

锯缘青蟹视神经节免疫细胞化学研究

黄辉洋¹, 李少菁¹, 叶海辉^{1,2}, 王桂忠¹, 李祺福²

(1. 厦门大学 海洋学系, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 生命科学学院 细胞生物学研究室 福建 厦门 361005)

摘要: 采用兔抗哺乳类血清, 应用链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化物酶免疫细胞化学技术, 观察了锯缘青蟹视神经节中 5 羟色胺、胰高血糖素、神经肽 Y 和生长抑素免疫阳性细胞和神经纤维的形态和分布, 结果发现, 视神经节的 4 个神经髓均有 5 羟色胺免疫阳性细胞, 除 X 器检出 1 个较大型阳性细胞外, 其余均为小型细胞. 视外髓、视内髓和视端髓都具有胰高血糖素免疫阳性细胞, 视端髓的神经髓质阳性染色深, X 器中阳性细胞成群分布, 窦腺免疫阳性反应强. 神经肽 Y 免疫阳性细胞在视神经层和视外髓为小型阳性细胞, 在视内髓和视端髓检出较大型阳性细胞, 另有小型阳性细胞散布于 X 器中. 生长抑素免疫阳性细胞分布于 4 个神经髓, 数量少. 4 种免疫阳性物的特异性分布模式, 可为其不同的神经生理作用提供形态学证据.

关键词: 锯缘青蟹; 视神经节; 5 羟色胺; 肽类; 免疫细胞化学

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253 - 4193 (2005) 01 - 0125 - 05

1 引言

十足目甲壳动物眼柄中的视神经节 (optic ganglia) 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 层. 位于视端髓基部外侧的 X 器由成群的神经分泌细胞组成, X 器能够合成蜕皮抑制激素 (molt-inhibiting hormone, M IH)、性腺抑制激素 (gonad-inhibiting hormone, GH)、甲壳动物高血糖素 (crustacean hyperglycemic hormone, CHH)、红色素聚集激素 (red pigment concentrating hormone, RPCH) 和色素扩散激素 (pigment dispersing hormone, PDH) 等神经激素, 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, 是甲壳动物的神经分泌中心^[1]. 窦腺 (sinus gland, SG) 位于视内髓和视端髓之间, 主要由 X 器 (MTXO) 发出的轴突形成. 不少研究者认为, 甲壳动物的 X 器 - 窦腺复

合体 (X organ - sinus gland complex) 的结构类似于脊椎动物的下丘脑 - 神经垂体, 是研究神经分泌活动的良好材料^[2,3]. 锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 隶属于节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda), 是我国重要的海洋经济蟹类. 上官步敏和李少菁^[4,5]已报道了锯缘青蟹视神经节 X 器 - 窦腺的形态结构. 研究采用兔抗哺乳类 5 羟色胺 (serotonin, 5-HT)、胰高血糖素 (glucagon, Glu)、生长抑素 (somatostatin, SOM) 和神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 特异性抗血清, 应用链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化物酶免疫细胞化学技术, 对锯缘青蟹视神经节中免疫阳性细胞的分布和定位进行了研究. 4 种免疫阳性物质特异性的分布模式, 为其可能参与调节视神经节的生理活动提供了形态学证据.

2 材料和方法

2.1 取材和切片

在厦门市农贸市场购买锯缘青蟹 20 只, 体长度

收稿日期: 2002 - 07 - 18; 修订日期: 2002 - 11 - 04.

基金项目: 福建省重中之重资助项目; 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20010384010); 国家自然科学基金资助项目 (30300269).

作者简介: 黄辉洋 (1973—), 女, 福建省南安县人, 副教授, 从事甲壳动物内分泌学研究. E-mail: huiyang@jingxian.xmu.edu.cn

为 4.0~8.8 cm, 体重为 45~400 g, 雌雄兼有. 将锯缘青蟹置于温度为 -20°C 下 5~15 min, 再转移到 4°C 下 20~30 min. 将低温麻醉后的锯缘青蟹在冰冷的 PBS (0.01 mol, pH7.4) 中迅速解剖出左右两侧眼柄中的视神经节, 于 Bouin 液固定 6~12 h, 常规脱水透明, 石蜡包埋, 连续横切或纵切, 切片厚度为 $6\ \mu\text{m}$, 间隔取片, 按顺序贴片.

2.2 主要试剂

兔抗哺乳类 5-HT, Glu, SOM 抗血清和链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫细胞化学试剂盒为美国 Zymed 公司产品, NPY 抗血清和 DAB 为美国 Sigma 公司产品, 均购自北京中山生物技术公司. 5-HT, Glu 和 SOM 抗血清的稀释度为 1:50, NPY 抗血清为即用型工作液.

2.3 免疫细胞化学程序

将切片脱蜡至水. 3% H_2O_2 / PBS 室温孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性. 蒸馏水浸洗, PBS 浸泡 5 min. 滴加正常山羊血清 (1:10), 室温孵育 10 min 封闭非特异性反应部位. 倾去血清, 滴加第一抗体, 37°C 孵育 1.5 h. PBS 浸洗 3 次, 每次 5 min. 滴加即用型生物素标记的羊抗兔抗体, 37°C 孵育 0.5 h. PBS 浸洗 3 次, 每次 5 min. 滴加即用型链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶, 37°C 孵育 0.5 h. PBS 浸洗 3 次, 每次 5 min. 以 0.03% H_2O_2 为溶剂, 配制浓度为 0.06% 的 DAB 溶液显色 5~10 min. 自来水冲洗, 苏木精复染, 脱水, 透明, 封片. Olympus BH-2 型显微镜下观察和摄影. 阴性对照实验采用相邻切片, 以正常羊血清或 PBS 代替第一抗体, 同步进行上述免疫细胞化学反应程序, 结果为阴性.

3 结果

锯缘青蟹视神经节由外向内可分为 LG, ME, MI, MT, X 器位于视端髓基部外侧, 由成群的神经分泌细胞组成; SG 位于 MI 和 MT 之间, 主要由 X 器发出的轴突形成 (图 1). 锯缘青蟹视神经节的免疫阳性细胞从形态大小上可分为两类: 一类的细胞较小, 直径约为 $10\ \mu\text{m}$, 称为小型细胞; 另一类的细胞较大, 直径为 $15\sim 60\ \mu\text{m}$, 称为较大细胞.

3.1 5-HT 免疫阳性反应

视神经节的 4 个神经髓均有 5-HT 免疫阳性细胞, 除 X 器检出 1 个较大细胞外 (见图 2-1), 余者均为小型细胞. LG 外缘和內缘均有不少阳性细胞, ME 的阳性细胞只位于外缘细胞之间 (见

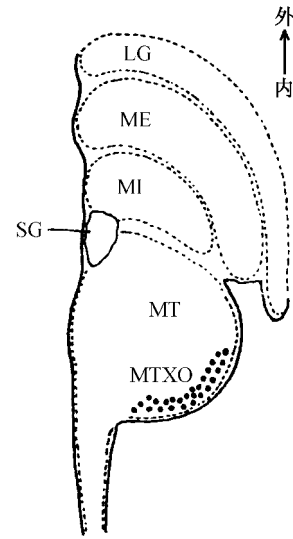


图 1 锯缘青蟹右眼视神经节背面图

图 2-2), MI 外缘的细胞之间和內缘细胞群內均有分布. MT 的阳性细胞数量较多, 外缘的阳性细胞位于 MI 下方, 中部细胞群也散布着一些阳性细胞. X 器中仅检出 1 个较大细胞 (见图 2-1), 小型阳性细胞数量也较少, 表明 X 器中 5-HT 的含量不多.

3.2 Glu 免疫阳性反应

除了 LG 外, 其他 3 个神经髓都具有 Glu 免疫阳性反应, 其中 MT 阳性细胞数量最多. ME 外缘的细胞中仅有少量小型阳性细胞. MI 的外缘具有小型阳性细胞, 內缘有少数较大细胞 (见图 2-3). MT 靠近 SG 处也有数个较大细胞. MT 背侧分布着一些小型阳性细胞, X 器中约有 30~35 个免疫阳性细胞, 染色深, 且成群分布 (图 2-4), 在 MT 神经髓质多数区域阳性反应强烈. SG 壁上的神经末梢也呈阳性反应 (见图 2-5), 表明 X 器等处分泌的物质被运输集中在 SG 的轴突末端.

3.3 NPY 免疫阳性反应

视神经节 4 个神经髓均有 NPY 免疫阳性反应. LG 和 ME 內缘均有小型阳性细胞分布 (见图 2-6). MI 和 MT 靠近 SG 处有较大细胞 (见图 2-7). X 器內两种类型的阳性细胞均有出现 (见图 2-8). 除 LG 外, 其他神经髓质均有阳性反应. MT 的阳性神经髓质集中于 X 器附近, 染色很深, 可见很短的阳性神经纤维 (见图 2-9).

3.4 SOM 免疫阳性反应

视神经节 4 个神经髓均有少量免疫阳性细胞分

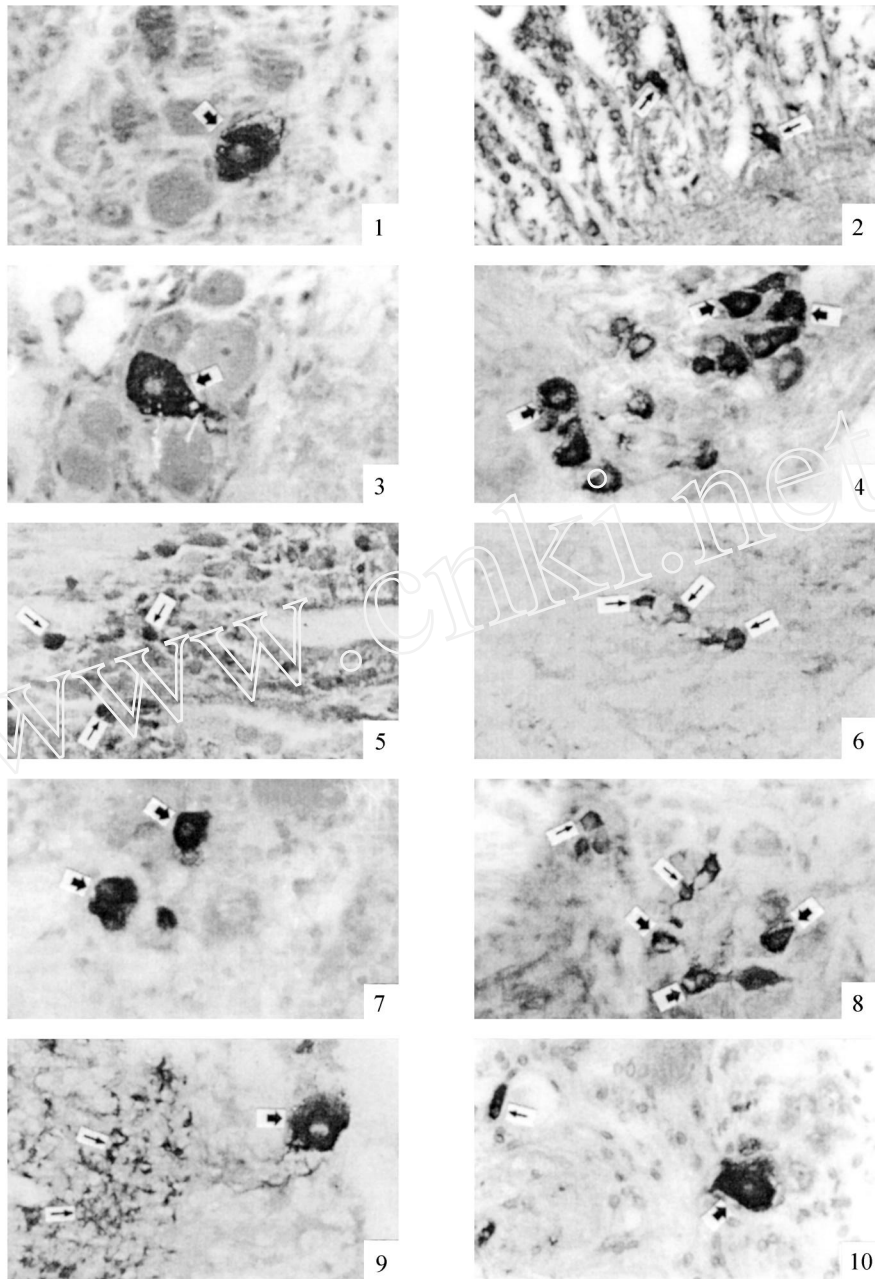


图 2 锯缘青蟹视神经节的免疫细胞化学阳性反应

1. X器内较大型 5-HT免疫阳性细胞(↑), ×330; 2. ME外缘的小型 5-HT免疫阳性细胞(), ×330; 3. MI内缘细胞群中较大型的 Glu免疫阳性细胞(↑), ×330; 4. X器内 Glu免疫阳性细胞(↑)成群分布, ×330; 5. 窦腺的神经末梢具有 Glu免疫阳性反应(), ×330; 6. ME内缘的小型 NPY免疫阳性细胞(), ×330; 7. MI靠近窦腺处有较大型 NPY免疫阳性细胞(↑), ×330; 8. X器内小型 NPY免疫阳性细胞()和较大型 NPY免疫阳性细胞(↑), ×330; 9. X器附近较大型的 NPY免疫阳性细胞(↑)和阳性神经纤维(), ×330; 10. MT背侧较大型 SOM免疫阳性细胞(↑)和小型 SOM免疫阳性细胞(), ×330

布. LG和 ME的阳性细胞只位于外缘,染色很浅,MI的阳性细胞位于内缘. MT背侧除了小型阳性细胞外,还检出少数较大型细胞(见图2-10). X器内只有小型阳性细胞. 4个神经髓质均为阴性反应,可能与阳性细胞和神经纤维较少有关.

4 讨论

5-HT免疫阳性细胞在已研究的甲壳动物视神经节中均有发现,不过分布特点存在差异. 黄道蟹(*Cancer antennarius*)的小型阳性细胞(约为10 μm)主要分布于ME和MI外缘,SG下方和X器各有1个大的阳性细胞^[6]. 软尾太平蛄(*Pacifastacus leniusculus*)的5-HT免疫阳性细胞位于ME,MI和MT,神经纤维的阳性反应强烈,在ME和MI各自形成3条阳性反应带^[7]. 锯缘青蟹视神经节的4个神经髓质均有5-HT免疫阳性细胞,但未见神经髓质的阳性反应,与在锯齿长臂虾(*Palaemon serratus*)中的观察结果相似^[8]. 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MH的合成;刺激窦腺中CHH的释放^[9]. 锯缘青蟹视神经节中较广泛分布的5-HT免疫阳性物,提示5-HT在神经细胞内可能起着递质的作用,参与了有关神经激素的合成和释放作用.

甲壳动物的CHH是甲壳动物特有的神经肽之一,视神经节中的X器是CHH的合成中心,CHH经轴突运输到窦腺,然后释放入血淋巴,从而调节血糖浓度,以满足能量代谢的需要. 已知多种甲壳动物,如菲岩龙虾(*Jasus lalandii*)、波纹龙虾(*Panulinus hananus*)和三叶真蟹(*Carcinus maenas*)的X器和窦

腺均呈CHH免疫阳性反应^[10]. van Deynen等^[11]报道,应用Glu抗血清,从蛄(*Astacus leptodactylus*)的视神经节LG,ME,MI均检测出Glu免疫阳性细胞,X器内的阳性细胞较为分散,SG则呈阴性反应. 锯缘青蟹视神经节的LG无Glu免疫阳性反应,X器内Glu阳性细胞成群,SG呈阳性反应. 这两种甲壳动物Glu免疫阳性反应差别很大,原因有待考察. 甲壳动物X器对CHH,Glu抗血清的免疫阳性反应特征极为相似,免疫阳性细胞成群分布,细胞数量均为30个左右,提示了CHH和脊椎动物Glu的结构具有相似之处.

NPY在甲壳动物分布的研究中甚少:Chamantier等^[12]曾从海蛄(*Hemarus gammarus*)的ME和M检测出少量的NPY阳性细胞,SG也呈阳性反应. 锯缘青蟹视神经节的NPY阳性细胞较多,在4个神经髓质均有分布,但SG呈阴性反应,两者免疫阳性反应模式显著不同. NPY对脊椎动物摄食、性行为、血压和生理节律等生理活动起着重要的调节作用^[13]. 对甲壳动物视神经节内NPY的生理作用尚待进一步研究.

锯缘青蟹视神经节的4个神经髓质均有SOM免疫阳性细胞,并首次证实了SOM细胞存在于十足目甲壳动物体内. 迄今除脊椎动物外,SOM在头索动物的厦门文昌鱼(*B ranchiostoma belcheri*)、昆虫纲的美洲大蠊(*Periplaneta americana*)、甲壳纲的鼠妇(*Porcellio dilatatus*)和原生动物的贻贝棘尾虫(*S tytonychia mytilus*)均能检出免疫阳性反应^[14-17]. 研究进一步证实了SOM是生物进化过程中一种保守的肽类物质. 在脊椎动物SOM对生理活动具有广泛的抑制作用,而在甲壳动物迄今尚无这方面的报道. SOM对锯缘青蟹视神经节的神经活动,尤其是对X器内神经激素合成和释放的调节作用,值得深入研究.

参考文献:

- [1] KELLER R. Crustacean neuropeptides: structure, functions and comparative aspects[J]. *Experientia*, 1992, 48: 439—448.
- [2] FINGERMAN M. Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective and introspective analysis[J]. *Physiological Zoology*, 1997, 70(3): 257—269.
- [3] HUBERMAN A. Shrimp endocrinology: a review[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1~3): 191—208.
- [4] 上官步敏,李少菁. 锯缘青蟹X器神经分泌细胞的细胞学研究[J]. *海洋学报*, 1994, 16(6): 116—121.
- [5] 上官步敏,李少菁. 锯缘青蟹窦腺显微和超微结构研究[J]. *动物学报*, 1995, 41(4): 341—346.
- [6] RUDOLPH P H, SPAZIAN I E. Distribution of serotonergic neurons in the eyestalk and brain of the crab, *Cancer antennarius* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1990, 97C: 241—245.
- [7] ELOFSSON R. 5-HT-like immunoreactivity in the central nervous system of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus* [J]. *Cell Tissue Research*,

- 1983, 232: 221—236.
- [8] BELLON - HUMBERT van, HERP C F. Localization of serotonin-like immunoreactivity in the eyestalk of the prawn *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda, Natantia) [J]. Journal of Morphology, 1988, 196: 307—320.
- [9] FINGERMAN M, NAGABHUSHANAM R, SAROJ N I R. Biogenic amines in crustaceans: identification, location and roles[J]. Journal of Crustacean Biology, 1994, 14 (3): 413—437.
- [10] MARCO H G, GADE G. A comparative immunocytochemical study of the hyperglycaemic, moult-inhibiting and vitellogenesis-inhibiting neurohormone family in three species of decapod Crustacea[J]. Cell Tissue Research, 1999, 295 (1): 171—182.
- [11] van DEYNEN J E, VEK F, van HERP F. An immunocytochemical study of the optic ganglia of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann) with antisera against biologically active peptides of vertebrates and invertebrates[J]. Cell Tissue Research, 1985, 240: 175—183.
- [12] CHARMANTIRE - DAURES M, DANGER JM, NETCHITA LO P. Immunocytochemical evidence for atrial natriuretic factor-like and neuropeptide Y-like peptides in the eyestalks of *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda) [J]. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences: Serie . Sciences de la Vie-life Sciences, 1987, 305: 479—483.
- [13] HOYLE CH. Neuropeptide families: evolutionary perspectives[J]. Regulatory peptides, 1998, 73: 1—33.
- [14] FANG Yong-qiang, HUANG Wei-quan, QI Xiang, et al. Distribution of somatostatin in amphioxus: a study of immunohistochemistry[J]. Chinese Science Bulletin, 1992, 37 (14): 1 203—1 207.
- [15] NISHITSUTSUJ HUWO J, ENDO Y, TAKEDA M. Insect brain - midgut endocrine system: with special reference to paraneurons[A]. KOBAYASHI H, BERNHARDT A. Neurosecretion and the biology of neuropeptides[A]. Japan Sci Soc Press[M]. Tokyo: Springer - Verlag, 1985. 410—417.
- [16] MARTIN G, DUBOIS M P. A somatostatin-like antigen in the nervous system of an isopod *Porcellio dilatatus* Brandt [J]. General and Comparative Endocrinology, 1981, 45 (1): 125—130.
- [17] 张小云, 卢丽, 邱子健, 等. 棘尾虫类神经肽的免疫细胞化学研究 [J]. 实验生物学报, 1993, 26(4): 483—491.

Immunocytochemical studies on the optic ganglia of the mud crab, *Scylla serrata* (Forskål)

HUANG Hui-yang¹, LI Shao-jing¹, YE Hai-hui^{1,2}, WANG Gui-zhong¹, LI Qi-fu²

(1. Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Laboratory of Cell Biology, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstracts: Immunocytochemistry technologies were applied to observe the immunoreactive neurons and neuropils of serotonin (5-HT), glucagon (Glu), neuropeptide Y (NPY) and somatostatin (SOM) in the optic ganglia of *Scylla serrata*. The results are as follows: 5-HT-immunoreactive cells are located in lamina ganglionaris (LG), medulla externa (ME), medulla interna (MI) and medulla terminalis (MT). Except one large immunoreactive cell in the X organ, the other immunoreactive cells are small. The presence of Glu-immunoreactive cells is found in the optic ganglia except LG. The immunoreactivity is strong in the neuropils of MT. Many immunoreactive cells in MT are aggregated in X organ. The sinus gland is immunoreactive. The NPY-immunoreactive cells are small in LG and ME and large in MI and MT. Small cells are also seen dispersing in the X organ. A few SOM-immunoreactive cells are distributed in the four neuropils in the optic ganglia. The specific distribution patterns of the four immunoreactive substances may thus supply morphological proofs for their different neurophysiological function.

Key words: *Scylla serrata*; optic ganglia; serotonin; peptides; immunocytochemistry