

# 东方铃蟾消化道 5-羟色胺免疫活性细胞的免疫组织化学定位

李淑兰 赵文艳 冷超 赵文阁

(哈尔滨师范大学生命与环境科学学院 哈尔滨 150080)

**摘要:**应用 5-HT 抗血清,以 ABC(avidin-biotin-peroxidase complex)免疫组织化学方法,对东方铃蟾(*Bombina orientalis*)消化道内的 5-HT 免疫活性细胞(5-Hydroxytryptamine immunoreactive cell, 5-HT cell)进行了免疫组织化学的定位研究和形态学观察,并探讨其分布型的成因及细胞形态与功能的关系。结果表明,5-HT 细胞在东方铃蟾消化道的各个部位均有分布,其中以胃贲门部分布密度为最高( $55.73 \pm 10.67$ )个/ $\text{mm}^2$ ;胃幽门部次之( $42.99 \pm 5.25$ )个/ $\text{mm}^2$ ;直肠部最低( $6.37 \pm 4.78$ )个/ $\text{mm}^2$ 。5-HT 细胞的形态多样,圆形、椭圆形、锥体形、长锥体形等,其中食管和直肠以圆形和椭圆形为主,小肠部则以长锥体形为主,其细长突起指向肠腔或固有膜。细胞分布于上皮基部、上皮细胞之间、腺泡上皮细胞之间或固有膜内;胃贲门部、胃体及胃幽门部 5-HT 细胞主要分布于腺泡上皮之间,也有的分布于胃上皮之间;肠部 5-HT 细胞主要分布于肠上皮之间。提示了东方铃蟾 5-HT 细胞分布型的形成与各部位消化功能及其食性和食物组成有关,5-HT 细胞形态与其内、外、旁分泌功能是相适应的。

**关键词:**东方铃蟾;5-HT 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)05-37-06

## Immunohistochemical Localization of 5-HT Immunoreactive Cells in the Digestive Tract of *Bombina orientalis*

LI Shu-Lan ZHAO Wen-Yan LENG Chao ZHAO Wen-Ge

(College of Life and Environment Science, Harbin Normal University, Harbin 150080, China)

**Abstract** Immunohistochemical localization and morphology of 5-Hydroxytryptamine immunoreactive cells(5-HT cell) in the digestive tract of *Bombina orientalis* have been investigated by using the ABC immunostaining technique and the origin of their distribution pattern as well as the relationship between cell morphology and function have been discussed. The 5-HT cells distribute throughout the digestive tract and their density is the highest in the cardiac part of stomach ( $55.73 \pm 10.67$  number/ $\text{mm}^2$ ), followed by the pyloric part of stomach ( $42.99 \pm 5.25$  number/ $\text{mm}^2$ ). The lowest cell density is found in rectum ( $6.37 \pm 4.78$  number/ $\text{mm}^2$ ). The 5-HT cells have different shapes including round, ellipse, shuttle-like, tapering and other shapes. The majority of the 5-HT cells in esophagus and rectum are round or ellipse, but most of them are tapering in small intestine and the tapering cells have a long process extending to either the gut lumen or lamina propria. The 5-HT cells distribute at the basal region of epithelial cells, between epithelial cells, between glandular epithelial cells or in the lamina propria. In the cardiac part of stomach, body of stomach and pyloric part of stomach, most of them are between glandular epithelial cells and some are between

基金项目 黑龙江省科学技术计划项目资助(No. sy02-07);

第一作者介绍 李淑兰,女,硕士,副教授,主要从事人体及动物生理学研究,E-mail:shulanli2002@yahoo.com.cn.

收稿日期 2005-01-05,修回日期 2005-07-14

epithelial cells. In bowel, the majority of 5-HT cells are between epithelial cells. The evidence indicates that the distribution pattern of 5-HT cells may be related to digestive function, feeding habit and food component and that the morphological characteristics of 5-HT cells are correlated with their endocrine, exocrine and paracrine functions.

**Key words:** *Bombina orientalis*; 5-HT cell; Immunohistochemistry

消化道内有许多内分泌细胞,其总量超过其他任何一个内分泌腺。应用免疫组化和银浸的方法对消化道内分泌细胞的研究,国外已有不少报道<sup>[1,2]</sup>。在国内,也有学者用 5-HT 抗血清对不同脊椎动物的消化道 5-HT 阳性细胞进行了定位研究<sup>[3]</sup>,其中爬行类动物消化道内分泌细胞的研究报道较多<sup>[4-7]</sup>,而两栖类研究较少<sup>[8,9]</sup>,东方铃蟾(*Bombina orientalis*)属两栖纲(Amphibia)无尾目(Anura)盘舌蟾科(Discoglossidae)铃蟾属(*Bombina*),对其消化道 5-HT 内分泌细胞的研究迄今未见报道。鉴于此,本文采用卵白素-生物素-过氧化物酶复合物(avvidin-biotin-peroxidase complex technique, ABC)法,对东方铃蟾消化道内 5-HT 免疫活性内分泌细胞的分布与形态学进行了研究,进一步丰富了比较内分泌学资料。同时还为进一步研究 5-HT 对两栖类消化道功能的影响提供形态学基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 东方铃蟾 6 只,雌雄各半,采自黑龙江省威虎山。双毁髓后,立即按下列消化道各段取材:食管、胃贲门部、胃体、胃幽门部、十二指肠、空肠、回肠和直肠。先用生理盐水快速冲洗,然后用改良的 Bouin's 液固定 24 h,常规脱水透明,石蜡包埋,切片 6  $\mu\text{m}$ ,贴于涂有铬矾明胶载玻片上,37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱烘片备用。

**1.2 试剂** 5-HT 抗血清(兔抗人)和 VECTASTAIN ABC 免疫组织化学试剂盒购于北京中山生物技术有限公司,美国 ZYMED 公司生产。5-HT 抗血清 稀释倍数 1/100,产品代号为 ZA-0231。

**1.3 免疫组织化学方法** 采用 ABC 免疫组织化学法。常规石蜡切片脱蜡复水。切片入 37 $^{\circ}\text{C}$  3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  甲醇溶液孵育 15 min,消除内源

性过氧化物酶的活性。蒸馏水浸洗 5 min, PBS 浸洗 5 min。然后取出,滴加正常山羊血清(3/200),室温(15~25 $^{\circ}\text{C}$ )孵育 20 min,封闭非特异性反应部位。倾去血清,滴加一抗(5-HT 抗血清 稀释倍数 1/100),室温过夜。PBS 浸洗 3 次  $\times$  5 min,滴加二抗(羊抗兔 IgG 抗血清 稀释倍数 1/200),孵育 45 min, PBS 浸洗 3 次  $\times$  5 min。滴加卵白素-生物素-过氧化物酶(ABC)试剂(稀释倍数 1/1/100),孵育 40 min。PBS 浸洗 3 次  $\times$  5 min,滴加 DAB- $\text{H}_2\text{O}_2$  显色后,冷 PBS 冲洗,冷蒸馏水、自来水冲洗。苏木精复染,常规石蜡脱水透明,封片。

对照切片以 ABC 试剂药盒中正常山羊血清取代兔抗 5-HT 血清(第一抗体)进行孵育,其余步骤同上。

**1.4 细胞计数** 在 Olympus BH-2 型显微镜下观察、拍照,对每个部位的切片随机取 20 个视野,计算每平方毫米 5-HT 免疫活性细胞的个数(个/ $\text{mm}^2$ ),结果用  $\bar{X} \pm SD$  表示,对所得数据用 Duncan 多重比较的方法进行统计学分析。

## 2 结 果

用 ABC 免疫组织化学法,显示的 5-HT 免疫活性细胞呈黑褐色,背景为淡蓝色,反差强,很易辨认。对照实验呈阴性反应。

**2.1 5-HT 免疫活性细胞的组织学分布** 5-HT 细胞见于东方铃蟾的消化道各段,分布于上皮基部、上皮细胞之间、腺泡上皮细胞之间或固有膜内,其形态多种多样,呈圆形、椭圆形、锥体形和梭形,具体分布位置和形态如表 1、图版 I 所示。

**2.2 消化道各段 5-HT 免疫活性细胞的分布密度** 对东方铃蟾消化道 8 个部位 5-HT 细胞计数所得的数据采用 Duncan 多重比较的方法进行统计学分析,实验结果列于表 2。

表 1 东方铃蟾消化道 5-HT 免疫活性细胞的分布位置和形态

Table 1 Location and shape of 5-HT immunoreactive cells in the digestive tract of *Bombina orientalis*

部位 Region	分布位置 Location	形态 Shape
食管 Esophagus	上皮基部 in the bottom of epithelia	呈椭圆形(图版 I :1)或圆形(图版 I :2) ellipse(Plate I :1) or round(Plate I :2)
胃贲门部 Cardiac part of stomach	胃贲门上皮之间及基部 between epithelial cells and in the bottom of epithelia	呈椭圆形(图版 I :3)或两个细胞借助于突起紧密连接(图版 I :4) ellipse(Plate I :3) or two 5-HT cells connect by their process(Plate I :4)
胃体 Body of stomach	腺泡上皮之间 between epithelial cells of gastric gland	呈锥体形突起指向腺泡腔(图版 I :5) shuttle-like and its process extending to the acinus lumen(Plate I :5)
胃幽门部 Pyloric part of stomach	胃幽门上皮之间或腺泡上皮之间 between epithelial cells or between epithelial cells of gastric gland	呈锥体形,突起指向腺泡腔(图版 I :6)或突起指向胃幽门腔(图版 I :7) shuttle-like, its process extending to the acinus lumen(Plate I :6) or extending to the pyloric lumen(Plate I :7)
十二指肠 Duodenum	肠上皮之间 between epithelial cells of the gut	呈长锥体形,突起指向肠腔(图版 I :8) tapering, its process extending to the gut lumen(Plate I :8)
空肠 Jejunum	肠上皮之间 between epithelial cells of the gut	呈锥体形,突起指向肠腔(图版 I :9) shuttle-like, its process extending to the gut lumen(Plate I :9)
回肠 Ileum	肠上皮之间 between epithelial cells of the gut	呈锥体形,突起指向肠腔(图版 I :10) shuttle-like, its process extending to the gut lumen(Plate I :10)
直肠 Rectum	肠上皮之间或腺泡上皮之间 between epithelial cells of the gut or between epithelial cells of gastric gland	呈梭形或椭圆形和圆形(图版 I :11,12) shuttle-like, ellipse or round(Plate I :11,12)

表 2 Duncan 多重比较的结果

Table 2 Results of Duncan multiple comparison ( $\bar{X} \pm SD$ )

部位 Region	分布密度(个/mm <sup>2</sup> ) The average of distribution density (number/mm <sup>2</sup> )	显著水平 Significance level	
		0.05	0.01
贲门 Cardiac part	55.73 ± 10.67	a	A
幽门 Pyloric part	42.99 ± 5.25	b	B
十二指肠 Duodenum	33.44 ± 10.59	c	BC
胃 Body of stomach	31.05 ± 7.48	c	CD
食管 Esophagus	21.50 ± 8.76	d	DE
回肠 Ileum	14.33 ± 5.97	de	EF
空肠 Jejunum	12.74 ± 7.32	ef	EF
直肠 Rectum	6.37 ± 4.78	f	F

含有相同字母的处理,差异不显著;含有不同字母的处理,差异显著。

The difference is not significant between groups with the same letters, while the difference is significant between groups with different letters.

消化道 5-HT 细胞分布密度呈波浪式,出现两个显著的高峰,一个是胃贲门部,另一个是胃幽门部。其中贲门部的 5-HT 细胞密度显著高于幽门部。由食管到胃贲门部逐渐上升达到第一个高峰,之后开始下降,到胃部达到较低,随

后又开始上升至胃幽门部又达到一个高峰,尔后经十二指肠部开始下降,到空肠部达到最低,最后经回肠稍有上升后,到直肠又降到最低。

### 3 讨论

消化道 5-羟色胺免疫活性细胞属内分泌细胞类,其分泌的 5-羟色胺对调节消化道功能有着重要作用<sup>[10]</sup>。5-HT 免疫活性细胞广泛存在于各种脊椎动物消化道中<sup>[3]</sup>,但分布状况差异较大。有学者<sup>[10]</sup>对几种脊椎动物消化道 5-HT 细胞的分布作了比较研究,发现食管 5-HT 细胞仅见于两栖类和爬行类。本文中,在东方铃蟾的食管上皮上也发现了 5-HT 细胞,这与前面的结论及吴孝兵<sup>[5]</sup>等在研究扬子鳄的食道中含有 5-HT 细胞分布的结果是一致的。

已有研究表明,多数动物 5-HT 细胞集中于胃幽门部<sup>[3]</sup>,如无斑肥螈<sup>9</sup>(*Pachytriton labiatum*)中华大蟾蜍<sup>[3]</sup>(*Bufo gargarizans*)黄喉水龟<sup>[3]</sup>(*Mauremys mutica*)小白鼠<sup>[3]</sup>。或集中在十二指肠,如扬子鳄<sup>[5]</sup>(*Alligator sinensis*)虎皮鹦鹉<sup>[3]</sup>(*Melopsittacus undulates*)。也有少数例外,

如大熊猫<sup>[11]</sup>(*Ailuropoda melanoleuca*) 在空肠最多。本文中的东方铃蟾 5-HT 细胞分布密度在胃贲门部最高,胃幽门部次之,直肠部最低。5-HT 免疫活性细胞密度在胃贲门部和胃幽门部高,可能与调节食物通过时肌肉的收缩运动有关。但其分布型与以上研究结果不尽相同,这种分布型的差异,杨贵波等<sup>[11]</sup>在大熊猫的研究中认为,大熊猫消化道 5-HT 细胞的特殊类型可能是其长期进化过程中对特殊食性适应的结果。之后,杨贵波等<sup>[12]</sup>又证明了改变大鼠食物组成可使 5-HT 细胞的分布型发生变化。总体上,东方铃蟾 5-HT 细胞的分布型的形成可能与其食性和食物组成有关,与种属无直接关系。

关于小肠中 5-HT 内分泌细胞的分布状况主要有两种观点,其一认为十二指肠数量最多,空肠次之,回肠最少,形成一条从小肠头端向尾端逐渐倾斜的密度分布曲线<sup>[13]</sup>;其二认为十二指肠和回肠数量均较多,而空肠最少,形成 U 字形分布曲线<sup>[14]</sup>。本文结果显示,东方铃蟾小肠各部位 5-HT 内分泌细胞的分布密度有明显差异,十二指肠最高,从空肠到回肠逐渐减少,与前一种观点一致。小肠内 5-HT 细胞的密度以十二指肠最高,原因很容易理解,因为十二指肠是消化和吸收的主要部位,需要很多的 5-HT 细胞分泌 5-HT 以刺激肠黏液分泌、平滑肌收缩和血管扩张,协助消化和吸收。之后,随着消化能力的减弱,5-HT 细胞的密度也随之降低。

消化道内分泌细胞的内分泌功能早已被肯定<sup>[15]</sup>,本文在东方铃蟾的消化道内可见有大量位于上皮基部的圆形或椭圆形 5-HT 细胞,进一步证实了消化道内分泌细胞的内分泌功能。至于消化道内分泌细胞是否还有外分泌功能,Nillson<sup>[16]</sup>等认为内分泌细胞可能以外分泌方式将 5-HT 排到肠腔,但形态学依据不足。本文用 5-HT 抗体的免疫组织化学法,观察到锥体形 5-HT 细胞具有长突起伸向肠腔或腺泡腔,并发现突起附近有免疫染色反应产物,从而在形态学上证明 5-HT 有可能从内分泌细胞的顶端释放到肠腔或腺腔内。即内分泌细胞以外分泌方式释放 5-HT,具有外分泌功能;此外,有的梭形

5-HT 阳性细胞一端指向肠腔,另一端指向固有膜,表明这种细胞可能同时具有内、外分泌双重功能;同时在其消化道内还发现有两个 5-HT 细胞借助突起紧密相接触的现象,这又说明消化道内分泌细胞具旁分泌作用,可能起局部调节作用。本文结果为内分泌细胞借外分泌及旁分泌途径释放其分泌产物提供了进一步的形态学依据,也表明这两种作用方式在较低等的两栖类就已存在。

现已公认,胃肠道内存在大量内分泌细胞,可产生多种肽类激素,是机体最大的内分泌器官<sup>[17]</sup>。5-HT 细胞是其中主要的内分泌细胞之一,其分泌产物参与许多生理与病理过程<sup>[18]</sup>。本文中,5-HT 细胞在东方铃蟾消化道中大量存在,提示 5-HT 在其消化生理过程中起着重要作用。但是,无论是 5-HT 细胞的分布差异原因,还是 5-HT 细胞作用机理,都有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Sjolund K, Sanden G, Hakanson R, et al. Endocrine cells in human intestine: an immunohistochemical study. *Gastroenterology*, 1983, **85**: 11 ~ 20.
- [2] Trandaburu T, Nummerger F. Somatostatin-immunoreactive cell in the gastrointestinal tract of the frog *Rana esculenta*. *Cell Tissue Res*, 1995, **279**: 437.
- [3] 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 ~ 297.
- [4] 张志强, 张盛周, 吴孝兵. 二种蛇消化道 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.
- [5] 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.
- [6] 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形态与观察. *动物学杂志*, 2004, **39**(2): 36 ~ 40.
- [7] 李淑兰, 陈霞, 赵文阁. 枕纹锦蛇消化道 5-羟色胺免疫活性内分泌细胞的分布形态与观察. *动物学研究*, 2004, **25**(1): 63 ~ 67.
- [8] 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 ~ 290.
- [9] 张盛周, 陈冬生, 张志强等. 无斑肥螈消化道 5-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**(1): 13 ~ 16.
- [ 10 ] El-Salhy M, Wilander E, Lundquist M. Comparative studies of serotonin-like immunoreactive cell in the digestive tract of vertebrates. *Biomedical Research*, 1985, **6**(6): 371 ~ 375.
- [ 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 ] 杨贵波, 王平. 改变食物组成对大鼠胃肠道嗜铬细胞的影响. *动物学报*, 1997, **43**(1): 55 ~ 60.
- [ 13 ] Penttila A. 5-Hydroxytryptamine in the enterochromaffin cells of the guinea pig alimentary tract. *Histochem J*, 1967, **11**: 185.
- [ 14 ] Josephson R L, Altmann G G. Distribution of diazo-positive (argentaffin) cells in small intestine of rats of various ages. *Ame J Anat*, 1973, **136**: 15 ~ 22.
- [ 15 ] Bülbring E, Crema A. The action of 5-Hydroxytryptamine, 5-Hydroxytryptophan and reserpine on intestinal peristalsis in anaesthetized guinea-pigs. *J Physiol*, 1959, **146**: 29 ~ 53.
- [ 16 ] Nilsson O, Ahlman H, Geffard M, et al. Bipolarity of duodenal enterophromaffin cells in the rats. *Cell Tissue Res*, 1987, **284**: 49 ~ 54.
- [ 17 ] Hakanson R. The Stomach as an Endocrine Organ. New York: Elsevier Science Publishing Co., 1991: 27.
- [ 18 ] Wong S H, Cho C H, Ogle C W. The role of Serotonin in ethanol-induced gastric glandular damage in rats. *Digestion*, 1990, **45**(1): 52.

## 图 版 说 明

1. 食管上皮基部的椭圆形 5-HT 细胞(箭头);
  2. 食管上皮基部圆形 5-HT 细胞(箭头);
  3. 胃贲门部上皮基部椭圆形的 5-HT 细胞(箭头);
  4. 胃贲门部上皮细胞之间两个相连的 5-HT 细胞(箭头);
  5. 胃体腺泡上皮之间小锥体形突起指向腺泡腔的 5-HT 细胞(箭头);
  6. 胃幽门部腺泡上皮细胞之间锥体形和椭圆形的 5-HT 细胞(箭头);
  7. 胃幽门部上皮细胞之间锥体形突起指向胃幽门腔的 5-HT 细胞(箭头);
  8. 十二指肠部上皮细胞之间长锥体形突起指向肠腔的 5-HT 细胞(箭头);
  9. 空肠上皮细胞之间呈锥体形突起指向肠腔的 5-HT 细胞(箭头);
  10. 回肠上皮细胞之间两个并排锥体形其突起伸向肠腔的 5-HT 细胞(箭头);
  11. 直肠上皮细胞之间呈梭形, 其一突起指向固有膜, 另一突起指向肠腔的 5-HT 细胞(箭头);
  12. 直肠腺泡上呈椭圆形和圆形的 5-HT 细胞(箭头),
- (× 400)

## Explanation of Plate

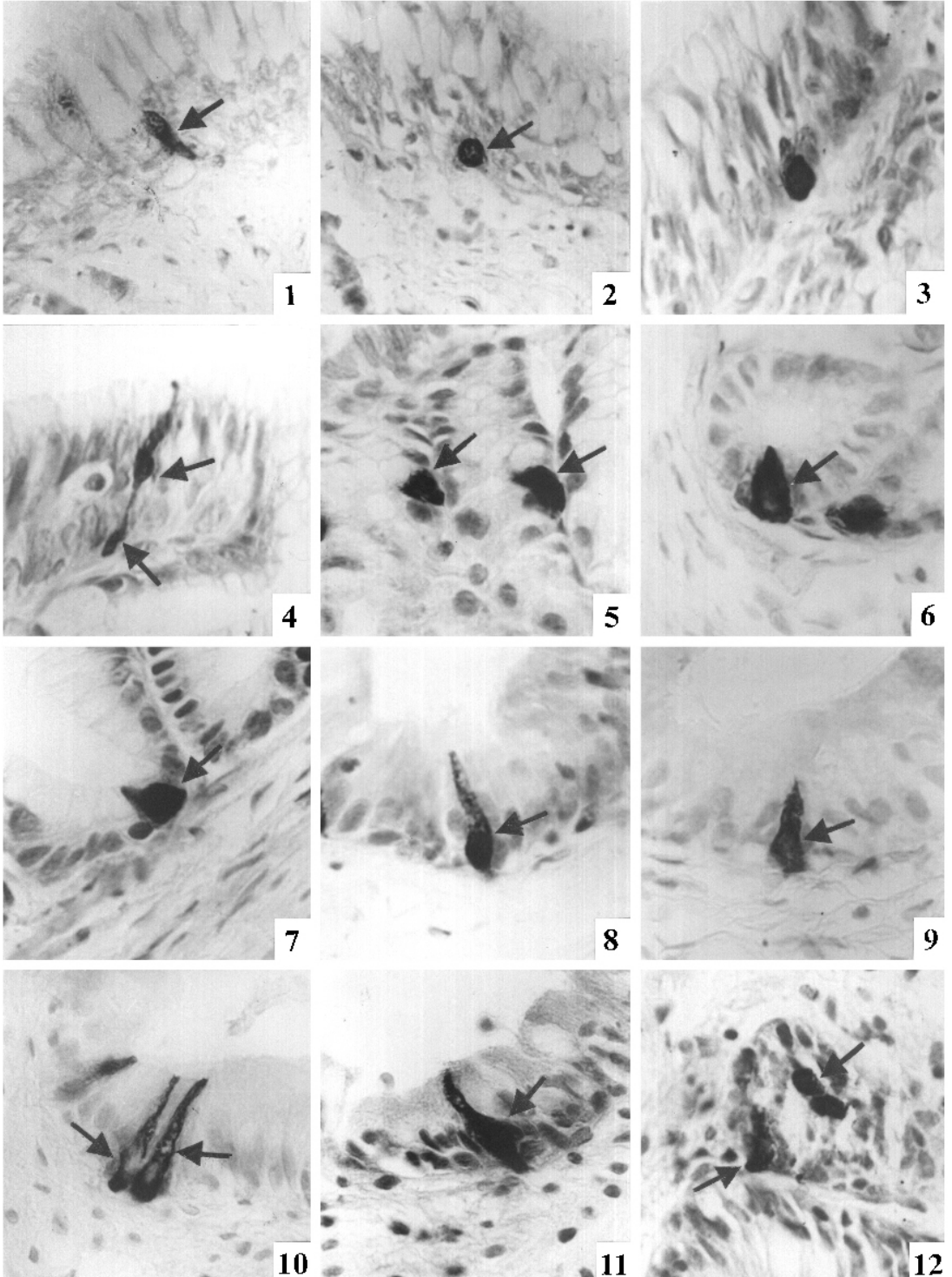
1. An ellipse 5-HT cell (arrow) at the bottom of epithelia of esophagus;
2. A round 5-HT cell (arrow) at the bottom of epithelia of esophagus;
3. An ellipse 5-HT cell (arrow) at the bottom of epithelia in the cardiac part of stomach;
4. Two conterminous 5-HT cells (arrows) between epithelial cells of the cardiac part of stomach;
5. Two shuttle-shaped 5-HT cells between epithelial cells (arrows) of the gastric gland in the body of stomach with their processes extending to the acinus lumen;
6. A shuttle-shaped 5-HT cell and an ellipse 5-HT cell (arrow) between epithelial cells of the gastric gland at pyloric part of stomach;
7. A shuttle-shaped 5-HT cell (arrow) between epithelial cells at pyloric part of stomach, with its process extending to the gut lumen;
8. A tapering 5-HT cell (arrow) between epithelial cells of duodenum, with its process extending to the gut lumen;
9. A shuttle-shaped 5-HT cell (arrow) between epithelial cells of jejunum, with its process extending to the gut lumen;
10. Two shuttle-shaped 5-HT cells (arrows) between epithelial cells of ileum, with their processes extending to the gut lumen;
11. A shuttle-shaped 5-HT cell (arrow) with two processes, one extending to the lamina propria, and the other extending to the gut lumen;
12. A round 5-HT cell and an ellipse 5-HT cell (arrows) between epithelial cells of gastric gland. Magnification of all figures is × 400.

李淑兰等: 东方铃蟾消化道 5-羟色胺免疫活性细胞的免疫组织化学定位

图版 I

LI Shu-Lan *et al.*: Immunohistochemical Localization of 5-HT Immunoreactive Cells  
in the Digestive Tract of *Bombina orientalis*

Plate I



图版说明见文后