

原癌基因 *C-MET* 在自然流产蜕膜中的表达降低

陈雪梅 黄金园 刘学庆 丁裕斌 王应雄 何俊琳*

(重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学研究室, 重庆 400016)

摘要 为探讨原癌基因 *C-MET* 在胚胎着床中的作用, 本实验分别采用实时荧光定量 PCR, 原位杂交和免疫荧光化学方法检测 *C-MET* 的 mRNA 及其蛋白在正常妊娠人工流产子宫蜕膜和自然流产蜕膜中的表达情况; 进一步采用围着床期小鼠(d3)单侧子宫角注射 *C-MET* 多克隆抗体, 观察胚胎着床变化。结果显示 *C-MET* 基因和蛋白在正常妊娠蜕膜组织中的表达量显著高于自然流产蜕膜组织 ($P < 0.01$), 且主要分布在蜕膜基质细胞胞浆和胞核中。围着床期小鼠单侧子宫角注射 *C-MET* 多克隆抗体后, 该侧多个胚胎发生流产。该结果提示原癌基因 *C-MET* 可能在胚胎着床过程中发挥了重要作用, 其表达降低可能通过某些途径诱发自然流产。

关键词 原癌基因 *C-MET*; 自然流产; 胚胎着床; 蜕膜

胚胎着床是指胚胎进入子宫腔后, 与子宫内膜贴附并逐渐侵入子宫内膜的过程。胚胎着床涉及细胞间的识别黏附、滋养层细胞在母体组织中的浸润和迁移以及子宫内膜的容受性改变等一系列复杂的分子事件。自 1829 年法国生物学家 Lobstein 和 Recamier 提出肿瘤胚胎性起源概念以来, 胚胎着床与肿瘤生物学行为的相似性越来越受到重视, 但与肿瘤发生不同的是胚胎着床受机体的严格调节, 是一种有控性侵袭行为。

原癌基因 *C-MET* 属酪氨酸激酶生长因子家族成员, 启动子区域有许多可被相应调控因子如 HGF (human gingival fibroblast, HGF) 和 IL-6 (interleukin-6, IL-6) 等作用的调控序列。被 HGF 激活后, *C-MET* 蛋白发生构象改变, 激活胞内蛋白激酶结构域中的酪氨酸蛋白激酶 (PTK), 最终参与对多种细胞的增殖、分化、形态发生和浸润等过程的调节^[1]。我们前期采用基因芯片技术对正常妊娠蜕膜和自然流产蜕膜的基因表达谱进行分析, 结果发现 *C-MET* 基因在自然流产蜕膜中表达显著下调。目前未见有关 *C-MET* 直接参与胚胎着床的报道, 为探讨该基因在正常的胚胎着床及自然流产过程中可能的作用, 本研究分别采用实时荧光定量 PCR、原位杂交和免疫荧光化学方法首次从基因和蛋白水平对 *C-MET* 在正常妊娠和自然流产蜕膜组织中的表达情况进行了分析; 通过对围着床期小鼠单侧子宫角注射 *C-MET* 多克隆抗体, 观察胚胎着床变化, 探讨原癌基因 *C-MET* 在胚胎着床和自然流产发生中的作用, 为临床自然流产的诊治和预防提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

自然流产组标本 30 例(妊娠 6~10W)来自重庆医科大学附属第一医院妇产科门诊, 患者年龄 20~35 岁, 经妇科检查、B 超诊断确认为自然流产胚胎停育者。正常妊娠组标本 30 例(妊娠 6~10W)来自重庆医科大学附属第一医院人流室计划外妊娠人工流产标本, 为自愿终止妊娠的健康妇女, 年龄 20~35 岁, 经妇科检查、B 超证实为宫内妊娠且符合孕周。所有研究对象均身体健康, 月经规律(月经周期为 28~30 天), 3 个月内未服用甾体类药物, 未放置宫内节育器。同时男方精液正常, 夫妇染色体核型正常, 无遗传病史, 无产道异常及免疫系统异常, 既往无自然流产和死胎死产史。标本收集均征得当事人知情同意。

实验动物采用清洁级昆明种系 NIH 小鼠(雌鼠 20 只、雄鼠 10 只), 8~10 周龄, 体重 25~30 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供。雌鼠与雄鼠 2:1 比例合笼交配, 次日晨检查雌鼠阴道有阴栓者定为妊娠第一天(d1), 并喂养至孕 3 天(d3)傍晚。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 检测蜕膜组织中 *C-MET* 的表达 分别获取自然流产和正常妊娠蜕膜组织, 按

收稿日期: 2010-03-15 接受日期: 2010-08-20

国家自然科学基金(No.30973195)和教育部博士点基金(No.20070631007)资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-68485001, E-mail: hejunlin_11@yahoo.com.cn

Trizol 试剂盒(上海生工)提取各组蜕膜组织总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳确定其完整性, 可见明显的 28S 和 18S 两条带; 紫外分光光度计定量并检测其纯度, $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 为合格。

实时荧光定量 PCR 反应采用 SYBR ExScript™ RT-PCR Kit (大连 TaKaRa 工程有限公司), 所需引物由上海 Invitrogen 公司设计合成。所有操作均按试剂盒要求进行。

C-MET 基因上游引物: 5'-TAG AAG AGC CCA GCC AGT GT-3';

下游引物: 5'-CGA ATG CAA TGG ATG ATC TG-3', 扩增片段长度 143bp。

β -actin 基因(内对照): 上游引物: 5'-CCT GAG GCT CTT TTC CAG CC-3';

下游引物: 5'-TAG AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG T-3', 扩增片段长度 110 bp。

PCR 扩增参数为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃, 15 s; 55℃, 30 s, 72℃, 20s, 40 个循环。

将各样品的目的基因和管家基因分别进行 Real-time PCR 反应。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的计算方法计算相对表达量。

1.2.2 原位杂交检测 *C-MET* mRNA 的表达与定位 分别将自然流产和正常妊娠蜕膜组织用 DEPC 处理过的生理盐水冲洗, 4% 多聚甲醛固定 1h, 梯度酒精 (70%、80%、90%) 脱水, 石蜡包埋切片。

C-MET 寡核苷酸探针: 5'-TCA CTg CAT ATT CTC CCC ACA gAT AgA AgA gCC CAg CCA gTg TCC TgA CT-3' (5' 地高辛标记, 北京鼎国生物公司)。原位杂交过程严格按照试剂盒说明书操作(北京鼎国生物公司)。以试剂盒自带的阳性探针作为阳性对照, 阴性对照为 *C-MET* 正义寡核苷酸探针。阳性结果为紫蓝色颗粒。每组标本随机选取 5 张切片, 每张切片随机选取 5 个视野分析, 利用北航 CM-2000B 生物医学图像分析系统进行图像采集分析, 测定 *C-MET* mRNA 的相对表达量。

1.2.3 免疫荧光化学检测 *C-MET* 蛋白的表达与定位 分别将自然流产和正常妊娠蜕膜组织放入 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 组织切片。常规脱蜡水化, 抗原修复至室温, 山羊血清(北京中杉)37℃ 封闭 30min, 一抗(武汉博士德公司, 1:50 PBS 稀释)4℃ 过夜。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。FITC 标记的山羊抗兔 IgG(北京中杉)37℃ 避光孵育 60 min, 甘油封片, 激光共聚焦镜观察。阳性结果为绿色荧光信号。结果用

Leica Confocal 软件分析, 每组标本随机选取 2 张切片, 每张切片取 2 个视野, 每个视野选 10 个阳性表达细胞, 每组标本共 40 个阳性结果计算平均荧光强度。

1.2.4 宫角注射 *C-MET* 多克隆抗体对胚胎着床的影响 选孕 3 天着床前期小鼠, 晚 8 点注射 1% 的水合氯醛 1ml, 待小鼠肌张力消失将小鼠四肢展开仰面固定, 75% 酒精湿润腹部毛发, 用眼科剪从大腿根部向腹中线方向剪开皮肤约 1cm, 分别向解剖口左右探进 1cm 左右剪开腹膜, 暴露子宫。用微量进样器, 左侧子宫角注射 *C-MET* 多克隆抗体 8 μ l, 右侧子宫角注射生理盐水 8 μ l 作为对照($n=10$), 缝合粘膜、皮肤。同时选取孕 3 天着床前期未做任何处理的小鼠($n=10$)作为阴性对照。喂养小鼠至孕 8 天, 75% 酒精常规湿润小鼠腹部, 剪开小鼠皮肤、粘膜, 取出小鼠子宫观察双侧子宫胚泡着床变化。

1.3 统计学处理

差异表达采用 *t* 检验, 以均数 \pm 标准差表示($\bar{x} \pm s$), 用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 *C-MET* mRNA 在各组蜕膜中的表达

Real-time PCR 结果显示, 正常妊娠和自然流产蜕膜组织均有 *C-MET* 表达, 但自然流产组 *C-MET* mRNA 的平均表达强度显著低于正常妊娠组($P < 0.05$, 图 1, 表 1)。原位杂交结果与 Real-time PCR 测得的 *C-MET* 基因表达趋势一致(图 2, 表 1)。

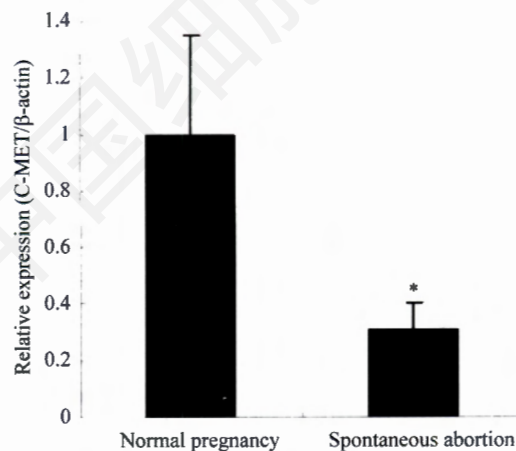


Fig.1 The result of Real-time PCR

The expression values of *C-MET* mRNA in decidua of spontaneous abortion were expressed relative to normal pregnancy values and represent the average \pm S.D. Levels of β -actin were used as inner control. * $P < 0.05$.

2.2 免疫荧光化学检测 C-MET 蛋白在各组蜕膜中的表达与定位

正常妊娠组蜕膜基质细胞胞浆和胞核均高表达 C-MET 蛋白, 阳性结果为绿色荧光信号, 而自然流产组 C-MET 蛋白荧光信号在胞浆和胞核较弱, 且平均荧

光强度显著低于正常妊娠蜕膜组 ($P < 0.05$, 图 3, 表 1)。

2.3 宫角注射 C-MET 多克隆抗体结果

实验结果显示注射 C-MET 多克隆抗体的一侧子宫胚泡着床数显著低于注射生理盐水侧 ($P < 0.05$, 图 4)。与阴性对照组比较, 注射 C-MET 多克隆抗体的

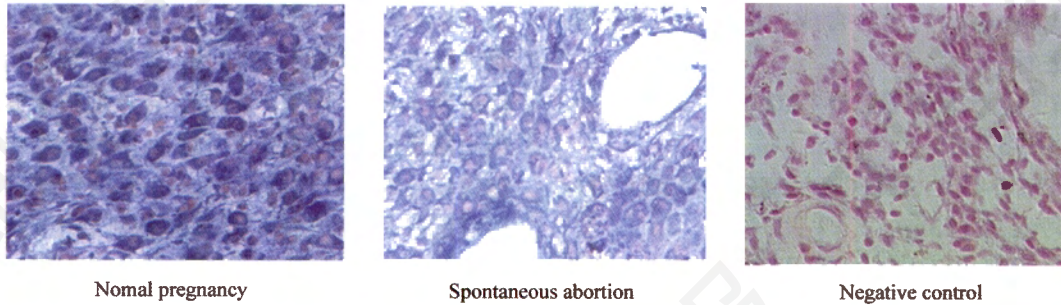


Fig.2 The results of *in situ* hybridization (400 \times)

The location and expression levels of C-MET mRNA in deciduas of normal pregnancy and spontaneous abortion were examined by *in situ* hybridization using DIG-labeled oligonucleotide probe. Blue stain was determined as positive.

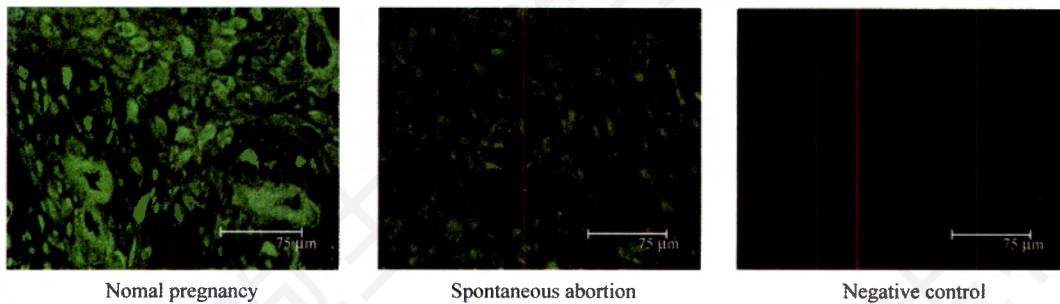


Fig.3 The result of immunofluorescence histochemistry (400 \times)

The localization and expression levels of C-MET protein in decidua of normal pregnancy and spontaneous abortion were determined by immunofluorescence histochemistry using anti-C-MET antibody. Green stain was determined as positive.

Table 1 Comparison of C-MET mRNA and protein level in decidua between normal pregnancy and spontaneous abortion ($\bar{x} \pm s$)

| | <i>n</i> | Normal pregnancy | Spontaneous abortion |
|------------------------------|----------|--------------------|----------------------|
| Real-time PCR | 30 | 1.0 \pm 0.31 | 0.35 \pm 0.09* |
| <i>in situ</i> hybridization | 30 | 0.46 \pm 0.10 | 0.20 \pm 0.08* |
| Immunofluorescence | 30 | 172.94 \pm 32.67 | 136.11 \pm 18.36* |

* $P < 0.05$.

Table 2 Comparison of implantation rate in mice receiving intrauterine anti-C-MET antibody or physiological saline ($\bar{x} \pm s$)

| | <i>n</i> | Left side (antibody) | Right side (physiological saline) |
|----------------------------|----------|----------------------|-----------------------------------|
| Number of implanted embryo | 10 | 6.3 \pm 0.93 | 1.7 \pm 0.95* |
| Implantation rate | 10 | 0.87 \pm 0.13 | 0.21 \pm 0.05* |

* $P < 0.05$.

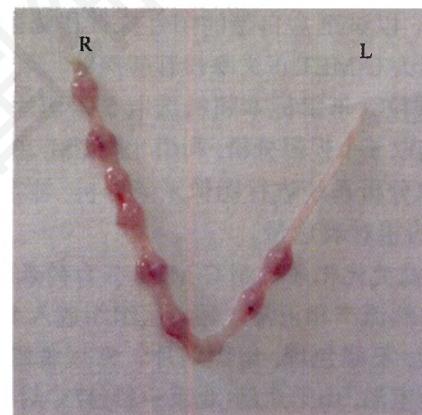


Fig.4 Effect of anti-C-MET antibody on the number of implanted embryo by intrauterine injection

L: the left side receiving anti-C-MET antibody; R: the right side receiving physiological saline.

一侧子宫胚泡着床率明显降低, 而注射生理盐水一侧子宫胚泡着床率无明显改变($P < 0.05$, 表 2)。

3 讨论

胚胎着床是哺乳动物生殖过程中的重要环节, 包括了胚泡与母体子宫内膜之间一系列复杂的相互作用。目前研究表明, 成功的植入取决于胚胎侵入性和子宫内膜接受性的密切合作^[2], 植入的成败与众多细胞因子及其参与的信号通路密切相关。*C-MET* 是肝细胞生长因子 HGF 的受体, 属酪氨酸激酶生长因子家族成员, 在多种组织和细胞中表达, 与配体 HGF 结合后发生构象改变, 激活 HGF/*C-MET* 信号转导通路, 促使细胞分裂、增殖、侵袭等, 在许多恶性肿瘤的发生、发展、转移中起着重要作用^[3]。而胚胎着床涉及胚泡与子宫内膜相互定位、黏附, 并逐渐侵入子宫内膜的过程, 其侵袭作用与肿瘤细胞的侵袭在机制上具有相似性。本研究结果显示, *C-MET* 在正常妊娠蜕膜中高表达, 而在自然流产蜕膜中表达降低, 提示 *C-MET* 在胚胎成功着床的过程中起了重要作用, 其表达降低可能是自然流产发生的一个关键因素。

在妊娠早期, 滋养层细胞侵入子宫蜕膜是胎盘形成的一个关键步骤, 有研究表明, 在这一时期, 滋养细胞是暴露在一个相对低氧的环境中^[4]。Masami 等^[5]证实低氧状态可以诱导 *C-MET* 的表达, 从而刺激滋养细胞的侵入以保证正常的胎盘形成。本研究结果显示, 正常妊娠 6~10W 的蜕膜组织中 *C-MET* 高表达, 推测低氧状态是诱导其高表达的一个重要原因。关于 *C-MET* 高表达通过何种途径调节滋养细胞的浸润, 目前研究较少, 由于胚泡对子宫内膜的侵袭与肿瘤细胞的侵袭机制有相似性, 借鉴肿瘤方面的研究成果, 我们推测原癌基因 *C-MET* 可能通过以下途径参与胚胎成功植入: (1)*C-MET* 能诱导血管内皮生长因子及碱性成纤维细胞生长因子的表达, 促进血管生成^[6], 为胚泡提供营养, 利于胚胎着床; (2)*C-MET* 通过 *C-MET*/EGF 通路, 促进细胞增殖核抗原的表达, 刺激滋养细胞分裂, 同时促进可诱导型 NO 合酶增加, 使 NO 合成增加, 抑制滋养细胞凋亡^[7]; (3)*C-MET* 促进细胞黏附因子的表达^[8], 并刺激滋养细胞运动^[9], 增加滋养细胞的浸润能力, 同时, 可通过调节细胞骨架蛋白重排并诱导基质金属蛋白酶降解细胞外基质^[9], 从而利于滋养细胞浸润。

C-MET 的激活与调控主要是通过与 HGF 结合起

作用的, 被 HGF 激活的 *C-MET* 易发生自身磷酸化, 其酪氨酸激酶活性明显增强, 导致多种底物蛋白如 Src、Shc、PI3-K、Gab1、Gab2、SHP2 等酪氨酸磷酸化。这些底物形成一个巨大的衔接蛋白网络。通过 MAPK 依赖或非依赖途径将信号转入胞核, 促使与细胞分裂、增殖相关的基因活化, 从而促进细胞 DNA 的合成。原位杂交与免疫荧光化学结果显示, *C-MET* mRNA 和蛋白在正常妊娠 6~10W 蜕膜组织中高表达, 细胞核和细胞浆均广泛分布, 表明正常妊娠 6~10W 蜕膜中 *C-MET* 处于活化状态, 参与胚胎着床。

Real-time PCR、原位杂交、免疫荧光化学结果均显示, 自然流产蜕膜组织 *C-MET* 表达量较正常妊娠蜕膜显著降低($P < 0.05$), 提示 *C-MET* 表达降低可能诱发自然流产。Haggart 等^[10]在体外实验中证实抑制 *C-MET* 的表达会降低滋养细胞对子宫内膜细胞的黏附; Kauma 等^[11]发现 HGF 的降低可以导致滋养细胞的浸润不足而引起先兆子痫的发生; Uehara 等^[12]的研究也证实敲除 *HGF* 基因的小鼠会出现胎盘发育障碍从而导致胚胎死亡, 如果在胚胎发育早期向该小鼠的羊膜腔内注射 HGF 可以维持正常的胎盘发育^[13]。以上研究均证明 HGF/*C-MET* 通路在妊娠的早期发挥了至关重要的作用。已有研究显示, *C-MET*/EGF 信号通路具有强大的抗凋亡作用, 能够抑制由 Fas 介导的细胞凋亡^[14]。HGF/*C-MET* 能够上调 Caspase-8 抑制因子 FLIP 蛋白的表达, 使 Caspase 系统不能激活, 阻断 Caspase-8, 从级联反应的开端抑制凋亡发生^[15]。并且, HGF/*C-MET* 还能够激活 PI3K/AKT 途径来诱导凋亡抑制因子 Bcl-2 家族 Mcl-1^[14]和 Bcl-xL^[16]的表达, 从而抑制由 Fas 介导的细胞凋亡。自然流产患者蜕膜中 *C-MET* 表达降低, 可能影响上述途径使其抑制细胞凋亡作用减弱, 导致滋养细胞凋亡增加, 从而引发自然流产。但 HGF/*C-MET* 通路在早孕阶段通过怎样的机制影响滋养细胞的浸润尚需更进一步的研究。

为研究 *C-MET* 对胚泡植入的影响, 我们参照 Illera^[17]法, 进行在体动物实验。单侧子宫角注射 *C-MET* 多克隆抗体后, 胚胎着床数较注射生理盐水侧显著减少, 提示 *C-MET* 在胚胎着床中起关键性作用。

本研究结果提示原癌基因 *C-MET* 与胚胎着床过程密切相关, 其表达降低可能导致流产的发生, 但 *C-MET* 参与胚胎着床的确切机制还有待更深入的探讨。了解胚胎着床相关分子的作用机理, 对于不孕

不育症、习惯性流产的诊治以及胚胎着床特异性避孕疫苗的研制具有十分重要的意义。

参考文献(References)

- 1 Ueoka Y, Kato K, Wake N. Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via ras mediated pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202(1-2): 81-8.
- 2 Choy MY, Manyonda IT. The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast. *Hum Reprod* 1998; 13(10): 2941-9.
- 3 Boon EM, Kovarikova M, Derksen PW, van der Neut R. MET signalling in primary colon epithelial cells leads to increased transformation irrespective of aberrant Wnt signalling. *Br J Cancer* 2005; 92(6): 1078-83.
- 4 Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 1992; 80(2): 283-5.
- 5 Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Tahara M, Yamamoto T, Okamoto Y, *et al.* Up-regulation of c-met protooncogene product expression through hypoxia-inducible factor-1alpha is involved in trophoblast invasion under low-oxygen tension. *Endocrinology* 2005; 146(11): 4682-9.
- 6 Crouch S, Spidel CS, Lindsey JS. HGF and ligation of alphavbeta5 integrin induce a novel, cancer cell-specific gene expression required for cell scattering. *Exp Cell Res* 2004; 292(2): 274-87.
- 7 Dash PR, Cartwright JE, Baker PN, Johnstone AP, Whitley GS. Nitric oxide protects human extravillous trophoblast cells from apoptosis by a cyclic GMP-dependent mechanism and independently of caspase 3 nitrosylation. *Exp Cell Res* 2003; 287(2): 314-24.
- 8 Khoury H, Naujokas MA, Zuo D, Sangwan V, Frigault MM, Petkiewicz S, *et al.* HGF converts ErbB2/Neu epithelial morphogenesis to cell invasion. *Mol Biol Cell* 2005; 16(2): 550-61.
- 9 Nasu K, Zhou Y, McMaster MT, Fisher SJ. Upregulation of human cytotrophoblast invasion by hepatocyte growth factor. *J Reprod Fertil Suppl* 2000; 55: 73-80.
- 10 Harduf H, Goldman S, Shalev E. Progesterone receptor A and c-Met mediates spheroids-endometrium attachment. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 14.
- 11 Kauma SW, Bae-Jump V, Walsh SW. Hepatocyte growth factor stimulates trophoblast invasion: a potential mechanism for abnormal placentation in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(11): 4092-6.
- 12 Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, *et al.* Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 1995; 373(6516): 702-5.
- 13 Uehara Y, Mori C, Noda T, Shiota K, Kitamura N. Rescue of embryonic lethality in hepatocyte growth factor/scatter factor knockout mice. *Genesis* 2000; 27(3): 99-103.
- 14 Schulze-Bergkamen H, Brenner D, Krueger A, Suess D, Fas SC, Frey CR, *et al.* Hepatocyte growth factor induces Mcl-1 in primary human hepatocytes and inhibits CD95-mediated apoptosis via Akt. *Hepatology* 2004; 39(3): 645-54.
- 15 Wang X, Zhou Y, Kim HP, Song R, Zarnegar R, Ryter SW, *et al.* Hepatocyte growth factor protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279(7): 5237-43.
- 16 Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Padiaditakis P, Johnson C, Bell A, *et al.* A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell* 2002; 9(2): 411-21.
- 17 Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA. Blockade of the alpha(v)beta(3) integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol Reprod* 2000; 62(5): 1285-90.

Expression Decreasing of Protooncogene *C-MET* in Decidua of Spontaneous Abortion

Xue-Mei Chen, Jin-Yuan Huang, Xue-Qing Liu, Yu-Bin Ding, Ying-Xiong Wang, Jun-Lin He*

(Laboratory of Reproductive Biology, College of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To investigate the role of proto-oncogene *C-MET* in decidua during embryo implantation and spontaneous abortion, we characterized the expression of *C-MET* mRNA and protein in decidua collected from 30 cases of normal pregnancy and 30 cases of spontaneous abortion. Real-time PCR and *in situ* hybridization results showed that the levels of *C-MET* mRNA in decidua of normal pregnancy were significantly higher than those of spontaneous abortion. The *C-MET* protein detected by immunofluorescence histochemistry showed the same tendency with *C-MET* mRNA and the protein mainly located in nucleus and endochylema of stromal cell. Further more, polyclonal antibody of *C-MET* was injected into the uterus horns of pregnant mice (d3) to investigate its effect on embryo implantation. The results showed that the number of implanted embryo markedly decreased in the side of uterus horns receiving polyclonal antibody of *C-MET* ($P < 0.05$). These findings suggest that *C-MET* may play an important role in embryo implantation and low expression of *C-MET* may induce spontaneous abortion.

Key words proto-oncogene *C-MET*; spontaneous abortion; implantation; decidua

Received: March 15, 2010 Accepted: August 20, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30973195) and the Ministry of Education Doctoral Foundation (No.20070631007)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485926, Fax: 86-23-68485008, E-mail: hejunlin_11@yahoo.com.cn