

孕酮对体外培养的牛子宫内膜细胞上孕酮受体表达的影响

张明¹,甘潇²,郑洁¹,赖松家¹,张华²,王雄清²,朱庆^{1*}

(1. 四川农业大学动物科技学院,雅安 625014;2. 四川绵阳师范学院动物应用技术研究,绵阳 621000)

摘要: 本试验分别用 50、100、200 和 400 ng/mL 浓度的孕酮处理体外培养的牛子宫内膜细胞 1、3、6、12、24 h,然后收集细胞通过半定量 RT-PCR 分析孕酮对子宫内膜细胞孕酮受体(PR)表达的影响。结果表明:在细胞层次水平上,孕酮能够抑制子宫内膜体外培养细胞上孕酮受体的表达。

关键词: 牛;子宫内膜;孕酮受体;半定量 RT-PCR

中图分类号:S814.8

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2008)09-1190-06

Effects of Progesterone on Progesterone Receptor Expression in Cultured Bovine Endometrial Cells (bEC)

ZHANG Ming¹, GAN Xiao², ZHENG Jie¹, LAI Song-jia¹,
ZHANG Hua², WANG Xiong-qing², ZHU Qing^{1*}

(1. College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Institute of Applied Animal Technology, Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China)

Abstract: In the studies, bovine uterine endometrium cells were cultured in medium including progesterone at 50, 100, 200 and 400 ng/mL respectively and collected after incubation for 1, 3, 6, 12 and 24 hours. Semi-quantitative reversed-transcript polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was used to observe the effects of progesterone on progesterone receptor (PR) expression. Results of the present study indicate that progesterone inhibit the expression of PR *in vitro*.

Key words: bovine; uterus endometrium; progesterone receptor; semi-quantitative RT-PCR

孕酮主要是由卵巢妊娠黄体分泌的类固醇激素^[1],主要作用于子宫内膜、子宫肌层和乳腺组织。孕酮是妊娠建立和维持的重要激素^[2]。孕酮通过孕酮受体(Progesterone receptor, PR)的介导发挥生理作用。PR属于类固醇核受体超家族的成员,是核受体家族中的重要转录因子,PR分为A、B亚型,它们由1个基因通过2个不同的起始密码子转录而成^[3]。在牛发情周期和妊娠过程中的不同阶段,PR在子宫内膜上的表达存在差异。在发情周期中:从发情前期到发情期,子宫内膜基质细胞上PR的表

达水平缓慢增加,发情后期增加迅速,间情期表达量降低;在妊娠时:在子宫子叶基质上PR表达水平低于子叶间基质细胞^[4]。在妊娠和非妊娠牛子宫子叶基质和腺上皮上,PR的表达水平较低,且不存在差异;妊娠个体子叶间基质上表达较高^[5]。研究表明,PR主要在牛子宫内膜基质细胞中表达,不同生理状况下,表达水平的差异主要是子叶基质区和非子叶基质区的差异。在个体水平上,孕酮分泌的增加,导致雌激素受体(ER)表达的减少,从而进一步导致ER介导的PR表达的降低^[6]。在妊娠识别后的妊

收稿日期:2007-09-07

基金项目:四川省教育厅“牛干扰素- τ 多态性及其与繁殖性状的相关性研究”;四川农业大学动物遗传与繁殖重点学科博士点基金联合资助

作者简介:张明(1975-),男,四川射洪人,博士,主要从事动物繁殖与胚胎生物工程研究,E-mail:zhm3000@163.com

* 通讯作者:朱庆,教授,博士生导师,E-mail:zhuqing5959@163.com

娠建立过程中,孕酮的分泌持续增加,为了维持孕酮对妊娠过程的生理作用,PR 的表达水平从理论上应该保持不变甚至增加,在妊娠建立的过程中,什么机制来阻止 PR 表达的下调?在细胞水平上,孕酮对 PR 的表达过程是否存在细胞内调控机制?解决这些问题,对于认识牛妊娠建立过程以及胚胎植入过程非常重要,从而为提高胚胎移植的妊娠率奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

黄体期(间情期)黄牛的子宫内膜。在屠宰场收集 8 头黄牛子宫,置于 37℃ 生理盐水中 30 min 内带回实验室。用含 500 IU/mL 青霉素和 500 μg/mL 链霉素的生理盐水溶液清洗 5 次后在超净工作台上,用眼科剪分离子宫内膜层。

1.2 子宫内膜细胞培养

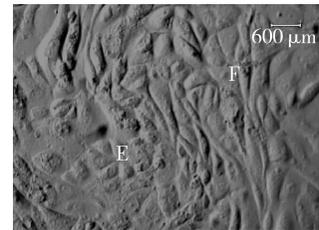
将子宫内膜组织块剪至 1 mm³ 大小,用含 10% FBS(HyClone)的 DMEM:Ham'sF₁₂(Sigma)培养液浸润,再将组织块均匀地置于预先用培养液浸润过的培养瓶底部,放入 37℃,5%CO₂ 环境的培养箱,6 h 后向培养瓶加入 1 mL 培养液(10%FBS+100 IU/mL 青霉素+100 μg/mL 链霉素+DMEM:Ham'sF₁₂);48 h 后再加入 3 mL 培养液。加液

时不要让组织块漂浮。原代细胞从组织块周围长出,细胞长满培养瓶底的 90% 时,进行传代。

传代时吸出培养液,用 PBS 淌洗后,加入 0.25% Trypsin-0.02% EDTA(Verson 液)消化液 3 mL 浸润细胞,细胞刚变圆时加入含血清的培养液 3 mL 终止消化,于漩涡振荡仪上振荡 15 s,离心收集细胞后,用培养液重悬后,按 2×10⁵/mL 密度接种细胞进行培养。

1.3 孕酮处理

取生长良好的 3~8 代牛子宫内膜细胞(bEC)混合(图 1),用无血清的 DMEM:Ham'sF₁₂ 培养 24 h。再用含不同浓度孕酮的无血清培养液培养不同时间后收集细胞。组成的不同试验组见表 1。



E. 上皮细胞;F. 成纤维样细胞

E. Epithelium;F. Fibroblast-like cells

图 1 混合生长的子宫内膜细胞(×400)

Fig. 1 To grow to confluency of endometrium cells (×400)

表 1 孕酮处理后细胞组编号

Table 1 The groups number after endometrium cells being treated with progesterone

处理时间/h Treated time	孕酮浓度 Progesterone concentration/(ng/mL)				
	0(对照组) 0 (Control group)	50	100	200	400
1	A1	B1	C1	D1	E1
3	A2	B2	C2	D2	E2
6	A3	B3	C3	D3	E3
12	A4	B4	C4	D4	E4
24	A5	B5	C5	D5	E5

表中字母数字标号表示孕酮处理后细胞的试验组编号

The letters and numbers labeled the different experimental groups after endometrium cells being treated with progesterone

1.4 细胞总 RNA 的提取

酶解后离心收集不同试验组细胞作 RNA 抽提。抽提过程参照 TIANGEN 公司的 TRizol 试剂盒进行。并通过电泳和测定 260、280 nm 下的 OD 值,进行总 RNA 浓度和纯度检查。

1.5 RT-PCR 反应

采用半定量 PCR 检测不同试验组中 PR 的表达水平。内参基因为 β actin。引物用 Primer 5.0 设计,SBS 公司合成。PR 上游引物 5'-GGTGGG-TATCCAAACGA-3',下游引物 5'-TATTA-

GATCAGGCGCAA-3', PCR 产物 373 bp; β -actin 上游引物 5'-TACAATGAGCTGCGTGTGG-3', 下游引物 5'-TAGCTCTTCTCCAGGGAGGA-3', PCR 产物 450 bp。

1.5.1 RT 反应 反转录过程按照 TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 3.0 试剂盒说明书进行。反应体系为: 2 μ L (0.05 μ mol) MgCl₂, 10 \times RT Buffer 1 μ L, RNase Free H₂O 3.75 μ L, dNTP Mixture 1 μ L (各 0.01 μ mol), RNase inhibitor 0.25 μ L (10 IU), AMV Reverse Transcriptase 0.5 μ L (2.5 IU), Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μ L (1.25 pmol), RNA 样品 1 μ L (0.8 μ g)。反转录反应条件: 42 $^{\circ}$ C 15 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min。

1.5.2 PCR 反应条件优化 PCR 反应体系: 5 \times PCR Buffer 10 μ L, 灭菌蒸馏水 28.75 μ L, TaKaRa Ex TaqTMHS 0.25 μ L (1.25 IU), 上游引物: 0.5 μ L (50 pmol), 下游引物: 0.5 μ L (50 pmol), RT 产物 10 μ L。PR 和 β -actin 分管扩增。

PCR 反应条件优化: 进行半定量分析, 必须对 PCR 反应条件进行优化, 使循环次数位于 PCR 产物指数增长阶段的末期, 并与初始 RT 模板量呈递增关系时。首先调节 RT 中 cDNA 浓度分别为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 μ g/ μ L 进行模板量优化; 然后按照 94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 分别用 52 $^{\circ}$ C, 54 $^{\circ}$ C, 56 $^{\circ}$ C, 58 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 优化退火温度。最后分别采用: 28、30、32、34、35、36、37 变性退火循环次数, 优化循环数。

1.6 半定量分析

取 5 μ L PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳后, 置 Bio-Rad ChemiDoc XRS 凝胶成像系统获取图像。利用 Quantity one 4.5 软件对 PR 与 β -actin PCR 电泳条件进行定量分析, PR 与 β -actin 比值反映 PR 基因在等量细胞中的表达水平。结果采用 *F* 检验。

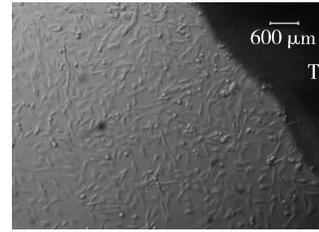
2 结果

2.1 组织块培养

在组织块贴壁后第 5 天发现有少量上皮细胞和成纤维样细胞出现在组织周围, 到第 10~14 天细胞可以基本长满培养瓶底(图 2)。添加孕酮对光学显微镜下的细胞形态没有影响(图 3、4)。

2.2 RNA 提取

琼脂糖电泳结果见图 5, 3 条带清晰可见, 28 S



T. 牛子宫内膜组织块

T. Tissue pieces from bovine endometrium

图 2 组织块周围长出的子宫内膜细胞 ($\times 100$)

Fig. 2 Growing endometrium cells about tissue ($\times 100$)

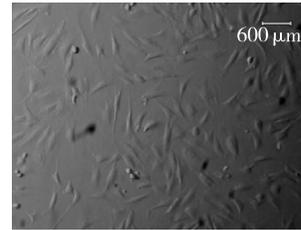


图 3 孕酮处理前细胞 ($\times 100$)

Fig. 3 The endometrium cells without progesterone treatment ($\times 100$)

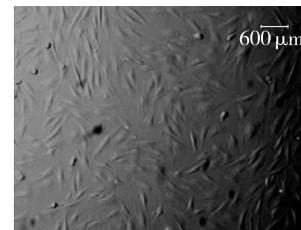
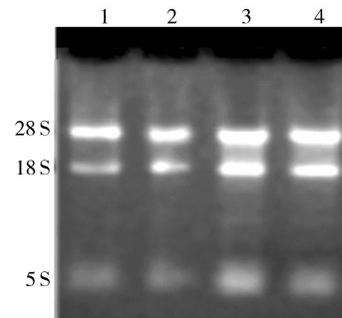


图 4 孕酮处理后的子宫内膜细胞 ($\times 100$)

Fig. 4 The bovine endometrium cells after being treated with progesterone ($\times 100$)

比 18 S 亮度比约为 2 : 1, 且无 DNA 条带。A₂₆₀/A₂₈₀ 的 OD 比值见表 2, 所有比值均在 1.70~2.18 之间。



1. P₄₀₀ ng/mL; 2. P₂₀₀ ng/mL; 3. P₁₀₀ ng/mL; 4. P₅₀ ng/mL

图 5 总 RNA 电泳图谱

Fig. 5 The electrophoresis results of total RNA by agarose gel

表 2 不同试验组中细胞总 RNA A_{260}/A_{280} 值
Table 2 The ratio of A_{260}/A_{280} of total RNA from different treated cells groups

The group number	A_{260}/A_{280} *	The group number	A_{260}/A_{280}						
A1	1.80	B1	1.73	C1	1.92	D1	2.18	E1	1.89
A2	1.79	B2	1.85	C2	1.76	D2	1.96	E2	1.88
A3	1.92	B3	1.76	C3	1.70	D3	1.87	E3	1.90
A4	1.96	B4	1.97	C4	1.94	D4	1.96	E4	1.86
A5	1.86	B5	1.79	C5	1.87	D5	1.96	E5	2.12

* A_{260}/A_{280} . 260 和 280 nm 波长下的 OD 值的比率

* The ratio of optical density under 260 nm wavelength and 280 nm wavelength

2.3 PCR 反应条件

图 6 表明,当 RT 模板浓度为 $0.8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, PR、 β -actin 的产物增长达到指数增长阶段的末期。从图 7 可以看出,循环次数从 28 增加到 37 次,PCR 的产物量也增加,PR 和 β -actin 扩增产物随循环次数的增加基本一致,在循环数为 35 次时,进入产物增长平台期。对退火温度的研究同样表明,选择 56°C 为退火温度时,PR 和 β -actin 扩增的特异性最

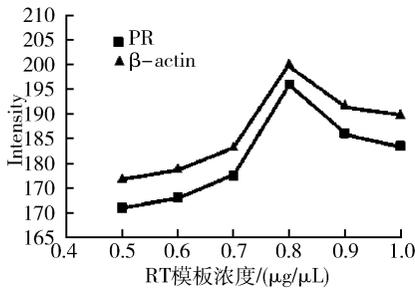


图 6 RT 模板浓度与 PCR 产物的关系
Fig. 6 The relationship between RT template dosage and PCR product

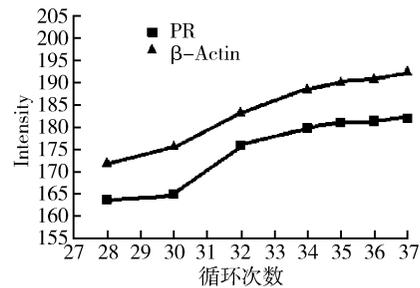
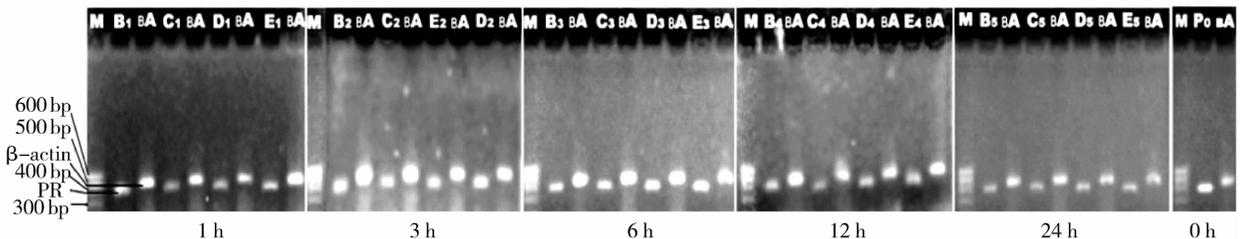


图 7 扩增循环次数与 PCR 产物的关系
Fig. 7 The relationship between amplification cycle times and PCR product

好。优化的 PCR 条件为:模板量 $0.8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,循环次数 35 次,退火温度 56°C 。

2.4 不同试验组细胞的 PR-mRNA 表达检测

通过对不同试验组细胞的 mRNA 的 RT-PCR 产物进行电泳(图 8)。电泳结果显示,在所有试验组中,均出现了 PR 和 β -actin 的特异性条带。表明在体外培养的牛子宫内膜细胞中,有 PR 和 β -actin 基因的转录。

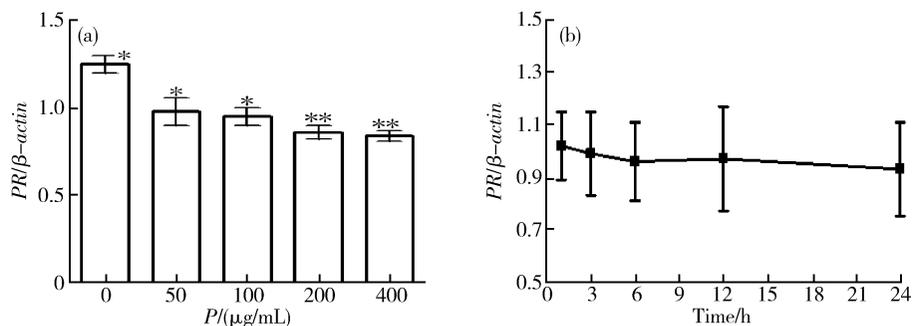


M. Maker; $B_1 \sim E_5$. 对应细胞组号(表 1)的 PR 条带; $B_1 A$. 对应细胞组号 β -actin 条带; P_0 . 控制组 PR 条带
M. Maker; $B_1 \sim E_5$. PR bands of the corresponding group number (Table 1); $B_1 A$. β -actin bands of the corresponding group; P_0 . PR bands of the control group

图 8 不同浓度孕酮处理不同时间后子宫内膜细胞 PR 和 β -actin mRNA 的 RT-PCR 电泳图谱
Fig. 8 Electrophoresis bands of RT-PCR product for PR and β -actin mRNA from endometrium cells after being treated with different dosage of progesterone for different time

β actin 基因在机体很多组织中的表达基本恒定,以 β actin 为内参基因,由 PR/β actin 进行 PR

基因半定量分析见图 9。



*. 表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$); ** . 表示与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)
 * . Showed statically different ($P < 0.05$) with the control group; ** . Showed highly statically different ($P < 0.01$) with the control group

图 9 不同孕酮浓度下 PR 的表达水平 (a) 和处理不同时间 PR 的表达水平 (b)

Fig. 9 Expression level of PR in bEC after being treated with different progesterone dose (a) and for different time (b)

孕酮受体在对照组细胞中表达最高,其表达水平显著高于 50、100 ng/mL 组 ($P < 0.05$),极显著高于 200、400 ng/mL 浓度孕酮处理组 ($P < 0.01$);从作用时间看,随着孕酮作用时间的延长,孕酮受体的表达水平降低:在低孕酮浓度处理组 (50、100 ng/mL) 中,随处理延长孕酮受体表达水平有下降的趋势,但不同处理组随时间的变化差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

牛子宫内膜细胞主要包含了基质细胞和上皮细胞,研究证实孕酮受体主要在上皮细胞表达^[7]。本试验培养的子宫内膜组织块,培养的细胞中主要包括子宫内膜上皮细胞和基质细胞。在培养过程中,子宫内膜基质细胞逐渐成为成纤维细胞,成为优势细胞。

半定量 PCR 方法是指在同样的反应条件下,同步扩增来自同一 DNA 的一段靶序列和另一段内参序列。只要测定靶序列与内参照物的扩增产量,对其进行比较即可确定靶序列的量。半定量 PCR 方法只有在靶序列与内参照物序列有相似的扩增效率时,这种定量方法才比较准确。扩增效率的差异常发生在 PCR 的终末期,所以在指数扩增期对产物进行定量较好^[8]。指数期内,模板扩增倍数与扩增效率的对数呈线性关系,适合定量^[9-10]。在本试验中,

PR 和内参基因 β actin 的 PCR 反应的温度和模板量进行优化,并测试了循环数与 PCR 产物之间的关系,当循环数超过 37 时,PCR 产物增长超过指数期,因此选择循环数 35 作为反应条件,保证扩增过程在指数增长期。Pastire 报道,半定量 PCR 系统可以检测出基因拷贝数 1/3 的差异^[11]。

在体情况下,孕酮与雌激素的作用既相互拮抗又相互协同,两者共同调节雌性生殖活动^[12]。高浓度孕酮通过抑制 ER 的表达,从而降低雌激素的生理作用。在体条件下,雌激素能够促进 PR 的表达^[6]。所以在非妊娠在体条件下,P 分泌量的增加,通过抑制 ER 的表达,进一步会抑制 PR 的表达^[13],Robinson^[5],Kimmins^[4]在研究牛妊娠早期 PR 表达时发现,P 分泌量的增加并没有抑制子宫内膜上 PR 的表达。此外,孕酮发挥其作用是通过孕酮受体介导的,所以理论上孕酮受体的表达与孕酮呈负相关。

本试验在体外条件下培养牛子宫内膜细胞,添加不同浓度的孕酮处理细胞,然后通过 RT-PCR 反应半定量分析孕酮受体基因表达的情况。结果显示孕酮受体在未处理细胞中最高表达,随着孕酮浓度 (50、100、200、400 ng/mL) 的增加,PR 表达水平下降。1999 年,Xiao 等通过体外培养子宫内膜细胞研究表明:在子宫内膜基质细胞上,雌激素能刺激 ER、PR 表达增加;孕酮能抑制雌激素的作用,但对

ER、PR 的表达影响不显著,这与在体水平的激素作用模式存在矛盾。在子宫的内膜上皮细胞上,高孕酮、高雌激素和二者联合作用,以及低雌激素,对 ER、PR 的表达影响不显著。同时,基质细胞上 PR 的表达量远远高于上皮细胞中的表达量^[11]。在体的研究容易受动物生理状况的影响,难以控制的因素很多,Xiao 等^[11]把子宫内膜的细胞分别单独培养研究。在本试验中,孕酮对联合培养基质细胞和上皮细胞作用后,PR 表达水平与 Xiao 等^[11]结论存在差异,但能更好的解释激素在体作用模式。在细胞水平上,P 抑制 PR 表达的分子机制,还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] THOMAS E S, FULLER W B. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy [J]. *Frontiers in Bioscience* 2002,7(9):1 879-1 898.
- [2] CONNEELY O M, MULAC-JERICEVIC B, DEMAYO F, et al. Reproductive functions of progesterone receptors [J]. *Recent Prog Horm Res*, 2002, 57:339-355.
- [3] LI X T, O'MULLEY B W. Unfolding the action of progesterone receptors[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003,278(41):39 261-39 264.
- [4] KIMMINS S, MACLAREN L A. Oestrous cycles and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium [J]. *Placenta*, 2001,22(89):742-748.
- [5] ROBINSON R S, MANN G E, LAMMING G E, et al. The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow [J]. *Journal of Endocrinology*, 1999,160:21-23.
- [6] SPENCER T E, BAZER F W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy [J]. *Reproduction Biology and Endocrinology*, 2004,49(2): 1-15.
- [7] WILSON T, LIGGINS G G, JOE L. Purification and characterization of a uterine phospholipase inhibitor that loses activity after labor onset in women [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1989,160:602-606.
- [8] HAYWARD A L, OEFNER P J, SABATINI S, et al. Modeling and analysis of competitive PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(11): 2 511-2 518.
- [9] LUCIO P, MARIA G C, GIULIA F, et al. A quantitative polymerase chain reaction assay completely discriminates between Duchene and Becker muscular dystrophy deletion carriers and normal females[J]. *Mol Cell Probes*, 1996, 10:129.
- [10] LUBIN M B, TOYODA H, MIDDLETON M, et al. Precise gene dosage determination by polymerase chain reaction: theory, methodology, and statistical approach[J]. *Mol Cell Probes*, 1991,5:307.
- [11] XIAO W C, GOFF A K. Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells [J]. *J Reprod Fertil*, 1999, 115(1):101-109.
- [12] WATHES D C, HOMON M. Location of estradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of ewes [J]. *Journal of Endocrinology*, 1993,138:479-492.
- [13] LAMMING G E, MANN G E. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F₂-alpha production in cows by progesterone and oestradiol [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1995, 103:69-73.