

17- β 雌二醇对去卵巢大鼠垂体前叶 IFN- γ 表达的影响

陆永新,赵慧英,杨 静,龙 敏,周 旭,彭正午

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】探讨雌激素对去卵巢大鼠垂体前叶 γ -干扰素(Interferon- γ , IFN- γ)表达的影响。【方法】将大鼠分为对照组(CG组)、去卵巢组(OVX组)和去卵巢并用 17- β 雌二醇治疗组(OVX+E₂组),应用免疫组化 SP 法检测不同时程各组大鼠垂体前叶 IFN- γ 免疫阳性物质含量的变化特点。【结果】去卵巢后不同时程,OVX 组大鼠垂体前叶 IFN- γ 表达较 CG 组显著减少($P<0.05$);OVX+E₂ 组大鼠 IFN- γ 表达显著回升($P<0.05$),且在第 4 周时回升至 CG 组水平。【结论】雌激素对大鼠垂体前叶 IFN- γ 免疫阳性物质的表达有明显影响,提示 IFN- γ 可能以自分泌或旁分泌方式,参与雌激素对垂体前叶调节功能的部分作用。

【关键词】 17- β 雌二醇;去卵巢大鼠;垂体前叶; γ -干扰素

【中图分类号】 Q189;S852.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)10-0039-04

Effects of 17- β -Estradiol on IFN- γ in anterior pituitary of ovariectomized rats

LU Yong-xin, ZHAO Hui-ying, YANG Jing, LONG Min, ZHOU Xu, PENG Zheng-wu

(College of veterinary medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The research was to study the effects of 17- β -Estradiol on IFN- γ in anterior pituitary of ovariectomized rat. 【Method】 Rats were divided into three groups, namely control group, ovariectomized group and group treated with 17- β -Estradiol. Immunohistochemical SP method was used to investigate the intensity of IFN- γ like immunoreactive substance in anterior pituitary of ovariectomized and treated with 17- β -Estradiol rats. 【Result】 As a result, in different periods after ovariectomy, contrast with the control group, the expression of IFN- γ in anterior pituitary of the ovariectomized group was significantly decreased. After being treated with 17- β -Estradiol, the expression of IFN- γ had a remarkable increase and almost returned to the normal level in the fourth week. 【Conclusion】 All the results illustrated that estradiol had a remarkable effect on IFN- γ like immunoreactive substance in rat anterior pituitary, and it seemed that part of estradiol's effects on anterior pituitary might be mediated by regulating the expression of IFN- γ .

Key words: 17- β -Estradiol; ovariectomized rat; anterior pituitary; interferon-gamma

垂体是高等动物体内重要的内分泌器官,控制着动物的生长、发育、行为、生殖、泌乳等一系列重要

生理功能,并能影响内环境的稳定,调节机体内其他一些内分泌器官的功能。垂体内的许多激素、细胞

* [收稿日期] 2007-10-29

[基金项目] 西北农林科技大学科研启动基金(01140504)

[作者简介] 陆永新(1981—),男,江苏苏州人,在读硕士,主要从事动物神经生物学研究。

[通讯作者] 赵慧英(1966—),女,陕西韩城人,副教授,硕士生导师,主要从事动物神经内分泌免疫调控研究。
Email: ylzhaohy@yahoo.com.cn

因子等对这些功能的实现发挥着重要的调节作用,雌激素是其中具有广泛调节作用的激素之一,其在垂体前叶的发育和稳态调节中起着重要作用,能促进垂体细胞的增殖和几乎所有垂体激素的合成与分泌。有研究表明,雌激素对垂体细胞因子的合成和分泌也有调节作用,如雌激素能促进大鼠垂体前叶白细胞介素-8(IL-8)的表达^[1],雌激素可抑制大鼠垂体转化生长因子- β (TGF- β)免疫阳性物质的表达等^[2]。 γ -干扰素(IFN- γ)作为一种细胞因子,由多种细胞产生,并具有抗病毒、抗肿瘤和调节免疫反应等多种生物学活性。有研究表明,IFN- γ 在垂体前叶也有分布,对垂体前叶激素合成和分泌有一定影响^[3-4]。

目前有关雌激素对大鼠 IFN- γ 表达影响的研究,大多集中于雌激素与脾脏、胸腺细胞 IFN- γ 表达的关系上^[5-6],而关于雌激素对垂体前叶 IFN- γ 表达的影响则未见报道。为此,本试验应用免疫组化 SP 法,研究大鼠去卵巢及补充外源性 17- β 雌二醇对垂体前叶 IFN- γ 表达的影响,以期对雌激素对垂体的调节作用提供新的形态学依据,进一步完善和丰富雌激素与 IFN- γ 关系的研究资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 健康雌性 SD 大鼠 36 只,购自第四军医大学实验动物中心,质量 200~220 g。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗 IFN- γ 多克隆抗体(武汉博士德公司产品),17- β 雌二醇(美国 Sigma 公司),链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化超敏 SP 试剂盒(福州迈新生物技术开发公司生产),葡萄糖氧化酶和 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸(DAB)(Sigma 公司进口,华美生物工程公司分装),牛血清白蛋白和 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APES)(华美生物工程公司)。Leica RM2235 型石蜡切片机(德国制造),OLYMPUS CHC 型光学显微镜(日本 OLYMPUS 光学工业株式会社),Motic 数码显微镜(Motic 实业有限公司)。

1.2 动物模型的建立

大鼠适应性饲养 1 周后,随机分成 3 组,每组 12 只,分别为对照组(CG)、去卵巢组(OVX 组)、去卵巢并用 17- β 雌二醇治疗组(OVX+E₂ 组)。经 0.1 g/mL 水合氯醛腹腔麻醉(3 mL/kg),OVX 组、OVX+E₂ 组均采用背侧法摘除大鼠双侧卵巢,CG 组用相同方法仅摘除卵巢周围小块脂肪;手术后做

阴道涂片检查,确定去势成功。

OVX+E₂ 组大鼠自手术 1 周后,隔天皮下注射 17- β 雌二醇 10 μ g/只^[7](每 10 μ g 溶于 0.1 mL 纯芝麻油中);CG 组和 OVX 组大鼠隔天注射等剂量溶剂。

1.3 大鼠脑垂体的采集

各组大鼠于注射药物后的第 2,4,6,8 周分别取 3 只,0.1 g/mL 水合氯醛腹腔麻醉(4 mL/kg),暴露胸腔,经主动脉灌注 40 g/L 多聚甲醛磷酸盐缓冲液(pH7.4),取垂体入相同固定液中后固定。

1.4 大鼠脑垂体组织切片的制备

固定好的组织经脱水、透明、浸蜡、包埋后,做连续切片,片厚 5 μ m,贴于 APES 包被好的载玻片上,45 $^{\circ}$ C 烘箱烤片,共制备 3 套切片。

1.5 大鼠脑垂体组织切片的染色

对制备的 3 套切片,1 套进行常规 HE 染色,1 套进行免疫组织化学 SP 法染色,剩下 1 套用作对照,以确定本试验免疫组化反应的特异性。

免疫组织化学超敏 SP 法染色程序如下:(1)切片脱蜡复水,按抗体要求进行组织抗原修复;(2)每张切片加过氧化物酶阻断液(试剂 A)室温下孵育 10 min;(3)加非免疫动物血清(试剂 B),室温下孵育 10 min;(4)甩去血清,加第一抗体(兔抗 IFN- γ 多克隆抗体,工作浓度 1:100(体积比)),室温下孵育 1 h 或 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;(5)加生物素标记的第二抗体(试剂 C),室温下孵育 10 min;(6)加链亲合素-过氧化物酶溶液(试剂 D),室温下孵育 10 min,试验中的试剂 A、B、C、D 均来自 SP 试剂盒;(7)葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍铵法呈色^[8];(8)切片脱水透明、封片,光镜下观察、记录、照相。以上每步骤间均以 0.01 mol/L PBS 液(pH 7.4)充分洗涤。对照试验以 0.01 mol/L PBS 液(pH 7.4)代替一抗,其余步骤同上。

2 结果与分析

在不同给药时期,各组大鼠垂体前叶内均有 IFN- γ 表达,阳性细胞弥散分布于整个垂体前叶,IFN- γ 免疫阳性物质主要在细胞膜、细胞质着色,细胞核不着色。对不同给药时期各组大鼠垂体前叶内 IFN- γ 免疫阳性物质进行灰度值分析,结果如图 1 所示。图 1 表明,对照组大鼠垂体前叶 IFN- γ 免疫阳性物质表达,在不同给药时程始终维持在相对稳定水平,从第 2 周至第 8 周,大鼠垂体前叶 IFN- γ 表达量均无显著差异(见图 2 中 A1~A4)。

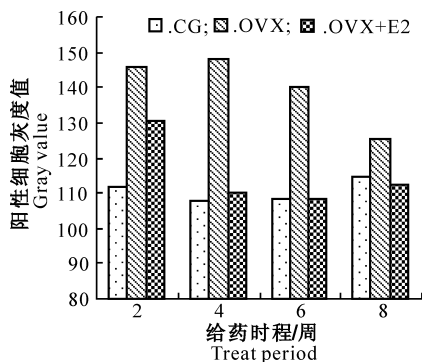


图 1 不同给药时程各组大鼠垂体前叶内 IFN-γ 阳性细胞灰度值的比较
Fig. 1 Contradistinction of gray level of IFN-γ immunoreactive positive cells in rat anterior pituitary of different periods

大鼠卵巢切除后,垂体前叶 IFN-γ 免疫阳性物质表达显著减少(图 1)。卵巢切除后 2 周,OVX 组

大鼠垂体前叶 IFN-γ 表达较对照组极显著减少 ($P<0.01$),阳性细胞数目减少,着色变浅(见图 2 中 B1);在随后的第 4 周和第 6 周,大鼠 IFN-γ 表达与第 2 周无显著差异(见图 2 中 B2 和 B3);第 8 周阳性细胞数有所回升(见图 2 中 B4),但仍与对照组差异显著($P<0.05$)。

对卵巢切除的大鼠进行雌激素治疗后,其垂体前叶 IFN-γ 免疫阳性物质表达随治疗周期延长逐渐增强,直至回升至对照组水平(图 1)。雌激素治疗后 2 周,OVX+E₂ 组大鼠 IFN-γ 表达较同时程 OVX 组显著增强($P<0.05$),阳性细胞数目增多,着色变深(见图 2 中 C1);雌激素治疗后 4 周,阳性细胞数目继续增多,IFN-γ 表达回升至对照组水平(图 2 中 C2);第 6 和第 8 周(见图 2 中 C3~C4)与第 4 周无显著差异。

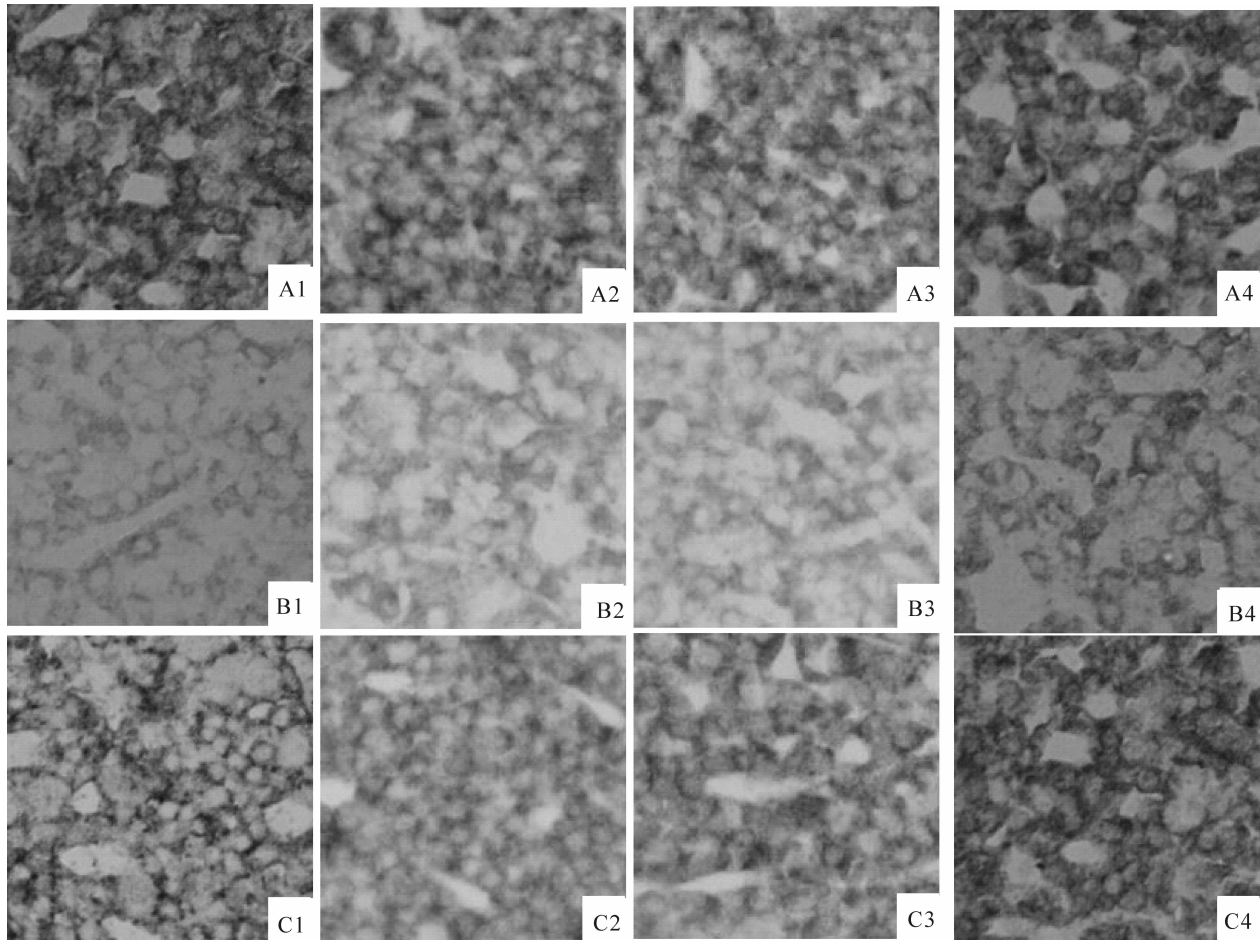


图 2 不同给药时程各组大鼠垂体前叶 IFN-γ 免疫阳性物质的表达(×400)
A. CG; B. OVX; C. OVX+E₂; 1~4. 分别为第 2, 4, 6, 8 周的染色结果

Fig. 2 The IFN-γ like immunoreactive substance in rat anterior pituitary of different periods(×400)
A. CG; B. OVX; C. OVX+E₂; 1~4. Stand for the result of the second week, the forth week, the sixth week and the eighth week

3 讨 论

IFN- γ 又称为免疫干扰素,在免疫-神经-内分泌网络中起重要的介质作用,是免疫调节物质又是神经传递物质,参与靶器官免疫过程的神经调节,可以影响机体的神经内分泌功能。本试验发现,IFN- γ 免疫阳性物质弥散分布于垂体前叶,这与胡格等^[3]的研究结果一致,进一步证实了 IFN- γ 确实参与了对免疫-神经-内分泌网络的调节。

IFN- γ 对垂体细胞和垂体的激素分泌具有一定作用,如 Holsboer 等^[9]发现 IFN- γ 能促进垂体释放促肾上腺皮质激素(ACTH),Yamaguchi 等^[10]发现 IFN- γ 能刺激大鼠垂体前叶培养细胞分泌催乳素(PRL),Vankelecom 等^[11]发现 IFN- γ 可抑制垂体前叶培养细胞生长激素(GH)的分泌。本试验中对对照组大鼠垂体前叶 IFN- γ 的表达,在不同时程都维持在一个稳定水平上,提示 IFN- γ 可能作为垂体前叶内的一种旁分泌或自分泌因子,对垂体的激素合成与分泌以及垂体的发育和稳态调节起着某种特定的作用,对其具体的作用机制仍需进一步研究。

雌激素是一种重要的性激素,有研究表明,雌激素也具有免疫调节作用^[12],其能调节多种细胞因子的合成和分泌,但对雌激素能否影响垂体前叶 IFN- γ 样免疫阳性物质的表达,未见报道。本试验中大鼠去卵巢后,OVX 组大鼠随着雌激素的减少,垂体前叶 IFN- γ 表达也随之减少,而给予 17- β 雌二醇治疗后,大鼠垂体前叶 IFN- γ 表达相比 OVX 组显著增多,且在第 4 周时回升至对照组水平,提示去卵巢大鼠由于缺乏内源性雌激素,引起垂体前叶 IFN- γ 表达减少,而补充外源性雌激素可缓解或抑制这一变化,说明雌激素对 IFN- γ 在垂体前叶的合成与分泌起着重要作用。另外,OVX 组大鼠垂体前叶 IFN- γ 表达在后期有所回升,推测是大鼠在去卵巢后,经过长时间的自我调整,机体自身代偿功能发挥作用^[13],使得雌激素有所回升,从而引起垂体前叶 IFN- γ 表达也随之有所回升。

雌激素在不同浓度时往往表现出不同的调节机制,本试验仅研究了在生理浓度范围雌激素对大鼠垂体前叶 IFN- γ 表达的影响,至于不同浓度雌激素对大鼠垂体前叶 IFN- γ 表达的影响,还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 钟延清,朱运龙,王高峰,等.雌二醇对大鼠垂体前叶白细胞介

素-8 样免疫阳性物质的影响 [J].第四军医大学学报,2002,23(10):880-883.

Zhong Y Q,Zhu Y L,Wang G F,et al. Effect of estrogen on interleukin-8 like immunoreactive substance in rat anterior pituitary [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2002,23(10):880-883.

[2] Burns G,Sarkar D. Transforming growth factor- β 1-like immunoreactivity in the pituitary gland of the rat;Effect of estrogen [J]. Endocrinology,1993,133(3):1444-1449.

[3] 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.

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

[5] Fox H S,Bond B L,Parslow T G. Estrogen regulates the IFN- γ promoter [J]. J Immunol,1991,146(12):4362-4367.

[6] Karpuzoglu-Sahin E,Hissorg B D,Ansar A S. Interferon- γ levels are upregulated by 17- β -estradiol and diethylstilbestrol [J]. Reprod Immunol,2001,52(12):113-127.

[7] Suresh B P,Jenny M J,Robert D K. Treatment of rats with 17- β -estradiol or relaxin rapidly inhibits uterine estrogen receptor β 1 and β 2 messenger ribonucleic acid levels [J]. Biology of Reproduction,2002,67(6):1919-1926.

[8] Shu S,Ju G,Fan L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system [J]. Neurosci Lett,1988,85(2):169-170.

[9] 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.

[10] 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]. J Endocrinol Invest,1991,14(6):457-461.

[11] Vankelecom H,Matthys P,Denef C. Involvement of nitric oxide in the interferon- γ -induced inhibition of growth hormone and prolactin secretion in anterior pituitary cell cultures [J]. Mol Cell Endocrinol,1997,129(2):157-167.

[12] Kanda N,Tsuchida T,Tamaki K,et al. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum,1999,42(2):328-337.

[13] 赵 宏,田占庄,陈伯英.去卵巢大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴的功能代偿机制研究 [J]. 中国神经科学杂志,2003,19(4):229-233.

Zhao H,Tian Z Z,Chen B Y. The functional compensation in hypothalamus-pituitary-ovary axis after ovariectomy in rats [J]. Chin J Neurosci,2003,19(4):229-233.