维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0954-05

小鼠孕早期 Cyclin-E 表达规律及意义

张 谭[1],周生健[2],魏莎莉[1],杨 戎[1],孟 君[1],马海兰[1]

(1. 重庆医科大学公共卫生学院生殖生理研究室,重庆 400016;2. 重庆市渝中区人口和计划生育生殖健康中心,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨细胞周期素 E(Cyclin-E)在早孕小鼠子宫内膜的的表达及其对小鼠胚胎着床数的影响。方法:应用 RT-PCR 及免疫组织化学的方法检测早孕小鼠子宫内膜细胞 Cyclin-E 基因和蛋白的表达规律;观察子宫角注射抗 Cyclin-E 抗体后对小鼠胚胎着床数的影响。结果:妊娠第 1 ~ 7d 小鼠子宫内膜组织均有 Cyclin-E 表达,自妊娠 2d 起表达增强,5d 表达量达高峰。小鼠妊娠期 Cyclin-E 在子宫内膜腔上皮、腺上皮及内膜基质中均有表达。单侧子宫抗 Cyclin-E 抗体注射后双侧胚胎着床数差值较对照组(注射等体积生理盐水)明显增大。结论:在小鼠胚胎着床过程中,Cyclin-E 可能参与调节子宫内膜的增殖分化,在子宫内膜蜕膜化及胚胎着床过程发挥作用。

【关键词】细胞周期素 E(Cyclin-E);着床;子宫内膜;RT-PCR;免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R394 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-13

Expression and significance of cyclin-E in the mouse endometrium during the early pregnancy

ZHANG Tan, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression rule of Cyclin-E in endometrium during the early pregnancy and its role in blastocyst implantation in mice. *Methods*: RT-PCR and immunohistochemistry techniques were applied to detect Cyclin-E gene and protein expression in endometrium from pregnant mice on days 1 ~ 7. In addition Anti-cyclinE antibody was injected into horns of uterus of day 3 pregnant mice to observe the numbers of implanted blastocysts. *Results*: Expression of Cyclin-E gene and protein in pregnant mice were steady increasing since day 2 and reaching maximal level on day 5 of pregnancy. Injection of Anti-cyclinE antibody could decrease the numbers of implanted blastocyst compared with that of saline-injected group. *Conclusion*: Cyclin-E were persistently expressed in mouse endometrium during the early pregnancy and might be concerned with proliferation differentiation of endometrium and participates in the regulation process of mouse blastodyst implantation.

【Key words】 Cyclin-E; Implantation; Endometrium; RT-PCR; Immunohistochemistry

胚胎植入是妊娠的关键,而胚胎的成功植入取决于处于接受状态的子宫内膜和具有侵入性的胚胎间的同步发育。细胞增殖是胚胎发育,子宫内膜增生处于接受态及蜕膜化,胎盘形成的必要条件。细胞周期素家族是调节细胞增殖的重要调控因子,在胚胎着床过程中的作用逐渐受到重视。Cyclin-E 为 G_1 期细胞周期素,是一类核蛋白,由 395 个氨基酸组成,分子量约 5 × 10ku,其表达升高始于 G_1 中期,至 G_1 晚期的 G_1/S 交界处达高峰,后随细胞进入 S 期并开始下降,到 G_2/M 期降为零[1]。韦毓等[2]的研究表明 Cyclin-E 在正常子宫内膜中呈阴性表达。Reese J 等[3]利用基因芯片技术发现 Cyclin-E 在妊娠小鼠胚胎着床点呈高表达,提示 Cyclin-E 可能是胚胎着床的调控因子。

本文主要是采用 RT-PCR、免疫组化等方法检测在胚胎植入早期 Cyclin-E 在子宫内膜的表达规律,同时运用子宫内注射抗 Cyclin-E 抗体的方法观察其对胚胎着床的影响,探讨 Cyclin-E 表达在胚泡植入早期可能的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

作者介绍:张 谭(1982-),女,硕士,研究方向:胚泡着床的分子机制。

通讯作者:魏莎莉,女,副教授,E-mail:zwz007cn@yahoo.com.cn。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.1 标本的收集 清洁级 NIH 小鼠，6～8 周龄，体重 20～25g，由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号：SCXK（渝）20050002]。选择性成熟的雌鼠，按雌雄比例 2∶1 与雄鼠自然合笼交配，次日晨发现阴栓者记为妊娠 1d，依次计算妊娠天数。

1.1.2 主要试剂及仪器 RNAisoReagent 购自 TaKaRa，dNTP 和逆转录酶（MML-V）购自 Promega，PCR 试剂购自 TaKaRa，DEPC 购自美国 sigma 公司，抗 Cyclin-E 单克隆抗体购自美国 Lab Vision-Neo Markers 公司（福州迈新代理），辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-HRP 和 DAB 显色试剂盒均购自北京晶美生物公司。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 70 只小鼠随机数字表法将其分为 7 组，每组 10 只，分别在妊娠 1～7d 上午 9 点左右断颈处死，无菌条件下取出子宫，刮取双侧子宫内膜（有胚泡者剔除）后置匀浆器中，加 1ml RNAiso 充分匀浆，后用按 Takara 说明书用三步法提取 RNA；临用前用紫外分光光度法检测 OD_{260}/OD_{280} 的比值在 1.8～2.0，经琼脂糖凝胶电泳见 3 条带证实 RNA 的完整性。

1.2.2 引物序列 根据序列 NM_001037134 设计 Cyclin-E 引物序列，选择管家基因 β-肌动蛋白（β-actin）为内参对照，引物均由上海英骏生物技术有限公司合成（表 1）。

1.2.3 RT-PCR 采用两步法，包括逆转录和 PCR，将提取的子宫内膜组织总 RNA 先逆转录为 cDNA，后取 2μl cDNA 产物进行 PCR 反应，反应条件如下：95℃预变性 4min，94℃变性 30s，57.5℃退火 45s，72℃延伸 1min，进行 35 个循环。内参照 β-actin 基因与目的基因反应条件相同。配制 1.5% 的琼脂糖，取 Cyclin-E 的 PCR 产物上样电泳后，用凝胶成像系统成像，再用 Quantity one4.4.0 软件分析各条带密度值/mm^2，计算各组标本 Cyclin-E 与 β-actin 的密度比值，即为 Cyclin-E 的相对表达量。

1.2.4 免疫组化 取妊娠 1～7d 的小鼠，每组 4 只，断颈处死，剖腹取子宫后立即放入 4% 多聚甲醛中固定，石蜡包埋，制备组织切片。二甲苯脱蜡，乙醇水化，抗原修复后滴加第一抗体（1∶100），4℃过夜后滴加辣根过氧化物酶标记的第二抗体（1∶20），DAB 显色，用磷酸盐缓冲液（PBS）代替一抗做阴性对照，棕黄色为阳性结果。

1.2.5 功能分析 妊娠小鼠随机分为 5 组，每组 10 只，至妊娠 4d 经腹腔麻醉后，取 4 个不同稀释倍数（原液；1∶50；1∶100；1∶200）的抗 Cyclin-E 抗体和生理盐水 5μl 分别从两侧子宫角注入两侧子宫，对照组双侧注射生理盐水，至妊娠 9d 脱颈处死剖腹检查胚胎着床数。对各组内小鼠双侧子宫胚胎着床数比较采用配对 T 检验，对各组小鼠双侧子宫胚胎着床数差值的均值比较，采用 SNK 法方差分析。所有统计处理由 SPSS11.0 统计软件完成，检验水准取 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 RT-PCR 产物定性与半定量分析

经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析，Cyclin-E 在妊娠 1～7d 小鼠子宫内膜均有表达，且同 β-actin 的 RT-PCR 产物与理论碱基数相一致（图 1），Cyclin-E/β-actin 的密度比值即为 Cyclin-E 的相对表达量。实验结果发现妊娠 1～7d 小鼠子宫内膜均有 Cyclin-E 表达，1d 表达量较低，2d 起表达量逐渐升高至 5d 达高峰，6d 开始下降趋于平缓，但仍维持在一较高水平。其中妊娠 5d 表达量最高，与其余 6d 比较差异显著（$P<0.05$）（图 2）。



Marker（M）. DL 2000 1～7. 孕 1～7d 的小鼠子宫内膜组织

图 1 RT-PCR 产物电泳图

2.2 免疫组化结果

免疫组化结果显示，Cyclin-E 蛋白在妊娠 1～7d 的小鼠子宫内膜腺上皮、腔上皮和间质细胞均有表达，棕黄色阳性着色部位在细胞核，随着子宫内膜组织增生、间质细胞分裂增值程度的改变表达发

表 1 引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度
Cyclin-E 引物正义	5'-TGTCAAGACGCAGTAGCCG-3'	310bp
Cyclin-E 引物反义	5'-TCTGGCAGAGGTGAGGGAT-3'	
内参 β-actin 正义链	5'-AATCTGGCACCACACCTTCTAC-3'	398bp
内参 β-actin 反义链	5'-CTTCTCCTTAATGTCACGCACG-3'	

维普资讯 http://www.cqvip.com

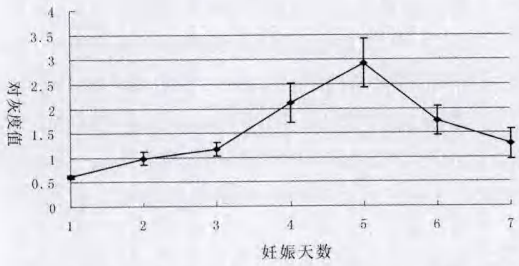


图 2 RT-PCR 产物电泳图谱灰度扫描分析

生变化(图 3)。

Cyclin-E 蛋白在早孕小鼠子宫内膜呈一定的规律表达:1d 内膜腺上皮有少量阳性表达;2d 则主要定位于内膜腺上皮和腔上皮;3～5d 内膜腺上皮、腔上皮及内膜基质均有表达,并随妊娠天数增加而表达增多;6d 基质的阳性表达开始减弱,而腺上皮及腔上皮阳性表达仍较强;7d 仅腔上皮少量表达(表2)。

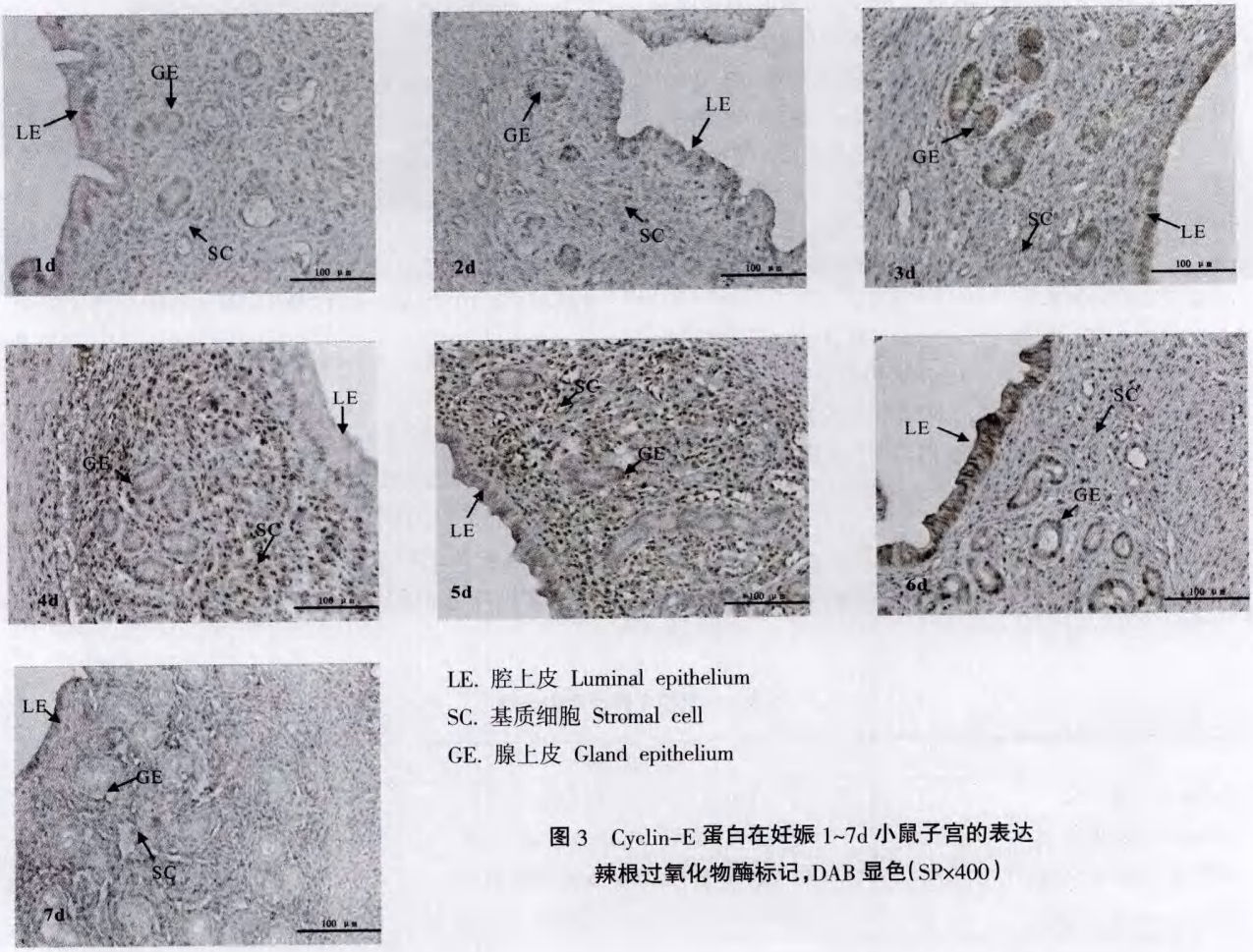
2.3 功能分析

剖腹检查发现,子宫内注射抗 Cyclin-E 单克隆抗体后,对妊娠小鼠胚泡着床具有明显的抑制作用,随着注射抗体浓度的降低,其抑制作用逐渐减弱;而注射生理盐水对小鼠胚泡着床并无明显的影

表 2 Cyclin-E 蛋白在各组小鼠子宫内膜中的表达情况

小鼠子宫内膜	不同时期 Cyclin-E 蛋白的表达						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
腔上皮	-	±	+	+	++	+	±
腺上皮	±	±	+	+	++	+	-
间质细胞	-	-	+	++	++	-	-
平均光密度	0.198 ± 0.076	0.219 ± 0.053	0.298 ± 0.048	0.409 ± 0.091	0.513 ± 0.162	0.296 ± 0.074	0.267 ± 0.061

注:++:强阳性 +:阳性 ±:弱阳性 -:阴性



LE. 腔上皮 Luminal epithelium
SC. 基质细胞 Stromal cell
GE. 腺上皮 Gland epithelium

图 3 Cyclin-E 蛋白在妊娠 1~7d 小鼠子宫的表达
辣根过氧化物酶标记,DAB 显色(SP×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 注射不同浓度抗体或生理盐水后双侧子宫着床数差值的比较

实验组别(抗体浓度)	原液	1:50	1:100	1:200	生理盐水
胚胎着床数差值	4.5 ± 1.167*	4.1 ± 0.989*	2.9 ± 0.544**	1.3 ± 0.567	0.4 ± 0.933

N=10, *P<0.01, **P<0.05

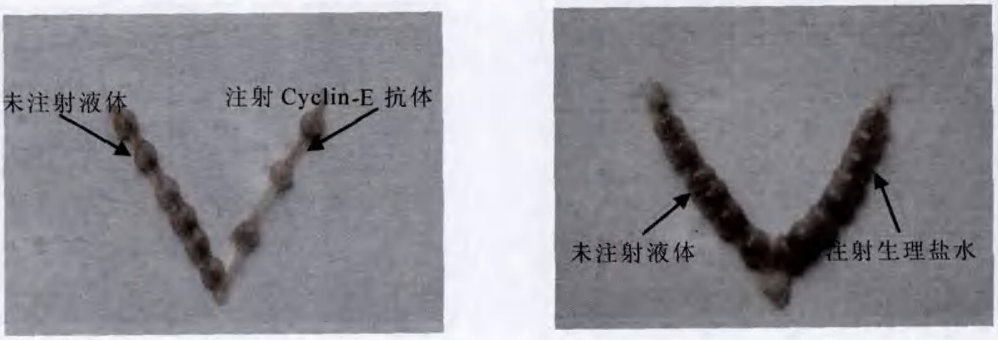


图 4 单侧子宫内注射后的早孕小鼠子宫

响(图 4)。

其中,单侧注射抗体原液和 1∶50 稀释液后,与对照(单侧注射生理盐水)比较,双侧子宫着床数差值差异非常显著,P<0.01;1∶100 抗体稀释液组与对照比较 P<0.05;1∶200 抗体稀释液组与对照比较 P > 0.05,增加样本量差异可能会有显著性(表 3)。

3 讨 论

胚胎植入的成功取决于胚胎侵入性和子宫内膜接受性的密切合作。在此过程中会发生一系列的细胞间相互作用如细胞增殖、侵入以及细胞凋亡等,导致着床点处组织重建。细胞的增殖和凋亡是胚胎发育,子宫内膜增生处于接受态及蜕膜化,胎盘形成的必要条件。大量研究表明,着床过程中,胚泡及子宫内膜均有多种细胞周期调控蛋白表达,影响胚泡着床。

Cyclin-E 为 G_1 期细胞周期素,其表达升高始于 G_1 中期,至 G_1 晚期的 G_1/S 交界处达高峰,后随细胞进入 S 期并开始下降,到 G_2/M 期降为零[1]。Ohtsubo 等发现 G_1 期抗 Cyclin-E 抗体微注射抑制人正常的成纤维细胞进入 S 期[4],因此 Cyclin-E 在细胞周期 G_1/S 期的转换中是主要的限速因子之一,主要作用于 G_1 晚期、S 期开始之前。其作用机制:Cyclin-E 与 CDK2 形成活性复合物 Cyclin-E/CDK2 参与 G_1 期和 S 期的 pRb 磷酸化作用,能加速 S 期,对 DNA 复制的启动十分重要。近年来研究表明,Cyclin-E 在多种恶性肿瘤中表达增高,与肿瘤的发生及迁移、侵袭过程关系密切[5-7]。由于胚胎着床与肿瘤侵袭过程有着高度相似性,因此有必要对 Cyclin-E 在胚胎着床过程中的作用进行探讨。

本研究应用 RT-PCR 技术及免疫组织化学技术分别检测妊娠 1 ~ 7d 小鼠子宫内膜组织 Cyclin-E 的表达,RT-PCR 结果显示早孕小鼠子宫内膜组织 Cyclin-E mRNA 表达自 2d 起随妊娠天数增加呈逐渐升高的趋势,在 5d 达到最高值,到 6d 开始略有下降,并维持在一较高水平(>1d)。免疫组织化学分析显示,Cyclin-E 蛋白在妊娠 1 ~ 7d 的小鼠子宫内膜腺上皮、腔上皮和间质细胞均有表达,并随着子宫内膜组织增生、间质细胞分裂增值程度的改变表达呈一定规律变化。3d 起内膜腺上皮、腔上皮和机制细胞均有明显阳性着色,略滞后于 mRNA 的表达并随妊娠天数增加而增强,至 5d 达峰值后逐渐表达下降。小鼠子宫的蜕膜化进程开始于胚胎着床前,胚胎粘附时,上皮深面的基质细胞增殖分化为蜕膜细胞,并向周围扩展,最终遍及子宫[8]。本实验中,Cyclin-E 自 2d 起表达量增多并随妊娠天数增加,与着床前子宫内膜蜕膜化进程同步,表明 Cyclin-E 对着床窗口期子宫内膜的增生起重要的调节作用,Cyclin-E 可能与 CDK2 形成活性复合物 Cyclin-E/CDK2,激活 CDK2 的蛋白激酶活性,参与 Rb 蛋白磷酸化,导致受 Rb 蛋白调控的转录激活因子 E2F 解阻遏,促使一些与 DNA 复制有关的酶蛋白基因得以表达,从而启动细胞 DNA 的复制,加速S 期,

维普资讯 http://www.cqvip.com

使内膜腺体增生,分泌旺盛,内膜血管增长,内膜间质分裂活跃,内膜增厚,利于小鼠子宫内膜在 4～5d 的处于接受态,为胚胎着床做好准备。着床后(6d 以后)间质的 Cyclin-E 表达减弱,而腔上皮和腺上皮表达仍维持较高水平,腺体进一步增生,分泌更加旺盛,血液供应更为丰富,间质细胞肥大,胞质含有丰富的糖原颗粒,成为蜕膜细胞,利于胚胎和胎盘的发育。为进一步探讨 Cyclin-E 在胚胎着床过程中的作用,我们应用子宫角注射抗 Cyclin-E 抗体的方法进行功能分析。结果显示,注射生理盐水对小鼠胚泡着床过程无影响;而注射抗 Cyclin-E 抗体后对妊娠小鼠胚泡着床具有明显的抑制作用,随着注射抗体浓度的降低,其抑制作用逐渐减弱,但不能完全抑制着床,表明 Cyclin-E 在胚胎着床过程中起着重要调控因子的作用,但并不是唯一的决定因素。

Cyclin-E 在着床过程中的作用机制尚未完全明了,需要对其更进一步的研究。但对于 Cyclin-E 在胚泡着床中作用的研究在为原发或继发性不孕女性患者的诊断治疗、提高辅助生育的成功率以及开发新的生育调控手段都有着重要意义。

参 考 文 献

[1] 龚建平,陈义发,舒 丹,等.人类主要 Cyclins 在 MOLT-4 细胞阻断动力学下的表达规律[J]. 细胞生物学杂志,2000;22(2):79-83.

[2] 韦 毓,庞 朗,冯秀英.PTEN 和 Cyclin-E 蛋白在子宫内膜癌组织中的表达[J]. 中国肿瘤临床与康复,2005;12(4):293-296.

[3] Reese J,Das SK,Paria BC,et al. Global gene expression analysis of identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation[J]. Biol Chem,2001;276(47):44137-44145.

[4] Ohtsubo M,Theodoras AM,Schumacher J,et al. Human cyclin E,a nuclearprotein essential for the Gl-to-S phase transition[J]. Mol Cell Bio,1995;15(5):2612-2624.

[5] Musgroye EA.Cyclins:roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation[J]. Growth Factors,2006;24(1):13-19.

[6] Kim YT,Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma[J]. Yonsei Med J,2005;46(5):597-613.

[7] Barton MC,Akli S,Keyomarsi K. Deregulation of cyclin E meets dysfunction in p53:closing the escape hatch on breast cancer[J]. Cell Physiol,2006;209(3):686-694.

[8] Correiada 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):538-547.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 953 页)

前景。虽然 HEP-2 细胞对其不敏感,但其联合低浓度化疗药物能高效杀灭 HEP-2 细胞,所以此方法既可克服肿瘤细胞耐药,还能有效地减轻因大剂量使用化疗药物而引起的全身毒副作用,可谓一举两得。本研究提出 TRAIL 与化疗药物的协同作用主要通过诱导细胞凋亡实现,目前工作的关键在于寻找到二者协同诱导肿瘤凋亡的机制,这对于化疗药物的正确选择将有一定的指导作用,也为临床用药提供一定的实验室依据。

参 考 文 献

[1] Wiley SR,Schooley K,Smolak PJ,et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. Immunity,1995;3(6): 673-682.

[2] Nagane M,Huang HJ. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy[J]. Apoptosis,2001;6(2):191-197.

[3] 冯长根,周汉生.TRAIL 促肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. 中国药学杂志,2006;41(8):561-564.

[4] Ashkenaziz,Dixitim.Death recoptora:signaling and modulation[J]. Science,1998;281(5381):1305-1308.

[5] Matsuzaki H,Bruno MS,Alexis U,et al. Combination of tumor neerosis factor-related apoptosis-inducing Ligand(TRAIL)and actinomycin D induces apoptosis even in TRAIL resistant human pancreatic cancer cells[J]. Clin Cancer Res,2001;7(3):407-414.

[6] Mizutani Y,Nakao M,Ogawa O,et al. Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to TRAIL mediated apoptosis by DDP and carboplatin[J]. Urol,2001;165(8):263-270.

[7] Pan G,Ni J,Wei YF,et al.An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL[J]. Science,1997;277(5327):815-818.

[8] Kim Y,Suh N,Sporn M,et al. An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis[J]. Biol Chem,2002;277(25):223-227.

[9] Lacour S,Hammann A,Wotawa A,et al.Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosls-inducing ligand.mediated caspase-8 activation and apoptosis[J]. Cancer Res,2001;61(4):1645-1647.

[10] Xiang H,Fox JA,Totpal K,et al.Enhanced tumor killing by Apo2L/TRAIL and CPT11 CO-treatment is associated with p21 cleavage and differential regulation of Apo2L/TRAIL ligand and its receptors[J]. Oncogene,2002;21(22):36115-36117.

(责任编辑:关蕴良)