

南美白对虾(*Penaeus vannamei*)视神经节和脑 免疫细胞化学研究*

叶海辉 王桂忠[†] 金朱兴[†] 李少菁^{†1)} 黄辉洋[†] 陈锦民[†]

(厦门大学海洋系 亚热带海洋研究所; 厦门大学生命科学学院细胞生物化学研究室 厦门 361005)

[†](厦门大学海洋系 亚热带海洋研究所 厦门 361005)

提要 应用抗脊椎动物 5-羟色胺、神经肽 Y、-内啡肽、P 物质、生长抑素、胰高血糖素、催乳素抗体和 SABC 免疫细胞化学方法,对南美白对虾视神经节和脑进行了免疫细胞化学研究。结果表明,前 4 种抗体呈现免疫阳性反应:5-羟色胺免疫阳性细胞分布于视神经节的视神经层、视外髓、视内髓和视端髓;前脑中中细胞群,中脑嗅叶内侧细胞群、嗅叶外侧细胞群以及前脑中部的神经髓质呈免疫阳性反应。神经肽 Y 免疫阳性细胞分布于视神经节的 4 个神经髓;前脑中中群细胞和前脑中部的神经髓质也呈阳性反应。P 物质免疫阳性细胞位于前脑中中群。-内啡肽免疫阳性细胞仅分布于后脑后侧群。4 种免疫阳性物质特异性的分布模式,为其可能参与调节神经内分泌活动提供了形态学证据。

关键词 南美白对虾,视神经节,脑,免疫细胞化学

中图分类号 Q952

胺类和肽类是甲壳动物体内重要的生物活性物质,可作为激素、神经递质、神经调质参与调节生命活动。迄今,已从甲壳动物神经系统检测出 5-羟色胺、多巴胺、脑啡肽、内啡肽、P 物质、催产素、血管紧张素、促黑色素激素、神经肽 Y、生长抑素、胃泌素、降钙素等物质(Fingerman *et al*, 1993, 1994; Harzsch *et al*, 2002)。视神经节和脑是甲壳动物神经内分泌中心,对蜕皮、生殖、血糖浓度变化和色素迁移等生理活动具有重要的调节作用(Fingerman, 1997a; Huberman, 2000)。开展生物活性物质在脑和视神经节分布的定位研究,可为了解其神经活动机制提供基础资料。南美白对虾(*Penaeus vannamei*)隶属甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、游泳亚目(Natantia)、对虾科(Penaeidae)、对虾属(*Penaeus*),是当今世界养殖产量最高的三大优良虾类的养殖种类之一。目前,有关南美白对虾的研究,主要集中在水产养殖和病害防治方面(刘恒等, 1998; 于琳江等, 2001; 雷

质文等, 2002),尚未见有神经内分泌生理学方面的报道。本研究应用 5-羟色胺、神经肽 Y、P 物质、-内啡肽、胰高血糖素、生长抑素和催乳素抗体进行了免疫细胞化学检测,结果发现前 4 种抗体呈现免疫阳性反应,其余抗体为阴性反应。4 种免疫阳性物质特异性的分布模式,为其可能参与调节神经内分泌活动提供了形态学证据。

1 材料与方法

1.1 取材与切片

南美白对虾 18 只,雌雄兼有,体长 11.4—13.8cm,体重 12.3—17.2g,购自厦门农贸市场,全部为活体材料。迅速解剖出脑和视神经节,于 Bouin's 液固定 16—18h,常规脱水透明,石蜡包埋,连续横切或纵切,切片厚度 4 μ m,间隔取片,按顺序贴片,37 $^{\circ}$ C 恒温箱干燥备用。

1.2 主要试剂

兔抗脊椎动物 5-羟色胺(serotonin, 5-HT)、P 物

* 福建省重中之重“福建省海洋生物优良种质和生物活性物质的应用基础研究”项目(1998—2002)资助。叶海辉,博士,讲师, E-mail: haihuiye@163.com

1) 通讯作者

收稿日期:2003-02-19,收修改稿日期:2003-05-20

质(substance P, SP)、-内啡肽(-Endorphin, -Ep)、生长抑素(somatostatin, SS)、胰高血糖素(glucagon, Gu)、催乳素(proctolin, PRL)抗体为美国 Zymed 公司产品。兔抗神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)抗体和 DAB 为美国 Sigma 公司产品。链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫细胞化学试剂盒(SABC kit)购自武汉博士德公司。NPY 抗体为即用型工作液,其余 6 种抗体的稀释度均为 1:50。

1.3 SABC 免疫细胞化学程序

切片脱蜡止水。3% H₂O₂/PBS 室温孵育 10min,以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水浸洗,PBS 浸泡 5min。滴加正常山羊血清(1:10)室温孵育 10min,封闭非特异性反应部位。倾去血清,滴加第一抗体,37℃ 孵育 1.5h。PBS 浸洗 3 次 ×5min。滴加即用型生物素标记的羊抗兔抗体,37℃ 孵育 0.5h。PBS 浸洗 3 次 ×5min。滴加即用型链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶,37℃ 孵育 0.5h。PBS 浸洗 3 次 ×5min。0.06% DAB-0.03% H₂O₂ 显色 5—10min。自来水冲洗,苏木精复染,脱水,透明,封片。阴性对照实验采用相邻切片,以正常羊血清代替第一抗体,同步进行上述免疫细胞化学反应程序。

2 结果

南美白对虾的脑由前脑、中脑和后脑组成,左右两侧互为镜像。视神经节由外向内,可分为视神经层(lamina ganglionaris, LG)、视外髓(medulla externa, ME)、视内髓(medulla interna, MI)和视端髓(medulla terminalis, MT)等 4 部分。多数免疫阳性细胞的胞质呈棕褐色,内有黑褐色的阳性反应颗粒,少数细胞阳性反应较浅,细胞质中的反应颗粒颜色较淡;细胞核空泡状,为阴性反应。实验对照组结果均为阴性。

2.1 视神经节

5-HT 免疫阳性细胞在 LG 内缘、ME 内外缘、MI 内外缘和 MT 外缘都有零星散布(图 1a),MT 中阳性细胞体积较大(图 1b),在 MT 近视神经处也见到阳性细胞。

NPY 免疫阳性细胞在 LG 内缘分布较多,排成一行。ME 外缘阳性细胞很小(图 1c),在 ME 内缘、MI 内缘与 MT 外缘也检测到阳性细胞(图 1d,e)。除 LG 外,其他 3 个神经髓质都有阳性反应。MT 中的阳性反应髓质集中在 MT 外侧细胞群附近。

视神经节中未检测到 SP 免疫阳性反应和 -Ep 免疫阳性反应。

2.2 脑

5-HT 免疫阳性反应强,阳性细胞位于前脑和中脑,细胞数量最多的部位是中脑嗅叶外侧群(图 1f),其次是嗅叶内侧细胞群(图 1g),在前脑的前中群也检测到少量免疫阳性细胞(图 1h)。但神经髓质中只有前脑中部的神经髓检测到阳性反应(图 1h)。

NPY 免疫阳性细胞只位于前脑前中群,有的细胞阳性反应较弱,另有一些细胞阳性反应强,染色深(图 1i)。前脑中部的神经髓呈免疫阳性反应,嗅叶免疫阳性较弱,染色浅。

SP 免疫阳性细胞仅分布于前脑前中群(图 1j)。

-Ep 免疫阳性细胞位于后脑后侧群,免疫阳性反应较弱(图 1k)。

3 讨论

3.1 5-HT 免疫阳性反应

5-羟色胺又称血清动素(serotonin),属于一种重要的生物胺。应用免疫细胞化学、放射免疫法和色谱等技术,在甲壳动物的视神经节、脑、腹神经链、围食道神经节、口胃神经节和围心器等处,都检测出 5-HT,5-HT 在甲壳动物神经系统的广泛分布反映了其生理作用的多样性(Fingerman *et al*, 1994)。

5-HT 阳性细胞在视神经节的分布有不少报道。黄道蟹(*Cancer antennarius*)的 ME 和 MI 外缘 5-HT 细胞多,窦腺下方和 X 器各有 1 个细胞(Rudolph *et al*, 1990)。同样,软尾太平洋螯蛄(*Pacifastacus leniusculus*)的 ME 和 MI 外缘也散布一些阳性细胞,但神经纤维的阳性反应更强烈,在 ME 和 MI 各自形成 3 条阳性反应带。MT 的阳性细胞主要分布于腹面外缘。视神经节内有阳性神经纤维进入前脑(Elofsson, 1983)。南美白对虾视神经节的 4 个髓中都有 5-HT 阳性细胞分布,但神经髓质未见阳性反应,这与上述种类差异颇大,而与锯齿长臂虾(*Palaemon serratus*)的结果相似(Bellor-Humbert *et al*, 1988)。研究表明,5-HT 对视神经节多种神经激素的分泌具有调节作用,如促进红色素扩散激素(red pigment dispersing hormone)的分泌,从而调节小网膜细胞的光敏感杆束的活动;诱导光敏小网膜细胞中的近端小网膜色素(proximal retinal pigment)迁移到完全黑暗的位置;增强离体眼柄 X 器内蜕皮抑制激素(molt inhibiting hormone, MIH)的合成分泌;刺激窦腺中甲壳动物高血糖素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)的释放(Fingerman *et al*, 1994)。南美白对虾视神经节中

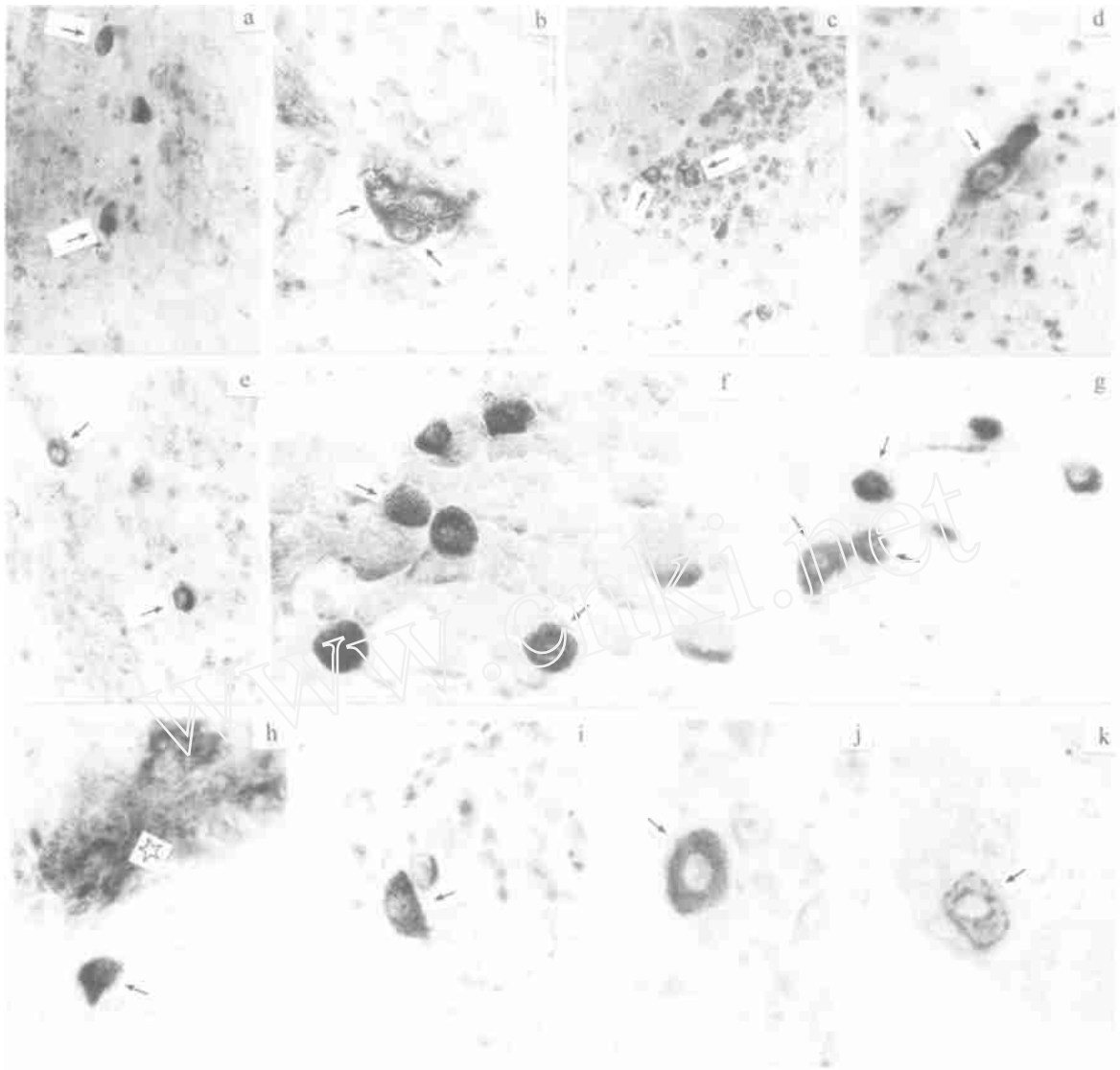


图 1 南美白对虾视神经节和脑的免疫细胞化学反应

Fig. 1 Immunoreactivity of the optic ganglia and the brain of *Penaeus vannamei*

a. LG 内缘的 5-HT 免疫阳性细胞;b. MT 中 5-HT 免疫阳性细胞;c. ME 外缘 NPY 免疫阳性细胞;d. ME 内缘的 NPY 免疫阳性细胞;e. MI 内缘的 NPY 免疫阳性细胞;f. 嗅叶外侧群的 5-HT 免疫阳性细胞;g. 嗅叶内侧群的 5-HT 免疫阳性细胞;h. 前脑前中群细胞()和前脑中部的 前端神经髓()呈 5-HT 免疫阳性反应;i. 前脑前中群的 NPY 免疫阳性细胞;j. 前脑前中群 SP 免疫阳性细胞;k. 后脑后侧群 -Ep 免疫阳性细胞。

放大倍数均为 $\times 330$

较广泛分布的 5-HT 免疫阳性物质,提示 5-HT 在神经细胞内可能起着神经递质的作用,参与了有关神经激素的合成与释放作用。

软尾太平洋螯蛄脑的前中区、后中区和嗅叶内侧的细胞群均有 5-HT 阳性细胞,前脑桥、中央体和嗅叶等多个神经髓质也有阳性反应(Elofsson, 1983)。南美白对虾前脑中部的 前端神经髓质、前脑的前中群、嗅叶内侧群和嗅叶外侧群都呈 5-HT 阳性反应。Johansson(1991)将嗅叶内侧的细胞群中的嗅觉中间神经元分为:5-HT 阳性大型细胞和 5-HT 阳性小型细胞:罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)只有大型

细胞,刺铠虾(*Munida sarni*)只有小型细胞,而软尾太平洋螯蛄和互爱蟹(*Hyas araneus*)兼具两种细胞。嗅觉中间神经元类型的不同反映了嗅觉信息加工处理过程的差异。南美白对虾嗅叶内侧细胞群的 5-HT 阳性神经细胞也只有一种类型,即为组织学观察中的 型神经细胞。据美国 Tulane 大学 Fingerman 课题组的报道,5-HT 能够刺激克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)和大西洋招潮蟹(*Uca pugilator*)的脑、胸神经节分泌性腺刺激激素(gonad stimulating hormone, GSH),从而促进性腺发育(Fingerman, 1997b)。Vaca 等(2000)也发现注射 5-HT 可以促进南美白对虾卵

巢成熟和产卵。本研究发现,南美白对虾脑内 5-HT 免疫阳性强,为 5-HT 可能参与南美白对虾 GSH 分泌活动提供了形态学依据。

3.2 NPY 免疫阳性反应

NPY 为胰多肽家族的一个成员,对脊椎动物的摄食、性行为、血压和生理节律等生理活动起着重要的调节作用 (Hoyle, 1998)。迄今,NPY 在甲壳动物分布的研究甚少,仅发现海螯蛄 (*Homarus gammarus*) ME 和 MI 具有少量 NPY 阳性细胞,窦腺呈阳性反应 (Charmantier-Daures *et al*, 1987)。南美白对虾视神经节的 4 个神经髓均有 NPY 阳性细胞;除 LG 外,其他 3 个神经髓质都呈阳性反应。

南美白对虾前脑中部的神经髓质、嗅叶和前脑中群呈 NPY 阳性反应,这与陆生的蟹 (*Chironomantes haematocheir*) 是一致的 (Honma-Yoshiharu *et al*, 1996)。南美白对虾 NPY 免疫阳性物质分布前脑与嗅叶的特点,或许提示了 NPY 参与嗅觉形成和摄食活动的生理作用。迄今,从原生动物、腔肠动物、甲壳动物和脊椎动物中均发现 NPY 的存在 (张小云等, 1993; 顾静雄等, 1998)。鉴于 NPY 在不同门类动物中的分布,可以认为 NPY 在生物系统发生过程中具有一定的保守性。

3.3 SP 免疫阳性反应

SP 广泛分布于脊椎动物神经系统和外周器官中,与兴奋平滑肌、舒张血管、促进腺体分泌、兴奋脊髓运动神经元、参与轴突反射、调节水平衡以及与痛觉感受和传递有密切关系 (顾增发, 1985)。

应用脊椎动物 SP 抗体在龙虾 (*Panulirus interruptus*) 视神经节的 4 个神经髓及窦腺,大西洋招潮蟹的小网膜细胞和 4 个神经髓及窦腺都检出阳性反应 (Mancillas *et al*, 1981; Fingerma *et al*, 1985)。SP 在窦腺中的分布,表明 SP 具有神经激素的作用。但南美白对虾视神经节中未检出阳性反应。

杂色瘦方蟹 (*Leptograpsus variegatus*) 和粗螯蛄 (*Cherax destructor*) 的前脑和中脑各有 2 个大型 SP 阳性细胞,胞突末梢最终进入嗅叶内 (Sandeman *et al*, 1990)。美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*) 脑内 SP 阳性分布极其广泛,除中脑嗅叶束神经髓质、第一触角中央神经髓质、第一触角两侧神经髓质外,其他神经髓质和各细胞群均呈阳性反应 (Langworthy *et al*, 1997)。南美白对虾仅在前脑的前中群中检测出 SP 免疫阳性细胞,神经髓质呈阴性反应,SP 样物质分布模式与上述甲壳动物相差甚远,可能为物种差异

造成。

3.4 -Ep 免疫阳性反应

-Ep 主要由下丘脑弓状核及垂体中叶合成分泌,除了具有镇痛和维持神经内分泌相对稳定的作用以外,它可以通过相应的受体作用于淋巴母细胞对免疫系统产生广泛的作用 (曹莉等, 1999)。甲壳动物神经系统 -Ep 的研究很少。南美白对虾视神经节未检测出阳性反应,但后脑中侧群中检测出 -Ep 免疫阳性细胞,有关生理功能尚待进一步研究。

本实验中,Gu、SS 和 PRL 呈阴性反应,但阴性结果并不能说明抗原不存在,可能由于以下原因导致阴性反应:这些物质的分子结构迥异于脊椎动物,即种属差异;南美白对虾体内这些物质的含量太低,超出本实验方法的测试范围;实验所采用的固定方法对于这些物质来说并非适宜,从而导致抗原失活;或许与本实验南美白对虾所处的蜕皮周期、生殖周期等生理状态有关。本实验检测到 5-HT、NPY、SP 和 -Ep 免疫阳性反应,但由于一个特定的抗体只能识别肽类分子结构的某一部分,因此单纯根据免疫细胞化学方法,还不能排除某些与脊椎动物神经肽相类似的分子(如只差个别的氨基酸)与抗体发生非特异性的交叉反应,即仅用免疫细胞化学的方法,只能说明所测得的免疫阳性物质的结构与脊椎动物相应的肽类物质相似,还不能完全确定这些物质的结构。要正确识别实验所测得的肽类物质,应采用氨基酸顺序不同的特异性抗体,并辅以其他分离技术,如离子交换层析法、凝胶层析法和色谱等方法;而从化学上鉴定其氨基酸组成则是最可靠的方法。但本文的研究结果至少说明,南美白对虾体内有些细胞和神经纤维含有可以同脊椎动物抗体结合的抗原决定部位。这些阳性抗原可能与脊椎动物神经肽类完全相同,或者是其同源物质。

参 考 文 献

- 于琳江,于奎杰,张乃禹,2001. 南美白对虾人工繁育技术的初步研究. 海洋与湖沼, 32(5): 575—580
- 刘恒,李光友,1998. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究. 海洋与湖沼, 29(2): 113—118
- 张小云,卢丽,邱子健等,1993. 棘尾虫类神经肽的免疫细胞化学研究,实验生物学报, 26(4): 483—491
- 顾静雄,罗振国,张小云,1998. 水螅 NPY 类似物的分布定位. 动物学研究, 19(4): 331—333
- 顾增发,1985. P 物质. 见:王志均主编. 胃肠激素. 北京:科学出版社, 297—311
- 曹莉,蒋春雷,路长林,1999. -内啡肽的免疫调节作用. 生理科

- 学进展, 30(1): 38—40
- 雷质文, 黄 健, 史成银等, 2002. 白斑综合症病毒(WSSV)的宿主调查. 海洋与湖沼, 33(3): 250—258
- Bellor Humbert C, Van Herp F, 1988. Localization of serotonin-like immunoreactivity in the eyestalk of the prawn *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda, Natantia), *J Morphology*, 196: 307—320
- Charmantier-Daures M, Danger J M, Netchitailo P *et al*, 1987. Immunocytochemical evidence for atrial natriuretic factor-like and neuropeptide Y-like peptides in the eyestalks of *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Comptes rendus de l academie des sciences serie -sciences de la vie-life sciences*, 305: 479—483
- Elofsson R, 1983. 5-HT-like immunoreactivity in the central nervous system of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Cell and Tissue Research*, 232: 221—236
- Fingerman M, 1997a. Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective and introspective analysis. *Physiological Zoology*, 70(3): 257—269
- Fingerman M, 1997b. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal in decapod crustaceans. *Invert Reprod Develp*, 31(1): 47—54
- Fingerman M, Hanumante M M, Kulkarni G K *et al*, 1985. Localization of Substance P-like, leucine-enkephalin-like, methionine-enkephalin-like, and FMRFamide-like immunoreactivity in the eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Cell and Tissue Research*, 241: 473—477
- Fingerman M, Nagabhushanam R, Sarojini R, 1993. Vertebrate-Type Hormones in Crustaceans-Localization, Identification and Functional Significance. *Zoological Science*, 10(1): 13—29
- Fingerman M, Nagabhushanam R, Sarojini R *et al*, 1994. Biogenic amines in crustaceans: identification, location and roles. *J Crustacean Biology*, 14(3): 413—437
- Harzsch S, Gotzner J, 2002. An immunohistochemical study of structure and development of the nervous system in the brine shrimp *Artemia salina* Linnaeus, 1758 (Branchiopoda, Anostraca) with remarks on the evolution of the arthropod brain. *Arthropod Structure & Development*, 30: 251—270
- Honma Yoshiharu, Takanori Keiko, Chiba Akira *et al*, 1996. Immunohistochemical localization of neuropeptides in the cephalic ganglion of the land crab *Chiromantes haematocheir*. *Fisheries Science Tokyo*, 62(6): 909—913
- Hoyle C, 1998. Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regulatory Peptides*, 73: 1—33
- Huberman A, 2000. Shrimp endocrinology: a review. *Aquaculture*, 191: 191—208
- Johansson KU I, 1991. Identification of different types of serotonin-like immunoreactive olfactory interneurons in four infraorders of decapod crustaceans. *Cell and Tissue Research*, 264: 357—362
- Langworthy K, Helluy S, Benton J *et al*, 1997. Amines and peptides in the brain of the American lobster: immunocytochemical localization patterns and implications for brain function. *Cell and Tissue Research*, 288: (1): 191—206
- Mancillas J R, McGinty J F, Selverston A I *et al*, 1981. Immunocytochemical localization of enkephalin and Substance P in retina and eyestalk neurons of lobster. *Nature*, 293: 576—578
- Resch-Sedlmeier G, Sedlmeier D, 1999. Release of digestive enzymes from the crustacean hepatopancreas: effect of vertebrate gastrointestinal hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology B-biochemistry & Molecular Biology*, 123: 187—192
- Rudolph P H, Spaziani E, 1990. Distribution of serotonergic neurons in the eyestalk and brain of the crab, *Cancer antennarius*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97C: 241—245
- Sandeman R E, Sandeman D C, Watson A, 1990. Substance P Antibody Reveals Homologous Neurons with Axon Terminals among somata in the crayfish and crab brain. *J Comparative Neurology*, 294: 569—582
- Vaca A, Alfaro J, 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture*, 182: 373—385

IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDIES ON THE OPTIC GANGLIA AND THE BRAIN OF *PENAEUS VANNAMEI*

YE Hai-Hui, WANG Gui-Zhong[†], JIN Zhu-Xing[†], LI Shao-Jing[†],
HUANG Hui-Yang[†], CHEN Jir-Min[†]

(Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography of Xiamen University; Laboratory of Cell Biology, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen, 361005)

[†](Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography of Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract Amines and peptides are important substances of biological activity in crustaceans. In the life process they play the role of hormone, neurotransmitter and/or neuromodulator, the optical ganglia and the brain are the center of neuroendocrinology in crustaceans, exerting significant modulation in molting, reproduction and other physical activities. *Penaeus vannamei*, despite being of global commercial importance, has never been subject to neuroendocrinological research. In this paper, immunocytochemistry techniques were used to observe the immunoreactive neurons and neuropils in the optic ganglia and brain of *P. vannamei*. The sections were stained with antibodies of serotonin (5-HT), neuropeptide Y (NPY), β -Endorphin (β -Ep), substance P (SP), somatostatin (SS), glucagon (Gu) and proctolin (PRL). The immunostained sections were observed and the positive neurons and neuropils were examined under a light microscope. Immunoreactivities are found against 5-HT, NPY, β -Ep and SP. Their distributions are as following: 5-HT-immunoreactive cells are located in lamina ganglionaris (LG), medulla externa (ME), medulla interna (MI) and medulla terminalis (MT). The immunoreactivity of 5-HT was detected in the anterior median cluster, the anterior medial protocerebrum neuropils, the inner and outer lateral cluster to olfactory lobe of the deutocerebrum. The presence of NPY-immunoreactive cells was found in the four neuropils of the optic ganglia. The immunoreactivity of NPY was located in the anterior median cluster and the anterior medial protocerebrum neuropils. SP-immunoreactive cells and β -Ep-immunoreactive cells existed in the anterior median cluster of protocerebrum and the posterior lateral cluster of tritocerebrum respectively. The wide distribution of 5-HT immunoreactivity in the optical ganglion of *P. vannamei* suggests that 5-HT probably plays the role of neuromodulator in the nerve cells. The 5-HT immunoreactivity in the cerebrum of *P. vannamei* may supply morphological proofs for its engagement in the secretion of GSH (gonad stimulating hormone). The specific distribution patterns of immunoreactive substances against NPY, β -Ep, SS and SP may also supply morphological proofs for their different neurophysiological functions. No immunoreactivities were found against SS, Gu and PRL. However, it cannot be concluded that these 4 corresponding antigen do not actually exist in the nervous system of *P. vannamei*. Further investigation is needed to reduce the technical and biological limits of this research.

Key words *Penaeus vannamei*, Optic ganglia, Brain, Immunocytochemistry