

胰岛素样生长因子结合蛋白-7'在大鼠胚胎植入过程中的差异表达与调节*

夏红飞^{1,2)} 孙敬^{1,2)} 杨颖¹⁾ 彭景榘^{1)**}

(¹⁾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;

²⁾中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 胰岛素样生长因子结合蛋白-7 (IGFBP-7) 已经证实在人的妊娠过程中起了重要作用, 但在大鼠中尚未见报道. 在过去的研究中曾利用抑制消减杂交 (SSH) 方法分析了植入前和植入期的基因表达谱, 发现 IGFBP-7 存在差异表达. 通过 RNA 印迹和原位杂交, 分析了 IGFBP-7 部分序列 (编码区 531~928 nt, 称作 IGFBP-7') 在大鼠妊娠早期子宫中的时空表达模式. 用 RT-PCR 方法检测了其在不同组织器官及假孕、人工诱导蜕膜化和延迟着床激活大鼠子宫中的表达模式. 结果显示: 在大鼠妊娠第 5 天 IGFBP-7' mRNA 的表达量开始增加, 第 5.5 和 6 天表达量显著高于植入前期. IGFBP-7' mRNA 主要表达于子宫腔上皮和腺上皮. IGFBP-7' mRNA 表达无组织特异性, 在大鼠的下丘脑、垂体、卵巢、子宫、心、肝、脾、肺、肾等器官均有表达, 在假孕的 D1~D6 大鼠子宫中均有表达, 但无显著性差异, 诱导蜕膜化后 IGFBP-7' mRNA 的表达量也无明显变化, 但在延迟着床激活的大鼠子宫中表达显著增加. 这些结果提示, 在植入期 IGFBP-7' 的表达增加主要是由胚泡引起的, 而非蜕膜化. 在大鼠妊娠早期, IGFBP-7' 的表达增加可能有利于胚胎植入的发生.

关键词 胰岛素样生长因子结合蛋白-7', SD 大鼠, 子宫, 胚胎植入

学科分类号 Q4

胰岛素样生长因子结合蛋白-7 (IGFBP-7) 又被命名为肿瘤粘附分子 (TAF) 或者前列腺素刺激因子 (PSF), 属于 IGFBP 超家族的一个成员. 结构上类似于 IGFBP 家族的成员, 但对 IGF 仅有较低的亲和力^[1]. IGF、IGF 受体及 IGFBP 超家族的成员等构成了 IGF 信号系统^[2,3]. 在妊娠过程中 IGF/IGFBP 系统的改变与许多严重的并发症如宫内发育迟缓 (IUGR) 和先兆子痫等密切相关^[4,5].

IGFBP-7 最初是由于在脑脊膜瘤中差异表达而被克隆出来^[6], 随后由于它在静止的人乳腺上皮细胞中大量表达, 被再次通过差异显示的方法分离出来^[7]. IGFBP-7 已经被证明是一个肿瘤抑制因子, 可能具备抗增殖能力^[1,8]. 如它可以诱导恶变的人前列腺上皮细胞凋亡, 抑制其在软琼脂上的生长, 也能抑制其在裸鼠中形成肿瘤^[9]. 此外, IGFBP-7 可刺激血管内皮细胞中的前列环素的产生, 因此抑制血管的通透性^[10]. 近年来, IGFBP-7 在妊娠过程中的功

能得到了广泛的研究^[11], IGFBP-7 可作为人子宫内 膜接受性的标志分子^[12]. 但至今在大鼠子宫中尚未见关于该基因的报道.

我们利用抑制消减杂交 (SSH) 技术研究大鼠植入前期 (妊娠第 4 和 4.5 天) 和植入期 (妊娠第 5.5 和 6 天) 的差异表达基因, 发现了妊娠大鼠子宫 IGFBP-7' (IGFBP-7 部分序列, 编码区 531~928 nt) 在植入期高表达. 本实验以妊娠大鼠、假孕大鼠和人工诱导蜕膜化大鼠子宫为研究对象, 研究了 IGFBP-7' 的时空表达变化, 为探索 IGFBP-7 在胚胎植入过程中的作用奠定基础.

*国家重点基础研究发展计划 (2006CB944007, 2006CB504006) 和 国家自然科学基金 (30370165) 资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 010-62571277, Fax: 010-62565689

E-mail: pengjp@ioz.ac.cn

收稿日期: 2006-07-17, 接受日期: 2006-11-20

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及处理.

选取性成熟, 体重 220~260 g Sprague-Dawley 大鼠, 在动情期与雄性大鼠或结扎的雄性大鼠 (1:1) 合笼交配, 验栓阳性为妊娠或假孕第 1 天 (D1). 收集妊娠和假孕 D1~D9 子宫组织, -80℃ 冰箱冻存备用.

人工诱导蜕膜化模型: 取假孕第 5 天大鼠, 麻醉、手术, 一侧子宫注入 70 μ l 的植物油, 另一侧子宫为对照, 妊娠第 8 天处死, 收集子宫. 处理一侧的子宫 (发生蜕膜化) 明显粗于对照一侧子宫.

延迟着床激活模型: 于妊娠的 D5 上午将雌鼠双侧卵巢切除, 将大鼠分为 3 组, 一组在妊娠 D6 到 D8 仅注射植物油, 一组在妊娠 D6 到 D8 仅注射孕酮 (3 mg/0.1 ml 植物油 / 只), 另一组在妊娠 D6 和 D7 注射孕酮 (3 mg/0.1 ml 植物油 / 只), 妊娠 D8 注射 17- β -雌二醇 (0.5 μ g/0.1 ml 植物油 / 只). 在妊娠 D9, 处死各组大鼠. 将延迟着床激活组大鼠尾静脉注射台盼蓝溶液, 检测是否有胚胎着床位

点. 收集各组大鼠子宫, -80℃ 冰箱冻存备用.

1.1.2 主要试剂. TRIzol reagent 购自 Invitrogen 公司; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; Prime-a-gene labeling system, M-MLV 反转录酶, TaqDNA 聚合酶, pGEM-T 载体, *Apa* I 和 *Sal* I 限制性内切酶购自 Promega 公司, Hybond N⁺ 尼龙膜和 NICK 柱购自 Pharmacia 公司; QIAquick Spin 柱购自 QIAGEN 公司; [α -³²P]dCTP 购自北京亚辉公司; RNA colour Kit 购自 Amersham 公司; 蛋白酶 K 购自 IBICO 公司; Histomount Mounting Solution 购自 ZYMED 公司; PCR 引物由奥科生物公司合成.

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 RT-PCR.

收集子宫用 TRIzol 一步法提取组织总 RNA, RNA 溶于无核酸酶水中, 为去除 DNA, 用 DNase 消化总 RNA. 逆转录反应采用 M-MLV 反转录酶进行, RT 反应中加入 1 μ g RNA. 反转录条件为 42℃ 1 h, 94℃ 3 min. IGFBP-7 和内参照 GAPDH 的引物序列见表 1. IGFBP-7 扩增片段为编码区 531~928 nt, 故称作 IGFBP-7'.

Table 1 Primers and expanding product size

	Primers	Sequence	Product size
IGFBP-7	Up-primers	5' CTTGAGCTGGGAAGTCATCGGAAT 3'	399 bp
	Down-primers	5' GGAATATGTCAGGCAGGAGTGG 3'	
GAPDH	Up-primers	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'	452 bp
	Down-primers	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	

PCR 扩增条件为 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 25 个循环, 然后 72℃ 7 min. GAPDH, PCR 扩增条件为 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 68℃ 1 min, 26 个循环, 然后 72℃ 10 min. 同时, 为确保扩增特异性, 设计了 3 种对照. 对照 1: 用 Nuclease-Free Water 代替 RNA 样品进行 RT-PCR; 对照 2: 不加逆转录酶进行 RT-PCR; 对照 3: RNA 样品不经逆转录直接进行 PCR. 为以半定量的方式判断靶基因的表达变化, 通过不同的 PCR 循环数扩增靶基因, 以确定达到平台期的循环数, 并最终采用处于对数增长期的扩增循环数扩增靶基因. PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (含终浓度 0.5 mg/L 溴乙锭) 上电泳. 电泳条带的吸光度值用

Quantity One software (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 分析, 靶基因的表达强度以与 GAPDH 的比值表示, 将校正值进行统计学分析.

1.2.2 RNA 印迹杂交. 根据 NCBI 数据库提供的 IGFBP-7 序列设计特异引物 (表 1), 以小鼠子宫提取的总 RNA 为模板, 用 RT-PCR 方法扩增特异 cDNA 片段, 连接至 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司) 构建重组质粒, 并经测序确认. 以 Primer-a-gene system 探针标记试剂盒对特异 cDNA 进行 [α -³²P]dCTP 标记, 再通过 Nick 柱纯化, 即可用于 RNA 印迹杂交的标记探针. 用 Trizol 试剂分别提取小鼠不同妊娠时期的子宫总 RNA, 取 30 μ g 总 RNA 进行甲醛变性琼脂糖凝胶 (1%) 电泳, 真空转移到

Hybond⁺尼龙膜上, 紫外交联 150 s. 尼龙膜在预杂交液(0.2 mmol 磷酸钠 pH 7.4, 0.1 mmol EDTA, 7% SDS, 1% BSA, 15%甲酰胺) 中于 65℃ 预杂交 4 h, 加入 ³²P 标记探针杂交过夜. 膜洗涤后, 用 X 胶片(富士, 日本)进行放射自显影, 信号用灰度扫描仪(MD, Amersham Biosciences, 英国)处理, 并维持家基因 GAPDH 校正.

1.2.3 原位探针的制备. 根据 NCBI 数据库设计 IGFBP-7 的特异引物(表 1), 以大鼠子宫提取的总 RNA 为模板, 用 RT-PCR 方法扩增特异 cDNA 片段, cDNA 片段用 QIAquick Spin 柱(QIA-GEN Inc)纯化. 连接至 pGEM-T 载体并经测序确认. 重组质粒用 *Apa* I 或 *Sal* I 限制性内切酶处理, 用 QIAquick Spin 柱纯化线性质粒, 以之为模板, 用 RNA colour Kit 分别标记正义与反义原位探针. 以 0.1 g/L 的浓度储存于-80℃ 备用.

1.2.4 原位杂交. 原位杂交实验采用 RNA colour Kit, 冰冻切片经 4%多聚甲醛固定和蛋白酶 K 处理后, 置于预杂交液(50%去离子甲酰胺, 5 × SSC, 120 mg/L 鲑鱼精 DNA)中, 于 55℃ 预杂交 2 h, 将荧光素标记的反义探针以 400 μg/L 的浓度加入预杂交液中, 55℃ 杂交过夜. 2 × SSC 缓冲液中洗涤以除去非特异性结合的探针. 用 0.5%封闭剂室温孵育 1 h, 加入抗荧光素抗体孵育 2 h, 用 NBT/BCIP 显色. 清水终止显色后, 用 Histomount Mounting Solution 封片. 阴性对照是用正义探针代替反义探针进行杂交.

1.2.5 数据统计. RT-PCR、RNA 印迹杂交和原位杂交用不同时期的动物至少取 3 只; RT-PCR、RNA 印迹杂交的扫描结果经 GAPDH 校正后, 各组数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析前, 用 Kolmogorov-Smirnov 对所有的数据进行正态分布检验. 经检验, 原始数据符合正态分布, 无须转换即可用于统计分析, 数据间的差异比较采用 Student's *t* 检验, 差异显著和差异极显著分别以小于 0.05 和 0.01 为标准.

2 结 果

2.1 IGFBP-7' mRNA 的差异表达鉴定

我们曾利用抑制消减杂交(SSH)方法检测到 IGFBP-7'在植入前和植入期差异表达. 为验证这一实验结果, 用 TRIzol 一步法提取了妊娠 D4.5 和 D5.5 大鼠子宫总 RNA 进行 RT-PCR 和 RNA 印迹.

结果显示, 妊娠 D5.5 大鼠子宫 IGFBP-7' mRNA 表达水平显著高于妊娠 D4.5 大鼠子宫 IGFBP-7' mRNA 的表达水平 (***P* < 0.01) (图 1). 这与 SSH 方法检测到的结果完全相吻合, 进一步证实了 IGFBP-7'在植入前和植入期的大鼠子宫中存在差异表达.

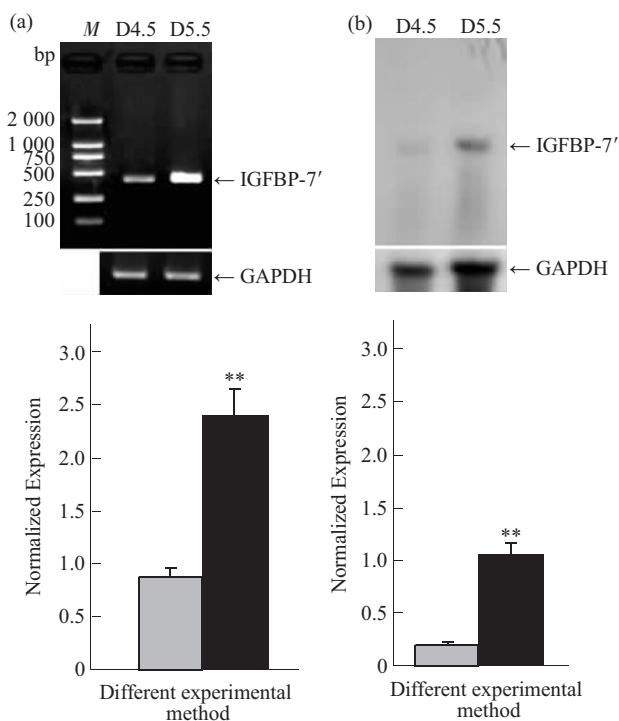


Fig. 1 Confirmation of the expression of IGFBP-7' mRNA by RT-PCR and Northern blot

(a) RT-PCR. (b) Northern blot. M: DNA marker; D4.5: The uterus from the 4.5th day in pregnancy; D5.5: The uterus from the 5.5th day in pregnancy. ***P* < 0.01. □: D4.5; ■: D5.5.

2.2 IGFBP-7' mRNA 在大鼠妊娠早期子宫中的表达

收集妊娠 D1~D6 大鼠子宫, 提取其总 RNA 进行 RT-PCR 和 RNA 印迹. RT-PCR 结果显示, 妊娠 D1~4 子宫 IGFBP-7' mRNA 的表达水平逐渐升高, 妊娠 D5 IGFBP-7' mRNA 的表达水平显著高于妊娠 D1~D4, 在妊娠 D5.5 和 D6 IGFBP-7' mRNA 的表达水平略有下降(图 2 a). RNA 印迹结果显示, 妊娠 D1~D4 子宫 IGFBP-7' mRNA 的表达水平较低, 在妊娠 D5 显著升高, D5.5 达到最高, 妊娠 D6 时有所下降(图 2 b). 这些结果提示了在大鼠妊娠早期 IGFBP-7' mRNA 的表达水平的变化可能与胚胎植入有关.

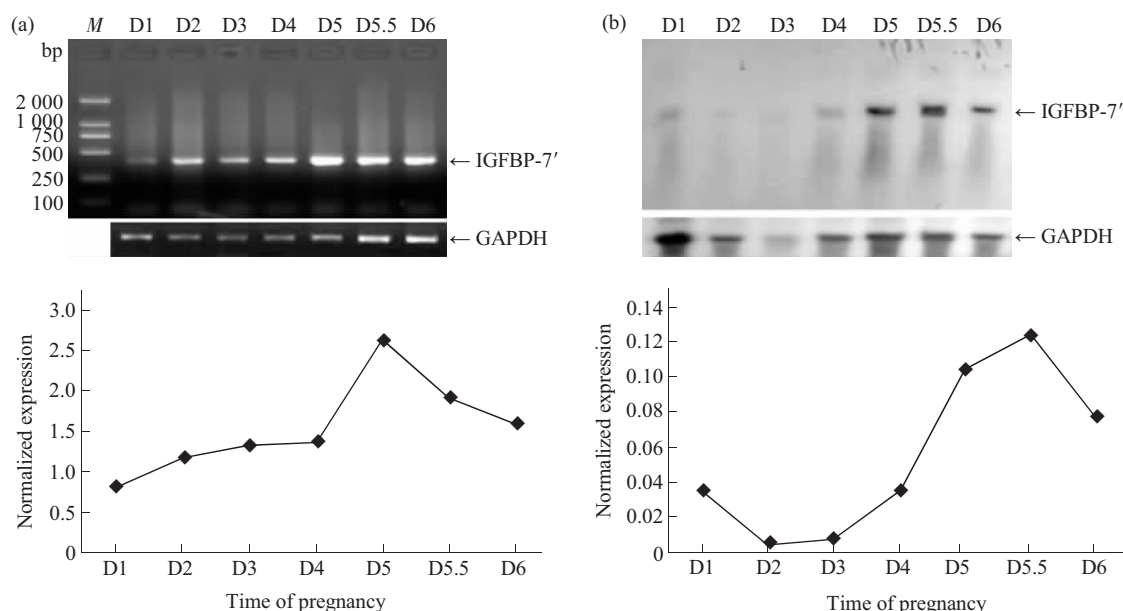


Fig. 2 The expression of IGFBP-7' mRNA in uterus in early pregnancy by RT-PCR and Northern blot

(a) Upper: The expression of IGFBP-7 in uterus in early pregnancy by RT-PCR; Down: Semi-quantitative PCR. (b) Upper: The expression of IGFBP-7 in uterus in early pregnancy by Northern blot; Down: Semi-quantitative. *M*: DNA marker; D1: The uterus from the 1st day in pregnancy; D2: The uterus from the 2nd day in pregnancy; D3: The uterus from the 3rd day in pregnancy; D4: The uterus from the 4th day in pregnancy; D5: The uterus from the 5th day in pregnancy; D5.5: The uterus from the 5.5th day in pregnancy; D6: The uterus from the 6th day in pregnancy.

2.3 IGFBP-7' mRNA 在大鼠假孕、人工诱导蜕膜化和延迟着床激活大鼠子宫中的表达

为了研究在胚胎植入过程中影响 IGFBP-7' 差异变化的因素, 大鼠的假孕、人工诱导蜕膜化和延迟着床激活模型被用来检测 IGFBP-7' mRNA 的表达变化. RT-PCR 结果显示, IGFBP-7' mRNA 的表达水平在大鼠假孕 D1~D6 子宫中没有显著性变化, 且表达水平较低 (图 3 a). IGFBP-7' mRNA 在人工诱导蜕膜化大鼠子宫中与未进行诱导蜕膜化的大鼠子宫中的表达水平很接近, 没有显著性变化 (图 3 b). IGFBP-7' mRNA 在延迟着床激活组大鼠子宫中的表达水平却显著高于未激活组 ($P < 0.05$) (图 3 c). 这些表明, 胚胎从输卵管进入子宫腔可能是诱导 IGFBP-7' mRNA 在植入期高表达的主要因素, 子宫蜕膜化单独并不会显著影响 IGFBP-7' mRNA 的表达水平.

2.4 IGFBP-7' mRNA 在正常大鼠不同组织中的表达

为了研究 IGFBP-7' mRNA 的表达是否具有组织特异性, 收集了正常大鼠的子宫、卵巢、下丘

脑、垂体、心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、大肠和肌肉组织, 提取其总 RNA 进行 RT-PCR, 结果显示, IGFBP-7' mRNA 在这些组织中均有表达, 在卵巢、垂体、脾、肾和大肠表达水平较高, 在子宫、下丘脑、心、肝、小肠和肌肉表达水平较低 (图 4). 这表明 IGFBP-7' mRNA 的表达不具有组织特异性, 但其在不同组织中的表达水平存在差异.

2.5 IGFBP-7' mRNA 在妊娠早期子宫中的定位

为了研究 IGFBP-7' 在大鼠妊娠早期子宫中的分布, 我们用原位杂交的方法检测了在妊娠 D3~D6 大鼠子宫中 IGFBP-7' mRNA 的定位. 在妊娠 D3 和 D4 IGFBP-7' mRNA 主要定位于子宫腔上皮、腺上皮和基质, 但其表达水平很低 (图 5 a 和 b). 从妊娠 D5 开始, IGFBP-7' mRNA 的表达开始增加. 在妊娠 D5 和 D5.5 子宫腔上皮和腺上皮可以检测到 IGFBP-7' mRNA 的强烈表达 (图 5 c 和 d). 在妊娠 D6, IGFBP-7' mRNA 广泛分布于子宫的子宫腔上皮、腺上皮和基质等部位 (图 5 e). 用正义探针代替反义探针进行杂交作为阴性对照, 未见有 IGFBP-7' mRNA 的表达 (图 5 f).

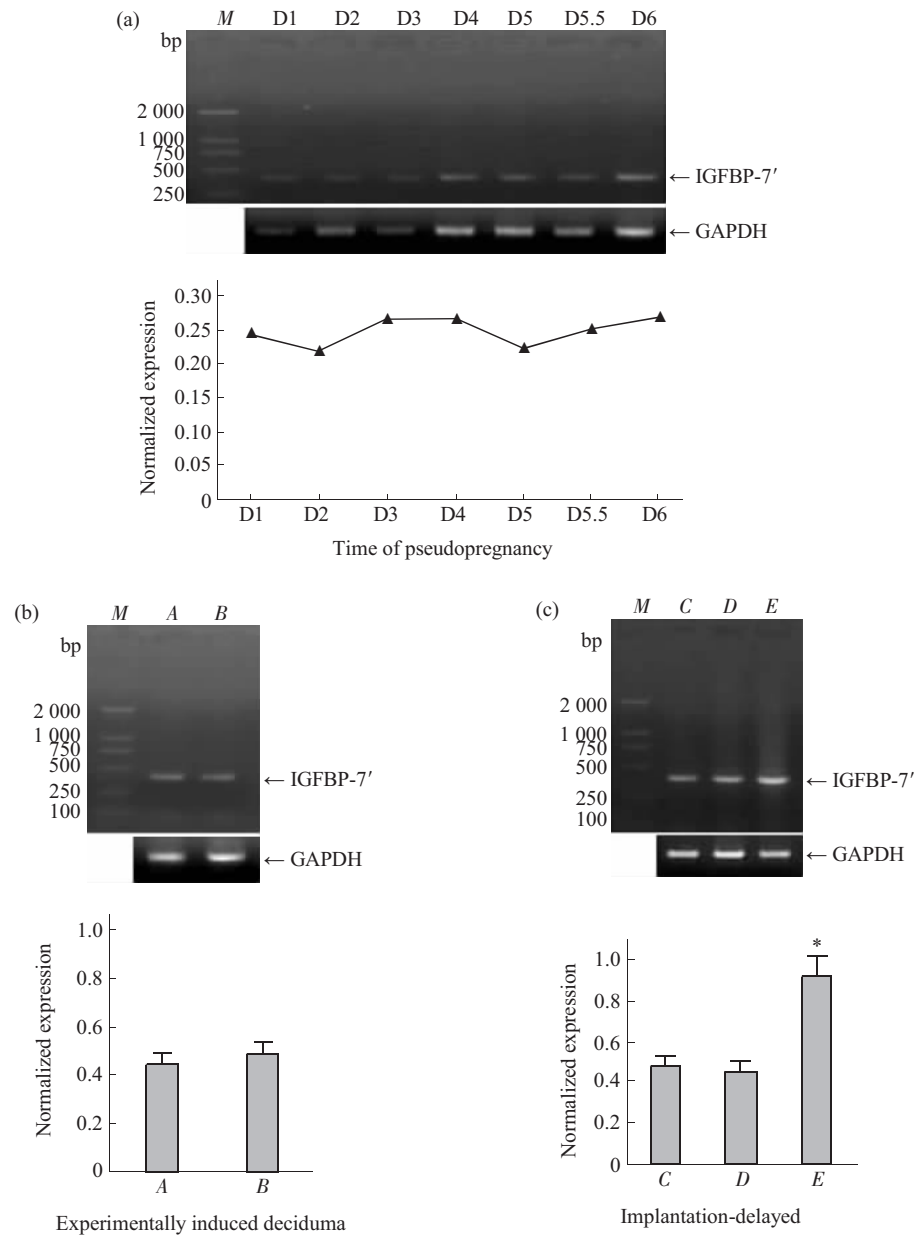


Fig. 3 The expression of IGFBP-7' mRNA in uterus of pseudopregnancy, artificial decidualization and delayed-implantation by RT-PCR

(a) The expression of IGFBP-7' mRNA in uterus of pseudopregnancy. (b) The expression of IGFBP-7' mRNA in uterus artificial decidualization. (c) The expression of IGFBP-7' mRNA in uterus of delayed-implantation. *M*: DNA marker; D1: The uterus from the 1st day in pseudopregnancy; D2: The uterus from the 2nd day in pseudopregnancy; D3: The uterus from the 3rd day in pseudopregnancy; D4: The uterus from the 4th day in pseudopregnancy; D5: The uterus from the 5th day in pseudopregnancy; D5.5: The uterus from the 5.5th day in pseudopregnancy; D6: The uterus from the 6th day in pseudopregnancy. *A*: Oil-infused decidualized uterus horn; *B*: Non-infused decidualized uterus horn; *C*: Injecting oil in D6~D8 of ovariectomy rats. *D*: Injecting progesterone in D6~D8 of ovariectomy rats. *E*: Injecting progesterone in D6~D7 and estrogen in D8 of ovariectomy rats. **P* < 0.05.

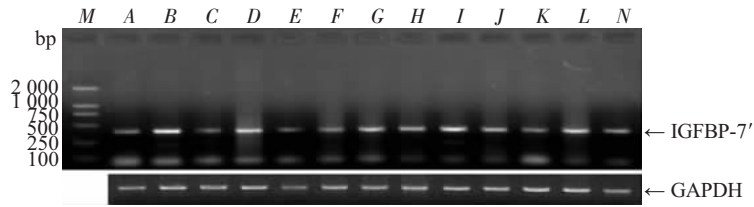


Fig. 4 Multiple tissue expression analysis of IGFBP-7' mRNA by RT-PCR
M: DNA marker; *A*: Uterus; *B*: Ovary; *C*: Hypothalamus; *D*: Pituitary; *E*: Heart; *F*: Liver; *G*: Spleen; *H*: Lung; *I*: Kidney; *J*: Stomach; *K*: Small intestine; *L*: Large intestine; *N*: Skeletal muscle.

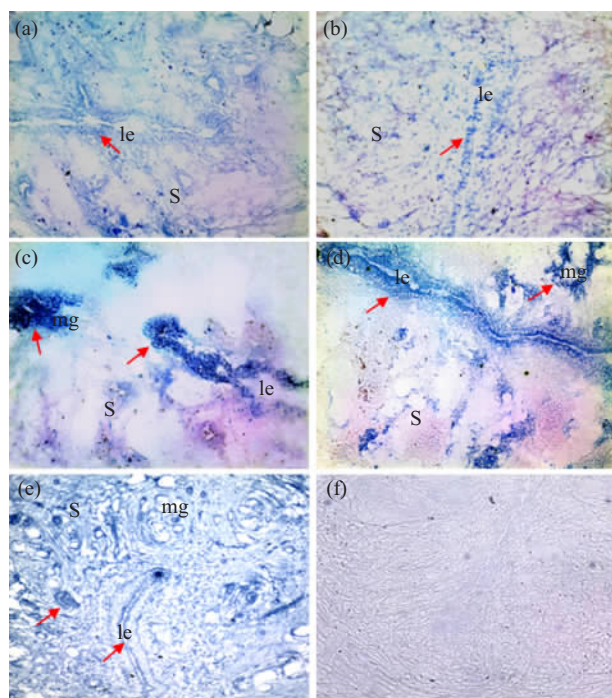


Fig. 5 Localization of IGFBP-7' mRNA in uteri

Localization of IGFBP-7' mRNA in uteri was detected by *in situ* hybridization. (a) The uterus from the 3rd day in pregnancy. (b) The uterus from the 4th day in pregnancy. (c) The uterus from the 5th day in pregnancy. (d) The uterus from the 5.5th day in pregnancy. (e) The uterus from the 6th day in pregnancy. (f) Negative control. Antisense probe was replaced by sense probe. Red arrow indicated the positive staining. mg: Maternal gland; S: Stroma; le: Luminal epithelium. The photographs were shown at $\times 200$ original magnification.

3 讨 论

在人和小鼠中, 已有许多关于 IGFBP-7 在胚胎植入过程中的作用的报道, 但在大鼠中尚未见相关报道. 我们利用抑制消减杂交(SSH)方法^[12]分析了大鼠妊娠 D4 和 D4.5(植入前期)与妊娠 D5.5 和 D6(植入期)的基因表达谱, 发现大鼠的 IGFBP-7' 在植入前期和植入期存在差异表达, 且植入期 IGFBP-7' mRNA 的表达水平显著高于植入前期. Dominguez 等^[13]的研究发现在人子宫中 IGFBP-7 在胎盘接受期较接受前期表达水平上升 35 倍. 我们在大鼠子宫组织中的检测结果与在人子宫中的报道基本一致.

Dominguez 等^[13]利用原位杂交方法检测人子宫中 IGFBP-7 的定位, 结果显示, 其主要定位于子宫上皮和基质部分, 而上调信号主要分布于子宫基质细胞. Degeorges 等^[14]研究 IGFBP-7 在正常人类组织中的分布发现, IGFBP-7 存在于分泌期和增殖期子宫内皮的腺上皮, 而这些时期的基质细胞都呈现

很弱的阳性. 而我们用原位杂交方法检测妊娠大鼠子宫 IGFBP-7' 的定位发现, 其主要定位于子宫腔上皮和腺上皮, 基质中的信号非常弱, 且上调信号也主要分布于子宫腔上皮和腺上皮. 这些显示, IGFBP-7' 在大鼠子宫中表达与正常人类组织子宫中的定位有些相似, 而与妊娠的人子宫组织中的分布存在差异. 这可能是由于物种的差异造成的. 它提示我们在大鼠和人胚胎植入过程中 IGFBP-7 的作用方式可能存在差异.

IGFBP-7 是一个血管内皮细胞中的前列环素刺激分子, 可以刺激血管内皮细胞中的前列环素的产生, 因此控制着血管的通透性^[10], IGFBP-7 可以通过介导内皮细胞与 IV 型胶原的相互作用而促进肿瘤组织中的新血管生成^[15]. IGFBP-7 在大鼠植入期高表达可能与胚泡着床和植入过程中的血管重建和新生有关.

在假孕大鼠子宫中 IGFBP-7' mRNA 的表达没有显著性差异, 且人工诱导蜕膜化也不能促进 IGFBP-7' mRNA 的表达, 但其在延迟着床激活的大鼠子宫中表达显著增加. 这些表明 IGFBP-7' mRNA 在植入期的高表达可能主要受胚胎因素的影响, 而非子宫蜕膜化.

Oh^[16]研究显示, TGF- β 能上调 Hs578T 乳腺癌细胞中 IGFBP-7 的表达, 用杆状病毒载体表达的 IGFBP-7 处理细胞能以剂量依赖的方式抑制 DNA 合成和细胞增生, 即使在 IGF 存在的情况下, 也不能改变这种情况. 这进一步证实了, IGFBP-7 对 IGF 仅有较低的亲和力, 它以非 IGF 依赖的方式调节细胞生长. 胚胎植入与肿瘤的生长有一定的相似性, 在妊娠过程中 IGFBP-7 是否通过 IGF 依赖或非 IGF 依赖的方式影响胚胎植入过程有待于进一步研究.

IGFBP-7 不仅存在于妊娠的大鼠和人的子宫中, 在未妊娠的大鼠和人的很多器官中均有表达. Degeorges 等^[14]研究发现, IGFBP-7 在正常人类组织普遍存在, 如呼吸系统, 输卵管、肾、附睾、平滑肌、膀胱、前列腺和肾上腺等, 但其被限制在一定器官的特定类型细胞中. 我们的研究发现, IGFBP-7' mRNA 在正常大鼠的子宫、卵巢、下丘脑、垂体、心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、大肠和肌肉均有表达, 这表明 IGFBP-7' mRNA 的表达不具有组织特异性. 但它的这种表达方式是否与该基因的功能相关尚有待于深入研究.

从以上结果可见, 大鼠 IGFBP-7' 也是一种与

妊娠相关的分子, 其在植入期高表达, 且这种高表达可能主要受胚胎因素的影响, 子宫蜕膜化的影响较小. IGFBP-7'的表达增加可能对大鼠胚胎植入是有利的. 对 IGFBP-7 的深入研究将有助于阐明 IGF 系统在胚胎植入过程中的作用机理, 为治疗妊娠相关疾病提供新的理论依据.

参 考 文 献

- 1 Baxter R C, Binoux M A, Clemmons D R, *et al.* Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein superfamily. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, **83** (9): 3213
- 2 Salmon W D, Daughaday W H. A hormonally controlled serum which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med*, 1957, **49**: 825~836
- 3 Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R G. Insulin-like growth factor binding proteins: a proposed superfamily. *Acta Paediatr Suppl*, 1999, **88** (428): 37~45
- 4 Crossey P A, Claire C P, Miell J P. Altered placental development and intrauterine growth restriction in IGF binding protein-1 transgenic mice. *J Clin Invest*, 2002, **110**: 411~418
- 5 Irwin J C, Suen L F, Martina N A, *et al.* Role of the IGF system in trophoblast invasion and pre-eclampsia. *Hum Reprod*, 1999, **14** (Suppl 2): 90~96
- 6 Murphy M, Pykett M J, Harnish P, *et al.* Identification and characterization of genes differentially expressed in meningiomas. *Cell Growth Differ*, 1993, **4** (9): 715~722
- 7 Swisshelm K, Ryan K, Tsuchiya K, *et al.* Enhanced expression of an insulin growth factor-like binding protein (mac25) in senescent human mammary epithelial cells and induced expression with retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (10): 4472~4476
- 8 Wilson H M, Birnbaum R S, Poot M, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 inhibits proliferation of MCF-7 breast cancer cells via a senescence-like mechanism. *Cell Growth Differ*, 2002, **13** (5): 205~213
- 9 Sprenger C C, Damon S E, Hwa V, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) is a potential tumor suppressor protein for prostate cancer. *Cancer Res*, 1999, **59**(10): 2370~2375
- 10 Yamauchi T, Umeda F, Masakado M, *et al.* Purification and molecular cloning of prostacyclin-stimulating factor from serum-free conditioned medium of human diploid fibroblast cells. *Biochem J*, 1994, **303** (Pt 2): 591~598
- 11 Nayak N R, Giudice L C. Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders. *Placenta*, 2003, **24**(4): 281~296
- 12 孙敬, 陈宏, 杨颖, 等. 植入前期与分娩前期子宫差别表达基因筛选及表达. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (2): 133~139
- 13 Sun J, Chen H, Yang Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32** (2): 133~139
- 13 Dominguez F, Avila S, Cervero A, *et al.* A combined approach for gene discovery identifies insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1 as a new gene implicated in human endometrial receptivity. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, **88** (4): 1849~1857
- 14 Degeorges A, Wang F, Frierson H F Jr, *et al.* Distribution of IGFBP-rP1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 2000, **48** (6): 747~754
- 15 Akaogi K, Okabe Y, Sato J, *et al.* Specific accumulation of tumor-derived adhesion factor in tumor blood vessels and in capillary tube-like structures of cultured vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (16): 8384~8389
- 16 Oh Y. IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding proteins. *Breast Cancer Res Treat*, 1998, **47** (3): 283~293

The Differential Expression and Regulation of IGFBP-7' in The Process of Embryo Implantation in Rats*

XIA Hong-Fei^{1,2)}, SUN Jing^{1,2)}, YANG Ying¹⁾, PENG Jing-Pian^{1)**}

⁽¹⁾State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

⁽²⁾Graduate University of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract IGFBP-7 plays an important role in the process of human pregnancy. However, it is not found in rats. In previous study, suppression subtractive hybridization (SSH) was utilized to analyse differentially expressed gene between pre-implantation period and implantation period and IGFBP-7 was identified as a gene differentially expressed. Temporo-spatial expression pattern of partial IGFBP-7 cDNA sequence(CDs 531~928 nt, IGFBP-7') in early pregnancy was detected by Northern blot and *in situ* hybridization. RT-PCR was used to analyse IGFBP-7' mRNA expression in multiple tissue and uterus of pseudopregnancy, artificial decidualization and delayed-implantation. Results indicated that IGFBP-7' mRNA expression level began to increase in the day 5 of

pregnancy, the expression level during day 5.5 and 6 is higher than pre-implantation period. IGFBP-7' mRNA was mainly located in luminal epithelium and gland epithelium. The expression of IGFBP-7' mRNA have not tissue-specific and was detected in hypothalamus, pituitary, uterus, ovary, heart, liver, spleen, lung, kidney and so on. The expression of IGFBP-7' mRNA was not significantly different in uterus of pseudopregnancy and artificial decidualization, and significantly increased in the uterus of delayed-implantation. Collectively, these results suggest that IGFBP-7' expression increase is mainly induced by blastocyst, not decidualization during the window of implantation, which may be beneficial to embryo implantation in the early of pregnancy in rats.

Key words IGFBP-7', SD rat, uterus, embryo implantation

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006CB944007, 2006CB504006) and The National Natural Science Foundation of China (30370165).

**Corresponding author . Tel: 86-10-62571277, Fax: 86-10-62565689, E-mail: pengjp@ioz.ac.cn

Received: July 17, 2006 Accepted: November 20, 2006