DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.02.003

猫的胆囊及肝外胆道系统植物性神经分布观察
——组织化学法和免疫组化法

周德山 蔡文琴（组胚教研室）

提 要 应用乙酰胆碱酯酶染色，乙醛酸诱发荧光及免疫过氧化物酶（PAP）法，采用铺片和切片，对猫的胆道系统植物性神经分布进行了观察。证明猫的胆道系统植物性神经由胆碱能、肾上腺素能及肽能神经组成两个神经节丛，即粘膜下神经节丛和浆膜下神经节丛。肾上腺素能神经分布于胆囊的浆膜下和粘膜固有层，参与上皮下丛和血管周神经丛的构成。生化检测组织中去甲肾上腺素（NA）含量结果表明：胆囊管NA含量最高，与其它各部位相比差异非常显著（$P<0.01$），其余各部之间差异不显著（$P>0.05$）。猫的胆道系统各层亦存在舒血管肠肽（VIP）、P物质（SP）、亮啡肽（L-ENK）及生长抑素（SOM）四种多肽免疫反应性神经，其中VIP最丰富，SP和L-ENK较少，SOM最稀疏，四种肽均以胆胰管括约肌处最为致密。本文并结合肽能神经对胆道系统的作用进行了讨论。

关键词 胆碱能神经；肾上腺素能神经；肽能神经；肝外胆道；胆囊

对于胆道系统植物性神经分布的研究较早，1860年Manz首先发现鸟类的胆囊壁存在神经细胞[1]。1873年Gerlanch研究指出在哺乳动物胆囊壁内存在一个以上神经丛[2]。继之，许多学者[3][4]应用镀银、甲基兰、胆碱酯酶染色（AChE）和醛类诱发荧光组织化学法及免疫组化法对不同种属肝外胆道系统植物性神经分布进行了研究，证明哺乳动物胆囊壁内植物性神经是由胆碱能神经、肾上腺素能神经及肽能神经组成，但是，各家报告的结果不尽一致，就猫而言，也存在一定的分歧，例如，一些学者认为猫的胆道系统神经支配与其它哺乳动物相似，存在三个神经节丛（浆膜下、肌、粘膜下神经节丛）[5]。另一些研究表明：猫的胆道系统仅存在两个神经节丛[6][7]。有关猫的胆道系统肽能神经的研究较为少见，除Sundler和Alumets分别报告在猫的胆囊及十二指肠乳头括约肌部位有VIP神经分布外[8][9]，其它肽类是否存在于猫的胆道系统尚未见报告。为此，本实验利用AChE染色、乙醛酸诱发荧光及PAP免疫组化法，从铺片和切片角度对猫胆囊及肝外胆道系统胆碱能神经、肾上腺素能神经及肽能神经的分布进行了观察，为研究植物性神经对胆道系统功能调节提供形态学基础。

材 料 和 方 法

成年猫30只，体重1.0～2.0kg，性别不限，分为组织化学组，免疫组化组及去甲肾上腺素定量组三组，每组10只，4%戊巴比妥钠（80mg/kg）腹腔注射麻醉，取材。（免疫组化组：动物先经Zamboin's液或0.4%对苯醌液左心室-主动脉灌注固定，再取材）。先将胆囊内容物排出，经0.85%NaCl充盈0.5～1h，分为胆囊底、体、颈，胆囊管，胆总管上、下段，于OPTON解剖镜下铺片或2700恒冷箱切片机冰冻切片（厚约10～20μm），分别显示胆碱能神经、肾上腺素能神经及肽能神经。显示胆碱能神经应用Karnovsky报告的AChE直接染色法[10]。显示肾上腺素能神经应用Torre报告的乙醛酸诱发荧光组化法[11]。肽能神经：切片以Sternberger等人报告的PAP免疫组化法进行漂浮染色[12]，分别显示VIP、SP、L-ENK、SOM四种肽神经。用于免疫染色的抗血清来源及工作液稀释度见表1。为验证抗体的特异性，本实验对第一抗体血清作了吸收实验和替代实验，即用过量的特异性抗原（100μg/ml 1:1000抗血清）吸收VIP、SP、L-ENK抗血清，代替第一抗体（SP、VIP为Sigma公司，L-ENK为Welcome公司生产），正常羊血清代替第二抗体，正常兔血清代替第一抗体进行染色。

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

表1 抗血清来源及稀释度

名 称	稀释度	产 地
VIP	1/6000	INC/USA
Substance P	1/6000	〃 〃
Leu-Enkephalin	1/6000	〃 〃
Somatostatin	1/6000	〃 〃
GAR	1:40	上海医科大学病解室
PAP	1:30	上海医科大学病解室 武汉医学院针麻室赠

NA定量：应用尤忠义等人报告的改良3-羟基吲哚荧光比色法测定[13]。结果用单因素多组间均数比较—F检验处理。本实验回收率 90.05±6.27%（N=10）。

结 果

一、AChE染色 以组织分层铺片、AChE染色法显示：猫的胆囊存在两个神经节丛，分别位于胆囊的浆膜下和粘膜下结缔组织内。神经节由AChE阳性神经元组成不规则的结节状，节间由AChE阳性神经束连结形成网（图1）。两个神经节丛自囊胆底至囊胆颈、向下经胆总管延续到十二指肠乳头。AChE阳性神经纤维在血管周和上皮下亦形成神经丛，血管周神经丛主要分布在浆膜下层，与浆膜下神经节丛间有纤维交换。上皮下丛位于粘膜下神经节丛的粘膜面，与该神经节丛间有纤维相互连结(图1)。

在十二指肠乳头切片可见AChE阳性神经节位于括约肌的粘膜面和外周，靠近粘膜面的神经节较小，AChE阳性纤维伸入粘膜皱襞内。括约肌外周的神经节较大，呈不规则的结节状。

二、乙醛酸诱发荧光染色 铺片可见猫的胆囊及肝外胆道系统存在丰富的呈亮绿色荧光的肾上腺素能神经纤维，它们主要分布在血管周围，与血管相伴，走行在胆囊的浆膜下和粘膜固有层(图2)。动脉周荧光纤维较致密，静脉周较稀疏。肾上腺素能神经纤维终末膨体呈串珠样，膨体本身荧光较强，膨体间束荧光较弱，在神经节部位，肾上腺素能神经纤维包绕在无荧光的神经节细胞周围，形成花篮状结构(图2)。肌层内肾上腺素能神经较少见。其分布以胆囊颈和胆囊管较致密，胆囊底和胆总管稍稀疏。整个胆道系统未见肾上腺素能神经元。切片可见肾上腺素能神经分布在肌层的内面和外面，部分纤维穿过肌层连结两个丛。

三、NA 测定结果 为从定量角度估计组织中肾上腺素能神经的相对密度，我们对猫的胆囊及肝外胆道系统组织中NA 含量进行了测定，结果见表2。

表2 胆道系统各部位NA量

	GF	GB	GN	CYD	UCD	DCD	PaP	DUD
$\bar{x}$	434.82	468.64	526.08	799.68	533.95	449.66	190.02	154.90
$S\bar{x}$	±25.64	±27.37	±41.89	±41.73	±26.54	±29.23	±20.50	±19.76
n	9	9	9	9	10	9	9	8

$\bar{x}$：平均数 $S\bar{x}$：标准误 n：例数 GF：胆囊底 GB：胆囊体 GN：胆囊颈部 CYD：胆囊管 UCD：胆总管上段 PaP：十二指肠乳头 DUD：十二指肠壁 DCD：胆总管下段

从上表可以看出，胆囊及肝外胆道系统组织中NA平均含量较十二指肠乳头和肠壁高，二者相比，差异非常显著（$P<0.01$）。整个肝外胆道系统组织NA含量以胆囊管最高，与其它各部位相比差异非常显著（$P<0.01$）；胆囊颈略高于胆囊底，但无显著差异（$P>0.05$）。

四、肽能神经 应用PAP免疫组化法显示猫的胆囊及肝外胆道系统各层存在VIP、SP、L-ENK、SOM四种多肽免疫反应性神经，其分布密度见表3。吸收和替代实验结果均阴性。

表3 胆道系统肽能神经分布情况

	GF	GB	GN	UCD	DCD	PaP
VIP	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SP	+++	+++	++	++	++	+++
ENK	++	++	++	++	++	+++
SOM	+	+	+	+	+	++

说明：+：可见阳性纤维 ++：常见阳性纤维 +++：阳性纤维清晰 ++++：清晰、阳性纤维致密

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

VIP免疫反应性神经最丰富，它们主要分布在神经丛内。在浆膜下伴随血管走行，动脉周较丰富，静脉周较稀疏。肌层内VIP神经较少见。在粘膜上皮下，VIP免疫反应性神经形成致密网，部分纤维伸入粘膜皱襞内，分布到上皮附近(图3)，但胰管的粘膜上皮下VIP免疫反应性纤维较稀疏；整个胆道系统以胆胰管括约肌内，VIP免疫反应性神经分布最为致密(图4)。SP免疫反应性神经主要分布在浆膜下层和胆胰管括约肌内。在神经节部位，可见SP免疫反应性神经纤维围绕着非SP免疫反应性神经细胞形成花篮状结构(图5)。

在猫的胆道系统，ENK较SOM免疫反应性神经略丰富。切片可见ENK免疫活性神经位于胆囊及肝外胆道系统的浆膜下层，胆胰管括约肌内ENK免疫活性神经亦较常见。SOM免疫活性神经很稀疏，仅在胆道系统粘膜下层可见少数SOM纤维，在胆总管末端的粘膜上皮内可见散在的SOM免疫反应性细胞，而在相邻的十二指肠粘膜上皮内可见较多的SOM免疫活性细胞。整个胆道系统未见肽能神经元。

讨　论

本实验应用AChE染色、乙醛酸诱发荧光、PAP免疫组化等方法证明猫的胆囊及肝外胆道系统植物性神经由胆碱能神经、肾上腺素能神经及肽能神经（包括VIP、SP、ENK、SOM四种多肽免疫反应性神经）组成粘膜下神经节丛、浆膜下神经节丛、上皮下神经丛及血管周神经丛。这一结果与Nawton[6]、Sutherland[2]等人的报告基本一致，而与恩田[7]、Baumgarten[5]等人的报告略有差别。恩田也认为存在两个神经节丛，分别位于胆囊的肌层和浆膜下层，无粘膜下神经节丛；Baumgarten认为存在浆膜下、肌层、粘膜下三个神经节丛。造成这一矛盾的结果原因尚不清楚，我们利用铺片技术，结合切片，采用多种染色方法，证明猫的胆囊仅存在两个神经节丛，即浆膜下神经节丛和粘膜下神经节丛。两个神经节丛自胆囊底至胆囊颈、向下经胆总管延续到十二指肠乳头。这提示胆道系统可能是在壁内固有神经和外源性神经的共同调控下完成各种生理功能。

乙醛酸诱发荧光组织化学方法能够较敏感特异地显示含单胺类的组织及细胞[11]。本实验应用该方法证明猫的胆道系统存在丰富的肾上腺素能神经，与血管相伴，分布在胆囊的粘膜固有层和浆膜下层的结缔组织中，为上皮下神经丛的一部分和血管周神经丛的主要组成部分。整个胆道系统未见肾上腺素能神经元。此结果提示胆道系统肾上腺素能神经为外源性神经。Baumgarten的实验结果亦支持胆道交感神经节后纤维绝大部分来自腹腔神经节或起自椎旁交感链经腹腔神经节分布于胆道系统。

在胆道系统，肾上腺素能神经除调控血流供应外，亦有舒张胆道平滑肌等作用。但是，实验发现猫的胆囊肌层肾上腺素能神经纤维较稀疏，在神经节部位，肾上腺素能神经纤维包绕在无荧光的神经节细胞周围，与之形成突触联系，这说明肾上腺素能神经舒张胆囊的作用可能是间接的，通过壁内花篮状结构，抑制兴奋性胆碱能神经元活动，达到使胆囊舒张。药理实验表明：胆囊平滑肌细胞β受体较多，α受体较少，只有β受体阻断剂存在时，α受体才能兴奋引起胆囊收缩，胆囊舒张需要β受体兴奋才能实现，而交感神经节后纤维递质主要为NA，对β受体作用甚微，也支持交感神经舒张胆囊的作用可能为间接的。

肾上腺素能神经在胆道系统的分布以胆囊管为致密，NA含量亦最高；在胆囊，以颈部较致密，底部相对稀疏。NA含量颈部也略高于底部，这可能与胆囊颈和胆囊管部位存在生理性括约肌功能（并非在解剖上真正存在环形平滑肌增厚，指机能而言）有关[14]。整个胆道系统组织中NA平均含量约是十二指肠肠壁的2.5～4倍，推测此种差别的原因可能是由于肾上腺素能神经主要围绕在血管周围，胆囊及肝外胆道系统血管较丰

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

富，肾上腺素能神经较致密，胆囊肌层较薄，而肠壁血管相对较少，平滑肌层较厚，平滑肌细胞间荧光纤维分布较稀疏之故。

生理学实验已证明许多神经肽对胆囊及肝外胆道系统的生理功能有调控作用[4]，但在哺头动物，真正从形态学上确认胆道系统内存在肽能神经的报告并不多。本实验应用免疫组织化学技术证明，猫的胆囊及肝外胆道系统各层存在 VIP、SP、L-ENK、SOM 四种多肽免疫反应性神经，与肠壁含肽能神经种类相似[15]，参与各神经丛的构成。

VIP 免疫活性神经分布特点与 Sundler 及Alumets 等人的报告基本一致。上皮下 VIP免疫反应纤维形成致密网，可能与 VIP 抑制胆囊的吸收有关。据报告：[16]给猫静脉内注入纯VIP（1μg/kg体重）或将豚鼠胆囊浸泡在含VIP（10μg/ml)的生理盐水中，能使胆囊从吸收转为分泌相，也支持VIP参与胆囊上皮功能的调节。肌层和血管周VIP免疫活性神经可能与VIP具有抑制胆囊平滑肌活动有关。我们知道，VIP的生理作用相当广泛，在哺乳动物胆道系统VIP 能使胆囊舒张，亦可拮抗CCK引起的胆囊收缩作用。生理和药理实验表明：刺激迷走神经，肝门静脉血浆中VIP浓度明显升高[17]。豚鼠胆囊平滑肌细胞存在VIP受体，均支持VIP 可能是以神经递质形式作用于胆道平滑肌，调节其运动功能。

SP神经主要分布在胆道系统的浆膜下层和胆胰管括约肌内。它的生理作用也较广泛，例如：作为初级感觉神经元的兴奋递质，直接抑制血管平滑肌活动，使肠神经节细胞除极等；在胆道，SP 有直接抑制 CCK 和VIP诱使的胆囊分泌及减少肝胆汁产生等作用。猫的胆道系统存在 SP 免疫反应性神经可能与上述作用有关。

L-ENK 为五个氨基酸残基多肽，在猫的胆道系统各层分布较少，主要位于浆膜下层和胆胰管括约肌内，与M-ENK 在豚鼠的胆道系统分布相似。胆道系统存在 ENK 免疫反应性神经是否与 ENK 具有使神经节细胞超极化，抑制乙酰胆碱的释放及拮抗CCK收缩胆囊的作用有关，还有待于证实。

SOM为环状十四肽，它在猫的胆道系统中分布很少，仅在粘膜下观察到少数SOM免疫反应性纤维。此外，在胆总管末端粘膜上皮细胞间有少数 SOM 免疫活性细胞，其量远少于十二指肠粘膜上皮，与 Cai 在豚鼠[4]、Dancygier[18]在人的胆道系统观察结果相似。这种SOM 免疫活性细胞是否可能以旁分泌形式对胆道系统发挥抑制作用，还需进一步研究

参考文献

1. 宮崎隆司等.胆囊およご肝外胆道系の内在性神经支配に関する研究．第二编：临床编：胆囊各疾患时の蛍光组织化学的研究．日本消化器病学会雑志。1980；77：935
2. Sutherland SD, et al. The intrinsic innervation of gall bladder in Macaca rhesus and cavia porcellus. J Anat 1966; 100:261
3. Burnett W. et al. Some observation on the innervation of the extrahepatic biliary system in man. Ann Surgery 1964; 159:8
4 Cai WQ, et al: Peptide immunoreactive nerves and cells of the guinea-pig gall bladder and biliary pathway. Gut 1983; 24:1186
5 Baumgarteu HG, et al. Extrinsic adrenergic innervation of the extrahepatic biliary system in guinea-pig, cat-and rhesus monkey. Z Zellforschung und mikroskopische Anatomie 1969; 100:606
6 Newton D Uber die leisbung der'silberimpragnations method nach richardsou zur darstellungdes vegetativen nerven systems an der haut amd darm und an der gallenblase Acta Anat 1964; 58:201
7. 恩田・昌邦，等．胆囊およご肝外胆道系の内在性神经支配に関する研究．日本消化器病学会雑志 1980；77:78

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

8 Sundler F. VIP innervation of gall bladder. Gastroenterology 1977; 72:1375

9. Alumets J, et al. A rich VIP nerve supply is characteristic of sphincters. Nature (London) 1979; 280:155

10. Karnovsky JM and Roots L. A direct colouring thiocholine method for cholinesterase. J Histochem Cytochem 1964; 12:219

11. Torre JC. A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescene using a modified glyoxylic acid technique:the SPG method. Histochem 1976; 49:81

12. Sternberger LA. The unlabelled antibody enzyme method. In Immunocytochemistry 2nd eds. J Wiley, New York, 1979

13. 尤忠义，等。血浆肾上腺素与去甲肾上腺素的荧光测定法。《烧伤整形专辑》第三军医大学 1984:365

14 Macpherson BR. The muscle layer of the canine gall bladder and cystic duct. Acta Anat 1984; 120:117

15. Bishop AE. Peptidergic nerves: In Basic science in gastroenterology structure of the gut eds:Polak JM, London Glaxl 1982; P221～238

16. Jansson RL: Effect of intravenous vasoactive intestinal peptide on gall bladder function in the cat. Gastroenterology 1978; 75:47

17. Schaffalitzky De Muckadell OB. Release of vasoactive intestinal polypeptide by electrical stimulation of vagal nerve. Gastroenterology 1977; 72:373

18. Dancygier H, et al: Somatostatin-containing cells in the extrahepatic biliary tract of humans. Gastroenterology 1984; 86:892

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

ted with anisodamine. Another 5 dogs were injected with saline to serve as control. The dynamic changes of total hemolytic complement activity, neutrophil aggregation rate, platelet aggregation rate, fibrin degradation products, white cell count and platelet count in both the peripheral arterial and venous blood, and blood gas analysis were tested. The pathological and clinical changes were also observed.

The results of the study suggest that the pathogenesis of respiratory distress syndrome was apparently related to the increase of complement activation, neutrophil aggregating activity, and blood coagulation. The therapeutic effect of anisodamine can be enhanced if the complement-neutrophil-fibrin degradation products pathway is blocked.

Key words: Complement activation; Neutrophil aggregation; Platelet aggregation; Fibrin degradation products; Respiratory distress syndrome; Oleic acid; Anisodamine (p.129)

An Immunohistochemical and Histochemical Study on Autonomic Innervation of the Gall Bladder and Bile Ducts in Cats

Zhou Deshan, Cai Wenqin (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical College)

This paper is to report the autonomic innervation of the gall bladder and extrahepatic bile ducts studied on whole mount stretch preparations and cryostat sections with acetylcholinesterase staining, glyoxylic acid induced fluorescence histochemical method, and PAP immunohistochemical method.

The autonomic nerves of the gall bladder and extrahepatic bile dudts in cats consist of two plexuses, composed of cholinergic, adrenergic and peptidergic nerves, and situated in the subserosa and submucosa respectively. They are known as subserosal and submucosal ganglionated plexuses. They distribute in the region from the fundus of the bladder, to the neck and the cystic duct, through the common bile duct downward, finally to the duodenal papilla.

The adrenergic nerves mainly run along the blood vessels, distributing in the serosa and lamina propria of the mucosa of the bladder, and participating in the formation of the subepithelial and perivascular plexuses. The adrenergic nerves are most densely distributed in the cystic duct and most sparsely in the fundus. This finding is in good agreement with the tissue concentration of noradrenaline(NA) determined with biochemical asssay, which is also the highest

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

in the tissue of the cystic duct. The difference of NA concentration between the cystic duct tissue and other biliary tissues was statistically significant($P<0.01$), while the difference among the tissues other than that of the cystic duct was not remarkable($P>0.05$).

Immunohistochemical study revealed that there are 4 kinds of immunoactive peptidergic nerves, i. e. nerves with vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance P(SP), L-enkephalin (L-ENK), and somatostatin (SOM) respectively. The 4 kinds of nerves distribute extensively in all the tissue layers of the extrahepatic biliary tract and participate in the formation of all the nerve plexuses. Among them, VIP nerves are the richest, then the SP and L-ENK nerves, and the SOM nerves the sparsest. In general, peptidergic nerves are densely distributed in the sphincter of Oddi.

Finally the physiological significance of the peptidergic nerves was discussed.

Key words: Cholinergic nerve; Adrenergic nerve; Peptidergic nerve; Gall bladder; Extrahepatic bile ducts

(p.134)

Isolation and Identification of cytopathogenic Effect Strains of Epidemic Hemorrhagic Virus in Vero-E_6 Cell Culture

Zhu Dezhong, Liu Qifu (Department of Microbiology, Third Military Medical College)

Five strains out of the 8 of epidermic hemorrhagic fever(EHF)virus isolated from the serum of the acute phase of EHF patients in Nanchong, Sichuan were found to have cytopathogenic effect(CPE)through 4th to 10th passages in Vero-E6 cell culture. The biological, physico-chemical and antigenic characteristics of HFN-04 and HFN-19, 2 out of the 5 CPE strains, were identified. The results were as follows:

(1) The CPE development and the dynamic proliferation of the virus are consistent.

(2) The main biological and physico-chemical characteristics of the 2 CPE strains are the same as those of EHF virus.

(3) When paired samples of EHF patients' serum were tested with the slide antigens of E6 cells infected with these CPE strains, all the convalescent serum demonstrated an increase by 4 fold or more of the IFA titer.

(4) The CPE of the virus can be neutralized by EHF patient's serum or EHF and KHF antisera, but not by normal rabbit serum or the

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

猫的胆囊及肝外胆道系统植物性神经分布观察—组织化学法和免疫组化法 （正文见第134页）

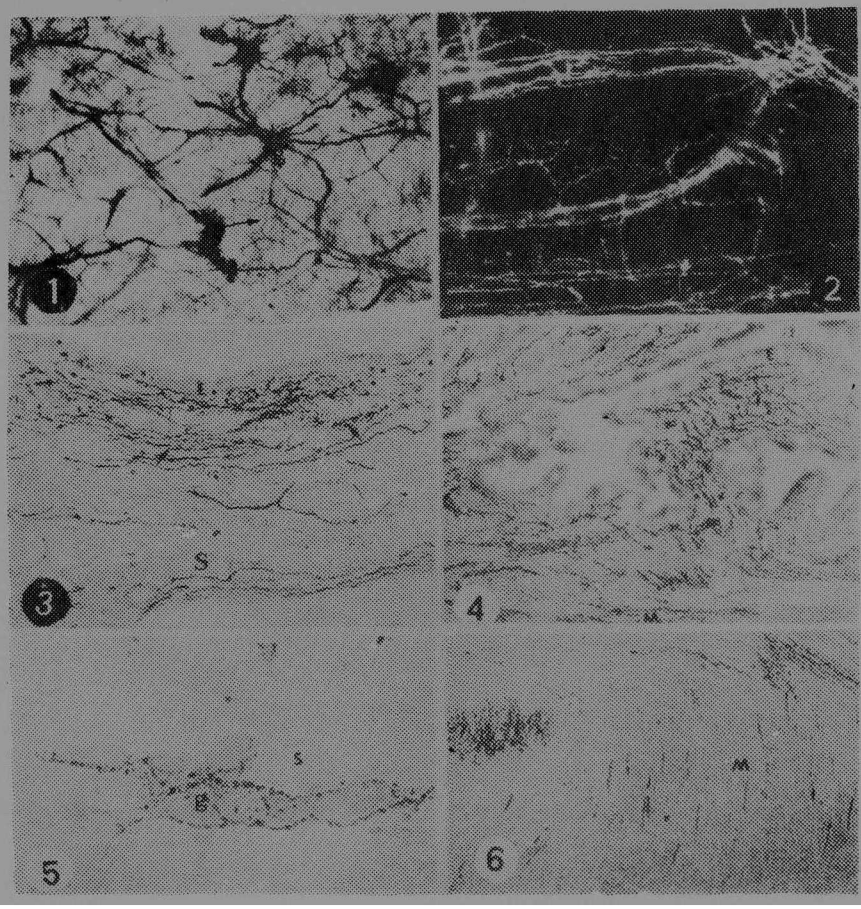


图1　铺片示胆总管粘膜下神经节丛。g：神经节箭头：上皮下丛与神经节丛间纤维连结。AChE　×350

图2　胆囊颈粘膜铺片，示上皮下神经丛。白色箭头：膨体；黑色箭头：胆碱能神经节细胞周围的肾上腺素能神经纤维。SPG：×350

图3　胆总管横断面切片：显示VIP免疫活性纤维分布。E：上皮；S：浆膜层；箭头：VIP纤维。PAP　×350

图4　十二指肠乳头切片示VIP免疫活性神经在胆胰管括约肌（M）和上皮（E）下的分布。f：VIP纤维。PPA　×350

图5　胆囊体切片显示 SP 免疫活性神经纤维在浆膜下神经节丛的分布。S：浆膜层；g：神经节。PAP　×1400

图6　十二指肠乳头切片显示ENK免疫活性纤维在胆胰管括约肌内的分布。M：括约肌层。PAP　×350

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