

日本三角涡虫神经系统的 AChE 组化定位

郑东敏 谢洪青 汪安泰* 吴程琛

(深圳大学生命科学学院 深圳 518060)

摘要:日本三角涡虫(*Dugesia japonica*)是探索再生机理常用的模式动物之一。本实验利用乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)组织化学定位整体日本三角涡虫神经系统,对其方法做了改进,取得理想效果。结果表明:1)日本三角涡虫的 AChE 阳性(DjAChE⁺)神经系统结构由中枢神经及其分支神经、侧神经索、外上皮神经网共同构建;2)由背神经网、腹神经网分别与侧神经索连接构成外上皮神经网;3)由脑神经节、腹神经索和视神经构成中枢神经;4)中枢神经发生密集的树枝状分支神经,在脑以及腹神经索内侧相互连接,在口孔内侧形成围口神经环,在咽基部延伸至咽部组织,形成咽神经网;5)中枢神经发生密集的树枝状分支神经,在脑以及腹神经索外侧连接背神经网和腹神经网,最终与侧神经索交汇。背神经网、腹神经网和侧神经索为本研究的重要发现。本论文为研究日本三角涡虫神经的再生机理提供了较为完整的神经解剖学数据,并提供了研究 DjAChE⁺ 神经系统的一种简便高效的组织化学研究方法。

关键词:日本三角涡虫; 神经系统; 乙酰胆碱酯酶; 组织化学; 解剖学

中图分类号:Q954.52 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)01-68-08

The Nerve System Identification by Histochemical Localization of Acetylcholinesterase in Planarian *Dugesia japonica*

ZHENG Dong-Min XIE Hong-Qing WANG An-Tai* WU Cheng-Chen

(College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: *Dugesia japonica* is usually used as model animal for the study of regeneration mechanism. In this study, an improved acetylcholinesterase histochemical method was used to locate the nerve system of *D. japonica*. The research results (DjAChE⁺) showed that the nerve system of *D. japonica* consisted of central nerve system and its branches, lateral nerve cords and peripheral epithelial nerve net. Dorsal and ventral nerve nets connected respectively with lateral nerve cords and formed the peripheral epithelial nerve net. Central nerve system was comprised of cerebral ganglion, ventral nerve cords and optic nerves. The multi-branch nerves from the central nerve connected with each other in the medial area of the cerebral ganglion and ventral nerve cords, which formed stomatic nerve ring in the medial mouth, which extended from pharynx root to pharynx tissue and formed pharyngeal nerve net. The multi-branch nerves from the central nerve connected with both dorsal and ventral nerve nets, and then joined together with lateral nerve cords. The important findings in this research were that dorsal nerve net, ventral nerve net and lateral nerve cords coexisted in the *D. japonica* nerve system. This study provided the systematic neuroanatomical foundation for the regeneration mechanism of the *D.*

基金项目 国家水体污染控制与治理科技重大专项(No. 2008ZX07423-003, 2008ZX07526), 深圳大学实验室开放基金项目, 2009 深圳大学教学研究 B 类项目(“专题研究型”课题);

* 通讯作者, E-mail: wang118@szu.edu.cn;

第一作者介绍 郑东敏, 男, 本科生; 研究方向: 动物学; E-mail: 124808355@qq.com。

收稿日期: 2010-08-20, 修回日期: 2010-12-21

japonica nerve system, and provided a simple and efficient histochemistry method for the AChE⁺ structure research in different planarians.

Key words: *Dugesia japonica*; Nerve system; Acetylcholinesterase; Histochemistry; Anatomy

一种经典而重要的神经递质乙酰胆碱 (acetylcholine) 的水解酶, 乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 广泛存在于三胚层动物的神经系统中, 在乙酰胆碱能突触传递中具有重要的作用, 是对突触释放的乙酰胆碱进行生理性分解的酶。利用 AChE 组织化学定位方法是研究一些吸虫纲 (Trematoda) 动物神经系统的一种有效手段^[1-4]。但运用其方法研究管大口涡虫 (*Macrostomum tuba*)、日本三角涡虫 (*Dugesia japonica*)、丽杰氏涡虫 (*Gieysztoria pulchra*)、中国小达氏涡虫 (*Microdalyellia sinensis*) 与平角涡虫 (*Planocera reticulata*) 以及水螅 (*Hydra magnipapillata*) 等的神经系统, 尚未获得十分理想的效果^[5-8]。对于不同的动物类群, 利用 AChE 组织化学定位其胆碱能神经系统, 其组织化学的各种参数存在较大差别^[1-8]。本实验在汪安泰等方法基础上^[8], 研究了 AChE 组织化学整体定位日本三角涡虫类胆碱能神经系统的方法。实验经历一年多, 使用了 3 200 条涡虫, 对孵育液与固定液的配方、固定方法、实验温度、缓洗时间和孵育时间做了实验探索, 取得理想效果, 揭示了一些迄今未发现的日本三角涡虫的神经结构, 完善了对日本三角涡虫神经系统结构的认识。以期作为涡虫神经系统的再生研究, 以及微小动物神经系统的解剖学研究提供一种便捷可行的方法。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 日本三角涡虫采集于深圳大学下文山湖的石块反面 (22°31'58"N, 113°55'38"E)。生化培养箱中 (25 ± 1) °C 培养, 每 3 d 换水并饲以兔肝, 喂食 2 h 后清除食物残渣。实验选择体长约 4 ~ 5 mm 的体色较浅的涡虫, 实验前让其饥饿 3 d。

1.2 试剂配制 磷酸缓冲液: 浓度 0.01 mol/L, pH 7.3。固定液: 多聚甲醛溶于磷酸缓冲

液, 浓度 4%。AChE 组化孵育液: 称取碘化乙酰硫代胆碱 (acetylthiocholine iodide, C₇H₁₆INOS) 12.5 mg, 溶于 1.25 ml 高纯水, 用移液枪依次加入 0.82% 醋酸钠 7.7 ml, 0.6% 醋酸 0.35 ml, 2.94% 柠檬酸钠 0.75 ml, 0.75% 硫酸铜 1.15 ml, 0.165% 铁氰化钾 1.35 ml, 混匀。以改变醋酸钠和醋酸的体积调整孵育液的 pH 值, 本实验取 pH 5.6。

1.3 组织化学定位过程 取涡虫滴到干净的载玻片上, 待其伸展时, 在虫体身上滴入 4°C 的 10% 的冰醋酸溶液, 待虫体伸展死亡后, 用冰水快速冲洗虫体 20 s, 滴加预冷至 0 ~ 4°C 的固定液 2 ~ 4 滴, 冰上预固定 20 min, 置于 4°C 冰箱中固定 12 ~ 24 h。置于冰上用 4°C 的 2% Triton-X100 和高纯水交替冲洗 30 min。再放进 4°C 冰箱, 取 pH 5.6 的醋酸缓冲液 1 L, 循环冲洗标本 3 h。室温 (24 ± 2) °C 下, 将换洗完毕的虫体移入干净器皿, 吸干醋酸缓冲液, 取少量新配制的 AChE 组化孵育液冲洗一次, 再移入新鲜的 AChE 组化孵育液中, 用吸管反复冲洗, 至神经呈现铜红色, 孵育时间在 30 min 之内。对照实验为不含底物的空白对照和加 1 × 10⁻⁴ mol/L 毒扁豆碱抑制剂的对照。

1.4 观察 组化处理后的标本用醋酸缓冲液 (pH 5.6) 冲洗 10 min, 高纯水换洗 5 min 后移到干净的载玻片上, 吸干水, 在标本上加 1 滴丙三醇, 3 ~ 5 min 后加盖玻片, 在 Olympus BX51 型显微镜微分干涉装置下检查, 用 Olympus DP72 专用数码相机获取数码图片, 用其软件测量标本。用 Photoshop 10.0 进行拼图与标注。

2 结 果

2.1 日本三角涡虫乙酰胆碱酯酶阳性 (DjAChE⁺) 的整体结构 DjAChE⁺ 呈铜红色多层次交错的网状沉淀, 其结构细致而清晰。显微镜下仔细检查, 并核对相关资料, 发现

DjAChE⁺ 结构为虫体的神经系统,其组成:由 1 对脑神经节 (cerebral ganglion) 与 2 条腹神经索 (ventral nerve cord) 构成中枢神经;在身体 2 侧各有 1 条纵向的侧神经索 (lateral nerve cord);在口孔周围有 1 条围口神经环 (circumoral nerve ring);在背面与腹面分别有呈网状的背神经网络 (dorsal nerve net) 与腹神经网络 (ventral nerve net)。眼点位于脑神经节内侧两旁,呈肾形。由中枢神经及其发生的树枝状分支神经,分别与眼、侧神经索、围口神经环、背神经网络和腹神经网络相互交织连接,构成一个三维网络状的神经系统结构(图 1;图版 I,图版 II)。所有对照组标本呈阴性,均无 AChE⁺ 反应,虫体颜色同孵育前。

2.2 DjAChE⁺ 的脑神经节与腹神经索及其分支神经

脑神经节 (cerebral ganglion):由似球棒形的左右两叶组成,呈倒“V”形。脑神经节每叶分别与 2 条腹神经索连接,其前缘发生密集的神经分支,直接延伸到头端部。本实验标本头部宽为 780 μm ,其脑神经节宽为 334 μm 。2 叶脑神经节之间有 10 ~ 12 条分支神经(直径 4 μm),每条分支神经上发生次级分支神经 1 ~ 2 根,脑分支神经及其次级分支神经分别与左右脑叶呈横向连接。脑神经节的左右外侧各有 10 多条的分支神经(直径 5 ~ 12 μm),从脑神经节近侧缘 1/5 处发生,其分支神经上又发生 1 ~ 3 根次级分支神经(直径 2 ~ 4 μm),分别向头部 2 侧延伸,与侧神经索交叉连接后,延伸到头部 2 侧边缘。在分支神经与侧神经索的一些连接点,分布有多极神经细胞(图版 II:A)。

腹神经索 (ventral nerve cord):本实验标本呈索状的 2 条直径为 46 μm (37 ~ 55 μm) 的腹神经索,其表面有密集的分支神经发生。前端分别与 2 叶脑神经节连接,在腹侧呈纵向分布,分别位于虫体宽的左右的 1/3 处,使虫体被纵向标记为左中右三部分;向后延伸至咽的 2 侧,再延伸至尾部,其尾端有细的呈半弧形神经与 2 条腹神经索后端连接。腹神经索发生分支神经处,呈树根状膨大。数条分支神经同时发生在

腹神经索的一个区域,该区域比其他部位明显隆起。分支神经有多级的次级分支神经,粗细不一。整条腹神经索的形态,近似于竹子的根鞭。从腹神经索发生的体侧主分支神经,有的止于侧神经索,有的与侧神经索交汇后继续向体侧缘延伸,每条主分支神经发生的多重的次级分支相互交汇连接,形成复杂密集的网状结构。腹神经索之间的分支神经密度高于其体侧的分支神经。在腹神经索上分支神经的发生位置,分布有数个神经细胞;在各分支神经交汇点,易发现神经细胞,在腹神经索之间相对较多(图 1:A;图版 I)。

围口神经环 (circumoral nerve ring):DjAChE⁺ 的围口神经环位于口孔四周(图版 I:B)。

咽神经索 (pharyngeal nerve cord):DjAChE⁺ 咽神经索位于身体近中部 2 条腹神经索之间,咽基部腹面,与左右腹神经索垂直连接,直径 11 μm 。咽神经索内分布有 10 个以上的神经细胞。咽神经索发生并列的 10 多条神经纤维通向咽部,在咽部形成密集的网状结构。通往咽部的每根神经纤维基部连接有 1 个双极神经细胞(图 1:A;图版 I:B,图版 II:B)。

侧神经索 (lateral nerve cord):DjAChE⁺ 侧神经索分别位于虫体左右体侧的近边缘。分别由脑神经节顶端的 2 条分支神经发生,向 2 体侧边缘延伸,与脑神经节和腹神经索的外侧缘平行,向后延伸至近尾端,止于腹神经索的最后一根分支神经。2 条侧神经索在头端不连接,脑神经节和腹神经索的 2 侧缘分支神经的末端分别与侧神经索交汇。背神经网络和腹神经网的 2 侧缘分支神经分别与侧神经索交汇。侧神经索上排列着向体侧缘发生的树枝状的分支神经,至体侧表皮层。神经交汇处的侧神经索上发现有多极神经细胞,侧神经索上有双极神经细胞(图 1:A;图版 I:B,C;图版 II:A)。

2.3 DjAChE⁺ 的背神经网络结构 DjAChE⁺ 的背神经网络位于虫体的整个背部。构成背神经网的分支神经粗细不等,较粗的神经(4 μm) 相互交汇呈不规则的网状结构,其网孔的大小与形态相差悬殊。在有些神经交汇点存在双极或多

极的神经细胞。在虫体头背部的背神经网络结构较为简单,其网孔大小相似,内无明显的分支神经。虫体中段的背神经网络,其交汇点常发生纤细的(1~2 μm)单支或分叉的分支神经,穿插

于其网孔内,构成较复杂的背神经网络结构。背神经网络在背部两侧延伸至侧神经索,并与其连接(图 1:B;图版 II:C)。

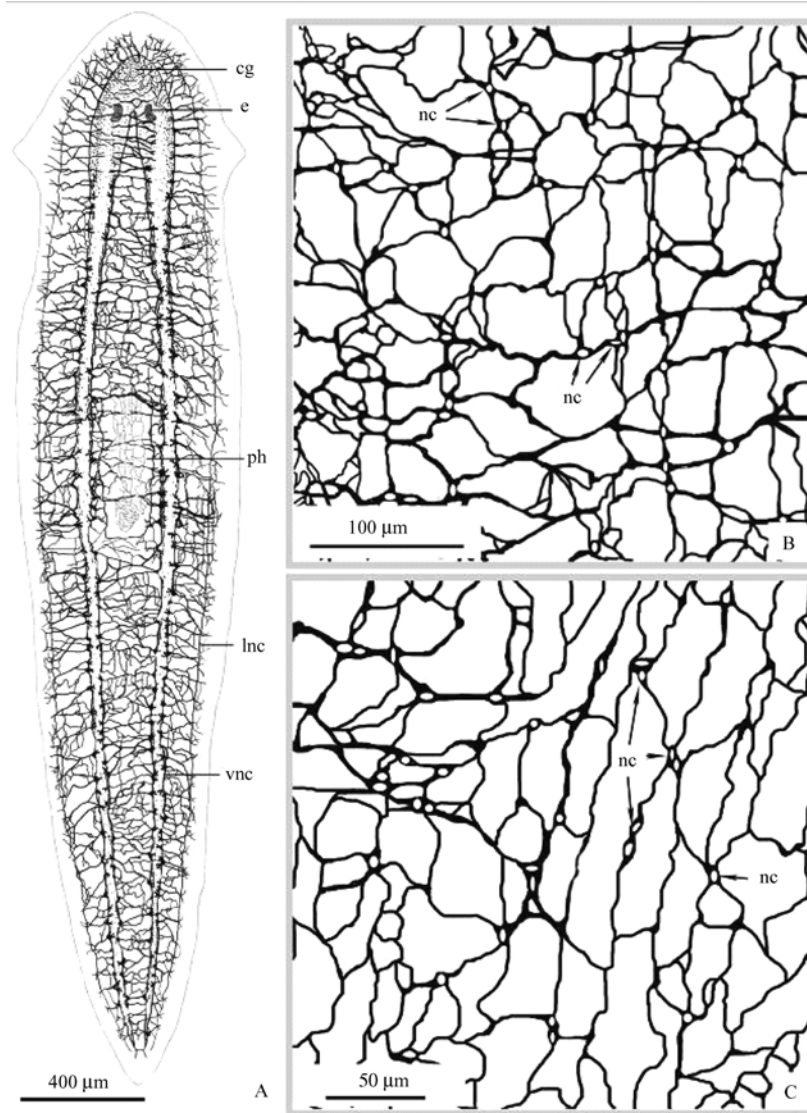


图 1 日本三角涡虫的神经系统模式图

Fig.1 Schematic drawing of the nerve system in Planarian *Dugesia japonica*

A: 神经系统整体形态; B: 背神经网络; C: 腹神经网络。

cg. 脑神经节; e. 眼; lnc. 侧神经索; nc. 神经细胞; ph. 咽; pnc. 神经索; vnc. 腹神经索。

A: Overall shape of the nerve system; B: Dorsal nerve net; C: Ventral nerve net.

cg. Cerebral ganglion; e. Eye; lnc. Lateral nerve cord; nc. Nerve cell; ph. Pharynx;

pnc. Pharyngeal nerve cord; vnc. Ventral nerve cord.

2.4 DjAChE⁺的腹神经网络结构 DjAChE⁺的腹神经网络位于虫体腹面。构成腹神经网的分支神经的粗细不等,较粗的神经(5 μm)相互交汇呈不规则的网状结构,其网孔有许多呈长条型,大小与形态相差悬殊,其网状结构明显比背神经网络模糊,在整体形态上与背神经网络有明显区别。腹神经网络分别向左右两侧延伸至侧神经索,与其连接(图 1:C;图版 II:D)。

3 讨论与结论

3.1 日本三角涡虫神经系统的基本结构 本研究表明,日本三角涡虫的神经系统由中枢神经及其分支神经、侧神经索、背神经网络与腹神经网络共同构建。由背神经网络、腹神经网络分别与侧神经索连接,构建呈网兜状的神经网络;由脑神经节与腹神经索构成其中枢神经。中枢神经发生密集的树枝状分支神经,在其内侧相互连接,在口孔内侧形成围口神经环,在咽基部形成横向的咽神经索,延伸至咽部组织,形成咽神经网络;在其外侧与侧神经索交汇,并连接背神经网络和腹神经网络。其中背神经网络、腹神经网络、侧神经索及咽基部的神经索是本研究的首次发现。

日本三角涡虫神经的再生机理研究得到许多研究者的关注^[9-14]。但对其神经系统的整体解剖学结构的认识,似乎停留在传统的“梯形”结构的基础上,即脑神经节及其延伸的 2 条腹神经索以及横向分支神经构成。一些特定的神经抗体的免疫组织化学定位研究^[9,12-17]的神经系统也基本是“梯形”结构。Umesono 等利用抗突触结合蛋白抗体的免疫组化方法,显示日本三角涡虫的中枢神经系统是由头部 1 个倒 U 型的脑和位于躯干的 1 对腹神经索组成,其脑神经节外侧有 9 对外侧分支神经^[14],但未显示出腹神经索上的分支神经;Nishimura 等描述日本三角涡虫神经系统为树枝状神经网络^[13],但无图片展示;Nishimura 等利用抗日本三角涡虫胆碱乙酰转移酶 (*Dugesia japonica* choline acetyltransferase, DjChAT) 抗体进行的荧光免疫检测,显示了日本三角涡虫类胆碱能神经解剖学结构,类胆碱能神经细胞在涡虫神经

系统的脑、腹神经索、视神经和咽神经丛中广泛分布^[9]。但未发现日本三角涡虫的侧神经索、背神经网络和腹神经网络。本实验发现 2 条腹神经索发生的分支神经呈多分枝结构相互连接,并分别与侧神经索连接;上述神经再加上背神经网络与腹神经网络,本文认为该神经结构已经很难再与“梯形”结构联想在一起。

本研究发现 DjAChE⁺神经细胞在腹神经索、侧神经索、背神经网络和腹神经网络的一些分支交叉点上有分布,从其脑神经节发出的外侧分支神经超过 9 对,与 Umesono 等的结果(9 对)不同^[14],地中海施氏涡虫 (*Schmidtea mediterranea*) 有 8 对分支^[14,18],本文认为这种差异与其研究方法及研究标本种类差异^[11]相关。如本研究发现日本三角涡虫从脑神经节与腹神经索发生的分支神经多数呈树枝状,与一些描述的结果同样存在差异^[9,12-17]。比较现有资料,本文工作完善了对日本三角涡虫神经系统基本结构的认识,为研究其神经再生,提供了较为完整的神经解剖学数据与研究方法。

3.2 日本三角涡虫神经系统中的一些原始结构与机能 Koizumi 等利用免疫组织化学技术展示了多克隆抗体定位的较为完整的水螅 (*Hydra*) 神经网络^[19]。本研究发现日本三角涡虫的神经系统的背神经网上有较多的神经细胞分布,与水螅的 AChE⁺网状神经结构相似^[8],与大口涡虫的背神经网络相同^[20],表明日本三角涡虫的神经系统依然保留有刺泡动物 (Cnidaria) 的网状神经结构。由于涡虫中胚层的发生,才出现中枢神经。值得注意的是,本文发现日本三角涡虫咽的基部有一条比其他神经分支粗壮的咽下神经索(图 1:A;图版 I:B;图版 II:B),其上面分布有较多的神经细胞,由其发生的通往咽的神经纤维基部均有 1 个双极神经细胞。本文初步提出,这是一种原始的神经节形态,类似于其他更高级的无脊椎动物的咽下神经节,控制着虫体咽的摄食与排遗的生理功能。虫体的腹面表皮层布满纤毛和少量杆状体,其背面布满杆状体。纤毛的功能是涡虫运动的主要工具,杆状体是其防御武器,其表皮神经网络协调机

体的防御与运动。2 条侧神经索直接与神经网络连接,把信息及时传输到脑神经节与腹神经索,以此协调虫体的生命活动。这种推理是否合理,还有待进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] 夏明仪,何毅勋. 日本血吸虫胆碱酯酶的组织化学定位. 动物学报, 1982, 28(4): 361 - 367.
- [2] 何毅勋. 华支睾吸虫神经系统的乙酰胆碱酯酶定位. 动物学报, 1991, 37(1): 47 - 51.
- [3] 王勇,汪昊,季虹,等. 卫氏并殖吸虫后尾蚴神经系统乙酰胆碱酯酶组织化学定位. 实用寄生虫病杂志, 1994, 2(4): 27 - 29.
- [4] 张浩,张威,杜凤霞,等. 盾盘亚纲二种盾盘吸虫 *Aspidogaster conchicola* 和 *Lophotaspis orientalis* 神经系统结构差异的研究. 四川动物, 2010, 29(6): 946 - 949.
- [5] 王晓安,蒋小满. 平角涡虫 (*Planocera reticulata*) 脑神经节胆碱酯酶的组织化学定位. 烟台师范学院学报: 自然科学版, 1998, 14(3): 209 - 212.
- [6] 李慧,汪安泰. 涡虫神经再生与原始脑构建初探. 深圳大学学报:理工版, 2005, 22(4): 368 - 372.
- [7] 于微,梁羽,汪安泰,等. 丽杰氏涡虫和中国小达氏涡虫的神经系统. 四川动物, 2008, 27(6): 1024 - 1026.
- [8] 汪安泰,罗振国,张小云. 水螅 AChE 和 NPY 类似物的定位. 动物学报, 2006, 52(1): 115 - 122.
- [9] Nishimura K, Kitamura Y, Taniguchi T, et al. Analysis of motor function modulated by cholinergic neurons in planarian *Dugesia japonica*. Neuroscience, 2010, 168(1): 18 - 30.
- [10] Cebria F, Nakazawa M, Mineta K, et al. Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. Develop Growth Differ, 2002, 44: 135 - 146.
- [11] Felix D A, Aboobaker A A. The TALE class homeobox gene *Smed-prep* defines the anterior compartment for head regeneration. PLoS Genetics, 2010, 4(6): 1 - 8.
- [12] Kato C, Mihashi K, Ishida S. Motility recovery during the process of regeneration in freshwater planarians. Behavioural Brain Research, 2004, 150: 9 - 14.
- [13] Nishimura K, Kitamura Y, Inoue T, et al. Reconstruction of dopaminergic neural network and locomotion function in planarian regenerates. Wiley Periodicals Inc Develop Neurobio, 2007, 67: 1059 - 1078.
- [14] Umeson Y, Agata K. Evolution and regeneration of the planarian central nervous system. Develop Growth Differ, 2009, 51: 185 - 195.
- [15] Tazaki A, Gaudieri S, Ikeo K, et al. Neural network in planarian revealed by an antibody against planarian synaptotagmin homologue. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 260: 426 - 432.
- [16] Cebria F, Kudome T, Nakazawa M, et al. The Expression of neural-specific genes reveals the structural and molecular complexity of the planarian central nervous system. Mech Dev, 2002, 116: 199 - 204.
- [17] Buttarelli F R, Pellicano C, Pontieri F E. Neuropharmacology and behavior in planarians: translations to mammals. Comparative Biochemistry and Physiology, 2008, 147: 399 - 408.
- [18] Salo E. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). BioEssays, 2006, 28(5): 546 - 559.
- [19] Koizumi O, Sato N, Goto C. Chemical anatomy of hydra nervous system using antibodies against hydra neuropeptides. Hydrobiologia, 2004, 531: 41 - 47.
- [20] Ladurner P, Mair G R, Reiter D, et al. Serotonergic nervous system of two macrostomid species: recent or ancient divergence. Invertebr Biol, 1997, 116: 178 - 191.

图版 I 说明

A. 日本三角涡虫神经系统的 AChE 组化定位; B. 咽段内部神经结构; C. 咽后段内部神经结构。

Explanation of Plate I

A: Localization of the nerve system by AChE histochemistry in planarian *Dugesia japonica*; B: Proximal pharyngeal internal nerve structure; C: Distal pharyngeal internal nerve structure.

图版 II 说明

A. 脑神经节与侧神经索; B. 咽部神经; C. 背神经网; D. 腹神经网。

Explanation of Plate II

A: Cerebral ganglion and lateral nerve cords; B: Pharyngeal nerve; C: Dorsal nerve net; D: Ventral nerve net.

cg. 脑神经节; cnr. 围口神经环; e. 眼; lnc. 侧神经索; m. 口; nc. 神经细胞; ph. 咽; pnc. 咽神经索; vnc. 腹神经索。

cg. Cerebral ganglion; cnr. Circumoral nerve ring; e. Eye; lnc. Lateral nerve cord; m. Mouth; nc. Nerve cell; ph. Pharynx; pnc. Pharyngeal nerve cord; vnc. Ventral nerve cord.

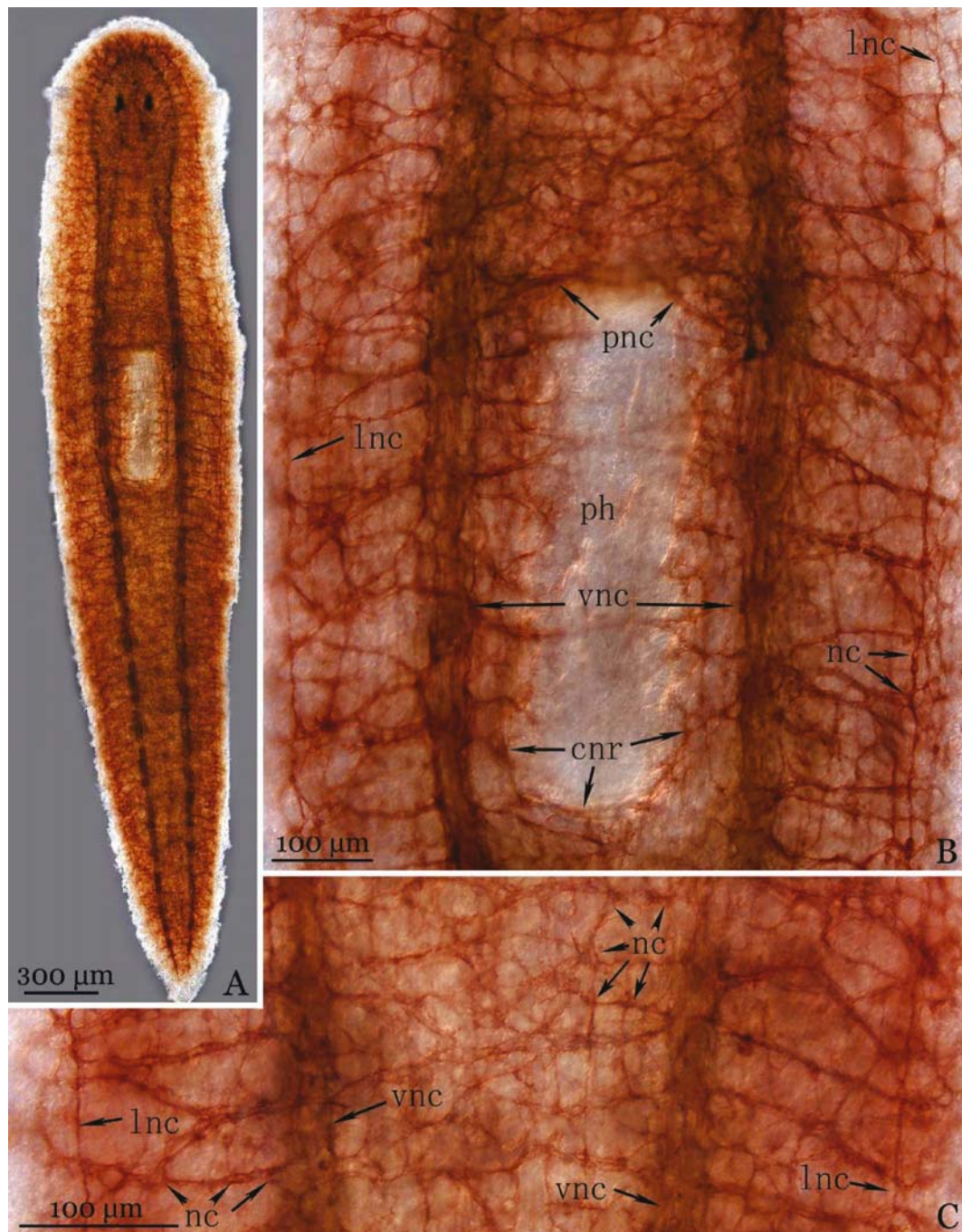
郑东敏等:日本三角涡虫神经系统的 AChE 组化定位

图版 I

ZHENG Dong-Min *et al.* : The Nerve System Identification by Histochemical Localization

of Acetylcholinesterase in Planarian *Dugesia japonica*

Plate I



图版说明见文后

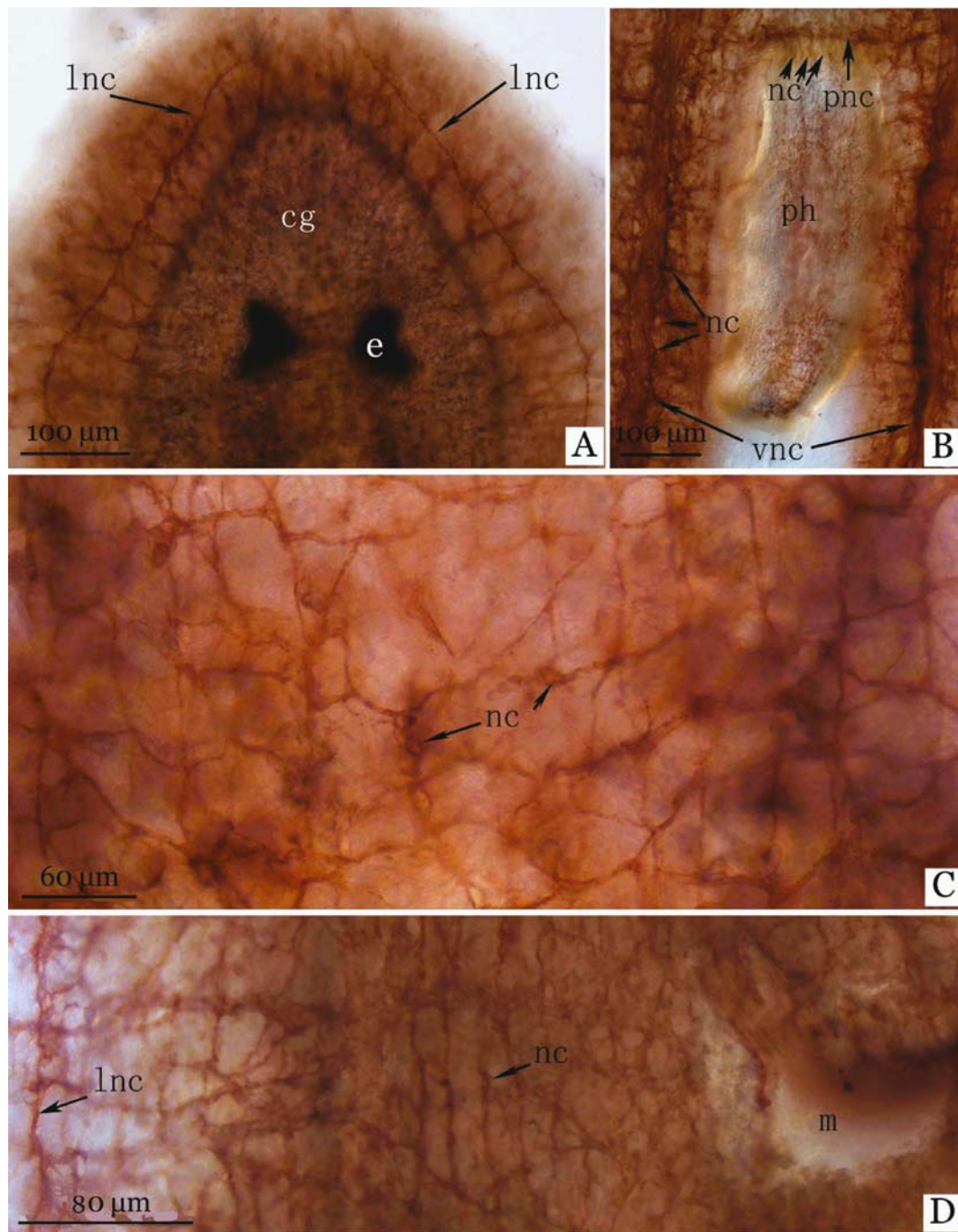
郑东敏等:日本三角涡虫神经系统的 AChE 组化定位

图版 II

ZHENG Dong-Min *et al.* : The Nerve System Identification by Histochemical Localization

of Acetylcholinesterase in Planarian *Dugesia japonica*

Plate II



图版说明见文后