

栉孔扇贝神经节一氧化氮合酶的组织化学和免疫组化定位

孙虎山¹, 王宜艳¹, 王晓安¹, 孙修勤², 李光友²

(1. 烟台师范学院 生命科学学院, 山东 烟台 264025; 2. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要:采用组织化学和免疫组化技术对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)神经节内的一氧化氮合酶(NOS)进行定位研究。组织化学显示,存在 NOS 的部位如下:脑神经节内纵行的神经纤维和表层的少量小细胞;足神经节表层的大量小细胞,中央大量水平分布的神经纤维;脏神经节中部大量水平分布的神经纤维,前叶内大量小细胞和神经纤维,后叶内少量小细胞和许多环行神经纤维,侧叶内大量似放射状分布的神经纤维;脑足和脑脏神经索内的神经纤维。免疫组化定位表明,神经型一氧化氮合酶(nNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在整个神经系统内均呈阴性;足神经节和脏神经节内有少量神经细胞呈内皮型一氧化氮合酶(eNOS)强阳性;各神经节和神经索内的部分小细胞和神经纤维呈 eNOS 弱阳性。栉孔扇贝进化上为较低等的贝类,NOS 阳性神经细胞应主要分布于外周器官组织内,神经系统内大量的 NOS 可在其神经传导和免疫调节等方面发挥重要的作用。

关键词:栉孔扇贝;神经节;一氧化氮合酶;组织化学;免疫组化

中图分类号:Q959.215 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)01-0020-06

一氧化氮(NO)是一种非经典的神经递质,近年来受到极大关注^[1]。它在脊椎动物神经、血管和免疫系统活动的调节中起着重要的信使作用^[2]。NO 的分子结构中具有不配对的电子,是一种自由基,作为细胞毒性介质,在动物体内发挥着生理和病理的双重作用,小剂量的 NO 起一种重要的第二信使作用,又是一种新的细胞间信息交换载体,在血管扩张、神经传导、大脑发育、学习与记忆等方面进行调节;大剂量的 NO 可产生细胞毒性作用,一方面可抑制和杀灭病毒等微生物,参与机体抗感染免疫和防御,另一方面也可损伤正常组织细胞^[3]。内源性 NO 是由一氧化氮合酶(NOS)通过 Ca^{2+} /钙调蛋白通路催化精氨酸而生成的。在病理状态下,巨噬细胞进行吞噬作用时,可产生诱导型的 NOS(iNOS),其生成不受 Ca^{2+} /钙调蛋白复合物的调节^[4]。NOS 存在于体内许多脏器细胞中,是一类复杂的酶系,它至少有 3 种同工酶,NOS 1 主要在神经细胞中,即神经型一氧化氮合酶(nNOS);NOS 2 主要在细胞因子诱导的巨噬细胞中,即诱导型一氧化氮合酶(iNOS);NOS 3 主要在内皮细胞中,即内皮型一氧化氮合酶(eNOS)^[5]。有关 NOS 的研究,主要集中在医学领域,对无脊椎动物尤其是双壳贝类的相关研究

较少^[6-7]。有关栉孔扇贝 NOS 的研究,国内外均未见报道。本实验采用组织化学和免疫组化技术,对栉孔扇贝中枢神经中 NOS 进行了定位研究,为贝类神经系统中 NOS 的分布提供形态学资料,也为贝类免疫学研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

栉孔扇贝取自烟台芝罘湾内人工养殖的 3 龄贝,壳长 45~50 mm,水族箱中暂养。每日换水 1 次,水温 20~21℃。

1.2 方法

20 只扇贝去壳后人 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)配制的 4%多聚甲醛中,4℃固定 24 h。解剖出脑侧神经节、足神经节和脏神经节,用于中枢神经 NOS 整体染色。另取脑侧神经节、足神经节和脏神经节组织块,滴加包埋剂后迅速冻结,冰冻切片,厚度为 18 μm。组织化学显示:神经节整体材料和切片分别用 0.05 mol/L pH 7.4 PBS 漂洗 3 次,每次分别为 30 min 和 10 min,加入含有 1 mg/mL β-NADPH、0.1 mg/mL 氯化硝基氮蓝四唑(NBT)、0.05 mol/L PBS、0.3% Triton X-100 的 NOS 反应

收稿日期:2004-01-13;修订日期:2004-05-20。

基金项目:国家“973”计划资助项目(G1999012005)。

作者简介:孙虎山(1962-),男,教授,博士,主要从事贝类免疫学研究。E-mail:s_hushan@163.com

液,37℃,分别作用2h和30min,设 β -NADPH空白对照。免疫组化显示:切片用0.3%过氧化氢-甲醇处理30min,10%正常绵羊血清孵育30min,兔抗大鼠nNOS、兔抗人iNOS和兔抗人eNOS多克隆抗体(Santa Cruz公司产品)室温孵育4h,PBS漂洗3次,每次10min,1:200生物素标记羊抗兔IgG室温孵育1h,PBS漂洗3次,每次10min,1:200链霉菌抗生物素蛋白与过氧化物(SP)复合物(福州迈新生物技术开发公司产品)室温孵育1h,PBS漂洗3次,每次10min,二盐酸联苯胺法显色,以抗体稀释液代替一抗作为空白对照^[8]。染色反应后的材料经0.05mol/L,pH7.4 PBS漂洗3次,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。镜检并拍照记录结果。

2 结果

栉孔扇贝中枢神经包括:1对彼此分离的脑侧神经节,每个脑侧神经节是由前后两叶愈合而成,前叶为脑神经节,后叶为侧神经节;1对相连并几乎愈合在一起的足神经节;1对完全愈合在一起的脏神经节,包括2个前叶、1个后叶、2个侧叶和2个嗅检叶;2条很短的脑足神经索;2条较长的脑脏神经索。

2.1 脑侧神经节 NOS 的组织化学和免疫组化定位

组织化学显示脑侧神经节内的NOS,存在NOS的部位如下:脑神经节内少量纵行的神经纤维和表层的少量小细胞;侧神经节内大量纵行神经纤维,偏外侧面神经纤维较多,纵行的神经纤维向前延伸到前外套神经,向后延伸到脑脏神经索;脑神经节和侧神经节愈合处的部分横行的神经纤维,其中部分神经纤维延伸到脑足神经索(图版I-1,2)。免疫组化显示,nNOS和iNOS在脑侧神经节均呈阴性,脑侧神经节内部分神经纤维和少量小细胞呈eNOS弱阳性。

2.2 足神经节 NOS 的组织化学和免疫组化定位

组织化学显示足神经节内的NOS,存在NOS的部位如下:中部表层的大量小细胞,中部中央的大量左右水平分布的神经纤维;两侧部的大量神经纤维,除了从中部延伸过来的外,另有部分环形神经纤维;部分神经纤维延伸到脑足神经索和足神经,其中延伸到足神经的神经纤维较多且较集中(图版I-3,1)。免疫组化显示,nNOS和iNOS在足神经节均呈阴性,每一足神经节中部有少量神经细胞呈eNOS强免疫反应阳性(图版I-4),神经纤维和少量小细胞呈eNOS弱阳性。

2.3 脏神经节 NOS 的组织化学和免疫组化定位

组织化学显示脏神经节内的NOS,存在NOS的部位如下:中部有大量左右水平分布的神经纤维,并延伸到各叶(图版I-5,6;图版II-2);两前叶内的少量神经细胞,大量小细胞和少量神经纤维(图版I-5;图版II-1);后叶内的许多环形神经纤维和少量小细胞(图版I-6);侧叶内的大量似放射状分布的神经纤维,并延伸到脑脏神经索、外套神经、鳃神经和后外套神经(图版I-5;图版II-3);嗅检神经节内的部分小细胞和神经纤维(图版I-6;图版II-4)。免疫组化显示,nNOS和iNOS在脏神经节均呈阴性,脏神经节前叶中部各有少量神经细胞呈eNOS强免疫反应阳性(图版II-6),其他各叶有部分小细胞和神经纤维呈eNOS弱阳性,近表层的区域阳性更强一些。

2.4 脑(侧)足和脑(侧)脏神经索 NOS 的组织化学和免疫组化定位

组织化学显示脑足和脑脏神经索内的NOS,较短的脑足神经索内有少量神经纤维着色,与脑侧神经节和足神经节的神经纤维相连续(图版I-1,3)。较长的脑脏神经索内有大量神经纤维着色,与脑侧神经节和脏神经节的神经纤维相连续(图版I-1;图版II-5)。免疫组化显示,nNOS和iNOS在两条神经索均呈阴性,神经纤维呈eNOS弱阳性。

3 讨论

本研究组织化学显示,栉孔扇贝中枢神经系统内的神经纤维和部分小细胞着色,而神经细胞不着色。与其他动物比较,高等动物中枢神经系统的NOS主要存在于神经元和星形胶质细胞内^[1],进化上较低等的蚯蚓等脑神经节内也有大量NOS着色的神经元^[6],因此栉孔扇贝应属于进化上较蚯蚓还要低等的动物,这与贝类形态解剖学观察到其中枢神经不够集中且两脑神经节完全分离等应属于低等种类的结论是一致的。同时也说明栉孔扇贝神经系统中NOS着色的神经细胞应在外周的器官组织内,实验中在其外套膜NOS分布的研究中观察到大量的着色神经细胞,证实了这一结论。神经节内NOS着色的小细胞可能属于神经胶质细胞,又因其主要分布于神经节表层,也可能部分属于结缔组织膜内的细胞。

本研究免疫组化定位与组织化学定位结果不一致,主要原因是实验所用一抗是由大鼠或人NOS制

作的。本实验采用大鼠 nNOS 制作的抗体, 栉孔扇贝神经节免疫反应呈阴性或弱阳性, 说明栉孔扇贝 nNOS 的分子组成与大鼠的 nNOS 差异较大, 这与扇贝在动物进化上非常低等与大鼠亲缘关系较远有关。一般情况下 iNOS 必须在有刺激因子的条件下由血细胞产生, iNOS 在神经系统呈阴性属正常现象^[1]。采用人 eNOS 制作的抗体, 少量神经细胞呈 eNOS 强阳性, 神经纤维呈 eNOS 弱阳性, 说明栉孔扇贝 nNOS 的分子组成反而与人 eNOS 有相似之处, 又因一抗的制作是用各种 NOS 分子组成中在进化上较保守的片段制作的, 所以栉孔扇贝 nNOS 分子主要与人 eNOS 分子的保守片段相似。目前由于无脊椎动物 NOS 已被纯化并了解其分子组成的很少, 相关的免疫组化定位大多采用高等脊椎动物相关试剂, 扇贝的 nNOS、iNOS 和 eNOS 还均未被纯化, 其分子组成、结构、性质和功能作用等均未知或所知甚少, 都是有待于深入研究的课题。

目前对贝类神经、内分泌和免疫 3 方面均所知甚少。已有的研究表明, 贝类神经系统结构简单, 中枢神经比较分散^[9]; 缺乏专门的内分泌器官, 神经系统具有内分泌作用, 即神经内分泌^[7]; 因无淋巴细胞而无特异性免疫, 主要依赖血细胞吞噬^[11]、水解酶^[11]、氧化酶^[12]、活性氧^[13]等非特异的抵御病原体, 但是, 贝类体内却具有内啡肽、脑啡肽、白细胞介素 1(IL-1)、IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)等活性肽和细胞因子^[14-16], 并对其免疫防御起重要的调节作用^[17], 这些活性肽和细胞因子均能通过 NOS 并最终通过 NO 对贝类的免疫防御起调节作用^[15-17], 说明贝类也可能具备神经-内分泌-免疫调节, 有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 高博, 尹桂山. 神经系统中的一氧化氮[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(1): 31-34.
- [2] Scharsack J P, Steinhagen R, Kleczka C, et al. The hemoflagellate *Trypanoplasma borreli* induces the production of nitric oxide, which is associated with modulation of carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte function[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003, 14: 207-222.
- [3] 孙雷, 孔小明. 一氧化氮与病毒感染研究进展[J]. 动物医学进展, 2003, 24(1): 23-25.
- [4] Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells[J]. FASEB J, 1992, 6: 3051-3064.
- [5] 陈育文, 孙长凯, 黄远桂. 一氧化氮合酶的若干研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(4): 293-297.
- [6] 王晓安, 郑哲民. 河北环毛蛭神经系统一氧化氮合酶的组织化学定位[J]. 动物学杂志, 2002, 37(2): 6-9.
- [7] Nieto-Fernandez F E, Alcide K, Ruelas C. Heavy metals and neuroimmunomodulation in *Mytilus edulis* [J]. Acta Biol Hung, 2000, 51: 325-329.
- [8] 黄长恩, 李淑庚, 王士平, 等. 组织化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 427-429.
- [9] 王晓安, 蒋小满. 中国蛭类神经系统显微结构的初步研究[J]. 动物学杂志, 1999, 34(4): 6-9.
- [10] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血细胞的吞噬作用及其扫描电镜研究[J]. 高技术通讯, 2001, 11(4): 16-19.
- [11] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中 ACP 和 AKP 活性及其电镜细胞化学研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 6-9.
- [12] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中酚氧化酶和髓过氧化物酶活性[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 9-13.
- [13] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(3): 259-265.
- [14] Ottaviani E, Franchini A. Immune and neuroendocrine responses in mollusks: the role of cytokines[J]. Acta Biol Hung, 1995, 46: 341-349.
- [15] Ottaviani E, Franchini A, Casanelli S, et al. Cytokines and invertebrate immune responses[J]. Biol Cell, 1995, 85: 87-91.
- [16] Smith K L, Galloway T S, Depledge M H. Neuroendocrine biomarkers of pollution-induced stress in marine invertebrates[J]. Sci Total Environ, 2000, 262: 185-190.
- [17] Stefano G B, Bilfinger T V, Ruelas C M, et al. 2-arachidonyl-glycerol stimulates nitric oxide release from human intraneuronal and vascular tissues and invertebrate immunocytes by cannabinoid receptor 1[J]. Pharmacol Res, 2000, 42: 317-322.

Histochemical and immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in nervous ganglia of scallop *Chlamys farreri*

SUN Hu-shan¹, WANG Yi-yan¹, WANG Xiao-an¹, SUN Xiu-qin², LI Guang-you²

(1. College of Life Science, Yantai Normal University, Yantai 264025, China; 2. The First Institute of Oceanography, State Ocean Administration, Qingdao 266061, China)

Abstract: The nitric oxide synthase (EC1.14.13.39; NOS) in the nervous ganglia of scallop *Chlamys farreri* were studied with histochemical and immunohistochemical localization method. The results indicate that the longitudinal nerve fibers in cerebral ganglia and a few of small cells in the surface layer of cerebral ganglia present NOS positive reaction. Abundant NOS positive small cells are in the surface layer of pedal ganglia, and abundant transverse positive nerve fibers in the center of pedal ganglia. A large number of transverse positive nerve fibers are in the center of visceral ganglia; abundant positive small cells and nerve fibers are in two anterior lobes; a few of positive small cells and many encircled positive nerve fibers are in the posterior lobe; a large number of radiate positive nerve fibers are in the lateral lobes. Positive nerve fibers are in pedal nerve cords and visceral nerve cords. There are no neuronal nitric oxide synthase (nNOS) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) positive cells or fibers in the nervous system. A few of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) strongly positive nerve cells are identified in pedal ganglia and visceral ganglia. Weakly positive cells and nerve fibers of eNOS can be seen in all of the ganglia and nerve cords. *Chlamys farreri* is a primary mollusc in evolution that a large number of NOS positive nerve cells must be located in the tissues of peripheral organs. The NOS in nervous system of scallop may play an important role in its nerve conduction and immune regulation.

Key words: *Chlamys farreri*; nervous ganglia; nitric oxide synthase; histochemistry; immunohistochemistry

期 刊 动 态

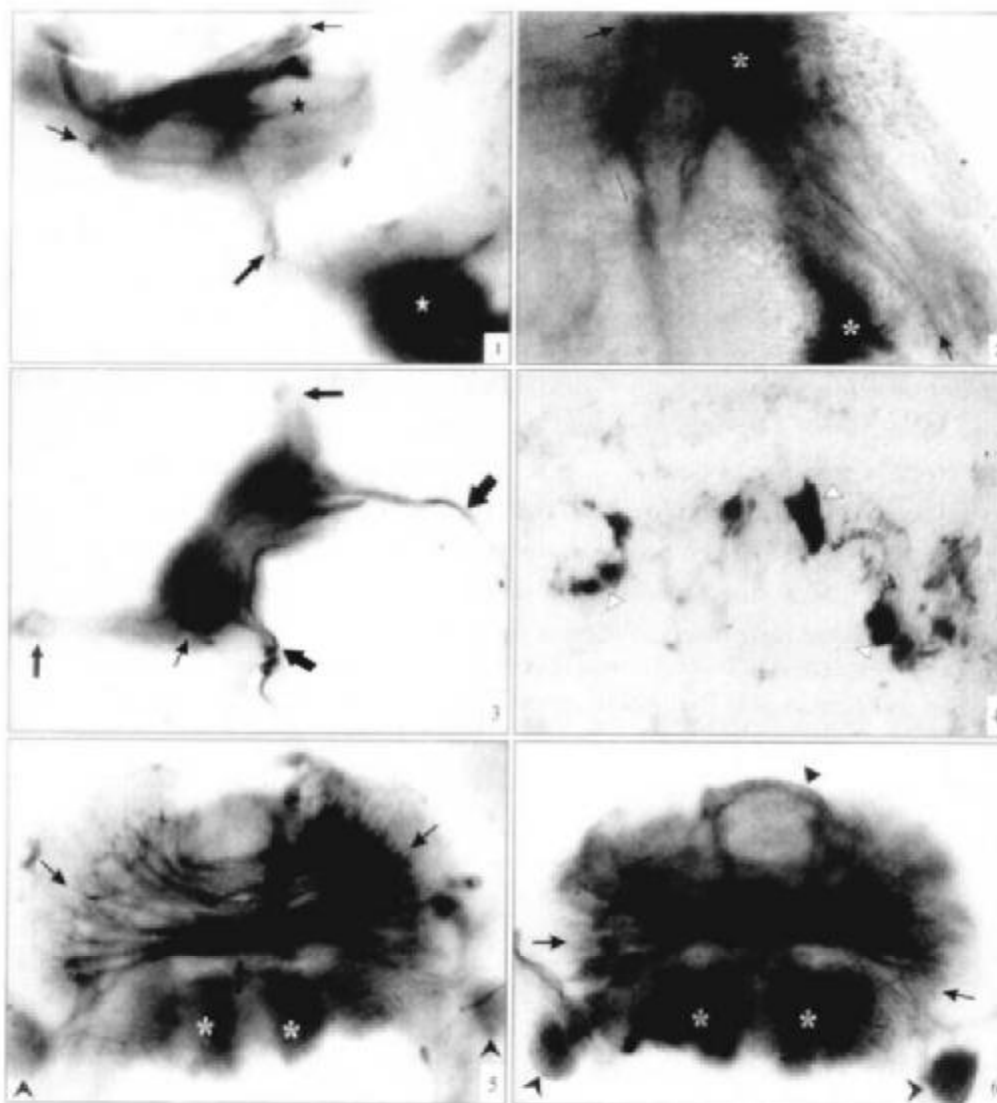
2004年12月7日在中国科学技术信息研究所召开的《中国科技期刊引证报告》发布会上,《中国水产科学》荣获第三届“中国百种杰出学术期刊”奖。在公布的《中国科技期刊引证报告》统计数据中,《中国水产科学》总影响因子为0.523,总被引频次为338次。

在2004年12月1日由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社和中国科学文献计量评价研究中心共同发布的《中国学术期刊综合引证报告》(2004版)中,《中国水产科学》的总影响因子为0.6610,总被引频次为458次。

《中国水产科学》编辑部
2004年12月

孙虎山等:栉孔扇贝神经节一氧化氮合酶的组织化学和免疫组化定位

SUN Hu-shan et al: Histochemical and immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in nervous ganglia of scallop *Chlamys farreri*



图版 I

1: 脑及足神经节 NOS 组化定位, $\times 30$. 2: 脑神经节局部 NOS 组化定位, $\times 150$. 3: 足神经节 NOS 组化定位, $\times 30$. 4: 足神经节 eNOS 免疫组化定位, $\times 150$. 5-6: 脏神经节 NOS 组化定位, $\times 30$.

↑—阳性神经纤维; △—阳性神经细胞; ▲—环行的阳性神经纤维; ★—脑神经节; ☆—足神经节; 亮—强烈阳性区域前叶; ↑—足神经; ▲—嗅腺神经节; ↑—足神经索或阳性神经纤维

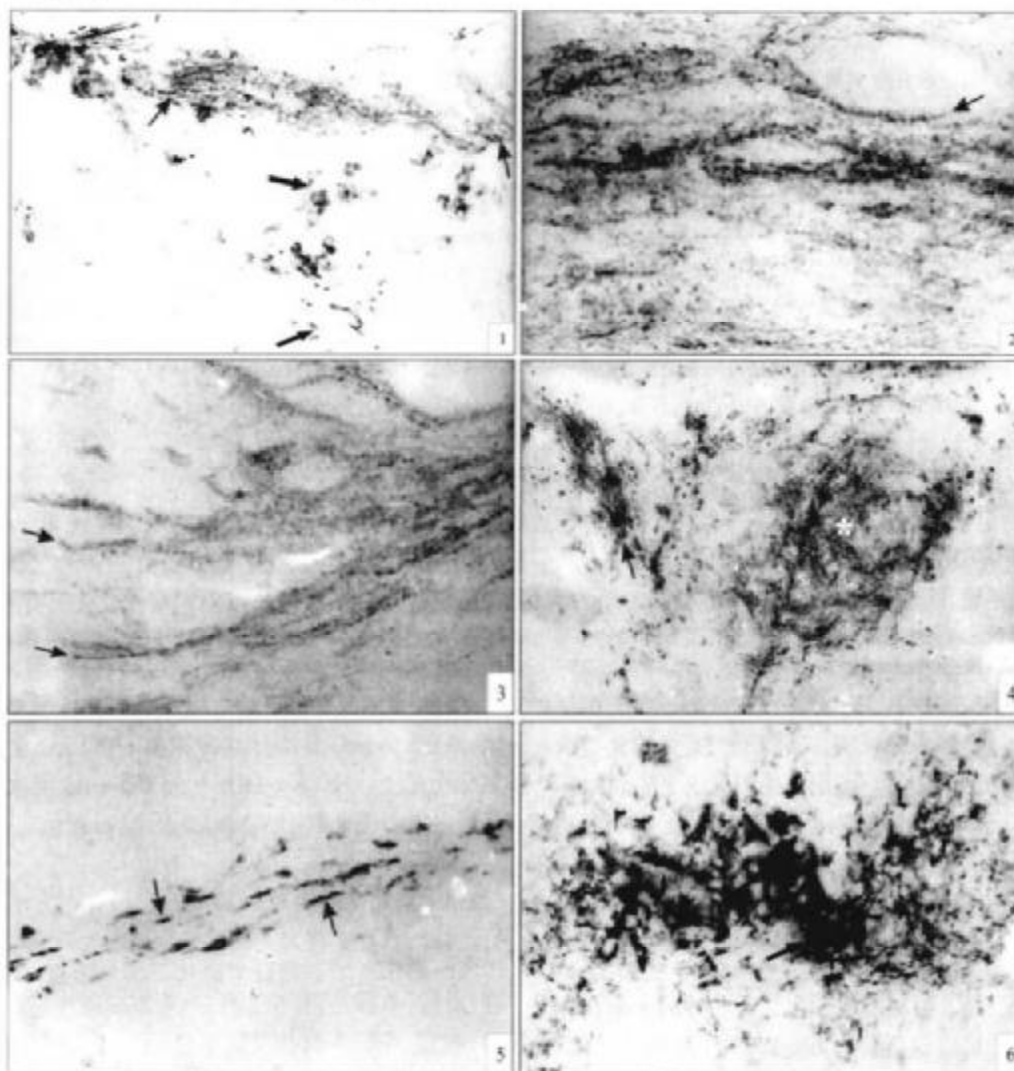
Plate I

1: Histochemical localization of NOS in the cerebral and pedal ganglia, $\times 30$. 2: Histochemical localization of NOS in a part of cerebral pedal ganglia, $\times 150$. 3: Histochemical localization of NOS in the pedal ganglia, $\times 30$. 4: Immunohistochemical localization of eNOS in the pedal ganglia, $\times 150$. 5-6: Histochemical localization of NOS in the visceral ganglia, $\times 30$.

↑—Positive nerve fibers; △—Positive nerve cells; ▲—Encircled positive nerve fibers; ★—Cerebral ganglia; ☆—Pedal ganglia; 亮—Strong positive area or anterior lobes; ↑—Pedal nerve; ▲—Olfactory ganglia; ↑—Pedal nerve cord or strong positive nerve fiber.

孙虎山等:栉孔扇贝神经节一氧化氮合酶的组织化学和免疫组化定位

SUN Hu-shan et al;Histochemical and immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in nervous ganglia of scallop *Chlamys farreri*



图版 II

1:脏神经节表层 NOS 组化定位, ×300. 2:脏神经节中部 NOS 组化定位, ×300. 3:脏神经节侧叶 NOS 组化定位, ×150. 4:嗅检神经节 NOS 组化定位, ×150. 5:脑脏神经索 NOS 组化定位, ×300. 6:脏神经节 eNOS 免疫组化定位, ×150.

↑—阳性神经纤维; ↑—阳性神经细胞; 嗅—嗅检神经节

Plate II

1:Histochemical localization of NOS in the surface layer of visceral ganglia, ×300. 2:Histochemical localization of NOS in the center of visceral ganglia, ×300. 3:Histochemical localization of NOS in the lateral lobes of visceral ganglia, ×150. 4:Histochemical localization of NOS in the osphradium ganglia, ×150. 5:Histochemical localization of NOS in the visceral nerve cords, ×300. 6:Immunohistochemical localization of eNOS in the visceral ganglia, ×150.

↑—Positive nerve fibers; ↑—Positive nerve cells; 嗅—Oosphradium ganglia