

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.14.003

网络首发 http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20190529.1604.013.html(2019-05-31)

半胱亚磺酸脱羧酶在妊娠小鼠子宫和胚胎中的表达定位研究*

李 炜¹, 吕钊旭², 冯永珍³, 张淑芝⁴, 左语馨⁴, 范晶晶^{4,5,△}

(1. 潍坊护理职业学院内科教研室, 山东潍坊 261041; 2. 山东省潍坊市妇幼保健院新生儿科 261000;

3. 潍坊学院附属医院护理部, 山东潍坊 261061; 4. 潍坊学院生物与农业工程学院, 山东潍坊 261061;

5. 山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室/潍坊学院, 山东潍坊 261061)

【摘要】目的 研究半胱亚磺酸脱羧酶(CSD)mRNA 和蛋白在妊娠小鼠子宫和胚胎中的表达定位。

方法 构建 CSD 原位杂交探针, 收集正常妊娠小鼠第 1~9 天子宫组织和第 11 天胚胎, 采用免疫组织化学染色、原位杂交检测 CSD 的表达情况。结果 小鼠妊娠第 1~2 天 CSD 主要定位在子宫腔上皮细胞和腺上皮细胞, 基质细胞从第 3 天开始表达, 第 6 天开始胚胎周围的子宫蜕膜细胞中检测不到 CSD 蛋白, 第 8 天子宫 CSD 的表达明显减弱, 第 9 天表达更弱。从囊胚到第 9 天时胚胎都有 CSD 表达。CSD 在第 7 天定位于着床点子宫和胚胎中, 胚胎周围的子宫蜕膜细胞无表达, 在第 11 天定位于胚胎的脑、心脏、脊髓。结论 子宫和胚胎在小鼠妊娠过程中可表达 CSD。

【关键词】半胱亚磺酸脱羧酶; 子宫; 胚胎, 哺乳动物; 定位

【中图法分类号】Q813.7 【文献标识码】A 【文章编号】1671-8348(2019)14-2349-04

Study on expression and localization of CSD in the uterus and embryo of mouse*

LI Wei¹, LYU Zhaoxu², FENG Yongzhen³, ZHANG Shuzhi⁴, ZUO Yuxin⁴, FAN Jingjing^{4,5,△}

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

【Abstract】Objective To explore the expression and localization of cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) in mouse uterus and embryo during pregnancy. Methods CSD in situ hybridization probes were constructed, then collected the uterus of pregnant mice from the first day to the ninth day and the embryos on the eleventh day, the expression of CSD was detected by immunohistochemistry and in situ hybridization. Results The epithelial and gland cells of uterus were positive for CSD from the first day to the second day, the stromal cells became intensely positive for CSD from the third day. CSD protein was not detected in decidual cells around embryo from the sixth day. The CSD response in the uterus was significantly weakened on the eighth day, and the expression was even weaker on the ninth day. The embryo expressed CSD from the blastocyst to the embryo on the ninth day. Uterus and embryo were positive for CSD whereas the decidual cells in the implantation site were unstained on the seventh day, CSD was positive at brain, heart and spinal cord in the embryo on the eleventh day. Conclusion CSD expresses in the uterus and embryo of the pregnant mice.

【Key words】cysteine sulfinate decarboxylase; uterus; embryo, mammalian; localization

哺乳动物妊娠是一个非常复杂的过程, 成功的妊娠需要多种分子的协同作用, 如类固醇激素、特定生长因子、细胞因子、脂类介质、黏附分子和转录因子等^[1]。近年来在胚胎自身和子宫内膜中发现的蛋白质、小分子肽类和一些氨基酸在妊娠过程中起十分重

要的作用, 其中牛磺酸发挥的作用逐渐引起人们的重视^[2-3]。在哺乳动物生殖系统中牛磺酸是含量最丰富的游离氨基酸之一, 并且在卵母细胞和着床前的胚胎中都有很高的含量^[4-5]。体外培养条件下牛磺酸可以提高兔、小鼠和猪等动物胚胎的桑葚胚率和囊胚

* 基金项目: 国家星火计划项目(2015GA740060); 山东省自然科学基金项目(ZR2016CB28, BS2013SW036); 山东省莱州湾海洋动物健康养殖工程技术协同创新中心项目(CXGX15005PT); 山东省潍坊市科学技术发展计划项目(2016GX022, 2017GX005)。作者简介: 李炜(1982—), 讲师, 硕士, 主要从事生殖内分泌研究。△ 通信作者, Email: fanjingjing2008@163.com。

率^[6-8]。如果在妊娠和哺乳过程中缺乏牛磺酸,后代就会出现生长发育停滞、畸形发育、视网膜退化、心肌损害和中枢神经系统的机能紊乱等现象^[9-10]。这些研究提示牛磺酸对于妊娠过程子宫生理作用的正常发挥及胚胎的发育可能起到非常重要的作用。

牛磺酸的多种生物学效应的发挥依赖于它在细胞内的浓度,细胞内牛磺酸来源主要有两种:一种可以通过牛磺酸转运体(TauT)从胞外转运,另一种可以通过细胞内含有的半胱亚磺酸脱羧酶(CSD)自身合成^[11]。CSD是一种同源二聚体酶,属于II型脱羧酶家族,其底物为半胱亚磺酸,产物为二氧化碳和亚牛磺酸,现在一般认为CSD是哺乳动物生物合成牛磺酸的主要限速酶^[12]。本实验采用免疫组织化学和原位杂交的方法,直观地研究CSD在妊娠早期小鼠子宫和胚胎的表达及定位情况,为研究CSD和牛磺酸在妊娠子宫发挥的生理功能及对胚胎发育的作用等奠定基础,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

采用8周龄昆明小鼠,控制温度为25℃,自然光周期条件下饲养。取发情期雌鼠与雄鼠自然交配,采集妊娠第1~9天着床点与非着床点的子宫组织,4%多聚甲醛固定,用于免疫组织化学。第7天子宫着床点组织、第11天胚胎在10倍体积的4%多聚甲醛中4℃固定过夜,再放入30%蔗糖溶液中浸泡直至组织沉降,取第7天着床点组织用Tissue Tek OCT包埋用于原位杂交,第11天小鼠胚胎进行全胚原位杂交。

CSD多抗由法国TAPPAZ教授(INSERM U433)赠送,碱性磷酸酶标记羊抗兔IgG(GAR-AP)、碱性磷酸酶标记的地高辛抗体(anti-DIG-AP)购自北京中杉金桥公司。Trizol、M-MLV购自美国Promega公司。DNA凝胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、质粒小提和大提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。地高辛标记试剂盒(DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit)购自瑞士Roche公司。pMD18-T DNA质粒购自日本TaKaRa公司。乙酰化溶液:10 mL 1 mol/L TEA(pH 8.0)、90 mL 焦碳酸二乙酯(DEPC)水、250 μL 醋酸酐混匀。Solution B1溶液:100 mL 1 mol/L Tris pH 7.5 和 30 mL 5 mol/L NaCl 用蒸馏水定容至1 L,灭菌室温保存。NBT/BCIP显色液:3.4 μL 100 mg/mL NBT,3.5 μL 50 mg/mL BCIP,2.4 μL 24 mg/mL 左旋咪唑,5.0 μL 10% Tween-20,986.0 μL NBT/BCIP显色液。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色

将石蜡包埋好的子宫组织切成5 μm厚连续切片,找到着床点及胚胎进行免疫组织化学。脱蜡,过梯度乙醇水化,0.01 mol/L 柠檬酸钠缓冲液抗原修复,放置至室温,羊血清封闭,按1:1 000稀释CSD抗体(一抗)滴加在组织上,放入

湿盒4℃冰箱过夜。第2天洗掉一抗,加入GAR-AP(1:200),孵育2 h,NBT/BCIP显色液显色,封片,显微镜照相。阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,其他步骤完全相同。

1.2.2 原位杂交

1.2.2.1 探针制备

针对CSD基因(GeneBank序列号:144942.4)设计实时荧光定量PCR(RT-PCR)引物,正向引物序列为:5'-AGC ACC TCC TCT TCC ATG AG-3',反向引物序列为:5'-GAT GGC TGA CTC AAA ACC AC-3'。RT-PCR扩增目的基因,纯化回收扩增产物,将产物连接到pMD18-T DNA质粒,质粒转化步骤参考文献[13]方法,重组质粒的酶切及PCR鉴定参考文献[14]方法。酶切、鉴定纯化的质粒DNA分别用限制性内切酶BamH I和Hind III线性化,琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切片段。线性化后的质粒用DNA凝胶回收试剂盒回收,用紫外分光光度计测定线性化DNA浓度。纯化后的探针使用地高辛标记试剂盒进行标记。

1.2.2.2 杂交方法

将包埋好的第7天子宫着床点组织切成10 μm厚的冰冻切片,室温风干30 min,4%四氟乙烯-全氟烷氧基乙烯基醚共聚物(PFA)固定10 min,PBS清洗5 min,乙酰化溶液处理10 min,DEPC水清洗5 min,5 μg/mL蛋白酶K溶液处理5 min,PBS清洗5 min。预杂交液孵育4~8 h,然后用CSD探针杂交液(5 μg/mL)50℃孵育过夜。第2天清洗杂交液,牛血清封闭1 h,加anti-DIG-AP(1:1 000)4℃孵育过夜。次日取出切片用Solution B1室温清洗10 min,NBT/BCIP显色液显色,显色结束终止反应,70%甘油封片并照相。

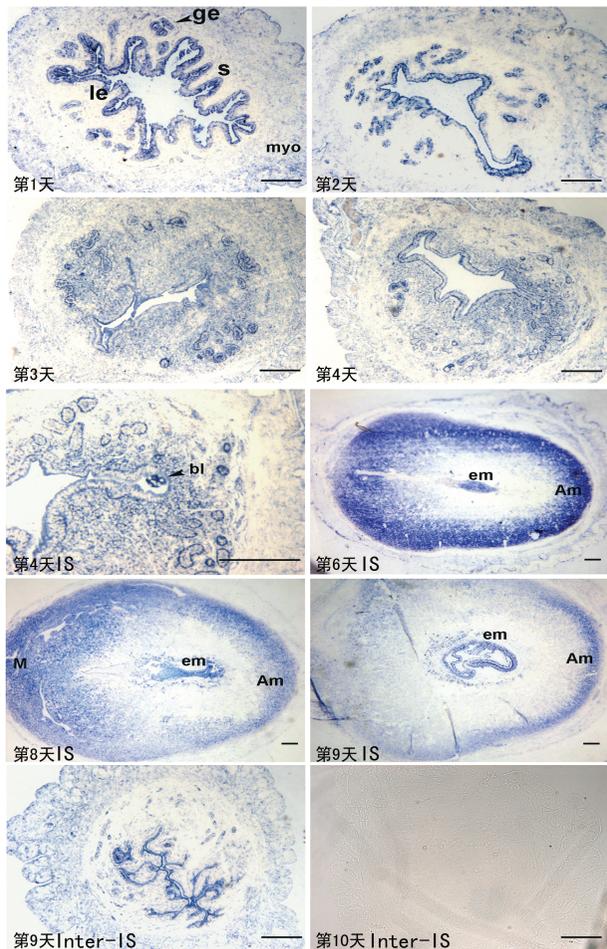
第11天胚胎从4%多聚甲醛固定,取出,依次通过含100%、95%、75%、50%甲醇PBS溶液,然后放置于PBS中,用10 μg/mL蛋白酶K消化处理20 min,清洗后放入含有0.1%戊二醛的4%多聚甲醛溶液再固定20 min,PBS清洗后,放入65℃含有1 μg/mL探针的杂交液中过夜。次日清洗杂交液,用20%胎牛血清封闭1 h,加anti-DIG-AP(1:1 000)4℃孵育过夜。次日取出放入含1%牛血清清蛋白(BSA)的PBS-Tween-20(PBST)中清洗,每2小时换液1次,PBST浸泡过夜。次日取出放入PBST中清洗2次,每次30 min,BM purple显色液显色,TE清洗终止显色,解剖镜下照相。正义链探针为阴性对照,原位杂交操作与反义链探针相同。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果

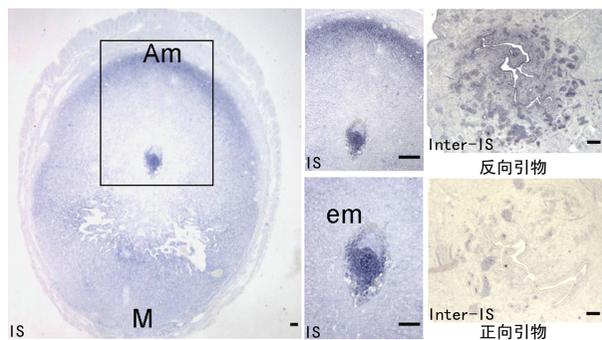
免疫组织化学染色结果见图1,蓝色为CSD阳性信号,分布在细胞质中。在妊娠第1、2天子宫中CSD主要定位在子宫腔上皮细胞和腺上皮细胞,而第3、4天大量子宫基质细胞也表现出较强的CSD阳性。第6天开始胚胎周围的子宫蜕膜细胞不表达CSD,但贴近子宫系膜缘和系膜对

侧缘均高表达 CSD。第 8 天开始子宫 CSD 的表达明显减弱,第 9 天表达更弱,只有系膜对侧缘子宫 CSD 呈中等程度阳性反应。在第 9 天着床点间的子宫 CSD 主要定位在腔上皮和腺上皮细胞。第 4 天子宫中的囊胚内细胞团和滋养层细胞都表达 CSD,到第 9 天胚胎都有 CSD 阳性。阴性对照未检测到阳性信号,见图 1。



le:腔上皮;ge:腺上皮;S:基质;myo:子宫肌层;bl:囊胚;em:胚胎;M:系膜缘;Am:系膜对侧缘;IS:着床点;Inter-IS:着床点之间的子宫(标尺为 20 μm)

图 1 CSD 在妊娠小鼠子宫中的免疫组织化学分布

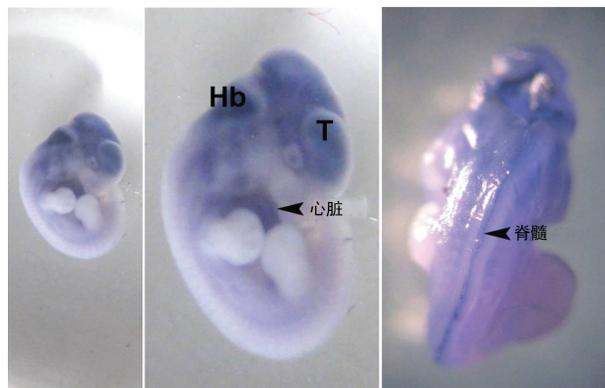


em:胚胎;M:子宫系膜缘;Am:子宫系膜对侧缘;IS:着床点;Inter-IS:着床点间的子宫(标尺为 100 μm)

图 2 原位杂交检测 CSD 的第 7 天胚胎和子宫定位

2.2 原位杂交结果 第 7 天胚胎和着床点子宫中都能检测到 CSD mRNA 阳性信号,子宫系膜对侧缘

CSD 阳性表达明显,胚胎周围的子宫蜕膜细胞未检测到阳性信号。第 7 天 CSD 主要定位于腔上皮和腺上皮细胞,阴性对照未检测到阳性信号。第 11 天 CSD 定位于脑、心脏、脊髓,见图 2、3。



Hb:后脑;T:端脑

图 3 原位杂交检测 CSD 的第 11 天胚胎定位

3 讨论

雌激素(E2)和孕激素(P4)是胚胎着床过程中最重要的两种激素,E2 主要刺激子宫腔上皮细胞和腺上皮细胞增殖,P4 主要刺激子宫内膜基质细胞增殖,并诱导基质细胞分化为蜕膜细胞^[15]。本研究结果显示 CSD 在第 1~9 天子宫的表达有一定的动态变化,第 1~2 天主要定位在子宫腔上皮细胞和腺上皮细胞,第 3 天开始子宫基质细胞也出现阳性表达。LO-BO 等^[16]用免疫组织化学检测到牛磺酸在发情后期、间情期大鼠子宫的腔上皮细胞和腺上皮细胞表达。子宫腔上皮细胞和腺上皮细胞具有分泌功能,其分泌物是子宫液的主要来源,本实验结果说明子宫腔上皮细胞和腺上皮细胞可以通过 CSD 途径自身合成牛磺酸分泌到子宫液中发挥生理作用,并且可能与 E2 和 P4 对子宫细胞的增殖调控有关。妊娠第 4~5 天被称为小鼠胚胎着床窗口期是妊娠最重要的一个时期,此时的胚胎要受到多种因子的复杂调控才能成功着床^[1]。本实验的结果显示从第 3 天开始大量子宫基质细胞开始表达 CSD,CSD 表达急剧增加说明可能在着床窗口期子宫需要合成大量牛磺酸,也有可能牛磺酸作为一种信号分子作用于子宫为接受胚胎做准备。从第 6 天开始胚胎周围的子宫蜕膜细胞中检测不到 CSD,第 8 天子宫 CSD 的反应明显减弱,第 9 天表达更弱,只有子宫系膜对侧缘有微弱表达,胚胎从囊胚到第 9 天胚胎都有 CSD 阳性。着床过程结束后子宫 CSD 表达开始下降,可能是由于牛磺酸需求量减少或胚胎通过自身 CSD 合成的牛磺酸已经能满足发育的需要。CSD 的表达模式说明牛磺酸在着床建立以后,可能对胚胎正常发育起一定作用。

原位杂交显示 CSD 第 7 天定位于着床点子宫和胚胎中,胚胎周围的子宫蜕膜细胞无表达。第 11 天定位于胚胎脑、心脏、脊髓。KIM 等^[17]采用 RT-PCR

方法也检测到 CSD mRNA 在 ICR 小鼠胚胎发育第 4、10、15、18 天都有表达。STURMAN 等^[18]发现缺乏牛磺酸的雌猫生下的足月小猫明显比正常猫小,脑质量明显降低,脑形态异常。补充牛磺酸可改善生长受限的胎鼠神经干细胞的增殖^[19]。基因敲除牛磺酸转运蛋白引起的牛磺酸耗竭会导致心肌萎缩和心脏病^[20]。以上结果说明在胎儿的心血管系统、神经系统等重要系统里是可以通过 CSD 途径合成牛磺酸,牛磺酸对胚胎重要系统的生长发育发挥一定作用。

综上所述,CSD 在妊娠小鼠子宫和胚胎中的表达动态变化,牛磺酸可能在胚胎发育和着床、调节妊娠子宫状态中发挥一定的作用。牛磺酸在胚胎发育过程中的作用及机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] DEY S, LIM H, DAS S K, et al. Molecular cues to implantation[J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(3): 341-373.
- [2] LI F, TENG H Y, LIU J, et al. Antenatal taurine supplementation increases taurine content in intrauterine growth restricted fetal rat brain tissue[J]. *Metab Brain Dis*, 2014, 29(3): 867-871.
- [3] LIN T, DIAO Y F, KANG J W, et al. Tauroursodeoxycholic acid improves the implantation and live-birth rates of mouse embryos[J]. *Reprod Biol*, 2015, 15(2): 101-105.
- [4] HARRIS S E, GOPICHANDRAN N, PICTON H M, et al. Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract[J]. *Theriogenology*, 2005, 64(4): 992-1006.
- [5] MILLER J G, SCHULTZ G A. Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract[J]. *Biol Reprod*, 1987, 36(1): 125-129.
- [6] BARNETT D K, BAVISTER B D. Hypotaurine requirement for in vitro development of golden hamster one-cell embryos into morulae and blastocysts, and production of term offspring from in vitro-fertilized ova[J]. *Biol Reprod*, 1992, 47(2): 297-304.
- [7] GUYADER-JOLY C, GUERIN P, RENARD J P, et al. Precursors of taurine in female genital tract: Effects on developmental capacity of bovine embryo produced in vitro[J]. *Amino Acids*, 1998, 15(1): 27-42.
- [8] 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.
- [9] STURMAN J A, MESSING J M. Dietary taurine content and feline reproduction and outcome[J]. *J Nutr*, 1991, 121(8): 1195-1203.
- [10] STURMAN J A. Taurine in development[J]. *Physiol Rev*, 1993, 73(1): 119-147.
- [11] HUXTABLE R J. Physiologically actions of taurine[J]. *Physiol Rev*, 1992, 1(72): 101-142.
- [12] MA Q W, ZHAO J J, CAO W, et al. Estradiol decreases taurine level by reducing cysteine sulfinic acid decarboxylase via the estrogen receptor-alpha in female mice liver[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 308(4): G277-286.
- [13] 李春利, 王云龙, 李晨阳, 等. 猪瘟病毒 E2 蛋白 A3BCD 主要抗原结构域的原核表达[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(1): 55-58.
- [14] 胡森, 王伟伟, 姜莺等. 猪传染性胃肠炎病毒 TH-98 株 S 基因 5'端部分片段克隆及序列分析[J]. *中国兽医杂志*, 2004, 4(1): 3-7.
- [15] CARSON D D, BAGCHI I, DEY S K, et al. Embryo implantation[J]. *Dev Biol*, 2000, 223: 217-237.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] STURMAN J A, MESSING J M. Dietary taurine content and feline reproduction and outcome[J]. *J Nutr*, 1991, 121(8): 1195-1203.
- [19] WANG Y, LI X W, LIU J, et al. Antenatal taurine supplementation in fetal rats with growth restriction improves neural stem cell proliferation by inhibiting the activities of Rho family factors[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2017, 31(11): 1-15.
- [20] ITO T, KIMURA Y, UOZUMI Y, et al. Taurine depletion caused by knocking out the taurine transporter gene leads to cardiomyopathy with cardiac atrophy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44(5): 927-937.

(收稿日期: 2019-01-02 修回日期: 2019-03-23)