

Bax、TGF- β 和 Ghrelin 在饥饿后长耳鸮胃及小肠中的免疫组织化学

王悦 俞诗源* 高先军 郭婷婷

(西北师范大学生命科学院 兰州 730070)

摘要: 应用免疫组织化学方法检测了 Bax 蛋白、TGF- β (TGF- β_2 、TGF- β_3) 和 Ghrelin 在饥饿后长耳鸮 (*Asio otus*) 胃及小肠中的表达,利用体视学方法对其表达强度进行半定量分析。结果表明,胃及小肠呈 Bax、TGF- β_2 、TGF- β_3 和 Ghrelin 免疫反应阳性。Bax 免疫反应阳性物质主要分布在胃黏膜、肠黏膜、肠腺的单层柱状上皮细胞,腺胃深腺单层立方上皮细胞及胃黏膜固有层;TGF- β_2 、TGF- β_3 免疫反应阳性物质主要分布在胃黏膜、肠黏膜及肠腺的单层柱状上皮细胞,腺胃深腺单层立方上皮细胞及肠黏膜固有层;Ghrelin 免疫反应阳性细胞分布在腺胃深腺,十二指肠、空肠、回肠的黏膜、肠腺的单层柱状上皮细胞及黏膜固有层。Bax 蛋白阳性表达部位的面密度值在腺胃有最大值,从腺胃到十二指肠面密度值下降,十二指肠到回肠逐渐上升;TGF- β_2 和 TGF- β_3 阳性表达部位的面密度值在十二指肠达到峰值,TGF- β_2 从十二指肠到回肠阳性表达部位的面密度值呈递减趋势,TGF- β_3 从腺胃到十二指肠面密度值逐渐增大,之后下降,到回肠回升;Ghrelin 阳性表达部位的面密度值从腺胃到回肠逐渐减小。Bax、TGF- β_2 、TGF- β_3 及 Ghrelin 在饥饿后长耳鸮胃和小肠各段均有不同程度的表达,它们可能参与长耳鸮胃肠功能的调节。

关键词: 长耳鸮;胃;小肠;Bax;转化生长因子 β ;生长素;免疫组织化学

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2010)03-127-06

Immunohistochemistry of Bax ,TGF- β and Ghrelin in the Stomach and Small Intestine of *Asio otus* after Starvation

WANG Yue YU Shi-Yuan* GAO Xian-Jun GUO Ting-Ting

(College of Life Science ,Northwest Normal University ,Lanzhou 730070 ,China)

Abstract: The expression of Bax ,TGF- β_2 ,TGF- β_3 and Ghrelin in the stomach and small intestine of *Asio otus* after starvation was investigated by immunohistochemical staining ,and their expression intensity was analyzed semiquantitatively by a stereological method. The stomach and small intestine showed immunoreactivity of Bax , TGF- β_2 ,TGF- β_3 and Ghrelin. Bax immunopositive cells were mainly distributed in the single-layered columnar epithelial cells of stomach mucosa ,intestinal mucosa ,intestinal glands and the single-layered cuboidal epithelial cells in deep glands of the glandular stomach. TGF- β_2 and TGF- β_3 immunopositive cells were mainly localized in the single-layered columnar epithelial cells of the mucosa of the glandular stomach ,simple tubular glands of muscular stomach ,intestinal mucosa ,intestinal glands as well as the single-layered cuboidal epithelial cells in deep glands of the glandular stomach and lamina propria in small intestine. Ghrelin immunopositive cells were

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30370163) ,甘肃省创新人才基金项目 (ZS006-016) ;

* 通讯作者 ,E-mail:syyu006@nwnu.edu.cn ;

第一作者介绍 王悦,女,硕士研究生;研究方向:动物分子形态学;E-mail:gssdwangyue@126.com。

收稿日期:2009-11-19,修回日期:2010-02-23

mainly distributed in the single-layered columnar epithelial cells of the intestinal mucosa ,intestinal glands as well as the single-layered cuboidal epithelial cells in deep glands of the glandular stomach and lamina propria of small intestine mucosa. The expression of Bax showed the maximum in the glandular stomach ,decreased progressively from glandular stomach to duodenum ,and then increased from duodenum to ileum. The expression of TGF- β_2 and TGF- β_3 showed the maximum in the duodenum. The expression of TGF- β_2 decreased progressively from duodenum to ileum ,while the expression of TGF- β_3 increased from glandular stomach to duodenum ,decreased progressively after duodenum ,and then increased in ileum. Ghrelin immunopositive cell density gradually decreased from the glandular stomach to the ileum. Bax ,TGF- β_2 ,TGF- β_3 and Ghrelin may participate functional regulation of stomach and small intestine.

Key words: *Asio otus*; Stomach; Small Intestine; Bax; TGF- β ; Ghrelin; Immunohistochemistry

长耳鸮 (*Asio otus*) 属于鸮形目鸮科动物,主要以鼠类为食,对于控制鼠害有积极作用,现为国家重点保护动物。观察 Bax 蛋白 (Bcl-2 associated X protein ,Bax)、转化生长因子 β (β_2 , β_3) (transforming growth factor β ,TGF- β_2 ,TGF- β_3) 和生长素 (Ghrelin) 在长耳鸮胃及小肠的表达对于此种动物的研究和保护有重要意义。牛红星等^[1]观察了长耳鸮消化系统的形态组织结构,马生祥等^[2]研究了长耳鸮的冬季生态,鲍伟东等^[3]分析研究了长耳鸮的食性,但有关长耳鸮胃肠道内相关活性物质表达的研究尚未见报道。有研究表明,Bax、TGF- β 和 Ghrelin 参与胃肠上皮细胞的增殖、分化、凋亡及胃肠黏膜的损伤修复等。Bax 蛋白具有促凋亡作用^[4],TGF- β 参与调节细胞的增殖、分化和组织的损伤修复^[5],Ghrelin 参与调节细胞的增殖、凋亡^[6-8]。Bax、TGF- β 和 Ghrelin 在长耳鸮胃肠道内是否表达,是否参与鸟类胃肠的功能调节等还需进一步研究。笔者运用免疫组织化学方法检测了 Bax、TGF- β 和 Ghrelin 在饥饿后长耳鸮胃及小肠中的表达,旨在为动物学研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物 由兰州市森林公安局提供的伤残长耳鸮(禁食约 120 h 以上)8 羽,经救援无效死亡,解剖未发现病理变化,按常规解剖方法打开体腔,迅速取出腺胃、肌胃、十二指肠、空肠和回肠,用生理盐水洗去食糜,用 10% 福尔马林液固定作为实验材料。

1.2 免疫组织化学(SP 法) 将上述福尔马林液固定的组织块按常规方法石蜡定向包埋、连续切片(厚 7 μm) ,腺胃、肌胃、十二指肠、空肠、回肠各段各选 3 个蜡带,每个蜡带贴一张切片。石蜡切片脱蜡至水,微波抗原修复 10 min,加 3% H_2O_2 孵育(10 min)消除内源性过氧化物酶活性,正常山羊血清室温孵育以封闭非特异性反应位点;一抗用兔抗 Bax 蛋白、兔抗转化生长因子 β_2 、 β_3 (工作浓度为 1 : 200,北京中杉金桥生物技术有限公司产品)、兔抗生长素 (Ghrelin) (工作浓度为 1 : 50,北京博奥森生物技术有限公司产品),置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜;入生物素标记的二抗(羊抗兔 IgG)室温孵育 30 min;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液室温孵育 30 min;空白对照以 PBS 代替一抗,DAB 显色,苏木精轻度复染,常规脱水、透明、封片。

1.3 体视学测量 随机选取胃及小肠 Bax、TGF- β_2 、TGF- β_3 和 Ghrelin 免疫组织化学各段照片各 10 张($\times 400$) ,采用方格测试系统交点计数法分别测算长耳鸮胃及小肠 Bax、TGF- β_2 、TGF- β_3 和 Ghrelin 免疫阳性细胞的面密度值,公式为: $S_v = 2Ix/Lc$ ($Lc = \sum Pc \cdot a$) ,式中 Ix 为阳性细胞与测试方格的交点数, Pc 为测试系统落在参照系的点数, a 为方格两点间的距离^[9]。

1.4 统计学分析 统计分析过程以 SPSS 13.0 软件完成,数据以 Mean \pm SD 表示,采用单因素方差分析,并用 t -检验对胃和小肠各段的面密度进行两两比较, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结 果

免疫组织化学结果显示,阳性表达部位被染成棕色或棕黑色。

2.1 Bax 在长耳鸮胃和小肠中的表达 长耳鸮胃和小肠呈 Bax 免疫反应阳性,胃内阳性物质主要分布于胃黏膜单层柱状上皮细胞、腺胃深腺单层立方上皮细胞的胞膜、胞质及固有层平滑肌纤维,小肠内阳性物质分布于黏膜和肠腺的单层柱状上皮细胞胞膜及胞质内(图版 I:1~6)。

2.2 TGF- β_2 、TGF- β_3 在长耳鸮胃和小肠中的表达 长耳鸮胃和小肠呈 TGF- β_2 免疫反应阳性,腺胃内阳性物质主要集中于深腺单层立方上皮细胞及黏膜单层柱状上皮细胞胞质内,肌胃内阳性物质主要集中于黏膜单层柱状上皮细胞及固有层单管腺单层柱状上皮细胞胞质内;小肠内阳性物质主要集中于黏膜、肠腺的单层柱状细胞胞质及黏膜固有层内(图版 I:7~10)。

TGF- β_3 在长耳鸮胃肠道的免疫反应表达部位与 TGF- β_2 基本相同(图版 I:11~15)。

2.3 Ghrelin 在长耳鸮胃和小肠的表达 长耳鸮肌胃呈 Ghrelin 免疫反应阴性,腺胃、十二指肠、空肠和回肠呈 Ghrelin 免疫反应阳性。腺胃内阳性细胞主要定位于胃腺单层立方上皮细胞,腺胃阳性细胞的分布数量远大于小肠;小肠内阳性细胞主要分布于黏膜、肠腺的单层柱状上皮细胞和固有层,其中在肠腺上皮和固有层的分布量较多,阳性物质集中于细胞质(图版 I:16~20)。

2.4 Bax、TGF- β_2 、TGF- β_3 、Ghrelin 表达的面密度值 Bax 阳性表达部位的面密度值在腺胃有最大值,从腺胃到十二指肠呈递减趋势,十二指肠到回肠面密度值逐渐上升。腺胃与肌胃有显著性差异($P < 0.05$),其他各段在各自表达部位的面密度值没有显著性差异($P > 0.05$)。TGF- β_2 在腺胃和肌胃的阳性表达面密度值基本一致,在十二指肠达到最大值,之后面密度值逐渐下降,肌胃与十二指肠有极显著性差异(P

< 0.01),其他各段在各自的表达部位的面密度值没有显著性差异($P > 0.05$)。TGF- β_3 从腺胃到十二指肠阳性表达部位的面密度值呈递增趋势,在十二指肠达到最大值后开始下降,到回肠回升。腺胃与肌胃有显著性差异($P < 0.05$),其他各段在各自表达部位的面密度值没有显著性差异($P > 0.05$)。Ghrelin 从腺胃到回肠阳性表达部位的面密度值呈递减趋势,胃肠道各段在各自表达部位的面密度值没有显著性差异($P > 0.05$)(图 1)。

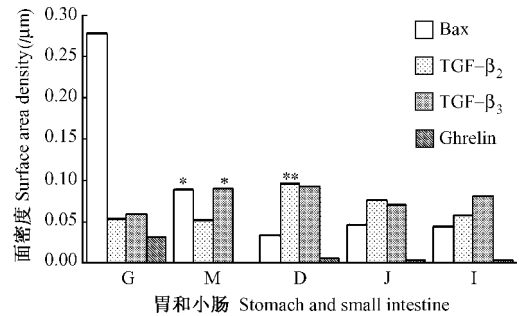


图 1 Bax、TGF- β_2 、TGF- β_3 、

Ghrelin 免疫阳性细胞分布的面密度

Fig. 1 Surface area density of Bax, TGF- β_2 , TGF- β_3 , Ghrelin immunopositive cells

G:腺胃; M:肌胃; D:十二指肠; J:空肠;

I:回肠; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

G:Glandular stomach; M:Muscular stomach;

D:Duodenum; J:Jejunum; I:Ileum; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨 论

细胞凋亡是机体为保持自身组织稳定,调控自身细胞增殖与死亡之间的平衡,由基因控制的细胞主动性死亡过程,一些病理性因素也可诱导细胞凋亡。正常情况下,凋亡是许多组织包括消化道细胞更新循环的必经过程,细胞在凋亡丢失率与增殖产生率相平衡时,组织的完整性才得以维持^[10]。Bax 是 bcl-2 家族中的一员,由 192 个氨基酸组成,相对分子质量 21 ku,可与抗凋亡蛋白 bcl-2 形成异源二聚体,抑制 bcl-2,发挥促细胞凋亡作用^[4],Bax 过表达可促进细胞凋亡^[4]。正常肠上皮细胞存在自发性凋亡,以清除突变细胞从而保证干细胞的

完整性^[11]。本实验观察发现, Bax 蛋白在长耳鸮胃和小肠内均有表达, 提示 Bax 参与长耳鸮胃和小肠细胞的凋亡, 可能是禁食对胃肠黏膜的损伤使得细胞得不到充分的营养供给, 发生了凋亡, 以此来维持黏膜的正常结构, Bax 在胃部的阳性表达面密度值明显大于小肠, 说明禁食对胃的损伤比小肠严重。

TGF- β 是一组结构相关、功能相似的多功能活性调节多肽, 广泛存在于细胞内。TGF- β 有 5 个亚型, 即 TGF- β 1 ~ 5, 哺乳动物中表达 3 种, 即 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3^[12]。TGF- β 对多种组织和细胞的生长分化具有调控作用, 调节肠上皮细胞的增殖、移行、分化、细胞外基质的形成及组织的损伤修复^[5, 12]。TGF- β 既可以刺激某些细胞增生, 又可以抑制另一些细胞增生; 甚至在不同实验条件下可以对同一种类型的细胞产生不同的作用^[12]。本实验观察到, 长耳鸮胃及小肠内均有 TGF- β 2 和 TGF- β 3, 免疫反应阳性物质分布, 且 TGF- β 2 和 TGF- β 3 在长耳鸮胃及小肠各段的表达强弱有差异, 表明二者所起的调控作用有差异。

Ghrelin 由 28 个氨基酸残基组成, 主要由胃和下丘脑弓状核神经元释放, 通过旁分泌、自分泌和内分泌作用, 联系胃肠道和中枢, 调节消化系统功能^[13]。Ghrelin 对胃黏膜上皮细胞的代谢、生长和分化有直接调节作用, 对胃肠黏膜有中枢性和外周性的保护作用^[13]。长耳鸮腺胃和小肠各段均有 Ghrelin 阳性细胞分布, Ghrelin 可能参与胃肠功能的调节。有研究表明, 适度的禁食并不显著影响 Ghrelin 的分泌, 对大鼠禁食 18 h Ghrelin 的分泌不受影响, 但禁食 48 h 后 Ghrelin 增加, 禽类则正好相反^[14]。长耳鸮肌胃内未发现 Ghrelin 免疫阳性细胞分布, 可能是因为禁食使长耳鸮肌胃内 Ghrelin 的分泌量减少。

胃肠功能的调节有赖于多种活性物质的协同作用, 本实验中饥饿后长耳鸮胃及小肠各段 Bax、TGF- β 和 Ghrelin 均有不同程度的表达, 表

明 Bax、TGF- β 和 Ghrelin 参与胃肠功能的调节, 与其他因子协同调控维持机体的生理平衡。

参 考 文 献

- [1] 牛红星, 余燕, 王艳梅, 等. 长耳鸮 *Asio otus* 消化系统形态组织学观察. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2005, 33(4): 114 - 117.
- [2] 马生祥, 萧文. 长耳鸮冬季生态的观察. 四川动物, 1995, 15(2): 78 - 79.
- [3] 鲍伟东, 孙来胜, 李晓京, 等. 北京市越冬长耳鸮食物中鼠类成分调查. 中国媒介生物学及控制杂志, 2007, 18(3): 184 - 186.
- [4] 车晓芳, 罗颖, 刘云鹏. Bcl-2 和 Bax 调节细胞凋亡的研究. 国外医学: 输血与血液学分册, 2001, 24(2): 103 - 105.
- [5] 丁桂荣, 郭鹤. 转化生长因子 β 对肠上皮的生长调节. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 1997, 17(1): 16 - 19.
- [6] 火焱, 杨银凤. 脑肠肽 ghrelin 的研究进展. 中国兽医科学, 2006, 36(3): 252 - 256.
- [7] Park J M, Kakimoto T, Kuroki T, et al. Suppression of intestinal mucosal apoptosis by ghrelin in fasting rats. *Experimental Biology and Medicine*, 2008, 233(1): 48 - 56.
- [8] 姒健敏. 关注生长因子对胃黏膜的保护作用. 中华医学杂志, 2005, 85(39): 4472 - 5472.
- [9] 陈玉琴, 俞诗源, 张虎林, 等. 红腹锦鸡肾的组织结构及 EGFR, TGF- β , AQP-2 在肾中的表达. 动物学报, 2008, 54(2): 323 - 331.
- [10] 刘磊, 林洁. 胃黏膜愈合和细胞凋亡概述. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(14): 2267 - 2268.
- [11] Oltval Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993, 74(4): 609 - 619.
- [12] 刘纯杰, 张兆山. 转化生长因子 β 的生物学特性、功能及其临床应用前景. 生物技术通讯, 2001, 12(4): 792 - 992.
- [13] 王娜, 吴立玲. Ghrelin 对消化系统功能的调节. 生理科学进展, 2007, 38(3): 242 - 244.
- [14] Moesgaard S G, Ahren B, Carr R D, et al. Effects of high-fat feeding and fasting on ghrelin expression in the mouse stomach. *Regulatory Peptides*, 2004, 120(1/3): 261 - 267.

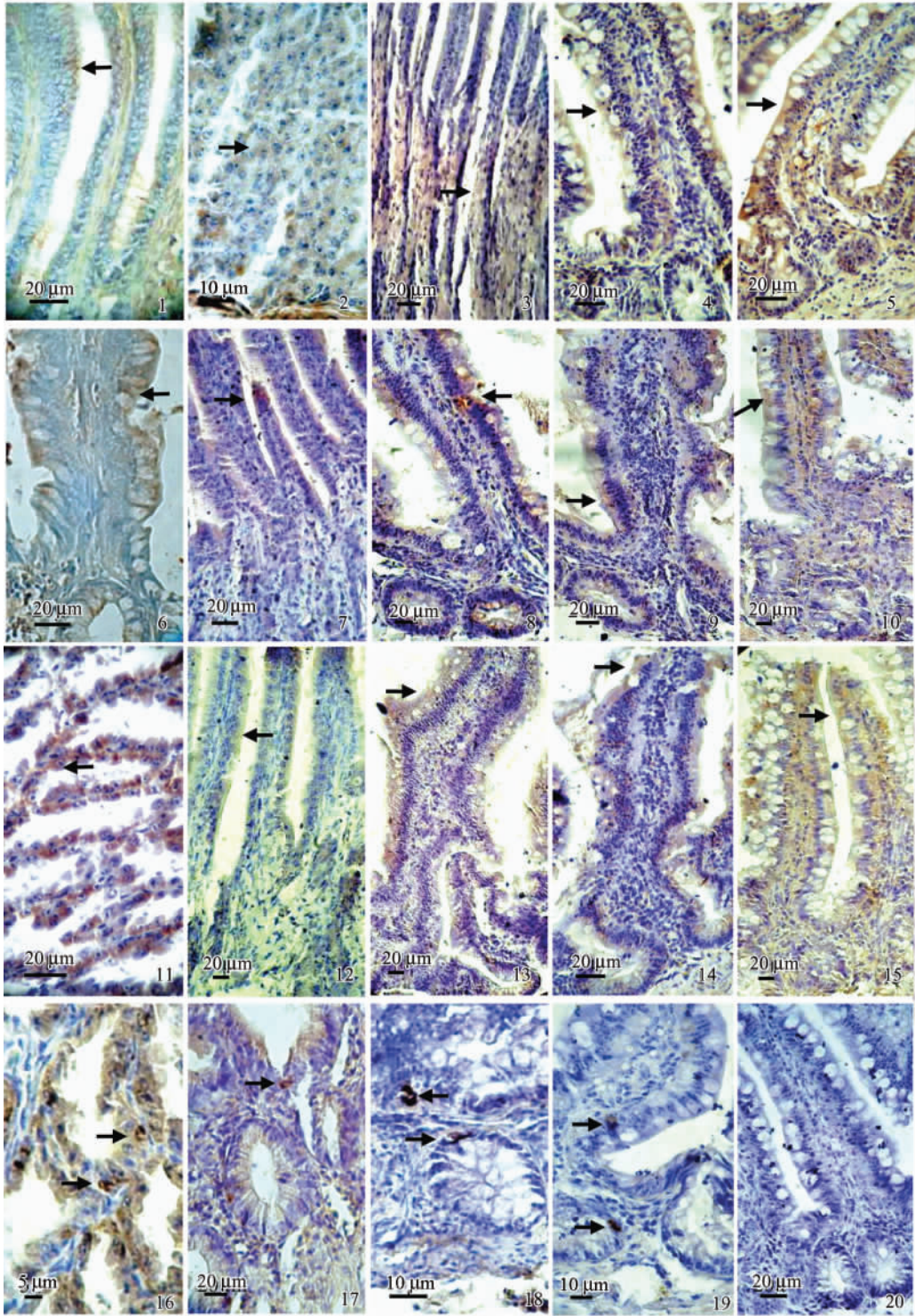
图 版 说 明

1. Bax 在长耳鸮腺胃的表达, 标尺 = 20 μm ; 2. Bax 在长耳鸮腺胃的表达, 标尺 = 10 μm ; 3. Bax 在长耳鸮肌胃的表达, 标尺 = 20 μm ; 4. Bax 在长耳鸮十二指肠的表达, 标尺 = 20 μm ; 5. Bax 在长耳鸮空肠的表达, 标尺 = 20 μm ; 6. Bax 在长耳鸮回肠的表达, 标尺 = 20 μm ; 7. TGF- β_2 在长耳鸮肌胃的表达, 标尺 = 20 μm ; 8. TGF- β_2 在长耳鸮十二指肠的表达, 标尺 = 20 μm ; 9. TGF- β_2 在长耳鸮空肠的表达, 标尺 = 20 μm ; 10. TGF- β_2 在长耳鸮回肠的表达, 标尺 = 20 μm ; 11. TGF- β_3 在长耳鸮腺胃的表达, 标尺 = 20 μm ; 12. TGF- β_3 在长耳鸮肌胃的表达, 标尺 = 20 μm ; 13. TGF- β_3 在长耳鸮十二指肠的表达, 标尺 = 20 μm ; 14. TGF- β_3 在长耳鸮空肠的表达, 标尺 = 20 μm ; 15. TGF- β_3 在长耳鸮回肠的表达, 标尺 = 20 μm ; 16. Ghrelin 在长耳鸮腺胃的表达, 标尺 = 5 μm ; 17. Ghrelin 在长耳鸮十二指肠的表达, 标尺 = 20 μm ; 18. Ghrelin 在长耳鸮空肠的表达, 标尺 = 10 μm ; 19. Ghrelin 在长耳鸮回肠的表达, 标尺 = 10 μm ; 20. Ghrelin 阴性对照, 标尺 = 20 μm 。→: 阳性细胞。

Explanation of Plate

1. Arrow showing expression of Bax in glandular stomach of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 2. Arrow showing expression of Bax in glandular stomach of *Asio otus*, Bar = 10 μm ; 3. Arrow showing expression of Bax in muscular stomach of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 4. Arrow showing expression of Bax in duodenum of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 5. Arrow showing expression of Bax in jejunum of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 6. Arrow showing expression of Bax in ileum of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 7. Arrow showing expression of TGF- β_2 in muscular stomach of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 8. Arrow showing expression of TGF- β_2 in duodenum of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 9. Arrow showing expression of TGF- β_2 in jejunum of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 10. Arrow showing expression of TGF- β_2 in ileum of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 11. Arrow showing expression of TGF- β_3 in glandular stomach of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 12. Arrow showing expression of TGF- β_3 in muscular stomach of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 13. Arrow showing expression of TGF- β_3 in duodenum rectum of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 14. Arrow showing expression of TGF- β_3 in jejunum of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 15. Arrow showing expression of TGF- β_3 in ileum of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 16. Arrow showing expression of Ghrelin in glandular stomach of *Asio otus*, Bar = 5 μm ; 17. Arrow showing expression of Ghrelin in duodenum of *Asio otus*, Bar = 20 μm ; 18. Arrow showing expression of Ghrelin in jejunum of *Asio otus*, Bar = 10 μm ; 19. Arrow showing expression of Ghrelin in ileum of *Asio otus*, Bar = 10 μm ; 20. Negative comparison of Ghrelin, Bar = 20 μm . →: Immunopositive cells.

王 悦等: Bax、TGF- β 和 Ghrelin 在饥饿后长耳鸮胃及小肠中的免疫组织化学 图版 I
WANG Yue *et al.*: Immunohistochemistry of Bax, TGF- β and Ghrelin in the Stomach
and Small Intestine of *Asio otus* after Starvation Plate I



图版说明见文后