

爬行动物消化道内分泌细胞的 免疫组织化学研究概况*

张志强 单玉喜 吴孝兵

(安徽师范大学生物学系 芜湖 241000)

关键词 爬行动物 消化道 内分泌细胞 免疫组织化学

中图分类号 Q952 文献标识码 A 文章编号 0250-3263(2000)03-50-05

消化道粘膜是脊椎动物体内最大、最复杂的内分泌器官,由于各种内分泌细胞弥散分布于非内分泌细胞之间,给研究带来了很大的困难^[1]。随着蛋白质化学的发展以及放射免疫测定和免疫组织(细胞)化学技术的广泛应用,哺乳类研究进展迅速,但爬行动物较少研究。本文主要综述了国内外近30年用免疫组织(细胞)化学技术对爬行动物消化道内分泌细胞分布的研究。爬行动物在脊椎动物的进化上处于特殊的位置,对其消化道内分泌细胞进行研究可为消化生理提供形态学依据,有利于探讨其分布与动物进化、生活环境和食性之间的关系。

1 爬行动物消化道内分泌细胞的分布

根据胃肠激素化学结构上的相似性,一般可分为胃素族、胰液素族和P物质族^[1]。

1.1 胃素族 这一族包括胃泌素和胆囊收缩素(CCK)。胃素免疫反应细胞曾被报道发生于距腿陆龟(*Testudo graeca*)的胃底^[2]。这些细胞与胃素抗血清的C末端发生反应,但不与N端或胃素分子的中间部分反应。在对草蜥(*Mabuya quinquetaeaiata*)^[3]和金氏胎生蜥(*Egernia kingii*)^[4]的研究中发现,胃底部的胃素细胞的胃素抗血清可特异性地与胃素分子的C端和中间部分分别反应^[5]。然而,胃素细胞在用胃素抗血清孵育后观察到的指向C端的数量大大超过了指向胃素分子中间部分的数量。由于在胃中未见CCK的免疫反应,所以可推断有两种类型的胃素细胞存在于蜥蜴的胃

中。第一种类型含有的胃素分子有与哺乳动物胃素分子相似的C末端和中间部分。第二种类型仅含有胃素分子的C末端。

Larsson和Rehfeld^[2]在距腿陆龟的十二指肠和空肠中曾发现CCK细胞对胃素特异性抗血清的C末端和CCK-33分子的25~30序列有免疫反应。这个结果在草蜥^[3]和金氏胎生蜥^[4]的小肠上也得到了证实。草蜥小肠的内分泌细胞可与胃素分子特异性抗血清的C末端和CCK分子的中间部分(9~20)发生反应。一种抗血清已知可特异性地与CCK-33分子的19~25序列反应^[3],此反应的缺乏,排除了草蜥CCK分子中此序列的存在。另一种仅含有CCK分子的9~20序列的细胞类型看起来好像来源于直肠,因为这种细胞类型对其它的抗胃素或抗CCK的血清没有显示出任何免疫反应。

Masinf^[6]在蛇的十二指肠和小肠的所有区域都看到了含有胃素/胆囊收缩素(Gastrin/CCK)样激素的细胞,这些细胞呈伸长型,并与消化腔明显相通。

在密河鳄(*Alligator mississippiensis*)中,含有胃素的细胞见于胃窦区、十二指肠、空肠和

*安徽省自然科学基金资助(No. 99042419)和安徽省教委科学研究基金资助(No. 96JL0036);

第一作者简介 张志强,男,26岁,硕士,研究方向:两栖爬行动物学;

收稿日期:1999-07-06,修回日期:1999-10-18

回肠,但结肠中未见,在外周神经纤维中也未见胃素免疫反应细胞^[7]。这与 Dimaline 的资料相符^[8]。Dimaline 报道了尼罗鳄(*Crocodylus niloticus*)胃中胃素和胆囊收缩素存在的 3 种独立形式。C 末端区域是被保存的共同免疫区,因而联结起 CCK-33、CCK-8 和雨蛙素。另外,在铜蜥(*Chalcides chalcides*)和马达加斯加蜥蜴(*Zoonosaurus madascariensis*)以及距腿陆龟、里海拟水龟(*Mauremys caspica*)和蓝斑蜥蜴(*Lacerta lepida*)的消化道中亦有胃素分布的报道^[10,11]。CCK 阳性细胞在陆龟属^[2~11]仅存在于小肠中,在草蜥中见于小肠和大肠。据此,有人提出在爬行动物中胃窦区含有胃素样肽,而在小肠中则含有 CCK 样肽。但也有例外情况发生,如吴孝兵等^[12]在扬子鳄(*Alligator sinensis*)胃未见胃泌素细胞。

1.2 胰液素族 这一族包括胰液素、高糖素、抑胃肽(GIP)和血管活性肠肽(VIP)。

1.2.1 胰液素(secretin):曾有研究表明在爬行动物肠中有胰液素样生物活性物质^[13]。胃底部胰液素免疫反应细胞的发现证明了以前的观察^[3]。但在其它几种被研究过的蜥蜴中均未见到胰液素阳性细胞^[4~10]。

Buchan 等人^[7]在密河鳄的十二指肠粘膜上也见到了胰液素细胞。而在鱼类^[13]和两栖类^[14]则未见。令人惊奇的是,在几种无脊椎动物的神经纤维和细胞体内均观察到胰液素样肽,而在一些脊椎动物的外周神经系统却并未发现胰液素^[13]。

1.2.2 高糖素:一般将胰腺、胃粘膜和血浆中的免疫反应性物质称为免疫反应性高糖素(immuno reactive glucagon, IRG);肠粘膜中的类似物称为高糖素样免疫反应物(glucagon-like immunoreactants, GLI)。文献中,也有将 IRG 和 GLI 统称为 GLI 的。1976 年, Sundby 等人从猪肠提取液中分离、纯化出一种大分子肠 GLI,称为高糖素样免疫反应百肽(glicentin),以下简称 GLI-百肽,亦称 GLI-I,它是由 100 个氨基酸残基组成的多肽^[15]。

Buchan 等人^[7]曾对密河鳄的消化道进行

研究,发现胰高糖素、肠高糖素和 GLI-百肽中, GLI-百肽不发生阳性反应。胰高糖素在胃窦粘膜上有分布,但在大、小肠中则没有分布。吴孝兵等^[12]在扬子鳄消化道未检出胰高糖素。肠高糖素在胃底腺和从空肠、回肠到结肠的粘膜上均有大量分布。在胃底部,胰高糖素在胃底腺中部 1/3 处的数量最多,并与胃腔无联系。而肠高糖素在小肠中则集中于隐窝基部,并与消化腔有明显的联系。GLI-百肽抗血清(R64)反应的缺少揭示在密河鳄中肠高糖素的 N 末端延伸的序列与猪的不同^[7]。

在草蜥中,高糖素免疫反应细胞仅在胃底部有分布,它们呈烧瓶状,位于腺上皮细胞间散乱分布^[3]。而在铜蜥和马达加斯加蜥蜴中,含有高糖素的细胞仅偶见于肠上皮中^[10]。金氏胎生蜥中则根本未见到含有高糖素的细胞^[4]。

在对三种爬行动物的研究中, Perez-Tomas 等人^[11]发现含有高糖素的细胞大量分布于消化道中。而 Masin^[6]在对蛇小肠的研究中,未发现高糖素的存在。

1.2.3 抑胃肽(gastric inhibitory peptide, GIP) 抑胃肽又称葡萄糖依赖性胰岛素释放肽(glucose-dependent insulinotropic polypeptide)^[16]。

GIP 免疫反应细胞在圆口类、软骨鱼、硬骨鱼和两栖类的胃肠道粘膜上有分布^[13,17,18]。GIP 在爬行动物胃肠道中存在的报道很少,只在草蜥小肠中发现有局部分布^[3],草蜥小肠中 GIP 的存在弥合了种系发生链的缝隙,显示出 GIP 在所有脊椎动物各纲中胃肠道粘膜上均有发生。密河鳄中亦缺少 GIP 免疫反应细胞^[7]。这说明不同的固定方法以及 GIP 序列发生改变都将影响 GIP 免疫反应细胞的成功检测^[9]。

1.2.4 血管活性肠肽(VIP) Buchan 等^[7]用免疫细胞化学的方法证明了密河鳄整个胃肠道中有大量的 VIP 神经分布。在胃中,可见到异常丰富的神经分布覆盖在上皮表面。吴孝兵等^[12]在扬子鳄中发现, VIP 细胞主要分布于胃贲门部,少数见于胃体和胃幽门部。但在蛇^[6]和另外三种爬行动物^[11]的研究中,却没有发现

VIP 免疫反应神经纤维和细胞体。对蜥蜴的研究结果也不一致。草蜥^[3]和金氏胎生蜥^[4]中发现了 VIP 免疫反应神经纤维和细胞体,另外几种蜥蜴却未发现^[10,11]。

Masinf^[6]在三种蛇的观察中证实 VIP 只存在于毒蝰(*Viper aspis*)的小肠终神经内,另外两种蛇中则未见 VIP 的分布。

1.3 P 物质族 这一族包括 P 物质、神经降压素、蛙皮素以及与蛙皮素有关的几种肽^[1]。

1.3.1 P 物质(substance P) 密河鳄中 P 物质免疫反应限于外周神经内分布,阳性纤维见于固有层和肌层以及粘膜下丛和肠肌丛的细胞体^[7]。但在其它爬行动物,如在草蜥^[3]和扬子鳄中^[12]未见 P 物质的分布。

1.3.2 蛙皮素(bombesin) 草蜥中蛙皮素免疫反应细胞仅见于胃底部,呈圆形或楔形,分布于管状腺中^[3]。密河鳄中蛙皮素免疫反应粘膜细胞在胃贲门区数量多,而在小肠中未见,只在粘膜下丛和肌层偶见免疫反应神经纤维^[7]。最近,在铜蜥和马达加斯加蜥蜴的胃部也发现了闭合型的蛙皮素免疫反应细胞^[10]。

1.3.3 神经降压素(neurotensin, NT) 草蜥 NT 免疫反应细胞分布在胃底和回肠中。在胃底 NT 细胞呈楔形,位于管状腺中。在回肠,呈柱状分散于粘膜细胞间^[3]。这与其它蜥蜴胃肠道粘膜中的分布方式一致^[19]。但在金氏胎生蜥中未见 NT 免疫反应细胞^[4]。

Perez-Tomas 等人^[11]在三种爬行动物的肠中发现了 NT 免疫反应细胞。

综上所述,爬行动物胃肠激素的分布特点不尽相同。方之平等^[20]认为,有胃动物的消化道内分泌细胞部分集中于胃中,肠中分布的种类则相应减少,这也适用于爬行动物。一些胃肠激素未有发现,究其原因,一是可能因为爬行动物的分子形式不同于哺乳类,而所用的抗血清又都是哺乳类的;二是可能由于这些激素含量太少而被漏检;三是可能由于固定方法不当,而使抗原失活^[3]。

2 胃肠激素与动物进化的关系

每一种胃肠激素都有多种分子形式,其分

子形式的异质性,反映它们在动物进化过程中曾丢失或保留了某些结构^[1]。脊椎动物各纲胃肠激素化学结构上的相同性很可能反映进化上的共同来源^[1]。

动物进化到两栖类,似才开始合成胃素和胆囊收缩素^[1]。蜥蜴中,除了 C 末端之外,胃素分子的中间部分也有免疫反应,说明在脊椎动物进化过程中, C 末端和胃素分子的中间部分共同被保存^[3,4]。Larsson 和 Rehfeld^[5]认为胃泌素和胆囊收缩素在两栖类中作为独立的实体不存在,而是被一个单肽取代,此单肽可能与胃素族的祖先分子有关,它可能是雨蛙素样肽,因为雨蛙素是从蛙皮肤中分离出来的,它与胃素和胆囊收缩素具有同一 C 端 10 肽的序列。

有研究发现,在 P 物质族中,神经降压素(NT)分子在整个进化过程中是保守的。草蜥与哺乳类神经降压素分子有相同的 C 末端^[3]。

胰液素族在种族发生上出现很早,在某些无脊椎动物的肠道中就出现了。GLU 具有多种分子形式,从胰腺、空肠提取液以及猪 GLI-百肽分子结构和分布的研究都完全支持关于胰高糖素的肠 GLI 具有共同前身的假说。A 和 L 细胞中存在共同的前身,说明它们在进化上可能有共同的祖先,在低等动物,仅在肠道中发现有 GLI,动物进化到较高等级时,才出现 A 细胞和胰高糖素,由此说明,它们的共同祖先可能是肠道细胞^[15]。

草蜥^[3]和金氏胎生蜥^[4]的研究结果表明,抑胃肽、肠促胰液肽和高糖素在草蜥消化道内都存在,而在金氏胎生蜥中均未发现。它们是同一科的成员,该区别导致了一个假说的出现,即在金氏胎生蜥的进化过程中,控制胃肠内分泌细胞获得的基因可能被抑制,并且在将来的家系中可能再次表达出原来的序列^[4]。

曾有人推测脊椎动物激素的进化与动物进化呈平行关系,以上的证据也说明了这一点,但越来越多的资料显示,这种关系并不明显,甚至常有反常的现象出现。例如一种无尾两栖类豹蟾蜍(*Bufo regularis*)的胰液素免疫反应细胞在胃和小肠中都存在。而绝大多数被研究过的

两栖动物和爬行动物中却都未能发现^[17]。更令人不解的是,八目鳗和人这两种远缘关系的种类,其内分泌系统却很相似^[21]。

3 胃肠激素与生活环境和食性的关系

爬行动物各种胃肠激素在消化道内的分布常出现明显的种间差异。如草蜥和金氏胎生蜥中胰液素、高糖素和抑胃肽的分布^[3,4],毒蛇和游蛇血管活性肠肽的分布^[6]。密河鳄^[7]和扬子鳄^[12]胃泌素的分布。这种差异,可能与它们祖先的生活习性有关,反映它们对不同的环境条件的适应。

杨贵波等^[22]在大鼠的研究中认为,改变食物组成不仅影响胃肠的大体形态,也影响胃肠内分泌细胞的数量和分布。在动物进化过程中,一个种群中胃肠内分泌细胞的数量和分布会发生与其食性相关的适应。长期自然选择的结果,导致不同食性的物种胃肠内分泌细胞的数量和分布型不同。唐晓雯等^[23]在对不同的脊椎动物 5-HT 的研究中也证明,消化道内 5-HT 免疫染色细胞密度并不与动物进化呈平行关系,而可能与生活环境有关。爬行动物目前尚未见这方面的报道,但胃肠内分泌细胞的数量和分布可能与生活环境中食物的丰欠有关,另外,一些爬行动物喜吞食、暴食,也可能会影响胃肠内分泌细胞的数量和分布。这方面的研究,还有待于将来提供更多的证据来证明。

参 考 文 献

[1] 王志均. 内分泌学现状: 总观. 见: 王志均主编. 胃肠激素. 北京: 科学出版社, 1985. 1~13. "

[2] Larsson, L. I., J. F. Rehfeld. Evidence for a common evolutionary origin of gastrin and cholecystokinin. *Nature*, 1977, **269**: 335~338.

[3] Grimelius. The endocrine cells of the gastrointestinal mucosa of a squamate reptile, The grass lizard (*Mabuia quinquetaeniata*). A histological and immunohistochemical study. *Biomedical Research*, 1981, **2**(6): 639~658.

[4] Arena, P. C., K. C. Richardson, J. Yamada. An immunohistochemical study of endocrine cells of the alimentary tract of the King's skink (*Egernia kingii*). *J. Anat.*, 1990, **170**: 73~85.

[5] Larsson, L. I., J. F. Rehfeld. Characterization of antral gastrin cells with region-specific antisera. *J. Histochem. Cytochem.*, 1977, **25**: 1317~1321.

[6] Masini, M. A. Immunohistochemical localization of gut peptides in the small intestinal of snakes. *Bas. Appl. Histochem.*, 1986, **30**: 317~324.

[7] Buchan, A. M. J., V. Lance, J. M. Polak. Regulatory peptides in the gastrointestinal tract of *Alligator mississippiensis*. *Cell Tissue Res.*, 1983, **231**: 439~449.

[8] Dimaline, R. Purification and characterization of a peptide related to gastrin and CCK from the stomach of a reptile *Crocodilus niloticus*. Presented at the 4th International Symposium on Gastrointestinal Hormones. Stockholm Sweden, 1982.

[9] Larsson, L. I., J. F. Rehfeld. Evolution of CCK-like hormones. In: Bloom, S. R. ed. Gut hormones Churchill Livingstone, Edinburgh, 1978. 68~73. "

[10] Morescalchi, A. M., M. Gaccioli, G. Faraldi *et al.* The gastro-enteric-pancreatic neuroendocrine system in two reptilian species: *Chalcides chalcides* and *Zoomosaurus madascariensis* (Sauridae). *Eru. J. Histochem.*, 1997, **41**(1): 29~40.

[11] Perez-Tomas, R., J. Ballesta, L. M. Pastor *et al.* Comparative immunohistochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine system of three reptiles. *Gen. Comp. Endocrinology*, 1989, **76**(2): 171~191.

[12] 吴孝兵, 张盛周, 陈壁辉等. 扬子鳄消化道内分泌细胞的免疫组织化学研究. *动物学报*, 1999, **45**(2): 155~161.

[13] Van Noorden, S., S. Falkmer. Gut-islet endocrinology: some evolutionary aspects. *Invest Cell Pathol.*, 1980, **3**: 21~35.

[14] Alison, M. J., Buchan, M. Julia *et al.* Gut hormones in *Salamandra salamandra*. An immunocytochemical and electron microscopic investigation. *Cell Tissue Res.*, 1980, **211**: 331~343.

[15] 张席锦, 高糖素. 见: 王志均主编. 胃肠激素. 北京: 科学出版社, 1985. 175~196. "

[16] 段瑞冬, 梅懋华. 抑胃肽. 见: 王志均主编. 胃肠激素. 北京: 科学出版社, 1985. 155. "

[17] El-salhy, M., L. Grimelius, E. Wilnder *et al.* Histological and immunohistochemical studies of the endocrine cells of the gastrointestinal mucosa of the toad (*Bufo regularis*). *Histochemistry*, 1981, **71**: 53~65.

[18] Falkmer, S., R. Ebert, R. Arnold *et al.* Some phylogenetic aspects of the enteroinsular axis with particular regard to the appearance of the gastric inhibitory polypep-

- tide. *Front Hormone Res.*, 1980, **7**: 1~6.
- [19] Reinecke, M., K. Almasan, R. Carraway *et al.* Distribution patterns of neurotensin-like immunoreactive cells in the gastrin-intestinal tract of higher vertebrates. *Cell Tissue Res.*, 1980, **205**: 383~395.
- [20] 方之平, 潘黔生, 赵雅心. 鲇、乌鳢和大口黑鲈消化道粘膜中内分泌细胞的定位及比较. *中国动物学研究*, 1999, **1**: 031~1 035.
- [21] 本特利, P. J. 著(方永强, 汪敏, 周宗澄译). 脊椎动物比较内分泌学. 北京: 科学出版社, 1984. 7.
- [22] 杨贵波, 王平. 改变食物组成对大鼠胃肠道嗜铬细胞的影响. *动物学报*, 1997, **43**(1): 55~60.
- [23] 唐晓雯, 郑一守. 不同脊椎动物消化道内 5-羟色胺免疫染色细胞的分布. *动物学研究*, 1991, **12**(3): 293~298.