

植入前期与分娩前期子宫差别 表达基因筛选及表达^{*}

孙敬^{1,2)} 陈宏²⁾ 杨颖¹⁾ 夏红飞¹⁾ 彭景桓^{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⁾西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘要 采用抑制消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH), 以 SD 大鼠为实验材料, 选取妊娠过程中植入前期 (第 5 天, D5) 和分娩前期 (第 19 天, D19) 子宫分别作为驱动方 (driver) 和实验方 (tester), 进行抑制消减杂交, 获得的消减文库经差异筛选得到 70 个阳性克隆. 序列测定和同源对比分析表明, 这些克隆所代表的基因在大鼠基因库中分别与 8 个已知基因有 90%~100% 不等的同源性. 这些基因均差别表达于分娩前期子宫组织中, 其中首次发现尿鸟苷蛋白和干扰素诱导蛋白 16 在 SD 大鼠妊娠子宫中有表达. RT-PCR 及半定量分析显示, 尿鸟苷蛋白基因在妊娠第 19 天子宫中的表达显著高于妊娠第 5 天 ($P < 0.001$), 而干扰素诱导蛋白 16 差异表达不明显. 在妊娠 D6、D9 和 D12 的子宫中尿鸟苷蛋白基因自胚泡植入后其表达逐渐上升, 妊娠 D15 下降, 在妊娠 D19 表达量最高. 结果提示特异表达的尿鸟苷蛋白基因可能与分娩有关.

关键词 SD 大鼠, 抑制消减杂交, 子宫, 差别表达基因, 尿鸟苷蛋白

学科分类号 Q4

妊娠主要包括胚泡的着床、妊娠的维持以及分娩等重要的阶段, 母体子宫基因在时间与空间上的差异表达对于妊娠的正常进行起着关键作用. 已有研究表明^[1], 人子宫内膜在胚泡着床时表达促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH), 该激素可在胚泡植入时加强伴随子宫蜕膜化 Fas 蛋白引起的细胞凋亡, 从而参与胚泡植入有关的侵入过程. 而在这一过程中, 保持细胞增殖与细胞死亡之间的均衡对于胚泡的成功植入以及妊娠的维持至关重要. 当胚泡植入时, 子宫内膜细胞向蜕膜细胞转化, Correia-da-Silva 等^[2]以小鼠为研究对象发现, 在此转化过程中, 增殖细胞细胞核抗原 (PCNA) 高水平表达直至妊娠第 12 天, 以后其表达骤然下降, 而且在这一过程中, 也伴随有其他细胞因子的差别表达, 例如子宫蜕膜细胞表达胰岛素样生长因子结合蛋白 1 (IGFBP-1), 在蜕膜细胞与侵入的胚胎滋养层细胞之间的相互作用中, 调节胰岛素样生长因子 (IGF) 的作用, 而 IGFBP-1 的表达又与转录因子 FKHR 和 HOXA10 的协同作用密不可分, 同时 IGF 又与白细胞介素 1 (IL-1) 相互作用共同调节胚泡的正确植入^[3]. 新近报道表明^[4], 在胚泡围植入期, 表皮生长因子 (EGF) 在妊娠不同时期的子宫中存在时间与空间上的差别表达. 本文以植入前期和分娩前期 SD 大鼠子宫为研究对象, 探讨这两个不同时期

子宫的差别表达基因, 为阐明与分娩有关的分子机理提供资料.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织. 将 SD 雌鼠与 SD 雄鼠合笼交配, 以验栓呈阳性为妊娠第一天, 分别断颈处死妊娠第 5 天和第 19 天 SD 雌鼠, 手术解剖取二者的子宫组织, 取材后于 -70℃ 保存备用.

1.1.2 试剂. TRIzol RNA 提取试剂和 Superscript II 反转录酶购自 Invitrogen 公司; SMART PCR cDNA 合成试剂盒、PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒和 Advantage 2 PCR 试剂盒购自 Clontech 公司; QIA PCR 纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; DH5 α 菌株由本室保存; Tap DNA 聚合酶购自 Promega 公司; 引物由北京奥科公司合成; Hybond N⁺ 尼龙膜和 NICK 纯化柱购自 Pharmacia 公司; [α -³²P]-dCTP 购自北京亚辉公司.

^{*}中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-SW-201) 和自然科学基金资助项目 (30370165).

^{**} 通讯联系人.

Tel: 010-62571277, Fax: 010-62529248

E-mail: pengjp@ioz.ac.cn

收稿日期: 2004-08-24, 接受日期: 2004-10-31

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取. 按照 TRIzol 试剂的说明分别提取妊娠第 5 天和第 19 天 SD 雌鼠的子宫组织总 RNA, 并经纯化后溶于适量灭菌 DEPC 水中, 紫外分光光度计定量, 并取少量电泳检测完整性.

1.2.2 单链 cDNA (sscDNA) 和双链 cDNA (dscDNA) 的合成. 按照 SMART PCR cDNA 合成试剂盒的说明, 将妊娠第 5 天和第 19 天子官组织总 RNA 反转录成 sscDNA. 利用 PCR 方法制备 dscDNA, 反应条件为 95℃ 预变性 1 min, 然后进行循环 95℃ 15 s, 65℃ 30 s, 68℃ 6 min, 总共 23 个循环.

1.2.3 抑制消减杂交 (SSH). 所得 dscDNA 用限制性核酸内切酶 *Rsa* I 37℃ 酶切 3 h, 酶切结束后分别进行正向消减和反向消减. 正向消减过程简述如下: 分别以第 5 天和第 19 天酶切所得的 dscDNA 片段为驱动方(driver)和实验方(tester), 将 tester dscDNA 分成两等分, 分别连接接头 1 和接头 2R, 与变性的 driver dscDNA 片段于 68℃ 杂交 8 h, 第一轮杂交结束后, 立即将二者混合并与新加入的变性 driver dscDNA 片段进行第二次消减杂交. 反向消减则是分别以第 19 天和第 5 天酶切所得的 dscDNA 片段为驱动方(driver)和实验方(tester), 过程同上.

将正向和反向消减产物分别进行两轮 PCR 扩增. 第一轮 PCR 反应是以接头 1 和接头 2R 的外侧序列为引物, 反应条件为 94℃ 预变性 25 s, 而后 94℃ 10 s, 66℃ 30 s, 72℃ 1.5 min, 共 30 个循环; 第二轮 PCR 反应是以接头 1 和接头 2R 的内侧序列为引物(巢式引物), 反应条件为 94℃ 10 s, 68℃ 30 s, 72℃ 1.5 min, 共 12 个循环. 与此同时进行相应的非消减对照 PCR 扩增.

1.2.4 消减效率的分析. 以正向消减杂交的第二轮 PCR 产物和相应的非消减对照的第二轮 PCR 产物为模板, 用 G3PDH 5' 和 3' 引物进行 PCR 反应, 反应条件为 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 68℃ 2 min, 分别在 18、23、28 和 33 个循环结束时取样, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析.

1.2.5 cDNA 消减文库的构建. 将正向消减杂交的第二轮 PCR 产物纯化, 连入 pMD18-T 载体, 将连接反应产物转化感受态 DH5 α 受体菌中, 并接种在 Amp^r/X-gal/IPTG 的 LB 培养板上, 37℃ 培养 14~16 h.

1.2.6 插入片段的 PCR 鉴定. 从培养板上随机挑取 288 个生长良好的白色菌落, 分别接种在三块每孔含有 100 μ l Amp^r LB 培养液的 96 孔板上, 37℃ 振

荡培养过夜. 从每孔中各取 1 μ l 菌液为模板, 用巢式引物进行 PCR 扩增, 反应条件为 95℃ 预变性 1 min, 94℃ 30 s, 68℃ 3 min, 共 23 个循环. 各取 5 μ l PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.7 斑点杂交筛选. 各取 5 μ l 上述 PCR 产物, 加入等体积的 0.6 mol/L NaOH, 混匀变性 5 min, 按照 96 孔板的位置各转移 2 μ l 到 Hybond N⁺ 尼龙膜上, 每张膜上 96 个点, 重复制备两张膜, 紫外交联. 用 [α -³²P]-dCTP 标记经纯化并去除接头的正向和反向消减杂交第二轮 PCR 产物, 再经 NICK 柱纯化后作为探针, 分别与上述膜 68℃ 杂交过夜. 杂交结束后先用 2 $\times$ SSC/0.5% SDS 缓冲液 68℃ 洗 4 次, 每次 20 min, 再用预热的 0.2 $\times$ SSC/0.5% SDS 缓冲液 68℃ 洗 2 次, 每次 20 min, 随后用 X 胶片在 -70℃ 放射自显影过夜.

1.2.8 阳性克隆的测序及同源性比对分析. 取斑点杂交筛选得到的阳性斑点, 从 96 孔板找出对应的克隆, 重新摇菌, PCR 检测为单一克隆后, 送上海博亚公司测序, 将测序结果在 GenBank 大鼠的基因库中利用 BLAST 软件进行序列同源性检索分析.

1.2.9 反转录 PCR. 利用 DNAMAN 软件对新发现的差别表达基因设计引物(表 1), 以不同妊娠时期子宫 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 利用 PCR 方法扩增目的基因. 尿鸟苷蛋白基因: 94℃ 预变性 1 min; 94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 25 个循环; 72℃ 最终延伸 5 min. 干扰素诱导蛋白 16 (interferon-inducible protein 16) 基因: 94℃ 预变性 1 min; 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 25 个循环; 72℃ 最终延伸 5 min. 分别以与目的基因相同的条件同时扩增持家基因 β -actin.

Table 1 Primer sequences

Gene	Primer sequences
Uroguanylin	5' ACACAGCTCACATTCATCAGT GG 3'
	5' ACCATGGCTT CCAAGTCCAG C 3'
Interferon-inducible protein 16	5' GTACGGGGTGACTGAGCTGG 3'
	5' GATGATGCAGATAATGACCATGAG 3'

1.2.10 半定量分析. 以 β -actin 作内参, 以处于妊娠同一时期不同 SD 大鼠子宫为材料, 重复进行 3 次目的基因的 PCR 扩增, 凝胶电泳图目的基因片段经 Quantity One 软件 (Bio-Rad) 扫描后, 所得数据用 SPSS 软件作统计分析.

2 结 果

2.1 总 RNA 的定性分析

对提取的总 RNA 进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳分析,凝胶图像见图 1,实验组和对照组总 RNA 中 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带十分明显,且二者亮度比值大于 1.5,表明提取的 RNA 较为完整,且所测 A_{260} 与 A_{280} 比值大于 1.8,纯度达到实验要求.

2.2 sscDNA 的合成

分别以持家基因 β -actin 和 G3PDH 经 PCR 方法检测 sscDNA 的合成,图 2a 示获得 β -actin 特异条带,图 2b 示获得 G3PDH 特异条带,证实 sscDNA 的合成质量达到实验设计要求.

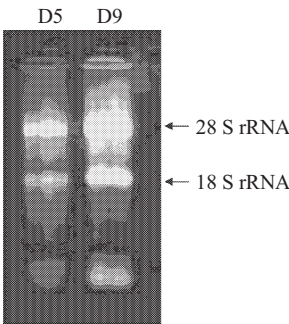


Fig.1 Results of total RNA by agarosegel electrophoresis

D5: Total RNA from uterus on the 5th day in pregnancy;
D19: Total RNA from uterus on the 19th day in pregnancy.

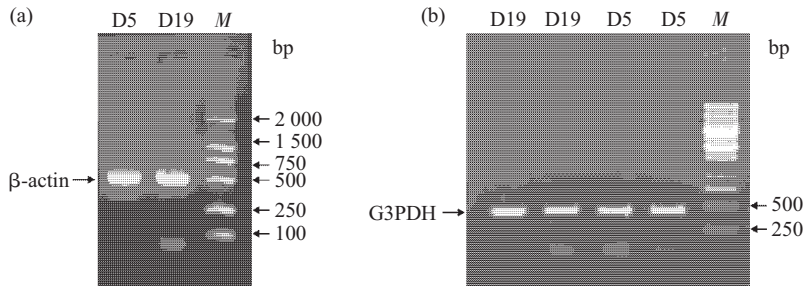


Fig.2 Results of the synthesis of D5 and D19 sscDNA by agarose gel electrophoresis

M: DNA marker.

2.3 抑制消减杂交

由 sscDNA 合成的 dscDNA 经 *Rsa* I 酶切后,弥散状的 dscDNA 群体向低分子质量 DNA 标准处移动,如图 3 中 D5' 和 D19' 所示, D5 和 D19 为未经酶切处理的 dscDNA 对照.

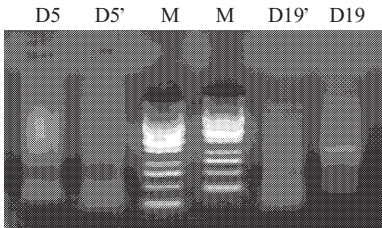


Fig.3 Results of digestion for dscDNA using *Rsa* I by agarose gel electrophoresis

M: DNA marker (1 kb molecular mass); D5: dscDNA from the 5th day in pregnancy; D5': digested dscDNA from the 5th day in pregnancy by *Rsa* I ; D19: dscDNA from the 19th day in pregnancy; D19': digested dscDNA from the 19th day in pregnancy by *Rsa* I .

消减杂交产物和非消减对照经过两轮 PCR 扩增后,二者的扩增产物均为弥散状群体,但前者的

分布区域 (250 ~ 1 000 bp) 明显小于后者 (250 ~ 2 000 bp 以上),结果表明二者的大部分共有基因被消减掉(图 4).

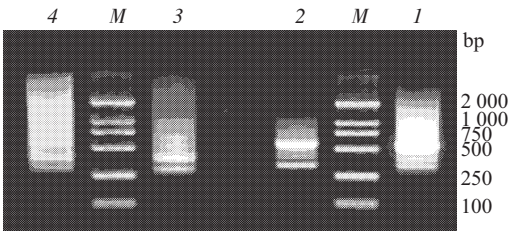


Fig.4 Results of the SSH products amplified with two-round PCR

M: DNA marker; 1: 2nd PCR products of unsubtracted control cDNA of forward subtraction; 2: 2nd PCR products of subtracted cDNA of forward subtraction; 3: 2nd PCR products of subtracted cDNA of reverse subtraction; 4: 2nd PCR products of unsubtracted control cDNA of reverse subtraction.

2.4 消减效率的分析

以正向消减杂交的第二轮 PCR 产物和非消减对照的第二轮 PCR 产物为模板,用 G3PDH 5'和 3'

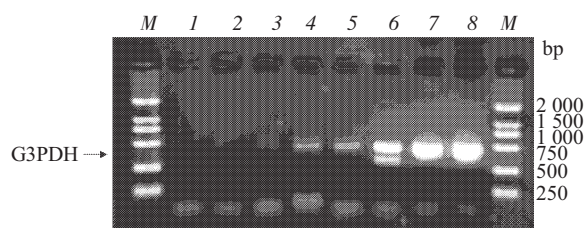


Fig.5 Analysis of the efficiency for SSH PCR amplification of G3PDH was carried out with the subtracted (1~4) or unsubtracted (5~8) products as templates respectively

1,5: 18 cycles; 2,6: 23 cycles; 3,7: 28 cycles; 4,8: 33 cycles; M: DNA marker.

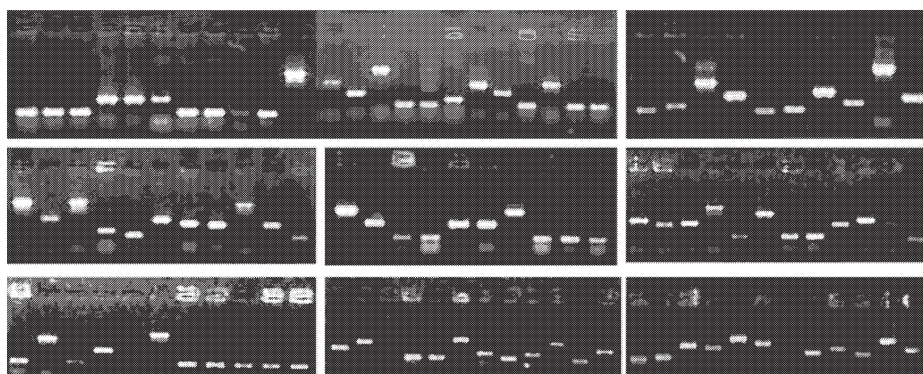


Fig.6 Identification of the inserted cDNA fragments from the forward subtractive library

2.6 斑点杂交

经过 DNA 斑点杂交, 部分结果如图 7 箭头所

示, 仅挑选与正向消减探针有杂交信号, 与反向消减探针无杂交信号的斑点为阳性克隆。

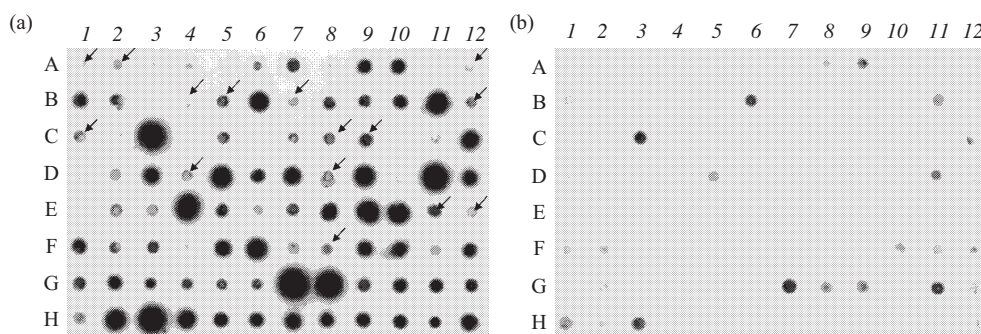


Fig.7 Partial results of differential screening for the forward subtractive library

The left three membranes (a) are hybridized with cDNA probes made from forward subtracted products; the right three membranes (b) that are identical to the corresponding left ones respectively are hybridized with cDNA probes made from reverse subtracted products. Arrows designate the positive clones of differential screening for the forward subtractive library. A total of 70 clones were selected.

2.7 阳性克隆的测序及分析

挑选出的阳性克隆由上海博亚生物技术公司测序, 结果与 GenBank 中大鼠基因库已公布的核酸序列进行同源性比较分析, 所得差别基因分别与 8

个已知基因的同源性在 90% 以上(表 2). 本次实验所获得的这些差别基因表达于分娩前期子宫组织中, 主要包括细胞外基质成分, 如纤连蛋白 (fibronectin)、线粒体内膜蛋白、细胞因子诱导蛋白

Table 2 The results of homology comparison in GenBank

Length /bp	Gene	GenBank No.	Homology /%
111	Fibronectin	X05834	99
339	Cytochrome c oxidase subunit I	AF276850	91
285	Cytochrome c oxidase subunit IV	NM017202	100
307	Interferon-inducible protein 16	AF164040	99
485	Lactoperoxidase	BC061212	90
235	Uroguanylin	U41322	99
474	Ferritin light chain	M73706	98
636	Acetyl-coenzymeA dehydrogenase	NM012819	95

以及参与细胞生化代谢的酶类等. 其中尿鸟苷蛋白和干扰素诱导蛋白 16 在 SD 大鼠妊娠子宫中的表达是首次报道.

2.8 差别基因的表达

PCR 产物经凝胶电泳分析显示尿鸟苷蛋白基因在妊娠第 5 天的子宫中未检测到其表达, 在胚泡植入后即从妊娠第 6 天开始表达, 分娩前期即妊娠第 19 天表达量最高(图 8a). 干扰素诱导蛋白 16 差异表达不明显(图 8b).

统计分析表明尿鸟苷蛋白基因在 SD 大鼠妊娠第 19 天子宫中的表达显著高于妊娠第 5 天($P < 0.001$). 在妊娠 D6、D9 和 D12 的子宫中表达呈现上升趋势, 妊娠 D15 有所下降, 在妊娠 D19 表达量最高(图 9).

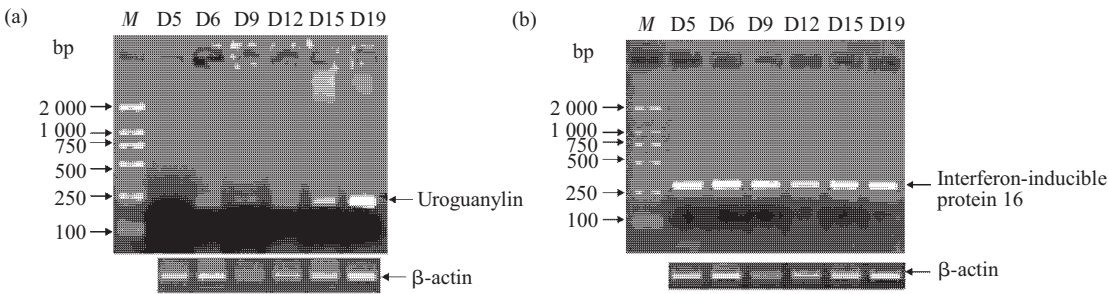


Fig.8 Confirmation of the expression of uroguanylin and interferon-inducible protein 16 by RT-PCR

M: DNA marker; D5: the uterus from the 5th day in pregnancy; D6: the uterus from the 6th day in pregnancy; D9: the uterus from the 9th day in pregnancy; D12: the uterus from the 12th day in pregnancy; D15: the uterus from the 15th day in pregnancy; D19: the uterus from the 19th day in pregnancy.

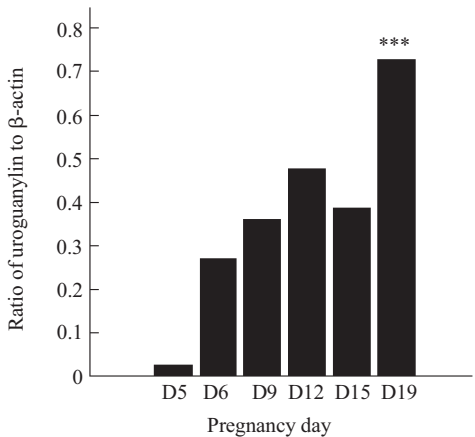


Fig.9 Relative expression of uroguanylin in the uterus of different stage in pregnancy

The expression level of uroguanylin was standardized with β -actin in each sample. *** indicated that the expression of uroguanylin was significantly different in the uterus between D5 and D19 in pregnancy ($P < 0.001$).

3 讨 论

抑制消减杂交是近几年在筛选差别表达基因方面应用较为广泛的一项技术, 该技术通过将两种组织的总 cDNA 进行两次消减杂交, 而后对消减产物进行两次特异的 PCR 扩增, 结果大量富集差别表达基因, 降低了实验中的假阳性率, 这是该技术一个突出的优点, 同时这项技术简便、快捷, 一次实验可获得几十甚至上百个差别表达基因的片段, 从而使该技术成为筛选差别表达基因的有力手段. 科学家利用这项技术已筛选克隆到了一些有重要功能的基因, 如老鼠肝细胞的 AFB1^[5]、马胚胎细胞的 PLA2^[6]、牛角膜上皮细胞的 ICDH 等^[7]基因. 但是从消减文库中挑选菌落由于带有随机性, 不可避免会重复挑取带有相同插入片段质粒的菌落, 结果会降低差别表达基因的筛选效率. 同时一次实验不可能将所有的菌落挑净, 无法避免会漏掉一些差别

表达基因的片段,笔者认为结合使用 SSH 与基因芯片技术可改进这种方法,取得的结果将更有利于提高筛选效率和筛选通量.

在所获得的差别表达基因中,纤连蛋白在胚泡附着到子宫壁上发挥重要的作用,子宫内膜表达纤连蛋白,与暴露于胚泡表面的整合素家族成员 $\alpha 5 \beta 1$ 和 $\alpha V \beta 3$ 相结合,进而激活与整合素相关的信号转导通路,从而介导胚泡的植入^[8].妊娠晚期这种蛋白质的作用有待进一步研究,推测其可能与晚期分娩时母胎界面发生的细胞凋亡有关.

本研究首次报道尿鸟苷蛋白(uroguanylin)在妊娠晚期子宫中表达,编码该蛋白质的基因与编码鸟苷蛋白(guanylin)的基因紧密连锁定位于大鼠第4号染色体上,由全长大约2.4 kb的3个短外显子组成^[9],主要在肠和肾脏中表达.该蛋白质在哺乳动物中主要作为鸟苷酸环化酶(GC-C)的内源性配体^[10],与GC-C相结合,从而激活GC-C,催化第二信使分子cGMP的合成,进而激活与该信号分子有关的信号转导通路.根据已有关于尿鸟苷蛋白作用的研究,以及本实验检测其在妊娠不同时期子宫中特异表达变化的初步结果,推断该蛋白质可能与妊娠终止的信号转导有关.在妊娠维持过程中,尿鸟苷蛋白呈低水平表达.接近分娩期时,该蛋白质表达显著提高,可能导致cGMP水平增加,进而活化了依赖cGMP的激酶(PKG),PKG激活其作用的下游底物,将耐受终止信号转达给相应的蛋白质分子,再作用于有关的靶基因或蛋白质,从而在反转免疫耐受为免疫排斥的过程中发挥作用,为分娩作生理准备.其具体的作用机制和功能尚待进一步的探讨和证实.

干扰素是一类具有广泛生物学功能的细胞因子,其功能主要包括抗病毒、抗肿瘤、免疫调控等,其功能多样性是通过诱导细胞表达多种蛋白质而实现的,这些蛋白质统称为干扰素诱导蛋白.本次实验首次检测到干扰素诱导蛋白16在大鼠妊娠子宫中有表达,Daido等^[11]的研究发现,其蛋白质主要表达于大鼠肾上腺皮质球状带,但该蛋白质在大鼠肾上腺皮质球状带和血管平滑肌细胞中的功能尚未阐明.本文初步研究发现其表达在妊娠不同时期无明显的差异,可能与目前基因表达检测方法的局限性有关,另一种可能是与筛选技术的假阳性有关.

本研究检测到在妊娠晚期子宫中有铁蛋白轻链(ferritin light chain)的表达.Cozzi等^[12]研究发现,

铁蛋白重链和轻链在经TNF α 处理的HeLa细胞中表达增加2倍,其中重链的过表达使凋亡细胞的数量减少一半,而轻链则无此结果,表明重链有抗凋亡作用,Hirose等^[13]的研究发现,在大脑皮层中,衰老与铁蛋白的表达呈正相关,而细胞的衰老是非病理情况下引起细胞发生凋亡的信号,据此我们推测铁蛋白轻链的表达可能与妊娠晚期子宫组织中的细胞凋亡发生有关.同时也有研究^[14]表明,铁蛋白结合蛋白(ferritin binding proteins, FBPs)FBP1和FBP2分别为IgM和IgG,提示在妊娠晚期子宫中,铁蛋白可能与其相应的结合蛋白即免疫球蛋白结合,在妊娠过程中发挥特定的免疫功能.

乙酰辅酶A脱氢酶是一类功能相关的蛋白质家族,由细胞核基因编码,主要功能是在线粒体中催化脂酰辅酶A的C α 处脱下一个质子,C β 处脱下一个带有一对电子的质子,使脂肪酸发生 β 氧化,反应得到的乙酰辅酶A进入线粒体经三羧酸循环可产生大量ATP,为生物机体提供能量.细胞色素c氧化酶亚单位IV是线粒体氧化呼吸链复合体IV成员之一,主要功能是将电子和氢传递给氧生成水以完成呼吸链的生化产能过程.由于二者均涉及能量的产生和供给,它们在妊娠晚期的高表达可能与分娩时子宫发生剧烈运动将胎儿娩出体外时所需大量的能量供给密切相关.

综上所述,妊娠是生殖研究领域中的一个充满奥秘的生理过程.如果我们能够找到参与维持免疫耐受和导致免疫排斥的关键细胞因子或蛋白质,就可利用基因敲除或RNAi等技术将它们的功能加以抑制来达到免疫耐受和免疫排斥的人工转变,这一理论和技术的突破将使我们对于妊娠机理有更深层次的认识,从而为器官移植、同种或异种克隆等研究热点提供理论依据,同时在临床上为治疗一些妊娠疾病如不孕、流产、胎儿畸形等的药物开发提供可作用的靶位点,因而具有重大的理论和实践意义.本文筛选得到的差别表达基因可能在子宫从免疫耐受向免疫排斥的转变过程中起重要作用,尤其首次报道了尿鸟苷蛋白差别表达于分娩前期SD大鼠子宫组织中,提示该基因可能在这个过程中发挥重要的功能,这些结果都将对妊娠过程更深层次的研究提供新的启示.

参考文献

- 1 Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, *et al.* Endometrial and placental CRH as regulators of human embryo implantation. *Journal of Reproductive Immunology*, 2004, **62** (1-2): 53-59

- 2 Correia-da-Silva G, Bell S C, Pringle J H, *et al.* Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. *Placenta*, **25**(6): 538~547
- 3 Fazleabas A T, Kim J J, Strakova Z. Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment. *Placenta*, **25** (Supplement 1): 26~31
- 4 Cai L Q, Zhang J, Duan E K. Dynamic distribution of epidermal growth factor during mouse embryo peri-implantation. *Cytokine*, 2003, **23**(6): 170~178
- 5 Harris A J, Shaddock J G, Manjanatha M G, *et al.* Identification of differentially expressed genes in aflatoxin B1- treated cultured primary rat hepatocytes and Fischer 344 rats. *Carcinogenesis*, 1998, **19** (8): 1451~1458
- 6 Simpson K S, Adams M H, Behrendt-Adam C Y, *et al.* Identification and initial characterization of calcyclin and phospholipase A2 in equine conceptuses. *Mol Reprod Dev*, 1999, **53**(2): 179~187
- 7 Sun L J, Sun T T, Lavker R M. Identification of a cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase that is preferentially expressed in bovine corneal epithelium. *J Biol Chem*, 1999, **274** (24): 17334~17341
- 8 Rout U K, Wang J, Paria B C, *et al.* $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ and the platelet-associated integrin $\alpha IIb\beta 3$ coordinately regulate adhesion and migration of differentiating mouse trophoblast cells. *Developmental Biology*, 2004, **268**(1): 135~151
- 9 Whitaker T L, Steinbrecher K A, Copeland N G, *et al.* The uroguanylin gene (*Guca1b*) is linked to guanylin (*Guca2*) on mouse chromosome 4. *Genomics*, 1997, **45**(2): 348~354
- 10 Hamra F K, Forte L R, Eber S L, *et al.* Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (22): 10464~10468
- 11 Daido H, Zhou M Y, Gomez-Sanchez E P, *et al.* Interferon-inducible genes in the rat adrenal gland and vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, **200** (1~2): 81~87
- 12 Cozzi A, Levi S, Corsi B, *et al.* Role of iron and ferritin in TNF α -induced apoptosis in HeLa cells. *FEBS*, 2003, **537**: 187~192
- 13 Hirose W, Ikematsu K, Tsuda R. Age-associated increases in heme oxygenase-1 and ferritin immunoreactivity in the autopsied brain. *Legal Medicine*, 2003, **5**: 360~366
- 14 Orino K, Ishiji T, Yamamoto S, *et al.* Characterization of bovine serum ferritin-binding proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2004, **137**(2): 375~381

Screening and Expression for Differentially Expressed Genes in The Uterus Before Embryo Implantation and That Before Parturition*

SUN Jing^{1,2)}, CHEN Hong²⁾, YANG Ying¹⁾, XIA Hong-Fei¹⁾, PENG Jing-Pian^{1)**}

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

⁽²⁾College of Animal Science and Technology, North West Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling Shanxi, 712100, China)

Abstract SD rats were applied as experiment materials to screen differentially expressed genes of the uterus in different stage of pregnancy by suppression subtractive hybridization (SSH), in which the uterus from the 5th and the 19th day in pregnancy were respectively used as driver and tester. Seventy positive clones from forward subtractive library are selected by differential screening. Sequencing analysis and homology comparison showed that all these clones are homologous to eight known genes in GenBank by the degree from 90% to 100%. These genes are differentially expressed in the uterus from the 19th day in pregnancy, in which the expression of uroguanylin and interferon-inducible protein 16 in the uterus in pregnancy are reported for the first time. Semi-quantitative analysis showed that the expression of uroguanylin was significantly higher in the uterus of 19th day in pregnancy than that of 5th day ($P < 0.001$), however, there was no difference about the expression of interferon-inducible protein 16. The expression of uroguanylin increased after embryo implantation, decreased on the 15th day and reached the peak on the 19th day in pregnancy. The result suggested that uroguanylin might be concerned with parturition.

Key words SD rat, suppression subtractive hybridization, uterus, differentially expressed genes, uroguanylin

*This work was supported by grants from The Key Innovation Research Programs of The Chinese Academy Sciences (KSCX2-SW-201) and The National Natural Science Foundation of China (30370165).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62571277, Fax: 86-10-62529248, E-mail: pengjp@ioz.ac.cn

Received: August 24, 2004 Accepted: October 31, 2004