

羊垂体前叶降钙素基因相关肽(CGRP) 与 P 物质(SP)免疫反应神经纤维

沈霞芬 贾维真 卿素珠 陈 谊

(西北农业大学, 陕西杨陵 712100)

刘惠玲 林英华 鞠 躬

(第四军医大学神经科学研究所, 西安 710032)

摘 要 应用免疫组化 ABC 法发现羊垂体前叶有降钙素基因相关肽免疫反应神经纤维存在, 这些纤维呈串珠状分布于结节部及远侧部前 2/3 区域。纤维形态多样, 细长者穿行于腺细胞之间; 短小弯曲者围绕于腺细胞周围; 反复分支折叠盘曲缠绕成团簇状者将腺细胞成堆的网络其中。神经纤维及串珠与腺细胞关系密切, 提示有可能对腺细胞分泌起直接支配作用。在纤维分布区域可见散在的免疫反应细胞, 形态不规则, 大部分与神经纤维无接触关系, 但有少数可位于纤维的网络之中。P 物质免疫反应神经纤维及细胞在羊垂体前叶分布稀疏, 且多位于结节部, 远侧部很少。

关键词 垂体前叶, 免疫组化, 降钙素基因相关肽, P 物质, 羊

垂体是家畜体内重要的内分泌器官, 垂体前叶的腺细胞分泌多种激素控制着机体的生长、发育、代谢、行为、泌乳、生殖等一系列生理活动。腺垂体的分泌又受下丘脑的调控, 其机制是 Harris 在 1948 年提出的“门脉递质假说”即通过门脉循环以体液调节方式来实现的, 并认为垂体前叶无神经的直接支配^[1]。此学说半个世纪以来一直成为神经内分泌学的经典基础理论。

80 年代以后, 由于各种免疫组化技术的出现, 对哺乳动物垂体前叶到底有无神经支配的研究再一次引起人们的注意。1982、1983 年 Westlund 等发现大鼠垂体前叶内有少量 5-HT(5-羟色胺)和 SOM(生长抑素)反应神经纤维的存在, 由于数量少, 未引起重视; Rosenfeld 等(1983)及 Skoffitsch 等(1985)发现大鼠垂体前叶内有少量降钙素基因相关肽(Calcitonin Gene-Related Peptide, CGRP)反应神经纤维。鞠躬等从 1988 年起先后发现了猴、大鼠、犬、人等一些高等动物的垂体前叶有较多的 P 物质(SP)和 CGRP 等肽能神经纤维的存在^[2-5]; 并证明这些纤维与 ACTH(促肾上腺皮质激素)细胞、TSH(促甲状腺素)细胞、GH(生长激素)细胞等关系密切^[6-7]; 还应用免疫电镜法于狗及大鼠垂体前叶内发现免疫反应神经纤维与腺细胞间建立的突触关系^[8,9]。将大鼠双侧肾上腺切除后, 他们观察到垂体前叶的 CGRP 免疫反应神经纤维明显增加^[10], 并证明系神经纤维的出芽增殖的结果^[11]。这些研究结果都证明了垂体前叶的激素分泌是受到神经纤维的直接调节, 因而鞠躬等提出了“哺乳动物垂体前叶受神经-体液双重调节”的假说^[12], 这是对 Harris 单纯体液调节假说的重大修正。

根据目前所掌握的文献来看, 还未见到家畜方面的有关类似报道, 山羊作为家畜中重要的

* 国家自然科学基金和陕西省自然科学基金资助。

** 收稿日期 1997-09-12。

一员,又是常作为神经内分泌极好的试验动物之一,因此本试验应用免疫组化 ABC 法观察了山羊垂体前叶内的 CGRP 和 SP 这两种重要神经肽免疫反应神经纤维和细胞的形态及分布状况,其结果支持了鞠躬提出的垂体前叶受神经-体液双重调节的这一假说,同时也丰富了家畜神经内分泌的有关内容,并为畜牧兽医基础理论的发展提供一些形态学方面的新资料。

1 材料与方 法

1.1 试验动物 选择健康山羊 7 头,其中成年羊 3 头(2♀1♂);幼羊 2 头(40~50 日龄 2♂);羔羊 2 头(10 日龄 2♂)。

1.2 组织切片制备 将羊皮下注射麻醉剂(846 合剂,1~1.5ml/10kg 体重)麻醉后,剖开胸腔,心脏放血,经主动脉先灌入温生理盐水,待流出液体清亮时,再灌入 4% 多聚甲醛,持续 1.5~2h(小羊 2 000ml 左右,成年羊 4 000ml 左右)待固定完全后,取垂体,再在上述固定液中后固定 4~8h 入 30% 蔗糖保存,4℃ 冰箱过夜。冰冻连续矢状切片,片厚 50μm,隔 3 取 1,共制得 4 套切片,取其中二套分别作 CGRP 和 SP 免疫组化 ABC 染色^[13],另一套作对照染色。

1.3 免疫组化染色程序 ①切片入 0.5% H₂O₂ 中作用 30min;②0.2% Triton X-100 浸泡 1h (37℃);③入一抗;CGRP(1:3 000)SP(1:5 000)兔抗血清(INC 公司产品),4℃ 冰箱作用 60~65h;④用 ABC 法染色(ABC Kit Sigma 公司产品);⑤葡萄糖氧化酶—DAB—硫酸镍铵显色^[14];⑥切片脱水透明,封片,光镜下观察。以上每程序间用 KPBS 液洗涤 3 次,每次 10~15min。

1.4 对照 ①替代试验:用 KPBS 液代替一抗,其余步骤同上。②无关抗体替代试验用工作浓度(1:5 000)的抗催产素抗体代替 CGRP 及 SP 抗体染垂体,选用抗催产素抗体是因为已知它能和垂体后叶有强反应,而不染垂体前叶。这种替代法(Ju and Liu 1989. J. Chem Neuroanat)比通常用的免疫前血清对照法更合理。

2 结 果

KPBS 替代试验未能使羊垂体任何部分呈色;无关抗体替代试验呈现后叶垂体非常密集的染色,而前叶垂体完全不被染色。证明本实验具有 CGRP 和 SP 免疫反应特异性。

2.1 CGRP 免疫反应组

2.1.1 结果:7 头山羊的垂体切片,除 2 头羔羊的垂体未见到有免疫反应细胞和神经纤维外,其余 5 头羊垂体前叶均不同程度地出现了 CGRP 免疫反应神经纤维和细胞。虽然个体间在数量和分布方面有差异,但免疫反应细胞和神经纤维的形态基本相同(图 A~D)。

2.1.2 免疫反应神经纤维形态及分布:CGRP 反应纤维均为无髓神经纤维。在羊垂体前叶的分布可见图 1。结节部在靠近正中隆起处有较多的反应纤维,并有少量纤维从正中隆起伸入结节部,其余结节部纤维变少,但在数量上有个体差异。纤维上有细小排列均匀的颗粒(膨体),呈串珠状多与血窦相随,沿窦壁分布,因此与血管关系密切;有的行径在血窦和腺细胞之间,较长,径直走向垂体远侧部;少数可分支弯曲,纤维上有较大的颗粒,围绕在腺细胞的周围,腺细胞轮廓依稀可见。远侧部的反应神经纤维最为多姿多态。既有单根细长串珠状行走于腺细胞之间,亦有短的单根纤维围绕于腺细胞而呈现出 C、S、O、Y 等各种形态;还有纤维分支后各自反复折叠、盘曲、缠绕成网络样而呈丛、片、簇的密布在一大堆腺细胞之上,在网络中还可

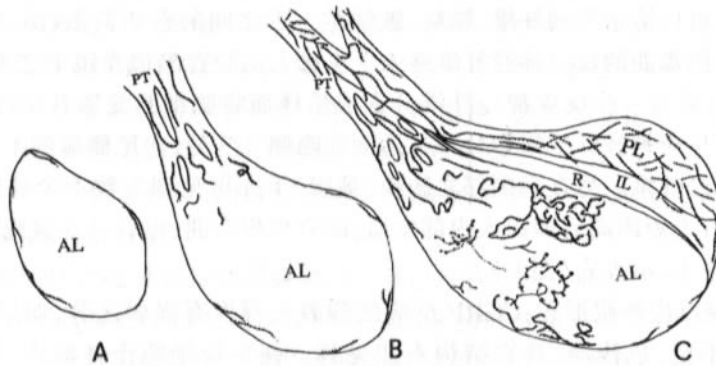


图 1 CGRP 免疫反应神经纤维在羊垂体分布示意图(矢状切面)

A、B、C 分别由外侧到正中 3 个不同切面

Fig.1 Schematic drawing of CGRP-ir nerve fibers in the pituitary of the goat A,B,C:

Three parasagittal section, from lateral to medium

AL 远侧部 PT 结节部 IL 中间部 PL 神经部 R 拉克氏囊(垂体裂) ○血窦

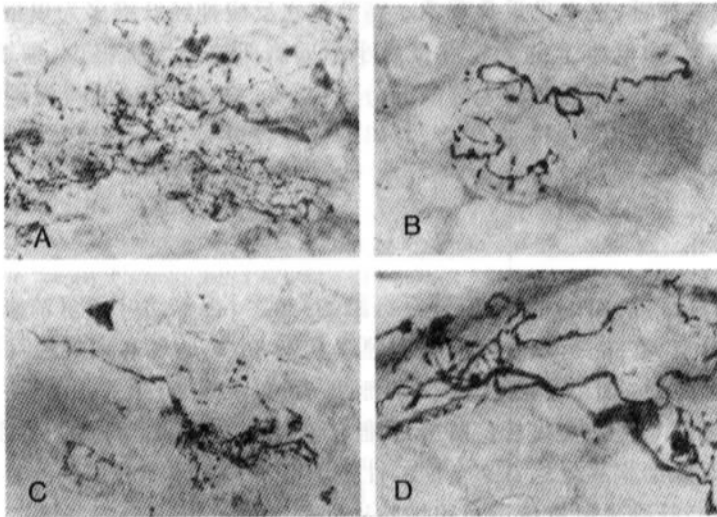


图 A 远侧部 CGRP 免疫反应神经纤维盘曲成网络样,免疫反应细胞网络其中 ×330

Fig. A A network of CGRP-ir nerve fibers, in pars distalis, enmeshed in which are CGRP-ir cells ×330

图 B CGRP 免疫反应神经纤维上的突触样结构 ×660

Fig. B Synapse-like structure of a CGRP-ir nerve fibers ×660

图 C CGRP 免疫反应神经纤维成爪样分支 ×330

Fig. C Branches of CGRP-ir nerve fibers forming claw-like structure ×330

图 D 远侧部被膜下 CGRP 免疫反应神经纤维 ×660

Fig. D CGRP-ir nerve fibers under the capsule of pars distalis ×660

隐约见到少量背景染色的细胞的轮廓,有时显现其不着色的核,纤维上的颗粒也变得大小不均,较大颗粒突出,可以清楚见到纤维、颗粒、腺细胞三者之间的密切关系(图A);在另一图象中更能清楚见到一团盘曲的反应神经纤维终末上有膨大的颗粒酷似光镜下之突触并紧贴于腺细胞之表面(图B);另有一些反应神经纤维分支成爪样而将腺细胞笼罩其中(图C)。以上所见各种形态之免疫反应神经纤维集中分布在远侧部吻侧2/3处,向尾侧端的1/3处很少,几乎不能见到典型的神经纤维。另在远侧部之脑膜(被膜)下亦可见到为数不少的反应神经纤维,由粗变细,沿脑膜行走短距离后即深入内部实质,既有单根弯曲,也有分支盘绕,还可形成网络样结构,一般内伸在1mm左右(图D)。

2.1.3 CGRP 免疫反应细胞形态:CGRP反应细胞着色程度有强弱之分,弱反应细胞仅有模糊轮廓,内含颗粒不清,色浅淡,其它结构不能见到。强反应细胞个体较大,直径约有12~20 μm ,胞质中充满了深蓝色反应颗粒,多者可融成一片,少数可见到不着色的核,位于中央或偏于一侧。细胞多呈圆形,椭圆形或三角形等不规则形态,无突起,散在地分布在垂体结节部和远侧部,在靠近垂体裂的一侧较多。有些反应细胞可出现在纤维附近,亦有极少数可出现在团簇状的免疫反应神经纤维网络之内,可与神经纤维重叠或接触(图A)。

2.2 SP 免疫反应组

7头羊中只有3头成年羊的垂体前叶出现为数不多的SP免疫反应神经纤维和细胞,且主要出现在结节部,密度和数量都较大程度地少于CGRP反应组。反应细胞形态同CGRP组,分布稀疏,不与神经纤维靠近,更未见重叠现象。结节部之反应神经纤维多为单根与血窦相并行,未见有分支或绕曲现象,纤维上的颗粒亦少而小。远侧部神经纤维很少,细短,有一定弯曲,有围绕腺细胞现象,但未能见到有较大范围的分支、折叠、缠绕现象,前叶周围的脑膜下有一定数量之反应神经纤维,尤以尾侧脑膜稍多,有串珠样,亦可见到少量分支,但伸入实质很短即消失。

3 讨 论

3.1 羊垂体前叶有 CGRP 和 SP 免疫反应神经纤维的存在 在羊前叶内可清晰见到CGRP免疫反应神经纤维的分支、卷曲、折叠并将腺细胞缠绕其中,尤其是观察到神经纤维的终末颗粒呈突触样与腺细胞紧贴使纤维、颗粒(膨体)、腺细胞三者关系非常密切。鞠躬等运用免疫电镜观察到了狗垂体远侧部CGRP免疫反应神经纤维与腺细胞之间建立的突触关系,由此可以认为该反应神经纤维对腺细胞的分泌具有支配的性质。由于羊垂体前叶内的神经纤维与腺细胞关系密切,推测此神经纤维也可直接调节腺细胞活动。

羊垂体前叶内P物质免疫反应神经纤维的数量很少。组织内部某种免疫反应纤维数量少并不一定反应神经纤维数量实在地少。有时因为神经纤维内肽含量过低,低于免疫组织化学的灵敏度,而未能被染出。在一定生理或病理生理条件下,其免疫反应神经纤维的数量可能明显地增加。

3.2 羊垂体前叶亦受神经-体液的双重调节 关于下丘脑对垂体的调控,Harris在肯定体液调节作用的同时否认了神经的直接调节作用。鞠躬等在有关神经的直接支配从各个方面作了大量的实验,以无可辩驳的确凿证据证明了一些哺乳动物的垂体前叶有数量不等的肽能神经纤维支配着腺细胞的分泌运动,从而提出了“哺乳动物垂体前叶受神经-体液双重调节”假说,

该假说认为哺乳动物垂体前叶有一定数量的神经纤维,它们和腺细胞关系密切,而且可以形成典型的突触结构,垂体前叶的腺细胞的分泌活动受神经、体液的双重调节;神经纤维可能对腺细胞的分泌发挥某种快速的调节作用,尤其在应激情况下^[15]。本实验的结果有力地支持这一假说的成立,尤其是家畜生活的环境条件、饲养管理、温度、饲料等变化更具应激性,因而,快速的神经调节似乎也显得较为重要。对于神经-体液双重调节机制的深入研究,不仅对神经内分泌生理学的发展产生促进作用,而且将会对人类和家畜神经内分泌系统的临床医学产生很大影响,其意义是十分巨大的。

3.3 免疫反应神经纤维的分布有种属特异性 从已知的各种动物试验的结果来看,同一种神经肽的免疫反应神经纤维在不同种属动物的垂体前叶的形态虽然基本相同,然而分布的密度和范围却有一定的差异,与已知的一些报道的资料相比较,羊垂体前叶 CGRP 的免疫神经纤维的密度和分布范围可能少于猴、狗及大鼠,而 SP 的分布与其他的动物相比,显得更为稀疏些^[2~5],这可能是由于山羊的种属特异性造成的。此外,本实验中两头羔羊未能出现 CGRP 反应神经纤维,可能是由于日龄太小,神经和内分泌系统发育还不够完善之故。其余 5 头(3♂2♀)羊中成年羊又明显多于幼羊,因此 CGRP 反应神经纤维的出现与分布似乎与性别关系不大而与年龄有关。

参 考 文 献

- 1 Harris GW. Neural control of the pituitary gland. *Physiol Rev*, 1948, 28:139~179
- 2 Liu SJ, Ju G. Substance P-like immunoreactive nerve fibers in the pars distalis of the adenohypophysis of macaque monkeys. *Neurosci Lett*, 1988, 94:1~4
- 3 Ju G, Liu SJ. Substance P-like immunoreactive nerve fibers in the pars distalis of the anterior pituitary of the dog. *Cell Tissue Res*, 1990a, 261:323~331
- 4 Ju G, Liu SJ, Ma D. Calcitonin gene-related peptide and substance P-like-immunoreactive innervation of the anterior pituitary in the rat. *Neuroscience* 1993, 54:981~989
- 5 马丹,鞠躬. 人胎儿垂体前叶 P 物质免疫阳性纤维与促甲状腺素免疫阳性细胞的关系及其发育变化. *神经解剖学杂志*, 1994, 10:117~121
- 6 Ju G, Liu SJ. The relationship of substance P-like immunoreactive nerve fibers to thyrotropes and corticotropes in the pars distalis of the anterior pituitary in the monkey. *Neuroscience*, 1989, 32(2):441
- 7 Ju G, Liu SJ. The relationship of substance P-immunoreactive nerve fibers to somatotropes of the anterior pituitary in the monkey. *J Neuroendocrinol*, 1989, 1(3):397
- 8 Ju G, Zhang X. An electronic microscopical study on substance P-like immunoreactive nerve fibers in the pars distalis of the adenohypophysis in the dog. *Neuroscience* 1990b, 38:503~513
- 9 张旭,鞠躬. 狗垂体远侧部降钙素基因相关肽免疫反应神经纤维的超微结构研究. *神经解剖学杂志*, 1991, 7:55~58
- 10 马丹,鞠躬,范思昌. 肾上腺切除后大鼠垂体前叶降钙素基因相关肽免疫反应神经纤维的变化. *解剖学报*, 1993, 24(4):361~367
- 11 Lu C R, Meng F T, Benowitz L I, Ju G. Evidence for axonal sprouting in the anterior pituitary following adrenalectomy in the rat. *Journal of Endocrinology*, 1995, 147:161~166
- 12 Ju G, Liu SJ, Zhang X. Peptidergic innervation of the mammalian anterior pituitary. *NIPS* 1991a. 6:26~28
- 13 Hsu SM, Ravid L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique.

- A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP)procedures. *J Histochem Cytochem*, 1981, 29(4):577
- 14 Shu S, Ju G, Fan L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett*, 1988, 85(2):169
- 15 Fahim A, Rettori V, MacCann SM. The role of calcitonin gene-related peptide in the control of growth hormone and prolactin release. *Neuroendocrinology*, 1990, 51:668~693

**CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE(CGRP)
AND SUBSTANCE P (SP) IMMUNOREACTIVE NERVE
FIBERS IN ANTERIOR PITUITARY OF GOAT**

Shen Xiafen, Jia Weizhen, Qing Suzhu, Chen Yi
(*Northwestern Agricultural University, Shaanxi, Yangling 712100*)
Liu Huiling, Lin Yinghua, Ju Gong
(*Institute of Neuroscience, The Fourth Military
Medical University, Xian 710032*)

Abstract

Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerve fibers in the anterior pituitary of the goat were found with ABC method of immunohistochemistry. These fibers occurred in the 2/3 front area of pars distalis and pars tuberalis, showed clear moniform. They had many shape, the long and thin fibers passed through glandular cells; the short and winding fibers surrounded by glandular cells; the branches of them folded and rolled into a network, many cells were on it. The close relation between fibers and cells suggest that they may play a direct role in the secretion of the cells. The scattered CGRP-ir cells were observed in fibers area, showed irregular. Few cells were found to be in close proximity to nerve fibers, several cells occurred in fibers network. There were a few sp-ir cells and fibers in anterior pituitary of the goat, many of them were in pars tuberalis, few in pars distalis.

Key words Anterior pituitary, Immunohistochemistry, CGRP, SP, Goat