

8种有胃真骨鱼消化道降钙素免疫活性细胞的定位及形态学研究*

方之平 潘黔生 聂秀云 赵雅心 白雪梅

(华中农业大学畜牧兽医学院, 武汉 430070)

提 要

应用过氧化物酶标记的链霉卵白素免疫细胞化学技术对鱥、大口黑鲈、尼罗非鲫、短盖巨脂鲤、鮰、黄颡鱼、黄鳍和乌鳢等8种有胃真骨鱼消化道粘膜中降钙素免疫活性内分泌细胞进行了免疫细胞化学定位及形态学比较。结果表明, 在尼罗非鲫、鱥和大口黑鲈消化道的任何部位均未见到阳性反应。另外5种鱼消化道的不同部位可不同程度地见到阳性细胞, 其中黄颡鱼的整个消化道均有降钙素免疫活性的阳性反应; 黄鳍和乌鳢的肠道中则无阳性反应, 但在它们的胃以及黄鳍的食道中见到阳性细胞; 鮰除食道中没有发现阳性细胞外, 消化道各段中均有阳性细胞的存在; 短盖巨脂鲤则仅在食道中发现阳性细胞。降钙素免疫活性细胞在肠道中的形态大多为长梭形, 胞体膨大, 胞核呈空泡状, 有两个相对的胞突分别伸向肠腔和基膜; 胃中的降钙素细胞在位于胃上皮细胞之间时形状多为较短的梭形, 而位于胃腺中时其形状较前者更加粗、短, 胞突短小, 常常呈不规则形状沿胃腺管边缘分布。

关键词 有胃真骨鱼, 消化道, 降钙素, 免疫活性细胞

降钙素(Calcitonin, CT)是一种多肽激素, 其主要功能是调节体内钙平衡^[1]。血钙浓度增高时, 降钙素的分泌增加; 反之血钙浓度降低则可抑制降钙素分泌^[2]。CT由C细胞分泌,C细胞起源于神经嵴, 鱼类、两栖和鸟类的C细胞由神经嵴移至后腮腺, 而哺乳类则移至甲状腺, 因此, 在哺乳类又称为甲状腺滤泡旁细胞。在鱼类的后腮腺中相继发现这种激素的存在。研究表明, CT也存在于大鼠垂体前叶细胞, 并可直接作用于垂体, 影响垂体前叶催乳素(PRL)的释放^[3]。在大鼠的PRL细胞中也发现CT。对鱼类消化系统内分泌细胞的研究中还未涉及到CT内分泌细胞。本研究采用的免疫细胞化学技术是美国ZYMED公司1986年首创的, 利用链霉卵白素具有分子量小, 不含糖链, 等电点较低等优点, 使该法敏感性高、特异性强, 是当前理想的免疫染色技术^[4]。本研究利用这种方法, 使用哺乳

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39470554)

注: 潘黔生、白雪梅在华中农业大学水产学院工作; 聂秀云同志在武汉市洪山区水产研究所工作。

1997年2月20日收到; 1997年6月22日修回。

动物 CT 抗血清对 8 种淡水名优鱼类的消化道 CT 内分泌细胞定位, 可为进一步完善鱼类胃肠道 (Gastro-entero-pancreatic, GEP) 内分泌系统的研究提供最新资料。

1 材料和方法

1.1 取材制片 黄鳝 [*Monopterus albus* (Zuiew)]、乌鳢 [*Channa argus* (Cantor)] 和鮀 [*Silurus asotus* (Linnaeus)] 购自武昌大东门市场, 鳜 [*Siniperca chuatsi* (Basilewsky)]、黄颡鱼 [*Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson)] 购自交通路市场, 短盖巨脂鲤 [*Colossoma brachypomum* (Cuvier)]、尼罗非鲫 [*Tilapia nilotica* (Linnaeus)] 购自洪山渔牧二场, 大口黑鲈 [*Micropterus salmoides* (Lacépède)] 购自武昌南湖渔场。以上 8 种鱼各 5 尾, 清水中暂养 24h, 待胃肠内容物排净后鲜活时解剖, 取出整个消化道, 迅速投入无冰醋酸的 Bouin 液中, 按食道、贲门、胃底、幽门、幽门垂(仅大口黑鲈、鳜、乌鳢有)、肠等部位取材, 使用肠卷石蜡切片法^[5], 低度石蜡包埋, 切片 6μm, 明胶贴片, 40℃ 烘片 36h。

1.2 抗血清及主要试剂 兔抗 CT 抗血清(多克隆抗体), 美国 ZYMED 公司产品, 工作稀释度 1:200; 过氧化物酶标记链霉亲和素试剂盒(S-PTM), 美国 ZYMED 公司产品, 工作稀释度 1:100; 3'-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产品, 由群马大学内分泌研究所井上金治博士提供。

1.3 过氧化物酶标记链霉亲和素 (Streptavidin-peroxidase) 免疫细胞化学染色技术 上述烘干切片脱蜡至水入 0.3% H₂O₂-methanol 中孵育 5min, 消除内源性过氧化物酶的活性, 再以 5%—10% 正常山羊血清室温中封闭 10min 后于一抗血清(兔抗 CT) 中孵育过夜, 后在生物素标记的羊抗兔 IgG(1:100) 37℃ 中孵育 15min, PBS 洗净后在辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素复合液(1:100) 37℃ 中孵育 15min。以上过程均在湿盒中进行并保持 pH7.3。最后以 0.05%DAB、0.01%H₂O₂、0.05mol / L pH7.6 的 Tris-HCl 缓冲液中显色 10—15min, Harris 苏木素复染胞核。对照片取每种鱼每个部位免疫细胞化学染色切片的相邻连续切片, 以正常山羊血清取代一抗血清, 其余步骤均与以上各步骤同步进行。

1.4 观察和计数 8 种鱼每种 5 尾, 每尾鱼 8 至 9 个取材部位都置于 Olympus BH-2 显微镜下观察鉴别, 并于 10×20 倍下计数, 显微摄影。切片上所显示棕色或棕黑色阳性细胞为 CT 免疫活性内分泌细胞。各取材部位任意 10 个视野的阳性细胞的平均数为每尾鱼每一取材部位的阳性细胞数, 每种鱼再取 5 尾的平均数即代表每种鱼的该部位的 CT 内分泌细胞的分布密度。以 5 个等级来表示分布密度。

2 结果

经免疫细胞化学染色后的切片上显示出棕色或棕黑色的阳性反应细胞即为 CT 免疫活性内分泌细胞。全部对照片均呈阴性反应。尼罗非鲫、鳜和大口黑鲈 3 种鱼消化道的各部位均为阴性反应, 其余 5 种鱼在各部位不同程度地见到阳性细胞(表 1 列出了平均每个视野的细胞数)。

由表 1 可知鮀的消化道除食道之外的每个部位均有 CT 免疫活性细胞(以下简称 CT 细胞) 分布, 而短盖巨脂鲤则与之相反; 乌鳢的胃中, 黄鳝的食道及胃中分布有 CT 细胞, 但在肠中却没有发现; 黄颡鱼从食道至后肠的整个消化道中均可见到 CT 细胞。

表1 5种鱼消化道粘膜中CT免疫活性细胞的分布

Tab.1 Distribution of CT immunoreactive cells in the digestive tract mucosa of 5 species of fish

	食道 Oesophagus	贲门 Cardia	胃底 Fundus	幽门 Pylorus	幽门垂 Pyloric caeca	前肠 Foregut	中肠 Midgut	后肠 Hindgut
鮀 <i>S. asotus</i>	-	+	++	++		+++	++	++
黄颡鱼 <i>P. fulvidraco</i>	+	+	++	+++		+	+	+
黄鳍 <i>M. albus</i>	++++	+	-	+		-	-	-
乌鳢 <i>C. argus</i>	-	+	++++	+++	-	-	-	-
短盖巨脂鲤 <i>C. brachypomum</i>	+	-	-	-		-	-	-

注: ++++ 30个以上; +++ 20—30; ++ 10—20; + 10个以下; -无。

CT 细胞大部分分布在食道、胃和肠粘膜上皮中,其次分布于胃腺腺细胞之间或腺管之间。同时在固有膜,粘膜下层,甚至肌间神经丛的神经细胞也可见到免疫阳性反应(图版 I : 2)。鮀的 CT 细胞在肠的前段分布最密(图版 I : 3, 表 1),在胃中主要分布于胃腺泡上(图版 I : 4)。在鮀的肠中,CT 细胞的形态大多为长梭形,有 2 个长的胞突分别通向基膜和肠腔,胞体居中,膨大,胞核呈空泡状(图版 I : 1, 2);而胃腺中的 CT 细胞则突起较短(图版 I : 4)。黄颡鱼的 CT 细胞在胃中分布最多,以幽门和胃底为最多。在幽门中常以细胞群的形式分布于胃小凹底部胃上皮细胞之间(图版 I : 5, 6);在胃底中则大多分布在胃腺管上皮之间或游离于胃腺管之间(图版 I : 7, 8)。它们有较大的胞体和沿胃腺上皮基膜伸出较短的胞突进行分泌。黄鳍在食道的复层上皮细胞之间夹有数目较多的排列不整齐的 CT 细胞(图版 II : 9),它们的分泌功能旺盛,分泌物成球团状进入腔中或紧贴基膜(图版 II : 10);从食道向后的整个消化道除在胃中有少量分布外,肠中完全没有阳性反应。乌鳢的 CT 细胞与黄颡鱼的大致相似,它们不仅分布于胃小凹底部,而是遍布于胃上皮细胞之间,有时亦成群分布(图版 II : 12, 13);而胃腺上的 CT 细胞的形状不规则,成堆分布(图版 II : 14)。短盖巨脂鲤仅在食道中偶见 CT 细胞,其形态与黄鳍食道中的 CT 细胞大相径庭,为长梭形,与肠中的 CT 细胞的形态相似(图版 II : 11)。

另外,在黄颡鱼胃上皮细胞中的高尔基体区也有阳性反应,这些部位的 CT 免疫活性反应十分明显,单层柱状上皮细胞的核上高尔基体区显示出一排深棕色的阳性反应,它们与胃腺及上皮细胞之间 CT 细胞的颜色完全一致,而该器官的其它部位的组织和细胞则表现出与之反差较大的阴性反应。

3 讨论

抗生素素蛋白——生物素系统虽然是目前较好的免疫细胞化学方法,但它与本研究比还是稍逊一筹,因为抗生素素蛋白具有较高的等电点($IP = 10.0 - 10.5$),分子量大

(67KD), 它含有4%的糖为寡糖, 这些结构都会产生非特异性反应, 增加背景色^[6,7]。而链霉亲和素除具有与抗生素蛋白同样的优点外, 它的等电点低($IP = 6.0 - 6.5$), 分子量较小(60KD), 不含寡糖, 非特异性吸附很低^[9]。本研究利用目前最灵敏的一种免疫细胞化学染色方法, 将抗哺乳动物降钙素的抗血清应用于8种有胃真骨鱼的消化道中CT细胞定位, 无疑是行之有效的。研究已证实, 无论是在无胃^[9]还是有胃真骨鱼的消化道中都存在着能分泌肽激素的散在分布的内分泌细胞。这几种有胃真骨鱼属不同的目、科, 它们的食性与胃肠的解剖学结构也不尽相同^[10], 其间所散在的内分泌细胞的分布也必不相同。与以前对4种不同食性无胃真骨鱼肠道中高血糖素免疫活性内分泌细胞的定位一样—分布各不相同^[11]。

各种鱼的CT细胞在胃上皮、胃腺和肠上皮甚至固有膜和肌间神经丛中的形态是随其所处部位的相邻上皮细胞的排列方式以及其本身的功能所需而各异。在胃和肠的单层柱状上皮细胞之间的CT细胞受周围上皮细胞的挤压而成为长梭形, 并将胞突伸向肠腔和基膜, 这与无胃鱼肠道中的散在内分泌细胞的形态一致^[12]。存在于胃腺管上皮细胞之间和腺管之间的CT细胞的长度相对较短些, 其形态也与腺管上皮细胞接近。在食道中, 黄鳍的食道上皮细胞层数多, 胞体较小, 排列不规则, 其CT细胞排列及形态均无规则, 其分泌物亦入腔或基膜处, 进行外分泌和旁分泌; 比较而言, 短盖巨脂鲤的食道上皮细胞层数少, 细胞排列较有序, 因此散在于其间的CT细胞也表现出长梭形。

本研究观察到在黄颡鱼的胃上皮细胞的核上方排成一列整齐的高尔基体区阳性反应带, 由于本研究所用的染色法非特异性结合的背景很低, 因此可以认为这种阳性反应是一种特异性结合。这种现象在对无胃鱼肠道的研究中也有所发现^[11], 并支持Rombout用免疫电镜证实了抗原被肠上皮细胞吸收并转运到核上区囊泡(Supranuclear vacuoles)即高尔基体区的结论^[13]。这种抗原被吸收和转运具有免疫学方面的意义。正如本研究在鮰鱼肠的固有膜层中亦见到阳性反应, 这提示抗原被固有膜中巨噬细胞吞噬所致。在其肌间结缔组织中亦可见到CT细胞, 这些阳性细胞是肌间神经丛中的副交感神经节后神经元, 它们活动时使胃肠运动增强, 其内的降钙素丰富可证实神经组织合成免疫调节的这一最新论述^[14], 为免疫-神经-内分泌网络学说提供了形态学依据。

参 考 文 献

- [1] 陈 曜. 在催乳素细胞中发现降钙素. 生理科学进展, 1990, 21(1): 30.
- [2] 施璇芳. 鱼类生理学. 北京: 农业出版社, 1991.
- [3] 童国遐. 降钙素可直接作用于大鼠垂体. 生理科学进展, 1990, 21(2): 170.
- [4] 倪灿荣. 免疫组织化学实验新技术及应用. 北京: 北京科学技术出版社, 1993, 132.
- [5] 黄荫乔等. 大鼠全胃肠卷石蜡切片法及其在改良的银浸法中的应用. 第四军医大学学报, 1985, 6(2): 156—159.
- [6] Bonnard C, et al. The streptavidin-biotin bridge technique: application in light and electron microscope immunocytochemistry. In: Immunolabelling for Electron Microscopy. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1984, 95—111.
- [7] Hofmann K, et al. Immunobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1980, 77: 4666—4668.

- [8] Chaiet L, Wolf F J. The properties of streptavidin, a biotinbinding protein produced by streptomycetes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1964, **106**(1): 1—5.
- [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] 潘黔生等. 6种有胃真骨鱼消化系统比较解剖的研究. 华中农业大学学报, 1996, **15**(5): 463—469.
- [11] 潘黔生、方之平、朱邦科等. 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.
- [12] 潘黔生、方之平、樊启学等. 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.
- [13] Rombout JHWM Berg van den AA. Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *J Fish Biol.*, 1989, **35**(1): 13.
- [14] 朱长庚. 免疫—神经—内分泌网络. 解剖学报, 1993, **24**(2): 216—221.

LOCALIZATION AND MORPHOLOGY STUDIES ON CALCITONIN IMMUNOREACTIVE CELLS IN THE DIGESTIVE TRACTS OF EIGHT SPECIES OF STOMACH-CONTAINING TELEOSTS

Fang Zhiping, Pan Qiansheng, Nie Xiuyun, Zhao Yixin and Bai Xuemei

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

Abstract

By using immunocytochemical technique of streptavidin labelled peroxidase, calcitonin immunoreactive cells in the digestive tract mucosa of mandarinfish (*Siniperca chuatsi*), largemouth bass (*Micropterus salmoides*), nile tilapia (*Tilapia nilotica*), freshwater pomfret (*Collossoma brachypomum*), oriental sheatfish (*Silurus asotus*), yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*), ricefield eel (*Monopterus albus*) and northern snakehead (*Channa argus*) were located and compared morphologically. Results showed that calcitonin immunoreactive cells were not found in any part of digestive tract of mandarinfish, nile tilapia and largemouth bass, but could be found in different part of digestive tract of other 5 species of stomach-containing teleosts. Positive reaction of calcitonin immunoreactive cell was found in all digestive tract of yellow catfish. No positive reaction was found in the intestine of ricefield eel and northern snakehead; but positive cells were found in their stomach and in the oesophagus of ricefield eel. Positive cells were seen in all part of digestive tract except oesophagus of oriental sheatfish. Positive cells were only seen in the oesophagus of freshwater pomfret. In the intestine, most of immunoreactive cells show a long shuttle-shaped, expanded cell body, nucleus show vacuole-like, and there are two opposite cytoplasmic processes extending to the gut lumen and the basement membrane

respectively. In the stomach, calcitonin immunoreactive cells show a short shuttle-shaped when they locate among the epithelial cells space; their shape is more thick and short, having a small and short cytoplasmic processe, showing often irregular in shape; they locate along the edge of gastric fundus gland.

Key words Stomach-containing teleosts, Digestive tract, Calcitonin, Immunoreactive cell

图 版 说 明

图 版 I

1. 鮟肠上皮中 CT 细胞的分布及形态(↑), ×132; 2. CT 细胞分布于鮟肠粘膜(↑)及肌间神经丛中(↑), ×33; 3. 鮟前肠中 CT 细胞的分布密度(↑), ×66; 4. 鮟胃腺中 CT 细胞(↑)的形态, ×330; 5. 黄颡鱼幽门上皮细胞间 CT 细胞(↑)的分布, ×66; 6. 黄颡鱼幽门上皮细胞间 CT 细胞成群分布(↑)及上皮中高尔基体区阳性染色带(↑), ×132; 7. 黄颡鱼胃底腺 CT 细胞分布密度(↑)及上皮中高尔基体区阳性染色带(↑), ×66; 8. 黄颡鱼胃底腺 CT 细胞的形态(↑)及上皮中高尔基体区阳性染色带(▲), ×132;

1. Distribution and shape of CT cells(↑) in the gut epithelium of *S. asotus*, ×132; 2. CT cells in the intestinal mucosa(↑) and the nerve plexus intermuscularium (↑) of *S. asotus*, ×33; 3. Distribution density of CT cells (↑) in the foregut of *S. asotus*, ×66; 4. Shape of CT cell (↑) in the gastric gland of *S. asotus*, ×330; 5. Distribution of CT cells (↑) among the epithelial cells of pylorus of *P. fulvidraco*, ×66; 6. Distribution in groups of CT cells (↑) among pyloric epithelial cells and positive staining band (↑) of Golgi zone in epithelium of *P. fulvidraco*, ×132; 7. Distribution density of CT cells (↑) in gastric fundus glands and positive staining band (↑) of Golgi zone in epithelium of *P. fulvidraco*, ×66; 8. Shape of CT cell (↑) in gastric fundus glands and positive staining band (▲) of Golgi zone in epithelium of *P. fulvidraco*, ×132

图 版 II

9. 黄鳍食道上皮细胞间 CT 细胞(↑)排列不规则, ×66; 10. 黄鳍肠上皮细胞间的 CT 细胞与其分泌物(↑), ×132; 11. 短盖巨脂鲤食道上皮中长梭形 CT 细胞(↑), ×132; 12. 乌鳢胃底上皮中 CT 细胞的分布, ×33; 13. 乌鳢胃底上皮细胞间 CT 细胞(↑)的形态, ×132; 14. 乌鳢胃底腺中 CT 细胞(↑), ×132;

9. Irregular arranging CT cells (↑) among the epithelial cells of oesophagus in *M. albus*, ×66; 10. CT cell (↑) among the epithelial cells of intestine and its secretion in *M. albus*, ×132; 11. A long shuttle-shaped CT cell (↑) in the oesophagus epithelium of *C. brachypomum*, ×132; 12. Distribution of CT cells in gastric fundus epithelium of *C. argus*, ×33; 13. Shape of CT cells (↑) among the epithelial cells of gastric fundus in *C. argus*, ×132; 14. CT cells (↑) in gastric fundus glands of *C. argus*, ×132