

青紫蓝兔体内 Ghrelin 的免疫组化定位

贾翠平 雷治海* 宁红梅 苏娟 张文龙 贾晓庆

(南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘要 采用免疫组织化学方法研究了 Ghrelin 在青紫蓝兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 体内的分布定位。结果显示, Ghrelin 免疫阳性细胞分布于下丘脑、大脑皮质、延髓、脊髓、胃、小肠和大肠。下丘脑内的阳性神经元胞体主要分布于弓状核、室旁核、腹内侧核、背内侧核和下丘脑外侧区。胃肠道内的 Ghrelin 免疫阳性细胞存在两种类型, 即“闭合型”细胞和“开放型”细胞。实验结果表明, 兔体内 Ghrelin 的分布与人和其他动物的分布基本相似, 但也存在一些差异。

关键词: Ghrelin, 青紫蓝兔, 免疫组化

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2007)04-129-06

Immunohistochemical Localization of Ghrelin-containing Cells in the Chinchilla Rabbit

JIA Cui-Ping LEI Zhi-Hai* NING Hong-Mei SU Juan ZHANG Wen-Long JIA Xiao-Qing

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Localization of ghrelin-containing cells in the Chinchilla Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) was studied by immunohistochemistry. Ghrelin-containing cells were found to exist in the cerebral cortex, hypothalamus, thalamus, medulla oblongata, spinal cord, stomach, small and large intestines. In the hypothalamus, ghrelin-containing cells were identified in the arcuate, periventricular, dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei, and lateral hypothalamic area. There were two kinds of ghrelin-containing cells, open- and closed-type cells, in the gastrointestinal tracts. These results are similar to those obtained in human and other animals, indicating the conservation of ghrelin in phylogeny.

Key words: Ghrelin; Chinchilla Rabbit; Immunohistochemistry

Ghrelin 是日本学者 Kojima 等人于 1999 年在人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 的胃组织中发现的一种多肽, 为生长激素促分泌素 (growth hormone secretagogue) 受体 (GHS-R) 天然的内源性配体。研究发现哺乳动物的 Ghrelin 由 28 个氨基酸组成, 而禽类的由 26 个氨基酸组成。Ghrelin 在种系发生上是高度保守的, 人和小鼠仅第 11、12 位的氨基酸不同, 同源性高达 92.9%^[1-4]。在体内 Ghrelin 有两种存在形式, 一种是 N 端去辛酰基化, 另一种是 N 端辛酰基化, 即第 3 位丝氨酸的 N 端与十八辛酸以酯键连接, 它是发挥生物学功能所必需的, 但对

未辛酰基化的 Ghrelin 的作用还不是很清楚^[5]。Ghrelin 在动物体内分布广泛, 有趣的是 Aydin 等人发现在植物体内也有 Ghrelin 的表达^[6]。Ghrelin 与其受体结合后会产生一系列生物学效应, 包括调节 GH 分泌、调节能量平衡、促进胃酸分泌、调节心血管活动、增强免疫应答、抗

基金项目 国家自然科学基金项目(No.30471248)资助;

* 通讯作者, E-mail: leizh@njau.edu.cn;

第一作者介绍 贾翠平, 女, 硕士研究生; 主要从事神经解剖学研究, E-mail: jiacuiping427@126.com。

收稿日期: 2007-02-09, 修回日期: 2007-05-08

细胞增殖、影响糖代谢、引起焦虑和改善记忆力、调节睡眠、维持睾丸正常功能等多种生物学作用^[7-10]。Ghrelin 一经发现就引起了人们的广泛关注,但主要集中在对人和鼠的研究,关于 Ghrelin 在兔体内的分布定位尚未有文献报道。本实验采用免疫组织化学方法研究了 Ghrelin 在青紫蓝兔(*Oryctolagus cuniculus*)体内的分布定位,为研究 Ghrelin 在兔体的生理功能提供了形态学资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物 3月龄健康青紫蓝兔 10只,雌雄各半,体重为(2 ± 0.1) kg,购自江苏省农业科学院,圈养在同一兔舍内分笼单只饲养。

1.2 实验试剂 第一抗体为羊抗人 Ghrelin 的多克隆抗体(SC-10368, Santa Cruz Biotechnology Inc),购自上海吉泰科技有限公司。兔抗羊 SP 免疫组化染色试剂盒、中性树胶封片剂和 DAB 显色试剂购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 取材与切片 实验动物(青紫蓝兔)经耳静脉注射 20%氨基甲酸乙酯(5 ml/kg)麻醉后,剪开胸壁,暴露心脏,经左心室快速灌注 0.85%的生理盐水(含 0.075%柠檬酸三钠),同时剪开右心耳,灌至流出清亮液体为止(大约 300 ml),然后用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)新鲜配制的 4%多聚甲醛固定液灌注,约 2 000 ml。固定后取脑、脊髓、胃、肠、脾、卵巢和睾丸等器官,材料置于同一固定液后固定约 6 h。固定好的组织块经 0.1 mol/L PBS 洗两次(30 min/次)后,置于用 0.1 mol/L PBS 配制的 25%蔗糖溶液中,放置于 4℃。待其下沉后做冰冻切片,切片厚 35 μm ,直接放置于防冻液内,然后置于 -20℃ 冰箱保存备用。切片分 2 套,其中一套用于免疫组化染色,另一套用作阴性对照。

1.4 免疫组化 SP 法操作程序 切片经 PBS 漂洗 20 min 后,按兔抗羊 SP 免疫组化染色试剂盒中的程序进行如下操作:①滴加试剂 A(过氧化酶阻断液),室温下孵育 40 min;②滴加试剂 B(二抗动物非免疫血清),置 37℃ 孵育 40 min;③滴加一抗(羊抗人 Ghrelin 多克隆抗体),于 37℃

孵育 3~4 h 或 4℃ 过夜;④滴加试剂 C(生物素标记的第二抗体),室温孵育 30 min;⑤滴加试剂 D(链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶溶液),室温孵育 30 min;⑥将显色盒中的 A、B、C 试剂各取 1 滴,加于 1 ml 蒸馏水中,混匀后滴加到切片上,避光显色,反应 3~10 min,蒸馏水洗涤,裱贴于载玻片上,晾干后用中性树胶封片。以上各步(除第二步)之后均用 PBS 洗 3 次(10 min/次)。

免疫组织化学对照实验:用 0.1 mol/L PBS 代替一抗,其余步骤同上。

1.5 结果观察与统计学处理 用 Olympus 双目显微镜对切片进行观察、拍照。脑核团定位参照兔和猫脑立体定位图谱确定^[11,12]。应用江苏捷达 801 形态分析软件对阳性细胞进行分析,各部位均在统一放大倍数下检测,每张切片随机选取 5 个不同视野,测量阳性细胞的大小。分别计算中枢神经系统内表达 Ghrelin 的核团的神经元个数、胃肠道内的阳性细胞密度,结果用平均数表示。

2 结果

2.1 Ghrelin 免疫阳性细胞在中枢神经系统的分布 Ghrelin 免疫阳性神经元分布于下丘脑、大脑皮质、延髓和脊髓,阳性神经元呈深浅不等的棕褐色,胞核淡染或不着色,胞体大小为 10~60 μm ,细胞成群或散在分布(图版 I:1~8)。

由图 1 可知,在中枢神经系统中下丘脑内出现的免疫阳性细胞最多,主要分布于弓状核、腹内侧核、室旁核、背内侧核和下丘脑外侧区(图版 I:1~5),各部位细胞个数分别为 110、76、102、98、100,胞体呈卵圆形、梭形或多边形,有数个突起,除腹内侧核外,其余部位免疫阳性细胞较多。在大脑皮质,免疫阳性神经元主要位于第 V 层,但数量较少,仅为 19 个,胞体多呈锥形,染色较浅(图版 I:6)。在延髓,免疫阳性神经元分布于迷走神经背侧运动核(图版 I:7),胞体呈多边形,突起明显。在脊髓,免疫阳性神经元分布于腹侧角(图版 I:8),为多极神经元。

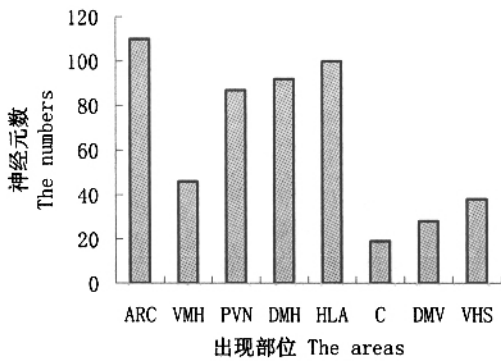


图1 青紫蓝兔中枢神经系统 Ghrelin 免疫阳性细胞分布情况

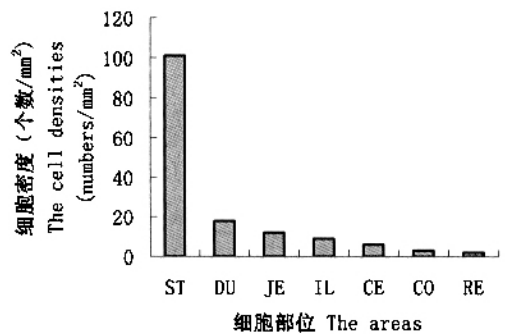


图2 青紫蓝兔胃肠道不同部位 Ghrelin 免疫阳性细胞密度

Fig.1 The numbers of Ghrelin immunoreactive neurons in different nerve nucleus of Chinchilla rabbit

Fig.2 The densities of Ghrelin-containing cells in the Chinchilla rabbit gastrointestinal tract

ARC:弓状核; VMH:腹内侧核; PVN:室旁核; DMH:背内侧核; HLA:下丘脑外侧区; C:大脑皮质; DMV:迷走神经背侧运动核; VHS:脊髓侧角。

ST:胃; DU:十二指肠; JE:空肠; IL:回肠; CE:盲肠; CO:结肠; RE:直肠。
ST :stomach; DU :duodenum; JE :jejunum; IL :ileum; CE :cecum; CO :colon; RE :rectum.

ARC :the arcuate nucleus; VMH :the ventromedial hypothalamic nucleus; PVN :the paraventricular hypothalamic nucleus; DMH :the dorsomedial hypothalamic nucleus; HLA :the lateral hypothalamic area; C :the cerebral cortex; DMV :the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in the medulla oblongata; VHS :the ventral horn of the spinal cord.

2.2 Ghrelin 免疫阳性细胞在内脏器官的分布

在研究的内脏器官中,大量的 Ghrelin 免疫阳性细胞发现于胃肠道,在脾、卵巢、睾丸中未发现免疫阳性细胞。在胃内,Ghrelin 免疫阳性细胞定位于黏膜层(图版 I :9),主要位于胃底腺区胃腺的颈部和底部,但在贲门腺区和幽门腺区也可见少量免疫阳性细胞。在肠道,Ghrelin 免疫阳性细胞数量较胃内少,分布于十二指肠(图版 I :10)、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠的黏膜层,阳性细胞呈深浅不等的棕褐色,细胞大小为 90~200 μm,且阳性细胞表达量从小肠到大肠逐渐减少(图 2)。胃肠道内的免疫阳性细胞根据其游离面是否到达腔面可分为两类,即“开放型”细胞(图版 I :11)和“闭合型”细胞(图版 I :12)^[13]。“开放型”细胞呈梭型、锥体型、三角形或多角形;“闭合型”细胞呈圆形或椭圆形。

对照实验仅见背景染色,未发现阳性细胞的分布(图版 I :13)。

3 讨论

3.1 Ghrelin 在中枢神经系统的分布定位

Ghrelin 在中枢神经系统和胃肠道均有分布,属于一种脑肠肽。Ghrelin 在动物脑内的分布定位文献中已有报道。Hou 等^[14]研究发现 Ghrelin 阳性神经元在大鼠(*Rattus norvegicus*)脑内主要分布于下丘脑弓状核、室旁核、外侧区、大脑皮质、扣带回。Cowley 等^[15]报道大鼠脑内 Ghrelin 阳性神经元分布于下丘脑外侧区、弓状核、腹内侧核、背内侧核、室旁核、第三脑室室管膜。Miller 等^[16]报道在成年绵羊(*Ovis aries*)的下丘脑和后脑存在 Ghrelin 及生长激素促分泌素受体(GHSR-1a)免疫活性。杨连玉等^[17]报道在新生仔猪(*Sus scrofa*)和 90 日龄生长猪的下丘脑具有 Ghrelin mRNA 分布。本实验结果与在其他动物中获得的结果基本相似,如在大脑皮质、下丘脑(弓状核、背内侧核、室旁核、腹内侧核和下丘脑外侧区)发现阳性神经元,但也存在一些差异,如在兔延髓、脊髓发现阳性细胞,在第三脑室室管膜未见有阳性神经细胞,这表明 Ghrelin 神经元在脑内的分布存在种属差异,也可能与研究使用的方法、使用的抗体或动物的年龄有关。

3.2 Ghrelin 在内脏器官的分布定位 Ghrelin 在内脏器官的分布定位文献中已有报道。杨连玉等^[17]发现新生仔猪和 90 日龄生长猪的胃底部、十二指肠、空肠、回肠、胰、肝、肾、心等部位均有 Ghrelin mRNA 分布。黄治国等^[18]报道了不同日龄哈萨克羊和新疆细毛羊下丘脑、垂体、心、肝、胃、十二指肠和背最长肌内 Ghrelin mRNA 的表达及发育性变化。Hayashida 等^[19]用免疫组织化学法研究了猪、绵羊、马(*Equus caballus*)和牛(*Bos tarurus*)胃内 Ghrelin 的分布定位,发现这些动物胃内 Ghrelin 的分布与大鼠的一样,免疫染色细胞密集分布于胃泌酸腺的颈部至底部,但猪的贲门部和幽门部分布也较多。本实验在青紫蓝兔的胃肠道发现 Ghrelin 免疫阳性细胞,但在脾、睾丸、卵巢内未发现免疫阳性细胞,表明 Ghrelin 在内脏器官的分布可能存在物种差异,也可能 Ghrelin 免疫阳性细胞的分布与 Ghrelin mRNA 的分布存在一定差异。本研究小组在另外的研究中发现 Ghrelin mRNA 在青紫蓝兔心、睾丸、卵巢中有表达,其他研究也发现某些神经肽的分布与其 mRNA 的分布定位有差异,这个问题有待深入研究。就胃肠道内的免疫阳性细胞分布的部位和类型而言,青紫蓝兔与猪、鼠等动物的基本相似,即胃肠道内也存在“闭合型”和“开放型”两种阳性细胞。有人认为“开放型”细胞与腔面相接触,可能接受来自管腔的诸如营养水平、pH 等信号的调节;“闭合型”细胞主要受激素、神经或机械刺激的调节。这为理解 Ghrelin 调节兔胃肠道的生理功能提供了形态学依据。

综上所述,Ghrelin 免疫阳性细胞在青紫蓝兔大脑皮质、下丘脑、脑干、脊髓、胃肠道等部位均有分布,实验上的异同,既说明 Ghrelin 在物种进化上的保守性,也反映出种间存在一些差异。

参 考 文 献

- [1] Kojima M , Hosoda H , Date Y , et al . Ghrelin is a growth hormone releasing acylated peptide from stomach . *Nature* , 1999 **402** : 656 ~ 660 .
- [2] Kojima M , Kangawa K . Ghrelin : structure and function . *Physiol Rev* 2005 **85** (2) : 495 ~ 522 .
- [3] Kojima M , Hosoda H , Matsuo H , et al . Ghrelin : discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor . *Trends Endocrinol Metab* 2001 **12** (3) : 118 ~ 122 .
- [4] Kaiya H , Van Der Geyten S , Kojima M , et al . Chicken ghrelin : purification , cDNA cloning , and biological activity . *Endocrinology* 2002 **143** (9) : 3454 ~ 3463 .
- [5] Hosoda H , Kojima M , Matsuo H , et al . Ghrelin and des - acyl ghrelin : two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue . *Biochem Biophys Res Commun* , 2000 , **279** (3) : 909 ~ 913 .
- [6] Aydin S , Geckil H , Zengin F , et al . Ghrelin in plants : What is the function of an appetite hormone in plants ? *Peptides* 2006 , **27** (7) : 1602 .
- [7] 雷治海 . Ghrelin 研究进展 . *畜牧与兽医* , 2005 **37** (5) : 54 ~ 57 .
- [8] Wren A M , Small C J , Ward H L , et al . The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion . *Endocrinology* , 2000 **141** (11) : 4325 ~ 4328 .
- [9] Salehi A , Dornonville D L , Cour C , et al . Effects of ghrelin on insulin and glucagons secretion : a study of isolated pancreatic islets and intact mice . *Regul Pept* 2004 **118** : 143 ~ 150 .
- [10] Ghigo E , Arvat E , Giordano R , et al . Biologic activities of growth hormone secretagogues in humans . *Endocrine* 2001 **14** (1) : 87 ~ 93 .
- [11] Fífková E , Marsala J . Stereotaxic atlases for the cat , rabbit and rat . In : Bures J , Petran M , Zachar J eds . *Electrophysiological Methods in Biological Research* . New York : Czechoslovak Academy of Sciences , Prague and Academic Press , 1967 , 653 ~ 731 .
- [12] Alvin L B , Edward G J . *The Thalamus and Basal Telencephalon of the Cat - A Cytoarchitectonic Atlas with Stereotaxic Coordinates* . Wisconsin : The University of Wisconsin Press , 1968 .
- [13] Sakata I , Nakamura K , Yamazaki M , et al . Ghrelin-producing cells exist as two types of cells (closed- and opened-type cells) in the rat gastrointestinal tract . *Peptides* 2002 **23** (3) : 531 ~ 536 .
- [14] Hou Z , Miao Y , Gao L , et al . Ghrelin - containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the DVC of brainstem in rat . *Regul Pept* 2006 **134** (2 ~ 3) : 126 ~ 131 .
- [15] Cowley M A , Smith R G , Diiano S , et al . The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis .

Neuron 2003 **37**(4):649~661.

[16] Miller D W, Harrison J L, Brown Y A, *et al.* Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005 (3):60.

[17] 杨连玉,杨文艳,冀凤杰等.猪 ghrelin 的基因克隆及其组织中 mRNA 的分布研究.吉林农业大学学报,2004 **26**

(1):86~88.

[18] Huang Z G, Xiong L, Liu Z S, *et al.* The tissue distribution and developmental changes of ghrelin mRNA expression in sheep. *Acta Genetica Sinica* 2006 **33**(9):808~813.

[19] Kangawa K, Murakami N. Ghrelin in domestic animals distribution in stomach and its possible role. *Domest Anim Endocrinol* 2001 **21**:17~24.

图 版 说 明

青紫蓝兔体内 Ghrelin 免疫阳性细胞的分布

1. 弓状核 Ghrelin 免疫阳性神经元;2. 腹内侧核 Ghrelin 免疫阳性神经元;3. 室旁核 Ghrelin 免疫阳性神经元;4. 背内侧核 Ghrelin 免疫阳性神经元;5. 下丘脑外侧区 Ghrelin 免疫阳性神经元;6. 大脑皮质 Ghrelin 免疫阳性神经元;7. 延髓迷走神经背核 Ghrelin 免疫阳性神经元;8. 脊髓腹侧角 Ghrelin 免疫阳性神经元;9. 胃内 Ghrelin 免疫阳性细胞;10. 十二指肠 Ghrelin 免疫阳性细胞;11. “开放型”细胞;12. “闭合型”细胞;13. 对照实验,未见有 Ghrelin 免疫阳性细胞;3v.第三脑室。

图 10 的放大倍数为 $\times 40$,图 11 和 12 为 $\times 600$,其余均为 $\times 100$ 。

Explanation of Plate

Distribution of the ghrelin-containing cells in Chinchilla rabbit

1. Ghrelin immunoreactive neurons in the arcuate nucleus;2. Ghrelin immunoreactive neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus;3. Ghrelin immunoreactive neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus;4. Ghrelin immunoreactive neurons in the dorsomedial hypothalamic nucleus;5. Ghrelin immunoreactive neurons in the lateral hypothalamic area;6. Ghrelin immunoreactive neurons in the cerebral cortex;7. Ghrelin immunoreactive neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in the medulla oblongata;8. Ghrelin immunoreactive neurons in the ventral horn of the spinal cord;9. Ghrelin-containing cells in the stomach;10. Ghrelin-containing cells in the duodenum;11. open-type cell;12. closed-type cell;13. no Ghrelin immunoreactive cells in control experiment;3v. the third ventricle.

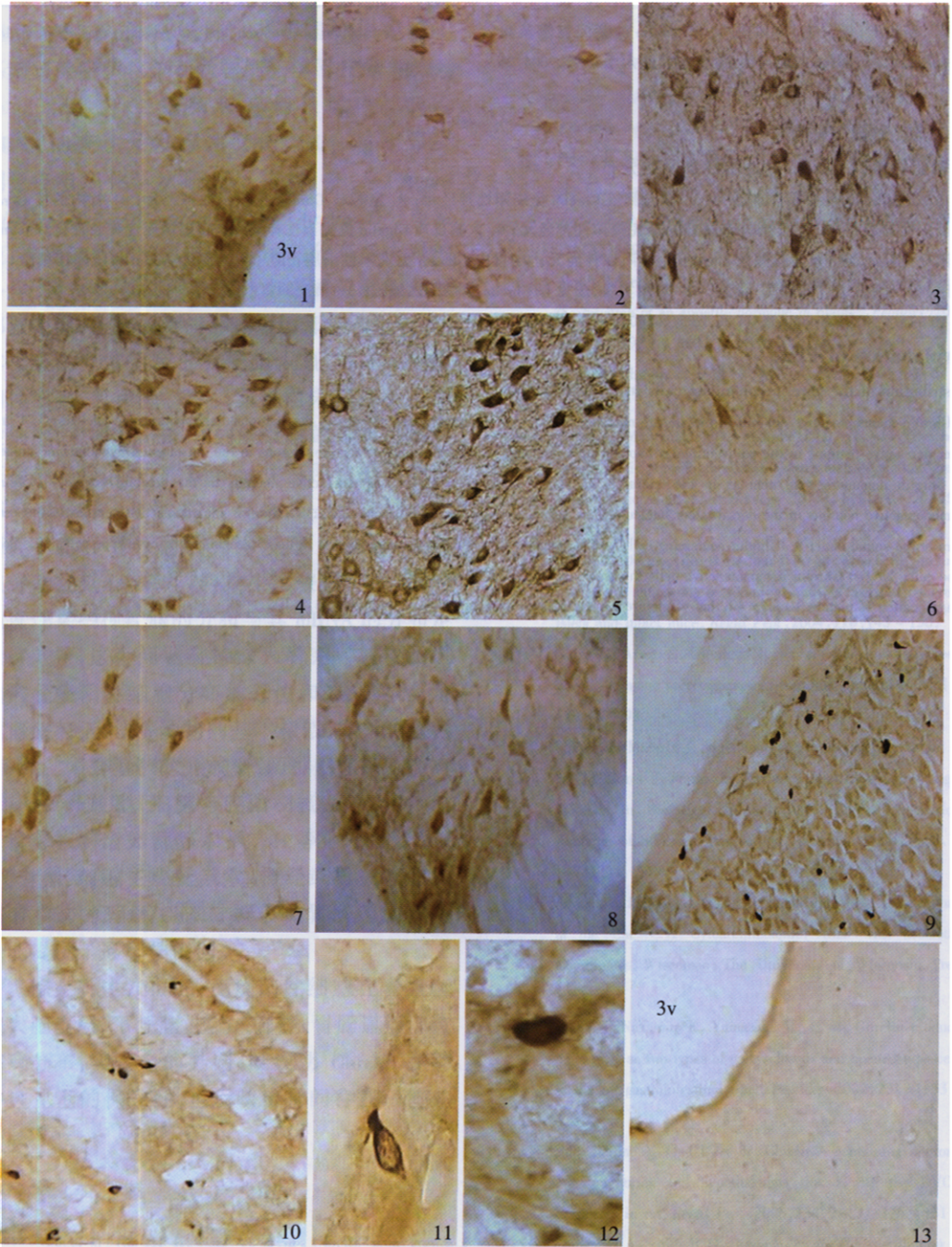
Magnification of picture 10 is $\times 40$, that of picture 11 and 12 is $\times 600$ and that of the others is $\times 100$.

贾翠平等:青紫蓝兔体内 Ghrelin 的免疫组化定位

图版 I

JIA Cui-Ping *et al.*: Immunohistochemical Localization of Ghrelin-containing Cells
in Chinchilla Rabbit

Plate I



图版说明见文后