

肥胖抑制素在断奶仔猪胃壁中的分布

董世起, 周东海, 张 鼎, 马 锐, 郭定宗* (华中农业大学 动物医学院, 湖南 武汉 430070)

摘要:将断奶 15 d 仔猪(45 日龄)处死后分别取胃窦部、胃体部、胃底部, 4% 中性多聚甲醛固定 24 h 后制作组织蜡块, 采用 SP 免疫组化试剂盒和 DAB 显色法, 对各组织蜡块进行免疫组化检测, 对检测结果进行拍照并分析。结果显示, 肥胖抑制素(Obestatin)在断奶仔猪胃组织内广泛存在, 而且在胃的不同部位其分布、含量有所不同。胃底部和胃体部以胞内分泌为主, 胃窦部则主要分泌到黏膜外。Obestatin 在仔猪胃壁中确实存在, 且其在胃壁中的分布从上到下逐渐在组织内和组织外变化。同时, 本试验也从侧面证实了猪和其他已证明的动物种属之间的 Obestatin 具有相似的结构位点。

关键词:肥胖抑制素; 仔猪; 胃; 免疫组化

中图分类号: S852.2

文献标志码: A

文章编号: 1005-4545(2013)01-0074-06

Distribution of obestatin in gastric wall of weaned piglet

DONG Shi-qi, ZHOU Dong-hai, ZHANG Ding, MA Rui, GUO Ding-zong* (College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The experiment was conducted to study the distribution of obestatin in stomach of weaned piglet. Gastric antrum, gastric body, fundus were taken from the piglet which was slaughtered at 15 days after weaning (45 days old), and immediately fixed in 4% neutral paraformaldehyde for 24 h, then made paraffin-embedded tissue for immunohistochemical staining using SP immunohistochemistry kit and DAB staining kit, and results of tests were photographed and analyzed. Results showed that obestatin was widespread in the stomach tissue of piglet. Its distribution and content of secretion was different. Mainly it was located in fundus and gastric body, and secreted into outside of the mucosa in gastric antrum. Obestatin did exist in stomach of weaned piglet. And its distribution gradually changed within and outside of the organization from top to bottom in the stomach.

Key words: obestatin; piglet; stomach; immunohistochemistry

* Corresponding author

肥胖抑制素(Obestatin)是生物信息学研究的一个重要发现。斯坦福大学的 Zhang 等^[1]在对胃生长素前体(Proghrelin)基因序列进行生物信息学分析时,发现了一种新的蛋白质,并随后在大鼠的胃组织中成功分离获得了此种蛋白,同时研究发现与已知的胃生长素之间作用密切,试验证实这种物质能够抑制饥饿感,故将其命名为 Obestatin,其中“obe”是拉丁文来源词“obedere”的缩写,表示大量

摄食,而“statin”则表示“抑制”。许多研究证明,Obestatin 是由 Ghrelin 基因翻译后形成的前体原的不同的片段加工修饰后形成的 23 个氨基酸组成的酰胺化多肽^[4],又被称为 Ghrelin 相关肽(Ghrelin associated peptide, GAP),可以和孤儿 G 蛋白 GPR39 受体结合,抑制食物摄取、空肠的蠕动和体重的增加^[2-3],具有与 Ghrelin 截然相反的生物学作用,被认为是 Ghrelin 的生物学拮抗剂或阴阳活性多肽^[4-5]。但也有人在重复试验中未发现上述的生物作用^[2,3],提示 Obestatin 发挥生物学活性作用的条件和作用原理还没有明确,需要进一步研究。目前国内关于 Obestatin 的研究多集中在 Obestatin 在人、大鼠的疾病模型中的血浆变化及其作用,在猪

收稿日期:2011-11-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700588)

作者简介:董世起(1986-),男,硕士。

* 通讯作者

方面的研究还不多,至今尚未见相关文献报道,而 Obestatin 生物活性作用的研究有可能对仔猪的应激预防和育肥具有十分重要的潜在价值。因此,本试验采用免疫组化方法^[8-9],检测 Obestatin 在断奶 15 d 仔猪^[10]胃中的分布,为进一步深入研究 Obestatin 在仔猪消化系统和能量代谢中的作用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验器材 手术刀、手术剪、一次性乳胶手套、烧杯、电子天平、脱水框、包埋框、烘箱、切片机、展片机、染缸、显微镜及摄像系统(OLYMPUS 1X71,日本)。

1.2 主要溶液 4% 中性缓冲多聚甲醛固定液(多聚甲醛 40 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 16.88 g, NaOH 3.86 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL)。

免疫组化专用 PBS(pH 7.2~7.6) (NaCl 8.5 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.52 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.05 g, ddH_2O 定容至 1 000 mL)。

0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(枸橼酸三钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 3 g, 枸橼酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.4 g, ddH_2O 定容至 1 000 mL)。

不同熔点蜡:1 号蜡为 50% 包埋石蜡+50% 冬青油;2 号蜡为 75% 包埋石蜡+25% 冬青油;3 号蜡为 100% 包埋石蜡。

1.3 主要试剂 所用化学试剂均为分析纯级别,均购自国药公司。Obestatin 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司(bs-1375R);SP 免疫组化试剂盒购买自上海长岛生物技术有限公司(D-3005);包括蛋白阻断液、生物素化二抗、辣根过氧化物酶标记的链霉菌抗生物素蛋白;DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司(AR1022);包括 DAB×20 倍浓缩液, H_2O_2 ×20 倍浓缩液,×20 倍 TBS 浓缩缓冲液。

1.4 具体方法与步骤 将断奶后仔猪(45 日龄)处死后立即取胃底部、胃体部、胃窦部各一部分,4% 中性缓冲多聚甲醛固定液固定 24 h;切取固定好的组织块,修整后放入脱水框流水水洗过夜处理;然后经系列梯度浓度酒精脱水处理(70% 3 h, 80% 2 h, 90% 2 h, 95% 1 h, 95% 1 h, 100% 1 h)后冬青油室温下过夜透明;将透明处理后的组织浸入不同溶点的蜡进行浸蜡处理(1 号蜡 45 min、2 号蜡 45 min、3 号蜡 15 min),使蜡充分浸入组织,然后用融好的包埋石蜡进行组织包埋,做好各组织蜡块的标记。蜡块冷却充分后修整蜡块,进行切片,在 39℃ 水温下展片捞片,61℃ 烘烤 2 h 后,按照预试验测得最适

抗体稀释倍数(200 倍)和 SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒说明书步骤进行免疫组化显色检测:(1)切片组织脱蜡至水;(2)3% H_2O_2 溶液室温下处理切片组织 10 min,以消除内源性过氧化物酶活性,处理后 ddH_2O 洗 3 次(3 min/次);(3)采用微波修复法在枸橼酸盐缓冲液中抗原修复 20 min,处理后 PBS 洗 3 次(3 min/次);(4)使用试剂盒中的封闭剂室温处理切片组织 10 min,处理后 PBS 洗 3 次(3 min/次);(5)一抗 4℃ 过夜处理切片组织,试验组使用 200 倍稀释抗体,对照组用稀释液代替抗体做空白对照,处理后 PBS 洗 3 次(3 min/次);(6)生物素标记的二抗室温处理切片组织 10 min,处理后 PBS 洗 3 次(3 min/次);(7)过氧化物酶标记的链霉菌抗生物素蛋白室温处理切片组织 10 min,处理后 PBS 洗 3 次(3 min/次);(8)DAB 室温显色 10 min;(9)流水冲洗 8 min 终止显色后,使用苏木素复染 2 min,然后脱水封片。对检测结果用奥林帕斯显微镜及成像系统(OLYMPUS 1X71)进行拍照并保存。

2 结果

2.1 胃底部 胃壁黏膜上皮、胃底腺、固有层弥漫分布的黄褐色阳性显色,且阳性显色由黏膜上皮向固有层逐渐加深,同时在黏膜上皮外侧也可见到黄褐色显色区,而在对照组相同位置未见类似显色(图 1、2)。

2.2 胃体部 胃体部黏膜上皮、胃底腺、固有层和部分黏膜下层等呈现弥散性黄褐色阳性显色,在黏膜上皮外侧也可见到少量黄褐色显色,而在对照组相同位置未见类似显色(图 3、4)。

2.3 胃窦部 胃窦部黏膜上皮及外层部分胃底腺有黄褐色阳性显色,显色较浅,胃底腺散在有少数颗粒状强显色,在黏膜上皮外侧可见到大量密集黄褐色阳性显色,在黏膜上皮外侧呈线状分布(图 5、6)。

3 讨论

胃是重要的消化器官。胃中含有许多内分泌和外分泌细胞,其中外分泌细胞,如壁细胞和主细胞等,它们分别分泌盐酸和胃蛋白酶原。胃黏膜分泌的盐酸又称为胃酸,胃酸具有激活胃蛋白酶原、抑制病原微生物、维持胃内酸度的作用,胃酸是胃进行消化的基础,也是衡量胃功能的重要指标。仔猪阶段胃功能尚未完全发育,胃酸分泌能力较弱。张宏福等^[13]对不同断奶日龄对仔猪胃酸分泌的影响做了研究,结果发现一般断奶后 1~3 周才能恢复至断奶

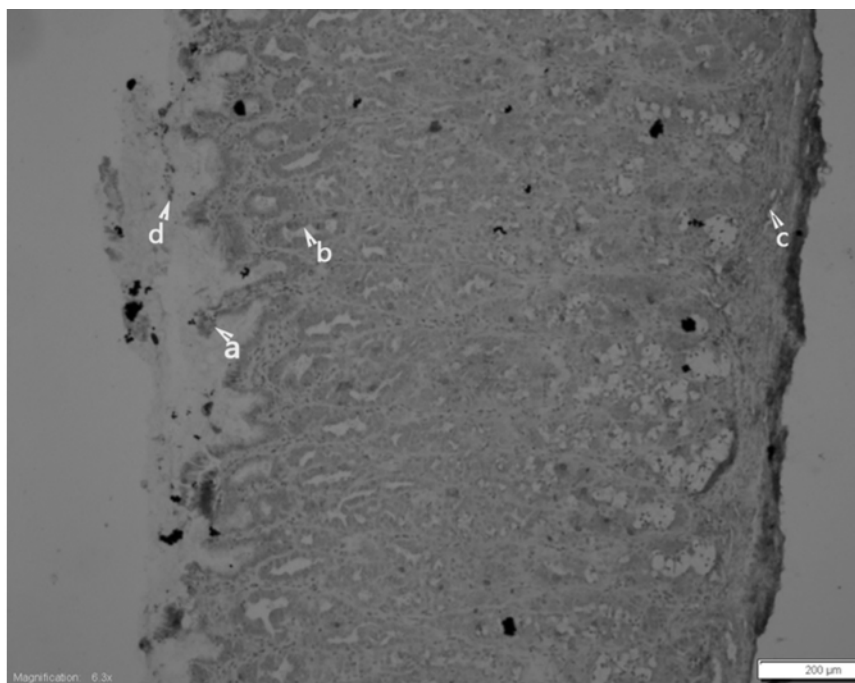


图 1 试验组胃底部免疫组化图(10×) a. 黏膜上皮阳性显色; b. 胃底腺阳性显色; c. 固有层阳性显色; d. 黏膜上皮外侧阳性显色

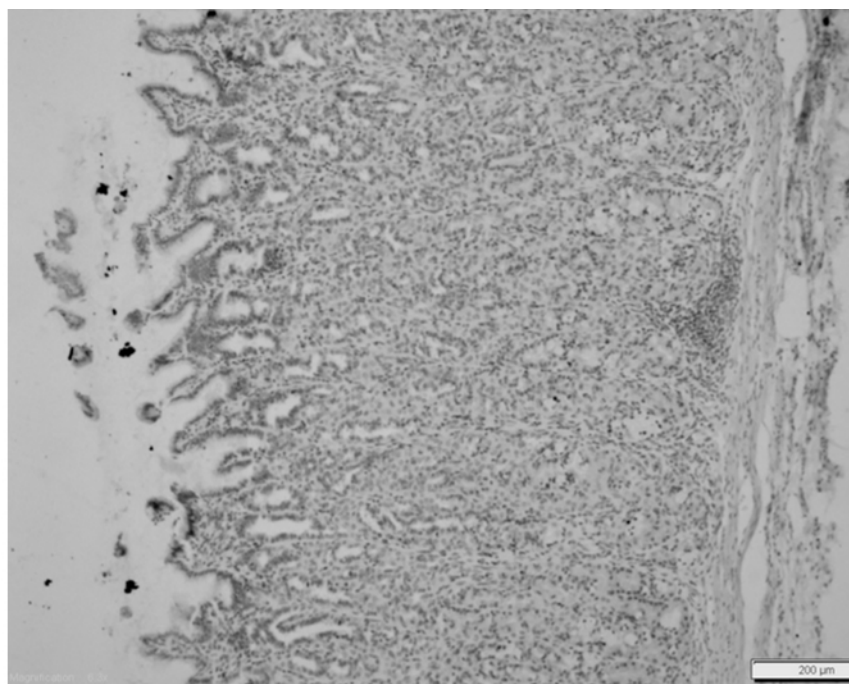


图 2 对照组胃底部免疫组化图(10×, 其中黑色点为苏丹素颗粒残留)

前水平, 2~3 月龄时, 仔猪的泌酸量接近成年猪水平。本试验采用断奶 15 d 仔猪, 由试验结果照片可以看出, 此时仔猪胃各部黏膜外侧均已经有大量成分的分泌, 提示胃的分泌能力已经有所提升, 但是黏膜内腺泡还不发达, 大部分腺泡尚未发育完全, 这与张宏福等的试验结果相一致。

胃不仅是一个消化器官, 还是一个复杂的内分泌器官。胃的内分泌细胞可以以自分泌、旁分泌和内分泌的方式分泌多种激素, 共同来参与胃肠道生长发育和胃酸分泌的调节。Obestatin 最初是在大鼠的胃组织中分离获得的^[1], 本试验的结果显示在仔猪胃内也存在 Obestatin, 且其在胃壁中的分布是

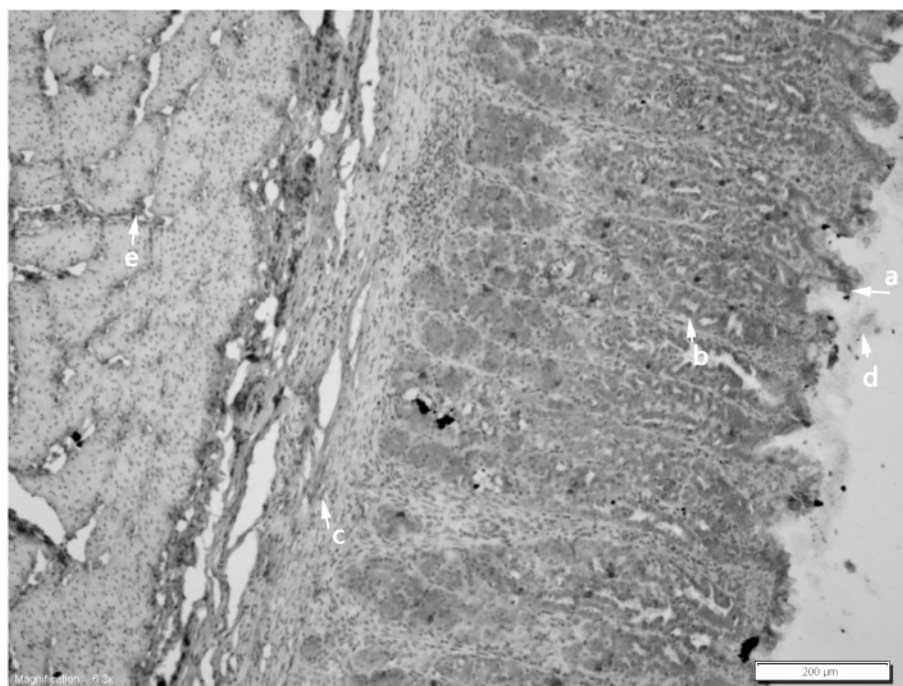


图 3 试验组胃体部免疫组化图(10 $\times$, 黑色点为苏木素颗粒残留) a. 黏膜上皮阳性显色; b. 胃底腺阳性显色; c. 固有层阳性显色; d. 黏膜上皮外侧阳性显色; e. 黏膜下层阳性显色

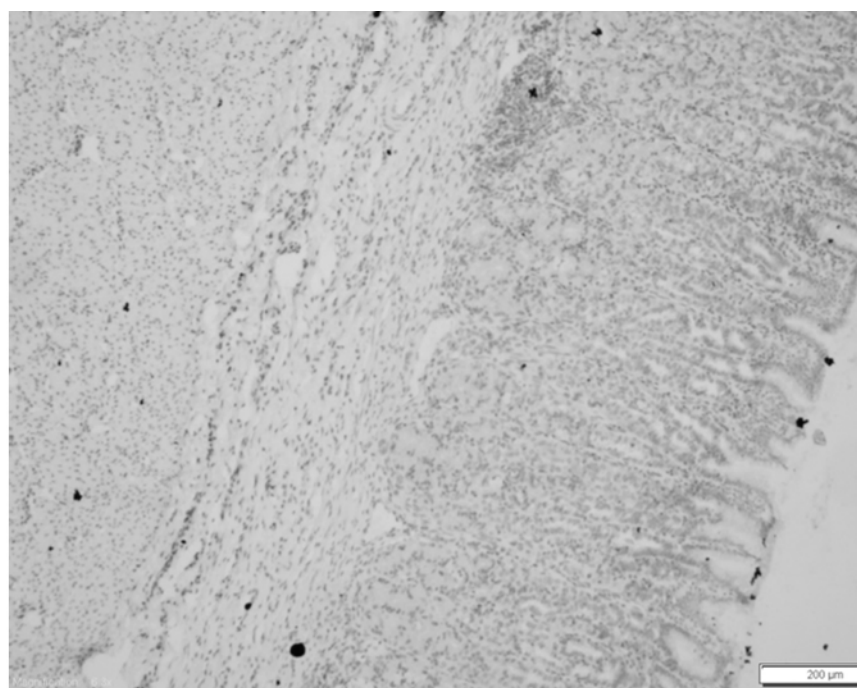


图 4 对照组胃体部免疫组化图(10 $\times$, 其中黑色点为苏木素颗粒残留)

广泛的。

Hayashida 等^[4]用免疫组织化学法检测到牛、绵羊、猪和马与大鼠一样, Ghrelin 免疫染色细胞密集分布于胃部泌酸腺的颈部至底部, 特别在猪的贲门和幽门部分布较多。本试验的结果中, Obestatin 的免疫染色细胞分布和 Hayashida 关于 Ghrelin 的

报道类似, 由于 Obestatin 是来源于同一前体的 Ghrelin 相关肽^[6], 所以本试验的结果显示 Obestatin 在仔猪胃内的分泌可能和 Ghrelin 存在相关性, 但他们的之间的相关性尚待进一步研究。

由图 1 可见在胃底部黏膜上皮、胃底腺、固有层弥漫分布的黄褐色阳性显色, 显示 Obestatin 在胃

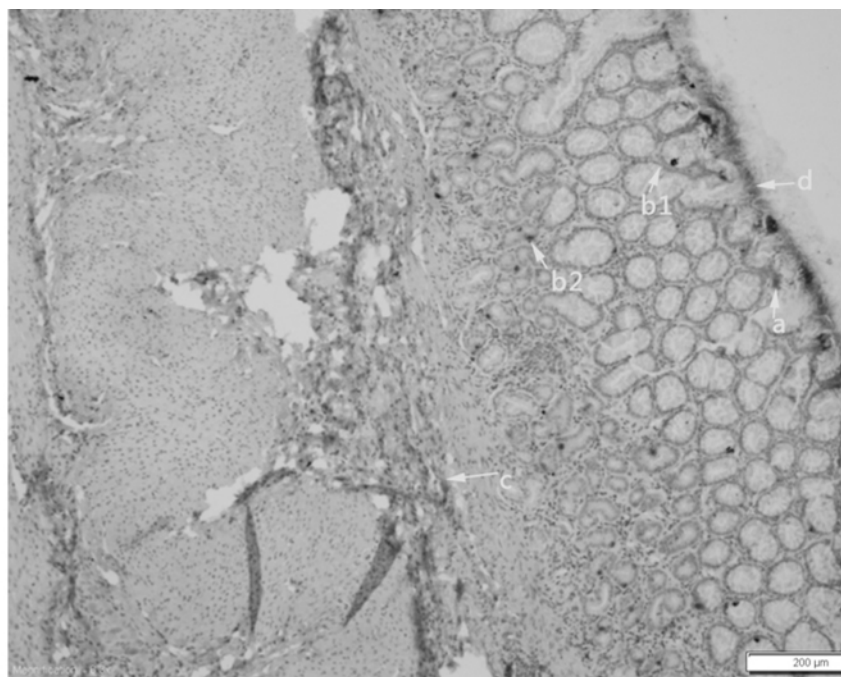


图 5 试验组胃窦部免疫组化图(10×) a. 黏膜上皮阳性显色; b1. 外层胃底腺阳性显色; b2. 胃底腺颗粒状强显色; c. 固有层阳性显色; d. 黏膜上皮外侧阳性显色带

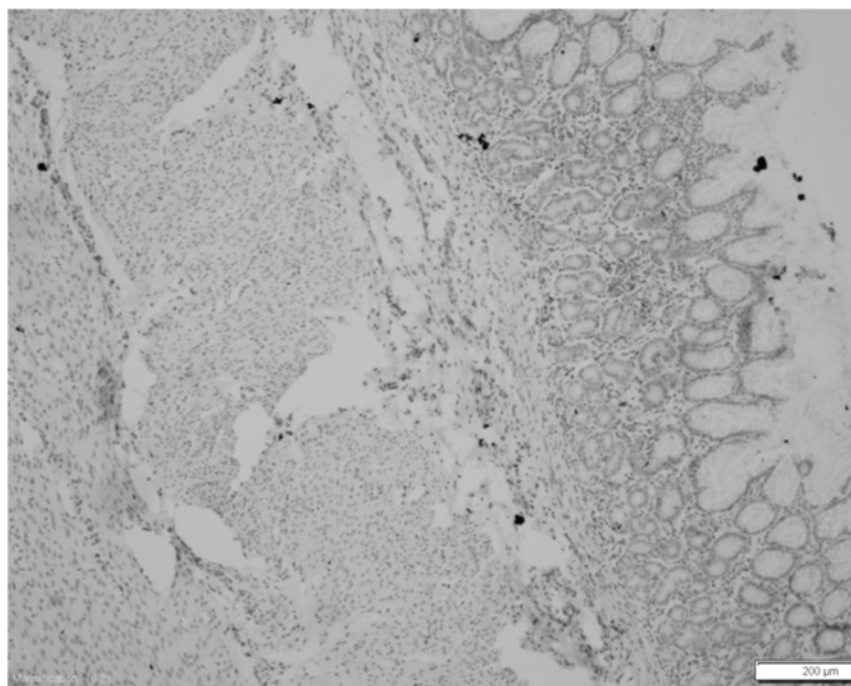


图 6 对照组胃窦部横切免疫组化图(10×, 其中黑色点为苏木素颗粒残留)

底部呈广泛性分布;同时,在黏膜上皮外侧也可见到少量黄褐色阳性显色,提示仔猪胃底部 Obestatin 以自分泌为主,但可以少量外分泌到黏膜外;且阳性显色由黏膜上皮向固有层逐渐加深,提示断奶 15 日后 Obestatin 在胃底部固有层的含量比黏膜上皮高,这种含量的差异是由于胃底部固有层的分泌比

黏膜上皮活跃还是由固有层分泌之后向黏膜层转运导致,尚待进一步验证。

由图 5 可见到,胃窦部黏膜上皮及外层部分胃底腺有黄褐色阳性显色,但显色较浅,提示此处 Obestatin 含量较少,胃底腺散在有少数强显色颗粒状,为 Obestatin 聚集区;在黏膜上皮外侧可见到大

量密集黄褐色阳性显色,在黏膜上皮外侧呈线状分布,与图 1、图 3 相对照,断奶 15 日仔猪胃窦部 Obestatin 分布和胃底部、胃体不同,胃窦部以外分泌为主,黏膜内自分泌的含量下降。

综上所述,通过断奶 15 日仔猪不同部位胃壁的免疫组化研究,证明了 Obestatin 在仔猪胃内广泛存在,而且在胃壁的不同部位,其分布、含量有所不同。同时,本试验也从侧面证实了 Obestatin 在猪和其他已证明的动物种属之间结构位点相似,提示 Obestatin 的蛋白序列、结构以及功能在种属间可能高度保守,这需要进一步采用其他分子生物学手段进行研究。同时,Obestatin 在仔猪阶段的分布、含量变化及在其他组织的分布,也需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhang J V, Ren P G, Avsian-Kretchmer O, et al. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake[J]. Science, 2005, 310: 996-999.
- [2] Chartrel N, Alvear-Perez R, Leprince J, et al. Comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake"[J]. Science, 2007, 315(5813): 766.
- [3] Holst B, Egerod K L, Schild E, et al. GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin[J]. Endocrinology, 2007, 148: 13-20.
- [4] Hayashida T, Murakami K, Mogi K, et al. Ghrelin in domestic animals; distribution in stomach and its possible role[J]. Domest Anim Endocrinol, 2001, 21(1): 17-24.
- [5] 刘 磊, 宋志刚. 家禽食欲的外周调节激素研究进展[J]. 中国家禽, 2011, 33(5): 44-46.
- [6] 任安经, 林 丽, 袁文俊, 等. Obestatin 及其生物学效应[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(4): 351-353.
- [7] 苏小舟, 郁 枫, 赵云辉, 等. β -catenin 在胎牛蹄边缘毛囊形态发生中表达的时空变化[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(6): 642-646.
- [8] 田树华, 张兰梅. 肥胖抑制素的临床研究进展[J]. 山东医药, 2009, 49(50): 114-115.
- [9] 唐胜球, 江青艳, 张永亮, 等. Obestatin 与 GPR39 受体的最新研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(3): 261-267.
- [10] 吴祯乾, 王维刚, 王志刚, 等. Obestatin 及其受体与胃肠动力[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(26): 2974-2979.
- [11] 赵二军, 李宪起, 王金涛, 等. AQP6 和 AQP5 在人下颌下腺上的免疫组化定位[J]. 现代口腔医学杂志, 2010, 24(5): 370-372.
- [12] 赵翠平, 康冬梅, 姚 慧, 等. 饥饿和再进食对小鼠下丘脑中 obestatin 表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(6): 756-759.
- [13] 张宏福, 顾宪红. 仔猪营养生理与饲料配制技术研究[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001.
- [8] Pham H M, Chang K S, Mase M, et al. Molecular characterization of the nucleocapsid protein gene of Newcastle disease virus strains in Japan and development of a restriction enzyme-based rapid identifying method[J]. Arch Virol, 2004, 149(8): 1559-1569.
- [9] 张海燕, 陈松林, 周春炎, 等. 新城疫病毒检测方法研究进展[J]. 中国家禽, 2009, 31(24): 9-10.
- [10] 姜 平, 陈傅言, 裔群英. 3 种方法检测鸡新城疫抗体的比较研究[J]. 中国兽医杂志, 1993(5): 21-25.
- [11] 丁炜东, 曹丽萍, 张体银, 等. 检测新城疫病毒中和抗体的间接 ELISA 和竞争 ELISA 方法的初步建立[J]. 中国兽医杂志, 2005, 41(3): 13-16.
- [12] 孙 杰, 刁有祥, 李建侠, 等. 10 株鸭源新城疫病毒的分离鉴定 F 基因遗传进化分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(8): 1054-1060.
- [13] 潘华奇, 曹瑞兵, 刘 磊, 等. 鸭瘟病毒 gB 蛋白 N 端主要抗原域的表达及间接 ELISA 检测[J]. 微生物学报, 2008, 48(1): 98-102.

(上接 28 页)