

文章编号: 1000-0615(2004)03-0261-06

GnRH 及其受体在 2 种真骨鱼消化系统中 存在的免疫细胞化学证据

方之平¹, 潘黔生²

(1. 华中农业大学动物科技学院, 湖北 武汉 430070;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 用链霉亲和素-生物素化过氧化物酶复合物(strept avidin biotin-peroxidase complex, SABC)免疫细胞化学方法,使用促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH),促性腺激素释放激素受体(gonadotropin-releasing hormone receptor, GnRHR)2种抗血清对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)和鲂(*Silurus asotus*)的食道、贲门、胃底、幽门、前肠、中肠、后肠和胰中的免疫活性内分泌细胞进行了定位。结果表明:在鲂的食道、胃、肠、肠固有膜、肠肌间神经丛、胰腺和胰岛中均存在着GnRH和GnRHR免疫活性阳性反应;黄颡鱼消化系统中除了在食道和胰岛中未见GnRH和GnRHR的免疫活性阳性反应外,其他部位均有阳性反应,而且GnRH和GnRHR分泌细胞的分布模式相类似。说明胃肠道中GnRH分泌细胞可能以自分泌或旁分泌方式参与消化功能的调节。本研究首次证实在鱼类的消化系统中存在着GnRH及其受体的免疫活性内分泌细胞,可为GnRH功能的多样性等研究领域提供新的形态学依据。

关键词: 鲂; 黄颡鱼; 促性腺激素释放激素; 促性腺激素释放激素受体; 免疫细胞化学

中图分类号: Q575.12; S917 文献标识码: A

An immunocytochemical evidence for the presence of GnRH and GnRHR in the digestive system of two teleosts

FANG Zhi-ping¹, PAN Qian-sheng²

(1. College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: By using the strept avidin biotin-peroxidase complex(SABC) immunocytochemical staining technique, the immunoreactive endocrine cells in the esophagus, cardia, fundus ventriculi, pylorus, foregut, midgut, hindgut, pancreas and liver of oriental sheatfish(*Silurus asotus*) and yellow catfish(*Pelteobagrus fulvidraco*) were localized with 2 kinds of antisera-gonadotropin releasing hormone(GnRH) and gonadotropin releasing hormone receptor(GnRHR). The result showed that there was GnRH and GnRHR immunoreactive positive reaction in the esophagus, stomach, intestinum, membrana propria, nerve plexus in myenteron, pancreas and pancreatic island of *S. asotus* and in the digestive system of *P. fulvidraco*, and the immunoreactive positive reaction of GnRH and GnRHR was also found in all parts except in the esophagus and pancreatic island, and the distributive patterns of

收稿日期: 2003-06-17

资助项目: 国家自然科学基金资助项目(30070590); 湖北省自然科学基金资助项目(2003ABA097)

作者简介: 方之平(1945-), 女, 四川成都人, 教授, 主要从事水产动物组织胚胎学、动物比较内分泌学及免疫细胞化学方面的研究。E-

mail: panfang@public.wh.hb.cn

GnRH and GnRHR are similar. It is suggested that the GnRH in the gastrointestinal tract may participate in modulation the digestive function via autocrine or paracrine mechanism. It is demonstrated for the first time that there are GnRH and GnRHR immunoreactive endocrine cells in the digestive system of fishes. It provided new morphological basis for the research field of the functional diversity of GnRH.

Key words: *Silurus asotus*; *Pelteobagrus fulvidraco*; gonadotropin-releasing hormone (GnRH); gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR); immunocytochemistry

促性腺激素释放激素(GnRH)是一种十肽结构的神经激素,分泌GnRH的细胞主要分布在下丘脑。GnRH以神经分泌方式从神经末梢释出,分泌到垂体门静脉中的GnRH可对垂体促性腺激素的合成和释放起重要的调节作用^[1]。随着对这一领域研究的深入,学者们发现在下丘脑以外的许多器官中也存在GnRH,而且不同器官中的GnRH具有不同的功能^[2]。有研究者用免疫细胞化学技术在大鼠的胃肠中发现存在GnRH免疫活性细胞和神经^[3];在大鼠颌下腺的上皮细胞等处见到GnRH的免疫活性阳性反应^[4];在大鼠的胸腺内发现GnRH免疫活性阳性细胞的存在^[5]。GnRH是通过特异膜受体的介导发挥生理作用,生殖轴的各个器官都含有GnRHR。上世纪70年代末相继在生殖轴之外的组织中发现有GnRHR的存在^[6],如在大鼠的胃肠上皮细胞中存在着较强的GnRHR免疫阳性反应^[7],这些研究结果证明了GnRH功能的多样性。目前未见有关对鱼类消化系统中

GnRH及其受体进行同步研究的报道。本研究可为组织学、生理学、内分泌学等相关学科提供新的资料,可为神经-内分泌系统、脑-肠肽等学术理论及GnRH功能的多样性提供新的形态学依据。

1 材料与方法

1.1 取材制片

黄颡鱼和鲇成鱼各10尾,购自武汉市大东门水产市场。清水中暂养24h,鲜活时解剖,依次取出食道、贲门、胃底、幽门、前肠、中肠、后肠、胰脏等部位,立即投入Bouin氏液中,固定12h后修块整理,再投入Bouin氏液中固定12h,共固定24h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,低度石蜡(52~54℃)包埋,切片6μm,明胶贴片,40℃烘片24h,入4℃冰箱中备用。

1.2 试剂

抗血清和主要试剂见表1。

表1 抗血清和主要试剂情况

Tab. 1 The major antisera and reagents

抗血清与试剂 antisera & reagents	来源 sources	工作浓度 dilutions	功能 functions
兔抗GnRH血清 rabbit anti-GnRH	中国科学院动物所 Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences	1:100	一抗 primary antiserum
兔抗GnRHR血清 rabbit anti-GnRHR	第四军医大学 The Fourth Military Medical University	1:100	一抗 primary antiserum
正常山羊血清 normal goat serum	武汉博士德生物工程有限公司 Wuhan Boster Biological Technology Ltd.	1:50	消除非特异性反应 eliminated non-specific immunity reaction
生物素化二抗 Biotin-IgG	武汉博士德生物工程有限公司 Wuhan Boster Biological Technology Ltd.	1:100	标记长臂生物素 labeling long arm biotin
SABC复合物 SABC complex	武汉博士德生物工程有限公司 Wuhan Boster Biological Technology Ltd.	1:100	与抗体结合起放大作用 combining with antibody and amplification action
3,3'-二氨基联苯胺 DAB	日本株式会社同仁化学研究所 Tongren Chemical Institute of Japan	0.05%	显色剂 chromogenic agent

1.3 免疫细胞化学方法

(1) 以上切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精下行入水后,于3% H₂O₂/PBS溶液于室温中处理5min,

以消除内源性过氧化物酶活性。

(2) 正常山羊血清(1:50)在37℃下孵育20min,以封闭非特异性第二抗体的结合。

(3) 滴加该抗原的抗血清(一抗), 在 4℃ 下孵育过夜后。

(4) 加 1: 100 生物素化二抗在 37℃ 孵育 20min。

(5) 加 1: 100SABC 复合物 37℃ 孵育 20min。

(6) 用 0.05% 的 DAB 在含有 0.01% H₂O₂ 的 0.05mol·L⁻¹ Tris-HCL 缓冲液(pH 7.6) 中显色。

以上所有过程均在湿盒中进行, 并保持 pH 为 7.3。阴性对照片以上述切片的连续切片用正常血清取代一抗进行孵育, 其它各步骤均与上述步骤同步进行。免疫染色完成后, 脱水、透明、封片, 于 Olympus 光学显微镜下观察, 彩色显微摄影。

2 结果

本实验中的阳性反应在细胞质上表达呈棕色, 胞核呈阴性不着色; 由于底物的原因, 背景呈浅黄色。所有的对照片各部位均呈阴性反应。

GnRH 及其受体的免疫活性阳性细胞(简称 GnRH 细胞和 GnRHR 细胞) 在黄颡鱼和鲇 2 种鱼

的消化系统中各部位的分布及密度见表 2。其中鲇从食道至肠道各段均有 GnRH 及其受体的免疫活性阳性反应; 在黄颡鱼的消化道中, 除了食道和贲门之外的胃肠道中都有 GnRH 及其受体的免疫活性阳性反应(表 1)。在鲇的食道和贲门上皮细胞中可见到 GnRH 细胞的存在(图版- 1)。而 GnRH 细胞在黄颡鱼和鲇胃底、幽门的上皮(图版- 2)、胃底腺中(图版- 3) 有较高的分布密度; 在肠和肠固有膜中亦可见到 GnRH 细胞的分布(图版- 4, 5); 2 种鱼的胰腺中均可见到 GnRH 细胞的稀疏分布, 阳性反应强度不大(图版- 6)。

GnRHR 细胞广泛存在于鲇的消化道中(表 2), 特别是在食道复层上皮中分布较密(图版- 7)。在鲇和黄颡鱼 2 种鱼的胃上皮和胃腺中 GnRHR 细胞的分布密度也很大(图版- 8, 9), 肠上皮间的阳性细胞则分布稀疏(图版- 10), 同时见到有 GnRH 受体免疫活性阳性反应在鲇胰岛中所表现(图版- 11), 肠肌间神经丛及副交感神经节细胞亦呈 GnRH 受体免疫活性阳性(图版- 12)。

表 2 2 种鱼消化系统中 GnRH 和 GnRHR 的分布

Tab. 2 The distributions of GnRH and GnRHR in the digestive system of two fishes

部位 parts	黄颡鱼 <i>P. fulvidraco</i>		鲇 <i>S. asotus</i>	
	GnRH	GnRHR	GnRH	GnRHR
食道上皮/ 食道腺 esophageal epithelium/esophageal gland	- / -	- / -	+ + + / -	+ + + / -
贲门上皮/ 贲门腺 cardiac epithelium/ cardiac gland	- / -	- / -	+ + / -	+ / -
胃底上皮/ 胃底腺 fundus epithelium/ fundus gland	+ / -	+ + + / + + +	+ + / + + +	+ + + / -
幽门上皮/ 幽门腺 pyloric epithelium/ pyloric gland	+ + / + + +	+ + + / + + +	+ + / + +	+ + / + +
前肠上皮/ 固有膜 foregut epithelium/ membrana propria	+ / -	+ + / -	+ + / +	+ / +
中肠上皮/ 固有膜 midgut epithelium/ membrana propria	+ / -	+ / -	- / -	- / -
后肠上皮/ 固有膜 hindgut epithelium/ membrana propria	- / -	+ / -	- / -	+ / -
胰腺/ 胰岛 pancreas/ pancreatic island	+ / -	- / -	+ / +	+ / +
肠肌间神经丛 nerve plexus in myenteron	-	+	-	+

注: + + + 表示阳性细胞在 30 个以上/ 每一个 10×10 的视野中; + + 表示 11~ 29 个阳性细胞; + 表示少于 10 个阳性细胞; - 表示未见阳性细胞

Notes: + + + showed above 30 positive cells in one field 10×10; + + showed 11- 29 positive cells; + showed below 10 positive cells; - no positive cells were found

3 讨论

大量研究证明,胃肠道粘液中存在许多散在分布的内分泌细胞,可以分泌多种激素,已被认为是体内最大、最复杂的内分泌器官^[8]。在淡水鱼类的胃肠胰中已鉴别出 13 种免疫活性内分泌细胞^[9, 10]。在哺乳动物消化系统中也有了关于 GnRH 鉴别和定位研究的报道^[3, 11],但鱼类消化系统中是否存在 GnRH 还未见报道。本研究观察到 GnRH 免疫活性内分泌细胞在鲇和黄颡鱼消化系统中的分布,从形态学上证实鱼类的胃肠胰也是鱼体内 GnRH 来源的重要场所之一。GnRH 可作为神经激素、神经递质和神经调质^[1],而分布在不同器官中的 GnRH 作用也不同。视网膜 GnRH 作为一种神经递质能增强节细胞对颜色刺激的敏感性^[2]; 胎盘绒毛 GnRH 调节绒毛膜促性腺激素等多种绒毛激素的释放^[12]; 广泛分布在哺乳动物胃肠胰中 GnRH 对消化生理起重要的调节作用^[11]。本研究不但见到 GnRH 的免疫活性阳性,同时还观察到 GnRH 受体的免疫活性阳性反应,证实了 GnRH 对鱼类的消化生理起着重要的调节作用。

GnRH 在体内的重要功能是由 GnRH 受体介导的,要知道 GnRH 是否对某一组织细胞有功能意义,必须先了解这种组织细胞是否含有 GnRH 的受体。下丘脑-垂体-性腺轴的各个器官都含有 GnRH 受体, GnRH 在其受体的介导下对生殖器官发挥重要的调节作用^[6, 7]。而在鲇和黄颡鱼的脑、垂体和卵巢中也观察到了 GnRH 受体的免疫活性阳性反应^[13], GnRH 在鱼类生殖生理活动中所起的重要作用已众所周知。最新的研究报道了哺乳动物消化系统中存在 GnRH 受体及 GnRH-mRNA^[3, 7],但是鱼类的消化系统中是否具有 GnRH 受体, GnRH 对鱼类消化系统是否有功能意义均未见报道。本实验对 2 种鱼的研究发现在食道上皮、食道腺、胃上皮、胃腺、肠上皮、肠固有膜、胰腺、胰岛和肠肌间神经丛等部位均存在 GnRH 受体的免疫活性阳性反应; 它们在 2 种鱼消化系统中的分布部位有一定的差异,这可能与食性的不同有关,但是在每种鱼中 GnRH 及其受体的分布模式具有很高的相似性,说明 GnRH 能以自分泌或旁分泌的方式^[3, 4, 7],对上述器官的功能进行局部调节。鱼类的食道有对食物的选择和分泌粘液以助食物吞咽的功能,胃小凹上皮的主要功能

是分泌粘液,胃底腺壁细胞主要产生胃酸。肠上皮细胞主要参与胃肠道蠕动的调节,胰主要分泌消化酶等; 本研究证实以上部位都有 GnRH 受体的分布,提示鱼类 GnRH 对胃肠胰系统的功能也有广泛的调节作用,也进一步地证实了鱼类胃肠胰内分泌系统几乎与哺乳动物的是一样的复杂。关于鱼类消化道粘液中 GnRH 的来源还需作进一步的研究,如果用免疫细胞化学原位分子杂交技术鉴别出 GnRH-mRNA 杂交信号,就能确定消化道粘液中上皮细胞可以自身合成 GnRH。

参考文献:

- [1] Xie Q W. Modern neuroendocrinology[M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1999. 29- 33. [谢启文. 现代神经内分泌学[M], 上海: 上海医科大学出版社, 1999. 29- 33.]
- [2] Stell W K, Walder S E, Chohan K S, *et al.* The goldfish nerves terminalis: a luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactory pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81 (3): 940- 944.
- [3] Huang W Q, Xiang Z H, Meng L. Distribution of GnRH-mRNA positive cells in gastro-entero-pancreatic system of rats[J]. Acta Anatomica Sinica, 1996, 27(2): 189- 191. [黄威权, 向正华, 孟琳. 促性腺激素释放激素 mRNA 阳性细胞在大鼠胃肠胰系统分布[J]. 解剖学报, 1996, 27(2): 189- 191.]
- [4] Jin H S, Huang W Q, Zhang J S, *et al.* Immunohistochemical and in situ hybridization study of GnRH and GnRH-mRNA in submaxillary gland of rat[J]. Acta Zool Sin, 1998, 44(2): 186- 189. [金花淑, 黄威权, 张金山, 等. 大鼠颌下腺促性腺激素释放激素及其 mRNA 的免疫组织化学与原位杂交研究[J]. 动物学报, 1998, 44(2): 186- 189.]
- [5] He W, Wang Z Y, Shi Y X, *et al.* The expression of GnRH-mRNA in rat thymus[J]. Acta Anatomica Sinica, 2000, 31(1): 90- 91. [何威, 王占友, 石玉秀, 等. 大鼠胸腺内促性腺激素释放激素-mRNA 的表达[J]. 解剖学报, 2000, 31(1): 90- 91.]
- [6] Han X B, Cao Y Q, Zhuang L Z. GnRH receptor and the regulation of its gene expression[J]. Advance of Physiologic Science, 1998, 29(3): 198- 202. [韩新兵, 曹咏清, 庄临之. 促性腺激素释放激素受体及其基因表达的调控[J]. 生理科学进展, 1998, 29(3): 198- 202.]
- [7] Yao B, Huang W Q, Sun L. Immunohistochemical study of gonadotropin releasing hormone receptor in rat digestive tract[J]. Acta Anatomica Sinica, 1999, 30(2): 152- 154. [姚兵, 黄威权, 孙岚. 大鼠消化道促性腺激素释放激素受体的免疫组织化学研究[J]. 解剖学报, 1999, 30(2): 152- 154.]
- [8] Wang Z J, Mei M H, Zhu W Y, *et al.* Gastrointestinal hormones[M]. Beijing: Science Press, 1985. 2- 372. [王志钧, 梅懋华, 朱文玉, 等. 胃肠激素[M]. 北京: 科学出版社, 1985. 2- 372.]
- [9] Pan Q S, Fang Z P, Huang F J. Identification, localization and

morphology of APUD cells in gastroenteropancreatic system of stomach-containing teleost[J]. World Journal of Gastroenterology, 2000, 6(6): 842-847.

- [10] Pan Q S, Fang Z P, Zhao Y X. Immunocytochemical identification and localization of APUD cells in the gut of seven stomachless teleost fishes[J]. World Journal of Gastroenterology, 2000, 6(1): 96-101.
- [11] Huang W Q, Zhang C L. Preliminary study of the distribution of GnRH immunoreactive cells and nerves in gastro-entero-pancreatic system of rats[J]. Acta Anatomica Sinica, 1990, 21(3): 299-301. [黄威权, 张崇理. GnRH 免疫活性细胞和神经在大鼠胃肠胰系统分布的初步研究[J]. 解剖学报, 1990, 21(3): 299-

301.]

- [12] Mathialagan N, Rao A J. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulates both secretion and synthesis of human chorionic gonadotropin (HCG) by first trimester human placental mince *in vitro* [J]. Biochem Int, 1986, 13(5): 757-763.
- [13] Fang Z P, Pan Q S, Luo L T, *et al.* An immunocytochemical localization of GnRH and GnRHR in the brain, pituitary and ovary of *Silurus asotus* and *Pelteobagrus fulvidraco* in maturity and immaturity[J]. Acta Hydrobiol Sin, 2004, 28(1): 63-68. [方之平, 潘黔生, 罗立廷, 等. GnRH 及其受体在性成熟前后鲢、黄颡鱼脑、垂体和卵巢中的免疫细胞化学定位[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1): 63-68]

图版说明

Explanation of Plate

1. 鲢贲门上皮中 GnRH 免疫活性阳性细胞的分布, ×200; 2. 鲢胃底上皮中 GnRH 免疫活性阳性细胞的形态, ×400; 3. GnRH 免疫活性阳性细胞在黄颡鱼幽门腺中的分布, ×100; 4. GnRH 免疫活性阳性细胞在黄颡鱼肠上皮中形态, ×400; 5. 鲢肠固有膜中 GnRH 免疫活性阳性细胞形态, ×400; 6. 鲢胰腺中一个 GnRH 免疫活性阳性细胞形态, ×400; 7. GnRH 受体免疫活性阳性在鲢食道中分布, ×100; 8. GnRH 受体免疫活性阳性在鲢胃上皮中分布, ×100; 9. 几个 GnRH 受体免疫活性阳性细胞在黄颡鱼胃底腺中分布, ×400; 10. 一个 GnRH 受体免疫活性阳性细胞在鲢肠上皮中形态, ×400; 11. 鲢胰岛中 GnRH 受体的免疫活性阳性表达, ×400; 12. 鲢肠肌间神经丛的 GnRH 受体免疫活性阳性表达, ×100

↑免疫活性阳性细胞; ↑ GnRHR 免疫活性阳性神经纤维; ≡≡≡ 消化道腔; ●固有膜层; ▲纵肌; △环肌; ★杯状细胞; 胰岛; ☆胰腺

1. Distribution of GnRH immunoreactive positive cells in the cardiac epithelium of *S. asotus*, ×200; 2. Morphology of GnRH immunoreactive positive cells in the fundus epithelium of *S. asotus*, ×400; 3. Distribution of GnRH immunoreactive positive cells in the pyloric gland of *P. fulvidraco*, ×100; 4. Morphology of GnRH immunoreactive positive cells in the intestinal epithelium of *P. fulvidraco*, ×400; 5. Morphology of a few GnRH immunoreactive positive cells in the intestinal membrana propria of *S. asotus*, ×400; 6. Morphology of a GnRH immunoreactive positive cell in the pancreas of *S. asotus*, ×400; 7. Distribution of GnRHR immunoreactive positive cells in the esophageal epithelium of *S. asotus*, ×100; 8. Distribution of GnRHR immunoreactive positive cells in the gastric epithelium of *S. asotus*, ×100; 9. Distribution of a few GnRHR immunoreactive positive cells in the fundus gland of *P. fulvidraco*, ×400; 10. Morphology of a GnRHR immunoreactive positive cell in the intestinal epithelium of *S. asotus*, ×400; 11. Expression of GnRHR immunoreactive positive in the pancreatic island of *S. asotus*, ×400; 12. Expression of GnRHR immunoreactive positive in the nerve plexus in myenteron of *S. asotus*, ×100

↑Immunoreactive positive cell; ↑ GnRHR immunoreactive neurofibræ; ≡≡≡ Lumen of digestive tract; ●Membrana propria; ▲Musculus longitudinalis; △Musculus circularis; ★Goblet cell; 胰岛; ☆Pancreas

