

丙酸睾丸酮对不同功能运动神经元群降钙素基因 相关肽配布式样的影响[△]

石葛明, 李双成*, 张 凯*, 邢凌霄*, 崔慧先*[#]

(河北医科大学 基础医学院神经生物研究室, 石家庄 050017)

摘要: **目的** 探讨丙酸睾丸酮对大鼠两种不同功能运动神经元群降钙素基因相关肽 (CGRP) 配布式样的影响。**方法** 应用霍乱毒素 B 亚单位结合胶体金 (CB-Au) 逆行标记神经元复合免疫细胞化学反应的非荧光双标记法, 揭示 CB-Au 标记运动神经元群的 CGRP 免疫反应配布式样及其改变。**结果** 与相应正常对照组和去势组相比, 肌肉注射丙酸睾丸酮 28 d 后, 快肌-趾长伸肌运动神经元群调质 CGRP 的表达显著降低 ($P < 0.001$); 对慢肌-比目鱼肌运动神经元群 CGRP 样免疫反应的配布式样影响较小 ($P > 0.05$)。**结论** 快肌-趾长伸肌运动神经元群比慢肌-比目鱼肌运动神经元群在 CGRP 表达调节上更易受到雄激素的影响。

关键词: 丙酸睾丸酮; 降钙素基因相关肽; 运动神经元

中图分类号: R322.81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2005)06-0739-04

Effect of Testosterone Propionate on the Distribution Pattern of Calcitonin Gene-related Peptide in Different Motoneuron Pools[△]

Shi Ge-ming, Li Shuang-cheng*, Zhang Kai*, Xing Ling-xiao*, Cui Hui-xian*[#]

(Department of Neurobiology, Institute of Basic Medical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Objective To study the effect of testosterone propionate (TP) on the distribution pattern of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in two types of motoneuron (Mn) pools in rats. **Method** The double labeling of cholera toxin B subunit coupled with colloidal gold (CB-Au) retrograde identification combining with immunocytochemistry was mainly used to reveal the distribution pattern of CGRP-like immunoreactivity (CGRP-LI) and its changes in the motoneuron pools labeled by CB-Au. **Result** TP injected intramuscularly 28 days later significantly decreased CGRP expression in Mn pool innervating extensor digitorum longus (EDL, fast-twitch), comparing with corresponding control and castration group respectively ($P < 0.001$), while no significant effect on Mn pools innervating soleus (SOL, slow-twitch, $P > 0.05$) was observed. **Conclusion** EDL-Mn pool is more sensitive to testosterone propionate than SOL-Mn pool in regulating CGRP expression.

Key words: testosterone propionate; calcitonin gene-related peptide; motoneuron

Acta Acad Med Sin, 2005,27(6):739-742

运动神经元 (motoneuron, Mn) 降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 的表达受多种因素的影响, 与神经营养因子、肌肉的活动方式、损伤及性激素水平等均有密切关系^[1-5]。血

循环中雄激素水平的变化能引起性别双态性 (sexual dimorphic) 球海绵体肌脊髓核 (spinal nucleus of the bulbocavernosus, SNB) 运动神经元 CGRP 表达的改变, 去势 (睾丸切除, castration) 增加大鼠 SNB Mn 的

CGRP 表达^[5]。目前尚不清楚雄激素对性别双态性 SNB Mn 群 CGRP 表达的调节作用是否适用于其他躯体运动神经元群。有研究显示,以慢肌运动单位为主(87%)的比目鱼肌运动神经元(soleus motoneuron, SOL-Mn)群和以快肌运动单位为主(97%)的趾长伸肌运动神经元(extensor digitorum longus motoneuron, EDL-Mn)群,其 CGRP 配布式样明显不同^[3,4]。本研究以霍乱毒素 B 亚单位结合胶体金(cholera toxin B subunit coupled with colloidal gold, CB-Au)为逆行示踪剂,对 SOL-Mn 和 EDL-Mn 群进行标记,以丙酸睾丸酮(testosterone propionate)调节这两群 Mn CGRP 配布式样的变化,探讨雄激素对一般运动神经元群 CGRP 表达的影响,为雄激素在运动神经元水平调控 CGRP 的表达提供实验依据。

材料和方法

动物及模型制备 成年雄性 Wistar 大鼠共 30 只(河北医科大学实验动物中心提供),体重 250~280 g。随机将其分成正常对照组(control, CON)、去势组(castration, CAS)和去势丙酸睾丸酮注射组(testosterone propionate, TP),每组 10 只(5 只用于观察 SOL-Mn, 5 只用于观察 EDL-Mn)。CAS 组大鼠在深麻醉下做双侧睾丸切除术;CON 组大鼠除不做睾丸切除外,手术处理与 CAS 组相同;TP 组大鼠行睾丸切除术后每日肌肉注射丙酸睾丸酮(上海市第九制药厂)40 mg/kg,同时 CON 和 CAS 组大鼠注射等体积的芝麻油(北京六必居有限公司,sesame oil),28 d 后处死大鼠。处死前 5 d 以参考文献[6]方法制备的 CB-Au 标记各组的 EDL-Mn 和 SOL-Mn 群。

Mn 群的 CB-Au 标记及 CGRP 免疫细胞化学双标记 麻醉后大鼠以微玻管将 10~20 μ l CB-Au 多点注射(由同一注射点向不同方向依次进针,边退针边注射)于 EDL 或 SOL 内,5 d 后处死大鼠。深麻醉下经心灌注固定(固定液内含 4%多聚甲醛和 0.25%戊二醛)。取腰膨大节段(含有 L4、L5)置于上述固定液内 4℃ 固定 4 h,入 30%蔗糖液过夜(4℃)。做背腹纵行冰冻切片(40 μ m),切片行银加强^[6](增强 CB-Au 信号)显示逆行标记的 Mn。光镜下挑选含有 CB-Au 标记的脊髓切片进行 CGRP 免疫细胞化学反应。用 1:4000 抗 CGRP 抗体(Cambridge,UK)于 4℃ 孵育切片

48 h;1:400 生物素化第二抗体(Dako)室温 4 h;1:400 辣根过氧化物酶结合链霉亲和素(Streptavidin-HRP, Dako)室温 2 h;行二甲基联苯胺(DAB)呈色。免疫细胞化学对照实验以 PBS 代替 CGRP 抗体进行反应,其结果为阴性。切片脱水、树脂裱藏。

CB-Au 标记的脊髓 Mn 群 CGRP 样免疫反应强度分析 运动神经元 CGRP 样免疫反应(CGRP-like immunoreactivity, CGRP-LI)强度分为阴性(-)、弱阳性(+)、中等阳性(++)和强阳性(+++)。阳性反应强度按 Phiel 使用的方法^[7]通过目测判定,判定标准依据切片中运动神经元 CGRP-LI 着色强度。以此对每只大鼠所有切片中被 CB-Au 标记的 Mn(有细胞核,直径>25 μ m)进行 CGRP-LI 含量强度的归类计数(由一位观察者对编码切片标记神经元进行归类计数,且至少计数两次以上)。

统计学处理 采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

结 果

运动神经元的 CB-Au、CGRP-LI 非荧光双标记 光镜下可见, CB-Au 单标记的 Mn 胞浆内标记物为散在分布的黑色银加强颗粒;CGRP-LI 单标记的 Mn 胞浆内标记物呈棕黄色;双标记 Mn 胞浆内则含有以上两种标记物(附图)。

丙酸睾丸酮对两组 Mn 群 CGRP 表达的影响 对照组中 SOL-CON 和 EDL-CON Mn 群 CGRP-LI 含量强度在不同级别的构成比上差异具有显著性($P < 0.001$)。实验组在丙酸睾丸酮肌肉注射 28 d 后, SOL-TP、SOL-CAS 与 SOL-CON 3 组 Mn 群 CGRP-LI 含量强度每一级别频数构成比差异均无显著性($P > 0.05$)。EDL-TP 组 Mn 群 CGRP-LI 强阳性的比率较 EDL-CON、EDL-CAS 组 Mn 群显著降低,而中等阳性、弱阳性和阴性所占的比率明显增高($P < 0.001$)。EDL-CAS 组与 EDL-CON 组相比,差异无显著性($P > 0.05$) (附表)。

讨 论

采用示踪剂 CB-Au 复合免疫细胞化学的双标记方法,双标神经元的两种标记物银加强颗粒与 DAB 棕黄色产物两者易区别,没有酶标配基造成的两种

附表 丙酸睾丸酮对 SOL-Mn 和 EDL-Mn 群 CGRP-LI 含量强度的影响

Table Effect of testosterone propionate on CGRP-LI in the SOL-Mn pool and EDL-Mn pool

Group	No. of rats	No. of identi- fied Mns	CGRP-LI (-)No. of Mns (%)	CGRP-LI (+) No. of Mns (%)	CGRP-LI (++) No. of Mns (%)	CGRP-LI (+++) No. of Mns (%)
SOL-control	5	187	35 (18.7)	70 (37.4)	37 (19.8)	45 (24.1)
SOL-castrated	5	191	40 (20.9)	71 (37.2)	32 (16.8)	48 (25.1)
SOL-TP	5	195	39 (20)	79 (40.5)	37 (19)	40 (20.5)
EDL-control	5	213	13 (6.1)*	28 (13.1)*	12 (5.6)*	160 (75.1)*
EDL-castrated	5	211	14 (6.6)	33 (15.6)	11 (5.2)	153 (72.5)
EDL-TP	5	205	33 (16.1)#	71 (34.6)*	28 (13.7)#	73 (35.6)#

TP: testosterone propionate; * $P < 0.001$ compared with SOL-control groups; # $P < 0.001$ compared with EDL-control and EDL-castrated groups

标记物相互掩盖,从而克服了传统上以酶标配基为示踪剂,复合免疫细胞化学难以确定标记神经元群递/调质配布式样的缺点,为分析标记神经元群递/调质的配布式样及其变化提供了便利方法^[6]。本研究利用这种方法显示 SOL、EDL 运动神经元群 CGRP 配布方式的不同,与笔者以往的研究及相关文献报道一致^[3,4,8]。SOL 和 EDL 两群功能不同的运动神经元在 CGRP 表达含量强度的构成比上差异具有显著性,EDL-Mn 群以表达强阳性 CGRP 为主,而 SOL-Mn 群则主要以 CGRP 弱阳性和阴性为主(附表),这主要与其所支配肌肉的不同功能性质有关。

本研究显示,丙酸睾丸酮(肌肉注射,40 mg/kg)可以明显改变快肌 EDL-Mn 群 CGRP 的配布方式,但并未改变 SOL-Mn 群 CGRP 的配布式样。丙酸睾丸酮降低 EDL-Mn 群 CGRP 的表达,CGRP 强阳性比率从正常的 75.1%下降到 35.6%,雄激素降低 EDL-Mn 群 CGRP 表达的结果进一步证实了 Monks 等^[5]使用雄激素受体突变嵌和大鼠(tfm mosaic rat,SNB 含有雄激素敏感和不敏感运动神经元)的研究发现,即运动神经元的雄激素受体对其 CGRP 的调节起着重要的作用。以往研究雄激素对运动神经元群 CGRP 的影响主要是采用具有性别双态性、雄激素敏感的 SNB Mn-肌肉体系^[5,9,10],该体系不论是 SNB Mn (SNB 在脊髓的位置易于识别,不需逆行标记)、还是其所支配的靶器官球海绵体肌和肛提肌复合体(bulbocavernosus/lavator ani,BC/LA)均具有丰富的雄激素受体^[11],成年大鼠去势后仍引起 SNB-BC/LA 的萎缩、肌肉活动的减少^[12],而后者又增加 SNB 运动神经元群 CGRP 表达。因此,利用 SNB-BC/LA 这一体系很难判定雄激素调控运动神经元 CGRP 表达变化的作用点。本研究 SOL 和 EDL Mn-肌肉体系与以往研究所使用的 SNB-BC/LA 体

系明显不同,为非性别双态性,去势后 SOL、EDL 不会出现肌肉萎缩,从而排除了由于肌肉萎缩而产生某种能增加 CGRP 表达因子的可能性^[1,2],也解释了本研究大鼠去势后为何未见 SOL、EDL 运动神经元群 CGRP 升高的结果(本研究判定的是雄激素直接对标记运动神经元群 CGRP 表达的调节作用)。

丙酸睾丸酮对 SOL、EDL 运动神经元群产生不同的影响,可能与该两群运动神经元所含雄激素受体水平不同有关。研究显示雄激素受体在 Mn 表达的多少及其对雄激素的敏感性在调解 Mn CGRP 的表达过程中起着重要作用^[5],支配快肌的运动神经元群比支配慢肌的运动神经元群可能含有更丰富的雄激素受体;同时长期的丙酸睾丸酮处理使运动神经元群雄激素受体的表达增加^[13],提高了快肌 EDL-Mn 群对雄激素的敏感性,但是否如此尚有待深入研究。

本研究显示,雄激素对 SOL、EDL 运动神经元群 CGRP 配布式样的影响不同,即明显改变快肌 EDL-Mn 群 CGRP 的配布方式,这一结果除为本室另一实验工作(雄激素促进快肌运动神经元群树突的发育和芽生)提供依据外,同时证实了运动神经元的雄激素受体对其 CGRP 的调节起着重要作用。

(本文附图见插图第 10 页)

参 考 文 献

- 1 Ramer MS, Bradbury EJ, Michael GJ, *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor increases calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in sensory and motoneurons *in vivo*. *Europ J Neurosci*, 2003, 18(10):2713-2721
- 2 Blesch A, Tuszynski MH. GDNF gene delivery to injured adult CNS motor neurons promotes axonal growth, expression of the trophic neuropeptide CGRP, and cellular protection. *J*

Comp Neurol, 2001, 436(4):399-410

- 3 石葛明, 万选才, 谭会兵, 等. 对大鼠两种不同运动神经元群调质 CGRP 配布式样研究. 中国医学科学院学报, 1996, 18(6):401-406
- 4 石葛明, 谭会兵, 刘 扬, 等. 5, 7 双羟色胺对不同功能运动神经元群调质 CGRP 配布式样的影响. 中国医学科学院学报, 2000, 22(3): 290-292
- 5 Monks DA, Vanston CM, Watson NV. Direct androgenic regulation of calcitonin gene-related peptide expression in motoneurons of rats with mosaic androgen insensitivity. J Neurosci, 1999, 19(13):5597-5601
- 6 石葛明, 万选才, 谭会兵, 等. 不同直径胶体金结合霍乱毒素 B 亚单位的逆行轴浆转运及其应用. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 1996, 3(1):1-7
- 7 Piehl F, Avidsson U, Hockfelt T, *et al.* Calcitonin gene-related peptide like immunoreactivity in motoneuron pools innervating different hind limb muscles in the rat. Exp Brain Res, 1993, 96(2):291-303
- 8 Forsgren S, Bergh A, Carlsson E, *et al.* Calcitonin gene-related peptide expression at end plates of different fibre types in rat hind limb muscles. Cell Tissue Res, 1993, 274

(3):439-446

- 9 Foster AM, Sengelaub DR. Hormone sensitivity of muscle activation in the sexually dimorphic SNB/BC neuro-muscular system of the rat. Neurosci Lett, 2004, 359(1-2):41-44
- 10 Hadi MS, Siegford JM, Ulibarri C. Early postnatal response of the spinal nucleus of the bulbocavernosus and target muscles to testosterone in male gerbils. Brain Res Dev Brain Res, 2003, 142(2):129-139
- 11 Jordan CL, Padgett B, Hershey J, *et al.* Ontogeny of androgen receptor immunoreactivity in lumbar motoneurons and in the sexually dimorphic levator ani muscle of male rats. J Comp Neurol, 1997, 379(1):88-98
- 12 Sachs BD, Leipheimer RE. Rapid effect of testosterone on striated muscle activity in rats. Neuroendocrinology, 1988, 48(5):453-458
- 13 Blanco CE, Davenport T, Wachi S, *et al.* Androgen receptor immunoreactivity of male rat cervical motor neurons is increased by chronic pharmacologic testosterone treatment. Acta Physiol Pharmacol Bulg, 2001, 26(1-2):7-10

(2004-11-12 收稿)