

# 绵羊卵泡内 Ghrelin 的免疫组化定位

杜晨光, 曹贵方

(内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:**为探索 Ghrelin 在绵羊各级卵泡的存在和分布, 采用免疫组织化学技术研究了 Ghrelin 多肽在绵羊 卵泡中的分布情况。结果表明, 初级卵泡、早期生长卵泡和晚期生长卵泡均有 Ghrelin 表达, 卵母细胞呈阳性信号, 而在各级卵泡中颗粒细胞 Ghrelin 呈弱阳性信号。各级卵泡内 Ghrelin 的表达, 提示 Ghrelin 在卵泡发育过程中可能具有一定作用。

**关键词:** Ghrelin; 绵羊; 卵泡; 免疫生物化学

中图分类号: S826.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)03-0151-03

## An Immunohistochemical Study of the Localization of Ghrelin in the Ovine Follicle

DU Cheng-guang, CAO Gui-fang

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

**Abstract:** The immunohistochemical staining results indicated that ghrelin peptide was expressed in the different developmental stages follicles. The granulosa cells from the early developing follicles were weak positive, whereas oocytes were positive. The presence of the ghrelin signaling system within the different developmental stages follicles opens up the possibility of a potential regulatory role of this novel molecule in reproductive function.

**Key words:** Ghrelin; Ovine; Follicle; Immunohistochemistry

Ghrelin 是 1999 年发现的一个含有 28 个氨基酸残基的多肽, 为生长激素促分泌素受体 (GHS-R) 的内源性配体<sup>[1]</sup>。Ghrelin 主要在胃和下丘脑中表达<sup>[2]</sup>, 具广泛的生物学作用。它在体外能引起培养的垂体细胞分泌 GH, 在很多物种体内引起垂体 GH 分泌<sup>[1]</sup>, 说明 Ghrelin 参与生长轴的生理控制。近几年的研究表明, Ghrelin 可能参与生殖功能的调节。目前已证明, Ghrelin 在人和啮齿类胎盘中表达, 并且能够抑制早期胚胎发育<sup>[3]</sup>。而在卵巢中, Ghrelin 的表达证明是在聚类固醇生成活性的黄体细胞和间质门细胞中<sup>[4]</sup>。此外, Ghrelin 在体内抑制 LH 分泌<sup>[5]</sup>, 在体外使 LH 对 LH 释放激素的敏感性降低。Ghrelin 可能在生殖系统的不同水平发生作用, 包括睾丸和卵巢, 此二者是生殖系统中 Ghrelin 作用的可能靶位点。性腺中 Ghrelin 信号系统两个成员 (配体和受体) 的存在提示这一新发现的分子在哺乳动物性腺功能调控中具有调节作用。目前, 关于绵

羊卵巢内卵泡 Ghrelin 的组织表达情况的相关报道非常少, 为检测各级卵泡中 Ghrelin 多肽的表达情况, 本试验用免疫组织化学的方法对各级卵泡 Ghrelin 的表达进行分析, 以探索 Ghrelin 在绵羊各级卵泡的存在和分布。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验动物

发情周期绵羊卵巢各 5 个。

### 1.2 试验试剂

一抗体为兔抗人 Ghrelin 多克隆抗体, 购自美国 Phoenix 公司。特异性抗体根据已发表的文献进行选择<sup>[6]</sup>。SP 免疫组化染色试剂盒、中性树胶封片剂和 DAB 显色试剂购自福州迈新生物技术有限公司。

### 1.3 取材与切片

①卵巢用 4% 多聚甲醛固定 24 h。②弃去固定液, 流水冲洗固定组织 5 h, 梯度酒精脱水。③透明、

收稿日期: 2007-12-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30660128); 内蒙古自然科学基金项目 (200711020506)

作者简介: 杜晨光 (1976-), 男, 河北乐亭人, 讲师, 在读博士, 主要从事组织胚胎学与发育生物学研究工作。

通讯作者: 曹贵方 (1963-), 男, 内蒙古赤峰人, 博士, 教授, 主要从事组织胚胎学研究工作。

浸蜡、包埋:二甲苯 I 40 min $\rightarrow$ 二甲苯 II 40 min $\rightarrow$ 1:1 二甲苯/石蜡 40 min $\rightarrow$ 软蜡 I 1 h $\rightarrow$ 软蜡 II 1 h $\rightarrow$ 硬蜡 I 1 h $\rightarrow$ 硬蜡 II 1 h;包埋。④切片,片厚 5  $\mu\text{m}$ ,切片贴于用明胶液处理的载玻片上,40 $^{\circ}\text{C}$ 烤 24 h,再在 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烤片 1 h 使切片粘牢。

#### 1.4 免疫组化 SP 法操作程序

切片经脱蜡处理后;PBS 漂洗 20 min 后,按兔抗羊 SP 免疫组化染色试剂盒中的程序进行如下操作:①滴加试剂 A(过氧化酶阻断液),室温下孵育 40 min;②滴加试剂 B(二抗动物非免疫血清),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min;③滴加一抗(羊抗人 Ghrelin 多克隆抗体),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;④滴加试剂 C(生物素标记的第二抗体),室温孵育 30 min;⑤滴加试剂 D(链霉菌抗生物素蛋白 2 过氧化酶溶液),室温孵育 30 min;⑥将显色盒中的 A、B、C 试剂各取 1 滴,加于 1 mL 蒸馏水中,混匀后滴加到切片上,避光显色,反应 10 min,蒸馏水洗涤,裱贴于载玻片上,晾干后用中性树胶封片。以上各步(除第二步)之后均用 PBS 洗 3 次(10 min/次)。免疫组化试验中,以不加第一抗体进行组化染色的切片作为阴性对照。

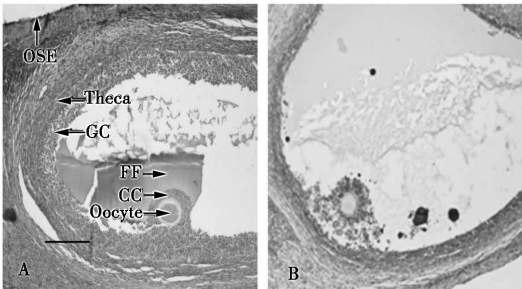
#### 1.5 结果观察

用 Nikon TE2000 显微成像系统对切片进行观察、拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 Ghrelin 在晚期生长卵泡的定位

从图 1 看出,晚期生长卵泡(图 1-A)的卵母细胞、卵泡液以及卵泡膜均呈阳性信号,卵泡细胞的卵丘细胞以及颗粒细胞层均为弱阳性,卵巢表面上皮表现为强阳性信号。不加一抗的阴性对照(图 1-B)未出现阳性信号。



卵母细胞(Oocyte)、卵丘细胞(CC)、颗粒细胞(GC)、卵泡液(FF)、膜细胞(Theca)和卵巢表面上皮(OSE);标尺为 80  $\mu\text{m}$

图 1 Ghrelin 在晚期生长卵泡的定位

Fig. 1 Localization of the Ghrelin protein in sheep antral follicle

### 2.2 Ghrelin 在早期生长卵泡的定位

从图 2 看出,早期生长卵泡(图 2-A)的卵母细胞为阳性,颗粒细胞为弱或极弱阳性,卵泡液亦为阳

性。不加一抗的阴性对照(图 2-B)未出现阳性信号。

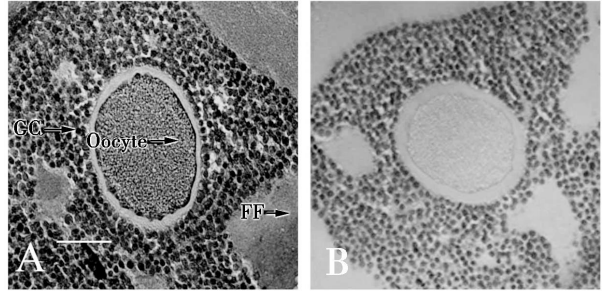


图 2 Ghrelin 在早期生长卵泡的定位

Fig. 2 Localization of the Ghrelin protein in sheep pre-antral follicle

### 2.3 Ghrelin 在初级卵泡的定位

从图 3 看出,初级卵泡(图 3-A)的卵母细胞为阳性,颗粒细胞为弱阳性。不加一抗的阴性对照(图 3-B)未出现阳性信号。

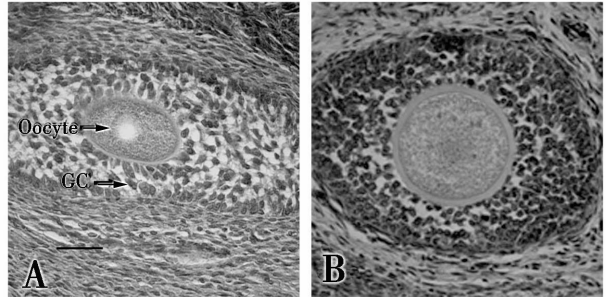


图 3 Ghrelin 在初级卵泡的定位

Fig. 3 Localization of the Ghrelin protein in sheep primary follicle

## 3 讨论

目前关于卵母细胞和早期胚胎是否表达 Ghrelin 少见报道,且卵母细胞和早期胚胎中是否存在 Ghrelin 蛋白,也存有较大争议。Miller 等<sup>[6]</sup>采用免疫组织化学技术,观察到处于不同发育阶段的成年绵羊卵泡颗粒细胞均有 Ghrelin 蛋白表达,而在卵母细胞内少有表达。Kawamura 等<sup>[3,7]</sup>发现 Ghrelin 蛋白仅在小鼠桑椹胚以后才开始表达,这种阶段性表达与其在妊娠早期过度的代谢消耗相协调。Ghrelin 也存在于人和大鼠的卵泡和黄体上,Gaytan 等<sup>[6,8]</sup>的研究表明 Ghrelin 受体 GHSR1a 与卵泡生长有关,提示 Ghrelin 与卵泡的发育有关。有研究表明 Ghrelin 及其受体对性腺的发育与功能有作用。本试验结果表明,发育不同时期的卵母细胞中有比较强的 Ghrelin 免疫染色信号,这说明 Ghrelin 在卵母细胞中发挥一定的作用并与卵泡的发育相关,但其机制还不清楚。这一结果与人<sup>[7]</sup>,小鼠<sup>[3]</sup>和羊<sup>[6]</sup>上的研究结果

有一些矛盾。因此, 关于卵母细胞中 Ghrelin 的表达在不同种间是否有差异仍需进一步研究。

本试验结果印证了 Ghrelin 在绵羊卵泡内颗粒细胞表达的同时, 并得出了 Ghrelin 在各级卵母细胞中均有表达的结论。卵母细胞 Ghrelin 的表达提示了这一新型分子在生殖功能上的潜在调控作用。

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( 6762 ): 656– 660.

[ 2 ] Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, *et al.* Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor [ J ]. *Trends Endocrinol Metab*, 2001, 12( 3 ): 118– 122.

[ 3 ] Kawamura K, Sato N, Fukuda J, *et al.* Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro [ J ]. *Endocrinology*, 2003, 144( 6 ): 2623– 2633.

[ 4 ] Caminos J E, Tena-sempere M, Gaytan F, *et al.* Expression of

ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary [ J ]. *Endocrinology*, 2003, 144( 4 ): 1594– 1602.

[ 5 ] Furuta M, Funabashi T, Kimura F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288( 4 ): 780– 785.

[ 6 ] 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.

[ 7 ] Gaytan F, Bareiro M L, Chopin L K, *et al.* Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary [ J ]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88( 2 ): 879– 887.

[ 8 ] Gaytan F, Morales C, Bareiro M L, *et al.* Expression of growth hormone secretagogue receptor type 1a, the functional ghrelin receptor, in human ovarian surface epithelium, mullerian duct derivatives, and ovarian tumors [ J ]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90( 3 ): 1798– 1804.