

应用激光扫描共聚焦显微镜 FRAP 技术研究 兔早期胚胎发育中细胞间隙连接介导通讯*

徐 营**、*** 雷 蕾** 刘忠华** 文端成** 廉 莉**

朱子玉** 韩之明** 杨利国*** 孙青原** 陈大元**、****

(**中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室 北京 100080

***南京农业大学动物科技学院 南京 210095)

间隙连接(Gap junction, GJ)是目前被认为能进行细胞间物质和信息直接交流的细胞间连接形式,它参与的物质和信息交流被称为由间隙连接介导的细胞间通讯(Gap junctional intercellular communication GJIC),GJIC在胚胎发育,细胞分化,多细胞同步化活动等方面具有至关重要的作用^[1],传统的测定GJIC的方法很多,如划痕法标记荧光染料示踪法^[2]、显微注射法^[3]、电生理法^[4]、同位素示踪法^[5]等,这些方法或是造成细胞膜的损伤,或是操作复杂。近年来,由于激光扫描共聚焦显微镜的出现,结合光漂白恢复(Fluorescence redistribution after photobleaching, FRAP)技术,可以很方便地对GJIC进行分析,FRAP是指将待测细胞用荧光物质标记,借助高强度脉冲式激光照射细胞的某一区域,从而造成该区域荧光分子的光淬灭,通过低强度激光扫描,可以探测到该区域周围的非淬灭荧光分子向被照射区域扩散的速度^[6,7],由于光漂白过程是不可逆的,荧光恢复过程可明显地反映荧光标记物质及其结合物的运动,因此可以用来研究间隙连接通讯的有无及GJIC的水平。以往多应用激光扫描共聚焦显微镜的FRAP技术分析培养细胞的GJIC,本文首次尝试用此项技术分析早期胚胎卵裂球细胞GJIC的建立时间及GJIC在胚胎发育中的重要作用。

材料与方 法

1. 实验动物

3.5-4.5公斤性成熟雌性日本大耳白兔,有配种经验的雄性日本大耳白兔。

2. 主要试剂

6-羧基荧光素乙酰乙酸盐(6-Carboxyfluorescein diacetate, 6-CFDA, 分子量 370)溶于二甲基亚砜制成浓度为2mg/ml的贮备液, -20℃避光保存,使用时,用不含血清和酚红的DPBS培养基将CFDA稀释为10μg/ml; M199培养液(Gibco产品, Cat No 11151-040)添加10% FCS作为兔胚胎培养液。

3. 实验方法

(1) 动物的超排处理及早期胚胎的获得 兔的超排

处理:分六次皮下或肌肉注射FSH(中国科学院动物所生产),每次0.15mg,间隔12小时,最后一次注射FSH后12小时,耳静脉注射HCG100IU(中国科学院动物所生产),于注射HCG同时与雄兔合笼,人工辅助配种,于HCG注射后17小时,采用手术方法由输卵管冲出受精胚胎,用预先平衡的发育培养液洗(M199+10% FCS)3-5次后,移入发育培养液中于5% CO₂, 100%湿度, 37℃培养箱中培养。

(2) 样品的处理 将发育到4-细胞期、8-细胞期以及异裂(卵裂球大小不均一,卵裂球数目明显超过同一培养滴中正常发育胚胎,本文所采用的异裂胚胎为16-32个细胞)的兔胚胎,用不含血清和酚红的DPBS漂洗3-5遍,移入10μg/ml的6-CFDA液滴中,于37℃染色15分钟,染色结束后用DPBS漂洗3次,将样品移入加有DPBS的样品碟中,应用激光扫描共聚焦显微镜观察分析。

(3) 早期胚胎GJIC的测定 在共聚焦显微镜上选择激发波长为488nm,发射波长为530nm,首先将激光光源功率设置为最大功率,调节图像采集条件,获得最佳效果及分辨率的细胞图像,扫描整个样品,选取一个界限清晰的卵裂球为漂白区(Region of interest for the photobleach, ROI),荧光漂白与恢复实验条件用Leica TCN-NT荧光漂白恢复程序设定,用漂白时间为20秒,恢复时间为15-20分钟,每隔1分钟采集图像。

(4) 图像分析和数据处理

荧光漂白恢复程序结束后,保存图像,并选定ROI以及未漂白区域(Region of interest for the unphotobleach, bleach, ROU)进行荧光漂白与恢复分析:首先比较ROI和ROU在荧光漂白前、漂白结束后、荧光恢复后的图像差异,然后比较ROI的荧光漂白恢复曲线的变化差异,计算荧光漂白恢复率 $R = (I_r - I_b) / (I_p - I_b)$,其中 I_r 为荧光恢复后的荧光强度, I_b 为荧光漂白后的荧光强度, I_p 为荧光漂白前的荧光强度,比较不同发育时期胚胎的光漂白恢复异同。

结 果

1. 从荧光漂白恢复图像上发现,兔胚胎在强激光漂白前,各卵裂球都被激发出不同强度的荧光(图

本文2002年4月22日收到,7月15日接受。

中国科学院知识创新重大项目(批准号:KSCX1-05-01)和科技部攀登项目(批准号95-专-08)资助。

**** 通讯联系人。

版中 A1, B1, C1 所示), 将兔胚胎发育不同时期的一个卵裂球用强激光漂白后, 4-细胞期胚胎、异裂胚胎和 8-细胞期胚胎荧光相对强度都下降, 未漂白卵裂球的荧光相对强度变化不大(图版中 A2, B2, C2 所示); 经过 15 分钟恢复后, 4-细胞期胚胎和异裂胚胎在荧光漂白后基本没有恢复(图版中 A3, B3); 兔 8-细胞期胚胎荧光的相对强度比漂白的瞬间有很大程度的提高(图版中 C3), 光漂白过程中不同发育胚胎的具体数值变化如表 1 所示。

表 1 不同发育胚胎的光漂白回复率

胚胎发育时期	Ip	Ib	Ir	R(%)
4-细胞	78.681	46.681	52.385	17.8a
异裂	198.209	125.829	143.046	23.7a
8-细胞	158.481	116.651	149.375	78.2b

Ip-光漂白前荧光平均强度; Ib-光漂白后 0 分钟荧光强度;

Ir-恢复 15 分钟后荧光强度; R-恢复 15 分钟的回复率; $b > a, ab (P < 0.05)$

2. 从光漂白恢复曲线(图 1)中发现, 兔 4-细胞期胚胎和异裂胚胎的恢复曲线斜率较小, 除恢复早期稍有升高外, 后期基本趋于同一水平; 兔 8-细胞期胚胎的恢复曲线斜率较大, 并且随着时间增加其荧光强度有继续升高的趋势。

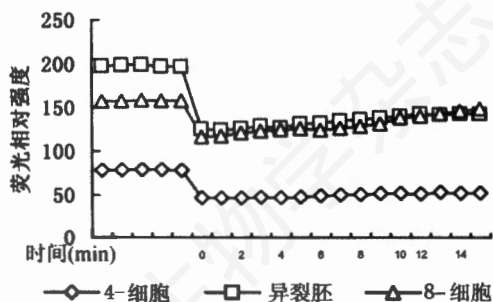


图 1 兔 4-细胞胚胎、异裂胚和 8-细胞胚胎的光漂白恢复曲线

光漂白后的瞬间记为 0min, 光漂白前对待漂白卵裂球荧光强度进行 5 次扫描并保存数据。

3. 从荧光漂白恢复后 15 分钟时的光漂白恢复率(如表 1 所示)上看, 4-细胞与异裂的兔早期胚胎荧光漂白回复率分别为 17.8% 和 23.7% 二者之间无显著性的差异($P > 0.05$); 而 8-细胞期胚胎的光漂白回复率为 78.2%, 与 4-细胞期胚胎和异裂胚胎相比存在显著差异($P < 0.01$)。

基于以上几点我们推测, 兔早期胚胎在 8-细胞期以前, 卵裂球之间的间隙连接通讯还没有建立, 兔早期胚胎卵裂球细胞间隙连接的建立发生在 8-细胞期; 异裂胚胎虽然卵裂球数目较多, 但因其不能通过细胞间隙连接进行卵裂球间的细胞通讯, 所以异

裂的胚胎很难进一步发育到囊胚, 因此, 细胞间隙连接的建立很可能是兔胚胎正常发育的重要条件。

讨 论

GJIC 对于细胞的生长控制十分重要, 它可以协调不同细胞、组织间的代谢或电传导性, 在胚胎发育和细胞分化过程中, GJIC 起着十分重要的作用^[6,20], 在小鼠早期胚胎发育过程中, 胚胎细胞利用胚胎细胞间隙连接分配营养、交换信息以保证卵裂球之间的代谢耦合^[8]; GJIC 对不同的第二信使分子(cAMP, IP₃, cGMP, Ca²⁺)具有不同的通透性, 仅使部分特定的细胞受到第二信使的调节^[9,19]; 由胚胎细胞间隙连接建立起来的小分子物质浓度梯度, 可以向细胞提供一个位置信息来控制决定细胞在胚胎中的身份和分化方向^[10]。

FRAP 中使用的 6-羧基荧光素乙酰乙酸盐(6-CFDA)无毒, 并具有膜通透性, 其进入细胞后, 在非特异性酯酶作用下水解为膜不通透性的 6-羟基荧光素, 它不具有膜的通透性, 因此, 荧光物质进入细胞后无法通过细胞膜出来, 而只能通过细胞间的通道才能在细胞间进行传递^[11,12], 本实验用 FRAP 技术和 6-CFDA 成功地分析了兔胚胎卵裂球之间的 GJIC, 发现兔早期胚胎的一个卵裂球经过强激光漂白后, 在 8-细胞阶段有很大程度的恢复, 恢复率为 78.2%, 从恢复曲线上看, 其荧光的恢复是缓慢进行的, 可以排除是同一细胞内的荧光扩散所引起的恢复, 如果是同一细胞内荧光扩散引起的恢复, 则曲线很陡, 荧光在毫秒时间内就可以得到恢复^[21]; 4-细胞期胚胎和异裂胚胎的恢复率很低, 恢复率分别为 17.8% 和 23.7%, 推测后两者的低荧光恢复率可能是由仪器的噪声所引起, 据此我们推测兔早期胚胎的 GJIC 建立可能是在 8-细胞阶段, 确证尚需要进一步的超微结构证明。

在胚胎的体外培养过程中, 经常出现异裂的胚胎, 其卵裂球数目明显多于同一培养液滴中其他正常发育的胚胎, 而且其卵裂球的大小不均一, 异裂胚胎不能发育到囊胚阶段, 本研究发现, 异裂胚胎卵裂球间未建立 GJIC 可能是其不能继续发育的原因。以往的研究发现, 不同动物的 GJIC 建立的时间不同, 在早期胚胎细胞通讯中所起的作用也不同, 在小鼠早期胚胎的 GJIC 研究中, 应用显微注射 6-CFDA 的方法证明, 小鼠早期胚胎细胞间隙连接的建立时间为发生致密化之前的 8-细胞阶段^[12], 推测 GJIC 对胚胎的致密化及卵裂球细胞命运起着重要作

用^[13-17],而人类的早期胚胎 GJIC 建立的时间是在囊胚阶段^[18],在人类早期胚胎的细胞通讯中 GJIC 不起主要作用^[18]。兔胚胎发育与小鼠类似,其 GJIC 所起的作用也可能很接近。目前对间隙连接的形成过程及对机体生理活动的作用仍不十分清楚,尚需要进一步的深入研究。

摘 要

本研究应用激光扫描共聚焦显微镜的光漂白恢复技术(FRAP)分析兔早期胚胎卵裂球之间通过间隙连接介导的细胞通讯(GJIC)。研究结果发现,用强激光分别将 4-细胞期胚胎、异裂胚胎和 8-细胞期胚胎的一个卵裂球荧光光漂白后,经过 15 分钟的荧光恢复,4-细胞期胚胎的光漂白恢复率为 17.8%,异裂胚胎的光漂白恢复率为 23.7%,二者之间没有明显的差异;8-细胞期胚胎的光漂白恢复率为 78.2%,与前二者之间存在明显的差异。推测兔早期胚胎卵裂球细胞间隙连接建立的时间在 8-细胞阶段,胚胎卵裂球间隙连接通讯可能是兔胚胎正常发育的重要条件。

关键词:激光扫描共聚焦显微镜 FRAP GJIC 兔胚胎卵裂球

参 考 文 献

[1] Guthrie SC, Gilula NB. 1989, *Trends Neurosci*, 12 (1):

12 - 16.

- [2] el-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. 1987, *Exp. Cell Res.*, 168(2):422 - 430.
- [3] Stewart WW. 1978, *Cell*, 14(3):741 - 759.
- [4] Lo CW, Gilula NB. 1979, *Cell*, 18(2):411 - 422.
- [5] Pitts JD, Simms JW. 1977, *Exp. Cell Res.*, 104 (1): 153 - 163.
- [6] Wey CL Cone RA and Edidin MA. 1981, *Biophys J*, 33: 225 - 232.
- [7] Wolf DE. 1989, *Methods Cell Biol*, 30:271 - 306.
- [8] 孙大业、郭艳林、马力耕等编著,2001,细胞信号转导,第三版,科学出版社,13 - 14.
- [9] 杨德鸿、高天明、陈建庭等,2001,生物化学与生物物理进展,28(4):463 - 466.
- [10] Lee S, Gilula NB, Warner AE. 1987, *Cell*, 51(5):851 - 860.
- [11] Wade MH, Trosko JE, Schindler M. 1986, *Science*, 232 (4749):525 - 528.
- [12] Goodall H and Johnson MH. 1982, *Nature*, 295 (11): 524 - 526.
- [13] Warner A. ,1992, *Semin Cell Biol.* ,3(1):81 - 91.
- [14] Warner AE. 1985, *J. Embryol. Exp. Morphol.* ,89 Suppl:365 - 380.
- [15] Becker DL, Davies CS. 1995, *Microsc Res Tech*, 31(5): 364 - 374.
- [16] Buehr M, Lee S, McLaren A, et al. ,1987, *Development*, 101:449 - 459.
- [17] Becker DL, Leclerc-David C, Warner A. 1992, *Dev.* ,suppl:113 - 118.
- [18] Dale B, Gualtieri R, Talevi R, et al. ,1991, *Mol Reprod Dev*, 29(1):22 - 28.
- [19] Schultz RM. ,1985, *Biol. Reprod.* ,32(1):27 - 42.
- [20] Levin M. ,2002, *J Membr Biol*, 185(3):177 - 192.
- [21] 莫永言、罗深秋、鲍永耀等,1997,细胞生物学杂志,19 (4):191 - 193.

GAP JUNCTIONAL INTERCELLULAR COMMUNICATION(GJIC) BETWEEN RABBIT BLASTOMERES AS REVEALED BY LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPY FRAP*

XU Ying**·*** LEI Lei** LIU Zhong Hua** WEN Duan Cheng** LIAN Li**

ZHU Zhi Yu** HAN Zi Ming** YANG Li Guo*** SUN Qing Yuan** CHEN Da Yuan**

(* ** State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Science Beijing 100080

*** College of Animal Science & Technology, Nanjing Agricultural University Nanjing 210095)

ABSTRACT

In order to analyze the gap junctional intercellular communication(GJIC)between rabbit blastomeres, we observed the fluorescence redistribution after photobleaching(FRAP)by laser scanning confocal microscopy. The results showed that the recovery rate was 17.8% in 4-cell stage embryos,23.7% in the abnormal embryos,after 15 min and that there was no significant difference between them. The recovery rate of 8-cell embryos was 78.2% ,significantly higher than that of 4-cell or abnormal embryos. The result indicated that the gap junction between blastomeres may be established at 8-cell stage,and it may be important to the development of rabbit embryos.

Key words: Laser scanning confocal microscopy FRAP GJIC rabbit blastomeres

* This work was supported by climbing project of China National Ministry of Science and Technology(95-zhuan-08)and of Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Science.