

奥尼罗非鱼肠道杯状细胞分布及分型观察

薛玉环^① 唐鸣慧^① 胡巍堃^② 金鑫^① 张艺钟^① 王晓丽^{①*}

① 广西大学动物科学技术学院 南宁 530005; ② 广西梧州市万秀区龙湖镇水产畜牧兽医站 梧州 543002

摘要: 本研究利用石蜡切片结合阿利新蓝-高碘酸 Schiff (AB-PAS) 和醛品红-阿利新蓝 (AF-AB) 染色法研究奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂) 肠道内杯状细胞的分布与分型。结果发现, 奥尼罗非鱼肠道黏膜层较厚, 有大量肠绒毛突起, 肠绒毛的数量从前肠到后肠逐渐减少。杯状细胞主要位于肠绒毛上皮细胞间, 形状大多为椭圆或近似圆形, 也有呈细长梭形。经统计分析可知, 肠道黏膜上皮单位面积中杯状细胞数量从前肠到后肠逐渐增多, 前肠、中肠、后肠杯状细胞平均数量分别为 (230.0 ± 4.9) 个/ mm^2 、 (287.9 ± 7.5) 和 (336.7 ± 10.0) 个/ mm^2 , 具有较大差异, 三者间两两相比差异显著 ($P < 0.05$)。奥尼罗非鱼肠道杯状细胞以中性-酸性双染为主, 酸性杯状细胞在肠道各段所占比例较低, 且以硫酸化亚型杯状细胞为主, 缺少羧酸化亚型杯状细胞。

关键词: 奥尼罗非鱼; 肠道; 杯状细胞; 分型

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2018) 03-456-05

Distribution and Classification of Intestinal Goblet Cells in *Tilapia Galilaea*

XUE Yu-Huan^① TANG Ming-Hui^① HU Wei-Kun^② JIN Xin^①
ZHANG Yi-Zhong^① WANG Xiao-Li^{①*}

① College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005; ② Aquatic Animal Husbandry and
Veterinary Station of Longhu, Wuzhou 543002, China

Abstract: The distribution and types of goblet cells in the intestine of *Tilapia Galilaea* (*Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂) were studied by Alcian Blue-Periodic Acid Sthiff (AB-PAS) and Aldehyde Fuchsin-Alcian Blue (AF-AB) staining. The results showed that the intestinal mucosal layer of tilapia was thick, and a large number of intestinal villi decreased gradually from foregut to hindgut. Goblet cells were mainly located between the epithelial cells of intestinal villi, and their shape was mostly oval or approximately circular, and some were in a shape of a long and thin spindle (Fig. 1). The statistical analysis showed that the number of goblet cells per unit area from foregut to hindgut gradually increased, the average numbers of goblet cells in foregut, midgut and hindgut of were 230.0 ± 4.9 cell/ mm^2 , 287.9 ± 7.5 cell/ mm^2 and 336.7 ± 10.0 cell/ mm^2 , respectively, with significant difference among the three groups ($P < 0.05$, Table

* 通讯作者, E-mail: xiaoliwang@gxu.edu.cn;

第一作者介绍 薛玉环, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物组织胚胎学; E-mail: 410989990@qq.com。

收稿日期: 2017-07-17, 修回日期: 2017-12-10 DOI: 10.13859/j.ejz.201803013

1). PAS and AB-PAS staining showed that the goblet cells in tilapia intestinal were mainly neutral and acid double staining, the acid goblet cells were low in the intestinal segments (Fig. 2, 3), and the sulfuric acid cells were mainly sulfuric acid cells in AF-AB staining (Fig. 3), and the cups of goblet cells were lack of carboxylic acid.

Key words: Tilapia Galilaea, *Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂; The intestinal tract; Goblet cells; Classification

杯状细胞为黏液分泌细胞, 其在肠道中所分泌的黏液可以促进食物消化, 帮助机体吸收营养物质以及抵御病原体侵害, 在维系肠道稳态方面具有重要作用 (Sibbing et al. 1985, 胡艳艳等 2013, Gipson 2016)。国内外对各种鱼类消化道黏液细胞的研究主要集中于海洋鱼类, 对淡水鱼类的研究较少, 对杯状细胞的类型也较少进行研究。本研究选取奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂) 肠道的前段、中段和后段, 利用石蜡切片结合阿利新蓝-高碘酸 Schiff (Aleian blue-periodic acid Schiff, AB-PAS) 和醛品红-阿利新蓝 (aldehyde fuchsin-Aleian blue, AF-AB) 染色法研究奥尼罗非鱼肠道内杯状细胞的分布与分型, 揭示奥尼罗非鱼肠道杯状细胞类型及数量变化, 为奥尼罗非鱼的基础研究及鱼类消化生理学提供形态学基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康的奥尼罗非鱼 10 尾, 体长 22 ~ 25 cm, 体重 700 ~ 800 g, 购买于广西大学东校园菜市, 饲养于长 × 宽 × 高为 80 cm × 45 cm × 110 cm 的玻璃鱼缸中, 通气, 定期换水, 稳定 3 d。把鱼敲晕, 从肛门稍向前沿着腹中线剪开腹壁, 取出消化道, 分别截取前肠、中肠、后肠, 生理盐水清洗肠道, 各段取长约 10 cm, 注入中性福尔马林固定液, 结扎为香肠状固定 48 h 后, 修整组织长约 0.2 ~ 0.4 cm, 常规脱水、透明、包埋, 石蜡切片厚 5 μm。

1.2 实验方法

AB-PAS 染色法: 切片脱蜡至水, 阿利新

蓝染色液 10 ~ 50 min, 1%高碘酸水溶液氧化 10 min, Schiff 试剂 20 min, 亚硫酸水洗, 流水冲洗, 天青石蓝液染 3 min, Mayer 苏木素染 3 min, 流水冲洗, 0.5%桔黄 G 水溶液 30 s, 常规脱水, 中性树脂封片。

AF-AB 染色法: 切片脱蜡至 70%乙醇, 醛品红染色 20 min, 70%乙醇洗, 水洗, AB 液染 5 min, 水洗, 常规脱水, 中性树脂封片。

1.3 统计分析

每尾鱼前肠、中肠、后肠各选取 3 张切片, 合计 30 张切片, 观察时随机选择罗非鱼前肠、中肠、后肠各 15 张切片计数杯状细胞, 每张切片均随机在 400 倍计数 5 个视野 (一个圆形视野, 直径为 0.45 mm, 400 倍视野面积为 0.16 mm²)。通过计算可得到每平方毫米的细胞数。结果用平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示。采用方差分析比较各组数据之间的差异。

2 实验结果

2.1 奥尼罗非鱼肠道组织形态学观察

通过光学显微镜对奥尼罗非鱼肠道切片进行组织形态学观察 (图 1), 肠道管壁分 4 层, 分别是黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜。其中, 黏膜层较厚, 有大量肠绒毛突起, 肠绒毛数量从前肠到后肠逐渐减少。前肠肠绒毛长且分布紧密, 肠道隐窝狭小且深, 杯状细胞主要位于肠绒毛两侧上皮细胞间, 形状大多为椭圆或近似圆形。中肠肠绒毛长度比前肠略短, 有大量短绒毛分布, 杯状细胞紧密分布于肠绒毛上皮, 绒毛顶端上皮分布的杯状细胞形状大多为细长形, 绒毛两侧其他部位大多以椭圆形为主。后肠肠绒毛短且肠绒毛间分布距离较远,

肠道隐窝浅而宽，杯状细胞分布密集。

2.2 阿利新蓝-高碘酸 Schiff (AB-PAS) 染色

阿利新蓝和高碘酸 Schiff 试剂共同染色，中性黏多糖为红色，酸性黏多糖为蓝色，复合物显示紫红色或蓝紫色，细胞核呈灰蓝色。根据 AB-PAS 染色显色情况把罗非鱼杯状细胞分为了 4 种类型：I 型杯状细胞为纯红色，PAS 阳性，AB 阴性，含中性黏蛋白。II 型杯状细胞为纯蓝色，AB 阳性，PAS 阴性，含酸性黏蛋白。III 型杯状细胞为紫红色，PAS 阳性为主，AB 阳性较弱，主要含中性黏蛋白和少量的酸性黏蛋白。IV 型杯状细胞为蓝紫色，AB 阳性为主，PAS 阴性较弱，主要含酸性黏蛋白和少量的中性黏蛋白。AB-PAS 染色后可以看到在肠绒毛和隐窝有大量杯状细胞呈现出 AB-PAS 阳性反应（图 2）。罗非鱼肠道杯状细胞以紫红色 III 型细胞和蓝紫色 IV 型细胞数量占大多数，表明罗非鱼肠道中杯状细胞以含有中性和酸性

黏多糖复合物为主，呈现酸性-中性双染亚型。

2.3 醛品红-阿利新蓝 (AF-AB) 染色

AB-AF 染色可以使酸性黏蛋白染色，含有不同成分的酸性黏蛋白显色也有差别，含有羧酸盐呈蓝色、含硫酸盐呈紫红色或黑色。罗非鱼肠道各段杯状细胞 AB-AF 染色阳性反应呈现为紫红色或黑色，呈现出硫酸盐阳性反应状态（图 3），表明罗非鱼肠道各段酸性杯状细胞以硫酸化亚型杯状细胞为主，缺少羧酸化亚型杯状细胞。

2.4 奥尼罗非鱼肠道杯状细胞数量的变化

在奥尼罗非鱼的前肠、中肠、后肠部位，杯状细胞的数量具有较大差异（表 1）。后肠杯状细胞的密度高于前肠，杯状细胞的分布前肠比较分散，中肠紧密，后肠呈堆叠效果。通过光学显微镜对奥尼罗非鱼肠道杯状细胞计数，经统计分析可知，肠道黏膜上皮单位面积中杯状细胞数量从前肠到后肠逐渐增多，具有

表 1 奥尼罗非鱼肠道杯状细胞的数量计数（细胞个数/mm²）

Table 1 Number of goblet cells in the intestine of *Tilapia Galilaea* (number of cells/mm²)

组织切片样本编号 Field of vision	前肠 Foregut	中肠 Midgut	后肠 Hindgut
1	206.3	293.8	306.3
2	243.8	287.5	275.0
3	168.8	318.8	462.5
4	237.5	343.8	337.5
5	243.8	212.5	250.0
6	268.8	243.8	431.3
7	168.8	237.5	256.3
8	231.3	325.0	312.5
9	256.3	237.5	362.5
10	293.8	262.5	350.0
11	193.8	300.0	400.0
12	225.0	306.3	268.8
13	250.0	281.3	337.5
14	200.0	400.0	393.8
15	262.5	268.8	306.3
平均值 ± 标准差 Mean ± SD	230.0 ± 4.9 ^a	287.9 ± 7.5 ^b	336.7 ± 10.0 ^c

不同上标字母为差异显著 ($P < 0.05$)。Values with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).



图 1 奥尼罗非鱼肠道组织形态 (× 10)

Fig. 1 Morphological characteristics of intestine of *Tilapia Galilaea* (× 10)

a. 前肠 (AB-PAS) ; b. 中肠 (AB-PAS) ; c. 后肠 (PAS) 。

a. Foregut (AB-PAS); b. Midgut (AB-PAS); c. Hindgut (PAS).

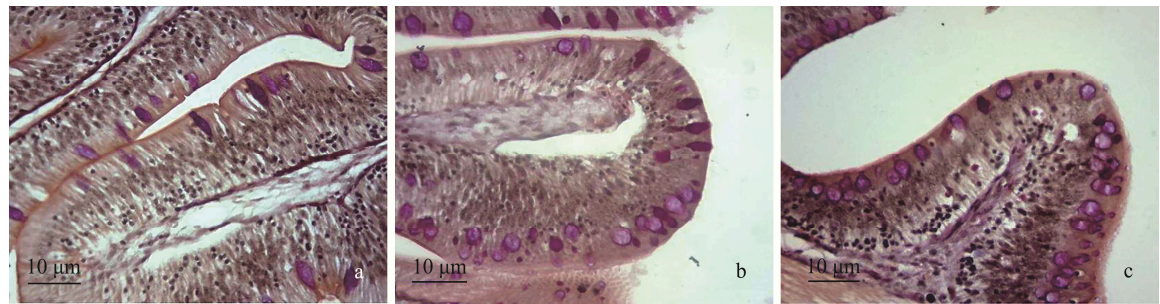


图 2 奥尼罗非鱼肠道杯状细胞 AB-PAS 染色 (× 40)

Fig. 2 AB-PAS staining of intestinal goblet cells of *Tilapia Galilaea* (× 40)

a. 前肠; b. 中肠; c. 后肠。 a. Foregut; b. Midgut; c. Hindgut.

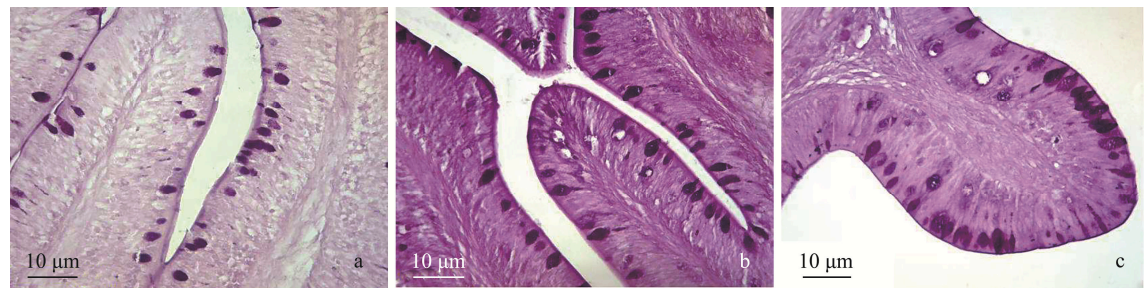


图 3 奥尼罗非鱼肠道杯状细胞 AB-AF 染色 (× 40)

Fig. 3 AB-AF staining of intestinal goblet cells of *Tilapia Galilaea* (× 40)

a. 前肠; b. 中肠; c. 后肠。 a. Foregut; b. Midgut; c. Hindgut.

较大差异,三者间两两相比差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

Kitzan 和 Sweeny (1968) 根据 PAS 反应颜色的深浅不同最早对非洲肺鱼 (*Protopterus*

annectens) 上皮组织中的黏液细胞进行分类,这种分类方法仅根据 PAS 反应颜色的深浅不同来划分,标准很难掌握;后来又有学者根据细胞的形态进行分类 (Sibbing et al. 1985),这种分类方法也不科学,这两种方法均不能准确

地反映细胞中黏液成分的复杂性。因此,本研究运用目前广泛应用的阿利新蓝-高碘酸 Schiff (AB-PAS) 染色方法进行科学分类,发现奥尼罗非鱼肠道杯状细胞大致分为中性黏液杯状细胞、酸性黏液杯状细胞及混合型黏液杯状细胞。这与其他鱼类研究结果一致(尹苗等 2000, 刘怀如等 2002, Kathiresan et al. 2016), 但前人研究中欠缺对酸性黏蛋白细胞的分类, 本研究运用 AF-AB 染色方法, 进一步区分酸性黏液杯状细胞为硫酸型杯状细胞。

杯状细胞的分布、类型、数量与鱼类生理特性相适应, 奥尼罗非鱼是杂食性动物, 杯状细胞于肠道的前肠、中肠、后肠均有分布, 但其在数量和类型上都具有较大差异, 前肠、中肠、后肠杯状细胞数量呈现出逐渐增加的趋势, 这与前人对杯状细胞的研究结果一致(王永波等 2016, 赵柳兰 2016)。研究还发现, 奥尼罗非鱼肠道杯状细胞类型主要为分泌中性黏蛋白和酸性黏蛋白复合物的杯状细胞。前肠绒毛长, 分布紧密, 肠腔较小; 中肠绒毛长, 黏膜肌层最厚, 大量杯状细胞分泌助消化的中性黏蛋白, 这与李振伟等(2006)认为中肠为主要消化部位的特征相适应; 后肠为了方便排泄功能故而肠腔较大。黏蛋白由杯状细胞分泌并释放到内腔作为上皮表面的润滑黏液涂层, 并且对上皮起重要的保护作用。在早期生活阶段酸性黏蛋白的存在可能作为先天防御屏障特别重要。何桂珍(2012)也报道, 虽然黏蛋白亚型的生理学关联不被理解, 但酸性黏蛋白可以阻碍细菌的迁移。也有研究报道(Jung et al. 2017), 杯状细胞的酸性成分可有效防止病原体的侵入, 并促进食物通过黏液吞咽。黏液中的所有酸性免疫物质可以构成防御屏障(祁凤华等 2015), 黏稠的黏液可通过润滑黏膜表面促进排便。随着研究的深入, 很多研究者对杯状细胞与病理变化之间的关系进行了探讨, 但杯状细胞的具体作用机制仍需进一步研究。

参 考 文 献

- Gipson I K. 2016. Goblet cells of the conjunctiva: A review of recent findings. *Progress in Retinal & Eye Research*, 54(9): 49–63.
- Jung K, Saif L J. 2017. Goblet cell depletion in small intestinal villous and crypt epithelium of conventional nursing and weaned pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Research in Veterinary Science*, 110(4): 12–15.
- Kathiresan P, Doreen L, Saju J M, et al. 2016. Morpho-histological characterisation of the alimentary canal of an important food fish, Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Peer Journal*, 4(8): e2377.
- Kitzan S M, Sweeny P R. 1968. A light and electron microscope study of the structure of proctopterus annectens epidermis I Mucus production. *Canadian Journal of Zoology*, 46(7): 767–772.
- Sibbing F A, Uribe R. 1985. Regional Specializations in the Oro-Pharyngeal Wall and Food Processing in the Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Netherlands Journal of Zoology*, 35(3): 377–422.
- 何桂珍. 2012. 肠道屏障功能与细菌移位. *协和医学杂志*, 3(3): 260–264.
- 胡艳艳, 刘小伟. 2013. 肠道杯状细胞结构和功能的研究进展. *国际病理科学与临床杂志*, 33(5): 424–430.
- 李振伟, 谷长勤, 胡薛英, 等. 2006. 鲫鱼消化道形态及组织学观察//中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会兽医病理学分会第十四次学术研讨会暨中国病理生理学会动物病理生理专业委员会第十三次学术会议论文集. 中国乌鲁木齐\石河子: 中国畜牧兽医学会兽医病理学分会第十四次学术研讨会暨中国病理生理学会动物病理生理专业委员会第十三次学术会议, 203–206.
- 刘怀如, 张耀光. 2002. 南方鲇消化道杯状细胞分布及类型探讨. *四川动物*, 21(1): 6–8.
- 祁凤华, 扇玉斌, 周立强, 等. 2015. 鸡源性嗜酸乳杆菌对肉鸡小肠黏膜免疫相关细胞的影响. *石河子大学学报: 自科版*, 33(1): 50–53.
- 王永波, 张杰, 李向民. 2016. 豹纹鳃鲈消化道粘液细胞的类型与分布. *海洋渔业*, 38(5): 478–486.
- 尹苗, 安国利, 杨桂文, 等. 2000. 鲤鱼粘液细胞类型的研究. *动物学杂志*, 35(1): 8–9.
- 赵柳兰. 2016. 加州鲈消化道组织学及其粘液细胞类型和分布特征//中国水产学会. 2016 年中国水产学会学术年会论文摘要集. 成都: 2016 年中国水产学会学术年会, 434.