

中国少棘蜈蚣(*Scolopendra subspinipes mutillans*)的毒腺结构

华卫建^{1,2} 徐国华¹ 周祀乔³ 华子春^{2*}

(¹江苏教育学院生物系, 南京 210013; ²南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093;

³南京大学医学院附属鼓楼医院病理科, 南京 210008)

摘要 用免疫组化和光镜、透射电镜等观察了中国少棘蜈蚣毒腺的结构。结果显示, 纵贯颚肢的弯月形毒腺为单管泡状腺, 主要由柱状分泌细胞和介于其间的纤细表皮细胞组成。被肌肉束环绕的分泌细胞辐射状排列于几丁质的毒液导管外, 其纤细的颈部由环状括约肌控制, 分泌端以折叠回转的单向瓣膜经导管壁上的孔道直接伸入管腔, 膨大的盲端直达毒腺底膜。高电子密度的分泌溶酶体向分泌口汇集时电子密度逐渐降低并降解为分泌小泡, 其中的杆状结晶样毒蛋白也经无定型状态逐渐分散, 经胞吐作用进入管腔并进一步疏散和均质化。免疫组化显示, 分泌细胞颈部密集分泌颗粒的主要成分为毒蛋白, 毒蛋白在分泌细胞中呈明显的向心式梯度增强型分布。根据上述观察, 提出了蜈蚣毒液以分泌溶酶体介导的非经典途径分泌的观点。

关键词 少棘蜈蚣; 毒腺; 显微结构; 超微结构; 免疫组化; 分泌溶酶体

蜈蚣是现存最古老的陆生节肢动物, 迄今已有4亿多年的历史^[1]。蜈蚣毒器和毒液是其捕食与防卫的重要工具, 也经常被用于蛰伤并毒害人类。然而人们对蜈蚣毒器和毒液的了解却很少, 对其毒腺形态结构的研究更是贫乏, 超微结构观察的文献不足十篇^[2-9]。少棘蜈蚣(*Scolopendra subspinipes mutillans* L.Koch)是我国传统的动物药材, 传统中医药用之“以毒攻毒”, 治疗肿瘤等疑难杂症已有两千多年的历史^[10], 迄今仍是重要的动物药材之一^[11], 且占蜈蚣药材用量的约95%^[12]。对少棘蜈蚣毒器和毒腺结构的研究尚未见报道。本研究用光镜、透射电镜、激光共聚焦显微镜和免疫组化等方法对中国少棘蜈蚣的毒腺结构进行观察, 以期阐明蜈蚣毒液的合成、分泌与排出的生物学过程提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 动物材料与制片观察

少棘蜈蚣购自安徽省滁县光明养殖场。活体解剖少棘蜈蚣取得毒腺。其中的10对立即投入2.5%戊二醛溶液中固定, 常规石蜡包埋, 行纵、横方向连续切片(厚6 μm), HE染色, 用Olympus BX51光学显微镜观察并拍照。另10对毒腺先在2.5%戊二醛溶液中固定, 然后再置1%锇酸中固定, 丙酮系列脱水后用Epon 812包埋, 半薄切片定位后, 制备超薄切片, 经醋酸双

氧铀-柠檬酸铅染色后的切片用JEM1200X透射电镜(80 kV)观察、拍照。第三组的10对毒腺用0.01 mol/L PBS(pH7.2~7.4)配置的10%甲醛固定, 石蜡包埋、切片后, 以自制的少棘蜈蚣毒液粗品的抗体经SP法作免疫组织化学染色(详见1.2)、用Olympus BX51光学显微镜观察并拍照。第四组的10对毒腺立即投入0.01 mol/L PBS中, 用BioRAD™ MRC 1024ES激光共聚焦显微镜作自激发荧光观察并拍照。

1.2 少棘蜈蚣粗毒抗血清的制备及免疫组化

少棘蜈蚣粗毒冻干粉用PBS(10 mg/mL)溶解, 加入等体积的Freund's完全佐剂混合, 充分乳化。采用皮下注射免疫法, 分别按60 mg/kg和30 mg/kg的剂量各免疫2只体重25 g的8周龄Balb/c小鼠, 在腹部皮下多点免疫, 每只每次注射0.2 mL。2周后进行第一次加强免疫, 所用剂量与首次免疫相同, 只是用不完全Freund佐剂乳化。再过2周后进行第二次加强免疫, 剂量相同, 不加佐剂。第二次加强免疫后10 d从眼窝采血, 室温静置, 待血清析出后加入0.02%叠氮钠, 于4℃冰箱保存备用。4只小鼠于免疫前分别取耳血,

收稿日期: 2011-09-05 接受日期: 2011-11-28

南京大学医药生物技术国家重点实验室开放基金和江苏教育学院科研基金资助项目

*通讯作者。Tel: 025-83324605, E-mail: zchua@nju.edu.cn

留作阴性对照血清。免疫组化采用常规SP法。

2 结果

2.1 毒器的解剖

少棘蜈蚣的毒器由毒爪和毒腺组成(图1A)。毒爪呈深黑色, 高度几丁质化, 中空、末端尖利如注射器针头, 其近末端外侧的毒孔(图1B)内通毒腺导管, 毒液由此输出。毒腺位于颚肢的外侧, 前端开口于跗爪的毒孔, 后端终于颚肢最粗壮的基节基部。毒腺整体呈前端略尖、后端钝圆的弯月形, 棕色的几丁质毒液导管沿毒腺长轴从后端直通尖端, 透过半透明的腺体隐约可见。毒腺的大小与蜈蚣的体积呈比例, 随机测量15条蜈蚣, 体长(11.5±0.93) cm、宽(0.7±0.09) cm, 其毒腺平均长为(5±0.5) mm、宽为(0.6±0.16) mm。

2.2 毒腺的显微结构

光镜下, 少棘蜈蚣毒腺为单管泡状腺, 横切面接近圆形(图1C), 由外向内依次为: (1)底膜: 由一层薄薄的结缔组织构成, 包在外周肌肉层之外, 使整个毒腺形成囊状(图1C~图1E); (2)肌肉层: 毒腺分泌细胞外都有肌肉层纵、横环绕, 肌肉层的运动使毒腺收缩、将毒液从腺腔挤入毒液导管中(图1C~图1E); (3)分泌细胞: 呈橄榄球棒状, 单层, 底膜端膨大、近腺腔中心狭小, 围绕毒液输送导管作放射状平行排

列(图1C和图1E)。着色深浅不同的分泌物几乎占据了分泌细胞的整个细胞质, 球形细胞核偏于膨大端, 胞质中可见深色的小球状分泌颗粒, 越近狭窄的分泌端这种颗粒越密集; (4)表皮细胞: 分泌细胞之间由细长的表皮细胞间隔开, 其细胞质极少, 细胞核细长、形态不规则(图1E); (5)毒液输送导管: 位于横切面中心偏下部, 其中上部管壁布满通向管腔的孔道, 与分泌细胞狭窄的分泌端连接, 为毒液进入管腔的通道; 下部管壁平整, 无分泌孔, 对应部位的细胞形态与柱状分泌细胞明显不同。管腔中心充满深染的待输出毒液(图1C和图1E)。

2.3 毒液的自发荧光

用激光共聚焦显微镜在488 nm和568 nm激发波长下, 观察刚解剖获得的活体毒腺, 可见腺细胞中弥漫着红色和绿色荧光点, 各色荧光在腺腔中心的导管处呈高亮度密集分布, 近毒腺前端尤甚(图2A)。

2.4 毒腺的免疫组化

免疫组化显示, 除分泌细胞之间的间隙处不显色外, 毒腺的每个分泌细胞及管腔内都呈现毒蛋白特异的黄色, 越近腺腔中心着色越深, 充满毒液的导管腔内染色程度最深(图2B和图2C)。切片的光密度测定也揭示毒蛋白自底膜至管腔中心呈明显的梯度增强型分布(表1)。该分布模式与毒腺中自发荧光点的分布模式一致, 提示自发荧光点很可能是毒蛋白。

表1 毒腺中不同分布区毒蛋白量的比较

Table 1 Comparison of venom protein distribution range in the venom gland

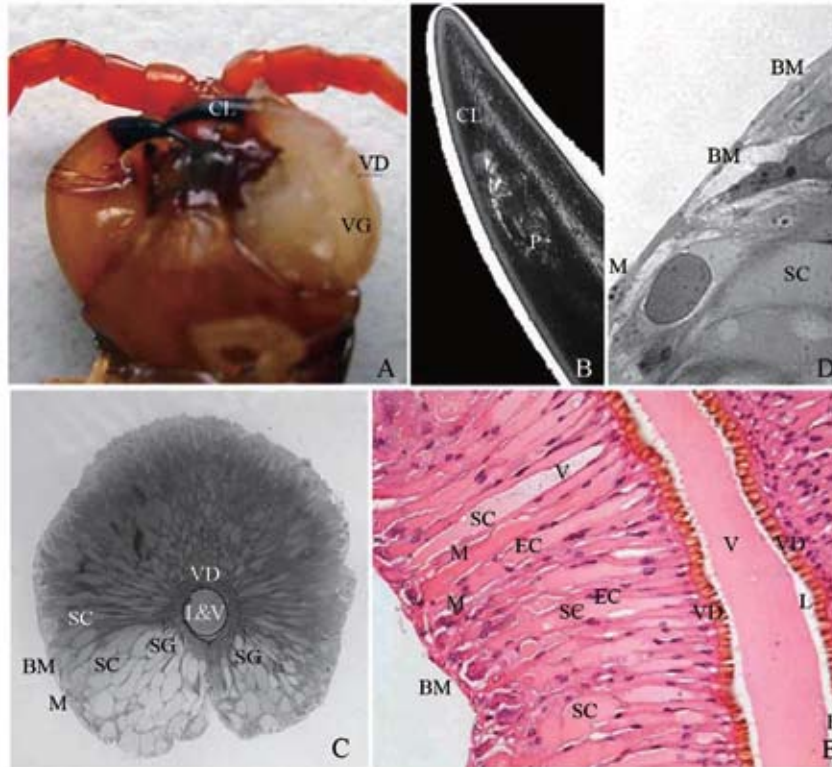
分布区 Distribution range	平均光密度值 Mean optical density	标准差 Standard deviation
Base membrane area	0.070	0.007
Near base membrane area	0.072	0.006
Near lumen area	0.080	0.031
Within the lumen	0.174	0.105

HE染色切片中密集于分泌细胞颈部的小颗粒在免疫组化中呈现浓密的深黄色, 表明其主要成分为毒蛋白。

2.5 毒腺的超微结构

透射电镜下, 分泌细胞间纵向分布有肌纤维和纤细的表皮细胞。表皮细胞的细胞核细长、呈不规则形, 多异染色质(图3A和图3C)。分泌细胞的胞质中分布着大量电子致密的分泌溶酶体(图3A), 其直

径为0.5~2 μm不等。分泌溶酶体的电子致密区有条纹状基质和均质基质两种结构(图3B), 其中包含了数量不等的杆状结晶样和无定型样低电子密度的物质。两侧被若干平行的条纹状电子致密基质包围的杆状结晶样低电子密度物质, 可能代表处于加工成熟过程中的毒液成分。这些低电子密度的毒液成分由杆状结晶样结构逐渐分散, 呈无定型结构, 最终形成电子密度低的膜泡成分, 释放到细胞质中(图3B)。

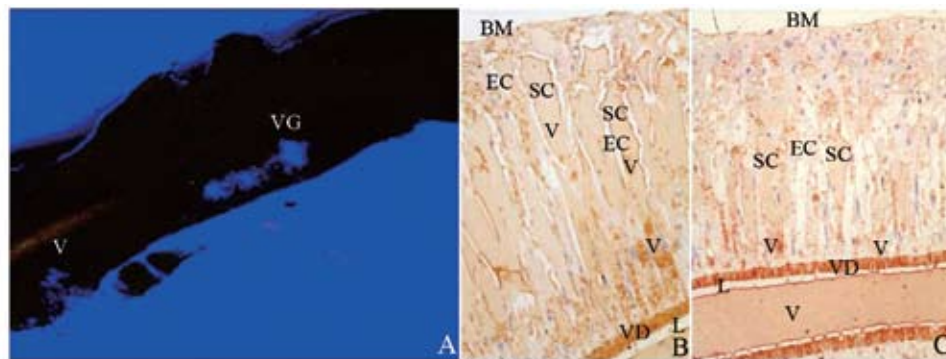


A: 毒器解剖(35×); B: 毒爪末端(100×); C: 毒腺横切面(100×); D: 毒腺横切局部(1 000×); E: 毒腺纵切局部(400×)。BM: 底膜; CL: 跗爪; EC: 上皮细胞; L: 管腔; M: 肌肉; P: 毒孔; SC: 分泌细胞; SG: 分泌颗粒; V: 毒液; VD: 毒液导管; VG: 毒腺。

A: anatomy of the venom apparatus(35×); B: end part of the claw(100×); C: cross section of the venom gland(100×); D: magnified part of the VG cross section(1 000×); E: part of longitude section of the VG(400×)。BM: base membrane; CL: claw; EC: epidermal cell; L: lumen; M: muscles; P: venom pore; SC: secretory cell; SG: secretory granular; V: venom; VD: venom duct; VG: venom gland.

图1 毒器解剖与毒腺的显微结构

Fig.1 Venom apparatus and microstructure of the venom gland



A: 毒蛋白的自激发荧光(120×); B,C: 毒蛋白的梯度分布(400×)。BM: 底膜; EC: 上皮细胞; L: 管腔; SC: 分泌细胞; V: 毒蛋白; VD: 毒液导管; VG: 毒腺。

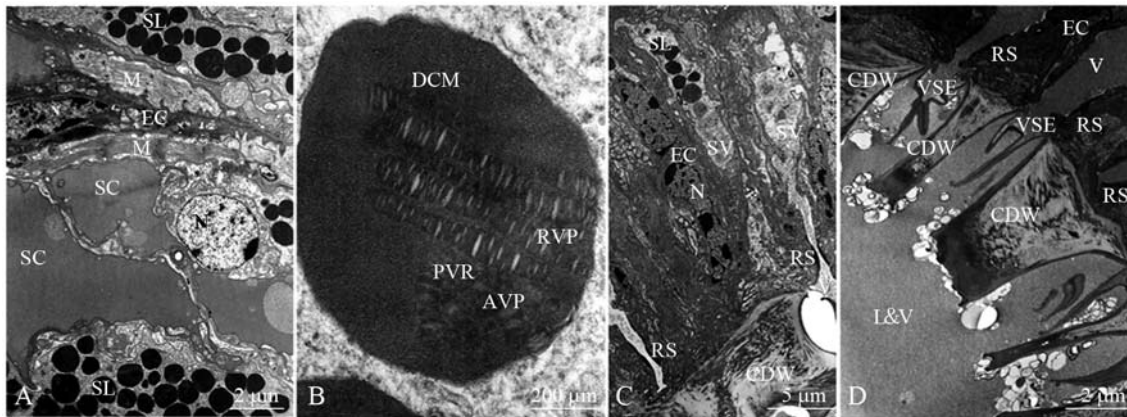
A: self-activating fluorescence of venom protein(120×); B,C: gradient distribution of venom protein(400×)。BM: base membrane; EC: epithelial cell; L: lumen; SC: secretory cell; V: venom protein; VD: venom duct; VG: venom gland.

图2 毒蛋白的梯度分布及其自发荧光情况

Fig.2 Gradient distribution of venom protein and its self-activating fluorescence

伴随着低电子密度结构的逐步分散、均质化,分泌溶酶体自身的电子密度也逐步降低,并被膜降

解,以至整个溶酶体降解成小的分泌泡,在抵达细胞膜前成为透明的小泡,并最终胞吐作用分泌进入



A: 毒腺的分泌细胞与上皮细胞; B: 分泌溶酶体之一; C: 分泌溶酶体的降解与分泌途径; D: 分泌途径及分泌口结构。AVP: 无定型毒蛋白; CDW: 几丁质管壁; DCM: 致密核心基质; EC: 上皮细胞; M: 肌肉; N: 细胞核; RS: 环状括约肌; RVP: 杆状结晶样毒蛋白; SC: 分泌细胞; SL: 分泌溶酶体; SV: 分泌小泡; V: 毒液; VSE: 阀样分泌口。

A: secretory cells and epithelial cells in the VG; B: one secretory lysosome; C: degradation of the secretory lysosome and exocytotic passage; D: exocytotic passage and secret pore on the CDW. AVP: amorphous venom protein; CDW: chitinous duct wall; DCM: dense core matrix; EC: epidermal cell; M: muscles; N: nucleus; RS: ring sphincter; RVP: rod-like venom protein; SC: secretory cell; SL: secretory lysosome; SV: secretory vesicle; V: venom; VSE: valve-like secret end.

图3 毒腺的超微结构

Fig.3 Ultra-structure of the venom gland

管腔(图3C)。

分泌细胞的颈部, 由增厚的电子致密的括约肌环绕(图3D), 继续前伸的细胞膜直接从几丁质导管壁上的孔道中伸入管腔, 形成回转折叠的单向瓣膜样结构, 以胞吐作用向管腔中分泌经加工的毒液。管腔中毒液的亚结构呈电子疏松的点状, 似乎比分泌小胞中的更均质化。

3 讨论

Cloudsley-Thompson^[13]提出蜈蚣毒腺位于颚节的第三节, Ménez等^[4]描述了*E.rubripes*蜈蚣的卵形毒腺位于基节外侧, 前端与毒液导管融合, 由导管沿着端肢节的第二、三节向前直达输出的终端——第四节即毒爪的末端。国内学者也认为, “颚节的毒腺呈囊状, 埋藏在巨大的第一节内, 通过毒导管向末爪的尖端开口^[14]”。

我们观察到*S.s.multilans*蜈蚣的弯月形毒腺始于颚肢基节、终于毒爪, 贯穿整个颚肢, 与Ménez等^[4]描述的*E.rubripes*的毒腺位置相似。*S.s.multilans*毒腺横切面近乎圆形, 不同于*E.rubripes*^[4]及*S.viridicornis*的卵形和*Cryptops iheringi*及*Otostigmus pradoi*^[7]的多角形, 表明了不同科属的蜈蚣的毒腺在形态、位置、可能还有结构方面存在多样性。本研究所见

*S.s.multilans*毒腺多张切片的导管下部平滑、无分泌孔, 与中上部结构不同, 其外层紧连着的细胞的形态也明显不同于巨大的柱状分泌细胞和其间的上皮细胞, 这在前人的研究中未见报道, 这究竟是毒腺前、中、后部的结构差异还是*S.s.multilans*的特有类型, 有待进一步探明。

本研究中纵、横切片都清晰地揭示了*S.s.multilans*毒腺分泌细胞的单层性, 与其他作者从横切面观察获得的结果一致, 表明蜈蚣毒腺均为单管、单层分泌细胞结构。本研究在显微和超微结构两个层次都观察到毒腺外周和内部的辐射状肌肉束, 不仅在形态上与前人描述的*E.rubripes*和*O.pradoi*毒腺中的肌肉束相同, 也与我们在该种蜈蚣毒腺转录组分析中获得的肌球蛋白^[15]、肌动蛋白、肌LIM蛋白以及肌钙蛋白C等的cDNA(合计占所测序列的2.0%, 尚未发表资料)的结果吻合。表明蜈蚣毒腺中的肌肉组织确实在毒液的分泌中发挥着不可或缺的作用。

本研究在*S.s.multilans*毒腺中观察到的柱状分泌细胞之间的纤细表皮细胞, 在接近几丁质导管的腺体中央尤其容易辨认。这与Nagpal和Kanwar^[3]在印度蜈蚣*Otostigmus ceylonicus*、Antoniazzi等^[7]在巴西蜈蚣*S.viridicornis*中观察到的表皮细胞相似。因此, 这类表皮细胞可能与毒腺导管管壁的几个几丁质堆

积有关。

我们首次运用激光共聚焦显微镜观察到活体蜈蚣毒腺中毒液的自激发荧光,并且毒液荧光强度在毒腺中向心地呈梯度增强型分布,与免疫组化法显示的分布模式一致。表明蜈蚣毒液是在分泌细胞中合成后向狭窄的分泌口转运,再经分泌进入管腔中心贮存,继而分泌排出的。

关于蜈蚣毒腺分泌细胞的分泌口结构与毒液分泌方式,尚无统一的认识。本研究用TEM观察了*S.s.mutilans*毒腺多个分泌细胞的颈部,揭示了无论处于狭窄的约束状态、还是宽松的舒张状态,该处都有一厚实的电子致密环结构,与Dass和Jangi^[2]、Ménez等^[4]和Antoniazzi等^[7]在其他蜈蚣中观察描述的类似,也与Hilken等^[5]在*Scutigera coleoptrata*的上颌II腺的分泌细胞颈部所见的结构相似。表明这种经由电子致密的括约肌环控制的分泌口,再进入几丁质的输送导管的毒液分泌-输送途径,在唇足类动物的毒腺中具有相当的普遍性。我们的结果也揭示了:*S.s.mutilans*毒腺分泌细胞的分泌口是以多种回转折叠的单向瓣膜样结构经导管壁上的孔道直接伸入管腔,并以胞吐的方式向管腔中分泌毒液的;一个管孔中只有一个细胞的分泌口进入。类似的瓣膜样结构,在*S.morsitans*^[2]、*E.rubripes*^[4]和*S.viridicornis*^[7]中也曾有报道。这表明单向瓣膜样分泌口结构,可能是蜈蚣毒腺分泌细胞的普遍结构。本研究结果还证实了Ménez等^[4]推测的蜈蚣毒腺细胞的分泌方式为胞吐分泌(也称局部分泌,merocrine secretion),而非Dass和Jangi^[2]认为的全浆分泌(holocrine secretion)。

分泌溶酶体(secretory lysosomes, SLs)在可诱导分泌中的作用,近年来在多种造血细胞尤其是CTL和NK细胞中得到了比较深入的研究,在免疫缺陷与自体免疫疾病中的作用也得到了更多的关注^[16-19]。我们用TEM观察揭示了光镜下在分泌细胞颈部密集的2 μm左右的小分泌颗粒就是分泌溶酶体,免疫组化的结果表明其中的低电子密度包涵体就是毒蛋白。据此可以认为,以毒蛋白为主要成分的蜈蚣毒液的分泌是以分泌溶酶体介导的非经典分泌途径进行的。本研究从亚细胞形态与结构角度揭示了蜈蚣毒蛋白在SLs中的变化及其分泌过程,提示*S.s.mutilans*蜈蚣毒腺细胞可以作为研究SLs介导的非经典蛋白质分泌途径的有效模型之一。

致谢

感谢南京大学医药生物技术国家重点实验室刘红旗博士后在蜈蚣粗毒抗血清制备、南京军区南京总医院病理室姜少军副教授在毒腺超薄切片制备与电镜观察、南京师范大学生命科学院实验中心张超英副教授在毒腺激光共聚焦显微观察中给予指导和帮助。

参考文献 (References)

- 1 Pisani D, Poling LL, Lyons-Weiler M, Hedges SB. The colonization of land by animals: Molecular phylogeny and divergence times among arthropods. *BMC Biol* 2004; 2:1.
- 2 Dass CMS, Jangi BS. Ultrastructural organization of the poison gland of centipede *Scolopendra morsitans* Linn. *Indian J Exp Biol* 1978; 16: 748-57.
- 3 Nagpal N, Kanwar U. The poison gland in the centipede *Otostigmus ceylonicus*; morphology and cytochemistry. *Toxicon* 1981; 19(6): 898-902.
- 4 Ménez A, Zimmerman K, Zimmerman S, Heatwole H. Venom apparatus and toxicity of the centipede *Ethmostigmus rubripes* (Chilopoda, Scolopendridae). *J Morphol* 1990; 206(3): 303-12.
- 5 Hilken G, Rosenberg J, Brockmann C. Ultrastructure of the epidermal maxilla II-gland of *Scutigera coleoptrata* (Chilopoda, Notostigmophora) and the ground pattern of epidermal gland organs in Myriapoda. *J Morphol* 2005; 264(1): 53-61.
- 6 Hilken G, Rosenberg J. Ultrastructural investigation of a salivary gland in a centipede: Structure and origin of the maxilla I-gland of *Scutigera coleoptrata* (Chilopoda, Notostigmophora). *J Morphol* 2006; 267(3): 375-81.
- 7 Antoniazzi MM, Pedroso CM, Knysak I, Martins R, Guizze SP, Jared C, et al. Comparative morphological study of the venom glands of the centipede *Cryptops iheringi*, *Otostigmus pradoi* and *Scolopendra viridicornis*. *Toxicon* 2009; 53: 367-74.
- 8 Jarrar BM. Morphology, histology and histochemistry of the venom apparatus of the centipede, *Scolopendra valida* (Chilopoda, Scolopendridae). *Int J Morphol* 2010; 28(1): 19-25.
- 9 Undheim EA, King GF. On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. *Toxicon* 2011; 57(4): 512-24.
- 10 李时珍. 本草纲目. 北京: 人民卫生出版社影印, 1957, 1562-3.
- 11 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社, 2010, 335-6.
- 12 王克勤, 方红, 叶卯祥, 陈厚祥, 朱耀璋, 方虹. 蜈蚣药源调查及商品鉴定. *中药材* 1997; 20(9): 450-1.
- 13 Cloudsley-Thompson JL. Adaptations of arthropoda to arid environments. *Annu Rev Entomol* 1975; 20: 261-83.
- 14 钱锐. 有毒动物及其毒素——中毒的防治和毒素的应用. 云南科技出版社, 1996, 54-60.
- 15 华卫建, 任玫, 吴晓菁. 中国少棘蜈蚣与家蚕和野桑蚕肌球蛋白轻链2的结构功能分析比较. *蚕业科学* 2008; 34(4): 663-9.

- 16 Stinchcombe J, Page LJ, Griffiths GM. Secretary lysosome biogenesis in cytotoxic T lymphocytes from normal and chediak higashi syndrome patients. *Traffic* 2000; 1(5): 435-44.
- 17 Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM. Linking albinism and immunity: the secrets of secretary lysosomes. *Science* 2004; 305(5680): 55-9.
- 18 Dikeakos JD, Reudelhuber TL. Sending proteins to dense core secretary granules: Still a lot to sort out. *J Cell Biol* 2007; 177(2): 191-6.
- 19 Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O. Secretary lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett* 2007; 108(1): 10-9.

Venom Gland Structure of Chinese Centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*

Hua Weijian^{1,2}, Xu Guohua¹, Zhou Siqiao³, Hua Zichun^{2*}

¹Department of Biology, Jiangsu Institute of Education, Nanjing 210013, China;

²State Key Lab of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

³Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

Abstract Structure of venom gland from Chinese centipede *Scolopendra subspinipes mutilans* was observed with immunohistochemistry by light microscopy, transmission electron microscopy and laser confocal microscope. Results showed the crescent-shaped venom gland ran through the whole maxilliped segment. It was a simple tubuloacinar gland and mainly consisted of two cell types, secretary cells and intermediate thin epithelial cells. The secretary cells surrounded by mussels radicalized around a chitinous venom duct with its thin neck controlled by a ring sphincter. Its excreting end intruded into the duct lumen through a pore on the duct wall with a back and forth folded valve, its enlarged blunt end directed to base membrane of the gland. A large amount of secretary substances and high electronic dens secretary lysosomes distributed in cytoplasm of the secreting cell. Within the secretary lysosomes, rod-like venom proteins diluted gradually through an amorphous structure in the extreme dense core, and were degraded into non-vesicle homogenized venom before it arrived the venom duct, concomitant with decrease in the secretary lysosomes' electronic dense. Venom was discharged into the lumen by exocytosis at last and became more dispersed and homogeneous. Immunohistochemistry showed that main constituents of the secretary bodies gathered near the neck of the secretary cells were venom proteins. They distributed in a gradient enhancement pattern from the base membrane to the lumen center of the gland, consistent with the self-excited fluorescence distribution pattern. Based on these observations, authors propose that centipede venom is secreted by a non-classical pathway which is mediated via secretary lysosomes.

Key words *Scolopendra subspinipes mutilans*; venom gland; microstructure; ultra structure; immunohistochemistry; secretary lysosome

Received: September 5, 2011 Accepted: November 28, 2011

This work was supported by the Open Fund from the State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology in Nanjing University and the Natural Science Foundation of Jiangsu Institute of Education

*Corresponding author. Tel: 86-25-83324605, E-mail: zchua@nju.edu.cn