

DOI:CNKI:61-1390/S.20111021.1703.004

网络出版时间:2011-10-21 17:03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111021.1703.004.html>

怀孕期山羊腺垂体中 IFN- α 和 IFN- γ 的表达研究

何 强,吕颜枝,赵慧英,耿阳雪,熊东升,蒋振兴,胡鹏翔,杨 爽

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究 α -干扰素(IFN- α)和 γ -干扰素(IFN- γ)在怀孕前期(怀孕 1~30 d)、中期(怀孕 31~120 d)、后期(怀孕 121~150 d)山羊腺垂体中的分布及表达量的变化特点。**【方法】**以怀孕前、中、后期的山羊为试验动物,放血致死采取其腺垂体制备切片,采用免疫组织化学 SP 法分别对怀孕前、中、后期山羊腺垂体内 IFN- α 、IFN- γ 阳性细胞的分布及表达变化进行研究。**【结果】**2 种干扰素阳性物质主要分布于腺垂体嗜酸性细胞、嗜碱性细胞和嫌色细胞中。不同怀孕期,IFN- α 和 IFN- γ 的分布存在明显差异,前期和后期表达量较高,中期明显降低;在前、中、后各个怀孕时期,IFN- α 的相对表达量均比 IFN- γ 多,在后期更为明显。**【结论】**IFN- α 和 IFN- γ 在山羊腺垂体中的表达量因怀孕时期的不同而存在明显差异,其可能在不同怀孕时期发挥作用或相互协同调节垂体激素的合成与分泌,参与动物生殖的调节。

【关键词】 怀孕期;腺垂体;IFN- α ;IFN- γ ;免疫组化;山羊

【中图分类号】 S852.13

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)11-0007-05

Research on interferon- α and interferon- γ in adenohypophysis of goat at different gestation periods

HE Qiang, LÜ Yan-zhi, ZHAO Hui-ying, GENG Yang-xue, XIONG Dong-sheng,
JIANG Zhen-xing, HU Peng-xiang, YANG Shuang

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The research was made to study the expression characteristic of interferon- α (IFN- α) and interferon- γ (IFN- γ) in adenohypophysis of goat at different gestation periods. **【Method】** The adenohypophysis of goats in prophase, metaphase and anaphase of gestation period were made to slices respectively. Then immunochemistry SP method was used to investigate the distribution of IFN- α and IFN- γ positive cells in these adenohypophysis. **【Result】** IFN- α and IFN- γ positive cells were mainly located in the acidophilic cells, basicyte and chromophobe cells of adenohypophysis, and significant difference existed at different gestation periods. The distribution of IFN- α and IFN- γ ascended in prophase and anaphase of gestation period, but declined in metaphase. The relative expression quantity of IFN- γ positive cells was less than that of IFN- α during the whole gestation periods, especially in anaphase. **【Conclusion】** The distribution and relative expression quantity of IFN- α and IFN- γ had significant difference in adenohypophysis of goat at different gestation periods. IFN- α and IFN- γ may regulate the reproduction function of goat through regulating the secretion of hypophyseal hormones alone or common.

Key words: gestation period; adenohypophysis; IFN- α ; IFN- γ ; immunochemistry SP; goat

干扰素(IFN)是细胞对相关刺激所产生的细胞 信号蛋白质,是细胞因子超家族中一个糖蛋白类同

* [收稿日期] 2011-04-21

[基金项目] 抗病转基因牛新品种选育重点专项(2009ZX08007-008B);西北农林科技大学国家级动物科学实验教学示范中心项目

[作者简介] 何 强(1984—),男,甘肃定西人,在读硕士,主要从事动物神经免疫内分泌调控研究。E-mail: heq1129@qq.com

[通信作者] 赵慧英(1966—),女,陕西韩城人,教授,主要从事动物神经免疫内分泌调控研究。E-mail: ylzhaohy@yahoo.com.cn

源细胞因子家族,即 IFN 家族。目前,IFN 与神经内分泌系统的关系已逐渐引起人们的重视,研究发现,IFN 在下丘脑-垂体-性腺轴(HPG 轴)中通过自分泌或旁分泌的方式参与靶器官免疫过程的神经调节,影响机体的神经内分泌功能^[1],并作为一种新的神经肽和有效的神经调质,参与靶器官免疫过程的神经调控^[2]。垂体是 HPG 轴中非常重要的神经内分泌器官,能够分泌多种激素,这些激素与多种细胞因子间能够互相协调参与机体的生理调节作用^[3],如 γ -干扰素(IFN- γ)对垂体前叶内激素合成和分泌会产生影响^[4],参与调节动物的生殖功能,高剂量 IFN- γ 具有抗生育作用^[5]。IFN- γ 也有参与妊娠子宫内膜基质细胞的蜕膜化并维持妊娠的作用^[6]。另有报道, α -干扰素(IFN- α)在垂体前叶细胞中也有分布^[7],能够参与调节垂体激素分泌与合成^[8],抑制小鼠 AtT-20 垂体瘤细胞前阿黑皮素基因的表达^[9]。IFN- α 受体在人垂体腺瘤中有表达^[10],对大多数垂体生长激素腺瘤细胞的分泌作用有抑制效应^[11]。本课题组前期对 IFN- γ 在山羊 HPG 轴的定位进行了较深入的研究^[12-15],但对 IFN- α 和 IFN- γ 在垂体中表达的关系及其与妊娠维持的关系尚不清楚。为此,本试验用免疫组织化学 SP 法对怀孕期山羊腺垂体中 IFN- α 和 IFN- γ 的分布、共存情况进行研究,以期对 IFN 参与垂体内分泌功能调节的机理研究积累形态学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 妊娠前期(怀孕 1~30 d)、中期(怀孕 31~120 d)、后期(怀孕 121~150 d)山羊各 5 只,均购自陕西杨凌农户。

1.1.2 试剂与仪器 Rabbit anti-SP 免疫组化试剂盒购自福州迈新公司;Rabbit anti IFN- α 和 IFN- γ 多克隆抗体购自北京博奥森公司;DAB 和葡萄糖氧化酶购自美国 Sigma 公司;柠檬酸盐缓冲液购自福州迈新生物有限公司。石蜡切片机,德国 LEICA 公司制造;Motic 数码显微镜(Motic 实业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 组织采集与固定 将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 pH7.4 磷酸盐缓冲液 600~800 mL,先快后慢,最后开颅取出腺垂体,放入固定液后固定 10~12 h,包埋,用石蜡切片机对包埋组织

块做连续切片,片厚 5 μ m。试验共制备 3 组切片,第 1 组做 HE 染色,确认细胞;第 2 组和第 3 组分别进行 IFN- α 和 IFN- γ 的免疫组织化学 SP 法染色。

1.2.2 IFN- α 和 IFN- γ 的组织切片 SP 染色 将切片脱蜡复水后置 0.01 mol/L pH 6.0 柠檬酸缓冲液中微波抗原修复 20 min,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗 5 min 之后用 SP 免疫组化试剂盒进行染色,具体步骤如下:(1)用过氧化酶阻断溶液(试剂 A)于室温下孵育 20 min;(2)用非免疫性动物血清(试剂 B)室温下孵育 20 min;(3)加兔抗 IFN- γ 、IFN- α 抗体(1:200 倍释释),4℃冰箱过夜;(4)加生物素标记的第 2 抗体(试剂 C,兔源),室温下孵育 15 min;(5)加链亲和素-过氧化物酶溶液(试剂 D),室温下孵育 15 min。以上各步骤之间均用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗 3 次,每次 5 min。最后用葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍铵蓝色液呈色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.3 切片的拍照及统计学分析 对封片后的切片用 Motic 数码显微照相系统照像,然后用江苏捷达 801 形态分析软件计算平均光密度和阳性面积,并计算相对表达量 μ^2 : $\mu^2 = (\text{光镜倍数} \times \text{平均光密度} \times \text{阳性面积})/x$,其中 x 表示像素,本试验取值为 $1\,024 \times 768$,最后对计算的相对表达量均值进行数据统计。数据以“平均值 $\pm$ 标准差”的形式表示;应用 DPS 数据分析软件进行统计分析,采用 t 检验比较各组 IFN- α 和 IFN- γ 表达量的差异。

2 结果与分析

2.1 IFN- α 和 IFN- γ 在怀孕各期山羊腺垂体中的定位

2.1.1 IFN- α 在腺垂体中的定位 IFN- α 在腺垂体嗜酸性细胞、嗜碱性细胞和嫌色细胞中均有分布,阳性产物主要存在于细胞质和细胞膜,有少量胞核着色,胞核呈空泡状居于胞体中央,细胞轮廓清楚;阳性细胞多为圆形或椭圆形,局部也可见多形态细胞,呈颗粒状、三角形、梭形等;阳性细胞在腺垂体结节部和远侧部分布较多,呈强阳性表达,靠近垂体柄一侧可见有较多的嫌色细胞分布,中间部阳性细胞分布较少。怀孕前期,腺垂体分布有大量的 IFN- α 阳性细胞,尤其在远侧部和结节部靠近垂体柄的区域着色较深,细胞形态各异且可见很多的着色颗粒充满整个细胞(图 1-A)。怀孕中期,在腺垂体柄一侧有少量淡染的纤维状 IFN- α 免疫阳性物质,可见明显的阳性细胞聚集表达区域,也有较少着色颗粒

散在(图 1-B)。与前期和中期相比较,怀孕后期腺垂体中可见较多椭圆形或梭形细胞;IFN- α 在结节

部管壁周围呈强阳性表达,并沿着分泌管道密集存在,腺细胞周围可见较多的阳性颗粒物(图 1-C)。

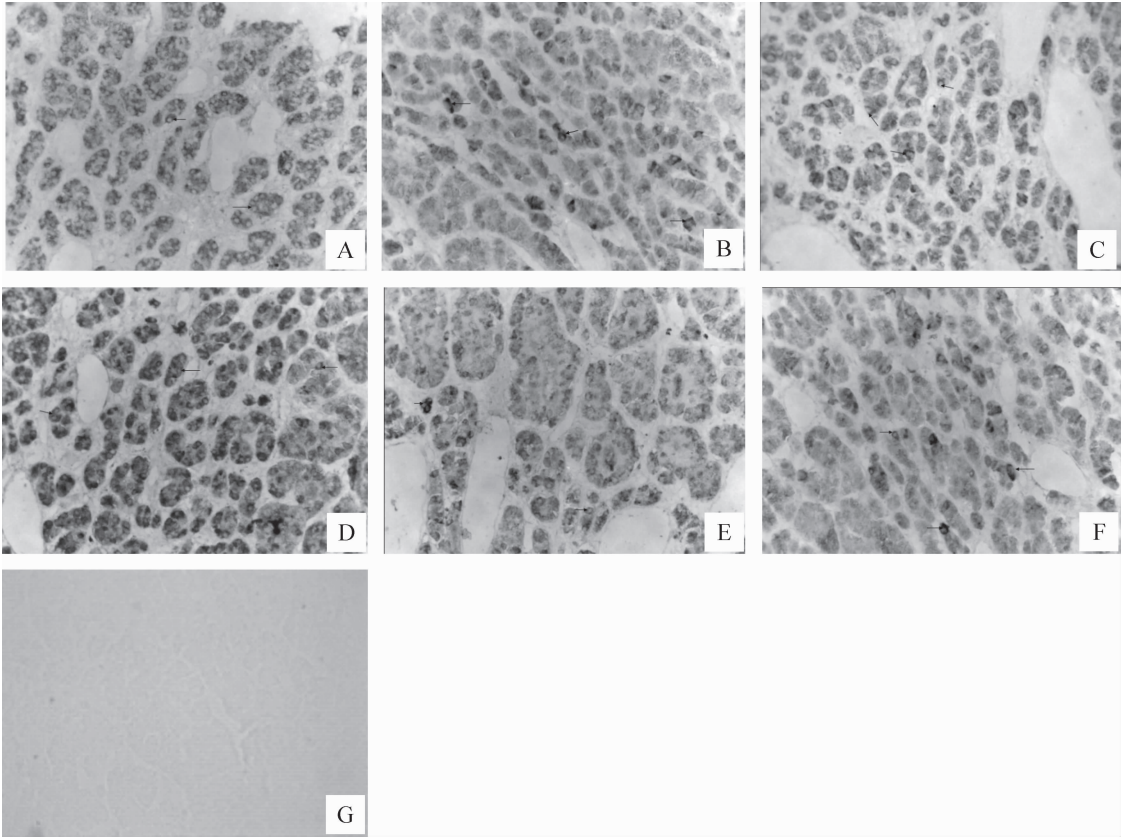


图 1 不同怀孕期山羊腺垂体中 IFN- α 和 IFN- γ 免疫阳性物质的分布($\times 400$)
A~C. 分别为 IFN- α 在怀孕前期、中期和后期山羊腺垂体中的分布情况;
D~F. 分别为 IFN- γ 在怀孕前、中期和后期山羊腺垂体中的分布情况;G. 阴性对照

Fig. 1 The distribution of positive IFN- α and IFN- γ cells in adenohypophysis of goat at different gestation periods($\times 400$)
A—C. The distribution of IFN- α positive cells in adenohypophysis of goat in the prophase,metaphase,anaphase of gestation respectively;D—F. The distribution of IFN- γ positive cells in adenohypophysis of goat in teh prophase, metaphase,anaphase of gestation respectively;G. Negative control

2.1.2 IFN- γ 在腺垂体中的定位 IFN- γ 同样分布于腺垂体嗜酸性细胞、嗜碱性细胞和嫌色细胞中,阳性产物主要存在于细胞质和细胞膜。IFN- γ 在垂体远侧部与结节部呈强阳性表达;在中间部呈弱阳性表达;在靠近垂体柄处也可见较多的着色颗粒,呈强阳性表达。怀孕前期,IFN- γ 阳性细胞分布较均匀,整个腺垂体均有,阳性细胞较小,多为细胞质着色,可见明显的空泡状的细胞核,呈强阳性表达(图 1-D)。怀孕中期,IFN- γ 阳性物质在垂体中呈弥散性表达,主要存在于结节部,该部位阳性细胞分布较多但着色较浅;其他区域阳性颗粒物分布较少,呈弱阳性表达;部分细胞胞核着色,染色较深但数量较少,呈零星分布(图 1-E)。怀孕后期,IFN- γ 主要在垂体远侧部分泌型细胞中表达,中间部也可见深染

的阳性细胞,细胞分布较均匀,胞体较小,存在胞膜着色细胞(图 1-F)。

2.2 IFN- α 和 IFN- γ 在怀孕各期山羊腺垂体中的分布特点

IFN- α 和 IFN- γ 在怀孕各期山羊腺垂体中的分布特点如图 2 所示。由图 2 可看出,怀孕前期呈强阳性表达,怀孕中期呈弱阳性表达,怀孕后期表达量又略微上升呈强阳性表达。IFN- α 在怀孕前期的表达量较中期高,差异极显著($P<0.01$),中期表达较后期显著降低($P<0.05$);IFN- γ 的表达怀孕前期显著高于怀孕中期($P<0.05$),怀孕中期低于怀孕后期,但差异不显著。怀孕各期中 IFN- α 阳性细胞相对表达量均高于 IFN- γ 相对表达量,说明 IFN- α 阳性细胞分布普遍较 IFN- γ 多。

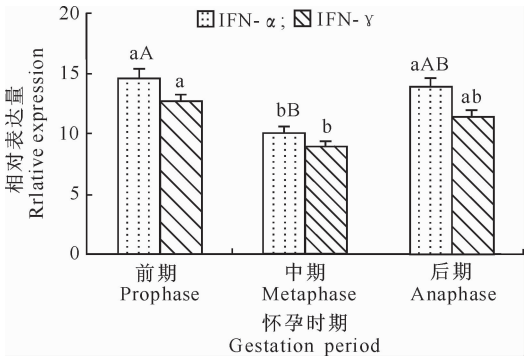


图 2 怀孕各期山羊腺垂体中 IFN- α 和 IFN- γ 阳性细胞相对表达量的变化趋势

同种干扰素相比,标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),
标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)

Fig. 2 The relative expression quantity of IFN- α and IFN- γ in adenohypophysis at different gestation periods
Compared with the same IFN, different small letters means significant difference ($P<0.05$), different capital letters means extremely significant difference ($P<0.01$)

3 讨 论

妊娠是一个复杂而精密的生理过程,在妊娠期,母胎之间存在着复杂的激素与细胞因子调节网络^[16],其中最主要的是 HPG 轴的调节,脑垂体作为调节轴的中间环节,既有内分泌调节功能又有神经调节功能。腺垂体能合成分泌多种与生殖活动相关的激素,如催乳素(PRL)、促卵泡素(FSH)、促黄体素(LH)、促甲状腺激素(TSH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)等。在怀孕期间,这些激素的合成与释放处在一个动态的变化过程中,从而维持妊娠的正常进行。有研究发现,IFN- γ 弥散分布于垂体前叶^[17],对垂体激素的分泌具有一定作用。Holsboer 等^[18]发现,IFN- γ 能促进垂体释放促肾上腺皮质激素(ACTH);Yamaguchi 等^[19]发现,IFN- γ 能刺激体外培养的大鼠垂体前叶细胞分泌催乳素(PRL)。由此推测,IFN- γ 可能对腺垂体分泌细胞起着某种快速的调节功能,对维持妊娠有重要作用。

目前,有关 IFN- α 在生殖内分泌调控方面的作用,尤其是其在垂体内定位的相关研究较少。有报道称,IFN- α 能够调节 HPA 轴的功能,并可直接作用于靶腺^[20],但 IFN- α 是否参与调控垂体的内分泌功能尚未见研究报道。有研究发现,IFN- α 对体外原代培养的大鼠下丘脑分泌 CRH 和原代垂体细胞分泌 ACTH 作用并不明显^[8]。本研究用免疫组织化学 SP 法对不同怀孕期山羊腺垂体内 2 种干扰素

的定位及表达量进行了研究,结果发现,IFN- α 在腺垂体远侧部和结节部广泛分布于各种分泌型细胞中,其在不同细胞中的定位也有明显差异,这提示 IFN- α 可能参与垂体内各种生殖激素的调控活动。进一步分析 2 种干扰素表达量的变化发现,在怀孕前期和后期山羊腺垂体中 IFN- α 和 IFN- γ 阳性细胞较多,呈强阳性表达,主要分布在分泌型细胞区域;在怀孕中期呈弱阳性表达,阳性细胞较小,但在腺垂体结节部聚集有较多的 IFN- γ 阳性物质颗粒;怀孕各期 IFN- α 阳性细胞的相对表达量均高于 IFN- γ 的相对表达量,这提示 IFN- α 可能作为一种激素样物质,通过某种方式参与调节垂体内分泌功能,但具体的作用机制仍需进一步研究。

[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.
Huang C. Cytokine regulate hypothalamic-pituitary-gonadal axis [J]. Foreign Med Sci: Section Endocrinol Endocrinol, 1997, 17(3):16-19. (in Chinese)

[2] Ljungdah A, Olsson T, Vander Meide P H, et al. Interferon-gamma-like immunoreactivity in certain neurons of the central and peripheral nervous system [J]. Neuroscience Research, 1989, 24:451-456.

[3] Jones T H, Kennedy R L. Cytokines and hypothalamic-pituitary function [J]. Cytokine, 1993, 5(6):531-538.

[4] Vankelecom H, Carmeliet P, Heremans H, et al. Interferon- γ inhibits stimulated adrenocorticotropin, prolactin, and growth hormone secretion in normal rat anterior pituitary cell cultures [J]. Endocrinology, 1990, 126(6):2919-2926.

[5] 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):98-100.
Cao Y Q, Sun D M, Chen Y Z, et al. Studies on the antifertility effect and mechanism of action of human recombinant interferon-gamma in rabbits [J]. Journal of reproductive medicine, 1999, 8(2):98-100. (in Chinese)

[6] Bulla R, Fischetti F, Bossi F, et al. Feto-maternal immune interaction at the placental level [J]. Lupus, 2004, 13(9):625-629.

[7] Khan N U, Pulford K A, Farquharson M A, et al. The distribution of immunoreactive interferon-alpha in normal human tissues [J]. Immunology, 1989, 66(2):201-206.

[8] Gisslinger H, Svoboda T, Clodi M, et al. Interferon- α stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis *in vivo* and *in vitro* [J]. Neuroendocrinology, 1993, 57(3):489-495.

[9] Masahito K, Yasumasa I, Yoshiaki A, et al. Cytokine regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells [J]. Endocrinology, 1998, 139(5):2414-2422.

[10] 李 杰, 史继新, 王汉东, 等. α -干扰素及其受体在垂体腺瘤的

- 表达及意义 [J]. 医学研究生学报, 2002, 15(4): 323-325.
- Li J, Shi J X, Wang H D, et al. Expression of interferon- α and interferon- α receptor in different types of pituitary adenomas [J]. Bulletin of Medical Postgraduate, 2002, 15(4): 323-325. (in Chinese)
- [11] 李 杰, 史继新, 王汉东, 等. α -干扰素和溴隐亭对垂体生长激素腺瘤细胞的作用 [J]. 中华神经外科杂志, 2004, 20(3): 207-210.
- Li J, Shi J X, Wang H D, et al. Effects of interferon- α and bromocriptine on secretion by cultured human GH-secreting pituitary adenoma cells [J]. Chinese Journal of Neurosurgery, 2004, 20(3): 207-210. (in Chinese)
- [12] 司丽芳, 赵 瑾, 贾利云, 等. 干扰素- γ 对妊娠早期大鼠下丘脑中胰岛素样生长因子-1 表达及妊娠结局的影响 [J]. 中国兽医科学, 2006, 36(11): 920-923.
- Si L F, Zhao J, Jia L Y, et al. Effects of IFN- γ on the expression of IGF-1 gene in hypothalamus of pregnant rats and on their pregnant results [J]. Chinese Veterinary Science, 2006, 36(11): 920-923. (in Chinese)
- [13] 孙健红, 赵慧英, 苏正元, 等. IFN- γ 在不同生殖周期奶山羊卵巢中的表达 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 16-18.
- Sun J H, Zhao H Y, Su Z Y, et al. Expression of interferon- γ in dairy goat ovary during different physiological periods [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(4): 16-18. (in Chinese)
- [14] 赵慧英, 何书海, 徐永平. IFN- γ R 和 ER 在大鼠下丘脑中的共存 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(2): 218-222.
- Zhao H Y, He S H, Xu Y P. The coexpression of IFN- γ R and ER in the hypothalamus of rats [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2008, 39(2): 218-222. (in Chinese)
- [15] 赵慧英, 孙健红, 徐永平, 等. IFN- γ 在怀孕早期山羊下丘脑-垂体-性腺轴的表达 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(8): 36-39.
- Zhao H Y, Sun J H, Xu Y P, et al. Expression of IFN- γ immunoreactivity on HPG axis of dairy goat during early pregnancy [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2006, 34(8): 36-39. (in Chinese)
- [16] 田仲萍. 细胞因子对妊娠的调节作用 [J]. 国外医学: 妇产科学分册, 1999, 29(7): 10-13.
- Tian Z P. Cytokine regulate to pregnancy [J]. Foreign Medical Sciences: Gynecotokology, 1999, 29(7): 10-13. (in Chinese)
- [17] 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.
- Hu G, Mu X, Chen S L, et al. Distribution of IFN- γ immunoreactive nerve fibers in the anterior pituitary of the rat [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2002, 33(6): 559-561. (in Chinese)
- [18] Holsboer F, Stalla G K, Bardeleben U, et al. Acute adrenocortical stimulation by recombinant gamma interferon in human controls [J]. Life Sci, 1988, 42(1): 1-5.
- [19] Yamaguchi M, Koike K, Matsuzaki N, et al. The interferon family stimulates the secretions of prolactin and interleukin-6 by the pituitary gland *in vitro* [J]. Endocrinol Invest, 1991, 14(6): 457-461.
- [20] Edwin B J. The syntax of immune-neuroendocrine communication [J]. Immunology Today, 1994, 15: 504-511.