

黑斑蛙嗅器和犁鼻器的组化及超微结构特征

刘 静 吴民耀 刘亦晨 王宏元*

陕西师范大学生命科学学院 西安 710062

摘要: 嗅感受器主要感知外界环境中化学信号分子。本文采用银染、NADPH-组化染色和电镜技术来观察黑斑侧褶蛙 (*Pelophylax nigromaculatus*) 的嗅器和犁鼻器的功能差异及细胞组成。银染法可对嗅上皮和犁鼻上皮的细胞进行分类及区分。其中, 支持细胞胞核深染成黑色, 嗅细胞胞核银染为花斑状。细胞计数显示, 犁鼻上皮的嗅神经细胞含量百分比显著高于嗅上皮。组化结果显示, 黑斑侧褶蛙嗅上皮和犁鼻上皮对 NADPH-d 表达模式差异显著, 前者表达明显高于后者。电镜结果显示, 黑斑侧褶蛙嗅上皮和犁鼻上皮的支持细胞由两种类型的细胞组成, 分别为纤毛型和颗粒型支持细胞。

关键词: 黑斑蛙; 嗅器; 犁鼻器; 黄递酶 (NADPH-d)

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2013)04-581-07

Ultrastructure and Histochemical Characteristics of Olfactory and Vomeronasal Organs in *Pelophylax nigromaculatus*

LIU Jing WU Min-Yao LIU Yi-Chen WANG Hong-Yuan*

College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: Olfactory sensory organ can perceive the chemical molecules of external environment. Here, we observed olfactory and vomeronasal organs in *Pelophylax nigromaculatus* using the silver staining, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) histochemistry staining and electron microscopy. Three cell types in the olfactory and vomeronasal epithelia could be distinguished using silver staining. Nuclear staining of supporting cells was strongly dark, but nuclear staining of the receptor cell was in a irregular spotting pattern. In addition, the proportion of olfactory receptor cells in the vomeronasal epithelium was significantly more than that of the olfactory epithelium. The olfactory and vomeronasal organs showed different staining patterns and they could be easily distinguished when NADPH-d histochemistry staining was employed. Finally, the supporting cells in the olfactory and vomeronasal epithelia consisted of two cell types: ciliated supporting cells and granular secretory supporting cells.

Key words: *Pelophylax nigromaculata*; Olfactory organ; Vomeronasal organ; NADPH-d

嗅觉感受器能够识别空气中或水中的化学信号分子。大多数陆生脊椎动物的鼻腔都有两套化学感受系统, 即主嗅系统和犁鼻系统。一般认为主嗅系统中的主嗅器主要接受挥发性的小分子化学信号; 犁鼻系统中的犁鼻器主要感受非挥发性的大分子信号物质, 如信息素 (Baxi et al. 2006)。鱼类只具有主嗅器, 无犁鼻器; 犁鼻器最早起源于两栖动物, 且水栖的龟鳖类

和哺乳类都缺失犁鼻器。据此, Bertmar

基金项目 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (No. SJ08C101), 陕西师范大学研究生培养创新基金项目 (No. 2012CXS052), 陕西师范大学勤助科研创新基金项目 (No. QZZD12073);

* 通讯作者, E-mail: hongyuanwang@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 刘静, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物发育生物学; E-mail: anjingtiger@126.com。

收稿日期: 2012-12-22, 修回日期: 2013-05-21

(1981)认为犁鼻器的起源可能是早期四足动物对陆栖环境适应进化的产物,犁鼻器可能是探测陆栖环境中的化学物质。Døving 等(1993)采用荧光染料对成体蛙进行水体暴露实验,结果显示,口腔和主嗅室没有被染色,反而犁鼻器被荧光染料深染。其认为犁鼻器是感受水中的化学信号。成体非洲爪蛙(*Xenopus laevis*)的嗅器可分为内囊和侧囊,被覆不同的感觉上皮。内囊为气鼻,感受空气中的物质,而侧囊为水鼻,感受水中的化学物质(Hansen et al. 1998)。黄递酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase, NADPH-d)组织化学法可以对“水鼻”进行特异染色,对来自“气鼻”中的纤维及犁鼻器不能着色(Meyer et al. 1997)。银染法,是显示神经细胞、核酸的一种方法,将切片浸于银盐(如硝酸银)染料中,使银盐沉淀在这些结构的表面而显出黑褐色,利于不同细胞类型的识别。本研究拟以黑斑侧褶蛙(*Pelophylax nigromaculatus*)幼蛙为实验材料,利用银染法、黄递酶组织化学法和透射电镜观察黑斑侧褶蛙嗅器和犁鼻器上皮的细胞类型及其超微结构特征,以期探讨无尾两栖类嗅器及犁鼻器的结构和机能差异。

1 材料与方法

1.1 材料 黑斑侧褶蛙蝌蚪于2011年5月采自陕西省长安区稻田,在实验室内将蝌蚪置于室温下饲养至幼蛙。

1.2 制片 选取6例正常幼蛙个体,冰上麻醉后迅速断头处死,取头部转移至4%的多聚甲醛溶液中(pH=7.4)固定,12 h后换液一次,固定72~96 h。常规石蜡切片,切片厚8 μm ,H.E染色。

1.3 银染 石蜡切片脱蜡至水,双蒸水清洗3次。在2% AgNO_3 中37℃避光浸银过夜(12 h)。倾去 AgNO_3 溶液,双蒸水洗3次。擦干切片背面及组织周围水分,一次10片置于湿盒中,滴染银根乙醇液20~40 s。倾去染液后直接浸泡10%甲醛中还原1~2 min,注意转动切片,更换2次溶液,使切片呈棕黄色,直到显

微镜下可清晰观察到斑块为止,双蒸水洗3次。0.2%氯化金(AuCl_3)水溶液调色3~5 min,5%硫代硫酸钠固定3 min。双蒸水洗3~5 min,用滤纸将周围水分吸干。乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.4 NADPH-d 组织化学染色 取黑斑蛙幼蛙3只冰上麻醉,迅速断头冰冻,将头部置于OCT(optimal cutting temperature)包埋剂中包埋,leica冰冻切片机中做连续冠状切片,切片厚约20 μm 。将冰冻切片放入孵育液[1 mmol/L β -NADPH,0.8 mmol/L NBT(氮蓝四唑, nitro tetrazolium blue chloride),0.06% TritonX-100,0.1 mol/L PBS]。 β -NADPH 和 NBT 均购自 Sigma 公司。37℃孵育过夜。当切片变蓝时,移入0.1 mol/L PBS(pH=7.6)中洗涤终止反应。将切片梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。Leica 2 光学显微镜下进行观察,采用 Leica Q win V₃ 图像系统拍照。

1.5 电镜样品制备 在解剖镜下将黑斑蛙幼蛙的嗅器取出,置于2.5%的戊二醛磷酸缓冲液中固定12 h,再置于体积分数1%的锇酸溶液中后固定30 min,常规脱水,Epon812包埋。超薄切片机切片,切片厚度为50 nm。将切片用醋酸双氧铀-枸橼酸铅双染后,在日立H-600型电子透射显微镜下观察、拍照。

1.6 形态计量和数据分析 用图像分析系统(Motic images advanced 311)计量嗅上皮和犁鼻上皮上支持细胞,计数嗅感受神经元和基细胞的数目。所得数据用统计软件SPSS处理。

2 结果

2.1 嗅器、犁鼻器的组织化学染色 黑斑蛙鼻区的横切面从背侧至腹侧可见3个嗅腔,分别为主嗅室、中室和犁鼻器。主嗅室的内侧面、背侧和腹侧被覆嗅上皮;犁鼻器的内侧面、背侧和腹侧被覆犁鼻上皮(图I:1)。主嗅室、中室和犁鼻器经银染可见嗅上皮和犁鼻上皮呈嗜银性(图版I:2)。NADPH-d组织化学染色可见,嗅上皮与NADPH-d反应呈阳性,可专一地被染为蓝紫色,而犁鼻上皮的游离面缺失NADPH-d

阳性反应物(图版 I:3)。

嗅上皮经 H.E 染色可见,嗅上皮游离面至基底面各种类型的细胞区分并不明显。但在主嗅室嗅上皮的基底层明显可见 Bowman's 腺。Bowman's 腺呈深红色,圆锥形,有些腺体顶端伸入至支持细胞层,可分泌黏液润湿嗅上皮黏膜(图版 I:4)。银染可见,主嗅室被覆的嗅上皮具有明显的细胞分层。支持细胞位于最顶层,嗅细胞层数较多,位于支持细胞的下方;基细胞位于最底层(图版 I:5)。经 NADPH-d 染色,嗅上皮的游离面呈强烈的阳性,游离面至基底部的 NADPH-d 反应物逐渐减淡, Bowman's 腺则完全无 NADPH-d 反应阳性物(图版 I:6)。

犁鼻腔被覆犁鼻上皮,犁鼻上皮从游离面至基底面分别为支持细胞、嗅受体细胞和基细胞,且犁鼻器背内侧部临近鼻中隔处分布着大量犁鼻腺(图版 I:7)。犁鼻上皮经银离子染色呈现明显的细胞分层。其中支持细胞 1 层,位于游离面;嗅受体细胞为多层,位于支持细胞下方,细胞被染为花斑色;基细胞位于底层,染为棕黑色(图版 I:8)。通过 NADPH-d 组织化学染色,与嗅上皮相比较,犁鼻上皮染色较浅,呈阴性。犁鼻腺的染色与犁鼻上皮一致呈阴性反应(图版 I:9)。

2.2 形态计量分析 嗅上皮和犁鼻上皮分布的支持细胞、嗅受体细胞和基细胞对于银染具有特异性。二者的支持细胞均位于游离面,胞核呈卵圆形,具强烈的嗜银性,被深染成黑色;嗅细胞多层,其胞核银染为花斑状;基细胞位于基底层,其胞核较小,银染呈棕黑色(图版 I:10,11)。依据银染结果统计单位面积内 3 种类型细胞的个数,嗅上皮的嗅受体细胞最多,其单位面积所占百分比均值为 80.54%,而犁鼻上皮的嗅受体细胞百分比均值为 89.77%,二者差异极显著($P < 0.001$)。嗅上皮的支持细胞次之,百分比为 10.59%,犁鼻上皮的支持细胞仅占 4.00%,两者差异极显著($P < 0.001$)。嗅上皮的基细胞占 8.87%,犁鼻上皮的基细胞占 6.28%,两者差异极显著($P < 0.001$)。

2.3 嗅上皮和犁鼻上皮超微结构 透射电镜

观察可见,嗅上皮主要包括 2 种类型的支持细胞,分别为纤毛型支持细胞和颗粒型支持细胞。纤毛型支持细胞具有长而密的纤毛,纤毛长约 $9 \sim 15 \mu\text{m}$,位于嗅上皮的游离面。嗅受体细胞表面具有一些小泡结构,这些小泡电子密度低,伸出嗅上皮的游离面(图版 II:1)。嗅上皮颗粒型支持细胞胞质内具有电子密度高的颗粒物质,这些颗粒分布在胞核周围(图版 II:2)。犁鼻上皮游离面也可见纤毛型支持细胞,其纤毛与嗅上皮内的纤毛型支持细胞比较,少而稀疏,纤毛长约 $9 \sim 13 \mu\text{m}$ (图版 II:3)。犁鼻上皮的深层可见颗粒型支持细胞。这些颗粒物质与嗅上皮中颗粒型支持细胞的结构类似,颗粒直径约 $0.5 \mu\text{m}$ 左右(图版 II:4,5)。

3 讨 论

主嗅器和犁鼻器在脊椎动物完成摄食、同种识别和繁殖等行为中具有重要作用。主嗅腔和犁鼻腔中遍布黏液,外界化学分子首先溶于这些黏液,才能被嗅上皮感受细胞所俘获。这些黏液的存在有利于对外界气味化学信号分子的俘获(Rachelle et al. 2009)。两栖动物嗅器中黏液主要源于 Bowman's 腺和颗粒型支持细胞的分泌;犁鼻器黏液主要来源于犁鼻腺和支持细胞(Hansen et al. 1998, Stuelpnagel et al. 2005)。超微结构观察提示,变态前的非洲爪蛙和日本林蛙(*Rana japonica*)的主嗅室被覆纤毛型支持细胞,变态后主嗅室则不具有纤毛型支持细胞(Taniguchi et al. 1996, Hansen et al. 1998)。据此一般认为,主嗅室纤毛型支持细胞的消失标志着嗅上皮由识别水中化学分子转换至识别空气中的信号分子(Stuelpnagel et al. 2005)。本文电镜观察结果显示,黑斑蛙幼蛙嗅上皮具有两种类型的支持细胞,分别为纤毛型支持细胞和颗粒型支持细胞。综上所述,黑斑蛙幼蛙的主嗅室仍具有识别水中化学分子的能力,可能与幼蛙还没有完全脱离水环境相关。

一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种气体信号分子,广泛分布于神经组织。NO 的分布可用 NADPH-d 组织化学染色进行显示。本文

结果显示,嗅上皮游离面 NADPH-d 反应呈强阳性,可以专一性染为蓝紫色;相比较而言,犁鼻上皮低水平表达 NADPH-d 酶,其酶活性由基底面至游离面逐渐增高。提示黑斑侧褶蛙嗅上皮和犁鼻上皮内 NOS(nitric oxide synthase)阳性神经元的树突区域具有大量的 NO 分子存在。Meyer 等(1997)对负子蟾科苏里南蟾(*Pipa pipa*)的鼻腔进行 NADPH-d 组织化学染色,嗅上皮被覆的主嗅室高水平表达 NADPH-d 酶;反之,犁鼻上皮对 NADPH-d 呈低水平表达。综上结果可见,黑斑侧褶蛙 NADPH-d 分布的模式与苏里南蟾基本一致。可以通过 NADPH-d 组化染色对蛙类的嗅器和犁鼻器进行区别,同时 NADPH-d 着色强弱可能体现了二者机能上的分工差异。而在哺乳动物中,负鼠(*Monodelphis domestica*)和小鼠(*Mus musculus*)的嗅器和犁鼻器对 NADPH-d 反应均呈阳性,二者之间并无显著差异(Shapiro et al. 1998)。可见 NADPH-d 作为一种酶标记物,其染色反应就种属不同而结果差异很大。NADPH-d 酶可能在不同的种属中,具有不同的酶表达模式,其酶系可能在不同的种属的嗅器和犁鼻器中呈现异质或同质表达。

另外,本文银染结果显示,银染法可以对黑斑侧褶蛙嗅上皮和犁鼻上皮的 3 种类型的细胞加以分类,区分度良好。嗅上皮支持细胞具有强烈的嗜银性,胞核被深染,呈黑色。统计结果显示,黑斑侧褶蛙犁鼻上皮中支持细胞相对于主嗅上皮明显较少,只有 4%,而嗅上皮的支持细胞则达到 11%。电镜观察显示,蛙类犁鼻上皮内具有颗粒型支持细胞,这些支持细胞具有分泌黏液的能力。另外, Hillenius 等(2001)和 Nowack 等(2010)认为蛙类的鼻泪管可将眼部哈氏腺分泌的泪液送至犁鼻腔,以润湿犁鼻上皮,有利于犁鼻器俘获外界化学信号分子。哈氏腺分泌泪液至犁鼻腔,是代偿犁鼻上皮较少的支持细胞。基细胞是嗅上皮基底层的未分化细胞,黑斑侧褶蛙主嗅上皮的基细胞显著多于

犁鼻上皮,提示主嗅上皮的分化增生能力可能强于犁鼻上皮;反之,犁鼻上皮的嗅神经细胞显著多于主嗅上皮细胞,提示犁鼻上皮可能较嗅上皮更为敏感。

参 考 文 献

- Baxi K N, Dorries K M, Eisthen H L. 2006. Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones. *Trends in Neurosciences*, 29(1): 1–7.
- Bertmar G. 1981. Evolution of vomeronasal organs in vertebrates. *Evolution*, 35(2): 359–366.
- Døving K B, Trotier D, Rosin J F, et al. 1993. Functional architecture of the vomeronasal organ of the frog (genus *Rana*). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 74(3): 173–180.
- Hansen A, Reiss J O, Gentry C L, et al. 1998. Ultrastructure of the olfactory organ in the clawed frog, *Xenopus laevis*, during larval development and metamorphosis. *The Journal of Comparative Neurology*, 398(2): 273–288.
- Hillenius W J, Watrobski L K, Rehorek S J. 2001. Passage of tear duct fluids through the nasal cavity of frogs. *Journal of Herpetology*, 35(4): 701–704.
- Meyer D L, Fackler I R, Jadhao A G, et al. 1997. Differential labelling of primary olfactory system subcomponents by SBA (lectin) and NADPH-d histochemistry in frog *Pipa*. *Brain Research*, 762(1/2): 275–280.
- Nowack C, Wöhrmann-Repenning A. 2010. The nasolacrimal duct of anuran amphibians: suggestions on its functional role in vomeronasal perception. *Journal of Anatomy*, 216(4): 510–517.
- Rachelle M B, Lynda D C. 2009. Review of aquatic sex pheromones and chemical communication in anurans. *Journal of Herpetology*, 43(2): 184–191.
- Shapiro L S, Halpern M. 1998. Development of NADPH-diaphorase expression in chemosensory systems of the opossum, *Monodelphis domestica*. *Developmental Brain Research*, 111(1): 51–63.
- Stuelpnagel J T, Reiss J O. 2005. Olfactory metamorphosis in the Coastal Giant Salamander (*Dicamptodon tenebrosus*). *Journal of Morphology*, 266(1): 22–45.
- Taniguchi K, Toshima Y, Saito T R, et al. 1996. Development of the olfactory epithelium and vomeronasal organ in the Japanese reddish frog, *Rana japonica*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(1): 7–15.

图版 I 说明

黑斑蛙嗅器和犁鼻器 H. E 染色、银染及 NADPH-d 染色显微结构

1. 黑斑蛙幼蛙鼻腔横切,示主室、中室及犁鼻器,H. E 染色,标尺 =100 μm; 2. 主室、中室及犁鼻器银染,标尺 =100 μm; 3. 主室、中室及犁鼻器 NADPH-d 染色,标尺 =100 μm; 4. 高倍镜下示主嗅室结构,可见嗅上皮下 Bowman’s 腺,标尺 =50 μm; 5. 主嗅上皮银染结构,标尺 =50 μm; 6. 主嗅上皮 NADPH-d 染色结构,标尺 =50 μm; 7. 高倍镜下示犁鼻器结构,标尺 =100 μm; 8. 银染示犁鼻上皮结构,标尺 =100 μm; 9. NADPH-d 染色示犁鼻器结构,标尺 =100 μm; 10. 银染示嗅上皮由支持细胞、嗅受体细胞和基细胞 3 种类型细胞组成,标尺 =30 μm; 11. 银染示犁鼻上皮内支持细胞、嗅受体细胞和基细胞,标尺 =30 μm。

Explanation of Plate I

Microstructure of olfactory and vomeronasal organs in *Pelophylax nigromaculatus* as revealed by H. E staining, silver staining and NADPH-d histochemistry staining

1. The cavum principale, cavum medium and vomeronasal organ can be observed in cross section of nasal cavity in frog, Bar =100 μm; 2. Microstructure of the cavum principale, cavum medium and vomeronasal organ as revealed by silver staining, Bar =100 μm; 3. Microstructure of the cavum principale, cavum medium and vomeronasal organ as revealed by NADPH-d histochemistrystaining, Bar =100 μm; 4. Magnification of the cavum principale (H. E staining) and the Bowman’s glands in olfactory epithelium, Bar =50 μm; 5. Microstructure of the olfactory epithelium as revealed by silver staining, Bar =50 μm; 6. Microstructure of the olfactory epithelium as revealed by NADPH-d histochemistry staining, Bar =50 μm; 7. Magnification vomeronasal organ (H. E staining), Bar =100 μm; 8. Microstructure of the vomeronasal epithelium (silver staining), Bar =100 μm; 9. Microstructure of the vomeronasal epithelium (NADPH-d histochemistry staining), Bar =100 μm;10. Silver staining showing supporting cells, receptor cells and basal cells in olfactory epithelium, Bar =30 μm;11. Silver staining showing supporting cells, receptor cells and basal cells in the vomeronasal epithelium, Bar =30 μm.

oe. 嗅上皮; cp. 主嗅室; cm. 中室; ve. 犁鼻上皮; vno. 犁鼻器; ci. 下室; sc. 支持细胞; rc. 嗅受体细胞; bc. 基细胞; bg. Bowman’s 腺; vng. 犁鼻腺。

oe. Olfactory epithelium; cp. Cavum principale; cm. Cavum medium; ve. Vomeronasal epithelium; vno. Vomeronasal organ; ci. Cavum inferious; sc. Supporting cell; rc. Receptor cell; bc. Basal cell; bg. Bowman’s gland; vng. vomeronasal gland.

图版 II 说明

黑斑蛙嗅器和犁鼻器的超微结构

1. 黑斑蛙主嗅上皮游离面超微结构,标尺 =1 μm; 2. 嗅上皮内分泌型支持细胞,标尺 =1 μm; 3. 犁鼻上皮超微结构,标尺 =1 μm; 4. 犁鼻上皮,示颗粒内分泌型支持细胞,标尺 =1 μm; 5. 犁鼻上皮放大,图示内分泌型支持细胞胞质内含大量分泌颗粒,标尺 =0.2 μm。

Explanation of Plate II

Ultrastructure of olfactory and vomeronasal organs in *Pelophylax nigromaculatus*

1. Ultrastructure of olfactory epithelium showing secretory supporting and receptor cells. Note blebbing of the surface of a microvillar receptor cell,Bar =1 μm; 2. Ultrastructure of granular supporting cell in olfactory epithelium, Bar =1 μm; 3. Ultrastructure of vomeronasal epithelium,Bar =1 μm; 4. Ultrastructure of granular supporting cell in vomeronasal epithelium, Bar =1 μm; 5. Magnification of granular supporting cell,showing numerous secretory granules, Bar =0.2 μm.

Sc. 纤毛型支持细胞; Sg. 颗粒分泌型支持细胞; Rm. 微绒毛型受体细胞; b. 小泡。

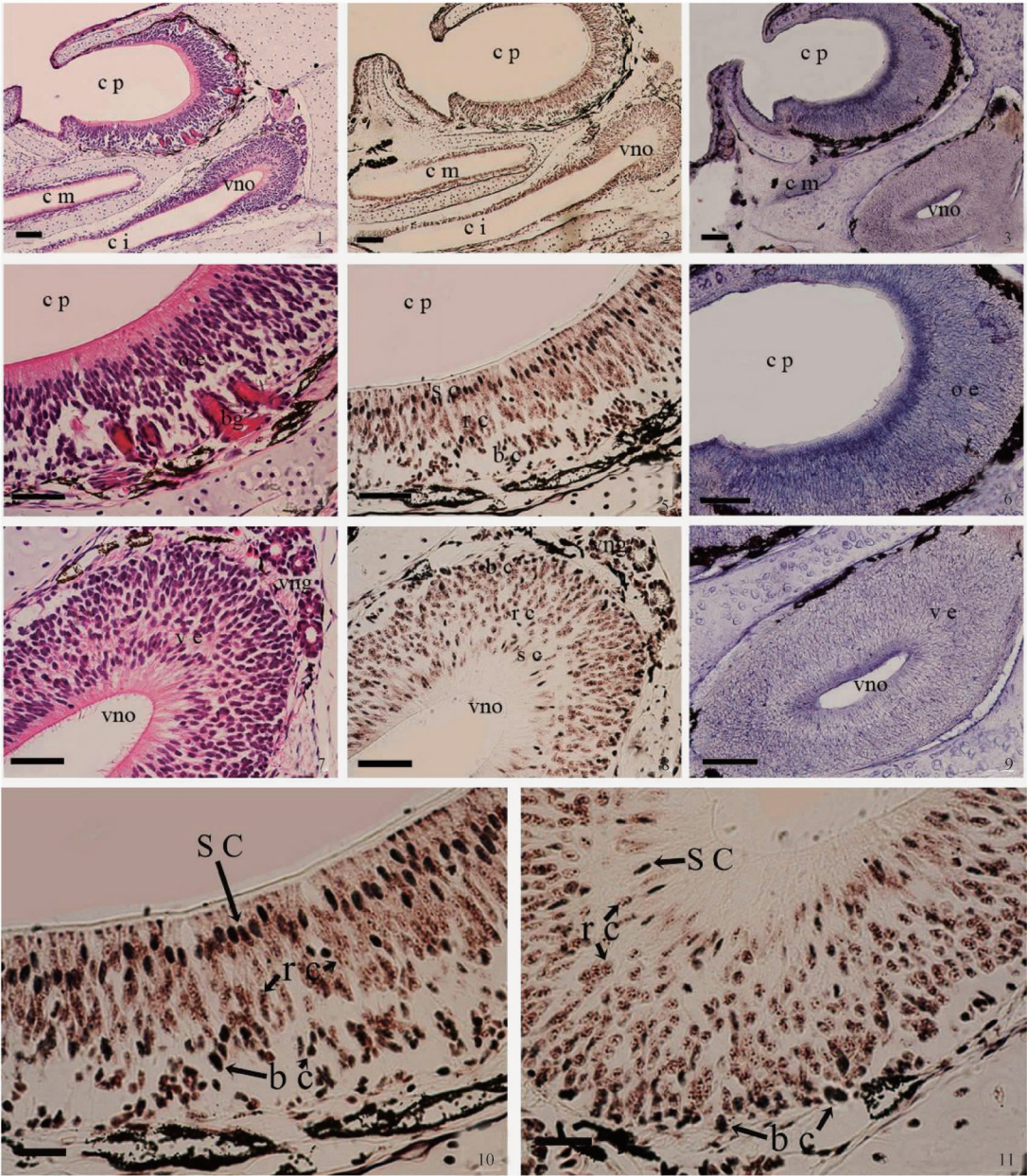
Sc. Ciliated supporting cell; Sg. Granular secretory supporting cell; Rm. Microvillar receptor cell; b. Blebbing.

刘 静等:黑斑蛙嗅器和犁鼻器的组化及超微结构特征

图版 I

LIU Jing *et al.*: Ultrastructure and Histochemical Characteristics of Olfactory and Vomeronasal Organs in *Pelophylax nigromaculatus*

Plate I



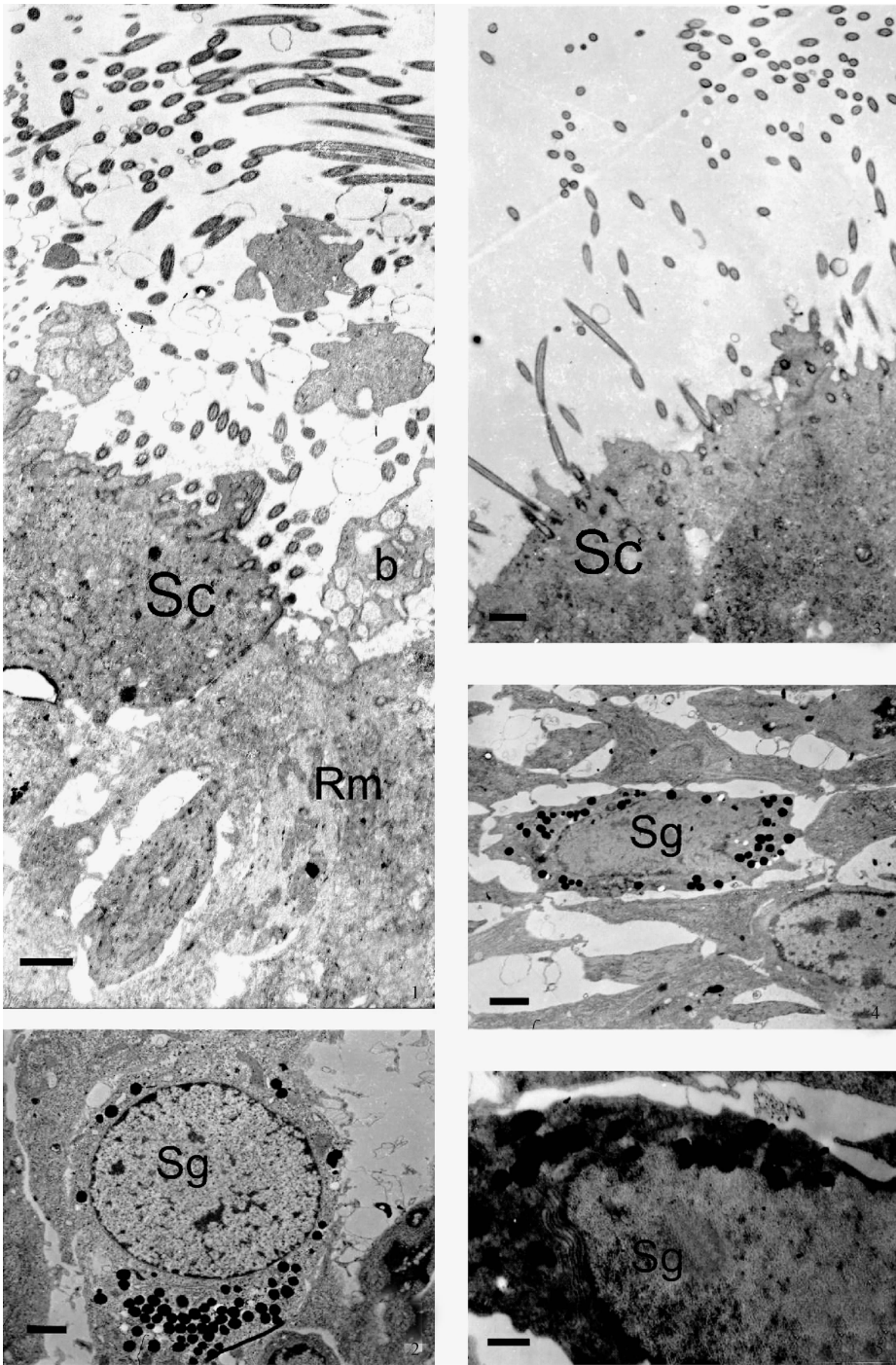
图版说明见文后

刘 静等:黑斑蛙嗅器和犁鼻器的组化及超微结构特征

图版 II

LIU Jing *et al.*: Ultrastructure and Histochemical Characteristics of Olfactory and Vomeronasal Organs in *Pelophylax nigromaculatus*

Plate II



图版说明见文后