维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0585－03

着床期小鼠子宫内膜 Trophinin 基因表达研究

施　琼，余秋波，王应雄

(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:研究细胞粘附分子 Trophinin 在着床期小鼠子宫内膜的表达。方法:收集孕 1～6 天的小鼠子宫内膜,采用 RT－PCR 技术测定 Trophinin mRNA 的表达水平。结果:未孕鼠及孕 D1、D2 未检测到其表达,孕 D3、D4、D5 大量表达,D6 仅有少量表达或不表达。结论:Trophinin mRNA 在小鼠子宫内膜的表达时间与胚泡着床时间一致,提示 Trophinin 可能参与了胚泡对子宫内膜的粘附。

【关键词】Trophinin;子宫内膜;胚泡着床

【中国图书分类法分类号】R332　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－11－28

Expression of Trophinin gene in mouse endometrium

SHI Qiong, et al

(*Department of Genetics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of Trophinin gene in the mouse endometrium during the period of blastocyst implantation. *Methods*: By reverse transcription－polymerase chain reaction(RT－PCR), Trophinin gene in the mouse endometrium of 1～6 day normal pregnancy was detected. *Results*: The Trophinin mRNA was not detected in endometrium of nonpregnant and 1～2 day pregnant mouse. But in 3～5 day normal pregnancy it was strongly expressed. The Trophinin gene was scarcely detected in the endometrium of the 6 day pregnancy. *Conclusion*: Expression time of Trophinin mRNA in mouse endometrium coincides with blastocyst implantation. This suggests Trophinin participate in the adhesion of blastocyst and endometrium.

【Key words】Trophinin; Endometrium; Blastocyst implantation

Trophinin 是一种内源性蛋白,因分离于胚胎滋养层细胞而得名,是近年来新发现的细胞粘附分子之一。国外学者 Fukuda[1,2] 等研究发现 Trophinin 在胚胎滋养层细胞及子宫内膜上皮细胞中均有表达,且 Trophinin 蛋白的表达时间与着床窗的开放时间一致,这提示 Tronhinin 参与了胚泡着床的起始粘附,在胚泡着床中可能起重要作用。本研究通过 RT－PCR 技术对孕早期小鼠子宫内膜 Trophinin 基因表达进行研究,探讨 Trophinin 基因在着床期小鼠子宫内膜的表达规律。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　动物　实验采用清洁级昆明种系成年小鼠,体重 25～30g,按雌、雄 1:1 合笼,次日早晨检查有阴栓者算为妊娠 0.5 天,记 D0.5,并按此依次计算天数。孕鼠 1～6 天共分为 6 组(每天为一组),每组 8 只,选 8 只未孕成年雌鼠作为对照组。

1.1.2　主要试剂上海生工产品 TRIZOL Reagent 和 M－MLV one－step RT－PCR kit。

1.2　方法

1.2.1　收集子宫内膜　小鼠到时间后脱颈处死,取出子宫,挤压出双侧子宫内膜,置于－70℃冰箱保存留作 RT－PCR 用。

1.2.2　总 RNA 的提取　按 100mg 组织加 1ml TRIZOL Reagent 的比例充分匀浆组织,加 0.2ml4％异戊醇(异戊醇:氯仿＝1:24)摇匀离心,取上清液加 0.5ml 异戊醇沉淀 RNA,75％的乙醇洗涤,加经 DEPC 水处理的去离子水溶解,并用紫外分光光度计测定 RNA 的 OD260/OD280 值,判定 RNA 纯度及计算其浓度。取部分 RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察,以确定其完整性。

1.2.3　引物设计　Trophmm 引物参照文献[3],上游引物:5'－GACCGCCAAGCACCGGTACT－3',下游引物:5'－AGTATTGTTGCAGTTAGCGTT－3',扩增片段长度为

作者介绍:施　琼(1969－　),女,博士生,
主要研究方向:胚胎着床研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30270510)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

281bp。

内对照 β-actin 引物由上海生工设计合成，上游引物：5' - ATGAGGTAGTCTGTCAGGT - 3'，下游引物：5' - ATGGATGACGATATCGCT - 3'，扩增片段长度为 569bp。

1.2.4 RT-PCR 采用单管法，用 M-MLV one-step RT-PCR kit。模板 RNA 先 94℃ 变性 5min，再进入 cDNA 合成：38℃ 25min；95℃ 5min；PCR 先 94℃ 5min，然后扩增 30 个循环，94℃ 40s，58℃ 40s，72℃ 40s。最后 72℃ 再延伸 5min。

1.2.5 PCR 产物电泳及定量分析取 PCR 产物 4μl，加 1μl 去离子水和 6× 载样缓冲液 1μl，2% 的琼脂糖凝胶电泳 (120V，55mA，60min)。凝胶图象分析系统成像及扫描各电泳带灰度值。

1.2.6 结果分析 计算 Trophimn 与 β-actin 灰度比值及各组灰度比值的平均值，采用 F 检验。

2 结 果

2.1 RNA 样品鉴定

1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳可见 28S、18S 和 5S 三条带，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。紫外分光光度分析 OD260/OD280 值在 1.8～2.0 之间，说明有较高纯度 (符合蛋白质污染限)，1μl RNA 量为 1.5～2.0μg。

2.2 RT-PCR 产物定性表达与定量分析

经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，Trophinin 与 β-actin 基因的 RT-PCR 产物与理论长度一致。目的基因 TrophininD3、D4、D5 开放，而内对照 β-actin 基因均有强烈表达 (如图 1)。利用 Trophinin 与 β-actin 灰度比值作为子宫内膜 Trophinin mRNA 相对表达水平。未孕组、D1、D2 未检测到 Trophinin mRNA 的表达；孕 D3(1.10±0.17)、D4(1.41±0.23)、D5(1.24±0.18) 与未孕组比较有极显著性差异 ($P<0.01$)。D6 仅有少量表达或不表达，计算各组平均表达水平 (如表 1)。

表 1 各组 Trophinin/β-actin 平均值

组 别	Trophinin/β-actin 平均值
未孕组	0
D1	0
D2	0
D3	1.10±0.17
D4	1.41±0.23
D5	1.24±0.18
D6	0.11±0.04

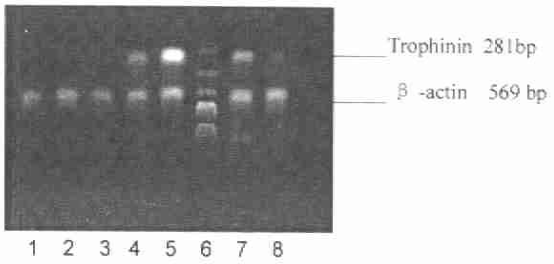


图 1 Trophinin、β-actin RT-PCR **产物电泳图**
(Marker：PBR322)1. **未孕组** 2. D1 3. D2 4. D3 5. D4 6. Marker 7. D5 8. D6

3 讨 论

随着对胚泡着床的深入研究，越来越多的细胞粘附分子被发现在胚泡的孵化，胚泡对子宫内膜的粘附、入侵中起重要作用。Fukuda 等利用 RT-PCR 技术研究发现了三种新型的蛋白分子：Trophinin、bystin、tastin 蛋白在滋养层畸胎瘤细胞系 (HT-H) 和内膜腺癌细胞系 (SNG-M) 中的表达。HT-H 和 SNG-M 分别代表了滋养层细胞和内膜细胞的特点，是这两种细胞的典型代表。在实验中发现 HT-H 和 SNG-M 细胞以各自的细胞表面相互粘着。在培养的内膜组织中加入 HT-H 和 SNG-M 两种细胞，二者粘着到表达 Trophinin 的内膜上皮细胞表面，用抗 Trophinin 的抗体处理这种组织，粘着消失。这些研究表明 Trophinin 直接介导 HT-H 细胞和 SNG-M 细胞与培养的子宫内膜上皮细胞间的粘附。妊娠妇女中，Trophinin 蛋白的表达时间与着床窗的开放时间一致[4,5]。Trophinin 表达在植入窗口期的滋养外胚层的顶端质膜及与之接触的子宫内膜上皮细胞，提示其在最初胚泡粘附、入侵子宫内膜中起作用[6,7]。

本研究发现 Trophinin 基因在小鼠子宫内膜的表达峰出现在受孕后 3～5 天，受孕前没有检测到其表达，受孕后第 6 天仅检测到少量表达，Trophinin 基因的开放时间与胚泡着床时间基本一致。这一表达规律提示 Trophinin 可能在胚泡对子宫内膜的识别粘附及子宫内膜容受性的形成起重要作用。我们还同时观察到 Trophinin 基因在着床点与着床旁的表达没有差异。Trophinin 基因的表达调控机制还有待进一步研究。Kimber[8] 等研究发现 Trophinin 和细胞质蛋白 tastin 借助于另一种细胞质蛋白 bystin 的桥梁作用，形成 Trophinin-bystin-tastin

维普资讯 http://www.cqvip.com

粘附复合物,使胚泡滋养层与子宫内膜的粘附得到加固。当有细胞角蛋白 8 和 18 存在时,三者之间的结合明显加强[9]。对 Trophinin 等粘附分子进一步的功能研究将有助于揭示胚泡着床机理和探索不孕机制。

参 考 文 献

[1] Fukuda MN, Sato T, Nakayama J, et al. Trophinin and tastin, a novel cell adhesion molecule complex with potential involvement in embryo implantation[J]. Genes Dev, 1995;9(10):1199-1210.

[2] Fukuda MN, Nozawa S. Trophinin, tastin, and bystin: a complex mediating unique attachment between trophoblastic and endometrial epithelial cells at their respective apical cell membranes[J]. Semin Reprod Endoerinol, 1999;17(3):229-234.

[3] Suzuki N, Nadano D, Paria BC, et al. Trophinin expression in the mouse uterus coincides with implantation and is hormonally regulated but not induced by implanting blastocysts[J]. Endocrinology, 2000;141(11):4247-4254.

[4] Tabibzadeh S. Molecule control of the implantation window[J]. Human Reprod Update, 1998;4(5):465-471.

[5] Aoki R, Fukuda MN. Recent molecular approaches to elucidate the mechanism of embryo implantation: trophimn, bystin, and tastin as molecules involved in the initial attachment of blastocysts to the uterus in humans[J]. Semm Reprod Med, 2000;18(3):265-271.

[6] 王华云,陈士玲. Trophinin、bystin、tastin 粘附分子复合体与着床[J]. 国外医学计划生育分册, 2002;21(2):80-82.

[7] 肖丽鹃,杨增明. Trophinin、bystin 和 tastin 在哺乳动物胚胎着床及早期胎盘形成中的作用[J]. 生殖医学杂志, 2002;11(2):120-123.

[8] Kimber SJ. Molecular interactions at the maternal-embryonic interface during the early phase of implantation[J]. Semin Reprod Meal, 2000;18(3):237-253.

[9] Suzuki N, Zara J, Stto T, et al. A cytoplasmic protein, bystin, interacts with Trophinin, tastin, and cytokeratin and may be involed in trophinin-mediated cell adhesion between trophoblast and endometrial epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998;95(9):5027-5032.

(上接第 579 页)发挥高效的生物学活性[11]。mtb 8.4/h IL12 嵌合 DNA 质粒的构建成功,为进一步研制 mtb 8.4/h IL12 嵌合 DNA 疫苗奠定了基础,该嵌合 DNA 疫苗可望将宿主免疫反应向更强的 Th1 型细胞反应转化,诱导强烈的特异性 CTL 反应,以达到对结核病的良好预防作用[12]。mtb 8.4/hIL12 嵌合 DNA 质粒在真核细胞的表达及对感染小鼠的免疫保护效果将另文发表。

参 考 文 献

[1] Baldwin SL, D'Souza C, Roberts A D, et al. Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis [J]. Infect. Immun. 1998;66(6):2951-2959.

[2] 李 晖,钟 森,任 红,等. 结核分枝杆菌新抗原 mtb8.4 基因的克隆及真核表达载体的构建[J]. 四川医学, 2003;23(5):448-450.

[3] Coler. RN, Skeiky YAW, Vedvick T, et al. Molecular cloning and immunologic reactivity of a novel low molecular mass antigen of Mycobacterium tuberculosis[J]. J. Immunol, 1998;161:2356-2364.

[4] Coler. RN, Campos-Neto A, Ovendale P, et al. Vaccination with the T cell antigen Mtb8.4 protects against challenge with Mycobacterium tuberculosis[J]. J. Immunol, 2001;166:6227-6235.

[5] 金冬雁,黎孟枫,译. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1992;(2):55-56.

[6] Orme IM. Progress in the development of new vaccines against tuberculosis[J]. Int. J. Tuberc. Lung. Dis, 1997;1(2):95-100.

[7] 李 晖. 一种新的分枝杆菌抗原 Mtb8.4[J]. 国外医学流行病学传染病学分册, 2002;29(1):35-36.

[8] Kim JJ, Ayyavoo V, Bagarazzi ML, et al. In vivo engineer of a celluar immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immuogen[J]. J. Immunol, 1997;158:816-826.

[9] 陈 敬. 白细胞介素-12 与结核病[J]. 国外医学 呼吸系统分册, 2002;22(4):220-222.

[10] 吴秋茜,姜宇飞,陈慰峰,等. hIL-7-GM-CSF(7-127)融合蛋白的构建和 E. coli 表达[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1998;18(1):52-57.

[11] Delogu G, Howard A, Collins FM, et al. DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberxulosis protein enhances antimycobacterial immunity[J]. Infect. Immun, 2000;68(6):3097-3102.