

栉孔扇贝神经节结构的显微观察

孙虎山, 王宜艳

(鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要:采用甲苯胺蓝、嗜银和铅苏木素3种组织学染色方法分别对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)神经节进行显微观察。结果表明,甲苯胺蓝染色法效果最好,神经细胞和神经纤维均着色较深,与背景反差较大。神经干及神经索中无神经元胞体,仅有沿神经索方向分布的神经纤维。神经节包括:1对彼此分离的脑侧神经节、1对连接在一起的足神经节和左右2个神经节完全愈合而成的脏神经节。各神经节均由表面的神经节被膜、周边的胞体层和中央纤维网构成,胞体层分层现象不明显,神经元胞体根据其大小大致可分为直径15~36 μm 的大型细胞和5~15 μm 的小型细胞,胞体发出的突起均进入中央神经纤维网。脑侧神经节胞体层明显分脑神经节(CG)和侧神经节(PG)2区,CG区中神经元胞体主要分布于前端和外侧面,而PG区中神经元胞体则主要分布于外侧面;大型细胞较多,小型细胞很少。足神经节表层神经元胞体无分区分布的现象;大型细胞较少,而小型细胞较多。脏神经节相对较复杂,神经元胞体数目多,胞体层分区明显,分为:2个前叶,1个后叶,2个侧叶和2个嗅检叶;前叶和后叶中大型细胞较多,小型细胞较少;侧叶和嗅检叶中仅有小型细胞,而无大型细胞。[中国水产科学,2007,14(3):390—396]

关键词:栉孔扇贝;神经节;中枢神经系统;显微结构;组织学

中图分类号:Q959.215

文献标识码:A

文章编号:1005—8737—(2007)03—0390—07

贝类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^[1-2]。Leung等从贻贝(*Mytilus edulis*)的足神经节分离出甲硫氨酸脑啡肽和亮氨酸脑啡肽,其分子组成与哺乳动物体内的脑啡肽相同^[3]。Stefano等实验证明贻贝体内的脑啡肽等阿片神经肽参与其免疫调节^[4],并进一步研究证明贝类的阿片肽也通过血细胞表面的 δ 受体介导^[5]。Hughes等^[6]报道贻贝体内有白细胞介素1和肿瘤坏死因子等细胞因子。采用RT-PCR和探针标记技术,Cadet等检测了贻贝足神经节 μ 型受体mRNA的表达,发现与人 $\mu 1$ 型受体有95%的序列一致性,从分子生物学水平证明了贻贝足神经节有 μ 受体^[7],并证实贻贝神经系统的调节作用是通过一氧化氮与一氧化氮合酶体系来实现的^[8]。上述研究表明贝类可能也具有与高等脊椎动物相似的神经内分泌免疫调节网络。然而,有关贝类神经系统显微结构的研究报道较少,过去的工作大多集中在腹足纲的褐云玛瑙螺(*Achatina fulica*)、钉螺(*Oncomelania hupensis*)和脉红螺(*Rapana venosa*)等

种类^[9-12],双壳纲种类的研究报道更少^[13],对许多重要养殖贝类神经细胞的分布情况还不了解,影响了贝类神经内分泌免疫调节研究的深入开展。栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是中国北方海水养殖的主要贝类之一,有关栉孔扇贝神经系统显微结构的研究尚未见报道。本研究采用组织学方法对栉孔扇贝神经系统的显微结构进行了观察,以期为贝类神经内分泌和比较神经生物学研究积累资料。

1 材料和方法

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18~20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 方法

选取健壮无伤、对外界刺激反应灵敏的栉孔扇贝10只,切断闭壳肌,去壳,取口和足丝间的小块组织和两肾间的小块组织,Bouin氏固定液固定12 h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,连续切

收稿日期:2006—07—26; 修订日期:2006—09—08。

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

片,切片厚度5~8 μm 。分别进行甲苯胺蓝、嗜银或铅苏木素染色^[14]。脱水,透明后中性树胶封片。镜检并拍照记录结果。

1.2.1 甲苯胺蓝染色法 1%甲苯胺蓝水溶液置于60 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内浸染40 min。

1.2.2 de Grandi 改良嗜银染色法 用0.02 mol/L pH 5.6的醋酸缓冲液配置的1%硝酸银溶液,60 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内作用6 h,浸入1%对苯二酚和5%亚硫酸钠混合组成的还原液中45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下作用1 min,水洗后浸入5%硫代硫酸钠中2 min。

1.2.3 Solcia 铅苏木素染色法 将50 mL 5%硝酸铅与50 mL 醋酸铵饱和溶液混合并过滤后加入37%甲醛2 mL,得硝酸铅液。0.2 g 苏木精用3 mL 95%乙醇溶解后滴入20 mL 硝酸铅液中,最后加入蒸馏水60 mL即得铅苏木素液。切片入铅苏木素液37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内染色3 h。

2 结果与分析

栉孔扇贝中枢神经系统由脑侧神经节、足神经节和脏神经节3对神经节及脑脏神经索和脑足神经索4条神经索组成。由各神经节发出的神经分布到身体的各个部位。3种染色方法均能使栉孔扇贝神经细胞着色。其中,甲苯胺蓝染色法效果最好,神经细胞胞质、核仁和神经纤维呈深蓝色,核质不着色,反差较大;嗜银染色法对神经纤维染色较好,神经纤维分布较清晰,但大多数神经细胞着色较浅,与其他组织细胞反差较小;铅苏木素法效果最差,神经细胞着色与甲苯胺蓝相似,只是反差较小,神经纤维分布不清晰,且易产生杂质污染。各神经节均由表面的神经节被膜、周边的胞体层和中央纤维网构成。神经节被膜与神经干被膜相延续。神经干及神经索中无神经元胞体,仅有沿神经索方向分布的神经纤维。各神经节的显微结构分述如下:

2.1 脑侧神经节

脑侧神经节1对,彼此分离,位于口和足之间,埋于消化腺和生殖腺的组织表层。每个神经节由前后相错迭的已愈合的2叶组成,前叶是脑神经节(CG)而后叶是侧神经节(PG),神经元胞体均只分布于表层,形成胞体层,且分层现象不明显。胞体层(RCB)明显分为2区:CG区和PG区。CG区中神经元胞体集中分布于前端、背侧面和外侧面,而腹侧面和内侧面分布很少,而PG区中神经元胞体则主要分布于外侧面,CG和PG的中央神经纤维网已完

全愈合在一起,大部分神经纤维纵向分布,向后进入脑脏神经索与脏神经节连接,向前进入脑侧神经连合、前外套神经等,小部分神经纤维横向分布,向内进入脑足神经索与足神经节连接(图版I-1)。

脑侧神经节神经元胞体呈圆形、卵圆形、梨形或不规则形,根据胞体大小大致可分为大型和小型细胞2种类型:大型细胞的胞体直径15~36 μm ,小型细胞的胞体直径10~15 μm 。大型细胞较多,小型细胞很少。大型细胞主要分布于靠近神经节表层的部位,而小型细胞则主要分布于深层。细胞核多为圆形或椭圆形,多居于胞质中央,大小为6~10 μm ,核仁1个,大多居于核的一侧。3种染色方法均是胞质染色较深,胞核染色极浅,核仁染色很深。每个神经元胞体一般发出1条神经纤维,少数神经元发出2~3条,由胞体发出的神经纤维均进入中央神经纤维网(图版I-2、3、4)。

2.2 足神经节

足神经节1对,连结在一起,位于足和口之间,靠近足背部中央。神经元胞体除了在神经干发出部位没有分布外,在整个足神经节的表层均有分布,且分层现象也不明显。中央神经纤维网内的大部分神经纤维沿2个神经节连结的方向横向分布,从左右两侧分出脑足神经索与脑侧神经节相连(图版I-5)。部分神经纤维向身体的腹面分布,形成足神经伸到足各部。

足神经节神经元胞体多呈圆形或不规则形,根据胞体大小明显分为大型和小型细胞2种类型:大型细胞的胞体大小15~28 μm ,小型细胞的胞体大小5~15 μm 。大型细胞数量较少,而小型细胞数量较多,2种类型的细胞混杂分布。胞核的形态和大小以及细胞的着色情况与脑侧神经节相似。四周的神经元胞体发出的突起也均进入中央神经纤维网(图版I-6)。

在足神经节的附近有1对平衡器。平衡器为圆形,中央有耳砂,内壁上分布着一层神经细胞,胞体大小10~20 μm ,发出的神经纤维伸向中央,有的神经纤维与耳砂相连接,另有少量神经纤维与自脑神经节发出的平衡器神经相联系(图版I-7、8)。

2.3 脏神经节

左右2个神经节完全愈合,形成1个复杂的大型神经节,位于闭壳肌腹面,分区现象明显,分为2个前叶、1个后叶、2个侧叶和2个嗅检叶共7个分叶。在2侧叶与前叶之间向前上方分出左右脑脏神

经索,与脑侧神经节相连。神经节后端分出1对后外套神经,分布到身体后端的外套膜。2侧叶向两侧呈放射状分出大量外套神经,分布到外套膜的大部分。神经元胞体主要分布于神经节的表层,分层不明显,在7个分叶的数量差别较大,2前叶数量最多,后叶和嗅检叶次之,侧叶最少。中央神经纤维网内的大部分神经纤维横向分布,在前叶与后叶之间有1个组织间隙,分布于前叶偏外侧的神经纤维在神经节两侧折向前上方,进入脑脏神经索;分布于后叶偏外侧的神经纤维折向后,进入后外套神经;分布于前叶和后叶偏中央的神经纤维经侧叶进入外套神经(图版Ⅱ-1)。

脏神经节神经元胞体多呈圆形或不规则形,根据胞体大小也明显分为15~28 μm 的大型和5~15 μm 的小型细胞2种类型。胞核的形态和大小以及细胞的着色情况也与脑侧神经节相似。前叶(图版Ⅱ-2、6、7、8)和后叶(图版Ⅱ-3)中大型细胞数量较多,小型细胞数量较少,2种类型的细胞混杂分布。侧叶(图版Ⅱ-4)和嗅检叶(图版Ⅱ-5)仅有小型细胞,而无大型细胞。7个分叶表层的神经元胞体发出的突起也均进入中央神经纤维网。

3 讨论

3.1 贝类神经组织染色方法的选择

神经组织的染色方法很多,其中最经典最常用的方法是Golgi镀银法,因为该法不分类别的仅显示约1%的细胞,便于观察各细胞形态类型;所显示的细胞成分,色调浓重,易于分辨,而未被染出的细胞无色,对比度极好;且操作比较简单,因此已成为观察中枢神经系统形态学的理想方法之一^[15]。笔者也曾采用Golgi镀银法显示栉孔扇贝神经节内的神经细胞,未观察到呈黑色或黑红色的神经胞体,效果不好。利用神经内分泌细胞或称产肽细胞系(APUD)细胞所含5-羟色胺的酚结构可还原银这一特征,有研究者建立了显示APUD细胞的银染色方法,并根据APUD细胞内5-羟色胺及肽类含量的多寡将银染色法分为不需任何帮助即可还原银盐的亲银染色法和需有还原剂或光线存在才能还原银盐的嗜银染色法^[14]。笔者还曾采用Zugibe改良亲银染色法和de Grandi改良嗜银染色法^[14]显示栉孔扇贝神经节内的APUD细胞,结果亲银染色未观察到呈黑色的亲银颗粒;嗜银染色也未观察到呈棕黑色的嗜银颗粒,而仅有部分呈浅棕色的细胞(图版Ⅰ-4;

图版Ⅱ-6、7),说明栉孔扇贝中枢神经系统的内分泌作用较弱,这与孙虎山等^[16]研究其神经节一氧化氮合酶组化定位时发现其神经节内无阳性细胞的结果是一致的。HE染色法也可用于神经组织的染色,但多数苏木素配方只对细胞核着色较好,而神经细胞的轮廓不清,且神经纤维着色不好;本实验采用Solcia等建立的铅苏木素法染色^[14],栉孔扇贝神经节内的神经胞体轮廓较清晰(图版Ⅱ-8),但反差较小,看不出神经纤维的走向,且极易产生大量污染色素颗粒,效果不理想。许多研究者建立了神经组织特殊结构或成分的染色方法,笔者选用了Pischinger缓冲亚甲基蓝法和甲苯胺蓝染色法2种神经组织尼氏小体染色方法^[14]对栉孔扇贝神经节进行了染色观察,结果亚甲基蓝法染色神经元胞体和神经纤维着色较浅,反差太小,效果不好;用甲苯胺蓝染色法染色,神经元胞体和神经纤维均着色很深,反差大,效果好,并将此方法用于其他几种贝类神经组织的染色,得到了相似的结果,说明甲苯胺蓝染色法是用贝类神经组织染色的理想方法。

3.2 栉孔扇贝中枢神经系统的结构特征

除了在双壳纲贝类中最低等的胡桃蛤科(Nuculidae)尚有脑、侧、足和脏神经节4对区分明显的神经节外,绝大多数双壳贝类的中枢神经系统均由脑侧神经节、足神经节和脏神经节3对神经节及脑足神经索和脑脏神经索4条神经索组成,栉孔扇贝也不例外,因其1对脑侧神经、1对足神经节均彼此分离,且脑神经节和侧神经节愈合程度较低,因此这与根据鳃和铰合齿等原始特征将扇贝划分到较低等的类群中去的观点是相符合的^[17]。较高等的双壳贝类蛤蜊科(Mactridae)和帘蛤科(Veneridae)等1对脑侧神经节彼此连结,脑神经节和侧神经节完全愈合,1对足神经节完全愈合^[13],与扇贝差异较大。显微观察表明,栉孔扇贝各神经节的显微结构具有一定的共同特征,即胞体层内含有大小不同的神经元,大小神经元混杂排列,分层现象均不明显,这与腹足类中的螺类有明显差别^[9,12],可能与双壳贝类头部退化消失,运动能力弱有关。扇贝神经元胞体根据其大小大致可分为直径15~36 μm 的大型细胞和5~15 μm 的小型细胞2种类型,分别相当于中国蛤蜊中的中、小2类神经元,而缺少直径40 μm 以上的第3类大型神经元^[13],这可能也是因扇贝较蛤蜊低等的缘故。栉孔扇贝的脏神经节结构较复杂,明显

分为7个区,比高等种类中国蛤蜊的还要复杂^[13],并且与脑神经节复杂而脏神经节简单的螺类正好相反^[10],这可能与扇贝不同于大多数双壳贝类在泥沙中营埋栖生活而是在海水中用足丝附着生活有关,外套膜边缘有许多外套眼和大量触手等感觉器官,而其脏神经节发出的神经支配着外套膜的绝大部分,并且还要支配鳃、心脏和闭壳肌等器官,因此扇贝的脏神经节的结构比腹足类和其他双壳贝类要复杂的多。

参考文献:

- [1] Ottaviani E, Franchini A. Immune and neuroendocrine responses in mollusks; the role of cytokines[J]. *Acta Biol Hung*, 1995, 46: 341—349.
- [2] Nieto-Fernandez F E, Alcide K, Rialas C. Heavy metals and neuroimmunomodulation in *Mytilus edulis* [J]. *Acta Biol Hung*, 2000, 51: 325—329.
- [3] Leung M K, Stefano G B. Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 955—958.
- [4] Stefano G B, Leung M K, Zhao X *et al.* Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 626—630.
- [5] Stefano G B. Opioid-like substances in an invertebrate; an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 11 099—11 103.
- [6] Hughes T K, Smith E M, Chin R, *et al.* Interaction of immunoreactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 4 426—4 429.
- [7] Cadet P, Stefano GB. *Mytilus edulis* pedal ganglia express mu opiate receptor transcripts exhibiting high sequence identity with human neuronal mu [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 74(1—2): 242—246.
- [8] Cadet P. Nitric oxide modulates the physiological control of ciliary activity in the marine mussel *Mytilus edulis* via morphine; novel mu opiate receptor splice variants [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2004, 25(3): 184—190.
- [9] 戴鸿佐, 李瑞秋. 褐云玛瑙螺(*Achatina fulica* Ferussac)脑神经节显微结构的观察[J]. *神经解剖学杂志*, 1989, 5(2): 229—234.
- [10] 李国华, 程济民, 王秋雨, 等. 脉红螺(*Rapana venosa*)神经系统解剖的初步研究[J]. *动物学报*, 1990, 36(4): 345—351.
- [11] 李国华, 秦成德. 脉红螺神经细胞和胶质细胞光镜及电镜观察[J]. *动物学杂志*, 1992, 27(1): 1—3.
- [12] 金志良. 钉螺神经系统的显微解剖[J]. *动物学报*, 1993, 39(3): 229—238.
- [13] 王晓安, 蒋小满. 中国蛤蜊神经系统显微结构的初步研究[J]. *动物学杂志*, 1999, 34(4): 6—9.
- [14] 龚志锦, 詹洲. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 98—268.
- [15] 杜卓民, 卫光辉, 王宜, 等. 实用组织学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 139—172.
- [16] 孙虎山, 王宜艳, 王晓安, 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[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(1): 20—23.
- [17] 蔡英亚, 张英, 魏若飞. 贝类学概论[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 64—65.

Microscopic observation of the ganglia of scallop *Chlamys farreri*

SUN Hu-shan, WANG Yi-yan

(College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The neurons in the ganglia of scallop *Chlamys farreri* were observed by histological method. The toluidine blue, argyrophilic tissue and plumbum-hematoxylin staining procedures were used respectively in this study. The effect of toluidine blue staining procedure was the best, by which the neurons and nerve fibers were colored deeply, making a distinct contrast with the background. There were nerve fibers distributing along nerve cords but no neuron in the nerve trunk and nerve cords. The main ganglia in the CNS consisted of one pair of separated cerebropleural ganglia, one pair of connected pedal ganglia and visceral ganglion ciliated with right-and-left ganglia. All those ganglia consisted of a surrounding sheath, a region of cell bodies and a region of central neuropile. And, the phenomenon of lamination of neuronal cell bodies wasn't obvious. According to their size, neuronal cell bodies could be divided up into good-sized cells (15—36 μm in diameter) and pint-sized cells (5—15 μm in diameter). Cell processes from neuronal cell bodies in

the ganglia entered central neuropile. The cell bodies region in the cerebropleural ganglia could be divided into two parts easily, which were cerebral ganglion (CG) and pleural ganglion (PG). Neuronal cell bodies in CG section were mainly distributed in the front and outboard surface, and neuronal cell bodies in the PG section mainly distributed in the outboard surface. The majority of neurons in the cerebropleural ganglia were the good-sized. There was no phenomenon of neuronal cell bodies zonation in the pedal ganglia's surface layer. And the numbers at pint size were more than that of those in good size. The structure of visceral ganglion was comparatively complex; the numbers of neuronal cell bodies were more, and the region of cell bodies could be divided up into four sections easily, which were two anterior lobes, one posterior lobe, two lateral lobes and two osphradium lobes. There were more good-sized cells in the anterior lobes and posterior lobe, while there were only pint-sized cells in the lateral lobes and osphradium lobes. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 390—396]

Key words: *Chlamys farreri*; ganglia; central nervous system; microscopic structure; histology

图版 I 说明

1: 脑侧神经节纵切; 2: 脑神经节纵切; 3~4: 脑侧神经节胞体层局部; 5: 足神经节纵切; 6: 足神经节胞体层局部; 7: 平衡器过中部纵切; 8: 平衡器过表层纵切。1~3 和 5~8 为甲苯胺蓝染色; 4 为嗜银染色。CG—脑神经节; CPC—脑足神经索; NF—神经纤维; PG—侧神经节; RCB—胞体区; RN—中央纤维网; SS—神经节被膜; ↑ 示大型神经元; ▲ 示小型神经元; ☆ 示耳砂

图版 II 说明

1: 脏神经节局部纵切; 2: 脏神经节前叶局部; 3: 脏神经节后叶局部; 4: 脏神经节侧叶局部; 5: 脏神经节嗅检叶; 6~8: 脏神经节前叶局部; 1~5 为甲苯胺蓝染色; 6~7 为嗜银染色; 8 为铅苏木素染色。AL—前叶; LL—侧叶; NF—神经纤维; PL—后叶; RN—中央纤维网; ↑ 示大型神经元; ▲ 示小型神经元

Explanation of Plate I

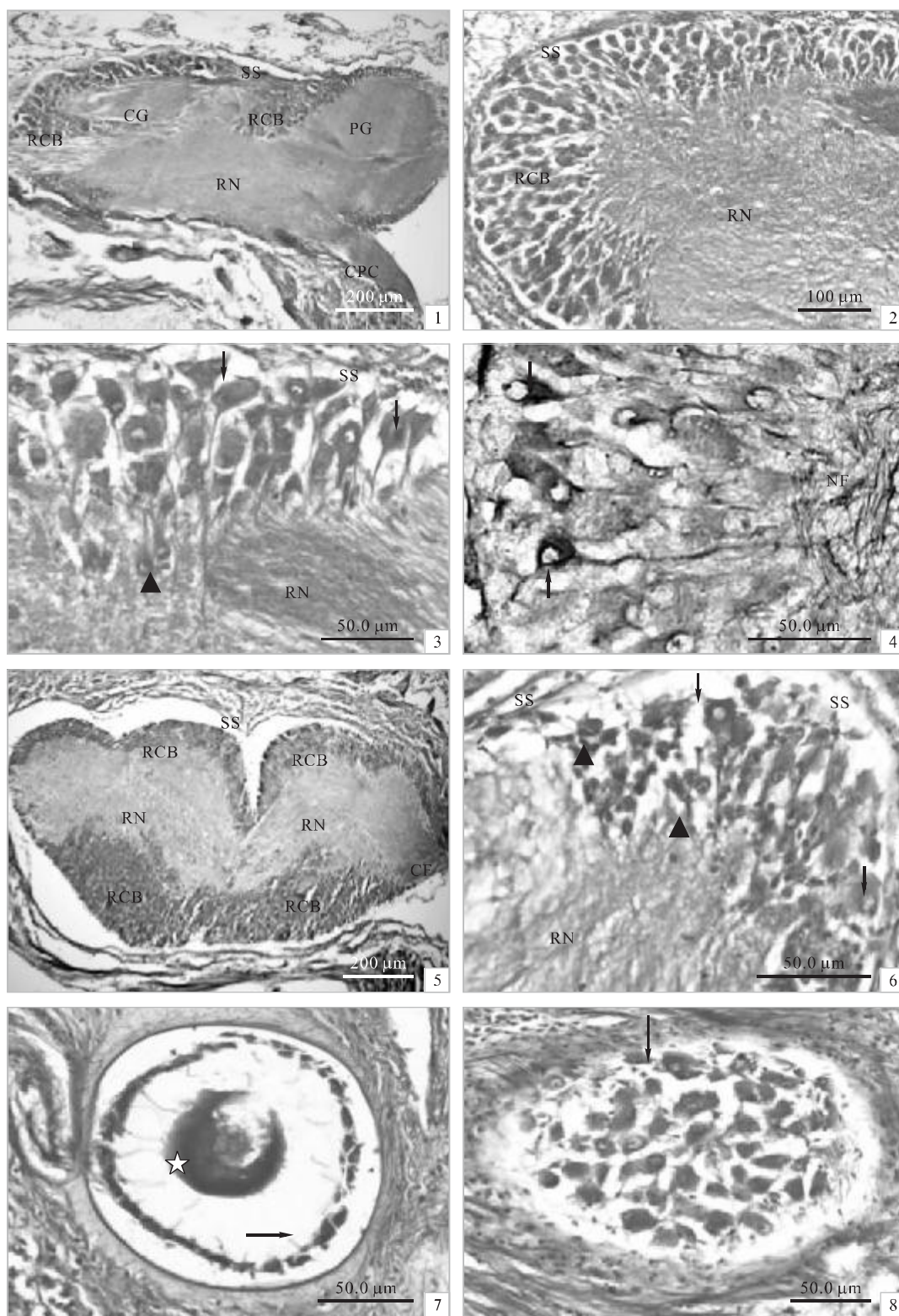
1: Vertical section of cerebropleural ganglion; 2: Vertical section of cerebral ganglion; 3—4: A part of cell bodies region in cerebropleural ganglion; 5: Vertical section of pedal ganglion; 6: A part of cell bodies region in pedal ganglion; 7: Vertical section of the middle of otocyst; 8: Vertical section of the surface layer of otocyst. 1—3 and 5—8: with toluidine blue staining procedure; 4: with argyrophilic tissue staining procedure. CG—cerebral ganglion; CPC—cerebro-pedal connective; NF—nerve fiber; PG—pleural ganglion; RCB—region of cell bodies; RN—a region of central neuropile; SS—surrounding sheath of ganglion; ↑ show good-sized neuron; ▲ show pint-sized neuron; ☆ show otoconia

Explanation of Plate II

1: Vertical section of a part of visceral ganglion; 2: Part of a anterior lobe of visceral ganglion; 3: Part of a posterior lobe of visceral ganglion; 4: Part of a lateral lobe of visceral ganglion; 5: Osphradium lobe of visceral ganglion; 6—8: Part of a anterior lobe of visceral ganglion. 1—5: with toluidine blue staining procedure; 6—7: with argyrophilic tissue staining procedure; 8: with plumbum-hematoxylin staining procedure. AL—anterior lobe; LL—lateral lobe; NF—nerve fiber; PL—posterior lobe; RN—a region of central neuropile; ↑ show good-sized neuron; ▲ show pint-sized neuron

孙虎山等:栉孔扇贝神经节结构的显微观察

SUN Hu-shan et al: Microscopic observation of the ganglia of scallop *Chlamys farreri*

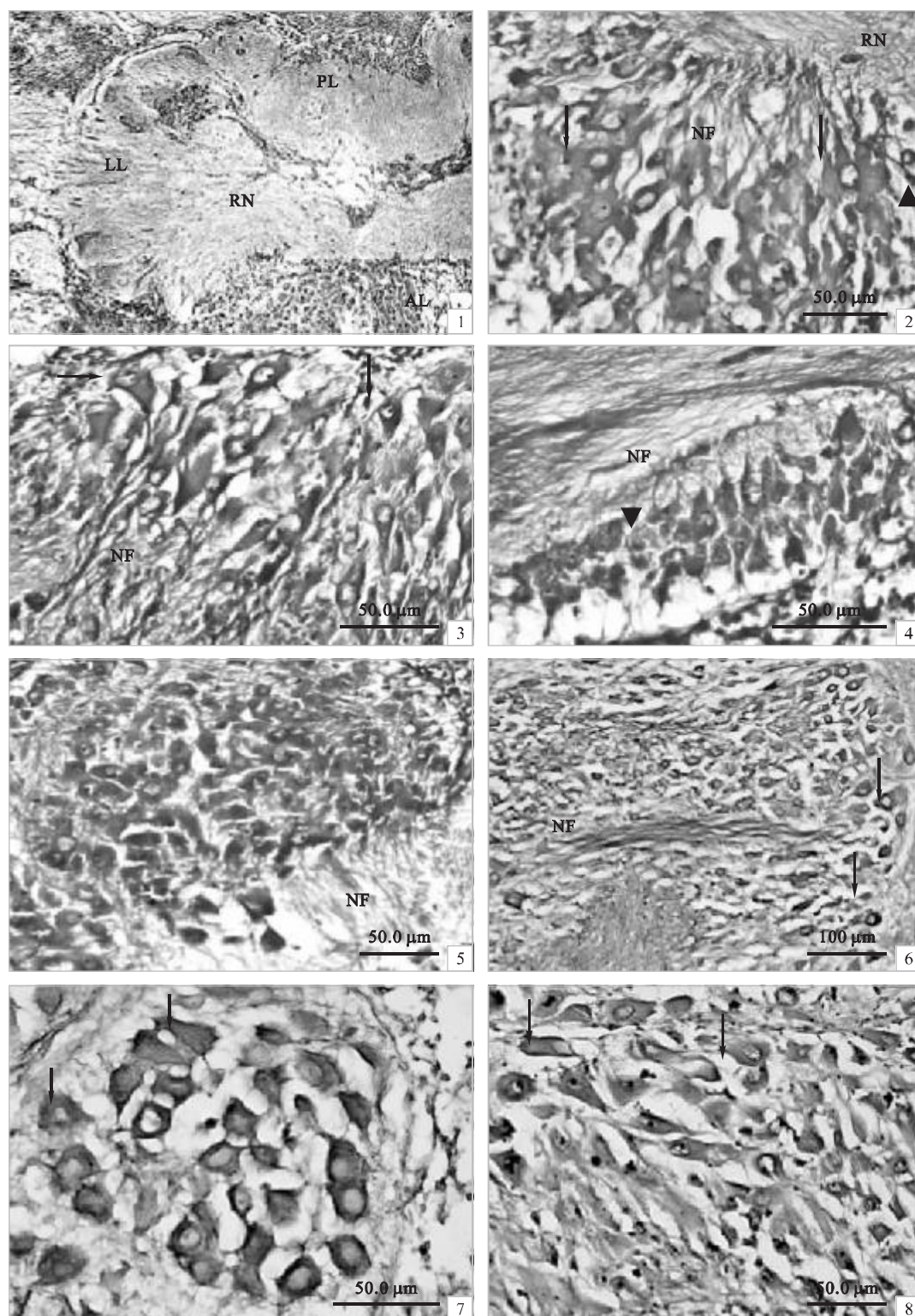


图版 I Plate I

(图版 I 说明见文末 Explanation of Plate I at the end of the text)

孙虎山等:栉孔扇贝神经节结构的显微观察

SUN Hu-shan et al: Microscopic observation of the ganglia of scallop *Chlamys farreri*



图版 II Plate II

(图版 I 说明见文末 Explanation of Plate I at the end of the text)