

鸡肠道组织中血管活性肠肽的分布特点

卿素珠,姜 河,安 源,曹 峰

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为探讨鸡肠道组织中肽能神经支配的途径及其功能,运用免疫组织化学超敏 SP 法,对不同生长阶段鸡肠道中血管活性肠肽(Vasoactive intestinal peptide,VIP)的分布特点进行了研究。结果显示,肠壁中 VIP 的表达范围较为广泛,涉及黏膜上皮和固有层、肌层和外膜,尤以固有层和肌层最为典型;随着日龄增加,黏膜上皮间 VIP 阳性细胞数量逐渐增多;从肠道不同部位的分布来看,十二指肠中 VIP 的表达强于同时期其他部位,空肠中的表达次之,回肠和盲肠的表达相对较弱。黏膜固有层和肌层一直分布有染色较深的 VIP 阳性神经纤维,呈串珠状、细线状或膨体状。提示鸡肠道是产生 VIP 的又一个重要部位,肠道中的 VIP 可参与鸡免疫器官的功能调节,并作为一种信息分子介导神经内分泌系统和黏膜免疫系统之间的相互作用。

[关键词] 血管活性肠肽(VIP);免疫组织化学;鸡;肠道组织

[中图分类号] S858.312.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)08-0044-05

Distribution of vasoactive intestinal peptide in intestine of chicken during growth

QING Su-zhu,JIANG He,AN Yuan,CAO Feng

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract : To investigate the pathway of peptidergic innervation on intestinal trace of chicken and its function ,immunohistochemical ultra sensitive SP method has been used to examine the distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) in intestine of chicken during growth. The results show that in insterstine ,VIP is extensively present in mucosa epithelia ,lamina propria ,muscle layer and tunica adventitia ,and particularly expressed on lamina propria and muscle layer. Expression of VIP on mucosa epithelia increases during the growth ,the expression of VIP in duodenum is heavier than that in the jejunum ,and the expression in the ileum and the caecum is the weakest. The dark staining VIP positive nerve fibers are distributed in lamina propria of mucosa and muscle layer at all different ages. The results show that intestine is another source which can produce VIP ,and plays an important role in functional regulation of immune organs. Besides the intestine also can be regarded as a signal molecule which contacts neuroendocrine system with mucosal immune system.

key words : vasoactive intestinal peptide(VIP) ;immunohistochemistry ;chicken ;intestine

黏膜免疫系统是机体免疫系统不可分割的重要组成部分,也是免疫系统的第一道防线,有研究表明,机体 95 %以上的感染发生在黏膜或由黏膜入侵

机体^[1]。最近的研究显示,黏膜免疫与神经内分泌系统之间也借助共同生物学语言形成了紧密的联系,如余锐萍等^[2]对兔圆小囊的系列研究结果表明,

†收稿日期] 2006-07-03

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2004C120);西北农林科技大学 2006 年专项科研项目

[作者简介] 卿素珠(1969 -),女,湖南永州人,副教授,博士,主要从事动物组织胚胎学和发育生物学研究。

兔圆小囊淋巴组织中的弥散神经内分泌细胞可能参与和调节兔体的肠道局部黏膜免疫反应;吕世军等^[3]应用免疫组织化学方法,对人肠相关淋巴组织中血管活性肠肽、神经元特异性烯醇化酶及 S-100 神经支配、5-羟色胺和生长抑素内分泌细胞的分布进行了观察,结果显示人肠道神经、内分泌和免疫系统之间有密切关系。这些研究初步将黏膜免疫与神经内分泌系统联系起来,但有关两者的联系方式及其机制还有待继续探索。

血管活性肠肽(Vasoactive intestinal peptide, VIP)又名舒血管肠肽,为一直链肽,相对分子质量达 3 323 ku,属胰高血糖素——胰分泌素家族,是近年来研究较多的一种物质,在生物体内分布极为普遍,作用也较为广泛^[4-6]。在生物体内,其既作为胃肠道激素,又是神经肽。最近的研究表明,VIP 是神经系统和免疫系统间相互作用的一种信号分子,在机体免疫,尤其是在局部黏膜免疫中起着一定的作用^[7]。目前,已有关于鸡免疫器官中 VIP 分布的研究^[8-10],但尚未见关于鸡肠道中 VIP 分布的报道。为此,本研究运用免疫组织化学超敏 SP 法,对不同生长阶段鸡肠道中 VIP 的分布变化特点进行了详细观察,以探讨鸡肠道中的肽能神经支配及其功能意义,揭示禽类肠道中的神经支配途径和规律,明确禽类黏膜免疫系统和神经内分泌系统之间的相互关系,进一步完善和丰富神经免疫调节及基础免疫学的研究资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 1 日龄白色单冠来航鸡 50 只(雌雄各半),购自西北农林科技大学畜牧站孵化厂。

1.1.2 主要试剂 兔抗 VIP 多克隆抗体(武汉博士德公司产品);链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化超敏 SP 试剂盒(福州迈新生物技术开发公司生产);葡萄糖氧化酶和四盐酸 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)(Sigma 公司进口,华美生物工程公司分装);牛血清白蛋白和 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APES)(Sigma 公司进口,华美生物工程公司分装)。

1.1.3 主要仪器 REICHERT 820 型精密轮转切片机(美国 AO 公司生产);XSZ-G 型生物显微镜(重庆光电仪器有限公司生产);Motic 数码显微镜(厦门 Motic 实业有限公司生产);Sartorius AA-160 型电子读数分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限

公司生产);雷磁 PHS J-4A 型实验室 pH 计(上海精密科学仪器有限公司生产)。

1.2 鸡肠道样本的采集

对购回的雏鸡,按正常饲养管理。分别在试验的 7,14,21,28,35 和 42 d,随机抽取试验鸡各 6 只(雌雄各半),开胸经左心室插管入主动脉,先用生理盐水冲洗,再用含体积分数 4%多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PB,pH 7.2~7.4)经心脏灌注固定,取十二指肠、空肠、回肠和盲肠扁桃体在相同固定液中固定、保存。

1.3 鸡肠道组织切片的制备

固定好的材料以流动自来水冲洗 12~24 h 后,经梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,连续环形切片,片厚 6~8 μm ,裱片于含体积分数 1%的 APES/丙酮预处理的载玻片上,45 $^{\circ}\text{C}$ 温箱烤片,共制得 3 套切片。

1.6 鸡肠道组织切片的染色

对制备的 3 套切片,1 套进行常规组织学 HE 染色,1 套进行 VIP 免疫组化 SP 法染色,剩下 1 套用于对照,以确定本试验免疫组化反应的特异性。

免疫组织化学超敏 SP 法染色程序如下:(1)切片脱蜡水,按抗体要求进行组织抗原修复(1.25 g/L 胰蛋白酶消化修复);(2)每张切片加过氧化物酶阻断液(试剂 A)室温下孵育 10 min;(3)加非免疫动物血清(试剂 B),室温下孵育 10 min;(4)甩去血清,加第一抗体(兔抗 VIP 多克隆抗体,工作浓度 1:200(体积比)),室温下孵育 1 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜;(5)加生物素标记的第二抗体(试剂 C),室温下孵育 10 min;(6)加链亲合素-过氧化物酶溶液(试剂 D),室温下孵育 10 min,试验中的 A、B、C、D 液均来自 SP 试剂盒;(7)葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍铵法呈色^[11];(8)切片脱水透明、封片,光镜下观察、记录、照相。以上每步骤间均以 0.01 mol/L PBS 液充分洗涤。对照试验以 0.01 mol/L PBS 液代替一抗,其余步骤同上。

2 结果与分析

经免疫组化 SP 法染色的切片,背景无色或浅蓝色,免疫阳性产物为蓝色或蓝黑色;而对照组切片染色为阴性,说明本试验具有免疫反应的特异性。根据染色的深浅分可为弱阳性(着色浅,+)、阳性(中等着色,++)和强阳性(深染,+++)3 级。

各日龄鸡肠道(十二指肠、空肠、回肠和盲肠扁桃体)中均有 VIP 的表达,VIP 广泛分布于黏膜上

皮和固有层、肌层及外膜。黏膜固有层中分布有染色较深的阳性神经纤维,呈串珠状、细线状或膨体状,这些神经纤维沿绒毛长轴纵向分布(图 1-A);肌层的内环肌和外纵肌上可见深染的细点线状或膨体样 VIP 阳性神经纤维分布(图 1-B)。黏膜上皮和固

有层中可见到染色程度不同的 VIP 阳性细胞,呈圆形或椭圆形,核不着色呈空泡状(图 1-C),其数量随日龄的增加逐渐增多;相邻切片的 HE 染色显示,肠道中出现的 VIP 阳性细胞多为淋巴细胞和巨噬细胞。

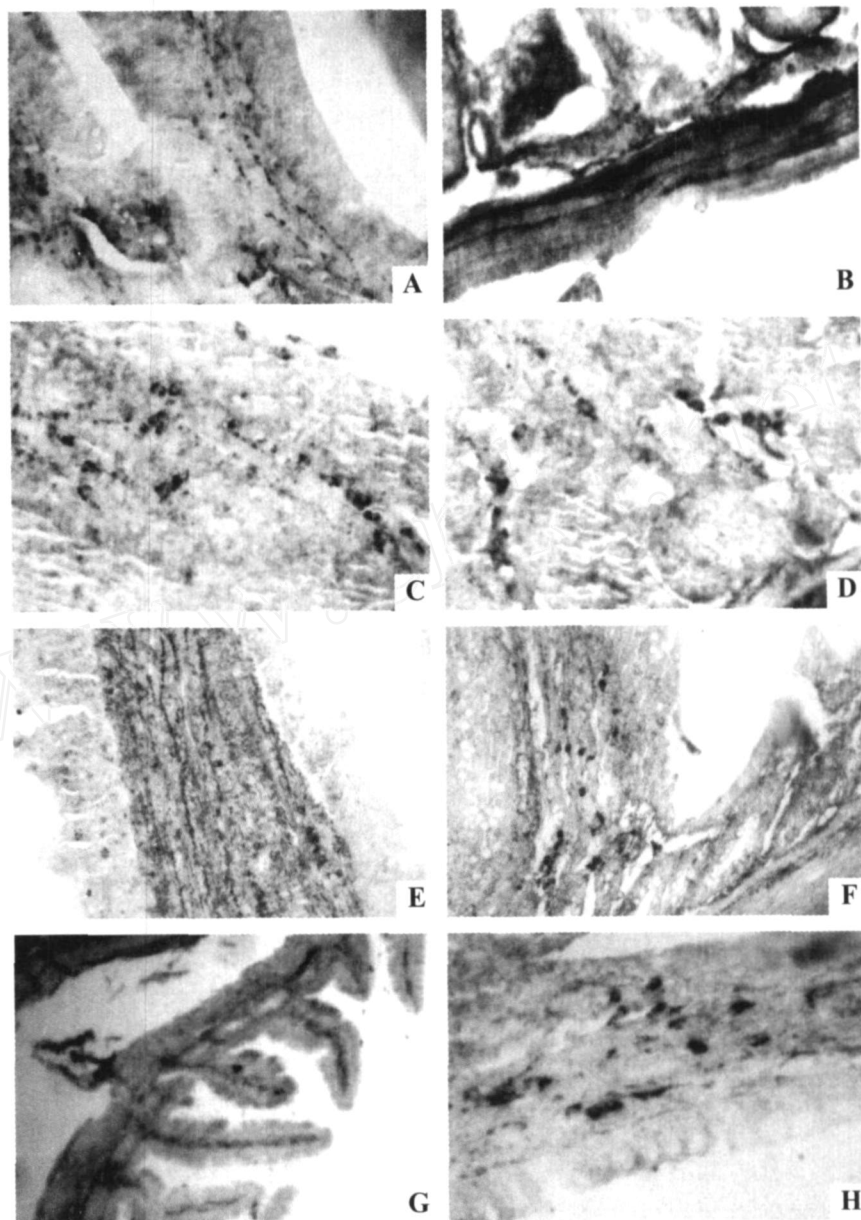


图 1 不同日龄鸡肠道 VIP 的分布

A. 21 d 回肠绒毛固有层内的 VIP 阳性神经纤维, $\times 400$; B. 7 d 十二指肠肌层内的 VIP 阳性神经纤维, $\times 400$; C. 21 d 十二指肠固有层内的 VIP 阳性细胞, $\times 400$; D. 21 d 十二指肠肠腺间的 VIP 阳性细胞, $\times 400$; E. 28 d 十二指肠固有层内的 VIP 阳性神经纤维, $\times 400$; F. 35 d 空肠固有层内的 VIP 阳性细胞, $\times 400$; G. 7 d 回肠内 VIP 阳性反应产物的分布, $\times 100$; H. 35 d 盲肠固有层内的 VIP 阳性纤维和阳性细胞, $\times 400$

Fig. 1 Distribution of VIP in intestine of chicken at different age

A. VIP positive nerve fibers in lamina propria of ileum villus at 21 d, $\times 400$; B. VIP positive nerve fibers in muscle layer of duodenum at 7 d, $\times 400$; C. VIP positive cells in lamina propria of duodenum at 21 d, $\times 400$; D. VIP positive cells during intestinal gland of duodenum at 21 d, $\times 400$; E. VIP positive nerve fibers in lamina propria of duodenum at 28 d, $\times 400$; F. VIP positive cells in lamina propria of jejunum at 35 d, $\times 400$; G. the distribution of VIP positive reactive products in ileum at 7 d, $\times 100$; H. VIP positive nerve fibers and positive cells in lamina propria of caecum at 35 d, $\times 400$

2.1 不同生长阶段鸡十二指肠中 VIP 的表达特点

鸡生长 7 d 时,其黏膜上皮可见弥散分布的弱阳性细胞,细胞呈圆形或椭圆形,个体小,胞质可见着色深浅不一的阳性颗粒,核不着色呈空泡状;固有层可见染色较弱的串珠状或细线状的 VIP 阳性神经纤维,沿绒毛长轴纵向分布,神经纤维之间出现零星的 VIP 阳性细胞,呈圆形或椭圆形,着色较弱,个别着色较深;肌层有发达的阳性神经纤维,呈串珠状或细线状环绕于肌层之间;肠腺内可见少数的 VIP 阳性细胞,呈锥形、椭圆形;外膜可见弱或中等染色的阳性神经纤维。

生长 14 d 时,黏膜上皮和固有层的阳性细胞数量有所增加。

生长 21 d 时,黏膜上皮 VIP 阳性细胞仍呈弥散分布,呈弱阳性或阳性;固有层分布有串珠状或细线状阳性神经纤维,沿绒毛长轴纵向分布,有的围绕血管分布,纤维之间 VIP 阳性细胞有所增加;肠腺之间的 VIP 阳性细胞深染,呈锥形、椭圆形(图 1-D);肌层仍可见发达的阳性神经纤维;外膜有中等着色的阳性神经纤维。

28 d,黏膜上皮间弥散的 VIP 阳性细胞增多,大部分为中等着色或深染;固有层内密集分布着深染的串珠状或细线状的阳性神经纤维,其数量随绒毛的增长、增粗而增多,呈蓝黑色(图 1-E),纤维之间的阳性细胞数量继续增加。

35 d,黏膜上皮间 VIP 阳性细胞继续增加,中等着色或深染;固有层中阳性神经纤维呈串珠状或细线状,其间的阳性细胞着色深,数量增加。

42 d,黏膜上皮间 VIP 阳性细胞数量增加,多为深染;固有层中仍有阳性神经纤维呈串珠状或条索状,其间的阳性细胞数量增多;外膜可见深染的阳性神经纤维。

2.2 不同生长阶段鸡空肠中 VIP 的表达特点

7 d,黏膜上皮可见少数弥散的 VIP 阳性细胞,呈圆形或椭圆形,个体小,核不着色呈空泡状,胞质可见深浅不一的阳性颗粒。阳性反应主要位于固有层和肌层:固有层可见细线状或膨体状阳性神经纤维,中等着色,其间的 VIP 阳性细胞数量较少,弱或中等染色;肠腺上皮细胞间可见少量散在的 VIP 阳性细胞,形态为圆形、椭圆形或不规则形;黏膜肌可见阳性神经纤维,染色较弱;肌层和外膜可见发达、深染的阳性神经纤维。

14~21 d,黏膜上皮间可见弥散的 VIP 阳性细胞,数量略有增加;固有层阳性神经纤维呈弱或中等

染色,形状为细线状、膨体状,不及十二指肠的阳性神经纤维发达,纤维之间阳性细胞呈现中等染色或深染,数量有所增加;肠腺上皮间可见少量的 VIP 阳性细胞;黏膜肌可见中等染色的阳性神经纤维;肌层的阳性神经纤维依然发达,为细线状、条索状;外膜有发达的中等着色阳性神经纤维。

28~35 d,黏膜上皮染色较深,弥散的阳性细胞数量增多;固有层仍有深染的阳性神经纤维,呈串珠状或细线状,纤维之间的 VIP 阳性细胞数量增多、染色深(图 1-F);肠腺上皮内 VIP 阳性细胞深染、弥散分布;黏膜肌可见深染的膨体状阳性神经纤维;肌层和外膜仍可见发达、深染的阳性神经纤维。

42 d,整体染色有所减弱。

2.3 不同生长阶段鸡回肠和盲肠扁桃体中 VIP 的表达特点

7 d,回肠黏膜上皮间阳性细胞很少;固有层中可见深染的阳性神经纤维,呈细线状或条索状,沿绒毛长轴纵向分布(图 1-G),纤维之间可见零星的深染 VIP 阳性细胞,细胞体积较小,呈椭圆形或不规则形态;黏膜肌和肌层可见中等染色的阳性神经纤维;外膜出现深染的阳性神经纤维;盲肠固有层阳性神经纤维呈细线状和膨体状,深染,其间的阳性细胞很少、深染,呈椭圆形或不规则形。

14 d,回肠固有层内有较多的深染阳性神经纤维,纤维间的阳性细胞数量有所增加;盲肠黏膜上皮间阳性细胞仍然很少;固有层的阳性神经纤维深染,其间的阳性细胞有所增加;肠腺之间的阳性细胞深染,数量增加。

21 d,回、盲肠染色整体下降,回肠的阳性反应变化不大;盲肠肌层间阳性神经纤维增多,深染,呈串珠状和细线状。

28 d,回肠黏膜上皮和固有层的阳性细胞数量变化不大;肌层间阳性神经纤维增多、变短,呈条索状或膨体状。盲肠黏膜肌层的阳性神经纤维呈中等着色。

35 d,回肠变化不明显。盲肠的固有层阳性细胞数量增多,细胞深染,阳性神经纤维少,染色浅,呈细线状(图 1-H);肌层的阳性神经纤维发达。

42 d,阳性反应的范围和染色程度均明显下降,回肠的黏膜上皮和固有层阳性细胞数量减少;肌层的阳性神经纤维深染,在肌层均匀分布,其间可见少量的阳性细胞;肠腺上皮间阳性细胞增多,中等着色,呈椭圆形或不规则形态;肌层的阳性神经纤维变多,呈膨体状、条索状,中等着色。盲肠的阳性反应

无太大变化。

以上结果表明,鸡肠壁组织中 VIP 的表达范围广泛,涉及黏膜的上皮和固有层、肌层及外膜,尤以固有层和肌层的较为典型;随着日龄的增加,黏膜上皮间 VIP 阳性细胞数量逐渐增多;从肠道不同部位的分布来看,十二指肠中的 VIP 表达要强于同时期其他部位,空肠中的表达次之,回肠和盲肠的表达相对较弱。

3 讨 论

3.1 鸡肠壁中阳性细胞表达的意义

肠道是禽类黏膜免疫的主要部位,其在禽类的黏膜免疫中发挥着重要作用^[12]。因此,研究禽类肠道的神经支配,是了解禽类神经内分泌系统和免疫系统的一个重要方面。肠道黏膜免疫系统,是由黏膜相关淋巴组织(主要是肠相关淋巴组织, GALT)组成的免疫系统,含有丰富的 B 细胞、T 细胞和巨噬细胞等,这些细胞在肠道黏膜免疫中发挥着重要的作用。研究表明,肠绒毛上皮淋巴细胞主要为 T 细胞,发生消化管黏膜免疫时,上皮内淋巴细胞接受刺激后可能迁出上皮而进入固有层,并将抗原信息传递给固有层中的淋巴细胞,被抗原致敏过的 T 细胞可迁移到肠外淋巴组织,发育成熟后重新分布于肠固有层和上皮内^[13]。本试验结果显示,鸡肠道黏膜上皮和固有层中的大量 T 淋巴细胞和巨噬细胞呈 VIP 阳性反应,且随着日龄的增加,十二指肠、空肠的黏膜上皮和固有层中的 VIP 阳性细胞有增多趋势;随着鸡日龄的增加,十二指肠和空肠的黏膜上皮及固有层中的 VIP 阳性细胞和纤维的数量与肠道黏膜免疫系统的逐渐完善呈正相关,提示 VIP 可能参与肠道黏膜的免疫。

3.2 鸡肠壁组织 VIP 阳性神经纤维的功能

VIP 阳性神经纤维较多地分布于肠壁固有层内,其可能通过与血管的联系影响淋巴细胞的黏膜免疫反应;肌层间也有 VIP 的较强表达,提示 VIP

可能通过舒血管作用来调节血管的管径和血流,从而控制淋巴细胞的迁移。

鸡肠壁中阳性细胞及阳性神经纤维的广泛分布,提示鸡的肠道也可能是神经系统以外产生 VIP 的重要源泉,VIP 是鸡神经内分泌免疫网络中共有的生物学语言,可介导神经内分泌和黏膜免疫系统之间的双向信息传递。

[参考文献]

- [1] 高英杰. 黏膜免疫向免疫学提出了新问题[J]. 上海免疫学杂志, 2000, 20(5): 257-259.
- [2] 余锐萍, 刘 环, 宋俊霞, 等. 兔圆小囊组织发育及其与肠道黏膜免疫关系的研究[J]. 中国学术期刊文摘, 2000, 6(5): 1322-1323.
- [3] 吕世军, 张伟栋, 林建韶, 等. VIP 能神经、生长抑素、5-羟色胺阳性细胞与淋巴组织在人肠中的分布[J]. 潍坊医学院学报, 1995, 17(3): 161-163.
- [4] 许海燕. 血管活性肠肽的免疫调节作用[J]. 国外医学-免疫学分册, 2002, 25(2): 73-76.
- [5] 陈 峰, 毕英佐, 曹永长, 等. 血管活性肠肽在禽类上的研究进展[J]. 中国家禽, 1997(1): 31-33.
- [6] 徐 伟, 赵亚华, 孔 洁. 血管活性肠肽研究进展[J]. 药物生物技术, 2002, 9(6): 545-547.
- [7] 喻召才. 血管活性肠肽与神经免疫调节[J]. 国外医学-免疫学分册, 1999, 22(2): 99-102.
- [8] 卿素珠, 杨延平. 鸡脾脏中血管活性肠肽的表达变化[J]. 动物医学进展, 2004, 25(6): 110-112.
- [9] 卿素珠, 杨延平. 鸡法氏囊中血管活性肠肽的免疫组织化学观察[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005(4): 15-16.
- [10] 卿素珠, 杨延平. 鸡法氏囊中血管活性肠肽的表达特点[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(5): 5-8.
- [11] Shu S, Ju G, Fan L. The glucose oxidase-DAB-nikel method in peroxidase histochemistry of the nervous system[J]. Neurosci Lett, 1988, 85(2): 169-170.
- [12] 文其乙, 崔治中. 家禽黏膜免疫研究[J]. 河北畜牧兽医, 2001(1): 15-16.
- [13] 成令忠. 现代组织学[M]. 3 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003.