

IFN- γ 在不同生殖周期奶山羊卵巢中的表达

孙健红, 赵慧英, 苏正元, 尹宝英, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 应用免疫组织化学 SP 法检测 γ -干扰素(Interferon- γ , IFN- γ)在不同生殖周期奶山羊卵巢中的表达情况,探讨 IFN- γ 的变化规律及其与生殖的关系。结果显示,在间情期三级卵泡颗粒细胞胞膜、发情期三级卵泡和成熟卵泡颗粒细胞、妊娠期卵泡颗粒细胞、妊娠 7 周粒黄体细胞、妊娠 12,16 和 20 周膜黄体细胞胞核中均有 IFN- γ 的表达;在三级卵泡和成熟卵泡的卵泡液中也有 IFN- γ 的表达;妊娠 12,16 和 20 周粒黄体细胞上 IFN- γ 表达量很低。IFN- γ 可能在不同类型的细胞上发挥着不同的作用。

[关键词] 山羊; IFN- γ ; 卵巢; 颗粒细胞; 黄体

[中图分类号] S814.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)04-0015-04

Expression of interferon- γ in dairy goat ovary during different physiological periods

SUN Jian-hong, ZHAO Hui-ying, SU Zheng-yuan, YIN Bao-ying, ZHANG Yong

(Institute of Biological Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this experiment, the method of supersensitive immunohistochemistry SP is used to detect the expression of the Interferon- γ (IFN- γ) during the different period of reproduction in the dairy goat ovary, and explore the variation regularity of IFN- γ and relationship between IFN- γ and reproduction. The results show that IFN- γ expression exists in cytomembrane of granulated cells in late tertiary follicle during dioestrus, granulated cells late tertiary follicle and mature follicle during oestrus, ovarian follicle during trimester of pregnancy, granulosa lutein cell in the 7th week of pregnancy, nucleus of theca lutein cell in the 12th, 16th, 20th week of pregnancy. The IFN- γ expression exists in the follicular fluid of late tertiary follicle and mature follicle, too. While, in granulosa lutein cell in the 12th, 16th, 20th week of pregnancy, the expression of the IFN- γ is few. It can be concluded that the IFN- γ exerts different roles in different types of cells.

Key words: goat; IFN- γ ; ovary; corpus luteum; granulated cell

有研究显示, γ -干扰素(Interferon- γ , IFN- γ)是由 Th1 型细胞产生的细胞因子,在生殖内分泌调控中与 Th2 型细胞产生的细胞因子作用相反,对妊娠的维持有害^[1-2]。陈鑫磊等^[3]研究发现,在妊娠恒河猴黄体中 IFN- γ 能抑制 TGF- β 1、T β R- II 和 StAR 的表达。TGF- β 1 及其受体可能对黄体的形成和功能维持有重要作用。Quirk 等^[4]报道, IFN- γ 参与

了黄体退化的调节。姚文等^[5]在 1998 年报道, IFN- γ 在一定剂量范围内有促孕酮分泌的作用。上述研究结果显示, IFN- γ 对生殖系统的作用是非常复杂的。在妊娠过程中, IFN- γ 正反两方面的作用是同时存在的。为了进一步了解 IFN- γ 的表达量及存在部位与生殖调控的关系,本试验应用免疫组织化学 SP 法结合硫酸镍铵加强的 DAB 蓝色呈色法,检

[收稿日期] 2006-03-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(2001AA203081);陕西省自然科学基金项目(2002C104)

[作者简介] 孙健红(1980-),女,蒙古族,辽宁康平人,在读博士,主要从事动物胚胎工程与生殖内分泌研究。

[通讯作者] 张 涌(1958-),男,内蒙古和林格尔人,教授,博士生导师,主要从事动物胚胎工程与发育生物学研究。

测了 IFN- γ 在不同生殖周期奶山羊卵巢中的表达情况,从形态学的角度探讨了 IFN- γ 与生殖活动的关系,为进一步研究细胞因子对生殖内分泌的调控机制提供了形态学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 发情期奶山羊 3 只,间情期奶山羊 3 只,妊娠 7 周、12 周、16 周、20 周健康奶山羊各 2 只。所有羊只均购自陕西杨凌,临床检查健康。

1.1.2 试剂及仪器 Rabbit anti-SP 免疫组织化学试剂盒购自福州迈新公司;Rabbit anti-IFN- γ 购自武汉博士德公司;DAB·4HCl 购自华美生物工程公司;葡萄糖氧化酶购自 Sigma 公司;柠檬酸盐缓冲液购自华美生物工程公司;LEICA CM1900 冰冻和石蜡切片机由德国 LEICA 公司制造。

1.2 奶山羊卵巢的采取

奶山羊放血致死后迅速采取卵巢,放入 4 °C 的含 40 g/L 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中,固定 24 h。

1.3 奶山羊卵巢切片的制备

固定好的奶山羊卵巢经常规脱水、透明、浸蜡、包埋后,做连续切片(切片厚 7 μ m),隔 3 取 3,共制得 3 套切片。

1.4 奶山羊卵巢切片的染色检查

3 套切片中,一套做常规 HE 染色,确认细胞;一套做 IFN- γ 免疫组织化学 SP 法染色;一套做阴性对照。免疫组织化学 SP 法染色流程如下:用枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 进行热抗原修复 20 min,冷

却后使用 SP 试剂盒中 A 液、B 液、C 液和 D 液依次孵育 10~15 min(具体时间随孵育温度而定),并在 B 液孵育之后用 Rabbit anti-IFN- γ (体积比 1:200 倍稀释)37 °C 孵育 1~2 h。D 液孵育之后用硫酸镍铵加强的 DAB 呈色 5~30 min,未复染。阴性对照切片染色时,用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 替代 Rabbit anti-IFN- γ ,其他步骤同免疫组织化学 SP 法。

1.5 结果的统计分析

对封片后的切片用 Motic 数码显微照相系统摄像,然后用江苏捷达 801 形态分析软件计算阳性结果的灰度值(将数字图像中各个像素的明暗程度用 0(黑色)~256(白色)之间的数字表示),并进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 奶山羊卵巢颗粒细胞中 IFN- γ 的表达

间情期三级卵泡颗粒细胞中 IFN- γ 主要表达于细胞膜上,细胞质染色极淡,几乎呈空泡样(图 1),灰度值为(97.128 4 \pm 14.611 0)~(118.419 2 \pm 15.888 2),平均值为 113.095 7 \pm 18.481 4。发情期,在三级卵泡和成熟卵泡的大部分颗粒细胞中,IFN- γ 的表达量非常丰富,呈深染的圆形颗粒,其中夹着一些胞质/胞核阴性的颗粒细胞,个别细胞仅为膜着色(图 2),灰度值为(99.253 5 \pm 21.112 5)~(126.771 2 \pm 15.501 7),平均值为 108.499 9 \pm 15.312 1。妊娠期,三级卵泡颗粒细胞中 IFN- γ 的表达量也很丰富,其灰度值近似于发情期。

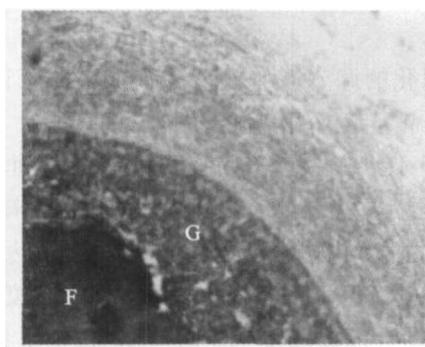


图 1 间情期奶山羊卵巢的三级卵泡颗粒细胞和卵泡液($\times 400$)
G. 颗粒细胞;F. 卵泡液

Fig. 1 Granulated cells and follicular fluid in late tertiary follicle in dairy goat ovary during dioestrus ($\times 400$)
G. Granulated cell; F. Follicular fluid.

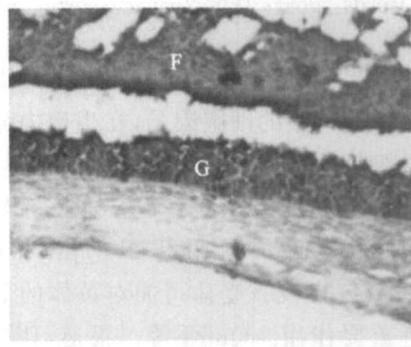


图 2 发情期奶山羊卵巢的成熟卵泡颗粒细胞和卵泡液($\times 400$)
G. 颗粒细胞;F. 卵泡液

Fig. 2 Granulated cells and follicular fluid in mature follicle in dairy goat ovary during oestrus ($\times 400$)
G. Granulated cell; F. Follicular fluid

2.2 奶山羊卵泡液中 IFN- γ 的分布

结果显示,卵泡液中 IFN- γ 的含量非常丰富,呈蓝紫色;有的卵泡液中 IFN- γ 的分布不均匀,有些区域含量丰富,呈大小不等的紫黑色团块(图 1,2)。

2.3 奶山羊黄体细胞中 IFN- γ 的表达

妊娠 7 周时,IFN- γ 主要表达于粒黄体细胞胞质,细胞核阴性或浅蓝色(图 3A),其灰度值为(165.973 8 \pm 23.569 2)~(195.749 9 \pm 23.399 3),平均值为 179.145 5 \pm 24.888 9;妊娠 12 周,IFN- γ 仅表达于少量膜黄体细胞,且以细胞核和细胞膜为主,胞质不表达或低水平表达(图 3B),其灰度值为

(120.821 6 \pm 21.591 6)~(141.554 9 \pm 27.866 8),平均值为 138.556 8 \pm 21.356 5;妊娠 16 周,IFN- γ 表达于部分膜黄体细胞细胞核和细胞膜,胞质低水平表达或不表达(图 3C),其灰度值为(163.953 9 \pm 16.993 6)~(172.259 1 \pm 2.549 2),平均值为 168.265 7 \pm 19.223 4;妊娠 20 周,IFN- γ 表达于几乎所有的膜黄体细胞中,其表达部位与妊娠 16 周相同(图 3D),灰度值为(133.312 6 \pm 13.900 7)~(142.934 0 \pm 23.088 5),平均值为 141.556 5 \pm 22.048 7。在妊娠 12,16 和 20 周的粒黄体细胞上,IFN- γ 均低水平表达。

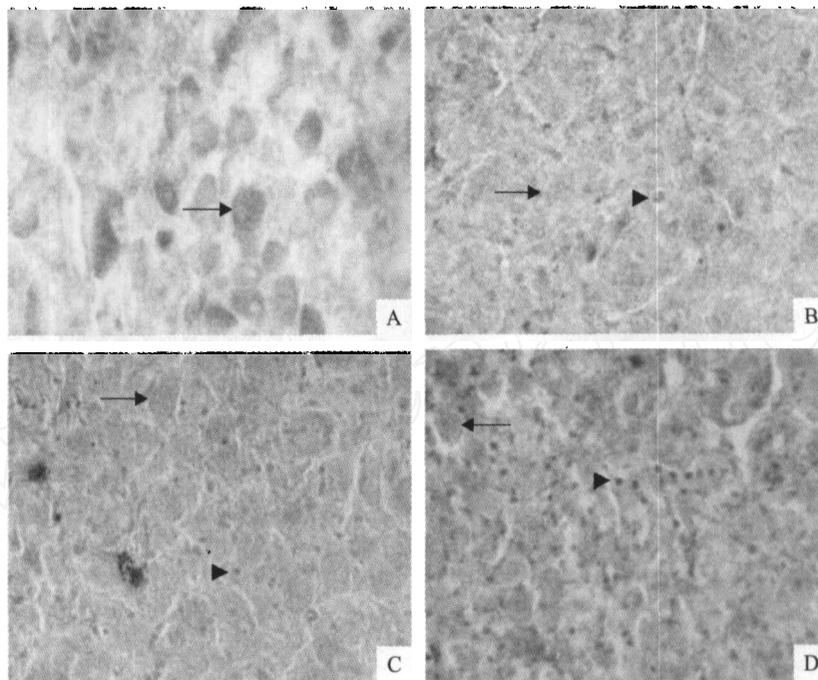


图 3 妊娠不同阶段奶山羊卵巢粒黄体细胞和膜黄体细胞的变化($\times 400$)

A. 妊娠 7 周;B. 妊娠 12 周;C. 妊娠 16 周;D. 妊娠 20 周; \rightarrow . 粒黄体细胞; \blacktriangleright . 膜黄体细胞

Fig. 3 Granulosa lutein cell and theca lutein cell in dairy goat ovary during different physiological periods ($\times 400$)

A. In the 7th week of pregnancy; B. In the 12th week of pregnancy; C. In the 16th week of pregnancy;

D. In the 20th week of pregnancy; \rightarrow . Granulosa lutein cell; \blacktriangleright . Theca lutein cell

3 讨论

近年来,随着免疫-神经-内分泌网络学说的发展及先进的实验技术与方法的不断出现,细胞因子对生殖的调控成为研究的热点。IFN- γ 属于 II 型细胞因子中干扰素家族中的一员,是一种分子量为 25 ku 的糖蛋白,具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用。在哺乳动物中,卵巢是重要的生殖器官,可分泌多种激素,参与对机体生殖过程的调节,其中起关键性作用的是雌激素和孕激素。雌激素主要由存在于

颗粒细胞内的芳香化酶作用于卵泡膜细胞产生的雄激素,使其芳香化而生成的,可诱导发情。孕酮由黄体细胞产生,可阻止卵泡的成熟和动物的再次发情,使动物维持妊娠状态。但在排卵前后,颗粒细胞有很强的产生孕酮和雌二醇的能力。有研究发现,IFN- γ 可抑制体外培养的猫卵巢颗粒细胞增殖及 E_2 的产生,并且这种抑制作用与 IFN- γ 的量呈正相关^[6];体外培养人黄体细胞时,IFN- γ 能抑制促黄体生成素诱导的孕酮生成,并且这种作用的产生并非由前列腺素造成^[7]。后来有研究发现,IFN- γ 对妊

娠小鼠黄体细胞分泌孕酮的作用随剂量的不同而有区别,在一定剂量范围内,对孕酮分泌有促进作用,但当 IFN- γ 大量存在时,对孕酮分泌则有一定的抑制作用^[5];并且黄体细胞的凋亡也受 IFN- γ 的调控^[8]。本研究发现,在发情期的三级卵泡和成熟卵泡颗粒细胞及妊娠 7 周粒黄体细胞中,IFN- γ 呈高水平表达,而在妊娠 12,16,20 周 IFN- γ 维持在一个较低水平;在妊娠 12 周时,个别膜黄体细胞呈 IFN- γ 阳性,在妊娠 16 周时阳性细胞增多,到 20 周几乎所有膜黄体细胞均呈阳性,这与上述研究结果相似,但也有不同。不同的原因是,本研究能区分体内正常妊娠状态下 IFN- γ 在 2 类黄体细胞中表达的不同之处,而上述体外试验不能区分 IFN- γ 在 2 种类型黄体细胞中表达的不同。因此可推测,IFN- γ 在粒黄体细胞中参与了妊娠维持,在膜黄体细胞中参与了黄体细胞的凋亡。

根据本试验的结果,笔者认为,IFN- γ 可能作为一种激素样物质经自分泌或旁分泌影响卵巢激素的合成和分泌,参与排卵、卵泡的黄体化、妊娠维持及黄体溶解,并且这些作用的发挥除了与 IFN- γ 的剂量有关外,还与靶细胞的类型有关。IFN- γ 对生殖的调控机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Subhasis B, Alan S, Jane M, et al. Placental expression of interferon- γ (IFN- γ) and its receptor IFN- γ R2 fail to switch from early hypoxic to late normotensive development in preeclampsia[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005, 90 (2): 944-952.
- [2] Vanina F, Virginia C, Liliana V, et al. Exogenous interferon- γ alters murine inner cell mass and trophoblast development. Effect on the wxpression of ErbB1, ErbB4 and heparin sulfate proteoglycan (perlecan)[J]. *Reproduction*, 2004, 128: 717-725.
- [3] 陈鑫磊,高洪娟,魏 鹏,等. IFN- γ 对甾类激素灵敏调节蛋白、转移生长因子 β 1 及其 II 型受体在妊娠恒河猴黄体中表达的调节作用[J]. *中国药理学报:英文版*, 2003, 24(5): 53-59.
- [4] Quirk S M, Cowan R C, Joshi S G, et al. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulose/luteal cells[J]. *Biol Reprod*, 1995, 52(2): 279-287.
- [5] 姚 文,庄临之. 干扰素- γ 对妊娠小鼠黄体细胞孕酮分泌的影响[J]. *南京师范大学学报:自然科学版*, 1998, 21(3): 88-89.
- [6] Yasuda K, Fukuoka M, Fujiwara H, et al. Effects of interferon on the steroidogenic functions and proliferation of immature porcine granulosa cells in culture[J]. *Biol Reprod*, 1992, 47: 931-936.
- [7] 张 翔,沈维雄,孙志达,等. 前列腺素和 γ -干扰素对人黄体细胞甾体激素生成的影响及相互作用[J]. *生殖与避孕*, 1995, 16(5): 343-350.
- [8] 冷 颖,曹 霖,顾芝萍. 黄体退化中细胞凋亡的调控研究[J]. *生殖与避孕*, 1999, 19(5): 268-272.

(上接第 14 页)

- [7] Osteen K G, Hill G A, Hargrove J T, et al. Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cell from human endometrial biopsy specimens[J]. *Fertil Steril*, 1989, 52(6): 965-972.
- [8] 陈秀丽,靳亚平,利光辉,等. 孕早期家兔子宫内膜细胞的分离培养与形态观察[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2004, 32(6): 1-4.
- [9] 陆品红,刘嘉茵. 人子宫内膜基质细胞及腺上皮细胞的分离纯化和体外培养[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2005, 25(5): 334-336.
- [10] 戈一峰,黄宇烽,胡毓安,等. 人子宫内膜细胞的纯化和培养[J]. *医学研究生学报*, 2005, 18(6): 496-498.
- [11] 闫丽隽,王小青,郭述真. 人子宫内膜细胞的分离培养及鉴定方法的探索[J]. *山西医科大学学报*, 2004, 35(3): 241-243.
- [12] 王 丽,周剑萍,张 炜,等. 小鼠容受性子宫内膜上皮细胞和基质细胞的共培养[J]. *生殖与避孕*, 2002, 22(5): 259-262.