

## 鸡胚发育过程中垂体促乳素的表达及其细胞的发育

何玉琴<sup>1,2</sup> 刘英<sup>2</sup> 刘佳利<sup>1</sup> 崔胜<sup>1</sup>

(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** 利用免疫荧光标记方法研究了鸡胚发育过程中垂体促乳素(PRL)细胞的发生。结果表明,在鸡胚发育的第14.5天可观察到有少量PRL免疫荧光阳性细胞散在分布于腺垂体前叶。随着胚龄的增加,垂体PRL细胞的体积逐渐增大,细胞直径从第14.5天的6.83 μm增加到第20.5天的11.24 μm,胞核直径从4.27 μm增加到5.99 μm。PRL细胞占腺垂体细胞总数的百分比在胚胎发育的第14.5天为0.86%,第20.5天增加到18.85%,并且分布于整个腺垂体前叶,细胞多呈索状排列或团状分布。研究结果表明,鸡胚垂体催乳素细胞的增殖、分化和对PRL的分泌功能主要发生和建立于胚胎发育后期。

**关键词** 鸡胚;腺垂体;催乳素细胞;免疫荧光标记

中图分类号 Q 132

文章编号 1007-4333(2004)04-0001-03

文献标识码 A

## Developing changes of the pituitary lactotropes in the developing chicken embryo

He Yuqin<sup>1,2</sup>, Liu Ying<sup>2</sup>, Liu Jiali<sup>1</sup>, Cui Sheng<sup>1</sup>

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

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

**Abstract** In the present study, the ontogeny of pituitary lactotropes and the changes of cellular morphology, distribution and number containing PRL were detected in the developing chicken embryos from day 3.5 (E) to E20.5 of incubation by using immunofluorescence chemistry. The results indicated that prolactin (PRL) positive cells were first detected at E14.5 of incubation in cephalic lobe of the anterior pituitary, and this distributing pattern persisted in the duration of this study. In addition, the diameters of PRL positive cells and the nuclear at E14.5 were 6.83 μm and 4.27 μm, which increased to 11.24 μm and 5.99 μm by E20.5 respectively. Most of them arranged in grapes. Cell counting results showed that the percentage of PRL positive cell accounting for the total pituitary cells was about 0.86% at E14.5 of incubation, after which this percentage significantly increased and rose up to 18.85% by E20.5. These results suggest the proliferation, differentiation and the functional initiation of pituitary lactotrope occur in the late stage of the developing chicken embryos, but the related mechanisms need to be elucidated further.

**Key words** chicken embryo; pituitary; lactotrope; immunofluorescence chemistry

促乳素(PRL)由腺垂体的PRL细胞分泌。PRL除了具有促进哺乳动物乳腺发育、启动和维持乳腺泌乳功能,还对动物生殖、生长、发育、代谢、免疫以及神经系统信号传递等具有重要的调节功能<sup>[1]</sup>。成年动物PRL细胞的功能及调节机制建立于胚胎期,因此有关胚胎期垂体PRL细胞的发生、

发育和调控机制的建立受到重视;但是,由于研究方法不同,所得结果并不完全一致<sup>[2~6]</sup>。一般认为鸡胚垂体中PRL细胞或PRL-mRNA的表达发生于胚胎发育的第15天<sup>[2~5]</sup>,另有报道,在胚胎发育的第18天可检测到垂体PRL-mRNA的表达和血浆PRL水平<sup>[5]</sup>;但到目前,有关垂体PRL细胞的发生发育

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,在职博士研究生;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。

与体内 PRL 激素含量之间的变化关系仍不清楚。为此,本研究利用免疫荧光组织化学方法研究了鸡胚发育过程中 PRL 细胞的发生/发育以及细胞形态与数量的变化,为 PRL 发育生物学的研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和药品

羊抗鸡 PRL 多克隆抗体由英国 MRC PJ Sharp 教授赠送; FITC 标记兔抗羊 IgG 购自英国 Scotland Antibody Product Unit。

### 1.2 实验动物与组织采集

将白莱航鸡种蛋(购自中国农业大学畜牧场)置于 37.5 °C 的自动孵化箱孵化。在鸡胚发育的第 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 8.5, 10.5, 12.5, 14.5, 16.5, 18.5 和 20.5 天,分别选择正常发育的 6 个鸡胚,用 4 °C 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),经 PBS 漂洗,0.04 g·mL<sup>-1</sup>多聚甲醛固定,常规方法石蜡包埋。

### 1.3 免疫荧光组织化学标记

对包埋的组织块做厚度为 5 μm 的连续切片,贴裱在经 APES 处理的载玻片上。然后按下列方法进行 PRL 的免疫荧光标记:1)对组织切片按常规方法脱蜡、水化;2)0.01 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后,加 25%(体积分数)正常山羊血清(NGS)封闭 30 min。3)将山羊血清用滤纸吸去后,加兔抗鸡的 PRL 抗血清(1:500),对照组滴加等量 PBS 替代 PRL 抗血清,切片放入湿盒中,4 °C 冰箱过夜;4)PBS 漂洗后,加 FITC 标记兔抗羊 IgG(1:30),在湿盒中室温孵育 2 h;5)PBS 漂洗后,用 Hoechst 进行复染,显示细胞核;6)用 25%(体积分数)的甘油封片。

### 1.4 细胞形态观察和细胞直径的测量

在荧光显微镜(Leica DMLB)下观察、分析 PRL 的细胞的变化,以 Leica DC 100 进行数码照相,同时应用 Leica 图像处理系统(Leica image database)在 400 倍图像中测量 PRL 阳性细胞和细胞核的直径,每组测 10 个细胞,计算其平均值。

### 1.5 细胞计数和数据统计分析

所有 PRL 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 PRL 免疫组化染色阳性细胞,结果以 PRL 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 t 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 结果与讨论

### 2.1 鸡胚 PRL 阳性细胞的形态、分布及其变化

鸡胚发育的第 3.5~14.5 天,在垂体中未观察到 PRL 阳性细胞。在鸡胚发育的第 14.5 天,用免疫荧光标记方法可观察到少量 PRL 阳性细胞散在分布于腺垂体前叶,这比大部分文献所报道的早 1~3 d<sup>[2,6]</sup>;但细胞体积小,多为圆形或卵圆形(图 1-A),细胞核大,且血浆中难以检测到 PRL<sup>[6]</sup>。由此证明鸡胚垂体 PRL 细胞发生于胚胎发育的第 14.5 天,但 PRL 细胞尚未完全分化,对 PRL 的分泌功能较弱或者缺少。在鸡胚发育的第 16.5~20.5 天, PRL 阳性细胞显著增加,并均匀分布于整个腺垂体前叶(图 1-B),细胞密集呈团状或索状分布(图 1-C)细胞体积增大(图 1-D),细胞直径从第 14.5 天的 6.83 μm 增加到第 20.5 天的 11.24 μm,胞核直径从 4.27 μm 增加到 5.99 μm。由此说明 PRL 细胞的增殖和分化过程主要发生在发育的后期,细胞数目的增加是细胞分裂增殖的结果。

### 2.2 鸡胚垂体中 PRL 阳性细胞率的变化

在鸡胚发育的第 14.5, 16.5, 18.5 和 20.5 天(出壳期),PRL 阳性细胞占细胞总数的百分率分别为 0.86%, 5.23%, 15.07% 和 18.85%(图 2),这一结果证明,垂体 PRL 细胞发生、增殖和分化过程主要发生于胚胎发育的第 14.5 天至出壳期(图 2)。PRL 阳性细胞率的这种变化趋势与垂体 PRL-mRNA 的表达<sup>[5,6]</sup>、血浆中 PRL 含量的变化<sup>[6]</sup>相应一致。因此,在鸡胚发育后期,垂体 PRL 阳性细胞率、PRL-mRNA 的表达和体内 PRL 含量在鸡胚发育后期的这种平行性变化证明垂体 PRL 细胞的分泌功能也发生于胚胎发育后期。

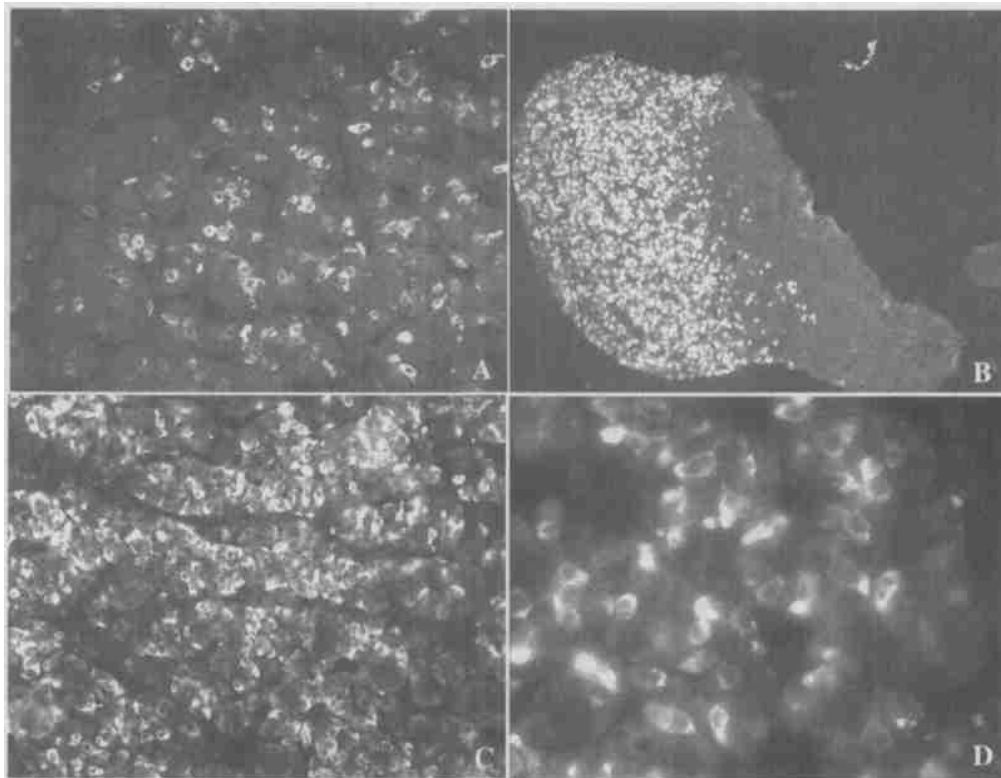


图 1 不同发育时期鸡胚的 PRL 阳性细胞(免疫荧光标记)的数量变化

Fig. 1 PRL immunopositive cells in pituitary of chick embryo

- A. 第 14.5 天散在分布(占腺垂体细胞总数的 0.86%) ,细胞体积小(×400)
- B. 第 18.5 天均匀分布于腺垂体前叶(×200)
- C. 第 18.5 天 PRL 阳性细胞显著增加(占 15.07%) ,细胞排列成团状或索状(×400)
- D. 第 18.5 天细胞体积增大 ,细胞为圆形或卵圆形(×1 000)

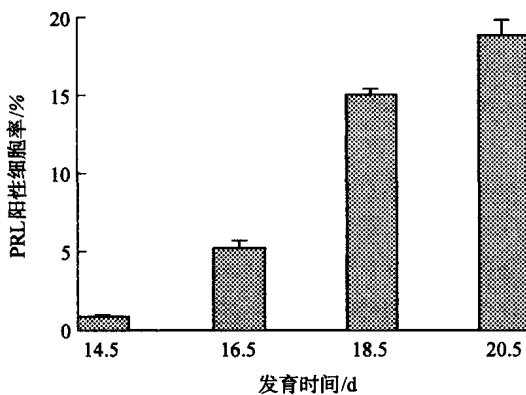


图 2 鸡胚各期 PRL 阳性细胞率变化

Fig. 2 Changes of PRL immunopositive cells percentage

中国农业大学生物学院的田兴贵、刘忠霞等同志给予了支持和帮助,在此感谢。

### 参 考 文 献

- [1] Bole-Feysot C, Coffin V, Edery M, et al. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice[J]. *Endocr Rev*, 1998, 19: 225 ~ 268
- [2] J ása R, Scanes C G, Vigh S, et al. Functional differentiation of the chicken embryonic pituitary gland studied by immunohistological approach[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1979, 39: 158 ~ 163
- [3] Woods K L, Porter T E. Ontogeny of prolactin-secreting cells during chick embryonic development: effect of vasoactive intestinal peptide [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1998, 112: 240 ~ 246
- [4] Harvey S, Davison T F, Chadwick A. Ontogeny of growth hormone and prolactin and secretion in the domestic fowl[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1979, 39: 270 ~ 273
- [5] Ishida H, Shimada K, Sato K, et al. Developmental expression of prolactin gene in the chicken[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1991, 83: 463 ~ 467
- [6] Kansaku N, Shimada K, Terada O, et al. Prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone subunit gene expression in the cephalic and caudal lobes of the anterior pituitary gland during embryogenesis and different reproductive stages in the chicken[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1994, 96: 197 ~ 205