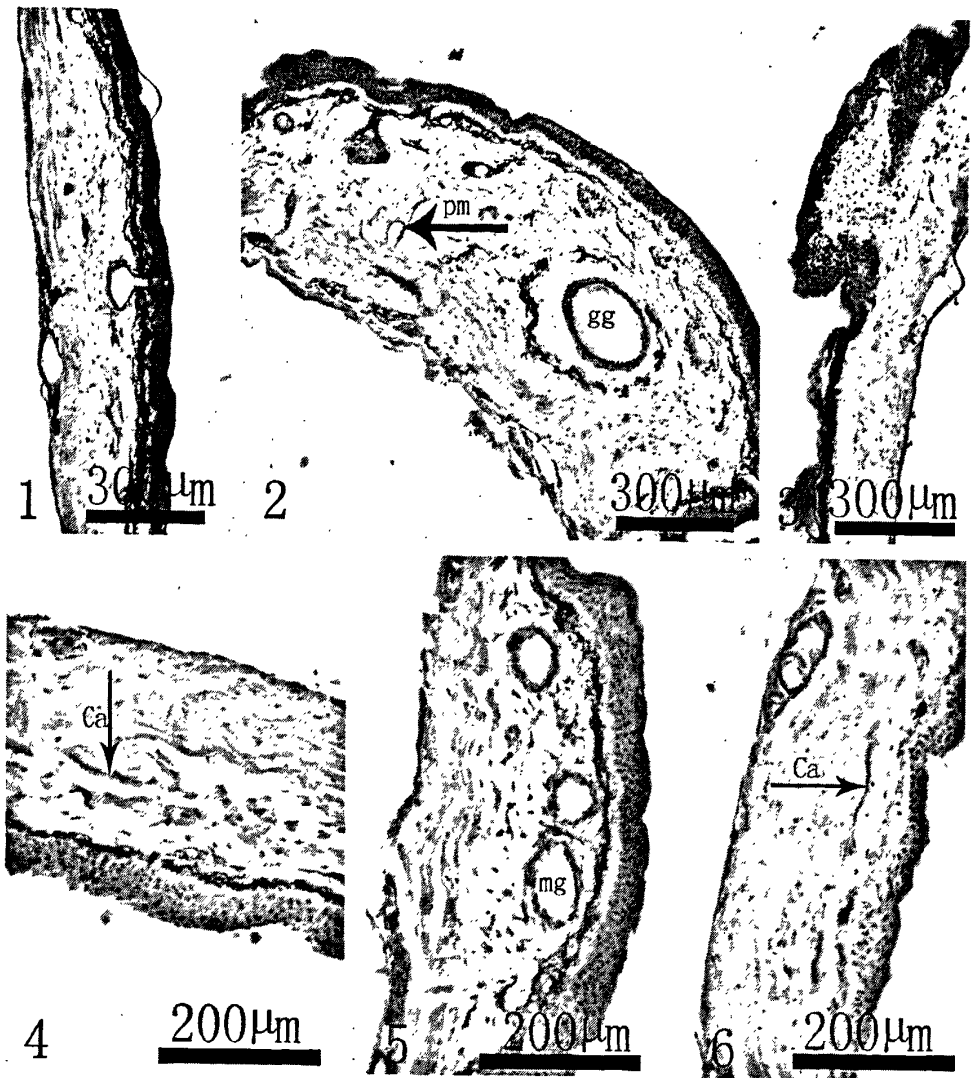
图版 4-15: 中华蟾蜍皮肤表皮的各种形态

- 1 雌性躯干背部表皮细胞下沉到疏松层中; 2 雄性前肢表皮; 3 雄性体侧部表皮;
4 雄性头腹部表皮; 5 雄性前肢表皮; 6 雌性前肢侧部表皮



图版 4-16: 中华蟾蜍颗粒腺及致密层、疏松层的显微结构图

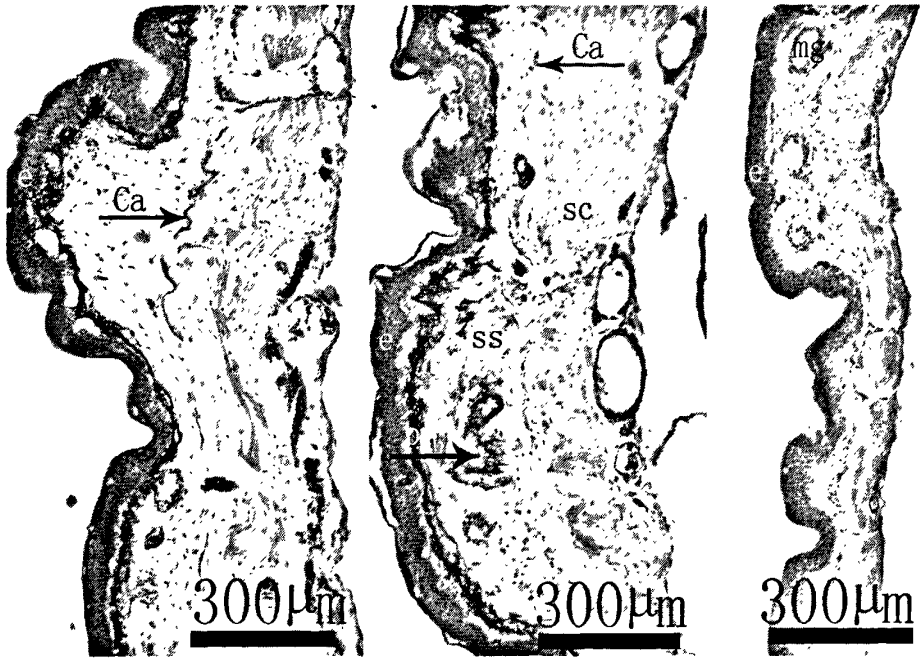
- 1 头背部皮肤颗粒腺; 2 躯干背部颗粒腺; 3 前肢侧部颗粒腺; 4 躯干侧部颗粒腺;
5 后肢侧部颗粒腺; 6 躯干背部皮肤疏松层; 7 躯干背部致密层中的钙化层及通道;
8 前肢侧部皮肤示贯穿真皮的血窦



图版 4-17: 中华蟾蜍前肢 (123) 后肢 (456) 三个部位的整体图

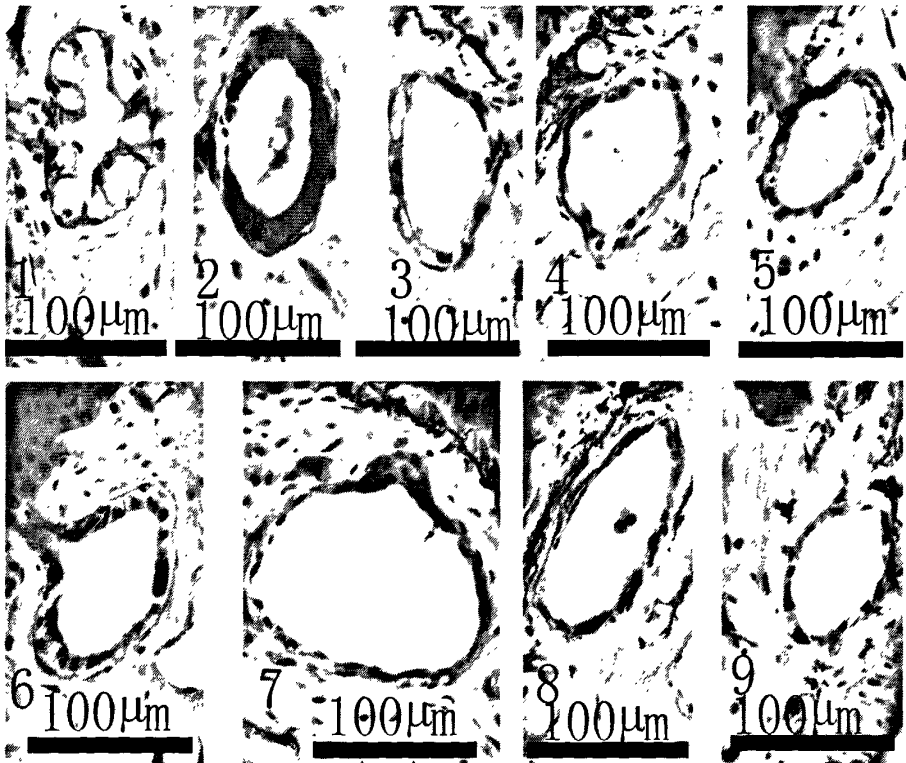
1、2、3 示中华蟾蜍前肢背部、侧部、腹部皮肤组织结构

4、5、6 示中华蟾蜍后肢背部、侧部、腹部皮肤组织结构



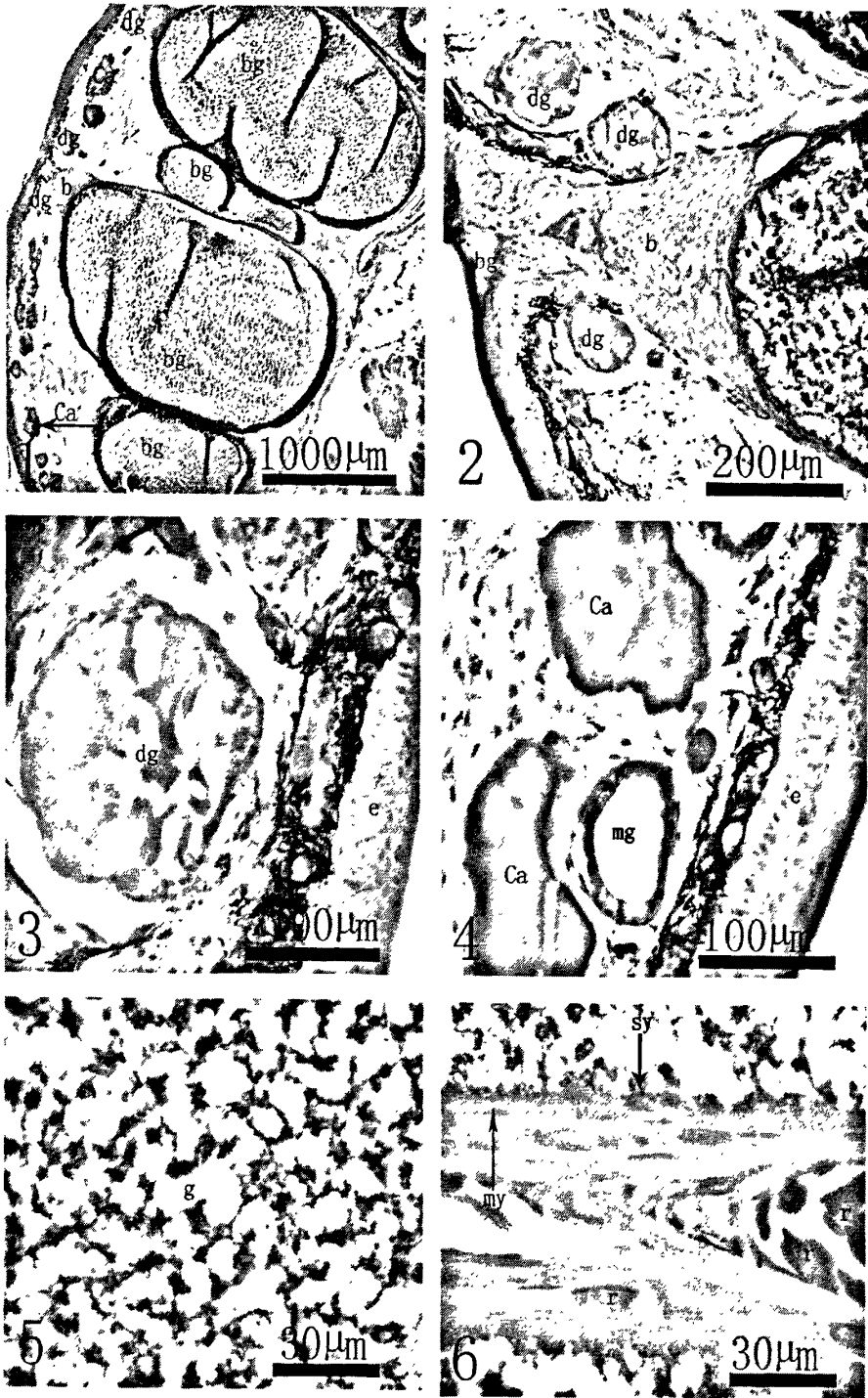
图版 4-18: 中华蟾蜍背、侧腹部整体皮肤

1 躯干背部皮肤组织结构; 2 躯干侧部皮肤组织结构; 3 躯干腹部皮肤组织结构



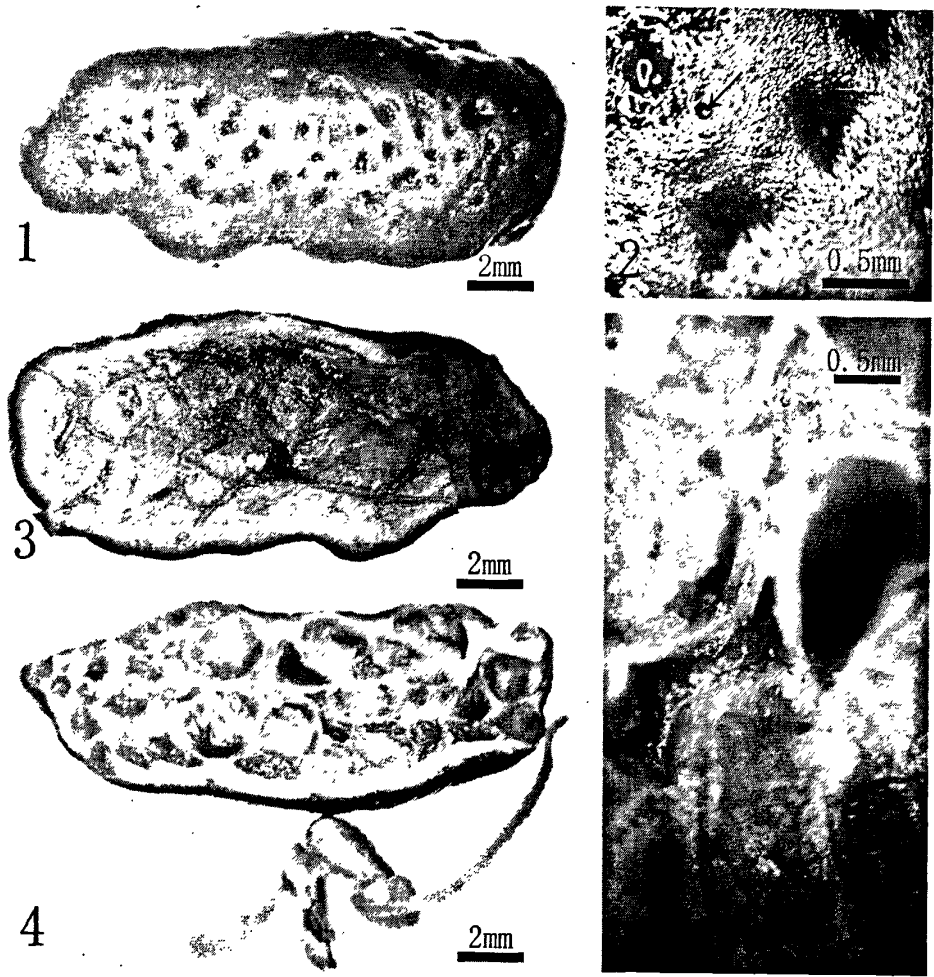
图版 4-19: 中华蟾蜍皮肤粘液腺显微结构

1 (HE) 2 (PAS) 后肢侧部皮肤粘液腺;
3 (HE) 4 (HE) 5 (HE) 躯干背部、腹部侧部皮肤粘液腺, 6 (PAS) 躯干腹部粘液腺;
7 (HE) 8 (PAS) 前肢侧部皮肤粘液腺; 9 (PAS) 后肢腹部粘液腺



图版 4-20: 中华蟾蜍耳后腺显微结构图

- 1 低倍显微镜下耳后腺组织结构; 2 大瓶状腺体导管 (b) 周围的差别腺体 (dg);
 3 高倍镜下导管周围的差别腺体 (dg); 4 耳后腺中的钙化层 (Ca) 好粘液腺 (mg);
 5 耳后腺中大瓶状腺体中网状嗜碱性分泌物质;
 6 大瓶状腺体相邻处, 示腺体周围的上皮肤 (my), 红细胞 (r) 和腺泡内部的合胞体 (sy)



图版 4-21: 中华蟾蜍耳后腺解剖结构图

1 蟾蜍耳后腺表面结构; 2 耳后腺表面的小孔, 箭头示小孔周围有更小的孔;

3 耳后腺下面的结构图示有较大的血管分布;

4 沿平行于表皮的面将耳后腺水平切开的内部蜂窝状结构;

5 示蜂窝状结构中充满了膏状分泌物, 及蜂窝状结构的肉红色的内壁

第五章 环渤海狭口蛙和陆泽蛙皮肤组织结构研究

一、狭口蛙皮肤组织结构的初步研究

北方狭口蛙 (*Kaloula borealis*, Barbour, 1908) 属于姬蛙科 (Microhylidae Günther, 1858), 狭口蛙属 (*Kaloula* Gray, 1831) 中的多疣狭口蛙种组 (*Kaloula verrucosa* group)。成体体长约 43 mm, 皮肤较厚且平滑, 背部有少数小疣, 腹面皮肤光滑。此蛙不善跳跃, 多爬行。生活时背面呈浅棕色或橄榄棕色。体侧至肩部有深浅相间的网状花斑。成蛙生活于 50-1200m 地区的水坑附近的草丛中或土穴内或石下 (费梁, 2009)。

(一) 材料与方法

1 材料

沈阳师范大学校园内采北方狭口蛙一只 SYNU09080991, 体长 39.06mm。

2 方法

常规石蜡切片制作, HE 染色, OLYMPUS-BX50 显微镜观察与测量。

(二) 研究结果

北方狭口蛙个体较小, 头部较尖, 身形较团, 四肢较短。活体时呈墨绿色, 身上有些花纹, 当它受到刺激时, 体表很快会弥漫白色牛奶状的黏胶状液体, 用手一捻, 就成为不容易捻碎的胶体, 解剖镜下观察, 其体表分布有极多的小孔, 这也是狭口蛙的特别之处。

1 皮肤显微结构观察

北方狭口蛙皮肤的厚度从躯干背部至腹部逐渐减小 (图版 5-1), 其皮肤的基本结构与其它两栖类相同, 均是表皮和真皮构成。表皮是由多层扁平上皮细胞构成, 真皮中含有色素层、血管、粘液腺、颗粒腺及钙化层还有穿过真皮到达表皮的细胞通道等, 但是狭口蛙的特别之处是颗粒腺的形态及大小与其它蛙的有很大差别, 粘液腺与其它蛙的也有些不同。

(1) 表皮 躯干部位表皮一般 4-5 层, 从内而外分别为生发层、颗粒层、角质替代层和角质层。最内层为生发层, 生发层细胞呈高柱状排列较紧密, 细胞核长椭圆形相对较大, 向外是颗粒层包括 1-3 层细胞, 向外逐渐变扁, 在这一层中可见到细胞核浓缩细胞质出现空白的一些细胞 (图版 5-2-1), 再向外为角质替代层, 一般包括 1-2 层细胞, 细胞核染色较深, 细胞及细胞核的形态很扁 HE 染色也加深, 最外层为角质层, 角质层角化最深, 与角质替代层之间结合较紧密 (图版 5-2-1、2), 在腹部表皮见到表皮表面两层稍有缝隙的现象 (图版 5-2-3)。没有发现蜕皮现象 (图

版 5-1)。

(2) 真皮 躯干部位真皮也包括两大层,紧贴表皮的外层为疏松层,其中含有色素细胞、血管、颗粒腺、粘液腺、钙化层等,下面为致密层。

颗粒腺 数量多,在躯干半侧环剥皮肤中分布十分密集,一个挨一个,尤其是在躯干背部及侧部的皮肤中(图版 5-1)。形态大,呈长椭圆形(图版 5-3-1),在躯干背部椭圆形颗粒腺的长轴垂直于表皮,短轴平行于表皮,位于正背部的颗粒腺的长轴与短轴都最长,从背部到腹部颗粒腺的长短轴均变小,这也使得躯干背部皮肤最厚。狭口蛙的颗粒腺的形态和蟾蜍的耳后腺中的大腺体相似,只是导管部位不是一个由导管细胞构成塞子,而是一个较大的孔(图版 5-1-3、6)。颗粒腺外面也有上皮肌细胞,分泌细胞也构成合胞体腺体内含有圆形嗜酸性极细的颗粒,也有很少的较大的圆形颗粒(图版 5-3-3),也可看到这些颗粒腺内的颗粒有溶解现象。

粘液腺 为单泡状腺体,腺泡外的上皮肌很细,不明显,分泌细胞内衬与腺腔内。粘液腺数量也远少于颗粒腺,位于躯干背部的粘液腺形态比位于躯干侧部和腹部的粘液腺小,分泌细胞形态也不相同。位于躯干背部的粘液腺的分泌细胞中等高柱状,细胞内含有均质嗜酸性物质,细胞核卵圆形位于分泌细胞基部(图版 5-3-2)。这一点不同于在蟾蜍及林蛙皮肤中观察到的普通的粘液腺。位于躯干侧部或腹部的粘液腺稍大,分泌细胞较矮或呈鳞片状(图版 5-3-4、5),细胞核位于分泌细胞的基部、中部或顶部。分泌细胞中含有 HE 染色很淡的均质或泡状物质。

钙化层 在狭口蛙躯干部位颗粒层之下致密层之上有基本连续的钙化层(图版 5-1;图版 5-3-1、4、5)。

色素细胞 色素细胞主要位于躯干背部(图版 5-1-1~18)的表皮之下疏松层上部,在表皮中似乎没有色素细胞。

穿过真皮到达表皮的细胞通道 在狭口蛙躯干部位皮肤中都含有通道细胞(图版 5-2-2、4)。

(三) 讨论

为了与林蛙、蟾蜍皮肤的结构进行比较,现取一只北方狭口蛙进行对比研究,初步得出狭口蛙的皮肤结构特点。

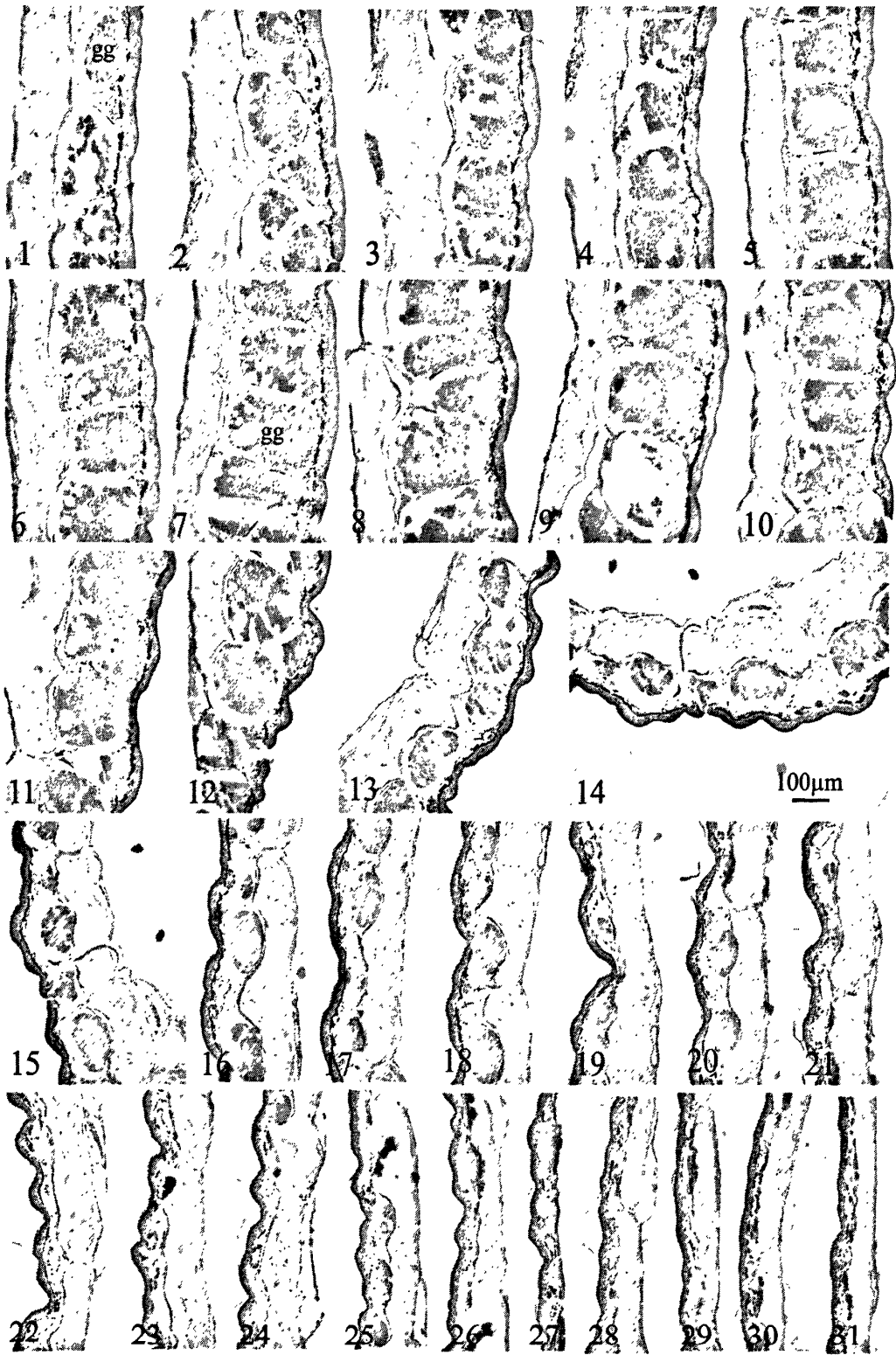
1 狭口蛙结构特点与生活环境的适应

狭口蛙躯干部位表皮较薄,其中躯干背部稍厚于侧部和腹部,表皮角化程度浅,角质层细胞排列紧密,有利于皮肤呼吸及防止水分蒸发。表皮中未见色素细胞,真皮中的色素层较薄,色素细胞呈水平条状,相互连接成一层。另外在粘液腺下方,颗粒腺之间也有色素细胞存在。钙化层位于颗粒腺与致密层交界处,在躯干半侧环剥处基本上呈连续的一层,这可能与狭口蛙生活在土穴或草堆里有关。在狭口蛙中也存在贯穿真皮到达表皮的细杆状细胞。

2 颗粒腺、粘液腺的形态、大小、数目的分析

狭口蛙躯干背部皮肤很厚，这是因为在背部皮肤中含有紧密排列着的颗粒腺较大所致。这种颗粒腺内充满了嗜酸性极细颗粒，分泌细胞也呈合胞体状态，狭口蛙有如此多的颗粒腺可能与其在土穴中生活相关系。其分泌物的性质有与两栖动物皮肤中典型的颗粒腺的不同，亦与研究中的其它两栖动物皮肤中的颗粒腺差别很大。形态与蟾蜍耳后腺中的瓶状大腺体相似，但是导管不是导管上皮细胞构成的塞子而是一个孔，有关其确切功能应该很有研究价值。粘液腺数目少，形态也小，可分为两种形态的粘液腺，与本研究的其它两栖类皮肤中的粘液腺不相同。在狭口蛙皮肤中的颗粒腺粘液腺的形态显示其在许多方面至今所研究的其他两栖类不同。

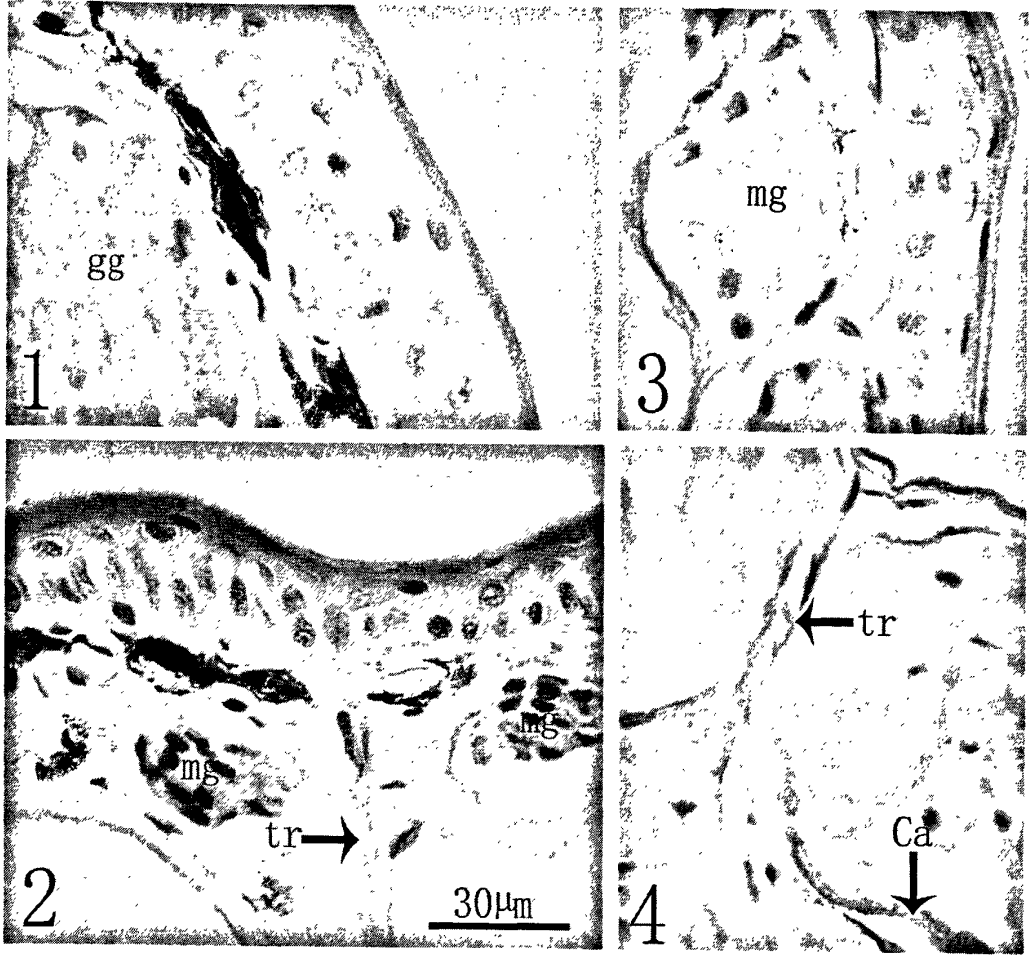
(四) 图版



图版 5-1: 狭口蛙躯干半侧环剥皮肤横切面显微结构图

1-11 躯干背部皮肤显微结构; 12-20 躯干侧部皮肤显微结构图

21-31 躯干腹部显微结构图



图版 5-2: 狭口蛙躯干背部、侧部、腹部表皮及躯干侧部贯穿真皮的细胞通道

1 躯干背部表皮显微结构; 2 躯干侧部表皮显微结构

3 躯干腹部表皮显微结构; 4 躯干侧部贯穿真皮的细胞通道



图版 5-3: 狭口蛙躯干部位腺体

1 躯干背部皮肤显微结构及其内颗粒腺和粘液腺; 2 躯干背部皮肤中的粘液腺

3 躯干背部皮肤中颗粒腺内的颗粒; 4、5 躯干侧部皮肤中的粘液腺

二、泽蛙皮肤组织结构的初步研究

泽蛙又称陆泽蛙 (*Fejervarya multistriata*, Hallowell, 1860) 属于蛙科 (Ranidae Rafinesque-Schmaltz) 叉舌蛙亚科 (Dicroglossinae Anderson, 1871) 陆蛙属 (*Fejervarya* Bolkay, 1915), 背部皮肤粗糙, 有长短不同的纵肤棱。泽蛙体形较小食量很大, 主要吞食害虫, 能有效控制虫害。泽蛙的多种器官还有药用功能, 据《中国药用动物志: 第二册》(1983: 281) 记载皮肤能清热止痛, 主治疮疖。

(一) 材料与方法

1 材料

采于宁波的四月份的泽蛙一只, 体长 37.35mm。

2 方法

常规石蜡切片制作, HE 染色, OLYMPUS-BX50 显微镜观察与测量。

(二) 研究结果

泽蛙皮肤结构与其它两栖类皮肤结构相似, 均包括表皮和真皮, 真皮输送层中含有色素层、血管、腺体等。泽蛙的特别之处是, 在其躯干半侧环剥中没有见到典型的颗粒腺, 只观察到粘液腺和一种腺泡内含有小泡的腺体。

1 表皮结构

表皮是由多层上皮细胞构成, 一般 4-6 层, 最内层是生发层, 生发层细胞呈高柱状, 最外层为角质层, 角质层角化程度较浅, 可见到蜕皮现象 (图版 5-4-2)。躯干背部表皮中有色素颗粒及色素细胞存在 (图版 5-4-1)。

2 真皮结构

上层为表皮之下的疏松层, 下层为致密层。

(1) 颗粒腺 在泽蛙躯干部位皮肤中没有观察到典型的颗粒腺, 只观察到腺腔内有泡的腺体 (图版 5-5-4)。

(2) 粘液腺 在泽蛙躯干部位皮肤中粘液腺数量多, 尤其在躯干背部皮肤中, 排列密集 (图版 5-6-1~10)。粘液腺形态较典型, 腺腔内壁衬有一层分泌细胞, 分泌细胞呈矮柱状, 腺腔内中空, HE 染色下分泌细胞着色很淡, 细胞核卵圆形位于分泌细胞的顶部、中部或基部。

(3) 色素层 位于表皮之下疏松层的上部, 在粘液腺的下方也有色素细胞 (图版 5-5-1、5)。

(4) 钙化层 钙化层是钙化的胶原纤维也是皮肤内骨骼的一种, 在腺体之下致密层之上有基本连续的钙化层 (图版 5-5)。

(5)贯穿真皮的通道细胞 在泽蛙躯干部位皮肤中亦有贯穿真皮到达表皮通道细胞(图版 5-7)。

(三) 讨论

除了选择一只狭口蛙做对比研究外,还选择了一只泽蛙,对其皮肤基本结构进行了初步研究。

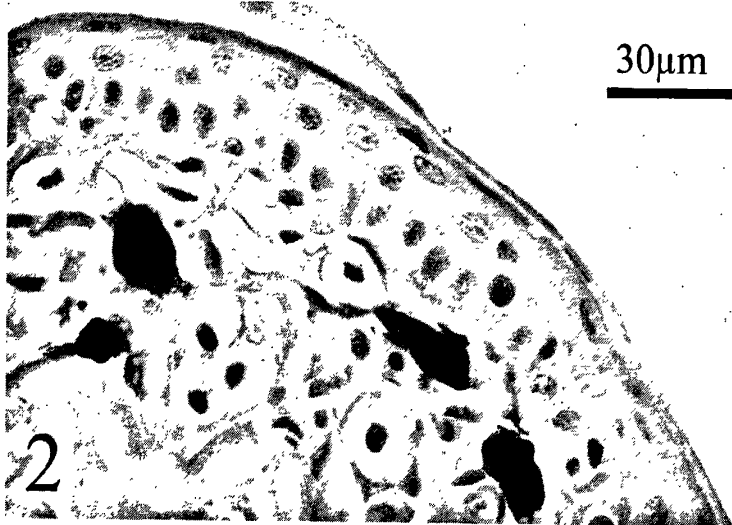
1 皮肤基本结构特点与环境的适应性

躯干部位表皮厚度不一致从背部到腹部表皮变薄,但是正腹部表皮厚有时候比背部表皮为厚,角质层角化程度浅,有蜕皮现象。色素层中的色素细胞基本上呈斑块状稠密地排列在体背部和侧部的真皮疏松层上部表皮之下,另外在躯干背部表皮中和粘液腺的下方也有色素细胞,色素细胞对于维持体色具有重要作用。在疏松层与致密层交界处有大致连续的钙化层,这有利于泽蛙防御干旱,适于陆地生活。在泽蛙表皮中也有贯穿于真皮的细杆状细胞,在蜕皮中起固定表皮的作用。

2 皮肤腺体的特殊性

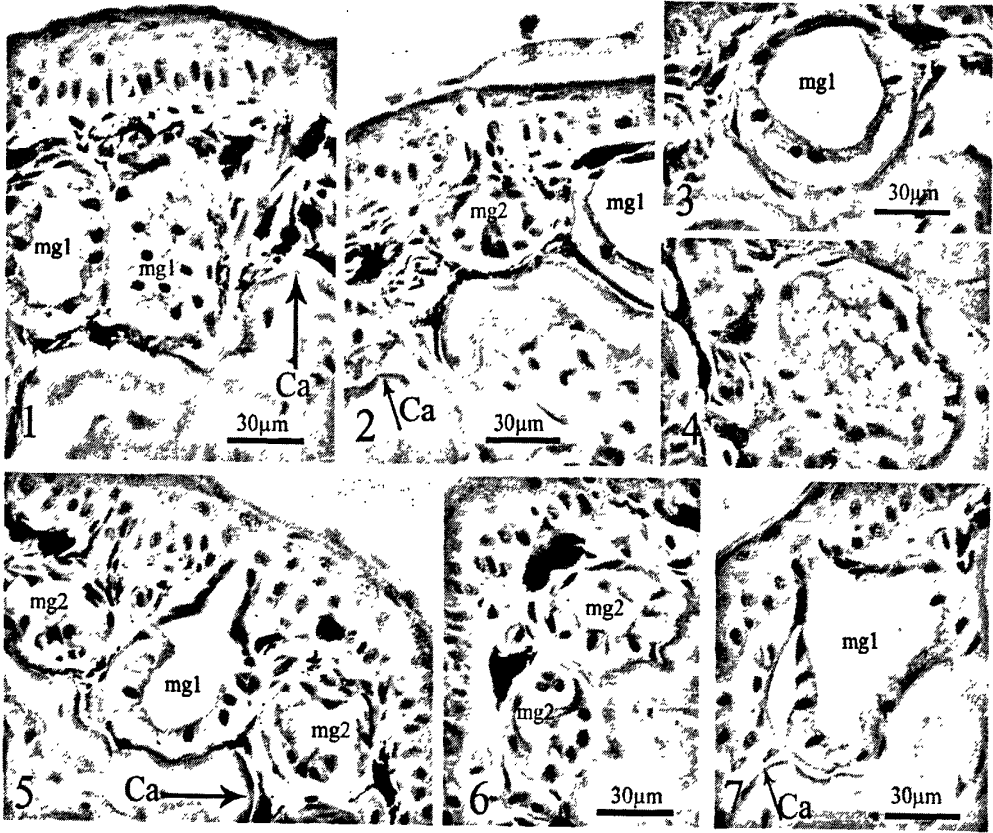
腺体分泌物是在微生物诱导下合成的,微生物的存在也是维持腺体正常形态的因素,蛙的皮肤腺体在细菌存在的情况下具有正常的结构如细胞核位于细胞的边缘,细胞质颗粒慢慢地释放填充到腺腔中。相反,在有抗生素存在的情况下,腺体再生受损,腺细胞不能扩大,细胞核位于中央,无细胞质颗粒(Mangoni, 2001)。泽蛙躯干部位含有大量的粘液腺,粘液腺排列很稠密,形态和无尾两栖动物皮肤中典型粘液腺相似,即腺腔中空,HE染色分泌细胞呈矮柱状,但是细胞核位于分泌细胞的顶部或中部,也有位于基部的。这里细胞核所处的位置是否为正常状态,还需进一步研究。Tatsunori(1995)报道,在海蛙(*Rana cancrivora*)皮肤见到三种类型的腺体:粘液腺、混合腺和泡状腺,并认为泡状腺可能就是颗粒腺的分泌颗粒释放完后的所处的泡状阶段。这与在泽蛙躯干皮肤中没有见到典型颗粒腺,只见到数量很少的泡状腺体相似,海蛙是生活高盐环境中这三种腺体均是对高盐环境的适应,所以对泽蛙腺体有做免疫组织化学研究的必要。

(四) 图版



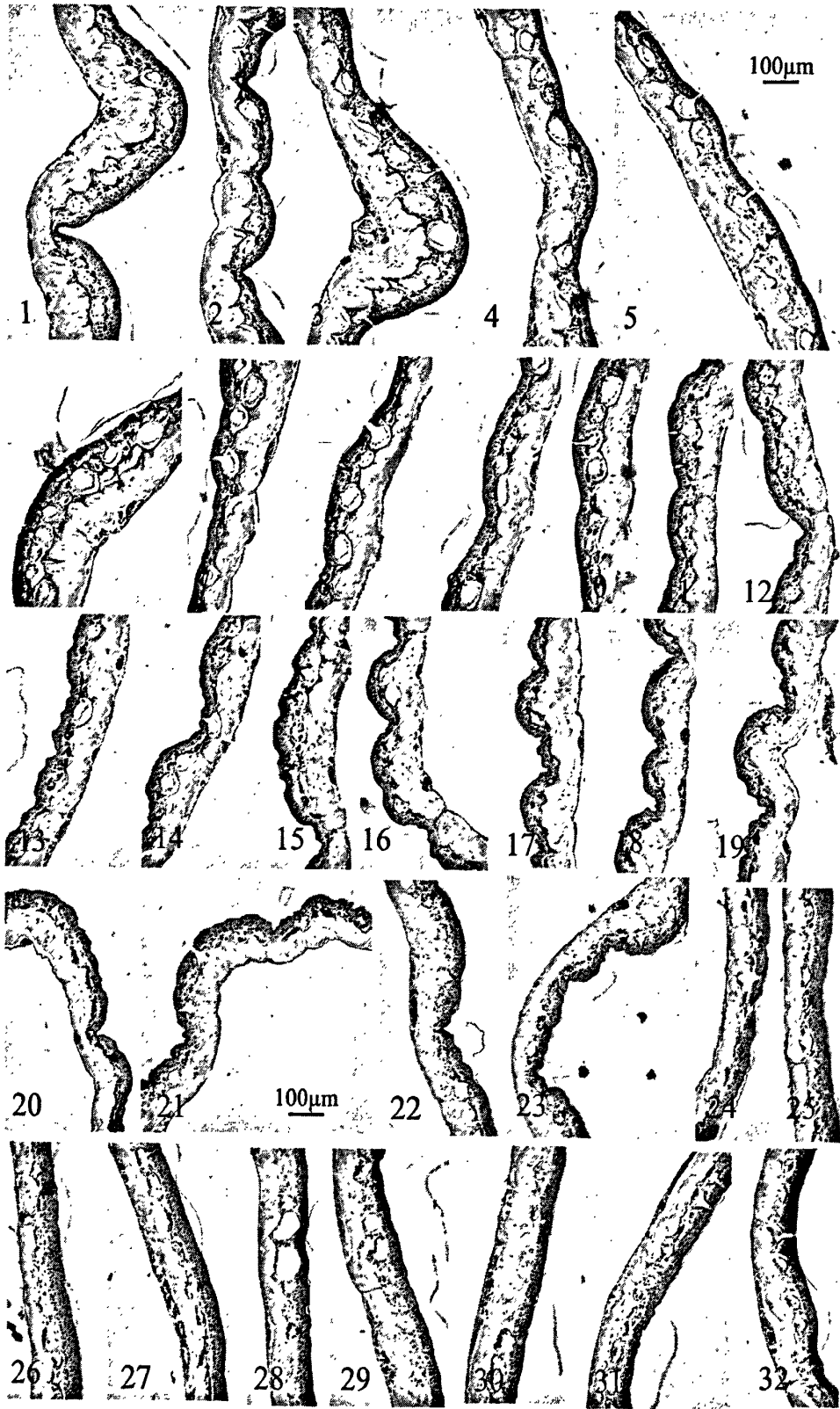
图版 5-4: 泽蛙躯干背部、侧部、腹部表皮结构

1 躯干背部皮肤结构; 2 躯干侧部皮肤结构; 3 躯干腹部表皮结构

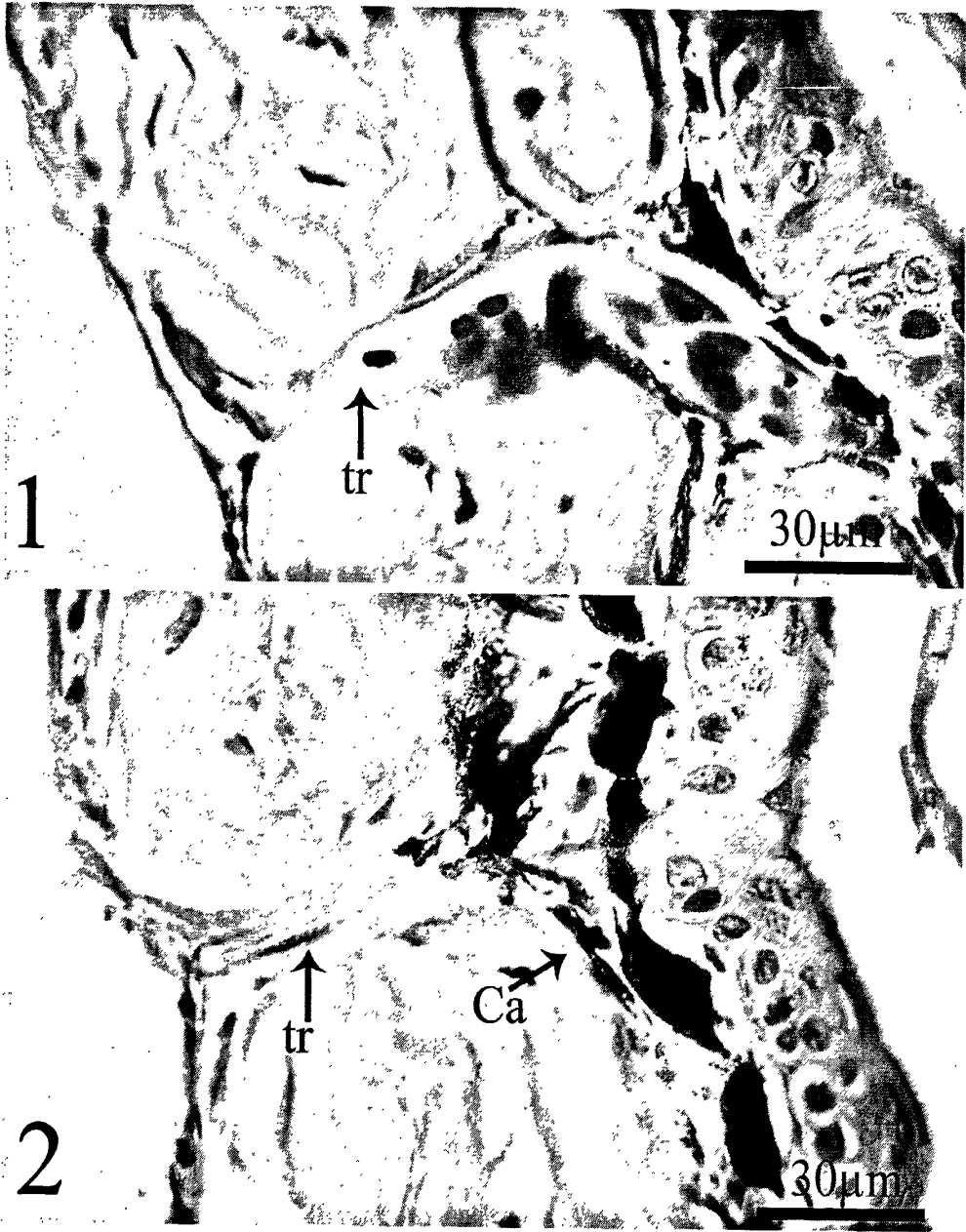


图版 5-5: 泽蛙躯干部位腺体

1、2、3 示躯干背部粘液腺; 4 躯干侧部泡状腺体;
5、6 躯干侧部粘液腺体; 7 躯干腹部粘液腺体



图版 5-6: 泽蛙躯干半侧环剥皮肤组织结构
1~12 从背中线开始的躯干背部皮肤组织结构;
13~23 躯干侧部皮肤组织结构; 24~32 躯干腹部皮肤组织结构



图版 5-7: 泽蛙躯干背部真皮通道及钙化层

1 躯干背部贯穿真皮的通道 (tr); 2 真皮通道 (tr), 钙化层 (Ca)

结 论

无尾两栖动物是一种重要的生物类群，其皮肤是一种重要的生物资源。无尾两栖动物皮肤的基本结构相似，即包括表皮和真皮，真皮中富含腺体，但是无尾两栖动物种类复杂多样，每个物种的皮肤结构在一些细节上又具有特殊性。本文主要运用组织学方法研究了分布于环渤海区域的无尾两栖类黑龙江林蛙、中国林蛙、昆嵛林蛙、徂徕林蛙、东北林蛙、花背蟾蜍、中华蟾蜍、狭口蛙和泽蛙 9 个种的皮肤的组织结构。初步得出以下结论：

一、五种林蛙和两种蟾蜍头背部表皮均较厚，在躯干部位皮肤中躯干侧部皮肤最薄，表皮之下毛细血管相对较多，背部皮肤比正腹部皮肤稍厚而雌性躯干腹部表皮厚于背部表皮。

二、钙化层是钙化的胶原纤维也是皮肤内骨骼的一种，在所研究的 9 种动物中除了花背蟾蜍，其余 8 种动物各部位尤其是体背部存在间断的条状钙化层，头背部钙化层条最宽最明显。在中华蟾蜍皮肤中除了有条状钙化层外，在头背部还有棉花团状的钙化结构，位于表皮之下疏松层中，排列成一层，偶尔在前后肢一可以见到棉花团状钙化结构。

三、在这 9 个动物的皮肤中均观察到细杆状细胞，细胞核位于表皮中，细胞的基膜可以下伸到真皮之下，Linsenmair (1999) 报道这种细胞富含张力原纤维，因此，推测这种细胞潜在的功能应该是一种支持细胞。

四、在繁殖期雄性黑龙江林蛙、中国林蛙、昆嵛林蛙的躯干部位均有一种特殊的腺体，根据国外有关报道，将这种腺体称为特殊粘液腺。但是 4 月份的雄性徂徕林蛙躯干部位皮肤中没有这种腺体。雄性黑龙江林蛙躯干背部侧部腹部皮肤中均含有特殊粘液腺，且位于腹部的着色深于位于背部的，而雄性中国林蛙和昆嵛林蛙皮肤中特殊粘液腺只分布于躯干背部。

五、本文还研究了怀卵期（3 月份）和冬眠前期（9 月份）的中国林蛙雌性的皮肤结构，发现二者在腺体形态和数目上存在很大差别。怀卵期躯干部位皮肤中颗粒腺饱满，粘液腺形态很大腔内排列一层分泌细胞，分泌细胞呈高柱状，细胞内和腔内均充满了嗜碱性的絮状物，还可见到随着嗜碱性分泌物的排出，分泌细胞变短的情形，这种形态大而富含分泌物的粘液腺在腹部稠密分布。冬眠前期的雌性中国林蛙颗粒腺和粘液腺数目都少于怀卵期，粘液腺多中空，分泌细胞呈矮柱状，躯干背部腺体变扁有退化现象。

六、花背蟾蜍皮肤中的粘液腺形态与典型的无尾两栖类粘液腺稍有不同，其分泌细胞呈高柱状，根据着色情况至少有两种类型的细胞，腺腔很小，偶尔在粘液腺的分泌细胞中可见到嗜酸性的分泌颗粒，这一点非常有别于典型的粘液腺。

七、颗粒腺和粘液腺是两栖类皮肤中普遍存在的腺体，具有典型的形态结构，但是狭口蛙皮肤中腺体尤其是颗粒腺的形态和分布与其它 8 种无尾两栖动物完全不同。狭口蛙皮肤中的颗粒腺形态大，和蟾蜍的耳后腺中大瓶状腺体形态相似，椭圆形，数量很多，稠密地排列于疏松层中，躯干背部中颗粒腺的长轴垂直于表皮表面，随着向躯干腹部过渡，垂直于表面的轴逐渐变短，这使得狭口蛙躯干背部皮肤很厚。粘液腺数量很少，根据分泌细胞的形态，很明显狭口蛙皮肤中至少有两种形态的粘液腺，粘液腺的形态与两栖类皮肤中典型的粘液腺也不很一致。

八、泽蛙与其它 8 种无尾两栖动物不同之处在于，在 4 月份泽蛙躯干皮肤粘液腺数量很多，在躯干背部和侧部基本上挨着排列于疏松层中，形态也较典型，没有见到典型的颗粒腺，只是见到少量的泡状腺体。

在这几种无尾两栖动物中还有许多需要进一步研究的，如特殊粘液腺是否是一类婚腺，还需要对相应林蛙的婚垫进行研究，观察婚垫中的腺体与特殊粘液腺是否相似或相同，还有雄性徂徕林蛙皮肤中是否存在特殊粘液腺也需要对其它月份的雄性个体进行比较，同时也需要同一时期雌雄个体的比较；对各种林蛙皮肤还有进一步研究的必要以为分类提供依据。由于时间有限，不能完成这么多内容，本研究论文只是初步得出了不同物种腺体形态不同，同一物种不同时期腺体形态亦不同。

参 考 文 献

- [1] 成令忠, 钟翠平, 蔡文琴, 现代组织学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003, 712~717.
- [2] 韩彤彤. 东北林蛙皮肤抗菌肽抗病毒活性的初步研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2006.
- [3] 曹燕, 谢锋, 江建平. 齿突蟾属四个物种皮肤的组织学观察[J]. 四川动物, 2011.
- [4] 费梁, 胡淑琴, 叶昌源, 等. 中国动物志[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 967~1033.
- [5] 耿欣莲. 大蟾蜍 (*Bufo bufo gargarizans* Cantor) 皮肤在不同季节中的组织学观察[J]. 动物学报, 1959, 11 (3) : 314-318.
- [6] 郭宪光, 张耀光, 王志坚, 等. 中华蟾蜍血细胞的观察[J]. 四川动物, 2002, 21(4): 211-213
- [7] 国家药典委员会. 2000. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社. 316-317.
- [8] 金莉莉. 东北林蛙皮肤抗菌肽及其生物学特性[D]. 沈阳: 中国医科大学博士学位论文, 2009.
- [9] 李洋, 金磊, 李春昌, 等. 黑斑蛙、虎纹蛙、牛蛙皮肤的比较组织学[J]. 安徽师范大学学报. 2009, 32(5): 466-470.
- [10] 林文达, 朱静, 郭爱伟, 等. 云南昆明地区三种蛙皮肤显微结构的比较[J]. 四川动物, 2008, 27(3): 420~423.
- [11] 刘秀红. 黑带蛙(*Rana nigrovittata*)皮肤抗菌肽的分子多样性、结构与功能研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文. 2008.
- [12] 刘满樱, 肖向红, 徐佳佳, 等. 东北林蛙皮肤及其腺体组织形态学观察[J]. 野生动物杂志, 2007, 28 (4): 6~9.
- [13] 陆宇燕, 王健, 刘新海, 等. 爪鲵皮肤的显微结构和呼吸作用[J]. 四川动物, 2004, 23(3): 181~182.
- [14] 邵世光, 嵇庆. 金线蛙冬眠期与冬眠后期皮肤角质层显微结构的观察[J]. 连云港教育学院学报, 1994, (4): 64-66.
- [15] 王玉洁, 符坚, 刘楠等. 重要的生物资源黑色素及其生理功能[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(1): 12~14.
- [16] 吴文英, 李丕鹏, 陆宇燕等. 黑龙江林蛙繁殖期两性皮肤组织结构的差异比较. 野生动物杂志.
- [17] 吴文英, 李丕鹏, 陆宇燕. 花背蟾蜍和中华蟾蜍皮肤腺体及耳后腺体的比较组织学研究. 蛇志, 2011 23(1): 20-25.
- [18] 赵建文, 银欢, 付文双, 周文华. 花背蟾蜍人工养殖技术的初探[J]. 中国比较医学杂志, 2007 17(8): 60.

- [19] 张贤芳, 张耀光, 王志坚, 等. 中华蟾蜍皮肤的组织学观察[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(5): 454-457.
- [20] 向德超, 陈昌琼, 何竹. 大蟾蜍耳后腺显微和超显微结构的观察[J]. 四川动物, 1993, 12(1): 11-14.
- [21] 杨纯, 张育辉, 崔慧婷. 中国林蛙婚垫的显微结构变化及其与辜酮的关系[J]. 动物学研究, 2005, 26(6): 638-644.
- [22] Alvarado RH, Moody A. Sodium and chloride transport in tadpole of the bullfrog *Rana catesbeiana*[J]. *Am J Physiol*, 1970, 218: 1510-1516.
- [23] Amey AP, Grigg. Lipid-reduced evaporative water loss in two arboreal hylid frogs[J]. *Comp Biochem Physiol A*, 1995, 111: 283-291.
- [24] Blaylock LA, Ruibal R, Platt-Aloia K. Skin structure and wiping behavior of Phyllomedusine frogs[J]. *Copeia* 1976: 283-295.
- [25] Bouwer S, Ewer DW, Shiff C. Frequency of moulting in Anura[J]. *Nature*, 1953, 172(4374): 408.
- [26] Bovbjerg AM. Development of the glands of the dermal plicae in *Rana pipiens*[J]. *J Morphol*, 1963, 113: 231-243.
- [27] Brizzi R, Delfino G, Pellegrini R. Specialized mucous glands and their possible adaptive role in the males of some species of *Rana* (Amphibia, Anura) [J]. *Journal of Morphology*, 2002, 254(3): 328~341.
- [28] Budtz PE, Larsen LO. Structure of the Toad Epidermis during the Moulting Cycle, II. Electron Microscopic Observations on *Bufo bufo* (L.)[J]. *Cell Tiss. Res*, 1975, 159: 459-483.
- [29] Budtz PE. Aspects of moulting in anurans and its control[J]. *Symp Zool Soc Lond*, 1977, 32: 317-334.
- [30] Cameron, J. W.. The origin of new-epidermal cells in the skin of normal and x-rayed frogs[J]. *J. Morph*, 1936, 59(2): 327-351.
- [31] Carlos Jared, Marta M. Antoniazzi, Amarildo E.C. Jordão, José Roberto M.C. Silva, Hartmut Greven, Miguel T. Rodrigues. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defence[J]. *Toxicon*, 2009, 54: 197~207
- [32] Conaway CH, Metter DE. Skin glands associated with breeding in *Microhyla carolinensis*[J]. *Copeia*, 1967, 1969: 672-673.
- [33] Christian K, Green B. Water loss and extraepidermal lipid barrier in the Australian treefrog

- Litoria caerulea*[J]. Am Zool, 1988, 28: 17A.
- [34] Christian K, Parry D. Reduced rates of water loss and chemical properties of skin secretions of the frogs *Litoria caerulea* and *Cyclorana australis*[J]. Aust J Zool, 1997, 45: 13-20.
- [35] Dapson RW, Feldman AT, Wright OL. Histochemistry of granular(poison) secretion in the skin of the frog, *Rana pipiens*[J]. Anat Rec, 1973, 177: 549-560.
- [36] Dockray GJ, Hopkins CR. Caerulein secretion by dermal glands in *Xenopus laevis*[J]. J Cell Biol, 1975, 64: 724-733.
- [37] Dominguez E, Navas P, Hidalgo J, Aijon J, et al. Mucous glands of the skin of *Rana ridibunda*. A histochemical and ultrastructural study[J]. Basic Appl Histochem, 1981, 25: 15-22.
- [38] Delfino G, Brizzi R, Calloni C. Dermo-epithelial interactions during the development of cutaneous gland anlagen in Amphibia: A light and electron microscope study on several species with some cytochemical findings[J]. Z. Mikrosk. Anat. Forsch, 1985, 99: 225-253.
- [39] Delfino G, Brizzi R, Calloni C. Mixed cutaneous glands in Amphibia: an ultrastructural study in urodele larvae[J]. Zool, Jb, Anat, 1986, 114: 325-344.
- [40] Delfino G, Brizzi R, Santis R de, et al. Serous cutaneous glands of the western spadefoot toad *Pelobates cultripes*(Amphibia, Anura): an ultrastructural study on adults and juveniles[J]. Arch Ital Anat Embriol, 1992, 97: 109-120.
- [41] Delfino G, Brizzi R, Calloni C. Serous glands in the Tree frog *Hyla arborea arborea*(L.): origin, ontogenetic evolution, and possible functional implications of the secretory granule substructure[J]. Acta Zool, 1994, 75: 27-36.
- [42] Delfino G, Brizzi R, Alvarez BB, et al. Serous cutaneous glands in *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae): secretory patterns during ontogenesis[J]. Tissue Cell, 1998, 30: 30-40.
- [43] Duellman W, E., Trueb L. Biology of Amphibians [M]. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1994, 369-370.
- [44] Erik Hviid Larsen and Bjorn E. Rasmussen. A mathematical model of amphibian skin epithelium with two types of transporting cellular units[J]. Pflugers Arch, 1985, 405: 50-58.)
- [45] Eric O. Thomas, Linda Tsang, and Paul Licht. Comparative Histochemistry of the Sexually Dimorphic Skin Glands of Anuran Amphibians[J]. Copeia, 1993(1), pp. 133-143.
- [46] Faraggiana R. Ricerche istologiche sulle ghiandole cutanee granulose degli Anfibi Anuri. I. *Bufo vulgaris* e *Bufo viridis*[J]. Archo Ital. Anat. Embriol, 1938a, 39: 327-376.

- [47] Faraggiana R. Ricerche istologiche sulle ghiandole cutanee granulose degli Anfibi Anuri. II *Rana esculenta* e *Rana agilis* e *Bombinator pachhypus*[J]. *Archo Ital. Anat. Embriol*, 1939, 41: 390-410.
- [48] Farquhar MG, Palade GE. Cell junctions in amphibian skin[J]. *J Cell Biol*, 1965, 26: 263-291.
- [49] Fox, H., Dermal glands[M]. In: Bereiter Hahn, J., Matoltsy, A.G., Richards, K.S. Eds.), *Biology of the Integument*, vol. 2. Vertebrates. Springer, Berlin, 1986. 16-135.
- [50] Frost DR. 2002. Amphibian species of the world [EB/OL]. <http://re-search.amnh.org/herpetology/amphiba/index.html>(AmericanMuseum of Natural Histry).
- [51] Fujikura K, Kurabuchi S, Tabuchi M, et al. Morphology and distribution of the skin glands in *Xenopus laevis* and their response to experimental stimulation[J]. *Zool Sci*, 1988, 5: 415-430.
- [52] Hayes TB, Gill TN. Hormonal regulation of skin gland development in the toad (*Bufo boreas*): the role of the thyroid hormones and corticosterone[J]. *Gen, Comp, Endocrinol*, 1995, 99: 161-168.
- [53] Heiss E, Natchev N, Rabanser A, et al. Three Types of Cutaneous Glands in the Skin of the Salamandrid *Pleurodeles waltl*. A Histological and Ultrastructural Study[J]. *Journal of Morphology*, 2009, 270: 892-902.
- [54] Holloway WR, Dapson RW. Histochemistry of integumentary secretions of the narrow-mouth toad, *Gastrophryne carolinensis*[J]. *Copeia*, 1971: 351-353.
- [55] Geise W, Linsenmair KE. Adaptations of the reed frog *Hyperilius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. II. Some aspects of the water economy of *Hyperilius viridiflavus nitidulus* under wet and dry season conditions[J]. *Oecologia*, 1986, 68: 542-548.
- [56] Geise W, Linsenmair KE. Adaptations of the reed frog *Hyperilius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. IV. Ecological significance of water economy with comments on thermoregulation and energy allocation[J]. *Oecologia*, 1988, 77: 327-338.
- [57] Grosse WR, Linnenbach M. Feinbau der Hautdrüsen und Entwicklung des Melanophoren-Musters beim Laubfrosch, *Hyla arborea* L. (Amphibia, Anura)[J]. *Zool Anz*, 1989, 223: 211-219.
- [58] Kim HH, Noh YT, Chung YW, et al. Ultrastructure of the granular glands in the amphibian skin[J]. *Korean J Zool*, 1979, 22: 103-114.
- [59] Kim KY, Kim KS, Moon MJ, et al. Ultrastructural study on the cutaneous granular glands in *Bombina orientalis* Boulenger[J]. *Korean J Zool*, 1989, 32: 107-119. *Am J Physiol*, 1983, 244:

R429-R443.

- [60] Kirschner LB. Sodium chloride absorption across the body surface: frog skins and other epithelia[J].
- [61] Kramer B. Histochemical demonstration of 5-hydroxytryptamine in poison glands of amphibian skin[J]. Histochemine, 1970, 24: 336-342.
- [62] Lavker RM. Fine structure of clear cells in frog epidermis[J]. Tissue Cell, 1971, 3: 567-578.
- [63] Lewinson D, Rosenberg M, Warburg MR. Mitochondria-rich cells in salamander larva epidermis; ultrastructure description and carbonic anhydrase activity[J]. Biol Cell, 1982, 46: 75-84.
- [64] Lillywhite HB, Mittal AK, Garg TK, et al. Integumentary structure and its relationship to wiping behaviour in the common Indian tree frog, *Polypedates maculatus*[J]. J Zool, 1997, 243: 675-687.
- [65] Linsenmair KE, Rosenberg M, Warburg MR. Unusual cell ultrastructure in ventral epidermis of the African reed frog *Hyperolius viridiflavus*, (Anura; Hyperoliidae)[J]. Anat Embryol, 1999, 200: 607-614.
- [66] Mangoni M L, Miele R, Renda TG, et al. The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms[J]. The FASEB Journal, 2001, 15(7): 1431-1432.
- [67] Masoni A, Garcia-Romeu F. Moulting in *Rana esculenta*: development of mitochondria-rich cells, morphological changes of the epithelium and sodium transport[J]. Cell Tissue Res, 1979, 197: 23-38.
- [68] Meliha SI, Songül S, Osman M, et al. Immunohistochemical detection of serotonin in the skin of frogs (*Rana ridibunda*) kept at different temperatures[J]. Biologia, Bratislava, 2004, 59/2: 273-281.
- [69] Muhse, E. F. . The cutaneous glands of the common toads[J]. Amer. J. Anat, 1909, 9(2): 321-360.
- [70] McCallion, D. J. . The parotoid gland of the toad, *Bufo americanus*[J]. Canadian Jour. Zool, 1956, 34(3): 174-177.
- [71] M. R. Warburg, M. Rosenberg, J.R. Roberts. Cutaneous glands in the Australian hylid *Litoria caerulea*(Amphibia, Hylidae)[J]. Anat Embryol, 2000, 201: 341-348.
- [72] Mills JW, Prum BE. Morphology of the exocrine glands of the frog skin[J]. Am J Anat, 1984, 171: 91-106.
- [73] Moon MJ, Do KR, Kim CW, Kim WK. Ultrastructural observations on the cutaneous granular glands and excretory granule formation in the water toad, *Bufo stejnegeri* Schmidt[J]. Korean J

- Zool, 1988, 31: 122-132.
- [74] Neuwirth M, Daly JW, Myers CW, et al. Morphology of the granular secretory glands in skin of poison-dart frogs(Dendrobatidae)[J]. Tissue Cell, 1979, 11: 755-771.
- [75] Sara Q, Malentacchi C, Delfino C, et al. Adaptive evolution of secretory cell lines in vertebrate skin[J]. *Caryologia*, 2006, 59(2): 187-206.
- [76] Quay WB. Integument and the environment: Glandular composition, function, and evolution[J]. *Am Zool*, 1972, 12: 95-108.
- [77] Robinson DH, Mills JW. Ouabain binding in tadpole ventral skin. II. Localization of Na⁺ pump sites[J]. *Am J Physiol*, 1987, 253: R410-R417.
- [78] Savage JM. The geographic distributions of frogs: patterns and predictions. in eolutionary biology of the anurans[J]. *Contemporary research on major problems*(ed J L Vial), 1973: 351-445.
- [79] Seki T, Kikuyama S, Yanaihara N. Development of *Xenopus laevis* skin glands producing 5-hydroxytryptamine and caerulein[J]. *Cell Tissue Res*, 1989, 258: 483-489.
- [80] Seki T, Kikuyama S, Yanaihara N. Morphology of the Skin Glands of the Crab-eating Frog(*Rana cancrivora*)[J]. *Zoological Society of Japan*, 1995, 12: 623-626.
- [81] Thompson IG, Mills JW. Chloride transport in glands of frog skin[J]. *Am J Physiol*, 1983, 244: C221-C226.
- [82] Toledo, R. C. and C. Jared. Cutaneous Granular Glands and Amphibian Venoms[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology*, 1995, 111(1): 1~29
- [83] Villalba JM, Navas P. Polarization of plasma membrane glycoconjugates in amphibian epidermis during metamorphosis[J]. *Histochemistry*, 1989, 90: 453-458.
- [84] Villalba J.M., Roldán J.M., Navas P. Flask cells and flask-shaped glandular cells of amphibian skin appecifically produce fucose-rich glycoproteins[J]. *Histochemistry*, 1993, 99: 363-367.
- [85] Voute CL, Thummel J, Brenner M. Aldosterone effect in the epithelium of the frog skin-a new story about an old enzyme[J]. *J Steroid Biochem*, 1975, 6: 1175-1179.
- [86] Warburg M. R. Rosenberg M., Roberts J.R.. Cutaneous glands in the Australian hylid *Litoria caerulea*(Amphibia, Hylidae)[J]. *Anat Embryol*, 2000, 201: 341-348.
- [87] Withers PC, Hillman SS, Drewes RC. Evaporative water loss and skin lipids of anuran amphibians[J]. *J Exp Zool*, 1984, 232: 11-17.
- [88] Whitear M. Flask cells and epidermal dynamics in frog skin[J]. *J Zool Lond*, 1975, 175: 107-149.

简 历

姓 名	吴文英	性 别	女
出生年月	1979年9月	籍 贯	山东省菏泽市
所学专业	动物学	最终学历	硕士研究生
学 习	2001年9月—2004年7	菏泽师范学院 应用生物技术专业	
经 历	2008年9月—至今	沈阳师范大学 化学与生命科学学院	

1. 吴文英, 李丕鹏, 陆宇燕. 黑龙江林蛙繁殖期两性皮肤组织结构的差异比较. 发表论文 野生动物杂志.
- 情 况 2. 吴文英, 李丕鹏, 陆宇燕. 花背蟾蜍和中华蟾蜍皮肤腺体及耳后腺体的比较组织学研究. 蛇志 . 2011 23(1): 20-25.

致 谢

本文是在我的导师李丕鹏教授和陆宇燕教授悉心指导下完成的。我要向我的导师致以衷心的感谢！在我实验的进行和论文的写作中两位导师给予了真诚的帮助和不懈的鼓励。在研究生学习中老师的渊博的学识和高尚的情操都将永远影响着我，是我长久的精神财富，使我终身受益，借此谨向两位老师致以衷心的感谢和深深地敬意。

特别感谢我的师姐周兵、宋阳、师妹谢冰楠、吴畏、师弟张雷、林川，感谢你们对我的实验的支持和帮助，感谢你们在生活上的陪伴，深深记得和你们在一起时的自由和快乐。

特别感谢我的师兄周正彦、师姐李贞、师妹杨皓月及本科生学妹李明月和高凤娟给我的研究工作提供的帮助，还要感谢师兄邵帅在我的电脑出问题时给予的真诚帮助，

特别感谢我的同伴马玲、贾迪、宋佳乐、巴山、王懿、任宏伟及我的师兄弟姐妹们，谢谢你们的支持与帮助。

最后，感谢我的家人在这三年中在精神上理解、支持和在物质上的资助，使我能够顺利地完成学业。

感谢所有关心我的老师和朋友们，是你们给予了我克服困难，勇往直前的力量。在此献上我最诚挚的谢意！