

大豆异黄酮对去卵巢大白鼠垂体雌激素受体 和白细胞介素-2 表达的影响

夏玉^{1,2}, 罗启慧^{1,2#}, 祝春梅^{1,2}, 陈正礼^{1,2*}

(1.四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130; 2.动物疾病与人类健康中心四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

摘要: 为探讨大豆异黄酮(SIF)对雌激素受体(ER α)和白细胞介素-2(IL-2)在去卵巢大鼠垂体各叶中表达的影响, 对去卵巢大鼠皮下注射不同剂量的 SIF(分别皮下注射 1.5、1.0、0.5 mg/kg 的 SIF)和无水乙醇, 另设假手术组, 注射等量无水乙醇。待 SIF 处理至第 2、6 周时, 于各组随机选取 5 只大鼠进行剖杀, 分别对大鼠垂体中 ER α 和 IL-2 的蛋白及 mRNA 表达变化进行研究。结果显示, 大鼠去除卵巢后, 垂体各叶中 ER α 和 IL-2 的蛋白及 mRNA 表达强度和阳性细胞数均显著下降, 补充 SIF 后有不同程度升高, 其中高剂量 SIF 作用 6 周后, 各指标的表达基本恢复至假手术组水平, 其他各组随 SIF 的剂量增加及作用延长也有部分恢复, 表明大豆异黄酮对去卵巢大鼠垂体各叶内 ER α 和 IL-2 蛋白及 mRNA 的表达有促进作用, 呈现时间和剂量的依赖性。

关键词: 大鼠; 大豆异黄酮; 垂体; 雌激素受体(ER α); 白细胞介素-2(IL-2); 免疫组化; 原位杂交

中图分类号: S865.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2018)01-0082-06

Effects of soybean isoflavone on protein and mRNA expression of ER α and IL-2 in pituitary of ovariectomized rats

XIA Yu^{1,2}, LUO Qihui^{1,2#}, ZHU Chunmei^{1,2}, CHEN Zhengli^{1,2*}

(1.College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China; 2.Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: To explore the effects of soybean isoflavone (SIF) on expression of estrogen receptor alpha (ER α) and interleukin-2 (IL-2) protein as well as mRNA in the pituitary of ovariectomized rat, forty healthy female rats were ovariectomized, and then respectively supplied with SIF at high dosage (1.5 mg/kg), middle dosage (1.0 mg/kg), low dosage (0.5 mg/kg) and solvent agent by mean of hypodermic injection, at the same time, sham operation group was injected at the same amount of solvent agent. After treatments of the second and sixth week, 5 rats out of each group were randomly selected for the study. The expression and distribution of ER α , IL-2 protein and mRNA in the pituitary were studied using technique of immunohistochemical (IHC) and in situ histo-hybridization method (ISHH). The results showed that the general tendency of intensity and the number of positive cells of ER α and IL-2 in pituitary of ovariectomized group rats were significantly decreased with time after ovariectomized. While, in ovariectomized rats treatment with SIF, the general tendency of the intensity and the number of ER α and IL-2 positive cells were increased, especially at high doses of soy isoflavones for six weeks, the intensity and quantity of these products were even reached to the level of that in the sham-operation group, while, in other groups, only part were recovered with SIF dose and time increase. The above results indicated that SIF could upregulate the expression of ER α and IL-2 protein as well as mRNA in the pituitary ovariectomized rat, and it showed a time and dose dependent manner.

收稿日期: 2017-06-28

修回日期: 2017-10-20

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项(2013YQ49085906); 国家科技支撑计划项目(2014BAI03B01); 四川省青年科技创新研究团队项目(2013TD0015)

作者简介: 夏玉(1988—), 女, 四川遂宁人, 硕士研究生, 主要从事实验动物疾病模型研究, xiayu113bvs@163.com; #共同第一作者, 罗启慧, 博士, 副教授, 主要从事试验动物疾病模型研究, luoqihui80@163.com; *通信作者, 陈正礼, 博士, 教授, 主要从事试验动物疾病模型研究, chzhli75@163.com

Keywords: rat; soy isoflavone; pituitary; estrogen receptor alpha (ER α); interleukin-2 (IL-2); immunohistochemical (IHC); in situ histo-hybridization method (ISHH)

大豆异黄酮(soy isoflavone, SIF)是一种植物雌激素,具有类雌激素作用^[1-3]。已有研究^[4-7]表明,SIF能与机体免疫系统中T淋巴细胞、单核细胞等免疫细胞表面的雌激素受体结合,还能促进干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)、白介素4(interleukin 4, IL-4)和白介素2(interleukin 2, IL-2)分泌,进而调节机体的免疫。目前,去除卵巢对ER α 、IL-2的蛋白及mRNA在大鼠垂体各叶中表达影响的相关研究和大豆异黄酮对ER α 、IL-2的蛋白及mRNA在大鼠垂体各叶表达影响的相关研究尚少。笔者拟建立去卵巢大鼠模型模拟动物雌激素水平低下状态,以垂体为研究对象,应用SABC免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)和核酸原位组织杂交技术(in situ hybridization histochemistry, ISHH),从蛋白表达和基因转录两方面探讨ER α 和IL-2在大鼠垂体各叶中的分布情况,并探讨SIF对去卵巢大鼠垂体中ER α 和IL-2表达的影响,旨在为大豆异黄酮的合理利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雌性SD大鼠50只([SCXK(川)2014-028],成都达硕实验动物有限公司),其平均体质量为(220 \pm 18)g。

大豆异黄酮(批号为20140806)购自西安天丰生物科技有限公司;ER α 和IL-2原位杂交检测试剂盒、SABC试剂盒以及ER α 和IL-2多克隆抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理及组织准备

3月龄雌性SD大鼠若干,经手术建立去卵巢模型大鼠40只,另设假手术组(以下简称为“S”)10只。于手术后14d将去卵巢大鼠随机平分为4组,分别皮下注射1.5、1.0、0.5 mg/kg的SIF(以下分别简称为H、M、L组),另外一组注射等量无水乙醇(以下简称为C组)。S组注射等量无水乙醇,注射剂量参照文献^[8-9]。连续处理6周,处理至第2周时,随机

从各组挑选5只进行剖杀,取垂体固定。处理至第6周时重复以上操作。

试验期间室内温度维持在(20 \pm 2)℃,相对湿度为60%~70%,每天12h光照。试验小鼠自由采食,饮用水清洁。每周更换2次垫料。试验中动物的处置符合中华人民共和国科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2.2 垂体中ER α 和IL-2的蛋白及mRNA的检测

1) 石蜡切片的制作。将固定后的垂体用蒸馏水冲洗,进行梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片(厚6 μ m)、贴片、脱蜡、复水。

2) 垂体中ER α 和IL-2蛋白的检测。将石蜡切片用3% H₂O₂在室温下作用5~10 min,以灭活内源性过氧化物酶,然后用蒸馏水洗3次;将切片浸入0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中加热至沸腾后取出,5~10 min后再加热至沸腾,如此反复2~3次;待冷却后用PBS洗涤1~2次,滴加5% BSA封闭液,室温下放置20 min,甩去多余液体,不洗;分别滴入ER α 、IL-2第一抗体,4℃孵育过夜,用PBS洗3次,每次2 min;滴加生物素标记的第二抗体,室温下孵育20 min后用PBS洗2 min,共洗3次;加SABC后置于室温下孵育20 min,用PBS洗5 min,共洗4次,然后入DAB显色液呈色,至显色完成时用蒸馏水终止反应。用PBS洗15 s,洗2次,然后进行贴片、晾干、脱水、透明、封片。阴性对照试验以PBS替代ER α 、IL-2抗体,其余步骤与ER α 和IL-2蛋白检测方法相同。

3) 垂体中ER α 和IL-2的mRNA的检测。将切片用0.5% H₂O₂处理5~10 min,双蒸水洗涤3次;用胃蛋白酶37℃消化5~120 s,用PBS洗涤,每次洗5 min,共洗3次,再用双蒸水洗1次;用1%多聚甲醛/0.1 mol/L PBS在室温下固定10 min,用蒸馏水洗3次;加入预杂交液后置于37℃恒温箱中2 h,吸去多余液体,不洗,滴杂交液40℃过夜;用2 \times SSC缓冲液于37℃洗涤3 min,洗2次;用0.5 \times SSC缓冲液洗涤15 min,再用0.2 \times SSC缓冲液洗涤2次,每次10 min;滴加封闭液,在37℃封闭30 min后甩去多余液体,滴加生物素化鼠抗地

高辛,在37℃温箱中孵育60 min,并用PBS洗4次,每次洗5 min,滴加SABC在37℃中孵育20 min,后用PBS洗3次,每次洗5 min;滴加生物素化过氧化物酶,在37℃下孵育20 min,用PBS洗4次,每次洗5 min,用DAB进行显色,至显色完成时用蒸馏水终止反应,然后进行洗涤、贴片、脱水,透明、封片。阴性对照试验以预杂交液替代杂交液,其余操作与ER α 和IL-2 mRNA检测方法相同。

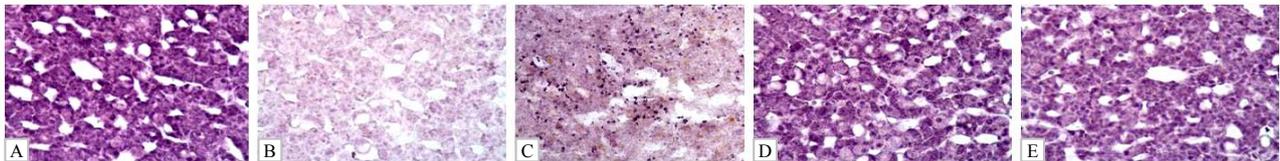
1.2.3 显微观察和数据分析

用Nikon50i-BF荧光生物数码显微镜拍照,并用江苏捷达801形态分析软件对阳性细胞进行分析,测量阳性细胞数及平均灰度值,用SPSS 11.5进行处理,采用单因子方差分析(One-Way ANOVA)进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 ER α 和IL-2的蛋白及mRNA在垂体中的分布

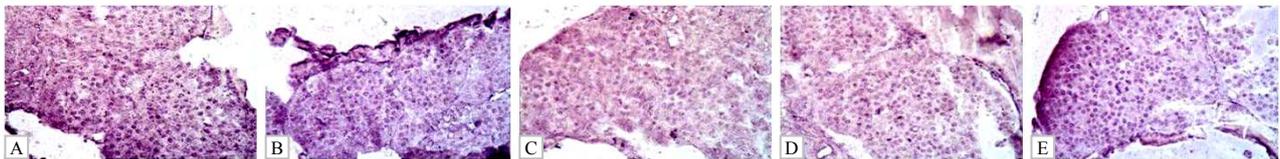
在假手术组中,垂体各叶中均有ER α 和IL-2蛋白免疫阳性产物及mRNA杂交产物分布,但分布数量和着色强度有差异。在垂体前叶,ER α 和IL-2蛋白主要定位于细胞核,仅有少数分布于细胞膜和细胞浆中(图1)。在垂体中间叶,2种免疫阳性产物着色均较淡,ER α 阳性细胞数量较多,占到总细胞数的60%~80%,而IL-2相对较少;ER α 主要分布于胞膜上,形成指环状围绕在细胞周围,而IL-2主要分布于细胞核中(图2-A)。另外,在垂体后叶也稀疏地分布着ER α 和IL-2的免疫阳性产物(图3-A)和mRNA杂交产物,但染色均较浅,且数量少,主要分布于血管和少数细胞周围(图3)。



A 假手术组+无水乙醇6周组;B 去卵巢组+无水乙醇6周组;C 去卵巢组+低剂量SIF处理6周组;D 去卵巢组+中剂量SIF处理6周组;E 去卵巢组+高剂量SIF处理6周组。

图1 ER α 蛋白免疫阳性产物在垂体前叶中的表达($\times 400$)

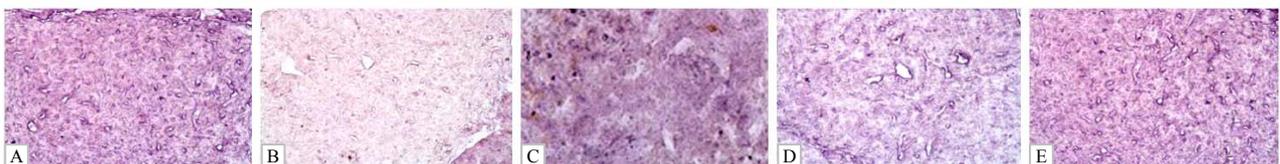
Fig.1 Positive products of ER α -IR distributed in the antepituitary ($\times 400$)



A 假手术组+无水乙醇6周组;B 去卵巢组+无水乙醇6周组;C 去卵巢组+低剂量SIF处理6周组;D 去卵巢组+中剂量SIF处理6周组;E 去卵巢组+高剂量SIF处理6周组。

图2 IL-2蛋白免疫阳性产物在垂体中间叶中的表达($\times 400$)

Fig.2 Positive products of IL-2-IR distributed in the intermediate lobe($\times 400$)



A 假手术组+无水乙醇6周组; B 去卵巢组+无水乙醇6周组;C 去卵巢组+低剂量SIF处理6周组;D 去卵巢组+中剂量SIF处理6周组;E 去卵巢组+高剂量SIF处理6周组。

图3 ER α 蛋白免疫阳性产物在垂体后叶中的表达($\times 400$)

Fig.3 Positive products of ER α -IR distributed in the posterior lobe of pituitary($\times 400$)

2.2 大豆异黄酮对去卵巢大鼠垂体ER α 和IL-2蛋白表达的影响

平均灰度值表示阳性物质表达的强弱,数值越小则表达越强。由表1可见,与假手术组(S)相比,

ER α 蛋白在去卵巢大鼠垂体各叶的表达强度和阳性细胞数(垂体前叶阳性细胞数除外)均极显著下降($P < 0.01$)。由表2可见,IL-2蛋白的表达强度在垂体各叶均极显著下降($P < 0.01$),但其阳性细胞数无明显

显变化。由表 1 可见,与对照组(C)相比,补充 SIF 后,在 SIF 作用时间相同时,ER α 蛋白的表达随 SIF 剂量升高呈显著升高趋势($P < 0.01$),在高剂量组作用 6 周时,ER α 蛋白的表达水平基本与假手术组持平,表现为剂量依赖性;在 SIF 浓度相同时,ER α

蛋白在垂体中间叶和垂体后叶的表达随 SIF 作用时间的延长极显著增强($P < 0.01$),表现为时间依赖性。IL-2 蛋白在垂体各叶中的表达强度与 ER α 的相似,即 IL-2 蛋白的表达强度也存在时间和剂量依赖性,但 IL-2 蛋白阳性细胞数未出现上述变化(表 2)。

表 1 去卵巢大鼠垂体 ER α 蛋白表达的阳性细胞数和平均灰度值

Table 1 Effects of supplying soybean isoflavone on the expression of ER α protein in pituitary gland of ovariectomized rat

处理	时间/周	阳性细胞数			平均灰度值		
		中间叶	垂体后叶	垂体前叶	中间叶	垂体后叶	垂体前叶
C 组	2	(54.4 \pm 3.7)aA	(12.4 \pm 1.1)aA	105.2 \pm 1.8	(161.4 \pm 9.78)cC	(180.3 \pm 5.0)dD	(177.1 \pm 5.2)dD
L 组	2	(64.2 \pm 3.5)bB	(12.2 \pm 0.6)aA	107.1 \pm 6.3	(163.1 \pm 5.2)cC	(173.2 \pm 4.5)cC	(179.1 \pm 3.2)dD
M 组	2	(74.2 \pm 3.7)cC	(12.5 \pm 2.1)aA	95.5 \pm 8.5	(162.3 \pm 6.5)cC	(152.3 \pm 5.7)bB	(166.0 \pm 9.2)cC
H 组	2	(83.3 \pm 5.6)dD	(13.9 \pm 1.5)bB	102.8 \pm 5.6	(146.8 \pm 7.9)bB	(141.8 \pm 7.4)aA	(155.7 \pm 7.7)bB
S 组	2	(100.1 \pm 6.5)eE	(18.4 \pm 1.2)cC	101.9 \pm 6.8	(124.0 \pm 5.4)aA	(140.3 \pm 5.8)aA	(127.7 \pm 7.2)aA

处理	时间/周	阳性细胞数			平均灰度值		
		中间叶	垂体后叶	垂体前叶	中间叶	垂体后叶	垂体前叶
C 组	6	(51.2 \pm 5.0)aA	(10.1 \pm 1.2)aA	103.3 \pm 4.8	(169.8 \pm 4.5)cC	(187.3 \pm 9.8)cC	(179.2 \pm 6.2)dD
L 组	6	(74.8 \pm 3.2)bB	(13.5 \pm 0.7)bB	105.0 \pm 6.0	(147.4 \pm 3.2)bB	(180.4 \pm 4.4)cC	(168.1 \pm 8.9)cC
M 组	6	(97.7 \pm 7.0)cC	(18.4 \pm 2.9)cC	98.9 \pm 2.0	(140.1 \pm 4.5)bB	(150.0 \pm 6.4)bB	(140.9 \pm 5.1)bB
H 组	6	(98.6 \pm 5.9)cC	(19.8 \pm 0.8)cC	100.3 \pm 3.4	(119.4 \pm 8.5)aA	(145.6 \pm 5.3)aA	(129.8 \pm 4.8)aA
S 组	6	(98.1 \pm 2.4)cC	(18.5 \pm 3.2)cC	97.8 \pm 9.1	(115.8 \pm 9.5)aA	(141.8 \pm 7.4)aA	(121.4 \pm 9.4)aA

同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);同列数据后不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

表 2 去卵巢大鼠垂体 IL-2 蛋白表达的阳性细胞数和平均灰度值

Table 2 Effects of supplying soybean isoflavone on the expression of IL-2 protein in pituitary gland of ovariectomized rat

处理	时间/周	阳性细胞数			平均灰度值		
		中间叶	垂体后叶	垂体前叶	中间叶	垂体后叶	垂体前叶
C 组	2	84.7 \pm 6.3	26.4 \pm 5.0	92.9 \pm 8.7	(167.9 \pm 8.5)cC	(160.8 \pm 3.8)cC	(164.9 \pm 5.5)bB
L 组	2	87.9 \pm 3.3	28.2 \pm 1.2	97.1 \pm 7.6	(160.3 \pm 6.0)bB	(153.8 \pm 8.2)bB	(165.2 \pm 8.9)bB
M 组	2	87.7 \pm 4.7	28.5 \pm 3.5	97.5 \pm 7.4	(159.8 \pm 6.0)bB	(153.8 \pm 7.6)bB	(167.2 \pm 8.3)bB
H 组	2	81.0 \pm 2.3	26.4 \pm 3.4	102.5 \pm 7.0	(155.9 \pm 9.9)bB	(147.6 \pm 6.0)aA	(162.1 \pm 8.1)bB
S 组	2	80.4 \pm 8.1	29.9 \pm 2.6	106.3 \pm 6.2	(134.3 \pm 9.5)aA	(145.5 \pm 4.8)aA	(144.3 \pm 7.5)aA

处理	时间/周	阳性细胞数			平均灰度值		
		中间叶	垂体后叶	垂体前叶	中间叶	垂体后叶	垂体前叶
C 组	6	83.6 \pm 2.9	29.1 \pm 1.8	95.0 \pm 9.5	(168.7 \pm 6.1)cC	(158.8 \pm 6.9)bB	(168.4 \pm 5.0)eE
L 组	6	87.0 \pm 4.1	32.9 \pm 9.6	106.1 \pm 4.2	(157.1 \pm 7.9)bB	(149.0 \pm 8.2)aA	(164.1 \pm 9.8)dD
M 组	6	89.0 \pm 6.3	27.5 \pm 3.0	101.5 \pm 3.4	(146.8 \pm 3.5)aA	(145.4 \pm 4.7)aA	(159.1 \pm 5.6)cC
H 组	6	82.2 \pm 4.0	29.1 \pm 0.9	104.3 \pm 5.5	(143.6 \pm 6.1)aA	(145.5 \pm 4.6)aA	(150.6 \pm 4.5)bB
S 组	6	87.0 \pm 4.5	26.6 \pm 3.6	102.5 \pm 8.6	(141.3 \pm 5.4)aA	(143.2 \pm 7.6)aA	(142.4 \pm 5.2)aA

同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);同列数据后不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

2.3 大豆异黄酮对去卵巢大鼠垂体 ER α 和 IL-2 mRNA 表达的影响

与假手术组(S)相比,ER α mRNA 的表达强度在去卵巢大鼠垂体各叶均呈极显著下降($P < 0.01$),但阳性细胞数仅在垂体中间叶和垂体后叶呈显著或

极显著下降($P < 0.05, P < 0.01$),在垂体前叶无明显变化(表 3);IL-2 mRNA 的表达强度在垂体各叶均呈极显著下降($P < 0.01$),但阳性细胞数无明显变化(表 4)。与对照组(C)相比,随着 SIF 作用时间的延长和剂量的增加,SIF 处理组 ER α mRNA 的表达强度和阳性细胞数均呈显著上升趋势($P < 0.01$),表现

出时间和剂量的依赖性,IL-2 mRNA 表达强度呈上升趋势,但阳性细胞数变化不显著(表3,表4)。

表3 去卵巢大鼠垂体 ER α mRNA 表达的阳性细胞数和平均灰度值

处理	时间/周	阳性细胞数			平均灰度值		
		中间叶	垂体后叶	垂体前叶	中间叶	垂体后叶	垂体前叶
C组	2	(81.0 \pm 6.2)a	(15.1 \pm 1.5)a	106.2 \pm 9.7	(145.2 \pm 6.1)cC	(146.9 \pm 2.2)bB	(133.8 \pm 7.1)bB
L组	2	(78.9 \pm 1.8)a	(14.2 \pm 2.0)a	106.4 \pm 7.4	(146.7 \pm 8.7)cC	(146.5 \pm 3.6)bB	(135.1 \pm 7.1)bB
M组	2	(84.2 \pm 8.6)b	(14.8 \pm 2.2)a	99.5 \pm 9.3	(143.9 \pm 8.4)cC	(142.7 \pm 9.8)bB	(132.3 \pm 6.3)bB
H组	2	(88.3 \pm 8.1)b	(16.2 \pm 1.7)a	106.1 \pm 6.3	(135.8 \pm 7.7)bB	(145.6 \pm 5.8)bB	(132.7 \pm 7.5)bB
S组	2	(103.4 \pm 4.6)cC	(21.7 \pm 4.3)bB	105.3 \pm 4.8	(113.1 \pm 9.7)aA	(130.3 \pm 9.6)aA	(114.4 \pm 9.8)aA

处理	时间/周	阳性细胞数			平均灰度值		
		中间叶	垂体后叶	垂体前叶	中间叶	垂体后叶	垂体前叶
C组	6	(72.9 \pm 5.6)aA	(14.1 \pm 2.8)aA	107.6 \pm 6.6	(153.0 \pm 5.5)dD	(144.0 \pm 4.1)cC	(133.8 \pm 3.1)cC
L组	6	(86.8 \pm 5.9)bB	(15.8 \pm 3.9)aA	108.4 \pm 8.6	(135.3 \pm 4.3)cC	(146.7 \pm 8.9)cC	(131.5 \pm 5.8)cC
M组	6	(98.7 \pm 4.1)cC	(19.4 \pm 3.9)bB	100.5 \pm 7.0	(127.7 \pm 7.7)bB	(140.0 \pm 3.6)bB	(126.2 \pm 3.7)bB
H组	6	(100.9 \pm 7.7)cC	(22.2 \pm 2.9)bB	103.6 \pm 6.2	(113.6 \pm 9.8)aA	(132.9 \pm 8.2)aA	(112.5 \pm 9.7)aA
S组	6	(101.1 \pm 3.6)cC	(21.1 \pm 5.7)bB	110.8 \pm 7.4	(109.6 \pm 9.4)aA	(128.5 \pm 5.9)aA	(108.0 \pm 7.0)aA

同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); 同列数据后不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

表4 去卵巢大鼠垂体 IL-2 mRNA 表达的阳性细胞数和平均灰度值

处理	时间/周	阳性细胞数			平均灰度值		
		中间叶	垂体后叶	垂体前叶	中间叶	垂体后叶	垂体前叶
C组	2	88.0 \pm 2.8	31.4 \pm 9.2	(94.6 \pm 6.3)aA	(157.9 \pm 4.9)cC	(154.1 \pm 6.7)cC	(148.2 \pm 7.6)bB
L组	2	91.3 \pm 2.6	31.6 \pm 4.9	(103.8 \pm 9.6)aA	(153.6 \pm 6.4)cC	(147.8 \pm 3.1)bB	(149.2 \pm 9.6)bB
M组	2	90.3 \pm 8.1	31.8 \pm 6.5	(97.5 \pm 7.4)aA	(153.1 \pm 4.3)cC	(154.4 \pm 8.5)cC	(153.8 \pm 7.8)bB
H组	2	82.3 \pm 9.8	28.7 \pm 3.5	(110.1 \pm 2.8)bB	(147.5 \pm 7.1)bB	(145.9 \pm 5.3)bB	(152.1 \pm 7.4)bB
S组	2	87.0 \pm 3.7	33.6 \pm 7.8	(113.0 \pm 7.0)bB	(128.3 \pm 9.4)aA	(132.2 \pm 7.5)aA	(128.9 \pm 8.5)aA

处理	时间/周	阳性细胞数			平均灰度值		
		中间叶	垂体后叶	垂体前叶	中间叶	垂体后叶	垂体前叶
C组	6	86.9 \pm 6.3	32.4 \pm 4.5	95.0 \pm 9.5	(161.1 \pm 6.6)cC	(157.2 \pm 6.9)bB	(155.4 \pm 9.9)cC
L组	6	90.3 \pm 6.8	35.3 \pm 5.7	110.7 \pm 9.2	(150.4 \pm 5.6)bB	(139.0 \pm 9.1)aA	(152.4 \pm 4.9)cC
M组	6	94.7 \pm 9.2	33.1 \pm 4.6	112.9 \pm 9.3	(135.1 \pm 9.1)aA	(137.1 \pm 8.6)aA	(139.1 \pm 9.8)bB
H组	6	85.6 \pm 4.6	32.5 \pm 5.2	112.3 \pm 8.8	(131.0 \pm 5.0)aA	(135.5 \pm 6.5)aA	(130.0 \pm 9.5)aA
S组	6	89.7 \pm 8.4	26.2 \pm 3.1	109.1 \pm 9.3	(132.9 \pm 9.0)aA	(131.2 \pm 9.9)aA	(128.8 \pm 8.8)aA

同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); 同列数据后不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

3 结论与讨论

在垂体中,ER 主要是在前叶细胞核中表达,在垂体中间叶呈弱阳性表达,在后叶不着色^[10-11]。ER α 主要分布于前叶和后叶细胞核中,在垂体中间叶无分布^[12-13]。本研究结果显示,ER α 蛋白及 mRNA 主要分布于垂体前叶和中间叶,在后叶极少表达,且主要定位于细胞核。这与文献[14-15]报道的研究结果相似。经分析发现,ER α 或 ER α mRNA 在垂体前叶均有高表达,表明 ER α 主要在垂体前叶与下丘脑

分泌的因子中参与反馈调节作用,而雌激素在垂体前叶发育和稳态调节中起重要作用。

IL-2 是重要的免疫因子,并具有内分泌作用^[16-18]。IL-2 促进大鼠垂体前叶细胞增殖的作用与雌激素水平密切相关,雌激素还可以影响大鼠垂体前叶 IL-2 与其受体表达^[19-20],提示 IL-2 信号转导通路与 ER α 有交叉联系;垂体细胞分泌的 IL-2 可能通过旁分泌影响周围的垂体细胞,也可能通过自身进行自身调节^[21-22]。本研究中摘除大鼠卵巢会对其垂体各叶 IL-2 和 ER α 产生影响,揭示了神经系统

与免疫内分泌网络之间存在着诸多联系,这进一步证实了神经-免疫-内分泌网络学说的重要性。

本研究结果表明,大鼠去卵巢后垂体各叶 ER α 和 IL-2 的表达均有不同程度的下降,且随去卵巢时间的延长降幅加大,表明去卵巢导致的雌激素水平低下对 IL-2 和 ER α 的表达具有显著影响。体外补充 SIF 后,IL-2 和 ER α 的蛋白及 mRNA 的表达水平均有不同程度升高,其中 SIF 高浓度(1.5 mg/kg)作用 6 周时可基本恢复至假手术组水平,表明大豆异黄酮(SIF)对去卵巢大鼠垂体中 ER α 和 IL-2 的蛋白及 mRNA 表达具有上调作用,且呈时间和剂量依赖性。

参考文献:

- [1] RIMOLDI G,CHRISTOFFEL J,SEIDLOVA-WUTTKE D, et al. Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(1): 62-68. DOI: 10.1289/ehp.9367.
- [2] NAGATA C, NAKAMURA K, FUJII K, et al. Soy isoflavone intake is not associated with the development of cedar pollinosis in adults[J]. J Nutr, 2008, 138(7): 1372-1376.
- [3] 陈正礼, 罗启慧, 程安春. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠脾脏 IL-2 mRNA 表达的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(9): 1948-1953.
- [4] COHEN J H, DANELL L, CORDIER G, et al. Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells[J]. J Immunol, 1983, 131(6): 2767-2771.
- [5] GULSHAN S, MCCRUDEN A B, STIMSON W H. Oestrogen receptors in macrophages[J]. Scand J Immunol, 1990, 31(6): 691-697. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1990.tb02820.x.
- [6] SAKAI T, KOGISO M, MITSUYA K, et al. Genistein enhances antigen-specific cytokine production in female DO11.10 transgenic mice[J]. J Nutr Sci Vitaminol, 2006, 52(5): 327-332. DOI: 10.3177/jnsv.52.327.
- [7] KARPUZOGLU-SAHIN E, ZHI-JUN Y, LENGI A, et al. Effects of long-term estrogen treatment on IFN-gamma, IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice[J]. Cytokine, 2001, 14(4): 208-217. DOI: 10.1006/cyto.2001.0876.
- [8] ALEKEL D L, GERMAIN A S, PETERSON C T, et al. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 72(3): 844-852.
- [9] DUFFY R, WISEMAN H, FILE S E. Improved cognitive function in postmenopausal women after 12 weeks of consumption of a soya extract containing isoflavones[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2003, 75(3): 721-729. DOI: 10.1016/s0091-3057(03)00116-3.
- [10] MOREL G, DUBOIS P, BENASSAYAG C, et al. Ultrastructural evidence of oestradiol receptor by immunocytochemistry[J]. Exp Cell Res, 1981, 132(2): 249-257. DOI: 10.1016/0014-4827(81)90100-2.
- [11] YAMASHITA S, KORACH K S. A modified immunohistochemical procedure for the detection of estrogen receptor in mouse tissues[J]. Histochemistry, 1989, 90(5): 325-330.
- [12] 张庆红, 陈亚琼, 胡玉珍, 等. 雌激素受体在大鼠垂体前叶的分布[J]. 解剖学报, 2001, 32(4): 352-353. DOI: 10.3321/j.issn: 0529-1356.2001.04.016.
- [13] 张庆红. 雌激素受体 α 在大鼠垂体的表达及其调控的初步探讨[J]. 中国应用生理学杂志, 2000, 16(2): 100. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6834.2000.02.002.
- [14] PELLETIER G, LIAO N, FOLLEA N, et al. Distribution of estrogen receptors in the rat pituitary as studied by in situ hybridization[J]. Mol Cell Endocrinol, 1988, 56(1/2): 29-33. DOI: 10.1016/0303-7207(88)90005-6.
- [15] WANG Y Q, SATO M, MORITA Y, et al. Postnatal ontogeny of POMC gene expression in the rat pituitary: an analysis by in situ hybridization histochemistry[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1989, 47(1): 53-58. DOI: 10.1016/0165-3806(89)90107-7.
- [16] 韦耿泽, 朱运龙, 王高峰, 等. 白细胞介素-2 mRNA 在大鼠垂体前叶的表达[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(3): 201-203. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-2790.2001.03.003.
- [17] ARZT E, STELZER G, RENNER U, et al. Interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in human corticotrophic adenoma and murine pituitary cell cultures[J]. J Clin Invest, 1992, 90(5): 1944-1951. DOI: 10.1172/JCI116072.
- [18] KARANTH S, MCCANN S M. Anterior pituitary hormone control by interleukin 2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(7): 2961-2965. DOI: 10.1073/pnas.88.7.2961.
- [19] 王高峰, 朱运龙, 胡玉珍, 等. 白细胞介素对大鼠离体垂体前叶细胞增殖的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 1997, 13(1): 65-68.
- [20] 张庆红, 胡玉珍, 陈亚琼, 等. 大鼠垂体前叶中一些免疫内分泌物质的共存[J]. 解剖学报, 2001, 32(4): 350-351.
- [21] ARZT E, PÁEZ PEREDA M, COSTAS M, et al. Cytokine expression and molecular mechanisms of their auto/paracrine regulation of anterior pituitary function and growth[J]. Ann N Y Acad Sci, 1998, 840: 525-531. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09591.x.
- [22] ARZT E, PEREDA M P, CASTRO C P, et al. Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland[J]. Front Neuroendocrinol, 1999, 20(1): 71-95. DOI: 10.1006/frne.1998.0176.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库