

美西螈胚胎鳃神经发育的形态学

黄明玉 下川隆 木南利菜子 安高悟 篠原治道 *

(青海大学医学院解剖学教研室 西宁 810001, 中国;

日本金泽医科大学分子形态科学(解剖) 内滩 920-0293, 日本)

摘要: 在约 25 °C 温度下孵化并选用第 30 ~ 44 期的美西螈 (*Ambystoma mexicanum*) 胚胎标本, 用 4% 多聚甲醛溶液固定, 进行整体标本免疫染色, 体视显微镜观察。结果显示, 胚胎 30 期, 可观察到鳃神经节短小的鳃神经本干; 胚胎 35 期, 已能观察到较明显的部分分支和交通支; 胚胎 37 期, 形成上颌神经及下颌神经; 胚胎 38 期, 可观察到舌咽神经的背支、咽头支; 胚胎 40 期, 可观察到舌咽神经的鳃裂前支。因而, 美西螈鳃神经在胚胎早期遵循祖先型排列的特点, 之后随胚胎的发育, 出现随鳃器官演化而重新分布的趋势; 其舌咽神经基本保持了鳃神经的原始形态特点。

关键词: 美西螈; 鳃神经; 舌咽神经

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)03-121-05

Morphological Characteristics of the Branchial Nerve in Axolotl Embryos at Different Stages

HUANG Ming-Yu Takara Shimokawa Rieko Kominami

Saturu Yasukata Harumichi Shinohara *

(Department of Anatomy, Medical College, Qinghai University, Xining 810001, China;

Division of Anatomy, Kanazawa Medical University, Ishikawa 920-0293, Japan)

Abstract: Axolotl's (*Ambystoma mexicanum*) spawn was incubated at 25 °C, and embryos at stages 30 - 44 were collected and fixed with 4% paraformaldehyde. The whole mount immunostaining was conducted and embryos were observed under stereomicroscope. The sensory ganglion of branchial nerve and smallish branchial nerve trunk were observed in the stage 30 embryo, rami and communicating ramus of branchial nerve appeared in the stage 35 embryo, maxillary and mandibular nerves developed in the stage 37 embryo, dorsal ramus and pharynxes ramus of glossopharyngeal nerve were found in the stage 38 embryo, and pretrematicus ramus of glossopharyngeal nerve were observed in the stage 40 embryo. Early stage axolotl embryo kept the same pattern of branchial nerves as in the ancestral vertebrates. In later stage, embryo showed the evolution tendency of the branchial apparatus and branchial nerves appearance and redistribution. The glossopharyngeal nerve of axolotl kept the original morphological characteristic of branchial nerve.

Key words: Axolotl; Branchial nerve; Glossopharyngeal nerve

脊椎动物由于脑的特化, 脑神经较脊神经有很大变化, 而且起源及分布与脊神经差异很大。其鳃神经(、)、与躯干部背根神经的情况也不相同, 主要的区别是这些背侧脑神经紧密伴随着鳃系统。在脊椎动物的种系发

基金项目 2003 年日元贷款项目人才培养计划;

* 通讯作者, E-mail: haru@kanazawa-med.ac.jp;

第一作者介绍 黄明玉, 男, 副教授; 研究方向: 比较解剖学;

E-mail: qyhuangmingyu@126.com.

收稿日期: 2007-11-27, 修回日期: 2008-03-10

生和个体发生发育过程中,鳃弓发生了巨大的形态学变化,随着种系的升高,其变化的程度也在增加。在发育过程中,鳃弓经历了大量的形态修正,结果使最初的结构(鳃节)变得模糊^[1];与之有着密切关系的鳃神经分支分布也发生了明显的改变。

两栖类在系统发生方面是承上启下的关键动物类群,是动物由水生到陆生的过渡阶段。在个体发生方面,两栖类在其一生中要经历一次变态,变态前的幼体具有类似鱼的体形及生活习性,变态后的成体则营陆地生活,用肺呼吸。终生保持幼体形态的美西螈(*Ambystoma mexicanum*)为我们提供了一种非常有价值的胚胎学研究素材,它们仍然保持着鳃弓的结构特点^[1]。本研究的目的是通过观察不同发育阶段美西螈胚胎鳃神经的发生发育过程,掌握更加翔实的有尾两栖类鳃神经的大体形态特征资料,同时也为哺乳类头面部神经的比较解剖学研究提供可靠的形态学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 美西螈属有尾两栖类蝶螈亚目钝口螈科墨西哥钝口螈属(美西螈属)。本研究采用 Bordzilovskaya 和 Detlaff 制定的美西螈胚胎发育分期标准^[2],在大约 25℃ 温度下孵化并选用第 30 期至 44 期的美西螈胚胎标本,用 4% 多聚甲醛溶液固定备用。

1.2 免疫染色 根据野地澄晴教授主编的《免疫染色·原位杂交》一书中所著的整体标本免疫染色方法^[3],进行胚胎标本整体染色。首先将标本经 PBS 充分洗涤,以避免因固定液残留而引起抗体的非特异性结合;TBST(150 mmol NaCl 100 mmol Tris-HCl (pH 7.5) 0.1% Tween) 溶液中处理 10 min ×2 次后,置于 1.5% H₂O₂-TBST(30% H₂O₂ 45 μl + TBST 955 μl) 中 60 min,阻断内源性过氧化物酶;TBST 溶液充分洗涤后,置于 1.5% Blocking (Blocking Reagent 1.5 g + TBST 100 ml) 溶液处理 60 min(回旋培养器缓慢摆动,使液体不断循环,增加渗透性);然后添加 1:1 000 抗神经相关蛋白的鼠源单克隆抗体

(3A10, 购买于美国阿依华大学的 Developmental Studies Hybridoma Bank), 4℃, 36 h, 使一抗与神经相关蛋白特异结合;TBST 充分洗涤,洗去未与神经抗原特异结合的一抗;1.5% Blocking 溶液中处理 90 min,添加 1:1 000 兔抗鼠 IgG 多克隆抗体,4℃, 16 h;TBST 充分洗涤,最后用 DBA-H₂O₂(TBST 1 ml + DBA 0.5 μg + 30% H₂O₂ 0.5 μl) 显色,脱水,透明,置于 BABB(1 份苯甲醇 1 份苯甲酸苄酯) 溶液,体视显微镜下观察。

2 标本观察

在 30 期美西螈胚胎,即孵化至 102 h 体长约 4.5 mm,此时头部继续变直,背部弯曲逐渐减小,身体延长,尾芽增大,鳍褶开始出现,三叉神经节已比较清晰,并可见由此发出一条短小的眼深神经根和一条上颌-下颌神经根;面神经、迷走神经和舌咽神经根也已经显现,并可观察到膨大的神经节;在这一期,咽头囊显示的非常清楚,可观察到舌咽神经本干向咽头囊后方延伸。

胚胎 31 期,即孵化到 109 h 体长约 4.7 mm 时,三叉神经节和短小的三叉神经本干已比较清晰,并已分出眼深神经,但上颌神经与下颌神经仍然在一起走行,尚无法区别;面神经、舌咽神经和迷走神经本干也变得十分清晰,而咽头囊则逐渐模糊;舌咽神经本干经咽头囊后方行向前下方,本干上端向前发出一分支与面神经吻合,形成 - 交通支,本干下端向后发出一分支到外鳃,形成舌咽神经鳃支,迷走神经也发出分支到外鳃形成其腮支。

胚胎 35 期,即孵化至 122 h 体长约 6.25 mm 时,从后脑至尾根的躯干轴完全变直,三个外鳃已具雏形,基本轮廓清晰可见,此时三叉神经干明显延长,其形态基本与上一期相似;面神经和舌咽神经本干明显向腹侧延伸,其舌咽神经与面神经的交通支、舌咽神经的鳃支以及迷走神经的腮支更为清晰(图版 :A),而咽头囊已变得十分模糊。

胚胎 37 期,即孵化至 177 h 体长约 7.5 mm

时,三个外鳃延长并伸向腹后侧。此时,三叉神经的眼深神经已伸至眼泡周围并发出分支,上颌神经伸至眼泡后下方,下颌神经几乎垂直向腹侧延伸;面神经、舌咽神经和迷走神经及其分支均变得更加清晰可见;可观察到面神经的末梢已形成分支,其向前的分支紧贴下颌神经的腹后侧前行;舌咽神经鳃支经鳃弓动脉后方行向后下方,并与迷走神经鳃支吻合;舌咽神经本干则经鳃弓动脉前方行向前下方(图版 : B)。

胚胎 38 期,即孵化至 178 h,体长约 7.8 mm。此时,三叉神经和面神经形态基本同上一期。舌咽神经背支经其神经节的背侧面发出后行向背侧,咽头支则在 - 交通支的上方自舌咽神经本干发出行向前内侧。

胚胎 40 期,即孵化到 240 h 体长约 9.3 mm 时,外鳃已比较长,外鳃上的丝芽明显增多,口角的标志更加清晰,此时三叉神经的眼深神经、上颌神经和下颌神经均形成明显的末梢分支,面神经的分支以及与舌咽神经的交通支更加清晰明了,舌咽神经的咽头支和鳃裂前支也已显示(图版 : C)。

3 讨 论

在低等脊椎动物,由于出现了鳃裂,其鳃神经(、)、就趋向大致成行排列的特点。至颌口类,由于前部颌结构的发生,而丢失了前面两个鳃裂,但其鳃神经仍表现出祖先型的特点^[4]。本研究结果显示,美西螈胚胎早期,脑神经干开始形成之初,四对鳃神经的排列顺序完全遵循其祖先型的特点,由前向后依次为眼深神经(1)、三叉神经(2、3)、面神经(4)、舌咽神经(5)和迷走神经(6)。随着胚胎的继续发育,三叉神经、面神经、舌咽神经和迷走神经相继形成分支,并且相邻神经的部分分支之间形成一些吻合支,如 - 交通支、舌咽神经鳃支与迷走神经鳃支的吻合。这种吻合在高等哺乳动物也有类似的表现,如人类面神经的内脏运动纤维随三叉神经的上颌神经和下颌神经分布到泪腺、下颌下腺、舌下腺;舌咽神经的内

脏运动纤维随三叉神经的下颌神经分布到腮腺等。因而,这种吻合现象提示有尾两栖类至胚胎发育后期,鳃神经的分布已逐渐摆脱较低等水栖脊椎动物成行排列的特点,出现随鳃器官的演化而重新分布的趋势。

眼深神经在神经发育之处就独立形成一条干的特点进一步证明,在低等动物,眼深神经从脑部就与三叉神经分离,之后随着生物的进化,上、下颌的发生和前部鳃裂的消失,而成为三叉神经的一部分。这也与 Northcutt 等^[5]的研究结果一致,即眼深神经、三叉神经分别独自从外胚层基板和神经嵴发出。三叉神经主干在胚胎 37 期分支形成上颌神经和下颌神经,提示美西螈胚胎口裂即将形成;而在对胚胎形态的观察中^[2],直至 39 期,才可以观察到口角的轮廓;因此,美西螈胚胎口裂发生发育的研究应从胚胎 37 期或更早期进行较为恰当。

美西螈胚胎在 30 期时,其鳃神经(、)、(、)的感觉神经节已清晰可见,同时可以观察到短小的鳃神经根;至 35 期,其本干明显延长,各鳃神经形成的分支已能明显识别。Northcutt 等^[5]的研究指出,外胚层基板衍生的构成感觉神经节的神经母细胞在胚胎 26 期就能够被识别,神经嵴衍生的神经母细胞在胚胎 30 期能够被识别,它们指向外周的神经轴突在胚胎 35 期形成可识别的分支。这与本研究结果基本一致。然而,由于本研究从胚胎 30 期开始采集标本,未能观察到之前鳃神经感觉神经节的发育情况。同时,本研究证实,在胚胎 31 期,鳃神经本干已形成一些细小的分支,至 35 期,其分支变得比较清晰明了。

最典型的鳃神经应该就是鱼的舌咽神经,伴随着第一标准鳃裂^[4],像所有的鳃神经一样发自延髓,其感觉根上有一显著的神元节。主干包含感觉和运动两种纤维,下行至鳃裂后方形成鳃裂后支;较细小的鳃裂前支走行在鳃裂的前方;咽头支向内向前下到达咽壁,最小的背支常常缺无。本研究结果表明,美西螈舌咽神经基本保持了鳃弓神经的形态特点,舌咽神经本干经咽头囊后方行向前下,在下行的过程

中,由上向下依次发出背支、咽头支、-交通支、鳃支和鳃裂前支。其背支在胚胎 38 期时可观察到,经舌咽神经节的背侧面发出后行向背侧。而在胚胎 40 期以后,其背支未能在染色标本中观察到。Tanaka 提出^[1],有尾目背支出现后又消失的短暂现象可能是来自一种轻微的隔代遗传变异。而有尾目的 - 交通支则是一个固定的分支^[1],这在本研究中也得到了进一步确认。美西螈舌咽神经同时向后发出分支至外鳃,并与迷走神经的鳃支形成吻合,这与在鸡胚神经系统发育研究中^[6]观察到的情况类似。

虽然美西螈为两栖类动物,但终生保持幼体形态,没有丧失鳃的功能,其舌咽神经仍保留着较多的原始形态。在胚胎 40 期时,可清楚地观察到鳃裂前支,这一点在有关成年期甚至在较高等哺乳动物的胚胎期研究中未见报道,但在其他鱼类中,可观察到明显的鳃裂前支存在^[7]。然而,由于美西螈鳃裂前支出现的时间较晚,该支出现时,咽头囊轮廓已基本消失,无法判断鳃裂前支是否走行在咽头囊的前方。因此成体后,鳃裂前支与周围结构以及与咽头囊之间的位置关系已无法确定。因而,深入研究美西螈鳃神经及其感觉神经节,详细观察其分支的分布以及与周围结构的关系,仍然是十分必要的,这将对三叉神经、面神经、舌咽神经和

迷走神经的比较解剖学研究提供更加丰富的形态学资料。

参 考 文 献

- [1] Tanaka S, Mizukami S. Microscopical study of the nervus glossopharyngeus of the urodeles Triturus pyrrhogaster ensicauda, with reference to communications of this nerve with the nervus facialis. *Zool Jb Anat*, 1992, **122**(3): 399~415.
- [2] Bordzilovskaya N P, Detlaff T A. Table of stages of the normal development of axolotl embryos and the prognostication of timing of successive developmental stages at various temperatures. *Axolotl Newsletter*, 1979, **7**(1): 2~22.
- [3] 野地澄晴编著. 免疫染色·in situ ハイブリダイゼーション. 东京: 株式会社羊土社, 2002, 101~103.
- [4] Romer A S, Parsons T S. The Vertebrate Body (Sixth Edition). Tokyo: Saunders College Publishing, Cas Publishing Japan Ltd, 1986, 558~559.
- [5] Northcutt R G, Brändle K. Development of branchiomic and lateral line nerves in the axolotl. *The Journal of Comparative Neurology*, 2004, **355**(3): 427~454.
- [6] Kuratani S, Tanaka S, Ishikawa Y, et al. Early development of the facial nerve in the chick embryo with special reference to the development of the chorda tympani. *The American Journal of Anatomy*, 1988, **182**(2): 169~182.
- [7] Kuratani S, Ueki T, Aizawa S, et al. Peripheral development of cranial nerves in a cyclostome, lampetra japonica: morphological distribution of nerve branches and the vertebrate body plan. *The Journal of Comparative Neurology*, 1997, **384**(2): 483~500.

图 版 说 明

A: 美西螈 35 期胚胎外鳃区左侧面观; B: 美西螈 37 期胚胎外鳃区左侧面观; C: 美西螈 40 期胚胎外鳃区左侧面观。(×10)

1. - 交通支; 2. 舌咽神经鳃支; 3. 迷走神经鳃支; 4. - 鳃交通支; 5. 鳃弓动脉; 6. 外鳃; 7. 舌咽神经鳃裂前支; 8. 舌咽神经鳃裂后支; 1. 眼深神经; 2. 上颌神经; 3. 下颌神经; 2+3. 上颌神经与下颌神经根; . 面神经; . 舌咽神经; . 迷走神经。Ot. 听泡; EB. 眼泡。

Explanation of Plate

A: Left lateral view of external branchial region of stage 35 Axolotl embryo; B: Left lateral view of external branchial region of stage 37 Axolotl embryo; C: Left lateral view of external branchial region of stage 40 Axolotl embryo. (×10)

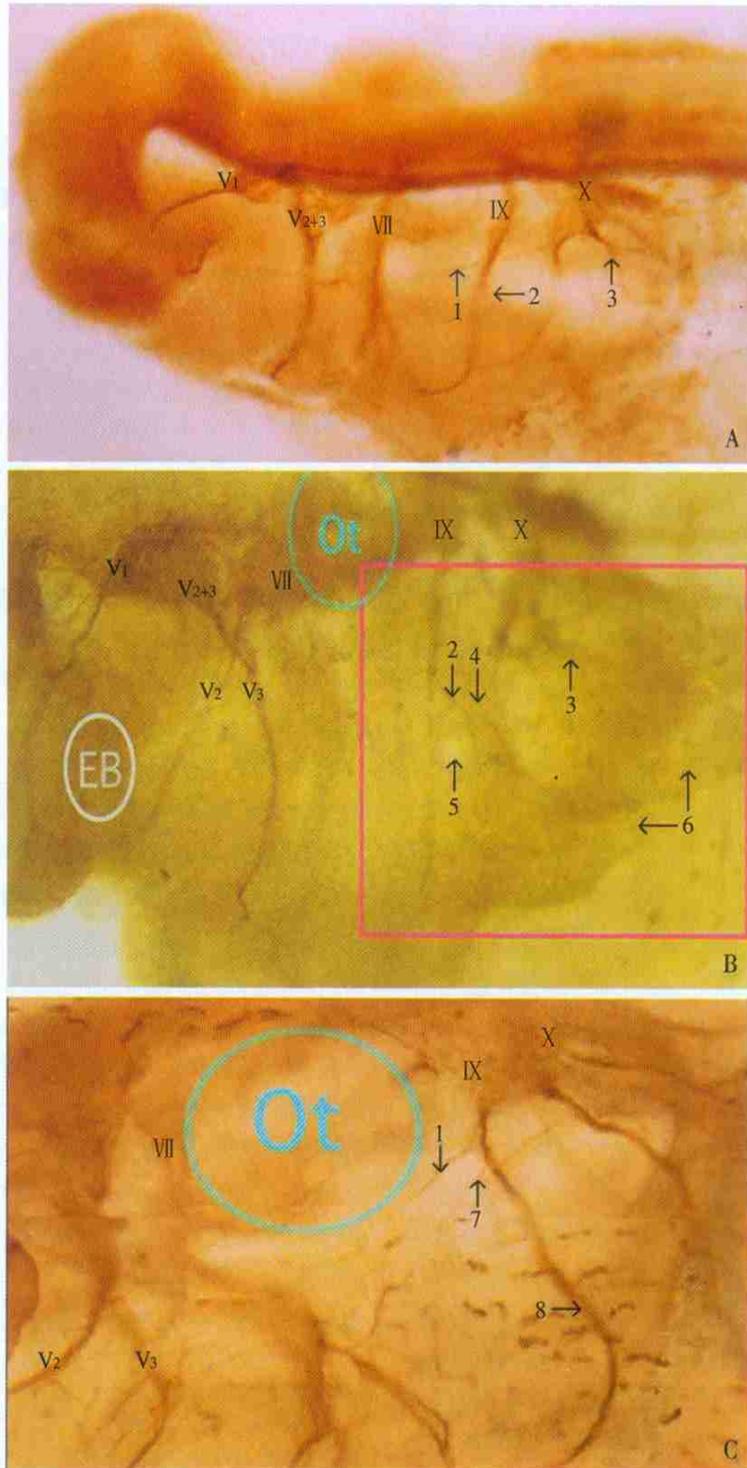
1. - communicating ramus; 2. Gill ramus of glossopharyngeal nerve; 3. Gill ramus of vagus nerve; 4. Communicating ramus of - gill ramus; 5. Branchial arch artery; 6. External gills; 7. Pretrematicus ramus of glossopharyngeal nerve; 8. Posttrematicus ramus of glossopharyngeal nerve; 1. Ophthalmic profundus nerve; 2. Maxillary nerve; 3. Mandibular nerve; 2+3. The root of maxillary nerve and mandibular nerve; . Cranial nerve; . Glossopharyngeal nerve; . Vagus nerve; Ot. Otocyst; EB. Eyeball.

黄明玉等:美西螈胚胎鳃神经发育的形态学

HUANG Ming-Yu *et al.*: Morphological Characteristics of the Branchial Nerve in Axolotl Embryos at Different Stages

图版

Plate



图版说明见文后