**广东药学院**

**硕士研究生学位论文**

|  |  |
| --- | --- |
| 题目： | p110δ在胎盘形成中的表达  功能作用的初步研究 |

姓 名： 胡曦文

学 号： 2111243017

院 系： 基础学院

学位类别： 学术学位

专 业： 病理学与病理生理学

导师姓名

及 职 称： 王丽京 （教授）

二○一五 年 四 月

**分类号： UDC：**

**密级: \_\_\_\_**  **\_**

p110δ在胎盘形成中的表达和功能作用的初步研究

The initiatory study of the expression and functional role of p110δ in murine placentation

姓 名： 胡曦文

学 号： 2111243017

院 系： 基础学院

专 业： 病理学与病理生理学

研究方向： 肿瘤分子病理学

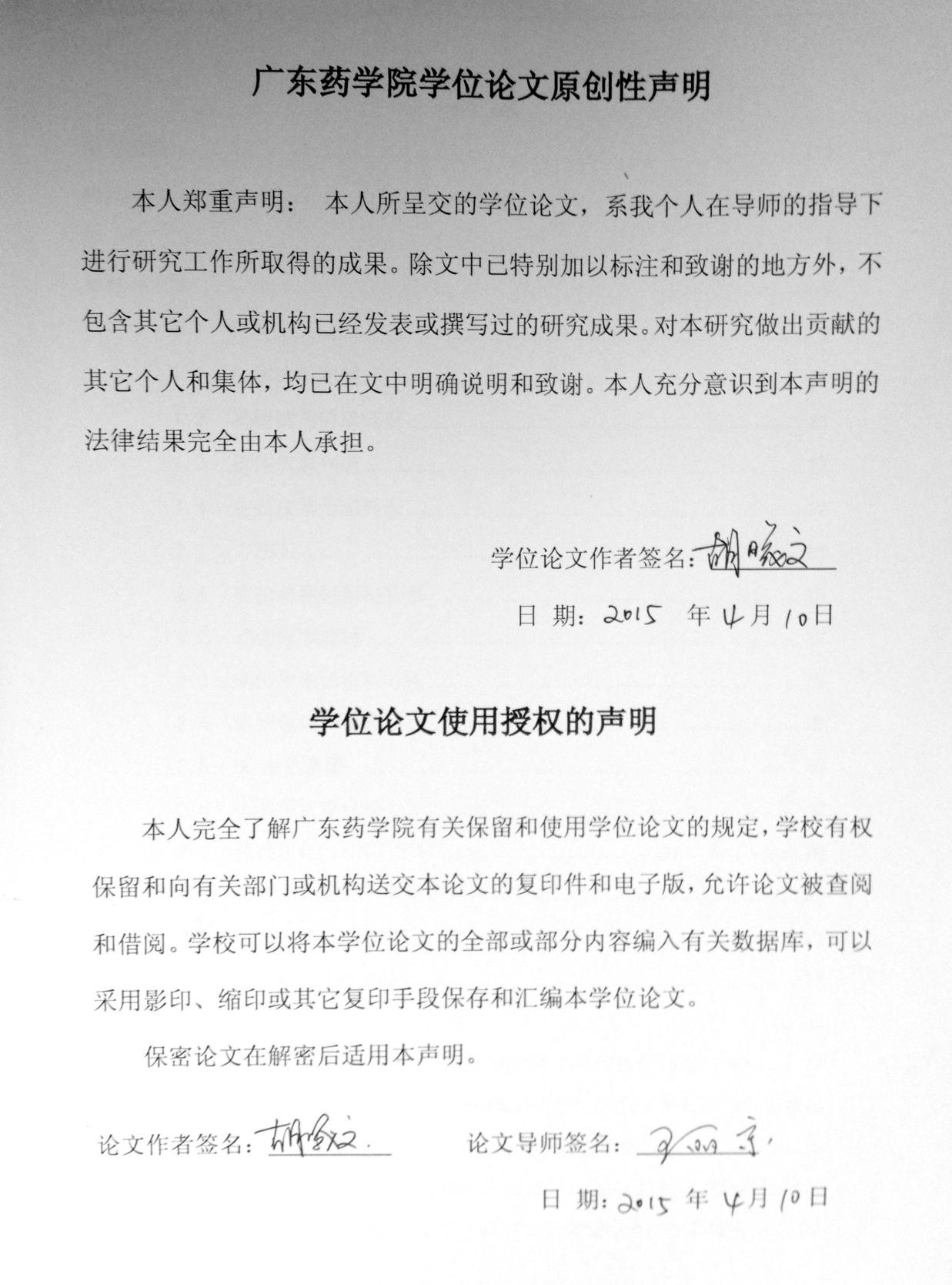
导师姓名： 王丽京 （教授）

论文提交日期： 2015 年 3 月

论文答辩日期： 2015 年 4 月

学位授予单位： 广东药学院

二○一五 年 四 月



目 录

[中文摘要](#_Toc686971068) 4

[结论：](#_Toc686971069) 4

[Abstract](#_Toc686971070) 4

[序言](#_Toc686971071) 5

[课题的研究思路](#_Toc686971072) 6

[材料与方法](#_Toc686971073) 6

[1. 材料](#_Toc686971074) 6

[1.1 常规试剂配制：](#_Toc686971075) 6

[1.2 其他试剂信息列表](#_Toc686971076) 7

[1.3 抗体信息列表](#_Toc686971077) 8

[1.4 主要仪器信息列表](#_Toc686971078) 9

[2. 方法](#_Toc686971079) 10

[2.1 实验动物饲养与管理](#_Toc686971080) 11

[2.1.1 基因工程小鼠的饲养与管理](#_Toc686971081) 11

[2.1.2 小鼠的保种和繁育](#_Toc686971082) 11

[2.1.3 基因工程小鼠的鉴定](#_Toc686971083) 11

[2.1.3.1 小鼠DNA的提取](#_Toc686971084) 11

[2.1.3.2 PCR法鉴定阳性小鼠](#_Toc686971085) 11

[2.2 动物标本取材](#_Toc686971086) 12

[2.2.1 蜕膜、胎盘及胚胎的取材](#_Toc686971087) 12

[2.2.2 胚胎肾脏的取材方法](#_Toc686971088) 13

[2.2.3 小鼠脑椎体的取材方法](#_Toc686971089) 13

[2.3 动情周期的检测方法](#_Toc686971090) 13

[2.4 组织包埋与切片](#_Toc686971091) 13

[2.5 HE染色步骤](#_Toc686971092) 13

[2.6 天狼星红染色法](#_Toc686971093) 13

[2.7 免疫组化（IHC）步骤](#_Toc686971094) 13

[2.8 免疫荧光步骤（石蜡切片）](#_Toc686971095) 14

[2.9 总RNA抽提与PCR](#_Toc686971096) 14

[2.9.1 总RNA抽提](#_Toc686971097) 14

[2.9.2 反转录PCR](#_Toc686971098) 14

[2.9.3 半定量PCR检测](#_Toc686971099) 14

[2.10 EPC体外培养步骤](#_Toc686971100) 16

[实验结果](#_Toc686971101) 17

[4. PI3K-p110δ突变失活对雌性C57BL/6J小鼠的Th殖系统的影响](#_Toc686971102) 17

[5. PI3K-p110δ突变失活对胚胎Th长发育过程中产Th的影响](#_Toc686971103) 18

[6. PI3K-p110δ特异性地表达于蜕膜时期的滋养层巨细胞](#_Toc686971104) 19

[7. PI3K-p110δ突变失活影响胚胎发育的细胞增殖和分化](#_Toc686971105) 19

[8. PI3K-p110δ突变失活影响胚胎发育过程中MMPs的表达](#_Toc686971106) 19

[小 结](#_Toc686971107) 20

[结](#_Toc686971108)[论](#_Toc686971108) 20

[展望：](#_Toc686971109) 20

[讨论](#_Toc686971110) 20

[参考文献](#_Toc686971111) 21

[攻读学位期间发表的论文及其他科研成果](#_Toc686971112) 24

[材料和方法](#_Toc686971113) 25

[结果](#_Toc686971114) 25

[讨论](#_Toc686971115) 25

[附录 英文缩略词汇](#_Toc686971116) 26

**p110δ在胎盘形成中的表达和功能作用的初步研究**

胡曦文（病理学与病理生理学）导师：王丽京（教授）

# 中文摘要

**背景和目的**：

生命繁衍是人类社会持续发展的基础。但是随着人类文明的不断发展，由于工作压力、环境污染等来自各方各面的外部因素导致世界范围内不孕不育人口显著增加，人类的繁衍能力已亮起了警报灯。生殖健康问题日渐引起人们的高度紧张与重视。不孕不育的发生病例中有近一半为病因不明的重复性流产，生殖免疫学观点认为这与免疫因素有关。磷脂酰肌醇3-激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶信号通路是具有酶活性的细胞内信号转导通路，可从增殖、凋亡、分化、炎性反应、免疫等多方面影响机体功能。磷脂酰肌醇3-激酶共有四个p110催化亚基：α，β，δ，γ，其中p110α或p110β

的缺失将导致胚胎致死，原因与胚胎血管生成相关。p110δ 主要高表达于白细胞表面， 这对研究其在生殖免疫过程中的作用十分有利。本课题预探索 p110δ 与在生殖中发挥的作用。

**方法和结果：**

首先利用p110δ突变失活小鼠模型（p110δD910A/D910A）进行配种繁殖，观察小鼠生殖发育情况，发现小鼠存在产崽数减少情况，且这种生育异常现象主要与雌性小鼠的p110δ基因型相关。进一步地取材观察后发现，p110δ突变失活引发的产崽数减少主要是因为胚胎妊娠中期，即胎盘生成后的胚胎流产所造成。随后，通过对生殖系统相关器官的组织学观察及病理技术染色发现，p110δ突变失活对蜕膜组织、胎膜及胎盘的血管系统构成具有一定影响，主要表现为组织中血管稀疏、不连续，血管网络形成受限；此外，p110δ特异性地高表达于蜕膜时期的壁滋养层巨细胞（包括初级和次

级的），缺失p110δ及其下游通路的激活，干扰了正常的滋养层细胞的功能活化，包括增殖、分化及与侵润能力相关的MMPs的分泌情况。最后，通过PCR技术就上述实验结果，对血管生成和滋养层细胞功能相关的基因的核酸转录水平进行了进一步的验证。

结论：

p110δ突变失活导致妊娠期的血管生成系统及滋养层细胞功能异常，进而促使胎儿于妊娠中期，即胎盘生成时期，流产死亡。

**关键词：**p110δ； 滋养层巨细胞； 胎盘； 流产

The initiatory study of the expression and functional role of p110δ in murine placentation

Xiwen Hu (pathology and pathophysiology) Supervisor: Lijing Wang (Pro.)

Abstract

**Background and experiment purpose:** The reproduction of life is foundation of th e sustainable development of human society. But with the continuous development o f human civilization, worldwidely speaking, infertility rate increased significantly, be cause the various external factors such as work stress and environmental pollution.

Human reproductive capacity has lit the Warning lights. Reproductive health has aro used people's higher tension and emphasis. As far as the infertility, nearly half of it is unexplained recurrent spontaneous abortion, which is regarded to be correlated w ith immune factors and hereditary factors by fertility experts. Phosphatidylinositol 3- kinase/ Serine threonine protein kinase (PI3K/Akt) is a vital intracellular signal trans duction pathway that has enzyme activity, which can regulate cell proliferation, apop tosis, differentiation, inflammatory reaction and immune response. PI3K has four cat alytic subunits: p110α, p110β, p110δ and p110γ. There were reports that p110 alpha or beta deficiency lead to embryonic lethal due to defective neovascularization. In t his study, we found that mice with mutant p110δ showed drastically reduced fertilit y number, and further study showed that the fetal losing mainly occurred in mid-ge station, when placentation happened. This experiment intends to explore the expressi on location and functional role of p110δ in reproductive system preliminarily, especi ally in placentation.

**Methods and results:** Firstly, to breed the mutant p110δmodel mice (p110δD910A/D910A) and record the mice reproductive capacity. We found that p110δD910A/D910A mice litter less than the normal, and this abnormal phenomenon is mainly associated with the female.

Based on further observation, we found that the reduction of birth number is actually the results of abortion after placentation. After the histological observation and pathological detection to the relevant reproductive organs, we detected negative influence on vascular system in decidua, embryolemma and the placenta when p110δis mutant, such as intermittent blood vessel and sparse vascular net. In addition, p110δspecifically and highly expresses in the parietal trophoblast giant cell during decidual period. Once the pregnant mice lacked the activation of p110δand its downstream pathway, the trophoblast ce**l** s' normal function would be interfered, including cell proliferation, differentiation and invasion related secretion of MMPs. Finally, the above experimental results, which are related to angiogenesis and trophoblastic cells function, were further verified through detecting the relative gene expression level by PCR technology.

**Conclusion:** p110δmutation caused abnormal angiogenesis/vascular remodeling and the functions of trophoblast cells during gestation period, which will promote fetal abortion in the middle of gestation, placentation period, subsequently.

**Keywords:** p110δ; Trophoblast; Giant; Cell; Placenta; Abortion

序言

自人类文明迈进21世纪以来，科技便以空前的速度带领人类走向数字信息化的新时代。但在文明高度发展，生活水平和物质享受大幅度提高的同时，人类在可持续发展方面也迎来了新的挑战：资源不足，环境恶化，以及面对日益剧增的生活压力而迫使人类大幅度出现的健康问题。

2010年，英国生理学家罗伯特・爱德华兹由于在试管婴儿研究方面作出突出贡献而获得该年诺贝尔生理学与医学奖。这一消息，引起人们对于不孕不育人群及由此带来的诸多问题的关注。

随着全球“人口爆炸”问题的产生，自上个世纪50年代开始，人类社会对改善生殖健康的努力便已开展。随着西方女权运动的发展，20世纪80年代，当与妊娠和分娩有关的疾病和死亡越来越受到人们的重视，人类社会开始倡导“母亲安全”行动，生殖健康（Reproductive Health）这一概念也随之得以提出。1988年，世界卫生组织

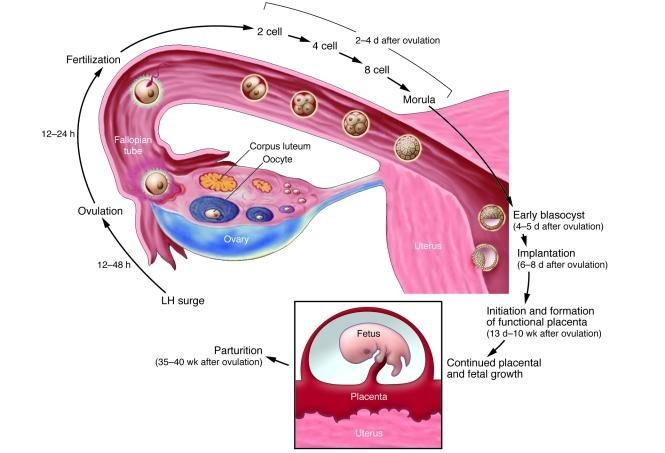
（WHO）——人类生殖研究与培训特别规划署（HPR）Barzelatto首先提出生殖健康应主要涉及计划生育、孕产妇保健、婴幼儿保健和性传播疾病的控制四个方面[1]，进入90年代后，人们对于“生殖健康”的理解进一步深入，妇女的权益与地位也日益受到充分的重视与保障。人们逐渐意识到：生殖健康与人们的生活方式，妇女的社会地位，社会的发展水平，以及环境、文化、宗教等事务之间有着不可分离的联系。在1991年第七届世界人类生殖会议上，WHO人类生殖特别规划署（HRP）前主任Fathalla提出了新的生殖健康概念[2]。在此基础上，1994年4月，世界卫生组织正式定义生殖健康为：在生命所有阶段的生殖和过程中的身体、心理和社会适应的完好状态，而不

仅仅是没有疾病和虚弱。同年9月，国际人口与发展大会（ICPD）接受了该项内容，并将生殖健康的相关策略与行动等列入了《行动纲领》第七章——“生殖权利和生殖健康”，这标志着国际社会对生殖健康概念的普遍认可与接受，并示意其已列入人类发展优先关注的领域和共同目标。

生命繁衍是人类社会持续发展的基础，但是由于诸多因素的不良影响，使得世界范围内不孕不育人口显著增加。生殖健康表示人们能够有满意而且安全的性生活，有生育能力，可以自由决定是否，何时以及生育多少。然而近期，一则世界卫生组织给出的推测却令人堪忧：21世纪，在世界范围内，不孕不育正在成为继肿瘤和心脑血

管病之后，严重影响人们生活与健康的第三大疾病。不孕不育的频发及高发趋势，引起了全世界范围内医疗界的关注与研究。

据最新[调查](http://dc.39.net/)数据显示，全世界由于工作压力、环境污染等原因导致不孕不育的人数在逐渐增长。几年前，一位英国生殖专家预测：10年后，欧美地区将有1/3的育龄夫妇无法正常生育，生育难将成为欧美“通病”。而在今天的美国，人工受孕已是不孕夫妻们的救命稻草，但随之而来的副作用也着实令人担忧：越来越多的婴儿出现早产或者以多胞胎形式出生，甚者可达八胞胎，严重影响孩子的充分发育，加大婴儿患病率及夭折的风险。而在我国，20年前，育龄人群中不孕不育率仅为3%，处于全世界较低水平；但2012年《中国不孕不育现状调研报告》显示，我国不孕不育的城市发病率已高达15%，患者超过5000万人，发病比例正向西方发达国家靠拢，且患者以25岁至30岁人数最多，呈年轻化趋势；发病原因不计其数，且男女因素各占一半，而治愈率仅达34%。其中，反复自然流产的发生率占适育夫妇中的0.4%～1.0%，其中40%～70 %原因不明，称不明原因的复发性流产(URSA)[3]。有相关研究表明，URSA的发生可能与多种因素异常有关，包括染色体，内分泌，生殖道解剖结构，感染，环境，心理状态和免疫等。



图片摘自Dey SK. J Clin Invest. 2010 Apr; 120(4):952-955

图1 生命体从排卵至分娩的过程示意图（人类）

生命体从孕育到诞生，本就是一个神圣而复杂的过程，大致经过（仅以人为本地建立研究内容）：受精，胚泡植入(Implantation)，蜕膜发育(Decidualization)，伴随胎盘形成（Placentation）的胚胎发育(Fetal growth)，以及分娩(Parturition)如图1[4]。

其中，胚泡植入，蜕膜发育和胎盘形是妊娠的三大关键环节（图2）[5-7]。

有研究报道称，近75%早期妊娠失败是源于胚泡植入或胎盘发育异常[7]。胚胎植入是一个复杂且精细的调节型时空性侵入过程。在胚胎植入前期，桑椹胚形成开始进一步发育，细胞开始出现分化。此时，聚集在胚胎的一端，个体较大的细胞称为内细胞团(inner cell mass, ICM)，是未分化的胚胎干细胞，具有发育全能性，能发育成胎儿的各种组织；沿透明带内壁扩展和排列的个体较小的细胞，称为滋养层细胞

（trophoblast cell, TC），它们会发育成胎膜和胎盘(如图3)[8-10]。在小鼠妊娠E4~5，胚泡会首先粘附在子宫上皮细胞表面，并启动胚胎着床程序，此时，围绕于胚泡囊腔周围的TC便开始分化成具有侵润能力的初级滋养层巨细胞（primary trophoblast giant cell, pTGC）。这些pTGC突破子宫上皮并降解其下的细胞外基质，与姆剃刀血液系统产生联系，进一步扩展胚胎植入的发展。至妊娠E5~6时，着床位点确立。与此同时，邻近内细胞团的外周细胞——极滋养外胚层细胞，通过不断地增殖，形成一个三角锥形的帽状结构，称外胎盘锥（ectoplacental cone, EPC）[11]。在随后的E6~7时，

EPC外围的一部分细胞开始分化，形成一种侵润性较强的次级滋养层巨细胞（如图3），两种滋养层巨细胞绕着胚胎合围成一个环状，又称壁滋养层巨细胞（parital trophoblast giant cell, P-TGC）。这种P-TGC与绒毛膜板将在E11之前，共同形成胎盘雏形，并对胎儿锚定子宫壁和母体-胚体血液循环系统的重建具有重要作用[12]。



图片摘自Lim HJ et al. J Clin Invest. 2010 Apr 1; 120(4): 1004–1015

图2 胚泡植入及发育的子宫切面示意图

在妊娠期间，胚胎的大部分生理功能实现依赖于胎盘的存在和正常运转。胎盘是哺乳动物妊娠期间由胚胎的胚膜和母体子宫内膜联合长成的母子间交换物质的过渡性器官，具有供给、代谢、排泄、分泌和免疫等功能。胎盘一旦异常则会引起胎儿缺氧、窘迫、营养不良、发育迟缓、智力受损、甚至胎死腹中等现象。在这其中，滋养层细胞体系的健全是胎盘形成与功能维持，胚胎发育及分娩的重要条件[13]。



图片摘自Rossant J et al. Nat Rev Genet. (2001)

图3 滋养层巨细胞发生发展示意图

在胎盘活跃期间，一方面，源于母体的蜕膜组织直接接触子宫而发挥着作用。另一方面，源于胚体的两部分组织结构也发挥着重要作用：一部分是母-胚交界区（the junctional zone），由滋养层巨细胞（TGC）和成胶质滋养层细胞（spongiotrophoblast cell，

SpT）组成；另一部分是迷路区（the labyrinth zone），由三部分——上皮细胞（滋养层细胞分化而来），密集的母-胚血管网络和源于胚胎中胚层的间质，共同构成的一个高度互连的结构。因此，对于小鼠的胎盘来说，主要构成细胞有三类：迷路区的滋养层细胞，成胶质滋养层细胞和滋养层巨细胞[14]。

在血管交织的迷路区中，最内层的组成细胞叫做合体滋养层细胞，简称，Syn

（syncytiotrophoblast cell），其围绕在胎儿的血管外周，共同参与到绒毛膜板的侵入和与母体血窦的互相交叉过程，此外，这种细胞可通过分泌相关的激素和细胞因子以维持妊娠和抑制局部免疫反应的能力，是母体与胎儿进行气体和养分交换的前沿细胞

[15-19]。在迷路区的最外层是母体和胚胎组织间的接口，由EPC的二倍体滋养层细胞分化而成的多核巨细胞形成。

成胶质滋养层细胞类似于人的细胞滋养层细胞（cytotrophoblast cell），其位于迷路滋养层细胞与滋养层巨细胞之间，能产生类固醇和蛋白类激素，如人绒毛膜促性腺激素（HCG）、胎盘生乳素(PL)、孕酮等[20]，并可通过不断地分裂、融合，一方面对无法分裂的合体滋养层细胞进行补充，另一方面为绒毛独特的结构特征提供基础支撑。虽然细胞滋养层细胞在妊娠晚期，分泌功能会逐渐减弱，变成残存断续的细胞索或零散的细胞，但如果缺乏这种细胞的分裂或融合，合体滋养层细胞合成激素的能力及物质转运功能将减退。因此，滋养层细胞运作的任何一个环节出现问题都可能导致如胎儿生长受限、子痫前期、流产等病理妊娠。

滋养层细胞是哺乳类动物发育期间最早进行分化的一类细胞，源于囊胚的滋养外胚层干细胞。其中，一些调节因子在滋养层细胞分化调节期间发挥着重要作用，例如细胞因子信号转导抑制因子-3(suppressor of cytokine signaling 3, 缩写SOCS3)[21-22]和纤维母细胞生长因子-4(fibroblast growth factor-4, FGF4) /纤维母细胞生长因子受体-2(FGF receptor-2, FGFR2)[23]，以及对胎盘成熟起重要调节作用的SpT, TGC 和

Syn的分化调控因子Mash2, Hand1和Gcm1等[24-27]。

伴随滋养层细胞的不断分化、分裂和融合，胚胎开始生长发育。在整个发育过程中，来自母体的营养物质通过血液源源不断地输送给胎儿，其中，以妊娠中期胎盘的出现为标志，母体被要求提供更多的血液来维持胎儿的正常生长，因此，在母胎界面处出现了另一个与胎盘形成与功能维持相关的重要组成——螺旋动脉。螺旋动脉是子宫-胎盘循环的母体终端动脉，它可以将母体的新鲜血液直接引入胎盘绒毛内空间进行母胚血液交换。众所周知，胎盘形成时必定会伴随有总螺旋动脉的重塑，该生理变化是由侵入的滋养层细胞，在uNK细胞和巨噬细胞的主要侵入配合下，逐步替代螺旋动脉壁内皮细胞与肌细胞的过程，螺旋动脉重塑主要依赖的滋养层细胞是胚胎植入后期分化产生的滋养层巨细胞（包括初级和次级两种，人体学中称绒毛外滋养细胞，extravillous cytotrophoblast cells,），其生物学能力类似于增生时的肿瘤细胞，具备迁移、侵入和增生的能力，唯其行为是受机体调控的，在侵入过程中将失去增长能力。根据已有文献记载，TGC功能多种多样，涉及范围相当广泛（如图4所示），其中作

用于生殖发育方面的主要功能包括：受精卵植入调节，母体血管网新生（蜕膜/胎盘），调节蜕膜细胞分化及调节母体生理功能[28]。



图片摘自Hu D et al. Int J Dev Biol. (2010)

图4 滋养层巨细胞（TGC）的功能及主要调节因子一览图

对于人类来说：妊娠6周时绒毛外滋养细胞侵入子宫蜕膜区。随后，大概在妊

娠9周时，绒毛外滋养细胞穿越被侵入的滋养层细胞封锁的蜕膜区螺旋动脉，此时胎盘的灌注量极少，之后胎盘动脉从胎盘外周开始重塑，血管重塑成功后，胎盘的灌注量增大，氧供量增加，给血管内的滋养层细胞生长和分化提供了极好的条件。可见，侵入的绒毛外滋养细胞广泛作用于螺旋动脉，通过一系列反应使血管内皮细胞凋亡，肌层部分消失，最终血管获得明显扩张，供血量剧增。绒毛外滋养细胞在子宫胎盘循环的血管扩容过程中起主要作用，在很多子痫前期的病例中，可见滋养层细胞侵入受限，血管重塑失败，子宫胎盘循环血量减少，胎儿发育受限。

磷酸肌醇3 -激酶（PI3Ks）蛋白家族最早被发现在细胞内信号转导通路中发挥着重要作用，影响并调控者许多生物学变化（图5）。PI3Ks信号通路的调控复杂性主要源于它的多种多样的PI3K亚型，并根据它们的亚单位结构、调节方式和底物选择性被分为Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型[29]。其中研究最广泛的为I类PI3K, 此类PI3K为异源二聚体，由一个调节亚基和一个催化亚基组成。调节亚基含有SH2和SH3结构域，与含有相应结合位点的靶蛋白相作用，通常称为p85。催化亚基有4种，因分子量大

约为110 kD而命名为p110α，β，δ，γ，分别作为催化性亚单位和另一个能调节其活性与定位的调节性亚单位紧密结合并发挥作用[30]。与其他亚基“广泛分布于各种细胞中”有所不同的是，p110δ选择性的高表达于白细胞表面[31-33]，参与免疫调节的一系列相关反应[33-38]，这使得PI3K-p110δ信号通路在免疫研究中获得了相对高的关注程度。



图5 PI3K-p110δ通路示意图

PI3K主要通过两种方式激活，一种是与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体或连接蛋白相互作用，引起二聚体构象改变而被激活；另一种是通过Ras和p110直接结合导致PI3K的活化。PI3K被激活后，在质膜上产生第二信使PIP3，然后PIP3与细胞内含有PH结构域的信号蛋白Akt和PDK1结合，促使PDK1磷酸化Akt蛋白的Ser308导致Akt的活化。PI3K的活化很大程度上参与到靠近其质膜内侧的多种生长因子和信号传导复合物，包括成纤维细胞生长因子(FGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、人生长因子(HGF)、血管生成素I(Ang1)和胰岛素并激活PI3K通路。目前，

PI3K信号通路已报道的生物调节功能涉及细胞代谢调节，细胞周期调控，细胞生长凋亡，细胞支架重排和迁移，免疫反应，血管生成和心血管稳态等多种生物学过程。

Akt是丝氨酸苏氨酸蛋白激酶，为P13K的下游效应物，在调控细胞生存、血管生成和肿瘤形成中扮演着重要的角色。

近年有文章报道，p110α与p110β的缺失会造成胚胎致死，主要原因与胎儿自身的血管生成障碍有关，但巨文献描述，p110δ亚基的缺失不会导致胚胎致死情况[39]；体外检测显示，自卵裂至桑葚胚形成，p110δ一直存在较高的表达水平[40]。此外，在我们的前期实验结果中显示：p110δ在血管壁结构的维持中发挥着至关重要的作用[41]。

自从病理学学者以人为本，以考察病理现象为主，把“动物模型”的研究与开发工作提上议事日程以来，“动物模型”受到各方学者的广泛关注与积极投入。

人类疾病的动物模型（animal model of human diseases）是生命科学研究中具有人类疾病模拟性的动物，而小鼠是使用数量最多的哺乳类实验动物。小鼠具有体型小，繁殖力强，饲养成本低的优点，更重要的是小鼠遗传资源丰富。到目前为止，已经培育了478个近交系（inbred strain）小鼠，通过自发突变、诱发突变和转基因技术等途径培育并保存了2000多个突变品系[42-43]。作为人类基因组计划的一部分，小鼠基因组序列的测定已经完成[44]，小鼠的基因组和人类基因组序列非常相似，几乎所有人类基因都可以在小鼠身上找到同源基因[45-46]。在科学研究中**使用基因工程动物模型的最大优越性在于**能在动物整体水平观察所改变基因在疾病演进过程中各阶段的生物学功能，探讨其在动物体内的组织特异性的表达或调控过程，是一般的体外实验所无法比拟的。

由此，我们假设PI3K-p110δ信号通路将一定程度地在生殖发育环节中产生影响。其中，在妊娠期间发挥重要作用的滋养层细胞及由其参与构成的母胎血液交换区域——胎盘，将是本课题着重观察的对象。

课题的研究思路

本课题拟探寻PI3K-P110δ信号在生殖发育过程中是否，在何处发挥调节作用，探讨其可能参与的分子调节机制。主要内容如下：

（1）以基因工程小鼠模型p110δD910A/D910A以及其同背景对照鼠p110δWT作为实验研究对象，分别将这两种基因型的小鼠进行组合配对，观察并记录p110δ突变失活后，小鼠的生殖发育状况是否受到影响；

（2）进一步探索p110δ参与活动的生殖生育环节及其缺失后造成的生理及机能的影响并初步检测涉及的致病原因；

（3）针对问题部位，利用病理学、分子生物学等相关检测方法，探讨可能存在的分子调节机制。

# 材料与方法

# 1. 材料

## 1.1 常规试剂配制：

1)磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline, PBS）

组分浓度0.2g NaCl, 8.0g NaCl, 0.24g KH2PO4, 1.44g Na2HPO4. 配制总量 1000ml

配制方法称量上述试剂粉末并置于1000ml的烧杯中，向烧杯中加入约800ml的双蒸水，充分搅拌溶解至溶解完全，添加液体至近1000ml，调节溶液PH = 7.4后，双蒸水定容液体至1000ml，高温高压灭菌后室温或

4℃冰箱保存待用。

2）4%多聚甲醛：

组分浓度40g多聚甲醛粉末1000ml PBS缓冲液配制总量 1000ml

配制方法将800ml的1X PBS缓冲液倒入1000ml烧杯中溶解已称量好的多聚甲醛粉末，充分溶解后，用PBS缓冲液定容到1L，调节PH = 7.4, 4℃保存待用。

备注：因多聚甲醛在1X PBS溶液中较难溶解，可先在溶解液中加入适量的NaOH粉末，待溶解完全后，将PH值调节到7.4并定容。

3）柠檬酸修复液的储备液及工作液的配制（PH 6.0）：**储备液**分为A液与B液。

A液组分10.505g柠檬酸

配制总量500mL

配制方法将称量的粉末置于500mL烧杯中，加入400ml双蒸水充分搅拌至溶解后，双蒸水定容至500ml，常温储存即可。

B液组分14.705g柠檬酸三钠配制总量500mL

配制方法将称量的粉末置于500mL烧杯中，加入400ml双蒸水充分搅拌至溶解后，双蒸水定容至500ml，常温储存即可。

**工作液：**9ml A液+ 41ml B液+ 450ml 双蒸水，Ph=6.0，现配现用。

4）小鼠鉴定时DNA粗提试剂的配制：

A液：Hotshot Lysis Buffer

A液组分NaOH、Na2EDTA

配制总量500mL

配制方法 将0.5g 25mM NaOH, 0.037g 0.2mM Na2EDTA的粉末置于500mL烧杯中，加入适当双蒸水充分搅拌至溶解后双蒸水定容至500ml，常温储存即可。

B液：Hotshot Neutralization Solution

B液组分Tris-Acid

配制总量500mL

配制方法将6.3g 40mM Tris-Acid粉末置于500mL烧杯中，加入适当双蒸水充分搅拌至溶解后，调节pH=5.0，双蒸水定容至500ml，常温储存即可。

5）0.1%苦味酸天狼星红溶液的配制：

天狼星红粉末0.1g与饱和苦味酸溶液混合至100ml。

6）EPC体外培养所需材料及相关配制：

基质胶用1640培养液配置为8mg/ml的混合液体，于4℃冰浴状态下包被24孔板，放入37℃CO2恒温箱凝固待用。

7) TAE 50X 配方：

组成成分242g 2mol/L Tris-Base, 57.1ml 1 mol/L冰醋酸，37.2g EDTA-2Na (pH=8.0)

配制总量1000mL

配制方法将称量品置于1000mL烧杯中，加入适当双蒸水充分搅拌至溶解后

（通风橱，烧杯封口），双蒸水定容至1000ml，常温储存即可。

8) DAB：

组分浓度稳定的过氧化物缓冲液（DAB试剂配套用液），Thermo Scientific公司10X DAB浓缩液

配制方法按需要用量，以DAB液：缓冲液=1: 9方式配制后（即用即配）。

9) 3% 的H2O2/甲醇溶液：

组分浓度30%过氧化氢溶液（30% H2O2），甲醇溶液。配制总量30ml 30% H2O2与270ml的甲醇溶液混合而得。

配制方法将30ml 30%过氧化氢溶液（H2O2）与270ml甲醇溶液室温下充分混匀即可备用。

备注：该试剂一般情况下可重复使用2次。

10）DAPI染色液/4，6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐：

组分浓度罗氏DAPI粉末于避光条件下配制成1mg/ml的原液，-20 ℃避光保存，甲醇溶液

配制方法甲醇溶液将DAPI原液稀释为1ug/ml的液体于4 ℃冰箱保存，按需取出使用即可。

## 1.2 其他试剂信息列表

表1 主要的实验试剂

| 试剂名称 | 试剂供应商 |
| --- | --- |
| 苏木精 | 北京世济合力生物科技有限公司 |
| 伊红 | 北京世济合力生物科技有限公司 |
| 天狼星红（Direct Red 80） | Sigma 公司 |
| Matrigel 基质胶 | BD 公司 |
| 牛血清白蛋白(BSA) | 生工生物工程(上海)股份有限公司 |
| 甲醇、30% H2O2、氯仿、异丙醇、乙醇 | 广州化学试剂厂 |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| EDTA-2Na | 天津市百世化工有限公司 |
| NaCl、KCl、柠檬酸、柠檬酸三钠 | 天津师大茂化学试剂厂 |
| Na2HPO4、K2HPO4 | 天津市永大化学试剂厂 |
| 琼脂糖 | Biowest 公司 |
| Trizol | Thermo Scientific 公司 |
| PCR Mix | Thermo Scientific 公司 |
| 培养基 | GIBCO 公司 |

## 1.3 抗体信息列表

表2 实验中的抗体信息

| 抗体名称 | 抗体供应商 |
| --- | --- |
| α-SMA | 北京博士德公司 |
| P110δ | Santa cruz 公司 |
| CD34 | 北京中杉金桥公司 |
| CK7（抗小鼠） | 北京中杉金桥公司 |
| Ki67 | 基因科技公司 |
| CK7（抗兔） | 北京博奥森公司 |
| Csh1 | 北京博奥森公司 |
| CD68 | AbD Serotec 公司 |
| Akt | Cell Signaling Technology 公司 |
| Phospho-Akt | Cell Signaling Technology 公司 |
| MMP12 | Abcam 公司 |
| MMP9 | Abcam 公司 |
| MMP2 | 生工生物工程(上海)股份有限公司 |

## 1.4 主要仪器信息列表

表3 主要的实验仪器

| **仪器名称** | **仪器厂商** |
| --- | --- |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 解剖显微镜 | Motic 公司 |
| PCR 仪 | 美国应用生物系统公司 |
| 冷冻离心机 | Eppendoff 公司 |
| 低温离心机 | 德国 Hettica 仪器公司 |
| 石蜡切片机 | 德国徕卡仪器公司 |
| 全自动石蜡包埋机 | PR 公司 |
| 全自动生物组织脱水机 | 湖北孝感公司 |
| 独立通气笼 IVC | 苏杭科技器材有限公司 |
| Airtech 超净工作台 | 苏净集团安泰公司制造 |
| 激光共聚焦显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| 正置荧光显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| 倒置体视显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| 高温高压灭菌锅 | 三洋公司 |
| 电泳仪 | Bio-RAD |
| 凝胶成像仪 | Gene 公司 |
| 纯水仪 | MILLIPORE |
| CO2 培养箱 | Thermo Scientific 公司 |
| 照相机 | Canon |

其它常用普通仪器：电子称（称量小鼠体重）、电子天平、制冰机、-20/4℃冰箱、-80℃冰箱、微波炉、鼓风干燥箱，涡旋仪，摇床，搅拌器等。

# 2. 方法

## 2.1 实验动物饲养与管理

### 2.1.1 基因工程小鼠的饲养与管理

(1) p110δD910A/D910A基因工程小鼠及p110δWT（C57BL/6）小鼠均饲养于SPF级环境中。

(2)饲养室：温度维持在22-28℃之间，相对湿度稳定在40％-60％之内，噪音小于

60dB,饲养室内昼夜明暗交替（日光灯照明情况）时间为12h/12h，紫外灯照射两小时/天进行杀菌，氨浓度（小鼠尿液气味）不超过20ppm，饲养室换气次数达到10~20次/小时，饲养器具定期更换并清洗消毒。其余各项指标亦都符合SPF级动物饲养环境及设施管理的要求。

(3)饲料：采用60Coγ射线灭菌的无菌全价营养颗粒饲料，对应于怀孕、哺乳期及身体状况不佳的小鼠会在饲料中添加少量葵花籽或熟鸡蛋（一周1~2次）。鼠笼的料斗内持续保证有足够量的新鲜干燥饲料储存，每周有固定的两天添加新鲜干燥饲料；饮用水：干净蒸馏水装瓶后经高压灭菌后供给，每周换水2-3次，水瓶不重复使用，更换后均及时清洗消毒再使用；垫料：经高压灭菌的混合锯木花或玉米芯；鼠笼采用M5型小鼠饲养笼（苏杭实验动物设备厂提供），经高压灭菌后使用。鼠笼和垫料每周更换两次。

(4)日常登记和观察：每天早晚检查与记录环境数据并密切观察小鼠饮食、活动及全身情况，若发现异常状况将及时处理。外观判断小鼠健康的标准是：①体毛光滑浓密，肌肉丰满，行动能力正常；②眼睛有神，反应敏捷；③食欲旺盛，进食波动不大；④身无破损及畸形；⑤粪便黑色干燥呈麦粒状。

(5)进入饲养室需穿无菌衣，戴一次性手套及口罩，使用2％新洁尔灭溶液每日消毒地板及门窗。

### 2.1.2 小鼠的保种和繁育

(1)小鼠成熟一般为6-8周，此为适宜的配种周龄，一般雌鼠比雄鼠早成熟；尽量挑取状态好的小鼠用做繁殖。判断状态的标准包括小鼠的大小、毛色等。如果繁殖笼一直不生，重新更换新鼠。

(2)将8周以上符合配种要求的成熟雄性和6周以上符合配种要求的雌性以1：n的比例合笼饲养，每笼最多不超过3只。另：因p110δD910A/D910A小鼠繁殖能力异常，配种方式尽量避免p110δD910A/D910A小鼠之间进行，多选择p110δD910A/D910A或p110δWT /D910A雄鼠与p110δWT/D910A雌鼠进行何时比例配种繁殖；获得的新生鼠经过DNA基因鉴定，p110δD910A/D910A小鼠留做实验用或少量的配种需要，p110δWT /WT小鼠，即背景鼠C57BL/6，留做实验对照用。

(3)一般使哺乳类雌性经常与雄性同居时，可反复出现下列一系列过程：（1）卵泡生长；（2）排卵；（3）妊娠前期变化；（4）妊娠；（5）分娩；（6）哺育。但将成熟雌性与雄性分开时，只反复出现（1）、（2）或（3）几个过程。在如此反复的非妊娠的生殖活动中，动情状态作周期性的出现，此周期称为动情周[期。动情周期](http://baike.baidu.com/view/3332901.htm)又名发情周期，是雌性有胎盘类哺乳动物拥有的一种经常性的生理变化，由身体的性荷尔蒙诱导产生。鼠在卵泡成熟期间，从卵巢分泌动情素，使生殖器官发生变化，而表现出发情（动情期estrus）状态并排卵。继之，卵泡黄体化，因而动情素分泌停止发情暂停，生殖器官也开始失去动情期的特有状态

（动情后期metestrus）。黄体可继续存在，但孕激素的分泌是暂时性的，动物在一定期间不表现发情，生殖器官也处于退化状态（动情间期diestrus）。不久，随着另外的新卵泡的生长，开始分泌动情素，因而引起阴道上皮增殖（动情前期proestrus）和角质化，动物再次发情。鼠的一个动情周期一般为4~5天，可通过阴道脂膏的变化去了解动情周期的全部过程。本课题采用两种方法进行检测：1、进行阴道黏液检测，观察并分析细胞特点进行周期判断（具体方法见“动情周期的检测方法”）；2、通过阴道开口情况判断动情期。小鼠喜阴暗，夜间活动活跃，交配和分娩也多发生在夜间。阴栓是雌鼠和雄鼠交配后，雌鼠的阴道口形成的一种特殊的栓，是雄鼠的精液、雌鼠的阴道分泌物与阴道上皮细胞的混合物遇空气后迅速变硬形成的，一般在交配12-14小时左右自动脱落，因此我们应该每日清晨检查阴栓，作为检测小鼠是否交配的重要标志[47]。

(4)小鼠的妊娠期一般为19-21天，确定交配后勤于观察有无产仔，及时做好产仔日期和数目的记录。注意：小鼠易受惊，分娩时如受强光或噪声刺激可导致母鼠神经紊乱，发生吃仔现象，应特别加以注意。

(5)小鼠一般的哺乳期为18-21天，p110δD910A/D910A小鼠较瘦弱，哺乳期适当延长3~5

天。

(6)哺乳期满的仔鼠要与母鼠分开，雌雄分笼饲养。如果离乳以后雌雄混养，两周内应检查并分开，超过两周若发现雌雄相混，所在的整笼小鼠即被视为不合格动物全部淘汰。雌鼠和雄鼠的主要区别为：雄鼠的外生殖器呈圆柱状突起，离

肛门较远，乳头不明显；雌鼠外生殖器离肛门较近，生殖器中间有一凹沟，五对乳头非常明显。

### 2.1.3 基因工程小鼠的鉴定

#### 2.1.3.1 小鼠DNA的提取

哺乳期满后的小鼠可进行DNA鉴定，鉴定步骤如下：

(1)剪指与编号：

a）待鉴定的小鼠需进行编号，以便辨认。编号方法如下：小鼠左右前肢各有四个手指，当小鼠腹部朝上（面对操作人员）时，其左前肢代表个位数，指头从外向内分别表示1、2、3、4，而1指和2指加起来表示5，1指和3指一起表示6，

1指和4指一同表示7，2指和3指加一起表示8，2和4加一起表示9。通过减

去相应指头的方法作为小鼠的编号方式。如，小鼠的编号为6，就剪去左前肢 1

指和3指；右前肢代表十位数，从外向内的指头分别表示1、2、3、4，而5、6、

7、8、9的表示方法同左边个位的表示方法一致，如编号为50，则剪去右前肢的外侧1指和2指，左前肢代表个位的四个手指均保留

b）用消毒后的剪刀按需要和编号方法剪下小鼠相应指头0.2cm并置于1.5mlEP管中待后续检测。剪指后的小鼠伤口进行止血及消毒。

(2)抽提尾部DNA：

a）向每只EP管中加入200ul鉴定液A（配方见“小鼠鉴定时DNA粗提试剂的配制”），充分混匀，95℃金属浴加热30~40分钟。

b）从金属浴锅中拿出EP管，离心3000rpm，3min。

c）向每只EP管中加入20ul鉴定液B（配方见“小鼠鉴定时DNA粗提试剂的配制”），

6000rpm，5min，4℃保存待用（储存不过1周）。

#### 2.1.3.2 PCR法鉴定阳性小鼠

（1）引物由上海英骏生物工程公司合成

a）P110δ引物序列如下：

1. 5'- CTG TCA TCT CAC CTT GCT CC -3'；

2. 5'- AGG GAA CCG CCG TAT GAC -3'；

3. 5'- AAT GCT TTC GTC CCA CGT CC -3' 。

产物结果：突变条带位置：600bp； 野生型条带位置：400bp。

b）PCR反应条件：

表 4 PCR鉴定的程序设置

| 94℃ | 4min | 预变性 |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 94℃ | 30s | 变性 |  |
| 65℃ | 30s | 退火 | 35 个循环 |
| 72℃ | 30s | 延伸 |  |
| 72℃ | 2min | 充分延伸 |  |
| 4℃ | ∞ | 冷却扩增产 |  |

c）琼脂糖凝胶电泳检测阳性转基因小鼠

取PCR反应产物10ul（含染料），加样于1.2%琼脂糖凝胶孔，于TAE电泳缓冲液中电泳（150v, 20min），检测PCR产物的大小是否符合要求。用凝胶成像系统观察电泳结果。

d) p110δD910A/D910A 小鼠的鉴定结果与筛选

小鼠交配后得到子代小鼠，经PCR反应，用凝胶成像系统观察电泳结果，阳性（突变型）p110δD910A/D910A小鼠在600bp处有条带，阴性（野生型）小鼠条带位置处于400bp。结果如图：



图6 p110δD910A/D910A小鼠鉴定结果，Marker: 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp；如图：

①为野生型p110δWT/WT小鼠，②为基因突变p110δD910A/D910A小鼠，③为杂合p110δWT/D910A小鼠。

## 2.2 动物标本取材

### 2.2.1 蜕膜、胎盘及胚胎的取材

孕鼠断颈处死小鼠（约E8蜕膜化时期取植入胚体及EPC；E12.5后胎盘生成，可取胎盘），剪开腹部皮肤及肌肉粘膜层。雌性小鼠子宫为双子宫型，整体呈“Y”字型，如图7所示。通过阴道口与两侧的卵巢（肾脏下头）定位整个子宫，将其剪下（保留定位点），如图8-A所示，借用剪刀与镊子分离胚胎着床点，置于盛有生理盐水的器皿中。取胎盘时期的组织时，用镊子将子宫肌层撕开，暴露出胎膜包裹的胚胎；进一步，可将胎膜撕开（羊水流出），如C图所示，一侧为胎盘（D），一侧为胚胎（E），二者间由脐带相连，小心地将脐带剪断并清理胎盘及胚胎上附带的残余蜕膜组织；取EPC时，解剖镜下，用镊子撕掉外层的子宫肌组织，小心地剥开/剪开蜕膜包裹的胚胎组织，EPC位于胚胎顶端，血红色部位三角区，此时，

pTGC包裹胚胎外延。分离EPC/胚胎，用移液器（移液枪，枪头剪掉一截，剪口圆滑）转移胚胎/EPC到新鲜的液体中。去掉蜕膜的胚胎如图B 中所示。

取蜕膜时期的EPC时，用两个镊子的尖部夹住，向相反的两个方向用力，撕开包裹着的子宫肌层，弃去；取EPC时，水平方向放置组织，EPC位置大概离地2/3的横截面处，剥开/剪开组织，小心EPC被破坏。



图7 小鼠腹腔内子宫及卵巢的位置示意图



图8 蜕膜、胎盘及胚胎的取材示意图

### 2.2.2 胚胎肾脏的取材方法

待产孕鼠颈椎脱臼处死，取出子宫，按上述方法分离出胚胎。借用解剖显微镜、精细镊子和精细剪刀取出胚胎肾脏。借用称量纸固定并包裹住取出的胎儿肾脏放入包埋盒中，固定过夜后脱水包埋。

### 2.2.3 小鼠脑椎体的取材方法

小鼠颈椎脱臼处死，用剪刀、弯镊将脑子取出后，垂体则会留在颅底的垂体窝内，小心取出并用称量纸固定、包裹住取出的垂体，放入包埋盒中固定过夜后脱水包埋。

## 2.3 动情周期的检测方法

(1)器材和试剂：酒精棉球、移液枪、小号枪头、载玻片、盖玻片、生理盐水、玻片架/盘、95%乙醇/多聚甲醛、苏木精-伊红染色、中性树胶、铅笔等。

(2)实验步骤：

a）选用适合量程的移液枪，吸取6~10μ生理盐水，待用；

b）对应待测雌鼠编号，填写记录信息与载玻片信息；

c）抓持小鼠并使其尾向上，头向下，用酒精棉球清洁阴道口后，温柔地用已吸好的生理盐水轻轻滴入小鼠阴道口内并慢慢回吸（液体只在阴道口处停留不可行，可小心地将枪头深进口内1毫米左右，但切勿强烈触碰阴道口而刺激小鼠，继而影响激素分泌和周期变化）；

d）将回吸的液体滴在载玻片上部，取盖玻片进行涂片，风干片刻后，固定液固定

15~30分钟；

e）进行苏木精-伊红染色，脱水封片，观察并记录。

## 2.4 组织包埋与切片

(1)将标本放入包埋盒内，浸入4%多聚甲醛固定过夜；

(2)自动生物组织脱水机进行脱水：70%浓度的乙醇、80%浓度的乙醇、90%浓度的乙醇、95%浓度的乙醇依次浸30分钟，无水乙醇浸60分钟，共2次，二甲苯

60分钟，共2次进行透明；

(3)蜡缸中浸蜡：低熔点蜡缸60分钟，共2次，高熔点蜡缸60分钟；

(4)浸蜡后的组织块进行石蜡包埋，3/4μm切片，44℃摊片，60℃展片30分钟，60℃烤片1~2小时后收好待用。

## 2.5 HE染色步骤

(5)石蜡组织切片脱蜡至水：依次置于二甲苯1（15-20分钟）－二甲苯2（15-20分钟）－无水乙醇1（10-15分钟）－无水乙醇2（10-15分钟）－95％乙醇（10-15分钟）－90％乙醇（10-15分钟）－80％乙醇（10-15分钟）－75％乙醇（10-15分钟），双蒸水浸洗5分钟；

(6)经自来水冲洗后，苏木精液染色2-5分钟（根据不同组织的嗜色程度而定），流水洗去苏木精液（1-2分钟），可选择性地进行自来水返蓝；

(7)伊红染色30秒；

（8）快速脱水（每缸5-10秒，震荡）：75％乙醇－85％乙醇－90％乙醇－95％乙醇-无水乙醇1-无水乙醇2-二甲苯1-二甲苯2；

（9）通风橱中晾干，中性树胶封片，即可。

## 2.6 天狼星红染色法

(1)天狼星红饱和苦味酸液60~90min；

(2)用无水乙醇快速分化并脱水。

(3)二甲苯透明、光学树胶封固。

## 2.7 免疫组化（IHC）步骤

(1)石蜡组织切片脱蜡至水（方法如HE染色步骤中所示）；

(2) PBS浸洗，5分钟×3次；

(3)柠檬酸盐（PH=6.0）/EDTA修复液（PH=8.0）修复（修复条件：高温高压10-15

分钟/煮沸加热10-15分钟）；

(4)待修复液冷至室温，PBS （PH=7.2-7.4）浸洗，5分钟×3次；

（5）3％H2O2-甲醇溶液中30分钟（37℃恒温箱）；

（6）PBS（PH=7.2-7.4）浸洗，5分钟×3次；

（7）一抗孵育（PBS/抗体稀释液配置，一般1: 100），4℃过夜/室温4-6小时；

（8）PBS（PH=7.2-7.4）浸洗，10分钟×3次；

（9）二抗孵育（PBS/抗体稀释液配置，一般1: 150），室温放置,1-2小时；

（10）PBS（PH=7.2-7.4）浸洗，10分钟×3次；

(11) DAB显色（1:9 Thermo）1-3分钟，自来水冲洗；

(12)苏木素复染30秒，自来水冲洗返蓝1-2小时；

（13）脱水（每缸20秒）：75％乙醇－85％乙醇－90％乙醇－95％乙醇-无水乙醇

1-无水乙醇2-二甲苯1-二甲苯2；

（14）风干，封片剂封片。

## 2.8 免疫荧光步骤（石蜡切片）

与免疫组化方法相似，但略有差异：

没有“3％H2O2-甲醇溶液中30分钟（37℃恒温箱）一步；从DAB显色开始的步骤改为：DAPI染色8-10分钟，PBS（PH=7.2-7.4）浸洗，10分钟每次，共3次，风干，防淬灭荧光封片剂封片，4℃储存拍照即可。

## 2.9 总RNA抽提与PCR

### 2.9.1 总RNA抽提

(1)取新鲜小鼠组织置于研钵，迅速放入液氮中研磨成粉，加入500ul左右的Trizol

继续研磨成液状；

(2)将液体转入放有1.5ml EP管中震荡混匀，室温静置5分钟；

(3)加入200ul氯仿，剧烈震荡15秒，室温静置3分钟，4℃，12000g，离心15分钟；

(4)取上清（约300ul）移至新的1.5ml EP管，加入等体积异丙醇，轻柔混匀，室温静置10分钟，4°C，12000g，离心10分钟；

(5)小心弃上清（若RNA量多可见白色沉淀于EP管底部），避免沉淀完全干燥，加入1ml 75%乙醇漂洗2次，4°C，7500g，5分钟；

(6)弃上清，EP管倒扣晾干，10分钟；

(7)加入20 ul DEPC水溶解RNA，分装10ul/支, -80℃保存。

(8)分光光度计测其OD值并记录相应数值，计算浓度；

(9)取1 ul RNA加入相应上样缓冲液进行琼脂糖电泳鉴定，见清晰的5S,18S和28S

三条带，说明RNA的抽提正常无误。

### 2.9.2 反转录PCR

反转录PCR(Reverse Reaction, RT-PCR) 应用TAKARA （RR047A）试剂盒进行.

(1) 10 ul反应体系：2 ug RNA, 5 X gDNA Eraser Buffer 2 ul, gDNA Eraser 1 ul, RNase Free dH2O 补足体积至10 ul，42℃变性2 分钟，4℃储存降温；

(2)向上述得到的反应体系中加入5 X Prime Script Buffer2 4ul, RT Enzyme Mix 1 1ul, RT Prime Mix 1ul, RNase Free dH2O 4ul,共计20 ul，于PCR仪进行37℃15分钟

-85℃5秒-4℃储存降温，获得的cDNA储存于-20℃，使用时进行相应稀释。

### 2.9.3 半定量PCR检测

引物由上海英骏生物工程公司合成，主要引物序列如下：

表5 相关引物序列表

| 引物名称 | 引物序列 | |
| --- | --- | --- |
| F (5' – 3’ ) | R (5' – 3’ ) |
| Hand1 | CATCGCCTACTTGATGGACGTG | CCCTTTAATCCTCTTCTCGCCG |
| Mash2 | GTGCAAACGTCCACTTCCCA CC | TGCTTTCCTCCGA CGA GTA GGC |
| HIF-1α | GTCGGACA GCCTCACCAAACA GA | GTTAACTTGATCCAAA GCTCTGA |
| Gcm 1 | GATACTGAGCTGGGA CATTAACG | CTGTCGTCCGA GCTGTA GATG |
| PLF | AGCCCCATGA GATGCAATACT | CGGACTGCGTTGATCTTTTTCTT |
| PL1 | CCACTGAAGA CCTGTATACTC | GGACTGCA GTTCTTCGA GTC |
| PL2 | CACCAGACAACATCGGAA GAC | TGACAGCA GA GTATCA GGTA CA |
| 4311 | AGGATAAAGAAGTTCTCATA | TGGCTGTGGTTTGTTTTCCTCCTC |
| LIFR | AGCTCTGA CCCTCCTGCAT | TGGGTGACAA GAATGGAA CCT |
| SOCS3 | TCACACTGAGCGTCGA GA | GTGGA GCATCATACTGGT |
| CCN1 | CTCCAGAATCTACCAAAACGGG | CGTCCA GGGA GTCCTTAATGC |
| VEGFR1 | CTCAGGGTCGAA GTTAAAAGTGC | TTGCCTGTTATCCCTCCCACA |
| VEGF | ATGACTTTCTGCTGTCTTGGGTG | CACCGCCTCGGCTTGTCACA |
| MMP12 | TGAAGCGTGA GGATGTA GA CT | TCAAGGATGGGGGTTTCA CT |
| GATA3 | GGAGGA CTTCCCCAAGA GCA | CATGCTGGAA GGGTGGTGA G |
| COX-2 | ATCTACGGTTTGCTGTGGGG | TTCTGTACTGCGGGTGGAAC |
| GAPDH | TCCACCACCCTGTTGCTGTA | TCCACCACCCTGTTGCTGTA |

PCR反应条件：

表6 半定量PCR的程序设置

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 94℃ | 5min | 预变性 |  |
| 94℃ | 30s | 变性 |  |
| 55-65℃ | 30s | 退火 | 30-45 个循 |
| 72℃ | 2min | 延伸 |  |
| 72℃ | 5min | 充分延伸 |  |
| 4℃ | ∞ | 冷却扩增产 |  |

PCR反应产物经琼脂糖凝胶电泳检测获得：

取PCR反应产物7-10ul，加样于1.2%琼脂糖凝胶孔，于TAE电泳缓冲液中电泳（150v, 20min），检测PCR产物的大小是否符合要求。用凝胶成像系统观察电泳结果。

## 2.10 EPC体外培养步骤

(1)按照“蜕膜、胎盘及胚胎的取材”方法取出EPC，用生理盐水小心冲洗，放于包被好的板中做好记录，37℃5% CO2培养箱中干涸培养1~3小时[48]；

(2)加入少量无双抗培养基（可以适当添加FBS），置于37℃5% CO2培养箱培养，于观测时间进行观察、记录和拍照。

（一般情况下，EPC培养24小时后贴壁，48小时可观察pTGC扩展情况。）

# 实验结果

1. PI3K-p110δ突变失活对C57BL/6J小鼠的体症体态的观察

随机抽取p110δD910A/D910A实验鼠和p110δWT对照鼠进行体重测定及体态观察，结果如图9所示，随着年龄的增长，两种基因型不同的雌鼠在体重与体态上显现出差异，p110δD910A/D910A雌鼠较为瘦弱，个别小鼠的腹部干瘪，且在后续的配种实验中发现，该类型小鼠在长期合笼后并无怀孕和分娩结果。

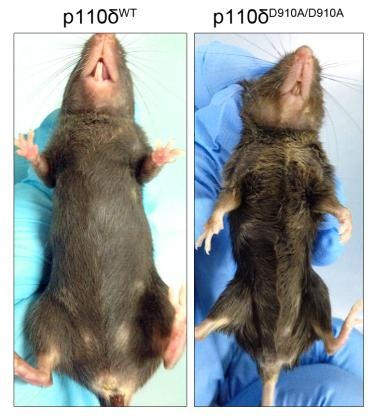
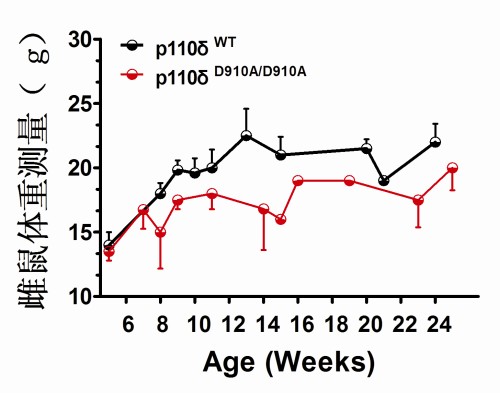


图9 小鼠体重结果图

2. PI3K-p110δ突变失活对C57BL/6J小鼠的Th殖发育能力的影响

随机抽取p110δD910A/D910A实验鼠和p110δWT对照鼠进行组合配对，年龄适育即可

（配对方式如图10-A所示）。合笼饲养一定时间后，观察并记录每种配种小鼠的产崽情况，结果如图10-B和10-C所示。通过比较小鼠♂p110δD910A/D910A X

♀p110δD910A/D910A与小鼠♂p110δWT X♀p110δWT 的配种后小鼠出生情况可以看出，

p110δD910A/D910A小鼠的产崽数明显低于p110δWT，但杂合的小鼠♂p110δWT/D910A X

♀p110δWT /D910A产仔情况略比纯突变小鼠p110δD910A/D910A正常；然而，当比较小鼠

♂p110δWT X♀p110δD910A/D910A 与小鼠♂p110δWT X♀p110δWT 的配种产仔情况，和

♂p110δD910A/D910A X♀p110δWT 与小鼠♂p110δD910A/D910A X♀p110δD910A/D910A的配种产仔情况时，我们发现：产崽数目的差异，与父系的p110δ存在与否无明显关系，但与母系则有巨大的相关性。随后我们对出生的乳鼠进行基因型鉴定发现：产崽数目的差异同胎儿的基因型也无相关性（图10-D）。



图10 小鼠交叉配种后的生殖情况统计

3. PI3K-p110δ在卵巢、子宫、胎盘中的表达情况

生殖生育过程中，雌性小鼠需要具备正常的内生殖器，即子宫、输卵管、卵巢；正常的下丘脑——垂体——卵巢内分泌性腺。



图11 p110δ在主要雌性生殖系统中的表达检测

根据上述结果显示，p110δ突变失活导致小鼠生育异常。那么，p110δ都在哪些生殖生育环节中存在功能发挥？我们首先通过免疫组化方式，对主要的小鼠生殖生育相关器官进行了p110δ的表达检测，结果如下图11A所示：p110δ在卵巢间质、颗粒细胞及外膜存在大量表达；p110δ在子宫内膜的炎细胞表面存在表达；胚胎植入位点附近的胚胎两侧及包绕胚胎的一圈细胞体积很大且多核的细胞出现特异的p110δ表达，且在多核细胞表达极为特异与强烈。但当外膜继续观察p110δ在胎盘生成时期及胎盘期的表达情况时，我们发现：自胎盘生成发生起，p110δ在胚胎周围组织中的阳性表达减弱，包括蜕膜时期阳性特异的巨大多核细胞也不出现表达。

这显示：p110δ在胚胎周围组织的表达呈时空性的表达状态，在蜕膜时期表达强烈，随胎盘生成即逐渐减弱至消失（图11-B）。依此我们推测：从p110δ的表达位置及时间来看，从蜕膜化至胎盘生成之前的一段时间里，PI3K-p110δ一定发挥着重要的，能影响着后期胎盘生成及胚胎发育的至关作用。其中，蜕膜时期的一圈p110δ强阳性表达的巨核大细胞紧邻发育中的胚胎，且呈现出格外引人注目的胞浆颗粒性表达，这一发现引起了我们的高度关注——这究竟是一种什么细胞，它在胚胎发育环节中又会发挥着何样的作用？

# 4. PI3K-p110δ突变失活对雌性C57BL/6J小鼠的Th殖系统的影响

在上述的p110δ表达情况的检测中我们看到，雌鼠卵巢与子宫中均有p110δ存在。卵巢是卵细胞生发和卵泡成熟的场所，分泌生殖生育过程中的许多重要的雌性激

素。卵泡发育是一个连续的变化过程，一般分为原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡和成熟卵泡四个阶段，原始卵泡始发育于胚胎时期，随着性的成熟，在激素的作用下，卵泡陆续开始发育；大部分的卵泡会在中途停止生长并退化，形成闭锁卵泡；排卵后，残留的卵泡结构演化成具有内分泌功能的细胞体，形成黄体。子宫是厚壁的肌性器官，小鼠的子宫由外到内分别是外斜行和内环行的肌层与充斥着血管和子宫腺扥个结构的内膜（又称粘膜）。自性成熟后，在卵巢分泌的激素作用下，内膜将发生周期性剥脱出血；妊娠后，音配体植入而继续生发发育为蜕膜。子宫是孕育和承载新生命的场所，它与受精卵/胚胎的关系，就像土壤与种子，地基与高楼一般，十分重要。

根据资料显示，一般情况下，雌性小鼠出生约5-6周（w）时即为发育性成熟，伴随激素的调节作用，卵泡逐级发育并排卵，子宫也将周期性地进行内膜更替；小鼠35w后，生育相关功能开始逐步衰退。

我们分别随机抽取了4w（n=4）和24w（n=4）的雌性p110δD910A/D910A鼠和p110δWT鼠，并对其卵巢进行统一取材、同周龄对比和相关检测，结果如图12所示：A-B图分别为两种小鼠在4w和24w时的卵巢大体结构对比图。经病理技术处理——脱水、包埋、切片、H&E染色后观察，与正常小鼠相比，p110δD910A/D910A小鼠在性成熟以前

（4w）的卵巢体积，各级卵泡数目以及卵泡总和并未显示差异性（图12- A1, A2）；但该种小鼠在青中年时期（24w）时的卵巢，则显现出明显的体积缩小现象（图12-B, D），但这种器官体积的差异，在结合小鼠个体体重差异后便不再具备统计学意义，如图 E

所示。经高倍光学显微镜观察，两种小鼠各级卵泡比例在24w时均相对正常，并未出现明显的某级别卵泡的增多或减少（图12-B1, B2），该结果也在后期增大样本量（n≥13）后的检测中得到验证（图12-C）。



图12 卵巢的观察情况

动情周期（estrous cycle）,又名发情周期，是雌性有胎盘类哺乳动物拥有的一种经常性生理变化，由身体的性荷尔蒙所诱导产生。自前一次排卵期至下一次排卵期之间的时间长度称为一个周期。动物体内的各种激素浓度还有动物的生育能力都随发情周期变化。动情周期主要分为四个时期：动情前期，动情期，动情后期以及动情间期。小鼠的动情周期越大约在4-5天，各期在阴道图片检查中的细胞特点如下：动情前期，

大部分细胞为有核上皮细胞，偶有少量的角化细胞，持续时间大约为10小时；动情期，大量的细胞呈现无核角化状态，且细胞很大，间或少量的上皮有核细胞，持续时

间约为42小时，排卵则介于前期与动情期之间；动情后期，角化上皮细胞、白细胞

与有核上皮细胞同时存在，大概持续12小时；动情间期，大量的白细胞涌现，少量

存在上皮细胞和粘膜，持续48-72小时左右。

我们分别随机抽取了性成熟的雌性p110δD910A/D910A鼠和p110δWT鼠（n≥10），对其动情周期进行检测。结果如图13所示，两种雌鼠的周期变化并无明显差异，内膜的周期性调节基本一致。



图13 小鼠动情周期-阴道涂片检测结果

随后，我们分别对雌性p110δD910A/D910A鼠和p110δWT鼠的子宫结构取材观察，结果如下：图14-A为两种小鼠未妊娠时，子宫同期状态下的大体图：大小相似，体态匀称，饱满，盈润，富有弹性，未见异常充血。二者无明显差异。

经病理技术处理——脱水、包埋、切片。、H&E染色结果显示（图14-B），p110δWT鼠的子宫，各层结构连接紧密，肌层紧实有序，内膜丰厚，子宫内膜上皮细胞为发育充分，功能活跃的单层矮柱状细胞，周围可见少许的炎细胞存在；而p110δD910A/D910A鼠的子宫，每一层组织之间的连接处都模糊不清或连接不紧密，两层肌层连接处常出现裂隙（如图中箭头所示），子宫内膜上皮细胞常为高柱状的非活跃型细胞，周围分布的炎细胞增多。

随后，我们通过IHC方法标记两种小鼠子宫的肌细胞进行进一步观察，结果如图

14-C所示：p110δWT鼠的子宫内环行肌连接紧密，有序地呈条索状排列；而

p110δD910A/D910A鼠的子宫内环行肌则连接断断续续，时有时无，排列也不总是紧密有序。统计显示，p110δD910A/D910A 鼠的子宫肌含量较少。而天狼星红检测显示，

p110δD910A/D910A鼠的子宫胶原含量较多，分布凌乱无序（图14-D）。



图14 小鼠子宫的观察结果

# 5. PI3K-p110δ突变失活对胚胎Th长发育过程中产Th的影响

结合上述的实验结果，我们大致推测：p110δ突变失活造成的产崽数减少，与雌性小鼠关系密切。其中，雌鼠的动情周期性变化，卵巢的卵泡发育及数量等方面并未显现明显的异常；但未妊娠雌鼠的子宫检测，显现出上皮细胞状态及子宫物质成分的含量变化，提示：子宫作为受精卵着床、生长的地方，其好比种子发芽生长所需要的土壤。未妊娠时期子宫显现出轻微差异；妊娠后，在长期而剧烈的负荷作用下，这种细小的差异是否会造成不可挽救的后果。

为此，我们再一次随机抽取p110δD910A/D910A鼠和p110δWT鼠进行组合配对。在之前的配对实验中，我们初步排除了雄性小鼠在该研究中存在的影响。因此，本次配对实验中的雄性小鼠我们统一选用p110δWT对照鼠。为了提高实验成功率，我们事先将雌性小鼠同笼放置于带有雄性小鼠气味的垫料的饲养笼内，促使小鼠动情周期同步化。一段时间后，合笼饲养。通过清晨的阴栓检测，确定小鼠交配时间，当即记为E0（小鼠交配时间一般在夜里，0.5天后受精卵形成，此时，记录为Embryo 0天）。

小鼠的妊娠期一般为21天。受精卵着床时间大约在E8.5天时子宫内膜进入蜕膜化时期，E13.5天时胎盘形成，母胚的物质交换更加顺畅，自此，胎儿获得在母体内最快最好的生长状态，直至出生。

根据以上时间点，我们分别获得了孕E8.5、E13.5和E15.5的雌鼠子宫，结果如图15所示。在胚胎植入后不久，蜕膜刚刚形成时（图15-A），两种孕鼠的受孕情况相当。这一点提示我们：p110δ突变失活造成产崽数减少问题中，精-卵结合能力的影响可以排除。但胎盘形成后的怀孕数据显示（图15-B, C），在E13.5时期和E15.5

时期，两种孕鼠的受孕结果都存在显著差异——p110δD910A/D910A实验鼠的子宫内的胚胎数目明显减少。



图15 小鼠妊娠期内子宫胚胎数目的统计

结合这一发现与之前p110δ表达情况的检测结果，即，胚胎周围组织在胎盘形成前有较为强烈且格外特异的p110δ阳性细胞存在，其该细胞的p110δ表达在胎盘形成前为表达巅峰时刻，随着胎盘形成，表达减弱至消失。我们获得这样一则提示：胎盘形成，很可能就是本研究课题中的一个重要时间转折点和解决问题的突破点。

随即，我们将E13.5和E15.5这两个时期的子宫剥离，进行进一步的观察，结果如图16-A所示：p110δD910A/D910A孕鼠的胎儿体形略小，胎膜血管纤细且凌乱，不时出现血管不连续、不充盈，甚至没有血管发生的现象（如箭头所示）。

胎盘是一个血管丰富且密集地交织在一起的组织，它从未停歇地进行着母体-胚体的物质交换工作，在胚胎发育过程中发挥着不可缺少的作用。进一步，我们将胚胎与胎盘分离，分别对其进行观测。首先，我们分别测量了胎盘和胚胎的最长直径（胚胎测的最长直径为顶臀长度）与重量。结果显示：p110δD910A/D910A鼠的胎盘最长直径及

胎盘重量的检测结果明显较p110δWT鼠的胎盘小而轻（图16-B-C）；相应的胚胎顶臀长度和体重的测量结果也显示p110δD910A/D910A鼠的更小更轻（图16-E-F）。当我们将胎盘的贴近胎儿一面向上，即胎盘横向面的部分，进行体式显微镜的拍照和观察时，我们发现（图16-D）：正常的胎盘，如p110δWT对照组，胎盘横向面的部分，除边缘区域为白色以外，其余部分都是血管密布丛生的，充盈的，饱满的鲜红色区域。然而，

p110δD910A/D910A实验鼠的胎盘，边缘白色区域增厚，血管所在的红色面积缩小，更甚者可出现如图中E15.5期所示的状况——胎盘的血管区域不是充盈的血红色，而是淡淡的，稀薄的肉粉色，且存在大量的无血色的白色透光区域。这一结果为我们清晰地指出：p110δD910A/D910A 鼠的胎盘，血管严重匮乏。



图16 胚胎及胎盘的观测结果

随后，我们将胎盘组织固定、脱水，并为能最大可能地观察到胎盘的结构层次，我们于包埋前，用刀片将胎盘纵向切割，一分为二，并将切口向下，包埋制作为蜡块。切片后，脱蜡并进行H&E染色，观察胎盘结构。



图17 蜕膜组织与胎盘组织的H&E染色结果

如图17所示，图17-A为蜕膜时期的胚胎状态（连同子宫一同包埋处理），从同部位的组织放大图片来看，p110δD910A/D910A鼠的蜕膜细胞区域，组织稀疏不紧密，存在很多空隙（a与a'）；而在b与b’的近母体子宫内膜区域中，p110δD910A/D910A鼠的

血管腔细而很长，与p110δWT鼠的密而曲折有所不同。图17-B为胎盘刚生成时期的组织切片结果，如图所示，p110δWT鼠的新生胎盘，血管密布，相互交织的迷路区饱满充实，放大图可见充盈的微血管球，富集成胶质滋养层细胞的母体-胚体母-胚交界区也厚实饱满，子宫内膜紧连胎盘的部位也过度自如紧密贴合；然而p110δD910A/D910A鼠在迷路区的饱满度远不如对照鼠，放大的微血管球也干瘪瘦小，母-胚交界区变窄，且与子宫内膜连接的部位也出现很多空泡，过度区域模糊，结构疏松。

当胎盘发育成熟至E15.5时，如图17-C所示，p110δD910A/D910A鼠的母-胚交界区仍然很细很薄，偶见母-胚交界区段接现象。图17-C中的放大图显示了迷路区中的血管网络情况——p110δWT 鼠的各部位血管均紧密交织，血管排布均衡；然而

p110δD910A/D910A鼠的迷路区局部则呈现出了血管分枝的生成不足，血管网络出现大量空隙，血管排布失衡。如图17-D通过分别测量两种小鼠每个胎盘样本中，母-胚交界区域的最窄、适中、最宽区域各一值，取平均值后加入统计列表进行对比，可见两种小鼠母-胚交界区的厚度的确存在统计学差异；与此同时，我们借用软件统计了随机选取的迷路区视野中的血管间空隙面积与视野面积的比值，p110δD910A/D910A鼠的血管空腔面积较p110δWT鼠的大。

从上述结果中我们得知，p110δ突变失活对蜕膜时期、胎膜及胎盘的血管存在形式都有所影响。为了进一步观察和验证这个结果，我们首先对蜕膜时期组织（E8.5）和胎盘组织（E15.5）进行CD34血管内皮细胞IHC检测，结果如图18-A-B所示。可见，p110δD910A/D910A鼠蜕膜时期（E8.5）：蜕膜区域（a与a'）的血管模糊不清，CD34阳性极弱，血管密度降低；近子宫内膜区域（b与b'）的血管管腔舒张松弛，曲折减少，血管密度降低。胎盘生成后（E15.5），p110δD910A/D910A鼠的血管网络稀疏，CD34阳性较弱，血管密度降低。

进一步，我们提取了两种小鼠胎盘组织RNA进行核酸水平的检测，如图18-C所示，p110δD910A/D910A鼠的血管生成相关因子VEGF和VEGFR1的含量降低；作用于绒毛膜板分支生成及血管完整性调节的Gcm1（调节绒毛膜版的生成）和CCN1（调节血管分支的生成）含量显著下降；调节VEGF表达并影响子宫血管发生的COX-2含量也在p110δ突变失活后降低；而缺氧诱导因子HIF-1α却在p110δ突变失活后明显上升。



图18 p110δ突变失活后CD34及血管相关因子的检测

当胎儿在母体内生长时，胎盘是胎儿营养摄取与代谢物排泄的通道，即，羊水量及肾脏发育及代谢情况均与胎盘供血量相关，如图19的展示图所示[49]。在p110δ突变失活后，胎盘血管网络生成异常，胎膜及胎盘的答题观察也显示出血管生成具有缺陷，血液供给可能不足。为了进一步确定胎儿是否真的血液供给不足，我们检测了待分娩胎儿的肾脏组织结构。检测结果如图19所示：

当孕鼠的p110δ突变失活，与同期对照鼠的待分娩鼠胚相比，其肾脏结构较凌乱，组织结构间偶见较大的空隙，肾小球出现相对不饱满的情况更多，且肾小囊腔扩大，球旁细胞扩大。p110δ突变失活鼠的胎儿肾脏发育受到一定影响。





图19 成熟的胚胎肾组织结构的观察结果

垂体（又称脑垂体）是人体最重要的内分泌腺，分泌多种激素，如生长激素、促性腺素（黄体生成素和卵泡刺激素）、催产素、[催乳素](http://baike.haosou.com/doc/3990187.html)、黑色细胞刺激素等，对代谢、生长、发育和生殖等有重要作用。

# 6. PI3K-p110δ特异性地表达于蜕膜时期的滋养层巨细胞

胚胎植入初期，免疫细胞异常活跃；增殖旺盛；血管生成丰富；滋养层细胞也活跃地侵入着。根据文献提示，我们对E8.5的蜕膜期组织进行了相关IHC检测，结果如图20-A显示。p110δ强阳性表达的细胞对滋养层细胞识别标记物细胞角蛋白7(cytokeratin 7, CK7)也存在特异地强阳性表达；对可标记巨噬细胞的分子CD68也存爱特异性表达；增殖指标检测（Ki67）和血管内皮细胞特异性检测（CD34）结果也显示，在这类细胞周围的组织区域内有对应检测目标较为丰富的阳性表达情况，但在该细胞本身却未见表达。上述检测显示：p110δ强阳性表达的细胞具有免疫细胞性质和滋养层细胞性质。



图20 蜕膜时期p110δ强阳性细胞的确认



图21 pTGCPI3K/Akt通路活性检测

研究报道，滋养层细胞中有一类细胞，名为壁滋养层巨细胞(Parietal trophoblast giant cell, pTGC)，是初级形态和次级形态的滋养层巨细胞的总称，在胚胎植入之后的蜕膜时期，呈大而多核状态环绕在胚胎周围。这种细胞形态与分布位置与上述实验中的p110δ强阳性表达的细胞很相似。pTGC有一种特异的检测标记物，称为绒毛膜生

长激素1 (Chorionic somatomammotropin hormone 1, Csh1,又名placental lactogen 1, Pl1).如图20-B显示的Csh1/p110δ的免疫荧光双标(double-labelling immunofluorescence)检测结果，该巨核大细胞不仅显示为p110δ阳性，同时也是Csh1阳性。这种细胞正是文献中所述的滋养层巨细胞。

PI3K-p110δ在p110δD910A/D910A鼠体内只是突变失活，无法进行正常的功能活化，但其仍然存在表达情况。如图，CK7与p110δ仍旧可以实现荧光共标检测（图21）；但随后，对Akt信号的检测中则显示，Akt信号可以得到标记，但因为其上游的

PI3K-p110δ失活使其无法被激活，因此，磷酸化的Akt (p-Akt)在原本阳性表达p110δ和Akt的pTGC中则出现了表达情况的差异，即p110δD910A/D910A鼠pTGC的p-Akt表达明显低于对照鼠pTGCp-Akt的表达（图21）。

# 7. PI3K-p110δ突变失活影响胚胎发育的细胞增殖和分化

为了进一步探究PI3K-p110δ突变失活对小鼠生殖生育能力造成的影响，我们做了如下实验检测：



图22 胎盘中滋养层细胞的增殖检测

我们对两种小鼠的E15.5胎盘进行了增殖检测（Ki67）,图中的蓝色虚线分隔了交界区（滋养层细胞）与迷路区（血管网络）。如图22所示，迷路区的来自母体或胚体的血细胞很多，存在明显的非特异阳性表达干扰；但在母-胚交界区，大部分的组成细胞为SpT，一种发挥重要分泌调节功能，可以影响TGC细胞分化的细胞。p110δ突变失活后，SpT增殖明显减弱。



图23 p110δ突变失活对滋养层细胞分化功能的影响

小鼠EPC经过培养后，周围细胞可分化成次级的pTGC。分别获得p110δWT鼠及p110δD910A/D910A鼠妊娠E7.5时的EPC进行体外培养，48小时后进行观察，结果如图23-A所示，p110δ突变失活后的新生pTGC细胞较少，向外扩展的能力也减弱。

为了更好的评价p110δ突变失活对滋养层细胞分化功能的影响，我们首先分别获得两种小鼠蜕膜组织及E15.5时期胎盘并提取RNA，根据文献提示，选取与滋养层细胞分化能力，尤其是pTGC功能相关的细胞因子进行检测。结果如图23-B所示，p110δ突变失活对pTGC活动旺盛的蜕膜时期的Hand1, Mash2，4311（合体滋养层细胞分化调节因子），PL1，PL2，PLF，GATA3, LIFR和SOCS3都有影响，表达量均有所下降且具有统计学差异；但相同的基因，在p110δ突变失活后的胎盘组织中的表达情况则略有不同：Hand1表达略微降低，但无统计学意义；Mash2，PL1，PL2，PLF，

GATA3和LIFR的表达仍存在统计学差异性的降低；4311和SOCS3的表达量则显示出上升趋势，且差异具有统计学意义。

# 8. PI3K-p110δ突变失活影响胚胎发育过程中MMPs的表达

胚胎发育从着床开始就伴随这滋养层细胞的侵入，其中MMPs在其中发挥着不可磨灭的作用，其中就包括MMP2，MMP9。与此同时，在我们的其他课题工作中也发现，p110δ突变失活后，MMP12的含量显著升高，且二者间的平衡关系对血管结构的完整性，血管弹力纤维的功能具有调节作用。我们分别对两种小鼠组织进行了相关的

IHC和IF检测，结果如图24所示。A图为蜕膜组织中p110δ与MMP9的免疫荧光双标检测结果。MMP9在蜕膜时期表达旺盛，如图所示，p110δ突变失活后MMP9表达更加旺盛。B图为IF检测时拍摄选取组织位置。C图为蜕膜组织中p110δ与MMP12的免疫荧光双标检测结果，可见，p110δ突变失活后，MMP12在pTGC中的表达量增多，该结果在D图中的PCR核酸水平检测中得到核实，此外，胎盘时期的MMP12核酸表达量也上升。E图为胎盘SpT细胞MMP2的表达情况，可见p110δ突变失活后，细胞对MMP2的表达上升，有统计学意义。





图24 p110δ突变失活对MMPs分泌功能的影响

## 小 结

本课题采用p110δ突变失活小鼠（p110δD910A/D910A小鼠）作为研究对象，探究

p110δ在小鼠生殖发育过程中可能发挥的作用。

实验中我们发现，p110δD910A/D910A小鼠成年后，同比对照组雌鼠，其体重逐步下降，体格变瘦弱，个别雌鼠可见腹部凹陷干瘪情况。不仅如此，我们还发现，p110δD910A/D910A小鼠存在生育异常现象，即流产，且根据检测观察得知，该种小鼠的流产现象多发于胎盘生成之后；成活小鼠（指胎盘生成后取材检测时仍存活的小鼠）的胎膜及胎盘血管状态存在异常现象：血管结构不完整，胎盘血管区域缩小，惨白甚至透光；相应地组织切片染色后也能观察到血管腔松弛扩张，血管密度下降，胎盘中血管区域偶现局部塌陷现象；相关的细胞因子，如VEGF，COX-2，CCN1, Gcm1等指标检测也显示出血管分支生成存在欠缺及血液供给不足。这些很有可能造成胎儿妊娠中期营养供给不足而死亡。其次，实验结果中我们还观察到，p110δ特异性地强阳性表达于pTGC细胞，它的突变失活，造成胎盘母体-胚体连接部位的SpT细胞增殖

减弱；相关的MMPs分泌能力也出现异常；分化相关指标也存在抑制状态。不可否认，这些改变也很有可能影响到滋养层细胞在妊娠过程中的正常功能的发挥，如血管重塑

（vasculature remodelling）、细胞因子分泌以及母体免疫系统的功能发挥等，进而影响胎儿的正常发育导致流产。课题小结图见图25所示。



图25 文章机制思路图

结 **论**

1. p110δ突变失活导致成年雌鼠体重下降，体格渐弱。

2. p110δ突变失活显著地抑制雌鼠的每胎产崽数目。

3. p110δ突变失活对雌鼠的卵巢结构及动情周期无明显影响，对子宫的结构连接性及肌组织和胶原含量存在影响。

4. p110δ突变失活导致蜕膜组织、胎膜以及胎盘的血管生成或重构体系发生异常，胎儿因血供不足最终在胎盘生成后的妊娠中期流产。

5. p110δ特异性地强阳性表达于小鼠pTGC，其下游Akt通路因p110δ失活而终止信号。

6. p110δ突变失活抑制了胎盘SpT细胞的增殖，干扰滋养层细胞的正常分化，影响MMPs

在蜕膜及胎盘中的表达。**特色：**

利用p110δ基因突变失活小鼠作为实验模型，首次对p110δ在小鼠的生殖发育体系中的作用进行了较为细致和全面的探索性研究，并发现其在pTGC和胎盘中的重要作用。

展望：

1. 虽然本课题目前已明确p110δ在滋养层细胞功能发挥及生殖过程中血管生成与重构中的重要作用，但是其中涉及的具体作用机制还有待进一步的研究。

2. 通过本课题结果我们还看到，p110δ突变失活对雌性小鼠的体态、体重和生育能力都存在影响。我们猜测，这与激素分泌有着密不可分的关系，有待实验进一步研究。

3. 生殖免疫在不孕不育发生机制中占有重要地位，p110δ主要表达于白细胞，因此，进一步探索p110δ作为免疫角色时的作用十分有必要和意义。

# 讨论

世界卫生组织推测，21世纪，在全球范围内，不孕不育正在成为继肿瘤和心脑血管病之后，严重影响人们生活与健康的第三大疾病。我国是世界人口第一大国，中国育龄夫妇的生育力不仅直接关系到个人和家庭的生活质量，甚至可能影响到社会经济的发展。近30年的一些小规模的生育力研究结果显示，我国育龄夫妇生育力下降明显，生育力低下（不孕）有上升趋势。继2000年“人人享有卫生保健”之后，2015年，世界卫生组织又一次提出新的国际卫生奋斗目标，即“人人享有生殖健康”，倡导并维护人类生殖健康事业的发展。

PI3KⅠ类p110亚基的共同特点是磷酸化细胞膜的磷脂酰肌醇产生第二信使PtdIns(3,4,5) P3，进而募集并激活PKB/Akt等信号分子，广泛地参与到细胞生长、分化和免疫调节等作用[50-51]。其中p110α和p110β在各种细胞中均有表达，p110δ和p110γ主要在白细胞表达，而p110γ在平滑肌细胞、内皮细胞和心肌细胞中也存在少量表达

[52-54]。有文献报道，缺乏P110α和p110β的小鼠在胚胎发育阶段即死亡[55]，无法用于研究其在免疫系统中的作用，不过，不具有P110δ或p110γ催化活性功能的小鼠，其胚胎可以存活并发育，且表现出免疫功能减弱。有研究结果显示：PI3Kδ敲除或突变失活小鼠边缘B细胞和腹膜B1细胞发育受阻，B细胞受体下游信号减弱或完全缺失；缺失p110δ功能的小鼠与p110δ敲除小鼠相比，T辅助细胞的发育增强[56-61]。

胚胎生殖发育的整个过程，从免疫学角度看与器官植入类似——异体植入过 程，引发机体免疫反应。然而，正常的胚胎发育过程中我们并没有看到母体对胚体产生的致命的免疫排斥作用，研究表明，这有赖于母胎界面发生的免疫耐受作用。因此，一旦这种免疫耐受格局被打破， 生殖发育环节必将受到影响，URSA将不可避免。

本课题的开始源于我们之前的小鼠饲养发现：在进行p110δ相关课题研究的过程中我们观察到，正常的C57BL/6J小鼠每胎产崽数目为7~10只，但p110δ突变失活小鼠的平均每胎产崽数目却只有3只左右，不仅如此，小鼠还出现体格瘦弱，产崽频率相对较低的情况，且出现频繁而稳定。据此我们推测：p110δ突变失活小鼠在这一问题上表现出的异常症状定是生殖发育过程中某一环节发生了病变。

生殖发育中涉及的环节很多：下丘脑——垂体——卵巢内分泌性腺的正常发育及激素分泌，输卵管（微环境），雄性精子数量及质量，雌性排卵数量及卵子质量，精卵结合，子宫状态及胚泡植入，蜕膜化，胎盘生成及胎儿的自身发育，母-胚免疫调节等。根据我们现有的结果——每胎产崽数目减少，我们开始探索问题出现的原因。首先，我们将p110δ突变失活小鼠（p110δD910A/D910A）与p110δWT小鼠进行交

叉配对，观察不同基因型的雌雄小鼠配对结果（如图10所示），我们惊讶地发现：

雄性p110δD910A/D910A配种雌性p110δWT，雄性p110δWT配种雌性p110δD910A/D910A得到的结果是不一样的，前者与正常小鼠p110δWT之间进行的繁殖结果相近，而后者的结果则与p110δD910A/D910A之间进行的繁殖结果相似；只要雌鼠的p110δ活性丧失，小鼠的繁殖后产崽数目则会明显减少。换言之，p110δ突变失活造成的每胎产崽数目下降与雄性小鼠的p110δ活性并没有明显关系，问题发生在雌鼠身上。

锁定研究目标为雌性小鼠之后，我们分别对小鼠的卵巢、子宫及孕后相关组织结构进行了p110δ的表达检测，查看p110δ的主要活跃区域。结果如图11显示，p110δ在卵巢颗粒细胞，间质，表皮单层细胞，子宫内膜的侵润细胞，蜕膜时期的pTGC 及

蜕膜两侧部位存在表达。据此，我们先后观察了雌性p110δWT与p110δD910A/D910A的卵巢、子宫、蜕膜的组织结构。卵巢：排除雌鼠发育后期体重与体积的差异，两种小鼠的卵巢体积无明显差异，各级卵泡所占总卵泡数目的比例也不存在统计学差异；子宫：

p110δ突变失活后，小鼠子宫内膜肌层易出现裂隙，内膜上皮细胞较为幼稚，胶原和肌束的分布较紊乱不连续；蜕膜：血管生成区域结构更加稀疏，现更多空隙；动情周期：该检测结果显示两种小鼠激素的周期性调节无明显差异。但随后的实验发现令我们眼前一亮。

首先，我们对p110δWT与p110δD910A/D910A孕后的蜕膜时期组织进行了相关检测：

CD34标记结果显示，p110δD910A/D910A蜕膜化时期的血管生成及侵润环节存在缺陷，血管易舒张，弯曲减少，血管密度也降低，同时期的EPC体外培养检测到的pTGC扩展细胞也降低，有迹象显示，p110δ突变失活在这个时期产生了一定程度的影响。但这个影响是否会导致胚胎死亡？在如图15-A的实验检测中我们得到确认：p110δWT与p110δD910A/D910A小鼠在孕后的蜕膜时期，宫内所含胚胎数目基本相同，p110δ突变失活并未影响到胚泡的植入，我们观测到的蜕膜时期血管形成存在的缺陷并未导致胚胎发育的中断。我们推想，蜕膜时期，胚泡才刚刚植入子宫内膜，母胚的交流刚刚开始。在之前的观察中我们已发现两种小鼠子宫之间的细微差异，也许随着胚胎地逐渐生长于母胚交流的频繁，母体负荷量逐渐加剧，导致胚胎出生数目减少的原因也将慢慢浮出水面。

随着胚胎地不断发育，母体负荷逐渐增大，仅仅靠母胚交界处的小血管供给胎儿发育已是远远不够，因此在蜕膜化之后，母胚之间形成了由密集的母体、胚体血管交织形成的供血器官——胎盘，形成母胚交流保护屏障的同时，满足了胚胎新陈代谢需要。在如图15-B/C的实验检测中我们可以看到，胎儿逐渐长大，母胚之间形成了胎盘，但也正是在胎盘出现之后，我们发现了p110δD910A/D910A小鼠宫内所含胚胎数目的减少。从图15观察到的不同时间点的两种小鼠的宫内胚胎情况我们判断：p110δ突变失活造成的每胎产崽数目下降的原因是胎儿在胎盘形成后发生了流产。

联想之前我们在蜕膜时期观察到的血管生成缺陷及胎儿流产发生的时间点，我们猜测：p110δ突变失活造成的胎儿流产是因为胎盘血管网的构成发生重大缺损，导致胎儿供血不足而死亡。这一猜测在我们随后的实验检测中（图16, 17-B-D, 18-B）

也获得了一定程度的证实，但究其现象形成的具体机制研究还有待进一步的深入讨论，但我们推测与蜕膜时期高表达p110δ的pTGC有一定的关系。

已有研究报道（图4所示），TGC可以通过旁分泌PLF、MMPs、VEGF、IFN-

γ等细胞因子，对胚泡植入、子宫蜕膜化、血管重构及子宫免疫调节等过程产生一定影响。在图20-24中我们可以看到，p110δ在pTGC存在特异性高表达，此外，pTGC还特性地表达CK7, CD68和Csh1，但该细胞并不存在增殖（K i67检测结果），CD34检测的结果显示，蜕膜时期的血管生成不侵入pTGC范围，但紧密挨着pTGC形成的细胞圈存在；当p110δ突变失活，Akt含量不变，但磷酸化Akt明显减少，且CK7的表达也降低，与此同时，EPC向外生成的次级TGC也明显减少，但MMP12的含量显著增加。在胎盘形成之后，pTGC的p110δ已不再强阳性表达，但受其早期调控而分化和活化的其他滋养层细胞，如SpT, TGC等，此时正发挥着胎盘功能维持的至关作用。但在p110δ突变失活之后我们看到，主要由SpT构成的母-胚交界区厚度变薄，甚至局部缺失，增殖细胞数降低，且局部现MMP2过度分泌现象。

如图25所示，我们猜测，p110δ可参与调节胎盘的形成过程，包括血管网络的构成与滋养层细胞的功能完全，一旦p110δ缺失，相关环节将出现异常。另一方面，我们推测，伴随着胚泡的成功植入，pTGC相继分化生成并开始发挥作用，与此同时

p110δ 也开启了为随之而来的胎盘生成进行的前期调节工作。在本课题的研究过程中我们还发现很多引人思考的现象：

首先，p110δ突变失活小鼠的p110δ的表达量与正常对照鼠p110δWT小鼠相同，只是相应的激酶活性丧失，对其它亚基的表达量和活性并无影响[62]，其可以生育，具有繁殖后代的能力，但相比正常对照鼠的生育情况，它的产崽数目明显减少；不仅如此，在我们进行有目的地组合配种实验后，我们惊讶地发现，这种产崽数的减少，与雌鼠的基因型，即，与雌鼠是否为p110δ突变失活存在相关性，而与雄鼠的基因型无明显的关系。这说明，这种生殖异常现象的主要发生因素来源于母系。随后，我们就母系可能与生殖能力有关的因素做了初步排查实验，其中，有出现引人思考的现象。

在Li Q等人的实验结果中显示，他们利用*pik3cd*缺失鼠（pik3cd是p110δ的编码基因），首次证明了小鼠的卵泡及颗粒细胞均存在p110δ的高表达情况，且同比于*pik3cd+9-*小鼠，*pik3cd-9-*小鼠在三周龄时的卵巢体积就已明显缩小，其它各指标均

显示卵巢发育受到抑制[63]。然而，本课题利用p110δD910A/D910A小鼠观察其卵巢状态时却并未发现明显的卵巢发育受阻现象。小鼠在4周龄时的卵巢体积大小与正常对照鼠并无明显差异，卵泡发育比例也不存在显著的差异性；卵巢体积上的测量结果在小鼠

24周龄时存在差异，但若考虑到小鼠自身的体重改变，这种差异将被消除。根据以上现象，我们提出了以下问题和思考：1、p110δD910A/D910A小鼠与*pik3cd-9-*小鼠有何差异，为何两种小鼠的卵巢发育状态会不一样？2、p110δD910A/D910A小鼠随着年龄增长，为何雌鼠会出现体态瘦小干瘪，体重减轻的现象，而雄鼠不会+3、以上的两点思考很可能与激素水平有着不可分离的关系，因此，p110δD910A/D910A小鼠的激素水平有待进一步检测。

就上述提及的小鼠激素问题，本课题起初打算跟进，但由于很多条件的不满足和昂贵的小鼠激素检测经费问题，我们遗憾地最终没能完成检测，仅初步查看了

p110δD910A/D910A小鼠和P110δWT小鼠的脑垂体情况。如图26所示，未见明显异常。



图26 雌鼠脑垂体的初步观察结果

其次，实验过程中我们还发现：胎盘时期的p110δD910A/D910A小鼠TGC可偶见异样的细胞形态（如图27所示）。P110δWT小鼠的TGC因为侵入和旺盛的分泌状态，细胞浆很大，细胞呈游走状态时的梭形；但图中的p110δD910A/D910A小鼠TGC则未显现出“穿梭”姿态，细胞核很大，细胞浆较少。这就提示我们：p110δ的突变失活影响到了TGC的功能活化。相关证明实验有待进一步的原代细胞培养后的实验验证。但很遗憾，小鼠的TGC非常少，目前，针对小鼠的TGC原代培养技术还很不成熟。建议稍后的实验中，可用滋养细胞先行检测。



图27 p110δ突变可见TGC形态异常

除此之外，随着课题的不断发展，很多实验信息令我们联想到临床母婴致病，甚至致死的高发疾病——子痫前期。虽然子痫前期的病理致病因素并不清晰，但两个阶段性模型己经建立，并提供了合理的解释。第一阶段：滋养层细胞入侵子宫螺旋动脉不足，致使胎盘缺血；第二阶段：由前一阶段产生的细胞因子对母体内皮细胞发挥作用并形成损伤，随后，由于胎盘浅着床而导致部分滋养层细胞碎片进入母体循环，激发母体血管的炎性反应，包括内皮细胞受损。揭示滋养层细胞的正常或异常入侵的机制很复杂，已报道的涉及因素很多，包括生长因子及其受体[64]，细胞粘附因子（如

E-cadherin）[65]，MMPs（如MMP9）[66]，免疫调节细胞因子（如IFN-γ），凋亡事件[67]，氧浓度，与氧有关的转化因子(HIF-1α, VEGF等)[68]，巨噬细胞和子宫NK细胞的存在等。有报道显示，在一些妊娠并发症中，如子痫前期或是胎儿生长受限等，可观察到滋养细胞的侵入不足甚至是缺失。滋养层干细胞在分化完成后即可转化为具有侵入性能的滋养层细胞，并伴随有相应的分泌能力，MMP9就是其中之一[69-71]. MMP9属于MMPs家族成员，其可以直接作用于蜕膜、基底膜，酶解底物为胶原蛋白、弹性蛋白，能降解几乎所有的细胞外基质，为侵入清除障碍。抑制MMP 9的表达可有效阻断滋养层细胞的侵入，说明MMP9在侵入中起重要作用。

本课题的实验数据显示，p110δ失活后，胎膜及胎盘的血管性结构生成受损，血液流通将因此出现异常，甚至导致母胚的血液交换异常而致胚胎死亡；此外，p110δ失活后，MMPs及滋养层细胞增殖的检测结果均显示异常，EPC的培养实验亦显示出

TGC的增殖扩展功能异常。这些结果提示我们：p110δ失活后，小鼠发生在胎盘部位的血管重构现象可能发生异常。因此，进一步证实两种小鼠的血管重构结果是否存在差异（例如血管灌注等），若有差异，什么指标出现了显著改变，其中涉及的p110δ相关机制又是怎样等问题，将是下一步实验的预完成目标之一。

最后，在检测p110δ的表达情况时，我们发现：子宫内膜，卵巢间质，蜕膜时期的TGC细胞及此时的植入区域母胚交界附近，都存在较为明显的p110δ阳性表达，且均呈现为特异识别的胞浆性阳性。p110δ不仅仅在滋养层细胞的发展史中发挥作用。

在胚胎发育的早期，大约为蜕膜化时期时，有报道显示，免疫细胞大量聚集并发挥着不可或缺的作用。最新的研究表明, URSA所表现的母胎界面免疫耐受异常与白细胞的抗原(HLA)调节异常及自然杀伤细胞( NK细胞)、T淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞（DC细胞）等多种免疫职能细胞的功能异常，细胞凋亡以及细胞因子表达异常等多种因素有关。有报道显示，母体蜕膜中的NK细胞通过分泌大量的细胞因子和血管生成素，在胎盘生成的整个过程中，包括：滋养层细胞侵入母体内膜组织和血管重构，都发挥着决定性的作用。蜕膜NK细胞对母体能否成功受孕有着不可小视的影响[70]。此外，p110δ也曾被报道对NK细胞的功能活化具有调节能力[72-73] 。最近，对

NK细胞的研究带来了一些有趣的发现，它们在平衡滋养细胞入侵不足和过度方面起了一定作用。根据各方资料显示，我们大胆地推测：p110δ对NK细胞在小鼠生殖生育的各项重要环节中，一定存在某种重要的调节作用。

综上所述，本课题利用p110δD910A/D910A小鼠作为研究对象，先后开展了一系列组织学与病理学方面的初步实验研究：证实p110δ突变失活后小鼠具有一定的生育能力，发现p110δ选择性地高表达于蜕膜时期的pTGC，若p110δ失活，相应地，胎盘和胎膜的血管形成受阻，滋养层细胞的分化、增殖、分泌功能出现异常，胎儿在妊娠中期开始出现流产等。尽管本课题已获得不少可喜的实验结果，但更多深入的，机制性的实验还有待完善和开展。我们期待着更多更好的实验数据，期待本课题研究早日完整地开花结果。

参考文献

[1]. Barzelatto J. *Continuation and change: research in human reproduction: biannial report 1986~1987[R]*. Geneva: WHO Special Program of Research, Development and Research Training in Human Reproduction, 1988.

[2]. Fathalla MF. *Reproductive health in the world: two decades of progress and the challenge ahead. Research in human reproduction: biannial report 1990~1991[R]*. Geneva: WHO Special Program of Research, Development and Research Training in Human Reproduction, 1992.

[3]. 朱国平, 等. *原因不明习惯性流产患者的B*淋巴细胞免疫治疗*[J]*. 中华妇产科杂志, 2000, 35: 4, 212-213.

[4]. Dey SK. *How we are born [J]*. J Clin Invest. 2010 Apr; 120(4): 952-955.

[5]. Lim HJ et al. *Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models [J].* J Clin Invest. 2010 Apr 1; 120(4): 1004–1015.

[6]. Wilcox AJ et al. *Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy [J]*, N Engl J Med, 1999, Jun 10; 340(23): 1796-1799.

[7]. Norwitz ER et al. *Implantation and the survival of early pregnancy [J]*, N Engl J Med, 2001, Nov 8; 345(19): 1400-1408.

[8]. Rossant J et al. *Placental development: lessons from mouse mutants [J],* Nat Rev Genet. 2001 Jul; 2(7): 538-548

[9]. Paria BC et al. *Blastocyst's state of activity determines the" window" of implantation in the receptive mouse uterus [J]*. PNAS, 1993, Nov 1; 90(21): 10159-10162.

[10]. Ma GT et al. *GATA-2 restricts prolactin-like protein A expression to secondary trophoblast giant cells in the mouse [J]*. Biol Reprod, 2000, Aug; 63(2): 570-574.

[11]. Afonso S. Romagnano L et al. *The expression and function of cystatin c and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation [J]*. Development, 1997, 124(17): 3415-3425.

[12]. Romagnano L et al. *Mechanisms of musine trophoblast interaction with laminin [J]*. boil reproduction, 1993, 49(2): 374-380.

[13]. Kingdom J et al. *Development of the placental vinous tree and its consequences for fetal growth [J]*. Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol, 2000, 92: 35-43.

[14]. Watson ED et al. *Development of structures and transport functions in the mouse placenta [J]*, Physiology (Bethesda). 2005 Jun; 20: 180-193.

[15]. Castelluucci M et al. *The development of the human placental villous tree [J]*. Anat Embryol (Berl), 1990, 181: 117-128.

[16]. Rossant J, Cross JC. *Placental development: lessons from mouse mutants [J]*. Nat Rev Genet. 2001 Jul; 2(7): 538-548.

[17]. Adelman DM et al. *Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses [J]*, Genes Dev. 2000 Dec 15; 14(24): 3191-203

[18]. Clark FM et al. *Early pregnancy factor: large scale isolation of rosette inhibition test-active polypeptide from ovine placental extracts [J]*. J Reprod Immunol, 1987, 10(2): 133-156.

*[19].* 胡承阅, 等. *妊娠早期绒毛组织培养液和血清对人淋巴细胞早期E*花环形成活性的影响*[J]*. 生殖与避孕, 1989, 9 (1): 52-54.

[20]. Nelson DM, Meister RK et al. *Differentiation and secretory activities of cultured human placental cytotrophoblast [J]*. Placental, 1986, 7: 1-16.

[21]. Roberts et al. *Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3 [J]*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 31; 98(16): 9324-9329

[22]. Takahashi et al. *Socs3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation [J].* EMBO J. 2003 Feb 3; 22(3): 372-384.

*[23].* Feldman et al. *Requirement of FGF-4 for post-implantation mouse development [J].* Science. 1995 Jan 13; 267(5195): 246-24*9*

[24]. Guillemot et al. *Essential role of Mash-2 in extraembryonic development [J].* Nature. 1994 Sep 22; 371(6495): 333-336.

[25]. Cross JC et al. *Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development [J].* Development. 1995 Aug; 121(8): 2513-23.

*[26].* Schreiber J et al. *Placental failure in mice lacking the mammalian homolog of glial*

*Cells missing, GCMa [J].* Molecular and cellular biology. 2000; 20(7):2466-2474.

[27]. Sahgal N et al. *Modulation of trophoblast stem cell and giant cell phenotypes: analyses using the Rcho-1 cell model [J]*. Differentiation. 2005 Dec; 73(9-10): 452-462.

[28]. Hu D, Cross JC. *Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta [J]*. Int J Dev Biol, 2010; 54(2-3): 341-354.

[29]. Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. *Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers [J]*. Trends Biochem Sci. 1997; 22(7): 267–272.

[30]. Osaki M, Oshimura M, Ito H. *PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer [J]*. Apoptosis. 2004; 9(6): 667–676.

[31]. Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, et al. *P110δ, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes [J].* Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(9): 4330–4335.

[32]. Chantry D, Vojtek A, Kashishian A, et al. *p110δ, a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes [J]*. J Biol Chem. 1997; 272(31): 19236–19241.

[33]. Ali K, Bilancio A, Thomas M, et al. *Essential role for the p110δphosphoinositide 3-kinase in the allergic response [J]*. Nature. 2004; 431(7011): 1007–1011.

[34]. Bilancio A, Okkenhaug K, Camps M, et al. *Key role of the p110δisoform of PI3K in B-cell antigen and IL-4 receptor signaling: comparative analysis of genetic and pharmacologic interference with p110δfunction in B cells [J]*. Blood. 2006; 107(2): 642–650.

[35]. Llorian M, Stamataki Z, Hill S, Turner M, Mårtensson IL. *The PI3K p110δis required for down-regulation of RAG expression in immature B cells [J]*. J Immunol. 2007; 178(4): 1981–1985.

[36]. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. *PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation [J]*. Nat Rev Immunol. 2003; 3(4): 317–330.

[37]. Suárez -Fueyo A, Barber DF, Martní ez -Ara J, Zea-Mendoza AC, Carrera AC. *Enhanced phosphoinositide 3-kinase δ activity is a frequent event in systemic lupus*

*Erythematosus that confers resistance to activation-induced T cell death [J].* J Immunol. 2011; 187(5):2376–2385.

[38]. Randis TM, Puri KD, Zhou H, Diacovo TG. *Role of PI3Kδand PI3Kγin inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils [J].* Eur J Immunol. 2008; 38(5): 1215–1224.

[39]. Mariona Graupera et al. *Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration [J]*. Nature, 2008 May 29; 453(7195): 662-666.

[40]. Joan K. Riley et al. *The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo [J]*. Developmental Biology. 2005 Aug 15; 284(2): 377-386.

[41]. Zheng L et al. *Inactivation of PI3Kδ induces vascular injury and promotes aneurysm development by upregulating the AP-1/MMP-12 pathway in macrophages [J]*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015 Feb; 35(2): 368-377.

[42]. Blake JA, Richardson JE, Bult CJ et al. *MGD: the Mouse Genome Database [J]*. Nucl Acids Res, 2003 Jan 1; 31(1): 193-195.

[43]. Bult CJ et al. *The Mouse Genome Database (MGD): integrating biology with the genome [J]*. Nucl Acids Res, 2004, 32: 476-481.

[44]. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome [J]*. Nature, 2002, 420(6915): 520-562.

[45]. Gitton Y, Dahmane N, Baik S, et al. *A gene expression map of human chromosome 21 orthologues in the mouse [J]*. Nature, 2002, 420(6915): 586-590.

[46]. Dragani TA. *10 years of mouse cancer modifier loci: human relevance [J]*. Cancer Res, 2003, 63(12): 3011-3018.

[47]. 李靖, 李炫诚, 等. *确定小鼠动情周期的三种方法[J]*. 实验动物科学, 2007, 24: 3, 62-64, 76.

[48]. 徐宏, 等. 小鼠外胎盘锥次级滋养层巨细胞的分离、培养与鉴定*[J]*. 激光生物学报, 2010, 19: 2, 268-272.

[49]. Raz T et al. *The hemodynamic basis for positional- and inter-fetal dependent effects in dual arterial supply of mouse pregnancies [J]*. PLoS One, 2012; 7(12): e52273..

[50]. Li Q et al. *Phosphoinositide 3-Kinase p110 Mediates Estrogen-and FSH-Stimulated Ovarian Follicle Growth [J]*. Mol Endocrinol. 2013 Sep; 27(9): 1468-1482.

*[51].* Vanhaesebroeck B et al. *Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids [J].* Annual review of biochemistry. 2001; 70: 535-602.

[52]. M. P. Wymann, R. Marone, *Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding [J].* Curr. Opin. Cell Biol. 17 (2005) 141–149.

[53]. E. Patrucco, et al. *PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overloadby distinct kinase-dependent and -independent effects [J].* Cell 118 (2004) 375–387.

[54]. K. Okkenhaug, B. Vanhaesebroeck, *PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation [J].* Nat. Rev., Immunol. 3 (2003) 317–330.

[55]. L. Bi et al. *Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase [J].* Mamm. Genome 13 (2002) 169–172.

[56]. K. Okkenhaug et al. *Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice [J].* Science 297 (2002) 1031–1034.

[57]. E. Clayton, G. Bardi, S. E. Bell, D. Chantry, C. P. Downes, A. Gray, L. A. Humphries, D. Rawlings, H. Reynolds, E. Vigorito, M. Turner, *A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation[J].* J. Exp. Med. 196 (2002) 753–763.

[58]. S. T. Jou et al. *Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110 delta in signaling by the B-cell receptor complex [J].* Mol. Cell. Biol. 22 (2002) 8580–8591.

[59]. E. Hirsch et al. *Central role for Gprotein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation [J].* Science 287 (2000) 1049–1053.

[60]. Z. Li et al. *Roles of PLCbeta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction [J].* Science 287 (2000) 1046–1049.

[61]. T. Sasaki et al. *Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration [J].* Science 287 (2000) 1040–1046.

[62]. Klaus Okkenhaug et al. *Impaired B and T Cell Antigen Receptor Signaling in p110δPI 3-Kinase Mutant Mice [J].* Science 297(2002) 9 1030-1034.

[63]. Li Q et al. *Phosphoinositide 3-Kinase p110 Mediates Estrogen-and FSH-Stimulated Ovarian Follicle Growth [J].* Mol Endocrinol. 2013 Sep; 27(9): 1468-1482.

[64]. Lyall F et al. *Transforming growth faetorβexpression in human Plaeenta and plaeenial bed in normal pregnancy, Preeclampsia and fetal growth restriction [J]*. Am J Pathol, 2001, 159: 1827-1838

[65]. Lyall. *Cell adhesion molecules: their role in pregnaney [J]*. Fetal Matem Med Rev, 1998, 10: 21-44

[66]. Huppert B et al. *Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta [J]*. Cell Tissue Res, 1998, 291: 133-148

[67]. Difederieo E et al. *Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall [J]*. Am J Pathol, 1999, 155: 293-301

[68]. Rajakumar A et al. *Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta [J]*. Biol Reprod, 2000, 63: 559-569

[69]. Staff AC et al. *8-iso prostaglandin freduces trophoblast invasion and matrix metalloproteinase activity [J]*. Hypertension, 2000, 35(6): 1307-1320

[70]. Berthold H, Kertschanska S. *Immunohistochemistry of matrix metalloproteinase (MMP), their substrates and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in human placenta [J]*. Cell Tissue Res, 1998, 291: 133-148

[71]. Hofmann AP et al. *Uterine natural killer cells pace early development of mouse decidua basalis [J].* Mol Hum Reprod. 2014 Jan; 20(1): 66-76.

[72]. Aurore Saudemont et al. *p110γand p110δisoforms of phosphoinositide 3-kinase differentially regulate natural killer cell migration in health and disease [J]*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Apr 7; 106(14): 5795-5800.

[[73]. Guo H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Guo%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18809712) et al. *The p110 delta of PI3K plays a critical role in NK cell terminal maturation and cytokine/chemokine generation [J]*. J Exp Med. 2008 Sep 29; 205(10): 2419-2435.

# 攻读学位期间发表的论文及其他科研成果

**[1]. 胡曦文**; 章倩倩; 雷岩; 刘红英; 周大磊; 陈佳园; 王丽京, p110δ突变失活的Apcmin/+结直肠癌癌前病变小鼠模型的建立, 中国病理生理学杂志（核心）, 2014.8, **第一作者**

**[2].** 顾取良; 黄韧; **胡曦文**; 勾红菊; 周晓明; 郑凌云; 王丽京, SGT基因在深静脉血栓形成中的作用, 临床与实验病理学杂志（核心）, 2014.5, **第三作者**

**[3].** 雷岩; 章倩倩; **胡曦文**; 刘红英; 郑凌云; 顾取良; 何晓东; 王丽京, Apcmin/+; Mac-1-/-小鼠模型的构建, 中国医疗前沿, 2013.12, **第三作者**

**[4].** 刘红英; 章倩倩; 周大磊; 雷岩; **胡曦文**; 何晓东; 张钰; 王丽京, TRAMP小鼠前列腺癌发生的病理进程观察, 临床与实验病理学杂志（核心）, 2014.10, **第五作者**

**[5].** 章倩倩; 丁一; 刘红英; 刘翼龙; 陈胜霞; **胡曦文**; 王丽京, 外源基因转染血管内皮细胞条件优化, 广东药学院学报, 2013.5, **第六作者**

[6]. **Xiwen Hu**1, Jiangchao Li1, Qianqian Zhang, Lingyun Zheng, Guang Wang, Jingli Zhang, Xiaohan Zhang, Quliang Gu, Yuxiang Ye, Xuesong Yang, Li-jing Wang, p110 <delta> is essential for trophoblast cell differentiation and placental placental development in mice, Biology ofReproduction, **Submitte d**, **第一作者**

**[7].** Qian-Qian Zhang1, **Xi-Wen Hu**1, Yi-Long Liu, Zhi-Jin Ye, Cui-Ling Qi, Xiao-Dong He, Hong-Lin Wang, Chun-Kui Shao, Li-Jing Wang, CD11b deficiency suppresses intestinal tumor growth by reducing myeloid cell recruitment, Scientific Reports, **Submitte d**, **共同第一作者**

**[8].** Guang Wang; Cheung-kwan Yeung; Jing-li Zhang; **Xi-wen Hu**; Yu-xiang Ye; Yong-xia Yang; Jiang-chao Li; Kenneth Ka Ho Lee; Xuesong Yang; Li-jing Wang, High salt intake negatively impacts ovarian follicle development, Annals of Anatomy, **Accepted**, **第四作者**

**[9].** Jiang-chao Li1, Yu-xiang Ye1, Ren-li Zhang1, Li-li Zhang, **Xi-wen Hu**, Dong Han, Jia-yuan Chen, Xiaodong He, Guang Wang, Xuesong Yang, and lijing wang, Robo1/2 regulate follicle atresia through manipulating granulosa cell apoptosis in mice, Scientific Reports, **Accepted**, **第五作者**

[10]. 王丽京, **胡曦文**, 李江超, 杨雪松, 章倩倩, p110δ 及其抗体在特异性标记滋养层巨细胞（pTGC）中的应用（发明专利）， 201410336883.3， 已受理， **第二发明人**

**p110δ突变失活的ApcMin/+结直肠癌癌前病变小鼠模型的建立**\*

**胡曦文**，章倩倩，雷岩，刘红英，周大磊，陈佳园，王丽京△

（广东药学院血管生物学研究所，广东广州510006）

**[摘 要] 目的：**建立p110δ突变失活的ApcMin/+结直肠癌癌前病变小鼠模型，为研究p110δ在小鼠结直肠癌癌前病变中的作用提供有力的实验模型。**方法：**将C57BL/6J背景的ApcMin/+结直肠癌癌前病变小鼠与p110δ突变失活小鼠（p110δD910A/D910A）进行杂交建系，通过PCR技术鉴定子代小鼠基因型，获得p110δ突变失活的ApcMin/+小鼠。对适龄小鼠进行肠道取材，亚甲蓝染色后，观察肠道结构，对腺瘤、微腺瘤进行

统计。肠道组织进行石蜡包埋、切片，做HE染色进行进一步观察。**结果：**获得p110

δ突变失活的ApcMin/+杂交鼠（ApcMin/+; p110δD910A/D910A）并得以稳定传代。ApcMin/+；p110δD910A/D910A杂交小鼠的肠道组织中，腺瘤数目与腺瘤体积对比ApcMin/+结直肠癌癌前病变小鼠均有减少。**结论：**成功建立p110δ突变失活的ApcMin/+结直肠癌癌前病变小鼠模型，并得到小鼠肠道肿瘤的初步表型，为进一步研究p110δ在肠道肿瘤发生发展中的作用提供重要的工具动物。

**[关键词]** 转基因小鼠； p110δ； ApcMin/+结直肠癌癌前病变小鼠模型

**[中图分类号]** R392.31 **[文献标识码] A**

\*[**基金项目**]国家973资助项目（2010CB529703）;国家自然科学基金资助项目（No. 31271455, No.31200896）；广东省自然科学基金资助项目（No. S2012040007658）；广东省医学科研基金资助项目（No. B2012181）

△通讯作者Tel: 020-39352126; E-mail: [wanglijing@gdpu. edu. cn](mailto:wanglijing@gdpu.edu.cn)。

**Establishment of a transgenic heterozygous mouse model about ApcMin/ +**

**Precancerosis of colorectal cancer with p110δ-mutation\***

HU Xi-wen, ZHANG Qian-qian, LEI Yan, LIU Hong-ying, ZHOU Da-lei, CHEN Jia-yuan, WANG Li -jing

△

(*Vascular Biology Research Institute, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong 510006, China* )

**[ABSTRACT] AIM:** To establish a transgenic heterozygous mouse model of

Precancerous lesions of colorectal cancer with p110δ-mutation in C57BL/6J background, and serve the studies on colorectal cancer research mediated by p110δ. **METHODS:** The transgenic heterozygous mice were generated by crossing in p110 δD910A/D910A mouse and

ApcMin/+mouse, and the genotype was detected by PCR. Compared with ApcMin/+mice, transgenic heterozygous mice, ApcMin/+; p110δD910A/D910A were count and analyzed the number and size of intestine polyps after methylene blue staining. Intestinal tissue structure was assessed by H& E staining. **RESULTS:** One transgenic heterozygous mouse model of precancerous lesions of colorectal cancer with p110δ-mutation was established. The number and size of polyps in the transgenic heterozygous mice have declined.

**CONCLUSION:** A transgenic heterozygous mouse model of precancerous lesions of colorectal cancer with p110 δ-mutation has been established. The initial phenotype of

Intestinal tumors in transgenic mice has been observed. This model will greatly contribute to the relative research of colorectal cancer in mouse.

**[KEY WORDS]** Transgenic mice; p110δ; ApcMin/+: mouse model of precancerosis of

Colorectal cancer.

传学研究中最早也是最重要的哺乳动物实验研究系统就是小鼠模型。它为人类认识自我提供了一面镜子，为生理学、病理学、药理学、毒理学和行为科学的研究提供了无数的优秀实验模型，并触发了免疫学等研究领域中的重要科学发现。这些都充分体现出小鼠模型的可操作性和可干预性，也是其作为模式生物的最重要的价值[1]。

近几年，肠道肿瘤越来越成为威胁人类健康的重要疾病之一，其全球发病率和死亡率仍在不断上升，在我国也不例外。其中结[直肠](http://baike.baidu.com/view/39591.htm)癌是常见的消化道恶性肿瘤，占胃肠道肿瘤的第二位。在我国常见恶性肿瘤死亡中，结[直肠](http://baike.baidu.com/view/39591.htm)癌患者在男性占第五位，女性占第六位。在西方发达国家，结直肠癌是第三位恶性肿瘤。

家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)是结直肠癌发生形成的癌前病变，患者结直肠部位多发上千个腺瘤性息肉，抑癌基因APC的突变失活是结直肠肿瘤的起始因素之一[2]。1990年，Dove实验室在C57BL/6J-小鼠的APC基因第850位点进行无义突变失活操作，致使小鼠肠道上皮细胞胞浆β-catenin蛋白积累并入核，与TCF4/LEF转录因子结合，激活Wnt信号通路，启动下游原癌基因，最终肠道多发腺瘤，成功构建了良好的家族性腺瘤性息肉病小鼠模型——ApcMin/+小鼠品系[3, 4]。如今，ApcMin/+小鼠已是国际公认的研究肠道肿瘤的小鼠模型，具有可遗传性、自发性和

稳定性的特点而被广泛应用于包括对肿瘤细胞生长、新生血管形成、凋亡、肿瘤免疫以及肿瘤治疗药物开发等多方面的肿瘤研究工作[5-7]。

现已证实有多种肿瘤的发生、发展与炎症相关，且由炎症细胞和其分泌的细胞因子组成的肿瘤微环境，对肿瘤细胞的增殖、生存、转移起到重要作用，是肿瘤形成的一个必不可少的环节。磷酯酰肌醇-3激酶(Phosphoinositide 3-kinases, PI3K)是一种与膜磷脂相关的丝苏氨酸蛋白激酶。PI3K最早发现是在细胞内信号转导通路中发挥着重要作用，影响并调控着许多生物学变化。PI3K信号通路的调控较为复杂，共有八个PI3K

亚型，而根据它们的亚单位结构、调节方式和底物选择性被分为Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型。p110δ属于Ⅰ型PI3K成员，分子量大约为110 kD，作为催化性亚单位和一个与之紧密结合并能调节其活性与定位的调节性亚单位结合并发挥作用。同属成员还有p110α，

p110β，但与之不同的是，p110δ更多地高表达于白细胞表面，参与涉及免疫紊乱的发生，这使得PI3K-p110δ信号通路在肿瘤免疫研究中获得了更高的关注程度。深入地了解p110δ-PI3K信号在调控信号通路中发挥的作用，有助于发现它们在病理学中扮演的特殊角色，并可以对相关疾病的进一步研究提供线索[8-10]。

利用基因工程小鼠建立各种肿瘤模型是当今肿瘤学研究的新趋势，也为研究工作的开展开拓了新的道路。随着分子生物学、细胞工程及繁育分析新技术的不断发展，生物学家和医学科研工作者根据各自工作的需求和对象，利用遗传工程技术对实验小鼠基因组进行有目的地改造或修饰，使实验小鼠有特定的生物表型或特性，为研究载

体、基因的功能和调控机理、基因相互作用等体内“秘密活动”，或重大疾病和其发病机理以及预防治疗用药物的筛选等研究提供直接有效的实验模型[11]。本实验使用

ApcMin/+模型小鼠同p110δD910A/D910A突变失活小鼠进行杂交并成功构建了

ApcMin/+; P110δD910A/D910A突变失活小鼠模型，为研究p110δ突变失活在结直肠癌发生发展中的作用提供有力的研究模型。

**材料和方法**

**1材料**

1.1实验动物：ApcMin/+小鼠（购于美国The Jackson Laboratory）及p110δD910A/D910A小鼠[8]每种品系各6只，雌雄各3只，6-8周龄。C57BL/6小鼠（购自广东省医学实验动物中心，生产许可证号：SCXK（粤）2008-0002），共6只（♀），6-8周龄。

1.2饲养环境：实验小鼠饲养于SPF的环境，室温维持在22-28℃，相对湿度50%-70%，光控12h明/12h暗，噪音小于60dB；小鼠饲养盒、垫料、小鼠饮用温开水均经过高温高压灭菌处理；小鼠饲料购自广东省医学实验动物中心，经60Co辐照灭菌；实验小鼠饲养室定期紫外灭菌。

1.3仪器及试剂：独立送回风净化笼具/IVC系统（购自苏杭实验动物设备厂）；PCR仪（购自美国应用生物系统公司）；2 X PCR Master Mix（购自Thermo公司）；PCR引物（购自上海英骏生物技术有限公司广州合成部）；DNA Ladder DL2000以及细胞/组织DNA提取试剂盒（购自上海捷瑞生物工程有限公司）。

**2方法**

**2.1 ApcMin/+; p110δD910A/D910A小鼠模型的构建：**

用ApcMin/+雄性小鼠和p110δD910A/D910A雌性小鼠杂交构建ApcMin/+; p110δD910A/D910A

小鼠模型，具体方法见图1。

**2.2小鼠组织DNA提取：**

剪取小鼠尾尖3~5mm,置于1.5ml离心管中，参照上海捷瑞生物工程有限公司细胞/组织DNA提取试剂盒说明书，提取小鼠组织DNA，存放于4℃保存。

**2.3 ApcMin/+小鼠鉴定：**

ApcMin/+小鼠突变基因引物设计：5'-GCC ATC CCT TCA CGT TAG-3', 5'-TTC CAC TTT GGC ATA AGG C-3', 5'-TTC TGA GAA AGA CAG AAG TTA-3'. 反应条件为：94℃变性3min，

94℃30s，55℃30s，72℃1min；循环35次；72℃延伸2min，4℃冷却扩增产物。

PCR产物于1.2% DNA琼脂糖凝胶进行电泳，用于凝胶荧光成像系统观察分析电泳结果：ApcMin/+小鼠突变基因扩增产物为300bp左右，野生型基因扩增产物为600bp[2]；

P110δD910A/D910A小鼠突变基因引物设计：5'- CTG TCA TCT CAC CTT GCT CC -3', 5'- AGG GAA CCG CCG TAT GAC -3', 5'- AAT GCT TTC GTC CCA CGT CC -3'. 反应条件为：94℃变

性3min，94℃30s，65℃30s，72℃30s，35个循环；72℃7min充分延伸。PCR产物于1.2% DNA琼脂糖凝胶进行电泳，用于凝胶荧光成像系统观察分析电泳结果：

P110δD910A/D910A小鼠的基因扩增产物为600bp条带，野生型基因扩增产物为400bp条带。

**结果**

**1 ApcMin/+小鼠与p110δD910A/D910A 小鼠的建系及鉴定**

ApcMin/+雄性成年小鼠和p110δD910A/D910A雌性成年小鼠以1: 2的比例相杂交两笼，所生小鼠P110δ基因全部为杂合子，ApcMin/+基因阳性的雄性小鼠为所需小鼠，即雄性

ApcMin/+；p110δD910A/+小鼠，得1只。再分别用雄性ApcMin/+；p110δD910A/+小鼠以1: 2的比例与雌性p110δD910A/D910A小鼠杂交，所生子代通过鉴定ApcMin/+及p110δD910A/D910A基因，确定ApcMin/+；p110δD910A/D910A小鼠是否构建成功，鉴定结果如图2所示。目前成功构建2只雄性及3只雌性ApcMin/+；p110δD910A/D910A，雄性杂交鼠用于繁殖，雌性杂交鼠取组织观察肠道组织结构。

**2 ApcMin/+; p110δD910A/D910A小鼠肠道组织学观察[12,1 3]**

选取15周的小鼠颈椎脱臼处死，取出肠道进行肠道腺瘤、微腺瘤的数目、体积统计分析。根据统计结果显示（见图3），ApcMin/+；p110δD910A/D910A小鼠相对于对照组

ApcMin/+模型鼠，肠道腺瘤、微腺瘤的数目和体积大小均有所减少。

**讨论**

PI3K信号通路涉及细胞代谢调节，细胞周期调控、细胞生长凋亡，细胞支架重排和迁移，免疫反应，血管生成和心血管稳态等多种生物学过程，也被认为是在癌症中最经常失调的途径之一。多发性骨髓瘤中的p110δ存在高表达，且肿瘤细胞的增殖生长在抑制p110δ后现出明显的抑制[14]；亦有报道显示，p110δ-PI3K在血液恶性肿瘤的发生发展中也扮演着一个诱发者的角色；人体实体瘤组织中也检测到了p110δ的过表达，揭示其在肿瘤发生发展中发挥的促瘤作用[9, 10]。本实验利用ApcMin/+结直肠癌癌前病变模型鼠与p110δD910A/D910A小鼠杂交构建的p110δD910A/D910A肿瘤研究小鼠模型，

为后续进一步研究p110δ在肠道肿瘤发生发展微环境中发挥的作用提供良好模型工具，具有重要意义。

此外，实验期间我们也发现，ApcMin/+；p110δD910A/D910A杂交小鼠相对不易获得，原因有两点：1、ApcMin/+结直肠癌癌前病变模型鼠雌鼠不宜受孕，只能靠雄鼠进行繁殖；

2、p110亚基突变小鼠在生殖发育方面存在异常，p110δD910A/D910A小鼠显现为受孕间隔增长，产仔数目减少[15]。为了实验的顺利进行，我们采取如下方法：1、ApcMin/+雄鼠繁殖，雌鼠做实验观察；2、适当引入p110δD910A/+小鼠参与繁殖配种，虽然工作量有所加大，但杂合p110δ突变小鼠的生育情况得到明显提升，实验得以顺利进行。

**[参考文献]**

[1]. Collins FS, Patrinos A, Jordan E, et al. New goals for the U. S. Human Genome Project: 1998-2003 [J]. [Science,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=collins%2Bf%2Bs%2B1998%2B282%3A682) 1998, 282 (5389): 682-9.

[2]. Näthke IS. The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004; 20: 337-66.

[3]. Su L K, Kinzler K W, Vogelstein B, et al. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene[J]. Science, 1992, 256 (5057): 668-70.

[4]. Taketo M M, Edelmann W. Mouse models of colon cancer [J]. Gastroenterology, 2009, 136 (3): 780-98.

[5]. McAlpine C A, Barak Y, Matise I, et al. Intestinal-specific PPAR gamma deficiency enhances tumorigenesis in ApcMin/+ mice [J]. Int J Cancer, 2006, 119 (10): 2339-46.

[6]. Korsisaari N, Kasman I M, Forrest W F, et al. Inhibition of VEGF-A prevents the angiogenic switch and results in increased survival of ApcMin/+ mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104 (25): 10625-30.

[7]. Urbanska A M, Bhathena J, Martoni C, et al. Estimation of the potential antitumor activity of microencapsulated Lactobacillus acidophilus yogurt formulation in the attenuation of tumorigenesis in Apc(Min/+) mice[J]. Dig Dis Sci, 2009, 54 (2): 264-73.

[8]. Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, et al. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice [J]. Science, 2002, 297 (5583): 1031-4.

[9]. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signaling [J]. [Nat Rev Mol Cell Biol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The%2Bemerging%2Bmechanisms%2Bof%2Bisoform-specific%2BPI3K%2Bsignaling) 2010, 11(5): 329-41.

[10]. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation [J]. Oncogene, 2008, 27(41): 5486-96.

[11]. Yamada T, Mori Y, Hayashi R, et al. Suppression of intestinal polyposis in Mdr1-deficient ApcMin/+ mice [J]. Cancer Res, 2003, 63 (5): 895-901.

[12]. 叶志金, 郑力, 亓翠玲, 等. APCMin/+结直肠癌癌前病变小鼠模型的生物学特性[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011(04): 393-395.

[13]. Castillo JJ, Furman M, Winer ES. CAL-101: a phosphatidylinositol-3-kinase p110-delta inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2012, 21(1): 15-22.

[14]. Srinivasan L, Sasaki Y, Calado DP, et al. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival [J]. Cell, 2009, 139 (3): 573-86.



Figure 1. The Mode Figure of cross breeding.

图1 小鼠建系配种模式图



Figure 2. Identification of the mice's genotype. （left: identification results of Apc gene and 300bp band indicates ApcMin/+; right: identification results of p110δgene and single 600bp band indicates p110δD910A/D910A）.

图 2 杂交小鼠的基因鉴定图（左：Apc基因鉴定结果，有300bp条带即为ApcMin/+；右：p110δ

基因鉴定结果，有且只有600bp条带即为p110δD910A/D910A）。

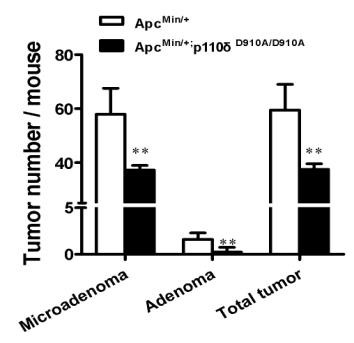


Figure 3. Intestinal methylene blue staining and intestinal adenomas number and volume charts.

图 3 肠道亚甲蓝染色及腺瘤数目与体积统计图

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001; ApcMin/+ (n=8), ApcMin/+; p110δD910A/D910A (n=3)

附录 英文缩略词汇

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| PI3K | Phosphoinositide 3-kinase | 磷脂酰肌醇 3-激酶 |
| URSA | Unexplained recurrentspontaneous abortion | 不明原因的复发性流产 |
| NK | Natural killer | 自然杀伤 |
| TC | Trophoblast cell | 滋养层细胞 |
| TGC | Trophoblast giant cell | 滋养层巨细胞 |
| SpT | Spongiotrophoblast cell | 成胶质滋养层细胞 |
| Syn | Syncytiotrophoblast cell | 合体滋养层细胞 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 多聚酶链式反应 |
| WT | Wide type | 野生型 |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| FBS | Fetal calf serum | 胎牛血清 |
| PBS | Phosphate buffer saline | 磷酸缓冲盐溶液 |
| EDTA | Ethylene Diamine Tetraacetic Acid | 乙二胺四乙酸 |
| HE | Hematoxylin-Eosin staining | 苏木精-伊红染色法 |
| IHC | Immunohistochemistry | 免疫组织化学染色法 |
| IF | Immunofluorescence | 免疫荧光 |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride | 二氨基联苯胺或联苯二胺 |

致 谢

三年的硕士学习时光如白驹过隙，匆匆而过，此时，我们内心充满了无限的感慨、眷恋和些许遗憾。一直以来我都认为，能来到广东药学院血管生物学研究所学习是我的荣幸，这将是我人生中的一份珍贵而又永恒的人生财富。

在我从事课题研究的过程中，我遇到了很多困难：我曾兴奋过，期待过；但也曾迷失过，质疑过，退缩过……但是因为我身边有这样一个团队，一群人，让我在迷惘时不孤单，是你们给予了我指导和帮助，给予了我前行的动力和继续探究的方向。我真诚地感谢你们，使我和我的课题能有今天的收获。

首先，我感谢我的导师王丽京教授：您向为我指引前方的道路的一盏明灯，无论在学习还是生活中，您都会在我困惑，需要有人帮助、指导时出现在我身边，为我驱散迷雾，指点迷津，教导我如何待人接物，引导我成长。毕业之际到来，曦文向您道一声：“王老师，您辛苦了，感谢您一直以来的帮助和关心！”

同时，这个课题获得今天的成果要得益于以下几位老师的全力支持与帮助：课题负责人李江超老师，一路来慷慨地给予我课题帮助的郑凌云老师，章倩倩老师，以及一直给予我课题分析指导和帮助的暨南大学杨雪松教授。感谢老师们能在我面对课题不知所措，惆怅迷惘时，愿意甚至主动积极地和我沟通与讨论，令我对课题探索得以明晰，困惑得以解决。同时，我也能从中体会到从事科研工作的艰辛但快乐着，我获益良多，特此鸣谢。

此外，在我硕士三年的学习生活中，我还要感谢实验室的各位老师和同学们，感谢你们对实验室工作的热情与负责，我们大家才历经风雨后，成功建设，并尽力维护、发扬着这个给予我们成长机会的科研平台。因为有你们，我的硕士阶段收获满满。在此一并致以深深的谢意。

最后，感谢王老师分享给我们的这句话：遇到某个人，他打破你的思维，改变你的习惯，成就你的未来，我们称之为：贵人；遇到一群人，他们会点燃你的激情，觉醒你的自尊，支持你的全部，我们称之为：团队；遇到一件事，唤醒你的责任，赋予给你使命，成就你的梦想，我们称之为：事业！

胡曦文

2015年3月20日星期五