

热休克蛋白 70 在妊娠早期小鼠子宫中的表达 及雌激素的诱导作用*

张顺利** 魏纪东 张文学 徐存拴

(河南师范大学生命科学学院, 河南省生物工程重点实验室, 河南新乡 453002)

摘要 采用 Western 印迹、免疫组织化学、免疫电镜和图像分析技术研究了妊娠早期小鼠子宫热休克蛋白 70 (Heat shock protein, HSP70) 的表达变化以及雌二醇对子宫 HSP70 表达的影响。结果表明: (1) 与正常小鼠相比, 孕鼠 HSP70 含量显著增多, 且随妊娠日龄的增加而增加 ($P < 0.01$); (2) 小剂量 (0.28 $\mu\text{g/g}$ 体重) 和大剂量 (1.10 $\mu\text{g/g}$ 体重) 雌二醇均可诱导小鼠子宫 HSP70 免疫反应阳性细胞数显著增加 ($P < 0.01$), 但不表现剂量依赖关系; (3) Western 印迹显示雌二醇使子宫 HSP70 蛋白谱带发生改变, 正常小鼠仅有 73 kD 1 条蛋白带, 小剂量组检出 68 kD、72 kD、73 kD 3 条蛋白带, 大剂量组检出 72 kD、73 kD 2 条蛋白带; (4) 电镜下, HSP70 免疫阳性反应定位于子宫内膜基质细胞胞浆与细胞核。这些结果提示, HSP70 可能与蜕膜反应中基质细胞增殖密切相关, 雌二醇对子宫 HSP70 的表达具有明显的诱导作用 [动物学报 49 (3): 345~352, 2003]。

关键词 小鼠 子宫 蜕膜反应 热休克蛋白 70 雌二醇

Expression of HSP70 in early pregnant mouse uteri and effect of estrogen on its synthesis

ZHANG Shun-Li WEI Ji-Dong ZHANG Wen-Xue XU Cun-Shuan

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Henan Bioengineering Key Laboratory, Xinxiang 453002, Henan, China)

Abstract In order to investigate the expression, function and endocrine regulatory mechanism of heat shock protein 70 (HSP70) in early pregnant (D1 - D6) mouse uteri, changes in immunoreactive positive cell count, content and protein bands of HSP70 and the ultrastructure localization of HSP70 in uteri stroma cells under different doses of dihydroxyestrin, were studied using immunohistochemistry, Western blotting, immunoelectron microscopy and image analysis techniques. The results indicate that: (1) positive HSP70 immunoreaction was localized in mouse uterine stroma and decidual cells. (2) HSP70 content increased markedly in pregnant mice and with the progress of gestation, increasing gradually from D1 to D5, peaking at D5 then decreasing from D6; (3) both small (0.28 $\mu\text{g/g}$ weight) and large doses (1.10 $\mu\text{g/g}$ weight) of dihydroxyestrin injected over three days can induce a marked increase in the HSP70 immunoreaction positive stroma cell count in mouse uteri ($P < 0.01$, Control: 52.86 \pm 6.19/eyeshot, 1.10 $\mu\text{g/g}$ weight: 161.28 \pm 13.95/eyeshot); Western blotting analysis showed that dihydroxyestrin also caused distinct changes in HSP70 protein bands; there was just one 73 kD protein band in the control group, three protein bands (68 kD, 72 kD and 73 kD) in the small dose group, and two protein bands (72 kD and 73 kD) in the large dose group ($P < 0.01$); (4) electron microscopy revealed that positive HSP70 immunoreaction was localized in the cytoplasmic matrix and nucleolus of endometrial stroma cells; aurosol granules were localized outside and inside the karyotheca of the same stroma cells and accumulated in a certain region of nucleolus. These results suggest that there is a significant relationship between HSP70 and the proliferation of uterine stroma cell during decidualization, and that dihydroxyestrin has a significant effect on the expression of HSP70 in mouse uteri that is

2002-06-15 收稿, 2002-11-23 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39670372) [The research was funded by a grant from National Natural Science Foundation of China (No. 39670372)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: zsl369@sina.com

第一作者简介 张顺利, 男, 38 岁, 副教授。研究方向: 细胞分化调控的分子机理。

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

not dosage-dependent. One possible mechanism for this effect is that dihydroxyestrin influences the proliferation of uterine stroma cells by stimulating the synthesis of HSP70. There is possibly positive feedback between the regulation of dihydroxyestrin in the endometrium and the expression of HSP70 [*Acta Zoologica Sinica* 49 (3): 346 - 352, 2003].

Key words Mouse, Uteri, Decidualization, Heat shock protein 70, Dihydroxyestrin

热休克蛋白 (Heat shock protein, HSP) 是一类生物界普遍存在、结构保守、分布和作用广泛的蛋白质 (Brown *et al.*, 1996; Piabowol *et al.*, 1998; 徐存拴等, 1999; 张顺利等, 2000)。HSP70 是热休克蛋白家族中最受关注的成员, 目前, 对其在热休克反应和组织损伤中的表达规律和细胞保护功能已有了较深入的认识, 而关于它在生理条件下的合成特点和作用的了解尚有限 (Pechan *et al.*, 1991)。哺乳动物胚胎着床的机制非常复杂, 其必要条件之一是子宫的蜕膜反应, 这种反应又依赖于雌激素和孕酮的协同作用。虽然 Smith *et al.* (1993)、Prapapanich *et al.* (1996) 指出 HSP70 参与了类固醇激素受体复合物的装配和运输, 但迄今为止, 还未见到有关妊娠早期子宫内膜细胞表达 HSP70 的系统研究资料, HSP70 表达与性激素间的关系也无定论 (Koshiyama *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996; 张顺利等, 2002)。因此, 本文研究了妊娠早期小鼠子宫中 HSP70 的表达动态和超微结构定位, 并对 HSP70 与其间子宫内膜基质细胞增殖的相关性以及雌二醇对子宫中 HSP70 表达的诱导效应之间的关系进行了讨论, 以期为进一步阐明蜕膜反应的分子机制提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明系雌性小鼠 150 只, 体重 22 ± 2.0 g, 购自河南省医学实验动物中心, 水食自取。随机分为正常对照组 (动情间期, 20 只)、妊娠组 (90 只) 和雌二醇处理组 (动情间期, 40 只)。妊娠组小鼠按雌、雄 2:1 合笼, 次日晨见阴栓者为妊娠第 1 天 (D1), 依此类推至 D6, 每日龄 15 只。雌二醇处理组又分为小剂量 ($0.28 \mu\text{g/g}$ 体重) 注射组和大剂量 ($1.10 \mu\text{g/g}$ 体重) 注射组, 各 20 只, 每天 8:00~9:00 分别腹腔注射雌二醇 1 次, 连续 3 天, 第 4 天取材。

1.2 主要试剂和化学药品

小鼠抗 HSP70 单抗 (一抗)、碱性磷酸酶标记的马抗小鼠 IgG (二抗)、胶体金 (15 nm 颗粒)

标记的羊抗小鼠 IgG (二抗)、雌二醇、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS、四甲基乙二胺、Tween-20、标准分子量蛋白等均为 Sigma 产品, 生物素标记的羊抗小鼠 IgG (二抗) 和链霉亲和素-辣根过氧化物酶复合物为 Zymed 产品, Tris-base 为 BM 进口分装。

1.3 电泳样品制备与 SDS-PAGE 及 Western 印迹

取上述各组动物子宫以预冷生理盐水冰浴匀浆, 然后离心 ($10\ 000\ \text{g}$, 上海安亭 TGL-16 型高速冷冻离心机) 10 min, 取上清液按 Neuhoff *et al.* (1979) 方法测定蛋白质浓度; 依 Laemmli *et al.* (1970) 方法进行 SDS-PAGE (110 V, 3 h; 200 V, 4 h); 参照 Towbin *et al.* (1979) 方法进行 Western 印迹 (200 mA, 转移 16 h)。将载有蛋白质的硝酸纤维素 (NC) 膜以 PBS/Tween20 洗涤, 2%BSA 封闭非特异性着色 (37 °C, 1 h), 依次以鼠抗 HSP70 抗体 (1:1 000)、碱性磷酸酶标记的马抗小鼠 IgG 二抗 (1:1 000) 于 37 °C 孵育 1 h, NBT-BCIP 显色。

1.4 切片标本制备和免疫组织化学方法

取正常对照组和雌二醇处理组小鼠子宫, 以 4%多聚甲醛固定 20 h, 常规石蜡制片, $6\ \mu\text{m}$ 连续切片, 间隔 $30\ \mu\text{m}$ 取 1 片, 每只动物取 6 片, 按免疫组化链霉亲和素-过氧化物酶 (Streptavidin-peroxidase, SP) 法染色。0.3% H_2O_2 甲醇液封闭内源性过氧化物酶活性, 加一抗前将切片置 0.01 mol/L 的枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 于微波炉内做抗原修复 10 min。加一抗 (1:600), 4 °C 孵育 24 h, 加生物素标记的羊抗小鼠 IgG 和 SP 复合物, 均以 1:200 稀释, 37 °C 孵育 30 min, DAB 显色 (镜下控制时间)。

1.5 超薄切片制备和免疫电镜方法

与上述取材同时, 轻轻剥离子宫内膜, 以 2%多聚甲醛和 2.5%戊二醛混和固定液于 4 °C 固定 1 h, 梯度酒精脱水, Epon812 包埋, $50\ \text{nm}$ 切片, 镍网收集。分别以 1% H_2O_2 蚀刻 10 min, 20%正常羊血清封闭 30 min。先后加一抗 (1:500) 和胶体金标记的羊抗小鼠 IgG (1:300) 分别于 37 °C 孵育 1 h, 5%醋酸铀及 0.2%柠檬酸铅 (pH 8.19)

各复染 5min, JEM-100SX 电镜下观察结果。

Western 印迹、免疫组化、免疫电镜等方法特异性对照均采用 PBS 代替第一抗体, 其余步骤相同。

1.6 凝胶图像分析、细胞计数和统计学处理

用 GIS-1000 凝胶图像分析系统 (Tanon 公司) 分别测算 Western 印迹结果的 HSP70 免疫反应阳性蛋白各条带的强度和面积, 对免疫组化结果则计数每个子宫横断面 HSP70 免疫反应阳性细胞数。统计学方法采用方差分析。

2 结果

2.1 小鼠妊娠早期子宫 HSP70 的表达定位和含量变化

2.1.1 Western 印迹结果 (图 1, 2) 显示, 正常未孕小鼠子宫的 HSP70 免疫反应呈弱阳性, 随妊娠日龄增加, D1 至 D5 呈现出含量逐渐增加的趋势, 于 D5 达高峰, D6 开始减少 ($P < 0.01$)。



图 1 HSP70 在妊娠早期小鼠子宫中表达的 Western 印迹结果

Fig. 1 Expression of HSP70 in early pregnant mouse uterus as shown by the Western blot test

2.1.2 电镜下基质细胞呈多边形, 表面有较多的伪足样突起, 内质网、线粒体较发达。HSP70 免

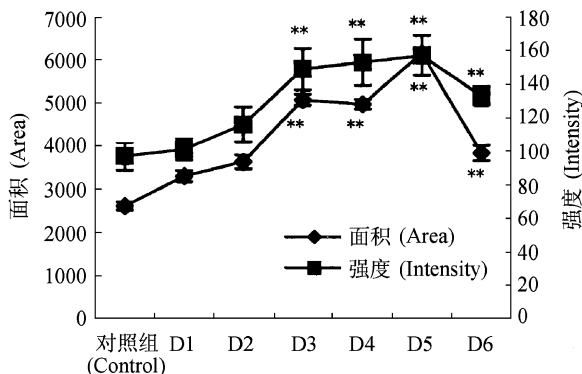


图 2 HSP70 在妊娠早期小鼠子宫中的表达
Fig. 2 Expression of HSP70 in early pregnant mouse uterus as revealed by image analysis

D: 天 (Day) ** $P < 0.01$

疫阳性反应为黑色颗粒, 与胞浆分泌颗粒很易区别。胶体金颗粒分布于蜕膜基质细胞胞浆、胞核 (图版 : 2, 3) 及内质网, 线粒体等其他细胞器未见胶体金颗粒分布。

2.2 雌二醇对小鼠子宫 HSP70 表达的影响

2.2.1 免疫电镜结果同妊娠组小鼠 (图版 : 4)。

2.2.2 免疫组化 SP 法显示的免疫反应阳性部位呈棕黄色, 背景无色, 对比清晰。雌二醇处理在使子宫基质细胞增多及内膜增厚的同时, 对子宫 HSP70 的表达也具有明显诱导作用, 但不表现剂量依赖关系。子宫 HSP70 免疫反应阳性细胞数 ($\bar{X} \pm S$) 在正常对照组、小剂量组、大剂量组分别为 52.86 ± 6.19 、 247.34 ± 17.54 、 161.28 ± 13.95 (图版 : 5~8), 后两组与正常对照组相比均有显著差异 ($P < 0.01$)。

2.2.3 Western 印迹发现在正常对照组仅有 73 kD 1 条蛋白带, 而小剂量组为 68 kD、72 kD 和 73 kD 3 条蛋白带, 大剂量组则检出 72 kD、73 kD 2 条蛋白带。各组动物蛋白带强度面积和图像分析结果分别如图 3、4、5 所示。

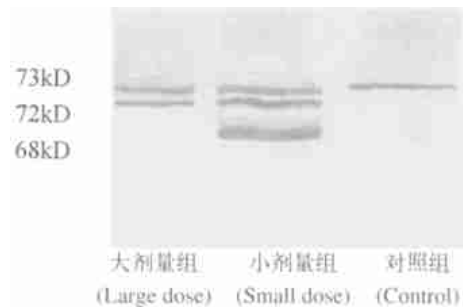


图 3 雌二醇对小鼠子宫 HSP70 表达影响的 Western 印迹结果

Fig. 3 Effect of dihydroxyestrin on HSP70 expression in the mouse uterus as revealed by the Western blot test

Western 印迹、免疫组化、免疫电镜方法特异性对照实验均呈阴性。

3 讨论

以往对 HSP70 的研究主要集中在它所参与的热休克反应, 并揭示了其细胞保护作用 (Brown *et al.*, 1996; Piabowol *et al.*, 1998; 张顺利等, 2000)。由于发现 HSP70 参与细胞增殖 (Pechan, 1991)、胚胎发育 (Hcikkila, 1993)、生物活性分子如激酶、受体和转录因子的活性调节 (Rutherford *et al.*, 1994) 等, 因此, 生理条件下 HSP70

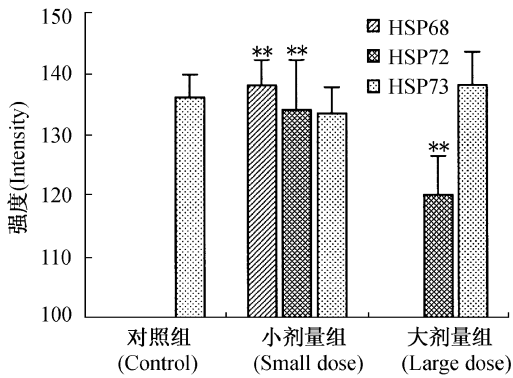


图 4 雌二醇对小鼠子宫 HSP70 表达影响的 Western 印迹结果强度分析

Fig. 4 Western blot intensity analysis of the effect of dihydroxyestrin on HSP70 expression in the mouse uterus

** $P < 0.01$ 与对照组相比 (Contrast with control)

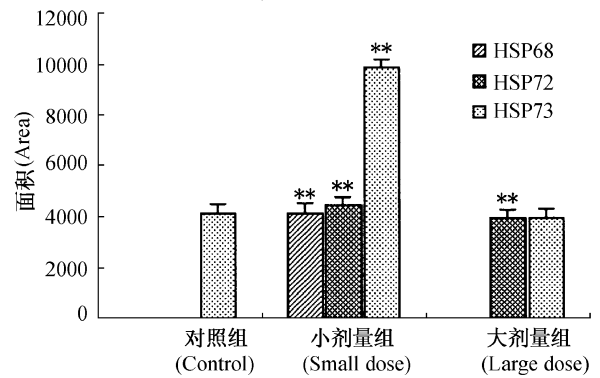


图 5 雌二醇对小鼠子宫 HSP70 表达影响的 Western 印迹结果面积分析

Fig. 5 Western blot area analysis of effect of dihydroxyestrin on HSP70 expression in the mouse uterus

* * $P < 0.01$ 与对照组相比 (Contrast with control)

的合成及其基因表达调控就逐渐成为许多学者新的研究热点。蜕膜反应对于胚泡着床和早期胚胎发育有重要意义, 这种反应的主要特点是在雌、孕激素的双重调节下子宫基质细胞、子宫腺和血管的大量增生。然而各种类固醇激素生理效应的大小取决于靶细胞中激素的浓度、相应受体的含量以及二者结合能力的强弱。Pechan (1991)、Stoklosinski (1992) 先后指出无论在正常组织中或是应激条件下, 热休克蛋白在细胞增殖中都起重要作用。随后免疫共沉淀实验又证实从网状细胞内提取的类固醇激素受体复合物中含有 HSP70, 后者参与了受体复合物前体与中间体的组成 (Prapapanich *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996)。依据这些事实, 我们推测 HSP70 可能参与了蜕膜反应中基质细胞的增殖。基于这一推测, 我们首先用免疫组织化学方法分析了 HSP70 在小鼠蜕膜反应中的表达, 发现 HSP70 免疫阳性反应主要定位于子宫内膜基质细胞, 且阳性细胞数随妊娠天数增加而增加 (张顺利等, 2002)。在此基础上, 本文 Western 印迹结果进一步证实, 与正常对照组小鼠相比, 妊娠早期子宫 HSP70 含量显著增加, 且呈现随妊娠日龄增加而增加的总体趋势, 在 D5 达最高峰, 而 D5 恰为小鼠胚泡的着床日, 并在着床后的 D6 仍维持在相当高的水平 ($P < 0.01$)。也有作者观察到人分泌期子宫内膜中 HSP70 的表达强于增生期 (Koshiyama *et al.*, 1995), 这与我们的结果相似。但人子宫内膜中 HSP70 的含量在整个月经周期中却无变化 (Koshiyama *et al.*, 1995; Wataba *et al.*,

2001)。此外, HSP70 参与细胞有丝分裂级联信号蛋白特别是苏氨酸激酶、酪氨酸激酶等的活化过程 (Helmbrecht *et al.*, 2000)。因此, 我们推测 HSP70 与妊娠早期子宫内膜基质细胞的增殖密切相关。由于 HSP70 首先在热休克反应中被发现, 因此普遍认为 HSP70 的主要功能为提高细胞对不利环境的抵抗能力, 并发现 HSP70 基因表达的同时, 细胞内大多数功能蛋白质的合成被抑制, 细胞周期进程出现延迟现象。然而与热休克反应不同的是, 蜕膜反应中存在大量基质细胞的增殖, 所以生理条件下细胞大量合成 HSP70 的同时, 其他基因的表达调控规律不同于应激情况。

关于 HSP70 在妊娠早期子宫内膜基质细胞的超微结构定位问题迄今未见报道。本文免疫电镜结果表明, HSP70 免疫阳性反应存在于基质细胞胞浆、内质网, HSP70 在这些部位的表达显然有助于其发挥分子伴侣作用, 引导新生肽链的正确折叠; 同时特别值得注意的是, 我们观察到胶体金颗粒分布于同一基质细胞核的核膜外侧、内侧直至于核内某一部位的较多堆积。由于 HSP70 不参与成熟类固醇激素受体复合物的组成, 也不随激素-受体复合物一同进入核内 (Prapapanich *et al.*, 1996); 而另有资料表明, HSP70 与细胞周期控制系统中 Cdk4、pRb、p53 以及 p27 等关键调节分子的核内定位密切相关, 在细胞周期进程中发挥重要作用 (Helmbrecht *et al.*, 2000)。因此, HSP70 的这种核内定位提示其在妊娠早期的基质细胞内通过介导类固醇激素受体复合物的装配而发挥作用的同时,

另有独立于这种作用之外的其他功能,但其确切机理有待深入研究。在蜕膜反应中,一方面随着基质细胞内 HSP70 含量的增加,有助于类固醇激素受体复合物的装配和运输,从而扩大了激素的作用效应;另一方面随着雌激素作用效应的增强,促进 HSP70 mRNA 的合成 (Wu *et al.*, 1996),进而又可促进基质细胞增殖时依赖于 HSP70 的大量新生肽链的折叠、组装和转运,有利于细胞增殖。在激素和 HSP70 之间构成一个相互促进的正反馈调节。随着热休克蛋白家族的另一成员 HSP90 与受体复合物的结合, HSP70 与之解离,并可能因此改变受体复合物的核酸亲和结构域的构象,受体复合物进入细胞核与 DNA 结合,开启某些基因,进而促进细胞的增殖 (Smith *et al.*, 1993)。

雌激素和孕激素在蜕膜反应发生和维持中的作用早已为人们所认识,但孕激素的绝大部分作用必须在雌激素作用的基础上才能进行。雌激素可上调子宫内孕激素受体蛋白的含量,孕酮能下调细胞内孕激素受体蛋白的含量,抗孕激素药物治疗则能升高子宫内孕激素受体蛋白的表达水平 (Read *et al.*, 1988)。在非孕母羊的研究中发现,孕酮不能影响子宫内膜中 HSP70 和 HSP90 mRNA 的含量,但却抑制雌激素的刺激作用 (Wu *et al.*, 1996)。我们通过研究外源性雌二醇对小鼠子宫内膜 HSP70 表达的诱导效应,以期阐明蜕膜反应的调控机制提供新的分子依据。免疫组化结果显示, HSP70 免疫反应主要定位于子宫内膜基质细胞,也发现,两种剂量的雌二醇在促进子宫内膜基质细胞增殖、内膜增厚的同时,使小鼠子宫内膜中 HSP70 阳性基质细胞显著增多,但不表现剂量依赖关系,大剂量注射雌二醇组反而较小剂量组少; Western 印迹结果也表明,雌二醇处理可诱导小鼠子宫 HSP70 含量增加。从而证实雌二醇可以调节子宫内膜基质细胞 HSP70 的合成,也提示雌二醇对基质细胞的影响存在一种新的机制,即雌二醇可通过刺激 HSP70 的合成调节该细胞的增殖。而雌二醇可能是通过增强热休克因子的活性(我们已在相关研究中观察到此现象)以促进 HSP70 的表达的。临床上可见假黄体功能不全患者,其血中孕激素水平并不低,但子宫内膜中受体复合物含量减少,造成子宫内膜对孕激素的反应能力降低,致使子宫内膜分泌延迟而不育 (戴林等, 2000)。本文结果表明适量补充雌激素能促进子宫内膜中 HSP70 的表达,具有实际意义。Western 印迹结果

还发现,大剂量注射组小鼠子宫除表达正常对照组所具有的 73 kD 蛋白带之外,新出现了 1 条 72 kD 的蛋白带,而小剂量注射组则显示 73 kD、72 kD、68 kD 3 条蛋白带。这可能是在不同剂量雌二醇作用条件下,70 kD 的 HSP 的修饰和降解方式不同,其生理意义和调节机制有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- Angela S., H. Kruse, C. R. Landsberg and L. Rensing 1992 Effect of heat shock on neuroblastoma (NIE 115) cell proliferation and differentiation. *Exp. Cell. Res.* **200** (1): 89~96.
- Brown, C. R., L. Q. H. Brown and S. J. Doxsey 1996 Molecular chaperones and the centrosome. *J. Biol. Chem.* **271** (2): 833~840.
- Chen, S. Y., V. Prapapanich, R. A. Rimerman, B. Honore and D. F. Smith. 1996 Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins HSP90 and HSP70. *Mol. Endocrinol.* **10**: 682~693.
- Dai, L., H. Shen, Y. Z. Yu, Y. D. Wang, W. L. Zuo and X. Kan 2000 Endometrial nuclear progesterone receptor in infertile women. *Chin. J. Pathol.* **29** (3) 184~187. [戴林, 沈浣, 虞有智, 王一丁, 左文莉, 阚秀 2000 不孕患者子宫内膜孕激素受体研究. *中华病理学杂志* **29** (3): 184~187.]
- Heikkila, J. J. 1993 Heat shock gene expression and development. *Developmental Genetics* **14** (1): 87~91.
- Helmbrecht, K., E. Zeise and L. Rensing 2000 Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif.* **33** (6): 433~365.
- Karl, T. R., L. A. Mizzen and J. W. William 1988 Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against HSP70. *Science* **242** (21): 433~436.
- Koshiyama, M., I. Konishi, K. Nanbu, M. Mandai, T. Komatsu, S. Yamamoto, T. Mori and S. Fujii 1995 Immunohistochemical location of heat shock protein HSP70 and HSP90 in the human endometrium: correlation with sex steroid receptors and ki-67 antigen expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80** (4): 1106~1112.
- Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins in the assembly of the head bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680~685.
- Neuhoff, V., K. Philipp and H. G. Zimmer 1979 A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Physiol. Chem.* **360**: 1657~1670.
- Paul, M. P. 1991 Heat shock proteins and cell proliferation. *Federation of European Biochemical Societies* **280** (1): 1~4.
- Prapapanich, V., S. Y. Chen, S. C. Nair, R. A. Rimerman and D. F. Smith 1996 Molecular cloning of human p48, a transient component of progesterone receptor complexes and an HSP70-binding protein. *Mol. Endocrinol.* **10**: 420~431.
- Read, L. D., C. E. Snider, J. S. Miller, G. L. Greene and B. S. Katzenellenbogen 1988 Ligand modulated regulation of proges-

- terone receptor messenger ribonucleic acid and protein in human breast cancer cell lines. *Mol. Endocrinol.* **2** (3): 263 ~ 271.
- Rutherford, S. L. and C. S. Zuker 1994 Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell* **79** (7): 1 129 ~ 1 132.
- Smith, D. F. and D. O. Toft 1993 Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.* **7**: 4 ~ 11.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Pro. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4 350 ~ 4 354.
- Wataba, K., T. Satio, K. Fukunaka, K. Ashihara, M. Nishihimura and R. Kudo 2001 Over-expression of heat shock protein in carcinogenic endometrium. *Int. J. Cancer* **91** (4): 448 ~ 456.
- Wu, W. X., J. B. Derks, Q. Zhang and P. W. Nathanielsz 1996 Changes in heat shock protein-90 and -70 messenger ribonucleic acid in uterine tissues of the ewe in relation to parturition and regulation by estradiol and progesterone. *Endocrinol.* **137** (12): 5 685 ~ 5 693.
- Xu, C. S., M. Xia, A. L. Lu, X. Y. Li, Y. H. Li, X. Y. Zhao and Y. H. Hu 1999 Changes in the content and activity of HSP70/HSC68, proteinase and phosphatase during liver regeneration. *Acta Physiol. Sin.* **51** (5): 548 ~ 556. [徐存拴, 夏民, 卢爱灵, 李效阳, 李永辉, 赵绪永, 胡轶红 1999 热休克蛋白、蛋白水解酶和磷酸酶在肝再生中的含量和活性变化. *生理学报* **51** (51): 548 ~ 556.]
- Zhang, S. L., M. Guo, X. S. Zhang, W. X. Zhang, X. Y. Li and C. S. Xu 2000 Study on the expression of HSP70 induced by heat shock in mouse hepatocytes. *J. Anat.* **23** (4): 329 ~ 332. [张顺利, 郭玫, 张新胜, 张文学, 李效阳, 徐存拴 2000 热休克诱导小鼠肝细胞表达热休克蛋白 70 的研究. *解剖学杂志* **23** (4): 329 ~ 332.]
- Zhang, S. L., J. D. Wei, J. T. Li, W. X. Zhang, L. S. Yang and C. S. Xu 2002 The immunohistochemical study of heat shock protein 70 in mouse endometrium during early pregnancy. *J. Anat.* **25** (1): 21 ~ 24. [张顺利, 魏纪东, 李金亭, 张文学, 杨林松, 徐存拴 2002 妊娠早期小鼠子宫内膜热休克蛋白 70 的免疫组织化学研究. *解剖学杂志* **25** (1): 21 ~ 24.]

图版说明 (Explanation of Plate)

图 版 (Plate)

1. 示小鼠子宫内膜基质细胞免疫电镜阴性对照 [Negative control of stroma cells in mouse endometrium by immunoelectron microscope] $\times 8\ 000$
2. 示电镜下金颗粒 () 分布于正常小鼠子宫内膜基质细胞 [Collaurem granules () distribute of stroma cells in normal mouse endometrium] $\times 15\ 000$
3. D5 小鼠子宫内膜基质细胞内金颗粒 () 分布于胞浆基质及核内特定区域 [Collaurem granules () distribute in cytoplasm matrix and specific area of the nucleolus] $\times 15\ 000$
4. 小剂量雌二醇注射组小鼠子宫内膜基质细胞 (N) 内金颗粒 () [Collaurem granules () in nucleolus (N) of the endometrial stroma cells in small dose dihydroxyestrin injecting group mouse] $\times 15\ 000$
5. 示正常小鼠子宫内膜 HSP70 阳性细胞 () [Showing HSP70 immunoreaction (IR) positive cells () in normal mouse endometrium] $\times 200$
6. 大剂量雌二醇注射组小鼠子宫内膜 HSP70 阳性细胞 () 增多 [HSP70 IR positive cells () increase in large dose dihydroxyestrin injecting group mouse endometrium] $\times 200$
7. 小剂量雌二醇注射组小鼠子宫内膜 HSP70 免疫反应阳性细胞 () 显著增多 [HSP70 IR positive cells () increased remarkably in small dose dihydroxyestrin injecting group mouse endometrium] $\times 200$
8. 小剂量雌二醇注射组小鼠子宫内膜基质细胞呈 HSP70 免疫阳性反应 (), 腺上皮为阴性 () [Endometrium stroma cells appear HSP70 IR positive (), glandular epithelium cells appears negative () in small dose dihydroxyestrin injecting group mouse] $\times 400$

