

生长素及其 mRNA 在大鼠性腺中的分布

王 琳,方富贵,章孝荣,刘 亚,王索路,蒲 勇,李运生

(安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036)

【摘 要】 【目的】阐明生长素(Ghrelin)及其 mRNA 在大鼠卵巢和睾丸中的分布。【方法】取成年 SD 大鼠的睾丸和卵巢,制成石蜡切片,采用免疫组化和原位杂交方法,分别检测 Ghrelin 和 Ghrelin mRNA 在大鼠性腺组织中的定位。【结果】雄性大鼠睾丸间质细胞、支持细胞、初级精母细胞、次级精母细胞中均有 Ghrelin 分布,而精原细胞、精子细胞、肌样细胞中均无 Ghrelin 分布;Ghrelin mRNA 的分布规律与 Ghrelin 一致。在雌性大鼠卵巢中,Ghrelin 主要分布在黄体细胞、卵巢门间质细胞、卵母细胞上;Ghrelin mRNA 在黄体细胞、卵巢门间质细胞、原始卵泡、初级卵泡的颗粒层细胞、次级卵泡的卵泡膜层细胞和颗粒层细胞中均有分布。【结论】Ghrelin 及其 mRNA 在大鼠性腺中均有分布,可能对大鼠性腺的发育及其功能有一定的调控作用。

【关键词】 Ghrelin;Ghrelin mRNA;免疫组化;原位杂交;大鼠

【中图分类号】 S852.21;Q492

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)02-0052-05

Localization of Ghrelin and its mRNA in the rat gonads

WANG Lin,FANG Fu-gui,ZHANG Xiao-rong,LIU Ya,WANG Suo-lu,
PU Yong,LI Yun-sheng

(College of Animal Science and Technology,Anhui Agricultural University,Hefei,Anhui 230036,China)

Abstract: 【Objective】 The study was to investigate the distribution of ghrelin and mRNA in the ovary and testis of rat .【Method】 Adult SD rats testes and ovaries were taken to make paraffin sections. The localization and mRNA of ghrelin in gonadal tissues were detected by immunohistochemical PV-9000 2-step and *in situ* hybridization respectively. 【Result】 The Ghrelin peptide was selectively expressed in Leydig cells,Sertoli cells,primary spermatocyte,and secondary spermatocytes. Ghrelin mRNA and ghrelin showed the same distribution in testis. In ovary,ghrelin was mainly distributed in the luteal cells,hilus interstitial cells and oocyte; while Ghrelin mRNA was expressed in luteal cells,hilus interstitial cells,the granulosa cells of primordial follicle and primary follicle,the granulosa and the thecal cells of secondary follicle. 【Conclusion】 Ghrelin and Ghrelin mRNA were both present in rat gonads,which suggested that the ghrelin may play a role in development and function in rat gonads.

Key words: Ghrelin;Ghrelin mRNA;immunohistochemistry;*in situ* hybridization;rat

生长素(Ghrelin)是 1999 年日本科学家 Kojima 等^[1]从大鼠的胃中提纯并鉴定出的生长激素促分泌素受体特定的内源性配体,它由 28 个氨基酸残基组成,N 端第 3 位丝氨酸残基上有 N-辛酰基化基团。N-辛酰基化基团对维持 Ghrelin 的生物活性是必需

的,去该基团后,则生长素失去生物活性^[2]。Ghrelin 在大鼠等多种动物的中枢神经系统和外周组织器官中均有分布,包括下丘脑、垂体等^[3],它不仅能促进生长激素(Growth hormone, GH)分泌,而且在摄食、能量代谢、内分泌、记忆、睡眠以及血液动力

* [收稿日期] 2009-06-19

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目(070411015)

[作者简介] 王 琳(1972—),男,安徽枞阳人,在读博士,主要从事动物生殖内分泌研究。

[通信作者] 章孝荣(1954—),男,安徽枞阳人,教授,博士生导师,主要从事动物繁殖学研究。

学等方面也发挥着重要作用。越来越多的研究表明,Ghrelin可能参与了动物生殖功能的调节。Barreiro等^[4]研究表明,Ghrelin能明显抑制干细胞因子SCF编码基因mRNA的表达,而SCF是由Sertoli细胞产生,以旁分泌的方式刺激生殖细胞发育,对精原细胞、精母细胞和精子细胞的存活起着决定性作用^[5],说明Ghrelin可能调控着雄性生殖细胞的发育;Tena-sempere等^[6]发现,Ghrelin呈剂量依赖性地抑制由人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin,hCG)和环化腺核苷一磷酸(Cyclic adenosine monophosphate,cAMP)刺激的睾酮分泌;Isabella等^[7]报道,Ghrelin呈剂量依赖性地抑制粒层黄体细胞合成类固醇激素(雌二醇(Estrogen,E2))和孕酮(Progesterone,P4)。这些研究均表明,Ghrelin参与生殖功能的调节,而睾丸和卵巢可能是其作用的靶点之一。但目前关于Ghrelin及其mRNA在性腺中的分布仍存在争议。本研究以SD大鼠为试验动物,采用免疫组化和原位杂交相结合的方法,探讨了Ghrelin及其mRNA在大鼠性腺内的分布,以为进一步阐明Ghrelin对性腺的作用提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 成年SD大鼠(180~240 g)16只,雌雄各半,购自安徽医科大学实验动物中心,室温(22~25℃)下养殖,自由摄食与饮水。

1.1.2 试剂及仪器 Ghrelin抗体为兔抗鼠Ghrelin多克隆抗体,购自美国Sigma公司;PV-9000两步法免疫组化检测试剂盒、DAB显色试剂盒,均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;地高辛标记的Ghrelin寡核苷酸探针、原位杂交检测试剂盒,均购自武汉博士德。主要仪器有组织切片机(YD-158R轮转式切片机)、Nikon显微镜照相系统。

1.2 大鼠睾丸和卵巢组织切片的制备

将大鼠处死,取睾丸和卵巢组织,用质量分数4%的多聚甲醛固定24 h。弃去固定液,流水冲洗固定12 h,梯度酒精脱水,然后二甲苯透明、浸蜡、包埋。常规方法制备切片,免疫组化、原位杂交分别采用5和7 μm连续切片,切片粘贴在多聚赖氨酸处理的载玻片上。

1.3 大鼠睾丸和卵巢组织切片的免疫组化染色

(1)在40℃恒温箱内过夜干燥切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精处理,水化。(2)热修复抗原:将切片浸

入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中,微波炉加热至沸腾后断电,间隔5~10 min后,反复1~2次;冷却后用PBS(pH 7.2~7.6)洗涤1~2次。(3)用体积分数3% H₂O₂室温孵育10 min,以灭活内源性酶,PBS洗3次。(4)滴加Ghrelin抗体(1:200),4℃过夜。(5)按照PV-9000两步法免疫组化检测试剂盒说明书,滴加polymer helper(GBI,USA),37℃孵育20 min,PBS洗3次,每次2 min。(6)滴加Polyperoxidase-anti-mouse/rabbit IgG(GBI,USA),37℃孵育30 min,PBS洗4次,每次5 min。(7)DAB显色20 s,蒸馏水洗涤。(8)苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。对照组用PBS代替一抗,其余步骤同上。

1.4 Ghrelin mRNA 在大鼠性腺上的定位检测

地高辛标记的Ghrelin寡核苷酸探针序列如下:(1)5'-CACCAGAAAGCCCAGCAGAGAAAG-GAATCCAAGAA-3',

(2)5'-TGGCTCCACCCAGAGGACAGAG-GACAAGCAGAAGA-3',

(3)5'-CAGGATATCCTCTGGGAAGAGGT-CAAAGAGGCGCC-3'。

所有溶液用DEPC水配制,原位杂交程序均按试剂盒说明书进行。(1)杂交前处理。切片依次进行二甲苯脱蜡、梯度酒精处理、水化;用体积分数3% H₂O₂去离子水孵育10 min,蒸馏水洗3次;胃蛋白酶37℃或室温消化3~30 min,暴露mRNA核酸片段;用10 g/L多聚甲醛室温固定10 min,蒸馏水洗3次。(2)预杂交。杂交盒底部加体积分数20%甘油20 mL以保持湿度;每张切片加20 μL预杂交液,40℃恒温箱中作用3 h,吸去多余液体,不洗。(3)杂交。每张切片加20 μL杂交液,恒温箱中40℃杂交过夜(时间可根据杂交情况调节)。(4)杂交后处理。揭掉盖玻片,于37℃下用2×SSC、0.5×SSC、0.2×SSC各洗涤15 min;加封闭液,37℃作用30 min;甩去多余液体,不洗,滴加SABC,37℃作用20 min(或室温作用30 min),用原位杂交专用PBS洗3次,每次5 min,滴加生物素化过氧化物酶,37℃作用20 min(或室温作用30 min),PBS洗4次,每次5 min。DAB显色,苏木素复染,充分水洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 Ghrelin 在大鼠性腺中的定位

2.1.1 睾丸 结果显示,睾丸间质细胞(图1-

A)、支持细胞(图 1-B)及初级精母细胞、次级精母细胞(图 1-C)均呈阳性,精原细胞、精子细胞、肌样细胞(图 1-C)均呈阴性;对照组中细胞均呈阴性(图 1-D)。

2.1.2 卵 巢 结果显示,卵母细胞(图 1-E)、黄体细胞(图 1-F)、卵巢门间质细胞(图 1-G)均呈阳

性,初级卵泡的颗粒层细胞(图 1-H)及次级卵泡的颗粒层细胞和内膜层细胞(图 1-E)均呈弱阳性,而次级卵泡的外膜层细胞(图 1-E)、原始卵泡的颗粒层细胞(图 1-H)均呈阴性;对照组中细胞(图 1-I)均呈阴性。

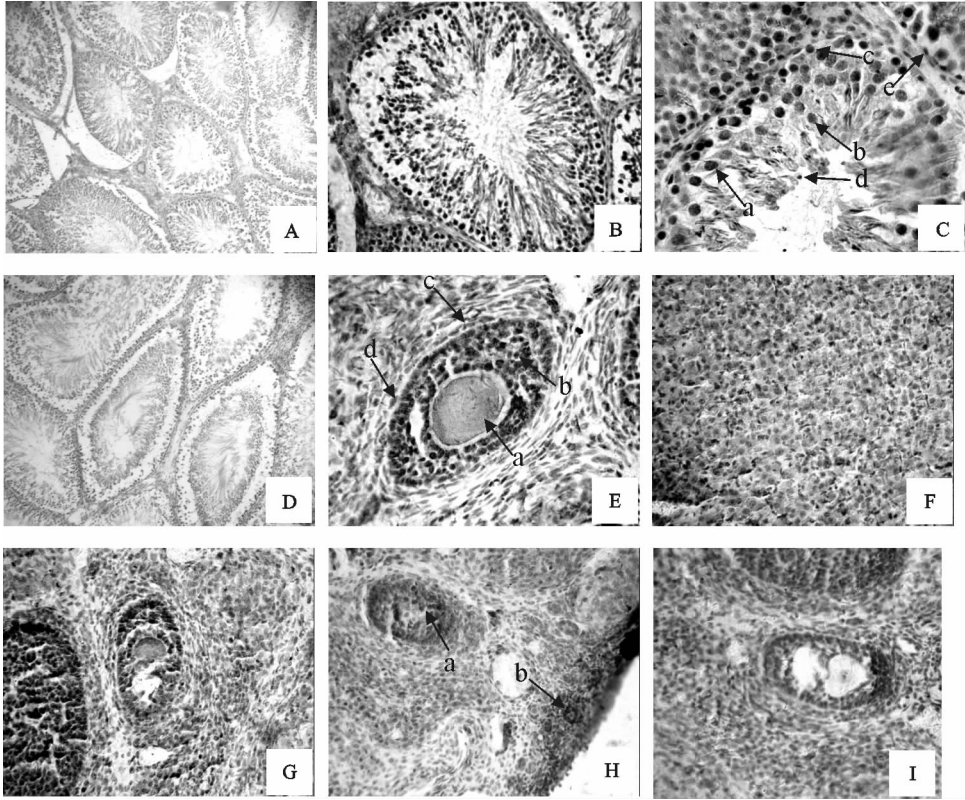


图 1 Ghrelin 阳性细胞在大鼠性腺中的分布

A. 睾丸间质细胞($\times 100$);B. 睾丸支持细胞($\times 250$);C. 睾丸($\times 400$), a. 初级精母细胞, b. 次级精母细胞, c. 精原细胞, d. 精子细胞, e. 肌样细胞;D. 阴性对照组睾丸间质细胞($\times 100$); E. 次级卵泡($\times 400$), a. 卵母细胞 b. 颗粒层细胞, c. 内膜层细胞, d. 外膜层细胞; F. 卵巢黄体细胞($\times 250$);G. 卵巢门间质细胞 ($\times 250$);H. 卵巢($\times 250$), a. 初级卵泡颗粒层细胞, b. 原始卵泡颗粒层细胞;I. 阴性对照组卵母细胞($\times 250$)

Fig. 1 Distribution of Ghrelin immunopositive cells in the gonads

A. Leydig cells($\times 100$);B. Sertoli cells($\times 250$);C. Testis, ($\times 400$), a. Primary spermatocytes, b. Secondary spermatocytes, c. Spermatogonium, d. Sperm cells, e. Muscle-like cells;D. Negative control group, Leydig cells ($\times 100$); E. The secondary follicles ($\times 400$), a. Oocyte, b. The granulosa cells, c. Endometrial cells, d. Foreign film cells; F. Luteal cells ($\times 250$);G. Hilus interstitial cells ($\times 250$);H. Ovary($\times 250$), a. The granulosa cells of the primary follicles b. The primordial follicle granulosa cells;I. Negative control group, Oocyte ($\times 250$)

2.2 Ghrelin mRNA 在大鼠性腺中的定位

2.2.1 睾 丸 结果显示,睾丸间质细胞(图 2-A)和睾丸支持细胞、初级精母细胞、次级精母细胞(图 2-B)均有 Ghrelin mRNA 分布;睾丸肌样细胞、精原细胞、精子细胞(图 2-B)中无 Ghrelin mRNA 分布;阴性对照组细胞(图 2-C)均呈阴性。

2.2.2 卵 巢 结果显示,卵母细胞(图 2-D)、卵巢黄体细胞(图 2-E)和卵巢门间质细胞(图 2-F)中均有 Ghrelin mRNA 分布,原始卵泡(图 2-F)、初级卵泡的颗粒层细胞(图 2-G)与次级卵泡的卵泡膜细胞和颗粒层细胞(图 2-H)中也有 Ghrelin mRNA 分布;阴性对照组细胞(图 2-I)均呈阴性。

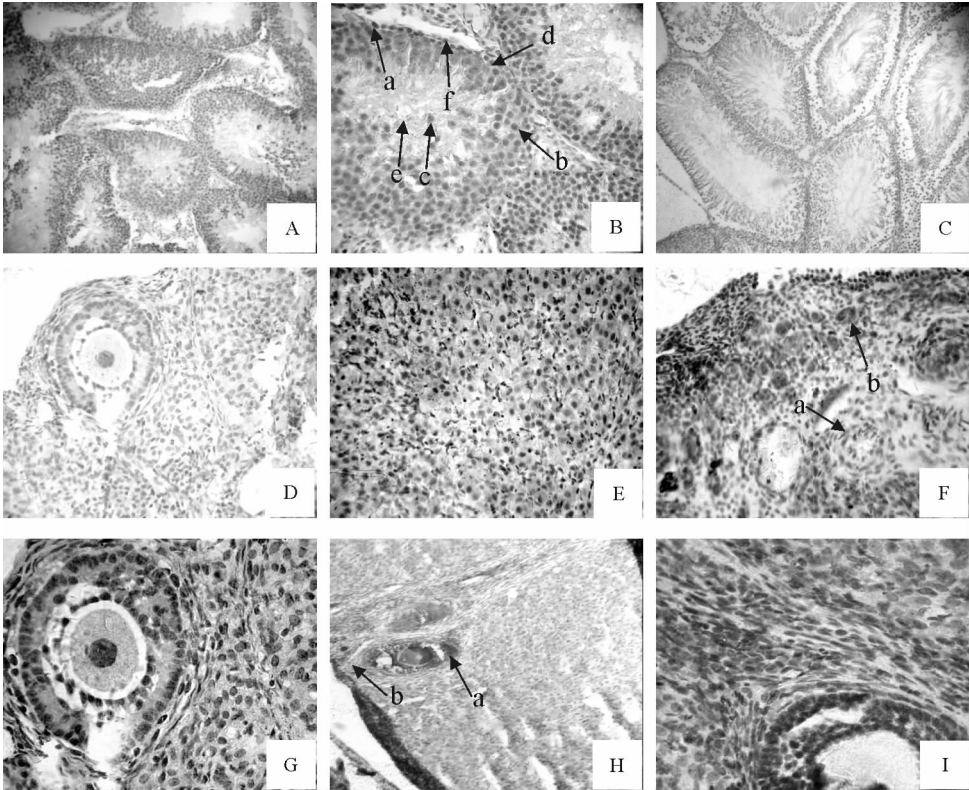


图 2 Ghrelin mRNA 阳性细胞在大鼠性腺中的分布

A. 睾丸间质细胞(×100);B. 睾丸(×250),a. 支持细胞,b. 初级精母细胞,c. 次级精母细胞,d. 精原细胞,e. 精子细胞,f. 肌样细胞;C. 阴性对照组睾丸间质细胞(×100);D. 卵母细胞(×250);E. 卵巢黄体细胞(×250);F. 卵巢(×250),a. 卵巢门间质细胞,b. 原始卵泡;G. 初级卵泡的颗粒层细胞(×400);H. 次级卵泡(×250),a. 颗粒层细胞,b. 卵泡膜细胞;I. 阴性对照组卵母细胞(×400)

Fig. 2 Distribution of Ghrelin mRNA positive cells in the gonads

A. Leydig cells(×100);B. Testis(×250),a. Sertoli cells,b. Primary spermatocytes,c. Secondary spermatocytes,d. Spermatogonium,e. Sperm cells,f. Muscle-like cells;C. Negative control group,Leydig cells(×100);D. Oocytes (×250);E. Luteal cells (×250);F. Ovary(×250),a. Hilus interstitial cells,b. Primordial follicle;G. Primary follicle granulosa cells,(×400);H. The secondary follicles (×250),a. Granulosa cells,b. thecal cells;I. Negative control group,Oocytes(×400)

3 讨论

Tena-Sempere 等^[6]和 Barreiro 等^[8]研究了 Ghrelin 在 Wistar 大鼠睾丸上的分布,发现 Ghrelin 仅仅分布在睾丸间质细胞。Ishikawa 等^[9]和 Gaytan 等^[10]发现,Ghrelin 不仅在人睾丸间质细胞中有分布,而且在曲精细管也有分布,但在精子细胞中没有分布。Miller 等^[11]发现,Ghrelin 在绵羊的睾丸间质细胞、曲精细管、精子细胞中均有分布。上述研究结果说明,Ghrelin 在睾丸中的分布状况有物种差异性。本研究发现,Ghrelin 在 SD 大鼠睾丸间质细胞、支持细胞、初级精母细胞、次级精母细胞中均有分布,但在肌样细胞、精原细胞、精子细胞、精子中没有分布,这与 Tena-Sempere 等^[6]和 Barreiro 等^[8]认为 Ghrelin 专一性地在睾丸间质细胞中表达的结论存在差异,究其原因可能与大鼠的种类、年龄有关。

通过原位杂交试验检测 Ghrelin mRNA 在大鼠睾丸中的分布时发现,Ghrelin mRNA 也主要在睾丸支持细胞、睾丸间质细胞、初级精母细胞、次级精母细胞中分布,与 Ghrelin 的分布规律一致。Tena-Sempere 等^[6]研究了不同发育阶段 Wistar 大鼠中 Ghrelin mRNA 的变化规律,结果显示,Ghrelin mRNA 的表达在青春期前较低,到成年期达到最高值,呈阶段差异性表达。这可能是由于青春期以后,在垂体促性腺激素的作用下,精原细胞不断分化为各个阶段的生精细胞,未成熟的睾丸间质细胞不断成熟,导致 Ghrelin mRNA 的表达水平不断上升。

Caminos 等^[12]研究报道,Ghrelin 主要分布在大鼠黄体细胞中,在生长卵泡和排卵前卵泡上均无 Ghrelin 蛋白。目前,关于卵母细胞中是否存在 Ghrelin 蛋白仍有争议,卵母细胞中是否有 Ghrelin mRNA 表达尚未见报道。本试验通过免疫组化和

原位杂交方法研究了 Ghrelin 在大鼠卵巢中的分布,结果表明 Ghrelin 除了在黄体细胞(早期、成熟、退化)、卵巢门间质细胞中分布以外,在卵母细胞中也有分布,这与 Caminos 等^[12]、Gaytan 等^[13]、Zhang 等^[14]的报道并不一致,但与杜晨光等^[15]的结果有相似之处,究其原因可能与物种有关。Ghrelin 在卵母细胞上的分布,导致 Ghrelin 对卵母细胞的发育、成熟以及胚胎的发育可能产生一定的影响,目前关于 Ghrelin 对卵母细胞成熟影响的报道较少。Caminos 等^[11]报道,Ghrelin mRNA 在整个发情期大鼠的卵巢上均有表达,其中发情前期水平较低,接着逐步上升,在间情期第 1 天达最高,第 2 天又开始下降。猪卵巢中的 Ghrelin mRNA 在发情前期水平也最低,而在间情期第 2 天达到最高^[13],说明 Ghrelin 在卵巢中的表达与黄体的功能密切相关。本试验的原位杂交结果显示,Ghrelin mRNA 主要分布在黄体细胞(早期、成熟、退化)中,与上述研究结果一致;然而 Ghrelin mRNA 和 Ghrelin 在卵巢中的分布并不一致,这说明 Ghrelin 在卵巢发育过程中差异表达,可能对大鼠卵巢起一定的调控作用。

总之,大鼠的性腺中存在 Ghrelin 与 Ghrelin mRNA,且它们在大鼠精母细胞、卵母细胞中均有分布,这预示 Ghrelin 对性腺的发育以及生殖细胞的成熟可能有潜在的调控作用,至于 Ghrelin 对生殖轴的作用机理还有待于进一步研究和探讨。

[参考文献]

[1] Kojima M, Hosoda H, Nalazato M, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated from stomach [J]. Nature, 1999, 402(6762): 656-660.

[2] Broglio F, Arrat E, Benso A, et al. Endocrine activities of cortistatin 14 and its interaction with GHRH and ghrelin in humans [J]. Clin Endocrinol Metab, 2002, 87: 3783-3790.

[3] Gualillo O, Laqo F, Gomez-renio J, et al. Ghrelin, a widespread hormone insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action [J]. FEBS Letters, 2003, 552(2/3): 105-109.

[4] Barreiro M L, Gaytan F, Castellano J M, et al. Ghrelin inhibits

the proliferative activity of immature Leydig cells in vivo and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis [J]. Endocrinology, 2004, 145: 4825-4834.

[5] Hakovirta H, Yan W, Kaleva M, et al. Function of stem cell factor as a survival factor of spermatozoid and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium [J]. Endocrinology, 1999, 140: 1492-1498.

[6] Tena-Sempere M, Barreiro M L, Gonzalez L C, et al. Novel expression and functional role of Ghrelin in rat testis [J]. Endocrinology, 2002, 143: 717-725.

[7] Isabella V, Alessandra V, Francesco T, et al. Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells [J]. Endocrinology & Metabolism, 2008, 93(4): 1476-1481.

[8] Barreiro M L, Gaytan F, Caminos J E, et al. Cellular location and hormonal regulation of Ghrelin expression in rat testis [J]. Biol Reprod, 2002, 67: 1768-1776.

[9] Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, et al. Ghrelin in human testis and serum expression testosterone level [J]. Androl, 2007, 28: 320-324.

[10] Gaytan F, Barreiro M L, Caminos J E, et al. Expression of Ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors [J]. Clin Endocrinol Metab, 2004, 89: 400-409.

[11] 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 [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005, 31(3): 60.

[12] Caminos J E, Tena-Sempere M, Gaytan F, et al. Expression of Ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary [J]. Endocrinol, 2003, 144: 1594-1602.

[13] Gaytan F, Barreiro M L, Chopin L K, et al. Immunolocalization of Ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary [J]. Clin Endocrinol Metab, 2003, 88: 879-887.

[14] Zhang W, Lei Z, Su J, et al. Expression of Ghrelin in the porcine hypothalamo-pituitary-ovary axis during the estrous cycle [J]. Anim Reprod Sci 2008, 109(1/4): 356-67.

[15] 杜晨光, 曹贵方. 绵羊卵泡内 Ghrelin 的免疫组化定位 [J]. 华北农学报, 2008, 23(3): 151-153.

Du C G, Cao G F. An immunohistochemical study of the localization of Ghrelin in the ovine follicle [J]. Journal of North China Agricultural, 2008, 23(3): 151-153. (in Chinese)