

小鼠出生后发育过程中轮廓乳头味蕾形态及其 α -味蛋白表达

张根华^{1,2} 李红涛¹ 李蕾蕾¹ 邓少平^{1*}

(¹浙江工商大学感官科学实验室, 杭州 310035; ²常熟理工学院生物系, 常熟 215500)

摘要 应用组织学与免疫荧光组织化学手段从不同侧面系统研究了小鼠出生后早期发育过程中轮廓乳头味蕾数量、形态及 α -味蛋白表达的变化规律; 结果表明: 出生当天小鼠轮廓乳头内尚未有味蕾存在, 但在出生后早期迅速发育, 在出生后最初4周内味蕾的数量、大小迅速显著地增长($P<0.001$), 味蕾的形态也从幼年期的椭圆形到成年期的长椭圆形, 味蕾细胞明显延长; 发育过程中离体味蕾的形态大小同组织学研究结果具有一致性; α -味蛋白阳性味蕾与阳性细胞在出生后最初2周内显著增长($P<0.001$)。结果表明, 味蕾发育过程是一个结构与功能相适应的过程。

关键词 味蕾; 形态; α -味蛋白; 表达; 出生后发育

新生哺乳动物的味觉系统在食物甄别与摄入过程中起着非常关键的作用。较早的研究^[1-3]主要集中于味蕾的形态、分布与细胞构成, 表明哺乳动物口腔内存在多种味蕾, 主要分布于舌面、上腭上皮、咽等部位, 特殊的味物质刺激新生婴儿或新生大鼠的口腔能产生特殊的反应, 说明了在出生后发育早期新生哺乳动物口腔内形成了功能成熟的味觉系统; 目前研究^[4-6]主要集中于味细胞受体、信号转导与编码等, 对于味蕾出生后发育的研究偶见报道^[7,8]。本文对出生后小鼠发育过程中舌面轮廓乳头(circumvallate, CV)味蕾的数量、大小、形态及其 α -味蛋白(α -gustducin)表达进行了系统定量研究, 为进一步研究味觉细胞功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

怀孕ICR小鼠购自浙江医学科学院实验动物中心, 一鼠一笼, (22±2)°C恒温饲养, 幼鼠出生日为PD (postnatal day)0, 母鼠喂养到21天断奶, 随后雌雄幼鼠分笼饲养。所有材料来自各年龄段的40只雌雄小鼠。

1.2 方法

1.2.1 连续冠状组织切片 小鼠过剂量麻醉(150 mg/kg 戊巴比妥钠)致死断颈取头(每个年龄段3只), 剥除头部皮肤后将头浸入10%中性甲醛固定, 其中小于4周龄鼠头的固定5天后取舌, 大于

4周龄的鼠头固定5天取舌, 将舌继续固定2天; 然后取1 cm×0.5 cm×0.5 cm含轮廓乳头的舌组织进行流水冲洗, 常规石蜡包埋, 连续10 μm厚冠状切片黏于蛋清包被过的载玻片上, 常规HE染色, 在光镜下观察(40~200×, BH2, Olympus); 为了定量研究味蕾的数目, 将所有味蕾的连续切片用高分辨率的数码相机记录成数字图象存于电脑, 通过切片的连续数字图象能检查和辨认几乎每一个味蕾。在同一样品的连续数字图象中随机选取5张切片, 每张切片随机选取2个具有味孔的味蕾(被认为是味蕾的截面积最大)利用ScopePhoto软件测量其高度和宽度。以味蕾的高宽比确定味蕾形状为椭圆形, 以下列公式计算味蕾截面积: 面积=π×高×宽/4。取材时间为PD0、PD7、PD14、PD21、PD28、PD63、PD70。

1.2.2 离体味蕾形态观察 各年龄段ICR小鼠CO₂深麻致死, 迅速取舌放入充氧的Tyrode液中清洗, 然后用混合酶液(弹性蛋白酶和分散酶)注入舌上皮与肌层间, 将舌放入无钙Tyrode液中30°C温育15~70 min(依据鼠龄而定), 撕下上皮后将上皮放入无钙Tyrode液中室温静置20 min, 随后用抛光的微吸管吸取轮廓乳头味蕾放置在Cell-Tak包被的单凹玻片上, 用微分干涉倒置显微镜观察并记录味蕾形态。

收稿日期: 2006-03-27 接受日期: 2006-06-15

国家自然科学基金资助项目(No.30060025)

* 通讯作者。Tel: 0571-88071024-8593, Fax: 0571-88071024-8570,

E-mail: spdeng@mail.zjgsu.edu.cn

取材时间为 PD5、PD7、PD14、PD21、PD28、PD63。

1.2.3 荧光标记免疫组织化学定量检测 α - 味蛋白表达 各年龄段 ICR 小鼠 CO₂ 深麻致死, 迅速取舌放入充氧的 Tyrode 液中清洗干净, 马上进行连续 50 μm 厚冠状振动切片, 在光镜下检查确认切片上轮廓乳头部位后, 进行免疫组化程序: 含 5% 正常山羊血清和 0.5% Triton X-100 的一抗(G-gust, 1:100, 0.1 mol/L PB 液配制, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)中 40 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 天, 0.1 mol/L PB 液漂洗, 二抗(FITC-conjugated anti-rabbit IgG, 1:100; Vector Laboratories, Burlingame, CA)中 40 $^{\circ}\text{C}$ 温育 12 h, 50% 缓冲甘油封片。激光共聚焦扫描显微镜(laser confocal scanning microscope, LCSM, Leica-SP2, Germany)连续进行光切扫描记录结果。通过 LCSM 对轮廓乳头连续切片免疫阳性反应记录的连续图象转成数字图象存入电脑, 能定量研究每个取样年龄小鼠整个乳头内具有阳性反应的味蕾(3 个小鼠的轮廓乳头)及味蕾的细胞数量(1 个小鼠选 2 张切片检查截面最大的 5 个味蕾, 共检查 3 个小鼠 15 个味蕾)。省略一抗或用 10% 的正常兔血清替代一抗作两组对照实验。取材时间为 PD7、PD14、PD21、PD28、PD63。

1.2.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 对测量项目进行统计, 数据用均值 \pm 标准差来表示, 以 $P < 0.05$ 表示差异显著性;

2 结果

2.1 出生后发育过程中轮廓乳头味蕾的数量、大小及其形态

小鼠刚出生时(PD0)轮廓乳头内未发现有味蕾(图 1-③), 但出生后最初 4 周内味蕾数量增长非常迅速, PD7、PD14 味蕾数量分别为 57.67 ± 3.21 、 242.00 ± 3.61 , $P < 0.001$; PD21、PD28 味蕾数为 295.67 ± 8.02 、 394.00 ± 16.70 (图 1-④, 图 2-①), $P < 0.01$, 4 周后味蕾增速趋缓, 到 PD63 后进入增长平台期(PD63、PD70 味蕾数为 525.33 ± 25.32 、 550.67 ± 15.31 , $P > 0.05$)。有味孔味蕾的增长趋势基本同味蕾的增长趋势一致, 高增长期主要集中于出生后最初 4 周, PD7、PD14、PD21、PD28、PD63、PD70 有孔味蕾占味蕾总数的比例(百分比)依次为 57.91 ± 3.07 、 64.27 ± 6.17 、 69.28 ± 3.59 、 81.09 ± 2.13 、 90.06 ± 3.24 、 93.89 ± 2.05 , 到 PD63 时尽管味蕾数量仍在上升, 但有味孔味蕾(成

熟味蕾)占所有味蕾比例稳定在 90% 左右(图 2-①, 图 2-②)。

轮廓乳头味蕾的大小在出生后最初 4 周增长迅速, 类似于味蕾数量的增长。PD7、PD14、PD21、PD28 味蕾高度(单位为 μm)依次为 29.53 ± 3.17 、 34.02 ± 5.18 、 42.50 ± 7.63 、 46.20 ± 5.73 , 特别是从 PD14 到 PD21 的增长差异极其显著($P < 0.01$); 另外味蕾的宽度也在出生后最初 4 周呈现迅速增长, PD7、PD14、PD21、PD28 味蕾宽度(单位为 μm)依次为 18.01 ± 1.79 、 28.45 ± 3.87 、 34.50 ± 5.22 、 35.59 ± 3.82 , 特别是从 PD7 到 PD14 的增长差异极其显著($P < 0.001$); 另外各年龄段的高宽比从 1.22 增长到 1.66, 可以认为味蕾为椭圆形, 从高宽比的增长也可以看出味蕾的形态沿着长轴(垂直于上皮表面)有个延长过程并最终保持在 1.6 左右的高宽比, 其形态基本定型在长椭圆形(图 2-③, 图 1-①, 图 1-②)。

味蕾截面面积的增长随着高宽的增长迅速增长, 尤其在出生后最初 3 周几乎呈现直线增长的方式($P < 0.001$), PD7、PD14、PD21 味蕾的面积(单位为 μm^2)依次为 417.51 ± 61.08 、 751.89 ± 108.98 、 1141.71 ± 238.29 ; 到出生第 4 周以后味蕾面积的增长比较缓慢, 到第 9 周后味蕾面积的变化趋向稳定($P > 0.05$)(图 2-④)。

2.2 出生后发育过程中的离体味蕾形态

味蕾的形成与味细胞的分化发生于哺乳动物的出生后发育过程中。实验结果表明, 多数离体味蕾的味细胞仍以味孔为中心聚集在一起维持味蕾的形态(图 3), 然而也有少数的早期味蕾在离体过程中可能受到较大的机械吸力会离散成单个的味细胞(图 3-①), 这种单个味细胞一般出现在出生后发育早期的离体过程中, 在成年小鼠轮廓乳头味蕾吸取过程中未发现单个的味蕾细胞。在我们实验中味蕾能够被可靠分离的最小鼠龄是在出生后发育的第 5 天, 当然味蕾比两周之后的味蕾要小的多(图 3-②)。不同发育阶段离体味蕾的大小、形态与通过组织切片观察的味蕾的发育是一致的。

2.3 出生后发育过程中味蕾细胞内 α - 味蛋白表达量的变化

α - 味蛋白被认为是味细胞进行味觉信息转导的分子标志。我们通过免疫荧光技术评估了小鼠不同发育阶段 α - 味蛋白表达阳性的味蕾数量及其单个味蕾内 α - 味蛋白阳性细胞的变化。结果表明, α - 味蛋白在轮廓乳头味蕾内呈现强阳性表达(图 4-①),

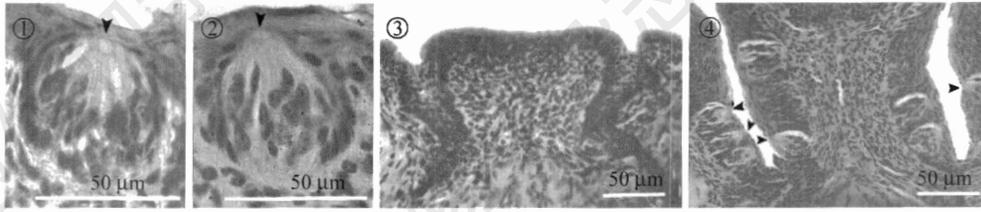


图1 小鼠轮廓乳头冠状切面味蕾的组织学形态

①、②表示PD21与PD63的味蕾；③表示PD0的轮廓乳头，没有味蕾；④表示PD21的轮廓乳头，在乳头冠状沟两侧有许多味蕾；箭头表示味孔；均为HE染色。PD：生后天数。

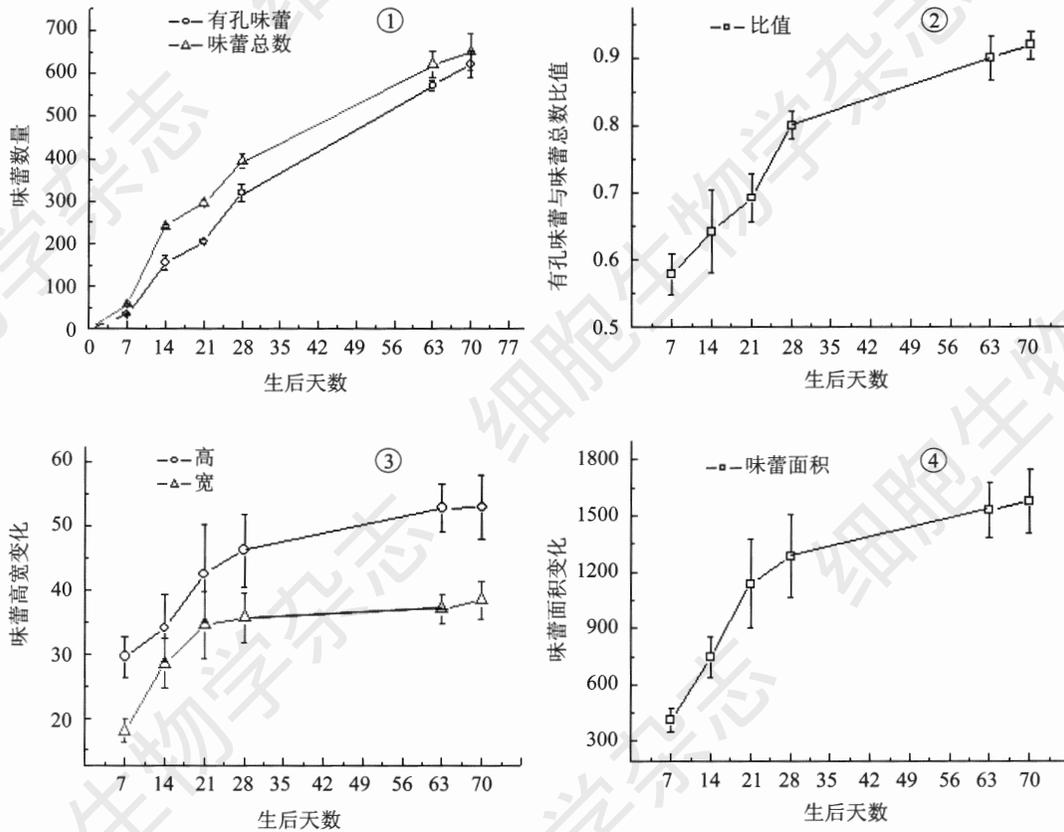


图2 小鼠轮廓乳头味蕾数量、形态及大小的生后发育变化

①表示味蕾及有孔味蕾的数量， $n=3$ ；②表示有味孔味蕾数与味蕾总数的比值， $n=3$ ；③表示味蕾截面高与宽的变化， $n=30$ ；④表示味蕾面积的变化， $n=30$ ；数据以均值±标准差表示。

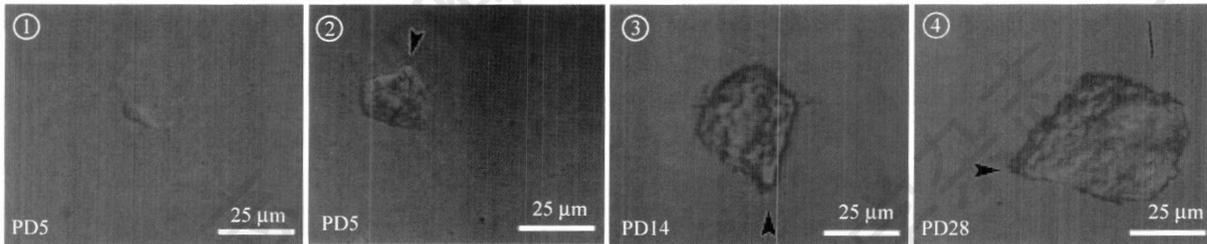


图3 小鼠轮廓乳头离体味蕾发育形态

①~③表示不同生后发育年龄离体味蕾微分干涉相差显微图；生后发育过程中味蕾尺寸的增长主要归因于每个味蕾细胞数量的增加；④表示发育早期离散的单个味蕾细胞；PD：生后天数；箭头指示味孔。

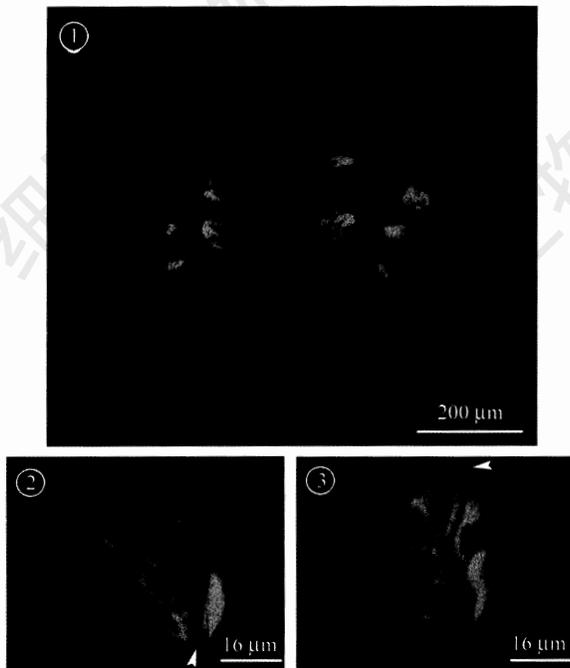


图4 小鼠轮廓乳头(PD21)冠状切面激光共聚焦扫描显微镜图片

①表示轮廓乳头沟两侧上皮内有许多 α -味蛋白强阳性表达的味蕾；②、③示两个 α -味蛋白强阳性表达味蕾放大图，味蕾内单个细胞内 α -味蛋白表达于细胞周质内，核内无表达。箭头指示味孔。

α -味蛋白表达阳性的味蕾数量在出生后最初3周内具有极显著的增加(PD7、PD14、PD21)的阳性味蕾数分别为 28.00 ± 3.61 、 70.33 ± 6.11 、 104.67 ± 6.03 ，增长显著， $P < 0.001$ ，3周(PD21)以后趋于平缓($P > 0.05$)(图5-①)。另外，味蕾内 α -味蛋白表达阳性细胞的数量增长趋势同阳性味蕾增长趋势具有一致性(PD7、PD14、PD21)的阳性味蕾数分别为 4.60 ± 0.91 、 7.07 ± 1.49 、 9.33 ± 0.72 ，增长显著， $P < 0.001$ ，生后3周(PD21)以后趋于平缓($P > 0.05$)(图5-②)。阴性对照结果均为阴性。

另外，味蕾细胞内 α -味蛋白阳性表达产物集中于细胞周质内，在核区未见表达(图4-②，图4-③)。

3 讨论

小鼠轮廓乳头味蕾的数量在出生后最初4周增长显著($P < 0.001$)，迅速达到较高的水平，生后4周以后的增长非常缓慢，没有显著性差异($P > 0.05$)；另外，出生当天的小鼠轮廓乳头内未见味蕾，这同在大鼠中的研究结果一致^[7,8]，出生当天的大鼠轮廓乳头中也未有味蕾发现，而在生后90天是其中的味蕾数量达到 610 ± 87 的最大值。味孔的出现是味蕾结

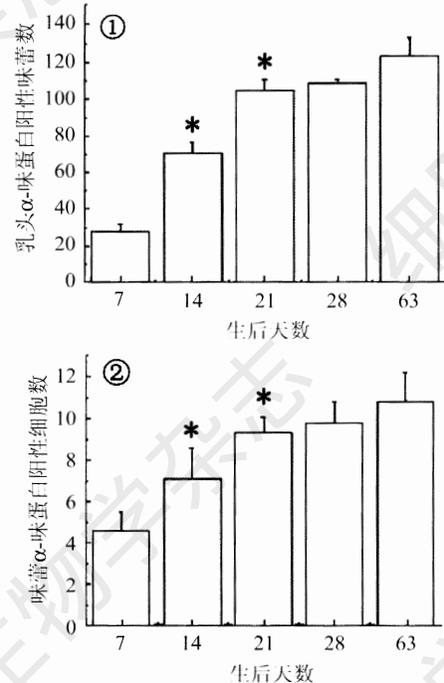


图5 生后不同年龄小鼠轮廓乳头内 α -味蛋白阳性表达味蕾及味细胞的变化

①表示不同年龄小鼠轮廓乳头内表达 α -味蛋白的味蕾数量；②表示不同年龄小鼠轮廓乳头味蕾中表达 α -味蛋白的细胞数量；星号(*)表示该取材年龄的阳性信号数量同前一取材年龄的阳性信号数量比较具有显著性差异($P < 0.05$)。

构成成熟的形态学标志，功能性味细胞的顶端微绒毛必须到达味孔处才能行使感受味信息的功能，因此味孔的出现及有味孔味蕾的比例在一定程度上决定了味觉功能发育的完善与否。实验发现有味孔味蕾的增长趋势同味蕾增长趋势一致，高增长期也集中于出生后最初4周。在生后第7天(PD7)时，有味孔味蕾的数量已经占到味蕾总数的近60%，成年后比例达到90%左右，可以看出新生哺乳动物为了适应外界新的味觉环境，味蕾特别是有孔味蕾的早期发育异常地迅速^[8]。

味蕾最大截面高与宽的比例变化基本揭示了生后不同发育阶段味蕾基本形态的演化规律。研究结果表明，生后不同发育阶段味蕾的高宽比从1.22增长到1.66，可以看出味蕾的形态沿着长轴(垂直于上皮表面)有个逐步延长的过程并最终保持在1.6左右的高宽比，其形态从椭圆形(生后最初4周)最终定型为长椭圆形(出生4周后)。以往研究表明^[7,8]成年大鼠轮廓乳头味蕾的高宽比为1.6~1.8，并认为味蕾的延长主要是由于出生后最初4周味蕾数量的迅猛增长，而轮廓乳头宽度的增速低于味蕾的增速，从而导致味蕾的延长。味蕾截面面积的增长随着高宽

的增长迅速增长, 尤其在出生后最初 3 周几乎呈现成倍增长的方式 ($P < 0.001$)。

对离体味蕾的观察更进一步直观地印证了发育过程中味蕾体积与形态的迅速变化过程, 而且我们发现, 离体后的味蕾在一定时间内味蕾细胞仍然能够围绕味孔维持味蕾的形态, 可见味蕾细胞间存在着较为坚固的结构与信息联系^[9]; 实验中发现刚离体后单个味细胞的出现总是发生在出生后最初 2 周之前, 2 周以后刚离体味蕾的细胞结合较为紧密, 没有发现过单个味细胞, 我们推测可能是由于随着味蕾发育的成熟, 味蕾细胞之间的联系更加紧密, 因此离体后不易散开成单个细胞; 在大鼠研究中有类似报道^[10]。早于生后 5 天的小鼠轮廓乳头中我们无法得到完整的离体味蕾, 即生后第 5 天开始能够可靠地得到完整离体味蕾, 这同轮廓乳头味蕾出生后才开始形成味蕾有关; 有研究认为能够在生后第 4 天得到离体味蕾^[11], 这种微小的差异可能是由于实验方法或操作差异引起的。另外在生后发育过程中离体味蕾的体积增长迅速, 除了味蕾细胞体积的增长与延长外, 主要归因于味蕾中细胞数量的增加 (图 3)。

味蛋白是味觉特异性信号偶联蛋白, 在哺乳动物味觉转导过程中起重要作用, 由 α 、 β 、 γ 三条不同的多肽链组成的异三聚体, 属于 G 蛋白家族,

与其他 G 蛋白一样具有 GTP 酶活性和 GTP 结合位点, 而 α - 味蛋白是该 G 蛋白的 α 亚单位, 在同味觉受体偶联启动味觉信号转导中起重要作用, 因此 α - 味蛋白的表达与否及量的多少是味觉信号转导的一个重要标志^[10-12]。我们的结果显示, 生后不同发育阶段的小鼠轮廓乳头味蕾中有 α - 味蛋白的强阳性表达, 而且不管是轮廓乳头中的阳性味蕾数还是味蕾中的阳性细胞数均在出生后最初 3 周内具有显著性增长。由于味蛋白在味觉信号转导中的媒介作用, 因此可以认为, 生后早期味蕾数量与体积迅速增长的同时伴随着味蛋白表达的不同步协调增长, 充分说明了小鼠轮廓乳头味蕾结构与功能的发育是一个相互协调的过程, 从而适应新的味觉环境。

参考文献 (References)

- [1] Ganchrow JR *et al.* *Dev Psychobiol*, 1986, **19**: 163
- [2] Belecky TL *et al.* *J Comp Neurol*, 1990, **293**: 646
- [3] Warburton D *et al.* *Mech Dev*, 2000, **92**: 55
- [4] Zhang Y *et al.* *Cell*, 2003, **112**: 293
- [5] Pronin AN *et al.* *Chem Senses*, 2004, **29**: 583
- [6] Mueller KL *et al.* *Nature*, 2005, **434**: 225
- [7] Hosley MA *et al.* *Anat Rec*, 1987, **218**: 216
- [8] Harada S *et al.* *Physiol Behav*, 2000, **68**: 333
- [9] Ryotaro H *et al.* *International Congress Series*, 2004, **1269**: 53
- [10] Sbarbati A *et al.* *Chem Senses*, 1999, **24**: 469
- [11] Bigiani A *et al.* *Neuroscie*, 2002, **22**: 493
- [12] McLaughlin SK *et al.* *Nature*, 1992, **357**: 563

Postnatal Development of Taste Buds and α -Gustducin Expression in Mouse Circumvallate Papilla

Gen-Hua Zhang^{1,2}, Hong-Tao Li¹, Lei-Lei Li¹, Shao-Ping Deng^{1*}

(¹Sense Science Laboratory, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China;

²Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract Postnatal changes in taste bud number, morphology and the expression of α -gustducin in mouse circumvallate papilla were studied using the histological microscopy and immunofluorescent confocal microscopy. No taste bud was found in the mouse circumvallate papilla on the day of birth; The number and the size of taste buds were increased rapidly before the 4 weeks after the postnatal day and there were significant differences at different postnatal days; The morphology and size of isolated taste buds at the different postnatal dates were correspondent with the histological results. The number of taste buds containing α -gustducin-positive cells and the number of α -gustducin-positive cells per each taste bud were increased significantly during postnatal development. The results indicate that there was an adaptation process between conformation and function of the taste buds in the development.

Key words taste buds; morphology; α -gustducin; expression; postnatal development

Received: March 27, 2006 Accepted: June 15, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30060025)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88071024-8593, Fax: 86-571-88071024-8570, E-mail: spdeng@mail.zjgsu.edu.cn