

IFN- γ 在怀孕早期山羊下丘脑-垂体-性腺轴的表达^{*}

赵慧英, 孙健红, 徐永平, 陈树林, 马夜肥, 李义书, 刘根胜, 龙 敏

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了探讨 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)在下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG 轴)中的免疫调节作用, 应用免疫组织化学 SP 法对 IFN- γ 免疫反应阳性产物在怀孕早期山羊 HPG 轴的分布特点进行了研究。结果显示, IFN- γ 分布于乳头体内侧核、视前内侧核、下丘脑前区、腹内侧核、连接核、室旁核、视上核等 20 个核团中, 各部分核团细胞着色程度深浅不一; 在视上核、室旁核分泌部、乳头体内侧核等有大量的阳性神经纤维; 同时在室周核、视前外侧核、视前内侧核等 13 个核团中散布有一些阳性星形胶质细胞, 与阳性神经细胞交错共存; 腺垂体中腺细胞和神经垂体中神经纤维均有 IFN- γ 表达; 卵泡和黄体中也有 IFN- γ 存在。表明 IFN- γ 与动物的神经内分泌活动关系密切, 参与了免疫-神经-内分泌网络中的生殖免疫调节。

[关键词] γ 干扰素; HPG 轴; 怀孕早期; 奶山羊; 免疫组织化学 SP 法

[中图分类号] S827.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)08-0035-04

下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG 轴)是免疫-神经-内分泌网络中与动物生产和临床密切相关的一个研究热点。 γ 干扰素(IFN- γ)在免疫-神经-内分泌网络中起重要的介质作用, 既是免疫调质又是神经递质, 参与靶器官免疫过程的神经调节, 可以影响机体的神经内分泌功能。研究^[1]发现, IFN- γ 在下丘脑-垂体-性腺轴中发挥着自分泌或旁分泌调控作用, 并有可能作为反馈调节中的传递信号之一, 在机体的生长、发育和生殖过程中发挥着重要作用。1990 年, Kiefer R 等^[2]首先对神经系统及外周器官中 IFN- γ 的分布进行了研究, 目前国内仅西北农林科技大学神经解剖学研究室对其在大鼠神经、免疫、内分泌等部分器官中的表达进行了研究^[3-7]。为了探讨 IFN- γ 在山羊不同生理时期 HPG 轴中的表达特点, 为家畜神经内分泌免疫调控提供形态学依据, 本试验用免疫组化 SP 法对山羊怀孕早期下丘脑、垂体、卵巢中 IFN- γ 的分布进行了研究, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 怀孕 1 个月左右的健康山羊 3

只。

1.1.2 试剂与仪器 Rabbit anti-SP 免疫组化试剂盒购自福州迈新; Rabbit anti-IFN- γ 购自武汉博士德; DAB 购自华美生物工程公司; 葡萄糖氧化酶购自美国 Sigma 公司; 柠檬酸盐缓冲液购自华美生物工程公司; LEICA CM 1900 冰冻和石蜡切片机由德国 LEICA 公司制造。

1.2 方 法

1.2.1 组织采集与固定 山羊放血致死迅速取下头部, 向两侧颈总动脉同时注入 37℃ 生理盐水 400~500 mL 冲去残血, 随后灌注 4℃ 的含 40 g/L 多聚甲醛的 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液 600~800 mL, 先快后慢。开颅取出下丘脑、垂体入固定液后固定 10~12 h。灌注脑的同时, 迅速取出卵巢放入固定液固定 10~12 h。

1.2.2 IFN- γ 在下丘脑中表达情况的检测 为了防止切片时形成冰晶, 将后固定好的下丘脑再浸入含 200 g/L 的蔗糖 PB 液中, 至组织沉底; 然后做连续冠状切片, 片厚 35 μ m, 隔三取三, 分成三套。一套按 SP 免疫组化试剂盒说明进行染色, 其中 A 液和 B 液 37℃ 各孵育 1 h, 1:200 倍稀释的兔抗 IFN- γ 抗体 4℃ 孵育 48 h, 再用 C 液和 D 液 37℃ 各孵育 1.5 h,

* [收稿日期] 2006-02-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30170683); 陕西省自然科学基金项目(2002JC104)

[作者简介] 赵慧英(1966-), 女, 陕西韩城人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物神经生物学研究。

最后用DAB 蓝色呈色法呈色。另一套用尼氏染色。第三套切片作阴性对照,其中用0.01mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液代替一抗,其他步骤同第一套。

1.2.3 IFN- γ 在卵巢和垂体中表达情况的检测
固定好的卵巢和垂体经脱水、透明、浸蜡、包埋后,做连续切片,片厚7 μ m。切片分为三套,一套根据抗体要求进行热抗原修复,之后按照SP 免疫组化试剂盒进行染色,其中A 液和B 液37 $^{\circ}$ C 各孵育10 min,1:400 倍稀释的兔抗 IFN- γ 37 $^{\circ}$ C 孵育48 h,再用C 液和D 液37 $^{\circ}$ C 各孵育10 min,最后用DAB 蓝色呈色法呈色;另一套用于H-E 染色;第三套作阴性对照,用0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液代替一抗,其他步骤同第一套。

1.2.4 切片的拍照及统计学分析
对封片后的切片用Motic 数码显微照相系统摄像,然后用江苏捷达801 形态分析软件对阳性结果进行灰度值(将数字图像中各个像素所具有的明暗程度用0(黑色)~

256(白色)间的数字表示)计算,并进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 IFN- γ 在怀孕早期山羊下丘脑中的表达
由表1 可知,IFN- γ 广泛分布于山羊下丘脑乳头体内侧核、视前内侧核、下丘脑前区、腹内侧核、连接核、室旁核、视上核等20 个核团中。核团中的阳性细胞形态以椭圆形、多角形、梭形为主(图1,2),各部分核团细胞着色程度深浅不一。在视上核、室旁核分泌部、乳头体内侧核等有大量的阳性神经纤维;同时在室周核、视前外侧核、视前内侧核等13 个核团中,散布有一些阳性星形胶质细胞,与阳性神经细胞交错共存,神经细胞呈色较浅,星形胶质细胞均呈强阳性着色;而在视交叉上核和视前正中核背亚核区无阳性神经细胞和纤维,仅见星形胶质细胞免疫反应阳性表达。

表1 IFN- γ 在怀孕早期山羊下丘脑中的分布
Table 1 Distribution of IFN- γ in hypothalamus of dairy goat during early pregnancy

核团名称 Nuclei	灰度值 Gray level	细胞密度 Cell density	纤维密度 Fibers density
视上核 Nucleus supra-optic	135.612 8 $\pm$ 9.414 1	++	****
下丘脑前区 Area anterior hypothalam i	144.518 3 $\pm$ 14.185 0	++/+ ++	**
下丘脑外侧区 Area lateralis hypothalam i	159.454 1 $\pm$ 17.258 5	+	**
室周核 Nucleus supra-optic	138.575 3 $\pm$ 18.361 1	-	***
室旁核小细胞部 Nucleus paraventricularis small cell	152.003 5 $\pm$ 24.026 6	+++	**
室旁核分泌部 Nucleus paraventricularis secrete	164.554 6 $\pm$ 18.618 0	+	****
结节乳头体核 Nucleus tuberom am illaris	112.778 1 $\pm$ 6.608 1	+	**
乳头体内侧核 Nucleus m am illaris medialis	107.713 2 $\pm$ 7.807 5	++++	****
乳头体后侧核 Nucleus m am illaris posterior	179.278 2 $\pm$ 10.410 1	++	*
乳头体外侧核 Nucleus m am illaris lateralis	138.481 0 $\pm$ 19.253 4	++	***
腹外侧核 Nucleus ventrolateralis	145.622 1 $\pm$ 19.822 5	+	***
腹内侧核 Nucleus ventrom edialis	190.557 8 $\pm$ 21.345 6	+++	*
穹窿周核 Nucleus perifornicalis	174.664 0 $\pm$ 15.569 5	+	**
连接核 Nucleus reuniens	144.387 6 $\pm$ 19.708 0	+++	***
弓状核 Nucleus arcuatus	144.300 6 $\pm$ 16.213 7	+	**
乳头体前背侧核 Nucleus rostralis dorsalis	170.052 6 $\pm$ 16.126 6	++	***
乳头体外侧核 Nucleus rostralis lateralis	150.693 3 $\pm$ 10.270 6	+	***
视前内侧核 Nucleus pre-opticus medialis	155.482 2 $\pm$ 17.956 3	++++	**
视前外侧核 Nucleus pre-opticus lateralis	152.889 0 $\pm$ 20.636 7	++	***
下丘脑后核 Nucleus posterior hypothalam i	155.860 0 $\pm$ 13.570 2	++	***

注:-. 无阳性细胞;+. 阳性细胞数少于50/mm²;++. 阳性细胞数为50~ 100/mm²;+++. 阳性细胞数为100~ 150/mm²;++++. 阳性细胞数为150~ 200/mm²;*. 稀疏;*. *. 稍密;***. 较密;****. 很密。
Note:-. No positive cell;+. Less than 50 positive cells per mm²;++. 50- 100 positive cells per mm²;+++. 100- 150 positive cells per mm²;++++. 150- 200 positive cells per mm²;*. Sparse;*. *. Dense;***. Denser;****. Densest

2.2 IFN- γ 在怀孕早期山羊垂体中的表达

在山羊腺垂体中可见大部分腺细胞呈阳性, 腺细胞形成的滤泡周围的 IFN- γ 免疫反应产物呈大小

不等的斑块状(图3); 神经垂体中可见较明显的呈点状的阳性纤维(图4)。

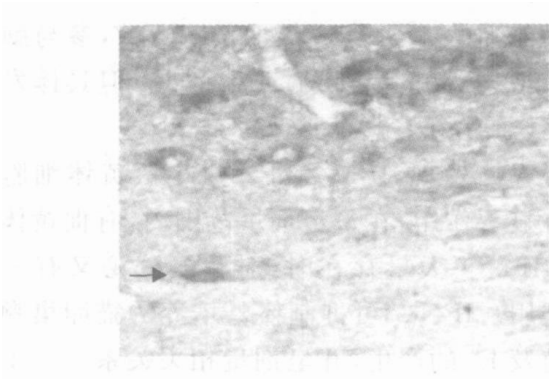


图1 山羊视上核中的 IFN- γ 阳性细胞 (×400)
→ 示 IFN- γ 阳性细胞

Fig 1 IFN- γ immunoactive positive cells in nucleus supra-optic of goat (×400)
→ IFN- γ immunoactive positive cells

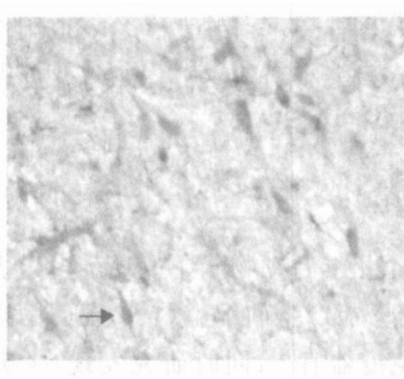


图2 山羊视前外侧核中的 IFN- γ 阳性细胞 (×400)
→ 示 IFN- γ 阳性细胞

Fig 2 IFN- γ immunoactive positive cells in nucleus pre-opticus lateralis of goat (×400)
→ IFN- γ immunoactive positive cells

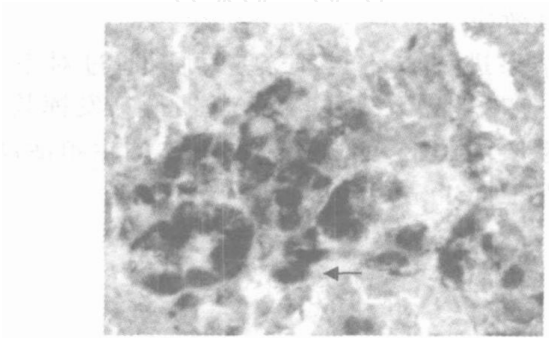


图3 山羊腺垂体中的 IFN- γ 阳性细胞 (×400)
→ 示 IFN- γ 阳性细胞

Fig 3 IFN- γ immunoactive positive cells in adenohypophysis of goat (×400)
→ IFN- γ immunoactive positive cells

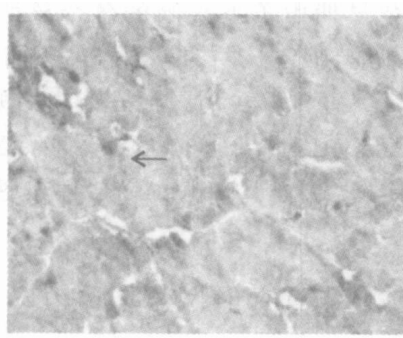


图4 山羊神经垂体中的 IFN- γ 阳性纤维 (×400)
→ 示 IFN- γ 阳性纤维

Fig 4 IFN- γ immunoactive positive fiber in neurohypophysis of goat (×400)
→ IFN- γ immunoactive positive fiber

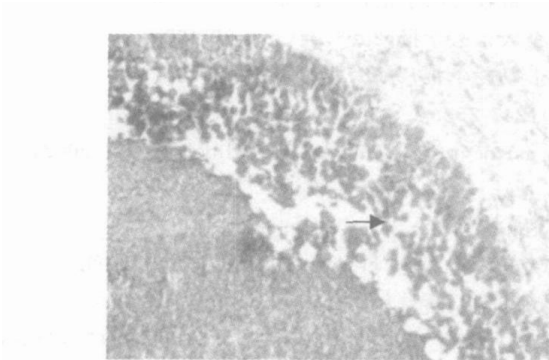


图5 山羊卵泡中的 IFN- γ 阳性细胞 (×400)
→ 示 IFN- γ 阳性细胞

Fig 5 IFN- γ immunoactive positive cells in follicular of goat (×400)
→ IFN- γ immunoactive positive cells

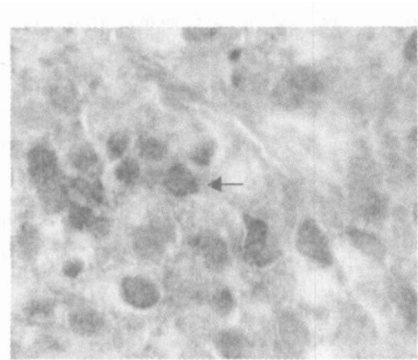


图6 山羊黄体中的 IFN- γ 阳性细胞 (×400)
→ 示 IFN- γ 阳性细胞

Fig 6 IFN- γ immunoactive positive cells in corpus luteum of goat (×400)
→ IFN- γ immunoactive positive cells

2.3 IFN- γ 在性腺中的表达

卵巢中 IFN- γ 密集分布在卵巢组织中。在同一卵泡中,从卵泡壁到卵泡腔, IFN- γ 免疫反应阳性细胞染色逐渐加深,尤其是卵母细胞周围的颗粒层细胞染色最深(图5)。黄体中的免疫反应阳性细胞呈强阳性(图6),大小均匀,密集分布,并可以看见少量的阳性纤维。

3 讨论

近年来,相继在动物脑中发现许多过去认为只有免疫器官才能产生的细胞因子,证明脑组织本身就是一个免疫器官^[8];同时研究发现,少突胶质细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞等能够对 IFN- γ 起反应^[9], IFN- γ 可以引起下丘脑激素的释放^[10],并能调节视前区和下丘脑神经元的电活动,同时也可作为一种内源性致热源引起机体发热,修正了以往研究认为中枢神经系统为免疫特赦区的概念。本研究发现,在怀孕早期山羊下丘脑的各个核团中都有 IFN- γ 阳性细胞,但各核团的表达程度不同,在合成 GnRH 的下丘脑前区较广泛的区域内表现为强阳性;下丘脑各核团阳性细胞的灰度值均较乏情期山羊(结果待发表)小,尤其在视前交叉上核、视前室周

核更为明显,表明 GnRH 的分泌与细胞因子 IFN- γ 呈正相关;同时在下丘脑的许多表达 IFN- γ 的核团中,散布有胶质细胞样的强阳性免疫反应细胞和神经纤维。推测在山羊怀孕早期下丘脑的众多核团和神经胶质细胞大量分泌或摄取的 IFN- γ ,参与脑中免疫调节或内分泌功能或递质样作用,但具体发挥何种作用,还有待于进一步研究。

研究^[11-13]发现, IFN- γ 对妊娠小鼠黄体细胞分泌孕酮有显著作用,在一定剂量范围内,有促黄体作用,但当 IFN- γ 大量存在时,对孕酮分泌又有一定的抑制作用。 IFN- γ 可抑制体外培养的猫卵巢颗粒细胞增殖及 E₂ 的产生,并呈剂量相关关系^[14]。本研究在怀孕早期山羊的卵巢及其黄体中发现大量的 IFN- γ ,推测 IFN- γ 可能作为一种激素样物质,经自分泌或旁分泌影响卵巢激素的合成与分泌,参与受精卵的附植及胎儿的发育成熟;卵巢和免疫系统之间也可能存在短环反馈, IFN- γ 可能在卵巢内发挥重要免疫效应。

本结果进一步证实, IFN- γ 可以通过对下丘脑-垂体-卵巢轴的长反馈和短反馈途径发挥其免疫因子或递质样作用,影响或调节机体的生殖活动,维持动物在不同生殖活动中的功能。

[参考文献]

- [1] 黄 诚 细胞因子对下丘脑-垂体-性腺轴的调控[J]. 国外医学·内分泌学分册, 1997, 17(3): 16-19
- [2] Kiefer R, Keutberg G W. Gamma interferon like immunoreactivity in the rat nervous system[J]. Neurosci, 1990, 37(3): 725-732
- [3] 孙志宏, 欧阳五庆, 杨增歧, 等. 应用免疫组织化学法研究 IFN- γ 在大鼠室管膜中的定位分布[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(2): 41-43
- [4] 胡格吉乐图, 穆 祥, 陈树林, 等. IFN- γ 在大鼠腰骶髓段脊髓内的分布[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(5): 484-486
- [5] 胡 格, 穆 祥, 陈树林, 等. 大鼠垂体前叶内 IFN- γ 免疫阳性神经纤维的分布[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(6): 559-561
- [6] 杨佐君, 孙志宏, 胡 格, 等. 大鼠卵巢内 IFN- γ 样免疫反应阳性物质的表达[J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(5): 465-467
- [7] 胡 格, 穆 祥, 陈树林, 等. 大鼠胰岛内 γ 干扰素样免疫反应阳性物质的表达[J]. 动物学报, 2003, 49(4): 540-542
- [8] Goley T E. Histology of the acupuncture point[J]. Amer J Acupunc, 1991, 19(3): 247-252
- [9] Tripathi B J, Xing Y Y, Tripathi R C, et al. Expression of γ interferon mRNA by astrocytes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 419-424
- [10] Jones T H, Kennedy R L. Cytokines and hypothalamic pituitary function[J]. Cytokine, 1993, 5(6): 531-538
- [11] 姚 文, 王卫光, 吴 畏. 干扰素- γ 对假孕大鼠黄体功能的影响 II [J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 1998, 21(2): 99-103
- [12] 姚 文, 庄临之. 干扰素- γ 对妊娠小鼠黄体细胞孕酮分泌的影响[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 1998, 21(3): 88-89
- [13] 张 翔, 沈维雄, 孙志达, 等. 前列腺素和 IFN- γ 对人黄体细胞甾体激素生成的影响及相互作用[J]. 生殖与避孕, 1995, 16(5): 343-350
- [14] 谢端薇, 欧汝强, 杨 宁, 等. 卵巢早衰与细胞因子 IFN- α IFN- γ 和 IL-2 的相关性研究[J]. 广东医学, 1999, 20(11): 23-25

(下转第43页)

- [7] Cameron D F, Muffly K E. Hormonal regulation of spermatid binding[J]. Cell Sci, 1991, 100(30): 623-626
- [8] Griffith T S, Brunner T, Fletcher S M. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege[J]. Science, 1995, 270(5239): 1189-1192
- [9] Bellgrau D, Gold D, Selawry H, et al. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection[J]. Nature, 1995, 377: 630-632

Isolation, purification and identification of testis Sertoli cells in prepubertal rats

KONG Qing-xue^{1,2}, ZHANG Yong¹

(1 College of Animal Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Tissue Engineering Research Center, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract Rats Sertoli cells were isolated, purified and identified by one-time digestion with collagenase V, differential adhesion, low osmotic buffer treatment and immunohistochemical staining. Results demonstrated that this isolation and purification method of Sertoli cells did little harm to the cells. The primarily isolated Sertoli cells had good cell viability; cell survival rate reached 85% and there was no big cell clump. Planted in flasks, cells proliferated rapidly and reached the proliferation peak at day 8 postcultured. Cell yield was 6.5×10^5 cell/g. Most acquired cells were Fas-L positively stained, and cell purity could reach 95%; the nucleolus of the cells was clear, and there were satellite nucleosomes around the nucleolus.

Key words: prepubertal rat; Sertoli cell; isolation purification

(上接第38页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)08-0035-EA

Expression of IFN- γ immunoreactivity on HPG axis of dairy goat during early pregnancy

ZHAO Hui-ying, SUN Jian-hong, XU Yong-ping, CHEN Shu-lin,

MA Ye-fei, LI Yi-shu, LIU Gen-sheng, LONG M in

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

Abstract To probe into the immunomodulation of IFN- γ to hypothalamic-pituitary-gonadal axis, the distribution of IFN- γ immunoreactivity on HPG axis of dairy goat during early pregnancy was determined by SP method of immunohistochemistry. The result showed that IFN- γ was distributed over 20 nucleus of the hypothalamus, such as nucleus mammillaris medialis, nucleus pre-opticus medialis, area anterior hypothalamus, nucleus ventromedialis, nucleus reunions, nucleus paraventricularis, nucleus supra-optic, and etc. Many of IFN- γ positive nerve fibers were found in supra-optic nucleus, paraventricular nucleus, nucleus mammillaris medialis and etc. Nerve fibers and astrocytes IFN- γ immunoreactive positive cells spreaded in periventricular nucleus, nucleus pre-opticus lateralis, nucleus pre-opticus medialis and etc. At the same time, IFN- γ is also observed obviously in adenohypophysis and neurohypophysis. IFN- γ also expresses in follicular and corpus luteum. The results suggest that IFN- γ is related to the activity of neuroendocrine of animals, and is concerned with the reproductive immunity regulation in immuno-neuro-endocrine network.

Key words: IFN- γ ; HPG axis; early pregnancy; dairy goat; SP method