

研究简报

重口裂腹鱼消化道内分泌细胞的免疫组织化学鉴别和定位

方 静 何 敏

(四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014)

LOCALIZATION AND IDENTIFICATION OF ENDOCRIN CELLS IN THE DIGESTIVE TRACT OF *SCHIZOTHORAX DAVIDI*

FANG Jing and HE Min

(College of Animal Science, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014)

关键词: 重口裂腹鱼; 消化道; 内分泌细胞; 免疫组织化学

Key words *Schizothorax davidi*; Digestive tract; Endocrine cell; Immunocytochemistry

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)05-0744-04

重口裂腹鱼(*Schizothorax davidi*)俗称“雅鱼”,属鲤科,裂腹鱼亚科,主要分布于大渡河、青衣江水系上游,以动物性食性为主。因其生长缓慢,肉质鲜嫩,深受人们喜爱。随着捕捞强度的增大和自然生态环境的破坏,其资源量急剧下降。目前大多数学者使用哺乳动物抗血清对鱼类消化道内分泌细胞进行了鉴别和定位,在硬骨鱼和软骨鱼的胃肠胰中分别发现了 17 种和 20 种内分泌细胞^[1]。本研究采用链霉亲和素-生物素过氧化物酶(Strept Avidin-Biotin-Complex, SABC)免疫组织化学技术对重口裂腹鱼消化道胃泌素(Gastrin, Gas)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、生长抑素(Somatostatin, Som)、胰高血糖素(Glucagon, Glu)内分泌细胞进行了鉴别和定位。因此,这项研究可为鱼类组织学、消化生理及内分泌学研究领域提供新资料,同时也为开发研究重口裂腹鱼的人工配合饲料,进行规模化养殖等提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 重口裂腹鱼采自青衣江,共 8 尾,体重 600—1200g,体长 30—42cm。将活鱼剖腹,分别取食道、前、中、后肠,迅速放入 Bouin 液中固定 24h,低熔点石蜡包埋、作连续切片(5 μ m),贴附于经多聚赖氨酸处理的玻片上,60 $^{\circ}$ C 烘烤 1h。

1.2 SABC 免疫组织化学方法主要反应步骤 抗血清和主要试剂见表 1。切片脱蜡至水后以 3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶 10min,洗净后放于正常山羊血清室温中 20min,再进入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵化 17h,又分别在生物素化二抗和 SABC 复合物 37 $^{\circ}$ C 中孵化 20min,最后以 DAB 显色。全部过程均在 pH7.4 和湿盒中进行。每个部位每种抗体反应时均以相邻切片作为对照片。对照片除一抗以 PBS 替代之外,其余步骤均同实验片。

表 1 抗血清和主要试剂

Tab. 1 The antisera and main reagent

抗血清与试剂	工作浓度	功能	来源
Antisera and main reagent	Working dilutions	Function	Source
兔抗胃泌素血清(Gas)	1%	一抗	武汉博士德生物工程公司
兔抗胰高血糖素血清(Glu)	1%	一抗	武汉博士德生物工程公司
兔抗生长抑素血清(Som)	1%	一抗	武汉博士德生物工程公司
兔抗 5-羟色胺血清(5-HT)	1%	一抗	武汉博士德生物工程公司
正常山羊血清	100%	占据位点,消除非特异反应	武汉博士德生物工程公司
生物素化二抗	100%	亲和纯化抗体,标记长臂生物素	武汉博士德生物工程公司
SABC 试剂	100%	与抗体结合起放大作用	武汉博士德生物工程公司
DAB 试剂	5%	底物,显色剂	武汉博士德生物工程公司

收稿日期: 2005-07-29; 修订日期: 2006-10-15

基金项目: 四川省科委基础研究基金(02NY029-069)和 2006J13-043)资助

通讯作者: 方静(1963—),女,在读博士,副教授;研究方向为动物组织胚胎。Tel: 13980177615; E-mail: fangjing@sicau.edu.cn

1.3 观察、计数、照相 在 Olympus 显微镜下观察切片,用接目网格测微尺对内分泌细胞计数,对每个取材部位切片随机取 10 个视野,计算出内分泌细胞数/ mm^2 ,而后作统计学分析,用($\bar{X} \pm S$)表示内分泌细胞的分布密度,显微照相。

表 2 重口裂腹鱼消化道中免疫活性内分泌细胞的分布密度(细胞数/ mm^2 , $\bar{X} \pm s$)

Tab.2 The density of immunoreactive endocrine cells in the intestine of *Schizothorax davidi* (cell number/ mm^2 , $\bar{X} \pm s$)

内分泌细胞 Endocrine cell	食道 Oesophagus	前肠 Fore intestine	中肠 Mid intestine	后肠 Hind intestine
胃泌素(Gas)	—	32.51 \pm 3.03	11.56 \pm 1.77	—
5-羟色胺(5-HT)	—	24.25 \pm 3.05	15.51 \pm 2.85	23.56 \pm 3.84
生长抑素(Som)	—	22.53 \pm 3.67	12.00 \pm 2.07	5.56 \pm 1.45
胰高血糖素(Glu)	—	16.50 \pm 2.21	15.26 \pm 2.27	2.46 \pm 1.21

注:“—”表示阴性反应 Note:“—” Negative reaction

Gas 细胞分布于前肠及中肠,以前肠分布最密(图版-1),后肠和食道未检出。Gas 细胞主要呈梭形,有两个胞突,顶端胞突伸向肠腔,基部胞突伸向基膜(图版-2);还有的呈锥形,只有一个粗大胞突,伸向肠腔(图版-3);胞突有的纤细,有的基部膨大与基膜接触,犹如神经元的突触(图版-4)。梭形、锥形细胞多分布于肠黏膜皱褶的顶部,位于黏膜上皮细胞和杯状细胞之间。少数 Gas 细胞呈卵圆形或圆形,无胞突,主要位于肠黏膜上皮基部和固有膜中。

5-HT 细胞分布于前、中、后肠,其密度表现为前肠最高(图版-5);中肠减少,后肠又增多的变化趋势(图版-6);食道未检出。5-HT 细胞呈长锥形、花瓶形、烧瓶形,这些细胞具有一个较大胞体和一粗大的胞突伸向肠腔(图版-5、6、7);短梭形、长梭形细胞有两个胞突,有的长梭形细胞伸向基膜的胞突末端突触样膨大(图版-8);楔形、长柱状、圆形或卵圆形细胞无胞突;角锥形、蝌蚪形细胞只具基部胞突。在肠上皮中以长锥形、长梭形细胞为主,分布于整个肠褶黏膜上皮细胞之间。

Som 细胞分布于肠道各段,以前肠分布最密(图版-9),中肠次之,后肠最低,食道未检出。Som 细胞主要呈圆形、卵圆形,无胞突(图版-9),多位于固有膜中,部分位于上皮基部;少数为长梭形、蝌蚪形和 C 形,其中 C 形细胞顶端胞突粗大,伸向肠腔,基部胞突纤细,弯曲并伸向旁边的细胞(图版-10)。

Glu 细胞分布于肠道各段,以前肠分布最密(图版-11),中肠次之,后肠最低,食道未检出。Glu 细胞主要呈锥形和长梭形,有的胞突纤细,有的胞突膨大呈串珠状(图版-12);少数呈圆形、卵圆形。

3 讨论

对鱼类胃肠道 Gas 细胞研究较多,但在不同鱼类中分布型差异较大。乌鳢胃、前肠及幽门盲囊 Gas 细胞较多^[2];花鲈^[3]、日本鳊^[4]、鲮鱼^[5]分布于胃肠;短盖巨脂鲤仅贲门有少量 Gas 细胞分布^[6];在一些无胃鱼中, Gas 细胞大多分布于前肠^[7-11];而在鳊鱼^[12]和尼罗非鲫^[6]胃肠中无 Gas 细胞。本研究在重口裂腹鱼前肠和中肠中均发现了 Gas 细胞,前肠

2 结果

四种免疫活性内分泌细胞在重口裂腹鱼消化道中的分布密度见表 2。

最多,中肠次之,其分布规律与一些无胃鱼相似^[8]。Gas 细胞可分泌胃泌素,以刺激胃酸和胃蛋白酶原的分泌;促进胃肠黏膜的生长,增加胃肠血流量^[13]。重口裂腹鱼无胃,前肠膨大,较多的 G 细胞分布于前肠,无疑对加速营养物质的消化和吸收具有重要作用。

5-HT 细胞在大多数有胃鱼的胃、肠道中均有分布^[4,5,6,12];在花鲈的食道和胃中有分布^[3];而在鲤、青鱼、草鱼、鲢、鳙、银鲫、团头鲂等无胃鱼肠中未发现该细胞^[7-12]。观察发现重口裂腹鱼整个肠道均有 5-HT 细胞,这与其他无胃鱼完全不同;且分布密度呈两头高中间低的变化趋势,这种分布型也与其他有胃鱼有差别。5-HT 能刺激胃肠黏液的分泌,平滑肌的收缩和血管的扩张^[14]。重口裂腹鱼前肠有较多的 5-HT 细胞分布,提示对消化功能有很强的调节作用;而后肠较多的 5-HT 细胞,可能与刺激平滑肌收缩以利于排泄有关。

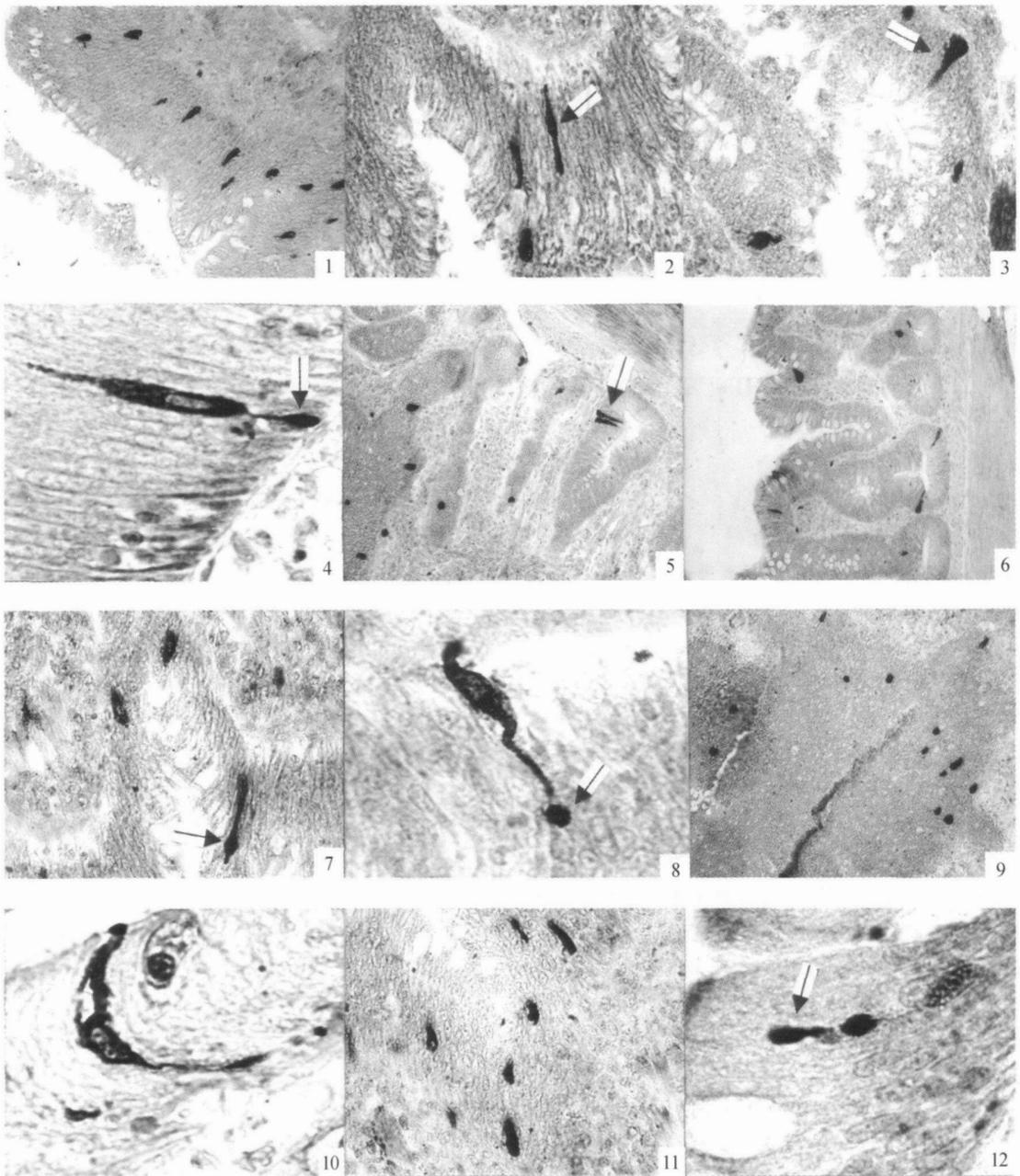
Som 细胞在各种鱼类胃肠道中的分布情况也不尽相同。黄鳝^[15]、乌鳢^[2]、短盖巨脂鲤^[6]、河鲈、云斑^[9]等鱼仅在胃中发现 Som 细胞;鲮鱼^[5]、尼罗非鲫^[6]、鳊鱼^[12]、日本鳊^[4]的胃、肠中均有 Som 细胞;花鲈的食道、胃贲门和幽门部有此细胞^[3];Rombout 等曾做过大量研究并认为, Som 细胞仅存在于有胃真骨鱼类的胃中^[11];而方之平在鲤鱼前肠中观察到 Som 细胞^[16]。重口裂腹鱼整个肠道均有 Som 细胞分布,其前肠最多,中肠次之,后肠最少。方永强认为 Som 细胞在有胃鱼中与抑制胃肠激素分泌及胃肠蠕动的功能有关,对胃肠道分泌与抑制活动达到动态平衡起着重要的调节作用^[9]。然而无胃鱼肠道中 Som 细胞的功能是否与有胃鱼相同,还有待研究。

Glu 细胞存在于花鲈^[3]、鲤鱼前肠和中肠,青鱼的整个肠道^[16];而尼罗非鲫、短盖巨脂鲤^[6]、日本鳊^[4]胃肠道中缺乏此细胞。重口裂腹鱼前、中、后肠均有 Glu 细胞,以前肠最多,中肠次之,后肠最少,这与其他鱼类的分布型有差异。据报道 Glu 细胞在消化道中食糜的刺激下,释放胰高血糖素,使食物的推进速度减慢,在肠中滞留时间延长,有利于营养物质的消化吸收^[13]。因此分布于前、中、后肠中的 Glu 细胞对肠道较短的重口裂腹鱼来说具有重要的生理意义。

鱼类消化道内分泌细胞分为开放型和封闭型两类。开放型细胞有明显胞突深入消化腔中,以感受消化道内容物的刺激而将激素通过顶端突起直接分泌进入胃肠腔中(腔分泌);封闭型内分泌细胞无胞突与消化腔相连,主要是感受局部组织内环境的变化而将激素直接分泌进入血液(内分泌)^[7]。重口裂腹鱼肠道中的 Gas 细胞、Glu 细胞和 5-HT 细胞,多数呈长梭形、锥形,均可见一胞突通向肠腔,说明这三种内分泌细胞主要是以开放型的腔分泌方式而发挥调节作用;而 Som 细胞多数呈圆形、卵圆形,无胞突,表明该内分泌细胞主要以封闭型的内分泌方式而发挥其生理效应。同时,我们还观察到以下一些特殊结构:(1)部分 Gas 细胞、5-HT 细胞胞突基部膨大,犹如神经元的突触(图版-4、8),方之平在其他几种鱼中,也观察到类似的结构,并认为这类细胞具有神经内分泌的作用^[7];(2)一些呈 C 形的 Som 细胞,其顶端胞突粗大,伸向肠腔,基部胞突纤细,弯曲并伸向旁边的细胞(图版-10),这从形态上表明这类细胞可通过腔分泌和旁分泌方式发挥调节作用;(3)少数 Glu 细胞,其基部胞突膨大呈串珠状(图版-12),据认为其与激素的贮存有关,可让激素逐步或分次释放^[7]。

参考文献:

- [1] He M, Fang J. Perspective of secretory cells of digestive tracts in fishes [J]. *Fisheries Science*, 2005, 24(6): 46—49[何敏,方静.鱼类消化道内分泌细胞的研究进展.水产科学,2005,24(6):46—49]
- [2] Xia L Q, Wang Q T. Immunocytochemical study of the endocrine cells in the gastrointestinal tract of *Ophiocephalus argus* [J]. *Zoological Research*, 1994, 15(4): 34—35[夏立群,王庆堂.乌鳢胃肠内分泌细胞的免疫组织化学研究.动物学研究,1994,15(4):34—35]
- [3] Lin S G, Huang X H, Wu D F. Localization and identification of endocrine cells in the alimentary canal of *Lateolabrax japonicus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(1): 7—9[林树根,黄小华,吴德峰.花鲈消化道内分泌细胞的鉴别和定位.水生生物学报,2005,29(1):7—9]
- [4] Lin S G, Wu D F, Wang S K, et al. Localization and identification of endocrine cells in the gastro-entero pancreas of *Arguilla japonicus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(6): 513—518[林树根,吴德峰,王寿昆,等.日本鳢胃肠胰内分泌细胞的鉴别与定位.水产学报,2003,27(6):513—518]
- [5] Fang Y Q, Weng Y Z, Hu X X, et al. Immunohistochemical localization of endocrine cells in gastrointestinal tract of *Mugil cephalus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(6): 481—485[方永强,翁幼竹,胡晓霞,等.鲮鱼胃肠道内分泌细胞免疫组织化学的定位.水产学报,2002,26(6):481—485]
- [6] Fang Z P, Pan Q S, Nie X Y, et al. Localization and identification of endocrine cells in the gastro-entero-pancreatic system of two species of stomachcontaining teleosts [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1997, 16(6): 594—598[方之平,潘黔生,聂秀云,等.两种有胃真骨鱼胃肠胰系统中内分泌细胞的鉴别与定位.华中农业大学学报,1997,16(6):594—598]
- [7] Pan Q S, Fang Z P, Fan Q X, et al. Immunohistochemical localization and morphological study on G cells in the intestine of *Hypophthalmichthys Molitrix*, *Aristichthys Nobilis*, *Carassius Auratus Gbeho* and *Megalobrama Amblycephala* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1995, 41(2): 167—171[潘黔生,方之平,樊启学,等.鲢、鳙、银鲫、团头鲂肠道 G 细胞定位与免疫组化研究.动物学报,1995,41(2):167—171]
- [8] Pan Q S, Fang Z P. The immunohistochemical location and comparison of gastrinimmunoreactive cells in the intestinal tract of four carps species [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1988, 7(3): 238—242[潘黔生,方之平.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,1988,7(3):238—242]
- [9] Pan Q S, Fang Z P, Zhao Y X. Immunocytochemical identification and localization of APUD cells in the gut of seven stomachless teleost fishes [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2000, 6(1): 96—101
- [10] Noailac-Depeyre J, Hollande E. Evidence for somatostatin, gastrin and pancreatic polypeptide-like substances in the mucosa cells of the gut in fishes with and without stomach [J]. *Cell Tiss. Res.*, 1981, 216: 193—203
- [11] Rombout J H W M, Tavernier-Thiele J J. An immunocytochemical and electron microscopical study of endocrine cells in the gut and pancreas of a stomachless teleost fish, *Barbus anchonus* (Cyprinidae) [J]. *Cell Tiss Res.*, 1982, 227: 577—593
- [12] Pan Q S, Fang Z P. The immunocytochemical evidence for four hormones in the gastrointestinal endocrine cells of mandarin fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, 25(6): 565—570[潘黔生,方之平.几种激素在鳊鱼胃肠道内分泌中存在的免疫细胞化学证据.水生生物学报,2001,25(6):565—570]
- [13] Wang Z J. Gut hormone [M]. Beijing: Beijing Science Press, 1985, 1—6[王志均.胃肠激素.北京:北京科学出版社,1985 1—6]
- [14] Solcia E, Capella. Endocrine cells of the gastric mucosa [J]. *Int Rev Cytol*, 1975, 42: 223—286
- [15] Shu M A, Xu H S, Zhu Y F, et al. Somatostatin secreting cells and ultrastructure of stomach and intestine of *Monopterus albus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(3): 206—212[舒妙安,徐海圣,朱有法,等.黄鳝胃肠的生长抑素分泌细胞及超微结构.水产学报,2002,26(3):206—212]
- [16] Fang Z P, Junzo Yamada, Pan Q S. Localization and identification of endocrine cells in the intestinal mucosa of common carp and black carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1991, 15(3): 212—217[方之平,山田纯三,潘黔生,鲤、青鱼肠黏膜内分泌细胞的免疫组织化学鉴别和定位.水生生物学报,1991,15(3):212—217]
- [17] Pan Q S, Fang Z P. Present progress in the study of the APUD cells in gastro-entero-pancreatic endocrine system of the fishes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, 19(3): 275—282[潘黔生,方之平.鱼类胃肠胰内分泌系统 APUD 细胞研究的现状.水生生物学报,1995,19(3):275—282]



图版说明 Explanation of Plate

- 1 前肠中的 Gas 细胞, $\times 200$; 2 长梭形 Gas 细胞(箭头), $\times 400$; 3 锥形 Gas 细胞(箭头), $\times 400$; 4 Gas 细胞基部胞突末端突触样膨大(箭头), $\times 1000$; 5 前肠中的 5-HT 细胞, 有的呈长锥形(箭头), $\times 200$; 6 后肠中的 5-HT 细胞, $\times 200$; 7 5-HT 细胞呈花瓶形(箭头), $\times 400$; 8 长梭形 5-HT 细胞, 基部胞突末端突触样膨大(箭头), $\times 1000$; 9 前肠中的 Som 细胞, $\times 200$; 10 C 形 Som 细胞, $\times 1000$; 11 前肠中的 Glu 细胞, $\times 400$; 12 Glu 细胞, 胞突膨大呈串珠状(箭头), $\times 1000$
1. The Gas cells in the fore intestine, $\times 200$; 2. Long shuttle-shaped Gas cell (arrow), $\times 400$; 3. Pyramid-shaped Gas cell (arrow), $\times 400$; 4. The end of the basal process of Gas cell was expanded like neuronal synapse (arrow), $\times 1000$; 5. The 5-HT cells in the fore intestine: some 5-HT cells were long taper-shaped (arrow), $\times 200$; 6. The 5-HT cells in the hind intestine, $\times 200$; 7. Vase-shaped 5-HT cell (arrow), $\times 400$; 8. The long shuttle-shaped 5-HT cell; the end of the basal process was expanded like neuronal synapse (arrow), $\times 1000$; 9. The Som cells in the fore intestine, $\times 200$; 10. C-shaped Som cell, $\times 1000$; 11. The Glu cells in the fore intestine, $\times 400$; 12. The Glu cell with beading-like process (arrow), $\times 1000$