

# AChE 及 M<sub>1</sub> 受体在柄袋沙蠋胚胎和幼虫中的免疫组化定位

管晓娟 王宜艳 黄雯雯 孙虎山\*

鲁东大学生命科学学院 烟台 264025

**摘要:**采用免疫组织化学 S-ABC 法和兔抗鼠抗体研究了乙酰胆碱酯酶(AChE)及 M<sub>1</sub> 受体在柄袋沙蠋(*Arenicola brasiliensis*)胚胎和幼虫的分布。结果表明,AChE 及 M<sub>1</sub> 受体在柄袋沙蠋胚胎和幼虫中分布非常广泛,从未受精卵开始,直至研究的 5 刚毛节幼虫均有分布,但不同发育阶段分布的情况不同。卵裂期主要分布于细胞膜和核的周围,幼虫期主要分布于头区、纤毛着生处、刚毛着生处和消化道等部位。另外,实验结果显示,M<sub>1</sub> 受体的分布与 AChE 的分布呈现出对应一致的特点。AChE 及 M<sub>1</sub> 受体在柄袋沙蠋胚胎和幼虫中分布的广泛性,表明乙酰胆碱可能参与柄袋沙蠋生长发育的调节。

**关键词:**柄袋沙蠋;乙酰胆碱酯酶;M<sub>1</sub> 受体;胚胎及幼虫;免疫组化

**中图分类号:**Q954 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2011)02-70-07

## Immunohistochemical Localization of AChE and M<sub>1</sub> Receptor in the Embryos and Larvae of *Arenicola brasiliensis*

GUAN Xiao-Juan WANG Yi-Yan HUANG Wen-Wen SUN Hu-Shan\*

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

**Abstract:** By using immunohistochemical S-ABC technique, AChE and M<sub>1</sub> receptor in the embryos and larvae of *Arenicola brasiliensis* were detected. The results showed that AChE and M<sub>1</sub> receptor were positivity stained from unfertilized eggs to 5-setiger larvae. However, their distribution was distinctive at different phases. For example, at the cleavage stage AChE and M<sub>1</sub> receptors were mainly distributed in the plasma membrane and perinuclear cytoplasm, while at the larval stage they were mainly detected in the head region, digestive tract, the areas where cilia grew, and setae etc. Furthermore, AChE and M<sub>1</sub> receptors had a similar distribution pattern in embryos and larvae. The results indicate that ACh may act as an important regulator during embryo and larvae development.

**Key words:** *Arenicola brasiliensis*; AChE; M<sub>1</sub> receptor; Embryo and larvae; Immunohistochemistry

乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)是 20 世纪上半叶第一个被确定为神经递质的化学物质<sup>[1]</sup>,它普遍存在于大多数动物体内。已有研究表明乙酰胆碱在高等动物主要分布在神经系统和肌肉组织,低浓度的 ACh 具有明显的促进肌肉收缩和促进血管扩张的作用<sup>[2-5]</sup>。在无脊椎动物,体肌、消化系统、纤毛等处也有广泛分布<sup>[6-8]</sup>。有关 ACh 在动物发育期的分布也有

相关的报道<sup>[9-10]</sup>。研究表明,ACh 在卵的排出、精卵的结合,卵裂期细胞内、细胞间信息的传递及后续的生长发育过程中均起重要的调控

**基金项目** 山东省自然科学基金项目(No. ZR2010CM017);

\* 通讯作者,E-mail:S\_hushan@163.com;

**第一作者介绍** 管晓娟,女,硕士研究生;研究方向:海洋生物学;E-mail:guanxiaojuan1@163.com。

收稿日期:2010-10-19,修回日期:2010-12-27

作用<sup>[9, 11-12]</sup>。采用免疫荧光检测和组织化学法, Angelini 等<sup>[12]</sup>和 Piomboni 等<sup>[13]</sup>分别在海胆 (*Paracentrotus lividus*) 未受精卵、受精卵、卵裂球和幼虫中检测到乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 的分布。运用铜硫代胆碱技术, Ozaki 等<sup>[14]</sup>在另一种海胆幼虫中检测到 AChE 的分布。Buznikov 等<sup>[10]</sup>对海胆发育过程中 ACh 含量的变化进行了研究, 表明从未受精的卵至胚胎发育的各个阶段, ACh 含量处于动态变化的过程中。ACh 功能的发挥要求与乙酰胆碱受体的结合, 在动物细胞中, ACh 有 2 种不同的受体, 毒蕈碱型受体 (即 M 胆碱受体, mAChRs) 和烟碱型受体 (即 N 胆碱受体, nAChRs)。M 胆碱受体可分为 5 种不同亚型 (M<sub>1</sub> ~ M<sub>5</sub>)。N 受体有 2 种亚型, N<sub>1</sub> 受体和 N<sub>2</sub> 受体。在哺乳动物 mAChRs 主要位于中枢神经系统、外分泌腺、平滑肌等部位, 它的主要功能是接受 ACh 的作用, 通过 G 蛋白的偶联激活质膜上的 Ca<sup>2+</sup> 通道, 或其他各种与第 2 信使产生有关的酶, 进而引发特异的生理生化反应, 此作用可以被毒蕈碱激活而被阿托品所抑制。nAChRs 是一种位于突触后细胞膜的整合蛋白, 主要分布于动物的骨骼肌等部位, 它的主要功能是结合 ACh, 并进而选择性地增加突触后膜对单价阳离子 (主要为 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup>) 的通透性, 以产生局部的去极化或动作电位, 引起最终生物效应, 此作用可以被烟碱激活而被筒箭毒等所抑制<sup>[15]</sup>。ACh 通过与受体相互作用, 调控机体的相关功能<sup>[16-17]</sup>。对棘皮动物胚胎发育过程的研究表明, M 受体和 N 受体都参与了胚胎发育过程的调控, 但具体的调控机制不同<sup>[9]</sup>。柄袋沙蠋 (*Arenicola brasiliensis*) 属环节动物门多毛纲隐居目沙蠋科营穴居生活的类群, 是环节动物多毛纲有代表性的底内动物。它保持着有体节动物的典型特征, 同时其体形大, 又容易采到, 因此是实验生态、生理、生化研究的一个很好的实验材料。有关柄袋沙蠋的研究仅见其发育期形态学描述方面的报道<sup>[18]</sup>。本文采用免疫组织化学 S-ABC 法研究了乙酰胆碱酯酶 (AChE) 及 M<sub>1</sub> 受体在柄袋沙蠋发育期的分布,

为环节动物多毛纲 AChE 及 M<sub>1</sub> 受体的分布提供形态学资料, 同时为进一步研究 ACh 及 M<sub>1</sub> 受体对多毛纲动物发育的调控作用提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 柄袋沙蠋于每年 7~9 月份取自烟台海滨夹河入海口, 水族箱中充气饲养。取原栖息处的砂, 铺缸底, 高为 20 cm, 每日换水一次, 水温 23~26℃, 所用海水为烟台芝罘湾砂滤海水, 换水量为缸内水体的 50%。每日投喂扁藻并加少许的硅藻和小球藻。

各时期样品获得的方法: 取活性较好的性成熟雌性个体, 剖开其体腔, 用胶头滴管将分散于体腔内的未受精卵吸出, 获得未受精卵的材料。柄袋沙蠋为体外受精, 卵子受精后便在雌虫穴道头段形成一个有柄的卵袋。卵袋形成后, 立即取出放入另一较小玻璃缸内培养。以吴宝铃等<sup>[18]</sup>对柄袋沙蠋发育期的界定为参考并进行预实验, 掌握各个发育期的典型特征及发育至不同时期所需要的时间。实验时, 自卵袋产出时刻起, 对卵袋内胚胎的发育进行追踪观察。观察方法是, 每隔相应的时间剪取约 0.1 cm<sup>3</sup> 的胶质块, 用 Olympus BX50 系统显微镜进行观察。由于同一个卵袋内胚胎发育的不同步性, 待视野中有 2/3 以上的胚胎发育至同一个阶段时, 就从卵袋上剪取一块约 2 cm<sup>3</sup> 胚胎, 作为实验材料。从受精卵至原肠胚都是用此种方法取材。端毛轮幼虫及 1、2 刚毛节幼虫虽已从卵膜内孵出, 但胶质的卵袋还没有溃败, 仍可以用此种方法取材。3~5 刚毛节幼虫行浮游生活, 此时取材方法为直接从玻璃缸中用胶头滴管吸取一部分幼虫。

**1.2 样品制备** 不同发育阶段的胚胎和幼虫取材后, 入 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制的 4% 多聚甲醛中, 4℃ 固定 10 min, 待胚胎或幼虫沉底后, 换固定液一次, 从此时开始计时固定 24 h, 中间换固定液一次。0.1 mol/L pH 7.4 PBS 冲洗 3 次, 每次 10 min, 梯度酒精脱水后, 蒸馏水复水, 整体进行免疫组化定位研究。另外, 端毛轮幼虫及刚毛节幼虫还进

行常规石蜡包埋,制作石蜡切片,用 Leica 石蜡切片机进行切片,切片厚度为 7  $\mu\text{m}$ 。

**1.3 免疫组织化学反应** 按 Santa Cruz 公司提供的 S-ABC 染色方法进行,并略微改进。样品入 0.3% 过氧化氢-甲醇处理 30 min,阻断内源性过氧化物酶,用加 Triton 的磷酸盐缓冲液 (PBST, 含 0.05 mol/L pH 7.4 的 PB, 0.9% 的氯化钠, 0.3% 的 Triton X-100) 漂洗 3 次,每次 10 min。兔抗鼠 AChE 或  $M_1$  受体 (一抗, 1:100, Sigma 公司产品) 室温孵育 5 h, PBST 漂洗 3 次,每次 10 min。生物素标记的羊抗兔 IgG (二抗, 1:200, Sigma Cruz 公司产品) 室温孵育 3 h, PBST 漂洗 3 次,每次 10 min。链霉菌抗生物素蛋白与过氧化物酶复合物 (AB 复合液, A 液:B 液 = 1:1, (A 液 + B 液): 二抗稀释液 = 1:50, Santa Cruz 公司产品) 室温孵育 2 h, PBST 漂洗 3 次,每次 10 min。3, 3-二氨基联苯胺 (DAB, Fluka 公司产品) 显色 5 min。以 PBST 分别代替一抗、二抗、AB 复合液, 或一抗、二抗、AB 复合液均用 PBST 代替直接加 DAB 显色, 作为 4 组空白对照。

整体进行免疫组化反应组,除 3~5 刚毛节幼虫期样品外,其他组样品在实验之前需先将胚胎或幼虫从胶质的卵块中吹打出来,收集入离心管中,在离心管中进行免疫组化反应。DAB 显色结束后,由离心管中取出,制成载玻片经梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片;石蜡切片组, DAB 显色后需用 Mayer 苏木素轻度复染,后进行脱水、透明、封片。用 Olympus BX50 系统显微镜对实验结果进行观察,并拍照记录实验结果。

## 2 结果

AChE 及  $M_1$  受体的免疫组化结果显示,实验组均呈阳性反应,阳性部位从强到弱依次呈深棕色(强阳性)、棕色(阳性)和浅棕色(弱阳性);对照组均呈阴性反应,无棕色颗粒出现;石蜡切片经复染后细胞核呈蓝色。

**2.1 未受精卵 AChE 和  $M_1$  受体的免疫组化定位** 未受精卵的细胞膜、靠近膜处的细胞质、

核周围的胞质呈 AChE 强阳性反应,其余部分的细胞质呈 AChE 阳性反应(图版 I:1)。 $M_1$  受体在未受精卵的细胞膜、靠近膜处的细胞质和核周围的胞质呈阳性反应,在其余部位的细胞质呈弱阳性反应(图版 I:2)。对照组呈阴性反应(图版 I:3)。

**2.2 受精卵 AChE 和  $M_1$  受体的免疫组化定位** 受精作用完成后,在受精卵的表面包被一层透明的受精膜,核膜在此期消失。免疫组化定位结果显示,细胞膜及靠近膜处的细胞质呈 AChE 强阳性反应,核区及其余部位的细胞质呈 AChE 阳性反应(图版 I:4)。 $M_1$  受体在细胞膜及靠近膜处的细胞质、核区均呈阳性反应,其余部位的细胞质呈  $M_1$  受体弱阳性反应(图版 I:5)。

**2.3 卵裂期 AChE 和  $M_1$  受体的免疫组化定位** 柄袋沙蠹卵裂方式为螺旋式卵裂。从二细胞到囊胚期, AChE 及  $M_1$  受体的分布呈现出类似的规律。核周围胞质、细胞膜呈 AChE 强阳性反应,其余部位细胞质呈 AChE 阳性反应(图版 I:6,7)。 $M_1$  受体在核周围的胞质、细胞膜处均呈强阳性反应,其余部位的细胞质呈  $M_1$  受体弱阳性反应(图版 I:8)。

**2.4 原肠胚及后原肠胚期 AChE 和  $M_1$  受体的免疫组化定位** 原肠胚期,有口前纤毛轮 (prototroch) 长出,但此时口前纤毛轮不明显。免疫组化定位显示,内、外胚层阳性反应程度呈现差异。AChE 在外胚层细胞呈强阳性反应、在内胚层细胞呈阳性反应(图版 I:9),  $M_1$  受体在外胚层和内胚层细胞中分别呈阳性和弱阳性反应(图版 I:10)。胚胎继续发育进入后原肠胚期,此期胚体明显拉长,口前纤毛轮明显,以口前纤毛轮为界,其圆钝的一端为纤毛轮前区,较锐细的一端为纤毛轮后区。免疫组化结果显示,口前纤毛轮着生处呈 AChE 强阳性反应,纤毛轮前区和纤毛轮后区呈 AChE 阳性反应(图版 I:11)。后原肠胚期,  $M_1$  受体的分布量较原肠胚期有明显增多的趋势,口前纤毛轮着生处呈  $M_1$  受体强阳性反应,纤毛轮前区和纤毛轮后区呈  $M_1$  受体阳性反应(图版 I:12)。

**2.5 端毛轮幼虫 AChE 和 M<sub>1</sub> 受体的免疫组化定位** 此时期幼虫自卵膜内孵出, 由于端纤毛轮 (telotroch) 的生出, 虫体可分为三区: 头区 (从顶板到口前纤毛轮)、中区或躯干区 (介于前后两纤毛轮之间)、后区 (端纤毛轮以后的部分)。消化管由此时期开始出现。免疫组化定位结果显示, 头区、口前纤毛轮着生处、端纤毛轮着生处、消化道等呈 AChE 强阳性反应, 体壁和尾部呈 AChE 阳性反应 (图版 I: 13, 14)。M<sub>1</sub> 受体在头区、口前纤毛轮着生处、端纤毛轮着生处、消化道等处呈强阳性反应, 体壁和尾部呈 M<sub>1</sub> 受体阳性反应 (图版 I: 15)。

**2.6 刚毛节幼虫 AChE 及 M<sub>1</sub> 受体的免疫组化定位** 端毛轮幼虫继续发育, 在幼虫体中区出现体节, 随后开始出现刚毛, 进入刚毛节幼虫期。对 1~5 刚毛节幼虫进行免疫组化定位结果显示, 幼虫头区、尾部、刚毛着生处呈 AChE 强阳性反应, 体中区体壁呈阳性反应 (图版 I: 16)。石蜡切片结果显示, 消化道呈 AChE 强阳性反应 (图版 I: 17)。M<sub>1</sub> 受体的分布与 AChE 的分布呈现相对应的特点, 幼虫的头区、尾部、消化道、刚毛着生处等部位呈 M<sub>1</sub> 受体强阳性反应, 体中区体壁呈阳性反应 (图版 I: 18)。

### 3 讨论

ACh 作为一种经典的神经递质广泛分布于动植物体内, 调控动物体的神经传导、肌肉运动及消化等功能。另外, 在动物的发育期对卵的排出、精卵的结合, 卵裂期细胞内、细胞间信息的传递也起到重要的调控作用。乙酰胆碱酯酶 (AChE) 作为一种蛋白质分子构成的生物催化剂, 是生物神经传导中的一种关键性酶, 其主要功能是将传导神经兴奋的化学物质乙酰胆碱迅速水解为乙酸和胆碱, 以维持神经系统的正常生理功能<sup>[19]</sup>。因此可通过定位 AChE 来反映 ACh 的分布情况。Falugi 等<sup>[20]</sup> 对环节动物寡毛纲的蚯蚓 (*Eisenia foetida*) 进行组织化学和免疫组织化学定位研究表明, AChE 广泛地分布于早期胚胎发育的各个阶段, 且不同时期分布的密度和程度不同, 表明 AChE 在早期胚胎发

育过程中有调控细胞间信息传递的功能, 并指出神经递质的保守序列, 在进化的早期就出现。因此本文用的 2 种抗体虽均为哺乳动物的抗体, 但仍可在低等环节动物定位出其分布情况。ACh 通过与 M 胆碱受体或 N 胆碱受体结合发挥作用。研究表明, 棘皮动物及两栖动物体内的 ACh 通过与 M 受体和 N 受体结合对胚胎的生长发育进行调控<sup>[9, 21]</sup>。AChE 及 M<sub>1</sub> 受体在柄袋沙蠋发育期分布的广泛性, 表明 ACh 通过 M<sub>1</sub> 受体对柄袋沙蠋的生长发育起重要的调控作用。

AChE 和 M<sub>1</sub> 受体在柄袋沙蠋未受精卵中分布结果显示, 细胞膜及靠近膜处的细胞质、核周围的胞质中有大量的阳性反应分布, 其余部位的细胞质中也有少量阳性反应。这与 AChE 和 M<sub>1</sub> 受体在海胆未受精卵中的分布相类似<sup>[13]</sup>。海胆未受精卵细胞膜上的 ACh, 在精、卵结合过程中对精子有一定的激发和诱导作用, 从而调控受精过程<sup>[22]</sup>。柄袋沙蠋未受精卵中 ACh 的分布是否也有类似的功能有待进一步研究。受精后, 受精卵的细胞膜、核区有大量 AChE 和 M<sub>1</sub> 受体的分布, 且染色程度较未受精卵深。有关海胆受精卵中胆碱乙酰基转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 分布的研究表明<sup>[9]</sup>, 海胆受精卵的细胞膜上分布有 ChAT, 能合成 ACh 并释放至卵黄周围, 作用于细胞膜上的 M 受体, 引起细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的改变, 进一步影响第一次卵裂过程。AChE 和 M<sub>1</sub> 受体在柄袋沙蠋受精卵中的分布表明, ACh 亦可能参与了其受精卵第一次卵裂过程的调控。在后续的卵裂过程中, 从二细胞至囊胚期, AChE 和 M<sub>1</sub> 受体主要分布于核周围、细胞膜上, 推测, ACh 在柄袋沙蠋胚胎卵裂过程中有调控细胞内及细胞间信息传递的作用<sup>[10, 12]</sup>。

Laasberg 等<sup>[23]</sup> 在高等动物的研究表明 ACh 与胚层分化有关, 此种作用由 M 受体介导, 且可被阿托品阻断。柄袋沙蠋原肠胚内外胚层均呈现 AChE 和 M<sub>1</sub> 受体阳性反应, 且外胚层阳性反应较内胚层强, 这是否说明 ACh 也介导了柄袋沙蠋胚层的分化还有待于进一步研

究。后原肠胚期,胚胎开始旋转,即将出膜。本实验结果显示,后原肠胚期,口前纤毛轮着生处呈 AChE 和  $M_1$  受体强阳性反应,且  $M_1$  受体的阳性反应在此期明显增强。Buznikov 等<sup>[10]</sup> 研究表明,在海胆胚胎发育的旋转期和出膜期, ACh 含量呈现出两次峰值。Bulbring 等<sup>[8]</sup> 对紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 的研究表明, ACh 有明显促进其鳃板纤毛摆动的作用。AChE 和  $M_1$  受体在柄袋沙蠋后原肠胚期的口前纤毛轮着生处有大量分布,这是否与胚胎的旋转和出膜有关有待于进一步探讨。有关报道指出, ACh 分布于动物的神经节、纤毛、肌肉、消化道等处,对动物的神经传导、运动、消化等起调节作用,且作用过程可被阿托品阻断<sup>[2-8]</sup>。本实验结果显示,端毛轮幼虫期和刚毛节幼虫期,在神经系统集中分布的头部,与运动有关的刚毛着生处,消化道等处均有 AChE 和  $M_1$  受体的分布,推测对这些组织器官的功能起调控作用。另外,通过实验发现 AChE 和  $M_1$  受体的分布具有相对应的特点,说明  $M_1$  受体能够接受 ACh 传递的信息,进而对胚胎的生长发育起调控作用。但是,其不同发育阶段 AChE 和  $M_1$  受体有不同程度的分布,分布密度的不同,可能与各阶段不同的调控功能有关,具体的调控机制有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Loewi O. Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung Pflügers. Archiv European Journal of Physiology, 1921, 189(1): 239 - 242.
- [ 2 ] Bulbring E, Lourie E M, Pardoe U. The presence of acetylcholine in *Trypanosoma rhodesiense* and its absence from *Plasmodium gallinaceum*. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 1949, 4(3): 290 - 294.
- [ 3 ] Burn J H, Dutta N K. The action of antagonists of acetylcholine on the vessels of the rabbit's ear. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 1948, 3(4): 354 - 361.
- [ 4 ] Wessler I, Kirkpatrick C J, Racké K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems; expression and function in humans. Pharmacology and Therapeutics, 1998, 77(1): 59 - 79.
- [ 5 ] Horiuchi Y, Kimura R, Kato N. Evolutional study on acetylcholine expression. Life Sciences, 2003, 72(15): 1745 - 1756.
- [ 6 ] Hassoni A A, Kerkut G A, Walker R J. The action of cholinomimetic and cholinolytic agents, hemicholinium-3 and alpha-and beta-bungarotoxin on the body wall muscle of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. Comparative Biochemistry and Physiology C: Comparative Pharmacology and Toxicology, 1985, 82(1): 179 - 192.
- [ 7 ] Anctil M, Laberge M, Martin N. Neuromuscular pharmacology of the anterior intestine of *Chaetopterus variopedatus*, a filter-feeding polychaete. Comparative Biochemistry and Physiology C: Comparative Pharmacology and Toxicology, 1984, 79(2): 343 - 351.
- [ 8 ] Bulbring E, Burn J, Shelley H. Acetylcholine and ciliary movement in the gill plates of *Mytilus edulis*. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 1953, 141(905): 445 - 466.
- [ 9 ] Angelini C, Baccetti B, Piomboni P, et al. Acetylcholine synthesis and possible functions during sea urchin development. European Journal of Histochemistry, 2004, 49(3): 235 - 244.
- [ 10 ] Buznikov G A, Chudakova I V, Berdysheva L V, et al. The role of neurohumors in early embryogenesis II. Acetylcholine and catecholamine content in developing embryos of sea urchin. J Embryol Exp Morph, 1968, 20(1): 119 - 128.
- [ 11 ] Yokota Y. Introduction to the sea urchin biology // Yokota Y, Matranga V Shmolenicka Z. The Sea Urchin: from Basic Biology to Aquaculture. Lisse, Abingdon, Exton (PA), Tokyo: Balkema Publishers, 2000: 1 - 10.
- [ 12 ] Angelini C, Aluigi M G, Sgro M, et al. Cell signalling during sea urchin development: A model for assessing toxicity of environmental contaminants. Progress in Molecular and Subcellular Biology, 2005, 39: 45 - 70.
- [ 13 ] Piomboni P, Baccetti B, Moretti E, et al. Localisation of molecules related to cholinergic signaling in eggs and zygotes of the sea urchin, *Paracentrotus lividus*. J Submicrosc Cytol Pathol, 2001, 33(1/2): 187 - 193.
- [ 14 ] Ozaki H. Localization and multiple forms of acetylcholinesterase in sea urchin embryos. Development, Growth and Differentiation, 1974, 16(4): 267 - 279.
- [ 15 ] 吕宝璋, 田英. 受体学概论. 北京: 科学出版社, 1991: 112 - 135.
- [ 16 ] Kaiser B, Koppen C V. Measurement of function and regulation of muscarinic acetylcholine receptors. Practical

- Methods in Cardiovascular Research, 2005, 2(6): 848 – 862.
- [17] Vesna A E, Lian L, Palma L, et al. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor function by adenine nucleotides. Cellular and Molecular Neurobiology, 1990, 10(3): 423 – 433.
- [18] 吴宝铃, 孙瑞平. 中国近海沙蠋科研究——黄海和渤海的柄袋沙蠋的研究. 海洋与湖沼, 1979, 10(3): 257 – 270.
- [19] 张明, 李盾, 陈仪本, 等. 乙酰胆碱酯酶分子生物学研究进展. 农药, 2006, 45(1): 8 – 11.
- [20] Falugi C, Davoli C. Localization of putative biochemical messengers during *Eisenia foetida* (Annelida, Oligochaeta) development. Tissue and Cell, 1993, 25(3): 311 – 323.
- [21] Kusano K, Miledi R, Stinnakre J. Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. The Journal of Physiology, 1982, 328: 143 – 170.
- [22] Baccetti B, Burrini A G, Collodel G, et al. Localisation of two classes of acetylcholine receptor-like molecules in sperms of different animal species. Zygote, 1995, 3(3): 207 – 217.
- [23] Laasberg T, Pedak A, Neuman T. The muscarinic receptor-mediated action of acetylcholine in the gastrulating chick embryo. Comparative Biochemistry and Physiology C: Comparative Pharmacology, 1987, 86(2): 313 – 316.

## 图 版 说 明

1. 未受精卵中 AChE 强阳性反应主要定位在细胞膜(M)和核周围的胞质(C); 2. 未受精卵中 M<sub>1</sub> 受体阳性反应主要定位在细胞膜(M)和核周围的胞质(C); 3. 阴性对照; 4. 受精卵中 AChE 强阳性反应主要定位在细胞膜(M); 5. 受精卵中 M<sub>1</sub> 受体阳性反应主要定位在细胞膜(M)和核区(N); 6. 二细胞期 AChE 强阳性反应主要定位在细胞膜(M)和核周围的胞质(C); 7. 囊胚期 AChE 强阳性反应主要定位在细胞膜(M)和核周围的胞质(C); 8. 四细胞期 M<sub>1</sub> 受体强阳性反应主要定位在细胞膜(M)和核周围的胞质(C); 9. 原肠胚期 AChE 强阳性反应主要定位在外胚层(E); 10. 原肠胚期 M<sub>1</sub> 受体阳性反应主要定位在外胚层(E); 11. 后原肠胚期 AChE 强阳性反应主要定位在口前纤毛轮着生处(P), 以口前纤毛轮为界, 分为纤毛轮前区(AR)和纤毛轮后区(PR); 12. 后原肠胚期 M<sub>1</sub> 受体强阳性反应主要定位在口前纤毛轮着生处(P), 以口前纤毛轮为界, 分为纤毛轮前区(AR)和纤毛轮后区(PR); 13. 端毛轮幼虫期 AChE 强阳性反应主要定位在口前纤毛轮着生处(P)和端纤毛轮着生处(T); 14. 端毛轮幼虫期 AChE 强阳性反应主要定位在头区(H)(石蜡切片); 15. 端毛轮幼虫期 M<sub>1</sub> 受体强阳性反应主要定位在头区(H)、消化道(D)(石蜡切片); 16. 刚毛节幼虫期 AChE 强阳性反应主要定位在头区(H)、尾部(Py)和刚毛着生处(S); 17. 刚毛节幼虫期 AChE 强阳性反应主要定位在消化道(D)(石蜡切片); 18. 刚毛节幼虫期 M<sub>1</sub> 受体强阳性反应主要定位在消化道(D)和刚毛着生处(S)(石蜡切片)。标尺 = 50 μm。

## Explanation of Plate

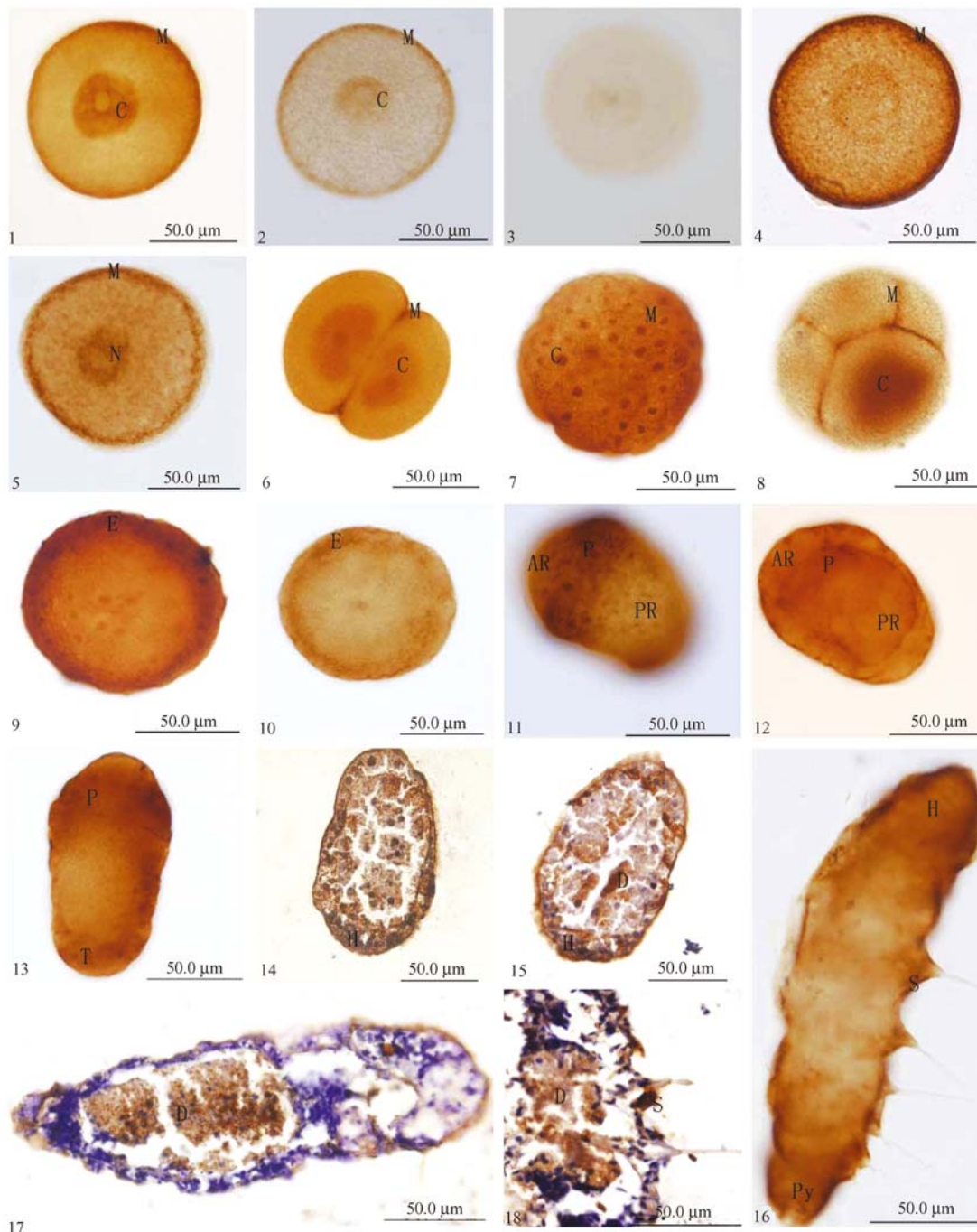
1. The strong expression of AChE on the plasma membrane (M) and perinuclear cytoplasm (C) of unfertilized egg in *Arenicola brasiliensis*; 2. The expression of M<sub>1</sub> receptor on the plasma membrane (M) and perinuclear cytoplasm (C) of unfertilized egg; 3. Negative control; 4. The strong expression of AChE on the plasma membrane (M) of fertilized egg; 5. The expression of M<sub>1</sub> receptor on plasma membrane (M) and perinuclear area (N) of fertilized egg; 6. The strong expression of AChE on the plasma membrane (M) and perinuclear cytoplasm (C) of two-cell embryo; 7. The strong expression of AChE on the plasma membrane (M) and perinuclear cytoplasm (C) of the blastulae; 8. The strong expression of M<sub>1</sub> receptor on the plasma membrane (M) and perinuclear cytoplasm (C) of four-cell embryo; 9. The strong expression of AChE in the ectoderm (E) of gastrula; 10. The expression of M<sub>1</sub> receptor in the ectoderm (E) of gastrula; 11. The strong expression of AChE in the growing prototroch (P) area of metagastrula. The body can be divided into two regions by prototroch, the anterior region (AR) and the posterior region (PR); 12. The strong expression of M<sub>1</sub> receptor in the growing prototroch (P) area of metagastrula. The body can be divided into two regions by prototroch, the anterior region (AR) and the posterior region (PR); 13. The strong expression of AChE in the areas where prototroch (P) and telotroch (T) grow in telotroch larvae; 14. The strong expression of AChE in the head region (H) of telotroch larvae (paraffin section); 15. The strong expression of M<sub>1</sub> receptor in the head region (H) and the digestive tract (D) of telotroch larvae (paraffin section); 16. The strong expression of AChE in the head region (H), the pygidium (Py), and the growing setae area (S) of setigerous larvae; 17. The strong expression of AChE in the digestive tract (D) of setigerous larvae (paraffin section); 18. The strong expression of M<sub>1</sub> receptor in the digestive tract (D) and the areas where setae grow (S) in setigerous larvae (paraffin section). Bar = 50 μm.

管晓娟等: AChE 及 M<sub>1</sub> 受体在柄袋沙蠅胚胎和幼虫中的免疫组化定位

图版 I

GUAN Xiao-Juan *et al.*: Immunohistochemical Localization of AChE and M<sub>1</sub> Receptor in the Embryo and Larvae of *Arenicola brasiliensis*

Plate I



图版说明见文后