DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.006
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)15-1339-03

论著

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

吕 彦,张吉强,周德山 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究雌激素β受体(estrogen receptorβ, ER-β)在妊娠及哺乳期小鼠下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)内表达的变化情况。方法 硫酸镍铵增强显色的免疫组化(S-P)法观察前述变化情况。结果 ER-β免疫阳性物质主要见于PVN的大细胞部,在小细胞部和帽部免疫阳性细胞数目较少。免疫阳性物质主要位于整个细胞核内,未见明显的胞浆或突起免疫阳性反应。在妊娠中期ER-β的表达最低,随后升高;最高表达见于妊娠第18天至分娩后1 d,随后表达降低到成年水平。结论 在妊娠和哺乳过程中PVN内最高水平的ER-β表达见于分娩前后很短的时间内,提示PVN内ER-β可能主要参与了对分娩过程的调节。

关键词:雌激素;雌激素受体;室旁核;妊娠;哺乳
中图法分类号:R322.81;R392.11;R714.12 文献标识码:A

Changes of expression of estrogen receptor β in the paraventricular nucleus of mice during pregnancy and lactation

LU Yan, ZHANG Ji-qiang, ZHOU De-shan (Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of estrogen receptor beta (ER-β) in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of maternal mice during pregnancy and lactation. **Methods** Nickel ammonium sulfate intensified immunocytochemical method was employed to investigate the expression of ER-β in the postnatal developing PVN of female mice. **Results** ER-β immunopositive materials were predominantly localized in the magnocellular division of PVN, and sparse positive cells were found in the parvocellular division. Most of the positive materials were found in the whole cell nuclei, but no obvious cytoplasma- or process- immunopositive cells were detected. In the pregnant female brain, generally, the ER-β level was lower. The lowest levels of expression were found at mid-pregnancy, and then peaked at peripartum (from gestational days 18 to postpartum day 1), followed by another decrease to normal adult level from postpartum day 4. **Conclusion** The above results suggest that during pregnancy and lactation, ER-β may be predominantly involved in the PVN regulation of parturitional process.

Key words: estrogen receptor; immunocytochemistry; paraventricular nucleus; pregnancy; lactation

雌激素及其β受体(estrogen receptorβ, ER-β)在脑内参与了对多种重要功能的调节[1,2]。ER-β mRNA和蛋白质在小鼠脑内的表达具有脑区专一性,在不同的脑区其表达水平有差异,而且与另一种雌激素受体即ER-α的表达模式和生理意义也不尽相同[3,4]。在小鼠,ER-β可能参与了对雄性小鼠攻击行为的抑制和对空间记忆行为的调节[5,6];还可能参与了神经元的存活、迁移以及对情绪的调节[7,8]。下丘脑的室旁核(paraventricular nucleus, PVN)是雌激素重要的靶器官之一。研究表明在正常动物小鼠PVN,尽管也有ER-α的表达,ER-β仍然是主要的雌激素受体[3,4],介导了雌激素对该核团结构与功能的直接调节。但是,PVN内ER-β究竟参与了哪些功能的调节目前仍缺乏直接的证据。本研究应用硫酸镍铵增强的免疫组化显色技术研究了妊娠以及哺乳过程中雌性小鼠PVN内ER-β表达的变化,以期为深入研究ER-β在中枢神经系统中的作用提供形态证据。

1 材料与方法

妊娠及哺乳期昆明小鼠购自本校实验动物中心,以见阴栓出现之日为妊娠第0天,以此类推。取妊娠第8、10、12、15、18天以及分娩后第1、4、8天的母鼠40只,每时相点5只,经1%戊巴比妥钠麻醉后暴露胸腔、升主动脉灌注4%多聚甲醛固定后,取脑入4%多聚甲醛-3.75%丙烯醛液后固定过夜,再浸入含30%蔗糖的溶液至组织块沉底,20 μm厚连续冰冻切片漂于PBS中备用。

硫酸镍铵增强显色的免疫组化技术参照文献[9]进行。兔

基金项目:第三军医大学中青年科研基金资助项目(2002)
Supported by the Foundation for Sci & Tech Research for the Middle-aged and Young Scholars of Third Military Medical University (2002)
作者简介:吕 彦(1981-),女,重庆市人,学员。电话:(023)65204359
通信作者:张吉强,E-mail:zhang-jiqiang@tom.com
收稿日期:2003-07-04;修回日期:2004-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

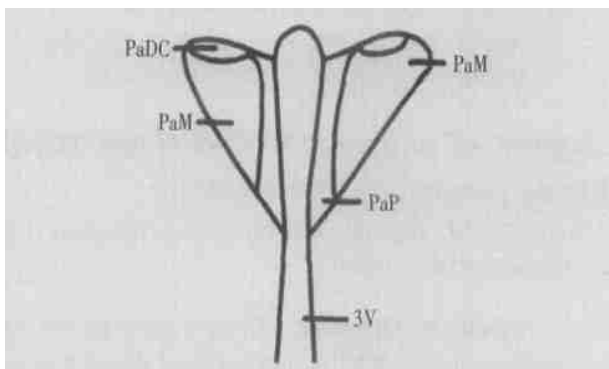
抗 ERβ 多克隆抗体(Z8P)购自 Zymed 公司，已经应用 Western bloting、抗原肽预吸收实验、免疫沉淀及免疫组化等方法证明了该抗体的特异性，它能与小鼠、大鼠以及人源性 ERβ 蛋白特异性结合，与 ERα 无交叉反应。羊抗兔免疫组化试剂盒为 Santa Cruz 产品(货号：2051)，硫酸镍铵为上海试剂二厂产品，DAB 为 Sigma 分装。切片经 1% 牛血清白蛋白-2% H_2O_2 (PBS 配)处理 20 min 以封闭内源性过氧化物酶活性，0.4% Triton X-100/0.1% 牛血清白蛋白(PBS 配)37 ℃孵育 1 h 后于一抗(1∶1 000；稀释液为 PBS 含 0.4% Triton X-100/2% 正常血清)37 ℃孵育 1 h，再于 4 ℃冰箱放置 48 h，二抗和 S-P 复合物(streptavidin-HRP)均于室温孵育 1 h。显色液配制：2.5% 硫酸镍铵－0.035% DAB-0.03% H_2O_2。对照试验以正常兔血清或无一抗的 PBS 代替 ERβ 一抗，其余操作同上。免疫染色反应以相同倍率视野下阳性细胞的多少来确定。

2 结果

PVN 可以分为大细胞部(magnocellular division，PaM)、小细胞部(parvocellular division，PaP)和背侧帽部(dorsal cap，PaDC)等部位(图 1)。我们应用 ERβ 多克隆抗体(Z8P)研究发现，ERβ 免疫阳性物质主要见于小鼠的 PVN 以及终纹床核、杏仁内侧核、中缝背核等核团，本研究主要研究了 PVN 内 ERβ 免疫阳性物质的表达情况。研究表明，PVN 内 ERβ 分布并不均匀，主要集中在 PaM，而在 PaP 较少，PaDC 则更少。阳性物质见于大多数阳性细胞的整个核内，但在个别时期，也可见免疫阳性细胞核的局部呈现阴性反应，但未见明显的胞浆或突起着色。大多数阳性细胞染色很深，但也有一些浅染的细胞。

妊娠第 8 天，可见较多的 ERβ 免疫阳性细胞核分散于 PVN 的 PaM 部，PaP 部的阳性细胞数目较少，PaDC 部基本上未见阳性细胞。妊娠第 10 天，可见少量的免疫阳性细胞均位于 PaM 部，其分布较为分散。PaP 部和 PaDC 部均呈免疫阴性反应(图 2)。妊娠第 12 天，PaM 部的免疫阳性细胞更少，PaP 部和 PaDC 部未见阳性细胞。妊娠第 15 天，ERβ 免疫阳性细胞数目有所增加，接近第 10 天时的表达水平，但阳性细胞更集中在 PaM 部的中央。其余部位未见阳性细胞。妊娠第 18 天，免疫阳性细胞数目进一步增加，主要见于 PaM 的中部和尾部。PaP 部只有散在的几个阳性细胞，PaDC 部未见阳性细胞。

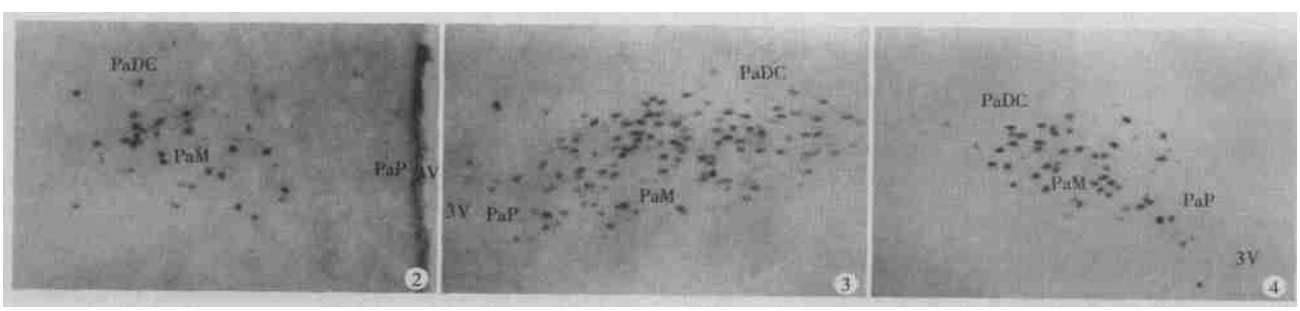
分娩后第 1 天，此时 PaM 部的 ERβ 免疫阳性细胞的数目、分布状态与妊娠第 18 天时比较一致，ERβ 免疫阳性细胞数目最多(图 3)。分娩后第 4 天，PVN 内 ERβ 免疫阳性细胞核数目较分娩后 1 天时减少，大约相当于妊娠第 15 天的水平(图 4)。分娩后第 8 天，此时 PVN 内 ERβ 免疫阳性细胞的分布模式均类似于分娩后第 4 天，阳性细胞数目略有减少。



PaDC：Paraventricular nucleus，dorsal cap；PaM：Paraventricular nucleus，magnocellular division；PaP：Paraventricular nucleus，parvocellular division；3V：The third ventricle

图 1 小鼠室旁核(**PVN**)的结构示意图(参照 **Franklin** 等，**1997**)

Fig 1 Schematic diagram of the structure of mouse PVN，based on Franklin *et al*，1997



PaDC：Paraventricular nucleus，dorsal cap；PaM：Paraventricular nucleus，magnocellular division；PaP：Paraventricular nucleus，parvocellular division；3V：The third ventricle

图 2 妊娠 **10 d PVN** 内 **ER**β 的表达 (S-P× 200)

Fig 2 Expression of ERβ **in the PVN at pregnant day 10** (S-P× 200)

图 3 分娩后 **1 d PVN** 内 **ER**β 的表达 (S-P× 200)

Fig 3 Expression of ERβ **in the PVN 1 d after delivery** (S-P× 200)

图 4 分娩后 **4 d PVN** 内 **ER**β 的表达 (S-P× 200)

Fig 4 Expression of ERβ **in the PVN 4 d after delivery** (S-P× 200)

3 讨论

下丘脑室旁核神经元主要分泌催产素(oxytocin，OT)，也分泌其它一些神经肽如加压素(vasopressin，VP)、甘丙肽、促肾上腺皮质激素释放激素等，这些物质被证明与应激、能量代谢、生殖、生长、水平衡以及泌

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

乳等有关[10]。大鼠 PVN 内 ER-α 的表达微弱甚至缺如, 但是 ER-β mRNA 或蛋白表达水平很高[3,4], 提示 ER-β 可能是 PVN 内雌激素主要的功能性受体, 介导了雌激素对该核团的神经结构与功能的调节。与在大鼠 PVN 内的表达不一样, 小鼠 PVN 尽管主要表达 ER-β, 但是仍然检测到 ER-α 的表达, 提示两种 ER 都对小鼠 PVN 的结构与功能发生影响。本实验研究了 ER-β 在妊娠以及哺乳过程中小鼠室旁核内表达的变化, 结果显示在妊娠早期, PVN 内 ER-β 的表达较高, 相当于未孕成年小鼠时的表达水平[11]; 最高表达见于分娩前后很短的时间内(妊娠第 18 天至生后 1 d), 随后(分娩后第 4 天)很快降低, 并略低于未孕成年水平。我们还发现, 免疫阳性物质主要位于 PVN 的大细胞部, 在小细胞部和帽部只有零星的分布, 表明即使在同一核团内 ER-β 的表达也存在细胞类型的差异性。既往研究表明, PVN 内 ER-β 的表达还存在种属差异性, 比如在大鼠 PVN 基本上只有 ER-β 的表达, ER-α 的表达非常微弱甚至没有[3]; 而在小鼠 PVN, 尽管 ER-β 是主要的 ER, 但依然能检测到 ER-α 的表达[4]; 在绵羊 PVN 则以 ER-α 的表达为主。

OT 和 VP 是 PVN 内主要的神经肽, 它们均由下丘脑 PVN 和视上核的大细胞部分泌(小鼠的视上核不表达 ER-β)。OT 通过调节子宫收缩参与了对正常分娩的调节, 还参与了对后代正常发育的调节。最近研究表明 OT 在改善经产小鼠依赖于海马的学习记忆过程中发挥了非常重要的作用[12]。大量的研究表明雌激素对调节 PVN 大细胞部的 OT 与 VP 神经元有着重要的功能, 它能诱导 PVN 内 OT mRNA 表达的增加, 进而启动分娩、泌乳、哺乳等母性行为。Alves 等[13] 发现大鼠 PVN 内有 ER-β /OT、ER-β/VP 共存于某些神经元, 其它文献也有类似的报道。总的来说, PVN 大细胞部神经元内 ER-β 与 VP 或 OT 免疫反应性的共存表明雌激素能直接调节 PVN 内上述神经肽的分泌, 从而对母性行为的诱发起到重要的作用。虽然目前还没有关于小鼠 PVN 内 ER-β 与 OT 或 VP 共存的研究报道, 但也有证据表明在小鼠 PVN, 雌激素处理显著升高 OT 而降低 VP 的表达, 而且雌激素的这种调节在敲除 ER-β 基因的小鼠则完全丧失[14], 表明 ER-β 直接介导了雌激素对 OT 和 VP 的调节。

已经知道 OT 对分娩时子宫的收缩与母性行为的诱导非常重要, 在分娩时检测到高水平的 OT mRNA 和蛋白表达。本研究表明, 在妊娠与哺乳过程中孕鼠 PVN 内高水平的 ER-β 表达见于分娩前后较短的时间内, 即妊娠第 18 天至生后 1 d, 而且如前所述已发现在小鼠 PVN 内 ER-β 介导了雌激素对 OT 的调节, 提示在分娩过程中雌激素可能通过 ER-β 的介导进而调节 OT 的表达、最终对分娩以及母性行为发挥调控作用。但是, 很有可能 ER-β 在调节分娩后 OT 介导的泌乳过程中作用甚微, 因为我们发现分娩后 PVN 内的 ER-β 表达很快降低到成年未孕小鼠的水平。前人的研究发现敲除 ER-β 基因的小鼠其乳腺发育与乳汁分泌均不受基因敲除的影响、在脑垂体中也只有极少数的催乳素免疫阳性细胞(11.2%±0.2%)表现为与 ER-β 的共存, 同样表明 ER-β 在乳腺发育以及泌乳调节中的有限作用。

参考文献:

[1] 张吉强, 蔡文琴. 雌激素β受体研究进展[J]. 生理科学进展, 2001, 32(1): 68-70.

[2] 张吉强, 蔡文琴. 脑内雌激素的来源、信号途径及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(8): S144-147.

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

[4] Mitra S W, Hoskin E, Yudkovitz J, *et al*. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: Comparison with estrogen receptor alpha [J]. Endocrinology, 2003, 144(5): 2055-2067.

[5] Nomura M, Durbak L, Chan J, *et al*. Genotype/age interactions on aggressive behavior in gonadally intact estrogen receptor beta knockout (betaERKO) male mice[J]. Horm Behav, 2002, 41(3): 288-296.

[6] Rissman E F, Heck A L, Leonard J E, *et al*. Disruption of estrogen receptor beta gene impairs spatial learning in female mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(6): 3996-4001.

[7] Krezel W, Dupont S, Krust A, *et al*. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta-deficient mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(21): 12278-12282.

[8] Wang L, Andersson S, Warner M, *et al*. Estrogen receptor (ER) beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(2): 703-708.

[9] 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.

[10] Ieibowitz S F. Differential functions of hypothalamic galanin cell grows in the regulation of eating and body weight[J]. Ann N Y Acad Sci, 1998, 863: 206-220.

[11] 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.

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

[13] Alves S E, Lopez V, McEwen B S, *et al*. Differential colocalization of estrogen receptor beta (ERbeta) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: an immunocytochemical study [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(6): 3281-3286.

[14] Nomura M, McKenna E, Korach K S, *et al*. Estrogen receptor-beta regulates transcript levels for oxytocin and arginine vasopressin in the hypothalamic paraventricular nucleus of male mice[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2003, 109(1-2): 84-94.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net