

生长抑素基因在猪胃组织中表达 发育性变化及品种比较

夏 东, 赵茹茜, 胥清富, 徐金先, 石子刚, 陈 杰

(南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 选用生长速度快的瘦肉型猪大白猪和生长速度慢的肥胖型猪二花脸作为试验动物, 用相对定量 RT-PCR 方法, 研究猪胃体部组织中生长抑素(somatostatin, SS)基因表达发育性变化并进行品种间比较。结果表明, (1) 出生当天两品种猪胃体部组织中 SS mRNA 表达水平较高, 但出生后第 3 天均出现显著下降 ($P < 0.05$); (2) 从 3 日龄到 30 日龄胃体部组织中 SS mRNA 表达在二花脸猪和大白猪均表现为上升, 二花脸猪在 90 日龄时达到高峰, 随后下降。而大白猪在 30 日龄之后保持相对稳定; (3) 二花脸猪胃体组织中 SS mRNA 表达从出生到 90 日龄均显著高于大白猪 ($P < 0.05$), 二花脸猪胃体组织中 SS 表达自 120 日龄下调, 120~180 日龄期间大白猪和二花脸猪胃体部 SS mRNA 表达没有间差异 ($P > 0.05$)。以上结果提示, 猪胃体部组织中 SS 基因表达调控有特定的时序性, 并且呈现显著的品种差异, 这是否与胃结构和功能的发育有关, 还有待进一步研究。

关键词: 生长抑素(SS) mRNA; 胃组织; 大白猪; 二花脸猪

The Developmental Changes of Somatostatin Gene Expression in Gastric Tissue of Erhualian and Largewhite Pigs

XIA Dong, ZHAO Ru-qian, XU Qing-fu, XU Jin-xian, SHI Zi-gang, CHEN Jie

(Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: In present study, the developmental changes of somatostatin gene expression in gastric tissue were compared between Erhualian and Largewhite pigs. A semi-quantitative RT-PCR was applied to determine the levels of SS mRNA. The gastric SS mRNA expression was high at birth, followed by a significantly decrease ($P < 0.05$) at 3 days of age (D3) in both breeds of pigs. From D3 to D30, the expression of SS mRNA in gastric tissue exhibited remarkable up-regulation in both breeds, after which a strain difference in the developmental changes of SS mRNA expression was observed: in Erhualian pigs, SS mRNA expression reached a peak at D90, declined thereafter towards D180, in Largewhite pigs, however, the expression of SS mRNA remained constant from D30 onwards. In general, Erhualian pigs expressed higher levels of SS mRNA in gastric tissue compared with Largewhite pigs at the same age. The strain difference were significant from birth to D90, and vanished at D120 and D180. The results suggest that the gastric expression of SS in the pig is regulated following an instinct timetable in a strain specific manner, its relationship with the development of gastric function as well as its interactions with environmental factors needs to be further studied.

Key words: Somatostatin (SS) mRNA; Gastric tissue; Largewhite pigs; Erhualian pigs

生长抑素(somatostatin, SS)广泛存在于中枢神经和消化道, 属于典型的脑肠肽(brain-gut-peptide),

其主要形式有 14 肽和 28 肽两种^[1]。SS 不仅具有抑制生长激素分泌的作用, 而且对胃、肠、胆、胰内、

收稿日期: 2001-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39830290)

作者简介: 夏 东(1966-), 女, 江苏盱眙人, 副教授, 硕士, 主要从事家畜环境卫生学教学与科研工作。赵茹茜和陈杰为本文通讯作者, Tel: 025-4396413; E-mail: yzwj@public1.ppt.js.cn

外分泌以及胃肠运动都有抑制效应^[2]。给人或狗灌注低剂量 SS 可抑制胃酸的分泌,离体试验表明,SS 可与壁细胞表面受体结合而抑制胃酸分泌^[3]。此外,在人、大鼠和猪上的试验研究表明,SS 是胃泌素分泌的调节因素,它不仅抑制 G 细胞释放胃泌素(gastrin),还直接抑制胃泌素的基因表达^[4]。因此,SS 被认为是机体生长发育和消化功能的重要调节因子。

初生仔猪胃功能发育缓慢,胃酸分泌不足,胃蛋白酶的含量较低,严重影响仔猪的消化吸收,是仔猪拉稀、生长缓慢和死亡的重要原因之一^[5]。而此过程中 SS 是如何起作用的?这一问题引起了研究工作者的关注。为了回答这一问题,首先必须了解胃组织 SS 的发育变化。目前相关研究较少,且报道不一,可能与所用试验动物不同有关。Zingg 用 Northern blot 研究表明,大鼠胃组织中 SS 基因表达的启动是出生以后,并随着年龄增加而逐渐增加^[6];Onolfo 也有类似的报道,大鼠在 4 日龄以后胃组织中 SS mRNA 表达才可以定量检测^[7]。Yee 在兔上的试验表明,从 20 胚龄到 30 胚龄,胃组织中 SS 的免疫活性升高了 3 倍^[8]。Lopez-Ruiz 用 RIA 方法研究发现,兔胃组织 SS 免疫活性在 0~5 日龄期间呈下降趋势,5~10 日龄期间迅速上升,然后又逐渐下降,35 日龄以后保持相对稳定^[9]。Read 研究发现绵羊胃组织中 SS mRNA 水平在 80 胚龄至 15 日龄期间呈显著上升趋势,140 胚龄和 15 日龄时的水平显著高于成年^[10]。以上报道说明,SS 在胃中的表达发育模式具有种族特异性。目前,关于猪的相关研究仅见 1 例,Alument 用免疫组化的方法检测出在 5 胚龄时猪胃组织中有 SS 细胞存在^[11]。至于猪胃组织中 SS 发育性变化的研究,至今未见报道,不同品种猪胃组织中 SS 表达的差异,更是空白。因此,本试验选用生长速度快的瘦肉型猪大白猪和生长速度慢的肥胖型猪二花脸猪作为试验动物,用相对定量 RT-PCR 的方法,研究猪胃组织中 SS 基因表达发育模式及其品种特点。

1 材料与方法

1.1 试验动物及采样

分别选取 2~3 胎龄的经产大白猪母猪和二花脸母猪各 8 头,同期进行纯繁,其后代用于试验。试验期间,猪自由采食、饮水。大白猪和二花脸猪的日粮分别按其品种要求进行配制。分别于 0、3、20、30、90、120 和 180 日龄随机选取大白猪公猪和二花

脸公猪各 4 头,宰杀后取胃体部组织样,置液氮速冻,-70℃冷冻保存。

1.2 SS 相对定量 RT-PCR (relative RT-PCR)

采用硫氰酸胍-酚-氯仿 RNA 一步抽提法提取组织样的总 RNA。用随机引物 Random hexamer primer 对所有样品的 RNA 进行反转录,建立各样品 RNA 的 cDNA (RT product)。同时用不加反转录酶的反转录体系作为阴性对照(C1),用于检测总 RNA 样品中是否有基因组 DNA 污染。

SS 引物根据 Genebank 猪 SS 基因组 DNA 序列中编码区设计,上游引物(forward primer):5'-AGC-TGCTGTCTGAACCCAAC-3',下游引物(reverse primer):5'-GAAATTCTTGCAGCCAGCTT-3'。以 Classic 18S internal standards(Ambion Inc. USA)为内源性标记。

分别对 PCR 反应条件、循环圈数以及 18S primer pair 和 18S competitor 比例等进行优化选择,确定 SS RT-PCR 条件如下:在 50 μ l 的反应体系中含有 5 μ l 10 \times PCR buffer, 1.5 mmol MgCl₂, 0.2 mmol·L⁻¹ dNTP, 100 ng SS 的上游引物和下游引物, 2 μ l 18S primer pair, 2 μ l 18S competitor, 2 μ l RT product, 1.0 U Tag DNA polymerase(Promega, Shanghai)。PCR 反应条件为:94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 32 圈;72℃延伸 5 min 构成。PCR 反应同时有 C1 和 C2 以水代替 RT 产物的 PCR 反应管,用以检测 PCR 反应体系有无 DNA 污染的质量控制。PCR 反应在 GeneAmp PCR system 9600 型 PCR 仪(Perkin Elmer, U.S.A.)上进行。

取 20 μ l PCR 产物在 2.0% EtBr 染色的琼脂糖凝胶上电泳。图像处理及灰度分析用 Kodak ID Electrophoresis Documentation and Analysis System 120(Kodak Photo Film Co., Ltd., U.S.)进行,根据 SS 和 18S PCR 产物的灰度比,确定样品中 SS mRNA 基因表达的相对含量。

1.3 数据统计与分析

数据用 SPSS10 软件统计,差异显著性检验用独立样本 t 检验和单因子方差分析(one-way ANOVA, LSD)。

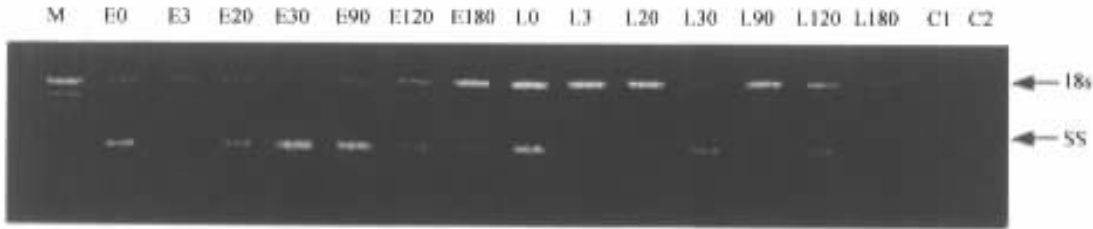
2 结果与分析

2.1 猪胃体组织中 SS mRNA 的发育变化

图 1、图 2 分别显示大白猪和二花脸猪胃体组织中 SS 基因表达的发育变化。出生当天两品种猪

胃体组织中 SS mRNA 的表达水平较高,但出生后第 3 天均出现显著下降($P < 0.05$);从 3 ~ 30 日龄胃体组织中 SS mRNA 表达在二花脸猪和大白猪均表现为上调,二花脸猪在 90 日龄时达到高峰,随后

下降。而大白猪在 30 日龄之后保持相对稳定。二花脸猪胃体组织中 SS mRNA 从出生到 90 日龄均显著高于大白猪($P < 0.05$),120 日龄和 180 日龄期间胃体部 SS mRNA 基因表达品种间差异消失。

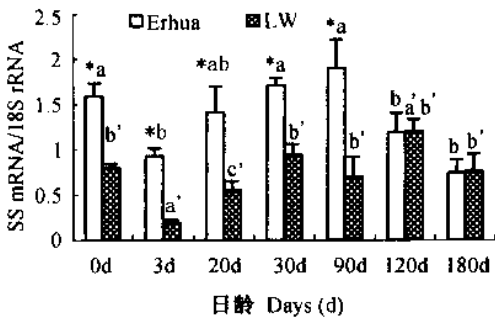


M 为分子量标记 pUC19; E0 ~ E180 分别表示二花脸猪 0 ~ 180 日龄; L0 ~ L180 分别表示大白猪 0 ~ 180 日龄

M is marker pUC19, E0 - E180 represent erhualian pigs at day 0 - 180 respectively, and L0 - L180 represent large-white pigs at day 0 - 180 respectively

图 1 大白猪和二花脸猪胃组织 SS mRNA RT-PCR 产物代表性琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Representative agarose gel electrophoresis photo of gastric tissue SS mRNA RT-PCR result of Largewhite pigs and Erhualian pigs



同一品种不同年龄之间的差异用字母表示:有不同字母的表示差异显著($P < 0.05$);不同品种同一年龄之间的差异用 * 表示: * $P < 0.05$

a vs b, b vs c, a' vs b', b' vs c', $P < 0.05$ indicating differences among different ages but in same breed, * $P < 0.05$, indicating differences between Erhualian and Largewhite pigs at same age

图 2 二花脸猪和大白猪胃组织中 SS mRNA 发育变化

Fig. 2 The ontogeny of gastric SS mRNA in Erhualian pigs and Largewhite pigs

3 讨论

胃组织中的 SS 主要由胃体和幽门部粘膜内的 D 细胞分泌, D 细胞通过其伸出的长突起与胃体部的壁细胞、主细胞和幽门部的 G 细胞直接接触^[3]。SS 对分泌酸的调节作用是通过直接抑制壁细胞以及间接抑制胃泌素释放而实现^[3]。血管灌流 SS 可抑

制胃泌素引起的酸分泌^[3]。SS 抑制胃泌素(gastrin)分泌可能与 SS 影响 gastrin 基因表达有关。免疫中和 SS 后,胃酸分泌和 gastrin 释放增加^[3]。在离体灌流的胃标本中, SS 抗血清可明显增加酸的分泌^[6]。说明 SS 是泌酸的强抑制剂^[3]。

初生仔猪主要特点是生长发育快而消化器官不发达,消化腺机能不完善。初生仔猪胃内仅有凝乳酶,而唾液和胃蛋白酶很少,约为成年猪的 1/3 ~ 1/4。同时胃底腺不发达,不能分泌盐酸,缺乏游离盐酸,胃蛋白酶呈原状态没有活性,不能消化蛋白质^[5]。在动物的生长发育过程中,胃中盐酸的变化可能与胃组织中 SS 的发育变化相关。Yee 用 RIA 研究表明,胚胎期兔胃组织中 SS 和 gastrin 比值随胎龄的增加逐渐减少的变化与壁细胞泌酸的启动相关^[8]。Read 研究发现,绵羊胃组织中 SS mRNA 的发育变化趋势和 gastrin mRNA、 H^+/K^+ -ATPase mRNA 发育变化趋势相反,他提出胃组织泌酸的启动与胃中胃泌素生物活性、 H^+/K^+ -ATPase 生物合成的增加以及一定水平的 SS 相关^[10]。本试验研究表明,0 ~ 3 日龄期间胃组织中 SS mRNA 显著下降。这与仔猪早期胃酸的分泌变化相反, Xu 的研究表明,第一周内初生仔猪单位胃重的最大泌酸量呈线性增长^[13]。本试验结果提示,胃组织中 SS mRNA 的表达在 0 ~ 3 日龄期间显著下降,可能减少了 SS 对 gastrin 的抑制作用,壁细胞

泌酸增加。而 3 日龄时胃组织 SS mRNA 水平显著下调可能与初生仔猪哺乳初乳有关。Xu 研究表明, 出生后 3 d 内仔猪胃的快速生长和胃酸分泌能力的增加与仔猪哺乳初乳有关, 因为初乳中含有多种较高浓度的激素和生长因子, 如胰岛素、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子(IGF-I)等对初生仔猪胃的发育有重要调节作用^[14]。同时 Simmen 研究报告, 哺乳初乳的初生仔猪胃重显著高于哺乳常乳的对照组^[15]。

在胃酸和 gastrin 组成的反馈环中, SS 抑制胃酸和 gastrin 的分泌, 而 gastrin 和胃酸的增加反过来刺激 SS 的合成和分泌^[16,17]。在动物发育过程中, 胃组织中 SS 与 gastrin、胃酸相互调节, 有可能在某一水平上达到动态平衡。笔者所揭示的胃组织中 SS mRNA 表达水平在发育后期处于相对稳定状态, 这一结果与 Lopez-Ruiz 研究报告相似: 兔胃组织中 SS 的免疫活性在 35 日龄以后维持相对稳定^[9]。其原因可能与 SS 和胃泌素、胃酸之间相互调节、相互影响的动态变化相关。以上解释可从猪胃酸发育变化模式中得到论证。据 Cranwell 等综述, 仔猪泌酸能力在出生前 15 d 左右出现, 胃内容物 pH 由 7.0 以上变为 3.0 ± 0.1 ^[18]。初生时酸分泌能力很低, 而第一周泌酸能力迅速增加, 断奶后维持不变。但本试验中两品种猪胃组织 SS mRNA 表达到达相对稳定水平的日龄不同, 这是否与两品种猪功能发育变化模式相关, 尚有待于进一步试验证明。

品种之间比较表明, 猪胃组织 SS mRNA 基因表达发育变化存在品种差异。在整个发育过程中二花脸猪胃组织 SS mRNA 的水平均高于大白猪, 从 0~90 日龄期间二花脸猪胃组织 SS mRNA 的水平显著高于大白猪 ($P < 0.05$), 发育后期 120~180 日龄期间品种之间无显著性差异。这一结果提示: 大白猪胃中 SS 对胃酸的抑制作用有可能低于二花脸猪, 大白猪的初生仔猪胃的消化功能可能高于二花脸猪。这可能是大白猪生长速度高于二花脸猪^[19]的原因之一, 有待进一步研究。

References

- [1] Eugenio E Müller, Vittorio Locatelli, Daniela Coochi. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiological Reviews*, 1999, 79(2): 511–579.
- [2] 李永渝, 高静涛. 生长抑素: 机体消化功能的重要调节因子. 生理研究进展, 1995, 26(1): 65–68.
Li Y Y, Gao J T. Somatostatin: the important factor for regulating digestive functions. *Progress in Physiological Sciences*, 1995, 26(1): 65–68. (in Chinese)
- [3] 陈元方, Tadataka Yamada. 胃肠肽类激素基础与临床. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 257–266, 499–458.
Chen Y F, Tadataka Yamada. *Gastrointestinal Peptide Hormones Basic and Clinical Aspects*. Beijing: Peking Union College and Beijing Medical University Joint Press, 1997: 257–266; 499–458. (in Chinese)
- [4] 谢启文. 现代神经内分泌学. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 33–36.
Xie Q W. *Contemporary Neuroendocrinology*. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1999: 33–36. (in Chinese)
- [5] 山西农业大学和江苏农学院主编. 养猪学. 北京: 农业出版社, 1982: 226.
Edited by Shanxi Agricultural University and Jiangsu Agricultural College. *Pig Production*. Beijing: Agricultural Press, 1982: 226. (in Chinese)
- [6] Zingg H H, Goodman R H, Habener J F. Developmental expression of the rat somatostatin gene. *Endocrinology*, 1984, 115(1): 90–94.
- [7] Onolfo J P, Lehy T. Comparative development of gastrin and somatostatin cell populations in the pancreas, stomach, and duodenum of the rat during the perinatal period. *Anatomical Record*, 1987, 218(4): 416–425.
- [8] Yee L F, Wong H C, Calastro E Q, Mulvihill S J. Roles of gastrin and somatostatin in the regulation of gastric acid secretion in the fetal rabbit. *Journal of Surgical Research*, 1996, 63(1): 364–368.
- [9] Lopez-Ruiz M P, Silva A, Arilla E. Postnatal developmental of somatostatin levels and its binding sites in rabbit gastric mucosa. *Peptides*, 1987, 8(6): 983–988.
- [10] Read M A, Patricia Chick, Kenneth J H, Arthur Shulkes. Ontogeny of gastrin, somatostatin, and the H^+/K^+ -ATPase in the ovine fetus. *Endocrinology*, 1992, 130: 1688–1697.
- [11] Alumets J, Hakanson R, Sundler F. Ontogeny of endocrine cells in porcine gut and pancreas. An immunocytochemical study. *Gastroenterology*, 1983, 85(6): 1359–1372.
- [12] Yana Zavros, William R F, Arthur Shulkes. Concurrent elevation of fundic somatostatin prevents gastrin stimulation by GRP. *Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1999, 276(1): 21–27.
- [13] Xu R J, Cranwell P D. Development of gastric acid secretion in pigs from birth to thirty six days of ages: the response to pentagastrin. *Journal Development Physiology*, 1990, 13(6): 315–326.
- [14] Xu R J. Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: a review. *Reproduction Fertility and Development*, 1996, 8(1): 35–48.
- [15] Simmen F A, Cera K R, Mahan D C. Stimulation by colostrum or mature milk of gastrointestinal tissue development in newborn pigs. *Journal Animal Science*, 1990, 68(11): 3596–3603.
- [16] Arthur Shulkes, Mark Read. Regulation of somatostatin secretion by gastrin and acid-dependent mechanisms. *Endocrinology*,

1991, 129: 2 329 - 2 334.

- [17] Simon L W , Graham H M , Keneth J H , Arthur S. Active immunization against somatostatin alters regulation of gastrin in response to gastric acid secretagogues. *Gastrointestinal and Liver Physiology* , 1998 , 274(4) :751 - 756.

- [18] 李长忠. 不同断奶日龄仔猪消化酶发育规律的研究. 中国农业大学硕士学位论文, 1998.

Li C Z. Study on development of digestive enzymes in piglets with different weaning ages. Master 's Degree Thesis of Chinese

Agricultural University , 1998. (in Chinese)

- [19] 徐金先. 二花脸猪生长激素基因表达的发育性变化及其与大白猪的比较性研究. 南京农业大学硕士论文, 2001.

Xu J X. Developmental changes of GH gene expression in Erhualian pigs and comparison with Largewhite pigs. Master 's Degree Thesis of Nanjing Agricultural University , 2001. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)

农业图书信息网书目

实用饲料手册	19.00	果树常用药剂与药械	16.00
果品贮藏保鲜与加工	11.00	果树施肥手册	25.00
果菜瓜贮藏保鲜(北方本)	14.00	小麦的根	79.30
淀粉糖品生产与应用手册	46.00	特种玉米加工技术	13.00
果蔬贮运学	23.00	微注射和转基因实验指南	69.00
水果保鲜及商品化处理	16.00	高温菌生物学	55.20
蔬菜生物技术概论	27.60	生态动力学	97.70
生物技术概论	21.00	医学分子生物学	63.20
RNA 加工与细胞周期调控	21.00	生物资源学	51.70
以核酸为作用靶的药物研究	26.00	分子生物学精要	64.40
生物化学与分子生物学原理	23.00	进化生物学(影印版)	89.70
兽医处方手册	52.90	遗传学基因与基因组分析(影印版)	101.20
蛋白质结构分析.制备.鉴定与微量测序	46.00	生物化学(第二版)	46.00
染色体带.基因组的图型	32.20	分子细胞生物学(第二版)	79.30
医用细菌遗传学实验指南	78.20	现代乳牛学	75.90
分子医学技术	51.70	种子贮藏	28.70
植物激素与蔬菜的生长发育	27.60	种子加工学	34.50
家禽免疫学	37.90	植物生态病理学	43.70
花生育种学	78.20	分子细胞遗传学	34.50
水稻育种学	42.50	数量遗传学导论(第四版)	92.00

以上图书均含邮寄费,如欲得到更多图书信息,可光临本网站查询,或向本网来信索取图书(光盘)目录,可免费邮寄。

邮局汇款:北京市中关村南大街12号中国农科院266信箱 邮编:100081

收款人:周尊博

电话:010-62116838 62192273 传真:010-62116838

网址: <http://www.agribook.net> E-mail: book@agribook.net