

Ghrelin 在小白鼠体内早期胚胎发育中的表达

塔娜^① 米焱^① 李海军^① 白瑞霞^{①②} 曹贵方^{③*} 仝素琴^④

① 内蒙古农业大学兽医学院 呼和浩特 010018; ② 内蒙古医学院 呼和浩特 010059;

③ 内蒙古农业大学生物工程学院 呼和浩特 010018;

④ 内蒙古乌兰察布市察右中旗疾病预防控制中心 察右中旗 013550

摘要: 为了探讨 Ghrelin 是否在昆明系小白鼠(*Mus musculus*)体内早期胚胎发育中发挥作用。运用激素超排卵技术及动物解剖学方法获取小鼠体内不同发育阶段的早期胚胎,应用实时定量 PCR 技术检测了 Ghrelin mRNA 的相对表达量。结果表明,Ghrelin mRNA 在小鼠各期胚胎中均有表达;同时,Ghrelin mRNA 的表达量呈现一定规律性变化,2-细胞期表达量最低,8-细胞期表达量达到最高值,总体趋势是先降低后升高之后又降低。研究结果揭示,Ghrelin 可能在小鼠早期胚胎发育中发挥一定的作用。

关键词: Ghrelin; 体内成熟; 早期胚胎发育; 实时定量 PCR

中图分类号: Q492 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2011)04-136-06

Expression of Ghrelin during Mouse Preimplantation Embryo Development *in Vivo*

TA Na^① MI Yan^① LI Hai-Jun^① BAI Rui-Xia^{①②} CAO Gui-Fang^{③*} TONG Su-Qin^④

① College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018;

② Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059;

③ College of Biological Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018;

④ Inner Mongolia Wulanchabu City Ezer Right-Mid Centre for Disease Control, Ezer Right-Mid 013550, China

Abstract: To investigate whether Ghrelin plays a role in mouse preimplantation(*Mus musculus*) development, *in vivo* embryos at different stages were obtained, and the relative expression level of Ghrelin mRNA was detected with real-time quantitative PCR. The results indicated that Ghrelin mRNA was expressed in early embryos in various developmental stages. The expression was the lowest at 2-cell stage, while reached the highest in 8-cell embryos, and thereafter decreased again. These results suggest that Ghrelin may play essential roles in mouse preimplantation embryo development.

Key words: Ghrelin; *In vivo* maturation; Preimplantation embryo; Real-Time PCR

Ghrelin 是 1999 年 Kojima 等发现的第一个内源性生长激素促分泌剂 GHSs (growth hormone secretagogues) 受体的配体^[1],最初是从昆明大白鼠(*Rattus norvegicus albus*)的胃组织内分泌细胞中分离提取出来,是由 28 个氨基酸组成的一种多肽,其第 3 位丝氨酸上有酰化基团,该基团对于其生理活性很重要,具有调节 GH 分泌、摄食、能量代谢、内分泌、记忆、睡眠、

胃肠功能等多种生物学作用^[2]。因此 Ghrelin 的生理和病理意义成为目前研究的热点问题之

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30660128, No. 30860201);

* 通讯作者, E-mail: guifangcao@126.com;

第一作者介绍 塔娜,女,硕士研究生;研究方向:动物组织胚胎及发育生物学;E-mail: taneluck@126.com。

收稿日期:2010-11-15,修回日期:2011-03-14

一。近几年的研究显示, Ghrelin 也可能参与生殖功能的调节, 其在大鼠^[3] 和人 (*Homo sapiens*) 性腺中都有表达, 特别是在卵巢中, Ghrelin 被发现在具类固醇生成活性的黄体细胞和间质细胞中有表达, 在睾丸中的表达具有成熟间质细胞的特异性。李刚等^[4] 将 Ghrelin 添加到猪 (*Sus domestica*) 卵母细胞体外成熟液中, 对不同的基础培养基中添加 Ghrelin, 结果表明, 添加 Ghrelin 对卵母细胞成熟有一定的影响, 但是没有显著提高后期胚胎发育的能力。杜晨光等^[5] 应用免疫组织化学等方法检测出绵羊 (*Ovis aries*) 卵母细胞及早期胚胎发育中 Ghrelin mRNA 和蛋白是持续表达的。然而 Ghrelin 在小鼠 (*Mus musculus*) 早期胚胎发育过程中的表达及作用的研究尚少见报道^[1-6]。本实验目的是以小鼠为材料, 超排卵后通过动物解剖学技术获得受精卵和早期胚胎, 运用 RT-PCR、实时荧光定量 PCR 技术检测 Ghrelin mRNA 在不同发育阶段的小鼠体内胚胎中的表达和变化规律, 探讨早期胚胎发育阶段基因表达的瞬时-空间变化模式。以期为进一步解决 Ghrelin 是否参与小鼠体内受精卵、早期胚胎发育的调控和作用机理等问题提供实验

支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料 昆明小白鼠 (体重 22 ~ 24 g), 雌鼠 4 ~ 6 周龄, 雄鼠大于 6 周。购自内蒙古大学动物研究中心, 饲养 5 ~ 7 d, 调节生理周期, 使其适应实验环境。

1.2 方法

1.2.1 超排处理 挑选生长健康、性成熟的雌性昆明小白鼠 10 只, 于腹腔内注射 PMSG (孕马血清, 苏州市苏木动物药业有限公司) 5 U/只, 48 h 后再腹腔注射同等量 hCG (人绒毛膜促性腺激素, 苏州市苏木动物药业有限公司), 并与 10 只雄性小白鼠以 1:1 合笼^[6]。过夜, 次日早晨观察雌鼠阴道口, 有阴栓者确定为孕鼠。此时孕期为 0.5 d (E 0.5), 挑出孕鼠, 另笼饲养。并准确记录孕期。

1.2.2 胚胎细胞的采集 注射 hCG 后 16 ~ 20 h, 原核形成; 注射 hCG 后 30 ~ 34 h, 2-细胞形成; 注射 hCG 后 63 ~ 67 h, 8-细胞形成; 注射 hCG 后 67 ~ 85 h, 桑葚胚形成; 注射 hCG 后 87 ~ 89 h, 囊胚形成^[6]。各个细胞时期形态如图 1 所示。

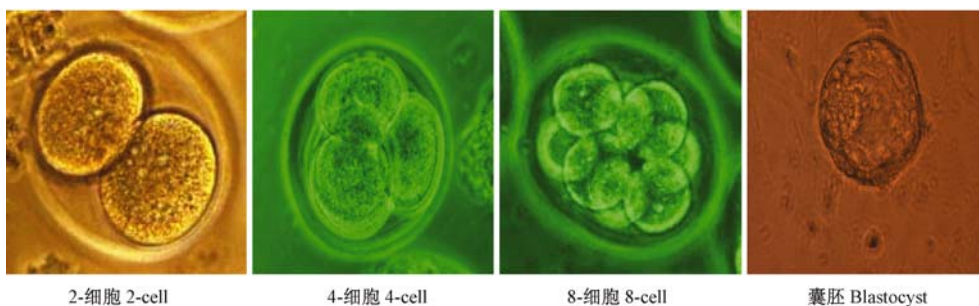


图 1 胚胎发育各个时期形态图

Fig. 1 Preimplantation embryos at different stages

采集胚胎的程序为: 将不同孕期的小鼠断颈处死, 75% 酒精喷洒体表消毒, 剖腹取出输卵管和子宫, 放入盛有 M2 缓冲液^[7] 的培养皿中 (M2 缓冲液用前需加入新生牛犊血清 BSA 4.0 g/L), 剃去多余组织, 反复冲洗。于解剖镜下, 刺破壶腹部管壁, 获得 1 ~ 8 细胞期胚

胎。对于桑葚胚或前期囊胚的收集, 采用 1 ml 注射器吸 0.5 ~ 0.7 ml 的冲胚液 M2, 左手持眼科镊夹住一侧子宫角, 右手持注射器刺入子宫角, 将冲胚液迅速推入子宫, 冲胚液从子宫颈流出为准, 双侧各冲一次^[8]。最后, 在显微镜下观察皿内冲胚液, 仔细寻找不同时期的胚胎细

胞,用口吸管将其全部转移至液滴内。用 M2 缓冲液清洗 3 次,挑选第二极体排出的单细胞受精卵或 2-细胞至前期囊胚的各发育阶段形态良好的胚胎 200 颗。用冻存管将收集到的卵母细胞及早期胚胎立即置于液氮中冻存,以备提取 RNA。

1.3 RNA 提取和反转录 采用 RNAfast 200 (上海飞捷 Fastagen) 微量 RNA 提取试剂盒,按其说明进行 RNA 提取直接获得模板 mRNA。

反转录前直接将 6.5 μl 的 RNA 加入到反转录体系中合成 cDNA,这样是为了防止获得的总 RNA 含量不够高,导致紫外分光光度计准确率不高。反应体系为 10 μl ,其中 PrimeScript RT Enzyme Mix 1 0.5 μl (TaKaRa DRR037S)、5 \times PrimeScript Buffer 2 μl 、Random 6 mers (引物) 0.5 μl 、Oligo dT Primer (引物) 0.5 μl ^[9]。于 PCR 仪 (Eppendorf AG 22331 Hamburg) 进行反转录,经筛选,最佳反应条件为:37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 实时定量 PCR 根据已发表的小鼠 Ghrelin mRNA 的引物序列^[10]和从 GenBank 检索到的小鼠 GAPDH 序列 (XM_001473 623.1),用 Primer Premier 5.0 软件根据跨内含子原则进行引物设计,以避免基因组污染干扰。设计引物序列如下:Ghrelin,目的片段 349 bp,上游引物 5'-TTG AGC CCA GAG CAC CAG AAA -3',下游引物 5'-AGT TGC AGA GGA GGC AGA AGC -3';GAPDH,目的片段 234 bp,上游引物 5'-CTG CCC AGA ACA TCA TCC CT -3',下游引物 5'-GGT CCT CAG TGT AGC CCA AG-3'。所有引物均由英潍捷基 Invitrogen (上海) 贸易有限公司合成。

采用 SYBRGreen I (TaKaRa) 荧光染料法进行实时定量 PCR 扩增的检测。PCR 反应体系为 20 μl ,其中 2 \times SYBR premix EX TaqTM 10 μl (TaKaRa DRR041A)、上下游引物各 0.4 μl (10 $\mu\text{mol/L}$)、cDNA 2 μl 、dH₂O 7.2 μl 。于实时定量 PCR 仪 (BIO-RAD IQ5 Multicolor real-time PCR detection system) 分别进行 Ghrelin 和 GAPDH 的 PCR 反应。扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变

性 1 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s,50 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。Ghrelin mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 进行计算^[11], $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Ghrelin}} - \text{CT}_{\text{GAPDH}}$ 。

1.5 PCR 扩增产物特异性的确定 PCR 产物经单一熔解曲线峰进行确定,并取 6 μl Real Time PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 10 min) 确定扩增产物片段大小后,送交上海生工生物公司进行序列测定。

1.6 统计分析 采用 SAS 软件进行单因子方差分析,共分析 5 组细胞期 (1-细胞、2-细胞、8-细胞、桑葚胚、囊胚),每个细胞期 2 个样品,每个样品重复 5 次。

2 结果

2.1 PCR 产物特异性的确定

2.1.1 实时定量 PCR 对产物的确定 PCR 检测 Ghrelin mRNA 在小鼠不同时期胚胎 (1-细胞、2-细胞、8-细胞、桑葚胚、囊胚) 中的表达。扩增曲线表明扩增效果良好,经熔解曲线分析,Ghrelin (图 2A) 和 GAPDH (图 2B) 分别在 86.0 $^{\circ}\text{C}$ 和 86.5 $^{\circ}\text{C}$ 出现单一产物峰,均与引物设计后预期产物 Tm 值相同。

2.1.2 凝胶电泳对产物的确定 经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果为清晰、无拖尾的条带,说明样品 RNA 的单一性和完整性。Ghrelin 和 GAPDH (图 3) 在各个时期胚胎内均出现与预期扩增片段大小吻合的片段。反应过程中以水代替 cDNA 为阴性对照的扩增没有出现阳性信号,验证反应体系没有被污染。产物经测序后与已发表的序列同源率为 99%,其中一个碱基的差异不影响翻译后多肽的序列。表明 PCR 产物分别为 Ghrelin 和 GAPDH 目的基因产物。

2.2 体内不同培养时间的胚胎细胞 Ghrelin mRNA 相对表达量 Ghrelin mRNA 的相对表达量是根据 Real Time PCR 结果,通过单因素方差分析得知 (图 4),8-细胞时期 Ghrelin mRNA 表达量最高,与其他各个细胞时期都具有极显著的差异。2-细胞时期 Ghrelin mRNA 表达量最低,与 1-细胞时期没有显著差异,但

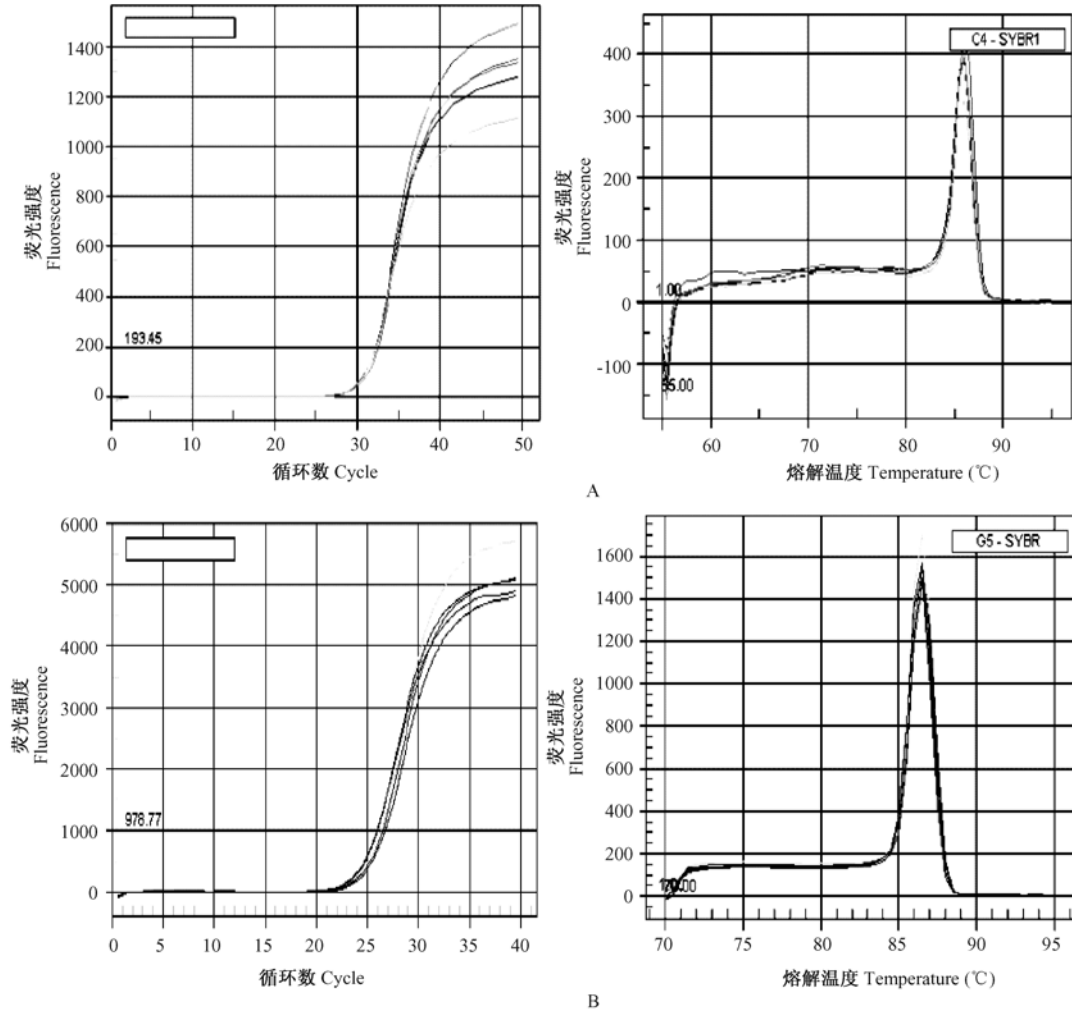


图 2 Ghrelin (A) 和 GAPDH (B) 的扩增曲线及熔解曲线

Fig.2 Amplification and melting curve analysis of Ghrelin (A) and GAPDH (B)

与其他细胞时期均有极显著差异。表达量呈现的整体趋势是先降低,在 8-细胞时期显著升高,之后从桑葚胚期开始逐渐下降。桑葚胚期与囊胚期有极显著性差异。

3 讨论

本实验利用多种技术对经超排、体内受精后获得的小鼠不同发育时期体内胚胎中可能存在的 Ghrelin mRNA 进行检测。结果表明,在小鼠体内早期胚胎发育中 Ghrelin mRNA 是持续表达的。这与杜晨光等^[5]对绵羊体内卵母细胞和早期胚胎的研究中观察到的处于不同发育阶段胚胎均有 Ghrelin mRNA 的表达是一致的。

但是与 Kawamura 等^[12]的研究发现不相符, Kawamura 发现 Ghrelin mRNA 和蛋白在小鼠桑葚胚以前不表达。本研究发现,虽然 Ghrelin mRNA 在小鼠体内 1-细胞和 2-细胞期胚胎中均有表达,但其表达量显著低于其他各期胚胎。这一结果为本研究与 Kawamura 等的结果^[12]的不一致提供了一种解释,即由于 1-细胞和 2-细胞期胚胎中 Ghrelin mRNA 的表达量极低,所以可能造成了实验结果的不一致。综上,本研究的发现可能预示着 Ghrelin 在小鼠胚胎早期发育过程中具有一定的作用,其具体的机制还须进一步探讨。

本研究利用实时定量 RT-PCR 技术证明了

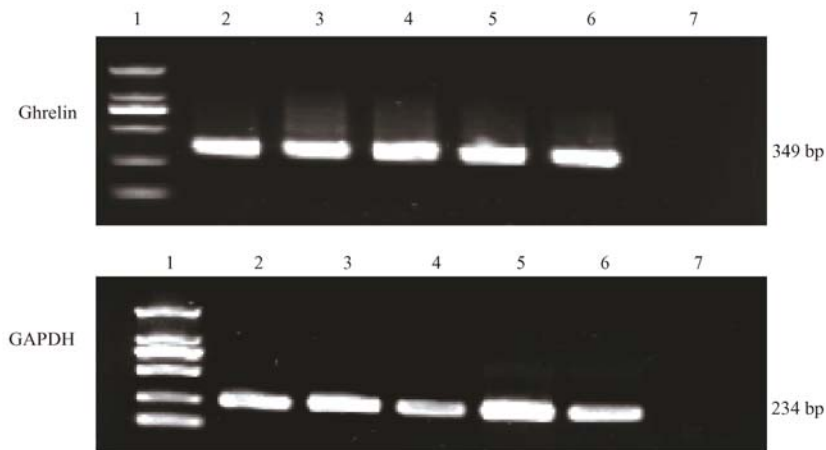


图3 电泳检测 Ghrelin 和 GAPDH 的 PCR 产物

Fig.3 Electrophoresis detection of ghrelin and GAPDH PCR products

1: DL2000 DNA 分子量标准; 2:1-细胞; 3:2-细胞; 4:8-细胞; 5:桑葚胚; 6:囊胚; 7:阴性对照。
 1: DL2000 DNA marker; 2: 1-cell; 3: 2-cell; 4:8-cell; 5: Morula; 6: Blastocyst; 7: Negative control.

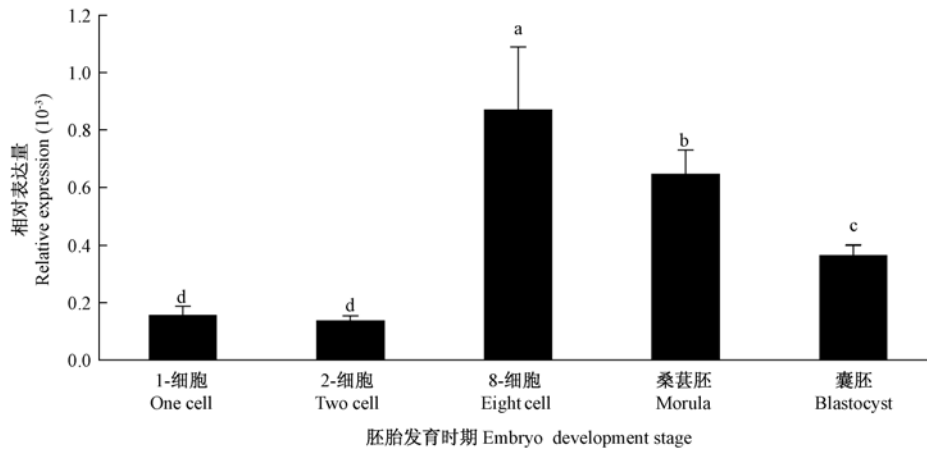


图4 小鼠各个时期早期胚胎 Ghrelin mRNA 相对表达量

Fig.4 Relative mRNA expression of Ghrelin at various developmental stages

a > b > c > d, F < 0.000 1, P < 0.01

Ghrelin mRNA 在小鼠体内胚胎发育过程中存在特定的时-空表达特征。小鼠早期胚胎发育阻滞时期发生在2-细胞期^[13-14],该时期也正处于卵子基因组向合子基因组激活转换的时期。2-细胞期表达量低于1-细胞期,两者间没有显著差异。这可能预示着在卵母细胞成熟或者受精过程中已经开始准备并积累一套为受精或者胚胎发育早期所需的母源型 mRNA^[15],说明 Ghrelin 可能在卵母细胞受精以及随后的发育过程中具有一定的作用,但是其具体的机制还

须进一步探讨。哺乳动物最早期的胚胎发育中受到母源 mRNA 和蛋白质的控制^[16],卵细胞在体内成熟过程中已经积累了大量的物质基础,随着卵裂母源的 mRNA 开始逐步降解和消失^[17],卵母细胞提供满足早期胚胎发育的物质需要。小鼠着床前胚胎的致密化从8细胞阶段开始发生,8-细胞期时合子基因组已被激活,所以8-细胞早期胚胎 Ghrelin mRNA 表达量显著增高并达到最大值,这与 Kawamura 等^[12]在对小鼠的研究中8-细胞以后的 Ghrelin mRNA 表

达模式相似,但其表达不是持续的,这种阶段性表达与其在妊娠早期过度的代谢消耗相协调。本研究也与绵羊^[16]、人^[18]的研究结果有一些矛盾, Ghrelin mRNA 在绵羊卵母细胞体外成熟过程中不仅持续表达,而且随着成熟时间的延长,卵母细胞 Ghrelin mRNA 相对表达量呈现先升高后降低再升高的波浪式趋势。这种不同表明了不同种间 Ghrelin mRNA 的表达模式是有差异的。

总而言之,本实验证实了在小鼠体内受精卵和早期胚胎发育过程中 Ghrelin mRNA 是持续表达的。其表达量随着早期胚胎在体内成熟呈现出先降低后升高再降低的表达模式,揭示 Ghrelin 可能参与早期胚胎的发育过程。这种模式上呈现出的动力学变化,揭示了这种新型分子在早期胚胎发育中潜在的作用,所得结果对于了解胚胎发育的机理具有一定意义,对进一步研究其在生殖系统的分泌规律及其作用机制奠定了实验基础。

参 考 文 献

- [1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999, 402(6762): 656 - 660.
- [2] Li Y, Wu X Y, Zhao Y, et al. Ghrelin acts on the dorsal vagal complex to stimulate pancreatic protein secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(6): G1350 - G1358.
- [3] Caminos J E, Tena-Sempere M, Gaytan F, et al. Expression of Ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology*, 2003, 144: 1594 - 1602.
- [4] 李刚. 猪卵母细胞体外成熟及核移植研究. 合肥:安徽农业大学硕士学位论文, 2009.
- [5] 杜晨光, 李海军, 杨燕燕, 等. Ghrelin 在绵羊体内卵母细胞和早期胚胎的表达. *动物学研究*, 2008, 29(2): 134 - 138.
- [6] 朱新产, 张涌, 王宝维. 早期小鼠胚胎发育的基因表达. *动物学报*, 2003, 49(2): 272 - 276.
- [7] 纳吉. 小鼠胚胎操作实验指南: Preparing M2 and M16 Media from Concentrated Stocks. 北京: 科学出版社, 2004: 183 - 185.
- [8] 徐立滨, 李光鹏. 小鼠胚胎收集及培养液的改进. *动物学杂志*, 1998, 33(1): 44 - 45.
- [9] 杜晨光, 曹贵方, 吕东媛, 等. 绵羊卵母细胞和卵丘细胞体外成熟过程中 ghrelin mRNA 的表达. *中国兽医学报*, 2008, 28(6): 729 - 731.
- [10] Zhang Z, Li Q, Liu F C, et al. Prevention of diet-induced obesity by safflower oil: insights at the levels of PPAR α , Orexin, and Ghrelin gene expression of adipocytes in mice. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2010, 42(3): 202 - 208.
- [11] Schmittgen T D, Zakrajsek B A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression; validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*, 2000, 46(1/2): 69 - 81.
- [12] Kawamura K, Sato N, Fukuda J, et al. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Endocrinology*, 2003, 144(6): 2623 - 2633.
- [13] Christine B, Ecrie N, Pascale D. Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryos. *Experimental Cell Research*, 1995, 218: 57 - 62.
- [14] 赵春丽, 焦丽红, 李雪梅, 等. 小鼠母源因子对早期胚胎发育的影响. *遗传*, 2006, 28(5): 601 - 605.
- [15] Crosby I M, Gandolfi F, Moor R M. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fert*, 1988, 82(2): 769 - 775.
- [16] Schultz R M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays*, 1993, 15(8): 531 - 538.
- [17] De S P, Watson A J, Schultz G A, et al. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. *Molecular Reproduction and Development*, 1998, 51(1): 112 - 121.
- [18] Gaytan F, Barreiro M L, Chopin L K, et al. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type Ia growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(2): 879 - 887.