

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.06.009

S100A2 在围着床期小鼠子宫内膜表达的动态观察

王 胜¹, 刘真真¹, 谭 毅¹, 周 兰², 谭冬梅¹

(重庆医科大学 1.实验动物中心;2.检验医学院,重庆 400016)

【摘 要】目的:了解 S100A2 mRNA 及蛋白在围着床期小鼠子宫的表达情况,为阐明 S100A2 在胚胎着床过程中的作用积累实验依据。方法:应用荧光定量 PCR(FQ-PCR)和免疫组化技术分别检测 S100A2 mRNA 和蛋白的表达情况。结果:①S100A2 mRNA 在妊娠第 1~6 天子宫中均有表达,且表达量逐渐降低;同时,在第 5 天,着床点的含量明显低于非着床点。②S100A2 蛋白主要表达于小鼠子宫内膜基质细胞的胞浆中,其表达量在第 1、2 天很丰富,第 3、4、5 天很低。③子宫内膜的腔上皮和腺上皮细胞未见 S100A2 表达。结论:在胚胎着床过程中,S100A2 在小鼠子宫中的表达呈动态变化,提示可能参与了子宫内膜对滋养层细胞侵袭的调控。

【关键词】S100A2;子宫内膜;胚胎着床

【中图分类号】Q492.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-06-17

Spatiotemporal expression of S100A2 in peri-implantation mouse endometrium

WANG Sheng¹, LIU Zhenzhen¹, TAN Yi¹, ZHOU Lan², TAN Dongmei¹

(1. Laboratory Animal Center; 2. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To identify the expression pattern of S100A2 mRNA and protein in peri-implantation endometrium in mice, and to accumulate experimental proof which S100A2 might play roles in embryo implantation. Methods: mRNA and protein expression of S100A2 were detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) and immunohistochemistry. Results: ① S100A2 mRNA was steadily expressed in the mouse uterus during d1-d6 of pregnancy, and its quantity gradually decreased day by day. On d5 of pregnancy, its expression level was lower in the implantation sites than that in inter-implantation sites. ② S100A2 protein was localized in cytoplasm of mouse endometrial stromal cells, while its level dynamically changed: strongly positive on d1-d2, weakly positive on d3-d5. ③ No expression was detected in endometrial luminal epithelial cells and gland cells. Conclusion: Dynamic expression of S100A2 in mouse uterus during embryo implantation shows that it might play roles in regulation of embryo invasion into the uterine endometrium.

【Key words】S100A2; endometrium; embryo implantation

在正常胚胎植入过程中,滋养层细胞对子宫内膜的植入行为与肿瘤细胞的侵袭转移过程存在大量相似之处。研究表明,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、基因突变等不仅参与了肿瘤侵袭转移的病理生理过程,是肿瘤发生及侵袭转移的分子机制之一,而且是胚胎植入这一正常生理过程中的信号转导通路所必需的^[1,2]。

S100 蛋白是一类具有独特 EF-手型结构(螺旋-环-螺旋)的钙结合蛋白家族,包括多种低分子量蛋

白,在细胞中以反平行同源或异源二聚体的形式存在,通过与钙离子的结合引起螺旋重排使其与靶蛋白结合,进而发挥其生物学效应,S100A2 已经被视为可能的肿瘤抑制因子^[3,4]。目前,S100A2 在胚胎植入过程中的作用尚不清楚,本文拟从胚胎植入与肿瘤侵袭转移相似的方面出发,研究 S100A2 在胚胎植入阶段子宫内膜中的表达情况,探讨其在胚胎植入过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 清洁级 NIH 小鼠,6~8 周龄,体重 20~25 g,购自重庆医科大学实验动物中心,合格证号:SCXK(渝)2007-

作者介绍:王 胜(1977-),男,助理研究员,硕士,

研究方向:胚胎着床机制方面的研究。

通信作者:谭冬梅,女,助理研究员,Email: dongmei_tan@126.com。

基金项目:重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ110316)。

0001。将性成熟的雄鼠和雌鼠于 17:00 合笼,自然交配后于次日 8:00 检查阴栓,发现阴栓者记为妊娠 d1。实验用 d1~d6 妊娠鼠各 3 只,共 18 只,每只孕鼠的一侧子宫组织用于 RNA 的提取,另一侧子宫组织用于石蜡切片。

1.1.2 主要试剂 S100A2 单克隆抗体(S6797)购于 Sigma 公司,免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司,荧光定量 PCR 试剂盒购于 Fermentas 公司,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 子宫组织 RNA 提取 9:00 取 d1~d6 孕鼠,颈椎脱臼法处死后,剖腹剪取双侧子宫角,剥离附着的脂肪组织后剪取子宫组织 40 mg。其中 d5、d6 小鼠,先由尾静脉注射 0.5% 锥虫蓝,每只 0.5 ml,等待大约 5 min 左右,观察待嘴唇、耳廓等部位变蓝时处死小鼠,分别剪取由锥虫蓝标示出的着床点子宫组织和着床点之间的子宫组织各约 40 mg。按说明书提取总 RNA,置于 -80 °C 备用。

1.2.2 RT-PCR 用紫外分光光度计测定所提总 RNA 的 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值,判断是否在 1.8~2.0 之间,然后取部分 RNA 进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,证实 RNA 的完整性。完整 RNA 采用两步法 RT-PCR,先逆转录成 cDNA,再用设计的 S100A2 引物进行 PCR 扩增,上游引物为 5'-GTGACCAGCA-GGTGGACTT-3',下游引物为 5'-AGAGATCCACGGCAGGT-AG-3'。扩增产物大小为 113 bp。PCR 反应条件为:先以 94 °C 预变性 120 s,然后以 94 °C 变性 15 s,62 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 30 s 的循环反应 40 次,最后再 72 °C 延伸 120 s。

1.2.3 电泳 取 RT-PCR 扩增产物 9 μl ,加 10 $\times$ 上样缓冲液 1 μl ,于 2% 琼脂糖凝胶上以 80 V 恒压电泳约 15~20 min,于凝胶成像仪下观察结果。

1.2.4 荧光定量 PCR(FQ-PCR) 将琼脂糖凝胶电泳的特异条带用刀片切下进行纯化,然后与载体进行连接,转化得到质粒。挑选白斑菌落培养后进行 PCR 鉴定。提取标准品质粒,按拷贝数进行稀释。反应体系为:Master Mix(2 $\times$) 10 μl ,上游引物和下游引物各 0.4 μl ,cDNA 2 μl ,无菌水 7.6 μl 。以 S100A2 和内参 GAPDH 的比值作为 S100A2 mRNA 的相对表达量。

1.2.5 免疫组化 收集 d1~d6 小鼠子宫组织,10% 福尔马林固定后,进行常规石蜡包埋与切片(5 μm)。免疫组化按操作说明书进行,S100A2 一抗按 1:1 000 稀释,DAB 显色,常规脱水、透明和封片。用 0.01 mol/L PBS 代替一抗孵育,作阴性对照。用 ImagePro Plus(IPP)软件测平均吸光度(Absorbance,A),作为 S100A2 蛋白的相对表达量。

1.2.6 统计学分析 用 SPSS 12.0 软件进行数据分析,所有数据均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,S100A2 mRNA 的表达用单因素方差

分析,两两比较用 LSD 法。S100A2 蛋白的表达用 Kruskal-Wallis H 检验,然后采用调整 t 检验进行组间差异的两两比较。以 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 S100A2 mRNA 在围着床期小鼠子宫组织中的表达

S100A2 基因的 RT-PCR 产物与理论长度 113 bp 相一致(图 1),表明妊娠小鼠子宫组织有 S100A2 mRNA 的表达。FQ-PCR 结果显示(表 1、图 2):妊娠 d1~d6 的小鼠子宫组织 S100A2 mRNA 的表达量有差异($F=101.697, P=0.000$)。在胚胎植入前的 d1、d2,小鼠子宫组织中 S100A2 mRNA 表达量无明显变化($P > 0.05$),在植入前的 d3,S100A2 mRNA 表达量开始下降($P < 0.05$);在植入开始的 d4,其表达量出现极显著下降,仅为植入前的 1/3 左右($P < 0.01$)。以后,其表达量进一步下降,至妊娠 d6,仅为植入前的 1/10 左右。此外,在妊娠 d5,S100A2 mRNA 的表达量在着床点明显低于非着床点($P < 0.05$),在妊娠 d6,S100A2 mRNA 的表达量在着床点与非着床点无明显差异($P > 0.05$)。

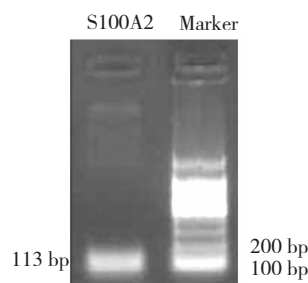


图 1 S100A2 mRNA 在妊娠 d3 小鼠子宫组织的表达

Fig.1 Expression of S100A2 mRNA in mouse uterus on pregnancy d3

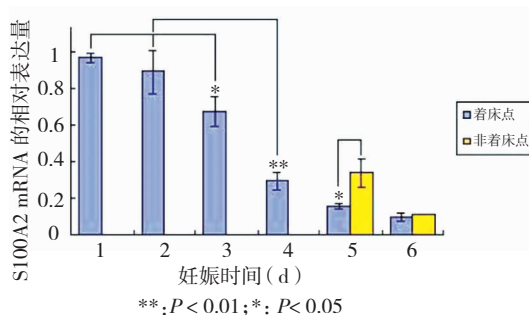


图 2 S100A2 mRNA 在妊娠 d1~d6 小鼠子宫组织的相对表达量

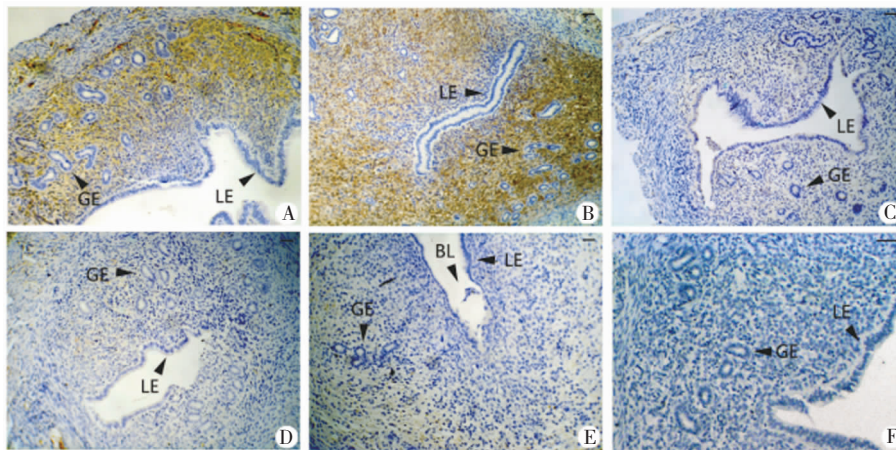
Fig.2 Relative quantity of S100A2 mRNA expressed in mouse uterus during pregnancy d1-d6

表 1 妊娠 d1~d6 小鼠子宫组织 S100A2 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Relative quantity of S100A2 mRNA expressed in mouse uterus during pregnancy d1-d6 ($\bar{x} \pm s$)

组别	S100A2 mRNA 的表达					
	d1	d2	d3	d4	d5	d6
植入点	0.969 $\pm$ 0.025	0.891 $\pm$ 0.117	0.676 $\pm$ 0.085	0.287 $\pm$ 0.045	0.156 $\pm$ 0.011	0.093 $\pm$ 0.024
非植入点	...	...	...	...	0.335 $\pm$ 0.076	0.107 $\pm$ 0.002

注:...,没有数值



A~E. 妊娠 d1~d5; F. 阴性对照 (LE= 腔上皮、GE= 腺上皮、BL= 胚胎)

图 3 S100A2 蛋白在妊娠 d1~d5 小鼠子宫内膜中的表达 (SP, 100 ×)

Fig.3 Expression of S100A2 protein in mouse uterus during pregnancy d1~d5 (SP, 100 ×)

2.2 S100A2 蛋白在围着床期小鼠子宫内膜中的表达

免疫组化结果显示:妊娠 d1~d5, S100A2 蛋白表达于小鼠子宫内膜基质细胞的胞浆中,核内无表达,同时腔上皮和腺上皮细胞也均无表达。IPP 图像分析结果显示:妊娠不同时间, S100A2 蛋白的表达量差异有统计学意义 ($HC=23.095, P=0.000$)。在妊娠 d1 和 d2, S100A2 蛋白的表达量差异无统计学意义 ($P=0.053$),但在妊娠 d3,其表达量较妊娠 d2 出现极显著下降 ($P=0.004$)。妊娠 d3~d5, S100A2 蛋白的表达量均较低,其中相邻 2 d 的表达量相比,差异无统计学意义 (P 分别为 0.056, 0.07)。S100A2 蛋白的表达部位也逐渐向外周移动 (图 3、4)。

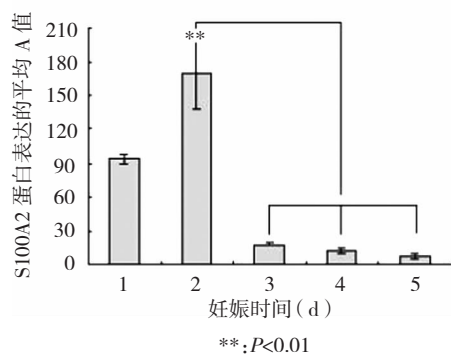


图 4 S100A2 蛋白在妊娠 d1~d5 小鼠子宫组织表达的平均吸光度值

Fig.4 Mean A value of S100A2 protein expressed in mouse uterus during pregnancy d1~d5

3 讨论

钙离子是体内最丰富的阳离子之一,它作为细胞信号传导的第 2 信使,控制着许多细胞生物化学

过程,不仅参与正常的生理调节、DNA 合成、细胞增殖调控,而且在肿瘤的发生、发展,尤其是在肿瘤的转移过程中起着重要调节作用。钙离子在受精和胚胎发育过程中的重要功能也被大量研究,已证实它与胚胎植入也有关联^[5]。在子宫中,子宫内膜上皮与滋养层细胞的结合增加了钙内流作用。在大鼠和小鼠,分别降低降钙素和 S100G 的表达能阻止胚胎植入。在猪的胚胎植入期,可以观察到子宫腔内的钙浓度明显升高,子宫内膜中的钙通道蛋白 TRPV6 呈高表达^[6]。

人类 S100 基因位于染色体 1q21 区域,该区域稳定性差,易发生染色体重排。目前已检测到 S100 蛋白家族在多种肿瘤中出现表达异常,其中 S100A2 是唯一与肿瘤呈负相关的成员,在多种肿瘤如前列腺癌^[7]、食管癌^[8]、胃癌^[9]中表达下降。Tsai 等^[10]发现 S100A2 的表达能抑制肿瘤细胞的运动和迁移能力,并可能通过抑制 COX-2 mRNA 转录为蛋白的方式抑制体内肿瘤的发生发展。

胚胎着床是妊娠过程中极其重要的环节,包括定位、粘附、侵入 3 个步骤,胚胎着床过程受到多种细胞因子、生长因子和激素调节。“假恶性”的囊胚滋养层细胞与恶性肿瘤细胞在细胞增殖分化、侵袭信号转导通路、血管侵蚀和新生血管形成、免疫逃逸及细胞凋亡等诸多方面有相似性,异常增生、过度侵入的滋养层细胞有发生妊娠滋养细胞肿瘤的风险^[11]。目前也有胚胎着床时,多种肿瘤抑制因子在子宫内膜上皮与胚胎中的规律性表达报告,如 CD9、CD63、CD82 等^[12-14],提示它们可能参与了胚胎

着床过程。

本研究运用 FQ-PCR 和免疫组织化学技术检测了围着床期小鼠子宫内膜中 S100A2 的表达规律。结果显示,随着妊娠天数的增加,S100A2 mRNA 和蛋白在子宫内膜的表达量呈逐渐下降趋势。在着床关键的 d4、d5,S100A2 mRNA 表达量分别只有 d1 的 1/3、1/7 左右,其蛋白的表达也只有 d1 的 1/7、1/12 左右。同时,子宫内膜上皮中 S100A2 蛋白仅定位于基质细胞或蜕膜细胞的胞浆中,腔上皮和腺上皮中未见表达,而且随着妊娠天数的增加,S100A2 蛋白的分布逐渐向子宫壁外侧转移,到 d5 时大部分存在于次级蜕膜区域。推测:由于 S100A2 有抑制肿瘤迁移的功能,而胚胎着床的过程涉及到子宫上皮的破坏和侵入等类似肿瘤的行为,因而 S100A2 表达下调可能有利于胚胎的着床。而 S100A2 具体通过什么机制达到抑制细胞迁移的功能呢?有研究发现,S100A2 能使细胞阻滞于 G₁ 和 S 期,并延迟进入 G₂ 期;也有报道发现 S100A2 能下调两个与肿瘤发生有关的基因 COX-2 和 CyclinD1,并推测 S100A2 的抑癌作用与之相关^[10]。此外,近年来有报道 S100A2 在某些肿瘤中表达增高,并发现其增高可能受 p53、p63、p73 等基因诱导调节所致^[15,16]。目前 S100A2 在肿瘤中的具体作用机理尚未得到明确,同时,S100A2 在胚胎植入过程中的功能及其作用机制需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer[J]. Cell, 2000, 100(1):57-70.
- [2] Yohan C, Heewon S, Mingoo K, et al. Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the peri-implantation rabbit uterus and blastocyst[J]. Biol Reprod, 2001, 64(6):1835-1844.
- [3] Heizmann C W, Fritz G, Schafer B W. S100 proteins: structure, functions and pathology[J]. Front Biosci, 2002, 7(5):1356-1368.
- [4] Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins[J]. Microsc Res Tech, 2003, 60(6):540-551.
- [5] Michael W. Calcium signalling in early embryos[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008, 363(1495):1401-1418.
- [6] Yohan C, Heewon S, Mingoo K, et al. Dynamic expression of calcium-regulatory molecules, TRPV6 and S100G, in the uterine endometrium during pregnancy in pigs[J]. Biology of Reproduction, 2009, 81(6):1122-1130.
- [7] Rehman I, Cross S S, Catto J W, et al. Promoter hyper-methylation of calcium-binding proteins S100A6 and S100A2 in human prostate cancer[J]. Prostate, 2005, 65(4):322-330.
- [8] Ji J, Zhao L, Wang X, et al. Differential expression of S100 gene family in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Cancer Res Clin-oncol, 2004, 130(8):480-486.
- [9] Liu Y F, He X S, Xu G, et al. Relationship of the S100A2 protein and differentiation of gastric carcinoma[J]. Journal of Nanhua University (Medical Edition), 2005, 33(1):1-3.
- [10] Tsai W C, Tsai S T, Jin Y T, et al. Cyclooxygenase-2 is involved in S100A2-Mediated tumor suppression in squamous cell carcinoma[J]. Mol Cancer Res, 2006, 4(8):539-547.
- [11] Campbell S, Rowe J, Jackson C J, et al. In vitro migration of cytotrophoblasts through a decidual endothelial cell monolayer; the role of matrix metalloproteinases[J]. J Placenta, 2003, 24(4):306-315.
- [12] Zhao B X, Tan D M, He M Z, et al. Spatiotemporal expression of tumor metastasis inhibitory factor CD63/ME491 gene in mouse uterine endometrium[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2007, 29(10):885-888.
- [13] Tan D M, He M Z, Zhao B X, et al. Spatiotemporal expression of tumor metastasis inhibitory factor CD9/MRP-1 gene in mouse endometrium during embryo pre-implantation[J]. Journal of Reproduction and Contraception, 2008, 28(9):513-518.
- [14] Tan D M, Zhao B X, Wei X W, et al. Spatiotemporal expression of tumor metastasis inhibitory factor CD82/KAI1 gene in pseudopregnancy and effect on embryo implantation in mice[J]. Journal of Reproduction and Contraception, 2007, 27(9):567-572.
- [15] Hibi K, Fujitake S, Takase T, et al. Identification of S100A2 as a target of the DeltaN p63 oncogenic pathway[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(11):4282-4285.
- [16] Lapi E, Iovino A, Fonte maggi G, et al. S100A2 gene is a direct transcriptional target of p53 homologues during keratinocyte differentiation[J]. Oncogene, 2006, 25(26):3628-3637.

(责任编辑:唐秋姗)