

谷胱甘肽-硫-转移酶 M2 基因在小鼠生殖器官中的表达

宇兴江 盛超 胡方园 王振东 陈小龙 倪华*

(东北农业大学生命科学学院 哈尔滨 150030)

摘要 :利用半定量 RT-PCR 和原位杂交的方法检测 *Gstm2* 基因在成年雄性和雌性小鼠生殖器官中的表达,并初步评价其在生殖过程中的作用。在雄性小鼠的睾丸、附睾、输精管和雌性小鼠的卵巢、输卵管、子宫、胎盘中,半定量 RT-PCR 的方法均检测到 *Gstm2* 的表达,在胎盘中表达水平较低,其余组织表达水平较高。利用原位杂交的方法在睾丸的间质细胞检测出较强的信号,在附睾中有微弱的信号,而输精管上皮细胞没有检测到信号,在输卵管上皮细胞和妊娠第 3 d 的子宫上皮细胞中检出较强的信号。由于 *Gstm2* 在 RNA 水平在小鼠的生殖器官中广泛表达,因此我们推测 *Gstm2* 可能在小鼠精子发生、睾酮合成、精子的成熟和运输、卵子的发生和运输、胚胎着床等生殖过程中发挥作用,此结果为深入研究 *Gstm2* 在生殖生理中的功能打下基础。

关键词 :谷胱甘肽-硫-转移酶;小鼠;子宫;睾丸

中图分类号:R321 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)05-27-06

The Expression of Glutathione-S-transferase M2 in the Genital Organs of Mouse

YU Xing-Jiang SHENG Chao HU Fang-Yuan WANG Zhen-Dong CHEN Xiao-Long NI Hua*

(College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract :The expression of Glutathione-S-transferase M2 (*Gstm2*) in the reproductive system of mouse was observed and the role of *Gstm2* in reproductive process was evaluated. Semi-quantitative RT-PCR showed that *Gstm2* expression level in the placenta was lower than that in other organs. *In situ* hybridization showed that *Gstm2* expression varied in different tissues: the signals were strong in the stroma cell of the testis, the epithelium of the oviduct and the luminal epithelium of the uterus on day 3 of early pregnancy; there were weaker signals in the epididymis; and no signals were found in the epithelium of the spermatiduct. Therefore, *Gstm2* may have effects on the process of spermatogenesis, oogenesis, transportation of the gamete and zygote, and implantation. The result would be groundwork for researching the function of the *Gstm2* in reproductive physiology.

Key words :Glutathione-S-transferase; Mouse; Uterus; Testis

谷胱甘肽-硫-转移酶 (glutathione S transferases, GSTs) 是生物体内一种重要的二相解毒酶,哺乳动物的可溶性 GSTs 根据其基因结构的不同可以分为 8 类: Alpha(α)、Zeta(ζ)、Sigma(θ)、Kappa(κ)、Mu(μ)、Omega(ω)、Pi(π)、Theta(σ)^[1]。其中, Mu 族 GSTs 可分为 *Gstm1*、*Gstm2*、*Gstm3*、

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30500361), 黑龙江省教育厅科研项目(No. 11511040)资助;

* 通讯作者, E-mail: huani@neau.edu.cn;

第一作者介绍 宇兴江,男,硕士研究生,研究方向:发育生物学, E-mail: yuxingjiang6@126.com。

收稿日期: 2007-04-19, 修回日期: 2007-06-28

Gstm4、Gstm5、Gstm6^[2]。Gstm2 是较为特殊的 GSTs,除解毒反应之外,Gstm2 可作为转运蛋白转运亲脂化合物,如胆红素、胆酸、类固醇激素、甲状腺激素和不同的外源性化合物。研究还发现,在人脑中,Gstm2 具有前列腺素 E 合成酶(PGES)的活性,可以参与前列腺素 E₂(PGE₂)的合成^[3]。在白血病母细胞(leukaemic blasts)、结肠直肠癌细胞和卵巢癌中检测到 Gstm2 的转录产物^[4-6]。在哺乳动物癌细胞中 Gstm2 的过表达与各种癌症药物和致癌因素的敏感性有关。

在生殖系统中,各种 GSTs 有独特的分布^[7-9],但关于 Gstm2 的表达目前还没有详细报道。本文应用半定量 RT-PCR 和原位杂交的方法在 mRNA 水平检测 Gstm2 在雄性和雌性小鼠生殖系统中表达水平,初步评价 Gstm2 在生殖中的作用,为进一步深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 小鼠组织获取 选取健康的性成熟中国昆明小鼠,分别收集雄性小鼠的睾丸、附睾、输精管和雌性小鼠的卵巢、子宫、胎盘及输卵管的组织,迅速投入液氮,-70℃保存,用于提取 RNA 和原位杂交。

1.2 相对定量 RT-PCR 按照 TRIZOL(GIBCO BRL 美国)试剂盒说明提取各组织的 RNA,溶解在 DEPC 处理的水中。用无 RNA 酶的 DNase I 消化,经过酚和氯仿抽提、沉淀,最后溶于 DEPC 处理的水中,稀释浓度为 1 μg/μl,-70℃保存。1 μg RNA 使用 BcaBEST RNA-PCR 试剂盒(TaKaRa,中国)进行反转录。设置 3 个对照实验,以排除基因组 DNA 污染的可能性(1) RNA 样品不经逆转录直接进行 PCR(2) RNA 样品不加逆转录酶进行 PCR(3) DEPC 处理的水代替 RNA 样品进行 PCR。对照实验为阴性后,进行 PCR 检测。用 Primer 5 软件根据 Gstm2 序列(序列号 BC037068)设计引物,引物序列为 sense: AGGATTACAAAGCCCAGAC; antisense: CTTAGCTGCTTACTCTGAGG(PCR 产物为 316 bp)。PCR 反应条件为:95℃ 30 s、60℃ 30 s、

72℃ 30 s,30 个循环。取 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,全自动图像分析仪测定紫外光下各电泳条带的灰度值。实验采用三磷酸甘油脱氢酶(Gapdh)对各组样品灰度值进行校正,样品灰度值/Gapdh 灰度值的比值,即为小鼠生殖组织内 mRNA 的表达水平^[10]。

1.3 原位杂交 回收 Gstm2 PCR 产物,克隆到 pGEMT 载体中,测序正确后,以质粒为模板,用 T7 和 SP6 引物扩增,回收 PCR 产物作为模板,用地高辛标记试剂盒体外转录地高辛标记的 Gstm2 RNA 探针,用于原位杂交。小鼠生殖器官组织制作冰冻切片,在 4% 的多聚甲醛(pH 9.5)中固定 1 h 后,用 Triton X-100 处理 20 min,55℃ 杂交过夜。杂交后用含 50% 甲酰胺的梯度 SSC 缓冲液充分冲洗,加入碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体。最后加入含 2 mmol/L 左旋咪唑(levamisole)的碱性磷酸酶底物充分显色,甲基绿复染,Olympus 显微镜下观察及拍照。

1.4 统计学分析 实验数据应用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,Gstm2 在各组织中的表达水平采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 相对定量 RT-PCR 检测 Gstm2 的表达 在雄性小鼠的输精管、附睾、睾丸以及雌性小鼠的卵巢、输卵管、子宫、胎盘中均检测到 Gstm2 的特异条带(图 1)。Gstm2 表达水平在胎盘中较低,在输精管、附睾、睾丸、卵巢、输卵管、子宫中表达较强。经过统计分析,胎盘中 Gstm2 mRNA 的表达量显著低于其他 6 种组织,在输精管、附睾、睾丸、卵巢、输卵管、子宫中 6 种组织中,Gstm2 mRNA 水平没有显著差异。

2.2 原位杂交结果 在附睾头、附睾体和附睾尾的上皮细胞中有较弱的信号(图版 I:A、B、C)。在小鼠睾丸的间质细胞中检测到较强的 Gstm2 mRNA 信号(图版 I:D);在输精管中没有检测到 Gstm2 mRNA 信号(图版 I:E)。在输卵管上皮中有较强信号(图版 I:F);在卵巢中,卵泡之间的组织中存在较弱的染色信号(图版 I:

G) ;在早期妊娠 1~8 d 的子宫中 ,仅在妊娠第 3、4 d 的子宫腔上皮中有较强的信号(图版 I :

H) ;在早期妊娠的其他时期和正常发情周期的子宫中 ,没有检测到 *Gstm2* mRNA 的表达。

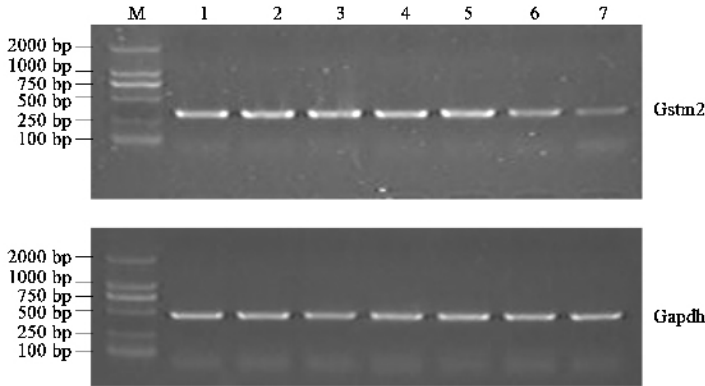


图 1 RT-PCR 检测 *Gstm2* 在雄性和雌性小鼠生殖器官中的表达

Fig. 1 RT-PCR confirmation of *Gstm2* expression in mouse reproductive system

M :DL2000 分子量标准 ;1~7 分别为 :输精管、附睾、睾丸、输卵管、卵巢、子宫和胎盘。

M :DL2000 DNA marker ; Lines 1 - 7 indicate vas deferens ,epididymis and testis of male mouse , and oviduct ,ovary ,uterus and placenta of female mouse ,respectively .

3 讨 论

作为胞质型 GSTs ,*Gstm2* 具有多种功能 :通过酶促和非酶促反应 ,解除化学诱变剂、促癌剂、脂质、DNA 以及过氧化物的毒性 ,保护正常细胞免受有毒有害因素的影响 ;*Gstm2* 具有前列腺素 E 合成酶的功能 ,通过催化 PGE2 的合成 ,发挥 PGE2 的各种生理功能。此外 ,GSTs 具有类固醇异构化酶的活性 ,参与睾酮和孕酮的合成^[11]。

睾丸中高含量的 *Gstm2* 可以使发育中的精子获得对毒性物质的抵抗力^[11]。原位杂交结果表明 ,在小鼠睾丸间质细胞中 *Gstm2* 高表达。间质细胞的主要功能是产生睾酮。睾酮和孕酮都是由类固醇代谢物孕烯酮合成的。这种化合物经过侧链裂解和氧化形成雄烯二酮(5-androstene-3 ,17-dione)或孕烯二酮(5-pregnene-3 ,20-dione)。这两种 3-酮-5-类固醇类物质(3-keto-5-steroids)分别异构化形成孕酮和睾酮的前体 3-酮-4-类固醇(3-keto-4-steroid)。GSTs 具有类固醇异构化酶的活性 ,可以催化 3-酮-5-类固醇类物质(3-keto-5-steroids)形成 3-酮-4-类固醇

(3-keto-4-steroid) ,在体内 GST 催化这一过程^[12]。此外 ,GSTs 可以与类固醇激素结合 ,可能与类固醇激素在体内的分布有关。虽然具有类固醇异构化酶活性的 GSTs 中是否包括 *Gstm2* 有待于进一步证实 ,本研究结果提示 *Gstm2* 有可能参与睾酮的合成。此外 ,*Gstm2* 有 PGES 活性 ,其表达量可能与 PGE2 在雄性生殖系统中发挥的功能有关。精液是精子、附属腺和管道分泌物的混合物 ,其中有较高浓度的前列腺素(PGs) ,PGE 被认为是人类精液中最重要 PGs 。Isidori 等分别在正常的和不孕男性的精液中检测到 PGE2 和 19 羟基-前列腺素 E(19-OH PGE) ,发现不孕男性的 PGE2 和 19-OH PGE 的含量均不正常 ,并且其精子的浓度和运动能力都明显下降^[13]。Didolkar 等通过实验发现 ,向老鼠体内注射 PGE2 后 ,其睾丸重量、RNA 含量、透明质酸酶活性、精子数目都有所增加 ,这说明 PGE2 可以促进睾丸的发育和成熟 ,并可能在精子发生的后期 ,即在精母细胞向精子细胞的转化过程中发挥作用^[14]。可见 ,在雄性生殖系统中 ,*Gstm2* 可能通过产生 PGE2 对睾丸的发育、精子的发生、成熟、运输等过程起调节作

用。

RT-PCR 结果表明:在卵巢和输卵管中, *Gstm2* 表达水平较高。原位杂交结果表明在输卵管上皮中, *Gstm2* 高表达。在卵巢中, PGE2 是参与排卵、黄体生成和退化过程中的关键调控因子^[15,16]。PGE2 能够增强输卵管的收缩能力,从而在配子运输、受精和早期胚胎发育中发挥重要作用^[17~20]。本研究表明 *Gstm2* 在卵巢中表达,其意义可能在于保护卵子免受有毒物质的伤害和产生 PGE2。

应用原位杂交的方法,本研究仅在妊娠第 3、4 d 的小鼠子宫腔上皮中检测到 *Gstm2* 的表达。小鼠胚胎着床发生在妊娠第 4 d 的子夜,妊娠第 3、4 d 是子宫为胚胎着床的准备期,此时孕酮的含量也大量增加,在这一阶段, *Gstm2* 高表达于腔上皮,推测该分子可能与胚胎着床时的子宫分化为接受态有关,并且可能受体内的孕酮调节。*Gstm2* 所起作用以及作用机理有待于进一步研究。

GSTs 在机体有毒化合物的代谢、保护细胞免受急性毒性化学物质攻击中起到重要作用^[21]。在肿瘤药物治疗中,由于 GSTs 参与抗肿瘤药物排出体外, GSTs 的表达与肿瘤的抗药性有关^[22]。GSTs 测定可能作为临床监测肿瘤耐药性早期出现的一个指标^[23],因此在肿瘤病因学和筛选治疗肿瘤药物方面,关于 GSTs 的研究备受关注^[24]。本实验检测了 *Gstm2* 在雌性和雄性小鼠生殖系统中的定量和定位表达,为深入研究 GSTs 在哺乳动物生殖系统中的功能奠定了一定的基础。相信,随着科学研究的不断深入,有关 GSTs 的具体作用机理将逐渐为人们所了解。

参 考 文 献

- [1] Hayes J D , Flanagan J U , Jowsey I R . Glutathione transferases . *Annu Rev Pharmacol Toxicol* , 2005 **45** : 51 ~ 88 .
- [2] Chanas S A , Jiang Q , McMahon M , *et al* . Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase *GstA1* , *Gsta2* , *Gstm1* , *Gstm2* , *Gstm3* and *Gstm4* genes in the livers of male and female mice . *Biochem J* , 2002 **365** : 405 ~ 416 .
- [3] Beuckmann C T , Fujimori K , Urade Y , *et al* . Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain . *Neurochem Res* , 2000 **25** : 733 ~ 738 .
- [4] Urzua U , Roby K F , Gangi L M , *et al* . Transcriptomic analysis of an *in vitro* murine model of ovarian carcinoma : functional similarity to the human disease and identification of prospective tumoral markers and targets . *J Cell Physiol* , 2006 **206** : 594 ~ 602 .
- [5] Kearns P R , Chrzanoska-Lightowlers Z M , Pieters R , *et al* . Mu class glutathione S-transferase mRNA isoform expression in acute lymphoblastic leukaemia . *Br J Haematol* , 2003 **120** : 80 ~ 88 .
- [6] Ebert M N , Klinder A , Peters W H M , *et al* . Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of *Gstm2* by butyrate . *Carcinogenesis* , 2003 **24** : 1 637 ~ 1 644 .
- [7] Tiltman A J , Haffajee Z . Distribution of glutathione S-transferases in the human ovary : an immunohistochemical study . *Gynecol Obstet Invest* , 1999 **47** (4) : 247 ~ 250 .
- [8] Wang L , Groves M J , Hepburn M D , *et al* . Glutathione S-transferase enzyme expression in hematopoietic cell lines implies a differential protective role for T1 and A1 isoenzymes in erythroid and for M1 in lymphoid lineages . *Haematologica* , 2000 **85** (6) : 573 ~ 579 .
- [9] Raijmakers M T , Steegers E A , Peters W H , *et al* . Glutathione S-transferases and thiol concentrations in embryonic and early fetal tissues . *Hum Reprod* , 2001 **16** (11) : 2 445 ~ 2 450 .
- [10] Sidhu S S , Kimber S J . Hormonal control of H-type a (1-2) fucosyltransferase messenger ribonucleic acid in the mouse uterus . *Biol Reprod* , 1999 **60** : 147 ~ 157 .
- [11] 聂立红 , 王声湧 , 胡毅玲 , 谷胱甘肽硫-转移酶研究进展 . 中国病理生理学杂志 , 2000 **16** (11) : 1 240 ~ 1 244 .
- [12] Johansson A S , Mannervik B . Human glutathione transferase A3-3 : a highly efficient catalyst of double-bond summations in the biosynthetic pathway of steroid hormones . *Biochem J* , 2001 **276** (35) : 33 061 ~ 33 065 .
- [13] Isidori A , Conte D , Laguzzi G . Role of seminal prostaglandins in male fertility . I . Relationship of prostaglandin E and 19-OH prostaglandin E with seminal parameters . *J Endocrinol Invest* , 1980 **3** (1) : 1 ~ 4 .
- [14] Didolkar A K , Roychowdhury D . Effect of prostaglandins A-1 , E-2 and F-2 alpha on spermatogenesis in rats . *J Reprod Fertil* , 1980 **58** (1) : 275 ~ 278 .
- [15] Ben-Ami I , Freimann S , Armon L , *et al* . PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells :

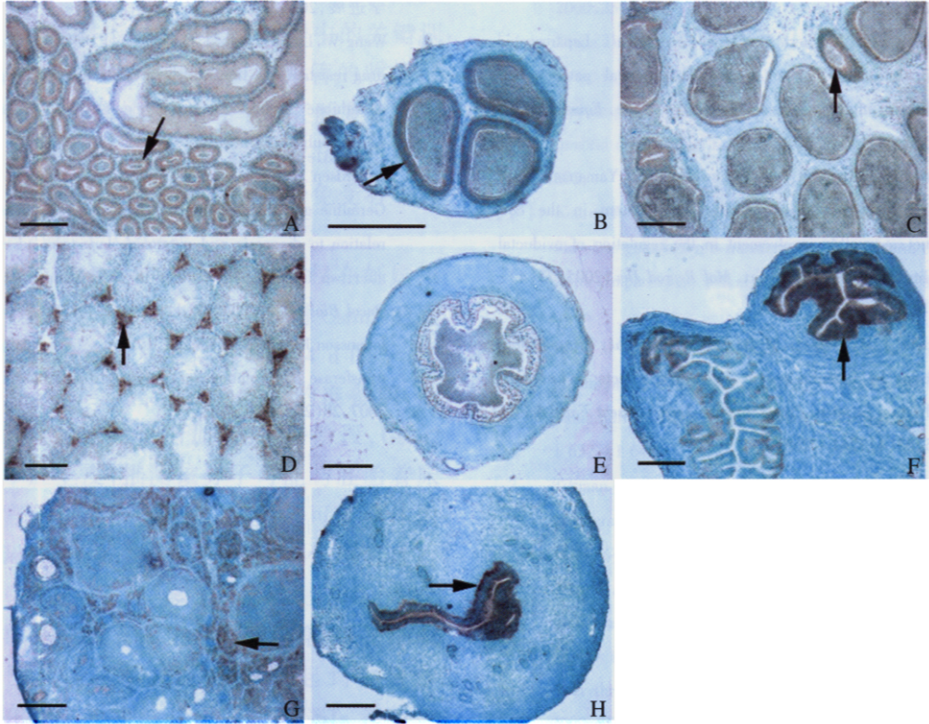
- new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. *Mol Hum Reprod* ,2006 ,**12** (10) :593 ~ 599.
- [16] Stouffer R L ,Xu F ,Duffy D M. Molecular control of ovulation and luteinization in the primate follicle. *Front Biosci* ,2007 , **12** :297 ~ 307.
- [17] Allen W R ,Wilsher S ,Morris L , *et al* . Laparoscopic application of PGE2 to re-establish oviducal patency and fertility in infertile mares :a preliminary study. *Equine Vet J* , 2006 ,**38** (5) :454 ~ 459.
- [18] Wijayagunawardane M P ,Kodithuwakku S P ,Yamamoto D ,*et al* . Vascular endothelial growth factor system in the cow oviduct :a possible involvement in the regulation of oviductal motility and embryo transport. *Mol Reprod Dev* ,2005 ,**72** (4) : 511 ~ 520.
- [19] Viggiano J M ,Herrero M B ,Cebal E , *et al* . Prostaglandin synthesis by cumulus-oocyte complexes :effects on *in vitro* fertilization in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* , 1995 ,**53** (4) :261 ~ 265.
- [20] Tan H N ,Liu Y ,Diao H L , *et al* . Cyclooxygenases and prostaglandin E synthases in preimplantation mouse embryos. *Zygote* ,2005 ,**13** (2) :103 ~ 108.
- [21] 徐峰 甄永芬 邵荣光. 肿瘤化疗与药物代谢酶. 生理科学进展 ,2005 ,**36** (4) :295 ~ 298.
- [22] Wang W ,Liu G ,Zheng J. Human renal UOK130 tumor cells :A drug resistant cell line with highly selective over-expression of glutathione S-transferase-pi isozyme. *Eur J Pharmacol* ,2007 , **22** :[Epub ahead of print]
- [23] Edvardsen H ,Kristensen V N ,Grenaker Alnaes G I , *et al* . Germline glutathione S-transferase variants in breast cancer : relation to diagnosis and cutaneous long-term adverse effects after two fractionation patterns of radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* ,2007 ,**67** (4) :1 163 ~ 1 171.
- [24] Johansson K ,Ahlen K ,Rinaldi R , *et al* . Microsomal glutathione transferase 1 in anticancer drug resistance. *Carcinogenesis* , 2007 ,**28** (2) :465 ~ 470.

宇兴江等:谷胱甘肽-硫-转移酶 M2 基因在小鼠生殖器官中的表达

图版 I

YU Xing-Jiang *et al.*: The Expression of Glutathione-S-transferase M2 in the Genital
Organs of Mouse

Plate I



原位杂交检测 *Gstm2* 在雄性和雌性小鼠生殖器官中的表达

A: 附睾头; B: 附睾体; C: 附睾尾; D: 睾丸; E: 输精管; F: 输卵管; G: 卵巢; H: 子宫(妊娠第 3 d). 标尺 = 100 μm .

In situ hybridization of *Gstm2* expression in mouse reproductive organs

A: Caput epididymidis; B: Corpus epididymidis; C: Cauda epididymidis; D: Testis; E: Vas deferens; F: Oviduct; G: Ovary; H: Uterus (day 3 during early pregnancy). Bars = 100 μm .