

小黄鱼内耳淋巴液液晶与耳石结晶 关系的初步研究*

徐学红 张晴川 何海平 吴熙载

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

提 要

作者以扫描电镜观察了小黄鱼 (*Pseudosciaena polyactis*) 耳尘的“透镜样”结构; X 衍射分析表明小黄鱼耳石由 CaCO_3 霏石构成; 以偏光显微镜发现内耳淋巴液中有液晶态存在。最后, 以液晶理论对耳尘、耳石的形成进行了讨论。

关键词 小黄鱼, 液晶, 耳石结晶, 耳尘, 耳石, 微耳石

耳石是普遍存在于脊椎动物内耳的固形物质。在鱼类中, 耳石无机成分占 85% 以上, 其中 CaCO_3 占绝大部分, Carlstrom 等已证实, 鱼类耳石多由 CaCO_3 霏石结构组成^[1]。依其大小可分为三类, 一类为耳尘 (Ear-dust, Statoconia), 较小, 分散于内耳淋巴液中; 另一类为耳石 (Ear-stone, Statolith), 较大; 还有一类, 大小不一, 介于两者之间, 早期称为“骨小石 (Ossiculith)”, 由于其与骨无关, 现在一般称为微耳石 (Microstatolith)。

关于鱼类耳石的研究, 国外已有大量的报道, 这些工作多集中在研究以耳石这种较稳定的晶体结构和与鳞片、鳍条相似的每年生长的特性来精确鉴定鱼类的年龄^[2,3]。近年来, Tsukamoto 以荧光标记的四环素饲喂香鱼 (Ayu) 证实了, 微耳石中 CaCO_3 厚度增加的“天积累轮”, 甚至天以下时间内的积累轮线^[4]。这说明, 利用耳石有鉴定鱼类的“天龄”甚至“亚天龄”的潜在能力。近些年来, 国内这方面的工作也已在开展。

作者在发现小黄鱼内耳淋巴液中有液晶态存在的基础上, 从液晶与 CaCO_3 晶相霏石结构的角度, 对耳石的形成和液晶的关系作了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 市售冻存小黄鱼 (*Pseudosciaena polyactis* Blecker)。

1.2 偏光显微镜及相变观察 材料流水解冻, 从鳃腹部剪开, 去鳃, 露出内耳。注射器抽出内耳淋巴液, 以盖玻片制成封闭盒, 以防止水份挥发。Leitz-II 型偏光显微镜观察, 加热附件加温作相变检测。

* 感谢唐承欢副教授在实验测试分析上提供的帮助。
1992 年 2 月 17 日收到; 1995 年 4 月 11 日修回。

1.3 扫描电镜观察 将内耳淋巴液滴于玻片上,自然干燥,梯度乙醇处理,临界点干燥,真空喷金,待测。取左右耳石,洗净,以适量洗涤剂除去淋巴液附于表面的有机质,流水冲洗 24h,干燥,真空喷金,待测。断裂耳石,以 0.1N 乙酸酸刻 30s,流水冲洗 15s,蒸馏水洗净^[9],干燥,真空喷金。以上所制三类样品,在 Hitachi-450 扫描电镜下观察。

1.4 X-射线粉末衍射分析 取干燥耳石,研制粉末,晶粒线性平均大小 $1\mu\text{m}$ 。样品在 XD-3A 型 X-射线衍射仪上测试。 $\text{CuK}\alpha$ 辐射,石墨单色器,功率 $40\text{kV} \times 20\text{mA}$,狭缝 $1^\circ-1^\circ-0.3\text{mm}$,阳极转速 $2^\circ/\text{min}$,TCIs,走纸速 $20\text{mm}/\text{min}$,室温 15°C ,扫描角度 2θ 为 $18-80^\circ\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 内耳淋巴液内液晶与耳尘 小黄鱼内耳淋巴液中有两类有序结构组分。一类为耳尘或微耳石结晶颗粒,在正交偏光显微镜下,呈强的双折射消光性,样品加热到 $40-50^\circ\text{C}$,双折射不改变,无相变。另一类,在正交偏振光下为典型的马尔它十字 (Maltese cross),或脂管样单根、多根盘绕在一起形成具双折射的线团,为各向异性(图版 I:1),样品加热到 $20-40^\circ\text{C}$ 时,双折射消失,转变成各向同性,并且在温度回降时,各向异性双折射现象再度恢复。光学各向异性和各向同性结构在非正交和正交偏光时,相变前后形态上没有很明显的差异,表明相变是在结构分子有序性性质上的变化。正交偏振光下,可直接观察到各向异性脂管样线团结构在较长时间(约 20min)内,能发生形态上的改变,由于表面张力的作用,向外伸展的脂管可回缩(图版 I:2a、2b),这表明,这些光学各向异性的线团,既如晶体样分子排列长程有序,表现出双折射,又象液体样,分子短程无序,保留一定的流动性,所以确定为液晶态。内耳淋巴液中,还有一种比较特殊的圆型颗粒,大小类似微耳石,外周为片层结构,正交偏光下双折射很强,加热时 (50°C 以下)不变,无相变,为结晶层,而内部有一个或两个具马尔它十字的小球滴,它在结晶构成的“外壳”内可以流动(图版 I:3),并且在加热时,能发生相变而成各向同性小滴,在温度回降时,有序性又恢复,为液晶态。作者认为,这种结晶外壳包裹着液晶小滴的特殊结构,是 CaCO_3 结晶附着于液晶片层,液晶小滴向结晶转变的中间形态。

Carlstrom 指出在鱼内耳淋巴液中的微耳石有些呈双凹透镜样 (Lens-shaped) 形态,有较弱的辐射结构^[1],它与作者观察到的外部为强双折射结晶片层结构、而内部有液晶小滴的特殊结构大小一致。在扫描电镜下,这些圆型颗粒呈双凹“轮胎”状,表面都有辐射状的凸棱和凹槽从中心凹处发出,整个表面都由网状结构所覆盖(图版 I:4a、4b)。从众多的观察可知,颗粒两面双凹的深浅不一;辐射棱高的颗粒,中心凹较深;辐射棱数量不同,宽窄不一。通常部分凹槽外端有一尖状突起,则每一突起基部都有一小孔。颗粒棱槽深的,每一凹槽端部皆有一突起;棱槽浅的,中心凹浅的,突起亦较少。在棱槽最浅的“轮胎”上,中心凹网上有较大的结晶颗粒,辐射凸棱外部细小的晶体颗粒清晰可见(图版 I:4c)。“轮胎”侧面有一圈有机质样带将其围住。“轮胎”相联接形成圆柱(图版 I:4d),断开侧面上突起清晰可见。颗粒边缘上的突起,插入到相邻“轮胎”突起基部的小孔中,辐射状凸棱与凸棱相对应,相邻槽即形成一个通道。耳石表面和耳石表面断面的扫描电镜显示,球形颗粒和片层断面是耳石 CaCO_3 形成的最初结晶形式(图版 I:5、6)。作者认为,

CaCO₃ 结晶首先出现沉积于脂管样髓鞘片层结构上,随着由外向内通过通道进入的沉积,使棱槽变浅,通道变小,结晶到一定的程度,由于突起的减少,脂管样结构解体成单个“轮胎”,中央凹及表面其它部位的网孔结构,保证了结晶化的进一步进行,最终形成球状结晶附着堆积于耳石表面,耳石增大。

2.2 耳石 CaCO₃ 霏石与液晶 耳石粉末 X-衍射结果与 JCPDS 卡(5—0453)对比表明,除 6 个低值峰表明有极少量物质第二相存在外,所有峰位 2θ 对应的 d 值都与卡片一致。表明耳石结构即为 JCPDS 卡(5—0453)所表征的 CaCO₃ 霏石结构(表 1)。CaCO₃ 霏石^[6]为斜方结构,晶胞常数为 a₀ = 4.959, b₀ = 7.968, c₀ = 5.741; 空间群为 D_{2h}¹⁶ — P_MCN; 折射率分别为 η₀ = 1.680, η_c = 1.529; 单轴负光性。结果与 Carlstrom 证明的硬骨鱼耳石 CaCO₃ 结构一致^[1]。

表 1 石首鱼科小黄鱼耳石 X-射线衍射数据及与 JCPDS 卡(5—0453)的比较
Tab. 1 The X-ray diffraction data of otolith in *P. polyactis* of the family Sciaenidae with comparisons to JCPDS (5—0453)

(5—0453) Data			P. polyactis		(50—453) Data			P. polyactis	
d(Å)	I/I ₀	hkl	I/I ₀ *	d(Å)	d(Å)	I/I ₀	hkl	I/I ₀ *	d(Å)
4.212	2	110	2	4.207	1.759	4	141	4	1.757
			3	3.983	1.742	25	113	25	1.742
3.396	100	111	100	3.386	1.728	15	231	15	1.726
3.273	52	021	50	3.264	1.698	3	222	2	1.700
			1	3.025				1	1.620
2.871	4	002	4	2.873	1.557	4	311	4	1.557
2.730	9	121	9	2.728	1.535	2	232	2	1.536
2.700	46	012	45	2.696	1.499	4	241	4	1.498
2.481	33	200	33	2.479	1.475	3	321	3	1.476
2.409	14	031	14	2.409	1.466	5	151	5	1.466
2.372	38	112	35	2.372	1.411	5	312	4	1.412
2.341	31	130	30	2.336	1.404	3	330	3	1.403
2.328	6	022	6	2.331	1.365	3	241.331	3	1.365
2.188	11	211	10	2.189	1.358	3	114	3	1.358
2.106	23	220	20	2.102	1.328	2	060	2	1.326
			1	1.988	1.261	6	332	1	1.261
1.977	65	221	65	1.975	1.240	7	400	7	1.240
1.882	32	041	30	1.879				1	1.236
1.877	25	202	25	1.875	1.224	5	134	4	1.224
			1	1.826	1.205	6	243.062	5	1.205
1.814	23	132	23	1.813	1.1892	5	153		
					1.1712	6	162.260		

* 此栏数据为估计值。
The experiment intensity in this column was estimated.

液晶是一种普遍存在于生物体中的现象^[7],在发育过程中尤为突出^[8,9],在鸡胚肝脏中表现出液晶、结晶相变的相关性^[10,11]。何海平等在研究鸡胚发育卵黄变化中表明,孵化第二天胚下即有液晶脂滴出现,第九天大量出现,同时在卵黄中出现大量的球晶(Spherocr-

ystal), 小鸡出壳时大量积累于卵黄囊中, 胚后发育中逐渐被吸收^[9]。这种球晶后被确定为 CaCO_3 球霰石和球方解石, 前者占大部分^[12]。软体动物贝壳珍珠层及珍珠早已被证实为 CaCO_3 霰石结构^[13], 日本学者也曾发现, 某一时期, 外套腔液中也有马尔它十字的双折射有序结构存在^[14], 结合作者的实验结果, 表明生物体内的 CaCO_3 霰石、球霰石结晶都与液晶态有直接的关系。

生物液晶为溶致液晶, 多由双亲性分子亲水头部并连, 形成双分子层的外界, 疏水尾部夹于其中。片层结构叠加构成液晶纯净相 (Nemphase), 层中分子可水平移动, 整体具流动性^[7]。Morales-Nin 等证明, 耳石是 CaCO_3 微晶 (Microcrystal) 构成的片层结晶 (Laminar crystal) 形成生长单位 (Incremental unit), 附着于一层有机质上而形成的, 有机质是形成 CaCO_3 霰石结构的基础^[15]。荧光标记的四环素也表明微耳石中有机质的重要作用^[4]。作者认为, CaCO_3 在片层上的沉积, 形成具有一定变形性的微耳石, 这种尚未完全形成晶体的结构, 保证不影响内耳淋巴液的正常流动性, 成为内耳具正常生理功能的基础。Carlstrom 曾指出, 内耳中微耳石大小变化范围很大, 呈现连续性, 这可能是一个有力的旁证^[1]。

近年来, 有资料表明, 耳石 CaCO_3 参予鱼体内环境中 Ca^{++} 平衡的调节, 鱼血液酸度的增高可以使耳石中 CaCO_3 重新溶解而再度吸收^[2,16]。所以, 作者观察到的小黄鱼内耳淋巴液中液晶现象, 是在耳石生长还是在重新吸收中的现象, 或者两者兼而有之, 需要进一步深入研究。生物体中 CaCO_3 霰石、球霰石与液晶现象有直接关系是可以肯定的。

参 考 文 献

- [1] Carlstrom, D., A crystallographic study of vertebrate otoliths, *Biological Bulletin*, 1963, **125**: 441—463.
- [2] Brothers, E. B., Methodological approaches to the examination of otoliths in aging studies. In: *The Age and Growth of Fish*, pp. 319—330. Ed by Robert, C., Printed in Iowa by The Iowa State University Press. 1987.
- [3] Mugiya, Y., Effects of photoperiods on the formation of otolith increments in the embryonic and Larval Rainbow Trout *Salmo gairdneri*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987, **53**(11): 1979—1984.
- [4] Tsukamoto, K. and Kajihara, T., Age determination of Ayu with otolith. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987, **53**(11): 1985—1997.
- [5] Wild, A and Foreman, T. J., The relationship between otolith increments and time for Yellowfin and Skipjack tuna marked with tetracycline. *Inter-American Tropical Tuna Commission Bull.*, 1980, **17**: 509—541.
- [6] Powder Diffraction File, No:5—0453, 1978, by JCPDS.
- [7] 吴熙载、何海平译 (G. H. Brown 著)。液晶与生物结构。北京: 科学出版社。1983。
- [8] 何海平、吴熙载等。鸡胚发育中几种重要器官内液晶态的一般观察。武汉大学学报(自然版), 1979, **4**: 65—71。
- [9] 何海平、吴熙载等。鸡胚发育中卵黄的液晶态及其生物学意义的初步研究。武汉大学学报(自然版), 1978, **4**: 32—46。
- [10] 徐学红、何海平等。鸡胚发育中肝脏液晶类脂滴、结晶及各向同性类脂滴的相变特性研究。生物物理学报, 1992, **8**(2): 226—230。
- [11] 徐学红、唐承欢等。鸡胚发育期间肝脏液晶类脂滴脂类成分的动态分析。生物化学与生物物理学报, 1992, **24**(4): 339—344。
- [12] 李美亚等。来杭鸡胚发育过程中卵黄囊球晶的研究。生物物理学报, 1986, **2**(4): 381—389。
- [13] Wilbur, K. M., Shell structure and mineralization in molluscs. In: *Calcification in Biological Systems*, pp. 15—40. Ed by Sognnaes, RF., Printed in Washington D C by AAAS, 1960.
- [14] Wada, K., Crystal growth of molluscan shell. *Bull. Natl. Pearl Research Lab*, 1961, **7**: 703—828.
- [15] Morales-Nin, B., Ultrastructure of the organic and inorganic constituents of the otoliths of

the sea bass. In: The Age and Growth of Fish, pp. 331—343. Ed by Robert, C., Printed in Iowa State University Press, 1987.

- [16] Pannella, D., Fish otoliths: Daily growth layers and periodical patterns. *Science*, 1971, **173**:1124—1126.

THE RELATIONSHIP BETWEEN LIQUID CRYSTALS AND OTOLITH CRYSTALS IN THE INNER-EAR OF *PSEUDOSCIAENA POLYACTIS*

Xu Xuehong, Zhang Qingchuan, He Haiping and Wu Xizai

(School of Life Science, Wuhan University, 430072)

Abstract

In this paper, we not only observed the lens-shaped microstatolith of *Pseudosciaena polyactis* by SEM, but also convinced that the otolith was composed of CaCO_3 aragonite by X-ray diffraction and the liquid crystalline existed in the inner-ear lymph by polarized microscopy. Furthermore, formations of statoconia, statolith and otolith were also discussed based on the liquid crystal theory primarily.

Key words *Pseudosciaena polyactis*, liquid crystal, otolith Crystal, Statoconia, Statolith, Microstatolith