基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1354-04

PCNA 在小鼠胚胎着床过程中的作用

孟 君,魏莎莉,覃致远,张 谭,杜 芳,王庆跃
(重庆医科大学公共卫生学院生殖生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在小鼠胚胎着床过程中的作用。方法:实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time Fluorescence Quantitative PCR, Real -time FQ-PCR)技术检测未孕及孕 2、3、4、5、6、7 d(分别记为 d0、d2、d3、d4、d5、d6、d7)小鼠子宫内膜 PCNA mRNA 的表达;子宫角注射 PCNA 单克隆抗体观察胚泡着床数。结果:FQ-PCR 测得随着小鼠妊娠天数的增加,PCNA mRNA 表达量也逐渐增高,在孕 d4、d5 达到峰值,孕 d6、d7 逐渐下降。子宫角注射 PCNA 单克隆抗体后胚泡着床数明显减少。结论:PCNA 在妊娠早期子宫内膜持续表达,可能参与了胚泡着床。

【关键词】PCNA 子宫内膜;植入;FQ-PCR;子宫角注射
【中国图书分类法分类号】R394 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-11

Effect of PCNA in the mouse uterus during embryo implantation

MENG Jun, et al
(*Department of the Reproductive Physiology, Public Health Institute, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of PCNA in the mouse uterus during embryo implantation. *Methods*: Real-time fluorescence quantitative PCR (FQ -PCR) was used to detect the PCNA mRNA of the mouse of unpregnancy, pregnancy at d2, d3, d4, d5, d6 and d7. PCNA monoclonal antibody was injected in horn of uterus at pregnant d3. *Results*: The expression of PCNA mRNA showed gradual hoist trend as days passed , and at pregnant d4, d5 it reached the maximum, at pregnant d6, d7 it showed gradual descent trend. The number of blastocysts in horn of uterus which was injected PCNA monoclonal antibody was smaller than in that of injected with Saline. *Conclusion*: PCNA is persistently expressed in mouse endometrium during the early pregnancy and maybe participates in the regulation process of mouse blastodysts implantation .

【Key words】PCNA; Endometria; Implantation; Real-timefluorescence quantitative PCR (FQ-PCR); Intrauterine injection

作者介绍:孟 君(1981-),女,硕士,
研究方向:胚泡着床的分子生物学机制。
通讯作者:魏莎莉,女,副教授,E-mail: zwz007cn@yahoo.com.cn。

[2] 贺光照,黄崇本,张代录,等.青蒿素局部治疗增殖性瘢痕临床观测[J].重庆医科大学学报,1998,23(3):260-261.
[3] 曹治东,石崇荣,黄崇本.青蒿素对体外瘢痕成纤维细胞的生物学影响[J].重庆医学,2003,32(5):521-523.
[4] Norton JD.Id helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis[J].J Cell Sci, 2000,113(Pt 22):3897-3905.
[5] Chaudhary J,Sadler-Riggleman I,Ague J M,et al.The helix-loop-helix inhibitor of differentiation(ID) proteins induce postmitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate[J]. Biol Reprod,2005,72(5):1205-1217.
[6] Leeanansaksiri W,Wang H,Gooya J M,et al.IL-3 induces inhibitor of DNA-binding protein-1 in hemopoietic progenitor cells and promotes myeloid cell development[J].J Immunol,2005,174(11):7014-7021.
[7] Alani R M,Hasskarl J,Grace M,et al.Immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein,Id-1[J].Proc Natl Acad Sci USA ,1999,96(17):9637-9641.
[8] Nickoloff B J,Chaturvedi V,Bacon P,et al.Id-1delays senescence but does not immortalize keratinocytes[J]. J Biol Chem,2000,275(36): 27501-27504.
[9] Schoppmann S F,Schindl M,Bayer G,et al.Overexpression of Id-1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer[J]. Int J Cancer,2003,104(6):677-680.
[10] Lee K T,Lee Y W,Lee J K,et al.Overecpression of Id-1 is significantly associated with tumour angiogenesis in human pancreas cancers[J]. Br J Cancer,2004,90(6):1198-1203.
[11] Coppe J P,Itahama Y,Moore D H,et al.Id-1and Id2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression[J]. Clin cancer Res,2004,10(6):2044-2051.
[12] Takai N,Miyazaki T,Fujisawa K,et al.Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma[J]. Cancer Lett,2001,165(2):185-193.
[13] Wong YC,wang X,ling MT.Id-1 expression and cell survival[J]. Apoptosis,2004,9(3):279-289.
[14] 姚庆军,陈 壁,胡大海,等.烧伤后不同瘢痕组织中 p16 基因的缺失与突变分析[J].西北国防医学杂志,2005,23(2):105-107.
[15] Pagliuca A,Gallo P,De Luca P,et al. Class A helix-loop-helix proteins are positive regulators of several cyclin-dependent kinase inhibitors' promoter activity and negatively affect cell growth [J].Cancer Res,2000,60(5):1376-1382.

(责任编辑:关蕴良)

胚泡着床是极其复杂的生理过程,在此过程中胚胎与子宫内膜发生极其复杂而精细的协同作用,涉及细胞增殖、细胞凋亡等复杂的分子事件,着床的成败与这一系列变化密切相关[1]。

增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是常用作细胞增殖的一个标记分子。近年的研究发现 PCNA 与细胞 DNA 合成关系密切,是 DNA 聚合酶 δ 的推动因子,并且参与了细胞凋亡等重要的细胞事件,在不同的调控通路中 PCNA 可以作为多种蛋白的功能转换因子发挥作用[2,3]。此外,肿瘤领域研究证实,PCNA 高表达会导致肿瘤侵袭性转移能力增强[4],而胚胎着床与肿瘤侵袭性转移之间具有高度相似的生物学行为,故推测 PCNA 可能参与胚泡着床过程。因此,本研究首次采用实时荧光定量聚合酶链反应 (Real-time fluorescence quantitative PCR, Real-time FQ-PCR)定量分析 PCNA 在妊娠早期子宫内膜的表达,用子宫角注射法观察 PCNA 单克隆抗体对胚泡着床的影响,初步探讨它在小鼠胚泡着床过程中的作用,为进一步探讨胚胎着床机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 NIH 小鼠,6~8 周龄,质量(23 ~ 25 g),由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(渝)20050002]。选择动情周期中任意时期的雌鼠按雌、雄比例 2:1 与雄鼠合笼交配,次晨发现有阴栓者为妊娠第 1 d,依次计算妊娠天数。随机将未孕小鼠和孕鼠分为 7 组(分别记为 d0、d2、d3、d4、d5、d6、d7),每组 20 只。断颈处死,取无菌条件下子宫内膜备用。再取 20 只孕 3 d 的小鼠,随机分为两组,进行子宫角注射。

1.1.2 主要试剂及仪器 FQ-PCR 引物和荧光探针由上海基康公司设计并合成。TRizol reagent、M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司。Taq DNA 聚合酶由 Ta-KaRa 公司提供,ABI TaqMan 2 × PCR Master mix 购自上海基康公司,鼠抗人 PCNA 单克隆抗体购自武汉博士德生物公司;荧光定量 PCR 仪 ABI 7900HT 型。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的制备及 cDNA 合成 按照 TRIizol 试剂的说明书提取小鼠子宫总 RNA,所提取的总 RNA 通过电泳和测定 A 值判断总 RNA 的质和量。25 μl 反应体系中总 RNA 1 μg,Olig-DT 500 ng,5 × 缓冲液 5 μl,M-MLV (200 U/μl) 1 μl,RNAi (25 U) 0.5 μl,dNTPs (10 mmol/L) 5 μl,加 DEPC-H_2O 至 25 μl,70℃ 5 min,42℃ 60 min,70℃ 10 min 进行逆转录反应。

1.2.2 荧光定量 PCR 标准品的制备 在实时荧光定量 PCR 中需要制备标准品以产生标准曲线,普通 PCR 仪上进行 β-actin 片断的 PCR,获得 351 bp 的产物,胶回收纯化 PCR 产物。与 PMD18-T 载体建立连接反应,产生 PMD18-T 载体 + β-actin 基因片断的质粒,蓝白斑筛选,转入感受态细菌扩增,抽提纯化质粒,酶切,PCR,测序。紫外分光光度计检测 OD_{260} 值并计算质粒浓度及换算拷贝数。梯度稀释质粒,得到 10^8、10^7、10^6、10^5、10^4、10^3 copies/μl 的质粒。

1.2.3 荧光定量 PCR 标准曲线的制备和数据分析 用已知 β-actin 质粒拷贝数的模板进行扩增得到 CT 值,与其对应的起始拷贝数的自然对数作图,得到一标准曲线(R≥0.99)。根据同时扩增的未知样品的 CT 值,仪器自动在标准曲线上产生它的起始拷贝数。

1.2.4 FQ-PCR 以 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板扩增 PCNA 和 β-actin(引物和探针序列见表 1)。20 μl 反应体系中含 0.25 μl 探针(20 μmol/L),引物 1(20 μmol/L)0.45 μl,引物 2(20 μmol/L)0.45 μl,H_2O 1.85 μl,ABI TaqMan 2 × PCR Master mix (2 ×)15.0 μl,cDNA 模板 2.0 μl。扩增反应条件 95℃ 10 min,预变性 95℃ 15 s,60℃ 60 s 收集荧光信号,72℃ 30 s,共 40 个循环。每一个样本做 3 个平行管。

1.2.5 小鼠子宫角注射 将 20 只妊娠 3 d 的小鼠随机分为两组:对照组(10 只),双测子宫角均注射生理盐水;试验组

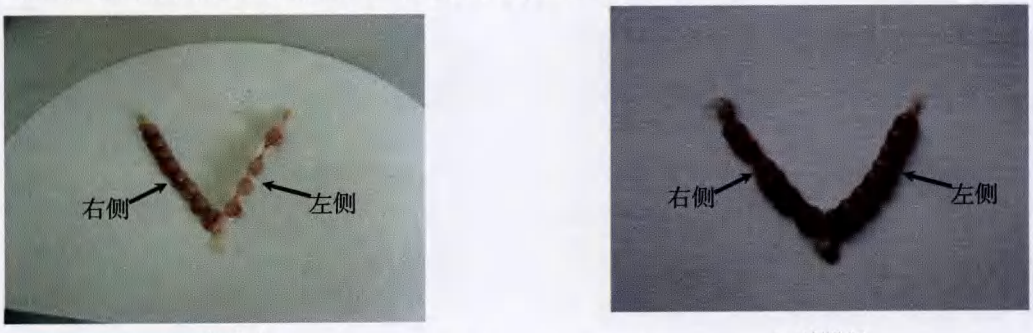
表 1 引物及探针序列

基因	引物序列
PCNA-FP	5'-CACCTTAGCACTAGTATTCGAAGCAC-3'
PCNA-RP	5'-CACCCGACGGCATCTTTATTAC-3'
PCNA-Probe-FAM	5'-F-CAGCTGTACTCCTGTTCTGGGATTCCAAGT-TAMARA -3'
MA-outer-FP	5'-ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3'
MA-outer-RP	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCT-3'
β-actin-FP	5'-CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC-3'
β-actin-RP	5'-TAGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT-3'
β-actin- Probe -FAM	5'-F-TCCTTCTTGGGTATGGAATCCTGTGGC-P-3'

表 2 PCNA 在妊娠 0~7 d 小鼠子宫内膜组织的相对表达量

妊娠天数	d 0*+	d 2*+	d 3+	d 4#+	d 5#+	d 6+	d 7*+
PCNAmRNA /β-actin mRNA	$(2.151 \pm 1.006) \times 10^{-4}$	$(2.821 \pm 1.314) \times 10^{-4}$	$(3.363 \pm 1.477) \times 10^{-2}$	$(5.236 \pm 2.346) \times 10^{-2}$	$(5.841 \pm 3.001) \times 10^{-2}$	$(2.101 \pm 1.049) \times 10^{-2}$	$(6.003 \pm 2.749) \times 10^{-3}$

* 组间比较 $P>0.05$；# 组间比较 $P>0.05$；+：其余各组两两组间比较 $P<0.05$



A 实验组　　B 对照组

图 1 小鼠子宫角注射 PCNA 单克隆抗体结果

（10 只），左侧子宫角注射 PCNA 单克隆抗体，右侧子宫角注射生理盐水对照。以上各组小鼠于妊娠 3 d 晚上 8 点子宫角分别缓慢注入 1∶100 稀释的 PCNA 单克隆抗体 8 μl 或生理盐水 8 μl（注射过程大于 3 min），具体步骤按 Maria J. Illera[12] 介绍的方法进行。待妊娠 8 d 剖腹取出子宫，肉眼观察并统计胚泡着床数。

1.3 统计学处理

每一个实验组 PCNA 基因 mRNA 拷贝数与 β-actin 基因 mRNA 拷贝数之比值作为实验结果（表 2），以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示；用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理，组间比较采用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 荧光定量 PCR 结果判定。

由表 2 中可以看出，FQ-PCR 测得未孕和孕各组小鼠子宫内膜组织均有 PCNA 表达，其中 d3、d4、d5、d6 组 PCNA/β-actin mRNA 的比值明显大于 d0、d2、d7 组（差异有统计学意义），且随着妊娠天数的增加，PCNA 的表达逐渐增强，到妊娠 d5 达到最高，d6、d7 组逐渐降低。方差分析显示 d0、d2、d7 组间无统计学意义（$P>0.05$）；d4、d5 组间无统计学意义（$P>0.05$）；其余各组两两比较组间均有统计学意义（$P<0.05$）。

2.2 子宫角注射 PCNA 单克隆抗体结果（见图 1）

实验组左右侧子宫胚泡着床数分别为 2.1±0.988 9 和 6.2±0.918 9；对照组左右侧子宫胚泡着床数分别为 7.1±0.875 6 和 6.7 ± 1.059 3，实验组注射 PCNA 单克隆抗体的左侧胚胎着床数较右侧明显下降，$P \leqslant 0.05$，差异有显著性。对照组左右侧子宫胚泡着床数无明显差异。

3 讨 论

PCNA 是伴随细胞增殖而表达的一种核内蛋白，与细胞的增殖周期密切相关，PCNA 在增殖细胞中的含量变化有明显的周期性，在 G_0 期基本无表达，G_1 晚期开始增加，在 S 期达高峰，G_2 期~M 期迅速下降。PCNA 具有众多生物学功能，在真核生物 DNA 复制的过程中，PCNA 是 DNA 聚合酶 δ 的推动因子，在细胞增殖的启动过程中起重要作用[5, 6]。另外，PCNA 还可与凋亡相关蛋白 P21 结合形成复合体，已知 P21 的 N 末端具有保守的 CDK/cyclin 结合位点，C 末端具有与 PCNA 结合的位点。PCNA-P21 复合体可以和多种 CDK/cyclin 形成四聚体，使 CDK 活性被抑制，从而影响 RB 蛋白磷酸化和与之结合的转录因子的释放，导致细胞不能通过 G1 期检验点进入 S 期，引发细胞凋亡[7, 8]。此外，PCNA 与 DNA 聚合酶 δ 的结合位点，可以被 P21 所竞争，从而直接阻止 DNA 的合成[9]。

细胞的增殖与凋亡发生在哺乳动物生殖过程中的每一个环节。在小鼠胚胎着床过程中，胚胎黏附时，子宫内膜间质细胞增殖分化成蜕膜细胞并逐渐向周围扩展，而早期形成的蜕膜细胞又依照同样的方向不断地退化凋亡，从而允许胚泡在着床窗口

期顺利着床。蜕膜细胞的增殖和凋亡在动态平衡中协调蜕膜细胞的数量和滋养层细胞的侵入,对于胚胎的成功植入和妊娠的维持起关键作用[10]。

本研究运用实时荧光定量 PCR 技术对未孕的小鼠和妊娠 d2、d3、d4、d5、d6、d7 小鼠的子宫内膜 PCNA 的表达进行研究,结果显示早孕各组 PCNA mRNA 的表达均与未孕组比较,PCNA mRNA 在 d3 表达量明显增加,d4、d5 达高峰,d6 开始下降,但仍明显高于未孕组,d2、d7 则接近未孕水平。该结果表明 PCNA 在胚泡着床窗口期表达量最高,故认为 PCNA 可能参与了胚泡着床过程。推测可能是由于胚泡与子宫内膜接触时,通过某种信号的传递,激活 PCNA,使其与 DNA 聚合酶 δ 结合,启动细胞增殖过程,引起子宫内膜增殖并发生蜕膜化转变,表现为细胞增殖分裂,使子宫腔内膜变成一个能吸附胚泡的表面。内膜腺体分泌粘多糖,间质细胞分裂活跃,这些都为胚泡着床作好准备。小鼠子宫蜕膜化过程中,当细胞增殖到一定程度后,某些凋亡因子被激活,使细胞按其分化扩展的方向不断退化和死亡,维持子宫内膜细胞的增殖与凋亡处于动态平衡状态,从而为胚胎的生长提供更大的空间。朱谨等研究发现,凋亡因子 P21 在早孕小鼠子宫内膜的表达在 d6、d7 达到高峰[11],而 P21 可与 PCNA 形成复合体,抑制 PCNA 对 DNA 聚合酶 δ 的推动作用,并启动细胞凋亡过程[9],这可能是本研究 d6、d7 组 PCNA 表达开始下降的原因。PCNA 表达下降,导致 d6、d7 细胞增殖速度减慢,从而有利于基质细胞按其分化的方向不断凋亡,使滋养细胞能够顺利侵入,并有利于妊娠的维持和胚胎的生长。为进一步研究 PCNA 对胚泡着床的影响,我们参照 Illera 法[12]进行在体试验,结果显示:单侧子宫角注射 PCNA 单克隆抗体可达到显著抑制胚泡着床的效果,但不能够达到完全抑制。推测其作用的途径可能是外源性的 PCNA 单克隆抗体抑制 PCNA 对 DNA 聚合酶 δ 的推动作用,DNA 复制减少,导致子宫内膜细胞增殖与分化过程受阻,影响子宫内膜蜕膜化,使子宫内膜对胚泡的黏附作用减弱,并且因细胞的增殖过程受阻,使蜕膜细胞的增殖和凋亡不能维持在动态平衡状态,滋养层细胞不能够顺利侵入子宫内膜,最终影响胚泡顺利着床。

总之,本实验研究表明了 PCNA 在早孕小鼠子宫内膜有规律性的持续表达,可能参与了胚泡着床过程,但其作用机制尚有待深入研究。

参 考 文 献

[1] Lawson RA, Parr RA, Cahill LP. Evidence for maternal controlof blastocyst growth after asynchronous transfer of embryos to the uterus of the ewe[J]. J Reprod Fertil, 1983, 67(2): 477-483.

[2] Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A dancer with many partners[J]. Journal of Cell Science, 2003, 116 (15): 3051-3060.

[3] 宋楠萌,桑建利,徐 恒. 增殖细胞核抗原(PCNA)的分子结构及其生物学功能研究进展[J].自然科学进展,2006,16(10):1201-1209.

[4] 肖秀英,祁晓丽.PCNA 在恶性肿瘤中的研究进展[J].张家口医学院报,2003,20(6):42-44.

[5] Fisher P A, Moutsiakis D L, McConnell M, et al. A single amino acid change (E85K) in human PCNA that leads, relative to wild type, to enhanced DNA synthesis by DNA polymerase past nucleotide base lesions (TLS) as well as on unmodified templates [J].Biochemistry, 2004, 43 (4): 15915-15921.

[6] Bravo R, Frank R, Blindeu P A. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein to DNA polymerase-delt[J]. Nature, 1987, 326(8):515-518.

[7] Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and P21 are components of multiple cell cycle kinase complexes [J]. Molecular and Cellular Biology, 1993, 4(3):897-906.

[8] Koundrioukoff S, Jonsson Z O, Hasan S, et al. A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation[J]. Biological Chemistry, 2000, 275(30):22882-22887.

[9] Cazzalini O, Perucca P, Nishida M, et al. P21 does not interfere with loading of PCNA at DNA replication sites, but inhibits subsequent binding of DNA polymerase delta at the G1/S phase transition[J]. Cell Cycle, 2003, 2(6):596-603.

[10] Correia-da-Silva G, Bell SC, Pringle JH.Patterns of uterine cellular Proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy[J]. Placenta, 2004, 25(6):538-47.

[11] 朱 瑾,周剑萍,刘银坤,等. 妊娠早期小鼠子宫内膜原癌基因 H-ras 的表达[J]. 生殖医学杂志,2002,11(3):163-167.

[12] Illera M J, Cullnan E, Gui Y T, et al. Blockade of the $\alpha v \beta 3$ integrin adversely affects implantation in the mouse[J]. Biology of Reproduction, 2000, 62(5):1285-1290.

(责任编辑:关蕴良)