

栉孔扇贝消化系统 γ -氨基丁酸的 免疫组织化学定位

王 斌 孙虎山 王宜艳*

鲁东大学生命科学学院 烟台 264025

摘要:采用抗生物素-生物素-过氧化物酶法(ABC法)的免疫组织化学技术,对 γ -氨基丁酸(GABA)在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)消化系统各组织器官中的分布进行了定位研究。结果表明,栉孔扇贝的唇瓣、口唇、肠道的上皮细胞均呈GABA阳性反应,阳性反应物质呈颗粒状分布且多集中于上皮细胞游离端;胃上皮中未见GABA阳性反应;肝胰腺的上皮细胞及部分结缔组织中呈现GABA阳性反应,其中部分上皮细胞中的阳性反应物质呈团块状分布。GABA在栉孔扇贝消化系统除胃以外的各器官均有分布,推测其可能参与消化功能的调节作用。

关键词: γ -氨基丁酸;免疫组织化学;消化系统;栉孔扇贝

中图分类号:Q955 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2012)05-74-05

Immunohistochemical Localization of Gamma-aminobutyric Acid in the Digestive System of *Chlamys farreri*

WANG Bin SUN Hu-Shan WANG Yi-Yan*

School of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China

Abstract: The gamma-aminobutyric acid (GABA) in the digestive system of *Chlamys farreri* was analyzed by immunohistochemical ABC staining. The results showed that GABA-positive cells existed widely in the epithelium of labellum, labia oris, and intestine. Besides, the positive granules were centralized in the dissociative sides of epithelium. There were no GABA-positive cells in the epithelium of stomach. Positive cells were also observed in both the epithelium and connective tissue of hepatopancreas, and some of them were accumulated in lumps in the epithelium. It can be concluded that GABA is abundantly distributed in the digestive system in *C. farreri* and it may be involved in the regulation of digestive function.

Key words: Gamma-aminobutyric acid; Immunohistochemistry; Digestive system; *Chlamys farreri*

γ -氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)是一种重要的氨基酸类抑制性神经递质。高等动物中的诸多研究证实GABA广泛分布在中枢神经系统及外周组织中发挥重要的生理作用。软体动物中,崔素敏等^[1]在中国蛤蜊(*Macra chinensis*)的中枢神经系统中检测到GABA,并运用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定了其含量。Laimek等在腹足类鲍属物种的足

边缘上皮细胞和分泌的黏液中检测到GABA^[2]。诸多研究表明,GABA在软体动物中也是广泛分布并发挥多种重要的生理功能。

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是我国重要的

基金项目 山东省自然科学基金项目(No. ZR2010CM017);

* 通讯作者, E-mail: yiyangwang@163.com;

第一作者介绍 王斌,男,硕士研究生;研究方向:海洋动物;
E-mail: 1310559354@qq.com。

收稿日期:2012-02-13,修回日期:2012-04-20

食用贝类,在我国北方已经开展了大规模的人工养殖,具有重要的经济价值,因此,对其摄食以及消化吸收等生理活动的研究具有重要意义。迄今为止,关于 GABA 在贝类消化系统的研究尚未见报道。本实验采用抗生物素-生物素-过氧化物酶法(avidin-biotin-peroxidase complex method, ABC 法)的免疫组织化学技术对 GABA 在栉孔扇贝消化系统各组织器官中的分布进行了定位研究,探讨 GABA 是否可以参与栉孔扇贝消化系统生理功能的调节,以期丰富贝类神经内分泌研究理论资料,为贝类养殖等方面的研究提供理论借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料 栉孔扇贝购自烟台近海水产市场,壳长 45 ~ 50 mm,水族箱中暂养。每日换水 1 次,水温 20 ~ 21℃。选取其中活性较好的 5 只,活体解剖,分别剪下其唇瓣、口唇、肝胰腺、胃、肠、直肠组织块,入 0.1 mol/L、pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)配制的 4% 多聚甲醛中,4℃ 固定 24 h,分割较大的组织块,石蜡包埋切片,厚度为 7 μ m,各结构均为横切。

1.2 试剂 兔抗大鼠 GABA(一抗)为武汉博士德公司产品;生物素标记羊抗兔 IgG(二抗)、链霉菌抗生物素蛋白与过氧化物酶复合物为 Santa Cruz 公司产品;3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)为 Fluka 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。一抗稀释液含有 0.2% 的牛血清白蛋白、0.05% 叠氮化钠和 0.05 mol/L pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液;二抗稀释液同一抗稀释液,但不含叠氮化钠。

1.3 免疫组织化学反应 石蜡切片常规脱蜡,按 Santa Cruz 公司提供的 ABC 染色方法进行,并略微改进^[3]。切片用 0.05 mol/L、pH 7.4 的 PBS 漂洗 3 次,每次 2 min,0.3% 过氧化氢-甲醇处理 30 min,阻断内源性过氧化物酶,兔抗大鼠 GABA(按 1:100 稀释)4℃ 过夜孵育,0.05 mol/L PBST 缓冲液(0.05 mol/L 的 PBS 中加入 2% 的 Triton X-100)漂洗 3 次,每次 2 min,生物素标记羊抗兔 IgG 室温孵育 3 h,

PBST 漂洗 3 次,每次 2 min,链霉菌抗生物素蛋白与过氧化物酶复合物室温孵育 2 h,PBST 漂洗 3 次,每次 5 min,DAB 显色,苏木素复染,二甲苯透明,中性树胶封片。用 Olympus DP72 显微镜系统对结果进行观察,并拍照记录。分别以抗体稀释液代替一抗、二抗、AB 复合液作为阴性对照。

2 结果

通过 DAB 显色的 GABA 阳性部位从强到弱依次呈深褐色、褐色和浅褐色,除胃以外的消化系统各器官中均有分布;背景不着色或呈淡黄色;复染后的细胞核为蓝色。

栉孔扇贝的消化系统主要由消化道和消化腺组成。消化道包括唇瓣、口唇、胃、肠及直肠;腺体主要是肝胰腺。

2.1 唇瓣 栉孔扇贝唇瓣分为内唇瓣和外唇瓣:内唇瓣外上皮细胞与外唇瓣内上皮细胞形态相似,均呈长柱状紧密排列,且游离端有纤毛;内唇瓣内上皮细胞与外唇瓣外上皮细胞形态相似,多为立方上皮细胞,有少量短柱状上皮细胞(图版 I:1)。免疫组化结果显示,唇瓣的内外上皮及结缔组织均呈 GABA 阳性反应(图版 I:2)。唇瓣的上皮细胞呈现强阳性,阳性颗粒多集中在上皮细胞游离端,基底部也有少量阳性颗粒(图版 I:3,4);唇瓣的结缔组织均呈现阳性或弱阳性(图版 I:2 ~ 4);阴性对照无阳性反应物质(图版 I:1)。

2.2 口唇 口唇位于口边上下两条纵嵴上,口上、下方边缘的黏膜上皮向外凸出并多次皱褶,褶皱横切面分为嵴状和瓣状(图版 I:5)。免疫组化结果显示,口唇上皮的游离端呈现 GABA 阳性,上皮组织基底部及口唇结缔组织呈现弱阳性反应(图版 I:6 ~ 8);阴性对照无阳性反应物质(图版 I:5)。

2.3 胃 胃形状不规则,胃壁平坦,柱状上皮细胞排列紧密整齐,直接与消化腺结缔组织相连,缺乏肌层。胃壁上皮未见 GABA 阳性反应(图版 I:9,10)。

2.4 肠 肠内壁形成高低不等的纵行褶皱,肠

黏膜上皮高低不等,上皮细胞均呈长柱状(图版 I:11)。根据肠的走向,分为上行肠和下行肠两部分,上行肠褶皱少,下行肠褶皱多。肠黏膜上皮呈 GABA 阳性反应且阳性物质集中分布在上皮细胞的游离端,结缔组织也呈现阳性反应,其中包括部分血细胞(图版 I:12,13);黏膜上皮基部有部分核近圆形的小细胞分布,呈现 GABA 强阳性或阳性(图版 I:14);阴性对照无阳性反应物质(图版 I:11)。

2.5 直肠 直肠内上皮细胞呈长柱状,排列紧密(图版 I:15)。直肠黏膜内上皮细胞呈 GABA 阳性且多集中于游离端,并有少量较大的强阳性颗粒及小的阳性细胞分布在上皮细胞之间(图版 I:16,17);黏膜上皮基部有部分呈 GABA 阳性或弱阳性反应小细胞分布(图版 I:18);直肠外膜呈现 GABA 弱阳性,直肠结缔组织呈现强阳性(图版 I:16,18);阴性对照无阳性反应物质(图版 I:15)。

2.6 肝胰腺 肝胰腺为复管状腺,由许多具分枝的腺管组成,众多腺管汇集成小的导管,再经大的导管开口于胃(图版 I:19)。肝小叶泡状上皮细胞呈现 GABA 阳性反应,有部分上皮细胞的阳性反应物质呈集中团块状分布;肝小叶间结缔组织呈现弱阳性反应(图版 I:20);阴性对照无阳性反应物质(图版 I:19)。

3 讨 论

关于 GABA 在高等动物摄食中作用的研究表明,在不同脑区应用 GABA 选择性受体拮抗剂可不同程度地促进或抑制摄食,并对味觉的喜好和厌恶发生改变,另外,GABA 与调节摄食和味觉的有关物质具有相互作用,他们共同参与摄食和味觉的调控^[4]。唇瓣和口唇是栉孔扇贝的摄食器官。本实验中,GABA 阳性物质在口唇和唇瓣上皮中均有分布,在唇瓣中分布尤其多,并靠近上皮细胞的游离端,推测 GABA 可能在调节口唇和唇瓣的纤毛摆动及调节摄食中发挥作用。

现已证明,高等动物胃肠道黏膜中散布着大量的胃肠内分泌细胞,他们大多单个地夹于

其他上皮细胞之间,多分布于黏膜的中下层,呈不规则的圆锥形,细胞最大的形态特点是胞质中含有大量的分泌颗粒。在哺乳动物中,消化道中除了有 GABA 阳性神经元支配外,其黏膜中还分布有 GABA 阳性内分泌细胞^[5-6],参与消化功能的调控。徐项桂等人的研究证实,GABA 能调节胃酸分泌,能有效地促进小白鼠(*Mus musculus domesticus*)离体胃标本泌酸^[7],GABA 可能可以直接激活壁细胞^[8],并且在小鼠胃中存在一种维持胃功能稳态的负反馈 GABA 摄取自身调节机制^[9-10];田琴等的研究证实 GABA 可以抑制小鼠回肠的自主收缩^[11]。在无脊椎动物中,陈洪洪等在中华稻蝗(*Oxya chinensis*)直肠内检测到相当数量的五羟色胺内分泌细胞^[12]。王宜艳等证实,在栉孔扇贝消化道黏膜中散布有甲硫氨酸脑啡肽的小的阳性细胞^[13],与本实验中肠和直肠黏膜中下层散布有许多小的 GABA 阳性细胞的结果相类似。因此推测,栉孔扇贝肠和直肠黏膜中下层散布的小的不规则阳性细胞为内分泌细胞,可以通过分泌 GABA 来参与对消化功能的调控。同时,在消化道的黏膜上皮中有较多 GABA 阳性反应物质,也表明 GABA 有可能参与调控栉孔扇贝的消化和吸收。另外,本实验中,GABA 阳性颗粒呈团块状分布在肝小管的泡状细胞中,表明肝胰腺可能是 GABA 重要的活动场所。

综上所述,GABA 在除胃以外的消化器官中均有分布,表明 GABA 可能参与调控栉孔扇贝的摄食、消化、吸收和排遗。

参 考 文 献

- [1] 崔素敏,王晓安,张丽丽. 中国蛤蚧神经系统 GABA 和 Glu 的 HPLC 测定和免疫组化定位研究. 四川动物, 2008, 27(5): 764 - 767.
- [2] Laimek P, Clark S, Stewart M, et al. The presence of GABA in gastropod mucus and its role in inducing larval settlement. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2008, 354(2): 182 - 191.
- [3] 李华,孙虎山,王宜艳,等. 扁玉螺体表和消化系统甲硫氨酸脑啡肽免疫组织化学定位. 动物学杂志, 2008, 43(4): 72 - 76.
- [4] 雷琦,闫剑群,施京红,等. GABA 在摄食和味觉机制

- 中的作用. 世界华人消化杂志, 2006, 14(19): 1906 – 1911.
- [5] 张南玲. 胃肠胰系统内 γ -氨基丁酸研究的新进展. 国际病理科学与临床杂志, 1993, 13(3): 139 – 142.
- [6] 徐项桂. 胃酸分泌的外周调节. 生物学杂志, 2000, 17(2): 6 – 8.
- [7] 徐项桂, 杨再福, 黄胜和. γ -氨基丁酸对小白鼠离体胃标本胃酸分泌的促进效应. 动物学报, 2001, 47(2): 170 – 175.
- [8] 徐项桂. GABA 促进小鼠离体胃胃酸分泌活动的机制探讨. 苏州科技学院学报: 自然科学版, 2005, 22(1): 53 – 58.
- [9] 徐项桂, 朱剑琴. 离体小鼠胃切片高亲和性 GABA 摄取及其特性的研究. 动物学报, 1996, 42(1): 52 – 59.
- [10] 徐项桂, 朱剑琴. 小鼠胃中 GABA 摄取系统的负反馈式自身调节机制. 南京大学学报: 自然科学版, 1996, 32(1): 47 – 52.
- [11] 田琴, 胡还忠, 马立群, 等. GABA 对小鼠回肠平滑肌自主收缩活动的影响. 世界华人消化杂志, 2005, 13(16): 1981 – 1984.
- [12] 陈洪洪, 潘洪珍, 张盛周. 中华稻蝗消化道内分泌细胞的鉴别与定位. 昆虫学报, 2009, 52(7): 749 – 754.
- [13] Wang Y Y, Sun H S. Immunohistochemical identification of met-enkephalin in digestive system and its effect on digestive enzyme activities of the scallop *Chlamys farreri*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2010, 16(1): 31 – 37.

图 版 说 明

1. 唇瓣上皮及结缔组织(阴性对照); 2. 唇瓣上皮及结缔组织; 3. 内唇瓣外上皮组织局部; 4. 内唇瓣内上皮组织局部; 5. 口唇嵴状部及瓣状部上皮及结缔组织(阴性对照); 6. 口唇嵴状部及瓣状部上皮及结缔组织; 7. 口唇嵴状部上皮及结缔组织; 8. 口唇瓣状部上皮及结缔组织; 9. 胃壁上皮及结缔组织(阴性对照); 10. 胃壁上皮及部分肝胰腺组织; 11. 肠黏膜上皮和结缔组织(阴性对照); 12. 肠壁局部; 13. 肠黏膜上皮组织游离端; 14. 肠黏膜上皮组织基部; 15. 直肠黏膜上皮组织及结缔组织(阴性对照); 16. 直肠黏膜上皮组织及结缔组织; 17. 直肠黏膜上皮组织游离端; 18. 直肠黏膜上皮及结缔组织; 19. 肝小管(阴性对照); 20. 肝小管。×40。

Explanation of Plate

1. Epithelium and connective tissue of labella (negative control); 2. Epithelium and connective tissue of labella; 3. Part of outer epithelium of inner labella; 4. Part of inner epithelium of inner labella; 5. Epithelium and connective tissue of cristae-like and flap-like department in labia oris (negative control); 6. Epithelium and connective tissue of cristae-like and flap-like department in labia oris; 7. Epithelium and connective tissue of cristae-like department in labia oris; 8. Epithelium and connective tissue of flap-like department in labia oris; 9. Epithelium and connective tissue of stomach (negative control); 10. Epithelium tissue of stomach and part of hepatopancreas; 11. Epithelium and connective tissue of intestine (negative control); 12. Part of intestine; 13. Dissociative part of epithelium tissue of intestine; 14. Basal part of epithelium tissue of intestine; 15. Epithelium and connective tissue of rectum (negative control); 16. Epithelium and connective tissue of rectum; 17. Dissociative part of epithelium tissue of rectum; 18. Basal part of epithelium tissue of rectum; 19. Hepatopancreas duct (negative control); 20. Hepatopancreas duct. ×40.

↗ 示 GABA 阳性颗粒; ☆ 示较大的强阳性颗粒; △ 示 GABA 阳性细胞; N 示细胞核; ET 示上皮组织; CT 示结缔组织; DC 示消化腔。

↗ Positive granules of GABA; ☆ Positive and large granules of GABA; △ GABA-positive cells; N: Nucleolus; ET: Epithelium tissue; CT: Connective tissue; DC: Digestive cavity.

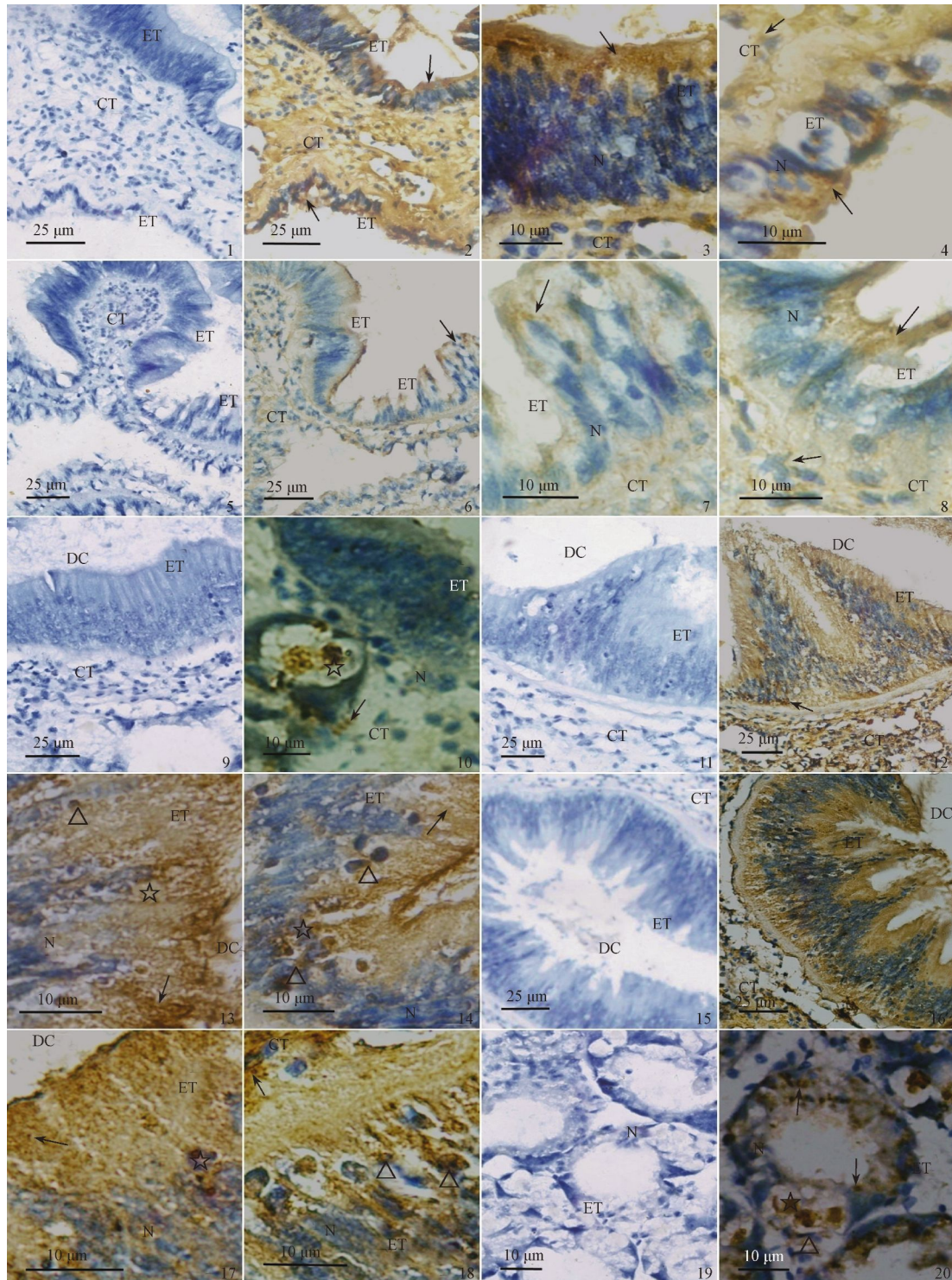
王 斌等:栉孔扇贝消化系统 γ -氨基丁酸的免疫组化定位

图版 I

WANG Bin *et al.*: Immunohistochemical Localization of Gamma-aminobutyric Acid in the

Digestive System of *Chlamys farreri*

Plate I



图版说明见文后