

# 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 spermatiductus. 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( $\alpha$ )、Zeta( $\zeta$ )、Sigma( $\theta$ )、Kappa( $\kappa$ )、Mu( $\mu$ )、Omega( $\omega$ )、Pi( $\pi$ )、Theta( $\sigma$ )<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)的合成<sup>[3]</sup>。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<sup>[4-6]</sup>。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<sup>[7-9]</sup>,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<sup>[10]</sup>。

**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。

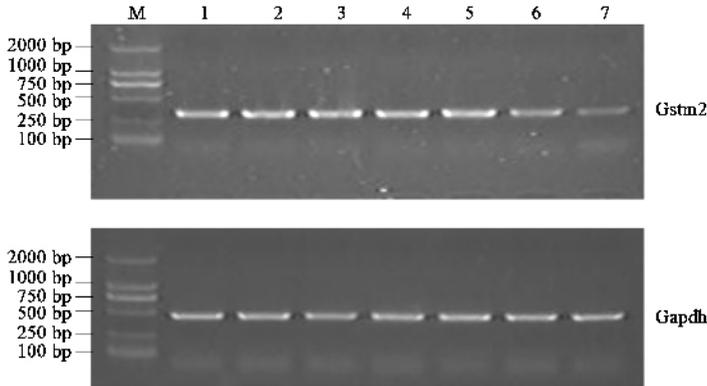


图 1 RT-PCR 检测 *Gstm2* 在雄性和雌性小鼠生殖器官中的表达

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<sup>[11]</sup>。

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<sup>[11]</sup>。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<sup>[12]</sup>。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<sup>[13]</sup>。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<sup>[14]</sup>。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<sup>[15,16]</sup>。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<sup>[17~20]</sup>。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<sup>[21]</sup>。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<sup>[22]</sup>。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<sup>[23]</sup>,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<sup>[24]</sup>。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 :

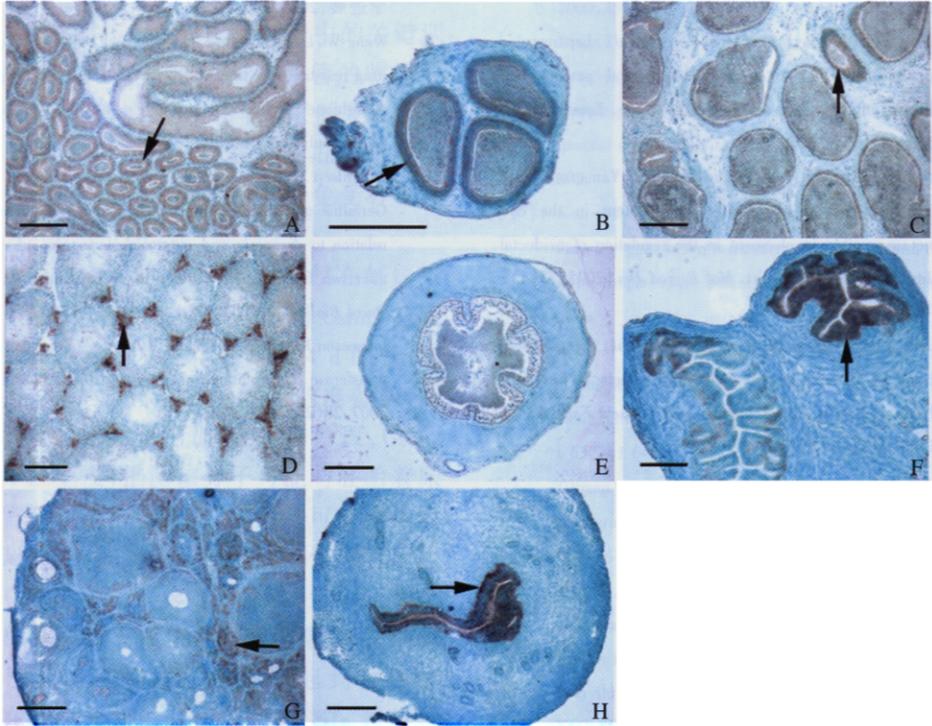
- new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. *Mol Hum Reprod* ,2006 ,**12** ( 10 ) :593 ~ 599.
- [ 16 ] Stouffer R L ,Xu F ,Duffy D M. Molecular control of ovulation and luteinization in the primate follicle. *Front Biosci* ,2007 , **12** :297 ~ 307.
- [ 17 ] Allen W R ,Wilsher 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  $\mu\text{m}$ .

*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  $\mu\text{m}$ .