

四眼斑水龟雌性生殖器官组织结构的季节变化

傅丽容, 洪美玲, 史海涛*, 张扬波, 钟昌茂

(海南师范大学生物系, 海口 571158)

摘要:应用石蜡常规切片, HE 染色, 分别在 3 月(春季)、8 月(夏季)、10 月(秋季)、1 月(冬季), 对 24 只四眼斑水龟雌性生殖器官组织结构变化进行研究, 结果表明: 四眼斑水龟雌性生殖器官的形态和结构存在季节性的变化, 8 月卵泡开始发育, 卵巢增重, 子宫腺增多; 10 月卵巢增重达最大, 卵泡发育成熟开始排卵, 随后形成黄体, 进入排卵期。翌年的 1~3 月卵巢重量减轻, 输卵管管腔增大, 腺体增多, 子宫肌层不断增厚, 进入产卵期。

关键词: 四眼斑水龟; 卵巢; 子宫

中图分类号: Q 959.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083 (2006) 02-0360-04

Seasonal Changes of Female Reproductive Organs of *Sacalia quadriocellata*

FU Li rong, HONG Mei ling, SHI Hai tao, ZHANG Yang bo, ZHONG Chang mao

(Department of Biology, Hainan Normal University, Haikou 571158)

Abstract: In this paper, the histological structure of 24 *Sacalia quadriocellata* female reproductive organs was observed on paraffin sections stained with HE in March (spring), August (summer), October (autumn) and January (winter). The results showed: seasonal changes happened in female reproductive system for form and structure. In August, follicle began to develop and the weight of ovary and uterine gland increased. In October, the weight of ovary reached maximum, follicle was mature and began to ovulate, then yellow body of ovary formed, entering the ovulatory period.

收稿日期: 2005-12-20 **基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (NO: 30260019)

第一作者简介: 傅丽容 (1965~), 女, 高级实验师, 从事动物解剖生理学研究, E-mail: flr@hainnu.edu.cn * 通讯作者

致谢: 海南医科大学附属医院病理室吴医生、蔡医生, 海南师范大学生物系高金岗副教授, 王力军、何滨老师协助本研究的实验工作和图片校对, 在此一并致以诚挚的谢意!

- [3] Lau M, Shi HT. Conservation and trade of terrestrial and freshwater turtles and tortoises in the People's Republic of China[J]. *Asian Turtle Trade*, 2000, 2: 30~38.
- [4] 龚世平, 徐汝梅, 史海涛. 海南岛淡水龟类区系特点及保护优先性分析[J]. *动物学杂志*, 2003, 38 (6): 68~71.
- [5] 史海涛, 符有利, 汪继超. 四眼斑水龟之谜[J]. *人与生物圈*, 2002, (6): 33~39.
- [6] 周婷. 四眼斑水龟及其人工饲养条件下的生态[J]. *四川动物*, 1997, 15 (增刊): 147~150.
- [7] 王志伟, 洪美玲, 史海涛, 等. 人工饲养条件下四眼斑水龟的食性研究[J]. *四川动物*, 2005, 24 (2): 218~221.
- [8] 洪美玲, 傅丽容, 史海涛, 等. 四眼斑水龟消化、呼吸系统的解剖[J]. *动物学杂志*, 2004, 39 (1): 68~71.
- [9] 傅丽容, 洪美玲, 史海涛, 等. 四眼斑水龟的泄殖系统解剖[J]. *动物学杂志*, 2004, 39 (3): 68~71.
- [10] 谭洪新, 施正瑶, 朱学宝. 水生龟鳖类能量生态学研究进展[J]. *上海水产大学学报*, 1998, 7 (3): 238~244.
- [11] 崔亚东. 乌龟冬眠后期和活动期肝糖、肝含水量研究[J]. *淮北煤师院学报*, 1999, 20 (1): 55~57.
- [12] 朱泽瑞, 向丹, 廖艳阳, 等. 冬眠状态乌龟尿液的生物学特性及生化分析[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2005, 28 (3): 62~67.
- [13] 傅丽容, 洪美玲, 史海涛, 等. 四眼斑水龟的血细胞形态及血液检验分析[J]. *动物学杂志*, 2004, 39 (6): 73~76.
- [14] 汪仁平, 周应健, 王朝林, 等. 扬子鳄生活习性与环境温度的关系[J]. *动物学杂志*, 1998, 33 (2): 32~35.
- [15] 李鸽鸣, 贺佩兰, 舒田东. 棘腹蛙温度生态学的初步研究[A]. *中国动物学会成立 60 周年纪念论文集 C*. 1994: 270~274.
- [16] 罗开富, 钟功甫, 等. 海南岛热带农业自然资源与区划(论文集)[C]. 北京: 科学出版社. 1985.
- [17] Fulton T. Rate of growth of seashes[J]. *Fish Scotl Invest Rept*, 1902, 20: 1035~1039.
- [18] 李建立, 刁杨. 蛇岛蝮蛇冬眠温度和湿度的初步影响[J]. *两栖爬行动物学研究* (第 1、2 辑): 110~113.
- [19] Jonsen TA, Chongdon JD, Fischer RU, et al. Morphological characteristics of the lizard *Anolis carolinensis* from south Carolina[J]. *Herpetologica*, 1995, 51 (4): 401~411.
- [20] 陈强. 丽斑麻蜥和草原沙蜥静止代谢率的研究[J]. *兰州大学学报*, 1995, 31 (1): 68~71.
- [21] 康梦松, 李文平, 屈孝初. 影响果子狸人工繁殖因素的探讨[J]. *特产研究*, 1998, 3: 28~30.
- [22] 鲍毅新, 杜卫国. 社鼠肥满度与气候环境的关系[J]. *浙江师大学报*, 2000, 23 (3): 287~290.
- [23] Frisch RE. Malnutrition and fertility[J]. *Science*, 1982, 215: 1272~1273.
- [24] 陈才法, 邹寿昌, 朱卫中. 几种龟类能量的比较研究[J]. *两栖爬行动物学研究* (第 4、5 辑): 225~229.
- [25] 王培潮, 徐宏发, 马伟, 等. 环境温度对乌龟体温与能量代谢的影响[J]. *两栖爬行动物学报*, 1988: 122~127.

The next year , the weight of ovary eased from January to March , oviduct became larger , body of gland increased , muscular layer increased gradually , enter oviposition period .

Key words : *Sacalia quadriocellata* ; ovary ; uterus

四眼斑水龟 (*Sacalia quadriocella*) 因头顶有两对眼斑, 故称“四眼龟”, 具有很高的观赏价值。近年由于滥捕乱杀和生存环境遭到严重破坏, 四眼斑水龟分布范围和种群数量大为缩减, 该种群的濒危引起人们对其研究的重视^[1], 对于四眼斑水龟的生态、生理生化、系统解剖的研究略见报道^[2~7]。有关繁殖生物学方面的研究迄今国内外未见详细报道。自1998年以来, 作者在野外条件下对四眼斑水龟的生态学研究发现, 四眼斑水龟没有冬眠期, 一般于1月底至4月初产卵, 产卵高峰期在3月, 窝卵数平均2枚, 繁殖能力较其它龟低, 因其生性胆怯, 喜栖息于水底隐蔽处, 主要在夜间活动, 故一直未观察到该种龟的交配行为; 在饲养条件下, 虽偶见交配行为, 但产下的卵为未受精卵^[3]。本研究通过组织学的方法对不同季节四眼斑水龟雌性生殖器官组织结构进行观察, 了解四眼斑水龟的繁殖周期, 为四眼斑水龟繁殖生物学研究提供有价值的参考资料, 也可为其养殖提供科学的理论依据。

1 材料与方法

分别于2003~2004年1、3、8、10月从郊县捕龟者处购得实验龟24只, 每次6只, 均为成体, 体重 $259.60 \pm 44.57 \text{ g}$ ($242 \sim 283 \text{ g}$), 对其生殖系统称重、测量并进行解剖。采用常规解剖方法直接进行麻醉, 分离腹甲, 卵巢和输卵管组织块用Bouin氏固定液固定24小时以上, 石蜡包埋, 切片厚度5 μm , 苏木精(haematoxylin)、伊红(eosin)染色。在普通显微镜下观察组织结构并摄影, 显微测微尺测量。

2 实验结果

2.1 不同季节卵巢重量和最大卵泡直径的变化

四眼斑水龟卵巢重量与体重之比和最大卵泡直径与背甲长之比都是在8月开始上升, 10月最大, 分别为 0.21×10^{-2} 和0.041 ($t = 2.471$, $P < 0.05$, $n = 6$), 到次年1月开始下降, 3月降到最小, 分别为 0.10×10^{-2} 和0.016 ($t = 2.612$, $P < 0.05$, $n = 6$) (表1, 2)。

表1 四眼斑水龟的卵巢重量变化 (g)

	样本数	春季 (3月)	夏季 (8月)	秋季 (10月)	冬季 (1月)
卵巢平均重	6	0.25 ± 0.15	0.48 ± 0.05	0.58 ± 0.12	0.36 ± 0.05
体重	6	258.50 ± 12.24	268.19 ± 11.56	269.00 ± 15.23	252.73 ± 13.51
卵巢平均重与体重比	6	0.10×10^{-2b}	0.18×10^{-2a}	0.21×10^{-2a}	0.14×10^{-2b}

注: 同一行中相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著

表2 四眼斑水龟的最大卵泡直径变化 (mm)

	样本数	春季 (3月)	夏季 (8月)	秋季 (10月)	冬季 (1月)
最大卵泡直径	6	2.1 ± 0.03	3.9 ± 2.45	5.18 ± 0.92	3.43 ± 0.95
背甲长	6	125.10 ± 18.25	128.00 ± 11.13	126.00 ± 16.35	124.40 ± 14.36
最大卵泡直径与背甲长之比	6	0.016 ^b	0.030 ^a	0.041 ^a	0.027 ^b

注: 同一行中相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著

2.2 卵巢组织结构和卵泡发育 (图版Ⅲ)

卵巢外为生殖上皮, 向内为结缔组织, 在其间可看到不同发育阶段的卵泡及卵原细胞, 同时亦伴有血管、淋巴及神经等。卵泡发育的不同时期, 其分布没有区域性, 卵泡周围有间质细胞存在。根据卵泡发育的不同阶段分为以下几种: 原始卵泡、初级卵泡、生长卵泡、成熟卵泡 (图版, 1)。

从卵巢最大卵泡的组织学观察看, 春季 (3月) 最大卵泡直径约 $2.1 \pm 0.03 \text{ mm}$, 由1个初级卵母细胞和1层扁平卵泡细胞组成为初级卵泡, 卵

黄逐渐积累, 颗粒细小, 分布稀疏 (图版, 2~3)。夏季 (8月) 卵泡进入生长期, 卵母细胞体积增大, 最大卵泡直径 $3.9 \pm 2.45 \text{ mm}$, 卵黄颗粒富集, 成为油滴状。卵泡细胞仍为单层扁平细胞, 卵泡膜变化不明显 (图版, 4~5)。秋季 (10月) 最大卵泡发育接近成熟, 直径可达 $5.18 \pm 0.92 \text{ mm}$, 卵泡细胞由单层扁平变成单层立方, 卵泡膜内层逐渐转化为多层, 分化明显, 内膜由4~6层立方膜细胞构成, 毛细血管丰富, 其间分布有卵泡腺, 外膜纤维多, 细胞为梭形, 厚度可达内膜的两倍。个

别切片偶见刚排卵的卵泡（图版，6~7）。在秋季还可见一些大卵泡闭锁，卵细胞自溶，卵泡细胞变成长柱状，形态规则，排列紧密，卵泡细胞数量增加，向卵泡中央侵入，使卵泡颗粒层增厚。卵泡膜内外层增厚，卵泡膜内层细胞变大，随着卵泡细胞向中央填充，卵泡膜细胞也向内聚集、皱缩，最后形成黄体（图版，8）。冬季（1月）最大卵泡发育成熟且排卵，排卵后的卵泡形成黄体（图版，10），每张切片中黄体平均3~4个，直径约为1187.5 μm ，白体4~5个。卵巢中遗留的最大卵泡直径约3.43±0.95 mm，卵泡细胞为单层的扁平细胞，卵泡膜的结构和厚度没有变化，属于初级卵泡（图版，9）。

2.3 输卵管的组织学结构

输卵管分为前段的喇叭口，中段和下段的“子宫”，输卵管壁由粘膜、肌层和浆膜3层组成。

2.3.1 粘膜层 是由粘膜上皮和固有膜构成，管腔不规则，粘膜向管腔内突起，形成许多皱壁，形似花瓣状或小峰状突起。喇叭口的粘膜层很薄，中段和子宫粘膜上皮为单层柱状纤毛上皮，上皮细胞

可为两种，一种是纤毛上皮细胞，细胞顶端有纤毛细胞核大，染色较深，细胞质染成淡红色，纤毛细胞在粘膜上皮中占多数。另一种是无纤毛的分泌细胞，细胞核呈圆形，染色浅夹在纤毛细胞中。固有膜在上皮细胞下面，有一层很薄结缔组织，其中可见少量血管、神经和腺体，粘膜上皮可见有微血管和单管状腺体管的开口部。

子宫固有膜腺体存在季节性的变化：春季子宫腺体夹杂在疏松的结缔组织中，由单管状腺体构成，每个单管状腺体由5~8个细胞构成，腺泡腔小，腺体不膨胀，沿着固有膜形成1~2层，排列不规则，腺体数量较少（图版，11）；夏季子宫腺上皮细胞开始分裂增生，腺体层数增加，约是春季的5倍（ $t = 5.952, P < 0.01, n = 6$ ），腺体分泌物少（图版，12）；秋季单管状腺体的腺细胞产生大量分泌物，细胞分界不清，嗜酸性小颗粒充满腺体，腺体极其膨胀（图版，13）；冬季腺体细胞的变化与10月的相似（图版，14），说明秋季和冬季子宫腺分泌旺盛。夏季、秋季、冬季子宫腺厚度没有差异显著性（ $t = 1.932, P > 0.05, n = 6$ ）（表4）。

表4 四眼斑水龟的子宫腺体及肌层厚度变化（ μm ）

样本数		季节 (月份)			
		春季 (3 月)	夏季 (8 月)	秋季 (10 月)	冬季 (1 月)
腺体厚	6	25.02±3.15 ^a	115.67±0.8 ^b	90.25±1.3 ^b	110.18±3.3 ^b
肌层厚	6	426.25±25.15 ^a	362.51±18.02 ^a	708.32±17.1 ^b	681.37±20.15 ^b
子宫壁厚	6	531.25±20.15	525.10±21.07	1150.41±19.31	1116.67±33.06

注：同一行中相同字母表示差异不显著，不同字母表示差异显著

2.3.2 肌层 在粘膜层和浆膜层之间是平滑肌。输卵管的不同节段肌层的厚度不同，喇叭口肌层很薄，中段略厚，后段“子宫”最厚，不同季节子宫平滑肌层数和厚度不一样，春季分3层内斜中环外斜，其它季节分为两层，内层为环行肌，外层为斜行肌，两层之间肌肉分界明显。春季子宫肌层厚度约426.5±12.3 μm ，夏季为362.5±10.1 μm ，秋季为708.3±9.2 μm ，冬季为681.3±14.1 μm ，夏季肌层最薄，秋季和冬季子宫肌层增厚（ $t = 3.962, P < 0.01, n = 6$ ），秋季、冬季子宫壁的增厚主要是由肌层变化引起的。输卵管的最外层为浆膜层，由单层扁平上皮细胞和结缔组织构成，血管多，变化不大（图版，15~18）。

3 讨论

3.1 卵巢的季节性变化

从最大卵泡的周期性变化、卵巢重量与体重的

比值（图1、图2）和组织切片观察，在一定程度上可反映卵巢的季节性变化，8月（夏季）开始，初级卵泡开始生长发育，卵母细胞和卵泡细胞体积增大，卵黄颗粒大量积累，甚至富集成油滴状，卵泡膜结缔组织增厚，同时细胞数目也增多，卵巢重量开始增加，10月（秋季）生长卵泡进一步发育，接近成熟卵泡，卵巢的重量达到最大，偶见黄体，数量不多，说明开始排卵。次年1月（冬季），组织切片观察卵巢内黄体和白体数量增加，显示成熟卵泡排卵进入高峰期，另外有些生长卵泡退化成为闭锁卵泡，卵巢的重量逐渐减少，3月（春季），卵巢内多数卵泡停止生长处于初级卵泡阶段，故卵巢重量减少到最小值。由此推断，四眼斑水龟的雌性生殖具有周期性，秋季开始排卵，冬季排卵达高峰期并且开始产卵，这与野外观察1月开始产卵是相吻合的^[4]。

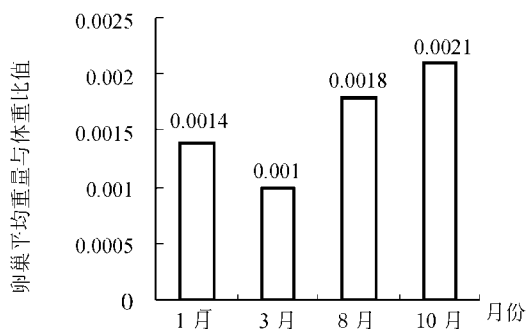


图1 卵巢平均重量与体重比值

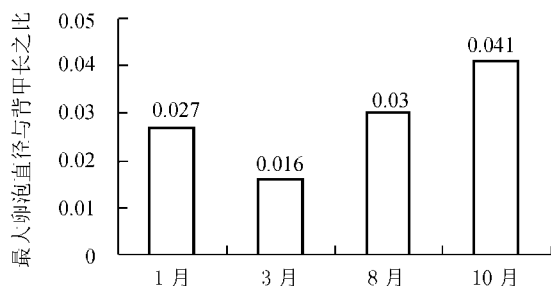


图2 最大卵泡直径与背甲长比值

3.2 卵巢内分泌细胞的变化

从哺乳动物的生殖调控中可知,随着卵细胞生长发育的同时,周围的卵泡细胞由单层的扁平细胞变成多层的立方细胞,能够产生雌激素促进卵泡的生长发育^[8],四眼斑水龟卵泡细胞在卵泡发育的各个时期始终为单层,只是形态上由扁平变成立方,这点与鸟类相同^[8],与哺乳动物不同。卵泡膜内层细胞随着卵泡的生长发育逐渐增多,有些特化形成卵泡腺,卵泡腺可能是雌激素来源之一;秋季有些大卵泡闭锁,一方面可以为减少卵巢的负担,给为数不多的生长卵泡提供营养,另一方面卵泡闭锁后形成黄体为其它卵泡生长发育提供必需的激素,这是雌激素来源之二;另外卵巢排卵后出现明显的持久性的黄体,从而保证了从卵泡生长发育到排卵的整个过程的激素供应。

3.3 输卵管的结构与功能

输卵管从喇叭口至子宫都有其不同的结构特点,其结构和功能相适应。

输卵管主要作用是输送卵子及其受精,输卵管管腔不规则,有许多隆起和纵沟,这种结构有利于卵的停留、营养的吸收和受精。

粘膜上皮纤毛细胞纤毛的摆动以及管壁肌层的收缩都有利于使输卵管内含物及卵子向泄殖腔方向

移动。子宫的腺体和肌层在排卵期变化最为显著,子宫肌层增厚,腺体的数量和体积增加,分泌物大量合成与积累,说明子宫在排卵期机能非常旺盛,一方面分泌粘液,使输卵管润滑,有利于卵的运送,另一方面为形成蛋白质卵壳膜和石灰质卵壳提供物质条件。

3.4 影响四眼斑水龟生殖周期的因素

在整个生态环境中,日照长度和环境温度是影响动物季节性繁殖活动主要因子。乌龟、中华鳖、黄缘盒龟等产卵期一般在5~9月气温升高时^[9,10],在夏季气温高,日照变长,摄食活动加强,卵黄生成加快,为卵泡的发育成熟提供良好的物质条件。海南四眼斑水龟秋季开始进入排卵期,冬季排卵进入高峰期,3月是产卵高峰,没有冬眠期。周婷在南京人工饲养条件下,观察到四眼斑水龟的产卵期是在5月下旬至6月下旬,水温在低于15℃时进入冬眠期,与我们的研究结果不同,原因可能有二:第一,海南属热带季风性气候,长夏无冬,气象资料显示年平均气温在22.8~25.8℃,因此夏季日照长度和环境温度对四眼斑水龟繁殖周期的影响不大;第二,在四眼斑水龟的血液检验分析中发现,夏季四眼斑水龟白细胞数量并未增加,很难防御因气温升高而日益增加的微生物的侵袭^[7],如果在夏季产卵,耗能大、体质虚弱,易染病,因此选择在冬季产卵,可能是减少疾病的一种适应机制。

4 参考文献

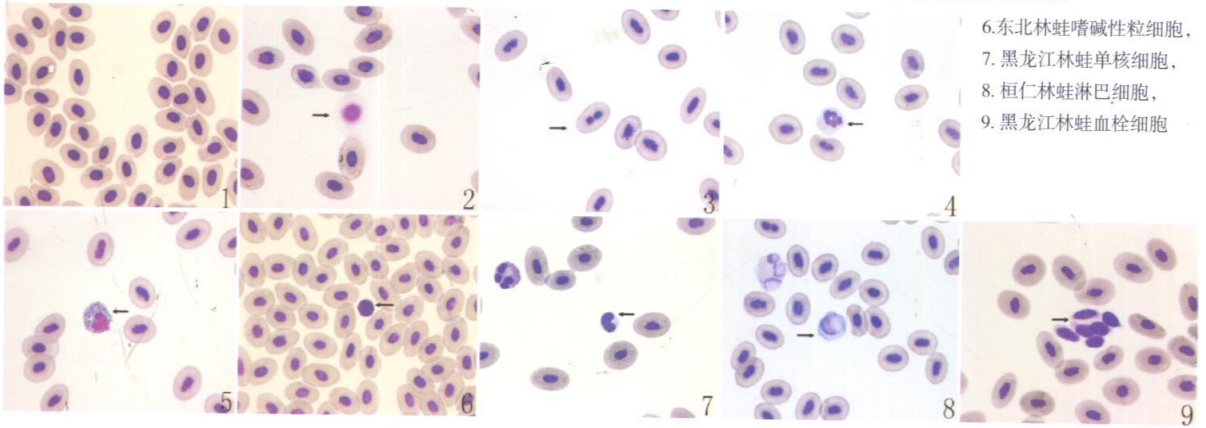
- [1] 赵尔宓主编. 中国濒危动物红皮书——两栖类和爬行类[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 134.
- [2] 夏金叶, 陈莉. 皖南地区龟类生活习性观察及比较[J]. 四川动物, 1983, 2(4): 30~34.
- [3] 周婷. 四眼斑水龟在人工饲养条件下的生态[J]. 四川动物, 1997, 15(增刊): 147~150.
- [4] 史海涛, 符有利, 汪继超. 四眼斑水龟之述[J]. 人与生物圈, 2002, (6): 33~39.
- [5] 洪美玲, 傅丽容, 史海涛, 等. 四眼斑水龟消化、呼吸系统解剖[J]. 动物学杂志, 2004, 39(1): 68~71.
- [6] 傅丽容, 洪美玲, 史海涛, 等. 四眼斑水龟的泄殖系统解剖[J]. 动物学杂志, 2004, 39(3): 68~71.
- [7] 傅丽容, 洪美玲, 史海涛, 等. 四眼斑水龟血细胞形态及血液检验分析[J]. 动物学杂志, 2004, 39(6): 68~71.
- [8] 王建辰, 章孝荣主编. 动物生殖调控[M]. 安徽: 安徽科学技术出版社, 1998: 60~125.
- [9] 黄斌, 杨霁虹, 赵万鹏. 黄缘盒龟的繁殖生物学[J]. 动物学杂志, 2004, 39(4): 40~44.
- [10] 李海, 唐大由. 雌龟生殖周期的季节性变化[J]. 中药材, 1997, 20(9): 441~444.

图版III

刘琳琳, 李淑兰, 赵文阁: 东北产三种林蛙血细胞的比较研究

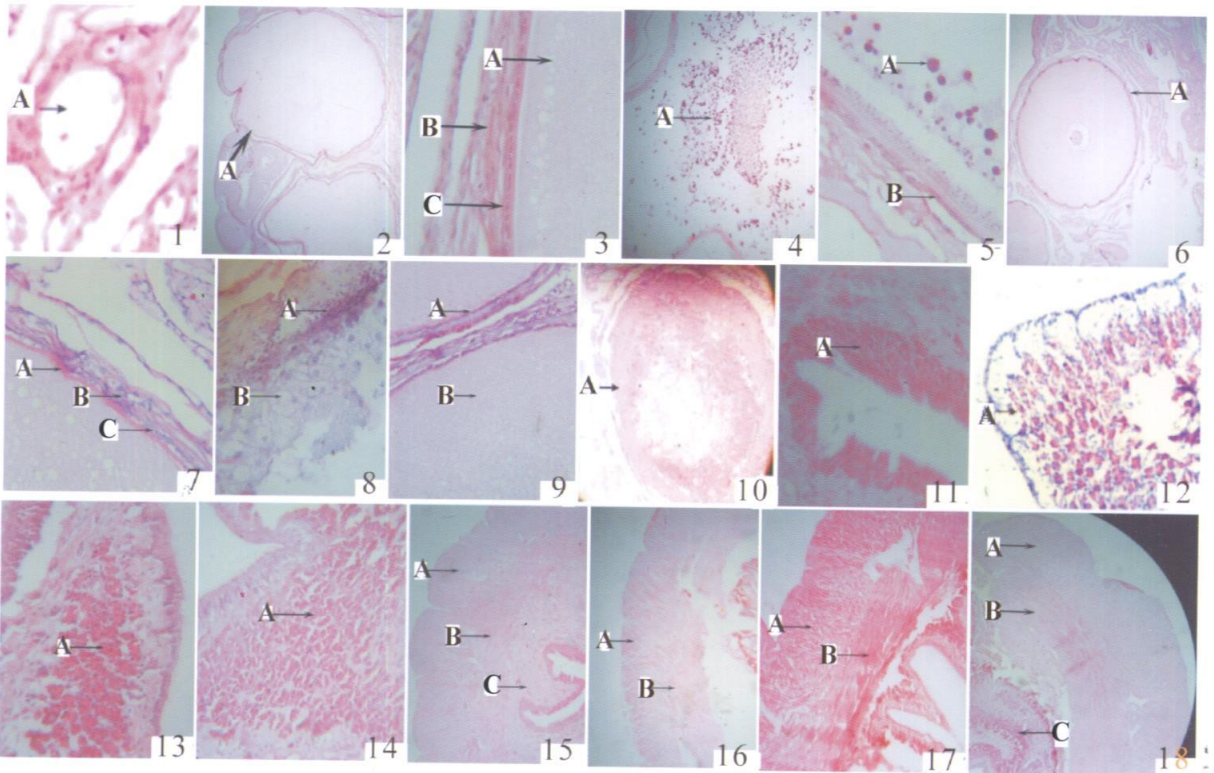
为部分血细胞 (1000×) (注: 由于3种林蛙各类血细胞形态相近, 所以每种血细胞只举一例)

1. 东北林蛙红细胞, 2. 黑龙江林蛙幼稚红细胞, 3. 桓仁林蛙红细胞分裂, 4. 黑龙江林蛙嗜中性粒细胞, 5. 桓仁林蛙嗜酸性粒细胞,



6. 东北林蛙嗜碱性粒细胞,
7. 黑龙江林蛙单核细胞,
8. 桓仁林蛙淋巴细胞,
9. 黑龙江林蛙血栓细胞

傅丽容, 洪美玲, 史海涛, 等: 四眼斑水龟雌性生殖器官组织结构的季节变化



四眼斑水龟卵巢、子宫的显微结构

1. 卵巢 (×880) A 原始卵泡; 2. 春季卵巢 (×40) 初级卵泡; 3. 春季最大卵泡 (×400) A 卵黄, B 外膜, C 扁平卵泡细胞; 4. 夏季最大卵泡 (×100) A 卵黄滴, B 扁平卵泡细胞; 5. 夏季最大卵泡 (×400) A 卵黄滴, B 扁平卵泡细胞; 6. 秋季卵巢 (×40) A 卵泡; 7. 秋季最大卵泡 (×400) A 透明带, B 外膜内层, C 立方卵泡细胞; 8. 闭锁卵泡 (×400) A 外膜内层细胞, B 特化的卵泡细胞; 9. 冬季卵泡 (×400) A 扁平卵泡细胞, B 卵母细胞; 10. 黄体 (×40) A 黄体; 11. 春季子宫内膜 (×400) A 子宫腺; 12. 夏季子宫内膜 (×400): A 子宫腺; 13. 秋季子宫内膜 (×400) A 子宫腺; 14. 冬季子宫内膜 (×400) A 子宫腺; 15. 春季子宫肌层 (×100) A 斜行肌, B 环行肌, C 斜行肌; 16. 夏季子宫肌层 (×40): A 斜行肌, B 环行肌; 17. 秋季子宫肌层 (×40) A 斜行肌, B 环行肌; 18. 冬季子宫肌层 (×40) A 斜行肌, B 环行肌