DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.032
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
260 2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)03-0260-03

卵巢切除对小鼠基底前脑内雌激素β受体表达的影响

张吉强[1],姚 青[2],蔡文琴[1] (第三军医大学:[1]基础医学部组织学与胚胎学教研室;[2]附属西南医院心血管内科;重庆 400038)

提 要:目的 研究卵巢雌激素对小鼠基底前脑内雌激素β受体(ER-β)表达的影响,探讨雌激素作用于基底前脑的机制。方法 以切除卵巢的小鼠为模型,采用硫酸镍铵增强显色的免疫组化SP法检测基底前脑内ER-β表达的变化。结果 卵巢切除使小鼠基底前脑内ER-β表达降低,第3天降到最低水平,然后逐渐恢复,第20天后基本上达到正常水平。结论 卵巢雌激素使小鼠基底前脑内ER-β表达表达呈时间依赖性改变,并可能通过ER-β这一新的受体途径发挥对该部位神经结构与功能的调控。

关键词:卵巢切除;雌激素;雌激素受体;基底前脑;小鼠
中图法分类号:R322.81;R392.11;R713.6 文献标识码:A

Effects of ovariectomy on the expression of estrogen receptor beta immunoreactivity in the basal forebrain of adult female mice

ZHANG Ji-qiang, YAO Qing, CAI Wen-qin (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of ovarian estrogen on the expression of estrogen receptor beta (ER-beta) of the basal forebrain of mice. Methods Ovariectomized (OVX) mice were used as animal model, and nickel ammonium sulfate intensified immunohistochemical SP technique was used to detect the changes of ER-beta expression in the basal forebrain. Results The expression of ER-beta in the basal forebrain of mice decreased dramatically, after OVX decreased to the lowest levels at 3 d after OVX, increased gradually, and recovered to normal level 20 d later. Conclusion Ovarain estrogen can regulate the expression of ER-β of the murine basal forebrain, indicating that estrogen, via ER-β, can regulate the nerous structure and function of the basal forebrain, which may be the mechanism of estrogen replacement therapy on Alzheimer's brain.

Key words: ovariectomy; estrogen; estrogen receptor; basal forebrain; mouse

基底前脑包括了隔内侧核(Medial septum, MS)、斜角带垂直部(Vertical limb of diagonal band, VDB)和斜角带水平部(Horizontal limb of diagonal band, HDB)等部位,是脑内雌激素的重要靶区,与老年性痴呆(Alzheimer disease, AD)有重要的联系,是AD的主要受累脑区。雌激素β受体(ER-β)是1996年克隆出来的一种新的雌激素受体[1],和"经典的"雌激素受体即雌激素α受体(ER-α)相比,ER-β对雌二醇的亲和力较ER-α低,提示很可能在循环雌激素水平升高时ER-β才能被激活[2,3]。我们先前的实验显示小鼠基底前脑几乎不表达ER-α,但ER-β的表达很高,提示ER-β可能是基底前脑内雌激素的功能性受体。本研究以卵巢切除(Ovariectomy, OVX)小鼠为雌激素缺乏模型,采用免疫细胞化学技术研究了OVX对小鼠基底前脑内ER-β表达的影响,以期为阐明雌激素作用于基底前脑的机制以及为将来研制有效治疗AD等神经退行性疾病的药物提供新的思路。

1 材料与方法

3月龄雌性昆明小鼠35只,共分为7组(每组5只),由本校实验动物中心提供。经1%戊巴比妥钠麻醉后暴露腹腔,切除双侧卵巢,制备雌激素缺乏的动物模型。对照假手术组为只暴露腹腔而不进行卵巢切除。腹部缝合后继续于常规条件下饲养,术后第1、3、5、10、15、20天,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后开胸,经主动脉灌注Zamboni液固定后,取前脑入Zamboni液后固定过夜,再浸入含30%蔗糖的溶液至组织块沉底,30μm厚连续冰冻切片漂于Zamboni液中备用。

兔抗ER-β(sc-8974)购自Santa Cruz公司,二抗(羊抗兔)和S-P复合物(辣根酶标记链亲和素)分别购自博士德生物工程有限公司和中山生物技术有限公司,硫酸镍铵为上海试剂二厂产

作者简介:张吉强(1968—),男,重庆市潼南县人,博士,讲师,主要从事雌激素对神经系统作用方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68752229
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752230,E-mail:wenqin@cta.cq.cn
收稿日期:2001-08-15;修回日期:2001-11-25

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

品, DAB 为 Sigma 分装。免疫组化采用硫酸镍铵增强显色法进行[4]。切片经 3% H_2O_2 处理 30 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(工作浓度 2 μg/ml) 37 ℃孵育 1 h, 再于 4 ℃冰箱放置 24 h, 二抗和 S-P 复合物均于室温孵育 1 h。显色液配制: 2.5% 硫酸镍铵, 0.035% DAB, 0.03% H_2O_2。对照实验以正常兔血清或无一抗的 PBS 代替 ER-β 一抗, 其余操作同上。

2　结果

采用硫酸镍铵增强的免疫组化显色结果为蓝黑色而不是棕黄色。应用该方法, 我们发现在小鼠基底前脑, ER-β 免疫阳性物质物位于细胞核内, 呈清晰的蓝黑色点状沉淀, 但染色深浅不一, 可能为不同种类的细胞。通过相邻或相近切片显示胶质细胞的结果表明, 小鼠基底前脑内的 ER-β 免疫阳性细胞为神经元而非神经胶质细胞。在假手术组(对照组)雌性小鼠, 基底前脑各部位都有较高水平的 ER-β 蛋白表达, 见图 1。OVX 导致基底前脑内 ER-β 蛋白表达降低, 第 3 天降至最低水平, 随后表达增加, 20 d 后恢复到正常水平。

OVX 1 d: MS 和 HDB 内的表达减弱, 其余各部无显著变化。

OVX 3 d: 各部位 ER-β 表达显著降低, HDB 和 VDB 只有零星的表达, 见图 2, 图 3, MS 内基本上未见阳性细胞。

OVX 5 d: VDB 和 HDB 内表达有所增加。但 MS 内仍然未见阳性细胞。

OVX 10 d: MS 内出现少量阳性细胞, VDB 背侧有较多阳性细胞, 但 VDB 腹侧较少; HDB 内的阳性细胞也较 OVX5 d 增多。

OVX 15 d: HDB 内的阳性细胞进一步增多, 基本上达到正常水平, VDB 和 MS 内的阳性细胞数目也接近正常水平, 见图 4。

OVX 20 d: 各部位基本恢复对照组水平。

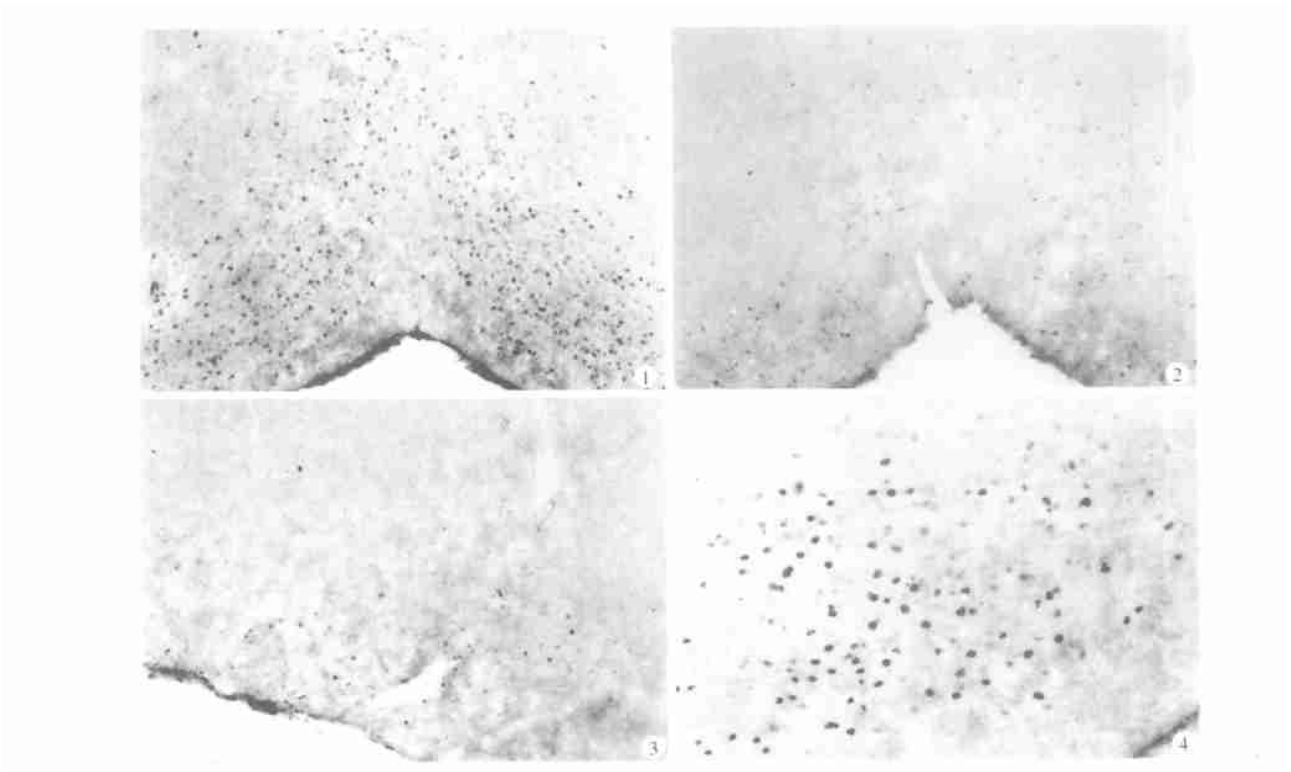


图 1　对照假手术组小鼠基底前脑斜角带垂直部内的 ERβ 免疫阳性细胞数量很多, 免疫阳性物质位于细胞核, 但染色深浅不一　(S-P× 100)

Fig 1　Many ERβ immunopositive neurons detected in VDB localized in the nuclei in control group　(S-P× 100)

图 2　**OVX 3 d.** 小鼠基底前脑斜角带垂直部内 **ER**β 免疫阳性细胞数目较对照组显著减少　(S-P× 100)

Fig 2　ERβ immunopositive cell in VDB decreased dramatically 3 d after OVX　(S-P× 100)

图 3　**OVX 3 d.** 小鼠 **HDB** 内的 **ER**β 免疫阳性细胞数目较正常明显减少。硫酸镍铵增强显色的免疫组化 **SP** 法　(S-P× 100)

Fig 3　ERβ immunopositive of HDB decreased dramatically 3 d after OVX　(S-P× 100)

图 4　**OVX 15 d. HDB** 内的 **ER**β 免疫阳性细胞数目基本达到正常水平　(S-P× 200)

Fig 4　Experimental group ERβ immunopositive cells of HDB recovered to control level 15 d after OVX　(S-P× 200)

3　讨论

对女性来说, 绝经即卵巢功能的丧失, 意味着生殖功能的终止以及雌激素水平显著的、永久性的降低。由于雌激素对成年脑组织是一种重要的营养、保护因子[5,6], 绝经后的低雌激素水平使得女性更容易受到脑

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

损伤以及神经退行性变引起的认知和功能缺陷等的影响。离体和在体的实验证据表明,雌激素对中风、AD以及其它神经退行性疾病都具有保护作用,生理或药理剂量的雌激素能减轻脑损伤的程度以及减少脑内细胞的死亡[7~9]。因此,研究雌激素的神经保护作用的机制具有十分重要的意义。

基底前脑是雌激素和神经生长因子(NGF、BDNF等)的重要靶区,含有大量的胆碱脑神经元,与AD、学习记忆和认知等有着密切的联系。雌激素替代可以预防或治疗AD患者基底前脑出现的胆碱能神经元丢失、神经纤维缠结、β-淀粉样蛋白沉积、学习记忆下降和认知缺陷等症状,还能调节基底前脑内NGF、BDNF和/或其受体以及乙酰胆碱酯酶、胆碱乙酰转移酶(ChAT)等的表达,但其机制尚不清楚[10]。目前对基底前脑内有关雌激素受体的研究报道不多,Shughrue等[11]发现大鼠基底前脑ER-β mRNA表达高于ER-αmRNA;Blurton-Jones报道在非人类灵长类基底前脑,只有少数散在的ER-α免疫阳性神经元[12],Wang等[13]注意到敲除ER-β基因的小鼠老年后基底前脑神经元丢失,我们也发现雌性小鼠基底前脑ER-β蛋白的表达较高而几乎没有ER-α的表达(待发表),以上结果提示ER-β可能是基底前脑内雌激素的功能性受体,介导了雌激素对基底前脑神经元及AD等的调节作用。

应用经典的雌激素缺乏模型即卵巢切除模型,我们研究了OVX后小鼠基底前脑内ER-β蛋白表达的表化,发现ER-β的表达于OVX后3 d后降至最低水平,然后逐渐恢复,到第20天时达到对照水平。以上结果表明雌激素对基底前脑内ER-β的表达有着显著的影响。我们还发现OVX后基底前脑内ChAT、神经元型一氧化氮合酶(NOS_1)和低亲和力神经生长因子受体p75的表达均显著下降,于第5天左右降到最低水平,然后逐渐恢复,这与ER-β表达变化的基本一致;应用免疫组化双重标记技术,我们还发现在基底前脑,ER-β分别与ChAT、NOS_1和p75共存于部分神经元内(待发表工作)。由于基底前脑内ER-α的表达微弱或缺如,因此以上结果表明ER-β可能直接介导了对ChAT、NOS_1和p75表达的调节、进而直接调节基底前脑神经元的结构与功能。至于OVX后ER-β等的表达先降低然后逐渐恢复正常,可能由于小鼠的自身代偿能力比较强、反馈调节致芳香化酶(雌激素合成酶)和/或ER-β的表达升高所致,因为小鼠体内(包括卵巢、皮肤、脑局部等)的芳香化酶表达较高[14],因此OVX并不能完全剥夺小鼠体内的雌激素,相反有可能经由反馈调节途径、促进芳香化酶的表达从而恢复循环雌激素水平,也有可能ER-β本身也能代偿性表达增强从而恢复到OVX前水平。在老年动物以及女性,随着衰老和绝经伴随的循环雌激素水平的降低是一个不可逆的过程,我们在另外的研究中发现老年大鼠和小鼠基底前脑内ER-β的表达较成年显著降低(待发表),同样表明低水平的雌激素导致的低水平ER-β对ChAT(胆碱能系统)、NOS_1(NO能系统)和p75(神经生长因子系统)等的调节可能因此而减弱,最终导致基底前脑神经结构与功能的易伤性,这可能是导致AD发病的主要原因之一。

(致谢:苏炳银博士在脑核团定位方面提供了大力协助,谨深表谢忱!)

参考文献:

[1] Kuiper G G, Enmark E, Pelto-Huikko M *et al*. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 5925—5930.

[2] Giguere V, Tremblay A, Tremblay G B. Estrogen receptorβ: re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling[J]. Steroids, 1998, 63(5-6): 335—339.

[3] 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.

[4] 张吉强,姚 青,刘建军,等. 不同显色方法对免疫组化显色结果的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(3): 359—360.

[5] Wise P M, Dubal D B, Wilson M E, *et al*. Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action[J]. Endocrinology, 2001, 142(3): 969—973.

[6] Dubal D B, Kashon M L, Pettigrew L C, *et al*. Estradiol protects against ischemic injury[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18(11): 1253—1258.

[7] Hum P D, Macrae I M. Estrogen as a neuroprotectant in stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(4): 631—652.

[8] Wilson M E, Dubal D B, Wise P M. Estradiol protects against injury-induced cell death in cortical explant cultures: a role for estrogen receptors[J]. Brain Res, 2000, 873(2): 235—242.

[9] Green P S, Simpkins J W. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action[J]. Int J Dev Neurosci, 2000, 18(4-5): 347—358.

[10] Monk D, Brodaty H. Use of estrogens for the prevention and treatment of Alzheimer's disease[J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2000, 11(1): 1—10.

[11] Shughrue P J, Lane M V, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and-beta mRNA in the rat central nervous system[J]. J Comp Neurol, 1997, 388(4): 507—525.

[12] Blurton-Jones M M, Roberts J A, Tuszynski M H. Estrogen receptor immunoreactivity in the adult primate brain: neuronal distribution and association with p75, trkA, and choline acetyltransferase[J]. J Comp Neurol, 1999, 405(4): 529—542.

[13] Wang L, Andersson S, Warner M, *et al*. Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(5): 2792—2796.

[14] 张吉强,蔡文琴. 脑内芳香化酶表达的定位、调控及意义[J]. 生理科学进展, 2001, 32(2): 107—110.

(编辑 陈聪连)

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