

扁玉螺体表和消化系统 甲硫氨酸脑啡肽免疫组织化学定位

李 华 孙虎山* 王宜艳 李 霞
(鲁东大学生命科学学院 烟台 264025)

摘要: 采用免疫组织化学 strept avidin biotin complex (S-ABC) 法对甲硫氨酸脑啡肽(methionine enkephalin, M-ENK) 在扁玉螺(*Neverita didyma*) 体表、消化系统各器官中的分布进行了研究。结果表明,扁玉螺的足上皮细胞、外套膜的内外上皮细胞以及食道、胃、肠道的黏膜上皮细胞均呈 M-ENK 阳性反应,且消化道中的阳性反应多集中于上皮细胞游离端;在食道腺的腺上皮中也有少量阳性细胞分布;肝是 M-ENK 阳性细胞分布较多的器官,主要分布在肝小叶中腺细胞边缘游离端。M-ENK 在扁玉螺体表和消化系统各器官均有分布,且分布密度有所不同,可能与各部位的功能有关。

关键词: 甲硫氨酸脑啡肽; 免疫组织化学; 消化系统; 体表; 扁玉螺

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008-04-72-05)

Immunohistochemical Localization of Methionine-enkephalin in the Body Surface and Digestive System of *Neverita didyma*

LI Hua SUN Hu Shan* WANG Yi Yan LI Xia
(College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The methionine enkephalin (M-ENK) in the body surface and digestive system of *Neverita didyma* was analyzed by the immunohistochemical S-ABC (strept avidin biotin complex staining). The results showed that M-ENK positive cells existed widely in the epithelium of foot, inner and outer epithelia of mantle, mucous membrane epithelium of oesophagus, stomach and intestine. Besides, the positive immunoreaction was centralized in the dissociative sides of alimentary canal epithelium. A small quantity of positive cells was observed in the esophageal gland, too. A great number of positive cells were observed in the liver, mostly in the dissociative sides of the gland cells. It can be concluded that M-ENK is abundantly distributed in the epidermis of the body surface and digestive system in *N. didyma*, and that different densities of M-ENK in these organs may be referable to their different functions.

Key words: Methionine enkephalin; Immunohistochemistry; Digestive system; Body surface; *Neverita didyma*

甲硫氨酸脑啡肽(methionine enkephalin, M-ENK) 是内源性阿片肽系统中一种重要的脑啡肽(enkephalin, ENK), 在高等动物体内广泛存在, 并且发挥着各种重要的生理功能^[1]。研究发现, 在贝类等无脊椎动物体内也存在 M-ENK。King 等利用放射性免疫测定技术在大蛞蝓(*Limax maximus*) 体内检测到 M-ENK 样物

质^[2]; Andersen 等采用免疫荧光标记法在贻贝(*Mytilus edulis*) 消化道上皮细胞、肝胰腺和神经

基金项目 国家“973”计划项目(No. G1999012005);

* 通讯作者, E-mail: s_hushan@163.com;

第一作者介绍 李华, 男, 硕士研究生; 从事海洋生物学研究;
E-mail: l_hua0628@163.com.

收稿日期: 2008-04-10, 修回日期: 2008-04-23

节中亦检测到 M-ENK 的存在^[3]。Ewadiner 等应用免疫组化技术在静水椎实螺 (*Lymnaea stagnalis*) 中枢神经系统以及心房中发现有 M-ENK 阳性细胞^[4]。同时,运用高效液相色谱技术从贝类体内分离提取出 M-ENK 并对其序列结构进行测定的工作也开始展开。1983 年 Leung 等人从贻贝神经节分离提取出 ENK 类物质,研究发现其与高等生物中的 M-ENK 结构相同^[5]; Ewadiner 运用高效液相色谱技术在静水椎实螺中枢神经中提取出 M-ENK 类似物,并对其含量进行了测定^[4]。有关 M-ENK 的研究也开始扩展到其他的无脊椎动物之中^[6,7]。国内迄今有关无脊椎动物 M-ENK 研究的相关报道还较少^[8]。

扁玉螺 (*Neverita didyma*) 隶属软体动物门腹足纲前鳃亚纲中腹足目玉螺科,为我国沿海常见的一种经济贝类。目前国内外有关扁玉螺的研究仅限于形态学、消化特性以及重金属对其体内金属酶类的影响等方面的少量报道^[9-11]。本文采用免疫组织化学 S-ABC 法对扁玉螺的足、外套膜、触角等体表结构和消化系统各器官的 M-ENK 分布进行了定位研究,以期对无脊椎动物 ENK 研究特别是贝类 ENK 研究提供一些基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材料 扁玉螺采自烟台芝罘岛。选取其中活性较好的 5 只,轻敲螺壳,致其破碎,且不伤其内部结构。活体解剖,分别剪下其前足、后足组织块;外套膜、触角、口球、食道、胃、肠、食道腺整体结构;在肝的不同部位分别取材。用过滤海水漂洗,4% 多聚甲醛固定 24 h,分割较大的组织块,冰冻切片,厚度为 20 μm ,各结构均为横切。

1.2 试剂 兔抗大鼠 M-ENK(一抗为 Sigma 公司产品;生物素标记羊抗兔 IgG(二抗)、链霉菌抗生物素蛋白与过氧化物酶复合物为 Santa Cruz 公司产品;3,3'-二氨基联苯胺(DAB 为 Fluka 公司产品, Triton X-100 为北京拜迪尔公司产品,其余试剂均为国产分析纯。一抗稀释

液含有 0.2% 牛血清蛋白、0.05% 叠氮钠和 0.05 mol/L pH 7.5 的 Tris HCl 缓冲液;二抗稀释液同一抗稀释液,但不含叠氮钠。

1.3 免疫组织化学染色 按 Santa Cruz 公司提供的 S-ABC 染色方法进行,并略微改进。切片用 0.05 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 2 min,0.3% 过氧化氢-甲醇处理 30 min,阻断内源性过氧化物酶,兔抗大鼠 M-ENK(按 1:800 稀释 室温孵育 1 h,0.05 mol/L PBST 缓冲液(0.05 mol/L 的 PBS 中加入 2% 的 Triton X-100 漂洗 3 次,每次 2 min,生物素标记羊抗兔 IgG 室温孵育 50 min, PBST 漂洗 3 次,每次 2 min,链霉菌抗生物素蛋白与过氧化物酶复合物室温孵育 50 min, PBST 漂洗 3 次,每次 5 min, DAB 显色,苏木素复染,二甲苯透明,中性树脂封片。用 Olympus BX50 系统显微镜对实验结果进行观察,并拍照记录实验结果。

2 结 果

通过 DAB 显色的 M-ENK 阳性部位从强到弱依次呈深褐色、褐色和浅褐色,在体表和消化系统各器官中均有分布;背景不着色或呈淡黄色;复染后的细胞核为蓝色。

2.1 体表 M-ENK 免疫组化定位

2.1.1 足 扁玉螺的足特别发达,适于爬行和掘沙,平时铺展在外,受到刺激后即缩回壳内。整个足的上皮细胞均呈 M-ENK 阳性反应,而结缔组织和肌肉呈现 M-ENK 阴性反应(图版 I: 1)。

2.1.2 外套膜 扁玉螺的外套膜为一层很薄的组织,覆盖着整个内脏团,其游离边缘在内脏囊和足的交接处,周围环绕成领状。把外套膜与内脏囊相接触的一面定义为外套膜内上皮,外套膜与贝壳相接触的一面定义为其外上皮。外套膜的内上皮细胞呈现 M-ENK 强阳性,外上皮细胞则呈现 M-ENK 弱阳性,M-ENK 阳性物质在内上皮细胞游离端分布较多;位于内、外上皮之间的结缔组织仅在部分区域呈现 M-ENK 阳性反应(图版 I: 2, 3)。

2.1.3 触角 扁玉螺的触角是重要的感觉器

官,在触角中许多神经纤维呈现 M-ENK 阳性反应,触角上皮细胞也大都呈 M-ENK 阳性反应,其内部结缔组织中,也有一些细胞呈现 M-ENK 阳性反应(图版 I:4)。

2.2 消化系统 M-ENK 免疫组化定位 扁玉螺的消化系统主要由消化道和消化腺组成。消化道包括口球、食道、胃、肠及直肠等;腺体主要有食道腺和肝。扁玉螺消化道管壁的组织结构由内向外可分为四层:黏膜层、黏膜下层、肌层和外膜。

2.2.1 口球 口球为消化管的第一个膨大的部分,位于头部前端腹面。口球内上皮中的大部分细胞呈 M-ENK 阳性反应,在黏膜下层中有一些呈现弱阳性反应的纤维(图版 I:5)。

2.2.2 食道 食道为一细长的管状结构,其内壁上有许多皱褶。食道内部的黏膜层上皮细胞呈 M-ENK 阳性反应,上皮细胞游离端分布有比较多的 M-ENK 阳性较强的颗粒(图版 I:6)。

2.2.3 胃 胃紧贴肝,为长扁囊状, M-ENK 阳性反应在胃内的分布规律与食道大致相同,在其黏膜层上皮细胞游离端有较多的 M-ENK 阳性颗粒,在其黏膜下层有较多的阳性纤维分布,肌层不明显,外膜细胞呈 M-ENK 极弱阳性(图版 I:7)。

2.2.4 肠、直肠 肠在形态学上不太明显,为连接胃和直肠的一段细管。肠、直肠黏膜层上皮细胞大都呈现 M-ENK 阳性或弱阳性反应,黏膜层上皮细胞游离端有较多的 M-ENK 阳性颗粒分布;黏膜下层则有少量的 M-ENK 阳性较强的细胞分布,肌层细胞呈 M-ENK 阴性反应;外膜细胞呈 M-ENK 弱阳性反应(图版 I:8,9)。

2.2.5 食道腺 食道腺又称勒布灵氏腺,为褐色蚕豆状的腺体,由外到内分别为表膜、平滑肌层、腺上皮。食道腺的腺上皮中仅部分细胞呈现 M-ENK 弱阳性反应,大部分上皮细胞呈 M-ENK 阴性反应(图版 I:10)。

2.2.6 肝 肝很肥大,呈黄褐色,是扁玉螺体内最大的腺体,也是消化系统中最重要的腺体,为复管泡状腺,最外层为一层浆膜,向内无肌层。在本实验中,肝是 M-ENK 阳性细胞分布较

多的器官,主要分布在肝小叶中腺细胞边缘游离端(图版 I:11,12)。

3 讨论

本实验结果表明,扁玉螺的足、外套膜、触角及消化系统各器官中均有呈 M-ENK 阳性反应的细胞,说明 M-ENK 可能参与了其痛觉调制、黏液免疫、摄食、消化等功能的调节,而 M-ENK 在扁玉螺不同器官中分布密度不同,可能与各部位的功能不同有关。已有的研究表明 M-ENK 可以参与软体动物蛞蝓(*Arion ater*)的痛觉调制作用,而这种作用主要是通过刺激足来完成的^[12]。实验中扁玉螺足的上皮细胞呈 M-ENK 阳性反应,是否与这种功能有关,还有待于研究;另外扁玉螺足的上皮细胞具有很强的黏液分泌功能,这是否与 M-ENK 的存在有关尚需进一步探讨;扁玉螺的外套膜是保护内脏的重要屏障,实验中发现其内上皮 M-ENK 阳性较强,亦可能与其参与了外套膜的黏液分泌有关;采用免疫组化、免疫荧光标记等技术已经检测到在贝类消化器官中存在 M-ENK^[3],本实验发现在扁玉螺消化道中, M-ENK 阳性细胞分布较多,表明 M-ENK 很可能介导了扁玉螺的消化和吸收,而有关 M-ENK 参与机体消化功能的研究在高等动物中已有报道^[1,13]。另外,在本实验所选取的扁玉螺各部分材料中,发现肝中分布的 M-ENK 阳性细胞最多,说明扁玉螺的肝有可能是 M-ENK 较为重要的合成或活动场所,至于扁玉螺其他器官和组织是否也有 M-ENK 阳性反应,需要进一步的实验证实。

在高等动物中, M-ENK 主要来源于神经中枢的神经胶质细胞和星形细胞,已有数以百计的报道阐明了其对于机体具有多种重要的功能调节作用。已经报道 M-ENK 类物质在贝类中亦发挥生理、免疫、生殖调控等多种重要的功能调节作用^[14-16]。M-ENK 在扁玉螺体内是否也发挥类似功能调节作用,还需要进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 谢启文. 神经肽. 上海: 复旦大学出版社, 2004. 125~

- 151.
- [2] King J A, Millar R P. Radioimmunoassay of methionine enkephalin sulphoxide: phylogenetic and anatomical distribution. *Peptides*, 1980, **1**(3 : 211~ 216).
- [3] Andersen A C, Hemite A, Ferrand R, *et al.* Immunohistological detection of methionine enkephalin like and endorphin like material in the digestive tract and in the nervous system of the mussel: *Mytilus edulis*. *L Gen Comp Endocrinol*, 1986, **62**(1 : 111~ 119).
- [4] Ewanger N M, Ridgway R L, Syed N I, *et al.* Identification and localization of a [Met⁵] enkephalin like peptide in the mollusc, *Lymnaea stagnalis*. *Brain Research*, 1996, **737**: 1~ 15.
- [5] Leung M K, Stefano G B. Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca). *PNAS*, 1984, **81**(3 : 955~ 958).
- [6] Harrison L M, Kastin A J, Weber J T, *et al.* The opiate system in invertebrates. *Peptides*, 1994, **15**(7 : 1309~ 1329).
- [7] Stefano G B, Scharter B. High affinity binding of an enkephalin analog in the cerebral ganglion of the insect *Leucophaea maderae*. *Brain Research*, 1981, **225**(1 : 107~ 114).
- [8] 陈振英, 王宜艳, 孙虎山. 甲硫氨酸脑啡肽对栉孔扇贝血细胞吞噬和包裹化作用的影响. *水产科学*, 2005, **24**(5 : 8~ 10).
- [9] 崔龙波, 唐慧, 刘晨临等. 扁玉螺(*Neverita didyma*) 消化系统的形态学研究. *烟台大学学报(自然科学与工程版)*, 1999, **12**(2 : 122~ 126).
- [10] 刘迅, 任虹, 刘玉鹏等. 扁玉螺植物消化特性的初步研究. *烟台大学学报(自然科学与工程版)*, 1997, **10**(3 : 199~ 202).
- [11] 宁黔翼, 杨洪, 任虹. 重金属对扁玉螺金属酶类的影响. *上海水产大学学报*, 1999, **8**(3 : 265~ 269).
- [12] Dalton L M, Widdowson P S. The involvement of opioid peptides in stress induced analgesia in the slug *Arion ater*. *Peptides*, 1989, **10**(1 : 9~ 13).
- [13] Xu R J. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. *Food Reviews International*, 1998, **14**(1 : 1~ 16).
- [14] Stefano G B, Digenis A, Spector S. Opioid like substances in an invertebrate: an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes and a role in immunosuppression. *PNAS*, 1993, **90**(23 : 11099~ 11103).
- [15] Stefano G B, Smith E M, Hughes T K. Opioid induction of immunoreactive interleukin 1 in *Mytilus edulis* and human immunocytes: an interleukin 1 like substance in invertebrate neural tissue. *Neuroimmunol*, 1991, **32**(1 : 29~ 34).
- [16] Wong M, Delaney K, Gelperin A. Opiate agonists activate feeding in *Limax*: comparison of *in vivo* and *in vitro* effects. *Behavioral Neuroscience*, 1991, **105**(1 : 15~ 24).

图 版 说 明

1. 足上皮; 2. 外套膜内上皮; 3. 外套膜结缔组织; 4. 触角; 5. 口球内上皮; 6. 食道; 7. 胃; 8, 9. 肠、直肠黏膜层; 10. 食道腺; 11. 肝; 12. 肝小叶。1~ 10, 12. × 400, 标尺= 20 μm; 11. × 338, 标尺= 100 μm。

⊕ 示 M-ENK 阳性颗粒; ↑ 示 M-ENK 阳性细胞; † 示 M-ENK 阳性纤维; △ 示细胞核; EC 示上皮组织; CT 示结缔组织。

Explanation of Plate

1. Epithelium of foot; 2. Inner epithelium of mantle; 3. Connective tissue of mantle; 4. Antennae; 5. Inner epithelium of mouth; 6. oesophagus; 7. Stomach; 8, 9. Intestine and rectum; 10. Esophageal gland; 11. Liver; 12. Hepatic lobules × 400. 1~ 10, 12. × 400, Bar= 20 μm; 11. × 338, Bar= 100 μm.

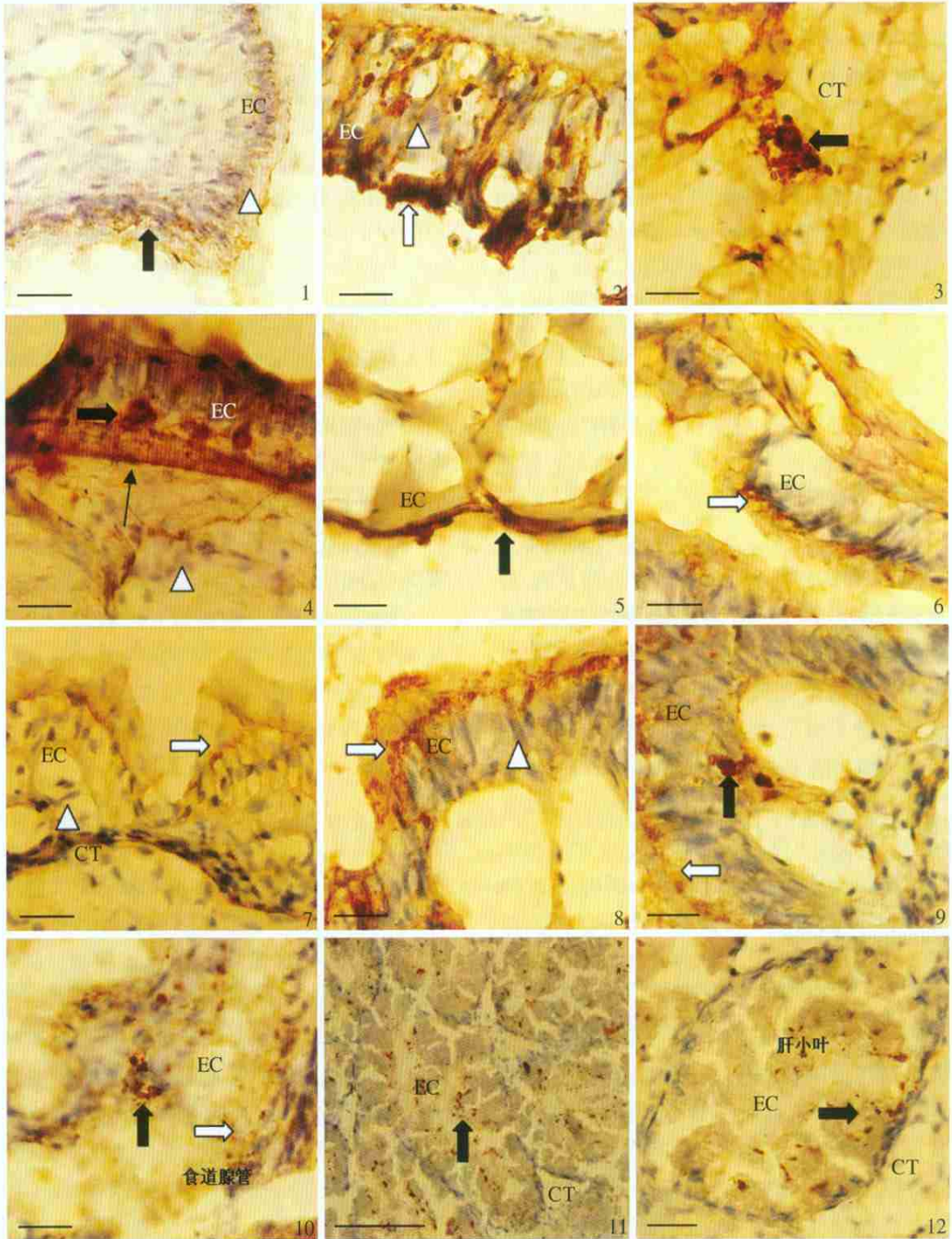
⊕: Positive granules of M-ENK; ↑: M-ENK positive cells; †: M-ENK positive fibers; △: Karyon; EC: Epithelium tissue; CT: Connective tissue.

李 华等: 扁玉螺体表和消化系统甲硫氨酸脑啡肽免疫组织化学定位

图版 I

LI Hua *et al*: Immunohistochemical Localization of Methionine enkephalin in the Body Surface and Digestive System of *Neverita didyma*

Plate I



图版说明见文后