

S100 蛋白在动情周期大鼠子宫中的分布

徐永平¹,王根辈¹,赵慧英¹,郝建军¹,范光丽¹,逢国梁²,蔡青青¹,马翔¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100;2 陕西省畜牧兽医总站,陕西 西安 710016)

【摘要】 **【目的】**研究 S100 蛋白在动情周期 SD 大鼠子宫中的分布情况及其变化规律。**【方法】**采用阴道涂片方法将 16 只雌性 SD 大鼠分为动情前期、动情期、动情后期和动情间期 4 组,处死各组大鼠取子宫制作石蜡切片,采用免疫组织化学超敏感法(Streptavidin-Peroxidase,SP),研究 S100 蛋白在大鼠动情周期子宫中的分布规律。**【结果】**S100 蛋白免疫阳性产物在各期子宫各层中均有不同程度的分布,主要定位于子宫内膜上皮细胞、腺上皮细胞、基质细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、肥大细胞、平滑肌细胞及成纤维细胞中。S100 蛋白免疫阳性产物在动情周期子宫内膜、肌层和外膜中的表达变化规律一致:动情前期着色最弱,动情期着色最深,动情后期着色变浅,动情间期着色又加深,表达呈双峰变化趋势。**【结论】**S100 蛋白在动情周期 SD 大鼠子宫中的表达具有一定规律,可能受性类固醇激素的调节。

【关键词】 S100 蛋白;免疫组化 SP 法;动情周期;子宫;SD 大鼠

【中图分类号】 S814.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2009)01-0017-05

Distribution of S100 protein in uterus of rats during the estrus cycle

XU Yong-ping¹, WANG Gen-bei¹, ZHAO Hui-ying¹, HAO Jian-jun¹, FAN Guang-li¹,
PANG Guo-liang², CAI Qing-qing¹, MA Xiang¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Animal Husbandry and Veterinary Station of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710016, China)

Abstract: **【Objective】** The trail was conducted to study the expression of S100 protein in uterus of the rats during estrus cycle. **【Method】** Sixteen mature female SD rats were divided randomly into 4 groups: proestrus, estrum, metoestrus and diestrus, by vaginal smear, the expression of S100 protein in uterus of the rats during estrus cycle was studied by immunohistochemical SP method. **【Result】** The expression and variation of S100 protein exist in uterus in rat estrous cycle. The immunoreactive products are mainly located in endometrial epithelial cells, epithelial cells, stromal cells, endothelial cells, vascular smooth muscle cells, mast cells, smooth muscle cells and fibroblasts. There is no much difference in the expression regulation of S100 protein immunoreactive products in muscular and the endometrium in different periods, but there are some similar rules to follow: the expression of S100 protein in proestrus is slight, then it is strongly expressed in estrus, while it decreases in metoestrus. At last, the expression of S100 is re-increased in metestrus. They present the bimodal distribution. **【Conclusion】** The results show that the expression of S100 protein in the uterus follows some certain rules and might be mediated by the sex steroid hormone.

Key words: S100 protein; immunohistochemical; estrus cycle; uterus; sprague Dawley rat

近年来,随着对神经系统、免疫系统和内分泌系统之间相互作用、相互依赖复杂关系的深入研究,人

* [收稿日期] 2008-03-03
[基金项目] 国家自然科学基金项目(39670550);西北农林科技大学科研专项(06ZR003)
[作者简介] 徐永平(1971—),男,陕西长安人,副教授,博士,主要从事神经生物学研究。

们逐渐认识到,神经免疫与内分泌系统之间存在着双向调节作用。神经系统通过神经递质、众多的内分泌激素和细胞因子以及广泛的外周神经突触,来调控免疫系统的功能;免疫系统则通过免疫细胞产生的多种细胞因子和激素样物质反作用于神经内分泌系统。神经、免疫、内分泌 3 大系统之间相互联系,相互制约,构成复杂的神经免疫内分泌网络,在整体水平调节、维持机体的正常生理机能^[1]。神经系统作用广泛、迅速而灵敏,内分泌系统与免疫系统作用相对局限、缓慢而持久。

子宫的神经分布、激素和免疫水平随生殖周期的变化而呈周期性变化,在子宫内膜周期性变化的细胞增殖和凋亡等诸多细胞事件中,有许多事件是钙离子所依赖的。S100 蛋白是一组相对分子质量较低的钙结合蛋白,其过量表达可以促进在没有神经生长因子情况下嗜铬瘤细胞的存活^[2]。另外, S100 蛋白可与 Bcl-2 家族成员 Bcl-xL/Bcl-2 相关死亡促进因子(BAD)相互作用,从而抑制 BAD 引起的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞凋亡过程^[3]。上述研究均表明, S100 蛋白作为一种钙依赖性的信号通路介导分子,参与多种细胞行为,但目前国内外对 S100 蛋白的研究多集中在通过测定其在外周血中的含量,间接用于神经系统疾病的诊断、判断疾病严重程度、估计预后和指导治疗等方面,侧重于将其作为神经元损伤的标志物,而忽视了 S100 蛋白本身独特的生理作用。同时, S100 蛋白在动情周期子宫中的分布规律尚不清楚。为进一步揭示 S100 蛋白在动情周期子宫中的表达方式及变化规律,本试验以 SD 大鼠为试验动物,采用敏感性强的 SP 免疫组织化学法,研究了 S100 蛋白在 SD 大鼠动情周期子宫中的分布,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验动物

健康 SD 大鼠, 16 只, 体质量 220~250 g, 购自第四军医大学试验动物中心, 清洁级饲养, 自由采食和饮水, 1 周后用于试验。

1.2 主要试剂

兔抗 S100 蛋白多克隆抗体, 武汉博士德生物工程有限公司产品; 山羊抗兔链霉素菌抗生物素蛋白-一过氧化物酶免疫组化超敏 SP 试剂盒, 福州迈新生物技术开发有限公司产品; 四盐酸 3,3-二氨基联苯胺(DAB), Sigma 公司进口, 华美生物工程公司分装; 葡萄糖过氧化物酶, 美国 Sigma 公司进口。

1.3 SD 大鼠子宫的采集与切片制备

采用阴道涂片法对大鼠所处的动情周期进行鉴别, 将受试大鼠分为动情前期、动情期、动情后期和动情间期 4 组, 每组 4 只。处死各组大鼠, 取出子宫, 迅速置于 4 ℃ 40 g/L 的多聚甲醛中固定 48 h, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 制成 5 μm 厚切片。

1.4 SD 大鼠子宫石蜡切片的免疫组织化学超敏 SP 法染色

SP 法染色按免疫组化 SP 试剂盒说明书进行操作, 一抗为兔抗 S100 蛋白多克隆抗体(工作浓度为 1:150), 阴性对照采用 PBS 缓冲液替代一抗。

1.5 SD 大鼠子宫石蜡切片染色结果的判断

切片中 S100 蛋白免疫阳性产物呈蓝色颗粒, 阴性不显色, 根据染色深浅分为弱阳性(着色浅)、中等阳性(中等着色)和强阳性(深染)3 级。每个样本随机选取 5 张切片, 每张切片相同部位取 2 个高倍镜视野(×400), 应用江苏捷达高清晰图像分析系统进行分析, 计算每个视野的阳性强度平均值(用平均光密度表示)和阳性面积, 再计算出相对表达量 μ^2 : $\mu^2 = \text{光镜倍数} \times \text{阳性强度均值} \times \text{阳性面积} / (2.6 \times 10^5)$ 。式中, 2.6×10^5 为本试验拍照时设定的像素值。再根据相对表达量平均值进行数据统计。

1.6 数据统计分析

试验结果用“平均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)”表示, 应用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析, 采用 *t* 检验法比较各组大鼠子宫 S100 蛋白表达的差异。

2 结果与分析

2.1 SD 大鼠子宫切片 S100 蛋白的 SP 组织化学法染色

经免疫组化 SP 法染色的切片, 背景无色或浅蓝色, 免疫阳性产物为蓝色颗粒, 对照组切片不显色, 说明本试验具有特异性。

2.2 SD 大鼠子宫组织中 S100 蛋白的分布特点

S100 蛋白在大鼠动情周期子宫各层组织中均有表达, 广泛分布于子宫内膜、肌层和外膜。S100 蛋白免疫阳性产物主要位于胞浆内, 而胞核不着色呈空泡状, 位于细胞中央。

2.3 大鼠子宫组织 S100 蛋白的分布规律

2.3.1 子宫内膜 动情前期, 子宫内膜上皮细胞呈中等阳性反应, 阳性细胞呈锥形或柱状, 胞质内有蓝色颗粒, 胞核不着色; 子宫腺上皮细胞着色同子宫内膜上皮细胞(图 1-I); 内膜固有层中基质细胞呈中

等阳性表达,肥大细胞呈强阳性表达,细胞大而明显;子宫螺旋动脉及其分支微血管内皮细胞呈中等阳性表达,螺旋动脉管壁肌层呈强阳性表达,并与血管内皮形成紧密联系。

动情期(图 1-Ⅱ),子宫内膜上皮细胞、内膜固有

层基质细胞中 S100 蛋白呈强阳性表达。靠近内膜上皮的浅层细胞成分较多,其中的基质细胞着色相对较深。子宫腺上皮细胞呈强阳性或中等阳性表达,血管内皮细胞呈强阳性表达,血管平滑肌呈中等阳性表达。

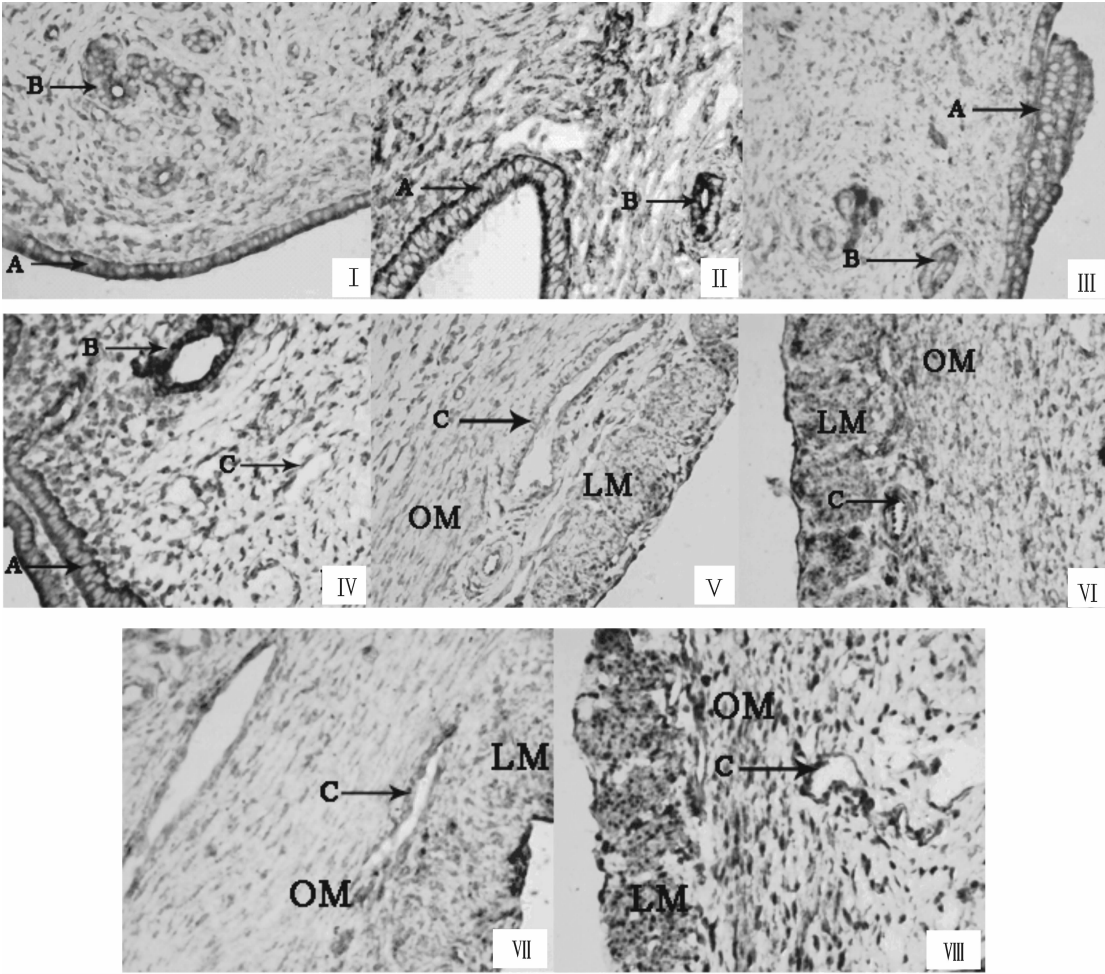


图 1 S100 蛋白在大鼠动情周期子宫内膜、肌层和外膜的免疫组织化学染色 (400×)
I. 动情前期大鼠子宫内膜;Ⅱ. 动情期大鼠子宫内膜;Ⅲ. 动情后期大鼠子宫内膜;Ⅳ. 动情间期大鼠子宫内膜;Ⅴ. 动情前期大鼠子宫肌层外膜;
Ⅵ. 动情期大鼠子宫肌层外膜;Ⅶ. 动情后期大鼠子宫肌层外膜;Ⅷ. 动情间期大鼠子宫肌层外膜;A. 子宫内膜上皮;
B. 子宫腺上皮;C. 血管内皮;D. 肥大细胞;OM. 环形肌;LM. 纵行肌

Fig. 1 Immunohistochemical stains of S100 protein in rat endometrium and myometrium during estrus cycle (400×)
I. S100 protein in rat endometrium during proestrus; Ⅱ. S100 protein in rat endometrium during estrus; Ⅲ. S100 protein in rat endometrium during metestrus; Ⅳ. S100 protein in rat endometrium during diestrus; Ⅴ. S100 protein in rat myometrium during proestrus;
Ⅵ. S100 protein in rat myometrium during estrus; Ⅶ. S100 protein in rat myometrium during metestrus; Ⅷ. S100 protein in rat myometrium during diestrus; A. Endometrial epithelium; B. Uterine glandular epithelium; C. Vascular epithelium; D. Mast cell;
OM. Circular muscle; LM. longitudinal muscle

动情后期(图 1-Ⅲ),子宫内膜上皮部分脱落呈中等阳性反应;S100 蛋白免疫阳性产物分布于内膜上皮细胞胞质中,内膜上皮细胞呈柱状,细胞核不着色;内膜固有层基质细胞着色较浅呈弱阳性反应;子宫腺数量下降,内膜上皮细胞散在分布,少量成簇分

布,子宫腺上皮 S100 蛋白免疫阳性反应产物呈中等阳性表达。

动情间期(图 1-Ⅳ),子宫内膜上皮细胞呈强阳性反应,脱落的内膜上皮有同等程度的着色;内膜固有层整体呈 S100 蛋白免疫阳性反应,着色较深,多

呈中等以上阳性反应,局部呈现强阳性反应;子宫腺散在分布,少数成簇分布,腺上皮及固有层血管内皮均呈强阳性反应。

上述结果表明,各期子宫内膜上皮细胞、腺上皮细胞、基质细胞、血管内皮细胞及肥大细胞等 S100

蛋白免疫阳性细胞,着色深浅有一定差别。对 S100 蛋白在子宫内膜层相对表达量 μ^2 进行分析,结果表明,S100 蛋白免疫阳性产物在动情前期着色最浅,动情期深染,动情后期染色变浅,动情间期染色又加深,其变化差异极显著,呈双峰变化趋势(图 2)。

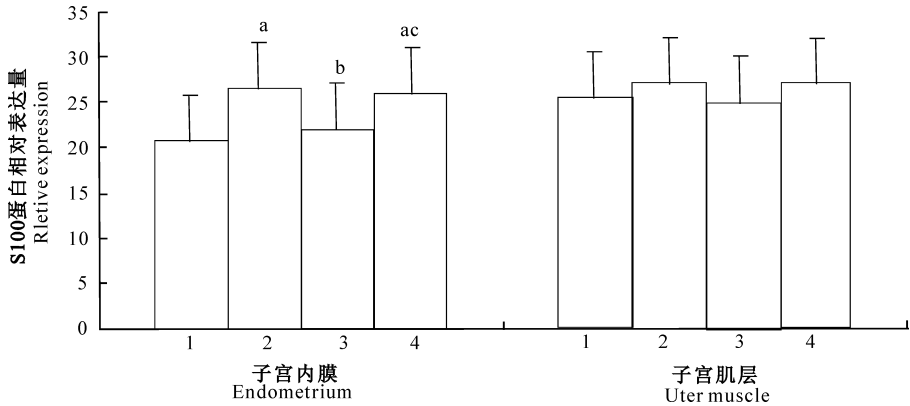


图 2 S100 蛋白在 SD 大鼠内膜和子宫肌层的相对表达量

1. 动情前期;2. 动情期;3. 动情后期;4. 动情间期;a. 与动情前期相比差异极显著($P<0.01$); b. 与动情期相比差异极显著($P<0.01$);c. 与动情后期相比差异极显著($P<0.01$)

Fig. 2 Expression of S100 protein in rat endometrium and uterus muscle

1. Proestrus;2. Estrus;3. Metestrus;4. Diestrus;a. compared with proestrus estrus,extremely significant difference($P<0.01$); b. Compared with estrus,extremely significant difference($P<0.01$);c. Compared with metestrus, extremely significant difference($P<0.01$).

2.3.2 子宫肌层 动情前期(图 1-V),环形肌和纵形肌中 S100 蛋白均呈中等阳性表达,其间散布有强阳性的肥大细胞等免疫细胞;血管层中血管内皮呈中等阳性反应,而血管肌层中 S100 蛋白免疫阳性产物着色较浅,呈弱阳性。

动情期(图 1-VI),环形肌总体着色均匀,S100 蛋白呈中等阳性表达,外纵行肌 S100 蛋白免疫阳性反应产物着色较深,呈中等阳性反应,局部为强阳性反应,其间散布的少量肥大细胞呈强阳性反应。

动情后期(图 1-VII),肌层总体着色较浅,环形肌中 S100 蛋白阳性产物随肌纤维走向呈弱阳性反应,阳性肌细胞数量有所下降;纵行肌着色不均,可见中等或弱阳性反应;血管内皮着色较深,与其紧密相连的血管平滑肌呈弱阳性反应。

动情间期(图 1-VIII),环形肌着色较深,S100 蛋白呈强阳性表达,且阳性肌细胞数量明显增多,纵行肌 S100 蛋白免疫阳性产物点状分布于外纵行肌断面,呈强阳性反应,环形肌与纵形肌之间亦可发现少量的呈中等阳性的肥大细胞。

上述结果表明,S100 蛋白免疫阳性产物在动情周期各期子宫肌层着色深浅的变化具有一定规律。对 S100 蛋白在子宫肌层相对表达量进行分析,结果

表明,S100 蛋白免疫阳性产物在动情前期着色较浅,动情期着色最深,动情后期着色又变浅,动情间期着色明显加深,但各期变化差异不显著。子宫肌层中 S100 蛋白免疫阳性产物的表达量,在整个动情周期中呈双峰变化趋势(图 2)。

2.3.3 子宫外膜 在动情周期各期子宫外膜上,均可见着色较深的 S100 蛋白免疫阳性产物分布,但各期变化不明显。

3 讨 论

S100 蛋白是一种低分子质量的酸性钙结合蛋白,具有钙离子结合区^[4]。绝大部分 S100 蛋白作为钙受体结合蛋白,存在于细胞浆中而发挥作用,在细胞结构形成、生长、能量代谢及细胞内、外信号传导方面,发挥着一定的作用,在中枢神经系统主要影响神经胶质细胞的生长繁殖、分化;维持钙稳态,并对学习记忆等发挥一定作用。S100 蛋白的其他功能还有:(1)参与调节细胞内的一系列生理过程(如细胞间交流、细胞结构的变化、细胞生长、能量代谢、收缩和细胞内的信号传递);(2)促进轴突生长、胶质细胞的增生、神经元的分化和钙离子内环境稳定;(3)作为阿尔采木病和艾滋病的相关因子。目前,越来越

越多的研究表明,S100 蛋白可以作为脑损伤的生化标志物用于脑组织损伤、脑缺血及脑中风的诊断和治疗,同时还可作为中枢神经系统细胞损伤的标记物,预测轻微头部损伤^[5-7]。

S100 蛋白被认为是一种钙传感器蛋白,在细胞增殖、分化、能量代谢、胞内信号传导及细胞凋亡中发挥着重要的作用^[8-9]。子宫是孕育生命的场所,是孕卵着床发育的主要场所^[10]。S100 蛋白作为一种钙依赖性的信号通路介导分子,参与多种细胞行为。有学者在恒河猴植入位点筛选差异表达基因时发现,S100 蛋白基因在恒河猴妊娠初始的植入位点有强表达,这提示此分子在子宫功能的调节中可能发挥着一定的作用^[11]。大鼠子宫在动情周期中会发生一系列的周期性变化,这种变化是受多种激素(尤其是性类固醇激素)调节的^[12]。本试验结果发现,S100 蛋白在大鼠子宫组织中分布广泛,在子宫内膜层中其表达量随动情周期的变化而变化,动情前期表达量最低,动情期表达量升高,动情后期降低,动情间期表达量又重新升高,呈双峰变化趋势,提示 S100 蛋白的表达可能受性类固醇激素的调节。正常大鼠血浆雌激素水平在动情前期开始上升,至动情期达到高峰,动情后期降低,动情间期又达到次高峰;而孕酮含量在动情前期和动情期均处于低水平,至动情后期和间期含量较高。性类固醇激素的这种周期性变化调控着子宫中许多基因的表达,如子宫珠蛋白和血管内皮生长因子 G0101C03-3 和 L0254H10-3 基因等^[13]。上述结果表明,S100 蛋白在子宫中的周期性表达可能与血浆性类固醇激素水平的周期性变化有一定的相关性,其有可能是卵巢分泌的性类固醇激素的靶分子之一,在不同动情周期子宫中表达量的差异,至少部分源于雌、孕激素的调节作用。有研究表明,动情前期和动情期,子宫内膜细胞在高水平雌激素的作用下,迅速发生分化;在动情期子宫的主要功能是调节精子活力并使之获能、抵抗交配引入的病原感染等^[14]。因此作者推测,在雌激素水平高的动情期,高表达的 S100 蛋白可能单独或通过与其他蛋白的协调,防止交配时精液引起的局部酸碱度变化对子宫内膜细胞造成的不良影响以及病原对细胞的侵入,为精子获能提供环境。本试验结果显示,S100 蛋白在子宫内膜上皮细胞与腺体上皮细胞中表达,并且在间情期与动情期的表达量较高,而在动情前期与动情后期的表达量较低。由此可以推测,S100 蛋白可能参与子宫细胞的程序性死亡、促进基质细胞的增殖与蜕膜化作用

以及参与交配等应激反应引起子宫的一系列变化过程,从而在大鼠动情期间子宫机能状态的维持中发挥重要作用。

本研究结果表明,子宫肌层中 S100 蛋白免疫阳性产物表达量,在整个动情周期中呈双峰变化趋势,但各期差异不显著。表明,大鼠动情周期中子宫肌层平滑肌细胞并非 S100 蛋白作用的主要靶细胞,子宫肌层平滑肌参与子宫机能是通过其他信号途径完成的,这还有待于进一步的研究来证实。

[参考文献]

- [1] Besedovsky H O, Sorkin E. Network of immune-neuro-endocrine interactions [J]. Clin exp Immunol, 1977, 27(1): 1-6.
- [2] Masiakowski P, Shooter E M. Changes in PC12 cell morphology induced by transfection with 42C cDNA, coding for a member of the S100 protein family [J]. J Neurosci Res, 1990, 27(3): 264-269.
- [3] Hsu S Y, Kaipia A, Zhu L, et al. Interference of BAD(Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter)-induced apoptosis in mammalian cells by 14-3-3 isoforms and P11 [J]. Mol Endocrinol, 1997, 11(12): 1858-1867.
- [4] Schefer B W, Heizmann C W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology [J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21: 134-140.
- [5] 袁 浩, 柳永和, 季永侠. S100 蛋白和血清白蛋白水平与缺血性脑卒中关系的预后 [J]. 医学临床研究, 2007, 24(5): 716-719.
Yuan H, Liu Y H, Ji Y X. The correlation of level of S-100 protein and albumin in serum and the prognosis of ischemic brain stroke [J]. Journal of Clinical Research, 2007, 24(5): 716-719. (in Chinese)
- [6] 廖群纷, 梁德胜, 王为民, 等. 脑出血患者血清 S100b 蛋白与神经功能损害的相关性研究 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(14): 1494-1497.
Liao Q F, Liang D S, Wang W M, et al. Association of serum protein S100b in intracerebral hemorrhage patients with nerve function lesion [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2005, 27(14): 1494-1497. (in Chinese)
- [7] 杨绍文, 曹国彬, 李 波, 等. 血清 S100B、NSE 和 MBP 在颅脑损伤患者中的检测及其临床意义 [J]. 广州医药, 2007, 38(3): 3-6.
Yang S W, Chao G B, Li B, et al. Checking and clinical significance of serum S100B, NSE and MBP in patients with brain injury [J]. Guangzhou Medical Journal, 2007, 38(3): 3-6. (in Chinese)
- [8] Diego Gazzolo, Rosanna Frulio, Alfonso Roletti, et al. S100A1B and S100BB urine levels in preterm and term healthy newborns [J]. Clinica Chimica Acta, 2007, 384(12): 186-187.

(下转第 28 页)