

[文章编号] 1000- 4718(2006)01- 0098- 04

心理应激雌性大鼠海马- 下丘脑- 垂体 雌激素受体的变化*

柯江维¹, 王建红², 段 荣¹

(¹江西省儿童医院, 江西 南昌 330006; ²江西中医学院, 江西 南昌 330006)

[摘要] 目的: 探讨雌性大鼠心理应激状态下, 海马- 下丘脑- 垂体雌激素受体(ER) 的改变, 进而阐明卵巢内分泌功能失调的机制。方法: 采用声- 光- 电复合刺激作为心理应激制造大鼠卵巢内分泌功能失调模型; 采用免疫组化方法和图像分析仪定量分析海马- 下丘脑- 垂体 ER 的表达。结果: 采用声- 光- 电复合刺激雌性大鼠后, 大鼠海马- 下丘脑- 垂体 ER 的表达下降。结论: 心理应激雌性大鼠海马- 下丘脑- 垂体 ER 下降可能是卵巢内分泌功能失调的机制之一。

[关键词] 应激; 海马- 下丘脑- 垂体; 受体, 雌激素; 免疫组织化学

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Change of estrogen receptor in hippocampus, hypothalamus and pituitary of female rats exposed to psychological stress

KE Jiang- wei¹, WANG Jian- hong², DUAN Rong¹

(¹Jiangxi Province Children's Hospital, Nanchang 330006, China; ²Jiangxi University of TCM, Nanchang 330006, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the change of estrogen receptor (ER) in hippocampus, hypothalamus and pituitary of female rats exposed to psychological stress, and to illuminate the mechanism of dysfunction on ovarian reproductive endocrine function. **METHODS:** Sound, light and electricity were combined into a psychological stressful stimulus to induce female rat dysfunction on ovarian reproductive endocrine function. Immunohistochemical technique and image analysis were used to assess the expression levels of ER in hippocampus, hypothalamus and pituitary. **RESULTS:** When exposed to compound stressful stimulus of sound, light and electricity for 20 days in female rats, the expression levels of ER in hippocampus, hypothalamus and pituitary dropped. **CONCLUSION:** The decrease in estrogen receptor expression in hippocampus, hypothalamus and pituitary of female rats exposed to psychological stress may be one of the mechanisms of ovarian reproductive endocrine dysfunction.

[KEY WORDS] Stress; Hippocampus- hypothalamus- pituitary; Receptors, estrogen; Immunohistochemistry

生殖内分泌系统是易受应激破坏的一个系统, 心理应激可引起生殖内分泌的紊乱, 引发生殖内分泌疾病, 严重困扰人们的身体健康和生活质量。因此, 进一步阐明心理应激影响生殖内分泌的机制对人类生殖健康具有重要意义。本文以雌性大鼠为研究对象, 用声- 光- 电复合刺激作为心理应激源, 模拟人类生殖内分泌功能紊乱建立动物模型, 探讨心理应激雌性大鼠海马- 下丘脑- 垂体雌激素受体(estrogen receptor, ER) 的改变, 以期阐明卵巢生殖内分泌功能紊乱的部分机制。

材 料 和 方 法

1 主要仪器、试剂与动物

1.1 主要试剂 ER 兔多克隆抗体(美国 NeoMarkers 公司生产); SP9001 Rabbit SP Kit 试剂盒(北京中山公司生产); BSA(牛血清白蛋白); ammonium nickel sulfate(硫酸镍铵)。

1.2 仪器 DVPM 图像分析仪(南京长城信息技术公司); Imago- pro plus 图像分析软件(美国冷泉仪器公司); Olympus 1 × 70 倒置显微镜(日本 Olympus 公司生产); 切片机(上海机械厂); 声- 光- 电复合应

[收稿日期] 2004- 06- 03 [修回日期] 2004- 11- 05

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 39960026)

Tel: 0791- 6813632; E- mail: kjw0791@163.com

激刺激装置(自制);美的KD25B-C型黑金星微波炉(产自广东省顺德市美的微波炉制造有限公司)。

1.3 动物 SD大鼠,体重180-220 g,江西省实验动物中心提供。室温 20 ± 2 °C,自然光照,自由进水进食。

2 方法

2.1 动物模型复制^[1] 取SD大鼠30只,适应2 d,以后每天显微镜下检查阴道涂片观察动情周期的变化,选择连续有2个正常动情周期的大鼠用于造模实验,其余淘汰。应激实验环境与饲养环境分开,应激实验环境光照强度恒定,与外界隔音。正常对照组(control)10只不造模;模型组(model)10只造模。具体操作方法:用声-光-电复合应激刺激大鼠,首先用声、光2种同时刺激,10 s以后再加电击足底,此时声-光-电3种刺激同时存在,60 s以后声-光刺激停止,电击足底继续维持5 s,总计每次时间75 s。每日进行3次,3次间隔时间不定,在1 h内完成。造模时间20 d,且定时检查阴道涂片(每天1次),观察动情周期的动态变化。选择在停止刺激后第1个动情期处死动物,如果7 d内未见动情期,则选择在停止刺激后第8 d处死动物。

声、光、电3种刺激参数恒定:①声音强度65 dB;②光照强度500勒克司(luminous flux density, lux),为闪烁状,频率1次/s,亮时500 lux、灭时300 lux(环境光照强度);③24 v-36 v安全电压;④光、声两种刺激源距离动物50 cm。

2.2 定量分析ER 按照解剖学结构特点及参考文献^[2-4]方法,迅速取海马、下丘脑、垂体,用10%甲醛固定,石蜡包埋作病理切片,按免疫组化法,用DVPM图像分析仪分别定量分析ER。

(1)免疫组化方法:取材→固定→包埋(制蜡块)→切片→脱蜡和水化→3% H₂O₂(试剂A)室温孵育5-10 min→先dH₂O冲洗,后用含有0.05% Tween20的0.1 mol/L PBS浸泡5 min→抗原修复[微波炉,先高温(P100)8 min,后低温(P10)5 min]→自然冷却至室温后,每个样品上滴加1滴0.1%的BSA(不含Tween20的PBS配制)或非免疫性动物血清(试剂B),室温5-10 min,不必冲洗→滴加I抗(ER稀释度1:150,用不含Tween20的PBS配制)4 °C过夜→含有0.05% Tween20的0.1 mol/L PBS冲洗3×5 min→滴加II抗(试剂C)室温孵育1 h→含有0.05% Tween20的0.1 mol/L PBS冲洗3×5 min→加试剂D室温孵育1 h→含有0.05% Tween20的0.1 mol/L PBS

冲洗3×5 min→用N-DAB显色→用自来水冲洗,干燥,中性树脂封固→镜检、拍照。阴性对照I抗用PBS代替,其它反应步骤相同。

(2)N-DAB显色液的配制^[5]:2.5%硫酸镍铵-0.035% DAB(0.1 mol/L醋酸钠溶液配制),过滤后加入0.03% H₂O₂。光镜下观察显色至合适,然后终止显色,进行常规脱水、透明、封片。

(3)图像分析判定阳性表达:ER含量用DVPM多媒体图像分析系统处理。测定程序为每种组织选10张切片,将每张切片上待测细胞在显微镜下定位后,在图像监视器上显示图像,测定该细胞的积分吸光度(A)值,任意单位(Au),再随机观察10个视野(×200)的阳性细胞,将测得数据存入计算机。以10张切片的ER平均吸光度值(IA)作为该样本的ER含量值,最后以整个一组的IA均值作为ER在相应组织表达的相对强度(ER用N-DAB显色法,阳性物质是蓝黑色而不是棕黄色,主要位于神经元的细胞核内)。

3 统计学处理

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用t检验,在SPSS 10.0软件包上完成。

结 果

1 心理应激大鼠海马ER的改变

结果见表1及图1。模型组大鼠海马内ER的含量明显降低,与正常组比较,有显著差异, $P < 0.05$ 。

表1 两组海马内ER含量的变化

Tab 1 Change of content of ER in hippocampus ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	ER(IA)
Control	9	22.33 ± 6.97
Model	8	13.45 ± 2.87 [▲]

[▲] $P < 0.05$ vs control group.

2 心理应激大鼠下丘脑ER的改变

结果见表2及图2。模型组大鼠下丘脑内ER的含量明显降低,与正常组比较,有显著差异, $P < 0.05$ 。

表2 两组下丘脑内ER含量的变化

Tab 2 Change of content of ER in hypothalamus ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	ER(IA)
Control	9	32.65 ± 4.90
Model	8	18.19 ± 1.12 [▲]

[▲] $P < 0.05$ vs control group.

3 心理应激大鼠垂体 ER 的改变

结果见表 3 及图 3。模型组大鼠垂体内 ER 的含量明显降低,与正常组比较,有显著差异, $P < 0.01$ 。

表 3 两组垂体 ER 含量的变化

Tab 3 Change of content of ER in pituitary ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	ER(IA)
Control	9	42.45 ± 7.86
Model	8	24.44 ± 6.86 [▲]

[▲] $P < 0.05$ vs control group.

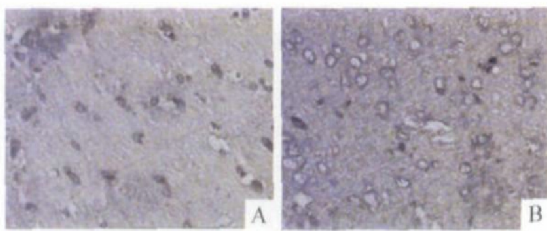


Fig 1 Change of content of ER in hippocampus (SP method, NAB staining, × 200).

A: ER strong positive staining (blue or black) on the nuclear membrane of neurons in control group; B: ER weak positive staining (appearing many pale districts) on the nuclear membrane of neurons in model group.

图 1 心理应激大鼠海马 ER 的改变

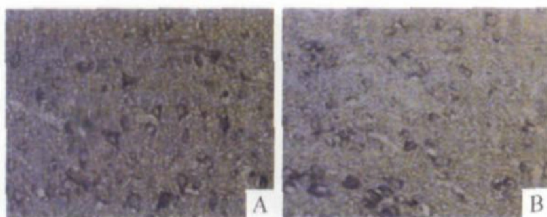


Fig 2 Change of content of ER in hypothalamus (SP method, NAB staining, × 200).

A: ER strong positive staining (blue or black) on the nuclear membrane of neurons in control group; B: ER weak positive staining (appearing many pale districts) on the nuclear membrane of neurons in model group.

图 2 心理应激大鼠下丘脑 ER 的改变

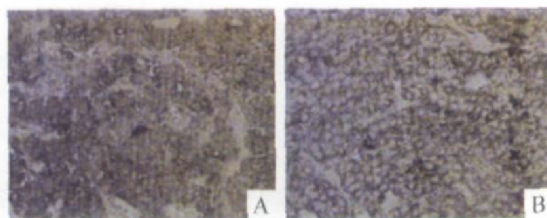


Fig 3 Change of content of ER in pituitary (SP method, NAB staining, × 200).

A: ER strong positive staining (blue or black) on the nuclear membrane of neurons in control group; B: ER weak positive staining (appearing many pale districts) on the nuclear membrane of neurons in model group.

图 3 心理应激大鼠垂体 ER 的改变

讨 论

海马结构含有各种信使受体,在应激反应中,它

不仅是高位调节中枢,更是受应激累及的最敏感区域^[6]。有证据表明,海马含雌激素 α β 型 (ER_{α} 、 ER_{β}) 两型受体,张吉强等^[7]研究发现,小鼠脑内 ER_{β} 蛋白基本只位于神经元的细胞核内,胞浆和突起未见阳性,且雌性的主要在海马裂、杏仁外侧核、斜角带水平部等表达较强; ER_{β} 在小鼠基底前脑内有广泛的表达,提示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控;同时他们指出雌激素能上调 ER_{β} 等的表达,进而通过 ER_{β} 直接调节生殖内分泌。本研究发现,心理应激大鼠海马 ER (因为我们所测定是总的 ER 含量,故包括 ER_{α} 、 ER_{β}) 下降,ER 的下降进而会影响生殖内分泌,但海马内 ER 的变化是如何影响到下丘脑,我们从实验中无法观察到,推测可能是通过 ER 介导,首先影响神经元胞浆内神经递质的合成,然后通过神经递质通路(海马与下丘脑之间的神经纤维束,如:去甲肾上腺素能神经投射的靶区)来影响下丘脑;或是心理应激后首先神经递质含量及比例发生变化,再通过 ER 介导,即通过 ER 反馈作用调节下丘脑。到底是什么途径,有待今后深入研究。

在一些下丘脑区域 ER 和 PR 共存^[8]。ER、PR 与配体结合后,通过神经递质的释放调节影响促性腺激素释放激素 (gonadotropin releasing hormone, GnRH) 的分泌,低水平雌二醇 (E_2) 导致 GnRH 分泌的减少,从而使整个下丘脑-垂体-卵巢轴产生抑制^[9]。而心理应激大鼠由于 E_2 ^[11] 和 ER 的水平下降,影响下丘脑神经递质合成与分泌,可能对下丘脑-垂体-卵巢轴产生抑制,进而影响生殖内分泌。

自从张庆红等^[10]首次用免疫组织化学方法显示 ER_{α} 和 ER_{β} 在大鼠垂体的分布以来,人们对垂体 ER 的研究日益见多。如有报道卵巢切除大鼠垂体 ER_{α} mRNA 表达下调,而雌激素替代能逆转该变化^[11]。而 Hirano 等^[12]发现,手术应激会导致大鼠垂体前叶催乳素 (prolactin, PRL) 细胞出现明显的颗粒和 Golgi 泡及肥大的粗面内质网,血浆中的 PRL、 E_2 都增高,肝细胞上的 ER 下降。本研究显示,心理应激大鼠海马-下丘脑-垂体 ER 的表达下降,而垂体 ER 表达下降幅度最大,从而影响到垂体分泌生殖激素和神经递质,进而影响卵巢的生殖内分泌功能。至于卵巢上的一些生殖激素受体(如促卵泡激素受体和黄体生成素受体)在心理应激下会发生什么样的变化有待研究。

[参 考 文 献]

- [1] 王建红,王敏璋,伍庆华,等. 心理应激大鼠内分泌功能降低模型的实验研究[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(4): 204- 206.
- [2] 苑小玲,王蕴红,邹延义. 运动对大鼠下丘脑 GnRH 和 β -EP 含量的影响[J]. 中国运动学杂志, 2000, 19(3): 270- 272.
- [3] 程治平. 生殖医学实验技术[M]. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 45- 46.
- [4] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993. 182- 185.
- [5] 张志强,姚青,刘建军,等. 不同显色方法对免疫细胞化学显色结果的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(3): 359- 360.
- [6] 张艳美. 慢性应激、大脑损害与抑郁症[J]. 国外医学: 精神病学分册, 2001, 28(2): 105- 106.
- [7] 张吉强,蔡文琴. 雌激素 β 受体免疫阳性神经元在成年小鼠脑内的分布与性别差异[J]. 四川解剖学报, 2001, 9(1): 35- 36.
- [8] Goldsmith PC, Boggan JE, Thind KK. Estrogen and progesterone receptor expression in neuroendocrine and related neurons of the pubertal female monkey hypothalamus[J]. Neuroendocrinology, 1997, 65(5): 325- 329.
- [9] 陈家旭,陈易新,季绍良,等. 健脾益气止血方对脾气虚大鼠血清 E_2 、P 及下丘脑、子宫 ER、PR 的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(4): 17- 20.
- [10] 张庆红,胡玉珍,陈亚琼,等. 大鼠垂体前叶中一些内分泌物质的共存[J]. 解剖学报, 2001, 32(4): 350- 353.
- [11] Shuplik Ma, Gordon MS, Chill WW. Tissue specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs[J]. Mol Endocrinol, 1989, 3(4): 660- 665.
- [12] Hirano N, Shiino M. Changes in prolactin cells caused by partial hepatectomy in the rat[J]. Acta Anat (Basel), 1991, 141(2): 170- 173.

《微循环学》出版

由著名微循环学专家田牛教授所著的《微循环学》一书,已于近期由原子能出版社正式出版发行。全书共分为六大部分:(1)总论(1~ 5章),(2)微循环的基础(6~ 13章),(3)器官微循环(14~ 31章),(4)微循环的改变(32~ 36章),(5)临床微循环(37~ 42章),(6)主要疾病的微循环的改变(43~ 56章)。全书共140万字,反映了作者近40年来的研究成果,资料丰富全面,论断合理有据,并有多幅实拍的珍贵微循环图像,是一部比较系统、完整的微循环学专著,可供微循环专业人员阅读,也可作为临床、基础医学的有关专家、研究生、大专院校师生参考。该书大16开本,定价280元,邮寄费30元。邮购款请邮至北京2108信箱发行部收,邮编:100037,电话:010- 68417733 转 2153。联系人:封春瑞。转帐开户行:北京银行紫竹支行,帐号:01091049400120109003266,户名:原子能出版社。