

中国对虾 XO-SG 复合体 及其分泌物的初步研究*

孙金生^{1,2}

相建海¹

(¹ 中国科学院海洋研究所) (² 天津市水产研究所)

X 器官-窦腺(XO-SG)复合体是甲壳动物重要神经内分泌器官,类似哺乳动物的下丘脑-垂体系统,它能分泌多种神经肽类激素,调控甲壳动物的生殖、发育和蜕皮等重要生理功能(Cooke *et al.*, 1982; Keller, 1992)。对 XO-SG 复合体的研究一直是甲壳动物内分泌学的重点内容。XO 由视神经节内一群相互无连接的单轴突分泌肽神经细胞组成,它们的轴突末梢在血窦附近膨大形成窦腺, XO 内胞体形成的神经肽类激素经轴突运输到窦腺储存和释放。近 20 年来,一些学者对 10 余种甲壳动物眼柄内 X 器官-窦腺复合体进行了形态及超微结构研究,发现 X 器官神经内分泌细胞胞体的分布位置和结构特征各不相同,区分出 2 至 7 种不同类型的神经内分泌末梢,并观察到多种神经内分泌物质释放方式(Fingerman, 1992; Dirksen, 1992; Castany, 1997; Weatherby, 1981)。我国对甲壳动物神经内分泌系统的研究刚刚开始(蔡生力, 1998),仅对锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) XO-SG 复合体进行了显微和超微结构观察(上官步敏等, 1994, 1995; 姚泊, 1995; 孙金生等, 2000)。中国对虾(*Penaeus sinensis*)是我国重要经济甲壳动物,在育苗过程中往往采用切断或灼烧眼柄的方法来加速亲虾性腺发育和产卵,而对 XO-SG 复合体却了解甚少,仅进行了组织学观察(康现江等, 1998)。为此作者对中国对虾眼柄 XO-SG 复合体显微和超微结构及其分泌物特征进行了初步研究,为进一步研究对虾神经分泌细胞的离体培养和神经分泌调控机制打下基础。

一、材料与方法

1. 实验用虾

实验用虾为养殖中国对虾,购于青岛南山市场,对虾体长为 9~11cm,暂养于海洋所水族楼 4t 水池中。选取体征健康雌虾,经冰水“麻醉”后,迅速切下右侧眼柄,置于 4℃ 生理盐水中剥离外骨骼、肌肉和复眼层,取出视神经节。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4236 号。

国家重点基础研究资助项目(G1999012007 号)。

收稿日期:2000 年 12 月 10 日。

2. 电镜样品的制作和观察

取 10 尾虾的视神经节, 去除视皮层后, 于内髓的外侧完整地取下窦腺。用两个双刃刀片在内髓(Medulla interna, MI)、外髓(Medulla externa, ME)和终髓(Medulla terminala, MT)的交接处分别切下 MT、MI、ME。按 Dircksen(1992)的方法固定样品, 样品经丙酮系列脱水后, 于 Epon 812 包埋、瑞典 LKB V 型超薄切片机切片, 在日立 6000 电镜下观察记录。在放大 28 000 倍的照片上测量神经颗粒的大小, 测量结果进行统计学分析。

3. 毛细管电泳实验方法

(1) SG 提取液制备 取 20 个 SG, 置于 100 μ l 的三蒸水中(5 μ l/SG), 经反复冻溶三次, 再经超声破碎 30s 后, 于 15 000 r/min 冷冻, 离心 10min, 取上清液存于 -80℃ 备用。

(2) 毛细管电泳条件和方法 本文采用 BioFocus™ 3000 型高效毛细管电泳系统(Bio-Rad, 美国), 数据采集和处理由 BioFocus operating software 工作站完成, 使用中国科学院大连化学物理所提供的聚丙烯酰胺涂层毛细管柱(50 μ m i. d. $\times$ 37 cm, 有效柱长为 32cm), 以 0.1mol/L 硼酸缓冲液(pH8.0)为电泳介质, 运行电压为 6kV [(-) $\rightarrow$ (+)]。被测溶液采用压力(15kPa/s)进样, 于 18℃ 下恒压电泳 30min, 210nm 检测。实验前和两次实验间依次用水和运行缓冲液清洗毛细管 2min, 每次实验重复 5 次以上。

二、结果与讨论

1. 中国对虾视神经节结构

XO-SG 复合体被称为甲壳动物内分泌调控中心, 在有眼柄的种类, XO-SG 位于眼中, 而无眼柄的种类, XO-SG 则位于脑神经节内。电镜观察结果表明, 虽然中国对虾为有眼柄类甲壳动物, 但视神经节尚未进入眼柄, 仍然位于眼内, 被复眼色素层包裹, 因此不能称为眼柄视神经节。视神经节主要由神经分泌细胞、视觉神经细胞和胶质细胞组成, 外覆一层结缔组织膜, 自上而下分为视皮层(Lamina ganglionaris, LG)、ME、MI 和 MT 四部分

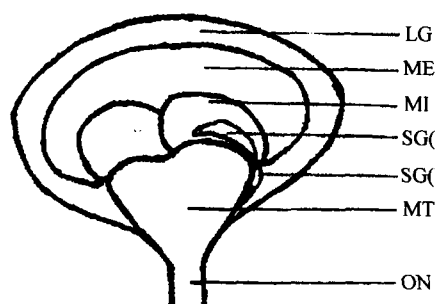


图 1 中国对虾神经内分泌系统结构示意图(侧面观) XO: X 器官(X-organ); SG: 窦腺(Sinus gland); MT: 终髓(Medulla terminalia); MI: 内髓(Medulla interna); ME: 外髓(Medulla externa); LG: 视皮层(Lamina ganglionaris), ON: 视神经(Optic nerve)

(图 1)。中国对虾 SG 由内窦和外窦两部分组成, 活体状态下 SG 呈乳白色, 无明显的轴路与 XO 连接。内窦位于视神经节内髓外侧面近终髓处, 呈月牙状, 大小约为 0.62mm $\times$ 0.25mm $\times$ 0.18mm。外窦位于终髓背侧, 扁平状, 明显小于内窦。

2. XO-SG 超微结构

XO-SG 复合体由两部分组成。XO 神经分泌细胞发出的轴突到达血窦周围后开始分枝、膨大, 包裹血窦形成一个神经血窦器, 即窦腺(SG)。切片中, SG 呈囊状, 轴突、膨大的末梢和胶质细胞及其突起紧密缠绕, 构成 SG 的壁, 中央是血窦腔。SG 壁的内侧覆盖一层无定形的神经衬膜(图版 I, 1)。与其他甲壳动物 SG 不

同,中国对虾 SG 部分神经衬膜朝血窦腔方向着生了大量的微绒毛。中央血窦形成许多小血窦,深入 SG 的壁内,使整个 SG 浸浴在血液中。神经胶质细胞主要起支持和运输营养的作用,散布于腺体中,呈椭圆形或不规则形状,核大,几乎占据整个细胞,异染色质较多,分布于核周,胞质中可见微丝、微管,线粒体多,呈椭圆型,细胞突起紧密缠绕神经末梢,使神经末梢形成双膜包裹的结构。

组成 SG 的主要结构成份是神经分泌末梢。膨大的末梢中充满了电子致密的神经分泌颗粒,微丝、微管消失,可见少量的线粒体和光面内质网(图版 I,1、2、3)。根据神经分泌颗粒的大小、形状、电子致密度及轴浆密度等特征,区分出 4 种类型的神经末梢(表 1,图版 I,2、3)。每种末梢中只含一种电子致密的神经分泌颗粒,颗粒的直径范围为 137~236nm,呈圆形或近圆形。I 型神经末梢为大型末梢,数量较多(29%),分泌颗粒的直径也最大,但电子密度最低。II 型末梢为小型神经末梢,数量较少(19.5%),分泌颗粒的电子密度最高。III 型神经末梢为中小型神经分泌末梢,数量最多(36.3%),内含中小型颗粒,电子密度较高;IV 末梢最少(14.7%),神经分泌颗粒最小,电子密度中等。

表 1 中国对虾腺神经末梢类型和神经分泌颗粒特征

末梢类型	末梢直径	末梢数量(%)	颗粒特征		
			平均直径(nm)	形状	电子密度
I	大型或中型	29.5	236 ± 22	圆形或近圆形	低
II	小型	19.5	198 ± 16	圆型或近圆形	高
III	小型或中型	36.3	155 ± 11	圆形或近圆形	较高
IV	小型	14.7	137 ± 15	圆形或近圆形	中等

由于中国对虾 SG 无明显的轴路,无法判断 XO 神经分泌细胞在视神经节中的分布位置,给超薄切片制作和超微结构的观察造成困难。康现江等(1998)采用组织切片方法观察了中国对虾 XO 神经分泌细胞的分布及组织学特征,发现神经分泌细胞散布于视神经节的内髓(MI)、外髓(ME)和终髓(MT)。于是我们分别固定和制备了 ME、MI、MT 的超薄切片。由于受超薄切片观察范围小的限制,我们只在视神经终髓基部外侧发现一种超微结构特征与甲壳动物神经内分泌细胞特征相似的神经细胞(图版 I,4),这种细胞胞质内具有丰富的高尔基体和一些致密颗粒,无发达的内质网,线粒体也较少。另外,在进行 XO 神经分泌细胞观察时,我们偶然在两尾中国对虾视神经节 MI 和 ME 神经细胞胞核中发现了对虾杆状病毒(图版 I,5、6),与寄生在其他组织中的对虾白斑杆状病毒的超微结构特征一致。在作者掌握的文献范围内,这还是首次在神经组织内发现对虾杆状病毒的寄生现象。

3. 神经分泌物质的释放方式

甲壳动物神经激素的释放方式和有关机制问题至今尚未解决。在一些甲壳动物 SG 中已观察到多种神经分泌物质的释放方式,但目前普遍认为胞吐作用是甲壳动物神经分泌物质的主要释放方式(上官步敏,1995; Bunt *et al.* 1967; Weitzman, 1969; Shivers, 1976)。胞吐作用发生时,颗粒膜首先与一定位置的末梢膜融合,随即裂开,使颗粒内容物与胞外相通,尔后颗粒释放到胞外,并扩散到血腔中,残留的膜通过胞纳作用再回到轴浆

中,形成清亮的小泡。在中国对虾 SG 中,作者未能观察到分泌颗粒以胞吐作用方式将内容物释放到胞外,但见到末梢中存在许多似胞吐作用发生后留下的清亮空泡。中国对虾 SG 神经分泌物质是否存在胞吐作用分泌方式尚待进一步研究。神经衬膜上着生的微绒毛是中国对虾 SG 的特有结构,超微结构观察结果表明这一结构可能与神经分泌物质的释放有关(图版 I,7、8、9)。

4. 中国对虾 SG 神经肽类激素的毛细管电泳

(1) 影响 SG 提取液毛细管电泳分离因素 采用毛细管电泳的方法分离甲壳动物神经肽类激素目前尚未见报道。作者首先进行了中国对虾神经肽类激素毛细管电泳最适合分离条件的筛选预实验。影响毛细管电泳分离效果的因素主要包括不同的缓冲液体系、不同的运行电压和检测波长等。根据已知的甲壳动物几种纯化的神经肽类激素的等电点,作者选择了 pH 为 8.0 的电泳缓冲液,发现以磷酸缓冲液分析时电流显著大于硼酸缓冲液,出峰时间缩短,但出峰少,干扰较大,噪声高,结果重复性较差;而使用硼酸缓冲液可清晰得到 4 个峰,干扰小,基线平直,结果重复性好。以 0.1mol/L 硼酸缓冲液 (pH 8.0) 为电泳缓冲液,电泳电压在 4~20kV 范围内,升高电压可提高分离速度,但电流也迅速上升,不利于电泳体系保持恒温,而且运行电压超过 10kV,第一个峰和第二个峰、第三个峰和第四个峰不能分开,故本文作者选择的电泳电压为 6kV。为了确定 SG 提取液中神经肽类激素的吸收波长,作者采用多波长检测和扫描的方法进行了 SG 提取液的电泳分离实验,结果表明,在 240nm 以上波长未检测到任何吸收峰,210nm 波长检测出的吸收峰峰值最高,这一结果与高效液相色谱分离甲壳动物神经肽类激素所用的 206nm 的检测波长相近。

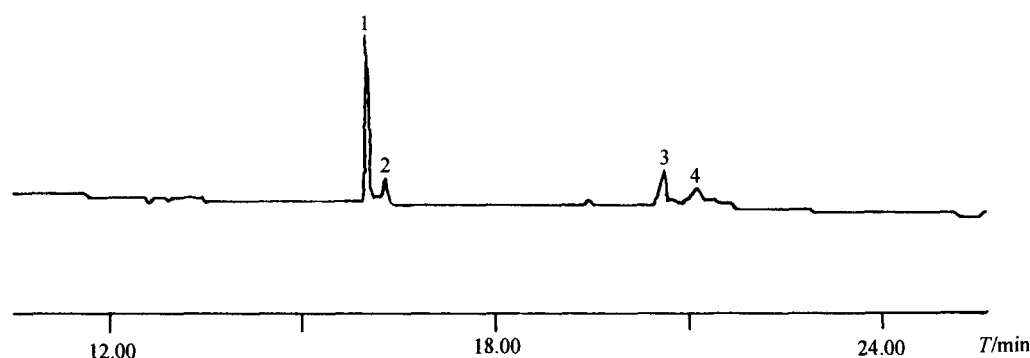


图 2 中国对虾 SG 提取液毛细管电泳谱图

(2) SG 神经肽类激素的毛细管电泳分离 图 2 是在本文建立的毛细管电泳分离条件下,中国对虾 SG 提取液经过 30min 电泳的毛细管电泳谱图。由图 2 可知,SG 提取液经毛细管电泳分离后出现 4 个吸收峰。经反复实验,结果重复性好,出峰时间稳定。如前所述,SG 是由充满激素颗粒的神经末梢组成,表明 SG 提取液中主要成分是神经肽类激素;而且实验中采用的检测波长为 210nm,故初步判断这 4 个吸收峰代表 4 种神经肽类激素。下一步我们将继续进行电泳样品的收集、生物功能测定和生化特性研究工作。另外,由比较可知,中国对虾 SG 超微结构观察结果与毛细管电泳分离实验结果一致,甚至

超出作者的预料,4种神经激素颗粒及其在SG中所占的比例与4个吸收峰及光吸收值也较吻合。

参 考 文 献

- 上官步敏、李少菁,1994,锯缘青蟹X器官神经分泌细胞的细胞学研究,海洋学报,16(6):116~121。
- 上官步敏、李少菁,1995,锯缘青蟹窦腺显微和超微结构研究,动物学报,41(4):341~346。
- 孙金生、刘安西、杜育哲、顾景龄,2000,中华绒螯蟹窦腺的显微和超微结构,动物学报,47:27~31。
- 姚泊,1995,罗氏沼虾眼柄神经分泌细胞的超微结构,中山大学学报论丛,(3):64~67。
- 康现江、王所安,1998,中国对虾眼柄神经分泌结构,河北大学学报,18(1):45~48。
- 蔡生力,1998,甲壳动物内分泌学研究展望,水产学报,22(2):154~161。
- Bunt, A. H., Ashby E. A., 1967, Ultrastructure of the sinus gland of the crayfish, *Cambarellus shufeldti*. *Gen. Comp. Endocr.*, 9(3):334~342.
- Castany, J., Van Herp F., *et al.*, 1997, Ultrastructural study of the neurosecretory granules and crustacean hyperglycemic hormone(CHH) immunolocalization in the sinus gland of *Homarus gammarus*. , *J. Crustacean Biol.*, 17(1):6~12.
- Cooke, I. M. and Sullivan, R. E., 1982, Hormones and neurosecretion. In: Bliss, D. E. ed. *Biology of Crustacea*. Atwood, H. L. and D. C. Sandeman ed. Vol.3, *Neurobiology: Structure and Function*, New York: Academic Press, 205~290.
- Dirksen, H., 1992, Fine structure of the neurohemal sinus-gland of the shore crab, *Carcinus maenas*, and immuno-electron-microscopic identification of neurosecretory endings according to their neuropeptide contents, *Cell Tiss. Res.*, 269(3):249~266.
- Fingerman, M., 1992, Glands and secretions. In: Harrison, F. W. ed. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Harrison, F. W. and Humes, A. G. eds., Vol.10, *Decapod Crustacea*, New York: Wiley-Liss inc., 345~394.
- Keller, R., 1992, Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects, *Experimentia*, 48(5):439~448.
- Shivers, R. R., 1976, Exocytosis of neurosecretory granules from the crustacean sinus gland in freeze-fracture, *J. Morph.*, 150(2):227~252.
- Weatherby, T. M., 1981, Ultrastructure study of the sinus gland of the crab, *Cardisoma carnifex*, *Cell Tiss. Res.*, 220(3):293~312.
- Weitzman, M., 1969, Ultrastructural study on the release of neurosecretory material from the sinus gland of the land crab, *Cecarcinus lateralis*, *Z. Zellforsch.*, 94(1):147~154.

PRELIMINARY STUDY ON THE XO-SG COMPLEX AND ITS SECRETION IN THE CHINESE SHRIMP (*PENAEUS CHINENSIS*) *

Sun Jinsheng^{1,2}, Xiang Jianhai¹

(¹ Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences)

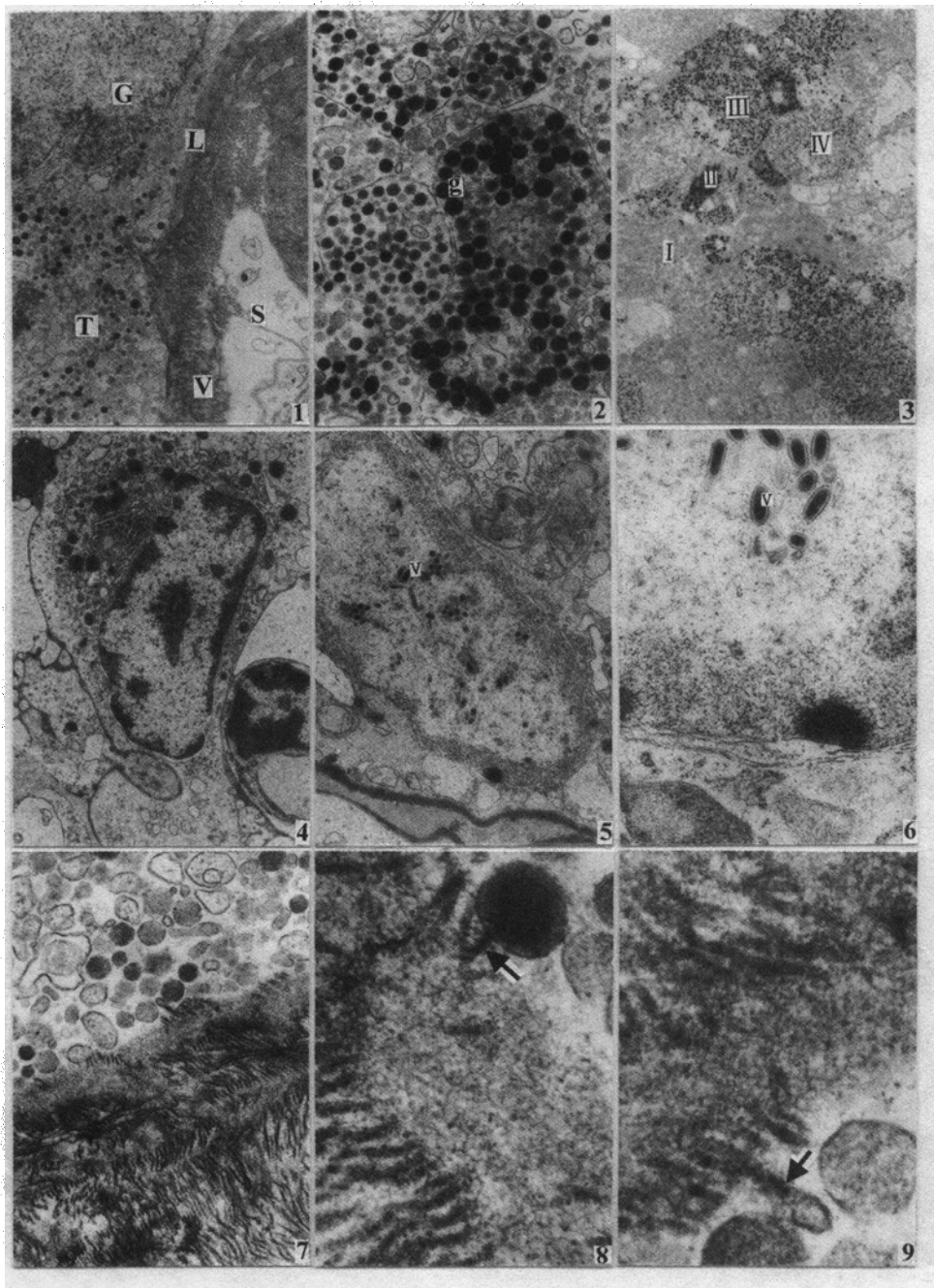
(² Tianjin Fishery Institute)

ABSTRACT

The authors' light and transimission electron microscopy examination of the X-organ(XO)-sinus gland(SG) complex in adult cultured Chinese shrimp(*Penaeus chinensis*) revealed that its SG was composed of inner sinus and outer sinus and located on the lateral side of the medulla interna and dorsal medulla terminalia separately. Only one cell type like neurosecretory cells was found in the medulla terminalia. Transimission electron microscopic examination revealed that the SG was mainly composed of enlarged axon terminals abutting on the thin basal lamina of a central hemolymph lacuna acting as a storage release centre for the membrane bound neurosecretory material. Also present in the SG were glial cells with cytoplasmic processes which enwrap the terminals. Four types of neurosecretory terminals were distinguished on the basis of size, morphology and electron density of the neurosecretory granules. Each axon terminal contained only 1 type of granule; the mean granule diameter ranged from 137 nm(type 4) to 236 nm(type 1). Neurosecretory granules exocytosis was not observed in the SG of the Chinese shrimp. To our knowledge, the villus originated from the lamina was not found in the SG of crustaceans despite of Chinese shrimp, some images showed that villus were related with the releasing of granules from the neurosecretory granules.

Examination of the SG ultrastructure showed the existence of four kinds of neuropeptides that could be separated from the SG extraction by high performance capillary electrophoresis in 50 μ m i. d. X 37 cm(33cm effective length) amino-coated capillary, with 0.1 mol/L boracic acid buffer(pH 8.0) as running buffer at 18 $^{\circ}$ C and 6kV running voltage[(-) $\rightarrow$ (+)].

* Contribution No. 4236 from the Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences.



1. 膨大的末梢(T)与胶质细胞(G)构成窦腺壁,壁内侧附着神经衬膜(L),衬膜上着生大量的微绒毛(V),中央是血窦腔(S), $\times 5,000$;2. 膨大的末梢中充满致密的神经分泌颗粒(g), $\times 10,000$;3. 依神经分泌颗粒的大小、形状和电子致密度等特征区分出四种类型分泌末梢(I、II、III、IV), $\times 2000$;4. 具有分泌细胞特征的视神经节终髓细胞, $\times 4,000$;5. 寄生在中国对虾视神经节外髓神经细胞核中的杆状病毒(v), $\times 5,000$;6. 寄生在中国对虾视神经节内髓神经细胞核中的杆状病毒(v), $\times 15,000$;7. 着生微绒毛神经衬膜附近聚集大量分泌颗粒和内容物释放后的空泡, $\times 15,000$;8. 颗粒膜与微绒毛接触(箭头), $\times 60,000$;9. 微绒毛与释放了内容物的空泡尚未分开(箭头), $\times 60,000$ 。