维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)12-1260-05

HOXa-10 在早孕小鼠子宫内膜中的表达

贾咏存[1],周生建[2],魏莎莉[1],杨 戎[1],陈晓玲[1],李 南[1]

(1. 重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学研究室,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 HOXa-10 基因在小鼠胚胎着床过程中的作用。方法:分别应用 FQ-PCR 和免疫组化方法检测未孕及早孕第 1、2、3、4、5、7 天小鼠子宫内膜 HOXa-10 基因及蛋白的表达。结果:FQ-PCR 测得随着小鼠妊娠天数的增加,子宫内膜 HOXa-10 基因表达量也逐渐增高,在孕 4 天达到峰值。免疫组化分析显示 HOXa-10 蛋白在子宫内膜的表达规律与 FQ-PCR 结果一致。结论:在小鼠胚胎着床过程中,HOXa-10 在子宫内膜中高表达,可能对子宫内膜容受性变化有重要的调节作用。

【关键词】HOXa-10;胚胎着床;实时荧光定量 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】2007-03-30

Expression of HOXa-10 gene in endometrium mice during early pregnancy

JIA Yongcun, et al

(Labortory of Reproductive Biology, Chongqing Medical University, Chongqing)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of HOXa-10 gene in the mouse uterus during embryo implantation. *Method*: real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) and immunohistochemistry were used to detect the HOXa-10 gene and protein of the mouse of un-pregnant pregnant d1、d2、d3、d4、d5 and d7. *Result*: The HOXa-10 mRNA/β-actin mRNA expression in pregnant group is higher than that of non-pregnant group, and the results showed gradual hoist trend as days past, the HOXa-10 mRNA expression reached the maximum at pregnant d4. Immunohistochemical analysis showed the same results as FQ-PCR. *Conclusion*: HOXa-10 is persistently expressed in mouse endometrium during the early pregnancy and maybe participates in the regulation process of mouse blastodyst implantation.

【Key Words】HOXa-10; Blastocyst implantation; Real-time fluorescence quantitative PCR; Immunohistochemical

转录调节因子 HOXA-10 是同源盒基因(HomeoBox HOX)亚类 AbdB 成员之一,近年有研究表明,HOXA-10 在细胞增殖和胚胎发育方面起着重要作用[1,2]。胚胎着床是一个复杂的生理过程,涉及胚胎与母体子宫间极其复杂而精细的多因素协同作用,包括胚泡的发育、分化,子宫内膜细胞增殖、发育与胚泡发育的同步化,以及子宫内膜的容受性变化等,子宫内膜的容受性变化在胚胎着床过程中起关键性作用。本研究用实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)和免疫组化方法分别检测未孕及早孕第 1、2、3、4、5、7 天小鼠子宫内膜 HOXa-10 基因和蛋白的表达规律。初步探讨它在小鼠胚胎着床过程中的作用,为进一步探讨胚胎着床机制提供实验依据。

1 材料与方法

作者介绍:贾咏存(1975-),男,硕士,主要研究方向:胚胎着床机制的研究。

1.1 材 料

1.1.1 实验动物及标本收集 体重 23~25g 的 NIH 雌性小鼠 70 只,购自重庆医科大学实验动物中心[合格证号:SCXK(渝) 20050002]。将小鼠雌雄合笼,次日观察雌鼠有阴栓者为妊娠第 1 天,按此依次计算妊娠天数。随机将未孕和早鼠分为 7 组(分别记为 D0、D1、D2、D3、D4、D5、D7),每组 20 只,断颈处死,无菌条件下取子宫内膜备用。再取以上 7 组小鼠(每组 8 只)的子宫,立即放在 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,切片备用。

1.1.2 主要试剂及仪器 大肠杆菌 JM-109 和质粒 pMD18-T 载体购自上海基康生物技术公司。限制性内切酶 EcoR Ⅰ、Pst Ⅰ、Taq DNA 聚合酶、T 载体连接试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、RT-PCR 试剂盒、RNA 提取试剂盒等均购自 TaKaRa 公司;梯度 PCR 仪、凝胶数字成像系统、ABI PRISM 7900(美国 BIO-Rad)型实时定量 PCR 仪。鼠抗人 HOXa-10 抗体(Santa Cruz),辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG-HRP、DAB 显色试剂盒(北京)。

1.2 方 法

1.2.1 总 RNA 的制备及 cDNA 合成 按照 TRI-zol 试剂的

维普资讯 http://www.cqvip.com

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。25μl 反应体系中总 RNA 1μg,Olig-dt 500ng,5×缓冲液 5μl,M-MLV(200U/μl)1 μl, RNAi(25U) 0.5μl,dNTPs(10mmol/L) 5μl,加 DEPC-H2O 至 25μl,70℃ 5min,42℃ 60min,70℃ 10min 进行逆转录反应。

1.2.2 荧光定量 PCR 标准品的制备 在 FQ-PCR 中需要制备标准品以产生标准曲线，普通 PCR 仪上进行 HOXa-10 片断的 PCR，获得 114 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 + HOXa-10 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 OD260 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、10^3copies/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 HOXa-10 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 HOXa-10 和 β-actin（引物和探针序列见表 1）。25μl 反应体系中含 Mg^{2+}（25mmol/l）3.0μl，dNTPs（各 2.5mmol/l）2.0 μl,10×buffer 2.5μl,引物 1,2(20 μmol/L)各 0.5μl,rTag 酶（5U/μl)0.2μl，探针（20 μmol/L）0.8μl,cDNA 模板 2.0μl。扩增反应条件 95℃ 10s 预变性，95℃ 15s,60℃ 30s 收集荧光信号，72℃ 30s，共 40 个循环。每个样本做 3 个平行管。检测结果用统计分析软件 SPSS12.0 进行单因素方差分析（见图 3）。

1.2.5 HOXa-10 的免疫组化染色 切片采用 SP 法进行免疫组化染色：切片常规脱蜡，梯度酒精中浸泡，滴加 3%的双氧水 15min 以灭活内源性的酶；热修复抗原；滴加鼠抗人 HOXa-10 单克隆抗体（1:300)37℃孵育 2h；用磷酸盐缓冲液（PBS)代替一抗为阴性对照。滴加山羊抗鼠 IgG 抗体 -HRP 多聚体 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，棕黄色着色处为阳性。每组动物取 10 张切片，每张切片 3 个视野。

2 结 果

2.1 各期小鼠子宫内膜 HOXa-10 基因的表达情况

FQ-PCR 结果的判定：图 1 为 HOXa-10 标准品扩增曲线，标准曲线公式：Y=33.491-2.77X（r=0.997）。横坐标为起始模板对数，纵坐标为 CT 值，曲线由低到高表示标准品浓度分别为 1×10^3,1×10^4,1×10^5,1×10^6,1×10^7。图 2 为待测样品扩增曲线，横坐标为循环数，纵坐标为荧光强度。

结果显示，HOXa-10 基因在小鼠性周期各期子宫内膜上均有表达，而且随着小鼠怀孕天数的增加其表达量也逐渐增高，在孕 D4 达到峰值，孕 D5~D7 开始下降。结果显示 D0、孕 D1 和孕 D7 各组之间无显著差异（P>0.05），这三组与其余各组的差异均有

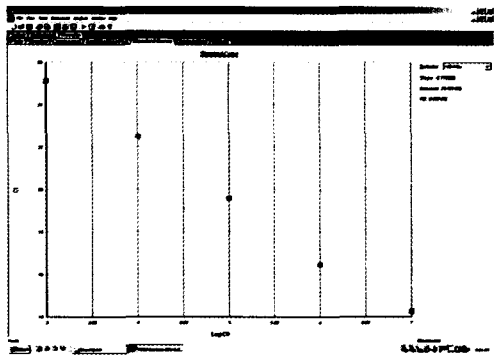


图 1 HOXa-10 基因的标准曲线图

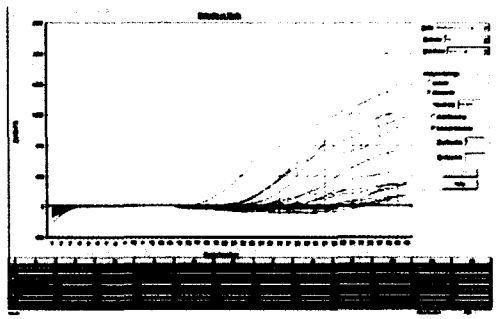


图 2 FQ-PCR 荧光信号检测图

表 1 引物及探针序列

基 因	引物序列
HOXa-10 外围引物正义	5'-CCAGCCCCTTCAGAAAACAG-3'
HOXa-10 外围引物反义	5'-GCAGCGTTTCTTCCGGC-3'
探针配套 HOXa-10 正义	5'-GGAGGCACACGCGTCATC-3'
探针配套 HOXa-10 反义	5'-GGACGCTACGGCTGATCTCT-3'
HOXa-10 荧光探针	F- AGAAGGACTCCCTGGGCAGTTCCAAA-P
内参 β-actin 正义链	5'-CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC-3'
内参 β-actin 反义链	5'-TAGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT-3'
内参 β-actin 荧光探针	F-TCCTTCTTGGGTATGGAATCCTGTGGC-P

维普资讯 http://www.cqvip.com

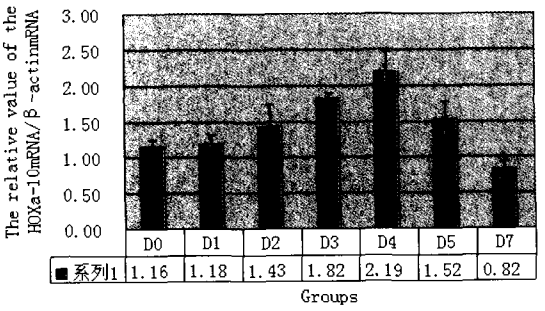


图 3 FQ-PCR 检测 HOXa-10 基因在各组小鼠子宫内膜中的表达情况

注：D0、D1 和 D7 各组两两比较 $P>0.05$，其余各组两两比较 $P<0.05$。

显著性意义($P<0.05$)。

2.2 免疫组化结果分析

HOXa-10 蛋白在腺上皮、腔上皮和间质细胞胞浆中均有表达，随着子宫内膜组织增生、间质细胞分裂增殖程度的改变表达发生变化（见图 4~图 10）。

HOXa-10 蛋白在早孕小鼠子宫内膜呈一定的规律表达：D0~孕 D3 逐渐升高，孕 D4 达高峰，从孕 D5 开始下降，孕 D7 降至未孕时的水平。孕 D2~D3 时 HOXa-10 蛋白主要在子宫腔上皮及腺上皮强表达；孕 D4~D5 时 HOXa-10 蛋白在腺上皮表达



图 4 D0 组



图 5 孕 D1 组



图 6 孕 D2 组



图 7 孕 D3 组



图 8 孕 D4 组



图 9 孕 D5 组

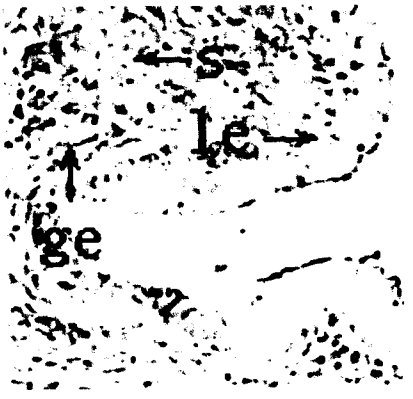


图 10 孕 D7 组

注：le：腔上皮 s：间质细胞 ge：腺上皮

图 4~图 10 HOXa-10 蛋白在未孕和妊娠各组小鼠子宫内膜的表达(SP×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 HOXa-10 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 HOXa-10 蛋白的表达						
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D7
腔上皮	+	+	+	+	±	±	—
腺上皮	+	+	+	+	+	+	—
间质细胞	—	—	—	±	+	+	+
平均阳性光密度	6.12 ± 0.68	7.43 ± 0.50	7.61 ± 0.49	8.08 ± 0.31	8.39 ± 0.24	7.32 ± 0.25	6.88 ± 0.31

注：+：阳性 ±：弱阳性 —：阴性

量开始下降，在间质细胞开始表达；孕 D7 时 HOXa-10 蛋白在子宫腔上皮和腺上皮中不表达，而在间质细胞中继续表达。见表 2。

3 讨 论

同源盒基因 HOXA-10 染色体定位于 7p15-p14.2，mRNA 全长 2691bp，编码 785 个氨基酸。HOX 基因均含有一个约 183 个核苷酸组成的同源框序列，编码 61 个氨基酸构成的同源域结构，通过螺旋-转角-螺旋的结构作为 DNA 的结合域，于下游靶基因的 DNA 序列（TTAT 或 TAAT）相识别，从而激活或抑制下游基因的转录[3,4]。有研究表明，HOXA-10 基因在粒细胞性白血病[5]中有高表达，认为 HOXA-10 可能有助于维持早期髓细胞增生的潜能。在表皮样卵巢癌[6]和子宫内膜癌[7]中 HOXA-10 呈低水平表达，体外实验中增强 HOXA-10 基因在子宫内膜肿瘤细胞中的表达会抑制肿瘤的侵袭和扩散，这可能与 HOXA-10 基因启动子的甲基化作用有关。自从 Lamy V 等[8]提出肿瘤胚胎性起源概念以来，胚泡着床与肿瘤侵袭性转移之间相似的生物学行为越来越受到重视，大量研究发现它们之间存在许多相似之处，表现在细胞增殖分裂、基因表达、侵袭特性、血管形成、细胞凋亡和免疫逃逸等方面。近年的研究发现，HOXA-10 在细胞增殖和胚胎着床方面起着重要作用。

胚胎着床是人和哺乳动物生殖过程中妊娠建立的重要环节，是决定妊娠成功与否的关键。胚胎成功的植入取决于子宫内膜的容受性变化和胚胎发育的同步性。着床窗口期，在雌孕激素作用下，子宫内膜发生形态学和生理学改变转为容受期，雌激素促使子宫内膜增生肥大，孕激素使内膜从增生期变为分泌期形成一个有利于胚胎着床的宫内环境[9]。胚胎黏附时，子宫内膜腺上皮下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，为维持胚胎的发育提供必要的支持[10]。

本研究运用 FQ-PCR 和免疫组织化学技术分别检测未孕及早孕小鼠的子宫内膜 HOXa-10 的基因和蛋白的表达，结果显示：妊娠的子宫内膜组织 HOXa-10 mRNA 的表达大于非妊娠的子宫内膜组织，且随着妊娠天数的增加呈现逐渐增加的趋势，在小鼠着床窗口期即孕 D4 达到高峰，孕 D5 开始下降，孕 D7 时接近未孕水平。免疫组化结果显示：在小鼠孕 D2~D3，子宫腔上皮及腺上皮 HOXa-10 强表达，子宫肌层低表达；孕 D4 时 HOXa-10 蛋白在子宫内膜的表达发生转移，子宫腺上皮表达量开始下降，腺上皮下方间质细胞开始表达；孕 D5 时在子宫腺上皮表达转阴，在间质细胞中表达，但这时 HOXa-10 蛋白的表达量已经下降到孕 D1 时的水平；孕 D7 时，HOXa-10 在间质细胞中继续表达，这提示其在子宫内膜细胞分化、蜕膜化和维持妊娠方面起一定作用。在妊娠初期，小鼠体内分泌雌、孕激素增加，HOXa-10 基因的表达量也相应增高[11]，可能促进子宫内膜间质细胞分裂、增殖、生长，有利于间质细胞转化成为蜕膜细胞，为子宫内膜的蜕膜化做好了准备，直至蜕膜化过程完成后 HOXa-10 的表达量又逐渐下降。子宫内膜基质细胞蜕膜化过程中形态由梭形逐渐转变为大多角形；并伴随核增大及胞质增加，细胞间的界线也逐渐变得不清。结合早孕期小鼠子宫内膜 HOXa-10 基因 FQ-PCR 检测结果，推测 HOXa-10 上调，可能优化 HOXa-10 所调节的靶基因的整体表达而影响基质细胞的蜕膜化过程，提供最合适的子宫内膜容受性，为胚胎着床创造条件。由此推测 HOXa-10 基因对胚胎着床时

维普资讯 http://www.cqvip.com

子宫内膜蜕膜化有重要的调节作用,参与了滋养层细胞的增殖和分化过程。

总之,HOXA-10 作为调节细胞发育的转录因子可能参与调节子宫内膜间质细胞及腺上皮周期性的增殖与分化。最终使子宫内膜进入容受状态,并可能参与子宫内膜的蜕膜化从而维持妊娠状态。但其诱导子宫内膜进入容受状态和在子宫内膜的蜕膜化过程的具体作用机制、通过何种途径还不明了,尚需进一步的研究。

(通讯作者:魏莎莉,重庆医科大学生殖生理教研室,E-mail:zwz007cn@yahoo.com.cn)

参 考 文 献

[1] Lim H,Ma L,Ma W,et al. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse[J]. Molec. Endocr,1999;13:1005-1017.

[2] Taylor H.S,Arici A,Olive D,et al. HOXA-10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium[J]. Clin. Invest,1998;101:1379-1384.

[3] Yong W,Pei Jun Z. On structure and function of homeodomain [J]. Devel Reprod Biol,1997;6(1):81-89.

[4] Shen WF,Rozenfeld S,Lawrrence HJ,et al The Abd-B-like homeod omain proteins can be subdivided by the ability to from complexes with Pbxla on a novel DNA target[J]. Biol chem,1997;272(13):8198-8206.

[5] Lawrence H J,Saurageau G,Abmad W,et al. Stage and lineage specific expression of the HOXA-10 homeobox gene in nomal and leukemic hematopoietic cells[J]. Experimental Hematology,1995;23:1160-1166.

[6] Cheng W,Liu J,Yoshida H,et al. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract[J]. Nat Med,2005;11(5):531-537.

[7] Yoshida H,Broaddus R,Cheng W,et al. Deregulation of the HOXA-10 homeobox gene in endometrial carcinoma:role in epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Res,2006;66(2):889-897.

[8] Lamy V,Roussi S,Chaabi M,et al. Chemopreventive effects of lupulone, a hop{beta}-acid,on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis[J]. Carcinogenesi,2007;4(17):191-203.

[9] Biwas S. The role of nitric oxide in the process of implantation[J]. Reprod Fertil,1998;114(1):157.

[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):538-547.

[11] Yaoting G,Jenning ZH,Lingwen Y. Regulation of HOXA10 and its expression in normal and a bnormal endometrim[J]. Mol Hum Reprod,1999;5(9):866-867.

(上接第 1245 页)

(12):1064-1074.

[4] Jordana M,Sarnstrand B,Sime PJ,et al. Immune-inflammatory functions of fibroblasts[J]. Eur Respir J,1994;7(12):2212-2222.

[5] Tremblay GM,Jordana M,Gauldie J,et al. Fibroblasts as effector cells in fibrosis[M]. In:Phan SH,Thrall RS,editors. Pulmonary fibrosis. New York:Marcel Dekker;1995.541-577.

[6] Powell DW,Mifflin RC,Valentich JD,et al. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease[J]. Am J Physiol,1999;277(1 Pt 1):C1-C9.

[7] Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis[J]. Chest,2002;122(6Suppl):286S-289S.

[8] William E,Lawson,Vasiliy V,et al. Characterization of Fibroblast-specific Protein 1 in Pulmonary Fibrosis[J]. Am Respir J,2005;171(8):899-907.

[9] Spinozzi F,Agea E,Russano A,et al. Th2-type cytokines and the Fas way to pulmonary fibrosis:comment on the article by Atamas[J]. Arthritis Rheum,2000;43(1):236-238.

[10] Crestani B,Dehoux M,Hayem G,et al. Differential role of neutrophils and alveolar macrophages in hepatocyte growth factor production in pulmonary fibrosis:Laboratory investigation[J]. American Journal of Technical Methods and Pathology,2002;82(8):1015-1022.

[11] Matsuoka H,Sisson TH,Nishiuma T,et al. Plasminogen-mediated activation and release of hepatocyte growth factor from extracellular matrix[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2006;35(6):705-713.