

# 黑眶蟾蜍腮腺之微細構造、發育、免疫細胞 化學鑑定及分泌物之生化分析

高中組生物科第二名

台北市立建國高級中學

作者：洪廣冀

指導教師：龔素雅

## 一、研究動機

腮腺 (Parotoid gland) 是蟾蜍科 (Bufonidae) 種類特有的器官，其功能可分泌毒液，藉以嚇阻天敵，David (1956) 討論到光顯層次的腮腺微細構造；事實上，許多超顯微的構造，如分泌顆粒即無法利用光顯辨識；故研究者選擇台灣最常見的黑眶蟾蜍 (*Bufo melanostictus*)，進行其腮腺光顯、電顯層次的腮腺微細構造。

根據研究者已往對黑眶蟾蜍生態的調查，可發現一些體長在1~2cm的個體，便已具備腮腺的構造；由此可衍伸出下列的問題：在蟾蜍的蝌蚪時期是否已具備腮腺？在蝌蚪何時的發育階段時，腮腺才會特化成一個器官？目前關於蝌蚪皮膚腺體發育的研究顯示：在早期的發育階段，並未在蝌蚪皮膚中發現任何具分泌能力的腺體，此表示在變態期間，蝌蚪皮膚中有一些細胞會轉變成具分泌毒性物質的腺體 (Tatsunori et al., 1989)；又證實此些腺體是在變態期間自表皮細胞開始發育 (Bovloerg 1963)；而關於蟾蜍腮腺發育過程的文獻則闕如；故研究者初步利用掃描式電顯觀察蝌蚪皮膚的變化；並利用光顯觀察皮膚內腺體的變化，期能對上述的問題進行解決。

## 二、研究材料與方法

### I、材料來源

實驗對象以性成熟的雌性黑眶蟾蜍；材料取自於台北植物園及三芝一帶，挑選SVL (Snout-Vent Length) 大於5cm的個體攜回實驗室，飼於20×20×30 cm<sup>3</sup>的透明飼養箱中，兩天餵食一次；蝌蚪取材自大屯山自然公園，飼育至適當的階段即可供實驗用。

### II、腮腺的微細構造

以脊椎穿刺法或乙醚麻醉蟾蜍，將腮腺取下，分別進行光顯、掃描式電顯、穿透式電顯觀察。

### III、腮腺發育的過程

依Shumway, W. (1940) 的分法，取24~33階段變態期 (Metamorphosis) 的蝌蚪皮膚樣本，以光顯及電顯觀察之。

### 三、結 果

#### I、腮腺的微細構造

##### A.光學顯微鏡的觀察

###### a.表皮層 (Epidermis)

腮腺上方表皮由Euboidal細胞及多面形細胞 (Polyhedral cell) 構成；可區分為角質層 (Stratum corneum)，顆粒層 (Stratum granulosum)，棘狀層 (Stratum spinosum) 及發育層 (Stratum germinativum)。

###### b.真皮層 (Dermis)

###### 1. 黏液腺 (Mucous gland)

表皮下方的真皮層，可觀察到囊狀的黏液腺，以金字塔 (Pyramidalsharp) 形的導管(Duct)開口於表皮，囊壁由橢圓形的肌上皮細胞 (Myoepithelial cell) 構成。

###### 2. 粒狀腺 (Granular gland)

組織的較深層部份可看見密集呈暗紫色橢圓形的粒狀腺，其最外圍為肌上皮細胞 (Myoepithelial cell)，第二層為肌上皮細胞層 (Myoepithelial cell envelope)，最內層為合成細胞分泌區間 (Syncytial secretory compartment)，後二層散佈多個呈條形的核 (Nucleus)，故稱為多核體 (Multicore body)；毒液在粒狀腺內是以分泌顆粒 (Secretory granules) 的形式存在於囊泡 (Acinus) 中。

未成熟的粒狀腺，其分泌區間充滿著完整 (Intact) 的分泌細胞 (Secretory cell)，周圍集中著大量的淋巴質 (Lymphocyte) 及分泌顆粒；未成熟的粒狀腺大小長至與成熟粒狀腺大小相當時，分泌細胞的細胞膜會崩解，細胞質便充滿在囊泡中，形成泡沫狀，此即為泡沫階段 (Vacuolated stage)。

半厚片 (Semi-thin section) 及Toluidine blue染色，可證明在囊泡內至少含有兩種以上的分泌顆粒；一種被染的較淺，類似空泡狀，一種被染的較深。半厚片下合成細胞分泌區間及肌上皮細胞外圍層清晰可辨，其間可觀察到數個小型的橢圓形構造，內部含有2~7個深色的分泌顆粒；此橢圓形構造 (下稱運送者) 可能具有自合成細胞區間及肌上皮細胞外圍層運送進入囊泡；或者運送至外圍的功能。

###### 3. 粒狀腺的更新 (Regeneration)

分別以脊椎穿刺法及擠壓的方式使蟾蜍腮腺釋放出毒液，再做組織切

片觀察，已將分泌顆粒釋放出的粒狀腺，其外圍呈現皺縮的狀態，周圍集中大量的淋巴質及分泌顆粒，外部的結締組織擴張至肌上皮細胞周圍；擠壓後約8小時，外界的淋巴質侵入到內緣的細胞質中；72小時後，囊泡內已出現新的分泌顆粒；此證明粒狀腺擠壓後仍有製造分泌顆粒的功能。在表皮附近導管兩側，出現新發育兩側對稱的更新粒狀腺，在剛開始是位於表皮層中一團散落的獨立細胞（Scattered independent cell），其後向棘狀層發育，形成簡單的胞形腺體（Alveolar gland）；其後中央的細胞逐漸消失形成囊狀的構造，約在10天後發育至與原始的粒狀腺同樣大小。

#### B. 掃描式電子顯微鏡（Scanning Electron Microscope, SEM）的觀察

經掃描式電顯低倍下的觀察，腮腺表面的角質層是由六角形的單位體構成，內部充滿著形狀不規則的角質，邊長為 $8.1818 \pm 2.2989 \mu\text{m}$  ( $\bar{X} \pm \text{SE}$ )；粒狀腺在角質層的開口呈橢圓形，長徑為 $145.4769 \pm 28.6271 \mu\text{m}$  ( $\bar{X} \pm \text{SE}$ )，最短距離為 $43.7864 \pm 10.8349 \mu\text{m}$  ( $\bar{X} \pm \text{SE}$ )，黏液腺的開口呈圓形，直徑為 $12.2449 \pm 1.1180 \mu\text{m}$  ( $\bar{X} \pm \text{SE}$ )。

以乾燥斷裂法（Dry-fracturing technique）研究腮腺內部的立體構造，可發現粒狀腺是位於類似鳥巢狀的構造中，周圍則為肌纖維；粒狀腺亦為圓形，直徑在 $312.4667 \pm 56.9017 \mu\text{m}$  ( $\bar{X} \pm \text{SE}$ )，導管在粒狀腺上的開口亦為圓形。

#### C. 穿透式電子顯微鏡（Transmission Electron Microscope, TEM）的觀察

藉由半厚片及光顯下的觀察，證明囊泡中存在著兩種分泌顆粒，利用穿透式電顯進一步觀察之，可看見其形狀呈圓形，外圍包著雙層膜，依其內部構造不同，可分為兩種：一種內部為可透過電子的泡狀物（Electron-translucent vacuoles），其中充滿著小滴（Droplet）狀的均質電子密度物質（Homogeneous electron-dense matrix），此應為儲存顆粒（Storage granule）。另一種內部有發達的電子不透明膜狀構造（Electron-opaque membrane structure），及呈同心圓狀的核（Core），此應為處於泡狀階段的分泌顆粒。

核及胞器（Cellular organelle）主要分佈在囊泡的周圍，肌上皮細胞外圍層部分可看見發達的粗糙內質網（Rough endoplasmic reticulum）及高爾基體（Golgi complex），在半厚片中觀察到的運送者，為一種由雙層膜構成的囊狀構造；形狀呈不規則形，廣泛存在於分泌顆粒與分泌區間相接的位置。

## II、腮腺的發育

### A. 光學顯微鏡的觀察

a. 在變態前第24個階段，尚未有任何的腺體出現在蝌蚪背部的皮膚中，皮膚的角

質層由兩層橢圓形細胞組成，表皮下則為3~4層的空胞狀構造，稱為巢床構造 (Epidermis nest)。

- b. 在第27個階段，可觀察到表皮下的巢狀構造日趨緊密，初步腺體 (Gland rudiment) 出現在巢狀構造的空隙中，是由一團位於中央緊湊的大型細胞組成。
- c. 關於腺體的增殖方面，在第28個階段，初步腺體逐漸形成球形，且向下發育至棘狀層，在初步腺體的周圍集中著分泌顆粒及淋巴。
- d. 第29~30個階段，在表皮及Stratum compactum中間，可觀察到不同階段發育的腺體。
- e. 在第31個階段，單位體內已有粒狀物出現，孔洞的外型已較完整，且可看出孔洞已較前述深入，鼻孔及眼睛周圍的角質層呈現明顯的突起。
- f. 第33個階段，已可發現大量發育完全的粒狀腺及黏液腺。

#### B. 掃描式電顯的觀察

- a. 利用掃描式電顯觀察蝌蚪表皮角質層的發育，在尚未變態的階段，角質層已具有發達的六角形單位體，內部為糾結的絲狀物，表面並未觀察到任何腺體的開口。
- b. 在第28個階段，已可觀察到腺體在表面的開口，開口呈圓形。
- c. 在第29個階段，發現孔洞的大小依出現部位不同而異，頭部周圍的孔洞很明顯大於尾部的孔洞。
- d. 在第31個階段，孔洞的形狀已很完整，單位體內出現粒狀角質，眼後已可觀察到初步的腮腺，大小僅數個單位體大。
- e. 在第31個階段，孔洞的大小已與一個單位體相同。
- f. 在第32個階段，蝌蚪的尾巴已經縮短，並已可登上陸地，此時角質層上的開口已與成體相同。
- g. 在第33個階段，蝌蚪已變態成小蟾蜍登陸，此時用肉眼即可辨認出腮腺。

## 四、結論與討論

### I、腮腺的微細構造

1. 黑眶蟾蜍的腮腺由黏液腺、粒狀腺及結締組織構成。
2. 粒狀腺為橢圓形的囊狀構造，有一導管通往角質層，最外圍為肌上皮細胞，第二層為肌上皮細胞外圍層，最內圈為合成細胞分泌層，其間散佈著長條形的核，內部為囊泡，懸浮著橢圓形的分泌顆粒。
3. 未成熟的粒狀腺囊泡較小，分佈著六角形的分泌細胞，外部則聚集大量的淋巴顆粒。

4. 分泌顆粒在TEM下依其內部構造的不同，可區分為兩種：第一種稱為儲存顆粒，充滿著均質的電子密度物質，另一種為處於泡狀階段的顆粒，內部為發達的網狀構造，並有一個同心圓狀的核。
5. 腮腺表面的角質層由呈六角形的單位體組成，內部充填著粒狀的角質。
6. 在囊泡邊緣的合成分泌區間，可觀察到發達的粗糙內質網及高爾基體，合成分泌區間與肌上皮細胞外圍層和分泌顆粒的製造有直接的關係；由半厚片可得知：在合成分泌區間分佈著橢圓形具雙層膜的“運送者”，可能與分泌顆粒的運送有直接的關係。

## II、腮腺粒狀腺的更新

1. 腮腺內的粒狀腺，在釋放出囊泡中的分泌顆粒後，外圍呈現明顯的皺縮狀態，外圍集中大量的淋巴質，約在72小時囊泡內出現新的分泌顆粒。
2. 擠壓後72小時，更新的粒狀腺出現在受擠壓粒狀腺導管的兩側，最初為一團細胞，而後部份的細胞逐漸消失形成囊狀的構造，約在10天左右時發育完全。

## III、粒狀腺的發育

1. 粒狀腺是在第28個階段出現在表皮下方的囊狀構造中；在角質上出現凹陷的狀態；第29個階段始出現分泌顆粒，並出現囊狀的構造；第33個階段出現在蝌蚪眼後。
2. 變態初期蝌蚪的角質層已具備六角形的單位體，內部為細絲狀的糾結構造，成體內部則出現粒狀角質。

## 評語

本作品用電子顯微鏡觀察黑眶蟾蜍腮腺，探討其腮腺分泌的機制，並觀察囊胞內懸浮之橢圓形分泌顆粒之成熟過程。此成熟過程與該蟾蜍之變態期之關係，其成果豐碩、詳實、尤其以電子顯微鏡觀察，其研究成果水準甚佳，本作品具學術價值，及供教學之材料。