

早孕小鼠子宫内钙网蛋白的表达规律

董艳玲 何俊琳 刘学庆 丁裕斌 黄德培 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 采用 RT-PCR、间接免疫荧光组织化学、Western 印迹及原位杂交技术分别检测未孕(d0)和妊娠 d1、d2、d3、d4、d5、d6、d7 天小鼠子宫内钙网蛋白(calreticulin, CRT)的表达规律, 探讨 CRT 在胚胎着床中的作用。结果显示 CRT mRNA 在妊娠小鼠子宫内钙网蛋白的表达明显高于未孕小鼠($P < 0.05$), 且随着妊娠天数的增加呈逐渐增强的趋势。间接免疫荧光组织化学结果显示 CRT 表达于子宫内钙网蛋白基质细胞、腺上皮以及腔上皮, 并在妊娠第 4、5 天基质细胞的胞浆中呈现高峰。实验结果提示, CRT 在妊娠早期子宫内钙网蛋白的持续表达, 可能通过调节整合素介导的细胞信号通路而调节胚胎滋养层细胞的黏附、侵袭, 参与胚胎着床。

关键词 钙网蛋白; 胚胎着床; 小鼠

胚胎着床是一个复杂的生命活动过程, 胚泡发育到一定时期, 子宫内钙网蛋白必须发生一系列形态与生化方面的表型变化以达到容受状态, 胚胎才能成功着床。细胞凋亡、细胞黏附和侵入到子宫内钙网蛋白都是着床过程中非常重要的步骤。着床开始前, 子宫内钙网蛋白上皮细胞先发生凋亡和黏附事件, 接着蜕膜化细胞允许滋养层细胞有限的、协调的侵入到母体^[1]。随着对胚胎着床机制的深入研究, 发现大量细胞因子、黏附分子和糖蛋白复合物等形成复杂的网络调节。

钙网蛋白(calreticulin, CRT)是内质网与肌浆网中主要的钙结合蛋白, 它作为细胞表面黏附分子的调节者以及免疫应答的调节基因而发挥多种生理功能。如 Ca^{2+} 稳态、基因表达的调节、凋亡和细胞黏附。过量的 CRT 可增加细胞与细胞以及细胞到细胞基质之间的黏附^[2]。进一步的研究表明, CRT 可以调节整合素依赖的 Ca^{2+} 信号和类固醇敏感性基因表达^[3]。胚胎着床过程中, 整合素信号对于胚泡黏附到子宫内钙网蛋白细胞外基质是非常重要的, 当滋养层细胞穿过基底膜侵入到蜕膜时整合素可调节黏附分子与细胞外基质成分的相互作用^[4], 这些研究提示了 CRT 也可能在胚胎植入过程起一定的作用, 但有关这方面的研究尚未见报道。因此, 我们采用 RT-PCR、激光共聚焦、原位杂交和 Western 印迹试验分析了早期妊娠小鼠子宫内钙网蛋白 CRT 的表达规律, 旨在探讨这一基因在胚胎着床中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 NIH 小鼠, 6~8 周龄, 体重 23~25 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号: SCXK(渝)20050002]。

1.1.2 主要试剂 TRIzol 试剂、M-MLV 逆转录酶(Promega); 寡核苷酸合成(Invitrogen)。Taq DNA 聚合酶、总蛋白提取试剂盒 Tripure(TaKaRa); 兔抗钙网蛋白抗体(Santa Cruz); HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体、 β 肌动蛋白抗体、间接免疫荧光组织化学用 FITC 标记荧光羊抗兔 IgG 抗体(北京中杉); 原位杂交探针及试剂盒(上海鼎固)。

1.2 方法

1.2.1 子宫内钙网蛋白的获取 选择性成熟的雌鼠, 按雌:雄=2:1 比例合笼交配, 次晨发现有阴栓者为妊娠 d1, 依次计算妊娠天数。随机将未孕小鼠和孕鼠分为 8 组, 分别记为未妊娠组(d0)和妊娠组(d1、d2、d3、d4、d5、d6、d7), 每组 20 只, 其中各组 10 只小鼠断颈处死后无菌条件下取子宫内钙网蛋白备用, 各组另 10 只小鼠断颈处死后剖腹取子宫立即放入 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 切片备用。

1.2.2 RT-PCR 总 RNA 提取按 Trizol 试剂盒说明操作, 所提取的总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳确定其完整性。紫外分光光度计测定 RNA A_{260} 、 A_{280} 值, 并计算 A_{260}/A_{280} 值, 判定 RNA 纯度及计算其浓度。CRT 基因(GenBank ID NM_007591) 上游引物: 5'-GTGTCAGGTTCGGGTGAG-3', 下游引物: 5'-AATC-

收稿日期: 2008-02-25 接受日期: 2008-04-28

重庆市自然科学基金重点资助项目(渝科发计字[2004]47号)

* 通讯作者。Tel: 023-68485926, E-mail: wyx61221@yahoo.com.cn

GGACTTATGTTTGGGA-3', 扩增片断为 265 bp, 同时以 β 肌动蛋白基因作为内对照, 扩增片断为 398 bp, PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 循环 30 次, 最后 72 °C 10 min。PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, Quantity One 4.4.0 软件扫描分析凝胶图像。获得早孕小鼠子宫内膜 CRT 基因的相对表达值。

1.2.3 原位杂交检测 地高辛标记的 CRT 寡核苷酸探针序列为 5'-tgggactttctgccaccaagaagataaaggaccctgatgctccaagcc-3', 杂交检测步骤如下: 切片经脱蜡至三蒸水, 3% H_2O_2 / 甲醇灭活内源性过氧化物酶, 经蛋白酶 K 消化; 42 °C 预杂交 3 h 后于含 30 ng/ μ l 探针杂交液中, 42 °C 杂交 16 h; 梯度 SSC 液充分洗涤, 封闭 37 °C 30 min 后滴加 1:100 稀释兔抗地高辛-BSA 37 °C 60 min, 滴加 1:100 稀释 AP-羊抗兔 IgG 37 °C 60 min; BCIP/NBT 于 37 °C 水浴箱中显色, 核固红复染, 常规脱水透明封片, 阴性对照组为无探针的空白对照。结果用多媒体图文操作系统采集并分析图像。

1.2.4 间接免疫荧光组织化学 石蜡切片脱蜡、水化后用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 浸泡 5 min, 放入柠檬酸盐缓冲液 (0.01 mol/L, pH 6.0) 中进行微波抗原修复, 室温冷却后 PBS 冲洗 3 次; 擦干玻片滴加山羊封闭血清, 37 °C 封闭 30 min; 倒掉封闭血清滴加 CRT 抗体 (1:400, PBS 稀释) 湿盒内 37 °C 温育 2 h; 采用 PBS 代替 CRT 抗体作为阴性对照; PBS 冲洗 3 次后滴加 FITC 标记的荧光羊抗兔抗体, 湿盒内 37 °C 温育 1 h; PBS 冲洗 4 次 50% 甘油封片后立即在激光共聚焦显微镜下观察结果。

1.2.5 Western 印迹 按 Tripure 试剂盒操作程序提取子宫内膜组织总蛋白, Bradford 法进行总蛋白定量; 等量上样 PAGE 分离, 半干转移系统转膜, 将 PAGE 分离的蛋白质转到 PVDF 膜上。以 β 肌动蛋白为内参照, 加 CRT 一抗 (1:2 000) 和 β 肌动蛋白一抗, HRP 标记的羊抗兔的二抗 (1:2 000), 经 SABC 处理后, DAB 显色成像。Quantity One 4.4.0 软件对 Western 印迹成像图进行分析。

1.3 统计分析

采用单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理, 检验水准 α 取 0.05, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 CRT mRNA 在小鼠子宫内膜中的表达

RT-PCR 测得各组子宫内膜均有 CRT mRNA 表达, 但在妊娠子宫内膜表达明显高于未妊娠子宫内膜 ($P < 0.05$), (图 1, 表 1) 且随着妊娠天数的增加呈逐渐增加的趋势, 在妊娠 d4、d5 呈现最高峰。原位杂交结果与 RT-PCR 结果基本一致, 杂交阳性信号定位于基质细胞、腺上皮以及腔上皮的胞浆中, 为紫蓝色细砂样至黑紫色粗颗粒状 (表 1, 图 2)。

2.2 CRT 在小鼠子宫内膜中的表达

间接免疫荧光组织化学结果显示 CRT 在妊娠与未妊娠小鼠子宫内膜均有表达, 但妊娠子宫内膜表达明显高于未妊娠 ($P < 0.05$)。妊娠 d4、d5 达到最高峰, 与 d4、d5 相比妊娠 d6、d7 略有下降, 但无显著意义。CRT 绿色荧光阳性信号主要定位于基质细胞、腺上皮以及腔上皮的胞浆中 (表 2, 图 3)。Western 印迹结果显示 CRT 在小鼠子宫内膜的表达规律与间接免疫荧光组织化学结果一致 (表 2, 图 4)。

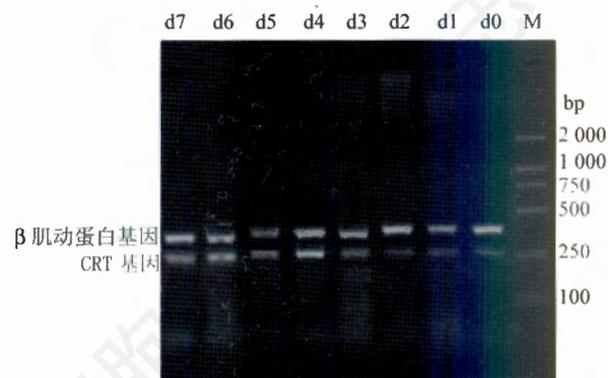


图1 RT-PCR 分析未孕(d0)与妊娠d1~d7小鼠子宫内膜CRT mRNA 表达

表1 CRT mRNA 在孕不同时间小鼠子宫内膜的表达($\bar{x} \pm s$, $n=24$)

检测项目	鼠数 (只)	未孕 (d0)	孕不同时间 CRT mRNA 的表达						
			d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
原位杂交	8	0.353±0.037*	0.529±0.208**	0.550±0.018**	0.566±0.038**	0.694±0.033*	0.695±0.021*	0.669±0.036*	0.668±0.010*
RT-PCR	8	3.040±0.287*	4.679±0.112**	4.819±0.323**	5.022±0.202**	7.026±0.182*	7.506±0.096*	6.882±0.132*	6.864±0.142*

与未孕相比, * $P < 0.05$; 与 d4、d5 相比, ** $P < 0.05$ 。

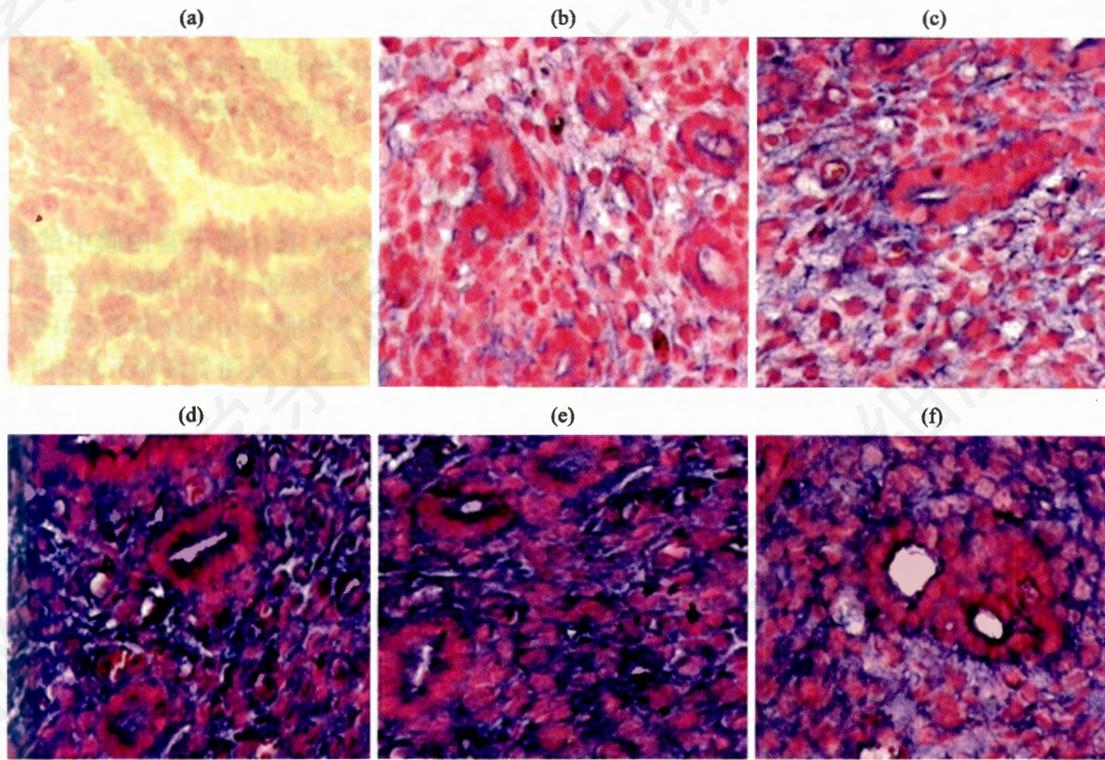


图2 原位杂交分析未孕(d0)与妊娠d1~d7小鼠子宫内膜CRT mRNA的表达
a: 阴性对照; b: 未孕(d0); c: 妊娠d2; d: 妊娠d4; e: 妊娠d5; f: 妊娠d7。

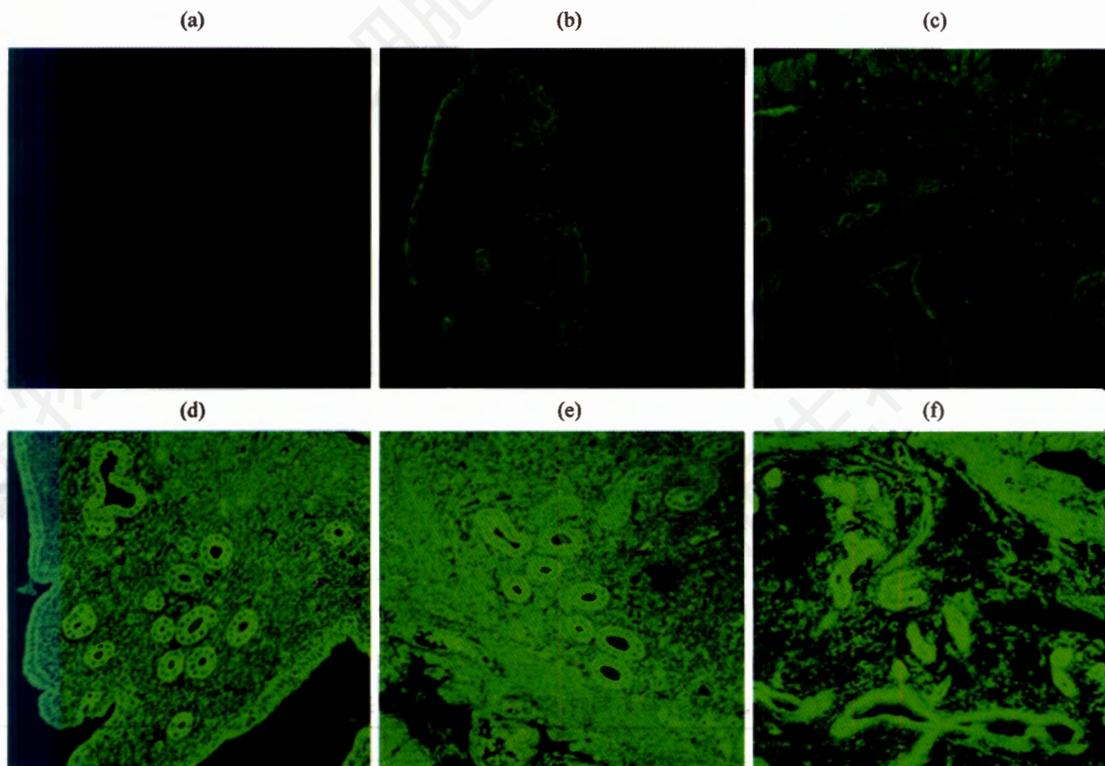


图3 间接免疫荧光组织化学分析未孕(d0)与妊娠d1~d7小鼠子宫内膜CRT的表达
a: 阴性对照; b: 未孕(d0); c: 妊娠d2; d: 妊娠d4; e: 妊娠d5; f: 妊娠d7。

表2 孕不同时间 CRT 在小鼠子宫内表达的表达($\bar{x} \pm s, n=24$)

检测项目	鼠数 (只)	未孕 (d0)	孕不同时间 CRT 的表达						
			d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
间接免疫荧光	8	5.072±0.241*	6.562±0.355**	6.836±0.359**	7.046±0.181**	8.004±0.197*	8.005±0.171*	7.740±0.474*	7.715±0.353*
Western印迹	8	0.992±0.273*	3.074±0.296**	3.214±0.425**	3.599±0.410**	6.605±0.146*	6.087±0.335*	5.708±0.428*	5.627±0.406*

与未孕相比, * $P<0.05$; 与 d4、d5 相比, ** $P<0.05$ 。

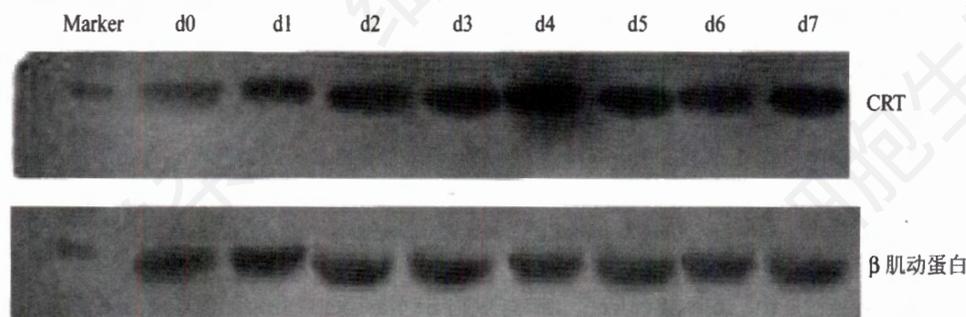


图4 Western 印迹分析未孕(d0)与小鼠妊娠 d1~d7 子宫内 CRT 的表达

3 讨论

胚胎着床是一复杂的生殖生理过程, 涉及胚胎发育的分化、子宫内膜妊娠反映的同步化以及胚泡黏附和侵入至子宫内膜, 这些复杂事件均有细胞或分子生物学的精细调节。CRT 是多功能的内质网钙结合蛋白, 除了分子伴侣活性以外, 还在钙环境稳态、基因表达的调节、细胞凋亡以及细胞黏附方面起重要作用, 而胚胎着床、胚胎的发生以及胎盘的形均涉及这些类似的生物学过程。

CRT 可以通过整合素高度保守的胞质区域与整合素受体 α 亚基相互作用来介导细胞黏附、侵入到细胞基质^[5,6]。整合素是黏附分子家族的成员, 它可以通过与纤连蛋白、玻连蛋白等细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 组分相互作用, 调节细胞间的黏附和通讯、对细胞迁移、细胞骨架建成以及细胞信号转导起重要作用^[7]。介导细胞与细胞、细胞与细胞基质之间通讯的这一复杂的网路信号可以促进早期妊娠的建立^[8]。Lessey 等^[9]认为, 整合素有助于子宫内膜由非黏附状态到黏附状态的转变, 为胚泡黏附植入作好准备, 是着床窗口期子宫内膜接受性的标记分子。胚泡植入过程经历定位、黏附并最终侵入到子宫内膜。黏附阶段发生在排卵后的 d6~d7 也就是植入窗(妊娠 d4~d5)^[10], 植入窗口期, 胚泡滋养外胚层和子宫腔上皮的黏附启动胚泡植入, 此时整合素的表达为胚泡在植入窗口期的黏附及侵入能力所必需^[11], CRT 表达的改变可以影响整合素的黏附特性, 其表达下调可以减少细胞黏附, 反之亦然^[12]。另

有研究表明^[13], 细胞内 CRT 表达量的不同可导致细胞迁移力的不同, 它通过调节纤维结合蛋白的基因表达而影响细胞黏附的形成和稳定, 从而影响基质的组装和骨的重塑。本研究运用 RT-PCR、间接免疫荧光组织化学等技术对未孕以及妊娠小鼠子宫内 CRT 的表达进行研究, 结果显示 CRT mRNA 在未孕及妊娠子宫内均有表达, 但妊娠子宫内表达明显高于未孕 ($P<0.05$), 且随着妊娠天数的增加呈逐渐增加的趋势, 原位杂交与间接免疫荧光组织化学结果显示 CRT 基因与蛋白质定位于基质细胞、腺上皮以及腔上皮的胞浆中。妊娠 d1、d2 时阳性表达较弱, d3、d4、d5、d6、d7 表达明显增强, 妊娠 d4、d5 达最高峰, 妊娠 d6、d7 略有下降, 但无显著差异。CRT 在窗口期的高表达的特点说明, CRT 可能通过与整合素相互作用而促进胚泡黏附、侵入到子宫内膜的细胞基质上, 参与胚胎着床。

胚胎着床和正常妊娠的建立都需要细胞黏附、基质组装、胚胎增殖与分化等许多生物学事件的相互合作才能完成, 结合以往在其他方面对 CRT 的研究资料和本研究结果, 我们认为 CRT 可能通过与多种基因与蛋白质的相互作用, 共同发挥生物学功能, 在调节小鼠胚胎着床甚至整个妊娠过程中起重要作用, 本研究探讨 CRT 参与胚胎着床的意义及可能的机制, 为进一步揭示胚胎着床的分子机制提供了重要的依据。

参考文献(References)

- [1] Joswig A et al. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1: 44

- [2] Opas M *et al.* *J Cell Biol*, 1996, **135**: 1913
[3] Michalak M *et al.* *Biochem J*, 1999, **344**: 281
[4] Wang J *et al.* *Dev Biol*, 2007, **302**: 143
[5] Coppolino MG *et al.* *Biochem J*, 1999, **340**: 41
[6] Reilly D *et al.* *Platelets*, 2004, **15**: 43
[7] Wang J *et al.* *Cells Tissues Organs*, 2002, **172**: 190
[8] Minas V *et al.* *Reprod Biomed Online*, 2005, **10**: 205
[9] Lessey BA. *Hum Reprod*, 1998, **13**: 247
[10] Valles CS *et al.* *Chang Gung Med J*, 2006, **29**: 9
[11] 蔡理全等. *科学通报*, 2000, **45**: 15
[12] Fadel MP *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 27083
[13] Papp S *et al.* *Biol Cell*, 2007, **99**: 389

Expression of Calreticulin in the Endometrium of Early Pregnant Mouse

Yan-Ling Dong, Jun-Lin He, Xue-Qing Liu, Yu-Bin Ding, De-Pei Huang, Ying-Xiong Wang*

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

Abstract To probe the role of calreticulin (CRT) in blastocyst implantation, we have detected expression of CRT mRNA and the protein in endometria from mice of non-pregnancy and pregnancy on days 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, respectively by RT-PCR, indirect immunofluorescence histochemistry, Western blot and *in situ* hybridization techniques. The results showed that the expression of CRT mRNA and the protein is higher in pregnant mice than that of non-pregnant mice, and reach maximal level pregnant on day 4, 5 and was located in the uterine stromal cells and epithelium. The result suggested that the expression characteristic of CRT might involved in adhesion/invasion of the blastocyst to endometrium and be useful for embryo implantation and maintenance of pregnancy in mouse.

Key words calreticulin; blastocyst implantation; mouse

Received: February 25, 2008 Accepted: April 28, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of Chongqing (No.[2004]47)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485001, E-mail: wyx61221@yahoo.com.cn