

文章编号: 1674 - 5566(2014)06 - 0814 - 06

## 大口黑鲈胰腺的组织学观察

佟春萌, 陈乃松, 季振尧, 徐祥泰, 苟仕潘

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 采用组织切片和免疫组化技术对大口黑鲈的胰腺进行了组织学观察。经 H-E 染色和 G-醛复红染色了的切片显示: 大口黑鲈腹腔中 10 多个肉眼可见的黄白色颗粒物其实是被一层结缔组织和外分泌胰腺包裹着的胰岛结构, 其中最大的一个即为胰岛; 还有许多肉眼不可见的胰岛结构被埋藏于总胆管的管壁中; 肝脏中有外分泌胰腺的存在与分布。过氧化物酶标记的链霉卵白素免疫组化切片和图像分析显示: B 细胞主要集中在胰岛的中央区; A 细胞分布于胰岛的全部。本研究的结论为: 大口黑鲈的内分泌胰腺主要分布于总胆管周围, 外分泌胰腺除了包裹于胰岛之外也分布于肝脏中, 胰腺的分布属于弥散型。

**研究亮点:** 采用 H-E 染色、G-醛复红染色以及过氧化物酶标记的链霉卵白素免疫组织化学技术, 明确了大口黑鲈的胰腺分布、胰腺内分泌部和外分泌部的关系以及胰岛内 A 和 B 细胞的分布, 为进一步深入开展大口黑鲈内分泌学以及内分泌营养学奠定了基础。

**关键词:** 大口黑鲈; 胰腺; 胰岛; 组织学观察

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

鱼类的胰腺也像哺乳动物一样, 包括着外分泌部和内分泌部<sup>[1]</sup>。但鱼类的外分泌部和内分泌部的存在形式是各种各样的。鱼类的外分泌胰腺是一种管泡状腺, 包括胰腺泡和导管两个部分。由于鱼类的内分泌胰腺在结构、分布以及与外分泌胰腺联系的不同, 在过往的学术论文中鱼类的内分泌胰腺有着不同的名称, 如胰岛器官, 布氏体和主岛等。为了避免混淆, 我们对本文中采用的上述术语作出如下说明: 不论鱼类的内分泌胰腺的分布或形式如何, 胰岛器官即为它的统称<sup>[2]</sup>; 主岛是指腹腔内最大的胰岛, 它由一层薄的外分泌胰腺包裹, 这样的构成体是肉眼可见的<sup>[2]</sup>; 布氏体通常不是纯粹的内分泌组织, 而是紧密联结的几个胰岛和周围的外分泌胰腺的集合<sup>[3]</sup>。鱼类的胰岛细胞主要有 4 种类型: A 细胞, 分泌胰高血糖素<sup>[4]</sup>; B 细胞, 分泌胰岛素<sup>[5]</sup>; D 细胞, 分泌生长抑素<sup>[6]</sup>; F 细胞, 分泌胰多肽<sup>[7]</sup>。目前关于鱼类内、外分泌胰腺结构与免疫组化的研究报道包括: 斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[8]</sup>、尼罗罗

非鱼 (*Oreochromis niloticus*)<sup>[9-10]</sup>、金头鲷 (*Sparus auratus*)<sup>[11]</sup> 和舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)<sup>[12]</sup> 等。

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 属硬骨鱼纲 (Osteichthyes), 鲈形目 (Perciformes), 棘臀鱼科 (Centrarchidae), 黑鲈属 (*Micropterus*), 是典型的肉食性鱼类, 在我国已形成了较大的养殖规模。鱼类的胰腺是参与营养物质的消化和代谢调节的重要器官, 因而开展特定养殖鱼类胰腺的组织学研究将有助于开展其营养与饲料学的研究。然而, 有关大口黑鲈胰腺组织的研究只见于 HINTON 等<sup>[13]</sup> 发现在肝脏中有外分泌胰腺的报道。进一步开展大口黑鲈胰腺的组织学研究将有助于深入开展其内分泌学、营养学和饲料学的研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 实验鱼

本实验所用大口黑鲈取自上海海洋大学生

收稿日期: 2014-02-27 修回日期: 2014-05-20

基金项目: 上海市科学技术委员会项目 (10320503100); 上海高校知识服务平台 (ZF1206)

作者简介: 佟春萌 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养学。E-mail: tongchunmeng@163.com

通信作者: 陈乃松, E-mail: nschen@shou.edu.cn

态实验室,体重在 5 g 左右。

### 1.1.2 实验试剂

H-E 染色所用的苏木精和伊红购自上海高信化玻仪器有限公司。G-醛复红染色使用的碱性品红购自武汉博士德生物工程有限公司。免

疫组织化学实验所用的胰岛素和胰高血糖素的第一抗体均是兔来源的多抗,但胰岛素一抗的氨基酸与大口黑鲈胰岛素的氨基酸序列相似度达 83%。抗血清与相关试剂详见表 1。

表 1 免疫组化抗血清与主要试剂  
Tab.1 Antiserum and main reagents used in the immunohistochemical tests

抗血清与试剂	产品代号	工作浓度	功能	来源
胰岛素抗血清	bs-0056R	1:100	一抗	美国 ZYMED 公司
胰高血糖素抗血清	bs-3796R	1:150	一抗	美国 ZYMED 公司
正常山羊血清工作液	SP-9001	工作液	封闭非特异性反应部位	美国 ZYMED 公司
生物素标记山羊抗兔 IgG	SP-9001	工作液	连接一抗和辣根酶标记的链酶卵白素	美国 ZYMED 公司
辣根酶标记链酶卵白素工作液	SP-9001	工作液	与抗体结合起放大作用	美国 ZYMED 公司
二氨基联苯胺	ZLI-9030	工作液	底物显色剂	美国 ZYMED 公司

### 1.1.3 实验仪器

实验所用仪器有石蜡切片机 (RM2255, Leica, 德国)、生物显微镜 (E200-F, NIKON, 日本) 和尼康照相机 (D5100, NIKON, 日本)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 取样

敲击活鱼的头部,将其击昏,置于解剖盘中。用手术剪刀将左侧体壁肌肉剪除,暴露其内脏,拭净器官周围可能存在的血迹及组织液,对相关器官作必要的拍照记录。采集肝脏和其他疑有胰脏组织存在的组织块,置于 Bouin 氏固定液中固定 24 h。

### 1.2.2 染液的配制

苏木精原液:将 2 g 苏木精溶于 5 mL 95% 的乙醇中,并加入 10 mL 冰醋酸加速其溶解,再加入 100 mL 的甘油和 95 mL 的 95% 乙醇后混合均匀;将 5 g 明矾研碎后,溶于 100 mL 水中并加热;把加热的明矾溶液一滴一滴地加入到染色剂中,不断搅动使其混合均匀。配置好的染液置于广口瓶中,广口瓶用双层纱布包扎,直到染液颜色变为紫红时方可使用。

伊红染液:1 g 伊红彻底溶于 100 mL 75% 的乙醇中,加入几滴冰醋酸使染液呈鲜红色时即可使用。

G-醛复红染液:2 g 碱性品红溶于 100 mL 70% 的乙醇中,再加入浓盐酸和三聚乙醛各 2 mL,该混合液室温放置 24 h 变为深紫色即可使用。

### 1.2.3 石蜡切片和 H-E 染色

组织块经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡

包埋后做连续切片(厚度为 6  $\mu\text{m}$ ),然后进行常规 H-E 染色,封片,最后显微镜下观察并摄片。

### 1.2.4 G-醛复红染色(显示 B 细胞)

固定 24 h 之后的组织经常规石蜡切片,脱蜡后依次经过高锰酸钾氧化液浸泡 3 min,流水冲洗 1 min,2% 草酸漂白 30 s,再经流水冲洗 1 min,60% 乙醇浸泡 5 min,醛复红染液浸泡 2 min,60% 乙醇浸泡 3 min,封片,显微镜下观察并摄片。

### 1.2.5 免疫组织化学染色(分别显示胰岛 A 细胞和 B 细胞)

组织经常规石蜡切片脱蜡至水,然后将切片放入 3% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液中孵育 20 min 以消除内源性过氧化物酶活性;PBS (pH = 7.4) 冲洗,5 min  $\times$  3 次;把切片浸入 90  $^\circ\text{C}$  的枸橼酸缓冲液 (pH = 6.0) 中,加热 20 min 以进行抗原修复;PBS (pH = 7.4) 冲洗,5 min  $\times$  3 次;在切片上滴加正常山羊血清,室温孵育 30 min;倾去切片上的血清,直接滴加一抗,隔夜 4  $^\circ\text{C}$  孵育 12 h;PBS (pH = 7.4) 冲洗,5 min  $\times$  3 次;在切片上滴加生物素化二抗,室温孵育 30 min;PBS (pH = 7.4) 冲洗,5 min  $\times$  3 次;在切片上滴加 DAB 显色剂,室温孵育 5 min;自来水冲洗,封片后在显微镜下观察并摄片。同时设置阴性对照,即取相应连续切片的相邻切片,用 PBS (pH = 7.4) 代替一抗,其余步骤同上。

## 1.3 图像分析

两种激素的免疫组化染色切片各取 5 张,每张切片随机取 2 个 400 倍视野进行阳性细胞计数,取得的数值经 Excel 2007 处理后,用平均值  $\pm$  标准差分别表示胰岛内两种内分泌细胞的分布

密度。

## 2 结果

### 2.1 胰腺组织的分布

肉眼观察发现,大口黑鲈的腹腔内有 10 多个大小不等(2~5 mm)的黄白色颗粒状结构分散地埋植于胃肠相接处和前肠腹面的肝脏内侧系膜上,此区域内总有 1 个最大(比普通的体积要大 1 倍以上)的黄白色颗粒出现(图版-1“→”)。经对含有这些黄白色颗粒的组织块作切片、染色和观察发现,在每一个肉眼可见的黄白色颗粒内均有一个胰岛隐藏其中(图版-2“→”),在胰岛的外周有一薄层的结缔组织(图版-3“→”)及外分泌胰腺分布(图版-3“▲”),上述肉眼可见的最大的黄白色颗粒内含着所谓的主岛。经对肝脏的组织切片观察发现,外分泌胰腺在肝脏中也有分布(图版-4“→”)。经对肝外胆总管的组织切片观察发现,在胆总管的管壁中有无数个胰岛埋藏于其中(图版-2“→”),这些胰岛应当归属于所谓的辅岛(accessary islet)。尽管这些胰岛是肉眼不可见的,但其数量可观。因此,本研究认为大口黑鲈胰腺的分布为弥散型。

### 2.2 外分泌胰腺的组织学观察

大口黑鲈的外分泌胰腺为葡萄状腺体,是由若干个胰腺泡构成的。胰腺泡是由若干个外分泌胰腺细胞围成的近球状的空囊状结构,其中间的空腔为腺泡腔(图版-5“→”)。外分泌胰腺细胞分界不明显,形状不规则,细胞质为蓝紫色并含有深颗粒物质分布。外分泌胰腺细胞核为圆形或椭圆形,大多靠近细胞基部,核膜明显,核仁为深蓝色(图版-5“▲”)。泡心细胞体积较小,染色较浅,位于腺泡腔的内侧(图版-5“↓”)。

### 2.3 内分泌胰腺的组织学观察

大口黑鲈的胰岛是一层结缔组织包裹的大小不等和形状不定的上皮细胞团,多呈圆形或椭圆形。G-醛复红染色把胰岛的整个轮廓显示得更为清晰,并将胰岛 B 细胞染成紫色,紫色的胰岛 B 细胞主要分布于胰岛的中央,胰岛外围的外分泌胰腺也没有深入到胰岛内部。经 H-E 染色的胰岛细胞的外围轮廓不清,但细胞核大且轮廓明显(图版-6“→”)。

### 2.4 内分泌胰腺的免疫组织化学观察

免疫组织化学染色显示每一个胰岛都有胰

岛素免疫阳性细胞——B 细胞(图版-7“→”)和胰高血糖素免疫阳性细胞——A 细胞(图版-8“→”)。胰岛素阳性细胞的分布主要集中于胰岛的中央区域,而胰高血糖素阳性细胞则较分散。胰岛内 A 细胞和 B 细胞数量较丰富,其中胰岛素免疫阳性细胞密度为 $(28.5 \pm 7.6)$ 个/400 倍视野,胰高血糖素免疫阳性细胞密度为 $(34.4 \pm 5.9)$ 个/400 倍视野。

## 3 讨论

LEGOUIS<sup>[14]</sup>总结了硬骨鱼类的 3 种胰腺分布类型为:紧凑型,散布型和弥散型。紧凑型胰腺的结构致密,单独存在,如南方鲇(*Silurus meridionalis*)<sup>[15]</sup>和哲罗鱼(*Hucho taimen*)<sup>[16]</sup>。散布型胰腺呈颗粒状分布,数量很多,存在于腹腔肠系膜上或脏器表面,如斑鳅(*Siniperca scherzeri*)<sup>[17]</sup>、瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)<sup>[18]</sup>和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)<sup>[19]</sup>。弥散型胰腺呈颗粒状或串珠状分布,数量非常多,被膜较薄,存在于腹腔肠系膜各处或伸入肝脏内,如尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)<sup>[9]</sup>、鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[20]</sup>和胡子鲶(*Claris fuscus*)<sup>[21]</sup>。大口黑鲈的胰腺一部分呈黄白色的致密颗粒状分布,散布于胃肠相接处和前肠腹面肝脏内侧系膜上,还有一部分胰腺的细胞团呈串珠状,伸入到肝实质中的血管周围。据此,我们认为大口黑鲈的胰腺分布属于弥散型。但这些不同类型的胰腺分布在鱼类生理学中有什么意义尚不明确。但鱼类的内分泌胰腺分散于外分泌胰腺的分布意味着内、外分泌组织之间存在着一定的联系<sup>[22]</sup>,而且散布的胰岛可增加内分泌组织的表面积,维持局部较高的激素水平<sup>[23]</sup>,这可能与鱼类的越冬和耐饥饿相适应<sup>[24]</sup>。

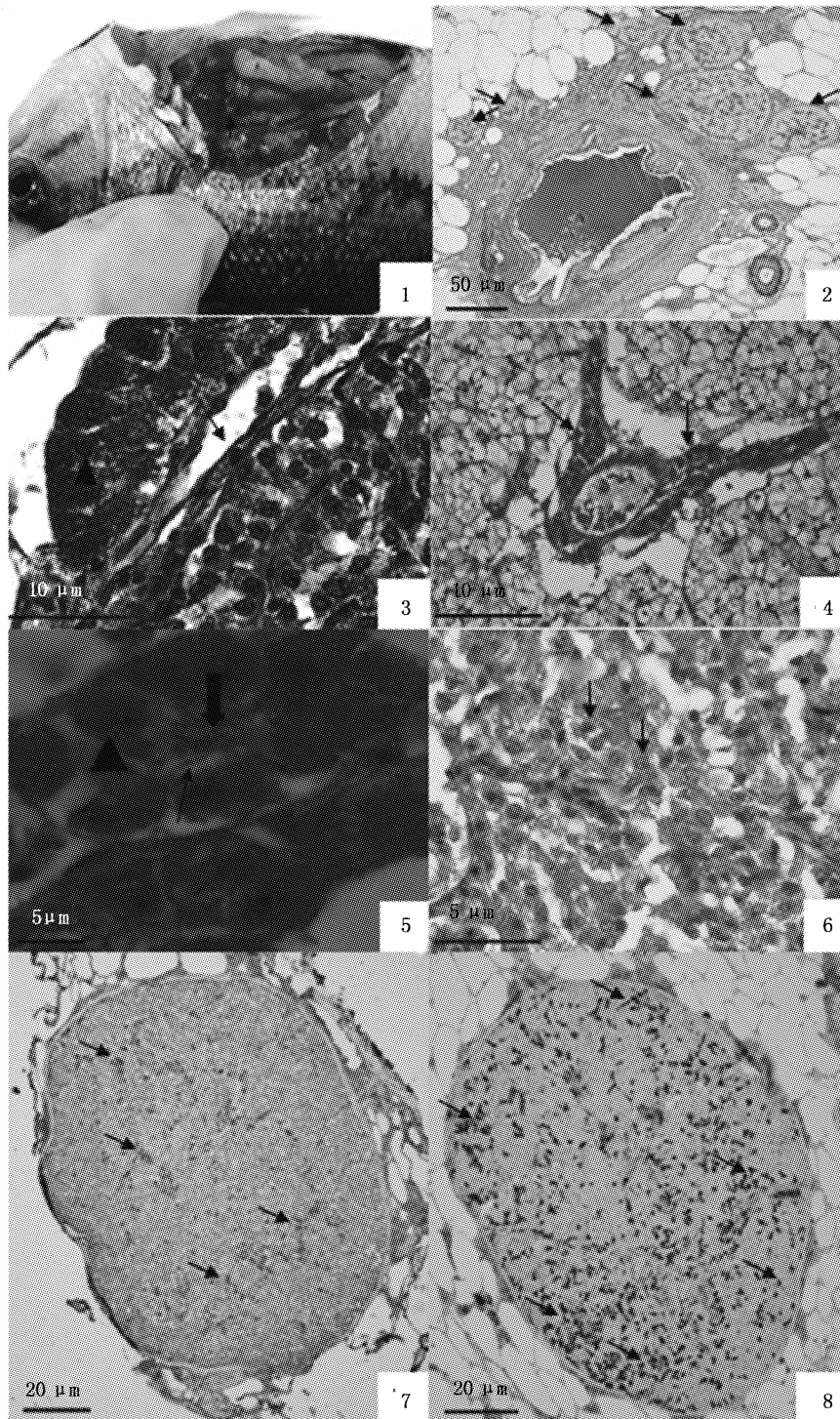
本研究在大口黑鲈体内没有发现布氏体的存在,这与罗非鱼(*O. niloticus*)<sup>[10]</sup>、蟾鱼(*Halobatrachus didactylus*)<sup>[25]</sup>、虹鳟(*Salmo gairdneri*)<sup>[26]</sup>的情况不同,这些鱼类的腹腔中都有肉眼可见的布氏体的存在。大口黑鲈体内没有布氏体,但有一个肉眼可见的主岛,这与金头鲷(*S. auratus*)<sup>[11]</sup>和舌齿鲈(*D. labrax*)<sup>[12]</sup>的胰腺特征相一致。值得一提的是,鱼类的胰腺分布存在着个体发育的差异。本研究使用的大口黑鲈的个体较小,对于较大个体是否有布氏体的存

在还有待进一步调查。不过,无论是布氏体或是主岛的存在,都为采取鱼体胰腺样本提供了方便的途径。

鱼类胰岛内至少含有 4 种内分泌细胞<sup>[27]</sup>,即 A 细胞、B 细胞、D 细胞和 F 细胞。本研究筛选了两种动物血清,通过免疫组化技术获得了大口黑鲈 A 细胞和 B 细胞的分布情况。但是,这并不是说大口黑鲈只有这两种胰岛细胞的存在。若想探究大口黑鲈胰岛内其他几种内分泌细胞的存在和分布情况,尚待大口黑鲈与胰岛相关的特异性抗体的开发成功。

### 参考文献:

- [1] 楼允东. 鱼类组织胚胎学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [2] YOUSON J H, AL-MAHROUKI A A, AMEMIYA Y, et al. The fish endocrine pancreas: review, new data, and future research directions in ontogeny and phylogeny [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 148 (2): 105 - 115.
- [3] BRINN J E. The pancreatic islets of bony fishes [J]. *American Zoologist*, 1973, 13(3): 653 - 665.
- [4] NELSON L E, SHERIDAN M A. Gastroenteropancreatic hormones and metabolism in fish [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 148 (2): 116 - 124.
- [5] CHAN S J, STEINER D F. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone [J]. *American Zoologist*, 2000, 40 (2): 213 - 222.
- [6] MAGLIO M, PUTTI R. Morphological basis of the interactions between endocrine cell types in the pancreatic islets of the teleost, *Blennius gattoruggine* [J]. *Tissue and Cell*, 1998, 30(6): 672 - 683.
- [7] LEE J H, KU S K, PARK K D, et al. Comparative study of endocrine cells in the principal pancreatic islets of two teleosts, *Silurus asotus* (Siluridae) and *Siniperca scherzeri* (Centropomidae) [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2001, 2(2): 75 - 80.
- [8] CHEN S, LI C, YUAN G, et al. Anatomical and histological observation on the pancreas in adult zebrafish [J]. *Pancreas*, 2007, 34(1): 120 - 125.
- [9] 王晓丽, 房慧伶, 文宗. 尼罗罗非鱼胰岛的显微和亚显微结构 [J]. *广西农业生物科学*, 2004, 23(1): 47 - 51.
- [10] YANG H, MORRISON C M, CONLON J M, et al. Immunocytochemical Characterization of the Pancreatic Islet Cells of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 114 (1): 47 - 56.
- [11] ABADM E, AGULLEIRO B, ROMBOUT J. An immunocytochemical and ultrastructural study of the endocrine pancreas of *Sparus auratus*. (Teleostei) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1986, 64(1): 1 - 12.
- [12] BECCARIA C, DIAZ J P, GABRION J, et al. Maturation of the endocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostei): An immunocytochemical and ultrastructural study: I. Glucagon-producing cells [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1990, 78(1): 80 - 92.
- [13] HINTON D E, SNIPES R L, KENDALL M W. Morphology and enzyme histochemistry in the liver of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 1972, 29(5): 531 - 534.
- [14] LEGOUIS R. 鱼类史[M]. 北京: 科学出版社, 1966.
- [15] 刘怀如. 南方鲇胰腺组织结构及胰腺泡的超微结构 [J]. *中国水产科学*, 2002, 9(4): 293 - 295.
- [16] 关海红, 尹家胜. 哲罗鱼肝脏和胰脏发生和发育的组织学研究 [J]. *水产学杂志*, 2011, 24(3): 16 - 20.
- [17] 熊洪林, 王志坚. 四种淡水肉食性鱼类胰脏及胰液导管系统的组织学比较 [J]. *四川动物*, 2009, 28(6): 843 - 847.
- [18] 谢碧文, 岳兴建, 张耀光. 瓦氏黄颡鱼肝和胰的组织学及超微结构 [J]. *西南农业大学学报*, 2004, 26(5): 645 - 653.
- [19] 吴金英, 林浩然. 斜带石斑鱼消化系统胚后发育的组织学研究 [J]. *水产学报*, 2003, 27(1): 7 - 12.
- [20] 秉志. 鲤鱼组织[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [21] 栾雅文, 刘翠敏. 胡子鲶肝脏, 胆囊以及胰脏组织学的初步研究 [J]. *内蒙古大学学报自然科学版*, 2001, 32(4): 440 - 442.
- [22] 敖竹君, 李季蓉. 乌鳢胰腺内分泌细胞的形态学和体视学研究 [J]. *遵义医学院学报*, 1994, 17(4): 276 - 278.
- [23] 本特利. 脊椎动物比较内分泌学[M]. 方永强, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 38 - 43.
- [24] 孟庆闻, 苏锦祥, 李婉端. 鱼类比较解剖[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 364 - 365.
- [25] PALAZON-FEMANDEZ J L, SUSO M P, MANCERA J M, et al. Immunohistochemical study of the principal pancreatic islet of the toadfish, *Halobatrachus didactylus* (Pisces: Batrachoididae) [J]. *Acta Histochemica*, 2001, 113(3): 256 - 261.
- [26] WAGNER G F, MCKEOWN B A. Immunocytochemical localization of hormone-producing cells within the pancreatic islets of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Cell and Tissue Research*, 1981, 221(1): 181 - 192.
- [27] JOHNSON D E, TORRENCE J L, ELDE R P, et al. Immunohistochemical localization of somatostatin, insulin and glucagon in the principal islets of the anglerfish (*Lophius americanus*) and the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *The American Journal of Anatomy*, 1976, 147(1): 119 - 24.



图版 大口黑鲈胰腺的组织学观察

Plate The histological observation of the pancreas of largemouth bass

1. 大口黑鲈腹腔内主岛外视图,“→”示主岛; 2. 胆管横切,“→”示胆管周围的胰岛,胰岛内紫色小颗粒为胰岛 B 细胞(G-醛复红染色); 3. 胰岛横切,“→”示胰岛外的结缔组织,“▲”示胰岛外的外分泌胰腺组织(H-E 染色); 4. 肝脏横切,“→”示肝脏中的外分泌胰腺组织(H-E 染色); 5. 外分泌胰腺横切,“▲”示胰腺细胞,“↓”示泡心细胞,“→”示胰腺腔(H-E 染色); 6. 胰岛横切,“→”示胰岛细胞(H-E 染色); 7. 主岛免疫组化染色图,“→”示主岛内的胰岛素免疫组化阳性细胞; 8. 主岛免疫组化染色图,“→”示主岛内的胰高血糖素免疫组化阳性细胞。

## The histological observation of the pancreas of largemouth bass, *Micropterus salmoides*

TONG Chun-meng, CHEN Nai-song, JI Zhen-yao, XU Xiang-tai, GOU Shi-pan  
(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In the present study, the techniques of histological section and immunohistochemistry were adopted to perform a histological observation on the pancreas of largemouth bass. It was revealed by the sections stained with H-E and G-aldehyde fuchsin that more than 10 yellow-white macroscopic nodules were identified as islet structures in the abdominal cavity of largemouth bass, in which the biggest one was designated as principal islet, and a lot of smaller invisible islets were embedded in the wall of the common bile duct. The islet was surrounded by an inner layer of connective tissue and an outer layer of exocrine pancreatic tissue, and the exocrine pancreatic tissue also existed and was distributed in the liver. The sections marked by streptavidin peroxidase (S-P) immunohistochemical method and the section image analysis suggested that B cells were located mainly in the central region of the islet while the A cells were distributed throughout the islet. It can be concluded that the pancreas of largemouth bass belongs to dispersal type, the endocrine pancreas (islet) is distributed mainly around the common bile duct while the exocrine pancreas surrounds the islet and it is also embedded in the liver.

**Key words:** *Micropterus salmoides*; pancreas; islet; histological observation