

大黄鱼脑垂体组织学与免疫组织化学

翁幼竹¹, 方永强¹, 周 晶¹, 谢芳靖², 刘家富²

(1. 国家海洋局 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005;

2. 宁德地区水产技术推广站养殖场, 福建 宁德 352100)

摘 要:用组织学和免疫组织化学方法研究不同发育时期大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 脑垂体的形态结构和各种促激素分泌细胞的分布。结果表明:(1)大黄鱼脑垂体呈“鸡心”形,由神经垂体和腺垂体组成,腺垂体可分为前外侧部(RPD)、中外侧部(PPD)和垂体中间部(PI)。(2)RPD部有3种细胞,分别为催乳激素(PRL)细胞,促肾上腺皮质激素(ACTH)细胞,促性腺激素(GnH)细胞。(3)PPD部位丁腺垂体腹面,也有3种细胞,其中1种为促生长激素(GH)分泌细胞,呈嗜酸性,另2种呈嗜碱性,分别为GnH细胞与促甲状腺激素(TSH)分泌细胞。(4)垂体中间部有2种细胞,1种为促黑激素(MSH)细胞,呈嗜酸性,另1种为GnH细胞,呈嗜碱性。随性腺发育成熟,大黄鱼GnH细胞的分布从中外侧部扩展至前外侧部和中间部背面;GnH细胞胞质空泡可作为其分泌活动的标志。

关键词:大黄鱼;脑垂体;组织学;免疫组织化学

中图分类号:Q959.483

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2003)01-001-04

自20世纪30年代末期Woodman^[1]报道了鱼类脑垂体的形态结构以来,鱼类脑垂体组织生理学的研究在国内外广泛开展。各国学者应用组织学、组织化学和电镜技术,在鱼类脑垂体解剖学、脑垂体各种类型细胞的鉴别、定位及其功能、脑垂体神经支配以及切除脑垂体对机体的影响等方面进行研究。20世纪60年代末,Ball^[2]对当时的研究热点脑垂体催乳激素分泌细胞的功能进行评述。70年代初免疫组织化学技术的问世,推动了脑垂体组织生理学的发展,此时,Sage等^[3]发表了一篇“硬骨鱼类脑垂体细胞生理学”的评论,对鱼类脑垂体研究进展予以总结。迄今,国内外学者发表有关鱼类脑垂体的论文有上百篇,涉及30余种不同科属的鱼,如虹鳟、罗非鱼、鲈、赤点石斑鱼、金鱼、鳊、鳊、茅尾鱼和青鳉等^[4-14],但未见大黄鱼脑垂体的研究报道。本研究用组织学和免疫组织化学方法对大黄鱼脑垂体形态和组织结构,尤其是促性腺激素GnH细胞发育成熟与性腺发育的关系进行详细研究,旨在分析大黄鱼

性早熟原因和阐明性早熟防治机理^[15]提供基础资料,同时丰富硬骨鱼类生殖内分泌学。

1 材料与方法

1.1 样品制备

大黄鱼于2000年6月取自宁德地区水产技术推广站养殖场海水网箱,体长19.8~23.5 cm,体重140~220 g。从间脑腹面摘出脑垂体,解剖取出性腺。脑垂体和性腺分别在Bouin液和Bouin-Holland's液中固定8~12 h,梯度酒精脱水,石蜡包埋,连续切片,厚3~4 μm 。

1.2 组织学染色

脑垂体纵切片用经典的Heidenhain-Azan法^[16](简称HA)和新的鱼类脑垂体染色法^[17](简称Jafri)染色。性腺切片用常规HE法染色。

1.3 免疫组织化学反应程序

脑垂体切片脱蜡至水,浸入3% H_2O_2 中10 min以除去内源性过氧化酶活性。接着按免疫组织化学SABC法(Strept Avidin-Biotin Complex)进行反应。正常羊血清(1:100)封闭后,分别滴加兔抗鲑促性腺激素抗体(日本东京大学Aida教授惠赠,1:400)、鼠抗促甲状腺素单克隆抗体(Santa Cruz公司产品,1:50~1:100);兔抗促肾上腺皮质激素抗体(购自武汉博士德生物工程有限公司,1:200)、兔抗鲑生长激素抗

收稿日期:2002-06-21.

基金项目:国家“八六三”资助项目(819-02-012).

作者简介:翁幼竹(1968-),女,博士,副研究员,主要从事海洋动物生殖内分泌学研究.

通讯作者:方永强, E-mail: fan98@public.xm.fj.cn

体(1:1 200)、兔抗哺乳类催乳素抗体(1:50),4℃孵育24 h, PBS清洗。接着滴加生物素化羊抗兔或鼠IgG(购自武汉博士德生物工程有限公司, 1:100), 室温孵育20 min。PBS洗后, 滴加 High-SABC 复合物(购自武汉博士德生物工程有限公司, 1:100), 室温孵育20 min。PBS洗后, 加 DAB(3', 3'-二氨基联苯胺)显色10~20 min, 蒸馏水终止反应。

对照片特异性检查以正常兔或鼠血清和 PBS 替代一抗, 分别作替换对照和空白对照, 同步按上述免疫组化程序进行染色, 结果为阴性。

2 结果 (图版见附录1)

2.1 脑垂体的形态

大黄鱼脑垂体形态与其他硬骨鱼类类似, 呈“鸡心”形, 位于下丘脑腹面的蝶骨窝中, 通过垂体柄与下丘脑相连。根据组织学染色结果, 大黄鱼脑垂体由神经垂体(Neuro-hypophysis)和腺垂体(Adeno-hypophysis)2部分组成, 腺垂体可细分为3个部分(图版I-1), 前外侧部(rostral pars distalis, RPD)、中外侧部(proximal pars distalis, PPD)和垂体中间部(pars intermedia, PI)。

2.2 脑垂体组织结构

2.2.1 神经垂体 大黄鱼神经垂体是由发自下丘脑的一束神经纤维(其中夹杂着结缔组织纤维与少量脑垂体细胞和微血管等)构成。这束神经纤维的分支伸向前外侧部和中间部。与神经纤维相伴随的有2种胶质, 1种胶质不着色或染极浅紫色, 另1种染为浅蓝色。神经纤维之间稀疏夹杂着纤维垂体细胞(fibrillar-pituicyte), 细胞为椭圆形, 胞体小, 染鲜红色。另有一种颗粒垂体细胞(granular-pituicyte), 胞体大, 核为卵圆形, 胞质染紫红色(图版I-2)。

2.2.2 腺垂体前外侧部和垂体中间部

(1)前外侧部: 该部有3种细胞, 1种是嗜酸性细胞, IIA 染为鲜红色, Jafri 染为红色, 细胞卵圆形, 核居中, 圆形, 胞质充满细的分泌颗粒。该细胞对兔抗人催乳素抗体显免疫阳性反应, 表明该细胞为催乳激素(prolactin, PRI)细胞(图版I-3)。另一种细胞用 IIA 染为浅蓝色, Jafri 染为粉红色。该细胞对兔抗人促肾上腺皮质激素(adrenocorticotropin, ACTH)抗体显免疫阳性反应, 属 ACTH 细胞(图版I-4)。还有一种嗜碱性细胞, 细胞椭圆形, 核被 IIA 染为红色, 胞质染为蓝色, Jafri 染为洋红色, 该细胞对兔抗鲑鱼促性腺激素抗体显免疫阳性反

应, 为促性腺激素(gonadotropin, GtH)分泌细胞。

(2)垂体中间部: 该部有2种细胞, 1种为嗜酸性细胞, 细胞小呈卵圆形, 核圆形, 被 HA 染为红色, Jafri 染为亮红色, 可能是促黑激素(melanotropin, MSH)细胞。另1种为嗜碱性细胞, 与嗜酸性细胞相邻, 核居中, 染为红色, 胞质被 HA 染为深蓝色, Jafri 染为洋红色, 可见细小分泌颗粒, 常见于性腺发育进入大生长期之后的大黄鱼垂体, 免疫组织化学鉴别为 GtH 细胞。

2.2.3 垂体中外侧部 该部位于腺垂体腹面。由3种类型细胞所组成。1种是嗜酸性细胞, 成簇分布在支配腺垂体的神经纤维周围。细胞为卵圆形或椭圆形, 胞质被 IIA 染为橙红色, 细胞排列无序。该细胞对鱼类生长激素抗体显免疫阳性反应, 可以确定为促生长激素(somatotropin, GH)细胞(图版I-5)。

另2种为嗜碱性细胞, 分布在促生长激素细胞的下方及两侧, 可区分为大小2种细胞。小细胞为椭圆形或不规则形, 核圆形, 居中或偏于一侧。在性腺发育早期, 主要分布在中外侧部的下方, 靠近脑垂体边缘, 胞质中分泌颗粒稀少, 染色较浅; 性腺发育进入大生长期之后, 嗜碱性增强, 被 HA 染成蓝色至深蓝色, Jafri 染为洋红色, 除中外侧部两侧外, 在前外侧部和中间部也有分布, 此时可见胞质中充满细小的分泌颗粒; 该细胞在性腺成熟和性早熟大黄鱼脑垂体中大量存在, 且胞质出现空泡(图版I-6)。免疫组织化学鉴别表明, 该细胞为 GtH 细胞。在未成熟大黄鱼, GtH 细胞对鲑鱼 GtH 抗体的免疫阳性反应强度较弱, 分布范围较狭窄(图版I-7), 而在性成熟大黄鱼, GtH 细胞的免疫阳性反应强度增强, 且分布范围广(图版I-8)。

人的嗜碱性细胞位于小嗜碱性细胞之间, 数量较少, 核较大, 胞质呈强嗜碱性, Jafri 法染为蓝色, 对促甲状腺激素抗体显免疫阳性反应, 可确定为促甲状腺激素(thyrotropin, TSH)分泌细胞(图版I-9)。

3 讨论

大黄鱼脑垂体的形态结构与鲈^[6]较为类似, 均有发达的神经纤维伸入前外侧部和中间部。但大黄鱼脑垂体促生长激素细胞的分布不像鲈和赤点石斑鱼^[7]那样呈沟回状, 而是围绕神经纤维成簇分布。

本研究用兔抗或鼠抗特异性单克隆或多克隆抗体对大黄鱼脑垂体各种促激素细胞进行免疫组织化学定位, 进一步证实用 Heidenhain-Azan 法和鱼类脑

垂体染色法所做的鉴别是正确的,尤其用来鉴别用组织学方法难以区分的 TSH 细胞和 GtH 细胞的分布,更有应用价值。因此,用免疫组织化学方法对鱼类脑垂体各种促激素细胞进行鉴别和定位,方法简单可靠,出现膺象机会少,有推广价值。

本研究还表明大黄鱼脑垂体 GtH 分泌细胞的发育成熟及其分泌活动与性腺发育相关。这一问题已被国内外学者所公认^[18]。从性腺未成熟、成熟或性早熟大黄鱼 GtH 细胞在脑垂体免疫组织化学定位的分布范围来看,证实先前所揭示 GnRH-A 抑制性早熟机制^[19]与 GtH 细胞发育成熟的关系。特别要指出的是,随着性腺发育成熟和在性早熟情况下,大黄鱼脑垂体 GtH 细胞胞质中出现空泡,这与我们以前观察到当鲈、罗非鱼和鳊 GtH 细胞进入分泌活动时,胞质出现空泡相一致^[4-6,8]。因此,可将 GtH 细胞胞质空泡作为其分泌活动的标志,此情况不仅出现在鱼类,还见于哺乳类脑垂体 GtH 细胞^[20-21]。

参考文献:

- [1] Woodman A S. The pituitary gland of the Atlantic salmon[J]. J Morph, 1939, 65: 411 - 435.
- [2] Ball J N. Prolactin and osmoregulation in teleost fishes: A review[J]. Gen Comp Endocrinol Suppl, 1969, 2: 10 - 25.
- [3] Sage M, Bern H A. Cytophysiology of the teleost pituitary[J]. International Review of Cytology, 1971, 31: 339 - 376.
- [4] 方永强,汪敏,许瑞安. 丘脑下部促黄体素释放激素类似物(LRH-A)的作用机制 I. 脑垂体组织生理学的研究[J]. 动物学报, 1981, 27: 203 - 207.
- [5] 方永强,汪敏. 丘脑下部促黄体素释放激素类似物(LRH-A)的作用机制 III. 对罗非鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞超微结构的影响[J]. 动物学报, 1983, 29: 124 - 128.
- [6] 戴燕玉,陈蕾,方永强. 鲈鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞与性腺发育的关系[J]. 台湾海峡, 1998, 17: 139 - 142.
- [7] 方永强. 赤点石斑鱼脑垂体组织生理学的研究[J]. 台湾海峡, 1990, 9: 69 - 72.
- [8] 翁幼竹,林君卓,洪方树,等. 鲈鱼脑垂体组织生理学的研究[J]. 台湾海峡, 2000, 19: 192 - 196.
- [9] 林浩然. 鳗鲡繁殖生物学研究 IV. 人工催熟过程中下海鳗鲡 GtH 分泌活动,性腺发育情况和脑垂体 GtH 细胞的超微结构[J]. 水生生物学报, 1987, 11: 320 - 327.
- [10] Lagios M D. The pituitary gland of the coelacanth *Latimeria chalumnae* Smith[J]. Gen Comp Endocrinol, 1975, 25: 126 - 146.
- [11] Nagahama Y, Yamamoto K. Basophils in the adenohypophysis of the goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Gunma Symposia on Endocrinology, 1969, 6: 39 - 55.
- [12] Kaneko T, Aida K, Hanyu I. Ultrastructural changes in the pituitary gonadotropes during the annual reproductive cycle of the female chichibu-goby *Tridentiger obscurus* [J]. Cell Tissue Res, 1986, 246: 137 - 144.
- [13] Föllénus E, Doerr-Schult J. Immunocytology of pituitary cells from teleost fishes[J]. International Review of Cytology, 1978, 54: 193 - 223.
- [14] Natio N, De Jesus E G, Nakai Y, et al. Ontogeny of pituitary cell-types and the hypothalamo-hypophysial relationship during early development of chum salmon, *Oncorhynchus keta* [J]. Cell Tissue Res, 1993, 272: 429 - 437.
- [15] 方永强,翁幼竹,周品,等. 大黄鱼性早熟问题的研究 I. 网箱养殖鱼性腺发育状况[J]. 台湾海峡, 2000, 19(3): 354 - 359.
- [16] Humason G L. Animal tissue techniques [M]. Third edition. San Francisco: Freeman W H and Company, 1972.
- [17] Jafri S I H. Combined stain for fish pituitary[J]. Stain Technology, 1982, 54: 93 - 95.
- [18] Aoki K, Uemura H. Cell types in the pituitary of the medaka, *Oryzias latipes* [J]. Endocrinol Japan, 1970, 17: 45 - 55.
- [19] 翁幼竹,方永强,周品,等. GnRH-A 和紫萁抑制大黄鱼性腺早熟的机制[J]. 水产学报, 2001, 25(6): 518 - 521.
- [20] 周寿康,谢表明. 大鼠动情周期垂体促性腺细胞周期性变化的定量免疫细胞化学研究[J]. 生理学报, 1988, 40(5): 436.
- [21] 周寿康,戴茂征,谢表明,等. 大白鼠促性腺激素细胞分泌周期中颗粒和液泡结构的周期性变化[J]. 生殖与避孕, 1990, 10: 18 - 23.

Histological and immunohistochemical study on pituitary gland of large yellow croaker *Pseudoscia crocea*

WENG You-zhu¹, FANG Yong-qiang¹, ZHOU Jing¹, XIE Fang-jing², LIU Jia-fu²

(1. The Third Institute of Oceanography, State Ocean Administration, Xiamen 361005, China;

2. The Experimental Farm of Aquaculture Technology Extension Station, Ningde 352100, China)

Abstract: The pituitary gland of *Pseudoscia crocea* at different development stages was analyzed to study its morphological structure and the distribution of various secretory cells producing tropic hormones. The results show that: 1) the pituitary gland of *P. crocea* is heart-shaped, composed of neurohypophysis and adenohypophysis that is divided into rostral pars distalis (RPD), proximal pars distalis (PPD) and pars intermedia (PI); 2) there are three kinds of cells in RPD, which are prolactin (PRL) cell, adrenocorticotropin (ACTH) cell and gonadotropin (GtH) cell; 3) PPD is located at the ventral part of adenohypophysis, containing somatotropin (GH) cell, GtH cell and thyrotropin (TSH) cell; 4) there are two kinds of cells in PI, which are melanotropin cell and GtH cell. The distribution of GtH cells in pituitary extends from PPD to RPD and PI during the development of gonads; the secretory activity of GtH cells could be marked by those vesicles in the cytoplasm.

Key words: *Pseudoscia crocea*; pituitary gland; histology; immunohistochemistry

图版说明

图版 I (见附页 1)

1. 未成熟雌性大黄鱼的脑垂体形态结构, 示前外侧部 (RPD)、中外侧部 (PPD) 及垂体中间部 (PI), $\times 70$ 。
2. 大黄鱼神经垂体, 示胶质 (CS)、颗粒垂体细胞 (◇) 和纤维垂体细胞 (→), $\times 120$ 。
3. 性成熟雌性大黄鱼 PRL 免疫阳性细胞 (◇) 分布在 RPD, $\times 400$ 。
4. 性成熟雌性大黄鱼 ACTH 免疫阳性细胞 (◇) 分布在 RPD, $\times 400$ 。
5. 未成熟雄性大黄鱼 GH 免疫阳性细胞 (◇) 定位在 PPD, $\times 200$ 。
6. 性成熟雄性大黄鱼脑垂体, 可见 GtH 细胞胞质出现大小不一的空泡 (◇), $\times 800$ 。
7. 未成熟雄性大黄鱼 GtH 免疫阳性细胞 (◇) 分布在脑垂体前外侧部、中间部和中外侧部垂体边缘, 显中等强度免疫阳性反应, $\times 45$ 。
8. 性成熟雄性大黄鱼 GtH 强免疫阳性细胞 (◇) 分布在脑垂体各部, $\times 25$ 。
9. 未成熟雌性大黄鱼脑垂体, 可见 TSH 免疫阳性细胞 (◇) 分布在中外侧部, $\times 300$ 。

Plate I (For plate I see attached page 1)

1. Morphological structure of pituitary gland in immature female large yellow crocea, showing rostral pars distalis (RPD), proximal pars distalis (PPD) and pars intermedia (PI) $\times 70$.
2. Neurohypophysis in large yellow crocea, showing colloid substance (CS), granular-pituicyte (◇) and fibrillar-pituicyte (→) $\times 120$.
3. PRL immunopositive cells (◇) distributing in RPD of pituitary in mature female fish $\times 400$.
4. ACTH immunopositive cells (◇) distributing in RPD of pituitary in mature female fish $\times 400$.
5. GH immunopositive cells (◇) distributing in PPD of pituitary in immature male fish $\times 200$.
6. Pituitary in mature male fish, showing different size of vesicles (◇) in the cytoplasm of GtH cells $\times 800$.
7. GtH immunopositive cells (◇) distributing in the edge of RPD, PI and PPD of pituitary in immature male fish $\times 45$.
8. GtH strong immunopositive cells (◇) distributing in various parts of pituitary in mature male fish $\times 25$.
9. Pituitary in immature female fish, showing TSH immunopositive cells (◇) in PPD $\times 300$.