

弓形虫 ROP16_{I/III} 蛋白对小鼠子宫基质细胞蜕膜化的影响

金郁, 计永胜, 姚湧, 汪学龙

摘要 目的 探讨弓形虫 ROP16_{I/III} 蛋白对妊娠小鼠子宫基质细胞蜕膜化的影响。方法 原代培养小鼠子宫基质细胞,用雌二醇、孕酮和 cAMP 体外诱导蜕膜化的同时加入 ROP16 重组慢病毒,72 h 后 qRT-PCR 检测蜕膜化标志物催乳素(PRL) mRNA 的表达,流式细胞术检测蜕膜细胞凋亡率的变化,并用 Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达水平。结果 提取的小鼠子宫基质细胞纯度为 95% 以上,在体外诱导蜕膜化后,PRL mRNA 的表达随时间延长而显著升高($P < 0.05$),在诱导的蜕膜细胞中过表达 ROP16_{I/III} 相比于对照组,蜕膜细胞的凋亡率降低($P < 0.01$),凋亡蛋白 Bax 表达降低,Bcl-2 蛋白表达上调。结论

弓形虫 ROP16_{I/III} 蛋白会抑制蜕膜细胞的凋亡,可能会影响蜕膜细胞增殖与凋亡的平衡,从而影响胚胎的植入。

关键词 弓形虫; ROP16 蛋白; 蜕膜化; 凋亡

中图分类号 R 382.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)10-1506-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.002

胚胎植入是一个复杂的过程,涉及到子宫与胚胎之间精确的相互作用。当胚胎附着在子宫内膜上后,在植入部位的基质细胞开始发生蜕膜化^[1]。子宫蜕膜化对胚胎的植入和妊娠的维持至关重要。如果产妇子宫不经过蜕膜化,胚胎就不会正常发育。小鼠子宫蜕膜细胞在胚胎植入后以有序的凋亡和增殖来适应其快速生长发育的需要,现已证明,蜕膜细胞的增殖与退化是一个涉及多种因素的细胞凋亡过程^[2-3]。在这个过程中,子宫内膜基质的增殖和凋亡需要严格遵循时空的发展。有研究^[4]显示,小鼠子宫基质细胞蜕膜化过程中的凋亡受到促进和抑制作用,都会导致蜕膜化的异常,导致着床位点的减少,引起着床的失败。

2019-06-03 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2016A353)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院人体寄生虫教研室,合肥 230032

作者简介: 金郁,男,硕士研究生;

姚湧,男,讲师,责任作者,E-mail: 2806900253@qq.com;

汪学龙,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wan-gx1964@163.com

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种属于真球虫目(*Eucoccidiorid*)、弓形虫科(*Toxoplasmatidae*)、弓形虫属(*Toxoplasma*)的专性细胞内寄生原虫,根据虫体对小鼠毒力的差异可以将弓形虫分为 3 型。弓形虫 ROP16 蛋白同样在不同虫株间存在多态性。I 型和 III 型虫株(如 RH、CTG) ROP16_{I/III} 蛋白可以通过直接和宿主细胞的 STAT3 结合,磷酸化 STAT 705 位的酪氨酸。目前有研究^[5]表明其对宿主细胞的凋亡具有抑制作用。同时,ROP16_{I/III} 会诱导人神经母细胞瘤发生凋亡^[6]。而 ROP16_{I/III} 对于蜕膜细胞的影响鲜有报道。该实验通过 ROP16_{I/III} 慢病毒感染原代小鼠蜕膜细胞,检测凋亡相关指标,探讨弓形虫 ROP16 蛋白对妊娠小鼠子宫基质细胞蜕膜化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与实验动物

1.1.1 主要试剂 DMEM/F12 培养基购自美国 HYCLONE 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 试剂盒、RIPA 裂解液、一抗稀释液、ECL Kit 化学发光试剂盒均购自南京碧云天生物技术公司; 胶原酶 II、NC 膜均购自美国 Sigma 公司; Western blot 所用一抗 anti-Bax、anti-Bcl-2、anti-Caspase3 均购自美国 Cell Signaling 公司; 二抗 HRP 羊抗兔、免疫荧光一抗 anti-Vimentin、二抗羊抗兔均购自武汉博士德公司; 流式细胞术凋亡试剂盒购自美国 BD 公司; E2、P4、cAMP 试剂购自美国阿拉丁公司。

1.1.2 实验动物 6~8 周龄清洁级昆明小鼠均为性成熟雌、雄鼠,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供。小鼠的饲养以安徽医科大学实验动物使用指南为标准,符合动物伦理相关准则。雌、雄鼠按 2:1 合笼,次晨发现阴栓者记为孕 D0。

1.2 小鼠子宫基质细胞的原代培养 取孕 D4 的雌鼠的子宫,剪净系膜和多余脂肪,放入培养皿,用 PBS 冲洗 2 次后,将子宫剪碎,过程中可适当加入少量胰酶继续剪,最终以约 1 只 0.7 ml 的体积加入胰酶。将加好酶液的培养皿在 4℃ 放置 1 h,再室温 1 h,然后用含 10% FBS 的培养液终止消化,转入 15

ml 离心管 500 r/min 离心 5 min。然后用 PBS 洗涤沉淀 1 次 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 然后加入配好的 0.5% 胶原酶 IV, 混匀, 放入恒温摇床 37 °C 消化 30 min。然后终止消化, 将组织液依次通过 200 目和 400 目的灭菌过滤网, 收集滤液到 50 ml 的离心管, 1 500 r/min 离心 5 min 后用 PBS 洗涤沉淀, 后 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加入含 FBS 的 DMEM/F12 培养基, 重悬沉淀, 计数后以 1×10^5 个/ml 接种于 6 孔板。将细胞在培养箱培养 2 h, 等基质细胞贴壁后换液去除杂细胞。

1.3 小鼠子宫基质细胞纯度鉴定 将上述步骤取得的原代子宫基质细胞做细胞爬片, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min 后用 PBS 洗 3 次, 用 5% BSA 封闭 37 °C 1 h, 接着加入 Vimentin 抗体 (1 : 100) 4 °C 孵育过夜, PBS 洗 3 次。然后加荧光二抗 (FITC 标记二抗 1 : 50), 室温避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次。最后加入 DAPI 染核 (1 : 25), 室温 15 min, PBS 洗 3 次, 加入荧光猝灭剂后封片。在荧光显微镜下观察细胞荧光信号。

1.4 ROP16_{I/III} 慢病毒感染小鼠子宫基质细胞并体外诱导蜕膜化 培养小鼠原代子宫基质细胞 24 h 后, 用 ROP16_{I/III} 慢病毒进行细胞感染, 实验分为空白对照组、空载慢病毒组和 ROP16_{I/III} 慢病毒转染组。慢病毒转染 24 h 后在培养基中加入 1 μmol/L 孕激素 (P4)、10 nmol/L 雌二醇 (E2)、0.5 mmol/L 环磷酸腺苷 (cAMP) 进行蜕膜化诱导, 镜下观察细胞形态变化。并接着培养 48 h, 分别收集 0、24、48 h 的蜕膜细胞, 提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 实时荧光定量 PCR 荧光染料法, 以 β-actin 为内参, 以比较 Ct 值法进行相对定量, 观察催乳素 (prolactin, PRL) mRNA 表达水平。PRL 基因上游引物为 5'-CTCCTCCTGTTGCTGA-3', 下游引物为 5'-CAGTCCG

GTCTTCCC-3' 扩增长度为 362 bp。内参基因 β-actin 上游引物为 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3', 下游引物为 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3', 扩增长度为 228 bp。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 小鼠子宫基质细胞在转染 ROP16_{I/III} 慢病毒并体外诱导蜕膜化 72 h 后, 收集各组细胞, 用胰酶消化下来后, 用 PBS 和缓冲液依次洗涤后按凋亡试剂盒说明书染色, 用流式细胞仪检测各组凋亡率。

1.6 Western blot 法检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平 收集细胞总蛋白, 用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白 (20 μg/孔) 转至 PVDF 膜, 按顺序孵育抗体 (一抗浓度均为 1 : 1 000, 二抗浓度为 1 : 5 000) 显色。

1.7 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析 (ANOVA), 两组之间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞纯度鉴定 采用免疫荧光方法检测小鼠子宫基质细胞波形蛋白的表达, 鉴定其纯度, 荧光显微镜下观察, Vimentin 蛋白主要集中于胞质, 产生绿色荧光, 用 DAPI 染核, 产生蓝紫色荧光。显微镜视野下随机选取 5 个不同区域, 计数波形蛋白阳性细胞数与细胞总数之比, 结果显示, 提取的原代基质细胞纯度为 $(95 \pm 2.5) \%$ 。见图 1。

2.2 成功诱导细胞蜕膜化 在培养基中加入 E2、P4 和 cAMP 培养原代基质细胞, 小鼠子宫基质细胞人工诱导蜕膜化后, 分别在 0、24、48 h 测定 PRL mRNA 表达水平, 结果显示, 随着体外诱导蜕膜化时间的延长, PRL mRNA 的表达会逐渐增加 ($P < 0.05$), 说明体外诱导蜕膜化成功。见图 2。

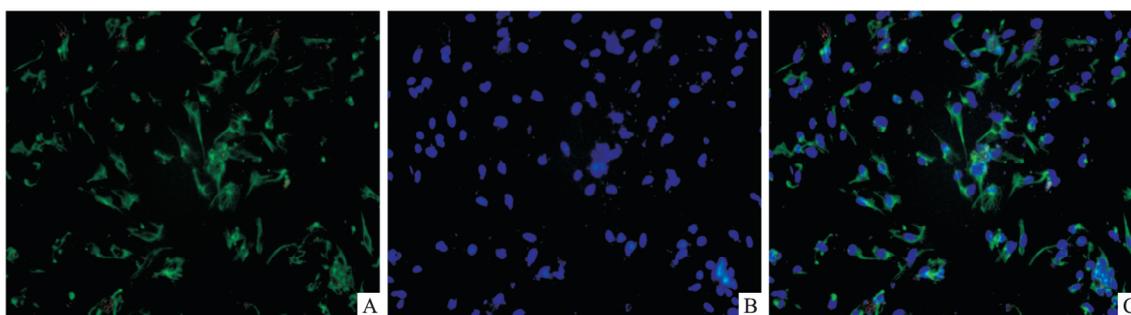


图 1 小鼠子宫内膜基质细胞的鉴定 ×200

A: 荧光显微镜下观察间质细胞标志物 Vimentin 蛋白; B: 荧光显微镜下观察 DAPI 染色的细胞核; C: 合并观察计数波形蛋白阳性细胞数与细胞总数

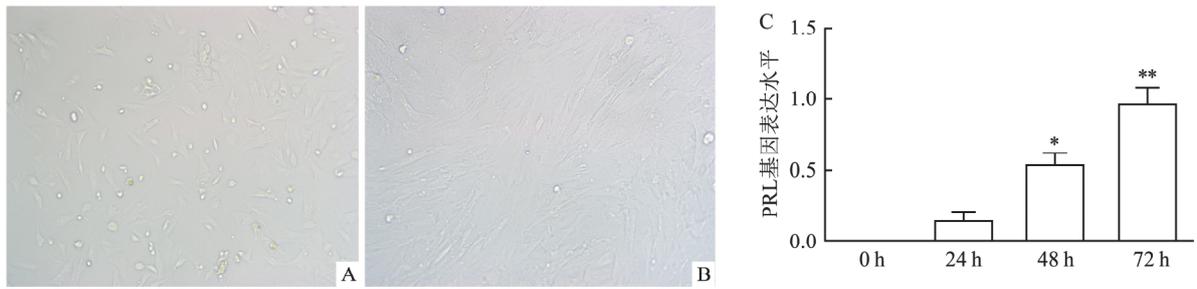


图2 小鼠子宫基质细胞体外诱导蜕膜化 ×200

A: 明场下观察小鼠子宫基质细胞; B: 经过体外诱导蜕膜化后, 明场下观察蜕膜细胞; C: 小鼠子宫基质细胞体外诱导蜕膜化 qRT-PCR 测定 PRL mRNA 表达; 与 24 h 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

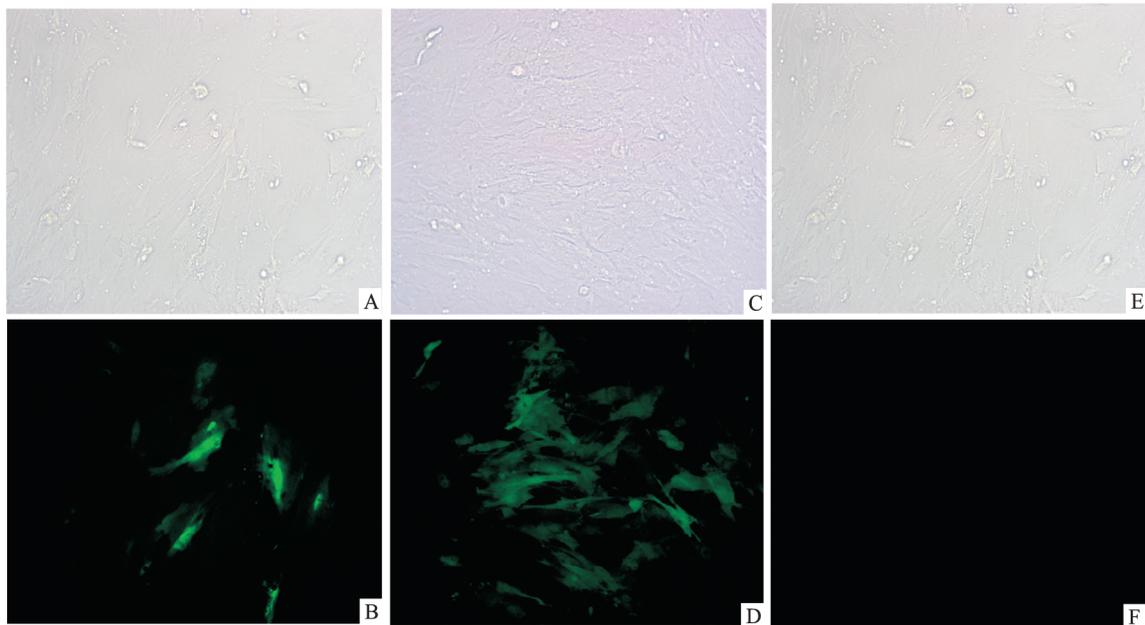


图3 ROP16_{I/III} 重组慢病毒感染小鼠子宫基质细胞 ×200

A: 明场下转染 ROP16_{I/III} 过表达重组慢病毒的蜕膜基质细胞; B: 荧光显微镜下转染 ROP16_{I/III} 过表达重组慢病毒的蜕膜基质细胞; C: 明场下转染空载病毒的蜕膜基质细胞; D: 荧光显微镜下空载病毒转染的蜕膜基质细胞; E: 明场下的蜕膜基质细胞; F: 荧光显微镜下的蜕膜基质细胞

2.3 慢病毒成功转染蜕膜细胞 培养的原代小鼠子宫基质细胞分别感染 ROP16_{I/III} 基因过表达和空载 LV 慢病毒并体外诱导蜕膜化培养 72 h 后, 显微镜下观察转染情况。见图 3。

2.4 ROP16_{I/III} 对蜕膜细胞凋亡的影响 流式细胞术结果显示: ROP16_{I/III} 过表达组的蜕膜细胞凋亡率相较于空载组 ($F = 111.4, P < 0.01$) 和对照组 ($F = 49.1, P < 0.01$) 降低。见图 4。

2.5 Bax、Bcl-2 蛋白表达 Western blot 法检测 Bax、Bcl-2 蛋白的表达水平后显示: 各组细胞在培养 72 h 后, 对照组和空载组的 Bax、bcl-2 蛋白表达没有明显差异, 而 ROP16_{I/III} 转染组 Bax 表达较对照

组和空载组降低, Bcl-2 表达较对照组和空载组则呈升高趋势, 因此 ROP16_{I/III} 转染组 Bax/Bcl-2 的值小于对照组 ($F = 75.22, P < 0.05$) 和空载组 ($F = 51.13, P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

胚泡和子宫是结构成分不同的两种组织, 植入是胚胎与子宫建立生理联系的过程, 是胚泡和子宫相互识别、黏附、容纳的过程, 所以植入是妊娠过程中的一个关键环节, 称为“植入窗口期”。植入过程中, 子宫内膜和胚泡的滋养层都会发生一系列复杂的变化: 植入位点的子宫内膜基质细胞首先会发生

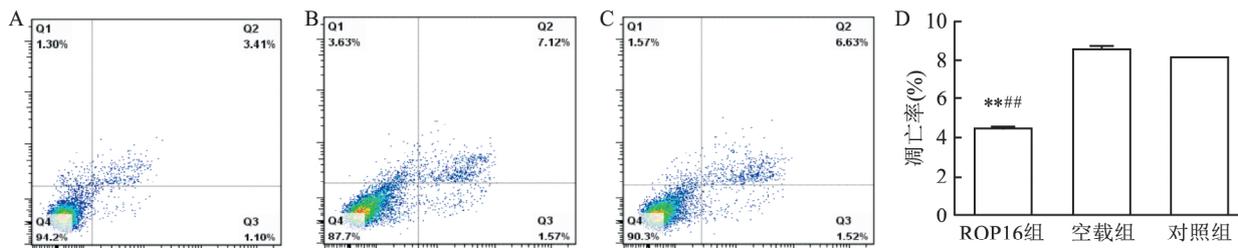


图4 各组基质细胞感染不同 ROP16_{I/III} 慢病毒的凋亡率

A: ROP16_{I/III} 慢病毒转染组; B: 阴性对照病毒组; C: 对照组; D: 各组凋亡率; 与空载组比较: ** $P < 0.01$; 与对照组比较: ## $P < 0.01$

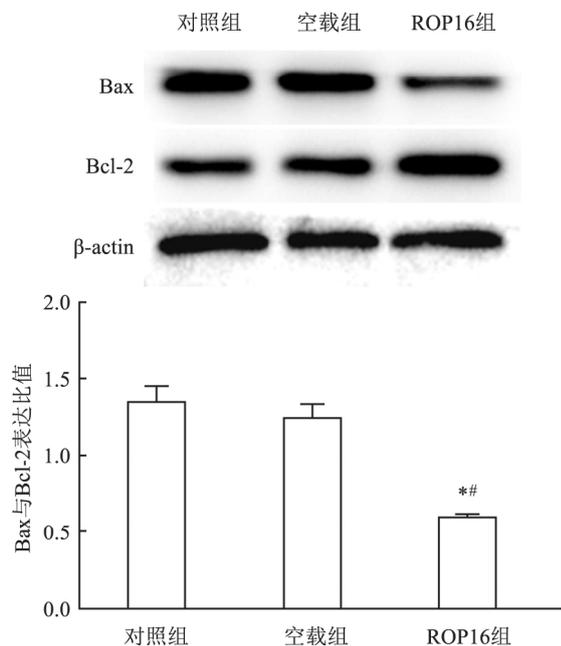


图5 Western blot 法检测 Bax 和 Bcl-2 表达

与空载组比较: * $P < 0.05$; 与对照组比较: # $P < 0.05$

剧烈的增殖和分化,这种变化会逐渐延伸到整个子宫内膜。这些变化统称为子宫蜕膜化。

子宫内膜进行蜕膜化的过程中,首先与子宫内膜基质细胞的正常增殖密切相关^[7]。当胚泡附着在子宫内膜上皮时,在附着位置周围的内膜上皮细胞会发生凋亡,而邻近的基质细胞则会进行广泛的增殖,增殖的基质细胞获得多倍性而分化成特殊的细胞类型,此时基质细胞会向着床位点周围扩展,逐步形成成熟的蜕膜细胞,然后随着胚泡的植入,又会按照相同的趋势持续退化和凋亡^[8],并被周围的滋养层或巨噬细胞吞噬^[9]。因为有了蜕膜化过程中细胞有序的增殖和退化,使胚泡周围的蜕膜细胞的数量得以控制,所以控制了滋养细胞的侵袭。在此过程中,小鼠子宫内膜基质细胞经历了形态学和分子水平的独特变化^[10]。蜕膜化过程中,着床位点的蜕膜细胞停止增殖,终末分化后形成的区域称之为

初级蜕膜区,第2次分化形成的区域称之为次级蜕膜区,最后次级蜕膜区的细胞也会发生凋亡,使着床位点的腔隙增大以便容纳生长的胚胎^[11]。

在本实验中,在孕鼠胚胎着床的时间段成功分离培养了子宫内膜基质细胞,在体外培养的小鼠子宫基质细胞中过表达 ROP16_{I/III} 蛋白,并体外诱导蜕膜化时,结果显示 ROP16_{I/III} 蛋白上调了蜕膜细胞 Bcl-2 的表达并降低了 Bax 表达,抑制了蜕膜细胞的凋亡,提示可能导致初级蜕膜区的蜕膜细胞不能按照正常程序退化消失,同时段发育的胚胎不能获得足够相应的发展空间,同时,初级蜕膜区退化的受阻也会导致次级蜕膜区的发展受阻,也会导致接下来胚胎发展空间的受限,最终导致母胎界面的对话受到干扰,从而导致植入位点的数量减少,引起胚胎着床的不良结局。

ROP16_{I/III} 蛋白作为弓形虫重要毒力因子,具有丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸激酶活性,参与宿主细胞内信号转活化因子(STATs)相关的磷酸化^[12]。由于 ROP16_{I/III} 能磷酸化 STAT3,两者作用后会从胞质中转移至细胞核引起下游转录因子改变,结果就会干预宿主细胞内信号通路传导^[13-14]。磷酸化的 STAT3 进入细胞核内,直接与 DNA 结合,诱导抗凋亡蛋白(Bcl-xL、Mcl-1、survivin)的表达,所以 STAT3 通路的活化在多种细胞都有抗凋亡的作用^[15]。ROP16_{I/III} 蛋白可以通过磷酸化 STAT3,介导细胞的凋亡变化。ROP16_{I/III} 蛋白在蜕膜细胞蜕膜化过程中抑制了细胞的凋亡,其中与细胞其他促凋亡因子之间的相互作用机制及信号通路和体内实验对于不良妊娠的验证是本研究下一步的研究方向和内容。

参考文献

[1] Lee K Y, DeMayo F J. Animal models of implantation[J]. Reproduction, 2004, 128(6): 679-95.
 [2] Joswig A, Gabriel H D, Kibschull M, et al. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for

- two different pathways [J]. *Reprod Biol Endocrinol* ,2003 ,1(1) : 44 – 52.
- [3] Selam B ,Kayisli U A ,Mulayim N , et al. Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium [J]. *Biol Reprod* 2001 65(4) :979 – 85.
- [4] 杨根岭 ,罗文萍 ,刘真真 等. MK 基因对小鼠子宫基质细胞蜕膜化进程的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展杂志* 2011 38(8) :730 – 6.
- [5] 刘 原. 弓形虫 ROP16 的表达及其调控宿主细胞凋亡的研究 [D]. 镇江: 江苏大学 2016.
- [6] Chang S ,Shan X ,Fan W , et al. *Toxoplasma gondii* rhoptry protein rop16 mediates partially SH-SY5Y cells apoptosis and cell cycle arrest by directing ser15/37 phosphorylation of p53 [J]. *Int Biol Sci* 2015 11(10) :1215 – 25.
- [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 – 47.
- [8] Abrahams V M ,Kim Y M ,Straszewski S L , et al. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy [J]. *Am J Reprod Immunol* ,2004 ,51 (4) :275 – 82.
- [9] Dey S K ,Lim H ,Das S K , et al. Molecular cues to implantation [J]. *Endocr Rev* 2004 25(3) :341 – 73.
- [10] Tan J ,Raja S ,Davis M K , et al. Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization polyploidy during implantation [J]. *Mec Dev* 2002 111(1–2) :99 – 113.
- [11] Lee S Y ,Lee Y Y ,Choi J S , et al. Phosphatidic acid induces decidualization by stimulating Akt-PP2A binding in human endometrial stromal cells [J]. *FEBS J* 2016 283(22) :4163 – 75.
- [12] Bradley P J ,Sibley L D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors [J]. *Curr Opin Microbiol* 2007 10(6) :582 – 7.
- [13] Hakansson S ,Charron A J ,Sibley L D. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous-vacuole [J]. *Embo J* 2001 20(12) :3132 – 44.
- [14] Yamamoto M ,Standley D M ,Takashima S , et al. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3 [J]. *J Exp Med* , 2009 ,206(12) :2747 – 60.
- [15] Darnell J E Jr. Joys and surprises of a career studying eukaryotic gene expression [J]. *J Biol Chem* 2013 288(18) :12957 – 66.

Effect of *Toxoplasma gondii* ROP16_{I/III} protein on decidualization of mouse uterine stromal cells

Jin Yu , Ji Yongsheng , Yao Yong , et al

(Dept of Parasitology , School of Basic Medical Sciences , Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract *Objective* To investigate the effect of *Toxoplasma gondii* ROP16_{I/III} protein on the decidualization of uterine stromal cells in pregnant mice. *Methods* Cultured primary mouse uterine stromal cells with estradiol and progesterone to induce decidualization *in vitro* , then infected with lentivirus. The expression of prolactin (PRL) mRNA was detected by qRT-PCR after 72 hours , and the apoptosis rate of decidual cells was detected by flow cytometry , Western blot was used to detect the expression of apoptosis-related protein Bcl-2 and Bax. *Results* The extracted mouse uterine stromal cells had a purity of over 95% . After induced decidualization *in vitro* , the expression of PRL mRNA increased significantly with time ($P < 0.05$) . Overexpression of ROP16_{I/III} was induced in the induced decidual cells. Compared with the control group , the apoptosis rate of decidual cells was decreased ($P < 0.05$) , the expression of apoptosis protein Bax was significantly decreased , and the expression of Bcl-2 protein was up-regulated. *Conclusion* *Toxoplasma gondii* ROP16_{I/III} protein inhibits apoptosis of decidual cells. It can affect the balance of proliferation and apoptosis of decidual cells and affect the implantation of embryos.

Key words *Toxoplasma gondii*; rhoptry protein 16; decidualization; apoptosis