生殖生理与胚胎着床 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001332

Nme2基因参与小鼠基质细胞蜕膜化过程

张 雪[1],张 爽[1],陈雪梅[1],刘学庆[1],何俊琳[1],王应雄[1],丁裕斌[1],付利娟[2]
(1. 重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室,重庆 400016;
2. 重庆医科大学中医药学院中药综合教研室,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:检测 Nme2(nucleoside diphosphate kinase 2)基因在小鼠早期妊娠和人工诱导蜕膜化的子宫内膜组织中的表达规律;探究 Nme2 基因与子宫基质细胞蜕膜化的相关性。**方法**:利用免疫组织化学、Western blot 和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分别检测小鼠妊娠第 5 天着床点(D_5IS)、着床旁(D_5IIS),D_6IS、D_6IIS、D_8IS、D_8IIS 及人工诱导蜕膜化模型小鼠子宫内膜中 Nme2 的表达定位,mRNA 和蛋白质水平的表达水平。**结果**:小鼠 D_5、D_6、D_8 子宫内膜中着床点 Nme2 基因的 mRNA 和蛋白水平的表达明显高于着床旁;免疫组织化学结果显示 Nme2 表达定位表达于 D_5 着床点的初级蜕膜区(primary decidua region,PDZ)、D_6 和 D_8 着床点的次级蜕膜区(secondary decidua region,SDZ);人工诱导蜕膜化模型中,Nme2 基因的 mRNA 和蛋白质水平在诱导组的表达明显高于对照组。**结论**:Nme2 基因的表达上调与小鼠基质细胞的蜕膜化过程相关。

【关键词】子宫内膜;蜕膜化;Nme2
【中图分类号】R394.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-05-02

Nme2 participates in decidualization in mice stromal cells

Zhang Xue[1], Zhang Shuang[1], Chen Xuemei[1], Liu Xueqing[1], He Junlin[1], Wang Yingxiong[1], Ding Yubin[1], Fu Lijuan[2]
(1. Laboratory of the Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University; 2. Department of Comprehensive Herbal Medicine, Traditional Chinese Medicine School, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To investigate the expression profile of Nme2 in the endometrium of early pregnant mouse and artificially induced pregnant mouse and to explore whether Nme2 is involved in the decidualization of stromal cells. ***Methods***: Immunohistochemistry, Western blot and real-time quantitative PCR(qRT-PCR) were used to detect the expression of Nme2 in mouse endometrium from implantation sites of pregnant day 5(D_5IS), inter-implantation of pregnant day 5(D_5IIS), D_6IS, D_6IIS, D_8IS, D_8IIS and artificially induced deciduaoma. ***Results***: The expression of Nme2 mRNA and protein in the D_5, D_6 and D_8 implantation sites was significantly higher than that of the inter-implantation sites. Immunohistochemical results showed that Nme2 staining was localized in the primary or secondary decidualization zone of D_5, D_6 and D_8 implantation sites. Moreover, the expression of Nme2 mRNA and protein in artificially induced deciduaoma was also significantly higher than that in the control. ***Conclusion***: Nme2 expression is associated with decidualization in mouse endometrium.

【Key words】endometrium; decidualization; Nme2

成功的妊娠依赖于拥有着床能力的囊胚和处于容受状态的母体子宫两者的协调[1]。胚胎成功植入后,围绕胚胎周围的子宫内膜基质细胞受相关因子的诱导刺激,发生显著增殖,进而分化为蜕膜细胞,它的形成对于妊娠的建立以及维持有十分重要的作用[1-3]。这个过程主要受卵巢分泌的甾体激素调控。同时,也会受一些重要的信号通路和因子调控[3-4]。但是,子宫内膜基质细胞的蜕膜化过程中的潜在分子机制目前还尚不完全明确。

NME(nucleoside diphosphate kinase,NDPK)也称 nm23,最早发现于 1988 年,具有肿瘤转移抑制作用[5]。在这个家族成员中,抑制转移的功能主要由 Nme1 和 Nme2 所体现。Nme1 和 Nme2 还参与细胞

作者介绍:张 雪,Email:649302422@qq.com,研究方向:胚胎植入。
通信作者:付利娟,Email:17359177@qq.com
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81671493)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170622.1639.048.html (2017-06-22)

增殖和分化过程的调控[6]。NDPK 活性是该家族的共同特征，Nme2 编码 NDPK 的 B 亚基，因其具有核苷二磷酸激酶活性，可以催化形成三磷酸核苷[7]。Nme2 基因位于染色体 17q21.3[8]。本课题组前期研究显示 Nme1 通过 PI3K-Akt-mTOR 信号通路参与基质细胞蜕膜化过程[9]。但是 Nme2 在受孕小鼠子宫内膜的表达模式以及功能暂无相关研究。

本研究应用免疫组织化学、Western blot 以及实时荧光定量 PCR（real-time quantitative PCR，qRT-PCR）来定性、定量分析小鼠妊娠第 5 天（D_5）、D_6、D_8 以及人工诱导蜕膜化子宫内膜 Nme2 基因表达定位以及表达，初步探讨了 Nme2 在小鼠基质细胞蜕膜化过程中的表达模式，为进一步探讨 Nme2 基因调控蜕膜化过程的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 本实验选用的性成熟昆明系小鼠为 6~8 周龄（25~30 g），均购自重庆医科大学实验动物中心（证书编号：SCXK[渝]2012-0001），置于重庆医科大学实验动物中心无特定病原微生物动物房饲养，给予自由饮食和饮水，提供严格控制温度、湿度和光线（12 h 光/12 h 黑暗）。

1.1.2 试剂 免疫组化试剂盒和 DAB 显色液购自北京中杉生物技术有限公司；RIPA 蛋白裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所；Trizol 裂解液、逆转录试剂盒和 SYBR 定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司；玉米油（99%纯度）和麻醉用乙醚购自美国 Sigma 公司；兔多克隆 Nme2 抗体购自 Abcam；ACTB（β-actin）及二抗购北京中杉生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立与材料收集 小鼠正常妊娠模型：性成熟的雌性小鼠与雄性小鼠按 2:1 合笼，次日清晨见阴栓记为妊娠第 1 天（D_1）。胚胎着床点（implantation site，IS）和着床旁（inter-implantation site，IIS）的区分采用小鼠尾静脉注射台盼蓝法。脱颈法处死小鼠，分别收集 D_5、D_6 和 D_8 的着床点和着床旁子宫组织。1/2 的子宫组织冻存于液氮用于提取 RNA，1/4 的组织用多聚甲醛固定后用于免疫组织化学实验，剩余组织冻存于-80 ℃，用于提取蛋白质。正常孕龄雌性小鼠与结扎输精管后休息 2 周的雄鼠按 2:1 合笼，次日查见阴栓记为 PD_1。在 PD_4 单侧子宫角注射 25 μL 玉米油作为诱导组，获得人工诱导蜕膜化小鼠子宫。对侧子宫不注射玉米油作为对照组，PD_8 上午取材。

1.2.2 免疫组织化学 子宫组织由 4%多聚甲醛中固定 24 h 后，经 75%、80%、95%、100%乙醇梯度脱水，二甲苯透明，浸软蜡 5 h，硬蜡包埋，制成石蜡组织包埋块。切片厚度 4 μm。组织切片采用二甲苯脱蜡，梯度酒精水化：100%、90%、80%、70%各 5 min，流水冲洗 10 min，蒸馏水浸泡 5 min；柠檬酸盐缓冲液抗原热修复：微波炉高火煮沸后调至中低火，热修复 16 min，取出室温冷却；去离子水室温孵育 10 min 后 PBS 浸洗 3 次，每次 5 min；滴加免疫组化试剂盒 A 液（封闭液），37 ℃水浴锅孵育 30 min；兔多克隆 Nme2 抗体（1:100，Abcam）4 ℃过夜。次日复温 10 min 后，滴加免疫组化试剂盒 B 液（生物素标记的兔二抗），37 ℃孵育 30 min 后，PBS 浸洗 3 次，每次 5 min；加入免疫组化试剂盒 C 液（辣根酶标记的三抗），37 ℃孵育 30 min 后，PBS 浸洗 3 次，每次 5 min；DAB 显色，棕色为阳性结果，自来水终止反应。苏木精复染 3 min，自来水冲洗干净，盐酸酒精分色 1 s 左右，自来水冲洗，饱和碳酸锂 3 s，自来水冲洗干净；乙醇脱水：70%、80%、90%、100%各 5 min；二甲苯透明 2 次，每次 5 min，中性树胶封片。

1.2.3 Western blot 分析 取得小鼠子宫内膜组织后，进行组织研磨，加入蛋白裂解液提取组织总蛋白，用 BCA 蛋白定量法测定总蛋白浓度，计算蛋白的上样量。蛋白样品（每支约 40 μg）溶于 5×Buffer（比例 4:1），沸水煮沸 10 min。配制分离胶和浓缩胶，60 V 恒压预电泳 10 min 左右后进行蛋白上样，80 V 恒压电泳 90 min；待充分分离后，截取所需蛋白分子量部分，250 mA 电转至 PVDF 膜；5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 80 min 后，滴加 5%脱脂奶粉稀释的一抗 Nme2（1:1 000）；兔单克隆 ACTB（1:1 000），4 ℃冰箱过夜；次日 PBST 清洗 3 次，10 min/次；滴加 5%脱脂奶粉稀释的二抗，室温孵育 80 min 后，PBST 清洗 3 次，10 min/次；化学发光 ECL 法显色。

1.2.4 qRT-PCR 分析 相应的 PCR 引物见表 1。采用 Trizol 抽提子宫内膜总 RNA，异丙醇沉淀浓缩，灭菌 DEPC 水溶解总 RNA，紫外分光光度计测总 RNA 的光密度值。逆转录为 cDNA 后，运用 qRT-PCR 检测 Nme2 的表达，相对表达量用 2-DDCt 法分析。

表 1 qRT-PCR 的引物

Tab.1 Primers used for real-time quantitative RT-PCR

基因		序列：5'- 3'
Nme2	正向引物	ATCGACCTGAAAGACCGTCCT
	反向引物	TCAGTTCTTCGGGCTTAAACC
ACTB	正向引物	CTGGGACGACATGGAGAAAA
	反向引物	AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC
dtprp	正向引物	AGCCAGAAATCACTGCCACT
	反向引物	TGATCCATGCACCCATAAAA

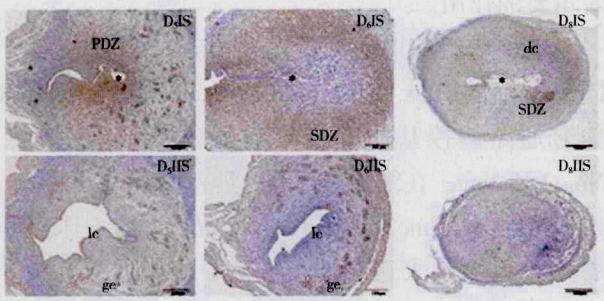
1.3 统计学分析

每个实验包括至少 3 个独立样品。以两组 Nme2 或 dtprp 拷贝数与 ACTB 拷贝数之比值作为 qRT-PCR 结果进行统计。用 Quantity One 软件对 Western blot 结果进行灰度分析。使用 GraphPad Prism 5.0 用于统计分析，两组间比较采用两独立样本 t 检验。检验水准 α=0.01。

2 结 果

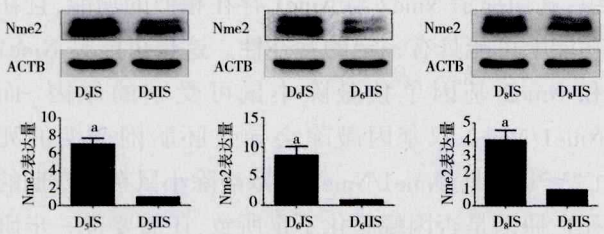
2.1 早孕小鼠子宫内膜中 Nme2 的表达

免疫组织化学方法检测 Nme2 蛋白在早孕小鼠子宫内膜的表达，结果显示 Nme2 表达于 D_5IS 的初级蜕膜区（primary decidua region，PDZ）。随着妊娠进程的发展，Nme2 逐渐表达于 D_6IS 和 D_8IS 的次级蜕膜区（secondary decidua region，SDZ）。另外，在 D_5IIS 和 D_6IIS 子宫内膜的腔上皮以及腺上皮也可检测到 Nme2 阳性表达信号（图 1A）。Western blot 检测结果表明 Nme2 在 D_5、D_6、D_8 的着床点的蛋白表达量均高于对应孕天着床旁的表达量，且具有统计学意义（图 1B）。qRT-PCR 检测 Nme2 的 mRNA 水平显示：Nme2 基因 mRNA 在着床点的表达均比对应着床天数的着床旁高，具有统计学意义（图 1C）。Nme2 的 mRNA 水平在着床点和着床旁的表达差异与蛋白水平表达差异相似。



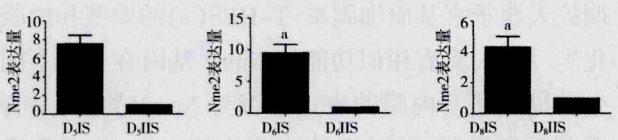
le：腔上皮；ge：腺上皮；PDZ：初级蜕膜区；SDZ：次级蜕膜区；*：胚胎；dc：蜕膜细胞

A. 免疫组织化学检测 Nme2 的表达



ACTB为内参；a：与相应着床旁相比，$P<0.01$

B. Western blot 检测 Nme2 蛋白水平表达以及灰度分析结果



ACTB为内参；a：与相应着床旁相比，$P<0.01$

C. qRT-PCR 检测 Nme2 mRNA 水平

图 1 Nme2 在小鼠早期妊娠妊娠组子宫内膜表达

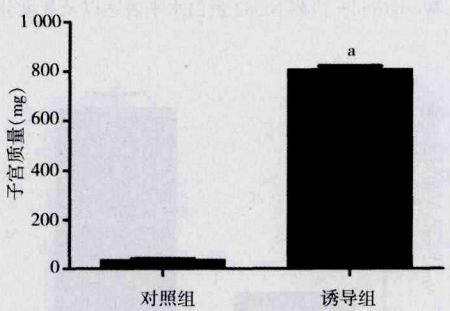
Fig.1 Expression of Nme2 in early pregnant mouse endometrium

2.2 Nme2 在小鼠人工诱导蜕膜化的子宫内膜的表达

利用假孕小鼠建立人工诱导蜕膜化模型。相对于对照侧子宫形态，成功诱导蜕膜化的一侧子宫呈明显肿胀状态（图 2A）。对照侧子宫明显重于对照侧子宫（图 2B）。qRT-PCR 检测小鼠基质细胞蜕膜化标志物 dtprp 的 mRNA 的表达，显示蜕膜化诱导侧表达明显高于对照侧（图 2C）。

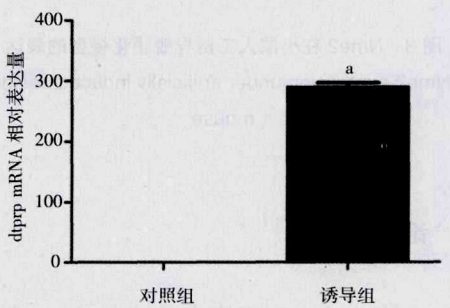


A. 小鼠子宫形态



a：与对照组相比，$P=0.000$

B. 诱导蜕膜化小鼠子宫与对照子宫的质量差异



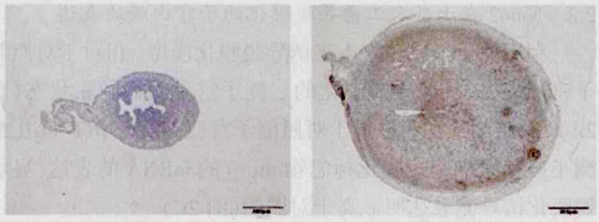
a：与对照组相比，$P=0.000$

C. qRT-PCR 测定蜕膜化标志物 dtprp

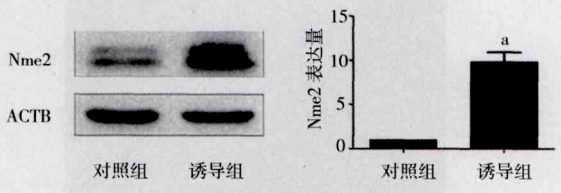
图 2 小鼠人工诱导蜕膜化模型的建立

Fig.2 Artificially induced decidualization in mouse

免疫组织化学结果显示 Nme2 广泛表达于人工诱导蜕膜化的蜕膜细胞，对照组则染色较弱或无染色（图 3A）。Western blot 和 qRT-PCR 结果显示 Nme2 在诱导蜕膜化组的蛋白和 mRNA 水平明显高于对照组（图 3B、C），提示 Nme2 的表达上调与蜕膜化发生相关。

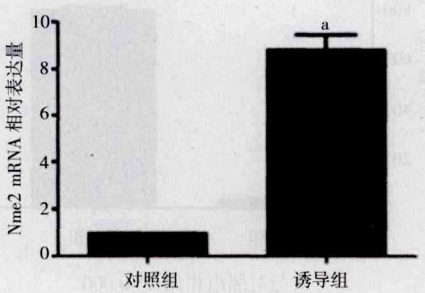


A. 免疫组织化学检测 Nme2 的表达



ACTB为内参；a：与对照组相比，$P<0.01$

B. Western blot 检测 Nme2 蛋白水平表达以及灰度分析结果



a：与对照组相比，$P<0.01$

C. qRT-PCR 检测 Nme2 mRNA 水平

图 3 Nme2 在小鼠人工诱导蜕膜化模型的表达

Fig.3 Nme2 expression under artificially induced deciduoma in mouse

3 讨 论

Nme2 作为 nm23 家族中的成员之一，编码 152 个氨基酸组成的 17 kD 蛋白，具有抑制肿瘤细胞转移的作用[14-18]。此外，Nme2 基因还具有其他生物学功能，如调节核苷酸磷酸化、参与发育调控、可作为转录调控因子以及参与信号转导过程[19]。

Arnaud-Dabernat 等[20]和 Di 等[21]的研究表明，分别敲除 Nme1 和 Nme2 基因的小鼠可受孕，但是 Nme1/ Nme2 双基因敲除会导致胚胎围产期的死亡[22]。在体外胚胎干细胞研究中发现，Nme2 基因可通过影响 c-Myc 的表达促进胚胎干细胞的分化[23]。Nme2 可能通过与调控因子 c-Myc 的相互作用调控癌细胞中的增殖[24]。有研究显示，Nme2 主要表达在细胞周期 S 期的细胞核，参与调控细胞增殖[25]。胚胎着床及基质细胞的蜕膜化过程，涉及一系列信号通路和重要因子的表达调控[1,10-11]。小鼠子宫内膜容受态的建立，需子宫腔上皮细胞的广泛增殖。在胚胎成功着床后，围绕着胚胎植入点的基质细胞迅速增殖、分化为蜕膜细胞，为胚胎的生长提供营养来源、免疫保护以及其他必要的支持[3,10,12]。子宫基质细胞的蜕膜化过程对正常妊娠的建立以及维持具有十分重要的作用[13]。本研究显示 Nme2 基因的 mRNA 和蛋白水平在着床点的表达都显著高于着床旁。提示 Nme2 可能参与小鼠基质细胞的蜕膜化过程的基质细胞增殖和分化，对于维持小鼠的正常妊娠可能有着重要的作用。

本课题组前期研究中发现，与 Nme2 基因属于同一家族的成员 Nme1 基因通过 PI3K-Akt-mTOR 信号通路调控基质细胞的增殖和蜕膜化过程[9]。Nme2 和 Nme1 在结构和功能上具有相似的功能[27-28]。本研究显示，Nme2 与在 D_5、D_6 以及 D_8 的着床点和着床旁组织的表达模式与 Nme1 相似，即Nme1和 Nme2 均主要表达于 D_5 的初级蜕膜区以及 D_6、D_8 的次级蜕膜区；人工诱导蜕膜化模型显示Nme2 在诱导蜕膜中的表达显著高于未发生蜕膜化的对照组织，这均提示 Nme2 与 Nme1 存在相似的功能，且在功能上可能具有一定的互补性。这也可能是 Nme1 和 Nme2 基因单独敲除小鼠可受孕的原因，而 Nme1/Nme2 双基因敲除会导致胚胎围产期的死亡[20-22]。但是，Nme1/Nme2 的双敲除小鼠在围产期的死亡原因是否因蜕膜化不足所致，还需要进一步研究。

此外，Nme1 基因在人的蜕膜组织高表达，能够调控人源子宫基质细胞系（T-HESCs）的增殖和蜕膜化[9]。那么，具有相似功能的 Nme2 基因在人的不同生殖周期子宫内膜的表达是否与 Nme1 类似，是否受到受卵巢雌、孕激素的调节均还未知，均需要进一步探索。

参 考 文 献

[1] Dey SK, Lim H, Das SK, et al. Molecular cues to implantation[J].

Endocr Rev,2004,25(3):341-373.

[2] Cha J,Sun X,Dey SK. Mechanisms of implantation:strategies for successful pregnancy[J]. Nat Med,2012,18(12):1754-1767.

[3] Ramathal CY,Bagchi IC,Taylor RN,et al. Endometrial decidualization:of mice and men[J]. Semin Reprod Med,2010,28(1):17-26.

[4] Mestre-Citrinovitz AC,Kleff V,Vallejo G,et al. A suppressive antagonism evidences progesterone and estrogen receptor pathway interaction with concomitant regulation of Hand2,Bmp2 and ERK during early decidualization[J]. PLoS One,2015,10(4):e0124756.

[5] Steeg PS,Bevilacqua G,Kopper L,et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential[J]. J Natl Cancer Inst,1988,80(3):200-204.

[6] Lacombe ML,Milon L,Munier A,et al. The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases[J]. J Bioenerg Biomembr,2000,32(3):247-258.

[7] Yamashiro S,Urano T,Shiku H,et al. Alteration of nm23 gene expression during the induced differentiation of human leukemia cell lines[J]. Oncogene,1994,9(9):2461-2468.

[8] Stahl JA,Leone A,Rosengard AM,et al. Identification of a second human nm23 gene,nm23 H2[J]. Cancer Res,1991,51(1):445-449.

[9] Zhang X,Fu LJ,Liu XQ,et al. nm23 regulates decidualization through the PI3K-Akt-Mtor signaling pathways in mice and humans[J]. Hum Reprod,2016,31(10):2339-2351.

[10] Tan Y,Li M,Cox S,et al. HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization via cyclin D3 during implantation[J]. Dev Biol,2004,265(1):181-195.

[11] Kodama A,Yoshino O,Osuga Y,et al. Progesterone decreases bone morphogenetic protein(BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells[J]. Hum Reprod,2010,25(3):751-756.

[12] Correia-da-Silva G,Bell SC,Pringle JH,et al. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy[J]. Placenta,2004,25(6):538-547.

[13] Bany BM,Cross JC. Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization[J]. Dev Biol,2006,294(2):445-456.

[14] Boissan M,Dabernat S,Peuchant E,et al. The mammalian Nm23/NDPK family:from metastasis control to cilia movement[J]. Mol Cell Biochem,2009,329(1-2):51-62.

[15] Hennessy C,Henry JA,May FE,et al. Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer:an association with good prognosis[J]. J Natl Cancer Inst,1991,83(4):281-285.

[16] Florenes VA,Aamdal S,Myklebost O,et al. Levels of nm23 messenger RNA in metastatic malignant melanomas:inverse correlation to disease progression[J]. Cancer Res,1992,52(21):6088-6091.

[17] Liu YF,Yang A,Liu W,et al. NME2 reduces proliferation,migration and invasion of gastric cancer cells to limit metastasis[J]. PLoS One,10(2):e0115968.

[18] Oda Y,Naka T,Takeshita M,et al. Comparison of histological changes and changes in nm23 and c-MET expression between primary and metastatic sites in osteosarcoma:a clinicopathologic and immunohistochemical study[J]. Hum Pathol,2000,31(6):709-716.

[19] Otero AS. NM23/nucleoside diphosphate kinase and signal transduction[J]. J Bioenerg Biomembr,2000,32(3):269-275.

[20] Arnaud-Dabernat S,Bourbon PM,Dierich A,et al. Knockout mice as model systems for studying nm23/NDP kinase gene functions. Application to the nm23-M1 gene[J]. J Bioenerg Biomembr,2003,35(1):19-30.

[21] Di L,Srivastava S,Zhdanova O,et al. Nucleoside diphosphate kinase B knock-out mice have impaired activation of the K^+ channel KCa3.1,resulting in defective T cell activation[J]. J Biol Chem,2010,285(50):38765-38771.

[22] Postel EH,Wohlman I,Zou X,et al. Targeted deletion of Nm23/nucleoside diphosphate kinase A and B reveals their requirement for definitive erythropoiesis in the mouse embryo[J]. Dev Dyn,2009,238(3):775-787.

[23] Zhu S,Wurdak H,Wang J,et al. A small molecule primes embryonic stem cells for differentiation[J]. Cell Stem Cell,2009,4(5):416-426.

[24] Yao Y,Li C,Zhou X,et al. PIWIL2 induces c-Myc expression by interacting with NME2 and regulates c-Myc-mediated tumor cell proliferation[J]. Oncotarget,2014,5(18):8466-8477.

[25] Kraeft SK,Traincart F,Mesnildrey S,et al. Nuclear localization of nucleoside diphosphate kinase type B(nm23-H2) in cultured cells [J]. Exp Cell Res,1996,227(1):63-69.

[26] Kar A,Saha D,Purohit G,et al. Metastases suppressor NME2 associates with telomere ends and telomerase and reduces telomerase activity within cells[J]. Nucleic Acids Res,2012,40(6):2554-2565.

[27] Lascu I,Gonin P. The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases[J]. J Bioenerg Biomembr,2000,32(3):237-246.

[28] Chandrasekharappa SC,Gross LA,King SE,et al. The human NME2 gene lies with in 18 kb of NME1 in chromosome 17[J]. Genes Chromosomes Cancer,1993,6(4):245-248.

（责任编辑：张辉洁）