

日本新糠虾卵巢和肝胰腺主要细胞内 5-HT 的免疫组织化学定位

杨丽丽, 杨筱珍, 赵柳兰, 成永旭*, 吴旭干

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室,
上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306)

摘要: 运用免疫组化方法, 观察了 5-HT 阳性物质在日本新糠虾不同发育期的卵巢卵细胞和滤泡细胞及肝胰腺细胞中的分布和变化。结果表明: 随卵细胞的发育, 滤泡细胞逐渐迁移至其近旁。各期卵巢卵细胞和滤泡细胞及肝胰腺细胞中均存在大量 5-HT 阳性细胞, 阳性物质呈深棕色; 各期卵巢中 5-HT 在滤泡细胞内均呈阳性; 在 I、II 和 III 期卵巢中卵细胞胞质和胞核均呈阳性, 且阳性强度呈递减; IV 期卵巢中 5-HT 在卵细胞中呈阴性, 而在 V 期卵巢中 5-HT 在卵细胞中又呈现弱阳性。5-HT 在发育各期的肝胰腺细胞中均呈阳性。同一期卵巢中, 不同类型肝胰腺细胞间 5-HT 的分布没有差别。除 IV 期卵巢外, 在其余各期卵巢中 5-HT 阳性强度在卵细胞胞质和肝胰腺细胞胞质中表现一致。

关键词: 日本新糠虾; 5-HT; 卵细胞; 滤泡细胞; 肝胰腺细胞

中图分类号: Q 952; S 917

文献标识码: A

隶属于节肢动物门 (Arthropoda) 甲壳纲 (Crustacea) 软甲亚纲 (Malacostraca) 糠虾目 (Mysidacea), 是维持海水环境生态平衡的重要生物, 也是众多海洋生物的天然饵料。日本新糠虾 (*Neomysis japonica*) 为糠虾科 (Mysidae) 新糠虾属 (*Neomysis Czerniavsky*), 是我国广为分布的糠虾类型。目前将糠虾作为环境监测的一种很好的模式动物, 已被国内外广泛接受^[1-2]。但对其生物学特性及环境监测方面的研究还较少^[3-5]。5-HT (5-hydroxytryptamine) 是一种胺类衍生的神经递质, 对动物生理和行为的调节起到广泛的作用, 如葡萄糖代谢, 昼夜节律, 行为, 摄食和繁殖等^[6-8]。大量研究已发现 5-HT 能促进经济类甲壳动物生长发育, 并对卵巢发育有促进作用, 如南美白虾 (*Penaeus vannamei*)^[9], 克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)^[10], 招潮蟹 (*Uca arcuata*)^[7], 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)^[11] 等。这些研究多集中在 5-HT 通过调节内分泌间接调节性腺发育^[12]。另外还有研究发现 5-HT 与其它生物胺共同参与卵巢发育

的调节^[13]。日本新糠虾卵巢呈“H”形, 由左右两侧卵巢和中间的横桥构成^[14]。横桥是各期卵细胞和滤泡细胞的生发带, 横桥内常分布着发育早期的卵细胞和滤泡细胞, 随着卵细胞逐渐成熟而迁出横桥并分布于左右两叶卵巢中。其卵巢形态有别于十足目的虾^[13]。众所周知, 甲壳动物卵细胞的发育与滤泡细胞和肝胰腺有密切关系^[15-16]。本课题组研究发现生物胺对日本新糠虾的生长、发育及性成熟有明显的影响, 但目前有关此物质在性腺中的分布鲜见报道。因此本文观察了不同发育期日本新糠虾卵细胞, 滤泡细胞和肝胰腺细胞中 5-HT 分布及变化, 旨在为糠虾性腺发育及甲壳动物繁殖生理方面的研究提供基础理论依据和形态学资料, 为弄清甲壳动物卵巢发育调节机制和糠虾的繁育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 糠虾培养与样品制备

将同批日本新糠虾新孵幼体 (亲本为本试验室连续培养 5 代以上的), 在实验室循环水养殖系

收稿日期: 2010-10-12 修回日期: 2010-11-24

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30700609); 上海高校创新团队 (第二期) 项目; 上海科委攻关项目 (08dz1205904)

通讯作者: 成永旭, Tel: 021-61900417, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

统中培养。恒温(25.0 ± 1.0) °C,光照周期为 12 h:12 h,盐度为 15(用盐卤配置,并充分曝气 24 h),pH 为 7.6 ~ 8.6。每天投喂刚孵出卤虫无节幼体(*Artemia nauplii*)2 次,每 3 天换水 1 次,每次换 1/3 水。当雌雄性征出现后,按雌虾卵巢发育分期^[14],对 I 至 V 期进行采样,每期采样 5 只,整虾放入 Bouin 氏液中固定。然后,经脱水、透明和石蜡包埋后,用 Leica RM2016 型切片机连续切片,片厚为 7 μm。

1.2 免疫组织化学染色

5-羟色胺兔源多克隆抗体(购自北京中杉金桥生物技术公司)。采用常规 Power Vision™ 两步法进行免疫染色。具体程序石蜡切片常规脱蜡后,用 0.3% 过氧化氢去离子水室温下孵育 30 min,以阻断内源性过氧化物酶。PBST 冲洗 10 min × 3 次,滴加一抗(浓度为 1:50)后,将标本置于湿盒内,4 °C 过夜。然后用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)水洗 10 min × 3 次,滴加生物素化山羊抗或兔 IgG 抗体-HRP 多聚体(购自北京中杉金桥生物技术公司),室温孵育 2 h,PBS 充分水洗后,用 DAB-H₂O₂ 显色。阳性细胞呈棕色。阴性对照染色用 PBS 替代一抗,其余实验步骤相同。根据染色的深浅,分为强阳性,中等阳性,弱阳性,阴性,分别表示为“+++”,“++”,“+”,“-”。

2 结果

2.1 卵巢各期卵细胞和滤泡细胞关系及肝胰腺细胞组成

在卵巢 I 期,滤泡细胞首先成群分布于横桥与两叶卵巢交界处,两侧卵巢周围没有滤泡细胞分布(图版-1)。II 期,两侧卵巢以内源性卵母细胞为主,滤泡细胞迁移至卵母细胞周围,但与卵细胞存在一定间隙,此时滤泡细胞呈椭圆形(图版-2)。III 期,两侧卵巢以外源性卵黄合成期卵母细胞为主,滤泡细胞已与卵母细胞相融合而界线不清,卵母细胞体积的增大挤压其周围的滤泡细胞,使之呈长条形(图版-3)。IV 期,两侧卵巢中以成熟卵母细胞为主,卵母细胞与滤泡细胞紧贴并相互融合(图版-4)。V 期,此时滤泡细胞呈多层围绕于卵细胞周围(图版-5)。在卵巢发育过程中肝胰腺细胞组成基本一致,由四种类型细胞组成,分别为胚细胞(E)、泡状细胞(B)、吸收细胞(R)和纤维细胞(F)细胞(图版-6)。E 细胞为未分化的

细胞,主要分布于肝小管盲端。B 细胞顶部多有一个较大的顶泡,主要分布于肝小管中段。R 细胞较细长,细胞核较小,细胞内充满脂滴,脱蜡后脂滴被溶解,故 R 细胞脂滴多呈透明的空泡状。F 细胞的胞核较 R 和 B 大且圆,主要分布其他细胞之间。

2.2 卵细胞和滤泡细胞及肝胰腺中 5-HT 阳性定位

I ~ III 期卵巢的 5-HT 免疫阳性物质主要分布在卵母细胞胞质,卵母细胞胞核的染色质,以及的滤泡细胞(图版-1 ~ 3)。在 IV 期卵巢仅滤泡细胞有免疫阳性,卵细胞胞核和胞质中均无 5-HT 阳性物质分布(图版-4)。到 V 期时,卵巢的卵母细胞质,卵母细胞核和滤泡细胞又均有免疫阳性(图版-5)。在各个发育期,肝胰腺中的 5-HT 免疫阳性主要分布在胚细胞(E)、泡状细胞(B)、吸收细胞(R)和纤维细胞(F)四类细胞的胞核和胞质,且胞核的阳性表达较胞质强(图版-1 ~ 6)。

2.3 卵细胞和滤泡细胞及肝胰腺中的 5-HT 阳性强度

对各期糠虾卵巢和肝胰腺进行 5-HT 免疫组化染色发现,5-HT 在不同卵巢发育期的卵巢和肝胰腺细胞阳性表达强度有所不同(表 1)。I 期滤泡细胞,卵母细胞胞质,卵母细胞胞核,肝胰腺细胞胞质和胞核均为强阳性(图版-1)。II 期的滤泡细胞和肝胰腺细胞核为强阳性,卵细胞胞质胞核和肝胰腺细胞胞质为中等阳性(图版-2)。III 期滤泡细胞和肝胰腺细胞核仍为强阳性,卵细胞胞质胞核和肝胰腺细胞胞质为弱阳性(图版-3)。IV 期滤泡细胞,肝胰腺细胞核和肝胰腺细胞胞质为强阳性。卵母细胞质和胞核均为阴性(图版-4)。V 期滤泡细胞和肝胰腺细胞核仍为强阳性,肝胰腺细胞胞质为中等阳性,卵细胞胞质和胞核为弱阳性(图版-5)。可见,滤泡细胞和肝胰腺细胞核在 I ~ V 期均为强阳性。I ~ IV 期卵细胞胞质和卵细胞核内 5-HT 阳性物质有随卵巢发育阳性减弱的趋势,到 V 期又增强,形成周期循环。四类肝胰腺细胞在同一期的阳性强度一致。比较 5-HT 在卵巢和肝胰腺的阳性强度,在卵巢发育 I、II、III 和 V 期中,肝胰腺细胞胞质 5-HT 的表达情况与卵细胞胞质基本一致。IV 期肝胰腺细胞胞质的阳性比卵细胞胞质强。设置的阴性对照组未见免疫阳性反应。

表 1 日本糠虾不同发育时期卵巢和肝胰腺细胞中的 5-HT 分布
 Tab. 1 The level of 5-HT in the ovary and hepatopancreas of *N. japonica* at different ovary stages

卵巢分期 the stage of ovary	细胞类型 the type of cells				
	滤泡细胞 follicule cells	卵细胞胞质 the cytoplasm of oocyte	卵细胞核 the nucleus of oocyte	肝胰腺细胞核 the nucleus of hepatopancreas cells	肝胰腺细胞胞质 the cytoplasm of hepatopancreas cells
I 期	+++	+++	+++	+++	+++
II 期	+++	++	++	+++	++
III 期	+++	+	+	+++	+
IV 期	+++	-	-	+++	+
V 期	+++	+	+	+++	+

注：“+++”表示强阳性，“++”表示中等阳性，“+”表示弱阳性，“-”表示阴性。

Notes: “+++” means strongly positive, “++” means medium positive, “+” means weakly positive, “-” means negative.

3 讨论

3.1 5-HT 在卵巢中的分布

有关研究神经递质在甲壳动物组织中分布的方法,常见的有免疫组化技术,酶联免疫技术,分子生物学技术和高效液相色谱法,其中免疫组化技术常用于组织定位,而其余几种常为定量。本研究通过免疫组化技术原位定位了 5-HT 在卵巢和肝胰腺组织内的分布,以发现 5-HT 在卵巢和肝胰腺组织中的分布规律,探讨这两种组织中主要细胞间可能存在的调节机制。目前有关 5-HT 在甲壳动物卵巢中的分布已有报道,但不同动物间存在差异,如 5-HT 在斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[17] 卵巢中分布是 I 期的滤泡细胞和初级卵母细胞,此期的卵原细胞没有阳性。II 期,初级卵母细胞胞质有较强阳性。在 III、IV 期,卵母细胞的胞质、皮质棒和卵母细胞膜呈阳性。并且发现在后两期,滤泡细胞不呈阳性,这与我们对日本新糠虾的研究结果即滤泡细胞在卵巢发育各时期均有 5-HT 的阳性表达有差异。用 ELISA 测定斑节对虾^[17] 和用高效液相色谱法测定罗氏沼 (*Macrobrachium rosenbergii*)^[13] 卵巢内 5-HT 含量发现 5-HT 含量均随着卵巢发育呈上升趋势,且不同发育期间存在显著差异。由于日本新糠虾个体较小仅约为 1 cm,定量研究 5-HT 在卵巢中的分布有一定困难,因此本研究采用免疫组化的方法对 5-HT 在卵巢中进行了定位。本研究发现,5-HT 阳性分布是随糠虾卵巢发育有逐渐下降的趋势,这一现象与 5-HT 在斑节对虾发育卵巢中变化趋势相反,这可能与种类不同有关,也有可能由于斑节对虾卵巢中 5-HT 含量的测定包括

除卵巢组织主要细胞即卵母细胞组成外,还有间质成份及血窦的存在,已有研究发现 5-HT 受体在斑节对虾卵巢的小梁和结缔组织隔膜上有分布^[13,18],因此不排除 5-HT 在其它部位的分布影响其在卵巢内的含量。有关这方面的研究还有待于进一步加以完善。ONGVARRASOPONE 等^[18] 发现,用 RT-PCR 方式检测 5-HT 受体斑节对虾除在卵巢组织分布外,在肝胰腺、胃等多种组织中均有分布。但这些研究并未探讨各组织间的相互关系。

3.2 5-HT 对卵巢发育的调节作用

大量研究发现 5-HT 能促进甲壳动物性腺发育与产卵,诱导体内和体外的卵巢成熟^[9-10]。并认为 5-HT 能通过眼柄分泌神经内分泌素而起作用,如克氏原螯虾 (*Procambarus clarkia*) 性腺快速成熟^[9],对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 眼柄视神经节端髓 X 器官 3 种类型神经内分泌细胞兴奋性和分泌活动的调控作用^[19]。而缺少与卵母细胞发育有密切关系的细胞间相互关系的研究。大量研究已证实卵细胞发育与滤泡细胞和肝胰腺细胞有密切关系。本研究证实 5-HT 阳性细胞在卵母细胞的分布随卵巢发育变化而变化,提示卵母细胞自身 5-HT 的调节作用,而卵母细胞和肝胰腺细胞 5-HT 的阳性表达极其相似,似乎说明在 5-HT 的调节中卵母细胞与肝胰腺细胞关系密切,而滤泡细胞在整个卵巢发育阶段,其内部 5-HT 均强表达,提示滤泡细胞中 5-HT 的分布可能也是调节卵细胞发育的重要因素,而此三类细胞在 5-HT 调节卵母细胞发育过程中的角色还有待于进一步研究加以证实。研究发现滤泡细胞有运输和合成卵黄物质的功能^[20],而 5-HT 能促进

卵巢中卵细胞内卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)的合成,刺激减数分裂和卵母细胞成熟^[21],这是否是糠虾卵母细胞成熟的调节机制之一还有待于进一步研究。有关生物胺对性腺发育的研究,除了从神经内分泌角度加以分析外,细胞间的调节也不容忽视。

此外,有研究表明 5-HT 能与其他胺共同参与调节甲壳动物卵巢的发育,如 5-HT 与多巴胺(Dopamine, DA)来共同调节甲壳动物的性腺发育,5-HT 对卵巢和精巢发育均有促进作用,而多巴胺对卵巢发育略有抑制作用,并认为这可能与 5-羟色胺能够刺激脑、胸神经节分泌性腺刺激激素(gonad-stimulating hormone, GSH),从而促进性腺发育,而多巴胺对性腺发育的抑制作用可能与抑制 GSH 分泌或促进性腺抑制激素(gonad-inhibiting hormone, GIH)分泌有关^[8]。组织胺与 5-HT 也有密切的联系,影响虾蟹类性腺发育^[22-23],5-HT 及其与各种激素的关系如何还有待于进一步证实。

参考文献:

- [1] MCKENNEY JR C L, MATTHEWS E. Alterations in the energy metabolism of an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) as indicators of stress from chronic pesticide exposure[J]. Marine Environmental Research, 1990, 30(1): 1-19.
- [2] VERSLYCKE T A, FOCKEDEY N, MCKENNEY JR C L, et al. Mysid crustaceans as potential test organisms for the evaluation of environmental endocrine disruption: a review [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2004, 23 (5): 1219-1234.
- [3] 吴志强,姜国良,项鹏. 日本新糠虾消化系统组织学研究[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版, 2007, 37(5): 781-784.
- [4] 窦亚卿,成永旭,唐伯平,等. Cu²⁺, Zn²⁺ 对黑褐新糠虾(*Neomysis awatschensis*)的毒性作用[J]. 海洋环境科学, 2008, 27(1): 33-36.
- [5] 王金锋,杨筱珍,吴旭干,等. 水体中组织胺对黑褐新糠虾生长与发育的影响[J]. 海洋渔业, 2008, 30(2): 157-162.
- [6] ZIFA E, FILLION G. 5-Hydroxytryptamine receptors [J]. Pharmacological Reviews, 1992, 44(3): 401.
- [7] FINGERMAN M. Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis [J]. Physiological Zoology, 1997a; 257-269.
- [8] FINGERMAN M. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans [J]. Invertebrate Reproduction and Development, 1997b, 31: 47-54.
- [9] VACA A A, ALFARO J. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection [J]. Aquaculture, 2000, 182 (3 - 4): 373-385.
- [10] SAROJINI R, NAGABHUSHANAM R, FINGERMAN M. Mode of action of the neurotransmitter 5-hydroxytryptamine in stimulating ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: An *in vivo* and *in vitro* study [J]. Journal of Experimental Zoology, 1995, 271(5): 395-400.
- [11] MEERATANA P, WITHYACHUMNARNKUL B, DAMRONGPHOL P, et al. Serotonin induces ovarian maturation in giant freshwater prawn broodstock, *Macrobrachium rosenbergii* de Man [J]. Aquaculture, 2006, 260(1-4): 315-325.
- [12] 叶海辉,李少菁,李祺福,等. 生物胺对雌性锯缘青蟹生殖神经内分泌的调控作用[J]. 海洋与湖沼, 2003: 329-333.
- [13] TINIKUL Y, JOFFRE MERCIER A, SOONKLANG N, et al. Changes in the levels of serotonin and dopamine in the central nervous system and ovary, and their possible roles in the ovarian development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 158(3): 250-258.
- [14] 杨筱珍,王金峰,杨丽娜,等. 日本新糠虾(*Neomysis japonica*)卵巢发育与卵子发生[J]. 海洋与湖沼, 2009(3): 338-346.
- [15] 杨筱珍,吴旭干,姚桂桂,等. 三疣梭子蟹第一次卵巢发育过程中卵母细胞和卵泡细胞超微结构的观察[J]. 复旦学报:自然科学版, 2007, 46(6): 963-967.
- [16] 姚桂桂,吴旭干,成永旭,等. 东海三疣梭子蟹雌体不同生理阶段肝胰腺的生化组成与其组织学结构的关系[J]. 海洋学报, 2008, 30(6): 122-131.
- [17] WONGPRASERT K, ASUVAPONGPATANA S, POLTANA P, et al. Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 2006, 261(4): 1447-1454.
- [18] ONGVARRASOPONE C, ROSHORM Y, SOMYONG S, et al. Molecular cloning and functional expression of the *Penaeus monodon* 5-HT receptor [J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Gene Structure

- and Expression, 2006, 1759(7):328-339.
- [19] 孙金生, 赵景霞, 相建海. 5-羟色胺对中华绒螯蟹眼柄 MTXO 细胞兴奋和分泌活动的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(4):450-453.
- [20] 姜叶琴, 姚健萍, 杨万喜. 秀丽白虾卵母细胞不同发育阶段滤泡细胞的超微结构[J]. 动物学研究, 2003, 24(4):287-292.
- [21] STRICKER S, SMYTHE T. 5-HT causes an increase in cAMP that stimulates, rather than inhibits, oocyte maturation in marine nemertean worms [J]. Development, 2001, 128(8):1415-1427.
- [22] BROWN R, SERGEEVA O, ERIKSSON K, *et al.* Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline) [J]. Journal of Neuroscience, 2002, 22(20):8850-8859.
- [23] HAMIDA L, MEDHIOUB M, COCHARD J, *et al.* Evaluation of the effects of serotonin (5-HT) on oocyte competence in *Ruditapes decussatus* (Bivalvia, Veneridae) [J]. Aquaculture, 2004, 239(1-4):413-420.

The presence of 5-HT in ovary and hepatopancreas of *Neomysis japonica* using immunohistochemical method

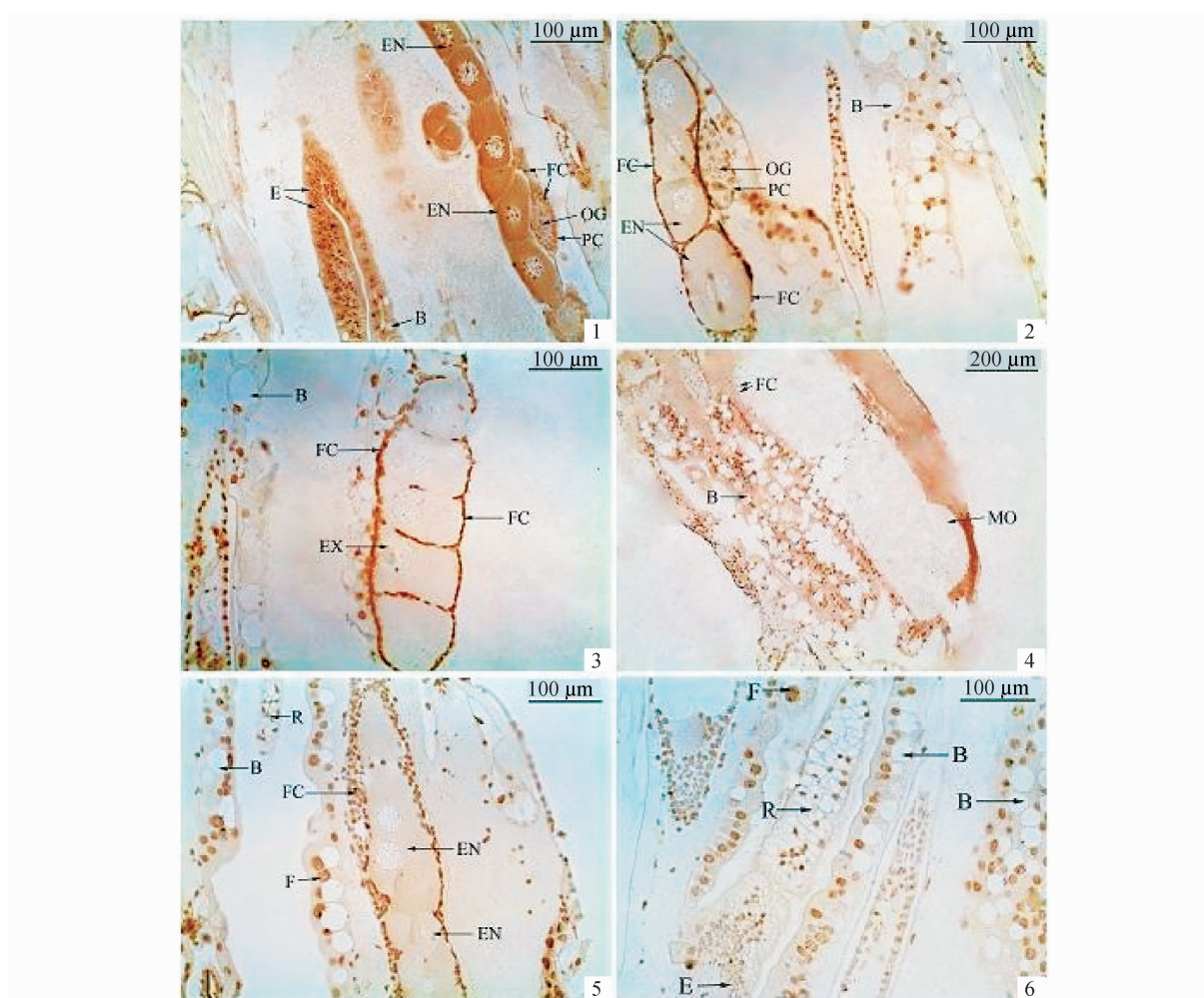
YANG Li-li, YANG Xiao-zhen, ZHAO Liu-lang, CHENG Yong-xu*, WU Xu-gan

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: The distribution of 5-HT in main cells of both ovary and hepatopancreas at different ovary stages of *Neomysis japonica* was observed and compared by using immunohistochemical method. These cells included follicle cell, oogonium, endogenous vitellogenic oocyte, exogenous vitellogenic oocyte, mature oocyte, embryonic cells, blister like cells, resorptive cells, fibrillar cells. The results showed that changes on the distribution of positive 5-HT cells were observed with ovary development. All the follicle cells are stained positively at each ovary stage. As for the oocyte, both the cytoplasm and nucleus are stained positively during the early developmental stages, including Stage I, II, and III. But the positive intensity presents a negative trend with ovary development. The oocytes are stained negatively at Stage IV whereas they were found weak positive in Stage V. In contrast, the hepatopancreas cells are stained positively during each stage. Moreover, there are no significant differences of positive 5-HT in different types of hepatopancreas cells during the ovary development. In addition, the 5-HT positive intensities of oocyte were consistent with hepatopancreas cytoplasm throughout all ovary developmental stages (except Stage IV).

Key words: *Neomysis japonica*; 5-HT; oocyte; follicle cells; hepatopancreas cells

Corresponding author: CHENG Yong-xu. E-mail: yxcheng@shou.edu.cn



图版 日本新糠虾不同发育时期卵巢和肝胰腺细胞中的 5-HT 阳性分布

1. I 期卵巢, 2. II 期卵巢, 3. III 期卵巢, 4. IV 期卵巢, 5. V 期卵巢, 6. III 期的肝胰腺。

FC: 滤泡细胞, OG: 卵原细胞, EN: 内源性卵黄合成期卵母细胞, EX: 外源性卵黄合成期卵母细胞, MO: 成熟卵细胞, PC: 横桥, E: 胚细胞, B: 泡状细胞, R: 吸收细胞, F: 纤维细胞。

Plate The distribution of positive 5-HT in the cells of ovary and hepatopancreas of *N. japonica* at different ovary stages

1. ovary at stage I, 2. ovary at stage II, 3. ovary at stage III, 4. ovary at stage IV, 5. ovary at stage V, 6. hepatopancreas at stage III.

FC: follicle cell, OG: oogonium, EN: endogenous vitellogenic oocyte, EX: exogenous vitellogenic oocyte, MO: mature oocyte, PC: proliferate center, E: embryonic cells, B: blister like cells, R: resorptive cells, F: fibrillar cells.