鲢、鳙、银鲫和团头鲂肠道内分泌细胞中3种肽激素的免疫组化研究*

潘黔生 方之平** 赵雅心** 程汉良 白雪梅

(华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

提 要

应用ABC免疫组化技术,用抑胃多肽、5-羟色胺和内啡肽3种哺乳动物抗血清对鲢、鳙、银鲫和团头鲂的肠粘膜中内分泌细胞进行了检测。结果4种鱼的肠粘膜中均有抑胃多肽免疫反应内分泌细胞存在,但未发现5-羟色胺和内啡肽的免疫反应。抑胃多肽免疫反应内分泌细胞主要分布在前肠前段,并单个地散布在肠褶顶部上皮细胞与杯状细胞之间,多呈长梭形。本文比较了不同食性鱼类和其他动物肠道抑胃多肽免疫反应内分泌细胞的分布规律,讨论了用5-羟色胺和内啡肽免疫染色的结果。

关键词 鲢,鳙,银鲫和团头鲂,肠道,抑胃多肽免疫反应内分泌细胞,免疫组织化学

抑胃多肽(Gastric inhibitory polypeptide, GIP)作为一种独立的激素在六十年代已被提取出来,并阐明其化学结构。它是一种经典的胃肠激素,一直被认为具有抑制胃酸分泌的作用,八十年代以来对GIP的释放和作用等研究取得了较大进展,引起了广泛关注[1]。由于抑胃多肽在胃肠中的作用与胃泌素(Gastrin)刺激胃酸分泌的作用相反[2],因而与食物的消化、吸收、营养等密切相关。用免疫细胞化学分类法将含有GIP的细胞命名为K细胞[3],主要分布在十二指肠和空肠粘膜内。王志均等提出消化道粘膜是动物体内最大、最复杂的内分泌器官[3]。Rombout认为鱼类消化道内分泌系统几乎与哺乳动物的一样复杂。作者曾用PAP(Peroxidase-anti-peroxidase)法对鲤(*Cyprinus carpio* L.)、青鱼[*Mylopharyngodon piceus* (Richardson)]和草鱼[*Ctenopharyngodon idellus* (Cuvier et Valenciennes)]3种不同食性鱼的肠粘膜中抑胃多肽免疫反应内分泌细胞进行过描述[4,5];使用ABC(Avidin-biotin-peroxidase complex)免疫染色技术对鲢[*Hypophthalmichthys molitrix* (Cuvier et Valenciennes)]、鳙[*Aristichthys nobilis* (Richardson)]、银鲫[*Carassius gibelio* (Bloch)]和团头鲂(*Megalobrama amblycephala* Yib)4种鱼肠粘膜中内分泌细胞进行过鉴别和定位的研究[6—8]。本文报道了对以上4种鱼肠中GIP免疫反应内分泌细胞定位研究的结果,并与鲤、青鱼、草鱼的研究结果进行了比较,为鱼类肠道K细胞较完整的

* 国家自然科学基金资助项目

** 华中农业大学畜牧兽医学院

1993年5月25日收到;1996年4月2日修回。

形态学研究以及鱼类比较解剖学、鱼类内分泌学提供较全面的基础研究资料。

1 材料和方法

1.1 取材及制片 鲢、鳙、银鲫和团头鲂各5尾，重0.5—1kg，取自本校水产养殖场，清水中饲养2d，待肠道内容物除净后鲜活时剖腹，肠道的取材及制片均按免疫组织化学方法的要求处理[4—7]。

1.2 抗血清及主要试剂 ①兔抗GIP血清，工作浓度1：1000，英国Guildhay, Surry, sera实验室产品，由中国农业大学兽医学院提供。②兔抗5-羟色胺(5-hydroxytriptamin, 5-HT)血清，工作浓度1：1000，来源同上。③兔抗内啡肽(Endorphine, END)血清，工作浓度1：500，来源同上。④ABC kit(药盒)，美国Vector试剂公司产品。⑤3'—3'-二氨基联苯二胺盐酸盐(DAB)，日本株式会社同仁化学研究所制品，群马大学内分泌研究所井上金治博士赠送。

1.3 ABC免疫组化技术的主要步骤 ①3%H_2O_2-甲醇于室温中(约25℃，下同)处理20min(封闭内源性过氧化物酶)。②正常山羊血清室温中孵育20min(杜绝非特异性反应)。③分别加入抗血清后孵育20h(4℃)。④滴加生物素——抗血清复合物于室温中孵育30min。⑤滴加ABC复合物，室温中孵育30min。以上5步均保持pH7.5和潮湿环境。⑥以pH7.2 Tris-HCl缓冲液配制的DAB在室温中显色10min(内含0.02%过氧化氢、DAB浓度为0.1%)。⑦对照片，用PBS(pH7.5)代替一抗血清的相邻切片作同步处理。

1.4 观察及计数 与作者以前所报道的方法相同[4—7]。

2 结果

4种鱼前肠中均出现GIP免疫反应细胞，中肠至直肠部位呈阴性反应。用5-HT和END抗血清进行免疫组化染色，4种鱼的肠道以及全部对照片均呈阴性反应。

表1 4种鱼肠粘膜中K细胞的分布密度(细胞数/mm^2)

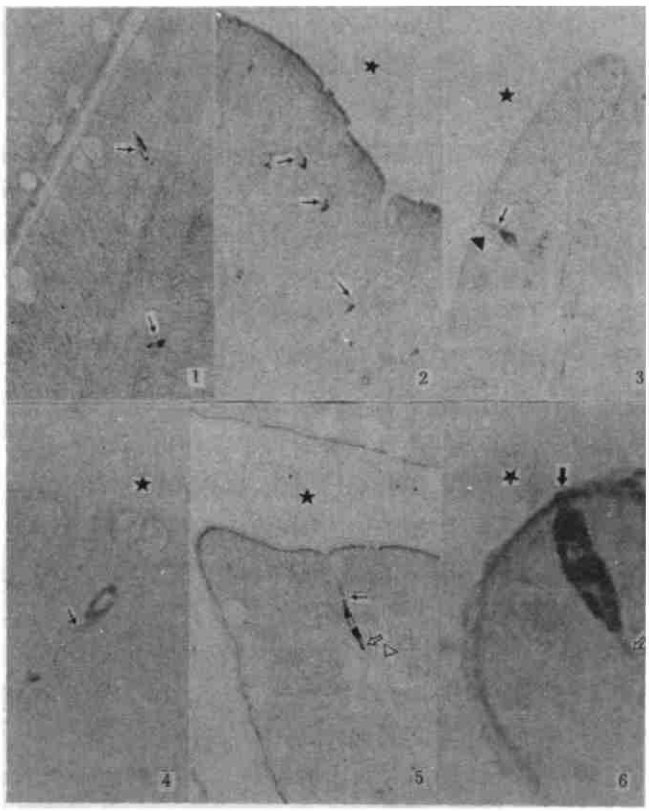
Tab. 1 Density of K cells in the intestinal mucosa in 4 species of fishes (cells / mm^2)

鱼类 Fish species	前肠前段 Anterior segment of foregut	前肠后段 Posterior segment of foregut	中肠 Midgut	后肠前段 Anterior segment of hindgut	直肠 Rectum
鲢 Silver carp	1.9±1.7*	6.4±4.5	—**	—	—
鳙 Bighead	13.3±18.5	—	—	—	—
银鲫 Silver crucian carp	1.3±1.7	—	—	—	—
团头鲂 Blunt-snout bream	3.8±1.4	—	—	—	—

* 平均数±标准差(Mean±SD)；** 未见到阳性细胞 Positive cells not found.

阳性细胞散布在肠粘膜上皮中(图1)，密度较小。在1号样本鳙的前肠前段可见到几个排列较密的阳性细胞(图2)，它们大多分布于肠褶顶部(图2、3、5)，4种鱼GIP免疫反应细胞(K细胞)的分布密度列于表1。部分K细胞的胞体较圆，胞突较短，明显区别于周

围肠上皮(图 2)；多数 K 细胞体较长，大多为长梭形(图 4、5、6)，游离端胞突伸向肠腔(图 3、5)，细胞基底端胞突则伸向基膜方向(图 4、5)，有时一个细胞同时存在着分别伸向肠腔和基膜的胞突(图 5、6)。明显可见 K 细胞胞突内的激素颗粒(图 5)。还发现在 K 细胞伸向肠腔的胞突上具有发达的微绒毛(Microvillus、图 6)。



图(Fig)1—6

1. K 细胞(↑)分布松散(鲢)，× 120；2. 几个胞突较短的 K 细胞(↑)，分布在鳙肠褶顶部，× 120；3. 分布于银鲫肠上皮与杯状细胞(▲)之间的 K 细胞的顶部胞突(↑)伸向肠腔(★)，× 120；4. 团头鲂的 K 细胞基部胞突伸向周围组织(↑)，× 240；5. 分布在鲢肠褶顶部的 K 细胞具有伸向肠腔(★)的顶部胞突(↑)和伸向基膜(△)的底部胞突，× 240；6. 位于鳙肠褶顶端的 K 细胞，其顶部胞突微绒毛(⇑)伸向肠腔，基部胞突(⇧)伸向基膜方向，× 360；(★)：肠腔。

1. Loose distribution of K cells in silver carp, × 120; 2. K cells (↑) with short cytoplasmic processes in apical parts of the fold in bighead, × 120; 3. K cell between epithelial and goblet cells (▲) with apical process (↑) extending to the gut lumen (★), × 120; 4. k cell with basal process extending to adjacent tissue (↑) in blunt-snout bream, × 240; 5. K cell in the apicat parts of the fold in silver carp, the apical process (↑) extending to the gut lumen (★) and basal process to the basement membrane (△), × 240; 6. K cell in the apical parts of the fold of bighead, the microvillus (⇑) in apical process extending to the gut lumen (★) and basal process (⇧) to the basement membrane, × 360; (★): gut lumen.

3 讨论

尽管对哺乳动物的肠内分泌细胞已做了精细的研究，但对鱼类肠内分泌细胞的研究仅有少数报道。Reifel 等用嗜银法对 3 种硬骨鱼胃肠道内分泌细胞进行了研究，在太阳鱼(*Lepomis gibbosus* L.)和白石鲈(*Morone americana* Gmelin)的胃中见到大量阳性细胞而在肠中却未发现；在美鳊[*Notemigonus crysoleucas* (Mitchill)]的肠上皮有少量嗜银细胞[9]。Abad 等对有胃硬骨鱼金头鲷(*Sparus auratus* L.)和无胃硬骨鱼贝鲃(*Barbus conchonius*)的消化道用免疫组化技术鉴别出了 10 种内分泌细胞，但后者的肠中仅有其中的 5 种[10]。可见无胃硬骨鱼消化道粘膜中的内分泌细胞要比有胃硬骨鱼的少。

本实验在 4 种鱼肠道中均未发现 5-羟色胺免疫反应内分泌细胞(简称 5-HT 细胞)。据报道已在有胃硬骨鱼金头鲷[10]及乌鳢[*Channa argus* (Cantor)][11]的胃中发现 5-HT 细胞。目前还未见到硬骨鱼肠道中存在 5-HT 细胞的报道，在草鱼、青鱼、鲤和贝鲃的肠道中均未检测出 5-HT 细胞[4, 5, 10]。

目前国内外对鱼类消化道 GIP 免疫反应内分泌细胞(下称 GIP 细胞)的鉴别和定位做过一些研究工作，国外仅在白斑角鲨(*Squalus acanthias* L.)的肠中检测出 GIP 细胞[12]，但未见其他的报道；国内已在草鱼、青鱼和鲤的肠中鉴别出 GIP 细胞[4, 5]。本实验又在 4 种鱼的前肠中检测出 GIP 细胞，并认为 GIP 细胞的分布密度与鱼类的食性有关。研究证明，脂肪、氨基酸和葡萄糖注入动物的十二指肠可引起 GIP 释放[1]。由于草食性鱼类食物中脂肪和蛋白质含量少，纤维素多，刺激肠道内分泌细胞释放 GIP 的作用小，对 GIP 的需要量也少，产生并分泌 GIP 的内分泌细胞的分布密度必然小。反之，肉食性鱼类因食物中脂肪、蛋白质含量高，与之相适应的是肠中分泌和释放 GIP 的内分泌细胞数量增多。这种推论作者从形态学上的研究给予证实，即青鱼肠中 GIP 细胞的分布密度大于草鱼和鲤的分布密度；鳙(主食浮游动物)肠中 GIP 细胞的分布密度大于团头鲂、鲢和银鲫。胃肠中 GIP 的释放除上述原因外，还需要吸收一种刺激因子，这种刺激因子是通过肠道中酶类的一系列化学变化形成，由 GIP 细胞的微绒毛感觉到并从肠腔中摄取营养物质从而刺激 GIP 的释放。在图 6 中见到的 GIP 细胞，具有一发达的伸入肠腔的微绒毛，为这一论点提供了形态学的依据。

本实验在 4 种鱼的肠道中均未见到 END 免疫反应内分泌细胞(下称 END 细胞)。作者曾用与 END 同为神经肽的脑啡肽(Enkephalin, ENK)对草鱼、青鱼和鲤的肠道进行免疫染色，3 种鱼肠道中均有阳性反应细胞，而 END 这种神经肽在本实验中却未被检出。Rombout 对鲤科鱼贝鲃肠道用 β-内啡肽(β-endorphin)进行免疫组化染色技术研究中亦未见到阳性细胞，在同时进行比较研究的小鼠消化道中则有阳性细胞分布[13]。Rombout 在贝鲃的肠中也鉴别出 ENK 细胞[14]。在白斑角鲨的肠中同时存在 ENK 和 END 两种细胞[12]。对于硬骨鱼肠道中是否存在 END 细胞，目前尚无法定论，但从有关的研究结果来看，作者认为存在 3 种可能的解释：鱼类肠道中 END 的活性处于 ABC 免疫组化染色技术的阈值之下；或在硬骨鱼肠粘膜中不存在 END 细胞；或目前所使用的哺乳动物的 END 抗血清与硬骨鱼肠道中相应类型的内分泌细胞不发生免疫反应。

参　考　文　献

[1] 段瑞冬。抑胃多肽的新概念和临床。国外医学内分泌分册，1984，(2)：65—67。

[2] 吕清浩、郭燕世。胃泌素研究的进展。生理科学进展，1980，**11**(4)：319—323。

[3] 王志均等。胃肠激素。北京：科学出版社，1985。

[4] Pan Q S(潘黔生)，Fang Z P(方之平). An immunocytochemical study of endocrine cells in the gut of a stomachless teleost fish, grass carp, Cyprinidae. *Cell Transplantation*, 1993,**2**(5)：419—427.

[5] 方之平等。鲤、青鱼肠粘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—218。

[6] 潘黔生等。四种无胃真骨鱼肠道L细胞的免疫组织化学研究。解剖学报，1995，**26**(1)：81—84。

[7] 潘黔生等。鲢、鳙、银鲫和团头鲂肠道G细胞定位与免疫组化研究。动物学报，1995，**41**(2)：167—172。

[8] 方之平、潘黔生。四种无胃真骨鱼肠道嗜银细胞的分布及形态学。中国动物学会成立60周年纪念论文集。北京：中国科学技术出版社，1994，47—53。

[9] Reifel C W, Linden R D. Endocrine cells in the gastrointestinal tracts of 3 teleostean species. *Anat. Anz. Jena.* 1983, **154**: 413—418.

[10] Abad M E. et al. A comparative immunocytochemical study of the gastro-entero-pancreatic(GEP) endocrine system in a stomachless and a stomach-containing teleost. *Gen. Comp. Endo.*, 1987, **66**: 123—136.

[11] 唐晓雯、郑一守。不同脊椎动物消化道内5-羟色胺免疫染色细胞的分布。动物学研究，1991，**12**(3)：293—298。

[12] El-Salhy M. Immunocytochemical investigation of the gastro-en-tero-pancreatic(GEP) neurohormonal peptides in the pancreas and gastrointestinal tract of the dogfish *Squalus acanthias*. *Histochemistry*, 1984, **80**: 193—205.

[13] Rombout J H W M. et al. Immunocytochemical identification and localization of peptide hormones in the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system of the mouse and a stomachless fish, *Barbus conchonius*. *Histochemistry*, 1986, **84**: 471—483.

[14] Rombout J H W M. Function and origin of endocrine cells in gut and pancreas of teleosts. *Acta Microscopica*, 1985, **8**(3): 329—335.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES OF 3 KINDS OF PEPTIDE HORMONES IN ENDOCRINE CELLS OF THE GUT OF SILVER CARP, BIGHEAD, SILVER CRUCIAN CARP AND BLUNT-SNOUT BREAM

Pan Qiansheng, Fang Zhiping, Zhao Yaxin, Cheng Hanliang and Bai Xuemei

(*College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070)

Abstract

Using immunohistochemical staining technique of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method, gastric inhibitory polypeptide (GIP), 5-hy-droxytryptamine (5-HT) and endorphine (END) antisera raised against mammalian hormones were employed to investigate the distribution of endocrine cells in the intestinal mucosa of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), bighead (*Aristichthys nobilis*), silver crucian carp (*Carassius gibelio*) and blunt-snout bream (*Megalobrama amblycephala*). GIP-immunoreactive endocrine cells were found in the intestinal mucosa of the 4 species of fishes. But immunoreactive endocrine cells of 5-HT and END were not found. GIP-immunoreactive endocrine cells are distributed mostly in the anterior segment of the foregut, and located mostly in the apical parts of the gut folds and dispersed between the epithelial cells and goblet cells. Most of GIP-immunoreactive endocrine cells were long shuttle-shaped. The distributive laws of GIP-immunoreactive endocrine cells in the intestinum of fishes were compared with of different feeding habits other animals. The immunostaining results are discussed in relation to the use of 5-HT and END antisera.

Key words Silver carp, Bighead, Silver carassian carp and blunt-snout bream, Gut, GIP-immunoreactive endocrine cell, Immunohistochemistry