

# $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)对离体大鼠卵巢颗粒细胞孕酮分泌的影响

方 廉

罗 荣 生

(汕头大学医学院生理教研室 515031) (上海生物工程研究中心 200031)

除脑以外,已在多种哺乳动物的近30种外周组织中发现 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的存在,其中大多数组织GABA浓度仅是脑的1%,而大鼠卵巢和输卵管组织中含有较高浓度的GABA,其水平又随动情周期和孕期的不同阶段而发生波动<sup>[1-4]</sup>。卵巢组织特别是颗粒细胞膜上有GABA的特异性结合位点<sup>[5]</sup>,Ritta等人<sup>[6]</sup>,用体外培养的方法,观察到GABA( $10^{-6}$  mol/L)能增加60天龄及45天龄大鼠睾丸酮的基础分泌及HCG刺激的分泌,认为GABA很可能参与对性腺功能的调控。本文研究的目的是用细胞体外培养的方法,观察GABA对大鼠离体卵巢颗粒细胞分泌孕酮的影响。

## 材 料 与 方 法

### 一、试剂

孕马血清促性腺激素(PMSG),卫生部长春生物制品研究所制品;人绒毛膜促性腺激素(HCG),上海生物化学制品厂产品;细胞培养液为1%牛血清蛋白-25 mmol/L HEPES-199液; $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)为美国Sigma公司产品。孕酮放射免疫测定试剂药盒由上海内分泌研究所提供。

### 二、大鼠离体颗粒细胞悬浮液的制备及培养

选择27-29日龄未成年健康Sprague Dawley雌性大鼠20只,每只鼠皮下注射PMSG 50 Iu,48 h后断头处死,迅速取出含有排卵前成熟卵泡的双侧卵巢。按高尔威等人<sup>[7]</sup>的方法制备颗粒细胞悬浮液,调整细胞悬液浓度为 $1 \times 10^6$ /ml,并分装至各培养管中(0.5 ml/管),充入95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>混合气,在37℃恒温振荡水浴中培养30 min后,取出培养管随机分组,每组4管按实验要求加入试剂,再充入95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>混合气,培养4 h后,取出培养管置入-20℃低温

冰箱20分钟终止反应。采用放射免疫分析法,测样品中的孕酮含量。实验结果经统计学处理用t值检验平均值的显著性。

## 结 果

### 一、细胞活力鉴定

用台盼蓝排斥试验测定细胞的存活百分率。颗粒细胞在分离及培养4 h后,细胞存活率为70%-80%。加入HCG(20 Iu/ml)及 $10^{-8}$ - $10^{-5}$  mol/L的GABA对颗粒细胞的存活率及计数无明显影响。

### 二、不同浓度的GABA对颗粒细胞孕酮基础分泌水平的影响

基础分泌组各管加不同浓度的GABA( $10^{-8}$  mol/L- $10^{-5}$  mol/L),另设正常对照管用培养液补充体积。培养4 h在终止反应后,测细胞悬液中的孕酮含量(图1)。

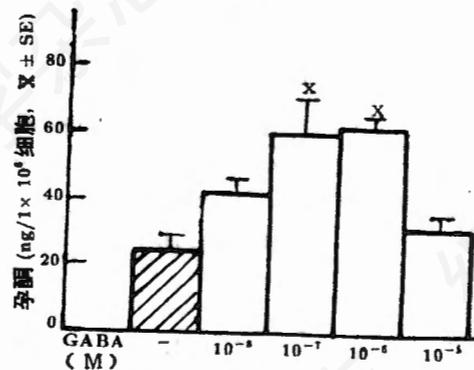


图1 不同浓度GABA对培养颗粒细胞基础孕酮分泌的影响

■ 对照组 \* 与对照组相比 $p < 0.05$

结果表明,当GABA浓度在 $10^{-8}$  mol/L- $10^{-5}$  mol/L范围内与对照组比较,均能促进

颗粒细胞孕酮基础分泌,当浓度为  $10^{-7}$ mol/L— $10^{-6}$ mol/L 时有显著意义 ( $p < 0.05$ )。

### 三、不同浓度 GABA 对颗粒细胞 HCG 生孕酮的影响

HCG 刺激分泌组各管加 20 Iu/ml HCG 和不同浓度的 GABA ( $10^{-8}$ mol/L— $10^{-5}$ mol/L), 对照组管除加 HCG 外还补以等体积的培养液。培养 4 h 在终止反应后, 测细胞悬液中的孕酮含量(图 2)。

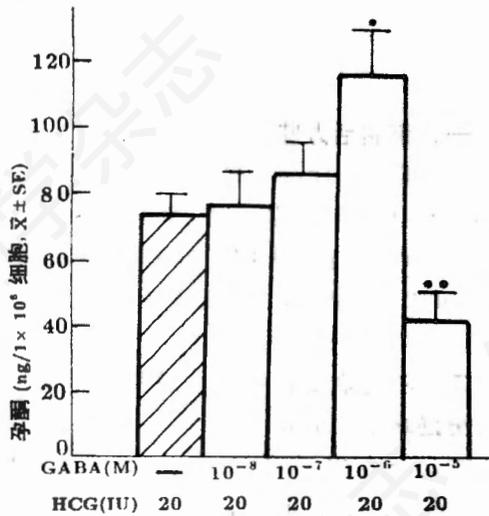


图 2 不同浓度 GABA 对培养颗粒细胞 HCG 生孕酮的影响

▨ 对照组 \* 与对照组相比  $p < 0.05$  \*\* 与对照组比  $p < 0.02$

结果表明:当 GABA 浓度在  $10^{-8}$ mol/L— $10^{-6}$ mol/L 时,对 HCG 刺激孕酮产生量都有不同程度的促进效应,但浓度为  $10^{-8}$ mol/L 时,才有显著意义 ( $p < 0.05$ )。当浓度增至为  $10^{-5}$ mol/L 时,则明显抑制 HCG 诱生孕酮的作用 ( $p < 0.02$ )。

## 讨 论

近年来发现 GABA 这一中枢抑制性递质参与 3 对垂体促性腺激素分泌的调节,并有实验证实是通过下丘脑 LHRH 细胞近旁 GABA 激导性传递的减少来实现的<sup>[8]</sup>。然而在外周组织中的 GABA 有何生理作用? 目前知

之甚少。自发现卵巢含有较高浓度的 GABA ( $0.56 \mu\text{g}/\text{mg.pro}$ )后<sup>[9]</sup>,它与卵巢功能之间有何关系? 引起了人们的关注。Erdö 等人报告<sup>[9]</sup>,GABA 局部作用于卵巢,能增加卵巢的血流量和  $E_2$  的分泌,但使孕酮的释放降低。Louzan 等人<sup>[4]</sup>,观察了大鼠动情周期不同阶段中卵巢及输卵管中 GABA 的变化,发现在动情日卵巢及卵泡囊液中 GABA 浓度均增高,而输卵管的 GABA 浓度则降低。孕鼠在孕酮升高的同时,卵巢 GABA 也升高<sup>[9]</sup>。上述现象提示:卵泡的生长、排卵及黄体功能可能均与卵巢的 GABA 有关。本文结果指出,当 GABA 浓度在  $10^{-7}$ mol/L— $10^{-6}$ mol/L 范围内显著促进颗粒细胞基础孕酮分泌,  $10^{-6}$ mol/L GABA 也能显著增强 HCG 刺激孕酮生成;当浓度为  $10^{-5}$ mol/L 时则反而抑制 HCG 的作用,表明 GABA 随剂量对颗粒细分泌孕酮表现双向调节作用。

罗履广等<sup>[10]</sup>发现酪氨酸可促使离体培养的大鼠排卵前卵泡颗粒细胞孕酮及雌二醇合成,并认为此效应是通过胞内 CAMP 升高引起的。细胞膜 GABA 受体有两种形态 GABA<sub>A</sub> 和 GABA<sub>B</sub>。瓜蟾垂体中叶黑素细胞促黑激素 (MSH) 释放是通过这两种受体形态调节的<sup>[11]</sup>。GABA<sub>B</sub> 受体活化后抑制 CAMP 生成,从而抑制 MSH 释放。GABA<sub>A</sub> 受体的作用则是双向的,既可通过 CAMP 升高刺激 MSH 释放,又可通过氯离子通道的开放使膜超极化而抑制 MSH 合成(取决于 GABA<sub>A</sub> 受体两种位点或亚型的相对敏感性)。大鼠卵巢的主要受体为 GABA<sub>A</sub>。本文的结果证明 GABA 对 HCG 刺激颗粒细胞孕酮分泌的效应也有双向性,是否也反映了 GABA<sub>A</sub> 受体由腺苷环化酶及氯离子通道介导两种不同的机制? 还有待进一步研究(如 GABA 受体位点分析,胞内 CAMP 及离子浓度测定等)。总上述,外源的 GABA 浓度变化会影响颗粒细胞分泌功能,至于 GABA 是否作为卵巢内的一种局部调节的天然物质,尚不能断定,但可以预言这方面的实验分析将

为更深入了解卵巢功能的调控机制有着重要的意义。

### 摘 要

本文观察了 GABA 对大鼠分散颗粒细胞生孕酮的影响。结果表明:当 GABA 浓度为  $10^{-6}$  mol/L 时明显促进颗粒细胞基础孕酮分泌 ( $p < 0.05$ ) 及促进 HCG 刺激孕酮的生成 ( $p < 0.05$ )。但更高浓度 ( $10^{-5}$  mol/L) 时则表现抑制 HCG 刺激孕酮生成的效应 ( $p < 0.02$ )。提示颗粒细胞的激素分泌功能可能受到 GABA 的调控。

### 参 考 文 献

- [1] Delrio, R. M. and Cablleno, A. L., 1980, *J. Neurochem.*, 34: 1584—1586.  
[2] Erdő, S. L. et al., 1982, *J. Neurochem.*,

38: 1174—1176.

- [3] Erdő, S. L., 1984, *Life Sci.*, 34: 1879—1884.  
[4] Louzan, P. et al., 1986, *J. Reprod Fertil.*, 77: 499—524.  
[5] Schaeffer, J. M. et al., 1982, *Life Sci.*, 30: 1599—1604.  
[6] Ritta, M. N et al., 1987, *Life Sci.*, 40: 791—798.  
[7] 高尔威等, 1982, *生理学报*, 34: 441—447.  
[8] Rohinsou, J. E. et al., 1991, *I. Neurocrinol.*, 3: 393—399.  
[9] Erdő, S. L., 1985, *Trends pharmacol Sci.*, 6: 205—208.  
[10] 罗履广等, 1991, *生理学报*, 3: 205—208.  
[11] Verburg-Van Kemenade, B. M. L. et al., 1987, *Life Sci.*, 40: 1859—1867.

## 电镜酶细胞化学样品微波制备技术

黄 立 王 玲

(南京医科大学电镜室 210029)

近年来, 超快微波制样技术在电镜生物样品固定中已得到较多的应用<sup>[1-3]</sup>, 但用于电镜细胞化学方面的报告还比较少<sup>[4,6]</sup>。我们设计了一套实验程序, 将微波照射应用于电镜酶细胞化学过程中的几个主要阶段(固定、温育和包埋聚合), 获得了较好的结果。

### 材 料 和 方 法

本实验使用的微波炉是南京三乐牌家用微波炉(型号: WL 500 p-1), 频率为 2450 MHz, 输出功率为 500 瓦, 功率设定分三档: 烹调、解冻及保温档。烹调档为连续微波照射, 解冻及保温档均为间歇微波照射。微波炉每开启 30 秒, 在解冻档和保温档微波照射时间分别为 17 秒和 5 秒, 间歇期分别为 13 秒和 25 秒。

取 ICR 小鼠肝及小肠切成  $1\text{ mm}^3$  小块, 放在含有 3 ml 二甲胍酸钠缓冲的 1% 戊二醛 (pH 7.2) 小玻璃瓶中。小瓶放在直径为 15 cm 的盛有冰水的培养皿中。

我们做了三种酶的细胞化学染色, 即 ACP 酶和 G-6-P 酶(肝脏); ALP 酶(小肠)。实验步骤如下:

1. 预固定 将盛有样品小瓶和冰水的培养皿放在炉内圆盘中央, 在圆盘边缘处放置盛有 900 ml 水的烧杯, 用作水负载, 吸收多余的微波能量。开启保温档 60 秒(微波照射时间实际上仅为 10 秒), 照射后样品仍留在原液中继续固定 30 分钟。
2. 厚切片 将样品放入 0.1 mol/L 二甲胍酸钠缓冲液中, 用振荡切片机切成 60  $\mu\text{m}$  厚的切片; 再用 0.1 mol/L Tris-Maleate 缓冲液洗 3 次。
3. 预温育 用未加底物的温育液处理 5 分钟, 20°C。
4. 温育 切片放入温育液中(表 1)。将盛有切片及温育液的样品小瓶放在盛有温水(20°C)的培养皿中, 一齐放在微波炉内圆盘中央, 水负载仍为 900 ml。开启保温档 60 秒钟。照射后样品在原液中停留 5 分钟, 然后用 0.1 mol/L Tris-Maleate 和 0.1 mol/L 二甲胍酸钠先后各洗 3 次, 每次 5 分钟。
5. 后固定 将切片放入 1.5%  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -