

疣荔枝螺 (*Thais clavigera*) 性畸变现象的解剖学和组织学研究*

于秀娟 黄长江¹⁾ 朱四喜 沈金辉[†] 董巧香^{††}

(汕头大学水生生物技术与环境资源保护研究所 汕头 515063;暨南大学水生生物研究所 广州 510632)

[†](汕头市中心医院病理科 汕头 515063)

^{††}(Aquaculture Research Station of Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70820, USA)

提要 以解剖学和组织学的方法研究了有机锡污染生物指示种——疣荔枝螺的正常雄、雌和性畸变个体的生殖系统。结果表明,性畸变个体除具有正常的雌性器官外,还有输精管或阴茎。当性畸变程度严重时,性畸变不育个体的卵囊腺组织出现破损,并具有不规则块状的不育卵囊和未排出的正常卵囊。虽然性畸变个体的雄性器官具有表现出雄性功能的潜能,但由于缺少精巢或完整的前列腺,不可能发展成为具有雄性功能的个体,这与性逆转有着本质上的区别。有机锡污染引起的性畸变已对疣荔枝螺种群生存构成了潜在的威胁,深化此类负面生态效应的研究是人类面临的重要课题。

关键词 疣荔枝螺,性畸变,解剖学,组织学,有机锡

中图分类号 Q954.5

含有机锡化合物的船舶防污漆自 20 世纪 60 年代开始使用以来,对海洋生态系统造成了严重的影响。其中,三丁基锡(TBT)和三苯基锡(TPT)能导致腹足类雌性个体产生雄性器官,如阴茎和输精管等,即所谓的性畸变现象(imposex)(Blaber, 1970)。而海产腹足类性畸变的易认性、不可逆性和对有机锡反应的特殊性,使之成为监测海洋有机锡污染的一种有效指标(施华宏等, 2002)。

近年来,在对我国海产腹足类性畸变现象的调查发现,疣荔枝螺(*Thais clavigera*)是分布最广、最易采集、性畸变现象最普遍、特征最明显和程度最严重的种类(施华宏等, 2001; Li, 2001; Liu *et al.*, 1996),已被认定为我国海洋有机锡污染生物监测的理想指示种(施华宏等, 2002)。但到目前为止,对疣荔枝螺的研究主要侧重于其繁殖和摄食等生态方面,以及性畸变程度的野外调查(Tong, 1986, 1988; 施华宏等, 2001; Li, 2001; Horiguchi *et al.*, 1997),疣荔枝螺正常个体和性畸变个体生殖系统的解剖学

和组织学方面的研究尚无详细的报道。本文研究了疣荔枝螺正常雌、雄和性畸变个体生殖系统的解剖学和组织学特征,旨在探讨性畸变过程中,生殖系统在形态结构和组织结构方面的变化,为有机锡污染的生物监测方案的制定和性畸变的机理研究提供形态结构和组织方面的知识。

1 材料与方法

2002 年 7 月—2003 年 3 月,在广东省沿海港口和岛屿沿岸于低潮时,用手或镊子在岩石上直接采集疣荔枝螺约 800 个。将样品活体带回实验室,用 7% MgCl₂ 麻醉 12h 后,用小铁锤敲破螺壳,取出软体部分。沿腮下腺剪开外套膜,用 4% 甲醛固定保存后,在 Carl Zeiss Stemi SV11 解剖镜下观察并记录生殖系统各部分的形态、颜色、相对位置和性畸变个体的畸变程度(Oehlmann *et al.*, 1996)。

从甲醛固定样品中选取 50 个雄性个体、80 个雌性个体和 100 个不同程度的性畸变个体,制作组织切片。雄性个体主要取精巢(testis)、前列腺

* 国家自然科学基金项目,40176029 号;广东省重大科技兴海项目,A200005F02 号;广东省自然科学基金项目,000792 号。
于秀娟,硕士,E-mail:blindar2001@sohu.com

1) 通讯作者,E-mail:cjhuang@stu.edu.cn

收稿日期:2003-05-30,收修改稿日期:2003-09-30

(prostate gland)、输精管(vas deferens)和阴茎(penis)。雌性个体主要取卵巢(ovary)、蛋白腺(albumen gland)、纳精腺(ingestion gland)和卵囊腺(capsule gland)。对不同性畸变程度的个体主要取卵巢、蛋白腺、纳精腺、卵囊腺、输精管和阴茎。样品直径3—5mm,厚度2mm。样品经乙醇逐级脱水、二甲苯置换、透蜡、石蜡包埋、连续切片(厚度5—7 μ m),最后用H.E染色。切片在正立显微镜 Carl Zeiss Axio-plan 2 下观察。

在解剖镜和显微镜下用 Carl Zeiss AxioCam 数码相机分别对解剖样品和切片进行图像拍摄,并用 Axio Vision 图像分析系统进行图像分析。最后,将照片经 Adobe Photoshop 剪切,转入 Powerpoint 中制作成图版。

2 结果

2.1 雄性生殖系统

雄性个体生殖系统主要由精巢、前列腺、输精管和阴茎组成(图 1a)。精巢位于内脏团顶端,紧贴肝脏,并随肝脏螺旋部的旋转而旋转。精巢由大量生精细管和输精管组成(图 1b),生精细管能形成精子,并由输精管将精子输送到外套腔膨大的部分,即前列腺。前列腺紧贴肠道,且与之并行。前列腺内的输精管靠近外套膜边缘的一侧,内层是柱状纤毛细胞,外层是环行肌;其它部分由大量腺体细胞和结缔组织组成,腺体细胞群集成团状,腺细胞团的导管相互平行开口于纤毛细胞之间(图 1c)。输精管从前前列腺跨过外套膜边缘到阴茎基部,外观呈线状突起。输精管内腔由均匀分布的柱状纤毛细胞组成,外层包围较厚的环肌和结缔组织(图 1d)。阴茎背腹扁平,呈“S”形,基部稍粗,到末端逐渐变得细小,末端没有分叉。阴茎内输精管的延伸部分为阴茎导管(penis duct),阴茎具有多个阴茎导管,管腔由纤毛细胞组成,外面包围着较薄的环肌和较厚的纵行肌与斜行肌(图 1e)。

2.2 雌性生殖系统

正常雌性个体生殖系统主要由卵巢、输卵管(oviduct)、蛋白腺、纳精腺、卵囊腺和生殖孔(vaginal opening)组成(图 1f)。卵巢位于精巢相对应的位置,由滤泡组成,滤泡能生成雌性生殖细胞(图 1g)。从卵巢靠近壳轴侧发出白色输卵管,其末端与蛋白腺相通。蛋白腺位于外套腔外侧,呈不对称的倒“U”

形,横切面上,其内为一条狭长空腔,腔壁内层为纤毛细胞,外层为腺体组织(图 1h)。纳精腺位于蛋白腺和卵囊腺之间,生殖季节大多数为深褐色至黑色,非生殖季节大多数为浅褐色或灰色。横切面上是大小不等的囊状结构,囊壁由同一种细胞构成,囊与囊之间是结缔组织。深褐色纳精腺的囊腔内充满大量棕色物质,并可见精子和大型卵黄颗粒(图 1i)。浅色的纳精腺内无棕色物质。卵囊腺呈肾形,与肠道并行,可以分为 6 个区(图 2a)。1、2、6 区半透明,3 区透明,4、5 区不透明。在横切面上,卵囊腺具有一个背腹狭长的腔,腔壁为纤毛细胞,而其它各区由腺体细胞组成(图 2b)。腔的腹侧褶皱形成一条贯穿整个腺体的沟状结构,称为腹部沟(ventral channel)。卵囊腺靠近头部一端与阴道(vagina)相连,阴道开口于外套膜,并形成生殖乳突(genital papilla),生殖乳突位于生殖乳突中央,在外套膜上邻近于肠道开口。

生殖季节,在疣荔枝螺群居的地方可以采集到成群粘附在岩石上的卵囊。卵囊外观呈花瓶状,具生命力的卵囊为黄色,卵囊内含有受精卵(图 2c);不具生命力的卵囊为粉色。

2.3 性畸变个体的生殖系统

性畸变个体除具上述正常雌性生殖器官外,还有输精管或阴茎(图 2d)。性畸变个体的输精管从阴茎基部开始形成,然后不断地沿着外套膜边缘延伸,直至生殖乳突处形成一条完整的输精管,但生殖乳突仍是开放的。输精管外观也呈线状突起,但略细于雄性个体的。在所制作的 30 个切片中,其中有 29 个个体形成的输精管同雄性个体的输精管结构相似,即均由表皮内褶形成,仅有 1 个个体的输精管是表皮细胞向外衍生形成的,这与雄性个体的输精管有明显的不同(图 2e, f)。

性畸变初期,在右触角稍后形成一个很小的阴茎突起,随着性畸变程度的加深,长度也不断增大,在外形上也渐渐与雄性个体的相似,但略小于雄性个体的阴茎。一些性畸变程度较低的个体的阴茎不具有阴茎导管,性畸变程度较高的个体的阴茎与雄性个体的阴茎基本相同,也具有多个阴茎导管(图 2g, h)。

当生殖乳突边缘处的输精管或生殖乳突组织增生时,会导致生殖乳突变形、异位,以至被阻塞;当生殖乳突被阻塞时,卵囊腺内的卵囊无法排出,滞留在卵囊

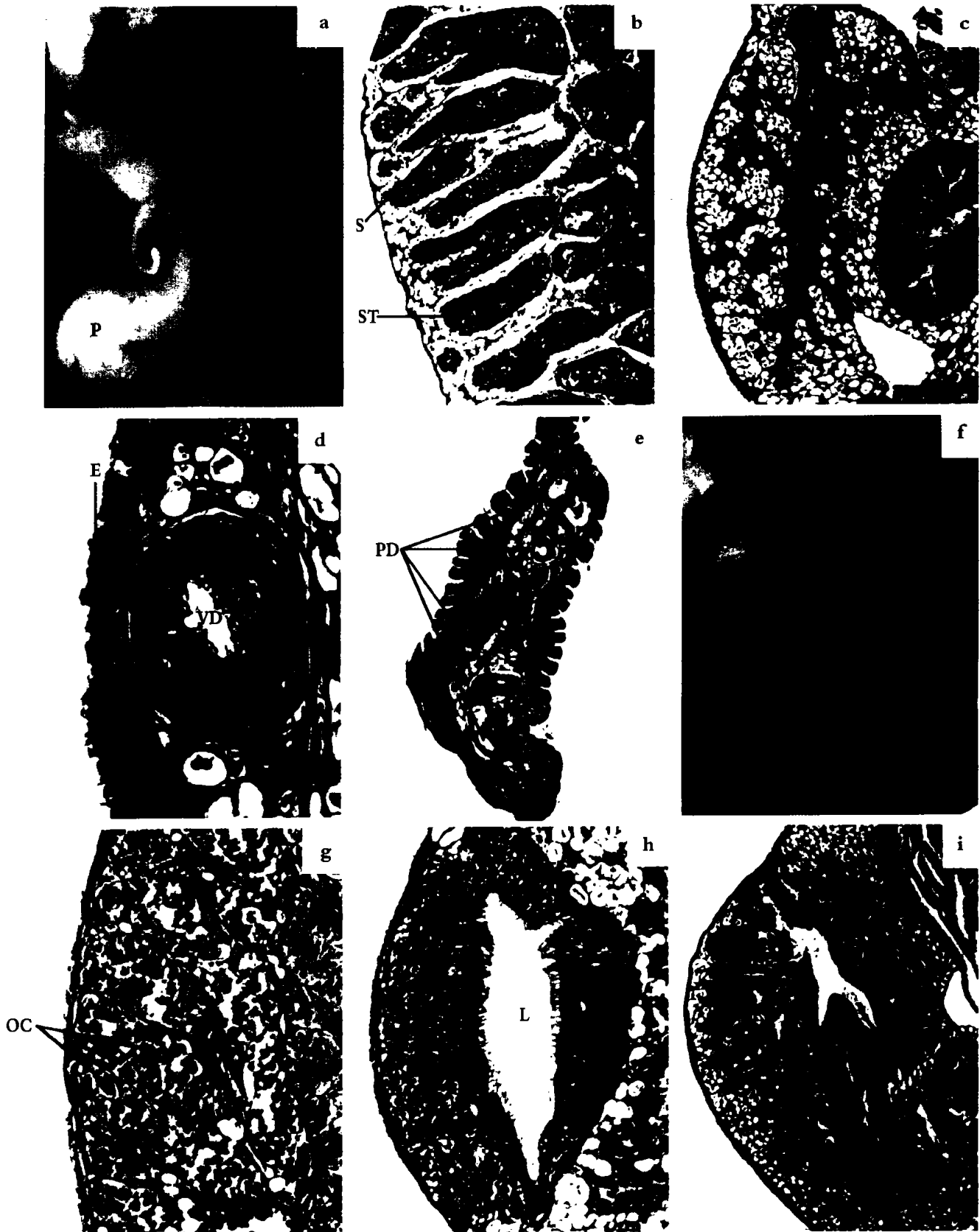


图 1 雌雄生殖系统的解剖学和组织学结构

Fig.1 Anatomical and histological structure of the male and female genital system

a. 正常雄性个体生殖系统, $\times 8$; b. 雄性精巢横切面 H.E., $\times 100$; c. 雄性前列腺横切面 H.E., $\times 100$; d. 雄性输精管横切面 H.E., $\times 200$; e. 雄性阴茎横切面 H.E., $\times 40$; f. 正常雌性个体生殖系统, $\times 8$; g. 正常卵巢横切面 H.E., $\times 100$; h. 正常蛋白腺横切面 H.E., $\times 100$; i. 正常纳精腺横切面 H.E., $\times 40$. CG: 卵囊腺; E: 表皮; L: 腔; OC: 卵细胞; P: 阴茎; PD: 阴茎导管; PR: 前列腺; R: 肠道; S: 精子; ST: 生精细管; TE: 触角; VD: 输精管; VO: 生殖孔; Y: 卵黄颗粒

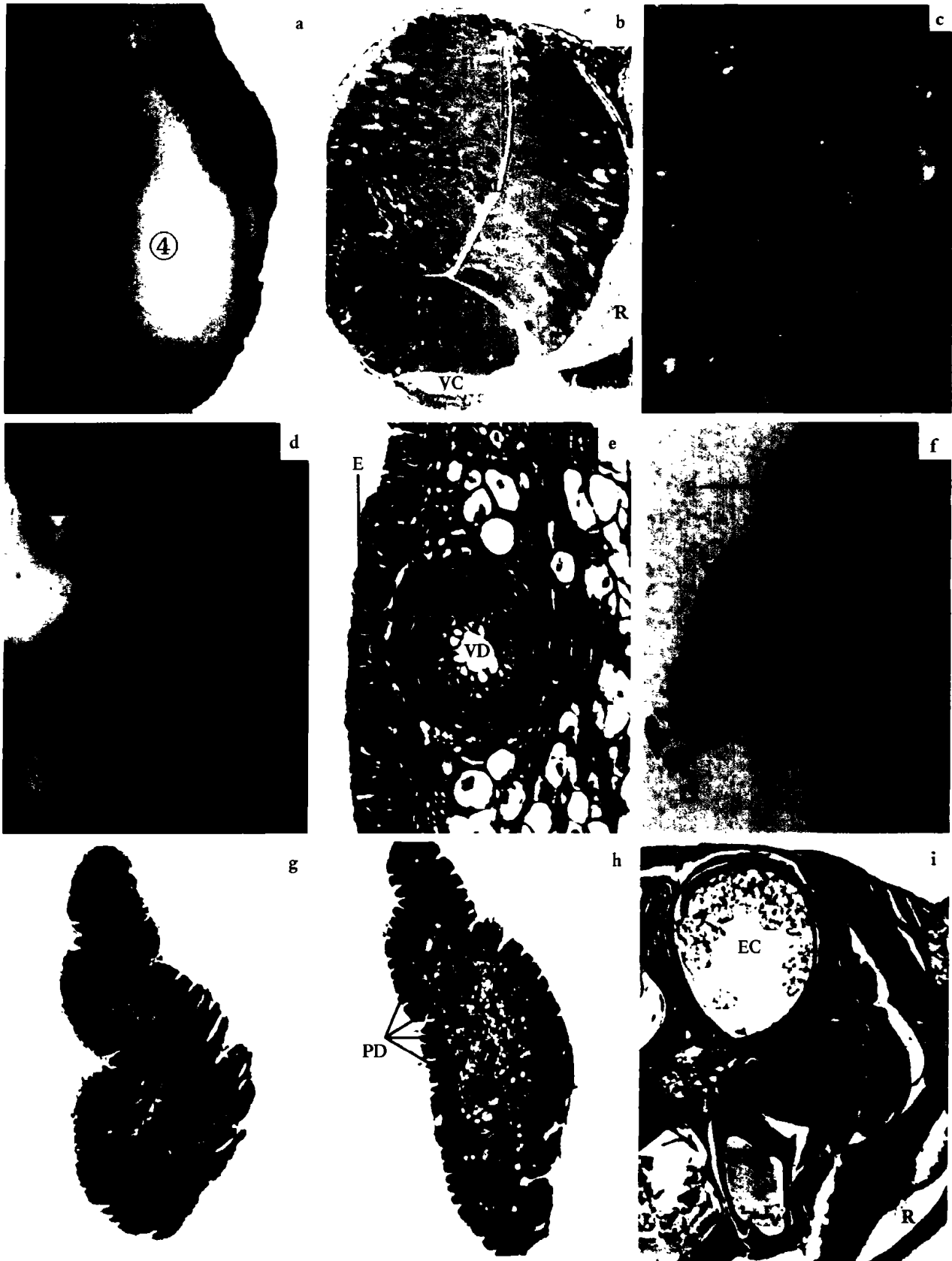


图 2 性畸变个体生殖系统的解剖学和组织学结构

Fig. 2 Anatomical and histological structure of an imposex genital system

a. 正常卵巢外观, $\times 10$; b. 正常卵巢横切面 H. E., $\times 40$; c. 卵巢外观, $\times 10$; d. 性畸变个体生殖系统, $\times 8$; e. 性畸变个体内起源输精管 H. E., $\times 200$; f. 性畸变个体外起源输精管 H. E., $\times 200$; g. 性畸变个体不具导管的阴茎 H. E., $\times 100$; h. 性畸变个体具导管的阴茎 H. E., $\times 100$; i. 性畸变个体的不育卵巢横切面 H. E., $\times 40$. AC: 不育卵巢; EC: 卵巢; VC: 腹前部。①背部; ②尾部; ③头部; ④右侧; ⑤左侧; ⑥腹前部

腺中形成不育卵囊团。从外观看,不育个体的卵囊腺局部或呈棕色或呈黑色。在不育个体的卵囊腺的组织切片中,可以观察到卵囊腺组织已破损,并具有染色较浓呈不规则块状的不育卵囊和未排出的正常卵囊,未排出的卵囊内具有含大量卵黄颗粒的卵细胞(图 2i)。

性畸变个体的蛋白腺和纳精腺的组织结构没有发现异常变化。对性畸变个体的性腺进行切片观察,性腺仍能形成正常的卵细胞,没有发现卵巢中形成精原细胞或精子的现象。

3 讨论

广义的性畸变现象,也称为假雌雄同体现象,存在两种类型:一种是雌性个体产生雄性生殖器官;另一种是雄性个体产生雌性生殖器官。目前发现的性畸变现象大多数为前一类型,只有少数情况为后一类型。例如, Fioroni 等(1991)报道狗岩螺(*Nucella lapillus*)中存在雄性个体的前列腺被雌性生殖器官卵囊腺、纳精腺等取代的现象,导致雄性个体发生性畸变的现象。本文中的研究对象疣荔枝螺仅存在雌性个体产生雄性生殖器官的现象。对比雄、雌和性畸变个体生殖系统的结构特征可以看出,性畸变个体所形成的雄性化结构与正常雄性个体结构至少有 3 点相似之处:

(1) 形态上,性畸变个体的阴茎与雄性个体的外形相似,如末端不分叉,只是长度略短。性畸变个体输精管的位置、长度也与雄性个体的相似,只是管径略细。

(2) 从组织结构上,绝大部分性畸变个体的输精管与雄性个体的结构相似,仅个别个体输精管起源不同于雄性个体。性畸变个体的阴茎与雄性个体的大体相同,只是有些性畸变个体刚刚形成的阴茎不具有阴茎导管。本实验中没有研究未发育完善的雄性阴茎,但阴茎导管可能只存在于发育较完善的雄性阴茎中,形成初期的阴茎可能没有阴茎导管。

(3) 从畸变路径上看,性畸变个体在外套腔中的雄性器官的形成方式遵循着与雄性个体相同的方式。性畸变个体先形成短小的阴茎,然后在阴茎基部形成输精管,输精管朝生殖孔口方向不断发展,最后到达生殖孔口处,这可能同卵囊腺和前列腺均与肠道并行并且位置相当有关。Gibbs(1993)对骨螺科生殖系统的发育顺序研究表明,一般来说,雄性个体先形成阴茎,然后在阴茎基部开始逐渐形成输精管,并朝前列腺方向发展,最后与前列腺相通。目前所发现的疣荔枝螺性畸变个体的雄性生殖器官形成

顺序恰恰都遵循这一规则。

由此可见,性畸变个体的雄性结构与正常雄性个体确有许多相似之处。Gibbs(1993)认为性畸变个体会遵循雄性化的过程,这一观点在疣荔枝螺的性畸变发展过程中得到了进一步的证实。但并不是所有的性畸变个体都遵循这一过程,例如,在疣荔枝螺中发现性畸变个体的输精管并不是全部由表皮内褶形成的,个别个体是由表皮向外衍生而成。所以,性畸变过程既有一般性又有特殊性。

雌性个体在发生性畸变的过程中,虽然总体遵从了雄性化的特征,而且性畸变个体的雄性化器官在解剖学和组织学上与正常雄性个体也有相似之处,这也只能说明性畸变个体具有表现出雄性器官功能的潜能,但却不可能发展成具有雄性生殖功能的个体。其一,到目前为止,还没有发现性畸变个体具有完整的雄性生殖系统,如缺少精巢或完整的前列腺,也没有任何调查或室内实验表明这种雄性化器官具有雄性个体阴茎所具有的交配能力,或其输精管具有输送精子的能力;其二,性畸变个体的雄性结构是在雌性结构的基础上叠加产生的,这种雄性器官的形成必然受到雌性生殖器官存在的影响,最终无法形成独立完整的雄性生殖系统结构;其三,生殖功能的完成还要受到激素水平的调节。虽然室内实验表明性畸变个体内的雄性激素水平升高,但没有证据表明它能达到正常雄性个体的水平(Bettin *et al.*, 1996)。

由此可见,性畸变个体不可能具有雄性个体的生殖功能,它与性逆转具有本质的区别,主要表现在三个方面:1) 性畸变是由有机锡污染引起的,这只是在 20 世纪 70 年代初期才出现,而性逆转是生物界的一种自然现象,是一种与生俱来的固有特征;2) 性畸变是在正常雌性器官的基础上又叠加了雄性器官,雌性器官会受到影响,但并不消失,而且程度严重时,会导致雌性个体的生殖能力受到影响甚至死亡,性逆转则会使原有的性别特征逐渐退化甚至消失,而且对雌体不产生任何不良的影响;3) 性畸变个体并不具有雄性个体所具有的生殖功能,而在发生性逆转的种类中,当雌(或雄)性个体完成性逆转之后,雄(或雌)性个体具有正常的生殖功能。

对性畸变程度的划分主要是用解剖镜和扫描电镜对其形态进行观察,但这往往得不到理想的结果(Oehlmann *et al.*, 1991)。比如,区分阴茎是否具有导管或有关输精管的不同起源就必须借助于组织学的观察结果才能实现。用腹足类的性畸变现象来评

估 TBT 这类内分泌扰乱物质对动物和人健康的不利影响是一种非常有前景的生物监测方法。长期以来,人们一直较关注雌激素对生物的影响,而对雄激素的负面作用了解甚少。本研究结果表明,当疣荔枝螺性畸变程度严重时,雌性个体卵囊腺的功能受到影响,无法保证雌性个体行使正常的生殖功能,甚至会导致雌体死亡,使种群中幼年个体减少,对种群的生存构成潜在的威胁。希望本文能引起有关部门对雌性个体雄性化现象的关注,广泛开展对有机锡等内分泌扰乱物质污染的生态效应的调查,制定相应的政策和法规,以保护我国的海洋生物资源,关注人类健康。

致谢 在组织切片的制作过程中,得到汕头市中心医院病理科方可君和吴旋技师的大力帮助,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 施华宏,黄长江,2001. 海产腹足类性畸变现象的形态特征. 台湾海峡, 20(4): 552—555
- 施华宏,黄长江,谢文勇,2002. 用疣荔枝螺性畸变监测海洋有机锡污染的方法初探. 海洋环境科学, 21(4): 37—41
- Bettin C, Oehlmann J, Stroben E, 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. Helgol Meeresunters, 50: 299—317
- Blaber S J M, 1970. The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). Proceedings of the Malacological Society of London, 39: 231—233
- Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E, 1991. The pseudo-hermaphroditism of prosobranchs; morphological aspects. Zoologischer Anzeiger, 226: 1—26
- Gibbs P E, 1993. A male genital defect in the dog-whelk, *Nucella lapillus* (Neogastropoda), favouring survival in a TBT-polluted area. J Mar Biol Assoc U K, 73: 667—678
- Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M *et al*, 1997. Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. Environ Pollut, 95(1): 85—91
- Li Z Y, 2001. Application of imposex as a biomonitor of tributyltin pollution. J of Ocean University of Qingdao, 31(4): 480—486
- Liu L L, Suen I J, 1996. Organotins promoting the development of imposex in the oyster drill *Thais clavigera*. J Fish Soc Taiwan, 23(2): 149—154
- Oehlmann J, Stroben E, Fioroni P, 1991. The morphological expression of imposex in *Nucella lapillus* (Linnaeus) (Gastropoda: Muricidae). J Moll Stud, 57: 375—390
- Oehlmann J, Fioroni P, Stroben E *et al*, 1996. Tributyltin effect on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. Sci Total Environ, 188: 205—223
- Tong L K Y, 1986. The feeding ecology of *Thais clavigera* and *Morula musiva* (Gastropoda: Muricidae) in Hong Kong. Asian Mar Biol, 3: 163—178
- Tong L K Y, 1988. The reproductive biology of *Thais clavigera* and *Morula musiva* (Gastropoda: Muricidae) in Hong Kong. Asian Mar Biol, 5: 65—75

ANATOMICAL AND HISTOLOGICAL STUDIES ON IMPOSEX OF *THAIS CLAVIGERA*

YU Xiu-Juan, HUANG Chang-Jiang, ZHU Si-Xi, SHEN Jin-Hui[†], DONG Qiao-Xiang^{††}

(Institute of Aquatic Technology and Environmental Resources Protection, Shantou University, Shantou, 515063;

Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou, 510632)

[†](Department of Pathology, Shantou Central Hospital, Shantou, 515063)

^{††}(Aquaculture Research Station, Louisiana Agricultural Experiment Station, Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, Louisiana, 70820, USA)

Abstract During July 2002 and March 2003, 50 normal males, 80 normal females and 100 imposexed females of *Thais clavigera* collected from coastal harbors in Guangdong Province of China, were used for anatomical and histological structure analysis. Results showed that the male genital system mainly comprised the testis, prostate gland, vas deferens and penis. The normal female genital system mainly comprised ovary, oviduct, albumen gland, ingestion gland, capsule gland and vaginal opening. The imposexed females exhibited a penis and/or vas deferens in addition to the normal female genital organs mentioned above. Capsule glands of females with severe imposex were damaged and contained irregular lumps of aborted egg capsules and normal unre-

leased egg capsules. Regardless of their imposex severity, however, the ovary, albumen gland and ingestion gland did not show any difference from those of normal females. The comparison of the male sex organs of imposex females with that of normal males showed similarities in morphology, origin and histological structure. In rare cases, the origin of vas deferens of imposex females was different from that of the normal males. However, the imposex females lacked testis and a fully developed prostate gland, which prevented the possession of a full male genital system. In addition, penises without ducts was observed in females at lower developmental stages of imposex. The imposex female may have the potential to perform the function of male sex organs, but could not act as a functional male. This is the distinctive difference between imposex and sexual reversal. The formation of male sex organs on imposex females also inhibit their female sex organs to function properly. Therefore, imposex induced by TBT results in population decline of *T. clavigera* by disrupting the female reproductive mechanism. Imposex in gastropods, used as the biological monitor, will offer a promising approach in assessing the effects of endocrine disruptors such as TBT, TPT on marine organisms. In order to protect marine biological resources and human health, the estrogenic effects and androgenic effects need further research.

Key words *Thais clavigera*, Imposex, Anatomy, Histology, Organotin

一种新型底质取样设备研制成功 ——DDC-XZ-1 型悬垂振动活塞取样器

在海洋地质学研究和海洋工程勘察项目中,海洋底质取样是一项必不可少的工作。从当前使用的技术手段来看,对于我国各类水域大片分布的砂和硬粘土(约占 40% 区域)等未固结-半固结的硬底质沉积物,要获取保存完好的长岩芯,振动活塞取样器是一种简便、快捷的取样设备。与工程钻机相比,振动活塞取样器的优势主要表现在 4 个方面:一次可完成较大的穿入深度,并能获取连续、完整的岩芯(而钻机往往需要用多个回次完成);工作消耗低、操作简便、灵活;取样效率高(作业时船只无需抛锚);适用范围广。

从国内多家相关单位的使用情况来看,目前的振动活塞取样器(DDC-Z-1 型及其前期设计产品)在设计上还存在一定的缺陷,如设备底盘过大、收放操作流程比较复杂以及取芯长度受到船舶吊装设备的限制等,这严重阻碍了该设备更大范围地推广。

针对上述技术缺陷,依托海洋局重点海洋高新技术项目“悬垂振动活塞取样器研制”,国家海洋局第一海洋研究所的李泽林、张道建和青岛海洋地质研究所的李春等同志对振动活塞取样器从整体设计上进行了重新研究和技术革新,并研制成功了 DDC-XZ-1 型悬垂振动活塞取样器。与目前普遍使用的 DDC-Z-1 型振动活塞取样器相比,该设备有以下几个特点:

- 1) 利用浮体取代了庞大的底盘来保持取样管在水下的垂向平衡,从而减小了设备的体积。
- 2) 改进了振动器的密封设计,密封效果大大改善,从而使设备的稳定性和适用水深大幅度提高。
- 3) 增大了振动器的输出功率,并对振动频率进行了优化设计,使输出激振力大幅度提高,从而提高了取样贯入速度,并使样品扰动程度得以明显降低。
- 4) 配备了同轴钢芯电缆,使现场操作更加安全可靠。

DDC-XZ-1 型悬垂振动活塞取样器的主要技术指标:1) 振动器功率 7.5kW(AC380V, 50Hz)最大输出激振力 20.0kN;2) 取样长度 7—8m(样品直径为 70mm);3) 适用水深 10—400m;4) 设备最大直径 1000mm;5) 设备总重(不含浮体)600—1000kg(可根据水深和底流情况加以调节)。

该设备可用于水深小于 200m 的滨浅海、湖泊、河流等水域的硬底质沉积物调查,岩土工程勘察、海洋矿物调查、地球化学调查等。