

参环毛蚓神经组织的 NSE、NF200、ED1、GFAP 和 NO 细胞化学特性*

罗振国** 赵越 韩庆国

(深圳大学生物工程系, 深圳 518060) (广东药学院药理学系, 广州 510224)

摘要 为研究环节动物的神经组织学特性, 我们选择生活在我国的环节动物门典型代表参环毛蚓 (*Pheretima aspergillum*) 为研究对象, 使用若干种兔抗鼠抗体, 进行了免疫细胞化学与细胞化学染色, 在光学显微镜下观察反应阳性细胞的形态与分布。研究发现, 在参环毛蚓脑、咽下神经节、腹神经节所有神经细胞呈 NSE 阴性; 在参环毛蚓脑, 部分神经细胞呈 NF200 阳性, 在咽下神经节、腹神经节未观察到 NF200 阳性神经细胞; 在参环毛蚓脑观察到较多 ED1 阳性细胞; 在参环毛蚓脑、咽下神经节、腹神经节均未观察到 GFAP 阳性细胞; 在参环毛蚓脑未观察到 NADPH-d 阳性神经细胞, 而在咽下神经节和腹神经节部分神经细胞及纤维 NADPH-d 阳性。结果表明, 参环毛蚓神经细胞的神经细胞特异的烯醇化酶特性、神经微丝蛋白特性与星型胶质细胞的 GFAP 特性不同于哺乳动物; 其神经组织存在有数量较多的吞噬功能的类似于哺乳动物小胶质细胞的细胞; 参环毛蚓的脑不含有 NO 能神经细胞, 而咽下神经节和腹神经节含有 NO 能神经细胞。

关键词 参环毛蚓 (*P. aspergillum*) 神经细胞特异烯醇化酶 (NSE) 神经微丝蛋白 200 (NF200) 一氧化氮 (NO) 巨噬细胞 - 小胶质细胞胞质抗原 (ED1) 胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) 免疫细胞化学

从环节动物到哺乳动物, 经历了漫长复杂的进化过程, 然而对它们神经组织的研究发现仍有许多相同之处, 如哺乳动物的神经细胞产生多种神经肽物质, 环节动物的神经细胞也产生若干种神经肽物质 (罗振国等, 2002), 神经肽物质的存在甚至可追溯到原生动 (张小云等, 1996)。那么, 作为神经组织基本成分的神经细胞和神经胶质细胞, 环节动物与哺乳动物有何相同与相异呢? 本文选择神经细胞特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE)、在神经细胞中广泛存在的神经微丝 200 (neurofilament 200, NF200) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO)、巨噬细胞 - 小胶质细胞胞质特异抗原 (ED1)、神经胶质细胞特异性标记物质胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 为指标进行了研究, 试图对此进行探索。此二者间神经组织的比较性研究对于理解神经组织、神经肽物质的起源与进化具有积极的意义。

1 材料和方法

1.1 动物饲养及处理

取健康成体参环毛蚓 40 条, 避光潮湿饲养。饲以纸浆, 琼脂, 排空泥沙, 酒精麻醉, 取材固定于含 4% 多聚甲醛的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 6 h, 后入含 30% 蔗糖 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 脱水至下沉。标本经 OCT (美国) 包埋, 液氮冷冻, 依头尾方向经 Leica-1100 恒冷切片机制连续切片 (-20℃), 片厚 15 μm。

1.2 组织化学染色

一氧化氮合酶染色: 切片入含 1 mg/mL NADPH (Sigma)、0.5 mg/mL 四唑氮蓝 (Nitro-Blue-Tetrazolium NBT, Sigma) 和 0.3% Triton X-100 的 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中, 37℃ 孵育 60 min。

1.3 免疫细胞化学染色

切片经 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 漂洗, 3% H₂O₂ 处理 30 min, 3% 正常猪血清封闭 30 min, 兔抗 IgG 神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 多克隆抗体 (Sigma, USA) 1:1500, 神经微丝蛋白 200 (NF200) 单克隆抗体 (Sigma, USA) 1:1500, 胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 多克隆抗体

2001-05-19 收稿, 2002-01-20 修回

* 国家自然科学基金 (No. 39770383) 资助项目

** 通讯作者 E-mail: lqlzg@yahoo.com.cn

第一作者简介 罗振国, 男, 50 岁, 博士, 副教授。研究方向: 神经生物学。E-mail: lqlzg@yahoo.com.cn

(Sigma, USA) 1 3 000, 巨噬细胞 - 小胶质细胞胞质抗原 (ED1) 单克隆抗体 (Monoclonal antibody against cytoplasmic antigen in bone marrow-derived macrophages, Dako) 1 1 000, 4 孵育 12 h, 生物素化的猪抗兔血清 (Biotinylated swine anti-rabbit IgG, Dako) 1 200, 37 孵育 120 min, 链霉亲和素抗生物素 - 辣根过氧化物酶复合体 (Streptavidin/HRP, Dako) 1 200, 37 孵育 60 min, DAB 显色, 1%酒精 - 苏木素衬染。

对照实验: 以正常兔血清和 PBS 代替一抗分别行替换对照和空白对照, 同步进行上述免疫组织化学染色, 结果为阴性。

1.4 形态学测量

用装有目镜网格的显微镜, 10 ×10 放大倍数下, 分别计数抗体反应切片的脑、咽下神经节、腹神经节和肠的阳性细胞, 每种抗体每个部位观察计数 50 个视野。

2 结果

NSE 免疫反应: 在参环毛蚓脑、咽下神经节、腹神经节均未观察到 NSE 阳性的神经细胞。NF200 免疫反应: 在参环毛蚓脑, 部分神经细胞呈 NF200 阳性, 部分神经细胞呈 NF200 阴性 (图版 : 1, 2), 在咽下神经节、腹神经节未观察到 NF200 阳性神经细胞。GFAP 免疫反应: 在参环毛蚓脑、咽下神经节、腹神经节均未观察到阳性细胞。ED1 免疫反应: 在参环毛蚓脑, 部分细胞呈 ED1 阳性, 在咽下神经节、腹神经节未观察到 ED1 阳

性神经细胞 (图版 : 3)。NADPH-d 组化反应: 在参环毛蚓脑未观察到 NADPH-d 阳性神经细胞, 在咽下神经节和腹神经节部分神经细胞及纤维 NADPH-d 阳性 (图版 : 5 ~ 7)。详细分布总结如表 1。

3 讨论

神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 是一种酸性可溶性蛋白质, 是一种糖酵解酶。它由两个亚基组成二聚体 ()。它不仅是神经细胞分化程度的指征, 而且是所有类型神经细胞的一个普遍功能标志。与其他烯醇化酶相比, NSE 稳定性高, 不易失活, 当神经细胞强烈去极化、放电时, 神经细胞内氯可达到很高水平, NSE 在在这样的细胞内环境中能够保持活性, 保证细胞能量代谢顺利进行, 对于神经细胞正常的功能活动具有特别重要的意义 (Marangos *et al.*, 1987)。在大鼠、小鼠神经系统免疫细胞化学技术很容易观察到阳性神经细胞, 但是环节动物的神经系统竟然没有观察到 NSE 阳性神经细胞, 究其原因, 我们发现环节动物的神经细胞在形态上, 胞体肥大, 突起稀少, 呈幼稚外观, 结构功能上仍不同于高等动物成熟的神经细胞。换句话说, 似乎电生理活动不是环节动物的神经细胞功能活动的主要形式。环节动物与哺乳动物进化程度相差甚远, 可能它们的基本神经细胞化学特性是不一致的。我们曾对扁形动物三角涡虫的神经系统进行研究, 发现其所有神经细胞不仅 NSE 染色阳性, 而且 NF200 染色也是阴性, 表明动物进程

表 1 NO、NSE、NF200 和 GFAP 免疫反应阳性细胞在参环毛蚓神经系统的分布

Table 1 Distribution of NO, NSE, NF200, GFAP and ED1 positive cells in the nervous system of the Earthworm (*P. aspergillum*)

抗体 Antibody	脑 Brain		咽下神经节 Subpharyngeal ganglion		腹神经节 Ventral ganglion		肠神经系统 Enteric nervous system	
	强度 Intensity	细胞数/视野 Cell number /field	强度 Intensity	细胞数/视野 Cell number /field	强度 Intensity	细胞数/视野 Cell number /field	强度 Intensity	细胞数/视野 Cell number /field
	神经细胞特异的烯醇化酶 (NSE)	-	-	-	-	-	-	-
神经微丝蛋白 200 (NF200)	+++	160 ±3.64	-	-	-	-	-	-
胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)	-	-	-	-	-	-	-	-
巨噬细胞 - 小胶质细胞胞质抗原 (ED1)	++	97 ±2.83	-	-	-	-	-	-
还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸 磷酸黄递酶 (NADPH-d)	-	-	+	11 ±1.75	+	8 ±0.91	-	-

反应产物相对强度 (Relative intensity of immunoreaction): +++ 深 (High) ++ 中 (Moderate) + 淡 (Low) - 阴性 (Negative)。

度相差越远, 它们的细胞化学特性相差越大。环毛蚓、涡虫都是再生能很强的动物, 其中也包括神经系统的再生, 它们的神经细胞的此种幼稚性应该是合乎逻辑的。

为什么参环毛蚓神经系统部分神经细胞 NF200 阳性, 部分神经细胞 NF200 阴性?

在哺乳动物已观察到某些发育中的轴突缺乏神经微丝, 较粗的成熟轴突, 再生的轴突神经中微丝含量丰富 (Pacher, *et al.*, 1984), 是否可以推测, 参环毛蚓神经系统 NF200 阳性神经细胞是产生轴突的细胞, NF200 阴性神经细胞是不产生轴突的细胞。支持这一推测的是我们的免疫细胞化学研究发现 (罗振国等, 2002) 参环毛蚓脑肽能神经细胞分为两大类: 大神经细胞和小神经细胞, 在大神经细胞胞质内含有密集的粗大分泌颗粒, 形态上类似于哺乳动物肠内分泌细胞, 且未观察到突起, 在小神经细胞阳性物质均匀分布, 细胞形态呈锥型, 或三角形, 有突起, 与哺乳动物的神经细胞相似 (图版 : 4), 是否 NF200 阳性神经细胞就是小神经细胞, NF200 阴性神经细胞就是大神经细胞, 有待双标免疫细胞化学研究进一步证实, 作者倾向于认为参环毛蚓脑内存在着不具备神经传导功能而只起分泌作用的神经细胞, 这一点显著不同于哺乳动物, 如在哺乳动物下丘脑室旁核、视上核的大细胞分泌神经细胞不仅具有分泌神经肽的功能, 而且电镜研究已观察到在肽神经细胞与非肽神经细胞之间, 或肽神经细胞之间存在着突触联系 (Swanson and Sawchenko, 1983), 进一步的免疫电镜研究将揭示其客观性。

ED1 是巨噬细胞 - 小胶质细胞的特异标记,

在参环毛蚓脑观察到大量的 ED1 阳性细胞, 应该属于吞噬功能的细胞, 但其形态完全不同于哺乳动物脑的小胶质细胞。在哺乳动物脑只有脑神经细胞受到病毒、细菌、化学毒剂、物理射线、缺血损伤时 ED-1 阳性小胶质细胞才会反应性增生 (Takaseyoden *et al.*, 1999), 正常情况下 ED1 阳性细胞数量稀少。参环毛蚓脑正常情况下仍有较多 ED1 阳性细胞存在, 表明参环毛蚓脑是细胞死亡与再生十分活跃的部位。

还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸黄递酶 (NADPH-d) 是一氧化氮合酶的辅酶, 在组织化学中常被用来显示 NO 的存在。目前认为 NO 在脊椎动物神经系统有 3 种功能: 调节脑血流与兴奋性突触处局部神经的活动相适应; 调节某一小组织区域内突触联系的效率, 使那些同时激活的突触活动得到加强, 并使另一些突触的活动削弱; 使突触发育过程中轴突分支成型和分聚, 使趋向于同步放电的神经元支配共同的靶组织区域 (Adelman, 1987)。经计算机联机检索文献, 未见关于 NO 存在于环节动物的报告, 本文实验观察到参环毛蚓咽下神经节、腹神经节存在有 NO 能神经元, 结合我们另一实验观察到参环毛蚓脑含有丰富的谷氨酸能神经元与纤维 (罗振国等, 2001), 这些纤维投射到咽下神经节和腹神经节, 释放兴奋性神经递质谷氨酸, 虽然目前尚无电镜结果证实这些谷氨酸纤维在咽下神经节的突触联系, 咽下神经节的 NO 能神经元极有可能与调节该处兴奋性谷氨酸突触的功能活动有关。对于参环毛蚓脑内不含有 NO 能神经元, 而神经节内含有 NO 能神经元, 这一截然不同于高等动物的差别, 目前尚难以作出解释。

参 考 文 献 (References)

- Adelman, G. 1987 *Encyclopedia of Neuroscience (supplements)*. American Boston: Bichauer Inc., 289 ~ 292.
- Luo, Z. G., Y. Zhao, Q. G. Han and X. Y. Zhang 2002 Localization of 13 neuropeptides in earthworm *Pheretima aspergillum*: immunocytochemical study. *Acta Zoologica Sinica* 48 (5): [罗振国, 赵越, 韩庆国, 张小云 2002 十三种神经化学物质在参环毛蚓的分布: 免疫细胞化学研究. *动物学报* 48 (5): 641 ~ 647.]
- Luo, Z. G. and X. Y. Zhang 2001 Immunocytochemical localization of glutamate and metabotropic glutamate receptor, mGluR1, mGluR2/3, mGluR4 in earthworm, *P. aspergillum*. *Acta Anatomica Sinica* 32 (4): 357 ~ 360. [罗振国, 张小云 2001 谷氨酸与代谢型谷氨酸受体 1 亚型、2/3 亚型、4 亚型在环毛蚓的分布. *解剖学报* 32 (4): 357 ~ 360.]
- Marangos, P. J. and D. E. Schmechel 1987 Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neuroendocrine cells. *Ann. Rev. Neurosci.* 10: 269 ~ 295.
- Pacher, J. S., R. K. H. Liem and M. L. Shelanski 1984 The neuronal cytoskeleton. *In: Federoff, S. ed. Adv. Cell. Neurobiol*, Vol 5. New York: Academic Press, 801 ~ 814.
- Swanson, L. W. and P. E. Sawchenko 1983 Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.* 6: 269 ~ 342.
- Takaseyoden, S. and R. Watanabe 1999 High incidence of meningeal infiltration by leukemic cells after infection of chimeric virus between neu-

ropathogenic and non-neuropathogenic retroviruses. *J. Neurovirol.* 5 (4): 414 ~ 420.

Zhang, X. Y., L. Lu and X. Y. He 1996 Study of like-neuropeptides in Protozoa, *Stylonychia mytilus*. *Chinese Science Bulletin* 41 (19): 1792 ~ 1796. [张小云, 卢 丽, 何晓阳 1996 原生动物的神经肽物质的研究. *科学通报* 41 (19): 1792 ~ 1796.]

外 文 摘 要 (Abstract)

IMMUNOCYTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF NSE, NF200, ED1, GFAP and NADPH IN NERVOUS TISSUE OF THE EARTHWORM (PHERETIMA ASPERGILLUM) *

LUO Zhen-Guo ** ZHAO Yue HAN Qing-Guo

(Department of Biotechnology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

(Department of Pharmacology, Guangdong Pharmacology College, Guangzhou 510224, China)

Despite the vast evolutionary gulf between Annelids and mammals their nervous tissues have retained considerable similarities in neuroendocrine function, for example, neurons that can secrete neuropeptide. However, the cytochemistry of nervous tissues including neurons and neuroglia is little known at present. Our experiment was undertaken to shed light on this area. Chinese earthworms, *P. aspergillum* were used as experimental animals. Worms were first fed with paper pulp and agar to cause them to excrete previously ingested earth and sand. They were then deeply anesthetized with 10% ethanol and dissected. The samples were fixed in fixative containing 4% paraformaldehyde and 2% picric acid in 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) at 4 °C for 6 hours, transferred to 30% sucrose-PBS until completely infiltrated, and then embedded in OCT compound (USA) before being quick frozen in liquid nitrogen and cut into 15 μm thick sections with a LEICA CM 1100 cryostat (Pharmacia). Sections were mounted on gelatin-coated slides, preincubated in 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) containing 0.25% Triton X-100 for 20 min then, in preparation for NADPH-d histochemistry, transferred to a freshly prepared 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mg/mL nicotinamide adenine dinucleotide diaphorase (NADPH-d) and 0.5 mg/mL Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT). Sections were incubated at 37 °C for 1 hour, for immunocytochemistry. They were then stained with polyclonal antibodies against neuron-specific enolase (NSE) and glial fibrillary acidic protein (GFAP), and monoclonal antibodies against neurofilament 200 (NF200) and cytoplasmic antigen in bone marrow-derived macrophages (ED1), and incubated at 37 °C for 1 hour and at 4 °C overnight. Sections were subsequently incubated in biotinylated goat anti-rabbit IgG for 1 hour at 37 °C and in avidin-biotin peroxidase complex for 2 hours at 37 °C. Finally, they were reacted with diaminobenzidine (DAB) and 0.01% H₂O₂. Specific controls for the primary antiserum included the substitution of normal rabbit serum for the primary antiserum and omission of the primary antiserum, none of which showed any sign of immunocytochemical reaction. The consecutive sections were observed and the positive cells and fibers examined under a light microscope. Morphological measure were performed under 10 × 10 magnification. The positive cells of each antibody were counted respectively in the brain, subpharyngeal ganglion, ventral ganglion and enteric nervous system.

NSE, GFAP and ED1 respectively are components of neurons, astrocytes and microglia in mammals. We found no NSE positive neurons in the brain, subpharyngeal ganglion or ventral ganglion, although some neurons, consisting primarily of small cells, were NF200 positive and others, comprised primarily of giant cells,

* This work was sponsored National Natural Science Foundation of China (No. 39770383).

** Corresponding author. lqlzg@yahoo.com.cn

were NF200 negative. There were no NF200 positive neurons in the subpharyngeal ganglion and ventral ganglion. Many ED1 positive cells were observed in brain. No GFAP positive cells were detected in the nervous system. NADPH-d positive neurons existed in subpharyngeal ganglion and ventral ganglion, but brain neurons were NADPH-d negative. These data indicate that the neurons of Annelids and mammals have different NSE immunocytochemical reactivity. There are no astrocytes containing GFAP, but there are many macrophages resembling mammalian microglia cells in the brains of Chinese earthworms, i. e., the astrocytes in the brain of the Chinese earthworm have a different GFAP cytochemistry to those of mammals but the cell-like microglia in the brain of the Chinese earthworm share the same ED1 cytochemical characteristics as microglia in the brains of mammals. We conclude that: 1. Morphologically, in the mammalian hypothalamus, neurosecretory cells include magnocellular neuroendocrine cells and parvocellular neuroendocrine cells. The parvocellular neuroendocrine cells are small metuliform, contain a typical nucleus like an eagle's eye. The magnocellular neuroendocrine cells are fat, rounded, or ovoidal with a large acentric nucleus and clear nucleolus and are distributed chiefly in the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON) of the hypothalamus. Peptidergic fibers project into the neurohypophysis where they release regulatory substances into the blood. The morphology of NF200 negative giant neurons in the brains of Annelids strongly resembles that of magnocellular neuroendocrine neurons in the brains of mammals, which also have many dense secretory macrogranules. The morphology of NF200 positive small cells in the brains of Annelids also greatly resembles that of parvocellular cells in the brains of mammals. Therefore, we speculate that NF 200 positive neurons contain neurofilament and may function in nervous transmission but that NF200 negative neurons only have a secretory function. Our experimental work provides the first morphological evidence for such speculation. 2. The ED1 antigen is a marker of macrophage-microglia. In mammalian brains, there are normally few ED1 positive cells, however, these increase significantly with infection, poisoning or other trauma. The fact that there are many ED1 positive cells in Annelid brains shows that apoptosis and regeneration of neurons is common even in a normal physiological condition.

Key words Earthworm (*P. aspergillum*), NSE, NF200, ED1, GFAP, NO, Immunocytochemistry

图版说明 (Explanation of Plate)

图 版 (Plate)

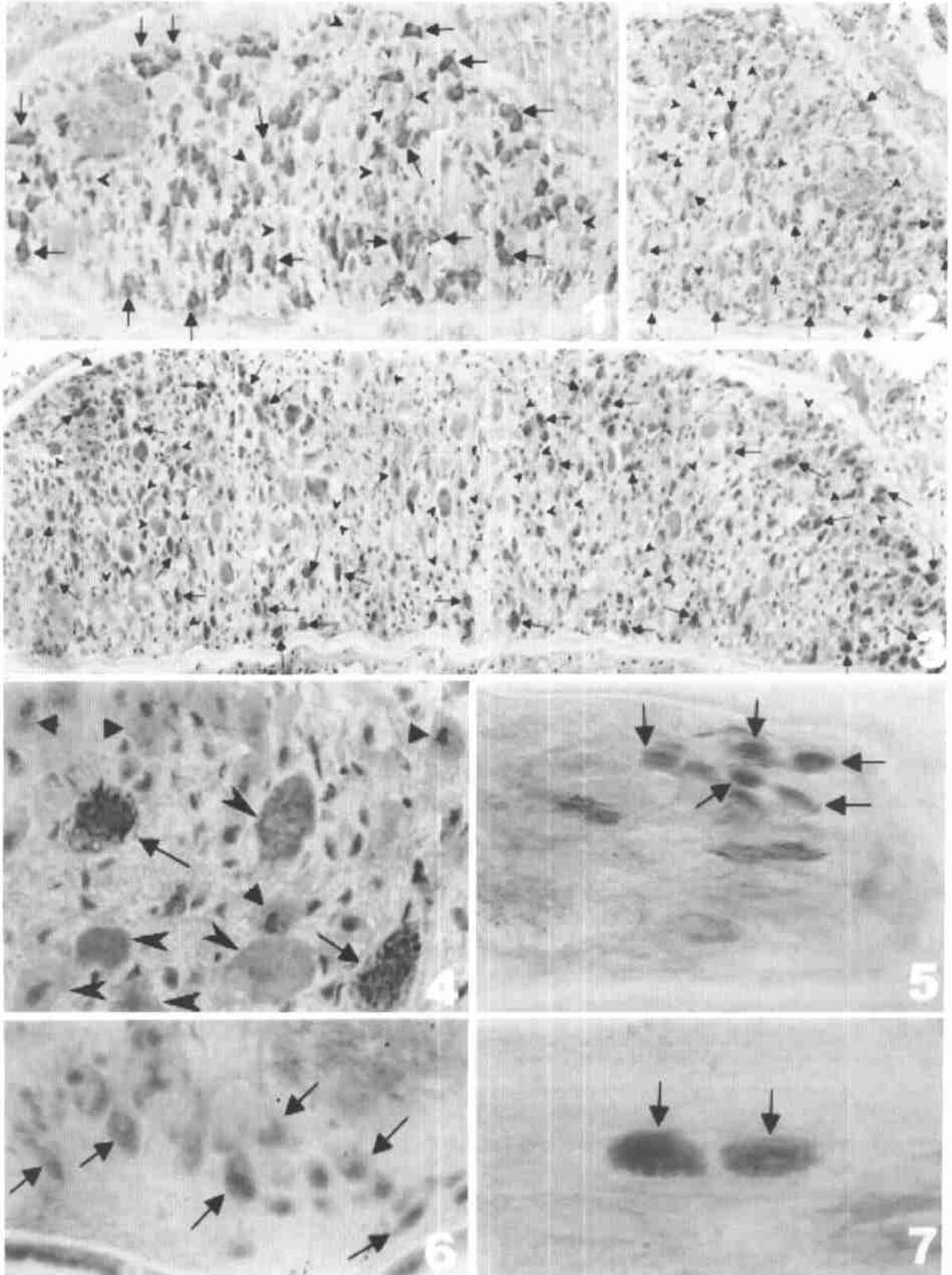
1. 参环毛蚓脑(咽上神经节)后部 NF200 免疫反应阳性神经细胞 (➡) 和阴性神经细胞 () [NF200 positive neurons (➡) and negative neurons () in posterior part of cerebroganglion of the Chinese earthworm *P. aspergillum*.] ×233
2. 参环毛蚓脑(咽上神经节)中部(半侧) NF200 免疫反应阳性神经细胞 (➡), 阴性神经细胞 () [NF200 positive neurons (➡) and negative neurons () in central part of cerebroganglion of the Chinese earthworm *P. aspergillum*.] ×100
3. 参环毛蚓脑(咽上神经节)中部 ED1 免疫反应阳性神经细胞 (➡), 阴性神经细胞 () [ED1 positive neurons (➡) and negative neurons () in central part of cerebroganglion of the Chinese earthworm *P. aspergillum*] ×100
4. 参环毛蚓脑(咽上神经节) calcitonin 免疫反应阳性大细胞性神经细胞 (➡), 胞体肥大, 内含粗大分泌颗粒; 阳性小细胞性神经细胞 (◄), 胞体较小, 阳性物质均匀分布; 阴性大细胞性神经细胞 () [Calcitonin positive magnoneurons (➡) containing dense large granules, positive parvoneurons without granules (◄) and negative magnoneurons () in the cerebroganglion of the Chinese earthworm *P. aspergillum*.] ×1 000
5. 参环毛蚓腹神经节 NADPH-d 反应阳性神经细胞 (➡) [NADPH-d positive neurons (➡) in the ventral ganglion of the Chinese earthworm *P. aspergillum*.] ×400
6. 参环毛蚓咽神经环 NADPH-d 反应阳性神经细胞 (➡) [NADPH-d positive neurons (➡) in the pharyngeal nervous circle of the Chinese earthworm *P. aspergillum*.] ×400
7. 参环毛蚓腹神经节 NADPH-d 反应阳性神经细胞 (➡) 高倍观察 [Amplification of NADPH-d positive neurons (➡) in the ventral ganglion of the Chinese earthworm *P. aspergillum*.] ×1000

罗振国等：参环毛蚓的 NSE、NF200、ED1、GFAP 和 NO 细胞化学特性

图版

LUO Zhen-Guo *et al.* : Immunocytochemical characteristic of NSE , NF200 , ED1 , GFAP and NADPH in nervous tissue of the earthworm (*Pheretima aspergillum*)

Plate



图版说明见文后 (Explanation at the end of the text)