

中华鳖脑垂体的显微与超微结构观察

陈晓武^{1,2}, 刘仪¹, 毕燕会², 包慧君¹, 陈秋生^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了探讨中华鳖脑垂体的组织结构及其季节性变化, 采用 H. E 染色、三色染色和免疫组织化学染色法在光镜下观察中华鳖脑垂体的显微结构, 结合电镜对鳖脑垂体进行超微显微观察。结果发现中华鳖脑垂体同样分为神经垂体和腺垂体, 但是缺乏中间部。腺垂体包括结节部和远侧部, 远侧部可分头叶和尾叶两部分, 头叶大于尾叶, 神经部很小。腺垂体中的细胞可分为嗜酸性细胞、嗜碱性细胞和嫌色细胞, 各类细胞的分布和形态有明显区别。免疫组化染色证明促肾上腺皮质激素 (ACTH) 细胞密集分布于结节部, 在远侧部也有零星分布; 促性腺激素 (GTH) 细胞和生长激素 (GH) 细胞数量在繁殖季节明显多于冬季。电镜下根据细胞大小、细胞核的形状和胞质中分泌颗粒特征可将腺垂体中的细胞分为 GH 细胞、ACTH 细胞、GTH 细胞、催乳激素 (LTH) 细胞、促甲状腺激素 (TSH) 细胞和嫌色细胞。在这些细胞间有明显的细胞连接。细胞形态和数量在繁殖季节和冬季有明显变化。

关键词: 中华鳖; 垂体; 显微结构; 超微结构; 免疫组织化学

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

中华鳖属于爬行纲 (Reptilia)、龟鳖目 (Testudinata)、鳖科 (Trionychidae)、鳖属 (*Trionyx*)。俗名鳖、甲鱼、元鱼、王八、团鱼、脚鱼、水鱼^[1]。中华鳖由于背腹甲外层缺乏角质盾片, 而盖以柔软的上皮, 通常被称为软壳龟 (soft-shelled turtle), 中华鳖在我国最为常见, 几乎遍布全国。它既可入药, 也可以作为营养品, 在我国也有较大的人工养殖规模。

脑垂体位于蝶鞍窝 (sella turcica) 内, 通过一个小柄和下丘脑联系, 是脊椎动物内分泌系统的核心, 能分泌多种激素调节机体活动^[2]。中华鳖是变温动物, 人工养殖最佳的生长温度是 30 °C, 秋季到 20 °C 左右时, 食欲明显下降, 15 °C 时停食, 12 °C 左右钻入泥沙开始冬眠^[3]。环境改变对中华鳖的各种组织器官都产生显著影响, 而神经内分泌系统在中华鳖的生活中起主要的调节作用。目前, 关于其内分泌生理学的资料很少有报道, 人们对脑垂体的形态和组织结构了解较少。

随着光镜及电镜和现代免疫学技术结合, 对脑垂体研究方法更加成熟, 本研究即从此着手, 对中华鳖脑垂体进行形态学观察与比较, 旨在为中华鳖的内分泌生理学与人工养殖提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

实验用中华鳖购自南京下关水产品市场。挑选体色健康, 活力强, 无皮肤病的鳖, 体重均在 500 g 左右, 购回后于实验室内暂养于大的水盆中, 水深度约 5 cm, 水温同环境温度。2002 年 9 月和 2003 年 1 月分别进行取材和实验, 每次取材共使用 10 只, 5 雄 5 雌。ACTH 和 GH 抗体 (工作浓度为 5%)、SP 系列检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, DAB 显色剂 (工作浓度为 0.05%) 购自武汉博士德生物技术公司。

1.2 实验方法

实验样品的采集和保存 取材均在上午

收稿日期: 2010-03-31 修回日期: 2010-06-01

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30671513, 30871833); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金 (ssc-07003)

通讯作者: 陈秋生, Tel: 025-84395817, E-mail: chenqsh305@yahoo.com.cn

8:00 ~ 11:00 完成。打开中华鳖颅腔,在蝶鞍窝取出脑垂体,固定于不含冰醋酸的波恩氏液,常规石蜡包埋,矢状切片。同时取部分材料于 2.5% 的戊二醛中固定,作为电镜制样。

组织切片的制作 组织块固定于不含冰醋酸的波恩氏液中,24 h 后转入 70% 的酒精保存,然后经 85%、95%、100% 的酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡 2.5 h,石蜡包埋,再做连续切片,厚度为 6 μm ,挑选相邻切片经过 H. E 染色、PAF-AB-PAS-OG 三色染色^[4]和免疫组织化学法分别进行染色。免疫组织化学染色方法参照 SP 检测试剂盒说明书。具体过程如下:切片脱蜡至水后以 3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶 10 min,洗净后在室温下与山羊抗血清孵育 15 min,再进入一抗 37 $^\circ\text{C}$ 中孵育 2 h,又分别在生物素化二抗和辣根酶标记链霉卵白素工作液中 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 15 min,最后以 DAB 显色。全部过程均在 pH 7.3 环境和湿盒中进行。每种抗体反应时均以相邻切片作为阴性对照。阴性对照除一抗以 PBS 替代之外,其余步骤均同实验组。使用 OlympusBH-2 显微镜观察拍照,Motic image 自动分析测量软件分析,使用软件中标尺对细胞大小进行测量。

透射电子显微镜材料制样 脑垂体采用取出后使用 2.5% 的戊二醛固定,1% 锇酸后固定,梯度酒精脱水,丙酮置换,Epon812 包埋,超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,最后使用 JEM-1200EM 型透射电镜观察拍摄。

2 结果

2.1 垂体的显微结构

体重在 500 g 左右的中华鳖垂体短径为 1 ~ 2 mm,雌雄鳖的脑垂体外形上未见明显的区别。刚取出的垂体为半透明状小体,和间脑有一长的小柄联系。

神经垂体 神经垂体包括漏斗和神经部。漏斗细长,中间包围垂体腔,靠近腔面的细胞为室管膜细胞,为单层柱状上皮,在部分细胞游离面可以看到纤毛。室管膜细胞 H. E 染色时着深蓝色,PAS 反应阳性。神经部为漏斗部向下的扩展,形成一些突起,多数突起都插入到腺垂体尾页中。H. E 染色时,神经垂体着色浅,其中主要是神经纤维,仅见少量的垂体细胞,胞核呈红色或棕红色,直径约 10 μm 。胞质中可见少量赫令氏体,呈

鲜红色圆形的小体,最大的直径可达 8 μm ,经过三色染色后神经垂体呈浅蓝色。

腺垂体 包括结节部和远侧部,未见中间部。腺垂体细胞间可见丰富的毛细血管以及管内的红细胞。结节部位于漏斗部的前方,狭长。漏斗部和结节部构成垂体柄。远侧部位于垂体柄的下方。远侧部是腺垂体的主体部分,体积最大,它又可分为远侧部头叶和远侧部尾叶,两者之间有一条沟隙分开。三色染色后可以清晰看到腺细胞多排列成团索状,在头叶周边区域细胞呈现网状的滤泡型,空隙比较大(图版 I-1)。H. E 染色后,细胞核被苏木精染色深、清晰,而中央部分细胞呈现很密集的细胞群,细胞核较垂体外周细胞的核大、着色稍浅(图版 I-2)。结节部细胞呈条索状(图版 I-3)。光镜下,根据对苏木精和伊红的不同的亲和性,垂体中的细胞可以分为 3 种:嗜酸性细胞,嗜碱性细胞和嫌色细胞。

嗜酸性细胞 主要分布在远侧部中央的嗜酸区,结节部也有少量的分布。H. E 染色胞质为红色,三色染色中有许多橘黄色细胞存在,多成团分布。嗜酸细胞包括两类:促生长激素(GH)细胞和催乳激素(LTH)细胞。LTH 细胞质充满比较多的橘黄 G 颗粒,而 GH 细胞中很少有橘黄 G 颗粒,GH 细胞在免疫组化染色中反应非常微弱(图版 I-4),在远侧部和结节部均有分布,着色浅,细胞小而圆。细胞核靠边,仅在 9 月份鳖脑垂体中可以见,在 1 月脑垂体中未见阳性细胞。上述两种细胞均为 PAS 阴性。

嗜碱性细胞 包括促甲状腺激素(TSH)细胞、促性腺激素(GTH)细胞、促肾上腺皮质激素(ACTH)细胞,主要在远侧部头叶的周边区域,结节部也有分布,分布的区域很广数量也多。3 种细胞均呈 PAS 阳性,着品红色。H. E 染色时细胞质呈蓝色、核着色深、多位于细胞中央。GTH 细胞比较大,直径在 20 μm 左右。ACTH 细胞免疫组化染色中免疫反应很强,主要分布于远侧部和结节部,此类细胞较大,胞核靠近中央。在远侧部的 ACTH 细胞零散分布(图版 I-5)。在结节部 ACTH 细胞多聚集在一起,呈条索状分布,常围绕在一些毛细血管周围(图版 I-6)。

嫌色细胞 数量相对较少,主要分布在结节部。H. E 染色后颜色很浅,细胞内部结构难以辨认。三色染色时呈现灰绿色,对比其它细胞显

得非常清晰(图版 I-3)。PAS 弱阳性,细胞核比较大,细胞群体围成多个泡状结构。

2.2 腺垂体的超微结构

电镜下,腺垂体中根据细胞的大小、形状、细胞核的位置以及其胞质内的颗粒的大小与分布特点,可辨认的细胞有 GH 细胞、GTH 细胞、TSH 细胞、LTH 细胞及 ACTH 细胞和嫌色细胞。

GH 细胞 在垂体中数量较少,细胞呈圆形或椭圆形,直径 12 μm ,胞质中含有电子密度高的分泌颗粒,颗粒比较小,直径约 200 nm 左右,大小均匀、稠密(图版 II-1,2)。冬季垂体内 GH 细胞中细胞器不发达。

GTH 细胞 数量很多,体积较大,细胞直径在 20 μm 左右,细胞圆形或卵圆形,核大,核仁明显。胞质中可以看到高尔基体,线粒体和粗面内质网等细胞器,这些细胞器常分布在细胞的一端,胞质分泌颗粒偏向另一端。胞质含有大小两种颗粒。大颗粒的直径在冬季接近 2 μm ,在夏季的细胞中略小些,最大的也有 1 μm 左右;小颗粒直径约 200 nm,小颗粒的电子密度相对大颗粒要高。另外,在胞质中有时可以见到空泡出现。这也是 GTH 细胞的一个特点(图版 II-3,4)。

TSH 细胞 细胞比较大,呈不规则的多角形,胞质中有一些泡状的结构,其内有胶状物质和其他一些结构存在,胞质中颗粒直径在 500 nm 左右,大小不均一,数量不多,多分布在细胞周边,细胞器不发达,可以看到一些线粒体,高尔基体,细胞核椭圆形,核仁明显,一般靠边(图版 II-5,6)。在繁殖期鳖脑垂体中,此类细胞的数量增多。

LTH 细胞 细胞椭圆形或不规则,常靠近毛细血管分布。电子密度高,胞质分泌颗粒在 300 nm 左右,大小不一,卵圆形,还有一些不规则的颗粒(图版 II-7,8)。细胞核小,电子密度低,所以不太明显。

ACTH 细胞 细胞不规则,有分枝状突起插入其他细胞之间或血窦中,胞质线粒体和粗面内质网发达,胞质分泌颗粒在 100 ~ 200 nm 之间,圆形,数量少,多靠细胞周边(图版 II-9,10)。细胞核比较大,电子密度低。

嫌色细胞 此类细胞小,形状不规则,胞质中没有分泌颗粒分布,有时可见粗面内质网,而其

它细胞器比较少。细胞核大且不规则占据了细胞的大部分空间(图版 II-11)。

垂体细胞之间的联系和细胞间的结缔组织在垂体的不同细胞之间常见有桥粒连接(图版 II-12)。这些结构表明腺垂体细胞之间的密切联系,它们是细胞间相互作用的结构基础。另外,在腺垂体细胞之间的结缔组织少,主要是一些纤维成分。

垂体中毛细血管 在脑垂体中分布着大量的毛细血管,均为有孔毛细血管,管壁很薄,可见血管内皮细胞,细胞质很少,内皮细胞的细胞核呈扁平状紧靠管壁,内皮细胞延伸围绕成血管壁,血管腔内还可见的红细胞(图版 II-13)。

3 讨论

3.1 脊椎动物脑垂体的演化和各种细胞的组织学特征

20 世纪初,Erdheim 等^[5]先后利用 H. E 和其他染色技术将垂体前叶内细胞分为嗜酸性细胞、嗜碱性细胞和嗜中性细胞。20 世纪 50 年代以后,电镜和免疫化学技术的发展促进人们对脑垂体组织结构的认识。按照国际解剖学会命名标准,人脑垂体由腺垂体和神经垂体两大部分组成。腺垂体又可分为远侧部、中间部和结节部,其中远侧部和结节部合称为前叶。神经垂体包括漏斗(由正中隆起和漏斗柄组成)和神经部。中间部和神经部紧密联系形成后叶。有的动物在远侧部和中间部之间还有垂体裂^[6]。一般认为脑垂体仅在脊椎动物中发现,无脊椎动物没有相应器官,所以脑垂体的比较研究对了解脊椎动物的进化史有重要的价值^[7]。20 世纪 90 年代以后,随着分子生物学的发展,对脑垂体中表达各种激素的基因进行分子系统分析,促进了对该器官进化的认识。脑垂体内分泌细胞中激素的分类,现在也比较明确地可分为 4 类,每一类在分子结构上都相关并且可能是有同一祖先通过基因复制和分化而来。第一类是来自神经垂体的催产素和加压素,属于肽类激素。第二类包括促肾上腺激素和黑色素细胞刺激素。第三类包括生长激素和催乳激素,还包括人的胎盘型催乳素。第四类包括黄体生成素和卵泡生成素,两者都属于糖蛋白家族。脑垂体垂体激素提供了有趣的进化问题,是分子进化有意义的模型^[8]。近年来,人们在果蝇体内

发现了与脊椎动物所特有的脑垂体类似内分泌器官,拓展了人类对脑垂体进化的认识^[9-10]。

因此,开展脊索动物脑垂体的比较与进化生物学研究有重要的理论意义。已经有大量相关研究在各类动物中完成,它们涵盖了哺乳动物^[11]、鸟类^[12-13]、两栖类^[14]、龟类^[15]、鱼类^[16-17]、文昌鱼^[18-20]等生物。鱼类脑垂体相对原始,鱼类神经垂体多与中间部混杂在一起,肺鱼和两栖动物神经叶初步分化,这与神经垂体分泌的加压素、催产素对陆生动物的生活相适应。

爬行动物不同种类的脑垂体结构变化很大,特别是神经叶和结节部两个部分。喙头类和龟鳖类神经叶很小,而在鳄类,有鳞类和蛇类的神经垂体相对大一些。从垂体上就可以看出这些动物在演化上的关系。本实验观察到中华鳖垂体的神经叶很小,仅为漏斗向腺垂体远侧部中伸出一些突起,边缘不整齐。这与其相对较低的进化地位相适应。早在 20 世纪 70 年代,一些爬行动物的脑垂体形态和细胞生理学就已经有较多研究^[21-22]。相关研究表明脑垂体中的结节部是变化最大的部分,在有的有鳞类爬行动物如蜥蜴体内非常小,而在蛇体内则完全缺失。在龟体内,结节部分布在下丘脑的腹面和侧面组成一个连续的组织,垂体门脉系统从中穿过^[23]。中华鳖的结节部比较发达,和龟类更接近。

Pearson 等^[24]在几种龟的体内发现,催乳素细胞主要分布在远侧部的前面和腹面;生长激素细胞在后面和背面。ACTH 细胞也在远侧部的前面,也有少数分布在腺垂体后部。通过对蠪龟脑垂体发育的研究比较清楚地发现,肽类激素 ACTH, MSH, PRL 和 GH 都是从垂体背侧部细胞分化而来;而糖蛋白类激素包括 LH, TSH 都是从腹侧和腹外侧分化而来。蠪龟脑垂体原基侧叶部分形成了远侧部表面的一层组织称为内结节部 (*pars tuberalis interna*, PTint), 在下丘脑底面生成一厚层称为咽神经结节部 (*juxtaneural pars tuberalis*, juxPT)。在发育后期, juxPT 靠近远侧部分分化出一些具有 LH 免疫活性的细胞, juxPT 末梢则没有任何免疫反应。LH 细胞也在 PTint 和远侧部后方大量分布。PRL 细胞在远侧部前部出现, GH 细胞在后部, ACTH 细胞主要出现在远侧部前 2/3 处^[24]。中华鳖的腺垂体远侧部占整个垂体的绝大部分,明显分为头区和尾区,这种现

象也见于其它多种爬行动物,在头区和尾区之间有一沟隙凹入两部分之间,结节部很小,这和龟类有比较明显的区别。中华鳖脑垂体中几乎看不到中间部,中间部在龟,蜥蜴和蛇类等一些爬行动物中是存在的,在有些爬行动物中则不存在或者是不发达^[25-26]。在鱼类的脑垂体中发现有中间部,并且能分泌促黑激素对调节鱼的体色有重要作用。部分鸟类没有中间部^[27-28]。由此可以看出这一部分在动物演化中变化比较大。

3.2 垂体细胞的季节性变化规律

脑垂体是动物内分泌系统的核心器官,随着动物的生理状态和环境变化具有显著性的周期变化规律,主要表现在脑垂体中各种细胞的数量和结构变化^[29-31],其中研究较多的是腺垂体中的 GTH 细胞。Farquhar 等^[32-33]在 1954 年首先通过电子显微镜观察发现促性腺激素细胞中大小两种颗粒,后来其他学者又在其他动物中发现同样的现象^[34-35]。将促黄体释放激素 (LH-RH) 注入鱼体内可致 GTH 细胞小分泌颗粒和球状分泌颗粒减少,而不定型的团块增多,故推测不定型的团块可能是球状分泌颗粒集合而成。Shiino 等^[36]报道在一种麝香鼠的脑垂体中此细胞的大的不规则颗粒是储存促性腺激素的一种形式。后来也有研究者认为,大的分泌颗粒储存着卵泡刺激素 (FSH), 小的颗粒含有黄体生成素 (LH)^[36-38]。中华鳖的 GTH 细胞中,我们也发现了大小明显不同的两种颗粒,在冬季的材料中,此颗粒更大,而在夏季的材料中此颗粒相对变小,但是颗粒的数目明显增多。夏季是中华鳖的繁殖季节,所以我们推测含大量比较小的颗粒的激素细胞应该是此种细胞活动旺盛的一种状态,而含少量大颗粒的细胞则是功能相对静止的状态。而且仅仅依靠这两种颗粒来分辨 FSH 和 LH 细胞显然的不够的。而大的颗粒或不规则团块可能只是 GTH 细胞的分泌机能的某种变化。另外,中华鳖 GTH 细胞中发现了一些胞质空泡,这在大黄鱼^[39]、罗非鱼^[40]和鳊^[41]有报道,被认为是此类细胞处于活动期的标志。此种现象同样存在于哺乳动物脑垂体中^[42]。

ACTH 细胞分布集中在远侧部的头区,集中分布, ACTH 是一肽类激素,在垂体的激素中是进化上最保守的一类^[43],所以在我们所做的免疫组织化学中其反应特异性最强,着色最深的一类细

胞,且在不同的季节中变化不大。STH 细胞数量比较少,无论在免疫组化染色还是电镜中均不多见。GH 细胞在年周期中数量稳定,但另一种嗜酸性细胞 LTH 细胞在繁殖季节数量增加。免疫组化染色后发现在 9 月的腺垂体中见到 STH 细胞阳性细胞,在 1 月份没有发现阳性细胞。这和哺乳动物,鱼类都不同,在哺乳类 STH 细胞占到 40% 之多,在鱼类此种细胞也是最多的一种。这可能也是和中华鳖的生长特性有一定的关系。在自然状态下中华鳖生长非常缓慢,一年中最适生长期很短,水温低于 25 ℃ 和高于 35 ℃ 时生长都受到抑制,推测外界温度对中华鳖的 STH 细胞的数量和功能活动有影响。在脊椎动物体内脑垂体的结构基本类似,都是由神经垂体和腺垂体组成,但是其各部分的大小、形状和细胞排列的方式有很大的变化。本文初步探讨了中华鳖脑垂体的组织结构特点,并且揭示内分泌细胞随着季节的更替表现了相应的变化规律,但这些细胞变化尚需进一步量化分析,与细胞数量变化对应的体内激素含量变化以及的这些变化的生理效应也需要深入研究。

参考文献:

- [1] 张孟闻,宗愉,马积藩. 中国动物志,爬行纲(第一卷)[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2] Hiller Sturmhofel S, Bartke A. The endocrine system: An overview [J]. Alcohol Health Res World,1998,22(3):153-164.
- [3] 陆忠康. 简明中国水产养殖百科全书[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [4] 杜卓民. 实用组织切片技术[M]. 北京:人民卫生出版社,1998.
- [5] Erdheim J. Zur normalen und pathologischen Histologie der glandula thyreoidea, parathyreoidea und hypophysis [J]. Beiträge zur Pathologischen Anatomie,1903,33:158-236.
- [6] 陈秋生. 兽医比较组织学[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [7] Gorbman A, Dickhoff W W, Vigna S R. Comparative Endocrinology[M]. New York:John Wiley and Sons Inc,1983:45.
- [8] Wallis M. The molecular evolution of pituitary hormones[J]. Biol Rev Camb Philos Soc,1975,50(1):35-98.
- [9] De Velasco B, Erclik T, Shy D, et al. Specification and development of the pars intercerebralis and pars lateralis, neuroendocrine command centers in the Drosophila brain. [J]. Dev Biol,2007,302(1):309-323.
- [10] De Velasco B, Shen J, Go S, et al. Embryonic development of the Drosophila corpus cardiacum, a neuroendocrine gland with similarity to the vertebrate pituitary, is controlled by sine oculis and glass [J]. Dev Biol,2004,274(2):280-294.
- [11] Howe A. The mammalian pars intermedia: a review of its structure and function [J]. J Endocrinol,1973,59(2):385-409.
- [12] 赵显玲,郝利铭. 法国鹌鹑脑垂体神经叶的超微结构研究[J]. 东北师大学报(自然科学版),2000,32(4):59-62.
- [13] Atwell W J. The morphogenesis of the hypophysis cerebri of the domestic fowl during the second and third weeks of incubation [J]. The Anatomical Record,1939,73(1):57-71.
- [14] 张育辉,任耀辉. 中国大鲵垂体的显微与超微结构观察[J]. 解剖学报,1997,28(3):244-247.
- [15] 刘文生,李勇. 乌龟脑垂体显微及其腺垂体超微结构的研究[J]. 水生生物学报,2005,29(6):661-668.
- [16] Schreibman M P, Leatherland J F, McKeown B A. Functional morphology of the teleost pituitary gland [J]. Integrative and Comparative Biology,1973,13(3):719.
- [17] Herzog W, Zeng X, Lele Z, et al. Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog [J]. Developmental Biology,2003,254(1):36-49.
- [18] 方永强. 文昌鱼哈氏窝结构与功能研究进展[J]. 生物学通报,2002,37(6):1-4.
- [19] 方永强. 文昌鱼哈氏窝结构功能的神经内分泌调节研究进展[C]. 中国动物科学研究——中国动物学会第十四届会员代表大会及中国动物学会 65 周年年会论文集,1999.
- [20] 方永强,齐襄. 文昌鱼哈氏窝上皮细胞超微结构的研究[J]. 中国科学:B 辑,1989(6):592-597.
- [21] Gans C, Parsons T S. Biology of the Reptilia (Vol. 3) [M]. New York: New York Academic Press,1970.
- [22] Holmes R L, Ball J N. The pituitary gland: a comparative account [M]. London: Cambridge University Press,1974.
- [23] Pearson A K, Licht P. Morphology and immunocytochemistry of the turtle pituitary gland with special reference to the pars tuberalis [J]. Cell

- Tissue Res,1982,222(1):81-100.
- [24] Pearson A K, Wurst G Z, Cadle J E. Ontogeny and immunocytochemical differentiation of the pituitary gland in a sea turtle, *Caretta caretta* [J]. Anat Embryol (Berl), 1983, 167(1):13-37.
- [25] Rodriguez E M, La Pointe J. Light and electron microscopic study of the pars intermedia of the lizard, *Klauberina riversiana* [J]. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1970, 104(1):1-13.
- [26] Ferray L. Light and electron microscopic study of the pars intermedia of the grass snake (author's transl) [J]. Anat Embryol (Berl), 1974, 145(3):269-282.
- [27] Wingstrand K G. The structure and development of the avian pituitary from a comparative and functional viewpoint [M]. Gleerup, Lund, 1951.
- [28] Gorbman A. Comparative anatomy and physiology of the anterior pituitary [J]. The Quarterly Review of Biology, 1941, 16(3):294-310.
- [29] Sherman B M, Korenman S G. Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life [J]. J Clin Invest, 1975, 55(4):699-706.
- [30] Cushing H, Goetsch E. Hibernation and the pituitary body [J]. J Exp Med, 1915, 22(1):25-47.
- [31] Nozaki M, Ominato K, Shimotani T, et al. Identity and distribution of immunoreactive adenohypophysial cells in the pituitary during the life cycle of sea lampreys, *Petromyzon marinus* [J]. Gen Comp Endocrinol, 2008, 155(2):403-412.
- [32] Farquhar M G, Rinehart J F. Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate rats [J]. Endocrinology, 1954, 54(5):516-541.
- [33] Farquhar M G, Rinehart J F. Ytologic alterations in the anterior pituitary gland following thyroidectomy: an electron microscope study [J]. Endocrinology, 1954, 65(6):857-876.
- [34] Kim J W, Im W B, Choi H H, et al. Seasonal fluctuations in pituitary gland and plasma levels of gonadotropic hormones in *Rana* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 109(1):13-23.
- [35] 本特利. 脊椎动物比较内分泌学 [M]. 北京:科学出版社, 1984.
- [36] Shiino M, Hirano N, Miyajima M. Distribution of gonadotrophins within the anterior pituitary cells of the musk shrew (*Suncus murinus* L) [J]. Anat Rec, 1992, 233(1):83-88.
- [37] 方永强, 汪敏. 丘脑下部促黄体素释放激素类似物 (LRH-A) 的作用机制 III. 对罗非鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞超微结构的影响 [J]. 动物学报, 1983, 29(2):124-128.
- [38] 温海深, 林浩然, 肖东, 等. 野生鲇鱼生长激素分泌的季节变化及其神经内分泌调控 [J]. 动物学报, 2002, 48(2):213-220.
- [39] 翁幼竹, 谢芳靖, 等. 大黄鱼脑垂体组织学与免疫组织化学 [J]. 中国水产科学, 2003, 10(1):1-4.
- [40] 方展强, 何艾文. 罗非鱼脑垂体结构研究 I. 腺垂体前叶的超微结构 [J]. 水生生物学报, 1993, 17(3):252-258.
- [41] 翁幼竹, 林君卓. 鲮鱼脑垂体组织生理学的研究 [J]. 台湾海峡, 2000, 19(2):192-196.
- [42] 周寿康, 戴茂征. 大白鼠垂体促性腺激素细胞分泌周期中颗粒和液泡结构的周期性变化 [J]. 生殖与避孕, 1990, 10(1):18-23.
- [43] Murray R, Rodwell V, Bender D, et al. Harper's Illustrated biochemistry [M]. 28th Edition. Columbus: The McGraw-Hill Companies, 2009.

Observation on microstructure and ultrastructure of pituitary in *Trionyx sinensis*

CHEN Xiao-wu^{1,2}, LIU Yi¹, BI Yan-hui², BAO Hui-jun¹, CHEN Qiu-sheng^{1*}

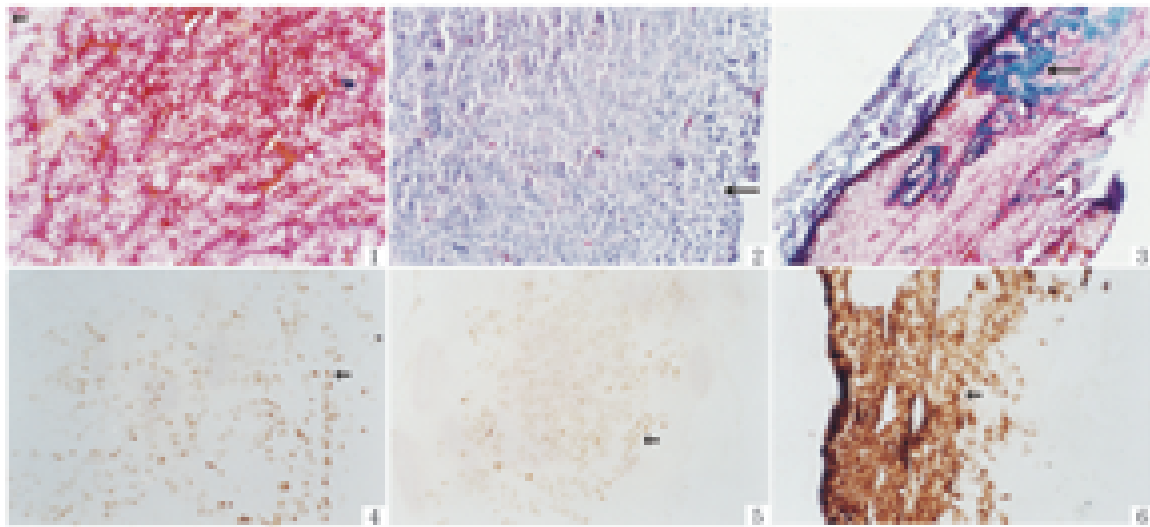
(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To investigate the histological structure and seasonal variation of the pituitary from *Trionyx sinensis*, the histological structure of *T. sinensis* pituitary in September and January was observed under light microscope and electron microscope. HE, PAF-AB-PAS-OG staining and immunohistochemical study were undertaken using different dyes or antisera. From the anatomical point of view, the pituitary of *T. sinensis* was composed of two lobes: the adenohypophysis and the neurohypophysis. It was functionally linked to the hypothalamus by the pituitary stalk. Adenohypophysis was composed by pars tuberalis and pars distalis, but pars intermedia was absent in the *T. sinensis*. Pars distalis could be divided into head lobe and tail lobe, and the former was larger than the latter. The neurohypophysis was small and finger-like extending into the pars distalis. Different cells of adenohypophysis were divided into three cells of eosinocyte, basicytes and chromophobe cells. The shape and distribution of those kinds were different obviously. The eosinocytes were mainly located in the central region of pars distalis while the basicyte in the surrounding area, eosinocytes were generally smaller than basicyte and possess a round and sidelined nucleus, the basicyte were bigger and possess a central nucleus; the chromophobe cells and adrenocorticotrophic cells were densely distributed in the pars tuberalis and sporadically distributed in the pars distalis. The quantity of somatotrophs and gonadotrophs in breeding season was higher than that in winter while other cells did not change significantly. Under electron microscope, the cells in adenohypophysis were divided into six categories of somatotrophs, gonadotrophs, thyrotrophs, prolactin cells, adrenocorticotrophic cells, adrenocorticotrophic cells and chromophobe cells according to the cell size, shape of nucleolus and secretory granules in the cytoplasm. The quantity of secretory granules in cytoplasm of somatotrophs and gonadotrophs changed significantly in summer and winter.

Key words: *Trionyx sinensis*; pituitary; microscopic structure; ultramicroscopic structure; immunohistochemistry

Corresponding author: CHEN Qiu-sheng. E-mail: chenqsh305@yahoo.com.cn

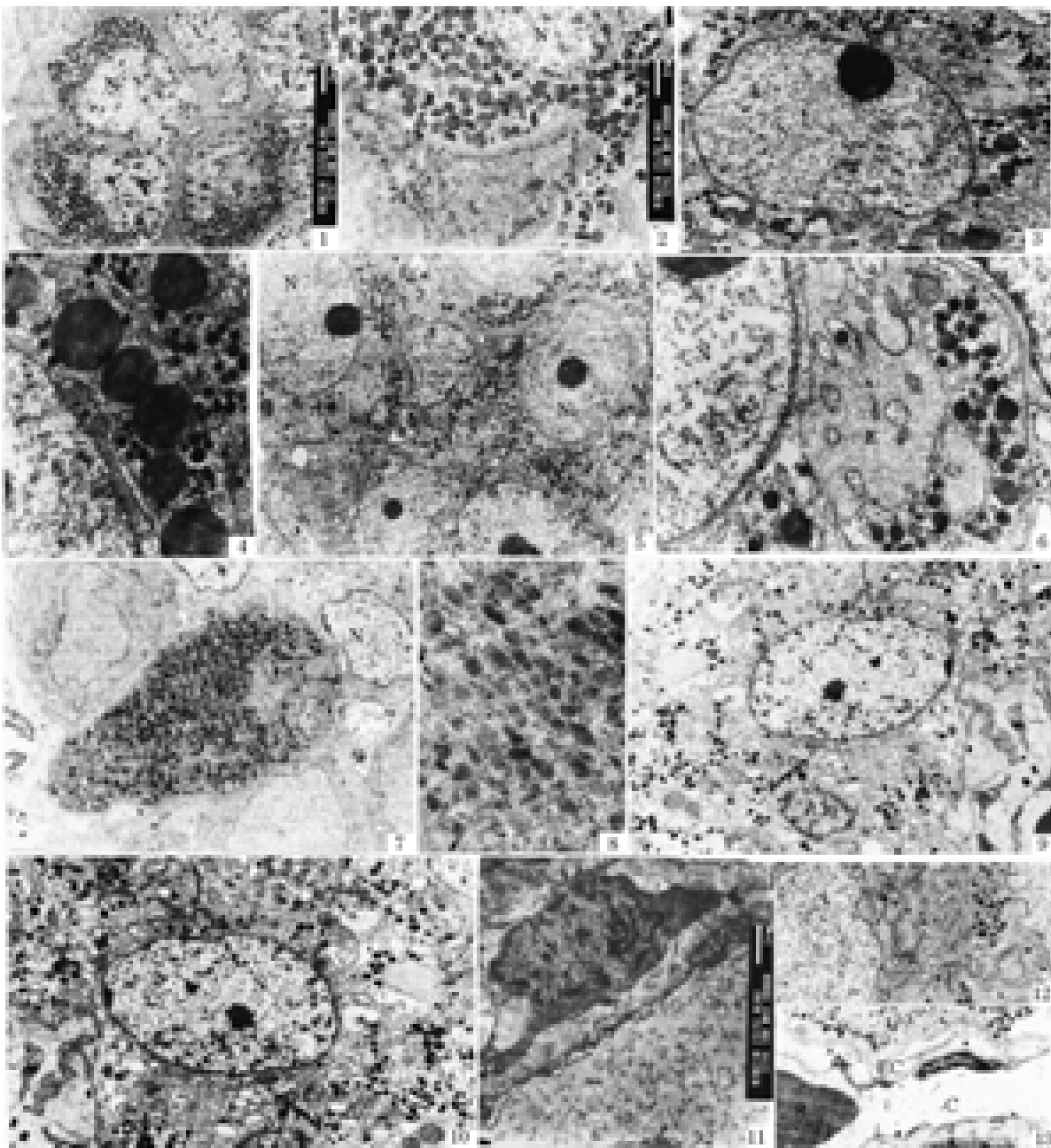


图版 I

1. 远侧部头叶,三色染色法, $\times 100$; 2. 远侧部头叶, H. E 染色, $\times 100$; 3. 结节部, 三色染色法, $\times 200$, 箭头所示嫌色细胞; 4. 远侧部生长激素细胞(箭头所示), 免疫组化染色, $\times 100$; 5. 远侧部 ACTH 细胞(箭头所示), 免疫组化染色, $\times 100$; 6. 结节部 ACTH 细胞(箭头所示), 免疫组化染色, $\times 200$ 。

Plate I

1. head lobe of pars distalis, PAF-AB-PAS-OG, $\times 100$; 2. head lobe of pars distalis, HE, $\times 100$; 3. pars tuberalis, PAF-AB-PAS-OG, $\times 200$, arrowhead represents chromophobe cells; 4. TSH cells of pars distalis(arrowhead), immunohistochemistry, $\times 100$; 5. ACTH cells of pars distalis(arrowhead), immunohistochemistry, $\times 100$; 6. ACTH cells of pars tuberalis(arrowhead), immunohistochemistry, $\times 200$.



图版 II

1. STH 细胞, $\times 3000$; 2. STH 细胞, $\times 8000$; 3. GTH 细胞, $\times 4000$; 4. GTH 细胞, $\times 10000$; 5. TSH 细胞, $\times 3000$; 6. TSH 细胞, $\times 12000$; 7. LH 细胞, 3000 ; 8. LH 细胞, $\times 10000$; 9. ACTH 细胞, $\times 3000$; 10. ACTH 细胞, $\times 4000$; 11. 嫌色细胞, $\times 8000$; 12. 腺垂体细胞间的桥粒连接, $\times 4000$; 13. 脑垂体内的毛细血管, $\times 4000$ 。

EC: 内皮细胞; 细胞核: N; 毛细血管: C; 内质网: E; 红细胞: R; 线粒体: M; \uparrow 表示桥粒。

Plate II

1. somatotrophs, $\times 3000$; 2. somatotrophs, $\times 8000$; 3. gonadotrophs, $\times 4000$; 4. gonadotrophs, $\times 10000$; 5. thyrotrophs, $\times 3000$; 6. thyrotrophs, $\times 12000$; 7. prolactin cells, 3000 ; 8. prolactin cells, $\times 10000$; 9. adrenocorticotrophic cells, $\times 3000$; 10. adrenocorticotrophic cells, $\times 4000$; 11. chromophobe cell, $\times 8000$; 12. desmosome between the cell of adenohypophysis, $\times 4000$; 13. capillary vessel in the adenohypophysis, $\times 4000$.

EC: endothelial cell; N: nucleus; C: capillary vessel; E: endoplasmic reticulum; R: red cell; M: mitochondrion; arrow represents desmosome.