

# 突触素在动情周期大鼠子宫中的分布

王根辈<sup>1</sup>,徐永平<sup>1</sup>,赵慧英<sup>1</sup>,张 艳<sup>1</sup>,逢国梁<sup>2</sup>,蔡青青<sup>1</sup>,  
马 翔<sup>1</sup>,杨永倩<sup>1</sup>,范光丽<sup>1</sup>

(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】研究突触素(SYP)在大鼠动情周期子宫内的分布情况及变化规律。【方法】选择健康、未产、体质量 220~250 g 成年雌性 SD 大鼠,采用阴道涂片法鉴定其动情周期,并采用免疫组化超敏 SP(Streptavidin-Peroxidase,SP)法研究突触素在大鼠动情周期子宫内分布的变化规律。【结果】大鼠子宫各层组织中均有不同程度 SYP 免疫阳性产物的分布,并随动情周期的变化表现出一定规律:子宫内膜着色强弱各期差别不大,黏膜上皮细胞、腺上皮细胞及血管内皮细胞基本不着色或少许胞浆淡染,但其基底面均有较深 SYP 免疫阳性产物分布,动情前期着色最深,动情期、动情后期、动情间期依次减弱,后 2 期差别不明显;肌层和子宫外膜中,动情前期着色最深,动情期着色减弱,动情后期着色最浅,动情间期表达量明显回升,后 3 期与动情前期相比差异均极显著( $P<0.01$ )。【结论】突触素在动情周期子宫中的分布表达具有一定的规律,可能受性类固醇激素的调节。

**【关键词】** 突触素;免疫组化 SP 法;动情周期;子宫;大鼠

**【中图分类号】** S814.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2009)07-0006-05

## Distribution of synaptophysin in uterus of rats during the estrus cycle

WANG Gen-bei<sup>1</sup>, XU Yong-ping<sup>1</sup>, ZHAO Hui-ying<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, PANG Guo-liang<sup>2</sup>,  
CAI Qing-qing<sup>1</sup>, MA Xiang<sup>1</sup>, YANG Yong-qian<sup>1</sup>, FAN Guang-li<sup>1</sup>

(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 trial was conducted to study the expression of synaptophysin in uterus of the rats during estrus cycle. 【Method】Sixteen healthy, non-pregnant mature female SD rats of 220 to 250 g in body weight were divided randomly into 4 groups of 4 each by vaginal smear, and the expression of synaptophysin in uterus of the rats during estrus cycle was studied by immunohistochemical SP method. 【Result】The results indicated that synaptophysin-IR products were present in each part of uterus, though the intensity differed, and the distribution of the products in each part of uterus during every period of the estrus cycle was found to adapt to some certain rules: There is no significant difference of the expression of synaptophysin in the endometrium during every period. No or few products in cytoplasm were found in the mucosa epithelium, the glandular epithelium and the blood vessel endothelium. But more products were found to be located in the basal surface of the mucosa epithelium, the glandular epithelium and the blood vessel endothelium. But the density of coloration was the strongest in the preoestrus, and became weaker in the estrum, metoestrus and diestrus, while no significant difference was found during the metoestrus and diestrus. In muscular layer and adventitia, the density of coloration was the strongest in the preoestrus, the significant increase of the products was found in the anoestrus, and the density of the products was a little

\* [收稿日期] 2008-10-31

[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] 王根辈(1982-),男,河南郑州人,在读硕士,主要从事神经生物学研究。E-mail: wanggenbei301@163.com

[通信作者] 徐永平(1971-),男,陕西长安人,副教授,主要从事神经生物学研究。E-mail: xuyup717@yahoo.com.cn

bit weaker in the estrus than that in the metoestrus. And the differences were all significant ( $P < 0.01$ ).

**【Conclusion】** The results showed that the expression of synaptophysin in the uterus was found to adapt to some certain rules and might be mediated by the sex steroid hormone.

**Key words:** synaptophysin; immunohistochemical; estrus cycle; uterus; rat

突触素(Synaptophysin, SYP)<sup>[1]</sup>是突触前囊泡膜上含量最丰富的糖蛋白之一,是一种与突触结构和功能密切相关的膜蛋白。它参与突触囊泡的导入、转运和神经递质的释放、突触囊泡再循环和突触发生。Crispino 等<sup>[2]</sup>利用原位杂交研究发现,大鼠动情周期期间,在内嗅皮质 II 层,动情前期的突触素 mRNA 水平低于动情期或动情间期;在内嗅皮质 III 层,突触素 mRNA 水平较内嗅皮质 II 层低 70%;内嗅皮质层突触素 mRNA 水平的波动说明其向上至海马的投射受类固醇激素周期变化的影响。

子宫是孕育生命的场所,而动情周期作为雌性动物重要的生理时期,会随着神经、免疫、内分泌系统对机体的调节而发生相应的变化,三者既相互协同又相互制约。但突触素在生殖系统中的分布和表达情况尚不清楚。本试验通过研究突触素在大鼠子宫动情周期中的分布表达变化,探讨突触素在大鼠子宫的分布、变化情况,以及突触素在雌性生殖系统中可能发挥的作用。现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物及分组

健康 SD 大鼠,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。应用阴道涂片法将受试大鼠分为 4 组:动情前期、动情期、动情后期和动情间期,每组 4 只。

### 1.2 主要试剂与仪器

小鼠抗鼠突触素单克隆抗体(武汉博士德生物工程公司产品),抗鼠链霉素菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化超敏 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)及常规仪器。

### 1.3 样本采集与组织切片制备

阴道涂片鉴定动物动情周期后,处死符合分组条件大鼠,取子宫,迅速置于 4 ℃、40 g/L 多聚甲醛固定 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 免疫组化超敏 SP 法染色程序

一抗为小鼠抗鼠突触素单克隆抗体(1:150 稀释),阴性对照采用 PBS 缓冲液替代一抗,其余步骤按免疫组化超敏 SP 试剂盒说明书操作。

### 1.5 结果判断

有蓝色颗粒为阳性,阴性不显色。每个样本随机选取 5 张切片,每张切片相同部位取 2 个视野,共 10 个高倍镜视野( $\times 400$ ),应用江苏捷达高清晰图像分析系统进行分析,计算出每个视野的阳性强度均值(用平均光密度表示)和阳性面积,再计算出相对表达量  $\mu^2$  均值( $\mu^2 = \text{光镜倍数} \times \text{阳性强度均值} \times \text{阳性面积} / 260\,000$ ,其中 260 000 表示像素)。

### 1.6 统计学处理

计量资料用“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突触素的表达, $P < 0.05$  为差异有显著性统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 阳性判定及分级

经免疫组化超敏 SP 法染色的切片,背景无色或浅蓝色,免疫阳性产物为蓝色或蓝黑色;而对照组切片染色为阴性,说明本试验具有特异性。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。

### 2.2 大鼠子宫组织突触素免疫样物质的分布

大鼠动情周期子宫各层组织中均有突触素分布;突触素免疫阳性产物呈点状、颗粒状、线状分布,部分呈板层样分布。

### 2.3 动情周期大鼠子宫组织突触素免疫阳性产物的分布规律

2.3.1 子宫内膜 动情前期(图 1-1):子宫黏膜上皮、子宫腺上皮呈阴性反应,黏膜固有层呈强阳性反应,突触素免疫阳性产物围绕黏膜上皮、腺上皮基底面分布;子宫螺旋动脉及其分支微血管内皮呈阴性或弱阳性反应,血管肌层呈强阳性反应。

动情期(图 1-2):子宫黏膜上皮轻微着色,呈弱阳性,黏膜固有层着色较深,但越靠近黏膜上皮着色越浅,子宫腺上皮、血管内皮呈弱阳性或阴性反应,

血管平滑肌呈强阳性反应。

动情后期(图 1-3):部分子宫黏膜上皮呈中等或弱阳性反应,阳性产物分布于黏膜上皮细胞胞膜或胞质,呈线状,黏膜固有层亦呈网状分布,浅层着色较深,呈强阳性反应,深层着色相对较淡;子宫腺上皮呈阴性反应,靠近腺上皮的着色较淡。

动情间期(图 1-4):子宫黏膜上皮基本上呈阴性反应,但可见上皮细胞膜上稍有阳性颗粒存在,黏膜固有层整体着染程度有所下降,多呈中等偏上阳性

反应,局部呈强阳性反应,子宫腺上皮及固有层血管内皮均呈阴性反应。

以上结果表明,各期子宫内膜着色强弱各期差别不大,黏膜上皮细胞、腺上皮细胞及血管内皮细胞基本不着色或少许胞浆淡染,但其基底面均有较深 SYP 免疫阳性产物分布,动情前期着色最深,动情期、动情后期、动情间期依次减弱,后 2 期差别不明显(图 2)。

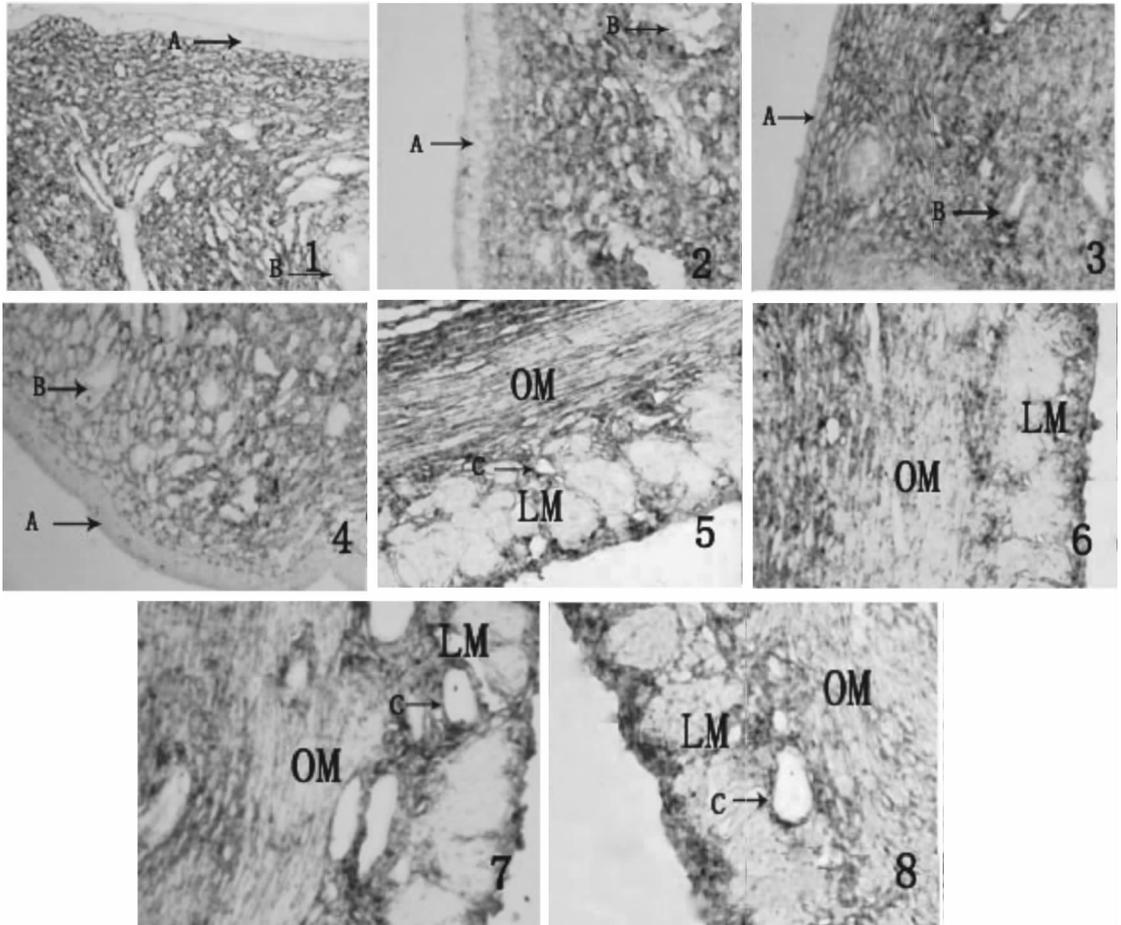


图 1 突触素在大鼠动情周期子宫内膜和肌层外膜的免疫组化染色结果(400×)

1. 动情前期大鼠子宫内膜;2. 动情期大鼠子宫内膜;3. 动情后期大鼠子宫内膜;4. 动情间期大鼠子宫内膜;5. 动情前期大鼠子宫肌层外膜;  
6. 动情期大鼠子宫肌层外膜;7. 动情后期大鼠子宫肌层外膜;8. 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;OM. 环形肌;LM. 纵行肌

Fig. 1 Immunohistochemical stains of synaptophysin in rat endometrium and myometrium during estrus cycle(400×)

1. Synaptophysin in rat endometrium during proestrus;2. Synaptophysin in rat endometrium during estrus;3. Synaptophysin in rat endometrium during metestrus;4. Synaptophysin in rat endometrium during diestrus;5. Synaptophysin in rat myometrium during proestrus;  
6. Synaptophysin in rat myometrium during estrus;7. Synaptophysin in rat myometrium during metestrus;8. Synaptophysin in rat myometrium during diestrus;

A. Endometrial epithelium;B. Uterine glandular epithelium;C. Vascular epithelium;OM. Circular muscle;LM. Longitudinal muscle

2.3.2 子宫肌层 动情前期(图 1-5):内环形肌层突触素免疫阳性产物呈强阳性反应,且靠近固有层

的肌层着色更深,外纵行肌肌膜上可见中等阳性反应,肌膜中心呈弱阳性或阴性反应,血管层中血管内

皮呈弱阳性反应,血管肌层中突触素着色深并与血管内皮紧密相连。

动情期(图 1-6):内环行肌靠近固有层突触素,呈强阳性反应,靠近纵行肌着色稍浅,外纵行肌突触素随肌膜的形成分布于大小各级肌膜上,呈中等阳性表达。

动情后期(图 1-7):内环行肌中突触素随肌纤维走向呈中等阳性反应,但着色有所下降,外纵行肌肌膜上可见中等阳性反应,血管层各血管内皮有阳性

着色,血管内皮基底面的血管平滑肌呈强阳性反应。

动情间期(图 1-8):内环行肌突触素着色深,外纵行肌突触素随肌膜走向分布,呈中等阳性或弱阳性反应。

以上结果表明,在肌肉层中,动情前期突触素的着色最深,动情期着色减弱,动情后期着色最浅,动情间期表达量明显回升,后 3 期与动情前期相比差异均极显著( $P < 0.01$ )(图 2)。

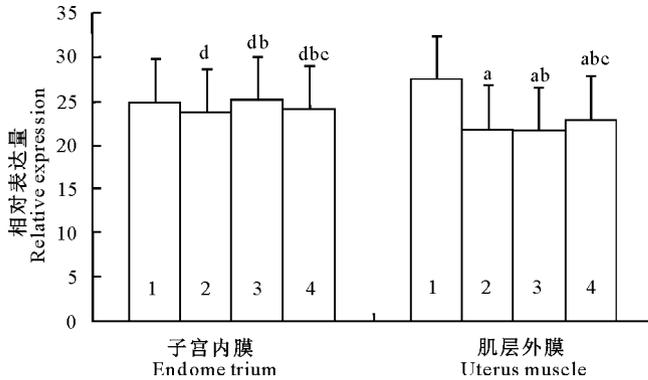


图 2 突触素在大鼠子宫内膜和子宫肌层外膜的相对表达量

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, $P < 0.01$ ;b. 与动情期相比, $P > 0.05$ ;c. 与动情后期相比, $P > 0.05$ ;d. 与动情前期相比, $P > 0.05$

Fig. 2 Expression of synaptophysin immunohistochemistry product in rat endometrium and uterus muscle

1. Proestrus;2. Estrus;3. Metestrus;4. Diestrus;a. Compared with proestrus group, $P < 0.01$ ;

b. Compared with estrus, $P > 0.05$ ;c. Compared with metestrus, $P > 0.05$ ;d. Compared with proestrus, $P > 0.05$

2.3.3 子宫外膜 动情周期各期子宫外膜上均可见着色较深的突触素免疫阳性产物分布,变化不明显。

### 3 讨论

突触素是一种与突触结构和功能密切相关的膜蛋白,分子量为 38 ku。1985 年,Jahn 等<sup>[1]</sup>首次在大鼠脑中发现突触素,同年德国肿瘤研究中心的 Wiedenmann 等<sup>[3]</sup>在牛脑中发现并提纯了该蛋白质,并命名为 Synaptophysin。突触素参与中枢神经元发育过程中神经元突起的延伸、神经元极性的建立以及突触的形成和维持<sup>[4]</sup>。在胚胎发育过程中,突触形成过程和突触素表达变化一致,表明突触素是突触发生的一个标志,因此其可作为突触前终末的特异性标记物,用于检测突触密度和分布<sup>[2,5-6]</sup>。

本试验发现,突触素在子宫黏膜上皮、腺上皮、血管内皮不着色,但黏膜上皮及子宫腺上皮基底面均有较深阳性产物的表达,提示支配子宫内膜上皮的神经末梢终止于上皮,在黏膜上皮细胞和腺上皮细胞的基底面与其发生突触联系。子宫肌层内环行

肌着色较外纵行肌深,说明在内环行肌中所形成神经突触的数量较外纵行肌多,推测分布于内环行肌的神经数量较外纵行肌丰富。子宫组织内各级血管管壁肌层普遍存在突触素阳性产物的表达,且主要存在于血管平滑肌,而血管内皮无表达,提示支配子宫血管的神经与血管平滑肌形成突触,调节血流和血管管径,参与对子宫血管的调节。文献<sup>[7-12]</sup>对动物生殖道内神经性质及分布的研究也正好验证了本研究结果。

支配子宫的植物性神经主要有肠系膜后神经节的节后纤维和盆神经的节前纤维。本试验结果显示,突触素阳性产物主要分布于子宫黏膜固有层、肌层和外膜,随动情周期的发生呈现一定的变化规律,动情前期着色最深,动情期着色减弱,动情后期着色最浅,动情间期表达量明显回升,说明各类神经是以突触的形式与子宫发生联系并进行支配的,支配子宫的神经在数量上呈规律性变化,暗示突触素的表达可能受性类固醇激素的调节。一般认为,卵巢合成的类固醇激素调节动情周期子宫发生的一系列周期性变化<sup>[13]</sup>。在动情期,大鼠血清中的雌激素水平

达到峰值,而动情后期相对较低,动情间期又有所升高;孕酮水平则在动情前期和动情期均处于低水平,至动情后期和动情间期较高<sup>[14]</sup>。性类固醇激素的这种周期性变化调控子宫中许多基因的表达,如子宫珠蛋白、血管内皮生长因子的表达受雌激素调节<sup>[14-15]</sup>;钙结合蛋白 Calbindin-D9K(CaBP-9K)等的表达则受孕激素调控<sup>[16]</sup>。上述结果表明,突触发生过程中,其数量不但受到年龄等诸多因素的影响,同时还与不同的生理状态有关,雌激素可以促进突触的发生,使神经元突触联系增多,而孕激素起到相反作用。提示突触素在子宫中的周期性表达及其受性类固醇激素的调节模式与血浆性类固醇激素的变化周期有一定相关性,有可能是卵巢分泌的性类固醇激素的靶分子,在动情周期子宫中的表达模式至少部分源于雌、孕激素的调节作用。

综上所述,突触素在大鼠动情周期子宫中的表达分布具有一定规律性,受雌激素和孕激素的双重调节。至于激素是如何影响支配子宫不同性质神经的数量,支配子宫的各种神经与子宫内膜上皮、子宫腺上皮以及血管内皮是如何建立突触联系等一系列问题,还有待于进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, et al. A 38000-dalton membrane protein(p38) present in synaptic vesicles [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(12): 4137-4141.
- [2] Crispino M, Stone D J, Wei M, et al. Variations of synaptotagmin I, synaptotagmin IV, and synaptophysin mRNA levels in rat hippocampus during the estrous cycle [J]. Exp Neurol, 1999, 159(2): 574-583.
- [3] Wiedenmann B, Franke W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38 000 characteristic of presynaptic vesicles [J]. Cell, 1985, 41: 1017-1028.
- [4] Christopher P, Arthur, Michael H B, et al. Structure of synaptophysin: A hexameric MARVEL-Domain channel protein [J]. Neuroscience, 2007(15): 707-714.
- [5] 杨春. 突触素的若干研究 [J]. 河南医学研究, 2004(1): 85-89.  
Yang C. Some research of synaptophysin [J]. Henan Medical Research, 2004(1): 85-89. (in Chinese)
- [6] Calhonn M E, Juck M, Martin L J, et al. Comparative evaluation of synaptophysin based methods for quantification of synapses [J]. J Neurocytol, 1996(25): 821-828.
- [7] 陈耀星, 胡满, 王子旭, 等. 妊娠家兔子宫交感神经分布的变化——HRP法研究 [J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(5): 113-116.  
Chen Y X, Hu M, Wang Z X, et al. Studies on changes of the sympathetic innervation during pregnancy in the uteri of rabbits with HRP method [J]. Journal of China Agricultural University, 2000, 5(5): 113-116. (in Chinese)
- [8] Larsson L I, Fahrenkrug J, Schaffalitzky C B. Vasoactive intestinal polypeptide occurs in nerves of the female genitourinary tract [J]. Science, 1977, 197: 1374-1375.
- [9] 李莲军, 腾可导, 陆峻波, 等. 山羊子宫内肽能神经分布及妊娠时的变化 [J]. 中国兽医学报, 2001, 21(1): 79-81.  
Li L J, Teng K D, Lu J P, et al. Distribution of peptidergic nerves in nonpregnant uteri and the nervous change in pregnant goat uteri [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2001, 21(1): 79-81. (in Chinese)
- [10] 马晓锋, 王绍坤, 高雨任, 等. 雌性大鼠生殖器官一氧化氮合酶I免疫反应神经纤维的分布 [J]. 解剖学杂志, 2000, 23(3): 267-270.  
Ma X F, Wang S K, Gao Y R, et al. Distribution of immunoreactivity to nitric oxide synthase in nerve fibers innervating female rat genital organs [J]. Chinese Journal of Anatomy, 2000, 23(3): 267-270. (in Chinese)
- [11] Moscarini M, Cantagalli A, Cavallotti C, et al. Cholinergic nerves in mouse uterus [J]. J Neural Transmission, 1982, 55: 139-148.
- [12] Thilander G. Adrenergic and cholinergic nerves supply in porcine myometrium and cervix [J]. J Vet Med, 1989, 36: 585-589.
- [13] Fata J E, Chaudhary V, Khokha R. Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle [J]. Biol Reprod, 2001, 65(3): 680-688.
- [14] Mueller M D, Vigne J L, Minchenko A, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(20): 10972-10977.
- [15] Yun S M, Choi K C, Kim H, et al. Dominant expression of porcine Calbindin-D9k in the uterus during a luteal phase [J]. Mol Reprod Dev, 2004, 67(3): 251-256.
- [16] Profet M. Menstruation as a defense against pathogens transported by sperm [J]. Q Rev Biol, 1993, 68(3): 335-386.