DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.06.010

大鼠胃肠道神经降压素的免疫细胞化学观察

杨代耘* 周德山 蔡文琴（组胚教研室）

摘 要 以PAP和双PAP法对大鼠胃肠道进行免疫细胞化学观察，结果表明：NT免疫反应性产物主要分布于小肠上皮内分泌细胞和肌间神经丛内。NT免疫反应性内分泌细胞在小肠各段的分布密度以回肠最高，平均每个横切面为40.79±2.91个，空肠次之（19.79±3.20），十二指肠最低（6.14±1.68）。其形态各异，多数细胞基底部膨大，细胞顶部直达腔面。NT免疫反应性神经稀疏分布于肌间神经节丛、纵肌和环肌层。在肌间神经节处，NT免疫反应性神经纤维包绕非NT免疫反应性神经元成网篮状结构，偶见NT免疫反应性神经元。以上结果提示，胃肠道NT存在内在性起源，其对胃肠道功能的调控可能主要来自肠上皮的NT免疫反应性内分泌细胞。

关键词 神经降压素、胃肠系统、肌间神经丛

神经降压素（Neurotensin 简称NT）为1种含13个氨基酸残基的多肽[1]。1973年，Carraway等首次在牛的下丘脑发现[2]。NT与胃肠道多种功能有关，有关NT在胃肠道的形态学研究，目前国内尚未见报告。为此，本实验应用免疫组化PAP法，对大鼠胃肠中NT免疫反应结构的分布及形态特征进行了光镜观察、并对其内分泌细胞在小肠的分布密度做了光镜下半定量计数，为进一步探讨NT对胃肠功能的调节机理提供了形态学资料。

材料与方法

Sprague-Dawley系成年大鼠6只，体重180～250g，性别不限。1%戊巴比妥钠（40～50mg/kg）腹腔注射麻醉。开胸，Zambonin's液（2.5%多聚甲醛，15%饱和苦味酸，磷酸缓冲液，pH 7.4；4℃）250～300ml/只灌注固定。分别取胃幽门部、十二指肠上段、空肠中段，回肠末段及横结肠中段入上液固定4h（4℃），再入4%多聚甲醛液（4℃）固定4h，标本分2部分处理，一部分入20%蔗糖溶液（4℃）8～12h，做恒冷冰冻切片，（20μm）；一部分入0.1mol PBS液，（pH 7.4，4℃），做小肠全层铺片，分离出纵肌/肌间神经丛层、环肌层及粘膜下层。切片及铺片均入0.01mol PBS液，按Sternberger PAP法，铺片用双PAP法[3]做漂浮染色。实验中抗血清、PAP复合物的工作浓度及来源见表。全部标本在0.05% DAB-0.01%H_2O_2-0.05mol Tris-Hcl液中显色。裱片、切片以苏木精轻度复染、常规脱水、透明、封固。光镜观察。

为检验抗体的特异性，本实验用正常兔血清代替第一抗体，正常羊血清代替第二抗体染色，结果为阴性，由于缺乏NT抗原，未做吸收实验。

表 抗血清来源及稀释度

名称		稀释度	产地
NT	铺片	1:3000	INC/U.S.A.
	切片	1:6000	
GAR		1:20	第二军医大学生理学教研室
PAP		1:80	

光镜下NT免疫反应性内分泌细胞半定量计数：计数每横截面肠管中所含NT免疫反应性内分泌细胞总数，各段肠管均计数5个横截面，共计数6例动物。

结果

实验结果显示，NT主要分布于小肠上皮内分泌细胞，少数分布于胃肠道肌间神经丛。粘膜下层、固有膜及血管周围均未见NT免疫反应性神经分布。

NT免疫反应性内分泌细胞在小肠各段含量不同，多数存在于回肠及空肠，光镜下半定量计数显

*现在四川省管理干部学院组织胚胎学教研组

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

示：NT免疫反应性内分泌细胞密度以回肠最高（40.79±3.91个/每横截面），空肠次之(19.79±3.20个/每横截面），十二指肠最低（6.15±1.68个/每横截面），胃与结肠粘膜均未见NT免疫反应性内分泌细胞。NT免疫反应性内分泌细胞存在于小肠绒毛上皮和腺上皮，呈单个散在分布(图1)，

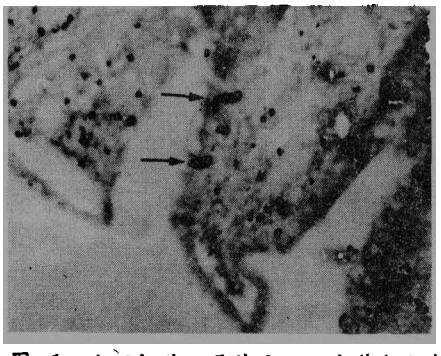


图 1 空肠切片，示绒毛上皮中单个散在分布的NT免疫反应性内分泌细胞（箭头）。PAP法苏木精复染。×300

其细胞形态各异，多数细胞呈三角烧瓶状，椭圆形，少数细胞为长梭形，细胞核多靠近基底部，着色浅淡；基底部较宽，着色深。高倍镜下可见密集分布的深棕色颗粒，多数细胞基底部与基膜靠近，细胞顶部直达腔面(图2)。此外，在空肠和回肠还



图 2 回肠切片；示肠腺上皮中NT免疫反应性内分泌细胞，顶部达腺腔。PAP法（未复染）。×1200

观察到少数NT免疫反应性细胞．在细胞底部，有时可见一短突起与相邻细胞接近（图3）。

在小肠肌层铺片；偶尔见NT免疫反应性神经元，位于神经丛边缘部（图4）。其细胞呈椭圆形或多角形，有2至3个突起，粘膜下神经丛未见

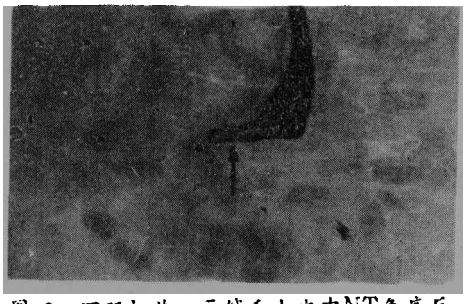


图 3 回肠切片，示绒毛上皮中NT免疫反应性细胞，底部有一突起（箭头）。PAP法（未复染）。×1200

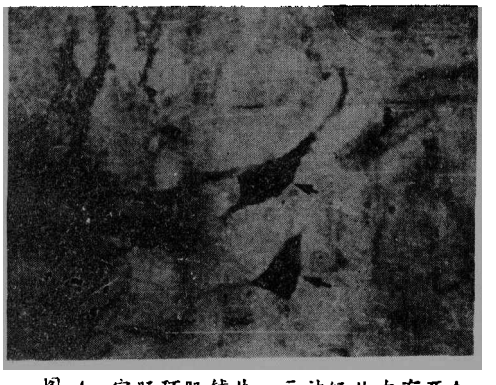


图 4 空肠环肌铺片，示神经丛内有两个NT免疫反应性神经元（箭头）。双PAP法，×1200

NT免疫反应性神经元。NT免疫反应性神经纤维为膨体纤维（图5），纤细、着色较浅，多呈单根纤维走行于肌间神经丛的节间束内，少数可至纵肌和环肌层，并与肌纤维伴行。在肌间神经节处，NT免疫反应性神经纤维包绕NT免疫反应性神经元形成

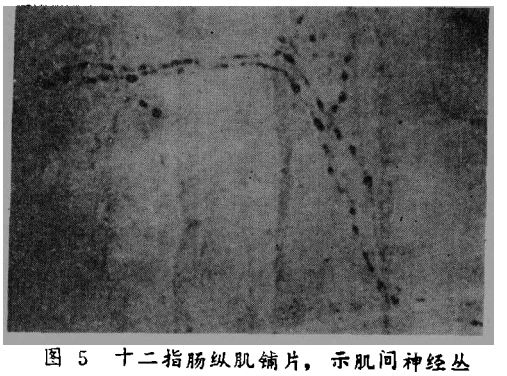


图 5 十二指肠纵肌铺片，示肌间神经丛中的膨体状NT免疫反应性神经纤维。双PAP法。×1200

网篮状结构（图6），从胃至结肠的切片，在肌间均可见NT免疫反应性神经纤维存在。在粘膜下

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

层，固有膜及血管周围，均未见NT免疫反应性神经纤维，NT免疫反应性神经纤维密度在小肠各段无明显差异。



图 6 回肠纵肌铺片，示NT免疫反应性神经纤维在神经节丛呈花篮状分布。双PAP法。×1200

讨 论

本实验应用免疫组化PAP法显示，NT主要分布于小肠上皮内分泌细胞和胃肠肌间神经中。此结果与Oric[4]及Helmstaer[6]等对NT免疫反应性内分泌细胞的观察一致，与Schultzberg[6]等关于NT在胃肠神经分布的报告有差异。Schultzberg等用间接免疫荧光法观察到，NT仅存在胃各肌层的神经纤维和十二指肠肌间神经丛，本实验结果显示，NT免疫反应性神经纤维除存在胃及十二指肠，也分布于空肠，回肠和结肠。造成这一结果差异的原因尚不清楚，可能由于我们采用了敏感性较高的双PAP法，使纤细的神经纤维得以显示，下面本文就三方面的问题进行讨论：

一、双PAP法的敏感性

双PAP法即在Sternberger PAP法的基础上，不进行显色再入二抗孵育，经PBS漂洗后，再入PAP复合物。在PAP法中，每个第一抗体可与多个第二抗体又与多个PAP分子结合，其敏感性较间接免疫荧光法高100～1000倍[7]。而双PAP法较PAP法使反应更加完善，其敏感性更高，能够显示PAP法所不能显示的NT神经纤维。

二、NT在胃肠神经中的分布

应用双PAP法，我们首次在小肠肌层铺片中观察到NT免疫反应性神经元。Saffrey[8]等观察到，早期鸡胚肠道存在较多NT神经元，至发生晚期，其数量明显减少。从而认为胚胎早期神经细胞体能合成NT，晚期仅合成前体物质，此物质不能被特异性NT抗血清检测。结合Saffrey的报告，本实验结果提示：NT免疫反应性神经存在有内在性起源，有关其它来源尚有待进一步研究证实。

NT免疫反应性神经纤维为膨体纤维，存在胃肠肌间神经丛，少数可至纵肌和环肌层，在神经节处，NT免疫反应性神经纤维包绕非NT神经元形成网篮状结构。生理学研究表明：NT可收缩大鼠胃底平滑肌，舒张十二指肠和回肠平滑肌，对豚鼠回肠平滑肌则起收缩作用，这些作用可被迷走神经阻断剂阿托品部分消除[9]。本实验所观察到的形态学特征提示：NT对胃肠平滑肌的调节作用，除了通过对平滑肌的直接作用外，可能还通过胆碱能神经元活性的间接调节途径而实现。

三、NT在肠道内分泌细胞的分布及形态特征

本实验结果显示：NT主要分布于小肠上皮内分泌细胞，其分布特征与Reinecke、Helmstaedter等的报告一致。NT免疫反应性内分泌细胞密度以回肠最高，空肠次之，十二指肠最低，此结果与RIA分析结果基本相符[11]。NT免疫反应性细胞形态各异，但多数为典型的开放型肠道内分泌细胞。NT在肠道内分泌细胞的形态学特征提示：NT免疫反应性内分泌细胞可直接感受腔内容物的变化，刺激基底颗粒释放入血，以激素形式参与胃酸分泌，胃粘膜血流等胃肠功能的调节，其血中NT主要来源于回肠和空肠。据报告：动物进食后，血浆中NT浓度升高达峰值的时间，与食物到达空肠和回肠的时

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

间一致，阻止食物进入空肠和回肠，血浆NT浓度不增高。这一实验证实：以激素形式参与胃肠功能调节的NT主要来源于回肠和空肠。

我们在空肠和回肠还观察到，一种NT免疫反应性阳性细胞、在基底部有一短的突起与相邻细胞接近，其形态学特征与目前认为有旁分泌功能的D细胞相似，提示：NT不仅以激素形式，而且也可能通过旁分泌途径参与胃肠功能的调节。

参 考 文 献

1. Carraway R, et al. The amino acid sequence of a hypothalamic peptide, neurotensin. J Biol Chem 1975:250:1907～1911
2. Carraway R, et al. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. J Biol Chem 1973: 248:6854～6861
3. Sternberger LA, et al. Immunocytochemistry Englewood Cliffs, NJ: prentice—Hall 1974:129～171
4. Oric L, et al. Evidence for immunoreactive neurotensin in dog intestinal mucosa. Life Sci 1976: 19:559～562
5. Helmstaedter V, et al. Localization of neurotensin-immunoreactive cells in the small intestine of man and various mammals. Histochemistry 1977: 53:35～41
6. Schultzberg M, et al. Distribution of peptide-and catecholaminecontaning neurons in the gastro-intestinal tract of rat and guineapig: Immunohisochemical studies with antisera to Substance Intestinal Polypeptide, Enkephalins, Somatostatin, Gastrin/Cholecystokinin, Neurotensin and Dopamine β-Hydroxylase. Neurosine 1980; 5:689～744
7. 蔡文琴。免疫细胞化学。第三军医大学 1986: 75～79
8. Saffrey MJ, et al. Distribution of Vasoactive Intestinal Polypeptide Substance P. Enkephalin and Neurotensin-like immunoreactive nerves in the chicken gut during development. Neuroscience 1982: 7 (1):279～293
9. Nemeroff CB, et al. Neurotensin, a brin and gastrointestinal peptide. The New York Academy of sciences New york. 1982:37～75
10. Carraway R, et al. Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat. J Biol Chem 1976; 251:7045～7052

(收稿：1989.8.8；修回：1989.8.30)

Observations on the Distribution of NT-Like Immunoreactive Structure in the Gastrointestinal Tract of Rats

Yang Daiyun, et al. (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical College)

By using PAP and double PAP immunohistochemical method, the gastrointestinal tract of rats is investigated. The results: the neurotensin-immunoreactive substance (NT-IS) mainly exists in the endocrine cells of intestinal epithelium and myenteric plexuses. Density of the NT-IS endocrine cells existing in the ileum is the highest(40.79±2.91/cross section), the jejunum the lower(19.79±3.20/cs), and the duodenum the lowest (6.14±1.68/cs). The shape of the endocrine cells varies greatly. Most of the cells have broad basal cytoplasm. The

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

top of the cell usually reaches the surface of the lumen. The NT-IS nerves scarcely distribute in the muscle layer, myenteric plexuses of the gastrointestinal tract. In the myenteric plexuses the NT-IS nerves surround the non-NT-IS neurons forming a basket-like. A few number of NT-IS neurons are ocasionally observed within the plexuses. This study provides the evidences that the NT of the gastrointestinal tract has the intrinsic origin. The NT which regulates the function of gastrointestinal tract mainly presents in the endocrine cells.

Key words: Neurotensin/PD; Gastrointestinal system/IR; Myenteric plexuses/UL

论文摘要

前列腺素对周围神经再生的有害影响及其合成抑制剂消炎痛的作用

肖桃元 导师 晏良遂教授 程天民教授（病理解剖学教研室）

临床实践表明，周围神经损伤后虽能再生，但再生和功能恢复的速度过慢。多年来医学家们着重研究促进神经再生的营养因素，而对体内存在有害于神经再生的因素未能予以足够注意。本研究系从后一观点出发，以兔坐骨神经挤压损伤为模型，通过光、电镜观察以及对前列腺素（PG）F_{2a}的放免测定，并结合乳兔背根神经节细胞体外培养等方法来研究PG对周围神经损伤后再生的影响及其合成抑制剂消炎痛的作用。放免测定结果显示，挤压伤后发生华勒氏变性的坐骨神经，PGF_{2a}含量随伤后时间延长呈梯度升高，而注射消炎痛的动物，PGF_{2a}则不升高或者降低。形态学观察结果显示，穿过神经挤压区再生的有髓神经纤维数目、直径、面积等，注射消炎痛的动物均大于注射生理盐水对照的动物。背根神经节分离细胞培养结果显示，在培养基中加入PGF_{2a}，培养的神经细胞体积，突小起再生的数目少，RNA含量低；相反，在培养基中加入PG合成抑制剂消炎痛，培养神经细胞体积大，突起再生的数目多，RNA含量高。同时扫描电镜观察到，各组培养神经细胞有不同的表面形态改变。

以上实验结果表明：（1）周围神经挤压损伤后华勒氏变性过程中产生了过量PG，抑制神经纤维的再生。（2）PG合成抑制剂消炎痛因能阻止神经损伤后PG的产生，故具有促进神经再生的作用。

文中讨论了神经损伤后过量PG产生的原因以及本实验结果的意义等问题。作者考虑：（1）周围神经损伤后，过量PG的产生为其修复和功能恢复缓慢的重要原因；（2）本实验研究在神经营养因素之外，找到一促进神经损伤修复的新途径，值得临床予以研究。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net