

鸡胚垂体生长激素细胞的发生及其变化

何玉琴^{1,2} 刘英² 刘佳利¹ 崔胜¹

(1. 中国农业大学 生物学院,北京 100094; 2. 甘肃农业大学 动物医学院,兰州 730070)

摘要 为研究鸡胚垂体中生长激素细胞的发生及其在发育过程中的变化,分别在鸡胚发育的第 3.5~20.5 天采集鸡胚垂体,用免疫组织化学方法研究鸡胚垂体中生长激素细胞的发生和细胞形态、数量、在垂体中的分布特点和在发育过程中的变化。结果表明,鸡胚发育中期第 9.5 天可观察到少量的生长激素阳性细胞散在分布于垂体后叶,细胞多排列成索状或团状,细胞之间边界不清,细胞核较大。在鸡胚发育的第 12.5 天以后,生长激素细胞的细胞浆与细胞核比值逐渐变小,且均匀分布于腺垂体的后叶。生长激素细胞数在鸡胚发育的第 12.5 天之后显著升高($P < 0.01$),在鸡胚发育的第 16.5 天,生长激素细胞占垂体细胞总数的 9.4%。以上结果证明鸡胚垂体中生长激素细胞增殖和分化过程主要发生在发育的中期至出壳之前,而生长激素细胞的分泌功能在鸡胚发育的后期最为活跃。

关键词 鸡胚;腺垂体;生长激素细胞;免疫组织化学

中图分类号 Q 132

文章编号 1007-4333(2004)03-0001-04

文献标识码 A

Ontogeny and the developing change of pituitary growth hormone (GH) cells of chick embryos

He Yuqin^{1,2}, Liu Ying², Liu Jiali¹, Cui Sheng¹

(1. College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Animal Medicine Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract To determine the ontogeny of pituitary GH cells and its change during the development of chicken embryos, the pituitary gland were collected from day 3.5 (E3.5) to E20.5 of incubation, and the expression, distribution of pituitary GH were then detected by immunohistochemistry. The results showed that very few scattered GH immunopositive cells were first detected in the caudal lobe of anterior pituitary gland at E9.5 of incubation. After E9.5 of incubation, it was observed that the number of GH positive cells increased, most of which located in the caudal lobe of anterior pituitary gland, and arranged in grape. While the nuclear/cytoplasm ratio between E9.5 and E20.5 gradually decreased. Cell counting results showed that percentage of GH positive cells accounting for total cell number was about 2% at E9.5, it then kept rising and reached 9.4% by E16.5 of incubation. These results suggest that the function of GH is much active during the late stage of the developing embryos, and the proliferation and differentiation of pituitary GH cells mostly occur between mid-incubation and before birth.

Key words chick embryo; anterior pituitary gland; growth hormone; immunohistochemistry

垂体是脊椎动物最重要的内分泌腺之一。由腺垂体分泌的生长激素(GH)具有促进个体生长发育、调节体内物质代谢等功能。对鸡胚发育过程中体内GH变化的研究结果证明,发育至第 17 天的鸡胚血

浆中可检测到 GH^[1],同时在垂体中亦可检测到 GH mRNA^[2];但迄今为止,对于鸡胚发育过程中垂体 GH 细胞的发生、发育以及垂体中 GH 的表达与体内 GH 的变化关系,尚缺乏系统的研究。本实验

收稿日期:2004-04-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170693,30325034)

作者简介:何玉琴,副教授,博士研究生;崔胜,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事动物生殖与发育调控机制的研究。

旨在利用免疫组织化学方法,对鸡胚胎发育过程中垂体 GH 细胞的发生、发育及其分布的变化进行研究,为认识垂体细胞中激素特异性细胞的分化机理及 GH 合成和分泌的调控机制提供重要的实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与药品

兔抗鸡 GH 多克隆抗体由美国激素与多肽研究中心(NHPP,美国) A. F. Parlow 教授赠送;生物素标记羊抗兔 IgG 购自 DAKO 公司(丹麦);辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素购自 Zymed 公司(美国);3,3'-二氨基联苯胺(DAB)购自 Sigma 公司(美国)。

1.2 实验动物与组织的采集

将白莱航鸡种蛋(购自中国农业大学畜牧场)在 37.5℃ 的孵化箱中孵化,分别孵育至第 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 8.5, 10.5, 12.5, 14.5, 16.5, 18.5 和 20.5 天,采集鸡胚。将正常发育的鸡胚以 4℃ 的磷酸盐缓冲液(PBS)进行低温麻醉后,用手术方法采集鸡胚头部(第 3.5~12.5 天的鸡胚)或垂体(第 14.5~20.5 天的鸡胚)。再经 PBS 漂洗后,用 0.04 g·mL⁻¹的多聚甲醛固定,按常规方法进行石蜡包埋。

1.3 免疫组织化学染色

对已包埋的组织作厚度为 5 μm 的连续切片,并贴裱于经 APES 处理的载玻片。经过常规脱蜡、水化后进行组织化学标记。首先,将组织切片置于 0.01 mol·L⁻¹的柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0),用微波进行抗原修复 20 min。然后用 3%(体积分数)过氧化氢处理 30 min 以消除内源性过氧化物酶,用 25%(体积分数)正常山羊血清封闭 30 min 以消除其非特异性染色。然后分别用兔抗鸡 GH 抗血清(1:500)在 4℃ 条件下孵育 24 h;用生物素标记的羊抗兔 IgG(1:300),在室温孵育 2 h;用辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(1:200 稀释)在室温孵育 2 h。最后用 DAB 显色 2 min 后,用苏木精进行复染,脱水、透明、光学树脂封片。

对照组实验用 PBS 分别代替上述兔抗鸡 GH 多克隆抗体、生物素标记羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶抗体,其他免疫组织化学标记方法与上述实验

方法相同。

1.4 细胞计数与数据统计分析

所有 GH 染色的垂体组织切片,在显微镜下选择四周和中央共 5 个区域,用目镜计数器在高倍镜(10×40)下计数,计算单位面积内的细胞总数和 GH 免疫组化染色阳性细胞。结果以 GH 免疫组化染色阳性细胞所占垂体细胞总数的百分比(平均值±标准差)表示。最后用 Student's *t*-test 检验及单因子方差分析(ANOVA)进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异显著。

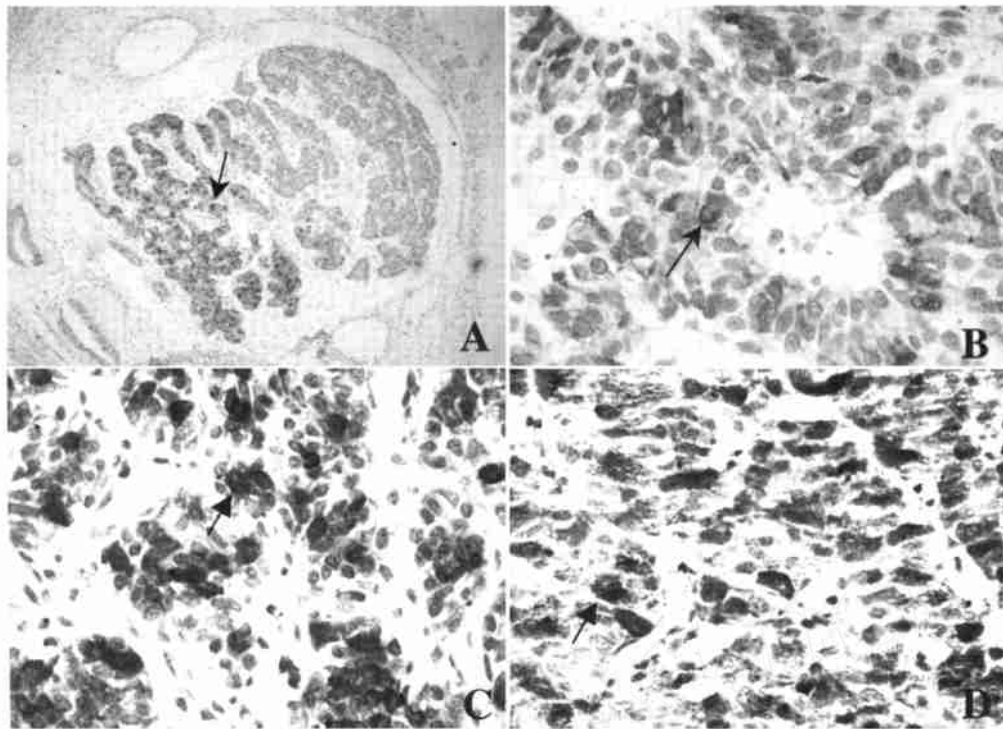
2 结果

2.1 鸡胚垂体中 GH 的表达以及 GH 阳性细胞的形态与分布

鸡胚发育第 3.5~7.5 天,Rathke's 囊或垂体中未见到 GH 阳性细胞。发育至第 9.5 天的鸡胚,垂体后叶可见到少数 GH 阳性细胞呈团状或索状分布。细胞多呈卵圆形或多角形,胞浆少,胞核大,胞核占细胞的大部分(图 1-A,B)。随着鸡胚的进一步发育和胚龄的增加,GH 阳性细胞的数量逐渐增多,并向整个垂体后叶延伸扩散。在鸡胚发育的第 14.5 天,细胞体积增大,细胞核所占细胞体积的比例明显减少,GH 阳性细胞均匀分布于整个垂体后叶。发育至第 16.5 天的鸡胚,GH 细胞多为卵圆形或圆形(图 1-C,D),这种分布状态持续到出壳。以上结果证明鸡胚胎垂体 GH 细胞发生于胚胎发育的中期,而在发育的第 9.5 天至出壳前,GH 细胞的增殖和分化过程最为活跃。

2.2 胚胎垂体中 GH 细胞的发生与变化

发育至第 9.5, 10.5, 12.5, 14.5, 16.5, 18.5 和 20.5 天的鸡胚,GH 阳性细胞占细胞总数的百分率分别为 2.2%, 3.6%, 7.0%, 7.6%, 9.4%, 14% 和 18.6%。即第 9.5~10.5 天的鸡胚,腺垂体后叶有少量散在的 GH 细胞;在鸡胚发育的第 12.5~20.5 天,GH 阳性细胞明显增加;在胚胎发育的第 16.5 天,GH 阳性细胞率显著高于第 12.5 天($P < 0.01$),且均匀分布于整个腺垂体的垂体后叶(图 2)。这一结果证明,垂体 GH 细胞的发生、增殖和分化过程主要发生在胚胎发育的第 9.5 天至出壳期。



A. 第 12.5 天的鸡胚垂体中 GH 阳性细胞分布于垂体后叶 (×10) ;
 B. 第 10.5 天 GH 阳性细胞少量散在分布,细胞核大,胞浆少 (×100) ;
 C. 第 16.5 天的垂体中 GH 细胞明显增加,均匀分布,细胞逐渐增大,胞浆逐渐增多 (×100) ;
 D. 第 20.5 天, GH 细胞显著增加,以大、中型细胞为主,多为卵圆形或圆形 (×100) 。
 箭头所示为典型的 GH 阳性细胞。

图 1 鸡胚垂体 GH 阳性细胞的分布与形态变化

Fig. 1 Changes of the pituitary GH immunopositive cells in morphology and cellular distribution of chick embryo

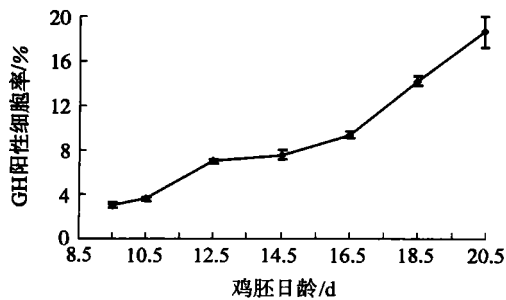


图 2 鸡胚垂体中 GH 阳性细胞率的变化

Fig. 2 Change in the percentage of GH immunopositive cells accounting for the total pituitary gland cells of the chick embryos

3 讨论

本研究结果显示,鸡胚垂体中 GH 细胞发生于胚胎发育中期,细胞的增殖和分化过程主要发生在发育中期至出壳之前。这一结果证明了 Murphy 和 Harvey 等的报道^[3],即鸡胚胎孵化的前 7 d,在腺垂体原始细胞发生的部位 (Rathke's pouch) 没有 GH

阳性细胞出现。Malamed^[4]的研究结果证明,鸡胚垂体 GH 细胞最早发生于孵化的第 12 天, GH 阳性细胞占腺垂体细胞总数的百分比由 12 d 的 0.2 % 提高到出壳前的 20.7 %。笔者的研究结果证明鸡胚胎生长激素细胞发生于孵化的第 9.5 天,比以前报道^[4,5]的早 3 d;在胚胎发育后期,生长激素细胞占腺垂体细胞总数的比率与 Malamed 等人的报道^[4]研究结果相似。但随着胚龄的增加,生长激素细胞占腺垂体细胞总数的比率不断增加,并持续到出壳之前。上述研究结果提示,生长激素阳性细胞的分裂增殖过程主要发生在鸡胚发育的后期。

Takahashi^[6]的研究结果证明,在大鼠胚胎发育的早期, GH 细胞体积较小,数量较少,胞质内多为小分泌颗粒,多为幼稚细胞,而随着胚胎的发育, GH 细胞胞体逐渐增大,数量增多,胞浆内多为大分泌颗粒,且多聚集成团。本实验结果证明,鸡胚胎垂体 GH 细胞的发育与大鼠的发育过程相似,即 GH 细胞是由少到多,从幼稚到成熟的过程,但在 GH 细胞

的发育在胚胎发育的第 14.5 天以后最活跃。另外,本研究结果还证明鸡胚生长激素细胞在鸡出壳前 2 d 有一个迅速增加阶段。与此同时,腺垂体中 GH-mRNA 的表达^[2]和血浆中生长激素含量也显著升高^[1]。所以,垂体 GH 细胞在胚胎发育的后期已具有分泌相应激素的功能。

本研究结果证明了鸡胚垂体中 GH 阳性细胞发生于胚胎中期,而其增殖和分化过程主要发生在胚胎发育的中后期;但对于调节 GH 细胞发生、增殖和分化的细胞和分子机理有待进一步的研究。

中国农业大学生物学院的田兴贵、刘忠霞等同志对本项研究工作给予了支持和帮助,在此感谢。

参 考 文 献

- [1] Harvey S, Johnson C D, Sharma P, et al. Growth hormone: a paracrine growth factor in embryonic development[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1998, 119: 305 ~ 315
- [2] McCann-Levors L M, Radecki S V, Donoghue D J, et al. Ontogeny of pituitary growth hormone and growth hormone mRNA in the chicken[J]. *Soc Exp Biol Med*, 1993, 202: 109 ~ 113
- [3] Murphy A E, Harvey S. Extrahypothalamic TSH and GH in early chick embryos[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 185: 161 ~ 171
- [4] Malamed S, Gibney J A, Cain L D, et al. Immunocytochemical studies of chicken somatotrophs and somatotroph granules before and after hatching[J]. *Cell Tissue Res*, 1993, 272: 369 ~ 74
- [5] Thommes R C, Umporowicz D M, Leung F C, et al. Ontogenesis of immunocytochemically demonstrable somatotrophs in the adenohypophyseal pars distalis of the developing chick embryo [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1987, 67: 390 ~ 39
- [6] Takahashi S. Immunocytochemical and immunoelectronmicroscopical study of growth hormone cells in male and female rats of various age[J]. *Cell Tissue Res*, 1991, 266: 275 ~ 84

成果介绍

“十五”国家科技攻关计划“畜禽规模化优质高效养殖关键技术研究产业化示范”项目验收结束,我校主持的 6 个课题全部通过验收

“十五”国家重点科技攻关计划“畜禽规模化优质高效养殖关键技术研究产业化示范”项目于 2002 年 2 月正式启动。项目围绕畜禽高效高产、产品安全、资源开发、环境保护等重大技术难点集中优势力量进行联合攻关研究,并将取得的技术突破和成果组装集成,在规模化养殖与产业化示范中推广应用,取得了丰硕成果并产生了显著的经济效益和社会效益,为带动全国畜牧业产业化技术水平的升级、为解决我国畜牧业发展中的技术瓶颈问题缩短我国畜牧业科技与国际先进水平的差距、提高我国畜产品的市场竞争力、促进畜牧业“十五”战略目标的实现提供了坚实的技术支撑。

农业部的验收工作陆续于 2004 年 4 月底顺利完成,其中我校主持的 6 个课题是:

- 1 新兽药研制开发与抗药性检测技术研究
- 2 兽药安全评价及残留检测技术研究
- 3 畜禽营养调控关键技术研究
- 4 饲料资源开发产业化利用关键技术研究
- 5 蛋鸡育种与健康养殖关键技术研究及示范
- 6 绒山羊种质特性利用与舍饲半舍饲养殖技术研究

(科学技术处供稿)