

CFTR在超排卵幼龄大鼠卵巢的分布与表达^{*}

汤瑞玲¹, 靳 镭^{2*}

(1. 咸宁学院附属第一医院妇产科, 湖北 咸宁 437100; 2. 华中科技大学附属同济医院生殖中心)

摘要:目的 探讨囊性纤维化跨膜转导调节器(CFTR)在超排卵幼龄大鼠各期卵泡和黄体中表达的变化及其意义。方法 采用免疫组化和免疫印迹方法检测超排卵幼龄 Wistar大鼠注射 HCG前, 注射 HCG后 24h、48h 及 72h卵巢中 CFTR的蛋白分布与含量变化。结果 CFTR在超排卵幼龄 Wistar大鼠的各级卵泡颗粒细胞、黄体细胞均有表达, 随着黄体期延长其表达量逐渐下降, 各时段卵巢表达量比较有显著性差异。免疫印记法证实各时段卵巢中均存在特异性的、相对分子质量为 170KD的 CFTR条带。结论 卵泡期 CFTR表达可能促进卵泡中卵泡液的积聚, 卵泡直径增大, 利于卵泡成熟; 而黄体期 CFTR表达下降则可能利于黄体形成, CFTR过多表达可能导致卵泡囊肿和黄体囊肿。

关键词:囊性纤维化跨膜转导调节因子; 卵巢; 氯离子通道; 大鼠

中图分类号: R339.22

文献标识码: A

文章编号: 1008-0635(2007)06-0476-04

Expression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Rat Ovary

TANG Rui-ling, JIN Lei

(Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Xianning College, Xianning Hubei 437100, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a cAMP-activated Cl⁻ channel, in ovarian stimulated premature female rat ovary during a cycle of follicle development and corpus luteum formation at protein level. **Methods** Animals were injected with 10 IU of FMSG and were given 10 IU of HCG 48h later. Time-course experiments were performed at 0h before, and 24, 48, 72h after HCG treatment. **Results** Immunohistochemistry showed that administration of FMSG stimulated CFTR expression in thecal cell layer and granulosa cell layer of mature follicles 48h post injection, coincident with the FMSG-induced peak in follicular estradiol. However, the expression of CFTR was time-course reduced followed by HCG injection, in accordance with the gradually increased P level during luteum corpus formation. Western blotting analysis demonstrated that rat ovarian tissue expressed the special CFTR band at 170 KD. **Conclusion** cAMP-dependent Cl⁻ channels are involved in regulation of follicle development and luteum formation.

KEY WORDS: CFTR; Ovary; Cl⁻ channel; Rat

囊性纤维化跨膜转导调节器(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)是由CF(cystic fibrosis)基因编码的cAMP依赖的膜氯

离子通道蛋白ABC(ATP-binding cassette)转运体超家族的一员,它能调节和促进上皮细胞膜电解质离子的转运。CFTR存在于多种组织如呼吸道、

* 通讯作者, E-mail: Ljin@tjhxjmu.edu.cn

胰腺、小肠、汗腺以及男女生殖道等组织器官的上皮细胞顶侧膜,在上皮细胞盐类转运、水分流动和离子浓度调节中发挥重要作用。CFTR基因突变可以引起囊性纤维化症,由于CFTR蛋白缺失或不正常,氯离子转运障碍,导致水分流失和分泌物稠厚,从而引起局部组织的阻塞和感染,诱发各种临床症状,如阻塞性肺炎、慢性特发性胰腺炎、男女不孕症,严重则可危及生命。近来研究发现CFTR在卵巢组织有表达^[1,2],本研究旨在进一步探讨CFTR在超排卵幼龄大鼠卵泡和黄体中表达的变化及其意义。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雌性Wistar大鼠,24日龄,体质量49~58g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。室温21~25,光照与黑暗为12h交替。实验期间自由饮水、进食。

1.2 动物分组

32只Wistar大鼠按HCG注射时间随机分为4组:注射HCG前,注射HCG后24h、48h、72h,每组8只。

1.3 方法

1.3.1 动物准备

将Wistar大鼠皮下注射含有10U孕马血清促性腺激素(pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG,天津实验动物中心)的生理盐水0.2ml,48h后皮下注射含有10U人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG,丽珠药业)的生理盐水0.2ml,分别在注射HCG前,注射HCG后24h、48h、72h各时间点处死大鼠,同时取出双侧卵巢。一侧卵巢用4%多聚甲醛常温固定24h后,石蜡包埋,切片,切片厚度为5 μ m。另外一侧卵巢用冻存管冻存于-80℃冰箱,留用于做免疫印迹法(Western-blot)检测。

1.3.2 免疫组化检测卵巢组织黄体中CFTR的蛋白分布

应用免疫组化方法检测石蜡切片中CFTR的蛋白分布。羊抗人多克隆抗体(能识别大鼠CFTR蛋白)购自美国Santa Cruz公司(Sc-8909)。链霉菌抗生物素蛋白过氧化物酶连接法(SP法)试剂盒购自武汉凌飞科技公司。石蜡切片经脱蜡、水化,3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶后,用正常兔血清阻断调节非特异结合,加入一抗(1:50)后置4℃下孵育过夜,依次滴二抗、三抗,应用二

氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色切片。以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。光学显微镜下细胞内呈现棕黄色颗粒为阳性信号。

1.3.3 Western-blotting检测卵巢组织中CFTR的蛋白表达

用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液匀浆冻存卵巢组织,提取总蛋白,用Bradford比色法测定蛋白含量。每个样本取总蛋白100 μ g与等体积1 \times SDS上样缓冲液混合,点样于10%SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,湿式法电转膜至硝酸纤维素膜(NC)上,5%脱脂奶粉-95%TBST封闭,与1:400稀释的羊抗人CFTR多克隆抗体4℃孵育过夜,然后与1:8000稀释的辣根酶标记兔抗羊抗体(武汉凌飞科技公司)37℃孵育1h,化学发光试剂(ECL,碧云天)反应5min,曝光10~15min,冲洗胶片。

1.4 结果判定

1.4.1 免疫组化结果分析

采用HPLAS-1000图像分析系统(武汉千屏影像技术有限责任公司)进行分析,切片在镜下按统一的放大倍数(\times 200)测量,每张切片测定5个视野,计算阳性反应物质的平均光密度(DD, integrated optical density)值。其值代表切片中阳性产物的相对强度。

1.4.2 免疫印记结果分析

采用扫描仪对免疫反应阳性条带进行扫描。

1.5 统计分析

采用SPSS10.0软件进行单因素方差分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$,有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化结果

免疫组化结果显示CFTR阳性物质呈棕黄色颗粒表达于卵泡和黄体细胞的胞质中。在超排卵幼龄Wistar大鼠的始基卵泡颗粒细胞见微弱表达;窦前卵泡颗粒细胞见点状表达,大直径卵泡颗粒细胞见强阳性表达;而内层卵泡膜细胞为弱阳性表达;黄体中的膜黄体和粒黄体细胞也均为弱阳性表达。对注射HCG前,注射HCG后24h、48h、72h各时间点CFTR免疫阳性细胞进行图像和统计分析,结果显示各时间点CFTR平均光密度分别为 0.296 ± 0.039 、 0.289 ± 0.034 、 0.286 ± 0.040 、 0.253 ± 0.065 。前三个时段CFTR表达量除第一时段与第三时段之间有显著性差异($P < 0.05$)外,其余两两之间无显著性差异(P 均 > 0 。

05);而第四时段 CFTR表达量与前三个时段之间 比较均有极显著性差异 (P 均 <0.01)。(图 1、2)

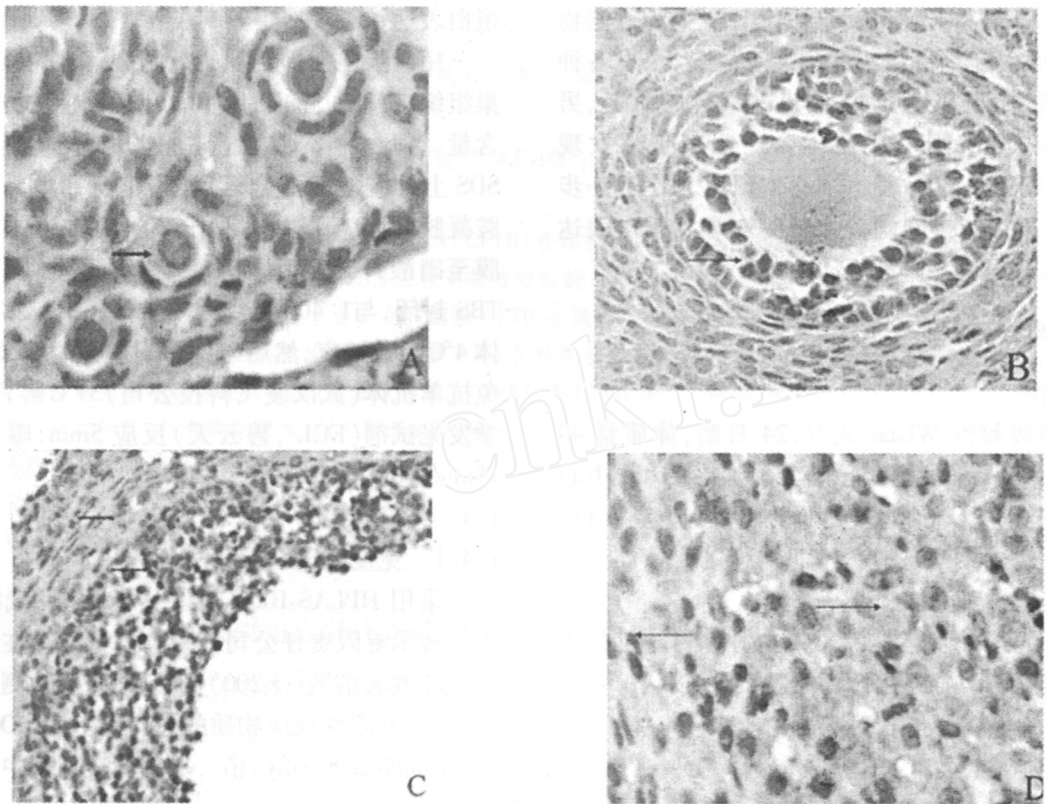


图 1 CFTR蛋白在始基卵泡(A),窦前卵泡(B),大直径卵泡(C),黄体(D)中的表达与分布(SP ×400)

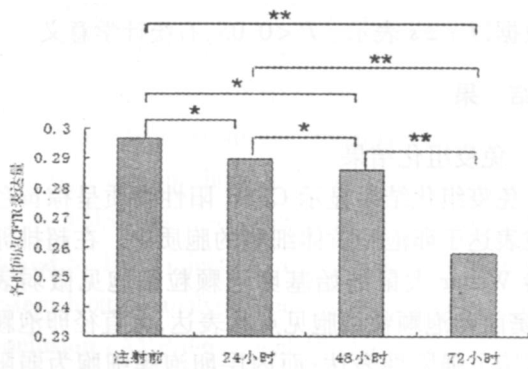


图 2 超排卵幼龄 Wistar大鼠注射 HCG前,注射 HCG后 24h、48h及 72h各时间点卵巢 CFTR蛋白表达量比较 (* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$)

2.2 免疫印记结果

免疫印记法分析显示在注射 HCG前,注射 HCG后 24h、48h、72h各时间点大鼠卵巢组织中均可检测到在相对分子量 170KD处的 CFTR蛋白条

带。(见图 3)

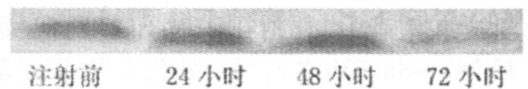


图 3 超排卵幼龄 Wistar大鼠注射 HCG前,注射 HCG后 24h、48h及 72h各时间点卵巢免疫印迹 CFTR蛋白条带

3 讨论

囊性纤维化基因位于人类染色体 7q31,编码产物是一种受 cAMP调控的氯离子通道蛋白,当 cAMP浓度升高时,通道开放,向外分泌氯离子。CFTR还可以通过抑制上皮钠通道 (sodium channel, NaC)和增强水通道 (aquaporin, AQP)作用,导致水份外渗,在跨上皮盐类的转运、水份流动和离子浓度调节中发挥重要作用^[3-5]。Tizzano 等在

1994年通过原位杂交实验证实,生育期女性的子宫内膜、输卵管和宫颈上皮中存在 CFTR mRNA,而青春期前女性生殖道无表达^[6]。生殖道 CFTR 的表达与分布的变化由性周期中垂体-下丘脑释放的促性腺激素刺激卵巢甾体激素的分泌来调节,雌二醇上调、孕酮下调生殖道上皮细胞 CFTR mRNA 及蛋白质的表达^[7~9]。这种生殖道液体含量及离子成分的周期性变化可能与精子运动、精子获能、受精过程、合子由输卵管移入宫腔及胚胎着床等一系列的生殖事件有关,为生殖过程每一个步骤提供最佳的液体内环境。2002年 Chan 等用原位杂交方法研究显示整个自然动情周期中 CFTR 在小鼠卵巢表面上皮均有丰富表达,并提示卵巢表面上皮的液体分泌作用与生殖道的液体内环境的变化关系密切^[1]。2005年 Ajonuma 等人用 RT-PCR 和 Western-blot 及电生理技术也检测到成年 SD 大鼠卵巢中有 CFTR mRNA 和蛋白表达^[2]。本文通过免疫组化首次定位 CFTR 在超排卵幼龄大鼠卵泡膜内层细胞、颗粒细胞和黄体细胞的表达,并发现其表达量改变也与外源促性腺激素刺激下卵巢性激素的周期性变化有关,卵泡期随着卵泡的生长发育,颗粒细胞上 CFTR 表达逐渐增强,成熟卵泡则卵泡膜内层细胞和颗粒细胞均有表达。这与卵泡期 E₂水平的变化趋势是一致的,说明颗粒细胞和卵泡膜细胞分泌的 E₂能通过自分泌方式和旁分泌方式促进卵巢自身的 CFTR 表达;黄体期随着黄体的逐渐成熟,膜黄体细胞和粒黄体细胞的 CFTR 的表达量逐渐减少,这与黄体期体内 P 水平的变化趋势相反,说明粒黄体细胞和膜黄体细胞分泌的 P 也能通过自分泌方式和旁分泌方式抑制卵巢自身的 CFTR 表达。这与以前性激素对 CFTR 表达量的调节研究结果一致。通过本实验研究及 CFTR 的生殖生理功能可以得出以下推论:卵泡期 CFTR 的表达增加可能与卵泡发育过程中卵泡液的形成积聚有关,而黄体期 CFTR 的表达减少可能有利于黄体形成,黄体期 CFTR 表达量的增加可能与卵泡囊肿及黄体囊肿的形成有关。囊性纤维化病变 (CF) 妇女不孕可能也与卵泡发育过程中卵泡液形成缓慢致卵泡成熟障碍或卵泡液离子成分改变导致成熟卵泡质量下降有关。

本研究结果显示 CFTR 的表达可能与卵泡成熟过程中卵泡液的形成有关,由此推测多囊卵巢综合征 (PCOS) 患者由于 T 水平升高,卵泡处于中等直径大小的发育停顿状态,其发育阻滞可能与 T 下调卵泡颗粒细胞 CFTR 的表达量有关。卵巢性激素调节颗粒细胞 CFTR 表达的具体机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Chan LN, Tsang LL, Rowlands DK, et al Distribution and regulation of ENaC subunit and CFTR mRNA expression in murine female reproductive tract [J]. J Membr Biol, 2002, 185: 165
- [2] Ajonuma LC, Tsang LL, Zhang GH, et al Estrogen-induced abnormally high CFTR expression results in ovarian hyperstimulation syndrome [J]. Mol Endocrinol, 2005, 19 (12): 3038
- [3] Jordan JR, Koloblen JM, Keren B, et al Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA [J]. Science, 1989, 245: 1066
- [4] Schreiber R, Nitschke R, Greger R, et al The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells [J]. J Biol Chem, 1999, 274: 11811
- [5] Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, et al CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels [J]. Science, 1995, 269: 847
- [6] Trizzano EF, Silver MM, Chitayat D, et al Differential cellular expression of cystic fibrosis transmembrane regulator in human reproductive tissues Clues for the infertility in patients with cystic fibrosis [J]. Am J Pathol, 1994, 144: 906
- [7] Tejada F, Cremades A, Aviles M, et al Hypokalemia alters sex hormone and gonadotropin levels: evidence that FSH may be required for luteinization [J]. Endocrino Metab, 1998, 38: E1037
- [8] 郑晓英,陈贵安,王海燕.囊性纤维化跨膜转导调节因子在子宫内膜中表达的变化及其意义 [J].中华妇产科杂志, 2004, 39 (7): 457
- [9] 郑晓英,陈贵安.囊性纤维化跨膜转导调节器在培养人子宫内膜上皮细胞的表达 [J].生殖医学杂志, 2005, 14 (1): 1

(收稿日期: 2007 - 10 - 31)