

恒河猴植入位点差异基因筛选及蛋白激酶 H11 的克隆*

李斐雪 孙晓阳 王雁玲**

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

摘要 采用 cap-finder 全长 cDNA 扩增技术和抑制消减杂交 (SSH) 相结合的方法研究了恒河猴胚胎植入初始时期子宫内膜植入位点与非植入位点的基因表达差异情况. 在准确获取妊娠 9.5 d 恒河猴植入位点和非植入位点子宫内膜后, 用 SSH 建立了植入位点消减 cDNA 文库, 从中随机挑选了 1440 个克隆, 通过点杂交获得了 179 个在植入位点高表达的克隆, 经测序和与基因库 (GenBank/EMBL) 比对分析, 证实其中 102 个克隆对应于人或恒河猴的 52 个同源基因, 75 个克隆对应于人的 58 个 EST, 另外 2 个克隆没有找到对应的同源基因, 推测为新的基因. 对其中最高频率出现的差异表达基因-蛋白激酶 H11, 通过 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 法克隆得到了它的全长 cDNA 序列. 与人的蛋白激酶 H11 相比, cDNA 序列同源性达到 94%, 所编码的蛋白质序列同源性为 83%.

关键词 恒河猴 差异基因 SSH H11 胚胎植入

胚胎植入是一个受到时间与空间严格调控的过程, 涉及母体子宫与胚胎细胞间的相互作用, 细胞的增殖与分化、子宫对胎儿的免疫反应等. 从时间上讲, 胚胎植入起始于特定的“植入窗口”期^[1], 人类为受精后第 6—7 天, 恒河猴为受精后第 9—10 天; 而且, 胚泡对子宫的粘附和植入发生在子宫内膜的特定位置, 被称为“植入位点”. 成功的胚胎植入过程需要母体子宫内膜和胚泡的相互协调, 受到来自双方多种因子的精确调控, 其中任何失误都将导致妊娠相关疾病, 如植入不完全造成流产或先兆子痫, 而过度植入导致绒毛膜上皮癌等. 临床上, 植入失败也是限制辅助生育成功率的重要因素之一.

胚胎植入分子机理的研究已引起国际学术界的广泛重视^[2,3], 尤其是基因表达高通量分析手段的发展使这一领域的研究取得了极大的进展^[4]. 如

Reese 等^[5]用基因芯片研究了 10⁴ 个基因在小鼠子宫植入点与非植入点的差异表达情况, 筛选到一批在调控小鼠胚胎植入中可能起关键作用的基因. 但人类与小鼠的胚胎植入模式及调控途径差异较大, 而且获取人类胚胎植入初期子宫的标本几乎不可能, 故到目前为止, 人类胚胎植入关键基因的研究进展甚微. 灵长类动物恒河猴 (*Macaca mulatta*) 从进化上与人类非常接近, 而且与人类有许多相似的生理过程, 如雌性恒河猴在繁殖季节 (每年 10 月至第二年 3 月) 具有类似于人类的月经周期 (25—35 d); 在分泌中期子宫内膜表面出现胞饮突 (pinopodes) 结构, 是子宫内膜具备接受胚胎能力的标志; Qin 等^[6]的研究也表明妊娠恒河猴母胎界面上多种相关分子的表达模式与人类相似. 因此恒河猴是研究人类胚胎植入机理的理想模型.

在本研究中, 我们以妊娠第 9.5 天恒河猴子宫

2004-04-21 收稿, 2004-07-13 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划 (批准号: G1999055903) 和中国科学院知识创新重要方向 (KSCZ-2-SW-201) 资助项目

** 通讯作者, E-mail: wangyl@panda.ioz.ac.cn

内膜为材料,通过抑制削减杂交(SSH)方法研究了恒河猴植入位点基因差异表达谱,并通过cDNA末端快速扩增法(RACE)克隆了其中一个差异表达基因-蛋白激酶H11的全长cDNA.

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

恒河猴子宫内膜材料取自福建省计划生育研究所非人灵长类实验动物中心.选取健康的雌性恒河猴,连续观察其两个月经周期,选取月经周期稳定在27—30d的雌猴与雄猴同笼;对观察到阴栓者,于排卵日后第9天下午手术剖取子宫,快速取下植入点子宫内膜材料(直径约0.5mm);非植入点材料取自植入点旁边的子宫内膜部分.取材后迅速冻存于液氮中备用.

PCR-SelectTM cDNA Subtraction 试剂盒和 Advantage 2 PCR 试剂盒购自 Clontech 公司; Taq DNA 聚合酶, DNase I, pGEM-T Easy 载体及 JM109 感受态细菌为 Promega 公司产品; Superscript II 反转录酶和 TRIzol RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司; QIAquick PCR 纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; [α -³²P]-dCTP 为北京亚辉公司生产; PCR 引物由上海申能博彩生物公司合成; Hybond N+ 尼龙膜、NICK 纯化柱和紫外分光光度计购自 Pharmacia 公司; PE2400PCR 仪购自 PE 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和纯化 根据 TRIzol RNA 提取试剂的说明,提取植入点和非植入点子宫内膜的总 RNA.随后用无 RNase 的 DNase I 于 37℃ 消化 15 min,去除混杂的基因组 DNA 片段;以酚/氯仿/异丙醇(25:24:1)抽提,酒精沉淀,溶于适量 DEPC 水.紫外分光光度计定量,并取少量电泳检测质量,余者冻存于-80℃ 备用.

1.2.2 抑制性削减杂交(SSH) 根据 SMART PCR cDNA Synthesis 试剂盒的说明,利用 cap-finder 技术合成植入位点和非植入位点全长双链 cDNA,经过 QIAquick PCR 纯化柱纯化后,用 Rsa I 内切酶 37℃ 酶切 3h,再一次纯化并用 4 mol/L 醋酸铵沉淀;随后根据 PCR-SelectTM cDNA Subtraction 试剂

盒说明,以植入位点 dscDNA 的酶切片段为试验方(tester),非植入位点 dscDNA 酶切片段为参照方(driver),进行两次削减杂交后,向产物中加入 200 μ L 缓冲液(20 mmol/L HEPES-HCl pH 8.3, 50 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L EDTA)稀释.取 1 μ L 上述削减杂交产物,利用试剂盒提供的两对引物在 PE2400 上进行两轮 PCR 反应,第一轮 PCR 的条件是:94℃ 预变性 25 s;而后 94℃ 10 s, 66℃ 30 s, 72℃ 90 s,共进行 27 个循环;第二轮 PCR 的条件是:94℃ 10 s, 68℃ 30 s, 72℃ 90 s,共进行 10 个循环.由此对削减杂交产物进行了选择性扩增富集.

1.2.3 cDNA 削减文库的构建 用 QIAquick PCR 纯化柱对上述第二轮 PCR 产物纯化后,取 2 μ L PCR 产物与 1 μ L pGEM-T Easy 载体 4℃ 连接过夜.取 1 μ L 连接的质粒转化 JM109 感受态菌,另外以同样方法用参照质粒转化感受态菌作为对照.以每块培养板 100 μ L 菌液的量接种在 37℃ 预热的 Amp⁺/X-gal/IPTG LB 培养板上.

1.2.4 差异基因筛选 从培养板上随机挑取 1440 个白色克隆,接种至 96 孔板,每孔含 100 μ L Amp⁺ LB 培养液,37℃ 振荡培养过夜后,各取 1 μ L 在 20 μ L 体系(10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, 25 mmol/L Mg²⁺ 1.6 μ L, 10 μ mol/L dNTP 0.4 μ L, 削减的第二轮 PCR 引物各 0.6 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L, Milli-Q 水 13.5 μ L)进行 PCR 反应,反应条件为:95℃ 预变性 1 min,随后于 94℃ 30 s, 68℃ 3 min 循环 23 次,68℃ 延伸 5 min.取 5 μ L PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.随后各取 5 μ L 上述 PCR 产物,加入等量的 0.6 mol/L NaOH,混匀 5 min,按 96 孔板上克隆的顺序分别点样(2 μ L)至 Hybond N+ 尼龙膜,对没有扩增出插入片段的克隆,在尼龙膜上对应的位置点上阴性对照(人睾丸特异蛋白 cDNA 和人 semenogelin II cDNA).每 96 个克隆重复制备两张膜,然后用 [α -³²P]-dCTP 分别标记植入点和非植入点 cDNA,并用 NICK 纯化柱(Pharmacia)纯化后作为探针.尼龙膜于 5 mL 预杂交液(6 \times SSC, 5 \times Denharts, 0.1% SDS 及 100 μ g/mL 剪切的鲑精 DNA)中 72℃ 预杂交 2 h 后,换新鲜的杂交液(含有标记探针的预杂交液),于 72℃ 杂交过

夜. 将杂交后的尼龙膜分别用 $2 \times \text{SSC}/0.5\% \text{SDS}$ 缓冲液 68°C 洗4次, 每次20 min; $0.2 \times \text{SSC}/0.5\% \text{SDS}$ 缓冲液 68°C 洗两次, 每次20 min, 随后用 Kodak BioMax MS 胶片在 -70°C 曝光过夜.

1.2.5 半定量 PCR 根据人蛋白激酶 H11 基因的 cDNA 序列设计引物, 5'引物序列为: 5'-AGT AAA ATG TTG GGG GGT GC-3', 3'引物序列为: 5'-GGA ATT GGG AGT CCA GAG TAG G-3', PCR 产物为 304bp. 以恒河猴植入位点的 dscDNA 为模板进行 PCR 反应, 所选取的 PCR 循环数要处于扩增反应的指数上升期, 同时以相同模板扩增的 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)做为内参.

1.2.6 恒河猴蛋白激酶 H11 基因的 cDNA 全序列克隆 用 SMART(tm) RACE cDNA Amplification Kit(Clontech 公司)克隆 H11 基因全序列. 以恒河猴植入点的 dscDNA 为模板, 5' RACE 引物序列为: 5'-TAT CCA GGG AAT CTG TGG TCA GTC C-3', 3' RACE 引物序列为: 5'-CTT GGT TGC GTT

AGG ACA AAA TCC-3'. 做 touchdown PCR, 退火温度先后为 72°C , 70°C , 68°C , PCR 产物测序鉴定.

2 结果

2.1 恒河猴植入位点差异表达基因的筛选

从恒河猴着床点消减文库中随机挑选了 1440 个克隆, 分别与植入点与非植入点的 cDNA 进行杂交, 图 1 显示的是点阵膜 1 的杂交结果. 选取与植入点 cDNA 有较强阳性杂交信号而与非植入点 cDNA 无阳性杂交信号的克隆, 为植入点差异表达克隆, 共 179 个; 通过 cDNA 测序并与基因库(GenBank/EMBL)比对分析, 证实其中 102 个克隆对应于人或恒河猴的 52 个同源基因, 75 个克隆对应于人的 58 个 EST, 另外 2 个克隆没有找到对应的同源基因, 推测为新的基因. 上述差异表达克隆的出现频率、对应基因等信息总结于表 1.

在上述 179 个差异表达克隆中, 有 14 个对应于人蛋白激酶 H11 基因, 为出现频率最高的差异克隆.

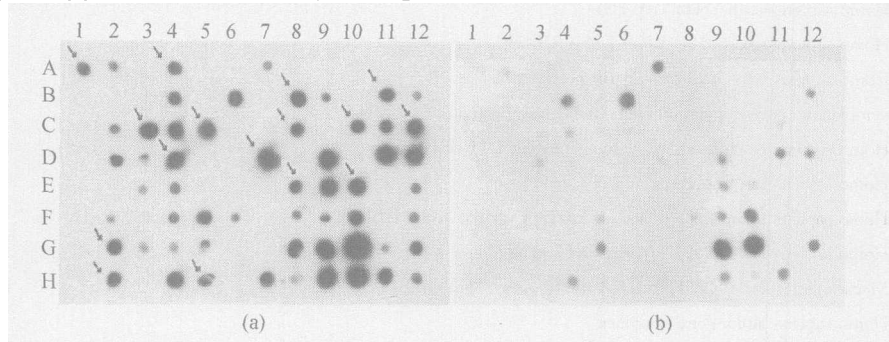


图 1 以植入点和非植入点的 dscDNA 为探针进行点杂交, 阵列膜 1 的杂交结果
(a) 植入点 dscDNA 为探针的杂交结果; (b) 非植入点 dscDNA 为探针的杂交结果; 箭头指示与植入点 cDNA 呈强阳性杂交而非植入点 cDNA 无阳性杂交的克隆. 其中 1H 为阴性对照杂交点

表 1 恒河猴植入位点差异表达 cDNA 片段对应的同源基因列表

差异克隆数	克隆号	同源基因名称	同源性/%	同源基因序列号
14	IIA11	Homo sapiens protein kinase H11 (H11)	94	NM-014365
5	7A6	Homo sapiens C3HC4-type zinc finger protein (LZK1)	98	NM-024835
5	IB8	Macaca fuscata CSTB gene for cystatin B	94	AB083417
4	IVD5	Macaca mulatta mitochondrial cytochrome C oxidase subunit II gene	99	M74005
4	IIIH9	Homo sapiens tumor rejection antigen (gp96) I (TRA1)	97	NM-003299
4	IVG1	Homo sapiens similar to 40S ribosomal protein S25 (LOC285625)	98	XM-209684
4	IIIA2	Homo sapiens SWAP-70 protein	97	XM-049197
3	IVG4	Homo sapiens ribosomal protein S8 (RPS8)	96	NM-001012
3	IIIE8	Homo sapiens ribosomal protein L5 (RPL5)	97	NM-000969

续表

差异克隆数	克隆号	同源基因名称	同源性%	同源基因序列号
3	12D6	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7)	97	NM_001553
3	15G8	Homo sapiens similar to 60S ribosomal protein L6	96	XM_300323
3	11C11	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	98	BT007165
2	IIC1	Homo sapiens ring-box 1 (RBX1)	99	NM_014248
2	IVE8	Homo sapiens MDN1, midasin homolog (yeast) (MDN1)	99	NM_014611
2	IIIF3	Homo sapiens SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like (SH3BGRL)	97	NM_003022
2	14E9	Homo sapiens general transcription factor II	95	XR_000139
2	11A1	Homo sapiens insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R) gene	96	AY293855
2	7H7	Macaca mulatta cytochrome b gene, mitochondrial gene	98	U38272
2	9C9	Homo sapiens tubulin, beta, 2 (TUBB2)	93	NM_006088
1	ID9	Macaca mulatta isolate 20156 12S ribosomal RNA gene	97	AF424950
1	IIH1	Homo sapiens, Similar to replication initiation region protein	94	BC001760
1	IIH2	Mus musculus phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha) (Pik3r1)	86	XM_127550
1	IVF2	Homo sapiens KIAA0051 mRNA, complete cds	97	D29640
1	IG3	Homo sapiens KIAA0102 gene product (KIAA0102)	94	NM_014752
1	IIC6	Homo sapiens Deleted in split-hand/split-foot 1 region (DSS1)	93	NM_006304
1	IG10	Homo sapiens, eukaryotic translation initiation factor 4B	97	BC007745
1	15E12	Homo sapiens neuroligin 4 (NLGN4), transcript variant 1	94	NM_020742
1	15E5	Homo sapiens MLN51 protein (MLN51)	95	NM_007359
1	12B9	Homo sapiens actin, beta (ACTB)	93	NM_001101
1	12C10	Homo sapiens ribosomal protein L35 (RPL35)	97	NM_007209
1	13B2	Homo sapiens ribosomal protein L9 pseudogene	94	NG_002468
1	13C4	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4 (CPEB4)	98	NM_030627
1	13D2	Homo sapiens retinoblastoma binding protein 1 (RBBP1), transcript variant 2	97	NM_023000
1	10D6	Homo sapiens butyrophilin (BT2.1) gene	87	U97495
1	10F12	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme variant Kua (UBE2V)	91	AF155120
1	10F5	Homo sapiens KIAA1627 protein (KIAA1627)	97	NM_020961
1	11A2	Macaca fascicularis RPS11 mRNA for ribosomal protein S11	100	AB093675
1	7B4	Homo sapiens alpha gene sequence	92	AF203815
1	7E12	human hla-dr heavy chain cooh terminus	93	J00200
1	9A6	Synthetic construct Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	99	BT008029
1	9B9	Homo sapiens E3 ligase for inhibin receptor	97	AY254380
1	9F1	Homo sapiens Opa-interacting protein 2 (OIP2)	97	XM_085017
1	5B12	Homo sapiens, Similar to myeloid ecotropic viral integration site 1	98	BC043503
1	5C12	Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 16.5kDa (SNRPD2), transcript variant 1	95	NM_004597
1	5C1	Homo sapiens mRNA for KIAA1238 protein	96	AB033064
1	5E12	Macaca mulatta secreted frizzled-related protein 4 (SFRP4)	98	AY321585
1	6B12	Macaca fascicularis RPL35a mRNA for ribosomal protein L35a	99	AB093673
1	6D7	Homo sapiens adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	98	BC053324
1	6E4	Homo sapiens vitamin D receptor interacting protein	96	BC005189
1	6F12	Homo sapiens leukemia-associated protein with a CXXC domain (LCX)	97	XM_167612
1	6F9	Homo sapiens RAR-related orphan receptor B (RORB)	98	NM_006914
1	8B1	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha), transcript variant 1	99	BC007503

表2 人和恒河猴蛋白激酶 H11 的全长蛋白质序列比较

蛋白激酶 H11		蛋白序列
Macaca mulatta	1—41	MADGQMPFSCHYPSRLRRDPSGLSLSSRLLDDGFGMDPFPD
Homo sapiens	1—42	MADGQMPFSCHYPSRLRRDPFRDPSLSSRLLDDGFGMDPFPD
Macaca mulatta	42—81	DLTASWPDWALPRLSSAWPGTLRSGMVPRGPTATARFGVP
Homo sapiens	43—82	DLTASWPDWALPRLSSAWPGTLRSGMVPRGPTATARFGVP
Macaca mulatta	82—122	AEGRTPPFPGEPEWPKVCVNVHSFKPEELMVKIKDGYVEVSG
Homo sapiens	83—123	AEGRTPPFPGEPEWPKVCVNVHSFKPEELMVKTKDGYVEVSG
Macaca mulatta	123—165	KHEEKQQEGGIVSKNFTKKIQLPAEVDVPTVFASLSPEGLLI
Homo sapiens	124—166	KHEEKQQEGGIVSKNFTKKIQLPAEVDVPTVFASLSPEGLLI
Macaca mulatta	166—195	EAPQVPPYSTFGESSFNELPQDSQEVCT
Homo sapiens	167—196	EAPQVPPYSTFGESSFNELPQDSQEVCT

根据差异表达克隆的测序结果, 设计恒河猴蛋白激酶 H11 的 PCR 引物, 用半定量 PCR 法检测该基因在恒河猴子宫植入点与非植入点的表达情况, 证实其在植入点的表达远较非植入点处强 (图 2).

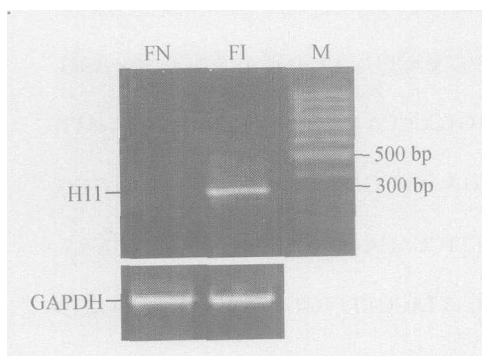


图2 半定量 PCR 法检测蛋白激酶 H11 基因在恒河猴植入点 (FI) 与非植入点 (FN) 处的表达情况 M 为 DNA 分子量标准

2.2 恒河猴蛋白激酶 H11 cDNA 全序列的克隆

根据测序获得的恒河猴蛋白激酶 H11 cDNA 片段的序列, 设计基因特异引物, 用 Clontech 公司的 SMART-RACE cDNA 扩增试剂盒进行 5'-和 3'-RACE 反应, 分别得到 970bp 和 670bp 的扩增产物 (图 3). 将两段序列加上差异表达克隆中的已有序列拼接后得到恒河猴蛋白激酶 H11 的全长 cDNA 序列 (图 4), 共 1670bp (GenBank 登录号: AY457046). 此 cDNA 序列与人的相应序列同源性达到 94%. 推演其编码的蛋白质为 195 个氨基酸, 与人的蛋白激酶 H11 相比, 少一个氨基酸, 并且在 21—24 位及 113 位氨基酸有所差异; 蛋白序列同源性达到 83% (图 5).

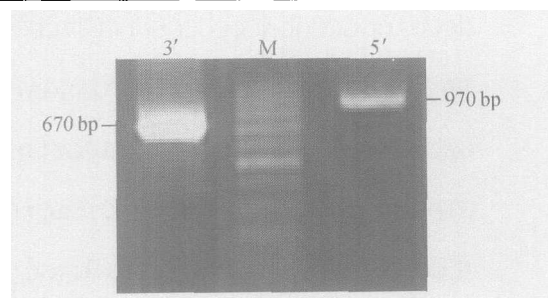


图3 RACE 法克隆恒河猴蛋白激酶 H11 基因的全长 cDNA 序列 M, 100 bp 分子量标准; 3', 3'RACE 产物; 5', 5'RACE 产物

3 讨论

抑制性消减杂交 (SSH) 方法具有假阳性率低, 敏感性高等特点, 被广泛用于筛选差异表达基因. 但该方法至少需要 5 μg mRNA, 而我们实验所采用的是恒河猴妊娠初始 (第 9.5 天) 时子宫的材料, 这时胚胎刚刚与子宫内膜黏附, 植入点仅为直径 0.5 mm 的充血点, 标本非常少而珍贵. 为了能对植入点与非植入点子宫基因的差异表达进行分析, 我们采用了根据 cap-finder 技术^[7] 创立的全长 cDNA 扩增技术, 从而用少量的材料也可以进行 SSH 分析^[8,9].

我们用 SSH 方法建立了植入点消减 cDNA 文库, 从中随机筛选到一批恒河猴植入点差异表达的基因. 分析它们的同源基因的功能, 发现在植入过程中多种功能不同的基因表达发生改变, 其中与细胞增殖和分化相关的基因有: 蛋白激酶 H11, cystatin B, ring-box 1 (RBX1), 磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K), 分泌型卷曲相关蛋白 4 (sFRP4) 等, 表明植入过程中伴随着活跃的细胞增殖及凋亡行为; 与

GGGATCTGCTGGATCTGCCTGGGGGTCGCCTTTGGGGTCTGGGACCCAGCCGAGGGGGCACAAC
 CGTCCC'GGCAGTGG'ITGGTCTGC'TTCTCCCTGCAGAAAAGCAGCATTTCGGAAGCTGAAGAATA
 AGCTAGCCCAGCCACACCACCTTGTGAGTGACCTTGGGCAGGTGGTCTGTCTCTCTGAGCCTCTG
 TTTCCCTCTGAGCTCAGCAGCCACC[ATG]GCTGATGGTCAGATGCCCTTCTCCTGCCACTACCCAAGC
 CGCCTGCGCCGAGACCCTTCGGGACTCTCCCTTTCTCTCGCCTGCTGGATGATGGCTTTGGCATGGA
 CCCCTTCCCAGACGACTTGACGGCCTCTTGGCCCGACTGGGCTCTGCCTCGTCTCTCTCCGCTGG
 CCAGGCACCCTAAGGTCTGGCATGGTGGCCCGGGGCCACTGCCACCGCCAGGTTTGGGGTACCT
 GCCGAGGGCCGGACCCCCCGCCCTTCCCTGGGGAGCCCTGGAAAGTGTGTGTGAATGTGCACAGC
 TTCAAGCCAGAGGAGTTGATGGTGAAGATCAAAGATGGATATGTGGAGGTGTCTGGCAAACACGAA
 GAGAAACAGCAAGAAGGTGGCATCGTTTCTAAGAACTTCACAAAAGAAAATCCAGCTTCTGCAGAG
 GTGGATCC'TGTGACAGTGT'TTGCCTCACTTTCCCCAGAGGGTCTACTGATCATCGAAGCTCCCCAGG
 TCCCTCCTTACTCAACA'ITGGAGAGAGCAGTTTCAACAACGAGCTTCCCCAGGACAGCCAGGAAG
 TCACCTGTACC[AGA]GATGCCAGTACTGGCCCATCCTTGT'TTGTCCCAACCC'TAGGGCTTCTCTGATT
 CCAGGGTACATTA'CTTTAGCTGAACTCAGATTTAGTGCAAGTAAAATGTTGGGGGGTGCGGGGGTGG
 GGACTGACCACAGATTCCTTGGATAGTGTAGTGGTAGATTTTCCACAAGATAGCGCAATTTGGCAAA
 CCATGCTTGGT'TGCGTTAGGACAAAATCCTAGTTTTCTTTCTTTACCTTTTCTATCTTGATGAAAATG
 TTGCACAT'CTATAGTTGCAAAAACACATAAAAAGGGGACTTAAACATTCACGT'TGTATCTTACCTTGCA
 GTGAATGCAAGGGT'ACTTTTCTCTGGGGACCTCCCCCATTACCCAGGTTCTACTCTGGACTCCCCAA
 TTCCCATGGCT'CCCAAACCATGCTGCATGGTTFGGTAAATGAAATCCAGTAGCTAACCCCACTG'ACT
 TCCACAT'GCC'TGGCCTACAAAAGGGT'GATATACAGGCTTATATCCCTATACGGAATTTG'CCATCAATC
 ACATAAAAACAAACAGTGCCTTCTGCCC'TCTGCCAGATAITTCAGCATGT'CCCAAGGTTTCCAA
 GTTAGCCT'ICCC'IAAGGACTCCGGGAGCCTCTCAGTTTATGATCTGGCCAAGGTCCCCATTTCTTCT
 GTCCCCTATGTTAAGT'CGGGATTTTACAGAGGGAGCTGTCTCCAGACAGCTCCATCAGGAACAAGC
 AAAGGGCAGATAGCTGACAATAGCTAGTGGTATTGTGTATACCGGAGGGACTGTGTGTCATGTATTGG
 TTATGCTGT'GTTAGGGGAATACG'TAATATTATACATATATAAGACGCGTTCAAAAAA

图 4 恒河猴蛋白激酶 H11 基因的全长 cDNA 序列恒河猴蛋白激酶 H11 基因的全长 cDNA 序列
 阴影部分为编码区

免疫相关的分子有: 1型 gp96 (TRA1), 胰岛素样生长因子 2 受体 (IGF2R), SWAP-70 等, 它们可能在母体与胚胎之间形成的免疫耐受中起重要的作用; 还有一些核糖体蛋白, 如 40S 核糖体蛋白 S25, 核糖体蛋白 L5, 60S 核糖体蛋白 L6 等, 可能与植入过程中细胞内大量的蛋白质合成有关。

在所筛选到的植入点差异表达基因中, 蛋白激酶 H11 出现的频率最高, 表明此基因在植入点上调幅度较大或表达丰度较高。人蛋白激酶 H11 是 Smith 等于近年发现的^[10], 是一种丝/苏氨酸蛋白质激酶, 可能与细胞的增殖有关。研究发现蛋白激酶 H11 在人黑色素瘤细胞中过度表达; 用 H11 基因的反义寡核苷酸处理人黑色素瘤细胞, 则大部分细胞都停滞在 G1 期, 推测此基因可能参与了黑色素细胞的转化, 通过激活诸如 E2F 等与增殖相关的转录因子或细胞周期蛋白 cdk4 等发挥作用。也有研究证明蛋白激酶 H11 的过度表达可以引起心脏的肥大, 可以激活与细胞增殖密切相关的 Akt 信号通路。最近 Gober 等^[11]的研究表明, H11 的过量表达引发人黑色素瘤细胞和人胚肾细胞的凋亡, 而且凋亡过程是通过 caspase 和 p38MAPK 途径介导的。

胚胎植入伴随着细胞的增殖和凋亡过程。有关哺乳动物生殖过程中细胞凋亡的研究大多集中在啮齿类动物, 对灵长类动物及人的植入过程中细胞凋亡的分子机理研究很少。在啮齿类中, 胚泡定位并黏附到子宫内膜的上皮, 随后进行浸润, 由胚胎诱导的局部受调控的子宫内膜凋亡是浸润过程中的关键步骤^[12]。研究表明, 啮齿类子宫进入植入窗口期时子宫内膜中细胞凋亡率即相应升高; 大鼠胚胎在向基质浸润的过程中, 孕体周围的母体组织中存在着持续的细胞凋亡^[13]。来自胚胎或胎盘的因子以及母体的激素都可能是凋亡信号的调节因子, 如小鼠胚胎植入过程中, 子宫内膜细胞的凋亡过程受自身分泌与旁分泌因素的调节^[14], 并且转化生长因子 (TGF) β 可能在调节内膜与滋养层接触部位发生的细胞凋亡中起着重要作用。

关于灵长类的胚泡引发子宫内膜上皮细胞发生凋亡以利于胚胎穿过上皮屏障的证据还不是很多, 有人用体外模型模拟人植入的胚泡定位和黏附阶段来研究单个胚泡对人子宫内膜上皮细胞 (hEEC) 凋亡的调控作用, 发现 hEEC 的凋亡也受到胚胎的协

同调节。在胚泡定位阶段, 胚泡的存在可以阻止子宫内膜上皮细胞发生凋亡; 但是, 当胚泡黏附到子宫内膜单层上皮细胞上后, 便引起了旁分泌调节的细胞凋亡反应^[15]。还有研究发现 Fas-L 出现在人胚胎的滋养层细胞中, Fas 则在人子宫内膜上皮细胞的外表面 (apical cell surface of hEEC) 表达, 流式细胞计数发现表达 Fas 的人子宫内膜细胞达到 60%。中和黏附试验发现 Fas/Fas-L 凋亡系统可能是胚泡穿过上皮屏障的重要机制^[12]。目前我们仍无法确定 H11 在恒河猴植入点的显著高表达是否也意味着它参与了此时子宫内膜上皮细胞的凋亡调节, 进一步的基因定位及体外实验将有助于回答这些问题, 而我们所克隆到的恒河猴 H11 全长 cDNA 将成为获得其特异抗体并进一步研究其功能的基础。

参 考 文 献

- 1 Paria B C, et al. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(21): 10159—10162
- 2 Yoshioka K, et al. Determination of genes involved in the process of implantation: Application of GeneChip to scan 6500 genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272(2): 531—538
- 3 Popovici R M, et al. Discovery of new inducible genes in *in vitro* decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology*, 2000, 141(9): 3510—3513
- 4 Lessey B A. The role of the endometrium during embryo implantation. *Hum Reprod*, 2000, Suppl 6: 39—50
- 5 Reese J, et al. Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. *J Biol Chem*, 2001, 276: 44137—44145
- 6 Qin L, et al. Expression of integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface during tubal implantation. *Reproduction*, 2003, 126: 383—391
- 7 Peliska J A, et al. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, 1992, 258(5085): 1112—1118
- 8 孙晓阳, 等. 用少量样本进行抑制性消减杂交. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(6): 889—893
- 9 Sun X Y, et al. Determination of genes involved in the early process of embryonic implantation in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) by Suppression-Subtractive Hybridization. *Biol Reprod*, 2004, 70(5): 1365—1373
- 10 Smith C C, et al. A novel human gene similar to the protein kinase (PK) coding domain of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) codes for a serine-threonine PK and is expressed in melanoma cells. *J Biol Chem*, 2000, 275(33):

- 25690—25699
- 11 Gober M D, et al. Forced expression of the H11 heat shock protein can be regulated by DNA methylation and trigger apoptosis in human cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 37600—37609
 - 12 Galan A, et al. The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. *Biol Reprod*, 2000, 63(2): 430—439
 - 13 Piacentini M, et al. Immunohistochemical localization of tissue transglutaminase and Bcl-2 in rat uterine tissues during embryo im-plantation and post-partum involution. *Differentiation*, 1994, 57(1): 51—61
 - 14 Kamijo T, et al. Biochemical evidence for autocrine/paracrine regulation of apoptosis in cultured uterine epithelial cells during mouse embryo implantation *in vitro*. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4(10): 990—998
 - 15 Galan A, et al. Embryonic regulation of endometrial epithelial apoptosis during human implantation. *Hum Reprod*, 2000, Suppl 6: 74—80

日本学术振兴会实施国际强强合作计划

为了迅速提升日本基础科学研究在国际上的地位,日本学术振兴会(JSPS)自2004财政年度开始实施一项新的国际合作计划,旨在建立与加强日本高水平的大学和研究机构与15个科学发达的西方国家在科学前沿领域的国际合作。这15个发达国家是:美国、加拿大、奥地利、比利时、芬兰、法国、德国、意大利、荷兰、西班牙、瑞典、瑞士、英国、澳大利亚和新西兰。JSPS将该计划称为强强合作计划(Core-to-Core Program)。

该计划包括两部分,即“战略研究网络”与“整合行动倡议”。前者的目标在于建立并加强日本与这些国家的研究网络,在相对较长的时间内保持和提高日本的大学与研究机构与其他科学先进国家的合作水平;后者则在于支持国内外研究人员的短期合作,为建立国内外合作研究网络奠定基础。对通过后者支持的短期合作的效果还将适时进行评估,评估结果满意的项目将整合进“战略研究网络”项目中。

在该计划的具体实施过程中,每个项目将在选定的合作领域内分别从日本与合作方各指定一个协调人,双方(或多方)的协调人可以超越其所属机构组织研究队伍,综合利用合作研究活动、双边(或多边)学术会议和人员交流等方式,促进国际合作与交流。JSPS将支付日方研究机构的国际旅费、国内旅费、耗材费、会议费以及酬金等费用。

该计划于2003财年立项2004年2月1日开始实施的项目有:筑波大学与比利时卢汶大学以及美国Argonne国家实验室合作的超导纳米科学与工程;京都大学与美国Lawrence Livermore国家实验室、英国剑桥大学、德国科学基金会分子放射生物学研究所、荷兰伊拉斯谟医学中心、意大利Nazionale Tumori研究所以及澳大利亚女王医学科学研究所合作的癌症患者放疗中细胞对电离辐射反应的分子分析;京都大学与德国马普进化人类学研究所以及美国哈佛大学合作的人类进化的灵长类起源研究;日本高能加速器研究所与美国Riverside加州大学合作的高级介子与正电子束开发;日本自然科学研究院与美国Irvine加州大学、加拿大卡尔加里大学以及英国威康信托基金和英国癌症研究所合作的对爪蟾(*Xenopus laevis/tropiclis*)进行功能基因组学研究。

2004财年立项2004年4月1日开始执行的项目包括:筑波大学与美国费米国家加速器实验室、英国爱丁堡大学以及德国电子能量质子同步加速器合作的建立与加强计算粒子物理国际研究网络;东京大学与加拿大Laval大学、法国原子能委员会、德国耶拿弗里德里希-席勒大学、意大利Palermo大学、英国Strathclyde大学以及美国密西根大学合作的超快强激光科学研究;东京医科齿科大学与美国哈佛大学、加拿大多伦多大学以及奥地利分子病理学研究所合作的骨骼与软骨病高级分子病理生理学研究;名古屋大学与美国威斯康星大学和康乃尔大学以及瑞典隆德大学合作的21世纪“发展援助与法律”研究;德岛大学与瑞士巴塞尔大学、荷兰莱顿大学、澳大利亚蒙纳什大学以及美国迈阿密大学合作的胸腺器官形成的分子机理研究;日本国家天文台与德国南欧天文台、英国剑桥大学以及美国空间电镜科学研究所合作的利用尖端信息技术建立与国际虚拟观测站联网的日本虚拟观测站;日本物质-材料研究所与美国华盛顿大学以及德国马普金属研究所合作开展的将材料研究及其应用与信息学相结合的国际合作。

龚旭 编译