

# 5-HT 与 NSE 和 SYN 在牛周期黄体细胞中的共存

陈树林<sup>1</sup>, 马永生<sup>1</sup>, 王桂花<sup>1</sup>, 李兆才<sup>1</sup>, 雷治海<sup>2</sup>,  
张 宝<sup>1</sup>, 段会娟<sup>1</sup>, 杭 超<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100;

2 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095)

**【摘要】**【目的】探讨弥散性神经内分泌细胞标记物在牛黄体细胞中的共存现象, 以为黄体细胞的内分泌研究提供理论依据。【方法】采集黄牛黄体, 常规方法制备石蜡切片, 采用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶法, 结合免疫组化双标记法染色后, 镜检拍照, 研究牛周期性黄体细胞中 5-HT 与 NSE 和 SYN 的共存情况。【结果】黄体组织中含有这 3 种标记物的单标记和 5-HT 与其他两者的双标记免疫反应阳性细胞, 其主要以散在形式分布于黄体中, 细胞形态多呈圆形、椭圆形和梭形, 阳性细胞平均数由多至少依次为: 5-HT、NSE、SYN/5-HT、SYN 和 NSE/5-HT; 在黄体细胞以外的卵巢细胞中未观察到这 3 种物质的存在。【结论】牛黄体组织中存在 5-HT、NSE、SYN 3 种标记物和 SYN/5-HT、NSE/5-HT 双标记免疫反应阳性细胞, 提示黄体组织在发生的同时也存在着部分细胞的神经内分泌分化。

**【关键词】** 牛; 5-羟色胺; 神经元特异性烯醇化酶; 突触素; 免疫组化双标记; 周期性黄体

**【中图分类号】** S858.232.2; Q42

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2009)04-0037-05

## Coexistence of 5-HT with NSE or SYN in corpus luteum cells of bovine during estrous cycle

CHEN Shu-lin<sup>1</sup>, MA Yong-sheng<sup>1</sup>, WANG Gui-hua<sup>1</sup>, LI Zhao-cai<sup>1</sup>, LEI Zhi-hai<sup>2</sup>,  
ZHANG Bao<sup>1</sup>, DUAN Hui-juan<sup>1</sup>, HANG Chao<sup>1</sup>

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

2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

**Abstract:** 【Objective】The study was done to probe into the existence of diffused cells label in corpus luteum (CL) to provide theoretical foundation for the study of neuroendocrine. 【Method】Corpus luteum of bovine was collected, paraffin slice prepared with routine method and dyed with immunohistochemistry streptavidin-peroxidase(SP) method combining with double-labeled immunohistochemistry, then a photograph was taken after examining under the microscope, and the coexistence of 5-HT、NSE and SYN in cycling corpus luteum cells of bovine was studied. 【Result】The results showed that cells which were single positive of 5-HT、NSE or SYN and double positive of NSE/5-HT or SYN/5-HT were localized in CL. They were mainly distributed in CL with dispersive form, and were mostly round, oval and triangle. The average number of immunoreactive cells in one section in descending order was 5-HT single positive cell, NSE single positive cell, SYN/5-HT double positive cell, SYN single positive cell and NSE/5-HT double positive cell. The existence of cells containing three antigens was not observed in the cell of ovary except the CL

\* [收稿日期] 2008-05-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30170683); 陕西省自然科学基金项目(2006C130); 河南省乳品工程技术研究中心科研基金项目(2006001)

[作者简介] 陈树林(1965—), 男, 陕西汉中, 副教授, 主要从事神经生物学和细胞生物学研究。

E-mail: csl\_1359@163.com; csl9719@163.com

cells. 【Conclusion】 It showed that three labels and the phenomena of 5-HT coexisted with NSE or SYN were localized in CL, and suggested that neuroendocrine differentiation exist in the portion of CL cells at the same time of the CL formation.

**Key words:** bovine; 5-HT; NSE; SYN; double-labeled immunohistochemistry; cycling corpus luteum

黄体是卵泡排卵后主要由颗粒细胞和卵泡内膜细胞形成的一个暂时性的内分泌器官,其周而复始的出现与消亡对哺乳动物的发情及分娩等生殖活动具有重要意义。5-羟色胺(5-HT)作为一种内源性单胺类中枢神经递质,广泛参与着脑的正常神经生理生化活动。神经元特异性烯醇化酶(Neuron specific enolase, NSE)是一种广泛分布于神经元和神经内分泌细胞中的烯醇化酶同工酶,其在糖酵解过程中催化 2-磷酸甘油转变为磷酸烯醇式丙酮酸<sup>[1]</sup>。突触素(Synaptophysin, SYN)是突触小泡膜上的一种含糖的膜结构蛋白,是目前发现的最显著的、特异的神经内分泌细胞标识物之一<sup>[2]</sup>。有研究表明,5-HT、NSE 和 SYN 作为弥散性神经内分泌系统广谱的、共同的细胞标记物,广泛分布于奶山羊卵巢黄体中<sup>[3]</sup>,但目前尚不清楚这 3 种标记物在黄体细胞中的联系。为此,本试验拟采用链霉素抗生物素-过氧化物酶(Streptavidin -peroxidase, SP)法,对牛周期性黄体中 5-HT、NSE 和 SYN 的存在进行检测,并结合免疫组织化学双标记法探查 5-HT 与其他二者在周期黄体细胞中是否有共存现象,以期为进一步研究其在黄体细胞中的联系及黄体细胞的神经内分泌分化提供理论和形态学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

处于发情周期的成年经产黄牛 5 头,临床健康,年龄为 24~30 月龄,体质量 350~400 kg。

### 1.2 主要试剂

抗兔及抗鼠链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化超敏 SP 试剂盒、鼠抗人 NSE 单克隆抗体,购自福州迈新生物技术开发公司;兔抗 5-HT 多克隆抗体、鼠抗人 SYN 单克隆抗体,购自武汉博士德生物工程有限公司;葡萄糖氧化酶和四盐酸 3,3'-二氨基联苯胺(DAB),Sigma 公司进口、华美生物工程公司分装;3-氨基-9-乙基咪唑(AEC),购自福州迈新生物技术开发公司。

### 1.3 牛黄体切片的制备

将供试黄牛颈动脉放血致死,快速取出卵巢并剥离其正常且较成熟的黄体,放入含 40 g/L 多聚甲

醛的 0.1 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)中固定 24~72 h。固定好的黄体采用常规方法制作石蜡切片,片厚 6  $\mu\text{m}$ 。共制作 6 套切片,其中 3 套分别用于 5-HT、NSE 和 SYN 抗体的免疫组织化学 SP 法单标记染色;2 套分别用于 5-HT 与 NSE 和 5-HT 与 SYN 抗体的免疫组织化学 SP 法双标记染色;最后 1 套部分用作阴性对照试验,部分用于 HE 常规染色以便于阳性细胞的定位。

### 1.4 牛黄体切片双重酶标记免疫组化 SP 法染色

切片脱蜡复水后,微波修复,然后按试剂盒所附说明书进行免疫组化染色,染色程序简述如下:将切片用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 次,每次 10 min(以下各步结束后均用 0.01 mol/L 的 PBS 充分漂洗 3 次,每次 10 min);切片在 37  $^{\circ}\text{C}$  下用过氧化物酶阻断液(试剂 A)孵育 10 min;加入非免疫动物血清(试剂 B),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min;加入第一抗体(兔抗 5-HT 多克隆抗体、鼠抗人 NSE 单克隆抗体或鼠抗人 SYN 单克隆抗体),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜;加入生物素标记的第二抗体(试剂 CNSE 或 CSYN),37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 10 min;加链亲合素-过氧化物酶溶液(试剂 DNSE 或 DSYN),37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 10 min;加入 AEC 呈色,呈色时间不超过 10 min,期间在镜下观察、掌握呈色时间;双蒸水洗 2 遍终止反应后,PBS 液洗涤 2 遍。然后 37  $^{\circ}\text{C}$  下再用过氧化物酶阻断液(试剂 A)孵育 10 min;加入生物素标记的第二抗体(试剂 C5-HT),37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 10 min;加链亲合素-过氧化物酶溶液(试剂 D5-HT),37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 10 min;加入 DAB 显色液呈色,显色不超过 10 min,期间在镜下观察、掌握呈色时间;双蒸水洗 2 遍终止反应后,PBS 液洗 2 遍。在切片水分挥发之前用水性胶封片,60  $^{\circ}\text{C}$  烘干。

阴性对照试验以 0.01 mol/L 的 PBS 代替一抗,其他步骤同上。

### 1.5 牛黄体切片的显微摄影、图像分析及数据处理

在光学显微镜下观察记录所制得的组织切片,用 Motic 数码显微镜在 400 倍镜野下拍照,然后从每例牛黄体 6 套切片中各随机选取 10 张切片照片,用江苏捷达 801 形态分析软件进行分析计算,测量免疫组化阳性细胞的数目和平均灰度值及 HE 染色时切片中的细胞总数目。其中阳性细胞数目用平均

数表示,平均灰度值用“均数±标准差( $\bar{X} \pm SD$ )”表

## 2 结果与分析

### 2.1 牛黄体切片的染色观察

将NSE/5-HT和SYN/5-HT免疫组化双标记阳性反应组织切片呈色后,镜下观察结果(图1-A, B)表明,大小黄体细胞都有阳性表达(图中箭头所示),阳性细胞轮廓清楚,胞质中含有棕褐色阳性颗粒,呈均质状或颗粒状分布于细胞质中;细胞核不着

示,结果进行*t*检验。

色或浅着色,呈圆形空泡状,位于细胞中央或稍偏于一侧;细胞胞体形态呈不规则的圆形、椭圆形或梭形等。根据胞体内反应颗粒着色的深浅,可将阳性细胞分为强阳性、中等阳性和弱阳性3种,强阳性细胞呈棕褐色,细胞轮廓清晰;中等阳性细胞呈棕色,细胞边缘较清晰;弱阳性细胞呈浅棕色,细胞轮廓模糊。

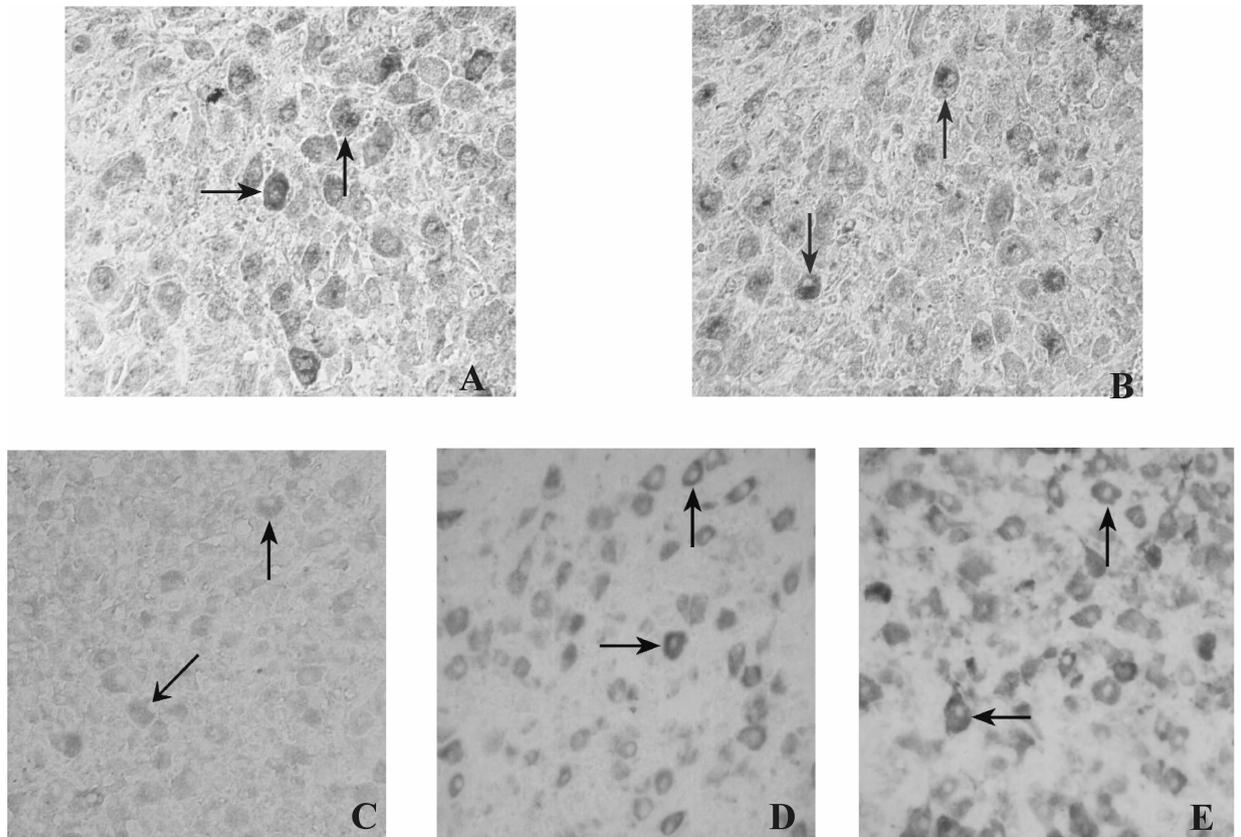


图1 牛黄体中单、双标记免疫反应后阳性细胞的观察( $\times 400$ )

A. 5-HT/NSE; B. 5-HT/SYN; C. 5-HT; D. SYN; E. NSE

Fig. 1 Positive cells in CL under the cycling corpus luteum

A. 5-HT/NSE; B. 5-HT/SYN; C. 5-HT; D. SYN; E. NSE

5-HT、NSE和SYN免疫组化单标记阳性反应组织切片呈色后,在镜下观察,由图1-C, D, E可见,胞质中分别含有橙红色和蓝黑色颗粒(图中箭头所示),而阳性反应细胞的形态及阳性反应颗粒的着色特点均与NSE/5-HT和SYN/5-HT双标记阳性反应细胞相似。

### 2.2 图像的形态分析

将拍照所得照片,经计算机形态分析,得到的数据统计及处理结果见表1。从表1可以发现,每张组织切片上的平均阳性细胞数由少至多的顺序为:SYN单标记、SYN/5-HT双标记、NSE/5-HT双标

记、NSE单标记和5-HT单标记。5-HT单标记切片的平均细胞数显著多于NSE/5-HT双标记切片( $P < 0.05$ ),而NSE单标记切片与NSE/5-HT双标记切片平均细胞数的差异不显著( $P > 0.05$ );5-HT单标记切片的平均细胞数显著多于SYN/5-HT双标记切片( $P < 0.05$ ),而SYN单标记切片与SYN/5-HT双标记切片平均细胞数的差异不显著( $P > 0.05$ )。平均灰度值由小到大依次为:NSE单标记、SYN单标记、SYN/5-HT双标记、5-HT单标记和NSE/5-HT双标记。说明阳性颗粒染色强度顺序由强至弱依次为:NSE单标记、SYN单标记、

SYN/5-HT 双标记、5-HT 单标记和 NSE/5-HT 双标记。 $t$  检验表明,NSE/5-HT 双标记切片拍照后照片的平均灰度值与 5-HT 和 NSE 单标记切片相

比差异均不显著( $P>0.05$ );SYN/5-HT 双标记切片拍照后照片的平均灰度值与 5-HT 和 SYN 单标记切片相比差异亦均不显著( $P>0.05$ )。

表 1 牛黄体中 5-HT、NSE 和 SYN 阳性细胞数及其灰度值的比较( $n=5$ )

Table 1 Cell number and gray value and its comparison of positive cells of 5-HT, NSE and SYN in CL of bovine ( $n=5$ )

项目 Item	$n$	5-HT 阳性细胞 5-HT positive cell	NSE 阳性细胞 NSE positive cell	SYN 阳性细胞 SYN positive cell	SYN/5-HT 双标细胞 SYN / 5-HT double labeled cell	NSE/5-HT 双标细胞 NSE / 5-HT double labeled cell
阳性细胞数 Number of positive cells	1	436	197	190	183	158
	2	378	208	183	212	127
	3	229	205	155	141	122
	4	237	196	145	135	185
	5	191	197	149	174	296
平均细胞数 Average number of cells		294 *	201	164	169	178
灰度值 Gray value	1	170±18	136±27.6	169±49.3	173±86.4	204±119
	2	168±30	148±31	147±19.3	170±97.9	211±134
	3	161±18	150±20	147±17.6	170±137.3	196±122
	4	160±30	159±15	138±6.4	160±103	265±181
	5	158±22	148±24.5	144±17.0	91±6.5	159±56
平均灰度值( $\bar{X}\pm SD$ ) The average gray value		163±23.6	148±23.6	149±21.9	153±86.2	207±122.4
占总细胞数的百分比/% Percentage of positive cells		60.7	41.5	33.9	34.9	36.6

注:平均灰度值越小表示阳性染色越深,即阳性颗粒表达量越多。数据后标 \* 者表示其与 NSE/5-HT 和 SYN /5-HT 双标细胞相比差异显著, $P<0.05$ 。

Note: The less the average gray value, the darker the positive staining, namely the more the positive expression. “\*” means significant difference compared with NSE/5-HT double labeled positive cells,  $P<0.05$ .

### 3 讨论

本研究主要检测了 NSE、SYN 和 5-HT 等 3 种广谱的、共同的弥散性神经内分泌系统细胞标记物在牛黄体中的存在情况。有研究表明,内源性或外源性雌激素对缺血脑组织均有明显的保护作用,推测其可能是通过增加 NSE 的表达,加强糖酵解,进而对细胞代谢的改善起保护作用<sup>[4]</sup>。赵正梅等<sup>[5]</sup>发现,己烯雌酚在一定浓度时能明显增加表达 NSE 的体外培养神经细胞数量。SYN 主要定位于神经元的胞体、神经末梢以及所有的神经内分泌细胞胞浆,是目前发现的最显著且具特异性的神经内分泌细胞标识物之一。有试验表明,雌激素能促进突触素合成和增加突触密度<sup>[2,6-7]</sup>。研究表明,5-HT 代表了一类通过 G 蛋白结合受体相互作用而促进细胞分裂的分子<sup>[8]</sup>,对神经细胞、免疫细胞具有生长因子的作用<sup>[9]</sup>;5-HT 还可以通过骨髓基质细胞表面 5-HT<sub>2</sub> 型受体对骨髓基质细胞起促生长作用<sup>[10]</sup>。而雌激素能加速单胺氧化酶(MAO)的变性,减少其对 5-HT 的分解,从而促进 5-HT 的合成代谢,增加 5-HT 能神经传导<sup>[11]</sup>。另外,雌激素还对脊背核和前脑 5-HT<sub>2A</sub> 受体及 5-HT 载体的表达有增强作

用<sup>[12]</sup>。

已证实雌激素对神经系统有一定的保护作用<sup>[13]</sup>。综上可知,雌激素可以通过增加 NSE 和 SYN 样神经细胞的数量而对神经细胞发挥保护作用,同时,雌激素对 5-HT 及其受体的表达也有促进作用。这与本课题组发现雌激素可促进小脑 ER 等的表达以保证小脑功能发挥的结论相类似<sup>[14]</sup>。本试验结果显示,牛周期性黄体细胞中存在 NSE/5-HT 和 SYN/5-HT 免疫组化双标记阳性细胞,并且阳性表达比较强。NSE/5-HT 双标记切片平均灰度值与 5-HT 和 NSE 单标记切片相比差异均不显著,5-HT 单标记切片的平均细胞数显著多于 NSE/5-HT 双标记切片( $P<0.05$ ),NSE 单标记切片与 NSE/5-HT 双标记切片差异不显著( $P>0.05$ )。与 5-HT 和 SYN 单标记切片的平均灰度值、平均细胞数相比,SYN/5-HT 双标记切片和二者的差异与 NSE/5-HT 和二者的差异一样。上述灰度值的分析与细胞计数结果一致,即 5-HT 单标记细胞平均数高于 NSE/5-HT 和 SYN/5-HT 双标记细胞平均数,而 NSE 和 SYN 单标记细胞平均数分别与 NSE/5-HT 和 SYN/5-HT 双标记细胞平均数处于同一水平。

以上结果提示,卵巢雌激素通过增加黄体组织中的5-HT及其受体的表达,促进NSE样和SYN样细胞的生长,这种作用还需要在细胞培养试验中进一步验证。迄今尚未见5-HT分别与NSE和SYN之间存在相互作用的报道,本试验中的NSE/5-HT和SYN/5-HT免疫组化双标记阳性反应细胞为5-HT与NSE和SYN之间相互作用的认识提供了形态学基础。5-HT、NSE和SYN作为弥散性神经内分泌系统广谱的、共同的细胞标记物,只存在于牛黄体细胞中,而在黄体细胞以外的卵巢细胞中尚未观察到,类似的现象在山羊上也存在<sup>[3]</sup>。由此推论,在反刍动物牛和羊的卵巢发生黄体化的同时,也存在着部分细胞的神经内分泌分化;5-HT、NSE和SYN与黄体的形成与退化有密切的关系,但有关5-HT、NSE和SYN在黄体组织的发生与退化中起什么作用及作用途径如何,均尚需作进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Muley T, Ebert W, Stieber P, et al. Technical performance and diagnostic utility of the new Elecsys neuron-specific enolase enzyme immunoassay [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2003, 41(1): 95-103.
- [2] 张燕平, 刘其强, 白宏英. 雌激素对慢性脑缺血大鼠认知功能及突触素的影响 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2007, 10(1): 76-78.
- Zhang Y P, Liu Q Q, Bai H Y, et al. Effects of estradiol benzoate on cognitive function and synaptophysin in rats with chronic cerebral ischemia [J]. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases*, 2007, 10(1): 76-78. (in Chinese)
- [3] 陈树林, 蒋田园, 雷治海, 等. 山羊黄体弥散性神经内分泌细胞的分布 [J]. *畜牧与兽医*, 2007, 39(9): 16-19.
- Chen S L, Jiang T Y, Lei Z H, et al. Distribution of diffused neuroendocrine system cells in the goat corpus luteum [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2007, 39(9): 16-19. (in Chinese)
- [4] 罗蔓, 谢瑞满. 雌激素在中枢神经系统中的作用 [J]. *中国临床医学*, 2005, 12(6): 1181-1182.
- Luo M, Xie R M. Involvement of estrogen in central nervous system [J]. *Chinese Journal of Clinical Medicine*, 2005, 12(6): 1181-1182. (in Chinese)
- [5] 赵正梅, 陈晓蓉. 己烯雌酚对体外培养中脑神经元的保护作用 [J]. *神经解剖学杂志*, 2007, 23(1): 69-72.
- Zhao Z M, Chen X R. The neuroprotection of diethylstilbestrol on mesencephalic neurons *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Neu-*

- roanatomy, 2007, 23(1): 69-72. (in Chinese)
- [6] 刘风华, 谭会兵, 左萍萍, 等. 苯甲酸雌二醇对去卵巢大鼠海马突触素和钙结合蛋白免疫活性的影响 [J]. *药理学学报*, 2000, 35(5): 339-342.
- Liu F H, Tan H B, Zuo P P, et al. Effects of estradiol benzoate on synaptophysin, parvalbumin and calbindin D28k immunoreactivity in hippocampus of ovariectomized rats [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2000, 35(5): 339-342. (in Chinese)
- [7] 郭安臣, 刘风华, 左萍萍, 等. 植物雌激素与突触素表达及空间认知水平的相关性研究 [J]. *中国临床康复*, 2002, 6(22): 3355-3356.
- Guo A C, Liu F H, Zuo P P, et al. The relative study of phytoestrogen  $\alpha$  zearalenol expression of synaptophysin and space learning ability [J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2002, 6(22): 3355-3356. (in Chinese)
- [8] Fanburg B L, Lee S L. A new role for an old molecule: Serotonin as a mitogen [J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(5): 795-806.
- [9] Dooley A E, Pappas I S, Parnavelas J G, et al. Serotonin promotes the survival of cortical glutamatergic neurons *in vitro* [J]. *Exp Neurol*, 1997, 148: 205-214.
- [10] 易岂建, 杨默, 庞雅轩, 等. 五羟色胺促进骨髓基质细胞生长初探 [J]. *重庆医科大学学报*, 2005, 30(2): 239-242.
- Yi Q J, Yang M, Pang Y X, et al. Serotonin stimulates the growth of bone marrow stromal cells [J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2005, 30(2): 239-242. (in Chinese)
- [11] 张巍, 郭锡永, 刘景英. 更年期妇女抑郁症状与血清孕激素、叶酸、五羟色胺的相关性研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2006, 21(17): 2433-2436.
- Zhang W, Guo X Y, Liu J Y. Study of the correlation among depression symptom and serum progesterone, folic acid 5-HT in climacteric women [J]. *Maternal and Child Health Care of China*, 2006, 21(17): 2433-2436. (in Chinese)
- [12] Fink G, Sumner B E, McQueen J K, et al. Sex steroid control of mood, mental state and memory [J]. *Clin Exp Pharmacol*, 1998, 25(10): 764-775.
- [13] Liu X, Fan X L, Zhao Y, et al. Estrogen provides neuroprotection against activated microglia-induced dopaminergic neuronal injury through both estrogen receptor- $\alpha$  and estrogen receptor- $\beta$  in microglia [J]. *Neurosci Res*, 2005, 81(5): 653-665.
- [14] 罗启慧, 陈正礼, 范光丽. 雌激素对去卵巢大鼠小脑ER、ChAT、NGF表达的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(9): 959-965.
- Luo Q H, Chen Z L, Fan G L. Effects of Estrogen on expression of ER, NGF and ChAT in cerebellum of ovariectomized female sprague-Dawley rat [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(9): 959-965. (in Chinese)