

幼龄大鼠子宫内膜蜕膜化的研究*

吕淑霞 王新明 周美云 盛洁漪

(中国科学院上海细胞生物所)

自从 Loeb^[1]第一个在豚鼠引发蜕膜瘤以来,对于蜕膜化所需的激素条件,子宫对外来刺激的敏感时期,以及蜕膜化刺激的性质等方面进行了大量的分析工作。这些工作的结果都表明,子宫内膜蜕膜化受卵巢甾体激素的控制。近年来的研究还指出,蜕膜不仅有内分泌功能^[2,3],而且具有免疫调节作用^[4]。

Sananes & Goaseogne^[5]在幼龄大鼠中,人工诱发了蜕膜瘤,而且观察了胚泡的着床和早期发育,从形态和功能上证明,幼年子宫的蜕膜与成年动物的妊娠蜕膜没有什么区别。

鉴于幼年动物细胞的生长能力和分化潜能较强,因此本实验试图以此大材料,通过透射电镜和扫描电镜,在亚显微结构水平系统地来观察基质细胞在外源卵巢甾体作用下转化为蜕膜细胞的过程,以及分析宫腔上皮在基质细胞转化中可能的作用。

材 料 和 方 法

Clack & Gorski^[6]在幼龄大鼠的工作中指出,雌激素受体的个体发育不依赖于卵巢的雌激素,10天的幼鼠子宫已有较多的雌激素受体结合位点,所以我们选用出生10—14天的Wistar幼年雌性大鼠为实验动物,共45只。

人工蜕膜化采用的甾体激素用量和处理时程参考Sananes & Goaseogne^[5], Finn & Publicover^[7]和程秀娟等^[8]的工作确定。

激素均溶于橄榄油中,作皮下注射。实验的前3天注射雌二醇0.1 μ g/只/日,溶于0.1ml橄榄油中,停药3天后,再7天注射孕酮1mg+雌二醇6.7ng/只/日,溶于0.11ml橄榄油中。实验第9天,于注射激素后6小时,腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉,在后腹部中线作一小切口,从一侧子宫宫颈上端注射10 μ l

橄榄油于宫腔内,作为蜕膜化刺激,然后在进针口上方,以丝线结扎,防油外溢,再缝合腹壁伤口。

实验分为14组,于实验的第三天和第九天以及宫腔内注油后6、12、24、48、和90小时处死动物。作为实验第3天和第9天的对照组,取相应年龄的正常动物子宫为材料,宫内注油后,以未注油侧的子宫为对照。除90小时组有8只动物外,其余各组均为3只动物。从动物取下子宫后,将中段子宫一分为二,分别制作成透射电镜和扫描电镜样品。其余的子宫组织固定于Bouin液,石蜡切片,HE染色,供光学显微镜观察。

透射电镜材料以戊二醛和锇酸双固定, Epon 812混合液包埋, LKB 4800型超薄切片机切片,醋酸钨和柠檬酸铅双重染色, JEM 100 B透射电镜观察。扫描电镜材料以戊二醛固定后,再经OTO(锇酸—单柠檬酸—锇酸)处理, Hitachi临界点干燥仪干燥, JEE-413真空镀膜机喷金, S-450扫描电镜观察。

结 果

光学显微镜观察

出生10—14天的幼鼠子宫内膜较薄,由柱状上皮细胞,梭形基质细胞和平滑肌细胞组成,并有腺体分化。注射雌二醇3天后,宫腔和腺上皮分裂相明显增多。停药3天,改用孕酮加微量雌二醇,注射第三天,宫腔上皮由柱状变为高柱状,核位于细胞中部,呈典型的分泌型上皮。基质处分裂相显著增加。宫腔内注油后6小时宫腔增大,上皮变薄,局部细胞皱缩,细胞排列不规则,基质轻度水肿,白血球由浆膜平滑肌层向宫腔迁移,同时可见局部血浆外渗。以上现象在注油后12小时愈益加重。宫腔内充满白血球;上皮细胞大部分解体,细胞大

* 刘爱华参加部分实验。

本工作获得 WHO 小额资助, 特此致谢。

水不一,排列不规则,较深染;基质水肿,为大量中性白血球所浸润,血浆外渗水肿区的基质细胞体积增大,偶见分裂相(图版I图1)。注油后24小时,基本情况与12小时相同,只是此时基质细胞的分裂又开始增加。注油后48小时,上皮分裂相明显增加,有的区域呈假复层,基质水肿趋于消退,分裂相仍多,并在宫腔侧发现界限分明的、较小的蜕膜化区域。检查的3只动物中,2只动物子宫中分别找到2—3个蜕膜化区。注油后90小时,宫腔内白血球显著减少,上皮和基质细胞分裂旺盛。检查的所有动物子宫,都可见数量和大小不等的蜕膜瘤(图版I图2)。仅就48和90小时的结果为依据,11只动物中有10只引发了蜕膜瘤。

扫描电镜观察

旨在显示子宫内膜上皮的变化。未经激素处理,对照组的子宫内膜上皮,细胞排列紧密,细胞界限清楚,表面为密集的微绒毛,并可见不少腺体开口于宫腔。雌二醇处理3天后,宫腔上皮细胞与对照组比较,向宫腔突起,微绒毛明显增长。孕酮加微量雌二醇处理的第三天,上皮细胞表面有很多分泌物和分泌颗粒,除了腺体开口于宫腔外,有些细胞顶面也出现裂口,这显然与顶浆分泌有关(图版I图3)。子宫内注油后6小时,上皮细胞表现不同程度的解体,多数上皮细胞微绒毛变稀,变短,有些细胞肿胀,多裂孔;有些细胞凹陷,犹如漏气的皮球,似乎是内含物排尽的结果(图版I图4)。注油后12小时,上皮细胞的排列较前松散,出现更多凹陷的细胞,表面多孔的细胞仍可见(图版I图5)。注油后24小时,微绒毛明显增长,细胞较前饱满。注油后48小时,由于细胞的生长和增殖,宫腔上皮形成很多不规则的皱褶,细胞表面为浓密的微绒毛所覆盖,但是细胞大小不一,局部突起区,上皮剥离,细胞增大,显然为蜕膜化区(图版I图6)。至注油后90小时,则可见大小不等的蜕膜瘤突出于宫腔。

透射电镜观察

主要了解紧接上皮的基质细胞的蜕膜化过

程。出生10—14天的正常幼鼠,子宫的基质细胞(即成纤维细胞)已完成分化,细胞和核呈梭形,细胞器发育良好,核内含大量异染色质,主要沿核膜成簇分布,也有的在核质中聚成团块,核仁较小,往往为单个。基膜与上皮细胞基底的细胞膜以透亮带相隔,基膜犹如上皮细胞膜,但结构较松散,染色稍浅,其下方还可见一些散在的纤维(图版II图1)。雌二醇处理3天后,基质细胞和基膜与以往未经激素处理的对照组的图象没有什么区别。孕酮加微量雌二醇处理的第三天,基质细胞发生明显的改变,核周和核内的异染色质消失,染色质在核内呈均匀分布,核仁增大,细胞质较前致密,上皮细胞底部原来着色匀称的脂滴,现在外圈变浅;基膜和透亮带清晰可辨,但是随着上皮细胞膜发生折迭,两层膜之间及其下方可见一些物质沉积(图版II图2)。子宫内注油后6小时,基质细胞和基膜没有明显变化。至注油后12小时,上皮下的基质细胞,体积进一步增大,细胞器包括多聚核糖体,内质网,线粒体和高尔基体都获得很好发育,细胞核随细胞相应变为圆形或卵圆形,核仁显著增大,往往有两个或两个以上的核仁。至此,基质细胞已完成了向蜕膜细胞的转化。与此同时,基膜上下为大量无定形物质所充塞,基膜与透亮带的界限变得难以分辨,只见在上皮下形成一条深染的宽带。靠基质侧也可见类似物质分布(图版II图3)。这时的上皮细胞,正处于其损伤最严重的阶段,细胞内除含大量脂滴以外,还出现不少溶酶体,有些细胞残缺不全。注油后24小时,这些无定形物质似乎朝基质方面散开,基膜和透亮带又清晰可辨(图版II图4)。至注油后48、90小时,除了无定形物质进一步散开以外,基质下方还可见一些纤维状物质沉积。

讨 论

Shekanyak^[9]最早的工作指出,幼年大鼠子宫的蜕膜反应,依赖于卵巢黄体,仅仅接受较低剂量激素处理的动物才能获得正反应。

Sananes & Goaseognes^[5]对出生15天后的大鼠进行人工蜕膜化。他们在诱发幼鼠子宫内膜蜕膜化的全过程中都使用孕酮,每天3毫克,仅于蜕膜化刺激前1天添加0.1微克雌二醇,引发蜕膜瘤的成功率为70%。我们采用10—14天的幼龄大鼠,先用雌二醇处理3天,每天0.1微克,停药3天后,模拟整体条件,除使用孕酮(1毫克/日)以外,再添加微量雌二醇。结果,诱发蜕膜瘤的比例达90%。

根据实验分析,我们除使用较低剂量卵巢甾体以外,重要的是进行雌二醇的预处理。出生10—14天的幼龄大鼠,组织学检查,子宫内膜的基质细胞层和平滑肌层均较薄,有少量腺体分化;卵巢滤泡的发育处于刚出现腔隙的生长滤泡早期,表明雌激素的分泌刚开始。这些都提示,子宫内膜的发育还未臻完善。雌二醇的预处理,显然使幼龄大鼠的子宫获得了更好的发育和分化。除此,现在普遍承认,雌二醇不仅使子宫雌激素受体的数量增加,同时刺激孕酮受体的合成。所以雌二醇的预处理也为基质细胞接受孕酮作用作好了准备。Sananes & Goaseogne^[5]在一组测试子宫反应性的实验中,以己烯雌酚预处理幼年大鼠,发现它对油诱发的蜕膜反应有增强作用。说明他们实际上也已经观察到了雌激素预处理的重要性。

孕酮在致敏子宫基质细胞中的作用,已为前人在成年动物的工作所证实。Tachi & Tachi^[10]采用放射自显影技术,在大鼠中曾观察到,孕酮处理后,核仁增大,DNA合成速率和³H-尿嘧啶掺入RNA的速率,尤其在核仁中明显增加。我们在幼龄大鼠中也看到,孕酮加微量雌二醇处理的第三天,基质细胞的核仁明显增大,染色质在核内呈均匀分布,原来核周聚集成簇的异染色质消失。这些乃是处于敏感时期的基质细胞,前人称之为前蜕膜细胞。它们在接受蜕膜化刺激后12小时即转化为蜕膜细胞,说明这一转化过程是非常迅速的。

宫腔上皮不论在正常胚泡着床和人工诱发蜕膜瘤中都是胚泡和其他蜕膜化信号首先接触

和作用的部位。它在基质细胞蜕膜化中的作用,Lejeune & Leroy^[11]指出象换能器,起着传递蜕膜化信息至基质细胞的作用。O'Grady & Bell^[12]提到在啮齿类,当基质细胞转化为蜕膜细胞的过程中,总伴随着上皮的解体,所以很可能上皮在退化过程中合成或释放某些物质,传递给基质细胞,促使其向蜕膜细胞转化。值得提出的是,我们实验中,上皮细胞及其下基膜的变化,也提示有这一可能性。

基膜是一层均质的膜层,一般视为上皮的支架,在本实验对照组和雌激素处理组中,基膜和透亮带都很清楚。孕酮加微量雌二醇处理后,基膜处有了无定形物质沉积。注油后12小时,正值子宫内膜上皮破坏最严重,基质细胞转化为蜕膜细胞之时,基膜上下有大量无定形物质积聚。与此同时,基质侧也出现类似物质。此后,这些物质似乎进一步朝基质方向转移。随着上皮的恢复,基膜处的无定形物质渐趋减少。以上物质在基膜周围的聚积、消退都与上皮细胞的变化同步,提示很可能是上皮来源的物质,在基质细胞蜕膜化中起作用。

摘 要

出生10—14天的Wistar大鼠,在雌二醇和孕酮一定剂量和时程的作用下,以油剂作为蜕膜化刺激,成功地诱发了蜕膜瘤。并在亚显微结构水平上,系统地观察了基质细胞转化为蜕膜细胞的过程。结果表明,出生10—14天的幼龄大鼠子宫内膜,已能对卵巢甾体作出迅速反应。孕酮加微量雌激素处理第三天,基质细胞已处于敏感时期,具备了向蜕膜细胞转化的条件,只是在蜕膜化刺激作用后12小时,才实现了这一转化。子宫内膜上皮在子宫腔内注油后开始解体,基膜处积聚大量无定形物质,它在基质细胞蜕膜化中可能起重要作用。

图 版 说 明

图版 I

1. 蜕膜化刺激后12小时的子宫内膜
示局部基质水肿,基质细胞增大 E. 上皮, S. 基

- 质 $\times 100$
2. 蜕膜化刺激后 90 小时的子宫内
示蜕膜瘤(D), 其上皮剥离 E. 上皮 S. 基质 $\times 50$
 3. 孕酮(加微量雌二醇)处理第三天的子宫上皮
示腺体和细胞顶浆分泌开口以及分泌颗粒 $\times 5000$
 4. 蜕膜化刺激后 6 小时的子宫上皮
示细胞肿胀、多裂孔、绒毛短而稀 $\times 3600$
 5. 蜕膜化刺激后 24 小时的子宫上皮
示大量细胞凹陷 $\times 960$
 6. 蜕膜化刺激后 48 小时的子宫上皮
示子宫上皮折皱, 局部蜕膜化(箭头) $\times 300$

图版 II

1. 正常幼龄大鼠(出生 13 天)的子宫基质
示基质细胞的异染色质, 基膜与透亮带(箭头) $\times 6000$
2. 孕酮(加微量雌二醇)处理第三天的基质
示基质细胞的异染色质消失, 基膜折迭, 有物质积聚(箭头) $\times 6000$
3. 蜕膜化刺激后 12 小时的基质
示基质细胞蜕膜化, 基膜与透亮带处无定形物质增多, 深染(箭头) $\times 8000$
4. 蜕膜化刺激后 24 小时的基质
示基膜与透亮带分界清楚, 无定形物质向基质转移(箭头) $\times 8000$

参 考 文 献

- [1] Loeb, L. 1907, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 4 : 93-94.
- [2] Riddick, D. H. & Kusmik, W. F. 1977, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 127 : 167-190.
- [3] Hochner-Celnikier, D., Ron, M., Elder,

- A., Segal, S., Palti, Z., Fuks, Z. & Vlodavsky, L. 1984, *Biol. of Reprod.* 31 : 827-836.
- [4] Searle, R. F., Elcock, J. M. & Matthews, C. J. 1987 Antigen presentation by mouse decidua and placenta. in "Immunoregulation and fetal survival" Eds. Gill & Wegmann Oxford Univ. press pp. 96-110.
- [5] Sananes, N. & Goascogne, C. Le. 1976, *Differentiation* 5 : 133-144.
- [6] Clark, J. H. & Gorski, J. 1970, *Science* 169 : 76-77.
- [7] Finn, C. A. & Publicover, M. 1981, Cell proliferation and cell death in the endometrium. in "Cellular and molecular aspect of implantation" Eds. Glasser & Bullock Plenum press pp. 181.
- [8] 程秀娟等, 1984, 生殖与避孕, 4 : 31-34.
- [9] Sheleanyak, M. C. 1933c, *Anat. Rec.* 56 : 211.
- [10] Tachi, C. & Tachi, S., 1974, Cellular aspects of ovum implantation and decidualization in the rat. in "Basic life sciences vol. 4B Physiology and genetics of reproduction" Eds. Coutinho & Fuchs Plenum press pp. 263-286.
- [11] Lejeune, B. & Leroy, F. 1980, *Prog. Reprod. Biol.* 7 : 92-101.
- [12] O'Grady, J. E. & Bell, S. C. 1977, The role of the endometrium in blastocyst implantation. in "Development in mammals" vol. 1 Ed. Johnson, M. H. Nolland-Holland Publishing company pp. 165-243.

原代培养的二倍体上皮细胞和成纤维细胞的纯化

沈翠英 肖忠明

(上海市肿瘤研究所免疫学与细胞生物学研究室)

人体包皮原代培养物所长出的两种细胞——上皮细胞和成纤维细胞, 通过本文介绍的纯化方法可以分别收集提供不同实验的需要。如正常上皮细胞在肿瘤实验及烧伤病人植皮等方面都有一定的实用价值。而成纤维细胞在转化试验及干扰素等的制备物中都是有用的实验材料。

材 料 和 方 法

一、标本来源

在无菌条件下用手术取下正常人包皮组织, 立即放置于含有 40% 小牛血清的 MEM 培养液内 (含 500 U/