维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)07-0679-03

自然流产患者蜕膜 MMP10 的表达及临床意义

余秋波,李红梅,董艳玲,王应雄,何俊琳

(重庆医科大学生殖生物学研究室,公共卫生学院遗传优生教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨基质金属蛋白酶 10(MMP10)基因及其蛋白在人自然流产蜕膜中的表达水平及临床意义。方法:利用 RT-PCR 和 Western blotting 技术分别检测 MMP10 基因和蛋白在人正常蜕膜和自然流产蜕膜的表达水平、利用免疫组织化学技术检测 MMP10 在人正常蜕膜和自然流产蜕膜组织中的分布。结果:正常蜕膜中 MMP10 基因(0.20±0.08)及蛋白(0.25±0.07)表达均较低,在自然流产蜕膜中 MMP10 基因(0.65±0.10)及蛋白(0.79±0.10)表达均较高,两者差异具有显著性意义($P<0.01$);MMP10 主要表达在流产蜕膜的基质细胞。结论:MMP10 在流产蜕膜中高表达可能有利于降解细胞外基质,促进胚胎滋养细胞的侵袭,从而延缓自然流产。

【关键词】基质金属蛋白酶 10;自然流产;蜕膜

【中国图书分类法分类号】R714.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-27

Expression level of MMP10 in human spontaneous abortion deciduas and its clinical significance

YU Qiubo, et al

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

【Abstract】*Objective*: To discuss expression levels of MMP10 gene and protein in human spontaneous abortion deciduas and its significance in clinic. *Methods*: Expression levels of MMP10 gene and protein in human spontaneous abortion decidua were determined by RT-PCR, Western blotting and distribution by immunohistochemistry. *Results*: Expression levels of MMP10 mRNA and protein in all normal deciduas were lower (0.20±0.08, 0.25±0.07), but all increased in Spontaneous Abortion Deciduas (0.65±0.10, 0.79±0.10). The difference between the two groups was significant ($P<0.01$, MMP10 was mainly expressed in stromal cells. *Conclusion*: The results suggested that higher expression of MMP10 in spontaneous abortion deciduas might resolve the matrix metalloproteinase, promote the extrovillous cytocyst cells invasion and prohibit the spontaneous abortion.

【Key words】 Protein of matrix metalloproteinase10; Spontaneous abortion; Decidua

自然流产是胚胎受到各种病理因素如遗传缺陷、感染、母体内分泌失调、免疫因素等的影响,导致胚胎不能继续发育而引起的。导致自然流产的因素较多,近来研究发现,蜕膜及其分泌的细胞因子构成了母胎之间特殊的免疫微环境,使胚胎滋层细胞进行"有控性侵袭",在胎盘的建立及胚胎发育中发挥重要作用,此微环境的变化可能是导致自然流产的重要因素。基质金属蛋白酶 10(Protein of matrix metalloproteinase, MMP10),即基质溶解素-2,能降解各种细胞外基质成分,促进肿瘤细胞的浸润转移,而胚胎滋养细胞的侵袭与肿瘤细胞的侵袭相似,我们设想 MMP10 也可能通过降解蜕膜的细胞外基质来促进胚胎滋养细胞的侵袭。因此,本研究拟通过 RT-PCR 技术、Western blotting 和免疫组织化学技术来检测人正常蜕膜与自然流产患者蜕膜 MMP10 基因及蛋白的表达规律,以期阐明 MMP10 与自然流产发生的关系及可能的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料

自然流产组选取 2006 年 3 月~2006 年 10 月在重庆医

作者介绍:余秋波(1976-),男,博士研究生,主要研究方向:胚泡着床的分子机制。

基金项目:国家自然科学基金(No.30500054),重庆市自然科学基金重点项目(渝科发计字[2004]47 号),重庆市计生委项目(No.2004-007)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

科大学附属第一院妇产科的门诊患者，年龄在 24~30 周岁孕妇 30 例，B 超提示胚胎停止发育，妊娠 8~12 周。作绒毛染色体培养排除染色体异常、排除生殖道畸形及感染、内分泌失调等相关疾病，孕期无重大疾病史，家族无遗传病史，孕期无致畸环境接触史等；正常对照组选取年龄在 24~30 周岁健康孕妇（无既往自然流产及死胎）人工流产 30 例，妊娠 8~12 周，B 超提示胚胎发育正常。标本采集均征得本人知情同意，收集无菌新鲜蜕膜，立即置液氮保存。

1.2 *方法*

1.2.1 RNA 的抽提和逆转录聚合酶链反应（RT-PCR） 自然流产蜕膜组织和正常组织总 RNA 提取按上海生工 TRIZOL 试剂盒说明操作，紫外分光光度计测定 RNA 的 A260，A280 值，计算 A260/A280 值，判定 RNA 纯度及计算其浓度。取部分 RNA 琼脂糖凝胶电泳，观察其完整性。MMP10 基因（Gene Bank ID：NM_002425） 上游引物：5'-GAGATGCCAGC-CAAGTGT-3'，下游引物：5'-TCAACCTTAGGCTCAACT-3'，退火温度 50℃，扩增片段长度 461bp。内对照 β-actin 基因（Gene Bank ID：Mm.297），上游引物：5'-AGATCTGGCAC-CACACCTTCTAC-3'，下游引物：5'-TCAGGATCTTCAT-GAGGTAGTCT-3'，扩增片段长度 329 bp。RT-PCR 按 Takara 试剂盒操作。PCR 扩增条件为：94℃预变性 5min，然后进入循环：94℃50s，50℃30s，72℃40s，循环 30 次。最后 72℃ 5min，PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳，凝胶图像分析系统扫描分析图像。

1.2.2 蛋白印记（Western blot） 蜕膜组织总蛋白按 Tripure 试剂盒操作，紫外吸光度法对蛋白进行定量，等量上样 PAGE 分离，半干转移系统转膜，将 PAGE 分离的蛋白转到 PVDF 膜上，以 β-actin 为内参照，加 MMP10（购自 SantaCrutz）一抗（1:200）和 β-actin 一抗，二抗，SABC（北京中山）处理后，DAB（北京中山）显色成像，用 Quantity One 4.4.0 软件对 Western blot 成像图进行分析，得到正常和自然流产蜕膜 MMP10 蛋白的相对表达值。

1.2.3 免疫组织化学检测 MMP10 在蜕膜组织的表达 常规石蜡包埋，切片（厚度 5μm），脱蜡，3%双氧水孵育以消除内源性过氧化物酶，微波修复抗原，一抗（SantaCrutz）工作浓度 1:100，操作过程按北京中山 SP9000 组织化学试剂盒及 DAB 显色试剂盒说明进行。MMP10 定位于细胞浆，呈棕黄色颗粒，无明显背景着色者为阴性表达，阳性细胞表达数 <25%为（-）；25%~50%为（+）；50%~75%为（++）；>75%为（+++）。结果用北航 CM-2000B 生物医学图像分析系统进行图像采集分析。

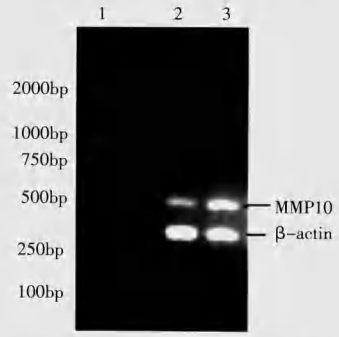
1.3 *统计分析*

采用组间样本均数 t 检验，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，显著性检验界值为 0.01 和 0.05。

2 结 果

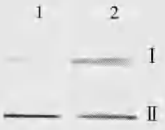
2.1 MMP10 基因及蛋白的表达

MMP10 总 RNA 电泳凝胶成像可见 28s、18s 两条带，OD260/OD280 约为 1.8~2.0，PCR 产物凝胶电泳成像见图 1。Western blot 检测 MMP10 蛋白的表达，发现在正常蜕膜及自然流产蜕膜组织中均有表达（图 2），但是在正常蜕膜中表达均较低，而自然流产蜕膜中表达均较高（表 1），自然流产组与正常组比较差别具有显著统计学意义（$P<0.01$）。



1.Marker：DL2000；2. 正常蜕膜；3.自然流产蜕膜

图 1 RT-PCR 结果



1.正常蜕膜；2.自然流产蜕膜；I.MMP10 II.β-actin

图 2 Western blot 结果

表 1 自然流产蜕膜与正常蜕膜 MMP10mRNA 及蛋白表达比较（$\bar{x} \pm s$，n=30）

组别	MMP10mRNA	MMP10 蛋白（Western blot）	MMP10 蛋白（免疫组织化学）
正常蜕膜	0.20 ± 0.08	0.25 ± 0.07	0.38 ± 0.12
自然流产蜕膜	0.65 ± 0.10*	0.79 ± 0.10*	0.72 ± 0.10*

* 表示同列两者比较，差异显著（$P<0.01$）

2.2 MMP10 在蜕膜组织的表达

MMP10 在正常蜕膜组织中，呈阴性或弱阳性，只在部分蜕膜基质细胞的胞浆中可见 MMP10 的表达，如图 3；而自然流产蜕膜组织基质细胞的胞浆则可见明显的黄棕色颗粒，MMP10 呈阳性（++或+++），如图 4，在少数细胞核发生固缩裂解的基质细胞，其细胞浆 MMP10 则呈阴性，如图 5。从图中还发现，流产蜕膜与正常蜕膜比较，前者细胞排列疏松，细胞间距较大，部分细胞核已发生浓缩甚至裂解。

自然流产组 MMP10 蛋白的表达与正常组比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

差别具有显著统计学意义（$P<0.01$）。MMP10 蛋白与基因的表达基本一致，在正常蜕膜中较低，在流产蜕膜中较高，见表 1。

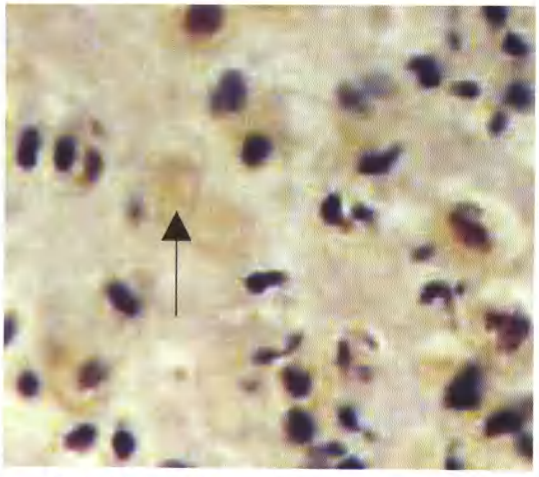


图 3 正常蜕膜 400×箭头示蜕膜基质细胞的胞浆呈弱阳性

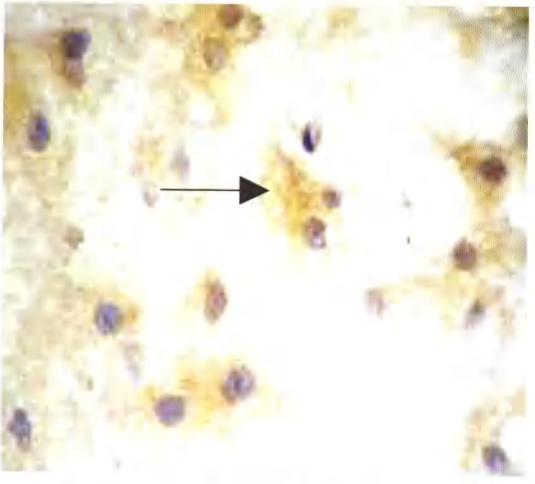


图 4 自然流产蜕膜 400×箭头示流产蜕膜基质细胞的胞浆呈强阳性

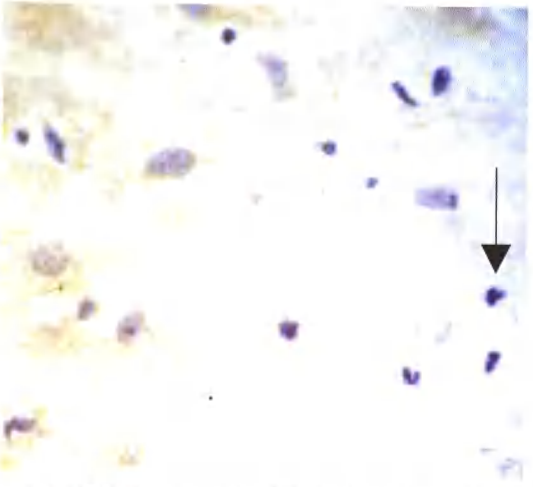


图 5 自然流产蜕膜 400×箭头示核发生固缩的流产蜕膜基质细胞胞浆呈弱阳性

3 讨 论

MMP10 由染色体 11q22.3 编码的 476 个氨基酸组成，含有两个锌离子结合区域。MMP10 的表达受到多种因子的调节，肌细胞增强因子-2（MEF-2）作为 MMP10 转录的直接激活因子，促进 MMP10 的表达[1]；C 反应蛋白可以介导 MMP10 在人的上皮细胞中表达[2]；ZNF-267 作为 MMP10 负性转录因子，结合到 MMP10 启动子区域，抑制其转录翻译[3]。目前对 MMP10 的研究主要集中在肿瘤领域：MMP10 在胃癌组织中表达增高，癌旁组织为阴性，被认为是胃癌的一个很好的标志物，同时 MMP10 表达的高低也是胃癌预后的指标之一[4]；MMP10 在 NSCLC 中呈高水平表达，且具有高活性，而正常细胞为阴性，因此，MMP10 可能是肺癌治疗的潜在靶标[5]；MMP10 在食管癌中的表达率为 35.19%，而食管癌旁正常组织均为阴性表达，食管癌中的表达强度与食管癌的组织分化程度呈负相关，与临床分期呈正相关，表明 MMP10 的表达在食管癌的浸润转移中发挥着重要作用[6]；LFA-1 与 ICAM-1 之间的相互作用可以调节 MMP10 的表达，促进肿瘤的转移[7]。MMP10 还可能参与了血管的发生，骨的重塑等[1,8]。在胚泡着床、胚胎发育及自然流产方面，研究较多的是 MMP2，MMP9，而 MMP10 尚未见报道。

本研究发现，MMP10 在自然流产蜕膜组织中表达较高，主要表达在蜕膜基质细胞，而在正常蜕膜组织中表达较低，在流产蜕膜组织中细胞核已经发生浓缩裂解的细胞，其胞浆也为阴性。MMP10 在蜕膜中的这些表达特点，提示 MMP10 在自然流产蜕膜中的高表达可能是代偿性的，是流产可能发生而机体自身采取的补救措施，因此，从这一角度看，MMP10 对于阻止流产是有益的，其高表达是自然流产引起的结果。因为流产蜕膜组织的微环境被破坏，不利于胚胎滋养细胞的侵袭，这时 MMP10 表达增高就可以大量水解和重塑细胞外基质，为胚胎滋养细胞侵袭子宫内膜及螺旋动脉提供更多适宜的空间，这相当于机体自身的“保胎”行为。MMP10 在正常蜕膜中的表达呈阴性或弱阳性，提示在早期正常妊娠胚胎滋养细胞侵袭蜕膜过程中，水解细胞外基质主要靠胚胎滋养细胞本身分泌的 MMP2、MMP9 等，MMP10 并没有发挥重要作用。因此，结合目前的研究结果及本文的研究发现，我们认为

（下转第 781 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

tioxidant respose element [J].Biochim Biophys Acta,2005;1744(1):29-37.

[9] Joung Hyuck Joo,Jae Wha Kim,Younghee Lee,et al.Involvement of NF-κB in the regulation of S100A6 gene expression in human hepatoblastoma cell line $HepG_2$[J].Biochem Biophys Res Commun,2003;307:274-280.

[10] Zeng FY,Gerke V,Gabins HJ.Identification of annexin II, annexin VI and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as calcyclin-binding proteins in bovine heart[J].Int Biochem Cell Biol,1993;25(7):1019-1027.

[11] Nowotny M,Spiechowicz M,Jastrzebska B,et a1.Calcium- regulated interaction of Sgtl with S100A6 (calcyclin)and other S100 proteins[J].J Biol Chem,2003;278(29):26923-26928.

[12] Alejandra T,Stephen EM.Calcium-and cell cycle-dependent association of annexin11 with the nuclear envelope [J].J Biol Chem,2003;278(22):20210-20216.

[13] Stradal TB,Gimona M.Ca^{2+} -dependent association of S100A6 (Calcyclin) with the plasma membrane and the nuclear envelope[J].J Biol Chem,1999;274(44):31593-31596.

[14] Ilg EC,Schafer BW,Heizmann CW.Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors[J].Int J Cancer,1996;68(3):325-332.

[15] Weterman MA,Stoopen GM,van Muijen GN,et al.Expressio of calcyclin in human melanoma cell lines correlates with metastatic behavior in nude mice[J].Cancer Res,1992;52(5):1291-1296.

[16] Maelandsmo GM,Florenes VA,Mellingsaeter T, et al. Differential expression patterns of S100A2,S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma[J].Int J Cancer,1997; 74:464-469.

[17] Vimalachandran D,Greenhalf W,Thompson C,et al.High nuclear S100A6(Calcyclin) is significantly associated with poor survival in pancreatic cancer patients[J].Cancer Res,2005;65(8):3218-3225.

[18] Kenoki Ohuchida,Kazuhiro Mizumoto,Nami Ishikawa,et al.The role of S100A6 in pancreatic cancer development and its clinlic implication as a diagnostic marker and therapeutic target[J].Clin Cancer Res,2005;11(21):7785-7793.

[19] Breen EC,Tang K.Calcyclin (S100A6) regulates pulmonary fibroblast proliferation,morphology,and cytoskeletal organization in vitro [J].J Cell Biochem,2003;88:848-854.

[20] Tonini GP,Casalaro A,Cara A,et al.Inducible expression of calcyclin, a gene with strong homology to S-100 protein, during neuroblastoma cell differentiation and its prevalent expression in Schwann-like cell line[J].Cancer Res,1991;51:1733-1737.

[21] Luu H H,Zhou L,Haydon R C,et al. Increased expression of S100A6 is associated with decreased metastasis and inhibition of cell migration and anchorage independent growth in human osteosarcoma[J],Cancer Lett,2005;229(1):135-148.

[22] Hsiao LH,Beat WS,Nobuyuki S,et al. Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays [J].Biophys Res Commun,2003;307:375-381.

(上接第 681 页)

MMP10 在自然流产蜕膜组织中高表达可能是自然流产引起的结果,MMMP10 的高表达有利于蜕膜基质的重塑，为胚胎滋养细胞的侵袭提供适宜的空间,对于阻止流产是有益的。但其确切分子机制尚有待进一步实验研究。MMP10 在自然流产蜕膜中的高表达提示 MMP10 可能将成为治疗自然流产的新靶点。

(通讯作者：何俊琳,023-68485001,E-mail:hejunlin_11@yahoo.com.cn)

参 考 文 献

[1] Chang S,Young BD,Li S,et al.Mapping and partial characterization of proteases expressed by a CHO production cell line[J]. Cell,2006;126(2):321-334.

[2] Montero I,Orbe J,Varo N.C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis[J].J Am Coll Cardiol,2006;47(7):1369-1378.

[3] Schnabl B,Hu K,Muhlbauer.Zinc finger protein 267 is up-regulated during the activation process of human hepatic stellate cells and functions as a negative transcriptional regulator of MMP-10[J]. Biochem Biophys Res Commun,2005;335(1):87-96.

[4] Aung PP,Oue N,Mitani Y,et al. Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data:melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer[J].Oncogene,2006;25(17):2546-2557.

[5] Gill JH,Kirwan IG,Seargent JM,et al.MMP-10 is overexpressed,proteolytically active,and a potential target for therapeutic intervention in human lung carcinomas [J].Neoplasia,2004;6 (6):777-785.

[6] YANG Guotao,YAN Zhaohua,ZHOU Yuting,et al. Expression of MMP10 and FHIT gene and the clinieopathological signifcance in esophageal cancer[J].Journal of Shandong University(Health Sciences),2005;43(12):1659-1662.

[7] Van Themsche C,Alain T, Kossakowska AE.Stromelysin-2 (matrix metalloproteinase 10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo[J].J Immunol,2004;173(6):3605-3611.

[8] LaFramboise WA,Bombach KL,Pogozelski AR,et al.Hepatic gene expression response to acute indomethacin exposure [J].Mol Diagn Ther,2006;10(3):187-196.