

家兔子宫内膜的凝集素结合特性及雌、孕激素的影响

*程腊梅 朱正美 崔肇春

(大连医学院生化教研室)

凝集素是具有与糖专一性结合的蛋白质,目前广泛应用于研究细胞膜表面糖复合物的变化,以及它们在细胞中的定位。用凝集素探测细胞膜表面糖分布的方法与标记抗体定位类似,有标记凝集素作指示剂的直接法和标记抗凝集素作指示剂的间接法。这些方法可用来直接观察不同组织和同一组织细胞表面糖的分布,也可用来观察细胞分化、转化、发育、衰老以及细胞分裂不同时期膜表面糖的变化。

研究表明,糖复合物与生殖功能,特别是一系列与细胞识别、粘连有关的受精、卵裂、着床等过程有密切关系。Lee等报道^[1],妊娠和非妊娠的小鼠子宫与凝集素的结合特性有明显差别。Lee等人^[1-3]用荧光标记的凝集素观察到着床前子宫内膜RCL、ConA受体随妊娠天数增加而增多。陈惠玲等^[4]用凝集素作探针,探索糖复合物在胚到着床中的作用,报道了与甘露糖有专一结合的ConA有明显的抗小鼠胚到着床的作用。迄今还未见有关子宫内膜细胞表面糖复合物变化调节机制的报道。鉴于子宫是女性激素的靶器官,本文作者观察了不同妊娠期家兔子宫内膜与凝集素的结合特性,并进一步探讨了雌、孕激素对家兔子宫内膜表面凝集素受体的影响。

材料与 方法

一、材料

1. 组织 以家兔交配当日为妊娠0天,在妊娠不同时期取子宫内膜,以5—9天为早孕,14—18天为中孕,26天为晚孕。激素处理后的子宫内膜:用2.5—3.5公斤健康雌兔,去双侧卵巢,两周后由皮下注射激素。动物分组 ① 雌二醇处理五天(简称E₅组); ② 孕激素处理五天(简称P₅组); ③ 雌孕激素先后处

理组,包括先注射雌二醇五天,再给孕激素一天(E₅+P₁)、三天(E₅+P₃)及五天(E₅+P₅)组,或用溶剂芝麻油代替孕激素注射五天以作对照(E₅+S₅); ④ 雌、孕激素联合处理组,即在雌激素处理五天后,再雌、孕激素同时注射五天(E₅+E₅P₅组)。以上各组雌二醇(苯甲酸雌二醇,上海第九制药厂)用量均为50 µg/kg/天,孕酮(己酸孕酮,上海淮海制药厂)为10 mg/kg/天。所有动物在最后一次注射24小时后取子宫,用生理盐水洗去血与粘液,刮取子宫内膜为样品。

2. 凝集素、抗血清与组化试剂 PNL、RCL、PSL及抗血清均来自中科院上海生化所, Biotin-SBL、Biotin-WGL、Biotin-ConA为Sigma产品,ABC试剂为Vector公司产品, PAP试剂盒为Dako公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

二、方法

样品经Bouin氏液固定,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后,切成约4 µm厚的切片。切片经脱蜡、水合后分别用Avidin-Biotin-凝集素法^[5](SBL、WGL和ConA)及PAP免疫组化法^[6](RCL、PNL和PSL)进行组织化学染色。简言之,用Avidin-Biotin-凝集素法即切片经0.2%胰酶37℃保温1小时,经0.3% H₂O₂-甲醇液处理除去内源性过氧化物酶活性,再用2%牛血清白蛋白(BSA)保温以阻断非特异性吸附。此后,切片分别与生物素结合的凝集素37℃保温1小时,再与ABC试剂反应,最后加入过氧化物酶底物二苯胺(DAB)溶液显色。用PAP法时,在水合后组织切片分别与100 µl/ml的PNL、PSL、RCL在37℃保温30分钟,在与正常阻断血清保温后再与1:20相应凝集素抗血清(得自家兔)中保温30分钟。此后,与1:100第二抗体(豚鼠抗兔IgG)保温30分钟。最终与PAP试剂保温以DAB显色。经上述显色后切片再用梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封固在显微镜下观察,拍片。结果判断:用大鼠肾组织为阳性对照,用0.01 M PBS代替凝集素与切片反应,

本课题由国家自然科学基金资助。

* 现在长沙市湖南医专。

为阴性对照。阳性结果按染色强度分四级: +弱, ++中等, +++强, ++++很强。

结 果

表1列出了动情期和不同妊娠期家兔子宫内凝集素的染色结果。动情期子宫上皮与PNL、SBL、PSL、WGL表现弱的结合(图版1),从动情期到早孕,与RCL、ConA的结合由阴性转为强阳性(图版2),与WGL、SBL、PNL的结合亦明显增强(图版2)。子宫内凝集素结合特点妊娠不同期有明显差别,ConA仅与早孕内膜上皮结合,而与中、晚期内膜上皮未见结合。反之,PSL则主要与中、晚期上皮结合。而间质部分仅早孕时与SBL呈强阳性反应,其他各时期与不同凝集素均未见反应。

表1 不同妊娠时期家兔子宫内凝集素的结合强度

| 时期 | 组织 | 凝 集 素 | | | | | |
|-----|----|-------|-----|------|-----|-----|-----|
| | | SBL | WGL | ConA | PNL | RCL | PSL |
| 动情期 | 上皮 | + | ++ | - | ++ | - | + |
| | 间质 | - | - | - | - | - | - |
| 早孕 | 上皮 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | + |
| | 间质 | - | - | - | - | - | - |
| 中孕 | 上皮 | +++ | +++ | ± | +++ | +++ | +++ |
| | 间质 | - | - | - | - | - | - |
| 晚孕 | 上皮 | + | ++ | - | +++ | +++ | +++ |
| | 间质 | - | - | - | - | - | - |

表2列出了雄、孕激素处理后,子宫内凝集素的结合情况。经雌、孕激素处理对子宫上皮与ConA与PSL的结合未见影响或影响不大(表2 E₅与P₅组)。其余四种凝集素的结合强度则明显受雌孕激素的影响。雌激素处理后(E₅组),子宫上皮与RCL、WGL的结合由阴性转为阳性,与SBL、PNL的结合亦见增强(图版3a,b);而孕激素(P₅组)仅加强子宫上皮与PNL、RCL的结合(图版3c,d)。在雌激素作用的基础上,再给孕激素,子宫上皮与这四种凝集素的结合均表现为强阳性(图版4)。特殊的是到给孕激素第五天(E₅+P₅组),上述结合又转为阴性。这种变化我们推断是由于在镜下

可见组织上皮退化、萎缩,腺体消失,间质细胞大量增生所致。在E₅+P₃、E₅+P₅、E₅+E₅P₅各组,基质中均出现蜕膜样细胞。这些蜕膜样细胞与所用六种凝集素均有一定结合,尤以ConA为著。此外,由表2结果尚可见,雌激素处理组与对照组相同,间质部分与六种凝集素均未见反应,但经孕激素处理组,如P₅、及E₅+P₃、E₅+P₅组间质部分与SBL、WGL均见弱阳性反应,与ConA则由阴性转为强阳性反应。

表2 去卵巢家兔经雌、孕激素处理后子宫内凝集素的结合强度

| 组别 | 组织 | 凝 集 素 | | | | | |
|---|----|-------|-----|------|-----|-----|-----|
| | | SBL | WGL | ConA | PNL | RCL | PSL |
| S ₅ * | 上皮 | + | - | - | + | - | + |
| | 间质 | - | - | - | - | - | - |
| E ₅ | 上皮 | ++ | ++ | - | ++ | + | + |
| | 间质 | - | - | - | - | - | - |
| P ₅ | 上皮 | - | - | - | +++ | + | ++ |
| | 间质 | + | + | +++ | + | + | + |
| E ₅ +P ₁ | 上皮 | ++ | +++ | - | +++ | +++ | ++ |
| | 间质 | + | - | - | - | - | - |
| E ₅ +P ₃ | 上皮 | +++ | +++ | - | +++ | +++ | +++ |
| | 间质 | + | + | ++ | + | + | + |
| E ₅ +P ₅ | 上皮 | - | - | - | - | - | ++ |
| | 间质 | + | ++ | +++ | + | + | ++ |
| E ₅ +P ₃ E ₅ | 上皮 | + | ++ | - | + | +++ | ++ |
| | 间质 | ++ | + | + | + | + | - |
| E ₅ +S ₅ | 上皮 | + | - | - | + | + | + |
| | 间质 | - | - | - | - | - | - |

* 注射芝麻油5天0.2 ml/kg/天),作为对照。

讨 论

动情期家兔子宫内凝集素结合特性和雌激素处理后(E₅组)的结合无明显差异。且已观察到两者的鞘糖脂含量、组分也基本一致(本文作者待发表资料),这提示动情子宫内凝集素的细胞行为及代谢状态主要受雌激素调节。

妊娠期,子宫上皮与PNL、SBL、WGL的结合均较动情期明显增强,这与Lee^[1]报道的与小鼠子宫上皮的结合基本上是一致的。我们观察到在雌激素预先作用的基础上再给孕激素,此三种凝集素与子宫上皮的结合均较单用雌激

素的明显增加。这个结果提示：妊娠期的这些变化主要由于雌、孕激素的共同作用所致。

据报道^[2]，小鼠子宫内膜 RCL 受体在妊娠第 3 天出现，到着床前明显增加，这与我们观察到的动情期家兔子宫内膜未见有结合，而妊娠早期表现为强阳性是一致的。经雌、孕激素处理后，子宫上皮与 RCL 的结合均转为阳性，且两种激素联用后，染色增强更明显($E_2 + P_1$ 组， $E_2 + P_3$ 组)，这也提示，雌、孕激素均能使子宫上皮表面与 RCL 结合的糖基(β -D-Gal, D-Gal NAC)增加。

ConA 与小鼠子宫上皮的结合，从动情到着床前明显增加^[4]。我们从家兔观察到，ConA 与子宫上皮的结合由动情期阴性到早孕时转为强阳性，到中、晚期又逐渐转为阴性。同时，ConA 与子宫上皮的结合，雌、孕激素给药后均为阴性。这提示妊娠早期 ConA 受体的出现与雌、孕激素作用无关，而可能由于胚泡进入宫腔，刺激子宫内膜合成含有与 ConA 特异结合的糖基(如 D-Glc, D-man 或特异的寡糖链)有关。引人注目的现象是与 ConA 有相同单糖特异性的 PSL 与妊娠期子宫上皮的结合与 ConA 显然不同(表 1)，PSL 与中晚期子宫上皮呈强阳性反应而与早期子宫上皮的结合很弱，同时，雌、孕激素给药后，子宫上皮与 PSL 结合强度也未见明显变化(表 2)。已知 ConA 与 PSL 对寡糖结构专一性不同，其差别在于，与 ConA 结合的 N-连接的寡糖必须包含两个未被取代的或只在 C-2 位被取代的 α -甘露糖基^[7]，而 PSL 结合的寡糖除上述条件外，还必须在寡糖的五糖核心中与天冬酰胺连接的 N-乙酰葡萄糖胺的 C-6 位由岩藻糖取代^[8]，且小鼠的实验表明：ConA 具有抗着床效应，而 PSL 则无^[5]。本文结果提示：

$$\begin{array}{l} \text{Man}\alpha_1 \searrow 3 \\ \text{Man}\alpha_1 \nearrow 6 \end{array} \text{Man} \beta_1-4\text{GlcNAC-GlcNAC}$$
与家兔胚泡着床有关。而糖链中的 Fucose 则非着床所必须。它在中、晚期的变化可能因子宫内膜上皮细胞糖复合物岩藻糖化的结果。而内膜

间质部分的糖复合物变化却有不同，经雌激素处理后其与凝集素结合的性能与对照组比较未见改变，而经孕激素处理或在雌激素作用基础上再加用孕激素 3—5 天，均见与各种凝集素的反应转为阳性，其中尤以与 ConA 的结合变化为著，由阴性转强阳性。上述结果提示，间质细胞的糖复合物表达可能主要受孕激素影响。

综上所述，妊娠子宫上皮所表现的与六种凝集素的结合特性，一方面与雌、孕激素作用有关，另一方面可能与胚泡的出现、胎盘的形成为妊娠多种体液因素有关。但具体影响糖复合物的环节尚不清楚。上述变化可能由于糖基转移酶活性增高或低下，使细胞表面糖链的新合成增加或减少，或细胞表面糖复合物分布情况改变，从而使某些凝集素受体显现或被隐蔽。总之，不同妊娠期子宫内膜细胞表面糖复合物的变化，特别是在早孕期间的变化，可能与着床过程中胚泡和子宫内膜的识别、粘连有关。这些糖基对胚泡着床的影响我们正在进一步观察中。此外，雌、孕激素对子宫内膜细胞表面糖复合物变化的调节机制亦有待于进一步阐明。

摘 要

本文观察了早、中、晚期妊娠家兔子宫内膜对六种凝集素(SBL、RCL、WGL、PNL、ConA、PSL)的结合特性，并用去卵巢家兔模型观察了雌、孕激素对子宫内膜凝集素结合特性的影响。从动情期到早孕(着床前后)，子宫上皮与 RCL、ConA 的结合由阴性转为强阳性，与 SBL、RNL 的结合由弱转强。在妊娠过程中，ConA 仅与早孕上皮结合，而 PSL 则到中、晚期才见阳性反应。经雌、孕激素处理后，子宫上皮与 ConA 结合始终为阴性，与 PSL 的结果各组均为阳性，激素处理后无明显改变。而另外 4 种凝集素则明显受激素影响。雌激素使子宫上皮与 RCL、WGL 的结合转阳性，使与 PNL、SBL 的结合增强。在雌激素作用后，再

给孕激素($E_5 + P_1$ 组, $E_5 + P_3$ 组), 子宫内膜与这4种凝集素的结合均比单独应用雌或孕激素更强。

参 考 文 献

- [1] Lee MC. et al., 1983, *Histochemistry*, 79 (3):365—75.
[2] Chavez DJ. et al., 1985, *Biology Reprod*, 32:1135—1142.

- [3] Johnson MH. et al., 1975, *Nature*, 257: 321—2.
[4] 陈惠玲等, 1988, *生理学报*, 40(2):202—6.
[5] 张保真编译, 1986, *免疫组织化学理论与技术*, 西安医科大学出版, pp. 279—81.
[6] 张保真编译, 1986, *免疫组织化学理论与技术*, 西安医科大学出版, pp. 15—16.
[7] Ogata S. et al., 1975, *J. Biochem*, (Tokyo), 78(4):687—96.
[8] Kornfeld K. et al., 1981, *J. Biol. Chem.*, 256:6633—40.

培养的小鼠心室肌细胞动作电位的波型分析

江 岩 苗智慧 王雪青

(河北省医科院病生理室)

刘 京 生

(河北省医科院微生物室)

大鼠的心室肌细胞在培养过程中, 由快反应非自律细胞转变成慢反应自律细胞, 因而发放慢反应动作电位, 使群落呈现自发性搏动^[1]。这一模型已被广泛用于与慢通道有关的生理、药理、病理生理等各学科的实验研究。而培养的小鼠心室肌细胞虽更易呈现自发性搏动, 但因其快、慢细胞相混^[2], 动作电位波型变异大, 使得实验结果不易分析, 而少有应用。本实验旨在从波型变化多端的培养小鼠心室肌细胞动作电位中找出规律, 以建立自发性发放快反应动作电位的培养心室肌细胞模型, 以适应于与快通道有关的研究需要。

方 法

一、心肌细胞培养^[3]

取新生昆明种小鼠全心室, 剪成约1 mm³碎片, 用0.1%胰蛋白酶(1:250 Difco)加机械搅拌的方法分离心肌细胞。将心肌细胞的培养基悬液, 分装于塑料培养瓶(Falcon 25 cm²), 在36.5℃、5%CO₂+95%空气的孵箱内培养。培养基为MEM(GIBCO, USA)加20%小牛血清(北京红星生化厂)。每3天更换一次培养基。

二、动作电位记录^[4]

启开培养瓶上壁, 将瓶放置于恒温循环槽内, 周围通以95%氧气和5%CO₂气体, 整个实验过程保持

温度在36.5℃、pH 7.2的条件下进行。按微电极电生理技术常规胞内引导心肌细胞动作电位及其时间常数。待微电极刺入细胞内稳定2分钟, 用微机联机采样分析动作电位波幅(APA)、超射(OS)、最大舒张电位(MDP)、阈电位(TP)、最大除极速度(V_{max})、复极10%; 50%; 90%水平的动作电位波宽(APD₁₀, APD₅₀, APD₉₀)以及动作电位发放频率(F)。

结 果

一、小鼠心室肌细胞动作电位的类型

共培养7瓶心肌细胞, 每个培养瓶中的心肌细胞取材于3个小鼠的全心室。于培养的第4天记录动作电位。

如图1所示, 动作电位表现3种类型:

1. 慢反应自律细胞动作电位: O期除极速度慢, 幅度低; 1.2.3期互相移行, 界限不明显; 4期呈舒张期自动除极化。
2. 快反应非自律细胞动作电位: O期除极速度快, 幅度高; 1.2.3期互相移行, 界限不明显; 无舒张期自动除极化。
3. 快反应自律细胞动作电位: O期除极速度快, 幅度高; 1.2.3期分界较清, 有明显的1期峰形电位; 动作电位波宽较窄。

除上述典型快反应与慢反应动作电位外, 还有介于两者之间的中间过渡型动作电位。我