基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1466-03

TACE-TGF-α 相互作用参与胚泡着床的机制研究

杨 环[1],朱兴春[2],杨 戎[1],张文文[1],刘 帅[1]

(1.重庆医科大学公共卫生学院生殖生理教研室,重庆 400016;2.川北医学院检验科,南充 637000)

【摘 要】目的:探讨胚泡着床过程中转化生长因子 α(Transforming growth factor-α,TGF-α)对肿瘤坏死因子-α 转化酶(Tumor necrosis factor- converting enzyme,TACE/ADAM17)的反馈调控机制。方法:用逆转录聚合酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction,RT—PCR)和免疫组化的方法分别检测实验组(注射 TGF-α 抗体)和对照组(注射小鼠血清)后子宫内膜 TACE mRNA 和蛋白的表达。结果:对照组 TACE mRNA 和蛋白明显高于实验组。结论:在胚胎着床过程中,TGF-α 能反馈调控 TACE 在子宫内膜的表达,TACE-TGF-α-EGFR 途径可能是胚胎着床的调控机制之一。

【关键词】胚胎着床;肿瘤坏死因子-α 转化酶;转化生长因子 α;子宫内膜;免疫组化;逆转录聚合酶链反应

【中国图书分类法分类号】R394 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-08

The regulation investigation of the interaction between TACE and TGF-α

YANG Huan, et al

(*Department of Reproductive Biology, College of Public Health, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the feedback regulation of transforming growth factor α (TGF-α) to tumor necrosis factor-α converting enzyme. *Methods*: Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunochemistry were applied to detect TACE mRNA and protein in mice endometria of experiment group (TGF-α antibody was injected) and control group (saline was injected). *Results*: The expressions of TACE mRNA and protein in control group were higher than in experiment group. *Conclusion*: TGF-α could feedback on TACE expression in mice endometria and TACE-TGF-α-EGFR might one of the regulations during blastocyst implantation.

【Keywords】Blastocyst implantation; Tumor necrosis factor alpha converting enzyme(TACE); Transforming growth factor-α (TGF-α); Endometria; Immunochemistry; RT-PCR

肿瘤坏死因子转换酶(Tumor necrosis factor-α converting enzyme,TACE/ADAM17/CD156q)属于膜于膜结合糖蛋白家族,即解整合素-金属蛋白酶(A disintegrin and metalloprotease,ADAM)家族,又归入锌离子结合蛋白超家[1]。有研究发现 TACE 在早孕子宫内膜的腔上皮和腺上皮上都有表达,于孕 4d 达到高峰,子宫角注射 TACE 抗体后植入胚胎数目明显减少(文章待发)。转化生长因子-α(Transforming growth factor-α, TGF-α) 是人类发现的第 1 个多肽类的有丝分裂原-表皮生长因子(Epithelia growth factor,EGF)家族的重要成员[2],TGF-α 在围着床期子宫基质及上皮细胞均有表达,TGF-α 抗体显著抑制雌激素倡导的子宫内膜增生过程,其可能参与了子宫内膜容受态的形成过程[3,4]。有研究发现,在大部分肿瘤里,高表达的 TACE 可蛋白水解 EGF、AR、HB-EGF、TGF-α、epiregulin 等表皮生长因子受体(Epithelia growth factor receptor,EGFR)家族的配体胞外区,引起其大量释放,导致 EGFR 的过度激活[5]。本研究运用 RT-PCR、免疫组化首次分析在胚泡着床过程中 TGF-α 对肿瘤坏死因子-α 转化酶(TACE/ADAM17)的反馈调控机制,从而更深入地理解胚泡着床的分子调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 清洁级 NIH 小鼠,10~12 周龄,体重25~30 g,由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK

作者介绍:杨 环(1983-),女,硕士,
研究方向:胚胎植入机制方面的研究。

通讯作者:杨 戎,女,教授, E-mail:yangrong3636@yahoo.com.cn。

基金项目:重庆市科委自然科学基金项目(CSTC,2007BB5273)。

(渝)20050002]。室温 22℃,光照周期为 14 h 光照(06:00～20:00),10 h 黑暗,自由取食、饮水。按雌:雄比例 2:1 合笼交配,次晨发现有阴栓者为妊娠第 1 d(d_1),依次计算妊娠天数,取孕 2 d 孕鼠随机分成 2 组,每组 10 只。

1.1.2 主要试剂及仪器 RNAiso Reagent、Taq 耐热 DNA 聚合酶购自 TaKaRa 宝生物公司,M-MLV 逆转录酶、dNTP、RNAsin 由 Promega 公司提供,PCR 引物均由英俊公司合成,奥林巴司显微镜购自日本,BIORAD 凝胶成像系统由意大利 Segrate 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 动物准备 实验组:取 10 只孕 2 d 小鼠,速眠新肌肉麻醉,于腹部切 1 个 1 cm 切口,向双侧宫角内注射 5 μl TGF 抗体,缝合切口。饲养至第 4 d 脱臼处死 。于 75%乙醇中浸泡消毒后转移至超净工作台,剖腹分离出一侧子宫,刮取子宫内膜备用。取另一侧子宫,置于 4%多聚甲醛,石蜡包埋,切片备用。对照组:取 10 只已经处理好的的孕 4 d 小鼠(注射小鼠血清)同样方法处理。

1.2.2 提取总 RNA 按照 TRI-zol 试剂的说明书提取小鼠子宫总 RNA,所提取的总 RNA 用紫外分光光度计定量并检测其纯度,$A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 为合格,并计算其浓度。所提取的总 RNA 完整性经琼脂糖凝胶电泳鉴定。-80℃保存备用。

1.2.3 cDNA 合成 20 μl 反应体系中总 RNA 5 μl,500 ng Olig-DT,5×缓冲液 4 μl, M-MLV(200 U/μl)1 μl,RNAsin(40 U/μl)0.5 μl,dNTPs(10 mmol/L)1 μl,加 DEPC 水至 20 μl。逆转录反应条件为 70℃ 3 min, 42℃ 60 min,70℃ 15 min。cDNA 置 -20℃冰箱备用。

1.2.4 PCR 20 μl 反应体系:无 RNAase 水 9.5 μl,10×Buffer (Mg^{2+} plus)3 μl,dNTP mixture 1 μl,cDNA 模版 2 μl,目的基因上下游引物各 1 μl, 内参基因上下游引物各 1 μl,TaKaRar-Taq 酶 0.5 μl。TACE 上游引物:5'-AAGGATGCTTGGGAT-GTG-3',下游引物:5'-CCTCCTTGGTCCTCATTT-3', 产物长 368 bp。内参 β-actin 上游引物:5'-CCTGAGGCTCTTT TCCAGCC-3',下游引物:5'-TAGAGGTCTTTACGGATGTCA ACGT-3',产物长 110 bp。扩增条件:94℃预变性 4 min;94℃变性 35 s,56.5℃退火 45 s,72℃延伸 60 s, 进行 34 个循环;72℃×10 min;4℃保存。

1.2.5 TACE 免疫组化染色 切片常规脱腊,二甲苯二次浸泡,梯度酒精浸泡;滴加 3%双氧水孵育 10 min 以灭活内源性过氧化物酶;微波修复抗原 10 min。自然冷却后滴加 10%羊血清 37℃孵育 20 min 以封闭非特异性抗原;兔抗鼠 TACE 一抗(1:150 工作浓度)37℃孵育 2 h;滴加羊抗兔生物素化二抗 37℃孵育 30 min;滴加 HRP 标记链亲和素 37℃孵育 30 min;DAB 显色镜下控制反应时间, 显色后脱水, 透明, 封片。光镜下观察,阳性为棕黄色。每组均用 PBS 代替一抗作为阴性对照,其他步骤相同。阳性标准:以出现棕黄色颗粒为阳性。

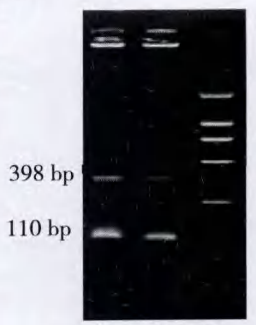
1.3 统计学处理

使用 SPASS 12.0 统计学软件进行分析,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用配对 t 检验分析,检验水准 α 取 0.05,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

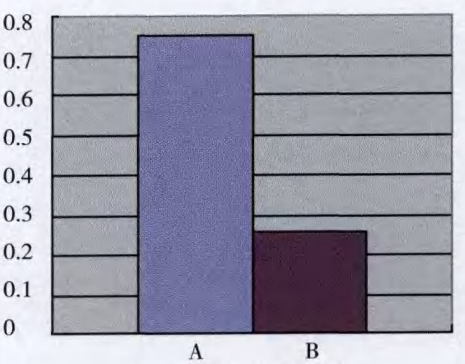
2.1 RT-PCR 结果

经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析,TACE 与 β-actin 基因的 RT-PCR 产物与理论长度一致。利用 TACE 与 β-actin 灰度比值作为子宫内膜 TACE mRNA 相对表达水平,对试验组(0.26±0.05)与对照组(0.75±0.07)比较 TACEmRNA 表达显著增低($P<0.05$)。



A. 对照组;B. 试验组;M. marker

图 1 TACE/β-actin RT-PCR 产物电泳图



A. 对照组;B. 试验组

图 2 实验组和对照组 TACE/β-actin 平均值图

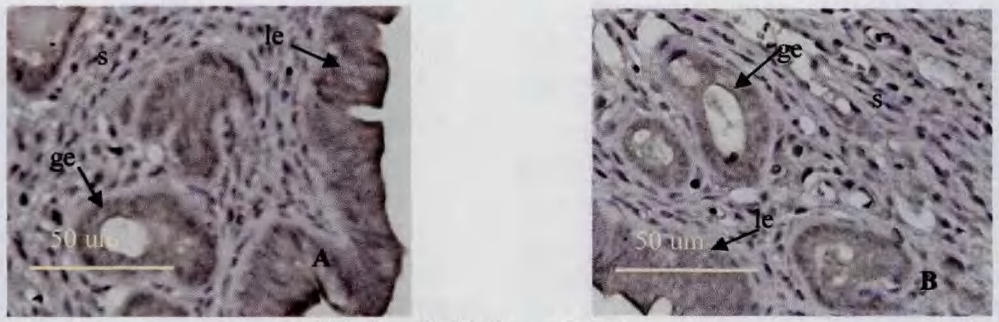
2.2 免疫组化结果

由图 3 可见 TACE 染色棕黄色阳性物质主要分布于内膜腔上皮和腺上皮胞浆,尤其是顶端面;用成都金盘电子科大 GD-8 型病理影像多媒体图像操作系统进行计算机图像分析,每组取 10 张切片,每张切片观察 3 个中倍视野(10×20),所有图像在同一条件下扫描和存储,由计算机自动计算出阳性积分光密度值与有效面积(μm^2),两项之比即面积积分光密度值(AIOD)来定量分析蛋白表达情况。

结果示:实验组(0.30±0.10) 比对照组(0.80±012)染色显著减弱($P<0.05$)。

3 讨 论

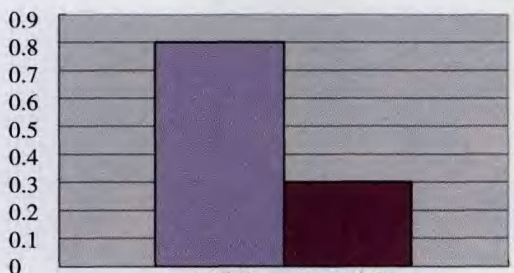
胚胎着床是母体子宫内膜组织与胚胎组织之间相互作用的过程,涉及胚泡在子宫内膜上的定



le 腔上皮；s 基质细胞；ge 腺上皮

A. 对照组　　B. 实验组

图 3　TACE 蛋白在实验组和对照组子宫内膜的表达(SP×400)



A. 对照组　B. 实验组

图 4　TACE 蛋白在实验组和对照组子宫内膜表达的平均光密度值

位、胚泡滋养层对子宫内膜的粘附和侵入以及子宫内膜的蜕膜化等环节[6]TGF-α 在不同的病理和正常组织中具有诱导肿瘤发生，参于发囊与眼的正常发育和围着床期子宫蜕膜化的过程，促进创伤愈合和组织修复，等多种生物活性。而 TGF-α 主要是通过与 EGFR 结合发挥其生物学活性的。TGF-α 通过与 EGR 受体结合，导致 EGFR(EGFR 属于蛋白酪氨酸激酶受体家族，在细胞的分化、增生、存活和在上皮源性肿瘤的发生发展中的有着重要的作用)二聚体化及自身磷酸化，继而激活其酪氨酸激酶活性，再通过具有 SH2 (Src homology-2)和 SH3(Src homology-3)结构域的 Grb2(Growth factor receptor bound protein-2)，结合于 mSoS1(Mammalian son of sevenless-1)，后者作用 Ras，使其从非活性的 Ras-GDP 结合型转化为活性的 Ras-GTP 结合型，从而引发有丝分裂原激动性蛋白激酶(MAPK)信号级联反应，最终调节核转录因子的活性和细胞增生等细胞行为[7]。

我们的实验运用 RT-PCR 和免疫组化的方法，对 TGF-α 抗体干预后的 TACE 的表达进行了 mRNA 及蛋白水平的测定，结果显示：TGF-α 抗体干预后的孕 4 d 小鼠子宫内膜上 TACEmRNA 的表达明显低于对照组，免疫组化对蛋白的半定量测定与 RT-PCR 的结果相同，这说明了 TGF-α 抗体能负反馈作用于 TACE，使其表达下降。已经有研究表明：TGF-α 前体在孕或假孕小鼠第 1 d 子宫腔上皮及腺上皮细胞中出现在第 4 d 晚上(植入时间)达到高峰[8]，TGF-α 在母体子宫的这种表达提示，TGF-α 在胚胎着床中发挥作用，但其具体调控机制尚不清楚。大量的文献显示：TGF-α 能够通过 EGFR 信号转导途径发挥生理学作用，促进胚泡生长，调节子宫内膜 脱膜化，加强内膜基质细胞生存能力，增进内膜的容受性来调节胚胎着床[9]。TACE-TGF-α-EGFR 途径在肿瘤中的作用已经得到证实[10]，在胚胎着床过程中的作用尚无研究，而肿瘤的侵袭与胚胎生活植入有惊人的相似之处。EGFR-$\alpha_v\beta_3$ 整合素-基质金属蛋白酶途径在胚胎着床过程中也已经得到证实，TACE 与基属金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase，MMPs)有众多的相似之处[11]，它们同属于 metzincin 超家族，与 MMPs 的一亚族模型基质金属蛋白酶(MT-MMPs)存在多个共同或相似的结构域，如锌离子信赖性接触反应位点的共同序列，金属蛋白酶结构域等，众所周知，MMPs 有利于肿瘤的发生，侵袭，TACE 正是通过自身蛋白水解酶活性释放生长因子而在上皮源性肿瘤恶化进级中起着重要作用。结构与功能 的相似性表明，TACE 与基质金属蛋白酶可能具有相似调控机制，结合我们的实验结果， 我们推测，TGF-α 与 EGFR 结合可能促进其下游的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素相互作用，进一步激活 $\alpha_v\beta_3$ 整合素下游信号转导通路，从而反馈调控 TACE 的表达，诱发着床过程的各个阶段，促进胚胎与母体子宫之间的同步化及协调化关系。

本实验证实了 TACE-TGF-α-EGFR 途径在胚胎着床中的作用，并分析了可能的其下游的分子调控机制，为不孕症患者的诊断治疗以及提高辅助生育技术的成功率提供了理论依据，但与影响胚胎着

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1469-03

基于抗原表位分析的 P- 糖蛋白表达研究

王祥卫,张远宁,周 锋,叶 钢
(第三军医大学第二附属医院泌尿外科,重庆 400037)

【摘 要】目的:对 P- 糖蛋白抗原表位进行分析和表达研究。方法:联合运用多种方法对 P- 糖蛋白的二级结构和表面特性进行分析,运用化学和酶法相结合的技术合成 P- 糖蛋白基因,再克隆入表达载体 pGEX-2T 进行表达、鉴定及纯化。结果:位于 P- 糖蛋白胞外段的抗原表位位点仅见于氨基酸残基 82aa~115aa(Ⅰ)、741aa~760aa(Ⅳ)及 800aa~816aa(Ⅴ)。SDS-PAGE 分析,表达出约 29 kD 大小的蛋白。结论:该基因片段的高效表达为进一步制备其抗体或筛选其特异性结合肽,进行靶向治疗等工作奠定了基础。

【关键词】多药耐药;P- 糖蛋白;抗原表位
【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-28

Expression of P-glycoprotein based on antigenic epitopes analyses

WANG Xiang-wei, et al
(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To analyze antigenic epitopes and express P-glycoprotein. *Methods*: The target gene was synthesized by the combined use of chemical synthesis and Klenow polymerase extension. The synthesized gene was cloned into expression vector pGEX-2T and expressed, identified and purified it. *Results*: Antigenic epitopes in extracellular fragment of P-glycoprotein were identified to amino acid residues 82aa~115aa(Ⅰ)、741aa~760aa(Ⅳ), and 800aa~816aa(Ⅴ). SDS-PAGE analysis indicated that the expressed protein was about 29 kD. *Conclusion*: High level expression of the target gene fragment was established for preparation of its antibody and biospanning its specific peptide using random phage library, which establishes basis for the targeting treatment of MDR.

【Key words】Multidrug-resistance; P-glycoprotein; Antigenic epitopes

作者介绍:王祥卫(1969-),男,副教授,
研究方向:人膀胱肿瘤基因治疗。

基金项目:重庆市自然科学基金资助(2006BB5084)。

床的其它相关调节因子的相互作用尚不明了,需对其进行进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Moss M L, Jin S L, Milla M E, et al. cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour necrosis factor-alpha[J]. Nature, 1997, 385: 733-736.

[2] Kumar V, Bustin S A, M ckay L A. Transforming growth factor alpha [J]. Cell Bio Int, 1995, 19 (5): 373-388.

[3] Tamada H, Das S K, Dey S K, et al. Cell$_2$type$_2$specific expression of transforming growth factor alpha in the mouse uterus during the peri-imp lantation period [J]. Bio Rep rod, 1991, 45 (2): 365-372.

[4] Bonvissuto A C, L ala P K, Dennedy T G, et al. Induction of transforming growth factor alpha gene expression inrat deciduas is independent of the concep tus [J]. Bio Reprod, 1992, 46 (4): 607-616.

[5] Borrell-Pags M, Rojo F, Albanell J, et al. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors[J]. EMBO J, 2003, 22(12): 1114-1124.

[6] Daniel D, Indrani B, Sudhandsu K, et al. Embryo Implantation [J]. Developmental Biology, 2000, 223(2): 217-237.

[7] W ells A. EGF receptor[J]. Int J Biochem Cell Bio, 1999, 31(6): 637-643.

[8] Paria B C, Das S K, Dey S K, et al. Distribution of transforming growth factor precursors in the mouete Tus during the perlimplantation period and after steroid hormone treatments[J]. Bio Reprod, 1994, 50(3): 481-491.

[9] Bush M R, Mele J M, Walmer D K, et al. Evidence of Juxtacrine signaling for transforming growth factor alpha in human endometrium[J]. Bio Reprod, 1998, 59 (6): 1522-1529.

[10] Hart S, Fischer O M, Prenzel N, et al. GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways [J]. Biol Chem, 2005, 386 (9): 845-855.

[11] Black R A, Rauch C T, Kozlosky C J, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells[J]. Nature, 1997, 385(6618): 729-733.

(责任编辑:冉明会)