

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)基因抑制小鼠子宫基质细胞的蜕膜化*

张晋平 罗文萍 张 倩 彭洪英 谭冬梅 王应雄 谭 毅**

(重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016)

摘要 为了观察肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)基因对体外培养的小鼠蜕膜基质细胞增殖及凋亡的作用, 探讨 TRAIL 对小鼠子宫蜕膜化进程的影响, 构建 TRAIL 过表达及干扰质粒, 转染小鼠基质细胞后诱导蜕膜化发生. 转染 72 h 后, 应用半定量 RT-PCR 和 Western blotting 检测蜕膜基质细胞中 TRAIL mRNA 和蛋白质的表达情况、MTT 法观察蜕膜基质细胞的生长和增殖能力、流式细胞术检测蜕膜基质细胞的细胞周期分布情况和凋亡率. 经酶切和核苷酸测序证实, TRAIL 基因正确克隆入真核表达载体且能够上调 TRAIL 的表达, 干扰质粒能有效地抑制 TRAIL 基因的表达. TRAIL 过表达和 RNA 干扰的结果表明: TRAIL 具有将蜕膜基质细胞阻滞在 G0/G1 期、抑制蜕膜基质细胞增殖并促使其凋亡的功效, 提示 TRAIL 可能参与调节胚胎植入后基质细胞的有序蜕膜化进程.

关键词 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL), 子宫基质细胞, 蜕膜化

学科分类号 Q492, Q954

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00589

在哺乳动物的胚胎着床过程中, 胚胎必须发育到胚泡阶段, 然后孵化并黏附到子宫腔上皮. 子宫必须进行分化以使自身变得对胚胎具可接受性, 随后, 在着床胚胎和子宫内膜之间发生“对话”, 胚胎才逐步在子宫内膜中着床^[1-2]. 子宫中的这些变化均受卵巢类固醇激素的调节. 胚泡植入后, 子宫内膜进一步增厚, 血液供应更加丰富, 腺体分泌更加旺盛, 基质细胞肥大, 胞质内富含糖原颗粒和脂滴, 且发生广泛的增殖和分化, 子宫内膜的这一系列变化称为蜕膜反应^[3]. 蜕膜化的基质细胞在其形态上从成纤维细胞变成较大的多核细胞^[4].

以囊胚植入点局部的血管渗透性改变为主要特征的小鼠胚胎植入启动发生在妊娠 D4 22:00~24:00^[5]. 在植入位点发生黏附反应的同时子宫基质细胞大量增殖, 发生蜕膜化. D5 中午和 D6 早上, 在囊胚植入周围聚集的基质细胞增殖下降并开始向蜕膜细胞分化, 形成初级蜕膜区, 这一区域呈无血管的上皮样, 有着密集的蜕膜细胞^[6]. 从 D6 开始, 与初级蜕膜区邻近的基质细胞继续增殖分化为多倍体的蜕膜细胞而形成次级蜕膜区. 次级蜕膜区在 D7 发育完全, D8 时初级蜕膜区逐渐退化, 使着床

位点的腔隙增大以便容纳生长的胚胎. D8 后, 胎盘和胚胎的生长慢慢地取代次级蜕膜区^[6]. 蜕膜细胞的增殖和退化同时并存, 二者在动态平衡中协调蜕膜细胞的数量和滋养层细胞的侵入^[7-8].

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是 TNF 家族的新成员, 能够通过内源性(死亡受体)和外源性(线粒体)两种途径诱导肿瘤细胞凋亡而不会对正常组织细胞的生长产生影响, 因此近年来被认为是一种极具潜力且安全的抗肿瘤因子. 鉴于胚泡植入与肿瘤侵袭的诸多同源性, 本课题组在前期工作中发现 TRAIL 在小鼠胚胎植入后的子宫蜕膜基质细胞中有表达, 推测 TRAIL 在小鼠蜕膜过程中对蜕膜细胞的增殖和凋亡具有一定作用. 为进一步研究 TRAIL 在围植入期小鼠子宫蜕膜基质细胞中的作

* 国家自然科学基金(30770816, 30270510)和重庆市自然科学基金项目(CSTC2009BB5409)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 023-68485997, E-mail: tanyee66@hotmail.com

收稿日期: 2009-10-12, 接受日期: 2009-12-28

用, 本研究构建了 TRAIL 过表达质粒和干扰质粒, 原代培养小鼠子宫基质细胞并进行蜕膜化诱导, 观察 TRAIL 小鼠蜕膜基质细胞增殖及凋亡的影响. 本研究首次证实, TRAIL 基因可以抑制蜕膜基质细胞的增殖并促进其凋亡, 在子宫蜕膜基质细胞增殖与凋亡的动态平衡过程中具有重要调控作用.

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级 NIH 小鼠, 6~8 周, 质量 20~25 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 合格证号为 [SCXK(渝)2007-0001]. 雌雄按 2:1 自然合笼, 次晨发现阴栓者记为妊娠 D1. 本研究中涉及动物的实验操作方案均通过重庆医科大学伦理委员会的批准.

pSEB-Hus 真核表达质粒由重庆医科大学医学检验系分子肿瘤实验室赠送; Trizol 试剂、RT 试剂盒、限制性内切酶、T4DNA 连接酶、Taq 聚合酶、DNA Marker、dNTP 购自 Takara 公司; TRAIL 引物和内参 β -actin 引物也由 Takara 公司合成; DNA 回收试剂盒购自 Omega 公司; 质粒提取试剂盒购自 Promega 公司; LipofectamineTM2000 Reagent 转染试剂盒、DMEM/F12 无酚红培养基、活性炭处理胎牛血清和胶原酶购自 Invitrogen 公司; 雌二醇、孕酮及 cAMP 购自 Sigma 公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物公司; TRAIL、波形蛋白、催乳素兔抗小鼠多克隆抗体购自武汉博士德公司; 内参 β -actin 兔抗小鼠多克隆抗体购自博奥森公司; 辣根酶标记山羊抗兔二抗购自北京中杉公司; ECL 化学发光法检测试剂盒购自碧云天公司.

1.2 方法

1.2.1 TRAIL 过表达质粒的构建.

根据 GenBank 公布的小鼠 TRAIL cDNA 编码区序列(NM_009425), 利用 Primer Premier 5.0 设计巢式 PCR 引物. 外引物的上游序列为: 5' AAG-TCTGCATTGGGAAGTC 3', 下游序列为: 5' GC-CATATCCTAACCAGTTCAGTC 3'; 内引物的上游序列含 *Sal* I 酶切位点(ACGCGT): 5' TATACG-CGTACCATGGGTATGCCTTCCTCAG 3', 下游序列含 *Mlu* I 酶切位点(GTCGAC): 5' GCCGTCGACCTTAGTTAATTAAAAAGGCTCC 3'. 所有引物由 TaKaRa 公司合成.

应用 RT-PCR 法从小鼠子宫组织总 RNA 扩增

TRAIL 基因, PCR 的反应条件为: 98℃ 预变性 2 min, 98℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min. 扩增产物的大小为 903 bp. 用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Mlu* I 分别双酶切、纯化扩增的 TRAIL 基因片段和 pSEB-Hus, T4 连接酶过夜连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 后, 氨苄青霉素平板筛选可疑阳性重组质粒, 采用菌液 PCR 和限制性内切酶进行初步鉴定之后, 送 TaKaRa 公司测序. 将测序正确的质粒命名为 pSEB-Hus-TRAIL 质粒, 同时用 Western blotting 检测含 pSEB-Hus-TRAIL 质粒和 pSEB-Hus 对照质粒菌液中的 TRAIL 蛋白, 如果过表达质粒构建成功, 则大量制备该重组质粒, -20℃ 备用.

1.2.2 TRAIL 干扰质粒的构建.

应用 Dharmacon's siDESIGN 软件设计了 4 个针对 TRAIL 基因的潜在的 siRNA 靶点. pSEB-Hus-TRAIL1 Oligo1: 5' AGAGGATTGTTCGAGCTAA-ATTTT 3', Oligo2: 5' ATTTAGCTCGAACAATC-CTCTTTT 3'; pSEB-Hus-TRAIL2 Oligo1: 5' AG-GACAAGGTGAGAACCAAATTTT 3', Oligo2: 5' ATTTGGTTCTCACCTTGTCCTTTT 3'; pSEB-Hus-TRAIL3 Oligo1: 5' ATGAAGCAGCTGCAGG-A CAATTTT 3', Oligo2: 5' ATTGTCCTGCAGC-TCTTCATTTT 3'; pSEB-Hus-TRAIL4 Oligo1: 5' ACAAGACGGATGAGGATTTTTTTT 3', Oligo2: 5' AAAATCCTCATCCGTCTTTGTTTT 3'.

将靶向 TRAIL 的干扰序列退火成为双链 DNA 片段之后克隆到 *Sfi* I 酶切后的 pSEB-Hus-TRAIL 质粒中, 转化 DH5 α 后氨苄青霉素选择性培养基筛选阳性克隆, 用 U6 和反义引物进行菌液 PCR, 筛选出目的干扰质粒^[9], 提取质粒送重庆医科大学分子生物学感染病实验室测序. 将测序正确的干扰质粒分别命名为 SipSEB-TRAIL1, SipSEB-TRAIL2, SipSEB-TRAIL3, SipSEB-TRAIL4. 在 24 孔板中将 4 个干扰质粒分别转染 HEK-293 细胞, 72 h 后, 在荧光显微镜下观察细胞, 选择 GFP 荧光最弱的干扰质粒. 将选出的质粒用 *pac* I 酶切除去 TRAIL 基因后自连, 大量制备该干扰质粒, -20℃ 备用.

1.2.3 小鼠子宫原代基质细胞的蜕膜化诱导及转染. 小鼠子宫原代基质细胞的分离和培养根据之前描述的方法进行^[10]. 分离的基质细胞以 1×10^5 /ml 浓度接种到 6 孔板中, 在含 10% 活性炭处理的胎牛血清的无酚红 DMEM/F12 培养基中培养 20 h 后, 按 LipofectamineTM2000 试剂说明书进行质粒

转染. 细胞分为4组, 分别为过表达组即 pSEB-Hus-TRAIL 转染组, 干扰组即 SipSEB-TRAIL3 转染组, 阴性对照组即 pSEB-Hus 空质粒转染组, 空白对照组即不经任何处理. 转染4 h后更换含 $1 \mu\text{mol/L}$ P4、 10 nmol/L E2、 0.5 mmol/L cAMP 的培养基进行蜕膜化诱导, 然后继续培养至72 h时终止培养, 分别在24 h、48 h、72 h收获细胞进行检测分析.

1.2.4 免疫细胞化学. 将蜕膜基质细胞爬片于APES包被的无菌盖玻片上, 待其形成单层后取出玻片, 按免疫细胞化学常规步骤操作, 观察波形蛋白或催乳素的表达. 以同型IgG代替一抗作为阴性对照.

1.2.5 半定量 RT-PCR 检测 TRAIL mRNA 表达的变化. Trizol 法提取转染72 h后细胞的总RNA, 用Oligo 随机引物逆转录生成cDNA. TRAIL 基因上下游引物分别是: 5' TATACGCGTACCATGGGTATGCCTTCCTCAG 3' 和 5' GCCGTCGACTTAGTTAATTAAAAAGGCTCCG 3', PCR 条件为: 94°C 预变性2 min, 94°C 变性30 s, 55°C 退火30 s, 72°C 延伸1 min, 30个循环, 最后 72°C 延伸5 min, 扩增产物的大小为903 bp. 内参基因 β -actin 的上下游引物分别是: 5' AGCCATGTACGTAGCCATCC 3' 和 5' CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA 3', PCR 条件同上, 扩增产物的大小为228 bp. 扩增产物经0.7%琼脂糖凝胶电泳, 用 BIO-RAD 图像分析软件对条带灰度值进行定量分析.

1.2.6 Western blotting 检测 TRAIL 蛋白的表达. 以细胞裂解液充分裂解各组细胞, 100°C 加热5 min, 4°C $12\,000 \text{ r/min}$ 离心5 min, 吸取上清液, 用BSA法定量后行 SDS-PAGE, 将凝胶半干转于PVDF膜上, 10% TBST 室温封闭1 h, 加入兔抗小鼠一抗, 4°C 孵育过夜, 加入羊抗兔二抗, 室温孵育1 h, TBST 漂洗3次, 每次15 min. 取等量 ECL 显色试剂A、B液混匀后孵育PVDF膜, 显色拍照. 以 β -actin 为内参, 用 BIO-RAD 图像分析软件对条带灰度值进行定量分析.

1.2.7 MTT 法检测细胞的增殖活性. 子宫基质细胞按 5×10^3 个/孔接种于96孔板, 共4板, 各设3复孔, 另设阴性对照(转染空载体)和空白对照(不经任何处理). 培养24 h后进行瞬时转染, 转染12 h、24 h、48 h、72 h后按常规步骤绘制各组细胞的生长曲线, 根据公式, 抑制率(%)=(空白A值-试验组A值)/空白A值 $\times 100\%$, 计算不同时间增殖抑

制率.

1.2.8 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡率.

分别收集转染24 h、48 h、72 h的细胞, 预冷PBS洗涤2次, 用预冷的结合缓冲液重悬细胞, 调整细胞数为 $1 \times 10^5/\text{ml} \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$, 将试管置于冰上, 振荡加入 -20°C 预冷的70%乙醇固定30 min, 冷PBS洗涤细胞2次(250 g , 5 min), 加入 $400 \mu\text{l}$ 碘化丙锭(PI)染液避光染色30 min, 流式细胞仪检测细胞周期分布情况.

细胞凋亡的检测步骤同上, 将试管置于冰上, 加 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 溶液和 $5 \mu\text{l}$ PI 至 $100 \mu\text{l}$ 的细胞悬液中, 避光孵育10 min后, 加入 $400 \mu\text{l}$ 冰预冷的结合缓冲液后上流式细胞仪.

1.2.9 统计学处理. 试验数据利用 SPSS16.0 统计软件中 One-Way ANOVA 模块分析, 多组间数据先经 LSD 转换后进行单因素方差分析, 统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 TRAIL 基因真核表达质粒的构建及鉴定

RT-PCR 扩增出的 TRAIL 全长 cDNA 为903 bp, 重组质粒用 *Sal* I 与 *Mlu* I 进行双酶切和测序鉴定, 结果与 GenBank 所报告的该基因序列完全一致, 证实 TRAIL 基因片段正确插入表达质粒中(图1a), 菌液 Western blotting 检测也证明 TRAIL 蛋白能够表达(图1b), 遂将重组质粒命名为 pSEB-Hus-TRAIL.

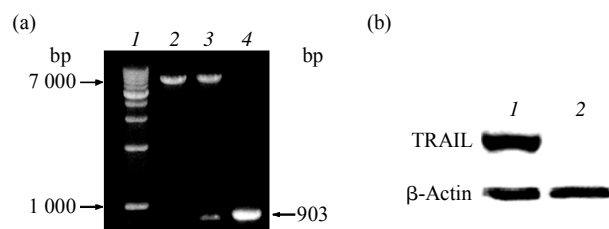


Fig. 1 Construction and verification of TRAIL over-expressing plasmid

(a) Digestion of pSEB-Hus-TRAIL plasmid with *Sal* I and *Mlu* I. 1: DNA marker; 2: pSEB-Hus-TRAIL; 3: pSEB-Hus-TRAIL plasmid digested with *Sal* I and *Mlu* I; 4: TRAIL gene. (b) Detection of TRAIL protein in DH5α by Western blotting. 1: TRAIL/DH5α; 2: Control/DH5α.

2.2 TRAIL 基因干扰质粒的构建及鉴定

菌液 PCR 筛选出的阳性克隆测序结果与设计的干扰片段序列完全一致, 进一步证实 siRNA 质

粒构建成功. 经过3次重复瞬时转染 HEK-293 细胞, 发现 SipSEB-TRAIL3 特异性干扰效果最好, 转染后 48~72 h 可见荧光强度最弱(图 2d). 故选

择 SipSEB-TRAIL3 进行 *pac* I 酶切去除 TRAIL 基因后自连, 用于下一步实验.

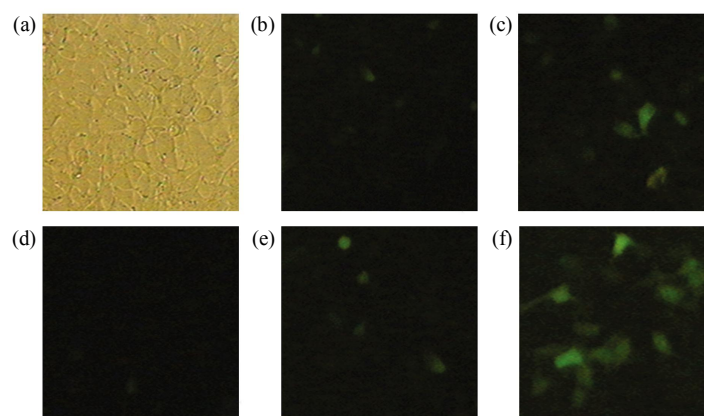


Fig. 2 Selection of the effective siRNA vector in HEK-293 cells with GFP as reporter (200×)

(a) Normal HEK-293 cells under bright field. (b~e) HEK-293 cells transfected with SipSEB-TRAIL1, 2, 3 and 4, respectively under fluorescence field. (f) Positive control of HEK-293 cells transfected with pSEB-Hus-TRAIL. Based on the signal intensity of GFP 3 to 5 days after transfection, SipSEB-TRAIL3 with the lowest GFP signal (d) was selected for further application.

2.3 原代培养的小鼠子宫基质细胞及蜕膜化诱导

贴壁生长的小鼠基质细胞呈梭形或锐三角形, 波形蛋白免疫组化染色为阳性, 主要分布在胞质区域(图 3a), 阴性对照组的细胞质区域均无阳性反应(图 3b). 显微镜下随机选择 5 个不同区域, 计数阳

性细胞与细胞总数之比, 结果表明, 提取的基质细胞纯度为 $(97.4 \pm 0.3)\%$. 小鼠蜕膜基质细胞具有特异合成催乳素的特性, 合成的催乳素存在于胞质内, 免疫组化染色催乳素可鉴定出蜕膜细胞(图 3c)与未发生蜕膜化的基质细胞(图 3d).

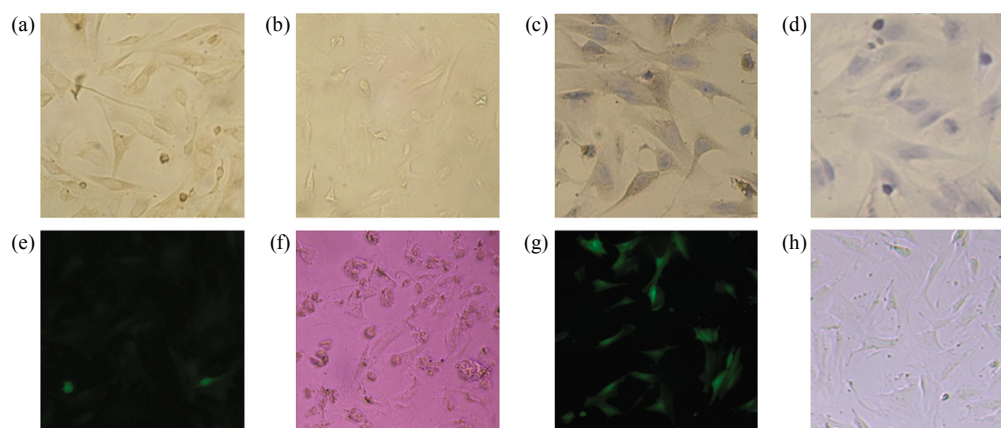


Fig. 3 Artificial decidualization of uterine stromal cells and DSC transfection with TRAIL overexpression and siRNA plasmids

(a~d) Decidualization induction of stromal cells. Positive vimentin detection by immunocytochemistry in stromal cells (a) via the negative control (b). Decidualization was verified by Prolactin signal (c) via the negative control (d). 200×. (e~h) Morphological alteration of DSC 72 h after transfected with TRAIL overexpression (e, f, which under fluorescence field and bright field) and siRNA (g, h, which under fluorescence field and bright field) plasmids. 100×.

2.4 检测 TRAIL mRNA 和蛋白质的表达

经凝胶分析系统鉴定电泳结果得出 TRAIL/ β -actin

灰度比值(图 4a): 过表达组 1.910 ± 0.061 , 干扰组 0.952 ± 0.061 , 阴性对照组 1.460 ± 0.031 , 空白对照

组 1.315 ± 0.055 . 统计学分析显示: 过表达组 mRNA 的表达显著高于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$), 干扰组 mRNA 的表达显著低于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$), 而两对照组间无明显差别 ($P > 0.05$). 结果表明, TRAIL 真核表达质粒可使细胞中 TRAIL mRNA 水平升高, TRAIL 干扰

质粒则可诱导 TRAIL mRNA 特异性降解. 以 β -actin 蛋白特异反应的亮度带作为标准, TRAIL 蛋白在过表达组 (3.805 ± 0.162) 明显升高 ($P < 0.05$), 干扰组 (0.813 ± 0.075) 显著下降 ($P < 0.05$), 阴性对照组 (1.721 ± 0.036) 和空白对照组 (1.772 ± 0.109) 之间无明显变化 (图 4b).

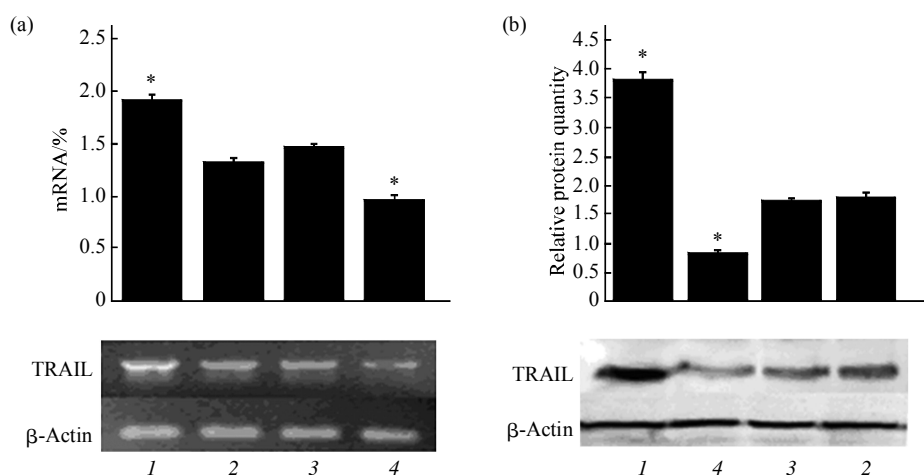


Fig. 4 Transfection of decidual stromal cells with TRAIL overexpression and siRNA plasmids

(a) Expression of TRAIL mRNA by RT-PCR in transfected DSC as indicated. * $P < 0.05$. As compared with β -actin. (b) The relative expression levels of TRAIL protein by Western blotting in transfected DSC as indicated. * $P < 0.05$. As compared with β -actin. 1: pSEB-TRAIL; 2: DSC; 3: pSEB-Hus; 4: SipSEB-TRAIL3.

2.5 细胞生长曲线

MTT 法检测各组细胞 A 值发现, 空白对照组与阴性对照组细胞生长速度基本一致, 过表达 TRAIL 组细胞在 24、48、72 h 各时间点的 A 值均明显低于对照组和空白对照组细胞 ($P < 0.05$), 即 TRAIL 过表达后, 蜕膜基质细胞的生长速度明显降低, 对蜕膜基质细胞增殖的抑制率显著高于阴性对照组和空白对照组 ($P < 0.05$), 而干扰组细胞在相应各时间点的 A 值均明显高于对照组和空白对照组细胞 ($P < 0.05$). 上述结果表明, 干扰 TRAIL 基因表达后, 蜕膜基质细胞的生长速度明显加快, 对蜕膜基质细胞增殖的抑制率显著下降, 提示 TRAIL 可能具有抑制蜕膜基质细胞增殖的作用 (图 5, 表 1).

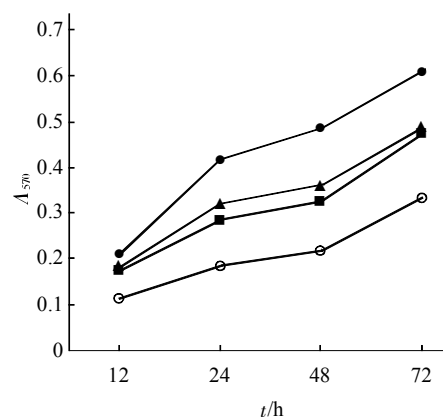


Fig. 5 Effects of TRAIL overexpression and siRNA plasmids on DSC proliferation

●—●: SipSEB-TRAIL3; ▲—▲: DSC; ■—■: pSEB-Hus; ○—○: pSEB-TRAIL.

Table 1 Statistic data of growth inhibition rate of DSC by TRAIL overexpression and siRNA plasmids

Groups	Inhibitory rate/%			
	12 h	24 h	48 h	72 h
DSC	—	—	—	—
pSEB-Hus	6.27 ± 0.029	3.35 ± 0.177	1.33 ± 0.046	2.32 ± 0.030
pSEB-TRAIL	34.55 ± 0.016	40.37 ± 0.090	38.90 ± 0.044	29.66 ± 0.033

2.6 TRAIL 基因对蜕膜基质细胞周期和凋亡率的影响

形态学观察发现, 转染 pSEB-Hus-TRAIL 之后部分基质细胞从瓶壁脱落, 漂浮于培养液中, 细胞体积缩小, 皱缩、变圆, 而转染 SipSEB-TRAIL3 后细胞形态与对照组无差别(图 3f, 3h)。

流式细胞术检测蜕膜不同时间点细胞周期和凋亡率的变化发现, 不同时间点间比较细胞周期及凋亡率, 发现除 S 期的 48 h 和 72 h, 凋亡率的 24 h 和 48 h, 48 h 和 72 h 差异不显著外($P > 0.05$), 其余

时间点间差异均为极显著($P < 0.05$)。4 个试验组间比较, 结果表明: 过表达 TRAIL 后蜕膜基质细胞的 G0/G1 期细胞比例明显增加, S 期和 G2/M 期细胞比例显著减少($P < 0.05$), 而干扰 TRAIL 基因表达后蜕膜基质细胞 G0/G1 期细胞比例明显减少, S 期和 G2/M 期细胞比例显著增多 ($P < 0.05$), 空白对照组与阴性对照组之间无明显差异($P > 0.05$), 表明上调 TRAIL 基因可阻滞细胞向 S 期和 G2/M 期转化, 使细胞停留在 G0/G1 期, 具有阻抑细胞周期进程的作用 (表 2)。

Table 2 Cell cycle distribution and apoptosis of DSC by TRAIL overexpression and siRNA plasmids

t/h	Groups	G0/G1(%)	G2/M(%)	S(%)	Apoptosis rate(%)
24	DSC	77.85 ± 2.21	5.32 ± 1.40	16.82 ± 1.18	10.48 ± 1.82
	pSEB-Hus	75.56 ± 2.47	7.44 ± 1.54	16.99 ± 1.14	10.54 ± 2.48
	pSEB-TRAIL	82.01 ± 1.65 ^{1,2)}	7.55 ± 1.82	10.44 ± 0.65 ^{1,2)}	21.79 ± 1.58 ^{1,2)}
	SipSEB-TRAIL3	59.32 ± 1.29 ^{1,2,3)}	17.85 ± 1.47 ^{1,2,3)}	22.83 ± 1.61 ³⁾	7.21 ± 1.13 ^{1,2,3)}
48	DSC	72.01 ± 2.16	7.97 ± 1.64	20.02 ± 1.06	9.69 ± 1.88
	pSEB-Hus	69.42 ± 1.27	9.96 ± 1.29	20.62 ± 2.40	10.04 ± 2.86
	pSEB-TRAIL	74.73 ± 0.97 ^{1,2)}	8.51 ± 1.36	16.76 ± 2.15 ^{1,2)}	19.92 ± 0.93 ^{1,2)}
	SipSEB-TRAIL3	53.9 ± 1.08 ^{1,2,3)}	24.45 ± 2.07 ^{1,2,3)}	21.61 ± 1.30 ³⁾	5.03 ± 1.18 ^{1,2,3)}
72	DSC	64.84 ± 2.53	13.64 ± 2.04	21.51 ± 2.47	8.85 ± 1.03
	pSEB-Hus	66.25 ± 1.18	10.53 ± 1.56	23.21 ± 1.63	8.91 ± 2.06
	pSEB-TRAIL	72.51 ± 1.75 ^{1,2)}	8.12 ± 1.20	19.38 ± 0.68 ^{1,2)}	17.22 ± 3.20 ^{1,2)}
	SipSEB-TRAIL3	50.44 ± 3.21 ^{1,2,3)}	31.62 ± 2.14 ^{1,2,3)}	17.94 ± 2.65 ³⁾	4.97 ± 2.32 ^{1,2,3)}

¹⁾ $P < 0.05$ vs DSC; ²⁾ $P < 0.05$ vs pSEB-Hus; ³⁾ $P < 0.05$ vs pSEB-TRAIL.

3 讨 论

人和小鼠的蜕膜过程有很多共性, 区别在于人的子宫基质细胞蜕膜化最早可发生在无胚胎存在的每个月经周期的分泌期, 而小鼠基质细胞的蜕膜化必须要有胚胎的存在。由于伦理等诸多限制因素, 不可能在人体直接研究胚胎植入过程中胚胎与子宫相互作用的潜在机制, 以小鼠为模型能够为研究胚胎植入和蜕膜的分子机制提供可比较的信息。

蜕膜具有多质性, 其细胞成分相当复杂^[11-12], 其中 DSC 约占全部蜕膜细胞数的 75%, 尽管在不同的物种中蜕膜化的程度跟滋养层的侵入程度有关。蜕膜的特定功能并不清楚, 一个可能就是蜕膜作为一个屏障, 通过控制滋养层侵入到母体动脉中的程度来行使功能^[13], 使母体免受由胎儿的过度侵入所带来的损害, 将侵入过程限制在子宫肌层的内

侧。蜕膜的另一个作用是分泌细胞因子, 调节蜕膜局部的免疫微环境, 同时发挥免疫抑制与免疫营养的双重功能, 蜕膜化反应是在血管周围启动, 随后扩展到黄体晚期的基质细胞以及妊娠子宫内膜中。由于蜕膜化与血管有关, 可能蜕膜细胞还在募集白细胞和止血方面起关键作用^[14]。蜕膜过程中基质细胞多倍性的生理意义仍然未知, 推测多倍体限制了蜕膜细胞的生存期, 促使其凋亡, 为胚胎的快速生长提供了空间, 同时持续的多倍性可能通过提高转录基因的复制数来保证合成蛋白质能力的增加^[2]。研究表明, 蜕膜化过程受到一些细胞周期分子的调节。Tan 等^[10]证明, HB-EGF 参与小鼠蜕膜细胞的多倍性过程, HB-EGF 能增加基质细胞的 DNA 合成量, 而细胞的数量并不发生显著变化, 这种作用是通过上调细胞周期蛋白 cyclinD3 来介导的。cyclinD3 与细胞周期蛋白激酶 cdk4 和 / 或 cdk6 共

同控制细胞的增殖. 小鼠妊娠 D5 时, cyclinD3 和 cdk4 在胚胎植入位点共表达, 表明这些调控因子在蜕膜的基质细胞增殖中具有一定作用. 到 D5 中午, 初级蜕膜区中细胞周期蛋白激酶的抑制因子 p21 的表达上调, cyclinD3 和 cdk4 下调, 支持 PDZ 的发育, 它们随后在次级蜕膜区的促增殖作用与此相似, 但细胞周期蛋白激酶 cdk4 变成了 cdk6.

细胞凋亡是一种正常的生理现象, 在妇产科临床, 细胞凋亡失常是功能失调性子宫出血、不孕症、流产、子宫内膜癌、子宫内膜异位症、子宫腺肌病等多种疾病的病理基础. 胚泡植入后, 随着胚泡的快速生长, 子宫蜕膜细胞也伴随着有序的增殖和凋亡以适应胚泡的发育, 随着妊娠的继续, 蜕膜细胞凋亡明显减少, 开始组织重建, 蜕膜组织重建和滋养层细胞的侵入达到相对稳定状态, 这种平衡是一个涉及多种因素的细胞凋亡过程, 有严格时间的限制^[7, 15]. 因此, 从细胞凋亡的角度探讨胚胎植入过程中不同分子的作用机制也是一个有意义的研究方向. 在诸多参与细胞凋亡的因子中, 肿瘤坏死因子 TNF 是诱导细胞凋亡的一类重要的细胞因子, TRAIL 作为其家族成员是近几年肿瘤预防和治疗领域的研究热点之一^[16]. TRAIL 通过与细胞膜上的死亡受体(death receptor, DR) 4 或 5 结合后, 通过一系列反应形成死亡诱导信号复合物(DISC)激活 caspase-8, 活化的 caspase-8 通过死亡受体和线粒体两条途径传递凋亡信号. 此外, TRAIL 与受体结合后还能通过激活 Akt 通路、核因子 κ B (NF- κ B)、蛋白激酶 C(PKC)、促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族成员等发挥凋亡诱导活性^[17-19].

细胞凋亡在维持子宫内膜正常周期性变化中起着重要作用, 与性激素及其受体、细胞因子、各种酶的作用有关. TRAIL 作为一种极具有潜力的抗肿瘤因子, 在生殖领域的研究还很少, 我们的前期试验表明, TRAIL 在植入后子宫蜕膜中的表达具有一定规律, 即妊娠 D1~8 的小鼠子宫组织均有 TRAIL mRNA 表达, 免疫组化结果显示: 妊娠 D1~2 TRAIL 在子宫腔上皮广泛表达, 妊娠 D3~4, TRAIL 在子宫腔上皮表达的范围减小, 只出现在一些特异位点, 妊娠 D5 和 D6 TRAIL 重新高表达于腔上皮和初级蜕膜带, 妊娠 D7~8 TRAIL 广泛高表达于次级蜕膜带, 推测 TRAIL 在植入后有序蜕膜化进程中起着重要作用^[20]. 本研究发现,

TRAIL 过表达的蜕膜基质细胞的增殖能力明显下降, 而用 RNA 干扰之后的蜕膜基质细胞的生长速度明显高于对照组, 表明 TRAIL 具有抑制蜕膜基质细胞增殖的生理效应. 进一步的流式细胞术检测结果显示, TRAIL 过表达使蜕膜基质细胞被阻滞在 G0/G1 期细胞, 停止向 S 期和 G2/M 期转化, 从而阻止了细胞周期的进程. 不仅如此, TRAIL 过表达还能促进蜕膜基质细胞的凋亡.

目前已有研究发现, TRAIL 存在于滋养层、胚胎及人蜕膜细胞. 体外诱导蜕膜化的人子宫内膜基质细胞中有 TRAIL mRNA 的表达, 且受孕酮和 cAMP 的调节^[21]. 滋养层中的 TRAIL 在妊娠时血管重塑过程中能引起血管平滑肌细胞的凋亡^[22]. 在小鼠, TRAIL 与其特异受体 MK 表达于小鼠卵母细胞、受精卵至囊胚各个阶段的胚胎中, 对囊胚的形成和发育具有生理意义^[23-24]. 本试验只考察了 TRAIL 这单一促凋亡因子对蜕膜细胞的影响, 实际上子宫内环境中还存在很多促凋亡因子, 共同在蜕膜化过程中发挥作用, 例如已发现母胎界面的滋养细胞能分泌可溶性 HLA-G(sHLA-G), sHLA-G1 通过 Fas/FasL 信号通路触发活化的外周血 CD8 细胞凋亡, 参与胚胎的免疫防御. 蜕膜组织中的 uNK 细胞也在促进植入部位蜕膜的血管形成、蜕膜正常结构及胎盘发育中起到了关键的作用^[25]. TRAIL 如何通过自分泌和(或)旁分泌与其他促凋亡因子相互协调、共同在子宫蜕膜细胞、胚胎滋养层细胞、甚至 uNK 细胞之间发挥作用等一系列更加复杂深入的问题还不清楚, 也是本研究下一步的研究方向和内容.

参 考 文 献

- [1] Psychoyos A. Hormonal control of ovoidimplantation. *Vitamins and Hormones*, 1973, **31**: 201-256
- [2] Dey S K, Lim H, Das S K, *et al.* Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews*, 2004, **25**(3): 341-373
- [3] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292**(5819): 154-156
- [4] Monice F L a1, Andrade C G, Abrahamssohn P A, *et al.* Granulated decidual cells in the mouse deciduoma: a putative source of decidual prolactin in mice. *Cells Nssues Organs*, 2001, **168** (4): 252- 263
- [5] Paria B C, Zhao X, Das S K, *et al.* Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Dev Biol*, 1999, **208**(2): 488-501

- [6] Tan J, Raja S, Davis M K, *et al.* Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation. *Mech Dev*, 2002, **111**(1-2): 99-113
- [7] Joswig A, Gabriel H D, Kibschull M, *et al.* Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, **1**(1): 44-52
- [8] Selam B, Kayisli U A, Mulayim N, *et al.* Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol Reprod*, 2001, **65** (4): 979-985
- [9] Luo Q, Kang Q, Song W X, *et al.* Selection and validation of optimal siRNA target sites for RNAi-mediated gene silencing. *Gene*, 2007, **395**(1-2): 160-169
- [10] Tan Y, Li M, Cox S, *et al.* HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization *via* cyclin D3 during implantation. *Dev Biol*, 2004, **265**(1): 181-195
- [11] Goldman S, Weiss A, Shalev E. The effect of progesterone on gelatinase expression in the decidual and fetal membranes before and after contractions. *Am J Obstet Gynecol*, 2007, **197**(5): 521-527
- [12] Blanco O, Tirado I, Muñoz-Fernández R, *et al.* Human decidual stromal cells express HLA-G: Effects of cytokines and decidualization. *Hum Reprod*, 2008, **23** (1): 144-152
- [13] King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update*, 2000, **6** (1): 28-36
- [14] Bell S C. Assessment of endometrial differentiation and function. *Br Med Bull*, 1990, **46** (3): 720-732
- [15] Selam B, Kayisli UA, Mulayim N, *et al.* Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol Reprod*, 2001, **65** (4): 979-985
- [16] MacFarlane M. TRAIL-induced signaling and apoptosis. *Toxicol Lett*, 2003, **139**(2-3): 89-97
- [17] Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther*, 2005, **12**(3): 228-237
- [18] Wachter T, Sprick M, Hausmann D, *et al.* cFLIPL inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated NF-kappaB activation at the death-inducing signaling complex in human keratinocytes. *Biol Chem*, 2004, **279**(51): 52824-52834
- [19] Kim K M, Lee Y J. Amiloride augments TRAIL-induced apoptotic death by inhibiting phosphorylation of kinases and phosphatases associated with the P13K-Akt pathway. *Oncogene*, 2005, **24** (3): 355-366
- [20] Peng H Y, Chen Q, Tan D M, *et al.* Differential expression of TRAIL and DR5 in preimplantation uterus reveals dynamic yet partially cooperative pattern for implantation preparation and decidualization in mice. *Biol Reprod*, 2007, **77**(Sp. Iss. SI): 174
- [21] Popovici R M, Kao L C, Giudice L C. Discovery of new inducible genes in *in vitro* decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology*, 2000, **141** (9): 3510-3513
- [22] Keogh R J, Harris L K, Freeman A, *et al.* Fetal-derived trophoblast use the apoptotic cytokine tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand to induce smooth muscle cell death. *Circulation Research*, 2007, **100**(6): 834-841
- [23] Riley J K, Heeley J M, Wyman A H, *et al.* TRAIL and KILLER are expressed and induce apoptosis in the murine preimplantation embryo. *Biol Reprod*, 2004, **71**(3): 871-877
- [24] Chang A S, Dale A N, Moley K H. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*, 2005, **146** (5): 2445-2453
- [25] Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, *et al.* Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reprod*, 2003, **126**(5): 569-577

TRAIL Suppresses Decidualization of Uterine Stromal Cells in Mice*

ZHANG Jin-Ping, LUO Wen-Ping, ZHANG Qian, PENG Hong-Ying,

TAN Dong-Mei, WANG Ying-Xiong, TAN Yi**

(Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To explore the functional role of TRAIL on the proliferation, apoptosis of mouse decidual stromal cells (DSC) artificially induced *in vitro*, a TRAIL gene expressing eukaryotic vector and a short interfering RNA (siRNA) expressing vector were constructed. 72h after transfecting with each vector, semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (semi-qRT-PCR) and Western blotting were applied to detect the expression levels of TRAIL mRNA and protein, respectively in DSC. Besides, MTT assay was performed to investigate the cell growth activity and proliferation capacity, and flow cytometry was used to examine cell cycle distribution and apoptosis rate of DSC. Restriction endonuclease digestion and sequencing of nucleotide acid confirmed the correct construction of both over-expression and interfering vectors. The combined results from TRAIL overexpression and interfering in DSC demonstrated that TRAIL is capable of markedly inhibiting DSC proliferation by blocking most of cells at G0/G1 phase, meanwhile the apoptosis rate of DSC was notably increased.

Key words TNF related apoptosis inducing ligand(TRAIL), uterine stromal cells, decidualization

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00589

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30770816, 30270510) and Chongqing Natural Science Foundation (CSTC2009BB5409).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-68485997, E-mail: tanyee66@hotmail.com

Received: October 12, 2009 Accepted: December 28, 2009