

日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 视神经节、脑和胸神经节 5-羟色胺的定位研究*

王 琼 黄辉洋 叶海辉¹⁾ 韩师昭 李少菁
(厦门大学海洋系 亚热带海洋研究所 厦门 361005)

提要 采用兔抗 5-羟色胺抗体和 SABC 免疫细胞化学方法, 对日本囊对虾视神经节、脑和胸神经节进行定位研究。结果表明, 视神经节内的 5-羟色胺免疫阳性细胞分布于视外髓、视内髓和视端髓。前脑前中群, 前脑中部前端神经髓质、中央体, 中脑嗅叶内侧细胞群, 后脑后中群、侧位群和后侧群呈 5-羟色胺免疫阳性反应。胸神经节 5-羟色胺阳性细胞较少, 第 4 对胸神经节检出 1 对阳性细胞, 第 5 对胸神经节检出 2 对阳性细胞, 神经髓质不呈阳性反应。5-羟色胺的特异性分布, 为日本囊对虾体内的生理功能和甲壳动物腹神经索演化提供了形态学依据。

关键词 日本囊对虾, 视神经节, 脑, 胸神经节, 5-羟色胺, 免疫细胞化学
中图分类号 Q952

5-羟色胺 (5-HT) 广泛分布于甲壳动物的神经系统, 应用免疫细胞化学、放射免疫法和色谱等技术, 在视神经节、脑、腹神经索、围食道神经节、口胃神经节和围心器等处都检测到 5-HT 的分布。研究证实, 5-HT 对蜕皮、生殖、血糖浓度变化和色素迁移等生理活动具有调节作用, 是一种重要的生物活性物质 (Fingeman *et al* 1992)。近年来, 国内相继开展了甲壳动物 5-HT 分布与功能的研究, 已对锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 胸神经团、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 视神经节和脑 5-HT 的定位分布以及 5-HT 对锯缘青蟹生殖调控作用有过报道 (黄辉洋等, 2003 叶海辉等, 2003 2004)。日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 属于甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、对虾科 (Penaeidae)、囊对虾属 (*Marsupenaeus*), 是一种优良的海洋养殖虾类。目前, 有关日本囊对虾的研究主要集中在养殖和病害防治方面 (林琼武等, 2001)。而对其神经生物学的研究尚少, Yang 等 (1995, 1996 1999) 对视神经节中的红色素聚集激素 (RPCH)、色素扩散激素 (PDH)、蜕皮抑制

激素 (MH) 和高血糖激素 (CHH) 进行了分离提取; Shih 等 (1998) 对视神经节中 MH 细胞和 CHH 细胞的分布进行了定位研究; Ohira 等 (1997) 克隆了 MH 的 cDNA; Tan 等 (1998) 报道了腹神经索冷敏神经细胞的分布和特性。本研究应用反应灵敏的 SABC 免疫细胞化学技术, 对日本囊对虾视神经节、脑和胸神经节中 5-HT 的分布进行定位, 旨在为其体内的生理功能和神经系统演化提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 取材与切片

日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 20 只, 购自厦门农贸市场, 体长 14.6—19.0 cm, 体重 22.4—47.0 g 雌雄兼有, 全部为活体材料。在冰冷的磷酸盐生理缓冲液 (PBS) 中迅速解剖, 完整地取出视神经节、脑和胸神经节, Bouin's 液固定 6—18 h (4℃), 系列酒精脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度为 6 μm, 间隔取片, 按顺序贴片, 切片置于 37℃ 恒温箱干燥备用。

* 国家自然科学基金项目资助, 30300269 号; 福建省青年科技人才创新项目资助, 2003J018 王 琼, 硕士, E-mail wq@xmcc.com

1) 通讯作者: 叶海辉, 博士, 副教授, E-mail hahuyj@xmu.edu.cn

收稿日期: 2004-10-28 收修改稿日期: 2005-01-25

1.2 主要试剂

兔抗脊椎动物 5-HT 抗体的工作浓度为 1:50 为美国 Zym ed 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) 为武汉博士德生物工程有限公司产品。3'-3'-二氨基联苯胺盐酸盐 (DAB) 为 Sigma 公司产品。

1.3 SABC 法主要步骤

切片脱蜡至水。3% H₂O₂ / PBS 室温孵育 10m in 以消除内源性过氧化物酶的活性。滴加正常山羊血清 (1:10) 室温孵育 10m in 封闭非特异性反应部位。滴加兔抗 5-HT 抗体, 37°C 孵育 2—2.5h。滴加即用型生物素标记的羊抗兔抗体, 37°C 孵育 50m in。滴加即用型链霉菌抗生物

素蛋白-过氧化物酶, 37°C 孵育 50m in。0.06% DAB-0.03% H₂O₂ 显色 10m in。苏木精复染。阴性对照实验采用相邻切片, 以正常羊血清代替 5-HT 抗体, 同步进行上述免疫细胞化学反应程序。

2 结果

视神经节, 除视神经层 (LG) 外, 其他 3 个神经髓都具有 5-HT 免疫阳性反应。阳性细胞在视外髓 (ME) 外缘, 视内髓 (MI) 内外缘均有少量散布 (图 1a), 视端髓 (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 器中多为小型阳性细胞, 染色较深, 聚集成群 (图 1b)。上述 4 个神经髓的神

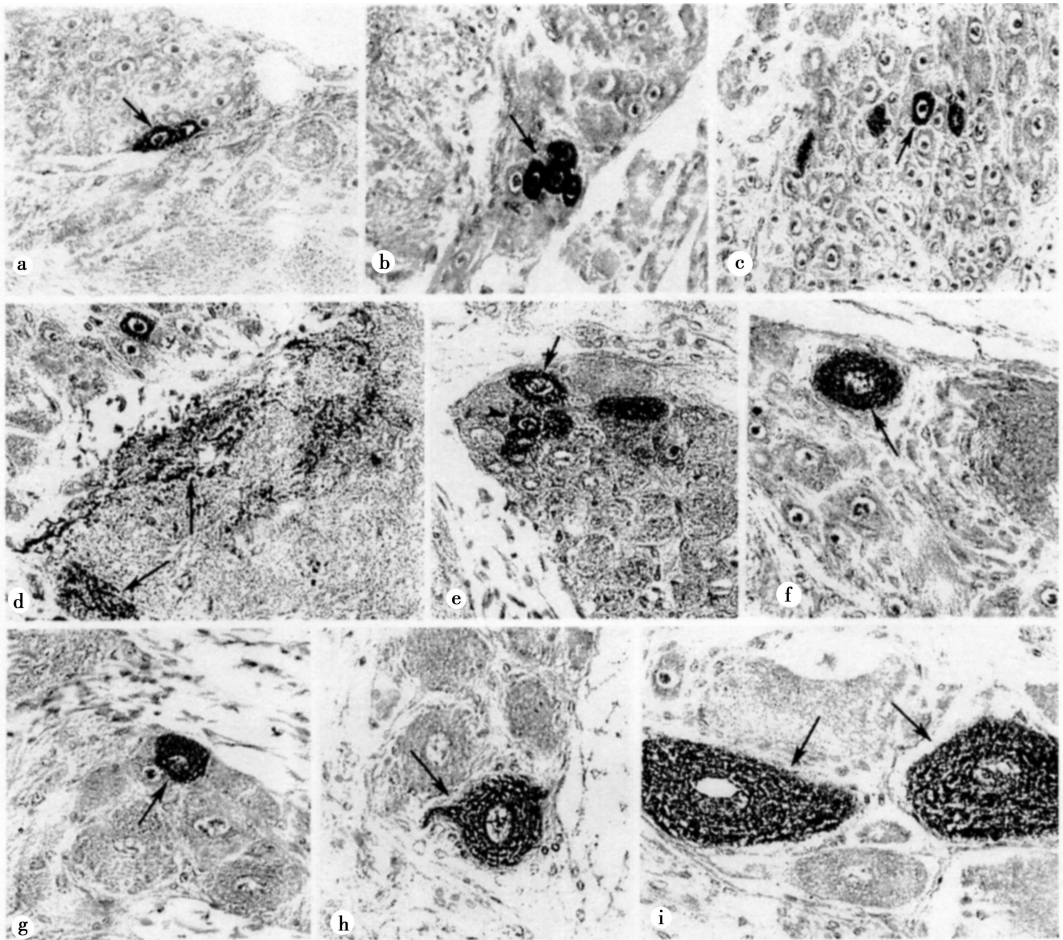


图 1 日本囊对虾视神经节、脑和胸神经节的 5-HT 免疫阳性反应

Fig 1 5-HT-immunoreactivity of optic ganglia brain and thoracic ganglion of *M. japonicus*

a MI 内缘 5-HT 免疫阳性细胞 (箭头); b MTXO 中的 5-HT 免疫阳性细胞 (箭头); c 前脑前中群的 5-HT 免疫阳性细胞 (箭头); d 前脑 AMPN 中 5-HT 阳性反应呈密集的颗粒状 (箭头); e 嗅叶内侧细胞群中的 5-HT 免疫阳性细胞, 大 (长箭头), 小 (短箭头); f 后脑侧群中的 5-HT 免疫阳性细胞 (箭头); g 第 4 对胸神经节左侧细胞群中的 5-HT 免疫阳性细胞 (箭头); h 第 5 对胸神经节左侧细胞群中的 5-HT 免疫阳性细胞 (箭头); i 第 5 对胸神经节腹面中线处成对的 5-HT 免疫阳性细胞 (箭头)。放大倍数均为 × 280

经髓质中不易见到阳性反应, 窦腺 (SG) 内无阳性反应。

前脑、中脑和后脑均检测出 5-HT 免疫阳性反应。前脑的前中群阳性细胞数量较多 (图 1c), 前脑中部前端神经髓质 (AMPN) 和中央体也呈阳性反应 (图 1d)。中脑的嗅叶内侧细胞群, 其阳性细胞大小不同 (图 1e), 有时观察到阳性神经纤维进入嗅叶。后脑的侧位群、后中群和后侧群阳性细胞数量少, 但胞体较大 (图 1f)。

胸神经节中 5-HT 阳性细胞的数量较少, 在第 4 对胸神经节左右两侧细胞群中各检出 1 个阳性细胞 (图 1g); 第 5 对胸神经节两侧细胞群中各检出 1 个具有较长胞突的阳性细胞 (图 1h); 第 5 对胸神经节中线处, 也具有 1 对较大的阳性细胞 (图 1i)。胸神经节内的神经髓质均为阴性反应。

3 讨论

5-HT 在视神经节的定位分布已有不少报道。软尾太平螯蛄 (*Pacifastacus leniusculus*) 的 ME 和 MI 外缘存在阳性细胞, MT 的阳性细胞主要分布于腹面; 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 (Ebfsson 1983)。凡纳滨对虾四个神经髓均有 5-HT 阳性细胞分布 (叶海辉等, 2004)。日本囊对虾视神经节的 5-HT 阳性细胞分布模式与黄道蟹 (*Cancer antennarius*) 较为相似, 仅位于 ME、MI 和 MT 之内 (Rudolph *et al.* 1990)。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迁移到完全黑暗的位置; 增强离体眼柄 X 器内 MH 的合成与分泌; 刺激窦腺中 CHH 的释放 (Fingeman *et al.* 1992)。迄今, 已从日本囊对虾视神经节中分离提取了 RPDH、PDH、MH 和 CHH。日本囊对虾视神经节 ME、MI 和 MT 中均有 5-HT 分布, 窦腺这个释放神经激素的神经血液器却呈阴性反应, 因此推测 5-HT 在视神经节内可能作为神经递质或神经调质, 参与了上述神经激素的合成与释放, 从而调控甲壳动物的蜕皮、血糖平衡、色素迁移等生理活动。

软尾太平螯蛄脑的前中细胞群、后中细胞群和嗅叶内侧细胞群均有 5-HT 阳性细胞, 前脑桥、中央体、嗅叶等多个神经髓质也有阳性反应 (Ebfsson 1983)。凡纳滨对虾前脑中细胞群、

中脑嗅叶内侧细胞群、嗅叶外侧细胞群以及 AMPN 呈阳性反应 (叶海辉等, 2004)。日本囊对虾脑内 5-HT 的阳性部位更为广泛, 在后脑侧位群、后脑后侧群也检测到阳性细胞。脑中 5-HT 的不同分布模式体现了甲壳动物脑结构的复杂性和物种的特异性。甲壳动物的前脑是视觉、行为中枢; 中脑是嗅觉中枢; 后脑是内脏活动中枢。日本囊对虾前中群细胞和 AMPN 呈 5-HT 免疫阳性反应, 可能与视觉、行为调节有关。中脑的嗅叶具有第一触角化学感受器传入神经, 嗅叶内部的神经纤维球是密集的突触区 (Schmidt *et al.* 1992)。日本囊对虾的嗅叶内侧细胞群的 5-HT 阳性细胞和进入嗅叶的阳性神经纤维, 可能参与了嗅觉的形成。日本囊对虾嗅叶内侧细胞群的 5-HT 阳性细胞兼有大小两种类型细胞, 与软尾太平螯蛄、互爱蟹 (*Hyas araneus*) 的观察相似, Johansson (1991) 认为, 嗅觉神经细胞类型的不同反映了嗅觉信息加工处理过程的差异。日本囊对虾后脑 5-HT 阳性细胞的存在, 为其内脏生理的调节作用提供了形态学依据。

研究表明, 美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*) 的 5 对胸神经节各有 1 对 5-HT 阳性细胞, 左右对称分布于胸神经节两侧 (Belz *et al.* 1983)。小长臂虾 (*Palaeomonetes mesogenitor*) 每对胸神经节也是各有 1 对 5-HT 阳性细胞 (Azzoua, 2000)。锯缘青蟹的食道下神经节、胸神经节和腹神经节高度愈合成为胸神经团, 但是每对胸神经节仍有两个 5-HT 阳性细胞对称排列 (黄辉洋等, 2003)。上述胸神经节 5-HT 神经细胞的分布特点, 反映了甲壳动物腹神经索在演化过程中, 虽然形态上有了很大的变化, 但 5-HT 神经细胞分布模式是保守的。与此不同, 日本囊对虾仅从第 4 和第 5 胸神经节检测到 5-HT 阳性细胞。作者认为, 前 3 对胸神经节均未见 5-HT 阳性细胞, 可能与这 3 对胸神经节 5-HT 含量低, 超出本实验方法的测量范围有关。因为采用同样的 SABC 法, 5-HT 抗体孵育时间为 1.5h 在锯缘青蟹和凡纳滨对虾神经系统就能出现明显的免疫阳性反应 (黄辉洋等, 2003; 叶海辉等, 2004)。而在本实验中, 孵育时间需要延长至 2—2.5h 才能检测到免疫阳性细胞, 且神经髓质不呈免疫阳性反应。日本囊对虾第 4 和第 5 胸神经节均能检测出成对的 5-HT 阳性细胞, 第 5 胸神经节具有 2 对 5-HT 阳性细胞, 是因为该神经节由前后 2 对神经节愈合而

成的缘故¹⁾, 即未愈合的每个神经节都含有 1 对 5-HT 阳性细胞。

迄今, 甲壳动物胸神经节和脑已被证实是性腺刺激激素 (GSH) 的合成来源, 5-HT 对 GSH 释放具有促进作用 (Fingerman, 1997)。日本囊对虾胸神经节和脑中 5-HT 的分布, 为其可能参与生殖神经内分泌活动提供了形态学依据。5-HT 调控甲壳动物 GSH 分泌的细胞学机制值得深入研究, 这对于将来开发其生殖调控技术具有重要意义。

参 考 文 献

- 叶海辉, 李少菁, 李祺福等, 2003. 生物胺对雌性锯缘青蟹生殖神经内分泌活动的调控作用. 海洋与湖沼, 34 (3): 329—333
- 叶海辉, 王桂忠, 金朱兴等, 2004. 南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 视神经节和脑免疫细胞化学研究. 海洋与湖沼, 35 (1): 78—83
- 林琼武, 黄加祺, 周文理, 2001. 日本对虾亲虾性腺多次成熟利用的研究. 海洋学报, 23 (4): 141—146
- 黄辉洋, 叶海辉, 李少菁等, 2003. 锯缘青蟹胸神经团的免疫细胞化学研究. 海洋科学, 27 (3): 77—80
- Azzouna A, 2000. Serotonin-like immunoreactivity of the ventral nerve cord of the shrimp *Palaemonetes mesogenitor* Sollaud 1912. Crustaceana Leiden, 73 (3): 301—310
- Beltz B S, Kravitz E A, 1983. Mapping of serotonin-like immunoreactivity in the lobster nervous system. Journal of Neuroscience, 3: 585—602
- Ebfsson 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, Nagabhushanan R, Saoini R *et al*, 1992. Biogenic amines in crustaceans: identification, location and roles. Journal of Crustacean Biology, 14 (3): 413—437
- Fingerman M, 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal in decapod crustaceans. Invert Reprod Devel, 31 (1—3): 47—54
- Johansson K U, 1991. Identification of different types of serotonin-like immunoreactive olfactory interneurons in four infraorders of decapod crustaceans. Cell and Tissue Research, 264: 357—362
- Ohia T, Watanabe T, Nagasawa H *et al*, 1997. Molecular cloning of a molt inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Zool Sci 14: 785—789
- 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
- Shih T W, Suzuki Y, 1998. Immunohistochemical identification on hyperglycemia hormone and molt inhibiting hormone producing cells in the eyestalk of the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Zoological Science Tokyo, 15 (3): 389—397
- Schmidt M, Ache B W, 1992. Antennular projections to the midbrain of the spiny lobster. Sensory innervation of the olfactory lobe. J Comp Neurol 318: 291—303
- Tani M, Kuramoto T, 1998. Cool-sensitive neurons in the ventral nerve cord of Crustaceans. Comp Biochem Physiol 119A (3): 845—852
- Yang W J, Aida K, Nagasawa H, 1995. Amino acid sequences of a hyperglycemia hormone and its related peptides from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture 135: 205—212
- Yang W J, Aida K, Terauchi A *et al*, 1996. Amino acid sequences of a peptide with molt-inhibiting activity from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Peptides 17 (2): 197—202
- Yang W J, Aida K, Nagasawa H, 1999. Characterization of chromophoretropic neuropeptides from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. General and Comparative Endocrinology 114: 415—424

1) 王 琼, 黄辉洋, 叶海辉等, 2004. 日本囊对虾神经系统的解剖学和组织学研究 (研究资料)

5-HT-LIKE IMMUNOREACTIVITY IN OPTIC GANGLIA, BRAIN, AND THORACIC GANGLION OF KURUMA PRAWN *MARSUPENAEUS JAPONICUS*

WANG Qiong HUANG Hu+Yang YE Ha+Hu; HAN Sh+Zhao, LI Shao-Jing

(Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography of Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract To investigate the distribution of 5-HT in the central nervous systems of *M. japonicus*, 5-HT antisera in rabbit and immunocytochemistry method of StreptAvidin-Biotin-Complex were applied to observe 5-HT-immunoreactive neurons and neuropils in optical brain and thoracic ganglion. Results showed that except for lamina ganglionaris (LG), 5-HT-immunoreactivity were found in medulla externa (ME), medulla interna (MI), and medulla terminalis (MT) in optic ganglia. There were a few 5-HT-immunoreactive cells in ME and MI but much more cells in MT and some small immunoreactive cells aggregated in X organ. Many 5-HT-immunoreactive cells were located in anterior median cluster. The anterior medial protocerebrum neuropils (AMPN) and central body also showed 5-HT immunoreactivity in protocerebrum. There were many 5-HT-immunoreactive cells of different sizes distributed in the inner cell cluster lateral to olfactory in the deutocerebrum. Only a few large 5-HT-immunoreactive cells were found in the clusters of posterior median, lateral and posterior lateral of tritocerebrum. 5-HT-immunoreactive cells were less in the thoracic ganglions. Only one pair 5-HT-immunoreactive cells were located in the fourth thoracic ganglion and two pairs immunoreactive cells in the fifth thoracic ganglion. The neuropils showed no 5-HT immunoreactivity.

The 5-HT immunoreactivity distribution in central systems of *M. japonicus* provided morphological proofs for its neurophysiological functions and phylogeny of crustacean ventral nerve cords. Further investigation is suggested on exact content and 5-HT mechanics in different physiological states.

Key words *Marsupenaeus japonicus*, Optic ganglia, Brain, Thoracic ganglion, 5-HT, Immunocytochemistry