

蛇岛蝮蛇消化道 5-羟色胺细胞的形态与分布

王立平 刘鹏 吴玉群 甄靓靓 李淑兰* 赵文阁

(辽宁蛇岛老铁山自然保护区管理处 大连 116041; 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院 哈尔滨 150080;
东北林业大学野生动物资源学院 哈尔滨 150040)

摘要: 采用 ABC(avidin-biotin-peroxidase complex)免疫组织化学方法,观察蛇岛蝮蛇(*Gloydius shedaoensis*)消化道内 5-羟色胺(5-HT)免疫阳性内分泌细胞的分布及形态。结果显示,5-羟色胺细胞从食管到直肠各段均有分布。细胞分布密度呈波浪式,其中胃贲门部分布密度最高(7.15 ± 2.38),直肠部次之(4.55 ± 3.14),食管部最低(1.2 ± 0.71)。5-HT 阳性细胞广泛分布于消化道上皮细胞之间、上皮基部、腺泡上皮细胞之间以及固有膜内。形态多样,呈圆形、锥体形、梭形等。分析认为蛇岛蝮蛇消化道 5-HT 细胞具有内、外分泌两种作用途径,并且其密度分布可能与其食性、生存环境有关。

关键词: 蛇岛蝮蛇; 5-HT 细胞; 消化道

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008)06-117-06

The Morphology and Distribution of 5-HT Cells in Digestive Tract of *Gloydius shedaoensis*

WANG Li-Ping LIU Peng WU Yu-Qun ZHEN Liang-Jing
LI Shu-Lan* ZHAO Wen-Ge

(Administrative Department of Snake Island and Laotieshan Mountain Nature Conservation, Dalian 116041;
Harbin Normal University, Department of Biological Science and Biotechnology, Harbin 150080;
College of Wildlife Resource, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Immunohistochemical localization and morphology of 5-Hydroxytryptamine immunoreactive cells (5-HT cells) in the digestive tract of *Gloydius shedaoensis* have been investigated by using the ABC(avidin-biotin-peroxidase complex) immunostaining technique. The 5-HT positive immunoreactive cells could be observed throughout the digestive tract, from esophagus to rectum. The density curve appeared wavelike and the cell density (number/field of vision) was the highest in the cardiac part of stomach (7.15 ± 2.38), followed by the pyloric part of the rectum (4.55 ± 3.14), and the lowest cell density was found in the esophagus (1.2 ± 0.71). The 5-HT cells distributed at the bottom of epithelial cells, between epithelial cells, between glandular epithelial cells or in the lamina propria. The 5-HT cells had different shapes including round, shuttle-like, tapering and other shapes. We suggest that 5-HT positive immunoreactive cells in the digestive tract of *G. shedaoensis* should have both endocrine and exocrine functions, and the distributive density is related to its feeding habit and life environment in *G. shedaoensis*.

Key words: *Gloydius shedaoensis*; 5-HT cells; Digestive tract

基金项目 辽宁省大连市科技局科技计划项目(大科技发[2004]165号);

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

第一作者介绍 王立平,男,工程师;研究方向:蛇岛蝮蛇生态、生理学; E-mail: wanglipingshedao@163.com。

收稿日期:2008-02-28,修回日期:2008-09-21

消化道 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 细胞属内分泌细胞,其分泌的 5-HT 具有十分重要的生理功能,与动物的摄食、胃肠分泌和运动都有关系^[1]。随着检测 5-HT 的免疫组织化学方法的建立^[2],哺乳类动物消化道内 5-HT 免疫活性细胞的定位研究较广泛^[3-5]。目前,关于爬行动物消化道内分泌细胞的免疫组织化学的研究,国内外已有一些报道^[6-10],现有的研究表明爬行动物消化道内分泌细胞的类型和分布不仅与哺乳动物不同,而且各个种间亦存在着较大的差异。蛇岛蝮蛇 (*Gloydius shedaoensis*) 隶属蛇亚目 (Serpentes) 蝮科 (Viperidae) 蝮亚科 (Crotalinae) 亚洲蝮属,剧毒,是世界珍稀濒危物种,现存 20 281 余条^[11],仅生活在渤海中 0.73 km² 的蛇岛上,主要以迁徙的候鸟为食。迄今,蛇岛蝮蛇消化道内分泌细胞的免疫组织化学研究未见报道。本文拟通过对蛇岛蝮蛇消化道内 5-HT 细胞的研究,了解生活在独特环境中具有特殊食性的蛇岛蝮蛇消化道 5-HT 细胞形态与分布情况,进一步探讨爬行类消化道内分泌细胞的分布规律,丰富消化道比较内分泌学的资料,同时,为蛇类消化生理学研究提供形态学基础。

1 材料与方法

1.1 材料 蛇岛蝮蛇 4 条,采自大连蛇岛。乙醚麻醉后,立即按下述消化道各段取材:食管、胃贲门部、胃体、胃幽门部、十二指肠、空肠、回肠、直肠,先用生理盐水快速冲洗,然后用改良的 Bouin's 液固定 48 h,常规石蜡切片,厚 6 μm。

1.2 试剂 5-HT 抗血清(兔抗人)和 VECTASTAIN ABC 免疫组织化学试剂盒由美国 ZYMED 公司生产(代号:ZA-0231)。

1.3 免疫组织化学方法 将切片常规脱蜡复水,入 37 的 H₂O₂-甲醇溶液孵育 15 min,消除内源性过氧化物酶的活性,然后入蒸馏水漂洗 5 min, PBS 漂洗 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 漂洗 3 ×5 min,滴加二抗(羊抗兔 IgG 抗血清,稀释倍数 1 200),孵育 45 min, PBS 漂洗 3 ×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 漂洗 3 ×5 min。滴加 DAB-H₂O₂ 显色后,冷 PBS 冲洗,冷蒸馏水、自来水冲洗。苏木精复染,常规脱水、透明,封固。阴性对照以正常血清取代一抗进行孵育,其余步骤同上。

1.4 拍照及细胞计数 用 Leica DC500 DMLB2 显微镜成像系统拍照。Olympus BH2 型显微镜下观察,并对每个部位的切片随机取 20 个(物镜 40 ×,目镜 10 ×)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。

2 结果

ABC 法显示 5-HT 免疫活性细胞的胞质呈棕黑色的均质状或颗粒状。对照片呈阴性反应。

2.1 5-HT 细胞的分布及形态特征 5-HT 细胞见于蛇岛蝮蛇的消化道全长,其分布部位和形态多种多样(表 1,图版)。

表 1 蛇岛蝮蛇消化道 5-HT 细胞的分布位置和形态
Table 1 Location and shape of 5-HT cells in the digestive tract of *G. shedaoensis*

部位 Region	分布位置 Location	形态 Shape
食管 Oesophagus	上皮细胞之间及基部、固有膜	圆形(图版 :1,2)或锥体形突起指向食管腔(图版 :3)
胃贲门 Cardiacus	上皮细胞之间及基部	圆形(图版 :4)或锥体形突起指向贲门腔(图版 :5)
胃体 Stomach	腺泡上皮细胞之间	锥体形其突起指向腺泡腔(图版 :6)
胃幽门 Pyloricus	上皮细胞之间及基部	锥体形其突起指向幽门腔(图版 :7)或圆形(图版 :8)
十二指肠 Duodenum	上皮细胞之间	锥体形其突起指向肠腔(图版 :9)
空肠 Jejunum	上皮细胞之间及基部、固有膜	圆形(图版 :10,12)或梭形其两端突起分别指向肠腔和固有膜(图版 :11)或锥体形其突起指向肠腔(图版 :13)
回肠 Ileum	上皮细胞之间、固有膜	锥体形其突起指向肠腔(图版 :14)或圆形(图版 :15)
直肠 Rectum	固有膜	圆形(图版 :16)

2.2 5-HT 细胞在消化道各段的分布密度 对蛇岛蝮蛇消化道 8 个部位的 5-HT 细胞计数,所得数据采用 Duncan 多重比较的方法进行统计分析(表 2,图版 :17~19)。

表 2 5-HT 细胞在消化道分布的相对密度(Mean \pm SD)

Table 2 Relative density of 5-HT cells in the digestive tract of *G. shiedaensis*

部位 Region	相对密度(个/视野) Relative density (Number/Field of vision)	显著水平 Significance level	
		0.05	0.01
胃贲门 Cardiacus	7.15 \pm 2.38	a	A
直肠 Rectum	4.55 \pm 3.14	b	B
十二指肠 Duodenum	3.45 \pm 1.63	c	BC
胃幽门 Pyloricus	2.35 \pm 0.98	d	CD
空肠 Jejunum	2.25 \pm 0.67	d	D
回肠 Ileum	1.50 \pm 0.72	de	D
胃体 Stomach	1.25 \pm 0.41	e	D
食管 Oesophagus	1.20 \pm 0.71	e	D

含有相同字母的处理,差异不显著;不含有相同字母的处理,差异显著。

Significant difference is indicated with different letters.

3 讨论

El-Salhy 等^[3]、唐晓雯等^[4]报道,鸟和哺乳动物食管中无 5-HT 细胞分布。在蛇岛蝮蛇,食管上皮中有 5-HT 细胞分布,这与张志强等^[6]对眼镜蛇(*Naja naja*)、李淑兰^[7,8]对胎生蜥蜴(*Lacerta vivipara*)、枕纹锦蛇(*Elaphe dione*)等爬行动物的观察结果一致。说明爬行动物食管中有 5-HT 细胞分布。5-HT 能刺激胃肠黏液分泌、平滑肌收缩和血管扩张,对消化功能有重要的调节作用。蛇岛蝮蛇为毒蛇,暴吞、暴食,食物进入食道后需要肌肉充分的扩张与收缩使食物顺利下行,5-HT 细胞在食管中有分布。

5-HT 细胞见于蛇岛蝮蛇消化道从食管至直肠各部位,其分布密度在胃贲门部最高、直肠次之、食管最低。方之平等^[12]认为,有胃动物的消化道内分泌细胞胃中种类较多,有利于食物的蠕动和消化。蛇岛蝮蛇习惯吞食、暴食,在胃部,胃贲门部 5-HT 细胞密度最高,胃幽门部次之,胃底部最低,这与乌苏里蝮(*Gloydius ussuriensis*)^[10]、眼镜蛇^[6]、竹叶青(*Trimeresurus*

stejnegeri)^[13]三种毒蛇的分布情况相似,与枕纹锦蛇^[8]、石龙子(*Eumeces chinensis*)^[14]二种蛇消化道从胃贲门至胃幽门 5-HT 细胞密度逐渐升高不一致。胃体是初步消化食物的主要部位,消化食物主要靠黏液,而蛇的毒液能够帮助消化食物^[15],可能需要 5-HT 刺激胃黏膜分泌的黏液相对较少,另外,食物消化后体积变小、变软,可能需要 5-HT 刺激胃壁的蠕动能力相对减弱,导致 5-HT 细胞的密度在蛇岛蝮蛇胃体的分布较低。

在爬行类中,石龙子^[14]、乌梢蛇(*Zaocys dhumnades*)^[6]等陆生动物肠道中的 5-HT 细胞分布密度曲线从十二指肠到直肠呈向下倾斜的趋势,而在蛇岛蝮蛇肠道中,5-HT 细胞分布密度曲线从十二指肠到直肠呈“V”字形分布,直肠处分布密度最大,其原因可能与蛇岛蝮蛇的生存环境有关。蛇岛自然环境恶劣,干旱现象严重,食源和水源短缺,大大限制了蛇岛蝮蛇个体的生长发育和种群的增长^[16],尽量减少食物和水分的流失,提高利用率,直肠处高密度的 5-HT 细胞分泌大量的 5-HT 能刺激肠道黏液分泌、平滑肌收缩和血管扩张,有利于代谢废物和食物残渣的快速排出。

消化道黏膜是脊椎动物体内最大、最复杂的内分泌器官^[17]。消化道中的 5-HT 免疫阳性内分泌细胞分泌的 5-HT 是机体内重要的神经递质和调节物,其对调节消化道功能发挥重要作用,在消化道各段的分布密度曲线差异较大。在已有的报道中,没有一种动物消化道中 5-HT 细胞的分布与蛇岛蝮蛇的相同,只是在胃部和肠道分别有类似的。蛇岛蝮蛇是陆栖性种类,在肠道中 5-HT 细胞分布密度曲线的“V”字形分布,与水栖或半水栖的爬行类如扬子鳄(*Alligator sinensis*)^[18]、两栖类的中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*)^[19]、虎纹蛙(*Rana rugulosa*)^[20]类似,表明蛇岛蝮蛇 5-HT 细胞的分布型的形成与动物进化的关系不大。从胃部看,蛇岛蝮蛇虽然与乌苏里蝮、眼镜蛇、竹叶青的食性不同,但 5-HT 细胞的分布都呈“V”字形,表明蛇岛蝮蛇 5-HT 细胞分布型的形成与食性或食物的组

成的关系不大。蛇岛蝮蛇消化道 5-HT 细胞特殊分布型可能是对其特殊生存环境和食性适应的结果。

生理学实验证明,哺乳动物胃肠壁分泌的 5-HT 可直接释放入血或肠腔^[21],电镜观察 5-HT 分泌物是通过弥散方式进入固有膜层的^[22]。黄威权等^[5]报道,大鼠胃肠道内的 5-HT 免疫活性细胞可通过细胞突起深入到固有层或肠腔面,行使内或外分泌功能。在蛇岛蝮蛇消化道可见有圆形或椭圆形的 5-HT 细胞位于固有膜内,证实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,并发现突起附近处有免疫染色反应产物,从而在形态学上证明其可能具有外分泌功能。5-HT 是爬行动物消化道中分布最广和含量最多的一种激素^[23]。5-HT 细胞在蛇岛蝮蛇消化道中大量存在,提示 5-HT 在其消化生理过程中起着重要作用。但是,无论是 5-HT 细胞分布型差异的原因,还是 5-HT 细胞作用机理,都有待于进一步加以阐明。

参 考 文 献

- [1] Ormsbee H S, Fondacaro J D. Action of serotonin on the gastrointestinal tract. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1985, **178**: 333 ~ 338.
- [2] Facer P, Bolk J M, Jaffe B M, et al. Immunocytochemical demonstration of 5-hydroxytryptamine in gastrointestinal endocrine cells. *The Histochemical J*, 1979, **11**: 117 ~ 121.
- [3] El-Salhy M, Wilander E, Lundqvist N. Comparative studies of serotonin-like immunoreactive cells in the digestive tract of vertebrates. *Biomedical Research*, 1985, **6**(6): 371 ~ 375.
- [4] 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.
- [5] 黄威权, 黄宗明, 王文超. 大鼠胃肠 5-羟色胺免疫活性内分泌细胞的分布及形态学观察. *解剖学报*, 1987, **18**(4): 422 ~ 426.
- [6] 张志强, 张盛周, 吴孝兵. 两种蛇消化道 5-羟色胺细胞的免疫组织化学定位及比较. *动物学杂志*, 2001, **36**(6): 11 ~ 14.
- [7] 李淑兰, 赵文阁, 冷超等. 胎生蜥蜴消化道 5-羟色胺免疫活性内分泌细胞的研究. *中国比较医学杂志*, 2005, **15**(6): 355 ~ 359.
- [8] 李淑兰, 陈霞, 赵文阁. 枕纹锦蛇消化道 5-羟色胺免疫活性内分泌细胞的分布形态与观察. *动物学研究*, 2005, **25**(1): 63 ~ 67.
- [9] 李淑兰. 黑龙江草蜥消化道 5-羟色胺免疫活性内分泌细胞的分布形态与观察. *动物学杂志*, 2004, **39**(2): 33 ~ 37.
- [10] 陈霞, 李淑兰. 乌苏里蝮消化道 5-羟色胺免疫活性细胞的分布与形态学观察. *哈尔滨师范大学自然科学学报*, 2003, **19**(3): 77 ~ 80.
- [11] 李建立, 孙立新, 王小平等. 蛇岛蝮蛇种群分布格局对捕食率的影响. *蛇志*, 2007, **19**(1): 12 ~ 16.
- [12] 方之平, 潘黔生. 四种无胃真骨鱼肠道嗜银细胞的分布及形态学. 见: 中国动物学会编. 中国动物学会成立 60 周年论文集. 北京: 科学出版社, 1994, 47 ~ 52.
- [13] 张志强, 张盛周, 吴孝兵. 竹叶青蛇消化道内分泌细胞的免疫组织化学定位. *动物学报*, 2001, **47**(6): 666 ~ 671.
- [14] 黄徐根, 吴孝兵, 张志强等. 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. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2003, **12**(4): 433 ~ 440.
- [15] 覃公平主编. 中国毒蛇学. 南宁: 广西科学技术出版社, 1994, 152 ~ 154.
- [16] 孙立新, 赵德碧, 张健等. 蛇岛蝮种群动态与蛇岛生态环境变化的研究. *四川动物*, 2000, **3**(19): 153 ~ 155.
- [17] 王志均. 胃肠内分泌学现状. 见: 王志均主编. 胃肠激素. 北京: 科学出版社, 1985, 1 ~ 14.
- [18] 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.
- [19] 郑一守, 唐晓雯, 朱洪文. 中华大蟾蜍多种组织内 5-羟色胺免疫染色细胞的分布. *实验生物学报*, 1990, **23**(3): 285 ~ 290.
- [20] 张盛周, 吴孝兵, 陈壁辉. 虎纹蛙消化道两种内分泌细胞的免疫组织化学定位. *解剖学杂志*, 2002, **25**(3): 275 ~ 278.
- [21] 方之平, 孙宝田, 谢云芳等. 新疆犏牛胃肠胰系统免疫活性细胞的免疫组织化学研究. *解剖学报*, 1994, **25**(1): 78 ~ 81.
- [22] Josephson R L, Altmann G G. Distribution of Diazopositive (argentaffin) cells in small intestine of rats of various ages. *Am J Anat*, 1973, **136**: 15 ~ 22.
- [23] Arena P C, Richardson K C, Yamada J. An immunohistochemical study of endocrine cells in the alimentary tract of the king's skink (*Egernia kingii*). *J Ana*, 1990, **170**: 73 ~ 85.

图 版 说 明

1. 食管固有膜内呈圆形 5-HT 细胞(); 2. 食管上皮细胞基部呈圆形 5-HT 细胞(); 3. 食管上皮细胞之间呈锥体形的 5-HT 细胞,其突起指向食管腔(); 4. 胃贲门上皮细胞基部呈圆形的 5-HT 细胞(); 5. 胃贲门上皮细胞之间呈锥体形的 5-HT 细胞,其突起指向贲门腔(); 6. 胃体腺泡上皮细胞之间呈锥体形的 5-HT 细胞,其突起指向腺泡腔(); 7. 胃幽门上皮细胞之间呈锥体形的 5-HT 细胞,其突起指向幽门腔(); 8. 胃幽门上皮细胞基部呈圆形 5-HT 细胞(); 9. 十二指肠上皮细胞之间呈锥体形的 5-HT 细胞,其突起指向肠腔(); 10. 空肠固有膜内呈圆形 5-HT 细胞(); 11. 空肠上皮细胞之间呈梭形的 5-HT 细胞,其突起分别指向肠腔和固有膜(); 12. 空肠上皮细胞基部呈圆形 5-HT 细胞(); 13. 空肠固有膜内呈锥体形的 5-HT 细胞,其突起指向肠腔(); 14. 回肠上皮细胞之间呈锥体形的 5-HT 细胞,其突起指向肠腔(); 15. 回肠固有膜内呈圆形 5-HT 细胞(); 16. 直肠固有膜内呈圆形 5-HT 细胞(); 17. 胃贲门腺泡上皮细胞之间多个呈圆形 5-HT 细胞(); 18. 十二指肠上皮细胞之间呈圆形和锥体形的 5-HT 细胞(); 19. 食管上皮细胞基部呈圆形 5-HT 细胞()。1~16. $\times 400$, 标尺 = $10\ \mu\text{m}$; 17~19. $\times 200$, 标尺 = $20\ \mu\text{m}$ 。

Explanation of Plate

1. A 5-HT cell in the lamina propria of oesophagus, round (arrow); 2. A 5-HT cell in bottom of glandular epithelia of oesophagus, round (arrow); 3. A 5-HT cell in between epithelial cells of oesophagus, shuttle-shaped, with its process extending to oesophagus lumen (arrow); 4. A 5-HT cell in bottom of glandular epithelia of cardiacus, round (arrow); 5. A 5-HT cell between epithelial cells of cardiacus, shuttle-shaped, with its process extending to cardiacus lumen (arrow); 6. A 5-HT cell between epithelial cells of intestinal gland in stomach, shuttle-shaped, with its process extending to acinus lumen (arrow); 7. A 5-HT cell between epithelial cells of pyloricus, shuttle-shaped, with its process extending to pyloricus lumen (arrow); 8. A 5-HT cell in bottom of glandular epithelia of pyloricus, round (arrow); 9. A 5-HT cell between epithelial cells of duodenum, shuttle-shaped, with its process extending to gut lumen (arrow); 10. A 5-HT cell in the lamina propria of jejunum, round (arrow); 11. A 5-HT cell between epithelial cells of jejunum, tapering, with its process extending to cardiacus lumen and lamina propria (arrow); 12. A 5-HT cell in bottom of glandular epithelia in jejunum, round (arrow); 13. A 5-HT cell in the lamina propria of jejunum, shuttle-shaped, with its process extending to gut lumen (arrow); 14. A 5-HT cell between epithelial cells of ileum, shuttle-shaped, with its process extending to gut lumen (arrow); 15. A 5-HT cell in the lamina propria of ileum, round (arrow); 16. A 5-HT cell in the lamina propria of rectum, round (arrow); 17. Many 5-HT cells between epithelial cells of cardiacus, round (arrow); 18. Two 5-HT cells between epithelial cells of duodenum, shuttle-shaped; a 5-HT cell between epithelial cells of duodenum, round (arrow); 19. A 5-HT cell in bottom of glandular epithelia of oesophagus, round (arrow). 1-16. $\times 400$, Bar = $10\ \mu\text{m}$; 17-19. $\times 200$, Bar = $20\ \mu\text{m}$.

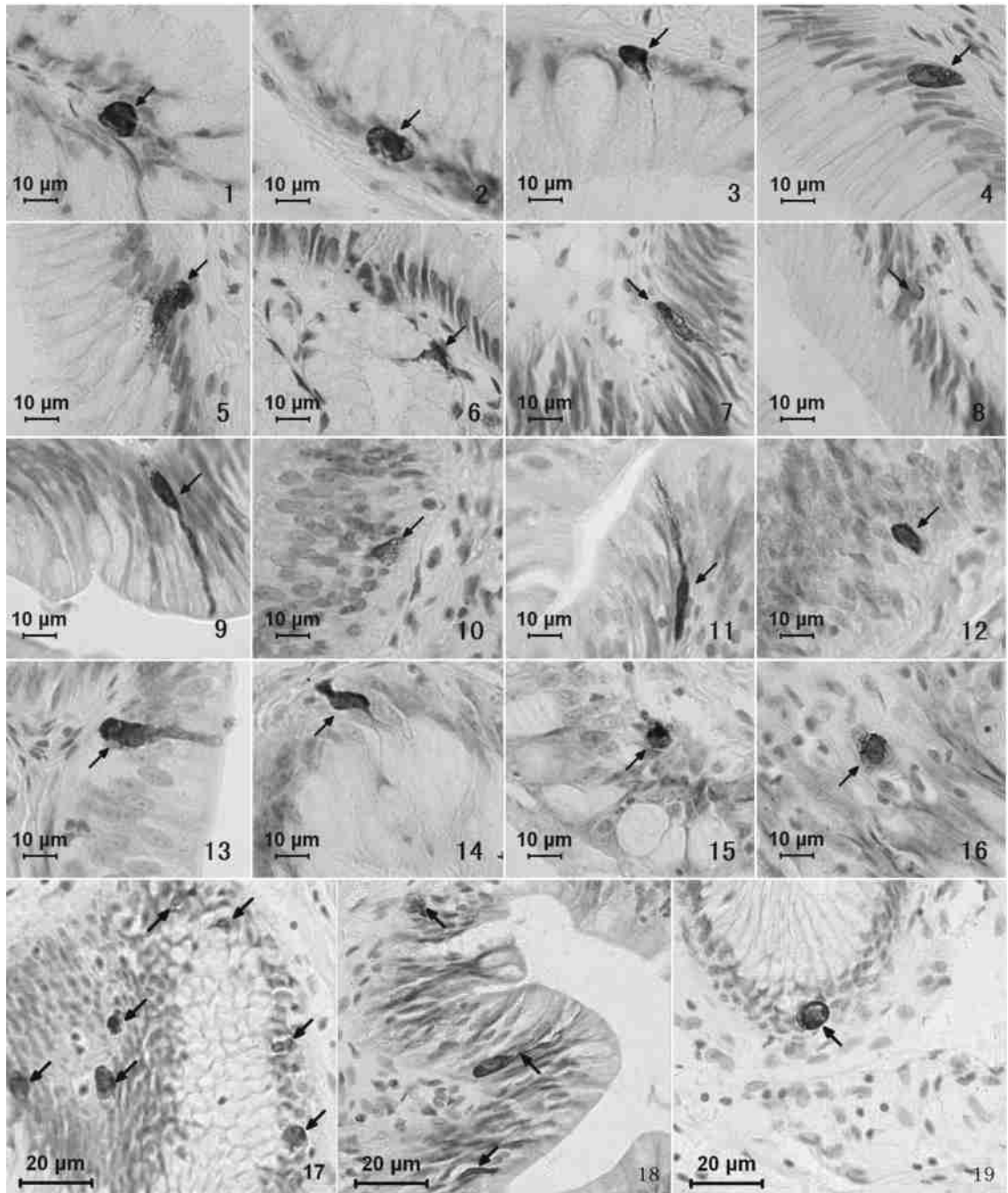
王立平等: 蛇岛蝮蛇消化道 5-羟色胺细胞的形态与分布

图版

WANG Li-Ping *et al.*: The Morphology and Distribution of 5-HT Cells in Digestive Tract

of *Gloydius shedaoensis*

Plate



图版说明见文后