

妊娠中期奶山羊下丘脑中催产素的免疫组化定位^{*}

陈树林, 张 艳, 赵慧英, 范光丽, 毛海鹏,
李耀辉, 尹宝英, 蒲强红

(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 采用免疫组织化学技术中的链霉素抗生物素-过氧化酶(streptavidin- peroxidase, SP)法, 对妊娠中期奶山羊下丘脑中催产素(Oxytocin, OT)神经元的定位及分布进行了观察研究。结果表明, 下丘脑中分泌 OT 的神经元主要分布在视上核和室旁核, 在环核、视上弥散核、弓状核、室周核、穹窿周核、下丘脑前区、下丘脑外侧区、下丘脑后核和乳头体各核团等也有一定数量的阳性神经元; 另外, 在室旁核、视上弥散核、视上核、正中隆起和第三脑室附近有较多数量的强阳性神经纤维, 在交叉上核有少量阳性神经纤维。提示 OT 在妊娠中期奶山羊下丘脑中分布广泛, 且下丘脑 OT 神经垂体、第三脑室、血管三条途径释放, 经血液循环最终作用于靶细胞而发挥生理作用。

关键词: 催产素; 免疫组化; 下丘脑; 妊娠中期; 奶山羊

中图分类号: S814.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2005)03-0001-04

Immunohistochemical Localization of Oxytocin on Hypothalamus in Dairy Goat during Midgestation

CHEN Shu-lin, ZHANG Yan, ZHAO Hui-ying, FAN Guang-li, MAO Hai-peng,
LI Yao-hui, YIN Bao-ying and PU Qiang-hong

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract The immunohistochemical SP method was used to study the distribution of oxytocin on hypothalamus in dairy goat during midgestation. The oxytocin-immunohistochemical (OT-IR) neurons were mainly distributed over nucleus parentricularis and nucleus supra-opticus; in addition, OT-IR neurons were also found in nucleus circularis, nucleus supra-opticus diffuses, nucleus arcuatus, nucleus periventricularis, nucleus perifornicalis, area anterior hypothalami, area lateralis hypothalami, nucleus posterior hypothalami, nucleus mamilaris and so on. More OT-IR nerve fibers were observed in nucleus paraventricularis, nucleus supra-opticus diffuses, nucleus supra-optious, medium eminence and the surrounding area of the third ventricle and so on. Also, some nerve fibers were found in nucleus suprachiasmaricus. These results suggested that the distribution of OT in the hypothalamus of dairy goat during midgestation was extensive and the physiological effection was on target cells by blood circle after releasing by three channels which were the third ventriculus(cerebrospinal fluid), neurohypophysis and blood vessel.

Key words Oxytocin; Immunohistochemistry; Hypothalamus; Midgestation; Dairy Goat

动物生殖过程受机体内多种因素综合调控, 其中起主要调控作用的是下丘脑神经内分泌

^{*} 收稿日期: 2004-10-25 修回日期: 2005-03-02
基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170683); 陕西省自然科学基金资助项目。
作者简介: 陈树林 (1965-), 男 (汉族), 陕西汉中, 副教授, 主要从事神经生物学和细胞生物学方面的研究, 电话: (029) 87092438。

系统。而催产素 (Oxytocin, OT) 则是下丘脑特殊分化的神经细胞合成的重要生殖激素之一, 具有促进子宫收缩 (催产), 促进乳腺排乳, 促进卵泡发育及排卵, 促进黄体形成和黄体溶解, 调节发情周期等重要作用, 并参与神经内分泌调节系统的调节, 如下丘脑-垂体-性腺轴, 下丘脑-垂体-肾上腺轴^[1]。大量研究显示, 催产素与妊娠密切相关, 但其究竟在妊娠中如何作用还未完全弄清, 因此本实验通过对催产素在妊娠中期奶山羊下丘脑中的定位及分布进行研究, 为进一步阐明催产素对妊娠的影响及作用机制提供形态学依据, 并为 OT 及其类似物在繁殖生产和临床治疗上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

妊娠 12 周关中奶山羊母羊 4 只, 临床健康。

1.2 样本采集

颈部动脉放血致死后用 4% 多聚甲醛灌注固定, 采集下丘脑, 用相同固定液继续后固定 24~48 h, 入 20% 蔗糖磷酸缓冲液中, 直至组织块沉底。

1.3 组织切片

对下丘脑做连续冰冻冠状切片, 片厚 $35\mu\text{m}$, 取其中 3 套。第 1 套进行免疫组化 SP 法染色; 第

2 套进行 Nissl 染色, 做核团定位; 第 3 套用于对照, 确定本实验反应的特异性。

1.4 免疫组化 SP 法操作程序

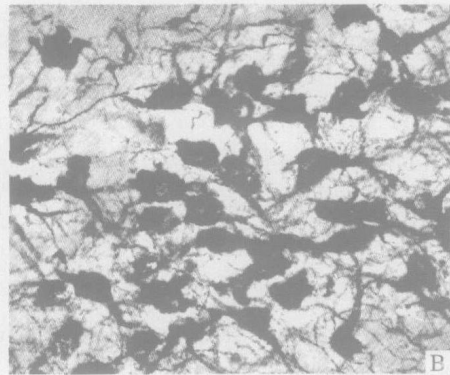
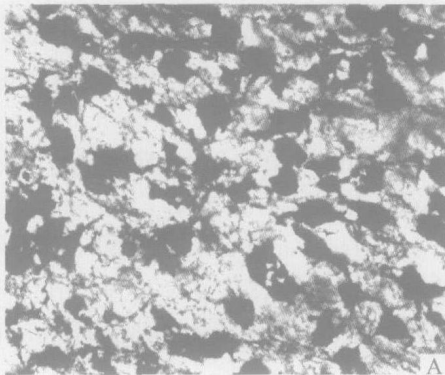
免疫组化染色程序按照试剂盒说明进行, 第一抗体 OT (第四军医大学馈赠) 工作浓度为 $1:5000$, 同时设阴性对照组, 用 DAB 呈色, 贴片, 再用梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 观察。阳性产物呈深蓝色或蓝色, 阴性对照组无阳性产物。

1.5 统计学处理

免疫组化染色结果每组切片中相同核团随机选取 5 个不同部位, Motic 数码显微镜拍照, 用江苏捷达 801 形态分析软件对阳性细胞进行分析, 测量阳性细胞的大小, 灰度值, 数目, 灰度值用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示, 其余用均数 ($\bar{x}$) 表示。

2 结果与分析

经免疫组化 SP 法染色的切片, 背景无色或浅蓝色, OT 免疫反应阳性神经元呈深浅不等的蓝黑色, 多为双极神经元或多极神经元, 也见单极神经元; 胞体呈不规则的圆形、卵圆形、梭形、三角形和多角形等, 大小不等, 细胞直径约为 $5\sim 30\mu\text{m}$, 成堆或分散分布。强阳性细胞蓝黑色, 胞体内深蓝色颗粒融合成团, 染成一片, 如视上核、室旁核 (图 1-A, 1-B)。



A. 视上核的 OT 免疫阳性细胞及纤维 The OT-IR neurons and nerve fibers in supra-optic nucleus
B. 室旁核的 OT 免疫阳性细胞 The OT-IR neurons in paraventricularis nucleus.

图 1 视上核和室旁核的 OT 免疫阳性细胞 ($\times 400$)

Fig. 1 The OT-IR neurons and nerve fibers in supra-optic nucleus and paraventricularis nucleus ($\times 400$)

弱阳性细胞着色浅淡, 细胞轮廓不清, 在高倍镜下方可见到胞质中有少量浅蓝色颗粒, 如下丘脑前区, 视前外侧核; 中等阳性细胞介于二者之间, 如乳头体外侧核, 结节乳头体核。胞核不着色呈空泡状, 居于中央或偏于一侧, 多数神经元可见

1~4 个突起, 长的突起还有分支, 突起内亦有反应颗粒, 有的神经元的突起伸向第三脑室或伸向血管 (图 2)。

免疫反应阳性神经纤维呈蓝黑色细丝状或串珠状, 颗粒大小不一, 形态多样, 在室旁核, 视上弥

散核,视上核,正中隆起(图 3)和第三脑室附近有较多数量的强阳性神经纤维。
对照组切片均为阴性(表 1)

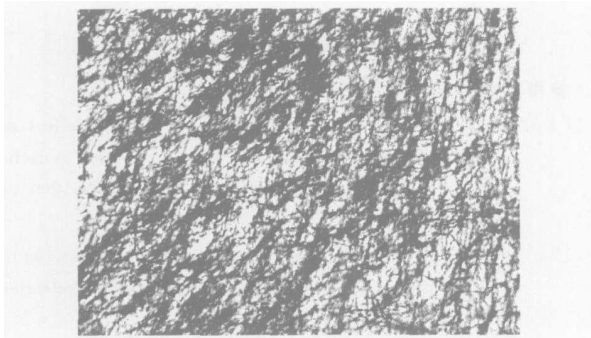


图 2 在血管周围的 OT免疫阳性细胞及纤维(× 400)

Fig. 2 The OT-IR neurons around the blood vessel (× 400)

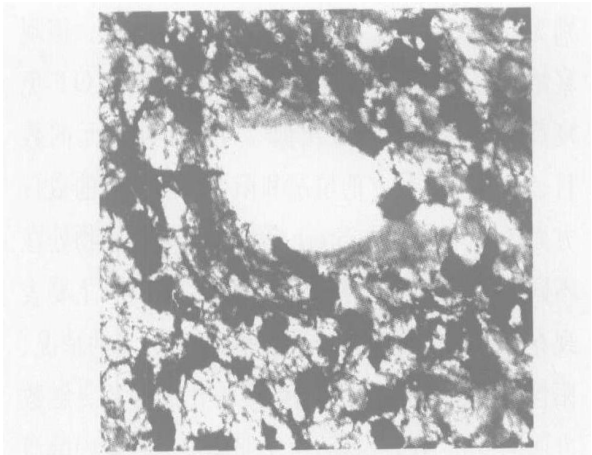


图 3 正中隆起中有大量的 OT免疫阳性纤维(× 400)

Fig. 3 The OT-IR nerve fibers in median eminence(× 400)

表 1 OT阳性神经元及神经纤维在妊娠中期奶山羊下丘脑中的分布
Table 1 Distribution of the OT-IR neurons and The OT-IR nerve fiberson hypothalamus in dairy goat during midgestation

核团名称 Nuclei	神经元平均数 Neurons average	平均灰度值* (x± S) Gray scale	神经纤维密度* Nerve fibers density
前连合核 Nucleus anterior commissuris	14	66. 36± 15. 02	-
下丘脑外侧区 Area lateralis hypothalami	224	82. 23± 11. 97	-
下丘脑室周核 Nucleus periventricularis hypothalami	49	54. 28± 9. 08	-
交叉上核 Nucleus supra-chiasmaticus	37	31. 69± 5. 51	+
视上核 Nucleus supra-opticus	569	21. 37± 6. 49	++
环核 Nucleus circularis	12	50. 7± 7. 22	+
视上弥散核 Nucleus supra-opticus diffuses	22	21. 08± 6. 55	+++
室旁核 Nucleus paraventricularis	289	23. 12± 6. 35	++
弓状核 Nucleus arcuatus	22	50. 44± 10. 62	-
腹外侧核 Nucleus ventrolateralis	109	81. 79± 13. 62	-
腹内侧核 Nucleus ventromedialis	66	94. 20± 18. 17	-
穹窿周核 Nucleus perifornicalis	14	85. 97± 9. 12	-
结节乳头体核 Nucleus tuberomamillaris	36	40. 15± 6. 12	+
乳头体内侧核 Nucleus mamillaris medialis	78	73. 92± 12. 37	-
乳头体外侧核 Nucleus mamillaris lateralis	82	63. 07± 9. 18	-
乳头体后核 Nucleus mamillaris posterior	156	66. 39± 7. 46	-
乳头体上核 Nucleus supramamillaris	10	92. 16± 4. 40	-
正中隆起 Median eminence	0	33. 9± 7. 06	+++

注: 灰度值越低神经元所含 OT颗粒越多;+++ 多,++ 中等, + 少量, - 无
Note The OT-IR granules in neuron are more when gray scale is low; +++ more, ++ medium, + less, - none.

3 讨论

Monika^[2]研究发现在哺乳动物 OT神经元主要存在于下丘脑大细胞核、视上核和室旁核,其神经纤维主要投射到垂体后叶和正中隆起。段晓勤、杨明、沈霞芬等^[3- 5]在多种动物的室旁核、视上核、穹窿周核、室周核、下丘脑外侧区、下丘脑前核、环核和前连合核等见到 OT神经元,本实验也在上述区域出现阳性神经元及数量不等的阳性纤

维,此外在视前内侧核、视前外侧核、视上弥散核、腹内侧核、腹外侧核、弓状核、结节乳头体核、交叉上核和乳头体各核团等 27个核团亦看到一定数量的神经元,在室旁核、视上弥散核、视上核、正中隆起、第三脑室附近有较多数量的强阳性神经纤维,在交叉上核、结节乳头体核可见少量阳性神经纤维。上述结果说明,OT在妊娠中期奶山羊下丘脑中分布非常广泛。

由表 1可以看出,在妊娠中期奶山羊下丘脑

中,OT主要存在于视上核和室旁核,其阳性神经元数目最多,分别为 569,289,单个阳性神经元中所含 OT颗粒较多,染色呈强阳性,平均灰度值分别为,21.3777± 6.4965,23.1285± 6.3599 该观察结果与发情期、乏情期奶山羊下丘脑中 OT免疫反应神经元的分布相似^[6,7],但在神经元的数目、大小、树突分支的情况和阳性神经纤维的数目方面还存在着差异。Stern等^[8]研究发现动物处在不同的生理周期,其细微结构会有所变化,主要表现在神经元的位置、数目、大小、树突分支的情况、阳性神经纤维的数目、细胞膜内在成分和突触数方面的变化。在妊娠期,由于卵巢中一些类固醇激素的调节,OT系统会发生一系列的变化,如下丘脑中 OTmRNA增加,神经垂体中 OT也会增加,分泌 OT的大细胞神经元在形态、电生理方面发生改变^[9]。但在妊娠中期,为确保胎儿正常发育,子宫活动的频率、幅度逐渐减慢,反馈地引起下丘脑分泌的 OT减少。所以妊娠中期奶山羊下丘脑分泌的 OT要明显少于妊娠晚期,少于发情期,高于乏情期奶山羊下丘脑分泌的 OT。

在第三脑室附近的一些核团如室旁核,室周核中有一些神经元的突起及神经纤维伸向第三脑室,杨庞等^[11]的研究已经证实了第三脑室室周区的 OT神经元可向垂体后叶投射,OT免疫阳性触液神经元在脑脊液和垂体后叶之间起功能上的联系作用,脑脊液可影响垂体后叶的分泌。因此,OT免疫阳性触液神经元可经室旁垂体束与脑脊液运输两种方式至神经垂体,即分别通过神经、体液两种途径对神经垂体进行往返调节。同时,在室旁核、视上核、穹隆周核、环核等核团中见到一些血管被 OT神经元及纤维环绕。另外,在正中隆起有较密集的神纤维,而且含有明显的分泌颗粒,

表明 OT经神经垂体、第三脑室(脑脊液)、血管(液)三条途径释放,经血液循环最终作用于靶细胞而发挥生理作用。

参考文献:

[1] Genowefa K, Barbara K, Anita F, *et al.* The effect of oxytocin on cortisol and corticosterone secretion in cyclic gilts in vivo and in vitro studies[J]. *Reproductive*, 2004, 4(1): 35 ~ 54.

[2] Monika O M. Effect of excitatory amino acids on activity of vasopressinergic and oxytocinergic neurons [J]. *Endocrine Regulations*, 2004, 38: 23~ 28.

[3] 段晓勤,鞠躬,包新民.大鼠下丘脑及邻近区域催产素免疫阳性神经元与垂体后叶的关系 [J].*解剖学报*, 1988, 19(3): 265~ 270.

[4] 杨明,陆振山.催产素神经元在丘脑下部的分布——免疫组化 PAP技术 [J].*四川解剖学杂志*, 1985, 5(3): 1~ 6.

[5] 沈霞芬,钱菊汾,田玉山,等.催产素、加压素神经元在奶山羊下丘脑的分布 [J].*中国兽医科技*, 1990, (3): 11~ 13.

[6] 卿素珠,陈树林,沈霞芬.发情周期中奶山羊下丘脑—垂体—卵巢轴催产素的免疫组化定位 [J].*中国兽医学报*, 2003, 23(3): 300~ 302.

[7] 沈霞芬,贾维珍,戚鹏先,等.奶山羊下丘脑中催产素神经元的分布 [J].*西北农业大学学报*, 1993, 21(4): 65~ 69.

[8] Stern J E, Hestrin S, Armstrong W E. Enhanced neurotransmitter release at glutamatergic synapses on oxytocin neurons during lactation in the rat [J]. *Journal of physiology*, 2000, 526(1): 109~ 114.

[9] David L L, William R C, Steven L B. Differential sensitivity of intranuclear and systemic oxytocin release to central noradrenergic receptor stimulation during mid-and late gestation in rats [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(7): 3386~ 3394.

[10] 杨庞,鞠躬.大鼠投射到垂体后叶的加压素样免疫反应神经元与第三脑室室管膜及软脑膜的关系 [J].*解剖学报*, 1992, 23(1): 23~ 26.