一氧化氮对小鼠胚胎植入的调控

张 璇 王红梅 林海燕 李庆雷 刘冬林 钱 东 刘国艺 祝 诚*

(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. * 联系人, E-mail: zhuc@panda.ioz.ac.cn)

摘要 采用子宫角注射及酶谱方法研究了一氧化氮(NO)对小鼠胚胎植入的影响. 受试小鼠于妊娠第 3 天(D3)在一侧子宫角内注射不同剂量一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME), 另一侧子宫角为对照侧; 小鼠于 D7 颈椎脱臼处死, 观察并统计每侧子宫角植入胚胎数. 结果发现, 与对照侧相比, L-NAME 0.05 mg/只处理组胚胎植入数无明显变化($P > 0.05$); L-NAME 0.2 mg/只处理组植入胚胎数显著降低($P < 0.05$). 在 L-NAME 中加入 NO 供体硝普钠(SNP)时, 则不影响胚胎植入数($P > 0.05$). 为进一步探讨 NO 在胚胎植入中的作用机理, 用明胶酶谱方法检测了子宫中基质金属蛋白酶-2 和-9(MMPs)的活性, 结果显示: 与对照侧相比, L-NAME 0.2 mg/只处理组子宫中 MMP-2 的活性没有变化, 而 MMP-9 活性显著下降; L-NAME 与 SNP 合并应用后, MMP-9 的活性恢复正常. 结果表明, NO 对小鼠胚胎植入起促进作用, 这种作用可能是通过影响 MMP-9 的活性实现的.

关键词 小鼠 一氧化氮 一氧化氮合酶 胚胎植入 基质金属蛋白酶

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种重要的旁分泌作用因子. 近年来研究表明, NO 参与血流调节、血栓形成、神经活动传导以及巨噬细胞的毒性作用等许多重要生理过程[1]. 生殖器官中分泌的 NO 与多种生殖功能的正常发挥密不可分[2]. NO 在多种组织中由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化合成. NOS 有多种异构体, 根据酶的理化性质, 如其亚细胞定位、受游离钙离子浓度调节等特性, 将其分为 3 种类型, 即: 来源于小脑的 nNOS, 巨噬细胞的 iNOS 及内皮细胞的 eNOS[3].

胚胎植入发生于排卵后的特定时期内, 成功的胚胎植入取决于胚胎在子宫内膜的黏附性和子宫内膜对胚胎的接受性, 这一过程受到一系列因素的精确调控[4]. 胚胎植入期间子宫内膜发生蜕膜化, 表现出最大的接受性, 容许胚胎黏附并侵入子宫内膜, 并伴随着子宫内膜细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解和重建. 参与 ECM 降解的酶主要有三类, 它们是: 纤溶酶原激活因子(PAs)、组织蛋白酶(cathepsin)和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs). 其中 MMPs 是参与胚胎植入过程中 ECM 降解和重建的重要蛋白水解酶[5~7]. 另有研究发现, 子宫内膜中有 NOS 表达, 并且在围植入期的胚胎植入区域 NOS 表达及活性均增加, 说明在围植入期 NO 可能参与了胚胎植入过程[8,9], 并在胎盘组织中可通过调节 MMP-9 的活性参与胎盘结构和功能调节[10]. 但在胚胎植入过程中 NO 和 MMPs 之间的调控关系尚不清楚.

本文采用子宫角注射和酶谱方法研究了 NO 对小鼠胚胎植入的影响, 并对 NO 在胚胎植入中的调控机制做了进一步研究.

1 材料与方法

(ⅰ) 主要化学试剂. N-硝基-L-精氨酸甲酯(N-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)、硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)、明胶(gelatin)购自美国 Sigma 公司; NOS 活性检测试剂盒购自南京聚力生物医学工程研究所.

(ⅱ) 实验动物. 昆明种小鼠(5~6 周龄, 体重 25~30 g), 购自中国科学院遗传与发育生物学研究所动物繁殖中心, 饲养温度在 25℃左右, 每天光照与黑暗各 12 h, 自由采食, 饮水.

(ⅲ) 子宫角注射. 将雌性、雄性小鼠按 2∶1 比例合笼, 次晨查出阴栓者定为妊娠第 1 天(D1). 雌鼠于 D3 下午麻醉后, 左侧子宫角内注药, 右侧子宫角内注入等体积(4 μL)生理盐水作为对照. 实验分为 3 组, 每组处理 8 ~ 10 只: (1) L-NAME 0.05 mg/只. (2)

L-NAME 0.2 mg/只. (3) L-NAME 0.2 mg + SNP 10 μg/只. 受试动物于 D7 剖检, 观察并计数两侧子宫角植入胚胎数, 并收集双侧子宫, 直接存放于–80℃以提取蛋白.

(ⅳ) NOS活性检测. 受试小鼠于D5处死, 分别收集处理侧和对照侧子宫, 每 100 mg 子宫组织加 0.9 mL 生理盐水匀浆, 10000 × *g* 离心 5 min, 取上清液 50 μL, 按 NOS 检测盒说明书检测 NOS 活性, NOS 活性以 U/mg 蛋白质表示.

(ⅴ) 酶谱测定. 使用 Trizol 试剂(购自 Gibco BRL 公司)按厂商提供的说明书提取小鼠子宫蛋白并用 1% SDS 溶解, 光密度法测定蛋白浓度. 将蛋白样品与加样缓冲液(0.25 mol/L Tris-HCl, 40%甘油, 0.04%溴酚蓝, 8%SDS, pH 6.8)混匀并在 37℃孵育 30 min, 然后取 50 μg 样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(分离胶中含 1% 明胶). 将胶在 2.5% Triton X-100 缓冲液(2.5%Triton X-100, 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.5)中清洗 2 次, 然后用钙缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl, 0.2 mol/L NaCl, 0.01 mol/L $CaCl_2$, 1% Triton X-100, 1 μmol/L $ZnCl_2$, pH 7.5)于 37℃孵育 18 h, 经 0.2%考马斯亮蓝 R-250 染色后, 用 10%乙酸脱色, 可见呈负染的 MMP-2 和 -9 的活性分解带. 通过密度扫描仪(Personal Densitometer SI; Molecular Dynamics Inc, Sunnyvale, CA)对 MMP-2 和 -9 的活性条带进行灰度扫描分析[11].

(ⅵ) 数据分析. 实验结果用平均值 ± 标准误差表示, *t* 检验分析数据. $P > 0.05$ 为无显著差异, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异.

2 结果

2.1 子宫角注射实验结果

图 1 显示妊娠小鼠于 D3 子宫角注射不同浓度的 L-NAME 或 L-NAME 和 SNP 合并注射对小鼠胚胎植入的影响. 由图 1 (a) 所示, 与对照侧相比, L-NAME 0.05 mg/只处理组小鼠子宫角的胚胎植入数有所减少, 但无显著差异($P > 0.05$), 而 L-NAME 0.2 mg/只处理组小鼠子宫角的胚胎植入数显著降低($P < 0.01$), 当 L-NAME 和 SNP(一种 NO 的自发性供体)合并注射时, 对小鼠的胚胎植入数没有影响. 图 1 (b) 显示 L-NAME 0.2 mg/只处理后两侧子宫角胚胎植入的变化. 由图所示, 子宫角注射 L-NAME 后, 子宫角的胚胎植入受到显著抑制.

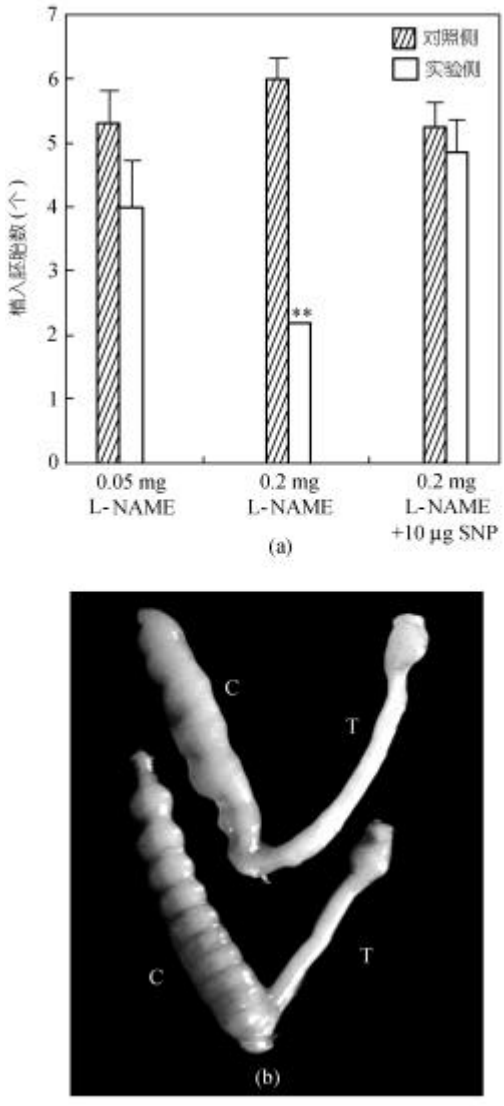

图 1 子宫角注射 NOS 抑制剂对小鼠胚胎植入的影响 ($n = 8$)

(a) 妊娠小鼠于 D3 子宫角注射不同浓度的 L-NAME 或 L-NAME 和 SNP 合并注射对小鼠胚胎插入的影响, ** 示实验侧与对照侧相比差异极显著($P < 0.01$). (b) 子宫角注射抑制剂后, 胚胎植入个数显著减少(两条子宫的注药侧各有一个胚胎), C 示对照侧, T 示实验侧

2.2 NOS 活性变化

图 2 显示子宫角注射 L-NAME 后, 于 D5 用 NOS 活性检测试剂盒测定实验侧和对照侧子宫的 NOS 活性. 结果发现, L-NAME 0.2 mg/只处理组小鼠子宫角

NOS 的活性受到显著抑制($P < 0.01$).

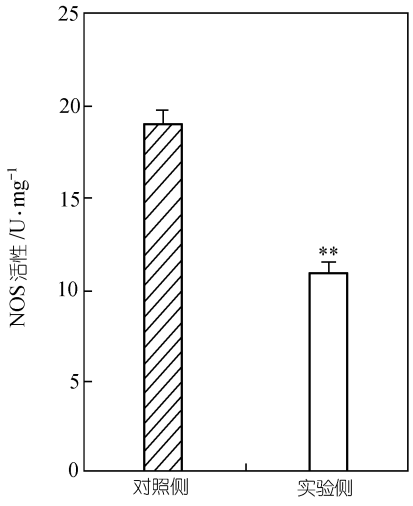

图 2 NOS 活性检测试剂盒检测子宫角注射 NOS 抑制剂 (0.2 mg/只 L-NAME)对小鼠子宫 NOS 活性的影响($n = 6$)
** 示极显著差异($P < 0.01$)

2.3 酶谱测定结果

图 3 和 4 显示子宫角注射 0.2 mg L-NAME 或 L-NAME 和 SNP 合并注射后, 子宫中 MMP-2 和 -9 的活性情况. 其中 92, 72 及 64 kD 活性条带分别为酶原型 MMP-9, 酶原型 MMP-2 和激活型 MMP-2. 由图 3 可见, 对照侧和实验侧都显示出 3 条明显的蛋白酶活性分解带, 与对照侧相比, 实验侧经 L-NAME 处理后, 分子量为 92 kD 的 MMP-9 活性电泳条带明显减弱, 而分子量为 72 及 64 kD 的 MMP-2 活性条带没有明显变化. 对酶谱结果进行灰度扫描并对扫描数据进行统计分析结果发现, 实验侧 MMP-9 活性显著下降($P < 0.01$), 而 MMP-2 活性没有明显变化. 图 4 显示, L-NAME 和 SNP 合并注射后, 对照侧和实验侧的 3 条蛋白酶分解带都没有明显差异, 对酶谱活性条带的灰度扫描数据进行统计分析的结果表明, MMP-2 和 MMP-9 的活性都没有发生显著变化($P > 0.05$).

3 讨论

本文采用子宫角注射及明胶酶谱方法研究了 NO 对小鼠胚胎植入的影响, 以探讨 NO 在胚胎植入中的作用机理. 子宫角注射法所使用的药物剂量小, 可以显示出药物对胚胎植入的直接影响和局部作用[12].

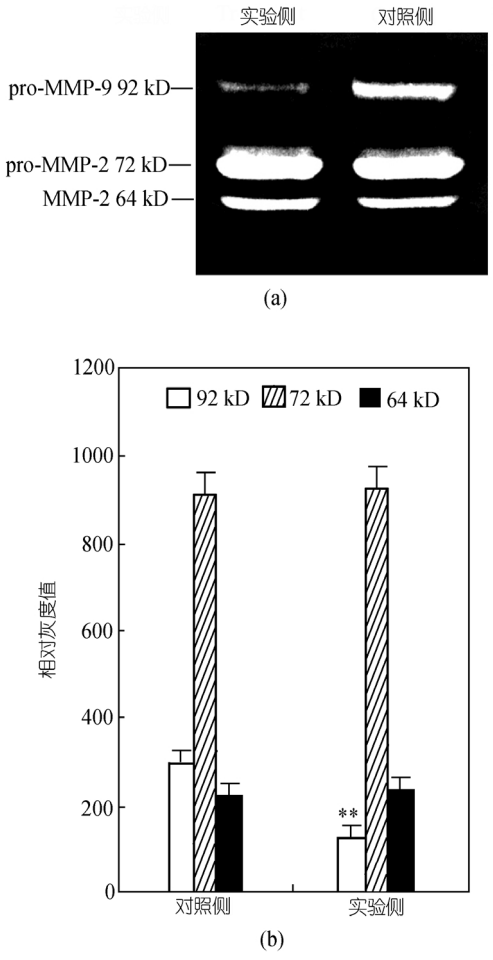

图 3 明胶酶谱法测定子宫角注射 NOS 抑制剂 L-NAME(0.2 mg/只)对小鼠子宫 MMP-2 和 -9 活性的影响 ($n = 6$)
(a) 子宫角注射 NOS 抑制剂后, 与对照侧相比, 实验侧子宫中酶原型 MMP-9 的活性显著下降, 而 MMP-2 的活性没有明显变化. (b) 对酶谱活性条带进行灰度扫描, 统计分析子宫角注射 NOS 抑制剂对 MMP-2, -9 活性的影响. ** 示极显著差异($P < 0.01$)

NO 是一种多功能分子, 它可以通过多种途径参与胚胎植入, 如 NO 可以通过调节细胞内环鸟苷酸(cGMP)的产生, 而参与子宫血管通透性的调节; 或通过促进前列腺素(prostaglandin, PGs)的产生, 实现对子宫内膜血管通透性和血管发生的调控, 另有研究表明, PGs 同时又是子宫蜕膜化的主要调节因子[9]; 此外 NO 还可通过诱导胚胎植入过程中细胞凋亡而参与胚胎植入的调节[13], 但目前对于 NO 在胚胎植入中的分子机理仍了解甚少.

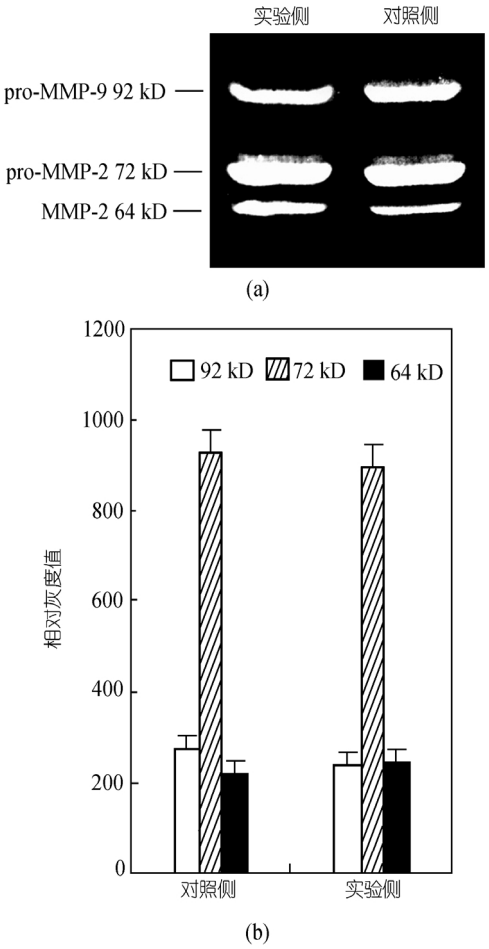

图 4 明胶酶谱法测定 L-NAME 和 SNP 合并注射对小鼠子宫 MMP-2 和 -9 活性的影响(n = 6)

(a) L-NAME 和 SNP 合并注射后，与对照侧相比，实验侧子宫中 MMP-2, -9 的活性没有明显变化. (b) 对酶谱活性条带进行灰度扫描，统计分析 L-NAME 和 SNP 合并注射对子宫 MMP-2, -9 活性的影响. 图示实验侧和对照侧相比, MMP-2 和 -9 的活性均无显著差异($P > 0.05$)

L-NAME 是一种 NOS 抑制剂，它可抑制 NOS 催化 L-精氨酸生成 NO 的反应，从而减少 NO 产生. 我们对 D3 妊娠小鼠使用不同剂量 L-NAME，结果发现，低剂量 L-NAME(0.05 mg/只)处理后，胚胎植入数没有明显变化；而 L-NAME 0.2 mg/只处理组，小鼠胚胎植入受到显著抑制. 为了验证注射 L-NAME 后小鼠胚胎植入期子宫 NOS 活性确实受到了抑制，我们利用 NOS 活性检测试剂盒检测了 D5 小鼠子宫中 NOS 活性. 结果发现，经 L-NAME 处理后，子宫内 NOS 活性，即 NOS 催化合成 NO 的能力显著下降，证明注射 L-NAME 后子宫中 NO 的产生确实受到了抑制. SNP 是一种 NO 释放剂，它可自发释放 NO，当在 L-NAME 中加入 SNP 后对小鼠进行子宫角注射，结果发现，实验侧的胚胎植入数没有明显的变化. 综合以上实验结果表明, NO 在小鼠胚胎植入过程中起重要作用.

胚胎植入受一系列复杂因素的严格调控，胚胎成功植入需要各种因子之间的协调作用. 胚胎植入过程中一个最突出的现象是子宫内膜 ECM 成分的重组和更新. 研究表明，MMPs 是胚胎植入过程中降解 ECM 的主要酶，其蛋白表达与胚胎滋养层细胞的最大侵入能力相吻合，是构成胚胎侵入能力的主要因素[14]. MMPs 在胚胎植入过程中所起的作用目前已成为研究热点. 在多个物种的胚胎植入过程中，子宫中存在 MMP-2 和 -9 的特异性表达[11,15]，说明 MMPs 在胚胎植入过程中具有重要作用. 在小鼠胚胎植入过程中，MMP-2 和 -9 在子宫中的表达方式存在差异. MMP-9 mRNA 在 D4.5 的子宫圆形滋养层细胞中表达较弱，在 D5.5~8.5 的胚胎周围滋养层巨细胞中 MMP-9 mRNA 的表达明显增加，但随后即消失，表明 MMP-9 与胚胎侵入有关；而 MMP-2 mRNA 的表达与 MMP-9 明显不同, MMP-2 主要表达在植入窗口期的子宫基质细胞中，一旦子宫基质开始蜕膜化，MMP-2 的表达就下降，说明 MMP-2 主要参与了蜕膜化过程[16,17]. 以上研究表明在胚胎植入过程中，MMPs 可参与胚胎滋养层细胞侵入和子宫内膜的蜕膜化过程. 另有大量研究发现，MMPs 作为参与胚胎植入调节的下游分子，其基因表达和活性受很多因素调节[18~20]. 有研究认为，NO 可能通过参与植入位点组织的重建参与对胚胎植入过程的调控[8,9]，但对于其具体调控机制还不清楚.

酶谱试验结果表明，小鼠子宫角注射 NOS 抑制剂 L-NAME 后，在胚胎植入数明显下降的同时，MMP-9 活性也明显降低；L-NAME 和 SNP 合并注射则使胚胎植入数恢复到正常水平，同时 MMP-9 的活性也恢复正常，说明 NO 可以通过局部调节 MMP-9 活性而参与胚胎植入过程的调节. 在实验过程中，MMP-2 的活性没有明显变化，说明这两种 MMPs 在胚胎植入中所发挥的作用有差别，MMP-9 可能在小鼠胚胎侵入过程中起重要作用. 进一步的研究将围

绕小鼠胚胎植入过程中 NO 在妊娠早期的不同时期对 MMPs 活性和表达的调节, 探讨 MMPs 活性和表达的动态变化, 以充分了解 NO 在植入中的作用机理.

总之, 本研究发现, NO 作为一种旁分泌因子, 可以通过参与对 MMPs 活性的调节而实现对胚胎植入的调控, 对于其详细作用机理, 尚需进一步研究. 对 NO 在胚胎植入中作用机理的阐明, 将有助于进一步了解胚胎植入的网络级联调节通路, 为揭开胚胎植入机理奠定理论基础, 同时也有望为开发新的抗生育药物提供理论依据.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: G1999055903)和中国科学院创新工程基金资助项目.

参 考 文 献

1 Beckman J S, Koppenol W H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol, 1996, 271(5 Pt 1): C1424~1437

2 O'Bryan M K, Zini A, Cheng C Y, et al. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. Fertil Steril, 1998, 70(6): 1143~1147

3 Knowles R G, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. Biochem J, 1994, 298(Pt 2): 249~258

4 Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. Hum Reprod, 1995, 10(6): 1579~1602

5 Salamonsen L A. Role of proteases in implantation. Rev Reprod, 1999, 4(1): 11~22

6 Fata J E, Ho A T, Leco K J, et al. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(1): 77~95

7 Waterhouse P, Denhardt D T, Khokha R. Temporal expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in mouse reproductive tissues during gestation. Mol Reprod Dev, 1993, 35(3): 219~226

8 Purcell T L, Given R, Chwalisz K, et al. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. Mol Hum Reprod, 1999, 5(5): 467~475

9 Novaro V, Rettori V, Gonzalez E T, et al. Interaction between uterine PGE and PGF2 alpha production and the nitridergic system during embryonic implantation in the rat. Prostaglandins, 1996, 51(6): 363~376

10 Pustovrh C, Jawerbaum A, Sinner D, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase-9 activity in placental tissue from patients with pre-existing and gestational diabetes mellitus. Reprod Fertil Dev, 2000, 12(5-6): 269~275

11 Wang H M, Li Q L, Shao L J, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, -14, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -2, -3 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (Macaca mulatta) during early pregnancy. Biol Reprod, 2001, 65(1): 31~40

12 蔡理全, 曹宇静, 段恩奎. 整合素 αVβ3 在小鼠胚胎植入中的作用. 科学通报, 2000, 45(15): 1639~1644

13 Evans C H. Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction? Agents Actions Suppl, 1995, 47: 107~116

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

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

16 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

17 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(6): 1723~1736

18 王晓琦, 刘煜, 段恩奎, 等. LeY 对小鼠胚泡和子宫上皮细胞分泌 MMPs 的影响. 科学通报, 1998, 43(12): 1292~1295

19 Birkedal-Hansen H, Moore W G, Bodden M K, et al. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med, 1993, 4(2): 197~250

20 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

(2002-03-19 收稿, 2002-05-15 收修改稿)