

流产大鼠下丘脑 TNF- α 的分布及变化

贾利云¹,周宏超¹,李文献²,曹 力¹,司丽芳¹,范光丽¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院 神经生物学教研室,陕西 杨凌 712100;2 河南省乳品工程技术研究中心,河南 郑州 450008)

[摘 要] 为了探讨流产大鼠下丘脑核团肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)的分布及变化,将 12 只孕 SD 大鼠随机分为流产组和妊娠组。流产组在妊娠第 10,11 天灌服米非司酮(RU486)3.75 mg/kg,妊娠组在妊娠第 10,11 天灌服等量生理盐水,所有大鼠均于妊娠第 13 天灌注取材。采用免疫组织化学 SP 法,对各组大鼠下丘脑 TNF- α 阳性细胞进行观察,探讨 TNF- α 在流产大鼠下丘脑的分布及变化。结果表明,妊娠组和流产组大鼠下丘脑视前大细胞核、视上核、室旁核、下丘脑室周核、弓状核均有 TNF- α 阳性细胞;与妊娠组相比,流产组大鼠各核团阳性细胞数量均极显著增加($P < 0.01$),灰度值均降低,除视前大细胞核外,均有极显著差异($P < 0.01$)。除以上核团外,流产组大鼠视交叉上核也有较多 TNF- α 阳性细胞。结果表明流产大鼠下丘脑核团 TNF- α 分布及变化较妊娠大鼠增强。

[关键词] TNF- α ;流产;免疫组织化学;下丘脑;大鼠

[中图分类号] R338;Q579.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)11-0029-04

Location and variation of TNF- α in hypothalamus of abortion rats

JIA Li-yun¹,ZHOU Hong-chao¹,LI WEN-xian²,CAO Li¹,SI Li-fang¹,FAN Guang-li¹

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

2 Research Center for Dairy Engineering Technology, Zhengzhou, Henan 450008, China)

Abstract : In order to investigate the location and variation of TNF- α in hypothalamus of abortion rats, twelve pregnant SD rats were divided into 2 groups randomly. One was abortion group, and the other was pregnancy group. Rats in abortion group were given RU486 3.75 mg/kg at 10th, and 11th pregnant day, while pregnancy group were only treated with 0.9% NaCl. All rats were affused at 13 th pregnant day. In order to study the location and variation of tumor necrosis factor α (TNF- α) in the hypothalamus of abortion rats, immunochemistry SP was used to detect the positive TNF- α cells. The result were as follows: TNF- α positive cells could be found in nucleus pre-opticus magno cellularis (poma), nucleus supra-opticus (so), nucleus periventricularis hypothalami (hvp), nucleus arcuatus hypothalami (ar) and nucleus paraventricularis hypothalami (pvn) in both two groups; compared with pregnancy group, amounts of TNF- α cells in above nucleuses of abortion group obviously increased, while gray scales were significantly decreased except poma. Besides, nucleus pre-opticus suprachiasmaticus (posc) also expressed TNF- α in abortion group. The results indicated that the expression of TNF- α in hypothalamus of abortion rats would increase.

Key words : TNF- α ; abortion; immunochemistry; hypothalamus; rats

下丘脑 - 垂体 - 性腺轴对动物整个生殖活动以及种族延续具有重要作用,下丘脑分泌的各种促垂

体激素以及神经肽均可通过这一轴系调控生殖,包括性分化、性成熟、性行为、妊娠等。肿瘤坏死因子

† 收稿日期: 2006-09-30

[基金项目] 西北农林科技大学科技创新基金项目

[作者简介] 贾利云(1982-),女,山西太谷人,在读硕士,主要从事发育神经生物学研究。E-mail: liyunjia1982@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

α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 是 T 辅助细胞 1 型(Th1) 重要的细胞因子之一^[1], 它在妊娠生理及病理现象中的作用已成为研究的热点。陆杉等^[2]报道, 孕妇体内适量的 TNF- α 能促进分解代谢, 胎儿体内的 TNF- α 与胚胎细胞增殖、分裂和免疫保护等重要作用相关, 但妊娠期异常分泌大量的 TNF- α 可能损害胎儿生长, 引起流产和早产。刘薇等^[3]通过对药物流产前后血清 TNF- α 的变化和细胞凋亡现象的观察发现, 药物流产后患者的 TNF- α 水平明显升高, 药物流产组蜕膜、绒毛细胞显示凋亡倾向。胡昌东等^[4]通过观察中药治疗溴隐亭致大鼠流产模型中内分泌对蜕膜 TNF- α 的影响发现, 溴隐亭致 SD 大鼠流产模型中孕酮受体(PR) 表达下降介导 TNF- α 表达异常升高, 减弱母胎免疫耐受, 而中药治疗自然流产模型可使 TNF- α 表达降低, 起到维持早孕的作用。但以上这些研究均集中在外周器官, 而对 TNF- α 在下丘脑的分布及其与流产的关系尚未见报道。本研究采用米非司酮(RU486) 建立 SD 大鼠流产模型, 探讨 TNF- α 免疫阳性细胞在下丘脑的分布及变化, 以期阐明流产过程中 TNF- α 在中枢神经系统的变化规律提供形态学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 雌性 SD 大鼠 12 只及 6 只供交配的雄性 SD 大鼠, 均由第四军医大学动物研究中心提供, 雌鼠质量为 220 ~ 250 g。

1.1.2 主要试剂与仪器 兔抗大鼠 TNF- α 多克隆抗体, 武汉博士德生物工程有限公司生产; RU486, 上海华联制药有限公司生产; 免疫组化 SP 试剂盒, 福州迈新生物技术开发公司产品; 葡萄糖氧化酶和四盐酸 3,3'-二氨基联苯胺(DAB), Sigma 公司产品; Leika1900 冰冻切片机, 德国 Leika 公司生产; Motic 生物显微镜, 厦门 Motic 实业有限公司生产。

1.2 SD 大鼠流产模型的建立与下丘脑切片的制备

每日给雌鼠做阴道涂片, 发现有许多无核角化上皮细胞者则处于发情期, 与雄鼠合笼, 次日早晨 8:00 做阴道涂片, 发现有大量精子者确定为妊娠第 1 天。孕鼠随机分为流产组和妊娠组, 每组 6 只。流产组于妊娠第 10, 11 天灌服 RU486 3.75 mg/kg^[5]; 妊娠组在妊娠第 10, 11 天灌服等量生理盐水。所有大鼠均于妊娠第 13 天用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 剖开腹腔观察妊娠结果, 然后按常规免疫组织化学方法灌注, 取出下丘脑, 于 40 g/L 多聚甲醛溶液

中后固定 10 h, 然后移入 200 g/L 蔗糖 PB 液中, 在 4 °C 过夜, 待沉底后, 在冰冻切片机上作连续冠状切片, 片厚 35 μ m, 隔 2 取 1。切片收集在 0.01 mol/L PBS(pH 7.4) 溶液中, 分两套, 一套用于 SP 法免疫组织化学反应, 一套用于阴性对照。

1.3 SD 大鼠下丘脑切片免疫组织化学 SP 法染色

按免疫组化 SP 试剂盒说明进行, 其中兔抗大鼠 TNF- α 多克隆抗体工作浓度为 1 : 200, 切片用 DAB 呈色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 镜检。核团定位参照文献[6]。阴性对照试验用 PBS 代替抗体。将切片在 Motic 生物显微镜下拍照, 用江苏捷达 801 形态分析软件对阳性细胞数及灰度值进行检测。

1.4 数据统计分析

试验结果以“平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm s$)”表示, 用 SPSS 13.0 对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 SD 大鼠胚胎及子宫的眼观变化

观察发现, 流产组大鼠胚胎紫黑, 变小, 或胚胎消失, 子宫呈竹节状, 宫腔淤血, 阴道出血; 妊娠组大鼠胚胎粉红, 未见异常, 子宫粗大如串珠状, 阴道无出血症状。

2.2 SD 大鼠下丘脑 TNF- α 的表达

(1) TNF- α 阳性细胞呈蓝黑色, 染色不均匀, 分布于胞浆、胞膜或突起。妊娠组和流产组大鼠下丘脑视前大细胞核、视上核、室旁核、下丘脑室周核、弓状核均有阳性细胞分布。

(2) 视前大细胞核(nucleus pre-opticus magnocellularis, poma): 流产组大鼠阳性细胞数量多, 胞体大, 突起多, 呈梭形、三角形或多角形, 着色深, 几乎整个胞体着色; 妊娠组大鼠阳性细胞数量少, 有些仅胞膜着色, 胞浆未着色, 呈空泡状。

(3) 视上核(nucleus supra-opticus, so): 流产组大鼠阳性细胞数量多, 呈梭形或多角形, 突起少, 深染; 妊娠组阳性细胞数量少, 染色浅(图版 A、B)。

(4) 室旁核(nucleus paraventricularis hypothalami, pvn): 两组大鼠核团形状均呈楔形, 外侧细胞较大, 内侧细胞较小; 妊娠组阳性细胞数量少, 着色浅; 流产组阳性细胞数量多, 着色深, 靠近第三脑室处有多极形或梨形细胞(图版 C、D)。

(5) 下丘脑室周核(nucleus periventricularis hypothalami, hpv): 两组大鼠核团细胞均为梭形, 整个核团形状呈带状; 妊娠组阳性细胞数量少且浅染;

流产组阳性细胞数量多,深染,靠近第三脑室处有梨形细胞,突起伸向第三脑室。

数量均极显著增加($P < 0.01$),灰度值均降低,除视前大细胞核外,均有极显著差异($P < 0.01$)(表 1)。

(6) 弓状核(nucleus arcuatus hypothalami,ar) : 妊娠组大鼠阳性细胞数量少,浅染,其中有许多阳性胶质细胞;流产组阳性细胞数量多,小且密集,深染(图版 E、F)。

(8) 除以上核团外,流产组大鼠视交叉上核(nucleus pre-opticus suprachiasmaticus, posc)也有较多的 TNF- α 阳性细胞。

(7) 与妊娠组相比,流产组大鼠各核团阳性细胞

胞。

(9) 阴性对照试验切片背景为蓝色,无阳性细胞。

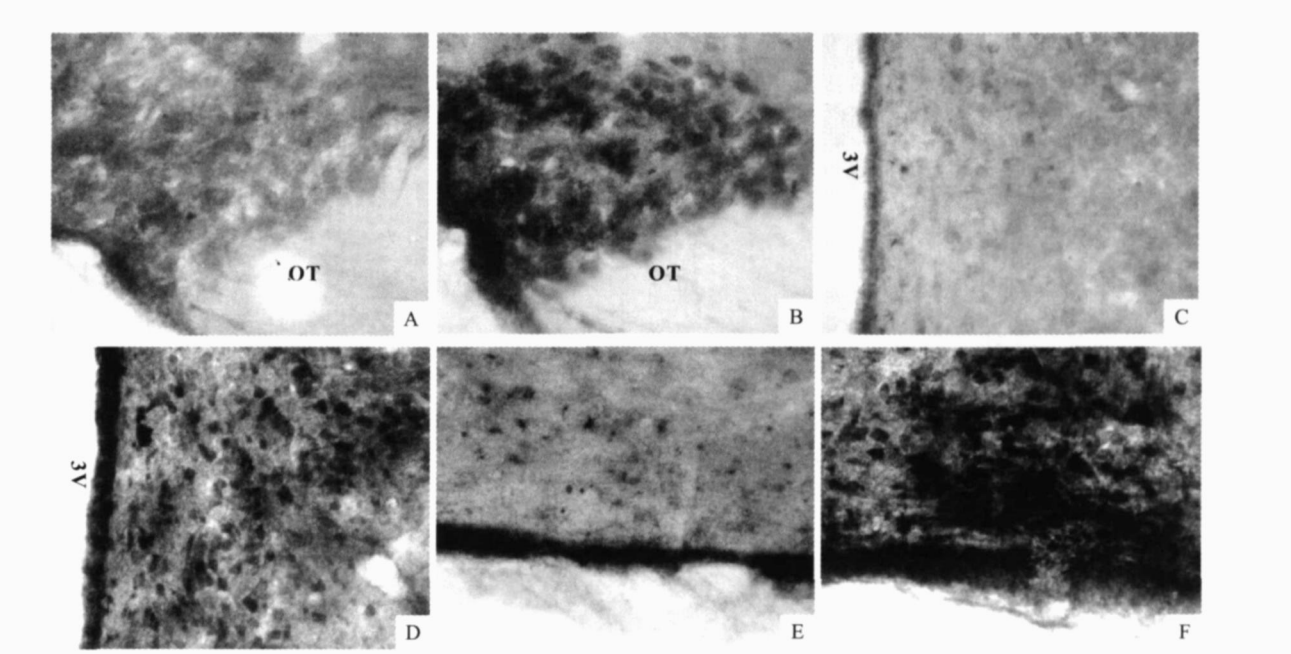
表 1 SD 大鼠下丘脑 TNF- α 神经元灰度值及阳性细胞数

Table 1 Gray scale and number of TNF- α cells in hypothalamus of SD rats

核团 Nucleus	流产组 Abortion group		妊娠组 Pregnancy group	
	灰度值 Gray scale	阳性细胞数 Number of positive cells	灰度值 Gray scale	阳性细胞数 Number of positive cells
视前大细胞核 Poma	164.8 $\pm$ 5.39	111.3 $\pm$ 3.40 **	178.9 $\pm$ 6.36	86.3 $\pm$ 6.92
视上核 So	112.5 $\pm$ 13.93 **	94.7 $\pm$ 4.51 **	191.1 $\pm$ 5.30	58.3 $\pm$ 3.86
室旁核 Pvn	138.3 $\pm$ 9.33 **	197.6 $\pm$ 7.54 **	169.3 $\pm$ 2.11	107.5 $\pm$ 3.54
下丘脑室周核 Hpv	141.1 $\pm$ 11.18 **	152.2 $\pm$ 3.31 **	167.4 $\pm$ 3.31	79.7 $\pm$ 4.51
弓状核 Ar	117.4 $\pm$ 8.43 **	135.8 $\pm$ 5.62 **	166.7 $\pm$ 3.01	69.4 $\pm$ 4.62

注: ** 表示与妊娠组相比差异极显著($P < 0.01$)。

Note: ** Means obviously significant difference ($P < 0.01$) compared with control group.



图版 SD 大鼠下丘脑 TNF- α 阳性细胞 ($\times 400$)

A. 妊娠组视上核;B. 流产组视上核;C. 妊娠组室旁核;D. 流产组室旁核;E. 妊娠组弓状核;F. 流产组弓状核;OT. 视束;3V. 第三脑室

Plate Positive cells of TNF- α in hypothalamus of SD rats ($\times 400$)

A. So of pregnancy group ;B. So of abortion group ;C. Pvn of pregnancy group ;D. Pvn of abortion group ;

E. Ar of pregnancy group ;F. Ar of abortion group ;OT. Optic tract ;3V. Third ventricle

3 讨 论

本研究发现,妊娠组和流产组大鼠下丘脑视前大细胞核、视上核、室旁核、下丘脑室周核、弓状核等核团均有 TNF- α 阳性细胞,流产组除以上核团外,视交叉上核也有较多 TNF- α 阳性细胞。两组相应核团 TNF- α 表达程度不同,阳性细胞数和灰度值均

存在差异。

Cearley 等^[7]报道,TNF- α mRNA 在正常大鼠脑内的表达随昼夜变化而变化,TNF- α 在脑中具有重要的生理作用;关洪平等^[8]报道,TNF- α 经中枢给药可刺激大鼠垂体释放催乳素(PRL)。本研究发现,正常孕鼠下丘脑中有少量 TNF- α 分布,原因可能是:生理剂量的 TNF- α 促进垂体释放 PRL ,PRL

可促进黄体细胞发育,调节卵巢功能,有利于妊娠维持。许多研究证实,自然流产或药物流产后母体卵巢、子宫、蜕膜、胎盘等器官内的 $\text{TNF-}\alpha$ 表达增高。在本研究中,流产组大鼠视前大细胞核、视上核、室旁核、下丘脑室周核、弓状核、视交叉上核等处阳性细胞数量增多,着色加深,与妊娠组比较差异显著。这些核团中 $\text{TNF-}\alpha$ 高表达的原因可能是:RU486 是糖皮质激素(GC)受体拮抗剂^[9],可阻断脑中内源 GC 的作用,生理剂量的 GC 可以抑制脑中 $\text{TNF-}\alpha$ 表达^[10],GC 作用被阻断,导致 $\text{TNF-}\alpha$ 分泌增强,这些核团可通过与垂体间的联系将 $\text{TNF-}\alpha$ 释放入垂体,干扰垂体激素正常分泌,导致流产;庄笑梅等^[11]报道, $\text{TNF-}\alpha$ 对生殖轴有调节作用,其在腺垂体及卵巢水平上同时发挥作用,抑制 P 合成,由此推断,下丘脑核团分泌的 $\text{TNF-}\alpha$ 可能通过垂体抑制 P 分泌导致流产。

本研究还发现,在下丘脑室周区存在一些阳性梨形细胞,有些胞体嵌入室管膜中,有些突起伸向第三脑室,推测其信息交换方式包括接受与分泌两个方面,一是感受脑脊液与周围环境中化学成分变化;二是分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 进入脑室,对其邻近细胞发挥调节作用。

上述核团中有些含有分泌生殖激素的神经元,如弓状核含有促性腺激素释放激素(GnRH)神经元;视上核、室旁核含有一氧化氮合酶(NOS)、催产素(OT)以及加压素(VP)神经元;下丘脑室周核含有生长抑素(SOM)神经元等^[12], $\text{TNF-}\alpha$ 在以上核团中是否与这些激素共存,在流产发生时与这些激素间是否存在复杂的相互作用还有待于进一步探

讨。

[参考文献]

- [1] 赵宏伟,田秀珠,成要平,等. Th1/ Th2 细胞因子在妊高征患者胎盘组织中的表达[J]. 现代妇产科进展,2004,13(5):368-370.
- [2] 陆杉,李红发. 肿瘤坏死因子 α 与生殖调节[J]. 国外医学妇产科学分册,2001,28(2):87-89.
- [3] 刘薇,王育华,刘明,等. 药物流产前后血清 $\text{TNF-}\alpha$ 的变化和细胞凋亡现象的观察[J]. 山东大学学报,2004,40(2):154-156.
- [4] 胡昌东,归绥琪,陆利民,等. 中药治疗溴隐亭致大鼠流产模型中内分泌对蜕膜 $\text{TNF-}\alpha$ 、Fas 的影响[J]. 中华中医药杂志,2005,20(1):36-39.
- [5] 张铭. 助孕 3 号方对脾虚黄体抑制动物流产模型的作用[J]. 广州中医药大学学报,2000,17(1):64-68.
- [6] 王平宇. 大白鼠中枢神经系统解剖学基础[M]. 北京:人民卫生出版社,1986:91-94;167-176.
- [7] Cearley C,Churchill L,Krueger J M. Time of day differences in IL1beta and TNF alpha mRNA levels in specific regions of the rat brain[J]. Neurosci Lett,2003,352(1):61-63.
- [8] 关洪平,李树新,库宝善. 肿瘤坏死因子 α 与中枢神经系统[J]. 生理科学进展,1998,29(1):55-58.
- [9] Sylvain N,Serge R. Glucocorticoids play a fundamental role in protecting the brain during innate immune response[J]. The Journal of Neuroscience,2003,23(13):5536-5544.
- [10] Mac P A,Dinkel K,Sapolsky R. Glucocorticoids worsen excitotoxin-induced expression of pro-inflammatory cytokines in hippocampal cultures[J]. Exp Neurol,2005,194(2):376-383.
- [11] 庄笑梅,姜恩魁,冯俐. $\text{TNF-}\alpha$ 对雌性大鼠生殖轴调控作用的研究[J]. 锦州医学院学报,2003,24(4):5-9.
- [12] 李继硕. 神经科学基础[M]. 北京:高等教育出版社,2002:302-311.