维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0040-02

超声波对小鼠胚胎表达整合素及其着床能力的影响

李　真[1]，顾美礼[1]，王智彪[2]，胡　凯[2]，艾　玲[2]，杜永洪[2]

（1. 重庆医科大学第二临床学院妇产科　重庆　400010；2. 重庆医科大学医学超声工程研究所　重庆　400046）

【摘　要】目的：研究超声波照射对小鼠胚胎表达整合素α1、α5、β1、β3的影响以及与其着床能力的关系。方法：取小鼠二细胞胚经超声波照射后体外培养至囊胚期，用免疫组化法检测其整合素α1、α5、β1、β3的表达及其着床能力的改变，并与未经照射的正常胚胎比较。结果：1、超声波照射组胚胎贴附率、滋养细胞外延生长率均显著低于正常胚胎。2、正常胚胎桑椹胚期即有α5、β1、β3整合素表达，而无α1表达；囊胚期α5、β1、β3表达增强，仍无α1表达；α1只出现在外延生长的滋养细胞。3、超声波照射组胚胎β3整合素的表达明显弱于正常组，且未见α1表达；而α5、β1的表达两组间无差异。结论：超声波照射使胚胎着床能力明显降低，可能与其影响胚胎细胞α1、β3整合素的正常表达有关。

【关键词】超声波；胚胎；着床；整合素

【中国图书分类法分类号】R431.2　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2000-01-20

The effects of ultrasound on expression of integrins in mouse embryo and embryo implantation capability

LI Zhen, et al

(Department of Obstetrics and Gynecology, Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400010)

【Abstract】 *Objective*: To study the effects of ultrasound on expression of integrin α_1, α_5, β_1, β_3 in mouse embryos and its implantation capability. *Methods*: Two cells mouse embryos irradiated by ultrasound were cultured into blastocysts. *Results*: 1. The attachment rate and the trophoblasts outgrowth rate in irradiated embryos were lower significantly than that in the normals. 2. The expression of subunits α_5, β_1, β_3 was detected in normal morulas and increased in blastocysts. The expression of subunit α_1 was not detected in morulas or blastocysts, but detected only in outgrowing trophocytes. 3. Expression of integrin β_3 in irradiated group embryos was weaker than that of normal group. There was no expression of integrin α_1 both in morulas and blastocysts in irradiated group and no difference in the expression of subunits α_5 and β_1 between these two groups. *Conclusion*: Ultrasound may damage the embryo implantation capability by impacting the nomal expression of α_1, β_3 integrins in embryo cells.

【Key words】Ultrasound; Embryos; Implantation; Integrins

胚胎着床是妊娠成功的关键，调控胚胎着床的机制十分复杂，与之有关的物质有很多，包括激素、细胞因子、生长因子、酶、粘附分子等等。近年来，粘附分子，尤其是整合素在胚胎着床中的作用日益受到重视。研究发现，哺乳动物着床前及围着床期胚胎细胞表面即有整合素表达，且其在不同时期及部位的分布具有时、空特异性，这有利于胚胎在着床期滋养细胞的侵润及胎盘的形成[1,2]。超声波能对胚胎造成损害，影响其生长发育及着床，但其作用机理尚不十分清楚[3]。本试验以小鼠胚胎体外培养系统为模型，用超声波照射胚胎，使其着床能力受到损害，用免疫组化法检测围着床期正常与经超声波照射的胚胎α1、α5、β1、β3整合素的表达特征并进行比较，研究超声波对胚胎细胞表达整合素及胚胎着床的影响及其相互关系。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物　ICR系实验小白鼠购自上海西普尔—必凯实验动物有限公司，饲养温度20～25℃，自动摄食和饮水，昼夜自然光照。

1.1.2　主要试剂　孕马血清（pregnant mare's serum

作者介绍：李　真（1963-　），女，主治医师，博士

维普资讯 http://www.cqvip.com

gonadotropin PMSG）购自天津实验动物中心。绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin hCG）购自宁波市激素制品厂。Ham's F_{12} 培养基：购自美国 Sigma 公司。抗小鼠 CD_{49a}（α_1）、CD_{62}（α_5）、CD_{29}（β_1）、CD_{61}（β_3）单抗购自深圳晶美生物工程有限公司。SP免疫组织化学染色试剂盒、DAB酶底物显色试剂盒、多聚赖氨酸等购自福州迈新生物技术开发公司。

1.2 方法

选8～10周雌鼠经 PMSG＋hCG 促排卵后以雌：雄2：1合笼，次晨查见阴栓为妊娠第一天，于注射hCG后 48～50 h 取二细胞胚，将其分为 A、B 两组，A 组：正常胚胎；B 组：经超声波照射的胚胎（用JC-A 型超声治疗仪，以 0.8 MHz，40W/cm^2，连续波照射 5 s，使其着床能力受到损害）。两组胚胎均用 Ham's F_{12} 培养基＋3%牛血清白蛋白，在37℃，5%CO_2 条件下培养至囊胚期，观测两组胚胎贴附率、滋养细胞外延生长率，以此作为评价胚胎着床能力的指标[4]；然后将胚胎滴在涂有PLL的玻片上，10%甲醛固定后用免疫组化 SP 法检测胚胎表达 α_1、α_5、β_1、β_3 整合素的情况（具体操作按试剂盒使用说明书进行）；实验设阳性及以 PBS 液代替 I 抗的阴性对照。结果判断：以细胞膜及/或细胞浆呈棕黄色着色为阳性，根据细胞着色程度及计数100个细胞中的阳性细胞数作半定量判定，阴性（－）：无阳性细胞；阳性（＋）：轻度着色及阳性细胞数＜30 %；强阳性（＋＋）：明显着色及阳性细胞数≥30%。

1.3 统计学处理

用 χ^2 检验进行统计学处理。

2 结 果

2.1 两组胚胎着床能力的比较

正常与异常组胚胎贴附率分别为 19.10±5.32 %、7.23±1.69%，滋养细胞外延生长率分别为18.07±4.62%和5.93±0.95%，经 χ^2 检验，$P<0.01$，差异非常显著，说明正常组胚胎的着床能力明显强于异常组。

2.2 两组胚胎 α_1、α_5、β_1、β_3 整合素表达结果

正常组胚胎桑椹胚及囊胚期 α_5、β_1、β_3 阳性，且囊胚期着色深于桑椹胚；而 α_1 在桑椹胚及囊胚期均为阴性，直到胚胎脱带、贴壁、滋养细胞外延生长时，可见向外生长的滋养细胞上 α_1 呈阳性反应。异常组胚胎也有 α_5、β_1 表达，与正常胚胎比较无明显差异；β_3 在桑椹胚期为阴性，囊胚期有表达，但明显弱于正常胚胎；异常组胚胎 α_1 呈阴性。两组胚胎 α_1、α_5、β_1、β_3 整合素表达结果见表1。

表1 两组胚胎 α_1、α_5、β_1、β_3 整合素表达结果

	胚胎	整合素			
		α_1	α_5	β_1	β_3
A组	桑椹胚	-	+	+	+
	囊 胚	-	++	++	++
	胚外滋养细胞	+	++	++	++
B组	桑椹胚	-	+	+	-
	囊 胚	-	++	++	+

3 讨 论

3.1 整合素与胚胎着床

着床是妊娠成功的关键，调控胚胎植入的机制十分复杂，与之有关的物质有很多，包括激素、细胞因子、生长因子、酶、粘附分子等等。近年来，粘附分子，尤其是整合素在胚胎着床中的作用日益受到重视。整合素是一类普遍存在于细胞表面的跨膜糖蛋白，由α、β二个亚单位以非共价形式构成异二聚体，它有两大基本功能：一、粘附：介导细胞与细胞外基质及部分细胞与细胞间的粘附。二、信号传递：参与细胞内外的信号传递，从而在细胞的粘附、迁移、增殖、分化等过程中起重要作用[5,6]。研究发现整合素在胚胎及子宫内膜上均有表达，且其在不同时期及部位的分布具有时、空特异性，这有利于胚胎在着床期滋养细胞的侵润及胎盘的形成。整合素表达紊乱将导致滋养细胞侵润异常，而引起着床失败、流产、不孕、妊高征、滋养细胞疾病等多种病理状况，因此，围着床期胚胎及子宫内膜上整合素的正确表达对着床的顺利进行起重要作用[2,7,8]。

现已知小鼠胚胎在围着床期表达 $\alpha_5\beta_1$、$\alpha_{6B}\beta_1$、$\alpha_v\beta_3$ 整合素，与子宫内膜中的Fn、Ln、Vn等细胞外基质成份结合，使胚胎与子宫内膜贴附，随后胚外滋养细胞进一步表达 α_1、α_{6A}、α_7，使之更多地与细胞外基质粘附，以利于滋养细胞逐步侵入子宫内膜，完成整个着床过程[9]。本研究结果显示，正常胚胎桑椹胚期即有 α_5、β_1、β_3 整合素表达，而无 α_1 表达；囊胚期 α_5、β_1、β_3 表达增强，仍无 α_1 表达；α_1 只出现在外延生长的滋养细胞上，说明不同的整合素分子按一定的时间、空间顺序在胚胎细胞上表达，有利于胚胎与子宫内膜的贴附及滋养细胞侵润，因而围着床期胚胎细胞表面整合素的正常表达与其着床能力直接相关。

（下转第44页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞周期，促进细胞增殖。泛素在细胞增殖周期G1早期有表达，HSP70高表达者，增殖细胞核抗原(PCNA)亦呈高表达。本文肺癌患者中，HSP70的表达与PCNA的表达有正相关关系($P<0.05$)。提示HSP70在肺癌细胞的增殖、分化中起重要作用，可作为判定肺癌增殖、分化指标。在对肺癌病人吸烟者与非吸烟者的观察中发现，吸烟组HSP70的表达明显高于不吸烟组，Volm等亦报告吸烟的年限与HSP70表达有关，吸烟年限长，每天超过20支，HSP70表达高，肺癌的发生率亦高[6]。其原因可能与细胞受到各种理化因素刺激后，发生应激反应，而诱导合成一种蛋白质有关，这种新合成的蛋白质即HSP。当烟草作为一种致癌物质刺激支气管粘膜上皮细胞时，易诱导细胞产生HSP，出现HSP70表达增高。

通过以上观察说明，HSP70高表达可能作为一种对NSCLC的诊断及预后判断有实用价值的参考指标。同时，HSP70也许可能作为一种重要的基因调控肿瘤细胞的增殖及凋亡。开发应用HSP抑制剂，抑制HSP合成，研究HSP反义RNA，阻断肿瘤细胞HSP70基因表达，有助于控制肿瘤生长。

参 考 文 献

[1] Ishidat T, Kaneko S, Akazawa K, et al. Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organzer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients [J].Cancer Res.1993;53:5000-5003.

[2] Pelham HRB. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins [J]. Cell.1986;46:959-961.

[3] Thmos MC. Friederike MP. Christoph W, et al. Differential expression of HSPs in pancreatic carcinoma [J].Cancer Res.1994; 54:547-549.

[4] Yano M, Naito Z. Tanaka S. et al. Expression and roles of heat shock proteins in human brest cancer [J]. Jpn J Cancer Res . 1996;87(9):908- 915.

[5] Wei YQ. Zhao X. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation HSP70 gene expression in tumor cells [J]. Cancer Immunol Immunother .1995;40:73-76.

[6] Vlo M. MathernJ. StammlerG. et al. UP-regulation of heat shock protein 70 in adonocarcinomas of the lung in smokers [J]. Anticancer Res. 1995;15(6):2607-2609.

（上接第41页）

3.2 超声波对胚胎细胞表达整合素的影响及其与胚胎着床的关系

着床是胚胎与子宫内膜同步发育、协调完成的过程，以往的研究显示超声波不仅能造成胚胎的损伤甚至死亡，还破坏子宫内膜的正常结构，从而影响胚泡着床[10]。本试验从胚胎的角度入手，着重研究超声波对胚胎的损害以及由此导致的对胚胎着床能力的影响。结果显示，超声波照射后胚胎的贴附率、滋养细胞外延生长率均显著低于正常胚胎，表明超声波照射使胚胎着床能力显著下降。与此同时超声波照射组胚胎整合素的表达与正常组胚胎比较也显现出差异：即超声波照射组胚胎 β_3 整合素的表达明显弱于正常组，且无 α_1 表达，α_5、β_1 的表达两组间无差异，提示 α_1、β_3 整合素在胚胎与子宫内膜贴附、滋养细胞侵入的过程中起重要作用，超声波照射使胚胎不能正常表达 α_1、β_3 整合素，从而影响其着床。

参 考 文 献

[1] Edwards RG. Physiological and molecular aspects of human implantation[J]. Hum Reprod, 1995; 10 (supple2) :1-13.

[2] 李 真，王智彪，顾美礼. 整合素在胚胎着床、生长发育及某些妇产科疾病中的作用[J]. 中华妇产科杂志，1999; 34:254-256.

[3] 于廷和，王智彪，蔡汉忠. 超声波对胚胎组织的生物学效应[J]. 中国超声医学杂志，1997;13(1):58-60.

[4] 李 真，王智彪，顾美礼. 胚胎着床体外培养模型的研究进展[J]. 国外医学·计划生育分册，1998;17(2):67-69.

[5] Clark EA & Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: The road taken[J]. Science. 1995; 268:233-239.

[6] Horwitz AF. Integrins and health[J]. Sci Am. 1997; 277: 68-75.

[7] Sueoka K. Kuji N. Shiokawa. et al. Integrins and reproductive phsiology: Expression and modulation in fertilization. embryogenesis. and implantation[J]. Fertil Steril. 1997; 67:799-811.

[8] Lessey BA & Arnold JT. Paracrine signaling in the endometrium: integrins and the establishment of uterine receptivity[J]. J Reprod Immunol. 1998;39(1,2):105-116.

[9] Sutherland AE. Calarco PG. Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo[J]. Development. 1993; 119:1175-1186.

[10] Wang Zhibiao. Gu Meili. Ling Luoda. et al. Effects of ultrasound on mouse blastocyst and endometria epithelial cells and on pregnant capacity of pseudopregnant mouse[J]. J.C.A.U. M.E. 1995;1:44-47.