# 黑麂肝、小肠和大肠的组织学结构 及 Ghrelin 的分布

蒋书东 戴书俊 方富贵\* 李福宝 安徽农业大学动物科技学院 合肥 230036

摘要:研究了成年雌性黑麂(Muntiacus crinifrons)的肝、小肠和大肠的组织学结构及 Ghrelin 的分布。采用 H. E 染色法观察组织学结构,免疫组化 PV-9000 两步法并结合 DAB 显色技术确定 Ghrelin 的分布。 结果表明,黑麂的肝组织分为被膜、肝小叶、肝中央静脉、门管区等结构。 被膜为浆膜结构,肝小叶不明显。肝细胞以中央静脉为中心,呈放射状排列。肝血窦的形状不规则。 肠黏膜上皮为单层柱状上皮,小肠、盲肠和结肠的黏膜肌层很薄,管壁皱襞与肠绒毛等形态在消化道各部也存在差异。 免疫组化结果显示肝细胞中有 Ghrelin 阳性细胞的表达;在肠道,免疫阳性细胞在十二指肠、空肠、回肠、盲肠和直肠的黏膜、黏膜下层和肌层均有分布,尤其在肠绒毛上皮和黏膜下层分布较多。 黑麂肝、小肠和大肠结构与哺乳动物基本相似,但无十二指肠腺;Ghrelin 阳性细胞在肝、小肠和大肠均有分布,这表明 Ghrelin 可能对消化有一定的调节作用。

关键词:Ghrelin; 黑麂; 肝; 小肠; 大肠; 组织学

中图分类号:Q954 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2012)01-36-08

# Histological Structure and Distribution of Ghrelin in Liver, Small Intestine and Large Intestine of *Muntiacus crinifrons*

JIANG Shu-Dong DAI Shu-Jun FANG Fu-Gui\* LI Fu-Bao
College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: This study was designed to investigate the histological structure and distribution of ghrelin in liver, small intestine and large intestine of adult female *Muntiacus crinifrons*. Section and HE staining were used to observe the histological structure, and PV-9000 two-step immunohistochemical staining as well as DAB method were used to the show the distribution of ghrelin. The liver was composed of serous membrane, hepatic lobule, hepatic central veins, portal area and other structures. Hepatic lobule was less obvious. Central veins were present in the center of hepatic lobule. Sinusoidal shape was irregular. Simple columnar epithelium of intestinal mucosa was observed. Muscularis mucosa of small intestine, cecum and colon was thin. The histological features of the folds and intestinal villi in the digestive tract were different. Ghrelin-positive cells were observed in the liver. Ghrelin immunoreactive cells also distributed in the mucosa, submucosa and tunica muscularis of duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon, especially more cells were found in the epithelium of intestinal villi and the submucosa. In conclusion, the structures of liver, small intestine and large intestine in *M. crinifrons* are

基金项目 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(No. KJ2011A117);

<sup>\*</sup> 通讯作者,E-mail:fgfang@ahau.edu.cn;

第一作者介绍 蒋书东,男,副教授;研究方向:动物神经内分泌;E-mail:jsdjsd@ ahau. edu. cn。

similar to the histological features of mammals, but the duodenum glands are not found. Ghrelin is present in the liver, small intestine and large intestine, suggesting its possible role in regulating the digestive function.

Key words: Ghrelin; Muntiacus crinifrons; Liver; Small intestine; Large intestine; Histology

黑麂(Muntiacus crinifrons)是鹿科麂属的哺乳动物,是麂类中体型较大的种类,是我国特有的、国家 I 级重点保护野生动物,没有亚种分化,分布范围十分狭小,仅见于安徽、浙江、江西、福建等地。成年黑麂多死于消化道及呼吸道感染等疾病[1]。目前我国已启动"黑麂家域研究项目"——旨在找出黑麂栖息地选择与利用的主要特征,从而营造出最适合黑麂生存栖息的生态环境,更好地保护这一濒危物种。但是到目前为止,有关黑麂肝、小肠和大肠的组织结构的研究尚未见报到。

生长素(Ghrelin)是由日本科学家 Kojima 等人<sup>[2]</sup>于 1999 年从小鼠(Mus musculus)的胃内分泌细胞及下丘脑弓状核中发现,其为含有 28 个氨基酸残基的多肽,是生长激素促分泌素受体(growth hormone secretatogue receptor,GHS-R)的内源性配体,能够刺激垂体前叶释放生长激素(growth hormone,GH)。还能影响动物的摄食、饮水和消化道的活动以及动物体内其他激素的分泌,从而影响动物的生长发育。Ghrelin 广泛分布于多种动物的食道、胃、回肠、输卵管、卵巢、肾上腺、肾、脾、淋巴管、淋巴细胞、心、肺、前列腺、胰腺、甲状腺、皮肤、垂体和血管中<sup>[3]</sup>,迄今为止,未见黑麂 Ghrelin 研究的相关报道。

本研究利用石蜡切片结合 H. E 染色及免疫组化,从组织和细胞角度对黑麂肝、小肠和大肠的组织结构及 Ghrelin 的分布规律进行研究,旨在丰富脊椎动物生物学资料,为进一步研究 Ghrelin 对黑麂胃肠道的影响及其作用机制提供可靠的形态学依据。

# 1 材料与方法

- **1.1 实验动物** 成年雌性黑麂 1 只,由合肥市 野生动物园提供。
- **1.2 样品制备** 动物死后采集正常的肝、小肠 (十二指肠、空肠和回肠)和大肠(直肠、盲肠和

结肠),用4%多聚甲醛固定24 h,直至组织块沉底。用4%多聚甲醛溶液固定后的组织依次进行常规石蜡切片,切片厚5 μm,每个组织块切6张切片,分别做免疫组化染色、免疫组化阴性对照和 H. E. 染色,显微观察并拍照。

1.3 免疫组化程序 (1)切片常规脱蜡至水; (2) 热修复抗原: 将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼 酸盐缓冲液(pH 6.0), 微波炉加热至沸腾后断 电,间隔5~10 min 后,反复1~2次。冷却后 PBS(pH 7.2~7.6)洗涤1~2次。(3)3% H,O, 去离子水室温孵育 10 min 以灭活内源性 酶,PBS 洗 3 次;(4) 滴加兔抗鼠 Ghrelin 多克隆 抗体(1:200,中杉金桥公司),4℃过夜。(5)滴 加辅助聚合物(polymer helper)(GBI, USA), 37℃孵育 20 min, PBS 洗 2 min × 3 次。(6)滴 加抗鼠/兔聚过氧化物酶 IgG (GBI, USA),37℃ 孵育 30 min, PBS 洗 5 min × 4 次。(7) DAB 显 色 20 s,蒸馏水洗涤。(8) 苏木素轻度复染,脱 水,透明,封片。显微镜(BA210,麦克奥迪 MOTIC)观察并拍照。阴性对照组用 PBS 代替 一抗,其余步骤同上。

## 2 结 果

2.1 组织学结构 肝组织表面有被膜包裹。 肝的组织(图版 I: A)主要由肝小叶和门管区构成,肝小叶较小,小叶间结缔组织不发达,分界不清楚。肝小叶为不规则的多边形。中央静脉位于小叶中央(图版 I: A, B)。高倍镜下可见管壁被以内皮。中央静脉周围的肝细胞呈放射状索条形排列。肝小叶边缘的肝细胞排列不整齐,肝细胞索互相吻合形成网状结构(图版 I:B)。肝细胞多数为多边形,体积较大。细胞核多为圆形,位于细胞的中央。多数为一个核,部分肝细胞有2个核。细胞质嗜酸性(图版 I:B)。肝血窦(图版 I:B)位于细胞索之间,大小不等,形状不规则。窦壁由单层扁平上皮 构成,有基膜,胞核为扁平,突向窦腔。窦腔内有很多血细胞,并可见到形状不规则,胞体较大的枯否氏细胞。肝小叶交界处的小叶间结缔组织中的门管区可见小叶间静脉、小叶间动脉和小叶间胆管(图版 I:C)。小叶间静脉管腔大、管壁薄、形状不规则,由一层内皮和一薄层结缔组织构成。小叶间动脉管腔小、管壁厚、呈圆形,内皮外可见2~3层环形的平滑肌纤维。小叶间胆管的管腔更小,呈圆形,管壁由单层立方上皮围成(图版 I:C)。

小肠分为十二指肠、空肠和回肠三段。管壁分黏膜、黏膜下层、肌层和浆膜,但每段又各具其结构特点(图版 I)。十二指肠(图版 I:D)黏膜突向肠腔形成一些绒毛,绒毛上皮为单层柱状,绒毛内可见到中央乳糜管。固有层有大量的小肠腺,小肠腺主要由柱状细胞和杯状细胞构成,未发现潘氏细胞,黏膜肌层很薄。黏膜下层未见十二指肠腺。肌层由内环外纵行的平滑肌层构成。十二指肠绒毛上皮表面多为柱状细胞,底面附着于基膜上,核椭圆形近细胞基底部,还有少数的杯状细胞散于其间;绒毛根部的固有层中有大量的小肠腺(图版 I:D)。黏膜下层有丰富的血管、神经和淋巴管。

空肠(图版 I:E)黏膜形成的绒毛向肠腔内突起,绒毛细长,杯状细胞增多,在固有层内有较少的小肠腺,黏膜肌层较薄,只看到一部分。空肠绒毛上部游离端细长,在绒毛中央可见起始于盲端的中央乳糜管;上皮柱状细胞排列整齐,紧凑的胞核呈椭圆形并且靠近细胞基底部。

回肠(图版 I:F)绒毛的数量比十二指肠和空肠的少,多呈锥状,杯状细胞更多。固有层中有大量小肠腺(图版 I:F)。

大肠包括盲肠、结肠和直肠,管壁也分黏膜、黏膜下层、肌层和浆膜(图版 I:G 和 H)。大肠黏膜无皱襞和肠绒毛,黏膜上皮中杯状细胞很多。大肠腺很发达,长而直,杯状细胞也特别多。盲肠管壁内分布有淋巴组织(图版 I:G),肌层很发达。

2.2 Ghrelin 的分布 经免疫组化 DAB 法染

色的肝切片,肝细胞胞质呈深浅不等的棕黄色,说明有 Ghrelin 表达,但染色不完全一致,强阳性细胞呈棕黄色,胞质内颗粒清晰可见,染成一片(图版 II: A)。弱阳性细胞胞质着色较浅,细胞轮廓不清。阴性对照组均未见到阳性反应物(图版 II: B)。

十二指肠中 Ghrelin 阳性细胞大部分胞浆着色,在黏膜、黏膜下层和肌层均有分布,肌层中着色细胞呈圆形和梭状(图版 II:C);空肠 Ghrelin 阳性细胞主要集中在黏膜层上皮和黏膜下层,固有层肠腺着色不明显(图版 II:D);回肠着色细胞分布于黏膜层和黏膜下层,肌层的着色颗粒变淡(图版 II:E)。盲肠黏膜层和黏膜下层可见 Ghrelin 阳性细胞的分布,肌层未见阳性细胞(图版 II:F);结肠和直肠阳性细胞都位于肠腺和肠绒毛上皮,黏膜下层和肌层未见阳性细胞(图版 II:G)。对照组未发现阳性细胞的分布(图版 II:G)。对照组未发现阳性细胞的分布(图版 II:G)。

# 3 讨论

黑麂的肝组织与其他反刍动物一样,亦是 由肝小叶构成,但小叶间结缔组织不发达,仅在 门管区集中分布,肝小叶区分不明显,小叶间静 脉管壁很薄,仅由一层内皮细胞和一薄层结缔 组织构成, 与牛 (Bos taurus)<sup>[4]</sup>、山羊 (Capra hircus)<sup>[5]</sup>、麋鹿(Elaphurus davidianus)<sup>[6]</sup>及驯 鹿(Rangifer tarandus)<sup>[7]</sup> 的相似,而猪(Sus scrofa) [4] 和双峰驼(Camelus bactrianus) [8] 的肝 小叶较明显。双峰驼肝小叶内有大量呈放射状 分布的网状纤维,在中央静脉及窦状隙也有一 些纤维分布,在门管区的小叶间静脉的管壁很 厚,均质似玻璃样变[8]。而梅花鹿(Cervus nippon taiouanus)的肝小叶内只能偶然见到网 状纤维<sup>[9]</sup>。黑麂的肝被膜比糜鹿和双峰驼的 薄,而且小叶间结缔组织不发达,因此肝的质地 较之双峰驼的要柔软,本研究选取的是黑麂正 常肝组织,组织学结构未见有病变,由于小叶间 结缔组织不发达,胶原纤维和弹性纤维少故质 地柔软。黑麂肝组织的肝血窦内皮也与牛[10]、 绵羊(Ovis aries)[10]、糜鹿[6]及驯鹿[7]的相似,

为连续的,内皮细胞之间的间隙较小,基膜较明显。山羊<sup>[10]</sup>的内皮为不连续的,基膜明显。双峰驼与大部分哺乳动物的内皮无基膜<sup>[8]</sup>。有文献记载<sup>[11]</sup>,哺乳动物的肝小叶中有胞核清晰、呈空泡状的贮脂细胞,本实验中未观察到类似的空泡。

黑麂肠道的组织结构与其他反刍动物基本相似,但也有其特点:黑麂小肠绒毛在十二指肠和空肠较密集,回肠较稀少,说明营养物质的吸收主要在十二指肠与空肠。上皮细胞呈高柱状,纹状缘结构不明显。肠腺在小肠前段密集,后段变稀疏。黏膜下层较厚,十二指肠黏膜下层无十二指肠特有的十二指肠腺,这一特点与多数哺乳动物不同,但与棕熊(Ursus arctos)的一致[12],其原因有待进一步探讨。肌层较厚,明显分为两层,肌纤维排列整齐,细胞轮廓清晰,两肌层间的结缔组织中含有血管、淋巴管和神经丛。内环行肌较厚、发达。

黑麂大肠的上皮细胞主要为柱状细胞,杯状细胞较少。大肠腺粗大而直,杯状细胞数量较多,其间有少量柱状细胞。黏膜层较薄。黏膜下层也较薄,分布有许多脂肪细胞,有丰富的血管。肌层发达。分为内环行肌和外纵行肌两层平滑肌,内环行肌发达。

Ghrelin 是一种刺激摄食和促进生长激素 释放肽,在人(Homo sapiens)和鼠,Ghrelin 在胃 肠道和中枢神经系统均有分布,属于一种脑肠 肽[13]。从研究报道中发现,目前关于 Ghrelin 的研究主要集中在人、大鼠(Rattus norvegicus) 和家畜家禽上,而对野生动物方面的研究较少, 有关 Ghrelin 在 黑麂方面的研究未见报道。 Ghelardoni 等[14] 用酶免疫测定法未测到肝中有 Ghrelin 表达, Nieminen 等[15] 在淡水鳕 (Lota lota) 血浆和肝中均检测到 Ghrelin。方富贵 等[16] 观察皖西白鹅(Anser masculus)肝中有 Ghrelin 表达。本实验结果表明, 黑麂肝中有 Ghrelin 表达。迄今为止,关于 Ghrelin 在肝中 的表达以及 Ghrelin 对肝的功能,不同的物种之 间和不同的研究者的结果还存在着差异,因此 有必要进一步阐明。

Ghrelin 已被发现分布于多种动物的肠道 组织中,本研究发现,Ghrelin 分布于黑麂整个 肠道的黏膜层,这与其他研究结果一致[17-18]。 然而,本研究也发现,在十二指肠、空肠和回肠 的黏膜下层也有很多 Ghrelin 的分布,这与 Ghrelin 在大鼠[19] 和鸡(Gallus gallus)[20]消化 管的分布规律不一致。Sakata 等[19]报道,在大 鼠的十二指肠和回肠上存在 2 种产生 Ghrelin 的细胞,即"闭合型"和"开放型"细胞。李福宝 等[21]运用 SABC 法发现 Ghrelin 免疫反应阳性 细胞在小肠的各段黏膜中均有分布,在小肠的 各段均可观察到"闭合型"和"开放型"2种阳 性细胞。Date 等[22]报道,在人和大鼠的消化道 中富含产生 Ghrelin 的内分泌细胞。研究表明, 在大鼠小肠内有高浓度的 Ghrelin 和去酰基化 Ghrelin 2 种形式的肽表达<sup>[23]</sup>, Edholm 等<sup>[24]</sup>报 道 Ghrelin 刺激小肠的运动主要是依赖迷走神 经的类胆碱能的机制起作用。Ahmed 等[25]研 究认为, Ghrelin 在肠道中主要是作为一种胃肠 激素,它的生物学作用相当于一种神经肽。致 于黑麂小肠内产生 Ghrelin 的细胞是哪一类内 分泌细胞,以及 Ghrelin 对小肠肠壁运动和肠壁 上皮细胞再生是否发挥功能,均有待进一步研 究。本次实验没有取到胃、食管、胰腺等材料, 研究不够全面,且实验动物亦仅有1只,代表性 不强,有待进一步加强研究。

#### 参考文献

- [1] 马建章. 中国野生动物保护实用手册. 北京: 科学技术 文献出版社,2002: 228 - 240.
- [2] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a Growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature, 1999,402(6762): 656-660.
- [3] 余跃, 王巧民. Ghrelin 与胃肠运动. 世界华人消化杂志, 2006, 14(23): 2329-2331.
- [4] 沈霞芬. 家畜组织学与胚胎学. 3 版. 北京: 中国农业出版社,2007: 130-157.
- [5] 中国人民解放军兽医大学,南京农学院,东北农学院. 彩色家畜组织学图谱.北京:中国农业出版社,1979: 125-157.
- [6] 丁利,梁宏德,方振华,等. 糜鹿肝脏组织学观察. 动物 医学进展,2007,28(2):41-43.

- [7] 苏布登格日勒,王秀梅,等. 驯鹿主要消化腺组织学研究. 内蒙古畜牧科学,2002,23(1):10-11.
- [8] 陈怀涛,王雯慧,李晓明,等. 双峰驼肝的形态结构研究. 畜牧兽医学报,1996,27(6):539-545.
- [9] 张义,张剑平,朱雪敏,等. 梅花鹿肝脏的形态及组织结构观察. 动物医学进展,2008,29(3): 29-31.
- [10] 董常生,沈萍. 家畜解剖与组织胚胎学. 北京: 中国农业出版社,1999; 321-324.
- [11] 李德雪,伊听. 动物组织学彩色图谱. 长春: 吉林科学 技术出版社,1995: 196-223.
- [12] 李德雪, 史凤君, 金龙珠. 棕熊消化管的组织学观察. 中国兽医学报, 1982, 2(4): 283-286.
- [13] 曹贵方,吕东缓,白春玲,等.一种新的脑肠肽激素——Ghrelin. 畜牧与饲料科学,2004,26(6): 64-66.
- [14] Ghelardoni S, Carnicelli V, Frascarelli S, et al. Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression. J Endocrinol Invest, 2006, 29(2): 115-121.
- [15] Nieminen P, Mustonen A M, Hyvarinen H. Fasting reduces plasm a leptin and ghrelin immunoreactive peptide concentrations of the burbot (*Lota lota*) at 2℃ but not at 10℃. Zool Sci, 2003, 20(9): 1109 – 1115.
- [16] 方富贵,李梅清,陶勇,等.生长素在成年皖西白鹅肝和 胰中的免疫组织化学定位.解剖学杂志,2008,31(1): 28-30.
- [17] Neglia S, Arcamone N, Esposito V, et al. Presence and distribution of ghrelin-immunopositive cells in the chicken gastrointestinal tract. Acta Histochem, 2005, 107(1): 3 -9.
- [18] 贾翠平, 雷治海, 宁红梅, 等. 青紫蓝兔体内 Ghrelin 的

- 免疫组化定位. 动物学杂志,2007,42(4): 129-134.
- [19] Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, et al. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. Peptides, 2002, 23(3): 531 – 536.
- [20] Wada R, Sakata I, Kaiya H, et al. Existence of ghrelinimmunopositive and -expressing cells in the proventriculus of the hatching and adult chicken. Regul Pept, 2003, 111 (1/3): 123-128.
- [21] 李福宝,方富贵,李梅清,等. Ghrelin 在成年皖西白鹅小肠内的免疫组化定位研究. 畜牧兽医学报,2007,38 (2): 206-208
- [22] Date Y, Kojima M, Hosoda H, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology, 2000, 141 (11): 4255 -4261.
- [23] Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, et al. Ghrelin and desacyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. Biochem Biophys Res Commun, 2000,279(3): 909 1013.
- [24] Edholm T, Levin F, Hellström P M, et al. Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons. Regul Pept, 2004, 121 (1/ 3): 25 - 30.
- [25] Ahmed S, Harvey S. Ghrelin; a hypothalamic GH-releasing factor in domestic fowl ( *Gallus domesticus*). J Endocrinol, 2002,172(1): 117 125.

#### 图版 I 说明

黑麂肝、小肠和大肠的组织学结构,H.E染色

A、B、C:肝; D:十二指肠; E:空肠; F:回肠; G:盲肠; H:直肠。A、D、E、F、G、H:×100,标尺=100 μm; B、C:×400,标尺=25 μm。

#### Explanation of Plate I

The histological structures of liver, small intestine and large intestine in *Muntiacus crinifrons* as revealed by H. E staining A,B,C: Liver; D: Duodenum; E: Jejunum; F: Ileum; G: Cecum; H: Rectum. A,D,E,F,G,H: ×100, bar = 100 µm; B,C: ×400, bar = 25 µm.

1. 中央静脉; 2. 肝血窦; 3. 枯否氏细胞; 4. 小叶间胆管; 5. 小叶间动脉; 6. 小叶间静脉; 7. 肠绒毛; 8. 肌层; 9. 小肠腺; 10. 大肠腺, 11 淋巴组织

1. Central vein; 2. Hepatic sinusoid; 3. Kupffer's cell; 4. Interlobular bile duct; 5. Interlobular artery; 6. Interlobular vein; 7. Intestinal villus; 8. Muscular layer; 9. Small intestinal gland; 10. Large intestinal gland; 11. Lymphatic tissue.

#### 图版Ⅱ说明

黑麂肝、小肠和大肠上 Ghrelin 的分布

A:肝; B:肝阴性对照; C:十二指肠; D:空肠; E:回肠; F:盲肠; G:直肠; H:十二指肠阴性对照。A、B、C、D、E、G、H: ×100,标尺 = 100 μm; F: ×400,标尺 = 25 μm。

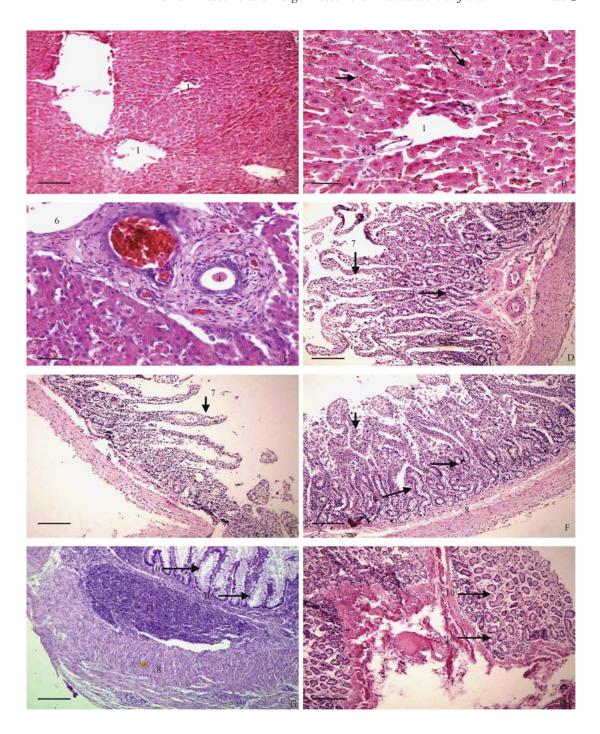
### **Explanation of Plate II**

The location of Ghrelin in the liver, small intestine and large intestine of Muntiacus crinifrons

A: Liver; B: Negative control of liver; C: Duodenum; D: Jejunum; E: Ileum; F: Cecum; G: Rectum; H: Negative control of duodenum. A, B, C, D, E, G, H: ×100, bar = 100 μm; F: ×400, bar = 25 μm.

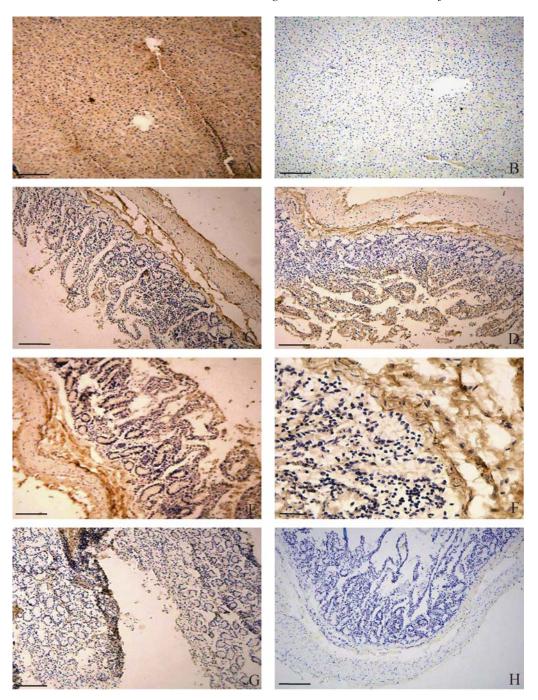
蒋书东等: 黑麂肝、小肠和大肠的组织学结构及 Ghrelin 的分布 JIANG Shu-Dong *et al.*: Histological Structure and Distribution of Ghrelin in Liver, Small Intestine and Large Intestine of *Muntiacus crinifrons*  图版 I

Plate I



图版说明见文后

蒋书东等:黑麂肝、小肠和大肠的组织学结构及 Ghrelin 的分布 图版 Ⅱ
JIANG Shu-Dong *et al.*: Histological Structure and Distribution of Ghrelin in Liver,
Small Intestine and Large Intestine of *Muntiacus crinifrons* Plate Ⅱ



图版说明见文后