

家畜胎盘生物活性物质的研究进展

刘泽隆 张 涌

(西北农业大学动物科学与动物医学学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要 综述了胎盘产生的几种特异性活性物质, 即 $TGF\beta$, CSF-1, IGF, PAG, 库尼特型蛋白酶抑制剂, bCYP19 及相关基因的作用时间、部位和作用机制, 以及这些物质的研究前景。认为加深其研究以利于完善早期妊娠和分娩发动诊断、妊娠疾病诊治、体外受精、人工输精妊娠以及人类避孕技术。

关键词 胎盘, 生物活性物质, 蛋白质, mRNA, 基因

分类号 S857.21

胎盘能产生各种甾体激素、调节肽、生长因子、细胞因子, 它们在胎盘内部产生极其复杂的相互调控作用, 以维持胎盘的发育, 并进入血液循环, 对胎儿生长发育及母体的内分泌功能起重要调节作用。研究胎盘生物活性物质, 可以加深对胎儿发育、胎盘发育、胎母互作、妊娠维持、分娩发动机理的认识, 从而有利于早期妊娠和分娩发动诊断、妊娠疾病诊治、体外受精和人工输精妊娠等胚胎工程技术, 以及人类避孕等技术的进一步发展。但在动物上的研究远不如人那样深入。本文着重综述近几年发现的牛、绵羊、猪和猫等家畜胎盘主要生物活性物质的研究进展。

1 $TGF\beta$

转化生长因子 β (Transforming growth factor β , $TGF\beta$) 是一个多功能生长因子家族。通过对胎盘组织、妊娠早期的绒毛膜上皮和内膜上皮的细胞培养发现, 牛胎盘组织中有 $TGF\beta_1$, $TGF\beta_2$ 和 $TGF\beta_3$ ^[1]。Northern 杂交发现, $TGF\beta$ mRNA 在绒毛、膜尿囊、肉阜组织、体外培养的滋养层和内膜上皮细胞培养物中表达。

$TGF\beta_s$ 是调节组织生长和形态形成的重要物质, 它分布于许多组织, 并具有广泛的作用。 $TGF\beta$ 对牛滋养层和子宫内膜上皮有促增生作用, 而对上皮细胞生长和侵入滋养层有抑制作用; $TGF\beta$ 还对转型变异的人子宫内膜和家畜上皮有促增生作用。姚鑫等^[2]研究表明, $TGF\beta$ 除了对某些基因进行直接调控外, 还可能通过碱性成纤维生长因子 (bFGF) 等与细胞生长和分化相关的生长因子, 间接地行使其生物学功能。

2 CSF-1

集落刺激因子 -1 (Clony-stimulating factor, CSF-1) 是单核或巨噬细胞生长因子。它有利细胞的增殖、分化和活力。

收稿日期 1998-04-13

课题来源 农业部生产技术重点项目, 95 牧 -01-04-01

作者简介 刘泽隆, 男, 1971 年生, 在读博士生

在牛胚盘中发现的 CSF-1 mRNA 能与 C-fms 和 V-fms cDNA 探针进行杂交反应。在妊娠 29 d 至足月期, 附植后牛胎盘有 fms 样蛋白表达^[3]。从牛体内冲出的 7, 14 日龄附植后孕体, 以及体外成熟、受精并发育 7 d 的胚胎内都有 fms 样蛋白表达。另外, 有约 50% 的妊娠细胞, 包括双核细胞, 其细胞核及细胞质内都有 CSF-1 蛋白。

在猪上发现, CSF-1 mRNA 在子宫、孕体、胎儿组织、尿囊绒毛膜中表达。随着孕期延长, 内膜 CSF-1 mRNA 的量增加 ($P < 0.05$), 并一直维持高水平至足月。胎盘 CSF-1 mRNA 的变化可能与胎盘和胎儿的迅速增长紧密相关。在胎儿骨骼肌、肾和肠等组织也有高水平的 CSF-1 mRNA^[4]。

从猪的孕体、子宫内膜和输卵管分别克隆出 3.6, 4.0 和 5.1 kb 的 3 种 CSF-1 mRNA。人有两种 CSF-1 mRNA 转录物, 分别长 4.0 和 3.0 kb。3.0 kb 的 CSF-1 mRNA 可能编码一种细胞膜结合型的 CSF-1, 但 4.0 kb 的 mRNA 是编码 CSF-1 的主要 mRNA^[4]。

CSF-1 及其受体与滋养层细胞分化、迁移和融合有关, 滋养层细胞迁移导致牛胎儿和母体细胞的融合, 形成双核或三核细胞。CSF-1 及其受体影响胎盘生长和发育及胎儿-胎盘吸收水分和营养的变化, 还调节胎儿组织分化前的增殖及组织分化。细胞膜结合型 CSF-1 的功能还不清楚^[4]。

小鼠子宫 CSF-1 的表达可能受卵巢甾体激素调节, 猪 CSF-1 表达可能也由性激素调节。子宫内膜 CSF-1 mRNA 水平与胎盘雌激素分泌水平呈时间性相关, 也与血液中雌激素浓度呈时间相关。切除卵巢的猪, 子宫内膜 CSF-1 表达不受影响, 这与小鼠上的研究结果不同。这可能与小鼠和猪有不同的雌激素分泌范型和胎盘类型有关。

3 IGF

胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF) 是一种具有广泛作用的生长因子。有人已经在人及动物胎盘中发现该物质及其受体。

有研究发现, 在妊娠 20 日龄的猪胎盘中有 IGF-I 受体, 且只存在于内膜细胞^[5]。IGF-II 或 M6P 受体存在于 4~10 日龄胚胎, 以及 20 日龄胎盘和胎体。而且滋养外胚层上的 IGF-II 或 M6P 受体数目与胎儿发育密切相关。

放射自显影和 Western 杂交免疫染色发现, 猫胎儿植入位点的组织可以合成并分泌 IGFBP-1, 非植入位点的组织不能合成 IGFBP-1^[6]。该物质于交配 16 d 就能在植入位点组织中被检测到并直至足月。IGFBP-1 的分子质量为 30 000, $P_{I\sim 5.1\sim 5.4}$ 。

IGF 的 mRNA 及受体和结合蛋白存在于子宫和胎盘, 说明该系统在滋养层生长和侵入过程中起着自分泌和旁分泌作用。IGF 主要通过膜受体起作用, 可刺激人胎盘促乳素的释放, 还可调节其他固醇类激素的合成与分泌, 而且 IGF-I 和 IGF-II 主要是通过 IGF-I 受体起作用。IGF-I 能增加体外芳香化酶 P450 的活性以及妊娠 12~13 d 的猪胚胎蛋白合成, IGF-I 和 IGF-II 有刺激体外小鼠外层胎盘锥细胞的生长、迁移和分化作用。IGFBP-1 在不同系统中或起促进作用, 或起抑制作用。在小鼠, 编码 IGF-II 或 M6P 的基因失活将导致严重的胎儿发育迟缓; 在猪, IGF-II 或 M6P 多少与胚胎活力有关。IGF-II 与 IGF-II 或 M6P 结合的能力比与 IGFBP 或 IGF-I 受体的能力强。

4 PAG

妊娠相关糖蛋白 (Pregnancy-associated glycoprotein) 已经在牛、绵羊、猪等动物发现,它是无活性天门冬氨酰基因族的产物。

bPAG 分子质量约为 67 000,有 4 种异构体,其 pI 分别是 4.4, 4.6, 5.2 和 5.4。bPAG 约含有 $10.02\% \pm 1.09\%$ 中性糖以及唾液酸异构体^[7]。胚胎附植后不久,就能检测到 bPAG-1,它由胎盘双核细胞分泌。bPAG-1 由于催化中心的一个关键突变,已经失去蛋白酶水解活性,它的基因有 9 个外含子 (约 99~281 bp) 和 8 个内含子 (约 87~1 800 bp),其组成与哺乳动物天门冬氨酰酶非常相似,其转录启动位点 (tsp) 是在起始密码子 (ATG) 上游 53 或 54 bp 处,转录启动位点 (tsp) 上游序列是 bPAG-1 特异性序列,分子质量约 47~90 kDa^[8]。bPAG-2 结构上与 bPAG-1, oPAG-1 和胃蛋白酶相似,分别有 58%, 58% 和 51% 的相同氨基酸序列。bPAG-2 cDNA 有 1 258 bp,编码 376 个氨基酸,与 bPAG-1 有两点不同,其一, bPAG-2 mRNA 只在胎儿胎盘表达,但不在其他胎儿组织表达;其次, bPAG-2 可由滋养层或单核细胞和双核细胞产生, bPAG-1 只能在双核细胞产生。刚刚产生的 bPAG-2 约 70 kDa,而后生成几种小分子质量片段 (分子质量为 31 000~70 000)^[9]。

在绵羊, oPAG-1 是绵羊胎盘滋养层双核细胞产物,多肽链不多于 330 个氨基酸,糖基化合物分子质量变化很大,约 47~90 kDa。经研究发现 oPAG-1 分子质量约 70 kDa,它可以产生为两种中间物,一种为 53~61 kDa,一种为 47 kDa,最后以 47 kDa 为主。也就是说,70 kDa 的 oPAG-1 是 47 kDa oPAG-1 的前体,其 N-寡聚糖链约 8~10 kDa, O-寡聚糖链约 11 kDa^[10]。

绵羊双核细胞特异性糖蛋白 SBU-3 在附植开始时出现,在整个妊娠期都可检测到。其分子质量 30~200 kDa^[11]。分析表明其糖链主要是 O-寡聚糖,杂有多个 N-寡聚糖,在 N-寡聚糖链中有 N-糖基化神经氨酸,是其特有抗原决定簇。对非植物刀豆素结合蛋白分析可知,主要是 3 种蛋白质,即 69, 62 和 57 kDa,其氨基酸序列分别与 oPAG, bPAG 和兔胃蛋白酶原 F 相同。

在猪,已检测到两个 PAG 基因序列 (1 371 bp, pPAG-1; 1 378 bp, pPAG-2),各编码 389 和 387 个氨基酸的信号肽链 (包括 15 个氨基酸的信号肽)^[12],每种多肽链上有几个 N-寡聚糖结合位点。pPAG-1 和 pPAG-2 约有 64% 的相同氨基酸序列,与猪胃蛋白酶原约有 50% 的相同序列。pPAG 与反刍动物 PAG 关系较远, pPAG-1 催化中心有氨基酸序列替代这些替代物酶失活,而 pPAG-2 在这些区域的氨基酸序列与胃蛋白酶相同。pPAG 有相当大的分子质量,约 70 kDa。猪 PAG 在怀孕 15 d 出现,直到足月都可检测到。

牛、羊、猪 PAG 和 SBU-3 免疫抑制活性还未确定,但 PAG-1 和 SBU-3 与人 SP1 抗体能进行免疫交叉反应。PAG 和 SBU-3 可能的作用如下: (1) 降低某些酶活性,防止对胚胎的降解; (2) 降低细胞免疫活性,或作为一种抗原刺激免疫加强; (3) 与甾体激素结合,调节激素生物活性; (4) 与某离子结合,调节其他物质的生物合成。妊娠相关糖蛋白 (PAG) 可能通过自分泌或旁分泌作用对胚胎发育和胎盘发育起作用。

5 库尼特型蛋白酶抑制剂 (Kunitz-type Proteinase inhibitor)

研究表明^[13],猪的子宫在孕酮作用下合成一种蛋白酶抑制剂(分子质量为 14 000),它至少有 3 种异构体,它对纤维蛋白酶和胰蛋白酶有特异作用,而对胰凝乳蛋白酶作用微弱。其 DNA 可以编码一种 93 个氨基酸的蛋白质,分子质量为 10 295。该抑制剂肽链末端的 64 个氨基酸残基有一稳定并且特有的 Kunitz 区,该区 67% 的氨基酸序列与牛胰岛素酶抑制剂相同,它的起始氨基酸是精氨酸而不是赖氨酸。妊娠时,子宫内的蛋白酶抑制剂 mRNA 高效表达直至 30 日龄,然后迅速下降。

许多动物胚胎附植时,滋养层细胞侵入子宫壁,并随胎盘发育与母体血管壁紧密相连。但猪胚胎滋养层不能侵入子宫壁,这说明库尼特型蛋白酶抑制剂可能中和了滋养层分泌的蛋白酶。库尼特型蛋白酶抑制剂在孕酮水平较高的黄体期或假孕期由子宫分泌,其分泌受孕酮或孕酮+ 雌激素的调控,但不受单独雌激素的调控。该蛋白酶抑制剂存在于子宫内膜表面和腺上皮,它最初分泌可能由妊娠 13~ 14 d 的孕体产生的雌激素而引发。

6 bCYP19 及相关基因

芳香化酶细胞色素 P450(Aro)是雌激素生物合成的主要酶,现在已在动物及人胎盘发现 P450 基因、假基因及编码 P450_{scc}和 STAR 的基因。

在牛,编码 P450(Aro)的 mRNA 三个重叠克隆,共 5 180 bp,包括两个紧邻的 Poly A 位点和信号^[14]。同在其他物种发现的一样,其开放阅读框(ORF)包含 1 509 bp,与人、大鼠、小鼠基因克隆分别有 87%、78% 和 78% 的共同序列。在牛上,该 mRNA 3'-UTR 的未翻译区比人 CYP19 mRNA 的未翻译区长 2 kb。bCYP19 在不同区域有两个 BDF(bovidae dimer family)同源重复元件,末端有牛基因组中的重复序列 motif。胎盘中 bCYP19 mRNA 的 5'-UTR 有一个从外元 II 开始的上游序列,是牛胎盘 CYP19 mRNA 上的一段特异序列。不同组织中芳香化酶有特异性增强子或转录位点,这与不同组织芳香化酶时序性表达有关。

在牛胚盘中发现的芳香化酶 P450psi(P450 pseudogene)转录物,与 bCYP19 基因与 bCYP19(bovine aromatase cytochrome P-450-encoding)的外元 II、III、V、VIII 和 IX 有 89%~ 98% 的相同序列,但缺少 bCYP19 的外元 VI 和 VII,其外元 IV 被重复序列 motif 替代^[15]。该 mRNA 存在许多翻译终止信号,因此它不能编码有功能的蛋白质。牛分娩后的胎盘中, bCYP19 psi 和 bCYP19 同时转录,可能引起雌激素水平波动,继而使催产素有一短暂高峰,这与胎盘的排出有关。

在牛子宫内部和绒毛叶中发现编码 P450_{scc}(P450 side-chain cleavage enzyme)和 STAR(steroidogenic acute regulatory protein)的 mRNA,其基因分别长 1.8 和 2.9 kb,是 STAR 基因的两种产物^[16]。

STAR mRNA 和 P450_{scc}的存在位置相同,但其产物有时只能测出一种,有时可测出两种。STAR mRNA 在发育黄体期量较少,在中期到晚期黄体期,其量增加 9~ 15 倍,在退化黄体中消失。在发情期,STAR 蛋白浓度与 STAR mRNA 紧密相关($r=0.93, P<0.05$)。P450_{scc} mRNA 量在黄体期没有变化,在退化黄体中消失。有人认为,STAR 可以

将胆固醇从线粒体膜转运到内膜,有利于甾体激素快速合成。P450_{scc}则可以降解甾体激素,它是黄体组织的基本基因产物之一,其生成不依赖于促性腺激素和 cAMP。在胎盘, P450_{scc} 和 STAR 与其他酶一起调节甾体类激素的合成与代谢,对胚胎的发育、胎盘生长、妊娠维持和分娩均具有重要作用。

7 其 他

有人在猪胎盘提取物中发现同时有免疫促进因子和免疫抑制因子,有助于胎母互作过程局部免疫的调节,利于胎儿成活^[17]。有人在牛胚盘发现纤粘连蛋白可能与双核细胞的迁移有关^[18]。还发现牛胎盘促性腺激素^[19]有 LH 生物活性和免疫活性,以及 TSH 免疫活性,但无 FSH 生物活性和免疫活性。牛胚盘中发现维生素 A 结合蛋白,它有利于胚胎正常发育^[20]。

8 结 语

胎盘活性物质的研究方兴未艾,一些研究取得了令人鼓舞的成果,但一些研究仍存在着争议。但可以预见,随着研究的深入发展,揭示这些物质奥秘的时代已经不远了。届时,人造子宫的建立将成为可能,在体外即可生产大量的家畜。

参 考 文 献

- 1 Munson L, Wilhite A, Boltz V F, et al. Transforming growth factor beta in bovine placentas. *Biol Reprod*, 1996, 55 (4): 748~ 755
- 2 姚 鑫,从笑俏. ES 细胞分化为血管样结构的机理探讨—— TGF β_1 在血管形成中的作用. *实验生物学报*, 1996, 29 (3): 273~ 285
- 3 Beauchamp J L, Croy B A. Assessment of expression of the receptor for colonystimulating factor-1 (fms) in bovine trophoblast. *Biol Reprod*, 1991, 45: 811~ 817
- 4 Tuo W B, Harney J P, Bazer F W. Colonystimulating Factor-1 in conceptus and uterine tissues in pigs. *Biol Reprod*, 1995, 53(1): 133~ 142
- 5 Chastant S, Monget P, Terquim. Localization and quantification of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II /mannose-6-phosphate (IGF-II /M6P) receptors in pig embryos during early pregnancy. *Biol Reprod*, 1994, 51 (4): 588~ 596
- 6 Boomsma R A, Mavrogianis P A, Fazleabas A T, et al. Detection of Insulin-like factor binding protein-1 in cat. *Biol Reprod*, 1994, 51(3): 392~ 399
- 7 Zoli A P, Beckers J F, WoutersBallman P, et al. Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol Reprod*, 1991, 45(1): 1~ 10
- 8 Xie S, Green J, Beckers J F, et al. The gene encoding bovine pregnancy-associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinase family. *Gene*, 1995, 159(2): 193~ 197
- 9 Xie S, Low B G, Nagel R I, et al. A novel glycoprotein of aspartic proteinase family expressed in bovine placental trophoctoderm. *Biol Reprod*, 1994, 51(6): 1145~ 1153
- 10 Xie S, Nagel R J, Green J, et al. Trophoblast-specific processing and phosphorylation of pregnancy-associated glycoprotein-1 in day 15 to 25 sheep placenta. *Biol Reprod*, 1996, 54(1): 122~ 129
- 11 Atkinson Y H, Gogolin-Ewens K J, Hounsell E F, et al. Characterization of placenta-specific binucleate cell

- glycoproteins possessing a novel carbohydrate Evidence for a new family of pregnancy-associated molecules. *J Biol Chem*, 1993, 268(35): 26679~ 26685
- 12 Szafranska B, Xie S C, Green J, et al. Porcine pregnancy-associated glycoproteins new members of the aspartic proteinase gene family expressed in trophoblast. *Biol Reprod*, 1995, 53(1): 21~ 28
- 13 Stallings-Mann M L, Burke M G, Trout W E, et al. Purification, characterization and cDNA cloning of Kunitz-type proteinase inhibitor secreted by the porcine uterus. *J Biol Chem*, 1994, 269(39): 24 090~ 24 094
- 14 Vanselow J, Furbass R. Novel aromatase transcripts from bovine placenta contain repeated sequence motifs. *Gene*, 1995, 154(2): 281~ 286
- 15 Furbass R, Vanselow J. An aromatase pseudogene is transcribed in bovine placenta. *Gene*, 1995, 154(2): 287~ 291
- 16 Pescador N, Soumano K, Stocco D M, et al. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol Reprod*, 1996, 55(2): 485~ 491
- 17 Georgieva R, Stefanov D, Echorova R, et al. Effects of the whole extract and the chromatographic fractions of the pig placenta on lymphocyte proliferation and humoral immune response. *Theriogenology*, 1995, 44(4): 539~ 551
- 18 Maclaren L A, Wildeman A G. Fibronectin receptors in preimplantation development cloning, expression, and localization of the $\alpha 4$ and $\beta 1$ integrin subunits in bovine trophoblast. *Biol Reprod*, 1995, 53(1): 153~ 165
- 19 Ng T B. Biological and immunological activities of bovine placental gonadotropin. *Biochem Mol Biol Int*, 1993, 31(6): 1149~ 1156
- 20 Byatt J C, Warren W C, Eppard P J, et al. Ruminant placental lactogens structure and biology. *J Anim sci*, 1992, 70(9): 2911~ 2923

Advances in the Study of the Biological Activity Substances Produced by Livestock Placenta

Liu Zelong Zhang Yong

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, North western
Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract In this paper, several kinds of regulatory peptides produced by placenta, such as $TGF\beta$, CSF-1, IGF, PAG, Kunitz-type proteinase inhibitor, proteinase produced by CYP19 gene and CYP19 associated gene etc., are discussed. The peptides have a very important role not only in the regulation of the growth and function of placenta by paracrine and autocrine, but also in the regulation of fetal growth, development and maternal endocrine.

Key words placenta, growth factor, protein, mRNA, gene