

文章编号: 1000-0615(2018)09-1348-10

DOI: 10.11964/jfc.20171211109

急性氨氮胁迫对虎斑乌贼肝脏、鳃和脑组织结构的影响

陈思涵, 彭瑞冰*, 黄晨, 赵晨曦,
李建平, 薛瑞萍, 蒋霞敏
(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

摘要: 为了探讨氨氮对虎斑乌贼器官组织结构的影响, 以体质量为(13.80±0.65)g的幼虎斑乌贼为对象, 研究了氨氮胁迫对其肝脏、鳃和脑组织结构的影响。根据96 h的LC₅₀实验结果设计5个梯度(0、1、3、6和12 mg/L)进行96 h的氨氮胁迫后, 利用光学显微镜和透射电子显微镜观察其肝脏、鳃和脑组织结构。结果显示, 在相同浓度的氨氮胁迫下, 虎斑乌贼不同组织器官之间损伤程度存在差异, 其中肝脏损伤的程度最大, 对氨氮胁迫表现最敏感, 其次是鳃组织和脑组织, 组织器官损伤程度与氨氮浓度呈现正相关。氨氮胁迫浓度越大或胁迫时间越长, 肉眼观察发现肝脏颜色越鲜红, 肿胀和易糜烂程度越明显, 可通过肉眼观察肝脏颜色和肿胀程度初步判断机体氨中毒程度; 氨氮胁迫后, 对肝脏和鳃组织造成较为严重的损伤, 可能是虎斑乌贼氨中毒致死的原因。当氨氮高于或等于6 mg/L时胁迫96 h后, 通过显微观察发现肝小叶轮廓模糊不完整、排列不紧密和胞浆疏松透明, 大量的细胞核溶解, 细胞出现空泡化, 肝血窦扩张; 通过电镜观察发现细胞核皱缩变形、核仁消失、线粒体嵴紊乱、线粒体空泡化、线粒体外室肿胀, 高尔基体数量减少; 显微观察发现鳃组织的泌氯细胞和上皮细胞核溶解, 细胞出现空泡化、排列紊乱, 鳃丝肿胀淤血、轮廓模糊不完整, 并出现坏死脱落和缺损; 通过透射电镜观察, 发现细胞核皱缩、核膜破损和细胞核裂解, 线粒体出现了皱缩变形、空泡化和不完整破损现象; 观察脑组织的神经团和视叶, 未发现脑组织的细胞有显著损伤。

关键词: 虎斑乌贼; 氨氮胁迫; 组织结构; 脑组织

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

虎斑乌贼(*Sepia pharaonis*)隶属于软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、乌贼属(*Sepia*), 俗称“墨鱼”, 是我国重要的经济头足类之一, 肉质细嫩鲜美、营养价值高、生长速率快, 养殖120 d就可上市(体质量可达0.5 kg以上)等特点, 被认为是一种极具养殖发展前景的头足类^[1-2]。近年来, 随着虎斑乌贼的人工繁育和养殖的不断发展, 各种问题接踵而至, 应对水环境因子突变时, 虎斑乌贼表现出较高的敏感性^[3]。其对氨氮污染胁迫较大多数鱼类和虾蟹类更加敏感, 当水中氨氮稍高, 就会引起乌贼

喷墨, 甚至大量死亡, 这已成为影响虎斑乌贼养殖业发展的重要瓶颈之一^[4]。

氨氮是养殖水体中常见的污染胁迫因子之一, 其在水体中通常以非离子氨(NH₃)和离子氨(NH₄⁺)的形式存在, 其中氨氮的毒性主要来源于NH₃, 其具有较高的脂溶性, 极易穿过细胞质膜在体内过度积累, 会导致机体的组织器官受损, 使其发生病变和免疫力下降^[5]。许星鸿等^[6]研究发现, 高浓度氨氮(20 mg/L)胁迫日本鳀(*Charybdis japonica*)后, 会导致其肝胰腺的上皮细胞形态不规则, 胃上皮细胞的排列规则。Benli等^[7]

收稿日期: 2017-12-28 修回日期: 2018-03-16

资助项目: 国家自然科学基金(41806186); 宁波市农业重大科技专项(201401C11001)

通信作者: 彭瑞冰, E-mail: pengruibing@nbu.edu.cn

研究发现尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)在慢性氨氮胁迫下,其鳃组织的毛细血管扩张、鳃小片充血和聚拢,泌氯细胞增生。Chen等^[8]发现氨氮胁迫日本对虾(*Penaeus japonicus*)后,其鳃组织的上皮细胞排列紊乱,质膜内褶减少和细胞器受损,鳃腔狭窄,并降低血淋巴输送氧气功能。张武肖等^[11]报道了在氨氮浓度为25 mg/L水体中胁迫48 h后,团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)肝细胞肿大、细胞核溶解、肝细胞空泡化、充血、血窦扩张和形成点状病灶,肾小管上皮细胞坏死。本研究拟通过研究不同浓度氨氮对虎斑乌贼器官组织结构的影响,探讨对氨氮胁迫最敏感的虎斑乌贼器官组织,分析其氨中毒致死的原因,并找出判断虎斑乌贼氨中毒程度的依据。

以往研究表明鳃、脑、肝脏(肝胰腺)和肾脏是受氨氮胁迫的主要组织器官,且鳃、脑和肝脏在氨氮胁迫下受到损伤是导致死亡的主要因素^[7, 9-10]。虎斑乌贼体内没有肾脏,本研究以虎斑乌贼的鳃、脑、肝脏为对象,利用光学显微镜和透射电子显微镜观察不同浓度氨氮胁迫后虎斑乌贼的肝脏、鳃和脑组织的结构变化。将有利于揭示氨氮胁迫对虎斑乌贼组织器官的影响程度和氨中毒致死原因,同时为虎斑乌贼育苗与养殖过程中的水质管理提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验乌贼和饲养条件

本实验在浙江舟山水产研究所实验基地进行。实验所用的虎斑乌贼来自舟山水产研究所,选取250只规格整齐、活力好、健康的幼体[平均体质量(13.80±0.65)g],平均分配到室内5个塑料桶(150 L,高1.30 m,直径1.20 m),实验前,先进行1周的暂养。暂养期间所用水为砂滤的海水[盐度29.0±1.0,温度(24±0.5)°C,溶解氧(7.53±0.63)mg/L, pH 8.02±0.13,氨氮含量为(0.02±0.01)mg/L,亚硝态氮(0.02±0.01)mg/L]。暂养期间每天投饵量为乌贼总重的15%(冰鲜虾),分3次投喂(8:30、12:30和17:30),每天换水1次(9:30),换水量为80%。每天(16:00)测量水质1次。盐度、温度、溶解氧和pH使用YSI(YSI, Yellow Springs, Ohio, USA)测定。氨氮和亚硝酸氮使用HACH试剂盒测定(Hach, DR-2000, Loveland, Colorado, America)。

1.2 实验设计

在实验前,先通过预实验得出氨氮胁迫下24 h后导致虎斑乌贼100%死亡的最小胁迫浓度(LC_{100, 24 h})和96 h(LC_{0, 96 h})0%死亡的最大胁迫浓度,然后分别以LC_{0, 96 h}和LC_{100, 24 h}为上下限,按照对数间距设立6个实验浓度。统计出各个时间点的死亡率,通过直线插法求出氨氮96 h的LC₅₀浓度。最终通过预实验得出,本实验所使用的幼乌贼96 h半致死浓度为11.90 mg/L。

在此基础上,按照幼乌贼96 h半致死浓度设计5个梯度,氨氮浓度分别为0(对照组)、1、3、6和12 mg/L,各3平行组,每平行15个幼体;实验在15个150 L塑料桶中进行,每一个桶为一个平行组,各梯度采用10 mg/L的氯化铵溶液进行调节。实验期间不投饵,日常管理和暂养期间一致,换水时更换等温、等盐和相同氨氮浓度的海水。实验为期96 h,每隔6 h进行总氨氮浓度的测定,如发现实验组氨氮浓度有改变,用10 mg/L的氯化铵溶液进行调节。实验期间各实验组水质参数如表1所示。

每一平行组随机取3只幼体,用0.15 mol/L的MgCl₂麻醉后进行解剖,取各实验组虎斑乌贼的肝脏、鳃和脑组织,先用生理盐水进行漂洗,使用数码相机拍照(Canon, EOS 80D)。后分成两半,一半用于光学显微镜观察;另一半用于透射电镜观察。

组织学切片 把样品切成5 mm×5 mm×5 mm大小,用波恩氏液固定4 h后,换新的波恩氏液保存于4 °C待用。

固定好的样品首先经过酒精梯度脱水,二甲苯透明、石蜡包埋、轮转式切片连续切片,切片厚度约5 μm,用苏木精-伊红进行染色,中性树胶封片, Olympus BX-50型荧光显微镜观察并拍照。

超微结构观察 肝脏、鳃和脑(视叶和神经团)用刀片切成约0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm的小块,放入过滤海水配制的2.5%戊二醛中固定,4 °C保存,回到实验室后用0.1 mol/L的磷酸缓冲液进行漂洗,再用1%的锇酸于4 °C固定2 h,用梯度酒精和丙酮进行脱水处理, Epon812氏环氧树脂渗透、包埋,在LKB-II型超薄切片机上进行切片,使用醋酸铀和柠檬酸铅双染色,之后在日立H-7650型透射电镜上观察并拍照。

表 1 各组实验期间水质参数

Tab. 1 Seawater quality parameters during the experimental period

参数 parameters	实验组 experiment group				
	0 mg/L	1 mg/L	3 mg/L	6 mg/L	12 mg/L
氨氮/(mg/L) ammonia-N	0.02±0.01	1.06±0.02	3.02±0.02	6.14±0.05	12.04±0.08
温度/°C temperature	24.0±0.5	24.0±0.5	24.0±0.5	24.0±0.5	24.0±0.5
盐度 salinity	29.0±1.0	29.0±1.0	29.0±1.0	29.0±1.0	29.0±1.0
pH	8.02±0.12	8.03±0.14	7.98±0.15	7.96±0.17	8.00±0.19
溶解氧/(mg/L) DO	7.43±0.61	7.51±0.53	7.47±0.58	7.52±0.52	7.48±0.63
亚硝酸氮/(mg/L) nitrite-N	0.02±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01	0.03±0.02	0.034±0.02

2 结果

2.1 氨氮胁迫后虎斑乌贼肝组织的显微和超显微观察

对对照组和处理组肝脏的外观进行肉眼观察(图1)。对照组肝脏呈暗红色或褐色,颜色分布均匀;氨氮胁迫组乌贼的肝脏与对照组相比更加鲜红,且出现肿胀、易糜烂现象。

对对照组和处理组的肝脏进行显微观察。对照组的肝脏由许多不规则肝小叶组成,肝小叶内部由腺细胞和边缘的胚细胞组成,肝小叶边缘轮廓清晰,细胞数量多且排列紧密整齐,轮廓清晰(图版I-1, 2)。1 mg/L氨氮胁迫96 h后,出现少数的细胞核溶解现象,少数肝细胞出现空泡化(图版I-3)。3 mg/L氨氮胁迫96 h后,少数细胞核肿大和溶解,少数肝细胞出现空泡化,肝血窦扩张、肝小叶胞浆开始出现轻微的疏松透明的现象(图版I-4)。6 mg/L氨氮胁迫96 h后,肝小叶轮廓模糊不完整,较多的细胞核溶解,较多肝细胞出现空泡化,肝血窦扩张,肝小叶胞浆开始出现中度的疏松透明的现象(图版I-5)。12 mg/L氨氮胁迫96 h后,大量肝小叶轮廓模糊不完整,肝小叶排列不紧密,大量的细胞核溶解,导致细胞坏死,细胞核的数量出现显著的减少,较多肝细胞出现空泡化,肝血窦扩张,肝小叶胞浆开始较严重的疏松透明,肝小叶破裂与不完整(图版I-6)。

对对照组和处理组的肝脏透射电镜观察。对照组细胞核呈圆形或椭圆形,内分布核仁(图版II-1);线粒体呈椭圆形或圆形,内有嵴,清晰可见,结构完整;内质网丰富,其表面上的核糖体和核周隙附近的高尔基体清晰可见



(a)



(b)

图 1 氨氮胁迫对虎斑乌贼肝脏组织的影响

(a)左边为对照组,右边为处理组(12 mg/L, 96 h);(b)从左到右依次为对照组、1、3、6、12 mg/L的肝脏

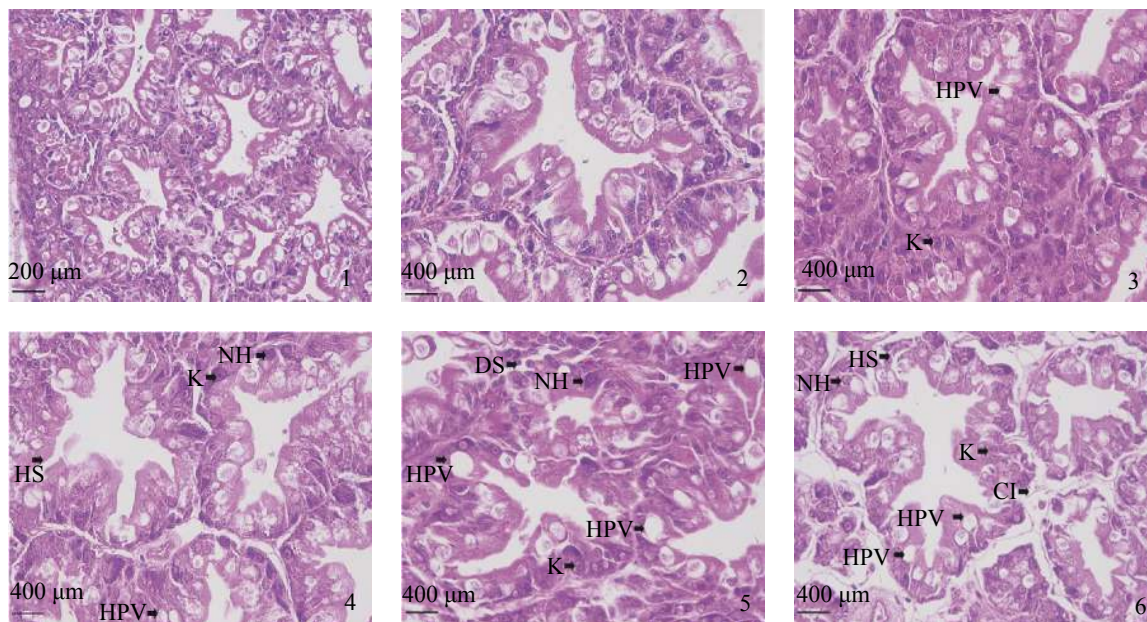
Fig. 1 Effect of ammonia exposure on liver of juvenile *S. pharaonis*

(a) the left side shows cuttlefish of control group, the right side shows *S. pharaonis* of 96 h after exposure to 12 mg/L ammonia; (b) left to right: control group, 1, 3, 6, 12 mg/L of liver

(图版II-3)。12 mg/L氨氮胁迫96 h后,细胞核皱缩变形、形状不规则和体积减少,同时出现核仁消失和核膜破损现象(图版II-2);线粒体出现皱缩变形、嵴紊乱、空泡化和外室肿胀现象;同时高尔基体数量出现了减少(图版II-4)。

2.2 氨氮胁迫后虎斑乌贼鳃组织的显微和超显微观察

对对照组和处理组的鳃组织进行显微观

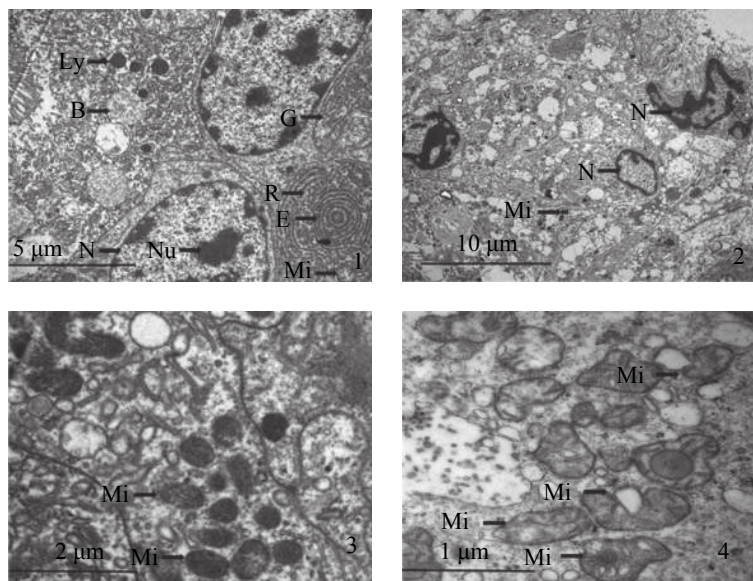


图版 I 氨氮胁迫对虎斑乌贼肝脏显微结构的影响

1, 2. 对照组; 3. 1 mg/L; 4. 3 mg/L; 5. 6 mg/L; 6. 12 mg/L。NH. 细胞核肿大; K. 细胞核溶解; HPV. 肝细胞空泡化; CI. 肝小叶轮廓模糊; DS. 血管扩张

Plate I Effect of ammonia exposure on liver microstructure in juvenile *S. pharaonis*

1, 2. the control groups; 3. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 1 mg/L ammonia for 96 h; 4. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 3 mg/L ammonia for 96 h; 5. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 6 mg/L ammonia for 96 h; 6. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 12 mg/L ammonia for 96 h. NH. nuclear hypertrophy; K. karyolysis; HPV. hepato cellular vacuolation; CI. cellular outline indistinguishable; DS. dilatation in sinusoids



图版 II 氨氮胁迫对虎斑乌贼肝脏超显微结构的影响

1, 3. 对照组; 2, 4. 12 mg/L。N. 细胞核; Nu. 核仁; Mi. 线粒体; G. 高尔基体; E. 内质网; Ly. 溶酶体; R. 核糖体; B. 噬菌体, 下同

Plate II Effect of ammonia exposure on liver ultrastructure in juvenile *S. pharaonis*

1, 3. the control groups; 2, 4. group of *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 12 mg/L ammonia for 96 h. N. nucleus; Nu. nucleolus; Mi. mitochondria; G. golgi; E. endoplasmic; Ly. lysosome; R. ribosome; B. bacteriophage, the same below

察。对照组的虎斑乌贼鳃丝蓝色的细胞核清晰可见且排布均匀, 泌氯细胞和上皮细胞致密有序排列, 鳃丝中间分布着丰富的微血管, 充满被伊红染成红色的红细胞, 鳃丝结构完整清晰(图版III-1, 2)。1 mg/L氨氮胁迫96 h后, 少数泌氯细胞和上皮细胞核溶解, 细胞数量减少, 上皮细胞出现少量空泡化(图版III-3)。3 mg/L氨氮胁迫96 h后, 少数泌氯细胞和上皮细胞核溶解, 数量减少, 少数细胞出现空泡化, 上皮细胞排列紊乱(图版III-4)。6 mg/L氨氮胁迫96 h后, 较多的泌氯细胞和上皮细胞核溶解, 细胞数量减少, 较多上皮细胞出现空泡化, 上皮细胞排列紊乱, 鳃丝肿胀淤血, 鳃丝轮廓模糊不完整, 出现坏死脱落和缺损(图版III-5)。12 mg/L氨氮胁迫96 h后, 较多的泌氯细胞和上皮细胞核溶解, 细胞数量减少, 上皮细胞空泡化严重、排列紊乱、细胞稀疏, 鳃丝肿胀淤血、坏死脱落和断裂缺损(图版III-6)。

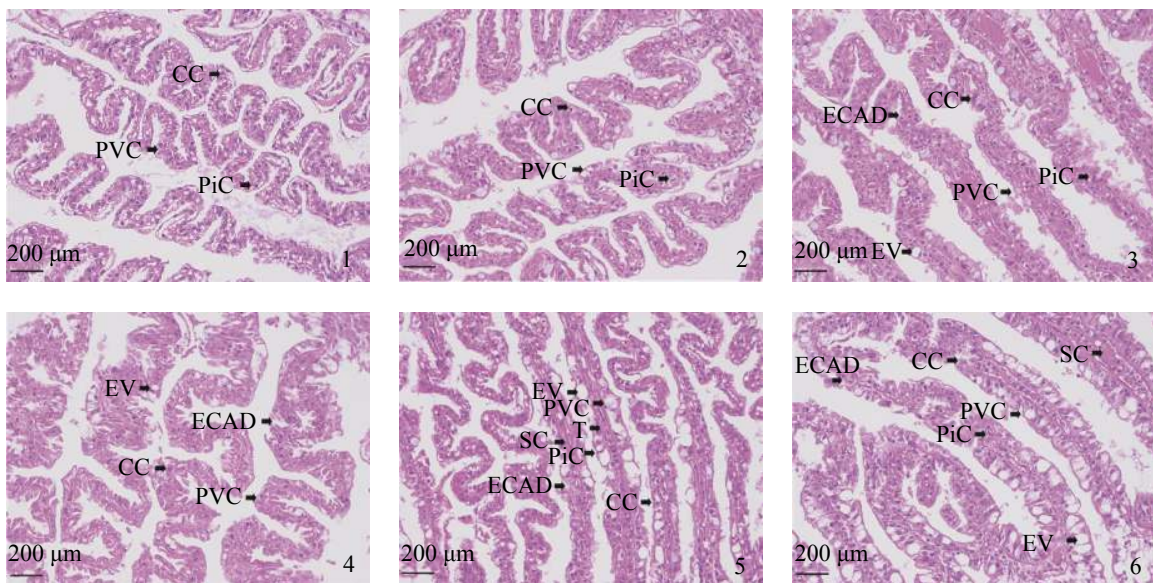
对对照组和处理组的肝脏透射电镜观察。对照组细胞核呈圆形或椭圆形, 内分布核仁(图版IV-1); 线粒体呈椭圆形或圆形, 内有嵴, 清晰可见、结构完整; 噬菌体清晰可见(图版IV-3)。

12 mg/L氨氮胁迫96 h后, 细胞核皱缩、核膜破损、细胞核裂解(图版IV-2); 同时线粒体出现皱缩变形、空泡化和不完整破损现象(图版IV-4)。

2.3 氨氮胁迫后虎斑乌贼脑组织的显微和超显微观察

对对照组和处理组的脑神经团进行显微观察, 虎斑乌贼的脑组织由神经团和视叶组成, 神经团位于中间, 左右为视叶(图版V-1)。对照组和处理组的脑神经团可清晰看到被染成粉红色的神经纤维和被染成紫蓝色的神经细胞胞体(包括圆形的分泌细胞和细长型的支持细胞), 且神经细胞胞体被神经纤维包围, 神经细胞胞体成群体形式出现(图版V-2)。氨氮胁迫组与对照组脑神经团的细胞结构没有显著差异(图版V-3, 4, 5, 6)。

对对照组和处理组的脑视叶进行显微观察, 可清晰看到被染成粉红色的神经纤维和被染成紫蓝色的分泌细胞和支持细胞, 分泌细胞呈层状密集排布, 被神经纤维包围(图版VI-1)。氨氮胁迫组与对照组脑视叶的细胞结构没有显著差异(图版VI-3, 4, 5, 6)。

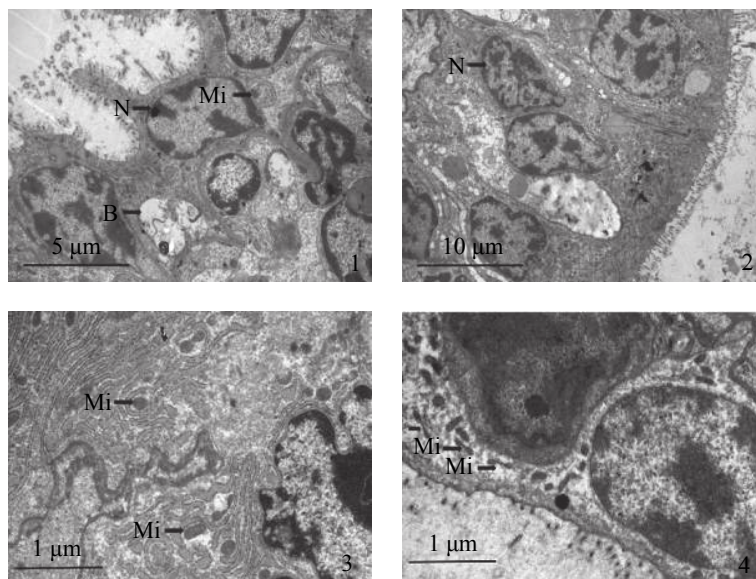


图版 III 氨氮胁迫对虎斑乌贼鳃显微结构的影响

1, 2. 对照组; 3. 1 mg/L; 4. 3 mg/L; 5. 6 mg/L; 6. 12 mg/L。SC. 鳃丝肿胀淤血; CC. 泌氯细胞; PVC. 上皮细胞; PiC. 柱状细胞; T. 毛细血管扩张; ECAD. 上皮细胞排列紊乱; EV. 细胞空泡化

Plate III Effect of ammonia exposure on gill microstructure in juvenile *S. pharaonis*

1, 2. the control groups; 3. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 1 mg/L ammonia for 96 h; 4. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 3 mg/L ammonia for 96 h; 5. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 6 mg/L ammonia for 96 h; 6. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 12 mg/L ammonia for 96 h; SC. swelling and congestion of gill filament; CC. chloride cells; PVC: pavement cells; PiC. pillar cells; T. telangiectasia; ECAD. epithelial cells arranged disorder; EV. cellular vacuolation



图版 IV 氨氮胁迫对虎斑乌贼鳃超显微结构的影响

1, 3. 对照组; 2, 4. 12 mg/L

Plate IV Effect of ammonia exposure on gill ultrastructure in juvenile *S. pharaonis*

1, 3. the control groups; 2, 4. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 12 mg/L ammonia for 96 h

3 讨论

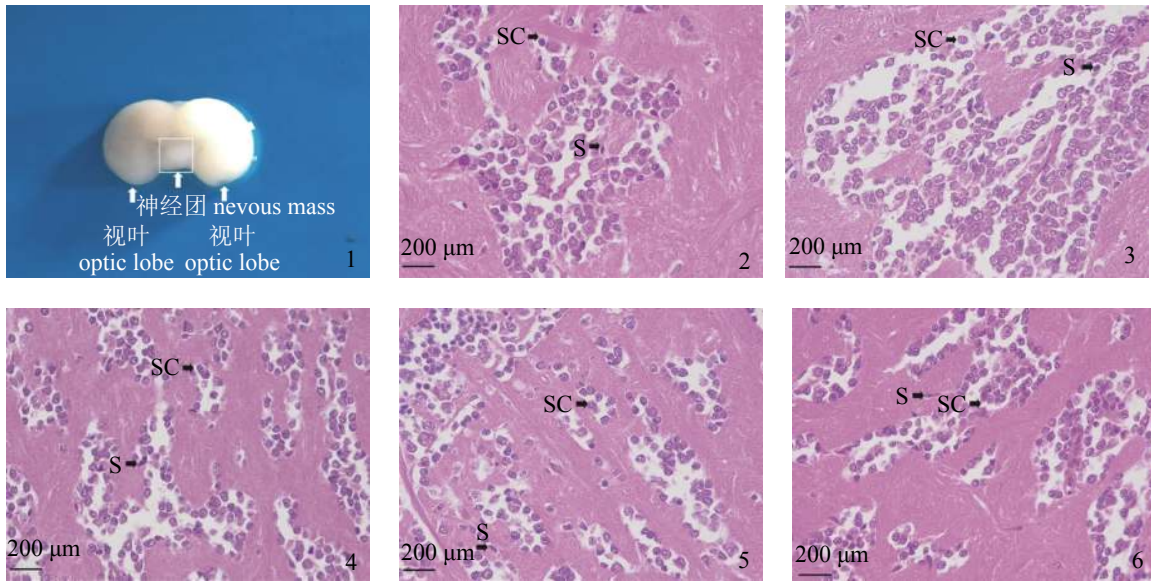
3.1 氨氮胁迫对虎斑乌贼肝脏组织结构的影响

肝脏是机体最大的腺体, 在机体的新陈代谢、功能解毒和免疫防御等方面起着非常重要的作用^[11]。肝脏受损往往会影响机体内解毒、代谢、排泄等活动的正常进行^[9-10, 12]。在氨氮胁迫后, 肉眼观察发现肝脏颜色更加鲜红, 且出现肿胀、易糜烂等现象; 显微观察发现肝小叶轮廓模糊不完整、排列不紧密, 细胞核溶解与空泡化, 肝血窦扩张和肝小叶胞浆疏松透明; 电镜观察发现细胞核皱缩变形、核仁消失, 线粒体嵴紊乱和空泡化, 高尔基体数量减少; 同时本研究发现肝脏损伤程度与氨氮胁迫的浓度和时间呈正相关。这与一些学者的研究结果相似, 如许星鸿等^[6]在研究氨氮胁迫对日本蠶免疫器官结构的影响中发现, 氨氮胁迫会造成日本蠶肝胰腺上皮细胞排列紊乱, 细胞空泡化, 核内染色质凝聚, 核糖体和内质网数量减少。王贞杰等^[13]研究发现急性氨氮胁迫后, 圆斑星鲈 (*Verasper variegatus*) 幼鱼肝细胞肿大、细胞轮廓模糊、血窦扩张、细胞核偏移和溶解、细胞水样变性和空泡化。同时张武肖等^[11]也发现氨氮胁迫会导致团头鲂幼鱼肝组织细胞核溶解和细胞肿胀, 肝细胞充血、水样变性、细胞轮廓模

糊、空泡化和细胞坏死。肝细胞肿大表明细胞活性增加, 但是细胞质空泡化、细胞核解体 and 线粒体受损则表明肝功能受到影响。同时本研究还发现虎斑乌贼肝脏的颜色越鲜红, 肿胀程度越大, 肝脏损伤程度就越大。因此, 通过肉眼观察其肝脏的颜色和肿胀程度, 可初步判断肝脏损伤程度, 并直观判断氨氮胁迫对虎斑乌贼影响程度。目前关于氨氮胁迫导致水产动物死亡主要有以下三种: 第一种是氨氮导致肾脏和肝胰腺等器官发生病变, 最后导致死亡; 第二种是氨氮导致鳃组织上皮细胞排列紊乱, 其质膜内褶减少和细胞器受损, 鳃腔狭窄, 降低血淋巴输送氧气功能, 从而影响其呼吸作用, 最终导致死亡; 第三种是氨氮导致脑组织中细胞肿胀和受损, 最终导致死亡^[9-10]。而从本研究结果来看, 比较不同浓度下肝脏、鳃和脑组织的损伤程度, 发现肝脏对氨氮胁迫最敏感。同时观察氨氮胁迫导致死亡的乌贼, 发现其肝脏肿胀和糜烂现象尤为显著, 大部分肝小叶轮廓模糊不完整、排列不紧密, 大部分细胞核溶解与空泡化。因此氨氮导致肝脏损伤, 可能是导致虎斑乌贼死亡的主要原因之一。

3.2 氨氮胁迫对虎斑乌贼鳃组织结构的影响

鳃是水产动物呼吸、滤食和渗透调节的主要器官^[14-15]。而鳃组织的病变往往影响食物摄

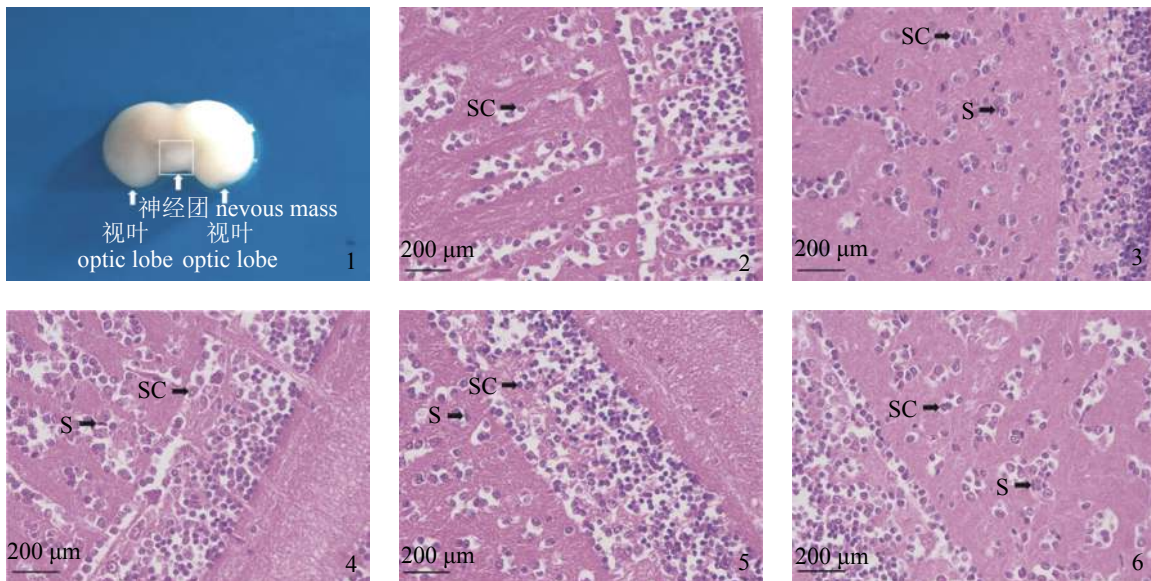


图版 V 氨氮胁迫对虎斑乌贼脑神经团组织显微结构的影响

1. 脑组织结构; 2. 对照组; 3. 1 mg/L; 4. 3 mg/L; 5. 6 mg/L; 6. 12 mg/L。SC. 分泌细胞; S. 支持细胞, 下同

Plate V Effect of ammonia exposure on brain ganglion microstructure in juvenile *S. pharaonis*

1. brain tissue of *S. pharaonis*; 2. control group of the *S. pharaonis*; 3. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 1 mg/L ammonia for 96 h; 4. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 3 mg/L ammonia for 96 h; 5. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 6 mg/L ammonia for 96 h; 6. group of the *S. pharaonis* were exposed to concentrations of 12 mg/L ammonia for 96 h. SC. secretory cell; S. sertolice, the same below



图版 VI 氨氮胁迫对虎斑乌贼脑视叶组织显微结构的影响

Plate VI Effect of ammonia exposure on brain optic lobes microstructure in juvenile *S. pharaonis*

取、酸碱和离子平衡调节、呼吸作用和含氮废弃物的排泄等生理活动^[16]。本实验结果显示, 氨氮胁迫会导致鳃的泌氯细胞和上皮细胞核溶解, 细胞数量减少、空泡化, 鳃丝肿胀淤血和轮廓模糊不完整, 并出现坏死、脱落和缺损现

象; 而通过透射电镜观察, 发现细胞核皱缩、核膜破损和细胞核裂解, 线粒体出现了皱缩变形、空泡化和不完整破损现象。且虎斑乌贼鳃损伤程度随氨氮胁迫浓度的升高和胁迫时间延长而增加。虎斑乌贼在较高浓度(≥ 6 mg/L)氨氮

胁迫96 h后,鳃的泌氯细胞和上皮细胞出现了显著的坏死。Chen等^[8]发现氨氮胁迫会破坏日本对虾鳃组织器官的上皮细胞,导致其质膜内褶减少和细胞器受损。郝小凤等^[9]研究发现泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)在50 mg/L和150 mg/L氨氮浓度胁迫后,鳃组织的上皮细胞水肿,在250 mg/L氨氮浓度胁迫下鳃小片聚拢,而在氨氮浓度450 mg/L的胁迫下,鳃上皮细胞出现坏死。胡毅等^[17]研究发现青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)在氨氮为中浓度(10 mg/L)胁迫12 h后和高浓度(20 mg/L)胁迫6 h后,随着胁迫时间和浓度增加,其鳃上皮细胞出现部分脱落,泌氯细胞出现死亡,渗透调节受到破坏,鳃生理功能无法正常运行,最终导致青鱼死亡。本研究结果表明氨氮胁迫会导致鳃的泌氯细胞和上皮细胞出现坏死,鳃小片融合、鳃腔狭窄,而它受损会降低血淋巴输送氧气功能;同时也影响渗透调节,损害鳃的离子交换和含氮废弃物的排泄等正常的生理活动,是导致死亡的主要原因之一。

3.3 氨氮胁迫对虎斑乌贼脑组织结构的影响

脑是神经中枢,乌贼的神经系统高度集中,是无脊椎动物中最为发达的,脑部结构复杂,且具有较好的运动、感觉以及认知能力^[18]。在氨中毒致死研究中,有学者研究表明氨氮胁迫导致脑组织细胞内谷氨酰胺的含量增加,其在脑组织中过多的积累,会导致脑组织中星状胶质细胞破裂,使得颅内压升高,最终导致死亡^[19-20]。也有研究表明氨氮对水产动物的危害机理主要是由于高浓度氨氮胁迫后,大量钙离子流入中枢神经系统,导致大脑的细胞死亡^[21]。然而,也有学者对以上观点提出不同的见解,认为水产动物氨中毒致死可能与脑组织星状胶质细胞肿胀诱发的氧化损伤和免疫抑制有关^[22-24]。针对水产动物氨中毒致死的原因还存在争论。然而对于乌贼来说,在氨氮胁迫后是否出现谷氨酰胺过量积累,或过量钙离子流入导致脑细胞肿胀、细胞破裂死亡的现象有待进一步探究。本研究通过显微和透射电镜对脑组织的神经团和视叶观察,发现虎斑乌贼在不同浓度氨氮胁迫后,其脑组织均没有出现显著的细胞核溶解、细胞破裂死亡的现象。从脑组织显微结构的结果来看,由于受到图片的局限性,无法明确判断出脑组织细胞肿胀。因此要彻底阐明氨氮胁迫对脑组织的影响,尚需要更多的证据。

急性氨氮胁迫下,虎斑乌贼不同组织器官之间损伤程度存在差异,其中肝脏损伤的程度最大,其次是鳃组织和脑组织。可通过肉眼观察肝脏颜色和肿胀程度,初步判断机体氨中毒程度。氨氮胁迫后,肝脏和鳃组织损伤较为严重,可能是虎斑乌贼氨中毒致死的原因。因此,在生产中应当注意对养殖水体的监测和管理,防止氨氮对虎斑乌贼的毒性效应。

参考文献:

- [1] 彭瑞冰,乐可鑫,蒋霞敏,等.虎斑乌贼受精卵卵黄营养成分分析[J].水产学报,2015,39(7):1034-1042.
Peng R B, Le K X, Jiang X M, et al. Analysis of nutritive composition of yolk of fertilized egg of *Sepia pharaonis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(7): 1034-1042(in Chinese).
- [2] 阮鹏,蒋霞敏,韩庆喜,等.社会等级因素对虎斑乌贼生长、存活及相关酶活的影响[J].水产学报,2016,40(12):1897-1905.
Ruan P, Jiang X M, Han Q X, et al. Effects of social hierarchy on the growth, survival and related enzyme activities of *Sepia pharaonis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(12): 1897-1905(in Chinese).
- [3] Peng R B, Le K X, Wang P S, et al. Detoxification Pathways in response to environmental ammonia exposure of the cuttlefish, *Sepia pharaonis*: glutamine and urea formation[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2017, 48(2): 342-352.
- [4] Peng R B, Wang P S, Le K X, et al. Acute and chronic effects of ammonia on juvenile cuttlefish, *Sepia pharaonis*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2017, 48(4): 602-610.
- [5] Sinha A K, Rasoloniriana R, Dasan A F, et al. Interactive effect of high environmental ammonia and nutritional status on ecophysiological performance of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) acclimated to reduced seawater salinities[J]. Aquatic Toxicology, 2015, 160: 39-56.
- [6] 许星鸿,张雁秋,阎斌伦,等.氨氮胁迫对日本鳎免疫生理指标及器官结构的影响[J].生态学报,2014,34(14):3885-3894.
Xu X H, Zhang Y Q, Yan B L, et al. Effects of ammonia-N stress on immunity-related indicators and histological structure of some organs of the marine crab,

- Charybdis japonica*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(14): 3885-3894(in Chinese).
- [7] Benli A Ç K, Köksal G, Özkul A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology[J]. Chemosphere, 2008, 72(9): 1355-1358.
- [8] Chen J C, Cheng S Y, Chen C T. Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1994, 109(2): 339-347.
- [9] 郝小凤, 刘洋, 凌去非. 氨氮对泥鳅的急性毒性及其肝、鳃组织超微结构的影响[J]. 水生生态学杂志, 2012, 33(5): 101-107.
- Hao X F, Liu Y, Ling Q F. Acute toxicity test of ammonia nitrogen and effects of ammonia-N stress on the ultrastructure of gill and liver of *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Journal of Hydroecology, 2012, 33(5): 101-107(in Chinese).
- [10] Hegazi M M, Attia Z I, Ashour O A. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure[J]. Aquatic Toxicology, 2010, 99(2): 118-125.
- [11] 张武肖, 孙盛明, 戈贤平, 等. 急性氨氮胁迫及毒后恢复对团头鲂幼鱼鳃、肝和肾组织结构的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(2): 233-244.
- Zhang W X, Sun S M, Ge X P, *et al.* Acute effects of ammonia exposure on histopathology of gill, liver and kidney in juvenile *Megalobrama amblycephala* and the post-exposure recovery[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(2): 233-244(in Chinese).
- [12] 洪美玲, 陈立桥, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412-418.
- Hong M L, Chen L Q, Gu S Z, *et al.* Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 412-418(in Chinese).
- [13] 王贞杰, 陈四清, 曹栋正, 等. 急性氨氮胁迫对圆斑星鲃(*Verasper variegatus*)幼鱼鳃和肝组织结构及相关酶活性的影响[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 59-69.
- Wang Z J, Chen S Q, Cao D Z, *et al.* Effects of acute ammonia nitrogen stress on histopathology of gill and liver and enzyme activities of juvenile *Verasper variegatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(2): 59-69(in Chinese).
- [14] Wong C K C, Wong M H. Morphological and biochemical changes in the gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure[J]. Aquatic Toxicology, 2000, 48(4): 517-527.
- [15] Shiohiri N S, Paulino M G, Carraschi S P, *et al.* Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2012, 34(2): 388-396.
- [16] Velmurugan B, Selvanayagam M, Cengiz E I, *et al.* Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, Kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2007, 24(3): 286-291.
- [17] 胡毅, 黄云, 钟蕾, 等. 氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝 Na⁺/K⁺-ATP酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(4): 538-545.
- Hu Y, Huang Y, Zhong L, *et al.* Effects of ammonia stress on the gill Na⁺/K⁺-ATPase, microstructure and some serum physiological-biochemical indices of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 538-545(in Chinese).
- [18] Suzuki H, Yanaka A, Shibahara T, *et al.* Ammonia-induced apoptosis is accelerated at higher pH in gastric surface mucous cells[J]. Gastrointestinal and Liver Physiology, 2002, 283(4): G986-G995.
- [19] Smart G R. Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish-gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to acutely lethal concentrations[J]. Journal of Fish Biology, 1978, 12(1): 93-104.
- [20] Wicks B J, Randall D J. The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation of ammonia[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2002, 132(2): 275-285.
- [21] Randall D J, Tsui T K N. Ammonia toxicity in fish[J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, 45(1-12): 17-23.
- [22] Van der Linden A, Verhoye M, Nilsson G E. Does anoxia induce cell swelling in carp brains? *In vivo* MRI measurements in crucian carp and common carp[J]. Journal of Neurophysiology, 2001, 85(1): 125-131.

- [23] Ip Y K, Tay A S L, Lee K H, *et al.* Strategies adopted by the swamp eel *Monopterus albus* to survive in high concentrations of environmental ammonia[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2004, 77: 390-405.
- [24] 黎庆, 龚诗雁, 黎明. 慢性氨氮暴露诱发黄颡鱼幼鱼谷氨酰胺积累、氧化损伤及免疫抑制的研究[J]. *水产学报*, 2015, 39(5): 728-734.
- Li Q, Gong S Y, Li M. Chronic ammonia toxicity induces glutamine accumulation, oxidative damage and immunosuppression of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(5): 728-734(in Chinese).

Effects of acute ammonia exposure on histopathology of liver, gill and brain in juvenile cuttlefish (*Sepia pharaonis*)

CHEN Sihan, PENG Ruibing*, HUANG Chen, ZHAO Chenxi,
LI Jiangping, XUE Ruiping, JIANG Xiamin
(College of Ocean, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The aim of this study is to investigate the toxic effects of ammonia-N stress on the histopathological changes of liver, gill and brain in juvenile cuttlefish (*Sepia pharaonis*). The *S. pharaonis*, whose initial average weight was (13.80±0.65) g, were first exposed to ammonia-N for 96 hours and then the 96 hours median lethal concentration was obtained. In this study, we established a control group (0 mg/L) and four different ammonia nitrogen concentrations of 1, 3, 6, and 12 mg/L for the acute ammonia toxicity experiment according to preliminary experimental results, and each ammonia-N level was respectively sampled at 96 h. The liver, gill and brain tissues were observed by optical microscope and transmission electron microscope. The results showed that the severity of lesions clearly differed among organs with the liver showing the most extensive damages, followed in order by the gill and brain. And there was no damage to the brain tissue. The damages of liver and gill increased with increasing exposure concentration and time. It is found that the liver is bright red, swollen, and easily eroding from the 96 h after exposure to no less than 6 mg/L ammonia. Microscopical observation showed that the liver displayed hypertrophy of hepatocytes, nuclear hypertrophy, cellular peripheral nucleus, hepato cellular vacuolation, hydropic degeneration, necrosis, dilatation in sinusoids, cellular outline indistinguishable and cytolysis. The transmission electron microscope observation showed the hepatocyte nuclear crinkle deformation, the nucleolus disappearance, the mitochondrial crista disorder, the vacuolation and the outer chamber swelling, and the number of Golgi bodies decreased. Microscopical observation showed shedding epithelial cells from gill lamella, irregular array and some necrosis phenomenon, vessel of gill filaments was pycnosis or even became cavum, and branchial swelling and congestion. The transmission electron microscope observation showed gill epithelium and chloride nuclear membrane breakage, and nuclear cleavage, mitochondrion has crinkle deformation, vacuolization and incomplete breakage. While the brain tissue and the optic lobes were observed, there was no cell damage in the brain tissue.

Key words: *Sepia pharaonis*; acute ammonia exposure; structure; brain

Corresponding author: PENG Ruibing. E-mail: pengruibing@nbu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41806186); Science and Technology Department of Ningbo (2014C11001)