

四种鲤科鱼肠道中高血糖素免疫活性 内分泌细胞的研究

潘黔生 方之平 廖瑞林¹⁾

(华中农业大学水产系, 武汉 430070)

提 要

应用过氧化物酶抗过氧化物酶(PAP)免疫组织化学技术,用4种哺乳动物中培育出的抗血清对草鱼、青鱼、鲤和翘嘴红鲌4种鲤科鱼的肠内分泌细胞进行免疫、组织化学的鉴别和定位。证实了高血糖素免疫活性内分泌细胞在草鱼整个肠道中均呈阳性反应;在鲤、青鱼前肠中仅有少量阳性反应;在翘嘴红鲌肠道中未见阳性反应。胃蛋白酶原(Pepsinogen)、凝乳酶(Prochymosin)和神经特异烯醇酶(Neuron specific enolase)3种抗血清在4种鱼的肠道中均未发现阳性反应。本文重点描述草鱼高血糖素免疫活性内分泌细胞在肠道各段的分布,密度及其形态学特征,还就其可能的生理功能与草食性哺乳动物胃肠道中该类内分泌细胞进行比较和讨论。

关键词 鲤科鱼,高血糖素免疫活性内分泌细胞,肠内分泌细胞,免疫组织化学

对哺乳动物胃肠胰(GEP)内分泌系统已进行了广泛的研究并且已鉴别出18种类型的内分泌细胞及激素^[7,9,12,13,17]。由于鱼类消化道中的内分泌系统几乎与哺乳动物的是一样复杂^[6,16],因而鉴别鱼类消化道中内分泌细胞的种类将是一项浩繁的工作。但是目前对鱼类胃肠道内分泌系统的知识是贫乏的。近些年来主要依靠使用哺乳动物激素培育出的抗血清对一些鱼类进行了几种免疫组织化学的研究,发现了多种内分泌细胞^[6]。我们曾使用PAP法在草鱼的肠道中发现了胃泌素、抑胃多肽、高血糖素样免疫反应物、亮氨酸脑啡肽、P物质和牛胰多肽等6种免疫活性内分泌细胞^[11]。并对草鱼 [*Ctenopharyngodon idellus*]、鲤 (*Cyprinus carpio*)、青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 和翘嘴红鲌 (*Erythroculter ilishaeformis*) 四种鱼的肠道胃泌素免疫活性内分泌细胞进行了免疫组织化学定位及比较的研究^[11]。本实验在以上研究的基础上又使用高血糖素、胃蛋白酶原、凝乳酶和神经特异烯醇酶4种抗血清对以上4种鲤科鱼的肠内分泌细胞进行了免疫组织化学的鉴别和定位的研究。证实了草鱼、鲤、青鱼肠道中高血糖素免疫活性内分泌细胞的存在与分布,为今后对鱼类胃肠胰内分泌系统及鱼类内分泌学的研究提供较可靠的资料。并试从内分泌学的角度为研究鱼类的食性、摄食行为等方面提供理论依据。

国家自然科学基金资助项目。

1) 现在成都市水产技术推广站工作。

1988年7月6日收到。

材 料 和 方 法

取材 1986年5—9月于武昌南湖渔场,取全长为35—45cm的草鱼8尾、鲤5尾、青鱼5尾,30—35cm的翘嘴红鲌4尾。鲜活时取出整个肠道,并按前肠前段、前肠后段、中肠、后肠前段、直肠5个部位取材,立即入 Bouin 液中固定24h,经一系列乙醇脱水,二甲苯透明之后在54℃石蜡中包埋,切片5 μm 。

抗血清及主要药品 (1)兔抗高血糖素血清,工作浓度1:500。由北京农业大学兽医学院提供;(2)兔抗胃蛋白酶原血清,瑞典 A. Andren 公司产品。工作浓度1:2000;(3)兔抗凝乳酶血清,瑞典 A. Andren 公司产品。工作浓度1:2000;(4)兔抗神经烯醇酶血清,丹麦 DAKO 公司产品。工作浓度1:1000;(5)羊抗兔 IgG 血清,丹麦 DAKO 公司产品。工作浓度1:100;(6)PAP 复合物(用兔制作的),丹麦 DAKO 公司产品。工作浓度1:500;以上抗血清和药品由日本带广畜产大学教授山田纯三博士提供。(7)3'3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB),日本株式会社同仁化学研究所产品。由日本群馬大学内分泌研究所井上金治博士提供;(8)正常山羊血清,工作浓度1:10。

免疫组织化学方法 切片脱蜡,各级酒精下行入水后,用 H_2O_2 -甲醇溶液(1:100)于室温中处理15min,用以消除内源性过氧化物酶活性,再以稀释后的正常山羊血清在室温中孵育30min,以消除非特异性抗体,然后滴加一抗血清于4℃中孵育16h,再滴加羊抗兔 IgG 血清,在室温中孵育0.5h,整个过程于 pH7.3 的条件下进行。接着用0.05%的 DAB 在含有0.01% H_2O_2 的0.05 mol/l Tris-HCl 缓冲液(pH7.6)条件下显色。Harris 苏木精复染,脱水,透明,封片。

在光镜下观察切片,任意取10个视野,用1/2mm接目网形测微计进行免疫活性内分泌细胞的计数。计算每平方毫米内平均出现的内分泌细胞数(平均数 $\pm$ 标准误),以此表示免疫活性内分泌细胞的分布密度。对草鱼各肠段中高血糖素的分布密度进行方差分析,并采用最小显著差数测验(LSD)法进行多重比较。

结 果

四种鲤科鱼的整个肠道对胃蛋白酶原、凝乳酶和神经特异烯醇酶3种抗血清均未发现阳性反应。对高血糖素抗血清,鲤、青鱼的前肠中可见少量阳性反应;翘嘴红鲌肠道中未见阳性反应;而草鱼的整个肠道中均可见明显的阳性反应(表1)。

高血糖素免疫活性内分泌细胞在草鱼肠道中主要分布于前肠前段,其分布密度朝尾部方向呈递减趋势。方差分析结果(表2)表明,草鱼高血糖素免疫活性内分泌细胞在各肠段中的分布密度存在极显著差异。多重比较结果(表3)表明,草鱼在前肠前段中高血糖素免疫活性内分泌细胞的分布密度比其他各肠段中的分布密度都高,差异达到统计学极显著水平;前肠后段上的分布密度比中肠上的高,差异接近显著水平,而且极显著高于后肠前段和直肠中的分布密度;中肠上的分布密度比后肠前段要高,差异不显著,但极显著高于直肠;后肠前段的分布密度与直肠中的分布密度有较大的差异,未达到显著水平。

表 1 四种鲤科鱼肠道中高血糖素免疫活性内分泌细胞的分布和出现频率

Tab. 1. Distribution and occurrence frequency of glucagon-immunoreactive endocrine cells in the gut of four cyprinids

鱼 类 Species	肠道部位 Area of the gut				
	前肠前段 Foregut anterior segment	前肠后段 Foregut posterior segment	中 肠 Midgut	后肠前段 Hindgut anterior segment	直 肠 Rectum
草 鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	64.50±6.58	43.53±3.58	30.88±3.32	21.38±5.10	9.11±4.88
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	+	±	—	—	—
青 鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	+	±	—	—	—
翘嘴红鲌 <i>Erythroculter ilishaeformis</i>	—	—	—	—	—

注: 表中数字为平均数±标准误 ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$), 单位为细胞数/mm²; +、±、— 分别代表较少、极少和未发现免疫活性内分泌细胞。

表 2 草鱼肠道中高血糖素免疫活性内分泌细胞分布密度的方差分析

Tab. 2. Analysis of variance in the distribution density of glucagon-immunoreactive endocrine cells in the gut of grass carp

变异来源 Source of variance	自 由 度 Degree of freedom	平 方 和 Sum of squares	均 方 Mean squares	F
处理 Treatments	4	14476.0786	3619.02	19.36**
误差 Error	35	6544.0913	186.97	
总变异 Total variance	39	21020.1697		

$F_{0.05(4,35)} = 2.65$; $F_{0.01(4,35)} = 3.9$.

** 为差异极显著 Difference was highly significant.

表 3 草鱼肠道中高血糖素免疫活性内分泌细胞分布密度的多重比较 (LSD 测验)

Tab. 3. Multiple comparisons (LSD) of the distribution density of glucagon-immunoreactive endocrine cells in the gut of grass carp

处 理 Treatments	平均数 Mean	64.50 - $\bar{x}_i$	43.53 - $\bar{x}_i$	30.88 - $\bar{x}_i$	21.38 - $\bar{x}_i$
前肠前段 Anterior segment of foregut	64.50				
前肠后段 Posterior segment of foregut	43.53	20.97**			
中 肠 Midgut	30.88	33.62**	12.65		
后肠前段 Anterior segment of hindgut	21.38	43.12**	22.15**	9.5	
直 肠 Rectum	9.11	55.39**	34.42**	21.77**	12.27

$LSD_{0.05} = 13.89$, $LSD_{0.01} = 18.60$.

** 为差异极显著 Difference was highly significant.

高血糖素免疫活性内分泌细胞在草鱼肠道中绝大部分分布在肠褶上部和中部(图版 I:1),肠褶基部分布极少。

草鱼肠道中高血糖素免疫活性内分泌细胞主要为开放型内分泌细胞(图版 I:3—7, 9),均具有较长的胞突。大多数胞突伸向肠腔(图版 I:2)。有些细胞体位于基膜附近(图版 I:2,5),另一些细胞体则位于肠上皮中部离基膜较远(图版 I:3,4)。前一种内分泌细胞一般具有一个较长的胞突,伸向肠腔进行腔内分泌。后者的基部往往又伸出一个胞突走向基膜或邻近细胞之间,并与伸向肠腔的胞突相对(图版 I:3,4,9)。有时则不见其伸向肠腔的胞突,而基部胞突特长,伸向基膜或邻近细胞间隙进行旁分泌(图版 I:8)。部分胞突膨大呈囊状,大小几乎与胞体相等(图版 I:4,6,7)。未见到不具胞突的椭圆形高血糖素免疫活性内分泌细胞。

讨 论

草鱼肠高血糖素免疫活性内分泌细胞是在草鱼肠道中发现的第7种内分泌细胞。其形态不像哺乳动物(如水牛)GEP内分泌系统中高血糖素免疫活性内分泌细胞的形态多样^[2]。但其最大的形态学特征是具有较发达的胞突。胞突的存在意味着不仅能将分泌物送入肠腔或邻近的细胞间隙或基膜上,同时兼有贮存激素的功能,它膨大成囊状的胞突将激素贮存于其中,伺机体需要时再排出^[1]。这与哺乳动物肠道中高血糖素免疫活性内分泌细胞的形态学特征有区别^[8,10,11]。由于所有哺乳动物的高血糖素均相同(豚鼠除外),而鱼类的略有差异^[3],因此,应用抗哺乳动物血清进行鱼类消化道免疫组织化学染色是比较困难的,因为某些哺乳动物激素培育出的抗血清对鱼类的消化道内分泌细胞不产生免疫反应。尽管如此,本实验仍然证实了4种鲤科鱼肠道中高血糖素免疫活性内分泌细胞的存在与否以及出现频率。根据荷兰学者 Rombout 对杂食性鲤科鱼贝鲃(*Barbus conchoni*)肠内分泌细胞免疫组化的研究,高血糖素免疫活性内分泌细胞主要分布在贝鲃第一肠段的肠褶中^[12],与本研究结果一致。

我们曾用 Grimelius 嗜银法对翘嘴红鲌、鲤、草鱼3种鲤科鱼肠内分泌细胞进行了检查,结果发现这3种鱼的整个肠道上均有内分泌细胞的分布^[9]。而本实验在翘嘴红鲌肠道上则出现阴性反应,这说明翘嘴红鲌肠道中的 Grimelius 嗜银阳性细胞中不包含高血糖素免疫活性内分泌细胞,但目前已发现有胃泌素免疫活性内分泌细胞的存在^[5]。鲤鱼仅在前肠中出现高血糖素免疫活性内分泌细胞,而且出现频率很低。在其前肠前段中还有胃泌素免疫活性内分泌细胞的分布^[5]。与 Grimelius 嗜银法的研究结果相对照,清楚地表明鲤鱼肠道中还有多种其他类型的内分泌细胞,这些有待进一步的研究。

用免疫荧光法在钝颌太阳鱼(*Ambloplites rupestris*)、驼背鳞鲷太阳鱼(*Lepomis gibbosus*)、金鲈(*Perca flavescens*)和雀鳝(*Lepisosteus osseus*)4种有胃硬骨鱼的胃中发现有胃蛋白酶原荧光细胞存在,肠中却没有这种荧光细胞^[14]。日本学者山田纯三在小牛的胃中发现有胃蛋白酶原和凝乳酶两种免疫活性内分泌细胞的存在^[18]。在鱼类的胃

1) 潘黔生等,1987年。三种鲤科鱼类肠道内分泌细胞的初探。中国动物学会显微与亚显微形态科学会第三届第五次学术讨论会(1987年9月,安徽屯溪)交流论文。

肠胰内分泌系统中, 目前还未见到有凝乳酶和神经特异烯醇酶免疫活性存在的报道。本研究结果在 4 种无胃硬骨鱼的肠粘膜细胞中没有发现胃蛋白酶原、凝乳酶和神经特异烯醇酶的免疫活性。对这一结果有以下几种可能的解释: 1) 鲤科鱼的肠道中不存在分泌胃蛋白酶原、凝乳酶和神经特异烯醇酶的内分泌细胞。2) 也许鱼类的肠道中存在胃蛋白酶原、凝乳酶和神经特异烯醇酶 3 种内分泌细胞, 但这 3 种哺乳动物抗血清与鱼类肠道中这 3 种类型内分泌细胞不发生免疫反应。3) 在 4 种鲤科鱼肠内分泌细胞中, 这 3 种酶的浓度处于免疫组织化学技术 (PAP 法) 的阈值之下。

分布于草鱼肠粘膜上的高血糖素免疫活性内分泌细胞是开放型的, 其顶端胞突伸向肠腔, 来自肠腔内的刺激对肠高血糖素的释放是必要的^[3]。这种细胞较集中分布于前肠前段的肠褶上部和中部, 便于准确和更快速地接受来自肠腔中的各种理化因子的刺激而发挥其生理功能。草食性哺乳动物马和羊的消化道中高血糖素免疫活性内分泌细胞在胃中的分布密度最大^[8,10]。草鱼无胃但其前肠膨大, 兼有贮存和消化吸收食物的功能, 具有类似哺乳动物胃的作用。就马、羊、草鱼胃肠道高血糖素免疫活性内分泌细胞的分布特点来看似乎也可说明这一点。由于高血糖素具有松弛平滑肌的作用^[3], 肠中未消化的食物有可能通过刺激肠中高血糖素的释放, 使食物推进速度减慢, 在肠中滞留较长的时间, 以利消化吸收。

草鱼能以简单结构的消化道进行草料的消化吸收, 堪与具有完整而复杂的消化道结构的牛、马、羊等相比, 而且草鱼对优质青草的利用率和能量转换率高于草食性家畜^[4], 除了某些生理因素外, 内分泌细胞在肠粘膜中的大量存在很可能发挥一定的作用。高血糖素内分泌细胞在人和哺乳动物胃肠道中的作用是多方面的^[3], 而在鱼类消化道中的作用有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 方之平、山田纯三、潘黔生, 1988。草鱼肠道内分泌细胞中肽激素的免疫组织化学定位。华中农业大学学报, 7(2): 169—175。
- [2] 方之平、李克平, 1988。水牛胃肠胰 (GEP) 内分泌系统中高糖素免疫反应细胞的分布及形态学研究。华中农业大学学报, 7(1): 85—89。
- [3] 王志钧等, 1985。胃肠激素。科学出版社。
- [4] 雷慧僧等, 1981。池塘养鱼学。上海科学技术出版社。
- [5] 潘黔生、方之平, 1988。四种鲤科鱼肠道中胃泌素免疫活性细胞的免疫组织化学定位及比较。华中农业大学学报, 7(3): 238—242。
- [6] 潘黔生、方之平, 1988。鱼类胃肠胰 (GEP) 内分泌细胞研究的进展。华中农业大学学报, 7(4): 384—389。
- [7] Buchan, A. M. J. and Polak, J. M., 1980. The classification of the human gastroenteropancreatic endocrine cells. *Investigation of Cell Pathology*, 3: 51—71.
- [8] Calingasan, N. Y., Kitamura, N., Yamada, J., Oomori, Y. and Yamashita, T., 1984. Immunocytochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine cells of the sheep. *Acta Anatomica*, 118: 171—180.
- [9] Grube, D. and Forssmann, W. G., 1979. Morphology function of enteroendocrine cells. *Hormonology Research*, 11: 589—606.
- [10] Kitamura, N., Yamada, J., Calingasan, N. Y. and Yamashita, T., 1984. Immunocytochemical distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the horse. *Equine Vet. J.*, 16(2): 103—107.
- [11] Kitamura, N., Yamada, J., Calingasan, N. Y., Yamashita, T., 1985. Histologic and immunocytochemical study of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the cow and calf. *Am. J. Vet. Res.*, 46(6): 1381—1386.
- [12] Noorden, S van and Polak, J. M., 1980. Hormones of the alimentary tract. In: Barrington EJW(ed) *Hormones and evolution*. Academic Press, New York, pp. 791—828.

- [13] Polak, J. M. and Bloom, S. E., 1980. Neural and cellular origin of gastrointestinal hormonal peptides in health and disease. In: Jerzy Glass GB(ed) *Gastrointestinal hormones*. Raven Press, New York, pp. 19—51.
- [14] Reifel, C. W., Marin-Sorensen, M. and Samloff, I. M., 1985. Cellular localization of pepsinogens by immunofluorescence in the gastrointestinal tracts from four species of fish. *Canadian Journal of Zoology*, **63** (7): 1692—1694.
- [15] Rombout, J. H. W. M. and Reinecke, M., 1984. Immunohistochemical localization of (neuro-) peptide hormones in endocrine cells and nerves of the gut of a stomachless teleost fish, *Barbus conchoni* (Cyprinidae). *Cell and Tissue Research*, **237**: 57—65.
- [16] Rombout, J. H. W. M., Grinten, van der C. P. M., Peeze Binkherst, F. M. Taverne-Thiele, J. J. and Schooneveld, H., 1986. Immunocytochemical identification and localization of peptide hormones in the gastro-entero-pancreatic(GEP) endocrine system of the mouse and a stomachless fish, *Barbus conchoni*. *Histochemistry*, **84**: 471—483.
- [17] Solcia, E., Capells, C., Buffa, R., Frigerio, B., Usellini, L. and Fiocca, R., 1980. Morphological and functional classification of endocrine cells and related growth in the gastrointestinal tract. In: Jerzy Glass GB (ed) *Gastrointestinal hormones*. Raven press, New York, pp. 1—17.
- [18] Yamada, J., Andren, A., Kitamura, N. and Yamashita, T., 1988. Electron immunocytochemical Co-localization of prochymosin and pepsinogen in chief cells, mucous neck cells and transitional mucous neck/chief cells of the calf fundic glands. *Acta Anatomica*, **132**: 246—252.

STUDY ON GLUCAGON-IMMUNOREACTIVE ENDOCRINE CELLS IN THE GUT OF FOUR CYPRINID FISHES

Pan Qiansheng Fang Zhiping and Liao Ruilin

(Department of Fishery, Central China Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract

By using the peroxidase-antiperoxidase (PAP) immunohistochemical technique, 4 kinds of antisera raised against mammalian hormones were used for immunohistochemical identification and localization of endocrine cells in the gut of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), black carp (*Mylopharyngodon piceus*), common carp (*Cyprinus carpio*), and culter fish (*Erythroculter ilishaeformis*). Positive reactions of glucagon-immunoreactive endocrine cells were proved in the whole gut of grass carp (*C. idellus*). There were only weak positive reactions in the foregut of common carp (*C. carpio*) and black carp (*M. piceus*). No positive reactions could be found in the gut of culter fish (*E. ilishaeformis*). However, only negative reactions were obtained with antisera against pepsinogen, prochymosin and neuron specific esterase in the gut of the 4 cyprinids. In the present paper, the distribution, density and morphological characteristics of glucagon-immunoreactive endocrine cells in different segments of the gut of grass carp (*C. piceus*) were described in detail. The possible physiological functions of the glucagon enteroendocrine cells were discussed and compared with those of glucagon endocrine cells in the gastrointestinal tract of herbivorous mammals.

Key words

Cyprinids, Glucagon-immunoreactive endocrine cells, Enteroendocrine cells, Immunohistochemistry



1. 草鱼高血糖素免疫活性内分泌细胞分布于肠褶的中、上部(箭头), GL——肠腔, $\times 187.6$; 2. 开放型内分泌细胞, 示胞突伸向肠腔(箭头), GL (肠腔), $\times 92.8$; 3. 胞体位于肠上皮中部, 两端均具胞突的内分泌细胞, 示伸向肠腔的胞突(细箭头)和基膜的胞突(粗箭头), $\times 187.6$; 4. 箭头示胞突上的囊状膨大。 $\times 187.6$; 5. 胞体位于基膜附近, 有一长胞突伸向肠腔, $\times 187.6$; 6. 箭头示囊状胞突伸向肠腔, $\times 187.6$; 7. 示胞体基部胞突伸向基膜(细箭头), 囊状胞突伸向肠腔(粗箭头), $\times 187.6$; 8. 胞体位于上皮基部, 胞突沿基膜伸向旁邻细胞(箭头), $\times 187.6$; 9. 基部胞突达到基膜(细箭头), 顶端胞突伸向肠腔(粗箭头), $\times 187.6$

1. Glucagon-immunoreactive endocrine cells of *Ctenopharyngodon idellus* are located in the middle and upper parts of the gut folds (arrows), GL, (gut lumen). $\times 187.6$; 2. Open-type endocrine cells, showing cytoplasmic processes extending to gut lumen (arrows), $\times 92.8$; 3. A endocrine cell with its cell body located in the middle parts of intestinal epithelium and processes in both ends, the processes extend to the gut lumen (small arrow) and to the basement membrane (thick arrow), $\times 187.6$; 4. The pocket-shaped bodies of cytoplasmic process as shown by the arrows, $\times 187.6$; 5. The cell body is located near the basement membrane and the long cytoplasmic process extends to the gut lumen, $\times 187.6$; 6. The pocket-shaped cytoplasmic process (arrows) extending to the gut lumen, $\times 187.6$; 7. The basement membrane (small arrows) and the pocket-shaped apical cytoplasmic process extending to the gut lumen (thick arrow), $\times 187.6$; 8. The cell body is located in the basal parts of epithelium. The cytoplasmic process extends to the adjacent cells along the basement membrane (arrow), $\times 187.6$; 9. The basilar cytoplasmic process reaches the basement membrane (small arrow) and the apical ones extend to the gut lumen (thick arrows), $\times 187.6$.