维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)03-0405-04

瘦素及其受体系统在小鼠胚泡着床过程中子宫内膜的表达

骆明勇, 杨 戎, 王应雄, 刘孝云

(重庆医科大学生殖医学系,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨瘦素(leptin)及其受体(Ob-Rb)在小鼠胚泡着床过程中子宫内膜的表达规律,以明确其在胚泡着床过程中的可能作用。方法:采用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),检测小鼠胚泡着床过程中子宫内膜 leptin 及其受体(Ob-Rb)的表达。结果:leptin 在胚泡着床过程中在小鼠子宫内膜也都有表达,各时期的表达水平差异不明显($P>0.05$);Ob-Rb 在胚泡着床过程中在小鼠子宫内膜也都有表达,各时期的表达水平差异($P<0.01$),且在孕期第 4 天表达水平最高,在 5 到 7 天仍然维持在一定水平。结论:瘦素及其受体(Ob-Rb)可能在胚泡着床过程中发挥作用,同时也可能参与着床后胚胎的生长发育。

【关键词】瘦素;瘦素受体;瘦素长型受体;子宫内膜;着床;基因表达

【中国图书分类法分类号】R394.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-11-03

Expression of leptin and leptin receptor system in the endometrium of mouse in the implantation process

LUO Mingyong, et al

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

【Abstract】*Objective*: To invstgate the expression of leptin and leptin receptor system in the endometrium of mouse in the implantation process. *Methods*: By reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR), the expressions of leptin and leptin receptor (Ob-Rb) gene in the endometrium of mouse in the different phases of the implantation process were detected. *Results*: Leptin was expressed in the endometrium of mouse throughout the implantation process. The expression showed no signficant differences in the different phases of the implantation process($P>0.05$). Ob-Rb was also expressed in the endometrium of mouse throughout the implantation process, but the expressions were significantly different in the different phases of the implantation process ($P<0.01$). And the expression at 4th day was the highest; from day 5 to day 7, its expression was on a higher level compared with normal endometrium. *Conclusion*: Leptin and leptin receptor may be involved in the implantation and the development of embryo.

【Key words】Leptin; Leptin receptor; Ob-Rb; Endometrium; Implantation; Gene expression

瘦素(leptin)是肥胖基因(Ob)编码有肽类激素[1],主要由脂肪组织合成,但近来发现胃、乳腺、骨骼肌及胎盘等组织也合成瘦素。瘦素通过其受体发挥作用,leptin 受体属于Ⅰ类细胞因子受体家族,现在已发现了五种亚型(Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd 和 Ob-Re),长型受体 Ob-Rb 具有一个长的细胞内区域,可以激活 JAK/STAT 信号转导通路。现已证明,瘦素受体在下丘脑、垂体、心、肝、肾、子宫及卵巢等部位均有表达。瘦素主要通过与其受体结合作用于中枢神经系统和外周组织,调节食物的摄取、能量的平衡、脂肪储存等。近年来的研究表明,leptin 在生长发育、青春期的调节及一些女性生殖健康相关的疾病中起重要作用。

近来,leptin 及其受体在生殖中的作用是生殖医学研究的热点。本实验采用 RT-PCR 技术就小鼠胚泡着床过程中瘦素及 Ob-Rb 在子宫内膜的表达进行研究,探讨其在着床中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本的收集 本实验采用成年昆明种小鼠,体重 23~25g,取自重庆医科大学实验动物中心。雌鼠常规超排卵

作者介绍:骆明勇(1975-),男,硕士,

主要研究方向:胚泡着床的分子机制。

维普资讯 http://www.cqvip.com

处理后,与成年雄鼠 1:1 合笼交配过夜,次日晨检查雌鼠阴道有阴栓者确定为妊娠第 1 天。将孕鼠随机分为 7 组,每组 10 只,分别在 1、2、3、4、5、6、7 天上午 8 点左右脱颈处死,取出子宫,孕期 5～7 天的小鼠在解剖显微镜下剔除胚泡着床点的胚胎组织,冲洗子宫,然后剥离子宫内膜,置于 -80℃保存。

1.1.2 主要试剂 小量组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒购至上海华舜,M-MLV 逆转录酶购自 Promega,TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶和 DL2000DNA marker 购自 TaKaRa。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取

采用华舜小量组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒,用 1ml 裂解液将 50mg 的组织充分匀浆,加入氯仿 0.2ml 混匀,离心,吸取上清液加入 75% 的乙醇,转移入 RNA 吸附柱,然后依次加入去蛋白液、洗涤液,离心,加入纯水洗柱,用离心管收集得总 RNA,-80℃保存备用。

临用前用紫外分光光度计测定 RNA 的 OD260/OD280 的比值,判定其纯度,并计算浓度。取部分 RNA 进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,判定 RNA 的完整性。

1.2.2 引物序列

引物均由上海生工合成,序列如下:

leptin[2]:扩增片段长度为 142bp

上游:5'-TGCTGCAGATAGCCAATGAC-3'

下游:5'-AGTAGAGTGAGGCTTCCAGGA-3'

Ob-Rb[3]:扩增片段长度为 533bp

上游:5'-GTGTGAGCATCTCTCCTGGAG-3'

下游:5'-ACCACACCAGACCCTGAAAG-3'

β-actin:扩增片段长度为 329bp

上游:5'-AGATCTGGCACCACACCTTCTAC-3'

下游:5'-TCAGGATCTTCATGAGGTAGTCT-3'

1.2.3 RT-PCR 采用两步法,包括逆转录和 PCR 两步。

逆转录:总 RNA2μg70℃变性 5min,再加入 5μl5×RT 缓冲液,2μl10mmol/L dNTP,25U RNasin、0.5μg oig(dT)、200U M-MLV 逆转录酶,加水至 25μl 混匀,42℃60min,最后 70℃10min,产物用于 PCR,

PCR:取 cDNA 3μL,加入 10×PCR 缓冲液、TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶、$MgCl_2$、dNTP、引物,最后加入至总体积 25μl。Leptin 的扩增条件为:94℃变性 50s,54℃退火 50s,72℃延伸 30s,进行 35 个循环;Ob-Rb 和 β-actin 的矿增条件为[3]:94℃变性 1min,55℃退火 1min,72℃延伸 1min,进行 35 个循环。

1.2.4 电泳及结果分析

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 Image-Pro Plus 软件分析各条带灰度值,得 leptin/β-actin 和 Ob-Rb/β-actin 的灰度比值,即为 leptin 和 Ob-Rb 的相对表达值。

1.2.5 统计处理 实验结果采用 SPSS 10.0 统计软件进行处理。多组间比较用方差分析,多重比较用 LSD-t 检验。

2 结 果

2.1 RNA 样品的鉴定

用紫外分光光度计测得各标本的 OD260/OD280 值在 1.8～2.0 之间,说明 RNA 有较高纯度,浓度为 0.5～1.0μg/μl。1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳结果说明 RNA 基本没降解,较完整。

2.2 PT-PCR 产物定性及半定量分析

经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析后,leptinOb-Rb、与 β-actin 基因的 RT-PCR 产物与理论长度相一致(见图 1),leptin/β-actin 和 Ob-Rb/β-actin 的灰度比值,即为 leptin 和 Ob-Rb 的相对表达值。

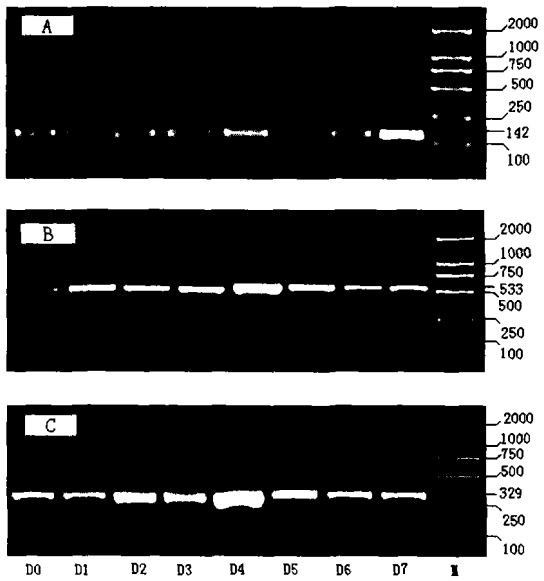


图 1 RT-PCR 电泳图

A. Leptin B. Ob-Rb C. β-actin D0. 未孕小鼠,D1～D7 孕期 1-7 天小鼠,M. DL2000 marker

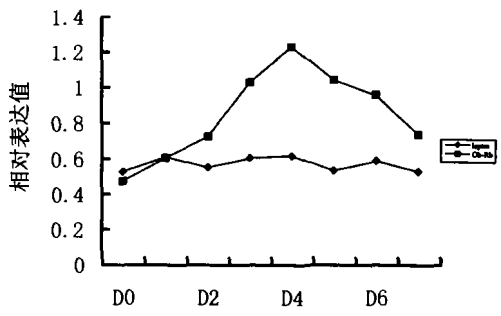


图 2 leptin 和 Ob-Rb 在小鼠胚泡着床过程中的表达

D0. 未孕小鼠,D1～7,孕期 1～7 天小鼠

维普资讯 http://www.cqvip.com

Leptin 在未受孕小鼠的子宫内膜有表达，表达水平为 0.53±0.04；同时在孕期 1～7 天也有表达，表达水平第 1 天为 0.61±0.05，第 2 天为 0.55±0.05，第 3 天为 0.61±0.06，第 4 天为 0.62±0.07，第 5 天为 0.54±0.04，第 6 天为 0.59±0.05，第 7 天为 0.53±0.04。统计分析后，$F=0.681$，$P>0.05$，leptin 在小鼠子宫内膜的表达在未受孕及各孕期的差别不显著(见图 2)。

Leptin 受体(Ob－Rb)在未受孕和各孕期小鼠都有表达(见图 2)，统计分析，$F=7.604$，$P<0.01$，各组之间的差异显著。在未受孕小鼠子宫内膜的表达水平为 0.47±0.04；受孕第 1 天开始升高，表达水平为 0.61±0.05，但与未受孕比较差别不显著($P>0.05$)；第 2 天表达水平为 0.73±0.06，与未受孕比较差别仍然不显著($P>0.05$)；第 3 天的表达水平为 1.0314±0.08，与未受孕比较差别开始具有显著性($P<0.05$)；第 4 天达到峰值，表达水平为 1.2332±0.07；第 5 天开始下降，表达水平为 1.0455±0.06，与未受孕比较差别仍然具有显著性($P<0.01$)；第 6 天和第 7 天的仍然维持在一个较高水平，表达水平为 0.9614±0.05 和 0.7388±0.06，与未受孕小鼠比较差别仍有显著性，而与第 4 天和第 5 天的差别也有显著性($P<0.05$)。

3 讨 论

最初，人们在研究肥胖症和进食过量中发现瘦素与肥胖症和食物摄取的调节密切相关。近年来的研究显示，瘦素参与哺乳动物许多的其它生理活动，包括血管生成、血细胞生成、炎症反应、青春期的启动及生殖等[4,5]。在人类生殖过程中，leptin 可能与不孕、子宫内膜异位症及先兆子痫等有关。瘦素水平低下或缺失的 Ob/Ob 小鼠不但肥胖，而且不孕，在给予外源性的 leptin 治疗后，其体重减轻，有恢复生殖功能，说明与生殖功能密切相关[6]。

胚泡着床是一个复杂的过程，近来的研究证实，有许多调控因子参与了此过程，包括细胞因子、细胞间粘附分子、糖复合物、激素、核转录因子及原癌基因等。近年对 leptin 的研究发现，它也与胚泡植入过程相关。Gonzalez 等[7]发现人分泌期的子宫内膜和体外培养的子宫内膜细胞有 leptin 和 leptin 受体的表达，同时发现人胚泡调节 leptin 的分泌，说明 leptin 系统可能与胚泡着床有关。Alfer 等[8]的研究发现，leptin 受体蛋白在人子宫内膜表达，并呈周期性变化，在卵泡期和黄体中期表达。Kitawaki 等[9]也证实人子宫内膜有 leptin 受体 mRNA 和蛋白表达，且表达也有规律，在分泌早期达峰值。这些研究证实了子宫内膜是 leptin 的分泌器官，且表达 leptin 的功能性受体，又是 leptin 作用的靶器官。同时 leptin 与其受体的相互作用影响子宫内膜一些与着床相关因子的表达。Fukuda 等[10]在体外的研究显示，leptin 可以调节子宫内膜 IL－6 和趋化因子的表达。Castellucci[11]在研究显示 leptin 可以刺激基质金属蛋白酶(MMPs)的分泌。Wu 等[12]还发现 leptin 可以提高子宫内膜基质细胞的增生。这些研究提示 leptin 通过自分泌或旁分泌的形式，与其受体相互作用，调节子宫内膜的生理功能，介导子宫的容受性状态，及胚胎和子宫内膜之间的沟通。

本研究证实了 leptin 的功能性受体 Ob－Rb 在胚泡着床过程中表达有一定规律性，其在孕期第 4 天有一个峰值表达，这也提示其在胚泡植入过程中起一定作用。结合以前的研究，我们推测 leptin 系统可能通过调节机体特别是子宫局部的能量代谢，为胚泡的植入做好能量上的准备。同时它还可以促进子宫内膜基质细胞的增生，调节机体激素的分泌以及胚泡着床调控网络中的一些调控因子的表达，可能参与胚泡在子宫内膜的定位、粘附和侵润等过程。同时本研究结果还显示 leptin 及其功能受体 Ob－Rb 在胚泡植入后仍保持在一定水平，提示它们可能参与着床后胚胎的生长发育。

Leptin 及其受体在胚泡着床过程中发挥作用，但其具体作用机制尚不完全明了，还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature, 1994; 372: 425－432.

[2] Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, et al. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997; 94: 11073－11078.

[3] Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV, et al. Localization of Leptin Receptor mRNA Splice Variants in Murine Peripheral

维普资讯 http://www.cqvip.com

Tissues by RT－PCR and in Situ Hybridization[J]. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1997;232:383－387.

[4] Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis[J]. J Leukoc Biol, 2000;68:437－446.

[5] Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, et al. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis[J]. Circ Res, 1998;83:1059－1066.

[6] Chehab FF, Lim ME, Lu RH. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin[J]. Nat Genet, 1996;12:318－320.

[7] Gonzalez RR, Caballero－Campo P, Jasper M, et al. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000;85:4883－4888.

[8] Alfer J, Muller－Schottle F, Classen－Linke I, et al. The endometrium as a novel target forleptin: differences in fertility and subfertility[J]. Mol Hum Reprod, 2000;6:595－601.

[9] Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, et al. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000;85:1946－1950.

[10] Fukuda J, Nasu K, Sun B, et al. Effects of leptin on the production of cytokines by cultured human endometrial stromal and epithelial cells[J]. Fertil Steril, 2003;80(s 2):783－787.

[11] Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, et al. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion[J]. Mol Hum Reprod, 2000;6:951－958.

[12] Wu MH, Chuang PC, Chen HM, et al. Increased leptin expression in endometriosis cells is associaed with endometrial stromal cell proliferation and leptin gene up－regulation[J]. Mol Hum Reprod, 2002;8:456－464.

(上接第 404 页)

从而产生功能上的差异所致[8]。

总之，Wnt 信号传导通路在肿瘤的发生，发展过程中起着重要的作用。但其多种组分在不同肿瘤中的改变及具体作用机制尚待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 张明金，王 强，王元和，等. 大肠癌组织连环蛋白的表达及其临床意义[J]. 第二军医大学学报，2000;21(3):239－241.

[2] Shimizu M, Saiton Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha－ras oncogene product in normal, benign and malignant human pancreatic tissues[J]. Hum Pathol, 1990;21:607－612.

[3] Gamallo C, Palacios J, Moreno G, et al. beta－catenin expression pattern in stage Ⅰ and Ⅱ ovarian carcinomas: relationship with beta－catenin gene mutations, clinico－pathological features, and clinical outcome[J]. Am J Pathol, 1999;155(2):527－536.

[4] Moreno－Bueno G, Gamallo C, Perez－Grallego L, et al. bete－Catenin expression pattern, bete－Catenin gene mutations, ane microsatelliteinstability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial carcinomas[J]. Diagn M OL Pathol, 2001;10(2):116－122.

[5] Wu R, Zhai Y, Fearon ER, et al. Diverse mechanisms of beta－catenin Deregulation in Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas[J]. Cancer Res, 2001;61(22):8247－8255.

[6] Karbova E, Davidson, Metodiev K, et al. Adenomatous polyposis coli(APC)protein expression in primary and metastatic serous ovarian carcimoma[J]. Int J Surg Pathol, 2002;10(3):175－180.

[7] Jarrett CR, Blancoto J, Car T, et al. Humman APC2 Localization and Allelic Imbalame[J]. Cancer Res, 2001;61(21):7978－7984.

[8] Thliveris A, Samowitz W, Mastsunami N, et al. Demonstration of Promoter Activity and Alernative Splicing in the Region 5' to Exon 1 of the APC Gene[J]. Cancer Res, 1994;54(11):2991－2995.