

雌激素快速诱导小鼠囊胚细胞中钙离子增加在囊胚着床中的作用*

张诗茂¹, 喻琳麟^{1,2}, 曲婷¹, 袁东智¹, 张金虎¹, 何亚平¹, 岳利民^{1△}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 生理学教研室(成都 610041); 2. 成都市计划生育指导所(成都 610031)

【摘要】 目的 观察雌激素快速诱导小鼠囊胚细胞中钙离子增加在囊胚着床中的作用。方法 获取小鼠囊胚,将其分为空白组、耦联牛血清白蛋白的大分子雌激素组(E_2 -BSA 组)和钙离子螯合剂预处理再给予 E_2 -BSA 组(BAPTA+ E_2 -BSA 组),采用免疫细胞化学染色结合共聚焦显微镜观察,囊胚与子宫内膜上皮细胞体外共培养和异体胚胎移植技术研究雌激素快速诱导的小鼠囊胚细胞中钙离子增加对囊胚细胞整合素的表达和定位以及对囊胚黏附和植入的影响。结果 共聚焦显微镜观察结果显示 E_2 -BSA 可引起囊胚细胞整合素 α_v 、 β_3 的聚集,而 BAPTA 可阻断雌激素所引起的整合素的聚集和迁移。体外黏附实验结果显示,空白对照组和 BAPTA+ E_2 -BSA 组的囊胚黏附率分别为 35.5% 和 26.7%,低于 E_2 -BSA 组的囊胚黏附率(65.6%, $P < 0.05$)。体内移植实验结果显示, BAPTA+ E_2 -BSA 组的囊胚着床率 11.8% 低于 E_2 -BSA 组(52.9%, $P < 0.05$)。结论 雌激素诱导的小鼠囊胚细胞内钙离子的快速增加可引起整合素聚集,并在囊胚的黏附和植入过程中发挥重要作用。

【关键词】 雌激素 钙离子 整合素 囊胚 着床

Estrogen Induced Rapid Increase of Intracellular Calcium Plays Important Role in the Implantation of Mouse Blastocysts

ZHANG Shi-mao¹, YU Lin-lin^{1,2}, QU Ting¹, YUAN Dong-zhi¹, ZHANG Jin-hu¹, HE Ya-ping¹, YUE Li-min^{1△}. 1. Department of Physiology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Chengdu Institute of Family Planning, Chengdu 610031, China

△ Corresponding author, E-mail: yuelimin@scu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To study the roles of the increased intracellular calcium induced rapidly by estrogen in the implantation of mouse blastocysts. **Methods** The mouse blastocysts were collected from the female mice on the pregnant day 4, divided into 3 groups: control, E_2 -BSA and BAPTA+ E_2 -BSA. Immunofluorescence staining, confocal microscopy, embryo and endometrial epithelial cells co-culture and embryo transfer were used to investigate the effect of increased intracellular calcium induced by E_2 -BSA on the expression and localization of integrins in blastocysts and their adhesion to endometrial epithelial cells (EECs) and implantation into the endometrium. **Results** The increase of intracellular calcium induced rapidly by estrogen could cause the cluster and relocation of integrin α_v and β_3 , and BAPTA might block this effect, the adhesion rate of blastocysts in control group was 35.5%, BAPTA+ E_2 -BSA group was 26.7% and significantly lower than 65.6% of E_2 -BSA group ($P < 0.05$), and the implantation rate in BAPTA+ E_2 -BSA group was 11.8%, which was significantly lower than 52.9% of E_2 -BSA group ($P < 0.05$). **Conclusion** The rapid increase of intracellular calcium induced by estrogen may cause the relocation of integrin in blastocysts and their adhesion to EECs, which is important in the process of implantation.

【Key words】 Estrogen Calcium Integrin Blastocyst Implantation

卵巢分泌的雌激素在调节囊胚着床过程中起着非常重要的作用^[1]。雌激素除了基因组效应外,还具有快速非基因组效应^[2,3]。我们前期研究也证明雌激素(E_2)作用于小鼠囊胚,引起囊胚细胞内游离钙离子(Ca^{2+})浓度快速升高^[4]。然而,雌激素对囊胚快速激活所导致的 Ca^{2+} 的增加在其后续着床中的作用并未见任何报道,需要进一步探索。胚胎着

床中的一个重要环节是囊胚定位并黏附于子宫内膜上皮细胞,这一过程需要整合素的参与。研究证明,整合素 α_v 、 β_3 在“植入窗口期”的小鼠胚胎的滋养层细胞中表达是胚胎植入子宫内膜的必需条件^[5]。另外,细胞内钙离子的变化可影响整合素分子的表达、定位及功能^[6]。据此,我们推断雌激素快速效应所致小鼠囊胚细胞中钙离子增加可进一步诱导囊胚细胞中整合素表达和定位的变化,并在囊胚黏附和着床过程中发挥作用。本研究目的在于探讨雌激素快速效应所致小鼠囊胚细胞中钙离子增加对整合素

* 国家自然科学基金(No. 31100844)资助

△ 通讯作者, E-mail: yuelimin@scu.edu.cn

αv 、 $\beta 3$ 的表达和定位,以及囊胚与子宫内膜上皮细胞的黏附和植入的影响。

1 材料与方 法

1.1 囊胚获取

实验用清洁级昆明小鼠购于成都中医研究院动物中心〔生产许可证号:SCXK(川)2008-1-9〕。动物按常规饲养,20℃,光照 12 h/d,自由摄食饮水。将性成熟雄性小鼠和雌性小鼠按 1:2 合笼,次日晨查雌性小鼠阴栓,以查见阴栓为孕 1 d。于孕 4 d 上午 9:00~10:00 断颈处死小鼠,取出双侧子宫角,用 M2 液冲洗宫腔,获取形态良好的囊胚用于实验。

1.2 主要试剂

羊抗小鼠整合素 αv 、 $\beta 3$ 多克隆抗体,钙离子螯合剂 BAPTA/AM 为 Santa Cruz 公司产品,DMEM/F12 培养液为 Gibco 公司产品,偶联牛血清白蛋白雌激素(E_2 -BSA)为 Sigma 公司产品。

1.3 方 法

1.3.1 整合素 αv 、 $\beta 3$ 的免疫荧光染色 将囊胚分为空白对照、 E_2 -BSA、BAPTA + E_2 -BSA 3 个实验组,每组 3~5 枚囊胚。将空白对照组、 E_2 -BSA 组囊胚分别采用溶剂或 1 $\mu\text{mol/L}$ E_2 -BSA, 37℃ 处理 30 min; BAPTA + E_2 -BSA 组囊胚先用 5 $\mu\text{mol/L}$ BAPTA/AM 37℃ 处理 30 min 后再用 1 $\mu\text{mol/L}$ E_2 -BSA 37℃ 处理 30 min。处理完成后的各组囊胚行免疫荧光染色。步骤如下:4% 多聚甲醛(体积分数)室温固定 15 min; 含 0.1% Triton 的 PBS 室温打孔 10 min; 含 3% BSA 的 PBS 37℃ 封闭 30 min; 1:100 稀释的羊抗鼠整合素 αv 、 $\beta 3$ 一抗,阴性对照用普通羊 IgG 代替一抗,4℃ 过夜; 1:100 稀释的兔抗羊荧光二抗,37℃ 30 min; Hoechst33258 复染细胞核 30 min; 甘油封片,在共聚焦显微镜下观察、采图。

1.3.2 囊胚与子宫内膜上皮细胞共培养 于孕 4 d 上午 9:00~10:00 行孕鼠卵巢摘除术,孕 5 d 上午 9:00~10:00 断颈处死小鼠,取出双侧子宫角,用 M2 液冲洗宫腔,获得 93 枚形态良好的脱透明带囊胚。将囊胚分为空白对照组、 E_2 -BSA 作用组和 BAPTA + E_2 -BSA 作用组。空白对照组(31 枚)和 E_2 -BSA 作用组(32 枚)分别用溶剂和 1 $\mu\text{mol/L}$ E_2 -BSA 37℃ 处理 30 min, PBS 洗涤 3 次备用; BAPTA + E_2 -BSA 作用组(30 枚)先用 5 $\mu\text{mol/L}$ BAPTA/AM 37℃ 预处理 30 min, PBS 洗涤 3 次,再用 1 $\mu\text{mol/L}$ E_2 -BSA 37℃ 处理 30 min, PBS 洗

涤 3 次备用。

将子宫内膜上皮细胞株 Ishikawa 接种于装有 1 mL 含 10 g/L 胎牛血清和青霉素及链霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)的 DMEM/F12 培养液的 12 孔板中,在 37℃、5% CO_2 环境中进行培养,待细胞贴壁后,吸出 DMEM/F12 培养液加入 1 mL mM16 培养液,分别将 3 组囊胚移入培养有 Ishikawa 的 3 个孔中,共培养 12 h 后将培养板置于倒置显微镜下观察每组囊胚的黏附情况,轻微连续晃动培养板,位置没发生改变的囊胚记为黏附的囊胚,计算并比较各组间的黏附率。黏附率(%) = 黏附囊胚数/总囊胚数 \times 100%。

1.3.3 异体胚胎移植 囊胚准备:共获 34 枚囊胚,将其分为 E_2 -BSA 作用组(17 枚)和 BAPTA + E_2 -BSA 作用组(17 枚),处理方法同前, PBS 洗涤 3 次备用。为了使实验结果更具有可比性,分别将两组胚胎移植入假孕受鼠的双侧子宫角。胚胎移植:将性成熟的雌性小鼠与已行输精管结扎术的雄性小鼠按 2:1 合笼,次日晨检查雌性小鼠阴栓,以查见阴栓为假孕 1 d。于假孕 4 d 上午 10:00~12:00 麻醉小鼠,去除手术区背毛,在背部卵巢所在区域开一长约 1 cm 的纵向开口,用眼科镊轻轻拉出输卵管子宫角。在靠输卵管端选血管分布少的部位,用 5 号针扎一小孔,然后将装有上述不同因素处理的囊胚的玻璃微管从小孔穿入宫腔,将其中胚胎移入双侧子宫角,每侧子宫角移植囊胚数分别为 5~9 枚。假孕 10 d 断颈处死小鼠,取出子宫,记数着床位点。

1.3.4 统计学方法 采用 χ^2 检验分析计数资料, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 整合素 αv 、 $\beta 3$ 在小鼠囊胚中的表达和定位

如图 1 所示,大分子雌激素 E_2 -BSA 作用虽不会明显增加整合素 αv 、 $\beta 3$ 的表达,但可引起整合素 αv 的聚集和 $\beta 3$ 向靠近囊胚表面的细胞膜迁移,而使用钙离子螯合剂 BAPTA 预处理囊胚则可以阻断 E_2 -BSA 引起的效应。

2.2 囊胚与子宫内膜上皮细胞的黏附

不同实验因素处理组囊胚与子宫内膜上皮细胞后,结果显示空白对照组的囊胚黏附率为 35.5% (11/31), BAPTA + E_2 -BSA 作用组囊胚的黏附率为 26.7% (8/30),均低于 E_2 -BSA 作用组的囊胚的 65.6% (21/32, $P < 0.05$)。

2.3 囊胚的着床情况

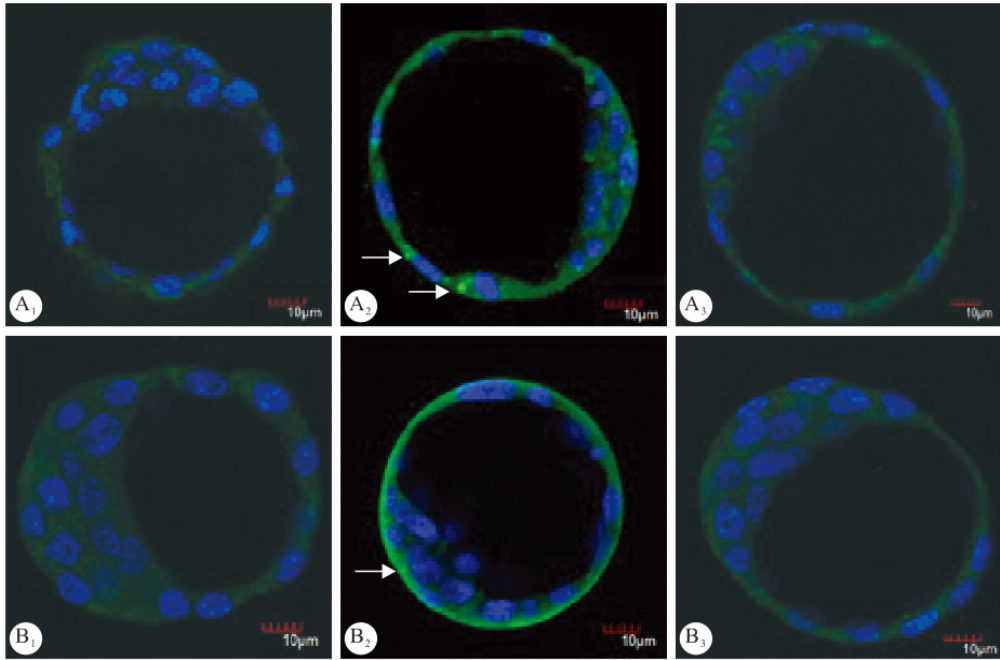


图 1 整合素 αv 、 $\beta 3$ 在不同因素处理的小鼠囊胚中的表达和定位

Fig 1 The expression and localization of integrin αv and $\beta 3$ in mouse blastocysts with different treatments

A: Integrin αv ; B: Integrin $\beta 3$; 1: Control; 2: E_2 -BSA; 3: BAPTA + E_2 -BSA. The green indicates the localization of integrin. The blue indicates nuclei. The arrows indicate integrin clusters

图 2 为两种不同处理囊胚分别移植入同一假孕雌鼠双侧子宫角的着床位点。 E_2 -BSA 处理囊胚植入的子宫角有 5 个着床位点，而 BAPTA + E_2 -BSA 处理囊胚植入的子宫角仅有一个着床位点。BAPTA + E_2 -BSA 组着床率为 11.8% (2/17)，低于对照组囊胚 52.9% (9/17) 的着床率 ($P < 0.05$)。



图 2 囊胚移植后双侧子宫角的着床位点

Fig 2 The implantation sites of blastocysts in the bilateral uterine horns of recipient (arrow indicates the implantation sites)

3 讨论

着床是胚胎与子宫内膜相互作用的生物学过程，它包括定位、黏附和植入，囊胚与子宫内膜上皮细胞的黏附是着床过程中的一个关键环节^[7]。

整合素及其配体系统直接参与了囊胚与子宫内膜上皮细胞的黏附反应。据文献报道，在囊胚和子宫内膜上皮细胞都有特定的整合素及其配体的表

达，这是两者间相互作用的重要分子基础^[8,9]。细胞内钙离子的变化与整合素分子之间有着重要的功能联系。Wang 等^[10]在研究滋养细胞整合素与细胞外基质中的纤连蛋白(FN)、胞浆中 Ca^{2+} 浓度的关系时发现，随着胞浆中 Ca^{2+} 浓度的升高，整合素分子大量交联、聚集。由此不难推断囊胚细胞中钙的增加也可能影响整合素表达和/或定位。

我们之前的研究发现 E_2 -BSA 能够诱导囊胚细胞内钙离子浓度的快速升高。为了进一步证明雌激素快速诱导小鼠囊胚细胞中钙离子增加是否也导致囊胚细胞整合素的变化，在本实验中，我们比较了空白对照、单独大分子雌激素 E_2 -BSA 处理和钙整合剂 BAPTA 与 E_2 -BSA 共同处理囊胚的作用差异，结果显示， E_2 -BSA 虽不会明显增加整合素 αv 、 $\beta 3$ 的表达，但可引起整合素 αv 的聚集以及 $\beta 3$ 向靠近囊胚表面的细胞膜迁移，而使用钙离子螯合剂预处理囊胚， E_2 -BSA 不再引起整合素的聚集效应。显然雌激素能够诱导囊胚细胞内钙离子浓度的快速升高可促使囊胚细胞整合素的聚集。

另有文献报道，整合素介导的细胞与细胞间的黏附与其在细胞中的定位有关^[11]。雌激素诱导囊胚细胞内钙离子浓度的快速升高可引起囊胚细胞整合素的聚集，也可能促进囊胚后续与子宫内膜上皮细胞的黏附和植入。我们进一步的研究证明，与空

白对照组的結果相比,单纯 E_2 -BSA 处理的囊胚黏附率明显升高,说明雌激素可以促进囊胚与细胞内膜上皮细胞的黏附;而 BAPTA+ E_2 -BSA 组的囊胚与共培养的子宫内膜上皮细胞的黏附率明显比 E_2 -BSA 组的囊胚黏附率低,移植后假孕小鼠子宫的着床率也明显降低。由此,我们有理由断定雌激素引发的胞内钙离子快速升高进一步触发了囊胚细胞整合素的定位变化,并在囊胚与子宫内膜的黏附及着床过程中发挥重要作用。

我们的上述结论揭示了雌激素通过其非基因组的快速效应所致囊胚细胞中钙离子的增加在囊胚后续着床过程中的作用。当前体外受精及胚胎移植,即试管婴儿技术越来越多的应用于临床对不育不孕的治疗,能否在胚胎移植前对体外培养的胚胎给予一定有效剂量的雌激素处理,以促进囊胚的激活,提高辅助生育技术的成功率是值得进一步探索的课题。

参 考 文 献

- 1 Takashi C, Toshihiro K, Nana N, *et al.* Ovarian estrogen regulates blastocyst adhesiveness through uterine osteopontin secretion during the implantation window. *Biol Reprod*,2011; 85(3):475.
- 2 Silva E, Kabil A, Kortenkamp A. Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways—distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010;245(2):160-170.
- 3 Pang Y, Dong J, Thomas P. Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest. *Endocrinology*,2008;149(7):3410-3426.
- 4 Yu LL, Zhang JH, He YP, *et al.* Fast action of estrogen on intracellular calcium in dormant mouse blastocyst and its possible mechanism. *Fertil Steril*,2009;91(2):611-615.
- 5 Kaneko Y, Murphy CR, Day ML. Extracellular matrix proteins secreted from both the endometrium and the embryo are required for attachment; a study using a co-culture model of rat blastocysts and Ishikawa cells. *J Morphol*,2013;274(1): 63-72.
- 6 Jia Z, Chen Q, Qin H. Ischemia-induced apoptosis of intestinal epithelial cells correlates with altered integrin distribution and disassembly of F-actin triggered by calcium overload. *Biomed Biotechnol*,2012;2012(10):617539.
- 7 Cuman C, Menkhorst E, Amy W, *et al.* Fetal-maternal communication: the role of Notch signalling in embryoimplantation. *Reproduction*,2014;147(3):R75-R86.
- 8 Gemma C, Jaume O, Montse C, *et al.* Expression pattern of osteopontin and $\alpha\beta 3$ integrin during theimplantation window in infertile patients with early stages of endometriosis. *Hum Reprod*,2012;27(3):805-813.
- 9 Yui K, Margot LD, Christopher RM. Integrin $\beta 3$ in rat blastocysts and epithelial cells is essential forimplantation *in vitro*: studies with Ishikawa cells and small interfering RNA transfection. *Hum Reprod*,2011;26(7):1665-1674.
- 10 Wang J, Mayernik L, ArmantDR. Integrin signaling regulates blastocyst adhesion to fibronectin at implantation; intracellular calcium transients and vesicle trafficking in primary trophoblast cells. *Devel Biol*,2002;245(2):270-279.
- 11 Kaneko Y, Lecce L, Day ML, *et al.* $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins disassemble from basal focal adhesions and $\beta 3$ integrin is later localised to the apical plasma membrane of rat uterine luminal epithelial cells at the time of implantation. *Reprod Fertil Dev*, 2011;23(3):481-495.

(2014 - 07 - 28 收稿,2014 - 10 - 17 修回)

编辑 吕 熙