

应用 3D 打印技术辅助识别昆虫脑解剖结构

陈秋燕, 常亚军, 郭倩倩, 苏冉冉, 王 博, 贺 静, 谢桂英, 赵新成*

(河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要:【目的】明确烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 雄成虫脑的结构, 构建和打印脑的三维模型, 并将该技术扩展应用到黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、西方蜜蜂 *Apis mellifera* 和沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 上, 制作这些模式昆虫脑的 3D 打印模型。【方法】首先采用突触蛋白抗体免疫组织化学染色标记的方法研究烟芽夜蛾雄成虫脑的结构, 利用激光扫描共聚焦显微镜获取脑解剖结构图像, 利用图形分析软件创建三维脑模型, 并利用 3D 打印技术进行三维图像打印。【结果】鉴定出烟芽夜蛾雄成虫脑及颞神经节、触角叶、视叶、前视结节、中央体和蕈形体等主要神经髓结构, 并构建了三维数字化模型。首次成功应用 3D 打印技术打印了烟芽夜蛾雄成虫脑的三维数字化模型, 获得实体模型。并将该技术进一步应用到黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗, 获得了这些昆虫的脑实体模型。基于脑模型, 对这些昆虫的味觉中枢、嗅觉中枢、视觉中枢和学习及记忆中枢等神经髓结构做了系统比较。【结论】3D 打印模型为脑解剖结构的观察提供了新形式, 并提供了便利工具。3D 打印所得脑实体模型大小适中, 可以放在手中, 任意旋转, 从不同角度观察昆虫脑不规则结构的形态、位置和空间关系, 也便于比较不同昆虫脑结构异同, 加深对昆虫脑结构和功能及其演化的认识。

关键词: 昆虫; 脑; 神经髓; 触角叶; 视叶; 蕈形体; 颞神经节; 三维模型; 3D 打印

中图分类号: Q964 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)04-0439-10

Identification of insect brain neuropils aided with the application of 3D printer technology

CHEN Qiu-Yan, CHANG Ya-Jun, GUO Qian-Qian, SU Ran-Ran, WANG Bo, HE Jing, XIE Gui-Ying, ZHAO Xin-Cheng* (College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to identify the neuropil structure of the brain of male adult of *Heliothis virescens*, to reconstruct and print the three-dimensional brain models, and to use the established 3D printing protocol to print the brain models of *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* and *Schistocerca gregaria*. 【Methods】 Immunohistochemical staining with a synaptic protein antibody was used to label the neuropil structures of *H. virescens* brain. The brain images were obtained by using a confocal laser scanning microscope, and the three-dimensional brain models were created by using imaging software and printed by using a 3D printer. 【Results】 The brain of male adult of *H. virescens* and its main neuropils including gnathal ganglion, antennal lobes, optic lobes, anterior optic tubercle, central body, and mushroom bodies were identified, and the digitalized three-dimensional brain models were created. For the first time, the three-dimensional brain models of male adult of *H. virescens* were printed by using a 3D printer and the digitalized models were transformed to the physical and solid models. Based on both digital and printed brain models of *H. virescens* and other three insects (*D. melanogaster*, *A. mellifera*

基金项目: 国家自然科学基金项目(U1604109); 河南农业大学大学生创新创业训练计划项目(201610466039); 河南省豫南植物有害生物绿色防控院士工作站项目(YZ201504)

作者简介: 陈秋燕, 女, 1990 年 11 月生, 河南鄢陵人, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: honeychen1114@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xincheng@henau.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-10-25; 接受日期 Accepted: 2017-12-22

and *S. gregaria*), the brain neuropils for the gustatory center, olfactory center, visual center, and the center for memory and learning were compared between these insect species. 【Conclusion】 The printed brain models offer a new form of brain visualization. The physical and solid insect brain models can be printed in desired size and be handled in hands for the visualization from any angles. The printed brain models facilitate the identification of neuropils and their spatial relationships, and the comparison for the equivalent structures in different insect species.

Key words: Insect; brain; neuropil; antennal lobe; optic lobe; mushroom body; gnathal ganglion; three-dimensional model; 3D printing

昆虫脑是调控昆虫行为和生理活动的神经中枢,能够接收和处理昆虫身体内、外环境信息并形成运动指令(Chapman, 1998)。昆虫脑的结构与其对行为和生理过程的神经调控功能相协调。不同生境下表现不同适应行为的昆虫,或同种昆虫的不同性别、品系或虫态,往往具有形态、大小和位置不同的脑结构(Chapman, 1998; Montgomery and Ott, 2015; Montgomery and Merrill, 2017)。比如,日出性蝴蝶视觉中枢结构视叶发达,占整个脑的70%(Heinze and Reppert, 2012),夜行性蛾的视叶占脑体积的30%(陈秋燕等, 2016)。蛾类昆虫嗅觉中枢发达,触角叶内具有80个神经纤维球,而蝉和龙虱等昆虫的嗅觉极不发达,脑内没有明显的纤维球结构(Strausfeld, 2012; Zhao *et al.*, 2016)。蜜蜂和蚂蚁等社会性昆虫,学习和记忆能力强,相应地,其学习和记忆中枢蕈状体发达,约占整脑体积的25%,而其他昆虫如蛾和蝶仅占5%左右(Wei *et al.*, 2010; Heinze and Reppert, 2012; 陈秋燕等, 2016)。因此,研究昆虫脑的解剖结构,将有助于促进理解昆虫行为和生理活动的神经调控机制。

标记技术、脑成像技术和图像分析技术的快速发展,促使昆虫脑数字化三维模型构建技术也得到快速发展。脑数字化三维模型便于从不同角度辨识脑内部结构形状、位置以及各结构之间的空间关系(Rein *et al.*, 2002),并实现定量分析不规则结构体积大小,比较不同昆虫脑结构的差异。所以,脑数字化三维模型构建技术的发展极大地促进了脑解剖结构的研究,比如,近十几年来,蟑螂 *Diploptera punctate* (Chiang *et al.*, 2001)、蜚蠊 *Leucophaea maderae* (Wei *et al.*, 2010)、沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* (Kurylas *et al.*, 2008)、绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (谢桂英等, 2016b)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Dreyer *et al.*, 2010)、蜣螂 *Scarabaeus lamarcki*, *Scarabaeus satyrus* (Immonen *et al.*, 2017)、西方蜜蜂 *Apis mellifera* (Brandt *et al.*, 2005)、烟草天蛾 *Manduca sexta* (El

Jundi *et al.*, 2009)、雌性烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (Kvello *et al.*, 2009)、雄性烟青虫 *Helicoverpa assulta* (陈秋燕等, 2016)、君主斑蝶 *Danaus plexippus* (Heinze and Reppert, 2012)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫(汤清波等, 2014)、茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 幼虫(谢桂英等, 2016a)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Rein *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2014)等多种昆虫脑解剖结构得到解析和深入研究。

3D打印技术是近几年快速发展起来的一种新型的快速成型技术,即通过计算机辅助设计(computer aided design, CAD)设计数据,采用材料逐层累加的方法制造实体物品的技术(卢秉恒和李涤尘, 2013)。由于其具有在三维结构上快速制造和自由制造的优势,被广泛应用于工业、建筑、汽车、能源、航天、医疗等重要领域。可以用于开发个性化、复杂化、高难度的新产品。昆虫脑数字化三维模型的创建以及3D打印技术的出现,为制作昆虫脑实体模型提供了便利条件。昆虫脑实体模型的制作将使得辨识昆虫脑的结构、认识各脑结构间的空间联系、比较不同昆虫类群脑结构的异同更直观、方便。昆虫脑实体模型制作将会推动脑解剖科研和教学的深入开展。

在本研究中,我们选取雄性烟芽夜蛾为对象,首先采用免疫组织化学染色标记的方法明确烟芽夜蛾雄成虫脑的解剖结构,为深入研究性信息素通讯神经调控机制提供了结构基础;在创建了烟芽夜蛾数字化三维脑模型的基础上,利用3D打印技术,制作烟芽夜蛾脑实体模型,以辅助识别脑的结构,理解脑结构的空联系;在利用3D打印技术成功打印烟芽夜蛾脑实体模型的基础上,我们进一步选取黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗等模式昆虫为对象,利用3D打印技术制作了黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗成虫的脑实体模型,以方便比较不同昆虫脑结构异同,加深对脑结构的认知,为昆虫脑的科研和教学提供便利工具。

1 材料与amp;方法

1.1 供试昆虫

烟芽夜蛾的蛹从先正达公司(Syngenta, Basel, Switzerland)购买获得。将雌雄蛹鉴别并分开后,放置在气候箱内饲养,温度为 22℃,光周期为 14L:10D。成虫羽化后喂以 5% 蔗糖水。羽化第 2-5 天的雄成虫用于试验。

1.2 烟芽夜蛾脑解剖和免疫组织化学染色标记

使用医学剪刀将烟芽夜蛾成虫头部剪下,置于 Ringer 氏生理液中,在实体解剖镜下用精细解剖镊子把脑解剖出来,并放置于用磷酸缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)(0.1 mol/L, pH 7.4)配制的 4% 多聚甲醛固定液中,进行脑组织固定,在 4℃ 条件下过夜。然后用 PBS 缓冲液连续冲洗 4 次,每次 15 min。冲洗后,把脑转移至 5% 的正常羊血清封闭液(normal goat serum)(Sigma, St. Louis, MO, USA)中预孵育 3 h,温度条件为室温。随后,将脑转移于含抗突触蛋白抗体 SYNORF1(Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA) PBS 溶液(SYNORF1 浓度为 1:100, v/v)中 4℃ 孵育 5 d。然后 PBS 缓冲液冲洗 6 次,每次 20 min。冲洗后将脑转移于荧光偶联的二抗(Cy2 偶联的抗鼠二抗,Invitrogen, Eugene, OR; 浓度为 1:300)4℃ 孵育 3 d。然后 PBS 再冲洗 6 次,每次 20 min。利用 50%, 70%, 90%, 96% 和 100% (v/v)的酒精由低浓度到高浓度将脑脱水,每个浓度脱水 10 min,其中 100% 的酒精脱水 2 次。脱水后把脑置于水杨酸甲酯中透明。最后将脑放在铝制载玻片的孔内中性树胶中,调整姿势后用盖玻片密封(孔上下用盖玻片密封)。

1.3 烟芽夜蛾脑图像数据获取和三维模型构建

用共聚焦激光扫描显微镜(LSM 510, META Zeiss, Jena, Germany)扫描脑结构以获得脑结构逐层图像集。图像分辨率设定为 1 024 × 1 024 像素。扫描图层间隔 3 μm。扫描激光为氩激光 488 nm。

构建脑三维结构的图像分析软件为 AMIRA 5.3(Visage Imaging, Fürth, Germany)。首先将获得共聚焦激光扫描显微镜图像集导入软件,利用图形分割编辑器“label field”重建脑内部各神经髓结构(Kurylas *et al.*, 2008; 汤清波等, 2014)。构建时首先识别所构建的脑结构,然后使用板刷将该结构的所在区域进行标记。最后将同一结构的多张标记图

形叠加,即生成三维结构。

1.4 黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗脑三维模型获得

黑腹果蝇脑数字化图像数据从虚拟果蝇脑网站 <http://www.virtualflybrain.org> 获得,该网站为果蝇脑结构资源公共开放网站,以方便供其他相关领域的科研人员和学生使用(Ito *et al.*, 2014)。我们所使用的果蝇脑图像数据即从该网站下载获得,文件名为 InsectBrainNomenclature_neuropil.am。随后,我们使用图像分析软件 AMIRA 5.3 进行读取和分析,并使用软件的 SurfaceGen 功能生成果蝇脑以及各个结构的三维模型。西方蜜蜂脑数字化图像数据从德国柏林自由大学网站获得,网址为:http://www.bcp.fu-berlin.de/en/biologie/arbeitsgruppen/neurobiologie/ag_menzel/beebrain/downloads/index.html,为公开免费共享资源。将下载获得的蜜蜂脑图像导入图像分析软件 AMIRA 5.3 进行读取和分析,并生成脑三维模型(Brandt *et al.*, 2005)。沙漠蝗的脑数字化三维模型由德国马尔堡大学 Uwe Homberg 教授提供(Kurylas *et al.*, 2008)。

1.5 3D 打印机打印

为获得昆虫实体模型,我们采用 3D 打印机(HORI H1, 北京)技术进行打印。打印材料为聚乳酸(poly lactic acid, PLA),打印技术为熔融沉积快速成型技术,即通过加热使材料融化,按照计算机设计从喷头喷出,并逐层向上堆积成型。打印过程中喷头的温度设置为 200℃,底板温度设置为 50℃。利用 3D 打印机匹配的软件 Cural 15.04.2 将昆虫脑三维模型转换为 G-code 打印代码。转换时,首先使用 AMIRA 将脑三维模型数据转换为 STL(STereoLithography)格式的文件。STL 为一种三维模型的文件格式,是一个较通用的 3D 制造的接口协议。然后将得到的 STL 格式的三维模型数据在 Cural 15.04.2 软件中打开,调整三维模型的长、宽、高,设置打印模型的大小,并设置打印起始位置、打印厚度、支撑类型等。设置后,将模型数据保存为打印代码 G-code 格式。G-code 格式的文件将数据模型沿纵向方向层层切割,成为 3D 打印系统可识别的数据。随后点击打印指令,3D 打印机即开始打印脑模型。

2 结果

2.1 烟芽夜蛾雄成虫脑的解剖结构

突触蛋白抗体免疫组织化学染色标记将烟芽夜

蛾雄成虫脑的主要神经髓结构显示出来(图 1)。脑的最前端,咽喉口两侧的球状突出结构为触角叶(antennal lobe, AL)(图 1: A, E)。咽喉的上侧为脑的最大结构,即前脑(proto-cerebrum)。前脑内包括多个边界清晰的神经髓结构,如前视结节(anterior optic tubercle, AOTU)、蕈形体(mushroom body, MB)、中央体(central body, CB)和视叶(optic lobe, OL)(图 1: B - G)。视叶位于前脑两侧,成球状,包括 3 个可识别的神经髓结构,从远端到中心分别为视髓(medulla, ME)、视小叶(lobula, LO)和视小叶板(lobula plate, LOP)(图 1: C - G)。中央体位于前脑正中心,为 1 个单独结构(图 1: C, F,

G)。在中央体两侧上方为一对蕈形体,从前端到后端,像横躺的蘑菇。每个蕈形体包括前端的叶(lobe, LOB)和后端的冠(calyx, CA)以及连接冠和叶的柄(pedunculus, PE)(图 1: B - G)。前视结节位于前脑的上方前端,左右各 1 个(图 1: B, E)。除了上述几个边界明显的结构外,前脑还包括大量的神经髓区域,主要位于前脑的外侧、腹侧和背侧,但这些区域没有明显内部边界。所以在结构分析和创建脑模型时,我们将该部分与咽喉下方的神经髓合并为一体,称为中间脑(midbrain)。位于咽喉下方的神经髓主要为颞神经节(gnathal ganglion, GNG)(图 1: C - F),其内部也没有明显的神经髓结构分区。

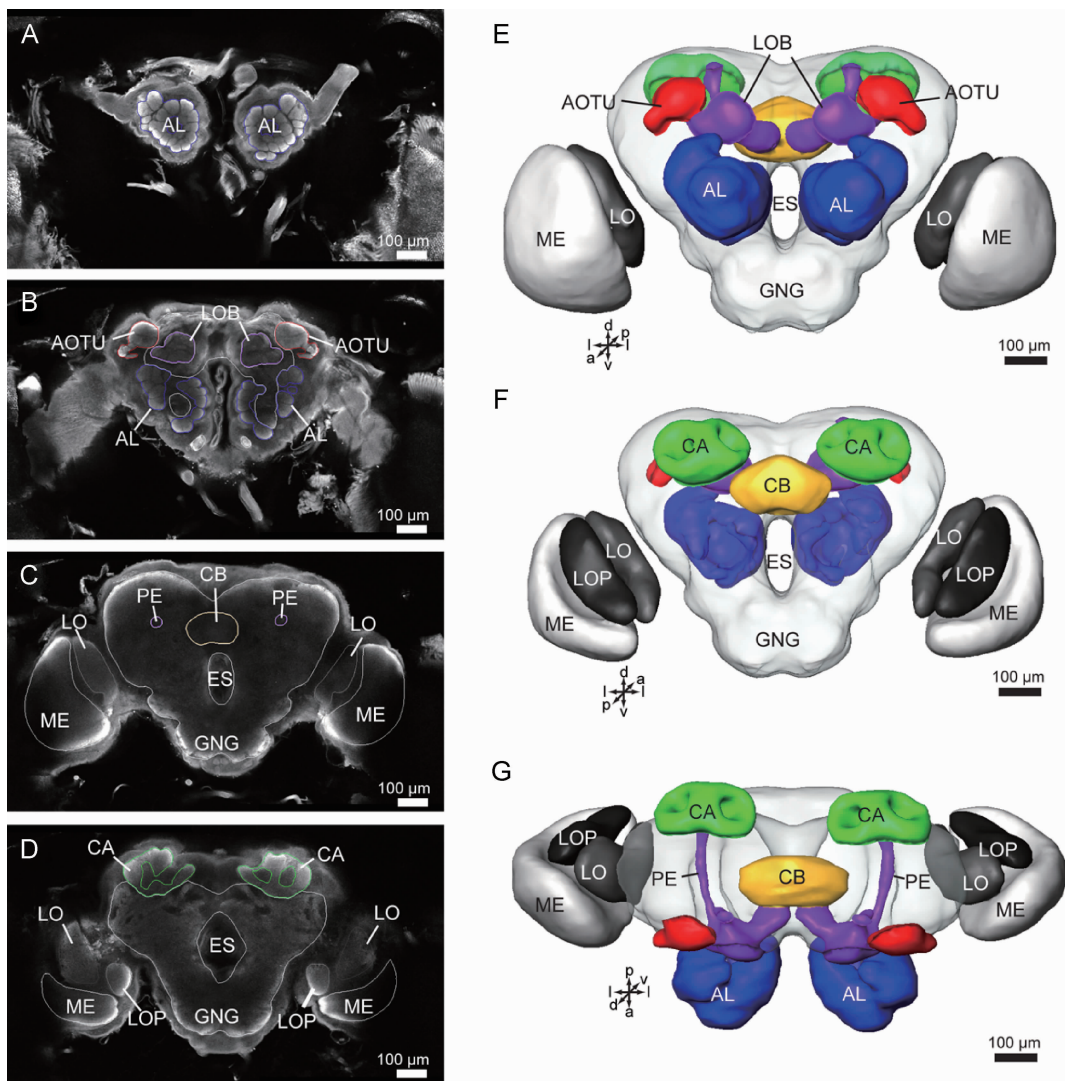


图 1 烟芽夜蛾雄成虫脑激光共聚焦扫描图像和数字化三维模型

Fig. 1 Confocal images of the brain of male adult of *Heliothis virescens* and digitalized three-dimensional models

A - D: 从前到后不同深度的脑显微图像 Confocal images of a brain at different depths from anterior to posterior; E - G: 脑数字化三维模型 Digitalized three-dimensional brain models; E: 正面观 Frontal view; F: 后面观 Posterior view; G: 背面观 Dorsal view. AL: 触角叶 Antennal lobe; AOTU: 前视结节 Anterior optic tubercle; CA: 蕈形体冠 Mushroom body calyx; CB: 中央体 Central body; ES: 食道 Esophagus; GNG: 颞神经节 Gnathal ganglion; LO: 视小叶 Lobula; LOB: 蕈形体叶 Mushroom body lobe; LOP: 视小叶板 Lobula plate; ME: 视髓 Medulla; PE: 蕈形体柄 Mushroom body pedunculus. 方位 Directions: a: 前向 Anterior; d: 背向 Dorsal; l: 侧面 Lateral; p: 后向 Posterior; v: 腹面 Ventral.

2.2 烟芽夜蛾雄成虫脑模型的 3D 打印

将获得的烟芽夜蛾脑数字化三维模型转换为 3D 打印可识别的 STL 格式文件,并导入 3D 打印机操控系统进行打印,获得 3D 打印的实体脑模型(图 2: A, B)。烟芽夜蛾脑实体模型尺寸大小约为脑实际大小的 100 倍,体积放大约 10^6 倍(表 1)。3D 打印的脑模型结构清晰,大小适中,便于拿在手中观察。为了区别各个结构,触角叶、前视结节和蕈形体

等不同的结构涂上不同的颜色。由于蕈形体为脑内部的结构,且结构复杂,为了便于观察,所以蕈形体也被制作成实体模型(图 2: C, D)。3D 打印的蕈形体实体模型最长处为 10.4 cm,最高处为 4.5 cm,最宽处为 6.5 cm,约为实际尺寸大小的 100 倍。为了展示脑内部的中央体结构,将脑模型作矢状、垂直和水平切割后进行了打印(图 2: A, B, E-J)。切割后制作的模型可将脑的切面清晰展示出来。

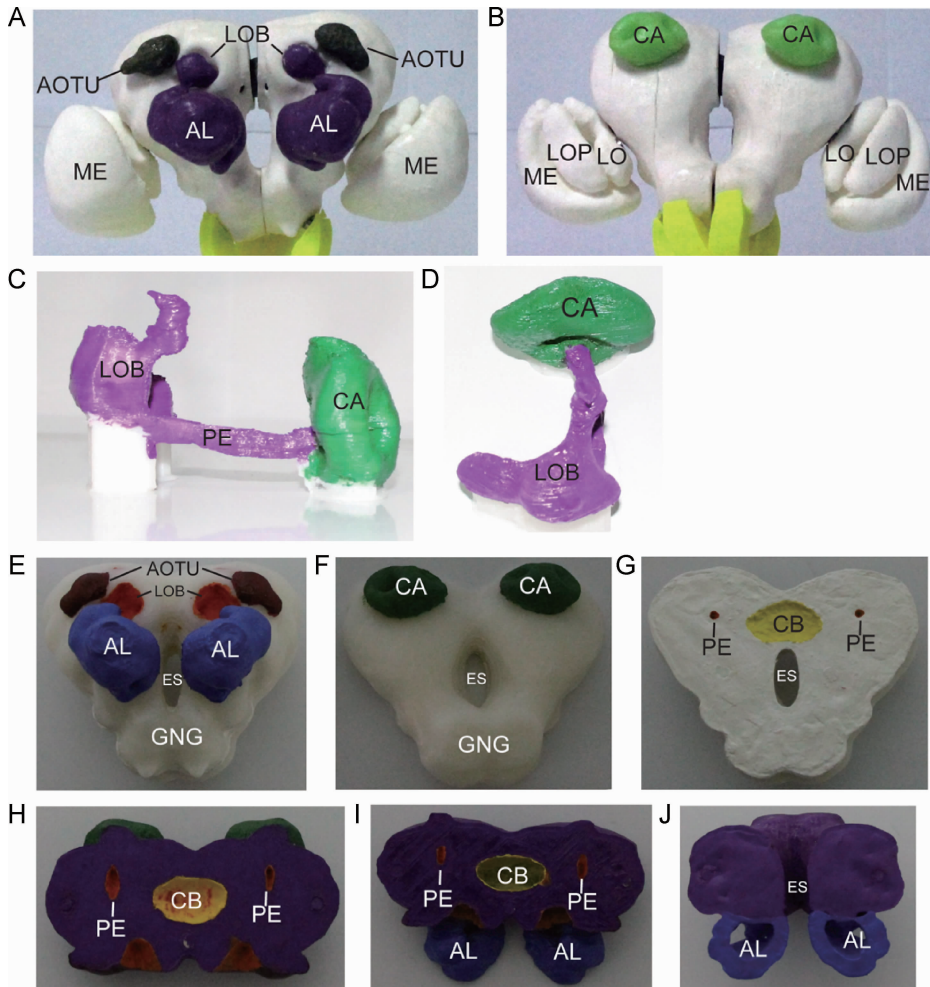


图 2 3D 打印的烟芽夜蛾雄成虫脑结构模型

Fig. 2 3D printed models of the brain structures of male adult of *Heliothis virescens*

A: 3D 打印脑正面观 Frontal view of the 3D printed brain model; B: 3D 打印脑后面观 Posterior view of the 3D printed brain model; C: 3D 打印蕈形体侧面观 Lateral view of the 3D printed mushroom body; D: 3D 打印蕈形体背面观 Dorsal view of the 3D printed mushroom body; E: 垂直切 3D 打印脑模型(无视叶)前面观 Frontal view of a vertical section of the 3D printed brain model without optic lobes; F: 垂直切 3D 打印脑模型(无视叶)后面观 Posterior view of a vertical section of the 3D printed brain model without optic lobes; G: 垂直切 3D 打印脑模型(无视叶)截面 A vertical section of the 3D printed brain model without optic lobes; H-J: 不同深度水平切 3D 打印脑模型(无视叶)截面 Horizontal sections of the 3D printed brain model without optic lobes at different depths. AL: 触角叶 Antennal lobe; AOTU: 前视结节 Anterior optic tubercle; CA: 蕈形体冠 Mushroom body calyx; CB: 中央体 Central body; ES: 食道 Esophagus; GNG: 颚神经节 Gnathal ganglion; LO: 视小叶 Lobula; LOB: 蕈形体叶 Mushroom body lobe; LOP: 视小叶板 Lobula plate; ME: 视髓 Medulla; PE: 蕈形体柄 Mushroom body pedunculus.

表 1 昆虫脑模型大小

Table 1 Sizes of insect brain models

昆虫 Insect species	数字化三维模型 Digitalized three-dimensional model			3D 打印模型 3D printed model			放大倍数 Magnification (-fold)
	长(μm) Length	高(μm) Height	宽(μm) Width	长(cm) Length	高(cm) Height	宽(cm) Width	
	烟芽夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	1 312	699	609	15.7	7.7	
黑腹果蝇(半个脑) <i>Drosophila melanogaster</i> (a half brain)	324	278	161	16.6	16.2	8.8	~500
西方蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	1 861	874	472	15.3	6.2	4.5	~90
沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	2 886	1225	699	14.5	6.3	3.5	~50

2.3 黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗脑模型的3D打印

黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗数字化脑模型
的尺寸大小分别以500, 90和50倍放大进行3D打

印, 获得实体脑模型[表1; 数字模型图3(A1, A2, B1, B2, C1, C2); 实体模型图3(A3, A4, B3, B4, C3, C4)]。多种昆虫脑实体模型的制作为比较不同

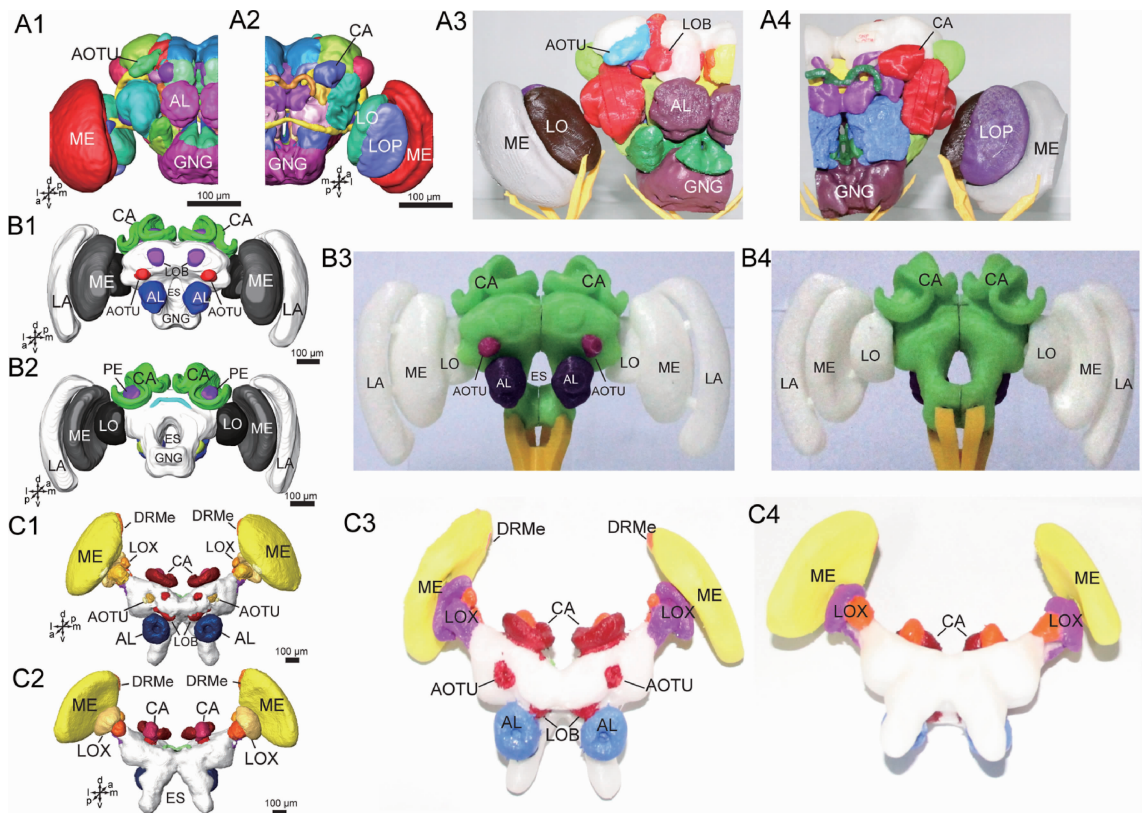


图3 黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗数字化脑三维模型和3D打印脑模型

Fig. 3 Digitalized three-dimensional and 3D printed brain models of *Drosophila melanogaster*,*Apis mellifera* and *Schistocerca gregaria*

A1: 黑腹果蝇数字化脑模型前面观 Frontal view of the digitalized three-dimensional brain model of *D. melanogaster*; A2: 黑腹果蝇数字化脑模型后面观 Posterior view of the digitalized three-dimensional brain model of *D. melanogaster*; A3: 黑腹果蝇3D打印脑模型前面观 Frontal view of the 3D printed brain model of *D. melanogaster*; A4: 黑腹果蝇3D打印脑模型后面观 Posterior view of the 3D printed brain model of *D. melanogaster*; B1: 西方蜜蜂数字化脑模型前面观 Frontal view of the digitalized three-dimensional brain model of *A. mellifera*; B2: 西方蜜蜂数字化脑模型后面观 Posterior view of the digitalized three-dimensional brain model of *A. mellifera*; B3: 西方蜜蜂3D打印脑模型前面观 Frontal view of the 3D printed brain model of *A. mellifera*; B4: 西方蜜蜂3D打印脑模型后面观 Posterior view of the 3D printed brain model of *A. mellifera*; C1: 沙漠蝗数字化脑模型前面观 Frontal view of the digitalized three-dimensional brain model of *S. gregaria*; C2: 沙漠蝗数字化脑模型后面观 Posterior view of the digitalized three-dimensional brain model of *S. gregaria*; C3: 沙漠蝗3D打印脑模型前面观 Frontal view of the 3D printed brain model of *S. gregaria*; C4: 沙漠蝗3D打印脑模型后面观 Posterior view of the 3D printed brain model of *S. gregaria*. AL: 触角叶 Antennal lobe; AOTU: 前视结节 Anterior optic tubercle; CA: 蕈形体冠 Mushroom body calyx; CB: 中央体 Central body; DRMe: 背侧视神经 Dorsal rim area of the medulla; ES: 食道 Esophagus; GNG: 颞神经节 Gnathal ganglion; LA: 视神经节层 Lamina; LO: 视小叶 Lobula; LOB: 蕈形体叶 Mushroom body lobe; LOP: 视小叶板 Lobula plate; LOX: 视小叶复合体 Lobula complex; ME: 视髓 Medulla; PE: 蕈形体柄 Mushroom body pedunculus. 方位 Directions: a: 前向 Anterior; d: 背向 Dorsal; l: 侧面 Lateral; m: 内侧 Medial; p: 后向 Posterior; v: 腹面 Ventral.

昆虫结构的异同提供了便利工具。由于果蝇是科研模式昆虫,具有强大而便捷的遗传工具,使得果蝇脑的解剖结构也得到了深入的研究,昆虫前脑内很多未知区域在果蝇内也得到解析(图 3:A)。为了便于比较不同昆虫脑结构的异同,在此项研究中,我们仅关注几个研究比较清晰的结构,即触角叶、蕈形体、前视结节、视叶和颞神经节。果蝇脑与烟芽夜蛾的脑相似,颞神经节与脑融合,成为脑的一部分。触角叶位于脑的最前端,呈球形。蕈形体叶位于脑前端,而蕈形体冠位于脑后端。前视结节位于前脑上方前端。视叶位于前脑两侧,其内部的视髓、视小叶和视小叶板 3 个结构清晰可见,且形态和排列方式与烟芽夜蛾的也类似。

蜜蜂的颞神经节与脑也紧密融合(图 3:B)。但脑的结构与烟芽夜蛾和果蝇的均有显著差异。最为显著的是蕈形体(图 3:B),其冠位于前脑顶端,覆盖整个前脑中间部分,几近占整个中间脑的 1/3。其次是视叶,视叶内部没有视小叶板结构,但视叶的最外层,即视神经节层(图 3:B),结构清晰。而烟芽夜蛾突触蛋白免疫染色未能呈现其视神经节层,在果蝇和蝗虫脑中也有类似现象,所以烟芽夜蛾、黑腹果蝇和蝗虫 3 种昆虫的脑模型中未包括视神经节层结构(图 1; 3:A, C)。

沙漠蝗的脑与颞神经节没有融合,其较粗的食道将脑和颞神经节分割开来(图 3:C),这一点与烟芽夜蛾、果蝇和蜜蜂显著不同。另外,蝗虫视叶位于前脑两侧上方,其视髓发达,视小叶形成复合体结构(lobula complex, LOX),包括多个亚结构。在视髓的上方内侧,具有一个较小结构,为背侧缘视髓(dorsal rim area of the medulla, DRMe),在其他昆虫中尚未发现该结构。蝗虫的蕈形体冠位于前脑的顶端,但为单个杯状结构。蜜蜂的蕈形体冠为两个杯状结构,烟芽夜蛾和果蝇的蕈形体冠为两个杯状结构,但两杯相接的地方杯壁融合在一起(图 1:D, F; 图 3:A, B)。

3 讨论

利用突触蛋白抗体免疫组织化学染色的方法,成功染色标记了雄性烟芽夜蛾的脑解剖结构,构建了脑及内部结构的三维数字化模型,并利用 3D 打印技术将三维数字化模型进行打印,制作了实体脑模型。我们首次将 3D 打印技术引入昆虫脑解剖结构的研究。我们进一步利用 3D 打印技术制作了黑

腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗的脑实体模型。黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗均为科研模式昆虫,并来自不同昆虫类群,具有代表意义。其中蝗虫也是昆虫学教学中常用代表性昆虫。烟芽夜蛾、黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗 3D 打印脑模型的制作,为昆虫脑科学研究和教学提供便利工具。这些模具大小适中,可以放在手中,任意旋转,从不同角度观察,方便对昆虫脑不规则结构的形态、位置 and 空间关系进行观察,也便于比较不同昆虫脑结构异同,加深对脑结构和功能及其演化的认知。此外,3D 打印技术也让模型制作从以前的工厂模具车间走进普通实验室。只要配置一台 3D 打印机,获得标本结构的数字参数,就可以在一个几平方米的实验室内完成 3D 模型打印,该技术克服了常规制作标本模具的高成本和复杂工序的缺点。在昆虫学研究中,任何昆虫的任何器官,只要拥有数据都可以在 3D 打印机中打印出来,这成果将对我们的昆虫学教学、科研和科普具有较好的促进作用。

烟芽夜蛾、黑腹果蝇和西方蜜蜂的脑和颞神经节完全融合,而沙漠蝗的脑和颞神经节并未融合,而由围咽神经索连接起来(Kurylas *et al.*, 2008)。昆虫脑和颞神经节的融合是长期演化的结果,但其原因和机制尚不清楚。脑和颞神经节的融合与否可能跟昆虫食道粗细相关。烟芽夜蛾和黑腹果蝇为吸收式口器,取食液体食物,食道较细,围食道神经连索缩短或消失,食道上下脑和颞神经节融合。西方蜜蜂的口器为嚼吸式,取食液体或细小固体食物,食道也较细。而蝗虫为咀嚼式口器,取食固体食物,食道较粗,围食道神经连索较长,脑和颞神经节分离。鳞翅目棉铃虫幼虫和茶尺蠖幼虫均属咀嚼式口器类群,幼虫的脑和颞神经节也分离(汤清波等, 2014; 谢桂英等, 2016a)。颞神经节是昆虫脑味觉中枢,包括上颞神经髓、下颞神经髓和下唇神经髓,分别接收和处理上颞、下颞和下唇等器官感受的信息(Tyrer and Gregory *et al.*, 1982; Rehder, 1989; Ito *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2014)。不同昆虫的颞神经节结构相似,这可能与不同昆虫的所取食食物的基本成分相似有关。不过,口器退化的昆虫颞神经节是否也会退化或者结构发生变化,目前尚不清楚。

烟芽夜蛾、黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗的触角叶、视叶和蕈形体等主要脑结构之间也存在明显的差异。触角叶为昆虫脑的嗅觉初级中枢,负责处理昆虫感知的化学气味信息(赵新成等, 2015)。烟芽夜蛾为夜蛾科昆虫,主要依赖于化学通讯实现雌雄

识别和寄主定位,所以烟芽夜蛾的触角叶相对较大,占主要神经髓结构的 16%,而黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗的仅为 9% 左右(Wei *et al.*, 2010)。通常,昆虫触角叶包含许多神经纤维球,1 个纤维球接收来自表达 1 种气味受体的嗅觉感受神经元,即遵守“1 个气味受体 1 个纤维球”气味编码的基本原则(Couto *et al.*, 2005)。所以气味受体决定触角叶神经纤维球的数量、大小、形状等。不同类群、不同性别的昆虫感受气味种类和数量不等,所以神经纤维球的数量、大小也不等。比如黑腹果蝇约有 60 种气味受体,50 多个纤维球,而西方蜜蜂具有 163 个气味受体,160 余个纤维球(Galizia *et al.*, 1999; Laissue *et al.*, 1999; Vosshall *et al.*, 2000; Robertson and Wanner, 2006)。雄性蛾类昆虫触角表达大量的性信息素受体,对应的在雄性触角叶具有几个巨大的神经纤维球感受性信息素成分(Berg *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2011),比如烟芽夜蛾的触角叶具有扩大型的神经纤维球,而雌性的没有(Kvello *et al.*, 2009)。但是,蝗虫的触角叶内具有 1 000 ~ 3 000 个纤维球,而触角只有 140 个气味受体,这可能说明蝗虫触角叶对气味的编码机制具有特异性,与其他昆虫存在差异(Ignell *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2015)。

视叶为昆虫的视觉中枢,负责处理昆虫感知的光、颜色、形状和运动等信息(Borst, 2009)。烟芽夜蛾、黑腹果蝇、西方蜜蜂和沙漠蝗的复眼都较大,相应的其视叶也都较大。昆虫视叶主要包括视神经节层、视髓、视小叶和视小叶板等神经髓。但不同昆虫的视叶结构组成具有差异,如烟芽夜蛾和黑腹果蝇具有视小叶板,而西方蜜蜂和沙漠蝗没有视小叶板结构。视小叶板内具有处理动感信息的神经元(Borst, 2009),但烟芽夜蛾、黑腹果蝇处理动感信息的机制与西方蜜蜂和沙漠蝗的是否有差异,有何差异,尚不清楚。沙漠蝗的视小叶由多个亚结构组成(Kurylas *et al.*, 2008),这说明蝗虫的视觉信息处理可能更为复杂。沙漠蝗具有群体远距离迁飞的习性。沙漠蝗视髓的内侧上方还具有缘状突起,可感知天空中偏振光信息,为迁飞定向导航(Homberg *et al.*, 2011)。水生豉甲 *Dineutus sublineatus* 具有上下两个复眼,同时观察水面上、下的情景,其视叶也分裂为上下两部分,与复眼的分裂相对应(Lin and Strausfeld, 2013)。

蕈形体为昆虫脑的学习中枢,接收和整合嗅觉、味觉和视觉等信息,形成联系性学习和记忆

(Menzel, 2001)。蕈形体包括蕈形体冠、柄和叶,主要由蕈形体内源细胞 Kenyon 神经元及与不同感觉区域相联系的传入、传出神经元构成。Kenyon 神经元数量和蕈形体结构的大小及复杂程度与学习能力相关。西方蜜蜂具有 340 000 个 Kenyon 神经元,约占所有脑神经元的 33%,而蕈形体体积约占整个脑体积的 25%(Fahrbach, 2006; Wei *et al.*, 2010),而蛾和蝶类昆虫仅具有 4 000 个 Kenyon 神经元,约占所有脑神经元的 0.4%,蕈形体体积仅占脑体积的 5% 左右(Sjöholm *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2010; Heinze and Reppert, 2012; 陈秋燕等 2016)。西方蜜蜂是社会性昆虫,营集群生活,个体间具有协同分工。西方蜜蜂的学习能力较强。黑腹果蝇的蕈形体具有 5 000 个 Kenyon 神经元,约占所有脑神经元的 5%,比例较高,所以果蝇的学习能力也较强(Fahrbach, 2006; Chiang *et al.*, 2011)。蕈形体冠是 Kenyon 神经元树突与传入神经元形成突触联系的地方,通常,分为中心冠和外侧冠 2 部分。西方蜜蜂的中心冠和外侧冠两冠又分为领(collar)、唇(lib)和基环(basal ring)3 部分(Fahrbach, 2006)。其中领负责视觉信息,唇负责嗅觉信息。烟芽夜蛾和黑腹果蝇的蕈形体冠也具有中心冠和外侧冠 2 部分,但两冠邻接的地方融合在一起(Rein *et al.*, 2002; Kvello *et al.*, 2009)。Kenyon 神经元的轴突汇聚形成蕈形体柄,轴突在蕈形体柄末端分叉形成蕈形体叶的垂直叶 α 和水平叶 β (Fahrbach, 2006)。西方蜜蜂垂直叶还具有 γ 叶,黑腹果蝇水平叶中还具有 γ 叶(Fahrbach, 2006),而鳞翅目昆虫,如烟芽夜蛾和君主班蝶等垂直叶和水平叶都具有 γ 叶(Rø *et al.*, 2007; Heinze and Reppert, 2012; 陈秋燕等 2016)。在鳞翅目昆虫中,蕈形体叶中还具有 Y 叶和 Y 束(Rø *et al.*, 2007; Heinze and Reppert, 2012; 陈秋燕等, 2016)。研究表明黑腹果蝇的蕈形体 α 叶和 β 叶负责长时程记忆,而 γ 叶负责短时程记忆(Dubnau and Chiang, 2013)。昆虫学习与神经突触的可塑性有关,突触的可塑性随昆虫年龄和经历会发生变化(Groh *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017)。最近研究发现,负责视觉学习的结构领,其内部的突触联系的密度随学习强度增加而增多(Li *et al.*, 2017)。

昆虫脑是调控昆虫行为和生理活动的神经中枢(Chapman, 1998)。不同的昆虫,生境不同,生存策略可能不同,其对应的感知系统也不尽相同。其中味觉、视觉和嗅觉以及不同感觉之间的整合与联系是昆虫生存和繁衍主要依赖的感觉系统。所以味觉

中枢、视觉中枢、嗅觉中枢以及学习和记忆中枢等脑结构,在适应不同的生境和生存策略中也发生适应性变化,以实现行为和生理过程的神经调控功能的协调。研究和认识昆虫脑解剖结构,对理解昆虫结构功能和演化具有重要的意义。我们的研究结果拓展了对昆虫脑结构的认识,并为进一步脑科学的研究和教学提供了便利的模具。

致谢 挪威科技大学 (Norwegian University of Science and Technology) 的 Bente G. Berg 教授在免疫染色标记和 AMIRA 软件使用方面提供帮助,德国马尔堡大学的 (Philipps-Universität Marburg) Uwe Homberg 教授提供沙漠蝗的脑数字化三维模型文件,日本东京大学 (The University of Tokyo) 的 Kei Ito 教授和德国柏林自由大学 (Free University of Berlin) 的 Randolph Menzel 教授提供网络共享的脑模型数据,在此一并表示感谢。

参考文献 (References)

- Berg BG, Almaas TJ, Bjaalie JG, Mustaparta H, 1998. The macrogglomerular complex of the antennal lobe in the tobacco budworm moth *Heliothis virescens*: specified subdivision in four compartments according to information about biologically significant compounds. *J. Comp. Physiol. A*, 183(6): 669–682.
- Borst A, 2009. *Drosophila*'s view on insect vision. *Curr. Biol.*, 19(1): R36–R47.
- Brandt R, Rohlfing T, Rybak J, Krofczik S, Maye A, Westerhoff M, Hege HC, Menzel R, 2005. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. *J. Comp. Neurol.*, 492(1): 1–19.
- Chapman RF, 1998. *The Insects: Structure and Function*. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 533–569.
- Chen QY, Wu X, Tang QB, Xie GY, Zhao XC, 2016. Anatomical organization and three-dimensional reconstruction of the brain in adult *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(1): 33–46. [陈秋燕, 吴晓, 汤清波, 谢桂英, 赵新成, 2016. 烟青虫成虫脑结构解剖和三维模型构建. *昆虫学报*, 59(1): 33–46]
- Chiang AS, Lin CY, Chuang CC, Chang HM, Hsieh CH, Yeh CW, Shih CT, Wu JJ, Wang GT, Chen YC, Wu CC, Chen GY, Ching YT, Lee PC, Lin CY, Lin HH, Wu CC, Hsu HW, Huang YA, Chen JY, Chiang HJ, Lu CF, Ni RF, Yeh CY, Hwang JK, 2011. Three-dimensional reconstruction of brain-wide wiring networks in *Drosophila* at single-cell resolution. *Curr. Biol.*, 21(1): 1–11.
- Chiang AS, Liu YC, Chiu SL, Hu SH, Huang CY, Hsieh CH, 2001. Three-dimensional mapping of brain neuropils in the cockroach, *Diploptera punctata*. *J. Comp. Neurol.*, 440(1): 1–11.
- Couto A, Alenius M, Dickson BJ, 2005. Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr. Biol.*, 15(17): 1535–1547.
- Dreyer D, Vitt H, Dippel S, Goetz B, El Jundi B, Kollmann M, Huetteroth W, Schachtner J, 2010. 3D standard brain of the red flour beetle *Tribolium castaneum*: a tool to study metamorphic development and adult plasticity. *Front. Syst. Neurosci.*, 4: 3.
- Dubnau J, Chiang AS, 2013. Systems memory consolidation in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 23(1): 84–91.
- El Jundi B, Huetteroth W, Kurylas AE, Schachtner J, 2009. Anisometric brain dimorphism revisited: implementation of a volumetric 3D standard brain in *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.*, 517(2): 210–225.
- Fahrbach SE, 2006. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. *Annu. Rev. Entomol.*, 51(1): 209–232.
- Galizia CG, McIlwraith SL, Menzel R, 1999. A digital three-dimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired by confocal microscopy. *Cell Tissue Res.*, 295(3): 383–394.
- Groh C, Lu Z, Meinertzhagen IA, Rössler W, 2012. Age-related plasticity in the synaptic ultrastructure of neurons in the mushroom body calyx of the adult honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.*, 520(15): 3509–3527.
- Heinze S, Reppert SM, 2012. Anatomical basis of sun compass navigation I: the general layout of the monarch butterfly brain. *J. Comp. Neurol.*, 520(8): 1599–1628.
- Homberg U, Heinze S, Pfeiffer K, Kinoshita M, El Jundi B, 2011. Central neural coding of sky polarization in insects. *Phil. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 366(1565): 680–687.
- Ignell R, Anton S, Hansson BS, 2001. The antennal lobe of Orthoptera – anatomy and evolution. *Brain Behav. Evol.*, 57(1): 1–17.
- Immonen EV, Dacke M, Heinze S, El Jundi B, 2017. Antatomical organization of the brain of a diurnal and a nocturnal dung beetle. *J. Comp. Neurol.*, 525(8): 1879–1908.
- Ito K, Shinomiya K, Ito M, Armstrong JD, Boyan G, Hartenstein V, Harzsch S, Heisenberg M, Homberg U, Jenett A, Keshishian H, Restifo LL, Rössler W, Simpson JH, Strausfeld NJ, Strauss R, Vosshall LB, Insect Brain Name Working Group, 2014. A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, 81(4): 755–765.
- Kurylas AE, Rohlfing T, Krofczik S, Jenett A, Homberg U, 2008. Standardized atlas of the brain of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res.*, 333(1): 125–145.
- Kvello P, Löfaldli BB, Rybak J, Menzel R, Mustaparta H, 2009. Digital, three-dimensional average shaped atlas of the *Heliothis virescens* brain with integrated gustatory and olfactory neurons. *Front. Syst. Neurosci.*, 3: 14.
- Laius PP, Reiter C, Hiesinger PR, Halter SH, Fischbach KF, Stocker RF, 1999. Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.*, 405(4): 543–552.
- Li L, MaBouDi H, Egertová M, Elphick MR, Chittka L, Perry CJ, 2017. A possible structural correlate of learning performance on a colour discrimination task in the brain of the bumblebee. *Proc. R.*

- Soc. B.*, 284(1864): 20171323.
- Lin C, Strausfeld NJ, 2013. A precocious adult visual center in the larva defines the unique optic lobe of the spilt-eyed whirligig beetle *Dineutus sublineatu*. *Front. Zool.*, 10(1): 7.
- Lu BH, Li DC, 2013. Development of the additive manufacturing (3D printing) technology. *Machine Build. Automat.*, 42(4): 1–4. [卢秉恒, 李涤尘, 2013. 增材制造(3D打印)技术发展. *机械制造与自动化*, 42(4): 1–4]
- Menzel R, 2001. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn. Mem.*, 8(2): 53–62.
- Montgomery SH, Merrill RM, 2017. Divergence in brain composition during the early stages of ecological specialization in *Heliconius* butterflies. *J. Evol. Biol.*, 30(3): 571–582.
- Montgomery SH, Ott SR, 2015. Brain composition in *Godyris zavaleta*, a diurnal butterfly, reflects an increased reliance on olfactory informations. *J. Comp. Neurol.*, 523(6): 869–891.
- Rehder V, 1989. Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the suboesophageal ganglion of the honey bee. *J. Comp. Neurol.*, 279(3): 499–513.
- Rein K, Zöckler M, Mader MT, Grübel C, Heisenberg M, 2002. The *Drosophila* standard brain. *Curr. Biol.*, 12(3): 227–231.
- Rø H, Müller D, Mustaparta H, 2007. Anatomical organization of antennal lobe projection neurons in the moth *Heliothis virescens*. *J. Comp. Neurol.*, 500(4): 658–675.
- Robertson HM, Wanner KW, 2006. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Res.*, 16(11): 1395–1403.
- Sjöholm M, Sjñakevitch I, Ignell R, Strausfeld NJ, Hansson BS, 2005. Organization of Kenyon cells in subdivisions of the mushroom bodies of a lepidopteran insect. *J. Comp. Neurol.*, 491(3): 290–304.
- Strausfeld NJ, 2012. *Arthropod Brains: Evolution, Functional Elegance, and Historical Significance*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Tang QB, Zhan H, Berg BG, Yan FM, Zhao XC, 2014. Three dimensional reconstructions of the brain and the suboesophageal ganglion of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Acta Entomol. Sin.*, 57(5): 538–546. [汤清波, 詹欢, Berg BG, 闫凤鸣, 赵新成, 2014. 棉铃虫幼虫脑和咽下神经节的三维结构构建. *昆虫学报*, 57(5): 538–546]
- Tang QB, Zhan H, Cao H, Berg BG, Yan FM, Zhao XC, 2014. Central projections of gustatory receptor neurons in the medial and the lateral sensilla styloconica of *Helicoverpa armigera* larvae. *PLoS ONE*, 9(4): e95401.
- Tyrer NM, Gregory GE, 1982. A guide to the neuroanatomy of locust suboesophageal and thoracic ganglia. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 297(1085): 91–123.
- Vosshall LB, Wong AM, Axel R, 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*, 102(2): 147–159.
- Wang G, Vásquez GM, Schal C, Zwiebel LJ, Gould F, 2011. Functional characterization of pheromone receptors in the tobacco budworm *Heliothis virescens*. *Insect Mol. Biol.*, 20(1): 125–133.
- Wang Z, Yang P, Chen D, Jiang F, Li Y, Wang X, Kang L, 2015. Identification and functional analysis of olfactory receptor family reveal unusual characteristics of the olfactory system in the migratory locust. *Cell. Mol. Life Sci.*, 72(22): 4429–4443.
- Wei H, El Jundi B, Homberg U, Stengl M, 2010. Implementation of pigment-dispersing factor-immunoreactive neurons in a standardized atlas of the brain of the cockroach *Leucophaea maderae*. *J. Comp. Neurol.*, 518(20): 4113–4133.
- Xie GY, Chen JH, Tang QB, Yin J, Zhao XC, 2016a. Anatomical structure of the brain of larval *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(8): 831–838. [谢桂英, 陈俊华, 汤清波, 尹健, 赵新成, 2016a. 茶尺蠖幼虫脑的解剖结构. *昆虫学报*, 59(8): 831–838]
- Xie GY, Zhao XC, Guo P, Chen QY, Wu GL, Li GP, Feng HQ, 2016b. Anatomical structure of the central nervous system of *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(4): 446–455. [谢桂英, 赵新成, 郭培, 陈秋燕, 吴国良, 李国平, 封洪强, 2016b. 绿盲蝽中枢神经系统的解剖结构. *昆虫学报*, 59(4): 446–455]
- Zhao XC, Chen QY, Guo P, Xie GY, Tang QB, Guo XR, Berg BG, 2016. Glomerular identification in the antennal lobe of the male moth *Helicoverpa armigera*. *J. Comp. Neurol.*, 524(15): 2993–3013.
- Zhao XC, Zhai Q, Wang GR, 2015. The structure of the antennal lobe in insects. *Acta Entomol. Sin.*, 58(2): 190–209. [赵新成, 翟卿, 王桂荣, 2015. 昆虫触角叶的结构. *昆虫学报*, 58(2): 190–209]

(责任编辑: 赵利辉)