中华乌塘鳢嗅觉系统孕酮受体的免疫细胞化学研究

赖晓健 1,2, 洪万树 1,2,3, 王桂忠 1,2, 马细兰 1,2, 张其永 1,2, 王琼 1,2

1. 厦门大学 海洋学系, 福建 厦门 361005;

2. 厦门大学 海洋生物资源开发与保护福建省高校重点实验室, 福建 厦门 361005

3. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021

摘要:为了进一步探讨中华乌塘鳢[Bostrichthys sinensis (Lacépède)]感受性信息素(17α-P和17α,20β-P)的作用机制, 以免疫细胞化学(SABC)法进行中华乌塘鳢嗅觉系统孕酮受体的免疫定位和数量分析。结果显示、孕酮受体免疫阳 性细胞在性成熟中华乌塘鳢的嗅上皮、嗅神经和嗅球上均有分布、免疫阳性细胞数量由高到低依次为:嗅上皮、嗅 球、嗅神经。半定量分析结果表明、中华乌塘鳢嗅觉系统的孕酮受体免疫阳性细胞的数量与其性腺发育程度有关。 性成熟雄鱼和雌鱼嗅上皮的免疫阳性细胞数量分别显著或极显著(P < 0.05 或 P < 0.01)高于性未成熟雄鱼和雌鱼; 性未成熟鱼嗅神经上未发现孕酮受体免疫阳性细胞、性成熟雌鱼嗅球上的免疫阳性细胞数量显著高于性未成熟雌 鱼(P < 0.05)。本研究证实了硬骨鱼类嗅觉系统中存在孕酮受体免疫阳性细胞。

关键词:中华乌塘鳢;嗅觉系统;孕酮受体;免疫细胞化学 中图分类号: Q959; S917 文献标志码:A

鱼类嗅觉器官是一种化学感受器,其敏感性 极高、对于鱼类的求偶、觅食、识别、集群、洄 游和防御敌害等均有重要意义^[1]、中华乌塘鳢 [(Bostrichthys sinensis (Lacépède)]是中国东南沿 海河口和港湾等半咸淡水域中的一种营穴居生活 的经济鱼类,属于嗅觉鱼类^[2]。其嗅觉系统由前到 后分为嗅囊、嗅神经和嗅球 3 个部分。嗅囊为纺 锤形、位于嗅窝内; 嗅囊上由嗅觉感受神经元的 神经纤维束组成的一对嗅神经、从嗅囊腹后侧发 出到达同侧的嗅球。嗅球从表层到深层分为嗅神 经层、嗅小球和僧帽细胞层以及颗粒细胞层 3 层。

研究表明, 17α -羟基孕酮(17α -P)、 17α , 20β -双 羟孕酮(17α ,20 β -P)、前列腺素 E₂ (PGE₂)和前列腺 素 $F_{2\alpha}$ (PGF_{2α})是中华乌塘鳢的主要性信息素, 能 够诱导性成熟雌、雄鱼产生生殖行为反应^[3]。用 文章编号:1005-8737-(2011)05-1043-08

嗅电图(EOG)方法检测到中华乌塘鳢嗅上皮对 PGE₂、PGF₂, 17α -P、 17α , 20β -P 的刺激均产生明 显的嗅电反应^[4],提示中华乌塘鳢感受外界的化 学物质是由嗅觉完成的。在硬骨鱼类中, 性信息 素随着水体进入嗅窝后、与嗅上皮上的性信息素 受体结合、将性信息素的化学信号转换为电信号、 通过嗅球将信息传递到脑、随后产生生殖内分泌 反应^[5]。作者先前的研究已发现中华乌塘鳢嗅觉 系统上存在 PGE2 受体亚型 EP1-4^[6]。为了进一步 探讨中华乌塘鳢感受性信息素 17α -P和 17α , 20β -P 的作用机制、本研究采用免疫细胞化学方法检测 了中华乌塘鳢嗅觉系统上17α-P和17α,20β-P受体 (progesterone receptor, PR)的分布, 分析了性成熟 和性未成熟的中华乌塘鳢嗅觉系统中 PR 的表达 量及其特点、旨在丰富鱼类生殖生理学和神经内

收稿日期:2011-02-26;修订日期:2011-04-07.

基金项目: 国家自然科学基金项目(40776080).

作者简介: 赖晓健 (1984-), 男, 博士研究生, 从事海洋鱼类生殖生理学研究. E-mail: laixj@xmu.edu.cn

通信作者: 洪万树, 教授. Tel: 0592-2186495; E-mail: wshong@xmu.edu.cn

分泌学的基础理论。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

野生中华乌塘鳢采自福建省九龙江口潮间带 滩涂。性成熟中华乌塘鳢采集于生殖季节的 5-6 月,雌鱼选择腹部膨大并有明显的卵巢轮廓、尿 殖乳突圆形膨大且呈鲜红色、性腺发育至第 期 的个体(轻微挤压鱼腹部卵能流出),全长 15.5~19.8 cm,体质量 86.5~128.0 g; 雄鱼选择尿殖 乳突三角形突起且呈粉红色、性腺发育至第 期 的个体,全长 14.1~17.0 cm,体质量 82.9~129.5 g。 性未成熟中华乌塘鳢采集于非生殖季节的 12 月, 雌雄鱼性腺均为第 – 期,雌鱼全长 14.0~16.5 cm,体质量 56.0~102.0 g; 雄鱼全长 14.5~17.0 cm, 体质量 91.5~109.0 g。

1.2 实验试剂

MS-222 为美国 Sigma 公司产品。兔抗人孕酮 受体(Progesterone Receptor, PR)、免疫细胞化学 (avidin-biotin-peroxidase complex, SABC)试剂盒 和 DAB 试剂盒为武汉博士德公司产品。其他化学 试剂为国药化学分析纯。

1.3 取材

取样时,将鱼立即投入含 30 mg/L MS-222 的 麻醉液中。麻醉后,测量鱼全长、称鱼体质量和 性腺质量。剪开前后鼻孔之间的皮肤,暴露嗅囊, 然后沿着嗅神经剪开鱼颅骨,暴露整个脑,取下 嗅囊、嗅神经和嗅球。4℃新鲜配置的 Bouin 氏 液固定 8~12 h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石 蜡包埋。连续切片 5 μm,4℃冰箱保存备用。

1.4 HE 染色

切片经常规二甲苯脱蜡,梯度酒精复水后, 埃氏苏木精染色,伊红复染,中性树脂封片, Leica DM 4500B 显微镜观察并拍照。

1.5 免疫细胞化学(SABC)法

实验前, 切片放入 40℃烘箱过夜。脱蜡复水 后, 滴加新鲜配制的 3% H₂O₂, 室温孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水浸洗, PBS (pH 7.4) 浸泡 5 min。滴加 BSA 室温孵育 10 min,封闭非特异性反应部位。吸去血清,滴加 PR 抗体(1:200),4℃孵育 12 h, PBS 浸洗 3 次×5 min。 滴加生物素标记的羊抗兔 IgG, 37℃孵育 25 min, PBS 浸洗 3 次×5 min。滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶, 37 ℃孵育 20 min。PBS 浸洗 3 次×5 min。DAB 显色 5~10 min,蒸馏水冲洗,苏木精轻 度复染、脱水、透明、封片。阴性对照片用相邻 组织切片,以 BSA 代替 PR 抗体进行孵育,进行 上述免疫组织化学反应程序。

1.6 免疫阳性细胞的观察和统计

免疫阳性细胞的统计参照 Khan 等^[7]的方法。 在 Leica DM 4500B 显微镜目镜中放入一个中央 带 5 mm×5 mm 线的正方形圆形玻片, 正方形每 个边都带平行相等的 11 个刻度线, 共有 121 个相 等的小正方形。随机选择 6 个小正方形, 统计落 在小正方形内(包括小正方形每条边上)的阳性细 胞数量。同时用不同的放大倍数计算同一小正方 形内所有的阳性细胞数量。采用多次重复计数来 降低误差, 前后计数的结果没有显著差异。应用 这种半定量的方法计算每 100 μm³ 组织中的阳性 细胞数量。

2 结果与分析

2.1 中华乌塘鳢嗅觉系统结构

中华乌塘鳢嗅觉系统包括 3 个部分: 嗅囊 (olfactory sac, OS)、嗅神经(olfactory nerve, ON) 和嗅球(olfactory bulb, OB) (图 1a)。嗅囊也称为外 部嗅觉器官(peripheral olfactory organ), 呈纺锤形, 位于嗅窝内。每个嗅囊由 10~16 个初级嗅板 (primary olfactory lamellae, POL) 组成,嗅板 (olfactory lamellae, OL)向嗅囊腔内突起的高度不 一,较大的初级嗅板上有次级嗅板(secondary olfactory lamellae, SOL) (图 1b)。

嗅板由嗅上皮和中央髓两部分构成,中央髓 位于嗅板的中央腔内, 嗅上皮排列于中央髓两侧, 细胞分层明显, 组织学观察可见到纤毛非感受细



图 1 中华乌塘鳢嗅觉系统构成及组织学特征 a.中华乌塘鳢嗅觉系统背面观. b.嗅囊水平切面. c.嗅神经和 嗅球联结处水平切面. d.嗅球冠状切面. OS:嗅囊; ON:嗅神经; OB:嗅球; T:端脑; A:嗅囊前部; P:嗅囊后部; OL:嗅板; POL:初 级嗅板; SOL:次级嗅板; D:嗅球背部; L:嗅球侧部; M:嗅球中 部; V:嗅球腹部.

Fig. 1 Structure of olfactory system of *Bostrichthys sinensis* (Lacépède)

a. Dorsal view of olfactory system. b. Horizontal section of olfactory sac. c. Horizontal section of the coupling olfactory nerve and olfactory bulb. d. coronal section of olfactory bulb;
OS: olfactory sac; ON: olfactory nerve; OB: olfactory bulb;
T: telencephalon; A: anterior of olfactory sac; P: posterior of olfactory sac; OL: olfactory lamellae; POL:primary olfactory lamellae; SOL: secondary olfactory lamellae; D: dorsal field;
L: lateral field; M: medial field; V: ventral field.

L. lateral field, M. medial field, V. ventral field.

胞、纤毛感受细胞、支持细胞和基细胞(图 2)。两 侧嗅囊中的嗅觉感受神经元的轴突会聚形成一对 嗅神经,在全长 17 cm 的中华乌塘鳢中,嗅神经 可以超过 1 cm。嗅神经从嗅囊的腹后侧发出到达 嗅球。中华乌塘鳢的嗅球呈长卵圆形,与端脑联 结。中华乌塘鳢的嗅球为无柄嗅球(sessile olfactory bulb)。从表层到深层,嗅球可分为 3 层: 1)嗅 神经层(olfactory nerve layer, ONL),含嗅觉感受 神经元的轴突; 2)嗅小球和僧帽细胞层(glomerular and mitral cell layer, G&ML),嗅觉感受神经元的 轴突和次级神经元(僧帽细胞)的树突间的突触形 成嗅小球,僧帽细胞体散布于嗅小球的周围; 3) 颗粒细胞层(granule cell layer, GL),密布着小的 颗粒细胞(图 3)。在嗅觉系统中,嗅神经束中的传 入神经元到达嗅球的前部,然后进入嗅球表层, 终止于嗅小球和僧帽细胞层,与僧帽细胞的树突 形成突触。嗅神经层在嗅球的腹侧部较厚,在背 中部较薄;嗅小球和僧帽细胞层在嗅球的中部较 薄,在侧部较厚(图 3)。



图 2 中华乌塘鳢嗅板的结构特征 a.H-E 染色示嗅上皮细胞; b.HE 染色示嗅上皮轴突.Ax:轴突; BC:基细胞; CN:纤毛非感受细胞; CR:纤毛感受细胞; De:树 突; SC:支持细胞.

Fig. 2 Structure of olfactory lamellae of *Bostrichthys sinensis* (Lacépède)

 a. HE staining of cells in olfactory epithelium. b. HE staining of axon in olfactory epithelium. Ax:axon; BC:basal cell; CN: ciliated non-receptor cell; CR: ciliated receptor cell; De: dendrite; SC: supporting cell.

2.2 孕酮受体免疫阳性细胞在中华乌塘鳢嗅觉系统中的分布

免疫细胞化学研究结果表明,孕酮受体免疫 阳性细胞在性成熟中华乌塘鳢嗅觉系统的嗅上 皮、嗅神经和嗅球均有分布,免疫阳性由强到弱 依次为:嗅上皮(图 4a)、嗅球(图 4c)、嗅神经(图 4b)。在嗅上皮上,孕酮受体免疫阳性反应主要发 生在细胞核上,阳性细胞在嗅板上皮层分布较广, 密集分布在上皮层中部的纤毛感受细胞上(图 4d)。阳性细胞在嗅板上的分布有如下特点:1)嗅 板基部阳性细胞数量较多,离基部越远数量越少, 这种现象明显见于最长嗅板;2)初级嗅板阳性细 胞数量多于次级嗅板;3)短嗅板阳性细胞数量多 于长嗅板。在嗅神经上发现有神经胶质细胞的细



图 3 中华乌塘鳢嗅球的结构特征

a.嗅球冠状切面; b.嗅球冠状切面腹侧部局部放大. D: 背部; G:嗅小球; GL: 颗粒细胞层; G&ML: 嗅小球和僧帽细胞层; GC:颗 粒细胞; L: 侧部; M: 中部; MC:僧帽细胞; ONL:嗅神经层; V:腹部.

Fig. 3 Structure of olfactory bulb of Bostrichthys sinensis (Lacépède)

a. Coronal section of olfactory bulb. b. Magnification image of coronal section through ventral lateral field of olfactory bulb. D: dorsal field; G: olfactory glomeruli; GL: granule cell layer; G&ML: glomerulus and mitral cell layer; GC: granule cell; L: lateral field; M: medial field; MC: mitral cell; ONL: olfactory nerve layer; V: ventral field.



图 4 孕酮受体免疫阳性细胞在性成熟中华乌塘鳢嗅觉系统中的分布

a. 嗅上皮孕酮受体免疫阳性染色; b. 嗅神经孕酮受体免疫阳性染色. c. 嗅球孕酮受体免疫阳性染色. d.嗅上皮阴性对照. e. 嗅 神经阴性对照. f. 嗅球阴性对照. I-CR: 免疫阳性纤毛感受细胞; I-C: 免疫阳性细胞; I-MC: 免疫阳性僧帽细胞; VM: 血管壁. Fig. 4 Distribution of PR positive cells in olfactory system of *Bostrichthys sinensis* (Lacépède)

a. PR positive immunoreactivity of olfactory epithelium. b. PR positive immunoreactivity of olfactory nerve. c. PR positive immunoreactivity of olfactory bulb. d. negative control of olfactory epithelium. e. negative control of olfactory nerve. f. negative control of olfactory bulb. I-CR: positive immunoreactive ciliated receptor cell; I-C: positive immunoreactive cell; I-MC: positive immunoreactive mitral cell; VM: vascular wall.

胞核和细胞膜免疫阳性反应, 血管壁细胞也有免疫阳性反应(图 4e)。嗅球孕酮受体免疫阳性细胞

定位在嗅小球和僧帽细胞层, 僧帽细胞的细胞核 和细胞质都有免疫阳性反应(图 4f)。嗅球侧部和 腹部的孕酮受体免疫阳性细胞数量分别多于中部 和背部。阴性对照未见孕酮受体免疫阳性反应(图 4a、4b、4c)。

2.3 中华乌塘鳢嗅觉系统孕酮受体免疫阳性细胞 数量

从表 1 看出, 性成熟中华乌塘鳢雄鱼和雌鱼 性腺指数(GSI)分别显著(*P*<0.05)高于性未成熟雄 鱼和雌鱼。免疫细胞化学研究结果表明, 嗅觉系 统中孕酮受体免疫阳性细胞数量与性腺发育程度 有明显的关系, 性成熟雄鱼和雌鱼孕酮受体免疫 阳性细胞数量高于性未成熟雄鱼和雌鱼(P<0.05), 与 GSI 的变化呈正相关关系。性成熟雄鱼和雌鱼 嗅上皮的孕酮受体免疫阳性细胞数量分别显著或 极显著(P<0.05或P<0.01)高于性未成熟雄鱼和 雌鱼。性成熟中华乌塘鳢嗅神经上有孕酮受体免 疫阳性细胞,但性未成熟中华乌塘鳢嗅神经上未 发现孕酮受体免疫阳性细胞。性成熟雄鱼和雌鱼 嗅球上孕酮受体免疫阳性均高于性未成熟雄鱼和 雌鱼,但雄鱼孕酮受体免疫阳性细胞数量在性成 熟和性未成熟个体之间没有显著差异(P>0.05)。

衣 】 中午与据短住脉泪效性暌见尔统中子酮文件先发阻住细胞效果的比较

Tab. 1 Variation of GSI value and PR positive cells in olfactory system of mature and immature *Bostrichthys sinensis* (Lacépède) n=5; $\overline{x} \pm SE$

				· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
指标 indicator			性未成熟 immature	性成熟 mature
性腺指数/%	GSI	ð	0.0435 ± 0.0143	0.164 ± 0.0480 *
		Ŷ	7.654 ± 1.181	$15.881 \pm 6.406^*$
阳性细胞数量 positive cell number	OE	3	101.954 ± 15.243	$186.262 \pm 37.401^*$
		Ŷ	91.497 ± 27.728	$245.736 \pm 61.531^{**}$
	ON	ð	0	$4.496 \pm 4.021^{**}$
		Ŷ	0	$9.803 \pm 8.646^{**}$
	OB	ð	10.893 ± 8.151	17.982 ± 11.619
		Ŷ	18.597 ± 11.454	$32.501 \pm 20.608^{*}$

注: OE: 嗅上皮; ON:嗅神经; OB:嗅球; *表示性成熟与性未成熟组间差异显著(P<0.05); **表示表示性成熟与性未成熟组间差异极显著 (P<0.01).

Note: OE: olfactory epithelium; ON: olfactory nerve; OB: olfactory bulb. * donates significant differences between immature and immature group (P<0.05), ** donates extremely significant differences between immature and immature group (P<0.01).

3 讨论

本研究表明,中华乌塘鳢孕酮受体免疫阳性 主要定位在嗅板上皮层中部的纤毛感受细胞的细 胞核上。马细兰等^[4]发现中华乌塘鳢嗅上皮对孕 酮类激素 17α-P 和 17α, 20β-P 刺激产生的嗅电反 应主要来自纤毛感受细胞密集分布的部位,因此, 结合本研究结果可以推断,中华乌塘鳢纤毛感受 细胞上的孕酮受体能够与 17α-P 和 17α,20β-P 结合, 把性信息素的化学信号转换为电信号,然后通过 嗅觉感受神经元的轴突将信号传入脑中。

本研究发现在中华乌塘鳢嗅神经的血管壁细 胞也有孕酮受体免疫阳性反应,提示血管壁细胞 上孕酮受体的作用可能是能与循环系统中的孕酮 结合,介导孕酮的生理生化作用。嗅球上的孕酮 受体免疫阳性定位在嗅小球和僧帽细胞层,这一 层是嗅觉初级感受神经元和次级感受神经元传递 信息的部位。中华乌塘鳢嗅神经和嗅球上孕酮受 体的作用可能是接受鱼体内孕酮的信号,生殖季 节孕酮受体数量增多可能起到增强中华乌塘鳢嗅 觉器官对性信息素的感受作用。国外的一些研究 也有类似的发现,在一些硬骨鱼类,如拉利毛足鲈 (*Colisa lalia*)^[8]、条斑星鲽(*Verasper moseri*)^[9]和印 度鲮(*Cirrhinus mrigala*)^[10]的嗅上皮和嗅球中都 发现垂体促性腺激素释放激素(GnRH)受体的免 疫阳性反应,而且印度鲮嗅球 GnRH 受体免疫阳 性的强弱和性腺成熟过程相关,研究结果提示, 鱼类嗅觉器官 GnRH 受体可以调节嗅觉器官对性 信息素的敏感性,促进生殖行为反应。Karen 等^[11] 应用 qRT-PCR 测定了高度群居的非洲丽鱼(*Astato*- *tilapia burtoni*)嗅球 5 种性类固醇受体(ER α , ER β a, ER β b, AR α , AR β)、2 种 GnRH 受体(GnRH-R1 和 GnRH-R2)和芳香化酶的 mRNA 水平, 研究结果 表明, mRNA 水平与雌雄性别、雌鱼的性成熟度等 因素有关, 并认为植入体内的雄激素可以作用于 嗅球, 然后将信息传到嗅上皮上, 从而调节嗅上 皮的敏感性。

本研究发现,中华乌塘鳢嗅觉系统孕酮受体 免疫阳性细胞数量的变化与其性成熟度呈正相关 的关系, 性成熟中华乌塘鳢嗅觉系统孕酮受体免 疫阳性细胞数量高于性未成熟鱼。作者先前研究 了中华乌塘鳢嗅觉系统中 PGE2 受体的 4 种亚型 EP1-4 的数量变化与性成熟度的关系、也获得了相 似的结果、即性成熟个体的 PGE₂ 受体数量高于 性未成熟个体^[6]。马细兰等^[4]以 17α-P 和 17α, 20β -P 作为性信息素刺激中华乌塘鳢的嗅觉上皮, 结果表明性成熟个体对刺激产生的嗅觉电位高于 性未成熟个体、结合本研究结果、可以进一步证 实 17α -P 和 17α , 20β -P 是中华乌塘鳢的性信息素。 鱼类对性信息素的敏感性与其性成熟度的关系在 黑口新虾虎鱼 (Neogobius melanostomus)^[12-14], 鲤 (Cyprinus carpio)^[15], 红鳍银鲫 (Puntius schwanenfeldi Bleeker), 银无须鈚 (Puntius gonionotus)^[16]、雄大西洋鲑(Salmo salar)^[17]和雄褐鳟 (Salmo trutta)^[18]等中已有报道。

Creese 等^[19]和 Habibi 等^[20]提出假说认为, 嗅 觉的敏感性可以通过嗅觉受体的活性和数量来调 节。组织学研究发现, 中华乌塘鳢嗅上皮纤毛感 受细胞的形态可随不同的发育阶段而有变化, 性 成熟个体嗅上皮纤毛感受细胞的嗅结既有较扁平 的也有较饱满的, 而性未成熟鱼没有扁平状嗅结, 推测具有扁平状嗅结的纤毛感受细胞是能够感受 性信息素的细胞^[21]。 Hamdani 等^[22]也发现鲤 (*Cyprinus carpio*)嗅上皮上的一种被认为可以感 受性信息素刺激的嗅觉感受神经元—隐窝细胞 (crypt cell), 在不同的季节其在嗅上皮上的分布 有所变化, 夏季产卵季节分布于嗅上皮的外表面, 春季分布于嗅上皮的深部, 作者推测这样的分布 有利于鲤在产卵季节感受性信息素的刺激。生殖 季节中华乌塘鳢嗅上皮孕酮受体免疫阳性细胞数 量高于非生殖季节,很可能是由于在非生殖季节 嗅上皮上孕酮的受体蛋白结合位点被隐藏或异构 化;而当生殖季节来临时,这些受体蛋白结合位 点重新暴露出来或构象发生了变化,有利于 17α -P和 17α , 20β -P的结合,从而提高中华乌塘鳢 对 17α -P和 17α , 20β -P的嗅觉敏感性^[17]。

参考文献:

- [1] 宋天复.鱼类的化学通讯[J].水产学报, 1987, 11(4): 359–371.
- [2] 马细兰, 洪万树, 张其永, 等. 中华乌塘鳢嗅觉器官的形态结构[J].中国水产科学, 2005, (12)5: 525–532.
- [3] 洪万树,赵卫红,马细兰,等.性外激素诱发中华乌塘鳢 产卵的初步研究[J].水产学报,2004,28(3):225-230.
- [4] 马细兰,洪万树,柴敏娟,等.中华乌塘鳢对性外激素嗅
 电反应的比较[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2003,42(6):
 781–786.
- [5] de Souza F M S, Antunes G. Biophysics of olfaction [J].Rep Prog Phys, 2007, 70: 451–491.
- [6] Lai X J, Hong W S. Variation with reproductive status of PGE2 receptor immunoreactivities in the *Bostrichthys sinen*sis olfactory system [J]. J Fish Biol, 2010, 77: 1542–1551.
- [7] Khan F A, Jain M R, Saha S G, et al.FMRFamide-like immunoreactivity in the olfactory system responds to morphine treatment in the teleost *Clarias batrachus*: involvement of opiate receptors [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 110: 79–87.
- [8] Yamamoto N, Oka Y, Amano M, et al. Multiple gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive systems in the brain of the dwarf gourami, *Colisa lalia*: immunohistochemistry and radioimmunoassay [J]. J Comp Neurol, 1995, 355: 354–368.
- [9] Amano M, Oka Y, Yamanome T, et al. Three GnRH systems in the brain and pituitary of a pleuronectiform fish, the barfin flounder *Verasper moseri* [J]. Cell Tissue Res, 2002, 309: 323–329.
- [10] Biju K C, Singru P S, Schreibman M P, et al.Reproduction phase related expression of GnRH-like immunoreactivity in the olfactory receptor neurons, their projections to the olfactory bulb and in the nervus terminalis in the female Indian major carp *Cirrhinus mrigala* (Ham.) [J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 133: 358–367.
- [11] Karen P M, Russel D F.Reproductive status regulates ex-

pression of sex steroid and GnRH receptors in the olfactory bulb [J]. Behav Brain Res, 2010, 213: 208–217.

- [12] Zielinski B, Arbuckle W, Belanger A, et al. Evidence for the release of sex pheromones by male round gobies (*Neogobius melanostomus*) [J]. Fish Physio Biochem, 2003, 28: 237– 239.
- [13] Belanger A J, Arbuckle W J, Corkum L D, et al. Behavioural and electrophysiological responses by reproductive female *Neogobius melanostomus* to odors released by conspecific males [J]. J Fish Biol, 2004, 65: 933–946.
- [14] Belanger R M, Corkum L D, Zielinski B S. Differential behavioral responses by reproductive and non-reproductive male round gobies (*Neogobius melanostomus*) to the putative pheromone estrone [J].Comp Biochem Physiol A, 2007, 147: 77–83.
- [15] Irvine I A S, Sorensen P W. Acute olfactory sensitivity of wild common carp, *Cyprinus carpio*, to goldfish hormonal sex pheromones is influenced by gonadal maturity [J].Can J Zool, 1993, 71: 2199–2210.
- [16] Cardwell J R, Stacey N E, Tan E S P. Androgen increases

olfactory receptor response to a vertebrate sex pheromone [J]. J Comp Physiol A, 1995, 176: 55–61.

- [17] Moore A, Waring C P. Electrophysiological and endocrinological evidence that F-series prostaglandins function as priming pheromones in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* parr) [J]. J Exp Biol, 1996, 199: 2307–2316.
- [18] Moore A, Olsen K H, Lower N. The role of F-series prostaglandins as reproductive priming pheromones in the brown trout (*Salmo trutta*) [J].J Fish Biol, 2002, 60: 613–624.
- [19] Creese I, Sibley D R.Receptor adaptations to centrally acting drugs [J].Annu Rev Pharmacal Toxicol, 1981, 21: 357–391.
- [20] Habibi H R, de Leeuw R, Nahorniak C S. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish: seasonal and gonadal effects [J].Fish Physiol Biochem, 1989, 7: 109–118.
- [21] 马细兰.中华乌塘鳢嗅觉器官及其对性外激素嗅电反应的 研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2004: 41-42.
- [22] Hamdani E H, Lastein S, Gregersen F. Seasonal variations in olfactory sensory neurons - fish sensitivity to sex pheromones explained [J]. Chem Senses, 2008, 33: 119–123.

Progesterone receptor immunoreactivities in *Bostrichthys sinensis* (Lacépède) olfactory system

LAI Xiaojian^{1,2}, HONG Wanshu^{1,2,3}, WANG Guizhong^{1,2}, MA Xilan^{1,2}, ZHANG Qiyong^{1,2}, WANG Qiong^{1,2}

1. Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. University Key Laboratory for Exploitation and Conservation of Marine Biological Resources, Xiamen University,

Xiamen 361005, China 3. Fishery College, Xiamen University, Xiamen 361021, China

Abstract: We evaluated the morphology and structure of the olfactory system in the Chinese black sleeper, Bostrichthys sinensis (Lacepede) using histology. The olfactory system consisted of the olfactory sac, olfactory nerve, and olfactory bulb. The olfactory sac (the rosette) was fusiform in shape and located inside the olfactory chamber, which had two openings that allow water to flow through the rosette as the fish moves. There were 10-16 primary olfactory lamellae radiating from the wall of the olfactory chamber. These lamellae were longitudinally arranged and parallel to each other. The primary olfactory lamellae differed in their height and some possessed secondary olfactory lamellae. Olfactory lamellae were composed of the olfactory epithelium and central core. The olfactory epithelium consisted primarily of ciliated receptor cells, ciliated non-receptor cells, supporting cells, and basal cells. The axons of the primary olfactory receptor neurons in each rosette converged to form a pair olfactory nerves that exceeded 1 cm in length in a 17 cm fish. The paired olfactory nerves extended from the posterior ventral base of each rosette to the ipsilateral olfactory bulb. The two olfactory bulbs, in close contact with the telencephalon, were slightly oval and sessile. Each olfactory bulb consisted of three, roughly distinguishable layers, in order from the surface: (1) the olfactory nerve layer, containing the axons of the olfactory receptor neurons, (2) the glomerular and mitral cell layer, where the axons of the olfactory receptor neurons arborized into glomeruli and the secondary neurons (mitral cells) were scattered around glomeruli, and (3) the granule cell layer, consisting of densely-packed small size cells. Afferent fibers of nerve bundles reached the anterior bulb, spread along the periphery of the bulb and terminated on the dendrites of mitral cells in the glomerular and mitral cell layer. The olfactory nerve layer extended more caudally in the ventral lateral field than in the dorsal medial field. The glomerular and mitral cell layer was thinner in the medial field than in the lateral field of the olfactory bulbs. Using immunocytochemistry SABC, we determined the distribution and numbers of progesterone receptor immunoreactive cells in the B. sinensis olfactory system. Progesterone receptors were present in the olfactory system of the fish, with the largest number of PR immunoreactive cells occurring in the olfactory epithelium, followed by the olfactory bulb and the olfactory nerve. PR immunoreactivity was confined to the cell nucleus in the olfactory epithelium. We only observed a few neurons that were immunostained with antibodies against PR in the olfactory nerve in mature fish. In addition, we noted the presence of some PR immunoreactive cells on the vascular wall during the spawning season. We observed a higher density of PR immunoreactive cells in the olfactory bulb. The immunoreactive intensity in the bulb was higher in the lateral field and ventral fields than in the mid and dorsal fields, respectively. In the sections that were immunostained with antibodies against PR, we observed immunoreactive mitral cells in the glomerular and mitral cell layers. The numbers of immunoreactive cells were linked to the reproductive status of the fish. In the olfactory epithelium, the numbers of immunoreactive cells in mature males and females was significantly (P < 0.05 or P < 0.01) higher than in immature males and females. Similarly, immunoreactive cells were not detected in the olfactory nerve in immature fish. The numbers of immunoreactive cells in the olfactory bulb was significantly (P < 0.05) higher in mature females than in immature females. To our knowledge, this is the first report documenting the distribution of immunoreactive progesterone receptor cells in the olfactory system of a teleost.

Key words: *Bostrichthys sinensis*; olfactory system; progesterone receptor; immunocytochemistry Corresponding author: HONG Wanshu. Tel: 0592–2186495; E-mail: wshong@xmu.edu.cn