DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.009

文章编号:1000-5404(2001)08-0895-03

论著

雌激素β受体在成年雄性大鼠脑内的免疫组化定位研究

张吉强,蔡文琴 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 为了研究雌激素作用于神经系统的机制,研究了近年发现的雌激素β受体免疫阳性物质在雄性大鼠脑内的分布。**方法** 应用免疫组化S-P法并结合硫酸镍铵增强显色技术。**结果** ①免疫阳性物质主要位于神经元的细胞核内,部分细胞的核周质和突起内也有浅淡的着色;也有部分神经元仅仅胞浆呈阳性;②最强阳性信号见于前嗅核、大脑皮质、斜角带垂直部、小脑浦肯野细胞、上丘各部、动眼神经核、红核、蓝斑、三叉神经运动核以及斜方体内、外侧核;中等强度的染色见于斜角带水平部、终纹床核、视前内侧核、乳头体内侧核以及黑质;较弱的阳性细胞见于下丘脑核团、未定带、杏仁复合体的部分核团以及脑桥网状核后部;微弱的阳性信号见于隔外侧核、苍白球、嗅结节岛、海马。**结论** 雌激素β受体在成年大鼠脑组织内有广泛的分布,在脑组织内雌激素可能通过β受体这一新的信号途径发挥多种重要的调控作用。

关键词: 雌激素β受体;大鼠;脑;免疫组织化学
中图法分类号: R322.81;R329-33;R392.11 **文献标识码:** A

Localization of estrogen receptor beta in the brain of adult male rats by using immunocytochemical technique

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

Abstract: Objective In order to explore the mechanism of estrogen on the brain, the distribution of a novel estrogen receptor β (ERbeta) was examined in the brain of adult male rats. **Methods** Immunocytochemistry combined nickel ammonium sulfate enhancement technique was used. **Results** ① Immunoreactivity (ERbeta-ir) was mainly localized in the nuclei of neurons. In some neurons weak but detectable ERbeta-ir positive signals were also localized in the perikaryon and neuritis. However, in some neurons, positive signals were only localized in the perikaryon and neuritis while the cell nucleus showed negative; ②High level of ERbeta-ir positive signals were detected in the anterior olfactory nucleus, cerebral cortex, vertical limb of the diagonal band, Purkinje cell, subregions of superior colliculus, loci ceruleus, motor trigeminal nucleus, medial and lateral nucleus of the trapezoid body, oculomotor nucleus, red nucleus; moderate level of ERbeta-ir signal was detected in the horizontal limb of the diagonal band, bed nucleus of the stria terminalis, medial preoptic nucleus, substantia nigra; low level of positive signals were localized in the hypothalamic nuclei, zona incerta, some nuclei of amygdaloid complex, pontine reticular nucleus; weak signals were localized in the lateral septal nucleus, pallidum, island of Calleja, hippocampus formation. **Conclusion** ER-β is widely distributed in the brain of male rats, indicating that this receptor may exert its unique role in the regulation of these specific brain regions.

Key words: estrogen receptor beta; rat; brain; immunocytochemistry

雌激素受体(ER)包括α(ER-α)和β(ER-β)两种[1,2],先前的研究发现在成年大鼠脑内两种ER的mRNA的分布模式不同[3],敲除ER-α基因后在下丘脑、嗅球、终纹床核等部位检测到较高水平的ER-β mRNA表达[4],提示ER-β有与ER-α各有不同的生物学功能。目前尚未见国内外有关ER-β蛋白在大鼠脑内分布的详细资料。本研究应用硫酸镍铵增强显色的免疫组化技术研究了成年雄性大鼠脑内ER-β的分布,以期为进一步阐明雌激素作用于神经系统的机制提供新的资料。

1 材料与方法

健康成年雄性Wistar大鼠($n=5$,体重200~230 g)由本校实验动物中心提供,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后开胸,经主动脉灌注Zamboni's液固定后,取脑入Zamboni's后固定过夜,再浸入30%的蔗糖溶液至组织块沉入瓶底,30 μm厚连续冰冻切片漂于Zamboni's液中备用。兔抗ER-β购自Santa Cruz公司,二抗(羊抗兔)和SP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品,DAB为Sigma分装。免疫组化采用S-P法并用硫酸镍铵增强显色[5],略加修改如下:切片经3% H_2O_2 处理30 min以封闭内源性过氧化物酶活性,0.3% Triton X-100/0.1%牛血清白蛋白(PBS配)37 ℃孵育2 h后于一抗(工作浓度2 μg/ml)37 ℃孵育1 h后置4 ℃冰箱放置72 h,二抗和SP复合物均于37 ℃孵育1 h。显色液配制:2.5%硫酸镍铵-0.035% DAB-0.03% H_2O_2(用0.1 mol/L的醋酸钠溶液配制)。对照试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。用特异性抗GFAP、GC和GSIB4抗体显示星形胶质细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞。脑核团的定位参照包新民等[6]的图谱进行。

2 结果

与一般的DAB/H_2O_2 显色结果(棕黄色)不同,采用硫酸镍铵增强的免疫组化显色结果为稳定的蓝黑色沉淀。我们的实验结果表明ER-β免疫阳性细胞在雄性大鼠脑有着广泛的分布,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。通

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870724)
作者简介:张吉强(1968~),男,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事雌激素对神经系统作用的研究,发表论文7篇。电话:(023)68752229
收稿日期:2001-02-10;修回日期:2001-04-28

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

过相邻或相近切片显示胶质细胞的结果表明阳性细胞为神经元而非神经胶质细胞。

在前脑，最强的染色见于扣带前、后皮质、颞叶、压部后皮质以及海马的下托，这些部位的 ER-β 免疫反应全部为核阳性，呈点状、杆状或不规则状，见图 1。小脑皮质内的 ER-β 阳性反应只见于浦肯野细胞的细胞核，见图 2。前嗅核和梨状内核内有密集的点状阳性细胞核。在基底前脑各部，斜角带垂直部腹侧的免疫阳性最强，其次为背侧和隔内侧核以及水平部。终纹床核内的免疫阳性反应也较强。但杏仁核各核团内的 ER-β 免疫反应性都比较弱，其中杏仁外侧核、杏仁中央核和杏仁内侧核稍强；在下丘脑，除了视前内侧核以及视前室周核的表达稍强以外其余各核团如腹内侧核、背内侧核等的表达都比较微弱。但在丘脑内侧背核各部可见密集的阳性细胞核，核小呈点状。海马内只有少数散在的阳性反应，其中 CA3 只是细胞核呈阳性，而 CA1、CA2 内除了细胞核着色以外胞浆和突起也有淡淡的着色。

小而呈点状的阳性细胞核也见于上丘以及大脑导水管周围的中央灰质，下丘各部位的染色相对微弱。动眼神经核内有一部分阳性细胞为核阳性，而另一部分为胞浆和突起内着色，见图 3；红核内主要为核阳性，乳头体内侧核与黑质各部也有较高的表达。在延髓，蓝斑有一些大的细胞核呈强阳性。蓝斑下核有稀疏的阳性细胞，核深染，胞体和突起淡染，见图 4；三叉神经运动核内有一些深染的细胞核与一些仅为胞浆和突起着色的阳性细胞，见图 5。脑桥网状核尾侧部内可见稀疏的阳性细胞，胞体大，细胞核着色深，胞体和突起淡染，细胞形态可辨。斜方体外侧核为细胞核阳性，而斜方体内侧核内除了细胞核着色外胞体和突起也有浅淡的染色。

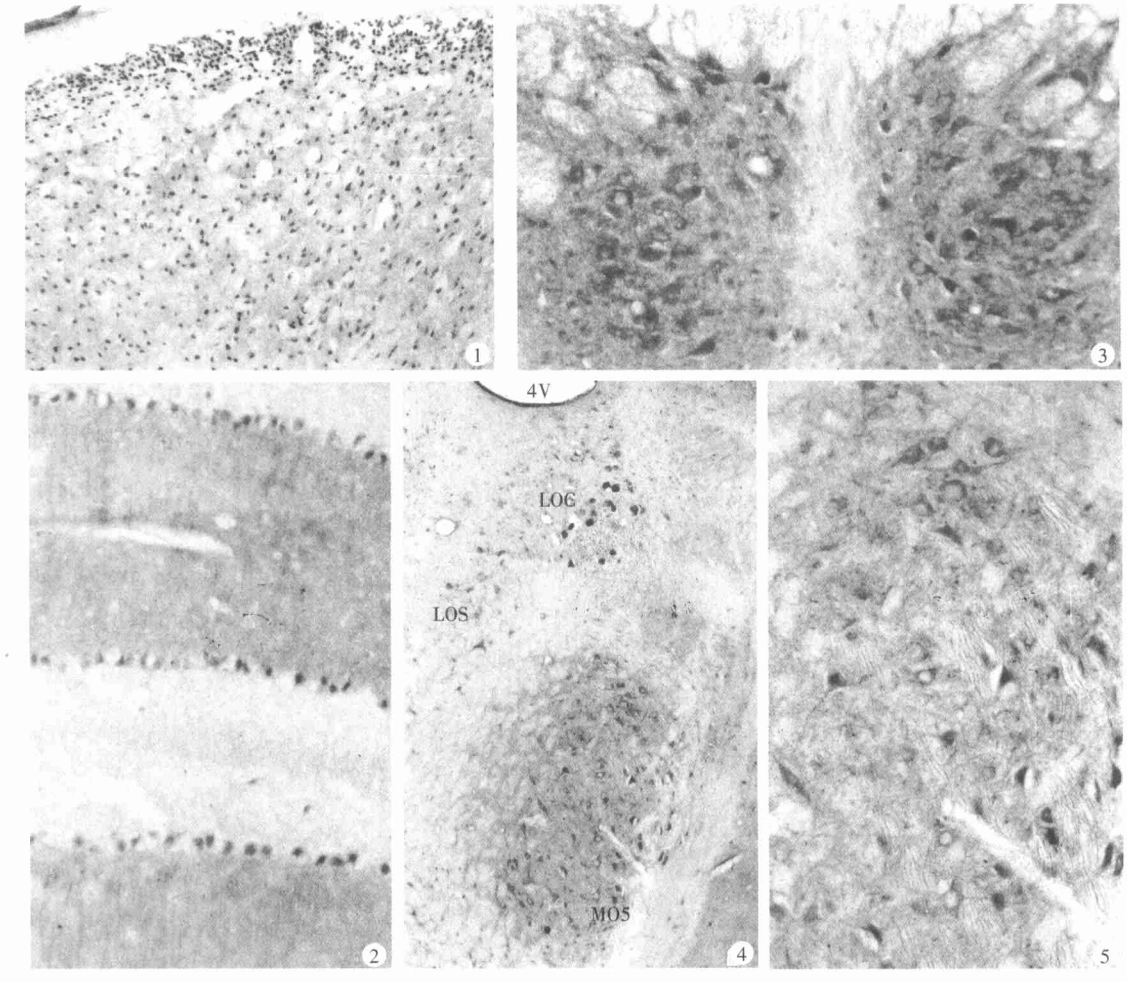


图 1 扣带皮质内的 ER-β 免疫阳性神经元(S-P × 100)

Fig 1 ER-β immunoreactive neurons detected in the cingulate cortex, positive materials were found in the cell nuclei only (S-P × 100)

图 2 小脑浦肯野细胞核呈 ER-β 免疫阳性反应(S-P × 200)

Fig 2 ER-β immunoreactive neurons detected in the cerebellar Purkinje cells, positive materials were found in the cell nuclei only (S-P × 200)

图 3 动眼神经核内的 ER-β 免疫阳性反应(S-P × 200)

Fig 3 ER-β immunoreactivity detected in the oculomotor nucleus (S-P × 200)

图 4 蓝斑、蓝斑下核以及三叉神经运动核内的 ER-β 免疫阳性反应(S-P × 100)

4V：第四脑室；LOC：蓝斑；LOS：蓝斑下核；MO5：三叉神经运动核

Fig 4 ER-β immunoreactivity detected in the locus ceruleus, the locus subceruleus and the motor nucleus of the trigeminal nerve (S-P × 100)

4V: the fourth ventricle; LOC: locus ceruleus; LOS: locus subceruleus; MO5: motor nucleus of the trigeminal nerve

图 5 三叉神经运动核内的 ER-β 免疫阳性反应 (S-P × 200) 可见三种明显不同的分布模式：细胞核阴性或阳性、核强阳性，胞浆和突起淡染

Fig 5 ER-β immunoreactivity detected in the motor nucleus of the trigeminal nerve showing three types of intracellular distribution pattern: nucleus positive, or cytoplasm and processes positive, or both (S-P × 200)

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

3 讨论

近年来的研究结果表明雌激素不仅作用于生殖系统，也深刻影响脑内神经元的结构和功能，如学习记忆和认知行为，但其机制尚不清楚。雌激素是通过其受体即 ER 而发挥调节作用的。尽管两种 ER 在外显子数目、DNA 结合域、配基结合域与结合特性等方面有很大的相似性，但也有各自不同的特点，提示二者介导的雌激素调节信号是有差异的[7~9]。

我们在国内外首次对 ER-β 蛋白在脑组织内的定位进行了较全面的研究，结果表明 ER-β 蛋白在脑组织内有广泛的表达，阳性物质主要位于细胞核，但也可在胞浆甚至突起内检测到，这与 Li 等[10]对海马 ER-β 的免疫组化研究结果基本一致。Li 等发现 ER-β 蛋白也可位于胞浆，但这种情况只见于海马锥体神经元；我们的结果表明明显的胞浆阳性主要见于三叉神经运动核，其次为动眼神经核，海马锥体神经元为核阳性。造成这种差异的原因可能是抗体的来源不一样。诸如 ER-β 一类的"核受体"在核外表达的意义尚不清楚，有人认为，核受体在未与其配基结合前可以以游离形式存在于核外，一旦与配基结合则形成受体-配基复合体，并进入细胞核，最终发挥对基因转录的调控作用。最近 Stefano 等[11]认为 ER 甚至可以位于细胞膜上。

研究发现 ER-β 在脑组织中可能起着独特的、与 ER-α 不一样的调节作用。比如视上核和室旁核只表达 ER-β 而不表达 ER-α；Alves 等[12]用免疫组化证实 ER-β 分别与催产素和加压素共存；Hrabovszky 等[13]用免疫组化结合原位杂交法发现催产素与加压素神经元内有 ER-β mRNA 表达。以上结果提示 ER-β 介导了雌激素对视上核和室旁核内催产素与加压素神经元的分泌活动而 ER-α 并未参与这个过程。嗅球、皮质、海马主要表达 ER-β mRNA 和/或蛋白提示 ER-β 可能是介导学习记忆的功能性受体并与协调、平衡、肌肉运动、视觉和季节节律有关；我们发现黑质、红核、动眼神经核与三叉神经运动核内有较高水平的 ER-β 蛋白表达，提示 ER-β 可能介导了雌激素对多巴胺能神经元功能、骨骼肌、视觉等面部感觉、表情等的调节，可能参与了对帕金森综合症的作用。我们对小鼠前脑内两种 ER 的比较研究结果表明，ER-α 的分布相当局限，主要见于与生殖有关的视前内侧核，而 ER-β 则主要见于基底前脑等部位，提示 ER-β 可能是基底前脑内雌激素的功能性受体(待发表)。由于基底前脑是老年性痴呆(Alzheimer's disease，AD)的主要受累脑区，而且雌激素替代治疗可以改善 AD 的痴呆症状和认知缺陷[7]，因此 ER-β 在此过程中可能发挥了关键作用。

目前越来越多的证据表明雌激素对神经系统的功能有多方面的调节作用，雌激素替代治疗能有效地改善神经退行性疾病如 AD 导致的学习记忆下降和认知缺陷，但其机制不明。ER-β 的发现加深了我们对雌激素信号途径的认识，对 ER-β(以及 ER-α)的深入研究将为治疗 AD 和雌激素依赖性肿瘤等奠定坚实的基础。

(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] 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.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Shughrue P, Scrimo P, Lane M, *et al*. The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-alpha knockout mouse[J]. Endocrinology, 1997, 138(12): 5 649-5 652.

[5] Mufson E J, Cai W J, Jaffar S, *et al*. Estrogen receptor immunoreactivity within subregions of the rat forebrain: neuronal distribution and association with perikarya containing choline acetyltransferase[J]. Brain Res, 1999, 849(1-2): 253-274.

[6] 包新民，舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京：人民卫生出版社，1991.4-98.

[7] Wickelgren I. Estrogen stakes claim to cognition[J]. Science, 1997, 276(5 313): 675-678.

[8] Kuiper G G J M, 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.

[9] Mosselman S, Polman J, DijkemaR. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor[J]. FEBS Lett, 1996, 392(1): 49-53.

[10] Li X, Schwartz P E, Rissman E F. Distribution of estrogen receptor-beta-like immunoreactivity in rat forebrain[J]. Neuroendocrinology, 1997, 66(2): 63-67.

[11] Stefano G B, Cadet P, Breton C, *et al*. Estradiol-stimulated nitric oxide release in human granulocytes is dependant on intracellular calcium transients: evidence of a cell surface estrogen receptor[J]. Blood, 2000, 95(12): 3 951-3 958.

[12] 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): 3 281-3 286.

[13] Hrabovszky E, Kallo I, Hajszan T, *et al*. Expression of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid in oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei[J]. Endocrinology, 1998, 139(5): 2 600-2 604.

(编辑　王　红)

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