

OVX - OP 大鼠腺垂体 FS 细胞中 S - 100 蛋白表达的共聚焦显微镜研究

马兴 李起鸿 王全平 吕荣 王春梅

【摘要】 目的 探讨神经组织蛋白 S - 100 在去卵巢致骨质疏松症大鼠(OVX - OP)腺垂体滤泡星形细胞(FS 细胞)中的表达。**方法** 采用适龄 SD 大鼠 40 只,随机均分为卵巢切除(OVX)组和假性手术对照(Sham 组),于术前和术后 6 周末测量大鼠全身及腰椎骨密度(BMD)。取垂体,应用免疫荧光组织化学法结合激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)分析技术,检测 FS 细胞中 S - 100 表达。**结果** 术后 6 周末 OVX 组大鼠全身及腰椎 BMD 均明显低于 Sham 组值($P < 0.01$, $P < 0.01$)。S - 100 阳性荧光标记物定位于 FS 细胞的胞浆中。FS 细胞具有典型的细胞突结构,与腺垂体中丰富的血窦直接相邻,结成了腺垂体中发达的活性细胞网络,在结构上与多种腺垂体内分泌细胞密切相连。两组间 S - 100 荧光强度和表达阳性率无显著差异($P > 0.05$)。**结论** SD 大鼠 OVX 术后 6 周出现骨质疏松变化,FS 细胞在形态结构和定位上的特征及其在数量上的稳定性可能是中枢调节骨代谢因素作用的一个细胞基础。

【关键词】 神经组织蛋白 S - 100; 免疫荧光组织化学; 激光扫描共聚焦显微镜

Expression of nerve tissue protein S - 100 in adenohypophyseal folliculo-stellate cells in ovariectomized osteoporotic rats—study by laser scanning confocal microscopy MA Xing, LI Qihong, WANG Quanping, et al. Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of nerve tissue protein S - 100(S - 100) in adenohypophyseal folliculo-stellate cells(FSCs) in ovariectomized osteoporotic rats. **Methods** Osteoporotic rat models were obtained by bilateral ovariectomy. 40 female rats were equally randomized into ovariectomized group(OVX group) and sham-operated control group(sham group). Total skeletal and spinal bone mineral density(BMD) of each rat were measured by DEXA. The expression of S - 100 in adenohypophyseal glands was detected by immunofluorescent histochemistry using laser scanning confocal microscopy(LSCM). **Results** Total skeletal BMD and spinal BMD of rats in OVX group were significantly lower than those in sham group($P < 0.01$, $P < 0.01$). S - 100 - positive FSCs in anterior pituitary(AP) were identified by their unique features: cytoplasmic processes between the endocrine cells and adjacent to blood sinuses. There was no difference in fluorescence and positive rate of S - 100 in the cytoplasm of FSCs between OVX group and sham group($P > 0.05$). **Conclusion** Osteoporosis in OVX rats can be determined by significantly decreased BMDs. The microscopic characteristics and quantitative identity of FSCs in either group revealed by detecting S - 100 could presumably form a cellular basis of bone metabolism in AP.

【Key words】 Nerve tissue protein S - 100; Immunofluorescent histochemistry; Laser scanning confocal microscopy

腺垂体滤泡星形细胞(folliculo-stellate cells/FSCs, 简称为 FS 细胞)虽然不是中枢内分泌细胞,但是 FS 细胞的表型和数量变化参与下丘脑—垂体—性腺轴多种内分泌活动的调控^[1-3]。因此近年来探讨 FS 细胞在内分泌活动中的作用的研究方兴未艾。但有关 FS 与骨质疏松内分泌相关性研究却鲜有报道。神经组织蛋白 S - 100 作为 FS 细胞特异的标记

物分子,是 FS 细胞表型和定量分析的重要参标^[4]。本研究旨在应用免疫荧光组织化学法结合激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)分析技术,探讨去卵巢致骨质疏松(ovariectomized osteoporosis, OVX - OP)大鼠腺垂体 FS 细胞中 S - 100 蛋白表达及其生物学意义。

材料和方法

1. 实验动物:选用 10 月龄,未孕产,CL 级(清洁级,由第四军医大学动物实验中心提供)SD 雌性大

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院骨科(马兴、李起鸿);第四军医大学西京医院骨科(王全平、吕荣);第四军医大学基础部(王春梅)

鼠40只,体重(337 ± 23)g。动物购进后饲养于第四军医大学西京医院骨科实验室,适应性喂养2周后,被随机均分为卵巢切除(ovariectomized, OVX)组和假性手术对照(sham-operated, Sham)组。

2. 仪器:美国 Lunar DPX-IQ 型双能 X 射线骨密度仪,附小动物骨密度(BMD)测量软件(第四军医大学西京医院骨科提供)。

3. 试剂来源:兔抗 S-100 pAb(美国 Zymed 公司), FITC 标记的羊抗兔 IgG(美国 Jackson 公司)。

4. 模型建立和标本制备:应用 1% 戊巴比妥钠对两组大鼠行腹腔内麻醉(30 mg/kg),应用双能 X 射线骨吸收测量法(dual-energy X-ray absorptiometry, DEXA)检测大鼠全身 BMD。取下腹部切口,OVX 组行双侧卵巢切除术,Sham 组仅行开腹后关腹术。术后各组大鼠分笼饲养。动物在 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 60%~70%,定期紫外线消毒、通风,10 h/14 h 间隔照明的条件下自由摄取标准实验室饲料和消毒蒸馏水。于术后 6 周末在上述相同的麻醉条件下,应用 DEXA 检测两组大鼠全身 BMD。经左心室灌注 4% 多聚甲醛,取两组大鼠腰椎 4-6(L_{4-6}),应用 DEXA 检测 L_{4-6} BMD。取垂体,标本经 4% 多聚甲醛后固定,脱水,常规石蜡包埋,制备成 $4\mu\text{m}$ 厚切片。

5. 间接免疫荧光标记:每例标本切片常规脱蜡至水,3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶 30 min, dd H_2O 振洗,10% 正常山羊血清封闭 30 min,倾去血清,每例标本滴加兔抗 S-100 pAb(1:500), 37°C 孵育 1 h,0.01 mol/L PBS 振洗 10 min 3 次。加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG(1:200, 37°C 孵育 30 min, PBS 振洗,50% 无荧光甘油缓冲液封片。

6. LSCM 定位和定量分析:实验选用 Bio-Rad MRC-1024 型 LSCM,备用 Zeiss 100 显微镜,用于 FITC 的激发波长为 488 nm,共聚焦系统由 Bio-Rad 公司软件控制,数值孔径(NA)为 1.3,图像存为 512×512 相素类型,图像采集的显微镜物镜为 Plan-Neofluar $40 \times$ 油浸镜,扫描激发值选择 3%。

7. 对照实验:以胞浆出现绿色荧光信号为阳性,根据反应强度和范围分为:阴性(-):阳性细胞 < 5%; 阳性(+):阳性细胞 5%~50%; 强阳性(++):阳性细胞 > 50%。设表达 S-100 蛋白的正常垂体后叶组织为阳性对照,分别以无关抗体和 PBS 代替一抗为特异性对照和阴性对照,省略一抗作为空白对照。

8. 统计学分析:BMD 参数值用均数 $\pm$ 标准差

($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异性比较用 t 检验。S-100 蛋白表达结果行四格表精确概率检验。结果经 NoSa 统计学软件分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

结 果

1. 骨密度测量:术前 OVX 组大鼠全身 BMD [$(0.381 \pm 0.018) \text{ g/cm}^2$] 与 Sham 组值 [$(0.378 \pm 0.010) \text{ g/cm}^2$] 差异无显著性($P > 0.05$)。术后 6 周 OVX 组大鼠全身 BMD [$(0.346 \pm 0.007) \text{ g/cm}^2$] 及 L_{4-6} BMD [$(0.193 \pm 0.006) \text{ g/cm}^2$] 均明显低于 Sham 组全身 BMD [$(0.367 \pm 0.009) \text{ g/cm}^2$] 及 L_{4-6} BMD [$(0.211 \pm 0.013) \text{ g/cm}^2$]($P < 0.01, P < 0.01$)。

2. LSCM 分析 S-100 蛋白阳性表达:OVX 组与 Sham 组 S-100 蛋白免疫荧光标记的阳性产物均明确定位于 FS 细胞的胞浆中,呈绿色荧光(图 1)。大量强阳性反应信号密集分布于胞浆中,FS 细胞的胞体及细胞突清晰可见。FS 细胞主要分布于腺垂体内分泌细胞之间,还与腺垂体中丰富的血窦直接相邻。低倍镜下 FS 细胞结成了腺垂体中发达的活性细胞网络(图 2)。两组 S-100 蛋白平均荧光强度在同一像素线水平。OVX 组和 sham 组 S-100 蛋白的阳性表达率分别是 85% 和 80%,差异无显著性($P > 0.05$)。



图 1 OVX 组 S-100 蛋白免疫荧光标记物
定位于 FS 细胞的胞浆(++)
LSCM, FITC 标记 IgG, $\times 800$

讨 论

DEXA 是一种灵敏度及精确度高、方便快捷的骨密度测定方法,对提示早期骨质疏松变化有重要



图 2 OVX 组 S-100 蛋白阳性的 FS 细胞结成了
腺垂体中发达的活性细胞网络
LSCM-FITC 标记 IgG $\times 200$

意义。S Zeni 等^[5]报道,SD 大鼠 OVX 术后 5 周全身 BMD 显著下降。本研究应用 DEXA 证实术后 6 周末 OVX 组大鼠全身及 L_{4-6} BMD 均低于 Sham 组值 ($P < 0.01$, $P < 0.01$),提示该组大鼠去卵巢后 6 周出现骨质疏松变化。

LSCM 分析技术作为先进的细胞生物学研究手段,能将细胞较完整的构像和定量、半定量分析有机地结合了起来。本研究以 S-100 为检测指标应用 LSCM 技术揭示:FS 细胞具有典型的细胞突结构;与腺垂体中丰富的血窦直接相邻;结成了腺垂体中发达的活性细胞网络,在结构上与多种腺垂体内分泌细胞密切相连。FS 细胞在形态结构和定位上的特征为介导和完善“中枢——循环——靶器官”的生物学效应及其变化提供了结构和功能基础^[4]。

有研究结果提示,FS 细胞数量变化是介导骨质疏松相关因素的一个易化环节。具体表现为 FS 细胞数量增多能明显干扰腺垂体内分泌细胞对 GnRH、TRH 和 GH-RF 等多种激素和因子的应答,从而导致

LH、PRL 和 GH 等分泌的异常^[6,7]。本研究以 S-100 为检测指标证实两组间 FS 细胞数量无显著差异性。FS 细胞在数量上的稳定性可能是机体在中枢水平调节骨代谢相关因素作用的一个细胞学特征和细胞学基础。这一现象不仅可能与受试对象种属差异性相关^[8],还可能与腺垂体 FS 细胞有丝分裂的时限性、增殖刺激元的异质性等多因素相关^[9]。其确切机理有待进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Soji T, Mabuchi Y, Kurono C, et al. Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microsc Res Tech*, 1997, 39:138-149.
- 2 Morand I, Forlup P, Guerrier A, et al. Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculo-stellate cells. *Endocrinology*, 1996, 137: 3356-3367.
- 3 Louise M, Bilczikjan AV, Turnbull AZ, et al. Interleukin-1 β regulates pituitary follistatin and inhibin/activin β_B mRNA levels and attenuates FSH secretion in response to activin-A. *Endocrinology*, 1998, 129: 3361-3365.
- 4 Soji T, Sirasawa N, Kurono C, et al. Immunohistochemical study of the postnatal development of the folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary gland. *Tissue Cell*, 1994, 26:1-8.
- 5 Zeni S, Gomes AC, Mantalen C. The effect of olpadronate in ovariectomized thyroxine-treated rats. *Bone*, 1997, 24:329-333.
- 6 Koike K, Zhang ZX, Sakamoto Y, et al. The pituitary folliculo-stellate cell line TGT/GF augments basal and TRH-induced prolactin secretion by GH3 cells. *Life Sci*, 1997, 61:2491-497.
- 7 Baes M, Allaerts W, Deneef C. Evidence for functional communication between folliculo-stellate cells and hormone-secreting cells in perfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology*, 1987, 120:685-691.
- 8 Schechter JE. Is cellular disruption the mechanism of release of basic fibroblast growth factor from anterior pituitary gonadotropes? *Tissue Cell*, 1992, 24:791-802.
- 9 Kurono C. Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. VI. Development of gap junctions between folliculo-stellate cells under the influence of ovariectomy and sex steroid in the female rat. *Anat Rec*, 1996, 244:366-373.

国外学术会议消息

亚太骨质疏松基金会将在 2001 年 3 月初在新加坡举办第二期骨质疏松焦点学习班,拟去学习者请用 E-mail: edithlau@cu-hk.edu.hk 联系。

第一届国际骨矿学会和欧洲钙化组织学会联合会议将于 2001 年 6 月 5 日至 10 日在西班牙马德里举办。论文截止日期: 2000 年 12 月 1 日。提前注册日期: 2001 年 6 月 1 日。E-mail: BEAPBMRC@263.net.