论著

文章编号:1000-5404(2007)21-2064-03

PTEN基因在小鼠胚胎着床过程中作用的实验研究

陈晓玲,杨 戎,贾咏存,刘孝云,魏莎莉 (重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学研究室,重庆,400016)

提 要:目的 探讨PTEN基因小鼠胚胎着床过程中的作用。**方法** 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative PCR ,FQ -PCR)分别检测未孕及孕1、3、4、5、7 d(分别记为d0、d1、d3、d4、d5、d7)小鼠子宫内膜PTEN基因mRNA的表达和子宫角注射反义寡核苷酸观察胚泡着床数。**结果** FQ-PCR测得妊娠的子宫内膜组织PTEN的表达高于未妊娠的子宫内膜组织,且随着妊娠天数的增加呈现逐渐增加的趋势,到妊娠第5天达到最高。子宫角注射PTEN反义寡核苷酸后胚泡着床数明显减少。**结论** PTEN在妊娠早期子宫内膜持续表达,可能参与了胚泡着床。

关键词:PTEN;子宫内膜;植入;FQ-PCR;子宫角注射

中图法分类号:R-33;R321.3;R394.2 **文献标识码**:A

PTEN gene expression in mouse endometria increases during embryo implantation

CHEN Xiao-ling, YANG Rong, JIA Yong-cun, LIU Xiao-yun, WEI Sha-li (Laboratory of Reproductive Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of PTEN gene in the mouse uterus during embryo implantation. **Methods** Real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) was used to detect PTEN mRNA expressed in the endometria of the nonpregnant mice and the late pregnant mice (day 1, day 3, day 4, day 5 and day 7), with 20 mice sacrificed at each fixed day. Out of another 20 3-day pregnant mice, ten received PTEN antisense oligonucleotide at the horn of uterus and ten received normal saline to count the blastocysts at pregnant day 8. **Results** The PTEN mRNA/β-actin mRNA in pregnant mice was higher than that of nonpregnant mice, gradually hoisted as days passed by, and reached the highest at pregnant day 5. The number of blastocysts in the mice that received PTEN antisense oligonucleotide was fewer than that received normal saline. **Conclusion** PTEN persistently expresses in mouse endometria during the early pregnancy and maybe participate in the regulation process of mouse blastodyst implantation.

Key words: PTEN; endometrium; implantation; real-time fluorescence quantitative PCR; intrauterine injection

PTEN是位于人类染色体的10q23的肿瘤抑制基因,编码一种双特异性的蛋白磷酸化酶,能够脱去丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸残基的磷酸[1]。序列分析表明,该蛋白质与张力蛋白和辅助蛋白有很大的同源性[2],促进细胞凋亡的发生。它在体外同时具有脂质磷酸酶和蛋白水解酶的活性。近年的研究表明,它在胚胎发育、着床,细胞迁移,和细胞凋亡等中发挥重要的作用[1,3]。胚胎着床和胎盘形成过程会发生一系列的细胞间相互作用,细胞增值,侵入以及细胞凋亡等,导致着床点处组织重建。细胞凋亡可能在胚胎发育和多余细胞清除方面起关键性的作用。本研究采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative PCR, real-time FQ-PCR)定量分析PTEN在妊娠早期子宫内膜的表达,用子宫角注射法观察PTEN反义寡核苷酸对胚泡着床的影响,初步探讨它在小鼠胚泡着床过程中的作用,为进一步探讨胚胎着床机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级NIH小鼠120只,6~8周龄,质量(23~25)g,由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(渝) 20050002]。选择动情周期中任意时期的雌鼠按雌、雄比例2:1与雄鼠合笼交配,次晨发现有阴栓者为妊娠第1天,依次计算妊娠天数。随机数字表法将未孕小鼠和孕鼠分为6组(分别记为d0、d1、d3、d4、d5、d7),每组20只。断颈处死,取无菌条件下子宫内膜备用。将孕3 d的20只小鼠,分为2

作者简介:陈晓玲(1979-),女,四川省彭州市人,硕士研究生,主要从事生殖遗传方面的研究。电话:(023)68573363,E-mail:chenxiao332001@yahoo.com.cn

通讯作者:魏莎莉,电话:(023)68485001,E-mail:zwz007cn@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-11-27;修回日期:2007-04-30

组，进行子宫角注射。

1.1.2　主要试剂及仪器　　FQ-PCR 引物和荧光探针均由上海基康公司设计并合成。荧光定量 PCR 仪为 ABI Prism 7000。PTEN 反义寡核苷酸由 TaKaRa 合成，脂质体 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司。

1.2　方法

1.2.1　总 RNA 的制备及 cDNA 合成　　按照 TRI-zol 试剂的说明书提取小鼠子宫总 RNA，所提取的总 RNA 通过电泳和测定 A 值判断总 RNA 的质和量。25 μl 反应体系中总 RNA 1 μg，Olig-DT 500 ng，5 × 缓冲液 5 μl，M-MLV(200 U/μl)1 μl，RNAi (25 U) 0.5 μl，dNTPs(10 mmol/L) 5 μl，加 DEPC-H2O 至 25 μl，70 ℃ 5 min，42 ℃ 60 min，70 ℃ 10 min 进行逆转录反应。

1.2.2　荧光定量 PCR 标准品的制备　　在实时荧光定量 PCR 中需要制备标准品以产生标准曲线，普通 PCR 仪上进行 PTEN 片断的 PCR，获得 255 bp 的产物，胶回收纯化 PCR 产物。与 PMD18-T 载体建立连接反应，产生 PMD18-T 载体 + PTEN 基因片断的质粒，蓝白斑筛选，转入感受态细菌扩增，抽提纯化质粒，酶切，PCR，测序。紫外分光光度计检测吸光度值[D(260)]，并计算质粒浓度及换算拷贝数。梯度稀释质粒，得到 10^8、10^7、10^6、10^5、10^4、10^3 copies/μl 的质粒。

1.2.3　荧光定量 PCR 标准曲线的制备和数据分析　　用已知 PTEN 质粒拷贝数的模板进行扩增得到 CT 值，与其对应的起始拷贝数的自然对数作图，得到一标准曲线($R \geqslant 0.99$)。根据同时扩增的未知样品的 CT 值，仪器自动在标准曲线上产生它的起始拷贝数。

1.2.4　荧光定量 PCR 检测 PTEN 表达　　以 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板扩增 PTEN 和 β-actin(引物和探针序列见表 1)。25 μl 反应体系中含 Mg^{2+} (25 mmol/l) 3.0 μl，dNTPs(各 2.5 mmol/l) 2.0 μl，10 × buffer 2.5 μl，引物 1，2(20 μmol/L)各 0.5 μl，*rTaq* 酶(5 U/μl)0.2 μl，探针(20 μmol/L) 0.8 μl，cDNA 模板 2.0 μl。扩增反应条件 95 ℃ 10 s 预变性，95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s 收集荧光信号，72 ℃ 30 s，共 40 个循环。每一个样本做 3 个平行管。

表 1　引物及探针序列

基因	引物序列
PTEN 外围引物正义链	CCCAGTCAGAGGCGCTATGT
PTEN 外围引物反义链	GATATCACCACACACAGGCAATG
探针配套 PTEN 正义链	ACCCGTGGCACTGCTGTT
探针配套 PTEN 反义链	GATATCACCACACACAGGCAATG
PTEN 荧光探针	F-TGGCGGAACTTGCAATCCTCAGTTTG-P
内参 β-actin 正义链	CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC
内参 β-actin 反义链	TAGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT
内参 β-actin 荧光探针	F-TCCTTCTTGGGTATGGAATCCTGTGGC-P

1.2.5　反义寡核苷酸-脂质体复合物的制备　　根据小鼠 PTEN 全基因 cDNA 序列设计反义寡核苷酸，序列为 5′-GGCG-GTGTCATAATGTCTCT-3′经 NCBI BLAST 向基因库检索验证 PTEN 反义寡核苷酸序列仅与 PTEN mRNA 互补。对所有核苷酸进行全硫代修饰。将 PTEN 反义寡核苷酸 81 μg 稀释于 50 μl 生理盐水中(A 液)，将脂质体 Lipofectamine2000 6 μl 稀释于 50 μl (B 液) 生理盐水中，将 A、B 液混匀，室温放置 30 min 备用。

1.2.6　小鼠子宫角注射　　将 20 只妊娠 3 d 的小鼠随机数字法分为两组：对照组(10 只)，双测子宫角均注射生理盐水；实验组(10 只)，左侧子宫角注射反义寡核苷酸，右侧子宫角注射生理盐水对照。以上各组小鼠于妊娠 3 d 晚上 8 点子宫角分别缓慢注入 A、B 混合液 8 μl、或生理盐水 8 μl(注射过程大于 3 min)，具体步骤按 Illera[4] 介绍的方法进行。待妊娠 8 d 剖腹取出子宫，肉眼观察并统计胚泡着床数。

1.3　统计学处理

每一个实验组 PTEN 基因 mRNA 拷贝数与 β-actin 基因 mRNA 拷贝数之比值作为实验结果，以 $x \pm s$ 表示；用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

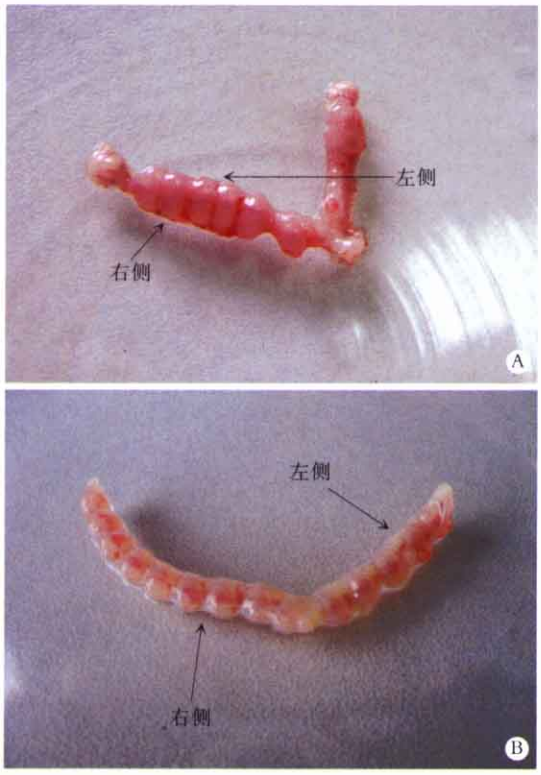
2　结果

2.1　荧光定量 PCR 结果判定

FQ-PCR 测得小鼠的妊娠和非妊娠的子宫内膜组织均有 PTEN 的表达，妊娠的子宫内膜组织 PTEN/β-actin mRNA 的比值大于非妊娠的子宫内膜组织，d0 ~ d5 小鼠子宫内膜 PTEN mRNA 表达量逐渐增加，d7 表达略有下降，方差分析显示 d0 ~ d8 小鼠子宫内膜 PTEN mRNA 表达有显著性差异($P < 0.05$)。其中 d0 与 d1、d3，d7 与 d1、d3 相比差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2　子宫角注射反义寡核苷酸结果(图 1)

实验组左右侧子宫胚泡着床数分别为(1.70 ± 0.95)和(6.20 ± 0.92)；对照组左右侧子宫胚泡着床数分别为(7.10 ± 0.88)和(6.70 ± 1.1)，实验组注射反义寡核苷酸的左侧胚胎着床数较右侧明显下降，差异有显著性($P \leqslant 0.05$)。对照组左右侧子宫胚泡着床数无明显差异($P > 0.05$)。



A：实验组；B：对照组

图 1　小鼠子宫角注射反义寡核苷酸后的大体观察

3 讨论

PTEN 蛋白是蛋白酪氨酸酶家族的一个成员。PTEN 作用的主要底物是 D3 位置的磷脂酰肌醇—PIP2 和 PIP3，均是 PI_3K 的产物[5]。PIP3 是胰岛素、表皮生长因子等一些细胞因子在细胞内的第二信使，在控制细胞的生长过程中起着重要的作用，它既能刺激细胞的生长，又能抑制细胞的凋亡。PTEN 编码的蛋白具有脂质磷酸酶的活性，可使 PIP3 去磷酸化，进而阻断相应的信号传导系统，从而抑制细胞的生长，促进细胞的凋亡 。磷酸化的 Akt(P-Akt)能调控不同的下游的与细胞存活和增殖有关的蛋白质的活性，阻断细胞的凋亡，PTEN 通过负调控 Akt，降低 P-Akt 的水平。因此 PTEN 能够诱导肿瘤细胞发生凋亡和对抗侵袭[6]。

胚泡着床是一个极其复杂的生理过程，是胚泡与子宫内膜两种不同遗传构成细胞之间相互识别，相互黏附和相互整合的过程。是生殖过程中的重要步骤，也是妊娠成功与否的关键。在妊娠期间，细胞增殖和死亡之间的平衡对于胚胎的成功植入和妊娠的维持至关重要。Correia-Da-Silva 等[7]研究发现增殖细胞核抗原(PCNA)在间质细胞蜕膜化期间高表达，直到妊娠 12 d 后突然降低，同时他们也发现在这个时期凋亡细胞也出现了。说明蜕膜细胞在妊娠的不同时间和空间都经历着凋亡。在着床的过程中，子宫内膜间质细胞增殖，分化成蜕膜细胞并逐渐向周围扩展，而早期形成的蜕膜细胞又依照同样的方向不断地退化和死亡，蜕膜细胞的增殖和退化在动态平衡中协调蜕膜细胞的数量和滋养层细胞的侵入[7]。Guzeloglu-Kayisli 等[8]发现在早孕期的蜕膜和腺体细胞 PTEN 的表达比月经周期任一期的表达均高。这可能和这一时期子宫内膜细胞增殖减少和细胞凋亡增加有关，因为在植入和早孕的过程中，许多细胞要经受凋亡，子宫内膜细胞的凋亡在调控子宫内膜的蜕膜化和滋养层细胞的侵入方面发挥重要的作用。

本研究运用实时荧光定量 PCR 技术对未孕的小鼠和妊娠 d1、d3、d4、d5、d7 小鼠的子宫内膜 PTEN 的表达进行研究，结果显示妊娠的子宫内膜组织 PTEN mRNA 大于非妊娠的子宫内膜组织，且随着妊娠天数的增加呈现逐渐增加的趋势，在小鼠着床窗口期即第 5 天达到最高，到第 7 天开始略有下降，各妊娠组之间比较差异具有显著性($P < 0.05$)。为进一步研究 PTEN 对胚泡着床的影响，我们参照 Illera[4]法，进行在体实验，结果证明单侧子宫角注射 PTEN 反义寡核苷酸可达到显著抑制胚泡着床的效果，但不能够达到完全抑制。推测其作用的途径可能是外源性的 PTEN 反义寡核苷酸渗入基因组特异区域，形成三股螺旋 DNA 或环状 DNA 阻断基因转录，而且能与 mRNA 的蛋白质合成起始区结合形成双链，抑制 PTEN 的翻译，从而抑制了 PTEN 在胚泡植入过程中作为凋亡促进子促进子宫内膜细胞凋亡的作用。小鼠子宫的蜕膜化进程开始于胚胎着床前，胚胎黏附时，上皮深面的基质细胞增殖分化为蜕膜细胞，并向周围扩展，最终遍及子宫，然后按其分化扩展的方向不断退化和死亡，为胚胎的生长提供更大的空间[7]。我们的实验 d3、d4、d5、d7 小鼠子宫内膜 PTEN mRNA 的表达显著增加与之相符，说明 PTEN 在诱导子宫内膜腔上皮细胞、蜕膜细胞、滋养层细胞的凋亡和限制滋养层细胞过度侵入子宫内膜的过程中发挥着重要的作用，有利于胚泡的着床。胚胎植入以及维持正常妊娠需激素-免疫-细胞因子和黏附分子网络系统的共同作用，一种因子往往不能起决定性的作用，而且可能还有其他的促凋亡抑制因子参与其中，这和我们发现 PTEN 反义寡核苷酸不能完全抑制胚泡着床也是相符合的。

在辅助生殖临床中，我们可以通过检测 PTEN 基因表达变化来进行产前诊断，从而提高辅助生殖的成功率以及异常妊娠的检出率。因此 PTEN 在胚泡着床过程中的研究对于不孕患者的诊断治疗，提高辅助生育的成功率及寻找新的生殖调控手段，都有重要的意义。但其诱导子宫内膜细胞发生凋亡的具体机制、通过何种途径诱导凋亡还不明了，尚需对其进行进一步的研究。

参考文献：

[1] Dahia P L. PTEN, a unique tumor suppressor gene[J]. Endoc Relat Cancer, 2000,7(2): 115-129.

[2] Stiles B, Groszer M, Wang S Y, *et al*. PTEN less means more[J]. Dev Biol, 2004, 273(2): 175-184.

[3] Mutter G L, Lin M C, Fitzgerald J T, *et al*. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(6): 2334-2338.

[4] Illera M J, Cullinan E, Gui Y T, *et al*. Blockade of the alpha(v)beta(3) integrin adversely affects implantation in the mouse[J]. Biol Reprod, 2000, 62(5): 1285-1290.

[5] Liu J L, Sheng X, Hortobagyi Z K, *et al*. Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25: (14): 6211-6224.

[6] Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, *et al*. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(4): 892-895.

[7] Correia-Da-Silva G, Bell S C, Pringle J H, *et al*. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy[J]. Placenta, 2004, 25(6): 538-547.

[8] Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli U A, Al-Rejjal R, *et al*. Regulation of PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) expression by estradiol and progesterone in human endometrium [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(10): 5017-5026.

(编辑 栾 嘉)