

DOI: 10.3969/j.issn.1000-7083.2011.03.009

东方蝾螈消化道 5-羟色胺免疫活性细胞的分布与形态学观察

刘新波¹, 曹雷², 李淑兰^{2*}

(1. 连云港师范高等专科学校生命科学系, 江苏连云港 222006;

2. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025)

摘要:采用 ABC 免疫组织化学方法对东方蝾螈 *Cynops orientalis* 消化道内 5-羟色胺免疫活性内分泌细胞的分布及形态进行观察。结果显示, 5-羟色胺(5-HT)细胞从食管到直肠各段均有分布, 其中十二指肠的分布密度最高, 空肠次之, 幽门和直肠部最低。5-HT 细胞形态多样呈圆形、锥体形和梭形等, 根据其形态认为东方蝾螈消化道 5-HT 免疫活性细胞具有内分泌、外分泌两种功能。

关键词: 东方蝾螈; 5-HT 细胞; 消化道

中图分类号: Q959.5; Q956 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2011)03-0409-03

Distribution and Morphological Observation on 5-HT Immunoreactive Endocrine Cells in Digestive Canal of *Cynops orientalis*

LIU Xin-bo¹, CAO Lei², LI Shu-lan^{2*}

(1. Department of Life Science, Lianyungang Teachers College, Lianyungang, Jiangsu Province 222006, China;

2. Institute of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

Abstract: Immunohistochemical localization and morphology of 5-Hydroxytryptamine immunoreactive cells (5-HT cells) in the digestive tract of *Cynops orientalis* have been investigated by using the ABC (avidin-biotin-peroxidase complex) immunostaining technique. The results indicated that the 5-HT positive immunoreactive cells could be observed throughout the digestive tract, from esophagus to rectum. The highest density is in duodenum, followed by the jejunum. The lowest density is found in pylorus and rectum. The 5-HT cells have different shapes including round, shuttle-like, tapering and so on. By the shapes of cells, it is suggested that 5-HT positive immunoreactive cells in the digestive tract of *Cynops orientalis* should have both endocrine and exocrine functions.

Key words: *Cynops orientalis*; 5-HT cells; digestive tract

消化道 5-羟色胺免疫活性细胞(5-Hydroxytryptamine immunoreactive, 5-HTIR)属内分泌细胞,其分泌的 5-羟色胺(5-HT)具有十分重要的生理功能。随着 5-羟色胺特异性抗体的制成和 5-HT 免疫组织化学方法的建立(Facer *et al.*, 1979)与不断完善,已有学者用 5-HT 抗血清对不同脊椎动物消化道 5-HT 细胞进行了精确定位,如对哺乳类(黄威权等,1987;唐晓雯,郑一守,1991)、鸟类(邓泽沛等,2004;李丽霞,安书成,2009)、爬行类(Morescalchi *et al.*, 1997;黄徐根等,2003;金显文等,2008;李淑兰等,2008a)、两栖类(郑一守等,1990;李淑兰等,2005;Huang & Wu, 2007)和鱼类(方静,何敏,2007),研究表明,5-HT细胞在不同脊椎动物的消化道中分布差异较

大。东方蝾螈 *Cynops orientalis* 隶属两栖纲 Amphibia 有尾目 Caudata 蝾螈科 Salamandridae 蝾螈属 *Cynops*。迄今未见东方蝾螈消化道 5-HT 免疫细胞化学定位的报道。本文对其消化道内 5-HT 细胞的分布与形态进行研究,以探讨两栖类消化道内分泌细胞的分布与其他脊椎动物之间的异同,为两栖类消化生理学的研究提供形态学基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

东方蝾螈 8 只,购于哈尔滨市花鸟鱼市场。乙醚麻醉后,立即取下食管、胃贲门部、胃体、胃幽门部、十二指肠、空肠、回肠、直肠等消化道各段材料,

收稿日期:2010-08-09 接受日期:2010-10-15

作者简介:刘新波,女,教授,主要从事脊椎动物方面的教学和科研工作

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shulanli2002@yahoo.com.cn

用生理盐水快速冲洗后,使用改良的 Bouin's 溶液固定 48 h,常规脱水透明,石蜡包埋,用 Histostat 820 型石蜡切片机进行切片,厚度为 6 μm ,切片烘干待检。

1.2 试剂

5-HT 抗血清和 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,产品代号为 ZA-0231。

1.3 免疫组织化学方法

常规石蜡切片脱蜡复水。切片入 37℃ 的 H_2O_2 -甲醇溶液孵育 15 min,消除内源性过氧化物酶的活性,然后入蒸馏水浸洗 5 min,PBS 浸洗 5 min,滴加正常山羊血清(3:200),室温孵育 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 \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 \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 \times 5 min。滴加 DAB- H_2O_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,封固。对照切片以正常山羊血清取代第一抗体进行孵育,其余步骤同上。

1.4 照相及细胞计数

Olympus BH-2 型显微镜下观察,并对 8 只东方蝾螈消化道每个部位的切片随机取 10 个(物镜 40 \times ,目镜 10 \times)视野计数,对所得数据用 Duncan 多重比较的方法进行统计学分析。应用 LEICA DC500 DM LB2 显微成像系统拍照。

2 结果

ABC 免疫组织化学法显示 5-HT 免疫活性内分泌细胞呈棕黑色,背景为淡蓝色,反差强,易辨认。对比照片呈阴性反应。

2.1 5-HT 细胞的组织学分布及形态特征

5-HT 细胞分布于东方蝾螈从食管到直肠的整个消化道,但各部位细胞形态和分布位置有所不同。食管部的 5-HT 细胞呈圆形(插页 II 图版,1)、锥体形(图版,2)或梭形(图版,3),主要分布于上皮细胞基部和上皮细胞之间;胃部 5-HT 细胞形态多样,多呈锥体形(图版,4、7)、杆状(图版,5)、椭圆形(图版,6)或圆形(图版,9),还有的呈梭形(图版,8)和三角形(图版,10),分布于胃粘膜上皮细胞之间和腺泡上皮细胞之间;肠部 5-HT 细胞呈圆形(图版,11)或锥体形(图版,12~16),且以锥体形细胞为

主,主要分布于肠粘膜上皮细胞之间。

2.2 消化道各段 5-HT 免疫活性细胞的分布密度

对 8 只东方蝾螈消化道 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分析(表),结果表明:5-HT 细胞在整个消化道中均有分布,其中以十二指肠的分布密度最高,空肠次之,幽门和直肠部最低。十二指肠 5-HT 细胞与其他部位相比差异显著。

表 Duncan 多重比较的结果
Table Results of duncan multiple comparison

部位 part	分布密度平均数(个/视野) Average density	显著水平 Significant level	
		0.05	0.01
食管 Oesophagu	1.15	bc	BC
贲门 Cardiacus	0.86	c	C
胃 Stomach	0.90	c	C
幽门 Pyloricus	0.45	d	C
十二指肠 Duodenum	2.30	a	A
空肠 Jejunum	1.60	b	B
回肠 Ileum	0.97	c	C
直肠 Rectum	0.46	d	C

注:凡含有相同字母的处理,差异不显著($P > 0.05$);凡不含有相同字母的处理,差异显著($P < 0.05$)

Note: the same letter means not statistically different ($P > 0.05$); the different letter means statistically different ($P < 0.05$)

3 讨论

5-HT 细胞广泛分布于各种脊椎动物的消化道中,但分布型差异较大。有学者(唐晓雯,郑一守,1991)对几种脊椎动物消化道 5-HT 细胞的分布进行了比较研究,认为鸟类和哺乳类食管中无 5-HT 细胞分布,而两栖类和爬行类中均有分布。本文中,在东方蝾螈的食管上皮中发现了 5-HT 细胞,这与无斑肥螈 *Pachytriton labiatus* (张盛周等,2001)、眼镜蛇 *Naja naja* (张志强等,2001)、东方铃蟾 *Bombina orientalis* (李淑兰等,2005)的研究结果一致。东方蝾螈以水生动物为食,由于舌端不完全游离,活动性较差,故食物由口腔经食管入胃需要更多的消化因子才能使食物顺利下行,因此 5-HT 细胞在食管中也有分布。东方蝾螈与无斑肥螈均属于两栖纲有尾目,虽然二者亲缘关系较近,但消化道 5-HT 细胞的分布与形态既有共性又有差异,其共性表现在 5-HT 细胞从食道到直肠的消化道各段均有分布,且细胞形态基本相似,差异性表现在 5-HT 细胞在消化道中的分布密度高峰不同,前者在十二指肠,后者在胃幽门部,其原因还有待研究。

已有研究表明多数动物的 5-HT 细胞集中于胃

幽门部,如白条草蜥 *Takydromus wolteri* (李淑兰等, 2008a)、乌梢蛇 *Zoocys dhumnades* (张志强, 2001)、牛蛙 *Rana catesbiana* (张盛周等, 2008), 或集中在十二指肠, 如犏牛 (方之平等, 1994)、扬子鳄 *Alligator sinensis* (吴孝兵等, 1999)、虎纹蛙 *Rana rugulosa* (张盛周等, 2002)。但也有少数例外, 如丽斑麻蜥 *Eremias argus* (李淑兰等, 2008b) 和大熊猫 *Ailuropoda melanoleuca* (杨贵波等, 1995) 的 5-HT 细胞在空肠最多, 北京鸭 (邓泽沛等, 1994) 多分布于盲肠和直肠。本文中, 东方蝾螈 5-HT 细胞的密度分布以十二指肠部最高, 这与犏牛、扬子鳄和虎纹蛙的分布情况一致。

关于小肠中 5-HT 细胞的分布情况主要有两种观点, 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 (Penttila, 1967; 张志强等, 2001; 李淑兰等, 2008a); 其二认为十二指肠和回肠均较多, 空肠最少, 形成 U 字形的分布曲线 (Josephson & Altmann, 1973; 李淑兰等, 2008a)。本文中东方蝾螈小肠各部位的 5-HT 细胞分布密度以十二指肠最高, 空肠至回肠逐渐减少, 与第一种观点一致。其原因为十二指肠是消化和吸收的主要部位, 需要更多的 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。之后随着消化功能的减弱, 5-HT 细胞的密度也随之降低。

消化道粘膜是脊椎动物体内最大、最复杂的内分泌组织。已有资料表明, 与其他胃肠道激素相比, 5-HT 是哺乳动物消化道中分布最广和含量最多的一种激素 (Arena *et al.*, 1990)。生理学实验证明, 哺乳动物胃肠壁分泌的 5-HT 可直接释放进入血液或肠腔 (方之平等, 1994), 电镜亦观察到 5-HT 分泌物是通过弥散方式进入固有膜层的 (Josephson & Altmann, 1973; Arena *et al.*, 1990)。据报道, 大鼠胃肠道内的 5-HT 免疫活性细胞 (黄威权等, 1987) 可通过细胞突起深入到固有层或肠腔面, 行使内分泌或外分泌功能。本文在东方蝾螈消化道内可见有圆形或椭圆形的 5-HT 细胞位于固有膜内, 证实了可能由此类细胞所分泌的 5-HT 直接进入血液循环完成内分泌。而梭形、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, 从形态学上证明了其可能具有外分泌功能。但是, 无论是 5-HT 细胞分布型的差异原因, 还是 5-HT 的作用机理, 都有待进一步深入研究。

4 参考文献

- 邓泽沛, 周占祥, 山田纯三. 1994. 北京鸭消化道内分泌细胞的免疫组织化学研究[J]. 动物学报, 40(4): 383~389.
- 方静, 何敏. 2007. 重口裂腹鱼消化道内分泌细胞的免疫组织化学鉴别和定位[J]. 水生生物学报, 31(5): 744~747.
- 方之平, 孙宝田, 谢云芳, 等. 1994. 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[J]. 解剖学报, 25(1): 78~81.
- 黄威权, 黄宗明, 王文超, 等. 1987. 大鼠 5-羟色胺免疫活性内分泌细胞的分布及形态学观察[J]. 解剖学报, 18(4): 422~425.
- 黄徐根, 吴孝兵, 张志强, 等. 2003. 两种爬行动物胃肠道内分泌细胞的免疫组织化学比较研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 12(4): 433~440.
- 金显文, 黄山, 吴孝兵. 2008. 山地麻蜥消化道内分泌细胞的免疫组织化学研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 17(1): 51~55.
- 李丽霞, 安书成. 2009. 红腹锦鸡胃肠道内分泌细胞的免疫组织化学定位[J]. 动物学杂志, 44(1): 24~32.
- 李淑兰, 于永忠, 高欣, 等. 2008a. 白条草蜥消化道内分泌细胞的免疫组织化学[J]. 动物学杂志, 43(2): 43~50.
- 李淑兰, 高欣, 王森. 2008b. 丽斑麻蜥消化道内分泌细胞的免疫组织化学研究[J]. 解剖学报, 139(5): 751~755.
- 李淑兰, 赵文艳, 冷超, 等. 2005. 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[J]. 动物学杂志, 40(5): 37~42.
- 唐晓雯, 郑一守. 1991. 不同脊椎动物消化道内 5-羟色胺免疫染色细胞的分布[J]. 动物学研究, 12(3): 293~298.
- 吴孝兵, 张盛周, 陈壁辉, 等. 1999. 扬子鳄消化道内分泌细胞的免疫组织化学研究[J]. 动物学报, 45(2): 155~161.
- 杨贵波, 陈茂生, 邓泽沛, 等. 1995. 大熊猫胃肠道内分泌细胞分布型的研究[J]. 兽类学报, 15(1): 4~10.
- 张盛周, 吴孝兵, 陈壁辉. 2002. 虎纹蛙消化道两种内分泌细胞的免疫组织化学定位[J]. 解剖学杂志, 25(3): 275~278.
- 张盛周, 薛立辉, 陶少武. 2008. 牛蛙胃肠胰系统内分泌细胞的免疫组织化学鉴定与定位[J]. 激光生物学报, 17(5): 689~694.
- 张盛周, 张志强, 吴孝兵, 等. 2001. 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[J]. 动物学杂志, 36(3): 13~16.
- 张志强, 张盛周, 吴孝兵. 2001. 两种蛇消化道 5-羟色胺细胞的免疫组织化学定位及比较[J]. 动物学杂志, 36(6): 11~14.
- 郑一守, 唐晓雯, 朱洪文. 1990. 中华大蟾蜍多种组织内 5-羟色胺免疫染色细胞的分布[J]. 实验生物学报, 23(3): 285~290.
- Arena PC, Richardson KC, Yamada J. 1990. An immunohistochemical study of endocrine cells of the alimentary tract of the king's skink (*Egernia kingii*) [J]. J Anat, 170: 73~85.
- Facer P, Polak JM, Jaffe BM, *et al.* 1979. Immunocytochemical demonstration of 5-hydroxytryptamine in gastrointestinal endocrine cells [J]. Histochemical Journal, 11: 117~121.
- Huang XG, Wu XB. 2007. Immunohistochemical localization of endocrine cells in the gastrointestinal tract of Mt. WuYi cascade-frog [J]. Ac Hydrobiologica Sinica, 31(2): 162~168.
- Josephson RL, Altmann GG. 1973. Distribution of diazo positive (argentaffin) cells in small intestine of rats of various ages [J]. Am J Anat, 136: 15~22.
- Morescalchi AM, Gaccioli M, Faraldi G, *et al.* 1997. The gastroenteric pancreatic neuroendocrine system in two reptilian species: *Chalcides chalcides* and *Zoonosaurus madascariensis* (Sauridae) [J]. Eru J Histochem, 41(1): 29~40.
- Penttila A. 1967. 5-Hydroxytryptamine in the enterochromaffin cells of the guinea pig alimentary tract [J]. Histochem Istry, 11: 185.

