

文章编号: 1000-5463(2004)03-0096-08

鲇脑垂体发生形态学的光镜和激光 扫描共聚焦显微观察

方展强, 唐以杰

(华南师范大学生命科学学院, 广东广州 510631)

摘要:应用光镜和激光扫描共聚焦显微镜对鲇脑垂体发生形态学进行观察: 鲇脑垂体由两个不同部位的胚胎细胞形成, 原始口腔背壁外胚层分离出来的细胞构成腺垂体的前外侧部(RPD)和中外侧部(PPD), 从间脑腹面漏斗体分离出来的细胞构成腺垂体中间部(PI)及神经垂体. 3 d龄仔鱼脑垂体的形态业已建成, 属前后型. 5 d龄仔鱼脑垂体可区分出神经垂体及腺垂体, 腺垂体可区分出 RPD、PPD、和 PI 3 个区域, 并开始出现毛细血管. 此时, PPD 内的生长激素(GH)细胞已经分化. 11 d龄稚鱼脑垂体中除 PPD 内 GH 细胞已分化外, 未见其它促激素分泌细胞分化. 15 d龄稚鱼脑垂体 PPD 内的促肾上腺皮质激素(ACTH)细胞及催乳激素(PRL)细胞已分化. 20 d龄稚鱼脑垂体内各种激素分泌细胞完全分化. 11 d龄以前仔鱼脑垂体属前后型, 15 d龄和 20 d龄的稚鱼脑垂体内 RPD、PPD 和 PI 3 部分呈垂直状排列, 性成熟鲇脑垂体结构呈背腹型.

关键词:脑垂体; 发生; 光镜; 激光扫描共聚焦显微镜; 鲇

中图分类号: Q13 **文献标识码:** A

OBSERVATIONS ON THE MORPHOLOGICAL DEVELOPMENT OF PITUITARY OF *SILURUS ASOTUS* WITH LIGHT AND LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPE

FANG Zhan-qiang, TANG Yi-jie

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: The morphological development of the pituitary of *Silurus asotus* was studied with laser scanning confocal microscope. It is shown that the pituitary of *Silurus asotus* originated from two embryonic cells of different position; the dorsal wall of the original cavum oris formed the rostralis pars distalis (RPD) and the proximal pars distali (PPD) and the infundibulum of the ventral part of diencephalons formed the pars intermedia (PI) and the neurohypophysis. In a 3-day old larva, the pituitary is formed and is of front-back style. In a 5-day old larva, the neurohypophysis and the pituitary gland can be distinguished. Blood capillary began to spread inside the pituitary gland. One can also make out the RPD, the PPD and the PI. At this time,

收稿日期: 2004-02-15

基金项目: 广东省科委科技攻关项目(河鲶驯化及人工繁殖技术研究)

作者简介: 方展强(1953-), 男, 广东普宁人, 华南师范大学教授.

the growth hormone (GH) cells in the PPD have differentiated. Except for the GH cells in the PPD, no other hormone cells were found differentiated. The ACTH and the PRL in the RPD do not differentiate until the larva got 15-day old. In a 20-day old larva, all hormone cells in the pituitary had differentiated. The pituitary is of front-back style before 11-day old. For 15-day and 20-day old larvae, the arrangement of the RPD, the PPD, the PI appeared vertically. The pituitary in the *Silurus asotus* of sexual maturity appeared as dorsoventral style.

Key words: pituitary gland; morphological development; light microscope; laser scanning confocal microscope; *Silurus asotus*

随着硬骨鱼类生殖内分泌生理学研究的不断深入,脑垂体腺作为生长、生殖等调节物质合成、分泌的重要器官,对其结构和功能的研究日益受到重视,但关于硬骨鱼类脑垂体的起源和发生的研究仅有甚少报道^[1,2]. 对硬骨鱼类脑垂体的研究,有许多内容需要作进一步探讨:①硬骨鱼类脑垂体起源于哪个胚层?其发生过程如何?②硬骨鱼类仔、稚鱼期腺垂体内各类促激素细胞分化次序如何?③硬骨鱼类脑垂体是否存在与其他所有脊椎动物所具有的正中隆起和门静脉系统的相应结构?本研究对鲇脑垂体发生过程的组织学结构变化进行细致观察,以期针对上述问题作探讨,为硬骨鱼类脑垂体的起源与发生过程在形态结构方面提供有益的资料.

1 材料与方法

1.1 实验动物

性成熟鲇(*Silurus asotus*)取自广东省饶平县汫洲镇,体重 550~1 500g,体长 21.4~38.2 cm,暂养在华南师范大学生命科学学院鱼类研究室的实验鱼场.人工诱导鲇产卵,从受精开始直到孵化脱膜后的鱼苗发育生长阶段中,分别取受精后 20、30 h 受精卵,孵化脱膜后 1、3、5、11、15 和 20 d 鱼苗固定.

1.2 观察方法

1.2.1 组织学观察 分别取不同日龄鱼苗及成鱼脑垂体,用津克尔氏(Zenker)液固定 24 h 后,在流水中冲洗 12~24 h,逐级乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片,厚度为 6~8 μm ,曼氏脑垂体染色液染色,中性树胶封片,置于 Olympus 显微镜观察并拍照.

1.2.2 激光扫描共聚焦显微观察 激光扫描共聚焦显微观察在汕头大学医学院进行.取受精后 20、30 h 受精卵,直接用吖啶橙(AO,荧光染料)染色;再分别取孵化脱膜后不同日龄鱼苗脑垂体,用津克尔氏(Zenker)液固定 24 h 后逐级酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片,厚度为 12~16 μm ,伊红染色,中性树胶封片,置于 ACAS Ultima 312 激光扫描共聚焦显微镜下,采用快速镜 DualScan 方式和台阶(Stage)方式对样品逐点扫描成像,再利用计算机的多种图像处理及三维重建软件(SFP 重建法),沿 x 、 y 、 z 轴或其它任意角度来表现标本的外形剖面,观察并拍照.

2 结果

2.1 脑垂体发生过程的组织学结构变化

受精后 30 h 的受精卵 胚胎出现视泡、视叶和小泡状耳囊,脑区分出前、中、后叶,视泡腹面原始口腔上皮细胞增生,口腔顶壁有一团外胚层上皮细胞开始向内迁移,在激光扫描共聚焦显微镜下可见这些上皮细胞(图版 I - 1)。

受精后 39 h 的受精卵 脑已初步分化成 5 部分,脑腔增大,部分上皮细胞已迁移到间脑底部下面(图版 I - 2)。

1 d 龄仔鱼 平均全长 5.51 mm,可见一团实心的由原始口腔分化而来的上皮细胞已集中到间脑底部,在视交叉后面与间脑向下凸出的部分即漏斗相接触(图版 I - 3),这团上皮细胞被曼氏脑垂体染色液染为浅红色(图版 II - 9)。

3 d 龄仔鱼 平均全长 7.02 mm,脑垂体基本形成,其大小为 $41.67 \mu\text{m} \times 23.48 \mu\text{m}$,扁平长条形,其结构属前后型(图版 I - 4)。它由几层细胞组成并且开始分化成不同的细胞团,但均被染成红色,还不能区分出神经垂体及腺垂体的前外侧部(RPD)、中外侧部(PPD)和中间部(PI)(图版 II - 10)。鱼苗已经开口,肠管建成,开始主动摄食。

5 d 龄仔鱼 平均全长 8.40 mm,脑垂体大小为 $61.36 \mu\text{m} \times 37.88 \mu\text{m}$,大体可区分神经垂体和腺垂体两部分。在间脑漏斗后已可见硬骨鱼类特有的脑部结构——血脉囊(图版 I - 5),根据腺垂体内细胞排列的紧密程度、细胞形态和伊红染色液着色深浅可以大致区分出 3 个区域:RPD 染色最浅,面积小于 PPD 和 PI,RPD 内细胞排列紧密,个体较小,细胞呈圆形或椭圆形,核圆形或椭圆形;PPD 染色浅于 PI 但深于 RPD,PPD 内细胞排列紧密,靠近 RPD 一侧的细胞核大而圆形,染色较深,细胞不规则。其余部分细胞较小,胞体圆形或椭圆形,核清晰,位于细胞中央,圆形;PI 部分染色最深,细胞较大,圆形或呈多边形,核大而明显,椭圆形。PI 内细胞排列较其它部位疏松,细胞之间有空隙存在,并有神经垂体的分枝分布。脑垂体内已见有毛细血管的分布(图版 II - 11)。

11 d 龄稚鱼 平均全长 11.01 mm,脑垂体大小为 $121.21 \mu\text{m} \times 68.18 \mu\text{m}$,神经垂体(NH)位于腺垂体的背上方,深入至 RPD 和 PPD 交界处以及 PPD 背上方(图版 I - 6)。腺垂体内细胞排列发生了变化,由紧密变为疏松排列。RPD 内细胞呈滤泡状,胞体椭圆形,核圆形或椭圆形,染色最浅;PPD 内细胞排列紧密,细胞之间有神经纤维伸入。靠近 PPD 背侧的细胞其细胞核较小,圆形,染色深,而靠近腹侧的细胞群有一个大而圆的核,染色较深。PI 内细胞排列较疏松,细胞椭圆形,核圆形,染色较浅;曼氏脑垂体染色液染色显示腺垂体内嗜酸性细胞颗粒全部呈红色,PPD 区内染色较深,PI、RPD 区内细胞染色较浅(图版 II - 12)。

15 d 龄稚鱼 平均全长 17.51 mm,脑垂体大小为 $132.58 \mu\text{m} \times 83.33 \mu\text{m}$,为垂直状排列,即 RPD 在上端而 PI 在下端。神经垂体分布在腺垂体的背上方,在 PPD 和 RPD 两区域及交界处神经垂体有较多的分枝伸入(图版 I - 7)。RPD 内细胞排列疏松,后部背侧与神经垂体相交处的细胞排列最为松散,其数量不多,个体大,胞体椭圆形,核圆形,染色较浅;大部分细胞呈带状排列,胞体椭圆形,染色较深。PPD 内的细胞形状出现了分化,靠 PI 一侧的细胞个体最大,胞体椭

圆形,核椭圆形,染色最浅;靠近 RPD 一侧的细胞个体较小,胞体为椭圆形,染色较浅,而 PPD 腹部的细胞个体较大,呈椭圆形,核圆形,染色较浅. PI 内细胞排列紧密,胞体大,呈椭圆形或不规则,核圆形,染色深. 曼氏脑垂体染色液染色显示 RPD 区内出现了少量浅蓝色的嗜碱性细胞,位于 RPD 背侧与神经垂体相交处. 而大部分呈带状排列的细胞仍为红色. PPD 和 PI 区细胞均被染成红色. 腺垂体内可见有毛细血管分布(图版 II - 13,14).

20 d 龄稚鱼 平均全长 31.02 mm,脑垂体大小为 $140.15 \mu\text{m} \times 98.48 \mu\text{m}$. 腺垂体分区明显,RPD 分布在背面,PI 在腹面. 神经垂体在 RPD 和 PPD 相交处分布增加(图版 I - 8). 曼氏液染色显示,腺垂体可以鉴别出 7 种激素分泌细胞. RPD 内有两种:靠近 PPD 与神经垂体相交处被染成蓝色嗜碱性的促肾上腺皮质激素细胞,数量少;占据 RPD 大部分被染成红色为催乳激素细胞. PPD 内有 3 种:背侧靠神经垂体分布被染成红色嗜酸性的生长激素细胞;靠近 RPD 一侧被染成淡蓝色的促甲状腺激素细胞;靠近 PI 一侧被染成蓝色的促性腺激素细胞. PI 内有两种,被染成紫红色的促黑激素分泌细胞和被染成淡红色的 PAS - 反应细胞(图版 II - 15).

2.2 性成熟个体脑垂体结构

性成熟鲇脑垂体呈椭圆形实心腺体,位间脑腹面,并以垂体柄与下丘脑紧密相连. 明显分为神经垂体和腺垂体两部分,垂体类型为背腹型. 腺垂体可区分为 RPD、PPD、PI 3 部分(图版 II - 16).

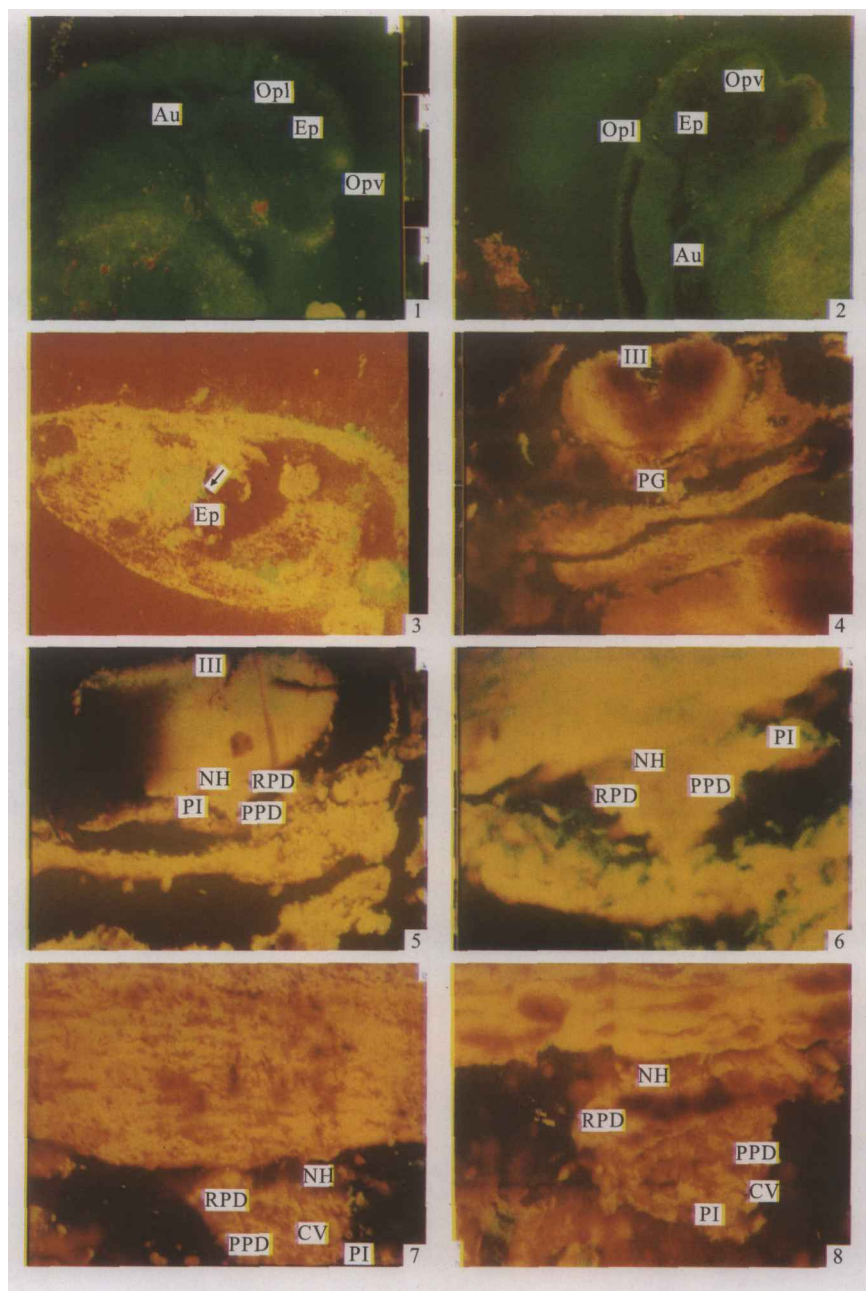
2.3 鲇脑垂体的发生模式

鲇脑垂体的发生经历:①发生期,从胚胎视泡出现到 3 d 龄仔鱼脑垂体基本形成之前,一团实心的由原始口腔分化而来的上皮细胞在视交叉后面与间脑向下凸出的部分——漏斗相接触;②雏形期(3~4 d 龄),脑垂体基本形成,但还不能区分出神经垂体及腺垂体,已有神经分泌纤维进入腺上皮组织中(图版 I - 4);③分化期(5~14 d 龄),构成脑垂体的细胞不断分化,已可区分出神经垂体和腺垂体两部分,神经纤维明显伸入到腺垂体组织(图版 I - 6);腺垂体可以区分 RPD、PPD 和 PI 三个区域,细胞排列由紧密变为疏松. 脑垂体内有毛细血管分布;④形成期(15~19 d 龄),脑垂体为垂直状排列,在腺垂体 PPD 和 RPD 两区域及交界处有较多的神经垂体分枝伸入. 腺垂体内可见有毛细血管分布,部分促激素细胞完成分化(图版 I - 7);⑤定型期(20 d 龄以后),腺垂体分区明显,神经垂体在 RPD 和 PPD 相交处分布明显增加,腺垂体内已分化出 7 种激素分泌细胞(图版 I - 8),腺垂体内可见有较丰富的毛细血管分布,脑垂体的基本结构已趋于定型.

3 讨 论

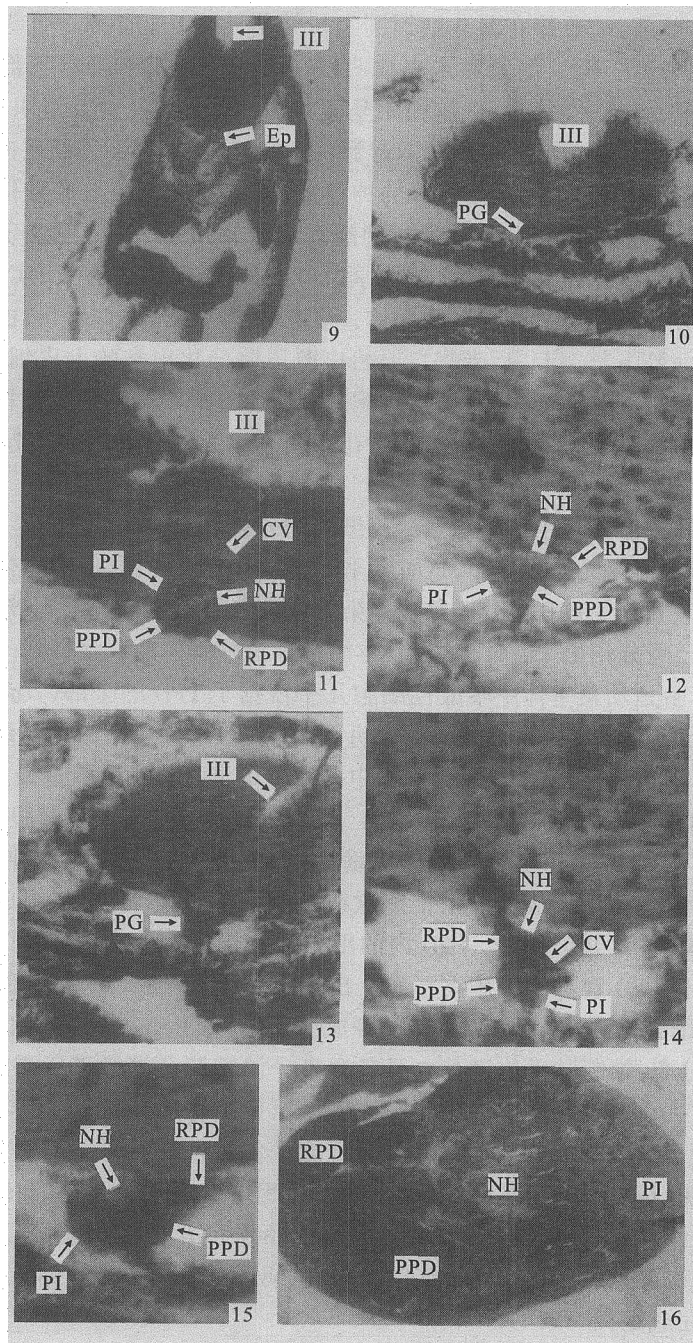
3.1 硬骨鱼类脑垂体的起源与发生特点

高等脊椎动物如爬行类、鸟类、哺乳类在脑垂体发生的胚胎发育早期,由原始口腔顶部外胚层上皮向间脑的方向突出形成拉克氏囊(Rathke pouch),该囊迅速与间脑底部的神经外胚层向腹侧突出而形成的漏斗状神经垂体芽相遇并失去与口上皮(buccal epithelium)的联系,其腔变成垂体残留空腔,存在于前叶和中叶之间;腺垂体的中间部是由拉克氏囊壁分化来的;而囊的其余部分特别增厚而演变为远侧部. 两侧延伸物则是由原基分化来的,最终溶合形成一块



图版说明 图版 I (激光扫描共聚焦显微观察)

1. 示受精后 30 h 的胚胎, 视泡(Opv), 视叶(Opl), 耳囊(Au), 上皮细胞团(Ep), 相邻光学切片的距离为 10 或 50 μm ; 2. 示受精后 39 h 的胚胎, 视泡(Opv), 视叶(Opl), 耳囊(Au), 上皮细胞团(Ep), 相邻光学切片的距离为 10 或 40 μm ; 3. 示 1 d 龄仔鱼脑垂体发生过程, 示与间脑接触的实心上皮细胞团(Ep)的立体重建图象; 4. 示 3 d 龄仔鱼脑垂体(PG), 第三脑室(III), 相邻光学切片的距离为 2 μm ; 5. 示 5 d 龄仔鱼脑垂体(PG), 神经垂体(NH), 前外侧部(RPD), 中外侧部(PPD), 中间部(PI), 第三脑室(III), 相邻光学切片的距离为 2 μm ; 6. 示 11 d 龄稚鱼脑垂体(PG), 神经垂体(NH), 前外侧部(RPD), 中外侧部(PPD), 中间部(PI), 相邻小光学切片的距离为 2 μm ; 7. 示 15 d 龄稚鱼脑垂体(PG), 神经垂体(NH), 前外侧部(RPD), 中外侧部(PPD), 中间部(PI), 毛细血管(CV), 相邻光学切片的距离为 2 μm ; 8. 示 20 d 龄稚鱼脑垂体(PG)的立体重建图象, 神经垂体(NH), 前外侧部(RPD), 中外侧部(PPD), 中间部(PI), 毛细血管(CV), 相邻小光学切片的距离为 1.5 μm .



图版 II (光学显微观察)

9. 示 1 d 龄仔鱼脑垂体发育过程, 注意与间脑接触的实心上皮细胞团 (Ep), $\times 264$; 10. 示 3 d 龄仔鱼脑垂体 (PG) 第三脑室 (III), $\times 264$; 11. 示 5 d 龄仔鱼脑垂体 (PG), 神经垂体 (NH), 前外侧部 (RPD), 中外侧部 (PPD), 中间部 (PI), 血脉囊 (CV), 第三脑室 (III), $\times 264$; 12. 示 11 d 龄稚鱼脑垂体 (PG), 神经垂体 (NH), 前外侧部 (RPD), 中外侧部 (PPD), 中间部 (PI), $\times 264$; 13. 示 15 d 龄稚鱼脑垂体 (PG), 第三脑室 (III), $\times 132$; 14. 示 15 d 龄稚鱼脑垂体 (PG), 神经垂体 (NH), 前外侧部 (RPD), 中外侧部 (PPD), 中间部 (PI), 毛细血管 (CV), $\times 264$; 15. 示 20 d 龄稚鱼脑垂体 (PG), 神经垂体 (NH), 前外侧部 (RPD), 中外侧部 (PPD), 中间部 (PI), $\times 264$; 16. 垂体矢状切面组织结构, 神经垂体 (NH), 前外侧部 (RPD), 中外侧部 (PPD), 中间部 (PI), $\times 26$.

很薄的组织板称为结节部,结节部在漏斗柄周围生长并伸展到丘脑下部.低等脊椎动物如两栖类动物的垂体原基来源于嘴外侧紧靠未来口凹(stomadeum)前部和前脑下部的一个楔状组织,它与拉克氏囊同源,但是一团实心细胞而不呈囊状^[3].从个体发育及组织学上来看,硬骨鱼类与其它脊椎动物一样,脑垂体的发生属双起源:由间脑底壁的神宫外胚层向下突起形成的神经垂体芽漏斗状结构主要参与形成垂体腺的神经垂体;从原始口腔顶壁分化外胚层细胞形成垂体腺的RPD、PPD,神经垂体与腺垂体通过神经纤维分枝相互联系.鲇脑垂体的发生过程中与两栖类相似,也没有拉克氏囊的产生,仅从原始口腔顶壁迁移来的一团实心上皮细胞团,与从漏斗分化出来的细胞愈合,共同形成脑垂体.鲇脑垂体的结构类似草鱼,由神经垂体和腺垂体构成,前者来自间脑下部突起,后者来自原始口腔顶壁分化出来的上皮细胞,表明硬骨鱼类的脑垂体(腺垂体和神经垂体)均属外胚层细胞起源.这与圆口类盲鳗其腺垂体发生由内胚层起源^[4]不同;也不象有些脊椎动物垂体发生中出现西塞氏囊对腺垂体的建造作用,表明其脑垂体是由内、外两种胚层组成.

3.2 硬骨鱼类脑垂体发生过程中各类激素分泌细胞的分化

鲇5 d龄仔鱼脑垂体内无血管分布,这时脑垂体还没有分泌功能,但腺垂体细胞开始分化形成了RPD、PPD、PI 3部分.PPD经曼氏脑垂体染色液染色显示大部分细胞被染成红色,呈嗜酸性,推测GH细胞已经分化出来.对5 d龄日本海马仔鱼脑垂体的观察得到一致结果^[1]. Nagahama^[5]观察到大麻哈鱼幼鱼垂体中嗜酸性细胞几乎占据了PPD的全部,其余的细胞则还没有分化;孵化不久的红鲑幼鱼也有相同现象,表明GH细胞最早分化出来是与幼鱼生长发育有密切相关的,在未达性成熟、处于生长发育阶段中的硬骨鱼类,GH细胞数量最多.脑垂体的组织结构完善是由RPD开始的,但PPD内仍以GH细胞占据大部分,贯穿于背腹部,而GTH细胞和TSH细胞尚未分化.15 d龄仔鱼整个垂体成垂直排列,在RPD内背侧与神经垂体相交处,出现了少量的嗜碱性蓝色细胞,从位置上推测这些是ACTH细胞,而RPD内成带状排列的大部分细胞呈红色嗜酸性,为PRL细胞.PPD内的细胞虽均被染成红色,但除了GH细胞外,靠近RPD一侧的细胞和PPD腹部的细胞在形态上出现了差异,表明TSH细胞和GTH已开始分化.PI内其中MSH细胞已分化;另一种细胞被染成淡红色,为PAS-反应细胞.20 d龄垂体内已有较多毛细血管分布,推断脑垂体已基本具备激素分泌细胞分泌激素所需的结构条件.日本海马仔鱼垂体则在30 d龄才基本具备分泌功能^[1],草鱼脑垂体形态建成基本完成则需5个月的时间,而且细胞分化尚未完成^[2].这些差异可能是鱼的种类不同以及发育温度等外部条件不同所引起的.魏刚^[6]在研究鲇胚胎和幼鱼发育过程中发现:鲇的器官和幼鱼发育体现了对环境较强的适应,鲇的器官发育较快,感官、心脏、上颌须和第1对下颌须原基均在孵化前出现.鲇的颌齿、肝脏和胃肠的分化均早于苏氏圆腹鲇、胡子鲇和南方大口鲇.这些与鲇仔鱼脑垂体在短期内构建完成是相一致的.

3.3 硬骨鱼类脑垂体结构类型及特点

在2万多种硬骨鱼类之中,仅有很少种类的脑垂体曾经被详细研究过.根据脑垂体的形态构造,可以分成前后型和背腹型,还有许多中间类型.鲇垂体呈背腹型,RPD位于腺体前背部,PPD于腺体的中央部,PI位于垂体腹后部,神经垂体位于腺垂体的背面;神经垂体的分布有一定规律,先形成中央轴,RPD、PPD和PI则围绕此轴排列,神经垂体形成分枝伸入这三区,而最为广泛的分枝是在腺体的腹后部.鲇与白鲢脑垂体的类型相似,但与鳊鱼、鲈鱼脑垂体类型

不同,这两种鱼 RPD 位于腺体的前部,PPD 位于腺体的中央部,PI 位于后部,神经垂体占据 1/2 的腺体后区的背后面,其分枝伸入到腺垂体的每一区域^[7]。此外,鲇脑垂体与鲤、虹鳟、北鳉一样具有垂体柄,但垂体柄较短,不象鮟鱇垂体柄较长,以至垂体的位置会前于视交叉。鲇垂体与间脑的接触属于关闭型,漏斗与垂体间不直接接触,漏斗的壁突入垂体柄,垂体柄几乎是实心的,它最后并入垂体。而鳗鲡及鲑垂体与间脑的接触属于开放型,第三脑室有一宽阔的开口通入神经垂体,漏斗的底部通常呈平扁状,它的突出有时进入垂体组织中形成神经垂体^[8]。鲇神经垂体的神经突起分支呈树枝状,穿入腺垂体,进入 PI 的分支通常比穿入其他部分的宽且长。硬骨鱼类没有形成明显的正中隆起结构,孟庆闻等^[8]认为在硬骨鱼类中,神经垂体与腺垂体接触区与高等脊椎动物的正中隆起相当。鲇腺垂体的 RPD 同鲑、鳗鲡一样,容易辨认,不象鲤鱼的 RPD 十分退化,减少到只残留一单层组织,被 PPD 包围。底鳃则完全无 RPD。由此可见,硬骨鱼类腺垂体 RPD 的大小因种属不同而异,一些学者认为 RPD 发达表明鱼类的进化程度较高。

参考文献:

- [1] 张 峰. 日本海马仔鱼期脑垂体发育的组织学研究[J]. 大连水产学院学报, 1994, 9(2): 41 - 46.
- [2] 鲁双庆, 刘 筠, 陈淑群. 草鱼脑垂体的起源和发生的研究[J]. 湖南农业大学学报, 1996, 22(2): 182.
- [3] HANOAKA Y. The effect of hypothalactomy at open neurula embryos in *Rana pipiens*[J]. Amer Zool, 1963, 3: 509.
- [4] AUBREY G. Early development of the hagfish pituitary gland: evidence for the endodermal origin of the adenohypophysis[J]. Amer Zool, 1983, 23: 639 - 654.
- [5] NAGAHAMA Y. Histophysiological studies on the pituitary gland of some teleost fishes, with special reference to the classification of hormone producing cells in the adenohypophysis[J]. Mem Fac Fish, 1973, 21: 1 - 63.
- [6] 魏 刚, 罗学成. 鲶胚胎和幼鱼发育的研究[J]. 四川师范学院学报, 1994, 15(4): 350 - 355.
- [7] 上海水产学院. 鱼类生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1961.
- [8] 孟庆闻, 苏锦祥, 李婉端. 鱼类比较解剖[M]. 北京: 科学出版社, 1987.

【责任编辑 黄玉萍】