

妊娠家兔子宫交感神经分布的变化——HRP 法研究

陈耀星 胡满 王子旭 邓泽沛

(中国农业大学动物医学院)

摘要 利用辣根过氧化物酶(HRP)顺向追踪法,研究了家兔子宫交感神经的分布及妊娠后的变化。结果发现,HRP 标记的交感神经纤维分布于子宫壁各层,其中内膜和环形肌层最多,神经纤维的直径为 3~ 9 μm ,平均为 $(5.92 \pm 0.23) \mu\text{m}$ 。光镜下对子宫切片整个横断面计数发现,妊娠组(妊娠 18 d)与非妊娠组相比,妊娠子宫各段 HRP 标记神经纤维数量显著下降($P < 0.01$),表明妊娠子宫交感神经数量减少。除数量变化外,妊娠组子宫 HRP 标记神经纤维直径也有减小的趋势。讨论了对妊娠子宫交感神经数量减少的意义。

关键词 兔; 子宫; 妊娠; 交感神经; 辣根过氧化物酶

分类号 S852.1

Studies on Changes of the Sympathetic Inervation during Pregnancy in the Uteri of Rabbits with HRP Method

Chen Yaoxing Hu Man Wang Zixu Deng Zepei

(College of Veterinary Medicine, CAU)

Abstract Horseradish peroxidase (HRP) was injected into the caudal mesenteric ganglia of rabbits to investigate the changes of uterine sympathetic nerves during pregnancy. The results showed that the nerves labelled with HRP demonstrated in every layer of the uterus and were abundant in the endometrium and circular smooth muscle layers. The diameters of the nerve fibers were approximately 3~ 9 μm , average $(5.92 \pm 0.23) \mu\text{m}$. The amount of the labelled nerves decreased greatly in the pregnant groups ($P < 0.01$). Moreover, the diameter of the nerves in the pregnant uterus also decreased during pregnancy. The possible physiological role of the changes in the uterine sympathetic nerve after pregnancy was discussed.

Key words rabbit; uterus; pregnancy; sympathetic nerve; horseradish peroxidase

关于子宫植物性神经分布的研究,到目前只见于用荧光组织化学法和乙酰胆碱酯酶染色法分别对其肾上腺素能神经和胆碱能神经进行的观察。由于植物性神经的递质不仅仅限于儿茶酚胺和乙酰胆碱^[1],这些方法又有易漏检和特异性差的缺点^[2,3],因此不能充分、直接而确切地反映 2 种神经的分布情况。尤其是妊娠子宫植物性神经是否发生变化及变化程度的报道还不一致,如有报道豚鼠妊娠子宫肾上腺素能神经的荧光强度自妊娠期三分之一开始减弱,到分娩时消失^[4]。组织化学法的研究也表明妊娠后期大鼠子宫肾上腺素能神经数量减少^[5]。而

收稿日期: 2000-03-22

国家自然科学基金资助项目(39500108)

陈耀星,北京海淀区圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区),100094

胡满,河北省宣化县张家口农业高等专科学校,075131

Renegar 等则报道,绵羊子宫肾上腺素能荧光纤维在妊娠第 65 天开始减少,105 天时已很少,但测得子宫肌每微克 DNA 表达的去甲肾上腺素(NE)浓度未受妊娠的影响,表明妊娠过程中 NE 在子宫中含量无明显变化^[6]。另外,Thilander 发现猪子宫在妊娠过程中主要见到肾上腺素能神经纤维直径减少,除子宫中段外其余部分神经纤维数量未见明显减少^[7]。因此,交感神经在子宫壁分布及妊娠后的变化情况还有待于进一步研究。辣根过氧化物酶能有效地特异标记神经元,克服荧光组织化学染色特异性较差的不足,所以本研究采用辣根过氧化物酶(HRP)顺向追踪法,对家兔子宫壁交感神经的分布及妊娠后的变化进行观察,为生殖生理学和生殖免疫学提供形态学资料。

1 材料和方法

1.1 材料

选用健康成年雌性新西兰白兔 8 只,分非妊娠组和妊娠组,每组 4 只。其中非妊娠组为青年兔,妊娠组为妊娠 18 d 的初孕兔。

1.2 方法

实验动物用混合麻醉剂(配方:戊巴比妥钠 5.0 g,无水乙醇 10.5 mL,1,3-丙二醇 40.0 mL,蒸馏水 49.5 mL)经耳缘静脉注射麻醉后($0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (体重)),用常规手术方法打开腹腔,将 $40 \mu\text{L}$ 20% 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP, 上海丽珠东风生物技术有限公司提供, RZ 30)溶液引入实验兔的肠系膜后神经节内。动物存活 48 h 后,从腹主动脉向后注入灌流液,同时剪开后腔静脉。灌流液的顺序:3.8% 柠檬酸钠溶液 200 mL,温生理盐水 800 mL,含 1% 多聚甲醛和 1.25% 戊二醛的磷酸缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4, 4) 600 mL, 10% 蔗糖磷酸缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4, 4) 300 mL。从每侧子宫角、子宫体和子宫颈各取 5 mm 长的材料:左侧的编为 1, 2 和 3 号;右侧材料编为 4, 5, 6 号。浸入 30% 蔗糖磷酸缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4, 4)内过夜。制作 $50 \mu\text{m}$ 厚的冰冻切片,1, 2, 3 号材料做横切,4, 5, 6 号材料做纵切。按 Mesulam (1976)^[8]的联苯胺(BDHC)法进行呈色反应。光镜下观察 HRP 标记神经的形态及在子宫壁各层的分布情况,并每隔 5 张切片取 1 张切片计数该切片全横断面的 HRP 标记神经纤维的数量,以及随机测量 50 根 HRP 标记神经纤维的直径。

2 结果

2.1 HRP 标记神经在子宫中的分布

BDHC 呈色的 HRP 标记神经纤维呈蓝色或蓝绿色,直径 $3 \sim 9 \mu\text{m}$ 。横断面的神经纤维呈密集或散在排列的颗粒状;纵断面的神经呈串珠状。子宫壁各层均有 HRP 标记神经纤维分布,其中以子宫内层和环行肌层较多。子宫内层的上皮下、腺体旁和血管旁,肌层的肌束旁、血管旁均见有 HRP 标记神经纤维的分布。标记神经纤维在子宫角、子宫体和子宫颈分布均很丰富,但以子宫颈的分布密度最高(图 1)。

2.2 HRP 标记神经计数与测量

妊娠组和非妊娠组相比,妊娠兔子宫各段 HRP 标记神经纤维的数目大幅度减少($P < 0.01$),如非妊娠兔子宫角的每横断面上 HRP 标记神经纤维数为 (669 ± 23) 个,而妊娠兔子宫

角减少至 (264 ± 15) 个, 减少幅度达 39.5% (图 1)。比较妊娠家兔子宫各段的变化, 以妊娠子宫体的减少幅度较大(41%)。神经纤维直径也有减少, 妊娠组的 HRP 标记子宫神经纤维直径为 (4.88 ± 0.19) μm , 而非妊娠组为 (5.92 ± 0.23) μm , 但减小的幅度不大, $P < 0.05$ 。

3 讨论

家兔腹下神经(从肠系膜后神经节到盆腔脏器)是支配子宫交感神经的惟一来源^[9-11], 因此本试验从肠系膜后神经节引入 HRP 后, 在子宫观察到的 HRP 标记神经纤维反映了家兔子宫交感神经的分布情况。HRP 标记神经纤维位于子宫壁血管

旁、肌层肌束间及肌束内, 且在子宫内膜分布丰富, 提示兔交感神经可能活化 α -肾上腺素受体^[12], 对子宫血流的调节和肌层平滑肌的活动起一定作用。本文在对 HRP 标记神经纤维计数时, 未采用统计切片中单位面积神经数目(密度)的方法, 而是对整张切片全横断面神经纤维数目进行计数, 目的是为了比较妊娠组和非妊娠组相同部位的交感神经分布变化情况, 尽可能地消除妊娠期子宫增大扩张引起的神经密度减小造成的误差。从计数结果可以看出, 家兔妊娠 18 d 时子宫各段 HRP 标记神经纤维数量与非妊娠兔的相比有大幅度减少, 这表明妊娠中后期家兔子宫交感神经数量减少。对于子宫肾上腺素能神经变化的原因, 有研究认为是随着胎体的增长, 胎儿给予子宫壁的压力增加, 慢性的扩张牵引而导致子宫壁内神经发生退行性变化^[5]; 也有认为是受激素调节的影响^[13]。本实验观察到妊娠兔的未孕侧子宫 HRP 标记神经纤维的数量也大幅度减少, 这说明胎儿增大对子宫壁的机械性牵张并非是造成妊娠家兔子宫交感神经数量减少的惟一的和主要的因素, 而性激素的影响可能是更重要的因素。

免疫是机体识别和排除抗原性异物的一种功能。有研究表明, 子宫局部免疫调节是胎儿不被母体排斥的主要机制^[14], 即妊娠时子宫内膜肥大细胞数量减少、子宫局部免疫水平下降^[15]。而免疫系统并不是独立的自我调节系统, 而要接受神经系统的调节^[16]。从子宫局部免疫水平下降与交感神经数量减少变化趋势一致的事实, 我们另一组实验切断植物性神经(包括交感神经)使子宫肥大细胞数量增多、胚胎着床率降低或推迟着床的现象^[17], 以及子宫以外器官的肥大细胞接受神经的支配^[18], 推测交感神经参与子宫局部免疫调节。除了交感神经外, 支配子宫的神经还有胆碱能神经和肽能神经^[19], 这些神经在子宫不同生殖周期的分布变化对于降低子宫免疫水平、使胎儿免受母体排斥的机制中可能起一定作用。

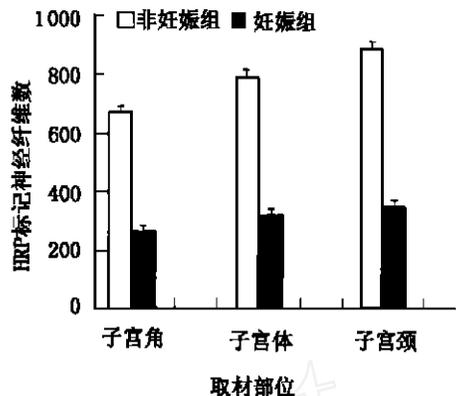


图 1 妊娠组和非妊娠组兔子宫各部交感神经纤维分布数量比较 (全横断面 $\bar{x} \pm s$)

参 考 文 献

- 1 韩济生 神经科学纲要 北京: 北京医科大学-协和医科大学联合出版社, 1993
- 2 Kiernan J. Histological and Histochemical Methods Oxford: Pergamon Press, 1990
- 3 杜卓民 神经解剖学传导通路追踪法 北京: 中国科学出版社, 1987, 254

- 4 Bell C, Macoin S. Observations on the loss of catecholamine fluorescence from intrauterine adrenergic nerves during pregnancy in the guinea pig. *J Reprod Fert*, 1978, 53: 51~ 58
- 5 蔡学琴,周德山,孙瑜,等.大鼠子宫妊娠期植物性神经变化. *解剖学报*, 1987, 18(1): 69~ 73
- 6 Renegar R, Rexroad C. Uterine adrenergic and cholinesterase-positive nerves and myometrial catecholamine concentrations during pregnancy in sheep. *Acta Anatomica*, 1990, 137(4): 373~ 381
- 7 Thilander G. Adrenergic and cholinergic nerve supply in the porcine myometrium and cervix. *J Vet Med Sci*, 1989, A 36: 585~ 595
- 8 鞠躬,万选才,董新文. *神经解剖学方法*. 北京:人民卫生出版社,1985
- 9 Brenda M. The innervation of the cervix and cornu uteri in the rabbit. *J Physiol*, 1952, 117: 317~ 328
- 10 Owmann C, Sjöberg N. Adrenergic nerves in the female genital tract of rabbit. *Z Zellforsch*, 1996, 74: 182~ 197
- 11 Kihara K, Croat W C. Sympathetic efferent pathways projecting to the bladder neck and proximal urethra in the rat. *J Autonomic Nervous System*, 1997, 62: 134~ 142
- 12 Sato Y, Hotta H, Nakayama H, Suzuki H. Sympathetic and parasympathetic regulation of the uterine blood flow and contraction in the rat. *J Autonomic Nervous System*, 1996, 59: 151~ 158
- 13 Spornong B, Alm P, Owmann C. Pregnancy is associated with extensive adrenergic nerve degeneration in the uterus. *Neuroscience*, 1981, 6: 11~ 19
- 14 胡树新. 局部免疫调节是胎儿不被母体排斥的主要机制. *国外医学免疫学报*, 1991, 14(1): 1~ 5
- 15 Deng Z, Liu Y, Zhou Z. Quantitative studies on mast cells and histamine in the endometrium of cow and sheep. *China Veterinary Science*, 1994, 1(1): 50~ 55
- 16 朱长庚. 免疫-神经-内分泌网络. *解剖学报*, 1993, 24(2): 216~ 221
- 17 袁学军,乔惠理. 支配子宫的植物性神经对子宫免疫的影响: I. 切断支配子宫的植物性神经对SD大鼠子宫肥大细胞的影响. *中国兽医学报*, 2000, 20(3): 290~ 292
- 18 Baccari G C, Paulis A, Matteo L D, et al. *In situ* characterization of mast cells in the frog *Rana esculenta*. *Cell Tissue Res*, 1998, 292: 151~ 162
- 19 胡满,陈耀星,邓泽沛,王子旭. VIP免疫反应神经纤维在大鼠和小鼠子宫中的分布. *张家口农专学报*, 1999, 15(4): 1~ 3