·论 著·

类固醇受体辅助活化因子-1在成年与老年雌性大鼠脑内的表达研究

张东梅,张吉强,边 晨,郭 强,蔡文琴,阮怀珍 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究雌性大鼠脑老化过程中脑内类固醇受体辅助活化因子(SRC-1)表达的变化。**方法** 硫酸镍铵增强显色的免疫组化SP法。**结果** SRC-1免疫阳性产物广泛分布于脑内,免疫阳性产物主要位于细胞核,但是在个别主要与运动有关的核团则明显位于细胞胞膜或胞浆。在成年,最高表达见于大脑皮质大部、海马、桥核、前嗅核、网状外侧核、小脑蒲肯野细胞等部位;中等强度的表达见于隔区、丘脑和脑干,较低水平的表达见于某些下丘脑和脑干的核团。和成年的表达水平相比,老年大鼠的前嗅核、斜角带垂直部、基底神经节、杏仁皮质后核、黑质、脑桥、网状外侧核和小脑浦肯野细胞等部位的表达显著下降,但是在大脑皮质、下丘脑和丘脑以及脑干的很多部位基本保持不变,在极个别核团甚至有所上升。**结论** SRC-1在大鼠脑内的表达比较广泛,可能参与了对多种重要脑功能的调节;老年脑内主要与运动调控和学习记忆有关脑区内SRC-1表达的降低提示SRC-1可能在脑老化导致的学习记忆障碍以及帕金森综合征等神经退行性疾病中有重要意义。核外SRC-1主要见于与运动有关的核团,提示SRC-1有可能通过第二信使途径发挥对运动功能的快速调节。

[关键词] 类固醇;类固醇受体;类固醇受体辅助活化因子-1;老化;神经内分泌

[中图分类号] R338.27 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)03-0159-04

Expression of steroid receptor coactivator-1 in the brain of adult and aged female rats

ZHANG Dong-mei, ZHANG Ji-qiang, BIAN Chen, GUO Qiang, CAI Wen-qin, RUAN Huai-zhen (Department of Neurobiology, Chongqing Neuroscience Institute, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To examine the expression of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) in the adult and aged female rat brain. **Methods** Nickel-intensified immunohistochemistry was used to identify the expression of SRC-1. **Results** SRC-1 immunoreactivities were extensively distributed in the brain, while most of the immunopositive materials were localized in the cell nuclei; surprisingly they were also detected in the extra-nuclear components. High levels of SRC-1 immunoreactivities were detected in the olfatory bulb, most of the cerebral cortex, hippocampus, pontine nuclei, lateral reticular nucleus, and cerebellar Purkinje cells; moderate levels were detected in some areas of the septal area, thalamus and brain stem; lower expression was detected in some nuclei of the hypothalamus and brain stem. Striking age-related decrease of SRC-1 expression was noticed in the olfactory nucleus, basal ganglion, substantia nigra, pontine nucleus, lateral reticular nucleus as well as Purkinje cells. **Conclusions** The above data suggested multifunctional roles of SRC-1 in the brain. The age-related decrease of SRC-1 in some specific nuclei strongly suggested its potential roles in the regulation of cholinergic and dopaminergic neurons, which may be one of the underlying mechanisms of the vulnerability of the aged brain. Additionally, the extra-nucleus SRC-1 implied it may also function through a novel non-genomic signaling pathway in the brain.

Keywords: steroid; steroid receptor; steroid receptor coactivator-1; ageing; neuroendocrinology

雌激素及其受体对神经系统有重要的作用,实验证明雌激素受体ERα和ERβ参与了对学习记忆等的调节,临床和动物实验发现它们的表达在某些脑区随老化而下降并与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)和帕金森综合征(Parkinson's disease, PD)的发生与演变有关[1-6]。类固醇受体辅助活化因子(steroid receptor coactivator-1,SRC-1)是包括ERα和ERβ在内的多种类固醇核受体必须的辅助活化因子,是核受体调节靶基因转录的始动因子,它与核受体的结合是核受体调节靶基因转录的限速步骤,因此研究SRC-1在脑内的功能具有重要的理论和临床意义[7]。本文利用免疫组化技术研究SRC-1在成年和老年雌性大鼠脑内的表达变化情况,以期为深入研究脑内SRC-1的功能奠定基础。

[基金项目] 重庆市回国人员启动基金(CSTC,2007BB5030);第三军医大学回国人员启动基金(TMMU,2007XG41)

[作者简介] 张东梅(1985-),女,四川省冕宁县人,硕士研究生,主要从事发育神经生物学方面的研究。电话:(023)68752930,E-mail:xixibeibei@163.com

[通讯作者] 张吉强,E-mail: zhangjqtmmu@yahoo.com

[收稿日期] 2010-02-21 [修回日期] 2010-03-18

1 材料与方法

1.1 实验动物

采用 3 月龄成年和 18 月龄老年 SPF 级雌性 SD 大鼠各 5 只(由第三军医大学实验动物中心提供)。

1.2 主要试剂和药品

兔抗 SRC-1 多克隆抗体(ab2859)购自英国 Abcam 公司;生物素化羊抗兔抗体(ZB2010)与辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素复合物(ZB2404)、封闭血清、DAB 显色试剂盒等购自北京中杉公司;其余试剂均为市售分析纯。

1.3 动物固定和取材

大鼠经 5% 水合氯醛麻醉后开胸,4% 多聚甲醛溶液灌注固定后取出大脑组织再后固定过夜,然后换 30% 蔗糖溶液脱水至组织块沉底,包埋后进行连续冰冻切片(片厚 30 μm),每隔 6 片收集一片于含 4% 多聚甲醛溶液的 6 孔培养板内备用。

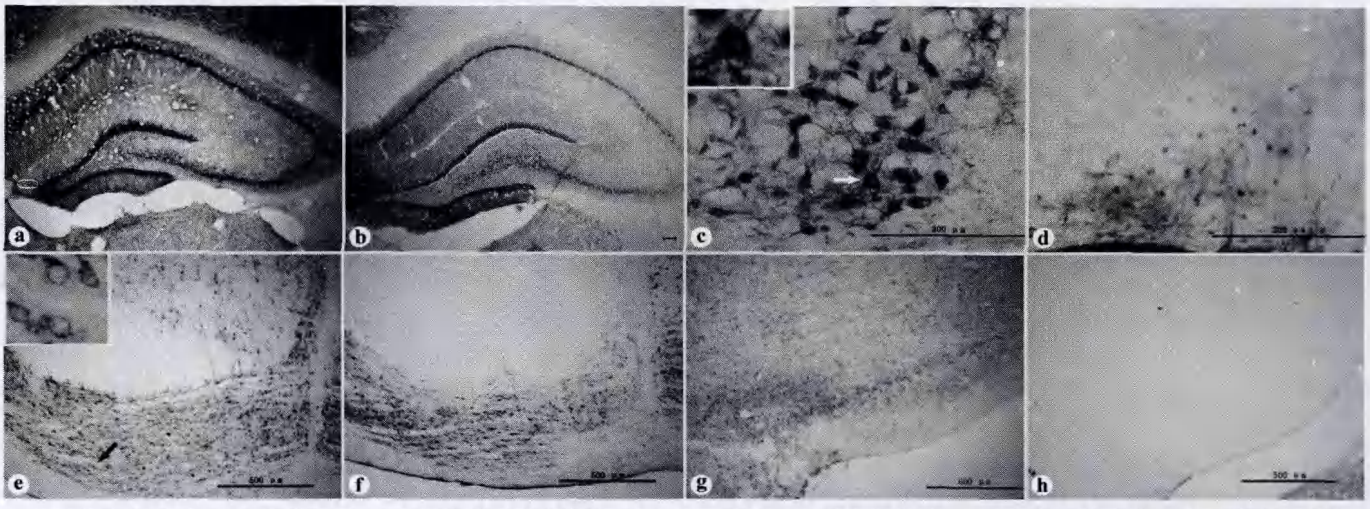
硫酸镍铵增强显色的免疫组化 SP 法基本上按照我们先前建立的方法进行[7]。切片经 PBS 漂洗 3 次后用 3% 过氧化氢溶液孵育 15 min,PBS 漂洗后入 5% 正常羊血清孵育 30 min,倾去血清后切片与兔抗 SRC-1 抗体(1∶1 000)于 4 ℃孵育 24 h。PBS 漂洗后用生物素化羊抗兔抗体(1∶200)于室温孵育 1 h,PBS 漂洗后用辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素复合物(1∶200)室温孵育 1 h。PBS 漂洗后用硫酸镍铵-DAB 显色法室温显色 5 min 后用 PBS 终止显色,裱片后于 60 ℃烘烤过夜、二甲苯透明、DPX 封片。阴性对照用 PBS 代替一抗,其余操作步骤相同。

1.4 数据统计

脑核团的定位于显微镜下结合包新民、舒斯云的《大鼠脑立体定位图谱》(1991)进行,图像采集使用奥林巴斯 DX60 显微摄像系统。表达水平以 + + + +, + + +, + +, + 和 - 表示,分别代表最强、强、中等、低和无明显表达。

2 结果

在成年和老年雌性大鼠的端脑部分,大脑皮质、终纹床核、海马包括齿状回等部位均有高水平的 SRC-1 免疫反应阳性。在大脑皮质,老年大鼠的表达基本上没有太大变化,但是在前嗅核、海马(图 1a、b)、基底前脑的斜角带垂直部、杏仁皮质前核有明显降低。尤其是在基底神经节的尾壳核,成年时的表达比较高,而老年时基本上检测不到明显的阳性产物。



a:成年大鼠海马;b:老年大鼠海马;c:成年大鼠网状外侧核,左上白色方框为箭头处的放大,显示免疫阳性产物可位于胞浆及突起;d:老年大鼠网状外侧核;e:成年大鼠脑桥核,左上白色方框为箭头处的放大,显示免疫阳性产物可位于细胞膜;f:老年大鼠脑桥核;g:成年大鼠黑质;h:老年大鼠黑质

图 1 SRC-1 在成年和老年大鼠海马、网状外侧核、脑桥核、黑质的表达

在间脑的大多数核团,SRC-1 的表达水平比较稳定,基本上未见明显变化。在成年大鼠,丘脑有中等程度的 SRC-1 免疫阳性反应而下丘脑的表达更高一些,缰内侧核、丘脑室旁核和背内侧核的表达最高,其次见于丘脑的多数核团以及下丘脑的视上核、视前区、弓状核、室旁核等,内侧膝状体和外侧膝状体、乳头体核群的表达都比较弱。在老年大鼠,显著高水平的表达见于丘脑室旁核与缰内侧核,其表达水平显著高于成年;丘脑的其他部位的表达都比较微弱。老年下丘脑内 SRC-1 的表达较丘脑更广泛,较高水平的表达见于弓状核、视上核与腹内侧核,微弱的免疫阳性反应见于视前内侧核与室旁核,而视前外侧区几乎呈阴性反应。其中,老年在视上核、视前外侧区等部位的表达明显下降,而在丘脑室旁核等部位反而有所上升。

在脑干部分,成年大鼠的脑桥核与网状外侧核有最高水平的 SRC-1 免疫阳性反应(图 1c、e),而且免疫阳性物质主要是位于细胞核外,如细胞膜(图 1e)、胞浆和突起内(图 1c、图 2b);老年使则有所下降,尤其是网状外侧核下降非常明显(图 1d、f)。成年大鼠斜方体核的染色也很强。在一些与感觉有关的核团如三叉神经感觉核、蜗神经核、前庭神经核等的表达也比较高。

在老年大鼠,最强的表达依然见于脑桥核,上丘、下丘、中央灰质、中缝核团、顶盖核团、蓝斑等部位的表达也比较强。较低水平的表达见于脑桥网状核、斜方体核的尾侧部、蜗神经背侧核等部位。成年黑质致密部有显著高水平的 SRC-1 免疫反应性(图 1g),而老年时则基本检测不到(图 1h)。成年小脑内SRC-1 的表达主要在浦肯野细胞;而老年 SRC-1 免疫阳性的浦肯野细胞数量显著减少,与此相反颗粒层的免疫阳性信号似乎有所增加。

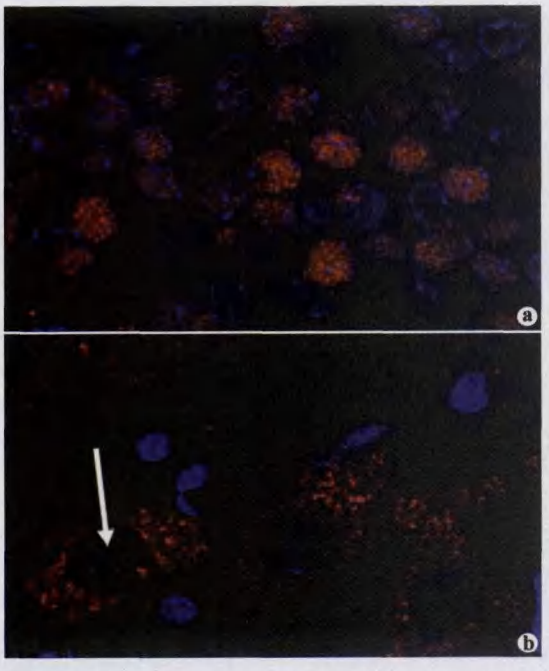
SRC-1 免疫阳性产物在成年和老年雌性大鼠脑内的表达结果见表 1。

表 1 SRC-1 免疫阳性产物在成年和老年雌性大鼠脑内的表达

脑区	成年	老年	脑区	成年	老年	脑区	成年	老年	脑区	成年	老年
前嗅核	+++	+	杏仁皮质后核	+++	+	弓状核	+++	++	红核	++#	+
扣带皮质	+++	+++	杏仁内侧核	++	+	视上核	+++	++	顶盖背侧核	++	++
内侧中央前区	+++	+	杏仁外侧核	++	++	室旁核	++	++	三叉神经运动核	++#	+#
边缘前区	+++	+++	CA1、CA3	++++	++	乳头体	+	+	脑桥核	++++*	++
压部后皮质	++	++	CA2	+++	+	丘脑背内侧核	+++	+++	网状外侧核	++++#	+
斜角带垂直部	+++	+	齿状回	++++	+++	缰内侧核	+++	++	上丘	+	++
斜角带水平部	+++	+++	盖带	+++	++	丘脑室旁核	++	++	下丘	++	++
隔内侧核	++	+	下托	++	++	外侧膝状体	++	++	中央灰质	++	++
隔外侧核	+++	++	视前内侧核	++	++	内侧膝状体	++	+	蓝斑	++	++
终纹床核	++	++	视前外侧核	++	+	黑质致密部	+++	-	小脑分子层	++	++
尾壳核	++	-	下丘脑前区	+++	+++	黑质网状部	+	-	小脑浦肯野细胞层	+++	+
杏仁皮质前核	+++	+	腹内侧核	++	++	动眼神经核	++	++	小脑颗粒层	++	+++

*:免疫阳性物质主要位于细胞膜;#:免疫阳性物质主要位于胞浆和突起

脑内 SRC-1 免疫阳性产物主要位于细胞核,但是在部分核团也可在细胞核以外的部位检测到,比如在桥核可能主要是位于细胞膜,而在网状外侧核则见于胞浆和突起内(图 2)。



a:海马,阳性产物见于细胞核;b:网状外侧核,阳性产物见于胞浆和突起内,箭头示细胞核

图 1 激光共聚焦显微镜下显示脑内 SRC-1 免疫阳性产物

3 讨论

本文应用免疫组化技术研究了 SRC-1 在成年和老年雌性大鼠脑内的表达,发现无论在成年还是老年脑,SRC-1 的表达都比较广泛,提示它在脑内参与了多方面的调节功能,这与先前对成年雄性大鼠脑的研究[7]以及前人对脑内 SRC-1 mRNA 的表达研究结果[8]基本一致。在小鼠脑 SRC-1 mRNA 高表达于嗅球、梨状皮质、海马、杏仁核、下丘脑、脑干(包括网状外侧核)以及浦肯野细胞;中等水平的表达见于丘脑与部分大脑皮质[8]。但是也有一些差异,比如在小脑皮质的颗粒层与分子层未检测到 SRC-1 mRNA 的表达[8]。研究发现即使在老年大鼠也可以在上述部位检测到 SRC-1 免疫阳性细胞,而且在老年的颗粒层 SRC-1 的表达还略微上升。造成这些差异的原因还不清楚,可能与动物种属有关。

SRC-1 免疫阳性产物除了位于细胞核以外,也可在细胞膜以及胞浆和突起内检测到,而且主要见于与运动调节有关的核团,提示 SRC-1 除了在细胞核内参与对靶基因转录的调控以外,还可能直接通过作用于第二信使系统引发快速的、非基因水平的效应。已有的研究发现,ERα 和 ERβ 除了主要位于细胞核内发挥

基因型调节功能以外，也可以位于细胞膜和/或胞浆[5-6]，进而通过第二信使系统发挥功能。是否胞浆内的ERs和SRC-1能协同作用引发第二信使的级联反应尚需要实验来证实。本文还注意到，老年脑内上述部位基本上未见细胞核以外的SRC-1免疫阳性反应，或许这代表着老年脑调节运动的能力显著下降的原因亦未可知。

随着脑老化在大脑皮质大部分、斜角带水平部、间脑和脑干大部分核团SRC-1的老化相关性改变不是很明显，提示脑内SRC-1的作用之一是维持基本的脑功能。在个别脑区如上丘、小脑皮质的颗粒层，SRC-1的表达随老化还有所增加，其生理意义尚待阐明。在前嗅核、斜角带垂直部、海马、尾壳核、杏仁皮质核、黑质、脑桥核、网状外侧核、浦肯野细胞等的表达显著下降，这些部位主要与学习记忆、认知运动有关，也与神经退行性疾病的发病和病程密切相关。比如，啮齿动物的嗅觉与其学习记忆有直接联系；斜角带垂直部是胆碱能神经元胞体所在，与学习记忆关系密切，是AD的主要受累脑区之一[9]；海马则是与学习记忆有关的主要脑区，雌激素及其受体对海马的突触可塑性影响极大[1-2,5]；杏仁核也参与了对学习记忆的调节；浦肯野细胞则与技巧性运动的学习记忆有关，敲除SRC-1基因后小脑浦肯野细胞的发育延迟，被认为是导致成年后运动学习能力下降的主要因素[8]。尾壳核、黑质、网状结构则与运动调节有关，黑质多巴胺能神经元的进行性退变是导致PD的主要原因。雌激素是黑质多巴胺能神经元存活、营养的关键分子，具有重要的神经保护效应[10-11]，研究发现黑质有较高水平的ERβ表达并认为它可能与PD的发病有关。本文发现老年黑质以及纹状体内SRC-1的表达显著降低，这可能也是导致老年脑黑质多巴胺能神经元的易伤性进而导致PD的重要原因之一。因此，老年脑内与学习记忆和运动有关的脑区内SRC-1的降低强烈提示SRC-1对维持这些功能的正常具有极为重要的意义，老化后SRC-1的降低与类固醇激素水平的降低以及其受体水平的降低可能都是导致神经退行性疾病的主要因素。

目前对脑内SRC-1的功能研究还很少，主要来自对下丘脑和小脑SRC-1的实验结果。先前的研究已经发现SRC-1与下丘脑依赖ERα和依赖于孕激素受体PR的性行为调节有关并影响下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能[12]，用SRC-1反义寡核苷酸处理后，大鼠下丘脑的性别二态性核团的体积减小了46%、成年鹌鹑下丘脑的后视前内侧区的体积也显著减小，而中止处理后该部位的体积可以恢复到正常水平[13]，表明SRC-1对生殖有关的脑结构有重要的影响。敲除SRC-1基因小鼠导致小脑浦肯野细胞发育延迟、突触囊泡素在P0～P10之间表达减少、成年后依赖小脑的hanging wire等测试中表现异常[8]。因此，脑内SRC-1的功能值得进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Liu F, Day M, Muniz LC, et al. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory[J]. Nat Neurosci, 2008,11(3):334－343.

[2] Ishunina TA, Swaab DF. Hippocampal estrogen receptor-alpha splice variant TADDI in the human brain in aging and Alzheimer's disease[J]. Neuroendocrinology, 2009,89(2):187－199.

[3] Morissette M, Paolo D. Effect of estradiol on striatal dopamine activity of female hemiparkinsonian monkeys[J]. J Neurosci Res, 2008,87(7):1634－1644.

[4] *Westberg L, Hakansson A, Melke J, et al. Association between the estrogen receptor beta gene and age of onset of Parkinson's disease*[J]. Psychoneuroendocrinology, 2004,29(8):993－998.

[5] Hojo Y, Murakami G, Mukai H, et al. Estrogen synthesis in the brain-role in synaptic plasticity and memory[J]. Mol Cell Endocrinol, 2008,290(1－2):31－43.

[6] 张吉强，蔡文琴. 脑内雌激素受体研究进展[J]. 局解手术学杂志，2009,18(1):1－2.

[7] 边 晨，张东梅，苏炳银，等. 类固醇受体辅助活化因子-1在成年雄性大鼠脑内的表达研究[J]. 局解手术学杂志，2010,19(1):6－9.

[8] Nishihara E, Yoshida-Komiya H, Chan CS, et al. SRC-1 null mice exhibit moderate motor dysfunction and delayed development of cerebellar Purkinje cells[J]. J Neurosci, 2003,23(1):213－222.

[9] Muth K, Sch nmeyer R, Matura S, et al. Mild cognitive impairment in the elderly is associated with volume loss of the cholinergic basal forebrain region[J]. Biol Psychiatry, 2010,67(6):588－591.

[10] Ookubo M, Yokoyama H, Takagi S, et al. Effects of estrogens on striatal damage after 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in male and female mice[J]. Mol Cell Endocrinol, 2008,296(1－2):87－93.

[11] Morale MC, L'Episcopo F, Tirolo C, et al. Loss of aromatase cytochrome P450 function as a risk factor for Parkinson's disease[J]. Brain Res Rev, 2008,57(2):431－443.

[12 Winnay JN, Xu J, O'Malley BW, et al. Steroid receptor coactivator-1-deficient mice exhibit altered hypothalamic-pituitary-adrenal axis function[J]. Endocrinology, 2006,147(3):1322－1332.

[13] Charlier TD, Ball GF, Balthazart J. Plasticity in the expression of the steroid receptor coactivator 1 in the Japanese quail brain: effect of sex, testosterone, stress and time of the day[J]. Neuroscience, 2006,140(4):1381－1394.

（编辑：郭光金）

《局解手术学杂志》投稿电子信箱：jjssxzz@yahoo.com.cn