

雄激素对大鼠嗅球中AR和NGF蛋白表达的影响^{*}

田光明, 范光丽, 田海霞, 阿依木古丽, 张永德,
张 燕, 何玉龙, 聂 聪, 王冠魁, 李定强

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 利用免疫组化SP法,检测了去势及去势后补充雄激素大鼠嗅球中雄激素受体(Androgen receptors, AR)和神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)蛋白的表达情况,探讨了雄激素对嗅球的作用机制。结果表明, 睾丸摘除组大鼠嗅球内AR与NGF蛋白的表达显著减少; 睾丸摘除并用睾酮替代组大鼠嗅球内2种蛋白的表达接近正常水平。说明去势大鼠由于缺乏内源性雄激素, 会引起嗅球内AR和NGF蛋白表达减少, 而补充外源性雄激素可缓解或抑制这一变化。

[关键词] 雄激素; 嗅球; 去势; AR; NGF

[中图分类号] Q 579.1⁺ 1; Q 429⁺. 1

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-9387(2006)01-0089-04

雄激素是甾体激素中最早被发现的激素,对正常雄性动物的发育、生殖及免疫功能的维持有重要作用,这些作用是由雄激素受体(Androgen receptors, AR)介导的。刘峻等^[1]的研究结果表明, 睾酮的代谢产物为5 α -二氢睾酮(5 α -DHT), 其在体内是AR的最佳配体。雄激素受体在人体组织分布很广,除了前列腺、精囊、睾丸、附睾等生殖器官外,在中枢神经系统、皮肤、腺体、骨骼、肌肉等组织中均发现AR的存在。近年来,性激素对脑的调节作用日益受到人们的重视。Thakur等^[2]通过免疫印迹法与免疫沉淀法测定发现,成年小鼠(24周龄)大脑皮层中AR的数量明显高于老年小鼠(65周龄),经雄激素处理过的成年及老年小鼠(老年雌性鼠除外)AR数量显著降低。

神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)影响着外周和中枢神经系统中某些神经元的存活和分化,可促进、调控神经元的发育,对神经元特殊功能的发挥具有重要作用,能使感觉神经节及交感神经节数目增加,体积增大。

目前,关于雄激素与嗅球中AR和NGF蛋白表达之间的关系研究较少。本试验采用免疫组织化学SP法检测了去势及去势后补充雄激素大鼠的嗅球中AR和NGF蛋白的表达情况,以探讨雄激素对嗅球的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组与动物模型的建立

3月龄雄性健康SD大鼠,购自第四军医大学实验动物中心,共30只,体重240~260 g。随机分为睾丸摘除组(GM组),假手术组(MC组)和睾丸摘除并用睾酮替代组(GM+T组)。每组10只,大鼠用水合氯醛腹腔麻醉,MC组做假手术(只切开睾丸皮肤和纵隔,不切除睾丸),GM组和GM+T组均摘除双侧睾丸,其中GM+T组自手术1周后开始,隔天皮下注射300 μ g/mL 睾酮(Testosterone),0.1 mL/只,连续注射4周。

1.2 标本采集及组织切片的制备

4周后,各组大鼠用水合氯醛腹腔麻醉,手术暴露胸腔,主动脉插管,100 mL 生理盐水冲净血液后,用200 mL 40 g/L 多聚甲醛固定液灌注固定。取嗅脑,于相同的固定液中固定12~36 h,浸入4 $^{\circ}$ C 200 g/L 蔗糖PB液(pH 7.4)中至组织沉底,将组织于开放式冰冻切片机上做连续冠状切片,切片厚35 μ m。

1.3 大鼠嗅球中AR和NGF蛋白的检测

免疫组化染色程序按照SP试剂盒(福州迈新生物技术开发公司生产)说明进行,一抗体抗AR和NGF多克隆抗体(武汉博士德公司生产)的工作浓度分别为1:150和1:200(体积比),同时设阴性

^{*} [收稿日期] 2005-05-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39670550)

[作者简介] 田光明(1979-),男,江苏盐城人,在读硕士,主要从事发育生物学研究。

[通讯作者] 范光丽(1943-),女,山西太原人,教授,博士生导师,主要从事神经生物学研究。E-mail: guanglifan@yahoo.com.cn

对照组,组织切片用硫酸镍铵增强的DAB (Sigma 公司生产)呈色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片观察。表达AR 和NGF 蛋白的阳性细胞呈深蓝色或蓝色,阴性对照组细胞不表达AR 和NGF 蛋白,呈与背景色相似的淡蓝色。

1.4 统计学处理

每组切片随机选取5个不同视野,Motic 数码显微镜拍照,用江苏捷达801形态分析软件对阳性细胞进行分析,测量阳性细胞的灰度值(以平均数±标准差($\bar{x} \pm S$)形式表示)。t 检验进行统计学分析。

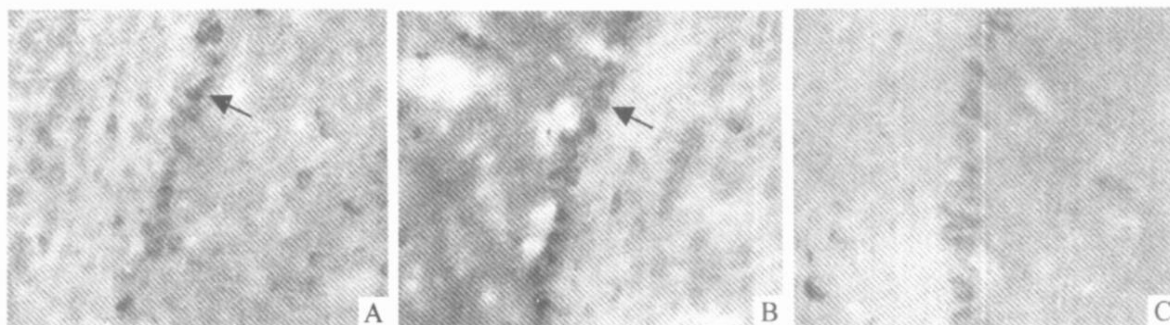


图1 嗅球僧帽细胞中AR 免疫阳性产物(×400)

A. GM + T 组; B. MC 组; C. GM 组; 箭头示AR 阳性细胞

Fig 1 Expression of AR in mitral cell (×400)

A. GM + T group; B. MC group; C. GM group

表1 嗅球僧帽细胞中AR 和NGF 阳性细胞灰度值($\bar{x} \pm S$)

Table 1 Average gray scale of AR⁺ and NGF⁺ cell ($\bar{x} \pm S$)

组别 Group	平均灰度值 Average gray scale	
	AR 阳性细胞 AR ⁺ cell	NGF 阳性细胞 NGF ⁺ cell
GM + T	89.089 5 ± 3.235 6 ^{**}	88.658 4 ± 4.148 7 [*]
MC	91.112 5 ± 4.552 1 [*]	90.410 8 ± 4.073 5 [*]
GM	106.824 7 ± 6.962 2	106.863 1 ± 5.437 8

注: *. 表示与GM 组相比差异显著($P < 0.05$); **. 表示与GM 组相比差异极显著($P < 0.01$)。

Note: *. Stand $P < 0.05$, **. stand $P < 0.01$, controlled with GM group.

2 结果与分析

2.1 嗅球僧帽细胞中AR 表达的变化

由图1和表1可知,GM + T 组AR 蛋白在嗅球僧帽细胞胞质中有表达,AR 阳性细胞数目比GM 组极显著增多($P < 0.01$),染色加深,接近正常水平;MC 组中AR 蛋白主要分布于靶细胞胞质中,阳性细胞数目多($P < 0.05$),染色深;GM 组中AR 蛋白的表达率则较低。

2.2 嗅球僧帽细胞中NGF 的表达变化

由图2和表1可知,GM + T 组NGF 蛋白主要分布于嗅球僧帽细胞的胞质中,胞核中则表达较少,NGF 阳性细胞数目比GM 组极显著增多($P < 0.01$),且小球周细胞中NGF 阳性细胞比AR 阳性细胞增多,染色加深;MC 组NGF 蛋白主要分布于嗅球僧帽细胞的胞质中,NGF 阳性细胞数目比GM 组极显著增多($P < 0.01$),染色强度与GM + T 组相当;GM 组中NGF 阳性表达率低。

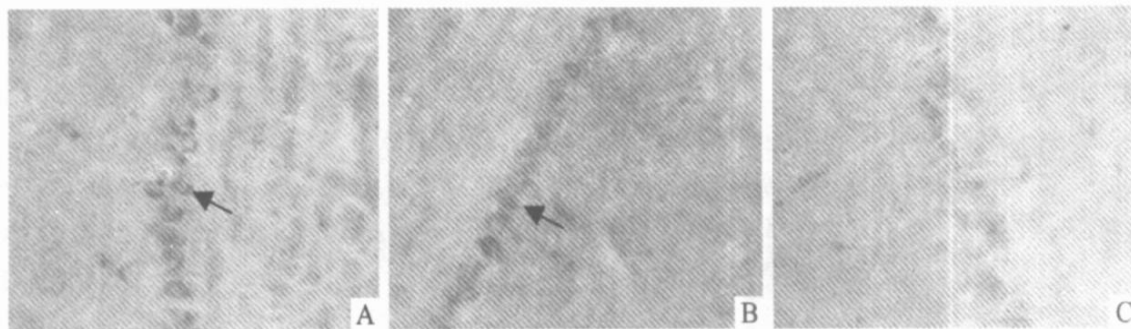


图2 嗅球僧帽细胞中NGF 免疫阳性产物(×400)

A. GM + T 组; B. MC 组; C. GM 组; 箭头示NGF 阳性细胞

Fig 1 Expression of NGF in mitral cell (×400)

A. GM + T group; B. MC group; C. GM group

3 讨论

嗅脑是接受、传递和整合嗅觉信息,并形成嗅觉意识的器官。乔鹏等^[3]发现,双侧嗅球切除对大鼠行为和睡眠有一定影响。嗅球切除后会导致类似人类抑郁症的症状,提示嗅球不仅和嗅觉相关,而且可能还与其他组织有一定的联系。嗅觉系统在诱导雄性和雌性交配中也起着重要作用^[4]。由此可见,嗅球不仅是与嗅觉功能相联系的器官,还与睡眠、生殖等其他功能相关,其作用机制仍需进一步研究。

雄激素对生殖、免疫和内分泌系统的调节作用是通过AR蛋白来实现的,AR蛋白的表达受诸多因素的调控,其中雄激素对其表达及功能有重要影响,对AR在靶组织中调节机制的研究将有助于了解雄激素在这些组织中的作用。关于雄激素对AR水平的调节作用,从目前的文献来看,有的报道为降调节,有的报道为升调节。Lubahn等^[5]最先报道了AR mRNA在鼠腹侧前列腺中的表达量随动物阉割后时间的延长而增加,但注射睾酮可使其表达量下降,表明雄激素可降低前列腺中AR mRNA的表达量。Brandstetter等^[6]发现雄激素对AR mRNA表达的降调节也存在于肾、脑、附睾等器官中。而Khetawat G等^[7]应用Western杂交法分析表明,用5 α -DHT处理后,AR表达量明显增加。贾孟春等^[8]通过RT-PCR与琼脂糖凝胶电泳条带分析发现,经十一酸睾酮(TU)处理后,大鼠睾丸及附睾中AR基因的表达式量减少了60%~64%。这些研究结果均提示,雄激素可以下调雄激素受体的表达式量。然而Shan等^[9]的研究却显示出相反的结果,本试验结果也表明,雄激素对AR量的调节表现为升调节。这可能是由于所选的实验动物以及所应用的激素不同所

致。此外,雄激素对AR和NGF蛋白表达量的影响似乎与雄激素的注射剂量有关。总之,从目前的研究来看,雄激素对AR表达量的调节尚无定论。

Tsin等^[10]发现,雄激素对嗅觉标记蛋白等相关蛋白的表达有调节作用,提示雄激素可能引导了嗅球中神经回路的发育。僧帽细胞是嗅球中最大的三角形细胞,对维持嗅神经通路的正常结构和嗅觉传导均有重要作用。本试验结果表明,僧帽细胞中AR的表达和NGF的表达呈明显的正相关。Arsenijevic等^[11]研究发现,20月龄老年大鼠体内血浆中睾酮浓度下降,是导致嗅结节和下丘脑腹内侧核中OT受体减少的原因。神经营养因子和NGF等缺失导致的嗅神经细胞死亡,可能是神经细胞发生细胞凋亡或死亡等的重要原因之一。李义召等^[12]研究发现,NGF对神经细胞变性和坏死具有保护和修复作用。本试验中,GM组大鼠嗅球NGF的表达显著低于GM+T组,提示随着雄激素含量的减少,嗅球中NGF蛋白的表达式量也减少,其对嗅神经元的营养及促分化作用明显减弱或丧失,最终导致嗅觉老化或障碍。本试验发现,AR蛋白和NGF蛋白的表达主要见于僧帽细胞,表明雄激素可能是与其受体相结合并与NGF共同作用于僧帽细胞,从而发挥其调节作用。

本试验还发现,在补充雄激素后,AR蛋白与NGF蛋白表达量的变化趋势相一致,提示睾酮对嗅球中神经元有促进其NGF表达的作用。但其具体调控机制还有待进一步研究。僧帽细胞数目的减少可能与嗅球中AR蛋白和NGF蛋白表达量的减少有关。因此,进一步探寻雄激素、AR、NGF与僧帽细胞数目之间的关系,对预防嗅功能的退化有重要价值。

[参考文献]

- [1] 刘峻,张永莲. 雄激素受体的研究进展[J]. 中国男科学杂志, 1998, 12(3): 183-186
- [2] Thakur M K, A saithambi A, Mukherjees S. Synthesis and phosphorylation of androgen receptor of the mouse brain cortex and their regulation by sex steroids during aging[J]. Mol Cell Biochem, 2000, 203: 95-101.
- [3] 乔鹏,张朝,章茜,等. 双侧嗅球切除对大鼠行为和睡眠的影响[J]. 河南实用神经疾病杂志, 2000, 5(3): 8-9
- [4] Keverne E B. Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function[J]. Physiol Behav, 2004, 83(2): 177-187.
- [5] Lubahn D B, Joseph D R, Sullivan P M, et al. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome[J]. Science, 1988, 240: 327-337.
- [6] Brandstetter A M, Pfaffl M W, Hocquette J F, et al. Effects of muscle type, castration, age, and compensatory growth rate on androgen receptor mRNA expression in bovine skeletal muscle[J]. J Anim Sci, 2000, 78: 629-637.
- [7] Khetawat G, Faraday N, Nealen M L, et al. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression[J]. Blood, 2000, 95: 2289-2296
- [8] 贾孟春,刘德瑜,吴婉婉,等. 长期使用十一酸睾酮抑制大鼠睾丸和附睾的雄激素受体基因表达[J]. 生殖与避孕, 1999, 19(3): 152-157.

- [9] Shan L X, Hardy D O, Catterall J F, et al Effects of luteinizing hormone and androgen on steady state levels of mRNA for LH receptors, androgen receptors, and steroidogenic enzymes in rat Leydig cell progenitors *in vivo*[J]. Endocrinology, 1995, 136: 1686-1693
- [10] Tsim T Y, Wong E Y, Leung M S, et al Expression of axon guidance molecules and their related genes during development and sexual differentiation of the olfactory bulb in rats[J]. Neuroscience, 2004, 123(4): 951-965
- [11] Arsenijevic Y, Tribollet E. Region-specific effect of testosterone on oxytocin receptor binding in the brain of the aged rat[J]. Brain Res, 1998, 785(1): 167-170
- [12] 李义召, 刘吉良 神经生长因子[J]. 脑与神经疾病杂志, 1997, 5(4): 254

Effects of testosterone on AR and NGF of olfactory bulb in rat

TIAN Guang-ming, FAN Guang-li, TIAN Hai-xia, Ayimuguli, ZHANG Yong-de,
ZHANG Yan, HE Yu-long, NIE Cong, WANG Guan-kui, LI Ding-qiang

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The method of immunohistochemistry SP was used to study the AR and NGF positive expression of rats to investigate the effects of androgen replacement on olfactory bulb. As a result, in castration group, the positive expression of AR and NGF were decreased. After being treated with testosterone, the immunoreactive production of AR and NGF were increased and immunoreactive production of AR and NGF almost returned to the normal level. All the results illustrated that the expression of AR and NGF were decreased after castration, and the testosterone could prevent this by down regulating the expression of AR and NGF.

Key words: testosterone; olfactory bulb; castration; AR; NGF

(上接第 83 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)01-0079-EA

Purification of protopectinase from *Pichia pastoris* engineering strain

LIU Zhan-min, LU Zhao-xin, LU Feng-xia, BIE Xiao-mei, ZHAO Hai-zhen

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: The electrophoresis level protopectinase was purified by ammonium sulfate, Sephadex G75 gel filter and ion exchange chromatography from *Pichia pastoris* engineering strain. The experiment showed that the recovery of protopectinase could reach 71.9% and specific activity was 1 096.35 U/mg when saturation 70% ammonium sulfate precipitated protopectinase. The recovery of protopectinase was 57.6% and specific activity reached 3 762.40 U/mg by Sephadex G75 gel filter. Finally, with the ion exchange chromatography the protopectinase was purified 18.91 times than the crude protopectinase and its specific activity increased to 9 743.20 U/mg, SDS-PAGE electrophoresis showed its molecular weight was 43.17 ku.

Key words: *Pichia pastoris*; protopectinase; purification