

山羊感觉和交感神经节中的 肽类免疫反应结构*

李育良 田九畴[△] 庄志业 陈树林

(西北农业大学兽医系, 陕西杨陵·712100)

摘 要 所有背根节和迷走神经结状节出现大量P物质(SP)阳性胞体和纤维,小细胞占92%,大中型细胞占8%,仅有极少数生长抑素(SS)样神经胞体。大量含SP的纤维和终末见于颈上节和腹腔-前肠系膜神经节,但含SS的纤维和终末主要见于腹腔-前肠系膜神经节,颈上节甚少。交感节中无SP和SS阳性胞体。出现于交感神经节中的SP和SS纤维和终末,可能来自背根节初级感觉神经元的外周侧支或肠神经元。按照这个模式,SP和SS可通过不涉及中枢神经系统的外周短反射环路,去调节交感神经的反应。

关键词 P物质,生长抑素,感觉神经节,交感神经节,山羊

中图分类号 S827.1

生理学的研究表明,P物质(Substance P SP)和生长抑素(Somatostatin SS)作为神经递质或调制物在自主神经的传递中起作用,SP引起的交感节神经元慢兴奋性突触后电位和膜去极化可为SP拮抗剂所阻断,而对胆碱拮抗剂不敏感^[1]。SP和SS通过增强酪氨酸羟化酶的活性去调节交感肾上腺素能神经的活动^[2]。免疫细胞化学研究表明,交感节中有SP纤维和终末^[3,4],与交感神经节神经元形成突触联系^[5]。推测这些纤维末梢可能来自背根节^[6]。但文献中关于SP和SS免疫反应物在感觉和交感神经节中的分布情况尚有一些不同或者截然相反之处。本研究对山羊背根节和迷走神经结状节以及交感神经节中的SP和SS样免疫反应物进行了系统观察,为研究SP和SS在自主神经传递中的作用提供了比较形态学方面的资料。

1 材料和方法

1月龄左右的奶山羊6只,用戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)腹腔麻醉后,依次经心脏灌注生理盐水500 mL,Zamboni氏固定液(含4%多聚甲醛和0.2%苦味酸的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液,pH7.47 4 000~5 000 mL,取颈、胸、腰和骶各段的背根节和迷走神经结状节、颈上节和腹腔-前肠系膜神经节,置上述固定液中后固定4~6 h,再放入含30%蔗糖的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)中,4℃冰箱过夜,次日制成40 μm厚冰冻切片,用卵白素-生物素-过氧化物酶复合物(Avidin-Biotin-Peroxidase Complex,ABC)法显示SP和SS样神经元。其操作程序如下:①切片依次经过0.5% H₂O₂ 30 min,0.3% Triton-x100 60 min和正常羊血清(1:50)30 min的预处理。②切片分别在兔抗SP血清

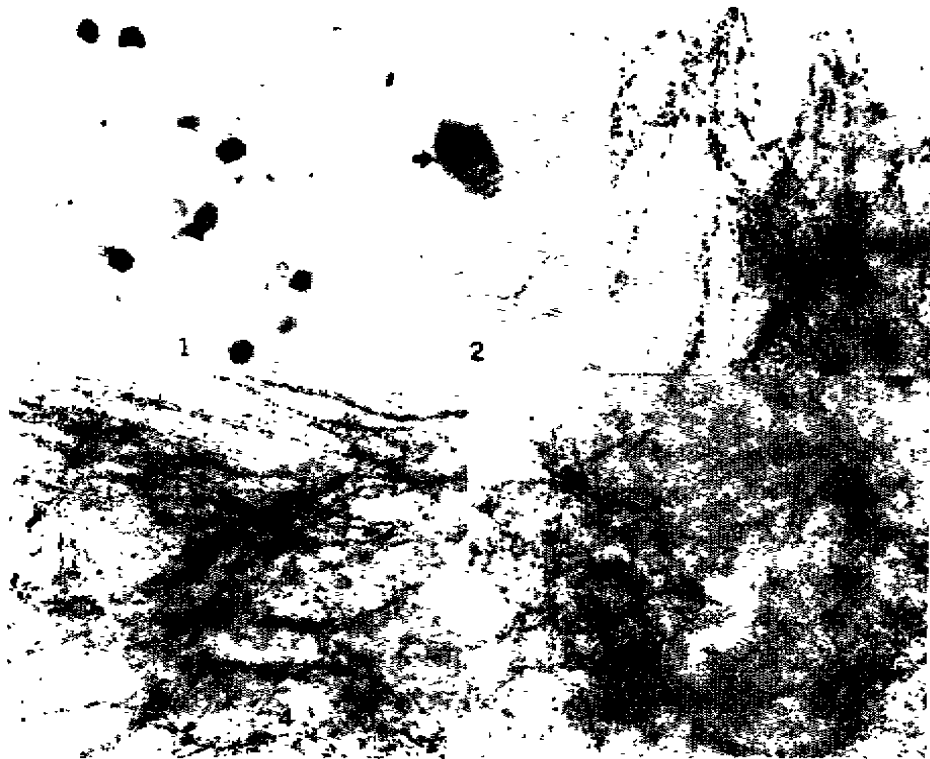
(1:7000)和兔抗 SS 血清(1:7000)(英国 Sera-Lab 产品)37℃温箱中孵育 30 min,4℃冰箱中 48~72 h。③切片入生物素结合的羊抗兔 IgG 抗体(美国 Vector Lab 产品,ABC kit,1:220)室温下孵育 1 h。④切片入 ABC 复合物(1:110)室温下 60~90 min。以上每个步骤完成后均用 0.01 mol/L PBS 充分洗涤。⑤最后将切片放入用 0.05 mol/L Tris-盐酸缓冲液(pH7.6~7.8)配制的 DAB/H₂O₂溶液中进行成色反应,铬明胶液贴片,干燥,脱水,透明,封片,光镜下观察。

对照实验:用正常兔血清或一抗稀释液代替兔抗 SP 和 SS 血清,其他步骤完全同上,用以证明一抗的特异性。

2 结 果

2.1 背根节和结状节中的 SP 免疫反应物

在迷走神经结状节和颈、胸、腰、骶各段背根节中,有大量 SP 阳性细胞(附图-1),免疫反应呈棕色或棕黑色颗粒,分布于细胞浆及发出的突起中。胞体呈圆形或卵圆形。随机测量了各段背根节中 1246 个阳性胞体的直径:小细胞(直径小于 25 μm)1143 个,占 91.7%;中细胞(26~35 μm)83 个,占 6.7%;大细胞(36 μm 以上)20 个,占 1.6%,其中各段背根节中的大、中和小阳性细胞的比例也基本相同,在结状节所测量的 204 个阳性细胞中,小细胞占 92.6%,中细胞占 5.9%,大细胞占 1.5%。可见背根节和结状节均以小细胞为主。



附图 感觉和交感神经节中的肽类免疫反应结构

1. 背根节中的 SP 阳性细胞 180×; 2. 背根节中的 SS 阳性细胞 360×; 3. 腹腔前肠系膜神经节的 SS 纤维终末网 360×; 4. 腹腔—前肠系膜神经节中的 SP 纤维终末网 270×; 5. 颈上节中的 SP 纤维终末网 270×

2.2 背根节和结状节中的 SS 免疫反应物

在与 SP 免疫反应完全相同的实验条件下,材料亦来自同一实验动物,但仅有极少数 SS 弱阳性小细胞(附图-2),无阳性纤维,增加兔抗血清浓度或延长 DAB 成色反应时间,亦无明显变化。

2.3 颈上节中的 SP 和 SS 样免疫反应物

SP 样反应物见于大量纤细的神经纤维和终末结构之中,与交感节细胞密切接触。在整个切片上,可见许多密集的斑片状纤维网,也有一些 SP 纤维较为稀疏或无阳性纤维和终末的区域(附图-5)。无 SP 阳性胞体。

在该节中仅见到少量的散在 SS 阳性纤维和终末,分布于神经节细胞周围,无 SS 阳性胞体。

2.4 腹腔—前肠系膜神经节中的 SP 和 SS 免疫反应物

SP 阳性纤维和终末不均匀地分布于该节中,有一些无膨体纤维混杂在阴性纤维束中穿过神经节,这可能是背根节中感受内脏刺激的初级感觉神经元周围突穿过神经节的过路纤维。切片上主要见到的是有膨体的 SP 阳性纤维和终末结构,呈念珠状或点状,形成大片密集的纤维网(附图-4),也有一些稀疏散在的阳性纤维和终末分布于神经节细胞周围。无 SP 阳性胞体。

在该节同样观察到含 SS 的纤维和终末,既有密集的纤维和终末网,也有稀疏散在的纤维终末(附图-3),但其阳性纤维的数量和密度相对小于该节中的 SP 纤维,却显著超过颈上节。无 SS 阳性胞体。

在用一抗稀释液或正常兔血清代替第一抗体的对照实验组,均未见阳性免疫反应物,说明 SP 和 SS 一级抗体具有特异性。

3 讨 论

3.1 关于交感神经节中 SP 和 SS 纤维终末的来源

一些研究者及本文已分别在大鼠、豚鼠、人和山羊的交感节中证实有 SP 传入纤维^[3,4,6],而且在电镜水平观察到,SP 阳性终末与神经节主细胞形成突触联系^[5],Matthews 用分组切断与椎前节相联系的神经支的方法证实,后肠系膜神经节中的 SP 免疫反应纤维可能来自背根节^[6],背根节中有大量含 SP 的小细胞已被普遍公认,据此推测,交感节中的 SP 纤维终末可能是背根节感觉神经元周围突的侧支。此外,我们在山羊脊髓内观察到一部分来自背根节的 SP 传入纤维沿后角外缘至胸腰髓中间外侧核形成密集的终末网,在中央管背外侧的背连合区也有 SP 纤维终末网^[7]。由此可知,SP 对交感神经活动的调节可以通过两条途径,即:内脏和躯体的传入冲动通过背根节的含 SP 神经元的周围突侧支,作用于交感节后神经元,这是一条中枢外的短反射环路,同时也将感觉冲动顺向传递至脊髓的自主神经区,也可能有来自脊髓上的 SP 纤维投射,与交感节前神经元发生联系,这是一条涉及中枢神经系的长反射环路。如果上述推论成立,它将对传统的反射弧概念予以补充。

关于交感节中含 SS 纤维终末的来源问题,目前尚缺乏充分的实验证据。由于本研究在腹腔—前肠系膜神经节发现 SS 纤维终末,而无 SS 阳性胞体,因而认为是一些外来的

传入纤维作用于交感节细胞。在背根节中有含 SS 细胞,所以交感节中 SS 纤维终末有可能来自背根节。但我们在山羊背根节中仅见极少数弱阳性细胞,与交感节中浓密的纤维网相比较,很难相信这些纤维来自背根节。Krukoff 在猫的胸腰髓自主神经区发现大量的含 SS 细胞^[3],这意味着交感神经节前神经元本身就是含 SS 的细胞,它发出节前纤维至交感节。由于 Molander 在背根节中未见到 SS 样内脏感觉神经元^[9],胃肠道的粘膜下丛中有大量含 SS 样神经元^[10],其 SS 纤维终末又恰出现于椎前节,所以这些纤维有可能来自脊髓或肠神经元,对于这个问题尚需做更深入细致的工作。

3.2 背根节中含 SP 神经元的大小与功能的关系

在一些神经解剖专著中,将背根节的神经元依据细胞体大小和染色特征分为大神经元(明细胞)和小神经元(暗细胞)。前者发出粗的有髓纤维,感受非伤害性刺激,后者发出薄髓纤维(A σ 类)和无髓纤维(C类),感受伤害性或非伤害性刺激。关于轴突直径与胞体大小的关系虽无确切资料,但 Lawson 用神经毒药物辣椒素(Capsaicin)选择性地破坏了 90%~95%的 C 类和 30%A σ 类纤维,这些纤维起源于直径为 15~25 μ m 的核周体^[11]。切断背根的细纤维有明显的止痛作用,痛觉敏感性减弱的患者,脊髓胶状质中来自背根轴突中的 SP 耗竭^[12]。由于 SP 主要存在于小型的传入神经元中,据此认为 SP 可能与伤害性刺激的传导有关。但 Leah 在许多感受伤害性刺激的神经元中未检出 SP,并证实 SP 和 SS 共存于神经元胞浆中,认为在感觉传递中可能是数种递质构成复合体而起作用^[13]。本研究在山羊背根节中所见以小型 SP 神经元为主,但还有 8%左右直径大于 25 μ m 的大中型细胞。Kawatani 在猫的背根节中还检出一些直径为 40~60 μ m 的 SP 大细胞^[14],说明 SP 并非严格局限于发出 A σ 类和 C 类纤维的小细胞中,含 SP 的大型感觉神经元可能还有其他的生理效应,值得进一步探讨。

3.3 山羊感觉和交感节中的 SP 和 SS 免疫反应物与其他哺乳类动物的比较

本研究结果与文献报道有许多不同之处。在山羊背根节中含 SP 神经元密集,而 SS 样神经元数量极少。Hökfelt 在大鼠背根节所见 SP 和 SS 阳性细胞却无此明显差别,还证明 SP 和 SS 存在于不同的小细胞之中^[15]。Krisch 却否认大鼠背根中含有 SS 神经元^[16]。Leah 在猫的背根节中发现大多数含 SS 细胞有 SP 与之共存^[13]。Kawatani 在猫的背根节均见到含 SP 和 SS 细胞,但 SS 样细胞占的比例很少^[14]。Charnay 在婴儿背根节中只检出很少弱阳性 SP 细胞^[17]。Hökfelt 用免疫荧光法发现豚鼠腹腔神经节中 2/3 的主细胞为 SS 阳性胞体,有可能是去甲肾上腺素与 SS 共存,在颈上节也有少数 SS 阳性细胞,但我们在山羊上述两个节中均未发现阳性细胞,却有纤维终末,这与上述报道截然相反。

综上所述,不同作者在不同实验对象上所得的结果存在着明显的差异。一般说,各种哺乳动物神经系统的结构应该是基本相似的,但又为什么出现如此大的差别呢?作者认为与诸多因素有关,如方法的灵敏性及用秋水仙素的预处理与否,动物的年龄和种属差异性等,这在以前的报告中已有论述。本文着重强调,与动物的生理状态或病理过程关系密切。本实验在手术创伤 24~48h 后的免疫反应中,背根节含 SS 细胞极少,但在脊髓背角 I 和 II 层却有肉眼可见的不规则的波形浓密 SS 纤维带和深部与之密接的阳性细胞带^[18],可见与实验方法本身的因素(如一抗的稀释浓度等)无关。Randie 认为,疼痛刺激可使相应感觉神经节中含 SP 的细胞数量增多,免疫反应增强,经中枢突运至脊髓背角的 SP 亦随

之增加^[20]。由上述结果提示,在动物机体的某种生理或病理过程中,神经系统感受和传递着不同性质的刺激,多种肽类起着不同的作用,当某种肽类发挥主要作用时,则胞体内该肽类的合成相应增加,并随轴浆流运输至末梢,而另一些肽类的合成和运输相对受抑,其免疫反应物减少。这可能是报道中 SP 和 SS 分布状况不一致的重要原因之一。因此,今后从这方面作深入探讨,对其神经肽类的生理作用的了解具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Jiang ZG, Dun NJ. Substance P. A putative sensory transmitter, in mammalian autonomic ganglia. *Science*, 1982; 217:739~741
- 2 Keseler JA, Adler JE, Black IB. Substance P and somatostatin regulate sympathetic noradrenergic function. *Science*, 1983 221:1059~1062
- 3 Hökfelt T, Elfvin LG. On the occurrence of the SP-containing fibers in sympathetic ganglia. *Brain Res.*, 1977; 132: 29~41
- 4 Flacco MD, Levanti MC. SP-like immunoreactivity in human sympathetic ganglia. *Brain Res*, 1984; 126:143~146
- 5 朱长庚, 刘庆莹, 卢金活等. SP 阳性神经末梢和颈上节主神经元的突触联系. 同济医科大学学报, 1986; 6(3): 188~190
- 6 Elfvin LD, Cuello AC. The origin and possible significance of sp immunoreactivity networks in the prevertebral ganglia and related structure in the guinea pig. *Phil Trans R Soc Lond*, 1984; B306:247~276
- 7 李育良, 田九畴, 庄志业等. 山羊脊髓内含 P 物质神经元胞体、纤维和终末的分布, 动物解剖组织胚胎学研究会第六次学术讨论会论文集, 1990: 64
- 8 Kruskoff TL, Ciriello J, Calaresu FR, et al. Somatostatin-like immunoreactivity in neurons, nerve terminals and fibers of the cat spinal cord. *J Comp Neurol*, 1986; 213:13~22
- 9 Molander C, Ygge J, Dalsgaard CJ. Substance P-, somatostatin-, and calcitonin gene related peptide-like immunoreactivity and fluoride resistant acid phosphatase activity in relation to retrogradely labeled cutaneous, muscular and visceral primary sensory neurons in the rat. *Neuroscience Letters*, 1987; 74:37~42
- 10 Schultzberg M, Hökfelt T, Nilsson G. Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastrointestinal tract of the rat and guinea pig. *Neuroscience*, 1980; 5:689~744
- 11 Lawson SN, Nichol SM. The use of morphometric technique to analysis the effect of neonatal capsaicin treatment on rat dorsal root ganglia and dorsal root. *J Physiol. (Lond.)* 1980; 303:12
- 12 Pearson J, Brandeis L, Cuello AC. Depletion of substance P-containing axons in substantia gelatinosa of patients with diminished pain sensitivity. *Nature*, 1982; 295:61~63
- 13 Leah JD, Cameron AA, Snow PJ. Neuropeptides in physiologically identified mammalian sensory neurons. *Neuroscience Letters*, 1985; 56:257~263
- 14 Kawatani M, Nagel J, Groat WC, et al. Identification of neuropeptides in pelvic and pudendal nerve afferent pathways to the sacral spinal cord of the cat. *J Comp Neurol*, 1986; 249:117~132
- 15 Hökfelt T, Elde T, Johansson RV, et al. Immunohistochemical evidence for separate population of somatostatin-containing and SP-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience*, 1976; 1:131~136
- 16 Kriisch B. Somatostatin-immunoreactivity fibers projection into the brain stem and spinal cord of the rat. *Cell Tissue Res*, 1981; 217:531~532
- 17 Charnay Y, Chayvialle JA, Pradayrol L, et al. Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in the spinal cord and dorsal root ganglia of the human foetus and infant. *Neuroscience*, 1983; 10(1):41~55
- 18 Hökfelt T. Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74:3587~3592

- 19 李育良,田九畴,庄志业.生长抑素样免疫反应物在山羊脊髓的分布.动物解剖组织胚胎学研究会第六次学术讨论会论文集,1990,65
- 20 Randic M,Miletic V. Effect of substance P in cat dorsal horn neurons activated by noxious stimuli. *Brain Res.* 1977;128:164~170

Peptide-Like Immunoreactivity in Goat Sensory and Sympathetic Ganglia

Li Yuliang Tian Jiuchou Zhang Zhiye Chen Shuling

(Department of Veterinary Science, Northwestern Agricultural University, Yangliang, Shaanxi, China, 712100)

Abstract A large number of SP-like perikarya and fibers were found in the nodose ganglia of the vagus and all dorsal root ganglia. The percentage of small neurons and medium-large neurons was 92% and 8% respectively. Only a few SS-like neurons were seen in the above ganglia. Sp-containing fibers and terminals were found in both cranial cervical ganglion and coeliac-cranial mesenteric ganglion complex in connection with postganglionic neurons, but SS-containing fiber and terminal networks were mainly found in the latter. Only a few in the former. However no SP and SS positive perikaryons were seen in those ganglia. SP-containing fibers present in the autonomic ganglia represent collaterals of the peripheral branch of primary sensory neurons located in the dorsal root ganglia, SS-containing fibers in the prevertebral ganglia may originate from enteric neurons or dorsal root ganglia. In this model, the autonomic response to sensory stimuli could be modulated by SP and SS through a short reflex loop, not involving the central nervous system.

Key words Substance P, somatostatin, sensory ganglion, sympathetic ganglion
goat