

人宫颈黏液 HMGN2 鉴定及在宫颈组织的表达 *

王莉莉^{1)**} 何跃东²⁾ 黄 宁¹⁾ 李 明¹⁾ 熊文碧¹⁾
冯 云¹⁾ 吴 琦¹⁾ 王伯瑶¹⁾ 潘小玲^{2)***}

(¹⁾四川大学华西医学中心基础医学与法医学院感染免疫研究室, 成都 610041; ²⁾四川大学华西第二医院, 成都 610041)

摘要 为探讨人子宫颈黏液的抗菌机制, 采用酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳和反相高压液相色谱技术, 从人子宫颈黏液酸溶性提取物鉴定出对大肠杆菌氨苄青霉素耐药株 ML-35p 有较强的抗菌活性的多肽 HCP-21 和 HCP-26. 蛋白质 N 端氨基酸序列测定和精确质谱分子质量测定证明, HCP-21 为 HMGN2, HCP-26 为 SLPI 片段. 提取原代培养宫颈上皮细胞的总 RNA, 采用 RT-PCR 技术扩增出一条与 HMGN2 cDNA 大小相同(270 bp)目的基因片段, 表明在生理状况下, 宫颈上皮细胞即可表达其 mRNA. 制备 HMGN2 多克隆抗体, 对生理状态下宫颈组织切片和宫颈黏液涂片进行 HMGN2 分子免疫组化分析表明, 该分子主要分布于子宫颈黏膜层, 并存在于子宫颈黏液. HMGN2 分子在宫颈黏膜上皮组织和黏液中固有表达, 可能在子宫颈天然免疫防御中起重要作用.

关键词 女性生殖道, 子宫颈, 抗菌肽, HMGN2

学科分类号 Q786

女性生殖道的解剖生理特点之一是具有比较完善的天然防御功能, 如子宫颈内口紧闭, 宫颈黏液栓的形成. 它们对避免病原体上行性感染, 保持内生殖器无菌环境具有重要作用, 被认为是抵抗病原体进入上生殖道的重要机械和理化屏障^[1].

已有研究表明, 子宫颈黏液对革兰氏阳性菌和阴性菌均具有较广谱的抗菌活性, 并检测到子宫颈黏液含有多种抗菌肽. 目前已经发现的抗菌肽分子包括 α - 防御素 1-3 (HNP1-3)、人 β - 防御素 (HBD1-3)、分泌型白细胞蛋白酶抑制蛋白(secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)^[2]、elafin、溶菌酶及乳铁蛋白等, 它们均参与了子宫颈黏液的抗菌效应^[3,4]. 现有的文献也表明子宫颈黏液也可能存在新的抗菌分子, 本研究从人子宫颈黏液样本中纯化、鉴定抗菌肽, 并检测了其组织分布, 以探讨女性生殖道的抗菌机制.

1 材料和方法

1.1 主要试剂

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TEMED、蛋白质 Marker, 为 Merck 公司产品; Tris、Tricine、脂糖、三氟乙酸、溶菌酶, 为 Sigma 公司产品; 乙

腈, 为 Fisher 公司产品; 水为 Millipore 超纯水; 反应试剂盒 BCA Protein Assay 为 PIERCE 公司产品; 氨银染色试剂及其他试剂均为国产分析纯. PVDF 膜为 Roche Molecular Biochemicals 公司产品, 滤纸为 Whatman 滤纸. 153 培养基为 GIBCO BRL 公司. 脱脂奶粉和 ECL+Plus 显色试剂盒为 Amersham Biosciences 公司产品.

大肠杆菌(*E. coli*)氨苄青霉素耐药株 ML-35p、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、白色念珠菌标准株 ATCC90028, 以上均为本室保存.

1.2 方法

1.2.1 子宫颈黏液酸溶性提取物的制备. 人宫颈黏液取自四川大学华西第二医院妇产科门诊宫颈未见炎性病变患者, 溶于 5% 乙酸中, 匀浆提取酸溶性粗提物, 4℃ 透析 48 h. 冷冻干燥, -70℃ 保存备用.

* 国家自然科学基金资助项目(39800146, 30470763, 30671963)和纽约中华医学会基金(98-681).

** 现工作单位为山东省青岛市市立医院中心实验室, 青岛 266011

*** 通讯联系人.

Tel: 028-85503142, E-mail: panxiaoll@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-10-25, 接受日期: 2007-11-05

1.2.2 子宫颈黏液酸性提取物电泳分析及抗菌活性分析. 参照 Panyim 等^[9]的方法, 对子宫颈黏液酸性提取物进行酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳(acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis, AU-PAGE)分析. 凝胶以中孔为界, 左右两侧上样相同处理样本. 电泳完毕后, 取出凝胶, 切取左侧凝胶, 采用考马斯亮蓝染色显示蛋白质电泳条带, 右侧用电泳凝胶琼脂糖弥散法分析其抑菌活性. 先用 PBS (10 mmol/L, pH 7.4) 震荡洗涤 10 min×3 次, 然后胶置于固态底层培养基(每毫升含 10⁵ 个对数生长期 *E. coli* ML-35P)上, 37℃ 孵育 3 h 后, 弃胶, 再倒入 42℃ 预热顶层培养基于底层培养基上, 室温凝固后 37℃ 孵育过夜, 观察所出现的抑菌带.

1.2.3 子宫颈黏液酸性提取物抗菌组分的制备及 RP-HPLC 分离纯化. 对子宫颈黏液酸性提取物进行制备性 AU-PAGE, 切下相应的抗菌条带 HCP 进行电泳洗脱. 采用反相高压液相色谱(RP-HPLC C18 柱 VYDAC 218TP)对 HCP 进一步分离纯化, 分析条件为^[6]: 0.1% 三氟乙酸→60% 乙腈 0~60 min 线性梯度洗脱, 检测波长 214 nm, 流速 1 ml/min. 收集洗脱液 1 ml/管, 冷冻干燥, 溶于 0.01% 乙酸备用.

1.2.4 HCP-21 和 HCP-26 的抗菌活性鉴定. 用琼脂糖弥散法^[7]测定 HCP-21 和 HCP-26 抗菌活性, 所用菌株为 *E. coli* ML-35p, 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和白色念珠菌 ATCC90028. 底层培养基的制备如前电泳凝胶琼脂糖弥散法所述, 在其上打直径为 3 mm 的圆孔, 各孔内分别加入抗菌分子, HCP-21 加样蛋白含量为 1.2 μg, HCP-26 为 1 μg, 对照溶菌酶含量为 25 μg. 37℃ 孵育 3 h 后, 加顶层培养基 37℃ 孵育过夜, 观察抑菌环大小, 并根据其大小判定其抑菌活性.

1.2.5 HCP-21 和 HCP-26 的相对分子质量测定. 按 Schagger 方法^[8], 进行 Tricine-SDS-PAGE. 浓缩胶浓度 4%、交联度 3%, 分离胶浓度 16.5%、交联度 3%, 胶厚 0.75 mm. 电泳条件: 恒压 80 V, 3~3.5 h. 电泳完毕后, 参照 Wary 方法^[9], 进行氨银染色.

1.2.6 HCP-21 和 HCP-26 的 N 端氨基酸序列测定及质谱分析测定 HCP-21 的精确分子质量. 采用 Edman 降解法对 HCP-21 和 HCP-26 进行 N 端氨基酸序列测定, 由北京大学生命科学学院完成. HCP-21 的精确分子质量采用 MALDI-TOF 源质谱分析仪检测, 由上海基康生物有限公司完成.

1.2.7 子宫颈原代上皮细胞培养并检测其 mRNA 表达. 新鲜组织来源于因子宫肌瘤、子宫内膜异位症行子宫全切无病变的宫颈组织, 由四川大学华西第二医院妇产科提供. 无血清 153 完全培养基培养 7 天后, 提取子宫颈原代上皮细胞总 RNA, 提取步骤按 RNA 纯化试剂盒操作说明进行. 根据 GenBank HMGN2 cDNA 序列(登录号为 X96735)设计特异引物: P1 5' AAC GGA TCC TTT GCC CTG CTG, P2 5' CCA GGA TCC GGC ACA CAC TAG. RT-PCR 反应条件如下: 42℃ 保温 50 min, 使 mRNA 逆转录为 cDNA, 95℃ 预变性 2 min, 然后进行 30 个 PCR 循环(94℃ 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s), 最后 72℃ 继续延伸 7 min.

1.2.8 重组蛋白质 GST-HMGN2 的诱导表达及其蛋白质的分离. 重组载体构建按常规方法进行, 使用原核载体 pGEX-1λT. 利用 ÄKTA Primer 低压色谱谷胱甘肽转移酶亲和层析柱(GSTrap FF)纯化重组融合蛋白 GST-HMGN2. 用凝血酶进行酶切(酶切条件 37℃, 6 h) GST-HMGN2, 其后用 RP-HPLC 收集分离纯化酶切产物, Tricine-SDS-PAGE 鉴定.

1.2.9 免疫新西兰大白兔制备抗血清及其纯化.

用纯化的融合蛋白 GST-HMGN2 常规免疫新西兰大白兔, 每次免疫剂量为 500 μg, 溶于 500 μl 生理盐水中, 首次与完全福氏佐剂等体积充分振荡混匀后, 对新西兰大白兔(雄性, 2.7 kg)颈后部进行皮内多点注射. 2 周后用相同抗原剂量与等体积福氏不完全佐剂充分振荡混匀后, 多点加强免疫, 共免疫 2 次. 第 4 次免疫用抗原 300 μg(不加佐剂), 从兔耳缘静脉免疫. 7 天后常规动脉放血, 制备抗血清^[10].

抗血清的纯化: 采用正辛酸-硫酸铵分步沉淀法纯化抗血清^[11].

抗血清的抗体滴度测定: 采用间接酶联免疫吸附测定法检测, 按常规操作.

抗血清的抗体特异性检测: 采用 Western blot 检测抗体特异性. 将正常和炎症状态下的子宫颈黏液中 HMGN2 分子分别纯化鉴定后, 进行 Tricine-SDS-PAGE, 对凝胶进行半干转移, 将 HMGN2 分子从凝胶转移至 PVDF 膜上. 5%BSA 封闭膜 1~2 h, 其后加入纯化后的多克隆抗体, 4℃ 孵育过夜. TBST 洗涤 3 次, 加羊抗兔 IgG-HRP 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 化学发光法检测结果.

1.2.10 免疫组化检测. 宫颈上皮组织、宫颈黏液直接涂片与宫颈黏液石蜡包埋切片采用 LsAB^[12]法

行免疫组化染色，阴性对照由免疫前的兔血清取代 HMGN2 多抗。

2 结 果

2.1 子宫颈黏液酸溶性提取物抗菌活性分析

子宫颈黏液酸溶性提取物经 AU-PAGE 分析显示有一含阳离子较强的区带，命名为 HCP(human cervical protein)(图 1a)。电泳琼脂糖弥散法显示，HCP 对应位置对 *E. coli* ML-35P 有明显抑菌透明带(图 1b)。

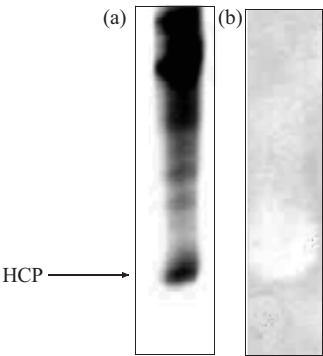


Fig. 1 Antibacterial activity assay of acid-soluble extracts of human cervical mucus by gel overlay technique (a) AU-PAGE stained by coomassie blue R250. (b) Gel overlay assay.

2.2 子宫颈黏液酸溶性提取物 HCP 的 RP-HPLC 分离

由图 2 可知，主要色谱峰集中在 20~40 min. 箭头所示分别为第 21 min 和 26 min 收集单峰，并有较强抑菌活性(图 3)。

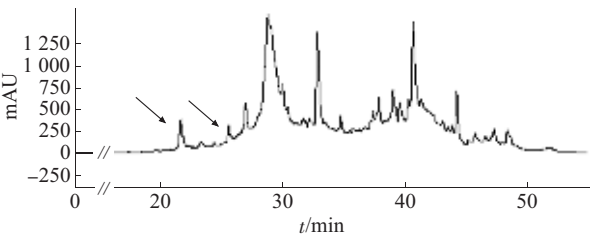


Fig. 2 RP-HPLC profile of HCP Arrows indicate antimicrobial fractions of HCP-21 and HCP-26.

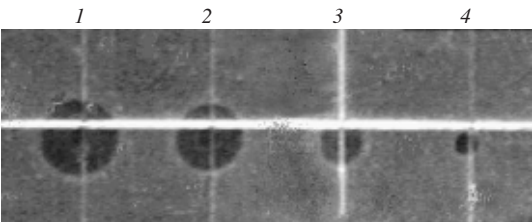


Fig. 3 Antibacterial activity against *E. coli* ML-35p of HCP 1: lysozyme; 2: HCP-21; 3: HCP-26; 4: 0.01% acetic acid.

2.3 HCP 各收集组分抑菌活性分析

琼脂糖弥散抑菌实验显示，RP-HPLC 收集的第 21 min 和第 26 min 洗脱组分对 *E. coli* ML-35p 均有明显的抑菌效应(图 3)，而对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和白色念珠菌 ATCC90028 未见抑菌效应(图未列出)。我们将组分 21 命名为 HCP-21，组分 26 命名为 HCP-26。

2.4 HCP 纯化组分的相对分子质量测定

图 4 显示 HCP-21 和 HCP-26 行 Tricine-SDS-PAGE 后银染染色分析结果，可见其均为纯化的单一条带。其中 HCP-21 表观分子质量位于 14 ku 左右的区域，HCP-26 分子质量位于 12 ku 左右的区域。

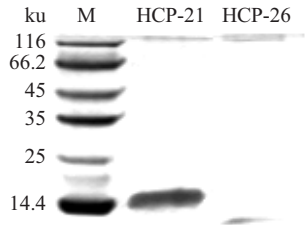


Fig. 4 HCP Tricine-SDS-PAGE silver stained

2.5 HCP 纯化分子的测序分析结果

HCP-21 分子 N 端前 10 个氨基酸序列依次为：脯氨酸，赖氨酸，精氨酸，赖氨酸，丙氨酸，谷氨酸，甘氨酸，天冬氨酸，丙氨酸，赖氨酸。经基因库 BLAST 检索，其 N 端氨基酸序列与 HMGN2 N 端第 2~11 个氨基酸序列完全相同，未见与其他蛋白质同源。

HCP-26 分子 N 端前 10 个氨基酸序列依次为：丝氨酸，甘氨酸，赖氨酸，丝氨酸，苯丙氨酸，赖氨酸，丙氨酸，甘氨酸，缬氨酸，半胱氨酸。经基因库 BLAST 检索，其 N 端氨基酸序列与 SLPI N 端第 26~35 个氨基酸序列完全相同，亦未见与其他蛋白质同源。

2.6 HCP-21 质谱分析结果

HCP-21 质谱结果显示(图 5)：HCP-21 的精确分子质量为 9 263.62 u，与文献报道 HMGN2 分子质量相同^[13]。

2.7 宫颈原代上皮细胞 RT-PCR 结果

宫颈原代上皮细胞 RNA 经 RT-PCR 合成 cDNA 第一条链，PCR 扩增出一条约 270 bp 左右

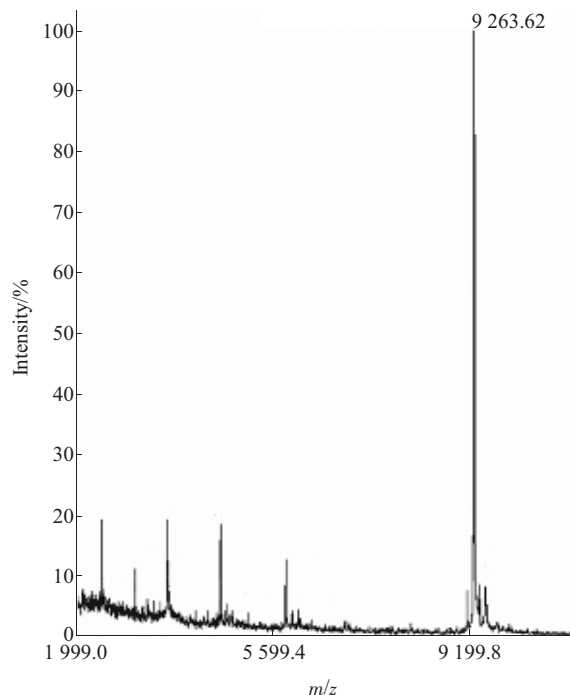


Fig. 5 Mass spectrometry detection of HCP-21

的目的基因 DNA 片段(图 6), 与预计 HMGN2 扩增片段大小相符, 对照组则无基因片段产生。

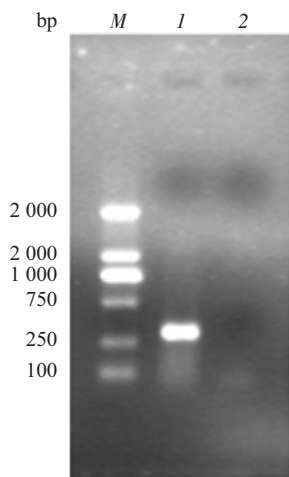


Fig. 6 RT-PCR amplification of HMGN2 cDNA fragment
I: HMGN2 cDNA; 2: Negative control; M: Marker.

2.8 融合蛋白 GST-HMGN2 鉴定及抗血清效价的测定

经亲和层析后获得纯化的融合蛋白 GST-

HMGN2 分子质量约为 35 ku. 经凝血酶切割后产生的重组 HMGN2 分子质量约 9 ku, 与 HMGN2 蛋白分子大小相符(图未列出)。

取末次加强免疫第 7 天血清, 经正辛酸 - 硫酸铵分步沉淀法纯化出 IgG, 采用间接 ELISA 法测定抗血清的效价, 免疫前的新西兰大白兔血清为阴性对照。结果显示免疫前的兔血清对融合蛋白质 GST-HMGN2、HMGN2 蛋白均没有反应, 而末次免疫后的抗血清对融合蛋白 GST-HMGN2 的滴度达 1 : 12 800, 对 HMGN2 的滴度达到 1 : 3 200. GST 蛋白是血吸虫蛋白抗原 Sj26, 与人体内的 GST 有较远的亲源关系, 因此通过 GST 融合蛋白制备的抗血清就与正常人体内的 GST 没有交叉反应, 避免了人体内 GST 的干扰^[4]。

2.9 GST-HMGN2 抗血清特异性分析结果

正常和炎症子宫颈黏液的临床标本分别纯化出的 HMGN2 分子进行 Tricine-SDS-PAGE, 氨银染色显示 HMGN2 表观分子质量约 14 ku 左右(图 7a)。Western blot 后的 PVDF 膜经 ECL 化学发光显色, 在 HMGN2 相应区域出现亮白色阳性条带(图 7b)。因此纯化的抗血清可以分别有效地跟正常和炎症子宫颈黏液的临床标本纯化出的 HMGN2 分子相结合。

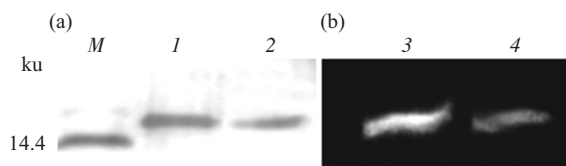


Fig. 7 Western blot analysis of HMGN2

(a) Tricine-SDS-PAGE. (b) Western blot. I and 3: HMGN2 isolated from inflammatory cervical mucus; 2 and 4: HMGN2 isolated from normal cervical mucus.

2.10 子宫颈上皮组织和宫颈黏液的免疫组化结果

子宫颈上皮组织、宫颈黏液直接涂片与宫颈黏液栓石蜡包埋切片行免疫组化染色(图 8), 结果显示: 光镜下子宫颈上皮组织整个上皮层被染成黄褐色, 少数间质细胞也被染成黄褐色, 子宫颈黏液被均染成黄褐色。阴性对照的相应区域仍为淡蓝色。HE 染色见正常组织、宫颈黏液和胞浆被染成淡红色, 细胞核被染成淡蓝色。

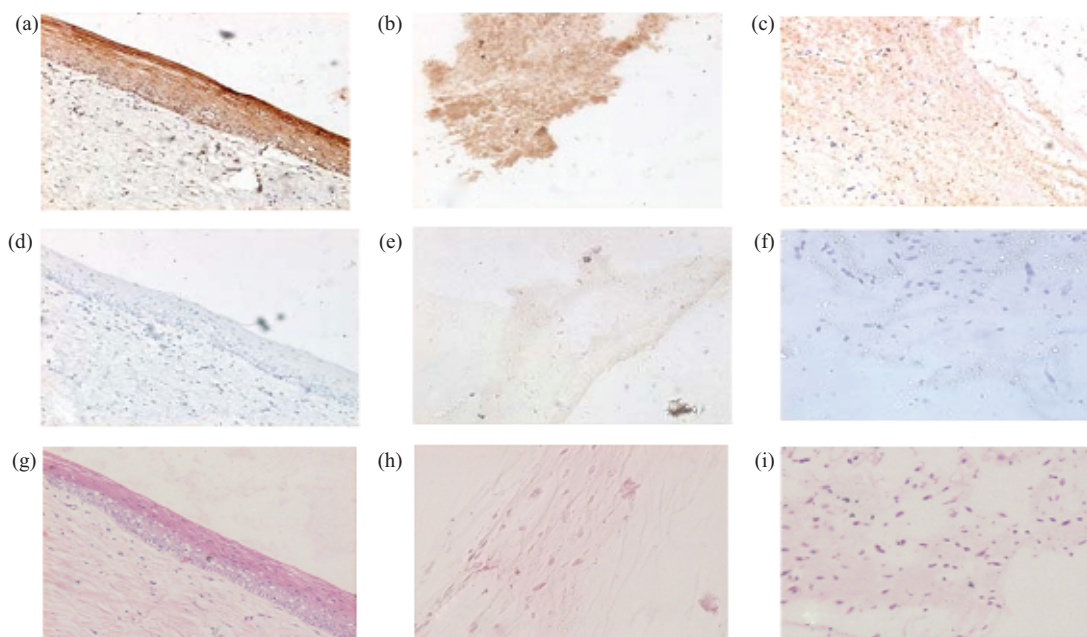


Fig. 8 Immunohistochemistry of cervical epithelial tissue and cervical mucus ($\times 100$)

(a) Cervical epithelial tissue. (b) Cervical mucus. (c) Cervical mucus plug. (d)~(f) Negative control. (g)~(i) HE staining.

3 讨 论

本研究通过制备酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳及反相高压液相色谱等技术手段从子宫颈黏液分离纯化出抗菌肽分子 HCP-21, 经 N 端氨基酸测序分析并进行基因库 BLAST 检索, 发现其 N 端前 10 个氨基酸序列与 HMGN2 N 端第 2~11 个氨基酸序列完全一致. 质谱分析其精确分子质量为 9263.62 u, 与文献报道 HMGN2 分子质量完全一致. 此外, 本室另有研究表明^[15], 通过已知氨基酸序列, 利用简并 PCR 技术, 克隆到了 HMGN2 cDNA, 以上实验充分证明了我们纯化的分子是 HMGN2.

HMGN2 属于高迁移率蛋白(high mobility group chromosomal protein, HMG)三大家族成员分子之一, 也是一种进化保守的, 在脊椎动物和非脊椎动物的细胞核中含量最为丰富的非组蛋白分子^[16]. 其基因位于染色体 1p35, 含 90 个氨基酸残基, 分子质量约为 9 200 u. HMGN2 生物学功能尚未完全研究清楚, 比较肯定的是它可能涉及到 DNA 分子构型的维持、基因的转录与活化^[17].

Polito^[18]报道, HMGN2 的缺失可能与子宫肌瘤发生发展有关. 其新的生物学功能正在不断探索之中, 新近有学者在成年雌性虹鳟鱼的脊背表皮

分泌物纯化出一分子质量为 67 ku 的小分子抗菌肽, 经鉴定为非组蛋白 H6 片段(onorhynchin III). 此抗菌肽对部分革兰氏阴性菌和阳性菌均有较强的抑菌活性, 并与 HMGN2 有较高的同源性^[19]. 我们从人子宫颈黏液中分离出的完整的 HMGN2 分子, 对 *E. coli* ML-35p 有较强的抑菌作用, 而对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和白色念珠菌 ATCC90028 无效. 我室用 PET 质粒在大肠杆菌表达的重组 HMGN2 融合蛋白也显示除对多株革兰氏阴性菌有抗菌活性外, 同样对白色念珠菌等无效.

HMGN2 分子普遍存在于真核细胞. Hock^[20]报道, HMGN2 与核的结合呈动态性, 在不同的细胞周期可出现在细胞核、细胞浆、或分泌至细胞外. 本研究从生理状况下的人子宫颈黏液中分离出了 HMGN2 分子, 子宫颈黏液涂片免疫组化也证明含有 HMGN2 分子. 因此我们推测生理状况下子宫颈黏液中的 HMGN2 分子有可能来源于子宫颈上皮细胞. 本研究对原代培养的子宫颈上皮细胞 HMGN2 分子的 mRNA 表达进行了检测, RT-PCR 结果显示, 正常的人子宫颈上皮细胞可表达 HMGN2 mRNA 分子. 在正常宫颈组织切片免疫组化可见, 其阳性信号主要集中在黏膜表层. 我室熊文碧博士在人子宫颈上皮的 HeLa 细胞的培养上清中, 用 ELISA 方法也检测到重组 HMGN2 分子存在. 所以

子宫颈上皮细胞有可能主动分泌了 HMGN2 分子, 以行使其抗菌功能^[21].

黏膜上皮细胞抗菌肽具有固有或诱导表达的特点^[22]. 本研究在非炎症临床子宫颈标本中发现有 HMGN2 分子存在, 为此我们制备了 HMGN2 的多克隆抗体, 经血清 ELISA 效价检测和 Western blot 特异性检测, 表明该抗体可有效地与炎症和非炎症状态下的 HMGN2 分子结合. 然而在炎症状态下机体是否会诱导 HMGN2 表达增加, 仍需要进一步证实.

此外, Casslen 等^[23]在 1987 年就在子宫和子宫颈组织的活检标本中检测到 SLPI, 随后在子宫颈黏液中也发现有 SLPI 存在^[24]. 本实验中, 在反相高压液相色谱保留时间为 26 min 的分子 HCP-26 其分子质量约 12 ku 左右. 经 N 端氨基酸序列测定及 GeneBank BLAST 检索, 其 N 端前 10 个氨基酸残基与 SLPI N 端第 26~35 的氨基酸残基完全相同.

SLPI 的分子质量为 117 ku, 由 107 个氨基酸组成, 包含 2 个结构域, 一般认为来源于黏膜下腺的浆液细胞. SLPI 可以抑制人中性粒细胞弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G、胰岛素、糜蛋白酶、胃促胰酶的活性. 同时, SLPI 还是小分子阳离子抗菌肽, 对革兰氏阳性菌、阴性菌、真菌、逆转录病毒等有较弱但广谱的抗微生物活性^[25], 其抗菌活性依赖于其分子降解所产生的特定片段^[26]. 我们的实验表明子宫颈黏液中确有该分子存在, 并对革兰氏阴性菌有抑菌作用.

子宫颈黏液中存在多种抗菌肽和蛋白质分子, 这可能与它们具有不同的优势抗菌谱有关, 比如溶菌酶主要针对革兰氏阳性菌, 而 β 防御素 -1 主要针对革兰氏阴性菌. 多种抗菌分子可以产生协同抗菌作用, 以对不同抗微生物感染. 随新的抗菌肽分子的发现及抗菌机理研究的深入, 子宫颈作为女性生殖道一特殊解剖结构, 其抗菌屏障的分子机理将逐步得到阐明.

参 考 文 献

- Hein M, Helmig R B, Schonheyder H C, *et al.* An *in vitro* study of antibacterial properties of the cervical mucus plug in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, **185**(3): 586~592
- Helmig R, Uldbjerg N, Ohlsson K. Secretory leukocyte protease inhibitor in the cervical mucus and in the fetal membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1995, **59**: 95~101
- Hein M, Valore E V, Helmig R B, *et al.* Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am J Obstet Gynecol*, 2002, **187**(1): 137~144
- Ganz T. Antimicrobial proteins and peptides in host defense. *Semin Respir Infect*, 2001, **16**(1): 4~10
- Panyim S, Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histone. *Arch Biochem Biophys*, 1969, **130**(1): 337~346
- 奥斯伯•F. 精编分子生物学实验指南. 颜子疑, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998. 388~390
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. Translated by Yan Z Y, Wang H L. Beijing: Science Press, 1998. 388~390
- Lehrer R I, Rosenman M, Harwig S S L, *et al.* Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial peptides. *J Immuno Meth*, 1991, **137**(2): 167~173
- Schagger M P, Von Jagow G. Ticine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1~100 Kda. *Anal Biochem*, 1987, **166**(2): 368~379
- Wary W I, Morrissey J H, Merrill C R, *et al.* Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1981, **118**(1): 197~203
- 董志伟, 王 炎主编, 抗体工程. 第二版. 北京: 北京医科大学出版社, 2002. 264~270
- Dong Z W, Wang Y. Antibody Engineering. 2nd. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical University Press. 2002. 264~270
- Mckinney M M, Parkinson A. A simple no-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascitic fluid. *J Immunol Methods*, 1987, **96**(2): 271~278
- Li X Q, Hisaoka M, Hashimoto H. Expression of estrogen receptors alpha and beta in soft tissue sarcomas: Immunohistochemical and molecular analysis. *Pathol Int*, 2003, **53**(10): 671~679
- Louie D F, Gloor K K, Galasinski S C, *et al.* Phosphorylation and subcellular redistribution of high mobility group proteins 14 and 17, analyzed by mass spectrometry. *Protein Sci*, 2000, **9**(1): 170~179
- Takemura H, Kaku M, Kohno S, *et al.* Cloning and expression of human defensin HNP-1 genomic DNA in *Eschericia coli*. *J Microbio Methods*, 1996, **25**(3): 287~293
- 李明, 潘小玲, 王莉莉, 等. 人宫颈黏液抗菌机制的研究: 抗菌多肽的分离鉴定. *中华医学杂志*, 2005, **85**(16): 1~3
- Li M, Pan X L, Wang L L, *et al.* National Medical Journal of China, 2005, **85**(16): 1~3
- Bustin M, Reeves R. High mobility group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1996, **54**: 35~100
- Crippa M P, Trieschmann L, Alfonso P J, *et al.* Deposition of chromosomal protein HMG-17 during replication affects the nucleosomal ladder and transcriptional potential of nascent chromatin. *EMBO J*, 1993, **12**: 3855~3864
- Polito P, Dal C P, Kazmierczak B, *et al.* Deletion of HMG17 in uterine leiomyomas with ring chromosome 1. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999, **108**(2): 107~109
- Fernandes J M, Saint N, Kemp G D, *et al.* Oncorhynchin III: a potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem J*, 2003, **373**(Pt 2): 621~628
- Hock R, Wilde F, Scheer U, *et al.* Dynamic relocation of chromosomal protein HMG-17 in the nucleus is dependent on

- transcriptional activity. *EMBO J*, 1998, **17**(23): 6992~7001
- 21 熊文碧, 冯云, 王国兴, 等. 重组人 HMGN2 多克隆抗体的制备及应用. *四川大学学报(医学版)*, 2005, **36**(4): 451~455
Xiong W B, Feng Y, Wang G X, *et al.* *Journal of Sichuan University (Medical Sciences Edition)*, 2005, **36**(4): 451~455
 - 22 Valore E V, Park C H, Quayle A J, *et al.* Human β -defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*, 1998, **101**(8): 1633~1642
 - 23 Casslen B, Rosengren M, Ohlsson K, *et al.* Localization and quantitation of a low molecular weight proteinase inhibitor, antileukoprotease, in the human uterus. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1981, **362**(7): 953~961
 - 24 Helmig R, Uldbjerg N, Ohlsson K. Secretory leukocyte protease-inhibitor in the cervical mucus and in the fetal membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1995, **59**(1): 95~101
 - 25 Sallenave J M, Schulmann J, Crosley J, *et al.* Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1994, **11**(6): 733~741
 - 26 King A E, Fleming D C, Critchley H O. Regulation of natural antibiotic expression by inflammatory mediators and mimics of infection in human endometrial epithelial cells. *Mol Hum Reprod*, 2002, **8**(4): 341~349

Characterization of HMGN2 in Human Cervical Mucus and Studying Its Expression in Cervical Tissue*

WANG Li-Li^{1)**}, HE Yue-Dong²⁾, HUANG Ning¹⁾, LI Ming¹⁾, XIONG Wen-Bi¹⁾,
FENG Yun¹⁾, WU Qi¹⁾, WANG Bo-Yao¹⁾, PAN Xiao-Ling^{2)***}

¹⁾Research Unit of Infection and Immunity of West China Medical Central of Sichuan University, Chengdu 610041, China;

²⁾West China Second Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract To explore the antimicrobial mechanism of human cervical mucus, HCP-21 and HCP-26 were isolated and purified from acid-soluble extracts of human cervical mucus by acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Both molecules could effectively kill *E. coli* ML-35p determined by agarose radial diffusion assay. The N-terminal amino acid sequence of HCP-21 was PKRKAEGDAK and its molecular mass was 9 263.62 identified by amino acid sequencing and mass spectrometry analysis. HCP-21 showed 100% identity to HMGN2 (high mobility group protein N2, HMGN2) fragment 2~11 by GenBank BLAST searching, and had the same molecular mass as HMGN2. So it was certain that HCP-21 was HMGN2. HCP-26 was SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI) fragment by N-terminal amino acid sequencing which was SGKSFKAGVC. It was the same with SLPI fragment 26~35 by GenBank BLAST searching. Total RNA was extracted from primary culture cervical epithelial cells, and the specific primer was designed based on HMGN2 cDNA sequence. RT-PCR showed that a fragment about 270 bp was amplified, which was same to HMGN2 cDNA. It was suggested that cervical epithelial cells could express HMGN2 mRNA in physiological condition. The fusion protein GST-HMGN2 was purified by low-pressure chromatography. The antiserum of HMGN2 was prepared from the immune rabbit with the fusion protein. Cervical tissue paraffin section and cervical mucus smear were detected by immunohistochemistry. The staining results showed that HMGN2 mainly distributed in mucosa surface of cervix and existed in cervical mucus. HMGN2 constitutively expressed in cervical mucosa and mucus, so it might play an important role in innate defensive of cervical.

Key words female reproductive duct, cervix, antimicrobial peptides, HMGN2

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39800146, 30470763, 30671963) and The China Medical Board of New York Inc(96-681).

**Now working at Central laboratory of Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011

***Corresponding author.

Tel: 86-28-85503142, E-mail: panxiaoli@yahoo.com.cn

Received: October 25, 2007 Accepted: November 5, 2007