

青年奶山羊下丘脑 GnRH 神经元的分布特点*

陈树林, 毛海鹏, 赵慧英, 卿素珠, 范光丽, 张 艳, 李耀辉, 周建平

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了探讨促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)在青年奶山羊下丘脑的表达特点, 采用灵敏度较高的免疫组化 SP 法研究了 GnRH 神经元在 6~8 月龄青年奶山羊下丘脑中的分布。结果表明, 分泌 GnRH 的神经元主要分布在视上核、下丘脑前核、室旁核和弓状核, 其次是视前内侧核、视前外侧核、交叉上核、下丘脑外侧区、视上弥散核、腹内侧核、腹外侧核及乳头体各核团, 前连合核、终纹床核、穹窿周核、环核、视前交叉上核和背内侧核分布较少。GnRH 阳性神经元的形态有圆形、三角形、卵圆形、梭形、多角形、不规则形, 有些阳性神经元还具有明显的突起; 圆形和三角形细胞直径为 7~27 μm , 卵圆形和梭形细胞短轴和长轴分别为 7~21 和 10~48 μm ; GnRH 阳性神经纤维仅见于视前内侧核、视前外侧核、弓状核、乳头体后核、乳头体内侧核等核团, 在正中隆起和第三脑室室周也可见中等数量的阳性纤维。结果提示, GnRH 神经元在青年奶山羊下丘脑分布广泛。

[关键词] 下丘脑; GnRH 神经元; 免疫组织化学; 青年奶山羊

[中图分类号] Q 189; S852.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0045-04

Distribution of gonadotropin releasing hormone neuron in the hypothalamus of youth dairy goat

CHEN Shu-lin, MAO Hairpeng, ZHAO Hui-ying, QING Su-zhu,

FAN Guang-li, ZHANG Yan, LI Yao-hui, ZHOU Jian-ping

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

Abstract: To study expressive characteristics of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the hypothalamus of youth dairy goat, the distribution of GnRH neuron in the hypothalamus of youth dairy goat was determined by immunohistochemical streptavidin-peroxidase (SP) method. The results revealed that GnRH-immunoreactive (GnRH-IR) neurons were mainly distributed over nucleus supraopticus, nucleus anterior hypothalamic, nucleus paraventricularis and nucleus arcuatus; in addition, a certain GnRH-IR neurons were also found in nucleus preopticus medialis, nucleus preopticus lateralis, nucleus suprachiasmaticus, nucleus lateralis hypothalamus, nucleus supraopticus diffusus, nucleus ventrodorsalis, nucleus ventrolateralis and nucleus mammillaris; and the rest were found to distribute over nucleus anterior commissuris, bed nucleus stria terminalis, nucleus perifornicalis, nucleus circularis, nucleus preopticus suprachiasmaticus and nucleus ventromedialis. The positive cells were mainly circular, triangle, oval, spindle-shaped, polygon, irregular shape, in addition, some of them had obvious projects. The circular and the triangle cell diameters were 7~27 μm , the ovoid and the spindle-shaped cell minor axis and the major axis were 7~21 μm , 10~48 μm respectively. GnRH-IR nerve fibers were only observed in nucleus preopticus medialis, nucleus preopticus lateralis, nucleus paraventricularis and nucleus suprachiasmaticus. Also, some nerve fibers were found in median eminence and the surrounding area of third ventricle. The results showed that the distribution of GnRH in the hypothalamus of youth dairy goat was extensive.

Key words: hypothalamus; GnRH; immunohistochemistry; young dairy goat

[收稿日期] 2005-12-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30170683)

[作者简介] 陈树林(1965-), 男, 陕西汉中, 副教授, 主要从事神经生物学和细胞生物学研究。E-mail: cs19719@163.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

下丘脑是联系高级神经中枢和内分泌腺体功能活动的枢纽,其通过分泌释放激素或抑制因子调节垂体促性腺激素的分泌,从而影响性腺的外分泌和内分泌功能,调控动物的个体发育和生殖过程。促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)是动物生殖过程中最重要的激素之一,1971年美国 Schally 等^[1]首先从猪的下丘脑分离并提纯得到 GnRH,并因此而获 1977 年诺贝尔医学奖。现在已基本确定 GnRH 除主要由下丘脑产生外,松果体、脊髓液和脑外组织,包括肠、胃^[2]、胰脏^[3]、卵巢、子宫内膜、胎盘^[4]、输卵管上皮细胞^[5]及交感神经节^[6]等器官和组织中也发现有 GnRH 类似物存在。下丘脑产生 GnRH 的神经元在神经末端以脉冲的方式分泌 GnRH,然后调节垂体促黄体生成素(LH)和促卵泡素(FSH)的分泌,从而刺激性腺发育和生殖过程,但有关 GnRH 脉冲式分泌的精确定位和发生机制尚不清楚。同时,人们对已探明的为数不多的下丘脑核团能否源源不断地以脉冲的方式分泌大量的 GnRH 感到疑惑。对不同生殖周期下丘脑中 GnRH 的分布变化规律未见文献报道。为此,本试验采用灵敏度较高的免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(streptavidin-peroxidase, SP)法对 GnRH 神经元在青年奶山羊下丘脑中的分布进行了研究,以期对 GnRH 在动物生殖调控中的作用及分布规律提供形态学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 6~8 月龄关中奶山羊 8 只,临床健康,质量 25~35 kg。

1.1.2 试剂及仪器 抗兔 SP 超敏试剂盒,福州迈新公司进口分装;兔抗 GnRH 抗体,武汉博士德生物工程有限公司生产;葡萄糖氧化酶,美国 SIGMA 公司生产。A 液:内源性过氧化酶阻断剂(无色);B 液:正常非免疫动物血清(蓝色);C 液:生物素标记的第二抗体(黄色);D 液:链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(红色)。二抗:羊抗兔 GnRH 抗体。OL YMPUS 生物显微镜,日本 OL YMPUS 光学工业株式会社;Leica 冰冻石蜡切片机,德国 Leica 公司;Motic 数码显微镜,厦门 Motic 实业有限公司。

1.2 青年奶山羊下丘脑切片的制备

奶山羊颈动脉放血致死,迅速割下头部,通过颈动脉依次灌注 37℃ 生理盐水和 4℃ 的 40 g/L 多聚甲醛磷酸盐缓冲液,开颅取脑,切取下丘脑,浸入 40

g/L 多聚甲醛固定液中固定 12 h。之后浸入 4℃ 含 200 g/L 蔗糖的 PB 液中,组织块沉底后,用冰冻切片机对下丘脑做连续切片(片厚 35 μm)。每只羊下丘脑制两套切片,一套做 Nissl 染色以确认下丘脑核团位置,兼做阴性对照实验;一套进行免疫组化 SP 法染色。

1.3 青年奶山羊下丘脑切片的 SP 法染色观察

将切片用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 次,每次 10 min,然后按以下步骤进行反应,各步骤间均用 0.01 mol/L 的 PBS 充分漂洗 3 次,每次 10 min。

切片入 A 液,室温下孵育 1 h;切片入 B 液,室温下孵育 40 min;切片入兔抗 GnRH 抗体(稀释倍数为 1:200),室温下孵育 24 h;切片入 C 液,室温下孵育 1.5 h;切片入 D 液,室温下孵育 1.5 h;切片用葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍胺呈色,室温下呈色,观察直至有蓝色反应产物出现为止。切片脱水、透明、封片光镜下观察。

同时设阴性对照实验,用 0.01 mol/L 的 PBS 代替兔抗 GnRH 抗体孵育切片,其余步骤同上。

1.4 数据统计分析

免疫组化染色的每组切片中,相同核团随机选取 5 个不同部位,用 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,测量阳性细胞的大小、数目、灰度值。数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示。

2 结果与分析

2.1 奶山羊下丘脑切片镜检结果

应用免疫组化 SP 法结合硫酸镍胺加强的 DAB 蓝色反应体系呈色的切片,背景呈无色或浅蓝色, GnRH 免疫反应阳性神经元呈深浅不等的蓝色,为双极神经元或多极神经元,也见单极神经元;胞体呈不规则的圆形、梭形、三角形等,大小不等,细胞直径为 7~48 μm ,成堆或散在分布。根据胞体内反应颗粒着色的深浅可分为强阳性、中等阳性和弱阳性 3 种。强阳性神经元呈深蓝色,胞体内深蓝色颗粒染成一片,如下丘脑前核(图 1A),视上核(图 1B),室旁核(图 1C),结节乳头体核(图 1D);弱阳性神经元着色浅淡,细胞轮廓不清,在高倍镜下方可见胞质中有少量浅蓝色颗粒,如穹隆周核,视前交叉上核;中等阳性神经元介于二者之间,如交叉上核,下丘脑外侧区,胞核大多呈空泡状。神经元突起有的第三脑室或伸向血管,如在环核中有的血管周围被一些神经元及纤维环绕。阳性神经纤维见于视前内侧核、视前

外侧核、弓状核、乳头体后核、乳头体内侧核等核团; 态多样, 尤以正中隆起较多。阴性对照组均未见阳性
阳性神经纤维呈细丝状或串珠状, 颗粒大小不一, 形 反应物出现。

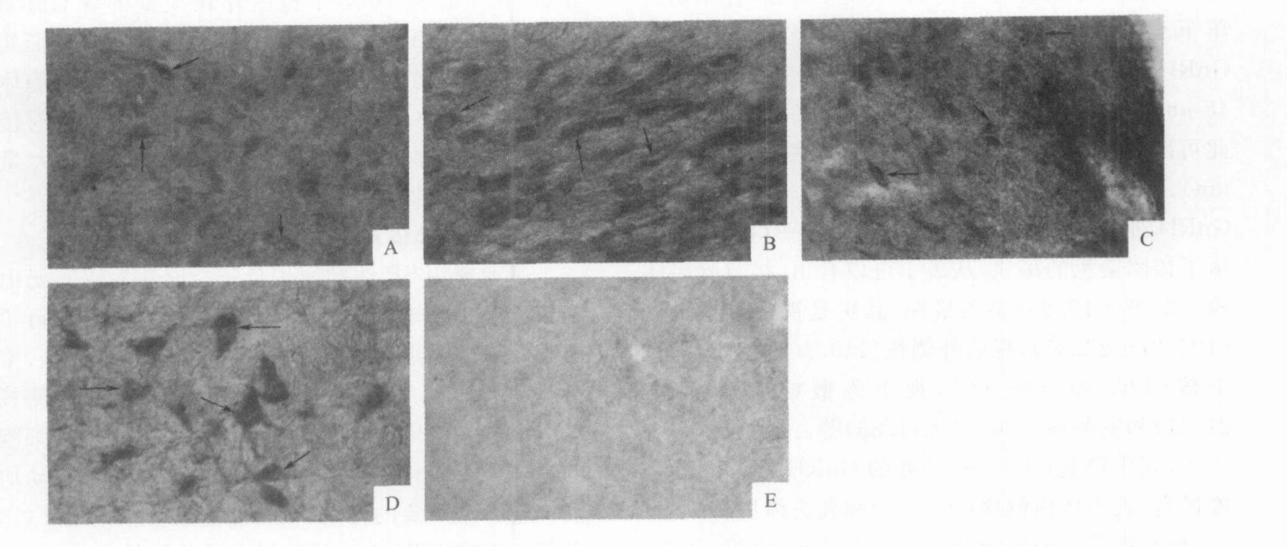


图 1 青年奶山羊下丘脑 GnRH 神经元的免疫组化 SP 染色结果 (× 400)
A. 下丘脑前核; B. 视上核; C. 室旁核; D. 结节乳头体核; E. 阴性对照; →. 示 GnRH 阳性产物

Fig 1 GnRH-immunoreactive products on hypothalamus in youth dairy goat,
arrow head indicates GnRH-immunoreactive positive neurons (× 400)

A. Nucleus anterior hypothalami; B. Nucleus supraopticus; C. Nucleus paraventricularis; D. Nucleus tuberomammillaris;
E. None GnRH immunoreactivity neurons in control group; →. Indicates GnRH immunoreactivity

表 1 青年期奶山羊下丘脑中 GnRH 阳性神经元和阳性神经纤维的分布

Table 1 Distribution of the GnRH-IR neurons and GnRH-IR nerve fibers on hypothalamus in youth dairy goat

核团名称 Nuclei	细胞大小/ μm Cell size	面密度/ μm Area density	平均灰度值 Average gray scale	GnRH 阳性 纤维密度 Nerve fibers density
前连合核 Nucleus anterior commissuris, AC	17~ 33	349.61	159.85 $\pm$ 14.32	-
终纹床核 Bed nucleus of the stria terminalis, BNST	15~ 40	472.66	162.47 $\pm$ 42.31	-
视前交叉上核 Nucleus pre-opticus supra-chiasmaticus, PO SC	8~ 19	335.94	109.27 $\pm$ 23.37	-
视前内侧核 Nucleus pre-opticus medialis, POM	22~ 38	73.0217	130.45 $\pm$ 14.07	++
视前外侧核 Nucleus pre-opticus lateralis, POL	16~ 35	158.10	119.30 $\pm$ 10.83	++
下丘脑前核 Nucleus anterior hypothalami, AH	11~ 26	37.90	130.31 $\pm$ 17.49	-
下丘脑外侧区 Lateral hypothalamic area, LH	13~ 26	114.42	130.26 $\pm$ 0.24	-
交叉上核 Nucleus supra-chiasmaticus, SC	9~ 18	101.48	120.02 $\pm$ 24.00	+
视上核 Nucleus supra-opticus, SON	10~ 36	57.25	120.60 $\pm$ 16.00	-
视上弥散核 Nucleus supra-opticus diffuses, SD	8~ 27	77.02	112.14 $\pm$ 27.41	-
室旁核 Nucleus paraventricularis, PVN	13~ 21	55.36	100.44 $\pm$ 11.83	+
弓状核 Nucleus arcuatus, ARN	9~ 33	58.95	148.28 $\pm$ 12.46	++++
背内侧核 Nucleus dorsomedialis, DM	14~ 39	184.49	151.81 $\pm$ 27.41	-
腹外侧核 Nucleus ventrolateralis, VL	9~ 24	80.31	167.09 $\pm$ 13.17	-
腹内侧核 Nucleus ventromedialis, VM	9~ 17	122.83	163.77 $\pm$ 17.85	-
穹窿周核 Nucleus perifornicalis, PF	7~ 21	1407.17	124.34 $\pm$ 6.22	-
乳头体内侧核 Nucleus mammillaris medialis, MM	13~ 26	108.02	131.91 $\pm$ 24.47	+++
乳头体外侧核 Nucleus mammillaris lateralis, ML	19~ 48	120.92	133.81 $\pm$ 16.02	-
结节乳头体核 Nucleus tuberomammillaris, TM	17~ 34	324.60	73.98 $\pm$ 12.95	-
乳头体后核 Nucleus mammillaris posterior, MP	13~ 31	114.64	129.65 $\pm$ 28.79	+++
乳头体上核 Nucleus supra-mammillaris, SM	10~ 22	175.50	179.34 $\pm$ 15.52	+
正中隆起 Median eminence, ME	9~ 33	52.22	135.26 $\pm$ 66.84	++++

注: + + + + . 大; + + + . 中等; + + . 小; + . 极小; - . 无; 面密度= 视野面积/阳性细胞总周长; 灰度值越高表示染色越浅。
Note: + + + + . Indicates "big"; + + + . "middle"; + + . "small"; + . "smallest"; - . "nothing". View acreage divided general girth is area density. The quantity is counter to the value of average gray density.

2.2 青年奶山羊下丘脑中 GnRH 神经元的分布

分泌 GnRH 的神经元及神经纤维在青年奶山羊下丘脑的分布情况见表 1。由表 1 可知, 青年奶山羊下丘脑中广泛分布有 GnRH 神经元以及一些 GnRH 阳性神经纤维。GnRH 神经细胞直径在 7~48 μm 。面密度值越小, 说明阳性神经元数越多, 据此可断定在下丘脑前核(37.90 μm)、视上核(57.25 μm)、室旁核(55.36 μm)和弓状核(58.95 μm)的 GnRH 神经元数明显多于其他核团。平均灰度值显示了核团染色的深浅, 从表 1 可以看出, 结节乳头体核(73.98 $\pm$ 12.95)染色最深, 其次是视前交叉上核(109.27 $\pm$ 23.37), 视前外侧核(119.30 $\pm$ 10.83), 视上核(120.60 $\pm$ 16.00), 视上弥散核(112.14 $\pm$ 27.41)和室旁核(100.44 $\pm$ 11.83)等。弓状核(+++)正中隆起(++++)处的 GnRH 阳性纤维密度最高, 乳头体内侧核(+++)和乳头体后核(+++)也有中等量的纤维分布。综上所述, 分泌 GnRH 的神经元主要分布于视上核、下丘脑前核、室旁核和弓状核。

3 讨 论

3.1 下丘脑 GnRH 阳性神经元的定位

下丘脑-垂体-性腺轴是性腺发育成熟和生殖功能正常进行的基础。下丘脑分泌的 GnRH、垂体分泌的促性腺激素(FSH, LH)和性腺分泌的性激素(雌激素, 雄激素)之间存在着正、负反馈调节机制。奶山羊断奶后, 随着下丘脑 GnRH 分泌量的增多, 垂体促性腺激素分泌也增多, 性激素分泌亦增多, 从而刺激性腺逐渐发育成熟。本试验对 6~8 月龄正处于性腺发育成熟阶段的青年奶山羊下丘脑 GnRH 的合成部位进行了研究。结果表明, GnRH 阳性神经元主要分布在视上核、下丘脑前核、室旁核和弓状核; 其次是视前内侧核、视前外侧核、交叉上核、下丘脑外侧区、视上弥散核、腹内侧核、腹外侧核、乳头体内侧核、乳头体外侧核、乳头体后核和乳头体上核; 前连合核、终纹床核、穹窿周核、视前交叉上核、环核、背内侧核和结节乳头体核的分布较少。可见青年奶山羊下丘脑的 GnRH 免疫反应阳性细胞分布范围广泛, 涉及 20 多个核区, 与前人的定位结果相比^[7-9], 本试验扩大了其分布范围。

3.2 下丘脑 GnRH 的来源

已知 GnRH 以脉冲式分泌入垂体门脉系统, 继之 LH 亦以脉冲式分泌, 从而调节哺乳类的生殖活动, 这种脉冲式分泌的发生器位于下丘脑^[10-11], 但人

们对已探明的为数不多的核团能否源源不断地以脉冲式分泌较多数量的 GnRH 感到疑惑。本试验结果显示, 在下丘脑 20 多个核区存在大量的含 GnRH 阳性神经元, 相邻的 GnRH 神经元之间有多种形式的接触, 如突起与突起接触、突起与胞体接触和胞体与胞体接触, 这种现象表明, 大量的神经元可同时接受刺激并释放 GnRH, 从而为揭示下丘脑大量 GnRH 的来源提供了形态学依据。

3.3 GnRH 和催产素之间的关系

作者曾用 SP 法和原位分子杂交法对青年奶山羊下丘脑催产素(oxytocin, OT)神经元分布进行了研究, 结果表明, OT 分布较多的核区为视上核、室旁核、弓状核、穹窿周核、下丘脑外侧区、腹内侧核等^[12], 这些核团和本实验 GnRH 免疫反应阳性细胞的主要分布区相一致。OT 和 GnRH 对生殖活动均发挥着非常重要的作用, 在功能上也有相似之处, 二者都可促进 FSH, LH 的分泌和动物的性行为, 但尚未查阅到将二者结合起来进行形态及功能研究的资料。将本试验结果和作者前期结果^[12]比较得知, 一些核团中既有 OT 神经元存在, 又有 GnRH 神经元存在, 提示这些核团可能与生殖密切相关, 而且在 OT 和 GnRH 之间可能存在着某种关系, 如 OT 对 GnRH 或 GnRH 对 OT 的分泌可能有促进作用, 但这仅仅是推测, 其具体作用还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Shally A V. Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1971, 44(1): 459-463.
- [2] Huang W Q, Yao B, Sun L, et al. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of GnRH and its receptor[J]. Life Science, 2001, 68(15): 1727-1734.
- [3] Wang L, Xie L P, Huang W Q, et al. Presence and expression of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and its mRNA in rat pancreas[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2001, 172(1-2): 185-191.
- [4] Siler K, Theresa M, Grayson M, et al. Salmon GnRH and its analogues bind the human placental receptor[J]. Journal of the Society for Gynecologic Investigation, 2001, 8(4): 233-238.
- [5] Casan E M, Raga F, Bonilla M F, et al. Human oviductal gonadotropin releasing hormone: possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(4): 1377-1381.

(下转第 53 页)

- mutated beta-amyloid precursor protein metabolism: reversal by astrocytic cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271(1): 82-85
- [6] 游松, 姚新生, 陈英杰. 银杏的化学及药理研究进展[J]. *沈阳药学院学报*, 1998, 5(2): 142
- [7] McKenna D J, Jones K, Hughes K. Efficacy, safety, and use of *Ginkgo biloba* in clinical and preclinical applications[J]. *Altern Ther Health Med*, 2001, 7(5): 70-86
- [8] 宿宝贵, 许鹿希. 用水迷宫检测大鼠空间辨别性学习记忆的探讨[J]. *解剖学研究*, 1999, 21(1): 30-32
- [9] 陈建英, 张可伟, 徐誉泰, 等. 银杏叶提取物(EGb) 药理作用[J]. *中医药学报*, 1999(4): 36-38
- [10] Bartus R T, Dean R L, Beer B, et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction[J]. *Science*, 1982, 217: 408
- [11] 任非, 龚淑英. 银杏叶提取物治疗老年痴呆症[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(32): 166-168
- [12] Bon C L, Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation[J]. *J Neurosci*, 2003, 23: 1941-1948
- [13] Mollace V, Rodino P, Massoud R, et al. Age-dependent changes of NO synthase activity in rat brain[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 215: 822-827.
- [14] 李慧. 雌性大鼠去势前后海马结构内一氧化氮合酶阳性神经元的变化[D]. 山西太原: 山西医科大学, 2003
- [15] 郭开华, 徐杰, 袁群芳. 植物雌激素对去卵巢大鼠海马NOS阳性神经元及学习记忆的影响[J]. *解剖学杂志*, 2004, 27(4): 404-407.
- [16] 颜艳, 肖明, 丁炯, 等. 去势后大鼠海马结构一氧化氮合酶阳性神经元的变化[J]. *南京医科大学学报*, 2002, 22(1): 10-12

(上接第48页)

- [6] Jan Y N, Jan L Y, Kuffler S W. A peptide as a possible transmitter in sympathetic ganglia of the frog[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(3): 1501-1505
- [7] Dudas B, Mihaly A, Merchenthaler I, et al. Topography and associations of luteinizing hormone releasing hormone and neuropeptide Y immunoreactive neuronal systems in the human diencephalons[J]. *J Comp Neurol*, 2000, 427(4): 593-603
- [8] Maurer J A, Wray S L. Luteinizing hormone releasing hormone quantified in tissues and slice explant cultures of postnatal rat hypothalamus[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(2): 791-799
- [9] 谢启文. 现代神经内分泌学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 29-33
- [10] Wilson R C, Kesner J S, Kaufman J M, et al. Central electrophysiologic correlates of pulsatile in the rhesus monkey[J]. *Neuroendocrinology*, 1984, 39(3): 256-260
- [11] Wetsel W C, Valencia M M, Merchenthaler I, et al. Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(9): 4149-4153
- [12] 陈树林, 赵慧英, 孙志宏, 等. 青年奶山羊下丘脑催产素神经元分布特点[J]. *中国农学通报*, 2005, 21(1): 5-7.