

营养条件对大鼠胃及小肠内 Ghrelin 表达的影响

徐 立, 何 强, 吕颜枝, 赵慧英

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】探讨营养水平对胃肠道 Ghrelin 表达的影响。【方法】运用免疫组织化学 SP 法, 在高、低和标准 3 个不同营养条件下, 对健康成年雄性 SD 大鼠胃肠道内 Ghrelin 阳性细胞的分布和数量变化进行研究。【结果】Ghrelin 阳性细胞在大鼠胃及小肠内均有表达, 各营养组胃中 Ghrelin 阳性细胞数量均明显多于十二指肠、空肠和回肠, 且主要分布于胃底腺的体部和底部; 低营养条件下, Ghrelin 阳性细胞表达量较标准营养条件下多 ($P < 0.05$), 恢复到标准状态下后其表达量减少 ($P < 0.01$); 高营养条件下, Ghrelin 阳性细胞数量与标准组无明显差异, 当其恢复到标准营养条件下时, Ghrelin 阳性细胞表达量减少, 但单细胞着色面积增大, 颜色加深。【结论】营养条件可影响胃肠道内 Ghrelin 的分泌, 并可能通过胃肠道内 Ghrelin 的分泌间接调节胃肠功能。

【关键词】 营养状态; Ghrelin; 大鼠; 胃肠道; 免疫组织化学 SP 法

【中图分类号】 Q952

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)04-0059-05

Effects of nutritional conditions Ghrelin-immunopositive cells' expression in the gastrointestinal tract of rats

XU Li, HE Qiang, LÜ Yan-zhi, ZHAO Hui-ying

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to investigate the effects of nutritional conditions on the expression of Ghrelin-immunopositive (Ghrelin-ip) cells in the gastrointestinal tract of rats. 【Method】 Immunohistochemistry SP method was used to stain rats gastrointestinal tissue under different nutritional conditions. 【Result】 Ghrelin-ip cells were found to be located in the stomach, duodenum, jejunum and ileum. Ghrelin-ip cells density decreased from stomach to intestine. The dentist Ghrelin-ip cells were found in the rats' stomachs under low nutrition; however, the Ghrelin-ip cells were reduced when nutritional condition changed to normal level. In contrast, Ghrelin-ip cells grew with the time in the control group. 【Conclusion】 Nutrients can determine the number of Ghrelin-ip cells to adjust the secretion of Ghrelin.

Key words: nutritional condition; Ghrelin; rat; gastrointestinal tract of rats; immunohistochemistry SP method

Ghrelin 是由 Kojima 等^[1]最早发现于大鼠胃底腺区的生长激素促分泌激素受体 (GHS-R) 的内源性配基。Ghrelin 主要有非辛酰基化和 3 位丝氨酸辛酰基化 2 种形式, 其中后者是 GHS-R 的主要活性形式。Ghrelin 在哺乳动物胎儿期的胃中即有表达, 并且随着胃的发育而增加^[2]。在哺乳动物甲状

腺、胰腺、肾脏、下丘脑垂体和性腺中也发现了 Ghrelin 阳性细胞^[3], 此外其也广泛存在于鸟类和鱼类组织中。Ghrelin 主要由胃底部泌酸腺 X/A 样细胞分泌进入血液循环^[4-6], 并通过下丘脑-垂体轴调节生长激素的合成与释放; 除此之外, 其还有增强胃肠动力、保护胃黏膜、促进胃酸分泌和抑制炎症因子释

* [收稿日期] 2009-10-27

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目 (SJ08C105)

[作者简介] 徐 立 (1984—), 男, 山东台儿庄人, 在读硕士, 主要从事神经生物学研究。

[通信作者] 赵慧英 (1966—), 女, 陕西韩城人, 教授, 硕士生导师, 主要从事动物神经生物学研究。E-mail: ylzhaoxy@yahoo. com. cn

放的功能^[7]。此前的研究结果已经表明,外源注射 Ghrelin 可刺激动物的食欲,但却不能增加动物的取食量^[8]。糖类、脂肪和蛋白类等大量营养元素会影响动物的 Ghrelin 分泌,动物摄取的能量对 Ghrelin 的分泌有抑制作用,即摄入的能量越多,Ghrelin 的分泌量就越少^[9-10],但目前尚不清楚营养条件的变化是否会对动物胃肠道内的 Ghrelin 表达产生影响。为此,本试验对不同营养条件下大鼠胃和小肠内 Ghrelin 阳性物质的表达情况进行研究,以期揭示 Ghrelin 对胃肠分泌和动力功能的调节提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 健康成年雄性 SD 大鼠 36 只,由第四军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 饲料的配制 标准饲料为普通商用饲料,购自第四军医大学实验动物中心;高营养饲料按照建立大鼠肥胖模型的饲料配制^[11-12]并进行改进,即在每 100 g 标准饲料中加入鸡蛋、白糖、猪油各 10 g,面粉 20 g;低营养饲料按照 m (麸皮): m (玉米粉)=2:1 的比例配制。

1.2 试验设计

将试验大鼠适应性饲养 1 周后,随机分成对照组、高营养组和低营养组 3 组,每组 12 只,分别用标准饲料、高营养和低营养饲料进行饲喂。2 周后,每组大鼠随机取 6 只禁食不禁水 24 h;然后各组大鼠分别用体积分数 10% 水合氯醛腹腔麻醉(4 mL/kg),开胸腔,先用 350 mL 生理盐水经主动脉快速将动物体内血液冲净,再用 40 g/L 多聚甲醛(pH=7.4)灌注固定后,取大鼠胃及小肠各段,清洗并放入 40 g/L 多聚甲醛后固定;其余大鼠全换用标准饲料饲养,2 周后用同样方法取材。

1.3 切片的制备与染色观察

将固定好的组织修剪成所需大小后脱水、透明、浸蜡、包埋,将包埋好的组织连续切片(德国 Leica CM1900),片厚 6 μm 。胃和十二指肠、空肠、回肠切片各备 2 套,其中一套用于 HE 染色以确认细胞类型;另一套用 Ghrelin 免疫组织化学 SP 法染色,染色步骤按试剂盒(北京博奥森 SP-0023)说明书进行,第一抗体为兔抗 Ghrelin(北京博奥森 bs-0467R),工作浓度 1:150;显色液是葡萄糖氧化酶-硫酸镍胺增强型的 DAB(DAB 和葡萄糖氧化酶均为美国 Sigma 公司产品),显色后阳性细胞呈现蓝

色,反应时间 10~30 min,蒸馏水终止反应。同时进行阴性对照试验,用 0.01 mol/L PBS 缓冲液代替第一抗体 Ghrelin(pH=7.4),其他步骤相同。切片染色后在 400 倍 Motic 显微镜下拍照,Ghrelin 阳性产物表现为蓝色或蓝黑色,阴性对照不着色。

1.4 数据统计与分析

在每组大鼠胃和小肠切片中各随机选取 5 张,在 400 倍 Motic 数码显微镜下进行拍照,用江苏捷达 801 形态分析软件统计和测量阳性细胞的数量及灰度值后,用 Spass 软件进行数据分析,数据用“平均数 $\pm$ 标准差($\bar{X}\pm S$)”表示,并进行 t 检验。灰度值与阳性产物的表达量呈反比,即灰度值越大阳性产物的表达量越少。

2 结果与分析

2.1 不同营养条件下大鼠胃和小肠中 Ghrelin 阳性细胞的定位

对标准营养组大鼠,胃中 Ghrelin 阳性细胞主要存在于胃底腺区黏膜固有层(图 1-A1),呈圆形或锥形,细胞浆或全细胞着色(图 1-B1),黏膜上皮层无细胞着色,黏膜下层偶见着色细胞,肌层未见着色细胞;十二指肠中的阳性细胞大部分胞浆着色,在黏膜、黏膜下层和肌层均有分布,上皮层阳性细胞主要呈锥形,是分泌型细胞,固有层中的阳性细胞既有“开放型”也有“闭合型”,呈圆形、锥形或不规则形状(图 1-C1),肌层中着色细胞呈圆形或梭状;空肠 Ghrelin 阳性细胞主要集中在固有层肠腺和黏膜下层,上皮细胞着色不明显;回肠着色细胞分布于黏膜下层(图 1-D1),肌层的着色颗粒变淡或逐渐消失。

对于 2 周高营养组大鼠,胃中 Ghrelin 阳性细胞主要集中在胃底腺区黏膜层的颈部和体部,着色细胞呈圆形或不规则状,黏膜上皮层、黏膜下层和肌层均无阳性细胞(图 1-A2);十二指肠着色细胞为圆形或不规则状,分布于上皮、固有层和黏膜下层,肌层无着色;空肠阳性细胞遍布于各层;回肠阳性细胞主要集中在肠腺的底部(图 1-C2),而且肌层着色较浅。

对于 4 周高营养恢复组大鼠,胃中 Ghrelin 阳性细胞在黏膜、黏膜下层和肌层均有分布,在胃底腺区较集中,并且单个细胞着色面积大、着色程度深,固有层可见圆形深着色淋巴样细胞(图 1-B2),肌层着色浅;十二指肠各部均有 Ghrelin 阳性细胞分布,且大部分为胞浆着色,固有层中阳性细胞分布较广并可见锥形“开放型”细胞;空肠中阳性细胞在各层均有分布

(图 1-D2);回肠的阳性细胞集中在黏膜下层。

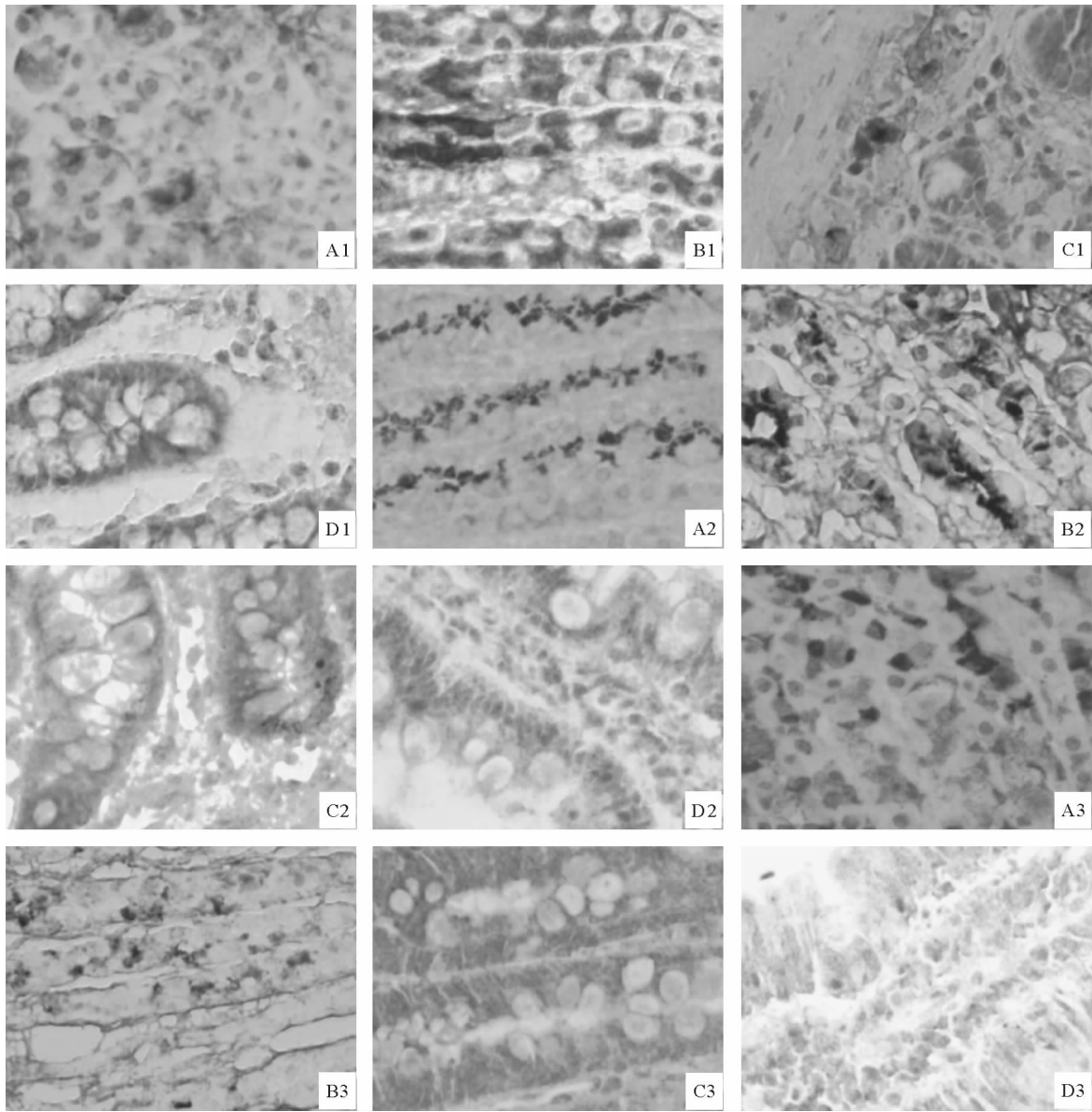


图 1 不同营养条件下 Ghrelin 阳性细胞在大鼠胃及小肠中的表达(×400)
A1~A3. 分别为标准、高、低营养处理 2 周的胃;B1~B3. 分别为标准营养处理 4 周的胃、4 周高营养恢复组的胃、4 周低营养恢复组的胃;
C1~C3. 分别为标准营养处理 2 周的十二指肠、高营养处理 2 周回肠、低营养处理 2 周的十二指肠;D1~D3. 分别为标准营养
处理 4 周的回肠、高营养恢复组的空肠、低营养恢复组的十二指肠

Fig. 1 Ghrelin-ip cells in the gastrointestinal tract under different nutritional condition(×400)

A1—A3. Immunopositive cells in the stomach of rats in normal,high,low nutrition level;B1—B3. Immunopositive cells in the stomach of rats after 4 weeks normal,high and low nutritional treatment;C1—C3. Immunopositive cells in the duodenum, ileum,and duodenum of rats in different nutrition level;D1—D3. Immunopositive cells in the ileum, jejunum and duodenum of rats after 4 weeks nutritional treatment

对于 2 周低营养组大鼠,胃中 Ghrelin 阳性细胞遍布于黏膜、黏膜下层、肌肉层和外膜,且在胃底腺区成片大量富集,胃壁细胞着色深,胞浆或全细胞着色,胃主细胞胞浆着色,部分不着色(图 1-A3);十二指肠着色细胞大多呈圆形或不规则形,胞浆着色,在肠腺底部有极少的锥形阳性细胞(图 1-C3);空肠

阳性细胞集中在肠腺和黏膜下层,胞浆着色;回肠着色部位与空肠相当,但肌层不着色。

对于 4 周低营养恢复组大鼠,胃中 Ghrelin 阳性细胞零星地分布于胃底腺区(图 1-B3),细胞呈圆形,黏膜下层和肌层也有少量阳性细胞;十二指肠肌层和黏膜下层可见阳性细胞(图 1-D3);空肠上皮、

固有层和黏膜下层有阳性细胞分布;回肠中只有少量阳性细胞分布于上皮、固有层和黏膜下层。

2.2 不同营养条件对大鼠胃和小肠中 Ghrelin 阳性细胞数量的影响

在 2 周标准组大鼠中,十二指肠 Ghrelin 阳性细胞数量较胃少($P<0.05$),但远比空肠多($P<0.01$);空肠 Ghrelin 阳性细胞数量远少于回肠($P<0.01$)(图 2A)。随着饲养时间的延长,4 周标准组胃 Ghrelin 阳性细胞数量和细胞着色强度均大于 2 周标准组($P<0.01$);十二指肠 Ghrelin 阳性细胞数量比胃少($P<0.01$),与 2 周标准组十二指肠 Ghrelin 阳性细胞数量差异不大;空肠 Ghrelin 阳性细胞数量与十二指肠差异不明显,但远多于 2 周标准组空肠($P<0.01$),其肠腺底部周围细胞着色深;回肠 Ghrelin 阳性细胞表达量与空肠无明显差异(图 2B)。

2 周高营养组大鼠中,胃 Ghrelin 阳性细胞数量

最多;十二指肠与 2 周标准组着色相当;空肠 Ghrelin 阳性细胞数量与十二指肠无差异,极显著多于 2 周标准组空肠($P<0.01$);回肠与 2 周标准组回肠无明显差异(图 2C)。

4 周高营养恢复组大鼠中,胃中 Ghrelin 阳性细胞数量较多,与 2 周高营养组相比,Ghrelin 阳性细胞数量无明显差异($P>0.05$);十二指肠中 Ghrelin 阳性细胞数量较 4 周标准组的高($P<0.05$);空肠 Ghrelin 阳性细胞数量与 4 周标准组差异不显著;回肠与 2 周高营养组 Ghrelin 阳性细胞数量无显著差异(图 2D)。

2 周低营养组大鼠中,胃 Ghrelin 阳性细胞着色均较 2 周标准组和 2 周高营养组胃深($P<0.05$);十二指肠 Ghrelin 阳性细胞数量比胃少($P<0.01$),与 2 周标准组十二指肠相当;空肠 Ghrelin 阳性细胞着色与十二指肠无显著差异;回肠 Ghrelin 阳性细胞数量与空肠相当(图 2E)。

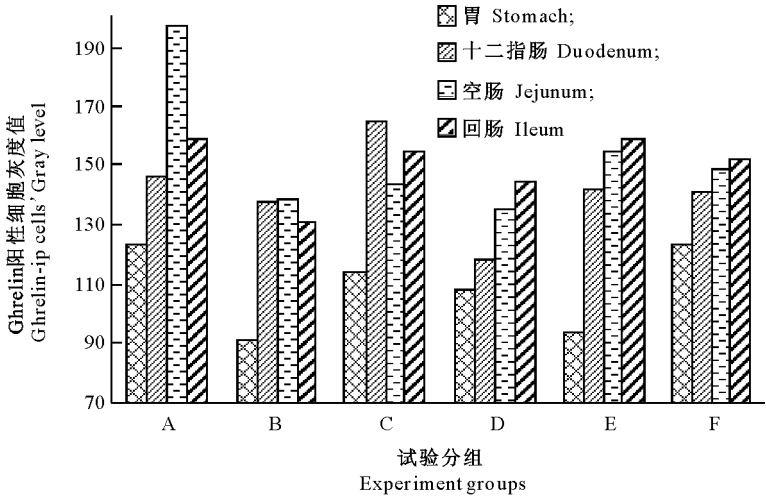


图 2 不同营养条件下大鼠胃肠道 Ghrelin 阳性细胞灰度值的比较

A. 2 周标准组;B. 4 周标准组;C. 2 周高营养组;D. 4 周高营养恢复组;E. 2 周低营养组;F. 4 周低营养恢复组

Fig. 2 Gray level of Ghrelin-ip cells in gastrointestinal tract under different nutrition

A. Control group 2 weeks;B. Control group 4 weeks; C. High nutritional group;D. High to normal group; E. Low nutritional group;F. Low to normal group

4 周低营养恢复组大鼠中,胃 Ghrelin 阳性细胞数量和单细胞着色面积均与 2 周低营养组差异极显著($P<0.01$),与 4 周高营养恢复组差异显著($P<0.05$);十二指肠 Ghrelin 阳性细胞数量较 4 周高营养恢复组少($P<0.05$),与 2 周低营养组十二指肠差异不显著;空肠 Ghrelin 阳性细胞数量与 4 周标准组空肠差异不显著;回肠细胞着色与空肠之间差异不显著(图 2F)。

3 讨 论

Ghrelin 自发现之日起便成为研究热点。随着研究的不断深入,人们发现 Ghrelin 对动物激素分泌、饮食和代谢都有影响。Kobelt 等^[13]发现,对大鼠进行外周 Ghrelin 注射可引起下丘脑背侧核 Fos 的表达,从而刺激动物采食;此外,还有研究者发现,能量变化会对 Ghrelin 的分泌和表达产生影响,如禁食会使 Ghrelin 的分泌量增加,而重新进食后 Ghrelin 表达水平下降^[14-17]。

本研究对大鼠进行不同营养处理,在各组均恢复到标准营养状态后,用免疫组织化学 SP 法对大鼠的胃肠道内的 Ghrelin 阳性细胞进行研究。结果表明,Ghrelin 分泌细胞存在于大鼠胃的底部,且“开放型”和“闭合型”同时存在,但以“闭合型”为主。在低营养状态下,大鼠胃中 Ghrelin 阳性细胞增多,表明糖类、蛋白等营养物质的不足,会导致动物胃中 Ghrelin 分泌增加;与胃相比,其对小肠肠中 Ghrelin 阳性细胞数量的影响较小。糖类、蛋白等营养物质供给充足后,胃中的 Ghrelin 阳性细胞数量明显减少,从而进一步验证了上述结论。Sakata 等^[18]曾报道,大鼠的十二指肠及回肠段存在分泌 Ghrelin 的细胞。本研究结果证实,高糖、高脂、高蛋白使得十二指肠和回肠中分泌 Ghrelin 的细胞减少。这一结果为糖类、脂类等营养物质可以抑制十二指肠和回肠中 Ghrelin 的分泌提供了组织学依据。

作为生长激素促分泌受体的内源性配体存在的 Ghrelin,越来越多的证据表明其在胃肠道生物活性调节中发挥着重要作用。幽门螺杆菌导致的慢性胃炎患者和短肠综合征体内的 Ghrelin 浓度会降低^[19]。Ghrelin 受体(GHS-R)2 种亚型都存在于胰岛中,胰岛也可以分泌 Ghrelin,提示 Ghrelin 可能通过胰岛素来调节糖代谢。对小鼠的研究结果也显示,其体内的 Ghrelin 可通过胰岛素增强对葡萄糖的消耗作用^[20]。由于 Ghrelin 分布广泛,同时其又在不同的激素调节中发挥作用,所以进一步研究 Ghrelin 对营养物质代谢的控制作用机理,可为胃肠道调节和保护药物的开发提供参考。

[参考文献]

- [1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402: 656-660.
- [2] Hayashida T, Nakahara K, Mondal M S, et al. Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role [J]. *Endocrinol*, 2002, 173: 239-245.
- [3] Tritos N A, Kokkotou E G. The physiology and potential clinical applications of Ghrelin, a novel peptide hormone [J]. *Mayo Clin Proc*, 2006, 81(5): 653-660.
- [4] Date Y, Kojima M, Hosoda H, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptides, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans [J]. *Endocrinology*, 2000, 141: 4255-4561.
- [5] Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, et al. Stomach is a major source of circulating Ghrelin, and feeding state determines plasma Ghrelin like immunoreactivity levels in humans [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 4753-4758.
- [6] Dornonville de la Cour C, Bjorkqvist M, Sandvik A K, et al. A-like cells in the rat stomach contain Ghrelin and do not operate under gastrin control [J]. *Regul Pept*, 2001, 99: 141-150.
- [7] Soares J B, Leite-Moreira A. Ghrelin, des-acyl Ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle [J]. *Peptides*, 2008, 29(7): 1255-1270.
- [8] Faulconbridge L F, Cummings D E, Kaplan J M, et al. Hyperphagic effects of brainstem Ghrelin administration [J]. *Diabetes*, 2003, 52: 2260-2265.
- [9] Blom W A, Stafleu A, Hendriks H F, et al. Ghrelin response to carbohydrate-enriched breakfast is related to insulin [J]. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81: 367-375.
- [10] Callahan H S, Cummings D E, Weigle D S, et al. Postprandial suppression of plasma Ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89: 1319-1324.
- [11] 丛丽, 俞茂华, 李益明, 等. 链脲佐菌素糖尿病仓鼠心肌病变的病理变化 [J]. *复旦学报: 医学版*, 2004, 31(3): 235-238.
Cong L, Yu M H, Li Y M, et al. Pathologic changes of diabetic cardiomyopathy in STZ-induced diabetic hamsters [J]. *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 2004, 31(3): 235-238. (in Chinese)
- [12] 孙志, 张中成, 刘志成. 营养性肥胖动物模型的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(4): 466-467.
Sun Z, Zhang Z C, Liu Z C. Experimental study of diet-induced obesity animal model [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2002, 18(4): 466-467. (in Chinese)
- [13] Kobelt P, Wissner A S, Stengel A, et al. Peripheral injection of Ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats [J]. *Brain Res*, 2008, 14(1204): 77-86.
- [14] Tschöp M, Smiley D L, Heiman M L. Ghrelin induces adiposity in rodents [J]. *Nature*, 2000, 407: 908-913.
- [15] Cummings D E, Purnell J Q, Frayo R S, et al. A preprandial rise in plasma Ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans [J]. *Diabetes*, 2001, 50: 1714-1719.
- [16] Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin [J]. *Gastroenterology*, 2001, 120: 337-345.
- [17] Toshinai K, Mondal M S, Nakazato M, et al. Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin induced hypoglycemia, and leptin administration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281: 1220-1225.
- [18] 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 [J]. *Peptides*, 2002, 23(3): 531-536.
- [19] Otto B, Tschöp M, Heldwein W, et al. Endogenous and exogenous glucocorticoids decrease plasma Ghrelin in humans [J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151(1): 113-117.
- [20] Heijboer A C, van den Hoek A M, Parlevliet E T, et al. Ghrelin differentially affects hepatic and peripheral insulin sensitivity in mice [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(4): 732-738.