



## 雌、孕激素对体外培养种植窗期子宫内膜腺上皮细胞降钙素表达的调节

正常子宫内膜仅在一个极短的时期内允许胚胎着床,这一时期子宫内膜容受性达到最高,被称为“种植窗”(implantation window)。虽然已知道“种植窗”的形成严密地受卵巢激素的控制,但其分子机制还不清楚,推测为卵巢激素调节子宫内膜特定基因表达,合成新的蛋白质,使子宫内膜能接受胚胎植入。Ding等[1]用基因表达筛选技术(gene expression screen technique)分离出“种植窗”期子宫内膜特异性增强表达的基因,DNA测序发现其中之一为降钙素(Ct),其表达与“种植窗”的开放相吻合并受母体因素调控。阻断其表达,导致着床失败,说明Ct在子宫内膜“种植窗”的形成中起重要作用。作者以前研究发现[2]Ct特异性表达于人类种植窗期子宫内膜腺上皮细胞胞浆内,并与不孕密切相关。本文应用流式细胞仪检测雌、孕激素对体外培养的子宫内膜上皮细胞Ct表达的影响,以探讨雌、孕激素参与着床的机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料来源及分组

1.1.1 标本来源 选取8例正常育龄期妇女,年龄25~35岁,月经周期28~30 d,术前3月无激素服用史。于月经周期第19~23天刮取少许子宫内膜,立即投入盛有10 ml D-Hanks液的青霉素瓶内,放入冰壶内,30 min内送入实验室进行培养。子宫内膜腺上皮细胞分离和培养参考Satyaswaroop等[3]的方法,并加以改进。

1.1.2 试验分组 子宫内膜原代接种 5~7 d细胞贴壁近满时传代,应用无血清培养基,生长3 d后分为5组:每组包括3瓶(25 cm)细胞,第1组为对照组,不加任何调节因子;第2组为孕酮( $P_4$ )组;浓度分别为 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-8}$  mol/L;第3组为 $E_2$ 组,浓度分别为 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-9}$  mol/L;第4组为孕激素受体拮抗剂(RU486)组,浓度为 $1 \times 10^{-6}$  mol/L;第5组为RU486+ $P_4$ 组:RU486浓度为 $1 \times 10^{-6}$  mol/L, $P_4$ 浓度为 $1 \times 10^{-6}$  mol/L,继续培养24 h或48 h,上机检测。

#### 1.2 主要试剂及方法

1.2.1 试剂与仪器 兔抗人Ct抗体(一抗)为DAKO公司产品,稀释浓度为1:100,FITC标记山羊抗兔IgG(二抗)购自华美公司,稀释浓度为1:100, $17\beta$ -雌二醇( $E_2$ )、 $P_4$ 购自Sigma公司,为美国Calchembio公司产品。流式细胞仪为美国Becton Dickinson公司生产的FACSTAR。

1.2.2 流式细胞仪(FCM)检测 将含有不同浓度 $E_2$ 、 $P_4$ 的培养液孵育24、48 h的子宫内膜上皮细胞0.25%胰酶消化制成单细胞悬液,以冷磷酸缓冲液(PBS)洗两次,加入冷的终浓度为70%乙醇,置于4 °C过夜。经乙醇固定的样品,以1 000 r/min离心5 min,弃上清液;加入PBS 10 ml洗涤细胞,以1 000 r/min离心5 min,弃上清液;沉淀加入0.1%Tris-X100 150  $\mu$ l,4 °C、2 h,加入PBS 10 ml洗涤细胞,以1 000 r/min离心5 min,弃上清液;沉淀加入一抗150  $\mu$ l,4 °C 过夜;洗涤细胞同上;沉淀加入二抗150  $\mu$ l,室温、避光染色20 min;上机测定各Ct阳性细胞的比例。

#### 1.2.3 统计学分析

所有资料应用SPSS软件包进行方差分析。

### 2 结果(表1)

表 1 孕激素与雌激素对体外培养子宫内膜上皮细胞 Ct 表达的影响 (阳性细胞百分比,  $\bar{x}\pm s$ )Tab.1 The effect of progesterone and estradiol on calcitonin expression in cultured human endometrial epithelial cells *in vitro* (percentage of calcitonin-positive cells,  $Mean\pm SD$ )

Time	Control	P <sub>4</sub> (mol/L)			E <sub>2</sub> (mol/L)			RU486	RU486+P <sub>4</sub>
		1×10 <sup>-8</sup>	1×10 <sup>-7</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-9</sup>	1×10 <sup>-8</sup>	1×10 <sup>-7</sup>		
24 h	14.0±1.20	26.1±2.74**	33.7±2.54**	47.3±3.01*	23.3±1.78	8.2±0.89*	3.6±0.75*	5.4±0.77*	17.8±1.76
48 h	13.4±1.12	29.1±2.56**	34.7±2.71**	45.9±2.98*	20.8±1.36	7.9±0.94*	2.7±0.54*	6.1±0.57*	19.6±1.65

P<sub>4</sub>: Progesterone; E<sub>2</sub>: Estradiol; \*P<0.05 vs control group; \*\*P<0.05 vs (1×10<sup>-6</sup>) group of P<sub>4</sub>

### 2.1 孕激素和RU486对子宫内膜Ct表达的影响

不同浓度P<sub>4</sub>均可显著促进Ct的表达(P<0.05), P<sub>4</sub>促进效应呈剂量依赖性。P<sub>4</sub>浓度为1×10<sup>-6</sup> mol/L, 作用24 h时, 阳性细胞百分比最高, 与其他浓度组相比差异具有显著性。增加刺激时间并不增强其表达。

RU486明显抑制Ct表达, 两时间段比较无差别, 但两时间段与对照组相比均具有显著性差别。

### 2.2 雌激素对子宫内膜Ct表达的影响

低浓度E<sub>2</sub>对子宫内膜Ct的表达有轻微的促进效应, 但无显著性差别, 高浓度E<sub>2</sub>显著抑制Ct的表达, 与对照组比较具有显著性差异。

## 3 讨论

在雌、孕激素的作用下, 围着床期子宫内膜发生形态学和生理学变化转为容受态。雌激素促进子宫内膜上皮增生、肥大, 孕激素使内膜从增殖期转为分泌期, 形成一个有利于胚胎粘附的宫内环境。我们以前的研究发现。Ct特异性表达于人种植窗期子宫内膜腺上皮细胞胞浆内, 其表达降低与不孕密切相关[2]。Ding [1]等也发现孕期小鼠子宫内膜Ct的表达与种植窗的开放吻合(受精后第2~6天), 在着床结束时, 子宫内膜中不能检测出Ct-mRNA。Zhu等 [4]在着床前(受精后第2天)小鼠子宫内注射与Ct-mRNA特异性互补的反义寡脱氧核糖核酸(ODNs), 阻断Ct基因的转录和翻译, 导致着床点数明显减少。这些结果均提示Ct在胚胎着床过程中起重要作用。

Ct是含有32个氨基酸残基的肽类激素, 主要由甲状腺滤泡旁C细胞合成、分泌。最近的研究表明, 子宫也可合成Ct[5]。但对Ct在子宫中合成的精确部位和功能还了解不多。Ct的主要生理功能是促进细胞外Ca<sup>2+</sup>转移, 增加细胞内游离Ca<sup>2+</sup>浓度。细胞膜上存在对Ct有高度亲和力的受体[6]。Ct与其受体结合后, 促进Ct受体与异三聚体G蛋白的结合, 活化腺苷酸环化酶和磷脂酶Cβ, 参与多种细胞功能如分化、增殖、变形。

本研究建立体外子宫内膜上皮细胞培养体系, 消除体内各种复杂因素影响, 发现P<sub>4</sub>刺激子宫内膜上皮细胞Ct的表达, 并呈剂量依赖性。在P<sub>4</sub>浓度为1×10<sup>-6</sup> mol/L 作用24 h, Ct阳性细胞数最高, 较基础值增加3倍, 再增加P<sub>4</sub>的浓度或延长作用时间均不能增加效应。而孕激素受体拮抗剂RU486则抑制其表达, 说明孕激素可能通过其核受体在转录水平调节Ct合成。为研究孕激素诱导Ct表达的分子机制, Zhu等[7]在体外培养的人类内膜癌HEC-1B细胞中转染Ct基因5'-端启动子(1.3 kb)。细胞内无内源性孕激素受体, 无论有或无孕激素存在, Ct启动子的活性均处于低水平, 若Ct启动子与孕激素受体并发转染细胞, 无孕激素存在时, Ct启动子活性不变, 但当孕激素浓度为100 nmol/L时, 其活性增加6~8倍, 若同时给予RU486, 启动子活性仍保持不变。提示孕激素由其受体介导, 通过调节启动子活性在转录水平调节Ct基因表达。

研究还发现, E<sub>2</sub>在低浓度(1×10<sup>-11</sup> mol/L)时对Ct表达有轻微的促进作用(与基础值比无显著性差别), 高浓度E<sub>2</sub>(1×10<sup>-8</sup> mol/L)抑制Ct表达。低剂量E<sub>2</sub>可能作为孕激素受体合成的底物, 加强P<sub>4</sub>促进Ct表达的效应, 而高浓度E<sub>2</sub>拮抗P<sub>4</sub>刺激Ct合成的效应。这些结果说明卵巢激素相互作用对子宫Ct的表达起重要调节作用。Ding等[1]研究发现小鼠孕2 d时Ct表达最强, 与受精后P<sub>4</sub>峰出现时间一致。有趣的是, 着床后至分娩, 低水平雌激素、高水平孕激素却不能诱导Ct的表达。提示除了雌、孕激素外, 还有其他阶段特异性因子参与Ct的表达调节。

Ct作为一个阶段特异性表达因子, 受卵巢激素调控, 在着床中起重要作用。Ct的主要功能是调节靶细胞的Ca<sup>2+</sup>水平, Wang等[8]研究发现移植前小鼠胚胎表面存在Ct的功能性受体, Ct可以增加卵裂球内游离Ca<sup>2+</sup>浓度, 促进胚胎分化, 加速囊胚形成。我们的研究也发现Ct可以快速增加人类子宫内膜间质细胞和4~8细胞阶段胚胎细胞内Ca<sup>2+</sup>水平(资料待发表)提示胚胎和子宫内膜表面存在Ct功能性受体, Ct可能通过加速子宫内膜蜕膜化, 促进胚胎生长、分化, 在胚胎着床过程中起重要作用。子宫内膜上皮细胞Ct的表达受性激素调节, 在人类胚胎着床中起重要作用。

(责任编辑: 杨金星)

参考文献:

[1] Ding YQ, Zhu LJ, Bagchi MK, et al. Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the

uterus during implantation[J]. Endocrinology, 1994, 135(5): 2265-74.

[2] 付志红, 陈士岭, 邢福祺. 降钙素在种植窗期子宫内膜特异性表达及与不孕的关系[J]. 同济医科大学学报, 2000, 29(4): 341-3.

[3] Satyaswaroop PG, Bressler RS, Dela MM, et al. Isolation and culture of human endometrial glands [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1979, 48(4): 639-41.

[4] Zhu LJ, Milan K, Bagchi, et al. Attenuation of calcitonin gene expression in pregnant rat uterus leads to a block in embryonic implantation[J]. Endocrinology, 1998, 139(1): 330-9.

[5] Fischer JA, Tobler PH, Kaufmann M, et al. Calcitonin regional distribution of the hormone and its binding sites in the human brain and pituitary[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78: 7801-5.

[6] Lin HY, Harris TL, Flannery MS, et al. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor.Science[J]. 1991, 254:1022-4.

[7] Zhu LJ, Kathleen CB, Mary P, et al. Calcitonin is progesterone-re-gulated marker that forecast the receptive state of endometrium during implantation[J]. Endocrinology, 1998, 139: 3923-34.

[8] Wang J, Rout UK, Bagchi IC, et al. Expression of calcitonin receptors in mouse preimplantation embryos and their function in the re- gulation of blastocyst differentiation by calcitonin[J]. Development, 1998, 125(21): 4293-302.

#### 参考文献:

[1] Ding YQ, Zhu LJ, Bagchi MK, et al. Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the uterus during implantation[J]. Endocrinology, 1994, 135(5): 2265-74.

[2] 付志红, 陈士岭, 邢福祺. 降钙素在种植窗期子宫内膜特异性表达及与不孕的关系[J]. 同济医科大学学报, 2000, 29(4): 341-3.

[3] Satyaswaroop PG, Bressler RS, Dela MM, et al. Isolation and culture of human endometrial glands [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1979, 48(4): 639-41.

[4] Zhu LJ, Milan K, Bagchi, et al. Attenuation of calcitonin gene expression in pregnant rat uterus leads to a block in embryonic implantation[J]. Endocrinology, 1998, 139(1): 330-9.

[5] Fischer JA, Tobler PH, Kaufmann M, et al. Calcitonin regional distribution of the hormone and its binding sites in the human brain and pituitary[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78: 7801-5.

[6] Lin HY, Harris TL, Flannery MS, et al. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor.Science[J]. 1991, 254:1022-4.

[7] Zhu LJ, Kathleen CB, Mary P, et al. Calcitonin is progesterone-re-gulated marker that forecast the receptive state of endometrium during implantation[J]. Endocrinology, 1998, 139: 3923-34.

[8] Wang J, Rout UK, Bagchi IC, et al. Expression of calcitonin receptors in mouse preimplantation embryos and their function in the re- gulation of blastocyst differentiation by calcitonin[J]. Development, 1998, 125(21): 4293-302.