

草鱼 GH 单克隆抗体对 9 种硬骨鱼的 免疫细胞化学定位*

方之平 潘黔生 陈松林¹⁾ 赵雅心

(华中农业大学牧医学院; 武汉 430070)

¹⁾(长江水产研究所, 荆州 434000)

摘要 研究表明: 1) 鳊和鲇的胰岛中有大量的 GH 免疫活性内分泌细胞存在; 8 种有胃硬骨鱼的消化道中均未见到阳性特异性反应。2) 草鱼的中腺、前腺垂体中均发现有 GH 和 Som 两种免疫活性内分泌细胞存在。还描述了胰岛和脑垂体中内分泌细胞的形态特征和分布特点并讨论了 GH 和 Som 这对具有相拮抗生理作用的抗原同时存在于草鱼垂体中的现象。

关键词 硬骨鱼, 草鱼 GH 单克隆抗体, 免疫细胞化学, 生长抑素

生长激素 (Growth hormone, GH) 是调节鱼类生长发育的最重要的激素。鱼体生长的快慢与其体内 GH 水平密切相关^[1]。弄清鱼类生长发育过程中体内的 GH 对鱼体的各种生理活动(包括消化生理)是一项有意义的工作。现有足够的证据表明, GH 对鱼类生长的促进作用是通过丘脑下部刺激鱼的摄食行为和提高了饲料转换效率、降低饲料系数^[2,3]等作用来完成的。而这些作用都与鱼类的各消化器官有密切关系。了解鱼类胃肠胰中 GH 抗原存在的部位, 为进一步研究 GH 促进鱼类生长作用机理提供线索和证据。生长抑素 (Somatostatin, Som) 是与生长激素的生理机能相拮抗的一种激素, Som 对垂体生长激素的调节作用已为人所熟知^[4]。过去认为 Som 广泛分布于动物脑中^[4-6]、胰岛^[7,8]、胃肠粘膜^[9]和外周神经中, 未见有分布于脑垂体中的报道。探讨 GH 和 Som 在垂体中的共存现象, 为它们之间的某些调节机理提供形态学依据。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂 黄鳝 (*Monopterus albus*) 乌鳢 (*Channa argus*)、鲇 (*Silurus asotus*) 购自武汉市大东门市场; 黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)、鳊 (*Siniperca chuatsi*) 购自武汉市交通路水产市场; 短盖巨脂鲤 (*Colossoma brachypomum*)、尼罗非鲫 (*Oreochromis nilotica*) 购自洪山乡渔牧一场; 大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 购自武汉南湖渔场。每种鱼各 5 尾, 清水中暂养 24h, 鲜活时解剖, 取出消化道, 按食道、贲门、胃底、幽门、幽门垂、全部肠

* 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 39470554)

1997-10-09收到; 1998-06-03修回

道(采用卷肠法^[10])及胰岛等部位取材,另取草鱼(4kg)垂体3枚,共同投入无冰醋酸 Bouin 液中,整个过程不超过 15min。以上材料固定 24h 后用低熔点石蜡(46℃)包埋,切片 6μm,明胶贴片,40℃烘片 36h。

鼠抗草鱼 GH 血清由中国水产科学院长江水产研究所及淡水鱼类种质资源与生物技术国家重点实验室研制并提供,工作稀度 1:400。免抗 Som 血清由美国 ZYMED 公司生产,工作稀度 1:400。SABC Kit(SA2001 小鼠 IgG, SA2002 兔 IgG),由武汉博士德生物工程公司生产。DAB 由日本株式会社同仁化学研究所生产。

1.2 主要方法步骤 以上烘干切片经二甲苯脱蜡,系列酒精下行后充分水洗,于 3% H_2O_2 / PBS 5min 灭活内源性酶,再以 1:50 正常血清(与二抗同种动物血清)封闭非特异性第二抗体的结合,20min 后入一抗 4℃ 孵育过夜。然后入 1:100 生物素化二抗 37℃ 孵育 20min 后,再入 1:100 SABC 复合物 37℃ 孵育 20min,最后进入含有 0.001 的 30% H_2O_2 ,浓度为 0.05% 的 DAB 液中显色。对照片以上述切片的连续切片,用正常血清代替一抗血清,其他各步骤均与上述同步进行。

每一个垂体均取 4 张纵切连续切片,其中 2 张连续切片分别做 GH 和 Som 的免疫组化染色,另外 2 张分别做对照片。其方法步骤同上。

以上所有过程均在湿盒中进行,并保持 pH 为 7.3。免疫染色完成后,脱水、透明、封片,于 Olympus 光学显微镜下观察,显微摄影。

2 结果

2.1 8 种有胃鱼胃肠胰的免疫细胞化学定位

除鳊和鲇的胰岛之外,8 种鱼的其他检测部位均未见到阳性特异性反应。在鳊和鲇的胰岛中,GH 免疫活性内分泌细胞(简称 GH 细胞)分布密集。所有对照片均为阴性反应。鲇胰岛中,GH 细胞几乎遍布整个胰岛,只有少数胰岛细胞中无 GH 抗原存在(图版 I: 1、2)。胰岛中的 GH 细胞以球形和椭球形较多,胞突很短或缺,细胞核呈阴性空泡状,分泌颗粒占据核外空间,清晰可见(图版 I: 2),胰腺处无阳性特异性反应。在鳊的胰中,GH 细胞分散于胰岛上,细胞的大小及分布密度均比鲇胰岛中的 GH 细胞小(图版 I: 3、4),形状不规则,排列无序,遍布胰岛各处,可见 GH 细胞紧贴着胰导管分布,在胰腺处则未见分布。

2.2 草鱼脑垂体 GH 和 Som 的免疫细胞化学定位

在草鱼垂体中,GH 和 Som 均有阳性特异性反应。可见到 GH 细胞大量分布在中腺垂体,仅有少量分布于前腺垂体之中(图版 I: 5、7)。Som 细胞则在前腺和中腺垂体均有分布(图版 I: 6、8)。GH 细胞的分布密集,呈堆集状(图版 I: 7、9);Som 细胞则稀疏散布在前腺和中腺各处(图版 I: 8、10;图版 II: 13)。由于 GH 细胞分布密度大,排列过分拥挤,细胞形状无法展示,细胞彼此相连成片,呈强阳性反应,但仍可见其胞核呈阴性反应(图版 I: 9、12)。Som 细胞的形状多样,有的呈球形、三角形(图版 II: 14—16),还有梨形、蝌蚪形(图版 II: 17—19)。它们有的胞突较长,有的胞体较大,其胞核呈空泡状,有的胞体和胞突中 Som 分泌颗粒清晰可见。由图版 I 中 5 和 6、7 和 8、9 和 10 三对连续相邻切片图可见分泌 GH 和 Som 二种激素的内分泌细胞的分布截然不同,可证实这两种激素是由不同的细胞所分泌。

3 讨论

链霉亲和素——生物素化过氧化物酶复合物 (Strept Avidin Biotin-peroxidase Complex SABC) 法是一种优于卵白素-生物素-过氧化物酶复合物 (ABC) 法的用以显示细胞或组织中抗原分布的免疫细胞化学方法。其中由于链霉亲和素的加入所形成的复合物可以与各种生物素标记的抗体结合。由于这种方法的使用,使免疫细胞化学的结果更加稳定、可靠。本研究结果证实在这 8 种有胃硬骨鱼的消化道和胰腺中没有 GH 抗原存在。可证明草鱼 GH 不属于胃肠激素,而是一种由鱼类脑垂体的间叶(中腺垂体)生长激素细胞合成后所分泌^[11]。GH 细胞不仅存在于中腺垂体中,还有少数分布在前腺垂体中。

Som 已被证实是一种胃肠激素,它可以通过腔内分泌,旁分泌和内分泌等途径来完成其生理机能。过去曾在水牛^[13]、大鼠^[14]、鸟类^[15]以及鱼类的消化道中均发现 Som 细胞的存在。Som 最初是从下丘脑提取液中分离和鉴定的一种生长激素释放抑制激素,这种在脑内和胃肠道内双重分布的激素被称为脑-肠肽^[16]。这些肽类都具有一些共同点,显示了在神经和胃肠系统之间可能存在着某种内在联系。由图版 II 所显示的 Som 细胞的形态是典型的鱼类 GEP (gastro-entero-pancreatic) 中的 APUD (amine precursor uptake and decarboxylation) 细胞的形态,它们有膨大的胞体,胞核在免疫反应时呈阴性空泡状,胞体和胞突中均可见分泌颗粒的存在。有资料表明第三脑室中有一组 Som 神经元,它们的轴突和末梢在下丘脑的核团中有较密的分布^[16]。草鱼前腺垂体和中腺垂体中存在 Som 免疫活性内分泌细胞,提示了鱼类尚存在一些未被知晓的生理机能。如何解释这种事实,尚需进一步研究。同时在 3 组连续相邻切片的照片中可见 GH 和 Som 在草鱼垂体中的免疫活性阳性反应出现在不同的区域,证明了在草鱼脑垂中, GH 和 Som 是存在于不同的细胞之中并由不同的细胞合成和分泌。

已有的研究资料表明,鱼类的胰岛中存在 6 种内分泌细胞。本研究在鳊和鲇的胰岛中又发现了 GH 细胞。在鳊的胰岛中, GH 细胞与胰导管相邻,这种分布特点提示了胰岛中 GH 细胞有可能进行腔内分泌的作用方式,将 GH 送入导管中,增强消化能力,从而提高饵料利用效率,降低饵料系数,最终促进鱼类生长发育,这样一种特殊的作用途径。

参 考 文 献

- [1] Weatherley A H, Gill H S, The biology of fish growth. New York; Academic Press, 1987
- [2] Komourdjian M P, et al. The effect of porcine somatotropin on growth, and survival in seawater of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr, *Can. J. Zool.*, 1976, **54**:531—535
- [3] Markert J R, et al. Influence of bovine growth hormone on growth rate, appetite, and food conversion of yearling coho salmon fed two diets of different composition. *Can. J. Zool.* 1977, **55**:74—83
- [4] Brownstein M, et al. The regional distribution of somatostatin in the rat brain. *Endocrinology*, 1975, **96**: 1456
- [5] Dube D R, et al. Immunohistochemical detection of growth hormone release inhibiting hormone (somatostatin) in the guinea pig brain, *Cell Tiss. Res.* 1975, **161**:385
- [6] Barden N, et al. Regional distributions of somatostatin and cholecystokininlike immunoreactivities in rat and bovine brain. *Peptides*, 1981, **2**:299
- [7] Luft R, et al. Immunohistochemical evidence for the localization of somatostatin-like immunoreactivity in

a cell population of the pancreatic islets. *Med. Biol.* 1974, 52:428

- [8] Polah G M, et al. Growth hormone release-inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D cells. *Lancet*, 1975, 1:1220
- [9] 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
- [10] 黄阴乔等. 大鼠全胃肠卷石蜡切片法及其在改良银浸法中的应用. 第四军医大学学报, 1985, 6(2): 156—159
- [11] 施琼芳. 鱼类生理学. 台北: 水产出版社, 1994
- [12] Clarke W C, et al. Effect of teleost pituitary growth hormone on growth of tilapia mossambica and on growth and seawater adaptation of sockeye salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1977, 33:174—178
- [13] 李克平等. 水牛胃肠胰(GEP)系统中生长抑素免疫反应细胞的形态和分布. 华中农业大学学报, 1988, 7(1): 73—77
- [14] 王庆堂等. 大鼠胃幽门 D 细胞内生长抑素的组织化学观察. 解剖学杂志, 1987, 10(3): 190—192
- [15] 周占祥等. 褐马鸡幽门区内分泌细胞的免疫组化研究. 动物学报, 1987, 33(3): 223—225
- [16] 王志均等. 胃肠激素. 北京: 科学出版社, 1985

IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF NINE TELEOSTS USING MONOCLONAL ANTIBODY OF GRASS CARP GROWTH HORMONE

Fang Zhiping, Pan Qiansheng, Chen Songlin¹⁾ and Zhao Yaxin

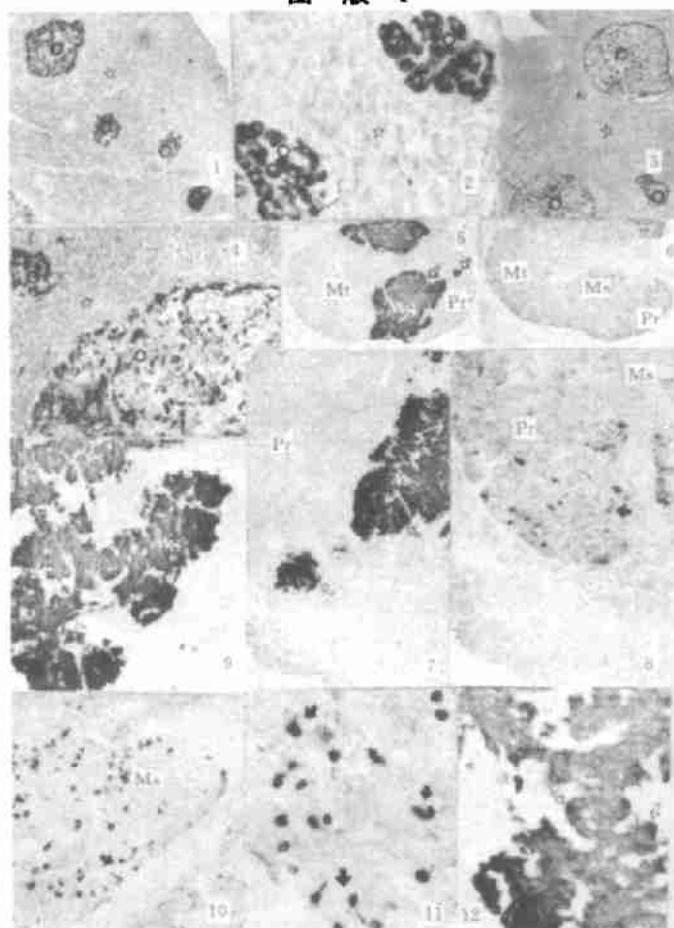
(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

1) (Changjiang Fisheries Institute, Jingzhou 434000)

Abstract Using immunocytochemical technique of Strept Avidin Biotin-peroxidase Complex (SABC), growth hormone (GH) immunoreactive endocrine cells in the gastro-entero-pancreas of northern snakehead (*Channa argus*), largemouth bass (*Micropterus salmoides*), oriental sheatfish (*Silurus asotus*), yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*), mandarin fish (*Siniperca chuatsi*), ricefield eel (*Monopterus albus*), freshwater pomfret (*Colossoma brachypomum*), and Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*) were located with monoclonal antiserum of grass carp GH raised against mouse. Using the same method, immunocytochemical localization of the hypophysis of grass carp were investigated with grass carp GH antiserum and somatostatin (Som) antiserum. Results showed that many GH immunoreactive endocrine cells existed in the islets of Langerhans of *S. chuatsi* and *S. asotus*, and no positive specificity reaction was found in all digestive tract of 8 teleosts GH- and Som-immunoreactive endocrine cells were found in the proadenohypophysis and meso-adenohypophysis of grass carp.

Key words Teleosts Monoclonal antibody of grass carp GH, Immunocytochemistry, Somatostatin

图版 I

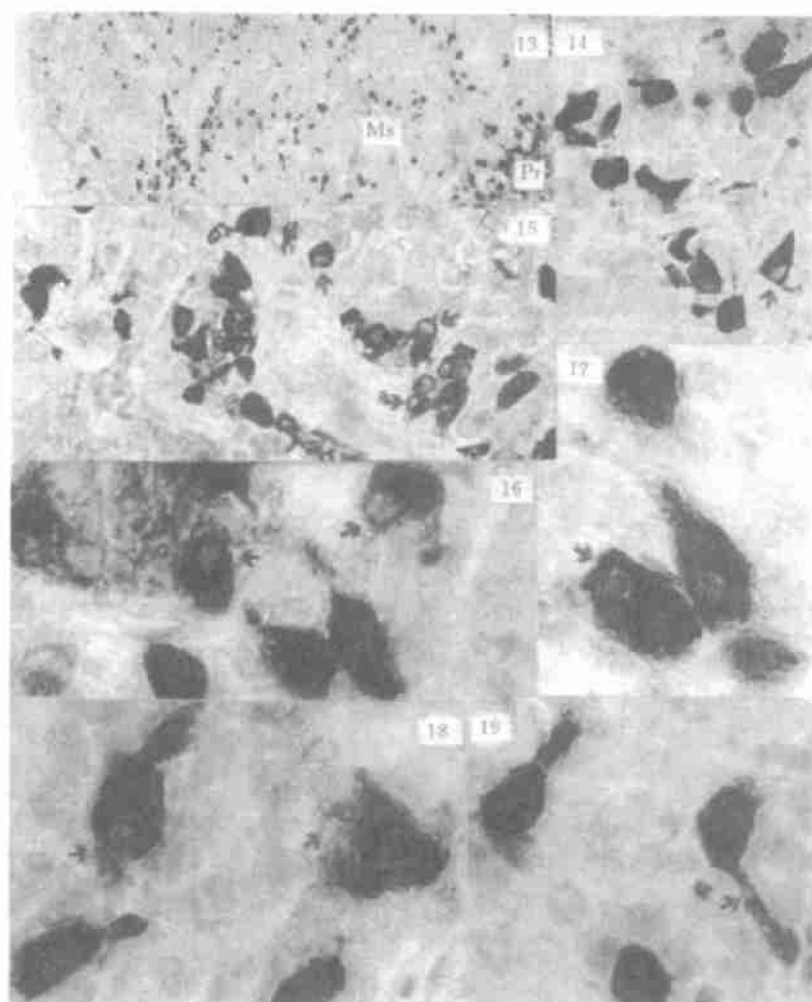


1. 鲢胰岛中 GH 免疫活性内分泌细胞(以下简称细胞)的分布, $\times 50$; 2. 鲢胰岛中 GH 细胞的形态, $\times 200$; 3. 鳊胰岛中 GH 细胞的分布, $\times 50$; 4. 鳊胰岛中 GH 细胞的形态, $\times 100$; 5. 草鱼垂体中 GH 细胞的分布, $\times 10$; 6. 草鱼垂体中 Som 细胞的分布, $\times 10$; 7. 草鱼垂体中 GH 细胞的分布, $\times 50$; 8. 草鱼垂体中 Som 细胞的分布, $\times 50$; 9. 草鱼垂体中 GH 细胞的形态, $\times 100$; 10. 草鱼垂体中 Som 细胞的形态, $\times 100$; 11. 草鱼垂体中 Som 细胞的形态, $\times 200$; 12. 草鱼垂体中 GH 细胞的形态, $\times 200$
(图 1—4 中, ☆—胰腺, ○—胰岛, ↑—胰导管, 图 5—12 中, Pr—前腺垂体, Ms—中腺垂体, Mt—后腺垂体, ↑—Som 细胞, ◆—GH 细胞)

1. Distribution of GH immunoreactive endocrine cells (bellow GH cells) in the islets of Langerhans of *S. asotus*, $\times 50$; 2. The morphology of GH cells in the islets of Langerhans of *S. asotus*, $\times 200$; 3. Distribution of GH cells in the islets of Langerhans of *S. chuatsi*, $\times 50$; 4. The morphology of GH cells in the islets of Langerhans of *S. chuatsi*, $\times 100$; 5. Distribution of GH cells in the hypophysis of grass carp, $\times 10$; 6. Distribution of Som cells in the hypophysis of grass carp, $\times 10$; 7. Distribution of GH cells in the hypophysis of grass carp, $\times 50$; 8. Distribution of Som cells in the hypophysis of grass carp, $\times 50$; 9. The morphology of GH cells in the hypophysis of grass carp, $\times 100$; 10. The morphology of Som cells in the hypophysis of grass carp, $\times 100$; 11. The morphology of Som cells in the hypophysis of grass carp, $\times 200$; 12. The morphology of GH cells in the hypophysis of grass carp, $\times 200$

(in Figs. 1—4, ☆—pancreas; ○—islets of Langerhans; ↑—Pancreatic duct; in Figs. 5—12, Pr—pro-adenohypophysis; Ms—meso-adenohypophysis; Mt—meto-adenohypophysis, ↑—Som cells, ◆—GH cells)

图版 II



13. Som 细胞在前腺垂体和中腺垂体中的分布, $\times 50$; 14. 前腺垂体中的 Som 细胞形态, 胞核呈阴性空泡状 (↑), $\times 200$; 15. 中腺垂体中的 Som 细胞形态, 细胞核 (↑) 呈阴性空泡状, $\times 200$; 16. Som 细胞形态, 胞核 (↑) 为阴性反应, $\times 500$; 17. 梨形 Som 细胞, 胞核 (↑) 为阴性反应, $\times 500$; 18. 蝌蚪形 Som 细胞, 胞核 (↑) 为阴性反应, 三角形 Som 细胞, $\times 500$; 19. 二个蝌蚪形 Som 细胞, 胞突中分泌颗粒 (↑) 清晰, $\times 500$

13. Distribution of Som cells in the pro-adenohypophysis (Pr) and meso-adenohypophysis (ms), $\times 50$; 14. The morphology of Som cells, cell nucleus (↑) are empty vesicle and negative, $\times 200$; 15. The morphology of Som cells in the pro-adenohypophysis, cell nucleus (↑) are negative and empty vesicle, $\times 200$; 16. The morphology of Som cells, cell nucleus (↑) show negative reactivity, $\times 500$; 17. Pear-shaped Som cells, cell nucleus (↑) are negative reactivity, $\times 500$; 18. A tadpole-shaped Som cell, cell nucleus (↑) shows negative reactivity, a triangle-shaped Som cell, $\times 500$; 19. Two tadpole-shaped Som cells, in the process the secretory granules (↑) are clear, $\times 500$