

## 维生素D受体蛋白及其mRNA在 人输卵管黏膜上皮的表达

张 纯<sup>1</sup>, 朱伟杰<sup>1</sup>, 徐建平<sup>2</sup>

(1. 暨南大学生命科学技术学院 生殖免疫研究所, 广东 广州 510632;

2. 暨南大学附属第一医院 妇产科, 广东 广州 510630)

**[摘 要]** 目的: 探讨人输卵管黏膜上皮维生素D受体(VDR)蛋白及其mRNA的表达。方法: 30例输卵管标本取自具有正常妊娠生育史, 因子宫肌瘤、子宫腺肌病等行腹式子宫切除术, 一并切除输卵管的妇女。输卵管取材包括峡部、壶腹部和伞部, 按子宫内膜组织学分期分为增生早期组6例、增生中晚期组9例、分泌早期组7例、分泌中晚期组8例。应用免疫组织化学法和逆转录聚合酶链反应法检测人输卵管黏膜上皮VDR的表达。结果: 人输卵管黏膜上皮中检测到VDR蛋白及其mRNA表达。VDR蛋白主要表达于输卵管上皮细胞的细胞核中, 部分间质平滑肌细胞核内亦有表达。相同时期各不同部位输卵管上皮细胞VDR蛋白表达无明显差别( $P > 0.05$ ), 随月经周期变化, 各不同部位输卵管上皮细胞VDR蛋白表达发生改变, 在增生早期和分泌中晚期较低, 与之比较, 在增生中晚期和分泌早期其表达明显增高( $P < 0.01$ ), 至分泌早期达最高值; 壶腹部输卵管黏膜上皮组织VDR mRNA表达在增生早期和分泌中晚期较低, 在增生中晚期和分泌早期明显增高( $P < 0.01$ )。结论: 人输卵管黏膜上皮组织存在VDR蛋白及其mRNA表达, 在增生中晚期和分泌早期其表达明显增高, 且具有周期性变化。

**[关键词]** 维生素D受体; 人输卵管; 免疫组织化学; 逆转录聚合酶链反应

**[中图分类号]** R339.2\*2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)02-0170-06

## Expressions of the vitamin D receptor protein and its mRNA in mucosa epithelium of human fallopian tubes

ZHANG Chun<sup>1</sup>, ZHU Wei-jie<sup>1</sup>, XU Jian-ping<sup>2</sup>

(1. Institute of Reproductive Immunology, College of Life Science and Technology,  
Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

**[Abstract]** **Aim:** To investigate the expressions of vitamin D receptor (VDR) protein and its mRNA in mucosa epithelium of human fallopian tubes. **Methods:** Samples of fallopian tubes were obtained from 30 women undergoing abdominal hysterectomy with adnexectomy for benign disease such as uterine leiomyoma, adenomyosis in the pelvic cavity. The isthmic, ampullary and fimbrial portions of fallopian tubes were respectively collected. These specimens were divided into 4 groups based on their endometrium histological staging: early-proliferative stage ( $n = 6$ ), mid- and late-proliferative stage ( $n = 9$ ), early-secre-

**[收稿日期]** 2008-10-08

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(A04010449)

**[作者简介]** 张 纯(1979-), 男, 博士研究生, 研究方向: 生殖生理学

通讯作者: 朱伟杰, 男, 研究员, 博士生导师, Tel: 020-85225718; E-mail: tzhuwj@jnu.edu.cn

tory stage ( $n=7$ ), mid- and late-secretory stage ( $n=8$ ). The expression of VDR in mucosa epithelium of human fallopian tubes was determined by immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction methods. **Results:** VDR protein and expression of its mRNA were detected in mucosa epithelium of human fallopian tubes. VDR positive staining was mainly located in the nucleus of epithelial cells, observed in smooth muscle cells occasionally. There was no significant difference in VDR positive expression among the isthmic, ampullary and fimbrial portions during the same phase of menstrual cycle ( $P>0.05$ ). However, VDR positive expression in the different portions changed with the variation of menstrual cycle. It was in low level during both the early-proliferative and mid- and late-secretory stages, then increased in both the mid- and late-proliferative and early-secretory stages significantly ( $P<0.01$ ) and achieved the maximum during the early-secretory stage. The expression of VDR mRNA in ampullary portion of fallopian tubal epithelium was in low level during both the early-proliferative and mid- and late-secretory stages, then obviously increased in both the mid- and late-proliferative and early-secretory stages ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** The expressions of VDR protein and its mRNA would exist in mucosa epithelium of human fallopian tubes. And the expressions would exhibit a cyclic change. During both the mid- and late-proliferative and early-secretory stages, the expressions of VDR protein and mRNA would increase significantly.

[Key words] vitamin D receptor; human fallopian tube; immunohistochemistry; reverse transcription polymerase chain reaction

维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)属于核受体超家族成员,是一种配体依赖性转录调节蛋白。VDR 在机体器官组织中广泛分布,介导维生素 D<sub>3</sub> 活性产物的生物学效应,发挥维系机体钙磷平衡,调控细胞增殖分化,调节机体免疫系统等功能。既往研究显示,卵巢、子宫、宫颈等雌(女)性生殖器官组织及卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌等肿瘤组织细胞中均存在 VDR 表达<sup>[1-4]</sup>,推测 VDR 可能与雌(女)性生殖系统的生理活动及其病理状态有关。然而,VDR 在输卵管的研究仅见于对大鼠的报道<sup>[4]</sup>。本研究应用免疫组织化学法和逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测女性输卵管黏膜上皮是否存在 VDR 蛋白及其 mRNA 表达,旨在为阐明人输卵管黏膜上皮生物活性物质的表达、变化及其规律提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

(1)研究对象及标本采集 30 例输卵管标本取自 2005-10-2008-05 间因子宫肌瘤、子宫腺肌病等行腹式子宫切除术、一并切除输卵管的妇女。患者年龄 30~47 岁,有正常妊娠生育史,末次月经时

间记忆准确,术前半年内未使用性激素类药物或放置宫内节育器,输卵管外观形态正常。输卵管组织的取材部位包括峡部、壶腹部和伞部。子宫内膜组织的取材部位均为子宫体近底部后壁中央,按 Noyes 等的子宫内膜分期方法<sup>[5]</sup>,确定子宫内膜时期,输卵管标本对应分为增生早期、增生中晚期、分泌早期、分泌中晚期 4 组,各组标本数分别为 6、9、7、8 例。本研究经伦理委员会批准,标本提供者均知情同意。

(2)主要试剂 大鼠抗人 VDR 单克隆抗体购自德国 Calbiochem 公司,克隆号为 9A7γE10.4。即用型 MaxVision™ 试剂购自福州迈新公司,Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司,DNA Marker 购自上海天根化工有限公司。

### 1.2 方法

(1)标本处理 术后 1 h 内取输卵管组织,取适量(约 100~150 mg)剪除浆膜及脂肪组织的壶腹部黏膜上皮置于去 RNA 酶的冻存管中,-70℃ 冰箱保存,用于 RT-PCR 检测。其余标本按峡部、壶腹部、伞部分别置于体积分数为 10% 中性福尔马林溶液中固定,常规石蜡包埋、切片(4 μm),用于免疫组织化学检测。

(2)VDR 蛋白的检测 采用快捷免疫组化染色法,操作步骤按试剂说明进行:切片常规脱蜡、水化,体积分数为 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温作用 10 min 以消除内源性过氧化酶活性,按 VDR 一抗要求,将组织切片入 2 mol/L 盐酸 37 ℃ 预处理 20 min,滴加一抗(1:50 稀释),4 ℃ 冰箱过夜,然后加即用型 MaxVision™ 试剂,室温 15 min,二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine)显色,脱水、透明后封片。用已知 VDR 表达阳性的乳腺癌组织作阳性对照,阴性对照以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution)取代 VDR 抗体。光镜下观察细胞核内含淡黄或棕黄色颗粒为 VDR 蛋白表达阳性细胞。采用 Leica QWin 图像分析系统分别测试输卵管黏膜上皮细胞中染色阳性细胞核及上皮细胞背景的灰度值,分别记为  $G_a$  和  $G_b$ ,按文献[6]方法以阳性单位(positive unit, PU)值表示,  $PU = |G_a - G_b| / G_{\max} \times 100$ ,  $G_{\max}$  等于 256。PU 值的大小与免疫组化阳性反应程度成正比。每张染色片随机测试 5 个视野,取其平均值。

(3)VDR mRNA 的检测 ①总 RNA 提取:取约 100 mg 冷冻完全的输卵管壶腹部组织标本,放入研磨器中迅速研碎,加入 1 mL Trizol,立即移至 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,按产品说明书提取总 RNA,紫外分光光度计及电泳分析 RNA 浓度与纯度。②cDNA 合成:取 2  $\mu\text{L}$  总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒说明书进行反转录反应,合成总体积 20  $\mu\text{L}$  的 cDNA。③PCR 扩增:根据 Genebank 中 VDR、 $\beta$ -actin 的序列 NM 000376、NM 001101,采用 Primer 5.0 软件设计,由 Invitrogen 公司合成 VDR 特异性引物(上游引物:5'-ATG AGG AGT TGC TGT TTG TTT GAC-3';下游引物:5'-TTC TTC TGT GAG GCT GTT TTT GTC-3'),扩增的基因片段大小为 430 bp。 $\beta$ -actin 特异性引物(上游引物:5'-ATG AAG TGT GAC GTG GAC ATC C-3';下游引物:5'-CTC GTC ATA CTC CTG CTT

GCT G-3')为内对照,扩增的基因片段大小为 246 bp。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 变性 30 s, VDR、 $\beta$ -actin 分别按各自的退火温度(62 ℃、59 ℃)退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,循环 35 次,最后 72 ℃ 充分延伸 10 min。④电泳:反应完毕后, DNA Marker、PCR 反应产物经体积分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,当观察到清晰、无明显杂带干扰且符合预期扩增片段大小的条带时,确定为 PCR 扩增阳性条带。应用 Quantity one 凝胶图像分析处理系统对扩增片段进行光密度扫描,求出积分光密度,以 VDR 基因与内参照  $\beta$ -actin 基因积分光密度的比值表示 VDR 基因的相对含量。

1.3 统计学分析

实验数据以(均数 ± 标准差) ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用统计软件 SPSS 13.0 进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

2 结果

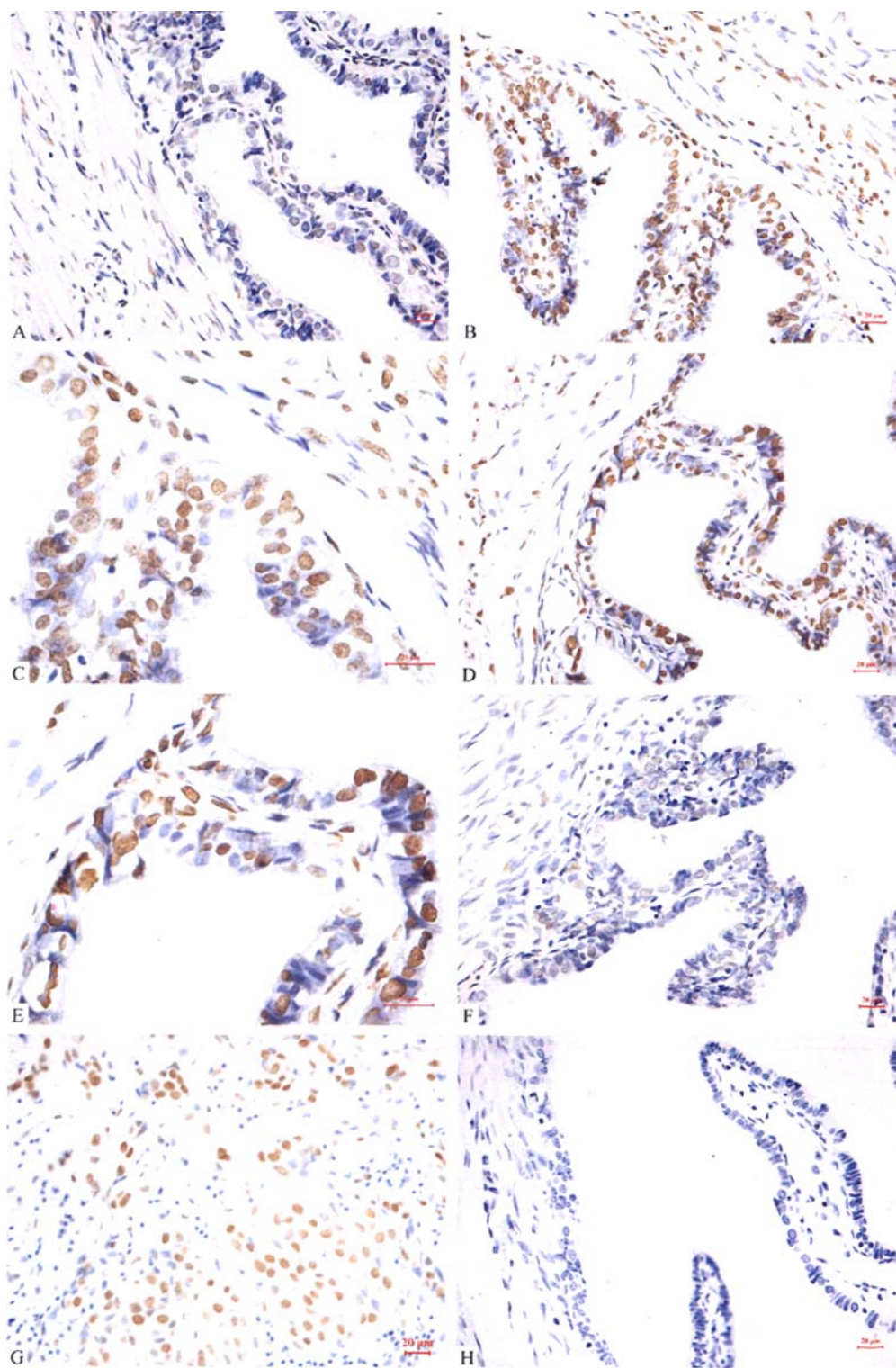
2.1 VDR 蛋白在人输卵管黏膜上皮的表达

应用免疫组化法检测,在 4 组人输卵管峡部、壶腹部和伞部组织均可见 VDR 表达,VDR 蛋白阳性表达于输卵管黏膜上皮细胞的细胞核内,纤毛细胞和分泌细胞均可见表达,部分间质平滑肌细胞核内亦有表达。在小部分标本的少数输卵管黏膜上皮细胞胞浆内亦可观察到淡黄或浅棕黄色显色。在月经周期同一时期,峡部、壶腹部和伞部输卵管上皮细胞核内 VDR 蛋白表达无明显差别 ( $P > 0.05$ )。随月经周期变化,各节段输卵管上皮细胞 VDR 蛋白表达发生变化,在增生早期、分泌中晚期较低,与之比较,增生中晚期和分泌早期其表达明显增高 ( $P < 0.01$ );与增生中晚期比较,分泌早期 VDR 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ),见表 1、图 1A ~ F。阴性对照则未见 VDR 表达,见图 1H。

表 1 人输卵管黏膜上皮 VDR 蛋白及其 mRNA( $\bar{x} \pm s$ ) 的表达

组别	例数 (n)	VDR 蛋白 (PU)			VDR mRNA- $\beta$ -actin mRNA/%
		峡部	壶腹部	伞部	
增生早期组 (A)	6	6.92 ± 1.63	7.21 ± 1.59	7.43 ± 1.65	72.74 ± 8.15
增生中晚期组 (B)	9	14.95 ± 1.71 <sup>1)</sup>	15.33 ± 1.65 <sup>1)</sup>	14.85 ± 1.69 <sup>1)</sup>	95.29 ± 11.24 <sup>1)</sup>
分泌早期组 (C)	7	18.30 ± 2.41 <sup>1),2)</sup>	19.02 ± 2.58 <sup>1),3)</sup>	18.59 ± 2.44 <sup>1),3)</sup>	98.20 ± 12.12 <sup>1)</sup>
分泌中晚期组 (D)	8	9.82 ± 2.31	10.17 ± 2.29	10.64 ± 2.41	75.83 ± 9.96

1) 与 A、D 组比较  $P < 0.01$ ; 2) 与 B 组比较  $P < 0.05$ ; 3) 与 B 组比较  $P < 0.01$   
在增生早期、增生中晚期、分泌早期、分泌中晚期各组内, VDR 蛋白峡部、壶腹部、伞部比较  $P > 0.05$



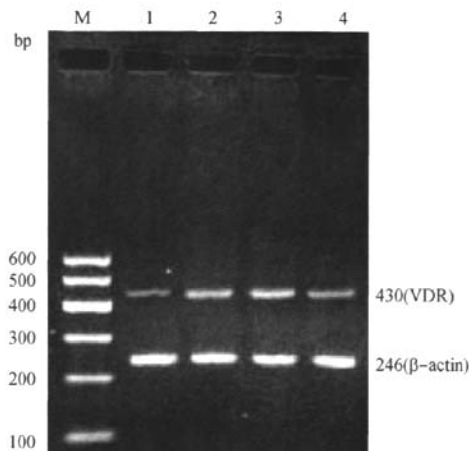
A:增生早期; B、C:增生中晚期; D、E:分泌早期; F:分泌中晚期; G:阳性对照(乳腺癌组织); H:阴性对照

图1 VDR蛋白在人输卵管黏膜上皮的表达(标尺, 20 μm.)

## 2.2 VDR mRNA 在人输卵管黏膜上皮的表达

4 组人输卵管壶腹部黏膜上皮组织标本行 RT-PCR 法检测,在 430 bp 和 246 bp 片段大小的位置出现两条清晰的条带,显示人输卵管黏膜上皮存在 VDR mRNA 表达,见图 2。

VDR 与  $\beta$ -actin mRNA RT-PCR 产物电泳条带积分光密度比值显示:随月经周期变化,壶腹部输卵管黏膜上皮 VDR mRNA 表达在增生早期和分泌中晚期较低,与增生早期、分泌中晚期比较,在增生中晚期和分泌早期其表达明显增高( $P < 0.01$ ),见表 1。



M: 100 bp DNA 标志 1: 增生早期; 2: 增生中晚期; 3: 分泌早期; 4: 分泌中晚期

图2 VDR mRNA 在人输卵管黏膜上皮表达的 RT-PCR 电泳结果

## 3 讨论

VDR 广泛分布于机体多种器官、组织与细胞,介导多个系统器官的生理功能<sup>[1-4,7-8]</sup>。输卵管是雌(女)性生殖系统的组成部分,在配子转运、成熟、受精以及早期胚胎发育等过程中发挥其生殖生理作用。Johnson 等<sup>[4]</sup>应用多克隆抗体在大鼠输卵管上皮细胞核内检测到 VDR 的抗原表位。然而,迄今未见 VDR 是否在其它种属包括人输卵管组织中表达的详细描述。本实验在人输卵管黏膜上皮检测到 VDR 蛋白及其 mRNA 表达,由于  $\text{Ca}^{2+}$  在机体器官组织广泛分布,参与人类输卵管的多种功能,且 VDR 与细胞  $\text{Ca}^{2+}$  转运密切相关,推测 VDR 可能与人类输卵管的生理功能有关。

本研究结果显示 VDR 蛋白不仅表达于输卵管

黏膜上皮细胞核内,在部分间质平滑肌细胞核内亦可见表达,与在大鼠的研究结果不完全一致<sup>[4]</sup>,可能与不同生物种属输卵管组织细胞 VDR 的表达存在差异有关,实验方法的不同亦可能导致检测结果的差异。本实验结果中少数输卵管黏膜上皮细胞浆内呈淡黄或浅棕黄色显色。由于胞浆内存在核糖体、内质网、高尔基体等执行蛋白合成、加工及转运等功能的细胞器,浅棕黄色显色可能是胞浆内正处于生物合成、修饰或转运状态的 VDR 蛋白。内质网、线粒体等细胞器内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度较高,并通过转运  $\text{Ca}^{2+}$ ,调节  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,VDR 亦与  $\text{Ca}^{2+}$  转运密切相关,推测胞浆浅棕黄色显色也可能是内质网、线粒体等细胞器内存在 VDR 蛋白表达。但不能排除实验过程中局部胞浆内物质与抗体结合,产生非特异性染色的可能。VDR 蛋白是否在人输卵管黏膜上皮细胞浆内表达,尚待进一步研究。

输卵管峡部、壶腹部与伞部具有不同的组织结构及生理特点,彼此协调共同完成输卵管的生理功能<sup>[9]</sup>。本实验结果显示,在月经周期同一时期各不同节段输卵管黏膜上皮细胞 VDR 蛋白表达无显著差异,推测 VDR 可能与人类输卵管峡部、壶腹部与伞部各不同节段特异性功能的发挥与维持无关。

输卵管黏膜上皮在雌、孕激素的影响下,随月经周期而变化<sup>[9-11]</sup>。本实验表明,在月经周期不同时期,输卵管黏膜上皮细胞 VDR 蛋白及壶腹部黏膜上皮组织 VDR mRNA 表达均在增生早期和分泌中晚期较低,在增生中晚期和分泌早期显著升高,具有周期性变化,提示人类输卵管黏膜上皮 VDR 表达可能受卵巢雌、孕激素调节,尤其 VDR 蛋白在增生中晚期和分泌早期明显增高,在分泌早期达最高值,此时正是发生排卵、配子转运、受精、早期胚胎发育等生殖事件的关键时期,推测人输卵管黏膜上皮细胞 VDR 可能通过缓冲排卵、受精、早期胚胎发育等过程中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化,保障这一系列生殖事件的顺利进行。

本实验免疫组化检测显示,分泌早期人输卵管黏膜上皮细胞 VDR 蛋白表达明显高于增生中晚期,RT-PCR 检测则显示,分泌早期与增生中晚期人输卵管壶腹部黏膜上皮组织 VDR mRNA 表达差异无显著性,出现分泌早期 VDR 蛋白及其 mRNA 定量的不一致,可能是由于两种图像分析的测定方法均

属于半定量范畴,两者间存在一定的误差。另外,VDR mRNA 测定的实验标本为壶腹部输卵管黏膜上皮组织,不能完全排除输卵管肌层,而在免疫组化检测中,部分输卵管间质平滑肌细胞内亦存在 VDR 蛋白表达,因此未能排除输卵管间质 VDR mRNA 表达对检测结果的影响,可能也导致 mRNA 与蛋白检测的不一致。

综上,人输卵管黏膜上皮存在 VDR 蛋白及其 mRNA 表达,在增生中晚期和分泌早期其表达明显增高,且具有周期性变化。VDR 在雌(女)性输卵管的功能及其调控机制有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] VILLENA-HEINSEN C, MEYBERG R, AXT-FLIEDNER R, et al. Immunohistochemical analysis of 1, 25-dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-receptors, estrogen and progesterone receptors and Ki-67 in ovarian carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(4): 2261 - 2267.
- [2] VIGANÒ P, LATTUADA D, MANGIONI S, et al. Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system[J]. *J Mol Endocrinol*, 2006, 36(3): 415 - 424.
- [3] REICHRATH J, RAFI L, MÜLLER S M, et al. Immunohistochemical analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in cervical carcinoma[J]. *Histochem J*, 1998, 30(8): 561 - 567.
- [4] JOHNSON J A, GRANDE J P, ROCHE P C, et al. Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in rat reproductive tissues[J]. *Histochem Cell Biol*, 1996, 105(1): 7 - 15.
- [5] NOYES R W, HERTIG A T, ROCK J. Dating the endometrial biopsy[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1975, 122(2): 262 - 263.
- [6] 申 洪, 陆药丹. 免疫组织化学染色的定量方法研究[J]. *生物医学工程杂志*, 1993, 10(3): 281 - 284.
- [7] NORMAN A W, ISHIZUKA S, OKAMURA W H. Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, 76(1 - 5): 49 - 59.
- [8] CORBETT S T, HILL O, NANGIA A K. Vitamin D receptor found in human sperm[J]. *Urology*, 2006, 68(6): 1345 - 1349.
- [9] LYONS R A, SARIDOGAN E, DJAHANBAKHCH O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia[J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(4): 363 - 372.
- [10] DONNEZ J, CASANAS-ROUX F, CAPRASSE J, et al. Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life[J]. *Fertil Steril*, 1985, 43(4): 554 - 559.
- [11] VERHAGE H G, BAREITHER M L, JAFFE R C, et al. Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women[J]. *Am J Anat*, 1979, 156(4): 505 - 521.

[责任编辑:朱颖娜]