

· 研究快报 · 文章编号 1000-2790(2006)21-封2-01

肿瘤转移抑制因子 CD82/KAI1 基因在小鼠子宫内膜的动态表达

王焕英^{1,2}, 谭冬梅¹, 何明忠¹, 王立芝¹, 谭毅^{1,3} (重庆医科大学:¹实验动物中心,²临床检验诊断学重庆市重点实验室 重庆 400016,³首都医科大学附属北京安贞医院妇产科 北京 100029)

【关键词】CD82/KAI1; 子宫内膜; 胚胎着床

【中图分类号】Q492 【文献标识码】A

0 引言 原癌基因/癌基因的激活和/或抑癌基因(包括肿瘤侵袭转移抑制基因)的失活、基因突变等是胚胎植入这一正常生理过程信号转导通路所必需的^[1]。本实验我们观察小鼠动情周期和妊娠早期, CD82/KAI1 mRNA 和蛋白在子宫组织中的表达情况, 探讨它们在胚胎植入信号转导通路中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 25~35 g 成年 NIH 封闭群小鼠, 由重庆医科大学实验动物中心提供。雌雄按 2:1 自然合笼, 次日早晨检出阴栓者作为妊娠第 1 日孕鼠(D1)。兔抗人 CD82/KAI1 pAb 由 Santa Cruz 提供, 兔 SP Kit 及 DAB 显色试剂盒等由北方同正提供。小量柱离心式组织/细胞总 RNA 提取试剂盒由上海华舜提供, RT 试剂盒、Taq 酶、dNTPs, Oligo 随机引物等由 Takara Biotech 提供。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 脱颈处死孕鼠, 剪取双侧子宫角, 冲洗 D1-D2-D3 孕鼠输卵管和 D4 孕鼠子宫腔, 选留能冲出相应发育时期胚胎的子宫角用于总 RNA 的提取。

1.2.2 分光光度法检测核酸浓度 紫外分光光度计先用 1 mL 蒸馏水校正调零。4 μL RNA 加入蒸馏水 1 mL 转入石英杯中。读取 $A_{260\text{nm}}$ 和 $A_{280\text{nm}}$, 计算 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 值。

1.2.3 RT-PCR 反应 以提取的 mRNA 为模板, 用 Oligo 随机引物逆转录反应生成 cDNA。小鼠 CD82/KAI1 基因序号为 NM_007656, 上下游引物分别是: 5'-CTCCTGCGAGAAGATCAAGG-3' 和 5'-CGGCACAAACATATGGACAG-3', PCR 条件为 94℃ 2 min, 94℃ 5 s, 56℃ 45 s, 72℃ 1 min 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物的大小为 237 bp。内参照基因 β-actin 的上下游引物分别是: 5'-AGCCATGTACGTACC-CATCC-3' 和 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTAA-3', PCR 条件为: 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物大小为 228 bp。扩增片段行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像扫描仪分析。

1.2.4 免疫组织化学 取动情周期和妊娠 D1-D4 小鼠子宫角, 用 40 g/L 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片。质量控制:

收稿日期 2005-11-11; 接受日期 2006-01-18

基金项目: 国家自然科学基金(30470654); 重庆市自然科学基金(8522)

通讯作者: 谭毅. Tel (023) 68485997 Email tanyee66@hotmail.com

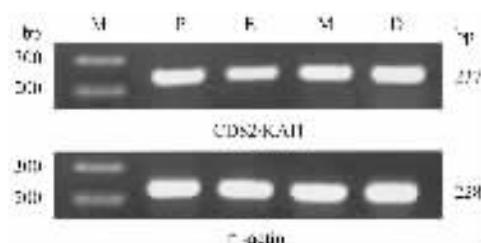
作者简介: 王焕英. 博士, 主治医师. Tel (010) 64456686 Email: hellen17@163.com

以试剂公司提供的阳性对照片作阳性对照, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。阳性结果评定标准: 镜下见胞质或胞膜被染为棕黄色者为阳性。

统计学处理: 所有实验重复 4 次, 数据用 *t*-test 分析, $P < 0.05$ 即认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD82/KAI1 mRNA 在动情周期小鼠子宫的表达 见图 1。



M: 100 bp DNA ladder; P: 动情前期; E: 动情期; M: 动情后期; D: 动情间期。

图 1 CD82/KAI1 mRNA 在小鼠动情周期子宫的表达

2.2 CD82/KAI1 蛋白在动情周期小鼠子宫内膜的表达 在子宫内膜上皮细胞均有表达, 但子宫内膜基质细胞中 CD82/KAI1 蛋白质的表达和分布却有区别, 动情期表达最为丰富, 动情后期基本没有表达。

2.3 CD82/KAI1 mRNA 在早孕小鼠子宫的表达 分光光度法检测提取的总 RNA 浓度 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1.8$ 。RT-PCR 见孕 D1-D4 小鼠子宫组织中, CD82/KAI1 mRNA 均有表达。CD82/KAI1 基因在孕 D1-D2 表达量微弱, 从孕 D3 开始表达增加。

2.4 CD82/KAI1 蛋白在早孕小鼠子宫内膜的表达 CD82/KAI1 蛋白表达于细胞质和胞膜。免疫组化结果显示, CD82/KAI1 蛋白在孕 D1-D4 子宫内膜腔上皮细胞和腺上皮细胞呈阳性表达。孕 D1 和 D2 子宫内膜基质细胞为阴性表达, 孕 D3 子宫内膜腔上皮细胞下的基质细胞出现微弱阳性表达, 孕 D4 子宫内膜基质细胞为散在的阳性表达。孕 D3-D4 子宫内膜(蜕膜)基质细胞表达 CD82/KAI1 蛋白的细胞数量逐渐增多。孕 D1-D4 小鼠子宫肌层和浆膜层细胞也有一定量表达。

3 讨论 本实验结果显示在小鼠动情周期的四个阶段中, 尽管 CD82/KAI1 mRNA 在动情期相对较低, 但发挥功能的 CD82/KAI1 蛋白质在动情期表达最丰富, 不仅内膜上皮, 而且基质细胞中都有广泛的分布, 其余三期的内膜上皮也呈阳性表达, 但基质细胞中 CD82/KAI1 蛋白质的表达和分布却有区别, 特别在动情后期的基质细胞中基本没有蛋白质表达。

CD82/KAI1 蛋白在早孕小鼠子宫内膜的表达结果提示在滋养层细胞侵袭子宫内膜前, 子宫内膜可能通过表达 CD82/KAI1 蛋白, 为抗滋养层细胞的侵袭做准备。而在接下来的孕 D5-D8 胚胎植入过程中, CD82/KAI1 蛋白在多数子宫蜕膜细胞上调表达, 提示其可能参与了子宫内膜对抗滋养层细胞侵袭的调节(待发表)。

【参考文献】

[1] Murray MJ, Lessey BA. Embryo implantation and tumor metastasis: Common pathways of invasion and angiogenesis [J]. Semin Reprod Endocrinol, 1999; 17(3): 275-290.

编辑 井晓梅