

锯缘青蟹胸神经团的免疫细胞化学定位研究 *

黄辉洋¹ 叶海辉² 李少菁^{1**} 王桂忠¹ 金朱兴¹

(¹ 厦门大学海洋系 厦门 361005)

(² 厦门大学生命科学学院细胞生物学研究室 厦门 361005)

提要 采用兔抗哺乳类抗血清,应用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫细胞化学技术,研究了锯缘青蟹(*Scylla serrata*)胸神经团中5-羟色胺(5-HT)、胰高血糖素(Glu)和神经肽Y(NPY)的分布。其分布的主要特征为:5-HT免疫阳性细胞在每对步足神经节都呈对称排列;Glu免疫阳性最强,胸神经节的阳性细胞排列成两条环绕胸动脉孔分布的细胞带,神经髓质中免疫阳性物质呈斑块状分布;NPY阳性细胞主要分布于食道下神经节。这3种免疫阳性物质的特定分布模式可为腹神经链的系统演化和参与神经活动提供形态学证据。

关键词 锯缘青蟹(*Scylla serrata*),胸神经团,5-羟色胺,胰高血糖素,神经肽Y,免疫细胞化学

中图分类号 Q189 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)03-0077-04

解剖学研究表明,十足目甲壳动物腹神经链的演化按照对虾类(Penaeidea)、真虾类(Caridea)、长尾类(Macrura)、异尾类(Anomura)和短尾类(Brachyura)等分类阶元而发展;短尾类为十足目的高级阶元,其腹神经链的各个神经节高度愈合,成为胸神经团^[1]。迄今,甲壳动物神经器官,特别是神经分泌细胞的研究,主要集中在脑和眼柄视神经节上,有关腹神经链或胸神经团的报道尚少。本文在锯缘青蟹胸神经团结构和神经分泌细胞分布研究的基础上^[2],采用兔抗哺乳类5-羟色胺、高血糖素和神经肽Y特异性抗血清,应用灵敏可靠的链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫细胞化学技术,对锯缘青蟹胸神经团免疫阳性物质的分布和定位进行了研究,结果发现它们具有特定的分布模式。这些物质的存在,为参与腹神经链的系统演化和神经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

锯缘青蟹30只,体长6.0~8.8 cm,体重155~400 g,雌雄兼有,购自厦门农贸市场。解剖前,先将锯缘青蟹置于-20℃下5~15 min,再转移到4℃下20~30 min。将低温麻醉后的锯缘青蟹在冰冷的PBS中迅速解剖出胸神经团,Bouin's液固定10~12 h,常规脱水透明,石蜡包埋,连续横切或纵切,切片厚度6 μm,间隔取片,按顺序贴片。

1.2 主要试剂

兔抗哺乳类5-羟色胺(serotonin,5-HT)、胰高血糖素(glucagon, Glu)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,神经肽Y(neuropeptide Y, 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和Glu抗血清的稀释度为1:50, NPY抗血清为即用型工作液。

1.3 免疫细胞化学程序

切片脱蜡至水。3% H₂O₂/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℃孵育1.5 h。PBS浸洗3次×5 min。滴加即用型生物素标记的羊抗兔抗体,37℃孵育0.5 h。PBS浸洗3次×5 min。滴加即用型链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶,37℃孵育0.5 h。PBS浸洗3次×5 min。

* 福建省重中之重项目“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”;高等学校博士学科点专项科研基金项目20010384010号。

第一作者:黄辉洋,出生于1973年,博士,讲师,从事甲壳动物内分泌学研究。通讯地址:厦门大学海洋系;电话:0592-2185539;E-mail: huiyang@jingxian.xmu.edu.cn

** 通讯联系人

收稿日期:2002-05-23;修回日期:2002-09-08

0.06% DAB 0.03% H₂O₂ 显色 5~10 min。自来水冲洗, 苏木精复染, 脱水, 透明, 封片。Olympus BH2 型显微镜下观察与摄影。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。

2 结果

锯缘青蟹胸神经团由食道下神经节、胸神经节和腹神经节愈合而成。免疫阳性细胞的细胞质呈棕色, 内有黑褐色免疫阳性颗粒物, 细胞核为阴性反应。对照实验的结果为阴性。

2.1 5-HT 免疫阳性反应

食道下神经节的左右两侧, 从背面到腹面都能检出免疫阳性细胞; 在食道下神经节中线处, 常见阳性

细胞成对间隔排列 (图 1-1)。食道下神经节内的神经髓质大部分区域呈阳性反应, 纵行的神经纤维有时染色较深。胸神经节的 5 对步足神经节近胸动脉孔处都能检出 1 个大型阳性细胞 (图 1-2), 即每对步足神经节有两个阳性细胞对称排列, 神经髓质呈阳性反应。腹神经节也可见大型阳性细胞, 神经髓质的阳性反应较弱。

2.2 Glu 免疫阳性反应

在食道下神经节的左右两侧, 背面常见大型阳性细胞, 有时数个聚集; 而腹面的阳性细胞很少。在食道下神经节的中线处, 阳性细胞数量较多, 前后相隔一定距离就有数个聚集 (图 2-1), 神经髓质大部分区域呈阳性反应。胸神经节的阳性细胞分布在各个步足神经节的相同位置上, 从矢状面上可见阳性细胞排列成

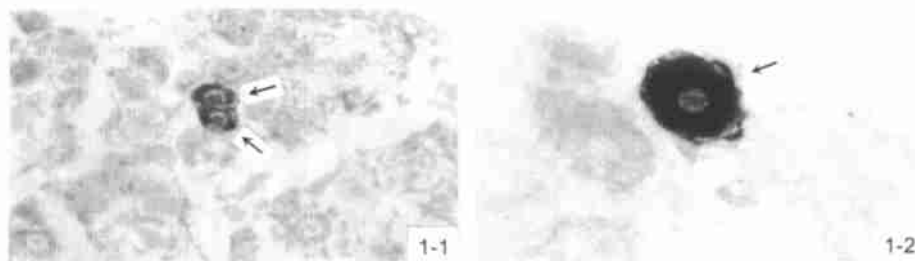


图 1 锯缘青蟹胸神经团 5-HT 免疫阳性反应

Fig.1 5-HT immunoreaction in the thoracic ganglion mass of *Scylla serrata*

1-1 食道下神经节中线处成对的 5-HT 免疫阳性细胞 (↑), ×330; 1-2 步足神经节内大型 5-HT 免疫阳性细胞 (↑), ×165
1-1 Paired 5-HT immunoreactive cells (↑) in the median of the subesophageal ganglion, ×330; 1-2 Large 5-HT immunoreactive cells (↑) in the leg ganglion, ×165

两条细胞带, 环绕胸动脉孔分布, 内侧细胞带贴近胸动脉孔 (图 2-2), 外侧细胞带则近步足神经分布; 神经髓质的绝大部分区域都呈阳性反应 (图 2-3)。腹神经节阳性细胞多, 神经髓质中免疫阳性物质呈斑块状分布 (图 2-4)。

2.3 NPY 免疫阳性反应

食道下神经节阳性细胞占整个胸神经团阳性细胞的半数以上。在食道下神经节左右两侧, 阳性细胞近口肢神经分布 (图 3-1), 中线处的阳性细胞密集分布 (图 3-2), 神经髓质的阳性反应强, 纵向神经纤维染色很深 (图 3-3)。胸神经节内阳性细胞较少。腹神经节背面的阳性细胞为大型阳性细胞 (图 3-4), 腹面的阳性细胞较小, 神经髓质的阳性反应很弱。

3 讨论

甲壳动物中枢神经系统的形态变化与系统演化密切相关, 一向受到学者们的重视。锯缘青蟹的腹神经索高度愈合成为胸神经团, 但胸神经团 5-HT 免疫

阳性细胞在食道下神经节的左右两侧和中线处成群分布, 每对步足神经节有两个阳性细胞对称排列, 腹神经节阳性细胞较多; 食道下神经节阳性细胞略小, 胸神经节和腹神经节阳性细胞较大, 其分布模式与美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*)^[13]、小长臂虾 (*Palaeomonetes mesogenitor*)^[14] 的腹神经索极为相似。上述结果表明, 甲壳动物腹神经索演化成胸神经团后, 虽然形态上有了很大的变化, 但神经细胞的排列方式及相同位置上神经细胞内的化学成分仍然是相似或相同的, 反映了甲壳动物神经系统进化过程中神经物质的分布具有保守的一面。美洲螯龙虾腹神经索发出的阳性神经纤维在外周形成神经丛, 并释放 5-HT 入血淋巴, 从而广泛地调节外周组织的生理活动^[15]。我们也观察到部分 5-HT 阳性神经纤维从胸神经节发出, 这些神经纤维的分布状况尚待进一步观察研究。

通常认为, 眼柄视神经节的 X 器是甲壳动物高血糖素 (crustacean hyperglycemic hormone, CHH) 的合成中心。Chang 等^[16] 发现美洲螯龙虾的食道下神经节含

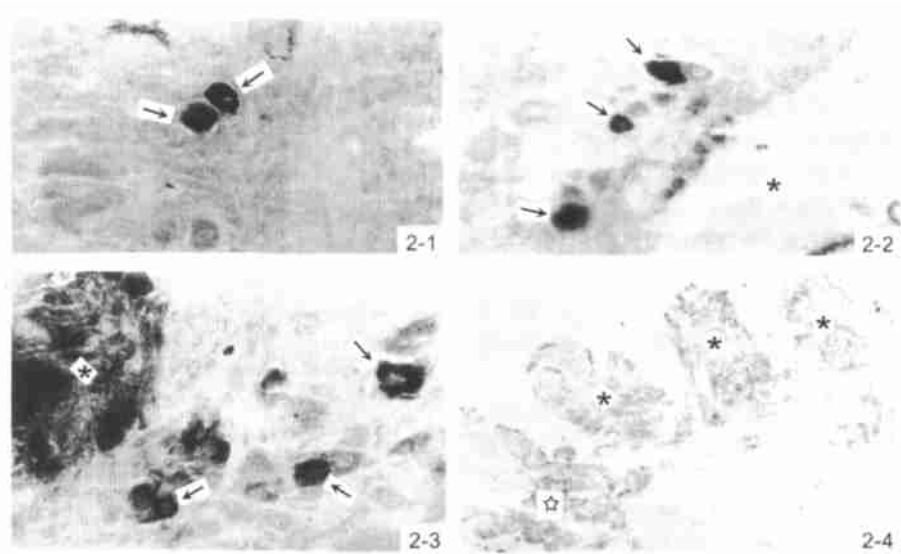


图 2 锯缘青蟹胸神经团 Gu 免疫阳性反应

Fig.2 Gurimmunoreaction in the thoracic ganglion mass of *Scylla serrata*

2-1 食道下神经节中线处的 Gu 免疫阳性细胞(↑), × 330; 2-2 步足神经节内侧的 Gu 免疫阳性细胞(↑) 围绕胸动脉孔(*), × 165; 2-3 腹神经节 Gu 免疫阳性细胞(↑) 和呈斑块状的免疫阳性神经髓质(*) × 33; 2-4 步足神经髓质(*) 和腹神经节的神经髓质(☆) 呈 Gu 免疫阳性反应, × 165

2-1 Gurimmunoreactive cell(↑) in the median of the subesophageal ganglion, × 330; 2-2 Gurimmunoreactive cells (↑) in the leg ganglion surrounding the thoracic artery foramen, × 165; 2-3 Gurimmunoreactive cells (↑) and neuropils in patchiness in the abdomen ganglion, × 33; 2-4 Gurimmunoreactive neuropils in the leg ganglion(*) and the abdomen ganglion(☆), × 165

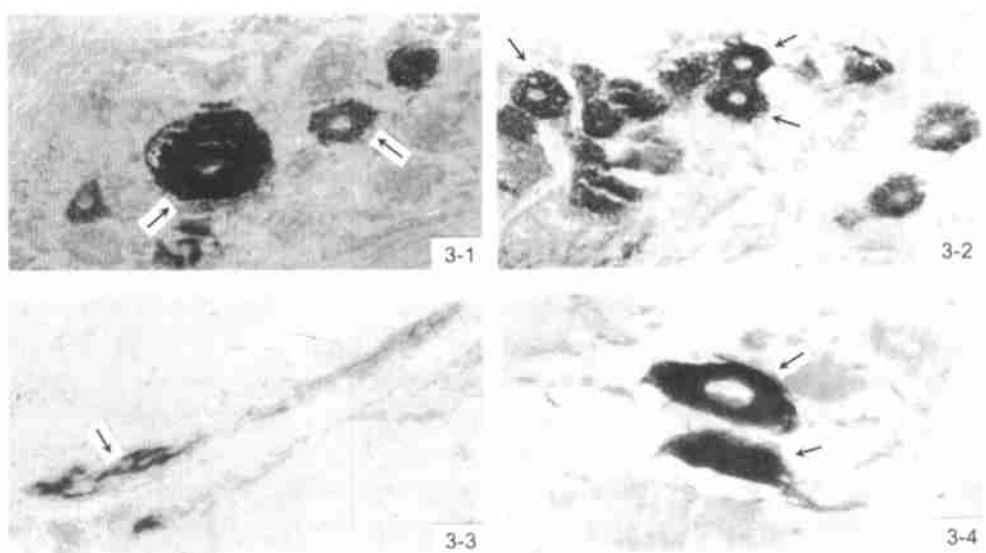


图 3 锯缘青蟹胸神经团 NPY 免疫阳性反应

Fig.3 NPYimmunoreaction in the thoracic ganglion mass of *Scylla serrata*

3-1 食道下神经节两侧的细胞群中的 NPY 免疫阳性细胞(↑), × 330; 3-2 食道下神经节中线处的 NPY 免疫阳性细胞(↑), × 330; 3-3 食道下神经节中纵向的 NPY 免疫阳性神经纤维(↑), × 82.5; 3-4 腹神经节中大型 NPY 免疫阳性细胞(↑), × 330

3-1 NPYimmunoreactive cells(↑) in bilateral cell clusters in the subesophageal ganglion, × 330; 3-2 NPYimmunoreactive cells in the median of the subesophageal ganglion, × 330; 3-3 Lognitudinal NPYimmunoreactive nervous fiber in the subesophageal ganglion, × 82.5; 3-4 Large NPYimmunoreactive cells (↑) in the abdomen ganglion, × 330

有 1 对 CHH 阳性细胞, 胸神经节第二神经根的细胞也呈阳性。这些阳性细胞很可能释放免疫阳性物质进入血淋巴, 从而作为神经系统的第二个重要来源。从锯缘青蟹胸神经团检出的 3 种免疫阳性反应中, Gu 阳性细胞数量最多, 阳性神经髓质的面积最广。胸神经团中 Gu 免疫阳性反应的存在, 表明脊椎动物胰高血糖素(Gu) 与甲壳动物高血糖素(CHH) 的部分结构是相同或相似的。锯缘青蟹视神经节已检出 Gu 免疫阳性物质, 与胸神经团相比, 阳性细胞的数量明显较少。因此, 我们认为锯缘青蟹胸神经团是 Gu 样物质的重要来源。这一结果扩大了高血糖素在甲壳动物神经系统分布的认识。

NPY 是由 36 个氨基酸组成的活性多肽, 结构与胰多肽极其相似, 故认为同属胰多肽家族。脊椎动物体内 NPY 对摄食、性行为、血压和生理节律等生理活动起着重要的调节作用^[7]。目前尚未见到 NPY 在甲壳动物腹神经索或胸神经团分布的研究。锯缘青蟹胸神经团中 NPY 免疫阳性分布较广泛。食道下神经节中神经髓质的阳性反应强, 并可见染色深的纵行神经纤维; 阳性细胞多, 占胸神经团阳性细胞的半数以上; 分布位置靠近四肢神经。该结果提示了 NPY 参与调节锯缘青蟹的摄食行为; 如果能进一步证实此观点, 那么脊椎动物和甲壳动物的 NPY 不仅结构相似, 而且

功能上也有相似之处。

参考文献

- 1 陈宽智. 东方对虾 *Penaeus orientalis* 和三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 中枢神经系统解剖及十足目动物腹神经的形态比较. 山东海洋学院学报, 1980, 10(3): 91-99
- 2 叶海辉, 李少菁, 金朱兴, 等. 锯缘青蟹胸神经团的组织学观察. 厦门大学学报, 2002, 40(4): 6-8
- 3 Beltz B S, Kravitz E A. Mapping of serotoninlike immunoreactivity in the lobster nervous system. Journal of Neuroscience, 1983(3): 585-602
- 4 Azzouna A. Serotoninlike immunoreactivity of the ventral nerve cord of the shrimp *Palaeomonetes mesogenitor* Sollaud, 1912. Crustaceana Leiden, 2000, 73(3): 301-310
- 5 Langworthy K, Helluy S, Benton J, et al. Amines and peptides in the brain of the American lobster: immunocytochemical localization patterns and implications for brain function. Cell and Tissue Research, 1997, 288(1): 191-206
- 6 Chang E S, Chang S A, Beltz B S, et al. Crustacean hyperglycemic hormone in the lobster nervous system: Localization and release from cells in the subesophageal ganglion and thoracic second roots. Journal of Comparative Neurology, 1999, 414(1): 50-56
- 7 Hoyle C H. Neuropeptide families: evolutionary perspectives. Regulatory peptides, 1998(73): 1-33

IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION IN THE THORACIC GANGLION MASS OF THE MUD CRAB, *Scylla serrata*

HUANG Hui-Yang¹ YE Hai-Hui² LI Shao-Jing¹ WANG Gui-Zhong¹ JIN Zhu-Xing¹

(¹ Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen, 361005)

(² Laboratory of Cell Biology, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Received: May, 23, 2002

Key Words: *Scylla serrata*, Thoracic ganglion mass, Serotonin, Glucagon, Neuropeptide Y, Immunocytochemistry

Abstracts

Immunocytochemistry techniques were applied to observing the immunoreactive neurons and neuropils of serotonin (5-HT), glucagon (Gu) and neuropeptide Y (NPY) in the thoracic ganglion mass of *Scylla serrata*. The distribution characteristics of the 3 immunoreactive substances are as follows:

5-HT immunoreactive cells in each leg ganglion are symmetrically distributed; Gu immunoreactivity is strong; the immunoreactive cells in the thoracic ganglion are arranged in two distinct bands, which surround the thoracic artery foramen; Gu immunoreactivity in the neuropils is distributed in patchiness; most of NPY immunoreactive cells locate in the subesophageal ganglion.

The specific distribution patterns of the 3 immunoreactive substances may provide morphological proofs for their different neurophysiological function and the evolution of the abdomen neural chain in decapod. (本文编辑:刘珊珊)