

非基因型雌激素膜性受体 GPR30 在生后雌性大鼠海马内的发育学表达与亚细胞水平定位研究*

赵承军²⁾ 邓其跃¹⁾ 张东梅¹⁾ 蔡文琴^{1)**} 张吉强^{1)**}

⁽¹⁾第三军医大学神经生物学教研室, 重庆市神经科学研究所, 重庆 400038; ⁽²⁾宁夏医科大学组织学与胚胎学教研室, 银川 750004)

摘要 为了研究非基因型雌激素膜性受体 GPR30 对海马的结构和功能的调节作用, 应用硫酸镍铵增强显色的免疫组化技术以及酶标免疫电镜技术, 观察了生后雌性大鼠海马内 GPR30 表达的变化及其免疫阳性产物在神经元亚细胞水平的定位情况。结果显示, GPR30 免疫阳性产物主要位于海马 CA 区的锥体层神经元与齿状回颗粒层的神经元内, 其表达水平随发育呈增加趋势。P0 时在雌性大鼠海马未发现明显 GPR30 免疫阳性反应, P7 后免疫阳性物质开始在 CA2 出现, P14 时见于 CA1、CA2 和齿状回, P30 和 P60 主要见于 CA1、CA2、CA3 和齿状回。在光镜下, GPR30 免疫阳性产物位于细胞核外的胞浆中, 细胞核未见免疫阳性反应。在透射电镜下可见其位于神经元的胞浆内, 可能主要是粗面内质网, 也可见于线粒体和细胞膜。以上结果证实, GPR30 是一种位于细胞核外的、非基因型作用的雌激素受体, 可能参与了雌激素对海马锥体神经元突触可塑性和学习记忆等功能的调节, 还可能参与了对齿状回成年神经干细胞某些活动的调节。

关键词 海马, 雌激素膜性受体, GPR30, 免疫组化, 免疫电镜

学科分类号 Q421, R338.6, R338.2*6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00207

已有的研究表明, 雌激素通过其经典的核受体即 ER- α 和 ER- β 对脑的发育、学习记忆、认知、情绪等高级脑功能在基因水平(genomic)发挥着十分重要的调节作用^[1~3]。近年的研究发现, 雌激素还存在非基因型(non-genomic)的调节途径, 该作用可能是由雌激素的第三种受体即膜性受体 GPR30 介导的。目前仅有一篇文献报道了 GPR30 在啮齿动物脑内的表达情况^[4], 但它在海马发育过程中表达的变化尚未见报道, 而且它在亚细胞水平的定位也还存在不同的研究结果。本实验采用免疫组化技术与酶标免疫电镜技术, 对 GPR30 在生后不同发育阶段大鼠海马内的表达及其免疫阳性产物在神经元内的定位进行了初步研究, 以期为深入研究雌激素对学习记忆等高级脑功能的调节提供新的基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

不同发育阶段(P0、P7、P14、P30 和 P60)SPF 级雌性 SD 大鼠共 36 只, 由第三军医大学实验动物中心提供, 成年雌鼠经阴道涂片后选取处于动情

间期者用于实验。P0、P7、P14、P30 和 P60 各 6 只用于免疫组化研究; 另选 P60 鼠 6 只用于免疫电镜研究, 设实验组 3 只和不加一抗的对照组各 3 只。

1.2 主要试剂和药品

兔抗 GPR30 多克隆抗体(ab12563)购自英国 Abcam 公司; 抗体稀释液(antibody diluents with background-reducing, S302281)与羊抗兔 EnVision™ 试剂盒(GK400305)购自 Dakocytomation(DAKO Co., USA); 封闭血清、DAB 显色试剂盒等购自北京中杉公司; 其余试剂均为市售分析纯。

1.3 动物固定、取材

动物用 5%水合氯醛麻醉, 开胸, 经左心室插管到主动脉, 剪开右心耳, 先后灌注生理盐水

* 第三军医大学回国人员启动基金(TMMU, 2007XG41)和重庆市回国人员启动基金(CSTC, 2007BB5030)资助项目。

** 通讯联系人。

蔡文琴. Tel: 023-68752233, E-mail: cwenqin@yahoo.com

张吉强. Tel: 023-68752232, E-mail: zhangjqtmu@yahoo.com

收稿日期: 2008-07-15, 接受日期: 2008-10-20

200 ml 和 4%多聚甲醛溶液 300 ml, 灌注后取出大脑组织. 对于免疫组化者, 将组织放入 4%多聚甲醛溶液继续后固定过夜. 常规脱水、透明、石蜡包埋、切片(片厚 5 μm)备用. 对于免疫电镜者, 小心分离海马组织并放入 2.5%戊二醛溶液后固定, 然后用振荡切片机制备海马切片(片厚 60 μm)备用.

1.3.1 免疫组化染色. 石蜡切片常规脱蜡、水洗后经抗原修复, 然后按文献[5]进行. 简述如下: 3% H_2O_2 封闭 15 min, PBS 漂洗后用正常山羊血清封闭 30 min, 然后加入一抗(GPR30, 1:200)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜. PBS 漂洗后加入羊抗兔 EnVisionTM 试剂, 室温孵育 1 h, PBS 漂洗后用硫酸镍铵 -DAB 显色 5 min. 梯度酒精脱水、二甲苯透明后中性树脂胶封片. 空白对照用 PBS 取代一抗, 其他步骤相同.

1.3.2 包埋前免疫电镜技术. 按文献[6]进行. 简述如下: 切片经上述免疫组化染色(对照组不加一抗)后, 在解剖镜下选取免疫阳性区域, 修成 0.1 mm \times 0.1 mm \times 1 mm 大小, 放入 2.5%戊二醛于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h, PBS 漂洗过夜后, 经 1%锇酸后固定, 丙酮梯度常规脱水, 环氧树脂 618 包埋, 半薄切片定位, 70 nm 超薄切片捞于有支持膜的 200 目镍网上, 醋酸双氧铀 - 枸橼酸铅染色, 于 TECNAI-10 型透射电子显微镜(80 kV)下观察拍照.

1.4 数据统计

每组免疫组化染色切片选取 5 张, 应用 Image-Pro Plus 4.5 软件进行图像分析, 数据经 SPSS 10.0 统计软件处理.

2 结 果

免疫组化研究发现, 在大鼠生后海马神经元内 GPR30 的表达呈增加趋势. P0 的时候在整个海马基本未发现任何 GPR30 免疫阳性反应(图 1a). 从 P7 开始出现免疫阳性反应, 主要集中在 CA1-CA2 交界部位尤其是 CA2, 其表达水平较低且呈弥散状态(图 1b). P14 时可见海马大部分的锥体神经元都有略为增强的免疫反应(图 1c), 齿状回的颗粒层也有较密集的阳性细胞, 但是与 P7 的表达水平相比无显著性差别(图 2). P30 时 GPR30 的表达进一步增强, 免疫阳性反应见于锥体细胞与齿状回的颗粒层, 在 CA1、CA2 的颗粒层也可见少数散在的阳性细胞(图 1d, e). 在成年(P60)海马可见更强的 GPR30 免疫阳性反应(图 1f). 总的来说, GPR30 免疫阳性物质在生后大鼠海马内的表达呈现随发育

而上升的趋势, 尤其是在 P30 以后有显著增强的表达, 与 P0 和 P7 相比有显著性差异(图 1, 图 2).

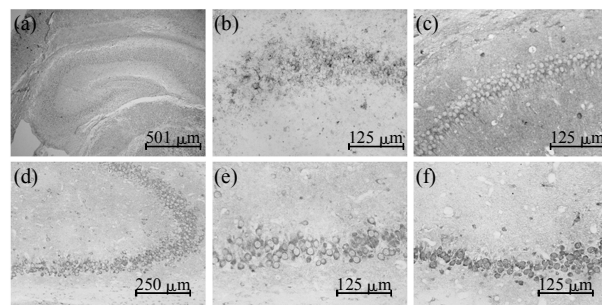


Fig. 1 GPR30 immunoreactivity detected in the hippocampus of the postnatal female rats

(a)P0, CA2. (b)P7, CA2. (c)P14, CA2. (d)P30, CA2-CA3. (e) P30, CA3. (f)P60, CA3. (e) The higher magnification of CA3 in (d). GPR30 immunoreactivity was increased with postnatal development. The positive materials were detected in the extra-nuclei fractions, both the cytoplasm and, to some extent, the processes of neurons.

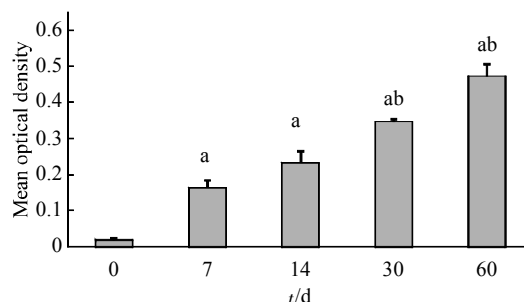


Fig. 2 Immunoreactivity of GPR30 in the hippocampus of postnatal female rats

a: Significant difference when compared with P0 ($P < 0.001$); b: Significant difference when compared with P7 ($P < 0.001$).

P60 大鼠海马切片经常规免疫组化染色后在光镜下观察, 可见锥体层和齿状回颗粒层的神经元中有 GPR30 免疫阳性产物的沉积, 主要在细胞核外, 细胞核内未见免疫阳性反应, 如图 1f 所示. 随机选取免疫阳性区域进行超薄切片, 经醋酸双氧铀 - 枸橼酸铅电子染色后在电镜下观察, 可见大鼠海马神经元超微结构清晰, 形态保存基本完好. 实验组海马神经元的胞浆内均出现高电子密度颗粒, 呈小团状或点状分布, 主要定位于粗面内质网, 也可定位于细胞膜、线粒体等膜性结构上, 尤其在粗面内质网上成团密集、聚集颗粒清晰可见, 特异性强. 而空白对照组胞浆内未见此致密颗粒(图 3a, b).

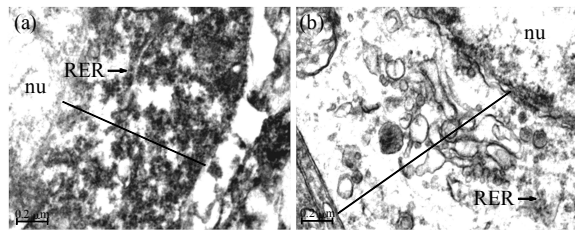


Fig. 3 Subcellular localization of GPR30 in the pyramidal neurons of hippocampus of adult female rats

(a) The immunopositive materials were predominantly localized in the rough endoplasmic reticulum, also detectable in the cell membrane as well as mitochondria. (b) Negative control. nu: Cell nucleus; RER: Rough endoplasmic reticulum. Bar=0.2 μ m. The black line in (a) and (b) indicated the cytoplasm of the neurons.

3 讨 论

越来越多的证据表明, 雌激素对神经元具有重要的保护作用, 如促进脑内神经细胞轴突及树突的生长、调节突触可塑性、影响突触的功能、参与对高级脑功能如学习记忆、情绪和认知等的调节。由于雌激素必须通过与细胞内的特异性受体即 ER 结合才能最终发挥其生物学效应, 因此脑组织中 ER 的研究成为人们关注的焦点^[1-3]。经典的雌激素受体即其核受体 ER- α 和 ER- β , 它们通过对各自特异的靶基因的调节进而影响基于下丘脑的生殖功能或基于海马的学习记忆等^[4]。然而, 多种组织的细胞在雌激素作用几分钟内就可出现快速的细胞效应, 这些效应也不被蛋白质合成和 RNA 合成的抑制剂所阻断, 如此迅速的激活过程很难用基因转录调节机制来解释, 而只能用核外的信号传导机制解释, 人们推测雌激素可能通过代号为 ER-X 的膜性受体(G 蛋白偶联受体和 / 或酪氨酸激酶受体)→第二信使(Ca²⁺、NO 等)→生物学效应的调控途径发挥着其非核型 (non-nuclear) 效应或非基因型 (non-genomic) 效应^[7], 该受体激活途径在胞膜表面启动, 但是一直未能得以证实。

1996 年, Zheng 等通过 BSA 交联的类固醇激素研究发现神经元膜上有类固醇激素的结合位点并证明它是一个 7 次跨膜的蛋白质。次年, Carmeci 等证明该蛋白质是一个 G 蛋白偶联受体并命名为 GPR30(G protein coupled receptor 30)。但是直到 2005 年, Thomas 和 Revankar 等^[8, 9]才正式提出 GPR30 实际上就是雌激素的膜性受体。因此, 目前雌激素受体除了 ER- α 和 ER- β 外, 还包括与前二

者不同的雌激素受体即雌激素的膜性受体 GPR30。

目前关于脑内 GPR30 的表达与功能研究的文献非常少。Brailoiu 等^[4]首次全面报道了 GPR30 免疫反应性在大鼠中枢神经系统内的分布, 发现 GPR30 主要位于下丘脑 - 垂体轴、海马、脑干等部位, 在培养的下丘脑神经元 GPR30 免疫阳性物质主要位于胞浆特别是核膜周围。Funakoshi 等^[10]报道 GPR30 见于成年大鼠海马的 CA2 区, Canonaco 等^[11]发现 GPR30 mRNA 在鼠脑某些部位的表达具有性别差异。我们的研究结果与 Brailoiu 的结果比较一致, 即 GPR30 在海马的其他部位也存在, 如 CA1、CA3 和齿状回颗粒细胞。根据我们的实验结果, 新生鼠海马基本上没有或只有很微弱的 GPR30 蛋白表达, 到 P7 时免疫阳性物质主要见于 CA2, 其他部位基本未见表达。到 P14 时表达就基本上见于整个海马, 而且除了胞浆呈免疫阳性以外突起内也隐约可见(图 1c)。随后海马内 GPR30 免疫阳性物质的表达随发育继续增加, 表达范围见于整个海马结构的锥体细胞与齿状回的颗粒细胞。以上结果提示, GPR30 可能参与了海马神经元的成熟与功能建立, 但这有待于进一步的研究来证明。

GPR30 在亚细胞水平的定位尚无定论。Revankar 等^[9]的研究显示, GPR30 主要在 COS-7 细胞的内质网表达, 而且只有细胞内的 GPR30 才能被雌激素激活并影响 PI3K 信号途径^[12]。Sakamoto 等^[13]用细胞内细胞器标记物和免疫电镜等特殊标记显示 GPR30 主要定位于神经元的高尔基复合体而非细胞表面。Filardo 等^[14]发现 GPR30 定位在 HEK-293 细胞的表面。Funakoshi 等^[10]研究发现, GPR30 位于 HeLa 细胞与海马 CA2 锥体细胞的细胞膜, 但在雌激素的作用下可以“转位”到胞浆, Brailoiu 等^[4]发现它主要位于下丘脑神经元紧邻核膜的胞浆中。本实验中我们发现, GPR30 主要位于海马锥体细胞胞浆内的膜性结构如粗面内质网, 也见于细胞膜和线粒体, 这与 Revankar^[9]的研究结果基本一致, 但与 Funakoshi 等^[10]的结果有所不同。以上研究结果的差异可能是所用的抗体不同, 也可能是 GPR30 的分布本身具有组织 / 细胞类型甚至功能状态特异性, 因为有文献报道在雌激素的刺激下, HeLa 细胞膜上的 GPR30 可以转位到细胞质^[10]。

GPR30 信号途径是通过非基因水平调节的一个快速途径, 有 PKA 活化、Ca²⁺ 的参与还有第二信使系统其他成分的参与, 最终影响靶细胞的生物

学或生理学功能, 是一个比较复杂的过程^[15, 16]. 本研究报道了该受体在海马神经元内的发育学表达模式与神经元内定位的初步研究, 发现其表达随发育增强并且主要定位于粗面内质网, 提示雌激素能够通过 GPR30 对锥体细胞内靶蛋白的合成进行非基因水平的调节, 进而影响海马的突触可塑性和学习记忆、认知等过程以及基于齿状回的成年神经干细胞的某些功能, 但是究竟参与了对锥体细胞哪些功能的调节尚有待于进一步研究.

基于本文和前人的研究结果, 我们认为将雌激素这一受体的中文名称定为“雌激素的膜性受体”(membranous estrogen receptor)较“雌激素膜受体”(membrane estrogen receptor)更为确切. 因为对膜受体一般的理解是位于细胞膜上的受体, GPR30 显然不只是位于细胞膜而是定位于细胞的膜性结构.

参 考 文 献

- 1 McCarthy M M. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev*, 2008, **88**(1): 91~134
- 2 Ishii H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, *et al.* Local production of sex hormones and their modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscientist*, 2007, **13**(4): 323~334
- 3 Zhang J Q, Cai W Q, Zhou D S, *et al.* Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats. *Brain Res*, 2002, **935**(1~2): 73~80
- 4 Brailoiu E, Dun S L, Brailoiu G C. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol*, 2007, **193**(2): 311~321
- 5 张吉强, 姚青, 刘建军, 等. 不同显色方法对免疫组化显色结果的影响. *第三军医大学学报*, 2002, **24**(3): 359~360
Zhang J Q, Yao Q, Liu J J, *et al.* *Acta Acad Med Mil Tert*, 2002, **24**(3): 359~360
- 6 秦小云, 黄巨恩, 骆耐香, 等. 大鼠杏仁体基底外侧核中 DA 能与 GABA 能神经元之间突触关系的免疫电镜研究. *解剖学报*, 2004, **35**(4): 373~377
Qin X Y, Huang J E, Luo N X, *et al.* *Acta Anatomica Sinica*, 2004, **35**(4): 373~377
- 7 Cheskis B J, Greger J G, Nagpal S, *et al.* Signaling by estrogens. *J Cell Physiol*, 2007, **213**(3): 610~617
- 8 Thomas P, Pang Y, Filardo E J, *et al.* Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 2005, **146**(2): 624~632
- 9 Revankar C M, Cimino D F, Sklar L A. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 2005, **307**(5715): 1625~1630
- 10 Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **346**(3): 904~910
- 11 Canonaco M, Giusi G, Madeo A, *et al.* A sexually dimorphic distribution pattern of the novel estrogen receptor G-protein-coupled receptor 30 in some brain areas of the hamster. *J Endocrinol*, 2008, **196**(1): 131~138
- 12 Revankar C M, Mitchell H D, Field A S. Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS Chem Biol*, 2007, **2**(8): 536~544
- 13 Sakamoto H, Matsuda K. Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in xytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Endocrinology*, 2007, **148**(12): 5842~5850
- 14 Filardo E, Quinn J. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*, 2007, **48**(7): 3236~3245
- 15 Shingo A S, Kito S. Estradiol induces PKA activation through the putative membrane receptor in the living hippocampal neuron. *J Neural Transm*, 2005, **112**(11): 1469~1473
- 16 Raz L, Khan M M, Mahesh V B. Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals*, 2008, **16**(2~3): 140~153

Developmental Profile and Subcellular Localization of The Non-genomic Membranous Estrogen Receptor GPR30 in The Hippocampus of Postnatal Female Rats*

ZHAO Cheng-Jun²⁾, DENG Qi-Yue¹⁾, ZHANG Dong-Mei¹⁾, CAI Wen-Qin^{1)**}, ZHANG Ji-Qiang^{1)**}

¹⁾Department of Neurobiology, Chongqing Neuroscience Institute, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

²⁾Department of Histology and Embryology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract To study the role that the novel nongenomic membranous estrogen receptor GPR30 plays in the hippocampal synaptic plasticity, the developmental profile and subcellular localization of GPR30 in the hippocampus of postnatal female rats was examined by nickel-intensified immunohistochemistry and immunoelectronic microscopy. Results showed that the immunoreactivity of the GPR30 was predominantly localized in the neurons of the hippocampal pyramidal layer of the CAs and granular layer of the dentate gyrus, and an increased profile with postnatal development was also noticed. GPR30 immunoreactivity was first detected at P7 in the CA2, at P14 it was detected in the CA1, CA2 and dentate gyrus, hereafter it was detected in the CA1, CA2, CA3 and dentate gyrus with higher expression in the adults (P60). Under light microscopy GPR30 immunopositive materials were found in the cytoplasm of the neurons, while under electronic microscopy they were localized in the membranous structure of the neuronal cytoplasm, predominantly the rough endoplasmic reticulum. The above results demonstrated that GPR30 is a membranous estrogen receptor, showing an increased expression profile in the hippocampus of postnatal female rats, it may mediate the rapid, non-genomic effect of estrogen on the morphology and function of the hippocampus, such as morphological maturation, synaptic plasticity, learning and memory.

Key words hippocampus, membranous estrogen receptor, GPR30, immunohistochemistry, immunoelectronic microscopy

*This work was supported by grants from Third Military Medical University (TMMU, 2007XG41) and Chongqing Science and Technology Committee (CSTC, 2007BB5030).

**Corresponding author.

ZHANG Ji-Qiang. Tel: 86-23-68752232, E-mail: zhangjqtmmu@yahoo.com

CAI Wen-Qin. Tel: 86-23-68752233, E-mail: cwenqin@yahoo.com

Received: July 15, 2008 Accepted: October 20, 2008