

研究论文

早孕小鼠子宫内膜M2型丙酮酸激酶 基因表达的研究

刘春艳 高茹菲 何俊琳 刘学庆 陈雪梅 丁裕斌 耿艳清 李娜 陈梦月 王应雄*
(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室, 重庆 400016)

摘要 该研究分析了M2型丙酮酸激酶(pyruvate kinase M2, *PKM2*)基因在早孕小鼠子宫内膜的表达规律。通过建立正常妊娠小鼠模型, 收集孕D1、D4、D5、D6、D7小鼠子宫内膜组织及孕D5小鼠着床点及着床旁子宫内膜组织。构建假孕小鼠模型, 收集假孕PD1、PD4、PD5、PD6和PD7小鼠子宫内膜组织。用Real-time PCR和Western blot方法检测*PKM2* mRNA和蛋白质表达水平; 免疫组织化学方法检测*PKM2*蛋白质在孕D5着床点与着床旁子宫内膜的分布。研究结果显示, 在正常妊娠小鼠子宫内膜, *PKM2* mRNA表达从孕D5开始出现明显升高, 孕D6达高峰, 孕D7略有下降, 孕D6、孕D7与孕D1相比有明显差异。*PKM2*蛋白质从孕D6开始出现明显升高, 孕D7略有下降, 孕D6、孕D7与孕D1相比有明显差异。假孕小鼠子宫内膜*PKM2* mRNA水平从PD6开始有明显升高, PD7与PD6水平相当, PD6、PD7与PD1相比有明显差异。*PKM2*蛋白质水平每两组间无明显差异。孕D5小鼠子宫内膜组织中, *PKM2* mRNA及蛋白质水平均呈现着床点明显高于着床旁趋势。该研究初步揭示了*PKM2*基因在早孕小鼠子宫内膜表达规律, 为深入探讨*PKM2*在维持早孕小鼠子宫内膜正常功能的机制上的作用提供了重要线索。

关键词 *PKM2*; 子宫内膜; 胚胎着床; 早孕

The Study of the Expression of Pyruvate Kinase M2 Gene in the Endometrium Mouse during the Early Stage of Pregnant

Liu Chunyan, Gao Rufeifei, He Junlin, Liu Xueqing, Chen Xuemei,
Ding Yubin, Geng Yanqing, Li Na, Chen Mengyue, Wang Yingxiong*
(Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health and Management,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The expression rules of the type of pyruvate kinase M2 (*PKM2*) gene in the endometrium of mouse during the early stage of pregnant were analyzed in this study. By establishing the pregnant model, we collected the endometrium of pregnant mice on D1, D4, D5, D6, D7 and implantation site and inter-implantation

收稿日期: 2017-01-11 接受日期: 2017-05-15

国家自然科学基金(批准号: 81300486)、渝中区基础与前沿科技项目(批准号: cstc2015jcyjA10013)、重庆市科委前沿与应用基础研究项目(批准号: 20150104)和重庆医科大学优秀青年学者项目(批准号: CYYQ201508)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485008, E-mail: wyx61221@aliyun.com

Received: January 11, 2017 Accepted: May 15, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81300486), the Projects of Foundation and Cutting-edge Technology of Yuzhong District (Grant No.cstc2015jcyjA10013), the Frontier and Applied Basic Research Project of Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.20150104) and Outstanding Young Scholars Program of Chongqing Medical University (Grant No.CYYQ201508)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485008, E-mail: wyx61221@aliyun.com

网络出版时间: 2017-05-27 16:27:01 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170527.1627.012.html>

site on D5. By establishing the pseudopregnant model, we collected the endometrium of pseudopregnant mice on PD1, PD4, PD5, PD6, PD7. Real-time PCR and Western blot were employed to detect the expressions of PKM2. Immunohistochemistry was used to detect the distribution of PKM2 protein in the endometrium of mice at implantation site and inter implantation site on D5. The results revealed that the level of *PKM2* mRNA in the endometrium of pregnant miceraised from D5, and reached the peak on D6, declined slightly on D7. The level of PKM2 protein in the endometrium of mice pregnant raised from D6, declined slightly on D7. The level of PKM2 protein on D6 and D7 had obvious differences compared with D1. In pseudopregnant model, the level of *PKM2* mRNA in the endometrium of mice raised from PD6, consisted with PD6 and PD7. The level of *PKM2* mRNA of PD6 and PD7 have obvious differences compared with PD1. There was no significant difference of PKM2 protein expression in pseudopregnant model. The level of PKM2 mRNA and protein in the endometrium of mice at implantation site was obviously higher than inter-implantation site on D5. Our results preliminarily revealed the expression rules of *PKM2* gene in the endometrium, also provided an important clue to explore the mechanism how the *PKM2* gene maintained the normal functions in the endometrium of mouse during the early stage of pregnant.

Keywords PKM2; endometrium; embryo implantation; early pregnancy

妊娠是胚胎和胎儿在母体内生长和发育的过程, 精卵结合是妊娠的开始, 胎儿及其附属物自母体排出是妊娠的终止, 整个妊娠过程是非常复杂而又极为协调的生理过程, 其中任一环节出现异常都会导致疾病的发生。成功的胚胎植入是正常妊娠的先决条件, 胚胎的正常植入一方面需要有一个与其同步发育并处于接受态的子宫内膜, 另一方面受精卵需发育为具有着床能力的囊胚^[1]。这一过程受极其复杂而精细的多因素调节。囊胚进入子宫腔后, 通过定位、黏附、侵入进入子宫内膜^[2]。在类固醇激素作用下, 围绕囊胚的子宫内膜基质细胞开始大量增殖和分化, 发育为蜕膜细胞。子宫内膜蜕膜化的过程为胚泡的发育提供营养, 而且对胚胎起到免疫性保护作用^[3-4]。

已有研究表明, 在早孕小鼠子宫内膜蜕膜化过程中存在有氧糖酵解这一特殊现象。蜕膜细胞即使在常氧条件下也可通过糖酵解途径进行代谢, 通过消耗乳酸来进行增殖、分化, 抑制糖酵解的代谢途径、减少乳酸的产生可阻碍蜕膜化的进程^[5]。糖代谢是三大物质代谢的重要组成部分, 通常情况下, 组织细胞在氧气充足时, 摄取的葡萄糖通过氧化磷酸化进行有氧代谢, 产生大量的能量满足机体代谢需求; 在缺氧时, 组织细胞摄取的葡萄糖则通过糖酵解途径代谢产生乳酸。然而, 20世纪20年代, 德国生物学家Otto Warburg发现, 在常氧环境下, 肿瘤细胞仍能够大量摄取葡萄糖, 产生丙酮酸并在胞质中经糖酵解转化成大量乳酸, 这种有氧糖酵解现象被称为

瓦博格效应(Warburg effect)^[6]。既往研究认为, 瓦博格效应主要存在于肿瘤细胞中, 但近来研究发现, 在哺乳动物生殖过程中也存在瓦博格效应^[7-8]。

M2型丙酮酸激酶(pyruvate kinase M2, PKM2)是糖酵解过程中一个标志性的代谢酶, 可以催化磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)生成丙酮酸并释放ATP。它主要以两种形式存在, 即高活性的四聚体形式和低活性的二聚体形式, 不同存在形式决定了葡萄糖转化为丙酮酸后用作供能还是参与生物合成过程。PKM2主要表达于胚胎组织以及增殖的细胞, 尤其是肿瘤细胞中, 其活性形式比值差异与肿瘤细胞的增殖有明显关系, 通过调控PKM2的活性形式可抑制或促进肿瘤的能量代谢^[9]。在胚胎着床过程中, 子宫内膜细胞的生物学行为和肿瘤细胞的侵袭、转移等方面极为相似^[10]。故研究PKM2在子宫内膜中的作用、功能以及调节机制, 可为不孕不育、流产及非计划妊娠等疾病的治疗提供新的思路。

本课题组前期基因芯片筛查结果初步显示, PKM2在早孕D5小鼠子宫内膜的表达呈现着床点高于着床旁的趋势, 但是PKM2在早孕小鼠子宫内膜的表达趋势尚未见报道。本研究初步分析了PKM2在早孕小鼠子宫内膜的表达规律, 为后续对其机制的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料收集

本实验小鼠均购于重庆医科大学实验动物中

心[合格证号: SCXK(渝)20070001], 所有动物实验都经重庆医科大学动物实验中心批准。研究用鼠饲养于实验动物中心的独立通气笼盒, 每盒5只, 自由摄食饮水。选择6~8周龄、体重为 27 ± 2 g的成年雌性昆明种系小鼠和6~10周龄的成年雄性昆明种系小鼠作为实验材料, 小鼠的喂养及实验过程已通过重庆医科大学伦理委员会审核。

建立正常妊娠模型与材料收集: (1)将雌鼠与雄鼠于每天18:00~19:00期间按4:1合笼交配过夜, 次日晨8:00~10:00检查雌鼠阴道, 有阴栓者定为妊娠第1 d(D1), 以此类推计算妊娠天数。采取颈椎脱臼法处死小鼠, 分别收集孕D1、D4、D5、D6、D7小鼠子宫内膜。(2)妊娠第5 d小鼠在处死前通过尾静脉注射0.4%台盼蓝, 10 min后处死小鼠, 见条状子宫胚胎着床点蓝染, 着床旁未蓝染, 用蒸馏水冲掉胚胎后, 分别收集着床点与着床旁内膜组织并保存。

建立假孕模型: 结扎正常成年雄鼠双侧输精管, 2周后将雌鼠与结扎雄鼠于每天18:00~19:00期间按4:1合笼交配过夜, 次日晨8:00~10:00检查雌鼠阴道, 有阴栓者定为假孕第1 d(PD1), 以此类推分别收集PD1、PD4、PD5、PD6和PD7小鼠子宫内膜。

1.2 主要试剂

Trizol购自TaKaRa公司。氯仿、异丙醇、无水乙醇购自重庆锦荣化工有限公司。逆转录试剂盒PrimeScript™ RT Master Mix和Real-time PCR试剂盒SYBR® Premix Ex Taq™ II购自TaKaRa公司。PCR引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。强效RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂PMSF、BCA蛋白质浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE蛋白质上样缓冲液购自上海碧云天生物技术公司。兔单克隆PKM2抗体购自Cell Signaling Technology公司。小鼠单克隆 β -actin抗体购自Sigma公司。兔单克隆PKM2抗体购自Cell Signaling Technology公司。兔免疫组化试剂盒、显色试剂DAB购自北京中杉金桥生物技术公司。EDTA抗原修复液购自武汉博士德生物公司。通过NCBI查询PKM2基因序列号(NM:011099.3), 在生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物, 正向引物为: 5'-GGT GGC TCT GGA TAC AAA GGG-3', 反向引物为: 5'-ACT TCT CCA TGT AAG CGT TGT CA-3'。以 β -actin基因为内参照, 正向引物为: 5'-GTG CTA TGT TGC TCT AGA CTT CG-3', 反向引物为: 5'-ATG CCA

CAG GAT TCC ATA CC-3'。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR) 取出小鼠子宫内膜组织, 称取适量放入匀浆器中, 加入1 000 μ L Trizol, 冰上充分研磨。将研磨液转移到EP管内, 加入200 μ L氯仿剧烈震荡混匀, 冰上静置5 min, 4 °C低温离心机12 000 r/min离心15 min, 加入等体积的异丙醇, 轻微震荡混匀, 4 °C低温离心机12 000 r/min离心15 min。加入新鲜配置的75%乙醇1 mL洗涤沉淀, 4 °C低温离心机7 500 r/min离心15 min, 加入20 μ L DEPC水溶解沉淀, 超微量核酸蛋白质测定仪(Thermo公司)检测RNA样品纯度及浓度。按照PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒操作步骤将RNA逆转录成cDNA, 逆转录反应条件: 37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s; 4 °C暂存。逆转录的cDNA -20 °C保存。按照SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒说明书, 在Bio-Rad iQ5荧光实时定量PCR仪上进行PCR反应, 采用15 μ L反应总体系, 操作在八连管中加样。Real-time PCR反应条件: 95 °C预变性3 min, 95 °C变性10 s, 60 °C延伸30 s, 39个循环。批间重复至少3次, 组内重复至少3次, β -actin作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的表达量。

1.3.2 免疫蛋白印迹(Western blot) 取小鼠子宫内膜组织30~40 mg放入匀浆器中, 加入适量裂解液与PMSF混合液, 置于冰上充分研磨。将研磨液转移至1.5 mL的EP管中, 离心后吸取中间层蛋白质液至另一干净EP管, 记录体积, 同时吸取5 μ L蛋白质液, 用BCA蛋白质浓度测定试剂盒检测蛋白质吸光度值。将变性后的蛋白质进行10% SDS-PAGE, 将蛋白质转移至0.45 μ m的PVDF膜上(Millipore公司), 经5% BSA、37 °C摇床封闭60 min, 一抗4 °C孵育过夜, PBST洗涤3次, 每次5 min, 二抗37 °C摇床孵育1 h, PBST洗涤3次, 每次5 min, UNIVERSALHOOD S.N.凝胶成像系统(Bio-Rad公司)成像, Quantity One软件(Bio-Rad)分析各条带灰度值。

1.3.3 免疫组织化学 组织包埋切片, 二甲苯脱蜡后, 梯度乙醇水化, 自来水冲洗。将切片浸泡在PBS中, 摇床震荡清洗5 min。将玻片放入装满EDTA抗原修复液的修复盒中采用微波修复, 取出后自然冷却至室温, PBS洗涤3次, 每次5 min, 加入3% H₂O₂孵育10 min, PBS洗涤3次, 每次5 min, 滴加5%山羊血清封闭, 37 °C孵育30 min, 弃去血清。

加入一抗, 37 °C湿盒孵育过夜。次日, 将玻片取出, 置于室温复温, 洗涤玻片, 加入生物素标记的二抗于37 °C孵育30 min, PBS洗涤3次, 每次5 min。加入辣根过氧化物酶标记的抗体, 37 °C孵育30 min, PBS洗涤3次, 每次5 min。DAB显色, 脱水, 封片, 采用欧林巴斯BX40显微镜观测结果并拍照。

1.4 统计分析

实验数据采用SPSS 13.0软件和GraphPad Prism 5.0软件及Image-pro plus 6.0进行统计分析, 数据采用均数±标准误($\bar{x}\pm S.E.M.$)形式表示, 各组之间的数据差异进行评估采用 t 检验分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 早孕小鼠子宫内膜PKM2 mRNA水平

运用Real-time PCR在正常妊娠和假孕小鼠子宫内膜组织中均检测到PKM2 mRNA的表达。结果显示, 在正常妊娠子宫内膜组织中, PKM2 mRNA水平从孕D5开始即有明显增强, 孕D6达到高峰, 孕D7少量下降, 孕D6明显高于孕D1和孕D4, 孕D7明显高于孕D1。假孕小鼠子宫内膜组织PKM2 mRNA水平从PD6开始有明显增强, PD6和PD7明显高于PD1(图1)。

2.2 早孕小鼠子宫内膜PKM2蛋白质水平

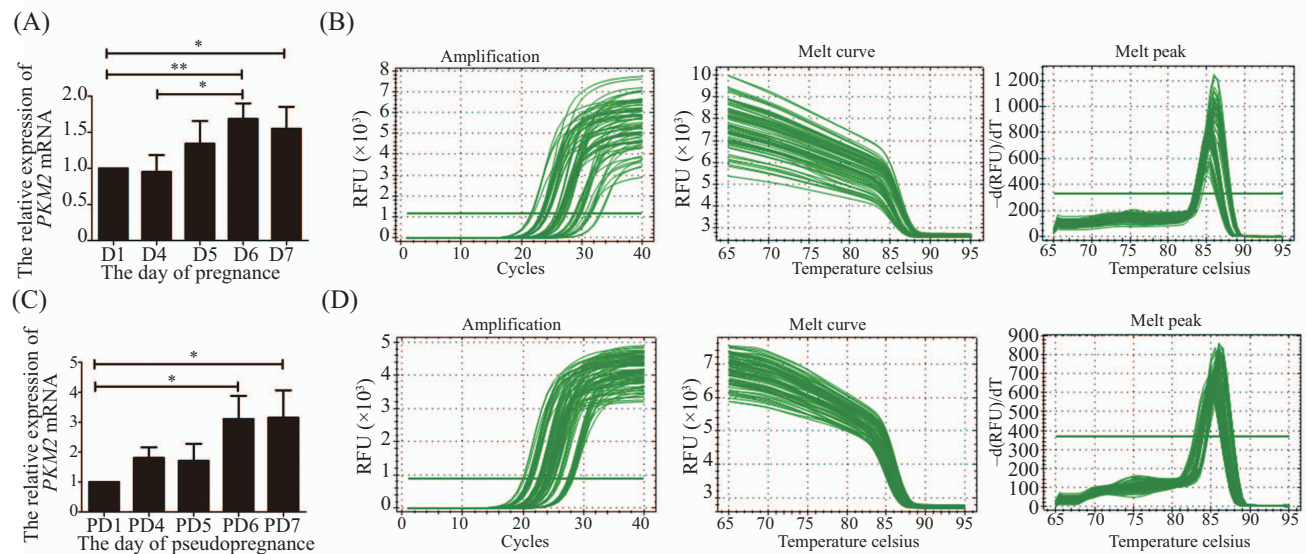
Western blot方法检测了正常妊娠与假孕小鼠子宫内膜组织PKM2蛋白质的表达。结果显示, 在正常妊娠模型中, 小鼠孕D6及孕D7的PKM2蛋白质水平明显升高, 孕D6达到高峰, 孕D6和孕D7明显高于孕D1; 在假孕模型中, 每两组间蛋白质水平无显著差异(图2)。

2.3 小鼠孕D5着床点(IS)与着床旁(IIS)子宫内膜PKM2 mRNA和蛋白质水平

孕D5早期胚胎发育形成囊胚并获得着床能力, 子宫同步发育进入接受状态, 即所谓的植入“窗口期”。Real-time PCR及Western blot检测结果均发现, PKM2在孕D5着床点子宫内膜的mRNA和蛋白质水平明显高于着床旁子宫内膜(图3)。

2.4 PKM2蛋白质在小鼠孕D5着床点与着床旁子宫内膜的定位

运用免疫组织化学方法的检测结果发现, 孕D5着床旁子宫内膜PKM2蛋白质主要存在于腔上皮和腺上皮, 基质细胞有少量表达; 孕D5着床点子宫内膜PKM2蛋白质主要表达于基质细胞及胚胎, 未见于腔上皮。运用Image-pro plus 6.0软件对PKM2蛋白质水平进行半定量分析, 孕D5着床点的水平明显

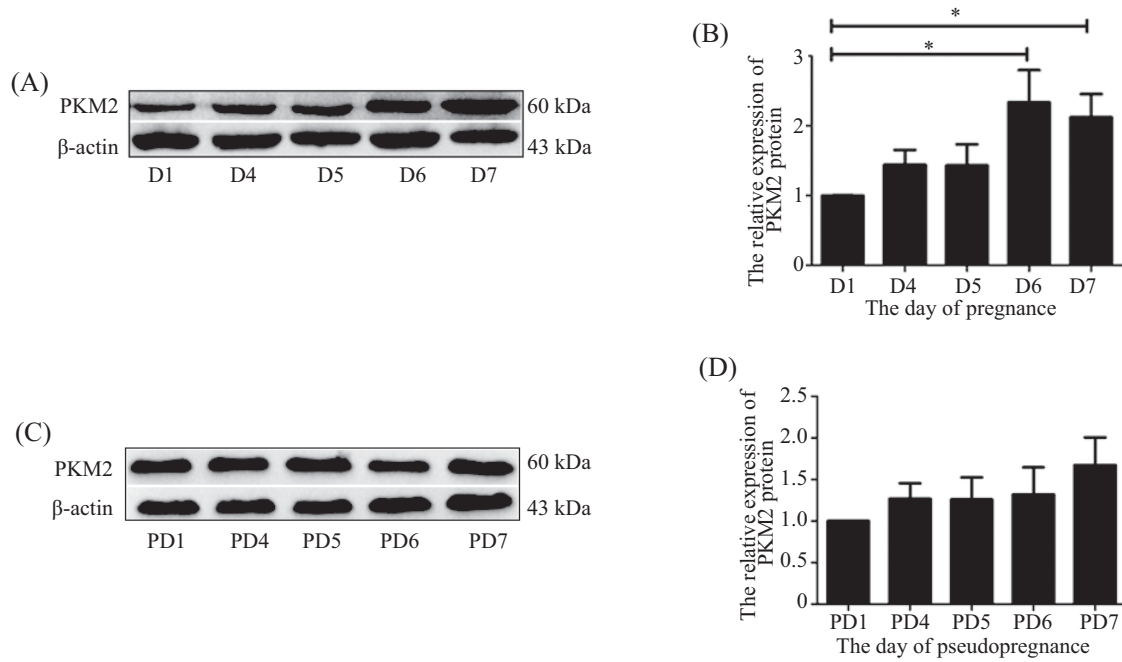


A: 正常妊娠小鼠子宫内膜PKM2 mRNA水平; B: 正常妊娠小鼠子宫内膜PKM2 mRNA水平的扩增曲线、溶解曲线及溶解峰曲线; C: 假孕小鼠子宫内膜PKM2 mRNA水平; D: 假孕小鼠子宫内膜PKM2 mRNA水平的扩增曲线、溶解曲线及溶解峰曲线。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: PKM2 mRNA levels in the endometrium of mice pregnant early stage; B: amplification curve, melt curve and melt peak of PKM2 mRNA in the endometrium of mice pregnant early stage; C: PKM2 mRNA levels in the endometrium of mice pseudopregnant early stage; D: amplification curve, melt curve and melt peak of PKM2 mRNA in the endometrium of mice pseudopregnant early stage. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图1 Real-time PCR检测早孕小鼠子宫内膜PKM2 mRNA水平

Fig.1 The relative level of PKM2 mRNA in the endometrium of mice pregnant and pseudopregnant early stage determined by Real-time PCR

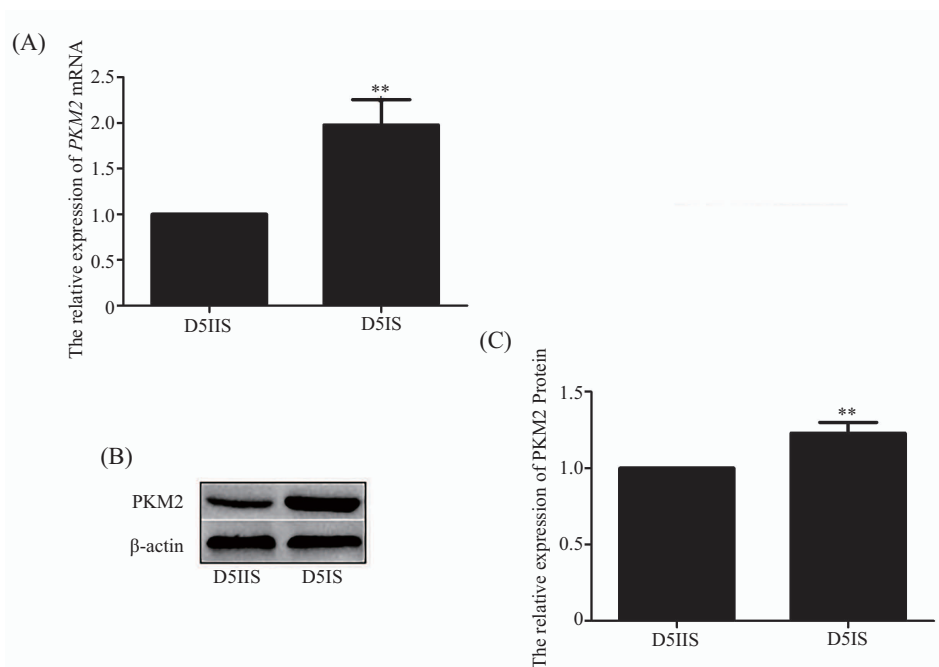


A: 正常妊娠小鼠子宫内膜PKM2蛋白质水平; B: A图的量化图; C: 假孕小鼠子宫内膜PKM2蛋白质水平; D: C图的量化图。* $P < 0.05$ 。

A: PKM2 protein levels in the endometrium of mice pregnant early stage; B: quantified levels of PKM2 protein in image A; C: PKM2 protein levels in the endometrium of mice pseudopregnant early stage; D: quantified levels of PKM2 protein in image C. * $P < 0.05$.

图2 Western blot检测早孕小鼠子宫内膜PKM2蛋白质水平

Fig.2 The relative levels of PKM2 protein in the endometrium of mice pregnant and pseudopregnant early stage determined by Western blot

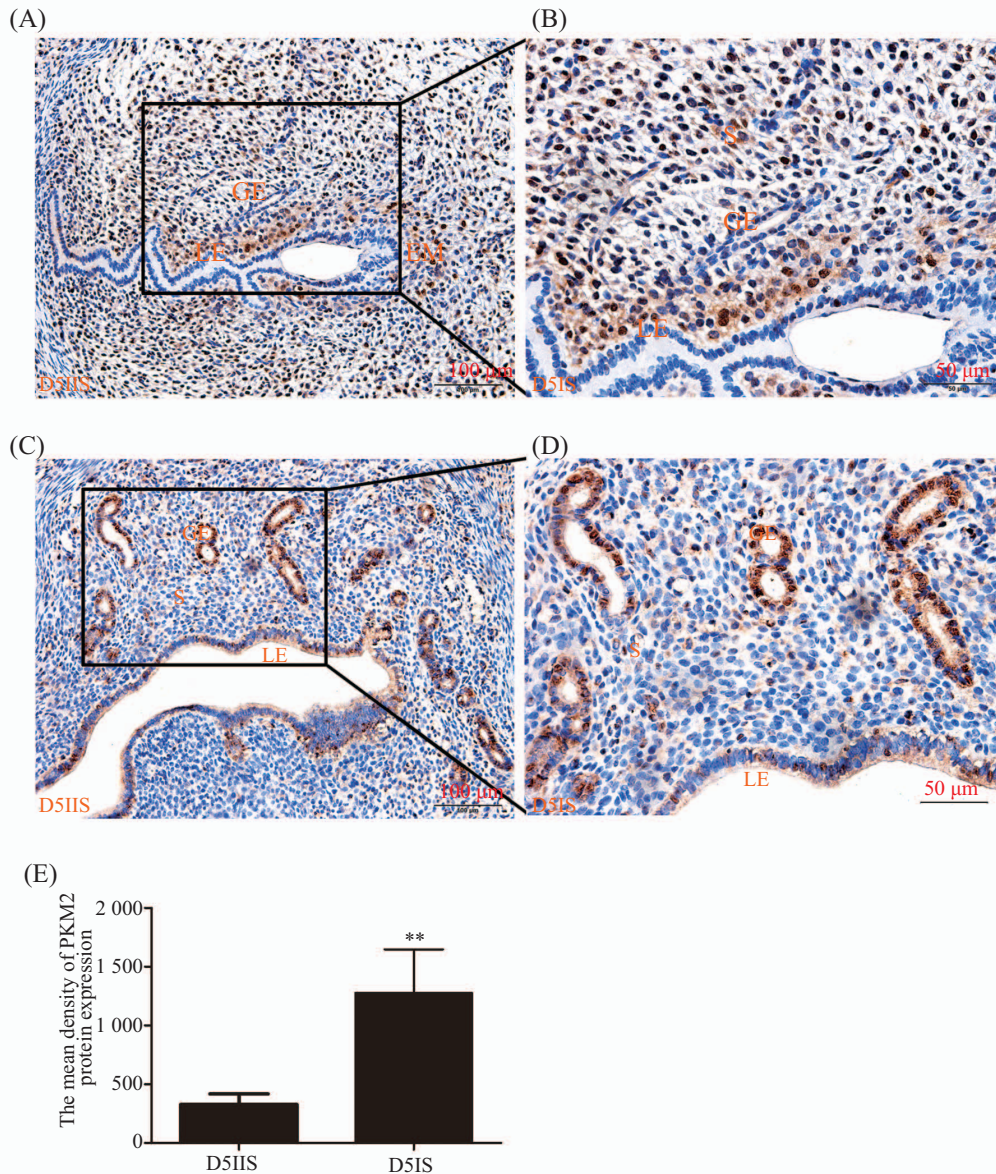


A: Real-time PCR检测D5着床点及着床旁小鼠子宫内膜PKM2 mRNA水平; B: Western blot检测D5着床点及着床旁小鼠子宫内膜PKM2蛋白质水平; C: B图的量化图。IS: 着床点; IIS: 着床旁。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与D5IIS组比较。

A: PKM2 mRNA levels in the endometrium of mice at implantation site and inter-implantation site on D5 determined by Real-time PCR; B: PKM2 protein levels determined by Western blot in the endometrium of mice at implantation site and inter-implantation site on D5; C: quantified the levels of PKM2 protein in image. IS: implantation site; IIS: inter-implantation site. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs D5IIS group.

图3 孕D5着床点及着床旁小鼠子宫内膜PKM2 mRNA及蛋白质水平比较

Fig.3 The levels of PKM2 mRNA and protein in the endometrium of mice at implantation site and inter-implantation site on D5



A: PKM2蛋白质在小鼠孕D5着床点定位; B: A图方框标记区域的放大图; C: PKM2蛋白质在小鼠孕D5着床旁定位; D: C图方框标记区域的放大图; E: PKM2蛋白质在早孕小鼠孕D5着床点及着床旁子宫内膜表达的平均光密度值。** $P < 0.01$, 与D5IIS组比较。LE: 腔上皮; GE: 腺上皮; S: 基质细胞; EM: 胚胎; IS: 着床点; IIS: 着床旁。

A: PKM2 protein location determined by immunohistochemistry in the endometrium of mice at implantation site on D5; B: a larger version of figure box marked area in A; C: PKM2 protein location determined by immunohistochemistry in the endometrium of mice at inter-implantation site on D5; D: a larger version of figure box marked area in C; E: the mean density of PKM2 protein expression in the endometrium of mice at implantation site and inter-implantation site on D5. ** $P < 0.01$ vs D5IIS group. LE: luminal epithelium; GE: gland epithelium; S: stromal cell; EM: embryo; IS: implantation site; IIS: inter-implantation site.

图4 免疫组化方法检测PKM2蛋白质在早孕小鼠孕第5 d着床点及着床旁子宫内膜的定位

Fig.4 The location of PKM2 protein in the endometrium of mice at implantation site and inter-implantation site on D5 determined by immunohistochemistry

高于着床旁, 差异具有统计学意义(图4)。

3 讨论

胚泡植入子宫内膜的过程涉及激素、细胞因子、黏附分子、免疫系统等的协同作用^[7], 与代谢途径也密切相关。正常细胞最主要的产能方式是通过线粒

体摄取丙酮酸和氧进入三羧酸循环进行代谢, 在缺氧的情况下, 通过糖酵解途径代谢产能。瓦博格效应是一种特殊的糖酵解, 不仅涉及糖代谢过程中多种相关酶表达模式改变, 而且还影响基因的转录及甲基化过程, 具有瓦博格效应的细胞正是通过参与多种信号通路的调节, 使细胞内整个物质和能量代

谢维持平衡, 最终导致细胞发挥正常生理功能^[11-12]。

目前研究发现, 瓦博格效应与一些生殖异常疾病紧密相关, 腹膜型子宫内膜异位症患者的病灶区高表达糖酵解相关基因^[13]。多囊卵巢综合征患者中, 体内脱氢表雄酮水平高的患者其子宫基质细胞的瓦博格效应遭到破坏, 可阻碍子宫内膜基质细胞的增殖并最终导致子宫机能受损^[14], 这是导致多囊卵巢综合征患者不孕的机理之一, 明确生殖异常疾病的发病机制需对瓦博格效应进行深入研究。研究还发现, 生殖过程与瓦博格效应也密切相关, 在对小鼠精子的研究中发现, 精子的运动能力与糖酵解关键酶的功能密切相关, 糖酵解关键酶的缺失能够降低精子的运动能力, 并且抑制精子获能过程中的糖酵解会造成异常的顶体反应, 不利于精卵的结合^[8]。在体外培养的卵子中, 蛋白激酶B(protein kinase B, PKB, 也被称为Akt)、葡萄糖转运体-1(glucose transporter-1, GluT-1)及其他瓦博格效应相关基因表达水平较高的卵子通常更优质^[15]。通过葡萄糖碳示踪实验发现, 囊胚中糖酵解产生的碳源物质主要进入磷酸戊糖通路而非三羧酸循环^[16]。在人子宫内膜基质细胞研究中发现, 敲低PKM2的表达或破坏PKM2的作用会显著抑制雌激素诱导的细胞增殖^[17]。

PKM2作为肿瘤能量代谢转换的标志, 通过调控PKM2四聚体及二聚体的活性从而抑制或促进肿瘤细胞能量代谢。在结肠癌、乳腺癌、肺癌及卵巢癌等肿瘤中PKM2均高表达, 且在晚期肿瘤中PKM2表达显著增高^[18]。PKM2的表达与肿瘤进展密切相关, 在结肠癌的研究中发现, 调控PKM2有望成为结肠癌治疗的方法^[19]。增加非小细胞肺癌对放疗的敏感性可抑制PKM2表达^[20]。PKM2与肿瘤的生长、侵袭、黏附及转移关系密切, 高水平的PKM2是一种不良预后的标志^[21-22]。PKM2主要表达于胚胎组织以及增殖的细胞, 在胚胎着床过程中子宫内膜的生物学行为和肿瘤细胞的浸润转移等方面极为相似, 通过调控PKM2的活性形式可抑制或促进肿瘤的能量代谢, 故将PKM2在肿瘤方面的研究经验运用于生殖领域, 研究PKM2在子宫内膜的分化、发育及胚胎植入过程中发挥的作用及调节机制, 可为不孕不育、流产等疾病的治疗提供新的思路。

PKM2作为糖酵解不可或缺的关键酶, 在糖酵解过程中发挥重要作用, 提示其在生殖过程中亦发挥重要作用^[23]。本研究建立了正常妊娠及假孕模

型, 研究胚胎植入是否影响PKM2的表达。结果发现, PKM2在早孕小鼠子宫内膜呈差异表达, 在真孕模型中, 胚胎植入的窗口期及胚胎植入后有明显表达差异, 胚胎植入后PKM2 mRNA和蛋白质水平上调, 推测PKM2在胚胎滋养细胞侵袭过程中发挥巨大作用, 在假孕模型中出现近似于真孕的表达规律。在正常妊娠模型中, PKM2蛋白质与mRNA的水平类似, 在假孕模型中, 各组间表达无组内差异。以上结果表明, 在子宫内膜蜕膜化过程中PKM2发挥一定的作用, 其水平可能与母体激素水平、胚胎的植入、生长及发育有一定关系, 在RNA转录后翻译成蛋白质的过程中也受到其他因素的调控, 使得mRNA与蛋白质水平不一致。在早孕小鼠第5 d着床点与着床旁子宫内膜, 着床点的PKM2蛋白质及mRNA水平明显高于着床旁的水平, 初步判断PKM2参与了子宫内膜容受性建立。PKM2在着床后的D6、D7表达明显增强, 我们分析, PKM2可能还参与了子宫内膜血管的生成和维持, 有利于促进内膜的发育及营养着床后的胚胎^[24], 为胚胎着床的维持提供更好的微环境。

本研究结果表明, PKM2在早孕小鼠子宫内膜呈差异表达, 我们推测, 在子宫内膜蜕膜化过程及胚胎植入过程中, 可能参与调控PKM2四聚体及二聚体的活性, 从而抑制或促进肿瘤细胞能量代谢的相同通路或途径。通过调节PKM2在子宫内膜基质细胞及胚胎中的表达, 调控细胞的增殖和凋亡, 使细胞内能量和代谢平衡, 确保子宫内膜与胚胎的发育同步, 使得妊娠最基本的步骤顺利完成。具体机制如何, 有待进一步研究。本研究报道了PKM2基因在妊娠早期小鼠子宫内膜的表达, 并对其在子宫内膜的差异表达进行研究, 阐明了PKM2在胚胎着床过程中的作用, 为胚胎着床的分子机制研究提供又一新的理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, *et al.* Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004; 25(3): 341-73.
- 2 Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, *et al.* Embryo implantation. *Dev Biol* 2000; 223(2): 217-37.
- 3 Ramathal C, Bagchi I, Taylor R, Bagchi M. Endometrial decidualization: of mice and men. *Sem Rep Med* 2010; 28(1): 17-26.
- 4 韩丙辰, 杨增明. 子宫内膜蜕膜化的特征及其调节因素. *中国细胞生物学学报*(Han Bingchen, Yang Zengming. *The*

- characteristic and regulation of endometrial decidualization. *Chinese Journal of Cell Biology* 2007; 29(5): 666-70.
- 5 Zuo RJ, Gu XW, Qi QR, Wang TS, Zhao XY, Liu JL, *et al.* Warburg-like glycolysis and lactate shuttle in mouse decidua during early pregnancy. *J Biol Chem* 2015; 290(35): 21280-91.
- 6 Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324(5930): 1029-33.
- 7 Metallo CM, Vander H, Matthew G. Understanding metabolic regulation and its influence on cell physiology. *Mol Cell* 2013; 49(3): 388-98.
- 8 Ferramosca A, Zara V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Bio Med Res Inter* 2014; 2014: 1-8.
- 9 Smith DG, Sturmey RG. Parallels between embryo and cancer cell metabolism. *Biochem Soc Trans* 2013; 41(2): 664-9.
- 10 Noguchi T, Inoue H, Tanaka T. The M1-and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J Biol Chem* 1986; 261(29): 13807-12.
- 11 Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update* 2007; 13(2): 121-41.
- 12 Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: A cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 2012; 21(3): 297-308.
- 13 Young VJ, Brown JK, Maybin J, Saunders PTK, Duncan WC, Horne AW. Transforming growth factor-beta induced Warburg-like metabolic reprogramming may underpin the development of peritoneal endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(9): 3450-9.
- 14 余秋波, 李红梅, 董艳玲, 王应雄, 何俊林. 自然流产患者蜕膜 MMP10 的表达及临床意义. *重庆医科大学学报* (Yu Qiubo, Li Hongmei, Dong Yanling, Wang Yingxiong, He Junlin. Expression level of MMP10 in human spontaneous abortion deciduas and its clinical significance. *Journal of Chongqing Medical University*) 2007; 32(7): 679-81.
- 15 Krisher RL, Prather RS. A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: Metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Reprod Dev* 2012; 79(5): 311-20.
- 16 Kim JY, Song H, Kim H, Kang HJ, Jun JH, Hong SR, *et al.* Transcriptional profiling with a pathway-oriented analysis identifies dysregulated molecular phenotypes in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(4): 1416-26.
- 17 Salama SA, Mohammad MA, Diaz-Arrastia CR, Kamel MW, Kilic GS, Ndofo BT, *et al.* Estradiol-17beta upregulates pyruvate kinase M2 expression to coactivate estrogen receptor-alpha and to integrate metabolic reprogramming with the mitogenic response in endometrial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(10): 3790-9.
- 18 Munoz CA, Fernandez SA, Fatela CD, Esther OP. Plasma tumor M2-pyruvate kinase levels in different cancer types. *Anticancer Res* 2015; 35(7): 4271-6.
- 19 Yang P, Li Z, Wang Y, Wang Y, Zhang L, Wu H. Secreted pyruvate kinase M2 facilitates cell migration via PI3K/Akt and Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 459(2): 327-32.
- 20 Meng MB, Wang HH, Guo WH, Wu ZQ, Zeng XL, Qian D, *et al.* Targeting pyruvate kinase M2 contributes to radiosensitivity of non-small cell lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett* 2015; 356(2): 985-93.
- 21 Lim JY, Yoon SO, Seol SY. Overexpression of the M2 isoform of pyruvate kinase is an adverse prognostic factor for signet ring cell gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18(30): 4037-43.
- 22 Yin L, Wang X, Luo C, Liu H, Zhang L, Zhang H, *et al.* The value of expression of M2-PK and VEGF in patients with advanced gastric cancer. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67(3): 1033-9.
- 23 Brinck U, Eigenbrodt E, Oehmke M, Fischer G. L- and M2-pyruvate kinase expression in renal cell carcinomas and their metastases. *Virchows Arch* 1994; 424(2): 177-85.
- 24 田真玲, 董艳玲, 余秋波, 刘学庆, 王应雄, 何俊琳, 等. 早孕小鼠子宫内蜕膜 MMP10 的表达及其意义. *西南大学学报(自然科学版)* [Tian Zhenling, Dong Yanling, Yu Qiubo, Liu Xueqing, Wang Yingxiong, He Junlin, *et al.* Expression of MMP10 in the endometrium of early pregnant mouse and its functions. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*] 2008; 30(6): 50-5.