维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)04-0416-03

TACE 在小鼠动情周期的表达规律

杨洁玉[1],李 彤[2],杨 戎[1],谢 怡[1],魏莎莉[1],郗 强[1]

(1.重庆医科大学公共卫生学院生殖生理教研室;2.重庆市人口与计划生育委员会,重庆 400016)

【摘 要】目的:初步探讨肿瘤坏死因子 α 转换酶(Tumor necrosis factor-α converting enzyme,TACE)在小鼠动情周期中的表达规律。方法:用 RT-PCR 及免疫组化方法分别检测动情周期各期小鼠子宫内膜 TACEmRNA 和蛋白的表达。结果:TACEmRNA 在动情周期小鼠子宫内膜呈规律性表达,在动情期表达明显增强,与其它 3 期相比有显著性差异($P<0.01$);其它 3 期间无显著性差异($P>0.05$)。免疫组化分析显示 TACE 在子宫内膜的表达规律与 RT-PCR 一致。结论:TACE 通过裂解 EGFR 家族多种配体释放其胞外区,从而激活 EGFR 信号途径,在子宫内膜的周期性变化中起着重要作用。

【关键词】TACE;子宫内膜;动情周期;RT-PCR;免疫组化

【中国图书分类法分类号】R394 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-22

Expression pattern of TACE in mouse endometrium during the estrus cycle

YANG Jie-yu, et al

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

【Abstract】*Objective*: To primarily investigate the expression pattern of tumor necrosis factor-α converting enzyme(TACE) in mouse endometrium during the estrus cycle. *Methods*: Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and immunohistochemistry were used to detect the expression of TACE mRNA and protein in mouse endometrium during each stage of the estrus cycle. *Results*: The expression of TACE mRNA in mouse endometrium during estrus cycle had regular pattern. The TACE mRNA/β-actin mRNA expression in estrus stage was higher than those of the other 3 groups, and there was significant difference between estrus stage and the other 3 groups($P<0.01$). Besides, there was no significant difference among the other 3 groups($P>0.05$). Immunohistochemical analysis showed the same expression pattern of TACE in endometrium as RT-PCR. *Conclusion*: TACE may play a key role in cyclic changes of normal endometrium through proteolytic removal of the extracellular domain of multiple ligands of EGFR family to release their extracellular domains which is capable of activating EGFR signal way.

【Key words】TACE; Endometrium; Estrus cycle; RT-PCR; Immunohistochemistry

TACE 属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族。TACE 是多结构域的Ⅰ型跨膜蛋白,开放阅读框编码 824 个氨基酸。它具有 ADAM 家族的共有序列:信号肽、前肽、金属蛋白酶区、解整合素区、富半胱氨酸区、跨膜区和胞浆区。可水解多种细胞表面结合因子,参与细胞的增殖、生长及分化等一系列过程。最近研究表明,TACE 在人子宫内膜上皮细胞株接受期有表达[2]。但 TACE 在性周期子宫内膜的表达规律尚无报道,我们的实验对未孕小鼠动情周期子宫内膜 TACE 的表达进行研究,初步探讨 TACE 在动情周期子宫内膜的表达规律及可能的作用。

作者介绍:杨洁玉(1972-),女,主治医师,硕士,研究方向:胚泡着床研究。

通讯作者:杨 戎,女,副教授,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);重庆市计划生育科研项目(2007-1-8)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 清洁级 NIH 成年未孕雌鼠,10~12 周龄,体重 25~30g,由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(渝)20050002]。室温 22℃,光照周期为 14h 光照(06:00~20:00),10h 黑暗,自由取食、饮水。采用阴道脱落细胞涂片依照动情周期分期标准[3]将小鼠分为 4 组,每组 10 只,分别于每日上午 10 时颈椎脱臼处死,于 75%乙醇中浸

维普资讯 http://www.cqvip.com

泡消毒后转移至超净工作台，剖腹分离出子宫，刮取子宫内膜备用。另取每组 10 只，断颈处死，剖腹取子宫置于 4%多聚甲醛，石蜡包埋，切片备用。

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，兔抗鼠 TACE 抗体、羊抗兔免疫组化试剂盒(LHK612)购自晶美公司。奥林巴斯 BX51 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 总 RNA 提取 按 100mg 子宫内膜组织加 1mlRNAiso Reagent 的比例充分匀浆组织，加 0.2ml 氯仿摇匀离心，取上清液加 0.5ml 异戊醇沉淀 RNA，75%乙醇洗涤 2 次，加经 DEPC 水处理的去离子水溶解。用紫外分光光度计测定 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8～2.0 之间，浓度为 0.5～1.0 μg/μl。1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳可见 28S、18S 和 5S 3 条带，28S 条带的亮度大约为 18S 条带的 2 倍，说明所提 RNA 基本没有降解，有较好的完整性。

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

1.2.3 引物设计 TACE(序列号 NM009615)上游引物：5'-AAGGATGCTTGGGATGTG-3'，下游引物：5'-CCTCCTTGGTCCTCATTT-3'，产物长 368bp。内参—actin 上游引物：5'-CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC-3'，下游引物：5'-TAGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT-3'，产物长 110bp。

1.2.4 PCR 20μl 反应体系：无 RNAase 水 9.5μl，10×Buffer (Mg^{2+} plus)3μl，dNTP mixture 1μl，cDNA 模版 2μl，目的基因上下游引物各 1μl，内参基因上下游引物各 1μl，TaKaRa rTaq 酶 0.5μl。扩增条件：94℃预变性 4min；94℃变性 35s，56.5℃退火 45s，72℃延伸 60s，进行 34 个循环；72℃×10min；4℃保存。

1.2.5 PCR 产物电泳及分析 取 PCR 产物 5μl 加 6×上样缓冲液 1μl，1.5%琼脂糖凝胶电泳(5V/cm，40min)，然后用凝胶成像系统成像，再用 Quantity One 软件(Bio Rad)分析各条带灰度值，得 TACE/β—actin 的灰度比值，即为 TACEmRNA的相对表达值。

1.2.6 TACE 免疫组化染色 切片常规脱腊，二甲苯 2 次浸泡，梯度酒精浸泡；滴加 3%双氧水孵育 10min 以灭活内源性过氧化物酶；微波修复抗原 10min。自然冷却后滴加 10%羊血清 37℃孵育 20min 以封闭非特异性抗原；兔抗鼠 TACE 一抗(1:150 工作浓度)37℃孵育 2h；滴加羊抗兔生物素化二抗 37℃孵育 30min；滴加 HRP 标记链亲和素 37℃孵育 30min；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。

1.3 统计学处理

每一实验组 TACE 基因 mRNA 拷贝数与 β-actin 基因 mRNA 拷贝数之比值作为实验结果，以均数±标准差表示，用 SAS 统计软件进行统计学处理，组间比较采用单因素方差分析，检验水准 α 取 0.05，以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

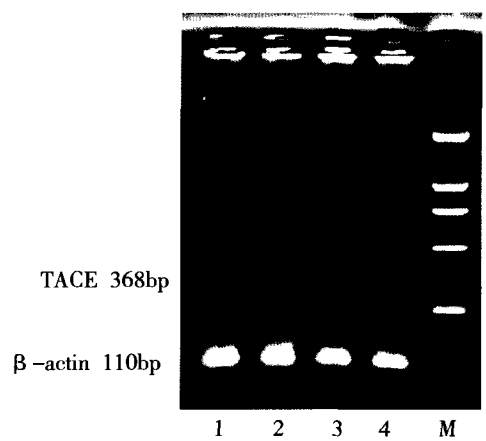
2 结 果

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。内参基因 β-actin 均有强烈表达，TACE 基因在动情周期各期小鼠子宫内膜均有表达(图 1)。利用 TACE 与 β-actin 灰度比值作为子宫内膜 TACEmRNA 相对表达水平(图 2)。动情期与其它 3 期相比表达明显增强($P<0.01$)，其它 3 组间无显著性差异($P>0.05$)。

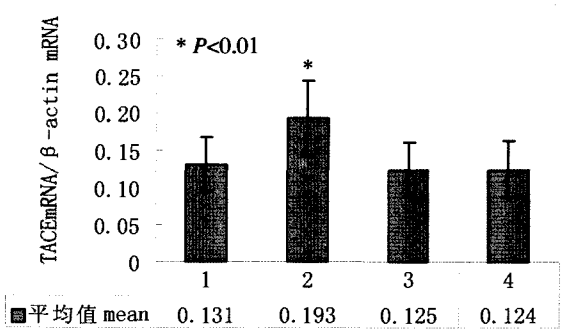
2.2 免疫组化结果

免疫组化结果分析，TACE 在动情周期各期小鼠子宫内膜组织中都有表达。可见 TACE 染色棕黄



1.动情前期；2.动情期；3.动情后期；4.动情间期

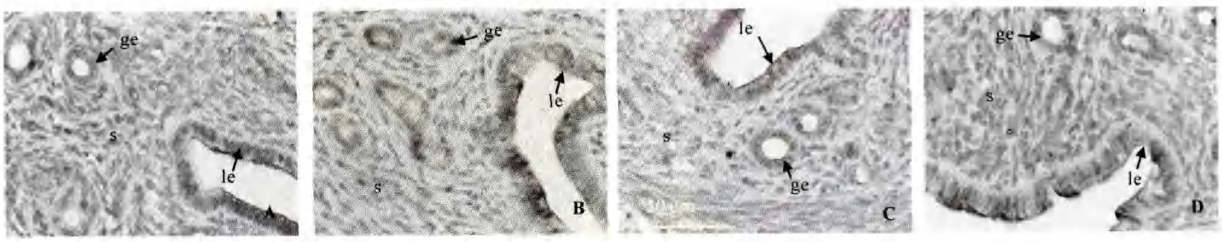
图 1 动情周期各期 RT-PCR 产物电泳凝胶成像图



1.动情前期；2.动情期；3.动情后期；4.动情间期

图 2 动情周期各期 TACEmRNA 的相对表达

维普资讯 http://www.cqvip.com



le.腔上皮；s.基质细胞；ge.腺上皮；A.动情前期；B.动情期；C.动情后期；D.动情间期

图 3 TACE 在动情周期小鼠子宫内膜的表达(SP×400)

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。动情期与其它 3 期相比表达明显增强，其它 3 组均较弱，之间无明显差异(图 3)。

3 讨 论

TACE 因其能水解细胞膜上的膜型肿瘤坏死因子(TNF-α)而得名。TACE 基因约 50kb，包括 19 个外显子，定位在小鼠的第 12 号染色体上，人的第 2 号染色体(2p25)上[1]。ADAMs 属于基质金属蛋白酶家族，又归入锌离子结合蛋白超家族。TACE mRNA 在大多数组织中表达，且其蛋白主要是组成型的[4]。

TACE 可水解多种细胞表面结合因子，如 EGFR 家族各种配体，从而激活 EGFR 信号转导通路，通过有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径，激活核内激活蛋白 1(AP-1)；通过磷脂酰肌醇—3—激酶(PI3K)途径将核因子 -κB(NFκB)移位至核内。AP-1、NFκB是重要的转录因子，这种信号转导的级联反应最终引起核内 DNA 合成、转化，影响细胞的增殖、生长及分化[5]。从而在正常生长发育中发挥着重要作用。最近研究表明，TACE 在人子宫内膜上皮细胞株接受期有表达[2]。实验显示 TACE 不管是在 mRNA 水平还是在蛋白水平在小鼠动情周期各期子宫内膜均有表达。故推测 TACE 可能通过裂解 EGFR 家族多种配体释放其胞外区，从而激活 EGFR 信号途径，在子宫内膜的周期性变化中起着重要作用。

啮齿类动物子宫内膜伴随卵巢激素水平的改变而发生周期性的变化。雌性成年小鼠的动情周期一般为 4～5d，可分为动情前期、动情期、动情后期、动情间期 4 个不同的时期，子宫的结构及功能在这 4 个阶段都发生一系列的改变，对小鼠而言雌激素和孕酮对这种改变起着主要的调节作用。我们已知正常小鼠血浆雌激素水平在动情前期开始上升，至动情期达到高峰，此时发生排卵并接受交配，随后子宫内的环境变得有利于胚胎的植入[6]；在小鼠动情后期，如未受精形成的黄体不产生孕激素并立即退化，子宫开始缩小、内膜萎缩[7]。研究表明 TACEmRNA 和蛋白在动情周期小鼠子宫内膜中的表达呈规律性变化，在动情期表达明显增强，与其它 3 期相比有显著性差异($P<0.01$)，其它 3 期间无显著性差异。TACE 蛋白主要表达在内膜腔上皮和腺上皮胞浆。动情期子宫内膜上皮细胞进一步增殖、生长、分化达到高峰。而此期 TACE 表达明显增强，有可能通过蛋白水解 EGFR 多种配体，激活EGFR 信号途径，增强子宫内膜腔上皮及腺上皮的增殖、生长、分化，是此期子宫内膜变化的机制之一，为卵子受精胚胎植入做好准备。若未受精依次进入动情后期、间期，子宫开始缩小、内膜萎缩，TACE 的表达亦迅速减弱。TACE 在动情周期的表达与雌激素变化一致，推测其表达可能受到卵巢类固醇激素的调控。

在动情期子宫的另一主要功能在于调节精子活力并使之获能、抵抗交配引入的病原微生物感染等[8,9]。我们推测动情期具有非常显著高表达的 TACE 基因可能单独或通过与其他蛋白的协调，防止交配时精液引起的局部酸碱度变化对子宫内膜细胞造成的不良影响以及病原微生物对细胞的侵入。

本研究显示了 TACE 在小鼠动情周期子宫内膜的表达规律，揭示了其在子宫内膜周期性变化中的作用，为卵子受精胚胎植入做好准备，暗示 TACE 可能参与早期妊娠胚胎植入机制。这尚需进一步的研究去证实。

参 考 文 献

(下转第 440 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

本实验通过建立粪肠球菌感染的兔心内膜炎模型来评价 sprE 基因在粪肠球菌致病中的毒力作用。实验结果显示在兔心内膜炎模型,所形成的赘生物无论从肉眼观,还是赘生物称重,菌落计数等方面 OG1RF 组都比 sprE mutant 组明显。由此可见,兔心内膜炎模型构建是成功的。可利用此模型对肠球菌的毒力进行研究和评价。

参 考 文 献

[1] Jones RN. Impact of changing pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in the treatment of serious infections in hospitalized patients[J]. Am J Med,1996;100(6A):3-12.

[2] Kristich CJ,Li YH,Cvitkovitch DG,et al. Esp-Independent Biofilm Formation by Enterococcus faecalis[J]. J Bacteriology,2004;186(1):154-163.

[3] Mylonakis E,Engelbert M,Qin X,et al. The Enterococcus faecalis fsrB gene,a key component of the fsr quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model[J]. Infect Immun,2002;70(8):4678-4681.

[4] Singh KV,Qin X,Weinstock GM,et al. Generation and testing of mutants of Enterococcus faecalis in a mouse peritonitis model[J]. J Infect Dis,1998;178(5):1416-1420.

[5] Pai SR,Singh KV,Murray BE. In Vivo Efficacy of the Ketolide ABT-773(Cethromycin) against Enterococci in a Mouse Peritonitis Model[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2003;47(8):2706-2709.

[6] 吴利先,黄文祥.sprE 基因敲除粪肠球菌突变株的构建和功能的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报,2006;22(9):828-832

[7] 张春芬,张金萍,王 清,等.免急性细菌性心内膜炎的制作方法[J]. 中国现代应用医学杂志,2000;17(3):174-178.

[8] Jacqueline C,Asseray N,Batard E,et al. In vivo efficacy of linezolid in combination with gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. International Journal of Antimicrobial Agents,2004;24(4):393-396.

[9] Singh KV,Qin X,Weinstock GM,et al. Generation and testing of mutants of Enterococcus faecalis in a mouse peritonitis model[J]. J Infect Dis,1998;178(5):1416-1420.

[10] Besnier JM,Bastides F,Choutet P,et al. Therapy of infections due to methicillin susceptible Staphylococcus aureus(MSSA)[J]. Med Mal Infect,1997;27(1):225.

[11] 魏 瑾,李家泰.甲氧西林耐药金葡菌所致实验性心内膜炎的研究[J]. 中国临床药理学杂志,1996;12(1):46.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 418 页)

[1] Moss ML,Jin SL,Milla ME,et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour necrosis factor-alpha [J]. Nature,1997;385(6618):733-736.

[2] 日本生理学会,主编. 生理学实验[M]. 第3版.北京:北京人民卫生出版杜,1980.180.

[3] Amantha T,Carl PB,Daniel DC. Tumor necrosis factor-α converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding[J]. The Journal of Biological Chemistry,2003;278(5):3386-3394.

[4] Black RA,Rauch CT,Kozlosky CJ,et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells[J]. Nature,1997;385(6618):729-733.

[5] 郑 展,徐振晔.表皮生长因子受体及其信号转导通路与中西药肿瘤靶向治疗[J]. 中西医结合学报,2005;3(4):318-321.

[6] Fata JE,Chaudhary V,Khokha R.Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle[J]. Biol Reprod,2001;65(3):680-688.

[7] 孔利佳,汤宏斌,主编.实验动物学[M]. 第 1 版.湖北:湖北科学技术出版社,2002.12.

[8] Profet M. Menstruation as a defense against pathogenas transported by sperm[J]. Q Rev Biol,1993;68(3):335-386.

[9] Herz Z,Northey D,Lawyer M,et al.Acrosome reaction of bovine Spermatozoa in vivo:Sites and effects of stages of the estrous cycle [J]. Biol Reprod,1985;32(5):1163-1168.

(责任编辑:冉明会)