维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0572－04

小鼠胚泡黏附时已黏附侧与未黏附侧子宫内膜蛋白质组差异的研究

潘 卫，王应雄，杨 戎

(重庆医科大学生殖医学系遗传优生教研室，重庆 400016)

【摘 要】目的：用蛋白质组相关技术分析小鼠胚泡黏附时已粘附侧与未黏附侧子宫内膜蛋白质组的差异，探讨小鼠胚泡在双侧子宫黏附不同步现象发生的可能机制。方法：用固相 pH 梯度双向凝胶电泳(2D－PAGE)分别分离妊娠五天(D_5)小鼠胚泡已黏附侧与未黏附侧子宫内膜的蛋白质组。银染显色，PDQuest 2DE 软件分析。结果：图像分析测得两种胶的匹配率达 82.5%，在等电点 pI4～7、分子量 14.0～75.4kD 范围内分离得胚泡黏附侧小鼠子宫内膜蛋白点大约 760 个，胚泡未黏附侧小鼠子宫内膜蛋白点大约 720 个，其中至少 60 个蛋白点在两种子宫内膜间有 2 倍以上的量变。结论：小鼠双侧子宫内膜蛋白质的差异表达，是造成两侧子宫内膜胚泡附着不同步的一个可能原因。

【关键词】蛋白质组；双向凝胶电泳；胚泡；着床

【中国图书分类法分类号】R321.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－12－29

Comparative study between protein profile of mice endometrium with blastocysts adhering and without blastocysts adhering

PAN Wei, et al

(*Department of Reproductive Medical Science, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Examining the difference in the protein profiling of endometrium between the blastocyst－adhering side and the side without blastocyst adhering, in order to study the asynchrony of blastocysts adhesion between two uteri. *Methods*: The endometrium with and without blastocyst adhering from the mice pregnant for 5 days were analyzed by two－dimensional gel electrophoresis and imaging analysis. *Results*: The number of matched protein spots between two gels was up to 82.5%. 760 and 720 protein spots with a molecular mass between 14.0～75.4 and isoelectric points (pI) from 4～7 were catalogued from silver－stained gels of the blastocyst－adhering endometrium and the endometrium without blastocyst adhering respectively. At least 60 proteins were up－regulated or down－regulated by over two folds between two groups. *Conclusion*: the different expression of protein profile may be a cause underlying the the asynchrony of blastocysts adhesion between two uteri.

【Key words】Proteome; Two－dimensional gel electrophoresis; Blastocyst; Implantation

胚泡植入(implantation)是一个复杂而重要的生命过程，涉及胚胎的发育分化与子宫内膜的同步化、胚泡在子宫内膜的粘附、入侵等过程。胚泡植入要求在某一特定时期发生，即所谓的植入窗口期，胚泡滋养层达到侵入状态，宫内膜达到接受状态，且两者同步发生才会导致胚泡成功植入。这一时期仅在极短的时间发生，小鼠胚泡黏附发生在妊娠第 5 天。

由于在研究人类生殖机制时某些材料不易获得，而小鼠和人类的卵发生、前植入期以及发育的总体图基本相似[1]，鼠生殖机制的研究为了解人类生殖健康和疾病发生的机制提供了有意义的资料。小鼠有双角子宫，在用小鼠为模型研究着床机制时，奇怪地发现大约有 15% 的孕小鼠在妊娠第 5 天(D_5)时表现出左右侧子宫内膜胚泡附着的不同步，并且主要表现为左侧已有明显的胚泡附着时，右侧仍未发现胚泡附着。利用蛋白质组的相关技术分析这两侧子宫内膜蛋白质组表达的差异，有助于从蛋白质组的整体水平探讨这种现象发生的可能机制。

作者介绍：潘 卫(1966－)，女，博士生，副教授，主要研究方向：临床检验诊断。

基金项目：国家自然科学基金项目(30270510)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 动物

昆明小鼠由重庆医科大学动物中心提供,医动字 310101005,重动字 0101005。选择月经周期中任意时期的未交配雌鼠(6~8 周龄)晚 8:00 与雄鼠合笼,次晨发现有阴栓者为妊娠第 1 天(D_1)孕鼠。

1.2 试剂

IPG Buffer、IPG Cover Fluid、linear IPG 干胶条(pH4~8,17cm)、Bio-Lyte(pH4~6、pH5~7)、低分子量蛋白标记物、30%丙烯酰胺(29:1,3.3% C)、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二硫苏糖醇(DTT)、硫脲(Thioourea)、十二烷基硫酸钠(SDS)购自 Bio-Rad 公司,超纯脲(ultra urea)、四甲基乙二胺(TEMED)、、丙基硫酸盐(CHAPS)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、碘乙酰胺(iodoacetamide)购自 Sigma 公司,Protease Inhibitor Cocktail 购自 Pierce 公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 设备

IPGphor、附件和循环水浴、Protein Ⅱ xi Cell 电泳系统及附件 GS-710 光密度仪、PDQuest6.0(Bio-Rad)。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠子宫内膜的获取 妊娠第 5 天的小鼠(D_5),参考谭毅等[2]方法,从尾静脉注射台盼蓝 0.125ml,10min 后脱颈处死,75%酒精浸泡消毒,移至超挣工作台,迅速取出双侧子宫角,选择仅有单侧子宫角染有蓝色带(蓝色部位为着床点)的子宫于消毒表皿上,无菌冰 PBS 冲洗 3 次。染有蓝色带的子宫角胚泡已发生黏附,未有蓝色带的子宫角胚泡未发生黏附。用眼科剪在子宫颈部将两侧子宫角剪断,分别置于不同的消毒表皿中,无菌 PBS 冲洗宫腔,将冲洗液于倒置显微镜下观察,发现胚泡黏附侧子宫角冲出的胚泡已脱透明带,而另一侧的胚泡发育完好,但未脱透明带。眼科镊夹住单侧子宫角,用处理过的 4 号针头从近输卵管端逐渐向子宫颈方挤压滚动,直至子宫内膜呈长条状完全滑出。两侧子宫角分装在不同的离心管备用。

1.4.2 蛋白样品的制备 获得的小鼠子宫内膜组织,分别用含 PMSF(3mmol/L)的冰 PBS 冲洗 3 次,按 50mg 标本用 1ml 裂解缓冲液(7mol/L ultra urea,2mol/L Thiourea,2% CHAPS,50mmol/L DTT,40mmol/L Tris,0.2% pH 3~10 的 Pharmalyte,3mmol/L PMSF,1% Protease Inhibitor Cocktail)冰浴中匀浆,分装于 1.5ml 离心管中,加 20μg/ml Dnase 和 5μg/ml Rnase 在 4℃ 放置 15min,13000r/min,4℃ 离心 30min,收集上清夜,Bradford 法测定蛋白浓度,液氮保存。

1.4.3 一向固相 pH 梯度等电聚焦 两种样本各 120μg 量加入重泡胀液(8mol/L urea,2% CHAPS,0.5% IPG Buffer,痕量溴酚蓝)中,使总体积为 350μl,用 IPGphⅢ等电聚焦仪,按如下程序自动进行:①12h 重泡涨,后 6h 加上 30V 低电压;②500V,1h;⑧1000V,1h;④8000V;8h。

1.4.4 平衡 将等电聚焦后的 IPG 胶条放入 8ml 平衡液(6mol/L urea,2% SDS,1.5mol/L pH 8.8Tris-HCl,20% 甘油,2%DTT,痕量溴酚蓝)中,于摇床上平衡 15min,再进行另 15min 平衡(2.5% 碘乙酰胺替代 2%DTT,其余组分同上)。

1.4.5 第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 配制 13%SDS-PAGE 均匀胶(20cm×20 cm×0.1cm)。将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶的上方,用 5% 低熔点琼脂糖封闭。凝固后用 Protein Ⅱ xi Cell 电泳仪进行电泳,先用 20mA/gel 电泳 40min,再按 30mA/gel 电泳至溴酚蓝前沿达玻璃板底部停止。

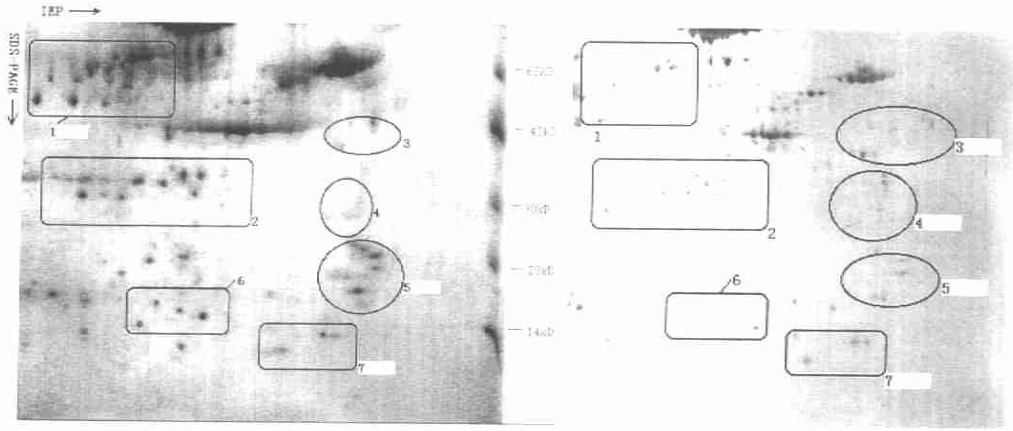
1.4.6 银染 参考郭尧君方法[3],将电泳结束后的待分析凝胶放入固定液(40% 无水乙醇,10% 冰醋酸)固定 30 min,弃固定液后直接加增敏液(30% 无水乙醇,0.125% 戊二醛%,0.2% 硫代硫酸钠,6.8% 无水醋酸钠)30min。弃增敏液,用双蒸水洗 3 次,5min/次。然后加入 0.25% 硝酸银溶液(0.04% 甲醛)反应 20 min。弃硝酸银溶液,双蒸水洗 2 次,1min/次。加入显色液(2.5% 无水碳酸钠,0.02% 甲醛)5~10 min 后,加入终止液(1.46% 乙二胺四乙酸二钠)终止反应 10min。以上在 20℃ 振荡下进行。

1.4.7 图像分析 用 GS-710 光密度仪对银染的凝胶进行扫描,扫描后的图像用 PDQuest 6.0 软件进行分析。

2 结 果

预实验用 pH 3~10 的线性胶条分离小鼠子宫内膜总蛋白,发现小鼠子宫内膜表达的蛋白质种类繁多,主要分布在 pH 4~7 的范围,故本研究选择 pH 范围(pH 4~7)的胶条使小鼠子宫内膜表达的蛋白质得到更好的分离,结果如图 1 所示。图像分析测得两种胶的匹配率达 82.5%,在等电点 pI4~7、分子量 14.0~75.4 kD 范围内分离得胚泡黏附侧小鼠子宫内膜蛋白点大约 760 个,胚泡未黏附侧小鼠子宫内膜蛋白点大约 720 个,其中至少 60 个蛋白点在两种子宫内膜间有 2 倍以上的量变。将部分蛋白质分组进行分析,1 组、2 组、7 组在两种不同的状况主要表现为表达量的变化,多数蛋白在胚泡已黏附侧子宫内膜表达高于胚泡未黏附侧,并且含量发生了两倍以上的变化。3 组、4 组、5 组和 6 组蛋白在两种不同的状况主要表现为种类的变化,3 组和 4 组的蛋白种类在胚泡未黏附侧子宫多于胚泡已黏附侧子宫,5 组和 6 组蛋白种类在胚泡已黏附侧子宫多于胚泡未黏附侧子宫。

维普资讯 http://www.cqvip.com



A B

图 1 双向凝胶电泳分离妊娠第 5 天小鼠胚泡已黏附侧与未黏附侧子宫内膜蛋白质组

3 讨 论

胚泡着床涉及胚泡在子宫内膜迁移、定位、粘附、入侵等过程，是哺乳动物及人类生殖过程的重要环节，是母体与胚胎同步发育、相互作用的精确过程。在受精卵产生的信号分子、激素信号等多种因素的调节下，母体子宫内膜发生一系列复杂而精细的变化，达到“可容受”状态时，胚泡才能成功地粘附和植[4,5]。

受精卵形成后开始了早期的胚胎发育，发育的胚胎和子宫内膜发育同步化并相互适应。胚胎的发育伴随着它的位置迁移，同步化的子宫为胚胎发育的各个阶段提供特定的、相适宜的生理环境和生存条件，并在某一特定时期达到最大接受状态，即着床窗口开放，允许胚泡着床。胚泡在着床前必需脱去透明带，以利于胚泡的黏附。胚泡和子宫内膜的黏附是着床的启动和关键环节。胚泡的滋养层细胞与子宫内膜细胞相互识别、迁移，进而发生黏附，其中涉及一系列的细胞—细胞、细胞—基质之间的相互作用。胚胎的发育和子宫内膜发育同步化的真正物质基础是蛋白质，细胞—细胞、细胞—基质之间的相互作用实际上也是蛋白质间的相互作用。

从受精卵正常发育到胚泡形成及脱透明带，是着床的先决条件之一。为了阐明这一过程发生的分子机制，Latham 等[6~8]进行了大量的研究，并构建了鼠胚不同发育时期的蛋白质数据库，详细地提供了鼠胚胎发生过程中蛋白质合成变化的特点，对认识哺乳动物胚胎早期发育的分子机制具有重要意义。围着床期子宫内膜的同步化也需要众多的蛋白质参与，目前已发现多种蛋白与着床有关，如 LIF (Leukemia inhibitory factor)[9]、层粘连结合蛋白 LN[10]、基质金属蛋白酶 MMPs[11]等。这些实验为人类了解胚泡着床的机制提供了有用的资料，但它们都仅限于研究单个蛋白质对胚泡着床的影响，不能解释胚泡植入的整个复杂过程。蛋白质组技术的应用，将使人类从蛋白质的整体水平了解胚泡植入的分子机制。

正常的生理条件下，哺乳动物左右侧卵巢受到的体内外刺激相同，它们应有同等发育、排卵的机会。有双角子宫的哺乳动物，其每侧子宫角中的胚胎发育及其子宫内膜的同步化应该一致。谭毅等[2]研究发现妊娠第 5 天小鼠左右子宫角内着床点的数目有显著差异，并且左侧子宫角多于右侧。有研究者提出，在转基因小鼠培育工程中进行胚胎移植时，应选择功能状态好的子宫角[12]。本研究发现，胚泡黏附侧子宫角 PBS 冲洗液中的胚泡已脱透明带，而另一侧的胚泡发育完好，但未脱透明带。用双向凝胶电泳分离两侧子宫角内膜的蛋白质组，发现它们的蛋白质表达在含量和种类均有差异。小鼠双侧子角宫内膜蛋白质表达的不同，是造成两侧子宫内角膜胚泡胚泡发育及附着不同步的一个可能原因。这些结果提示围着床期左右子宫角的功能状态可能存在差异，但要阐明其确切原因，还需大量的工作对差异表达的蛋白质进行鉴定。

(感谢野战外科研究所刘良民教授及其研究室的全体老师在研究中给予的大力支持。)

参 考 文 献

[1] Mailer WA. Developmental Biology [J]. Heidelberg:

维普资讯 http://www.cqvip.com

Springer, 1995.

[2] 谭 毅,韦 克,顾美礼,等.台盼兰染色小鼠胚泡着床点的研究[J].中国实验动物学杂志,1999;9:69-72.

[3] 郭尧君.SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展[J].生物化学与生物物理进展,1991;18:32.

[4] Paria BC, Lim H, Wang XN, et al. Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholestrogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse[J]. Endocrinology, 1998;139:5235-5246.

[5] Giudice LC. Genes associated with embryoric attachment and implantation and the role of progesterone[J]. JReproductive Med, 1999;44(s):165-171.

[6] Latham KE, Garrels JI, Chang C, et al. Quantitative analysis of protein in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one-cell and two-cell stages[J]. Development, 1991;112(4):921-932.

[7] Latham KE, Garrels JI, Chang C, et al. Analysis of embryonic mouse development: construction of high-resolution, two-dimensional gel protein database[J]. Applied and Theoretical Eletrophoresis, 1992;2:163-170.

[8] Latham KE, Garrels J1, Solter D. Alteration in protein synthesis following transplantation of Mouse 8-cell stage Nucleated 1-cell embryos[J]. Developmental Biology, 1994;163, 341-350.

[9] Stewart CL, Kaspaar P, Brunet LJ, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor[J]. Nature, 1992;359(6390):76-79.

[10] Zhang C, Duan E, Cao Y, et al. Effect of 32/27 kDa laminin-binding protein antibody on mouse embryo implantation[J]. J Reprod Fertil, 2000;119:137-142.

[11] Lala PK, Graham CH. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and inhibitors [J]. Cancer Metastasis Rev, 1990;9(4):369-379.

[12] 魏 泓.医学实验动物学[M].四川科技出版社,1997;441.

(上接第 566 页)素的非内分泌细胞奠定了基础。

(致谢:感谢第三军医大学野战外科研究所分子生物学中心对本项研究的大力支持。)

参 考 文 献

[1] Quinn D, Orci L, Moore HPH. Intracellular transport and sorting of mutant human proinsulin that fail to form hexamers [J]. J Cell Biol, 1991;113(5):987-996.

[2] Galloway JA, Hooper SA, Spardlin CT, et al. Biosynthetic human proinsulin. Review of chemistry, in vivo receptor binding, animal and human pharmacology studies, and clinical experience[J]. Diabetes Care, 1992;15(5):666-692.

[3] Van de Ven W. J. M, Roebroek A. J. M, Van Duijnhoven H. L. P. Structure and function of serine proteases[J]. Crit Rev Oncogenesis, 1993;4(2):115-136.

[4] Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 金冬雁译.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1999;35-40,42-49,56,304-306.

[5] Fuller. R. S., Brake, A. J. and Thorner, Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease[J]. Science, 1989;246(4929):482-486.

[6] Bart P. J., Mason O. B., Landsberg K. E., et al. cDNA and gene structure for a human subtilisin-like protease with cleavage specificity for paired basic amino acid residues[J]. DNA Cell Biol, 1991;10(5):319-328.

[7] Kiefer M. C., Tucker J. E., Joh R., et al. Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15[J]. DNA Cell Biol, 1991;10(10):757-769.

[8] Brems DN, Brown PL, Bryant C, et al. Improved insulin stability through amino acid substitution[J]. Protein Eng, 1992;5(6):519-525.

[9] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes[J]. Cell, 1986;44(2):283-292.

[10] Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells[J]. J. Mol Biol, 1987;196(4):947-950.