

电针肾旁穴对兔下丘脑雌激素受体免疫反应阳性产物的影响

陈正礼¹, 范光丽^{1*}, 郎子文², 张 曼¹, 郑小敏¹, 牛建荣², 杨国林², 张国伟²

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃 兰州)

摘 要: 研究电针肾旁穴对下丘脑内雌激素受体免疫反应阳性产物的影响及对生殖内分泌的调控。采用电针穴位法及免疫组织化学 SP 法。电针组兔下丘脑的视上核、室旁核、视交叉上核、室周核、腹内侧核、背侧区、小细胞核等核区有大量阳性神经元出现, 染色深, 突起明显, 细胞形态多样, 轮廓清晰; 而正常组相应神经核团中阳性细胞数量较少且淡染, 突起也不明显, 形态单一或轮廓不清。电针肾旁穴可使家兔上述核团内雌激素受体的表达增强, 从而对生殖内分泌活动进行调控。

关键词: 兔; 电针; 肾旁穴; 雌激素受体

中图分类号: S852.4⁺

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2004)02-0222-05

现代中医研究表明, 针灸刺激某些穴位可以改变体内雌激素水平, 对雌性生殖内分泌功能有调节作用^[1], 郎子文等^[2]作过“针刺膻穴对母牛生殖内分泌功能的调控”的研究, 进一步证实针刺膻穴可促使卵泡发育、排卵和受孕, 从而有效地提高奶牛受孕率, 但这些研究尚缺乏形态学依据。本实验以常规饲养条件下的健康兔为实验对象, 以下丘脑作为观察部位, 用鼠抗雌激素受体多克隆抗体作为一抗, 用超敏感的免疫组织化学 SP 法系统地研究了电针兔肾旁穴对下丘脑雌激素受体免疫反应(Estrogen receptors immunoreaction, ER-IR)阳性产物的影响, 并讨论了电针对免疫反应阳性产物的影响及其意义, 为探讨电针肾旁穴对生殖内分泌的调控机制提供形态学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 发育正常的 8 只青年雌兔, 对兔进行发情鉴定, 处于发情期的兔用于实验。

1.2 实验方法

1.2.1 取穴及针刺方法

选取肾旁穴。肾旁穴: 以百会穴为标志, 从百会穴正旁开向外侧触摸, 在百会与肠骨外角最高点之

间略少于 1/2 处的臀中肌上一条肌沟, 顺此肌沟向后触摸到臀中肌与股二头肌交界处有一凹陷, 该凹陷即为肾旁穴。

将 8 只发情期青年雌兔随机分为两组, 一组作为正常组, 一组为电针组。对电针组进行肾旁穴电脉冲刺激, 用由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所研制的 XXH-IIA 型经穴治疗仪, 将探头按于穴区测记部位, 诊疗仪自动巡回检测, 现出低阻敏感点, 电子开关将脉冲控制在低阻点上, 通过电极直接进行脉冲电刺激, 刺激强度以动物剧烈骚动为宜, 刺激时间 30 min, 正常组同电针组在相同条件下进行模拟刺激实验, 不进行电针刺激。

1.2.2 动物组织切片准备

刺激后 80 min, 将兔保定, 经主动脉快速灌注生理盐水, 继而灌注 4℃的 4%的多聚甲醛, 先快后慢, 取出脑浸入相同固定液中, 后固定 5~10 h, 再移入含 20% 蔗糖的 PB 液中, 4℃直至组织块沉底。取含下丘脑的脑区做连续冠状冰冻切片, 片厚 30 μm, 隔 3 取 2, 分两套分别用于免疫组织化学、尼氏染色和阴性对照。参照 Alvin L. Berman 图谱进行核团定位。

1.2.3 免疫组织化学 SP 法操作程序

切片经链霉菌抗生素蛋白一过氧化物酶免疫组化染色超敏 S-P 试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)A 液(内源性过氧化物酶阻断液)在室温下孵育 1 h; B 液(正常非免疫动物血清)在室温下孵育 50 min; 切片放入鼠抗雌激素受体多克隆抗体

收稿日期: 2002-10-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670550, 39870551)

作者简介: 陈正礼(1975-), 男(汉族), 四川简阳人, 在读博士研究生, 主要从事神经生物学及动物胚胎工程方面的研究, Tel: (029) 7092438; * 为通讯作者

(Boster, 1: 150) 中 4℃ 孵育 72 h; 入 C 液(生物素标记的第二抗体), 室温下孵育 1.5 h; 入 D 液(链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶), 室温下孵育 1.5 h。上述各步之间, 切片均用 0.01 mol/L PBS 液漂洗 3 次, 每次 10 min。切片放入硫酸镍胺加强的 DAB 反应液呈色 20~40 min; 双蒸水洗 3 次, 每次 15 s, 贴片、脱水、透明、封片。

阴性对照组实验步骤以 0.01 mol/L PBS 液代替一抗, 其它步骤同上。各组实验均在同一条件下进行。

1.2.4 阳性细胞计数: 每只家兔各选取 4 张下丘脑切片(分别在视前部、下丘脑前部、结节部、乳头体部平面), 在显微镜下观察各个核区的阳性产物实际数目, 密度按以下标准表示: 10 倍目镜 × 10 倍物镜下进行网格面积计数, 将阳性产物的密度相对地分为高密度(###)、较高密度(##)、中等密度(+)和低密度(+)4 个等级。

2 结果

2.1 雌激素受体免疫组织化学 SP 法免疫反应阳性产物

雌激素受体(estrogen receptors, ER) 免疫反应阳性产物为蓝色沉淀。显示蓝色沉淀的为 ER 免疫反应阳性产物。根据 ER-IR 阳性神经元蓝色沉淀的颜色深浅, 可把 ER-IR 阳性神经元分为强阳性、中等阳性和弱阳性神经元三种。弱阳性神经元着色淡, 胞体轮廓不明显。强阳性神经元胞体着色很深, 呈深蓝色, 胞体形态和突起清晰, 且阳性免疫产物数量较多, 分布较密集。中等阳性神经元胞体着色介于强阳性与弱阳性神经元之间, 胞体轮廓较为清晰, 但突起不太明显。另外, 在某些区域也出现 ER-IR 阳性神经纤维或终末。神经纤维分为膨体型和非膨体型两种, 还发现阳性颗粒, 它们在各个区域的分布密度是有差异的。

阴性对照切片: 不加 ER 单克隆抗体的空白对照切片, 无 ER-IR 阳性产物出现, 结果为阴性, 说明本实验无非特异性反应。

2.2 ER-IR 阳性产物在兔下丘脑内的分布(表)及形态

正常组: 视上核内偶见大型的强阳性神经元, 突起非常明显胞核不着色(图 1)。乳头体内侧核可见有中等密度的阳性神经元, 细胞淡染, 突起不明显。

表 ER-IR 阳性产物在兔下丘脑内的分布
Table Distribution of ER-IR production in hypothalamus in rabbits

	正常组			电针组		
	Control group			Electrical acupuncture		
	强	中	弱	强	中	弱
SON 视上核	+			##		
HAA 下丘脑前区			+		##	
SCH 交叉上核			+	##		
PAH 下丘脑室旁核			##		##	##
INF 漏斗核			##	##		
HLA _t 外侧核结节部			##	##		
MM _m 乳头体内侧核			##	##	##	##
HAD 下丘脑背侧区	+	##	+	##	##	
VMH 下丘脑腹内侧核			##	###		
PVH 下丘脑小细胞核			+		##	
PEH 下丘脑室周核			+		##	##
MV 腹内侧核			+		##	

注: 阳性胞体密度计数符号如下: 高密度: ###, 10 个细胞以上/mm²; 较高密度: ##, 6~10 个细胞/mm²; 中等密度: #, 2~6 个细胞/mm²; 低密度: +, 2 个细胞/mm² 以下; f: 含有纤维及终末。

下丘脑背侧核内, 中等密度分布着阳性免疫反应产物, 以中等阳性神经元为主, 中间夹杂强阳性和弱阳性神经元, 胞体轮廓较清晰, 胞核不着色(图 3)。下丘脑腹内侧核密集地分布着弱阳性的中、小型神经元, 突起不明显。在下丘脑外侧核结节部可见到中等密度分布的弱阳性神经元, 细胞轮廓不清(图 5)。另外, 在下丘脑前区、交叉上核、下丘脑室旁核、漏斗核内也可见阳性神经细胞, 但染色均较弱, 突起不明显。

电针组: 在下丘脑视上核可见到强阳性神经元排列成一带状, 为大型神经元, 形态清晰, 呈梭形, 卵圆形, 有些胞核不着色, 突起非常明显, 密度较高, 内含一些阳性纤维终末及颗粒(图 2)。乳头体内侧核内密集分布着中等大小的阳性神经元, 以强阳性、中等阳性和弱阳性细胞均匀混杂分布, 有些细胞突起明显。下丘脑背侧核内散在分布中等大小菱形、梭形、圆形的阳性神经元, 以强阳性为主, 也有部分细胞呈中等阳性胞核不着色而呈明亮区(图 4)。在下丘脑腹内侧核里, 高密度地分布着深染的阳性神经元, 细胞形态多样, 神经元突起相当明显。电针后在下丘脑外侧核结节部出现了强阳性的神经元, 密度中等, 胞体清晰, 突起明显, 胞核不着色(图 6)。在下丘脑前区、交叉上核、下丘脑室旁核、漏斗核内同

样发现了阳性细胞,且密度较高,着色较深,有些细胞突起明显。另外,在下丘脑小细胞核内出现了中等密度、大小不等的阳性神经元,染色较深,有明显突起。下丘脑外侧区也见到深染的阳性免疫产物,

细胞染色较深,其内分布较高密度的阳性纤维、终末和阳性颗粒物质。在下丘脑室周核内,中等阳性神经元高密度分布,深染,细胞形态不清晰,隐约可见有突起。

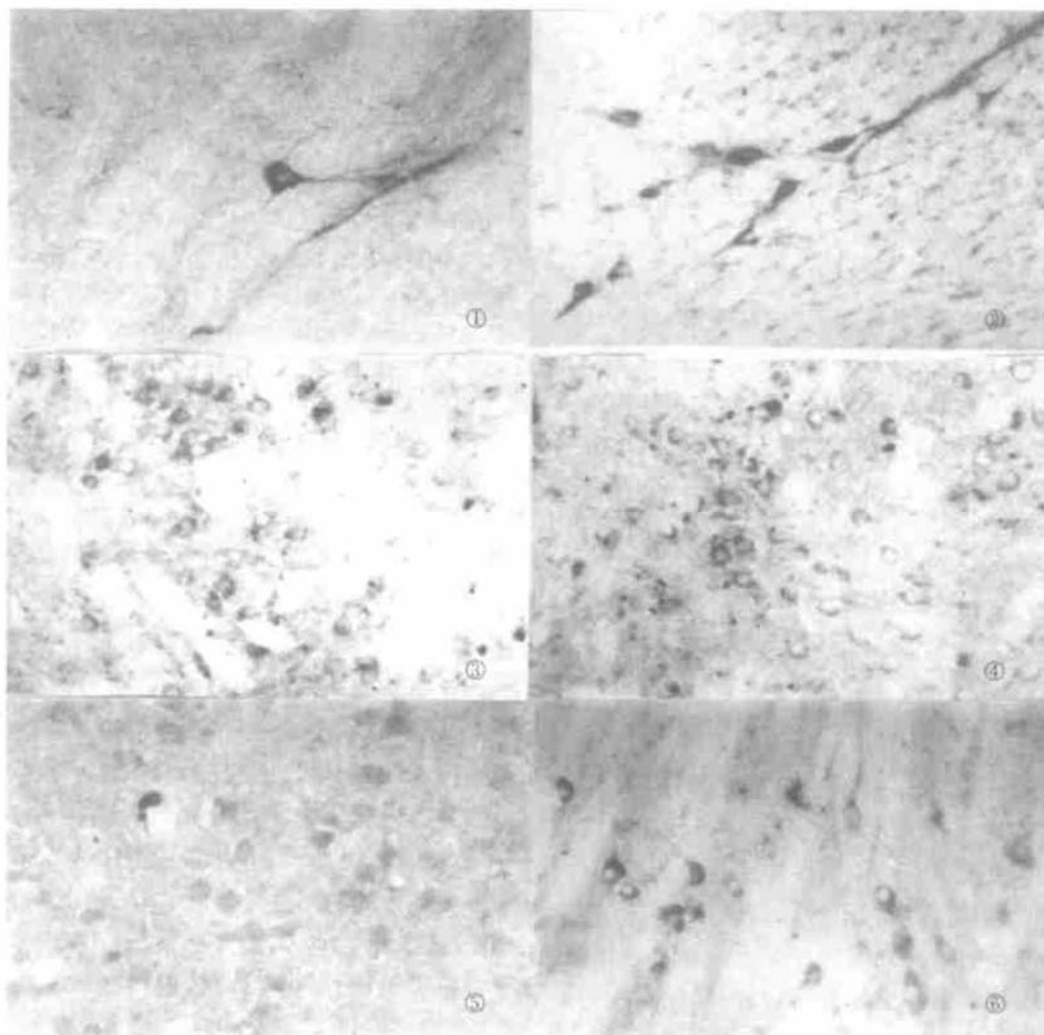


图1 对照组视上核区 ER-IR 阳性细胞 $\times 400$ 图2 针刺组视上核区 ER-IR 阳性细胞 $\times 400$ 图3 对照组下丘脑背侧区 ER-IR 阳性细胞 $\times 400$ 图4 针刺组下丘脑背侧区 ER-IR 阳性细胞 $\times 400$ 图5 对照组下丘脑外侧核结节部 ER-IR 阳性细胞 $\times 400$ 图6 针刺组下丘脑外侧核结节部 ER-IR 阳性细胞 $\times 400$

Fig.1 ER-IR cells in the SON of control group $\times 400$ Fig.2 ER-IR cells in the SON of acupuncture group $\times 400$

Fig.3 ER-IR cells in the HAD of control group $\times 400$ Fig.4 ER-IR cells in the HAD of acupuncture group $\times 400$

Fig.5 ER-IR cells in the LHAT of control group $\times 400$ Fig.6 ER-IR cells in the LHAT of acupuncture group $\times 400$

3 讨论

雌激素是引起母畜发情的主要激素。生理学研究表明:雌激素、雄激素、孕酮等对下丘脑和垂体都有反馈调节作用,通过下丘脑-垂体-性腺轴而调节整个生殖活动。在动物的整个生殖过程中,均受到生殖内分泌激素的调控,任何一个环节发生异常,都将影响动物繁殖力并致不育。雌激素必须与其受

体相结合后才能发挥其生理功能。雌激素受体在下丘脑内分布广泛,它主要分布在神经元核膜和胞浆内,雌激素与雌激素受体结合后,形成激素-受体复合物,该复合物可调控 DNA 分子的转录和 mRNA 的翻译。雌激素对下丘脑-垂体-性腺轴反馈调节都发生于下丘脑和垂体水平,可调控下丘脑促性腺激素释放激素的分泌,从而调节垂体前叶分泌促性腺激素,导致卵巢分泌雌激素和黄体的水平的波动,进

而发挥对家畜的生殖功能调控^[3]。

近年来,许多学者都在探讨经络与生殖生理方面的相互关系。有报道耳穴电阻与妇女月经的生理周期有关。日本鸟谷部(1997, 1998)应用神经测定仪测定法,发现十二经穴的皮肤导电量与妇女的生理周期有一定联系,排卵表现出导电量不平衡现象,排卵期与妊娠期以肝胆二经变动最大^[4]。牛、马等母畜在发情过程中,卵泡发育往往在一侧卵巢之中,即使两侧均有发育也有差异,卵巢这种生理机能的变化,引起生物电变化,反映于体表相关腧穴,引起腧穴阻抗变化。经临床反复探索,发现处于不同发育期的卵泡,可分别引起相关的左右两侧肾旁穴阻抗失衡,而左右两侧卵巢生理机能相对静止时,其相关腧穴阻抗也相对平衡。表明肾旁穴与卵巢生理机能密切相关,并能明显反映卵泡发育期。在其腧穴低阻敏感点进行无针电脉冲刺激,可促进卵泡发育、排卵和受胎,从而有效地提高家畜情期受胎率^[2]。本实验旨在通过电针穴位对雌激素受体在下丘脑内的影响来实现对家畜生殖内分泌活动的调节。

下丘脑控制着机体的多种重要活动,在维持人体自身稳定中起关键作用,调节诸如电解质平衡、摄食、生殖、体温、内分泌及免疫反应等各种基础活动。在本实验中,电针组与正常组相比,下丘脑的主要神经核团内的雌激素受体免疫反应阳性产物均有不同程度的增多。下丘脑的视下核、下丘脑前区、交叉上核、室旁核、下丘脑背侧核、下丘脑小细胞核、下丘脑室周核、漏斗核、下丘脑腹内侧核等重要核团中阳性神经细胞和纤维的密度明显升高。这些结果说明电针肾旁穴后,穴区内的感觉信息通过背根节入脊髓,经脊髓上行(直接或间接)入脑,激活中枢神经核团神经元的功能活动,雌激素在该核区内通过与雌激素受体相互作用而调控神经元内的相关基因表达,从而发挥其信息传递的作用,并通过下丘脑-垂体-性腺轴发挥对家畜生殖功能的调节作用,以促进生殖内分泌活动,促使发情、卵泡发育、排卵以及受孕。

此外,电针后还发现在下丘脑腹内侧核内的ER-IR产物明显增加,该核团为ER的富集区,这与张庆东等^[5]的雌性大鼠下丘脑腹内侧核神经元雌激素受体研究结果相吻合,下丘脑腹内侧核分布着大量的雌激素受体,是雌性的性行为中枢,对动物生殖行为有重要影响。李耀功等^[6]人发现雌激素能够抑制去卵巢大鼠垂体FSH、LH的mRNA表达,对LH、

FSH的合成和分泌呈负反馈作用。Pelletier^[7]研究表明,雌激素受体大量分布于垂体前叶、间叶,提出垂体的雌激素受体可能与雌激素的反馈抑制促性腺激素的分泌有关。那么,结合我们的结果,表明下丘脑中的雌激素受体也可能与雌激素反馈抑制促性腺激素的分泌有关,从而导致血浆中雌激素水平下降,支持了郎子文等发现的针刺发情期母牛肾旁穴可使血浆17-β-雌二醇水平下降的观点。陈伯英等人^[8,9]作了电针对大鼠脑内雌激素受体蛋白及其mRNA表达影响的研究,结果发现电针组和对对照组的血雌二醇水平和脑内雌激素受体表达均未见明显改变,这与我们的实验结果不一致。分析原因可能有以下几点:所选穴位不同,其选用的穴位为腹部和下肢的关元、中极、双侧子宫及三阴交穴;实验动物选用Wistar大鼠而本实验用的是家兔;所选仪器不同,本研究采用无针的9道电脉冲经穴治疗仪,而陈伯英等用的是有针电刺激。从实验结果可以看出电针肾旁穴与生殖内分泌之间有密切的联系,而且无针电刺激9道仪对穴位的定位很精确,能很好地进行穴位刺激。

过去许多研究及临床应用对于生殖内分泌方面的治疗和维持,基本方法是通过激素等药物替代疗法,但是药用激素类制剂价格昂贵,且长期频繁使用易引起动物生殖内分泌紊乱以及激素类制剂在乳肉品中残留而对人类造成潜在性危害。腧穴调控生殖内分泌激素,不仅为传统医学探索一条调控生殖内分泌激素的途径和方法,并且方法简单,经济安全,没有副作用,便于推广应用。

参考文献:

- [1] 刘琦,朱笛霓. 穴位刺激和对氯苯丙氨酸对生殖期大鼠脑干和心肌雌二醇受体水平的影响[J]. 陕西中医, 1998, 18(2): 90.
- [2] 郎子文,杨国林,张国伟,等. 针刺腧穴对母牛生殖内分泌功能的调控[C]. 中兽医药研究及应用, 2000, 189.
- [3] 毕会民,王卫星,李栋,等主编. 下丘脑-垂体疾病现代治疗[M]. 北京:人民军医出版社, 2001, 62.
- [4] 王本显. 国外对经络穴位电学特性的研究进展[J]. 中国针灸, 1984, 4(2): 45.
- [5] 张庆东,郭晓红,沈伟,等. 雌性大鼠下丘脑腹内侧核神经元雌激素受体研究[J]. 天津医科大学学报, 1999, 5(1): 15.
- [6] 李耀功,杨茹,高慧,等. 针刺对雌性大鼠垂体雌激素受体mRNA表达和血雌二醇水平影响的研究[J]. 针刺研究, 1998, (1): 28.

- [7] Pelltier G, Allen D, Gordon M, et al. Distribution of ER in the rat pituitary as studied by in situ hybridization[J]. *Mol Cell Endocrinology*, 1998, 56: 29.
- [8] 陈伯英, 程立海, 高 慧, 等. 电针对大鼠脑内雌二醇受体蛋白及其 mRNA 表达的影响[J]. *生理学报*, 1998, 50(5): 495.
- [9] 陈伯英. 电针调节大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴功能的研究[J]. *上海医科大学学报*, 1994, 21: 67.

The Effects of Shenpang Acupoint-stimulation on Estrogen Receptors Immunoreactive Neurons in Hypothalamus in Rabbits

CHEN Zheng-li¹, FAN Guang-li¹, LANG Zi-wen², ZHANG Man¹, ZHENG Xiao-min¹,
NIU Jiarong², YANG Guo-lin², ZHANG Guo-wei²

(1. College of animal technology, Northwestern Sci-tech University of agriculture and forestry, Yangling Shanxi 712100; 2. Lanzhou institute of animal husbandary and veterinary medicine, Chinese academy of agriculture science)

Abstract: In order to observe the effects of Shenpang acupoint-stimulation on reproductive endocrine. The changes of estrogen receptors immunoreactive neurons after Shenpang acupoint-stimulation was studied by using the technique of immunohistochemistry SP. In acupuncture group, a great number of immunoreactive neurons, with clear dendrite, existed in Supraopticus nucleus, Paraventricularis nucleus, Decussationis supraopticus nucleus, periventricularis nucleus, medialis ventralis nucleus, dorsalis region, parvocellularis nucleus of hypothalamus, and were stained strongly. In contrast, a few of neurons existed in the above nuclei in control group, and the neurons were stained weakly. The expression of estrogen receptors in the above nuclei increased after the Shenpang acupoint-stimulation, which modulated the reproductive endocrine.

Key words: Rabbit; Electrical Acupuncture; Shenpang Acupoint; Estrogen receptor

会 讯

免疫接种控制动物传染病 OIE/ IABs 国际会议将于 2004 年 4 月 1316 日在阿根廷布宜诺斯艾利斯召开。
动物运输协会第 30 届国际会议将于 2004 年 4 月 1821 日在奥地利维也纳召开。
OIE 国际委员会第 72 届大会将于 2004 年 5 月 2328 日在法国巴黎召开。
第五届食源性传染病和中毒病世界大会将于 2004 年 6 月 711 日在德国柏林召开。
第 22 届世界禽病会议将于 2004 年 6 月 813 日在土耳其伊斯坦布尔召开。
第 15 届世界肉类大会将于 2004 年 6 月 1417 日在加拿大温尼伯召开。
第 5 届火鸡病国际会议将于 2004 年 6 月 1519 日在德国柏林召开。
第 7 届马立克氏病国际会议将于 2004 年 7 月 1114 日在英国牛津召开。
第 23 届世界牛病大会将于 2004 年 7 月 1116 日在加拿大魁北克召开。
第 7 届国际兽医免疫大会将于 2004 年 7 月 2530 日在加拿大魁北克召开。
第 21 届包虫学国际会议将于 2004 年 9 月 1215 日在瑞典召开。