

牙鲆生长抑素分泌细胞的免疫细胞化学研究

王静凤, 刘扬, 赵芹, 逢龙, 薛长湖

(中国海洋大学, 山东 青岛 266003)

摘要:采用链霉亲合素—生物素—过氧化物酶复合物(SABC)免疫细胞化学染色技术,利用兔抗哺乳动物生长抑素血清对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)消化道(包括食道、胃、幽门垂、肠道全长及肛门)、肝胰脏、肾脏、脾脏以及生殖腺等器官的生长抑素(SS)分泌细胞进行定位和鉴别。结果表明,生长抑素分泌细胞仅存在于胃和胰岛中,其他检测部位均未见分布。在胃中,生长抑素分泌细胞主要散在分布于胃黏膜上皮、胃小凹底部上皮和胃腺的颈部周围。在胃的不同部位,生长抑素分泌细胞的分布密度存有差异,以胃体部数量最多,贲门部次之,幽门部最少。参照消化道内分泌细胞与胃肠腔或腺腔有无直接联系,以及基部有无胞质突起的分类方法,将SS分泌细胞分为4种不同的类型,这4种类型的SS分泌细胞在胃中均有出现,且不同部位出现的几率不同。其中,贲门部以第Ⅲ、Ⅰ型居多;胃体部以第Ⅳ、Ⅰ型细胞为主;幽门部仅有第Ⅰ、Ⅱ型细胞。提示,牙鲆的胃是一个复杂的内分泌器官。在胰脏中,生长抑素分泌细胞零散地分布于胰岛细胞之间,数量很少。[中国水产科学,2007,14(3):397—402]

关键词:免疫细胞化学;牙鲆;生长抑素;消化道;胰岛

中图分类号:Q959.4

文献标识码:A

文章编号:1005—8737—(2007)03—0397—06

生长抑素(Somatostatin, SS)最初从羊的下丘脑中分离、提纯,并鉴定其化学结构为含有14个氨基酸残基的环状多肽(SS-14)。现已证明,SS是多基因家族^[1],广泛分布于脊椎动物的中枢及外周神经系统、甲状腺、脾脏、胸腺、胰脏和胃肠道等部位,对动物的生长、发育、代谢和免疫等生理功能具有调节作用,是脊椎动物体内重要的神经递质和神经调质。

目前,对生长抑素的研究主要集中在哺乳类和鸟类。国外学者对鱼类生长抑素的研究始于20世纪80年代,至今已经完成多种鱼生长抑素分泌细胞的鉴别与定位、分离纯化、基因表达和受体克隆等方面的研究工作^[2],并证明生长抑素对某些鱼具有抑制生长,调节渗透压和参与变态发育调控等生理功效^[3-5]。国内的研究起步较晚,仅有少量淡、海水鱼生长抑素分泌细胞鉴别和定位的研究报道^[6-9]。鲆鲽类为中国北方沿海重要的经济养殖鱼种,本研究以牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)为实验材料,利用免疫细胞化学技术对其生长抑素分泌细胞进行研究,旨在为鱼类内分泌学和鱼类生理学研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 牙鲆与取材

牙鲆成鱼5尾,雌雄兼有,体长25~40 cm,购自青岛市南山水产品市场。活体解剖,迅速按下列部位取材:食道、胃(贲门、胃体、幽门)、幽门垂、肠(前、中、后段)、直肠、肛门、肝脏、肾脏、脾脏和生殖腺。用不含冰醋酸的Bouin's液固定24 h,采用常规石蜡切片法制片,切片厚度为6 μm,明胶铬矾贴片。

1.2 抗血清及主要试剂

兔抗哺乳动物SS血清(200 μg/mL),工作浓度1:800(体积比);生物素标记的山羊抗兔IgG血清;SABC试剂盒和DAB显色试剂盒。以上试剂均由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.3 免疫细胞化学主要染色步骤

采用链霉亲合素—生物素—过氧化物酶复合物(SABC)免疫细胞化学染色方法。主要步骤如下:切片脱蜡、复水,3% H₂O₂室温孵育10 min,灭活内源性过氧化物酶;5%正常山羊血清室温孵育20 min,消除非特异性抗体;适当稀释的第一抗体4℃孵育过

收稿日期:2006—06—27;修订日期:2006—11—13。

基金项目:国家863高技术研究与发展项目(2005AA625010);中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放课题。

作者简介:王静凤(1964—),女,博士,教授。研究方向,生物活性物质的功效评价。E-mail:jfwang@ouc.edu.cn

夜;生物素标记的山羊抗兔 IgG 血清 20~37 °C 孵育 30 min;洗涤后 SABC 复合物 20~37 °C 孵育 40 min;最后,DAB 显色,苏木精轻度复染。以上全部过程均在湿盒中进行。

常规脱水、透明、封片。每个部位均以相邻切片作为对照片,对照片以 PBS 代替一抗。

1.4 观察与计数

切片于 Olympus BH—2 型显微镜下观察,并进行拍照。用接目网格测微尺对 SS 分泌细胞进行计数,对每个取材部位的 3~5 张切片各随机取 10 个视野,计算出 SS 分泌细胞个数/mm²。再将 5 尾鱼的数据进行统计处理,算出平均值,以此表示不同部位 SS 分泌细胞的分布密度。

2 结果与分析

2.1 生长抑素分泌细胞的分布

免疫阳性分泌细胞仅分散存在于胃和肝胰脏中,其他部位均未见分布。在胃中,SS 免疫阳性细胞主要散在分布于胃黏膜上皮、胃小凹底部上皮和胃腺的颈部周围(图版 I—1、2)。其分布密度以胃体部最大[(30.7±2.16)个/mm²],贲门部次之[(16.4±2.00)个/mm²],幽门部最少[(7.0±0.88)个/mm²]。

胰脏弥散于肝脏之中,SS 免疫阳性细胞单个零散地分布于胰岛细胞之间,数量很少(图版 I—3)。

2.2 生长抑素分泌细胞的形态

胃中的 SS 免疫阳性细胞形态多样,切面呈长梭形、长颈瓶形、圆形、椭球形、梨形、三角锥形和蝌蚪形等,其胞体大,胞质内充满棕褐色阳性颗粒,胞核多居中,为免疫阴性(图版 I—4)。长梭形、长颈瓶形 SS 分泌细胞多零散分布于胃黏膜柱状上皮细胞之间,细胞一端具胞质突起,伸向胃腔,有时可见分泌颗粒(图版 I—5、6);或具有相对两端的胞质突起,一端伸向胃腔,另一端伸向基膜(图版 I—7),伸向基膜的胞突末端多数无膨大,少数可见到末端形成突触样膨大(图版 I—8)。圆形、椭球形、梨形、三角锥形或蝌蚪形等细胞,大多数单个散在分布于胃小凹的底部上皮细胞之间和胃腺的颈部周围(图版 I—2),有的具短胞突(图版 I—9),少数具短胞突伸向腔面(图版 I—10);有的无突起,贴近基膜或胃腺细胞分布(图版 I—11)。

采用 1:100(体积比)工作浓度的 SS 抗血清,在胰岛中检测到少量 SS 免疫阳性细胞。细胞多数

呈圆形,无任何胞质突起。胞质内充满粗大的棕色颗粒,胞核呈圆形或卵圆形,染色质致密,不居中,为免疫阴性(图版 I—3)。

2.3 生长抑素分泌细胞的类型

参照消化道内分泌细胞与胃肠腔或腺腔有无直接联系,以及基部有无胞质突起的分类方法^[10],将牙鲆 SS 分泌细胞分为 4 类:I 型为细胞有胞质突起与腺(胃)腔面有直接接触但无基部胞质突起(图版 I—5、6);II 型为细胞具伸向腔面和基膜两端的胞质突起(图版 I—7);III 型为细胞位于基膜与上皮之间,无任何胞质突起(图版 I—11);IV 型为细胞位于基膜与上皮之间,具有基部胞质突起且沿着基膜延伸(图版 I—9)。牙鲆 4 种不同类型的 SS 分泌细胞在胃中都有存在,但不同类型 SS 分泌细胞在胃不同部位所占权重不同:贲门部主要以第 III 型分泌细胞居多,第 I 型次之;胃体部则以第 IV 型和第 I 型细胞为主;幽门部无腺管和胃腺细胞,SS 分泌细胞仅零散分布在胃黏膜上皮之间,其细胞类型仅有第 I 型和第 II 型,以第 I 型居多。胰岛中的 SS 分泌细胞几乎都为第 III 型。

3 讨论

哺乳类动物体内 SS 主要以 2 种活性形式存在,即 SS-14 和 SS-28,后者由 SS-14 的 N 末端向外延伸而成,由同一基因编码,来源于 SS 前体 PSS I。而硬骨鱼类体内至少含有 PSS I 和 PSS II 2 种 SS 前体^[11],除 SS-14 外,硬骨鱼类中还含有来源于 PSS II、具 22~28 个氨基酸残基的其他类型 SS。研究表明,在所有脊椎动物中,SS-14 具有高度同源性,其氨基酸序列相同,而 PSS I 和 PSS II 仅有约 30% 的同源性^[12]。因此,本实验利用兔抗哺乳动物 SS 血清反映出的免疫阳性细胞,仅代表了牙鲆体内一类 SS-14 分泌细胞。目前,由于国内对于鱼的 SS 抗体较难获得,大多采用兔抗哺乳动物 SS 血清。方之平等^[6]、舒妙安等^[7]在非鲫(*Tilapia nilotica*)的肠黏膜,白鲳(*Colossoma brachypomum*)、非鲫及黄鳍(*Monopterus albus*)的胃上皮和胃腺,黄鳍的食道上皮等部位发现 SS 分泌细胞。林树根等^[8-9]在大黄鱼和黑鲷的食道、胃肠各部黏膜中均发现 SS 分泌细胞。本研究采用 SABC 法对牙鲆消化道 SS 细胞进行了定位研究,仅在其胃黏膜和胰岛中发现 SS 分泌细胞,表明鱼类消化道 SS 分泌细胞的分布具有种属特异性。

细胞形态与其功能密切相关。陈吉龙等^[10]根据胃肠内分泌细胞有无胞质突起将其分为4种类型,并进一步讨论了细胞形态与功能的关系:I型细胞具腔分泌作用,II型细胞兼具腔分泌与旁分泌的功能,III型细胞具内分泌作用,IV型细胞具旁分泌作用。本实验结果表明,牙鲆胃黏膜中存在4种不同类型的SS分泌细胞。根据陈吉龙等的结论推断,贲门部的主要以内分泌和腔分泌方式为主,胃体部和幽门部的以旁分泌和腔分泌方式为主。因此,牙鲆的胃不仅是一个消化器官,而且还是一个复杂的内分泌器官。这提示了在养殖生产中,可利用强化饵料和某些条件刺激来调控鱼类的SS分泌和生理调节作用,以达到提高鱼类养殖产量的目的。

研究发现,鱼类的胰岛中含有较高比例的SS分泌细胞。Yang等^[13]利用兔抗人SS和兔抗鲑SS-25血清研究了尼罗罗非鱼胰岛SS分泌细胞。结果显示,尼罗罗非鱼胰岛SS分泌细胞所占比例高达44.9%(SS-14为21.8%,SS-25为23.1%)。McDonld等^[14]证实琵琶鱼的胰脏中含有大量SS分泌细胞,同时证实其释放SS的种类不止一种,分别由不同类型的SS细胞所分泌。Abad等^[15]也证明,金头鲷(*Sparus auratus*)胰岛中含有SS-14和SS-25分泌细胞。而本实验结果显示,牙鲆胰脏中SS分泌细胞的数量很少,这与所使用的兔抗哺乳动物SS血清不能检测由PSS II衍生的SS多肽有关^[13]。另外,采用相同类型的SS抗体,方之平等^[7]研究发现,非鲫胰脏的SS分泌细胞集中分布于胰岛中央,而白鲈的胰岛中则未见SS细胞分布。本实验结果显示牙鲆胰脏中的SS细胞零散地分布于胰岛细胞之间,与方之平报道的有所不同,表明鱼类胰脏中SS细胞的分布也具有种属特异性。

参考文献:

- [1] Patel Y C. The somatostatin receptor family[J]. Life Science, 1995,18(57):1 249—1 259.
- [2] 刘扬,王静凤,田树川,等.鱼类生长抑素的研究进展[J].海洋科学,2004,28(7):67—170.
- [3] Very N M, Knutson D, Kittilson J D, et al. Somatostatin inhibits growth of rainbow trout[J]. J Fish Biol, 2001, 59:157—165.
- [4] Sheridan M A, Eilertson C D, Kerstetter T H. Changes in plasma somatostatin associated with seawater adaptation and stunting of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* [J]. Aquaculture, 1998, 168:195—203.
- [5] Kao Y H, Youson J H, Holmes J A. Effects of somatostatin on lipid metabolism of larvae and metamorphosing landlocked sea lamprey, *Petromyzon marinus* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 111:177—185.
- [6] 方之平,潘黔生.两种有胃真骨鱼胃肠胰系统中内分泌细胞的鉴别与定位[J].华中农业大学学报,1997,16(6):594—598.
- [7] 舒妙安,徐海圣,朱有法,等.黄鲢胃肠的生长抑素分泌细胞及超微结构[J].水产学报,2002,26(3):202—216.
- [8] 林树根,王全溪,王寿昆.大黄鱼消化道内分泌细胞免疫组织化学的定位[J].福建农业学报,2005,20(4):238—242.
- [9] 林树根,杨志峰,王寿昆.黑鲷消化道内分泌细胞免疫组织化学的定位[J].福建农林大学学报,2006,35(1):77—81.
- [10] 陈吉龙,马海飞.发育生物学进展[M].北京:高等教育出版社,1994:108—118.
- [11] Moore C A, Kittilson J D, Ehrman M M, et al. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess two somatostatin mRNAs that are differentially expressed[J]. Am J Physiol, 1999, 277: R1 553—R1 561.
- [12] Conlon J M, Tostivint H, Vaudry H. Somatostatin- and uro-tensin II-related peptides: Molecular diversity and evolutionary perspectives[J]. Regul Peptides, 1997, 69:95—103.
- [13] Yang H, Morrison C M, Conlon J M, et al. Immunocytochemical Characterization of the Pancreatic Islet Cells of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 1999, 114:47—56.
- [14] McDonald J K, Greiner F, Bauer G E, et al. Separate cell Type That Express Two Different Forms of Somatostatin in Anglerfish Islets Can Be Immunohistochemically Differentiated [J]. J Histochem Cytochem, 1987, 35(2):155—162.
- [15] Abad M E, Garcia Ayala A, Lozano M T, et al. Somatostatin 14- and somatostatin 25-like peptides in pancreatic endocrine cells of *Sparus auratus* (Teleost): A light and electron microscopic immunocytochemical study [J]. Gen Comp Endocrinol, 1992, 86:445—452.

Immunocytochemistry study on somatostatin secreting cells in *Paralichthys olivaceus*

WANG Jing-feng, LIU Yang, ZHAO Qin, PANG Long, XUE Chang-hu

(Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Somatostatin (SS) was originally isolated from ovine hypothalamus and found to inhibit the release of growth hormone (GH) from the rat pituitary. SS is now well established to be a multifunctional peptide widely distributed throughout the central nervous system and peripheral tissues, playing vast physiological roles in neuromodulation and affecting various aspects of growth, development and metabolism in vertebrates. In the present study, Paraffin slices of whole digestive tract (including esophagus, stomach, pyloric cecum, whole intestine and anus), liver-pancreas, kidney, spleen and gonad of *Paralichthys olivaceus* were prepared, and somatostatin (SS) secreting cells were identified and located using rabbit anti-mammalian SS serum with SABC immunocytochemical method. The results show that SS secreting cells are only distributed in stomach and pancreatic islets. In stomach, SS secreting cells are dispersedly distributed among the epithelium of gastric mucous membrane, the bottom of gastric pits and around the neck of gastric glands. Densities of SS secreting cells in different area of stomach varied, which is the highest in the zone of fundus and proximal two thirds of the stomach, the moderate is in the cardia area, and the smallest is in the pylorus region. According to classifying method of endocrine cells on the basis of cytoplasmic protuberance at their bottom, four types of SS secreting cells can be distinguished in the stomach, and the odds presenting in various zone of stomach is also varied. Types III and I are dominating SS cells in the cardia, types IV and I are preponderant in the fundus, and types I and II are characteristic in the pylorus. It suggests that stomach of *P. olivaceus* is an important endocrine organ. In pancreas, SS secreting cells are scattered and dispersedly located in pancreatic islets. SS arises from a multigene family. In mammals, SS exists as two biologically active forms, SS-14 and its NH₂-terminal extension of 14 amino acids, SS-28. Both SS-14 and SS-28 are encoded by a common gene and processed in a tissue-specific way from a single precursor, preprosomatostatin I (PSS I). SS-14 has been identified with the same amino acid sequence in all vertebrate species. Besides PSS I, teleosts possess a second SS precursor (PSS II), producing a second somatostatin with 22–28 amino acid residues. Because of PSS I and PSS II sharing low amino acid identity, the peptide derived from preprosomatostatin II would not be detected by only anti-mammalian SS serum used. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 397–402]

Key words: immunocytochemistry; *Paralichthys olivaceus*; somatostatin; digestive tract; pancreatic islets

图版 I 说明

1. 胃贲门部黏膜上皮中多种形态的 SS 分泌细胞, $\times 290$; 2. 胃体部胃小凹及胃腺颈部周围的 SS 分泌细胞, $\times 580$; 3. 胰岛内圆形 SS 分泌细胞(↑), $\times 1\ 160$; 4. 胃腺颈部 SS 分泌细胞, 胞质内充满褐色分泌颗粒, 胞核无色(↑), $\times 1\ 160$; 5. 胃上皮中 I 型 SS 分泌细胞(↑), 具一端胞质突起, 伸向胃腔, $\times 1\ 160$; 6. 胃幽门上皮中 I 型 SS 分泌细胞, 细长胞突(↑)开口于胃腔, 有颗粒释放, $\times 1\ 160$; 7. 胃上皮中 II 型 SS 分泌细胞, 具两端胞质突起, 一端朝向胃腔, 另一端(↑)紧贴其下的血管, $\times 1\ 160$; 8. 胃上皮中 SS 分泌细胞, 一端胞突伸向胃腔, 另一端突起末端形成突触样膨大(↑), $\times 1\ 160$; 9. IV 型 SS 分泌细胞, 具短胞突(↑), $\times 1\ 160$; 10. I 型 SS 分泌细胞, 具锥形胞突(↑), 伸入腺腔分泌颗粒, $\times 1\ 160$; 11. 胃上皮中 III 型 SS 分泌细胞(↑), 无胞质突起, $\times 1\ 160$

GC: 胃腔或腺腔; GG: 胃腺; GP: 胃小凹; LP: 固有层; ME: 黏膜上皮; PI: 胰岛

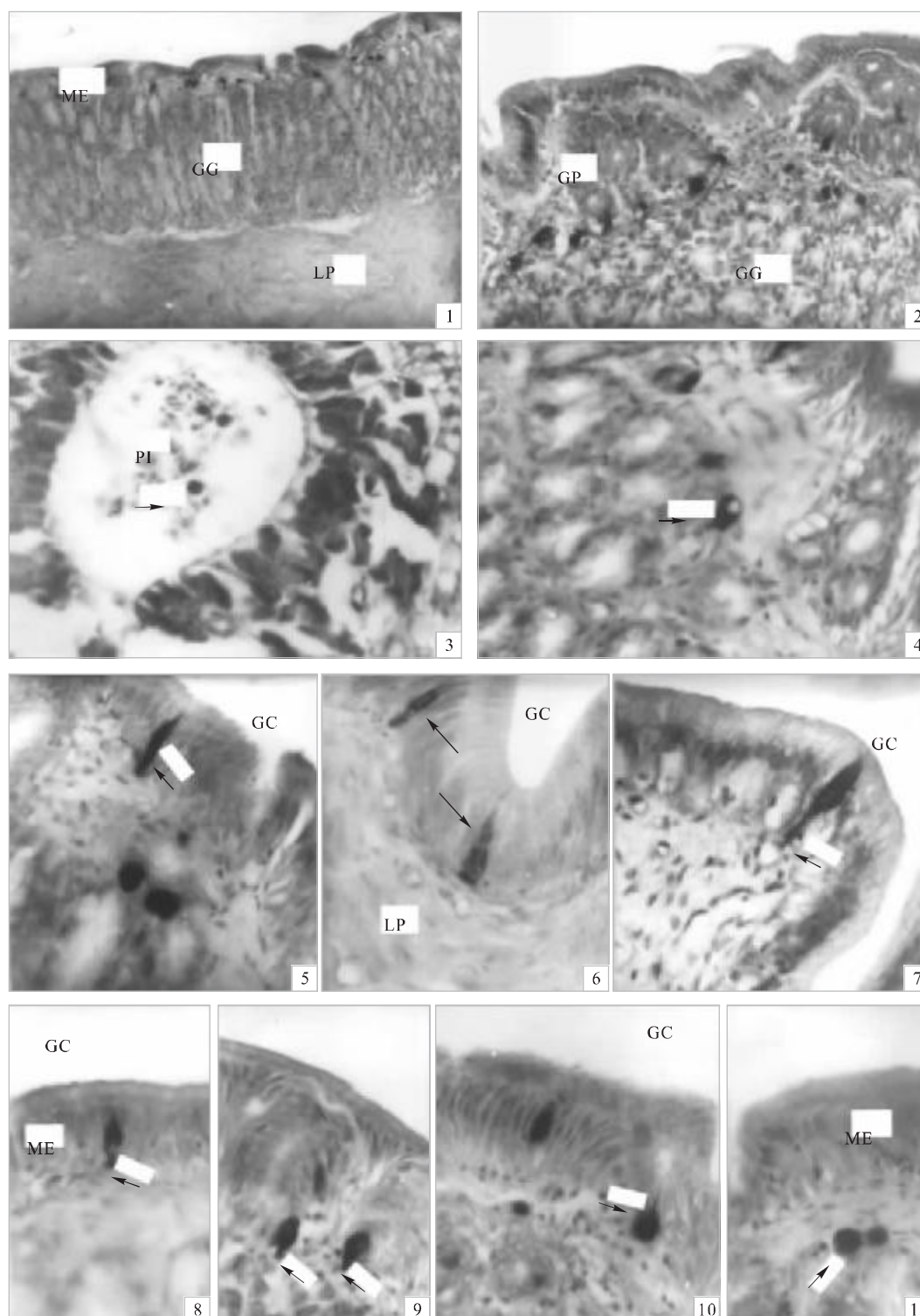
Explanation of Plate I

1: Different shapes of SS secreting cells among the cardia epithelium, $\times 290$; 2: SS secreting cells around gastric pits and the neck of gastric glands, $\times 580$; 3: SS secreting cells with round shape (↑) in pancreatic islets (PI), $\times 1\ 160$; 4: An SS secreting cell in the neck of gastric glands, with brown secreting granules in its cytoplasm and negative reaction in its nucleus (↑), $\times 1\ 160$; 5: Type I SS secreting cell with a cytoplasmic protuberance (↑) extending to gastric cavity, $\times 1\ 160$; 6: Type I SS secreting cell among the epithelium of pylorus with a long cytoplasmic protuberance (↑) extending to gastric cavity and releasing secreting granule, $\times 1\ 160$; 7: Type II SS secreting cell among mucous epithelium with two cytoplasmic protuberance, one extending to gastric cavity and the other (↑) keeping tightly close to blood vessel, $\times 1\ 160$; 8: SS secreting cell among the epithelium of stomach with a cytoplasmic protuberance extending to gastric cavity and the other end forming a synapse-like expansion (↑), $\times 1\ 160$; 9: Type IV SS secreting cell (↑) with a short cytoplasmic protuberance, $\times 1\ 160$; 10: Type I SS secreting cell with a coniform cytoplasmic protuberance (↑) extending to gland cavity, $\times 1\ 160$; 11: Type III SS secreting cell among mucous epithelium without any cytoplasmic protuberance (↑), $\times 1\ 160$.

GC: gastric cavity or gland cavity; GG: gastric gland; GP: gastric pit; LP: lamina propria; ME: mucous epithelium; PI: pancreatic islet.

王静凤等:牙鲆生长抑素分泌细胞的免疫细胞化学研究

WANG Jing-feng et al: Immunocytochemistry study on somatostatin secreting cells in *Paralichthys olivaceus*



图版 I (图版说明见文末)

Plate I (Explanation of plate I at the end of the text)