

# 小鼠胸腺 Ghrelin 阳性细胞的定位分布

张 媛, 李 英, 叶远兰, 马勇江, 李玉谷\*

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 以小鼠胸腺组织和原代培养的胸腺上皮细胞为研究材料, 采用免疫组织化学和免疫荧光组织化学技术对 Ghrelin 阳性细胞在小鼠胸腺中的定位分布进行了研究。结果显示, 小鼠胸腺中存在大量的 Ghrelin 免疫反应阳性细胞, 主要分布在髓质, 而皮质中只有少量呈零星分布的阳性细胞; 这些阳性细胞为胸腺上皮细胞和巨噬细胞, 其中不同表型的胸腺上皮细胞着色程度存在差异, 表明 Ghrelin 是胸腺微环境的组成部分。

**关键词:** Ghrelin; 胸腺; 免疫组织化学; 小鼠

**中图分类号:** S852.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2009)05-0122-03

## The Localization and Distribution of Ghrelin Positive Cells in Mouse Thymus

ZHANG Yuan, LI Ying, YE Yuan-lan, MA Yong-jiang, LI Yu-gu\*

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** To study the distribution of Ghrelin positive cells in mouse thymus, thymus gland tissue of mouse and primary cultural thymic epithelial cell (TEC) were studied by using immunohistochemistry and immunofluorescence histochemistry technology in this study. The results showed that Ghrelin immunopositive cells were found in the cortex and medulla of thymus, especially centralized in thymic medulla. The matrix cell in the medulla, such as TEC and macrophage, were all positive cells and different in coloring among cells. These results suggested that Ghrelin was expressed in the thymus of mouse and shows little difference in TEC of different phenotype. So, Ghrelin would be participate in protecting the thymic microenvironment.

**Key words:** Ghrelin; Thymus gland; Immunohistochemistry; Mouse

由胸腺基质细胞(上皮细胞、交错突细胞、巨噬细胞等)和细胞外基质构成的胸腺微环境, 为胸腺细胞的发育和分化提供了最适宜的场所<sup>[1]</sup>。胸腺微环境的变化, 直接影响胸腺细胞祖细胞的归巢及其随后的发育、分化和成熟, 导致胸腺结构、细胞构成、产生处女型 T 淋巴细胞的能力等发生变化, 从而影响机体的免疫功能<sup>[2]</sup>。Ghrelin 是 1999 年发现的一种含 28 个氨基酸残基的脑肠肽, 主要由胃黏膜的内分泌细胞分泌, 因它能刺激垂体前叶释放生长激素, 增加大鼠采食量而备受关注<sup>[3,4]</sup>。但近几年研究发

现, Ghrelin 及其受体在淋巴器官和各种白细胞亚群包括 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞, 以及单核细胞和树突状细胞中也存在<sup>[2,5]</sup>, 同时发现它在胃炎、关节炎、胰腺炎、内毒素休克等多种炎症性疾病中通过调节细胞因子分泌而发挥抗炎作用<sup>[5,6]</sup>。从 Ghrelin 在免疫系统的表达情况和在炎症性疾病中的作用来看, Ghrelin 可能在胸腺细胞发育及机体免疫功能的调节方面发挥了一定的作用。本试验就 Ghrelin 在小鼠胸腺中表达情况进行了研究, 旨在为进一步探讨 Ghrelin 的生理功能提供形态学依据。

收稿日期: 2009-01-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871834)

作者简介: 张 媛(1978-), 女, 山西太谷人, 实验师, 在读博士研究生, 主要从事动物组织胚胎学研究。

通讯作者: 李玉谷(1963-), 男, 江西萍乡人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物组织胚胎学研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1月龄BALB/c小鼠,由广州实验动物中心提供。兔抗小鼠Ghrelin抗体由上海申能博彩生物科技有限公司提供,SABC试剂盒由武汉博士德公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 胸腺的免疫组织化学染色 采用SP法对石蜡切片进行免疫组织化学染色。BALB/c小鼠脱颈椎处死,立即取胸腺,置于4%多聚甲醛固定液中,4℃固定过夜,常规石蜡包埋,5μm厚切片。进行免疫组化SABC法染色,并设立对照,确定该反应的特异性。切片滴加一抗兔抗鼠Ghrelin血清(稀释度为1:1000),37℃湿盒内孵育1h;用0.01mol/L的PBS(pH7.2)缓冲液洗3次,每次5min;滴加生物素标记的羊抗兔二抗工作液,37℃孵育30min;PBS冲洗;滴加链霉抗生物素结合的过氧化物酶偶联物(streptavidin peroxidase),37℃孵育30min;PBS液冲洗。用DAB显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,显微镜观察。阳性产物呈棕黄色;阴性对照组用PBS代替一抗,则无阳性产物。

1.2.2 胸腺上皮细胞培养 胸腺上皮细胞培养按文献[7]的方法进行。

1.2.3 体外培养胸腺上皮细胞的免疫细胞化学染色 去培养上清液后,用PBS清洗2次,再加多聚

甲醛固定15min,去固定液后,PBS清洗2次,染色方法及抗体稀释度同1.2.1。

1.2.4 胸腺的免疫荧光组织化学染色 常规石蜡切片、脱蜡、复水至蒸馏水,用PBS洗2次,滴甲醇配制的0.3%过氧化氢阻断液(Hydrogen Peroxide Block,HPB),10min,再用(UVB)正常血清封闭液,7min,滤纸吸除UVB(免洗),滴加抗体(一抗、二抗稀释度均为1:200),37℃孵育1h,PBS洗2次,荧光显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 胸腺的免疫组织化学染色

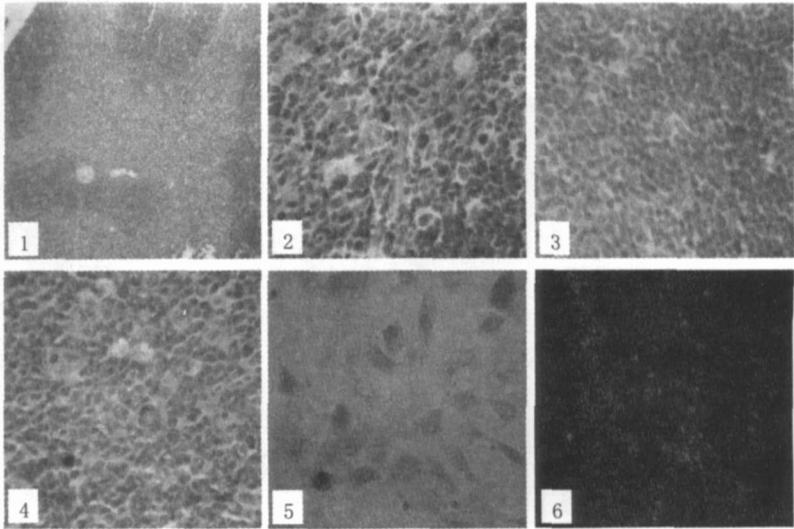
Ghrelin免疫反应阳性细胞呈深浅不等的棕黄色,低倍镜下可见Ghrelin阳性细胞在胸腺皮质呈零星分布,而胸腺髓质内较密集(图1-1)。皮质区被膜下上皮细胞及上皮性网状细胞、髓质区的髓质上皮细胞和胸腺小体上皮细胞均呈阳性反应;巨噬细胞也呈阳性反应;阳性反应程度在不同细胞之间有明显差异(图1-2、图1-3、图1-4)。

2.2 体外培养胸腺上皮细胞的免疫细胞化学染色

体外培养的胸腺上皮细胞呈Ghrelin阳性反应,细胞质着色,为棕黄色,细胞核不着色,细胞之间存在着色深浅差异(图1-5)。

2.3 胸腺的免疫荧光组织化学染色

荧光主要在胸腺髓质区,皮质区也有零星分布,其荧光有强弱差异(图1-6)。



1. 胸腺Ghrelin阳性反应的分布; 2. 胸腺髓质的Ghrelin阳性细胞; 3. 阴性对照; 4. 胸腺小体呈Ghrelin阳性反应; 5. 培养的胸腺上皮细胞呈Ghrelin阳性反应; 6. 胸腺Ghrelin免疫荧光染色

图1 Ghrelin阳性细胞在胸腺内的分布

### 3 讨论

Ghrelin 主要由胃的内分泌细胞分泌, 随后的研究发现, 它在很多方面通过不同的机制发挥作用<sup>[3~5]</sup>。有报道 Ghrelin 在脾、淋巴结等免疫器官或淋巴细胞有表达, 通过抑制炎症因子的产生而起免疫调节作用<sup>[5, 6, 8]</sup>。但至于胸腺中 Ghrelin 阳性细胞分布情况, 是否参与胸腺微环境来对胸腺 T 淋巴细胞发育分化产生影响以及在胸腺的增龄退化过程中起到的作用及其作用机制等一系列问题都有待解决。试验中发现, Ghrelin 在胸腺中尤其是在胸腺上皮细胞中表达, 而胸腺上皮细胞是胸腺微环境最重要的成分, 它们通过分泌可溶性分子以及细胞与细胞之间的相互作用, 对胸腺 T 淋巴细胞发育分化产生重要的影响。这提示 Ghrelin 作为胸腺微环境的组成部分, 参与影响胸腺 T 淋巴细胞的发育和分化。Dixit 报道, Ghrelin 是通过特有的配体—受体模式促进胸腺细胞发育、分化<sup>[9]</sup>。试验中还发现, 不同表型的胸腺上皮细胞的着色程度不同, 说明 Ghrelin 在不同表型的胸腺上皮细胞的表达量有差异。胸腺上皮细胞在胸腺中为一个动态的细胞群体, 其上皮细胞亚型的生物学特性与泛宿主性调节有关, 其功能也有差异<sup>[10]</sup>。由此推测, 胸腺上皮细胞中 Ghrelin 表达量也会影响到胸腺细胞发育分化的能力, 但其影响途径有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Mukamoto M, Okada T, Kodama H, *et al.* Effects of chicken thymic stromal cells on the growth and differentiation of thymocytes *in vitro* [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999, 68: 25—37.

rentiation of thymocytes *in vitro* [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999, 68: 25—37.

- [2] Dixit V D, Taub D D. Ghrelin and immunity: a young player in an old field [J]. *Experimental Gerontology*, 2005, 40: 900—910.
- [3] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402: 656—660.
- [4] Ueno H, Yamaguchi H, Kangawa K, *et al.* Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis [J]. *Regulatory Peptides*, 2005, 126: 11—19.
- [5] Dixit V D, Schaffer E M, Pyle R S, *et al.* Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114: 57—66.
- [6] Xia Q, Pang W, Pan H, *et al.* Effects of ghrelin on the proliferation and secretion of splenic T lymphocytes in mice [J]. *Regulatory Peptides*, 2004, 122: 173—178.
- [7] 陈培忠, 孙红琰, 云中杰, 等. 氟对小鼠胸腺及上皮细胞形态与功能的影响 [J]. *中国地方病学杂志*, 2005, 24(1): 21—24.
- [8] Hattori N, Saito T, Yagyu T, *et al.* GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 4284—4291.
- [9] Dixit V D, Yang H, Sun Y, *et al.* Ghrelin promotes thymopoiesis during aging [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117: 2778—2790.
- [10] Manley N R. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation [J]. *Semin Immunol*, 2000, 12(5): 421—428.

(上接第 121 页)

#### 参考文献:

- [1] Fang Xu, Paolo Sarti, Jin Zhang, *et al.* Halothane and isoflurane alter calcium dynamics in rat cerebrotal synaptosomes [J]. *Anesthesia & Analgesia*, 1998, 87: 701—710.
- [2] Lingamaneni R, Birch M L, Hemmings H C. Widespread inhibition of sodium channel-dependent glutamate release from isolated nerve terminals by isoflurane and propofol [J]. *Anesthesiology*, 2001, 95(6): 1460—1466.
- [3] Martine C, Daniel L, Andre P. Neurochemical characterization of dopaminergic neurons in human striatum [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2005, 11(5): 277—286.

- [4] 张惠, 徐礼鲜, 计根林, 等. 异丙酚麻醉时对人脑内氨基酸递质水平的变化 [J]. *华南国防医学杂志*, 2005, 19(2): 1—3.
- [5] 哈里逊. 哈里逊内科学 [M]. 赵华月, 译. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [6] 王铁华. 血液中氨基酸的 RP-HPLC 测定 [J]. *安徽医药*, 2001, 5(3): 216—217.
- [7] 郭燕舞, 蔡颖谦, 张世忠, 等. HPLC 法检测 PVS 患者脑脊液中氨基酸类神经递质 [J]. *中华神经医学杂志*, 2004, 3(4): 251—253.
- [8] 刘鸿洲, 尤瑞琛. 2, 4-二硝基氟苯柱前衍生法测定氨基酸的改进 [J]. *亚热带植物通讯*, 1999, 28(1): 47—50.
- [9] 刘焕奇. 犬用复合麻醉剂——QMB 的实验研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2001.