

螯合细胞外钙离子对体外培养的大鼠卵巢颗粒细胞成熟的影响

曹文¹ 潘玲梅^{1,3} 蒋永清² 卢立志² 孟春花¹ 李键¹ 田谷一善³ 石放雄^{1*}

¹南京农业大学动物科技学院动物繁殖研究室, 南京 210095; ²浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 杭州 310014;

³东京农工大学兽医系家畜生理学教室, 东京 183-8509)

摘要 在发现利用钙离子螯合剂 EGTA 螯合细胞外钙离子(Ca^{2+})后, 可以显著抑制促滤泡(激素(FSH)刺激体外培养的颗粒细胞合成和分泌雌激素, 并且该抑制作用呈剂量依赖性。假设该特异性反应是通过 Ca^{2+} 影响细胞内腺苷酸环化酶(AC)发挥作用的, 因为 Ca^{2+} 具有激活ACVIII的作用。通过RT-PCR和Northern印迹检测大鼠不同阶段卵巢组织中ACVIII的表达。结果表明, 虽然 Ca^{2+} 可以调控颗粒细胞类固醇激素的合成, 但不同阶段的卵巢组织中均检测不到ACVIII的mRNA。实验间接提示了 Ca^{2+} 促进颗粒细胞成熟的作用不是通过ACVIII发挥作用的, 而可能是通过其他AC同工酶或其他 Ca^{2+} 信号通路发挥作用。

关键词 钙离子; 颗粒细胞; 腺苷酸环化酶

颗粒细胞(granulosa cell, GC)的增殖和成熟是卵巢功能维持和发挥过程中的关键一环, 这其中依赖多种信使的传递和调控。衰老引起动物繁殖力的下降, 部分原因在于卵巢颗粒细胞凋亡的加速^[1]。激素、神经递质及其他信号分子主要通过激活颗粒细胞膜上G偶联蛋白受体, 活化腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC), 催化ATP生成cAMP, 促进颗粒细胞内雌激素(estrogen, E)、孕激素(progestin, P)、抑制素(inhibin)的合成和分泌。cAMP受到磷酸二酯酶(phosphodiesterase type, PDE)的负相调控, PDE能将cAMP水解为5'-AMP, 从而终止cAMP在体内发挥作用^[2,3]。研究发现钙离子(calcium ion, Ca^{2+})作为第二信使, 在动物卵巢中发挥着广泛的生物学功能, 因此, 关于 Ca^{2+} 与AC的互作关系也成为生殖生物学的热点。虽然目前关于 Ca^{2+} 对AC作用方面的研究报道已不胜枚举, 但到目前为止尚无有关卵巢颗粒细胞内是否存在 Ca^{2+} 对ACVIII作用的相关报道。

AC在哺乳动物中广泛分布, AC的分子结构由一个短N端区域和两个细胞质结构域(C1和C2), 6个跨膜螺旋的疏水构域(M1和M2)组成^[4], 其中C1和C2是AC的催化构域, 是大部分细胞内调控因子的作用构域。目前所知的AC有9种同工酶和一种可溶性腺苷酸环化酶(sAC), 其中约一半以上的同工酶受 Ca^{2+} 调控。不同的AC同工酶的组织分布状况、丰度及调控模式有一定的特异性, 如: 啮齿类动物的卵

母细胞和牛黄体细胞主要表达ACIII^[5,6], 人黄体颗粒细胞表达不同程度的ACI、ACIII、ACIV、ACV、ACVI、ACVII、ACVIII、ACIX, 其中ACII、ACVIII在样本间存在较大的变异性^[7], 具体分布情况仍需进一步验证。目前尚无啮齿动物颗粒细胞中AC同工酶表达和调控方面的报道。最新的研究结果显示ACVIII除了参与药物上瘾、记忆、学习等神经塑造过程外, 还在人精子中参与嗅觉受体介导的趋化作用, 这是ACVIII参与动物生殖功能的最新报道^[8]。本实验通过在体外培养的颗粒细胞中加入不同剂量的EGTA与促滤泡(激素(follicle stimulating hormone, FSH)共培养, 观察螯合细胞外 Ca^{2+} 对颗粒细胞的影响, 并进一步探讨颗粒细胞中ACVIII是否参与上述过程。

1 材料与方 法

1.1 激素和试剂

羊FSH(oFSH-19-SIAFP; 94xNIH-oFSH-SI)购于美国NIDDK, NIH激素和垂体工程公司, EGTA购于美国Sigma公司, PCR试剂盒和pCRII载体购于美国Invitrogen公司, Trizol试剂和^[32P]-CTP购于美国Amersham公司, 其他试剂均为市售优质纯。TE缓

收稿日期: 2007-11-14 接受日期: 2007-12-18

国家自然科学基金资助项目(No.30571335, No.30771553)

*通讯作者。Tel/Fax: 025-84395701, E-mail: fxshi@njau.edu.cn

冲液: 2.5 ml 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 ml 0.5 mol/L EDTA, 5 ml 5 mol/L NaCl, 加 ddH₂O 至 250 ml。杂交缓冲液: 1×50% 甲醛, 5×氯化柠檬酸钠(sodium citrate-sodium chloride, SSC), 1 mmol/L EGTA, 25 g/ml 变性鲑鱼精子 DNA, 500 g/ml 酵母 tRNA。

1.2 实验动物与实验设计

25 日龄(未成熟组), 3~4 月龄(青年组), 12 月龄(老年组)的 Sprague-Dawley 大鼠, 购于南京青龙山实验动物养殖场, 自由采食饲料和饮水。整个程序操作符合南京农业大学动物管理及使用委员会规定的实验动物管理规程。

使用大鼠颗粒细胞的原代培养系统进行整合细胞外钙离子对颗粒细胞影响的检测。该系统可以保持颗粒细胞存活 4~5 天以上^[9]。购进动物当天, 用三氟溴氯乙烷将 25 日龄组(未成熟组)大鼠麻醉, 皮下植入含 4 mg 100% 17-β 雌二醇的 5 mm 硅胶管, 以诱导颗粒细胞的增殖。植入管需预先在 37 °C 等渗生理盐水中浸泡过夜, 以诱导类固醇激素的释放。植入 5 天后, 大鼠用三氟溴氯乙烷进行安乐死, 收集卵巢置于无血清的添加了 PSG (100 IU/ml 青霉素, 100 IU/ml 硫酸链霉素, 2 mmol/L L- 谷氨酰氨) McCoy's 培养液中, 以备颗粒细胞的提取。

为进一步探讨颗粒细胞中 ACVIII 是否参与 Ca²⁺ 对颗粒细胞的影响过程, 采用 RT-PCR、Northern 印迹研究 ACVIII mRNA 在不同生理阶段大鼠卵巢组织和其他组织中的分布情况。实验选用 25 日龄(未成熟组), 3~4 月龄(青年组), 12 月龄(老年组)大鼠, 每组各 4 只, 用三氟溴氯乙烷进行安乐死, 收集卵巢、心脏和脑组织, 置于液氮罐以备 RNA 的提取。

1.3 卵巢颗粒细胞培养

体视显微镜下, 用 26 号针头穿刺卵巢卵泡, 释放颗粒细胞。进行颗粒细胞的收集、清洗, 低速离心进行集落收集, 再用新鲜的培养液重悬。通过苔盼蓝排斥实验, 红细胞计数板计算存活细胞的密度。12 mm×75 mm 聚丙烯管中培养活颗粒细胞密度约为 1 000 000。Falcon 培养管中加入约 0.5 ml McCoy's 培养液, 并添加 10⁻⁷ mol/L 雄烯二酮, 作为合成雌二醇(estradiol, E₂)的底物。对照组细胞只用培养液培养, 处理组或添加 FSH (2 ng/ml) 共培养, 或添加不同浓度 EGTA (50 μmol/L、100 μmol/L、500 μmol/L) 和 FSH 共培养。在 5% CO₂、95% 空气, 37 °C、饱和湿度的恒温培养箱中温育 48 h。温育结束后, 进行培养液的收集和储存(-70 °C), 以备 E₂ 浓度测定, 作

为芳香化酶活性的间接评估。每个处理有 3 个平行样, 每个实验重复 3 次。

1.4 雌二醇的放免测定(radioimmunoassay, RIA)

用 RIA 测定颗粒细胞培养液中 E₂ 的浓度。本实验室 E₂ 测定批内变异系数小于 9%。所有细胞培养实验在相同测定方法下进行分析。每个处理有 3 个平行样, 每个实验至少重复 3 次。实验结果数据以平均值 ± 标准误表示, 并进行统计学处理和配对 *t* 检验。

1.5 RNA 的提取和 RT-PCR

采用异硫氰酸胍(guanidinium isothiocyanate, GTC)方法提取大鼠卵巢、心脏、脑组织的 RNA^[10]。

使用 RT-PCR 试剂盒扩增 ACVIII cDNA 片段。ACVIII 引物根据已发表的大鼠 ACVIII 3 513~4 196 碱基的 cDNA 序列设计构建, ACVIII 引物的序列正向为: 5'-GGACACCAGCTGGAGTACACAGC, 反向为: 5'-CCTGATCCTTCAGGATGAGATAG。

PCR 反应(25 μl)体系: 20 mmol/L Tris pH 8.4, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 4×0.1 mmol/L dNTP, 1 μmol/L 引物, 1.25 U Taq 酶, 反应至 cDNA 浓度积累达到 1 μl 终止。PCR 循环次数为 30 次: (1) 95 °C 105 s; (2) 94 °C 1 min; (3) 55 °C 退火 1 min; (4) 72 °C 2 min; (5) 从第二步 94 °C 1 min 开始循环 30 次; (6) 72 °C 7 min。PCR 产物用 7% 丙烯酰胺凝胶 DNA 分子标记和溴乙锭(ethidium bromide, EB)染色在紫外光下进行检测。

1.6 ACVIII cDNA 载体的组建、扩增、纯化和测序

将 PCR 产物嵌入 pCRII 载体, 转染到感受态细胞。进行青霉素抵抗选择克隆, 用 1.5 ml 培养液扩增, 初步纯化后, 用内切酶 *EcoRI* 酶切后通过琼脂糖凝胶电泳确认所选的克隆有预期大小的条带。然后选择另一内切酶 *SlyI* (pCRII 载体上有两个 *SlyI* 酶切位点, 插入的 ACVIII PCR 产物上有一个 *SlyI* 酶切位点) 酶切, 通过琼脂糖凝胶电泳确认有预期大小和数量的条带后, 用 200 ml 培养液扩增所选克隆, 纯化。将纯化的质粒送测序中心, 根据 pCRII 载体的要求, 利用 M13 逆向引物进行 cDNA 测序验证。具体操作见 PCR 克隆试剂盒指导说明(美国 Invitrogen 公司)。

1.7 探针的制备和 Northern 杂交分析

采用 Trizol 试剂(美国 Gibco BRL 公司), 分离 RNA, 具体操作依照生产商提供的试剂指导说明。每 100 mg 冰冻组织样(脑组织和不同生理阶段的卵巢)添加 1 ml 苯酚/异硫氰酸胍。每 100 mg RNA 片

断进行 1% 甲醛-琼脂糖凝胶电泳, 用 20×SSC 毛细管印迹转移法将 RNA 样品转移到醋酸纤维素薄膜 (NCs)- 印迹膜 (blot) 上。

探针制备: 室温下解冻 [32 P]-CTP, 取 12.5 μ l 125 μ Ci [32 P]-CTP 于 1.5 ml 的微管中, 用封口胶封闭微管, 干燥 30 min。按顺序添加: 8.2 μ l DEPC 处理过的 H_2O_2 (室温), 0.8 μ l 40 000 IU/ml RNase, 2.0 μ l 100 mmol/L DTT, 4.0 μ l 5× 转录缓冲液, 各 1.0 μ l ATP、GTP、UTP, 2.0 μ l 线性化的 DNA 模板 (内切酶 *Xho*I 内切后的 cDNA), 0.4 μ l 15 000 IU/ml SP6 RNA 聚合酶。在 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min。进行同位素检测, 检测 32 P 是否结合进入探针 cRNA。加 1 IU/ μ l DNA 聚合酶 I, 37 $^{\circ}$ C 温育 15 min, 加 1 μ l 25 mg/ml 酵母 tRNA, 120 μ l DEPC 水, 封口胶封闭。苯酚/氯仿/辛醇 (25:24:1) 抽提样品, 14 000 r/min 5 min, 取上清液。1×150 μ l 3 mol/L NaAc 和 4×600 μ l 100% 乙醇进行乙醇层析, 振荡, 避光保存样品于 -70 $^{\circ}$ C 过夜。4 $^{\circ}$ C 下 14 000 r/min 离心样品 20 min, 弃上清液。用乙醇清洗沉淀块, 4 $^{\circ}$ C 下 14 000 r/min 离心 5 min。用封口胶封闭离心管, 干燥 10 min 后, 用 1×TE 缓冲液重悬沉淀块。取 1 μ l 探针至液闪计数器计数检测探针丰度。

Northern 杂交: 将印迹膜与适量的预热杂交缓冲液 (HB), 65 $^{\circ}$ C 预杂交 2 h。解冻探针, 将 HB 倒出。用适量 HB 稀释探针, 65 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交后, 在室温下清洗膜两次, 每次 5 min, 至背景为 0.2 K。在 -80 $^{\circ}$ C 用 Kodak RX 胶片曝光盒 (美国 Kodak 公司) 曝光 1~2 周。杂交信号通过 Photoshop Imager 进行检测。

2 结果

2.1 整合细胞外 Ca^{2+} 对大鼠颗粒细胞合成和分泌 E_2 的影响

FSH (2 ng/ml) 处理颗粒细胞 48 h, 颗粒细胞合成和分泌的 E_2 水平显著高于对照组, 设计不同梯度剂量的 EGTA 和 FSH 共同培养时, EGTA 处理组的 E_2 水平呈剂量依赖性下降 (图 1)。

2.2 RT-PCR

大鼠脑组织和不同阶段卵巢样 RNA 的 RT-PCR 结果显示, 只有脑组织的 RNA 样在预期的 683 bp 处有明显的条带, 心脏、青年及未成熟大鼠卵巢 RNA 的 RT-PCR 结果呈阴性, 一条不在预期范围内的大约 300 bp 的条带分布于心脏和脑组织, 实验结果见图 2。

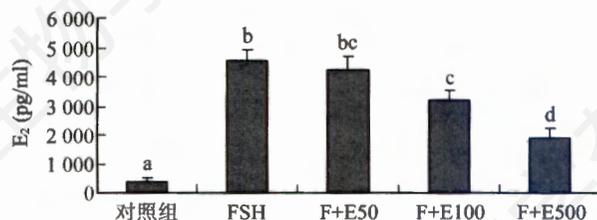


图 1 EGTA 对于体外培养的大鼠颗粒细胞中雌激素浓度的影响

F+E50: 2 ng/ml FSH 和 50 μ mol/L EGTA; F+E100: 2 ng/ml FSH 和 100 μ mol/L EGTA; F+E500: 2 ng/ml FSH 和 500 μ mol/L EGTA。



图 2 不同组织样的 RT-PCR 结果

1: 脑; 2: 心脏; 3: 成熟大鼠卵巢; 4: 未成熟大鼠卵巢; M: marker.

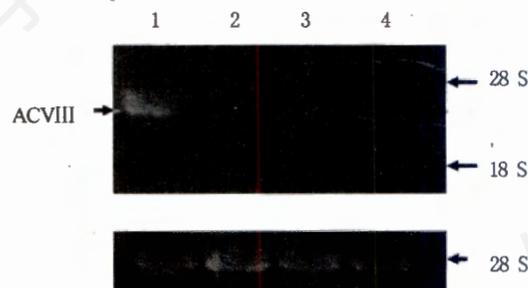


图 3 不同组织样的 Northern 印迹结果

1: 脑; 2: 成熟卵巢; 3: 未成熟卵巢; 4: 老年组卵巢。

2.3 细菌克隆的选择和内切酶酶切确认以及 cDNA 测序验证

采用 *Eco*RI 限制性内切酶对多个克隆进行酶切, 琼脂糖凝胶电泳。选择在预期的 683 bp 处有清晰的条带出现的克隆, 再用限制性内切酶 *Sty*I 酶切, 出现 3 条预期的清晰条带, 初步说明该克隆为所需克隆。扩增该细菌克隆, cDNA 测序结果和 PubMed blast 的结果显示该克隆正确性为 100%。

2.4 Northern 印迹

大鼠脑组织和不同阶段卵巢样 RNA 的 Northern 印迹的实验结果与 RT-PCR 结果一致。只有脑组织样实验结果为阳性, 不同卵巢样均为阴性 (图 3)。

3 讨论

本实验结果清楚表明 Ca^{2+} 可以调控颗粒细胞合

成类固醇激素, FSH 诱导颗粒细胞成熟过程需要细胞外 Ca^{2+} 内流过程的参与, 但 RT-PCR 和 Northern 印迹实验结果表明 Ca^{2+} 并非通过激活 ACVIII 而发挥上述作用, 因此推测在大鼠卵巢颗粒细胞中可能通过其他第一类 AC 同工酶或者通过其他信号系统与 cAMP 信号系统间的互作发挥作用。

通过激活颗粒细胞细胞膜上的 Gs 亚基作用于颗粒细胞, 是 FSH 作用于颗粒细胞的经典途径。激活的 Gs 亚基作用于 AC, AC 催化 ATP 生成 cAMP, 进而引发下游生物反应。目前已知 AC 的 9 个同工酶中, I~IX 均是大分子蛋白质(1 080~1 248 Da)。AC 同工酶依据调控模式的不同, 划分为 4 大类: 第一类, 包括 ACI、ACIII、ACVIII^[7,11], 受 Ca^{2+} 和钙调蛋白(CaM)的正向调控, 受 $\beta\gamma$ 亚基的负向调控作用; 第二类, 包括 ACII、ACIV、ACVII^[7], 受 G 偶联蛋白、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 磷酸化作用、 $\beta\gamma$ 亚基的正向调控; 第三类, 包括 ACV 和 ACVI, 受 Ca^{2+} 、蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 磷酸化作用及 Gi 的负向调控; 第四类, 目前只有 ACIX, 对 CaM 和 β/γ 亚基都不敏感, 但受神经钙磷酸酶(phosphatase calcineurin)的负向调控^[12, 13]。EGTA 虽然不能直接进入细胞, 但可以螯合细胞外(即培养液)的 Ca^{2+} , 减少胞外 Ca^{2+} 内流, 导致胞浆内 Ca^{2+} 减少或缺乏。EGTA 抑制 FSH 诱导颗粒细胞成熟实验, 间接提示了在大鼠的卵巢中表达的主要是第一类 AC, 而非第三类 AC。因为第一类 AC 受 Ca^{2+} 的正向调控, 而第三类 AC 受 Ca^{2+} 的负向调控。通过进一步实验排斥了 Ca^{2+} 通过激活 ACVIII 参与颗粒细胞成熟的假设。所以大鼠卵巢中起主要作用的 AC 可能是 ACI、ACIII, 至于第二类和第四类 AC 同工酶在卵巢中的分布尚不十分确定。具体的 AC 同工酶分布情况还有待进一步研究, 而且需考虑不同生理阶段对 AC 同工酶表达的影响。本实验再次证实了 Ca^{2+} 在颗粒细胞成熟过程中具有重要作用, 也是 Ca^{2+} 参与生殖作用的另一个旁证。

随着钙离子研究的深入, Ca^{2+} 在动物生殖生理中

作用的认识日益受到人们的重视, 但其机制的确切了解还有待进一步探讨。例如环核苷酸门控离子通道(cyclic nucleotide-gated ion channels, CNG)作为一种非选择性的阳离子通道, 可直接被环核苷酸活化。但 CNG 在动物生殖生物学中的研究最近才受到了广泛的关注^[14]。维生素 D 可影响 Ca^{2+} 的吸收, 维生素 D 主要是通过胞内类固醇类激素维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)发挥生物学功能的。近来的研究不仅发现 VDR 与卵巢内 E_2 合成相关, 而且维生素 D 通过与 VDR 结合, 可改变基因转录的速度, 抑制肿瘤细胞增殖和诱导分化。VDR 及其类似物有望成为一种新型抗妇科肿瘤的药物^[15,16]。

总之, 本实验提示了在大鼠卵巢中起主要作用是第一类 AC, ACVIII 在大鼠卵巢的颗粒细胞中表达量很少, 或根本不表达。此外, RT-PCR 和 Northern 印迹实验结果还显示大鼠的脑组织可检测到 ACVIII mRNA, 这与先前的 Ca^{2+} 可调控 ACVIII 并参与记忆和学习过程的报道相一致^[17,18]。

参考文献(References)

- [1] Yeh TS et al. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, **1042**: 157
- [2] 曹文等. *细胞生物学杂志*, 2007, **29**: 800
- [3] 王正朝等. *科学通报*, 2006, **51**: 2577
- [4] Tang WJ et al. *Cell*, 1992, **70**: 869
- [5] Horner K et al. *Dev Biol*, 2003, **258**: 385
- [6] Mamluk R et al. *Endocrinology*, 1999, **140**: 4601
- [7] Asboth G et al. *Reproduction*, 2001, **121**: 217
- [8] Spehr M et al. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 40194
- [9] Shi F et al. *Biol Reprod*, 2004, **70**: 1552
- [10] Chomczynski P et al. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156
- [11] Gu C et al. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 6980
- [12] Taussig R et al. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 1
- [13] Hanoune J et al. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, **128**: 179
- [14] 王正朝等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, **22**: 282
- [15] Evans K N et al. *Am J Pathol*, 2004, **165**: 807
- [16] Gilad LA et al. *J Endocrinol*, 2006, **191**: 387
- [17] Mons N et al. *Neurobiol Learn Mem*, 2003, **79**: 226
- [18] Maas JW Jr et al. *J Neurosci*, 2005, **25**: 2376

Effect of Chelation of Extracellular Calcium on Maturation of Cultured Rat Granulosa Cells

Wen Cao¹, Ling-Mei Pan^{1,3}, Yong-Qing Jiang², Li-Zhi Lu², Chun-Hua Meng¹,
Jian Li¹, Kazuyoshi Taya³, Fang-Xiong Shi^{1*}

(¹Laboratory of Animal Reproduction, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310014, China; ³Laboratory of Veterinary Physiology, Department of Veterinary Medicine, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 183-8509, Japan)

Abstract Calcium is an important cellular signal. The aim of the present study is to examine the effect of chelation of extracellular calcium on the maturation of cultured rat granulosa cells. The results demonstrate that addition of EGTA, a chelator of extracellular calcium, significantly inhibits the estradiol production in cultured rat granulosa cells stimulated by FSH in a dose-dependent manner. As it is known that adenylyl cyclase VIII can be promoted by intercellular calcium, we hypothesize that the action of calcium may be through activating adenylyl cyclase VIII in rat granulosa cells. However, the results of our RT-PCR and Northern blot indicate that the role of calcium is not via adenylyl cyclase VIII isoform but may be through other pathways in cultured rat granulosa cells.

Key words calcium; granulosa cell; adenylyl cyclase

Received: November 14, 2007 Accepted: December 18, 2007

This work was supported by the National Natural Foundation of China (No.30571335 and No.30771553)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-25-84395314, E-mail: fxshi@njau.edu.cn