

文章编号:1000-0615(2009)02-0265-06

## 不同规格瘤背石磺胃盲囊5-羟色胺和 P物质分布与数量的初步研究

杨筱珍, 沈蓓杰, 吴旭干, 胡冰, 滕炜鸣, 成永旭

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:**将不同规格野生瘤背石磺,按8 g以下、8~18 g和18 g以上分为3组,组织切片观察胃盲囊组织结构,并采用免疫组化方法,观察5-羟色胺和P物质在胃盲囊中分布及数量变化规律。结果表明,瘤背石磺胃盲囊主要由非纺锤型和纺锤型两种类型绒毛组成,这两种绒毛所占比例在瘤背石磺不同发育阶段明显不同,在18 g以上组中以纺锤型为主,此时纺锤型所占比例(66%)约为非纺锤型(34%)的2倍。各组瘤背石磺胃盲囊中均有大量5-HT和P物质阳性细胞的分布,这些细胞主要分布于上皮粘膜层,且主要分布在非纺锤型绒毛中,5-羟色胺和P物质阳性非纺锤型绒毛比例均匀约为纺锤型绒毛的10倍。5-羟色胺和P物质阳性细胞数在瘤背石磺胃盲囊的分布规律,均有随瘤背石磺重量的增加而不断增加的趋势,其中18 g以上组5-羟色胺阳性细胞数(112.82 ind/cm<sup>2</sup>)约为8 g以下组(34.8 ind/cm<sup>2</sup>)的3倍,而18 g以上组P物质阳性细胞数(177.48 ind/cm<sup>2</sup>)约为8 g以下组(51.08 ind/cm<sup>2</sup>)的3.5倍。在各组中P物质阳性细胞的数量明显高于5-羟色胺,且在不同发育阶段其增加趋势更为明显。

**关键词:**瘤背石磺;胃盲囊;5-羟色胺;P物质

**中图分类号:**S 917

**文献标识码:**A

瘤背石磺(*Onchidium strumas*)是介于海洋和陆地过渡带的生物,隶属于软体动物门(Mollusca),腹足纲(Gastropoda),肺螺亚纲(Pulmonata),柄眼目(Stylommatophora),瘤背石磺科(Onchidiidae),具有重要营养价值和药用价值<sup>[1-3]</sup>。近年来由于环境污染和人为滥捕,瘤背石磺的自然资源量正在迅速下降,因此迫切需要开展瘤背石磺的人工增养殖,以满足市场需求<sup>[2]</sup>。目前已有关于瘤背石磺繁殖、发育及习性的研究报道<sup>[1-4]</sup>,但因其人工养殖和育苗中存在很多困难,弄清其消化道结构与功能,将为指导人工饲养提供理论资料。消化道所分泌的胃肠激素在动物的消化吸收和营养等方面起着重要作用<sup>[5-6]</sup>。胃盲囊是位于胃与肠道之前的膨大部分,并认为它可能是软体动物的主要消化吸收部

位,它可以消化和吸收小型食物,而把过大的直接送到肠,不经过消化、吸收就排出<sup>[7]</sup>。5-羟色胺(5-HT)和P物质广泛存在于脊椎动物<sup>[8-10]</sup>和无脊椎动物<sup>[11]</sup>的胃肠道中,在全面调节消化道功能如营养吸收、肠道运动和肠道免疫功能中发挥着重要的作用<sup>[8-12]</sup>,但对其在较低等的软体动物消化道中的分布与作用研究较少。因此,深入研究石磺胃盲囊的组织结构和神经递质的关系具有重要的理论意义和应用价值。有研究表明石磺个体发育与体重有相关性<sup>[13-14]</sup>。本文通过观察不同重量规格瘤背石磺胃盲囊5-羟色胺和P物质的分布与数量,旨在为石磺食性和消化生理方面的研究提供基础理论依据,并为其人工养殖提供参考,同时也为其病理学研究打下基础。

收稿日期:2007-07-16 修回日期:2007-09-19

资助项目:上海市教育委员会E-研究院建设项目(E03009);上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字2005D4-3);上海市博士启动资金(05-212);上海市重点学科建设项目(Y1101);上海市优青基金(170401)联合资助

通讯作者:成永旭, Tel:021-61900417, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 动物处理及切片制备

2006年5月于崇明县北支沿江滩涂采集不同规格的野生瘤背石磺(体重2~25g),将所采瘤背石磺按8g[(8±1.06)g]以下、8~18g[(8±2.34)~(18±2.34)g]和18g[(18±1.55)g]以上分组,共分为3组,每组12只。将各组瘤背石磺解剖,取出胃盲囊,Bouin氏液(不含冰醋酸)固定24h,经常规脱水、透明、石蜡包埋和5μm厚连续切片。

### 1.2 免疫组织化学染色

5-羟色胺和P物质均为兔源多克隆抗体(购自北京中杉金桥生物技术公司)。采用常规PowerVision™两步法进行免疫染色。具体程序:石蜡切片常规脱蜡后,用0.3%过氧化氢去离子水室温下孵育30min,以阻断内源性过氧化物酶。充分水洗后,于pH6.0的枸橼酸缓冲液中煮沸,进行抗原修复30min,室温冷却。滴加一抗后,标本置于湿盒内,4℃过夜。一抗浓度为1:100。然后用0.01mol/L PBS(pH7.4)水洗,滴加生物素化山羊抗兔IgG抗体-HRP多聚体(购自北京中杉金桥生物技术公司),室温孵育1h,PBS充分水洗后,用DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显色。阳性细胞呈棕色。阴性对照染色用PBS替代一抗,其余实验步骤相同。

### 1.3 数据处理

用SPOT软件(Scion Corporation, USA)测量胃盲囊横断面积(不包括囊腔面积,为胃盲囊实质组织面积)(n=3),并分别统计这些面积中5-羟色胺或P物质阳性细胞数。每只瘤背石磺分别统计50根完整绒毛中非纺锤性和纺锤性绒毛所占的比率。统计每只瘤背石磺3张切片(每张切片间隔50μm)内所有阳性5-羟色胺或P物质绒毛数(绒毛上只要有1个以上5-羟色胺或P物质免疫染色阳性细胞者,即为阳性),并求得纺锤性和非纺锤性阳性绒毛所占的比率。

以上数据均采用SPSS 13.0软件进行统计分析,用Levene法进行方差齐性检验,不满足齐性方差时对百分比数据进行反正弦或者平方根处理,采用ANOVA对实验结果进行方差分析,采用Tukey氏法进行多重比较,取P<0.05为差异显著,在EXCEL上绘制相关图表。

## 2 结果

### 2.1 胃盲囊绒毛组成

光镜下发现瘤背石磺胃盲囊主要由两种形态的绒毛组成,一种是多分枝的,我们称之为非纺锤性绒毛(图版-1),一种是顶端无分枝的,样似纺锤,我们称之为纺锤性绒毛(图版-2)。对这两种类型绒毛比例进行统计后发现,非纺锤性绒毛的比例有随瘤背石磺发育重量增高而降低的趋势,而纺锤性绒毛则相反。其中非纺锤性绒毛比例从84%(8g以下组)降至34%(18g以上组)左右,约降了2.5倍,而纺锤性绒毛比例从16%(8g以下组)升高至66%(18g以上组),约升高了4倍(图1)。

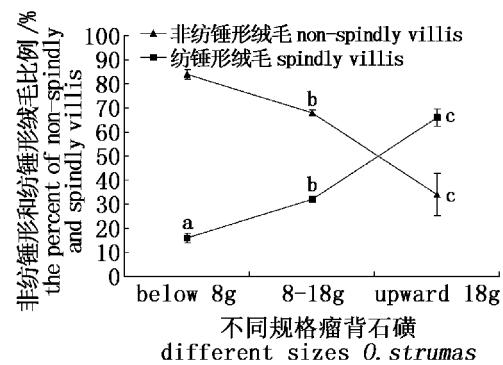


图1 不同规格瘤背石磺胃盲囊非纺锤性绒毛和纺锤性绒毛所占比例

不同字母代表不同规格组间差异显著( $P < 0.05$ )

Fig.1 The percentage of spindly and non-spindly villi in different sizes of *Onchidium strumas* stomach caeca

Values that do not share the same letter are statistically significantly different among three size groups ( $P < 0.05$ )

### 2.2 5-羟色胺阳性细胞分布与数量变化

对各组动物胃盲囊进行5-羟色胺免疫组化染色发现:5-羟色胺呈棕色,为胞浆着色,主要分布在胃盲囊非纺锤性绒毛的上皮细胞内,纺锤性绒毛上皮细胞内也有分布。5-羟色胺阳性细胞在18g以上组明显比8g以下组着色深(图版-3,4)。各组间阳性绒毛总数以8g以下组与8~18g组和18g以上组均有显著差异( $P < 0.05$ )。在两种形态绒毛中,阳性非纺锤性绒毛比例明显高于阳性纺锤性绒毛比例约为它的10倍,而且阳性非纺锤性绒毛比例在8g以下组与8~18g组和18g以上组均有显著差异( $P < 0.05$ )(表1)。比较各组间单位面积胃盲囊5-羟色胺阳性细胞数

发现, 18 g 以上组 5-羟色胺阳性细胞数 ( $112.82 \text{ ind/cm}^2$ ) 约为 8 g 以下组 ( $34.8 \text{ ind/cm}^2$ ) 的 3 倍(图 2)。

表 1 5-羟色胺和 P 物质阳性绒毛数及阳性纺锤性绒毛和非纺锤性绒毛比例  
Tab.1 The number of positive 5-HT villis and positive substance P villis and the percentage of positive spindly and non-spindly villis

重量(g) weight	阳性绒毛总数(个) the total number of positive villis		阳性纺锤性绒毛比例(%) the percent of positive spindly villis		阳性非纺锤性绒毛比例(%) the percent of positive non-spindly villis	
	5-羟色胺 5-HT	P 物质 substance P	5-羟色胺 5-HT	P 物质 substance P	5-羟色胺 5-HT	P 物质 substance P
8 g 以下 below 8 g	$11.8 \pm 0.55^a$	$13.2 \pm 0.3^a$	$2 \pm 0.4^a$	$3.2 \pm 0.5^a$	$21.6 \pm 0.7^a$	$23.2 \pm 0.1^a$
8 ~ 18 g	$15.7 \pm 0.4^b$	$13.2 \pm 4.5^a$	$2.8 \pm 0.4^a$	$2.8 \pm 0.8^a$	$28.6 \pm 0.4^b$	$23.5 \pm 8.2^a$
18 g 以上 upward 18 g	$16.7 \pm 1.85^b$	$16.3 \pm 0.8^b$	$3.2 \pm 1.2^a$	$2.6 \pm 0.8^a$	$30.2 \pm 2.5^b$	$30 \pm 0.7^b$

注:同一列数据右上角的不同字母代表组间差异显著( $P < 0.05$ )

Notes: Figures with different superscript letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ )

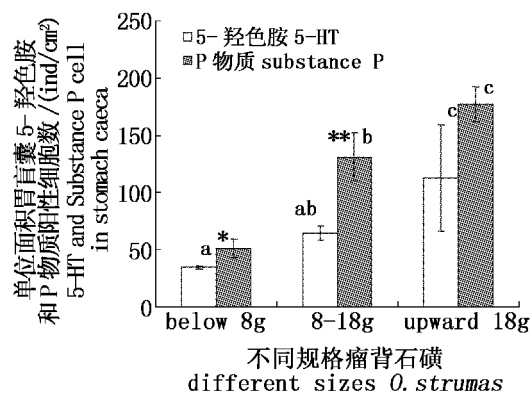


图 2 单位面积胃盲囊 5-羟色胺和 P 物质阳性细胞数

- (1) 柱上字母不同代表不同规格组间差异显著 ( $P < 0.05$ );  
(2) “\*”代表 5-羟色胺和 P 物质之间差异显著

Fig.2 The number of 5-HT positive cells and substance P positive cells in stomach caeca per  $\text{cm}^2$

- (1) the columns with the different letter are significant difference among three size groups ( $P < 0.05$ ); (2) the columns with “\*” means there is significant difference between the number of 5-HT positive cells and substance P positive cells on the same size groups ( $P < 0.05$ )

### 2.3 P 物质阳性细胞分布与数量变化

对各组动物胃盲囊进行 P 物质免疫组化染色发现: P 物质呈棕色, 为胞浆着色, 主要分布在胃盲囊绒毛的上皮细胞内, 各绒毛固有层也有少量阳性细胞分布且胞体较大。P 物质阳性物质在 18 g 以上组明显比 8 g 以下组着色深(图版-5, 6)。各组间阳性绒毛总数在 8 g 以下组与 18 g 以上组间有显著差异 ( $P < 0.05$ )。在两种形态绒

毛中阳性非纺锤性绒毛比例明显高于阳性纺锤性绒毛比例也约为它的 10 倍, 而且阳性非纺锤性绒毛比例在 8 g 以下组与 18 g 以上组间有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。比较各组间单位面积胃盲囊 P 物质阳性细胞数发现, 各组间均有明显差异 ( $P < 0.05$ ), 其中在 8 g 以下组与 18 g 以上组间差异更为明显, 18 g 以上组 P 物质阳性细胞数 ( $177.48 \text{ ind/cm}^2$ ) 约为 8 g 以下组 ( $51.08 \text{ ind/cm}^2$ ) 的 3.5 倍(图 2)。

## 3 讨论

### 3.1 胃盲囊绒毛组成

瘤背石磺是目前倍受关注的营养丰富的经济动物, 而有关其消化生理方面的基础资料还很匮乏。胃盲囊是位于消化道胃与肠道之前的膨大部分, 并认为它可能是软体动物的主要消化吸收部位<sup>[7]</sup>, 本研究对瘤背石磺胃盲囊组织切片观察中也发现瘤背石磺胃盲囊绒毛类型较为多样(非纺锤型和纺锤型)且长度较长(约为  $2848.7 \mu\text{m}$ ), 更加表明其可能在瘤背石磺消化道发挥消化吸收功能的重要地位。本研究发现瘤背石磺胃盲囊两种类型绒毛比例在瘤背石磺不同发育阶段明显不同, 在较为成熟的个体中(18 g)以纺锤型为主。

### 3.2 5-羟色胺和 P 物质阳性细胞数量变化

国内外已对在硬骨鱼和爬行类有关胃肠道神经递质, 也有称神经激素如 5-羟色胺、P 物质和胃泌素等进行了研究, 如在硬骨鱼<sup>[8-9, 15]</sup>、鳗

鳎<sup>[16]</sup>、裂腹鱼<sup>[17]</sup>、乌龟<sup>[18]</sup>和扬子鳄<sup>[19]</sup>等的研究中,而在国内尚未查到对软体类动物这方面研究的资料。5-HT 细胞和 P 物质在消化道中的分布已被认为与消化道功能的发挥与调节密切相关,如它们能刺激消化道黏液分泌,平滑肌收缩和血管扩张等<sup>[5-6,20]</sup>。有学者研究发现,当胃肠壁受到化学和物理刺激时,5-羟色胺被释放到肠腔,可增进小肠蠕动<sup>[15]</sup>。方永强等<sup>[16]</sup>报道,生长十分缓慢的欧洲鳎(俗称僵鳎)胃肠中 5-羟色胺免疫活性细胞的数量明显少于正常生长的欧鳎。已有研究表明 5-羟色胺阳性细胞数量在一些高等的哺乳动物如牛<sup>[21-22]</sup>和马<sup>[10]</sup>消化道中的数量在幼体远高于成体,并认为这与新生动物肠道更为敏感,易发一些肠道疾病有关<sup>[10]</sup>。本研究观察了不同发育重量组瘤背石磺胃盲囊 5 羟色胺和 P 物质数量变化后发现,5-羟色胺和 P 物质在瘤背石磺胃盲囊的分布数量,均有随瘤背石磺不断发育重量不断增加而增加的趋势,18 g 以上较成熟组明显高于 8 g 以下幼体组,约是它的 3 倍,这与 Fink 等<sup>[10]</sup>在成马与胎马、成牛与胎牛<sup>[21]</sup>和水牛与小水牛<sup>[22]</sup>变化趋势相反,而这种不同与瘤背石磺生理与病理间的关系,还有待于进一步的研究加以解释。5-羟色胺阳性细胞和 P 物质主要分布在绒毛的粘膜上皮层,说明其有可能与腔内物质消化吸收有密切联系<sup>[8-10]</sup>,并以非纺锤性绒毛的粘膜上皮层为主,提示非纺锤性绒毛在胃盲囊消化与免疫功能中可能发挥着更为重要的作用。本研究还发现 P 物质阳性细胞的数量明显高于 5-羟色胺,且在不同发育阶段其增加趋势更为明显,可能提示 P 物质在瘤背石磺胃盲囊消化道调节与功能建立方面起着重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] 王金庆,成永旭,吴旭干,等. 瘤背石磺的生殖系统和性腺发育[J]. 动物学杂志, 2006, 41(1): 19-26.
- [2] 王金庆,成永旭,吴旭干. 瘤背石磺的胚胎和幼虫发育[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(2): 108-115.
- [3] 王金庆,成永旭,吴旭干,等. 瘤背石磺的形态、习性和生殖行为[J]. 动物学杂志, 2005, 40(1): 32-40.
- [4] 沈和定,陈汉春,陈贤龙,等. 石磺繁殖生物学
- [5] 王志均,梅懋华,朱文玉. 胃肠激素[M]. 北京: 科学出版社,1985.
- [6] Solcia E, Capella C, Vassallo G, et al. Endocrine cells of the gastric mucosa [J]. *Ira Rev Cytol*, 1975, 42:223-286.
- [7] 蔡英亚,张英,魏若飞. 贝类学概论[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994:127.
- [8] Bermúdez R, Vigliano F, Quiroga M I, et al. Immunohistochemical study on the neuroendocrine system of the digestive tract of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), infected by *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22:252-263.
- [9] Cinar K, Senol N, Özen M R. Immunohistochemical study on distribution of endocrine cells in gastrointestinal tract of flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*) [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12(42):6874-6878.
- [10] Fink C, Tatar M, Failing K, et al. Serotonin-containing cells in the gastrointestinal tract of newborn foals and adult horses [J]. *Anat Histol Embryol*, 2006, 35:23-27.
- [11] Garnerot F, Pellerin J, Blaise C, et al. Immunohistochemical localization of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the gonad and digestive gland of *Mya arenaria* (Mollusca: Bivalvia) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 149:278-284.
- [12] Cinar K, Diler A. Immunohistochemical localization of glucagon, substance-P, and vasoactive intestinal peptide in gastrointestinal tract mucosa of zander [J]. *J Fish Biol*, 2002, 60:319-327.
- [13] Deshpande U D, Nagabhushanam R. Annual reproductive cycle of the marine pulmonate, *Onchidium verruculatum* (Cuvier) and its control by environmental factors [J]. *Indian J Mar Sci*, 1983a, 12(2): 122-124.
- [14] Deshpande U D, Nagabhushanam R. Seasonal changes in the biochemical composition of the *Chiton iatricus* (Polyplacophora: Mollusca) and the marine pulmonate *Onchidium verruculatum* (Gastropoda: Mollusca) in relation to their reproductive cycles [J]. *Marine Biology*, 1982, 72(3): 227-234.
- [15] Rombout J H. Function and origin of endocrine cells

- in gut and pancreas of teleost [J]. *Acta Microscopica*, 1985, 8(3):329-335.
- [16] 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.
- [17] 樊均德,方静,何敏. Glu 细胞与 5-HT 细胞在两种裂腹鱼肠道的免疫组织化学研究[J]. 四川农业大学学报, 2006, 24(4):444-447.
- [18] 黄徐根,吴孝兵,张志强,等. 乌龟胃肠胰系统内分泌细胞的免疫组织化学研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(3):291-298.
- [19] 吴孝兵,张盛周,陈璧辉,等. 扬子鳄消化道内分泌细胞的免疫组织化学研究[J]. 动物学报, 1999, 45(2):155-161.
- [20] 高巍,黄裕新,陈洪. 脑肠肽在针刺调节免疫反应中的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2001, 17(9):473-477.
- [21] Kitamura N J, Yamada N Y, Calingasan, *et al.* Histologic and immunocytochemical study of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the cow and calf [J]. *Am J Vet Res*, 1985, 46:1381-1386.
- [22] Lucini C P, De Girolamo L, Coppola G P, *et al.* Postnatal development of intestinal endocrine cell populations in the water buffalo[J]. *J Anat*, 1999, 195:439-446.

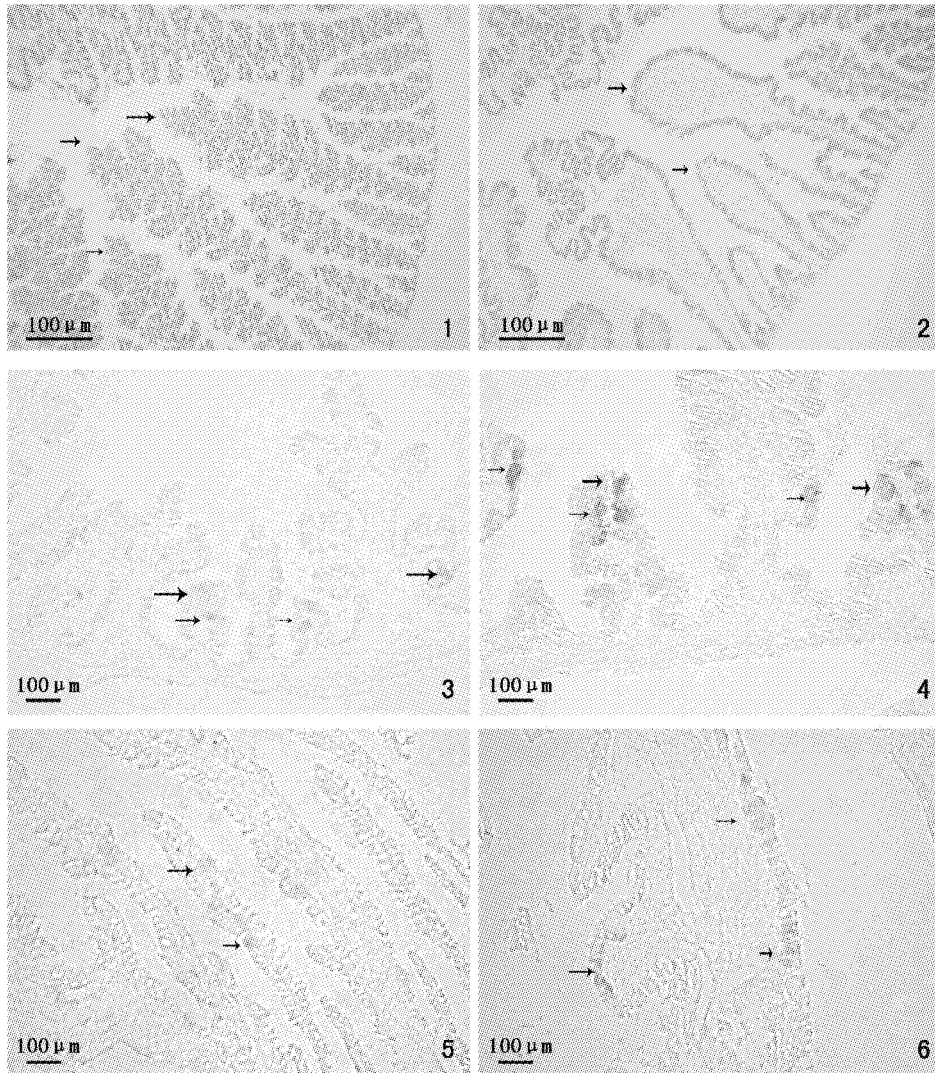
### Preliminary study on distribution and relative frequency of 5-HT and substance P positive cells in stomach caeca of different sizes of *Onchidium strumas*

YANG Xiao-zhen, SHEN Bei-jie, WU Xu-gan,  
HU Bing, TENG Wei-ming, CHENG Yong-xu

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources,  
Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Different sizes of *Onchidium strumas* were divided into three groups, which were below 8 g, 8-18 g and upward of 18 g group. The histological structure and the number of 5-HT and substance P positive cells in stomach caeca of different sizes of *Onchidium strumas* were observed by histology and immunohistochemical methods. The results showed that histologically, two types of villis, spindly and non-spindly, were found in stomach caeca of *Onchidium strumas*. The percentage of non-spindly villis was reduced with body weight of *Onchidium strumas* increasing. The much more spindly villis were distributed in upward of 18 g *Onchidium strumas*. The percentage of spindly villis (66%) was about two-fold more than non-spindly villis (34%) in upward of 18g group. Numerous 5-HT cells and substance P were detected in the epithelial mucosa of *Onchidium strumas* stomach caeca villis, especially in non-spindly villis. The percentage of positive non-spindly villis of both 5-HT and substance P were 10 times more than that of spindly villis. The number of positive cells of both 5-HT and substance P in stomach caeca were significantly increased in a weight-dependent manner, from below 8 g to upward of 18 g group. The amount of 5-HT in upward of 18 g group (112.82 ind/cm<sup>2</sup>) was about 3-fold more than that in below 8 g (34.8 ind/cm<sup>2</sup>), meanwhile, the amount of substance P in upward of 18 g group (177.48 ind/cm<sup>2</sup>) was about 3.5-fold more of that in below 8 g (51.08 ind/cm<sup>2</sup>). The amount of substance P was higher than that of 5-HT in three groups, and increased with weight.

**Key words:** *Onchidium strumas*; stomach caeca; 5-HT; substance P



**图版 不同规格瘤背石磺胃盲囊组织结构及 5-HT 和 P 物质阳性细胞的分布**

1. 8 g 以下组胃盲囊(箭头示非纺锤性绒毛);2. 18 g 以上组胃盲囊(箭头示纺锤性绒毛)3. 8 g 以下组胃盲囊 5-HT;4. 18 g 克以上组胃盲囊 5-HT;5. 8 g 以下组胃盲囊 P 物质;6. 18 g 以上组胃盲囊 P 物质

**Plate The structure of stomach caeca and the distribution of 5-HT positive cells and substance P positive cells in different sizes of *O. strumas* stomach caeca**

1. The histological structure of postembryonic *O. strumas* stomach caeca below 8 g group, non-spindly villis (arrows). 2. The histological structure of postembryonic *O. strumas* stomach caeca upward 18 g group, spindly villis (arrows). 3. 5-HT-positive cells of postembryonic *O. strumas* stomach caeca below 8 g group. 4. 5-HT-positive cells of postembryonic *O. strumas* stomach caeca upward 18 g group. 5. Substance P -positive cells of postembryonic *O. strumas* stomach caeca below 8 g group. 6. Substance P -positive cells of postembryonic *O. strumas* stomach caeca upward 18 g group