

早孕小鼠子宫内mTOR基因表达增高

曾 兰¹ 何俊琳² 丁裕斌² 陈雪梅² 王应雄² 刘学庆^{1*}(重庆医科大学公共卫生学院,¹生殖生物医学研究室,²遗传优生教研室,重庆 400016)

摘要 利用实时荧光定量PCR、原位杂交法、免疫组化(SP法)和Western印迹法分别检测未孕、假孕及孕d3、d4、d5、d6、d7小鼠子宫内mTOR mRNA和蛋白质的表达,研究mTOR基因在早孕小鼠子宫内mTOR的表达规律。结果显示妊娠子宫内mTOR的表达较未妊娠的子宫内mTOR组织显著增加($P < 0.05$);着床窗期表达最高(d4, d5),且与其他妊娠各期比较差异有统计学意义($P < 0.05$);原位杂交和免疫组化分析显示mTOR mRNA和蛋白质表达主要在子宫内mTOR基质细胞,与上皮细胞各组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。研究表明mTOR在子宫内mTOR基质细胞的规律性表达所调控的细胞生长、增殖和分化可能是胚胎正常着床的分子机制之一。

关键词 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 胚胎着床; 子宫内mTOR; 实时荧光定量PCR; 原位杂交

胚胎着床过程中,母体子宫内mTOR所发生的一系列精细和复杂的变化是胚胎成功着床的关键之一。而大量分子所形成的网络调节着这一复杂过程。近来有研究表明,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)及其信号通路在胚胎着床过程中对子宫内mTOR细胞增殖、分化及凋亡的调控可能起着重要的作用^[1]。mTOR是一类脯氨酸调控的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于磷脂酰肌醇激酶相关激酶(phosphatidylinositol kinase-related kinases, PIKKs)家族成员,有蛋白激酶及信号转导的功能^[2]。mTOR及其信号通路通过调节细胞周期、蛋白质合成、细胞能量代谢等多种途径发挥重要的生理功能,在细胞的增殖、生长、分化和凋亡过程中起着中心调控点的作用^[3]。本研究采用实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT FQ-PCR)、原位杂交法、免疫组织化学和Western印迹法定量、定性分析妊娠小鼠子宫内mTOR mRNA和蛋白质的表达规律,初步探讨它在小鼠胚胎着床过程中的作用,为进一步探索mTOR在胚胎着床中的分子机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验采用清洁级昆明种系小鼠,6~8周龄,体重25~30 g,由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(渝)20050002]。选择性成熟的雌鼠,按雌:雄比例2:1与雄鼠合笼交配,次晨发现有阴

栓者为妊娠第一天(d1),依次计算妊娠天数。随机将未孕小鼠和孕鼠分为6组(分别记为未孕组、d3、d4、d5、d6、d7),另设一假孕组(取见到阴栓后三、四天的小鼠子宫内mTOR,子宫内mTOR无胚胎也未见充血的即为假孕)。每组16只,脱颈处死,无菌条件下取小鼠子宫内mTOR备用。其中每组8只用做RT FQ-PCR,另8只立即放入4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,连续切片,取厚7 μ m的切片,经52 $^{\circ}$ C干烤1天备用。

1.2 方法

1.2.1 组织总RNA提取 按照TRIzol试剂说明书提取小鼠子宫内mTOR总RNA,并用紫外分光光度计测定总RNA的浓度及纯度, $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 为合格。取部分总RNA作琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性,可见明显的28S和18S两条带,说明总RNA提取良好。-70 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.2 cDNA合成 25 μ l反应体系中5 μ l总RNA,4 μ l 5 \times 缓冲液,2 μ l 2.5 mmol/L dNTPs,1 μ l Olig-DT,1 μ l 40 U/ μ l RNase抑制剂,1 μ l 20 U/ μ l M-MLV,加DEPC-H₂O至25 μ l。逆转录反应条件为70 $^{\circ}$ C 5 min,37 $^{\circ}$ C 60 min,70 $^{\circ}$ C 10 min,cDNA产物-80 $^{\circ}$ C放置待RT FQ-PCR反应。

1.2.3 RT FQ-PCR标准品的制备和标准曲线分析 标准品的制备和标准曲线分析均由上海基康

收稿日期:2007-10-30 接受日期:2007-12-26

国家自然科学基金(No.30500054)、重庆市人口与计划生育委员会自然科学基金(06-01)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-68485001, E-mail: zenglan0414@yahoo.com.cn

表 1 引物及探针序列

基因	序列
Primer-F-STND	TGCTACGGACGCACTGAGAT
Primer-R-STND	CGTGAAGAGGGAAGGTGGAACA
mTOR-TAMRA-FP	TGCTCAAAGTAGCTTGTGCTGAA
mTOR-TAMRA-RP	CAGTCATATGGTTTAATAACTTCTTTGGA
mTOR-TAMRA-FAM	TGTTCCGCCCTCCGTCCTACTTTCCT
β -actin-TAMRA-FP	CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC
β -actin-TAMRA-RP	TAGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT
β -actin-TAMRA-FAM	FTCCTTCTGGGTATGGAATCCTGTGGCP

公司完成。分析原理为: PCR 扩增时, 存在一个产物的对数增长期, 即 Ct 值与起始模板的对数存在线性关系, 可利用标准曲线对未知样品进行定量测定。

1.2.4 RT FQ-PCR 引物和探针由上海基康公司设计和合成(表 1)。反应总体积为 25 μ l, 在反应管内依次加入 2.5 μ l 20 μ mol/L 10 \times PCR 缓冲液, 2.0 μ l 25 mmol/L Mg^{2+} , 2.0 μ l 2.5 mmol/L dNTPs, 0.3 μ l 5 U/ μ l rTaq 酶, 各 1.125 μ l 20 pmol/ μ l 引物 1、2, 0.625 μ l 20 pmol/ μ l 探针, 2.0 μ l cDNA 模板, 加 ddH₂O 补至 25 μ l 体系。扩增反应条件 95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 57 $^{\circ}$ C 1 min 收集荧光信号, 共 40 个循环。每份标本作两个平行管, 取均值计算结果, 并采用严格的防污染措施进行操作。

1.2.5 mTOR 免疫组织化学方法及阳性结果判定 抗 mTOR 单克隆抗体(工作浓度 1:30)购于 CRT 公司。免疫组化采用超高敏的 SP 法。光镜下观察, 细胞胞浆染为黄色至棕黄色者为阳性细胞。每组以磷酸盐缓冲液(phosphatebuffered saline, PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.2.6 mTOR mRNA 原位杂交 设计针对 mTOR 的寡核苷酸探针, 其序列为: 5'-GGTGTTCAGCCTG-AGTGTGAAAATTAGAGTGATGCCTTCCAGCT-TCTT-3', 用地高辛标记。采用北京鼎国生物技术公司的原位杂交试剂盒进行杂交。过程为: 石蜡切片, 脱蜡, 水化, 0.5% H₂O₂ 甲醇室温 30 min 灭活内源性过氧化物酶, 胃蛋白酶 37 $^{\circ}$ C 消化 7 min, 滴加预杂交 42 $^{\circ}$ C 3 h, 滴加 1:9 mTOR 杂交液, 42 $^{\circ}$ C 过夜; 梯度 SSC 液充分洗涤, 滴加封闭液 37 $^{\circ}$ C 30 min, 滴加 1:100 稀释兔抗地高辛-BSA 37 $^{\circ}$ C 60 min, 滴加 1:100 稀释 AP-羊抗兔 IgG 37 $^{\circ}$ C 60 min; NBT/BCIP 室温显色 33 min, 自来水冲洗, 核固红复染 5 min, 脱水, 透明, 中性树脂封片。对照实验用 PBS 代替杂交液进行阴性对照。阳性显色呈蓝色细颗粒状, 信号越强, 颜色越深, 呈蓝紫色或紫黑色。

1.2.7 mTOR Western 印迹分析 吸取蛋白质上清液, 考马斯亮蓝法测定样品中蛋白质浓度。mTOR 上清液用 4% SDS-PAGE 分离, 然后转移硝酸纤维膜上, 经 2 h 50 V 的转印后 TTBS 洗膜 3 次, 每次 5 min。用含 5% BSA 的 TTBS 封闭, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 再与抗 mTOR 抗体室温温育 2 h, 与相应的 HRP 标记的山羊抗小鼠的二抗(1:5 000)室温温育 1 h, ECL 系统显影, 凝胶成像系统上摄像分析并计算光密度值。

1.3 统计学处理

对于 RT FQ-PCR 结果, 每一对照组和实验组 mTOR 基因 mRNA 拷贝数与 β -肌动蛋白基因 mRNA 拷贝数之比值作为实验结果(图 3), 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 免疫组化和原位杂交的图像均采用多媒体图像分析系统软件分析结果。用 SPSS 12.0 统计学软件进行统计学处理, 组间比较采用单因素方差分析, 检验水准 α 取 0.05, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 RT FQ-PCR 及原位杂交结果

RT FQ-PCR 测得各组子宫内膜组织均有 mTOR mRNA 表达, 但妊娠子宫内膜组织 mTOR/ β -肌动蛋白 mRNA 的比值较非妊娠的子宫内膜组织显著增加 ($P < 0.05$), 且着床窗期表达与其他妊娠各组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 即妊娠 d4、d5 的 mRNA 表达达到高峰, d6、d7 迅速下降(表 2、图 1、图 2、图 3)。

原位杂交结果与 RT FQ-PCR 测得的 mTOR 基因表达规律一致(表 2), 且 mTOR 杂交信号阳性产物主要定位于基质细胞胞质中(图 4)。

2.2 Western 印迹及免疫组化结果

免疫组化分析, mTOR 在各组子宫内膜组织均有表达, 但 mTOR 染色棕黄色阳性物质主要分布于子宫内膜基质细胞胞质, 与上皮细胞各组比较差异显著 ($P < 0.05$)(表 3、图 5)。与未孕组和假孕组比较,

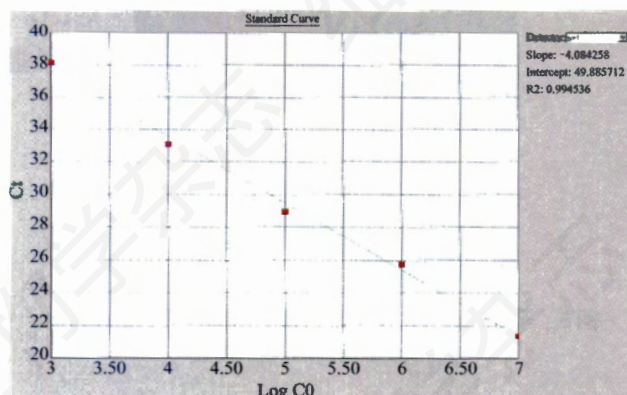


图1 mTOR 标准曲线图

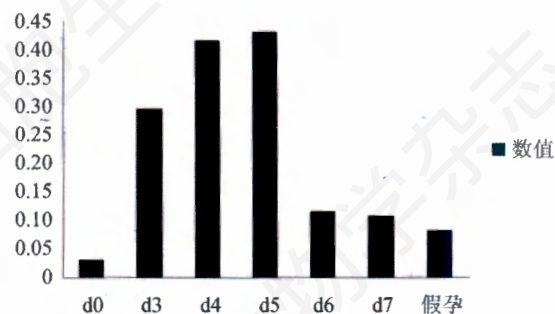
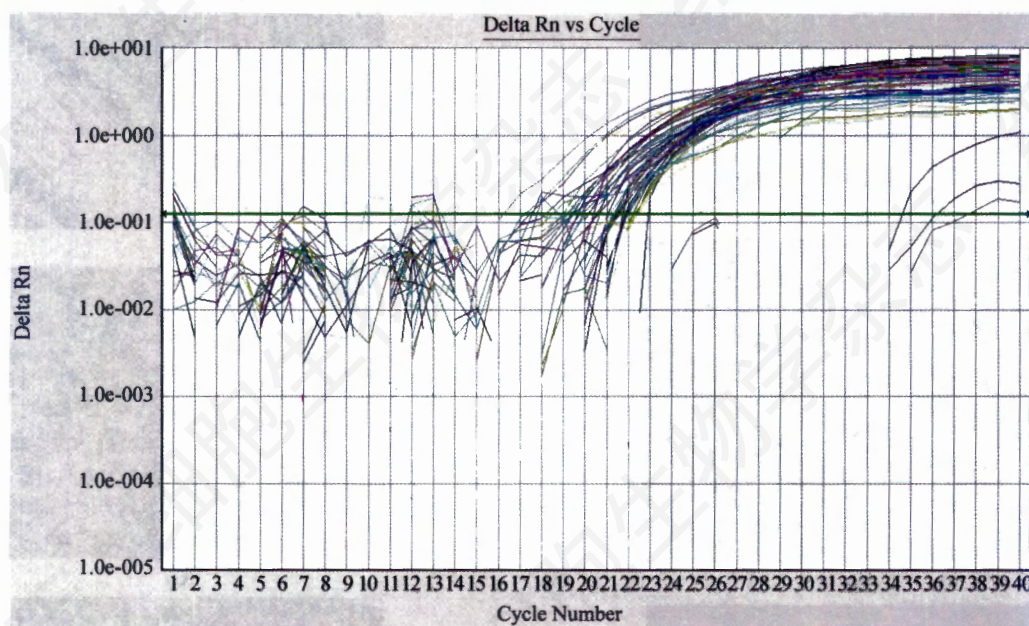
图3 各组 mTOR mRNA/ β -肌动蛋白 mRNA 比值平均数柱形图

图2 定量 PCR 荧光信号检测图(部分样本)

表2 mTOR mRNA 在孕不同时间子宫内层的表达($\bar{x} \pm s$)

检测项目	鼠数 (只)	未孕	孕不同时间 mTOR mRNA 表达					假孕
			d3	d4	d5	d6	d7	
原位杂交	8	0.10±0.028 [#]	0.282±0.019**	0.568±0.080*	0.599±0.058*	0.204±0.003**	0.231±0.016**	0.157±0.019 [#]
RT FQ-PCR	8	0.03±0.032 [#]	0.293±0.184**	0.413±0.276*	0.427±0.282*	0.115±0.099**	0.107±0.142**	0.081±0.118 [#]

与未孕相比, * $P < 0.05$; 与 d4、d5 比较, ** $P < 0.05$ 。

d3、d4、d5、d6、d7 表达显著增加($P < 0.05$), d4、d5 表达强度显著高于 d3、d6、d7($P < 0.05$)(表 4、图 6)。Western 印迹表达变化趋势与免疫组化结果一致, 均在着床窗期表达最强(图 7)。

3 讨论

本研究发现, 早孕小鼠子宫内膜组织中 mTOR 基因表达较非妊娠的子宫内膜组织明显升高, 并且

mTOR 表达量从着床前期至着床窗期逐渐增高, 着床窗期 d4、d5 达最高, 以后迅速下降, 其表达部位主要在子宫内膜基质细胞。

在胚胎着床前至着床窗期, 子宫内膜组织细胞的生长、增殖和分化对于胚胎正常着床具有重要意义。有研究报道, mTOR 基因剔除的突变体小鼠子宫内膜增殖异常, 导致胚胎发生流产^[4]。Kimura 等^[5]和 Murakami 等^[6]研究证实 PI3K/Akt/mTOR 信号通路通

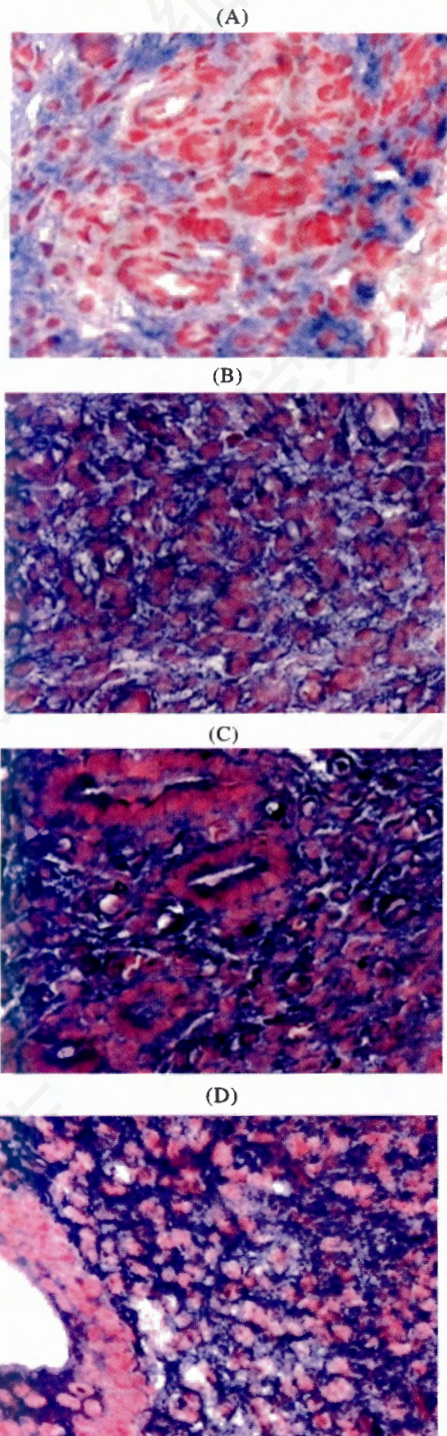


图4 mTOR mRNA在早期妊娠小鼠子宫内膜的表达(原位杂交)(400×)

A: 未孕; B: d3; C: d5; D: d6。

表3 mTOR在子宫内膜不同部位的表达($\bar{x} \pm s$)

部位	鼠数(只)	mTOR 表达	P 值
基质细胞	56	0.077±0.065	0.002
上皮细胞	56	0.003±0.003	

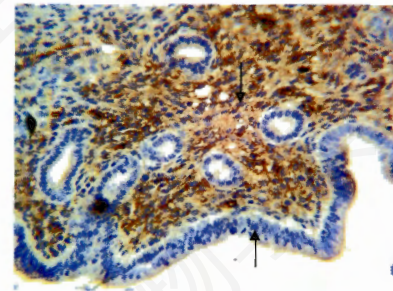


图5 孕d5 mTOR在子宫内膜不同部位的表达(200×)

↑: 上皮细胞; ↓: 基质细胞。

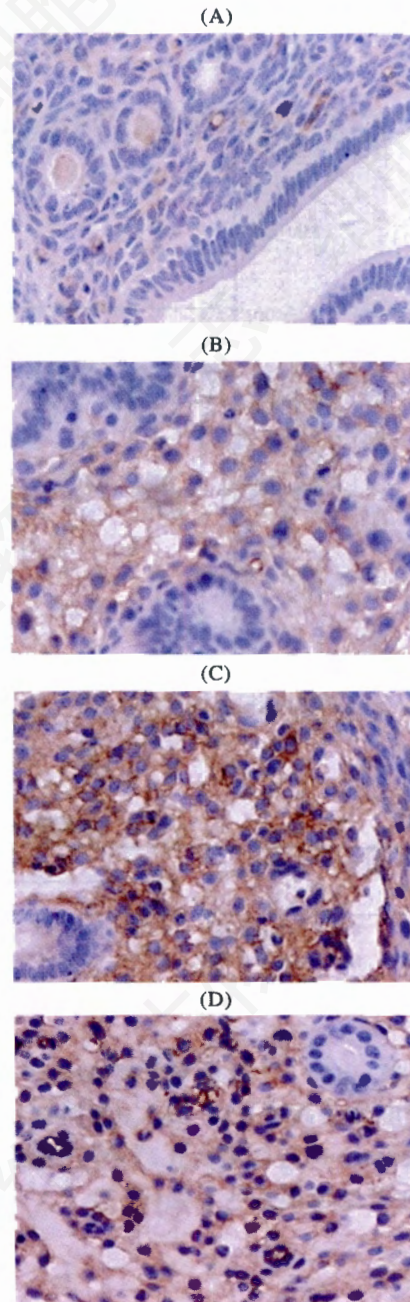


图6 mTOR在早期妊娠小鼠子宫内膜的表达(SP) (400×)

A: 未孕; B: d3; C: d5; D: d6。

表 4 mTOR 在孕不同时间子宫内膜的表达($\bar{x} \pm s$)

检测项目	鼠数 (只)	未孕	孕不同时间 mTOR mRNA 表达					假孕
			d3	d4	d5	d6	d7	
免疫组化	8	0.003±0.003 [*]	0.062±0.021 ^{**}	0.151±0.030 [*]	0.172±0.039 [*]	0.089±0.027 ^{**}	0.049±0.014 [*]	0.009±0.012 [*]

与未孕相比, * $P < 0.05$; 与 d4、d5 比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

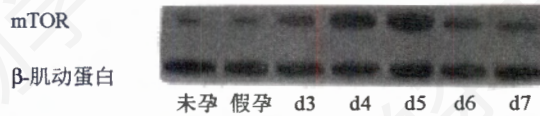


图 7 Western 印迹检测小鼠子宫内膜 mTOR 表达

过激活 mTOR, 而磷酸化它的两个下游分子[即翻译抑制分子 eIF-4E 结合蛋白 1(4E-BP1)和核糖体蛋白 p70^{S6K}], 启动蛋白质的翻译, 促进蛋白质合成, 从而促进细胞生长、增殖和分化。本研究结果显示, d3、d4、d5 这一时期子宫内膜 mTOR 表达逐渐增强, 且着床窗期达高峰, 提示其作用是增强以 mTOR 为中心调控点的促进蛋白质合成、能量释放的信号通路被激活, 为促进子宫内膜细胞快速生长、增殖和分化提供能量和物质支持^[7,8]。

在胚胎着床后, 子宫内膜细胞的生长、增殖降低, 且部分细胞发生蜕膜化和凋亡, 为胚胎着床的维持提供更好的微环境。有研究证实, 在早孕期的蜕膜和腺体细胞中 PTEN 表达比月经周期任一时期的表达都高^[9], 而在 PI3K/PTEN/Akt 信号通路中负调控因子 PTEN 抑制 mTOR 活性, mTOR 活性的降低通过影响 PIP3 的活化使子宫内膜间质细胞蜕膜化, 近而促进凋亡^[9]。本研究结果显示, d6、d7 这一时期 mTOR 的表达与着床窗期相比迅速降低, 提示 mTOR 的下调使着床后的子宫内膜细胞生长和增殖减缓, 并且 mTOR 可能通过影响 PIP3 的活化而促进子宫内膜细胞凋亡。

人子宫内膜基质细胞为具有多能性的间叶细胞, 在子宫内膜中保持高度可变潜能和强大的再生能力, 在妊娠时分化为蜕膜细胞和颗粒细胞^[10], 在胚胎着床中具有重要作用。而妊娠时小鼠子宫内膜基质细胞亦如此。大量肿瘤研究表明, mTOR 的过量表达促进肿瘤细胞增殖和分化, 从而促进肿瘤的发生发展, 由

于肿瘤细胞的生物学特性与间质细胞很相似, 因而 mTOR 在间质细胞的表达与细胞增殖和分化程度呈正相关。本研究结果显示, mTOR 在小鼠子宫内膜基质细胞的阳性表达明显高于上皮细胞, 提示 mTOR 与早期妊娠子宫内膜基质细胞生长、增殖和分化密切相关。此外, Dallenbach-Hellweg 等^[11]认为颗粒细胞中含有的大量富含色氨酸、酪氨酸蛋白质, 其作用与松弛素相似, 在孕卵植入时释放溶解网状纤维, 以利于胚胎着床, 因而我们推测 mTOR 信号通路可能经氨基酸营养激活通路调控细胞内氨基酸的浓度, 从而调控胚胎着床时子宫内膜的微环境。

综上所述, mTOR 在早孕小鼠子宫内膜基质细胞的规律性表达对于胚胎正常着床具有重要意义。随着对 mTOR 深入的研究, 我们认为仍然还有一些问题亟待进一步探索, 如 mTOR 信号通路对子宫内膜细胞增殖、分化和凋亡的精细调控机制是什么? 通过何种途径与影响胚胎着床的一些重要调节因子之间发生怎样的相互作用? 因而有关 mTOR 在人类生殖过程的研究是一值得关注的领域, 它将有助于了解人类正常生殖过程机制, 为人类生育的调控、生殖方面疾病的诊断和治疗提供新的思路和方法。

参考文献(References)

- [1] Martin PM *et al. Dev Biol*, 2001, **240**: 182
- [2] Rohde J *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 9583
- [3] Fingar DC *et al. Oncogene*, 2004, **23**: 3151
- [4] Schalm SS *et al. Curr Biol*, 2003, **13**: 797
- [5] Kimura N *et al. Genes Cells*, 2003, **8**: 65
- [6] Murakami M *et al. Mole Cell Biol*, 2004, **24**: 6710
- [7] Zhou X *et al. Clin Cancer Res*, 2004, **10**: 6779
- [8] Ray RM *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 13039
- [9] Correia-da-Silva G *et al. Placenta*, 2004, **25**: 538
- [10] 林 崧等. *妇产科病理学*, 天津: 天津科学技术出版社, 1986, 205
- [11] Dallenbach-Hellweg G. *Histopathology of the Endometrium, 4th ed.*, New York: Springer Verlag, 1987, 25

Expression Increasing of mTOR Gene in Endometrium of Early Pregnant Mouse

Lan Zeng¹, Jun-Lin He², Yu-Bin Ding², Xue-Mei Chen², Ying-Xiong Wang², Xue-Qing Liu^{1*}

(¹Laboratory of the Reproductive Biology, ²Department of Genetics, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To explore the expression rule of mammalian target of rapamycin (mTOR) gene in endometria of early pregnant mouse, real-time fluorescence quantitative PCR (RT FQ-PCR), *in situ* hybridization, immunohistochemistry and Western blotting were used to detect the mTOR mRNA and protein in the mouse endometria from unpregnant, pseudopregnant and pregnant d3, d4, d5, d6 and d7. Results showed that the mTOR expression in pregnant groups was higher than that of non-pregnant group ($P < 0.05$), and the mTOR expression increased significantly in the implantation window ($P < 0.05$). By *in situ* hybridization and immunohistochemistry, mTOR expression of stroma cell in endometria was higher than that of uterine epithelium cell ($P < 0.05$). The above results indicated that the expression rule of the mTOR in endometrial stromal cell may be one of the implantation mechanisms by regulating cell growth, proliferation and differentiation.

Key words mTOR; blastocyst implantation; endometrium; real-time fluorescence quantitative PCR; *in situ* hybridization

Received: October 30, 2007 Accepted: December 26, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30500054) and Natural Science Foundation of Population and Family Planning Committee of Chongqing (No.06-01)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485001, E-mail: zenglan0414@yahoo.com.cn