DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.005
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

文章编号:1000-5404(2002)08-0889-03

论著

雌激素β受体免疫阳性物质在生后不同发育时期小鼠基底前脑的表达研究

张吉强[1],姚 青[2],蔡文琴[1] (第三军医大学:[1]基础医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 研究出生后不同发育时期小鼠基底前脑内雌激素β受体(ERβ)的表达。方法 采用硫酸镍铵增强显色的免疫组化S-P法。结果 小鼠基底前脑内ERβ免疫阳性物质位于细胞核。新生时在两性基底前脑ERβ免疫阳性细胞数目较少,生后第14天至3月龄时最多,老龄(18月时)表达显著减少甚至消失,尤其在雌性更明显。ERβ的表达具有一定的性别差异,表现为生后早期和老龄时雄性表达强于同期雌性。结论 小鼠生后不同发育时期基底前脑内ERβ蛋白表达的变化与循环雌激素水平的变化一致,表明该受体可能参与了雌激素对基底前脑神经结构与功能的调节。

关键词:雌激素受体;免疫组织化学;小鼠;基底前脑
中图法分类号:R322.81;R392.2 文献标识码:A

Expression of estrogen receptor β immunoreactivity in the basal forebrain of postnatal 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 expression of estrogen receptor beta (ERβ) immunoreactivity in the basal forebrain of postnatal mice. Methods Nickel ammonium sulfate intensified immunohistochemical SP technique was used. Results ERβ immunoreactive materials were localized in the cell nuclei of the basal forebrain of the mice. Low levels were detected at early postnatal stage in both males and females, and highest levels were detected at postnatal 14~90 d, and then decreased to the lowest level at old ages (18 months old). Sex differences of ERβ immunoreactivity were also noticed, showing higher levels in the males but not females at early postnatal and old ages. Conclusion The changes of the expression of ER-β immunoreactivity at different postnatal stages are coincidence with that of circulating estrogen, indicating that this receptor may be involved in the regulation of estrogen on the structure and function of basal forebrain.

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

雌激素β受体(Estrogen receptor β, ERβ)首先由Kuiper等[1] 1996年从大鼠前列腺克隆出来,它和"经典的"雌激素受体即雌激素α受体(ERα)相比有一些共同的特性但也有显著不同的特点,提示二者可能介导了不同的雌激素信号[2,3]。基底前脑是雌激素的重要靶区之一,我们发现小鼠该部位ERβ的表达很高但几乎没有发现ERα的表达,提示ERβ可能是小鼠基底前脑内雌激素的功能性受体。为了进一步研究ERβ对基底前脑的作用,我们应用免疫组织化学技术研究了生后不同发育时期小鼠基底前脑内ERβ的表达,以期为阐明雌激素作用于基底前脑神经结构与功能的机制提供新的实验证据。

1 材料与方法

雌雄昆明小鼠购自本校实验动物中心。出生之日为P0(Pastnatal 0),以此类推。取P0、P3、P7、P14、1、3、12、18月龄动物,每组5只。除生后早期动物经麻醉后直接断头取脑行浸泡固定外,其余均经1%戊巴比妥钠麻醉后暴露胸腔,升主动脉灌注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,30 μm厚连续冰冻切片漂于Zamboni液中备用。

兔抗ERβ(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,硫酸镍铵为上海试剂二厂产品,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SP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。对照试验以正常血清或无一抗的PBS代替ERβ一抗,其余操作同上。免疫反应的强弱主要以相同倍率视野下阳性细胞数目的多少来确定。

2 结果

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)、斜角带水平部(Horizontal limb of Diagonal band, HDB)和嗅结节岛等部位,其中VDB又可分为背侧部和腹侧部两部分,由于嗅结节岛内表达ERβ蛋白的细胞数目很少,因此我们主要观察了MS、VDB和HDB内ERβ蛋白的表达情况。在两性小鼠,P0时可见弱但明显的ERβ免疫阳性反应,随后(P3)表达增加,P14-3月龄时两性小鼠基底前脑内的阳性细胞数目最多,12月龄时略有减少,但仍保持较高水平。老年(18月龄)时,两性小鼠基底前脑内ERβ免疫阳性细胞数目明显减少甚至消失。免疫阳性物质位于细胞核,胞浆和突起内未见阳性。在发育的某些时期,基底前脑内ERβ免疫反应性还具有性别差异。

P0:雌性基底前脑各部均有表达,较多的阳性细胞见于MS、HDB和VDB腹侧部,VDB背侧部只有零星的分布。而雄性

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的研究,发表论文9篇。电话:(023)68752229
收稿日期:2001-09-14;修回日期:2002-05-25

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

基底前脑各部阳性细胞数目较多，以 MS 最多。总的来说，雄性的阳性细胞数目多于雌性。

P3：雌性各部位的阳性细胞数目有所增加，但 HDB 只有少数散在的阳性细胞。雄性 MS 表达进一步增加。其余各部也较雌性多。

P7：各部位阳性细胞数目进一步增加。在雌性，VDB 腹侧部和 HDB 内的阳性细胞最多。雄性 MS 内最多，其次为 HDB、VDB 腹侧和背侧。

P14：在雌雄两性基底前脑各部阳性细胞数目较 P7 增加。但在雌雄小鼠，ERβ 的免疫阳性细胞数目未见明显的性别差异。见图 1。

1 月龄：雌性小鼠 HDB 和 VDB 腹侧多于 MS 和 VDB 背侧部；雄性为 MS 最多，HDB 次之，VDB 较少，尤其是背侧部。

3 月龄：在雌雄小鼠基底前脑各部均有很多的阳性细胞，阳性细胞核清楚，而且阳性细胞数目无明显的性别差异。见图 2、图 3。

12 月龄：两性基底前脑阳性细胞数目较 3 月龄时减少。雌性主要在 HDB 仍然有较多的阳性细胞，VDB 只有少数散在的阳性细胞。此时雄性基底前脑各部位较 3 月龄时未见明显减弱，阳性细胞数目仍然较多。

18 月龄：阳性细胞数目进一步减少。雌性主要见于 HDB，MS 只有少量散在的阳性细胞，其余部位基本未见表达。雄性各部表达虽有减少但仍较雌性多，尤其是在 MS 和 HDB。见图 4。

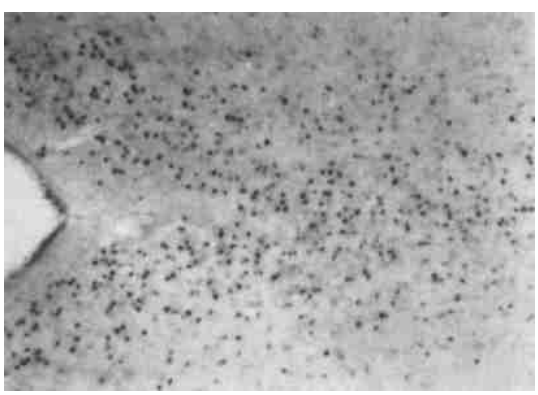


图 1 P14 雌性小鼠斜角带垂直部和隔内侧核内的 ERβ 免疫阳性细胞 (S-P× 100)

Fig 1 ERβ immunoreactivity in the vertical limb of Diagonal band and medial septum of postnatal d 14 female mouse (S-P× 100)

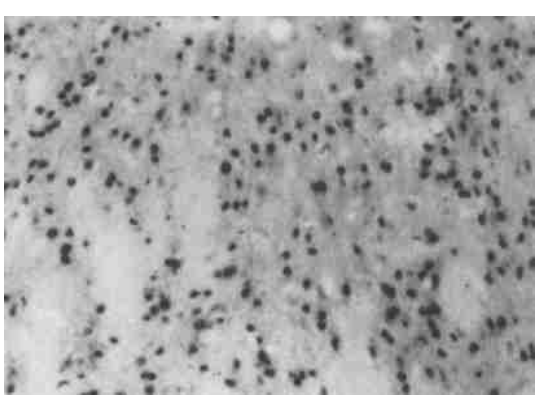


图 2 3 月龄雄性小鼠隔内侧核内的阳性细胞 (S-P× 200)

Fig 2 ERβ immunoreactivity in the medial septum of 3 month-old male mouse (S-P× 200)

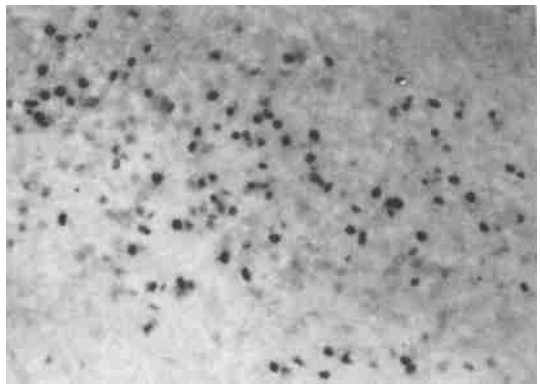


图 3 3 月龄雌性大鼠斜角带水平部内的 ERβ 免疫阳性细胞 (S-P× 200)

Fig 3 ERβ immunoreactivity in the horizontal limb of Diagonal band of 3 month-old female mouse (S-P× 200)

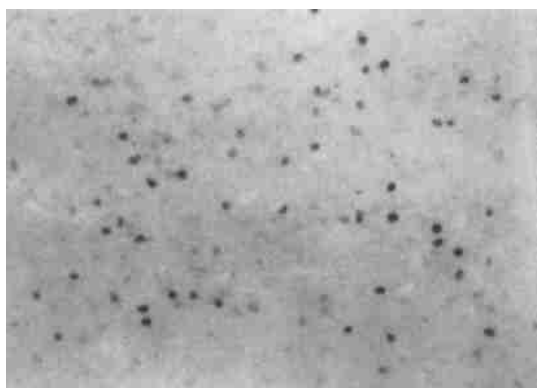


图 4 18 月龄雄性小鼠斜角带水平部内的 ERβ 免疫阳性细胞，阳性细胞数量较 P14 和 3 月龄时显著减少 (S-P× 200)

Fig 4 ERβ immunoreactivity in the horizontal limb of Diagonal band of 18 month-old female mouse, numbers of positive cells were significantly decreased when compared to that of P14 and 3 month-old (S-P× 200)

3 讨论

老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)是与老年人记忆丧失有关的神经退行性变疾病，其发病率仅次于心脑血管疾病和癌症，成为威胁老年人健康的第三大杀手，女性的发病率约为男性的 3 倍。据统计，65 岁以上的人约有 10%具有 AD 的某些症状，到 85 岁时发病率达到 50%左右。基底前脑是 AD 的主要受累脑区之一，含有大量的胆碱能神经元，已经证实这些神经元与学习记忆和 AD 有密切的联系，参与了 AD 的发病过程。研究发现 AD 患者基底前脑出现大量的胆碱能神经元丢失(即数量减少)，而外源性雌激素能促进基底前脑内胆碱能神经元标志物胆碱乙酰转移酶(Choline acetyltransferase, ChAT)的表达与酶活性、促进神经生长因子及其受体的表达，因而老年后的雌激素水平降低被认为是导致 AD 的主要诱因之一。雌激素替代治疗

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

(Estrogen replacement therapy, ERT)可以改善 AD 患者基底前脑胆碱能神经元的结构与功能, 增强患者的学习记忆和认知能力, 减少 AD 患者基底前脑β-淀粉样蛋白的沉积和胆碱能神经元的丢失, 改善 AD 的痴呆症状和情感紊乱, 预防或推迟 AD 的发生, 但其机制尚不清楚[5~8]。

雌激素的神经保护作用是通过其受体(ER-α 和 ER-β)来介导的。已有的研究表明基底前脑内 ER-α 的表达可能很低, 但是 ER-β 的表达相对很高[9~11], 提示 ER-β 可能是基底前脑内雌激素的功能性受体, 对基底前脑神经结构与功能的保持具有重要的意义。目前尚未见国内外有关 ER-β 在生后不同发育时期基底前脑内的表达研究, 本实验结果表明, 基底前脑内 ER-β 的表达具有性别差异, 在生后早期和老年雄性表达强于同期雌性。其次新生时在两性表达较低, P3 时表达增加, 生后第 14 天至 3 月龄时阳性细胞数目最多, 然后逐渐减少, 老年时表达显著降低。我们应用免疫组化双标技术还发现在小鼠基底前脑, 有部分细胞能同时表达 ER-β 和 ChAT, 提示 ER-β 直接介导了雌激素对胆碱能神经元结构与功能的调节(待发表工作)。在老化过程中, 随着卵巢功能的丧失, 循环雌激素水平下降, 导致基底前脑胆碱能神经元功能下降; 长时间的雌激素缺乏使雌激素靶神经元对雌激素的敏感性降低、导致这些神经元形态结构和功能发生不可逆改变, 可能是造成AD 等神经退行性疾病的重要原因[12]。在发育过程中, 由于雌性鼠的循环雌激素和 ER-β 水平减弱较雄性显著得多, 因而上述发现或许是女性的学习记忆更容易受到雌激素影响的原因。Wang 等[13] 还注意到敲除 ER-β 基因导致小鼠基底前脑神经元丢失, 认为 ER-β 对神经元的存活是必需的, 在 AD 的发生中起了重要作用。Savaskan[14] 和 Ishunina 等[15] 发现 AD 患者海马和基底核等脑区内的 ER-β 免疫反应性显著改变, 提示 ER-β 介导了雌激素对 AD 有关的神经病理产生作用。以上研究表明, 在 AD 的发生以及演变过程中, ER-β 可能扮演了重要的角色。

(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): 5 925—5 930.

[2] Giguere V, Tremblay A, Tremblay G B. Estrogen receptor β: 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] Felician O, Sandson T A. The neurobiology and pharmacotherapy of Alzheimer's disease[J]. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 1999, 11(1): 19—31.

[6] Miller M M, Franklin K B. Theoretical basis for the benefit of post-menopausal estrogen substitution[J]. Exp Gerontol, 1999, 34(5): 587—604.

[7] 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.

[8] Garcia-Segura L M, Azcoitia I, DonCarlos L L. Neuroprotection by estradiol[J]. Prog Neurobiol, 2001, 63(1): 29—60.

[9] Donahue J E, Stopa E G, Chorsky R L, *et al*. Cells containing immunoreactive estrogen receptor-alpha in the human basal forebrain[J]. Brain Res, 2000, 856(1—2): 142—151.

[10] 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.

[11] 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.

[12] Gibbs R B. Impairment of basal forebrain cholinergic neurons associated with aging and long-term loss of ovarian function[J]. Exp Neurol, 1998, 151(2): 289—302.

[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 USA, 2001, 98(5): 2 792—2 796.

[14] Savaskan E, Olivieri G, Meier F, *et al*. Hippocampal estrogen beta-receptor immunoreactivity is increased in Alzheimer's disease[J]. Brain Res, 2001, 908(2): 113—119.

[15] Ishunina T A, Swaab D F. Increased expression of estrogen receptor alpha and beta in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2001, 22(3): 417—426.

(编辑　张大春)

(上接 888 页)

伤。抗 HBe、抗 HBc 阳性提示乙肝现症或乙肝病毒近期感染, HBsAg 量少测不出, 此模式 CIC 阳性率也较高(39.5%), 估计该模式乙肝患者血清中 HBsAg 可能以 CIC 形式存在。

HBsAg、HBeAg、抗 HBc 阳性组和 HBsAg、抗 HBe、抗 HBc 阳性组的 CIC 阳性率无明显差别($P>0.05$), 可见 HBeAg 转变为抗 HBe 虽可在一定程度上反映病情缓解, 病毒复制转慢, 但由于 HBsAg 持续存在, 表明机体仍然有免疫损伤, 进而引起 CIC 的升高。

单纯抗 HBs 阳性或合并抗 HBe、抗 HBc 中一项以上阳性组血清 CIC 水平相对较低, 和对照组无明显差别($P>0.05$)。这四种模式提示乙肝恢复阶段, 病毒已逐渐消失, 免疫应答逐渐平息, 机体已产生较多的抗体, 病毒抗原已被清除。

总之, 本研究认为乙型病毒性肝炎患者检测 CIC 量的变化对肝病的病情观察、预后判断均有一定的临床意义。

关键词: 乙型肝炎, 循环免疫复合物
中图法分类号: R446.11　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 陈敬贤, 宗庭益. 循环免疫复合物测定法的研究(乙二醇沉淀—酚试剂显色法)[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1983, 3(3): 164.

[2] Nityanand S, Holm G, Lefvert A K. Immune complex mediated vasculitis in hepatitis B and C infections and the effect of antiviral therapy[J]. Clin Immuol Immunopathol, 1997, 82(3): 250—257.

[3] Chang W Y, Hsieh M Y, Lin Z Y, *et al*. Immunoglobulin and hepatitis B surface antigen-specific circulating immune complexes in chronic heptitis B virus infection[J]. Clin Immunol Immunopathol 1998, 86(3): 246—251.

(编辑　郭建秀)

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