

中华蜜蜂工蜂视叶胚后发育过程中的细胞凋亡^{*}

李兆英^{1,2**}

(1. 陕西教育学院 生命科学系 西安 710061; 2. 陕西师范大学 生命科学学院 西安 710062)

Programmed cell death of developing optic lobes in the honey bee, *Apis cerana cerana*. LI Zhao-Ying^{1,2**}

(1. Biology Department, Shaanxi Institute of Education, Xi'an 710061, China; 2. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract Programmed cell death (PCD) during the postembryonic development of the optic lobes of *Apis cerana cerana* was investigated by comparative anatomical research and TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The results show that PCD begins within the brain after the end of the final larval instar after which the number of apoptotic nuclei increases. Apoptosis of cells in the optic lobes peaked in three developmental stages; 2 instar larvae, 5 instar larvae and day 2 of pupal development. There was more apoptosis in the medulla than in the lobula and lamina. Nerve projection pulses trigger cell proliferation and apoptosis during optic lobe development.

Key words *Apis cerana cerana*, optic lobes, postembryonic development, programmed cell death

摘 要 本研究通过形态解剖和原位末端标记法(TUNEL),对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 视叶胚后发育过程中的细胞凋亡进行了研究,结果表明:视叶内的细胞程序性死亡开始出现在1龄幼虫末期,随后凋亡细胞数量逐渐增加;在视叶的胚后发育过程中,细胞凋亡经历了3个高峰期,即2龄幼虫、5龄幼虫和蛹发育的第2天;在视叶3个部分的发育中,视髓层中细胞凋亡的数量远远多于视小叶和视神经节层,而视神经节层最少,说明了细胞凋亡的数量和位置与各部分结构发育的时间以及神经投射有关。广泛的细胞凋亡是蜜蜂视叶发育过程中的一个显著特征。

关键词 中华蜜蜂, 视叶, 胚后发育, 细胞程序性死亡

昆虫的视叶(optic lobes, OL)是昆虫视觉的神经中心,由三个连续的神经纤维网组成,即视神经节层(lamina, La),视髓层(medulla, Me)和视小叶(lobula, Lo)。蜜蜂的视叶起源于幼虫早期脑内部的两个视原基^[1,2]。细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)在昆虫视叶的发育过程中非常普遍。Monsma 和 Booker^[3]研究了烟草天蛾 *Manduca sexta* 视网膜和视神经节层之间的关系,描述了在视髓层和视神经节层发育过程中,视神经前体细胞的增殖和凋亡的模式,研究显示,在烟草天蛾幼虫发育过程中,大约有一半发育中的视神经节层细胞退化。Fischbach 和 Technau^[4], Wolff 和 Ready^[5]分别对果蝇 *Drosophila melanogaster* 视网膜以及视叶发育过程中的细胞凋亡进行了研

究。

本研究通过形态解剖和原位末端标记法(TUNEL),对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 视叶胚后发育过程中细胞凋亡的特点进行了比较研究,为神经生物学、发育生物学等的研究提供一定的参考,也为更有效的保护和利用中华蜜蜂这一宝贵资源提供重要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用的中华蜜蜂均购自西安大峪中华

* 资助项目:陕西省科技厅经济发展项目(2008k02-11)。

**E-mail: apis2002@yahoo.com.cn

收稿日期:2009-11-14,修回日期:2010-01-23

蜜蜂养殖基地。

1.2 研究方法

1.2.1 组织化学 中华蜜蜂工蜂的幼虫、前蛹、蛹在昆虫生理盐水 (130 mmol/L NaCl, 6 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 7 mmol/L CaCl₂, 160 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L HEPES 缓冲液, pH 6.7) 中将头部同身体分离, 多聚甲醛 4℃ 固定过夜。5 d 及更老的蛹, 在盐溶液中, 切开头壳。4% 多聚甲醛 4℃ 固定 8 h。梯度酒精脱水, 二甲苯透明。石蜡包埋, 正面横向连续切片, 切片厚度 5~7 μm, 切片裱于涂有多聚赖氨酸的载玻片上, 烘干备用。切片脱蜡后复水, H. E 染色, OLYMPUS (BX51) 显微镜观察拍照。

1.2.2 TUNEL 原位细胞凋亡检测 切片常规脱蜡至水; 复合消化液 (蛋白酶 K-胃蛋白酶) 37℃ 孵育 20 min, PBS 洗 2 次; 滴加新鲜配置的 TUNEL 反应混合溶液, 湿盒中 37℃ 孵育 60 min, PBS 洗 3 次; 滴加转化剂-POD, 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次 (TUNEL 检测试剂盒为 Roche 公司产品); DAB 显色 (北京中山生物技术公司) 后镜检, 中性树胶封片, Nikon 数码显微成像系统 (DS-5M) 拍照。阴性对照以不含末端脱氧核糖核酸转移酶的核苷酸混合液代替 TUNEL 反应混合溶液。

1.2.3 细胞计数 为了评价视叶发育过程中细胞的凋亡情况, 对切片上 TUNEL 标记的凋亡细胞的数量进行计数 (7 μm 切片)。细胞计数基于连续的石蜡切片。切片上标记的细胞核的数量同细胞的数量是成比例的, 比例系数依赖于切片的厚度, 细胞的大小、形状以及核的方位。校正公式为 $C = t/(t + d)$, C 是校正数, t 为切片厚度, d 是细胞的直径^[6]。每一时间点计数 2~4 只动物的 1~5 个视叶, 计算其平均数, 误差值为标准误差 (Mean ± SE)。

2 结果与分析

2.1 中华蜜蜂工蜂视叶的形态结构

昆虫脑部的视叶由 3 部分构成: 视小叶、视髓层及视神经节层。视小叶和视髓层之间有内

神经交叉 (inner chiasm, ic); 视髓层和视神经节层之间有外神经交叉 (outer chiasm, oc)。由复眼发出的视神经纤维投射进入神经节层 (图 1)。

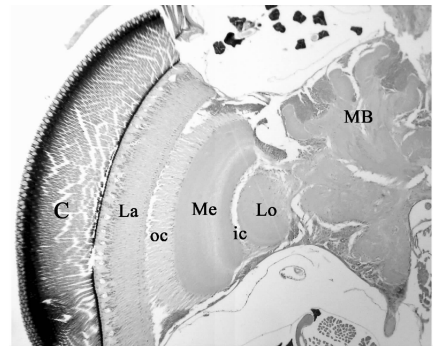


图 1 中华蜜蜂工蜂视叶形态的显微结构

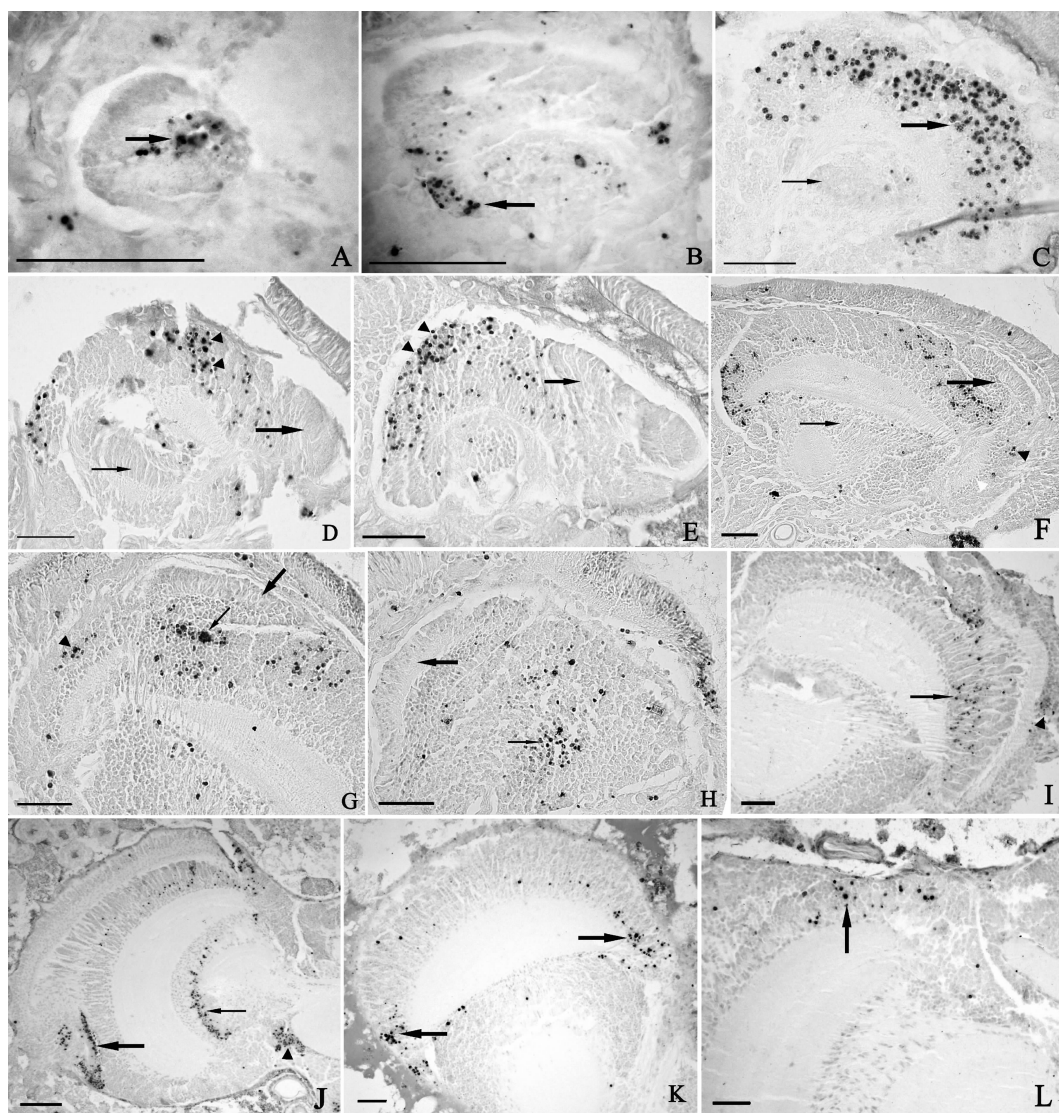
注: La: 视神经节层; Me: 视髓层; Lo: 视小叶; MB: 蕈形体; C: 复眼; ic: 内神经交叉; oc: 外神经交叉。

2.2 工蜂视叶发育过程中的程序性细胞凋亡

在中华蜜蜂视觉系统的发育过程中, 广泛的细胞凋亡是最显著的特征。在 1 龄幼虫 (L1) 发育末期, 凋亡细胞就已经出现在内部视原基 (inner optic anlage, IOA) (图版 I : A) 和外部视原基 (outer optic anlage, OOA) 的增殖细胞带内 (图版 I : B)。在 2 龄幼虫 (L2), 凋亡细胞的数量增加, 外部增殖带内凋亡细胞的数量多于内部增殖细胞带。凋亡细胞较小, 胞质浓缩, 着色暗黑, 直径约 1.7 μm, 没有发现细胞碎片。每一个视叶的凋亡细胞数为 (140 ± 13) 个 (图版 I : C, 图 2)。从 3 龄幼虫 (L3), 凋亡细胞数量逐渐增加, 一直持续到 5 龄幼虫 (L5), 它们主要集中在外部增殖细胞带内 (图版 I : D, E, 图 2)。IOA 形成的神经细胞丛中, 凋亡的细胞数量较少, 并且持续时间较短, 大约到蛹发育前期 (P3) 就已经结束了 (图 2)。

在 5 龄幼虫, 由 OOA 和 IOA 形成的细胞群中的凋亡细胞的数量都达到了一个较高的水平 (图版 I : F, 图 2)。随后 (前蛹期), 凋亡细胞的数量逐渐减少 (图版 I : G~I)。到蛹发育的第 5 天, 只在增殖细胞带两端的区域内能看到极少数凋亡细胞的痕迹 (图版 I : L)。在整个幼虫发育阶段, 凋亡的细胞形态都较为完整, 很

图版 I



A. 工蜂 L1 的 IOA, 箭头指示为 IOA 内的凋亡细胞 B. 工蜂 L1 的 OOA, 箭头指示为 OOA 内的凋亡细胞 C. 工蜂 L2 的视叶, 大箭头指示为 OOA 内的凋亡细胞, 小箭头指示为 IOA D. 工蜂 L3 的视叶, 大箭头指示为 OOA, 小箭头指示为 IOA, 三角指示为外部增殖细胞带内的凋亡细胞 E. 工蜂 L4 的视叶, 大箭头指示为 OOA, 三角指示为外部增殖细胞带内的凋亡细胞 F. 工蜂 L5 的视叶, 大箭头指示为 OOA, 小箭头指示为 IOA, 黑色三角指示为神经节层增殖细胞带内的凋亡细胞, 白色三角指示为神经节层神经纤维网 G. 工蜂 PP 早期的视叶, 大箭头指示为 OOA, 小箭头指示为外部增殖细胞带内的凋亡细胞, 三角指示为神经节层增殖细胞带内的凋亡细胞 H. 工蜂 PP 中期的视叶, 大箭头指示为 OOA, 小箭头指示为外部增殖细胞带内的凋亡细胞 I. 工蜂 PP 末期的视叶, 箭头指示为外部增殖细胞带内的凋亡细胞, 三角指示为神经节层增殖细胞带内的凋亡细胞 J. 工蜂 P1 的视叶, 大箭头指示为外部增殖细胞带内的凋亡细胞, 小箭头指示为内部增殖细胞带内的凋亡细胞, 三角指示为侧前脑与视小叶连接处下部的凋亡细胞 K. 工蜂 P3 的视叶, 箭头指示为外部增殖细胞带内的凋亡细胞 L. 工蜂 P5 的视叶, 箭头指示为外部增殖细胞带内的凋亡细胞; 标尺 = 100 μm 。

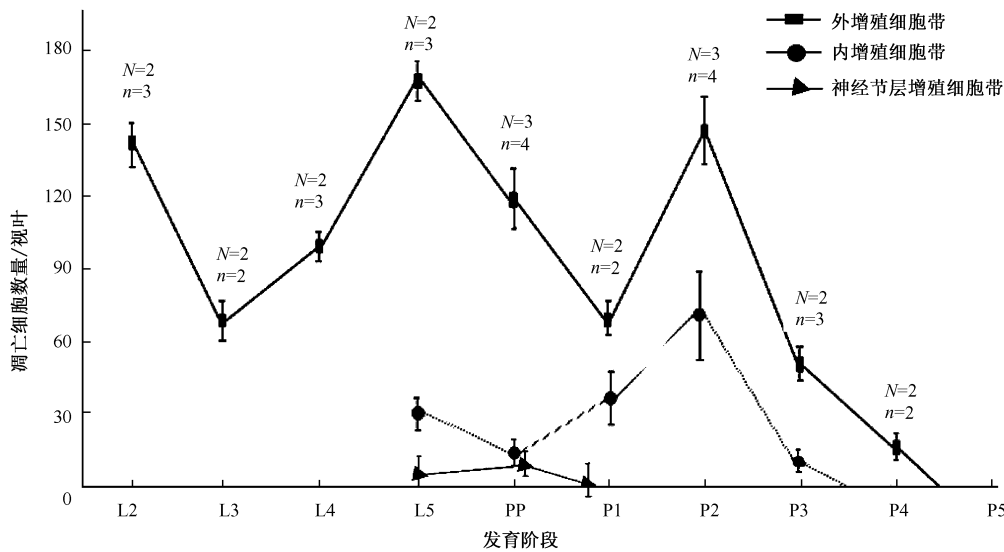


图2 工蜂视叶发育过程中内、外增殖细胞带内凋亡细胞数量变化

N 和 n 分别表示动物数量和细胞群数量; L2 ~ L5 分别表示 2 ~ 5 龄幼虫; PP 表示前蛹; P1 ~ P3 表示蛹发育各阶段。(图版 I 同)

少看到细胞碎片。直到幼虫发育末期,当“C”型增殖带两端的细胞凋亡高发区出现时,在其中才能观察到破碎的细胞残骸(图版 I :F)。在细胞凋亡的最后一个高峰期出现前后(P1 - P2),大量的细胞碎片出现在细胞群中,几乎有一半的细胞形态不完整,显示了典型的细胞凋亡形态(图版 I :J,K)。

OOA 外侧下部的极少数细胞构成视神经节层的形成中心。在其发育过程中,细胞凋亡在整个幼虫期都不明显,直到幼虫发育末期(L5),凋亡的细胞才开始出现(图版 I :F),到前蛹发育早期,凋亡细胞数量有所增加(图版 I :G),随后逐渐减少,到前蛹发育末期,只能看到少量破碎的细胞痕迹(图版 I :I)。

3 结论和讨论

程序性的细胞凋亡在蜜蜂视觉系统的发育过程中扮演了重要的角色。在整个胚后发育过程中,视叶内的细胞凋亡经历了3个高峰期,即 L2、L5 到前蛹以及 P2,凋亡的细胞数量平均达到(153 ± 18)个。细胞凋亡一直同细胞的增殖相伴随,细胞凋亡的高发区集中在“C”型增殖

带的两端,而这一区域也恰恰是细胞增殖最活跃的部分。在野生型果蝇视叶发育的过程中,凋亡细胞也出现在内部和外部视原基附近^[4,5,7]。而在烟草天蛾幼虫发育过程中,大约有一半发育中的视神经节层细胞退化^[3]。

通过 BrdU 和 TUNEL 技术所显示的凋亡细胞的位置和特点上看,细胞的增殖和凋亡在 OOA 和 IOA 内的成神经细胞区并不频繁,而在神经节母细胞所在的区域却以很高的频率出现,并且每个凋亡高峰期总是紧接在增殖高峰期之后出现,证明了视叶的发生过程中,神经细胞最初生产过剩,在随后的发育和分化过程中,依赖程序性的细胞凋亡选择性的消除过剩的细胞^[3]。在视叶 3 个部分的发育过程中,视髓层形成过程中细胞凋亡的数量远远多于视小叶和视神经节层,而视神经节层最少。视髓层在视叶 3 个部分的发育过程中,起着承上启下的作用,它的较早以及快速的发育形成了大量无明确连接关系的视神经细胞,这些细胞最终会以程序性的细胞凋亡的方式被清除。而它向内部视小叶伸出的神经为视小叶神经的发育提供了引导,这也是视小叶发育过程中细胞凋亡发生

较少的原因。而视神经节层作为视叶中最后一个发育的部分,其神经发生同来自于视网膜的轴突投射直接相关。中华蜜蜂视觉细胞发出的视神经进入前脑大约是在蛹发育的第5天以后,每一个新形成的小眼光感受器细胞群发出的轴突到达神经节层,触发那里的前体细胞群细胞的分裂并开始分化,而此处凋亡细胞的出现也大约在幼虫发育末期。在果蝇的盲眼突变体中,视神经节层完全缺失,其它视神经中枢的体积减小。每一个新形成的小眼光感受器细胞群发出的轴突到达神经节层,触发了那里的前体细胞群细胞的最终分裂并开始分化。缺乏视网膜神经分布的动物,神经节层前体细胞群不能进行最终的细胞分裂,它们停留在有丝分裂的G1期直到死亡,同视网膜轴突的直接接触触发了神经节层前体细胞群从有丝分裂的G1期到S期的转换^[8]。这与嗅叶的发育非常相似^[9]。这些都证明了细胞凋亡的数量和位置与各部分结构的发育时间以及神经投射有关,即投射关系越明确,其形成的突触联系越准确,发生凋亡的细胞数量就会越少。

参 考 文 献

1 Meinertzhagen I. A. Development of the compound eye and

optic lobes of insects. In: Young D. (ed.). *Developmental Neurobiology of Arthropods*. London: Cambridge University Press, 1973. 51 ~ 104.

- 2 Farris S. M., Robinson G. E., Davis R. L., *et al.* Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.*, 1999, **414**:97 ~ 113.
- 3 Monsma S. A., Booker R. The genesis of the adult retina and outer optic lobers of the moth, *Manduca sexta*. 11. Effects of deafferentation and developmental hormone manipulation. *J. Comp. Neurol.*, 1996, **367**:21 ~ 35.
- 4 Fischbach K. F., Technau G. Cell degeneration in the developing optic lobes of the sine oculis and small-opticlobes mutants of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 1984, **104**: 219 ~ 239.
- 5 Wolff T., Ready D. F. Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development*, 1991, **113**:825 ~ 839.
- 6 Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome seccions. *Anat. Rec.*, 1946, **94**:239 ~ 247.
- 7 Anderson H. Postembryonic development of the visual system of the locust, *Schistocerca gregaria*: patterns of growth and developmental interactions in the retina and optic lobe. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1978, **45**:55 ~ 83.
- 8 Wolff T., Martin K. A., Rubin G. M., *et al.* The development of the *Drosophila* visual system. New York: Oxford University Press, 1997. 474 ~ 508.
- 9 李兆英,奚耕思. 中华蜜蜂工蜂嗅叶的胚后发育. 动物学报, 2008, **54**(3): 546 ~ 554.