

血管生长抑素在小鼠胚泡中的调节作用*

赵田夫^{1,2)}** 张 键¹⁾** 李 晶¹⁾ 曹宇静¹⁾
李素敏¹⁾ 周家喜¹⁾ 李福洋³⁾ 药立波³⁾ 段恩奎¹⁾***

(¹⁾中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080;

²⁾保定师范专科学校生物系, 保定 071000; ³⁾第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710031)

摘要 血管生长抑素 (angiotatin, AS) 是一种新血管生成的抑制蛋白, 它可以有效抑制内皮细胞的增殖、迁移和管状形态的产生, 是肿瘤转移的有效抑制剂. 肿瘤转移和胚胎植入具有惊人的相似性, AS 对小鼠胚胎植入是否有作用迄今尚无报道. 采用体外培养、RT-PCR 和蛋白质印迹等多种方法研究了 AS 对小鼠胚泡中血管内皮生长因子 (VEGF) 及其受体 KDR、基质金属蛋白酶 (MMPs) 及其组织抑制剂 (TIMPs) 的影响. 研究显示, AS 下调了 VEGF 及其受体 KDR、MMP-2 和 MMP-9 的表达, 而上调了 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达. 应用整合素 $\alpha V\beta 3$ 的特异性抑制剂 Echistatin 与 AS 共同处理胚泡, 结果显示, Echistatin 减弱了 AS 对 MMP-2 的下调作用及对 TIMP-2 的上调作用. 以上结果提示: AS 可能通过与整合素 $\alpha V\beta 3$ 相互作用调节胚泡中 VEGF、MMPs 和 TIMPs 的表达, 从而影响胚泡的植入过程.

关键词 血管生长抑素, 整合素, 胚泡, 基质金属蛋白酶, 组织抑制剂

学科分类号 Q551

近年来, 血管生长抑素 (angiotatin, AS) 被认为是一种新型有效的肿瘤抑制剂, 人们对其分子结构、抗肿瘤功能及作用机理进行了大量的研究, 取得了可喜的进展^[1], 但是 AS 在生殖上的作用至今没有详尽的报道. 由于 AS 可以抑制肿瘤的生长, 我们曾提出假设: AS 在胚胎植入过程中可能也有作用.

胚胎植入这一复杂的生理过程, 受许多因素的精确调节^[2~5], 类固醇激素 (E_2/P_4) 充当系统信号, 细胞因子或生长因子充当类固醇激素信号转导的局部调节物, 并通过自分泌和旁分泌途径参与滋养层及其微环境之间的局部联系; 另外, 整合素等细胞粘附分子参与细胞-细胞、细胞-基质之间的联系, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 等参与侵入过程中细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的降解^[6], 最终使胚胎成功地植入于母体子宫内膜. 在此过程中, 整合素与 ECM 相互作用, 诱发一系列细胞内信号转导机制, 调节细胞的粘附、迁移、增殖和分化, 并通过一系列信号转导途径引起胚胎内相关分子, 如 MMPs 及其组织型抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 的变化. MMPs 中的 MMP-2 和 MMP-9 被认为是胚泡滋养层侵入性的标

志, 其蛋白质表达与滋养层细胞的最大侵入能力相吻合, 它们负责降解 ECM, 是构成胚胎侵入能力的主要因素.

我们前期的一些实验研究证实: 一定剂量的 AS 能够显著降低小鼠胚泡的着床率, 并且以剂量依赖的方式降低小鼠胚泡在子宫上皮细胞单层上的粘附和扩展, 进而降低了小鼠子宫中 MMP-2 和 MMP-9 的基因表达 (李素敏博士论文, 2002), 但是有关 AS 对小鼠胚胎中基质金属蛋白酶 (MMPs)、组织抑制剂 (TIMPs)、血管内皮生长因子 (VEGF) 及其受体详尽的调节作用还未见报道.

因此, 本文以小鼠胚胎为模型, 旨在进一步研究 AS 对小鼠胚胎中 MMPs、TIMPs、VEGF 及其受体的调节作用, 以揭示 AS 在胚胎植入过程中的功能.

* 国家重点基础研究资助项目 (TG1999055903)、国家自然科学基金资助项目 (30170357) 以及中国科学院知识创新工程领域前沿项目 (KSCX3-IOZ-07) 资助.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-62558112, E-mail: duane@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 2003-02-19, 接受日期: 2003-03-24

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年(5~6周龄,体重25~30 g)昆明白远交系小鼠购自中国科学院动物研究所饲养场,饲养温度25℃,光照周期12L:12D,水食自由摄取。

1.2 主要试剂

纤粘连蛋白(fibronectin, FN)、Echistatin、VEGF因子和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自Sigma公司,Ham's F-12培养基、胎牛血清、胰蛋白酶和TRIzol购自Gibco BRL公司, Oligo(dT)₁₈和Taq DNA聚合酶购自Promega公司, MMP-2和MMP-9质粒由Kevin赠送, MMP-2、TIMP-2和 β -actin引物由赛百盛生物公司合成, VEGF和Flk-1多克隆抗体购自Santa Cruz公司, 血管生长抑素(AS)由第四军医大学合成^[7]。

1.3 体外培养

参考张键等^[8]的方法进行胚泡培养。简述如下:常规PMSG-hCG超数排卵, D4处死雌鼠, 收集胚泡。胚泡培养液为Ham's F-12添加0.24 g/L乳酸钙、0.3 g/L谷氨酰胺、1.6 g/L碳酸氢钠、400 U/ml硫酸庆大霉素、0.4% BSA和 10^{-3} g/L的雌二醇。

实验前用10 μ l 1.0 g/L FN铺碟, 于洁净台中吹干。用含有不同浓度AS的胚泡培养液制作微滴, 再移入发育基本一致的50个胚泡, 相同实验重复3次。本实验分为四组, 培养液中AS的浓度分别为0 g/L(C)、 2×10^{-3} g/L(T1)、 10^{-2} g/L(T2)和 5×10^{-2} g/L(T3)。

1.4 RNA印迹法

用限制性内切酶酶切MMP-2和MMP-9质粒, 产物经凝胶电泳回收作为制备探针的模板。采用随机引物标记法, 以 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ CTP底物制备DNA探针。采用Sephadex G-50凝胶过滤柱纯化探针。待测RNA变性电泳, 湿式电转移至尼龙膜, 紫外交联, 按照说明书进行杂交反应、放射自显影检测; 以 β -actin mRNA作对照。

1.5 明胶酶谱分析

培养24 h后收集培养液, 用Bradford法测定培养液的蛋白质浓度^[9]。用含1 g/L明胶的12%丙烯酰胺凝胶做分离胶, 其加5%丙烯酰胺凝胶作为浓缩胶, 用酶标仪测定培养液的蛋白质含量。每泳道10~20 μ l培养液, 相当于6 μ g蛋白质, 以5:1与样品缓冲液混合上样, 进行聚丙烯酰胺凝胶电

泳, 浓缩胶内的电压为100 V, 分离胶中的电压为150 V, 电泳时间为2 h。整个电泳过程在冰浴中进行。

电泳完毕, 凝胶在2.5% Triton X-100中洗涤数次, 然后在孵育液(150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂和50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6)中37℃孵育过夜。37℃常规考马斯亮蓝G-250染色, 脱色后拍照记录, 并进行半定量光密度扫描分析。孵育过程中加入EDTA(20 mmol/L)蛋白质酶抑制剂, 以鉴定MMPs的存在。

1.6 逆转录-聚合酶链式反应

取经过不同条件培养的胚泡用TRIzol提取总RNA。用Oligo(dT)₁₈合成cDNA第一条链, 特异性引物用于PCR。反转录及PCR程序参照张键等^[10]的方法, 简述如下: 10 μ g总RNA, 70℃变性5 min, 再加入1.5 μ g Oligo(dT)₁₈, 0.5 μ l RNasin, dNTPs(每种NTP终浓度为250 μ mol/L), 300 U的反转录酶AMV溶于反转录缓冲液中, 反应体系为20 μ l。混合液于42℃孵育1 h, 然后放入95℃停止反应并变性。取1/10的cDNA产物, 加入特异性引物各1 μ g, dNTPs(每种NTP终浓度为150 μ mol/L), 1U Taq DNA聚合酶溶于PCR缓冲液中, 反应体系为100 μ l。每个PCR循环包括: 94℃变性1 min, 60℃复性1 min, 72℃延伸1 min, 进行30个循环后, 72℃延伸10 min。所用引物序列如下, β -actin上游: 5'GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3', β -actin下游: 5'CTT CCT TAT TGT CAC GCA CGA TTT C 3', 预计扩增片段大小为540 bp; MMP-2引物序列^[11]为, 上游: 5'CAC CTA CAC CAA GAA CTT CC 3', 下游: 5'AAC ACA GCC TTC TCC TCC TG 3', 预计产物大小为332 bp; TIMP-1引物序列^[12]为, 上游: 5'CGC AGA TAT CCG GTA CGC CTA 3', 下游: 5'CAC AAG CCT GGA TTC CGT GG 3', 预计扩增片段大小为354 bp; TIMP-2引物序列为, 上游: 5'CTC GCT GGA CGT TGG AGG AA 3', 下游: 5'CAC GCG CAA GAA CCA TCA CT 3', 预计扩增片段大小为309 bp。

最后用1%的琼脂糖进行电泳并拍照, 然后进行灰度扫描。

1.7 免疫印迹

将经过不同条件培养的胚泡进行裂解, 应用VEGF及其受体KDR多抗分别检测不同浓度的AS对VEGF和KDR蛋白表达的影响。将等量(约

20 μg) 的蛋白提取液上样于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 湿式电转移法将蛋白质转印至硝酸纤维素膜 (Bio-Rad) 上, 按印迹常规操作进行, 加 VEGF 或 KDR 多抗 (1: 500 稀释) 反应过夜 (4 $^{\circ}\text{C}$), 再与碱性磷酸酶标记的二抗 (1:1 000 稀释) 结合, NBT-BCIP 显色观察。

1.8 数据分析

所有数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并采用 *t* 检验进

行统计分析。

2 结 果

2.1 AS 对小鼠胚泡中 MMPs 的影响

图 1 表明, 提取经不同 AS 浓度 (C: F-12、T1: F-12 + 2×10^{-3} g/L AS、T2: F-12 + 10^{-2} g/L AS 和 T3: F-12 + 5×10^{-2} g/L AS) 培养的胚泡总 RNA, 采用 RNA 印迹法检测 MMP-2 和 MMP-9

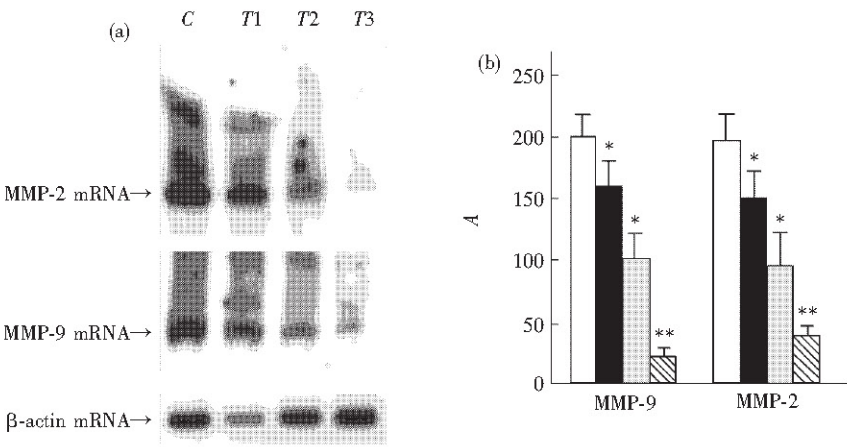


Fig.1 Influence of different concentration of angiotensin on MMPs gene expression

(a) represents Northern blot of MMP-2 mRNA, MMP-9 mRNA and β-actin mRNA respectively. (b) shows statistical analyses. C: 0 g/L angiotensin; T1: 2×10^{-3} g/L angiotensin; T2: 10^{-2} g/L angiotensin; T3: 5×10^{-2} g/L angiotensin. □: C; ■: T1; ▒: T2; ▨: T3. **P*<0.05, ***P*<0.01.

的表达. 结果显示, AS 以剂量依赖的方式下调了 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 水平。

收集经不同 AS 浓度 (C: F-12、T1: F-12 + 2×10^{-3} g/L AS、T2: F-12 + 10^{-2} g/L AS 和 T3: F-12 + 5×10^{-2} g/L AS) 培养的胚泡培养液, 采用明胶酶谱法检测 MMP-2 和 MMP-9 的活性. 结果显示, AS 以剂量依赖的方式降低了 MMP-2 和 MMP-9 的酶活性 (图 2)。

2.2 AS 和 VEGF 对小鼠胚泡中 TIMPs 的影响

提取经不同条件 (C: F-12、T1: F-12 + $10 \mu\text{g/L}$ VEGF 和 T2: F-12 + 10^{-2} g/L AS) 培养的胚泡总 RNA, 采用 RT-PCR 半定量法检测 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达. 结果显示, VEGF 下调了 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达, 而 AS 上调了 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达 (图 3)。

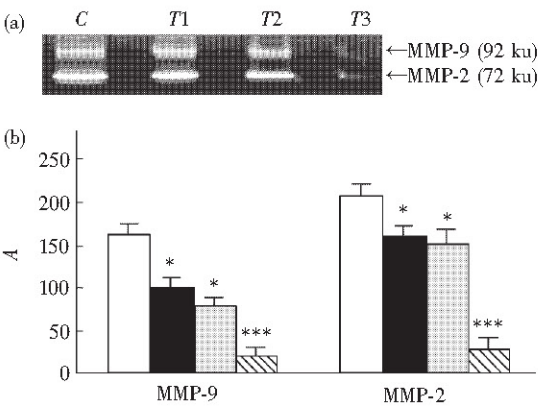


Fig.2 Influence of different concentration of angiotensin on MMPs activity

(a) is gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9. (b) shows statistical analyses. C: 0 g/L angiotensin; T1: 2×10^{-3} g/L angiotensin; T2: 10^{-2} g/L angiotensin; T3: 5×10^{-2} g/L angiotensin. □: C; ■: T1; ▒: T2; ▨: T3. **P*<0.05, ****P*<0.001.

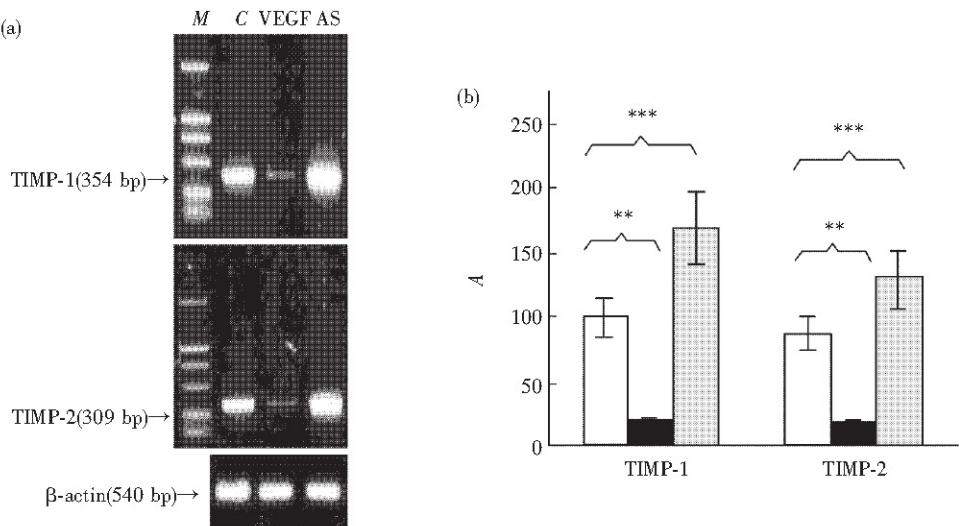


Fig.3 Influence of angiostatin and VEGF on gene expression of TIMP-1 and TIMP-2

(a) the RT-PCR products of TIMP-1, TIMP-2 and β-actin mRNA respectively. (b) statistical analyses. M is DNA molecular mass standards, 2 000, 1 000, 750, 500, 250 and 100 bp. C: F-12 media; VEGF: F-12+10⁻² g/L VEGF; AS: F-12+10⁻² g/L angiostatin. □: C; ■: VEGF(T1); ▨: AS(T2). **P<0.01, ***P<0.001.

2.3 AS 对小鼠胚胎中 VEGF 和 KDR 蛋白表达的影响
提取经不同 AS 浓度 (C: F-12、T1: F-12 + 2 × 10⁻³ g/L AS 和 T2: F-12 + 10⁻² g/L AS) 培养的胚胎总蛋白, 采用免疫印迹法检测了 VEGF 和 KDR 的表达. 结果显示, AS 下调了 VEGF 和

KDR 的蛋白表达, 而高浓度 (10⁻² g/L) AS 的下调作用达到极显著水平 (图 4).

2.4 Echistatin 对 AS 的抑制作用

提取经不同条件 (C: F-12、T1: F-12 +

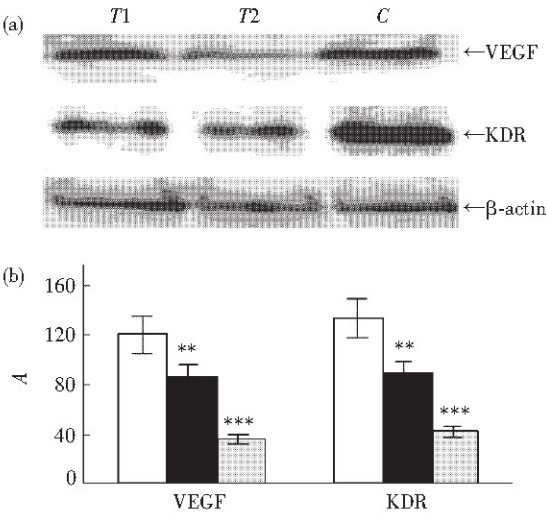


Fig.4 Influence of angiostatin on protein expression of VEGF and KDR

(a) protein products of VEGF, KDR and β-actin respectively; (b) statistical analyses. C: F-12 media; T1: F-12+2×10⁻³ g/L angiostatin; T2: F-12+10⁻² g/L angiostatin. □: C; ■: T1; ▨: T2. **P<0.01, ***P<0.001.

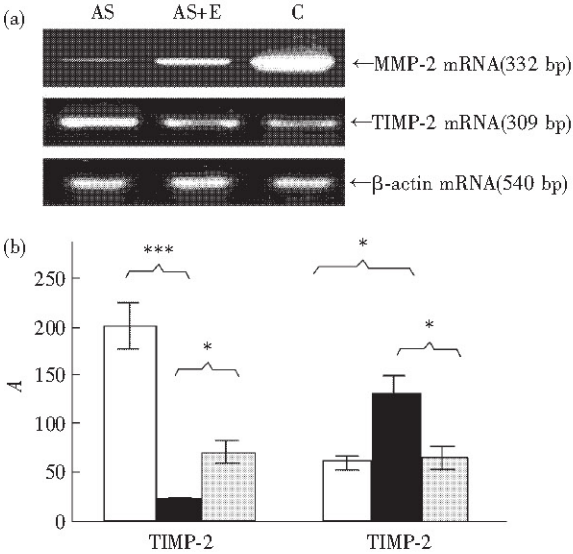


Fig.5 Inhibition effect of echistatin on angiostatin

(a) RT-PCR products of TIMP-1, TIMP-2 and β-actin mRNA; (b) statistical analyses. C: F-12 media; AS: F-12+10⁻² g/L angiostatin; AS+E: F-12+10⁻² g/L echistatin+10⁻² g/L angiostatin. □: C; ■: AS(T1); ▨: AS+echistatin(T2). *P<0.05, ***P<0.001.

10^{-2} g/L AS 和 T2: F-12 + 10^{-2} g/LAS + 10^{-2} g/L echistatin) 培养的胚泡总 RNA, 采用半定量 RT-PCR 法检测了 MMP-2 和 TIMP-2 的表达. 结果显示, echistatin 减弱了 AS 对 MMP-2 的下调作用, 同时也减弱了 AS 对 TIMP-2 的上调作用 (图 5).

3 讨 论

大量研究表明, 胚胎植入与肿瘤的浸润转移具有惊人的相似性. 有人将胚胎形容为“良性瘤”^[13], 主要是因为胚胎中的滋养层细胞具有不断向母体子宫内膜组织浸润和迁移的能力, 但是与恶性肿瘤细胞的无限制浸润和转移相比, 胚胎的滋养层细胞的浸润和迁移是有节制的行为, 受到严格的调控. 胚胎滋养层细胞与肿瘤细胞不但具有很多相似的行为^[13], 如粘附、侵入和转移, 还具有很多相似的生化介导者, 如细胞粘附分子 (cell adhesion molecule, CAM) 和 MMPs 等等, 生殖生物学家经常借鉴与肿瘤有关的物质来探讨胚胎植入之谜.

近年来, 血管生长抑素 (angiostatin, AS) 被认为是一种新型有效的肿瘤抑制剂, 人们对其分子结构、抗肿瘤功能及作用机理进行了大量的研究, 并取得了很大的进展, 但是 AS 在生殖系统的作用至今没有详尽的报道. MMPs-TIMPs 之间的平衡对于胚胎正常植入于子宫内膜是至关重要的. 本研究显示: AS 以剂量依赖的方式下调了 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的水平和酶活性, 上调了 TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 的水平, 提示 AS 可能通过上调 TIMPs 的表达和抑制 MMPs 的表达及活性来降低小鼠胚泡的侵入能力. 已有研究报道, 很多物质可以刺激产生 AS, 其中包括 MMP-7 和 MMP-9^[14], AS 由 MMPs 产生, 反过来又抑制了 MMPs 的表达和活性, 这充分表明了生物体内的动态平衡机制.

VEGF 也是一种与血管新生有关的因子, 它通过促进内皮细胞的增殖和迁移而促进血管新生, 大量研究表明, VEGF 与肿瘤的生长和迁移有关^[15]. 但是新近研究表明, VEGF 在小鼠胚泡和外胎盘锥中表达, 促进小鼠胚胎和外胎盘锥在子宫上皮的粘附和扩展并参与了小鼠胚胎的植入过程^[16]. 在本研究中, AS 下调了 VEGF 及其受体 KDR 的蛋白质表达水平, 进一步表明 AS 可以通过影响 VEGF 及其受体的表达来影响胚胎植入过程.

据报道, 在内皮细胞中, 整合素 $\alpha V\beta 3$ 是血管生长抑素的特异性受体^[17], AS 与整合素 $\alpha V\beta 3$ 结

合后可以抑制内皮细胞的增殖和迁移. 近来研究表明, 整合素 $\alpha V\beta 3$ 在小鼠胚泡中有强烈的表达, 并且是小鼠胚胎植入过程中必不可少的分子^[18]. 那么在小鼠胚泡中, AS 是否通过与整合素 $\alpha V\beta 3$ 结合而发挥其功能呢? 我们用整合素 $\alpha V\beta 3$ 的特异性抑制剂 echistatin 单独或与 AS 共同处理胚泡, 发现 echistatin 中和了 AS 对 MMP-2 和 TIMP-2 的作用, 这表明当整合素 $\alpha V\beta 3$ 被其抑制剂 echistatin 抑制后, AS 对 MMP-2 和 TIMP-2 的作用减弱了, 提示 AS 影响胚泡内 MMP-2 和 TIMP-2 的表达是 AS 与整合素 $\alpha V\beta 3$ 作用的后续事件, $\alpha V\beta 3$ 可能是 AS 在小鼠胚泡上的受体之一. 另外, 我们从研究中发现, echistatin 并没有完全抑制住 AS 的作用, 这提示在小鼠胚泡中, 还存在其他可以与 AS 结合的受体, 当 AS 与其结合后, 可以通过一系列信号转导途径进一步引起胚泡内部的许多分子 (包括 MMPs、TIMPs 和 VEGF 及其受体 KDR) 表达发生变化, 从而影响胚泡的侵入行为.

综上所述, 血管生长抑素这种有效的抗肿瘤药物, 可以通过影响 MMPs、TIMPs、VEGF 及其受体 KDR 的表达来影响胚胎植入过程, 从而提示: 如果摸索出给药的适宜剂量和适宜时间, 它可能也是一种新型有效的避孕药物.

参 考 文 献

- O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, **79** (2): 315 ~ 328
- Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and invasion. *Hum Reprod*, 1995, **10** (6): 1579 ~ 1620
- Psychoyos A. Hormonal control of ovoidimplantation. *Vitam Horm*, 1973, **31**: 201 ~ 256
- Harvey M B, Leco K J, Arcellana-Panlilio M Y, *et al.* Roles of growth factors during peri-implantation development. *Hum Reprod*, 1995, **10** (3): 712 ~ 718
- Stewart C L, Cullinan E B. Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Dev Genet*, 1997, **21** (1): 91 ~ 101
- Behrendtsen O, Alexander C M, Werb Z. Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowth. *Development*, 1992, **114** (2): 447 ~ 456
- 李福洋, 何 鹏, 刘新平, 等. 一步法从人血浆中制备天然血管生成抑制素. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (3): 325 ~ 327
- Li F Y, He P, Liu X P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (3): 325 ~ 327
- 张 键, 曹宇静, 刘为敏, 等. 基质金属蛋白酶-28 在人细胞滋养层与绒毛膜癌细胞系 JEG-3 细胞中的表达. *科学通报*, 2002, **47** (3): 216 ~ 220
- Zhang J, Cao Y J, Liu W M, *et al.* *Chin Sci Bull*, 2002, **47** (9):

732 ~ 736

- 9 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 ~ 254
- 10 张 键, 铁国栋, 段恩奎, 等. 纤维粘连蛋白与白血病抑制因子对小鼠胚泡基质金属蛋白酶基因表达的影响. *科学通报*, 2001, **46** (5): 401 ~ 405
Zhang J, Tie G D, Duan E K, *et al.* *Chin Sci Bull*, 2001, **46** (15): 1296 ~ 1299
- 11 Bany B M, Harvey M B, Schultz G A. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the mouse uterus during implantation and oil-induced decidualization. *J Reprod Fertil*, 2000, **120** (1): 125 ~ 134
- 12 Leco K J, Hayden L J, Sharma R R, *et al.* Differential regulation of TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in normal and Ha-ras-transformed murine fibroblasts. *Gene*, 1992, **117** (2): 209 ~ 217
- 13 张春雨. 胚胎植入与肿瘤浸润转移的相似性. *生命科学*, 1997, **9** (3): 97 ~ 99
Zhang C Y. *Life Science*, 1997, **9** (3): 97 ~ 99

- 14 Patterson B C, Sang Q A. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem*, 1997, **272** (46): 28823 ~ 28825
- 15 Ferrara N, Houck K, Jakeman L, *et al.* Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrinol Rev*, 1992, **13** (1): 18 ~ 32
- 16 张 晶, 王 莉, 蔡理全, 等. 血管内皮生长因子在小鼠胚胎植入“窗口”的表达和功能. *科学通报*, 2000, **45** (23): 2535 ~ 2538
Zhang J, Wang L, Cai L Q, *et al.* *Chin Sci Bull*, 2001, **46** (5): 409 ~ 411
- 17 Tarui T, Miles L A, Takada Y. Special interaction of angiostatin with integrin $\alpha v \beta 3$ in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2001, **276** (43): 39562 ~ 39568
- 18 蔡理全, 曹宇静, 段恩奎. 整合素 $\alpha v \beta 3$ 在小鼠胚胎植入中的作用. *科学通报*, 2000, **45** (15): 1640 ~ 1643
Cai L Q, Cao Y J, Duan E K. *Chin Sci Bull*, 2000, **12** (11): 1676 ~ 1682

Regulation Effects of Angiostatin on The Mouse Blastocysts*

ZHAO Tian-Fu^{1,2)} **, ZHANG Jian¹⁾ **, LI Jing¹⁾, CAO Yu-Jing¹⁾, LI Su-Min¹⁾

ZHOU Jia-Xi¹⁾, LI Fu-Yang³⁾, YAO Li-Bo³⁾, DUAN En-Kui¹⁾ ***

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

²⁾ Department of Biology, Baoding Teacher's College, Baoding 071000, China;

³⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Angiostatin, a 38 ku fragment encompassing the four kringle region of plasminogen, has been identified and characterized to be a potent inhibitor of neovascularization and tumor metastasis. There is a strikingly similarity between tumor metastasis and embryo implantation. However, effect of angiostatin in the mouse blastocyst has never been reported. The results showed for the first time that angiostatin down-regulated the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, vascular endothelial growth factor family and its receptor, KDR, and up-regulated the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression by binding with integrin $\alpha v \beta 3$, suggesting that angiostatin may play a role in embryo implantation.

Key words angiostatin, integrin, blastocyst, matrix metalloproteinases (MMPs), TIMPs

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (TG1999055903), The National Natural Sciences Foundation of China (30170357) and The CAS Knowledge Innovation Program (KSCX3-IOZ-7).

** These two authors made same contribution to this work.

*** Corresponding author. Tel: 86-10-62558112, E-mail: duane@panda.ioz.ac.cn

Received: February 19, 2003 Accepted: March 24, 2003