维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2008年第17卷第3期
J Regional Anat & Operative Surg, 2008, Vol. 17, No. 3

小鼠室旁核内雌激素受体与催产素、加压素表达的免疫组化研究

赵承军，邓其跃，张东梅，蔡文琴，阮怀珍，张吉强 （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** 研究雌激素的核受体ER-α和ER-β以及催产素、加压素在成年雌性小鼠下丘脑室旁核内的表达。**方法** 采用硫酸镍铵增强显色的免疫组化SP法检测ER-α、ER-β、催产素和加压素在室旁核内的表达。**结果** 雌激素的两种核受体在室旁核内都有表达，但是以ER-β为主（$P<0.001$），其免疫阳性产物均在细胞核内，未见核外免疫阳性反应。催产素的免疫阳性产物主要在细胞核周围的胞浆即核周质内，而加压素的免疫阳性物质除了在核周质内有很强的反应外，在突起内也可见很强的免疫反应。ER-α的免疫阳性胞体主要在大细胞部内侧，而ER-β、催产素和加压素的免疫阳性胞体主要在背侧帽部或大细胞部的外侧。**结论** 室旁核内两种雌激素受体可能都参与了对催产素和加压素的调节，但ER-β可能发挥了主要的调节作用。

［关键词］雌激素受体；催产素；加压素；室旁核；小鼠
［中图分类号］R338.27；R322.81；Q189 ［文献标识码］A ［文章编号］1672-5042(2008)03-0164-03

Expressions of estrogen receptor α and β, oxytocin and vasopressin in the paraventricular nucleus of the adult female mice

ZHAO Cheng-jun, DENG Qi-yue, ZHANG Dong-mei, CAI Wen-qin, RUAN Huai-zhen, ZHANG Ji-qiang (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the expressions of the two estrogen receptors (ER-α and ER-β), oxytocin and vasopressin in the paraventricular nucleus (PVN) of mice. **Methods** The expressions of ER-α, ER-β, oxytocin and vasopressin were detected using nickel ammonium sulfate intensified immunohistochemical SP method. **Results** Both of the two ERs (ER-α and ER-β) immunoreactivities were detected in the cell nuclei of the PVN, while ER-β showed stronger staining. Positive staining of oxytocin and vasopressin were in the cytosol of the neurons and the former gave less intensity, many positive varicosities for vasopressin were also noticed in neurite. Most of ER-α were found in the magnocellular part, and others were found out the magnocellular part or dorsal cup of the PVN. **Conclusion** Both ERs might involve the accommodation of PVN, but ER-β might be the predominant ER in mediating this ER-dependant regulation.

Keywords: estrogen receptor; oxytocin; vasopressin; hypothalamic paraventricular nucleus; mouse

已有的研究表明雌激素可以调节下丘脑室旁核的神经内分泌活动尤其是催产素（oxytocin，OT）和加压素（vasopressin，VP）的分泌，但是其机制尚不清楚[1-2]。我们此前研究了雌激素β受体（estrogen receptor-β，ER-β）在小鼠室旁核（paraventricular nucleus，PVN）内的发育学表达，以及在妊娠、哺乳鼠PVN的表达[3-4]，本文拟对PVN内两种雌激素受体ER-α和ER-β，以及OT和VP的表达进行初步研究，以期为阐明雌激素受体介导的雌激素调节室旁核神经内分泌活动的机制提供新的资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗ER-α、兔抗VP和鼠抗OT购自Chemicon公司；兔抗ER-β购自Zymed公司。生物素标记的羊抗兔或马抗小鼠以链霉卵白素标记的辣根过氧化物酶复合体（SP-HRP）均购自北京中杉生物技术公司。其它试剂如硫酸镍铵为分析纯。

1.2 实验动物及标本制备

正常成年昆明雌性小鼠（体重25～28 g）由第三军医大学实验动物中心提供。经阴道涂片鉴定为动情间期者共选取5只。动物用5%水合氯醛腹腔麻醉，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，分离下丘脑，放入4%多聚甲醛溶液继续后固定过夜。Leica 1860型冰冻切片机行冰冻切片，片厚30 μm，切片漂于PBS中备用。

1.3 免疫组化染色

硫酸镍铵增强显色的免疫组化技术按文献[5]进行。简述如下：切片经3% H_2O_2 封闭15 min，PBS漂洗后用正常血清封闭30 min，然后加入一抗（ER-α 1∶1 000；ER-β 1∶1 000；OT

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

［作者简介］赵承军（1965－），男，山西省吕梁市人，副教授，主要从事发育神经生物学方面的研究。现工作单位：宁夏医学院组织胚胎学教研室。

［通迅作者］张吉强，第三军医大学基础医学部神经生物学教研室，电话：(023)68752232

［收稿日期］2008-02-01 ［修回日期］2008-03-12

维普资讯 http://www.cqvip.com

1:8 000;VP 1:8 000)于37 ℃孵育1 h后转4 ℃孵育48 h。PBS漂洗过夜后加入各自对应的二抗,室温孵育1 h,PBS漂洗后用SP-HRP孵育1 h,最后用硫酸镍铵-DAB显色5 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明后中性树胶封片。

1.4 图像分析与数据处理

所有染色切片经Leica显微摄像系统采集后,用Image Pro Plus软件进行光密度(OD)分析,每只小鼠随机测量5张切片,共计5只小鼠。用Excel软件对数据进行统计分析处理。

2 结果

两种雌激素受体在正常雌性小鼠PVN内的免疫阳性产物都位于细胞核内,未见核外阳性产物。ER-α免疫阳性细胞数量较多但是染色浅,主要见于大细胞部的内侧(图1a);ER-β免疫阳性细胞主要见于背侧帽部、大细胞部内侧部(图1b)。OT在正常雌性小鼠PVN内的免疫阳性细胞数量少,稀疏分布于背侧帽部和大细胞部,在细胞内有很深的染色,整个PVN内都可见到呈串珠样的免疫阳性突起(图1c)。VP在正常雌性小鼠PVN内免疫阳性最强,在背侧帽部和大细胞部外侧有密集的免疫阳性细胞,小细胞部有网络状的免疫阳性突起,而在背侧帽部和大细胞部外侧发出大量的免疫阳性突起(图1d、e)投射到视上核与弓状核(照片未显示)。

为了进一步分析两种ER在正常雌性小鼠PVN内的表达强度,将其免疫组化染色进行了光密度分析。结果表明尽管ER-α的免疫阳性细胞数目看似较ER-β多,但是其平均光密度却显著低于ER-β,$P<0.001$(图2)。提示ER-β是PVN内主要的雌激素受体,在介导雌激素对PVN神经内分泌活动中可能发挥了主要作用。

3 讨论

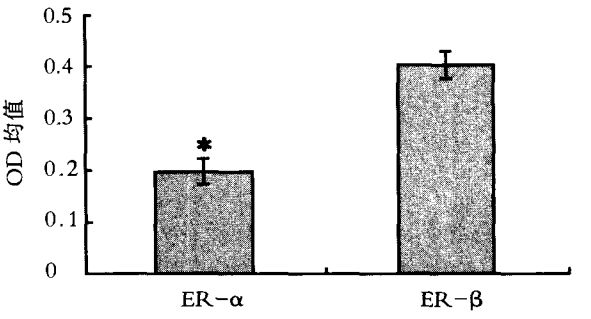
雌激素对神经系统的结构与功能具有重要的调节作用[1-2],而其受体ER-α和ER-β在脑内可能介导了不同的生物学功能,这与其分布密切相关[6-8]。比如ER-α在与生殖有关的核团如终纹床核、下丘脑腹内侧核和弓状核等部位表达较高,提示该受体可能主要参与了对生殖功能的调节。而ER-β在大脑皮质、基底前脑、海马等部位表达较高,提示ER-β可能主要参与了对学习记忆等高级功能的调节。有研究已证明敲除ER-β基因后,基于海马的学习记忆行为和LTP下降[9],足以表明ER-β在脑内的重要作用。

下丘脑含有两大神经内分泌系统,即位居室旁核、视上核的大细胞神经内分泌系统(主要分泌OT和VP),以及散在于下丘脑底部和其它核团的小细胞神经内分泌系统(主要分泌各种促垂体激素)。因此,室旁核是重要的神经内分泌核团,主要由靠近第三脑室的小细胞部、外侧的大细胞部和位居其上的背侧帽部构成。OT是室旁核内的重要激素之一,对分娩起着关键的作用,还参与了学习记忆等重要的生理功能[10-12],有研究报道哺乳母鼠的学习记忆明显优于未育小鼠,实验证明这与OT密切相关。VP是PVN内的另一重要神经内分泌激素,除了主要与利尿有关以外,也有文献报道VP与学习记忆有关。所以研究PVN内这两种激素的表达及其调节具有重要的意



a:ER-α,×200; b:ER-β,×200; c:催产素,×200; d:加压素,×200; e:加压素,×400

图1 雌激素受体、OT和VP在正常雌性小鼠PVN内的分布,硫酸镍铵增强显色的免疫组化SP法



*:与ER-β比较,$P<0.001$

图2 PVN内ER-α和ER-β表达的比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

义[13-14]。已有研究报道了两种雌激素受体在PVN内的分布，但是究竟是哪一种ER在起主要调节或二者协调作用至今尚无定论[8]。我们前期对妊娠及哺乳母鼠PVN内ER-β的表达进行了初步研究，结果发现在分娩前后其表达最高，表明ER-β对分娩可能起了主要作用。本研究显示，ER-β、OT和VP的免疫阳性胞体主要位于背侧帽部（VP在大细胞部外侧也有很高水平的表达）而ER-α免疫阳性细胞核主要位于大细胞部的内侧靠近小细胞部。因此，从位置关系上来看，ER-β与OT或VP共存的可能性较ER-α大，强烈提示在成年雌性小鼠PVN内，ER-β可能是介导雌激素作用于OT和VP的主要受体，发挥了主要的调节作用，而ER-α的调节作用会比较弱。当然，这还需要用免疫组化双重染色技术等来加以证实。ER-β是如何发挥调节作用以及其信号途径与作用机制等问题，有待进一步的研究来回答。

[参考文献]

[1] Shughrue PJ, Dellovade TL, Merchenthaler I. Estrogen modulates oxytocin gene expression in regions of the rat supraoptic and paraventricular nuclei that contain estrogen receptor-beta[J]. Prog Brain Res, 2002, 139: 15-29.

[2] Sladek CD, Swenson KL, Kapoor R, et al. The role of steroid hormones in the regulation of vasopressin and oxytocin release and mRNA expression in hypothalamo-neurohypophysial explants from the rat[J]. Exp Physiol, 2000, 85: 171S-177S.

[3] 吕 彦，张吉强，周德山. 妊娠及哺乳过程中小鼠室旁核内雌激素β受体表达的变化[J]. 第三军医大学学报，2004，26(15)：1336-1341.

[4] 张吉强，吕 彦. 生后雌性小鼠下丘脑室旁核内ER-β表达的免疫组化研究[J]. 实验生物学报，2003，36(5)：388-392.

[5] 张吉强，姚 青，刘建军，等. 不同显色方法对免疫细胞化学显色结果的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(3)：359-360.

[6] 罗 丹，张吉强. 下丘脑室旁核内雌激素受体的表达与意义[J]. 生理科学进展，2004，35(4)：332-334.

[7] Bodo C, Rissman EF. New roles for estrogen receptor beta in behavior and neuroendocrinology[J]. Front Neuroendocrinol, 2006, 27(2): 217-232.

[8] Simonian SX, Herbison AE. Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity by oxytocin neurons of rat paraventricular nucleus[J]. J Neuroendocrinol, 1997, 9(11): 803-806.

[9] Day M, Sung A, Logue S, et al. Beta estrogen receptor knockout (BERKO) mice present attenuated hippocampal CA1 long-term potentiation and related memory deficits in contextual fear conditioning[J]. Behav Brain Res, 2005, 164(1): 128-131.

[10] Tomizawa K, Iga N, Lu YF, et al. Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade[J]. Nat Neurosci, 2003, 6(4): 384-390.

[11] Domes G, Heinrichs M, Michel A, et al. Oxytocin improves "mind-reading" in humans[J]. Biol Psychiatry, 2007, 61(6): 731-733.

[12] Heinrichs M, Meinlschmidt G, Wippich W, et al. Selective amnesic effects of oxytocin on human memory[J]. Physiol Behav, 2004, 83(1): 31-38.

[13] Keverne EB, Curley JP. Vasopressin, oxytocin and social behaviour[J]. Curr Opin Neurobiol, 2004, 14(6): 777-783.

[14] McEwen BB. General introduction to vasopressin and oxytocin: structure/metabolism, evolutionary aspects, neural pathway/receptor distribution, and functional aspects relevant to memory processing[J]. Adv Pharmacol, 2004, 50: 1-50, 655-708.

（编辑：余汇洋）

本刊对一稿两投和重复发表问题处理的声明

为杜绝学术不端行为，维护杂志的声誉，尊重审稿专家和编辑工作者的劳动成果，本刊编辑部就一稿两投和重复发表问题提出严正声明：

1. 凡原始创新的研究论文，用同一语种多份投寄不同的杂志，或主要数据和图表相同、只是文字表达可能存在某些不同之处的论文，分别投寄不同的杂志，均属一稿两投；凡经两家（或多家）杂志刊用，为重复发表。

2. 作者在接受到收稿回执后满3个月未接到退稿，表明稿件仍在处理中，若欲投他刊，应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或重复发表嫌疑时，将认真仔细核对，证实为一稿两投的稿件，立即退稿，通知作者退稿原因并给予警示。

4. 已经证实为重复发表的论文，将择期在本刊中刊出作者姓名、单位、以及该论文系重复发表的通告，向作者所在单位通报情况。

特此声明。

《局解手术学杂志》编辑部