

网络出版时间:2015-01-05 08:59

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.02.002

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150105.0859.002.html

LH 受体在雌性山羊肠系膜后神经节中的分布

董 伟^{1,2}, 范 洁¹, 徐永平¹, 金秀芳¹, 郭瑜龙¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 畜牧兽医科学研究院, 甘肃 武威 733000)

【摘 要】 【目的】探讨促黄体生成素(LH)是否可以通过影响雌性山羊肠系膜后神经节(CMG)参与动物机体生殖活动的调节。**【方法】**取 5 只未怀孕健康成年雌性山羊肠系膜后神经节,于多聚甲醛中固定,经石蜡包埋并制作厚度 7 μm 的连续石蜡切片后,采用免疫组织化学 SP 染色方法观察雌性山羊 CMG 中 LH 受体(LHR)的分布特点,并计算 LHR 免疫反应阳性细胞的相对表达量。**【结果】**在 CMG 中,神经元细胞均为 LHR 免疫阳性反应,多数细胞呈中等阳性,少数细胞呈强阳性,LHR 免疫阳性产物主要分布在神经元的细胞膜、细胞质和细胞核膜上,但细胞核为阴性反应。神经纤维和卫星细胞中的 LHR 免疫阳性产物为弱阳性表达。神经元细胞上 LHR 的相对表达量(7.057 ± 0.797)极显著高于其他非神经元细胞(1.497 ± 0.690) ($P < 0.01$)。**【结论】**CMG 中神经元细胞是 LH 发挥作用的主要靶细胞,提示 CMG 神经元细胞中存在的 LHR 可能是协调 LH 对生殖器官的内分泌调节和自主神经对生殖器官的神经调节的中转站。

【关键词】 促黄体生成素受体;肠系膜后神经节;免疫组织化学 SP 法;雌性山羊

【中图分类号】 S852.16

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)02-0023-05

Distribution of LHR on caudal mesenteric ganglion of female goats

DONG Wei^{1,2}, FAN Jie¹, XU Yong-ping¹, JIN Xiu-fang¹, GUO Yu-long¹

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

2 Animal Husbandry and Veterinary Science Institute, Wuwei, Gansu 733000, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate whether LH could regulate reproductive activity through the effect on caudal mesenteric ganglion (CMG) of female goat. **【Method】** Caudal mesenteric ganglions were taken from five healthy adult female goats. The caudal mesenteric ganglions were made into 7 μm serial paraffin section after fixed by paraformaldehyde and embedded by paraffin. Immunohistochemical SP method was adopted to observe the distribution of LH receptor (LHR) in caudal mesenteric ganglion of female goats. **【Result】** All the neurons in CMG responded positively to LHR, and most of these substances showed moderately positive expression while minor were strong positive. LHR immunoreactive substances mainly distributed in membrane and cytoplasm of neurons, but the nucleus were negative to LHR. However, in supporting cells and nerve fibers, weakly positive expression was observed. Significantly higher relative expression of LHR was observed in neurons (7.057 ± 0.797) compared to that in other non-nerve cells (1.497 ± 0.690) ($P < 0.01$). **【Conclusion】** Neurons in caudal mesenteric ganglion were the main target cells of LH, indicating that LHR existing in these neurons might be a “transfer station” to coordinate the endocrine regulation and nervous regulation.

【收稿日期】 2013-09-29

【基金项目】 陕西省自然科学基金项目(SJ08C105); 国家自然科学基金项目(31072184)

【作者简介】 董 伟(1988—),女,山西浮山人,硕士,主要从事基础兽医学研究。E-mail:880501dongwei@163.com

【通信作者】 徐永平(1971—),男,陕西西安人,副教授,硕士生导师,主要从事基础兽医学与发育生物学研究。

E-mail:xuyup717@nwsuaf.edu.cn

Key words: luteinizing hormone receptor (LHR); caudal mesenteric ganglion (CMG); immunohistochemical SP method; female goat

促黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)是垂体前叶促性腺细胞合成与分泌的一种重要糖蛋白类生殖激素,而 LH 受体(Luteinizing hormone receptor, LHR)属于 G 蛋白偶联 7 次跨膜受体。LHR 的胞外域对 LH 具有高度亲和性和特异性, LH 通过激活靶器官上的 LHR, 诱导环腺苷酸(cAMP)合成, 进而产生多种生理学功能。研究表明, LH 可通过内分泌途径参与许多复杂的生殖系统的功能活动, 如 LH 协同卵泡刺激素(FSH)共同促进卵泡的发育成熟, 参与内膜细胞合成雌激素、诱发排卵, 促进黄体生成以及分泌孕酮, 此外还可影响子宫的生长发育、妊娠的识别^[1]。以上研究表明, LH 对动物机体的生殖活动具有重要的内分泌调节作用。

肠系膜后神经节(Caudal mesenteric ganglion, CMG)属于交感神经节中的椎下神经节, 其发出的交感节后神经纤维形成的腹下神经, 是支配雌性动物生殖器官的惟一交感神经^[2-3]。王志豪等^[4]在雌性山羊肠系膜后神经节中检测到卵泡刺激素(FSH)受体, 提示生殖激素对内脏器官的调节作用至少存在 2 种途径: 一是性激素通过内分泌途径调节生殖器官的功能活动; 二是性激素通过神经调节途径影响生殖器官的交感节后神经元活动, 以达到调控该神经节所支配的靶器官的功能。但作为支配生殖器官的交感肠系膜后神经节, 是否也可与 LH 作用而成为 LH 内分泌调节和自主神经调节 2 种调节途径协调调控动物生殖活动的中转站, 目前尚未见报道。为此, 本试验采用免疫组织化学 SP 法, 研究了雌性山羊 LHR 在 CMG 中的分布特点, 从而为进一步探讨 LH 在生殖活动中的神经内分泌调节机制提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

未怀孕健康成年雌性山羊 5 只, 年龄 1 岁左右, 体质量约 30 kg/只, 来源于陕西杨凌农户。

1.2 主要试剂

一抗为兔抗 LHR 多克隆抗体, 武汉博士德生物工程有限公司生产; 一抗稀释液, 北京鼎国昌盛生物技术有限公司生产; 免疫组织化学 SP 超敏试剂盒(兔)和内源性生物素阻断试剂盒, 福州迈新生物技术开发有限公司生产; 四盐酸 3,3'-二氨基联

苯胺显色剂(DAB), 武汉华美生物工程有限公司分装产品。

1.3 切片的制备

将供试雌性山羊用质量分数 3% 戊巴比妥钠按 1 mL/kg 剂量进行麻醉, 颈动脉放血致死, 打开腹腔, 迅速取出肠系膜后神经节, 置于 40 g/L 多聚甲醛磷酸缓冲液中固定 24 h, 自来水冲洗 12 h(控制水流速度), 依次经梯度为体积分数 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 的乙醇进行脱水(其中体积分数 95% 和 100% 乙醇脱水 2 次), 二甲苯透明、浸蜡、包埋、制作连续石蜡切片(片厚 7 μ m)。将石蜡切片分为 3 套: 第 1 套切片进行免疫组织化学 SP 染色, 用于 LHR 阳性细胞定位和图像分析, 并计算 LHR 阳性细胞的相对表达量; 第 2 套切片作为空白对照, 用于确定反应的特异性; 第 3 套切片在完成免疫组织化学 SP 染色之后进行苏木精复染, 用于 LHR 阳性细胞核的定位观察。

1.4 免疫组织化学 SP 法染色

取石蜡切片, 经脱蜡复水后进行微波抗原修复, 之后冷却至室温后, 依次滴加内源性生物素阻断剂 A 液和 B 液(各孵育 10 min); 之后按照免疫组织化学 SP 超敏试剂盒说明书进行 SP 染色: 依次滴加 A 液、B 液、C 液、D 液(各孵育 20, 15, 15, 15 min); 且在滴加 B 液之后滴加一抗(体积比 1:200 稀释)孵育过夜, 空白对照组则用抗体稀释液代替一抗进行试验; 之后 DAB 显色 5 min(具体根据显色效果控制时间)。以上孵育过程中要充分摇匀, 并用 PBS 液充分洗涤(每次 5 min, 连续 3 次)。第 3 套切片在免疫组织化学 SP 染色完成后进行苏木精复染。以上步骤完成之后进行常规脱水、透明、中性树胶封片、镜下观察与测量。根据 CMG 中 LHR 免疫反应阳性物质的着色程度, 将 LHR 免疫组织化学 SP 染色结果分为 4 个等级: 不着色为阴性, 淡黄色为弱阳性, 黄色为中等阳性, 棕黄色为强阳性。

1.5 图像分析

在 Motic 生物显微镜下观察免疫组织化学 SP 染色切片, 并进行拍照和测量。每只山羊取同一批次 SP 染色的 5 张连续切片, 每张切片随机选取 5 个视野, 用江苏捷达高清图像分析系统进行分析, 并计算 LHR 免疫反应阳性细胞的相对表达量: 相对表达量 = 光学倍数 $\times$ 平均光密度 $\times$ 阳性面积/像素。

1.6 统计分析

试验数据均以“平均值±标准差”表示,用 SPSS 18.0 进行分析,利用单因子方差分析(One-Way ANOVA,LSD)对试验结果进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 肠系膜后神经节免疫组织化学 SP 法染色结果

空白对照组切片经 LHR 免疫组织化学 SP 染色后,肠系膜后神经节内无 LHR 免疫反应阳性物质产生(图 1-A);再经苏木精复染后可见蓝色的细胞核,无其他异样着色,LHR 为阴性反应(图 1-B),表明本试验 LHR 的免疫组织化学 SP 染色具有特异性反应。试验组切片经 LHR 免疫组织化学 SP 染色后,肠系膜后神经节内的神经细胞、卫星细胞、神经细胞突起和神经纤维均呈现出不同程度的阳性

着色(图 1-C):大多数神经元细胞呈黄色,LHR 为中等阳性;少数神经元细胞呈棕黄色,LHR 为强阳性;卫星细胞染色较弱,呈淡黄色,LHR 为弱阳性;神经元群之间的神经纤维呈淡黄色,LHR 为弱阳性。在神经元胞体中,LHR 免疫反应阳性物质主要分布在细胞膜、细胞质以及细胞核膜上;另外,部分神经元胞体可见其突起呈阳性反应。试验组再经苏木精复染后可观察到呈蓝色反应的细胞核,除此之外,组织细胞均呈不同程度的阳性着色,无其他异样着色(图 1-D)。

肠系膜后神经节内神经元胞体大小不一,轮廓清晰,细胞形状呈圆形或卵圆形,经测量,其所含核神经元胞体直径最大为 36.5 μm,最小为 11.5 μm,胞体直径在 25~36.5 和 11.5~25 μm 的细胞分别占 47.7%和 52.3%。

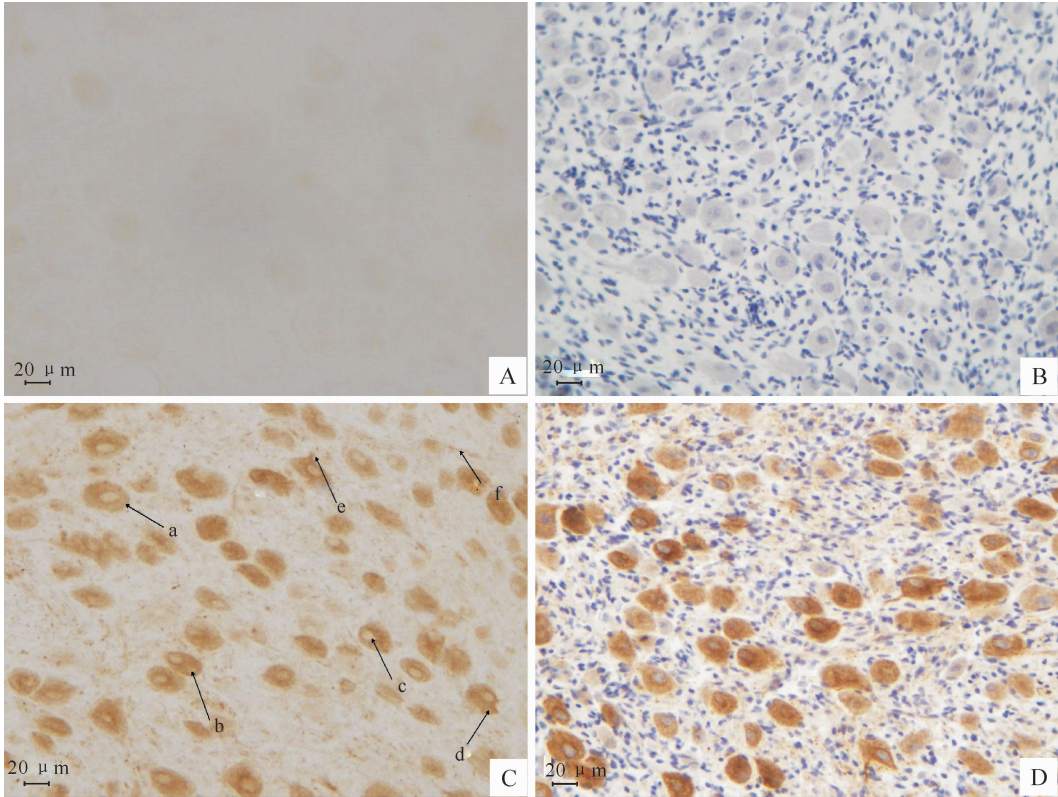


图 1 雌性山羊肠系膜后神经节 LHR 免疫组织化学 SP 染色及苏木精复染结果(400×)
A. 空白对照组 LHR 免疫组织化学 SP 染色;B. 空白对照组 LHR 免疫组织化学 SP 染色及苏木精复染;
C. 试验组 LHR 免疫组织化学 SP 染色;D. 试验组 LHR 免疫组织化学 SP 染色及苏木精复染
a. 神经细胞;b. 神经细胞质;c. 神经细胞核;d. 卫星细胞;e. 神经细胞突起;f. 神经纤维

Fig. 1 Immunohistochemical SP staining and hematoxylin counterstain of LHR in CMG of female goat (400×)
A. Immunohistochemical SP staining of LHR in control group;B. Hematoxylin counterstain of immunohistochemical SP staining of LHR in control group;C. Immunohistochemical SP staining of LHR;D. Immunohistochemical SP staining and hematoxylin counterstain of LHR
a. Nerve cells;b. Cytoplasm;c. Nuclei;d. Satellite cells;e. Neurite;f. Nerve fiber

2.2 肠系膜后神经节 LHR 的相对表达量

图像分析结果显示,LHR 阳性神经元细胞呈棕黄色,为强阳性反应,其 LHR 相对表达量为 7.057 ± 0.797 ;LHR 阳性非神经元细胞呈淡黄色,为弱阳性反应,其 LHR 相对表达量为 1.497 ± 0.690 ,肠系膜后神经节中神经元细胞 LHR 的相对表达量极显著高于节内非神经元细胞($P < 0.01$)。说明肠系膜后神经节中神经元细胞是 LH 发挥作用的主要靶细胞。

3 讨论与结论

1977 年,Besedovsky 等^[5]提出了神经-免疫-内分泌网络学说,并逐渐被广大学者所接受。该学说认为动物机体的功能活动是由神经、内分泌、免疫系统之间的相互协调作用来维持的,而作为神经、内分泌以及免疫系统的各种通用信息分子共同构成了 3 个系统间联系的回路。雌性动物生殖活动的正常发生是否也通过 3 个系统间的相互协调作用来完成尚未见报道。因此,本试验以 LHR 和 CMG 为切入点,研究生殖激素 LH 的内分泌调节与肠系膜后神经节自主神经调节之间的内在联系。

促黄体生成素(LH)是由垂体前叶合成及分泌的一种生殖激素,其受体(LHR)属于 G 蛋白偶联 7 次跨膜受体,具有信号转导和 G 蛋白偶联功能。LH 通过激活靶细胞上的 LHR 表现出许多复杂的生理学功能。LHR 在生殖腺以及生殖腺相关的多种组织中广泛分布,如子宫肌层、子宫内膜、子宫颈、子宫血管、输卵管、卵巢、海马、齿状回、小脑、脉络丛、大脑皮质、下丘脑等,且对这些组织的功能具有一定的调节作用^[6-11]。Filicori^[6]研究表明,LHR 存在于卵巢内,而 LHR 的活化对正常卵泡的发生发育、卵母细胞的成熟、排卵以及黄体的形成至关重要。Derecka 等^[7]通过免疫组织化学方法在猪输卵管中发现有 LHR 存在,LH 可以通过活化输卵管上的 LHR 影响配子的运输、成熟、受精以及胚胎的早期生长和及时着床。Shemesh 等^[8]在牛子宫静脉中检测到有 LHR 阳性产物的表达,并且 LHR 的活化可以加快黄体的溶解。Shemesh 等^[9]和 Stepien 等^[10]研究发现,LHR 主要存在于子宫中,且 LHR 的活化对调节动物的发情周期、妊娠识别、分娩以及黄体期子宫静止状态的维持具有重要作用。LHR 在性腺器官及非性腺器官中的广泛分布表明,LH 和 LHR 对生殖器官的周期性功能变化发挥着直接的内分泌调节作用。

众所周知,自主神经系统对动物生殖器官的功能活动起着重要的调控作用。作为支配生殖器官的肠系膜后神经节交感神经元与生殖器官之间建立起来的功能联系,在实现神经系统对生殖功能活动的调节方面具有重要的整合作用。另外,在调节生殖活动的内分泌途径与神经调节途径中,神经肽可通过内分泌的激素作用来共同调控生殖器官的功能活动。肠系膜后神经节是支配雌性动物生殖活动的节后神经纤维,是内脏反射的最后通路之一^[2-3]。本研究表明,在肠系膜后神经节内,LHR 免疫反应阳性产物主要分布在神经元细胞的细胞膜、细胞质以及细胞核膜上,多数细胞呈 LHR 中等阳性反应,少数细胞呈强阳性反应,其他非神经元细胞为弱阳性表达;神经元细胞 LHR 的相对表达量极显著高于节内非神经元细胞($P < 0.01$),这说明肠系膜后神经节中神经元细胞是 LH 发挥作用的主要靶细胞。研究表明,支配子宫的交感神经与子宫的局部免疫水平之间存在内在联系,且与性激素共同调节哺乳动物早期胚胎的着床与发育^[12-13]。郝建军等^[14]采用免疫组织化学 SP 法证明,5-HT 和 5-HT_{1A}受体在大鼠妊娠期子宫中的表达具有规律性,并且参与妊娠活动的调节。罗文萍等^[15]采用比色法检测了妊娠小鼠子宫中 γ -氨基丁酸的含量,结果表明,在围植入期小鼠子宫中 γ -氨基丁酸呈现动态变化,并可能参与抑制子宫脱膜化的过程。More 等^[16]研究表明,妊娠期支配子宫的交感神经数目会发生变化,并且这种变化受到性激素的影响。上述研究结果表明,自主神经系统与生殖器官的周期性变化之间存在着紧密的功能性联系,并且支配生殖器官的神经系统受生殖激素的影响,提示 LH 可能通过作用于肠系膜后神经节神经元上的 LHR 来影响该神经元的功能活动,从而使得雌性动物生殖活动的内分泌调节途径与神经调节途径达到协调统一,推测肠系膜后神经节神经元上存在的 LHR 可能是雌性动物生殖活动中内分泌调节途径与神经调节途径之间达到协调统一的网络节点。这一推测丰富了 LH 对生殖活动的调节途径,但其作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 朱桂金,聂睿. FSH 和 LH 的作用 [J]. 生殖医学杂志, 2010, 19(4): 353-355.
Zhu G J, Nie R. Roles of FSH and LH in follicle development [J]. Journal of Reproductive Medicine, 2010, 19(4): 353-355. (in Chinese)

- [2] Owman D C, Sjöberg N O. Adrenergic nerves in the female genital tract of the rabbit with remarks on cholinesterase-containing structures [J]. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie, 1966, 74(2): 182-197.
- [3] Shi M Y, Zhou H Z, Jiang Z G, et al. The exciting origin of guinea pig inferior mesenteric ganglion neurons *in vivo* [J]. Acta Physiologica Sinica, 1995, 47(3): 301-304.
- [4] 王志豪, 任妮, 明佳. 等. FSH受体在雌性山羊肠系膜后神经节中的分布 [J]. 中国兽医科学, 2012, 42(3): 318-321.
- Wang Z H, Ren N, Ming J, et al. Distribution of FSHR in inferior mesenteric ganglion of female goats [J]. Chinese Veterinary Science, 2012, 42(3): 318-321. (in Chinese)
- [5] Besedovsky H, Sorkin E. Network of immune-neuroendocrine interactions [J]. Clinical and Experimental Immunology, 1977, 27(1): 1-12.
- [6] Filicori M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction [J]. Fertil Steril, 1999, 71(3): 405-414.
- [7] Derecka K, Pietila E M, Zieciak A J, et al. Cycle-dependent LH/hCG receptor gene expression in porcine nongonadal reproductive tissues [J]. J Physiol Pharmacol, 1995, 46: 4677-4685.
- [8] Shemesh M, Hansel W. Levels of prostaglandin F (PGF) in bovine endometrium, uterine venous, ovarian arterial and jugular plasma during the estrous cycle [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1975, 148: 123-126.
- [9] Shemesh M, Mizrahi D, Gurevich M, et al. Expression of functional luteinizing hormone (LH) receptor and its messenger ribonucleic acid in bovine endometrium: LH augmentation of cAMP and inositol phosphate *in vitro* and human chorionic gonadotropin (hCG) augmentation of peripheral prostaglandin *in vivo* [J]. Reprod Biol, 2001(1): 13-32.
- [10] Stepien A, Derecka K, Gawronska B, et al. LH/hCG receptors in the porcine uterus—a new evidence of their presence in the cervix and myometrium [J]. J Physiol Pharmacol, 2000, 51: 917-931.
- [11] Lei Z M, Rao C V, Komyei J L, et al. Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain [J]. Endocrinology, 1993, 132(5): 2262-2270.
- [12] Lakoski J M, Perez-Polo J R, Rassin D K, et al. Neuroimmune modulation of reproductive function [M]. New York: [s. n.], 1989: 306-309.
- [13] 赵娇慧, 陈耀星, 王子旭, 等. 交感神经对妊娠早期小鼠子宫内膜发育的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(11): 1669-1674.
- Zhao J H, Chen Y X, Wang Z X, et al. Effect of sympathetic nerve on development of endometrium in mice during early pregnancy [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2009, 40(11): 1669-1674. (in Chinese)
- [14] 郝建军, 徐永平, 王红梅, 等. 5-HT及5-HT_{1A}受体在不同妊娠阶段大鼠子宫中的分布 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(3): 604-612.
- Hao J J, Xu Y P, Wang H M, et al. Distribution of 5-HT and 5-HT_{1A} receptors in uterus of rats during pregnancy [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(3): 604-612. (in Chinese)
- [15] 罗文萍, 赵海, 刘真真, 等. γ -氨基丁酸在围植入期小鼠子宫的含量及其意义 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(2): 154-158.
- Luo W P, Zhao H, Liu Z Z, et al. γ -amino butyric acid in peri-implantation mouse uterine contents and its significance [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2012, 17(2): 154-158. (in Chinese)
- [16] More J, Nedjar K. Intrinsic innervation of the ewe cervix and its variations during pregnancy [J]. Histochemistry, 1984, 80(1): 59-62.