

两种软体动物神经系统一氧化氮合酶的组织化学定位

王晓安^① 刘丽^② 郑哲民^①

(①陕西师范大学动物研究所 西安 710062; ②南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘要:运用一氧化氮合酶(NOS)组织化学方法研究了软体动物门双壳纲种类中国蛤蜊和腹足纲种类嫁蠣神经系统中NOS阳性细胞以及阳性纤维的分布。结果表明:在蛤蜊脑神经节腹内侧,每侧约有10~15个细胞呈强NOS阳性反应,其突起也呈强阳性反应,并经脑足神经索进入足神经节的中央纤维网中;足神经节内只有2个细胞呈弱阳性反应,其突起较短,进入足神经节中央纤维网中,但足神经节中,来自脑神经节阳性细胞和外周神经系统的纤维大多呈NOS阳性反应;脏神经节的前内侧部和后外侧部各有一个阳性细胞团,其突起分别进入后闭壳肌水管后外套膜神经和脑脏神经索。脏神经节背侧小细胞层以及联系两侧小细胞层的纤维也呈NOS阳性反应。嫁蠣中枢神经系统各神经节中没有发现NOS阳性胞体存在;脑神经节、足神经节、侧神经节以及脑-侧、脑-足、侧-脏连索中均有反应程度不同的NOS阳性纤维,这些纤维均源于外周神经。与已研究的软体动物比较,嫁蠣和前鳃亚纲其它种类一样,神经系统中NO作为信息分子可能主要存在于感觉神经。而中国蛤蜊的神经系统中一氧化氮作为信息分子则可能参与更广泛的神经调节过程。

关键词:中国蛤蜊;嫁蠣;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(2003)03-14-08

Histochemical Localization of Nitric Oxide Synthase in the Nervous Systems of two Molluscs

WANG Xiao-An^① LIU Li^② ZHENG Zhe-Min^①

(① Institute of Zoology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062;

② College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: The distribution of nitric oxide synthase (NOS) positive cells and fibers histochemically stained for NADPH diaphorase (a nitric oxide synthase) were studied in the nervous systems of two molluscs *Mactra (Mactra) chinensis* Philippi (Mollusca, Bivalvia) and *Cellana toreuma* (Mollusca, Gastropoda). The results indicate: there are about 10~15 NOS positive neurons on each side of the ventromedial cerebral ganglion. The positive processes of these neurons enter the neuropile of the pedal ganglion through the cerebropedal connective. The neuropile of the pedal ganglion has abundant positive fibers from the cerebral ganglion and peripheral pedal nerve. Only a few neurons in the pedal ganglion are had a weakly positive reactive. The processes of these neurons enter the neuropile

第一作者介绍 王晓安,男,38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;现工作单位:烟台师范大学生物科学与技术系,烟台 264025;E-mail:wangxiaoan@163.com。

收稿日期:2002-04-10,修回日期:2003-01-22

of the pedal ganglion also. Three groups of positive neurons distribute in the anteromedial, posterolateral and dorsal small neuron layer of the visceral ganglion. The positive processes of these neurons enter the mantle-siphon nerve, dorsal small neuron layer and cerebral-visceral connective. The dorsal small neurons and the connective fibers between the two sides of the visceral ganglion displayed an NOS positive reactive. There are no NOS positive neurons in the central nerve system of *C. toreuma*, but positive nerve fibers were widely distributed in the cerebral ganglia, pedal ganglia, pleural ganglia, cerebropedal connective, cerebropleural connective and pleurovisceral connective. The positive fibers in the *C. toreuma* central nerve system all originate from peripheral nerves. The results of this study indicate that nitric oxide as a messenger molecule may exist mainly in the sensory nerves of *C. toreuma*, but have a more wider range of neural regulation in the nervous system of *M. chinensis*.

Key words: *Mactra (Mactra) chinensis*; *Cellana toreuma*; Nervous system; Nitric oxide synthase (NOS); Histochemistry

近年关于软体动物神经系统一氧化氮及一氧化氮合酶的研究报道不少, Moroz 和 Gillette 对多板纲、腹足纲、头足纲的 20 多种软体动物一氧化氮及一氧化氮合酶进行了比较研究^[1]。一氧化氮作为信号分子参与软体动物的运动调节^[2~4]、学习记忆^[5~7]、机体防御^[8~11]等生理功能。但是,有关双壳类和低等腹足类的研究报道却很少。

中国蛤蜊 [*Mactra (Mactra) chinensis*] 属软体动物门双壳纲种类,为我国北部沿海习见种,穴居于低潮线附近的沙中^[12]。是双壳类神经解剖的一种好材料。目前仅见其神经系统大体解剖^[13]和显微结构的报道^[14]。嫁蟇 (*Cellana toreuma*) 属前鳃亚纲原始腹足目的软体动物,是腹足纲中较原始的种类,广泛分布于我国沿海^[12]。作者曾对其神经系统的大体解剖及显微解剖进行过研究^[15],有关这两种动物神经递质特点还未见有详细研究。

本文以中国蛤蜊和嫁蟇为实验材料,用一氧化氮合酶(NOS)组织化学定位的方法对其神经系统一氧化氮合酶(NOS)阳性神经元的分布和数量进行了研究,以期为研究软体动物神经系统提供形态学资料,也为进一步研究一氧化氮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

实验用中国蛤蜊购于烟台市场;嫁蟇采自烟台月亮湾、芝罘岛等海滨,动物暂养于实验室新鲜海水中,选取健壮无伤的个体为实验对象。

实验方法参照 Moroz 和 Gillette^[16]的方法修改。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,然后解剖出各神经节,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,部分神经节整体入含有 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 的一氧化氮合酶预反应液 4℃ 孵育 24 h,然后入一氧化氮合酶(NOS)反应液,反应液含有 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。另取中国蛤蜊部分神经节置入 4℃ 20% 蔗糖溶液(0.05 mol/L, pH 7.4 PBS 配制)至材料下沉,冰冻切片 12~15 μm,入 NOS 反应液 37℃,30 min。

染色反应的材料经 0.05 mol/L, pH 7.4 PBS 漂洗 3×10 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。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

经过对各神经节 NOS 整体染色和冰冻切片 NOS 染色的结果观察发现,中国蛤蜊脑、脏和足三对主要神经节及脑-脏、脑-足神经索中有 NOS 阳性细胞和纤维分布;嫁蟇各神经节中仅有阳性反应纤维而未见阳性反应胞体存在。

2.1 脑神经节 在中国蛤蜊脑神经节腹内侧的细胞层中有一 NOS 阳性细胞团,每侧大约有 15 个细胞,细胞体染色很深,胞体大小约 10 μm ,属于单极神经元。由其发出的阳性反应突起有明显的念珠状膨突,这些突起形成一纤维束经脑足神经索进入足神经节的中央纤维网。脑神经节中还有来自脏神经节的阳性纤维末梢(图版 I:1~3);在嫁蟇脑神经节背外侧部的神经纤维网中,有一束呈强 NOS 阳性反应的纤维来自触角神经,其末端终止于脑联合基部。脑与食道下神经节连索基部也有反应较强的 NOS 阳性纤维,在吻神经、脑侧连索基部也有少量 NOS 阳性纤维分布(图版 II:9~11)。

2.2 脏神经节 中国蛤蜊脏神经节前端背内侧中线附近有一阳性细胞团,包括 3 对短突起细胞和 1 对长突起细胞,短突起型细胞的突起终止于其附近的纤维网中。长突起型细胞的突起经交叉后沿中央纤维网中后行进入后闭壳肌、水管、后外套膜神经中。在脏神经节后外侧部胞体层中约有 6 对 NOS 阳性细胞构成的细胞团,部分细胞的突起经交叉后沿中央神经纤维网前行进入脑脏神经索,最后终止于脑神经节的中央纤维网和脑神经节 NOS 阳性细胞附近,部分短的突起前行终止于这一阳性细胞团前背侧的小细胞团中。在脏神经节背侧叶的纤维网中还可见有一阳性纤维束联系两侧呈 NOS 阳性反应小细胞层(图版 I:7,8);嫁蟇脏神经节中没有 NOS 阳性细胞和纤维分布。

2.3 足神经节 中国蛤蜊足神经节的胞体层后背侧足神经基部有一对弱阳性反应细胞,其突起进入足神经节的中央纤维网。进入足神经节的脑足神经索中可见反应很强的神经纤维,

神经纤维呈念珠状,膨突明显(图版 I:4~6)。该阳性纤维进入足神经节后分散于中央神经纤维网中,末端仍可见念珠状结构;嫁蟇足神经节中有细的 NOS 阳性纤维沿足神经节纵行分布,分散于中央神经纤维网中,有时纤维呈念珠状,膨突明显。足神经节联合部位无阳性细胞或纤维存在(图版 II:13,14)。

2.4 食道下神经节 嫁蟇食道下神经节中有丰富的 NOS 阳性纤维分布,这些纤维与脑神经节形成密切联系(图版 II:12)。

2.5 侧神经节 在嫁蟇左右两侧神经节中均有浅染的 NOS 阳性纤维,自脑-侧连索至侧神经节。侧-脏连索也有 NOS 阳性纤维存在,但不到达脏神经节(图版 II:15,16)。

3 讨 论

一氧化氮与静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)呼吸的中枢调节模式有关^[17],在胚胎发育过程中则主要参与感觉过程,中枢神经系统中的一氧化氮可作为信息分子参与取食活动模式的调节,如对其取食的初始化和取食模式的影响^[18]。在大蛞蝓(*Limax maximus*),一氧化氮参与嗅觉活动的调节。侧鳃(*Pleurobranchaea californica*)中枢神经系统中约有数百个 NADPH 阳性细胞,而软体动物的其它种类(*Philine*, *Aplysia*, *Tritonia*, *Flabellina*, *Cadina*, *Armina*, *Coriphella*, *Sepia*, *Rossia*)的阳性细胞染色相对较浅,侧鳃相对较高的 NOS 活性明显不同于其它的后鳃类,这也许与动物偶然的捕食性生活方式有关^[19]。双壳类软体动物(*Mizuhopecten yessoensis* 和 *Modiolus kurilensis*)中枢神经系统中 NADPH-d 组织化学研究发现,*M. yessoensis* 的 NOS 阳性细胞主要位于足神经节的背外侧和内侧部,轴突末梢在神经纤维网中形成密集的氮能神经丛,神经节间联系、脑侧联合和外周神经有染色的纤维,雌雄个体间未发现差异。*M. kurilensis* 中枢神经系统中未发现 NOS 阳性反应^[2]。

Moroz 和 Gillette^[1]通过对 20 多种软体动物一氧化氮及一氧化氮合酶的研究结果比较发现:(1)软体动物不同种类都存在一氧化氮依赖

性信号通路;(2)软体动物中一氧化氮合酶阳性神经元的演化趋势是由外周向中枢迁移;(3)一氧化氮信号分子的一个主要生理功能是反馈作用。一氧化氮合酶阳性细胞的分布模式在肉食性种类(主要是中枢运动神经元呈阳性反应)和植食性种类(主要是外周感觉神经细胞呈阳性反应)有明显差别,在陆生及淡水生种类和海水生种类之间也有明显差别。在所有研究种类的口神经节都具有一氧化氮活性反馈调节作用。

本研究结果显示,中国蛤蜊神经系统的脑、足、脏神经节中都有 NOS 阳性细胞分布,呈现脏 - 脑 - 足的支配顺序,脏神经节的阳性细胞数量较多,到达脑神经节的阳性纤维末梢终止于脑神经节 NOS 阳性反应细胞附近,另有一对阳性细胞其分支经外套膜 - 水管神经到达外套膜后部以及水管。脑神经节的阳性细胞少而集中,其突起全部进入足神经节的纤维网中。而足神经节 NOS 阳性纤维主要来自脑神经节,其自身的阳性细胞很少,其突起也不离开足神经节,来自外周足神经的阳性纤维,其起源部位不详,似应属于感觉神经纤维。从蛤蜊神经系统的 NOS 细胞的分布模式可以看出,一氧化氮在蛤蜊神经系统的功能似乎主要是中枢调节作用,可能对于足和水管的运动起着重要的调节作用。阳性细胞的分布模式与已经研究的双壳纲种类和其它软体动物都有着明显的差别。与腹足类软体动物不同,双壳类由于头部的退化,使脑神经节的结构相对比较简单,而脏神经节的结构却复杂的多^[14]。从 NOS 细胞的这种分布形式来看,脏神经节在整个调节联系中处于十分重要的位置。

根据整体染色和连续切片的观察,作者绘制出中国蛤蜊和嫁蟻神经系统中 NOS 阳性反应分布的模式图(图 1~4)。

由于对双壳纲种类神经系统一氧化氮的研究十分有限,因此目前很难对一氧化氮在双壳类软体动物的生理功能做出结论,还有待于从多方面对更多不同类群的深入研究,才能真正揭示一氧化氮这种信息分子在软体动物中的确切功能。

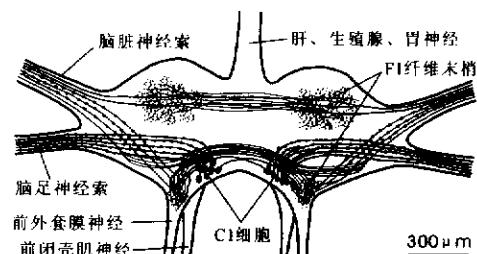


图 1 中国蛤蜊脑神经节 NOS 反应细胞模式图

C1 细胞: 脑神经节腹内侧的细胞层中的 NOS 阳性细胞团;
F1 纤维末梢: 来自脏神经节的阳性纤维末梢

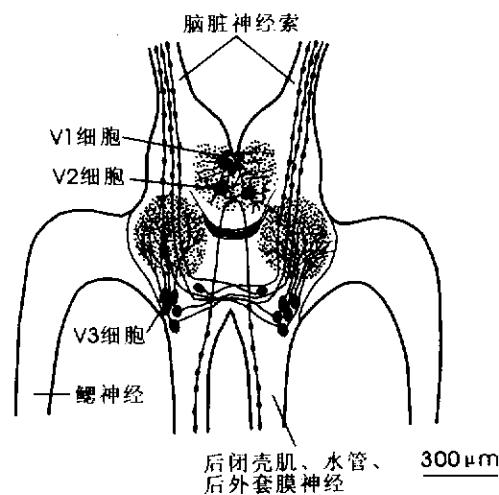


图 2 中国蛤蜊肝神经节 NOS 反应细胞分布模式图

V1 细胞: 神经节前端背内侧中线附近阳性细胞团中的 3 对短突起细胞; V2 细胞: 神经节前端背内侧中线附近阳性细胞团中的 1 对长突起细胞; V3 细胞: 神经节后外侧部胞体层的 6 对 NOS 阳性细胞

嫁蟻中枢神经系统中各神经节集中程度较低,脑神经节间有较长的脑联合,脑 - 足、脑 - 侧神经节间也有较长的神经连索。本实验未观察到中枢神经系统中有 NOS 阳性细胞分布,仅见有阳性纤维分布于中枢的部分神经节,可见嫁蟻作为前鳃亚纲原始腹足目的种类,又属于植食性种类,其 NOS 阳性反应的分布模式与前人在其它软体动物的研究结果一致^[1]。触角神经以及食道下神经节中强的 NOS 反应表明了一氧化氮在嫁蟻神经系统可能主要是参与感觉和取食调节。至于一氧化氮是如何具体发挥作用,以及它与经典递质的相互关系还有待进一步的深入研究。

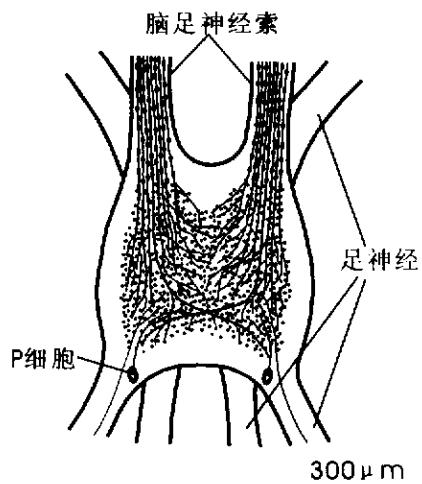


图3 中国哈蜊足神经节NOS反应细胞模式图

P细胞:后背侧足神经基部的一对弱阳性反应细胞

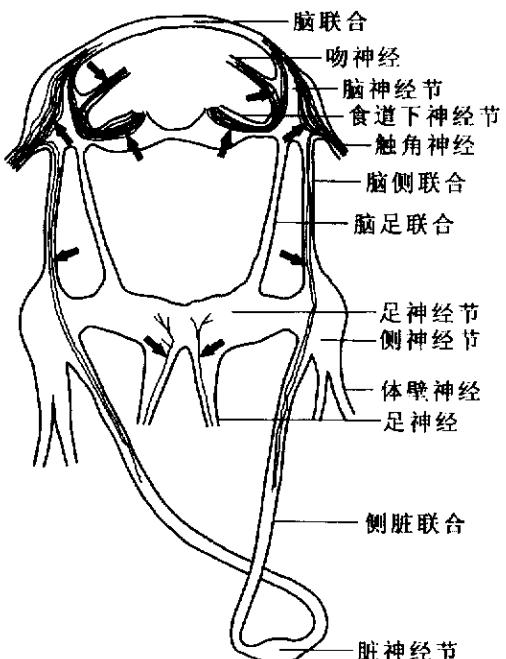


图4 嫁蟹神经系统NOS阳性纤维分布示意图

箭头(↑)示阳性反应纤维

参 考 文 献

- [1] Moroz L L, Gillette R. From polyplacophora to cephalopoda: comparative analysis of nitric oxide signalling in mollusca. *Acta Biol Hung*, 1995, **46**(2~4):169~182.
- [2] Dyuizien I V, Annikova L V, Motavkin P A. NO-Synthase localization in the central nervous system of the bivalve mollusks *Mizuhopecten yessoensis* and *Modiolus kuriensis*. *Russ J Mar Biol*, 1999, **25**(3):277~279.
- [3] Moroz L L, Park J H, Winlow W. Nitric oxide activates buccal motor patterns in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroreport*, 1993, **4**(6):643~646.
- [4] Kobayashi S, Sadamoto H, Ogawa H, et al. Nitric oxide generation around buccal ganglia accompanying feeding behavior in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci Res*, 2000, **38**(1):27~34.
- [5] Kemenes I, Kemenes G, Andrew R J, et al. Critical time-window for NO-cGMP-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *J Neurosci*, 2002, **22**(4):1414~1425.
- [6] Robertson J D, Bonaventura J, Kohm A, et al. Nitric oxide is necessary for visual learning in *Octopus vulgaris*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1996, **263**(1377):1739~1743.
- [7] Robertson J D, Bonaventura J, Kohm A P. Nitric oxide is required for tactile learning in *Octopus vulgaris*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1994, **256**(1347):269~273.
- [8] Hahn U K, Bender R C, Bayne C J. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol*, 2001, **87**(4):778~785.
- [9] Gourdon I, Guerin M C, Torreilles J, et al. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide*, 2001, **5**(1):1~6.
- [10] Ottaviani E, Franchini A, Cassanelli S, et al. Cytokines and invertebrate immune responses. *Biol Cell*, 1995, **85**(1):87~91.
- [11] Ottaviani E, Paeman L R, Cadet P, et al. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. *Eur J Pharmacol*, 1993, **248**(4):319~324.
- [12] 齐钟彦, 马绣同, 王桢瑞等. 黄渤海的软体动物. 北京: 农业出版社, 1989. 19~190.
- [13] 王宜艳, 孙虎山. 中国蛤蜊神经系统的初步观察. 生物学通报, 1997, **32**(4):41~42.
- [14] 王晓安, 蒋小满. 中国蛤蜊神经系统显微结构的初步研究. 动物学杂志, 1999, **34**(4):6~9.
- [15] 王晓安, 傅更锋. 嫁蟹神经系统结构的初步研究. 动物学杂志, 1998, **33**(4):11~14.
- [16] Moroz L L, Gillette R. NADPH-diaphorase localization in the CNS and peripheral tissues of the predatory sea-slug *Pleurobranchaea californica*. *J Comp Neurol*, 1996, **367**(4):607~622.
- [17] Moroz L L, Park J H. Nitric oxide modulates the central respiratory patterns in *Lymnaea stagnalis*. *J Physiol*, 1993, **473**:

188.

- [18] Sadamoto H, Hatakeyama D, Kojima S, et al. Histochemical study on the relation between NO-generative neurons and central circuitry for feeding in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*.

Neurosci Res, 1998, 32(1): 57 ~ 63.

- [19] Moroz L L, Chen D, Gillette M U, et al. Nitric oxide synthase activity in the molluscan CNS. *J Neurochem*, 1996, 66(2): 873 ~ 876.

图版Ⅰ说明(图1~8为中国蛤蜊)

1. 脑神经节背面观, NOS 整体染色示阳性反应细胞(△)和阳性纤维(↑)的分布。比例尺 = 100 μm[Dorsal view of cerebral ganglion showing the distribution of NOS positive neurons(△) and fibers (↑) in whole-mount preparation. Scale bar = 100 μm].
2. 脑神经节冰冻切片 NOS 染色, 示阳性细胞(△)和阳性纤维(↑)。比例尺 = 100 μm[Distribution of NOS positive neurons(△) and fibers (↑) in frozen section of cerebral ganglion. Scale bar = 100 μm].
3. 图2中脑神经节 NOS 阳性细胞(△)和纤维(↑)的放大。比例尺 = 50 μm[Amplification of NOS positive neurons (△) and fibers (↑) in the cerebral ganglion of figure 2. Scale bar = 50 μm].
4. 足神经节背面观, NOS 整体染色示阳性反应纤维(↑)分布。比例尺 = 100 μm[Dorsal view of pedal ganglion showing the distribution of NOS positive fibers (↑) in whole-mount preparations. Scale bar = 100 μm].
5. 冰冻切片 NOS 染色, 示足神经节中的 NOS 阳性反应纤维(↑)。比例尺 = 100 μm[Distribution of NOS positive fibers (↑) in frozen section of pedal ganglion. Scale bar = 100 μm].
6. 图5中足神经节 NOS 阳性纤维(↑)放大。比例尺 = 50 μm[Amplification of NOS positive fiber (↑) in the pedal ganglion of figure 5. Scale bar = 50 μm].
7. NOS 整体染色, 示脏神经节中的 NOS 阳性反应细胞(△)、背侧小细胞团(★)和阳性反应纤维束(↑)。比例尺 = 100 μm[NOS positive neurons (△), dorsal small cell group (★) and fibers (↑) in the visceral ganglion in whole-mount preparation. Scale bar = 100 μm].
8. 冰冻切片 NOS 染色, 示脏神经节背侧小细胞团(★)的阳性反应。比例尺 = 100 μm[NOS positive reactive cells in the dorsal small cell group (★) of visceral ganglion (frozen section). Scale bar = 100 μm].

图版Ⅱ说明(图9~16为嫁蛾)

9. 嫁蛾脑神经节背面观, 示 NOS 整体染色阳性反应纤维(↑)的分布。A. 触角神经; B. 脑联合; C. 吻神经; D. 食道下神经; E. 脑侧神经索。比例尺 = 100 μm[Dorsal view of cerebral ganglion showing the distribution of NOS positive fibers (↑) in whole-mount preparation. A. tentacular nerve; B. cerebral commissure; C. proboscis nerve; D. suboesophageal nerve; E. cerebropleural connective. Scale bar = 100 μm].
10. 图9部分放大, 示脑神经节 NOS 阳性反应纤维(↑)。比例尺 = 50 μm[Amplification of NOS positive fibers (↑) in the cerebral ganglion of figure 9. Scale bar = 50 μm].
11. 图9部分放大, 示脑神经节中来自触角神经的 NOS 阳性纤维(↑)。比例尺 = 50 μm[Amplification of NOS positive fibers (↑) from tentacular nerve to the cerebral ganglion of figure 9. Scale bar = 50 μm].
12. 食道下神经节中的 NOS 阳性反应纤维。比例尺 = 50 μm[NOS positive fibers in the suboesophageal ganglion. Scale bar = 50 μm].
13. 足神经节中的 NOS 反应纤维(↑)。比例尺 = 100 μm[NOS positive fibers (↑) in the pedal ganglion. Scale bar = 100 μm].
14. 图13中部分放大, 示 NOS 阳性纤维(↑)。比例尺 = 50 μm[Amplification of NOS positive fibers (↑) in the pedal ganglion of figure 13. Scale bar = 50 μm].
15. 侧脏连索中的 NOS 阳性纤维(↑)。比例尺 = 50 μm[NOS positive fibers (↑) in the pleurovisceral connection. Scale bar = 50 μm].
16. 脑侧连索中的 NOS 阳性纤维(↑)。比例尺 = 50 μm[NOS positive fibers (↑) in the cerebropleural connection. Scale bar = 50 μm].

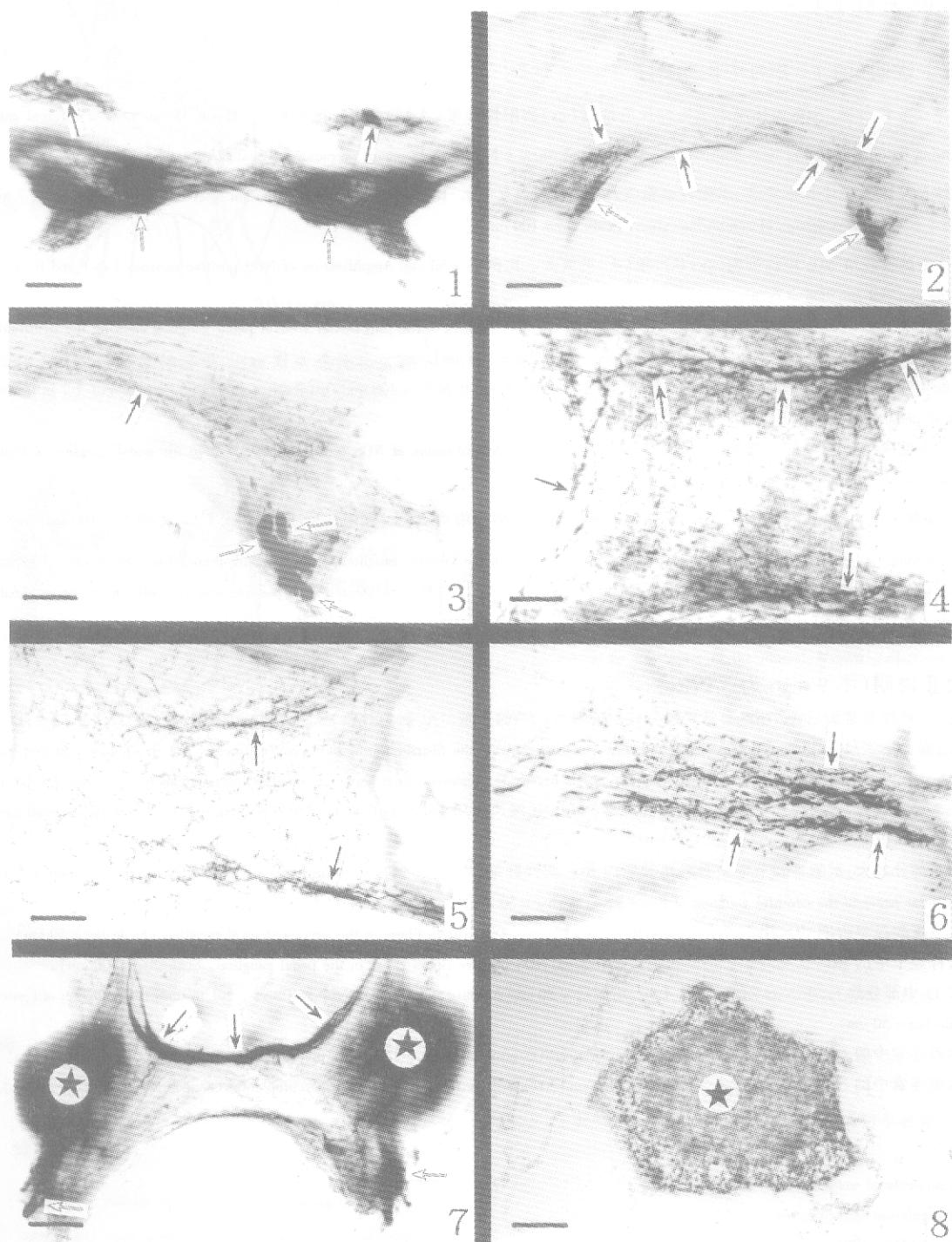
王晓安等:两种软体动物神经系统一氧化氮合酶的组织化学定位

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

Nervous System of two Molluscs

图版 I

Plate I



图版说明见文后

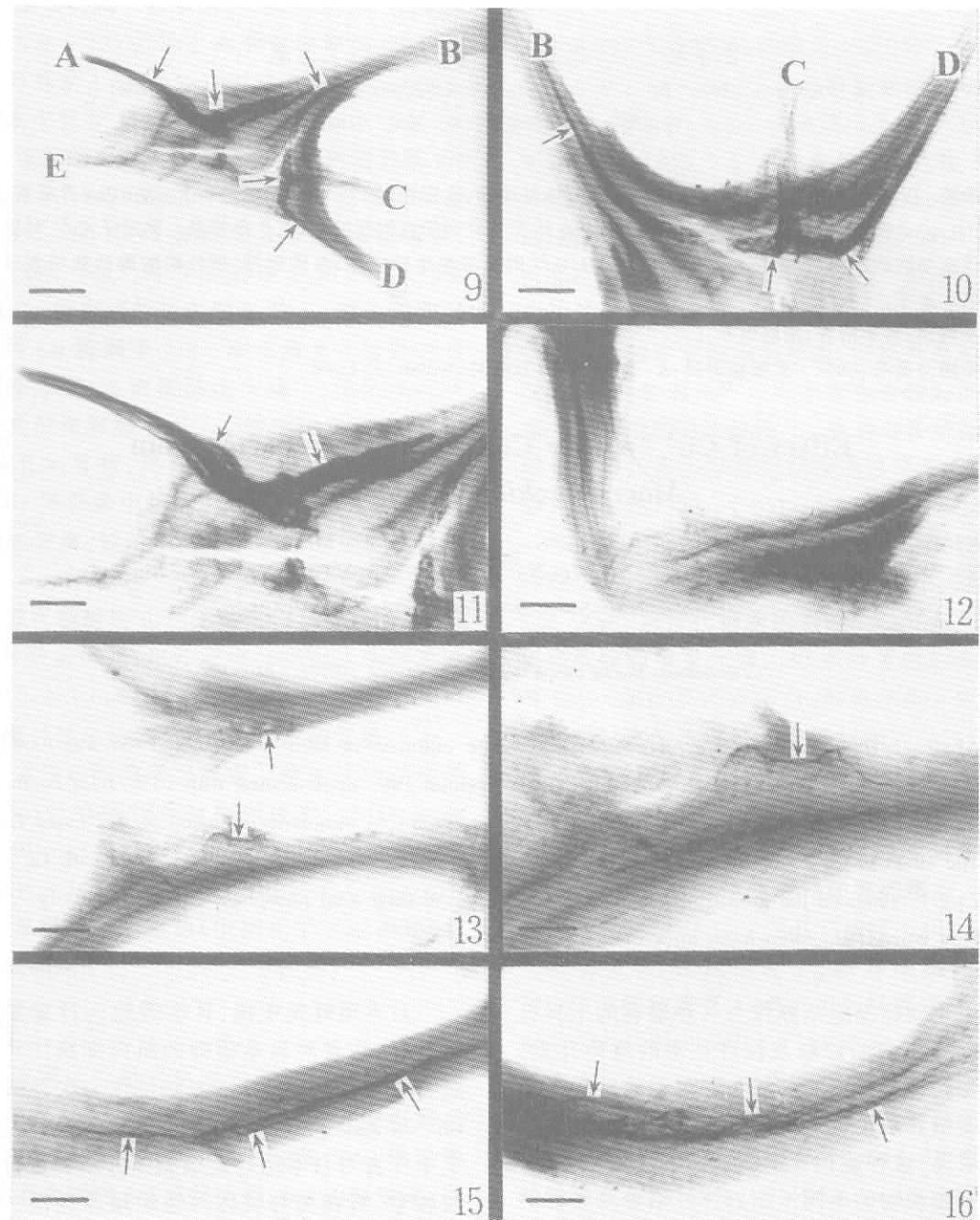
王晓安等:两种软体动物神经系统一氧化氮合酶的组织化学定位

图版 II

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

Nervous System of two Molluscs

Plate II



图版说明见文后