文章编号:1000-5404(2007)10-0885-04

论著

肿瘤转移抑制因子CD63/ME491基因在小鼠子宫内膜表达的动态观察

赵邦霞[1],谭冬梅[1],何明忠[1],陈 媛[1],高立芳[1],谭 毅[1,2] (重庆医科大学:[1]实验动物中心,[2]临床检验诊断学省部共建重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 了解小鼠动情周期和早孕子宫中CD63/ME491 mRNA和蛋白的表达规律,探讨CD63/ME491在胚胎着床过程中的作用。**方法** 应用RT-PCR和免疫组化技术分别观察CD63/ME491 mRNA和蛋白的表达。**结果** 在整个动情周期中,CD63/ME491 mRNA在动情间期表达最多,而在动情期表达最少,但蛋白质却是在动情前期和间期表达最丰富,子宫内膜上皮和基质细胞均呈阳性。早孕的小鼠子宫组织均有CD63/ME491 mRNA表达,且在胚胎开始植入的第4天表达最多,以后维持在较高的表达水平。CD63/ME491蛋白在妊娠第1~6天子宫内膜腔上皮细胞和腺上皮细胞呈阳性表达。但在基质细胞表达的量和范围却不同:妊娠第1天,无CD63/ME491蛋白的表达;妊娠第2天,子宫内膜基质细胞出现微弱阳性表达;以后CD63/ME491蛋白在基质细胞的表达量和表达范围逐渐增强。**结论** 在胚胎着床过程中,CD63/ME491在小鼠子宫中呈动态表达,提示它可能参与了子宫内膜对滋养层细胞有限侵袭的调控。

关键词: 肿瘤转移抑制因子CD63/ME491;子宫内膜;胚胎着床
中图法分类号: R322.65;R341;R394.3 **文献标识码:** A

Spatiotemporal expression of tumor metastasis suppressor gene CD63/ME491 in mouse endometrium

ZHAO Bang-xia[1], TAN Dong-mei[1], HE Ming-zhong[1], CHEN Yuan[1], GAO Li-fang[1], TAN Yi[1,2] ([1]Laboratory Animal Center, [2]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To identify mRNA and protein expression of tumor metastasis suppressor gene CD63/ME491 in mouse uterus during estrous cycle and early pregnancy, and to explore their effects during the process of embryonic implantation. **Methods** Protein and mRNA expression of tumor metastasis suppressor genes CD63/ME491 were detected by immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** During estrous cycle, CD63/ME491 mRNA expression was most during diestrus, while was least during estrus. However, protein was expressed most during proestrus and diestrus, and strongly positive in both endometrial epithelial cells and stroma cells. CD63/ME491 mRNA was expressed in the mouse uterus during pregnancy day 1 to 8, and the expression quantity reached the maximum on pregnancy day 4 when embryo started implantation, then maintained at high level. CD63/ME491 protein was expressed in the mouse endometrial luminal epithelial cells and gland cells during pregnancy day 1 to 6, while its level dynamically changed in the stroma cells, negative on day 1, weakly positive in the subepithelial stroma cells on day 2, gradually increased in quantity and range from day 3 to 8. **Conclusion** Spatiotemporal expression of CD63/ME491 in mouse uterus during embryo implantation indicated its role in regulation of embryo cells invasion to endometrium.

Key words: CD63/ME491; endometrium; embryo implantation

正常胚胎植入过程中,滋养层细胞对子宫内膜的侵入行为与肿瘤细胞的侵袭转移过程存在大量相似之处。研究表明,原癌基因/癌基因的激活和/或抑癌基因(包括肿瘤侵袭转移抑制基因)的失活、基因突变等不仅参与了肿瘤侵袭转移的病理生理过程,是肿瘤发生及侵袭转移的分子机制之一,而且是胚胎植入这一正常生理过程信号转导通路所必需的[1,2]。

基金项目: 国家自然科学基金(30470654);重庆市自然科学基金(8522)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470654) and the Natural Science Foundation of Chongqing (8522)
作者简介: 赵邦霞(1972-),女,湖北省十堰市人,硕士研究生,主治医师,主要从事胚胎着床机制方面的研究,现在湖北省十堰市太和医院妇产科。电话:(023)68486187
通讯作者: 谭 毅,电话:(023) 68485997,E-mail: tanyee66@hotmail.com
收稿日期: 2006-06-13;**修回日期:** 2006-11-21

CD63/ME491 基因是四跨膜蛋白超家族(transmembrane 4 superfamily, TM4SF)成员,与肿瘤细胞转移抑制相关,被称为肿瘤转移抑制基因。目前关于CD63/ME491 基因在胚胎植入过程中的作用还属未知,相关研究报道极少。本实验从胚胎植入与肿瘤侵袭转移相似性的角度,观察小鼠正常动情周期和早孕阶段,肿瘤转移抑制基因 CD63/ME491 mRNA 和蛋白在子宫组织中的表达情况,探讨它在胚胎植入信号转导通路中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 NIH 小鼠,共 60 只,6~8 周龄,体质量 20~25 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。雌雄按 2∶1 自然合笼,次日早晨检出阴栓者作为妊娠第 1 天孕鼠。小鼠动情周期通常分为 4 期:即前期、动情期、后期、间期,各期的划分以阴道细胞涂片中上皮细胞、角化细胞的比例变化确定。

1.2 抗体及试剂

兔抗人 CD63/ME491 多克隆抗体(Sc-15363, Santa Cruz),生物素化羊抗兔二抗、链霉素亲和素-过氧化物酶复合物以及 DAB 显色试剂盒(北方同正)。小量柱离心式组织/细胞总 RNA 提取试剂盒(上海华舜),RT 试剂盒、*Taq* 酶、dNTPs 、Oligo 随机引物(TaKaRa)。

1.3 总 RNA 提取

将妊娠鼠随机数字表法分为 8 组,每组 5 只,分别在妊娠第 1~8 天上午 8 点左右脱颈处死小鼠,取出子宫角,用于总 RNA 的提取。其中妊娠第 5~8 天的小鼠,分别取着床点和着床点之间的子宫组织。另取动情周期各个时期的小鼠,每组 5 只,用于子宫组织总 RNA 提取,具体操作步骤按说明书进行。

1.4 RT-PCR 反应

以提取的 mRNA 为模板,用 Oligo 随机引物逆转录反应生成 cDNA。小鼠 CD63/ME491 基因在 GenBank 的序号为 BC008108,上下游引物分别是:5′-GACAGAGTCCCCGATTCTTG-3′和 5′-CCCCCACCCCTACATTACTT-3′, PCR 条件为:94 ℃预变性 2 min, 94 ℃变性 5 s, 56 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 1 min, 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。扩增产物的大小为 240 bp。内参照基因 β-actin 的上下游引物分别是:5′-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3′ 和 5′-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3′, PCR 条件为:94 ℃预变性 2 min, 94 ℃变性 30 s, 56 ℃退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。扩增产物的大小为 228 bp。CD63/ ME491 基因扩增片段行 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统成像。用 Quantity One 软件分析各条带强度值,求妊娠各天 CD63/ME491/β-actin 的比值,即为 CD63/ME491 的相对表达值。

1.5 免疫组织化学

取动情周期小鼠和第 1~8 天孕鼠子宫角,其中妊娠第 5~8 天在取胚胎着床点的子宫组织,用 40 g/L 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片。S-P 法免疫组化程序按说明书进行。一抗的工作浓度为 1∶350。细胞质和/或细胞膜染成棕黄色者为阳性染色。

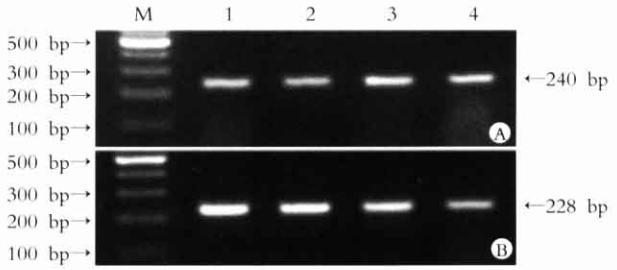
1.6 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件包进行单因素方差分析,两两比较用 Games-Howell 法。

2 结果

2.1 CD63/ME491 mRNA 在动情周期小鼠子宫的表达

CD63/ME491 mRNA 在动情前期、动情期、动情后期和间情期的小鼠子宫组织均有表达,其相对表达量分别为(0.593 ± 0.061), (0.423 ± 0.075), (0.777 ± 0.040), (0.863 ± 0.078)。方差分析提示动情周期各期小鼠子宫 CD63/ME491 mRNA 的表达有显著性差异($P = 0.000$)。其中动情间期表达最丰富,动情期表达最少(图 1)。



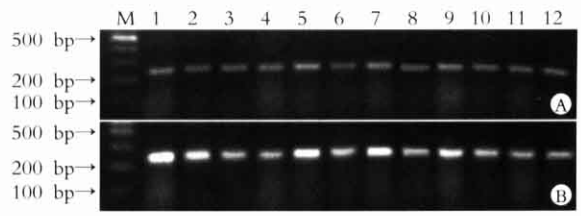
A:CD63/ME491; B: β-actin

M:标准; 1:动情前期; 2:动情期; 3:动情后期; 4:动情间期

图 1 CD63 /ME491 mRNA 在动情周期小鼠子宫组织的表达

2.2 CD63/ME491 mRNA 在早孕小鼠子宫的表达

妊娠第 1~8 天小鼠子宫组织均有 CD63/ME491 mRNA 表达。CD63/ME491 与 β-actin 基因的 RT-PCR 产物与理论长度相一致(图 2)。方差分析提示妊娠第 1~8 天小鼠子宫 CD63/ME491 mRNA 的表达有显著性差异($P = 0.000$)。在妊娠前 2 d, CD63/ME491 mRNA 低表达,从妊娠第 3 天开始,表达明显增加,妊娠第 4 天表达最多($P < 0.05$)。以后 CD63/ME491 mRNA 在较高的水平波动,与妊娠第 4 天比较,表达均无显著性差异($P > 0.05$)。妊娠各天的着床点与非着床点相比,CD63/ME491 mRNA 表达差异无显著性($P > 0.05$)(图 3)。



A:CD63/ME491; B: β-actin M:标准; 1-4:妊娠第 1~4 天子宫组织;6,8,10,12: 妊娠第 5~8 天非着床点的子宫组织, 5,7,9,11: 妊娠第 5~8 天着床点的子宫组织

图 2 CD63/ME491 mRNA 在妊娠第 1~8 天小鼠子宫组织的表达

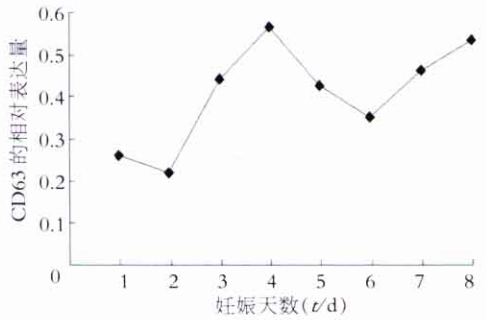


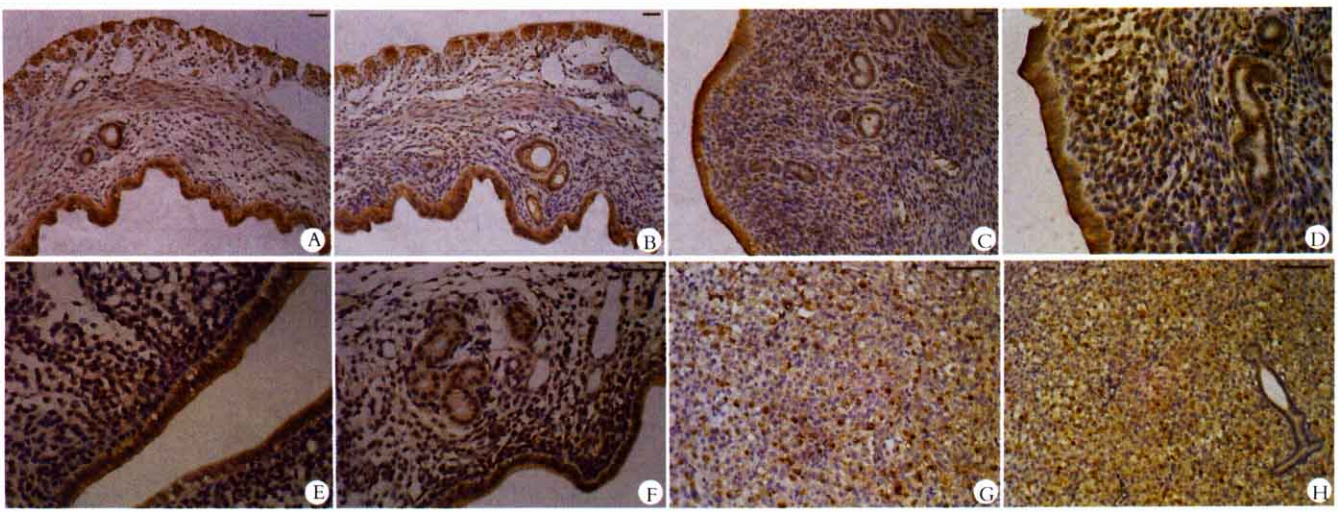
图 3　CD63/ME491 mRNA 在妊娠第 1 ~ 8 天小鼠子宫组织的相对表达量

2.3　CD63/ME491 蛋白在动情周期小鼠子宫内膜的表达

动情周期的小鼠子宫内膜上皮细胞中均有 CD63/ME491 蛋白表达，但子宫内膜基质细胞中 CD63/ME491 蛋白质的表达和分布却有区别：动情间期和动情前期有少量表达，动情期和动情后期基本没有表达。

2.4　CD63/ME491 蛋白在早孕小鼠子宫内膜的表达

CD63/ME491 在妊娠第 1 ~ 6 天小鼠子宫内膜腔上皮细胞和腺上皮细胞呈阳性表达，妊娠第 1 天子宫内膜基质细胞为阴性表达，妊娠第 2 天子宫内膜基质细胞出现微弱阳性表达，从妊娠第 3 天开始，子宫内膜（蜕膜）基质细胞表达 CD63/ME491 蛋白的量和范围逐渐增多（图 4）。



A - H：妊娠第 1 ~ 8 天

图 4　CD63/ME491 蛋白在妊娠第 1 ~ 8 天小鼠子宫组织的表达　（S-P，标尺为 100 μm）

3　讨论

原癌基因/癌基因的激活和/或抑癌基因（包括肿瘤转移抑制基因）的失活，是肿瘤发生及侵袭转移过程的重要分子机制，也是胚胎植入这一正常生理过程信号转导通路所必需的[1]。在胚胎植入中，胚胎细胞同样有生长因子类癌基因（FGF-4/hst-1）、受体-蛋白酪氨酸激酶类癌基因（*C-met*、*C-kit*、*C-fms*、Ron/STK 及 erbB1-4）、非受体-蛋白酪氨酸激酶类癌基因（*Src*、*Yes* 及 *Fyn*）、膜结合蛋白类癌基因（*bcl*-2 家族和 Ras 家族）以及核转录因子类癌基因（*C-fos*、*C-jun*、*Myb*、*Myc*、*Vav* 及 *erbA*），以及抑癌基因 nm23、$p16^{INK4a}$ 等的大量表达与信号转导[2,3]。

ME491 基因定位于人染色体 12p12-12q13，其编码的蛋白为黑色素瘤相关抗原（melanoma-associated antigen），是一种膜黏附糖蛋白，由 237 个氨基酸组成。序列分析显示 ME491 与 CD63 是相同的。现研究最多的是在人黑色素瘤细胞中的表达，CD63/ME491 在人的黑色素瘤可能起着肿瘤抑制基因的作用——限制黑色素瘤的侵袭和进展。研究表明 CD63/ME491 表达与人恶性黑色素瘤的侵袭转移呈负相关，在黑色素瘤进展的早期阶段表现为强表达，在进展阶段如垂直生长期的原发性黑色素瘤和转移性黑色素瘤微弱表达或不表达。将 CD63 基因 DNA 转染 CD63 阴性的人黑色素瘤细胞，发现它可抑制人黑色素瘤细胞在裸鼠体内的生长并使血行转移减少，阻止黑色素瘤的侵袭和转移。CD63/ME491 在体内可以影响细胞的生长，而在体外则无此作用，提示 CD63/ME491 在体内可能起着某种配体受体的作用[4]。对胰腺癌、乳腺癌、NSCLC 研究表明，CD63/ME491 mRNA 在所有的研究标本中均有表达，未发现其与这些肿瘤的侵袭转移及预后有关，提示 CD63/ME491 对肿瘤侵袭转移的抑制作用具有组织特异性。

胚胎植入时，胚胎与子宫相互作用，共同决定了滋

养层细胞侵袭子宫内膜的有限特性。本实验显示在小鼠动情周期的4个阶段中，CD63/ME491 mRNA在动情间期和动情后期表达相对较高，但发挥功能的CD63/ME491蛋白在动情间期和前期表达较丰富，不仅内膜上皮，而且在基质细胞中都有分布，其余两期仅有内膜上皮呈阳性表达，基质细胞中基本没有CD63/ME491蛋白表达。CD63/ME491 mRNA在妊娠第1～8天小鼠子宫组织均有表达，在胚胎植入开始的第4天，表达最丰富；以后维持在较高的水平。CD63/ME491蛋白虽在妊娠第1～6天小鼠子宫内膜上皮细胞均呈阳性表达，但在基质细胞表达的量和范围却不同：妊娠第1天，CD63/ME491蛋白表达阴性；妊娠第2天，子宫内膜下基质细胞开始出现弱阳性表达；从妊娠第3天开始，子宫内膜（蜕膜）基质细胞表达CD63/ME491蛋白的量和范围逐渐增多。提示在胚胎滋养层细胞侵袭子宫内膜前，子宫内膜可能就通过表达CD63/ME491蛋白，为抗滋养层细胞的侵袭做准备。而在接下来的胚胎植入过程中，CD63/ME491蛋白在多数子宫蜕膜细胞上调表达，提示其可能参与了子宫内膜对抗滋养层细胞侵袭的调节。

KAI1/CD82属与肿瘤细胞转移抑制相关的TM4SF成员，可抑制多种肿瘤的侵袭和转移[5,6]，免疫组化显示妊娠第1～8天小鼠子宫组织中，KAI1/CD82和CD63/ME491蛋白表达的部位相似（资料待发表）。在胚胎植入时，小鼠子宫蜕膜组织中上调表达的CD63/ME491和KAI1/CD82蛋白，可能相互作用，或与其他的TM4SF成员及整合素交联形成四聚体，通过Src介导的FAK-Lyn-p130CAS-CrkII信号转导通路，或其他机制，抑制滋养层细胞的粘附性和运动性，从而参与了子宫内膜对滋养层细胞有限侵袭的调控[7-9]。

参考文献：

[1] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer[J]. Cell, 2000, 100 (1): 57-70.

[2] Klonisch T, Wolf P, Hombach-Klonasch S, *et al*. Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the peri-implantation rabbit uterus and blastocyst[J]. Biol Reprod, 2001,64 (6): 1835-1844.

[3] 李大强，赵 勐，王 瑗，等. $P16^{INK4A}$和nm23/NDPK在早孕期和围植入期子宫组织中的表达及意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2003, 19(2): 156-158.

[4] Sauer G, Kurzeder C, Grundmann R, *et al*. Expression of tetraspanin adaptor proteins below defined threshold values is associated with in vitro invasiveness of mammary carcinoma cells[J]. Oncol Rep, 2003, 10(2): 405-410.

[5] Houle C D, Ding X Y, Foley J F, *et al*. Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression[J]. Gynecol Oncol, 2002, 86 (1): 69-78.

[6] Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, *et al*. Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer[J]. Br J Cancer, 2003, 89(1): 158-167.

[7] Liu L, Wu D H, Li Z G, *et al*. Effects of KAI1/CD82 on biological behavior of human colorectal carcinoma cell line[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(6): 1231-1236.

[8] Zhang X A, He B, Zhou B, *et al*. Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration[J]. J Biol Chem, 2003, 278(29): 27319-27328.

[9] Jee B, Jin K, Hahn J H, *et al*. Metastasis-suppressor KAI1/CD82 induces homotypic aggregation of human prostate cancer cells through Src-dependent pathway[J]. Exp Mol Med, 2003, 35(1): 30-37.

（编辑 薛国文）

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母，也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母x，卡方的符号是希腊字母χ^2，自由度的符号是希腊文"υ"，不是拉丁文"V"。样本的相关系数是英文"r"，不能误为希腊文"γ"。

化学元素及核素在医学写作时一般各采用符号，都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加"－"或"＋"表示。例如Na^+、Ca^{2+}、P^{5-}等等，不采用Ca^{++}、P^{---}、Al^{+3}、O^{-2}表示。核素的核子素（质量数）应写在元素符号的左上角，例如：^{131}I、^{32}P。表示激发状态的m写在右上角，例如：$^{99m}Tc^m$、$^{113}In^m$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称，即不能写成^{131}碘、铟^{113m}、P^{32}、Tc^{99m}。

近几年分子生物学发展很快，并已渗透到各学科，大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式，要对符号的来源及其内涵有深刻的了解，使用时不致发生错误，例如：RNA有rRNA（ribosomal RNA）、tRNA（transfer RNA）、mRNA（messenger RNA）3类。r、t、m是表示类型的符号应小写，RNA应大写。

本刊编辑部