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

边 晨[1],张东梅[1],苏炳银[2],张吉强[1] (1.第三军医大学神经生物学教研室,重庆 400038;2.成都医学院,四川 成都 610083)

[摘 要] **目的** 研究类固醇受体辅助活化因子(steroid receptor coactivator-1,SRC-1)在成年雄性大鼠脑内的表达。**方法** 采用硫酸镍铵增强显色的免疫组化技术研究大鼠海马内SRC-1的表达情况。**结果** SRC-1主要在细胞核内表达,但是在某些核团,尤其是与运动调节有关的核团,可以在细胞核外表达,如胞浆、胞膜甚至突起内。最强表达见于基底前脑的斜角带垂直部、下丘脑弓状核与网状外侧核;高水平的表达见于前嗅核、海马、丘脑和下丘脑部分核团、桥核、脚间核与小脑浦肯野细胞;中等水平的表达见于大部分大脑皮质结构和杏仁复合体以及丘脑,低水平的表达见于中脑、脑桥和延髓大部份。**结论** SRC-1在成年雄性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,如学习记忆、神经干细胞分化发育、神经内分泌与神经免疫、生殖、信息整合与感觉和运动。另外,在大部分脑区SRC-1可能以经典的基因型方式发挥作用,但是,在部分核团也能以通过第二信使的非基因型方式发挥作用。

[关键词] 类固醇;类固醇受体辅助活化因子-1;脑;免疫组化;大鼠

[中图分类号] R338.27 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)01-0006-04

Immunolocalization of steroid receptor coactivator-1 in the brain of adult male rats

BIAN Chen, ZHANG Dong-mei, SU Bing-yin, ZHANG Ji-qiang (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To investigate the role that steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) plays in the brain. **Methods** The localization of SRC-1 in adult rat brain was observed using nickel-intensified immunohistochemical techniques. **Results** The results showed that SRC-1 immunoreactivities were extensively distributed in the brain. The highest level was detected in the vertical limb of the Diagonal band, hypothalamic arcuate nucleus and lateral reticular nucleus, high levels were detected in the anterior alfactory nucleus, hippocampus, paraventricular thalamic nucleus, habenular nucleus, supraoptic nucleus, hypothalamic paraventricular nucleus, pontine nuclei, cerebella Purkinje layer. Moderate expression was detected in most parts of the cerebral cortex, some nuclei of the thalamus and hypothalamus, as well as some nuclei of the midbrain. The immunopositive staining was predominantly localized in the cell nuclei, but it was also detectable in the cytoplasm and plasma membrane in some nuclei of the brain stem. **Conclusions** The above results suggest a multifunctional role of SRC-1 in the brain, which may be relevant to the regulation of learning and memory, plasticity, synaptogenesis, adult neural stem cell differentiation, optical and auditory pathways. Furthermore, the unexpected sub-cellular distribution pattern implies beside its classic genomic effect, SRC-1 may also exert its function by non-genomic way.

Keywords: steroid; steroid receptor coactivator-1; brain; immunohistochemistry; rat

越来越多的证据表明,神经类固醇激素(如雄激素和雌激素)通过其核受体对神经系统的结构和功能有着重大的影响[1-2]。核受体调节靶基因转录需要辅助活化因子的参与,已经发现了类固醇的20多种辅助活化因子,其中研究得最深入的是分子量为160 kD的p160家族,包括SRC-1、SRC-2、SRC-3等3个成员,目前认为在神经系统起作用的主要是SRC-1[3]。

SRC-1能以配体依赖性方式显著增强多种核受体的转录活性,抑制脑内SRC-1的表达则导致脑发育、行为和生理性改变[4-5]。在胚胎发育过程中,SRC-1转录物广泛表达于8.5 d胚胎(E8.5);在胚胎14.5 d和胚胎18.5 d,高水平的SRC-1转录物见于嗅上皮、新皮质以及垂体前叶等部位;在成年雄性大鼠SRC-1 mRNA表达见于海马、杏仁复合体、下丘脑、基底神经节与大脑皮质[6]。但SRC-1蛋白在脑内表达的详细情况尚未见报道。本文采用硫酸镍铵增强显色的免疫组化SP技术对SRC-1在成年雄性大鼠脑内的表达进行了初步研究,以期为深入研究神经类固醇在脑内的作用及其机制奠定基础。

[基金项目] 重庆市回国人员启动基金(CSTC,2007BB5030);四川省教育厅重大培育项目及四川省科技厅项目(NO.2008JY0081);第三军医大学回国人员启动基金(TMMU,2007XG41)

[作者简介] 边 晨(1985-),女,甘肃省兰州市人,硕士,主要从事发育神经生物学方面的研究。电话:(023)68752232

[通讯作者] 张吉强,E-mail: zhangjqtmmu@yahoo.com;苏炳银,E-mail: subingyin@yahoo.com.cn

[收稿日期] 2009-11-17 [修回日期] 2009-12-05

1 材料与方法

1.1 实验动物

3月龄SPF级成年雄性SD大鼠5只,购自第三军医大学大坪医院实验动物中心。

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、取材

用5%水合氯醛麻醉动物,开胸,经左心室插管到主动脉,剪开右心耳,先后灌注生理盐水200 mL和4%多聚甲醛溶液300 mL,灌注后取出大脑组织,用4%多聚甲醛后固定过夜,然后换30%蔗糖溶液脱水至组织块沉底。脑组织经OCT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法基本上按照文献进行。切片经PBS漂洗3次后用3%过氧化氢溶液孵育15 min,以封闭内源性过氧化物酶;然后用PBS漂洗3次,切片入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;ab2895,Abcam)于4 ℃孵育24 h。PBS漂洗后用生物素化羊抗兔抗体(1∶200;ZB2010,北京中杉)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;ZB2404,北京中杉)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 ℃烘烤过夜然后用二甲苯透明、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,用奥林巴斯DX60显微摄像系统采集数码图像。各核团内SRC-1免疫反应的强弱根据每只大鼠同一脑区3~5张切片,5只大鼠共计15~25张切片的染色水平综合判断。

2 结果

硫酸镍铵增强的免疫组化显色结果为蓝黑色,ER-β蛋白在大鼠脑内有比较广泛的分布,阳性物质主要位于细胞核,但也可在胞浆和突起内检测到,少数细胞甚至出现细胞核阴性、胞浆(突起)为阳性的情况,各部位的SRC-1表达情况见表1。

端脑:大脑皮质内SRC-1的表达水平较高,特别是梨状皮质有很多的免疫阳性细胞。在嗅球,前嗅核前部的免疫阳性细胞数目非常多(图1a),而在后部的阳性细胞数量很少。在基底前脑,高水平的表达见于斜角带垂直部,而隔内侧核与斜角带水平部的表达较少(图1b)。在海马,SRC-1主要见于锥体细胞和齿状回的颗粒细胞层,其染色较深(图1e)。盖带(海马前部残迹)内也有密集的SRC-1免疫阳性细胞(图1c)。终纹床核和杏仁皮质前核都有较高水平的SRC-1表达,杏仁复合体的其余部位以及纹状体内SRC-1的表达水平较低。

表1 成年雄性大鼠脑内SRC-1的表达

部位	强度	部位	强度
大脑皮质	++	内侧膝状体	++
梨状前皮质	+++	未定带	++
伏核	+	内侧视前区	++++
前嗅核 后部	+	下丘脑背内侧核	++
前嗅核	+++	下丘脑腹内侧核	++
海马	+++	下丘脑室旁核	+++
盖带	+++	下丘脑室周核	+++
杏仁皮质前核	+++	视上核	+++
杏仁其余	++	弓状核	++++
斜角带垂直部	++++	下丘脑室周核	++
隔内、外侧核	+	乳头体核群	++
终纹床核	++	黑质致密部	++
丘脑室旁核	+++	上丘	+
缰核	+++	中央灰质	++
桥核*	++++	斜方体核	++
脚间核	+++	疑核*	+++
被盖背侧核	++	展神经核	++
下丘	++	网状外侧核*	++++
中缝背核	+	分子层	+
动眼神经核*	++	浦肯野细胞层	++
脑桥网状核	+	颗粒层	++

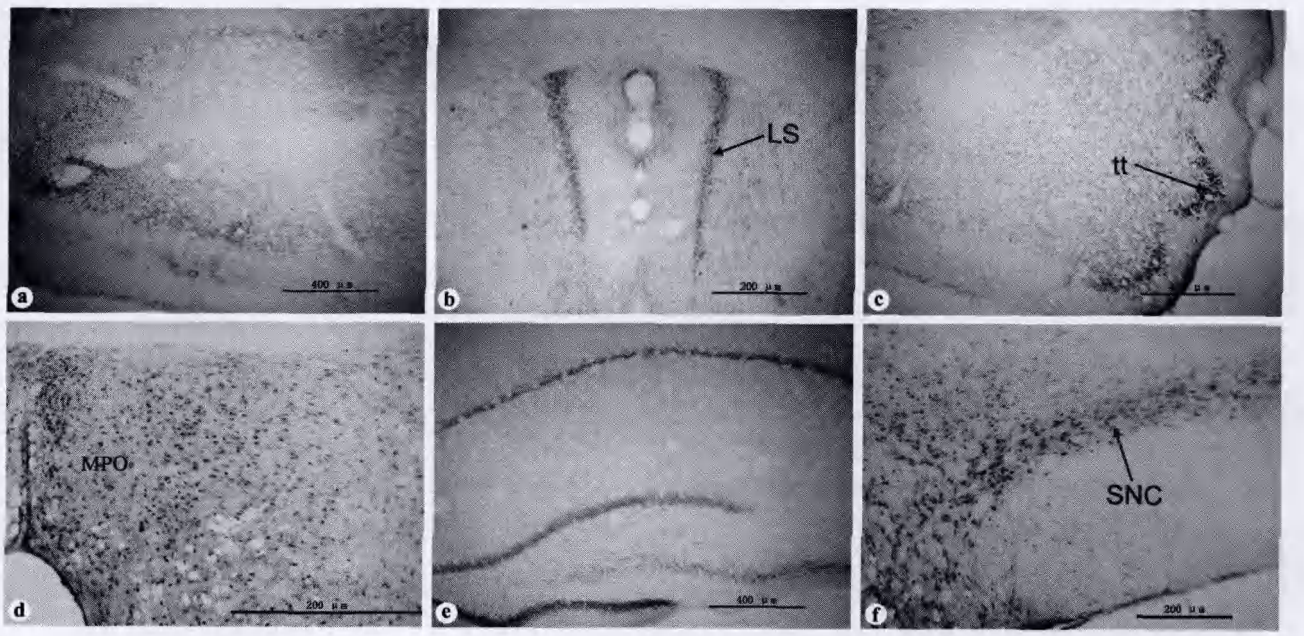
*:免疫阳性物质位于细胞核外;++++、+++、++、+分别代表最强、强、中等、低(弱)表达

间脑:在背侧丘脑,最高水平的SRC-1表达见于丘脑室旁核与缰核,其次见于外侧膝状体,其余部位表达较低。在下丘脑,SRC-1的总体表达水平较高,最高水平的表达见于弓状核、其次见于内侧视前区(图1d)、室旁核,中等水平的表达见于室周核、背内侧核、腹内侧核以及乳头体各核团。

脑干:最强的SRC-1免疫反应性见于网状外侧核(图2b),高水平的表达见于桥核(图2a)、脚间核和疑核,中等水平的表达见于黑质致密部(图1f)、中央灰质、被盖背侧核(图2d)、展神经核、动眼神经核(图2c)、斜方体核(图2e)等部位,其余部位如中缝背核、上丘、脑桥网状核等表达较低。在网状外侧核,除了细胞核着色以外,胞浆甚至突起内也有着色,在个别细胞免疫阳性产物仅见于细胞核外(图2b)。桥核内的免疫阳性细胞数量也非常多,而且几乎所有细胞的SRC-1免疫阳性产物都位于细胞膜而不是细胞核(图2a)。细胞核外着色的情况也见于疑核和动眼神经核(图2c)。

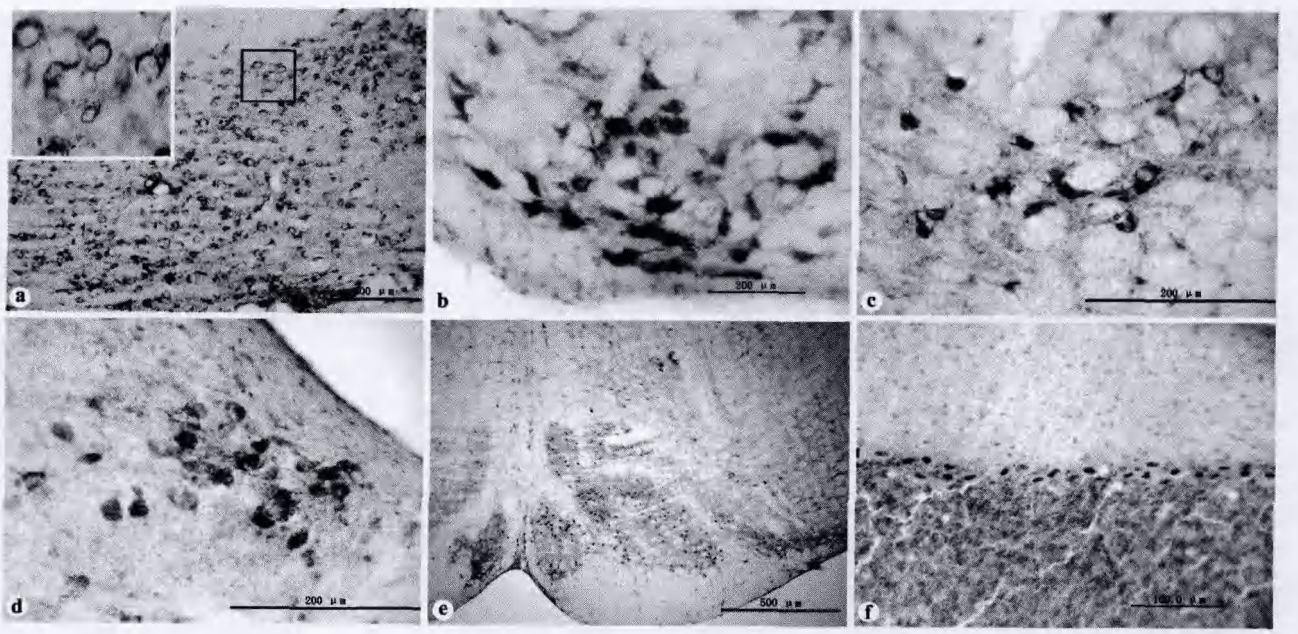
小脑:SRC-1免疫阳性产物均位于细胞核,最强的免疫阳性产物位于浦肯野细胞层,分子层内有较为弥散的免疫阳性细

胞。颗粒层的免疫阳性细胞数量较多,但是染色都比较浅淡 (图2f)。



a:前嗅核;b:隔外侧核(LS);c:盖带(tt);d:内侧视前区(MPO);e:海马; f: 黑质致密部(SNC)

图1 SRC-1在端脑和中脑的表达



a:脑桥核;b:网状外侧核;c:动眼神经核;d:顶盖背侧核;e:斜方体; f:小脑皮质

图2 SRC-1在脑干的表达

3 讨论

本文首次报道了用免疫组化技术研究SRC-1蛋白在成年雄性大鼠脑内表达的情况,结果发现SRC-1主要位于细胞核内,但是也可以在核外部位,如胞浆甚至胞膜以及突起中检测到,这与以前所有文献报道的结果有所不同。我们还发现SRC-1在脑内的表达比较广泛,很高水平的SRC-1免疫反应性表达见于斜角带垂

直部、隔内侧核、网状外侧核、桥核，较高水平的表达见于大脑皮质大部、前嗅核、海马、基底前脑和杏仁复合体以及丘脑和下丘脑的部分核团。高水平的表达见于海马（包括齿状回）、嗅球、下丘脑与丘脑大部分核团，以及部分中脑核团。

脑内 SRC-1 蛋白的表达与先前文献报道的其 mRNA 的表达模式基本一致。比如在小鼠脑，高水平的 SRC-1 mRNA 表达见于嗅球、梨状皮质、海马、杏仁复合体、下丘脑、小脑和脑干；中等水平的 SRC-1 mRNA 表达见于丘脑和部分大脑皮质[5]。另外，以前报道认为 SRC-1 是一种核蛋白，位于细胞核内，而我们的免疫组化研究结果却发现尽管在大多数脑区 SRC-1 免疫反应性见于细胞核，但它也见于细胞核外的结构如胞浆、突起甚至细胞膜上，强烈提示其调节方式除了经典的调节核蛋白转录以外，还可能通过第二信使系统发挥快速的、非基因型的调节作用。

脑内 SRC-1 广泛表达的模式提示它参与了对多种脑功能的调节。高水平的 SRC-1 见于嗅球，提示它可能参与了嗅上皮的发育与功能；小脑浦肯野细胞内 SRC-1 的 mRNA 和蛋白水平都很高，有研究已经证明它参与了对浦肯野细胞发育和功能的调节[5]。下丘脑是调节摄食、神经内分泌、神经免疫和性行为的主要中枢，其内的 SRC-1 参与了对性行为和下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴的调节[6]。下丘脑内 SRC-1 的表达还受到光周期的调节[7]。另外，较高水平的 SRC-1 见于丘脑和中脑，提示 SRC-1 参与了对各种传入传出信息包括视觉、听觉、躯体运动和头面部运动等的整合[8]。黑质致密部有较高水平的 SRC-1 表达，提示 SRC-1 可能参与了对多巴胺能神经元结构与功能的调节，本文在老年大鼠黑质致密部基本上未检测到 SRC-1 的表达（结果未显示），表明老化可以下调 SRC-1 的表达，这或许是老年易发帕金森综合症的重要因素之一。在一些与运动有关的核团，如动眼神经核、桥核、网状外侧核等，SRC-1 的表达主要见于细胞核以外，提示 SRC-1 对运动的调控可能主要以非基因型方式进行，即通过第二信使系统发挥对运动的快速调节。高水平的 SRC-1 表达见于大脑皮质、嗅球和海马齿状回，提示 SRC-1 可能参与了对成年神经干细胞的调节，因为已发现上述部位有成年神经干细胞[9-10]。

SRC-1 也可能参与了对学习记忆等高级脑功能的调节，因为我们发现高水平的 SRC-1 见于斜角带垂直部、海马与小脑等与学习记忆密切相关的脑区。目前已经发现敲除 SRC-1 基因可以导致小鼠依赖于小脑的技巧性学习记忆能力下降、小脑突触囊泡素的表达显著降低[5]。海马以及基底前脑内高表达的 SRC-1 究竟有什么功能、是否参与了对海马突触可塑性和依赖于海马的学习记忆的调节尚未见文献报道。

在老化过程中男性雄激素水平的缓慢下降可能与老年痴呆的认知功能紊乱有关[11]。针对老年痴呆的临床和实验研究发现雄激素替代治疗可以显著改善老化导致的空间记忆与语言记忆障碍，但是其机制尚不清楚；作为雄激素受体辅助活化因子之一的 SRC-1 在脑老化过程中扮演了什么角色尚不清楚，本文的研究结果为进一步深入研究雄激素在脑老化过程中的作用及其机制提供了新的基础资料。

[参考文献]

[1] Acevedo SF, Tittle S, Raber J. Transgenic expression of androgen receptors improves spatial memory retention in both sham-irradiated and 137Cs *gamma-irradiated female mice*[J]. Radiat Res, 2008, 170(5): 572 - 578.

[2] Srivastava DP, Woolfrey KM, Jones KA, et al. Rapid enhancement of two-step wiring plasticity by estrogen and NMDA receptor activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(50): 14650 - 14655.

[3]. Xu JM, Li Q. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family[J]. Mol. Endocrin, 2003, 17(9): 1681 - 1692.

[4] Tetel MJ. Nuclear receptor coactivators: essential players for steroid hormone action in the brain and in behaviour[J]. J Neuroendocrinol, 2009, 21(4): 229 - 237.

[5] 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.

[6] 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.

[7] Tetel MJ, Ungar TC, Hassan B, et al. Photoperiodic regulation of androgen receptor and steroid receptor coactivator-1 in Siberian hamster brain [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 131(1 - 2): 79 - 87.

[8] Tahera Y, Meltser I, Johansson P, et al. Sound conditioning protects hearing by activating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis[J]. Neurobiol Dis, 2007, 25(1): 189 - 197.

[9] *Ehninger D, Kempermann G. Neurogenesis in the adult hippocampus* [J]. Cell Tissue Res, 2008, 331(1):243 - 250.

[10] Nishihara E, Moriya T, Shinohara K. Expression of steroid receptor coactivator-1 is elevated during neuronal differentiation of murine neural stem cells[J]. Brain Res, 2007, 1135(1): 22 - 30.

[11] *Pike CJ, Rosario ER, Nguyen TV. Androgens, aging, and Alzheimer's disease*[J]. Endocrine, 2006, 29(2): 233 - 241.

（编辑：文 灿）