

IFN- γ 在流产大鼠下丘脑的表达

曹 力,贾利云,乔海莲,郑小敏,许 勃,
司丽芳,张 燕,王根辈,范光丽

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了探讨下丘脑对妊娠的调节作用,采用免疫组织化学 SP 法研究了妊娠中期,正常妊娠大鼠及流产大鼠下丘脑内 IFN- γ 阳性神经元的形态与分布,同时利用图像分析软件测定了其灰度值。结果显示,正常妊娠大鼠和流产大鼠 IFN- γ 主要在下丘脑的视前大细胞核、室旁核、视上核、下丘脑前核等部位分布,而流产大鼠的 IFN- γ 阳性细胞数多于正常妊娠组且表达强于正常妊娠组。表明 IFN- γ 在下丘脑的表达对妊娠大鼠的神经内分泌调节有重要影响。

[关键词] 妊娠大鼠;下丘脑;IFN- γ ;免疫组化

[中图分类号] Q954.42

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0039-04

Expression of IFN- γ in hypothalamus from aborted rat

CAO Li, JIA Li-yun, QIAO Hai-lian, ZHENG Xiao-min, XU bo, SI Li-fang,
ZHANG Yan, WANG Gen-bei, FAN Guang-li

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

Abstract : To approach the regulation of hypothalamus on pregnancy, immunohistochemistry SP method was used to investigate the morphous and distribution of IFN- γ -positive-neurons in hypothalamus of normal or abortion rats ' during mid trimester of pregnancy. The gray scale value was also determined by using image analysis software. The results showed that IFN- γ -positive-neurons were distributed mainly in pre-opticus magno cellularis nucleus, paraventricular nucleus, supraoptic nucleus, anterior hypothalamic nucleus in both normal pregnancy and aborted rats ' hypothalamus. While the number of IFN- γ -positive-neuron in hypothalamus of aborted rats ' was larger than in normal pregnancy ones. IFN- γ was also expressed more strongly in aborted rats ' hypothalamus. It can be concluded that the expression of IFN- γ in hypothalamus plays an important role in neuroendocrine regulation during pregnancy.

Key words : pregnant rat; hypothalamus; IFN- γ ; immunohistochemistry

女性正常生殖功能依赖于下丘脑-垂体-卵巢轴的相互作用。有研究表明,细胞因子参与下丘脑-垂体-卵巢轴的调节^[1]。近年来,干扰素- γ (IFN- γ) 与生殖免疫的关系已成为生殖免疫学研究中普遍关注的问题。Haddad 等^[2]研究表明,IFN- γ 能够诱导子

宫蜕膜巨噬细胞活化,诱发 NO 等致流产物质,造成孕鼠流产;朱晓勇等^[3]报道妊娠第 9 天和第 14 天的小鼠,与正常妊娠组(CBA $\times$ BALB/c)相比,自然流产组(CBA $\times$ DBA/2)小鼠母胎界面 IFN- γ 的表达均显著升高;刘喆等^[4]研究发现,人重组 IFN- γ

* [收稿日期] 2006-06-13

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39670550,30070093);西北农林科技大学科技创新基金

[作者简介] 曹 力(1979-),男,甘肃靖远人,在读硕士,主要从事发育神经生物学研究。E-mail:xbcaoli@yahoo.com.cn

[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

(hrIFN- γ)能够抑制妊娠兔孕酮的分泌,导致胎盘细胞凋亡,并最终导致妊娠的终止。这些结果提示,IFN- γ 的过量表达不利于妊娠的维持。

目前,有关 IFN- γ 对生殖轴调控的研究主要集中在其对卵巢及母胎界面的作用上,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、内分泌等器官中的表达进行了研究^[5-7],而对 IFN- γ 在大鼠下丘脑的分布及其对下丘脑的调控作用报道较少。为了探讨大鼠下丘脑对妊娠的免疫调节作用,本试验应用免疫组化法对妊娠中期的正常妊娠及流产大鼠下丘脑内 IFN- γ 的分布情况进行了研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 健康、未产、质量为 220~260 g 的性成熟雌性 SD 大鼠,购于第四军医大学实验动物中心。

1.1.2 试验试剂与仪器 试验试剂主要有兔抗大鼠 IFN- γ 抗体(武汉博士德生物工程有限公司)、米非司酮片(上海华联制药厂)、免疫组化超敏 SP 试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)、牛血清白蛋白(华美生物工程有限公司)。试验仪器主要有 Leika9100 冰冻切片(德国 Leika 公司)和 Motic 生物显微镜(厦门 Motic 实业有限公司)。

1.2 米非司酮用量的确定

经预试验发现,每只孕鼠灌服 2 mg/mL 的米非司酮 1 mL,致流产效果较好,故将米非司酮的量定为 2 mg/只。

1.3 试验动物分组与处理

大鼠常规饲养 1 周后,做阴道涂片镜下观察,判断其是否发情。将发情期的雌鼠与公鼠以 1:1 合笼,于次日早晨进行阴道涂片,如果发现大量精子,则将该雌性大鼠作为妊娠第 1 天孕鼠。将孕鼠随机分为 2 组,每组 6 只,第 1 组为正常妊娠组,于妊娠第 10 和 11 天灌服生理盐水 1 mL;第 2 组为流产模型组,于妊娠第 10 和 11 天灌服米非司酮 1 mL。两组均于第 13 天腹腔注射水合氯醛(1.5 mL/只)进行麻醉,开胸,心脏灌注,先快速灌注生理盐水 250 mL,再缓慢灌注 4%多聚甲醛 250 mL,大鼠随即出现四肢抽搐,待身体僵硬后取其大脑,移入 4%多聚甲醛中后固定 48 h,做免疫组化染色。同时剖检大鼠子宫,观察其是否流产,判定条件为:流产胚胎体积变小,胎儿聚集在一块儿,子宫无明显结节状,颜

色暗红,内有淤血;而正常妊娠子宫呈粉红色,血管分布明显,胚胎个体大,无出血、淤血现象。

1.4 SD 大鼠脑组织切片的制备

将固定好的大鼠大脑组织放入 200 g/L 蔗糖溶液中,脱水至沉底。取组织做连续冰冻横切片,片厚 35 μ m。

1.5 免疫组化染色 采用 SP 法进行免疫组化染色,切片经 0.01 mol/L PBS 清洗后,依次进行下列各步处理:(1)加入过氧化酶阻断溶液,室温下孵育 1 h;(2)加入非免疫性动物血清,室温下孵育 1 h;(3)加入兔抗大鼠 IFN- γ 抗体(第一抗体),室温下孵育 1 h;(4)加入生物素标记的第二抗体,室温下孵育 1 h;(5)加入链霉素-过氧化物酶溶液,室温下孵育 40 min;(6)用 DAB 蓝色呈色法呈色 15~20 min,用双蒸水阻断显色反应。切片在 0.01 mol/L PBS 中漂洗后,置于 10 g/L 铬矾明胶中贴片。室温下自然干燥,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

在进行上述各步处理时,除第 2 步完成后漂洗 5 min 外,其他各步完成后均用 0.01 mL/L PBS (pH=7.4)漂洗 3 次,每次 5 min。第(3)步中第一抗体用含小牛血清白蛋白、0.01 mL/L PBS、质量分数 0.03%叠氮钠和质量分数 0.2% tritonX-100 的血清白蛋白稀释液稀释,与稀释液的体积比为 1:200。

阴性对照试验用抗体稀释液代替第一抗体,其余步骤同上。

1.6 图像分析与数据处理

应用江苏捷达 801 图像分析软件,在 10 倍视野下对下丘脑各核团 IFN- γ 阳性神经元染色结果进行图像分析,测量 IFN- γ 阳性神经元的平均灰度值并对阳性细胞计数。试验数据用“平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm S$)”表示,所有数据用 SPSS 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 SD 大鼠下丘脑中 IFN- γ 神经元的分布与形态

正常妊娠组和流产组大鼠均于视前大细胞核、室旁核、室周核、弓状核、视上核等部位分布有 IFN- γ 神经元,而其阴性对照未见阳性反应产物。两组大鼠表达的阳性神经元在形态上无明显差异,对其形态特点描述如下。

视前大细胞核 阳性神经元大而明显,着色深,

呈三角形、梭形和不规则形,其胞体、突起均着色,一些神经元中央不着色,而胞质着色较深(图 1)。

室旁核 外侧为突起长而明显的强阳性大神经元,呈梭形和多角形,突起粗大而长,颗粒丰富。内侧多见短梭形、卵圆形、圆形阳性神经元,其突起短小或看不到。

室周核 阳性神经元胞体为圆形、椭圆形,有神经元嵌于室管膜内,其突起深入第三脑室,同时还可

发现有触液神经元分布于第三脑室周边或嵌于室管膜(图 2)。

视上核 阳性神经元较为密集,呈内侧稍宽的带状分布于视交叉的外上方。阳性神经元为大型细胞,胞体呈圆形、椭圆形,染色深。

弓状核 位于下丘脑内侧基底部第三脑室两侧,阳性神经元呈圆形或不规则形。细胞着色不均匀。

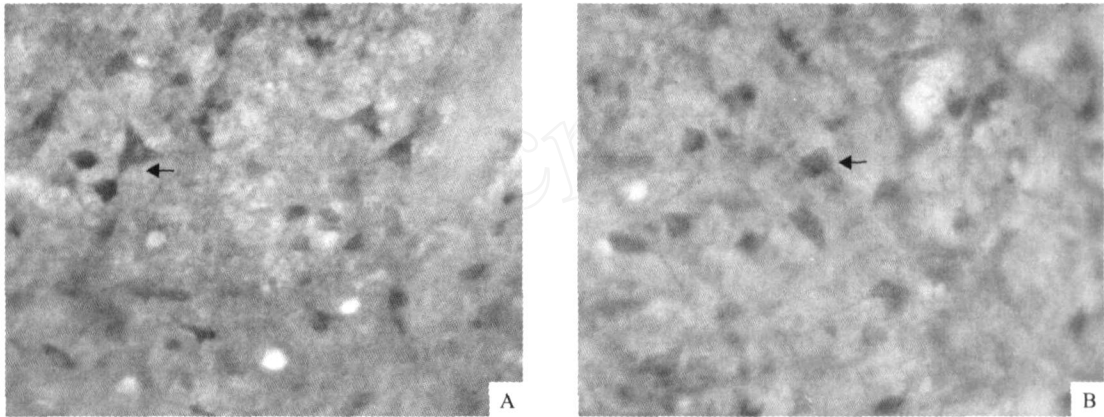


图 1 正常妊娠组和流产组大鼠的视前大细胞核($\times 400$)
A. 正常妊娠组;B. 流产组; $\leftarrow$ 示 IFN- γ 阳性神经元
Fig.1 Poma of normal pregnancy group and abortion group($\times 400$)
A. Normal pregnancy group;B. abortion group; $\leftarrow$ showing IFN- γ positive neurons

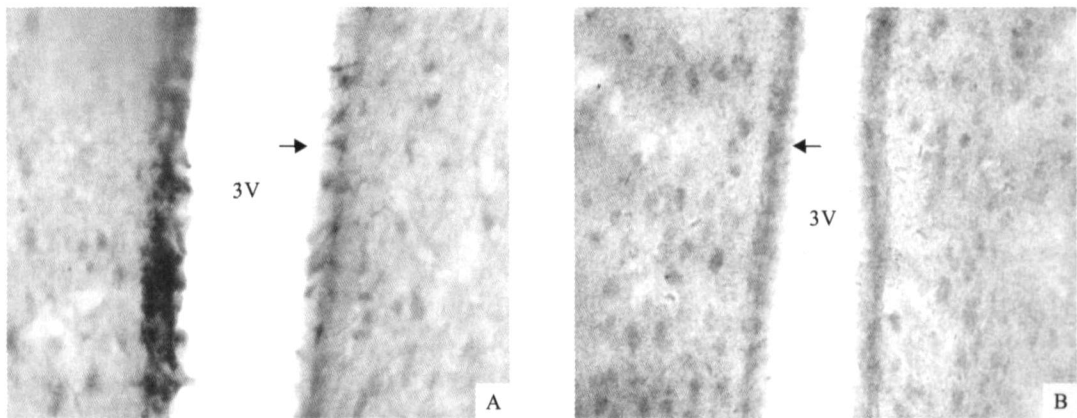


图 2 正常妊娠组和流产组大鼠的下丘脑室周核($\times 400$)
A. 正常妊娠组;B. 流产组;3v. 第三脑室; $\rightarrow$ 示触液神经元
Fig.2 HpV of normal pregnancy group and abortion group($\times 400$)
A. Normal pregnancy group;B. Abortion group;3v. Third ventricle; $\rightarrow$ showing positive Cerebrospinal fluid-contacting neurons

2.2 两组大鼠下丘脑各核团 IFN- γ 神经元计数与灰度值分析

表 1 结果表明,流产组大鼠的视前大细胞核、室旁核、室周核、视上核和弓状核等核团的 IFN- γ 阳

性神经元数目多于正常妊娠组,差异显著或极显著。灰度值分析结果表明,流产组 IFN- γ 在下丘脑内的表达强度明显高于正常妊娠组。

表 1 IFN-γ 阳性神经元数目与灰度值

Table 1 Number of IFN-γneurons and gray scale

核团名称 Name of nucleus	正常妊娠组 Normal pregnancy group		流产组 Abortion group	
	阳性细胞数 Number of cell	灰度值 Gray scale	阳性细胞数 Number of cell	灰度值 Gray scale
视前大细胞核 Pre-opticmagnocellularnucleus	65 ±10. 78	162. 77 ±4. 49	84. 33 ±6. 02 b	126. 79 ±5. 38 a
室旁核 Pararentricular nucleus	96. 67 ±6. 11	154. 58 ±7. 65	124. 33 ±8. 02 a	118. 29 ±3. 58 a
室周核 Periventriculars nucleus	21. 5 ±2. 38	102. 16 ±9. 44	32. 00 ±2. 94 b	67. 68 ±7. 46 a
视上核 Supraoptic nucleus	27. 67 ±1. 52	101. 22 ±3. 53	39. 33 ±2. 05 b	84. 36 ±3. 59 b
弓状核 Nucleus arcuatus	28. 50 ±3. 69	98. 73 ±3. 14	51. 5 ±5. 19 b	82. 91 ±3. 58

注:a表示与正常妊娠组比较差异极显著($P<0.01$);b表示与正常妊娠组比较差异显著($P<0.05$)。
Note: a stands for extremely significant difference ($P<0.01$) compared with normal pregnancy group;b stands for significant difference ($P<0.05$).

3 讨 论

越来越多的证据表明,细胞因子在下丘脑-垂体间有信号传递作用,下丘脑-垂体-卵巢轴的功能发挥,有赖于细胞因子在其中进行信息交流和传递^[8]。IFN-γ是妊娠过程中必需的一种细胞因子,关于IFN-γ在妊娠过程中的作用报道很多。曹咏清等^[9]发现,人重组IFN-γ对子宫蜕膜组织蛋白的合成呈抑制作用,给孕兔注射hrIFN-γ后胚胎着床率降低80%。翟向和等^[10]在研究苦楝皮对妊娠的毒性作用时发现,孕7 d小鼠灌服苦楝皮煎液后,子宫中IFN-γ的含量升高,并引起流产。外源注射超生理剂量的IFN-γ能造成孕鼠流产,并且能下调妊娠各个时期大鼠子宫和胎盘组织中TGF-βmRNA的表达^[11],表明IFN-γ和TGF-β可能有相互拮抗、制约的作用。大量研究表明,IFN-γ在母胎界面局部微环境中有调控作用^[12],而对其在妊娠过程中下丘脑的表达调控报道较少。Kiefer等报道,正常大鼠脑内下丘脑乳头体和中脑被盖有少量IFN-γ阳性产物^[13]。本试验结果显示,不论是正常妊娠还是流产大鼠,IFN-γ的阳性产物广泛分布于下丘脑中视前区、视上区及下丘脑外侧区的诸多核团,如视前大细胞核、室旁核、视上核、弓状核等,IFN-γ阳性产物的分布范围与Kiefer等^[13]报道的结果有所不同,这可能是妊娠状态下,下丘脑中需要启动更多的核团表达IFN-γ来调节妊娠。与正常妊娠相比,流产大鼠下丘脑中这些核团表达的IFN-γ阳性细胞数目增多、水平升高,说明下丘脑内表达的IFN-γ对正常妊娠的维持有重要调解作用。

另外,本试验还观察到,正常妊娠组在第三脑室

室管膜内有IFN-γ阳性“触液神经元”^[14],其胞体与突起嵌入室管膜上皮内,另有一些神经元距室管膜有一定距离,但有突起伸入室管膜,说明这类神经元与脑脊液关系密切。由于脑脊液与脑组织之间不存在血脑屏障,可经过非突触方式发挥信息传递作用^[15]。提示IFN-γ阳性触液神经元可能在脑与脑脊液、神经体液信息传递回路中起中介作用。推测其信息交换方式包括接受与分泌两个方面:一方面能感受脑室周围及脑脊液中化学成分的变化;另一方面可释放IFN-γ至脑室及周围的神经组织,对邻近细胞发挥调节作用或影响垂体功能变化。

[参考文献]

[1] Karagouni E E, Chryssikopoulos A, Mantzavinos T, et al. Interleukin1 beta and interleukin1alpha may affect the implantation rate of patients undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer[J]. Fertilsteril, 1998, 70(3): 553-559.

[2] Haddad E K, Duclos A J, Anteck A. Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss[J]. Cell Immunol, 1997, 181(1): 68-75.

[3] 朱晓勇, 李大金, 孙晓溪. 正常妊娠与自然流产小鼠模型母胎界面细胞因子表达特征比较[J]. 生殖医学杂志, 2003, 12(5): 283-287.

[4] 刘喆, 杨颖, 陈云, 等. 人重组γ干扰素对兔妊娠的影响[J]. 动物学报, 2002, 48(2): 277-280.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 胡格吉乐图, 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.

(下转第 47 页)

cells stimulated to divide *in vitro*[J]. Journal of Endocrinology,2000,166:103.

[4] Homayoun V, Samuel B. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life-span[J]. Current Biology, 1998, 8 (5) : 279-282.

[5] Funk W D, Wang C K, Shelton D N, et al. Telomerase expression restores dermal integrity to vitro-aged fibroblasts in a reconstituted skin model[J]. Exp Cell Res, 2000, 258 (2) : 270-278.

[6] Fiedler W, Reinicke D, Aurich H, et al. *In Vitro* Immortalisation of Porcine hepatocytes by transfection with the gene for the human catalytic subunit of telomerase reverse transcriptase (hTERT) [J]. Journal of Hepatology, 2004, 40(1) :102.

[7] Xiang H, Wang J, Mao Y W, et al. hTERT can function with rabbit telomerase RNA :regulation of gene expression and attenuation of apoptosis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 278 :503-510.

[8] 阮承迈,陈守义,吴东林,等. 端粒酶活性在哺乳动物细胞中的表达[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(1) :66-68.

[9] 孙继虎,汪 洋,于彦铮,等. 血管内皮细胞的体外培养及形态学观察[J]. 解剖学杂志, 1996, 19(3) :261-263.

[10] 杨娜娜,王 娟,杜立新,等. 细胞永生化的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2005, 32(1) :37-39.

[11] Shay J W, Van Der Haegen B A, Ying Y. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen[J]. Exp Cell Res, 1993, 209(1) :45-57.

[12] Toouli C D, Huschtscha L I, Neumann A A. Comparison of human mammary epithelial cell immortalized by simian virus 40 T antigen or by the telomerase catalytic subunit[J]. Oncogene, 2002, 21(1) :128-139.

[13] Thomas M, Suwa T, Yang L. Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis :a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells[J]. Neoplasia, 2002, 4(6) :493-500.

(上接第 42 页)

[8] 谢启文. 现代神经内分泌学[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1999 :246-247.

[9] 曹咏清,孙德明,陈幼珍,等. 人重组 γ -干扰素抗生育效应及其机理研究[J]. 生殖医学杂志, 1999, 8(2) :98-102.

[10] 翟向和,宫新城,李清艳,等. 苦楝皮妊娠毒性作用及对妊娠早期小鼠子宫 NK、IFN- γ 和 TNF- α 含量的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(7) :747-750.

[11] 刘美玲,彭景梗,孙泉红,等. 妊娠大鼠子宫和胎盘 TGF- β 1 的表达及 IFN- γ 对其的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(5) :413-420.

[12] 孙泉红,彭景梗. 干扰素- γ 对母胎界面免疫调控的影响[J]. 自然科学进展, 2005, 16(2) :129-134.

[13] Kiefer R, Keutzbeg G W. Gamma interferon like immunoreactivity in the rat nervous system[J]. Neurosci, 1991, 37(3) : 725-732.

[14] 肖 明,丁 炯,左国平,等. 一氧化氮合酶神经元在大鼠下丘脑中的分布观察[J]. 南京医科大学学报, 2001, 21(5) :220-223.

[15] Kaehler S T, Singewald N, Sinner C, et al Nitricoxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus[J]. Brain Research, 1999, 835(2) :346-349.