DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.009
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
18 2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)01-0018-04

雄激素对脑损伤后星形胶质细胞反应的影响

黄其林[1],张可成[1],蔡文琴[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院神经外科,重庆 400037;[2]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要 目的:研究雄激素对脑穿刺损伤后星形胶质细胞(Ast)反应性胶质化的影响。方法:通过免疫组化、免疫荧光染色及流式细胞仪计数等方法,观察切除睾丸及补充睾丸酮后脑穿刺损伤鼠伤灶周围GFAP-IR阳性细胞的形态、数量与比例变化。结果:切除睾丸鼠脑损伤后,伤灶周围反应性胶质比较单纯损伤鼠明显,表现为胞体肥大,突起增粗、延长,GFAP免疫组化染色显著增强。睾丸酮治疗后,Ast反应程度虽有减弱,但未能恢复到正常水平。流式细胞计数结果表明,切除睾丸及用睾丸酮治疗前后,Ast比例无显著变化。结论:睾丸酮能影响Ast的形态变化及对损伤的反应,但可能对Ast的增殖作用不明显。

关键词 星形胶质细胞;脑损伤;雄激素
中图法分类号 R322.85;R651.15 文献标识码 A

Effects of androgen on the reactions of astrocytes after brain injury in rats

HUANG Qi-lin, ZHANG Ke-cheng, CAI Wen-qin (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037)

Abstract Objective: To study the effects of androgen on the reactional glial formation of astrocytes after cerebral stab injury in rats. Methods: The changes of the morphology, number and proportion of the GFAP-IR positive cells in the surroundings of the brain stab injury (BSI) were studied with immunohistochemistry, immunofluorescent staining and flow cytometry in adult male rats with orchidectomy and testosterone treatment. Results: The morphological changes of GFAP-IR positive cells in the surroundings of brain stab wounds were more obvious in the cestrated rats than in the rats with intact testicles. In the castrated rats, the GFAP-IR positive cells were more hypertrophic with thick and prolonged dendrites and deeper staining of GFAP. After testosterone treatment, the reactions of astrocytes were decreased but remained higher than those in the rats with intact testicles. Flow cytometry revealed that no significant change of the proportion of astrocytes was found before and after castration and testosterone treatment. Conclusion: Androgen can modify the reactivity of astrocytes but shows no effect on their proliferation.

Key words astrocyte; brain injury; androgen

研究发现,性激素是影响星形胶质细胞(Astrocyte, Ast)形态、结构和功能的重要因素之一[1,2],其中,雄激素对不同脑区正常Ast的形态及生物学行为,以及Ast表达胶原纤维酸性蛋白(GFAP)mRNA的水平等都有明显的调节作用[3]。然而,雄激素对脑损伤后Ast反应性胶质化的影响尚不清楚。业已证明,Ast反应不仅影响了损伤局部组织的修复,而且对损伤局部神经元的再生与功能重建也有影响。因此,研究脑损伤后的Ast反应及其影响因素是神经科学研究的重要课题之一。本研究通过切除睾丸及补充睾丸酮,以比较雄激素水平的变化对正常及脑损伤后Ast反应的影响,探讨雄激素调节脑损伤后Ast反应的作用与机制。

基金项目:全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(96M090)及重庆市青年科研基金资助项目
作者简介:黄其林(1960.7),男,四川省资中县人,博士,主治医师,讲师,主要从事中枢神经损伤与修复方面的研究,发表论文23篇。电话:(023)68755365-74610
收稿日期:1999-05-18;修回日期:1999-11-15

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

仪器:FJ-2008Q自动免疫计数器;FACStar^{PLUS}型流式细胞计数仪;Becton Dichinson公司产品。主要试剂:睾酮放免测定试剂

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

盒(上海放射医学研究所产品);丙酸睾丸酮注射液;鼠抗 GFAP 单抗,购自重庆医科大学病理生理学教研室;FITC 标记鼠 IgG,SP 免疫组化试剂盒均购自中山生物技术公司。

1.2　动物与分组

雄性 Wistar 大鼠 105 只,体重(200±10)g。随机分成正常对照组;睾丸酮治疗组;睾丸切除组;睾丸切除+睾丸酮治疗组;脑穿刺损伤组;睾丸切除+脑穿刺损伤组;睾丸切除+脑穿刺损伤+睾丸酮治疗组。根据观察时间每组再分为 1 周、2 周、1 月 3 个小组,每小组各 5 只大鼠。

1.3　睾丸切除及血清睾丸酮测定

1%戊巴比妥钠腹腔注射(30 mg/kg 体重)麻醉大鼠后,常规消毒,下腹部正中切口,分离并切除双侧睾丸,止血,缝合皮肤。15 d 后,采用放免法测定血清中睾酮含量,待睾酮水平显著降低后用于制作脑损伤模型。

1.4　脑损伤模型制作

按上述方法麻醉大鼠后,固定于立体定位架上,右顶部电钻开颅,骨孔直径 2 mm。自制刀片(长 70 mm,宽 1.5 mm,厚 0.3 mm)固定于微推进器上,经顶叶皮层插入脑组织中,深 5 mm,留针 2 min 后退出刀片,缝合头皮,制成脑损伤模型。对照组仅开颅,不致伤。

1.5　睾丸酮治疗

用丙酸睾丸酮 25 mg/kg 肌注治疗睾丸切除鼠;每天 1 次,连用 3 d 后,每周给药 1 次维持。脑损伤+睾丸酮治疗组在损伤的同时进行睾丸酮治疗。

1.6　免疫组化染色

麻醉动物后,4%多聚甲醛+30%苦味酸灌注固定,取全脑,4 ℃后固定 4 h,30%蔗糖浸泡 24 h 后,经伤道冰冻切片,片厚 30 μm,按本室常规方法进行免疫组化染色。

1.7　单细胞悬液制备及免疫荧光染色

麻醉动物后,活杀取脑,去软脑膜,锐利刀片沿伤道周围组织取材,D-Hanks 液漂净血迹,剪碎组织,0.25%胰酶 37 ℃消化 30 min,反复吹打成单细胞悬液,终止胰酶消化,200 目滤网过滤,0.01 mol PBS 漂洗,800 r/min 离心 10 min,反复 2 次,1%Triton 30 min,0.01 mol PBS 漂洗 5 min,调整细胞数为 10^5 后,加鼠抗 GFAP 单抗,37 ℃孵育 1 h 后转 4 ℃过夜;0.01 mol PBS 漂洗 5 min,3 次;加 FITC 标记鼠抗 IgG,37 ℃孵育 30 min,0.01 mol PBS 漂洗 5 min,3 次,荧光显微镜镜检,确认染色成功后,再次调整细胞数为 10^6 后,上流式细胞仪检测。

1.8　图像分析

采用重庆大学设计生产的 Tiger 图像分析系统进行图像分析,操作方法与步骤按说明书进行。分析项目包括细胞平均面积(μm^2)、单个细胞的平均突起数量与长度(μm)。

1.9　统计学处理

采用计算机统计程序作 t 检验及 χ^2 检验。

2　结果

2.1　血清睾丸酮含量

切除睾丸 15 d 后,血清睾丸酮水平由(116.74±5.3) pg/ml 降至(20.52±2.5) pg/ml,补充睾丸酮后,血清睾丸酮水平上升至(98.2±3.2) pg/ml。

2.2　GFAP 免疫组化染色

切除睾丸后,Ast 免疫组化染色增强,胞体增大,突起增多,增粗,延长,以海马 Ast 尤为明显,皮层与白质也有一定程度增加。图像分析结果见表 1、2。

表 1　切除睾丸及睾丸酮治疗后 GFAP 阳性细胞的变化($n=5$)

Tab 1　Changes of GFAP positive cell after castration and testosterone treatment in rats($n=5$)

	Normal control group			Castrated rats group			Normal + treatment with testosterone group			Castrated rats + with testosterone group		
	ACS	PN	PL	ACS	PN	PL	ACS	PN	PL	ACS	PN	PL
7 d	20.4±2.9	6.2±1.0	21.4±2.4	24.5±2.1	7.2±1.4	23.2±2.9	20.5±2.5	6.2±1.0	20.4±2.5	21.1±2.8	6.8±1.1	21.5±3.5
14 d	21.3±3.5	6.3±1.8	20.3±2.9	28.7±3.2*	8.2±1.4	24.3±3.5	20.3±2.9	6.5±2.8	20.3±2.9	20.3±2.1#	6.5±1.7	21.7±3.9
30 d	20.8±2.6	6.6±0.9	22.4±3.1	25.6±2.5*	8.1±1.1	23.1±2.9	21.8±2.7	6.2±0.9	21.4±3.2	19.4±2.5#	6.3±0.7	20.4±2.7

ACS: Cell average area; PL: Average length of cell processes; PN: Average number of cell processes;
*: $P<0.05$ *vs* normal control group; #: $P<0.05$ *vs* castrated rats group

从表 1 中看出,切除睾丸后 GFAP 细胞面积较正常对照组显著增加($P<0.05$),平均突起数及平均突起长度较对照组绝对数值增高,但统计学分析,差异不显著($P>0.05$);睾丸酮治疗后,平均面积、突起长度与数量与睾丸切除组比,差异显著($P<0.05$);正常鼠用睾丸酮治疗后,单位面积内平均细胞面积、平均突起数量与长度等无明显变化($P>0.05$)。

睾丸切除鼠脑损伤后,伤灶周围 Ast 反应更为强烈,胞体明显肥大,突起粗大,延长,免疫组化染色显著增强。睾丸酮治疗后,免疫组化染色虽有减弱,但仍较正常对照组明显,见图 1。图像分析结果见表 2。

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

表 2 睾丸切除鼠脑损伤后睾丸酮治疗伤灶 GFAP 阳性细胞的变化($n=5$)

Tab 2 Changes of GFAP positive cell around site in castrated rat with and without testosterone treatment($n=5$)

	BSI group			Castrated + BSI group			Castrated + BSI + treatment with testosterone		
	ACS	PL	PN	ACS	PL	PN	ACS	PL	PN
7 d	24.2±1.6	24.8±2.8	8.2±1.4	27.6±3.5	25.4±4.1	7.4±1.2	21.4±2.5	27.6±3.5	6.3±1.1
14 d	25.3±2.1	30.6±2.5	9.1±1.8	29.7±2.3#	29.1±3.4	7.8±1.5	23.1±4.3*	20.2±2.7	6.2±0.7
30 d	22.2±2.1	28.8±2.3	8.0±1.5	24.4±2.8	26.8±2.9	7.1±1.3	23.1±4.3*	20.2±2.7	6.2±0.7

ACS: Cell average area; PL: Average length of cell processes; PN: Average number of cell processes;

#: $P<0.05$ *vs* BSI group; *: $P<0.05$ *vs* castrated + BSI group

2.3 流式细胞计数

睾丸切除鼠 GFAP 阳性细胞比例与正常组比较无显著差异，分别为(36±3.2)%和(32±2.7)%。睾丸切除鼠脑损伤后 14 d，GFAP 阳性细胞比例为(45.2±3.6)%，与单纯脑损伤组比较差异不显著，与正常组比较差异显著。睾丸切除鼠脑损伤后用睾丸酮治疗 14 d，GFAP 阳性细胞比例为(44.1±3.7)%，与单纯脑损伤组比较差异显著。

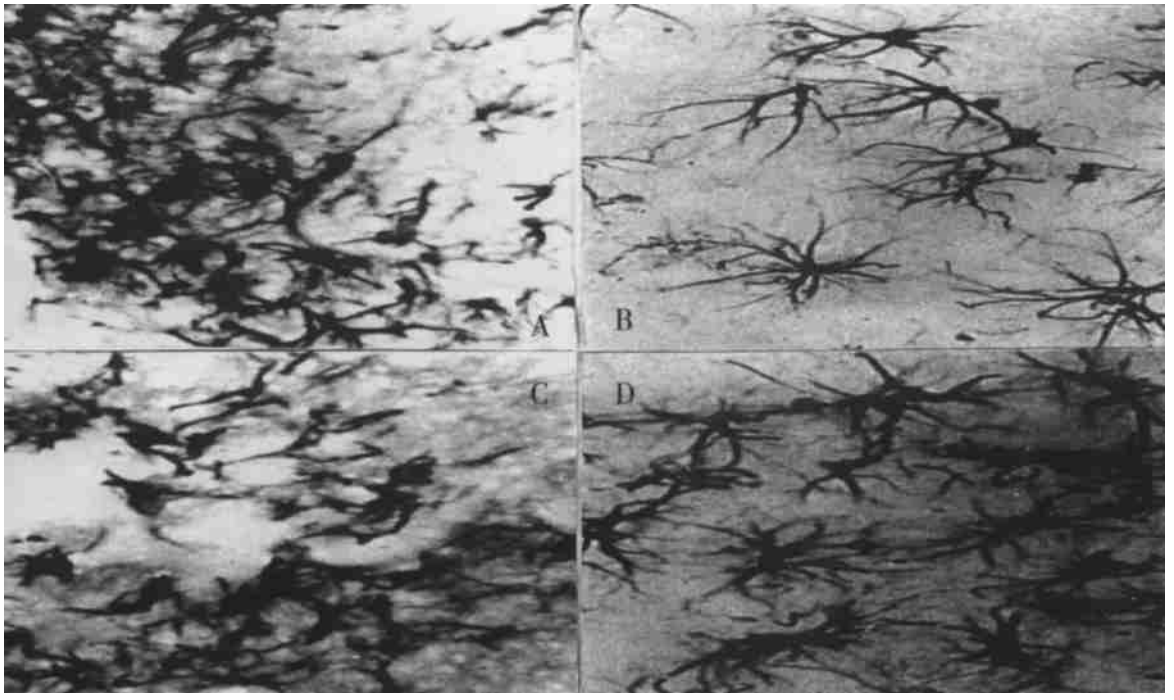


图 1 雄激素对 GFAP 阳性细胞影响的免疫组化染色

A：正常对照组；B：睾丸切除鼠：胞体增大，突起增粗、延长，GFAP 染色增强；C：睾丸切除鼠脑损伤后 14 d。胞体明显肥大，突起增粗、GFAP 染色增强；D：睾丸酮治疗组脑损伤后 14 d。胞体依然肥大，突起增粗、延长，GFAP 染色增强，但较睾丸切除后脑损伤组程度明显减轻 (×400)

Fig 1 The immunohistochemistry stain of effect of the androgen on GFAP positive cells

A: Normal control group; B: GFAP positive cells of hippocampi in castrated rats. The cell bodies were hypertrophic, the processes became thicker and prolonged, the staining of GFAP was deeper; C: GFAP positive cells surrounding the BSI sites in castrated rats on the 14th day after injury. Cell bodies became more hypertrophic, cell processes were thicker, the staining of GFAP was deeper; D: GFAP positive cells surrounding the BSI sites in castrated rats which was treated by testosterone on the 14th day after injury. The change of morphology and stain intensity of GFAP positive cell were more marked, but less than those in castoated rats after BSI (×400)

3 讨论

近年来的研究发现，胶质细胞与神经元一样也是性激素作用的一类靶细胞。在神经胶质细胞，尤其是在 Ast 中不仅发现了性激素的受体，如雌激素、雄激素受体，而且还发现了促使性激素代谢和转化的多种酶类，如芳香化酶，5α 还原酶等[1,2]，Day 等人应用 Northern 杂交和免疫组化研究发现，阉割成年雄性大鼠睾丸后，

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

海马 Ast 表达 GFAP 和簇素 (Clusterin) mRNA 的水平显著升高, 表明性激素与 Ast 之间有着密切的关系。

本实验通过切除雄性大鼠的睾丸, 观察睾丸酮水平降低对 Ast 形态结构及 GFAP 表达的影响; 同时用睾丸酮治疗性腺切除鼠, 比较睾丸酮缺乏鼠在治疗后 Ast 形态及 GFAP 表达的变化。结果证实, 雄激素对 Ast 的形态、结构及 GFAP 的表达确有一定程度影响。Garcia-Sequra 等人[3,4] 的研究也发现, 睾丸酮对海马、弓状核、内侧隆起等部位 Ast 的形态产生影响, 阉割成年雄性大鼠后, 海马 GFAP 免疫组化染色增强, GFAP mRNA 表达水平增高。

既然睾丸酮能调节 Ast 形态及 GFAP 基因的表达, 那么, 对脑损伤后 Ast 反应性胶质化有什么样的影响呢? 有关文献报道甚少。本实验在切除大鼠性腺的基础上造成大鼠脑损伤, 通过免疫组化、流式细胞计数等方法进行研究, 结果发现, 切除性腺大鼠脑穿刺损伤后, 伤灶区域 Ast 的反应性胶质化比单纯脑穿刺损伤鼠明显, 表现为 Ast 胞体显著肥大, 胞浆丰富, 突起粗大, 以伤后 7 ~ 14 d 尤为明显; 14 d 以后, Ast 反应便逐渐减弱。图像分析结果表明, 单位面积中 GFAP 阳性细胞的平均面积, 突起长度等均显著高于单纯损伤鼠; 补充睾丸酮后, Ast 的反应性胶质化较单纯损伤鼠程度减轻, 但尚未达到对照组水平。流式细胞计数结果表明, 在切除性腺+脑损伤、切除性腺+脑损伤+睾丸酮治疗前后 Ast 的数量变化不显著($P > 0.05$), 提示睾丸酮可能对脑损伤后 Ast 增殖作用不明显。Chowen 等人[5] 的研究也发现, 性激素对正常大鼠 Ast 的数量没有显著的影响。这种现象与睾丸酮对外周组织细胞的促分裂、增殖作用是不同的, 造成这种现象的原因尚不清楚。是否与睾丸酮促细胞分裂、增殖作用存在组织差异性 ?有待深入研究。

从对正常大鼠使用睾丸酮治疗后 Ast 形态无显著改变的结果, 我们推测, 睾丸酮对 Ast 的影响可能与血清睾丸酮的基础水平有关。在一定范围内, 睾丸酮的作用可能呈量效关系, 即当睾丸酮水平降低后, 补充睾丸酮, 随着血清睾丸酮浓度的增高, 对 Ast 的作用增强, 当睾丸酮水平达到或超过一定范围时, 这种作用便明显减轻, 甚至消失。对此, 尚待进一步证实。

有关睾丸酮的作用机制目前尚不清楚。有研究提示, 睾丸酮对 Ast 的调节可能以间接作用为主, 因为在 Ast 上雄激素或雌激素受体的表达非常少[6]。Ganady 等[7] 的研究发现, Ast 中 GFAP mRNA 表达及 GFAP 合成增加是神经元电活动增加的结果。他们认为, 睾丸酮可能通过直接作用于神经元的雄激素与雌激素受体而间接实现其对 Ast 的影响。睾丸酮对 Ast 的调节可能也存在着直接作用的途径。近年来的研究发现, 在视前区, 约 10% 的胶质细胞亚群是雌激素受体阳性的细胞, 但用常规的免疫组化方法难以检测出阳性反应。这一现象与 GFAP 免疫组化研究发现 Ast 的分布存在明显异质性的现象是十分吻合的。除此之外, 睾丸酮对 Ast 的作用可能还存在第三途径, 即通过作为其他非睾丸酮受体的配基, 间接的调节 Ast 反应。例如, 有人发现, 还原性孕激素的衍生物是 GABA 受体的配基, 而 GABA 受体的激活可以影响 Ast 的反应。总之, 正确理解睾丸酮的作用机制, 对于认识睾丸酮对 Ast 反应的影响是十分有益的。

参考文献

[1] Schumacher M, Baulieu E E. Neurosteroids: Synthesis and functions in the central and peripheral nervous systems[J]. Ciba Found Symp, 1995, 191(1): 90—91.

[2] Meleangi R C, Riva M A, Fumagalli F, *et al*. Effect of progesteron, testosterone and their 5α-reduced metabolites on GFAP gene expression in type 1 astrocytes[J]. Brain Res, 1996, 711(1-2): 10—15.

[3] Garcia-Segura L M, Torres-Aleman I, Naftolin F. Astrocytic shape and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity are modified by estradiol in primary rat hypothalamic cultures[J]. Brain Res Dev, 1989, 47(2): 298—302.

[4] Garcia-Sequra L M, Luquin S, Parducz A, *et al*. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus[J]. Glia, 1994, 10(1): 59—65.

[5] Chowen J A, Busiguina S, Gareia Segura L M. Sexual dimorphism and six steroid modulation of glial fibrillary acidic protein messenger RNA and immunoreactivity levels in the rat hypothalamus[J]. Neuroscience, 1995, 69(2): 519—532.

[6] Simerly R B, Chang C, Muramatsu M, *et al*. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study[J]. J Com. Neurol, 1990, 294(1): 76—95.

[7] Canady K S, Rubel E M. Rapid and reversible astrocytic reaciton to afferent activity blockade in chick cochlear nucleus[J]. J Neurosci, 1992, 12(3): 1001—1009.

（编辑　王　红）

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