

日本林蛙胃肠道内分泌细胞的免疫组织化学*

黄徐根 吴海龙 吴孝兵** 张盛周

(安徽师范大学生命科学学院 重要生物资源保护与利用安徽省重点实验室 芜湖 241000)

摘要: 应用7种胃肠激素抗血清对日本林蛙胃肠道内分泌细胞的形态和分布进行了免疫组织化学研究。5-羟色胺(5-HT)免疫活性(-IR)细胞分布于胃肠道各段,其在胃肠道中的分布密度为:十二指肠、空肠处最高,胃中各段居中,回肠和直肠处最低。生长抑素(SS)-IR细胞分布于胃贲门至空肠的胃肠道段,其分布密度自前向后呈递减趋势。胃泌素(Gas)-IR细胞在十二指肠和空肠处有少量分布。高血糖素(Glu)-IR细胞仅见胃体部位较少分布。P-物质(SP)-IR细胞在回肠和直肠中有分布。胃肠道各段均未检出胰多肽(PP)-IR细胞和胰岛素(Ins)-IR细胞。与其它动物相比较,对日本林蛙胃肠道内分泌细胞的分布型进行了讨论。

关键词: 日本林蛙;胃肠道;内分泌细胞;免疫组织化学

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)02-19-07

Immunohistochemical Studies on Endocrine Cells in the Gastrointestinal Tract of *Rana japonica japonica*

HUANG Xu-Gen WU Hai-Long WU Xiao-Bing ZHANG Sheng-Zhou

(College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: Distribution and morphology of endocrine cells in the gastrointestinal tract of *Rana japonica japonica* were studied by immunohistochemical method with seven gut hormone antisera. Five type of endocrine cells were found, namely 5HT-IR, SS-IR, Glu-IR, SP-IR, and Gas-IR cells. 5HT-IR cells distributed throughout the gastrointestinal tract with the highest density in the duodenum and jejunum, the second highest in each region of stomach, and the lowest in the ileum and rectum. SS-IR cells were present from stomachus cardiacus to jejunum and its distributive density descended gradually. Gas-IR cells were rarely observed in the duodenum and jejunum, and were not founded in the stomach. Glu-IR cells were only simply detected in the stomachus corpus. SP-IR cells moderately distributed in the ileum and rectum. Cells showing PP-and Insi-mmunoreactivity were not detected. Compared with other animals, the distributive mode of endocrine cells in the gastrointestinal tract of *Rana japonica japonica* was discussed.

Key words: *Rana japonica japonica*; Gastrointestinal tract; Endocrine cells; Immunohistochemistry

* 安徽省优秀青年基金(No. 04043049),重要生物资源保护与利用安徽省重点实验室专项基金,安徽省教育厅科学基金(No. 2001kj099)及安徽省学术与技术带头人基金,安徽师范大学校青年基金资助;

**通讯作者, E-mail: wuxb@mail.ahnu.edu.cn;

第一作者介绍 黄徐根,男,29,硕士,研究方向:两栖爬行动物学。

收稿日期:2003-07-10,修回日期:2003-11-06

目前对人类和哺乳动物消化道内分泌细胞的研究较多,并发现了多种类型的内分泌细胞,它们对消化系统功能发挥着重要作用^[1]。两栖类消化道内分泌细胞的研究,国内研究较少,仅见对中华大蟾蜍^[2] (*Bufo bufo gargarizans*)、无斑肥螈^[3] (*Pachytriton labiatum*) 消化道 5HT-IR 细胞及虎纹蛙^[4] (*Rana rugulosa*) 消化道 5-HT-IR、SS-IR 细胞的免疫组织化学研究,国外虽有一些报道^[5-8],但分歧较大。

日本林蛙 (*Rana japonica japonica*) 为两栖纲无尾目动物,栖居于山地林区、山间田野附近的水坑周围或山溪沿岸的灌丛和小片的水竹林中,捕食农林害虫,对抑制虫害,保护农林业生产起一定作用^[9]。对其消化道内分泌细胞的研究未见报道,本文对其消化道内分泌细胞进行

了免疫组织化学研究,为蛙类消化生理学研究提供形态学基础,同时为探求两栖类消化道内分泌细胞的分布规律积累资料,丰富比较内分泌的内容。

1 材料与方法

1.1 材料 日本林蛙 3 只,采自安徽泾县,头体长 40~60 mm,穿刺脊髓处死,迅速解剖,按下列消化道各段取材:胃贲门、胃体、胃幽门部、十二指肠、空肠、回肠和直肠。

1.2 主要试剂 7 种胃肠激素兔抗血清(胰岛素为鼠抗)详见表 1。链霉菌抗生物素蛋白——过氧化物酶(streptavidin peroxidase, S-P)免疫组织化学试剂盒购于北京中山生物技术公司。

表 1 胃肠激素抗血清一览表

| 激素抗血清 | 产品代号 | 特异性 | 稀释倍数 |
|----------|---------|--------------|-------|
| 5-羟色胺 | ZA-0231 | - | 1/100 |
| 胃泌素 | ZA-0115 | - | 1/50 |
| 合成环形生长抑素 | ZA-0232 | - | 1/50 |
| 人胰多肽 | ZA-0211 | 与人血清蛋白无交叉反应 | 1/50 |
| 猪胰高血糖素 | ZA-0119 | - | 1/100 |
| P-物质 | ZA-0235 | - | 即用型 |
| 单克隆鼠抗胰岛素 | ZM-0155 | 与大多数哺乳类有交叉反应 | 1/50 |

激素抗血清均来源 ZYMED 公司

1.3 免疫组织化学方法 常规石蜡切片置备:取 1.1 中的实验材料用生理盐水洗净,无冰醋酸的 Bouin's 液固定 18~24 h,常规脱水透明,石蜡包埋,切片 5~6 μm ,贴片。免疫组化染色步骤:常规石蜡切片脱蜡至水后,3% H_2O_2 甲醇溶液孵育 10 min,消除内源性过氧化物酶活性。蒸馏水洗尽,PBS 浸泡 5 min,滴加正常山羊血清(1:10)室温孵育 10 min,封闭非特异性反应部位。倾去血清,滴加一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 浸洗 3 次 \times 5 min,滴加即用型生物素标记的二抗(羊抗兔 IgG 抗血清),室温孵育 15 min。PBS 浸洗 3 次 \times 5 min,滴加即用型链霉菌抗生物素蛋白——过氧化物酶,室温孵育 15 min。PBS 浸洗 3 次 \times 5 min。DAB- H_2O_2 显色,苏木精复染,自来水洗净。脱水、透明、封片(免疫组化染色

步骤见北京中山生物技术公司 S-P 免疫组织化学试剂盒说明)。免疫组织化学法阴性对照,分别用正常山羊血清和 PBS 代替一抗,其余步骤同上。

1.4 细胞计数 在 Olympus BX-51 型显微镜下观察、拍照。并对每个部位的切片随机取 10 个 400 倍视野计数。取平均值($\bar{M} \pm SD$)表示内分泌细胞的分布密度。

2 结果

7 种胃肠激素抗血清在日本林蛙胃肠道显示的内分泌细胞种类及分布密度见表 2。对照反应结果均为阴性。

5-羟色胺免疫活性(5-hydroxytryptamine immunoreactive, 5-HT-IR)细胞分布于日本林蛙

胃肠道各段,其分布密度在十二指肠和空肠处最高($P < 0.05$),胃中各段居中,回肠和直肠处最低($P < 0.05$)。胃中 5-HT-IR 细胞多分布于胃腺中,形态多样,以锥形、楔形居多(图版 I:1,2,3);小肠中 5-HT-IR 细胞多分布于肠上皮

细胞间,十二指肠处分布最为密集(图版 I:4),梭形细胞居多,多数细胞有较长胞突伸向肠腔(图版 I:5);大肠 5-HT-IR 细胞亦分布于肠上皮细胞间,卵圆形、杆状细胞均可见(图版 I:6)。

表 2 日本林蛙胃肠道内分泌细胞的分布密度

| | 5-羟色胺 | 生长抑素 | 胃泌素 | 胰高糖素 | P-物质 | 胰多肽 | 胰岛素 |
|------|-------------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|
| 胃贲门 | 10.0 ± 3.6 ^b | 5.7 ± 1.3 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 胃体 | 7.8 ± 0.9 ^b | 3.9 ± 0.9 ^b | 0 | 1.9 ± 0.4 | 0 | 0 | 0 |
| 胃幽门 | 9.2 ± 2.4 ^b | 2.1 ± 0.9 ^c | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 十二指肠 | 15.2 ± 1.8 ^a | 1.4 ± 0.7 ^c | 0.6 ± 0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 空肠 | 14.4 ± 4.5 ^a | 0.9 ± 0.4 ^c | 1.2 ± 0.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 回肠 | 4.0 ± 1.8 ^c | 0 | 0 | 0 | 2.0 ± 1.0 | 0 | 0 |
| 直肠 | 4.4 ± 1.0 ^c | 0 | 0 | 0 | 2.0 ± 0.9 | 0 | 0 |

表中数据用平均值 ± 标准差 ($n = 10$) 表示, 每列数据经平方根转换 [$x' = x^{1/2}$], 符合正态分布, 用单向 ANOVA 比较, 上标不同的平均值间差异显著, $a > b > c > d > e$ (Tukey's 检验, $P < 0.05$)

生长抑素免疫活性 (synthetic cyclic somatostatin immunoreactive, SS-IR) 细胞在贲门至空肠的胃肠道各段呈递减趋势分布, 胃中 SS-IR 细胞位于胃腺中, 卵圆形、楔形(图版 I:7)、梭形(图版 I:8), 且梭形细胞有胞突伸向邻近细胞。十二指肠中 SS-IR 细胞位于肠上皮细胞间, 锥形、梭形(图版 I:9)。

胃泌素免疫活性 (gastrin immunoreactive, Gas-IR) 细胞仅少量分布于十二指肠和空肠中, 阳性细胞位于肠上皮细胞间, 基部膨大且有胞突伸向肠腔(图版 I:10, 11)。

高血糖素免疫活性 (glucagon immunoreactive, Glu-IR) 细胞仅分布于胃体部位, 阳性细胞多位于胃腺中, 多数细胞呈圆形、卵圆形(图版 II:12), 亦有楔形、梭形细胞。

P-物质免疫活性 (substance P immunoreactive, SP-IR) 细胞分布于回肠和直肠中, 均位于肠上皮细胞间, 形态多样, 圆形、梭形(图版 II:13)、锥形(图版 II:14)细胞均有分布。

胰多肽免疫活性 (pancreatic polypeptide immunoreactive, PP-IR) 细胞和胰岛素免疫活性 (insulin immunoreactive, Ins-IR) 细胞在胃肠道各段均未检出。

3 讨论

5-HT-IR 细胞广泛分布于各类脊椎动物的消化道中^[2-8, 10-14], 但分布型差异较大。多数动物的 5-HT-IR 细胞集中在胃幽门部位, 如小鼠^[2] (*Mus musculus albula*)、乌梢蛇^[14] (*Zaocys dhumnades*)、中华大蟾蜍^[2]、无斑肥螈^[3]; 或十二指肠部位, 如扬子鳄^[10] (*Alligator sinensis*)、眼镜蛇^[14] (*Naja naja*)、虎纹蛙^[4]。也有少数例外, 如大熊猫 5-HT-IR 细胞在空肠最多^[11], 黄喉水龟 (*Clemmys nutica*) 在直肠最多^[2]。5-HT-IR 细胞分泌的 5-HT 能刺激胃肠粘液分泌、平滑肌收缩和血管扩张, 对消化功能有很强的调节作用^[15]。日本林蛙胃肠道 5-HT-IR 细胞在十二指肠及空肠中分布密度最高, 胃中各段分布密度其次, 而以回肠和直肠最低。5-HT-IR 细胞这种分布型可能与 5-HT 调节肠道消化吸收功能相一致, 十二指肠和空肠是实现食物消化及吸收的主要场所, 是胃肠道活动最强、消化液分泌最多的节段, 5HT-IR 细胞在其中的高密度分布有利于其消化吸收功能的实现; 胃是实现食物消化的重要场所, 5-HT-IR 细胞在其中的分布密度亦较高; 食物的消化吸收在空肠中已基本完成, 回肠和直肠段基本上不承担消化及吸收的功

能,5-HT-IR 细胞的分布相对最低。

日本林蛙肠道段 5-HT-IR 细胞分布密度自十二指肠至回肠逐渐下降,直肠又有上升趋势。这与中华大蟾蜍^[2]、虎纹蛙^[4]肠道段 5-HT-IR 细胞分布型相似。而无斑肥螈^[3]肠道段 5-HT-IR 细胞分布密度自前向后呈逐渐下降趋势。在爬行动物的研究中发现黄喉水龟^[2]、扬子鳄^[10]等水栖和半水栖的动物肠道 5-HT-IR 细胞亦具有相同的分布型,此外在多疣壁虎肠道中主要分泌 5-HT 的嗜银细胞也有相似分布型^[16]。

SS-IR 细胞在时蛙 (*Rana temporaria*)、食用蛙 (*R. esculenta*) 和北蝗蛙 (*Acris crepitans*) 的胃及大小肠中均有分布,而被研究的其它多数种类 SS-IR 细胞存在于胃和小肠部位^[7]。真螈 (*Salamandra salamandra*) 中 SS-IR 细胞从胃到结肠都有分布,但直肠中未见阳性细胞^[6],这也表现出 SS-IR 细胞在两栖类分布种间的差异性。日本林蛙胃肠道中 SS-IR 细胞分布部位与豹蟾蜍^[5] (*Bufo regularis*) 基本相似,即分布于自贲门至空肠的胃肠道各段,回肠和直肠未见,但二者分布型不同,后者以胃幽门部和十二指肠处分布密度最高,而日本林蛙 SS-IR 细胞分布密度自前向后呈递减趋势,且胃中各段差异显著 ($P < 0.05$)。在哺乳类 SS 是一种重要的抑制性激素^[1],推测其在日本林蛙胃肠道中可能对其它内分泌细胞的分泌起抑制性调节作用,从而使胃肠道中具不同作用的激素的分泌量相平衡,共同调节胃肠道的消化吸收功能。SS-IR 细胞在胃中的较高密度分布及 5-HT-IR 细胞在其中的中等密度分布,使食物在胃中只进行了初步的消化,而 SS-IR 细胞在小肠和回肠的低密度分布加之 5-HT-IR 细胞在其中的高密度分布使未消化的食物在此段被充分消化和吸收。由此可见动物胃肠道内分泌细胞的分布与其消化吸收功能高度适应。

Gas-IR 细胞在两栖类消化道中的存在和分布差异较大。真螈^[6]和食用蛙^[7]的 Gas-IR 细胞仅分布于胃中。红腹铃蟾^[7] (*Bombina bombina*)、产婆蛙^[7] (*Alytes obstetricans*) 和豹蟾蜍^[5] 的 Gas-

IR 细胞分布于胃及小肠各段。美西钝口螈 (*Ambystoma mexicanum*)、香港剑尾螈^[7] (*Cynops hongkongensis*) 和时蛙的 Gas-IR 细胞仅分布于肠道中,胃中各段未见分布,与此相似,在爬行类^[10]中也有这种现象。

在哺乳类的研究表明, Gas-IR 细胞主要分布于胃幽门部,其分泌的 Gas 具有刺激胃酸、胃蛋白酶原分泌、胃窦收缩、增加胃粘膜血流量等作用^[1]。日本林蛙 Gas-IR 细胞分布于十二指肠和空肠部位,而胃中未见,这与美西钝口螈^[7] 中分布近似。分布在十二指肠和空肠中的 Gas-IR 细胞基部膨大,可能内储分泌物,顶端有胞突伸向肠腔,可能其可感受肠腔内容物的刺激而直接向肠腔分泌 Gas,即以分泌的方式发挥生理作用。

Glu-IR 细胞在两栖类胃肠道中的分布差异也较大, Glu-IR 细胞在豹蟾蜍^[5] 的胃和小肠中存在,在真螈^[6] 分布于胃至结肠的胃肠道各段。北蝗蛙^[7] Glu-IR 细胞仅存在于胃中。胰高糖素在营养物质供应不足或机体代谢需要增加时释放,以动员肝脏释放葡萄糖以及供应自由脂肪酸和酮体等替代性能源物质^[1]。日本林蛙 Glu-IR 细胞仅存在于胃体部位,推测其在胃中的存在与蛙的耐饥饿特性相关。

真螈^[6] SP-IR 细胞分布于其胃肠道各段。在雨蛙 (*Hyla arborea*)、美西钝口螈和尖吻斑蟾 (*Atelopus oxyrhynchus*) 的胃和小肠中均有 SP-IR 细胞^[7]。SP 具有强烈的刺激消化管平滑肌的作用^[1],日本林蛙 SP-IR 细胞在回肠和直肠中有分布,其分泌的 SP 可能与肠道的排遗有关。

PP-IR、Ins-IR 细胞在胃肠道各段均未检出。

日本林蛙胃肠道中,多种内分泌细胞主要集中分布在消化道前段,而空肠之后较少分布。吴孝兵等在扬子鳄消化道中亦发现类似现象,并认为在空肠中消化吸收已基本完成,其后主要是水分的吸收和未消化物的排泄,故与调节消化吸收功能相关的内分泌细胞减少,而调节肠道运动的 5HT-IR 细胞仍有分布^[10],作者认为日本林蛙胃肠道内分泌细胞的总体分布型亦

可作此解释,即胃肠道前段主要分布调节消化吸收功能的内分泌细胞,而肠道后段仅分布调节肠道运动的5-HT-IR细胞和SP-IR细胞。

参 考 文 献

- [1] 王志均,梅懋华,朱文玉. 胃肠激素. 北京:科学出版社,1985.
- [2] 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.
- [3] 张盛周,陈冬生,张志强等. 无斑肥螈消化道五羟色胺免疫活性细胞的分布与形态学观察. 动物学杂志, 2001, **36**(3):13~16.
- [4] 张盛周,吴孝兵,陈壁辉. 虎纹蛙消化道两种内分泌细胞的免疫组织化学定位. 解剖学杂志, 2002, **25**(3):275~278.
- [5] El-Salhy M, Grimelius L, Wilander E, et al. Histological and immunohistochemical studies of the endocrine cells of the gastrointestinal mucosa of the toad (*Bufo regularis*). *Histochemistry*, 1981, **71**:53~65.
- [6] Alison M J, Buchan J, Polak M, et al. Gut hormones in *Salamandra salamandra*. An immunocytochemical and electron microscopic investigation. *Cell Tissue Res*, 1980, **211**:331~343.
- [7] Buchan A M J. An immunocytochemical study of regulatory peptides in the amphibian gastrointestinal tract. *Can J Zool*, 1986, **64**:1~7.
- [8] El-salhy M, Wilander E, Lundqvist M. Comparative studies of serotonin-like immunoreactive cells in the digestive tract of vertebrates. *Biomedical Research*, 1985, **6**(6):371~375.
- [9] 陈壁辉主编. 安徽两栖爬行动物志. 合肥:安徽科学技术出版社,1991.
- [10] 吴孝兵,张盛周,陈壁辉等. 扬子鳄消化道内分泌细胞的免疫组织化学研究. 动物学报, 1999, **45**(2):155~161.
- [11] 杨贵波,陈茂生,邓泽沛等. 大熊猫胃肠道内分泌细胞分布型的研究. 兽类学报, 1995, **15**(1):4~10.
- [12] 邓泽沛,周占祥,山田纯三. 北京鸭消化道内分泌细胞的免疫组织化学研究. 动物学报, 1994, **40**(4):383~389.
- [13] 方之平,潘黔生,赵雅心. 鲇、乌鳢和大口黑鲈消化道中内分泌细胞的定位及比较. 见:中国动物学会主编. 中国动物科学研究. 北京:林业出版社, 1999, 1 031~1 035.
- [14] 张志强,张盛周,吴孝兵. 两种蛇消化道5-羟色胺细胞的免疫组织化学定位及比较. 动物学杂志, 2001, **36**(6):11~14.
- [15] Solcia E, Capella Vassallo G, Buffa R. Endocrine cells of the gastric mucosa. *Int Rev Cytol*, 1975, **42**: 223~286.
- [16] 李伟,李霖,吴孝兵等. 多疣壁虎肠道内分泌细胞的分布及形态学观察. 动物学杂志, 2001, **36**(1):11~14.

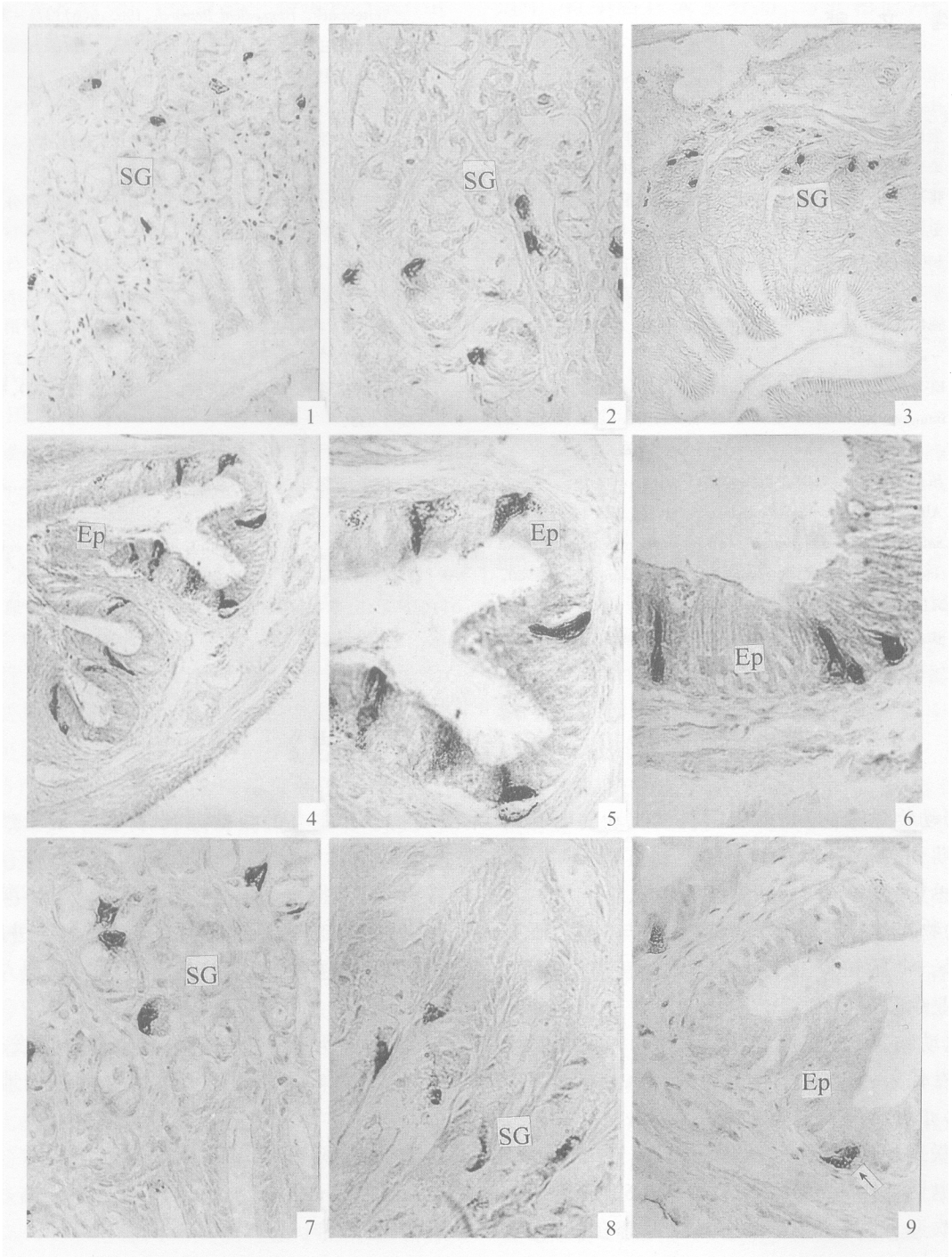
黄徐根等:日本林蛙胃肠道内分泌细胞的免疫组织化学

图版 I

HUANG Xu-Gen *et al.*: Immunohistochemical Studies on Endocrine Cells

in the Gastrointestinal Tract of *Rana japonica japonica*

Plate I



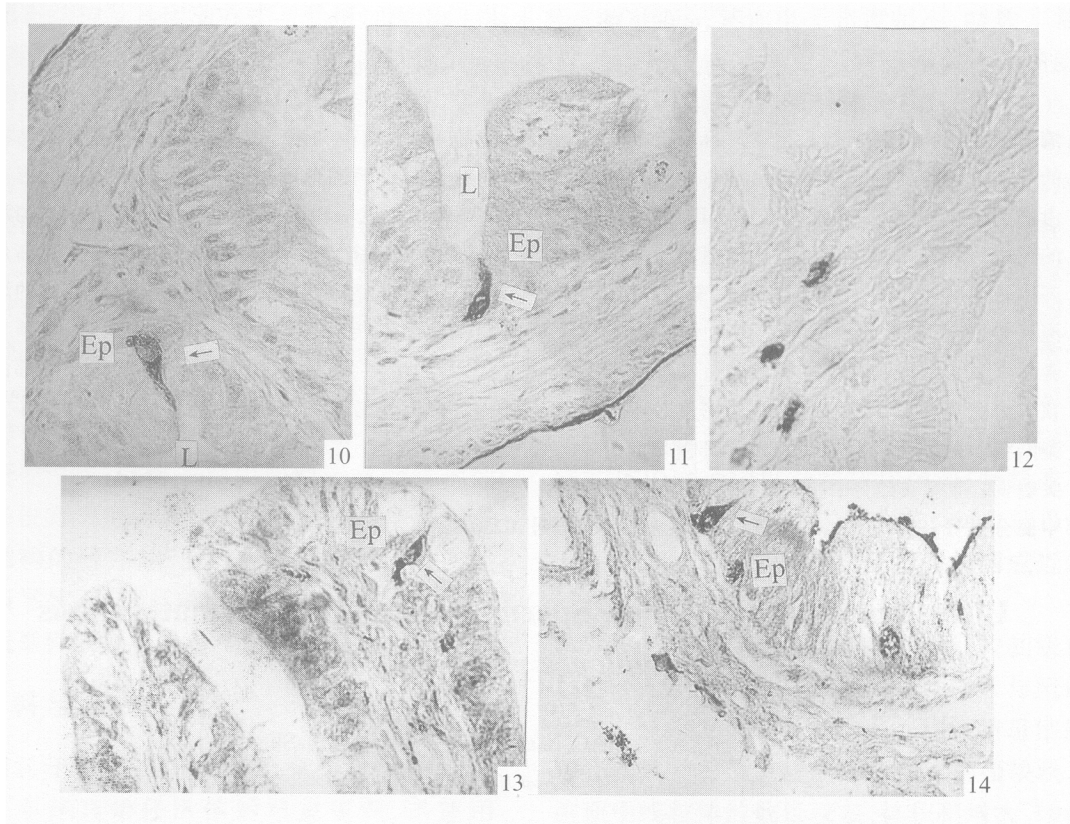
图版说明见图版 II

黄徐根等:日本林蛙胃肠道内分泌细胞的免疫组织化学

图版 II

HUANG Xu-Gen *et al.*: Immunohistochemical Studies on Endocrine Cellsin the Gastrointestinal Tract of *Rana japonica japonica*

Plate II



1. 贲门中中等密度分布的 5-HT-IR 细胞 $\times 400$; 2. 胃体中楔形 5-HT-IR 细胞 $\times 800$; 3. 幽门中较多的 5-HT-IR 细胞 $\times 400$; 4. 十二指肠中最高密度的 5-HT-IR 细胞 $\times 400$; 5. 十二指肠中梭形 5-HT-IR 细胞 $\times 800$; 6. 直肠中杆状 5-HT-IR 细胞 $\times 800$; 7. 贲门中楔形、圆形 SS-IR 细胞 $\times 800$; 8. 幽门中有胞突的 SS-IR 细胞 $\times 800$; 9. 十二指肠中有胞突的 SS-IR 细胞 $\times 800$; 10. 十二指肠中有胞突伸向肠腔的 Gas-IR 细胞 $\times 800$; 11. 空肠中有胞突伸向肠腔的 Gas-IR 细胞 $\times 800$; 12. 胃体中椭圆形 Glu-IR 细胞 $\times 800$; 13. 回肠中两端有突起的 SP-IR 细胞 $\times 800$; 14. 直肠中锥形 SP-IR 细胞 $\times 800$

Ep: 上皮; SG: 胃腺; LP: 固有膜; L: 消化道腔