

嗜银细胞在菲牛蛭消化管中的形态 与分布特征

高胜涛^① 苏岩^{①②} 李芳^① 葛海龙^① 刘亚秋^① 王志坚^{①*}

① 西南大学生命科学学院, 水产科学重庆市重点实验室 重庆 400715;

② 重庆市中药研究院 重庆 400065

摘要: 运用 Grimelius 银染法对菲牛蛭 (*Poecilobdella manillensis*) 消化管内嗜银细胞的分布和形态进行观察, 并根据嗜银细胞的分布特点统计其分布密度。消化管除食道外各部位均有嗜银细胞分布, 细胞染棕色或黑色; 嗜银细胞基本位于上皮细胞之间和固有层内, 主要呈圆形、椭圆形、锥体形和长条形等多种形态; 部分细胞胞突明显, 细胞内可见黑色分泌颗粒。嗜银细胞分布密度为颚片最高, 嗦囊次之, 直肠最低, 食道内未检测出嗜银细胞。消化管各段嗜银细胞的形态特征和分布规律可能与其食性和消化生理活动密切相关。

关键词: 菲牛蛭; 消化管; 嗜银细胞; Grimelius 银染法; 形态

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2017) 02-331-07

Morphology and Distribution of Argyrophilic Cells in Digestive Tube of the Mexican Medical Leech (*Poecilobdella manillensis*)

GAO Sheng-Tao^① SU Yan^{①②} LI Fang^① GE Hai-Long^① LIU Ya-Qiu^① WANG Zhi-Jian^{①*}

① *The Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715;*

② *Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China*

Abstract: Grimelius' silver nitrate stain was used to investigate the morphology and distribution of argyrophilic cells in digestive tube of the Mexican Medical Leech (*Poecilobdella manillensis*). The distribution density of argyrophilic cells was counted according to the distribution characteristics. All the measured data were compared with Duncan multiple comparison using spss 17.0. The level of significant difference was set at $P < 0.05$. The results showed that argyrophilic cells did not exist in esophagus (Plate I : 5), but distributed throughout most of the other portions in different densities (Plate I). These cells were stained with brownish or black in the digestive tube. Argyrophilic cells in epithelium of lips had apophysis pointing to the oral cavity, and some of them had distinct cytoplasmic processes and inner cell visible black

基金项目 重庆市万盛区科技局应用开发类项目 (No. yykf-2014-002);

* 通讯作者, E-mail: wangzj1969@126.com;

第一作者介绍 高胜涛, 男, 硕士研究生; 研究方向: 资源动物学; E-mail: gaost1988@foxmail.com.

收稿日期: 2016-05-13, 修回日期: 2016-08-14 DOI: 10.13859/j.cjz.201702017

particles (Plate I : 1). Argyrophilic cells were observed in the jaw, with shapes of circle, ellipse, strip and so on (Plate I : 2, 3). Most argyrophilic cells in epithelium of crop and villus epithelium of intestine had apophysis pointing to the crop or intestine (Plate I 6 - 8), while a minority stretched their processes to the lamina propria (Plate I : 9), indicating the possible luminal secretion and endocrine functions of these cells. The density of argyrophilic cells in the jaw was the highest (117.63 ± 14.08), while that in the rectum was the lowest (2.63 ± 0.91). There was extremely significant difference between the two parts ($P < 0.05$). No argyrophilic cells were also observed in the esophagus (Table 1). Based on these results, we inferred that the morphology and distribution of argyrophilic cells in the digestive tube might be closely related to the feeding and digestive physiological activities of this leech.

Key words: Mexican Medical Leech, *Poecilobdella manillensis*; Digestive tube; Argyrophilic cells; Grimelius' silver nitrate; Morphology

消化道不仅是动物体消化和吸收的场所,更是最大、最为复杂的内分泌器官(El-Salhy et al. 1985),消化道中分布多种功能的内分泌腺,而这些腺体内的内分泌细胞可与神经系统相互配合,共同调控消化、吸收和机体其他生理代谢活动(方静等 2007, 章龙珍等 2012)。嗜银细胞属于消化道内分泌细胞中的一类,现已证实其广泛分布于从低等无脊椎动物到高等脊椎动物的肠道黏膜内(王晓平等 2003, 陈洪洪等 2008, Radenahmad et al. 2014),可分泌激素类物质,主要为胺和多肽类,刺激肠道分泌黏液、平滑肌的收缩以及血管的扩张等,以此来完成对动物体消化过程的调节(牛鑫鑫等 2013)。近年来,有关脊椎动物消化道嗜银细胞的研究已经较为深入(Ku et al. 2005, Gonzalez-Maeso et al. 2009, Freitas-Ribeiro et al. 2012, Maksud et al. 2013),而无脊椎动物嗜银细胞的研究相对较少,且主要集中于虾蟹类(陈洪洪等 2010)和昆虫类(陈洪洪等 2009)。菲牛蛭(*Poecilobdella manillensis*)属环节动物门(Annelida)蛭纲(Hirudinea)无吻蛭目(Arhynchobdellida),菲牛蛭是我国传统的中药材,其体内提取的水蛭素可治疗心脑血管疾病,大大减少病人的死亡率(周莹等 2013),因此,菲牛蛭具有极高的药用价值和养殖前景。但近来由于人为捕捞和环境破坏等因素使野生资源量急剧减少,加上养殖户对其基础生物学

知识的缺乏,使得大规模养殖技术难以突破。因此,本文以菲牛蛭为研究对象,采用改良的Grimelius银染法,对菲牛蛭消化管嗜银细胞的分布规律及其功能进行探究,以期从内分泌学和消化机能等角度为菲牛蛭的人工规模化养殖提供参考和基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用菲牛蛭于2014年9月购于广西钦州市,暂养于实验室玻璃缸中备用。随机取健康成体菲牛蛭9尾,称量体重(2.74 ± 1.71)g,将称重后的菲牛蛭置于冰盘内固定,低温麻醉后解剖,分别取出消化道各段,包括口、咽、食道、嗉囊、肠和直肠,剔除其附着物,每段截取0.5 cm左右,用0.7%的生理盐水冲洗干净,迅速投入10%中性福尔马林固定24 h,70%乙醇漂洗,石蜡包埋切片(厚度为5 μm)后用于银染处理。

1.2 改良型 Grimelius 银染法

常规石蜡切片脱蜡水洗,侵入预热的预先配制的硝酸银染液中作用3 h(60 $^{\circ}\text{C}$)。硝酸银染液配方,50 mg 硝酸银置入100 ml 0.1 mol/L的醋酸缓冲液中。切片再置入45 $^{\circ}\text{C}$ 的还原液(1%的对苯二酚和5%亚硫酸钠分别置入60 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中预热1 h后按1:1混合)中1 min,经5%的硫代硫酸钠处理2 min,蒸馏水漂洗后置

入亮绿染液 (0.1 g 亮绿置入 100 ml 95% 的酒精) 中复染 3 min, 常规脱水透明, 中性树胶封片。

1.3 观察和细胞计数

在显微镜 (Nikon DXM1200) 下观察嗜银细胞并拍照, 每一部位分别随机取 3 ~ 5 张切片, 共 10 个 400 倍视野 (物镜 40 ×, 目镜 10 ×) 统计嗜银细胞数目。

1.4 统计分析

所得数据采用 SPSS 17.0 软件进行处理, 用 Duncan 多重比较法进行统计学分析, 取平均值 ± 标准误 (Mean ± SE) 以表示内分泌细胞的密度, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

经改良型的 Grimelius 硝酸银染色后, 消化管内嗜银细胞被染成棕黑色或黑色, 细胞的主要形状有圆形、椭圆形和锥体形等, 部分细胞内明显可见黑色细小颗粒。背景细胞则呈棕黄色, 两者对比明显, 容易辨认。

2.1 消化管嗜银细胞的组织学分布和形态特征

消化管除食道部未发现嗜银细胞外, 其余各段均有分布, 且细胞形态、分布位置各不相同。口唇上皮细胞间嗜银细胞分布较为分散, 细胞多呈椭圆形或梭形, 易与其他细胞区分; 部分细胞形成的突起明显可见, 指向口腔面, 胞内含有细小黑色颗粒 (图版 I: 1)。颚片内层含较多嗜银细胞, 且和白色空泡状细胞均匀分布在弹性纤维之间, 细胞呈椭圆形、圆形和长条形等多种形态 (图版 I: 2, 3)。咽部嗜银细胞位于咽上皮细胞之间, 数量较少, 分布较散, 细胞主要呈圆形, 胞内可见黑色分泌颗粒 (图版 I: 4)。菲牛蛭食道未检出嗜银细胞 (图版 I: 5)。嗉囊段嗜银细胞分布较多, 且大多分布于上皮细胞基部, 少数分布于上皮细胞之间, 细胞多呈椭圆形和圆形, 少数为锥体形, 其中部分细胞内具黑色分泌颗粒, 形成的突起指向嗉囊腔 (图版 I: 6, 7)。肠道中嗜银细胞

多分布于上皮细胞之间, 少数位于上皮细胞基部, 细胞呈长条形、圆形和椭圆形, 形成的细胞突起从上皮细胞之间指向肠腔 (图版 I: 8), 部分上皮基部嗜银细胞形成突起指向肠腔反方向 (图版 I: 9)。直肠段嗜银细胞较少, 主要位于上皮细胞之间, 细胞形态单一, 多为椭圆形, 细胞形成的胞突指向肠腔, 胞内可见黑色细小颗粒 (图版 I: 10)。

2.2 消化管嗜银细胞的分布密度

菲牛蛭嗜银细胞分布密度整体出现两个峰值, 分别在颚片和嗉囊部, 颚片内嗜银细胞分布最多, 与其他各部差异显著 ($P < 0.05$), 食道中未检测出嗜银细胞, 由嗉囊到直肠部嗜银细胞的分布密度呈递减趋势, 嗉囊与咽、肠部差异不显著 ($P > 0.05$), 但与口腔和直肠差异显著 ($P < 0.05$)。对菲牛蛭消化管嗜银细胞多重比较统计结果见表 1。

表 1 菲牛蛭消化管嗜银细胞的分布密度
(平均值 ± 标准误)

Table 1 Distribution density of argyrophilic cells in the digestive tract of Mexican Medical Leech
(Mean ± SD)

分布 Distributed	平均分布密度 (个/400 × 视野) The average distributive density (Number of cells /400 times field)
口腔 Oral cavity	2.77 ± 0.68 ^a
颚片 Jaw	177.63 ± 14.08 ^c
咽部 Pharynx	5.73 ± 2.14 ^{ab}
食道 Esophagus	0
嗉囊 Crop	10.20 ± 1.93 ^b
肠 Intestine	6.40 ± 1.91 ^{ab}
直肠 Rectum	2.63 ± 0.91 ^a

同列数值中, 上标含不同小写字母表示组间差异显著 (Duncan 检验, $P < 0.05$)。

The values with different superscript letters within the same rank are significantly different (Duncan test, $P < 0.05$).

3 讨论

3.1 菲牛蛭消化管嗜银细胞形态与功能

消化道内分泌细胞分泌的激素, 其本质为

多肽和胺类,可用银染显示(胥维勇等 2006)。近年来学者们根据嗜银细胞的形态将其分为内、外两种分泌功能:行使内分泌功能的细胞多呈圆形、椭圆形,细胞若有胞突则一般指向固有膜;行使外分泌功能的细胞呈梭形、锥体形,胞突指向消化道腔内(Gershon 2013)。本研究检测到菲牛蛭消化管中分布多种形态的嗜银细胞,分布于上皮细胞之间的嗜银细胞多呈锥体形,且有明显的胞突指向消化管腔内,这说明细胞内的嗜银颗粒可能直接释放到消化管内,参与消化与吸收,起到调节消化功能的作用,故这类细胞行使外分泌的功能,此研究结果与范红军等(2012)对日本三角涡虫(*Lugesia japonica*)和杨兰英等(2012)对家蚕(*Bombyx mori*)消化管嗜银细胞的研究结果是相似的。此外,有些嗜银细胞存在于上皮细胞基部,主要呈圆形、椭圆形和长条形,细胞形成的突起指向固有层,且嗜银颗粒与突起相连并延伸较长,从形态学上看这些嗜银颗粒也许通过固有膜而进入血液循环,进而调控摄食行为,调节消化道运动以及起到细胞营养等作用(Josephson et al. 1973),所以,此类细胞行使内分泌的功能。张志强(2013)对两栖类、谢冰楠等(2012)对爬行类、王春蕾等(2015)对鸟类以及 Webster 等(2000)和 Favrel 等(1987)对无脊椎动物消化道嗜银细胞的研究中,都发现了行使内分泌功能的嗜银细胞。从研究结果来看,菲牛蛭消化管内嗜银细胞应该兼具内外两重分泌功能。

3.2 菲牛蛭消化管嗜银细胞分布规律

很多研究认为,消化道内嗜银细胞的分布规律与动物食性、生活环境等密切相关(陈洪洪等 2009, 2010, 王丽影等 2009)。本研究发现,菲牛蛭嗜银细胞分布最密集的部位为颚片,颚片上着生大量的唾液腺乳突(高胜涛等 2016),可分泌水蛭素——多肽类物质(杨潼 1996),在菲牛蛭摄食时颚片分泌活动旺盛,推测这可能与嗜银细胞的参与密切相关;其次为嗦囊,嗦囊内的嗜银细胞主要位于上皮细胞基

部,行使内分泌功能,在饥饿和饱食两种状态下,嗦囊体积变化较大,且嗦囊消化能力较差(高胜涛等 2016),其内存储的血液要进入肠道被吸收,所以,嗦囊内的嗜银细胞可能通过感受消化管内容物压力和组织局部内环境的刺激,将激素释放到血液,对食物顺利进入肠道和整个消化吸收过程起调控作用(马雪涛等 2012)。有学者研究发现,肠上皮受到理化刺激时,嗜银细胞会分泌激素作用于肠腔或周围细胞,调节消化吸收过程(Rombout 1985),肠是菲牛蛭整个消化管最主要的消化和吸收场所(高胜涛等 2016),菲牛蛭摄食一次可长时间不再进食(杨潼 1996),说明嗦囊内血液的消化和吸收较为缓慢,而这整个过程可能需要嗜银细胞分泌激素,作用于肠腔或周围细胞并对消化吸收的过程加以控制,进而维持其正常的生命活动。菲牛蛭直肠分布少量嗜银细胞,直肠内的嗜银细胞可能通过影响其他内分泌活动来共同完成对代谢废物的排泄、渗透压和离子平衡的调节作用(张小民等 2007)。菲牛蛭口腔率先接触到食物,此段分布的少量嗜银细胞可能与菲牛蛭的摄食行为有关,陈洪洪等(2010)对中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)消化道嗜银细胞的研究也得出相似的结果。咽部发达的肌肉用于吮吸作用,而咽部分布的嗜银细胞可能与咽神经细胞共同调节咽部肌肉的收缩,完成吮吸的过程。菲牛蛭食道粗短,只起到运输的作用,因此,并无嗜银细胞的分布。

总之,菲牛蛭消化管各段嗜银细胞形态与分布密度上的差异可能是由于各段行使的不同生理功能而决定的。

参 考 文 献

- El-Salhy M, Wilander E, Lundqvist M. 1985. Comparative studies of serotonin-like immunoreactive cells in the digestive tract of vertebrates. *Biomedical Research*, 6(6): 371-375.
- Favrel P, Van-Wormhoudt A, Studler J M, et al. 1987. Immunochemical and biochemical characterization of

- gastrin/cholecystokinin-like peptides in *Palaemon serratus* (Crustacea: Decapoda): intermolt variations. *General and Comparative Endocrinology*, 65(3): 363–372.
- Freitas-Ribeiro G M, Fonseca C C, Sartori S S R, et al. 2012. Endocrine cells and nerve ganglia of the small intestine of the Opossum *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Mammalia: Didelphidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84(3): 747–758.
- Gershon M D. 2013. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 20(1): 14–21.
- Gonzalez-Maeso J, Sealfon S C. 2009. Psychedelics and schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, 32(4): 225–232.
- Josephson R L, Altmann G G. 1973. Distribution of diazo-positive (argentaffin) cells in the small intestine of rats of various ages. *American Journal of Anatomy*, 136(1): 15–22.
- Ku S K, Seong S K, Lee L, et al. 2005. Changes of gastrointestinal argyrophilic endocrine cells in the COLO205 tumor-implanted Balb/c-nu/nu mice. *Journal of Veterinary Science*, 6(4): 267–271.
- Maksud F A N, Kakehasi A M, Barbosa A J A. 2013. Argyrophilic cell density in the oxyntic mucosa is higher in female than in male morbidly obese patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(4): 339–342.
- Radenahmad N, Boonyoung P, Kamkaew K, et al. 2014. Effects of young coconut juice on the numbers of argyrophilic endocrine cells in the gastrointestinal tract of male rats: Novel preliminary findings. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 36(6): 599–606.
- Rombout J. 1985. Function and origin of endocrine cells in gut and pancreas of teleosts. *Acta Microscopia*, 8(3): 329–335.
- Webster S G, Dirksen H, Chung J S. 2000. Endocrine cells in the gut of the shore crab *Carcinus maenas* immunoreactive to crustacean hyperglycaemic hormone and its precursor-related peptide. *Cell and Tissue Research*, 300(1): 193–205.
- 陈洪洪, 潘洪珍, 詹厅, 等. 2008. 克氏原螯虾消化道内分泌细胞的鉴别与定位. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 17(6): 583–587.
- 陈洪洪, 潘洪珍, 张盛周. 2009. 中华稻蝗消化道内分泌细胞的鉴别与定位. *昆虫学报*, 52(7): 749–754.
- 陈洪洪, 朱联九, 潘洪珍, 等. 2010. 中国对虾和日本沼虾胃肠道内分泌细胞的鉴别与比较. *水生生物学报*, 34(3): 642–646.
- 范红军, 李晶, 高伶俐, 等. 2012. 日本三角涡虫组织结构嗜银反应观察. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 40(2): 144–146.
- 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. *水生生物学报*, 31(5): 744–747.
- 高胜涛, 苏岩, 袁渊, 等. 2016. 菲牛蛭消化系统的组织学和组织化学研究. *水生生物学报*, 40(3): 514–523.
- 马雪泷, 唐鑫生, 吴仁红, 等. 2012. 凹耳蛙消化道组织学和嗜银细胞形态观察. *动物学杂志*, 47(1): 9–15.
- 牛鑫鑫, 咸振飞, 金晨晨, 等. 2013. 花背蟾蜍消化道 5-羟色胺细胞的分布及形态学特征. *动物学杂志*, 48(6): 912–918.
- 王春蕾, 王冰莹, 张婷婷, 等. 2015. 麻雀 (*Passer montanus*) 消化道嗜银细胞的分布及形态学观察. *黑龙江畜牧兽医*, 3(3): 190–192.
- 王丽影, 任媛, 刘超, 等. 2009. 白条草蜥消化道嗜银细胞的分布和形态学观察. *四川动物*, 28(2): 247–249.
- 王晓平, 谢文海, 李家洲. 2003. 蛤蚧消化道嗜银细胞的分布及形态学观察. *玉林师范学院学报*, 24(4): 91–93.
- 谢冰楠, 李丕鹏, 陆宇燕. 2012. 爬行动物消化道嗜银细胞的研究进展. *四川动物*, 31(3): 504–507.
- 胥维勇, 杨群, 范小莉. 2006. 显示神经内分泌细胞的染色方法. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 15(1): 106–109.
- 杨兰英, 刘再群, 王子茹, 等. 2012. 家蚕消化管内桑叶的银染法研究. *四川动物*, 31(1): 108–112.
- 杨潼. 1996. 中国动物志: 环节动物门 蛭纲. 北京: 科学出版社, 120–122.
- 张小民, 郭亚平, 马恩波. 2007. 蝗虫消化道结构的比较研究. *动物分类学报*, 32(3): 643–648.
- 张志强. 2013. 两栖类消化道嗜银细胞和 5-羟色胺细胞的研究进展. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 22(2): 172–175.
- 章龙珍, 杨金海, 庄平, 等. 2012. 长鳍篮子鱼消化道内分泌细胞的免疫组织化学鉴别和定位. *海洋渔业*, 34(1): 39–44.
- 周莹, 何志龙, 孔毅. 2013. 凝血酶抑制剂的进展. *中国药业*, 22(12): 9–11.

图 版 说 明

菲牛蛭消化系统不同部位嗜银细胞形态与分布

1. 口唇横切, $\times 40$; 2. 顎片横切, $\times 20$; 3. 顎片横切, $\times 40$; 4. 咽横切, $\times 20$; 5. 食道横切, $\times 20$; 6. 嗉囊横切, $\times 20$; 7. 嗉囊横切, $\times 40$; 8. 肠横切, $\times 20$; 9. 肠横切, $\times 40$; 10. 直肠横切, $\times 20$ 。箭头示嗜银细胞。

Explanation of Plate

Distribution and morphological observation of argyrophilic cells along the digestive tract of Mexican Medical Leech

1. Cross-cutting of lips, $\times 40$; 2. Cross-cutting of jaw, $\times 20$; 3. Cross-cutting of jaw, $\times 40$; 4. Cross-cutting of pharynx, $\times 20$; 5. Cross-cutting of esophagus, $\times 20$; 6. Cross-cutting of crop, $\times 20$; 7. Cross-cutting of crop, $\times 40$; 8. Cross-cutting of intestine, $\times 20$; 9. Cross-cutting of intestine, $\times 40$; 10. Cross-cutting of rectum, $\times 20$. Arrow shows argyrophilic cells.

EC. 食道腔; EP. 上皮; IC. 肠腔; J. 顎片; L. 口唇; PC. 咽腔。

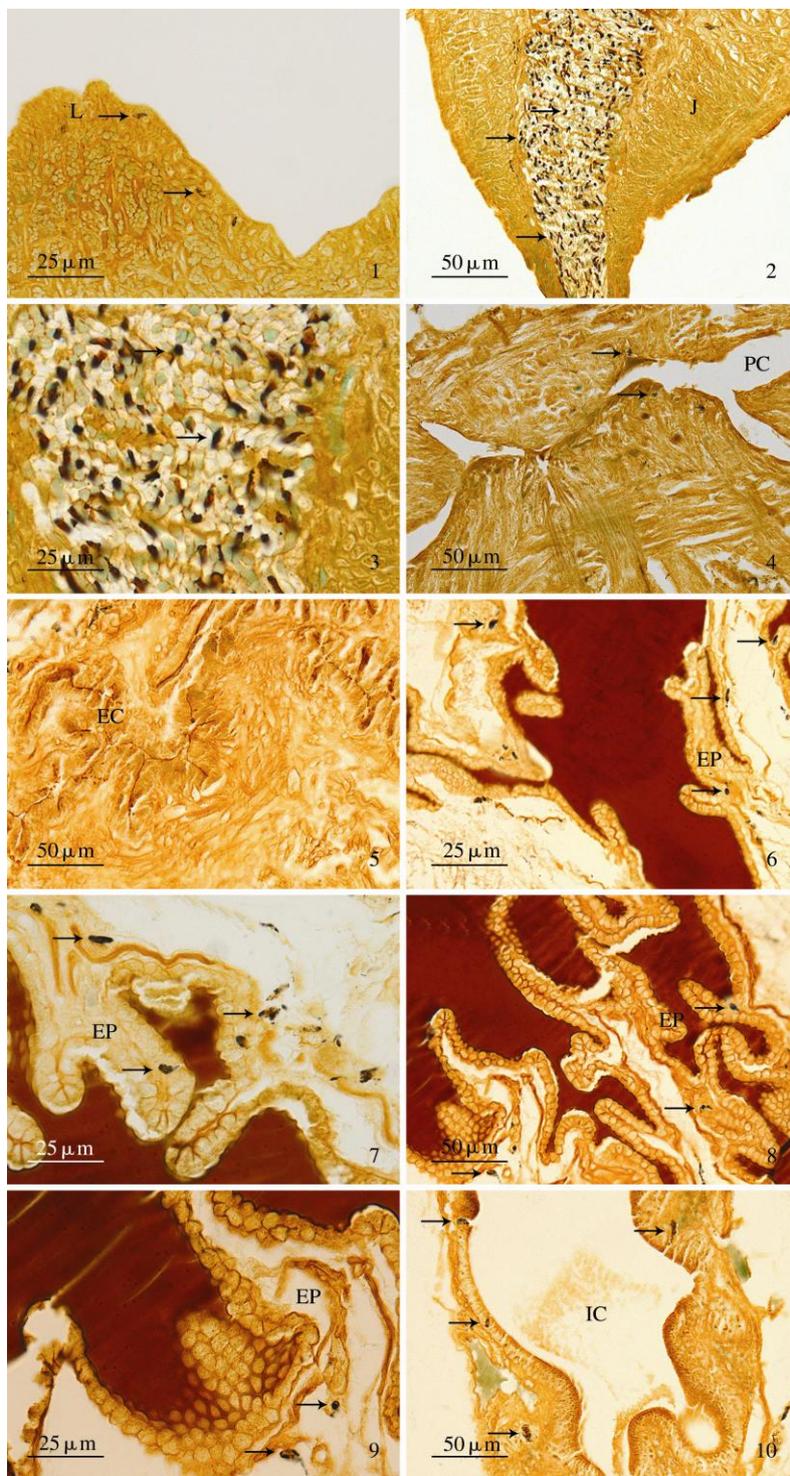
EC. Esophagus cavity; EP. Epithelium; IC. Intestine cavity; J. Jaw; L. Lips; PC. Pharyngeal cavity.

高胜涛等：嗜银细胞在菲牛蛭消化管中的形态与分布特征

图版 I

GAO Sheng-Tao *et al.*: Morphology and Distribution of Argyrophilic Cells in Digestive Tube of the Mexican Medical Leech (*Poecilobdella manillensis*)

Plate I



图版说明见文后