[2] 肖继明，陈锐华. 阿片肽参与心肌缺血预适应的分子机制[J]. 医学研究生学报，2004，17(12)：1135－1137，1150.
[3] Campbell J N, Meyer R A. Mechanisms of neuropathic pain[J]. Neuron, 2006, 52(1): 77－92.
[4] Cuesta M C, Quintero L, Pons H, *et al*. Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells[J]. Neurochem Int, 2002, 40(4): 301－306.
[5] Valtchanova-Matchouganska A, Ojewole J A. Mechanisms of opioid delta (delta) and kappa (kappa) receptors' cardioprotection in ischaemic preconditioning in a rat model of myocardial infarction[J]. Cardiovasc J S Afr, 2003, 14(2): 73－80.
[6] McPherson B C, Yao Z. Signal transduction of opioid-induced cardioprotection in ischemia-reperfusion[J]. Anesthesiology, 2001, 94(6): 1082－1088.
[7] Pugsley M K. The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system[J]. Pharmacol Ther, 2002, 93(1): 51－75.
[8] Gross E R, Hsu A K, Gross G J. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts[J]. Cite Res, 2004, 94(7): 960－966.
[9] Patel H H, Hsu A K, Peart J N, *et al*. Sarcolemmal K(ATP) channel triggers opioid-induced delayed cardioprotection in the rat[J]. Circ Res, 2002, 91(3): 186－188.
[10] Guo Z, Yao T P, Wang J P, *et al*. Acute myocardial ischemia upregulates nociceptin/orphanin FQ in dorsal root ganglion and spinal cord of rats[J]. Neurosci Lett, 2008, 433(3): 274－278.
[11] Mika J, Li Y, Weihe E, *et al*. Relationship of pronociceptin/orphanin FQ and the nociceptin receptor ORL1 with substance P and calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion of the rat[J]. Neurosci Lett, 2003, 348(3): 190－194.

(收稿：2010-03-31 修回：2010-06-22)
(编辑 邓强庭)

短篇论著

文章编号：1000-5404(2010)17-1900-03

孕早期绒毛和蜕膜组织差异表达蛋白的初步研究

李红梅，龙 玲，邓 丽，姚春莉 (400038 重庆，第三军医大学西南医院妇产科)

【摘要】 目的 利用蛋白质组相关技术分析孕早期胚胎绒毛和蜕膜组织蛋白质组的差异表达，探讨胚胎植入的可能机制。方法 选择2007年1－5月期间，正常妊娠10周在本院行人工流产者的胚胎绒毛和子宫蜕膜组织各20例。用固相pH梯度双向凝胶电泳(2D-PAGE)分别分离正常早孕人工流产者的胚胎绒毛和蜕膜的蛋白质组。考马斯亮蓝显色，PDQuest 2DE软件分析。结果 图像分析测得绒毛与蜕膜凝胶的匹配率蜕膜达45%，在等电点pI4～7、相对分子质量(14.40～116.00)×10^3范围内，分离得到正常早孕绒毛蛋白点大约680个，蜕膜蛋白点大约621个，其中至少33个蛋白点在绒毛中的表达量高于蜕膜3倍以上，27个蛋白点在蜕膜中的表达量高于绒毛3倍以上，利用质谱相关技术鉴定出7个有意义的差异表达蛋白点。结论 早期胚胎绒毛和蜕膜蛋白质的差异表达，可能是胚胎植入的一个原因。

【关键词】 蛋白质组学；绒毛；蜕膜
【中图法分类号】 R321.3；R321.4；R394.3
【文献标志码】 A

胚胎植入涉及两个关键事件：一是胚胎对子宫内膜腔上皮的黏附，二是子宫内膜基质的蜕膜化。在植入窗口期，胚胎滋养层细胞达到侵入状态，宫内膜达到接受状态，两者同步发生才导致胚胎成功植入[1]。目前，胚胎植入的机制尚不清楚，本课题利用双向凝胶电泳、质谱分析等蛋白质组学相关技术，研究孕早期胚胎绒毛和蜕膜组织蛋白质组的差异表达，以期从差异蛋白质组角度探讨胚胎植入的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选择2007年1－5月期间，正常妊娠10周在本院行人工流产者的胚胎绒毛和子宫蜕膜组织各20例。

1.2 主要试剂与仪器

胰酶、DMEM、Dnase Ⅰ、Percoll、FBS、低分子量蛋白标记物、Pharmalyte(pH 3～10)购自Amersham Pharmacia Biotech，30%丙烯酰胺(29∶1，3.3% C)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二硫苏糖醇(DTT)、硫脲(Thiourea)、十二烷基硫酸钠(SDS)、IPG干胶条(pH3～10，11cm)、甘氨酸(glycin)购自Bio-Rad，超纯脲、TEMED、丙基硫酸盐(CHAPS)、PMSF、碘乙酰胺、考马斯亮蓝R-250、G-250购自Sigma，Trypsin购自Promega，其余试剂均为国产分析纯。IPGphor、附件和循环水浴(Amersham Pharmacia)、Protein Ⅱ XL Cell电泳仪、PDQuest 8.0(Bio-Rad)、MALDI-TOF-MS(ABI)、Nikon D100＋AF-SNIKKOR 17～35 mm 1∶2.8D数码相机。

1.3 实验方法

1.3.1 蜕膜组织蛋白样品的制备 将人工流产获得的蜕膜组织标本置于装有生理盐水的消毒器皿中，用4 ℃生理盐水反复洗涤标本后，仔细分离蜕膜组织，再用4 ℃生理盐水冲洗标本组织15次，消毒吸水纸充分吸干水分后，按50 mg标本加1 ml裂解缓冲液(7 mol/L ultra urea、2 mol/L Thiourea、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、40 mmol/L Tris、0.2% pH 3～10的Pharmalyte、0.1 g/L PMSF)，经液氮反复冻融、研磨3次后加入0.02 g/L DNase和5 mg/L RNase，4 ℃放置15 min，12 000 r/min，4 ℃离心30 min。取上清分装，－80 ℃保存，Bradford法

【通信作者】 李红梅，电话：(023)68765408，E-mail：hmys@sohu.com

测定上清液中蛋白浓度。

1.3.2　绒毛组织蛋白样品的制备　　同蜕膜组织。

1.3.3　双向凝胶电泳　　参照张群等[2]的实验方法，将提取的绒毛或蜕膜组织蛋白样品 500 μg 加入重泡胀液中，使总体积为 200 μl，用等电聚焦仪，按指定程序自动进行，然后进行第二项垂直平板 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。所得的 2-DE 凝胶置于考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h，脱色过夜。染色后的凝胶用 Nikon D100 + AF-SNIKKOR 17 ~ 35 mm 1 ∶ 2.8D 数码相机进行拍摄，用 PDQuest 8.0 软件进行图像分析。

1.3.4　目的蛋白斑点 PMF 样本的制备及质谱分析　　以绒毛组为参考胶，将蜕膜组与之相比较，选取 3 倍以上的差异点作为目的蛋白，参照张群等[2]的实验方法制备其 PMF 样本，然后向制备好的冻干样品管中加入 3 μl 50% ACN/0.5% TFA 溶解，加基质溶液 3 μl，混匀后取 1 μl 于 MALDI-TOF-MS 仪上进行分析，得到 PMF。

2　结果

2.1　2-DE 图谱特点

图像分析测得正常绒毛和蜕膜组织的 2-DE 凝胶匹配率为 45%，在等电点 pI4 ~ 7、相对分子质量（14.40 ~ 116.00）×10^3 范围内分离孕早期胚胎绒毛蛋白点大约 680 个（图 1A），子宫蜕膜蛋白点大约 621 个（图 1B），大约 60 个蛋白点在二者间有 3 倍以上的量变，其中 33 个蛋白点在绒毛中的表达量高于蜕膜 3 倍以上，27 个蛋白点在蜕膜中的表达量高于绒毛 3 倍以上。从 60 个差异表达的蛋白点中随机选取 12 个（图 1 中箭头所示）进行质谱鉴定，其中 5 个蛋白点（1、5、6、8、10）在正常绒毛中的表达量高于正常蜕膜 3 倍以上，其余 7 个蛋白点（2、3、4、7、9、11、12）在正常蜕膜中的表达量高于正常绒毛 3 倍以上。

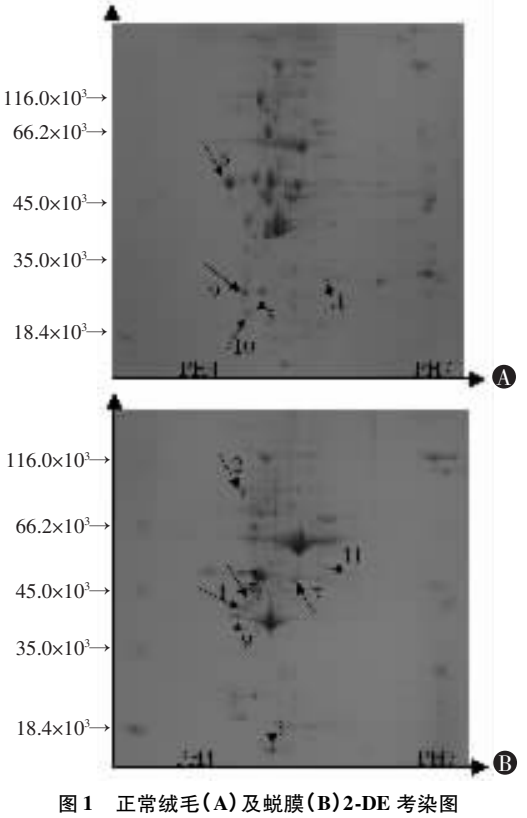


图 1　正常绒毛（A）及蜕膜（B）2-DE 考染图

2.2　差异候选蛋白的 MALDI-TOF 质谱鉴定

将 2-DE 胶上切下的 12 个具有显著差异的候选蛋白点进行 MALDI-TOF-MS 鉴定，经 SWISS SPORT 蛋白质数据库查询，7 个蛋白点（图 1）获得了有意义的结果，分别为膜联蛋白 A1（annexin A1，ANXA1）（1 号，图 2A）、热休克蛋白 90β（heat shock protein 90 kDa beta，HSP90β）（2 号，图 2B）、载脂蛋白 A-Ⅰ前体（apolipoprotein A-I precursor，APOA1）（3 号）、波形蛋白（vimentin，VIME）（4、12 号）、膜联蛋白 A5（annexin A5，ANXA5）（5 号）、原肌凝蛋白 4（tropomyosin-4，TPM4）（6 号）、蛋白质二硫键异构酶 A3 前体（protein disulfide-isomerase A3 precursor，PDIA3）（7 号）。其中 4 号和 12 号鉴定为同一蛋白（VIME），可能为同分异构体。其余 5 个蛋白点未获得有意义的结果。

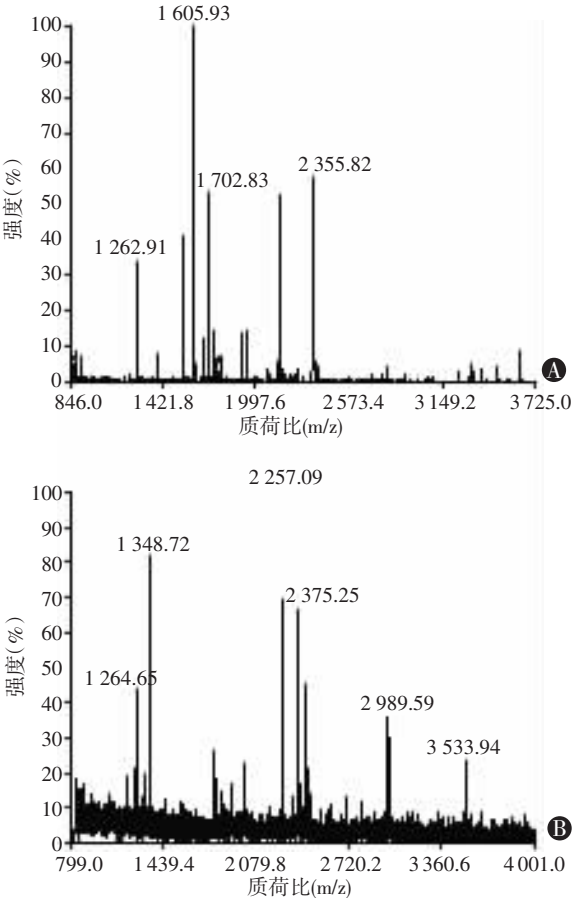


图 2　1 号（A）、2 号（B）蛋白质点肽质指纹图

3　讨论

Annexin Ⅰ是 annexins 蛋白超家族中为结构相关钙离子依赖的磷脂结合蛋白，可参与细胞信号转导、细胞分化和细胞凋亡等重要的生命过程。Annexin Ⅰ在肝癌、转移的肾细胞癌、转移的肺腺癌以及进展期的膀胱癌中表达明显上调，而在食管癌、前列腺癌、鼻咽癌中表达却明显下调[3,4]。有研究发现，Annexin Ⅰ被癌细胞自分泌至胞外，活化跨膜的甲酰肽受体，从而引发

信号通路激活，促进癌细胞的迁移和侵袭能力[5]。Annexin Ⅰ在肿瘤的发生与肿瘤演变过程中起着重要的调节作用。Tropomyosin-4 在乳腺癌[6]中的高表达、Vimentin 在前列腺癌细胞中高表达[7]，提示它们可能参与肿瘤发生、发展的某个过程，而胚胎植入与肿瘤侵袭转移特性十分相似，推测它们在胚胎植入中的发挥一定的作用。HSP90β 是细胞内最活跃的分子伴侣蛋白之一，近年来的研究认为 Hsp90 是很多癌基因通路中的重要组成部分。Hsp90 在植入前的小鼠胚胎中有表达，至囊胚发育中期表达广泛，主要位于中枢区神经系统和骨骼形成区[8]。本实验也证实了 Hsp90 在人胚胎早期发育过程中表达。推测 Hsp90 一方面参与细胞分裂、神经分化等，在胚胎发育中具有看家基因的功能；另一方面 Hsp90 作为分子伴侣，通过介导新合成的或可逆变性的蛋白质正确折叠、装配、转动和促进不需要的或不可逆变性的蛋白质降解，参与胚胎的正常发育。

目前认为 Apo-AI 是子宫容受性的标志，对胚胎着床具有促进作用，测定血清 Apo-AI 对判断自然流产的发生的预测具有指导意义[9]。本研究发现 Apo 在人正常蜕膜中表达上调，可能对蜕膜的侵袭功能有调节。生理情况下，ANXA5 调节母体与胎盘的血液循环，保持着血液的流动性。免疫荧光染色检测发现人 Annexin V 在人绒毛滋养层细胞、绒毛间质细胞、间质内血管内皮细胞中有表达[10]。推测 ANXA5 在胚胎植入过程中发挥一定作用。

综上所述，人早期胚胎绒毛和蜕膜的蛋白质组存在差异表达，这可能是胚胎植入的一个重要机制。

参考文献：

[1] Yoshinaga K. Research on Blastocyst Implantation Essential Factors (BIEFs)[J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 63(6): 413 - 424.

[2] 张群，余秋波，刘学庆，等. 小鼠胚泡植入不同时期子宫内膜组织细胞蛋白质组研究[J]. 西南大学学报(自然科学版)，2007，29(4)：62 - 66.

[3] Lim L H, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule[J]. FASEB J, 2007, 21(4): 968 - 975.

[4] 刘迎福，肖志强，张鹏飞，等. 人原发性肺腺癌转移相关分子的定量蛋白质组学研究[J]. 生物化学与生物物理进展，2009，36(4)：448 - 457.

[5] Babbin B A, Lee W Y, Parkos C A, *et al*. Annexin I regulates SKCO - 15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors[J]. J Biol Chem, 2006, 281(28): 19588 - 19599.

[6] Raval G N, Bharadwaj S, Levine E A, *et al*. Loss of expression of tropomyosin - 1, a novel class II tumor suppressor that induces anoikis, in primary breast tumors[J]. Oncogene, 2003, 22(40): 6194 - 6203.

[7] Zhao Y, Yan Q, Long X, *et al*. Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells[J]. Cell Biochem Funct, 2008, 26(5): 571 - 577.

[8] Hotchkiss R, Nunnally I, Lindquist S, *et al*. Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin [J]. Am J Physiol, 1993, 265(6 Pt 2): R1447 - R1457.

[9] 黄泽洧. 载脂蛋白 A - I 与自然流产发生关系的探讨[J]. 江西医学检验，2006，24(1)：11 - 12.

[10] 张润驹，岳亚飞，李淑红，等. 胎盘组织中 Human Annexin V 的表达及与 HBV 感染的关系[J]. 西安交通大学学报：医学版，2006，27(1)：79 - 81.

(收稿：2010-03-12 修回：2010-05-27)

(编辑 王小寒)

短篇论著

文章编号：1000-5404(2010)17-1902-03

己酮可可碱对慢性心力衰竭患者细胞因子免疫调节及 B 型利钠肽的影响

蔡伦安[1,2]，卢永昕[1]，苏冠华[1]，周 晗[3] (430022 武汉，华中科技大学同济医学院附属协和医院心血管病研究所[1]；464000 河南 信阳，河南省信阳市中心医院心血管内科[2]；450003 郑州，河南省人民医院心血管内科[3])

【摘要】 目的 探讨己酮可可碱(pentoxifylline，PTX)对慢性心力衰竭患者外周血辅助性 T 淋巴细胞(Th) Th1/Th2 细胞因子免疫调节及 B 型利钠肽(B-type natriuretic peptide，BNP)的影响。方法 心力衰竭患者分为己酮可可碱治疗组(PTX 组，17 例)和常规治疗组(常规组，18 例)，采用流式细胞分析法，检测 35 例心力衰竭患者和正常对照者(10 例)外周血 $CD4^+$ Th1 型细胞因子干扰素-γ(IFN-γ)和 Th2 型细胞因子白介素-10(IL-10)细胞百分率的变化；采用酶联免疫吸附法(ELISA)分别测定心力衰竭患者外周血肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IL-10 及 B 型利钠肽的水平；应用彩色多普勒超声诊断仪测定左心室射血分数(LVEF)的变化。结果 心力衰竭患者基线水平 $CD4^+$ Th1(IFN-γ)细胞百分率及 Th1/Th2 比值显著高于正常对照组[(18.42 ± 5.63) *vs* (6.69 ± 1.39)，$P < 0.01$]；(1.58 ± 0.78) *vs* (0.17 ± 0.04)，$P < 0.01$)，心力衰竭患者治疗 1 个月后，PTX 组与常规组比较，PTX 组 $CD4^+$ Th1(IFN-γ)细胞百分率[(11.97 ± 2.75) *vs* (15.20 ± 4.13)]和 Th1/Th2 比值[(0.82 ± 0.31) *vs* (1.33 ± 0.40)]显著降低($P < 0.01$)，外周血 TNF-α 及 B 型利钠肽水平显著降低[(80.42 ±

【通信作者】 蔡伦安，电话：(0376)6210275，E-mail：tsaiyifee@yahoo.com.cn