

肉鸡胚胎发育过程中肝脏的组织学观察

那威, 吴媛媛, 王宇祥, 李辉

(东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 肝脏是家禽体内最大的消化腺, 其发生发育与功能的行使紧密相连。本研究从组织学的角度观察肉鸡肝脏组织在胚胎发育过程中的特点, 并比较高、低脂系间肝脏组织在发育过程中的区别。结果发现, 肝叶体积随日龄的增长而增加; 胚胎发育至 12 日龄时肝小叶结构基本发育完整; 在胚胎发育后期, 肝细胞内脂滴明显增加, 且肝叶周边的肝细胞较肝叶中心的肝细胞增殖活动旺盛。而在整个胚胎发育过程中, 两系间肝细胞内脂滴沉积并没有明显的区别。

关键词: 鸡胚; 肝脏; 组织学观察

中图分类号: S831.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2012)11-0111-05

鸡胚是发育生物学研究中常用的脊椎动物模型, 肝脏作为脊椎动物体内重要的消化腺之一, 参与多种物质代谢活动(Calabotta 等, 1985), 是研究生长发育及脂类代谢的理想模型。与哺乳动物不同, 禽类肝脏是合成脂肪的主要场所。鸡的脂肪酸合成仅很少部分是在脂肪组织中进行的, 大部分是在肝脏中完成的(Goodridge 等, 1968)。

家禽肝脏的组织学结构包括肝小叶、被膜和门管区三部分。肝脏表面覆盖的浆膜称被膜; 被膜深入肝内形成的小叶间结缔组织将肝实质分成的很多小隔称为肝小叶, 肝小叶是肝脏的结构单位。在每

个肝小叶的周围均存在着由结缔组织包围的包括小叶间动脉、小叶间静脉和小叶间胆管在内的门管区。与哺乳动物相比, 家禽的小叶间结缔组织不发达, 故肝小叶间无明显的分界(程树军, 1994), 只能依据中央静脉和门管区的位置来判断。肝小叶中央是中央静脉, 以中央静脉为中心辐射排列着下列结构: 肝板、肝血窦和窦周隙。鸡的肝板是由两排肝细胞组成(哺乳动物肝板只有一排肝细胞); 肝板之间的不规则的、互相贯通成网的腔隙称为肝血窦, 由一层内皮细胞构成; 肝血窦内皮和肝细胞之间的狭小裂隙是窦周隙, 是肝细胞和血液之间进行物质交换的场所。

胚胎期肝脏的发育和肝脏功能的正常行使有着紧密的关系, 因此了解肝脏的发生发育过程有着重要的意义, 然而对鸡胚肝脏发生发育的研究鲜有报道(张德禄等, 2002)。本研究以肉鸡鸡胚的肝脏组织为试验材料, 制备石蜡组织切片, 通过 HE 染色, 分析鸡胚发育过程中肝脏的组织学变化并比较两系间的差异, 为肝脏组织的相关研究奠定基础。

收稿日期: 2012-05-02

作者简介: 那威(1986—), 女, 黑龙江人, 硕士, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。

通信作者: 李辉。E-mail: lihui645@hotmail.com

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-42); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB941604); 黑龙江省高等学校科技创新团队建设(2010td02)。

Research Progress on Genes and Signal Pathways Associated with Lactose Synthesis and Lactation in Dairy Cows

LI Wen-qing, WANG Jia-qi, NAN Xue-mei, SUN Peng

(State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Lactose is a special component of milk and is closely related to milk yield. The factors of influencing lactose synthesis are extensive. The paper reviews the related genes and cell signaling pathways, including glucose transporters, intracellular catalytic lactose synthesis enzymes, hormones (insulin, prolactin, growth hormone, leptin, glucocorticoid), cell factors (IGF- I, IGF- II, EGF) and its main cell signal transduction pathway.

Key words: lactose; glucose transporters; insulin-like growth factor; growth hormone; prolactin; cell signal transduction pathways

1 材料与方法

1.1 试验材料 以东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择品系第14世代鸡为试验材料,收集高、低脂系种蛋各50枚,入孵后取7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21日龄高、低脂系鸡胚的肝脏组织(入孵后7日龄命名为E7,以此类推),制作石蜡切片,每个时间点取3只个体作为生物学重复。

1.2 试验方法 敲开气室部位的蛋壳,取出胚胎,摘下肝脏,迅速放入5%戊二醛中固定。固定后的组织首先用梯度酒精脱水;然后二甲苯I(100%酒精:二甲苯=1:1)透明1~1.5h,二甲苯II(纯二甲苯)透明2~3h;将透明后的组织依次放入石蜡I(13石蜡+23二甲苯)、石蜡II(23石蜡+13二甲苯)、石蜡III(纯石蜡)中各3h,包埋切片,常规HE(苏木精-伊红)染色;最后用树胶进行封片,放置光学显微镜下进行观察(成都励扬显微成像系统)并拍照。

2 结果与分析

2.1 鸡胚发育过程中肝脏显微结构的观察与分析

鸡胚肝脏的发育过程伴随着肝细胞索结构的延伸、肝血窦的减小和肝内脉管的血管化过程。观察各日龄的鸡胚肝脏组织切片(图1),发现7日龄肝脏(图1A)的肝小叶及肝细胞索结构不明显,肝细胞多为双核,细胞核居肝细胞中央,占细胞大部分体积,肝细胞排列无规则,细胞质嗜酸性;可观察到肝板结构(肝板由2层肝细胞组成);中央静脉不明显;肝组织疏松,肝血窦腔隙大,内有红细胞出现。8日龄时(图1B),与7日龄相比,初具肝细胞索雏形,肝血窦减小,其中散在的红细胞较多,中央静脉较明显。鸡胚发育至9~10日龄(图1C)时可观察到明显的肝细胞索结构,肝血窦进一步变小,肝细胞核位于肝血窦侧,肝组织较致密。12日龄(图1D)时结构发育完整,可观察到小叶间静脉、小叶间动脉、小叶间胆管,肝血窦排列整齐,肝细胞核膜、核仁清晰可见,肝细胞内出现少量空泡。13日龄时(图1E),窦状隙变小,肝板排列不如从前整齐;14日龄时(图1F),肝组织更加致密,肝血窦变窄,肝叶周边的肝细胞核及核糖体染色较肝叶中心的深;15日龄

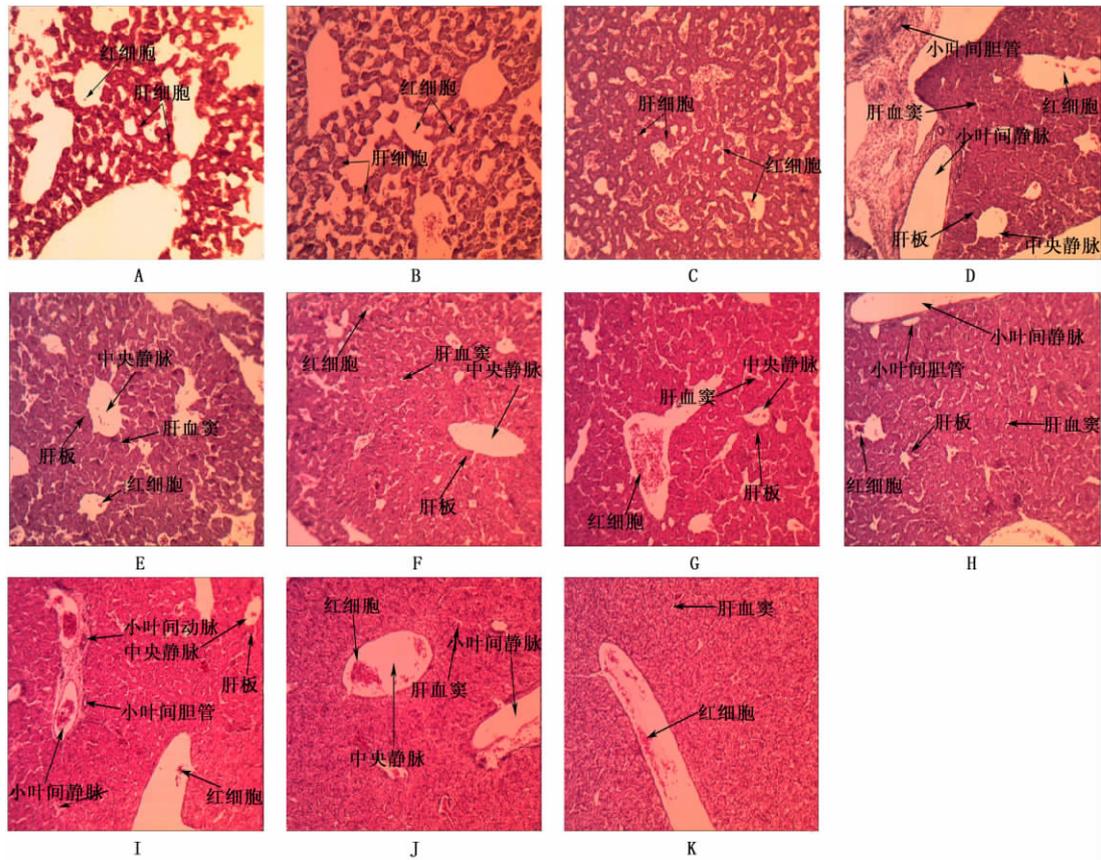


图1 肉鸡胚胎发育过程中肝脏的组织学观察(低脂系)

注:A~K分别为发育7、8、9、12、13、14、15、16、18、19及21日龄的肝脏组织(HE染色,100×);图中细胞核和核糖体染为蓝紫色,细胞质染为红色。

(图 1G)时,肝板结构不明显,细胞稍有肿胀,肝血窦进一步变窄;鸡胚肝脏发育至 16~18 日龄(图 1H、1I)时,中央静脉壁增厚,肝叶周边的肝细胞核及核糖体较肝叶中心区域丰富,染成较深的蓝紫色。从 19 日龄(图 1J)鸡胚肝脏的组织切片可以看出,肝叶周边肝细胞的细胞核和核糖体染色较肝叶中心区域肝细胞的深,但与 16 和 18 日龄相比,差异不明显。两系间肝脏的发育过程及显微结构并无差异。

2.2 鸡胚发育过程中肝细胞内脂滴的观察与分析

胚胎发育过程中肝细胞内脂滴变化较明显,体现肝脏内脂类代谢活动日益增强。观察鸡胚发育过程

中肝细胞内的脂滴变化情况(图 2),结果发现:7 日龄时肝细胞内未见明显的脂滴;发育至 12 日龄(图 2A、2E)时在显微镜下观察到少量的脂滴;15 日龄时,肝细胞内脂滴数量有所增加,但体积变化不大;17 日龄(图 2B、2F)时,肝细胞脂滴数量增加,体积稍有增大;19 日龄(图 2C、2G)时,肝细胞内脂滴数量继续增加,体积增大;21 日龄(图 2D、2H)的鸡胚肝细胞内可观察到数量较多的、体积较大的脂滴,细胞核被挤到细胞的边缘。但肉眼观察判断各日龄两系间的脂滴无明显区别。

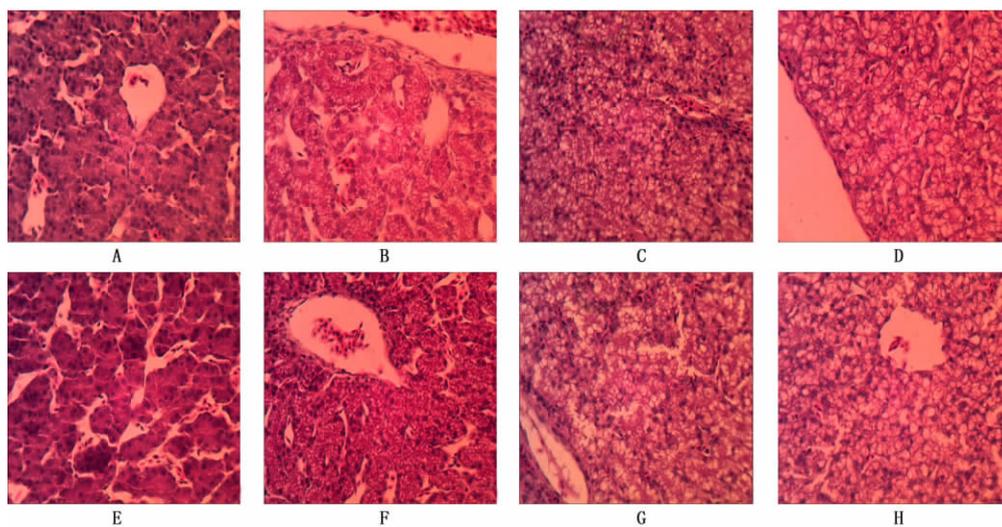


图 2 高、低脂系肉鸡鸡胚肝细胞内脂滴的观察(HE 染色,400×)

注:A、B、C、D 分别代表低脂系肉鸡发育 12、17、19、21 日龄的肝脏,E、F、G、H 分别代表高脂系肉鸡发育 12、17、19、21 日龄的肝脏,脂滴在图中呈空泡状。

3 讨论

肝脏是动物体内重要的代谢器官,参与机体多种物质如糖原、胆固醇、脂蛋白及血浆蛋白的合成和代谢过程。与哺乳动物不同,禽类肝脏还是其脂质合成的最主要场所(Evans 等,1972),与脂类代谢密切相关。胚胎期肝脏的发生发育影响其功能的行使,因此了解其发生发育过程对解析禽类脂类代谢特点具有十分重要的意义。

3.1 肝脏的发育过程 通过解剖 7 日龄的鸡胚,结果发现此时鸡肝脏的 3 个肝叶均已形成,右叶肝最大,左叶肝分为两个小叶,后腹部小叶相对后背部小叶稍大些。此结果与 Sanong 等(2004)的结果是一致的,肝脏在鸡胚发育至 4 日龄时肉眼可见;发育至 6 日龄时肝的第二叶已经形成;发育至 7 日龄时肝的第三叶也已经形成,初步形成特定形状的肝脏。

肝脏的发育最早开始于 20~22 体节(孵化 50~53 h),在前肠腹壁出现内胚层憩室,并不断向腹侧延伸,进入到横隔的间充质中(Douarin 等,1975),此内胚层憩室的末梢部分最终发育成肝脏,其相邻部分发育成胆管和胆囊(Romanoff 等,1960)。肝脏的发育是肝细胞不断增殖,肝叶体积不断增加的过程。通过对鸡胚肝脏的组织学观察,发现肝叶体积随日龄的增加而增大,而且肝叶周边细胞内的核糖体较肝叶中心细胞内的核糖体多,其染色也较深,这一结果暗示肝叶周边的肝细胞增殖活动较旺盛。王凤华等(2008)研究结果表明,孵化的鸡胚其肝细胞第 7、8 天前存在一个较高的增殖期,随后迅速降低,增殖活跃区由肝叶中心转移到肝叶周边,其可能的原因是孵化 8 d 的鸡胚肝脏内部组织结构已接近成熟,8 d 后主要是肝细胞数量增多

和体积增大的过程。肝脏的发育过程同时伴随着肝索结构的延伸和复杂的成血管化过程,包括中央静脉、肝动脉及肝血窦的分化(Gouysse等,2002)。本研究通过对鸡胚肝脏的组织学观察,结果发现7日龄时肝脏组织较疏松,肝细胞排列无规则,肝细胞索、肝小叶等结构不明显;肝血窦腔隙较大;能观察到中央静脉,但是不明显。随着发育的进行,肝细胞不断增殖,形成肝细胞索结构;肝索结构不断充实肝小叶,使肝血窦不断减少;中央静脉明显,小叶间动脉、小叶间静脉、小叶间胆管等逐步形成。

3.2 肝脏内的脂类代谢 哺乳动物胚胎发育过程中能源物质为葡萄糖(Liggins等,1990)。与哺乳动物不同,鸡胚发育早期其主要能源物质为葡萄糖和氨基酸(Freeman等,1974;Romanoff等,1967),此时期是羊膜、尿囊膜及卵黄囊膜形成的主要时期(Romanoff等,1960);鸡胚发育中后期是主要生长期,其生长发育所需的能量均来自卵黄中的脂类(Noble等,1990)。在鸡胚发育中后期也就是孵化的第13~17天(Noble等,1967),卵黄囊膜通过吞没或吞噬作用吸收卵黄中的脂类(Kanai等,1996),并对其进行改造,形成新的脂蛋白被机体利用。脂类转移过程中剩余残基物(富含油酸—胆固醇酯)在胆固醇脂酰转移酶的作用下转化成胆固醇(Suckling等,1985),被肝脏吸收并以脂滴的形式贮存,但肝细胞基质及微粒体中的中性胆固醇水解酶可以水解脂滴,所以肝细胞中脂滴的含量取决于以上两种酶的相对活性(John等,1994)。有研究证明肝细胞中中性胆固醇水解酶的活性很低,但卵黄囊膜中的胆固醇脂酰基转移酶的活性却很高,所以在胚胎发育中后期有大量胆固醇生成,贮存在肝细胞中,导致肝脏内的脂滴大量增加(Freeman等,1974)。本研究中也得到类似的结果,通过对鸡胚发育过程中肝细胞内脂滴的观察,发现在胚胎发育早期,观察不到明显的脂滴;发育至12日龄时,两系肝细胞中均出现少量脂滴;随着发育过程的进行,脂滴的数量不断增加、体积不断增大;发育至21日龄时,脂滴充满整个肝细胞。

通过比较高、低脂系肉鸡胚胎发育过程中肝细胞中的脂滴含量,结果发现在两系间并没有明显的区别,推测其原因可能有两点:①本研究中所使用的试验材料是东北农业大学育种基地建立的肉鸡高、低腹脂双向选择品系,该群体是利用腹脂率和血浆

VLDL浓度作为选择标准选育出来的,目前已经进行了14个世代的选育。这两个品系从第4世代开始,在体重没有差异的情况下,腹脂率就已经达到极显著的水平,在14世代高脂系腹部脂肪的重量是低脂系的4.5倍。由于这两个品系起源于一个品种,本试验仅仅是从腹脂率和血浆VLDL浓度两个方面进行的选择,这种选择方式对胚胎期卵黄囊膜的发育及功能影响不大,所以本研究观察到胚胎期两系间肝细胞内脂滴沉积无差异。②胚胎期肝脏也具有脂蛋白合成与分泌的能力。本实验室前期研究结果显示高、低脂系肉鸡在7日龄时,腹脂重和腹脂率出现显著性差异;但在5日龄时,两系间并没有差异(Guo等,2011),而脂肪是在肝脏中合成,并以脂蛋白的形式转运到脂肪组织中储存的,这一结果暗示5日龄之前两系间肝脏合成脂肪的能力没有差异。这也从另一个角度解释了胚胎期两系间肝细胞中脂滴沉积无差异的原因。

本研究中,高、低脂系肉鸡肝脏在发育过程及脂滴沉积上均无区别,但这仅仅是组织学观察的结果,后期还会从分子水平进一步研究参与肝脏发育及脂类代谢的基因和蛋白,并比较两系间的差异,对肝脏发生发育过程及胚胎期肝脏内脂类代谢情况做更深入的了解。

参 考 文 献

- 1 王凤华,戚飞,王磊,等.鸡胚肝脏发育过程中增殖细胞核抗原及核仁组织区的免疫组化观察[J].中国兽医杂志,2008(9):87~88.
- 2 沈霞芬.家畜组织学与胚胎学[M].第3版.北京:中国农业出版社,2001.
- 3 张德禄,俞诗源,刘世倩,等.红腹锦鸡肝脏的显微结构观察[J].西北师范大学学报:自然科学版,2002,38(2):61~63.
- 4 罗克.家禽解剖学与组织学[M].福州:福建科学技术出版社,1983.
- 5 程树军.肝脏组织切片观察[J].中国实验动物学杂志,1994(1):15~16.
- 6 廖望,付晶,白秀娟.冷应激鸭盲肠、直肠的超微组织学病理观察[J].中国畜牧兽医,2012,39(3):174~181.
- 7 Calabotta D F, Cherry J A, Siegel P B, et al. Lipogenesis and lipolysis in fed and fasted chicks from high and low body weight lines[J]. Poultry Science, 1985, 64(4):700~704.
- 8 Douarin N M. An experimental analysis of liver development[J]. Med Biol, 1975, 53(6):427~455.
- 9 Evans A J. *In vitro* lipogenesis in the liver and adipose tissues of the female Aylesbury duck at different ages[J]. Poultry Science, 1972, 13(6):595~602.
- 10 Freeman B M, Vince M A. Development of the avian embryo. A behavioural and physiological study[M]. London: Chapman and

- Hall, 1974.
- 11 Goodridge A G. Lipolysis *in vitro* in adipose tissue from embryonic and growing chicks[J]. Am Physiological Society, 1968, 214(4): 902~907.
 - 12 Gouysse G, Couvelard A, et al. Relationship between vascular development and vascular differentiation during liver organogenesis in humans[J]. Journal of Hepatology, 2002, 37(6): 730~740.
 - 13 Shand J H, West D W, et al. The esterification of cholesterol in the liver of the chick embryo[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1994, 1213(2): 224~230.
 - 14 Kanai M, Soji T, Sugawara E, et al. Participation of endodermal epithelial cells on the synthesis of plasma LDL and HDL in the chick yolk sac[J]. Microscopy Research and Technology, 1996, 35(4): 340~348.
 - 15 Liggins G C. Reproduction in mammals. Book 2: Embryonic and fetal development [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
 - 16 Guo L, Sun B, Li H. Comparison of adipose tissue cellularity in chicken lines divergently selected for fatness[J]. Poultry Science, 2011, 90(9): 2024~2034.
 - 17 Noble R C, Cocchi M. Lipid metabolism and the neonatal chicken[J]. Progress in Lipid Research, 1990, 29(2): 107~140.
 - 18 Noble R C, Moore J H. The partition of lipids between the yolk and yolk-sac membrane during the development of the chick embryo[J]. Canadian Journal of Biochemistry, 1967, 45(6): 949~958.
 - 19 Romanoff A L. Biochemistry of the avian embryo. A quantitative analysis of prenatal development [M]. New York: Interscience Publishers, 1967.
 - 20 Romanoff A L. The avian embryo. Structural and functional development[M]. New York: The Macmillan Company, 1960.
 - 21 Suksaweang S, Lin C M, Chuong C M. Morphogenesis of chicken liver: Identification of localized growth zones and the role of β -catenin/Wnt in size regulation[J]. Developmental Biology, 2004, 266(1): 109~122.
 - 22 Suckling K E, Stange E F. Role of acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism [J]. Lipid Res, 1985, 26: 647~671.

Histological Observations on the Broiler Liver Tissue during Embryonic Period

NA Wei, WU Yuan-yuan, WANG Yu-xiang, LI Hui

(College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The liver is the largest digestive gland in poultry, and its growth and development are vital for playing functions. In the current study we observed the development of broiler liver tissue with the histological method, and compared the differences of the development of liver tissue between fat and lean lines during embryonic period. We found that the lobes of liver become bigger with developing, and the hepatic lobule structure was integrity when chicken embryo was 12-day-old. The hyperplastic and hypertrophic growth lipid droplets in liver cells significantly increased in the later stage of the embryogenesis, and the proliferation activity of liver cells located around was stronger than those which located in the center of the lobes of liver. During the whole embryonic period, there was no difference on the deposition of lipid droplets between the two lines.

Key words: chicken embryo; liver; histological observations

十二指肠灌注 α -亚麻酸对泌乳奶牛乳腺脂肪酸代谢的影响

Yang G. 等著 孙鹏摘译 晋大鹏校

摘要: 增加血液中 α -亚麻酸 (LNA; 18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15) 浓度将会影响泌乳奶牛乳腺脂肪酸代谢。本试验旨在研究 18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 (18:3n-3) 不同动脉浓度对泌乳奶牛乳腺的脂肪酸摄取、合成和平衡的影响, 其中不同 18:3n-3 动脉浓度是通过十二指肠灌注不同浓度 LNA 实现的, 而乳腺对脂肪酸的摄取是通过动脉浓度与矫正静脉浓度差 (AC-RVC) 推算出来的。安装有十二指肠管的 4 头初产中国荷斯坦泌乳牛被实施两处理交叉试验设计: LNA 组的灌注液中亚麻酸含量有 4 个梯度 (0、100、200 和 300 g/d), 而对照组灌注液中只含有基本的灌载体。当 LNA 的灌注剂量从 0 g/d 增加到 300 g/d, 18:3n-3 的动脉浓度也呈增加趋势 (29.24、134.1、218.3 和 219.3 mg/L)。

当 LNA 的灌注剂量增加时, 乳腺组织对 18:3n-3 的摄取率和摄取量都呈线性增加。在所有的处理组中, 当动脉浓度增加时, 18:3n-3 和总脂肪酸的 AC-RVC 差会随之增加。增量灌注 LNA 线性增加 10:0 和 12:0 的乳腺合成量, 而线性降低 14:1 和 15:0 的乳腺合成量。增加动脉中 18:3n-3 浓度会影响泌乳奶牛乳腺的脂肪酸摄取与合成。研究结果证明, AC-RVC 差可以被用来研究乳腺脂肪酸的摄取与合成。

关键词: α -亚麻酸; 乳腺代谢; 摄取; 泌乳牛

(原载: Journal of Dairy Science, 2012, 95(10): 5821~5830)