DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.018

论著

文章编号:1000-5404(2000)12-1166-04

Ⅰ型胶原在胎鼠骺板的表达及其与雌激素的关系

李灵芝,张永亮,冯凯琳,刘建中 (武警医学院药学教研室,天津 300162)

提 要:目的 研究胚胎小鼠骺板Ⅰ型胶原的表达情况及雌激素对其表达的影响。方法 采用免疫组织化学方法,研究体外培养胚胎小鼠长骨骺板静止区、增殖区和肥大区Ⅰ型胶原蛋白表达情况,同时观察10^{-7}、10^{-8}、10^{-9} mol/L雌酚酮对其表达水平的影响。结果 正常对照组骺板各区均有Ⅰ型胶原蛋白免疫组织化学染色阳性细胞。当培养基中雌酚酮浓度为10^{-7} mol/L和10^{-8} mol/L时,各区Ⅰ型胶原蛋白免疫组织化学染色阳性细胞面积与对照组相比均增加。当浓度降至10^{-9} mol/L时,则与对照组差异不显著。随浓度升高,静止区和肥大区阳性细胞面积呈逐渐增加趋势。除10^{-7} mol/L浓度下,静止区阳性细胞数与对照组相比增加外,各实验浓度下,各区阳性细胞数与对照组相比差异不显著。结论 在体外培养条件下,胚胎小鼠骺板静止区、增殖区和肥大区可表达Ⅰ型胶原蛋白,且表达水平可被雌激素上调。

关键词:骺板;Ⅰ型胶原;雌酚酮;免疫组织化学
中图法分类号:R341.26;R977.12 文献标识码:A

Expression of type Ⅰ collagen in epiphyseal plates of fetal mice and role of estrogen in this event

LI Ling-zhi, ZHANG Yong-liang, FENG Kai-lin, LIU Jian-zhong (Medical Collage of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

Abstract: Objective To study the expression of type Ⅰ collagen in epiphyseal plates of fetal mice and the effect of estrogen on the expression. Methods The expressions of type Ⅰ collagen protein were determined with immunohistochemical methods in resting, proliferative and hypertrophic zones of epiphyseal plates of *in vitro* cultured ulnae resected from fetal mice. The effects of estrogen on the expression were also analyzed at different concentrations of 10^{-7}, 10^{-8} and 10^{-9} mol/L. Results The positively stained cells to type Ⅰ collagen protein antibody were observed in the 3 zones in control group. The areas of positive cells in every zone increased significantly when the concentration of estrogen in the medium was 10^{-7} or 10^{-8} mol/L but no difference was founded as compared with the control when the concentration declined to 10^{-9} mol/L. The areas of positive cells in resting zone and hypertrophic zone increased in a dose-dependent manner. Compared with control, the number of positive cells in resting zone was increased at the concentration of 10^{-7} mol/L estrogen, but there were no significant changes in every zone when estrogen was at the concentrations was 10^{-9} mol/L and 10^{-8} mol/L. Conclusion Type Ⅰ collagen protein is expressed in resting, proliferative and hypertrophic zones of epiphyseal plate of *in vitro* cultured fetal mouse ulna and the level of expression can be up-regulated by estrogen.

Key words: epiphyseal plate; type Ⅰ collagen; estrone; immunohistochemistry

既往研究认为,Ⅰ型胶原是骨特异蛋白,主要由成骨细胞合成和分泌。Ⅱ型胶原是软骨特异蛋白,主要由软骨细胞合成和分泌。但最近有文献表明,软骨细胞也合成和分泌Ⅰ型胶原[1~4]。但对胚胎发育期,各种软骨细胞Ⅰ型胶原的表达情况报道很少,雌激素对其表达的影响尚未见报道。本实验采用体外培养小鼠胚胎长骨,观察骨发育过程中,骺板Ⅰ型胶原的表达情

作者简介:李灵芝(1963—),女,内蒙古乌拉特前旗人,博士,副教授,主要从事雌激素类抗骨质疏松症新药研制及其分子药理学方面的研究,发表论文38篇。电话:(022)24372788-78455

收稿日期:2000-07-05;修回日期:2000-11-13

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

况及雌激素对其表达的影响, 为研究雌激素对软骨内骨形成的作用提供基础资料。

1　材料和方法

1.1　主要试剂及设备

雌酚酮购自浙江仙居药厂。兔抗鼠Ⅰ型胶原多克隆抗体(一抗, 华西医科大学口腔医学院惠赠)。兔 SP™ 试剂盒(含生物素化羊抗兔 IgG, 二抗, 美国 Zymed 公司)。隔水式恒温培养箱(上海), 旋转培养装置(成都), 超净工作台(蚌埠), Olympus 显微镜(日本), AO 型组织切片机(美国), THW-500 型真彩色图像分析系统(四川联合大学图像研究所)。

1.2　模型与分组

将怀孕 16 d 的昆明株小鼠脱颈椎处死, 取出子宫, 置于盛有 Hanks 液的培养皿中, 分离胚胎, 剪下前肢, 在解剖显微镜下剥离肌肉及软组织, 游离出尺骨。将尺骨放入含有 BGJb 培养基的培养瓶中, 置于旋转培养装置上, 通入混合气体 O_2:CO_2:N_2 (45%:5%:50%), (37.5±0.5) ℃旋转悬浮培养, 转速 35 r/min, 24 h 补充气体 1 次[5]。

实验设正常对照组及高、中、低 3 个雌酚酮剂量组, 浓度分别为 10^{-7}、10^{-8} 和 10^{-9} mol/L。每组培养长骨 18 根, 分 6 根×3 次培养。

1.3　Ⅰ型胶原蛋白免疫组织化学染色

1.3.1　骨组织固定与处理　　骨组织培养 48 h 后, 用 4%多聚甲醛磷酸缓冲液(pH 7.2)固定, 7%EDTA 磷酸缓冲液(pH 7.2, 4 ℃)脱钙, 石蜡包埋, 纵向连续切片(5 μm), 裱于涂有明胶的载玻片上, 置 37 ℃烤箱 72 h。

1.3.2　免疫组织化学染色方法　　采用 S-P 染色法。组织切片常规脱蜡入水, 在 3%H_2O_2 溶液中孵育 30 min, 蒸馏水洗。加 0.4%胃蛋白酶 37 ℃反应 15 min, 以蒸馏水、磷酸缓冲液依次冲洗。加新配 2%牛血清白蛋白, 37 ℃封闭 30 min。加抗Ⅰ型胶原抗体(1∶200), 37 ℃反应 2 h。磷酸缓冲液冲洗, 加二抗(1∶200), 37 ℃反应 1 h。磷酸缓冲液冲洗, 加 S-P 复合物(1∶300), 37 ℃反应 1 h。磷酸缓冲液冲洗, DAB 显色, 自来水冲洗, 逐级酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。阴性对照骨组织染色时以磷酸缓冲液代替一抗, 其余步骤相同。阳性染色物质为棕黄色或深棕色, 主要定位于胞浆。

1.4　图像分析及统计方法

图像分析系统下观察染色阳性物质的定位及染色强度, 测定骺板静止区(Resting zone)、增殖区(Proliferative zone)和肥大区(Hypertrophic zone)Ⅰ型胶原蛋白染色阳性细胞面积和阳性细胞数, 切片放大倍数 40 倍, 测量窗面积 100 μm^2。

数据用 PEMS 统计软件包进行方差分析和 q 检验。

2　结果

2.1　正常对照组骺板Ⅰ型胶原蛋白免疫组织化学染色阳性物质的分布

正常对照组骺板各区均有Ⅰ型胶原蛋白表达, 染色呈弱阳性。阳性物质主要定位于细胞浆, 少量出现于细胞核。基质无着色, 见图 1。

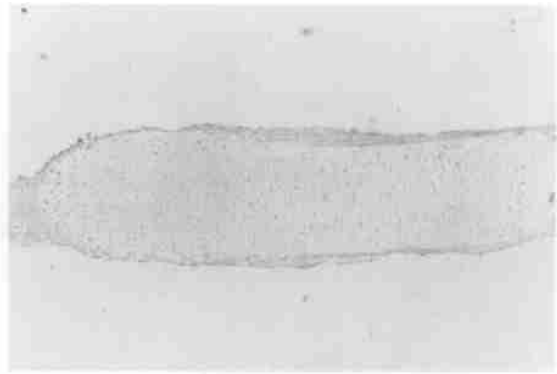


图 1　对照组Ⅰ型胶原呈弱阳性, 棕黄色阳性物质主要定位于细胞浆, 少量见于细胞核 (S-P× 100)

Fig 1　Type Ⅰ collagen protein weak positive, light brown positive substance mainly located in cytoplasm and a few was found in nuclei in control group (S-P× 100)

2.2　雌酚酮对骺板Ⅰ型胶原蛋白免疫组织化学染色阳性细胞面积的影响

当培养基中雌酚酮浓度为 10^{-7} mol/L 和 10^{-8} mol/L 时, 各区Ⅰ型胶原蛋白免疫组织化学染色阳性细胞面积与对照组相比均增加, 见图 2。当浓度降至 10^{-9} mol/L 时, 各区均与对照组差异不显著。随浓度升高, 静止区和肥大区阳性细胞面积呈逐渐增加趋势, 见表 1。

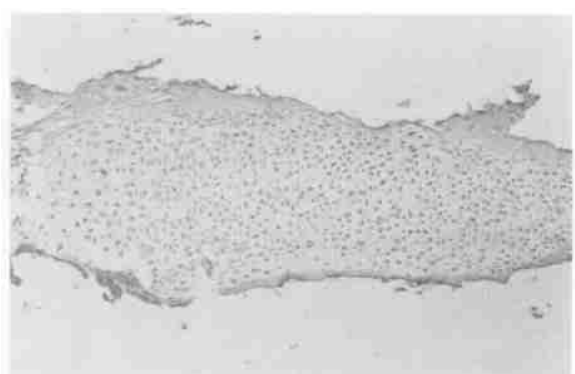


图 2　10^{-7} mol/L 雌酚酮组Ⅰ型胶原呈强阳性, 阳性物质呈深棕色, 阳性细胞数增多 (S-P× 100)

Fig 2　10^{-7} mol/L estrone group, type Ⅰ collagen protein strong positive, positive substances dark brown stained, number of positive cells increased (S-P× 100)

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

2.3 雌酚酮对骺板Ⅰ型胶原蛋白免疫组织化学染色阳性细胞数的影响

雌酚酮对骺板Ⅰ型胶原蛋白免疫组织化学染色阳性细胞数的影响，见表1。当培养基中雌酚酮浓度为 10^{-7} mol/L 时，静止区阳性细胞数较对照组显著增加，增殖区和肥大区与对照组差异不显著。雌酚酮浓度为 10^{-8} mol/L 和 10^{-9} mol/L 时，各区阳性细胞数与对照组差异不显著。

表1 雌酚酮对骺板Ⅰ型胶原蛋白免疫组化染色阳性细胞面积、阳性细胞数的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The effects of estrone on the area and number of immunohistochemical stain positive cells of type Ⅰ collagen protein in epiphyseal plates($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Area of positive cells (μm^2)			Number of positive cells		
		Resting zone	Proliferative zone	Hypertrophic zone	Resting zone	Proliferative zone	Hypertrophic zone
Control	18	6.62±2.04	9.16±2.68	4.84±1.92	46.2±2.4	54.6±3.8	21.4±3.8
10^{-9}mol/L estrone	18	6.90±2.92	8.85±2.61	4.89±1.64	53.4±4.2	55.8±2.7	20.8±4.6
10^{-8}mol/L estrone	18	10.05±2.08$^{**▲▲}$	11.71±3.01$^{*▲}$	7.08±2.28$^{*▲}$	54.0±3.9	54.2±4.0	23.0±3.2
10^{-7}mol/L estrone	18	12.99±1.79$^{**△△}$	11.92±1.82*	9.58±2.61$^{**△△}$	65.7±4.7**	57.1±2.3	25.5±4.9

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △△: $P<0.01$ *vs* 10^{-8} mol/L estrone; ▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ *vs* 10^{-9} mol/L estrone

3 讨论

一般认为，软骨基质胶原富含Ⅱ型胶原蛋白，缺乏Ⅰ型胶原蛋白。也有文献表明，体外培养条件可能促使软骨细胞从合成Ⅱ型胶原和软骨型糖蛋白向合成Ⅰ型胶原和非软骨型糖蛋白快速转化[6,7]。对于原代培养的承重实验鸡生长板软骨细胞，视黄酸也可促使其合成Ⅰ型胶原，而降低其合成Ⅱ型胶原和Ⅹ型胶原的能力[8]。近年来的文献证实，软骨基质确实含有Ⅰ型胶原。Claassen 等[1]的研究证实，在人童年和少年早期，Ⅰ型胶原局限于第1肋软骨膜，而Ⅱ型胶原则位于透明软骨基质。老年时，在大片软骨细胞基质中心发现Ⅰ型胶原，肋软骨膜下软骨细胞基质则显Ⅰ型胶原阴性。提示在发育过程中，第1肋软骨细胞经历了向Ⅰ型胶原生成细胞变化的过程。Sasano 等[3]发现，大鼠发育过程中，在体内生理条件下，胫骨关节软骨细胞合成Ⅰ型胶原，并在软骨基质中积累Ⅰ型胶原蛋白。Wardale[2]也发现，正常鸡生长板软骨含有Ⅰ型胶原蛋白。采用免疫组织化学方法研究证实，胚胎小鼠踝软骨既含有Ⅰ型胶原，也含有Ⅱ型胶原。15 d 孕龄的小鼠踝软骨可检出Ⅰ型胶原，但与Ⅱ型胶原抗体反应却很弱。而在成年大鼠生长板软骨则未检出Ⅰ型胶原[4]。本实验结果显示，胎鼠尺骨培养48 h后，在骺板静止区、增殖区和肥大区均有Ⅰ型胶原表达。此与用成年大鼠进行实验所得结果相左[4]。推测可能与下列因素有关：①在发育的不同阶段，Ⅰ型胶原在软骨细胞中的表达可能有差异。胚胎期生长板软骨细胞对胶原的表达与成年期不同，生长板软骨细胞在发育过程中表达Ⅰ型胶原的能力逐渐降低。②在体外培养条件下，软骨细胞表达的胶原类型可能发生转化。③可能与种属差异有关。Sandberg 等[9]曾在早期软骨细胞中检测到Ⅰ型胶原 mRNA，但却未发现Ⅰ型胶原蛋白的合成。因此认为在早期软骨细胞中的Ⅰ型胶原 mRNA 很可能是该细胞先前表型遗留的产物。Hughes 等[10]的研究显示，大鼠骨折后第8天，具有软骨细胞形态的细胞中有Ⅰ型胶原，说明此时在成骨细胞和软骨细胞之间存在共有的表型表达。本实验在传统认为应以Ⅱ型胶原为主而不存在Ⅰ型胶原的骺板各区均检测到Ⅰ型胶原蛋白，间接证实这种共有表型表达的存在。可能软骨细胞在分化过程中，基因表型发生了变化，因此在某一特定阶段，Ⅰ型胶原和Ⅱ型胶原两种表型同时出现于软骨细胞。能表达Ⅰ型胶原的软骨细胞是否已经趋于成骨细胞，或刚由成纤维细胞样间充质细胞演化而来有待进一步证实。

培养基中加入雌酚酮后，可显著上调各区Ⅰ型胶原水平，并且当雌酚酮浓度由 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7} mol/L 逐渐升高时，各区Ⅰ型胶原含量也逐渐升高，表现出剂量依赖的特点。但雌酚酮对阳性细胞数影响很小。表明雌酚酮可促进骺板软骨细胞表达Ⅰ型胶原，表现为使单个细胞中Ⅰ型胶原表达增强。

原癌基因 c-fos 和 c-jun 是转录因子家族成员，JUN 蛋白可以和 FOS 形成异源二聚体，或自身形成同源二

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

聚体, 结合至启动子中含有 AP-1 结合位点的 DNA 序列, 启动基因转录。我们在新近的实验中发现, 雌酚酮可上调骺板各区 c-fos 和 c-jun 蛋白质表达水平[11]。Ⅰ型胶原基因序列中存在 AP-1 结合位点。因此我们推测雌酚酮可能通过增强 c-fos 和 c-jun 表达, 继而经 AP-1 位点促进了骺板Ⅰ型胶原蛋白表达。

TGFβ 在软骨内成骨等细胞的组织分化、演变具有重要调节作用[12]。软骨形成期, TGFβ1 在软骨小岛中的软骨细胞或未成熟软骨细胞样间充质细胞中均有表达, 并在软骨内成骨期, 随软骨细胞的成熟、肥大而衰减。史炜镔等[13]发现在骨折愈合过程中, Ⅰ型前胶原 mRNA 和 TGFβ1 mRNA 在成熟的肥大软骨细胞中均有表达。在 TGFβ 基因序列中也存在 AP-1 结合位点, 雌酚酮是否通过激活 TGFβ 基因, 间接激活Ⅰ型前胶原基因表达, 尚需通过进一步实验证实。

参考文献:

[1] Claassen H, Kampen W U, Kirsch T, *et al*. Localization of type Ⅰ and Ⅱ collagen during development of human first rib cartilage [J]. Anat Embryol Berl, 1995, 192(4): 329—334.

[2] Wardale R J, Duance V C. Collagen expression in chicken tibial dyschondronplasia[J]. J Cell Sci, 1996, 109(Pt 5): 1 119—1 131.

[3] Sasano Y, Furusawa M, Ohtani H, *et al*. Chondrocytes synthesize type Ⅰ collagen and accumulate the protein in the matrix during development of rat tibial articular cartilage[J]. Anat Embryol Berl, 1996, 194(3): 247—252.

[4] Ishii M. An immunohistochemical study on fetal mouse condylar cartilage[J]. Kukubyo Gakkai Zasshi, 1995, 62(1): 16—28.

[5] 马丽英, 王瑞淑, 李　云, 等. 小鼠胚胎长骨体外培养的研究[J]. 卫生研究, 1998, 27(6): 399—401.

[6] Benya P D, Silvil S R, Nimni M E. The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types Ⅰ and Ⅲ and trimer, but not type Ⅱ. Verification by cyanogen bromide peptide analysis[J]. Biochemistry, 1977, 16(5): 865—872.

[7] Muller P K, Lemmen C, Gay S, *et al*. Immunohistochemical study of collagen synthesis by chondrocytes in culture[J]. Exp Cell Res, 1977, 108(1): 47—52.

[8] WU L N, Ishikawa Y, Nie D, *et al*. Retinoic acid stimulates matrix calcification and initiates type Ⅰ collagen synthesis in primary cultures of avian weight-bearing growth plate chondrocytes [J]. J Cell Biochem, 1997, 65(2): 209—230.

[9] Sandberg M, Aro H, Multimaki P, *et al*. *In situ* localization of collagen production by chondrocytes and osteoblasts in fracture callus[J]. J Bone Joint Surg Am, 1989, 71(1): 69—77.

[10] Hughes S S, Hicks D G, O'Keefe R J, *et al*. Shared phenotypic expression of osteoblasts and chondrocytes in fracture callus [J]. J Bone Miner Res, 1995, 10(4): 533—544.

[11] 李灵芝, 张永亮, 冯凯琳, 等. 雌激素上调长骨 c-fos 和 c-jun蛋白质表达水平[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(1): 44—46.

[12] Joyce M E, Jingushi S, Bolander M E, *et al*. Transforming growth factor-β in the regulation of fracture repair[J]. Orthop Clin North Am, 1990, 21(1): 199—209.

[13] 史炜镔, 杜　凝, 符诗聪, 等. 骨痂组织冰冻切片前胶原及转化生长因子-β_1 基因表达的原位定位[J]. 中华骨科杂志, 1999, 19(4): 239—242.

(编辑　冯崇英)

文章编号: 1000-5404(2000)12-1169-01

经验与短篇

25 例非癌性血性腹水原因分析

Analysis on the causes of non-cancerous bloody ascites: 25 cases

张晓荣　(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所消化内科, 重庆 400042)

我科 1981～1999 年共收治肝硬化腹水患者 2 531 例, 其中非癌性血性腹水 25 例, 男性 21 例, 女性 4 例, 平均年龄 42 岁。其中腹内及腹膜后静脉曲张破裂 5 例; 肝再生结节破裂 5 例; 结核性腹膜炎 5 例; 淋巴管破裂 2 例; 腹内血管畸形 2 例; 急性胰腺炎 1 例; 胰假性囊肿破裂 1 例; 脾破裂 1 例; 急性胆囊炎穿

(下转 1172 页)

作者简介: 张晓荣(1955—), 女, 河北省石家庄市人, 副主任护师, 主要从事消化道疾病护理方面的研究, 发表论文 26 篇。电话: (023)68757342

收稿日期: 2000-04-05; 修回日期: 2000-10-25

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