

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2011.04.007

柄袋沙蠋体壁和消化系统甲硫氨酸脑啡肽免疫组织化学定位

黄雯雯, 王宜艳, 管晓娟, 孙虎山*

(鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025)

摘要:采用免疫组织化学 SABC 法, 对甲硫氨酸脑啡肽(M-ENK)在柄袋沙蠋体壁及其附属物鳃、疣足和消化系统各器官中的分布进行了研究。结果表明, 柄袋沙蠋体壁、鳃、疣足以及各消化器官的上皮细胞中均有不同程度的 M-ENK 阳性反应, 且体壁、消化道的食管、肠、直肠中阳性反应多集中在上皮细胞的游离端; 体壁肌肉中环肌层 M-ENK 阳性反应比纵肌层强; 食道侧囊上皮细胞和结缔组织中也有 M-ENK 分布。M-ENK 在柄袋沙蠋的体壁、鳃、疣足及消化系统各器官中均有分布, 且分布密度不同, 可能与各部位的功能有关。

关键词: 柄袋沙蠋; 甲硫氨酸脑啡肽; 体壁; 消化系统; 免疫组织化学

中图分类号: Q959.19; Q954.58; R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2011)04-0502-04

Immunohistochemical Localization of Methionine-enkephalin in the Body Wall and Digestive System of *Arenicola brasiliensis*

HUANG Wen-wen, WANG Yi-yan, GUAN Xiao-juan, SUN Hu-shan*

(College of Life Science, Ludong University, Yantai, Shandong Province 264025, China)

Abstract: The methionine-enkephalin (M-ENK) in the body wall and its components gill, parapodia and digestive system of *Arenicola brasiliensis* was analyzed by the immunohistochemical strept avidin-biotin complex (SABC) staining. The results showed that the different degree of positive M-ENK immunoreaction was observed in the epithelium of body wall, gill, parapodia and each organ of the alimentary. Besides, the positive immunoreaction was centralized in the dissociative sides of the epithelium of the body wall, oesophagus, intestine, rectum. In muscle of the body wall, the degree of M-ENK immunoreaction in the circular muscle layer was stronger than in the longitudinal muscle layer. There was M-ENK in the epithelium and the connective tissue of the oesophageal pouch too. It can be concluded that M-ENK is abundantly distributed in the body wall, gill, parapodia and digestive system in *A. brasiliensis*, and that different densities of M-ENK in these organs may be related to their different functions.

Key words: *Arenicola brasiliensis*; methionine-enkephalin; body wall; digestive system; immunohistochemistry

甲硫氨酸脑啡肽(M-ENK)已被证实高等动物体内广泛分布,并发挥着调节胃肠、内分泌和免疫等各种生理功能(滑静等,1998)。研究表明,M-ENK在环节动物等低等无脊椎动物体内也广泛存在。Rzasa等(1984)采用放射免疫分析技术从寡毛纲蚯蚓 *Lumbricus terrestris* 的神经、内脏、贮精囊、体壁等组织器官中检测到了 M-ENK 样物质,并发现消化道中 M-ENK 样物质活性在可分泌消化酶和胃泌素的部位最强,可能参与消化功能的调节;Gesser 和 Larsson(1986)采用免疫细胞化学法,发现蚯蚓体壁上皮组织的感觉细胞中存在 M-ENK 阳性反应物质,并证明 M-ENK 在中枢神经和周围神经之间发挥着

感觉调节作用;Verger-Bocquet 等(1987)采用免疫组化技术在水蛭 *Theromyzon tessulatum* 中枢神经系统中发现了 M-ENK 的阳性反应细胞;Salzet 等(1995)采用反相高效液相色谱技术也从水蛭脑神经节中成功提取出 M-ENK 并鉴定出其序列结构与哺乳动物相同。随后的研究发现,水蛭中枢神经和免疫细胞中的脑啡肽原与两栖动物非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 的相似程度为 25.4% (Salzet *et al.*, 1997, 2002; Salzet & Stefano, 1997)。也有报道证实,在多毛纲沙蚕 *Nereis* (Dhainaut-Courtois, 1986)、管虫 *Sabellastarte magnifica* (Diaz-Miranda *et al.*, 1991) 的神经系统中都有 M-ENK 存在。柄袋沙蠋 *Arenicola brasiliensis* 隶

收稿日期:2010-11-25 接受日期:2010-12-29 基金项目:山东自然科学基金项目(ZR2010CM017)

作者简介:黄雯雯(1985~),女,硕士研究生,研究方向:海洋生物学,E-mail:ld.huangwen@163.com

*通讯作者 Corresponding author, E-mail: S_hushan@163.com

属于环节动物门多毛纲隐居目沙蠋科,是环节动物中典型的底栖生活类群,为沙滩和泥沙滩的优势种类,在研究潮间带生态学时是一个较重要的研究对象(吴宝铃,孙瑞平,1979)。关于柄袋沙蠋免疫组织化学的研究至今未见相关报道。本文采用免疫组织化学 SABC 法对柄袋沙蠋的体壁及其附属物鳃、疣足和消化系统各器官的 M-ENK 分布进行定位研究,为丰富 M-ENK 对无脊椎动物特别是多毛纲环节动物的调节作用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

柄袋沙蠋于 2010 年 7 月底采自山东烟台夹河入海口,置于实验室充气的水族箱中暂养,每日换水 1 次,水温 23 ~ 26℃,所用海水为烟台芝罘湾砂滤海水。用砂滤海水浸泡卫生纸搅拌成浆状,取材前将柄袋沙蠋置于纸浆中使其吞入纸浆,清空消化道内沙粒,整体浸入 0.1 mol/L、pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS,含 0.1 mol/L、pH7.4 的 PB,2% 的氯化钠)配制的 4% 多聚甲醛中,4℃ 固定 6 h。分别剪下吻、食管、食道侧囊、胃、肠、直肠、带有鳃和疣足的体壁等,再次浸入 0.1 mol/L、pH7.4 PBS 配制的 4% 多聚甲醛中,4℃ 固定 12 h。将组织块用 0.1 mol/L、pH7.4 PBS 冲洗 3 次,每次 10 min,梯度酒精脱水后,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋。用 Leica 石蜡切片机进行切片,厚度为 7 μm。

1.2 试剂

兔抗鼠 M-ENK(一抗)为 Sigma 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(AB 复合液)为 Santa Cruz 公司产品,3,3-二氨基联苯胺(DAB)为 Fluka 公司产品,Triton X-100 为北京拜迪尔公司产品,其余试剂均为国产分析纯。一抗稀释液为含有 0.2% 牛血清蛋白、0.05% 叠氮钠、0.05 mol/L、pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液,二抗稀释液为不含叠氮钠的一抗稀释液。

1.3 免疫组织化学定位

按 Santa Cruz 公司提供的 SABC 染色方法进行,并略微改进。切片脱蜡复水后,用 0.3% 过氧化氢-甲醇处理 30 min,阻断内源性过氧化物酶,用加 Triton 的磷酸盐缓冲液(PBST,含 0.05 mol/L、pH7.4 的 PB,0.9% 的氯化钠,0.3% 的 Triton X-100)漂洗 3 次,每次 10 min,一抗(按 1:1000 的体积比稀释)室温孵育 6 h,PBST 漂洗 3 次,每次 10 min,二抗室温

孵育 3 h,PBST 漂洗 3 次,每次 10 min,AB 复合液室温孵育 2 h,PBST 漂洗 3 次,每次 10 min,DAB 显色。阴性对照组用 PBST 分别代替一抗、二抗、AB 复合液作为阴性对照。苏木素复染后,室温充分干燥,二甲苯透明,中性树胶封片。镜检并拍照记录结果。

2 结果

细胞核为蓝色,背景不着色,存在 M-ENK 强阳性呈深棕色,阳性呈棕色,弱阳性呈浅棕色(封 3,图版)。结果显示在体壁及其附属物、消化系统的各器官中均有不同程度的分布;对照组不着色,呈阴性。

2.1 体壁及其附属物 M-ENK 免疫组化定位

2.1.1 体壁 柄袋沙蠋的横切面似两个同心管套在一起,内管壁为消化管,外管壁为体壁,两管壁间的空腔为体腔。体壁的组织结构从外向内依次为角质膜、表皮、环肌、纵肌、体腔膜,表皮与环肌之间、环肌与纵肌之间均有一薄层结缔组织,纵肌成束排列,各束之间被结缔组织膜隔开。体壁角质膜不明显,表皮由排列紧密的柱状上皮细胞组成,中间夹杂分泌细胞,柱状上皮细胞呈 M-ENK 强阳性反应,阳性反应颗粒多聚集在柱状上皮细胞游离端,分泌细胞呈 M-ENK 阴性或弱阳性反应,表皮与环肌间的结缔组织中有少量 M-ENK 阳性反应颗粒分布(封 3,图版,1);环肌中仅靠近表皮的纤维呈 M-ENK 弱阳性反应,大部分环肌纤维呈 M-ENK 阳性反应,环肌与纵肌间的结缔组织中有大量 M-ENK 阳性反应颗粒分布;纵肌中有少量 M-ENK 阳性反应颗粒分布,纵肌纤维呈 M-ENK 弱阳性反应(封 3,图版,2)。

2.1.2 疣足 疣足是由体壁向外突起形成的扁平片状物,双叶型,背叶为圆锥形突起,上具 1 束羽毛状细刚毛,腹叶为横长突起,上具一行带弯钩的刚毛。疣足上皮细胞呈 M-ENK 阳性反应,疣足肌呈 M-ENK 弱阳性反应,疣足肌间结缔组织呈 M-ENK 阳性或弱阳性反应(封 3,图版,3);刚毛呈 M-ENK 强阳性反应(封 3,图版,4)。

2.1.3 鳃 柄袋沙蠋鳃成对分布在第 7 节至第 17 节身体两侧疣足背上方,由体壁外凸形成的中空树枝状结构,主枝 11 ~ 16 支,鳃上密布微血管。鳃仅由一层上皮细胞组成。鳃上皮细胞呈 M-ENK 阳性或弱阳性反应,上皮细胞外游离面的少量部位有 M-ENK 阳性反应颗粒分布,鳃内结缔组织呈 M-ENK 阴性或弱阳性反应(封 3,图版,5)。

2.2 消化系统 M-ENK 免疫组化定位

柄袋沙蠋的消化道包括吻、食道、胃、肠和直肠等,在食道与胃之间有一对食道侧囊。消化道管壁组织结构由内至外依次为黏膜层(上皮组织)、黏膜下层、肌肉层和外膜(Kermace,1955)。

2.2.1 吻 吻位于头部的最前端,围成柄袋沙蠋的口咽腔,可外翻呈囊状,其上有吻外壁上皮组织向外突起形成的小乳突。吻外壁上皮细胞呈 M-ENK 弱阳性反应,有 M-ENK 阳性反应颗粒分布;内部结缔组织和肌肉组织呈 M-ENK 弱阳性反应(封3,图版,6)。

2.2.2 食道 食道为一细长的管状结构,内壁向内突起成纵行皱褶。食道黏膜上皮细胞呈 M-ENK 弱阳性反应,黏膜上皮细胞游离端有 M-ENK 阳性反应颗粒分布;黏膜下层结缔组织呈 M-ENK 弱阳性反应,并有少量 M-ENK 阳性反应颗粒分布,肌肉层和外膜呈 M-ENK 弱阳性反应(封3,图版,7)。

2.2.3 食道侧囊 食道侧囊是位于食道与胃之间的一对圆锥状腺体,由一层外膜包裹,单层上皮向内突起形成高低不等的指状突起,指状突起内部少量部位有少量疏松结缔组织。食道侧囊外膜呈 M-ENK 弱阳性反应;上皮细胞呈 M-ENK 弱阳性反应,上皮细胞游离端少量部位有 M-ENK 阳性颗粒分布,疏松结缔组织呈 M-ENK 弱阳性或阳性反应;少数指状突起内部由大量 M-ENK 阳性反应颗粒填充(封3,图版,8)。

2.2.4 胃 胃为整个消化道最粗的部位,内壁上皮细胞向内突起形成许多分叶的发达皱褶,皱褶间有少数疏松结缔组织,肌肉层不明显。胃上皮细胞呈 M-ENK 阳性反应,疏松结缔组织多数呈 M-ENK 阴性反应,少数呈弱阳性反应,外膜呈 M-ENK 弱阳性反应(封3,图版,9)。

2.2.5 肠 肠壁很薄,肠内壁大量部位向内突起呈高低不等的纵行皱褶,少量部位向内突出形成盲端。肠皱褶上皮细胞呈 M-ENK 阳性反应,上皮细胞游离端有大量 M-ENK 阳性反应颗粒分布,皱褶内部结缔组织呈 M-ENK 弱阳性或阴性反应(封3,图版,10);盲端表面大量部位有 M-ENK 阳性反应颗粒分布,盲端上皮细胞呈 M-ENK 弱阳性反应,盲端内部有大量 M-ENK 阳性反应颗粒分布(封3,图版,11);肌肉层呈阳性反应,外膜呈弱阳性反应。

2.2.6 直肠 直肠位于肠后,圆管状,粗于肠,内壁也有大量纵行皱褶,但皱褶高度较低,肌肉层较薄。直肠黏膜层上皮细胞呈 M-ENK 阳性反应,黏膜层上

皮细胞游离端有大量 M-ENK 阳性反应颗粒分布;黏膜下层、肌肉层和外膜呈 M-ENK 弱阳性反应,黏膜下层有少量 M-ENK 阳性反应颗粒分布(封3,图版,12)。

3 讨论

甲硫氨酸脑啡肽是动物体内广泛存在的内源性活性肽,通过与受体结合,在调节动物的内分泌、消化、呼吸、泌尿、感觉、运动和免疫等功能方面起着重要的作用(滑静等,1998)。本实验的研究结果表明,柄袋沙蠋的体壁及其附属物疣足、鳃和消化系统的各器官中均有 M-ENK 存在,说明 M-ENK 可能参与了其免疫、运动、呼吸、摄食、消化等功能的调节。而 M-ENK 在不同器官中分布密度不同,可能与各部位的不同功能有关。

本实验发现,M-ENK 在柄袋沙蠋靠近体表的部位含量较高,可能参与其感觉、运动和黏液免疫等功能的调节。柄袋沙蠋的防御体系结构是典型的同心圆式,体壁是第一道防御屏障,体壁表皮层具有分泌黏液的功能,这种黏液具有保护机体的作用,通过免疫组织化学研究发现,柄袋沙蠋体壁表皮组织中 M-ENK 的分布多于肌肉组织,这是否与黏液分泌有关有待于进一步的研究。柄袋沙蠋身体蠕动是依靠肌肉组织节律性收缩和舒张完成的,环肌可以使虫体变细长,纵肌可以使虫体变粗短,疣足的肌肉可以控制疣足和刚毛的运动。有研究报道,柄袋沙蠋身体蠕动时,环肌在维持体位流压方面起着比纵肌更重要的作用(Wells,1950),实验发现,肌肉组织的环肌中比纵肌中 M-ENK 的含量高,可以说明 M-ENK 参与了柄袋沙蠋的运动。在高等哺乳动物中发现,M-ENK 对肿瘤形成、个体发育、细胞再生、组织愈合等有调节作用(李孟森等,2000)。当遇到危险时,柄袋沙蠋就会断尾逃生,断掉的尾会很快再生(De Vlas, 1979),通过体壁和消化道免疫组织化学定位发现其尾部各组织中 M-ENK 的含量均比头部、躯干部的多,因此可以认为其新生尾中亦有 M-ENK 存在,这与 M-ENK 的镇痛作用还是调控尾的再生有关,尚有待于进一步的研究。

近年来,在高等动物中研究证实脑啡肽作为脑肠肽的一种,具有增加胃液分泌、减少胰液分泌及减弱肠蠕动的作用(滑静等,1998)。M-ENK 样物质在蚯蚓消化道中的分布规律与消化酶和胃泌素相同,M-ENK 样物质可增加消化酶的分泌,与胃泌素共同作用调节胃肠的蠕动,进而调节其消化功能

(Rzasa *et al.*, 1984)。本实验发现,柄袋沙蠋食道、胃、肠、直结肠的黏膜层上皮细胞游离端有较多的 M-ENK 分布,说明 M-ENK 可能参与消化道黏膜层分泌调节作用,进而调节消化吸收。另有报道,在鸭的第三脑室注入 M-ENK 对其胃酸分泌有明显的抑制作用,这种抑制作用可被阿片肽受体阻断剂纳洛酮完全阻断(滑静等,2004),柄袋沙蠋胃内存在的 M-ENK 可能也调节其胃液的分泌,进而调节消化功能。在柄袋沙蠋食道侧囊的上皮细胞游离面和结缔组织也都有 M-ENK 阳性反应颗粒,说明 M-ENK 可能也参与消化液分泌的调节作用。本实验还发现,柄袋沙蠋食道侧囊中少数指状突起间填充有大量 M-ENK 阳性反应颗粒;肠内壁某些部位向内突出形成盲端,盲端内部有大量 M-ENK 阳性反应颗粒密集。在高等动物中,脑肠肽除来自于神经中枢的神经胶质细胞和星形细胞外,胃肠壁内肠神经系统的神经元也能合成和释放(周吕,1996;柳力公等,2003)。柄袋沙蠋消化系统中的这些 M-ENK 颗粒的合成场所是否与高等动物一致需要进一步实验研究证实。

4 参考文献

- 滑静,杨佐君,门瑞霄. 1998. 内源性阿片肽研究进展[J]. 北京农学院学报, 13(3): 115~121.
- 滑静,杨佐君,乔惠理,等. 2004. 脑室注射脑啡肽对北京鸭肌胃电和胃酸分泌的影响[J]. 动物科学与动物医学, 21(12): 5~6.
- 李孟森,李平风,杨非易,等. 2000. 甲硫氨酸脑啡肽对 NIH3T3 细胞和人肝癌 Bel7402 细胞生长具有抑制作用[J]. 北京医科大学学报, 32(2): 138~141.
- 柳力公,周吕,王玲. 2003. 肠神经系统脑肠肽神经元的免疫组化研究[J]. 基础医学与临床, 23(3): 348~349.
- 吴宝铃,孙瑞平. 1979. 中国近海沙蠋科研究——黄海和渤海的柄袋沙蠋的研究[J]. 海洋与湖沼, 10(3): 257~270.
- 周吕. 1996. 第五讲 肠神经系统脑肠肽[J]. 中华消化杂志, 16(5): 287~289.
- De Vlas J. 1979. Secondary production by tail regeneration in a tidal flat population of lugworms (*Arenicola marina*), cropped by flatfish[J]. Netherlands Journal of Sea Research, 13(3-4): 362~393.
- Dhainaut-Courtois N, G Tramu, J Beauvillain, *et al.* 1986. A qualitative approach of the Nereis neuropeptides by use of antibodies to several vertebrate peptides[J]. Neurochemistry international, 8(3): 327~338.
- Diaz-Miranda L, G Escalona de Motta, J Garcia-Ararrfis. 1991. Localization of neuropeptides in the nervous system of the marine annelid *Sabellastarte magnifica*[J]. Cell and Tissue Research, 266(1): 209~217.
- Gesser BP, Larsson L. 1986. Enkephalins may act as sensory transmitters in earthworms[J]. Cell and Tissue Research, 246(1): 33~37.
- Kermace D. 1955. The anatomy and physiology of the gut of the polychaete *Arenicola marina* (L.) [J]. Wiley Online Library, 125(2): 347~381.
- Rzasa P, K Kaloustian, E Prokop. 1984. Immunochemical evidence for met-enkephalin-like and leu-enkephalin-like peptides in tissues of the earthworm, *Lumbricus terrestris* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 77(2): 345~350.
- Salzet M, P Bulet, M Verger-Bocquet, *et al.* 1995. Isolation and structural characterization of enkephalins in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*[J]. FEBS letters, 357(2): 187~191.
- Salzet M, B Salzet-Raveillon, C Cocquerelle, *et al.* 1997. Leech immunocytes contain proopiomelanocortin; nitric oxide mediates hemolymph proopiomelanocortin processing[J]. The Journal of Immunology, 159(11): 5400~5411.
- Salzet M, G Stefano. 1997. Invertebrate proenkephalin: [delta] opioid binding sites in leech ganglia and immunocytes[J]. Brain research, 768(1-2): 224~232.
- Salzet M, A Tasiemski, C Lefebvre, *et al.* 2002. Comparison of molecular neuroimmune processes between leeches and human[J]. Zoology, (18): 141~151.
- Verger-Bocquet, MJ Malecha, G Tramu. 1987. Immunohistochemical localization of opioid peptides in the brain of the leech *Theromyzon tessulatum*[J]. Cell and Tissue Research, 250(1): 63~71.
- Wells G. 1950. The anatomy of the body wall and appendages in *Arenicola marina* L., *Arenicola claparedii* Levinsen and *Arenicola ecaudata* Johnston[J]. Journal of the Marine Biological Association of the UK, 29(1): 1~44.