

瘦素受体在小尾寒羊消化系统的表达

肖欢,崔亚利,胡满,邓艳慢
(河北农业大学动物科技学院,河北保定 071001)

摘要:试验通过HE、免疫组织化学SABC染色和Western Blot方法对瘦素受体(ob-R)在小尾寒羊消化系统的表达进行研究。HE染色结果显示,各组织结构正常,细胞形态清晰可见;SABC染色结果显示,在皱胃胃体部固有层胃底腺的主细胞和壁细胞及十二指肠黏膜上皮细胞和固有层肠腺的柱状细胞中均可见大小数量不等的棕黄色颗粒;Western Blot检测发现,在皱胃和十二指肠均检测到120、110和98 ku三条带。120 ku长型瘦素受体蛋白在胃中表达量显著高于小肠中的表达;110 ku的短型瘦素受体蛋白在小肠和皱胃中表达量接近;98 ku短型受体蛋白在胃和小肠表达均较弱。试验结果表明,瘦素受体在小尾寒羊消化系统中表达,对调节能量平衡和饲料摄入具有重要作用。

关键词:ob-R;皱胃;十二指肠;免疫组织化学;Western Blot

中图分类号:S826

文献标志码:A

论文编号:2009-2337

Expression of Leptin Receptor in Digestive System of Small Tail Han Sheep

Xiao Huan, Cui Yali, Hu Man, Deng Yanman

(College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding Hebei 071001)

Abstract: In the present study, we analysed expression of the leptin receptor in normal digestive system of Small Tail Han Sheep using Hematoxylin-eosin staining, immunohistochemistry and Western Blot. Our results demonstrate: The structures of the organs are normal, and the shapes of cells are clearly visible. There are lots of positive brown granules in Chief cells and Parietal cells in abomasum as well as the mucosa epithelial cells and gland cells of duodenum. Three bands with a molecular mass close to 120 ku, 110 ku and 98 ku were identified by Western Blot. The ob-R levels of 120 ku in abomasum were significantly higher than that of in small intestine. The levels of 110 ku were similar in the two organs. The expression of 98 ku ob-R was weak. We inferred that Leptin receptor in digestive system can regulate the energy balance and appetite of Small Tail Han sheep.

Key words: ob-R; abomasum; duodenum; immunohistochemistry; Western Blot

0 引言

瘦素(Leptin)是肥胖基因编码的主要由白色脂肪细胞分泌的一种多功能蛋白质激素,作为中枢神经系统和外周组织的营养信号,对家畜能量平衡和脂肪沉积具有重要的调节作用^[1]。瘦素通过与其受体(ob-R)结合发挥作用。Ob-R属I类细胞因子受体家族,是一种跨膜蛋白,广泛分布于下丘脑的多个神经核和外周组

织,其结构类似表皮生长因子受体^[2]。通过其特异的信号传导途径发挥瘦素的神经内分泌调节作用。迄今为止,人们发现ob-R有a、b、c、d、e和f 6种亚型。其中ob-Rb属长型受体,其余属短型受体。众多受体亚型中,只有ob-Rb和ob-Ra在体内外有激活信号转导和转录作用,ob-Rb是最重要的功能受体^[3-4]。

瘦素及其受体通过营养物质和能量的摄入影响机

基金项目:河北农业大学博士基金资助项目(BS200618)。

第一作者简介:肖欢,女,1982年出生,河北昌黎人,硕士研究生,研究方向:机能形态学。通信地址:071001 河北农业大学动物科技学院研究生学院基础兽医学2007级, Tel: 0312-7528452, Email: xiaohuan_xin@126.com。

通讯作者:崔亚利,女,1970年出生,河北保定人,博士,副教授,研究方向:机能形态学。通信地址:071001 河北保定建设南路256号河北农业大学动物科技学院, Tel: 0312-7528472, Email: cuiyalidk@hebau.com。

收稿日期:2009-11-10,修回日期:2009-11-20。

体的多种生物学功能,并通过旁分泌、自分泌或内分泌方式调节和控制食物的消化和吸收^[5],瘦素通过向中枢传递摄食信号来控制摄食行为,进而调节脂肪容量。研究表明,瘦素作为营养信号可以调节季节性繁殖动物羊的生殖活动^[6]。近年来研究证实瘦素及其受体广泛存在于人和小鼠等单胃动物的消化系统中。但有关ob-R在反刍动物小尾寒羊消化系统中的分布及表达鲜见报道。试验采用免疫组织化学和Western Blot方法对小尾寒羊皱胃和十二指肠ob-R的分布和表达进行研究,以探讨其在小尾寒羊消化代谢过程中的作用,为研究瘦素及其受体在调节羊的繁殖性能、肉质性状和消化系统疾病中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试验准备

屠宰厂选取6月龄左右健康、发育正常的小尾寒羊6只。大抹脖法处死后开膛,剪取皱胃体部和十二指肠中段组织各2份,一部分超低温冰箱冷冻保存;一部分生理盐水冲洗后放入已准备好的4%中性甲醛固定液中,固定2 h后对组织进行修块并更换固定液,固定12~24 h后常规石蜡包埋切片,切片厚5 μm。

1.2 HE染色

切片经脱蜡、染色、脱水、透明和封片,显微镜下进行组织学观察。

1.3 免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡后,按照SP免疫组化染色试剂盒及DAB显色试剂盒说明书进行免疫组织化学试验。一抗为兔抗山羊ob-R多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,稀释比例为1:200);二抗为生物素标记山羊抗兔SABC免疫组化试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)。显色后苏木素复染细胞核,镜检并拍照。

1.4 对照试验

以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照;以脂肪组织的染色结果作为阳性对照。

1.5 Western Blot检测

从超低温冰箱中取出冻存组织,低温条件下精确称重100 mg加入RIPA裂解液1 mL和10 μL PMSF抑制剂,研磨后4 ℃离心,提取组织总蛋白,SDS-PAGE电泳(8%分离胶,5%浓缩胶),转膜至PVDF膜,经脱脂奶粉中和特异性抗体后与ob-R一抗、二抗作用,BCIP/NBT显色。

1.6 结果判断

免疫组化试验ob-R阳性细胞细胞质内出现棕黄色颗粒;Western Blot检测转膜显色后出现特异性条带。

2 结果与分析

2.1 HE染色

显微镜下观察,各组织结构完整,细胞形态清晰可见。皱胃固有层胃底腺可见壁细胞、主细胞和颈粘液细胞;十二指肠固有层肠腺可见柱状细胞、杯状细胞。

2.2 对照试验

阴性结果为镜下可见大小不等的淡蓝色细胞核,细胞轮廓不清;阳性结果为脂肪细胞胞浆内呈现深棕色。

2.3 免疫组织化学SABC染色

在固有层的胃底腺中,可见大量ob-R阳性表达细胞,浆膜层可见阳性脂肪细胞(图1A)。胃底腺阳性细胞分散分布,细胞大小不等,呈圆形或矮柱状,胞质呈深浅不一的棕黄色,阳性细胞胞核都呈圆形。从细胞形态和大小判断,推测为壁细胞和主细胞(图1B)。在皱胃肌层未见明显的ob-R蛋白阳性表达细胞。

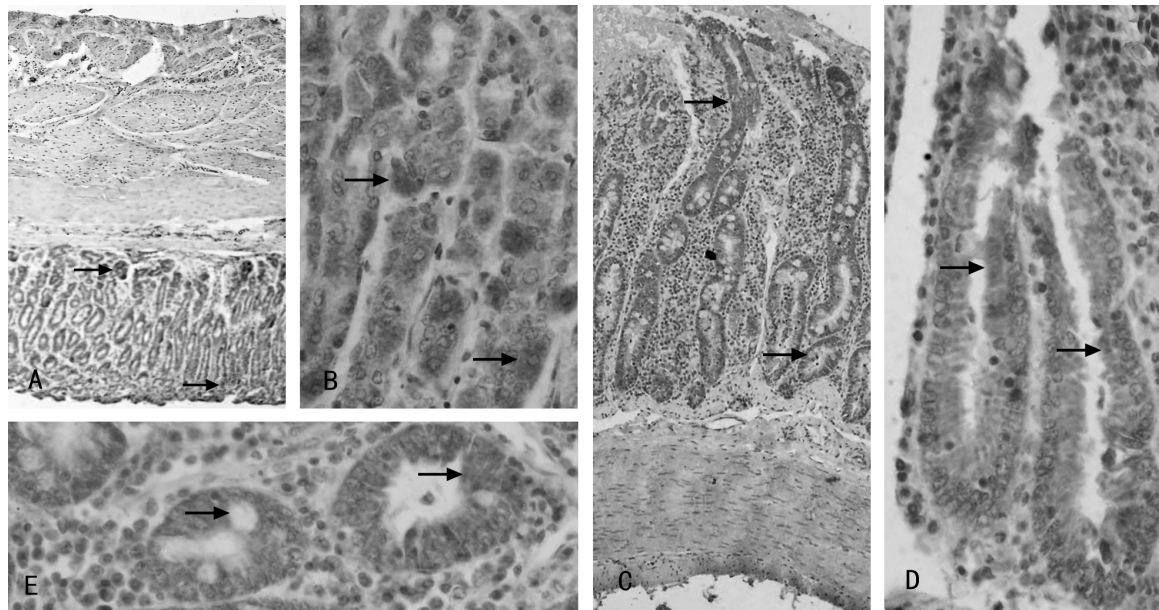
十二指肠绒毛的黏膜上皮细胞和固有层肠腺中均可见ob-R蛋白阳性表达细胞(图1C)。瘦素受体蛋白广泛分布于黏膜上皮细胞的细胞质和基膜(图1D);固有层肠腺柱状上皮细胞的游离端胞质呈棕黄色(图1E),胞核整齐排列在细胞基底侧,空泡状的杯状细胞未见着色。十二指肠肌层未见阳性表达细胞。

2.4 Western Blot检测结果

电泳转膜后发现,胃瘦素受体在120、110 ku处有较强烈的蛋白表达,在98 ku处表达很弱;十二指肠只在110 ku处瘦素受体蛋白表达较明显,在120和98 ku处表达均较弱。其中,在110 ku处,两组织蛋白表达量相近(图2)。

3 讨论

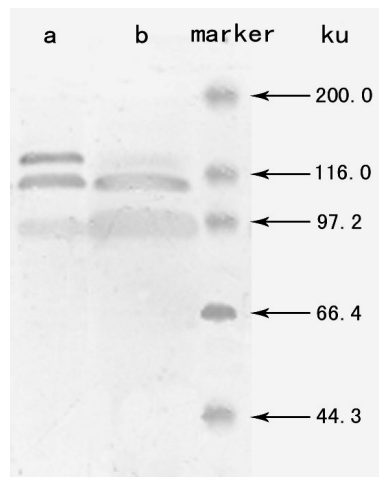
1998年,Bado等应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术在大鼠胃黏膜中检测到ob-R mRNA的表达,随后他在小鼠小肠中又发现ob-R的存在。Wormald^[7]指出在人胃腺壁细胞呈ob-R免疫反应阳性。Mix等^[8]在胃镜下活检的胃底及胃窦黏膜、原代培养的人胃上皮细胞均检测到瘦素及瘦素受体的mRNA表达,免疫组化显示瘦素及其受体免疫反应阳性细胞存在于胃腺的中下部分,并证实这些细胞为壁细胞和主细胞。彭彦霄等^[9]发现,在人和大鼠的十二指肠、空肠和结肠均有ob-R存在,定位在肠上皮细胞的刷状缘、基底外侧膜和细胞质内。研究结果显示,瘦素受体阳性细胞主要位于皱胃胃底腺的主细胞和壁细胞,多数为壁细胞;十二指肠上皮细胞和肠腺细胞也呈阳性表达,与上述结果基本一致。推测瘦素可能通过对胃、肠功能的调节而调控机体的能量平衡和饲料摄入。



A, 皱胃胃壁(100×); B, 皱胃胃底腺(400×); C, 十二指肠肠壁(100×);

D, 十二指肠肠绒毛(400×); E, 十二指肠固有层肠腺(400×)

图1 小尾寒羊皱胃和十二指肠免疫组化染色结果(——→所示为ob-R阳性细胞)



a, 皱胃; b, 十二指肠

图2 小尾寒羊皱胃、十二指肠ob-R Western Blot检测结果

大鼠胃窦部黏膜内的STAT-3是瘦素与其受体结合后的唯一信号分子^[10]。随后姚红等又发现壁细胞同样具有STAT-3蛋白表达,且核内STAT-3含量与瘦素含量呈明显正相关^[11]。分析原因认为,瘦素受体信号转导的主要途径是JAK-STAT途径。瘦素受体本身无酪氨酸激酶活性,但它们可通过偶联和激活JAK酪氨酸蛋白激酶家族而实现信号转导^[12]。卢静等^[13]指出,瘦素浓度的升高对肠运动起一定的抑制作用。胃液中的瘦素到达十二指肠后,部分与十二指肠的上皮细胞表面的功能性受体ob-Rb结合,刺激CCK的释放。CCK直接作用于胃体和胃窦不同的CCK受体,引起胃体平滑肌舒张,胃窦平滑肌收缩,并通过外周迷走神经

不同CCK受体产生抑制性和兴奋性迷走-迷走反射,使近端胃内压降低和远端胃收缩^[14],有规律的控制胃排空进程。瘦素受体在胃和十二指肠的大量表达,说明瘦素在食物的消化过程中具有重要作用,瘦素可能通过抑制胃收缩和肠管蠕动,或是减少蠕动频率而延缓其排空,延长食物的滞留时间,不仅保证营养物质得到充分吸收,也可减少进食量。机体瘦素水平的调控,应用在畜牧业中有望降低料肉比,提高生产效益和饲料利用率以及防治消化系统疾病。

瘦素受体是一种跨膜受体,长短型受体的主要区别是胞内区的长度即氨基酸序列组成及长短不同。长型受体ob-Rb胞内区氨基酸序列最长,分子量最大,主要分布于中枢神经系统和绝大部分外周组织中,具有信号传递作用。短型受体ob-Ra、c、d、e、f主要分布于外周组织,其中ob-Ra、c胞内区氨基酸序列最短,主要是转运和代谢瘦素,ob-Re是一种可溶性受体,仅由胞外区组成,分子量最小^[15]。试验结果显示,在小尾寒羊的皱胃和十二指肠中均表现3条带。3条带中,根据分子量的大小推测120ku大小的条带是ob-Rb,即小尾寒羊胃和小肠中长型瘦素受体蛋白的分子量为120ku,在皱胃中的表达量较多,而十二指肠中表达量较少。110ku的蛋白为短型瘦素受体,在小肠和皱胃中表达量接近。Sobhani等^[16]试验结果发现人胃黏膜胃底和胃窦基底膜侧的细胞中或壁细胞的分泌小管中存在相对分子量为120ku的ob-Rb,与笔者的研究结果一致。但是人骨骼肌内的长型瘦素受体蛋白质分子

量接近 170 ku^[17]。表明瘦素受体的分子量具有种属和组织差异性。在 120 ku 处皱胃表达量较多,说明皱胃有较多的功能型瘦素受体分布,瘦素在皱胃食物消化过程中具有重要作用。长型受体中含有潜在的 motifs,可与 JAK 和信号转移子及转录激动因子结合,是唯一能进行信号转导并调节热量摄入和能量消耗的异形体^[15]。研究结果中在 98 ku 附近两种组织的蛋白表达量均较弱,可能是可溶性瘦素受体 ob-Re, ob-Re 多存在于血液中,提取组织总蛋白时,混悬组织液中可能有部分血液,造成微量表达。欲确定 ob-R 不同亚型的具体含量及在食物消化过程中的作用机理,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Horiguchi A, Sumitomo M, Asakuma J, et al. Increased serum leptin levels and over expression of leptin receptors are associated with the invasion and Progression of renal cell carcinoma. *J Urol*, 2006, 176(4Pt1):1631-1635.
- [2] Leibowitz S F, Chang G Q, Dourmashkin J T, et al. Leptin secretion after a high-fat meal in normal-weight rats:strong predictor of long-term body fat accrual on a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 290(2):E258-267.
- [3] Accorsi P A, Gamberoni M, Isani G, et al. Leptin does not seem to influence glucose uptake by bovine mammary explants. *J Physiol Pharmacol*, 2005, 56(4):689-698.
- [4] Ren J, Relling D P. Leptin-induced suppression of cardiomyocyte contraction is amplified by ceramide. *Peptides*, 2006, 27(6): 1415-1419.
- [5] Cao Q, Mak K M, Lieber C S. Leptin represses matrix metalloproteinase gene expression in LX2 human hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 2007, 46(1):124-133.
- [6] Zieba D A, Szczesna M, Klocek-Gorka B, et al. Leptin as a nutritional signal regulating appetite and reproductive processes in seasonally-breeding ruminants. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2008, 59(Suppl 9):7-18.
- [7] Wormald P J, Wee D T, van-Hasselt C A. Endoscopic ligation of the sphenopalatine artery for refractory posterior Epistaxis. *Am J Rhinol*, 2000, 14(4):261-264.
- [8] Mix H, Widjaja A, Jandl O, et al. Expression of leptin and leptin Receptor isoforms in the human stomach. *Gut*, 2000, 47(4):481-491.
- [9] 彭彦霄,何江才,伍雪芳,等.人胎胃壁瘦素及瘦素受体的免疫组织化学.解剖学杂志, 2004, 27(6):613-615.
- [10] Goiot H, Attoub S, Kermorgant S, et al. Antral mucosa-expresses functional leptin receptor coupled to STAT-3 signaling, which is involved in the control of gastric secretions in the rats. *Gastroenterology*, 2001, 121:1417-1427.
- [11] 姚红,郝素珍,原素梅,等.胃黏膜瘦素和瘦素受体的表达及信号转导.山西医科大学学报, 2004, 35(2):122-125.
- [12] Ponzo O J, Reynoso R, Rimoldi G, et al. Leptin stimulates the reproductive male axis in rats during sexual maturation by acting on hypothalamic excitatory amino acids. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2005, 113(3):135-138.
- [13] 卢静,魏良洲,田宇彬,等.瘦素与肠动力关系的研究进展.胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(1):83-84.
- [14] Huo L, Maeng L, Bjorbeck C, et al. Leptin and the control of food intake: neurons in the nucleus of the solitary tract (NTS) are activated by both gastric distension and leptin. *Endocrinology*, 2007, 148:2189-2197.
- [15] Bjorbeck C, Kahn B B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Int Rev*, 2004, 59:305-331.
- [16] Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, et al. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut*, 2000, 47(2):178-183.
- [17] Borja G, Alfredo S, Teresa F, et al. Leptin receptors in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2007, 102:1786-1792.