

# 17 $\beta$ -雌二醇快速诱导静止状态小鼠囊胚细胞 胞内钙离子增加

喻琳麟 胡颖 张金虎 何亚平 岳利民\*

(四川大学华西基础医学与法医学院生理教研室, 成都 610041)

**摘要** 用钙离子荧光探针 fluo-3/AM 标记囊胚细胞内钙离子, 用激光共聚焦扫描显微镜连续检测 17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -E<sub>2</sub>)作用所致囊胚胞内钙离子浓度的动态变化, 用荧光显微镜检测偶联牛血清白蛋白的 17 $\beta$ -雌二醇(E<sub>2</sub>-BSA)所致囊胚胞内钙离子浓度的改变, 以及在去钙镁 M2 液、传统雌激素受体阻断剂 tamoxifen 和磷脂酶 C 特异抑制剂 U73122 作用下 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 所致囊胚细胞内钙离子浓度的改变。结果显示: 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 和 E<sub>2</sub>-BSA 均可引起静止状态囊胚细胞内 [Ca<sup>2+</sup>] 的快速升高; 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 诱导的囊胚细胞内 [Ca<sup>2+</sup>] 的快速升高不依赖于胞外钙离子的内流, 且不被传统雌激素受体阻断剂所阻断, 而磷脂酶 C 特异性抑制剂可明显抑制该效应。

**关键词** 雌激素; 小鼠囊胚; 钙离子

着床是一个复杂的生物学过程。雌激素对于这一过程的实现起着十分重要的作用, 它不仅可以促进子宫内膜着床窗口的开放, 同时还促进囊胚的激活, 使着床过程得以实现。Paria 等<sup>[1]</sup>利用延迟着床模型研究发现, 去卵巢小鼠如仅给予孕激素, 小鼠胚胎一直处于静止状态, 游离于宫腔内不能植入, 但一旦给予雌激素, 囊胚能够快速附着并植入子宫内膜。显然, 雌激素对于囊胚具有快速激活效应。然而, 雌激素对囊胚的快速激活作用尚未得到研究, 其快速作用的机制也不清楚。传统的雌激素对靶细胞的作用是通过与胞浆或核受体结合产生的基因组效应而发挥作用。近年来, 越来越多的研究证明, 除了传统的基因组效应外, 雌激素对多种细胞, 如心肌细胞、神经细胞等的作用还存在有快速的非基因组效应。即首先通过与细胞膜受体或膜上的结合位点结合之后, 经跨膜信号传递的方式使胞内产生第二信使物质, 进而导致细胞功能状态的改变<sup>[2]</sup>。在雌激素引起的快速非基因组效应中, 胞内游离 Ca<sup>2+</sup> 的变化往往十分迅速, 并由此进一步触发一系列的胞内事件<sup>[3]</sup>, 因此, 在国内、外所进行的雌激素快速非基因组效应的研究中, 钙离子常被作为一个重要的信号分子而受到关注。

本课题拟设计不同实验因素作用于囊胚, 然后检测细胞内游离 Ca<sup>2+</sup> 的变化, 目的在于研究雌激素对囊胚的快速激活作用及其机制, 以进一步阐明着床的分子生物学机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -E<sub>2</sub>), 偶联牛血清白蛋白的 17 $\beta$ -雌二醇(E<sub>2</sub>-BSA), 磷脂酶 C 特异性抑制剂 U73122, 传统雌激素受体阻断剂 tamoxifen 均购自 Sigma 公司; 钙离子荧光探针 Fluo-3/AM 购自 Molecular Probes 公司。17 $\beta$ -E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>-BSA 用二甲亚砜(DMSO)溶解至 100 mmol/L 贮存, 使用时用配制的 M2 液<sup>[4]</sup>逐级稀释至 1  $\mu$ mol/L 的工作浓度; 实验用 Fluo-3/AM 用 DMSO 溶解为 0.9 mmol/L 贮存, 使用时用去钙镁 M2 液稀释至 3  $\mu$ mol/L 的工作浓度; U73122 和 tamoxifen 分别用 M2 液溶解至 10  $\mu$ mol/L 备用。

### 1.2 静止状态囊胚的获取

根据 Huett 等<sup>[5]</sup>的方法, 性成熟雌性昆明小鼠(由四川大学华西医学中心实验动物中心提供), 经腹腔注射 PMSG, 10 IU/只, 48 h 后腹腔注射 hCG, 10 IU/只, 与雄鼠合笼, 次日晨查雌鼠阴道栓塞, 发现有阴栓记为妊娠第一天。在妊娠第 4 天 12:00~14:00 对妊娠小鼠行双侧卵巢去除手术, 从妊娠第 5 天开始, 每天经皮下给予去卵巢小鼠孕酮 2 mg/只, 在妊娠第 7 天, 断颈处死小鼠, 取出双侧子宫角, 用 M2 液从卵巢端冲洗宫腔, 在解剖显微镜下从冲洗液中挑选形态良好的囊胚用于实验。

收稿日期: 2006-12-18 接受日期: 2007-04-12

\* 通讯作者。Tel: 028-85503048, E-mail: yuelimin@yahoo.com

### 1.3 实验方法

实验分两部分进行,第一部分实验研究雌激素作用下囊胚细胞内钙离子浓度随时间的动态变化,第二部分研究雌激素对囊胚快速激活作用的机制。

第一部分实验:将囊胚加入含 $3\ \mu\text{mol/L}$  Fluo-3/AM的M2液中,室温,避光负载30 min。负载完成后,用无钙镁M2液洗涤囊胚3次,然后置于装有M2液液滴的35 mm培养皿内。将培养皿静置在激光共聚焦扫描显微镜(Leica)载物台上行连续扫描,扫描所用激发光波长为488 nm,发射光波长526 nm,每2 s扫描一张。先扫描囊胚细胞5 min,然后在液滴中加入 $17\beta\text{-E}_2$ ,使其终浓度为 $1\ \mu\text{mol/L}$ ,继续扫描20 min。使用随机配置的软件对每张扫描图中囊胚的荧光强度值进行测定,并计算其平均荧光强度值以反映该时间点囊胚细胞内钙离子浓度。以前5 min各时间点所测得的荧光强度值的平均值作为基础值,将各时间点荧光强度值与基础值的比值,绘制成囊胚细胞内钙离子浓度随时间变化的关系曲线,分别选取加入 $17\beta\text{-E}_2$ 后5 min、10 min、15 min、20 min反映囊胚细胞内钙离子浓度的荧光强度值与基础值进行比较,据此选择出变化最明显的时间点进行下一步实验。

第二部分实验:本部分实验共分为6个实验组进行,第1组为空白对照组( $n=13$ );第2组为 $17\beta\text{-E}_2$ 作用组( $n=14$ );第3组为 $\text{E}_2\text{-BSA}$ 作用组( $n=13$ );第4组为 $17\beta\text{-E}_2+\text{tamoxifen}$ 作用组( $n=8$ ),该组囊胚在负载钙探针前先用 $10\ \mu\text{mol/L}$  tamoxifen,  $37\ ^\circ\text{C}$ 条件下作用30 min后用M2液洗涤3次;第5组为 $17\beta\text{-E}_2+$ 去钙镁M2作用组( $n=12$ );第6组为 $17\beta\text{-E}_2+\text{U73122}$ 作用组( $n=8$ ),该组囊胚在负载钙探针前先用 $10\ \mu\text{mol/L}$  U73122,  $37\ ^\circ\text{C}$ 条件下作用30 min后用M2液洗涤3次。

上述各实验组囊胚均按第一部分所述方法用钙离子探针进行负载。负载完成后,按上述分组设计,将各组囊胚分别放入含有不同实验因素的液滴中,  $37\ ^\circ\text{C}$ 条件下温育15 min。温育完成后,除第5组囊胚用去钙镁M2液洗涤外,其余各组囊胚均用M2液洗涤3次。最后在荧光显微镜(Nikon)下分别观察各组囊胚的荧光强度并拍照,用Image-Pro Plus 5.1图像分析软件测定照片上每个囊胚的荧光强度值,以荧光强度值代表囊胚细胞内的钙离子浓度。

### 1.4 统计学方法

使用SPSS11.5统计软件分别对两部分结果进行分析,第一部分实验各观测点的荧光强度值以 $\bar{x}\pm s$ 表

示,各时间点的荧光强度值与基础值之间采用 $t$ 检验进行比较;第二部分实验各组荧光强度值以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组之间荧光强度值采用单因素方差分析进行比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 雌激素诱导囊胚细胞内钙离子的动态变化

图1为雌激素作用下囊胚细胞内钙离子浓度的动态变化。从图中可以看出 $17\beta\text{-E}_2$ 作用后7 min囊胚细胞内钙离子浓度开始逐渐增加,15 min达到峰值,此后略有降低。表1为选取的各时间点囊胚细胞的荧光强度值,基础值为 $56.71\pm 6.31$ ,统计学结果发现 $17\beta\text{-E}_2$ 作用后5 min及10 min测定的反映胞内钙离子浓度的荧光强度值较基础值时差异不明显( $P>0.05$ );15 min及20 min荧光强度值与基础值相比有明显升高( $P<0.05$ )。

### 2.2 各实验因素引起囊胚细胞内钙离子的变化

图2为各实验组囊胚荧光照片。表2为各组囊胚荧光强度测定值。统计学结果发现 $17\beta\text{-E}_2$ 作用组( $90.58\pm 5.86$ )和 $\text{E}_2\text{-BSA}$ 作用组( $93.75\pm 8.12$ )较空白对照组( $75.23\pm 8.50$ )荧光强度都有明显升高( $P<0.05$ ); $\text{E}_2\text{-BSA}$ 作用组、 $17\beta\text{-E}_2+\text{tamoxifen}$ 作用组( $95.59\pm 6.56$ )和 $17\beta\text{-E}_2+$ 无钙镁M2作用组( $87.92\pm 7.24$ )分别与 $17\beta\text{-E}_2$ 作用组相比荧光强度差异不明显( $P>0.05$ ); $17\beta\text{-E}_2+\text{U73122}$ 作用组( $79.83\pm 3.65$ )与 $17\beta\text{-E}_2$ 作用组相比荧光强度有明显降低( $P<0.05$ )。

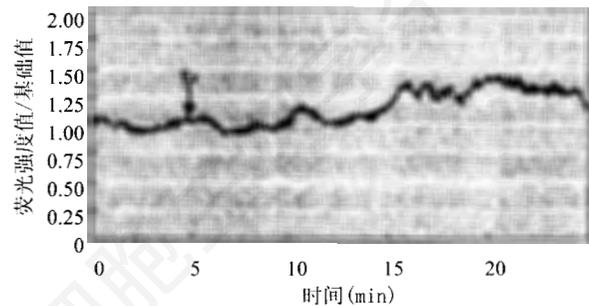


图1  $17\beta\text{-E}_2$ 作用囊胚细胞内钙离子浓度的动态变化

表1 不同时间点测定 $17\beta\text{-E}_2$ 作用后囊胚细胞的荧光强度

$17\beta\text{-E}_2$ 作用时间(min)	荧光强度值
5	$60.86 \pm 4.32$
10	$66.05 \pm 5.36$
15	$81.86 \pm 7.25$
20	$70.45 \pm 6.23$

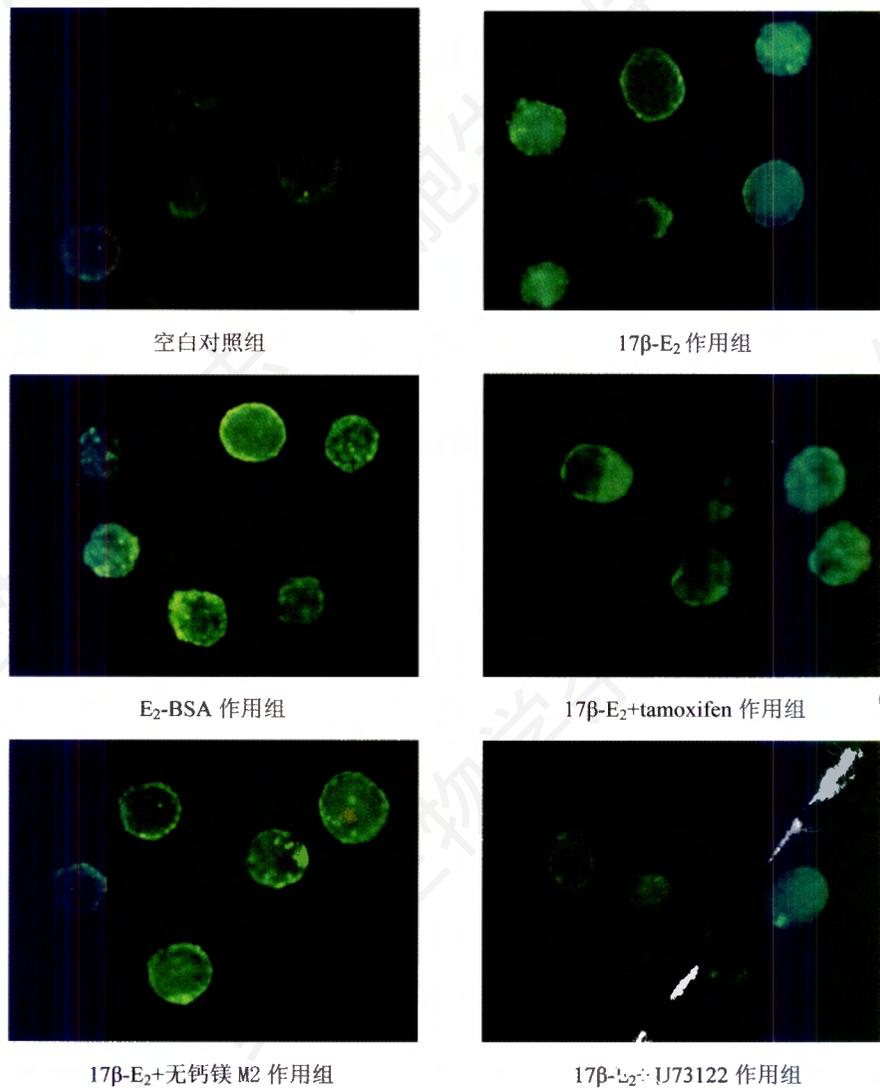


图2 不同实验因素下囊胚细胞的荧光照片(100 ×)

表2 不同实验组囊胚细胞的荧光强度值

组别 (n)	荧光强度值
空白对照组 (13)	75.23 ± 8.50
17 $\beta$ -E <sub>2</sub> 作用组 (14)	90.58 ± 5.86*
E <sub>2</sub> -BSA 作用组 (13)	93.75 ± 8.12*#
17 $\beta$ -E <sub>2</sub> +tamoxifen 作用组(8)	95.59 ± 6.56#
17 $\beta$ -E <sub>2</sub> + 无钙镁 M2 作用组(12)	87.92 ± 7.24#
17 $\beta$ -E <sub>2</sub> + U73122 作用组(8)	79.83 ± 3.65 $\diamond$

<sup>\*</sup>与空白对照组相比较, \* $P < 0.05$ ; <sup>#</sup>与 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 作用组相比较, # $P < 0.05$ ;  <sup>$\diamond$</sup> 与 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 作用组相比较,  $\diamond P < 0.05$ 。

### 3 讨论

雌激素属于类固醇激素。按照经典的雌激素作用基因组效应的理论, 雌激素首先是进入靶细胞, 通过与胞浆中或核内的受体结合成为复合物, 进而启动特异基因的转录、翻译, 合成具有特定功能的蛋白

质, 进而产生生物学效应。近年来, 越来越多的研究证明, 雌激素的作用除了传统的基因组效应外, 还可能作用于存在于细胞膜上的雌激素受体或特异性结合位点, 通过跨膜信号转导机制产生快速的非基因组效应<sup>[6,7]</sup>。雌激素快速非基因组效应的重要特征包括: 速度快, 在几秒到几分钟内发挥作用; 与非透膜的大分子物质偶联的雌激素也能诱导快速效应; 不能被经典的类固醇激素受体拮抗剂所阻断<sup>[8]</sup>。并且, 雌激素作用于细胞膜结构所产生的快速非基因组效应可能通过多种跨膜信号传递途径实现, 但在众多可能的信号途径中, Ca<sup>2+</sup> 相关信号途径十分普遍和重要。当雌激素作用于细胞后, 胞内Ca<sup>2+</sup>的变化往往是最快出现的反应, 并且Ca<sup>2+</sup>对于触发一系列的后继的胞内事件起着重要的作用<sup>[9,10]</sup>。

雌激素的快速非基因组效应已经在包括精卵在

内的生殖细胞以及许多的体细胞中得到了证明,然而有关雌激素是否对囊胚具有同样的快速效应,并通过该效应参与囊胚着床过程的调控尚未得到研究。虽然本实验尚未直接证明囊胚细胞膜上雌激素受体或结合位点的存在,然而根据现有的实验结果,雌激素和偶连大分子非透膜牛血清白蛋白的雌激素作用于囊胚细胞,在几分钟内便能够诱导静止状态小鼠囊胚细胞内游离钙离子浓度升高;且雌激素的该快速效应不被传统的雌激素受体阻断剂 tamoxifen 所阻断,这就提示雌激素对静止状态囊胚细胞可能具有快速效应。并且,实验结果还显示,雌激素作用于去钙培养液中的囊胚,仍然引起胞内钙离子浓度的快速升高,且磷脂酶C特异性的抑制剂U73122能抑制雌激素的快速效应,因此可以推测,雌激素对囊胚细胞的快速效应可能是通过与膜受体或结合位点结合后,激活磷脂酶C相关信号途径引起胞内钙离子释放而发挥作

用。

综上所述,雌激素对小鼠囊胚具有快速诱导胞内钙离子升高的作用,这种快速效应可能是雌激素通过与膜受体或结合位点结合后,激活磷脂酶C相关信号途径致胞内钙离子释放而实现的。

#### 参考文献(References)

- [1] Paria BC *et al. Semin Cell Dev Biol*, 2000, **11**: 67
- [2] 李丛丛等. *生命的化学*, 2005, **25**: 447
- [3] Falkenstein E *et al. Pharmacol Rev*, 2000, **52**: 513
- [4] Kline D *et al. Dev Biol*, 1992, **149**: 80
- [5] Huet YM *et al. J Reprod Fertil*, 1987, **81**: 453
- [6] Ho KJ *et al. Mol Interv*, 2002, **2**: 219
- [7] Szemraj J *et al. Pol J Pharmacol*, 2003, **55**: 887
- [8] Revelli A *et al. Endocr Rev*, 1998, **19**: 3
- [9] Koldzic-Zivanovic N *et al. Mol Cell Endocrinol*, 2004, **226**: 33
- [10] Improta-Brears T *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 4686

## Rapid Effects of Estrogen on Intracellular Calcium of Mouse Dormant Blastocyst

Lin-Lin Yu, Ying Hu, Jin-Hu Zhang, Ya-Ping He, Li-Min Yue\*

(Department of Physiology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract** We use Fluo-3/AM, a fluorescent probe of calcium, to sign intracellular calcium; laser scanning confocal microscope, to continuously detect the dynamic intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in blastocyst caused by 17beta-estradiol ( $17\beta-E_2$ ); and fluorescent microscope, to check out the alterations of  $[Ca^{2+}]_i$  induced by  $E_2$ -BSA that conjugated with bovine serum albumin, and also by  $17\beta-E_2$  with  $Ca^{2+}$ -free M2, tamoxifen (a traditional block agent of estrogen receptor), and U73122 (a specific inhibitor of phospholipase C) respectively. We found that both  $17\beta-E_2$  and  $E_2$ -BSA could increase the  $[Ca^{2+}]_i$  of blastocyst rapidly, while this increasing of  $[Ca^{2+}]_i$  was independent on the extra calcium in the incubation medium and it can be blocked by specific inhibitor of phospholipase C but not the traditional block agent of estrogen receptor.

**Key words** estrogen; mouse blastocyst; calcium

Received: December 18, 2006 Accepted: April 12, 2007

\*Corresponding author. Tel: 86-28-85503048, E-mail: yuelimin@yahoo.com