

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.30.005

小鼠早期胚胎 CSD 基因及牛磺酸的表达研究*

范晶晶^{1,2}, 李 炜³, 吕钊旭⁴, 冯永珍⁵, 郑秋阁^{6△}

(1. 潍坊学院生物与农业工程学院, 山东潍坊 261061; 2. 山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室, 山东潍坊 261061; 3. 潍坊护理职业学院内科教研室, 山东潍坊 261041; 4. 山东省潍坊市妇幼保健院 新生儿科 261000; 5. 潍坊学院附属医院护理部, 山东潍坊 261061; 6. 潍坊学院化学 化工与环境工程学院, 山东潍坊 261061)

[摘要] **目的** 研究半胱亚磺酸脱羧酶(CSD)及牛磺酸在小鼠早期胚胎发育过程中的表达。**方法** 小鼠超排卵后自然交配, 分别在交配后不同时间收集 2-细胞、4-细胞、8-细胞、桑椹胚、囊胚期胚胎, 采用逆转录 PCR (RT-PCR)、免疫荧光染色方法检测 CSD 及牛磺酸的表达情况。**结果** 着床前不同时期小鼠胚胎都有 CSD mRNA 的表达, 且呈逐渐升高趋势, 桑椹胚表达量急剧升高, 囊胚期达到最高值。免疫荧光染色结果显示 CSD 和牛磺酸在早期胚胎各阶段都有表达, 主要表达在细胞质中。**结论** 在小鼠早期胚胎发育过程中牛磺酸可能通过 CSD 途径合成, 牛磺酸可能在小鼠早期胚胎细胞的分裂和分化过程起重要作用。

[关键词] 半胱亚磺酸脱羧酶; 牛磺酸; 胚胎发育; 基因表达

[中图分类号] Q813.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)30-3863-04

Study on the expression of CSD gene and taurine in mouse early embryos*

FAN Jingjing^{1,2}, LEI Wei³, LV Zhaoxu⁴, FENG Yongzhen⁵, ZHENG Qiukai^{6△}

(1. College of Biological and Agricultural Engineering, Weifang University, Weifang, Shandong 261061, China; 2. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in University of Shandong, Weifang, Shandong 261061, China; 3. Department of Internal Medicine, Weifang Nursing Vocational College, Weifang, Shandong 261041, China; 4. Department of Neonatology, Maternity and Child Care Hospital of Weifang city, Weifang, Shandong 261000, China; 5. Department of Nursing, School Hospital of Weifang University, Weifang, Shandong 261061, China; 6. College of Chemical Engineering and Environmental Engineering, Weifang University, Weifang, Shandong 261061, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of CSD gene and taurine in early embryo development of mouse. **Methods** 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula and blastocyst were collected respectively in different times after superovulation and natural mating. The expression of CSD and taurine were detected by immunofluorescence and RT-PCR. **Results** The results show that CSD mRNA was expressed in preimplantation embryo and the expression level showed an increasing tendency. The expression of CSD mRNA was increased sharply in morula and reached the highest in blastocyst. The immunofluorescence results showed that taurine and CSD were expressed in preimplantation embryo, mainly in the plasma. **Conclusion** Taurine may be synthesized through CSD pathway during early embryonic development in mice. Taurine may play an important role in early embryos division and differentiation.

[Key words] cysteine sulfinate decarboxylase; taurine; embryonic development; gene expression

半胱亚磺酸脱羧酶(cysteine sulfinate decarboxylase, CSD)对底物半胱亚磺酸具有较高亲和性, 是牛磺酸合成的限速酶^[1]。在哺乳动物体内牛磺酸合成的第一步是由蛋氨酸和半胱氨酸经代谢产生半胱亚磺酸, 然后半胱亚磺酸经过 CSD 的脱羧作用形成亚

牛磺酸, 再经氧化最终生成牛磺酸^[2]。研究发现牛磺酸是输卵管液中水平最高的游离氨基酸, 在小鼠输卵管液中可达到 6.64 $\mu\text{mol/L}$, 能占总游离氨基酸的 59%^[3], 在妊娠第二天大鼠输卵管液中浓度达 101.8 $\mu\text{mol/L}$ ^[4]。输卵管是胚胎早期发育的主要场所, 许多

* 基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2016CB28); 国家星火计划项目(2015GA740060); 山东省莱州湾海洋动物健康养殖工程技术协同创新中心(CXGX15005PT); 山东省潍坊市科学技术发展计划项目(2016GX022, 2017GX005)。 作者简介: 范晶晶(1981—), 讲师, 博士, 主要从事生殖与发育研究。△通信作者, E-mail: zqiukai@163.com。

研究结果已证实牛磺酸确实参与调节胚胎的发育和胚胎的着床。在培养液中添加一定量的牛磺酸能促进小鼠、大鼠、兔、牛和人等多种动物胚胎的体外发育^[4-8]。但是目前早期胚胎是否表达 CSD,胚胎能否通过 CSD 的作用来自身合成牛磺酸满足发育的需要,至今仍无详细的研究。因此,本实验采用反转录 PCR(RT-PCR)、免疫荧光染色的方法,研究分析牛磺酸、CSD 基因及蛋白在小鼠早期胚胎中的表达情况,进而为 CSD 和牛磺酸在胚胎早期发育功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 10 周龄雌、雄昆明(KM)品系小鼠(购自青岛市实验动物中心,SCXK(鲁)20130010),自由饮水采食,温度控制在 22~26 ℃,14 h 光照,10 h 黑暗。小鼠超数排卵和早期各发育阶段胚胎的收集方法按照范晶晶^[9]的描述进行。Trizol RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司),M-MLV 反转录试剂盒(美国 Promega 公司),孕马血清激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(hCG,宁波第二激素厂),FITC 标记链霉亲和素(SP-FITC,美国 Southern Biotech 公司),生物素标记羊抗兔 IgG(GARB)、FITC 标记山羊抗兔 IgG(GAR-FITC,Zymed 公司),牛磺酸一抗(德国 Merck 公司),CSD 一抗是由法国 TAPPAZ 教授(Directeur de Recherche CNRS,INSERM U 433,法国)赠送。其余试剂购自美国 Sigma 公司。主要仪器有高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),凝胶成像系统(美国 Alpha Imager 公司),TE2000-E 激光共聚焦扫描显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 RT-PCR 分别收集各发育时期 100 枚胚胎于 500 μL 的 Trizol RNA 裂解液中,按照说明书步骤提取总 RNA,进行反转录。取 3 μL 反转录产物加至 PCR 反应体系中,引物各 1 μL,10×buffer 5 μL,dNTP 4 μL,Taq 酶 1 μL,H₂O 35 μL,反应总体积为 50 μL。PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;循环结束后 72 ℃ 10 min。CSD 上游引物为 5'-GTT TGG GAT TGT TGT AGA TGA-3',下游引物为 5'-GTG TAC TGG CTA GTG TTG AGG-3',预计扩增片段长度为 279 bp(登录号 NM_144942)。β-肌动蛋白(β-actin)作为内参,上游引物为 5'-ATG AGG TAG TCT GTC AGG T-3',下游引物为 5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT-3',预计扩增片段长度为 569 bp(登录号 X03672)。扩增 PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离,Alpha Imager 凝胶成像系统拍照分析,Alpha Imager 2200 软件分析 PCR 电泳条带的光密度值。

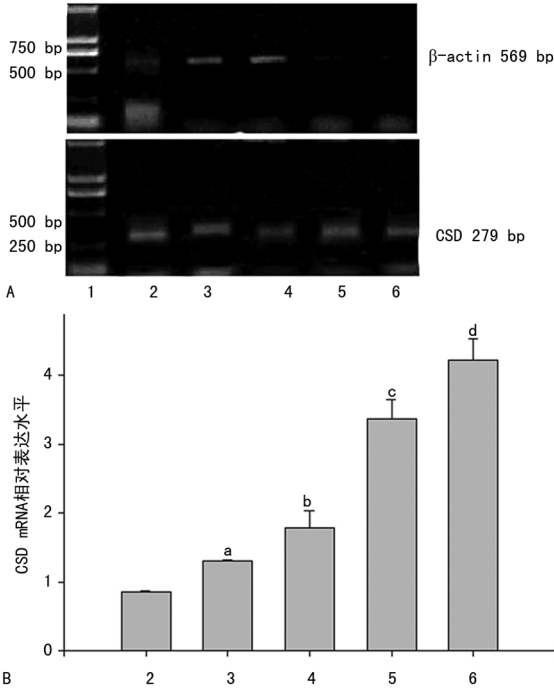
1.3 免疫荧光染色 取 2-细胞、4-细胞、8-细胞、桑葚胚、囊胚期胚胎用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,然后转移

到载玻片上,晾干后迅速用-20 ℃预冷的固定液(甲醇:丙酮=1:1)固定 30 min。封闭液(0.2% Triton X-100、10% 正常羊血清的 PBS)封闭 2 h,加入 CSD 一抗(1:1 000)在 4 ℃下孵育过夜。次日 PBS 洗 3 次,每次 5 min,加入 GARB(1:200)在常温下孵育 2 h,然后用 PBS 洗涤,加入 SP-FITC(1:50)常温下孵育 2 h,再用上述方法进行洗涤,用 Hoechst33342 复染 2 min。另外一部分固定好的胚胎封闭后加入牛磺酸一抗(1:1 000),4 ℃下孵育过夜,加入 GAR-FITC(1:200)在常温下孵育 2 h,加入碘化丙啶(PI)(1:200)复染 2 min,用 1,4-二叠氮双环[2.2.2]辛烷(DABCO)封片,激光共聚焦显微镜观察。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果 CSD mRNA 在 2-细胞、4-细胞、8-细胞、桑葚胚、囊胚期的 RT-PCR 检测结果显示,着床前不同时期小鼠胚胎都有 CSD mRNA 的表达,扩增的 PCR 产物与预期的大小一致,约 279 bp,β-actin 约 569 bp。CSD mRNA 在小鼠着床前胚胎中的相对表达强度显示,胚胎从 2-细胞期开始到囊胚期 CSD mRNA 表达量呈逐渐升高趋势,桑葚胚表达量急剧升高,囊胚期达到最高值。见图 1。



A:PCR 凝胶电泳图;B:PCR 分析图。1:DNA 分子标记物;2:2-细胞期;3:4-细胞期;4:8-细胞期;5:桑葚胚期;6:囊胚期;^a:*P*<0.95,与 2-细胞期比较;^b:*P*<0.05,与 4-细胞期比较;^c:*P*<0.05,与 8-细胞期比较;^d:*P*<0.05,与桑葚胚期比较

图 1 RT-PCR 检测 CSD mRNA 在早期胚胎发育各阶段的表达

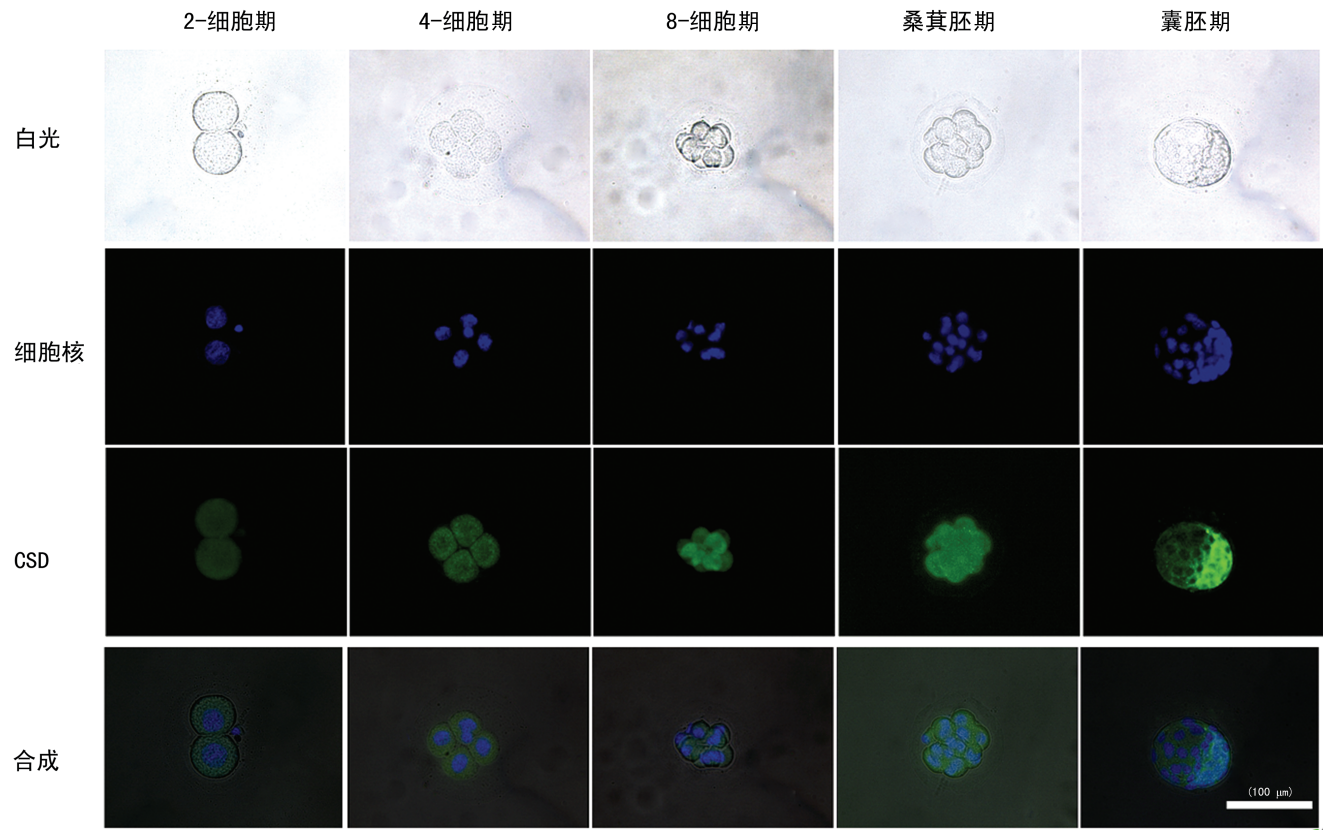
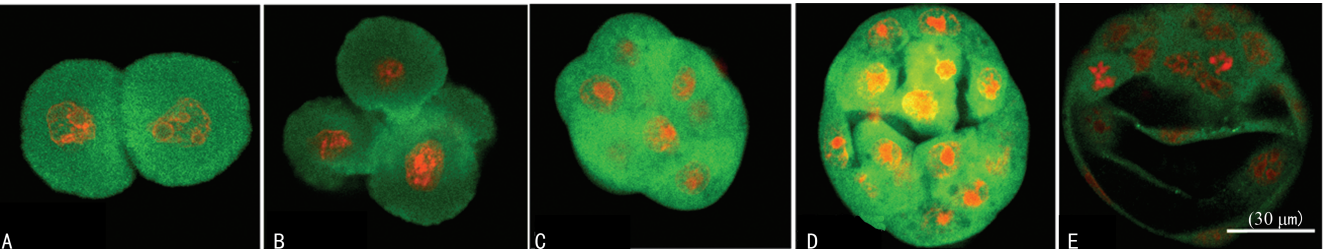


图2 CSD蛋白在小鼠早期胚胎发育各阶段的表达(免疫荧光染色)



A:2-细胞期;B:4-细胞期;C:8-细胞期;D:桑葚胚期;E:囊胚期

图3 牛磺酸在小鼠早期胚胎发育各阶段的表达(免疫荧光染色)

2.2 免疫荧光染色结果 CSD蛋白免疫荧光染色结果显示,从2-细胞至囊胚期均呈阳性绿色荧光,荧光亮度逐渐增强。CSD均匀分布在卵裂球细胞质中,晚期囊胚的内细胞团和滋养层细胞都为阳性着色,透明带无着色,见图2。牛磺酸免疫荧光染色结果显示,从2-细胞期至囊胚期的整个发育过程细胞质均呈阳性绿色荧光,透明带无阳性,见图3。

3 讨论

小鼠妊娠期短、繁殖力强多被用来研究胚胎的发育。哺乳动物早期胚胎发育是一个复杂有序的调控过程,任何因素异常都有可能导致发育失败^[10]。牛磺酸是调节机体多个系统功能的重要活性物质^[11-12]。近年研究发现在雌性动物生殖系统含量丰富,对胚胎的生长发育具有重要的促进作用^[13]。例如可提高受精卵的发育速度^[4],显著提高胚胎2-细胞率、囊胚率、囊胚总细胞数^[5,14]。牛磺酸促进胚胎发育的机制主要

有:(1)调节渗透压稳定细胞膜^[15];(2)可以抑制氧化性毒素物质的产生,并通过调节线粒体活性起到抗氧化作用^[16];(3)有类胰岛素样作用,能促进细胞增殖^[17];(4)可以抑制 Na^+ , K^+ -ATP酶活性,避免细胞内 K^+ 水平异常升高所造成胚胎的损伤等^[18]。

CSD在啮齿类动物体内的活性较高,其自身合成的牛磺酸足以满足生理需要。CSD基因敲除后,第二代(G2)小鼠大部分在出生后24 h死亡,给G2代鼠饮水中饲喂牛磺酸可以使G3代鼠的成活率从15%提高到92%^[19]。李建华^[20]报道在小鼠输卵管上皮细胞中有CSD的表达,并且在输卵管上皮细胞也检测到了牛磺酸^[21],说明输卵管上皮细胞可以通过CSD途径合成并分泌牛磺酸到输卵管液中,从而调节早期胚胎的发育。KIM等^[12]也报道,在ICR品系小鼠4.5、10.5、15.5、18.5 d胚胎中都能检测到CSD mRNA的表达。另外,对小鼠卵巢进行CSD免疫组织化学染

色,结果发现从初级卵泡到三级卵泡的卵母细胞都有 CSD 蛋白表达^[20]。本研究结果发现从小鼠 2-细胞开始一直到囊胚的整个发育过程都能检测到 CSD 的表达,说明胚胎自身也可以通过 CSD 来合成牛磺酸。结果提示着床前后胚胎中牛磺酸不仅可以由输卵管液提供,也可以通过自身来合成一部分牛磺酸。同时早期胚胎也一直有牛磺酸表达,说明牛磺酸确实参与了胚胎的卵裂、细胞的发育和分化过程。

参考文献

- [1] WINGE I, TEIGEN K, FOSSBAKK A, et al. Mammalian CSAD and GADL1 have distinct biochemical properties and patterns of brain expression [J]. *Neurochem Int*, 2015, 90(8):173-184.
- [2] MA Q I, ZHAO J, CAO W, et al. Estradiol decreases taurine level by reducing cysteine sulfinic acid decarboxylase via the estrogen receptor- α in female mice liver [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 308(4): G277-G286.
- [3] HARRIS S E, GOPICHANDRAN N, PICTON H M, et al. Nutrient contents in murine follicular fluid and the female reproductive tract [J]. *Theriogenology*, 2005, 64(4): 992-1006.
- [4] NAKAMURA K, MORIMOTO K, SHIMA K, et al. The effect of supplementation of amino acids and taurine to modified KSOM culture medium on rat embryo development [J]. *Theriogenology*, 2016, 86(8):2083-2090.
- [5] 范晶晶, 郑秋闯. 牛磺酸对昆明小鼠早期胚胎体外发育和着床的影响 [J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2016, 34(1):11-15.
- [6] JIN D I, KIM D K, IM K S, et al. Successful pregnancy after transfer of rabbit blastocysts grown in vitro from single-cell zygotes [J]. *Theriogenology*, 2000, 54(7): 1109-1116.
- [7] 袁水桥, 罗光彬, 李东全, 等. 牛磺酸在牛胚胎体外发育中的作用研究 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2007, 38(4): 552-555.
- [8] DRABKOVA P, ANDRLOVA L, HAMPL R, et al. Amino acid metabolism in human embryos [J]. *Physiol Res*, 2016, 65(5):823-832.
- [9] 范晶晶. 半胱亚磺酸脱羧酶(CSD)在成年小鼠生殖系统的表达及相关功能的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2009.
- [10] 张晋平, 李跃民. 早期胚胎发育与调控因子的研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2006, 27(1):13-16.
- [11] MURAKAMI S. The physiological and pathophysiological roles of taurine in adipose tissue in relation to obesity [J]. *Life Sci*, 2017, 186:80-86.
- [12] KIM H W, YOON S H, PARK T, et al. Gene expressions of taurine transporter and taurine synthetic enzyme during mouse and chicken embryonic development [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 583:69-77.
- [13] PARK E, PARK S Y, DOBKIN C, et al. A novel cysteine sulfinic acid decarboxylase knock-out mouse; comparison between newborn and weanling mice [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 803(3):3-16.
- [14] 王敏康, 张田, 王晓燕, 等. 几种克服昆明小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞的培养液研究 [J]. *动物学报*, 2000, 46(1): 81-87.
- [15] LI R, WHITWORTH K, LAI L, et al. Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(9):1228-1235.
- [16] SILVA E, GREENE A F, STRAUSS K, et al. Antioxidant supplementation during in vitro culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2015, 27(6, SI): 975-983.
- [17] CHOI Y H, CHUNG Y G, WALKER S C, et al. In vitro development of equine nuclear transfer embryos: effects of oocyte maturation media and amino acid composition during embryo culture [J]. *Zygote*, 2003, 11(1):77-86.
- [18] INOUE K, FURUKAWA T, KUMADA T. Taurine inhibits K^+-Cl^- cotransporter KCC2 to regulate embryonic Cl^- homeostasis via with-no-lysine (WNK) protein kinase signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(25): 20839-20850.
- [19] PARK E, PARK S Y, DOBKIN C, et al. Development of a novel cysteine sulfinic acid decarboxylase knockout mouse: dietary taurine reduces neonatal mortality [J]. *J Amino Acids*, 2014, 2014:346809.
- [20] 李建华. 半胱亚磺酸脱羧酶在成年小鼠生殖系统的表达以及雌二醇和孕酮对 CSD 在子宫中表达的调控 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [21] LOBO M V, ALONSO F J, LATORRE A, et al. Immunohistochemical localization of taurine in the rat ovary, oviduct, and uterus [J]. *J Histochem Cytochem*, 2001, 49(9): 1133-1142.

(收稿日期:2018-05-18 修回日期:2018-07-02)