

花鱼骨染色体核型的研究

李均祥 (韶关学院英东生物工程学院, 广东韶关512005)

摘要 [目的] 为了解和确定韶关地区花鱼骨的分类地位及演化关系。[方法] 采用PHA和秋水仙素活体注射、肾细胞培养和空气干燥制片技术, 制备花鱼骨的染色体。[结果] 花鱼骨体细胞的染色体数目 $2n=50$, 核型公式为 $16m+14sm+16st+4t$, $NF=80$ 。[结论] 韶关花鱼骨在染色体系统演化上没有明显的数目和形态变化。

关键词 花鱼骨; 染色体; 核型

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)31-13658-02

Study on Chromosome Karyotype of Spotted Steed

LI Jun-xiang (Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005)

Abstract [Objective] The classification status and the evolution of spotted steed in Shaoguan area were understood and identified through the investigation and research. [Method] The chromosome karyotype of spotted steed was analyzed with PHA and colchicine injection in vivo, kidney cell culture and chromosome-observing technique. [Results] The result showed that diploid chromosome number of spotted steed was 50, and the karyotype formula was $16m+14sm+16st+4t$ and its fundamental arm number was 80. [Conclusion] There was no obvious variation in the number and morphology during the evolution of spotted steed chromosome.

Key words Spotted steed; Chromosome; Karyotype

花鱼骨(*Hemibarbus maculatus* Beeker) 属鲤形目(Cypriniformes) 鲤科(Cyprinidae) 鱼钩亚科(Cobioninae) 花鱼骨属(*Hemibarbus*)。花鱼骨为花鱼骨类群中最大的属。继Pallas于1776年发现花鱼骨属第一种——唇花鱼骨[*Hemibarbus labeo*(Pallas)]后, 1871年才有人记载花鱼骨(*H. maculatus* Beeker)^[1]。花鱼骨俗称麻鲤、麻叉鱼、大鼓眼、吉勾鱼、花鸡公。分布广泛, 从黑龙江流域向南一直到广东、云南元江等地都产此鱼。

花鱼骨是淡水水域常见的一种中小型经济鱼类, 其肉质细嫩, 味道鲜美, 营养价值高, 近年来畅销于华东地区且供不应求, 其深加工产品很受东南亚消费者的青睐, 具有极好的市场前景。研究花鱼骨的染色体, 有助于了解和确定当地花鱼骨的分类地位及演化关系, 同时对养殖业的发展也有着极其重要的参考价值^[2]。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 试验鱼花鱼骨6尾(3, 3), 体重为38.1~41.5 g, 采自广东省韶关市北江。形态特征为: 体长, 前部略呈圆棒状, 后部稍侧扁, 腹部圆。吻钝圆, 口下位, 马蹄型。下唇两侧叶狭窄, 颌部中央有一小三角形突起。口角有须1对, 其末端达眼前缘的下方。前鳃盖骨和眼眶至吻部有明显的粘液腔。下咽齿末端呈钩状。鳞中等大, 侧线平直。背鳍具光滑的硬刺, 其长度小于或等于头长, 背鳍起点至吻端较至尾鳍基为近。胸鳍不达腹鳍起点。腹鳍短小, 起点约位于背鳍基部中点的垂直下方。臀鳍不达尾鳍基部, 其起点距尾鳍基较距腹鳍起点为近。尾鳍叉形, 上、下叶等长。肛门紧靠臀鳍起点。体灰褐色, 体上及背鳍、尾鳍均具有许多褐色小斑点, 体侧正中有7~11个大黑斑。

1.2 试验方 法

1.2.1 前处理。自试验鱼胸鳍基部注射8~10 $\mu\text{g/g}$ (体重) PHA(植物血球凝集素) 溶液, 在25 $^{\circ}\text{C}$ 水中培养22~24 h后,

再按2~3 $\mu\text{g/g}$ (体重) 注射秋水仙素溶液, 作用时间约为3 h。秋水仙素溶液处理后, 把试验鱼断尾放血20 min, 解剖取出头肾, 两手各持一把镊子, 反复拉撕分散肾组织, 让细胞游离出来, 加入生理盐水制备细胞悬液。

1.2.2 低渗与固定。将细胞悬液1 200 r/min离心10 min, 弃上清液, 加入6 ml 0.075 mol/L KCl 溶液吹打均匀, 34 $^{\circ}\text{C}$ 低渗处理45 min。在低渗液上加少许固定液(甲醇:冰醋酸=3:1), 用吸管吹打进行预固定, 随后1 200 r/min离心10 min, 再重复固定2次, 固定时间为30 min。

1.2.3 制片与染色。将细胞悬液滴于预冷载玻片上, 自然干燥后用pH值为6.8的磷酸盐缓冲液配制的10%的Gensa(姬姆萨) 染色20 min, 自来水冲洗, 自然干燥后镜检。

1.2.4 染色体核型分析。在显微镜高倍镜下观察图像清晰、染色体分散较好的中期分裂相, 以确定染色体数目; 选择典型的中期染色体标本, 在油镜下进行拍照, 用图像处理软件Photoshop处理照片, 测量染色体臂长, 计算染色体相对长度、臂比等, 按照Levan提出的命名和分类标准进行染色体配对、分类和排列核型^[3]。

2 结果与分析

2.1 花鱼骨的染色体数目 共统计了6尾花鱼骨100个细胞的染色体中期分裂相, 其染色体数目主要集中在46~51, 染色体数目为46~49的有13个细胞, 染色体数目为50的有81个细胞, 染色体数目为51的有6个细胞。染色体数目为50的占观察细胞总数的81.00%, 因此确定花鱼骨体细胞的染色体数目为 $2n=50$ 。花鱼骨细胞染色体数目计数结果见表1, 染色体中期分裂相照片见图1。

2.2 花鱼骨的染色体核型 选择10个典型的染色体中期分裂相, 测量其染色体臂长, 计算染色体相对长度、臂比, 得到花鱼骨的染色体核型指数见表2。根据表2的结果, 将花鱼骨二倍体体细胞50条染色体配成25对, 按Levan标准分为4组, 其中中部着丝粒染色体(m) 8对, 亚中部着丝粒染色体(sm) 7对, 亚端部着丝粒染色体(st) 8对, 端部着丝粒染色体(t) 2对, 核型公式为 $16m+14sm+16st+4t$, 染色体总臂数(NF) 为80。由此排列花鱼骨的染色体核型见图2。

表1 花鱼骨细胞染色体数目统计

Table 1 The statistics of chromosome number in the cells of *Hemibarbus maculatus* Heeler

染色体数目	细胞个数	出现频率 %
Chromosome number	Cell number	Occurrence frequency
46	3	3.00
47	4	4.00
48	2	2.00
49	4	4.00
50	81	81.00
51	6	6.00
合计 Total	100	100.00

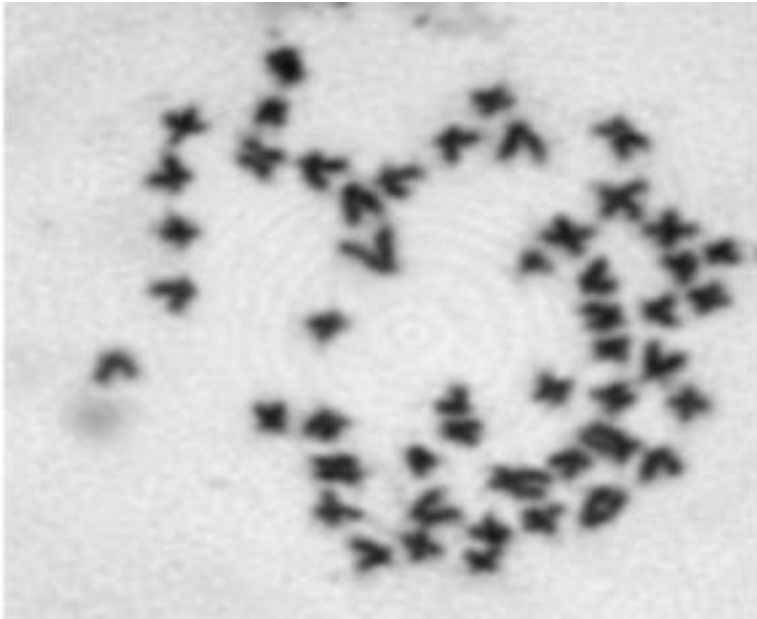


图1 花鱼骨肾细胞的中期染色体

Fig.1 Metaphase chromosomes of kidney cell of *H. maculatus*

表2 花鱼骨染色体的相对长度、臂比及其分类组别

Table 2 Relative length, arm ratio, classified groups of chromosome in *H. maculatus*

染色体序号 Chromosome No. (n = 10)	相对长度 % Relative length (M ± S)	臂比 Arm ratio (M ± S)	类型 Type
1	2.52 ± 0.15	1.53 ± 0.05	m
2	2.35 ± 0.14	1.33 ± 0.02	m
3	2.24 ± 0.12	1.17 ± 0.08	m
4	2.13 ± 0.11	1.33 ± 0.09	m
5	2.02 ± 0.19	1.35 ± 0.05	m
6	1.98 ± 0.13	1.40 ± 0.12	m
7	1.83 ± 0.20	1.39 ± 0.05	m
8	1.67 ± 0.18	1.04 ± 0.06	m
9	2.20 ± 0.11	2.53 ± 0.13	sm
10	2.18 ± 0.13	2.42 ± 0.01	sm
11	2.13 ± 0.17	2.31 ± 0.08	sm
12	2.09 ± 0.12	2.29 ± 0.07	sm
13	2.06 ± 0.14	2.28 ± 0.05	sm
14	2.03 ± 0.13	2.20 ± 0.16	sm
15	2.02 ± 0.21	2.00 ± 0.03	sm
16	2.64 ± 0.20	4.92 ± 0.08	st
17	2.60 ± 0.15	4.25 ± 0.18	st
18	2.24 ± 0.18	4.18 ± 0.02	st
19	2.19 ± 0.20	4.12 ± 0.04	st
20	2.12 ± 0.16	4.08 ± 0.05	st
21	2.09 ± 0.19	3.98 ± 0.08	st
22	1.98 ± 0.20	3.45 ± 0.20	st
23	1.82 ± 0.22	3.23 ± 0.12	st
24	1.58 ± 0.18		t
25	1.43 ± 0.12		t

注: n 为细胞数(Cell count); M 为平均数(Mean value); S 为标准差(Standard deviation)。

Nte: n stands for cell number; M stands for mean; S stands for standard deviation.

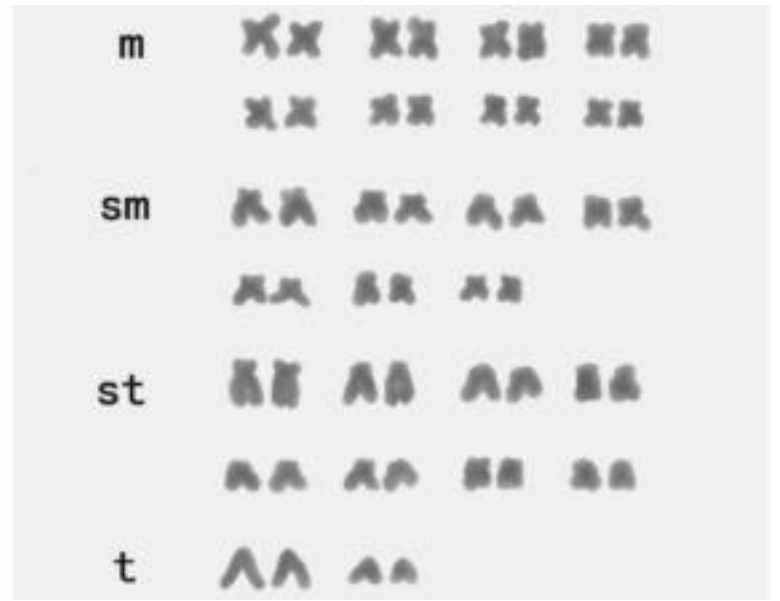


图2 花鱼骨染色体核型

Fig.2 Chromosome karyotype of *H. maculatus*

3 讨论

关于花鱼骨的染色体核型,报道极少。据任修海等的研究显示,花鱼骨的染色体数目为 $2n = 50$,核型公式为 $16m + 14sm + 16st + 4t$ ^[4]。该文的研究结果与其报道的完全一致,表明韶关花鱼骨在染色体系统演化上没有明显的数目和形态变化。

常重杰等的研究表明,鲃亚科的棒花鱼(*Abbottina rivularis*)染色体数目为 $2n = 50$,核型组成为 $24m + 24sm + 2st$;铜鱼(*Coreius heterodon*)染色体数目为 $2n = 50$,核型组成为 $16m + 22sm + 10st + 2t$;江西鲮(*Sarcocheilichthys kiangsienensis*)染色体数目为 $2n = 50$,核型组成为 $18m + 22sm + 8st + 2t$ 等^[5]。花鱼骨与鲃亚科鱼类染色体数($2n = 50$)的一致性,表明这些鱼具有极为相近的亲缘关系。

余先觉等认为 $2n = 50$ 是鲤科鱼类染色体的基本核型特征。在鲤科鱼类系统进化过程中,鲤科各亚科的核型演化分为两大支:一支的主要特点是罗伯逊易位,另一支的主要特点是多倍化。罗伯逊易位是那些具有单臂的端部着丝粒染色体,其着丝粒融合形成具有双臂的非端部着丝粒染色体,造成染色体核型数目的减少;反之那些具有双臂的非端部着丝粒染色体的着丝粒解离后形成具有单臂的端部着丝粒染色体,造成染色体数目的增多;所以罗伯逊易位不仅使染色体形态改变,而且使染色体数目也发生改变,或增加,或减少^[6]。多倍化明显使染色体数目成倍增加。由此形成当今鲤科鱼类不同物种间染色体核型数目从48~162条非常大的变异范围。而花鱼骨的染色体数目及核型特征都没有发生改变,表明其在鲤科鱼类的系统进化中是相对比较保守的。

小岛吉雄在研究鱼类染色体时,将真骨鱼类划分为低位类、中位类和高位类3个演化类群^[7]。探讨了鱼类的进化与染色体的关系,通过对大量资料的分析提出:进化上越是处于上位,染色体越收敛,端着丝粒染色体多,臂数少。而花鱼骨的端着丝粒染色体数目较少,臂数较多,说明其在鱼类系统进化上属于低位类。

关于鱼类在染色体核型上是否有性染色体存在的问题,有不同的报道和争议。统计显示,全世界大约有2000多种真骨鱼类做过了染色体组型的研究,可能有近100种鱼类被认为有性染色体,但是在细胞遗传学研究上能分辨出来的、具有较好性染色体形态分化的鱼类可能只有40种左右^[8]。

(下转第13699页)

5 香菇水提取液的抗肿瘤作用

香菇水提取液是以蒸馏水浸泡香菇子实体粉末的滤液,用含小牛血清的培养液配成生药浓度, G6 漏斗抽滤除菌而得的香菇药液。郭原健等用 SOS 呈色法和 Ames 实验法观察了香菇水提取液对丝裂霉素 C (MMC) 和紫外线 (UV) 诱导大肠杆菌 PQ35 SOS 反应的抑制和对 N 甲基 N 硝基 N 亚硝基胍 (MNNG)、苯并 a (BaP)、黄曲霉素 B1 (AFB1) 诱导鼠伤寒沙门氏菌 TA98、TA100 回复突变的抑制作用。结果表明香菇水提取液能够抑制直接和间接的致突变物,并有剂量反应关系。但不能抑制 DNA 损伤后诱导的 SOS 反应,香菇水提取液是复杂的混合物,其中除香菇多糖外的其他抗致突变的有效成分还有待研究^[30]。

6 香菇 呤和核酸的抗肿瘤作用

香菇 呤 (eritaderine) 是 20 世纪 60 年代日本科学家在进行香菇研究过程中从香菇水提取物中分离到的一种生物碱,其分子结构已经得到证实。香菇 呤有降血浆胆固醇的作用,经大鼠实验证明香菇 呤能明显降低大鼠的血浆、肝胆和肾上腺中的胆固醇,但未发现有提高免疫和抗肿瘤作用^[31]。香菇核酸的研究较少,对它的生理功能了解不多。

综上所述,通过实验研究及临床观察,香菇的有效成分对机体的免疫功能和抗肿瘤等方面的作用是较为肯定的。但是香菇的组分较多,其抗肿瘤生物学活性差异也较大,尤其是在香菇各种成分的分离、提取及纯化、化学结构与抗肿瘤药理作用之间的关系方面,还有很多工作需要做。香菇抗肿瘤研究正在从细胞向分子水平、基因水平深入,由一种结构成分应用向多种成分、细胞因子、肿瘤杀伤效应细胞、放化疗的联合应用深入。相信在不久的将来,香菇抗肿瘤的药用成分将可能作为一类高效低毒的抗肿瘤药物出现,必将在很大程度上推动肿瘤治疗与临床的发展,为人类健康做出巨大贡献。

参考文献

- [1] 石明生,袁桂英,焦镭,等.黑麦仁香菇营养酱的研制[J].中国酿造,2004(3):31-32.
- [2] 景军.香菇多糖对人体作用的研究与应用[J].中国食品卫生杂志,2001,13(2):46-47.
- [3] CHIHARA G, HAMURO J, MAEDA Y, et al. Fraction and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially Lentinan from *Lentinus edodes* sing[J]. *Cancer Res*, 1970, 30:2776-2781.
- [4] 芮菁.香菇多糖的药理作用和临床应用概况[J].天津药学,2000,12(1):35-37.
- [5] 罗祎,李东.香菇多糖的研究进展[J].食品与发酵工业,2000,26(4):63-66.
- [6] KANAI KXONDO E, JACQUES P J. Immunopotentiality effect of fungal glucans as revealed by frequent relapse of psychomotor relapse in mouse experimental tuberculosis[J]. *Jpn J Med Sci Biol*, 1980, 30:283-288.

(上接第13659页)

该文研究的花鱼骨在形态上无法区分性染色体与常染色体,这是否与其性染色体处于进化的原始状态有关,仍尚待研究。

参考文献

- [1] 乐佩琦.花鱼骨属鱼类的分类整理 鲤形目:鲤科[J].动物分类学报,1995,20(1):116-123.
- [2] 韩荣成,岳永生,姜中伸.鱼类染色体核型分析方法概述[J].水利渔业,2003,23(5):38-40.

- [7] ZAKANY J, CHIHARA G, FACHET J. Effect of lentinan on tumor growth in murine allogenic and syngenic hosts[J]. *Int J Cancer*, 1980, 25(3):371-376.
- [8] SUGA T, SHIO T, MAEDA Y Y. Antitumor activity of lentinan in murine syngenic and autochthonous hosts and its suppressive effect on 3-methylcholanthrene induced carcinogenesis[J]. *Cancer*, 1980, 44(11):5132-5137.
- [9] 马占好,文海芳,蔡玉琴,等.香菇多糖对小鼠腹水型S180、H22 抑瘤作用的实验研究[J].实用肿瘤学杂志,1996,10(4):7-8.
- [10] 李盟军,吴达龙,吴德政,等.蘑菇多糖对小鼠S180 肉瘤抗瘤效应的初步研究[J].免疫学杂志,1997,13(4):243-246.
- [11] 袁静,王平全.香菇多糖抗肿瘤作用的研究进展[J].中国药房,1999,10(5):233-234.
- [12] 王欣,韩永涛,王本杰,等.香菇多糖对恶性血液病患者免疫功能的调控作用[J].山东医科大学学报,1999(1):53-54.
- [13] GORNELLA M, WEACND A, GORONZY J. Short analytic review: Functional domains on MLA DR molecules chin[J]. *Immunopathol*, 1994, 70:91-94.
- [14] HAMURO J, TAKAISUKI F, SUGA T. Synergistic antitumor effects of lentinan and interleukin 2 with pre and post-operative treatment[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1994, 85:1288-1297.
- [15] 张涛,柳朝阳,魏凤香,等.香菇多糖对小鼠免疫功能的影响[J].黑龙江医药科学,2003,26(6):108-109.
- [16] MURATA Y, SHIMAMURA T. The skewing to Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content[J]. *J Int Immunopharmacol*, 2002, 2(5):673-689.
- [17] 赵小茜,谭艳蓉.香菇多糖配合TACE 治疗中晚期肝癌临床效果观察[J].山东医药,2005,45(32):37-38.
- [18] 孙卫国,张学东.香菇多糖用于晚期或复发胃癌的疗效观察[J].医药论坛杂志,2003,24(23):19-21.
- [19] 陈占红,叶魏武,李铁,等.香菇多糖合并化疗治疗晚期非小细胞肺癌[J].广西中医学院学报,2003,6(3):15-17.
- [20] SUP T, YOSHIMAMA T, ISUCHIYA Y, et al. Reversion of tumor prevention of tumor metastasis and recurrence of DBA/2M.C57 fibrosarcoma, MH134 hepatoma and other murine tumor using lentinan[J]. *Int J Immunother*, 1989, 5:134-187.
- [21] 周卫东,刘如林,邢邦华,等.深层发酵香菇水溶性胞外多糖的生物学活性[J].菌物系统,1997,16(3):202-207.
- [22] 黄敏,宁安红,张卓然,等.香菇 C91-3 菌发酵液小鼠体内外抗肿瘤作用的研究[J].中国微生态学杂志,1996,8(3):38-40.
- [23] 唐粉芳,金宗旅,王磊,等.香菇发酵液对小鼠抗衰老及增强免疫功能的评价[J].北京联合大学学报,1994,8(1):9-12.
- [24] 黄敏,宁安红,张卓然,等.病毒免疫治疗小鼠H22 腹水瘤的研究.对肿瘤细胞膜抗原的观察[J].大连医科大学学报,1994(3):169-171.
- [25] HUANG M. Studies on antitumor effects of extract from C91-3 lentinus fermentative liquid[M]. 13th Asia Pacific CANCER Conference Penang Malaysia, 1996:499-502.
- [26] 戴兵,黄敏,丁安红,等.香菇 C91-3 菌丝发酵液蛋白抑制小鼠宫颈癌细胞株 U14 生长及诱导凋亡的实验研究[J].浙江医学,2004,26(9):656-658.
- [27] ZHAO C G, SUN H, TONG X, et al. Antitumor lectin from Edible Mushroom *Agaricus bisporus* [J]. *Biochem J*, 2003, 374:321-327.
- [28] SUN H, ZHAO C G, TONG X, et al. A lectin with mycelial differentiation and anti-phytovirus activities from the edible mushroom *Agaricus bisporus* [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2003, 36(2):214-222.
- [29] VEJICKA V. Activation of antitumor immunity by intratumor injection of biological preparations[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2003, 30(11):1555-1558.
- [30] 郭原健,李国华,贾继峰,等.香菇水提取液体外抗致突变作用[J].癌变·畸变·突变,1995,7(4):224-226.
- [31] SHIMADA Y, YAMAKAWA A. Effects of dietary eritaderine on the liver microsomal Delta6-desaturase activity and its mRNA in rats[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(6):1258-1266.

[3] LEVAN A, FREDGE K, SANDBERG A A. Nonrandomness for centromeric position on chromosomes[J]. *Heredity*, 1964, 52(2):201-220.

- [4] 任修海,崔建勋,余其兴.六种鲤科鱼类核仁组织者区的研究[J].遗传,1993,15(4):11-13.
- [5] 常重杰,杜启艳,卢龙斗,等.鲟亚科三种鱼银染核型的比较研究[J].河南师范大学学报,1995,23(4):66-68.
- [6] 毛连菊,李雅娟.5种海水鱼类染色体的组型分析[J].大连水产学院学报,2002,17(2):109-113.
- [7] 小岛吉雄.鱼类细胞遗传学[M].林义浩,译.广州:广东科学技术出版社,1990:8-33.
- [8] 杨东,余来宁.鱼类性别与性别鉴定[J].水生生物学报,2006,30(2):221-227.