

GnIH 在陆川仔公猪消化系统及气管的分布定位

王晓晔¹ 霍孔林¹ 肖 凯¹ 郭庚霖¹ 李 珣^{1,2}

1. 广西大学动物科学技术学院, 南宁 530004; 2. 广西理工科学实验中心, 南宁 530004

摘要 为探究 GnIH 在猪消化系统和呼吸系统的分布定位,应用免疫组化和半定量 RT-PCR 技术,对 30 日龄健康陆川仔公猪的消化及呼吸系统进行 GnIH 定位研究。免疫组化试验结果显示:在陆川猪消化系统和呼吸系统中,幽门圆枕、十二指肠、回肠、结肠、肝、食管、丝状乳头、颌下腺及气管均有 GnIH 免疫阳性细胞分布,但胞体的形态和大小不一。半定量 RT-PCR 试验结果显示:结肠、颌下腺有中等丰度的表达,幽门圆枕、丝状乳头、回肠有低丰度的表达,无 GnIH mRNA 表达的组织有食管、十二指肠、肝和气管。

关键词 促性腺激素抑制激素; 仔公猪; 免疫组化; 半定量 RT-PCR; 分布定位; 消化系统; 气管

中图分类号 S 828 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)03-0089-05

促性腺激素抑制激素(gonadotropin-inhibitory hormone, GnIH)于 2000 年被日本科学家 Tsut-sui^[1]发现。人们对 GnIH 的研究在研究初期主要集中在脑部^[2-4],但在后来发现 GnIH 还具有摄食、内分泌、应激等广泛的生物学作用^[5-7]。陆川猪是中国八大家猪之一,具有母性好、繁殖力高、抗逆性强、肉味鲜、遗传力稳定等优点。在推广陆川猪的人工养殖时,所遇到的关键问题是如何改善消化吸收效率、提高生长速度。目前 GnIH 在猪消化系统和呼吸系统的研究报道相对较少。因此,对 GnIH 在陆川猪消化和呼吸系统进行定位研究,可为 GnIH 影响摄食行为和参与营养与消化等生理功能提供基础资料和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试动物为 10 kg 左右的 30 日龄健康陆川仔公猪共 6 头。其中用于免疫组织化学试验的 3 头陆川仔公猪活体麻醉后剖开胸腔,小心剪开右心耳,经由循环系统全身灌注生理盐水,直至流出清亮液体后马上换用预备好的 4%多聚甲醛溶液,灌注至全身肌肉僵硬。取下列消化道各段及呼吸道:食管、幽门圆枕、十二指肠、结肠、回肠、肝、下颌腺、丝状乳

头、气管。在同一固定液中固定 24 h 后流水缓慢冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片厚 5 μm ,贴附于经多聚赖氨酸处理过的玻片上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜干燥后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。另外 3 头陆川仔公猪则用于半定量 RT-PCR,直接经颈动脉放血处死,马上取与免疫组化相同的组织放入液氮中速冻,然后转入-70 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

1.2 主要仪器和试剂

即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(羊抗兔)和 DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);兔抗猪 GnIH 抗体为笔者所在实验室自备抗体;Trizol、反转录试剂盒、Golden View 核酸染料和 DL2000DNA Marker(南京诺唯赞生物科技有限公司);琼脂糖(南京生兴生物技术有限公司)。

RM2235 轮转式切片机(Leica 公司);Nikon E-CLipse Ti 倒置显微镜(Nikon 公司);T100 型梯度 PCR 仪(美国伯乐公司);Sigma 3K15 离心机(德国 Sartorius Sigma 公司);通用型电泳仪-JY1600C;Tanon-1600 凝胶成像系统(上海天能公司);DK-S24 电热恒温水浴锅(上海精宏公司产品);DNP-9082 电热恒温培养箱(宁波江南仪器厂)。

1.3 免疫组化步骤

常规石蜡切片脱蜡。(1)用 3% H_2O_2 孵育 30

收稿日期: 2015-10-09
基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31502079); 广西自然科学基金青年基金项目(2015GXNSFBA139077, 2015GXNSFBA139067); “大学生创新创业训练计划”国家级创新训练项目(20151059309); “大学生创新创业训练计划”省级创新训练项目(201510593118); 广西理工科学实验中心项目(KTYX2014007)
王晓晔, 博士, 讲师, 研究方向: 动物神经内分泌、病毒与宿主相互作用. E-mail: wangxiaoye161@163.com
通信作者: 李 珣, 博士, 讲师, 研究方向: 动物神经内分泌. E-mail: lixun198@163.com

min,以消除内源性过氧化物酶活性;(2)用 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液在微波环境中进行抗原热修复 20 min,蒸馏水洗涤 3 次;(3)滴加正常兔血清于 37 ℃封闭 20 min 以封闭非特异性反应位点;(4)滴加 GnIH(工作浓度 1 : 200)一抗于 4 ℃过夜,37 ℃复温 1 h,PBS 洗涤 5 min×3 次;(5)滴加二抗(生物素化兔抗山羊 IgG)于 37 ℃孵育 20 min,PBS 洗涤 5 min×3 次;(6)滴加 SABC 于 37 ℃作用 20 min,PBS 洗涤 5 min×3 次;(7)于室温滴加 DAB 显色,约 5 min;(8)蒸馏水终止反应,经苏木精复染 10 s,封片。空白对照以 PBS 代替第一抗体,其他步骤不变。判定阳性的标准为背景清晰且细胞呈棕褐色-棕黄色颗粒。

1.4 半定量 RT-PCR 步骤

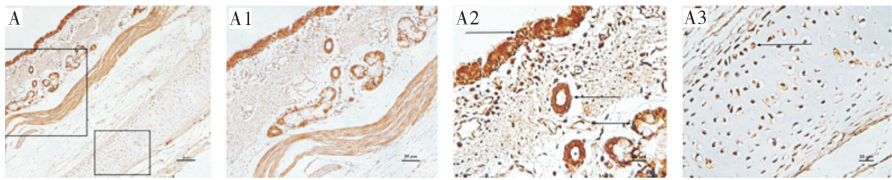
(1)提取按照 Trizol 试剂的说明书在无 RNA 酶的环境下进行;(2)所得 RNA 在无 RNA 酶的环境下按一步法进行反转录,按照 vazyme 反转录试剂盒说明书反转录获得 cDNA。采用的反应体系为 20 μL,于 RT 体系加入 7 μL 总 RNA、10 μL 2×RT Mix、1 μL Oligo dT18、2 μL HiScript,混匀后置于 50 ℃水浴 45 min,反转录产物于-20 ℃保存备用;(3)本试验以 GAPDH 为内源性参照基因,检测猪 GnIH mRNA 在陆川猪不同组织的表达水平。以

上述反转录所得 cDNA 为模板,取各待测样品 cDNA 等量混合。所用引物参照汪瑶等^[8],引物 GAPDH 和 GnIH 序列如下:GAPDH-1:5'-AGG TCG GAG TGA ACG GAT TTG-3';GAPDH-2:5'-CAG TCT TCT GGG TGG CAG TGA T-3';PCR 产物大小为 549 bp;GnIH-1:5'-TAA CAT CCA ACA TCT TTT GTA CAG-3';GnIH-2:5'-CGG GTG ATG GAG TAA AGT AAC-3';PCR 产物大小为 442 bp。置于 PCR 仪中,94 ℃变性 5 min;94 ℃变性 30 s;退火 30 s(GAPDH:57 ℃;GnIH:56 ℃);72 ℃延伸 30 s;适当循环圈数(GAPDH:42 圈,GnIH:48 圈);72 ℃延伸 10 min;(4)用凝胶电泳的方法,取 10 μL RT-PCR 产物在紫外检测仪上拍照分析观察结果。

2 结果与分析

2.1 GnIH 免疫阳性细胞在气管的分布

在气管中,GnIH 免疫阳性细胞分布于气管(图 1A)的黏膜层、黏膜下层和外层。其中假复层纤毛柱状上皮和气管腺(图 1A2)呈强烈的 GnIH 免疫阳性反应,且阳性细胞排列紧密,中等程度 GnIH 免疫阳性细胞分布于固有层、肌层及透明软骨(图 1A1)。



比例尺 Scale bar: A=100 μm; A1=50 μm; A2、A3=20 μm

图 1 GnIH 免疫阳性细胞在气管的分布定位

Fig.1 Distribution of GnIH in the trachea

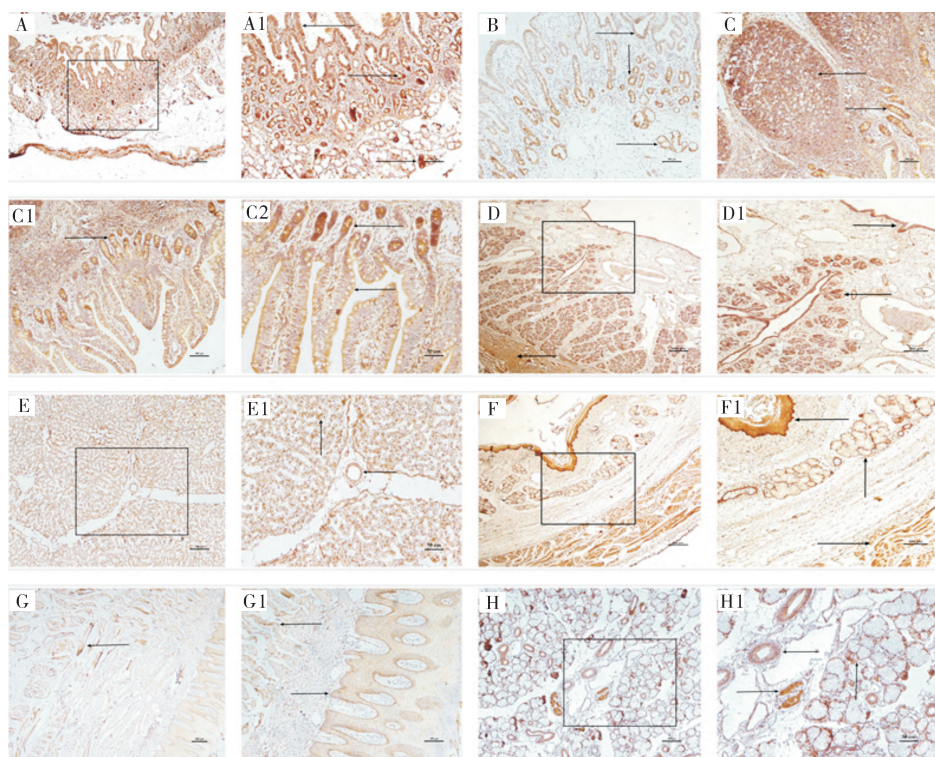
2.2 GnIH 免疫阳性细胞在消化系统的分布

在消化系统中,幽门圆枕、十二指肠、回肠、结肠、肝、食管、丝状乳头、颌下腺均有不同程度的 GnIH 免疫阳性反应。在胃幽门部,单层柱状上皮(图 2A1)、幽门腺、黏膜下层、肌层(图 2A)均有较强 GnIH 免疫阳性反应;在十二指肠(图 2B),单层柱状黏膜上皮、十二指肠腺呈中等强度的 GnIH 免疫阳性反应;在回肠,集合淋巴小结(图 2C)、小肠腺(图 2C1)和小肠绒毛(图 2C2)均有不同程度的 GnIH 免疫阳性反应,其中以小肠腺最强;在结肠后段,肌层(图 2D)、黏膜层及淋巴小结有 GnIH 免疫强阳性反应(图 2D1);在肝(图 2E),所有肝小叶均

呈弱 GnIH 免疫阳性反应;在食管,复层扁平上皮(图 2F)、食管腺及肌层(图 2F1)均有较强的 GnIH 免疫阳性反应;GnIH 在丝状乳头 GnIH 免疫阳性反应相对较弱,主要分布于肌层和结缔组织乳头(图 2G1)处;在颌下腺,GnIH 免疫阳性细胞主要分布于黏液腺泡和纹管(图 2H1)。

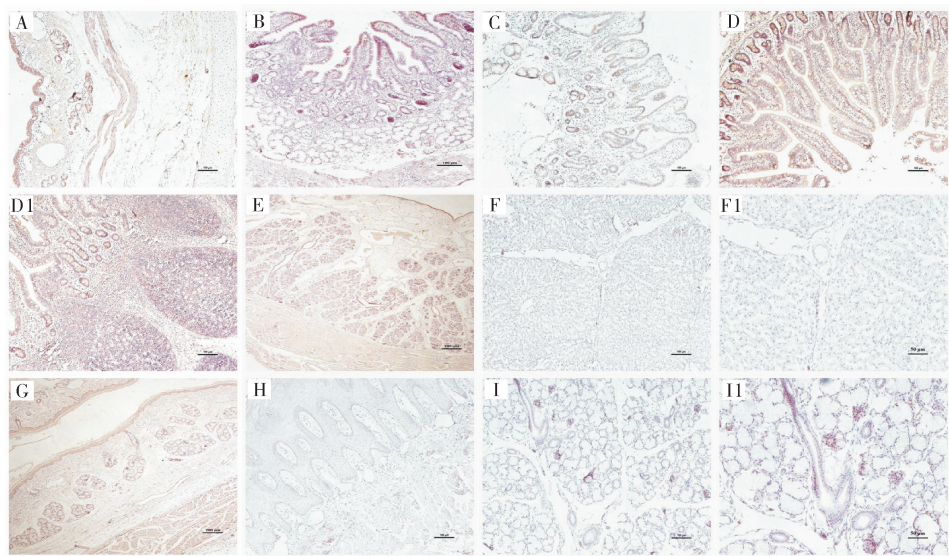
2.3 GnIH mRNA 表达情况

在消化系统和呼吸系统中,部分组织有中低强度的 GnIH mRNA 的表达。结肠、颌下腺有中等丰度的表达,幽门圆枕、丝状乳头、回肠有低丰度的表达,无 GnIH mRNA 表达的组织有食管、十二指肠、肝和气管。



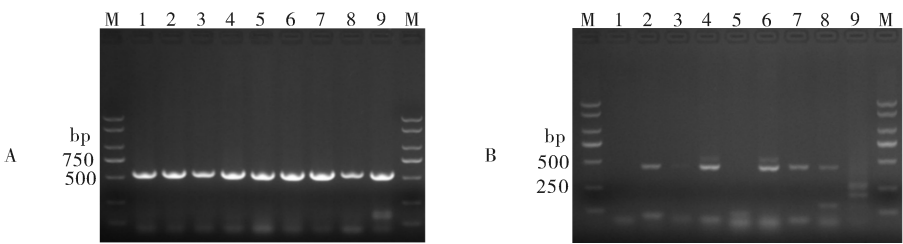
A-A1:幽门圆枕；B:十二指肠；C-C2:回肠；D-D1:结肠后段；E-E1:肝；F-F1:食管；G-G1:丝状乳头；H-H1:颌下腺。A-A1: Torus pyloricus; B: Duodenum; C-C2: Ileum; D-D1: Colon; E-E1: Liver; F-F1: Oesophagus superior segment; G-G1: Filiform papillae; H-H1: Submandibular gland . 比例尺 Scale bar: A, D, F, G=200 μm ; A1, B, C, C1, D1, E, F1, G1, H=100 μm ; C2, E1, H1=50 μm .

图 2 GnIH 免疫阳性细胞在消化系统的分布定位
Fig.2 Distribution of GnIH in the digestion system



A:气管；B:幽门圆枕；C:十二指肠；D-D1:回肠；E:结肠后段；F-F1:肝；G:食管；H:丝状乳头；I-II:颌下腺。A: Trachea; B: Torus pyloricus; C: Duodenum; D-D1: Ileum; E: Colon; F-F1: Liver; G: Oesophagus superior segment; H: Filiform papillae; I-II: Submandibular gland; 比例尺 Scale bar: E, G=200 μm ; A, B, C, D, D1, F, H, I=100 μm ; F1, I1=50 μm .

图 3 GnIH 阴性对照组
Fig.3 Negative controls



A: GAPDH 半定量 RT-PCR 电泳图; B: GnIH mRNA 半定量 RT-PCR 电泳图。1: 食管; 2: 幽门圆枕; 3: 十二指肠; 4: 结肠; 5: 肝; 6: 颌下腺; 7: 丝状乳头; 8: 回肠; 9: 气管。A: Semi-quantitative RT-PCR electrophoretogram of GAPDH; B: Semi-quantitative RT-PCR electrophoretogram of GnIH. 1: Oesophagus superior segment; 2: Torus pyloricus; 3: Duodenum; 4: Colon; 5: Liver; 6: Sub-mandibular gland; 7: Filiform papillae; 8: Ileum; 9: Trachea.

图 4 GAPDH 和 GnIH 的凝胶电泳

Fig.4 Gel electropherogram of the pig GAPDH and GnIH

3 讨 论

Tsutsui 等^[1]于 2000 年在鹌鹑的下丘脑内分离得到一种能够抑制垂体前叶促性腺激素释放的神经肽,这一激素也因此被命名为促性腺激素抑制激素(gonadotropin- inhibitory hormone, GnIH)。后来的研究表明, GnIH 的生理功能并不局限于生殖,还具有摄食、内分泌及应激等多种生理功能^[5-7],有关 GnIH 的生理功能,分子结构及其调控机制成为了新近内分泌学的热点之一。经过众多研究人员的努力,已证实禽类、鸟类、哺乳动物、鱼类及两栖类动物均有 GnIH 的存在^[1-2,9-11],且该激素在各物种间参与多种生理功能的调控。汪瑶等^[8]在半定量 RT-PCR 研究中发现,肠有极低丰度的 GnIH mRNA 表达,胃无表达。本试验采用免疫组化和半定量 RT-PCR 的方法研究 GnIH 在消化系统(食管、幽门圆枕、十二指肠、结肠、肝、颌下腺、丝状乳头、回肠)和呼吸系统(气管)的定位,发现 GnIH 免疫阳性在猪消化系统和呼吸系统的分布表达范围比 GnIH mRNA 分布广泛,如在食管、十二指肠、肝和气管检测到 GnIH 免疫阳性细胞,但未检测到 GnIH mRNA 的表达,也有可能是由于个别组织器官中 mRNA 表达与蛋白水平并非完全一致。

在呼吸系统中,气管黏膜各层均发现有 GnIH 免疫阳性细胞,黏膜上皮的 GnIH 免疫阳性细胞排列整齐且与气管腔相通但无基部细胞突起,从形态学上提示这种细胞具有直接将激素释放到气管腔或者具有感受功能,在黏膜下层的气管腺上有较强的 GnIH 免疫阳性反应则提示对其自身的分泌率有调节作用。此外,在气管的透明软骨处有中等 GnIH 免疫阳性反应,可认为 GnIH 对气管的骨生长或者

气管的形态固定具有一定的生理作用。

在消化系统,胃幽门部的单层柱状上皮和幽门腺有 GnIH 免疫阳性反应,免疫阳性反应均匀环绕在上皮细胞外周,与胃腔直接相接,提示了 GnIH 对分泌肠胃激素和控制分泌有调节作用,在固有层的幽门腺未见有细胞突起,提示其具有内分泌调节作用;在十二指肠,单层柱状黏膜上皮、十二指肠腺呈中等强度的 GnIH 免疫阳性反应,同样提示了 GnIH 对分泌某种肠激素和控制分泌有调节作用;在回肠,集合淋巴小结、小肠腺和小肠绒毛均有不同程度的 GnIH 免疫阳性反应,其中我们发现以小肠腺最强,且有些小肠腺上 GnIH 免疫阳性细胞的胞突伸向了肠腔,提示 GnIH 参与回肠肠黏液分泌并起到了调节分泌的作用,在回肠的集合淋巴小结处有较强的 GnIH 免疫阳性反应则提示 GnIH 同时也参与了免疫生理过程;在结肠后段、黏膜层及淋巴小结有 GnIH 免疫强阳性反应,同样提示 GnIH 参与回肠肠黏液分泌的同时还参与了免疫生理过程;在食管,复层扁平上皮、食管腺均有较强的 GnIH 免疫阳性反应,提示 GnIH 有可能参与分泌消化液及调节黏液内分泌的生理过程;在以上的组织器官中,发现呼吸道和胃肠道各段的肌层及黏膜层均有不同程度的 GnIH 免疫阳性反应,提示其可能与气管的呼吸运动和肠胃推动性蠕动和激素分泌的功能有关,在调节并为机体内外环境统一和稳定等复杂的生理活动中发挥重要的作用。

肝作为一个非常重要的物质代谢器官,参与多种物质的合成、储存、代谢和转化,本试验结果显示所有的肝小叶均呈中等强度的 GnIH 免疫阳性反应,提示其可能参与肝功能代谢并起到了某种生理作用;在颌下腺,黏液腺泡处显示较强的 GnIH 免疫

阳性反应,提示其参与黏液分泌调节的生理过程;在丝状乳头,结缔组织乳头及肌层的 GnIH 免疫阳性反应则提示参与了舌头的运动和感受等生理功能。

综上所述,本研究仅是为猪的消化系统和呼吸系统中 GnIH 免疫阳性细胞和 GnIH mRNA 的分布定位及其可能的功能提供形态学资料,至于这些细胞确凿的生理调控机制有待深入的研究。

参 考 文 献

[1] TSUTSUI K,SAIGO H E,UKENA K,et al.A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release [J]. Biochem Biophys Res Commun,2000,275(2): 661-667.

[2] UKENA K,UBUKA T,TSUTSUI K.Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain [J]. Cell Tissue Res,2003,312(1):73-79.

[3] UBUKA T,UENO M,UKENA K,et al.Developmental changes in gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*) hypothalamo-hypophysial system [J]. J Endocrinol,2003,178(2):311-318.

[4] JOHNSON M A,TSUTSUI K,FRALEY G S.Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion,inhibits LH secretion,and has variable effects on sex behavior in the adult male

rat [J].Horm Behav,2007,51(1):171-180.

[5] 雷治海,李月.促性腺激素抑制激素的研究进展[J].畜牧与兽医,2008,40(9):96-99.

[6] CLARKE I J,QI Y,PUSPITA S I,et al.Evidence that RFamide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals [J].Frontiers in neuroendocrinology,2009,30(3):371-378.

[7] TSUTSUI K.A new key neurohormone controlling reproduction,gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): biosynthesis, mode of action and functional significance[J].Progress in neurobiology,2009,88(1):76-88.

[8] 汪瑶,李珣,李敏婕,等.GnIH 对母猪生殖调控的研究 [J].中国农业科学,2014,47(18):3716-3724.

[9] OSUGI T,UKENA K,BENTLEY G E,et al.Gonadotropin-inhibitory hormone in Gambel's white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*): cDNA identification, transcript localization and functional effects in laboratory and field experiments [J].J Endocrinol,2004,182(1):33-42.

[10] CLARKE I J,SARI I P,QI Y,et al.Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion [J].Endocrinology,2008,149(11):5811-5821.

[11] ZHANG Y,LI S,LIU Y,et al.Structural diversity of the GnIH/GnIH receptor system in teleost:its involvement in early development and the negative control of LH release [J].Peptides,2010,31(6):1034-1043.

Distribution and expression of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) indigestion system and trachea of Luchuan male piglets

WANG Xiaoye¹ HUO Konglin¹ XIAO Kai¹ GUO Genglin¹ LI Xun^{1,2}

1.College of Animal Science and Technology,Guangxi University,Nanning 530004,China;
2.Guangxi Experiment Centre of Science and Technology,Nanning 530004,China

Abstract Immuhischemistry (IHC) and semi-quantitative RT-PCR were used to study the distribution and expression of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in the digestion and respiratory system of 30-day-old Luchuan male piglets in this research.The IHC results showed that the GnIH immune positive cells distributed in both digestion and respiratory system,such as torus pyloricus,duodenum,ileum,colon,liver,esophagus,filiform papillae,submandibular gland and trachea,but the GnIH-ir cell morphology and sizes were diverse.The results of semi-quantitative RT-PCR suggested that the GnIH mRNA was moderately expressed in the colon and submandibular gland,lowly expressed in the torus pyloricus,filiform papillae and ileum,and not expressed in the other organs.

Keywords GnIH; male piglets; IHC; semi-quantitative RT-PCR;distribution and expression; digestion system;trachea

(责任编辑:边书京)