

人早期胎盘绒毛中去甲肾上腺素和多巴胺的免疫组织化学研究

石 佳 黄威权^① 张崇理

(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080;

① 第四军医大学组织胚胎学教研室, 西安 710032)

关键词 去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、酪氨酸羟化酶(TH)、人胎盘绒毛、免疫组织化学

关于人胎盘绒毛的内分泌的研究已经有许多报道,但大多是关于神经肽、垂体激素样物质、生长因子和细胞因子方面的研究^[1]. 单胺类物质报道较少. 我们曾首次发现胎盘绒毛滋养层细胞合成 5-羟色胺(5-HT),并且 5-HT 的含量随妊娠时间而变化^[2]. 多巴胺(DA)和去甲肾上腺素(NE)也是重要的生物胺,它们与性腺激素的合成及分泌关系密切^[3,4]. 应用高压液相色谱(HPLC)和电化学检测仪,我们曾检测到人胎盘绒毛中 NE 和 DA 的存在,并通过组织培养证明了胎盘绒毛在体外可合成和释放 NE^[5]. 本文用免疫组织化学的方法,对人胎盘绒毛中 NE 和 DA 的分布做了探讨,为研究其在胎盘中的意义提供直接的形态学依据.

1 材料与方 法

1.1 试剂

兔抗 NE 和兔抗 DA 多克隆抗体为中国科学院动物研究所本实验室自制^[6]. 鼠抗酪氨酸羟化酶(TH)单克隆抗体为 Amersham England 公司的产品,由第四军医大学解剖学教研室惠赠. ABC 药盒是 Vector 公司产品.

1.2 组织

7—8 周人胎盘绒毛 6 例,由北京市海淀区医院计划生育门诊室提供.

1.3 胎盘绒毛石蜡切片的制备

经手术取得新鲜的胎盘绒毛后,立即用 4℃ 生理盐水洗去血液,剪成小块,然后用 1% 的戊二醛固定,以熔点为 50—52℃ 的石蜡包埋,制成 2μm 的连续切片.

1.4 免疫组织化学反应

石蜡切片经脱蜡、脱水之后,进入过氧化氢/甲醇(7—8μl/35—40ml)中孵育 30min,以除去内源性过氧化物酶,然后按常规的 ABC 法进行免疫组织化学反应. NE 抗体的稀释度为 1:100, DA 抗体的稀释度为 1:100, TH 单克隆抗体的稀释度为 1:300,生物素标记的马抗鼠单克隆抗体的稀释度为 1:200, ABC 复合物的稀释度为 1:100.

以正常兔血清和鼠血清代替第一抗体进行孵育,分别作为 DA 和 TH 抗体免疫组织化学的阴性对照. NE 抗体免疫组织化学反应的阴性对照设两组:一组用第一抗体预先和过量的抗原稀释液(1mg/ml)反应,24h 后再与样品标本进行孵育;另一组以正常兔血清代替第一抗体进行孵育.

1.5 邻片法免疫组织化学双重染色

将 $2\mu\text{m}$ 的绒毛连续石蜡切片贴于同一张载玻片上,使每片样品间留出少许间距. DA, NE 抗体分别加到同一载玻片的 2 张相邻的连续切片上(液面间不相混),进行免疫组织化学反应,染色步骤为 ABC 法.

2 实验结果

阳性反应的细胞呈棕黄色,背底很浅,几乎不着色,对比鲜明,易于辨认. 所有对照实验均呈阴性反应.

胎盘多数绒毛断面的细胞滋养层细胞和合体滋养层细胞均呈现 DA 免疫强阳性反应. 各细胞的反应强度一致,着色较均一. 大多数 DA 免疫反应阳性颗粒分布于胞质中,少数细胞的胞核同时呈现阳性反应,绒毛中轴的结缔组织毛细血管中也有阳性反应显示(图 1). 有

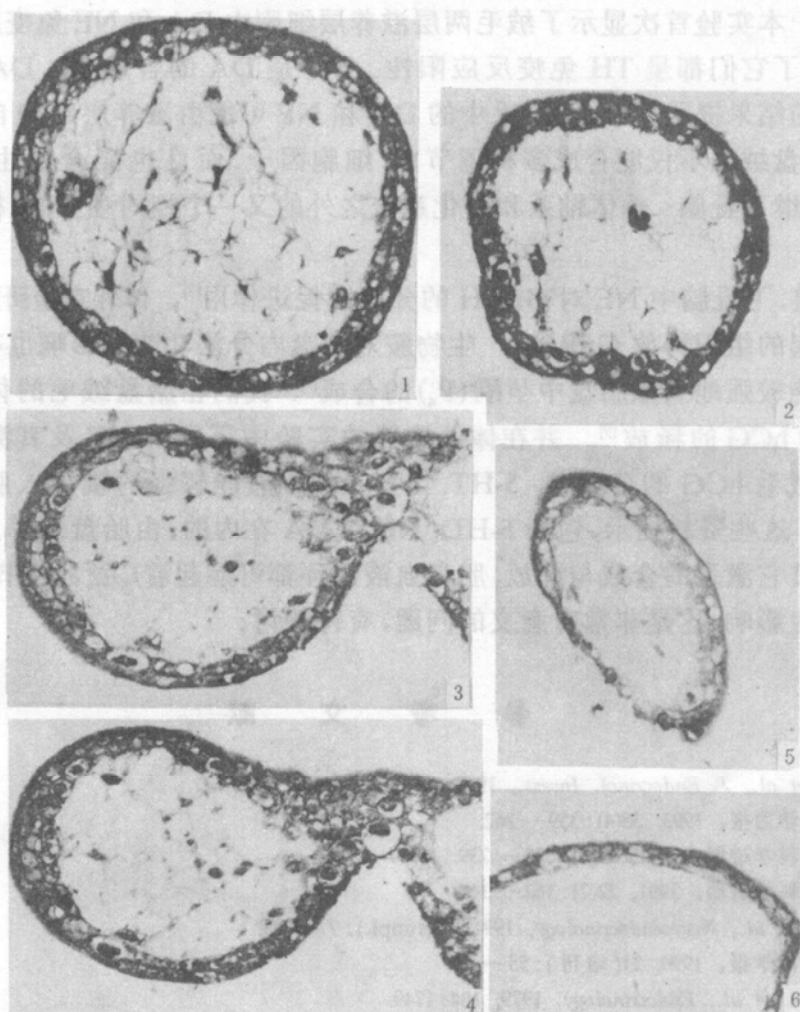


图 1—6

1——8 周龄胎盘绒毛石蜡切片的 NE 免疫化学反应. 绒毛的细胞滋养层和合体滋养层细胞均为 NE 强阳性免疫反应. $\times 280$; 2——8 周龄胎盘绒毛石蜡切片的 DA 免疫化学反应. 绒毛的细胞滋养层和合体滋养层细胞均为 DA 强阳性免疫反应. $\times 280$; 3——邻片法免疫双重染色. DA 在绒毛滋养层细胞截面为免疫反应阳性. $\times 280$; 4——邻片法免疫双重染色. NE 在相对于图 3 的绒毛截面亦为免疫反应阳性. $\times 280$; 5, 6——8 周龄胎盘绒毛石蜡切片的 TH 免疫化学反应. 绒毛的细胞滋养层和合体滋养层细胞均为 TH 免疫反应阳性. 合体滋养层细胞的阳性反应比细胞滋养层细胞的稍强. $\times 280$

在个别绒毛断面,可见细胞滋养层细胞的阳性免疫反应比合体滋养层细胞的强。

NE 免疫反应阳性颗粒在滋养层细胞中的分布特点与 DA 的相似(图 2)。

邻片法双重染色的结果显示,相邻切片中同一绒毛断面 DA 和 NE 免疫反应阳性颗粒的分布特点非常相似,两层滋养层细胞均呈 DA 和 NE 强阳性免疫反应,即 DA 和 NE 共存于同一绒毛滋养层细胞内(图 3,4)。

TH 免疫组织化学反应的结果显示,绒毛两层滋养层细胞均呈 TH 免疫反应阳性。由于用的是 TH 单抗,故染色相对 DA 和 NE 的为浅。但是合体滋养层细胞的阳性反应比细胞滋养层的稍强,大多数阳性反应颗粒分布于细胞质中(图 5,6)。

3 讨 论

我们先前用 HPLC 结合电化学检测仪检测到人早期胎盘存在 NE 和 DA^[9],但尚缺少直接的形态学证据。本实验首次显示了绒毛两层滋养层细胞中 DA 和 NE 免疫反应阳性物质的分布,而且还证明了它们都呈 TH 免疫反应阳性。TH 是 DA 的合成酶,DA 是合成 NE 的前体。所以本文的结果提示,人胎盘绒毛中的 DA 和 NE 可能由滋养层细胞自身所合成。这进一步说明,人胎盘绒毛不仅能合成多种调节肽,细胞因子,而且也能合成生物胺。有理由设想,胎盘可能是继下丘脑-垂体轴系和消化系统之外的又一个相对独立的,极其复杂的神经内分泌器官。

有研究报道,下丘脑中 NE 对 GnRH 的分泌起促进作用^[7]。体外实验研究表明,DA 能刺激下丘脑正中隆起的组织释放 GnRH^[7]。生物胺对胎盘内分泌功能的影响也有一些研究。外源性的 DA,NE 能较强地刺激胎盘中孕酮(P₄)的合成^[8]。我们在胎盘绒毛的体外灌流实验中发现,NE 能刺激 hCG 的释放^[9],并在体外培养的实验中还发现 NE 及其激动剂能明显地促进人早期胎盘绒毛 hCG 的分泌^[10]。5-HT, NE 及组织胺能较强的刺激人胎盘绒毛膜动脉和静脉的收缩^[11]。这些资料提示,包括 5-HT, NE 和 DA 在内的,由胎盘滋养层细胞自身合成的生物胺对胎盘其它激素的合成与释放,胎盘血液循环都可能起着广泛的调节作用。它们对胚胎发育是否也发生影响,这是非常有意义的问题,有待探讨。

参 考 文 献

- [1] Petraglia, F. et al., *J. Endocrinol. Invest.*, 1990, 13: 353—371.
- [2] 黄威权等, 科学通报, 1993, 38(4): 359—362.
- [3] 赵伟等, 生理科学进展, 1991, 22(3): 235—239.
- [4] 詹 皓, 生理科学进展, 1991, 22(2): 162—164.
- [5] Zhang, C. L. et al., *Neuroendocrinology*, 1991, 53(suppl.): 77—83.
- [6] 黄威权等, 解剖学报, 1990, 21(增刊): 55—58.
- [7] Negro-Vilar, A. et al., *Endocrinology*, 1979, 104: 1749.
- [8] Battista, P. J. et al., *Placenta*, 1990, 11(4): 337—348.
- [9] 程丽仁等, 生理通讯, 1991, (增刊 1): 83—84.
- [10] 沈卫斌等, 生理通讯, 1991, (增刊 1): 82—83.
- [11] Marin, J. et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1990, 42(3): 217—220.