

绵羊垂体促性腺激素细胞的细胞类型 以及在发情周期内的变化^①

崔 胜^② 夏国良

(生物学院)

摘 要 本研究以绵羊发情周期内的不同时期,即黄体期、卵泡前期、卵泡后期和排卵后期的垂体组织为研究对象,利用免疫荧光单标记和双标记方法研究绵羊垂体促性腺激素细胞的细胞类型以及在发情周期内的变化。研究结果证明:在绵羊发情周期内,垂体促黄体激素(LH)免疫荧光单标记、促卵泡激素(FSH)免疫荧光单标记和 LH/FSH 免疫荧光双标记细胞的细胞阳性率之间无显著差异($P>0.05$);绵羊垂体 FSH 和 LH 分泌细胞属同一细胞类型,并且在发情周期内无明显变化($P>0.05$)。

关键词 绵羊; 垂体; 促性腺激素细胞; 发情周期

中图分类号 S852.2

Cellular Type of Pituitary Gonadotropes and Their Changes During Sheep Estrous Cycle

Cui Sheng Xia Guoliang

(College of Biological Sciences)

Abstract Sheep pituitaries, collected at different phases during the estrous cycle, were used to identify the cellular type of LH and FSH gonadotropes and their changes during the estrous cycle by means of single immunofluorescence labelling and double immunofluorescence labelling. The results suggested that there were no obvious differences ($P>0.05$) between the percentages of FSH positive cells and LH positive cells, and their changes were not observed during the estrous cycle. FSH/LH double labelling showed that all pituitary gonadotropes contained both FSH and LH. The cells secern pituitary FSH and LH respectively are belong to same kind, and their number did not change markedly throughout the estrous cycle.

Key words sheep; pituitary; gonadotrope; estrous cycle

垂体促性腺激素细胞分泌的 LH 和 FSH 对于维持雌性动物的发情周期以及生殖细胞成熟具有重要的生物学功能。目前,对于 LH 和 FSH 分泌细胞类型的认识仍有较大的争论

收稿日期: 1998-03-26

①本研究为国家自然科学基金资助项目 39770552

②崔胜,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

“两种激素一种细胞”学说认为 FSH 和 LH 由同一种细胞分泌^[1];“一种激素一种细胞”学说认为 FSH 和 LH 分别由垂体中的两类细胞分泌^[2];而另外一种学说则认为垂体促性腺激素细胞包括 LH 分泌细胞、FSH 分泌细胞和 FSH-LH 分泌细胞等三种细胞类型^[3,4]。另外,动物在不同生理状态下,垂体促性腺激素细胞的细胞类型是否随其分泌功能的改变而有所不同,也是有待进一步研究的问题。本研究的主要目的是以绵羊发情周期内不同时期的垂体组织为研究对象,利用免疫荧光单标记和双标记方法,研究垂体 FSH 和 LH 分泌细胞的细胞类型以及在发情周期内的变化,为进一步探讨促性腺激素的分泌调控机制,揭示生殖生理规律提供新的实验依据和研究思路。

1 实验材料和方法

1.1 绵羊垂体组织

所用绵羊垂体组织由英国生殖生物学中心馈赠。垂体组织采集方法:试验用母绵羊 24 只,人工诱导同期发情,随机分为 4 组,每组 6 只,先后在黄体期、卵泡前期、卵泡后期和排卵后期宰杀,采集垂体组织。4%多聚甲醛磷酸缓冲液固定 24 h 后,石蜡包埋。同时分析血液中 LH、FSH 以及雌激素含量,以证实动物处于上述不同的生理时期^[6]。

1.2 主要试剂

鼠 LH- β 单克隆抗体(由英国 A. S. McNeilly 教授赠送;兔抗羊 FSH β 抗体(NIH20, 英国);四甲基异硫氰酸罗达明(TRITC)标记猪抗鼠 IgG(Sigma 公司);异硫氰荧光素(FITC)标记驴抗兔 IgG(SAPU, S121-201, 英国)。

1.3 免疫荧光标记方法

所有组织切片厚度为 5 μm 。为了防止标记过程中的组织脱片,所有的载玻片用多聚赖氨酸(APES, ZLI-9001, Sigma)处理。

1.3.1 LH 免疫荧光单标记 (1)常规方法脱腊、水化;(2)3%过氧化氢甲醇溶液(W/V) 30 min;(3)0.05M Tris 缓冲液(pH 7.4)漂洗 2 \times 5 min;(4)正常猪血清封闭 30 min;(5)加入 LH- β 抗体(1:1000),4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 24 h;(6)磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗 2 \times 5 min;(7)加入 TRITC 标记猪抗鼠 IgG(1:200),常温下孵育 30 min;(9)PBS 漂洗 2 \times 5 min 后,滴加 10%的甘油,盖玻片覆盖,荧光显微镜观察。

1.3.2 FSH 免疫荧光单标记 (1),(2),(3)与上述 LH 标记方法(1),(2),(3)相同;(4)正常驴血清封闭 30 分钟;(5)加入 FSH- β 抗体(1:500,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 24 h;(6)PBS 漂洗 2 \times 5 min;(7)加入 FITC 标记驴抗兔 IgG(1:200),常温下孵育 30 min;(8)与上述 LH 免疫荧光标记方法(8)相同。

1.3.3 FSH-LH 免疫荧光双标记 (1),(2),(3)与上述单标记方法相同;(4)用混和后的正常猪血清和驴血清(1:1)封闭 30 min;(5)加入混合后的 LH- β 抗体(1:1000)和 FSH 抗体(1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 24 h;(6)PBS 漂洗 2 \times 5 min;(7)加入 TRITC 标记猪抗鼠 IgG(1:200),常温下孵育 30 min;(8)PBS 漂洗 2 \times 5 min;(9)加入 FITC 标记驴抗兔 IgG(1:200),常温下孵育 30 min;(10)与上述单标方法(8)相同。

1.4 对照实验

(1)用正常鼠血清(1:1000)代替 LH- β 抗体,其它方法与 LH- β 单标记相同;(2)用正常兔血清(1:500)代替 FSH- β 抗体,其它方法与 FSH 单标记相同;(3)FITC 标记驴抗羊 IgG 代替 TRITC 标记猪抗鼠 IgG,其它方法与 LH- β 单标记相同;(4)TRITC 标记猪抗鼠 IgG 代替 FITC 标记驴抗羊 IgG,其它方法与 FSH- β 单标记相同;(5)PBS 代替 FSH- β 抗体,其它方法与 FSH/LH 双标记方法相同;(6)PBS 代替 LH- β 抗体,其它方法与 FSH/LH 双标记方法相同。上述对照组中(1),(2)用以检验 FSH- β 和 LH- β 抗体的特异性;(3),(4)用以检验荧光标记第二抗体的特异性;(5),(6)用以检验双标记过程中两组抗体之间是否有交叉反应。

1.5 细胞计数和结果统计

所有垂体组织切片进行免疫荧光染色的同时,对其相邻切片进行苏木精染色以显示细胞核,然后在高倍(1 \times 40)镜下随机选择5个区域,分别用目镜计数器计数单位面积内的细胞总数。对 FSH、LH 免疫荧光单标记和 FSH-LH 免疫荧光双标记的切片,分别在荧光显微镜(1 \times 40)下,用同样方法计数单位面积内 FSH、LH 免疫荧光标记阳性细胞,以计算免疫荧光单标记的 FSH、LH 或 FSH-LH 免疫荧光双标记的细胞阳性率。对于计数结果用 T 检验方法进行显著性检验。

2 结果

2.1 对照组结果

对照组(1),(2),(3)和(4)不见有任何荧光标记阳性细胞;对照组(5)只可观察到 FITC 标记细胞;对照组(6)只见到 TRITC 标记细胞。由此证明所用抗体均具有高度特异性,并且两组抗体之间无交叉反应。

2.2 LH 和 FSH 单标记

在荧光显微镜下可见 LH 阳性细胞(红色)和 FSH 阳性细胞(绿色)的分布比较均匀,遍布于垂体前叶的所有区域。计数结果表明(图1):黄体期的 LH 和 FSH 的阳性细胞率虽然低于卵泡前期、卵泡后期和排卵后期,但差异不显著($P>0.05$)。在发情周期内的不同时期,FSH 细胞率和 LH 细胞率之间无显著差异($P>0.05$),并且发情周期内也表现相似的变化趋势(图1)。

2.3 FSH/LH 免疫荧光双标记

分别观察同一视野内 FSH 和 LH 荧光标记结果,可清楚地显示出垂体促性腺激素细胞是同时含有 FSH 和 LH 的双激素细胞,即 FSH/LH 分泌细胞(图2);并且 FSH/LH 分泌细胞的

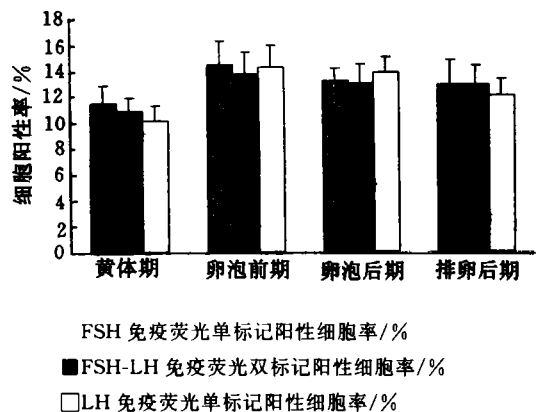


图1 绵羊发情周期内垂体中 FSH 免疫荧光单标记,FSH-LH 免疫荧光双标记和 LH 免疫荧光单标记细胞阳性率的变化

分布情况与上述单标记的结果相似。细胞计数结果表明: 在黄体期、卵泡前期、卵泡后期和排卵后的 FSH/LH 细胞阳性率分别为 $10.84 \pm 1.08\%$ 、 $13.67 \pm 1.73\%$ 、 $12.90 \pm 1.54\%$ 和 $12.88 \pm 1.47\%$, 这与 LH 和 FSH 单标记的计数结果相近(图 1)。

3 讨论

免疫组织化学技术已广泛应用于激素特异性细胞的研究, 但对于垂体促性腺激素细胞中 FSH 和 LH 的免疫组织化学双染色仍难以获得较为理想的标记效果。本研究所建立的免疫荧光双标记方法不仅可获得较为理想的染色结果, 而且克服了对连续切片分别进行染色的不足^[4]。另外, 本研究所选用的抗体均来自不同品种的动物, 以避免在染色过程中所产生的交叉反应, 并通过设立相应的多组对照, 有效地否定了因非特异性结合而产生的假阳性结果。因此, 免疫荧光双标记方法对于动物双激素或多激素分泌细胞类型的研究具有重要的应用价值。

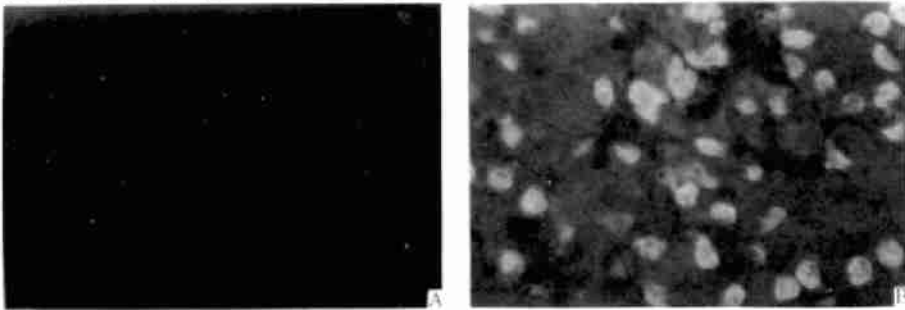


图 2 垂体促性腺激素细胞免疫荧光双标记(LH/FSH)

A. TRITC 标记 LH (红色), B. FITC 标记 FSH (绿色)

为了回答动物垂体中 FSH 和 LH 分泌细胞是否属于同一细胞类型, 有关学者已经作了大量的科学研究工作, 但因选用的动物品种和采用的研究方法不同, 对于垂体中 FSH 和 LH 分泌细胞的认知尚不统一。本研究结果证明绵羊垂体中 FSH 和 LH 细胞的类型与人^[8]以及猴^[9]、狗^[10]等动物的相同, 即绵羊垂体促性腺激素细胞具有 LH 和 FSH 免疫反应性, 并在发情周期内保持一致, 从而支持了“两种激素一种细胞”的学说。

前期的研究已证实本研究所用绵羊血液中 FSH 和 LH 浓度的变化与其它动物相似^[6], 而在发情周期内垂体中 FSH 和 LH 分泌细胞的数目的变化与 FSH 和 LH 血液浓度的变化无显著的相关性。因此, 动物 FSH 和 LH 血液浓度的变化主要与垂体促性腺激素细胞对 FSH 和 LH 分泌功能的改变有关。另外, 动物在发情周期内的不同时期, 垂体中 FSH 和 LH 分泌细胞的细胞类型和细胞数目基本相同, 而血液中 FSH 和 LH 含量的变化趋势和幅度有很大的差异。因此, FSH 和 LH 的分泌调控具有不平行的机制和生理意义。这也是生殖生物学有待进一步研究的问题之一。

致谢:英国生殖生物中心 A. S. McNeilly 教授为本研究提供部分实验材料,中国农业大学生物学院付国栋、王海滨、胡新者等同志给与热情的支持帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Nakamura F, et al. Immunohistochemical and ultrastructural study of anterior pituitary cells in the female Afghanpika. *Ocotone rufescens*. *Cell Tissue Res*, 1986, 244(3):627
- 2 Data M O, et al. A quantitative immunocytochemical study of LH and FSH cell in the adenohypophysis of adult male rat and adult female rats through the estrous cycle. *Endocrinology*, 1983, 133(2):970
- 3 Bastings E, et al. Immunocytochemical evidence for production of luteinizing-hormone and follicle-stimulating hormone cells in separate cells in the bovine. *Biol Reprod*. 1991, 45(5):78
- 4 郝建成等. 黄体生成素和卵泡刺激素在大鼠垂体前叶的细胞共同定位. *解剖学报*, 1997, 28 (1):55
- 5 Dacheux F. Heterogeneity in the subcellular localization of FSH and LH in the LH/FSH cells. *IRCS Med Sci*, 1986, 14:215
- 6 Cui Sheng, et al. The cellular distribution of estrogen receptor expression in the sheep pituitary throughout estrous cycle. in: 33th International Congress on Physiology Science. P005. 12, St. Petersburg Russia. 1997
- 7 Francisco G N, et al. Subcellular localization of gonadotrophic hormones LH and FSH in frog adenohypophysis using double-staining immunocytochemistry. *J Histochem. Cytochem*, 1987, 35(7):763
- 8 Kitajima K, Oakada K. Immunohistochemical localization of FSH and LH in human-pituitary glands. *Acta Histochem Cytochem*, 1980, 3:157
- 9 Herbert D C. Immunocytochemical evidence that luteinizing hormone(LH) and follicle stimulating hormone (FSH) are present in the same cell type in the rhesus monkey pituitary gland. *Endocrinology*, 1976, 98:1554
- 10 Eleltreby M F, et al. Localization of gonadotrophic hormone in the dog pituitary gland. *Cell Tissue Res*, 1997, 183:167
- 11 Campell B K, McNeilly A S. Follicular dominance and oocyte maturation. *Zyogate*, 1996, 4:327