

黑眶蟾蜍和黑斑蛙消化道 5-羟色胺免疫活性细胞的免疫组织化学

张秋金^{①②} 陈友铃^① 耿宝荣^① 王义权^②

(^① 福建师范大学生物工程学院 福州 350007; ^② 厦门大学生命科学院 厦门 361005)

摘要: 对黑眶蟾蜍 (*Bufo melanostictus*) 和黑斑蛙 (*Rana nigromaculata*) 消化道 5-羟色胺免疫活性细胞的形态、分布进行了免疫组织化学定位。5-羟色胺免疫活性细胞在黑眶蟾蜍和黑斑蛙消化道各段中均有分布,分布密度均呈升-降-升-降的波浪式分布特点,二者在幽门部和回肠都有个分布的高峰值。黑眶蟾蜍回肠最高,空肠、幽门部次之,十二指肠、直肠最低;黑斑蛙幽门部最高,回肠、空肠次之,食道、贲门部、直肠最低。5-羟色胺免疫活性细胞位于胃的胃腺上皮、食道及肠的粘膜上皮,有圆形、椭圆形、梭形、楔形等,有的有胞突。文中讨论了 5-羟色胺免疫活性细胞分布型的原因及形态与功能的关系。

关键词: 黑眶蟾蜍;黑斑蛙;消化道;5-羟色胺免疫活性细胞;免疫组织化学

中图分类号:Q954 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)04-17-05

Immunohistochemical Study on 5-Hydroxytryptamine Immunoreactive Cells in the Alimentary Tract of *Bufo melanostictus* and *Rana nigromaculata*

ZHANG Qiu-Jin^{①②} CHEN You-Ling^① GENG Bao-Rong^① WANG Yi-Quan^②

(^① Bioengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007;

^② College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Using immunohistochemical technique, 5-Hydroxytryptamine immunoreactive (5-HT-IR) cells were observed in the alimentary tract of the toad *Bufo melanostictus* and the frog *Rana nigromaculata*. 5-HT-IR cells were distributed throughout the alimentary tracts of both species and located in the gastric glands of the stomach regions and in the intestinal or esophageal epithelium with variable frequencies. The density of the cell in *B. melanostictus* is the highest in the ileum, moderate in the jejunum and stomachus pyloricus, and the lowest in the duodenum and rectum. In *R. nigromaculata* the density of 5-HT-IR cells is the highest in the stomachus pyloricus, moderate in the ileum and jejunum, and the lowest in the esophagus, stomachus cardiacus and rectum. 5-HT-IR cells were spherical, ellipsoid, coniform or spindle-shaped with long cytoplasmic process reaching to the lumen. The distribution mode of 5-HT-IR cells and the relationship between morphology and function are also discussed.

Key words: *Bufo melanostictus*; *Rana nigromaculata*; Alimentary tract; 5-Hydroxytryptamine immunoreactive cell; Immunohistochemistry

5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine,简称 5-HT)是机体内具有神经内分泌功能的神经介质之一,主要分布在中枢神经系统和消化道内,对机体完成生理功能具有重要作用。在消化道内,5-羟色胺具有调节黏液分泌、胃肠道蠕动、平滑

肌收缩和血管扩张的功能。

基金项目 福建省自然科学基金(No. D0320001);

第一作者介绍 张秋金,男,博士研究生,副教授,研究方向:

两栖爬行动物学;E-mail: zqzhang@fjnu.edu.cn。

收稿日期:2004-12-10;修回日期:2005-04-27

近些年来,随着免疫组织化学技术的发展与应用,不少学者对多种动物尤其是脊椎动物的消化道内分泌细胞进行研究^[1-15],为比较内分泌学提供了丰富的资料。黑眶蟾蜍(*Bufo melanostictus*)和黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)属于两栖纲(Amphibia)无尾目(Anura),其消化道5-羟色胺免疫活性细胞的免疫组化研究未见报道,本文采用不同的免疫组化染色方法对其分布进行研究和定位,可以丰富两栖动物内分泌学资料。

1 材料与方法

1.1 材料 黑眶蟾蜍 3♀3♂,黑斑蛙 2♀2♂,2004年4~5月采自福州市仓山区。毁髓处死,迅速解剖,按下列消化道各段取材:食道、贲门部、胃体、幽门部、十二指肠、空肠、回肠、直肠。将消化道各段用生理盐水漂洗,然后用10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋、切片(7 μm)。

1.2 试剂 即用型小鼠抗5-HT单克隆抗体、即用型链霉菌亲生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)和EliVision™ Plus免疫组化检测试剂盒、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)及正常非免疫小鼠血清均由福州迈新生物技术有限公司提供。

1.3 免疫组织化学染色 按照迈新公司SP检测试剂盒和EliVision™ Plus检测试剂盒说明书进行。石蜡切片脱蜡、水化,用PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)冲洗(3次,每次3 min,下同)。除去PBS,用3% H₂O₂孵育10 min,阻断内源性过氧化物酶, PBS冲洗,除去PBS,10%正常山羊血清孵育10 min。除去血清,滴加即用型小鼠抗5-HT单克隆抗体,室温下孵育60 min。用SP法染色者,小鼠抗5-HT抗体孵育后, PBS冲洗,除去PBS,滴加生物素标记的二抗(biotin-goat anti mouse IgG)孵育10 min。PBS冲洗,除去PBS,滴加链霉菌亲生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase)孵育10 min。PBS冲洗、DAB显色、苏木素复染、脱水、透明、中性树胶封片。用EliVision™ Plus方法染色者,小鼠抗5-HT抗体

孵育后, PBS冲洗,除去PBS,滴加多聚物增强液(polymer enhancer)孵育20 min, PBS冲洗,除去PBS,滴加过氧化物酶-羊抗鼠IgG多聚物孵育30 min, PBS冲洗, DAB显色、苏木素复染、脱水、透明、中性树胶封片。实验设阴性对照:用PBS和正常非免疫小鼠血清分别代替小鼠抗5-HT单克隆抗体,其余步骤一样。

1.4 细胞计数与统计 用Olympus AHB-LB型显微镜观察、计数。在10×40视野下对每个部位的切片随机取20个视野,计数每个视野5-羟色胺免疫活性细胞的数量,然后求平均值,表示该部位5-羟色胺免疫活性细胞的分布密度,并对黑眶蟾蜍和黑斑蛙消化道相同部位的细胞密度均值进行差别显著性检验。

2 结果

通过DAB显色的阳性5-羟色胺免疫活性细胞呈褐色。用SP试剂盒染色,在肠段尤其是直肠的背景比较深,阴性对照也有一些褐色背景着色(图版I:11),而用EliVision™ Plus试剂盒染色则背景清晰,阳性细胞容易辨认。

2.1 5-HT细胞的分布密度 黑眶蟾蜍和黑斑蛙消化道5-羟色胺免疫活性细胞分布密度见表1。5-羟色胺免疫活性细胞在黑眶蟾蜍和黑斑蛙消化道各段中均有分布,分布密度都呈升-降-升-降的波浪式分布特点,二者在幽门部和回肠都有个分布的高峰值。黑眶蟾蜍回肠最高,空肠、幽门部次之,十二指肠、直肠最低;黑斑蛙幽门部最高,回肠、空肠次之,食道、贲门部、直肠最低。对黑眶蟾蜍和黑斑蛙消化道相同部位5-羟色胺免疫活性细胞密度均值进行差别显著性检验的结果表明,除幽门部、空肠、直肠外,其他各部位二者的5-羟色胺免疫活性细胞密度差异极显著($P < 0.01$)。

2.2 5-羟色胺免疫活性细胞的形态学特征 黑眶蟾蜍和黑斑蛙消化道相同部位的5-羟色胺免疫活性细胞形态上没有明显的种的特异性。食道的5-羟色胺免疫活性细胞位于食道粘膜上皮细胞间,呈圆形、楔形、梭形和长颈瓶形(图版I:12),胃的5-羟色胺免疫活性细胞位于胃

腺腺上皮细胞间,大多呈圆形、半月形、弧形和长条形,细胞一般较小,细胞周边可见分泌颗粒,往腺内分泌(图版 I :3~5),肠的 5-羟色胺免疫活性细胞位于粘膜上皮,呈圆形、长椭圆

形、楔形、梭形(图版 I :6~10)。消化道中楔形和梭形的 5-羟色胺免疫活性细胞有胞突伸向消化管腔面,梭形的还有伸向固有膜的胞突。

表 1 黑眶蟾蜍和黑斑蛙消化道 5-羟色胺免疫活性细胞分布密度(细胞数/400×视野)

Table 1 Distribution and density of 5-HT-IR cells in the alimentary tract of *Bufo melanostictus* and *Rana nigromaculata*(cell numbers/area of 400×scope)

	食道 Esophagus	贲门部 Stomachus cardiacus	胃体 Stomachus corpus	幽门部 Stomachus pyloricus	十二指肠 Duodenum	空肠 Jejunum	回肠 Ileum	直肠 Rectum
黑眶蟾蜍 <i>B. melanostictus</i>	4.65±2.37	5.00±1.12	5.80±2.33	6.35±5.12	2.60±1.27	6.50±2.61	12.4±5.66	3.05±2.16
黑斑蛙 <i>R. nigromaculata</i>	2.15±1.09	2.20±1.06	3.05±1.54	8.20±3.64	7.00±2.13	7.20±5.45	7.80±2.86	2.60±1.35
P 值 P-Value	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01	>0.05

3 讨 论

目前国内各试剂公司所提供的抗 5-HT 抗体都是抗人 5-HT 抗体,用抗人的 5-HT 抗体在各种动物组织上都能得到阳性结果,说明 5-HT 在动物演化史上的保守性。5-羟色胺免疫活性细胞广泛分布于多种动物的消化道中,但在不同动物消化道中的分布情况不尽相同^[1~15]。黑眶蟾蜍和黑斑蛙 5-羟色胺免疫活性细胞分布于整个消化道各段,各段的细胞形态没有大的差异,从切片上观察到的有圆形、椭圆形、楔形、梭形等。其中梭形的 5-羟色胺免疫活性细胞具有长短不一的胞突,伸向消化道管腔面,这与其他脊椎动物中 5-羟色胺免疫活性细胞形态是一致的^[1],具有胞突的梭形细胞属于开放型的细胞,而圆形、椭圆形的则属于闭合型的细胞^[2],说明黑眶蟾蜍和黑斑蛙消化道 5-羟色胺免疫活性细胞有外分泌及内分泌的功能。

5-HT 对消化道的蠕动具有很重要的调节作用。目前所报道的两栖类和爬行类食道都有 5-羟色胺免疫活性细胞分布,而鸟类和哺乳类食道未见有 5-羟色胺免疫活性细胞^[1],这正好体现了 5-HT 对消化道的蠕动有重要调节作用。两栖爬行类缺乏口腔消化,食物是整个咽下、经过食道到达胃部,在此过程中食道分泌的 5-HT 起重要作用。而鸟类食道较长并形成嗉囊,嗉

囊有暂时贮存并软化食物的功能,食物并不急于送到胃部,可以无需 5-HT 的作用,而哺乳动物出现口腔咀嚼及口腔消化,食物经过口腔咀嚼,容易经过食道,也无需 5-HT 的作用。

消化道 5-羟色胺免疫活性细胞的分布与动物的栖息环境及食物类型也有关系。黑眶蟾蜍除了繁殖期间在池塘水域,平时多栖息在离水源较远的旱地,而黑斑蛙与大多数蛙类一样生活环境离水源较近,黑眶蟾蜍的吞咽必须有较多的 5-HT 因子的作用,因而食道到胃体的 5-羟色胺免疫活性细胞都比黑斑蛙来得多,明显与食物的通过有关。

虽然黑眶蟾蜍和黑斑蛙消化道不同部位 5-羟色胺免疫活性细胞密度不同,而且最高或最低值出现的部位也不同,但是二者从前到后都呈现出升-降-升-降的波浪式分布特点,在胃幽门部有个密度峰值,这可能是由于幽门部与十二指肠交接处比较狭窄,必须增加该部位的蠕动才有利于食糜从胃到肠的移动,5-羟色胺免疫活性细胞在十二指肠稍有降低后又升高,到回肠段出现第二个峰值,这与回肠是完成消化道功能的主要部位有关,二者的 5-羟色胺免疫活性细胞密度到直肠又降低。脊椎动物胃肠道中的嗜银细胞主要分泌 5-HT^[13],免疫组化显示的 5-羟色胺免疫活性细胞的分布密度、形态特征与用改良龙桂开浸银染色法显示的消化道嗜

银细胞的结果基本一致^[14]。

李淑兰^[15]认为黑龙江草蜥回肠、直肠的 5-HT 细胞可能与动物对水分的保持有某种联系,黑眶蟾蜍回肠的 5-HT 细胞密度明显较高,是否与其生活环境远离水源更需要保持水份有关,有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 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,1991,11(3):293~298.
- [2] 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.
- [3] 黄辉洋,李少菁,王桂忠等.锯缘青蟹消化系统 5-羟色胺免疫组织化学的研究.厦门大学学报(自然科学版),2001,40(3):789~792.
- [4] 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(1):53~65.
- [5] 郑一守,唐晓雯,朱洪文.中华大蟾蜍多种组织内 5-羟色胺免疫染色细胞的分布.实验生物学报,1990,23(3):285~287.
- [6] 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):275~277.
- [7] 黄徐根,吴海龙,吴孝兵等.日本林蛙胃肠道内分泌细胞的免疫组织化学.动物学杂志,2004,39(2):19~25.
- [8] Ku S K, Lee H S, Lee J H. An immunohistochemical study of endocrine cells in the alimentary tract of the red-bellied frog, *Bombina orientalis*. *J Vet Med Sci* 2000, 62(6):589~594.
- [9] Sae-kwang Ku, Hyeung-sik Lee, Jae-kee Koh, et al. An immunohistochemical study on the neuropeptide-producing endocrine cells in the alimentary tract of wrinkled frog, *Rana rugosa*(*Ranidae*). *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 131:1~8.
- [10] 张志强,张盛周,吴孝兵.竹叶青蛇消化道内分泌细胞的免疫组织化学定位.动物学报,2001,47(6):666~671.
- [11] 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.
- [12] 方之平,孙宝田,谢云芳等.新疆犏牛胃肠胰系统 5-羟色胺免疫活性细胞的免疫组织化学研究.解剖学报,1994,25(1):78~81.
- [13] 李伟,李霖,吴孝兵等.多疣壁虎肠道内分泌细胞的分布与形态学观察.动物学杂志,2001,36(1):11~14.
- [14] 楚德昌,邓振旭.中华蟾蜍、黑斑蛙冬眠期与非冬眠期消化管嗜银细胞的比较.动物学杂志,2004,39(1):21~24.
- [15] 李淑兰.黑龙江草蜥消化道 5-羟色胺免疫活性内分泌细胞的分布与形态学观察.动物学杂志,2004,39(2):33~37.

图 版 说 明

1,2.黑斑蛙食道 5-HT-IR 细胞 ×760;3.黑斑蛙贲门部 5-HT-IR 细胞 ×760;4.黑斑蛙胃体 5-HT-IR 细胞 ×760;5.黑斑蛙幽门部 5-HT-IR 细胞 ×1 520;6.黑眶蟾蜍十二指肠 5-HT-IR 细胞 ×760;7.黑眶蟾蜍空肠 5-HT-IR 细胞 ×1 520;8.黑眶蟾蜍回肠 5-HT-IR 细胞 ×760;9.黑斑蛙回肠 5-HT-IR 细胞 ×760;10.黑眶蟾蜍直肠 5-HT-IR 细胞 ×760;11.黑眶蟾蜍直肠,示阴性对照背景着色 ×760;其中 1,2,3,6,8,11 为 SP 法染色,4,5,7,9,10 为 EliVision™ Plus 染色。

Ep:上皮;GG:胃腺。

Explanation of Plate

1,2. 5-HT-IR cells in the esophagus of *R. nigromaculata* ×760;3. 5-HT-IR cells in the stomach cardiacus of *R. nigromaculata* ×760;4. 5-HT-IR cells in the stomach corpus of *R. nigromaculata* ×760;5. 5-HT-IR cells in the stomach pyloricus of *R. nigromaculata* ×1 520;6. 5-HT-IR cells in the duodenum of *B. melanostictus* ×760;7. 5-HT-IR cells in the jejunum of *B. melanostictus* ×1 520;8. 5-HT-IR cells in the ileum of *B. melanostictus* ×760;9. 5-HT-IR cells in the ileum of *R. nigromaculata* ×760;10. 5-HT-IR cells in the rectum of *B. melanostictus* ×760;11. The background of negative control in the rectum of *B. melanostictus* ×760;1,2,3,6,8,11 stained by SP kit and 4,5,7,9,10 by EliVision™ Plus kit.

Ep:epithelium;GG:gastric gland.

张秋金等:黑眶蟾蜍和黑斑蛙消化道 5-羟色胺免疫活性细胞的免疫组织化学

图版 I

ZHANG Qiu-Jin *et al.*: Immunohistochemical Study on 5-Hydroxytryptamine Immunoreactive Cells in the Alimentary Tract of *Bufo melanostictus* and *Rana nigromaculata*

Plate I

