

# 功能基因组学和蛋白质组学在 胚胎植入机制研究中的应用

叶倩 何俊琳\* 王应雄

(重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学研究室、遗传优生教研室, 重庆 400016)

**摘要** 胚胎植入是人类和哺乳动物生殖过程中的重要步骤, 其分子机制至今尚未完全明了。近年来, 功能基因组学和蛋白质组学等高通量检测新技术已广泛应用于胚胎植入机制的研究领域。通过从整体上观察胚胎植入过程中基因和蛋白质表达的变化, 全面地筛选出大量胚胎植入相关因子, 从而为在分子水平上阐明胚胎植入过程中的调控网络打下了基础。

**关键词** 胚胎植入; 功能基因组学; 蛋白质组学

胚胎植入(embryo implantation)即胚胎着床, 是胚胎黏附于子宫壁, 穿过子宫内膜, 进而穿透母体血液循环形成胎盘的过程, 是决定妊娠成功与否的关键。长期以来其机制研究是生殖生物学界关注的热点, 并已取得许多成果, 特别是近年来功能基因组学(functional genomics)和蛋白质组学(proteomics)新技术广泛应用于胚胎植入机制研究领域, 获得了大量宝贵数据。本文就这些新技术在胚胎植入机制研究中的应用进展作一综述。

## 1 功能基因组学技术在胚胎植入机制研究中的应用

功能基因组学是在结构基因组学的研究成就和高通量的分析技术得到突破的背景下产生的研究基因组功能表达的一门分支学科, 研究重心从揭示生命的所有遗传信息转移到从分子整体水平探讨基因的功能<sup>[1]</sup>。近年来已发展了多种研究基因表达谱和筛选差异表达基因的方法, 主要有基因芯片(gene chip)、基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)、消减杂交(subtractive hybridization, SH)等技术, 这些高通量技术及生物信息学的快速发展使同时研究胚胎植入过程中大规模的基因表达成为可能。

### 1.1 基因芯片技术

基因芯片又称 DNA 芯片或微阵列(DNA chip 或 DNA microarray), 它是将大量探针分子固定于支持物上, 然后与标记的样品进行杂交, 通过检测杂交信号的强弱进而判断样品中靶分子的数量。它具有高通量、高速度、高灵敏度、高精度的特点, 可

对多个基因甚至基因组进行快速、全自动、多参数同步分析。基因芯片技术可以获得细胞的基因表达谱, 筛选出与特定生理过程相关的基因。子宫内膜组织周期性的动态变化, 适合应用基因芯片表达谱来研究参与成熟子宫内膜周期性变化以及胚胎植入过程中的基因, 得以更全面的了解子宫内膜、蜕膜以及滋养层与蜕膜之间接触面的动态改变, 为解析植入分子机制提供了一个良好的技术平台<sup>[2]</sup>。

子宫内膜容受性状态(endometrial receptivity)是子宫允许胚泡黏附的一个严格的时期, 其分子基础还不清楚。Riesewijk 等<sup>[3]</sup>采用包含约 12 000 个基因的 DNA 芯片比较子宫内膜容受性状态前期 LH+2 [黄体生成素(LH)峰第2天]和容受性状态期 LH+7 的基因表达谱, 发现其中 LH+7 相对于 LH+2 有 153 个基因上调, 58 个基因下调。Kao 等<sup>[4]</sup>用基因芯片技术比较了植入窗口期(implantation window)与增生晚期内膜组织的基因表达, 结果显示窗口期有 156 个基因表达显著上调, 377 个基因表达下调。Carson 等<sup>[5]</sup>用高密度 cDNA 芯片比较黄体早期和黄体中期的子宫内膜组织中的基因表达, 研究发现黄体中期有 323 个基因表达上调, 370 个基因表达下调。已有研究证实雌、孕激素对子宫容受性状态的形成起主要作用, 在此基础上, Borthwick 等<sup>[6]</sup>用高密度寡核苷酸芯片研究基因启动子中雌激素或孕激素反应元件, 发现含孕激素反应元件的基因在分泌期上调; 而含雌激素反应元件的基

收稿日期: 2007-09-18 接受日期: 2008-01-08

国家自然科学基金资助项目(No.30500054)

\* 通讯作者。Tel: 023-68485001, E-mail: hejunlin\_11@yahoo.com.cn

表 1 四项研究的比较及其筛选的人类子宫内膜容受性基因标志物

	Riesewijk 等 <sup>[3]</sup>	Kao 等 <sup>[4]</sup>	Carson 等 <sup>[5]</sup>	Borthwick 等 <sup>[6]</sup>
采用的芯片	Affimetrix HG-U95A	Affimetrix HG-U95A	Affimetrix HG-U95A	Affimetrix HG-U95A-E
第一个样本	LH+2	增生期(8-10)	LH+(2-4)	增生期(9-11)
第二个样本	LH+7	LH+(8-10)	LH+(7-9)	LH+(6-8)
上调基因(>3.0 倍)	153	60	120	85
骨桥蛋白(osteopontin) (结构蛋白)	✓	✓	✓	✓
载脂蛋白 D (apolipoprotein D) (物质转运)	✓	✓	✓	✓
Dickkopf/DKK1 (hdkk-1) (Wnt 信号转导)	✓	✓	✓	✓
胎盘蛋白 14 (placenta protein 14) / 免疫抑制性糖蛋白(glycodelin) (分泌蛋白)	✓	✓		✓
补体衰变加速因子(CD55, Cromer blood group system) (免疫调节)	✓	✓		✓
Adipsin / 补体因子 D(补体蛋白)	✓	✓		✓
G 蛋白 2 (GBP-2), interferon-inducible (GTP 结合蛋白)	✓		✓	✓
Claudin 4 / CEP-R (受体)	✓	✓	✓	
单胺氧化酶 A (MAOA) (信号转导)	✓	✓		✓
生长停滞与 DNA 损伤诱导蛋白 45 (gadd45) (调节蛋白)	✓	✓		✓
Nip2 (细胞凋亡因子)	✓		✓	✓
下调基因(>3.0 倍)	58	87	153	40
Olfactomedin-related ER localized protein (分泌蛋白)	✓	✓	✓	✓

因在增生期上调。综合以上四组研究结果, 筛选出在子宫内膜容受阶段上调或下调大于 3 倍的基因可作为子宫内膜容受性的新的基因标志物(表 1)。这几项研究在实验设计和数据分析的方法上存在差异, 但他们共同发现了某些功能与这个过程密切相关的基因, 而且他们得到的数据是相互补充的, 为建立一个植入窗口期子宫容受性状态的基因表达数据库奠定了基础。可以看出在子宫内膜容受性建立的过程中, 有许多功能基因的参与, 包括蛋白质转录合成相关基因、信号转导分子、黏附分子、肿瘤相关分子、凋亡相关分子等, 说明子宫内膜容受性建立过程涉及多种分子事件的发生, 这些分子共同作用的结果启动了子宫内膜容受性的建立。

子宫内膜间质细胞蜕膜化是胚胎植入和胎盘发挥功能的先决条件。蜕膜化是为了调节胚胎的生长和侵袭, 其主要特点是血管生成和组织重构, 其分子基础尚不明了<sup>[7]</sup>。Popovici 等<sup>[8]</sup>用 cDNA 芯片比较体外诱导的蜕膜化细胞与非蜕膜化细胞中的基因表达差异, 发现大量可能参与蜕膜化的基因。在被筛查的 588 个基因中, 上调的基因包括细胞因子、生长因子、核转录因子、细胞周期蛋白家族成员、cAMP 信号转导途径的载体。还发现一些表达受孕酮(P)和 cAMP 调节的基因, 包括胰岛素受体、神经转导受体、神经调节递质、FSH 受体、抑制素/激活素  $\beta$  亚单位、抑制素  $\alpha$  和与肿瘤坏死因子相关的

凋亡诱导配体(TRAIL)。Brar 等<sup>[9]</sup>用基因芯片分析在人蜕膜成纤维细胞分化过程中的基因表达模式。在分析的 6 918 个基因中, 121 个上调大于 2 倍, 110 个下调, 另 50 个既有上调又有下调。这些基因按照其生物学功能被分为五类: 细胞和组织功能、细胞和组织结构、基因表达调控、表达序列标签(EST)和“功能未知”。结果提示, 这些基因表达的变化在间质蜕膜化发生以及子宫内膜周期性变化过程中发挥重要作用。这几项研究都采用基因芯片研究了子宫蜕膜化过程中的基因表达谱变化, 更全面地筛选出参与子宫内膜间质细胞过程的分子, 有助于深入了解蜕膜化的分子机制。

## 1.2 基因表达系列分析

SAGE 是 Velculescu 等<sup>[10]</sup>在 1995 年发展起来的一种快速分析基因表达信息的技术。通过快速和详细分析成千上万个 EST 来寻找出表达丰度不同的 SAGE 标签序列, 从而接近完整地获得基因组的表达信息。SAGE 可以在较短时间内高通量、平行性检测细胞内基因表达谱, 并且可以对基因表达的拷贝数进行定量分析, 同时可在未知任何基因或 EST 序列的情况下对靶细胞进行研究, 发现相关的未知基因。还用于寻找那些较低丰度的转录物, 最大限度地收集基因组的基因表达信息, 是从总体上全面研究基因表达、构建基因表达图谱的首选策略。该技术为高通量筛选胚胎植入相关基因提供了有力的工具。

Ma等<sup>[11]</sup>运用SAGE技术分析妊娠第五天的小鼠子宫胚胎植入点和植入旁位点之间的差异表达基因。在该研究中建立的两个11 bp标签的SAGE文库里,分别分析了植入旁位点48 121个和植入点50 227个标签。其中,1 039个在植入旁位点特异表达,1 252个在植入点特异表达。根据P值,有195个标签在植入旁位点显著上调,261个标签在植入点显著上调,其中植入旁位点和植入点分别有100个和127个基因与标签唯一匹配。通过RT-PCR,植入旁位点与植入点的标签被证实有14个基因显著改变。经原位杂交证明,在植入点1810014L12Rik、Psm5、Cd63、Npm1、Fads3和Tagln2比植入旁位点显著高表达。DdX39在妊娠第五天的鼠植入点基质细胞显著高表达,且它在植入点的表达是被活性胚泡特异诱导的。此外,在卵巢切除的小鼠,雌激素使DdX39的表达显著上调。通过建立SAGE文库从而筛选得到的差异表达基因,为获取与胚胎植入相关的关键基因提供了非常有价值的数据库。

### 1.3 消减杂交

利用核酸杂交原理建立了能分离差异表达基因的消减杂交技术(SH), Diatchenko等<sup>[12]</sup>在抑制性PCR的基础上建立起来抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH),该技术根据杂交二级动力学原理,即高丰度单链DNA退火时产生同源杂交的速度快于低丰度单链DNA,使原来存在丰度差异的基因片段含量趋于一致,促进低丰度的差异表达基因被检出,从而克服了样本间由于mRNA丰度差异导致不能有效分离差异基因的问题;而且,巧妙利用抑制性PCR的链内退火优于链间退火特点,使非目的片段因两端反向重复序列在退火时产生链内互补/锅柄样结构而停止扩增,从而更简单、更快速地分离差异表达的基因。SSH技术因其高敏感性、高特异性及高效率,已成为现阶段筛选差异表达基因最常用的方法之一。

Sun等<sup>[13]</sup>用SSH技术研究恒河猴胚胎植入初始时期(9.5 d)子宫内膜植入位点与非植入位点的基因差异表达。他们建立植入位点消减cDNA文库后,从中随机挑选了376个克隆,筛选到76个差异表达克隆,用斑点印迹(dot blot)、反向Northern印迹及半定量RT-PCR证明了其在植入位点的差异表达。其中15个阳性克隆代表S100A10基因,10个对应于sFRP-4(secreted frizzled-related protein 4)基因。另外2个克隆对应于1个与人同源的EST,还有一个克

隆与人的DNA序列同源,可能是一个新基因。该研究小组又进一步从植入位点消减cDNA文库中随机挑选1 440个克隆,通过点杂交获得179个在植入位点高表达的克隆,证实其中102个克隆对应于52个人和恒河猴的同源基因,75个克隆对应于人的58个EST<sup>[14]</sup>。分析这些同源基因的功能,发现在植入过程中多种功能不同的基因表达发生了变化,其中有蛋白激酶H11、cystatin B等与细胞增殖和分化相关的基因,表明植入过程中伴随着活跃的细胞增殖及凋亡行为;1型gp96(TRA1)、胰岛素样生长因子2受体(IGF2R)等与免疫相关的分子,可能在母体与胚胎之间形成的免疫耐受中起重要作用;还有40S核糖体蛋白S25、核糖体蛋白L5、60S核糖体蛋白L6等核糖体蛋白,可能与植入过程中细胞内大量蛋白质合成有关。

杜国平等<sup>[15]</sup>应用SSH技术筛选胚胎植入窗口期的差异表达基因,并探究子宫内膜容受性形成的分子基础。该研究建立了人子宫内膜植入窗口期的消减cDNA文库,其中50个克隆经鉴定后确定胚胎植入窗口期有35个差异表达基因,包括23个已知基因和12个未知功能基因。该研究除了对已知的子宫内膜容受性相关基因的验证外,还发现了一些在子宫内膜着床窗口期表达的新的相关基因,核糖体蛋白质(RP) L7基因、RPL7假基因(RPL7p)、RPL19基因和酪氨酸3-单氧化酶/色氨酸5-单氧化酶激活蛋白zeta多肽(YWHAZ)基因均在植入窗口期子宫内膜中呈高表达。这些基因可能在子宫内膜容受性的形成过程中发挥作用,机制有待进一步研究。

## 2 蛋白质组学技术在胚胎植入机制研究中的应用

蛋白质组学作为功能基因组研究的重要支柱,是在20世纪90年代中期独立于基因组学而发展起来的一门新兴的前沿学科。它是在特定的时间和空间研究一个完整的生物体(或细胞)所表达的全体蛋白质的特征,包括蛋白质的表达水平,翻译后的修饰,蛋白质与蛋白质相互作用等,从而在蛋白质水平上获得对有关生物体生理、病理等过程的全面认识。目前蛋白质组研究技术常用以下手段:(1)用于蛋白质分离技术方面的如双向凝胶电泳(2-DE)、双向“高效”柱层析等。(2)用于蛋白质鉴定的技术如质谱技术、凝胶图像分析、蛋白质和多肽的N端、C端测序及氨基酸组成分析等。(3)用于蛋白质相互作用及作用方式研究的双杂交系统。(4)用于分析大量数据的生物

工程信息学等。根据基因组学研究所揭示的大量胚胎植入差异表达基因,应用蛋白质组学技术对其编码的蛋白质作更进一步的研究,以明确它们在胚胎植入过程中发挥的作用,从而全面、高通量地筛选出与植入过程特定功能相关的分子标记物。

转录因子 *Hoxa10* 是植入过程中关键因素之一, *Hoxa10*<sup>-/-</sup> 雌性小鼠胚胎植入和蜕膜化失败是由于在子宫容受状态和胚胎植入期间子宫对孕酮的反应性降低和间质细胞的增殖受损。然而, *Hoxa10* 下游的信号通路还不完全清楚。Daikoku 等<sup>[16]</sup>运用差异凝胶电泳(DIGE)技术发现免疫亲和蛋白 fkbp52(FK506 binding protein 4)在小鼠子宫中作为 *Hoxa10* 介导信号的转导分子之一。fkbp52 在 *Hoxa10*<sup>-/-</sup> 小鼠的间质细胞表达显著下调,且在围植入期子宫不同细胞呈特异性表达: D1 在子宫上皮细胞表达, D4(小鼠子宫容受性状态期间)表达向间质扩展, D5 表达局限于植入点周围蜕膜化的基质细胞中。此外, fkbp52 在子宫不同细胞中的表达还受孕酮和/或雌激素的影响,这与它在围植入期的表达模式一致。以上结果均表明 *Hoxa10*-fkbp52 信号轴线在子宫内膜容受性状态及胚胎植入过程中发挥重要作用。李洁等<sup>[17]</sup>采用胶内差异双向电泳(2D-DIGE)和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术,鉴定和分析正常妇女子宫内膜植入窗口前期 LH+2 d 和植入窗口期 LH+7 d 内膜差异表达蛋白质。结果发现在 LH+7 d 膜联蛋白 IV 的表达比 LH+2 d 增强 2.12 倍。免疫组织化学结果显示,在 LH+2 d 膜联蛋白 IV 表达于子宫内膜上皮细胞,而在 LH+7 d 上皮细胞和基质细胞均有表达。Western 印迹鉴定,膜联蛋白 IV 在 LH+7 d 的表达明显高于 LH+2 d。研究表明膜联蛋白 IV 可能是人类子宫内膜向容受性状态转化的重要蛋白质之一。

在植入期胚胎研究方面, Katz-Jaffe 等<sup>[18]</sup>应用飞行时间质谱技术第一次成功获取和分析了人类单个胚胎的蛋白质组,并鉴定胚胎植入差异表达蛋白质。该研究获得早期胚胎与扩展胚胎之间,以及在发育中与退化中胚胎之间的差异蛋白质表达谱,并在退化的胚胎检出几个显著上调和下调的蛋白质。经蛋白质数据库检索为 T 细胞因子 Tcf-4 (Wnt 信号转导通路中的核内信号分子)抑制剂和凋亡蛋白活性因子 (Apaf), 据此推测退化中的胚胎几个上调表达的蛋白质可能涉及细胞凋亡和生长抑制途径。研究者在另

一项研究中分析了人和小鼠胚胎的周围介质(分泌腺)分泌产生的蛋白质,并研究其与胚胎发育的相关性<sup>[19]</sup>。发现在胚胎发育阶段的分泌图谱中泛素(ubiquitin)显著上调,这提示泛素在哺乳动物胚胎植入过程中发挥了重要作用。研究结果不仅提示这些蛋白质分子的变化可作为胚胎发育特定时期的标志物,加深我们对胚胎生理的理解,而且还为人类 IVF 中胚胎发育能力的非侵入性检测提供了有力的支持。

### 3 问题与展望

胚胎植入是短暂而复杂的过程,参与此过程的调控因素繁多,近十年来胚胎植入机制的研究已获得许多有价值进展。实践证明,在基因组和蛋白质组水平上分析并结合功能研究是解析胚胎植入分子通路的有希望的方法<sup>[20]</sup>。然而,我们面临的问题是如何分析处理并应用这些高通量技术所产生的海量数据,从而详尽阐明胚胎植入复杂的调控网络。随着科学技术日新月异的发展以及人类对生殖研究的进一步深入,这些问题会逐步被解决,胚胎植入机制也会逐步明朗。功能基因组和蛋白质组研究将为生殖医学的生理及病理研究、临床诊断、药物筛选、新药开发等提供理论基础,有助于不孕患者的诊断和治疗、提高辅助生育的成功率以及寻求新的生殖调控手段,进一步为人类的优生打下基础。

### 参考文献(References)

- [1] Peltonen L *et al.* *Science*, 2001, **291**: 1224
- [2] Giudice LC. *Am J Pharmacogenomics*, 2004, **4**: 299
- [3] Riesewijk A *et al.* *Mol Hum Reprod*, 2003, **9**: 253
- [4] Kao LC *et al.* *Endocrinology*, 2002, **143**: 2119
- [5] Carson DD *et al.* *Mol Hum Reprod*, 2002, **8**: 871
- [6] Borthwick JM *et al.* *Mol Hum Reprod*, 2003, **9**: 19
- [7] Ma W *et al.* *Mol Endocrinol*, 2001, **15**: 1983
- [8] Popovici RM *et al.* *Endocrinology*, 2000, **141**: 3510
- [9] Brar AK *et al.* *Physiol Genomics*, 2001, **7**: 135
- [10] Velculescu VE *et al.* *Science*, 1995, **270**: 484
- [11] Ma XH *et al.* *J Biol Chem*, 2006, **281**: 9351
- [12] Diatchenko L *et al.* *Methods Enzymol*, 1999, **303**: 349
- [13] Sun XY *et al.* *Biol Reprod*, 2004, **70**: 1365
- [14] 李斐雪等. *自然科学进展*, 2005, **15**: 53
- [15] 杜国平等. *中华妇产科杂志*, 2007, **42**: 187
- [16] Daikoku T *et al.* *Mol Endocrinol*, 2005, **19**: 683
- [17] 李洁等. *中华妇产科杂志*, 2006, **41**: 803
- [18] Katz-Jaffe MG *et al.* *Fertil Steril*, 2006, **85**: 101
- [19] Katz-Jaffe MG *et al.* *Fertil Steril*, 2006, **86**: 678
- [20] Reese J *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 44137

## Applications of Functional Genomics and Proteomics in Study on Embryo Implantation Mechanism

Qian Ye, Jun-Lin He\*, Ying-Xiong Wang

(Laboratory of Reproductive Biology, Department of Genetics and Eugenics, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** Embryo implantation is a critical event during the process of mammalian reproduction. The molecular mechanism involved is still unknown. Recently, functional genomics and proteomics have been extensively applied in the research of embryo implantation. By profiling the global gene and protein expression alterations during the implantation process, we can screen implantation-related molecules and lay foundation for elucidating molecule regulation mechanism of implantation.

**Key words** embryo implantation; functional genomics; proteomics

---

Received: September 18, 2007

Accepted: January 8, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30500054)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-68485001, E-mail: hejunlin\_11@yahoo.com.cn