

Ghrelin 在驯鹿器官内的表达及定位检测

张曼, 金鑫, 刘骄, 杨银凤*

(内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 为了探索 Ghrelin 在驯鹿体内的表达及定位, 采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 和免疫组织化学技术对其进行检测。Real-time PCR 结果显示 Ghrelin 在所检测的 17 种器官中均有转录, 在皱胃内的转录量最高, 其次是胰、十二指肠、睾丸和食管, 且转录量显著高于其他器官 ($P < 0.05$); 免疫组化结果揭示 Ghrelin 的免疫阳性细胞在食管和皱胃内主要分布于黏膜层、黏膜下层和肌层; 在瘤胃、网胃、瓣胃的黏膜层、黏膜下层中也可见 Ghrelin 的免疫阳性细胞, 但肌层中未见表达; 在肠道主要位于十二指肠、空肠、回肠、结肠的黏膜层、黏膜下层和肌层, 尤其在肠绒毛和黏膜下层分布较多; 在肝、胰、甲状腺、垂体前叶、睾丸、肺、肾、脾器官内均有 Ghrelin 的免疫阳性细胞。Real-time PCR 和免疫组化结果显示 Ghrelin 在所检测的器官内均有分布, 且在食管和胃肠道内表达量及分布范围最为广泛, 这表明 Ghrelin 对驯鹿的消化系统可能存在一定的调节作用。

关键词: Ghrelin; 驯鹿; 实时荧光定量 PCR; 免疫组化

中图分类号: S852.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)12-2510-10

The Examination of Expression and Localization of Ghrelin in the Reindeer Organs

ZHANG Man, JIN Xin, LIU Jiao, YANG Yin-feng*

(College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China)

Abstract: The Real-time PCR and Immunohistochemistry were used to examine the expression and localization of Ghrelin in the reindeer organs. The results of Real-time PCR indicated that Ghrelin was expressed in 17 kinds of organs and the expression in the abomasum was highest, followed by pancreas, duodenal, testis and oesophagus, in which the expression of Ghrelin were remarkably higher than that of the rest organs ($P < 0.05$). Immunohistochemical results showed that Ghrelin-positive cells in the oesophagus and abomasum mainly distributed in the tunica mucosa, tunica submucosa and tunica muscularis and also detected in the tunica mucosa, tunica submucosa of rumen, reticulum, omasum. In the intestine, Ghrelin-positive cells were mainly localized in the tunica mucosa, tunica submucosa and tunica muscularis of duodenum, jejunum, ileum, colon, especially more cells were found in the epithelium of intestinal villi and the tunica submucosa. Ghrelin-positive cells were observed in the liver, pancreas, lung, spleen, kidney, testis, anterior pituitary, thyroid gland. Real-time PCR and immunohistochemistry results showed that Ghrelin was presented in all of the organs that were examined, where the expression and distribution of Ghrelin in the esophagus and gastrointestinal were most widely, suggesting its possible role in regulating the digestive function.

Key words: Ghrelin; reindeer; Real-time PCR; immunohistochemistry

Ghrelin(生长素)是一种能够刺激摄食和促进生长激素释放的脑肠肽^[1],是生长激素促分泌素受体 1a(growth hormone secretagogue receptor 1a, GHS-R1a)的一个内源性配体。当 Ghrelin 与其特异性受体结合后不仅能够促进 GH 的释放,还能对心血管、生殖和免疫系统起到调控作用。研究发现在人体内 Ghrelin mRNA 和免疫阳性细胞主要分布于消化系统^[2-3]。在禽类体内,李福宝等^[4]研究显示在成年皖西白鹅小肠内检测到 Ghrelin 免疫阳性细胞的表达。在反刍动物体内,D. W. Miller 等^[5]研究显示在成年绵羊的胃肠道内均有分布。Ghrelin 广泛存在于动物体内,说明该激素可能对动物各器官具有重要的调节作用。迄今为止,有关 Ghrelin 在人类和啮齿类动物体内的表达及作用机制的研究比较成熟,而关于 Ghrelin 在驯鹿体内的研究才刚刚起步。目前,本课题组已完成了驯鹿生长素 Ghrelin 全长 cDNA 的克隆及序列分析^[6],但未见有关驯鹿器官内 Ghrelin 的表达及定位的报道。因此,本试验采用 Real-time PCR 和免疫组织化学方法,从分子和细胞水平上研究驯鹿体内 Ghrelin 的表达量及免疫阳性细胞分布情况,旨在丰富反刍动物生物学资料,为探索 Ghrelin 在驯鹿体内的作用及其机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

RNAiso Plus (Total RNA 提取试剂,日本 TaKaRa 公司), PrimerScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa 公司), Premix TaqTM (TaKaRa 公司), SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNase Plus, TaKaRa 公司), DAB 染色液 (DAB-0031 福州迈新), Mayor's 苏木素 (AR0005 武汉博

士德),即用型 SABC-POD(兔 IgG)试剂盒 (SA1002 武汉博士德), Ghrelin (GHRL) Antibody (BA1619 武汉博士德)。

1.2 试验动物及样品制备

1 头成年残疾雄性驯鹿(右后肢缺失)由内蒙古大兴安岭北敖鲁古雅民族自治乡提供。驯鹿屠宰后立即将食管、瘤胃、网胃、瓣胃、皱胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠等组织的黏膜进行分离,并切取适量肝、胰、肺、脾、肾、睾丸、垂体前叶、甲状腺等组织块,放入液氮中冷冻备用,将以上用于免疫组化的组织块用生理盐水清洗后放入 4% 多聚甲醛固定液中 4 ℃ 固定 24 h。

1.3 总 RNA 的提取和反转录反应

总 RNA 的提取按照 TaKaRa 公司(日本)的 RNAiso Plus Total RNA 提取试剂盒说明书操作。反转录反应使用 PrimerScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 试剂盒。去除基因组 DNA: 6.5 μL 的总 RNA、RNase Free dH₂O 0.5 μL、gDNA Eraser 1.0 μL、5×gDNA Eraser Buffer 2.0 μL,反应体系共 10 μL,42 ℃ 水浴 2 min。cDNA 的合成: 10 μL 的上述反应液、RNase Free dH₂O 4.0 μL、5×PrimeScript Buffer 2(for Real-Time) 4.0 μL、RT Primer Mix 1.0 μL、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μL,反应体系共 20 μL。于 PCR 仪进行反转录,反应条件: 37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s,于 -20 ℃ 备用。

1.4 Real-time PCR

根据本课题组呈送到 GenBank 中的驯鹿 *Ghrelin* 部分 mRNA 序列和跨内含子引物设计原则设计一对特异性 PCR 引物。另外根据驯鹿 18S rRNA 序列设计另外一对 PCR 引物。引物序列见表 1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences for Real-time PCR

基因名称 Gene names	GenBank 登录号 GenBank accession	引物序列 Primer pair sequences
<i>Ghrelin</i>	EU099031.2	U-5'-AACGCCCCCTTTGACATTGG-3' D-5'-TGAGGGTGGGGGAACGGACAG-3'
18S rRNA	AY225108.1	U-5'-CCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAAC-3' D-5'-TGATGCCCCCGACTGTCCCTATTA-3'

采用 SYBR Green II 荧光染料进行实时定量 PCR 检测。反应体系:SYBR Premin Ex *Taq*(2×) 10 μ L,上下游引物各 0.8 μ L,10 倍稀释的 cDNA 模板 2 μ L,dH₂O 补足 20 μ L。于实时定量 PCR 仪(VIIA7,ABI)进行反应。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,62 $^{\circ}$ C 退火 30 s,45 个循环。每个样品的 18S rRNA 基因和 *Ghrelin* 基因分别做 3 个重复。

1.5 数据处理

将 RT-PCR 得到的 *Ghrelin* 基因和 18S rRNA 基因的 *Ct* 值,根据公式 $2^{-\Delta Ct}$ [7] 求出 *Ghrelin* 基因的相对转录量,其中 $\Delta Ct = Ct(Ghrelin) - Ct(18S rRNA)$,并进行统计分析。

1.6 数据统计分析

用 Graphpad Prism 5 软件进行单因子方差分析,每组重复 3 次,检验结果以 $P < 0.05$ 代表差异显著。

1.7 免疫组织化学染色

将固定好的组织样品进行常规石蜡包埋,切片厚度为 4~5 μ m,连续切片。按照免疫组化试剂盒(武汉博士德,SA1002)说明书进行染色。一抗为兔

抗人、大鼠、小鼠、兔 *Ghrelin* 多克隆抗体(武汉博士德,BA1619)稀释度为 1 : 200,对照组用 PBS 代替一抗。用 DAB 显色(福州迈新,DAB-0031),苏木精复染,脱水,透明,封片。显微镜观察,阳性产物为棕黄色。

2 结果

2.1 *Ghrelin* 在驯鹿器官的转录

2.1.1 *Ghrelin* 基因和 18S rRNA 基因 PCR 扩增效率曲线 将 *Ghrelin* 和 18S rRNA 基因 cDNA 以 10 倍浓度稀释后,分别进行实时荧光定量 PCR 扩增。得到不同浓度下 *Ghrelin* 和 18S rRNA 基因荧光定量 PCR 的扩增效率曲线(图 1)。两组标准曲线的回归系数分别为 $R^2(Ghrelin) = 0.995$ 、 $R^2(18S rRNA) = 0.998$ 。*Ghrelin* 和 18S rRNA 基因转录量的对数值(*x* 轴)和 *Ct* 值(*y* 轴)存在着反比例的关系,且扩增效率(*E*)接近等于 1($E = 100\%$),待测基因转录量的对数值与 *Ct* 值呈明显的线性关系,表明可以用荧光定量 PCR 方法检测 *Ghrelin* 基因的相对转录情况,并可以通过运用 $2^{-\Delta Ct}$ 公式进行目的基因相对转录量的计算。

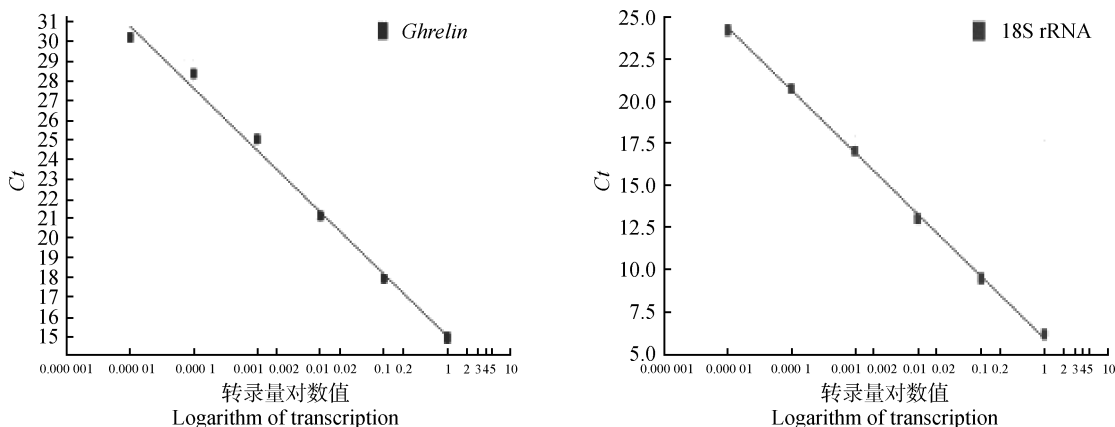


图 1 *Ghrelin* 和 18S rRNA 基因的扩增效率曲线

Fig. 1 The Real-time PCR amplification efficiency curve of *Ghrelin* and 18S rRNA genes

2.1.2 *Ghrelin* 相对转录量 Real-time PCR 检测结果经 Graphpad Prism 5 软件分析发现,*Ghrelin* 在驯鹿不同器官内均有转录且相对转录量差异显著(图 2),*Ghrelin* 在皱胃内的转录丰度显著高于其他器官($P < 0.05$),其次是胰、十二指肠、睾丸和食管,且与瘤胃、网胃、瓣胃、空肠、回肠、结肠、肝、甲状腺、垂体前叶、肺、脾、肾等器官内的转录量相比差异显著($P < 0.05$)。

2.2 *Ghrelin* 在驯鹿器官的分布

2.2.1 *Ghrelin* 在消化管内的分布 免疫组化结果显示,*Ghrelin* 免疫阳性细胞在消化管内广泛分布。在食管内 *Ghrelin* 免疫阳性细胞主要定位于黏膜层、黏膜下层和肌层(图 3A1),黏膜上皮角质层内分布较少(图 3A2、A2-1);在瘤胃、网胃、瓣胃内 *Ghrelin* 免疫阳性细胞主要分布于黏膜层和黏膜下层,但着色较浅,肌层未见阳性染色(图 3B1、B2~

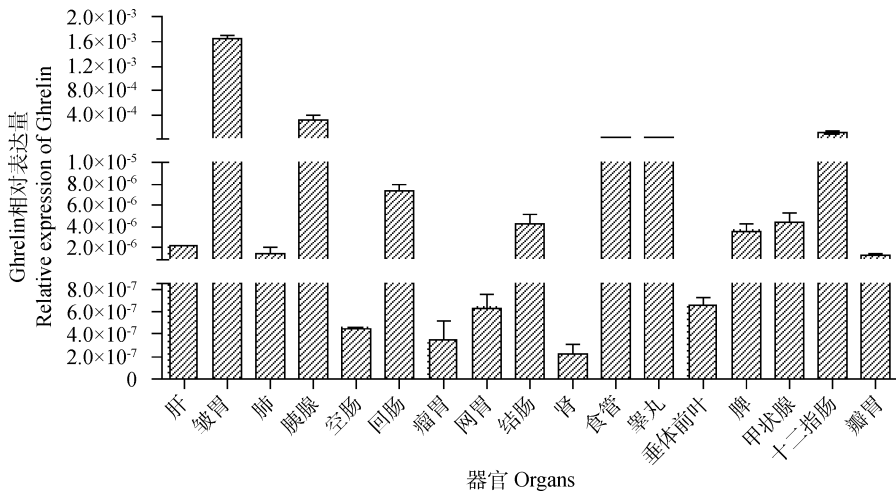


图 2 Ghrelin 的相对转录量

Fig. 2 Relative expression of Ghrelin

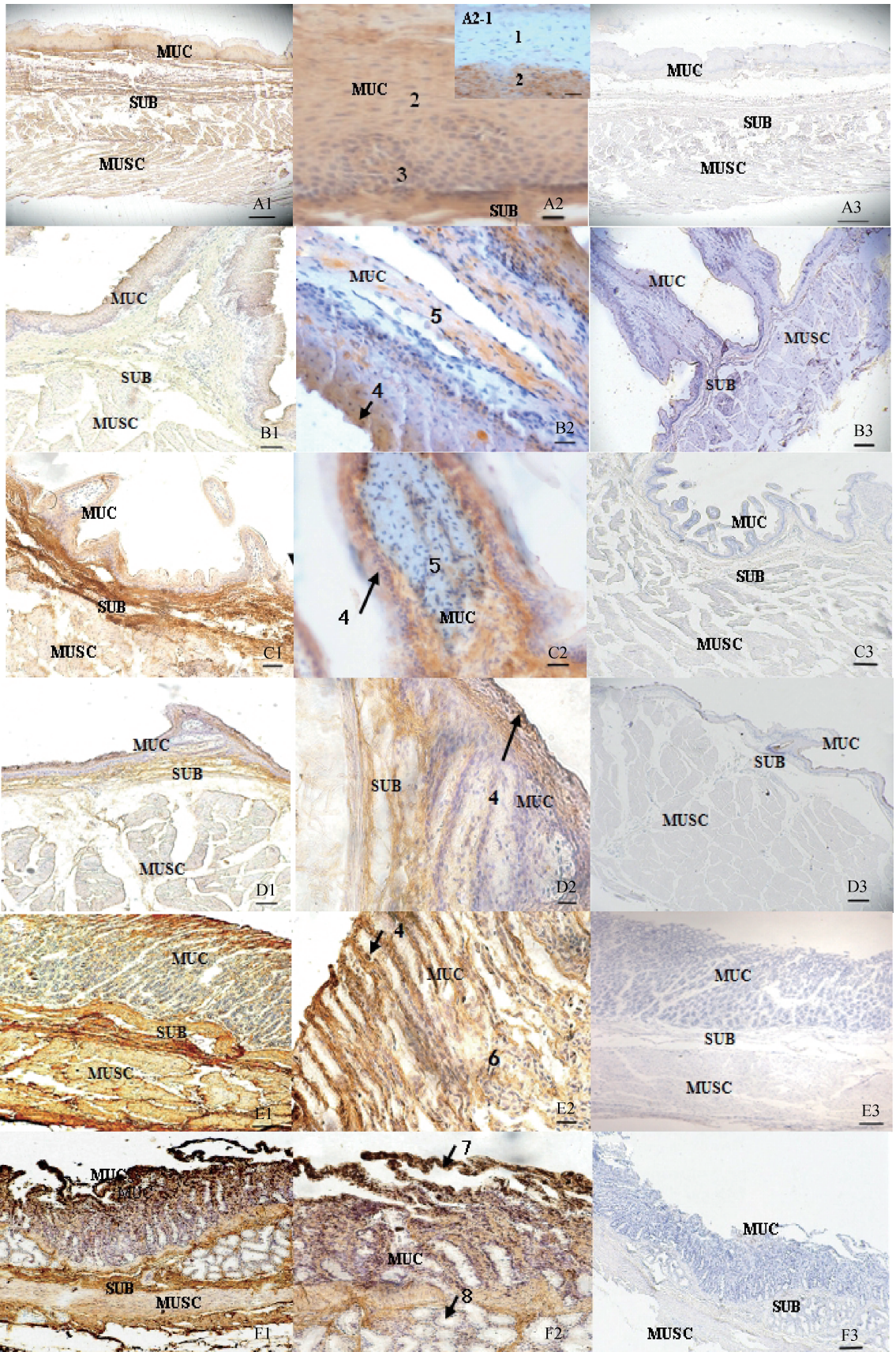
D1、D2)。在皱胃内, Ghrelin 免疫阳性细胞主要分布于黏膜层、黏膜下层和肌层(图 3E1), 且在黏膜上皮和胃底腺区的腺颈部着色较深、腺体部和腺底部着色较浅(图 3E2)。经免疫组化 DAB 染色发现, 在十二指肠、空肠、回肠和结肠均可见 Ghrelin 免疫阳性反应。在十二指肠内 Ghrelin 的阳性细胞大部分细胞质着色, 在黏膜层、黏膜下层和肌层均有分布(图 3F1), 其中肠绒毛上皮和黏膜下层着色较深, 十二指肠腺着色不明显(图 3F2); 空肠内的 Ghrelin 阳性细胞主要集中在肠绒毛上皮和黏膜下层(图 3G1), 固有层肠腺和肌层着色不明显(图 3G2); 回肠内阳性细胞主要分布于黏膜层和黏膜下层, 固有层肠腺着色不明显, 肌层的着色颗粒与十二指肠相比明显变淡(图 3H1、H2); 结肠着色细胞主要位于黏膜层和黏膜下层, 固有层肠腺着色不明显, 肌层未见阳性细胞(图 3I1、I2)。上述各阴性对照组均未发现阳性信号(图 3A3~I3)。

2.2.2 Ghrelin 在消化腺内的分布 经免疫组化 DAB 法染色后的肝切片, 阳性细胞呈棕黄色, 细胞质内颗粒清晰可见, 染成一片, 说明 Ghrelin 在驯鹿肝内有阳性细胞表达(图 4J1、J2)。阴性对照组未见到阳性染色(图 4J3)。胰腺切片经免疫组化 DAB 法染色后发现, 外分泌部和内分泌部均有 Ghrelin 表达(图 4K1)。在外分泌部染色深浅不均一, 说明 Ghrelin 的表达强弱不一致。内分泌部中均可见免疫阳性表达, 但周边着色较深, 呈深棕色, 中间的细胞着色较淡(图 4K2), 呈

淡棕黄色。阴性对照组未见到阳性反应物(图 4K3)。

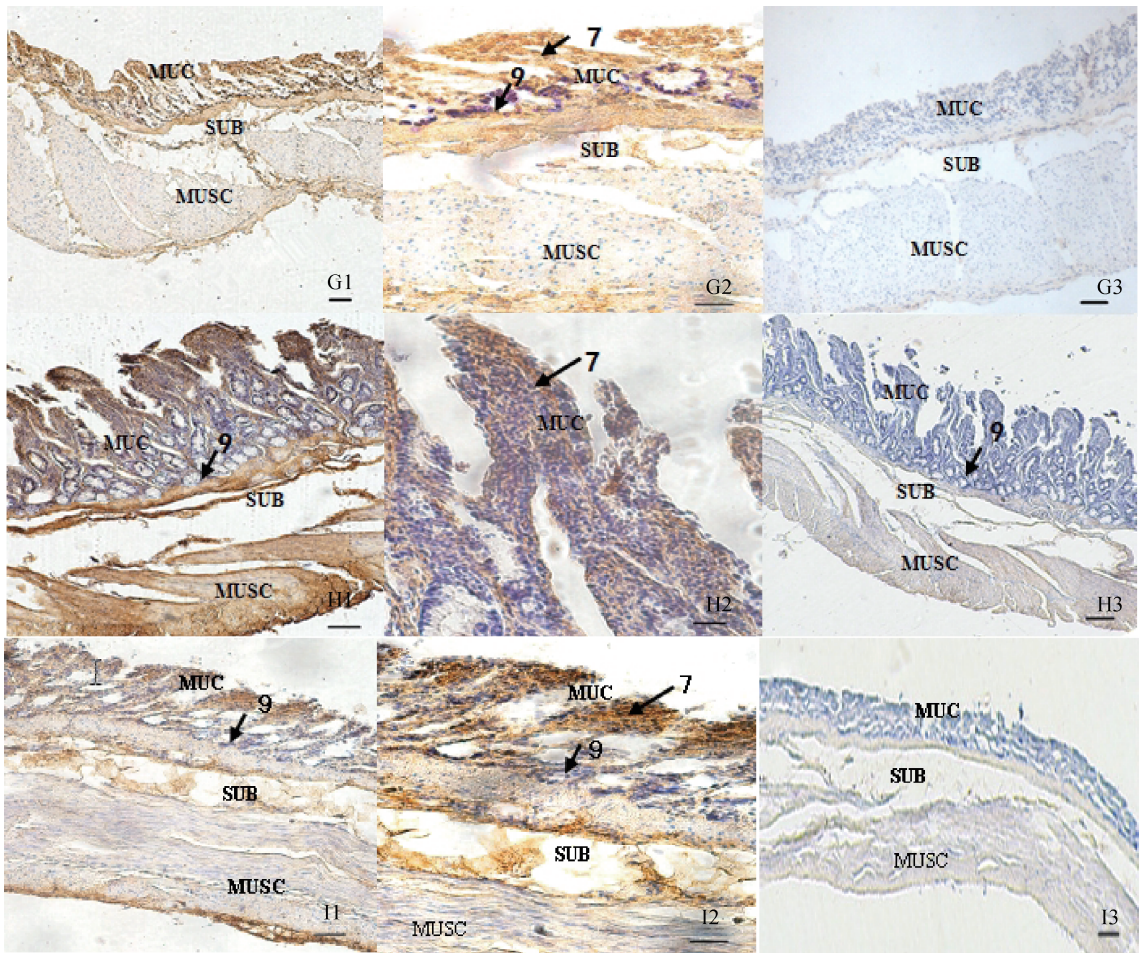
2.2.3 Ghrelin 在其他实质性器官内的分布

Ghrelin 在驯鹿的甲状腺、垂体前叶、睾丸、肺、肾、脾均有免疫阳性反应(图 5)。在甲状腺的滤泡旁细胞和滤泡上皮细胞内均可见阳性着色, 且染色深浅不一(图 5L1)。在滤泡旁细胞内可见细胞质着色较深, 细胞核为阴性, 滤泡上皮细胞内胞质有少量着色, 胶质着色不明显(图 5L2); 在垂体前叶的嗜酸性细胞、嗜碱性细胞和嫌色细胞内可见 Ghrelin 免疫反应, 阳性着色较深, 大部分为细胞质和细胞核周染色, 少量细胞核染色(图 5M1、M2); 睾丸内 Ghrelin 的免疫阳性细胞在间质区染色明显, 也存在于支持细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精原细胞内, 在精子内着色不明显(图 5N1、N2); Ghrelin 在肺内可见明显阳性染色, 肺内支气管上皮着色较深(图 5O1), 在高倍镜下可见肺泡细胞的细胞质和少量细胞核着色(图 5O2); 肾, Ghrelin 在肾小囊壁层的扁平上皮细胞和脏层的足细胞以及球旁复合体内着色明显, 近端小管和远端小管上皮细胞内阳性染色相对较浅, 且大部分为细胞质着色(图 5P2); Ghrelin 的免疫阳性细胞在脾的被膜、小梁、白髓和红髓内均有着色(图 5Q1), 其中白髓内淋巴小结染色较明显, 红髓内阳性表达主要位于巨噬细胞和网状细胞内, 细胞质着色明显(图 5Q2)。上述各阴性对照组均无阳性反应(图 5L3~Q3)。



(转下页 Carried forward)

(续图 3 Continued)



A. 食管; B. 瘤胃; C. 网胃; D. 瓣胃; E. 皱胃; F. 十二指肠; G. 空肠; H. 回肠; I. 结肠; A2-1 和 1. 角质层; 2. 颗粒层和棘层; 3. 基层; 4. 黏膜上皮; 5. 固有层; 6. 胃底腺; 7. 肠绒毛; 8. 十二指肠腺; 9. 肠腺; MUC. 黏膜层; SUB. 黏膜下层; MUSC. 肌层。A1、B1、C1、D1、E1、F1、G1、H1、I1. $\times 100$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$; A2、A2-1、B2、C2、D2、E2、F2、G2、H2、I2. $\times 400$, 标尺 = $20 \mu\text{m}$; A3、B3、C3、D3、E3、F3、G3、H3、I3. 阴性对照 $\times 100$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$

A. Oesophagus; B. Rumen; C. Reticulum; D. Omasum; E. Abomasum; F. Duodenum; G. Jejunum; H. Ileum; I. Colon; A2-1 and 1. Stratum corneum; 2. Stratum granulosum and stratum spinosum; 3. Stratum basale; 4. Epithelial; 5. Lamina propria; 6. Fundic gland; 7. Intestinal villus; 8. Duodenum glands; 9. Intestinal gland; MUC. Tunica mucosa; SUB. Tunica submucosa; MUSC. Tunica muscularis. A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1, I1. $\times 100$, bar = $100 \mu\text{m}$; A2, A2-1, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2, I2. $\times 400$, bar = $20 \mu\text{m}$; A3, B3, C3, D3, E3, F3, G3, H3, I3. Negative control, $\times 100$, bar = $100 \mu\text{m}$.

图 3 Ghrelin 在驯鹿食管和胃肠道的分布

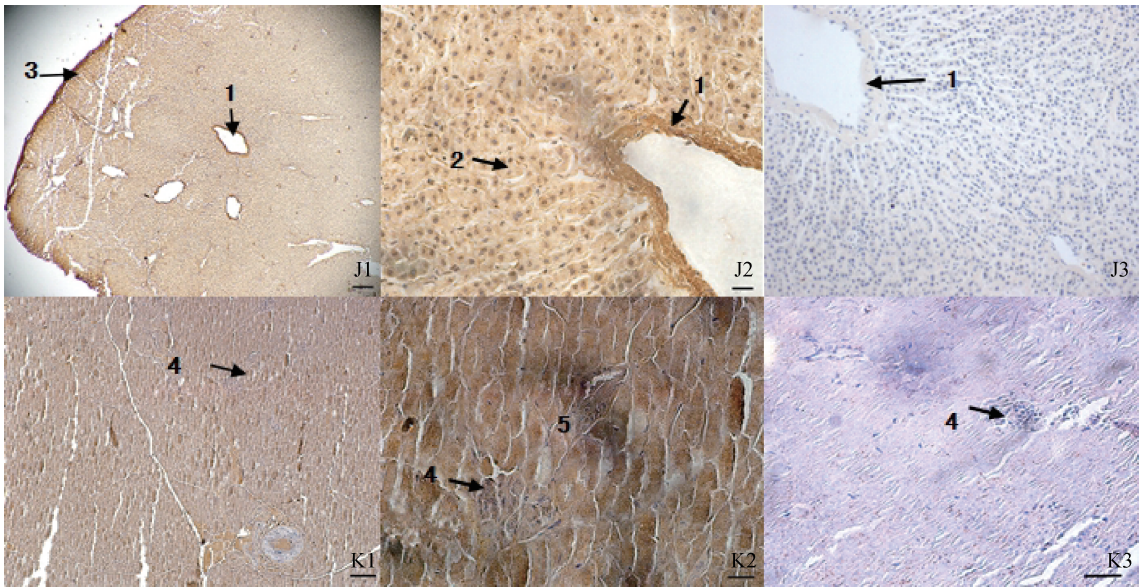
Fig. 3 The distribution in the oesophagus, stomach and intestine of Reindeer Ghrelin

3 讨论

3.1 Ghrelin 在驯鹿体内的表达

Ghrelin 是由日本学者 M. Kojima 等^[1]于 1999 年发现的一种含有 28 个氨基酸残基的多肽, 这 28 个氨基酸序列在鱼、爬行动物、两栖动物、鸟类和哺乳动物体内存在一定的保守性^[8], 且在人和鼠胃肠道、中枢神经系统均有分布^[9]。本试验采用 Real-time PCR 和免疫组织化学相结合的方法检测了 Ghrelin 在驯鹿体内的表达量及表达部位。

W. Wang 等^[10]通过检测 0~56 日龄羔羊胃肠道内 Ghrelin 的表达, 结果显示 Ghrelin 在皱胃内的表达量最远高于其他组织。与本试验得出的结果相一致, 因此笔者推测 Ghrelin 在反刍动物皱胃内表达量最高, 说明反刍动物在表达 Ghrelin 上可能存在种属特异性。本研究还发现 Ghrelin 在食管、肝、胰、肺、脾、肾、睾丸、垂体前叶、甲状腺等多种组织中也有广泛分布, 说明 Ghrelin 可能对动物的内分泌系统、呼吸系统、泌尿系统、生殖系统和免疫系统存在重要的调节作用。T. Lin 等^[11]研究发现 Ghrelin

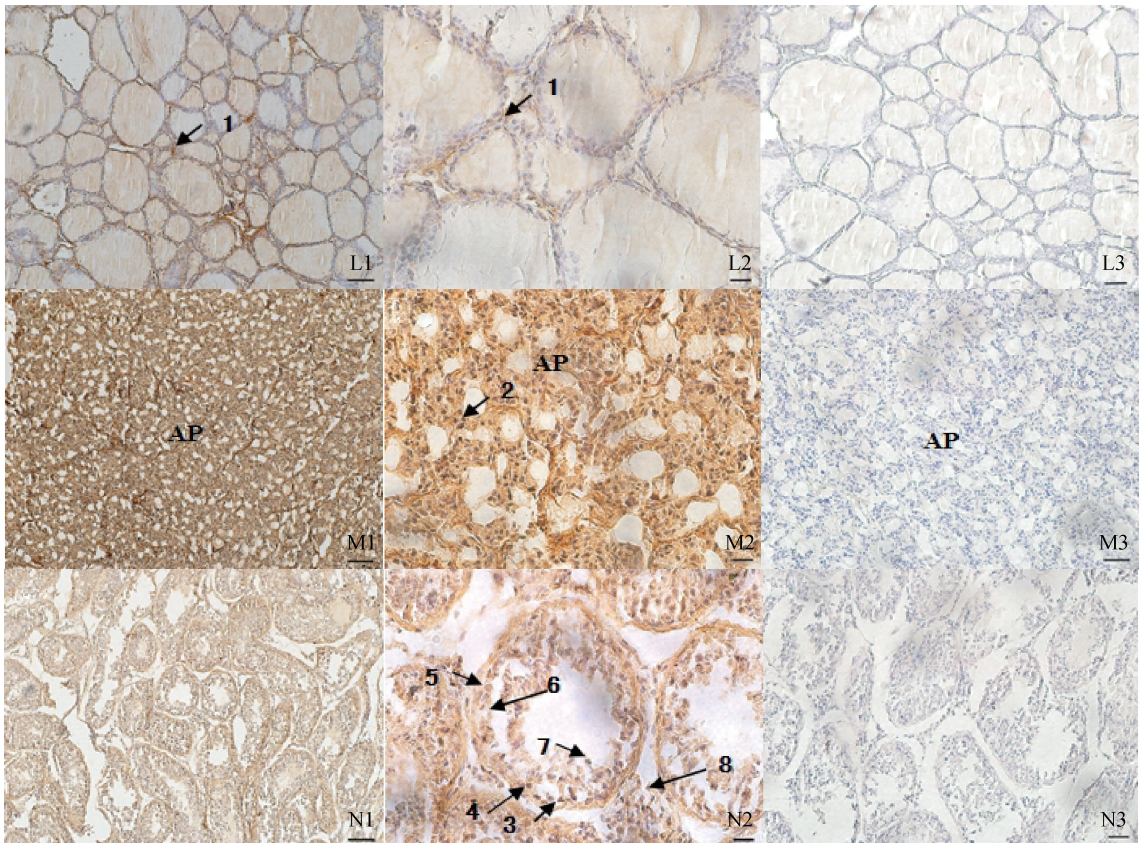


J. 肝; K. 胰腺; 1. 中央静脉; 2. 肝细胞; 3. 被膜; 4. 胰岛; 5. 外分泌部; J1、K1. $\times 100$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$; J2、K2. $\times 400$, 标尺 = $20 \mu\text{m}$; J3、K3. 阴性对照, $\times 100$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$

J. Liver; K. Pancreas; 1. Central vein; 2. Liver cell; 3. Liver capsule; 4. Pancreas islet; 5. Exocrine portion; J1, K1. $\times 100$, bar = $100 \mu\text{m}$; J2, K2. $\times 400$, bar = $20 \mu\text{m}$; J3, K3. Negative control, $\times 100$, bar = $100 \mu\text{m}$

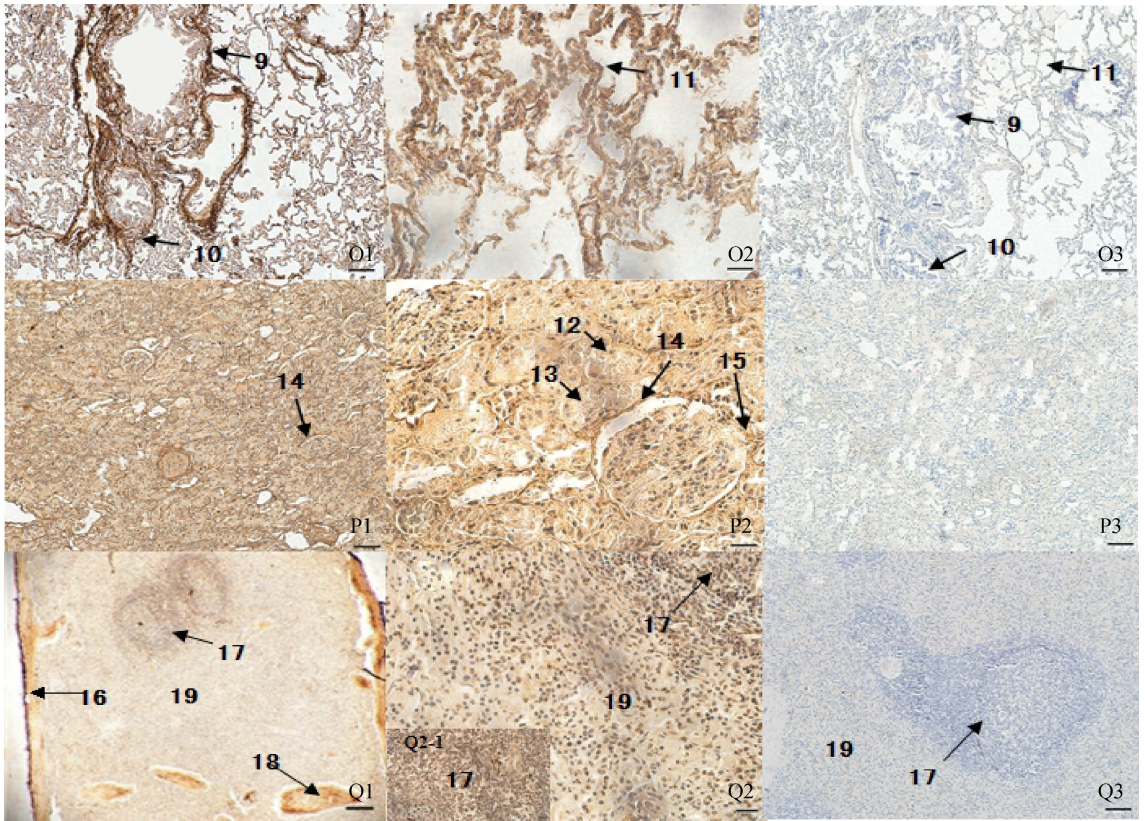
图 4 Ghrelin 在驯鹿肝和胰腺的分布

Fig. 4 The distribution in the liver and pancreas of Reindeer Ghrelin



(转下页 Carried forward)

(续图 5 Continued)



L. 甲状腺; M. 垂体前叶; N. 睾丸; O. 肺; P. 肾; Q. 脾; Q2-1. 白髓; 1. 滤泡胖细胞; 2. 垂体前叶内的免疫阳性细胞; 3. 支持细胞; 4. 精原细胞; 5. 初级精母细胞; 6. 次级精母细胞; 7. 精子细胞; 8. 间质细胞; 9. 支气管; 10. 细支气管; 11. 肺泡; 12. 近端小管; 13. 远端小管; 14. 肾小囊; 15. 球外系膜细胞; 16. 被膜; 17. 小梁; 18. 白髓; 19. 红髓。L1、M1、N1、O1、P1、Q1. $\times 100$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$; L2、M2、N2、O2、P2、Q2、Q2-1. $\times 400$, 标尺 = $20 \mu\text{m}$; L3、M3、N3、O3、P3、Q3. 阴性对照, $\times 100$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$

L. Thyroid gland; M. Anterior pituitary; N. Testis; O. Lung; P. Kidney; Q. Spleen; Q2-1. White puple; 1. Parafollicular cell; 2. AP section showing positive staining for ghrelin in most cells; 3. Sertoli cells; 4. Spermatogonia; 5. Primary spermatocyte; 6. Secondary spermatocyte; 7. Spermatid; 8. Interstitial cell; 9. Bronchus; 10. Bronchiole; 11. Alveolar; 12. Proximal tubule; 13. Distal tubule; 14. Renal capsule; 15. Extraglomerular mesangial cell; 16. Splenic capsule; 17. Spleen trabecula; 18. White puple; 19. Red puple; L1, M1, N1, O1, P1, Q1. $\times 100$, bar = $100 \mu\text{m}$; L2, M2, N2, O2, P2, Q2, Q2-1. $\times 400$, bar = $20 \mu\text{m}$; L3, M3, N3, O3, P3, Q3. Negative control, $\times 100$, bar = $100 \mu\text{m}$.

图 5 Ghrelin 在驯鹿甲状腺、垂体前叶、睾丸、肺、肾、脾的分布

Fig. 5 The distribution in the thyroid gland, hypophysis, testis, lung, kidney, spleen of Reindeer Ghrelin

在猪的胃和十二指肠内表达量最高,其次是胰,与本研究得出的胰内 Ghrelin 表达量高于十二指肠的结果又存在矛盾,但由于目前关于鹿属动物的报道仅有黑鹿^[12]的肝及胃肠道内 Ghrelin 蛋白定位的研究,而并未发现其他鹿种 Ghrelin 的表达及定位,所以现在很难断言是鹿属动物 Ghrelin 共有的特性,还是由于驯鹿 Ghrelin 发生了变异,这将有待于进一步研究证实。

3.2 Ghrelin 在驯鹿体内的分布

迄今为止, Ghrelin 免疫阳性细胞已被发现分布于多种动物的消化管中^[12-14]。本试验发现, Ghrelin

阳性细胞分布于驯鹿整个消化管的黏膜层,说明 Ghrelin 在不同物种间可能存在一定的保守性。本研究还发现,在食管、瘤胃、网胃、瓣胃、十二指肠、空肠、回肠和结肠的黏膜下层也分布较多,这与 Ghrelin 阳性细胞在皖西白鹅^[4]和大鼠^[15]胃肠道内的分布结果不一致,而与阳性细胞在济宁青山羊^[14]和黑鹿^[12]相一致,进一步说明反刍动物在表达 Ghrelin 上可能存在种属特异性。研究发现 Ghrelin 免疫阳性细胞在瘤胃、网胃、瓣胃和结肠的肌层内未见免疫阳性表达,而在食管、皱胃和十二指肠可以看见明显的阳性染色,空肠和回肠内染色明显减少。Ghrelin

免疫阳性细胞在消化管肌层内的广泛表达,提示 Ghrelin 可能对食管和胃肠道的运动具有调节作用。

近年来,研究者发现在淡水鳙^[16]和皖西白鹅^[4]的肝中均可检测到 Ghrelin 阳性表达。本研究同样发现 Ghrelin 免疫阳性细胞在驯鹿肝内有棕黄色阳性染色。目前,不同的研究者关于 Ghrelin 在不同物种肝中的分布情况及 Ghrelin 对肝功能的影响结果还存在差异,因此有必要进一步研究。据报道,大鼠胰岛的 A 细胞和 B 细胞存在生长激素促分泌素受体(GHSR),A 细胞能合成和分泌 Ghrelin,并通过自分泌或旁分泌的方式作用于 A 细胞本身;此外,Ghrelin 可能通过和 GHSR 的相互作用,调节 B 细胞胰岛素的分泌^[17]。本试验结果显示,在驯鹿胰腺的外分泌部和内分泌部都检测到 Ghrelin 阳性表达,且在内分泌部外周的染色较中央区域强,提示 Ghrelin 在驯鹿体内可能同样存在调节胰岛素分泌的作用。

Ghrelin 在垂体上的功能主要是促进 GH 的释放,本研究发现 Ghrelin 在垂体前叶的部分嗜酸性细胞和嗜碱性细胞均有分布,由此推测 Ghrelin 在垂体可能通过旁分泌/自分泌形式发挥作用。魏凤梅等^[13]研究显示,Ghrelin 免疫阳性细胞在鸡脾的巨噬细胞和网状细胞、肾小囊壁层的扁平上皮细胞和脏层的足细胞、球内系膜细胞、球旁复合体和肺的巨噬细胞内均呈免疫阳性反应,与本试验得出的 Ghrelin 在驯鹿睾丸、肺、肾、甲状腺和脾的定位结果基本一致。Ghrelin 可剂量依赖性的抑制 hCG 以及 cAMP 诱导睾丸分泌睾酮,并调节体内的睾丸间质细胞的增殖和睾丸基因的表达,在 hCG 诱导的睾酮分泌中,Ghrelin 的抑制作用可能与其抑制睾酮合成相关酶(如 StAR 蛋白、P450、HSD、17 β 2HSDIII)的表达有关^[19]。本研究发现 Ghrelin 免疫阳性细胞在驯鹿睾丸的间质区、支持细胞和生殖细胞均有分布,提示 Ghrelin 可能直接调控睾丸的生物学功能。

4 结 论

Real-time PCR 和免疫组化结果显示,Ghrelin 免疫阳性细胞的分布与 Ghrelin mRNA 的表达在驯鹿体内是一致的,即 Ghrelin 在驯鹿的消化系统、内分泌系统、呼吸系统、泌尿系统、生殖系统和免疫系统内均有表达,且在消化系统内的表达最为广泛。

参考文献 (References):

[1] KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, et al. Ghrelin

is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. *Nature*, 1999, 402 (6762): 656-660.

[2] 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(10): 4753-4758.

[3] GNANAPAVAN S, KOLA B, BUSTIN S A, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(6): 2988.

[4] 李福宝, 方富贵, 李梅清, 等. Ghrelin 在成年皖西白鹅小肠内的免疫组化定位研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(2): 206-208.

LI F B, FANG F G, LI M Q, et al. Immunohistochemical localization of Ghrelin in the small intestine of adult Wanxi white goose[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(2): 206-208. (in Chinese)

[5] 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, 3: 60.

[6] 杨银凤, 余兴邦, 王冠玉, 等. 中国驯鹿生长素(Ghrelin)全长 cDNA 的克隆及序列分析[J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(10): 1647-1652.

YANG Y F, YU X B, WANG G Y, et al. Cloning and analysis of the full-length cDNA of China reindeer Ghrelin[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(10): 1647-1652. (in Chinese)

[7] SHAO Y J, LIU S Q, TANG X Y, et al. Ontogeny of ghrelin mRNA expression and identification of ghrelin-immunopositive cells in the gastrointestinal tract of the Peking duck, *Anas platyrhynchos* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 166(1): 12-18.

[8] KAIYA H, MIYAZATO M, KANGAWA K, et al. Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2008, 149(2): 109-128.

[9] 曹贵方, 吕东媛, 白春玲, 等. 一种新的脑肠肽激素-Ghrelin[J]. *畜牧与饲料科学*, 2004(6): 64-66.

CAO G F, LV D Y, BAI C L, et al. A new brain-gut peptide hormone-Ghrelin [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2004(6): 64-66. (in Chinese)

[10] WANG W, CHENG L, GUO J, et al. Expression of Ghrelin in gastrointestinal tract and the effect of early weaning on Ghrelin expression in lambs[J]. *Mol Biol*

- Rep*, 2014, 41(2): 909-914.
- [11] LIN T, MENG Q, SUI D, et al. Molecular cloning and expression analysis of porcine ghrelin O-acyl-transferase[J]. *Biochem Genet*, 2011, 49(9-10): 576-586.
- [12] 蒋书东, 戴书俊, 方富贵, 等. 黑鹿肝、小肠和大肠的组织学结构及 Ghrelin 的分布[J]. *动物学杂志*, 2012, 47(1): 36-43.
- JIANG S D, DAI S J, FANG F G, et al. Histological structure and distribution of Ghrelin in liver, small intestine and large intestine of *Muntiacus crinifrons* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2012, 47(1): 36-43. (in Chinese)
- [13] 魏凤梅, 李玉谷, 叶远兰, 等. Ghrelin 免疫反应阳性细胞在鸡外周器官中的定位分布与发育性变化[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(3): 341-346.
- WEI F M, LI Y G, YE Y L, et al. Localization and development of Ghrelin-immunopositive cells in periphery organs of broiler chickens[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(3): 341-346. (in Chinese)
- [14] 张德敏. 济宁青山羊胃肠道 Ghrelin 免疫阳性细胞与小肠组织结构的发育性变化[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- ZHANG D M. Developmental changes of Ghrelin-immunopositive cells in the gastrointestinal tract and morphological structure of small intestine in Jining gray goat[D]. Tai'an: Shandong Agricultural College, 2012. (in Chinese)
- [15] 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.
- [16] NIEMINEN P, MUSTONEN A M, HYVÄRINEN H. Fasting reduces plasma leptin- and ghrelin-immunoreactive peptide concentrations of the burbot (*Lota lota*) at 2°C but not at 10°C [J]. *Zoolog Sci*, 2003, 20(9): 1109-1115.
- [17] KAGEYAMA H, FUNAHASHI H, HIRAYAMA M, et al. Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas [J]. *Regul Pept*, 2005, 126(1-2): 67-71.
- [18] TOLLE V, ZIZZARI P, TOMASETTO C, et al. *In vivo* and *in vitro* effects of Ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat [J]. *Neuroendocrinology*, 2001, 73(1): 54-61.
- [19] 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]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(1): 400-409.

(编辑 白永平)