

日本弓背蚁视叶中 5-羟色胺阳性神经元的分布^{*}

张金华 林佳乔 暴学祥^{**}

(东北师范大学生命科学学院, 长春 130024)

摘要 采用树脂石蜡 (Colophony-paraffin, CP) 组织包埋切片技术和链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶 (Streptavidin-peroxidase, SP) 免疫组织化学方法, 研究了 5-HT 能神经元在日本弓背蚁 (*Camponotus japonicus*) 视叶中的分布。5-HT 阳性纤维起源于少量的细胞体, 但在其视叶不同纤维网中有广泛的分布, 呈现明显的静脉曲张状。染色强度在 3 个视觉纤维网各不相同, 并出现分层现象。结果表明 5-HT 是在大面积神经丛区域, 而不是在局部神经丛区域起作用 [动物学报 49 (2): 224~229, 2003]。

关键词 日本弓背蚁 视叶 5-羟色胺 免疫组织化学

Distribution of 5-HT immunoreactive neurons in the optic lobes of the ant (*Camponotus japonicus*)^{*}

ZHANG Jir-Hua LIN Jia-Qiao BAO Xue-Xiang^{**}

(School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract *Camponotus japonicus* (Formicidae, Hymenoptera) is a typical social insect. Because of its comparatively concentrated and concise nervous system it is a good experimental model for the study of visual information processing in compound eyes and the structure and function of the insect brain and nervous system. Optic lobes are the visual center in insect compound eyes and the anatomical structure and electrophysiological characteristics of these organs have been studied in detail. The distribution of 5-HT immunoreactive neurons and their pathways has been reported in some insects. However, the distribution of 5-HT in the optic lobes and brain of *Camponotus japonicus* has not yet been investigated. CP (Colophony-paraffin) embedding tissue section technique and immunohistochemical streptavidin-peroxidase (SP) methods were employed to slice and stain *Camponotus japonicus* optic lobes. By investigating 5-HT immunoreactivity, the distribution of 5-HT in the optic lobes of *Camponotus japonicus* can be determined, which can provide information useful for the further study of insect brain neurobiology. 5-HT-like immunoreactive processes originate from a relatively small number of cell bodies but each neuron has layers of processes over a large volume of the neuropil of the optic lobe. All neuropil regions of the optic lobe, the lamina, medulla and lobula, contain 5-HT immunoreactive varicose fibers, which were distinct in morphology and degree of staining. These all showed pronounced stratification. The lamina is divided into layers A, B and C. Staining indicated that 5-HT immunoreactivity in layer A and B was weaker while that in C was stronger and well distributed (Plate 1). These 5-HT varicose fibers were arranged in a columnar form and the columns were interconnected by laterally projecting fibers. Medulla could be divided into nine layers according to the degree of staining. The staining of the first, second, third, seventh, eighth and ninth layers on both sides was lighter and immunoreactivity was weaker. 5-HT immunoreactive fibers in the fourth, fifth and sixth layers, which were vertical to the columnar cells of the medulla, was distributed extensively and stained even in the middle of the medulla, forming a characteristic centripetal mesh pattern

2002-07-22 收稿, 2002-09-09 修回

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (No: 3994019) 和科技部、教育部国家科技经费 (JG-99-20) 资助项目 [This study was funded by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 39940019), Ministry of Science and Technology, Ministry of Education (JG-99-20)]

^{**} 通讯作者 (Corresponding author) E-mail: xuexiangb@yahoo.com.cn

第一作者简介 张金华, 女, 26 岁, 硕士研究生。研究方向: 昆虫脑神经生物学。

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

(Plate : 3). Lobula could be divided into five layers for 5-HT immunoreactive fibers (Plate : 5). The staining of the second layer was the lightest, while the first and fourth layers lacked any immunoreactive fibers. The third and fifth layers were very thin with dark and clear 5-HT immunoreactive fibers. These two centripetally orientated layers were vertical to the positive fiber layer of the medulla. A few diffused fibers were revealed in the fifth layer. There were two groups of large immunoreactive neurons in the midposterior parts of protocerebrum. Their axons ran in bundles, some thin branches of which invaded a large area of the protocerebrum. Some of them also invaded the lobula and medulla (Plate : 6). In addition, we could see 3 clear and weak immunoreactive visual fiber tracts: medulla-lateral protocerebrum fiber tract (Plate : 7), lobula-lateral protocerebrum fiber tract (Plate : 8) and lobula-lobula fiber tract. 5-HT immunoreactivity was obvious in outer chiasma (Plate : 2) but was weak in the inner chiasma. There were three kinds of neurons related to optic lobes: amacrine cells, columnar neurons and tangential neurons. The number of 5-HT immunoreactive neurons was about 20, which were located on both sides of the inner chiasma, between the lamina and medulla, medulla and lobula, lobula and protocerebrum (Plate : 4). From the distribution of 5-HT immunoreactive neurons, we infer that 5-HT is more important in mediating distant rather than local neural interactions. Furthermore, 5-HT immunoreactivity in the lamina of optic lobes was strong, which might be related to the underground living habit and an adaptation to the consequent marked variation in light intensity [Acta Zoologica Sinica 49 (2): 224-229, 2003].

Key words *Camponotus japonicus*, Optic lobe, 5-HT, Immunohistochemistry

日本弓背蚁属昆虫纲、膜翅目、蚁科、弓背蚁属 (*Camponotus*), 是一种典型的社会性昆虫, 有 5 种蚁态: 雌蚁、雄蚁、大工蚁、小工蚁和兵蚁。与高等动物相比, 日本弓背蚁的神经系统比较集中, 结构相对简单, 是研究昆虫复眼视觉信息加工整合和脑神经系统结构与功能的优良实验材料。视叶是昆虫复眼的基本视觉中心, 复眼视觉感受器的轴突投射到视叶, 再通过视叶与前脑联系, 最后发出反馈。在无脊椎动物中, 5-HT 是作为一种经典的神经递质或调质起作用, 主要与昼夜节律、防御反应、调节饮食行为有关 (Nässel, 1988)。人们对昆虫视叶的解剖学结构和电生理学特性已有详细研究 (Hausen, 1984; Shaw, 1984), 并且 5-HT 能神经元在蟑螂的神经系统 (Klemm *et al.*, 1984)、蜜蜂脑中 (Schürmann *et al.*, 1984; 徐智敏等, 1994)、烟草蛾前脑和咽下神经节中 (Homberg *et al.*, 1989) 及其在整个昆虫神经系统中分布 (Nässel, 1988) 已有报道。与乙酰胆碱 (ACh) 和 -氨基丁酸 (GABA) 不同, 目前对于 5-HT 在昆虫视觉系统信息调节整合过程中的生理功能尚无定论。我们对该模型昆虫视叶中 5-HT 能神经元的分布模式所进行的系统研究, 可以清晰地观察到 5-HT 在视叶中各功能髓区的分布规律及其主要特征, 因而可以进一步为其在视觉系统中的生理功能的分析提供直接而有力的证据。探讨日本弓背蚁视觉系统中 5-HT 的分布, 同时也可作为昆虫脑神经生

物学的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 标本的制备

(1) 取大工蚁 20 只, 用刀片迅速切下头部, 置于 4% 多聚甲醛 (0.1% mol/L PB) 中室温固定 8 h; (2) 用 PBS (0.1 mol/L pH 7.4) 充分洗干净, 酒精系列脱水; (3) 叔丁醇透明; (4) CP 包埋剂包埋; (5) 手摇切片连续切片 (片厚 8 μ m); (6) 将切片裱于涂多聚赖氨酸的载玻片上, 晾干备用。

1.2 免疫组织化学染色过程 (张素娟, 1993)

(1) 切片复水后入 PBS (0.1 mol/L, pH 7.4); (2) 过氧化酶阻断溶液室温孵育 10 min; (3) 非免疫性动物血清室温孵育 5 min; (4) 1 \times 900 兔抗 5-HT 4 过夜; (5) 次日生物素标记的第二抗体室温孵育 10 min; (6) 链亲和素-过氧化物酶溶液室温孵育 10 min; (7) DAB/H₂O₂ 显色 5~10 min, 以上除 2、3 步 PBS 洗 5 min 外, 其他步骤间 PBS 洗 15 min, 3 次; (8) 苏木精复染, 脱水, 透明, 中性树脂封片; (9) OL YMPUS 显微镜观察照相。兔抗 5-HT 由美国 Sigma 公司生产, 经武汉博士德生物工程有限公司分装后购置; SP 试剂盒由福州迈新生物技术开发公司提供。

1.3 对照实验

用 PBS 代替兔抗 5-HT 同步进行上述免疫组织

化学染色过程, 结果为阴性。

2 结果

日本弓背蚁视叶包括 3 个彼此相连的神经纤维网, 由外向内为: 神经节层、外髓及内髓。神经节层分为细胞体层和神经纤维层。细胞体层主要包括单极细胞的胞体, 神经纤维层又分为 A、B、C 三层。从神经节层到外髓通过外交叉把神经节层和外髓连接起来, 外髓向内通过内交叉和内髓相连, 从内髓到前脑有纤维束相连。5-HT 阳性纤维呈现明显的静脉曲张状, 并呈分层现象。三个视神经纤维网的神经纤维都成柱状排列, 与视网膜的柱状排列一致, 与层状结构相垂直。详述如下。

2.1 神经节层 (Lamina)

依据神经节层的组织学特征, 可将其分为外侧的细胞体层和内侧的神经纤维层, 前者宽度约是神经节层的 1/2, 大量的单极神经元 5-HT 免疫反应皆为阴性 (蓝色); 后者可分为 A 层、B 层和 C 层。A 层最宽, C 层次之, B 层最狭窄, 约是 C 层的 1/3。A 层位于纤维层的外侧, 与视网膜相连, 主要接受光感细胞、无长突神经元单极神经元的投射, 再发出纤维连接 B 层和 C 层。A 层阳性反应最弱; B 层纤维较稀疏, 阳性反应最弱; C 层位于纤维层的内侧, 5-HT 免疫阳性反应最强列 (图版 : 1), 其中含有大量的阳性纤维分枝终末, 染色深而均匀, 细的 5-HT 神经纤维成柱状排列, 这些柱状结构通过边缘的神经纤维相连接。在神经节层和外髓之间, 存在一个明显的视交叉, 即外交叉 (Outer chiasma, Och) (图版 : 2)。沿外交叉两侧有许多神经元, 染色皆为蓝色。在外交叉可看到来自前脑的一束粗大的阳性纤维 (图版 : 2), 投射到 C 层。

2.2 外髓 (Medulla)

外髓体积最大, 宽 112 μm 。根据染色程度的不同, 可以把它分为 9 层。其中第 1、2、3、7、8、9 层染色浅, 反应弱。中间的第 4、5、6 层, 阳性纤维分布最广, 染色均匀, 在向心方向呈规则的网孔排列, 与外髓柱状细胞相垂直。这三层边界不明显, 约占外髓的三分之一 (图版 : 3)。

外髓与内髓之间存在第二个视交叉 - 内交叉 (Inner chiasma, Ich), 阳性反应较弱。三种神经元与外髓有关: 第一种是无长突神经元 (Amacrine cells), 胞体较小, 位于外髓的两侧, 突起深入髓的层状结构并形成许多细小分支, 它们中只有 6~

8 个被标记。第二种是柱状神经元, 连接外髓和内髓, 胞体位于内交叉两侧, 有 3~4 个被标记, 胞体向外髓、内髓发出轴突。第三种是切向神经元 (Tangential neurons), 胞体较大, 发出轴突到外髓和前脑。外髓和前脑之间有一群切向神经元 6~7 个, 直径在 5.6~9.8 μm 之间, 染色很深 (图版 : 4)。

2.3 内髓 (Lobula)

内髓是视叶的第三个神经纤维网, 体积约为外髓的一半, 通过内交叉与外髓相连。5-HT 染色使内髓分为 5 层 (图版 : 5), 第 2 层染色最浅, 第 1、4 层染色均匀, 没有明显的阳性纤维。第 3、5 层阳性纤维细, 染色深而清晰, 这两层呈向心排列并且与外髓的阳性纤维层相垂直。第 5 层有少量阳性纤维呈不规则分散状分布。内髓与外髓之间的少量柱状神经元被染色, 发出纤维到内髓; 内髓与前脑罩形体冠之间有 3~5 个胞体较大的切向神经元染色很深, 它们发出纤维与前脑联系。在前脑中腹部侧有两组非常大的阳性细胞, 直径在 11.2~16.8 μm , 发出的纤维聚集成束, 其中许多细的分枝, 扩展到前脑的大部分区域, 它们向边缘扩展的一部分分支侵入内髓, 还有一部分纤维侵入外髓 (图版 : 6)。此外可看到清晰的弱阳性视觉通路: 外髓 - 侧前脑通路 (Medulla-lateral protocerebrum fiber tract) (图版 : 7)、内髓 - 侧前脑通路 (Lobula-lateral protocerebrum fiber tract) (图版 : 8)、内髓 - 内髓通路 (Lobula-lobula fiber tract)。它们染色很浅, 其中有些细的纤维染色较深。

3 讨论

3.1 5-HT 可能在大面积神经丛区域起作用

5-HT 可能参与调节昆虫视觉的精确性或视觉中间神经元的活性, 并与昼夜节律的调整有关 (Nässel, 1988)。从日本弓背蚁视叶中 5-HT 能神经元的形态学特征及其在三个视神经网区的分布模式可以看出, 视叶中所有的 5-HT 阳性突起仅起源于少数的神经元, 但在视叶中却有广泛的分布。可以说明, 5-HT 在视觉信息的加工和大面积神经纤维的调节中起重要作用。

3.2 视叶中 5-HT 与 GABA 分布的比较

我们对日本弓背蚁视叶中 GABA 的分布进行过研究 (党永岩等, 2002), 结果表明其视叶中 GABA 分布很丰富, 与 5-HT 的分布模式有明显的不同。在神经节层, 5-HT 主要分布于 C 层, GA-

BA 主要分布于 A 层、C 层; 外髓中 5-HT 主要分布于中间的第 4、5、6 层, 而 GABA 主要分布于第 1、3、5、9 层; 内髓中 5-HT 分 5 层, 第 3、5 层染色深, GABA 则在第 1、3、5 层染色深。视叶中 GABA 阳性神经元的数量明显多于 5-HT 能神经元, 这进一步说明 5-HT 是在远距离神经丛区域起作用, 而 GABA 则主要参与局部区域神经活动的调节。

通过比较可以看出 5-HT 和 GABA 在视叶同一纤维层有重叠部分。同一部位神经丛中有两种或两种以上递质存在, 它们可能相互协调起作用, 也可能分别独立起作用。

3.3 几种昆虫视叶中 5-HT 分布的比较

与沙漠蝗 (*Schistocerca gregaria*)、美洲大蠊 (*Periplaneta americana*) 和红头丽蝇 (*Calliphora erythrocephala*) 视叶中 5-HT 的分布 (Nässel *et al.*, 1983) 相比: (1) 神经节层, 日本弓背蚁与沙漠蝗和红头丽蝇的分布模式相同, 染色显著的阳性纤维层 1 层, 而美洲大蠊 2 层; (2) 外髓, 日本弓背蚁中间的第 4、5、6 层染色深, 其余 6 层反应较弱; 沙漠蝗阳性纤维层 6 层, 2、4 层较宽, 每层又可分为 2 个亚层; 美洲大蠊阳性纤维 3 层; 红头丽蝇也分 3 层, 最外层可分 2 个亚层; (3) 内髓, 日本弓背蚁 3、5 层染色深, 呈向心排列, 其余 3 层反应弱; 沙漠蝗阳性纤维呈现较宽的 3 层, 最里面一层围成没有阳性纤维的核心; 美洲大蠊没有明显的分布特征; 红头丽蝇内髓和内髓板 (Lobula plate) 阳性纤维呈弥散状, 最内层阳性反应最强。

5-HT 阳性神经元主要分布于沙漠蝗外髓背侧边缘; 美洲大蠊的神经节层与外髓之间, 外髓、内髓及侧前脑的边缘; 红头丽蝇的外髓及侧前脑之间。日本弓背蚁则在上述部位均有分布。

以上比较结果进一步说明昆虫视叶神经纤维网结构的复杂性及种间的差异性。5-HT 在沙漠蝗视叶中的分布模式比美洲大蠊和红头丽蝇复杂, 而日本弓背蚁比沙漠蝗更复杂。这也说明了日本弓背蚁神经系统相对发达, 与其社会性生活相关。此外, 5-HT 在日本弓背蚁视叶神经节层中阳性反应异常强烈, 这可能与其营穴居生活, 经常出入蚁穴, 对

光线明暗急剧变化的适应有关。

参考文献 (References)

- Bao, X. X., Y. P. Zheng and H. S. Zhang 1999 CP embedding agent and its application to the serial section of the body wall tissue of insects. *Chinese Science Bulletin* **44** (7): 720 ~ 723. [暴学祥, 郑一平, 张恒山 1999 CP 包埋剂及其在昆虫体壁组织连续切片中的应用. *科学通报* **44** (7): 720 ~ 723.]
- Dang, Y. Y., Y. N. Li and X. X. Bao 2002 Distribution of GABA-like immunoreactivity in the optic lobe neuropils of *Camponotus japonicus*. *J. Northeast Normal University* **34** (2): 72 ~ 77. [党永岩, 李一娜, 暴学祥 2002 日本弓背蚁 (*Camponotus japonicus*) 视叶髓区 GABA 免疫阳性反应的初步研究. *东北师大学报* **34** (2): 72 ~ 77.]
- Hausen, K. 1984 The lobula-complex of the fly structure, function and significance in visual behaviour. In: Ali, M. A. ed. *Photoreception and Vision in Invertebrates*. New York: Plenum Press, 523 ~ 559.
- Homberg, U. and J. G. Hildebrand 1989 Serotonin-immunoreactive neurons in the median protocerebrum and suboesophageal ganglion of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* **258**: 1 ~ 24.
- Homberg, U. 1994 Distribution of neurotransmitters in the insect brain. *Progress in Zoology* **40**: 8 ~ 13.
- Klemm, N., W. M. Steinbusch and F. Sundler 1984 Distribution of serotonin-containing neurons and their pathways in the supraoesophageal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana* as revealed by immunocytochemistry. *J. Comparative Neurology* **225**: 387 ~ 395.
- Nässel, D. R. and N. Klemm 1983 Serotonin-like immunoreactivity in the optic lobes of three insect species. *Cell Tissue Res.* **232**: 129 ~ 140.
- Nässel, D. R. 1988 Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects. *Progress in Neurobiology* **30**: 1 ~ 85.
- Schürmann, F. W. and N. Klemm 1984 Serotonin-immunoreactive neurons in the brain of the honeybee. *J. Comparative Neurology* **225**: 570 ~ 580.
- Shaw, S. R. 1984 Early visual processing in insects. *J. Exp. Biol.* **2**: 225 ~ 251.
- Xu, Z. M., S. Z. Shi and H. Ning 1994 Comparison of the distribution of 5-HT, GABA, ACh positive immunoreactive neurons in the brain of the honeybee (*Apis sinensis*). *Acta Biophysica Sinica* **10** (2): 263 ~ 268. [徐智敏, 石淑珍, 宁红. 蜜蜂脑中 5-HT、GABA、ACh 免疫反应阳性神经元分布的研究. *生物物理学报* **10** (2): 263 ~ 268.]

图版说明 (Explanation of Plate)

图 版 (Plate)

1. 视叶的额切示分层的神经节层、外髓、内髓 (Frontal section through the optic lobe, showing the stratified lamina, medulla and lobula) ×200
2. 视叶的水平切示外交叉的阳性纤维 (细箭) [Horizontal section through the optic lobe, showing the immunoreactive fibers in the outer chiasma (thin arrow)] ×400
3. 外髓的水平切示外髓分层 (Horizontal section through the medulla, showing the nine layers in the medulla) ×264
4. 视叶的额切示外髓与前脑之间的阳性神经元胞体 (细箭) [Frontal section through the optic lobe, showing the immunoreactive somata between medulla and protocerebrum (thin arrow)] ×400
5. 视叶的水平切示内交叉与内髓分层 (Horizontal section through the optic lobe, showing the inner chiasma and the stratification in the lobula) ×264
6. 脑的水平切示脑中部粗大阳性纤维末端分支侵入内髓 (Horizontal section through the brain, showing the giant immunoreactive fibers projecting into the lobula) ×66
7. 视叶水平切示外髓与前脑间粗大纤维和阳性胞体 (细箭) [Horizontal section through the optic lobe, showing the giant fibers between medulla and protocerebrum and some immunoreactive somata (thin narrow)] ×264
8. 视叶水平切示内髓与前脑间粗大纤维 (Horizontal section through the optic lobe, showing the giant fibers between the lobula and protocerebrum) ×200

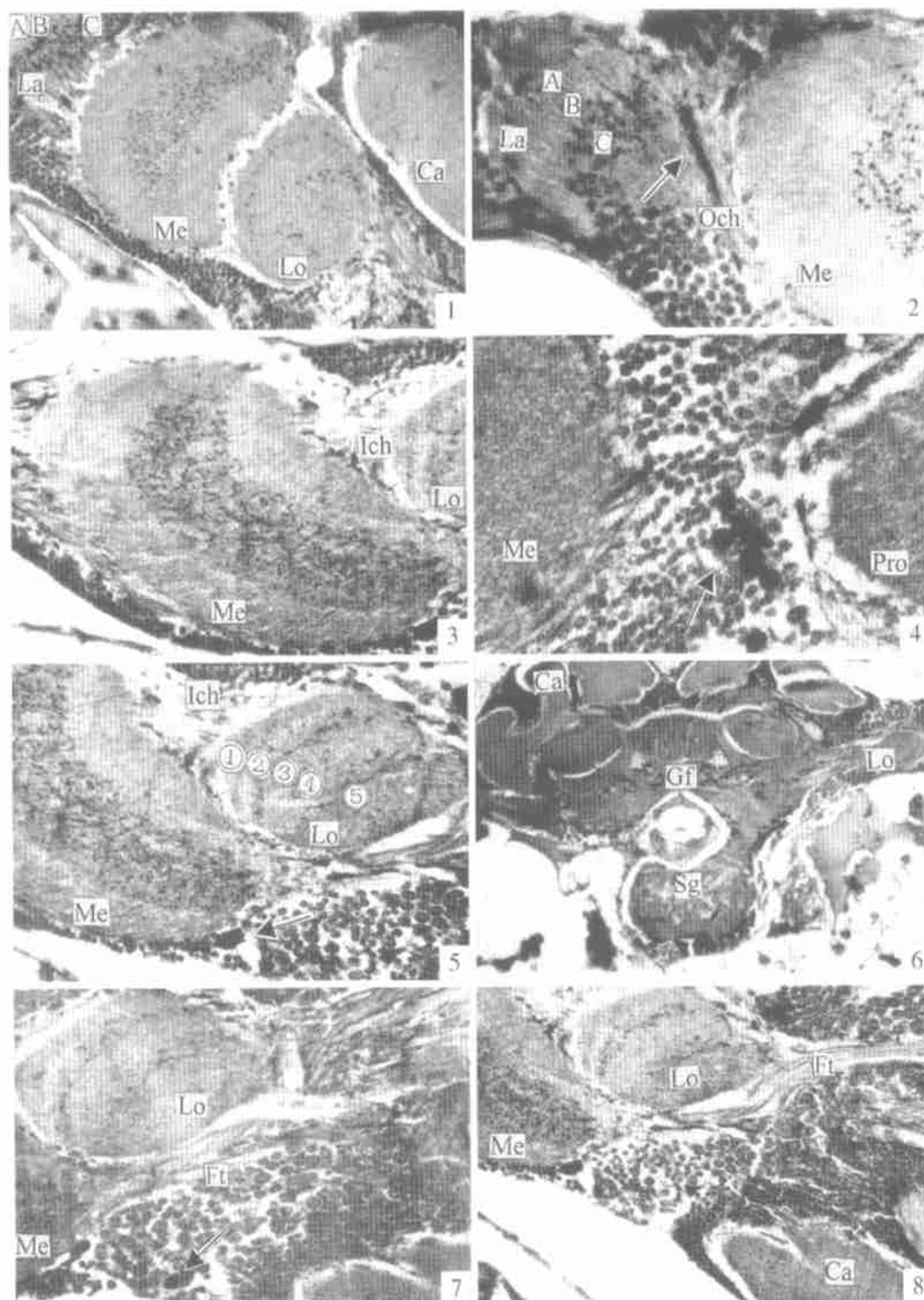
La: 神经节层 (lamina) Me: 外髓 (medulla) Lo: 内髓 (lobula) Och: 外交叉 (outer chiasma) Ich: 内交叉 (inner chiasma) Pro: 前脑 (protocerebrum) Ca: 冠 (calyx) Ft: 纤维通道 (fiber tract) Gf: 粗大纤维 (giant fiber) Sg: 食道下神经节 (suboesophageal ganglion)
 A, B, C: 神经节层纤维层 A、B、C 层 (The layers A, B and C of lamina neuropil)

张金华等：日本弓背蚁视叶中 5-羟色胺阳性神经元的分布

ZHANG Jin-Hua *et al.* : Distribution of 5-HT immunoreactive neurons in the optic lobes of the ant (*Camponotus japonicus*)

图版

Plate



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