技术方法 文章编号:0253-3626(2009)05-590-03

小鼠肠道 Cajal 间质细胞膜雌激素受体的检测和分析

李 凡,黄 颖,童卫东,刘宝华
(第三军医大学大坪医院野战外科研究所普外科,重庆 400042)

【摘 要】目的:检测并分析体外培养的小鼠肠道 Cajal 间质细胞(Interstitial cells of cajal,ICC)膜雌激素受体(Membrane estrogen receptor,mER)。方法:利用原代培养小鼠 ICC,采用免疫荧光染色结合激光共聚焦显微镜技术分析 ICC 细胞膜雌激素结合位点;采用密度梯度离心法分离 ICC 细胞膜,采用同位素法、放射性配体结合分析法对 mER 的最大结合容量(Bmax)和平衡解离常数(kD)进行分析。结果:免疫组化结果证实体外成功分离培养小鼠肠道 ICC;激光共聚焦观察显示,ICC 细胞膜上存在雌激素作用位点;放射性配体结合分析及 Scatchard 分析证实 ICC 细胞膜雌激素受体的的受体最大容量(Bmax)为 45.75 fmol/mg protein,平衡解离常数(kD)为 0.717 3 nmol/L。结论:ICC 表达 mER,该受体可能介导雌激素对 ICC 的快速非基因组作用。

【关键词】雌激素膜受体;Cajal 间质细胞;雌激素
【中国图书分类法分类号】Q952.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-11

Identification and analysis of membrane estrogen receptor in interstitial cells of Cajal

LI Fan, et al
(*Department of General Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University*)

【Abstrat】*Objective*: To detect and analyze the membrane estrogen receptor(mER)in primary cultured interstitial cells of Cajal (ICC). *Methods*: Interstitial Cells of Cajal(ICC)'s surface binding sites for 17-β estradiol(E2)were detected by cell-impermeant ligand using confocal microscopy. Radioligand binding assay and Scatchard software were used to analyzed the characteristics of mER. *Results*: Immunofluorescence shows the staining pattern of nonfixed, nonpermeabilized ICC incubated with E2BSAFITC. The radioligand binding assay were analyzed by Scatchard software, The Bmax of mER was 45.75 fmol/mg protein and the kD was 0.717 3 nmol/L. *Conclusion*: A form of the estrogen receptor is present within the cell membrane of ICC and maybe capable of mediating rapid effect of estrogen.

【Key words】Estrogen; Membrane estrogen receptor; Interstitial cells of Cajal

雌激素被认为是影响肠道动力的因素之一[1],而(Interstitial cells of cajal,ICC)是肠神经系统的重要组成部分和肠道动力有密切关系[2],那么雌激素是否对 ICC 有直接的作用,ICC 是否表达经典的核雌激素受体(Nulear estrogen receptor,nER)和膜雌激素受体(Membrane estrogen receptor,mER)? 验证这一问题对研究雌激素在 ICC 功能调节作用以及雌激素对肠道运动功能的影响中有重要意义,本研究通过免疫荧光染色及激光共聚焦显微镜扫描分析 ICC 上的雌激素受体,并对细胞膜上的雌激素受体的生物化学特性进行初步分析。

作者介绍:李 凡(1980-),男,硕士,
研究方向:胃肠动力学。
通讯作者:刘宝华,男,教授,E-mail: lbh57268@163.com。
基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC,2006BB5114)。

1 材料与方法

1.1 材料

E2BSAFITC、Ficoll400、BSAFITC、Percoll、Trincine、Ⅱ型胶原酶、己烯雌酚(DES)均购自 Sigma 公司,rmSCF 购自 CytoLab 公司。2,4,6,7^{3}H 雌二醇(^{3}H-E2)由 Pharmacia 公司提供;M199 培养基为 Hyclone 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 ICC 原代培养 参照李春穴等[3]分离、培养 ICC,具体实验步骤如下:Balb/c 小鼠,出生后 15 ~ 20 d 内,雌雄不限,清洁级,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物试验中心提供。小鼠禁食 12 h,在无菌条件下,取中段 3 cm 的结肠,放入直径 10 cm 培养皿;仔细剥去结肠系膜和血管,用 10 ml D-Hank'S (pH7.0)液将结肠内容物冲洗干净后,将结肠

固定在木板上；纵行剖开结肠，剥去结肠粘膜层，D-Hank'S 液反复冲洗肌条 3～4 次，将肌条剪碎至 1～2 mm^3 小块后放入小烧杯中；加入 20 ml Ⅱ型胶原酶（1.3 mg/ml），37℃消化 30 min；将其移入 15 ml 离心管，1 500 r/min 离心 3 min，用 10 ml D-Hank'S 重悬沉淀，用吸管反复吹打约 10 min；1 500 r/min 离心 3 min，用 10 ml 左右 M199 重悬细胞；过 200 目筛网去除大块组织，将细胞加在等体积 Ficoll400 梯度密度液上；30 g 离心 10 min，取液面交界细胞沉淀；M199 培养基重悬细胞；将细胞浓度调整至 1×10^6 个 /ml，接种至 6 孔培养板，板中预先放置包被鼠尾胶原（2 ng/cm^2）的盖玻片；放入培养箱内，在 37℃，5%CO_2 条件下培养。

1.2.2 免疫荧光染色激光共聚焦显微镜观察 ICC 雌激素受体 以每孔 1×10^6 个细胞接种细胞于 6 孔板（内置盖玻片），细胞生长至接近汇合时，弃去培养液，4%多聚甲醛固定细胞爬片，膜受体观察组在 4℃下 5%BSA 封闭细胞 30 min，加入 E2BSA-FITC（1 mg/ml）或 BSA-FITC 孵育 40 min。核受体观察组 5%BSA 封闭细胞后加入 0.1% Triton X-100 破膜处理 10 min，再加入 E2BSAFITC（1 mg/ml）或 BSA-FITC 孵育 40 min。PBS 多次清洗后，在共聚焦显微镜下观察、拍照。

1.2.3 密度梯度离心法提取 ICC 细胞膜 细胞接种于 75 ml 培养瓶至生长融合后，弃去培养液，PBS 冲洗，用细胞刮刮取细胞。1 000 r/min 4℃离心 10 min 收集细胞。弃去上清液，加入 1 ml BufferA 重悬细胞，4℃下静置 20 min 后匀浆。将匀浆液转入 1.5 ml Epperdorf 离心管，1 000 g 4℃下离心 10 min。上清液即为去核后部分，置于冰上保存。沉淀用 1 ml BufferA 重悬后，4℃下静置 20 min 后匀浆，收集上清液。将两次上清液混合。铺 9 ml 30% Percoll 于 TI60 rotor 离心管，将上清液贴离心管壁加载其上，84 000g × 60 min，可见离心管中部有一条白色环带，即为细胞质膜，用巴斯德吸管环形吸取收集。膜蛋白用提取液进行抽提，4℃下作用 30 min 后，离心，12 000 r/min × 15 min，上清液为抽提出的膜蛋白。

1.2.4 放射性配体结合实验及 Scatchard 分析 在 200 μl 总反应体系中，加入膜蛋白，使其终浓度为 3 mg/ml。分别加入不同终浓度的 ^{3}H-E2（0.05~2.0 nmol/L）作多点饱和分析的总结合（Total Bound，TB）测定。非特异性结合（Nonspecific Bound，NB）测定再加入 100 倍于 ^{3}H-E2 浓度的己烯雌酚（DES）。置 4℃反应 16 h 后，立即加入等体积的 DCC 悬液，混匀。冰浴 10 min，4℃下 4 000 r/min × 10 min。取 200 μl 上清液，加入 10 ml 闪烁液中，摇匀放置在液闪烁记数仪上进行放射性活性计数（cpm）测定。同时作 T 管 cpm（以 T 表示）测定，直接取 10 μl ^{3}H-E2，直接加入闪烁液，液闪计数，并计算出相应的 ^{3}H-E2 体积的 T 管总结合。用 Scatchard 软件系统进行数据处理和分析，特异结合（Specific Bound，SB）由 TB 减去 NB 得出。标记游离配基（Free，F）由 T 管总结合（Total）计数减去 TB 的计数，并换算成 fmol 数。饱和曲线作图以标记配基的浓度（nmol）为横坐标，SB（fmol/mg）为纵坐标；Scatchard 作图以 SB（fmol/mg）为横坐标，SB/F 为纵坐标。

2 结 果

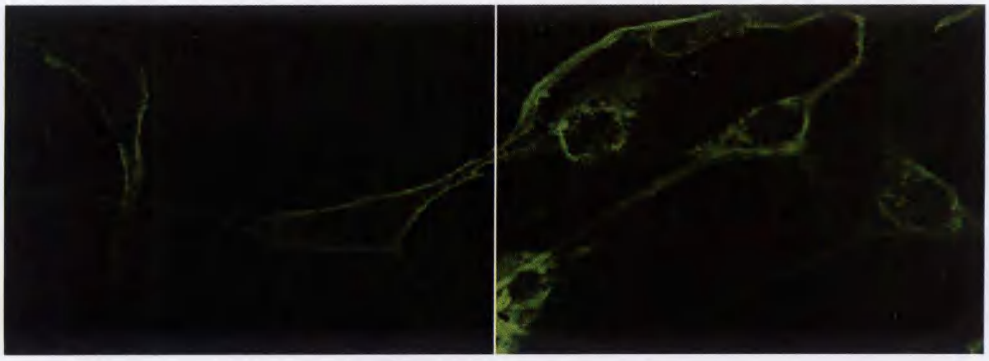
2.1 免疫荧光观察 ICC 雌激素受体表达

2.1.1 ICC 细胞膜受体观察 由于 E2BSAFITC 是大分子，在未对细胞进行固定及透膜处理之前，无法通过细胞膜，所以常常被研究者用来观察位于细胞膜的雌激素受体。在膜受体观察组，我们观察到显著的绿色荧光，绿色荧光染色呈点状分布于细胞膜及突起（图 1A），证明 ICC 细胞膜表面的确有雌激素作用位点的表达，也就是 mER。

2.1.2 ICC 细胞核受体观察 对细胞进行 0.1% Triton X-100 后，E2BSAFITC 就能够进入细胞核，可以通过它来观察位于细胞核的雌激素受体。在核受体观察组，我们依然可以观察到显著的绿色荧光（FITC），而且绿色荧光染色主要分布于细胞膜，细胞质及突起，而细胞核并未发现绿色荧光分布（图 1B）。这一结果说明 ICC 细胞核内并无雌激素受体的表达，ICC 上并不存在经典的核受体（nER）。

2.2 放射性配体结合实验及 Scatchard 分析

通过放射性配体结合实验我们对 ICC 雌激素



A. 膜受体观察组　　B. 核受体观察组

图 1 ERβ 在乙状结肠粘膜中的表达(×1 000)

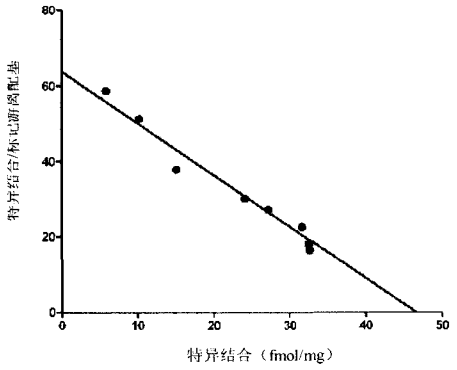


图 2 ^{3}H-E2 与 ICC 细胞膜雌激素受体结合的 scatchard 图

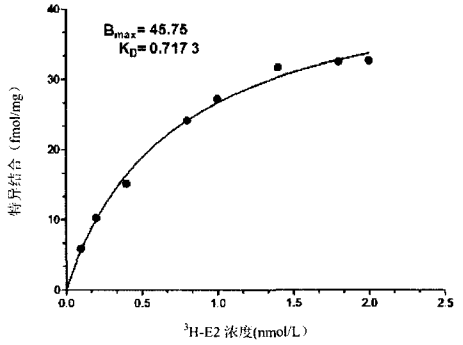


图 3 ICC 细胞膜雌激素受体饱和曲线

膜受体进一步的分析，由 Scatchard 分析通过线性回归绘制 ^{3}H-E2 与 ICC 上 mER 结合的 Scatchard 图（图 2）以及饱和曲线（图 3），得出 mER 的受体最大容量（Bmax）为 45.75 fmol/mg protein，平衡解离常数（kD）为 0.717 3 nmol/L（图 3）。

3 讨 论

经典的 nER 分为两型：ERa、ERβ。两者具有不同的结构和组织分布，导致雌激素对不同靶器官呈现不同的作用。但 1975 年 Pietras 等人首次证实，雌激素可作用于子宫内膜，快速影响细胞钙离子内流[4]，并随后提出“雌激素膜受体”的概念，认为细胞膜上存在 mER，介导雌激素的快速效应[5]。后续的研究发现，雌激素可以通过快速非基因组作用（Nonge normic effect）快速活化细胞内第二信号分子并介导相应的生物学效应。例如，雌激素的刺激会引起 PI3-kinase（Phosphatidylinositol 3-kinase），MAPK（Mitogen activated protein kinase）等家族蛋白激酶快速而短暂的活化，这种反应在几分钟内就会发生[6,7]。通过活化这些第二信号分子，雌激素可以影响多种细胞的生长、凋亡及功能。

ICC 是肠神经系统的一种具有独立功能的特殊类型的细胞，以网状结构存在于胃肠道[8,9]。ICC 网状结构通过缝隙连接将慢波传递到平滑肌，导致平滑肌细胞的电压依赖性钙通道激活，产生动作电位[9]。由于其在控制胃肠动力方面独特和重要的地位，已逐渐成为胃肠动力领域的研究热点之一。本研究我们首先应用免疫荧光法技术，利用 E2BSAFITC 对 ICC 进行荧光标记，从形态学方面来探讨 ICC 膜上雌激素的结合位点。E2BSAFTIC 为标记有异硫氰酸荧光素的雌激素—牛血清白蛋白大分子复合物，不能透细胞膜，广泛应用于雌激素膜受体的研究[10,11]。免疫荧光显微镜镜下可见，E2BSAFITC 处理后的 ICC 膜上有散在荧光。这一结果和在 MCF-7[12]，GIB 垂体瘤细胞[13]等细胞质膜上观察到的雌激素的结合位点的荧光结果很相似，然而和这些细胞不同的是，在应用 Triton X-100 对细胞膜作通透处理后. 在细胞核我们并不能观察到荧光，表明 ICC 并不表达经典的 nER。

为进一步研究 mER 的特性，我们用采用密度梯度离心法对收集的 ICC 进行超高速离心，分离纯化了细胞质膜。根据受体与配体结合动力学的基本原理，本研究对提纯的 ICC 质膜进行放射配体结合分析及 Scatchard 数据处理。结果表明，^{3}H-E2 能与 ICC 质膜作特异结合，受体最大容量（Bmax）为 45.75 fmol/mg protein，本研究中 mER 具有“S”型饱和曲线，这也证实 E2 与 mER 的结合具有饱和性。kD 是配体与受体结合性质的重要参数，表示受体与配体间亲和力的大小，本研究中 kD 值约为 0.717 3 nmo/L，说明受体结合具有高度的亲和力。

1992 年，Everson 等[14]观察到妊娠对人全消化道动力有显著影响。1993 年，Baron 等[15]发现便秘也是妊娠主要的并发症之一。2003 年，Jung 等[16]发现女性月经周期中黄体期的结肠传输时间较卵泡期显著延长，近来，我们的研究发现雌激素受体和结肠肌电变化有关[16]，这些研究结果证明女性激素异常可以影响肠道动力引起肠道动力障碍。作为女性激素的重要一员，雌激素究竟是通过何种方式影响肠道动力？迄今国内外未有深入研究。我们的研究表明，ICC 细胞仅表达 mER，不表达 nER。这一结果说明在雌激素对 ICC 的作用中是以非基因组作用为主导的，进一步的深入探讨将会揭示雌激素通过 mER 对 ICC 生长、功能的调控作用，这对我们了解

技术方法 文章编号:0253-3626(2009)05-0593-04

实时荧光定量 PCR 检测大鼠组织 Angptl3 表达的标准曲线构建

王继红,黄家利,程 梅,曾建涛,王 欣
(重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:采用实时荧光定量 PCR(染料法)建立检测 SD 大鼠组织血管生成素样蛋白 3(Angiopoietin-related protein 3, Angptl3)表达量的标准曲线。方法:以 SD 大鼠肝组织总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 获得目的 DNA 片段,用 T-A 克隆方法将其装载到质粒 pUCm-T 上,经过转化、质粒提取获得标准品,并以此为模板梯度稀释进行 Real-time PCR 反应,建立该方法的标准曲线。结果:Angptl3 标准曲线相关系数为 0.997 6,相关性较好;斜率为 0.862 3,扩增效率适中。结论:成功构建了用 Real-time PCR 方法检测 SD 大鼠肝组织 Angptl3 表达量的标准曲线。

【关键词】荧光定量 PCR;Angptl3;标准曲线;SD 大鼠
【中国图书分类法分类号】Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-25

作者介绍:王继红(1955-),女,副教授,
研究方向:临床酶学、蛋白质组学。

基金项目:重庆医科大学创新基金 CX200528。

雌激素和肠动力障碍的关系有重要意义。

参 考 文 献

[1] Beckett EA, McCloskey C, O'Kane N, et al. Effects of female steroid hormones on A-type K^+ currents in murine colon [J]. J Physiol, 2006, 573 (Pt 2): 453-468.

[2] Ward SM, Sanders KM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(3): G602-611.

[3] Li CX, Liu BH, Tong WD, et al. Dissociation, culture and morphologic changes of interstitial cells of Cajal in vitro[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(18): 2838-2840.

[4] Pietras RJ, Szego CM. Endometrial cell calcium and oestrogen action [J]. Nature, 1975, 253(5490): 357-359.

[5] Pietras R J, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells[J]. Nature, 1977, 265(5589): 69-72.

[6] Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase [J]. Nature, 2000, 407(6803): 538-541.

[7] Yue W, Wang JP, Conaway M, et al. Activation of the MAPK pathway enhances sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to the mitogenic effect of estradiol[J]. Endocrinology, 2002, 143(9): 3221-3229.

[8] Lee JC, Thuneberg L, Berezin I, et al. Generation of slow waves in membrane potential is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal [J]. Am J Physiol, 1999, 277(2 Pt 1): G409-423.

[9] Ordog T, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of cajal generate electrical slow waves in the murine stomach[J]. J Physiol, 1999, 518 (Pt 1) 257-269.

[10] Zheng J, Ali A, Ramirez VD. Steroids conjugated to bovine serum albumin as tools to demonstrate specific steroid neuronal membrane binding sites[J]. J Psychiatry Neurosci, 1996, 21(3): 187-197.

[11] 张广军,刘宝华,童工东. 雌雄素受体 β 在大鼠结肠的表达及其对 Cajal 间质细胞,结肠肌电影响的实验研究[J]. 重庆医学, 2008, 37 (9): 942-943.

[12] Cao S, Hudnall SD, Kohen F, et al. Measurement of estrogen receptors in intact cells by flow cytometry [J]. Cytometry, 2000, 41 (2): 109-114.

[13] Norfleet AM, Thomas ML, Gametchu B, et al. Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry [J]. Endocrinology, 1999, 140(8): 3805-3814.

[14] Everson GT. Gastrointestinal motility in pregnancy[J]. Gastroenterol Clin North Am, 1992, 21(4): 751-776.

[15] Baron TH, Ramirez B, Richter JE. Gastrointestinal motility disorders during pregnancy[J]. Ann Intern Med, 1993, 118(5): 366-375.

[16] Jung HK, Kim DY, Moon IH. Effects of gender and menstrual cycle on colonic transit time in healthy subjects[J]. Korean J Intern Med, 2003, 18(3): 181-186.

(责任编辑:关蕴良)