DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.030
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

文章编号:1000-5404(2001)06-0689-03

论著

小鼠生殖周期中纤溶酶原激活因子及抑制因子的表达

曾益军,季煜华,杨 恬 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究小鼠生后不同发育阶段生殖腺上皮中纤溶酶原激活系统的表达情况。方法 出生后第9天至60天小鼠72只,雌雄各半,按出生后第9、15、20、25、32、40、45、50、60天分为9组,每组8只小鼠,雌雄各半,取小鼠的卵巢和睾丸,应用免疫组织化学方法,对卵巢和睾丸石蜡切片上纤溶酶原激活因子及抑制因子的表达进行了检测和半定量分析。结果 出生后第9~30天的小鼠卵巢和睾丸中没有检测出纤溶酶原激活因子及抑制因子的表达,而在第30~60天的小鼠卵巢中检测出uPA、uPAR表达,在第30~60天的小鼠睾丸中检测出tPA的表达,并且表达量较强。结论 小鼠生殖周期中纤溶酶原激活因子及抑制因子的表达与大鼠生殖腺中的规律有一定差异。

关键词:纤溶酶原激活因子;纤溶酶原激活因子抑制因子;生殖周期;小鼠
中图法分类号:Q339.2;R345.3;R345.63 文献识别码:A

Expressions of plasminogen activators and inhibitors in mice during reproductive cycle

ZENG Yi-jun, JI Yu-hua, YANG Tian (Department of Cellular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To investigate the expressions of plasminogen activators (PA) and inhibitors (PAI) in epithelium of mouse genital gland in different developing stages. Methods A total of 36 male and 36 female mice were equally divided into 9 groups, that is, 9, 15, 20, 25, 32, 40, 45, 50 and 60 d afterbirth. The expressions of PA and PAI in ovaries or testicles of mice were determined and semio quantified with immunohisochemical analysis. Results The expressions of PA and PAI were not detected in ovaries or testicles of mice 9 to 30 d after birth. The expressions of urokinase type PA (uPA) and uPA receptor in ovaries and tissue type PA (tPA) and tPA receptor in testicles were significantly increased in 30 to 60 d after birth. Conclusion The expressions of PA and PAI in mice genital gland during reproductive cycle differ from those in rats.

Key words plasminogen activator; plasminogen activators inhibitor; reproductive cycle; mice

纤溶酶原激活剂(Plasminogent activator, PA)系统所介导的细胞外基质的局部降解与许多生理和病理过程密切相关,如排卵,胚胎发生,胚泡着床,乳腺退化,纤蛋白溶解,血管生成,炎症以及肿瘤转移等[1]。PA系统是一个蛋白水解酶及其抑制系统,目前包括尿激酶型PA(Urokinase type PA, uPA)、组织型PA(Tissue type PA, tPA)、1型PA抑制剂(PA inhibitor-1, PAI-1)、2型PA抑制剂(PA inhibitor, PAI-2)和uPA受体(uPA receptor, uPAR)五类。PA是一种丝氨酸蛋白水解酶激活因子,已发现包括组织型PA(tPA)及尿激酶型PA(uPA),其分子量分别为(70~75)×10^3和(50~55)×10^3,是不同的基因产物,但它们的共同作用底物是纤溶酶原,PA将纤溶酶原激活成纤溶酶,后者能水解纤蛋白成可溶性蛋白质分子[2]。纤溶酶原激活因子(PA)抑制因子主要有两种:即血管内皮细胞型(PAI-1)和胎盘型(PAI-2),它们均能与PA结合形成复合体使之活性消失或下降[3]。膜结合的uPA与细胞表面临近的纤溶酶原相互作用,形成一个高效的纤溶酶产生系统,uPA-R定位于细胞膜上,在介导局部纤溶中起着非常重要的作用[4]。研究发现在大鼠卵巢和睾丸中,纤溶酶原激活因子及抑制因子间的相互作用有一定的规律,并对维持卵巢和睾丸的正常生理功能以及排卵和产生精子起重要作用。而小鼠在生殖周期中,纤溶酶原激活因子及抑制因子在在体中的表达情况,未见系统报道。本项研究主要目的是探讨小鼠生殖周期中PA/PAI及uPA-R在体的表达情况。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗啮齿动物tPA、uPA、、uPA-R、PAI-1、PAI-2抗血清均购自American Diagnostic公司,SABC试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供,DAB显色液购自北京中山生物技术公司。

1.2 材料

出生后第9~60天小鼠72只,分为9组,每个时相点的小鼠8只,雌雄各半,分别于出生后第9、15、20、25、32、40、45、50、60天取卵巢和睾丸,10%福尔马林固定24~36 h,70%~100%梯度酒精脱水,常规石蜡切片(6 μm)待用。

1.3 免疫组化技术

将切片置37~40℃烤箱1 h,然后放入二甲苯脱蜡3次,每次15 min,再进入无水乙醇、95%酒精、75%酒精、50%酒精、蒸馏水清洗,3%过氧化氢浸泡20 min,PBS冲洗。用抗原修复液5~10 min进行抗原修复,PBS清洗2次,正常山羊血清封闭20 min,加一抗37℃孵育2 h,PBS清洗3次,每次15 min,加二

基金项目:国家教育部春晖计划98资助
作者简介:曾益军(1966-),女,四川省新都县人,实验师。电话:(023)68752259
收稿日期:2001-03-12;修回日期:2001-05-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

抗，置室温 20 min，PBS 清洗 3 次，每次 15 min，加三抗，置室温 20 min 后，PBS 清洗 4 次，每次 20 min 或更长。DAB 显色，蒸馏水清洗，苏木素复染，梯度酒精脱水，二甲苯透明后封片。PBS 代替一抗做阴性对照。

1.4 免疫组化结果半定量分析：

＋：表示微弱阳性信号；＋＋：表示阳性信号；＋＋＋：表示较强阳性信号；＋＋＋＋：表示极强阳性信号。

2 结果

出生后第 9～30 天小鼠的睾丸中未能检测出 tPA。tPA 在 32、45 和 60 d 的小鼠睾丸支持细胞中有表达，主要表达部位在生精上皮的内层，集中在形成精子的周围，32 d 表达强度为＋，60 d 增加为＋＋见图 1。在第 9～60 天小鼠的睾丸中未能检测出 uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2 表达。



图 1 出生后 **45 d** 小鼠睾丸免疫组化 **tPA** 表达 （SABC× 400）

Fig 1 Expression of tPA detected by immunohistochemical analysis in testicle of 45-day-old mice （SABC× 400）

在第 9～60 天的小鼠卵巢中没有检测出 tPA、PAI-1、PAI-2 的表达。出生后第 9 天和 15 天的小鼠卵巢中没有检测出 uPA 和 uPA-R 的表达。在 32 d 和 50 d 的小鼠卵巢中检测到 uPA 和 uPA-R 的表达。表达的部位在卵泡中的颗粒细胞和卵细胞的周围，表达的强度因卵泡的发育程度不同而异，在 32 d 的卵巢中 uPA 阳性强度为＋，uPA-R 为＋＋，50 d uPA 为＋＋＋＋，见图 2，uPA-R 为＋＋＋＋，见图 3，uPA/uPA-R 表达是一致的。



图 2 出生后 **50 d** 小鼠卵巢免疫组化 **uPA** 表达 （SABC× 400）

Fig 2 Expression of uPA detected by immunohistochemical analysis in ovary of 50-day-old mice （SABC× 400）



图 3 出生后 **50 d** 小鼠卵巢免疫组化 **uPA-R** 表达 （SABC× 400）

Fig 3 Expression of uPA-R detected by immunohistochemical analysis in ovary of 50-day-old mice （SABC× 400）

3 讨论

本实验在 9～30 d 的小鼠睾丸中未检测到 tPA 的表达，而在稍后期的 32～60 d 小鼠支持细胞中检测到 tPA 的表达，其中 32 d 表达量为（＋），60 d 为（＋＋），以往的研究表明，精原细胞减数分裂由基底膜进入管腔发生于Ⅶ和Ⅷ两期，对于前细线期精母细胞穿过支持细胞间的紧密连接时的局部的蛋白水解是必须的，此过程伴随 tPA 的分泌，因此支持细胞分泌 tPA 的功能，可能与精子的形成有关[5]。本研究的结果表明，在性成熟的小鼠睾丸支持细胞中有 tPA 的表达，从而证实 tPA 在精子的成熟及排放过程中具有重要作用。

另外，我们的研究还发现小鼠卵巢颗粒细胞中 uPA 和 uPA-R 在不同时相点，表达量是一致的。我们应用半定量分析的结果，32 d uPA（＋），50 d uPA（＋＋＋），32 d uPA-R（＋＋），50 d uPA-R（＋＋＋），uPA 及 uPA-R 均随小鼠成熟的天数增加，表达量逐渐增强。Canipari 等[6]报道，小鼠卵巢颗粒细胞只产生 uPA。刘以训等[5] 1995 年实验结果表明，在没有卵细胞的小鼠颗粒细胞中大约产生 30％的 tPA 活性，70％的 uPA 活性，我们在在体实验中也只检测出 uPA，而且表达较强，未检测出 tPA 的表达。uPA 在卵巢中的功能尚不清楚[4]，本实验结果显示，uPA 和 uPA-R 表达的强度随卵巢成熟的天数而增强，推测 uPA 和 uPA-R 在卵巢的成熟及卵子的排放过程中，可能起着一定的作用。此外，在不同时相的卵巢中，我们未检测出 PAI-1 的表达，这可能是因为卵巢中纤溶酶生成体系具有物种特异性，这与文献[7]报道一致。在此次实验中 PAI-2 无论在卵巢或是睾丸中均未能检测出，除了我们的实验原因有待摸索以外，也未见 PAI-2 在生殖腺中的表达的研究的文献报道，关于 PAI-2 在小鼠生殖器官中的表达规律以及在生殖中的作用还有待进一步探索。

总之，我们发现，小鼠生殖周期中，在体条件下，PA/uPA-R 在小鼠生殖腺成熟时表达逐渐增强，而未成

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

熟的小鼠生殖腺中则未检测出 PA/uPA-R 的表达，PA/uPA-R 在小鼠的生殖发育过程中起着重要作用。

（致谢：我室的郁枫博士、崔志鸿博士、高强国硕士等在该项工作中也给予了大力帮助，表示感谢。）

参考文献：

[1] Saksela O, Rifkin D B. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions[J]. Annu Rev Cell Biol, 1988, 4: 93－126.
[2] 刘以训. 纤溶酶原激活因子及抑制因子在排卵中功能的研究[J]. 自然科学进展, 1995, 5(4): 410－416.
[3] 刘以训, 冯　强. 大鼠卵巢细胞分泌纤溶酶原激活因子抑制因子(PAI-1)的激素调节[J]. 生理学报, 1992, 44(3): 282－289.
[4] 唐辉滨, 朱运松, 宋后燕. 尿激酶受体的结构和功能及在肿瘤组织中的表达[J]. 中华医学杂志, 1995, 75(5): 315－317.
[5] 刘以训, 杜　群, 刘　奎, 等. Sertoli 和 Leydig 细胞的相互作用及其 PA/PAI-1 表达的调节[J]. 中国科学, B 辑, 1995, 25(8): 852－857.
[6] Canipari R, Oconnell M L, Meger G, *et al*. Mouse ovarin granulosa cells produce urokinase-type plasminogen activator, whereas the corresponding rat cells produce tissue type plasminogen activator[J]. J Cell Biol, 1987, 105(　): 977－981.
[7] 刘以训, 陈毅军, 冯　强, 等. 纤溶酶原激活因子及抑制因子在溶黄体过程中的作用[J]. 科学通报, 1997, 42(19): 2 026－2 030.

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2001)06-0691-01

个案与短篇

小叶性肺炎患儿白细胞介素-10 及一氧化氮的改变及其意义

Changes of interleukin-10, nitric oxide and its significance in children with lobular pneumonia

李华强, 蒋东波, 潘　婕, 史　源　（第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所儿科, 重庆 400042）

我们观察了小叶性肺炎患儿白细胞介素-10(IL-10)及一氧化氮(NO)水平的改变，现报告如下。

1　对象和方法

1996 年 10 月至 1997 年 4 月在我科住院确诊的支气管肺炎 24 例，男 14 例，女 10 例，年龄 1 月至 6 岁，平均年龄 1 岁 10 个月，所有病儿均住院次日晨抽静脉血 3 ml，收集于肝素抗凝管及试管中，立即测 NO 水平，IL-10 血清离心后存－20 ℃冰箱待测。健康儿童 20 例作为对照组，男 12 例，女 8 例，年龄 1 岁 2 个月至 6 岁，平均年龄 2 岁 5 个月。

IL-10 测定：采用双抗夹心 ELISA 法[1]：人 IL-10 ELISA 试剂盒购于美国 Genzyme 公司。

NO 测定：测定血浆中 NO 稳定代谢产物亚硝酸/硝酸根离子(NO_2^-/NO_3^-)，采用镉还原层析柱及比色法。

统计学处理：采用 Wilcoxon 两样本法、Spearman 相关分析法，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2　结果

血清 IL-10 水平：正常儿童组：(11.17±2.88)pg/ml；肺炎组：(27.92±2.63)pg/ml，两组差异显著($P<0.01$)。

血浆 NO 水平：正常儿童组：(16.37±4.98)μmol/L；肺炎组：(42.03±5.03)μmol/L，两组差异显著($P<0.01$)。

血清 IL-10 与血浆 NO 水平经 Spearman 相关分析。$r=0.76$，两者呈正相关($P<0.01$)。

3　讨论

在细胞因子网络中 IL-10 能抑制多种细胞因子的产生，如 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8、IFN-r、GM-CSF 等。这些细胞因子对 IL-10 合成分泌中 TNF 起关键作用，TNF 能增加 IL-10mRNA 表达，IL-10又可抑制 TNF 的合成，这样 TNF 与 IL-10 形成一个负反馈，这一负反馈对于抑制过度炎症反应是非常重要的。同时，IL-10 增高又可抑制 IL-10 自身负反馈调节，来维持细胞因子网络的相对平衡。

我们对 24 例支气管肺炎极期患儿测定 IL-10 及 NO 水平，其水平都明显高于正常儿童组($P<0.01$)。这表示 IL-10 和 NO 可能参与感染性肺炎的细胞因子网络的调控及病理生理过程。Sawa 等[2] 报道绿脓杆菌肺炎鼠肺组织 IL-10 mRNA 表达和血液中 IL-10 水平增加。应用 rIL-10 后可使肺损伤减轻，鼠存活率增高，认为 IL-10 在治疗绿脓杆菌肺炎有明显作用。Martine 等[3]报道在间质性肺脏疾患者肺泡灌洗液中肺泡巨噬细胞培养，TNF mRNA 表达与正常志愿者无差异，IL-10 mRNA 表达明显增高，认为 IL-10 mRNA 表达增加抑制了 TNF 的表达。

在小叶性肺炎极期患儿 IL-10 与 NO 水平升高，两者有一定的相关性，其机制尚不清楚，也未见文献报道。

IL-10 是一种具有多种生物活性的细胞因子，具有抑制炎症细胞因子的作用，可望用于临床的治疗。

关键词：肺炎；白介素-10；一氧化氮
中图法分类号：R725.631　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 蒋东波, 李化强. 哮喘患儿外因血 IL-10 水平及其对 IL-2 调节作用[J]. 中华儿科杂志, 1999, 37(1): 28－30.
[2] Sawa T, Corry D B, Gropper M A, *et al*. IL-10 improves lung injury and survival in pseudomonas aeruginosa pneumonia[J]. J Immunol, 1997, 159(6): 2 858－2 866.
[3] Martine J A, King T E, Brown K, *et al*. Incased expression of the interleukin-10 gene by alveolar macrophages in interstital lung disease[J]. Am J Physiol, 1997, 273(3 Pt 1): L676－683.

（编辑　汪勤俭）

作者简介：李华强(1951－)，男，浙江省宁波市人，主任医师，教授，主要从事儿童的呼吸系统及支气管哮喘的临床和基础方面的研究，发表论文 25 篇。电话：(023)68757365

收稿日期：2000-07-20；修回日期：2001-04-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net