

血管内皮生长因子对小鼠胚胎植入过程中 基质金属蛋白酶的影响

李素敏^{①②} 曹宇静^① 张键^① 田永强^① 郑行^② 段恩奎^{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中国农业大学生物学院, 北京 100094.

* 联系人, E-mail: duane@panda.ioz.ac.cn)

摘要 血管内皮生长因子(VEGF)是内皮细胞的特异性致裂原, 在血管发生和血管生成过程中占有重要地位. 近年来发现, VEGF 对胚胎植入也具有一定作用, 但有关 VEGF 与植入中标记分子 MMPs 之间的关系, 迄今未见报道. 因此, 研究目的是阐明 VEGF 在小鼠胚胎植入过程中对 MMPs 的影响. 半定量 RT-PCR 的结果表明, VEGF 抗体可显著抑制小鼠子宫 MMP-2 和-9 mRNA 的表达; 将小鼠胚泡培养于 FN 铺碟的培养液中, 同时用不同浓度的 VEGF 抗体孵育胚泡, 通过明胶酶谱分析检测发现, 0.1 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 VEGF 抗体能明显降低胚泡分泌的 MMP-2 和-9 水解明胶活性的能力. 以上结果提示, VEGF 抗体可干扰子宫内膜或胚泡 MMP-2 和-9 的基因表达和蛋白分泌, 使滋养层细胞向子宫内膜的侵入能力或者子宫内膜接受胚泡的能力降低, 影响胚胎植入过程.

关键词 血管内皮生长因子 基质金属蛋白酶-2 基质金属蛋白酶-9 胚胎 植入

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种内皮细胞的特异性致裂原, 通过两个酪氨酸激酶受体(Flt-1 和 Flk-1/KDR)发挥其生理功能. 许多研究表明, VEGF 作用于胚胎植入过程. 在小鼠胚胎与子宫内膜的黏附反应开始时, VEGF 及其受体 mRNA 集中表达于母胎界面, 接着系膜侧和系膜对侧的蜕膜基质细胞中有这些基因的聚集^[1], 提示 VEGF 及其受体可能参与了蜕膜化以及胎盘形成过程. Charnock-Jones 等人^[2]报道 VEGF 的特异性受体 Flt-1 mRNA 强烈表达于怀孕前 3 个月的人细胞滋养层细胞及侵入到母体蜕膜中的绒毛外滋养层上. 此外, 在围植入期的胚胎中也发现 VEGF 及其受体 mRNA 的表达和蛋白的分布^[1,3,4]. 另有报道, VEGF 抗体可显著抑制小鼠胚胎的着床率、降低体外培养的胚泡及外胎盘椎在子宫上皮细胞单层上的黏附和扩展率^[4], 提示 VEGF 可能促进滋养层细胞的增殖和分化. 同时参与胚胎向子宫内膜的植入过程.

植入启动后, 滋养层细胞通过一些蛋白水解酶的作用, 穿过子宫基底膜, 进入基质组织, 完成植入过程. 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及其组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)在植入过程的组织重建中起关键作用^[5,6]. MMPs 是一类依赖于 Zn^{2+} 的蛋白酶家族, 水解各种类型胶原、糖蛋白以及蛋白多糖等多种细胞外

基质, 以此参与细胞黏附、迁移、增殖和分化等过程. 其中 MMP-2 和-9 被认为是滋养层细胞侵入的分子标志^[7].

VEGF 对胚胎植入的调控是否通过 MMPs 完成, 尚未见报道. 本文以小鼠为实验模型, 利用 RT-PCR 及明胶酶谱分析方法检测 VEGF 对植入过程中 MMP-2 和-9 表达及分泌的影响, 以探讨 VEGF 对胚胎植入作用的分子机制.

1 材料与方法

(i) 主要试剂. 小鼠抗人 VEGF 单克隆抗体、纤黏连蛋白(fibronectin, FN)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自美国 Sigma 公司; Ham's F-12 培养基和 TRIzol 试剂购自美国 Gibco BRL 公司; Oligo(dT)₁₈, 反转录酶 MMLV 和 Taq DNA 聚合酶购自美国 Promega 公司; GAPDH 引物为北京鼎国生物公司产品.

(ii) 实验动物. 成年(5~6 周龄, 体重 25~30 g)昆明远交系小白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, 自由摄食饮水.

(iii) 半定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR). 雌、雄鼠自然交配, 查出阴栓之日为怀孕第 1 天(D1), 在小鼠 D4 子宫角注射 3 μg VEGF 抗体(溶于 3 μL

PBS), 对照组注射 3 μg 小鼠 IgG(溶于 3 μL PBS). 用 TRIzol 提取 D6, D7 和 D8 的子宫总 RNA. 用 Oligo (dT)₁₈ 合成 cDNA 第 1 条链, 特异性引物用于 PCR. 反转录及 PCR 程序参照张键等人^[8]介绍的方法, 简述如下: 10 μg 总 RNA, 72 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 再加入 1.5 μg Oligo (dT)₁₈, 0.5 μL RNasin, dNTPs (其中 dATP, dTTP, dCTP 和 dGTP 的终浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$), 300 U 的反转录酶 MMLV 溶于反转录缓冲液中, 反应体系为 20 μL . 混合液于 42 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h, 然后放入 95 $^{\circ}\text{C}$ 停止反应并变性. 取 1/10 的 cDNA 产物, 加入特异性引物各 1 μg , dNTPs (其中 dATP, dTTP, dCTP 和 dGTP 终浓度均为 150 $\mu\text{mol/L}$), 1 U Taq DNA 聚合酶溶于 PCR 缓冲液中, 反应体系为 100 μL . 每个 PCR 循环包括: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 进行 30 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 以管家基因 GAPDH 作为内参, 特异性引物 MMP-2 和 9 的序列参照 Bany 等人^[9], 所有引物序列如表 1.

表 1 RT-PCR 中所用引物的序列			
基因	引物	序列(5'~3')	片段大小/bp
GAPDH	正义	GGTCGGAGTCAACGGATTTC	350
	反义	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	
MMP-2	正义	CACCTACACCAAGAAGCTTCC	332
	反义	AACACAGCCTTCTCCTCTG	
MMP-9	正义	TTGAGTCCGGCAGACAATCC	433
	反义	CCTTATCCACGCGAATGACG	

最后用 1%琼脂糖进行电泳并摄影, 再以吸光度扫描仪进行灰度扫描分析.

(iv) 体外培养. 常规 PMSG-hCG 法超数排卵, 雌雄合笼后以查出阴栓之日为孕, D1, D4 处死雌鼠, 收集胚泡. 胚泡培养液为 Ham's F-12 添加 0.24 mg/mL 乳酸钙、0.3 mg/mL 谷氨酰胺、1.6 mg/mL 碳酸氢钠、400 U/mL 硫酸庆大霉素、0.4%BSA 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 雌二醇. 实验前, 用 10 μL 1.0 mg/mL FN 铺碟, 置超净台内吹干. 用含有不同浓度 VEGF 抗体(分别为 0, 0.1 和 1 $\mu\text{g/mL}$)的胚泡培养液制作成 50 μL 微滴, 将培养 24 h, 发育良好的胚泡移入其中, 1 ~ 2 个/ μL 培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 的培养箱中培养 6, 24 和 48 h 后, 分别收集培养液, 用明胶酶谱分析检测其中 MMP-2 和-9 活性的变化. 本实验分为 3 组, 培养液中抗体的浓度分别为 0(对照 C), 0.1(处理 1, T1)和 1 $\mu\text{g/mL}$ (处理 2, T2).

(v) 酶谱分析. 参照文献^[10]并略加以修改, 简

述如下: 用含 1 mg/mL 明胶的 10%丙烯酰胺凝胶作为分离胶, 其上加入 2%丙烯酰胺凝胶作为浓缩胶, 用酶标仪测定胚泡培养液中的蛋白质含量, 再以 5 : 1 的比例加入样品缓冲液(16.6 g/L SDS, 70 g/L 蔗糖, 1 g/L 酚红), 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应 30 min, 然后以每个样品 20 μg 总蛋白质的标准上样, 浓缩胶内的电压为 100 V, 分离胶中的电压为 150 V, 电泳时间约为 1 h, 整个电泳在 Bio-Rad 电泳槽中进行. 电泳结束后, 以 2.5% Triton-X 100 溶液振荡 1 h (10 min $\times$ 6), 将凝胶置于 Tris-HCl 缓冲液(10 mmol/L CaCl₂, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6)中孵育 18 h (37 $^{\circ}\text{C}$, 恒温摇床), 再用考马斯亮蓝 G-250 染色, 脱色后摄影, 并用吸光度扫描仪进行半定量吸光度扫描分析.

(vi) 数据分析. 所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示, 并采用 Student-T 进行统计分析.

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

提取怀孕 D6, D7 和 D8 的小鼠子宫总 RNA, 用 MMP-2 和-9 特异性引物进行 RT-PCR, 用 GAPDH 作为内参照, 进行半定量分析. 结果显示, 子宫角注射 VEGF 抗体后, 子宫内 MMP-2 和-9 mRNA 的表达明显降低(图 1). 从图 2 可以看出, VEGF 抗体对 MMP-2 mRNA 的最大抑制作用($P < 0.001$)出现在注射后 D3, 即怀孕 D6, 随着时间的延长, 作用逐渐不明显; 而对 MMP-9 mRNA, 在检测的时间(D6, D7)内均有显著降低, 最大抑制($P < 0.001$)出现在注射后 D4, 即怀孕 D7.

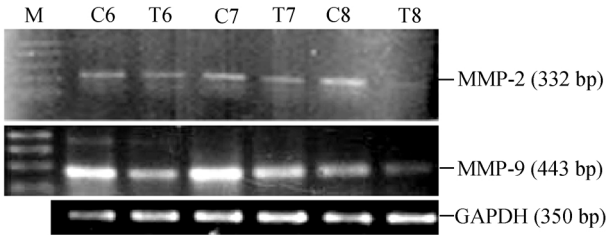


图 1 子宫角注射 VEGF 抗体对小鼠子宫 MMP-2 和-9 mRNA 表达的影响

M 示 PCR 分子量标准, C 示对照组, T 示实验组

2.2 明胶酶谱分析结果

将胚泡培养于不同浓度的 VEGF 抗体中, 分别在 6, 24 和 48 h 取培养液, 用明胶酶谱分析的方法检

测其中 MMP-2 和-9 的活性变化,见到不同浓度 VEGF 抗体在不同时间对胚泡分泌的 MMP-2 和-9 的活性均产生抑制作用(图 3).从光密度扫描结果(图 4)看,VEGF 抗体对 MMP-2 和-9 的影响存在剂量依赖关系;而且,在培养 24 h 时, MMP-2 和-9 的降低趋势最明显,说明此时 VEGF 抗体的作用最强.

3 分析与讨论

MMP-2 和-9 被认为在 小鼠胚胎植入过程中起着重要作用. MMP-2 主要参与早期蜕膜化和胎盘形成所需要的新血管生成,而 MMP-9 主要调节滋养层细胞的侵入^[5,9,11].许多研究表明, 这二者的基因表达和激活受到白血病抑制因子(LIF)^[8,12]、表皮生长因子(EGF)^[12]等细胞因子的调控. Bany 等人^[9]等报道,在

小鼠怀孕 D5 和 D8, MMP-2 和-9 主要分布于子宫内 膜,随着植入过程的进行不断发生变化;在肌层中也 有分布,但不受怀孕的影响;而在浆膜层没有表达; 而且子宫内膜中 MMP-2 和-9 的表达变化不受来自胚 胎信号的影响.我们在研究中发现, VEGF 抗体可以 显著降低怀孕子宫以及胚泡 MMP-2 和-9 的水平, 所以推测, VEGF 抗体可能对子宫内膜分泌两种 MMPs 的过程也存在调控.

VEGF 抗体对 MMP-2 和-9 的转录和翻译过程的 抑制,导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的 降解和组织重建过程受阻,使胚泡的侵入能力和子 宫内膜的接受能力均有所降低,影响了整个植入过 程的顺利进行.这与张晶等人^[4]的结论相吻合. FN 是

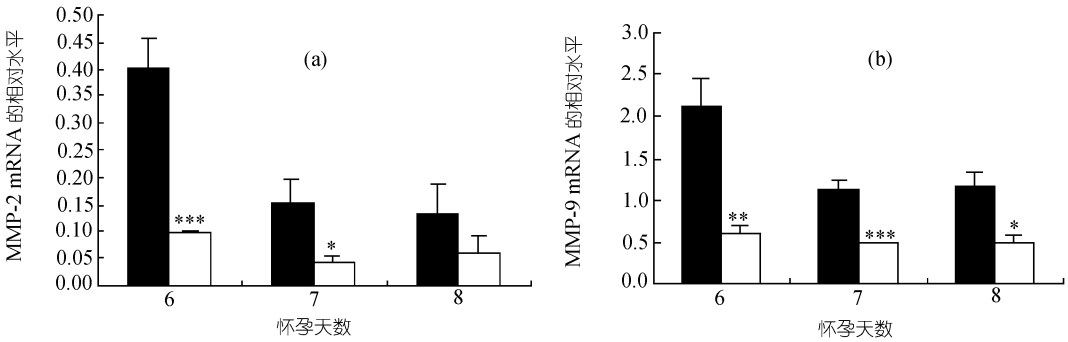


图 2 子宫角注射 VEGF 抗体对小鼠子宫 MMP-2 和-9 mRNA 表达的影响
■示对照组, □示实验组. *, **和***分别示与对照组相比, $P < 0.05, 0.01$ 和 0.001 (下同). 所取数据为重复 3 次的实验结果平均值

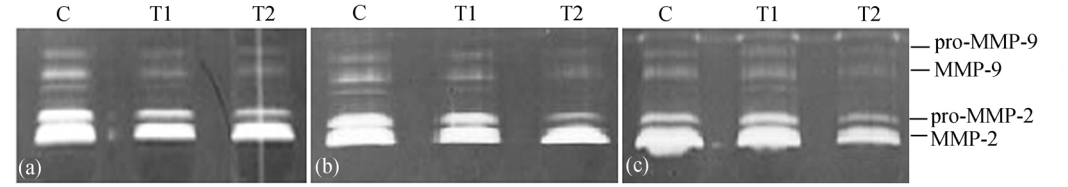


图 3 VEGF 抗体对小鼠胚泡分泌 MMP-2 和-9 的明胶酶谱分析
(a) 培养 6 h, (b) 培养 24 h, (c) 培养 48 h. C 示对照组, T1 示 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 抗体组; T2 示 $1 \mu\text{g/mL}$ 抗体组

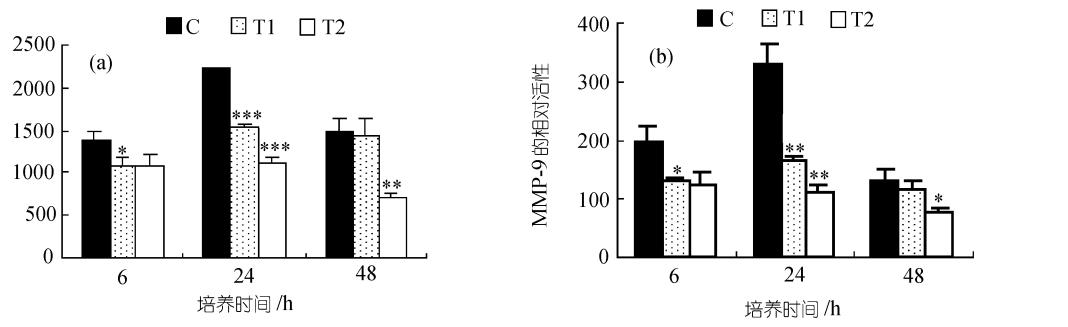


图 4 VEGF 抗体对小鼠胚泡分泌 MMP-2 和-9 的影响
图中所有数据为 MMPs 与 pro-MMPs 的光密度值之和. C, T1, T2 同图 3 所示. 所取数据为重复 4 次实验结果平均值

一种主要的 ECM, 可与其受体整合素结合, 通过 Ras-MAPK(mitogen-activated of protein kinase)信号转导通路^[13~15], 启动胚泡 MMP-2 和-9 的基因表达^[8], 并促进 MMP-2 和-9 活性升高^[16]. 有研究表明, VEGF 可通过其受体 Flt-1 提高血管平滑肌细胞 MMP-1 和-9 的活性^[17]; 另有研究表明, 皮肤微血管内皮细胞经 VEGF 处理后, 其 MMP-2 的活性显著提高^[18]. 我们由此推测, VEGF 抗体对子宫内 MMPs 基因表达和对胚泡 MMPs 分泌的抑制, 可能是 VEGF 抗体阻碍了其受体的激活, 从而作用于 FN-整合素-蛋白酶通路, 或者直接作用于细胞因子-蛋白酶途径^[8], 影响 MMPs 的转录和翻译. 邵龙江等人^[19]报道围植入期大鼠子宫中的血管生成和血管通透性增加可能与 VEGF 的介导有关. 所以, VEGF 抗体对小鼠胚胎着床率的抑制也可能是因为阻止了植入时所需新血管的形成, 从而使胚胎不能顺利植入到母体子宫内膜上.

TIMPs 可与 MMPs 以 1 : 1 结合, 从而抑制后者的活性; 同样, TIMPs 还可与 pro-MMPs 结合, 促进酶原的激活^[20]. 所以 TIMPs 对 MMPs 具有双向调节作用. 在正常生理条件下, 如胚胎植入过程, TIMPs 与 MMPs 平衡表达, 使滋养层细胞有节制地侵入子宫内膜^[5,6]. 但 VEGF 抗体对 MMPs 的调节是由于单纯降低了 MMPs 的活性, 还是同时作用于 TIMPs 的表达, 从而使 MMPs 的激活受到抑制, 有待于进一步研究.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划(批准号: G1999055903)、国家自然科学基金(批准号: 30170112)、中国科学院知识创新工程领域前沿项目和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客座课题资助项目.

参 考 文 献

1 Chakraborty I, Das S K, Dey S K. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation. *J Endocrinol*, 1995, 147(2): 339 ~ 352

2 Charnock-Jones D S, Sharkey A M, Boockock C A, et al. Vascular endothelial growth factor location and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod*, 1994, 51(3): 524 ~ 530

3 Krussel J S, Behr B, Milki A A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7(1): 57 ~ 63

4 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

5 Das S K, Yano S, Wang J, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse

uterus during the peri-implantation period. *Dev Genet*, 1997, 21(1): 44 ~ 54

6 Alexander C M, Hansell E J, Behrendtsen O, et al. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development*, 1996, 122(60): 1723 ~ 1736

7 Huppertz B, Kertschanska S, Demir A Y, et al. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMPs), their substrates, and their inhibitors (TIMPs) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res*, 1998, 291(1): 133 ~ 148

8 张键, 铁国栋, 曹宇静, 等. 纤维黏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 ~ 404

9 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

10 Mertilli M, Campana A, Bischof P. Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells *in vitro*. *J Reprod Fertil*, 1993, 98(1): 67 ~ 76

11 Reponen P, Leivo I, Sahlberg C, et al. 92 kD type IV Collagenase and TIMP-3, but not 72 kD type IV collagenase or TIMP-1 or TIMP-2, are highly expressed during mouse embryo implantation. *Dev Dyn*, 1995, 202(4): 388 ~ 396

12 Harvey M B, Leco K J, Arcellana-Panlilio M Y, et al. Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development*, 1995, 121(4): 1005 ~ 1014

13 Schlaepfer D D, Hanks S K, Hunter T, et al. Integrin-mediated signal transduction linked to ras pathway by Grb: binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 1994, 372(6508): 786 ~ 791

14 Schlaepfer D D, Hunter T. Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J Biol Chem*, 1997, 272(20): 13189 ~ 13193

15 张春雨, 段恩奎, 曹宇静, 等. 焦点黏着激酶在小鼠外胎盘锥体外扩展中的表达、分布和功能. *科学通报*, 1998, 43(14): 1527 ~ 1532

16 铁国栋, 曹宇静, 赵兴绪, 等. 纤维黏连蛋白-整合素相互作用启动胚泡中基质金属蛋白酶活性. *科学通报*, 2000, 45(5): 475 ~ 479

17 Wang H, Keiser J A. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res*, 1998, 83(8): 832 ~ 840

18 Lamoreaux W J, Fitzgerald M E, Reiner A, et al. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells *in vitro*. *Microvasc Res*, 1998, 55(1): 29 ~ 42

19 邵龙江, 王红梅, 段恩奎, 等. 围植入期大鼠子宫中血管内皮生长因子的表达与血管生成. *科学通报*, 2001, 46(5): 397 ~ 400

20 Nagase H, Suzuki K, Itoh Y, et al. Involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) during matrix metalloproteinase activation. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 389: 23 ~ 31

(2002-05-20 收稿, 2002-07-29 收修改稿)