

牙鲆消化道组织学观察及内分泌细胞分布

施志仪, 陈晓武, 顾一峰

(上海水产大学 生物技术研究中心, 上海 200090)

摘要:牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)体质量约0.5 kg,活体取材,通过免疫组织化学染色和H-E染色,在光学显微镜下观察牙鲆消化道组织结构。结果表明,牙鲆消化道和高等脊椎动物类似,分为口腔、食道、胃、胃盲囊和肠。肠也可分为前肠、中肠和后肠,三者之间没有明显的界限。胃和前肠是消化吸收主要的部位,胃盲囊和前肠结构和功能非常类似。Serotonin细胞和P Substance细胞在牙鲆胃前部的黏膜中零星分布,在胃体中较多见,平均每 $10^4 \mu\text{m}^2$ 胃体黏膜上皮约各有2.2和2.0个阳性细胞。而Gastrin细胞分布在胃盲囊和前肠中,平均每 $10^4 \mu\text{m}^2$ 黏膜上皮分别有0.98个和0.71个阳性细胞。可见,牙鲆和哺乳动物消化道一样都分布有肽能神经元。这些结果将为神经内分泌系统的研究提供资料。
[中国水产科学,2006,13(5):851-855]

关键词:牙鲆;消化道;内分泌细胞;免疫组织化学

中图分类号:Q959.486 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)05-0851-05

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)属鲆形目(Pleuronectiformes)、牙鲆科(Paralichthyidae)、牙鲆属(*Paralichthys*)的冷温性底层鱼类,是中国重要的海水养殖鱼类之一,其肉质鲜美、营养价值高。同时,牙鲆二次变态显著,变态前后其外形、食性以及生态习性都发生了很大的变化,是研究变态发育较理想的模式生物。

消化道的结构和功能的转变是食性改变的基础,牙鲆的胃在胚胎发育和变态前后有显著的变化^[1]。目前未见关于牙鲆消化道组织结构和内分泌细胞分布的详细报道。5-羟色胺(Serotonin)细胞、胃泌素(Gastrin)细胞和P物质(P Substance)细胞是在脊椎动物胃肠道中广泛分布的内分泌细胞。其分泌物和胃肠道平滑肌收缩、胃黏膜分泌胃酸、蛋白酶和胰酶分泌等生理活动都有密切关系。本研究采用免疫组织化学和HE染色等方法,通过光学显微镜观察牙鲆消化道组织形态,并在此基础上,对上述3种内分泌细胞的分布进行观察,以期为进一步研究牙鲆胚胎发育和变态发育中胃肠道结构和功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

牙鲆于2004年11月购自上海铜川路水产品市

场,体质量0.5 kg左右,打开腹腔,取消化道的食道中部、食道与胃连接处、胃体、胃盲囊、前肠、中肠和后肠。所有组织材料均用不含冰醋酸的Bouin氏液固定,24 h后转入70%的酒精于4℃保存。Serotonin、Gastrin和P Substance抗体(实验浓度为5%)、SP系列检测试剂盒均购自北京中杉生物技术公司,DAB显色剂(实验浓度为0.05%)购自武汉博士德生物技术公司。

1.2 染色

梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,做连续切片,厚度为8 μm ,常规HE染色。免疫组织化学染色方法参照SP检测试剂盒说明书,过程如下:切片脱蜡至水后以3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶10 min,洗净后在室温下与山羊抗血清孵育15 min,再进入一抗37℃中孵育2 h,又分别在生物素化二抗和辣根酶标记链霉卵白素工作液中37℃下孵育15 min,最后以DAB显色。全部过程均在pH 7.3环境和湿盒中进行。每种抗体反应时均以相邻切片作为阴性对照。阴性对照除一抗以PBS替代之外,其余步骤均同实验组。

1.3 计数方法

Olympus显微镜和Motic image自动分析测量软件观察拍照、对结果进行统计分析。在200倍镜

收稿日期:2005-09-28;修订日期:2005-12-02。

基金项目:国家自然科学基金项目(30271017);教育部高等教育博士科研基金项目(20040264001)。

作者简介:施志仪(1954-),男,博士,教授,从事海洋生物和海洋药物研究。E-mail:zyshi@shfu.edu.cn

下,在计算机视野中随机挑选10个区域,选定 $10^4 \mu\text{m}^2$ 的胃肠黏膜上皮区域,对其中的免疫阳性细胞进行计数,然后求平均值,作为细胞分布密度的指标。在400倍视野中使用软件中标尺对阳性细胞大小进行测量。

2 结果

2.1 牙鲆消化道组织学特点

牙鲆消化道分口腔、食道、胃、前肠、中肠和后肠几个主要部分。胃和肠交界处还有胃盲囊,食道比较粗,胃是最膨大的部分,二者各占消化道总长的1/6,肠占消化道长度总长的2/3左右,相对较细。同其他脊椎动物类似,消化道壁分为黏膜层、黏膜下层、肌肉层和浆膜。黏膜层由柱状上皮构成,含有一些游离细胞,包括淋巴细胞,尤其在肠部分多见。固有层和黏膜下层界限不明显。固有层主要由致密的结缔组织构成,含有胶原纤维、弹性纤维以及一些网状纤维组成,也可见大量游离的淋巴细胞,而黏膜下层主要由疏松结缔组织构成,且主要由成纤维细胞组成。固有膜和黏膜下层都有丰富血管。肌肉层由内环外纵的平滑肌构成,内层较外层厚。

食道黏膜层形成高的纵行皱襞,无分支。黏膜层有很多凹陷形成小凹,食道中段黏膜上皮主要由柱状或圆形的杯状细胞组成,柱状杯状细胞排列整齐且连续,有些地方圆形的杯状细胞还堆积成团,食道后段黏膜上皮中杯状细胞开始减少,柱状上皮细胞开始增多。固有层不发达,有的地方不连续。肌肉层很厚,可见纵肌和环肌,以横纹肌为主,外层被伊红染染色的是横纹肌,发达的肌肉层与其肉食性相适应(图版I-1)。黏膜基底层的细胞小,着色深,细胞间界限不明显。黏膜肌层不明显(图版I-2)。

食道和胃交界处形成细颈,横纹肌一直延伸到胃壁中。同时,胃腺和内分泌细胞开始出现,杯状细胞开始减少,黏膜层形态明显改变(图版I-3)。

胃是消化道中最膨大的部分,圆桶型。黏膜形成乳头状皱襞,皱襞顶端平缓。可见大量胃小凹,黏膜上皮单层柱状,排列规则,核椭圆形,位于细胞底部,染色深,核仁明显。细胞质淡红色。上皮中没有杯状细胞分布。黏膜肌层明显(图版I-4)。胃腺非常发达,为管状腺体,开口于胃小凹,可以分为颈、体和底部,腺体和腺底的细胞为浆液性细胞,HE染色时伊红色较深(图版I-5)。胃腺细胞矮柱状,细胞质充满淡红色的酶原颗粒,细胞核大,有圆形也有长形,染色质分散、淡染(图版I-6)。肌肉层也

比较厚,约占壁厚度的1/2,黏膜层和黏膜下层各占1/4。黏膜层、黏膜下层、肌肉层和浆膜层中均有血管和神经。其在靠近浆膜层的肌肉处,神经纤维常常形成明显的神经丛。

胃盲囊和前肠没有明显的区别,管壁比较薄。皱襞长且有较多分支,几乎充满整个肠腔(图版I-7),黏膜层主要由单层柱状细胞和圆形杯状细胞组成。柱状细胞的细胞核椭圆形。位于基部。上皮层还可见大量游离的淋巴细胞(图版I-8)。在胃盲囊和前肠平均每400 μm 长的黏膜有1个杯状细胞,而在中肠和后肠杯状细胞又开始增多,并开始有成群分布的杯状细胞,平均50 μm 长的黏膜有1个杯状细胞,HE染色呈空泡状。黏膜层与固有膜之间有许多游走细胞(图版I-9)。小肠绒毛中毛细血管通到顶端,上皮表面有微绒毛。固有膜中有丰富的毛细血管,黏膜下层由疏松结缔组织构成,和黏膜层和肌肉层分界明显,没有发现肠腺。中肠和后肠皱襞越来越短,分支也渐少(图版I-10)。

2.2 5-羟色氨酸细胞、胃泌素细胞和P物质的分布

免疫组化染色结果表明, Serotonin, Gastrin 和 P Substance 三种兔抗人抗体均在牙鲆体内表现了免疫活性,阳性细胞染成黄褐色。所有阴性对照都未发现阳性反应。胃肠道内分泌细胞分为两类:即开放型和封闭型。而大多数黏膜内分泌细胞都是属于开放型,它们都有1个管道通向消化腔中。

Serotonin 细胞主要集中在胃黏膜上皮层,固有层的胃腺细胞间基本没有阳性细胞。位于上皮柱状上皮细胞之间的 Serotonin 细胞为细长型,一端突起伸向消化腔,长度可达70~90 μm ,宽度在10 μm 左右;而靠近上皮基底的 Serotonin 细胞多呈圆形,较小且圆,直径也可达到20 μm 。每 $10^4 \mu\text{m}^2$ 的上皮层平均有2.2个阳性细胞(图版I-11)。

Gastrin 细胞分布在前肠和胃盲囊中,两处分布的细胞在形态上未见有区别。他们都位于基膜上方,穿插于上皮细胞间,多呈纺锤形,长度可达42 μm ,直径在8 μm 左右,有的呈圆形,可能由于切面不同或细胞种类不同(图版I-13)。前肠和胃盲囊 $10^4 \mu\text{m}^2$ 的上皮中平均分布有0.71个和0.98个 Gastrin 细胞。

P物质内分泌细胞分布在胃上皮细胞间,细胞形态大小不一,最大的细胞长度可达40 μm ,直径在15 μm 左右。在靠近食道的前胃黏膜中零星分布(图版I-12),胃体的黏膜层中P物质细胞密度较高,平均 $10^4 \mu\text{m}^2$ 上皮中有2个P物质细胞,有的位于基底层。由于被切的角度不同,细胞形成长杆形

或圆形,长杆形细胞方向和上皮细胞相同,一端伸向腔内(图版I-14)。

3 讨论

3.1 牙鲆消化道组织结构

鱼类消化道由内到外的几层结构类似于高等脊椎动物。消化道不仅是一个消化吸收器官,也是一个神经内分泌细胞广泛分布的器官,同时也是动物体内最大的免疫系统,有大量弥散的淋巴细胞分布在消化道中。另外,由于种间及个体的差异,不同环境影响下,使得消化道的组织与功能体现了多样性。牙鲆是肉食性有胃真骨鱼,消化道较无胃真骨鱼多了胃和胃盲囊的结构。其结构是和肉食性相适应的。胃盲囊和前肠的组织结构,包括胃泌素细胞和淋巴细胞的分布都非常类似,说明胃盲囊是前肠的延伸,是前肠扩大消化吸收面积的一种适应,这和 R. K. Buddington 等^[2]对另外几种真骨鱼胃盲囊功能的研究结果一致。

牙鲆在仔鱼向稚鱼的发育中有变态现象,变态前后其食性、肌纤维结构、血细胞形态、生活习性都发生很大的变化^[3]。而食性的改变肯定是和消化道的功能相适应,本研究对牙鲆成鱼消化道进行详细观察,为进一步研究牙鲆变态发育不同阶段的消化道内分泌,免疫,消化吸收等功能变化打下基础。

3.2 内分泌细胞的分布

鱼类胃肠道内分泌细胞常常单个分散在胃肠道黏膜上皮中,能产生具有生理作用的胺类或肽类物质。多数情况下,肽类和胺类产物共同存在于同一细胞中。有的内分泌细胞产生不止一种肽类物质^[4]。内分泌细胞受到内外环境变化的刺激而释放激素。其量的多少受肠道内物质的化学成分及酸碱度的影响。

国内外学者对骨舌鱼(*Osteoglossum xanthurus* Cuvier)、鲟鱼(*Acipenser baileyi* Gunther)、雀鳝(*Lepisosteus osseus*)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、鲤(*Cyprinus carpio* L.)、青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、银鲫(*Carassius auratus gibelio*)、鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)等不同淡水鱼和欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)的胃肠道内分泌细胞进行了观察^[5-12],在这些硬骨鱼的胃肠道中先后发现了10多种免疫活性内分泌细胞,分别为:5-羟色胺、胃泌素、P物质、神经降压素、蛙皮素、蛋氨酸脑啡肽、血

管活性肠肽、胆囊收缩素、抑胃多肽、生长抑素、高血糖素、类高血糖素、胰多肽、胰岛素及降钙素免疫反应细胞。在软骨鱼和圆口鱼类的胃肠道中则发现了约20种免疫活性内分泌细胞。除了上述外,还有蛙皮素、胃泌素释放肽、 α -内啡肽、 β -内啡肽等内分泌细胞^[13]。先前对无胃鱼的研究已经证实鳊、青鱼、草鱼、鲢、鳙、银鲫和团头鲂等的肠道中。Gastrin细胞大多在前肠前段分布。同有胃鱼如尼罗非鲫(*Tilapia nilotica*)和短盖巨脂鲤(*Colossoma brachypomum*)胃中未发现 Gastrin 细胞的存在一样。在牙鲆的胃中也无 Gastrin 细胞。在大多无胃真骨鱼肠道中未发现的 Serotonin 细胞,在有胃真骨鱼,如鳊胃肠道中均有较密的分布。而牙鲆的 Serotonin 细胞和 P-物质细胞只见于胃中,表现了其独特性的一面。

就胃肠道内分泌细胞的研究资料来看,对鱼类的探索取得很大进展,但是由于条件限制,在深度上还远远不够。对鱼类胃肠道内分泌细胞进行鉴别和定位多采用高等动物的抗血清,迄今,还少见使用专门的鱼类抗血清对鱼类胃肠道内分泌细胞进行研究的报道。而且大多数研究是针对发育后或成鱼进行的。而对胚胎期鱼类内分泌细胞的研究比较少。对海水鱼的相关研究资料则更少。

上述事实提示,无胃与有胃真骨鱼以及淡水和海水真骨鱼,由于消化道的结构及食性差异导致所分布的免疫活性内分泌细胞的种类及密度不尽相同。对牙鲆胃肠道内分泌细胞的研究,将丰富鱼类消化内分泌学的内容,为牙鲆营养学和人工养殖提供参考,也为揭示牙鲆胚胎发育和变态发育期这些细胞形态和功能的变化规律打下基础。

参考文献:

- [1] Miwa S, Yamano K, Inui Y. Thyroid hormone stimulates gastric development in flounder larvae during metamorphosis[J]. Exp Zool, 1992, 261: 424-430.
- [2] R K Buddington, J M Diamond. Pyloric cox of fish: a "new" absorptive organ[J]. Gastrointestinal and Liver Physiology, 1987, 252, 1: 65-76.
- [3] 张俊玲, 施志仪. 牙鲆早期阶段的变态发育及其机制[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(4): 348-352.
- [4] 顾江. APLN 系统的现状[J]. 生理科学进展, 1982, 13(2): 120-125.
- [5] AL-Mahrouki, Youson J H. Immunohistochemical studies of the endocrine cells within the gastro-entero-pancreatic system of osteoglossomorpha, an ancient teleostean group[J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 110: 125-139.

- [6] Groff K E, Youson J H. An Immunohistochemical study of the endocrine cells within the pancreas, intestine, and stomach of the gar (*Lepisosteus osseus* L.) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 106 (1): 1-16.
- [7] Mes-Vinas J G, a-Hernandez M P G, Lomero M T, et al. Ghrelin- and NPY-related peptide-immunoreactive cells in the gut of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): a light and electron microscopic study [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 112(1): 26-37.
- [8] 潘勤生, 方之平. 四种鲤科鱼肠道中胃泌素免疫性细胞的免疫组织化学定位及比较 [J]. 华中农业大学学报, 1998, 7(3): 238-242.
- [9] 夏立群, 王庆堂. 乌鳢胃肠由分泌细胞的免疫组化研究 [J]. 动物学研究, 1994, 15(4): 36-45.
- [10] 方之平, 潘勤生, 聂秀云, 等. 8种有胃真骨鱼消化道降钙素免疫活性细胞的定位及形态学研究 [J]. 水生生物学报, 1997, 21(4): 359-364.
- [11] 潘勤生, 方之平. 几种鱼类在胃肠道内分泌细胞中存在的免疫细胞化学证据 [J]. 水生生物学报, 2001, 25(6): 565-570.
- [12] 方永强, 戴燕玉, 陈 蕾. 欧洲鳊鱼胃肠道激素免疫组织化学的研究 [J]. 台湾海峡, 1999, 18(1): 83-86.
- [13] 张金花, 王柯超. 鱼类胃肠内分泌细胞的研究进展 [J]. 水产科学, 2002, 21(3): 37-39.

Histological studies on gastrointestinal tract of *Paralichthys olivaceus* and endocrine cells distribution within it

SHI Zhi-yi, CHEN Xiao-wu, GU Yi-feng

(Research Center of Biotechnology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The digestive tract histology structure of *Paralichthys olivaceus* and three types of endocrine cells were studied by using HE staining and immunocytochemical methods. The results showed that the histological structure was similar to that of high vertebrate animals. The tract consisted of oesophagus, stomach, pylorus-theca, and intestine. The intestine was divided into fore-intestine, mid-intestine and hind-intestine although there was no obvious limit between two of them. Stomach and fore-intestine were the main region of digestive and absorption. Serotonin and P substance immunoreactive endocrine cells were found in stomach, there are 2.2 and 2.0 cells in every $10^4 \mu\text{m}^2$ epithelium. Gastrin immunoreactive cells were founded in pylorus-theca and fore-intestine, there are 0.98 and 0.71 cells in every $10^4 \mu\text{m}^2$ epithelium. Three types of cell were mainly located in the epithelium of stomach or intestine. It showed that there were also many peptidergic neurons in the gastrointestinal tract of *Paralichthys olivaceus* as in the mammalian and as a result, these mentioned above would provide morphological basis for the resource of neuro-endocrine system. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 851-855]

Key words: *Paralichthys olivaceus*; gastrointestinal tract; endocrine cells; immunohistochemistry

图版 I 说明

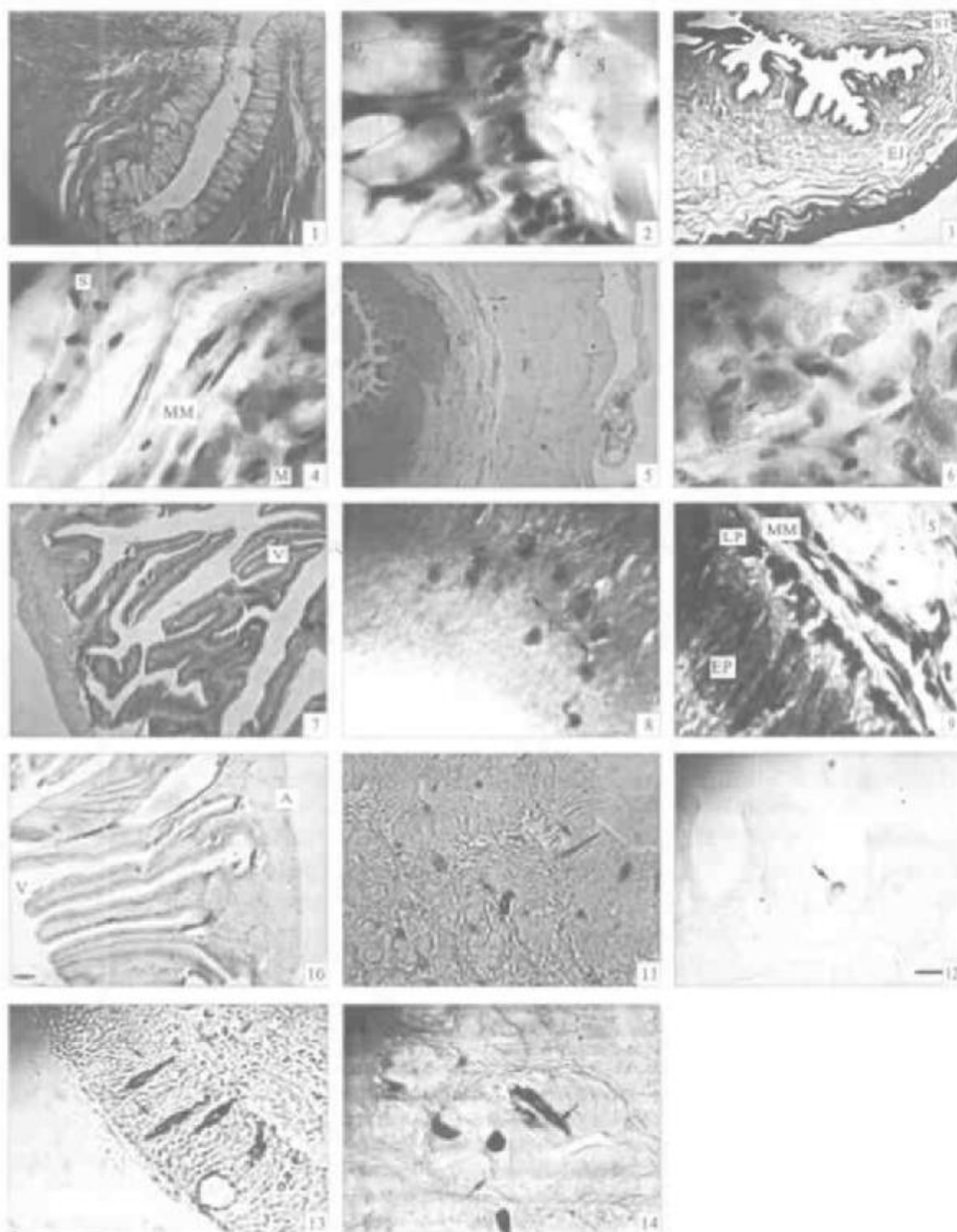
1: 食道中段的杯状细胞(↑)H·E染色×400; 2: 食道上皮基底层大量颗粒细胞分布(↑)H·E染色×1 000; 3: 食道和胃的连接处, H·E染色×40; 4: 胃固有膜, H·E染色×1 000; 5: 胃壁, H·E染色×40; 6: 胃腺细胞细胞中酶原颗粒(↑), H·E染色×1 000; 7: 前肠, H·E染色×40; 8: 前肠黏膜层中的淋巴细胞(↑), H·E染色×1 000; 9: 前肠上皮基底层, H·E染色×1 000; 10: 中肠, H·E染色×40; 11: 胃上皮中的 Serotonin 细胞(↑), ×400; 12: 胃前部的 P 物质细胞(↑), ×400; 13: 前肠的 Gastrin 细胞(↑), ×400; 14: 胃体部的 P 物质细胞(↑), ×400; (本版图 3 为纵切, 其他均为横切; M: 黏膜层; S: 黏膜下层; F: 肌肉层; A: 浆膜; G: 杯状细胞; LP: 基底层; ST: 胃; SP: 胃小凹; EC: 胃腺细胞; EJ: 食道胃连接; MM: 黏膜肌层; LC: 淋巴细胞; EP: 上皮层; V: 小肠绒毛)。

Explanation of Plate I

1: The goblet cells(↑) in the middle of the esophagus, H·E×400; 2: The granule cells in the lamina propria of esophagus(↑), H·E×1 000; 3: The esophagogastric junction, H·E×40; 4: The muscularis mucosae of stomach, H·E×1 000; 5: Stomach, H·E×40; 6: Enzyme granules in the stomach gland cells(↑), H·E×1 000; 7: Front intestine, H·E×40; 8: Lymphocytes(↑) in the front intestine, H·E×1 000; 9: Lamina propria of the front intestine, H·E×1 000; 10: The middle intestine, H·E×40; 11: Serotonin cells in the stomach(↑), ×400; 12: P substance cells in the front stomach(↑), ×400; 13: Gastrin cells in the front intestine(↑), ×400; 14: P substance cells in the stomach(↑), ×400; (Fig3 was longitudinal section., the others were all transverse section. M: the mucosa; S: the submucosa; F: the muscularis; A: adventitia; G: goblet cells; E: esophagus; LP: lamina propria; ST: stomach; SP: stomach pits; EC: stomach gland cells; EJ: esophagogastric junction; MM: muscularis mucosae; LC: lymphocyte; EP: epithelium; V: villi)。

施志仪等:牙鲆消化道组织学观察及内分泌细胞分布

SHI Zhi-yi et al: Histological studies on gastrointestinal tract of *Paralichthys olivaceus* and endocrine cells distribution within it



图版 I Plate I

(图版 I 说明见第 854 页 Explanation of Plate I at page 854)