

牙鲆脑垂体早期发育的组织学观察

邵明瑜 张志峰* 刘建国 李 昀 张全启

(中国海洋大学 海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 青岛 266003)

摘 要 垂体作为鱼类最重要的内分泌器官之一, 在生长、发育、生殖以及其他一些内分泌相关生理活动中起重要作用。作者采用组织学方法观察了牙鲆的脑垂体发生, 对不同发育时期的腺垂体细胞进行了初步鉴定。结果表明, 孵化后 1 d 仔鱼的间脑下方可见一实心细胞团, 于孵化后 3 d 迁移至间脑后方的漏斗体下, 与来自漏斗体的神经内分泌细胞及其神经纤维结合共同形成脑垂体, 前者形成腺垂体, 后者则主要形成神经垂体。孵化后 8 d 腺垂体分为中间部(Pars intermedia, PI)和外侧部(Pars distalis, PD)两部分。孵化后 14 d 腺垂体分化为前外侧部(Rostral pars distalis, RPD)、中外侧部(Proximal pars distalis, PPD)和 PI 共 3 部分, 为“前后型”脑垂体。稚鱼变态期间及变态完成后的幼鱼, 各部分从“前后型”排列开始向“背腹型”排列转变。孵化后 14 d 的牙鲆仔鱼中, PPD 细胞多呈强嗜酸性, 至变态完成后一直是 PPD 的主要细胞; PI 靠近神经纤维的细胞呈强嗜碱性。孵化后 42 d 的牙鲆幼鱼 RPD 中, 与神经垂体相邻的少量细胞呈嗜碱性, 而其下方细胞则呈嗜酸性。根据成体牙鲆激素分泌细胞的染色特征对上述各细胞类型进行了推测。

关键词 牙鲆 脑垂体 发育 组织学

中图分类号 Q17; Q133 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)02-0040-06

Histological observation on early development of pituitary in flounder *Paralichthys olivaceus*

SHAO Ming-yu ZHANG Zhi-feng* LIU Jian-guo LI Yun ZHANG Quan-qi

(Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education,
Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT The fish pituitary, as an important endocrine organ, plays vital roles in endocrine-related function including growth, development and reproduction. In the present study, the histological development of pituitary was observed for flounder *Paralichthys olivaceus*, and adenohypophysial cells were identified preliminarily. The results showed that a solid cell cluster was located under the diencephalon in 1 day post hatching (DPH) fry, migrated towards under the infundibulum at the posterior diencephalon, and coalesced with neuroendocrine cells and nerve fibers from the infundibulum to form the pituitary preliminarily in 3 DPH fry. The cell cluster formed the adenohypophysis, and others primarily formed the neurohypophysis. In 8 DPH fry, the adenohypophysis differentiated into two portions: the pars intermedia (PI) and the pars distalis (PD), which was divided into the rostral pars distalis (RPD) and the proximal pars distalis (PPD) in 14 DPH fry. The fore-and-aft pituitary changed to dorsal-ventral position

国家 863 计划项目(2006AA10A401)资助

* 通讯作者。E-mail: zzfpl07@ouc.edu.cn, Tel: (0532)82031647

收稿日期: 2009-05-02; 接受日期: 2009-07-21

作者简介: 邵明瑜(1979-), 男, 讲师, 博士, 主要从事海洋动物发育生物学研究。E-mail: shaomy@ouc.edu.cn, Tel: (0532)82031647

during metamorphosis stages of juvenile to young fish. The highly acidophilic cells were found to dominate in the PPD in the 14 DPH fry and posterior developmental stages, and cells close to nerve fibers in the PI showed strong basophilia. In the 42 DPH young fish, a few cells around nerve fibers in the RPD were basophilic, whereas cells in the lower part of RPD were acidophilic. The types of these cells were speculated based on the staining characteristics of hormone-secreting cells in the adult *P. olivaceus*.

KEY WORDS *Paralichthys olivaceus* Pituitary Development Histology

脑垂体作为鱼类最重要的内分泌器官之一,能够分泌促甲状腺激素(Thyroid-stimulating hormone, TSH)、促肾上腺皮质激素(Corticotropin, ACTH)、促性腺激素(Gonadotropin, GTH)、生长激素(Growth hormone, GH)、催乳素(Prolactin, PRL)和黑色素细胞刺激素(Melanocyte stimulating hormone, MSH)等6~9种激素,通过这些激素的直接作用,或者通过调节其他激素的分泌参与了鱼类生长、发育和生殖等各种生命活动(谢碧文等 2008)。自20世纪30年代末Woodman(1939)报道了鱼类脑垂体的形态结构后,国内外学者已对30多种鱼的脑垂体结构和分泌细胞进行了观察,基本弄清了脑垂体的细胞组成及其生理功能。对脑垂体发生的进一步研究,可为鱼类器官发育的基础研究以及规模养殖中的实际应用提供重要参考,然而目前关于鱼类脑垂体发育的研究只有少量报道(Chapman *et al.* 2005; Einarsdóttir *et al.* 2006; 谢碧文等 2008)。

牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 是我国北方沿海的重要养殖鱼种,由于养殖牙鲆缺乏野生鱼繁殖时天然生态因子的综合刺激,脑垂体GTH不能形成高峰,性腺发育受阻,必须利用注射激素或激素类似物等手段人工诱导牙鲆产卵(林浩然 1999)。宋海霞等(2007)观察鉴定了牙鲆成鱼脑垂体的结构与各类分泌细胞,为其内分泌调节机理的研究提供了数据。Tanaka等(1995)和Estevez等(2001)则通过组化和免疫组化方法鉴定了牙鲆仔、稚鱼脑垂体的数种激素分泌细胞。本研究则以养殖的牙鲆仔、稚和幼鱼为对象,采用组织学方法观察了牙鲆的脑垂体发生,对不同发育时期的腺垂体细胞类型进行了初步鉴定,为探讨脑垂体发生与牙鲆生长以及性腺发育的相关性提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

人工培育的牙鲆仔、稚和幼鱼均取自山东省海阳市黄海水产有限公司,培育水温17~18℃。初孵仔鱼至孵化4d内每天取样1次,孵化4d后每2~3d取样1次,孵化14d后每5~6d取样1次,每次取样数量大于5。取样鱼全长范围为2.4~28.2mm。

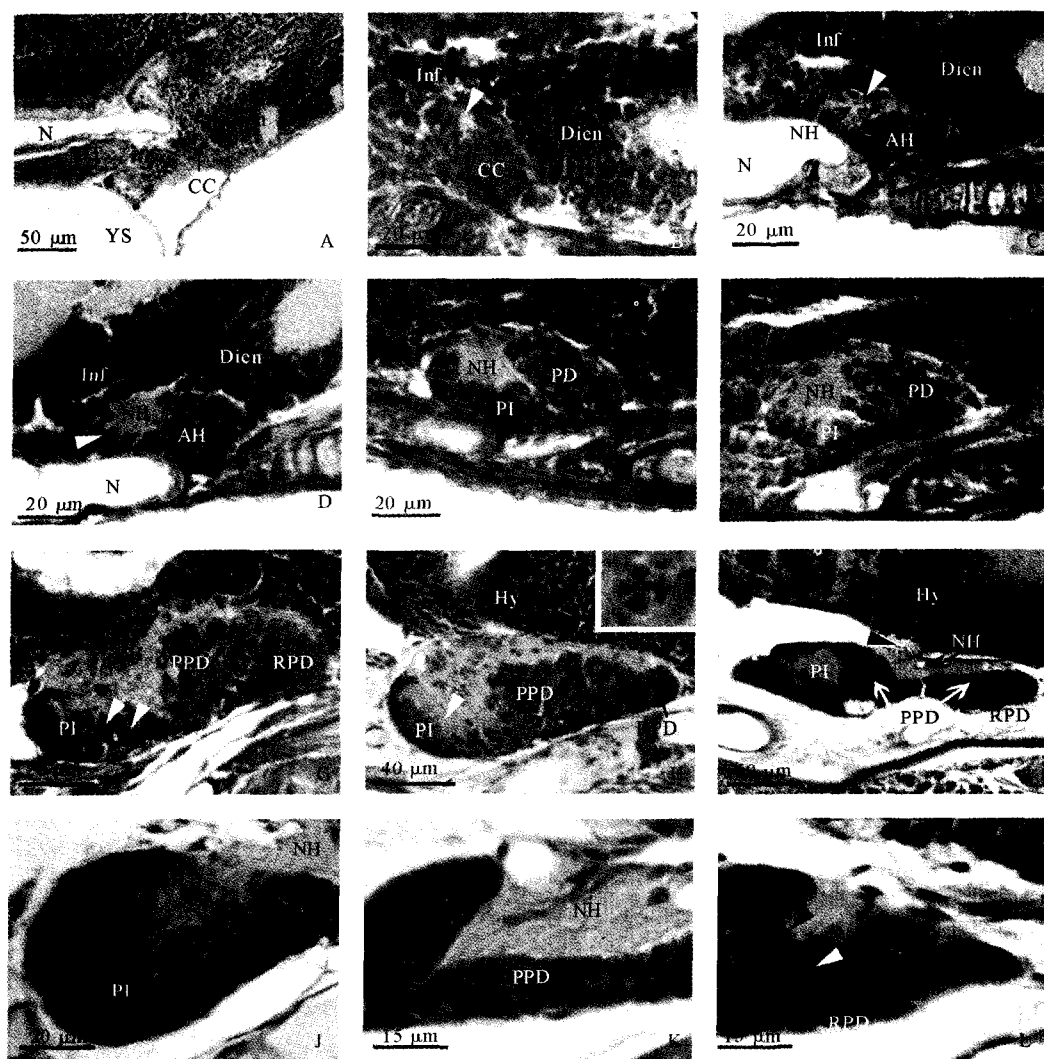
1.2 方法

初孵仔鱼到孵化后14d的仔鱼均直接放入Bouin's液中固定,孵化14d以后的仔、稚和幼鱼取头部于Bouin's液中固定,24h后保存于70%酒精中。常规石蜡包埋,连续切片(厚6~7μm),HE染色。Olympus BH-2显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 脑垂体的形成

初孵仔鱼全长平均2.4mm,端脑、间脑和中脑已分化形成,但未观察到脑垂体相关结构。孵化后1d仔鱼全长平均2.6mm,可见间脑下方有一实心细胞团,与原始口腔顶壁外胚层上皮细胞相连,但与间脑神经细胞分界明显,这些细胞呈圆形或椭圆形,排列紧密,细胞核嗜碱性弱于间脑神经细胞(图版I-A)。孵化后2d(平



A: 孵化 1 d 仔鱼纵切; B: 孵化 2 d 仔鱼纵切, 箭头示漏斗体神经内分泌细胞的神经纤维; C: 孵化 3 d 仔鱼纵切, 箭头示神经垂体背部由漏斗体分离出来的细胞; D: 孵化 6 d 仔鱼纵切, 箭头示腺垂体腹后部细胞; E: 孵化 8 d 仔鱼纵切; F: 孵化 10 d 仔鱼纵切; G: 孵化 14 d 仔鱼纵切; H: 孵化 20 d 仔鱼纵切, 箭头示 PI 的神经部, 插图示 I 型和 II 型神经垂体细胞; I: 孵化 42 d 仔鱼纵切, 箭头示垂体柄; J: 孵化 35 d 仔鱼纵切, 示 PI 嗜碱性细胞; K: 孵化 35 d 仔鱼纵切, 示 PPD 嗜酸性细胞; L: 孵化 42 d 仔鱼纵切, 黑箭头示 RPD 嗜碱性细胞, 白箭头示 RPD 嗜酸性细胞

AH—腺垂体; CC—细胞团; Dien—间脑; DT—消化道; Hy—下丘脑; Inf—漏斗体; N—脊索; NH—神经垂体; PD—外侧部; PI—中间部; PPD—中外侧部; RPD—前外侧部; YS—卵黄囊

A: Longitudinal section of 1 day post hatching (DPH) fry; B: Longitudinal section of 2 DPH fry, arrow showing nerve fibers of neuroendocrine cells in the infundibulum; C: Longitudinal section of 3 DPH fry, arrow showing cells in the dorsal neurohypophysis separated from the infundibulum; D: Longitudinal section of 6 DPH fry, arrow showing cells in the ventral-posterior adenohypophysis; E: Longitudinal section of 8 DPH fry; F: Longitudinal section of 10 DPH fry; G: Longitudinal section of 14 DPH fry; H: Longitudinal section of 20 DPH fry, arrow showing the neural part of the PI, insert showing the I and II type cells of the neurohypophysis; I: Longitudinal section of 42 DPH fry, arrow showing the pituitary stalk; J: Longitudinal section of 35 DPH fry showing the basophilic cells in the PI; K: Longitudinal section of 35 DPH fry showing the acidophilic cells in the PPD; L: Longitudinal section of 42 DPH fry, black arrow showing the basophilic cells in the RPD, white arrow showing the acidophilic cells in RPD

AH—Adenohypophysis; CC—Cell cluster; Dien—Diencephalon; DT—Digestive tract; Hy—Hypothalamus; Inf—infundibulum; N—Notochord; NH—Neurohypophysis; PD—Pars distalis; PI—Intermedia; PPD—Proximal pars distalis; RPD—Rostral pars distalis; YS—Yolk sac

图版 1 孵化后的仔、稚、幼鱼头部切片

Plate 1 Longitudinal section of fry post hatching

均全长 2.8 mm),该细胞团迁至间脑腹后方的漏斗体下,并有少量来自漏斗体神经内分泌细胞的神经纤维伸入该细胞团后背部(图版 I-B)。至孵化后 3 d(平均全长 3.1 mm),可见更多的漏斗体神经内分泌细胞及其神经纤维与上述细胞团结合,脑垂体基本形成,并可区分出神经垂体和腺垂体(图版 I-C)。神经垂体位于脑垂体后背部,由漏斗体分离出来的神经内分泌细胞及其神经纤维构成;腺垂体主要由实心细胞团细胞分化而成,无明显分区,细胞排列紧密,细胞间无神经纤维。

2.2 脑垂体的分化

孵化后 6 d 的仔鱼平均全长 3.9 mm,神经垂体所占比例增大,腺垂体细胞大部分集中于脑垂体前部,其后腹部仅有单层腺垂体细胞分布(图版 I-D)。孵化后 8 d 仔鱼平均全长 4.4 mm,神经纤维向前下方伸入腺垂体,将其分为外侧部(Pars distalis,PD)和中间部(Pars intermedia,PI),中间部细胞增至两层(图版 I-E)。

孵化后 10 d(平均全长 5.2 mm),神经纤维向前伸向腺垂体前部背上方,向后伸入腺垂体后部细胞间(图版 I-F)。孵化后 14 d 仔鱼平均全长 7.1 mm,卵圆形脑垂体的长径明显加长,腺垂体可区分出前外侧部(Rostral pars distalis,RPD)、中外侧部(Proximal pars distalis,PPD)和中间部(Pars intermedia,PI)3 部分(图版 I-G)。RPD 位于脑垂体前部,纵切面上呈三角形,RPD 细胞排列紧密;PPD 位于脑垂体中部,与 RPD 分界明显,PPD 细胞排列稍疏松,多呈强嗜酸性;PI 位于脑垂体后腹部,与 PPD 被神经纤维分开,细胞间神经纤维丰富,部分细胞嗜碱性强。

2.3 变态期和变态完成期脑垂体的发育

孵化后 20 d 仔鱼平均全长 10.1 mm,右眼开始上升,进入变态阶段。随腺垂体外侧部上方神经纤维和神经垂体细胞的增加,神经垂体呈带状分布于腺垂体背部,仍紧贴于下丘脑腹部,此时垂体细胞可分辨出两种类型:Ⅰ型细胞核呈圆形,核仁明显,即颗粒状脑垂体细胞;Ⅱ型细胞核呈纺锤形,核物质高度浓缩,为纤维状脑垂体细胞。腺垂体 PI 出现明显神经部(图版 I-H)。

稚鱼变态期间(孵化后 27、31 d,平均全长 13.8、15.6 mm)及变态完成后的幼鱼(孵化后 35、42 d,平均全长 20.4、28.2 mm)中,脑垂体长径进一步加长,变为长条形,各部分结构从“前后型”排列开始向“背腹型”排列转变。神经垂体位于脑垂体背侧中部,随发育与下丘脑逐渐分离,在幼鱼中仅通过垂体柄与下丘脑相连,并开始向腺垂体中内陷(图版 I-I)。PI 位于脑垂体后腹部,约占腺垂体的 2/5,细胞多嗜碱性(图版 I-J);PPD 逐渐伸长,由脑垂体中部向后延伸至 PI 背部,约占腺垂体的 2/5,以嗜酸性细胞为主(图版 I-K);RPD 位于脑垂体前腹部,约占腺垂体的 1/5,与神经垂体交界的少量细胞呈嗜碱性,而其下方细胞则呈嗜酸性(图版 I-L)。

3 讨论

3.1 牙鲈脑垂体的起源

初孵牙鲈仔鱼中未观察到脑垂体相关结构,孵化后 1 d 仔鱼可见间脑下方有一实心细胞团,后来迁移至间脑后方并与漏斗体结合,共同形成脑垂体。关于该实心细胞团的来源,在草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* 和南方鲶 *Silurus meridionalis* 脑垂体的发生中,是由原始口腔顶壁外胚层细胞增生并内迁形成的,从细胞增生到迁移至间脑底部二者分别用了 13 h 和 15 h(鲁双庆等 1996;谢碧文等 2004)。本研究中,在初孵仔鱼中尚未观察到原始口腔顶壁外胚层细胞增生内凹的现象,孵化后 1 d 即可观察到细胞团位于间脑底部,推测是牙鲈仔鱼孵化后 1 d 内即完成了外胚层细胞增生并内迁到间脑下方的过程。

由漏斗体分化出来的细胞在脑垂体发育早期形成神经垂体,至孵化后 10 d 神经垂体的分泌纤维向后伸入腺垂体后部细胞间,开始参与腺垂体 PI 神经部的形成,这与草鱼、南方鲶和鲶 *Silurus asotus* 漏斗体细胞的分化命运是相似的(鲁双庆等 1996;谢碧文等 2004;方展强等 2004)。实心细胞团细胞则分化形成了腺垂体的 RPD、PPD 和部分 PI。该过程与草鱼、南方鲶、鲶和斑马鱼 *Danio rerio* 等鱼类脑垂体的双起源发生相似(鲁双庆等 1996;谢碧文等 2004;方展强等 2004;Chapman *et al.* 2005)。

3.2 牙鲆脑垂体的结构分化

脑垂体的实心细胞团与漏斗体结合后于孵化3 d分化出神经垂体和腺垂体。孵化后8 d腺垂体分为PD和PI两部分。孵化后14 d腺垂体RPD、PPD和PI3部分分化形成,三者由前向后排列,为“前后型”脑垂体。稚鱼变态期间及变态完成后的幼鱼(孵化后42 d)中,脑垂体为长条形,PPD由脑垂体中部向后延伸至PI背部,神经垂体开始向腺垂体中内陷,各部分结构从“前后型”排列开始向“背腹型”排列转变,符合楼允东(2000)关于硬骨鱼类成鱼期背腹型脑垂体的在仔、稚鱼期常表现为前后型的推测。牙鲆脑垂体各部分的分化过程和形态与大西洋庸鲽 *Hippoglossus hippoglossus* 基本相似,但由于后者个体发育速度较牙鲆慢,故脑垂体发育的各阶段相对滞后(Einarsdóttir *et al.* 2006)。

3.3 激素分泌细胞的分化

孵化后前10 d的牙鲆仔鱼中,腺垂体3部分尚未形成,通过HE染色未能观察到腺细胞的分化。孵化后14 d的牙鲆仔鱼中,随着腺垂体分区形成,各部分细胞的染色性质发生了变化,PPD细胞多呈强嗜酸性,且至变态完成后一直是PPD的主要细胞。根据牙鲆成鱼GH细胞嗜酸性,且在PPD广泛分布的特点(宋海霞等2007),推测该类细胞即牙鲆腺垂体的GH细胞。大西洋庸鲽GH细胞是腺垂体最早出现的激素分泌细胞之一,当PD分化形成时位于其中腹部区域,发育至变态期时已遍布PPD(Einarsdóttir *et al.* 2006)。日本海马 *Hippocampus japonicus* 的GH细胞在5日龄左右即成为腺垂体PPD的主要细胞(张峰1994)。南方鲈6日龄首先分化产生GH细胞,21日龄几乎占据了腺垂体PPD的全部(谢碧文等2004)。可见牙鲆与其他鱼类相似,脑垂体的GH细胞分化较早并几乎全部占据PPD,这可能与其在仔、稚鱼期旺盛的生长发育密切相关。

孵化后14 d的牙鲆仔鱼中,伴随GH细胞的分化,PI靠近神经纤维的细胞呈强嗜碱性,发育至孵化后42 d,PI细胞多嗜碱性。牙鲆成鱼PI的MSH细胞呈弱嗜碱性(宋海霞等2007),据此推测脑垂体发育过程中PI的细胞主要为MSH细胞。孵化后42 d的牙鲆幼鱼RPD中,与神经垂体交界的少量细胞呈嗜碱性,而其下方细胞则呈嗜酸性,根据成鱼RPD激素分泌细胞的形态特征(宋海霞等2007),推测该两类细胞分别为ACTH细胞和PRL细胞,其位置特征也与Tanaka等(1995)和Estevez等(2001)通过组化和免疫组化方法在牙鲆仔、稚鱼中观察到的这两类细胞的分布是一致的。然而,对于牙鲆脑垂体激素分泌细胞分化的确切时间和顺序,尚需通过进一步的免疫组化分析来确定。

参 考 文 献

- 方展强,唐以杰. 2004. 鲑脑垂体发生形态学的光镜和激光扫描共聚焦显微观察. 华南师范大学学报(自然科学版), 3: 96~103
- 宋海霞,温海深,翁幼竹. 2007. 养殖牙鲆脑垂体的显微和超微结构观察. 台湾海峡, 26(3): 387~394
- 张峰. 1994. 日本海马仔鱼期脑垂体发育的组织学研究. 大连水产学院学报, 9(1~2): 41~46
- 林浩然. 1999. 激素和人工诱导鱼类繁殖. 生物学通报, 34(8): 1~3
- 鲁双庆,刘筠,陈淑群. 1996. 草鱼脑垂体的起源和发生的研究. 湖南农业大学学报, 22(2): 182~186
- 谢碧文,岳兴建. 2004. 南方鲈脑垂体发育的研究. 水生生物学报, 28(6): 599~606
- 谢碧文,王志坚,张耀光. 2008. 鱼类垂体发育研究进展. 水生生物学报, 32(1): 102~108
- 楼允东. 2000. 组织胚胎学. 北京: 中国农业出版社, 138~147
- Chapman, S. C., Sawitzke, A. L., Campbell, D. S., and Schoenwolf, G. C. 2005. A three-dimensional atlas of pituitary gland development in the zebrafish. J. Comp. Neurol. 487: 428~440
- Einarsdóttir, I. E., Silva, N., Power, D. M., Sm rad ttir, H., and Björnsson, B. T. 2006. Thyroid and pituitary gland development from hatching through metamorphosis of a teleost flatfish, the Atlantic halibut. Anat. Embryol. 211: 47~60
- Estevez, A., Kaneko, T., Seikai, T., Doris, R. M., Tagawa, M., and Tanaka, M. 2001. Ontogeny of ACTH and MSH cells in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in relation to albinism. Aquaculture, 202: 131~143
- Tanaka, M., Tanangonan, J. B., Tagawa, M., de Jesus, E. G., Nishida, H., Isaka, M., Kimura, R., and Hirano, T. 1995. Development of the pituitary, thyroid and interregional glands and applications of endocrinology to the improved rearing of marine fish larvae. Aquaculture, 135: 111~126
- Woodman, A. S. 1939. The pituitary gland of the Atlantic salmon. J. Morphol. 65: 411~435