

文章编号: 1000- 0615(2002)06- 0481- 05

# 鲮鱼胃肠道内分泌细胞免疫组织化学的定位

方永强<sup>1</sup>, 翁幼竹<sup>1</sup>, 胡晓霞<sup>1</sup>, 林君卓<sup>2</sup>

(1. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2. 福建海洋研究所, 福建 厦门 361012)

**摘要:**用 7 种哺乳类胃肠激素抗体对鲮鱼消化道内分泌细胞进行免疫组织化学定位。结果表明 5-HT、SST、VIP、GAS 和 P 物质免疫活性内分泌细胞均存在于鲮鱼胃肠粘膜中, 而胰高血糖素和胰岛素则显免疫阴性反应。文中还描述了鲮鱼胃肠道免疫活性内分泌细胞的形态学特点及在胃肠各部的分布密度, 并对其可能的分泌方式和功能进行了讨论。

**关键词:** 鲮鱼; 免疫组织化学; 胃肠激素

中图分类号: S917 文献标识码: A

## Immunohistochemical localization of endocrine cells in gastrointestinal tract of *Mugil cephalus*

FANG Yong-qiang<sup>1</sup>, WENG You-zhu<sup>1</sup>, HU Xiao-xia<sup>1</sup>, LIN Jun-zhuo<sup>2</sup>

(1. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China;

2. Fujian Institute of Oceanography, Xiamen 361012, China)

**Abstract:** Gut hormones immunoactivities were studied in the gut of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) using antisera against mammalian 5-hydroxytryptamine (5-HT), somatostatin (SST), gastrin (GAS), P substance, vasoactive intestinal peptide (VIP), insulin and glucagon. 5-HT, SST, VIP, GAS, P substance immunoactive cells were detected in the gastroenteric mucosa of grey mullet, but the immunoactivity of glucagon and insulin in the gut mucosa was not detected.

In the present paper, the morphological characteristics and the distribution density in all stomach intestinal segments of immunoreactive endocrine cells in the gastrointestinal tract were described. At the same time, the possible way of secretion and the physiological function of these endocrine cells were discussed.

**Key words:** *Mugil cephalus*; immunohistochemistry; gastrointestinal hormones

鲮鱼是世界性养殖鱼类, 也是我国东南沿海广泛养殖的海产经济鱼类。此鱼肉质鲜美, 营养价值高, 抗病力强。它的卵巢可以替代大马哈鱼卵巢, 加工为鱼仔酱, 而成为名贵海珍品。在推广鲮鱼人工养殖时, 遇到的问题是提高鲮鱼人工饲料的质量, 加快其生长速度。因此, 很有必要对鲮鱼胃肠道激素在消化道中的分布进行研究。现已研究证实, 鱼类胃肠道激素不仅参与调节食物在胃肠道中的消化吸收过程, 而且还能影响其它一些内分泌腺的活动, 对胃肠本身具有营养作用, 对摄食行为也具有控

收稿日期: 2002-02-08

资助项目: 福建省重中之重资助项目

作者简介: 方永强(1937), 男, 福建云霄人, 研究员, 从事海洋动物生殖内分泌学研究。Tel: 0592-2195277, E-mail: fant98@public.xm.

制作用<sup>[1]</sup>。为此,我们采用免疫组织化学技术,用7种哺乳类胃肠道激素抗体对鲮鱼胃肠道各部进行定位研究,目的在于为鲮鱼营养与消化生理学以及人工饲料的科学配方提供基础资料和理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品制备

鲮鱼(*Mugil cephalus* L)取自福建龙海市福建省水产研究所苗种繁殖中试基地土池养殖的鲮鱼,体长21.5~24.7 cm。采集的样品在海水中暂养48 h,用丁香酚麻醉后,打开腹腔,小心分离出胃、小肠、中肠和后肠4个部位,入新配制 Bouin 氏液中固定12~16 h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,塑料石蜡(paraplast)包埋,作连续横切或纵切片,厚6 $\mu$ m,用于免疫组织化学反应。

### 1.2 免疫组织化学反应

鲮鱼胃肠道切片脱蜡水化后,入含0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇液20 min,除去内源性过氧化物酶活性,然后按免疫组织化学链霉亲合素、生物素-过氧化物酶复合物技术(strept avidin biotin complex, SABC)进行免疫组织化学反应。第一抗体分别为兔抗5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)抗体(第四军医大学组织胚胎教研室研制),工作浓度为1:1500;兔抗生长抑素(somatostatin, SST)抗体(丹麦Dako公司产品),工作浓度为1:500;兔抗胃泌素(gastrin, GAS)抗体,工作浓度为1:200;兔抗P物质(P substance)抗体,工作浓度为1:1000;兔抗血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)抗体,工作浓度为1:1000;兔抗胰岛素(insulin)抗体,工作浓度为1:100;兔抗胰高血糖素(glucagon)抗体,工作浓度为1:50。在4℃孵育24 h, PBS洗三次,后加生物素标记羊抗兔抗体(1:100)孵育20 min,加SABC复合物,室温下孵育30 min,最后用3',3'-二氨基联苯胺(DAB)显色10~30 min。在光镜下( $\times 400$ )观察,每个切片中任选10个视野,计数每平方毫米内各种免疫活性细胞的平均数量,表示各部位分布密度。

对照实验:省去一抗或用正常兔血清替代一抗孵育切片,结果为免疫阴性反应。

## 2 结果

### 2.1 鲮鱼胃肠道中免疫活性内分泌细胞的种类及分布

免疫组织化学反应结果表明5-HT(5-羟色胺)、SST(生长抑素)、GAS(胃泌素)、P物质、VIP(血管活性肠肽)、5种兔抗人胃肠道激素抗体均在鲮鱼胃、小肠、中肠和后肠显免疫活性反应,而胰高血糖素和胰岛素抗体则显免疫阴性反应。这些免疫活性细胞在胃肠道的形态、类型和分布的特点是:

(1)5-HT细胞:在鲮鱼胃肠道中,5-HT免疫活性细胞有两种类型,一种是开放型,另一种是封闭型。前者有两种不同形态,其特点是,一种细胞为柱状,细胞基部膨大成圆锥形,向上伸出短的胞质突起,免疫染色为深棕色,另一种内分泌细胞为长柱形,有短的胞质突起(图版-1,2)。后者为椭圆形,可见胞质中有小的分泌颗粒,没有伸出胞质突起(图版-3)。5-HT免疫活性细胞广泛分布在鲮鱼胃、小肠、中肠和后肠,分布密度为:胃2个细胞 $\cdot$ mm<sup>-2</sup>、小肠16个、中肠和后肠各为6个。

(2)SST细胞:SST免疫活性细胞在胃、小肠、中肠和后肠都有广泛分布。开放型细胞底部膨大或为柱状,细长胞质突起伸向胃、小肠、中肠和后肠粘膜下层至绒毛(图版-4,5,6)。封闭型免疫活性细胞为卵圆形,位于胃和小肠上皮基部或肠腺细胞之间,与开放型细胞混杂在一起。在消化道各部免疫活性细胞分布密度是:胃26个细胞 $\cdot$ mm<sup>-2</sup>、小肠34个、中肠20个和后肠18个。小肠中SST免疫活性细胞的数量最多,胃次之。

(3)GAS细胞:开放型细胞为柱形,基部略膨大,位于肠粘膜基部,有短的胞质突起,染色为深棕色(图版-7)。另一种柱状内分泌细胞位于小肠固有膜基部,有短的胞质突起(图版-8)。GAS内分泌细胞的分布密度是:胃6个细胞 $\cdot$ mm<sup>-2</sup>、小肠4个、中肠4个和后肠2个。

(4)P物质细胞:该细胞有多种不同形态。开放型细胞有两种不同形态,一种为粗柱状或圆锥形,细

胞位于肠基膜基部, 另一种为细长柱形, 有短的胞质突起(图版- 9, 10)。靠近基膜处的封闭型细胞形态为卵圆形, 数量较多, 位于腺体基部和胃粘膜下层, 染色为深棕色。免疫活性细胞广泛分布在胃、小肠、中肠和后肠中, 分布密度分别为: 胃  $19 \text{ 个细胞} \cdot \text{mm}^{-2}$ 、小肠  $12 \text{ 个}$ 、中肠  $17 \text{ 个}$  和后肠  $16 \text{ 个}$ 。

(5) VIP 细胞: VIP 免疫活性细胞在鳙鱼胃肠道的定位特点是, 大多数细胞分布在胃粘膜基部及其粘膜下层, 细胞为椭圆形或长柱形, 其中有的细胞突起伸向邻近细胞, 并夹杂在卵圆形与圆锥形细胞之间, 染深棕色(图版- 11); 另一种细胞为粗柱形, 细胞基部略有膨大, 可见胞内有分泌颗粒(图版- 12)。VIP 免疫活性细胞分布密度为: 胃  $24 \text{ 个细胞} \cdot \text{mm}^{-2}$ 、小肠  $16 \text{ 个}$ 、中肠  $12 \text{ 个}$  和后肠  $20 \text{ 个}$ 。

## 2.2 胃肠免疫活性内分泌细胞的形态学特点

鳙鱼胃肠道各种免疫活性内分泌细胞的免疫染色反应均呈深棕色, 明显区别于胃肠粘膜层中其它上皮细胞。这些细胞均散在地分布于胃肠上皮细胞和杯状细胞之间, 具有独特形态。有些细胞胞体较大并有一个长的胞质突起(图版- 6, 7), 通向胞腔的突起较长, 通向基膜的突起较短并与基膜相接触为其特征。而有些内分泌细胞未见胞突, 形状为卵圆形或椭圆形(图版- 3, 4, 5, 9, 11)。此外, 还有少数内分泌细胞伸向基膜和邻近细胞基部(图版- 9, 11)。

## 3 讨论

硬骨鱼类胃肠道激素免疫组织化学定位在国内外已有许多学者做过报道。Al Mahrouki 和 Youson [2] 报道生长抑素、胰多肽在骨舌鱼、巩鱼、齿蝶鱼、弓背鱼和指吻鱼 5 种鱼类胃- 肠- 胰腺系统中的分布。Groff 和 Youson [3] 和 mez Visus 等 [4] 对两种鱼, 雀鳊 (*Lepisosteus osseus*) 和舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 的胰腺、胃肠中的生长抑素、胰高血糖素和胰多肽进行定位研究。国内学者唯有潘黔生和方之平 [5-9] 对淡水鱼类胃肠激素在消化道的分布进行大量研究, 他们先后在草鱼、鲤鱼、青鱼、鲢鱼、鳙鱼、团头鲂, 银鲫和鳊鱼等 8 种淡水鱼类, 用免疫组织化学方法对这些鱼胃肠中内分泌细胞进行定位研究, 发现了胰高血糖素、胃泌素、抑胃多肽、牛胰多肽、亮氨酸脑啡肽、P 物质、生长抑素、胆囊收缩素、5- 羟色胺和神经降压素等 10 种胃肠激素在消化道各部位的分布及其密度。而对于海水鱼类胃肠激素在消化道中的分布及其生理作用, 除方永强等 [10] 曾对欧洲鳗鲡胃肠激素的分布作过报道外, 迄今在国内尚未查阅到可利用资料。

本文用 7 种胃肠激素抗体进行免疫组化定位, 其中有 5 种胃肠的内分泌细胞均定位在鳙鱼胃肠的不同部位, 并计数其分布密度。结果表明 SST、P 物质和 VIP 主要分布在胃和小肠。其中, SST 细胞在胃和小肠的分布特点与 Al Mahrouki 和 Youson [2] 和方之平等 [5] 报道相一致, 而与 Rombout 等 [11, 12] 报道不同, 后者认为 SST 免疫活性内分泌细胞仅存在于硬骨鱼的胃中。我们认为, SST 在胃肠道中分布广泛, 且数量多, 可能与 SST 具有抑制胃肠激素分泌及胃肠蠕动的功能有关, 这对胃肠道分泌与抑制活动达到动态平衡将起着重要的调节作用。另外, 这些内分泌细胞在胃肠道的分布密度从前至后没有出现明显的递减趋势, 这可能是这种杂食性鳙鱼的一种特性, 与草食性和肉食性 [5, 7] 鱼类分布有差别。5-HT 是存在于神经系统和胃肠道的一种重要的神经递质和胃肠激素。有的学者研究发现, 当胃肠壁受到化学和物理刺激时, 5-HT 被释放到肠腔, 可增进小肠蠕动 [12]。方永强等 [10] 报道, 生长十分缓慢的欧洲鳗鲡(俗称僵鳗) 胃肠中 5-HT 免疫活性细胞的数量明显少于正常生长的欧鳗。本文研究发现 5-HT 免疫活性细胞在鳙鱼小肠中分布密度最高, 提示 5-HT 在鳙鱼肠道消化吸收中起重要的调节作用。胃泌素在鳙鱼胃肠的分布以胃最多, 我们认为这可能与胃泌素的生理作用是刺激胃液分泌有关。P 物质在鳙鱼胃肠道中广泛分布, 这与 P 物质具有刺激平滑肌收缩的功能有关, 这对于胃肠道的正常排泄功能是必需的。

其次, 胃肠道开放型内分泌细胞具有较长的胞质突起, 并与肠腔相通, 提示这种细胞直接将激素释放到肠腔, 其生理意义我们完全赞同潘黔生和方之平等 [5] 的分析, 它能够调节自身的分泌率。至于那些内分泌细胞的胞质突起伸向邻近细胞或者基膜, 并与之相接触, 很有可能这类细胞通过旁分泌来局部调

## 节腺细胞的营养和分泌活动。

综上所述,本研究仅是为鲮鱼胃肠道内分泌细胞形态和分布及其可能的功能提供形态学资料,至于这些细胞确凿的生理机能和如何调节胃肠活动仍很有必要进行全面和深入的研究。

## 参考文献:

- [1] Pan Q S, Fang Z P. Present progress in the study of the APUD cells in gastroenteropancreatic 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[J]. 水生生物学报, 1995, 19(3): 275- 282.]
- [2] Al Mahrouki, Youson JH. Immunohistochemical studies of the endocrine cells within the gastroenteropancreatic system of osteoglossomorpha, an ancient teleostean group[J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 110: 125- 139.
- [3] Groff K E, Youson J H. An immunohistochemical study of the endocrine cells within the pancreas, intestine, and stomach of the gar (*Lepisosteus osseus* L)[J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 106(1):1- 16.
- [4] mezVistus I G, rHerna ndez M P G, Lozano M T, et al. Glucagor and NPY-related peptide immunoreactive cells in the gut of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L): a light and electron microscopic study[J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 112(1): 26- 37.
- [5] Fang Z P, Jurzo Yamada, Pan Q S. Immunohistochemical identification and localization of endocrine cells in the intestinal mucosa of common carp and black carp[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1991, 15(3): 212- 219. [方之平,山田纯三,潘黔生. 鲤、青鱼肠粘膜内分泌细胞的免疫组织化学鉴别和定位[J]. 水生生物学报, 1991, 15(3): 212- 219.]
- [6] Pan Q S, Fang Z P. An immunocytochemical study of endocrine cells in the gut of a stomachless teleost fish, grass carp, Cyprinidae[J]. Cell Transplantation, 1993, 2: 419- 427.
- [7] Pan Q S, Fang Z P, Zhu B K, et al. Immunohistochemical study on L cells in the gut of four kinds of stomachless teleost[J]. Acta Anatomica Sinica, 1995, 26(1): 81- 84. [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[J]. 解剖学报, 1995, 26(1): 81- 84.]
- [8] Pan Q S, Fang Z P. Immunohistochemical localization and comparison of gastrin immunoreactive cells in the gut of four cyprinid fishes[J]. Acta Central China Agricultural University, 1988, 7(3): 238- 242. [潘黔生,方之平. 4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[J]. 华中农业大学学报, 1988, 7(3): 238- 242.]
- [9] Pan Q S, Fang Z P. The immunocytochemical evidence for two hormones in the gastrointestinal endocrine cells of mandarin fish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001, 25(6): 565- 570. [潘黔生,方之平. 几种激素在鲮鱼胃肠道内分泌细胞中处在的免疫细胞化学证据[J]. 水生生物学报, 2001, 25(6): 565- 570.]
- [10] Fang Y Q, Dai Y Y, Chen L. Immunohistochemical study of gut in European eel, *Anguilla anguilla*[J]. J of Oceanography in Taiwan Strait, 1999, 18(1):83- 86. [方永强,戴燕玉,陈 蕾. 欧洲鳗鲡胃肠道激素免疫组织化学的研究[J]. 台湾海峡, 1999, 18(1): 83- 86.]
- [11] Rombout J H W M, Reinecke M. Immunohistochemical localization of (neur $\alpha$ ) peptide hormones in endocrine cells and nerves of the gut of a stomachless teleost fish, *Barbus condonius* (Cyprinidae)[J]. Cell Tissue Res, 1984, 237: 57- 65.
- [12] Rombout J H W M. Function and origin of endocrine cells in gut and pancreas of teleost[J]. Acta Microscopica, 1985, 8(3): 329- 335.
- [13] Bulbring E. The release of 5 hydroxytryptamine in relation to pressure on the intestinal mucosa[J]. J Physiol, 1959, 146: 19.

## 图版说明

## Explanation of Plate

1. 5 HT 细胞分布在小肠中,可见短的胞质突起(箭头), $\times 400$ ;
2. 柱状 5 HT 细胞分布在中肠,胞质突起(箭头)伸向粘膜下层, $\times 400$ ;
3. 椭圆形 5 HT 细胞分布在后肠(箭头), $\times 400$ ;
4. SST 细胞分布在胃腺中,可见柱状细胞有细长胞质突起伸向粘膜(箭头)和卵圆形细胞(空心箭头), $\times 400$ ;
5. SST 细胞分布在小肠,有短柱状(空心箭头)和圆锥形细胞及其突起(箭头), $\times 400$ ;
6. SST 细胞分布在中肠,可见圆锥形细胞突起伸向基膜(箭头), $\times 400$ ;
7. GAS 细胞分布在胃中,长柱状细胞及其突起(箭头), $\times 400$ ;
8. GAS 细胞分布在小肠,长柱状细胞及其短突起(箭头), $\times 400$ ;
9. P 物质细胞分布在胃粘膜下层,细胞为粗柱形和圆锥形, $\times 400$ ;
10. P 物质细胞分布在后肠粘膜下层,细长柱形细胞及短的胞质突起(箭头), $\times 400$ ;
11. VIP 细胞分布在胃粘膜下层,可见卵圆形(箭头)和长柱状细胞(空心箭头), $\times 400$ ;
12. VIP 细胞分布在小肠粘膜下层,细胞为圆柱状(箭头), $\times 400$

1. 5 HT cells distributed in the small intestine, it is seen short cytoplasmic protrusion (arrow);
2. Columnr shaped 5 HT cells distributed in the middle intestine, the cytoplasmic process(arrow) extending to submucosa;
3. Ellipticity shaped 5 HT cells distributed in the posterior intestine (arrow);
4. Showing SST cells in the gastric gland, it is seen long cytoplasmic process of column cells extending to mucosa (arrow) and oval cells (hollow arrow);
5. Showing SST cells in the intestine, it is seen short column cell and cytoplasmic process of taper cell (arrow);
6. Showing SST cells in the middle intestine, it is seen the cytoplasmic process of taper cell extending to basal membrane (arrow);
7. Showing GAS cells in the stomach, it is seen the cytoplasmic process of long column cell (arrow);
8. Showing GAS cells in the intestine, it is seen the short cytoplasmic process of long column cell (arrow);
9. Showing P substance cells in the submucosa of stomach, the cell is thick column or taper in shape;
10. Showing P substance in the submucosa of posterior intestine, it is seen short cytoplasmic process of long and thin column cell (arrow);
11. Showing VIP cells in the submucosa of stomach, it is seen oval and long column cell (arrow, hollow arrow);
12. Showing VIP cells in the submucosa of intestine, the cell is cylinder in shape(arrow)

