

牦牛子宫基质细胞与上皮细胞的标记物

屠迪^{1,2}, 崔燕², 余四九^{2*}

(1.湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128; 2.甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 以妊娠前后的牦牛子宫为材料, 应用免疫组织化学 SP 法, 研究波形蛋白(Vimentin)、泛角蛋白(CKs)和角蛋白 7(CK7)能否成为牦牛子宫内基质细胞和上皮细胞的特异标记物。结果表明, Vimentin 可作为妊娠前后牦牛子宫基质细胞标记蛋白; CKs 可标记妊娠前后牦牛子宫腺上皮、腔上皮细胞和妊娠早期尿囊内层细胞; CKs 和 CK7 均可标记妊娠早期牦牛尿囊外层细胞。

关 键 词: 牦牛; 子宫; 基质细胞; 上皮细胞; 角蛋白; 波形蛋白

中图分类号: S823.8*5 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)01-0065-03

Specific mark of stroma cell and epithelial cell in yak uterus

TU Di^{1,2}, CUI Yan², YU Si-jiu^{2*}

(1.College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Through the immunohisto chemistry SP methods, it was studied that whether the expression of Vimentin, cytokeratins and cytokeratin-7 could be specific mark of yak stroma cell and epithelial cell before and after implantation. The results showed: Vimentin was a specific mark of yak stroma cell before and after implantation. The cavity epithelium, epithelium and allantoic inner layer cell were only marked by CKs. The allantoic outer layer cells were comarked by CKs and CK7.

Key words: yak; uterus; stroma cell; epithelial cell; cytokeratin; vimentin

牦牛是一种典型的季节性发情动物, 其品种原始, 繁殖能力和生产能力很低。用体外培养技术进行牦牛生殖的相关研究, 可促进牦牛品种的改良和繁殖工作。哺乳动物子宫和胎盘结构十分复杂, 要对其中的各种细胞进行体外培养和相关试验, 必须找到特异的细胞标记。CK 家族成员被认为是不同上皮细胞所特有的表达物^[1], 波形蛋白 Vimentin 被认为是间充质细胞的特有标记物^[2]。CKs/Vimentin 一直被作为区分人子宫内膜上皮细胞和基质细胞的特异性免疫标记^[3-5], CK7/Vimentin 被认为是人滋养层细胞的特异性标志物^[6]。据报道^[7-8], 体外研究时来源

于不同动物子宫的细胞与来源于人的细胞存在差异。关于牛子宫内基质细胞和上皮细胞的研究^[9]已有报道, 但关于牦牛这一原始物种的研究尚属空白。笔者以妊娠前后牦牛子宫为研究对象, 采用免疫组织化学方法, 对与附植过程密切相关的腔上皮、腺上皮和基质细胞等细胞的特异性标记物进行研究。

1 材料与方法

经颈动脉放血后 30 min 内, 取牦牛子宫, 根据其卵巢判断子宫所处周期。试验所用未妊娠牦牛子宫的单侧或双侧卵巢上均有 0.5 cm 以上的卵泡, 无

收稿日期: 2010-04-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371069); 教育部博士点基金项目(20050733008); 湖南农业大学动物医学院青年科学基金项目(BK0735); 湖南农业大学青年科学基金项目(07QN07)

作者简介: 屠迪(1981—), 男, 内蒙古赤峰人, 博士研究生, 主要从事动物生殖生理研究, tudi1981@gmail.com; *通信作者, yusj@gsau.edu.cn

黄体 and 血体。妊娠牦牛子宫根据胎儿大小判断为妊娠 25 d 左右。取双侧子宫角的 1/2 处的子宫组织, 迅速用 pH7.4 的 4% 多聚甲醛固定。

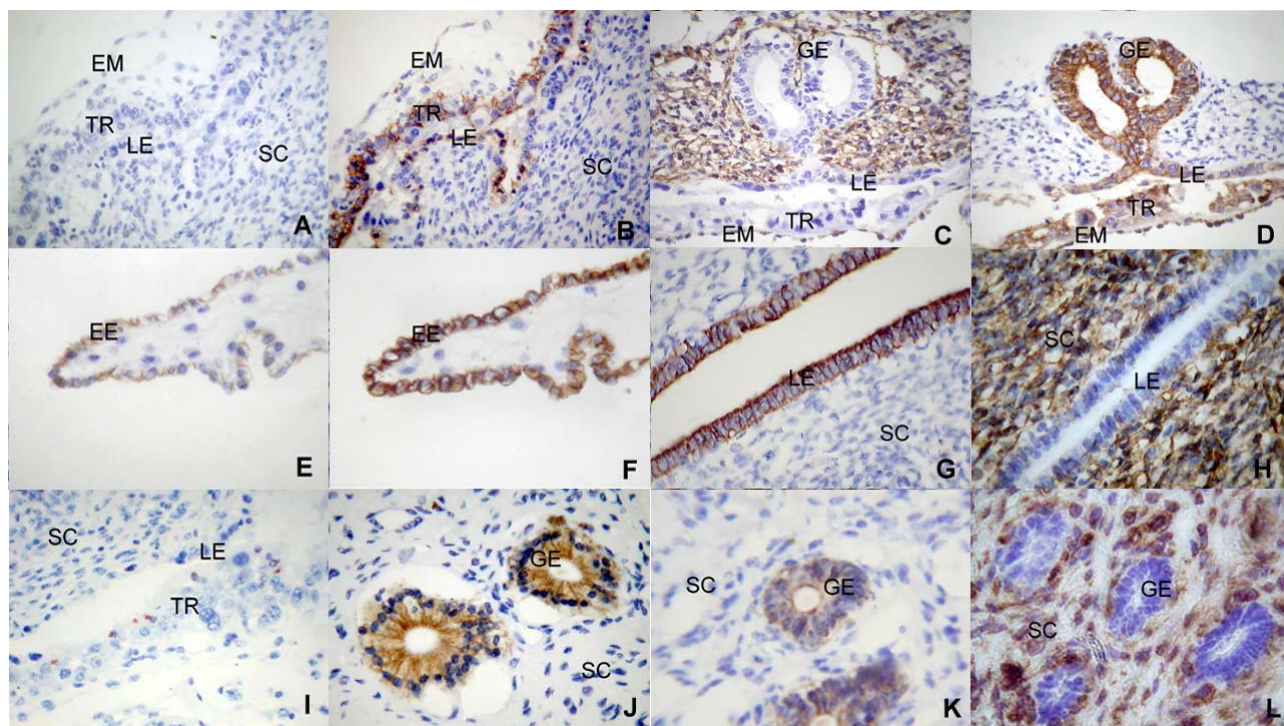
所用抗体包括鼠抗人细胞角蛋白广谱单克隆抗体(mouse anti-cytokeratin, CKs)克隆系 AE1/AE3、鼠抗人细胞角蛋白 7 单克隆抗体(mouse anti-cytokeratin, CK7)克隆系 OV-TL12/30、鼠抗人平滑肌肌动蛋白单克隆抗体(mouse anti-actin smooth muscle, actin)克隆系 1A4、鼠抗人波形蛋白单克隆抗体(mouse anti-vimentin, Vimentin)克隆系 V9。

切片制备和染色方法: 样品采用石蜡包埋, 4 μm 连续切片, 贴片于多聚赖氨酸包被的载玻片上, 45 $^{\circ}\text{C}$ 烤片过夜; 按免疫组织化学 SP 法, 用石蜡切片, 脱蜡至水; 用 0.01 mol/L pH6.0 枸橼酸盐缓冲液抗原修复 15 min; 用蒸馏水冲洗 PBS 浸泡 5 min; 用 3% H_2O_2 室温孵育 10 min; 用山羊血清封闭 15 min; 滴加一抗, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 h, 阴性对照组以 PBS 代替一抗; 用 PBS 冲洗; 生物素化二抗室温作用 15 min; 用 PBS 冲洗; 用辣根酶标记链霉卵白素工作液, 于室温作用 15 min; 用 PBS 冲洗; DAB 显色, 用苏木精复染; 封片观察。

2 结果与分析

未妊娠的牦牛子宫内, CKs 在腺上皮(GE)和腔上皮(LE)细胞发生特异性表达(图 1-G、K); Vimentin 只在基质细胞(SC)发生特异性表达(图 1-H、L)。妊娠的牦牛子宫内, CK7 在尿囊内层细胞(EE)和部分腔上皮细胞(LE)为阳性(图 1-E、I), 在腺上皮(GE)、基质细胞(SC)、滋养层(TR)和尿囊外层(EM)呈阴性(图 1-A、E、I); CKs 在腺上皮(GE)、腔上皮(LE)、尿囊内层(EE)和尿囊外层(EM)为阳性(图 1-B、F、J), 在基质细胞(SC)为阴性(图 1-B、J); Vimentin 在基质细胞(SC)和尿囊外层(EM)为阳性, 在滋养层(TR)、腔上皮(LE)和腺上皮(GE)为阴性。

连续切片显示, 处于妊娠早期的牦牛子宫尿囊外层(EM)细胞是一种 Vimentin 和 CKs 双阳性的细胞(图 1-C、D)。与 CKs 相比, CK7 在尿囊内层(EE)细胞呈较弱的阳性(图 1-E、F)。此时的滋养层(TR)细胞并不表达 CK7(图 1-A、I), 而少数的腔上皮(LE)细胞胞浆内存在 CK7 的弱阳性表达(图 1-I)。Actin 只标记子宫平滑肌和血管平滑肌。试验中的所有阴性对照组均无阳性反应。



A、B、C、D、E、F、I、J 为妊娠期; G、H、K、L 未妊娠; A、E、I 由 CK7 标记; B、D、F、J、G、K 由 CKs 标记; C、H、J 由 Vimentin 标记。

图 1 牦牛子宫组织免疫着色($\times 400$)

Fig.1 Immunocytochemical analysis of yak endometrial ($\times 400$)

3 结论与讨论

鼠抗人波形蛋白单克隆抗体可以标记妊娠前、后牦牛子宫基质细胞。鼠抗人细胞角蛋白广谱单克隆抗体可标记妊娠前后牦牛子宫腺上皮、腔上皮细胞和妊娠早期尿囊内层细胞。鼠抗人细胞角蛋白广谱单克隆抗体和鼠抗人细胞角蛋白 7 单克隆抗体均可标记妊娠早期牦牛尿囊外层细胞。

CKs 和 Vimentin 在各种类动物子宫内膜上皮细胞和基质细胞的表达特点存在差异。本研究结果与应用于人类的研究结果相同^[3-5]，并未出现其他物种存在的上皮细胞双阳性表达现象^[7-8]，因此，可采用 CKs/Vimentin 作为鉴别牦牛子宫内膜上皮细胞和基质细胞的特异性标记物。本试验中 CK7 在妊娠前后牦牛子宫内腔上皮细胞内的表达差异可能与子宫周期有关^[9]。要对此进行证实，需要对 CK7 在整个牦牛子宫周期内的表达规律进行研究。

CKs/Vimentin 曾被用于鉴别人的滋养层细胞。在人类的整个妊娠期，滋养层细胞只稳定表达 CK7^[10-11]。CK7/Vimentin 被用于鉴别人滋养层细胞^[12]。本试验中 CK7 无法标记牦牛滋养层细胞。由于尿囊外层细胞是 CKs/Vimentin 双阳性细胞，而且 CK7 在尿囊内层呈弱阳性表达，因此，可以采取 CK7/CKs/Vimentin 联合的方式鉴别滋养层细胞和尿囊内、外层的细胞。结合本试验结果，对比应用于人、兔等物种的研究，发现妊娠期内 CK 家族成员在滋养层细胞内的表达存在一定规律，不同物种间 CK 家族成员的表达规律存在差异^[6]。CK 家族成员表达规律的种间差异可能源自不同胎盘的结构影响。对比 CK7 与 CKs 在滋养层细胞和尿囊内、外层细胞内的表达差异，发现这 3 种细胞可能表达 CK 家族内特定的蛋白，这为进一步进行特异标记物筛选指明了方向。

参考文献:

- [1] Quinlan R A , Schiller D L , Hatzfeld M , et al . Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments[J] . Acad Sci , 1985 , 455 : 282-306 .
- [2] Franke W W , Schmid E , Schiller D L , et al . Differentiation-related patterns of expression of proteins of intermediate-size filaments in tissues and cultured cells[J] . Quant Biol ,

1982 , 46 : 431-453 .

- [3] Kaei Nasu , Kazuyo Arima , Kengo Kai , et al . Expression of epithelial neutrophil-activating peptide 78 in cultured human endometrial stromal cells[J] . Molecular Human Reproduction , 2001 , 7(5) : 453-458 .
- [4] Moll R , Franke W W , Schiller D L . The catalog of human cytokeratins : Patterns of expression in normal epithelia , tumors and cultured cells[J] . Cell , 1982 , 31 : 11-24 .
- [5] Perrier d'Hauterive S , Charlet-Renard C , Berndt S , et al . Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium[J] . Human Reproduction , 2004 , 19(11) : 2633-2643 .
- [6] Juan Maldonado-Estradaa , Elisabeth Menu , Pierre Roquesd , et al . Evaluation of cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry[J] . Journal of Immunological Methods , 2004 , 286 : 21-34 .
- [7] Genevieve M Moreau , Ali Arslan , Deborah A Douglas , et al . Development of immortalized endometrial epithelial and stromal cell lines from the mink (*Mustela vison*) uterus and their effects on the survival *in vitro* of mink blastocysts in obligate diapause[J] . Biology of Reproduction , 1995 , 53 : 511-518 .
- [8] Zhang Z , Paria B C , Davis D L . Pig endometrial cells in primary culture : Morphology , secretion of prostaglandins and proteins , and effects of pregnancy[J] . Anim Sci , 1991 , 69(7) : 3005-3015 .
- [9] Pérez-Martinnez C , García-Fernández R A , Escudero A , et al . Expression of cytokeratins and vimentin in normal and neoplastic tissue from the bovine female reproductive tract[J] . Comp Path , 2001 , 124 : 70-78 .
- [10] Daya D , Sabet L . The usefulness of cytokeratin as a sensitive and reliable marker for trophoblastic tissue[J] . Clin Pathol , 1991 , 95(2) : 137-142 .
- [11] Hsi B L , Yeh C J . Monoclonal antibody GB25 recognizes human villous trophoblasts[J] . Reprod Immunol Microbiol , 1986 , 12(1) : 1-3 .
- [12] Maldonado- Estrada J , Menu E , Roques P , et al . Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry[J] . J Immunol Methods , 2004 , 286(1/2) : 21-34 .

责任编辑: 王赛群
英文编辑: 罗文翠