

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)脑显微结构 及视腺超微结构观察*

于新秀 吴常文 迟长凤

(浙江海洋学院 浙江省海洋养殖装备与工程技术重点实验室 舟山 316004)

提要 采用解剖学、组织切片以及电子显微镜技术,对成熟曼氏无针乌贼的脑部形态结构进行观察。结果表明,以贯穿脑的食道作为参照物,可将其脑分为三部分:食道上神经团、食道下神经团以及位于脑两侧两个发达的视叶,各个神经团又可以细分为不同的神经叶。同时采用光镜和电镜技术对内分泌器官——视腺做了显微结构和超显微结构的观察,结果发现,视腺外缘有结缔组织包裹,位于视神经束区上,嗅叶和背外侧叶之间,视腺内可观察到大量分泌细胞,细胞核较大,直径可达 10 μ m;分泌细胞含有丰富的粗面内质网、高尔基体及很多高电子密度的分泌颗粒。此项研究结果将为进一步研究曼氏无针乌贼的神经结构的生理以及发育提供形态学基础。

关键词 曼氏无针乌贼,脑,视腺,显微结构,超显微结构

中图分类号 Q955

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)属于头足纲、乌贼目、乌贼科、无针乌贼属,具有很高的营养价值和药用价值,曾经是东海广泛分布的物种。20 世纪 70 年代以后,出现种质资源衰退,产量明显下降,目前仅作为兼捕对象,面临灭绝的危险。为保护这一珍贵物种,进行人工繁育迫在眉睫(常抗美等, 2008; 宋微微等, 2009)。目前国内对于曼氏无针乌贼的研究主要集中在生殖等方面,雄性生殖系统和雌性生殖系统均已做过详细完整的解剖以及组织学方面的观察(叶素兰等, 2007; 蒋霞敏等, 2008),而其神经系统的研究尚未见相关的报道。

头足类神经系统高度集中,脑部结构复杂,且具有很强的运动、感觉以及认知能力,特别是其敏锐的视觉和灵活的腕,在无脊椎动物中最为发达,甚至可以与脊椎动物相媲美(Shuichi *et al*, 2002)。关于头足类神经系统结构的研究在国内较少,国外学者 Young(1960, 1977, 1979)、Boycott(1961)、Messenger(1979)等已经在真蛸(*Octopus vulgaris*)、枪乌贼

(*Loligo vulgaris*)、商乌贼(*Sepia officinalis*)等头足类神经系统的结构和功能做了大量的深入细致的研究工作。目前有关曼氏无针乌贼的中枢神经系统的研究国内外均未见报道。作者对曼氏无针乌贼的脑部结构进行了组织形态的观察,并与上述头足类的脑结构做了比较;同时观察了脑中视腺的显微结构和亚显微结构。头足类中的视腺类似于脊椎动物中的垂体,可以控制性腺的发育成熟,刺激性腺细胞的分裂,促进卵黄的形成(Wells *et al*, 1975)。视腺由 delle Chiaje 于 1828 年首次命名(Messenger, 1967a); Wells 等(1959)首次发现真蛸视腺的分泌物可以控制性腺的成熟,而其分泌活动受食道上神经团中的脑亚脚叶(subpeduncle lobe)的抑制调节,最终受外界的光照调控。该分泌物可促进性腺成熟,摘除视腺后,会导致成熟的真蛸 *O. vulgaris* 性腺萎缩(Wells *et al*, 1959, 1972)。关于头足类视腺的超显微结构, Dwight(1999)研究了拟乌贼属的微鳍乌贼 *Sepiotheutis sepioidea* 视腺内的细胞构成和性腺不同发育阶段视腺内粗面内质网、线粒体等细

* 国家高技术研究发展计划(863)项目, 2010AA10A404 号; 国家自然科学基金项目, 31001109 号; 2009 年度浙江省研究生创新科研项目, YK2009070 号。于新秀, E-mail: yuxinxu@126.com

通讯作者: 吴常文, 教授, E-mail: wucw08@126.com

收稿日期: 2011-01-04, 收修改稿日期: 2011-03-19

胞器以及分泌颗粒的变化。本文对曼氏无针乌贼视腺中的分泌细胞做了电镜观察, 以期为进一步研究曼氏无针乌贼的神经结构生理以及发育研究提供形态学基础, 并为其脑中各种生殖相关神经肽的分布提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

性成熟曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*), 体重约为 65—70g, 取自浙江省岱山县秀山乌贼养殖基地。

1.2 实验方法

1.2.1 石蜡切片

(1) 取材 取新鲜成熟的曼氏无针乌贼, 解剖出完整的脑组织, 放入 Bouin's 固定液固定 24h。

(2) 石蜡切片制作 将固定好的脑组织经过一系列浓度梯度的酒精、二甲苯脱水及浸蜡包埋后, 进行切片, 切片厚度为 6 μ m。用苏木精-伊红对组织切片进行染色, 显微镜观察并拍照。

1.2.2 视腺超微结构观察

(1) 取材 取新鲜的乌贼视腺, 放入 2.5%的戊二醛溶液中 4 固定过夜, 保存备用。

(2) 电镜超薄切片制作 取固定好的视腺, 倒掉固定液, 用 0.1mol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品干净后, 用 1%的锇酸溶液固定样品 2h, 再用上述磷酸缓冲液漂洗; 样品经一系列浓度梯度酒精脱水和丙酮与包埋剂的梯度渗透后, 放入纯包埋剂 70 加热过夜。样品在 Reichert 超薄切片机中切片, 获得 70—90nm 的切片, 该切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50%乙醇饱和溶液各染色 15min, 即可在日本 JEOL JEM-1230 型透射电镜中观察。

2 结果与分析

2.1 曼氏无针乌贼脑部结构

曼氏无针乌贼的脑位于两眼之间, 且有软骨包裹, 以贯穿脑的食道作为参照物, 可以将曼氏无针乌贼的脑分为三部分: 食道上神经团、食道下神经团以及位于脑两侧两个发达的视叶。神经细胞聚集, 神经细胞胞体集中在外周, 形成神经叶。食道上下神经团又可分为不同的神经叶(Boycott, 1961; Shuichi *et al.*, 2002)。

2.1.1 食道上神经团(supraoesophageal mass) (图 1A、B) 可以分为垂直叶复合物(vertical lobe complex)、前后基叶(anterior and posterior basal lobes; ab,

pb)、视神经束区(optic tract region; ot)、前连叶(precommissural lobe; pc)以及脑亚脚叶(subpeduncle lobe; spl), 其中垂直叶复合物又可细分为垂直叶(vertical lobe; v)、亚垂直叶(subvertical lobe; sv)、上额叶(superior frontal lobe; fr.s)和下额叶(inferior frontal lobe; fr.i); 视神经束区包括嗅叶(olfactory lobe; olf)、脑脚叶(peduncle lobe; pl)及视腺(optic gland; og)。
2.1.2 食道下神经团(suboesophageal mass) (图 1A、C) 按相对位置分为前区、中区和后区, 各区又可以细分为不同的神经叶。前区包括腕神经叶(brachial lobe; bl); 中区细分为前足叶(anterior pedal lobe; ab)、后足叶(posterior pedal lobe; pb)、色素细胞前叶(anterior chromatophore lobe); 后区包括色素细胞后叶(posterior chromatophore lobe)、巨细胞后叶(posterior magnocellular lobe; mag)、内脏叶(visceral lobe; vl)、外套内脏叶 palliovisceral lobe (pvl)和鳍叶(fin lobe)。

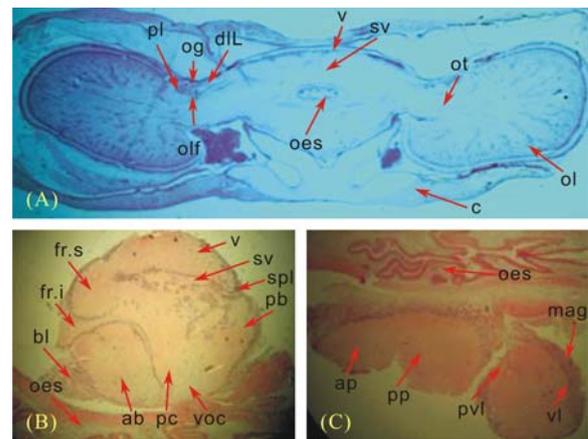


图 1 曼氏无针乌贼脑结构

Fig.1 Brain structure of *S. maindroni*

(A). 脑横切, 上面为背部; (B). 脑纵切, 食道上神经团, 左侧为前; (C). 脑纵切, 食道下神经团, 左侧为前。ab. 前基叶, ap. 前足叶, bl. 腕叶, c. 软骨, dIL. 背外侧叶, fr.i. 下额叶, fr.s. 上额叶, bp. 后基叶, mag. 巨细胞叶, oes. 食道, og. 视腺, ol. 视叶, olf. 嗅叶, ot. 视神经束, pc. 前连叶, pl. 脑脚叶, pp. 后足叶, pvl. 外套内脏叶, spl. 脑亚脚叶, sv. 亚垂直叶, v. 垂直叶, vl. 内脏叶, voc. 腹部视神经连接

2.2 曼氏无针乌贼的视腺结构

视腺位于视神经束上, 靠近视叶一侧(图 2a; 图 4a, b), 是头足类中用于分泌生殖类激素调控性腺成熟的内分泌器官。

2.2.1 视腺显微结构观察 曼氏无针乌贼的视腺外周有一层结缔组织包裹(图 2b), 内部数量最多的为分泌细胞, 细胞核较大, 直径约 10 μ m(图 2c, d, e), 占

据了整个细胞的绝大部分,仅含有很少量的细胞质。另含有支持细胞、神经细胞等,而且支持细胞的细胞核致密较小(图 2d)。细胞间的结缔组织丰富,神经纤维穿梭其中(图 2f)。

2.2.2 分泌细胞的超显微结构 分泌细胞的细胞核较大,而且基本为常染色质,仅有少量的异染色质(图 3a)。细胞质中含有丰富的粗面内质网(图 3b),分泌高电子密度的颗粒(图 3d, 图 3e),高尔基体很活跃,形成高尔基体复合物(图 3c, 图 3e),分泌有膜包被的高电子密度的小泡(图 3e)。另外在分泌细胞的周围还有血管分布(图 3f)。

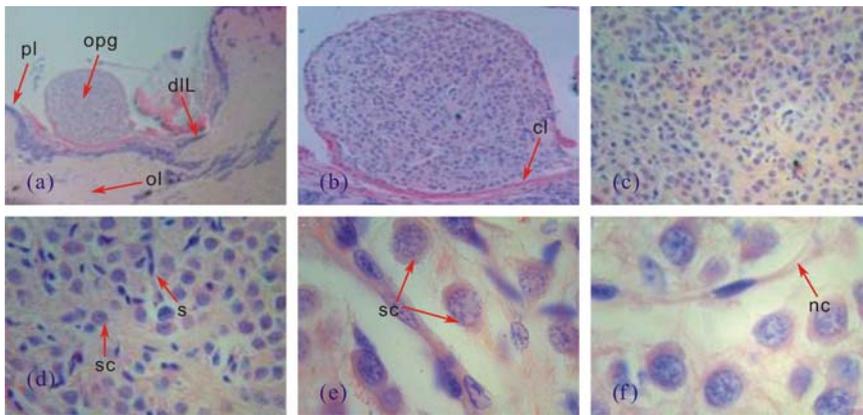


图 2 性成熟曼氏无针乌贼视腺

Fig.2 Optic gland of a sexually mature *S. maindroni*

(a) 视腺(opg)的位置, $\times 40$, pl. 脑脚神经叶, ol. 嗅叶, dIL. 背外侧叶; (b) 视腺, $\times 100$, 示视腺外部的结缔组织层(cl); (c) 视腺, $\times 200$; (d) 视腺, $\times 400$, s. 支持细胞, sc. 分泌细胞; (e) 视腺, $\times 1000$, 示分泌细胞(sc); (f) 视腺, $\times 100$, 示视腺内部的神经细胞(nc)

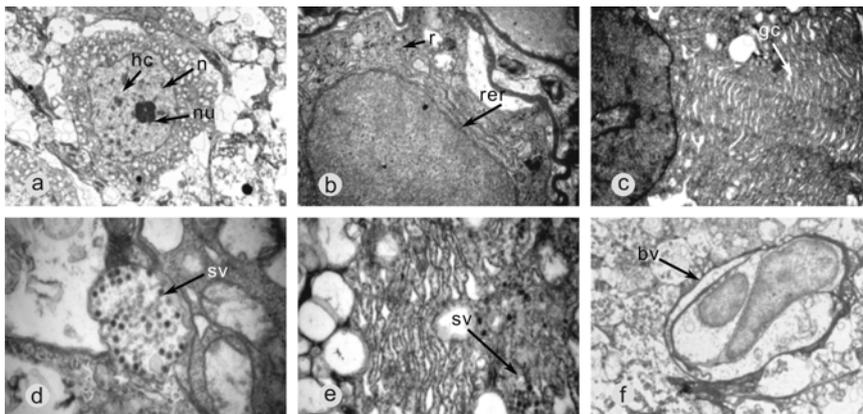


图 3 视腺分泌细胞超显微结构

Fig.3 Ultrastructure of the secretory cells in the optic gland

a. 分泌细胞, $\times 7000$, n. 细胞核, hc. 异染色质, nu. 核仁; b. 分泌细胞核周围的粗面内质网(rer), $\times 30000$, r. 核糖体; c. 分泌细胞核周围的高尔基体复合物(gc), $\times 15000$; d. 分泌细胞胞质中的分泌小泡(sv), $\times 30000$; e. 分泌细胞中高尔基体复合物的分泌小泡(sv), $\times 50000$; f. 分泌细胞间的血管组织(bv), $\times 8000$

3 讨论

3.1 曼氏无针乌贼脑部结构及其功能

通过对曼氏无针乌贼脑进行解剖并组织切片发现,曼氏无针乌贼的脑叶构成与商乌贼(*S. officinalis*)和枪乌贼(*L. vulgaris*)在形态上基本相同(图 4),而与真蛸(*O. vulgaris*)垂直叶稍有不同,曼氏无针乌贼的垂直叶上下边缘较为平缓,而真蛸的垂直叶上下边缘均形成较大的弧度。这表明头足类的中枢神经系统结构上还是保守的。Young(1977)、Boycott(1961)、Messenger(1967a, b)、Shuichi 等(2002)对真蛸、微鳍

乌贼(*Idiosepius paradoxus*)等头足类利用手术摘除等方式研究了各个神经叶的功能,按其功能可分为运动、记忆及生殖相关的神经叶等。曼氏无针乌贼与真蛸、微鳍乌贼等头足类的脑各神经叶结构相似,因此在功能上也基本相同。

运动中枢 前基叶和后基叶控制身体运动的方向以及腕的运动和色素细胞的变化(Shuichi *et al.*, 2002);前足叶和后足叶同样控制腕的运动;腕叶则是协调各腕的运动。外套内脏叶 palliovisceral lobe 调节外套膜肌肉的运动;细胞色素前叶和后叶控制细胞色素的运动;内脏叶调节内脏的活动;鳍叶调节鳍的运动;背外侧叶和脑脚叶控制眼睛的运动(Messenger, 1967a)。

记忆中枢 垂直叶存储记忆信息并对方位作准确辨别(Binyamin *et al.*, 2006);亚垂直叶接收来自垂直叶的神经冲动,并传到视叶(Young, 1960);上额叶和下额叶分别存储来自于腕的和眼的学习和记忆信息(Shuichi *et al.*, 2002)。

生殖相关神经叶 脑亚脚叶具有控制视腺的神经,在未成熟个体中,摘除该叶会引起视腺中生殖激素的提前释放,导致性早熟,因此它属于抑制神经,在性腺的成熟过程中起着重要的调控作用(Mes-

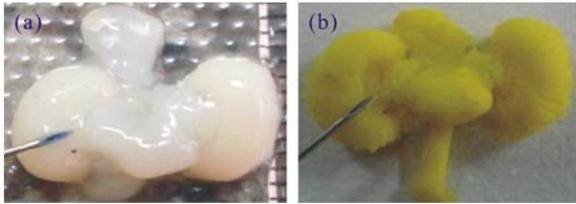


图 4 曼氏无针乌贼视腺在脑中的位置

Fig.4 The location of optic gland in the brain of *S. maindroni*
(a) 视腺; (b) 脑, 指针部分为视腺(经 Bouin's 固定液染色)

senger, 1979; Diter, 1974)。视腺分泌调控性腺成熟激素, 如促性腺激素。嗅叶可以看作背部基础叶的侧向延伸, 虽然这样命名, 目前尚未发现与嗅觉相关的证据(Messenger, 1967b, 1979), 但已经发现嗅叶后部具有促性腺激素释放激素的免疫活性(Anna *et al.*, 1998)。脊椎动物中存在下丘脑—垂体—性腺生殖调控轴, 头足类中也可能存在一条类似的生殖调控轴, 即嗅叶—视腺—性腺轴(Minakata *et al.*, 2009), 嗅叶和视腺分别相当于脊椎动物中的下丘脑和垂体。

本文采用的是石蜡切片及常规 H.E 染色法, 可以看到神经纤维全貌, 很清晰地观察到蓝色的神经细胞胞体和红色的神经纤维网, 且细胞体将神经纤维网环绕, 脑组织中的各个神经叶也清晰可辨, 基本结构已经清楚, 达到认识曼氏无针乌贼脑基本结构的目的, 但是在显微结构中并未观测到清晰的毛细血管。用 Cajal 镀银法可以显示细微的结构, 能够在神经元胞质中看到许多交错成网的细丝, 以及神经原纤维和神经末梢(潘美华等, 2005; 杨少芳, 2006), 这在 H.E 染色中是看不到的, 因此要研究曼氏无针乌贼突触等细微的结构需要制作银染切片, 进行更深入的探讨。

3.2 性成熟曼氏无针乌贼视腺与真蛸视腺的比较

性成熟曼氏无针乌贼的视神经束区与性成熟的真蛸相比, 外形上看二者除形状均为圆球形外, 具有明显的不同。最明显的差异是视腺的颜色, 曼氏无针乌贼的视腺与脑组织视叶等同为一色, 均为乳白色。真蛸的视腺相对较大, 为暗黄色或橙色(Dwight, 1999), 而周围的脑组织及视叶为乳白色。

曼氏无针乌贼的视神经束区比真蛸短, 视叶与中央的脑有约 2mm 的距离。曼氏无针乌贼的视腺较小, 被硕大的视叶遮盖, 因此需要将视叶拨向两侧才能看到, 由于颜色与周围的脑组织一致, 导致观察有些困难, 但是由于视腺为圆球形, 且折光率与周围的脑组织不同, 故尚可清楚分辨。而真蛸的视腺较大,

将脑解剖出来即清晰可见。

3.3 视腺的生殖调控功能

视腺是头足类的一对圆球形的内分泌器官, 普遍存在于蛸亚纲。它位于视叶和脑相连接的视神经束上, 左右视神经束各有一个, 内部有神经分布, 受到位于食道上神经团的脑亚脚神经叶的支配, 最终受光照调控(Wells *et al.*, 1959; Boyle *et al.*, 1984)。Wells 等(1959)首次发现真蛸(*O. vulgaris*)视腺分泌物可以控制性腺的成熟, 而且后来他们发现摘除脑亚脚神经叶后会导致其性早熟, 因此脑亚脚神经叶对视腺有抑制作用。所有的这些研究为解决目前养殖曼氏无针乌贼出现的性早熟问题提供了研究思路。头足类中的视腺类似于脊椎动物中的垂体, 可以控制性腺的发育成熟, 目前已经在从真蛸(*O. vulgaris*)、商乌贼(*S. officinalis*)、枪乌贼(*L. edulis*)等头足类中发现了促性腺激素释放激素(Iwakoshi-Ukena *et al.*, 2004; Anna *et al.*, 1998; Chinari *et al.*, 2009)。曼氏无针乌贼中是否也存在促性腺激素释放激素, 还需要进一步研究。

参 考 文 献

- 叶素兰, 王健鑫, 吴常文, 2007. 曼氏无针乌贼雄性生殖系统的组织学研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 26(4): 371—376
- 杨少芳, 2006. Cajal 氏法对突触的显示. 解剖科学进展, 12(3): 288
- 宋微微, 王春琳, 2009. 养殖对曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)群体遗传多样性的影响. 海洋与湖沼, 40(5): 591—595
- 常抗美, 吴常文, 吕振明等, 2008. 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)野生及养殖群体的生化特征及其形成机制的研究. 海洋与湖沼, 39(2): 145—150
- 蒋霞敏, 符方尧, 李正等, 2008. 人工养殖曼氏无针乌贼生殖系统的解剖学与组织学研究. 中国水产科学, 15(1): 63—70
- 潘美华, 李晓静, 张传勇, 2005. Cajal 吡啶银染色法在瘢痕组织神经纤维末梢染色中应用. 临床与实验病理学杂志, 20(3): 362—363
- Anna Di Cosmo, Carlo Di Cristo, 1998. Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: fmrf-amide and GnRH immunoreactivity. Journal of Comparative Neurology, 398: 1—12
- Binyamin Hochner, Tal Shomrat, Graziano Fiorito, 2006. The octopus: a model for a comparative analysis of the evolution of learning and memory mechanisms. Neurobiology of Octopus Learning, 7: 308—317
- Boycott B B, 1961. The functional organization of the brain of the cuttlefish *Sepia officinalis*. Proc R Soc Lond B, 153: 503—534
- Boyle P R, Thorpe R S, 1984. Optic gland enlargement and fe-

- male gonad maturation in a population of the octopus *Eledone cirrhosa*: a multivariate analysis. *Marine Biology*, 79: 127—132
- Chinari Onitsuka, Akihiko Yamaguchi, Hikoichirou Kanamaru *et al*, 2009. Molecular cloning and expression analysis of a GnRH-like dodecapeptide in the swordtip squid, *Loligo edulis*. *Zoological Science*, 26: 203—208
- Diter Froesch, 1974. The subpeduncle lobe of the octopus brain: evidence for dual function. *Brain Research*, 75: 277—285
- Dwight Arrieche, 1999. Ultrastructure of the optic gland of the squid *Sepiotheutis sepioidea* (Cephalopoda: Loliginidae). *Revista de Biología Tropical*, 47(4): 831—842
- Iwakoshi-Ukena E, Ukena K, Takuwa Kuroda K *et al*, 2004. Expression and distribution of octopus gonadotropin-releasing hormone in the central nervous system and peripheral organs of the octopus (*Octopus vulgaris*) by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Comp Neurol*, 477: 310—323
- Messenger J B, 1967a. The effects on locomotion of lesions to the visuo-motor system in octopus. *Proc R Soc Lond B*, 167: 252—281
- Messenger J B, 1967b. The peduncle lobe: a visuo-motor centre in octopus. *Proc R Soc Lond B*, 167: 225—251
- Messenger J B, 1979. The nervous system of loligoiv. the peduncle and olfactory lobes. *Phil Trans R Soc Lond B*, 285: 275—309
- Minakata H, Shigeno S, Kano N *et al*, 2009. Octopus Gonadotrophin-Releasing Hormone: A Multifunctional Peptide in the Endocrine and Nervous Systems of the Cephalopod. *Journal of Neuroendocrinology*, 21: 322—326
- Shuichi Shigeno, Masamichi Yamamoto, 2002. Organization of the nervous system in the pygmy cuttlefish, *Idiosepius paradoxus* Ortmann (Idiosepiidae, Cephalopoda). *Journal of Morphology*, 254: 65—80
- Wells M J, Odor R K, Buckley S K L, 1975. An *in vitro* bioassay for a molluscan gonadotropin. *The Journal of Experimental Biology*, 62: 433—446
- Wells M J, Wells J, 1959. Hormonal control of sexual maturity in octopus. *The Journal of Experimental Biology*, 36: 1—33
- Wells M J, Wells J, 1972. Optic glands and the state of the testis in octopus. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 1: 71—83
- Young J Z, 1960. The failures of discrimination learning following the removal of the vertical lobes in octopus. *The Royal Society*, 153: 18—46
- Young J Z, 1977. The nervous system of loligo higher motor centres the basal supraoesophageal lobes. *Phil Trans R Soc Lond B*, 276: 351—398
- Young J Z, 1979. The nervous system of loligo V. the vertical lobe complex. *Phil Trans R Soc Lond B*, 285: 311—354

BRAIN MICROSTRUCTURE AND OPTIC GLAND ULTRASTRUCTURE IN *SEPIELLA MAINDRONI*

YU Xin-Xiu, WU Chang-Wen, CHI Chang-Feng

(Zhejiang Ocean University, Key Laboratory of Mariculture Equipments and Engineering Technology of Zhejiang Province, Zhoushan, 316004)

Abstract The morphological structure of the brain of sexually mature *Sepiella maindroni* was examined in this study. Based on our observations, the brain of *S. maindroni* can be divided into three parts, which included a supraesophageal mass, a suboesophageal mass, and two advanced optic lobes referring to the esophagus. In addition, each mass can be subdivided into different lobes. Observation of the microstructure and ultrastructure of the optic gland revealed that this gland was covered by a thin layer of connective tissue, which was located on the optic tract and between the olfactory lobe and the dorsal lateral lobe. Abundant secretory cells with the diameter of up to 10 μ m were observed within the optic gland. The ultrastructure of the secretory cells was examined using a Transmission Electron Microscope (TEM), which revealed numerous rough endoplasmic reticula, Golgi apparatus, and electron dense granules inside the cells. These results will provide morphological basis for the research on physiology and development of neuromechanism in *S. maindroni*.

Key words *Sepiella maindroni*, Brain, Optic gland, Microstructure, Ultrastructure