

雌二醇及雌酮对人子宫内膜细胞 GJIC 及连接蛋白的影响

唐雪莲¹, 谢梅青^{2*}, 赵晓苗², 李雪梅¹, 蒲江波¹, 付志红¹

(1. 南方医科大学附属深圳市妇幼保健院生殖科, 广东 深圳 518028; 2. 中山大学附属第二医院, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨雌二醇(E₂)及雌酮(E₁)对体外培养的人子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞间隙连接细胞间通讯(GJIC)及连接蛋白(Cx)43、32表达的影响。【方法】采用划痕染料标记示踪技术及激光共聚焦显微镜扫描技术(LSCM), 观察E₂及E₁对原代培养的20例人子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞GJIC的影响, 采用激光共聚焦显微镜扫描技术, 观察E₂及E₁对Cx43、Cx32表达的影响。【结果】5 × 10⁻⁵ mol/L雌二醇作用48 h后间质细胞及腺上皮细胞GJIC功能没有明显变化(P > 0.05), 2.5 × 10⁻⁵ mol/L雌酮作用间质及腺上皮细胞48 h后, 细胞GJIC功能有所下降(P < 0.01), 同种Cx腺上皮细胞表达较间质细胞强(P < 0.05), 5 × 10⁻⁵ mol/L E₂、2.5 × 10⁻⁵ mol/L E₁对两种细胞Cx的表达没有影响(P > 0.05)。【结论】E₁抑制细胞GJIC功能, 提示其在子宫内膜增殖性病变的阶段扮演重要角色; E₁及E₂均未影响子宫内膜细胞Cx43、Cx32的表达, 提示Cx表达量不能完全反映GJIC功能。

关键词: 雌二醇; 雌酮; 子宫内膜; 间隙连接细胞间通讯; 连接蛋白

中图分类号: R711.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2013)03-0345-05

Effect of Estradiol-17 Beta and Estrone on Gap Junction Intercellular Communication and Connexin of Human Endometrial Cell

TANG Xue-lian¹, XIE Mie-qing^{2*}, Zhao Xiao-miao², LI Xue-mei¹, PU Jiang-bo¹, FU Zhi-hong¹

(1. Shenzhen Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to Southern Medical University, Shenzhen 518028, China;

2. The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the effects of estradiol-17 beta and estrone on gap junction intercellular communication and Cx43 and Cx32 expression of stromal and glandular cells in vitro. 【Methods】 The scrap loading dye transfer was used to investigate the effects of E₁ and E₂ on GJIC of endometrial stromal and glandular cells. The influence of E₁ and E₂ on Cx43 and Cx32 expressions was investigated with a laser scanning confocal microscope. 【Results】 The ability of GJIC function was higher in the endometrial stromal cells than that of the glandular cells in vitro. 2.5 × 10⁻⁵ mol/L E₁ leading to smaller GJIC after 48 h (P < 0.05). Cx32 expression in endometrial stromal and glandular cells were significantly higher than Cx43. 5 × 10⁻⁵ mol/L E₂ and 2.5 × 10⁻⁵ mol/L E₁ had no effect on Cx expression. 【Conclusions】 The function of Estrone's down-regulation on GJIC of endometrial stromal and glandular cells may be one of mechanisms which invert endometrial hyperplasia. E₁ and E₂ had no effect on Cx expression of endometrial stromal and glandular cells, which indicate Cx expression could not completely reflect GJIC function in vitro.

Key words: estradiol-17 beta; estrone; endometrium; gap junction intercellular communication; connexin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(3): 345-350]

收稿日期: 2013-01-12

基金项目: 广东省自然科学基金(2004年编号 31740)

作者简介: 唐雪莲, 硕士, 副主任医师; E-mail: 1632983576@qq.com; * 通信作者: 谢梅青, 博士, 教授, E-mail: mq-xie@yahoo.com

细胞间隙连接 (gapjunction, GJ) 是生物体内细胞间直接进行物质和信息交换的重要通道, 为细胞间通讯提供细胞间信号传递的特殊跨膜亲水性通道^[1], 间隙连接细胞间通讯 (Gap Junction Intercellular Communication, GJIC) 参与调控细胞增殖、分化及凋亡。GJIC 的基本蛋白质亚单位是连接蛋白 (Connexin, Cx)。子宫内膜腺上皮细胞、间质细胞均存在间隙连接。子宫内膜 Cx 表达受性激素调节^[2]。细胞在发生过度增殖过程中, 发生 GJIC 功能紊乱和下降, 细胞间接触抑制作用的丧失, 是导致癌变的不可忽视的重要因素。GJIC 功能的减弱或丧失已在许多器官的恶性肿瘤细胞中得到明确的证实^[3-4]。目前, 尚未见子宫内膜增殖激素雌二醇及雌酮对体外培养的子宫内膜细胞 GJIC 功能及 Cx 表达影响的研究报告。我们在既往细胞增殖抑制试验的基础上, 研究其对体外培养的子宫内膜细胞 GJIC 功能及 Cx 表达影响, 为探索子宫内膜异常增殖的发生机制以及寻找新的防治措施提供研究依据。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

选择 2006 年 6 月至 2007 年 4 月在中山二院因子宫肌瘤行全子宫切除的患者 20 例, 36 ~ 48 岁, 术前 3 个月未用激素, 月经周期规律 (28 ~ 32 d), 术后病理诊断未发现子宫内膜存在病变。术中获取子宫内膜, 之后立即投入盛有 5 mL PBS 的无菌青霉素瓶内, 低温条件下迅速转移到实验室进行分离培养。

1.2 主要试剂

雌二醇 (estradiol-17 beta, E₂); 雌酮 (Estrone, E₁); 荧光黄染料 (Lucifer Yellow, LY); 氟波酯 (TPA); D-MEM/F-12; 胶原酶 I; 二甲基亚砷 (DMSO); 胎牛血清。

1.3 主要实验仪器

倒置显微镜: 德国 Leica; 荧光显微镜: 德国 Leica TCS ST 型; 图像分析系统: 德国 Kontron 公司。

1.4 方 法

1.4.1 细胞培养方法 细胞培养方法: 原代细胞培养参照 Ryan^[5]的方法并加以改良: 利用差速贴壁法分离培养子宫内膜细胞并进行细胞纯度鉴定^[6]: 将子宫内膜组织剪成碎块, 加入 0.1% 的胶原酶 I, 混匀 37 °C 水浴 60 min, 筛网过滤, 将滤液及滤膜上组织及细胞收集离心分别接种, 利用差速贴壁法纯化子宫腺上皮细胞及间质细胞。

1.4.2 细胞缝隙连接通讯功能测定 用划痕染料标记示踪技术及激光共聚焦显微镜检测: 将细胞接种于直径为 35 mm² 的培养皿中生长至基本融合, 根据细胞毒性实验结果加入雌二醇 5 × 10⁻⁵ mol/L, 雌酮 2.5 × 10⁻⁵ mol/L (浓度的选择根据既往细胞增殖抑制试验结果及预实验决定)、每一浓度均做 2 个平行样, 作用 48 h 后, 10 ng/mL TPA 作用 2 h 后 (目前, 有大量文献报道 ATP 可抑制多种细胞 GJIC 的功能, 我们增加 ATP 作为对照), 弃去培养液, 用温和的磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 洗涤细胞 3 次, 加入 2 mL 0.05% 的荧光黄染料, 用手术刀片在平皿底部轻轻划线数条, 然后将平皿置于 37 °C 接触染料 10 min, 吸出染液, 再用 PBS 洗 3 次, 去除游离的荧光染料及脱落的细胞, 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min 后置于荧光显微镜下观察细胞间荧光黄染料的扩散情况并拍照。部分使用激光共聚焦显微镜检测。为了对实验结果进行定量分析, 对实验结果采用德国 KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统计算照片上划痕两侧 50 mm × 60 mm 范围内荧光染料扩散的面积。

1.4.3 激光共聚焦显微镜检测 Cx 表达 将原代子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞消化后, 六孔板内盖片法培养细胞。细胞长至 50% 予 5 × 10⁻⁵ mol/L 雌二醇, 2.5 × 10⁻⁵ mol/L 雌酮, 10 ng/mL TPA, 另设阴性对照。作用 48 h 后予 40 g/L 多聚甲醛固定 60 min, PBS 洗涤 3 min × 3 次。正常山羊血清封闭液室温封闭 30 min, 弃血清。分别滴加鼠抗 Cx43mAb (1:80)、Cx32mAb (1:80), PBS 代替一抗为空白对照, 无关抗体代替一抗为抗体特异性对照。4 °C 冰箱过夜, PBS 洗涤 5 min × 3 次。滴 FITC

标记羊抗鼠 IgG(1:200), 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 5 min × 3 次。无荧光缓冲甘油封片, 镜下观察, 用 488 nm 波长激发 FITC, 扫描并存储图像, 将上述染色爬片在激光共聚焦显微镜上进行 Cx43 和 Cx32 定位和定量分析。

1.4.4 统计学处理 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据用 SPSS11.0 统计软件处理, 组间比较用方差分析及配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 E₁, E₂ 对细胞 GJIC 功能的影响

细胞划痕染料标记示踪实验的结果可以看出, 对照组细胞的 GJIC 功能正常, 荧光黄染料在

细胞间的扩散距离较远。TPA 可显著抑制荧光黄染料在细胞间的扩散。浓度为 5×10^{-5} mol/L 的 E₂ 作用 48 h 后间质细胞及腺上皮细胞 GJIC 功能没有明显变化 ($P > 0.05$), 2.5×10^{-5} mol/L E₁ 作用间质及腺上皮细胞 48 h 后可抑制荧光黄染料在间质细胞及腺上皮细胞间的扩散(表 1, 图 1、2)。

2.2 E₁ 及 E₂ 对子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞 Cx43、Cx32 表达的影响

Cx43、Cx32 在两种细胞的膜浆上都有表达, Cx32 在上皮及间质的表达较 Cx43 的表达强, 同种 Cx 腺上皮细胞表达较间质细胞强 ($P < 0.05$), 2.5×10^{-5} mol/L E₁, 5×10^{-5} mol/L E₂, 10 ng/mL TPA 作用间质及腺上皮细胞 48 h 后 Cx43、Cx32 表达没有明显变化 ($P > 0.05$, 表 2、3, 图 2)。

表 1 E₁、E₂、TPA 对子宫内膜细胞的荧光染料扩散作用的面积

Table 1 The effects of E₁, E₂, and TPA on the scrap loading dye transfer of endometrial cells ($n = 6$)

| Group | Endometrial stromal cells | <i>P</i> | Endometrial glandular cells | <i>P</i> |
|---|---------------------------|----------|-----------------------------|----------|
| E ₁ 2.5×10^{-5} mol/L | 244 ± 58 ¹⁾ | 0.001 | 107 ± 21 ¹⁾ | 0.001 |
| E ₂ 5×10^{-5} mol/L | 959 ± 169 | 0.687 | 242 ± 97 | 0.687 |
| TPA 10 ng/mL | 43 ± 6 ²⁾ | 0.0001 | 45.9 ± 2.6 ²⁾ | 0.0001 |
| Control group | 992 ± 170 | | 225 ± 72 | |

E₁ (2.5×10^{-5} mol/L) leading to smaller GJIC after 48 h 1) $P < 0.01$, TPA down-regulate GJIC function of endometrial stromal and glandular cells 2) $P < 0.01$

表 2 E₁、E₂、TPA 对子宫内膜细胞 Cx43 表达的影响

Table 2 The influence of E₁, E₂, and TPA on Cx43 expressions of endometrial cells (A = 492 nm; $n = 12$)

| Group | Endometrial stromal cells | <i>P</i> | Endometrial glandular cells | <i>P</i> |
|---|---------------------------|----------|-----------------------------|----------|
| E ₁ 2.5×10^{-5} mol/L | 28 ± 4 | 0.436 | 35 ± 5 | 0.457 |
| E ₂ 5×10^{-5} mol/L | 27 ± 5 | 0.641 | 37 ± 4 | 0.649 |
| TPA 10 ng/mL | 26 ± 5 | 0.375 | 37.5 ± 2.7 | 0.346 |
| Control group | 27 ± 5 | | 36 ± 5 | |

表 3 E₁、E₂、TPA 对子宫内膜细胞 Cx32 表达的影响

Table 3 The influence of E₁, E₂, and TPA on Cx32 expressions of endometrial cells (A = 492 nm; $n = 12$)

| Group | Endometrial stromal cells | <i>P</i> | Endometrial glandular cells | <i>P</i> |
|---|---------------------------|----------|-----------------------------|----------|
| E ₁ 2.5×10^{-5} mol/L | 44 ± 5 | 0.736 | 60 ± 7 | 0.634 |
| E ₂ 5×10^{-5} mol/L | 42 ± 4 | 0.658 | 58 ± 5 | 0.712 |
| TPA 10 ng/mL | 42 ± 5 | 0.473 | 60 ± 4 | 0.523 |
| Control group | 44 ± 4 | | 61 ± 7 | |

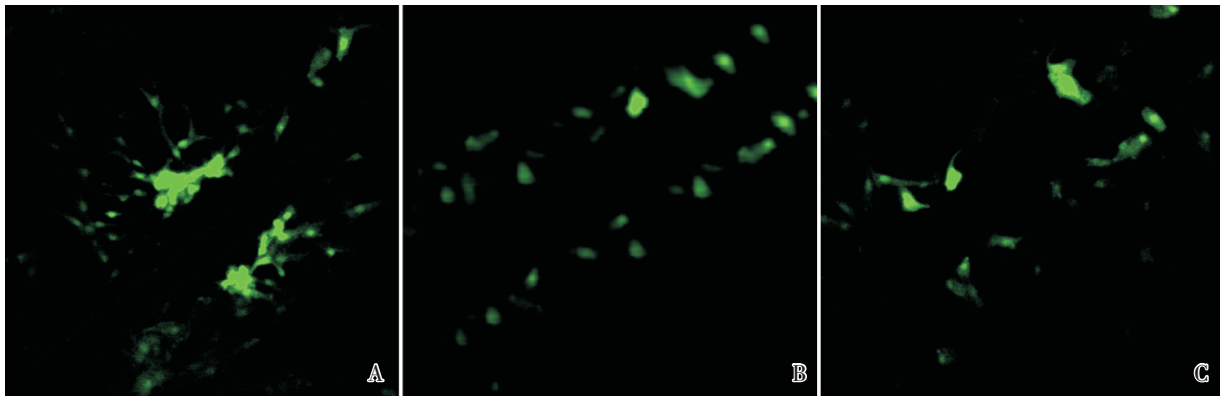


图 1 子宫内膜腺上皮细胞划痕荧光标记法+LSCM 测 GJIC

Fig.1 Endometrial glandular epithelial cell scratch fluorescence labeling and LSCM GJIC

A: Group control; B: Group E₁; C: Group TPA. × 200

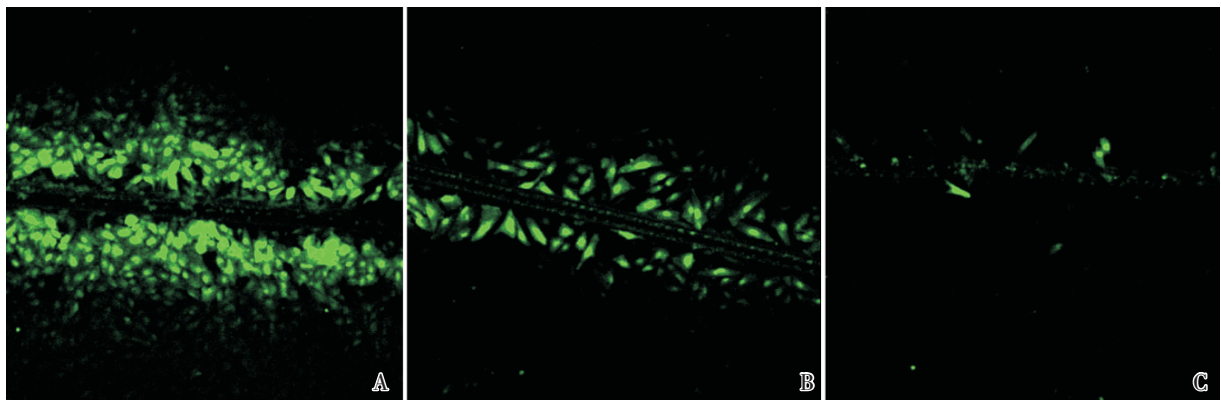


图 2 子宫内膜间质细胞划痕荧光标记法+LSCM 测 GJIC

Fig.2 Endometrial stromal cell scratch fluorescence labeling and LSCM GJIC

A: Group control; B: Group E₁; C: Group TPA. × 200

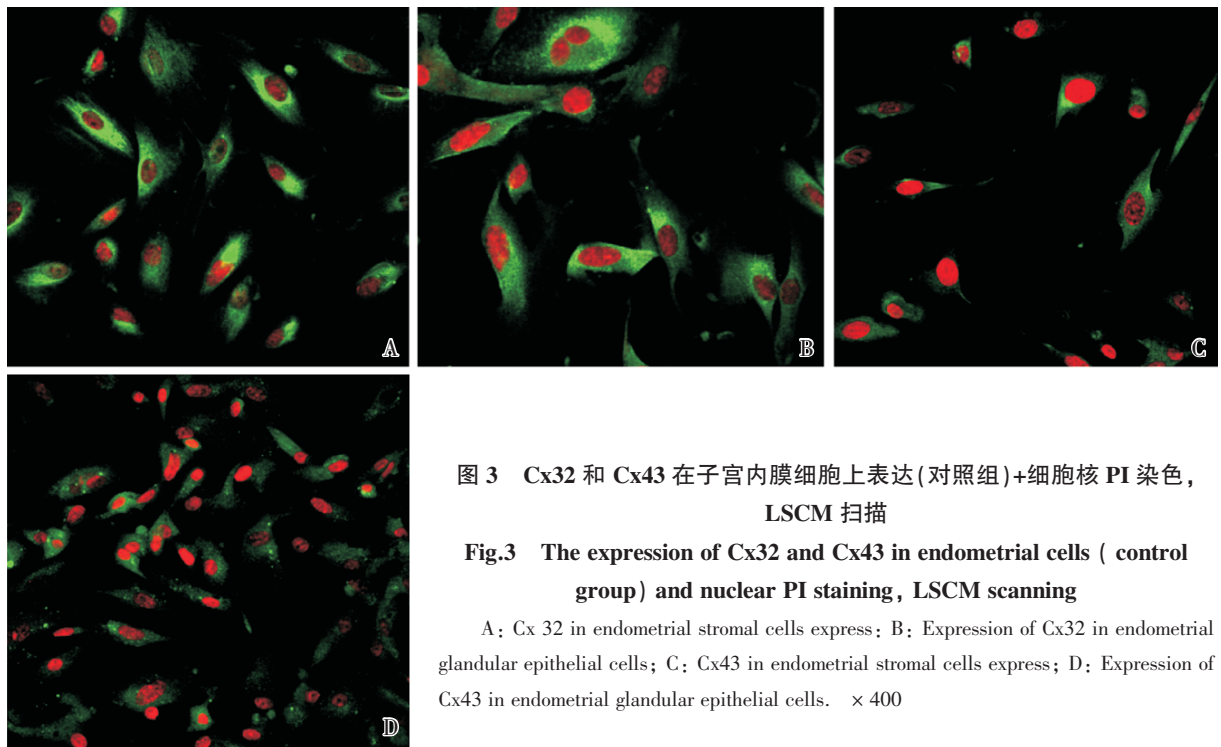


图 3 Cx32 和 Cx43 在子宫内膜细胞上表达(对照组)+细胞核 PI 染色, LSCM 扫描

Fig.3 The expression of Cx32 and Cx43 in endometrial cells (control group) and nuclear PI staining, LSCM scanning

A: Cx 32 in endometrial stromal cells express; B: Expression of Cx32 in endometrial glandular epithelial cells; C: Cx43 in endometrial stromal cells express; D: Expression of Cx43 in endometrial glandular epithelial cells. × 400

3 讨 论

雌激素、孕激素是性成熟女性体内主要的性激素,它们对子宫内膜的周期性变化起主要调节作用,雌激素促进子宫内膜增生,孕激素则在此基础上促进子宫内膜发生分泌期改变。如果卵巢分泌的雌激素与孕激素失去平衡,子宫内膜遭受过度的雌激素刺激,可能出现各种病理改变,包括增生过长、不典型增生甚至子宫内膜腺癌。雌二醇和雌酮对子宫内膜的刺激在子宫内膜增殖性病变的发生发展过程中起促进作用。目前,已有较多的研究资料证明雌酮与妇女的子宫内膜癌、乳腺癌、结肠癌发生有较密切的关系,绝经后妇女体内雌激素以雌酮成份为主,其与子宫内膜癌的关系已受到关注。Lewis^[7]发现雌酮可与细胞 DNA 结合,继而损伤 DNA,造成碱基丢失而致突变,从而诱发癌症的发生。

本研究在既往增殖抑制试验基础上观察 E₁ 及 E₂ 对 GJIC 功能及 Cx 表达的影响。GJIC 异常是癌症发生的重要机制之一。在肿瘤形成过程中, GJIC 功能的抑制或缺陷使前肿瘤细胞或转化细胞失去周围正常细胞的调控而获得自主性生长,进而发展成肿瘤细胞^[8]。GJIC 功能的抑制被认为是促癌变阶段的重要机制。既往有一些体外实验也证实许多促癌物(如 TPA)、癌基因和生长因子等均抑制 GJIC^[9-10],而一些有抗癌作用的物质(如绿茶、类胡萝卜素、某些黄酮类物质等)则明显提高 GJIC^[11-13]。这些都说明了 GJIC 异常与癌症的发生有密切关系。

我们既往有研究表明:将 10 ng/mL EGF 作用于体外培养的子宫内膜细胞发现 GJIC 功能下降,认为 EGF 对体外培养的子宫内膜细胞 GJIC 功能的下调作用与其促进子宫内膜细胞增生过长甚至癌变有可能有一定的相关性^[14],EGF 在雌激素促使其靶细胞癌变过程中起着极其重要的作用,体外培养的乳腺癌细胞株,必须在雌激素的影响下通过生长因子才能产生维持肿瘤生长所必需的调节因子,无雌激素存在,则肿瘤不能生长,也不能

在动物模型中形成肿瘤的^[15]。本研究将 2.5×10^{-5} mol/L 的 E₁ 作用于子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞后,也出现 GJIC 功能下调,提示我们可进一步研究 E₁ 对子宫内膜细胞 GJIC 功能的抑制是否与 EGF 有关。 5×10^{-5} mol/L 的 E₂ 对子宫内膜上皮及间质细胞 GJIC 功能没有明显影响,其促子宫内膜细胞增殖的作用有待我们进一步探讨,或扩大样本量,增加浓度组,或从细胞 DNA 及促有丝分裂方面进一步研究。

哺乳动物和人子宫内膜中已发现三种 Cx: Cx26、Cx32 和 Cx43。研究表明子宫内膜癌的 GJIC 功能的下调跟 Cx26 及 Cx43 的异常表达有关^[16]。雌激素对子宫内膜的单一、持续的刺激,可能通过抑制子宫内膜 Cx 的表达,继而干扰 GJIC 的功能,导致细胞的过度增殖,在子宫内膜癌的发生过程中起到重要的作用。本研究中我们将 E₁ 作用于子宫内膜细胞后 GJIC 功能下调,但 Cx 的表达没有明显变化,考虑可能与细胞的磷酸化状态有关,已有研究表明维 A 酸可以通过调节 Cx43 的磷酸化来调节子宫内膜间质细胞的 GJIC 功能^[17],Cx 的磷酸化状态对 GJIC 功能有密切关系^[18-19],现有的免疫组化法、免疫印迹法检测到的连接蛋白的总体含量变化,可能不能完全反映 GJIC 的功能改变,有待我们通过检测其磷酸化状态进行进一步研究。

参考文献

- [1] Maeda S, Tsukihara T. Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(7): 1115-1129.
- [2] Winterhager E, Grümmer R, Mavrogianis PA, et al. Connexin expression pattern in the endometrium of baboons is influenced by hormonal changes and the presence of endometriotic lesions [J]. *Mol Hum Reprod*, 2009, 15(10): 645-652.
- [3] Vinken M, De Kock J, Oliveira AG, et al. Modifications in connexin expression in liver development and cancer [J]. *Cell Commun Adhes*, 2012, 19(3-4): 55-62.
- [4] Czyz J, Szpak K, Madeja Z. The role of connexins in

- prostate cancer promotion and progression [J]. *Nat Rev Urol*, 2012, 9(5): 274–282.
- [5] Ryan IP, Schriock ED, Taylor RN. Isolation, characterization and comparison of human endometrial and endometriosis cells in vitro [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78(3): 642–649.
- [6] 唐雪莲, 谢梅青, 张凤丽. 高纯度分离子宫内膜腺上皮及间质细胞和体外培养技术[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2003, 11(6): 589–592.
- TANG XL, XIE MQ, ZHANG FL. A Method to Isolate and Culture Highly Purified Populations of Glandular Epithelial and Stromal Cells from Human Endometrial Specimens [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2003, 12(6): 589–592.
- [7] Lewis JS, Thomas TJ, Klinge CM, et al. Regulation of cell cycle and cyclins by 16 alpha-hydroxyestrone in MCF-7 breast cancer cells [J]. *J Mol Endocrinol*, 2001, 27(3): 293–307.
- [8] Baltaziak M, Kańczuga-Koda L, Rutkowski R, et al. Gap junction intercellular communication in carcinogenesis of endometrial cancer [J]. *Ginekol Pol*, 2011, 82(7): 520–524.
- [9] Geletu M, Trotman-Grant A, Raptis L. Mind the gap; regulation of gap junctional, intercellular communication by the SRC oncogene product and its effectors [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(10): 4245–4250.
- [10] Yeh SL, Hu ML. Oxidized beta-carotene inhibits gap junction intercellular communication in the human lung adenocarcinoma cell line A549 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41(12): 1677–1684.
- [11] Chung YH, Choi SJ, Joo JS, et al. Green tea prevents down-regulation of gap junction intercellular communication in human keratinocytes treated with PMA [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2011, 268(6): 885–892.
- [12] Zhang X, Ren Z, Zuo J, et al. The effect of all-trans retinoic acid on gap junctional intercellular communication and connexin 43 gene expression in glioma cells [J]. *Chin Med Sci J*, 2002, 17(1): 22–26.
- [13] Long AC, Bomser JA, Grzybowski DM, et al. All-trans retinoic acid regulates cx43 expression, gap junction communication and differentiation in primary lens epithelial cells [J]. *Curr Eye Res*, 2010, 35(8): 670–679.
- [14] 唐雪莲, 谢梅青, 郑峥, 等. 表皮生长因子对子宫内膜细胞 GJIC 影响的体外研究[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2006, 27(4S): 36–38.
- Tang XL, Xie MQ, Zheng Z, et al. In vitro study of the effects of epidermal growth factor on GJIC human endometrial cells [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2006, 27(4S): 36–38.
- [15] Chujo H, Yamasaki M, Nou S, et al. Effect of conjugated linoleic acid isomers on growth factor-induced proliferation of human breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2003, 202(1): 81–87.
- [16] Lesniewicz T, Kanczuga-Koda L, Baltaziak M, et al. Comparative evaluation of estrogen and progesterone receptor expression with connexins 26 and 43 in endometrial cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2009, 19(7): 1253–1257.
- [17] Wu J, Taylor RN, Sidell N. Retinoic acid regulates gap junction intercellular communication in human endometrial stromal cells through modulation of the phosphorylation status of connexin 43 [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(4): 903–910.
- [18] Joshi CN, Martin DN, Shaver P, et al. Control of vascular smooth muscle cell growth by connexin 43 [J]. *Front Physiol*, 2012, 3(1): 220–246.
- [19] Piccoli C, D'Aprile A, Scrima R, et al. Subcytotoxic mercury chloride inhibits gap junction intercellular communication by a redox- and phosphorylation-mediated mechanism [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(5): 916–927.

(编辑 张恩健)