

富含脯氨酸小蛋白-2 在小鼠子宫中的表达及调节*

谈寅飞 孙晓阳 唐 爽 朴允尚 王雁玲**

(中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 富含脯氨酸小蛋白 (Sprrs) 参与构建复层扁平上皮的角化细胞壳 (CE), 它们在子宫单层上皮中的作用还不清楚. 采用 RNA 印迹和半定量 RT-PCR 方法, 研究了 Sprr2 在小鼠动情周期和妊娠子宫中的表达及其激素调控. 实验结果发现: Sprr2 在动情前期和动情期表达上调, 而动情后期和间情期表达下调. 在妊娠初期表达迅速下调, 直至临产期表达重新受到诱导并在产后达到高峰. 鉴于其在不同生殖阶段子宫中独特的表达模式和在复层上皮中保护性的功能, 推测 Sprr2 与子宫对交配和分娩所产生的应激反应有关.

关键词 富含脯氨酸小蛋白, 子宫, 应激, 动情周期, 妊娠, 分娩

学科分类号 Q492

富含脯氨酸小蛋白 (small prolin-rich proteins, Sprrs) 是哺乳动物皮肤角化细胞壳 (cornified envelope, CE) 的主要成分之一. CE 是由 20 多种蛋白质通过共价交联所形成的疏水结构, 为分化的复层扁平上皮特有, 是其抵抗外界伤害如外伤、摩擦和水分蒸发等的功能性结构^[1,2]. 在鼠中共发现了 4 类 Sprr, Sprr1 包含 2 个成员; Sprr2 有 11 个成员, 以 A ~ K 分别命名, 其中, C 是假基因; Sprr3 和 Sprr4 各有 1 个成员^[3,4]. 到目前为止, 对 Sprr 的功能认识仅限于其参与构建 CE. Song 等^[3]曾发现小鼠子宫上皮细胞表达 Sprr, 其后 Cabral 等^[5]也在人子宫中发现了 Sprr 的表达, 但子宫腔上皮和腺上皮均属于单层上皮, 不存在 CE 结构. 我们曾用基因芯片的方法研究了小鼠子宫基因表达谱动情周期的变化, 发现动情期与间情期相比, Sprr2 表达高度上调, 而 Sprr1 和 Sprr3 表达水平没有变化, 暗示 Sprr2 在子宫中可能具有与 CE 无关的独特作用^[6].

本文研究了 Sprr2 在小鼠动情周期和妊娠期子宫中的表达模式, 并利用卵巢切除小鼠模型研究其表达的激素调控, 由此探讨了 Sprr2 在子宫中的可能功能.

1 材料和方法

1.1 动物处理及取材

成年处女 CD-1 小鼠购自北京联通利华公司, 动物每日光照 12h, 自由采食. 阴道涂片检测小鼠情期, 选取至少有 2 个连续 4 天周期的小鼠为实验动物. 小鼠交配后以出现阴栓当天为妊娠第 1 天, 分别在妊娠第 1、2、3、4、13、20 和产后第 1 天

的中午取子宫以及第 13、20 天的胎盘.

卵巢切除小鼠在术后 2 周接受皮下注射激素, 共分为 4 组: 17- β 雌二醇 (E_2) 处理组 (E 组, 每只每天为 200 ng), 孕酮 (P_4) 处理组 (P 组, 每只每天为 1 mg), E_2/P_4 合并处理组 (EP 组, 每只每天注射 E_2 200 ng 和 P_4 1 mg) 和对照溶剂油组 (C 组, 每只每天注射 100 μ l 花生油). 连续处理 3 天, 在最后一次注射 24 h 后取子宫^[7].

上述所有材料均在液氮速冻后移至 -80℃ 冰箱保存.

1.2 总 RNA 的提取和 RNA 印迹探针的制备

不同实验组的材料用电动匀浆器 (Kinematika 公司, 瑞士) 破碎后, 按照 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA. 取 1 μ g 总 RNA, 在 20 μ l 体系中用 oligo (d) T 引物和 SuperScript II 逆转录酶进行逆转录反应, 随后取出 1 μ l 产物进行 PCR 反应. 引物根据 Sprr2A 或 2F 的 cDNA 序列设计, 分别为 A (上游: 5'-AAGTAAAAGAGGCAATCCAGG, 下游: 5'-CATCATAGGCACATGGAGG) 和 F (上游: 5'-TCATTCCAGCAGAAATGC, 下游: 5'-CTGAACA-ATGGAACAAGACC), 退火反应温度为 55℃, 共进行 30 个循环. 扩增产物经测序验证后, 连接至 pGEM T easy 载体构建重组质粒. 质粒扩增纯化并经内切酶处理, 凝胶回收纯化 cDNA 片段. 随后采用 Prime-a-gene 试剂盒 (Promega 公司, 美国) 对 cDNA 片段进行 [α -³²P] dCTP (亚辉公司, 北京)

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999055903) 和中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX-2-SW-201).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62631832, E-mail: wangyl@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 2003-06-04, 接受日期: 2003-07-29

标记, 并通过 Nick column 层析柱纯化 (Pharmacia 公司, 美国), 即为可用于 RNA 印迹的标记探针。

1.3 半定量 RT-PCR

Sprr2A 和 Sprr2F 的引物序列如上所述。其他 8 对 (Sprr2B、D、E、G、H、I、J、K) 引物参照文献 [3] 合成, 逆转录反应亦如上进行。通过不同 PCR 循环数下的扩增产物量作出每对引物的反应曲线, 选取在“指数期”内, 并且凝胶电泳能检测到产物的最小循环数为 PCR 反应最优循环数, 由此进行 PCR 反应, 结果以相同起始模板量的管家基因 GAPDH 扩增产物进行校正^[8]。

1.4 RNA 印迹杂交

25 μg 总 RNA 和 3 μl 的 RNA 标准 (Promega 公司, 美国) 于 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶中电泳, 随后真空转移至 Hybond⁺ 尼龙膜 (Pharmacia 公司, 美国) 并紫外交联。尼龙膜于 65℃ 预杂交 4 h 后, 加入 ³²P 标记探针杂交过夜。膜洗涤后, 用 X 胶片 (Fuji photo film 公司, 日本) 进行放射自显影, 信号用灰度扫描仪 (MD, Amersham Biosciences, 英国) 处理, 并经持家基因 GAPDH 校正。

1.5 数据统计

RT-PCR 和 RNA 印迹杂交均用不同组的样本

重复 3 次, 每组样本来自至少 10 只动物, 数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并通过 Student's *t* 检验作显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结 果

2.1 Sprr2 在小鼠动情周期和妊娠期子宫中的表达模式

RNA 印迹杂交所用的探针为 Sprr2A 与 Sprr2F 的 cDNA 片段, 二者有 70% 的同源性, 与其他 Sprr2 成员也有一定的同源性。2 种探针杂交均得到一个 1.9 kb 的杂交信号, 放射自显影所用时间仅为持家基因 GAPDH 的 1/10, 表明其表达丰度非常高, 我们将其命名为 Sprr2 样 (Sprr2-like) 基因。杂交结果表明: 子宫中该 Sprr2 样基因在间情期和动情后期有基础水平的表达, 在动情前期表达水平显著升高, 至动情期达到高峰; 妊娠第 1、2 天维持较高表达水平; 从妊娠第 3 天起, 表达受到迅速抑制, 直至第 13 天均维持于相对检测不到的水平; 而在临近分娩时 (第 20 天), 子宫内该 Sprr2 样基因又开始有表达, 并在分娩后第一天恢复较高水平表达。而在妊娠第 13 天和 20 天的胎盘中, 检测不到该 Sprr2 样基因的表达 (图 1a, b)。

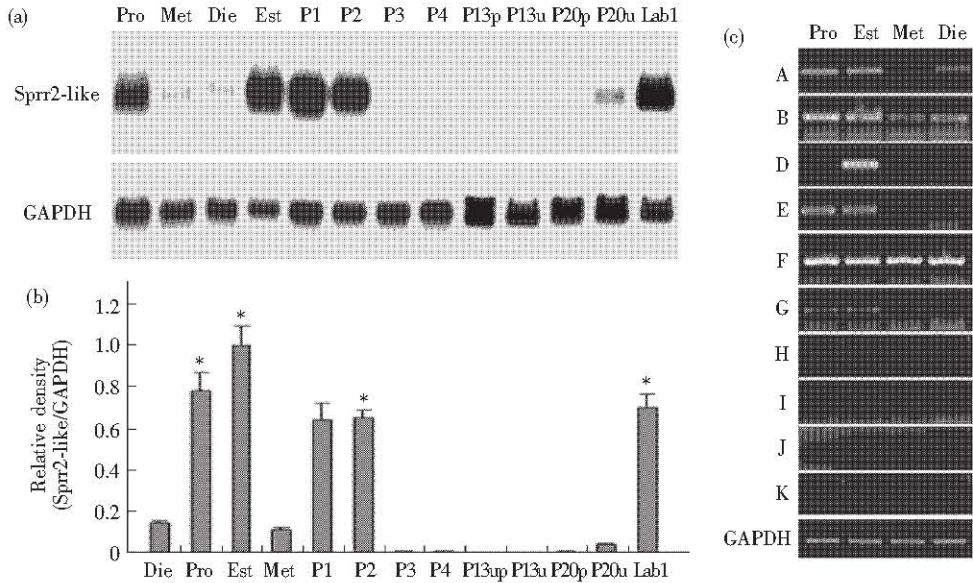


Fig. 1 The expression of members of Sprr2 family in the mice uteri during estrous cycle and pregnancy
(a) Northern blots revealed the expression patterns of Sprr2-like transcript in the mice uteri of proestrus (Pro), metestrus (Met), diestrus (Die), estrus (Est), pregnant day 1 (P1), 2 (P2), 3 (P3), 4 (P4), 13 (P13u), 20 (P20u) and day 1 of labor (Lab1), as well as in the placenta of pregnant day 13 (P13p) and 20 (P20p); (b) Statistical analysis of Northern blots from 3 independent experiments. $P < 0.05$ demonstrated significant difference (*); (c) Semi-quantitative RT-PCR manifested the expression patterns of Sprr2 members in the mice proestrus, estrus, metestrus and diestrus uteri. Sprr2A, B, E, G were up-regulated in proestrus and estrus uteri, sprr2D were only induced at estrus, while sprr2F showed stable expression during estrous cycle.

半定量 RT-PCR 反应中, 各个基因在反应指数扩增期的循环数分别为 23 (Sprr2A 和 F), 25 (Sprr2B、D 和 E), 28 (Sprr2G), 35 (Sprr2H、I、J 和 K) 和 19 (GAPDH). 结果表明, Sprr2A、B、D、E、F 和 G 在动情周期的子宫中有表达. 其中, Sprr2F 丰度最高, 在整个动情周期维持稳定表达; Sprr2D 在动情期高表达, Sprr2A、B、E 和 G 于动情前期和动情期高表达, 它们的水平均于动情后期和间情期显著下降 (图 1c). 这些 Sprr2 成员的表达模式均与 RNA 印迹揭示的不同, 说明 RNA 印迹反映了一个与 Sprr2A 和 Sprr2F 高度同源的基因, 故暂且称之为 Sprr2 样基因.

2.2 类固醇性激素对小鼠子宫 Sprr2 表达的调节

对卵巢切除的小鼠进行外源类固醇性激素处理后, 研究子宫中 Sprr2 表达的变化. RNA 印迹杂交表明, 卵巢切除的小鼠子宫中检测不到 Sprr2 样基因的基础表达, E_2 能够强烈诱导 Sprr2 样基因表达, 其水平甚至高于正常小鼠动情期子宫的表达量; P_4 单独并无明显作用, 但能够部分逆转 E_2 对

Sprr2 样基因的诱导作用 (图 2a, b). 半定量 RT-PCR 的结果显示, Sprr2B 和 F 有一定的基础表达, 该表达受到 P_4 的抑制; Sprr2A、D、E 和 F 的表达受 E_2 诱导, 其中对 D 和 E 的诱导表达可被 P_4 所阻断 (图 2c).

3 讨 论

Sprr2 作为 CE 的前体蛋白, 在终末分化的复层扁平上皮中表达. 它在诸如子宫内膜上皮细胞等不具备 CE 的单层扁平上皮中又有什么功能呢? 本工作发现, 在正常小鼠子宫中, 多个 Sprr2 成员的表达与动情周期相关, 并在卵巢切除小鼠中受外源雌孕激素的调节. 例如, Sprr2A、B、D 和 E 在动情前期和/或动情期子宫中表达上调, 而动情后期和间情期表达明显被抑制, 卵巢切除小鼠子宫中, 它们的表达受雌激素的诱导, 孕酮可抑制 B 的表达, 并部分逆转雌激素对 D、E 的诱导作用. 我们已知正常小鼠血浆雌激素水平在动情前期和动情期较高, 孕酮水平在动情后期和间情期较高^[9]. 上述结果表明, 这些 Sprr2 成员在动情周期中的特异表达模式至少部分地源于雌、孕激素的调节作用. 而 Sprr2F 表达虽然在卵巢切除鼠中受雌激素诱导和孕酮抑制, 在正常周期子宫中却呈稳定表达, 提示生理状况下, F 的表达还受到其他因子的控制. 从功能上看, 动情前期和动情期子宫内膜细胞在高水平雌激素的作用下, 迅速发生分化; 在动情期子宫的主要功能在于调节精子活力并使之获能、抵抗交配引入的病原感染等^[10,11]. Sprr 成员虽然不能在子宫上皮形成坚韧的 CE, 来发挥类似于在复层扁平上皮中的保护作用, 但我们设想它们可能通过与其他结构蛋白的协调, 加固细胞膜, 稳定细胞结构, 从而防止精液引起的局部酸碱度变化对细胞的不良影响以及病原对细胞的侵入. 该时期表达上调的 Sprr2A、B、D、E 等可能参与了这些应激反应过程.

目前小鼠中已知有 11 个 Sprr2 的成员, 它们大小相近并有一定的同源性. Song 等^[3]通过 DNA 印迹, 预计还有一些 Sprr2 新成员尚未被发现. 本实验利用 RT-PCR 发现, 已知的 Sprr2 成员中, F 在子宫中的表达丰度最高, 但仍不及持家基因 GAPDH 的丰度, 而以 Sprr2A 和 F 的 cDNA 片段为探针, 进行 RNA 印迹杂交所检测到 1.9kb 的转录产物, 其表达水平远较 GAPDH 者高, 并在动情前期和动情期呈现特异高表达, 其表达水平和特性与 RT-PCR 所检测到的已知 Sprr2 成员均不同, 提示

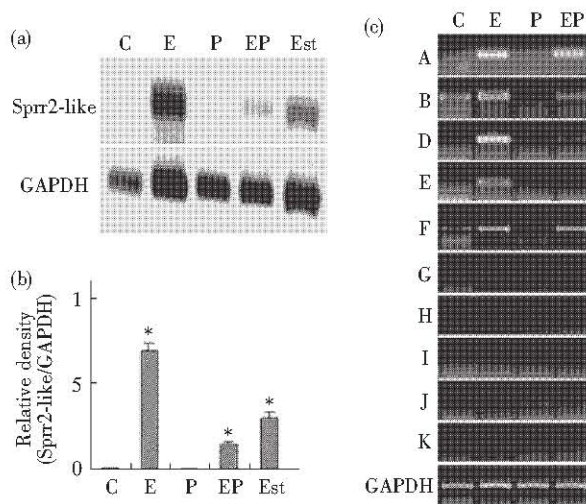


Fig.2 The effects of estrogen and progesterone on the expression Sprr2 members in the uteri of ovariectomized mice (a) RNA blot revealed the expression pattern of Sprr2 like transcript in the vehicle (C), estradiol-treated group (E), progesterone-treated group (P) as well as combination of estradiol and progesterone treatment (EP); Normal estrous uteri was set as positive control (Est). (b) Statistical analysis of Northern blots from 3 independent experiments. $P < 0.05$ demonstrated significant difference (*). The result showed estradiol significantly induced the expression of Sprr2-like transcript, while progesterone could partially reverse this effect. (c) Semi-quantitative RT-PCR manifested that the expression of Sprr2A、D、E、F could be induced by estradiol, in which, progesterone could reverse the inducement of Sprr2D, E, and inhibit the basal expression of Sprr2B and F.

这一转录产物可能是 *Sprr2* 的一个未知新成员, 它与 *Sprr2A* 和 *F* 高度同源, 故我们且将其称为 *Sprr2* 样基因。高丰度的 *Sprr2* 样基因在动情前期和动情期高表达, 而后期和间情期表达下调 (和 *E* 相似); 在卵巢切除鼠的子宫中没有基础表达, 雌二醇诱导其强烈表达, 孕酮部分逆转雌激素的效应, 这一模式与 *Sprr2D* 和 *E* 相似。推测 *Sprr2* 样基因也可能参与了其他 *Sprr2* 成员的上述应激对抗作用。另一方面, *Sprr2* 样基因在妊娠的早期直至分娩前表达被显著抑制, 这可能引起子宫上皮细胞可塑性的增加, 而这对胚泡着床和胎儿发育过程中子宫的适应性扩张是必要的。而在临产期, 该分子开始表达, 并在分娩后即呈现强烈表达, 提示它可能参与了分娩所引起子宫内膜创伤的应激反应。胎盘是母胎进行活跃物质交换的场所, *Sprr2* 样基因在妊娠期胎盘中无表达, 提示它不参与胎盘发生过程中, 胚胎滋养层细胞和母体蜕膜细胞的相互作用。进一步克隆获得该基因序列将有力地阐明它的作用。

总之, 本文首次研究了 *Sprr2* 成员在子宫中表达及其激素调控模式, 并发现了 *Sprr2* 家族中一个高丰度的新成员; 探讨了 *Sprr2* 在不同生殖环节子宫中的作用。我们将进一步工作以确定它们在子宫中作用的具体机制。

致谢 感谢庄临之研究员在论文修改中提出的宝贵意见。

参 考 文 献

- Steinert P M. The complexity and redundancy of epithelial barrier function. *J Cell Biol*, 2000, **151** (2): F5 ~ F7
- Tarasa E, Candi E, Kartasova T, *et al.* Structural and transglutaminase substrate properties of the small proline-rich 2 family of cornified cell envelope proteins. *J Biol Chem*, 1998, **273** (36): 23297 ~ 23303
- Song H J, Poy G, Darwiche N, *et al.* Mouse *Sprr2* genes: a clustered family of genes showing differential expression in epithelial tissues. *Genomics*, 1999, **55** (1): 28 ~ 42
- Patel S, Kartasova T, Segre J A. Mouse *Sprr* locus: a tandem array of coordinately regulated genes. *Mamm Genome*, 2003, **14** (2): 140 ~ 148
- Cabral A, Voskamp P, Cleton-Jansen A M, *et al.* Structural organization and regulation of the small proline-rich family of cornified envelope precursors suggest a role in adaptive barrier function. *J Biol Chem*, 2001, **276** (22): 19231 ~ 19237
- Tan Y F, Li F X, Piao Y S, *et al.* Global gene profiling analysis of the mouse uterus during the oestrous cycle. *Reproduction*, 2003, **126**: 171 ~ 182
- Kurita T, Lee K J, Paul S C, *et al.* Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor and lactoferrin by progesterone in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 2000, **62** (4): 831 ~ 838
- 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 223
- Lu S D. *Current Protocols for Molecular Biology*. Beijing: Chinese Union Medical University, 1999. 223
- Fata J E, Chaudhary V, Khokha R. Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17 β -estradiol during the estrous cycle. *Biol Reprod*, 2001, **65** (3): 680 ~ 688
- Profet M. Menstruation as a defense against pathogens transported by sperm. *Q Rev Biol*, 1993, **68** (3): 335 ~ 386
- Herz Z, Northey D, Lawyer M, *et al.* Acrosome reaction of bovine spermatozoa *in vivo*: sites and effects of stages of the estrous cycle. *Biol Reprod*, 1985, **32** (5): 1163 ~ 1168

Expression and Regulation of Small Prolin-rich Protein 2 Family Members in The Mice Uteri*

TAN Yin-Fei, SUN Xiao-Yang, TANG Shuang, PIAO Yun-Shang, WANG Yan-Ling**

(State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Small prolin-rich proteins (Sprrs) participate in the construction of cornified cell envelop in stratified squamous epithelial cell. Their functions in the simple epithelium are not clear. Northern blots and semi-quantitative RT-PCR were used to investigate the expression pattern of *Sprr2* in mice uteri during the estrous cycle and pregnancy as well as their hormonal regulation. The results showed the up-regulation of *Sprr2* in the proestrous and estrous uteri during the estrous cycle. The expression of *Sprr2* was rapidly down-regulated at the early stage of pregnancy until the perinatal stage when it was re-induced and reached the high level after labor. Due to its unique expression pattern in the uterus at different reproductive stages and its protective function in stratified squamous epithelial cell, its role in uteri against reproductive stress such as copulation and labor was suggested.

Key words small prolin-rich proteins, uteri, stress, estrous cycle, pregnancy, labor

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1999055903) and The Knowledge Innovation Project of The Chinese Academy of Sciences (KSCX-2-SW-201).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62631832, E-mail: wangyl@panda.ioz.ac.cn

Received: June 4, 2003 Accepted: July 29, 2003