

雌孕激素对体外培养种植窗期子宫内膜腺上皮细胞降钙素表达的调节

付志红 袁士岭 邢福祺 第一军医大学南方医院妇产科 广东 广州 510515 冤

摘要 目的 探讨雌孕激素对体外培养人类子宫内膜腺上皮细胞降钙素(Ct)表达的影响及其意义。方法 建立子宫内膜腺上皮细胞体外培养体系,分别用雌二醇(E₂)、孕酮(P₄)刺激细胞 24 h 或 48 h,其浓度分别为 1伊0⁻⁷、1伊0⁻⁸、1伊0⁻⁹ mol/L 和 1伊0⁻⁶、1伊0⁻⁷、1伊0⁻⁸ mol/L,利用流式细胞仪对 Ct 表达阳性细胞进行检测。结果 性激素影响体外培养的人子宫内膜上皮细胞 Ct 的表达,促进 Ct 表达,并呈剂量依赖性。1伊0⁻⁶ mol/L 作用 24 h 其促进效应最强,而低剂量 E₂ 对 Ct 表达无明显影响,高浓度 E₂ 则抑制其表达。结论 子宫内膜上皮细胞 Ct 的表达受性激素调节,在人类胚胎着床过程中起重要作用。

关键词 降钙素;子宫内膜上皮细胞;着床;雌激素;孕激素

中图分类号 R492.5 文献标识码 A 文章编号 000-2588(2001)11

付志红,袁士岭,邢福祺.雌孕激素对体外培养种植窗期子宫内膜腺上皮细胞降钙素表达的调节.中国妇幼保健杂志,2001,11(11):1492-1495.

FU Zhi-hong, CHEN Shi-ling, XING Fu-qi

(Department of Obstetrics and Gynecology, Nangfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Objective To explore the effect of estradiol and progesterone on the expression of calcitonin in human endometrial epithelial cells cultured in DMEM medium. Methods Human endometrial epithelial cells were cultured in DMEM medium. After the cells were treated respectively with estradiol and progesterone at different concentrations for 24 and 48 h, the fluorescence density of the cells was measured by flow cytometer. Results Progesterone treatment of the epithelial cells for 24 h produced in a dose-dependent manner significantly higher fluorescence level than that of the control (P < 0.01). Small dose of estradiol took little effect on calcitonin expression, but high-concentration estradiol resulted in lowered fluorescence level than the control. Conclusion Progesterone promotes calcitonin expression in cultured human endometrial epithelial cells in a dose-dependent manner, while estradiol tends to inhibit its expression.

Key words calcitonin; endometrial epithelial cells; ovum implantation; estradiol; progesterone

正常子宫内膜仅在一个极短的时期内允许胚胎着床,这一时期子宫内膜容受性达到最高,被称为种植窗(implantation window)。虽然已知道种植窗的形成严密地受卵巢激素的控制,但其分子机制还不清楚,推测为卵巢激素调节子宫内膜特定基因表达,合成新的蛋白质,使子宫内膜能接受胚胎植入。Ding 等^[1]用基因表达筛选技术 (gene expression screen technique) 分离出种植窗期子宫内膜特异性增强表达的基因, DNA 测序发现其中之一为降钙素 (Ct), 其表达与种植窗的开放相吻合, 并受母体因素调控, 阻断其表达导致着床失败, 说明 Ct 在子宫内膜种植窗的形成中起重要作用。作者以前研究发现^[2] Ct 特异性表达于人类种植窗期子宫内膜腺上皮细胞胞浆内, 并与不孕密切相关。本文应用流式细胞仪检测雌孕激素对体外培养的子宫内膜上皮细胞 Ct 表达的影响, 以探讨雌孕激素参与着床的机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源及分组

1.1.1 标本来源 选取 8 例正常育龄期妇女, 年龄 25~35 岁, 月经周期 28~30 d, 术前 3 月无激素服用史, 于月经周期第 19~23 天刮取少许子宫内膜, 立即投入盛有 10 ml D-Hanks 液的青霉素瓶内, 放入冰壶内, 30 min 内送入实验室进行培养。子宫内膜腺上皮细胞分离和培养参考 Satyaswaroop 等^[3]的方法, 并加以改进。

1.1.2 试验分组 子宫内膜原代接种 5~7 d 细胞贴壁近满时传代, 应用无血清培养基, 生长 3 d 后分为 5 组, 每组包括 3 瓶, 25 cm² 细胞瓶。第 1 组为对照组, 不加任何调节因子; 第 2 组为孕酮 (P₄) 组, 浓度分别为 1伊0⁻⁷、1伊0⁻⁸、1伊0⁻⁹ mol/L; 第 3 组为 E₂ 组, 浓度分别为 1伊0⁻⁷、1伊0⁻⁸、1伊0⁻⁹ mol/L; 第 4 组为孕激素受体拮抗剂 RU486 组, 浓度为 1伊0⁻⁶ mol/L; 第 5 组为 RU486+P₄ 组, RU486 浓度为 1伊0⁻⁶ mol/L, P₄ 浓度为 1伊0⁻⁶ mol/L, 继续培养 24 h 或 48 h 上机检测。

1.2 主要试剂及方法

收稿日期 2001-02-22

作者简介 付志红, 1971 年, 女, 河南内黄人, 2001 年毕业于第一军医大学, 主治医师, 电话 020-85141908

1.2.1 试剂与仪器 兔抗人 Ct 抗体(一抗)为 DAKO 公司产品 稀释浓度为 1:100 FITC 标记山羊抗兔 IgG(二抗)购自华美公司 稀释浓度为 1:100 17 β -雌二醇 E₂、P₄ 购自 Sigma 公司 为美国 Calchembio 公司产品 流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司生产的 FACSTAR

1.2.2 流式细胞仪 CM 检测 将用含有不同浓度 E₂、P₄ 的培养液孵育 24~48 h 的子宫内膜上皮细胞 0.25% 胰酶消化制成单细胞悬液 以冷磷酸缓冲液 PBS 洗两次 加入冷的终浓度为 70% 乙醇 置于 4 度过夜 经乙醇固定的样品 以 1000r/min 离心 5 min

弃上清液 加入 PBS 10ml 洗涤细胞 以 1 000 r/min 离心 5min 弃上清液 沉淀加入 0.1% Tris-X100 150 滋 益 2 h 加入 PBS 10ml 洗涤细胞 以 1 000 r/min 离心 5min 弃上清液 沉淀加入一抗 150 滋 益 过夜 洗涤细胞 同上 沉淀加入二抗 150 滋 室温避光染色 20min 上机测定各 Ct 阳性细胞的比例

1.2.3 统计学分析

所有资料应用 SPSS 软件包进行方差分析

2 结果 表 1

2.1 孕激素和 RU486 对子宫内膜 Ct 表达的影响

表 1 孕激素与雌激素对体外培养子宫内膜上皮细胞 Ct 表达的影响 阳性细胞百分比 依据 表 1 孕激素与雌激素对体外培养子宫内膜上皮细胞 Ct 表达的影响 阳性细胞百分比 依据 表 1 孕激素与雌激素对体外培养子宫内膜上皮细胞 Ct 表达的影响 阳性细胞百分比 依据

Time	Control	P ₄ (mol/L)			E ₂ (mol/L)			RU486	RU486+P ₄
		1伊0 ⁸	1伊0 ⁷	1伊0 ⁶	1伊0 ⁹	1伊0 ⁸	1伊0 ⁷		
24 h	14.0依.20	26.1依.74**	33.7依.54**	47.3依.01*	23.3依.78	8.2依.89*	3.6依.75*	5.4依.77*	17.8依.76
48 h	13.4依.12	29.1依.56**	34.7依.71**	45.9依.98*	20.8依.36	7.9依.94*	2.7依.54*	6.1依.57*	19.6依.65

P₄:Pragesterone;E:Estradiol;*孕0.05 孕control group;#孕0.05 孕1伊0⁶ group of P₄

不同浓度 P₄ 均可显著促进 Ct 的表达(孕0.05 孕 P₄ 促进效应呈剂量依赖性 孕 P₄ 浓度为 1伊0⁻⁶ mol/L 作用 24h 时 阳性细胞百分比最高 与其他浓度组相比 差异具有显著性 增加刺激时间并不增强其表达

RU486 明显抑制 Ct 表达 两时间段比较无差别 但两时间段与对照组相比均具有显著性差别

2.2 雌激素对子宫内膜 Ct 表达的影响

低浓度 E₂ 对子宫内膜 Ct 的表达有轻微的促进效应 但无显著性差别 高浓度 E₂ 显著抑制 Ct 的表达 与对照组比较具有显著性差异

3 讨论

在雌孕激素的作用下 围着床期子宫内膜发生形态学和生理学变化 转为容受态 雌激素促进子宫内膜上皮增生 肥大 孕激素使内膜从增殖期转为分泌期 形成一个有利于胚胎粘附的宫内环境 我们以前的研究发现 Ct 特异性表达于人种植窗期子宫内膜腺上皮细胞胞浆内 其表达降低与不孕密切相关 董 Ding 等也发现孕期小鼠子宫内膜 Ct 的表达与种植窗的开放吻合 受精后第 2~6 天 在着床结束时 子宫内膜中不能检测出 Ct-mRNA 孕 Zhu 等 在着床前 受精后第 2 天 小鼠子宫内注射与 Ct-mRNA 特异性互补的反义寡脱氧核糖核酸 ODNs 阻断 Ct 基因的转录和翻译 导致着床点数明显减少 这些结果均提示 Ct 在胚胎着床过程中起重要作用

Ct 是含有 32 个氨基酸残基的肽类激素 主要由甲状腺滤泡旁 C 细胞合成 分泌 最近的研究表明

子宫也可合成 Ct 但对 Ct 在子宫中合成的精确部位和功能还了解不多 Ct 的主要生理功能是促进细胞外 Ca²⁺ 转移 增加细胞内游离 Ca²⁺ 浓度 细胞膜上存在对 Ct 有高度亲和力的受体 Ct 与其受体结合后 促进 Ct 受体与异三聚体 G 蛋白的结合 活化腺苷酸环化酶和磷脂酶 C 参与多种细胞功能如分化 增殖 变形

本研究建立体外子宫内膜上皮细胞培养体系 消除体内各种复杂因素影响 发现 P₄ 刺激子宫内膜上皮细胞 Ct 的表达 并呈剂量依赖性 在 P₄ 浓度为 1伊10⁻⁶ mol/L 作用 24h Ct 阳性细胞数最高 较基础值增加 3 倍 再增加 P₄ 的浓度或延长作用时间均不能增加效应 而孕激素受体拮抗剂 RU486 则抑制其表达 说明孕激素可能通过其核受体在转录水平调节 Ct 合成 为研究孕激素诱导 Ct 表达的分子机制 孕 Zhu 等 在体外培养的人类内膜癌 HEC-1B 细胞中转染 Ct 基因 5'-端启动子 1.3kb 细胞内无内源性孕激素受体 无论有或无孕激素存在 Ct 启动子的活性均处于低水平 若 Ct 启动子与孕激素受体并发转染细胞 无孕激素存在时 Ct 启动子活性不变 但当孕激素浓度为 100nmol/L 时 其活性增加 6~8 倍 若同时给予 RU486 启动子活性仍保持不变 提示孕激素由其受体介导 通过调节启动子活性在转录水平调节 Ct 基因表达

研究还发现 E₂ 在低浓度(1伊10⁻¹¹ mol/L)时对 Ct 表达有轻微的促进作用(与基础值比无显著性差别) 高浓度 E₂(1伊10⁻⁸ mol/L)抑制 Ct 表达 低剂量 E₂ 可能

作为孕激素受体合成的底物加强 P₄ 促进 Ct 表达的效应而高浓度 E₂ 拮抗 P₄ 刺激 Ct 合成的效应。这些结果说明卵巢激素相互作用对子宫 Ct 的表达起重要调节作用。Ding 等^[1]研究发现小鼠孕 2 d 时 Ct 表达最强与受精后 P₄ 峰出现时间一致。有趣的是着床后至分娩低水平雌激素、高水平孕激素却不能诱导 Ct 的表达。提示除了雌、孕激素外还有其他阶段特异性因子参与 Ct 的表达调节。

Ct 作为一个阶段特异性表达因子受卵巢激素调控在着床中起重要作用。Ct 的主要功能是调节靶细胞的 Ca²⁺ 水平。Wang 等^[2]研究发现移植前小鼠胚胎表面存在 Ct 的功能性受体。Ct 可以增加卵裂球内游离 Ca²⁺ 浓度促进胚胎分化、加速囊胚形成。我们的研究也发现 Ct 可以快速增加人类子宫内膜间质细胞和 4~8 细胞阶段胚胎细胞内 Ca²⁺ 水平。资料待发表提示胚胎和子宫内膜表面存在 Ct 功能性受体。Ct 可能通过加速子宫内膜蜕膜化促进胚胎生长、分化。在胚胎着床过程中起重要作用。子宫内膜上皮细胞 Ct 的表达受性激素调节在人类胚胎着床中起重要作用。

参考文献

[1] Ding YQ, Zhu LJ, Bagchi MK. Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the uterus during implantation. *Endocrinology*, 1994, 135(5): 2265-74.

[2] 付志红, 陈士岭, 邢福祺. 降钙素在种植窗期子宫内膜特异性表达及与不孕的关系. *同济医科大学学报*, 2000, 29(4): 341-3.

[3] Satyaswaroop PG, Bressler RS, Dela MM. Isolation and culture of human endometrial glands. *J Clin Endocrinol Metab*, 1979, 48(4): 639-41.

[4] Zhu LJ, Milan K, Bagchi. Attenuation of calcitonin gene expression in pregnant rat uterus leads to a block in embryonic implantation. *Endocrinology*, 1998, 139(1): 330-9.

[5] Fischer JA, Tobler PH, Kaufmann M. Calcitonin regional distribution of the hormone and its binding sites in the human brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 7801-5.

[6] Lin HY, Harris TL, Flannery MS. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science*, 1991, 254: 1022-4.

[7] Zhu LJ, Kathleen CB, Mary P. Calcitonin is progesterone-regulated marker that forecast the receptive state of endometrium during implantation. *Endocrinology*, 1998, 139: 3923-34.

[8] Wang J, Rout UK, Bagchi IC. Expression of calcitonin receptors in mouse preimplantation embryos and their function in the regulation of blastocyst differentiation by calcitonin. *Development*, 1998, 125(21): 4293-302.

责任编辑院杨金星

经椎管、胸腔内联合手术入路治疗哑铃型肿瘤 8 例临床分析

阙少雄 袁新安 梁瀚 第一军医大学珠江医院脊柱骨病科 广东 广州 510282 冤

摘要 哑铃型生长的椎管内肿瘤由于解剖结构的特殊性手术切除有一定的难度。本文报告了 8 例与胸外科联合经椎管和胸腔一期切除 8 例该类肿瘤。3 例位于下颈段、5 例位于胸段。8 例 MRI 均示椎管外部分突入左侧胸腔。术后病理报告神经鞘瘤 4 例、神经纤维瘤 3 例、神经内分泌瘤 1 例。术后 10 d 症状减轻。1 例神经内分泌瘤辅助全身化疗半年。随访至今已 2 年。无复发。作者认为联合手术增加了 一期切除该类肿瘤的机会。也有利于减少手术创伤和风险性。

关键词 椎管内肿瘤 / 治疗 / 手术入路 / 肿瘤 / 哑铃型

中图分类号 R681.5; R739.42 文献标识码 B 文章编号 000-2588-2001-11

哑铃型肿瘤因其在影像学上尤其是在 MRI 上显示的特殊形状而得名。肿瘤经椎间孔在椎管内外生长。由于内外形状相似。而被称之为哑铃型。umbell 冤或沙漏型。and-glass 冤肿瘤袁可以原发于纵隔袁也可以原发于椎管遥由于解剖结构的特殊性手术切除有一定难度遥我们经椎管、胸腔内联合 一期切除 8 例该类椎管内肿瘤袁取得了较好的效果遥

1 临床资料

1.1 病例资料

收稿日期 院 001-03-12

作者简介 阙少雄 渊 1973 冤男 袁江西奉新人 袁 1995 年毕业于第一军医大学袁医师 渊助教冤 电话 院 020-85143560

男 5 例袁女 3 例袁年龄 12~42 岁 渊平均 29.3 岁冤 冤病程 20 d~9 个月 渊平均 3.7 个月冤 冤病变位于下颈段 3 例 渊7.5%冤 冤胸段 5 例 渊2.5%冤 冤胸背痛 3 例 尧一侧肢体麻木无力 6 例 尧双侧肢体麻木无力 2 例 尧胸腹部束带感 5 例 尧舌约肌功能障碍 3 例 尧棘突压痛 5 例 尧病变平面以下感觉障碍 8 例 尧腱反射活跃 6 例 尧病理征阳性 6 例 冤 X 线正位示右肺尖颈根部区软组织肿块影 6 例 冤斜位示椎间孔扩大 5 例 冤 5 例行 CT 检查袁例示左胸腔肿块袁左锁骨下动脉尚未受侵 冤例示椎间孔扩大袁椎管内高密度阴影遥 8 例均行 MRI 矢冠轴位检查示病变部位髓外硬膜下块状等 T1 尧 T2 异常信号灶 尧信号不均匀袁例增强扫描肿块呈不均匀强化袁脊髓受压向右侧移位 冤肿瘤经椎间孔在椎管内外生长形似哑铃状遥

1.2 手术方法