

河北环毛蚓神经系统 一氧化氮合酶的组织化学定位*

王晓安 郑哲民

(陕西师范大学生命科学院动物研究所 西安 710062)

摘要: 用依赖还原型辅酶 II 的黄递酶组织化学方法,研究了环节动物门寡毛纲种类河北环毛蚓 (*Pheretima tschiliensis*) 神经系统中一氧化氮合酶(NOS)阳性细胞及阳性纤维的分布。结果表明,河北环毛蚓神经系统中脑神经节背侧有大量细胞呈现 NOS 强阳性反应,胞体和突起染色明显。咽下神经节中偶尔能见少数染色较浅的神经元。在脑神经节腹内侧、围咽神经、咽下神经节外侧部及腹神经链中都有一氧化氮合酶阳性纤维存在且染色很深。实验结果表明,在环节动物中作为信息分子的一氧化氮已广泛存在于神经系统中。

关键词: 河北环毛蚓; 神经系统; 一氧化氮合酶; 组织化学

中图分类号: Q954.52 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)02-06-04

Histochemical Localization of Nitric Oxide Synthase in the Nervous System of Earthworm

WANG Xiao-An ZHENG Zhe-Min

(College of Life Science, Shaanxi Normal University Xi'an 710062, China)

Abstract: The distribution of nitric oxide synthase (NOS) positive cells and fibers in the nervous system of earthworm (*Pheretima tschiliensis*) was studied with NADPH-diaphorase histochemical method. The intense staining was localized in many neurons in the dorsal part of cerebral ganglion. The somatas and processes were stained obviously. A few weakly stained neurons were observed occasionally in subpharyngeale. A strongly NOS positive tract from ventromedial of cerebral ganglion, through circumpharyngeal nerve into subpharyngeale ganglion and all ganglia of ventral nerve chain was observed. The results of this study indicate that nitric oxide as a message molecular existes in the nervous system of Annelidan.

Key words: *Pheretima tschiliensis*; Nervous system; Nitric oxide synthase (NOS); Histochemistry

近年来大量的研究证明一氧化氮在许多生理过程中具有十分重要的生理意义,如在免疫、心血管和神经系统中发挥重要作用。有人称之为一种“新的信使分子”。内源性 NO 由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 L-Arg 氧化而来,该反应需要 NADPH 和氧气(O₂)作为反应的辅助底物。一氧化氮合酶广泛存在于神经

系统中,也是神经组织中的一种合成酶,其解剖学分布可通过黄递酶(NADPH-d)组织化学方法

* 山东省自然科学基金(No. Y95D0851);

第一作者介绍 王晓安,男,37岁,副教授,博士研究生;研究方向:无脊椎动物比较神经解剖学;工作单位:烟台师范学院生物科学与技术系,烟台 264025;E-mail: wangxiaonan@163.com。

收稿日期:2001-04-05,修回日期:2001-11-12

进行观察^[1]。但目前对神经系统中一氧化氮的研究主要集中在哺乳动物,关于环节动物神经系统一氧化氮或一氧化氮合酶的研究仅见有关水蛭的报道^[2-6],其它种类的研究报道很少。环毛蚓属环节动物门、寡毛纲典型的代表动物,其神经系统属于典型的链式结构,是无脊椎动物神经系统演化中的重要阶段。对其神经系统及其递质特点的研究对于探讨动物系统发育和演进有很重要的意义。

本实验用河北环毛蚓为实验材料,用一氧化氮合酶组织化学方法对其神经系统一氧化氮合酶阳性神经元的分布进行了研究,本研究不仅为环节动物神经系统中一氧化氮的分布提供形态学资料,也为研究一氧化氮神经元在动物系统发育过程中的演变情况提供资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 河北环毛蚓于 2000 年 4~5 月采自山东省烟台师范学院校园,实验室暂养,选取健壮无伤的个体为实验对象。

1.2 实验方法 材料经体腔注射 4% 多聚甲醛(0.1 mol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲液配制),4℃ 固定 24 h,然后解剖出完整神经链。取部分材料进行 NOS 整体染色:材料经 0.05 mol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲液生理盐水(0.9% NaCl; PBS)漂洗 3 × 10 min,再放入含有 0.1 mg/ml 氯化硝基氮蓝四唑(NBT, sigma 产品);0.05 mol/L, PBS; 0.3% Triton X-100 的 NOS 预反应液 4℃ 孵育 12~24 h。然后入 NOS 反应液。反应液中含有 1 mg/ml 还原型辅酶 II (β -NADPH, Sigma 产品); 0.1 mg/ml 氯化硝基氮蓝四唑(NBT); 0.05 mol/L PBS; 0.3% Triton X-100; 37℃ 反应 30~60 min, 经 0.05 mol/L, pH 7.4 的 PBS 漂洗过夜(4℃)。将材料贴于载玻片,室温凉干。

另取一些材料,分别取下脑和咽下神经节,冰冻切片 40~50 μ m,然后直接入 NOS 反应液, 37℃ 反应 30 min,经 0.05 mol/L, pH 7.4 的 PBS 漂洗 3 × 10 min。贴片,室温凉干。

材料经常规梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封固、镜检、拍照、记录结果。实验中设

β -NADPH 空白对照,结果为阴性。

2 结 果

2.1 神经系统的一般结构 河北环毛蚓神经系统包括脑神经节、围咽神经、咽下神经节、腹神经链及各神经节发出的神经。神经元胞体主要分布在各神经节,围咽神经以及各神经节发出的神经中无神经元胞体。

2.2 神经系统中 NOS 阳性反应细胞和纤维的分布

2.2.1 脑神经节 在脑神经节背侧有大量典型的神经细胞呈现很强的 NOS 阳性反应(图版 I:A, B, C)。这些 NOS 阳性神经元染为深蓝色,胞体及突起均着色,胞核清亮不着色(图版 I:D)。胞体直径约为 10 μ m,有多个明显的突起(图版 I:D)。胞体层的胞体突起向脑神经节腹内侧延伸形成了神经纤维网(图版 I:A)。在靠近围咽神经处,中央纤维网中的纤维分别向两侧汇集成一束粗大的神经纤维束,经过围咽神经,进入咽下神经节,一直贯穿于整个腹神经链。这些纤维 NOS 阳性反应强烈、染色很深(图版 I:A, E, F)。

2.2.2 咽下神经节(图版 I:E) 在咽下神经节的胞体层中偶尔能观察到少数 NOS 阳性反应很弱的神经元。神经节中央有少数阳性神经纤维,两侧为反应较强的阳性纤维束。

2.2.3 腹神经链(图版 I:F) 腹神经链中的神经节中无明显的 NOS 阳性神经细胞存在。不同体节神经节也未见明显差异。整个腹神经链的外侧部各有一束染色很深的 NOS 阳性纤维束。由腹神经节发出的神经也无 NOS 阳性神经细胞存在,而其神经纤维呈现强烈的 NOS 阳性反应。

3 讨 论

一氧化氮是一种性质活泼的气体分子,在神经系统中发挥重要作用。但迄今为止尚无直接有效地检测组织中一氧化氮含量及分布的方法,而一氧化氮合酶的分布可提示组织中一氧化氮的分布情况。本实验用 NADPH-d 酶法观

察了一氧化氮合酶阳性神经元在河北环毛蚓神经系统中的分布。结果证明该方法能够十分清楚地显示神经节中 NOS 阳性细胞的胞体及突起,而且能够准确追踪阳性反应纤维的走向。

河北环毛蚓神经系统中一氧化氮合酶阳性细胞主要集中在脑神经节中,脑神经节中的 NOS 阳性反应细胞数目较多,胞突明显,染色很深。Leake 和 Moroz 在环节动物的水蛭 (*Hirudo medicinalis*) 神经系统 NOS 组织化学定位研究结果表明,在水蛭体神经节腹侧部的初级感觉神经元、运动神经元和中间神经元有较强的阳性反应,生殖体节的神经节还表现出比其它神经节的阳性细胞要多,而在头部和尾部神经节以及体神经节背侧部则缺乏染色细胞,水蛭整个神经系统中约有 12% ~ 15% 的神经元呈 NOS 阳性反应^[4]。这一结果与本研究的结论有很大差异,这可能与这两类动物在生活习性、运动方式、生活环境及食性的不同有很大关系。因为 Moroz 在对软体动物各纲不同种类神经系统 NOS 细胞的分布模式进行比较时已经发现,捕食性种类的中央运动神经元标记较多,草食性种类的外周感觉细胞标记的较多,同样陆生、淡水生和海生种类之间也表现出很大的不同^[7]。

尽管目前关于一氧化氮在环节动物中的功能所知甚少,Chen^[2],Shafer^[3],Leake^[4,5]等对水蛭的研究表明,损伤诱导型一氧化氮在神经再生和修复过程中起着重要作用,神经元非诱导型一氧化氮的功能还不清楚。

本文为研究蚯蚓脑的功能从组织化学方面提供了形态学资料,用 NADPH-d 法显示的 NOS 阳性细胞为多突起神经细胞,其形状类似于高等脊椎动物的多极神经元,这一结果是否意味着环节动物与脊椎动物之间存在某种联系,有待于进一步的深入研究。

参 考 文 献

[1] 钟慈声,孙安阳编. 一氧化氮的生物医学. 上海:上海医科大学出版社,1997. 3 ~ 167.
 [2] Chen A, Kumar S M, Sahley C L *et al.* Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the

leech CNS. *J Neurosci*, 2000, 20(3):1 036 ~ 1 043.

[3] Shafer O T, Chen A, Kumar S M *et al.* Injury-induced expression of endothelial nitric oxide synthase by glial and microglial cells in the leech central nervous system within minutes after injury. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1998, 265(1 411):2 171 ~ 2 175.
 [4] Leake L D, Moroz L L. Putative nitric oxide synthase (NOS)-containing cells in the central nervous system of the leech, *Hirudo medicinalis*. *Brain Res*, 1996, 723(1 ~ 2):115 ~ 124.
 [5] Leake L D, Davis M P, Chen D *et al.* An unique model for the analysis of neuronal nitric oxide signaling: the leech CNS. *Acta Biol Hung*, 1995, 46(2 ~ 4): 135 ~ 143.
 [6] Elofsson R, Carlberg M, Moroz L L *et al.* Is nitric oxide (NO) produced by invertebrate neurons? *Neuroreport*, 1993, 4(3): 279 ~ 282.
 [7] Moroz L L. Giant identified NO-releasing neurons and comparative histochemistry of putative nitrergic systems in gastropod mollusks. *Microsc Res Tech*, 2000, 49(6):557 ~ 569.

图 版 说 明

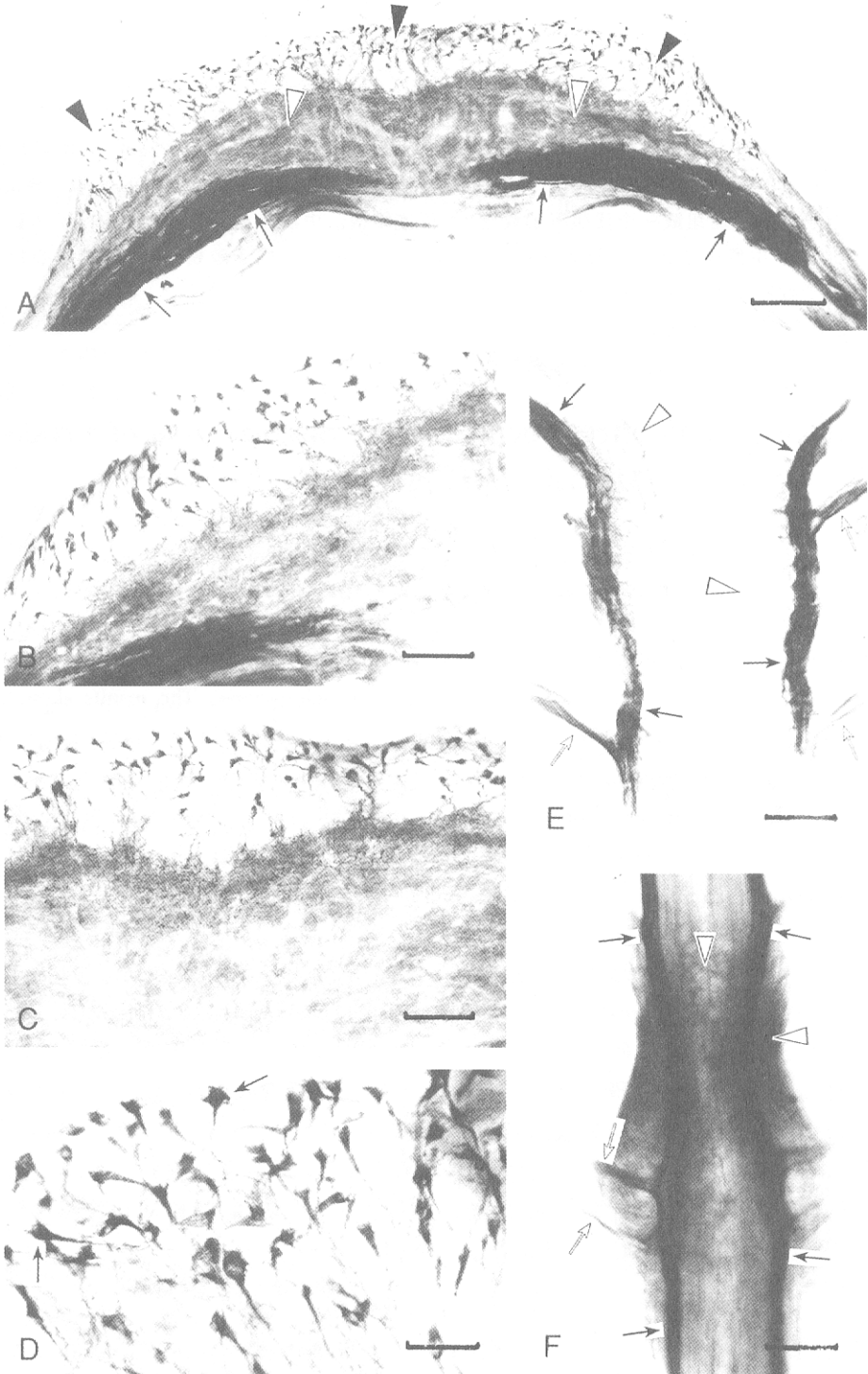
A. 脑神经节的横切,示 NOS 阳性细胞层(▲),NOS 阳性纤维网(△),NOS 阳性纤维束(↑)。比例尺 = 100 μm [Transverse section of cerebral ganglion, showing NOS positive cell layer(▲), NOS positive neuropile(△) and NOS positive fiber tract(↑). Scale bar = 100 μm]
 B. 脑神经节背外侧的 NOS 阳性细胞及阳性纤维。比例尺 = 50 μm [The NOS positive cells and fibers in dorsal lateral of cerebral ganglion. Scale bar = 50 μm]
 C. 脑神经节背内侧的 NOS 阳性细胞层和纤维网。比例尺 = 50 μm [The NOS positive cell layer and neuropile in dorsal median of cerebral ganglion. Scale bar = 50 μm]
 D. 脑神经节部分 NOS 阳性细胞的放大图,示阳性细胞形态(↑)。比例尺 = 25 μm [Some NOS positive cells of cerebral ganglion, showing morpha of the positive cells(↑). Scale bar = 25 μm]
 E. 咽下神经节的水平切,示 NOS 阳性纤维网(△),NOS 阳性纤维束(↑),咽下神经节发出的 NOS 阳性神经(◇)。比例尺 = 50 μm [Horizontal section of subpharyngeal ganglion, showing NOS positive neuropile(△), NOS positive tract(↑) and NOS positive tract from subpharyngeal ganglion(◇). Scale bar = 50 μm]
 F. 部分腹神经链的整体染色,示 NOS 阳性纤维网(△),NOS 阳性纤维束(↑),NOS 阳性神经(◇)。比例尺 = 100 μm [Part of whole-mount stained ventral nerve chain, showing NOS positive neuropile(△) and NOS positive tract(↑), NOS positive never fiber(◇). Scale bar = 100 μm]

王晓安等:河北环毛蚓神经系统一氧化氮合酶的组织化学定位

图版 I

WANG Xiao-An *et al.*: Histochemical Localization of Nitric Oxide Synthase in the Nervous System of Earthworm

Plate I



图版说明见文后