

网络出版时间:2013-07-18 15:59

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130718.1559.003.html>

老龄贵州小型猪胃黏膜 5-HT-IR 及 SS-IR 细胞的初步观察

吴曙光^a, 刘霞^b, 王明镇^a, 詹新义^a, 周谷于^c, 钱宁^a

(贵阳中医学院 a 实验动物研究所, b 组织学与胚胎学教研室, c 基础医学院, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] 【目的】观察、比较分析老龄贵州小型猪胃内分泌细胞的形态、数量和分布。【方法】采集老龄和青年贵州小型猪的胃,取胃的不同部位(贲门、胃体、胃窦),用免疫组织化学染色法分别对老龄和青年贵州小型猪胃黏膜中的 5-羟色胺(5-HT)、生长抑素(SS)细胞染色,在 400 倍视野中观察其形态及分布,并进行计数,比较老龄与青年贵州小型猪胃黏膜的差异。【结果】老龄和青年贵州小型猪胃黏膜中的 5-HT-IR、SS-IR 阳性细胞呈锥形、圆形、卵圆形等多种形态;分布不均匀,分别主要分布于胃腺的体部、底部或黏膜表面上皮细胞之间。老龄贵州小型猪胃窦 5-HT-IR 阳性细胞数较贲门极显著增加($P<0.01$),胃体较贲门显著增加($P<0.05$);胃窦 SS-IR 阳性细胞数较贲门极显著增加($P<0.01$),而胃体与贲门差异不显著。老龄贵州小型猪 5-HT-IR、SS-IR 阳性细胞数较青年贵州小型猪明显减少,且差异达极显著水平($P<0.01$)。【结论】老龄贵州小型猪胃黏膜 5-HT-IR、SS-IR 阳性细胞的形态、分布规律与青年贵州小型猪相似,但分泌 5-HT、SS 的细胞数量减少,提示老龄贵州小型猪的胃黏膜内分泌功能减退。

[关键词] 老龄贵州小型猪;胃黏膜;5-羟色胺;生长抑素

[中图分类号] S828.8⁺9

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)08-0038-04

Preliminary observation of SS-IR cell and 5-HT on gastric mucosa of Guizhou miniature aged pigs

WU Shu-guang^a, LIU Xia^b, WANG Ming-zhen^a,
ZHAN Xin-yi^a, ZHOU Gu-yu^c, QIAN Ning^a

(a Laboratory Animal Institute, b Histology and Embryology Staff Room,

c College of Basic Medical, College of Guiyang Traditional Chinese medicine, Guiyang, Guizhou 550002, China)

【Objective】 This study aimed to observe and compare the morphology, number and distribution of gastric endocrine cells of aged and young Guizhou miniature pigs. **【Method】** Stomachs of aged and young Guizhou miniature pigs were collected and different parts (cardiac, gastric body and antral) of their stomachs were picked. 5-HT-IR and SS-IR cells on gastric mucosa were stained by immunohistochemical SABC method before the distributions and morphology were observed and the numbers were counted. At last, the differences between aged and young pigs were revealed. **【Result】** Positive 5-HT-IR and SS-IR cells on gastric mucosa of aged and young pigs had shapes of vertebral, circle, ovoid, and spindle etc. They mainly distributed in body and bottom of gastric gland. Extremely significant differences between the numbers of the 5-HT-IR cells in gastric body and antral ($P<0.01$), and significant differences between gastric body and

* [收稿日期] 2012-10-25

[基金项目] “十五”国家科技攻关计划重点项目(2004BA717B-01-03); 贵州省科技计划项目(黔科合中药字[P2012]LKZ7001 号)

[作者简介] 吴曙光(1971—),女(蒙古族),内蒙古奈曼人,高级实验师,硕士,硕士生导师,主要从事贵州小型猪的基础及应用研究。E-mail: wxsg126@126.com

[通信作者] 钱宁(1959—),男,贵州贵阳人,教授,硕士生导师,主要从事贵州小型猪实验动物化研究。

E-mail: qnwlqxk@yahoo.com.cn

antral were observed ($P<0.05$). Same differences were found between gastric antral and cardiac stomach ($P<0.01$), while no significant difference was observed between cardiac and gastric body. There were also significant differences between the numbers of t 5-HT-IR cells and SS-IR cells in the aged and young mini pigs ($P<0.01$).【Conclusion】 The morphologies and distribution of positive 5-HT-IR and SS-IR cells on gastric mucosa of Guizhou miniature aged pigs were similar to the youth pigs, but the secretion 5-HT and SS cells number were less, indicating that gastric endocrine function of Guizhou miniature pigs decreased as the increase of age.

Key words: Guizhou-miniature aged pigs; gastric mucosa; 5-HT; somatostatin

小型猪作为实验动物的优越性已被越来越多的人所认知,但由于其基础及应用研究背景资料不足,小型猪还未能取代犬和非人灵长类实验动物,在生物医学研究中充分体现其重要价值。消化道不仅是消化器官,也是体内最大、最复杂的内分泌器官,其内分泌细胞种类繁多,功能各异。消化道内分泌细胞与神经系统和外分泌腺相互配合,共同调控和调节消化、吸收及体内其他生理过程^[1-2]。本课题组曾对贵州小型猪血液生理生化指标进行了检测分析,结果显示,5 岁以上贵州小型猪部分血液生理生化指标出现异常,相关功能也出现了退化现象^[3-4]。为了进一步观察老龄贵州小型猪消化道的形态学变化,本研究对老龄贵州小型猪胃黏膜中 5-羟色胺(5-HT)和生长抑素(Somatostatin, SS)阳性细胞的形态及分布进行了观察,并与青年贵州小型猪进行了比较,旨在为小型猪作为实验动物提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

贵州小型猪,5 岁龄以上老龄猪 7 头,1 岁龄的青年猪 6 头,健康,雌雄不限,普通级,由贵阳中医学院实验动物研究所提供,饲养于开放系统,全价营养配合饲料喂养,自由饮水。兔 5-HT 及 SS 抗血清,北京中杉金桥生物工程有限公司生产;羊抗兔 IgG、免疫组织化学染色法(Strept Avidin-Biotin Complex, SABC)复合物,武汉博士德生物工程有限公司生产。

1.2 切片的制备

将老龄和青年贵州小型猪常规麻醉^[5]处死后立即取出胃,小心清理内容物,用生理盐水冲洗干净后分别取贲门、胃体、胃窦组织(1 cm×1 cm×1 cm),用体积分数 4% 中性甲醛固定,制作常规石蜡切片,片厚 4 μm ,每间隔 56 μm 取 1 张切片,共取 5 张备用。

1.3 切片的染色

采用免疫组织化学染色法分别对 5-HT 细胞及 SS 细胞染色,主要步骤如下:切片脱蜡至水;用体积

分数 10% H_2O_2 于室温处理 10 min 以灭活内源性酶;PBS 洗 3 次(2 min/次);滴加正常山羊血清(稀释倍数 1:10)室温封闭 20 min;甩去多余液体后依次滴加兔 5-HT 及 SS 抗血清(稀释倍数 1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS 洗 3 次(2 min/次);滴加羊抗兔 IgG(稀释倍数 1:100),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min;PBS 洗 3 次(2 min/次);滴加 SABC 复合物(稀释倍数 1:100),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min;PBS 洗 4 次(5 min/次);DAB- H_2O_2 液显色约 10 min;苏木精复染细胞核;中性树胶封片。对照:用 PBS 缓冲液代替特异性抗血清,其余步骤同上。

1.4 切片观察及细胞计数

从胃组织不同部位每种抗体染色切片中各选取 5 张,在光镜下观察 5-HT 免疫反应(5-HT-IR)、SS 免疫反应(SS-IR)阳性细胞的分布及形态,并对每张切片随机选 5 个高倍(400×)视野进行计数,其计数结果取“平均值±标准差($\bar{X}\pm S$)”,利用 SPSS 17.0 对数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 贵州小型猪胃黏膜 5-HT-IR、SS-IR 阳性细胞的显微观察

在显微镜下,青年贵州小型猪胃黏膜 5-HT-IR 阳性细胞免疫反应产物位于胞质内,染色较深,为棕黑色细颗粒状;阳性细胞胞体较大,呈锥形、卵圆形、圆形、柱状或不规则形,细胞顶部可伸达腺腔;阳性细胞分布不均匀,主要位于胃腺底部和体部的上皮细胞之间,偶见于黏膜表面上皮细胞之间,阳性细胞数量从贲门至胃窦逐渐增多;对照切片中未见免疫反应阳性细胞。老龄贵州小型猪胃黏膜 5-HT-IR 阳性细胞形态及分布特点与青年贵州小型猪相似,但胞质染色较浅,数量较少(图 1)。

在显微镜下,青年贵州小型猪胃黏膜 SS-IR 阳性细胞免疫反应产物位于胞质内,染色较浅,为棕黄细颗粒状;阳性细胞胞体较小,以锥形较常见,其次

为圆形和卵圆形,锥形细胞的顶部可伸达腺腔,也可伸至腺细胞之间或腺体之间的结缔组织内;阳性细胞数量较少,分布不均匀,主要位于胃腺上皮细胞之间,黏膜表面上皮细胞之间也有少量分布;贲门和胃

体的阳性细胞数量少,胃窦处略有增加。对照切片中未见免疫反应阳性细胞。老龄贵州小型猪胃黏膜 SS-IR 阳性细胞形态及分布特点与青年贵州小型猪相似,但胞质染色较浅,数量较少(图 1)。

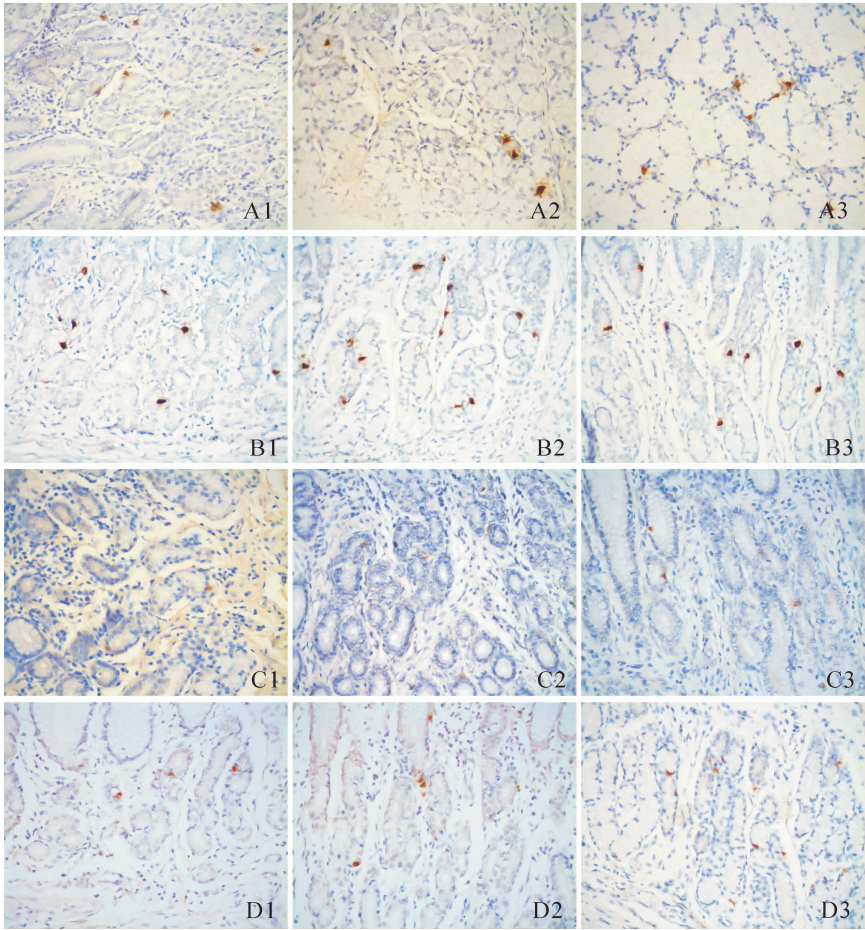


图 1 老龄、青年贵州小型猪胃粘膜 5-HT-IR 和 SS-IR 阳性细胞的显微观察(400×)
A. 老龄猪 5-HT-IR;B. 青年猪 5-HT-IR;C. 老龄猪 SS-IR;D. 青年猪 SS-IR;1. 贲门;2. 胃体;3. 胃窦

Fig. 1 Microscopic observation of gastric mucosal 5-HT-IR and SS-IR cells of aged and young Guizhou miniature pigs (400×)

A. Aged pig 5-HT-IR;B. Young pig 5-HT-IR;C. Aged pig SS-IR;D. Young pig SS-IR;1. Cardia;2. Gastric body;3. Antral

2.2 贵州小型猪胃黏膜 5-HT-IR、SS-IR 阳性细胞的计数结果

HT-IR、SS-IR 阳性细胞数与青年猪相应部位的比较结果见表 1。

老龄贵州小型猪贲门、胃体及胃窦 3 个部位 5-

表 1 老龄、青年贵州小型猪胃黏膜 5-HT-IR、SS-IR 阳性细胞数的比较

Table 1 Numbers of 5-HT-IR and SS-IR cells in gastric mucosa of aged and young Guizhou miniature pigs

部位 Position	5-HT-IR 阳性细胞 5-HT-IR cell		SS-IR 阳性细胞 SS-IR cell	
	青年猪 Young pig	老龄猪 Aged pig	青年猪 Young pig	老龄猪 Aged pig
贲门 Cardia	7.08±2.29	1.90±0.41 ^{ΔΔ}	3.75±1.56	1.80±0.33 ^{ΔΔ}
胃体 Gastric body	8.57±2.49	2.10±0.25 ^{*ΔΔ}	4.12±1.39	1.97±0.42 ^{ΔΔ}
胃窦 Antral	9.38±3.54	2.17±0.37 ^{**ΔΔ}	5.58±1.45	2.13±0.31 ^{**ΔΔ}

注:在同一年龄组中标“*”与“**”者分别表示与贲门差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$);在胃黏膜相同部位标“ $\Delta\Delta$ ”者表示与青年猪差异极显著($P<0.01$)。
Note:“*” and “**” indicate significant different ($P<0.05$) and extremely significant different ($P<0.01$) between aged and young pigs while “ $\Delta\Delta$ ” indicates extremely significant different ($P<0.01$) between aged and young pigs.

由表 1 可知,老龄贵州小型猪胃 5-HT-IR、SS-IR 阳性细胞在贲门中最少,胃体中较多,胃窦中最多;胃窦中 5-HT-IR 阳性细胞数与贲门部差异极显著($P<0.01$),胃体与贲门差异显著($P<0.05$);胃窦 SS-IR 阳性细胞数与贲门差异极显著($P<0.01$),但胃体与贲门差异不显著。在同一部位,老龄贵州小型猪 5-HT-IR、SS-IR 阳性细胞数较青年贵州小型猪明显减少,且差异极显著($P<0.01$)。

3 讨 论

小型猪在解剖学、生理学、疾病发生机制等方面与人类极其相似,因此在生命科学研究领域,小型猪有望逐步替代实验猴和犬,成为新型实验动物。目前小型猪已广泛用于肿瘤、心血管、糖尿病、外科、牙科、皮肤烧伤、血液病、遗传病、消化及营养代谢、新药评价等多个领域^[6]。

5-HT 是机体内重要的神经介质。研究发现,哺乳动物体内大约 60%~90% 的 5-HT 是在肠道内合成,5-HT 存在于胃肠道内,胃窦和十二指肠 5-HT 含量最多,而胃底黏膜内数量随动物种属而异,其中 5-HT 含量在猪、狗、兔、猴中较高,而在豚鼠中较低^[7-8]。5-HT 主要由肠嗜铬细胞(Enterochromaffin cells,EC)分泌,EC 对来自肠腔内的化学刺激和压力变化较为敏感,升高肠腔内压力可刺激 EC 分泌 5-HT,作用于黏膜下传入神经纤维,并与麦氏神经丛中上行和下行中间神经元形成突触,形成胃肠道由近端向远端的蠕动反射^[9-10]。5-HT 与呕吐、腹泻等胃肠运动失调及肠预激综合征的病理形成机制有关,并参与返流性食管炎、消化性溃疡及胃肠功能病等疾病的内分泌调节^[11-12]。本试验观察发现,贵州小型猪胃黏膜 5-HT-IR 阳性细胞形态多样,分布不均匀,主要分布于胃腺底部和体部或黏膜表面上皮细胞之间;5-HT-IR 阳性细胞分布以胃窦黏膜处最多,胃体次之,贲门最少。老龄贵州小型猪 5-HT-IR 阳性细胞的分布规律及细胞形态与青年贵州小型猪基本一致,细胞染色较浅,数量明显减少。提示老龄贵州小型猪胃黏膜分泌 5-HT 的功能减退。

SS 又称生长激素释放抑制激素,是与生长激素生理功能拮抗的一种激素,广泛分布于脊椎动物神经系统、甲状腺和胃肠道等部位。SS 由胃及小肠黏膜内的 D 细胞分泌,能抑制胃酸和胰高血糖素的分泌以及肠道内 T 细胞和 B 细胞的增殖^[13]。SS 对免疫系统有着重要的调节作用,其作用与胃肠道的免疫功能有关^[14]。本试验观察发现,贵州小型猪胃黏

膜内的 SS-IR 阳性细胞体积较小,主要分布于胃腺上皮细胞间,或分布于黏膜表面上皮细胞之间,SS-IR 阳性细胞分布以胃窦黏膜处最多,胃体次之,贲门最少。老龄贵州小型猪 SS-IR 阳性细胞的分布规律和细胞形态与青年贵州小型猪细胞基本一致,细胞染色较浅,数量减少。提示 5 岁龄以上贵州小型猪胃黏膜分泌 SS 的功能减退。

5 岁龄以上(含 5 岁龄)老龄贵州小型猪与青年猪相比,表现为被毛稀疏,蛀齿增多或恒齿残缺,体况下降。在大体解剖上表现为腹腔器官粘连,公猪睾丸硬化、粘连等,其红细胞数、血红蛋白含量及血清总胆红素、白蛋白水平均降低,肌酐(UREA)升高^[15]。本试验观察结果显示,5 岁龄以上的老龄贵州小型猪胃黏膜内分泌 5-HT、SS 细胞数量减少,提示老龄贵州小型猪胃内分泌功能减退。这为老龄贵州小型猪的基础及应用研究提供了参考。

[参考文献]

- [1] Nilsson A H. The gut as the largest endocrine organ in the body [J]. *Ann Oncol*,2001,12(2):63-68.
- [2] 田德峰,王彦辉,任慧霞. 胃肠激素的研究概况 [J]. *中国生化药物杂志*,2000,21(6):316-318.
Tian D F,Wang Y H, Ren H X. Research status of gastrointestinal hormones [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmacology*,2000,21(6):316-318. (in Chinese)
- [3] 吴曙光,董小君,郭科男,等. 贵州小型猪血液生化指标检测 [J]. *黑龙江畜牧兽医*,2011(3):44-45.
Wu S G,Dong X J,Guo K N,et al. Examination of blood biochemical indexes in Guizhou miniature pigs [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*,2011(3):44-45. (in Chinese)
- [4] 吴曙光,董小君,郭科男,等. 贵州小型猪血液生理指标检测 [J]. *黑龙江畜牧兽医*,2010(19):53-54.
Wu S G,Dong X J,Guo K N,et al. Examination of blood physiological indexes in Guizhou miniature pigs [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*,2010(19):53-54. (in Chinese)
- [5] 吴曙光,余小明,田 颢,等. 速眠新Ⅱ对幼龄贵州小型猪外科手术中的应用研究 [J]. *实验动物科学与管理*,2006,23(4):21-23.
Wu S G, She X M, Tian K,et al. Study of drugs “Su_Mian_XinⅡ” application on Guizhou miniature piglets under surgical operation [J]. *Laboratory Animal Science and Management*, 2006,23(4):21-23. (in Chinese)
- [6] 秦 川,张连峰,魏 泓,等. 实验动物学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2010:53.
Qin C,Zhang L F, Wei H, et al. *Laboratory animal science* [M]. Beijing People's Medical Publishing House,2010:53. (in Chinese)