基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0018-04

自然流产患者绒毛 EVTs 的基因芯片初步分析

余秋波[1],胡建刚[2],王应雄[2],黎 刚[1],谭 彬[2],何俊琳[2]
(1. 重庆医科大学公共卫生学院生殖毒理教研室;2. 重庆医科大学公共卫生学院遗传优生教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨自然流产绒毛外滋养细胞(Extravillous trophoblast cells,EVTs)侵袭相关基因表达变化。方法:利用 U133 plus2.0 芯片对自然流产绒毛和正常绒毛组织中 EVTs 的基因表达谱进行检测,并用生物信息学方法对检测结果进行分析。结果:与正常 EVTs 相比,在自然流产 EVTs 中,发现显著上调基因 219 个,下调基因 293 个,其功能主要涉及细胞粘附、免疫应答、代谢等。结论:与滋养层细胞细胞粘附、免疫应答、水解酶及凋亡等相关基因的差异表达可能与滋养细胞侵袭行为变化及自然流产有关。

【关键词】自然流产;EVTs;侵袭;基因表达谱
【中国图书分类法分类号】R714.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-28

Expression profile analysis of human spontaneous abortion extravillous trophoblast cells

YU Qiu-bo, et al
(*Department of Genetic, Colledge of Public Health, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression changes of invasion-relevant genes in spontaneous abortion Extravillous trophoblast cells (EVTs). *Methods*: The U133 plus2.0 gene chips were used to analyze gene expression profiles in spontaneous EVTs and normal EVTs.The results were analyzed by bioinformatics methods. *Results*: Compared with normal EVTs, 219 and 293 genes in spontaneous abortion EVTs were up-regulated and down-regulated respectively. These genes were mainly associated with signal transduction, apoptosis, metabolism, immune response, etc. *Conclusion*: Differential expression of genes related with apoptosis, immune response, hydratase, cell adhesion may play a role in the EVTs' abnormal invasion and spontaneous abortion.

【Key words】Spontaneous abortion; EVTs; Invasion; Gene expression profiles

胚胎滋养细胞在妊娠早期向绒毛和绒毛外两个方向分化,其中只有绒毛外滋养层细胞(Extravillous trophoblast cells, EVTs)具有侵袭能力。EVTs 与子宫内膜细胞接触粘附,降解细胞外基质,迁移和侵入子宫蜕膜,使胎盘锚着在子宫上;EVTs 还侵入母体子宫螺旋动脉,替代和重塑螺旋动脉的内皮细胞层,使螺旋动脉管腔扩大,为胎盘和新生血管提供充足的血液[1,2]。EVTs 的侵袭能力决定了胚泡的侵袭性和胎盘的形成,其"有控性侵袭"行为的改变直接影响胎盘的形成和胚胎的发育。因此,研究自然流产患者 EVTs 与正常 EVTs 之间基因表达谱的变化有利于寻找 EVTs 异常侵袭和自然流产的发生机制。本文中我们利用人类全基因组芯片 U133 plus2.0,以正常 EVTs 为对照,检测自然流产绒毛 EVTs 的基因表达谱变化,并对差异基因进行功能分析,以期找出 EVTs 异常侵袭和自然流产发生的新机制。

作者介绍:余秋波(1976-),男,博士,
研究方向:自然流产的机制研究。
通讯作者:何俊琳,女,教授,E-mail:hejunlin_11@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30500054)。

1 材料和方法

1.1 材料

选择 2008 年 10 月到 2008 年 12 月在重庆医科大学附属一院妇产科门诊患者,收集妊娠 8~12 周自然流产和正常人工流产的绒毛标本各 10 例,标本收集均征得本人知情同意。自然流产组选择 B 超提示胚胎停止发育的标本,正常人工流产组选择既往无自然流产及死胎,B 超提示胚胎发育正常的标本。两组年龄均在 26~28 周岁,排除染色体异常、内分泌失调等相关疾病,孕期无重大疾病史,家族无遗传病史,孕期无致畸环境接触史。收集无菌新鲜绒毛,置液氮保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 参照 Kliman[3]方法分离正常 EVTs 和流产 EVTs,TRIzol 法分别抽提总 RNA,分光光度计和琼脂糖电泳鉴定 RNA 浓度、纯度和完整性。

1.2.2 cRNA 探针制备芯片杂交 收集纯度和完整性合格的 RNA,等量混合后,重新沉淀 RNA,70%酒精保存,在干冰的保护下交生物芯片上海国家工程研究中心完成 cRNA 探针

制备及芯片(Affymetrix)杂交扫描。

1.2.3 数据提取和差异表达基因筛选芯片 信号经 GCOS1.2 软件处理,得到 Signal Log Ratio,即实验组(自然流产绒毛)与对照组(正常绒毛)比值取"Log_2"后的值;差异基因筛选标准为 Log-Ratio≥2(上调)或 Log-Ratio≤-2(下调)。

1.3 基因芯片结果验证

选取芯片检测结果中流产 EVTs 上调的 MMP10、DSPG3 基因和下调的 EIF5A、CXCL13 基因进行 RT-PCR 验证,以 β-actin 为内参。验证基因引物设计如表 1。

1.4 差异基因功能分类和检索

我们对 Log-Ratio≥2(上调)或 Log-Ratio≤-2(下调)的基因进行了功能检索和分类。功能检索参考 Gene Ontology、NCBI Genebank 等数据库。

2 结 果

2.1 EVTs 总 RNA 抽提及质量控制

总 RNA 经紫外分光光度计检测,正常 EVTs 为 1.38 μg/μl,流产 EVTs 为 1.70 μg/μl, A_{260}/A_{280} 为均大于 1.9, 接近 2.0; RNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳分析 (图 1),28SrRNA 和 18SrRNA 电泳条带清晰, 两者灰度比值约为 2:1,RNA 完整性较好,总 RNA 浓度、纯度及完整性符合实验要求。

2.2 芯片数据处理

芯片数据经处理后,得到流产 EVTs- 正常 EVTs 信号散点图(图 2)。

2.3 RT-PCR 验证芯片数据的可靠性

RT-PCR 产物电泳结果如下(图 3- 图 6)。结果与基因芯片数据基本一致(表 2),说明芯片数据是可靠的。

2.4 差异基因功能分类检索及生物学功能注释

基因芯片经扫描和数据处理,得到 Log-Ratio≥2 的上调基因 219 个,Log-Ratio≤-2 的下调基因 293 个,按 Gene Ontology 功能分类标准对其进行功能分类检索,如表 3;选取上调及下调的各前 15 位基因进行功能注释,如表 4(上调)和表 5(下调)。

3 讨 论

对差异表达基因进行功能分析发现, 流产 EVTs 主要涉及细胞粘附分子、免疫调节因子、代谢调节等相关基因的表达变化。

本实验中, 发现细胞外基质及细胞粘附分子相关基因表达下降,如粘附分子 ICAM2、Cadherin 1,Mucin 15;而基质水解酶相关基因表达上调,如 MMP10、MMP3,其抑制因子相关基因表达下降, 如 TIMP1,TIMP2。粘附分子表达下调,使 EVTs 与子宫内膜细胞间连接疏松,不利于 EVTs 粘附,容易导致胚胎流产[4]。胚胎对于母体属同种异体移植物。正常妊娠时,胚胎 EVTs 细胞入侵子宫内膜而不被排斥,是因为母体对于胚胎具有"容受性",母体免疫系统对于胚胎处于非活化状态[5]。芯片检测结果发现,应激反应、细胞防御反应、免疫应答相关基因在自然流产 EVTs 中表达呈增强的趋势,如 HLA-

表 1 验证基因 RT-PCR 引物

基因名称	正义(F)/反义(R)	引物序列	产物长度
MMP10	F	CAATTTATTCCTCGTTGCT	492 bp
	R	CGTCCAATAGGTTCTCCG	
DSPG3	F	GACTTGATTCATCGTGGCG	226 bp
	R	TGTTGCAATAAGTTGTATG	
EIF5A	F	TATCTGCCCGTCAACTCATAAT	621 bp
	R	CACCTAAGACCGTTTACCA	
CXCL13	F	GCATGCTAATCGCTCGTGGT	208 bp
	R	GATGCTGCTCGTCTACTGATCAG	
β-actin	F	AGCGGGAAATCGTGCGTGAC	386 bp
	R	AGACTTCTAGTTCTAGTAACGAG	

表 2 RT-PCR 与芯片结果的比较

基因名称	基因文库号	目的基因/β-actin 灰度 ($\bar{x} \pm s$)		流产 EVTs/ 正常 EVTs 比率	由基因芯片所得到的 ratio
		正常 EVTs	流产 EVTs		
MMP10	NM_002425	0.049 ± 0.002	0.824 ± 0.005	4.1*	5.5
DSPG3	NM_004950	0.035 ± 0.003	0.743 ± 0.004	3.9*	5.4
EIF5A	NM_001970	0.685 ± 0.005	0.086 ± 0.004	-3.97*	-5.3
CXCL13	NM_006419	0.583 ± 0.002	0.074 ± 0.003	-4.36*	-5.5

*表示该值为流产 EVTs/ 正常 EVTs 比值取 Log_2 后的值

表 3　差异表达基因的 Gene Ontology 分类

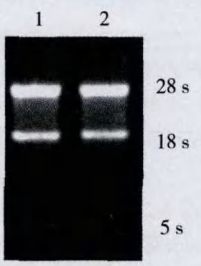
Gene Ontology 分类	上调基因数目	下调基因数目
细胞外基质相关基因	14	19
信号转导相关基因	39	34
转录调节相关基因	35	20
细胞生长/维持相关基因	10	8
代谢相关基因	42	24
凋亡相关基因	7	5
物质转运相关基因	17	20
细胞周期相关基因	20	18
应激反应相关基因	9	7
细胞防御反应相关基因	4	7
免疫应答相关基因	7	3
细胞黏附相关基因	35	38
发育相关基因	8	5
功能未分类基因	54	115
合计	304*	323*

*同一个基因可能涉及不同功能组

表 4　15 个上调差异表达基因功能注释

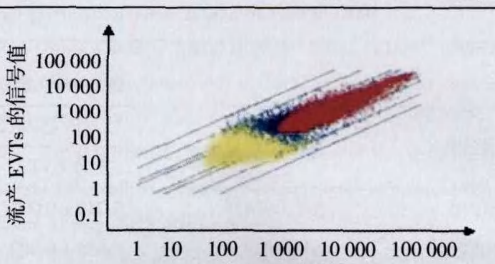
基因名称	法定公开号	唯一基因号	比值	基因功能
MMP10	NM_002425	Hs.2258	5.5	hydrolase activity*
DSPG3	NM_004950	Hs.506285	5.4	glycosaminoglycan binding,traceable
LRRC	AU147799	Hs.288467	5.4	-
IL8	NM_000584	Hs.624	5.3	chemokine activity,interleukin-8 receptor binding*
HLA-DRB4	BC005312	Hs.534337	5.2	MHC class Ⅱ receptor activity*
ADM	NM_001124	Hs.441047	5	hormone activity
MMP3	NM_002422	Hs.375129	5	calcium ion binding, hydrolase activity*
IL13RA2	NM_000640	Hs.336046	5	Interleukin receptor activity, receptor activity*
UTS2	NM_021995	Hs.162200	4.9	hormone activity
-	AW337833	-	4.8	-
WNT4	NM_030761	Hs.302428	4.7	signal transducer activity
IL1RL1	NM_003856	Hs.66	4.6	iterleukin-1 receptor*
SOD2	AL050388	Hs.384944	4.6	manganese ion binding, oxidore ductase activity
KCND2	NM_012281	Hs.21703	4.5	protein binding
IL6	NM_000600	Hs.130210	4.4	cytokine activity, interleukin-6 receptor binding
ENO2	NM_001975	Hs.146580	4.3	lyase activity, magnesium ion binding

*表示参与肿瘤和(或)滋养层细胞侵袭行为调节的基因



1. 正常 EVTs；2. 流产 EVTs

图 1　EVTs 总 RNA 电泳图



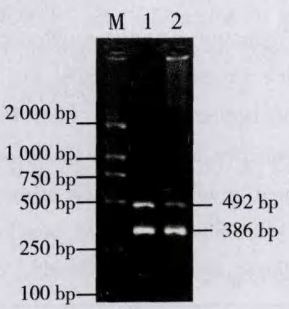
图中红色的点表示该基因在两种细胞中均有表达；蓝色的点表示该基因只在一种细胞中表达；黄色的点表示这些基因在两种细胞中均没有表达。

图 2　流产 EVTs- 正常 EVTs 信号散点图

表 5 15 个下调差异表达基因功能注释

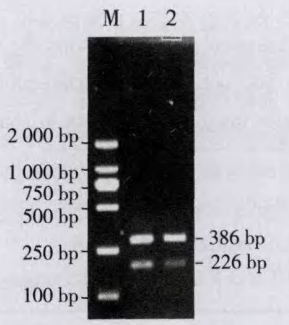
基因名称	法定公开号	唯一基因号	比值	基因功能
TAGLN	BC010946	Hs.512705	-5.7	actin binding
CXCL13	NM_006419	Hs.100431	-5.5	chemokine activity
EIF5A	NM_001970	Hs.310621	-5.3	nucleic acid binding, translation factor activity *
KIAA1324	AI565067	Hs.104696	-5.3	-
DPP4	M80536	Hs.44926	-5.1	hydrolase activity,prolyl oligopeptidase activity*
SCGB1D2	NM_006551	Hs.204096	-5	-
MMP26	NM_021801	Hs.204732	-4.9	hydrolase activity ,metalloendopeptidase activity,
KCNAB1	L39833	Hs.157818	-4.7	potassium channel regulator activity
SIAT7A	Y11339	Hs.105352	-4.7	alpha-2,6-sialyltransferase activity,sialyltransferase activity*
HGD	NM_000187	Hs.116992	-4.6	oxidoreductase activity
AKR1C3	AB018580	Hs.78183	-4.4	prostaglandin-F synthase activity*
DPP4	M74777	Hs.44926	-4.3	aminopeptidase activity, dipeptidyl*
-	AW467136	-	-4.3	-
CD36	M98399	Hs.443120	-4.2	protein binding, receptor activity
MUC15	R79759	Hs.24139	-4.2	-

*表示参与肿瘤和(或)滋养层细胞侵袭行为调节的基因



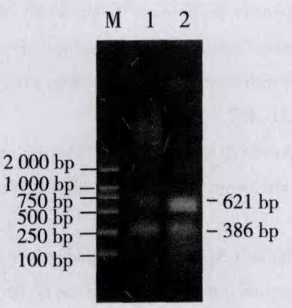
M. DL2000；1. 流产 EVTs；2. 正常 EVTs

图 3 MMP10 的 RT-PCR 结果



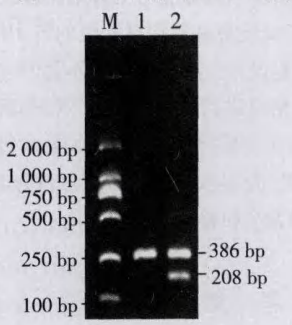
M. DL2000；1. 流产 EVTs；2. 正常 EVTs

图 4 DSPG3 的 RT-PCR 结果



M. DL2000；1. 流产 EVTs；2. 正常 EVTs

图 5 EIF5A 的 RT-PCR 结果



M. DL2000；1. 流产 EVTs；2. 正常 EVTs

图 6 CXCL13 的 RT-PCR 结果

DRB4、IL1RL1、IL13RA2、IL8 相关基因上调，HLA-G 下调；MHCI 通路中 HSP70、KIR 基因上调。EVTs 表达 KIR 增强，可以直接促进自然杀伤(NK)细胞介导的细胞毒活性。Quenby S 等[6]研究认为 NK 细胞活性增强与 EVTs 异常侵袭和流产密切相关；Shimada S 等[7-9]研究认为 EVTs 表达 HLA 分子(HLA-C，HLA-G，HLA-E)，与 NK 细胞的 inhKIR-fetal HLA-C 共同组成同种(异体)识别系统。因此，HLA-G 的下调能使这种识别系统功能减弱，NK 细胞毒性增强，不利于 EVTs 侵袭子宫内膜。胎儿正常妊娠时，EVTs 的物质转运和代谢是相当活跃的。在本实验中，发现了一些如 ATP8A2、RGS1、APOA1 等与能量代谢、脂转运等相关基因的上调，但同时也发现一些如 EIF5A、KIAA、AKR1C3 等与转录调节、离子转运、蛋白合成与转运、生长发育等相关基因的下调[10]。这些变化提示，在自然流产的 EVTs 中，蛋白的转录合成、转运和代谢相对受到抑制。

本研究表明，流产 EVTs 涉及多基因共同调控，其中凋

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0022-03

多囊卵巢综合征差异蛋白质组分析

秦 芬,丘 彦,杨 曦,孟江萍
(重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心,重庆 400016)

【摘 要】筛选和鉴定与多囊卵巢综合征相关蛋白。方法:以固相 pH 梯度等电聚焦为第一向,垂直平板十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳为第二向进行血清蛋白质分离;图像分析软件 PDQuest 7.3 分析电泳图谱寻找有意义的差异蛋白点,运用 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定,分析其意义。结果:选取具有明显差异的 3 个蛋白点进行质谱鉴定,经数据库查询,2 个蛋白点获得了有意义的结果分别为载脂蛋白 A-Ⅰ(Apolipoprotein A-Ⅰ,ApoA-Ⅰ),热休克蛋白 70(Heat shock protein,HSP70)。结论:多囊卵巢综合征患者与正常妇女的血清蛋白表达存在差异,这些差异蛋白有可能是多囊卵巢综合征特异相关性蛋白,并有可能成为多囊卵巢综合征诊断的分子标志物。

【关键词】多囊卵巢综合征;血清;蛋白质组
【中国图书分类法分类号】R332 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-07

Proteomic analysis of serum from patients with polycystic ovary syndrome

QIN Fen, et al
(*Center of Assisted Reproduction, the First Affiliated Hospitial, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To find out disease specific-proteins (DSPs) which are closely collelated with Polycystic ovary syndrome. *Methods*: proteins ext racted from serum were run in immobilized pH gradient isoelectic focusing (IPG-IEF) at the first dimension.The proteins pots in gels were visuali zed by silver staining protocol followed by gel scanning and analysised by Pdquest 7.3 software. The differentially displayed protein spot s were searched and identifiyed by MALDI-TOF-MS. spots associated with PCOS.

作者介绍:秦 芬(1984-),女,硕士,
研究方向:生殖内分泌。
通讯作者:丘 彦,女,教授,E-mail:cqartq@163.com。
基金项目:重庆市自然科学基金项目(编号:2007BB5300)。

亡、免疫应答、水解酶等相关基因上调,以及细胞粘附、转录因子、细胞周期调节相关基因下调可能与滋养细胞侵袭行为变化和自然流产有关。本实验将患者和对照组的各 10 例总 RNA 分别等量混合,在实验设计上存在一定的不足。在后续的研究中,我们将对芯片结果进行进一步验证,对表达有明显差异的基因进行深入的功能研究,了解 EVTs 异常侵袭和自然流产的复杂病理过程,为揭示 EVTs"有控制性侵袭"母体子宫内膜和自然流产的发生机制提供依据。

参 考 文 献

[1] Askelund K, Liddell H S, Zanderigo A M, et al.CD83$^+$ dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy [J].Placenta, 2004, 25(2-3): 140-145.

[2] Blomberg L, Hashizume K, Viebahn C. Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation[J]. Reproduction, 2008, 135(2): 181-195.

[3] Kliman H J, Nestler J E, Sermasi E, et al.Purification, characterization, and invitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae[J].Endocrimology, 1986, 118(4): 1567-1582.

[4] Hannan N J, Salamonsen L A.CX3CL1 and CCL14 regulate extracellular matrix and adhesion molecules in the trophoblast: potential roles in human embryo implantation[J].Biol Reprod, 2008, 79(1): 58-65.

[5] Yamada H, Shimada S, Morikawa M, et al. Divergence of natural killer cell receptor and related molecule in the decidua from sporadic miscarriage with normal chromosome karyotype[J]. Mol Hum Reprod, 2005, 11(6): 451-457.

[6] Quenby S, Farquharson R.Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage[J].Reprod Biomed Online, 2006, 13(1): 24-28.

[7] Shimada S, Nishida R, Takeda M, et al. Natural killer, natural killer T, helper and cytotoxic T cells in the decidua from sporadic miscarriage[J]. Am J Reprod Immunol, 2006, 56(3): 193-200.

[8] Ordi J, Casals G, Ferrer B, et al. Uterine (CD56$^+$) natural killer cells recruitment: association with decidual reaction rather than embryo implantation[J]. Am J Reprod Immunol, 2006, 55(5): 369-377.

[9] Varla-Leftherioti M.The significance of the women's repertoire of natural killer cell receptors in the maintenance of pregnancy[J]. Chem Immunol Allergy, 2005, 89(4): 84-95.

[10] Wu G, Aoyama C, Young SG, et al.Early embryonic lethality caused by disruption of the gene for choline kinase alpha, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis[J]. J BiolChem, 2008, 283(3): 1456-1462.

(责任编辑:关蕴良)