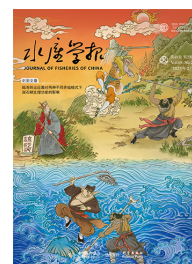


DOI: 10.11964/jfc.20220913693

## 短蛸脑图谱的构建

王丽华<sup>1,2</sup>, 郑小东<sup>1,2\*</sup>

1. 中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 中国海洋大学, 海洋生物多样性与进化教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

第一作者: 王丽华, 从事头足类神经生物学研究, E-mail: [lhwang@stu.ouc.edu.cn](mailto:lhwang@stu.ouc.edu.cn)

## 摘要:

【目的】为探究短蛸脑组织结构和神经元分布特征。

【方法】采用解剖学和组织学方法获得短蛸脑矢状面、冠状面和横断面的连续切片图像, 构建脑结构图谱, 并采用免疫组化技术, 以神经元核抗原 (NeuN) 为第一抗体标记短蛸脑成熟神经元细胞, 分析脑组织结构和内部神经元分布特征。

【结果】短蛸中央脑环绕食道, 可分为食道上神经团和食道下神经团, 视叶位于两侧, 通过视神经束与中央脑相连; 根据各脑叶的结构和功能, 将食道上神经团分为垂直叶复合体、基底叶复合体、口球叶复合体、视神经束复合体和其他区域, 食道下神经团分为前部食道下神经团、中部食道下神经团和后部食道下神经团; NeuN 抗体免疫反应阳性信号出现在中央脑区域, 且多集中在食道下神经团脑叶核周层的大细胞, 视叶无阳性信号; 短蛸脑结构与分区呈现典型蛸类脑特征, 各脑叶神经元细胞类型存在结构差异性。

【结论】本研究为完善短蛸基础神经生物学信息, 深入开展脑功能分子网络机制等研究提供理论基础。

关键词: 短蛸; 脑图谱; 神经元核抗原; 免疫组化

通信作者: 郑小东, 从事头足类分类与遗传多样性研究, E-mail: [xzheng@ouc.edu.cn](mailto:xzheng@ouc.edu.cn)

资助项目: 国家自然科学基金 (32170536)

收稿日期: 2022-09-19

修回日期: 2023-07-12

文章编号: 1000-0615(2025)02-029111-09  
中图分类号: S 917.4  
文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)  
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

现存头足类动物可分为鹦鹉螺亚纲 (Nautiloidea) 和鞘亚纲 (Coleoidea), 后者包括章鱼、鱿鱼和乌贼<sup>[1]</sup>。鞘亚纲的神经系统由中枢神经系统和周围神经系统组成, 是无脊椎动物进化的顶峰<sup>[2]</sup>, 其中, 中枢神经系统指高度集中的中枢脑<sup>[3-4]</sup>。鞘亚纲中, 章鱼具有最为复杂化的中枢脑, 其脑由若干相互交织的脑小叶组成, 以支持信息的传输、集成和计算, 参与调控生殖、色素变化、防御等各项生理和行为活动<sup>[2, 5]</sup>。目前对章鱼脑的研究主要集中在脑结构和神经连接<sup>[2, 5-6]</sup>、电生理学和分子突触<sup>[7-10]</sup>、神经肽分布与表达<sup>[11-14]</sup>以及基因组和转录组<sup>[15-16]</sup>等方面。构建章鱼脑结构图谱, 掌握其神经网络分布特征可以从基础生物学角度阐明脑对生长发育、生殖、衰老等生理活动的调控机制。

短蛸 (*Amphioctopus fangsiao*) 俗称饭蛸、短腿蛸、小蛸等, 栖息于底质为泥砂质的海域, 北至日本北海道西海岸, 南至中国南海均有分布, 具有生活史短、生长迅速、营养丰富等优势, 是我国重要的经



济蛸类<sup>[17]</sup>。与广泛研究的真蛸相比, 短蛸体积小, 脑体重比更高, 易获得且价格较低, 可作为研究我国近海头足类动物脑部结构和行为调控的模式物种。近年来, 有关短蛸基础生物学、繁育、遗传等方面研究相继开展<sup>[17-19]</sup>, 但神经生物学研究尚未见报道, 识别短蛸脑内部组织结构与功能分区是开展短蛸神经科学研究的第一步。

本实验采用解剖学、组织学和免疫组织化学等技术手段探究短蛸脑图谱, 旨在为完善其基础神经生物学信息, 深入开展短蛸等章鱼脑功能分子网络机制等研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品固定与解剖

活体短蛸(19♂, 11♀)购于山东青岛齐东路海鲜市场, 体重(63.65±14.85)g。所选取样品的脑均已发育成熟, 内部形态结构无显著差异。将短蛸置于3.5% MgCl<sub>2</sub>溶液中麻醉15~20 min, 直至其体表颜色变白且无法对外界刺激做出反应后停止麻醉。采用改良的经心灌注法对短蛸脑进行灌注固定<sup>[20]</sup>。按照解剖学方法, 即以短蛸口球处为起点沿中线向后解剖直至脑暴露于视线中, 观察脑的位置、形态、特征并拍照。本研究遵守中国海洋大学伦理委员会规范, 样品解剖符合实验动物福利要求。

### 1.2 组织学方法

将剥离出的完整脑置于4%多聚甲醛(PFA)中4℃固定12~24 h。脱水前, 样品用0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.36)冲洗3次, 每次5 min, 以清除残留固定液。乙醇梯度脱水、二甲苯透明后进行石蜡包埋。包埋时要注意方位, 便于后续连续切片。使用切片机(Leica RM2016)进行矢状面、冠状面和横断面三方位切片, 切片厚度为5 μm, 然后进行苏木精和伊红(H.E)染色<sup>[21]</sup>, 显微镜下观察并拍照。

### 1.3 免疫组织化学方法

根据与H.E染色相同的步骤制备5 μm石蜡切片。切片梯度酒精脱蜡水化后滴加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育10 min; 置于0.01 mol/L柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)中进行微波抗原修复。待切片冷却至室温后, 用免疫组化笔描绘脑切片轮

廓, 滴加7.5%山羊血清, 室温孵育10 min, 吸去血清后滴加第一抗体(NeuN Rabbit Monoclonal Antibody, 上海碧云天生物技术股份有限公司)4℃湿盒孵育过夜。第2天, 滴加第二抗体[辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L), 上海碧云天生物技术股份有限公司], 室温孵育15 min。滴加DAB显色, 约3~5 min, 显色后迅速置于0.1 mol/L PBS中以终止染色。除滴加山羊血清之后, 在每一步之间用0.1 mol/L PBS(pH 7.36)摇床冲洗切片3次。苏木精复染细胞核, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。显微镜下观察并拍照。用0.1 mol/L PBS(pH 7.36)代替第一抗体滴加在切片上, 作为阴性对照。

## 2 结果

### 2.1 短蛸脑结构

短蛸头部位于胴体和腕之间, 头部表皮组织下方就是位于两眼间的脑(图1)。在完全去除包围在脑周围的软骨匣和结缔组织后, 即可观察短蛸完整的脑结构(图2)。从外部形态上看, 短蛸脑整体呈乳白色, 处于性成熟时期的视腺呈淡黄色(图1-b)。食道穿过中央脑, 将其分为食道上神经团和食道下神经团。中央脑周围有软骨匣包裹, 起保护作用。两侧的视叶在内侧通过视神经束(视腺、嗅叶和脑脚叶位于其上)与中央脑(主要为食道上神经团)相连, 在外侧通过视觉神经与眼睛相连。

根据解剖特征, 在脑后端选定一点为连续切片的基准点以确定每个切片的坐标(图2红色标注处), 然后对短蛸脑进行冠状面、矢状面和横断面三个方位的连续切片。共识别主要神经束12条、脑叶49个, 其中食道上神经团36个, 食道下神经团11个。沿用真蛸脑命名和缩写<sup>[5]</sup>进行标注(图版I)。

短蛸脑环绕食道, 由不同大小的脑叶组成, 各神经脑叶通过神经纤维相互连接。基于短蛸脑结构和内部分区, 将食道上神经团分为垂直叶复合体、基底叶复合体、口球叶复合体、视神经束复合体和其他区域(表1)。每个神经脑叶复合体由若干神经小叶组成, 它们构成一个系统, 协调控制短蛸的各项活动, 如垂直叶、亚垂直叶和额叶构成垂直叶复合体, 调控认知、

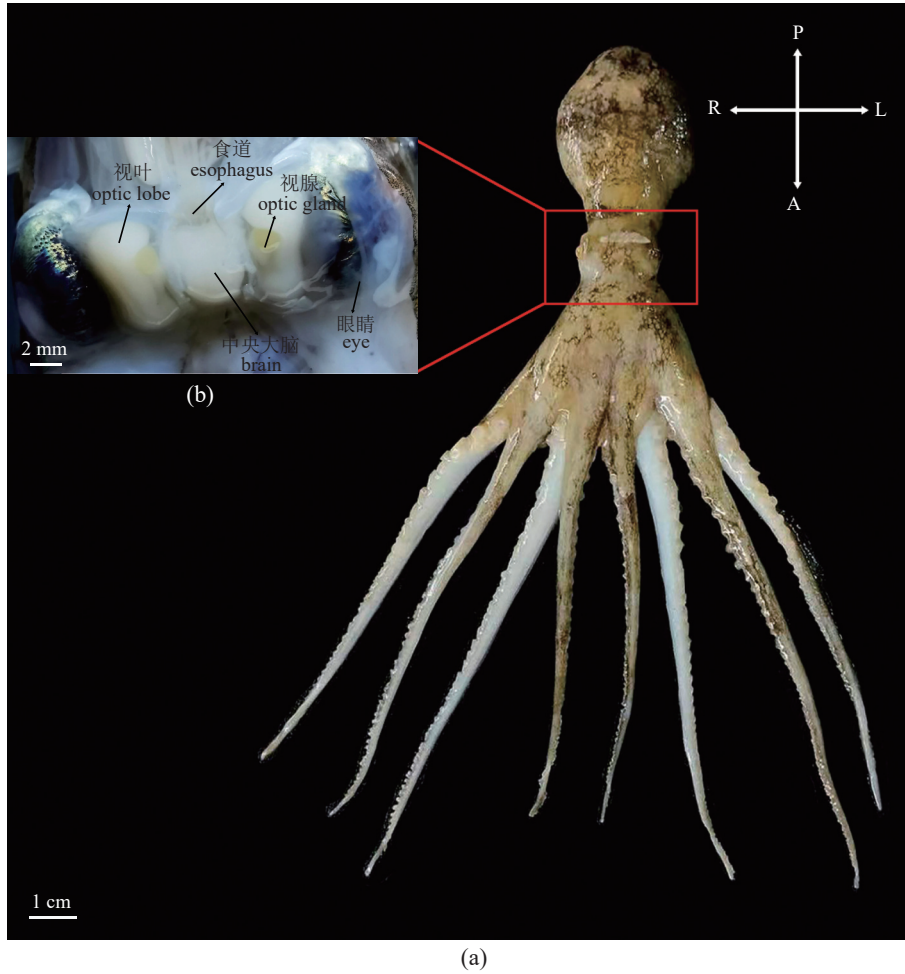


图 1 短蛸脑

(a) 短蛸; (b) 未离体的短蛸脑, A.前侧, L.左侧, R.右侧, P.后侧, 下同。

Fig. 1 Brain of *A. fangsiao*

(a) *A. fangsiao*, (b) the brain of *A. fangsiao*, A. anterior, L. left, R. right, P. posterior, the same below.

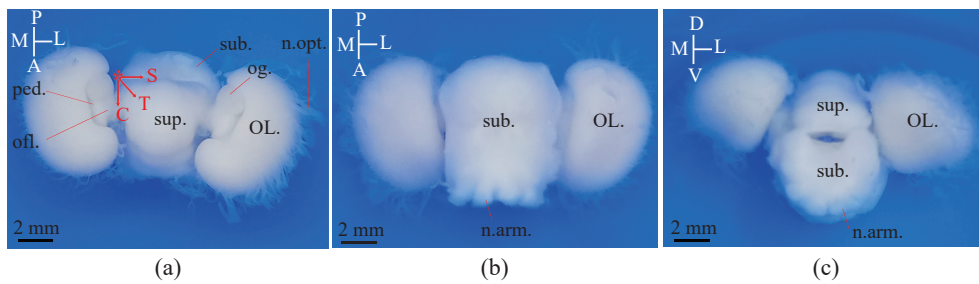


图 2 不同视角下短蛸脑解剖图

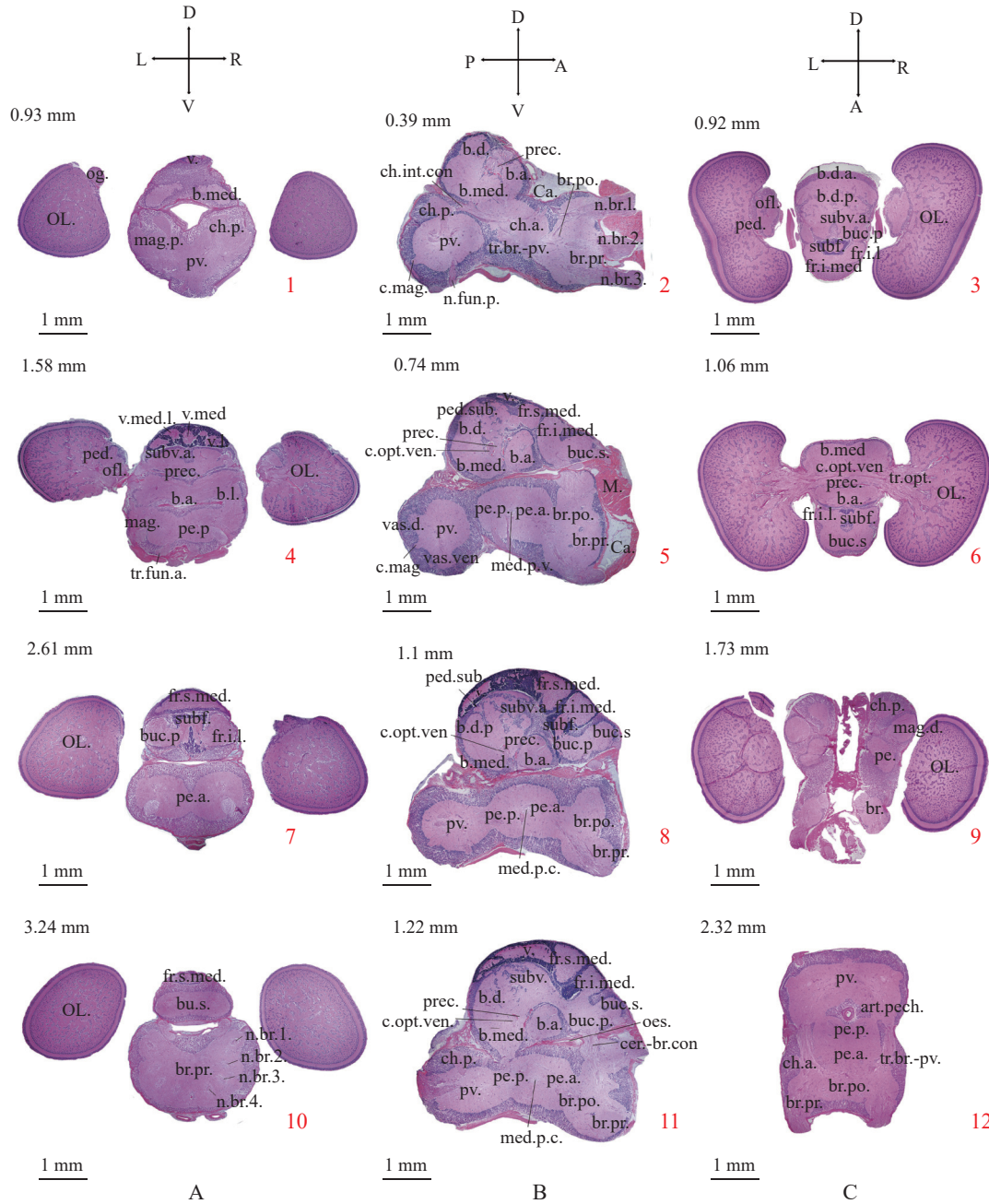
(a) 俯视图, (b) 仰视图, (c) 正视图。C.冠状面, D.背侧, M.中线, S.矢状面, T.横断面, V.腹侧。n. opt. 视神经, n. arm.. 腕神经, og.. 视腺, OL.. 视叶, ofl.. 嗅叶, ped.. 脑脚叶, sub.. 食道下神经团, sup.. 食道上神经团, 下同。

Fig. 2 Anatomy of the *A. fangsiao* brain from different perspectives

(a) overhead view, (b) upward view, (c) front view. C. coronal plane, D. dorsal, M. middle, S. sagittal plane, T. transverse plane, V. ventral. n. opt. optic never, n. arm.. arm nerve, og.. optic gland, OL.. optic lobe, ofl.. olfactory lobe, ped.. peduncle lobe, sub.. subesophageal mass, sup.. supraesophageal mass, the same below.

学习和记忆行为。根据矢状面 H.E 染色图像可以明显区分出食道下神经团的前、中、后三个

部分 (图版 I 中的 B)。与食道上神经团相同, 它们由不同的神经脑叶组成, 主要参与调控短



图版 I 短蛸脑图谱

A. 冠状面, B. 矢状面, C. 横断面; art.ceph.: 脑动脉, ca.: 软骨, cer.-br.con.: 脑-腕连接, ch.int.con.: 间色素细胞连接, c.mag.: 巨大细胞连接, c.opt.ven.: 腹侧视觉连合, M: 肌肉, ofl.: 嗅叶, med.p.c.: 中间足叶连合, n.br.1.: 腕神经 1, n.br.2.: 腕神经 2, n.br.3.: 腕神经 3, n.br.4.: 腕神经 4, n. fun.p.: 后漏斗神经, oes.: 食道, tr.br.-pv.: 腕叶-外套内脏叶束, tr.opt.: 视叶神经束, 其余缩写见表 1。左上角数字表示切片深度。

Plate I Brain atlas of *A. fangsiao*

A. coronal plane, B. sagittal plane, C. transverse; art.ceph.: artert cephalic, ca.: cartilage, cer.-br.con.: cerebro-brachial connective, ch.int.con.: interchromatophore connective, c.mag.: magnocellular commissure, c.opt.ven.: ventral optic commissure, M: muscle, ofl.: olfactory lobe, med.p.c.: median pedal commissure, n.br.1.: brachial nerve 1, n.br.2.: brachial nerve 2, n.br.3.: brachial nerve 3, n.br.4.: brachial nerve 4, n. fun.p.: posterior funnel nerve, oes.: esophagus, tr.br.-pv.: brachial - palliovisceral lobe, tr.opt.: optic lobe tract, see Tab.1 for other abbreviations. The number in the upper left corner represents the slice depth.

蛸的低级和中级运动。从横断面上, 可以明显观察到食道穿过短蛸脑, 将食道下神经团最靠

近背部的结构分为对称的两部分, 涉及的脑叶有后色素细胞叶、背巨大细胞叶、足叶和腕叶,

表 1 短蛸脑结构列表、对应缩写和中文名称

Tab. 1 List of *A. fangsiao* brain structures, corresponding abbreviations and Chinese names

结构 structure	缩写 abbreviation	中文名称 Chinese name	
垂直叶复合体 vertical lobe complex	vertical lobe	v.	垂直叶
	median vertical lobe	v.med.	中间垂直叶
	lateral median vertical lobe	v.med.l	侧-中间垂直叶
	lateral vertical lobe	v.l.	侧垂直叶
	subvertical lobe	subv.	亚垂直叶
	anterior subvertical lobe	subv.a.	前亚垂直叶
	posterior subvertical lobe	subv.p.	后亚垂直叶
	lateral subvertical lobe	subv.l.	侧亚垂直叶
	superior frontal lobe	fr.s.	上额叶
	median superior frontal lobe	fr.s.med.	中间上额叶
	lateral superior frontal lobe	fr.s.l.	侧上额叶
	inferior frontal lobe	fr.i.	下额叶
	median inferior frontal lobe	fr.i.med.	中间下额叶
	lateral inferior frontal lobe	fr.i.l.	侧下额叶
	subfrontal lobe	subf.	亚额叶
	基底叶复合体 basal lobe complex	anterior basal lobe	b.a.
anterior anterior basal lobe		b.a.a.	前-前基底叶
posterior anterior basal lobe		b.a.p.	后-前基底叶
dorsal basal lobe		b.d.	背基底叶
median basal lobe		b.med.	中间基底叶
lateral basal lobe		b.l.	侧基底叶
interbasal lobe		b.int.	间基底叶
口球叶复合体 buccal lobe complex	buccal lobe	bu.	口球叶
	superior buccal lobe	bu.s.	上口球叶
	posterior buccal lobe	bu.p.	后口球叶
视神经束复合体 optic tract complex	olfactory lobe	ofl.	嗅叶
	peduncle lobe	ped.	脑脚叶
	optic gland	og.	视腺
	optic tract	opt.t.	视神经束
其他区域 other regions	subpedunculate lobe	ped.sub.	脑亚脚叶
	precommissural lobe	prec.	前连合叶
	Optic Lobe	OL.	视叶
前部食道下神经团 anterior subesophageal mass	brachial lobe	br.	腕叶
	prebrachial lobe	br. pr.	前腕叶
	postbrachial lobe	br. po.	后腕叶
中部食道下神经团 middle subesophageal mass	pedal lobe	pe.	足叶
	anterior pedal lobe	pe.a.	前足叶
	posterior pedal lobe	pe.p.	后足叶
	lateral pedal lobe	pe.l.	侧足叶
	anterior chromatophore lobe	ch.a.	前色素细胞叶
后部食道下神经团 posterior subesophageal mass	palliovisceral lobe	pv.	外套内脏叶
	posterior chromatophore lobe	ch.p.	后色素细胞叶
	funnel lobe	fun.	漏斗叶
	vasomotor lobe	vas.	血管舒缩叶
	ventral vasomotor lobe	vas.ven.	腹血管舒缩叶
巨大细胞叶 magnocellular lobe	dorsal vasomotor lobe	vas.d.	背血管舒缩叶
	posterior magnocellular lobe	mag.p.	后巨大细胞叶
	dorsal magnocellular lobe	mag.d.	背巨大细胞叶

随后又逐渐愈合形成一个整体, 这种分隔在食道上的神经团并不明显(图版 I 中的 C)。巨大细胞叶与背基底叶、侧基底叶、外套内脏叶等多个脑叶相连, 位于短蛸脑两侧, 环绕食道形成一个特殊脑叶, 既不属于食道神经团, 也不属于食道下神经团, 称为环食道神经团。

## 2.2 NeuN 在短蛸脑中的定位

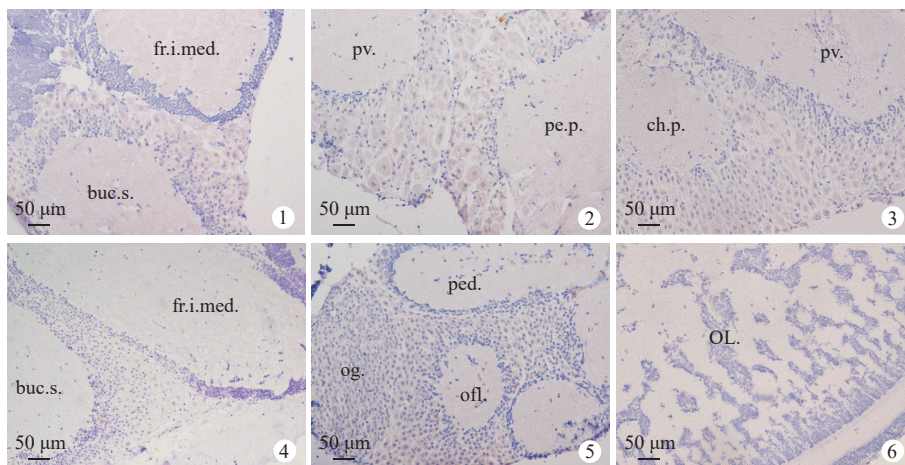
NeuN 抗体的免疫反应阳性信号位于短蛸的中央脑区域, 视叶无阳性信号(图版 II -6)。与食道下神经团相比, 食道神经团免疫反应阳性信号稀疏且局部化, 其中口球叶染色最为明显。上口球叶细胞的外层大细胞免疫反应阳性信号强烈, 靠近神经纤维网的小细胞无染色(图版 II -1)。垂直叶复合体仅亚垂直叶有稀疏轻微染色, 其余各叶均无免疫反应阳性信号产生。在食道下神经团的脑叶中, NeuN 抗体免疫反应阳性信号主要集中在外套内脏叶、足叶和腕叶的大神经元(图版 II -2)。在色素细胞叶中, 在中等大小的神经元中可以检测到免疫反应阳性信号(图版 II -3)。视神经束复合体各小叶均有不同程度染色, 其中嗅叶染色最强烈, 阳性染色位于嗅叶的外层细胞, 靠近神经纤维网的小细胞无染色(图版 II -5)。

## 3 讨论

本研究从冠状面、矢状面和横断面三方位

呈现了短蛸脑的完整内部组织结构及脑叶分区。短蛸脑内部脑叶和神经束在结构上与真蛸(*Octopus vulgaris*)和长蛸(*O. minor*)一致<sup>[5-6, 22]</sup>, 具有典型的章鱼脑特征: 视叶占脑部整体结构比例大且无折叠, 垂直叶向内凹陷形成 5 个脑回, 但真蛸的视叶占比相对较大, 可能与真蛸需要更加强大的视觉功能以支持其在较深海域进行捕食等行为活动有关。头足类动物的神经解剖学数据表明, 八腕目神经系统结构是相对保守的。与鱿鱼和乌贼相比, 短蛸脑在结构上更加集中, 主要表现为口球叶复合体作为中央脑的一部分, 二者紧密相连, 而鱿鱼和乌贼是分离的<sup>[3, 23]</sup>。将短蛸脑结构与曼氏无针乌贼比较后发现, 除上述特征外, 短蛸的垂直叶占食道神经团的比例更大, 且食道下神经团中缺少鳍叶(fin lobe)<sup>[24]</sup>。此外, Koizumi 等<sup>[25]</sup>在玄妙微鳍乌贼(*Idiosepius paradoxus*)脑中观察到额背基底叶(frontal dorsal basal lobe), 但在短蛸脑及之前所描述的长蛸和真蛸脑的对应区域均未发现此结构, 不同类群神经系统特异性差异可能是对系统发育限制和对栖息地适应的一种反应<sup>[26-27]</sup>。

NeuN 抗体是一种能与多数脊椎动物中枢和周围神经系统中的成熟神经元发生免疫反应的神经元标记物<sup>[28-29]</sup>。Baldascino 等<sup>[30]</sup>首次将 NeuN 抗体应用于真蛸的周围神经系统, 以识别真蛸胃神经节的一般结构。其中所描述的神



图版 II NeuN 免疫染色短蛸脑的矢状面(1-4)和冠状面(5-6)图像

1. 口球叶复合体 NeuN 免疫反应阳性信号, 2-3. 食道下神经团脑叶, 4. 图像 1 中相同部位的阴性对照, 5. 视神经束复合体, 6. 视叶无免疫反应阳性信号。

### Plate II NeuN immunostaining of sagittal (1-4) and coronal (5-6) sections of *A. fangsiao* brain

1. positive immunoreactivity for NeuN in the buccal lobe complex, 2-3. lobes of subesophageal mass, 4. negative control of graphic 1, 5. optic never tract complex, 6. no NeuN immunoreactivity in the optic lobe.

元细胞分布特征在短蛸脑中得到证实, 并有一些新的发现。免疫组织化学结果发现, 与食道神经团相比, 食道下神经团的 NeuN 抗体免疫染色效果更为强烈。这可能是由于系统发育的限制, 在胚胎发育过程中, 食道下神经团的神经纤维网比食道上神经团的神经纤维网发育的更快<sup>[31-32]</sup>。NeuN 抗体在短蛸脑中的表达是选择性的, 其分布与各脑叶参与调控的行为功能密切相关。其中在负责调控摄食、防御和吸盘活动等行为的食道下神经团脑叶外周细胞层表达强烈, 而在垂直叶、亚垂直叶等少突胶质细胞或小胶质细胞含量丰富的食道上神经团脑叶中未观察到免疫反应阳性信号或免疫反应阳性信号较弱。这种表达模式与小鼠 (*Mus musculus*) 类似<sup>[33]</sup>。猜测短蛸脑各脑叶成熟神经元分布的这种结构差异性, 与参与构成各脑叶的神经元细胞类型不同相关。同时本研究证明 NeuN 抗体可作为章鱼中枢神经系统成熟神经元的有效标记物。

Messenger 等<sup>[34]</sup>通过电刺激、诱发脑损伤等方法验证了真蛸脑各脑叶的功能。食道下神经团脑叶多属于低级和中级运动中枢, 控制腕、胴体肌肉和内脏等活动<sup>[5, 35]</sup>。食道上神经团结构更加复杂, 其脑叶负责调控精细运动(基底叶)或进食、防御等认知过程(额叶、口球叶等)<sup>[3, 35]</sup>。不同脑叶之间互相配合以调控各项活动, 如来自视叶的视觉信息传递至侧上额叶, 经过中下额叶后神经元投射到垂直叶, 构成视觉学习和记忆的短通路<sup>[36]</sup>。短蛸脑内部组织结构与真蛸相类似, 且各脑叶成熟神经元细胞类型与其调控的功能密切相关, 因此认为短蛸脑各脑叶的功能与真蛸一致, 但仍需设计实验进一步验证。

### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Strugnell J, Norman M, Jackson J, *et al.* Molecular phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) using a multi-gene approach; the effect of data partitioning on resolving phylogenies in a Bayesian framework[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 37(2): 426-441.
- [ 2 ] Nixon M, Young J. Z. The brains and lives of cephalopods[M]. Oxford, UK: Oxford University Press, 2003: 383-385.
- [ 3 ] Shigeno S, Yamamoto M. Organization of the nervous system in the pygmy cuttlefish, *Idiosepius paradoxus* Ortmann (Idiosepiidae, Cephalopoda)[J]. *Journal of Morphology*, 2002, 254(1): 65-80.
- [ 4 ] McPhie D L, Miller M W. *Biological bulletin* virtual symposium: marine invertebrate models of learning and memory[J]. *The Biological Bulletin*, 2006, 210(3): 171-173.
- [ 5 ] Young J Z. The anatomy of the nervous system of *Octopus vulgaris*[M]. London: Oxford University Press, 1971.
- [ 6 ] Jung S H, Song H Y, Hyun Y S, *et al.* A brain atlas of the long arm octopus, *Octopus minor*[J]. *Experimental Neurobiology*, 2018, 27(4): 257-266.
- [ 7 ] Shomrat T, Zarrella I, Fiorito G, *et al.* The octopus vertical lobe modulates short-term learning rate and uses LTP to acquire long-term memory[J]. *Current Biology*, 2008, 18(5): 337-342.
- [ 8 ] Wollesen T, Sukhsangchan C, Seixas P, *et al.* Analysis of neurotransmitter distribution in brain development of benthic and pelagic octopod cephalopods[J]. *Journal of Morphology*, 2012, 273(7): 776-790.
- [ 9 ] Shigeno S, Ragsdale C W. The gyri of the octopus vertical lobe have distinct neurochemical identities[J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 2015, 523(9): 1297-1317.
- [ 10 ] Sanders G D. Long-term memory of a tactile discrimination in *Octopus vulgaris* and the effect of vertical lobe removal[J]. *Brain Research*, 1970, 20(1): 59-73.
- [ 11 ] Altobelli G G, Cimini V. Calretinin distribution in the octopus brain: an immunohistochemical and *in situ* hybridization histochemical analysis[J]. *Brain Research*, 2007, 1132: 71-77.
- [ 12 ] Wollesen T, Loesel R, Wanninger A. FMR/Famide-like immunoreactivity in the central nervous system of the cephalopod mollusc, *Idiosepius notoides*[J]. *Acta Biologica Hungarica*, 2008, 59 Suppl: 111-116.
- [ 13 ] Di Cristo C, De Lisa E, Di Cosmo A. Control of GnRH expression in the olfactory lobe of *Octopus vulgaris*[J]. *Peptides*, 2009, 30(3): 538-544.
- [ 14 ] Bertapelle C, Polese G, Di Cosmo A. Enriched environment increases PCNA and PARP1 levels in *Octopus vulgaris* central nervous system: first evidence of adult neurogenesis in lophotrochozoa[J]. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2017, 328(4): 347-359.
- [ 15 ] Zhang X, Mao Y, Huang Z X, *et al.* Transcriptome analysis of the *Octopus vulgaris* central nervous system[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e40320.
- [ 16 ] Albertin C B, Simakov O, Mitros T, *et al.* The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties[J]. *Nature*, 2015, 524(7564): 220-224.

- [17] Jiang D H, Zheng X D, Qian Y S, *et al.* Embryonic development of *Amphioctopus fangsiao* under elevated temperatures: implications for resource management and conservation[J]. *Fisheries Research*, 2020, 225: 105479.
- [18] Jiang D H, Zheng X D, Qian Y S, *et al.* Development of *Amphioctopus fangsiao* (Mollusca: Cephalopoda) from eggs to hatchlings: indications for the embryonic developmental management[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2020, 2(1): 24–30.
- [19] Zheng J, Tang Y, Xu R, *et al.* Molecular phylogenetics and population demographic history of *Amphioctopus fangsiao*, inferred from mitochondrial and microsatellite DNA markers[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2023, 42(6): 39–48.
- [20] Abbott N J, Bundgaard M, Cserr H F. Brain vascular volume, electrolytes and blood-brain interface in the cuttlefish *Sepia officinalis* (Cephalopoda)[J]. *The Journal of Physiology*, 1985, 368(1): 197-212.
- [21] Fourth E. Acknowledgements[M]//Culling C F A, Allison R T, Barr W T. Cellular pathology technique. London: Butterworth-Heinemann, 1985.
- [22] 朱之发, 边力, 陈四清, 等. 长蛸脑显微结构及视腺的超微结构[J]. *水产学报*, 2021, 45(4): 522-530.  
Zhu Z F, Bian L, Chen S Q, *et al.* Microstructure of brain and ultrastructure of optic gland of *Octopus minor*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(4): 522-530 (in Chinese).
- [23] Chung W S, Kurniawan N D, Marshall N J. Toward an MRI-based mesoscale connectome of the squid brain[J]. *iScience*, 2020, 23(1): 100816.
- [24] 于新秀, 迟长凤, 吴常文, 曼氏无针乌贼 (*Sepiella maindroni*) 脑显微结构及视腺超微结构观察 [J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(2): 300-304.  
Yu X X, Chi C F, Wu C W. Brain microstructure and optic gland ultrastructure in *Sepiella maindroni*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(2): 300-304 (in Chinese).
- [25] Koizumi M, Shigeno S, Mizunami M, *et al.* Three-dimensional brain atlas of pygmy squid, *Idiosepius paradoxus*, revealing the largest relative vertical lobe system volume among the cephalopods[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2016, 524(10): 2142-2157.
- [26] Young J Z. Brain, behaviour and evolution of cephalopods[C]. Cambridge University Press, London, 1977, 38:377-434.
- [27] Maddock L, Young J Z. Quantitative differences among the brains of cephalopods[J]. *Journal of Zoology*, 1987, 212(4): 739-767.
- [28] Wolf H K, Buslei R, Schmidt-Kastner R, *et al.* NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1996, 44(10): 1167-1171.
- [29] Lavezzi A M, Corna M F, Matturri L. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a useful marker of neuronal immaturity in sudden unexplained perinatal death[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2013, 329(1-2): 45-50.
- [30] Baldascino E, Di Cristina G, Tedesco P, *et al.* The gastric ganglion of *Octopus vulgaris*: preliminary characterization of gene- and putative neurochemical-complexity, and the effect of *Aggregata octopiana* digestive tract infection on gene expression[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 1001.
- [31] Shigeno S, Yamamoto M. Embryonic brain development of *loliginids*: axonal scaffold and neuropil formation related to early life styles[J]. *Phuket Mar. Biol. Cent. Res. Bull*, 2005, 165: 155-165.
- [32] Wollesen T, Loesel R, Wanninger A. Pygmy squids and giant brains: Mapping the complex cephalopod CNS by phalloidin staining of vibratome sections and whole-mount preparations[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2009, 179(1): 63-67.
- [33] Weyer A, Schilling K. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2003, 73(3): 400-409.
- [34] Messenger J B. The effects on locomotion of lesions to the visuo-motor system in *Octopus*[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1967, 167(1008): 252-281.
- [35] Boycott B B. The functional organization of the brain of the cuttlefish *Sepia officinalis*[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1961, 153(953): 503-534.
- [36] Wang Z Y, Ragsdale C W. Cephalopod nervous system organization[M]//Oxford University. Oxford research encyclopedia of neuroscience. Oxford University Press, 2019: 1-24.



## Construction of the brain atlas of *Amphioctopus fangsiao*

WANG Lihua<sup>1,2</sup>, ZHENG Xiaodong<sup>1,2\*</sup>

1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory of Evolution and Marine Biodiversity, Ministry of Education,

Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Cephalopods possess the most complex brain structures among invertebrates. Due to the distinct functions regulated by various brain lobes, studying the anatomical structure of the brain and the distribution of neurotransmitters can lay the foundation for further in-depth research in neurobiology. Anatomy and histology were used to obtain three consecutive slice images of the sagittal plane, coronal plane and transverse plane, and constructed the brain atlas of *Amphioctopus fangsiao* to investigate the brain structure and neuronal distribution characteristics for this species. Neuron nuclear antigen (NeuN) was used as the primary antibody to label the mature neurons by immunohistochemical technique, and the brain tissue structure and internal neuron distribution characteristics were analyzed. The results showed that the central brain of *A. fangsiao* surrounded the esophagus, which could be divided into the supraesophageal mass and subesophageal mass, optic lobes were located on both sides and were connected to the central brain through the optic nerve tract. According to the structure and function of each lobe, supraesophageal mass was divided into vertical lobe complex, basal lobe complex, buccal lobe complex, optic tract complex and other regions. Subesophageal mass was consisted of anterior subesophageal mass, middle subesophageal mass and posterior subesophageal mass. NeuN immunoreactivity was observed in the central brain, and mainly concentrated in the large cells in the perinuclear layer of the subesophageal mass, and there was no NeuN immunoreactivity in the optic lobe. The brain structure and division of the *A. fangsiao* showed typical octopus brain characteristics, and there were structural differences in the neuronal cell types in the lobe of the brain.

**Key words:** *Amphioctopus fangsiao*; brain atlas; neuronal nuclear antigen; immunohistochemistry

**Corresponding author:** ZHENG Xiaodong. E-mail: [xdzheng@ouc.edu.cn](mailto:xdzheng@ouc.edu.cn).

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (32170536)