



牛体内囊胚经体外共培养诱导子宫内膜上皮细胞整合素 α_v, β_3 基因差异的表达

倪茜麟, 倪和民, 潘兴乾, 齐晓龙, 盛熙晖, 邢书涵, 刘云海, 郭勇*

(北京农学院动物科学技术学院/兽医学(中医药)北京市重点实验室, 北京 102206)

【摘要】 目的 利用牛体内胚胎与其子宫内膜上皮细胞体外共培养的方式, 探究共培养前、后子宫内膜上皮细胞中整合素 α_v, β_3 基因差异表达的变化, 为今后建立快捷有效的牛子宫容受态预判方法提供参考。方法 将体内冲出的牛囊胚与原代培养并传代纯化至第5代的牛子宫内膜上皮细胞进行24 h体外共培养, 利用RT-PCR技术对共培养前、后的子宫内膜上皮细胞进行 α_v, β_3 基因的表达检测。结果 RT-PCR 检测结果显示, 共培养前、后均有整合素 α_v, β_3 的表达; 共培养 I 组(囊胚组), 其共培养后诱导整合素 α_v, β_3 基因的表达与未共培养对照组二者之间差异无显著性 ($P > 0.05$); 共培养 II 组(孵化囊胚组), 其共培养后整合素 α_v, β_3 基因的表达显著高于对照组和共培养 I 组 ($P < 0.05$)。结论 牛体内孵化囊胚经体外共培养诱导牛子宫内膜上皮细胞表达整合素 α_v, β_3 的效果, 明显优于早期囊胚; 整合素 α_v, β_3 基因具有作为牛子宫容受态体外检测标志的潜力。

【关键词】 牛; 体内胚胎; 子宫内膜上皮细胞; 共培养; α_v, β_3 基因

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0273-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.011

Differential expression of integrin α_v, β_3 in bovine endometrial epithelial cells before and after co-culture with bovine blastocysts

NI Qian-lin, NI He-min, PAN Xing-qian, QI Xiao-long, SHENG Xi-hui,
XING Shu-han, LIU Yun-hai, GUO Yong*

(1. College of Animal Science and Technology; 2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

【Abstract】 Objective To investigate the differential expression of integrin alpha v beta 3 (α_v, β_3) on bovine endometrial epithelial cells before and after co-culture with bovine blastocysts, and to explore whether this specific signal might be applied as a new marker for identifying the bovine uterine receptivity. **Methods** The in vivo bovine embryos were co-cultured with their endometrial epithelial cells for 24 h, then, RT-PCR was used to detect the differential expression of α_v, β_3 among those groups. **Result** The results showed that α_v, β_3 can be expressed on bovine endometrial epithelial cells both before and after co-culture with their in vivo embryos. There were no significant differences of expression of α_v, β_3 between Group I (only bovine blastocyst) and the control one ($P > 0.05$), but there were significant differences of α_v, β_3 among Group II (the hatched bovine blastocyst), and Group I, the control one ($P < 0.05$). **Conclusions** The in vivo hatched bovine blastocysts are more suitable for induction of integrin α_v, β_3 in bovine endometrial epithelial cells after their co-culture than that of co-cultured with early stage blastocyst. Integrin α_v, β_3 might be applied as a new molecular marker for detecting bovine uterine receptive status of the bovine endometrium.

【基金项目】 2013年度北京市教委北京市属高等学校创新团队建设与教师职业发展计划项目(No. PXM2013_014207_000067); 国家自然科学基金面上项目(No. 31272526)。

【作者简介】 倪茜麟(1990-), 女, 硕士生, 研究方向: 动物产科及胚胎工程。E-mail: niqianlin@sina.com

【通讯作者】 郭勇, 男, 教授, 研究方向: 动物生殖生理与生物技术。E-mail: y63guo@126.com

【Key words】 Bovine; In vivo hatched blastocyst; Co-culture; Endometrial epithelial cells; Integrin $\alpha_v\beta_3$ gene
Corresponding author: GUO Yong. E-mail: y63guo@126.com

家畜胚胎移植技术可显著提高良种母畜的繁殖效率,但移植后其胚胎着床率偏低的问题却一直影响着该技术的实际应用、推广效果^[1]。在牛的妊娠过程中,大约有一半的胚胎在第 8~17 天之间发生着床失败,其原因普遍认为是由于孕体与子宫间交流不足所致^[2]。有研究表明,胚胎的附植是通过母体子宫与胚胎之间的双向沟通(cross-talking)而建立起来的^[3]。因此,通过对动物胚胎早期着床机理的研究,将有助于认识母体与胚胎间的相互作用机理及相关的调节机制,并为日后人为调控母畜子宫生理状态,以及进一步提高体外制备家畜胚胎的移植妊娠率提供理论基础。

目前,公认的反刍动物胚胎源信号仅有 IFN- τ 一种^[4],与此同时,与妊娠相关并在母畜子宫内膜上皮细胞中表达的基因簇,也逐渐被人们发现并得到关注,现已知的主要基因包括:整联蛋白、骨桥蛋白、ISG15 以及白细胞介素等^[5,6]。其中整合素主要参与调控细胞间的粘附,迁移等过程^[7],是一种以异二聚体形态存在的细胞表面糖蛋白,由两种非共价连接的亚基 α 和 β 组成,被认为是动物细胞间最重要的连接细胞外基质与细胞内骨架的受体^[8]。人们最早在人类子宫内膜上皮细胞中发现了整合素,并有研究显示:整合素 $\alpha_v\beta_3$ (由编码构成该整合素蛋白的 2 个不同亚基的 2 个不同基因的表达产物组成)的表达量在妊娠期会大幅上升,因此推测其可能与胚胎着床有关。目前,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 已成为判断人类子宫建立容受态的标志之一。此外,国外近年来有报道指出,在牛、羊等反刍动物的子宫内膜上皮细胞中也检测到了整合素的表达,但是有关利用反刍动物体内胚胎,进行其相应子宫内膜细胞体外共培养,以及体外诱导相关子宫源基因差异变化的研究,尚未见任何报道。目前对于反刍动物子宫内膜上皮细胞中整合素的表达规律及调控机理仍不明确。

有鉴于此,本实验将体内冲胚获得的牛体内胚胎,经与其子宫内膜上皮细胞体外共培养之后,利用 RT-PCR 技术检测共培养前、后整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在牛子宫内膜上皮细胞中的差异表达情况,为今后有效建立牛的子宫容受态体外(快速)检测体系提供一些参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验选用生殖器官正常且未受孕的小牛子宫,取自河北省大厂县屠宰场。于屠宰场取下保存于 25~30℃ 且含有双抗(青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 IU/mL)的钙镁水中,保证 4 h 内运回实验室。牛体内胚胎:购自北京奶牛中心(编号:021-10012)。

1.2 实验试剂

胎牛血清(Gibco)、DMEM、DPBS、NEAA、EAA、丙酮酸钠、胰蛋白酶(TE)、二甲基亚砜(DMSO)、青霉素(penicillin)、链霉素等均购自 Sigma 公司;SDS(十二烷基硫酸钠)、EDTANa 购自北京奇华盛;Trizol(Invitrogen);EDTANa₂(北京奇华盛);50 * TAE buffer(博迈德生物);异丙醇、无水乙醇、三氯甲烷均购自北京化工厂;M-MLV RT 试剂盒、GV-1、DNA Marker Mix E、琼脂糖凝胶均购自北京赛百盛公司。

1.3 实验仪器

体视显微镜:江南 XTB-1;倒置显微镜:江南;培养箱:Thermo CO₂ 培养箱,371;电子天平:西德,Sartorius BS124S;超净工作台:苏州市医用净化设备厂;掌心离心机:北京医用离心机 LDZA-0.8。

1.4 实验方法及分组

1.4.1 牛子宫内膜组织的分离、原代培养

①将带回的子宫用预先加热到 37℃ 且含有双抗的钙镁水清洗至无血无杂质;②根据实验需求,取适量的子宫角,纵向剖开,用 PBS 清洗 2~3 遍;③用剪刀、镊子及刀片将外层脂肪等剥离,留下最内层半透明状内膜上皮,PBS 冲洗 6~8 遍至无细碎组织掉落;④将其剪成 1 mm² 的小块,DPBS 清洗数遍至上清透亮;⑤取约 200 mL 的组织块悬液以小滴的形式均匀接种于 6 cm 培养皿中,植块间距约在 0.3 cm,然后补充 DMEM (20% FBS)液 500 mL,轻摇培养皿,使组织块均匀的平铺于培养皿上(液体很薄,但一定要铺满全皿);⑥培养于 5% CO₂,37℃ 的培养箱中;⑦约 5~10 d 后,组织边缘有细胞长出。

1.4.2 牛子宫内膜细胞传代培养

①自接种后每 48 h 换一次液,待汇合度达到 90% 时,利用胰酶消化法进行传代;②吸去皿中的培养液,挑除组织块;③加入 1 mL 0.25% 胰酶,放入

37℃ 培养箱中消化 8 ~ 12 min, 期间可拿出培养箱在倒置显微镜下观察, 若细胞大部分变圆, 则应立即加入 1 mL DMEM (10% FBS) 终止消化; ④利用移液枪轻轻吹打培养皿底部, 使细胞漂浮, 后吸取细胞悬浊液于 1.5 L 离心管中, 3000 r/min, 离心 3 min, 弃上清; ⑤加入 1 mL DMEM 轻轻吹打混匀, 接种到新的培养皿中, 置于培养箱中继续培养。

1.4.3 牛子宫内膜细胞的冻存与复苏

①子宫内膜传至第 3 代, 若暂不进行共培养实验, 则将其冻存。②吸出培养液, DPBS 缓冲液清洗两遍, 胰酶消化; ③细胞变圆后, 移入离心管, 离心 3000 r/min, 3 min, 弃上清, 加入 1 mL 预先配置好的冻存液, 混匀后转移至冻存管; ④放入冻存盒中, -80℃ 冰箱 18 h, 转入液氮, 可长期保存。当准备进行共培养时, 对第 3 代冻存的细胞进行复苏。

①将细胞从液氮中取出, 迅速放入 37℃ 的温水中进行解冻, 边水浴加热边晃动, 当内容物完全呈液态时即可, 总时间不超过 2 min; ②酒精擦拭冻存管外部, 细胞液移入 1.5 mL EP 管中, 离心 3000 r/min, 3 min, 弃上清; ③加入 DMEM (10% FBS) 培养液轻轻吹打混匀, 接种于四孔板中, 待汇合度达到 85% 以上即可使用。

1.4.4 牛体内胚胎的解冻复苏

①预先准备好 37℃ 的温水, 室温保持在 25 ~ 28℃, 将液氮中保存的胚胎管取出, 空气浴 5 s, 37℃ 水浴 10 s, 见管内乳白色变为透明色液体即可; ②拔出棉塞, 将胚胎打入培养液中, 观察形态是否完整; ③捡入 Hepes 清洗 2 ~ 3 遍, CR₂ 后期液润洗 2 ~ 3 遍后, 入滴培养; ④观察 12 h, 若胚胎有扩张, 则可以继续进行后续实验。

1.4.5 牛体内胚胎与牛子宫上皮细胞共培养

①细胞传入四孔板培养至第 5 代, 汇合度达到 85% 以上, 可进行后续实验; ②在共培养前 2 h, 换上含有 20% FBS 的 CR₂ 后期培养液; ③复苏五枚牛体内囊胚, 培养 12 h 后观察, 选取形态良好的大腔囊胚与牛子宫内皮细胞共培养, 一孔一囊胚, 用 CR₂ 后期培养液培养于 37℃, 5% CO₂ 的环境中 24 h; ④实验重复五次, 每次三枚胚胎分别与一孔上皮细胞共培养; ⑤设对照组为未共培养的牛子宫内皮细胞。

1.4.6 共培养后子宫内皮细胞总 RNA 提取及相关基因的表达检测

①检出囊胚, 细胞用 DPBS 洗 2 遍, 加入 500 μL TRIzol, 若不能立即提取, 放入 -80℃ 冰箱保存; ②提取时, 常温融化, 冰上静置 5 min, 加入 200 μL 氯仿, 颠倒混匀 10 次, 冰上静置 5 min, 4℃ 高速离心, 12 000 r/min, 10 min; ③取上层液相移入新 EP 管中, 加入 500 μL 异丙醇, 颠倒混匀 10 次, 冰上静置 10 min, 4℃ 高速离心, 12 000 r/min, 10 min; ④离心后, 可见管底有极少量沉淀, 弃上清, 加入 1 mL 85% 的冰乙醇, 4℃ 高速离心, 10 500 r/min, 5 min; ⑥弃上清, 晾干 5 min, 加入 ddH₂O 溶解 RNA 样品, 测定总 RNA 浓度及纯度; ⑦合格样品进行 10 倍稀释作为检测模板, 反应体系及程序如下: 95℃ 5 min; 95℃ 45 s; 55℃ 45 s; 72℃ 1 min, 共 30 个循环后, 进行 72℃ 延伸 5 min; 以 β-actin 作为内参; ⑧扩增引物由英俊生物公司合成。αv 的上游引物 5'-gagct-gagaacaacggctcc-3', 下游引物 5'-atcccgtctcgatgagat-3'; β3 的上游引物 5'-cagagggtggtttgatcc-3', 下游引物 5'-catcattgggctggacgatg-3', β-actin 的上游引物 5'-cctcgccattcacgaaactac-3', 下游引物 5'-actcctgcttgatccactc-3'; ⑨制备 2% 琼脂糖凝胶, 每孔加入 7 μL 的 PCR 产物, 在 120 V/cm 的恒定电压下电泳 20 min, 放入凝胶成像仪观察, 拍照。

1.4.7 图像分析

用 ImageJ 软件进行灰度值分析, 对信号表达进行比较。

1.4.8 统计方法

用 SPSS 19.0-for Windows 进行数据单因素方差分析(数据相关分析结果采用平均数 ± 标准差表示)。平行对比, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 牛子宫内皮细胞

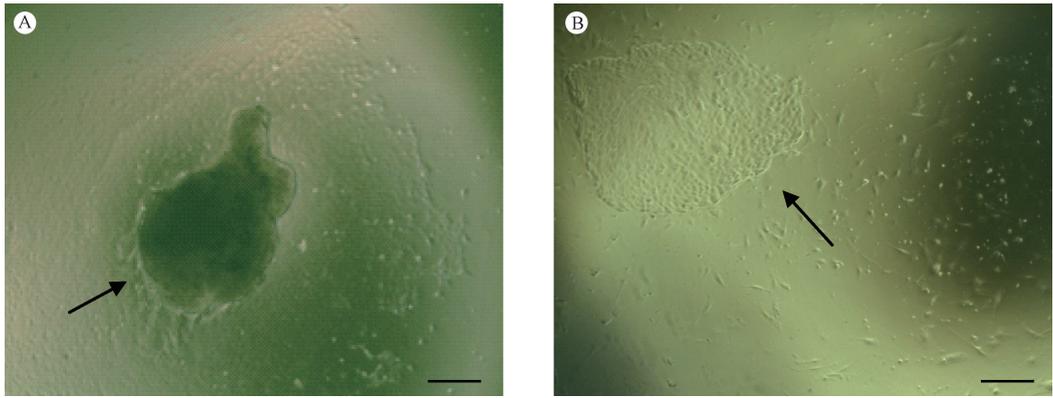
体外培养的牛子宫内皮原代细胞(图 1)与传代细胞(图 2), 长势良好, 可进行后续实验。

2.2 解冻的体内胚胎

刚复苏时, 内细胞团聚集在一起, 无明显空腔; 待培养 12 h 后, 囊胚恢复扩张状态, 腔体清晰可见, 结构完整, 说明情况良好, 可用于后续实验(见图 3)。

2.3 共培养

如图 4 所示, 共培养时间为 24 h, 胚胎稍有扩张, 囊胚腔变大, 透明带变薄。

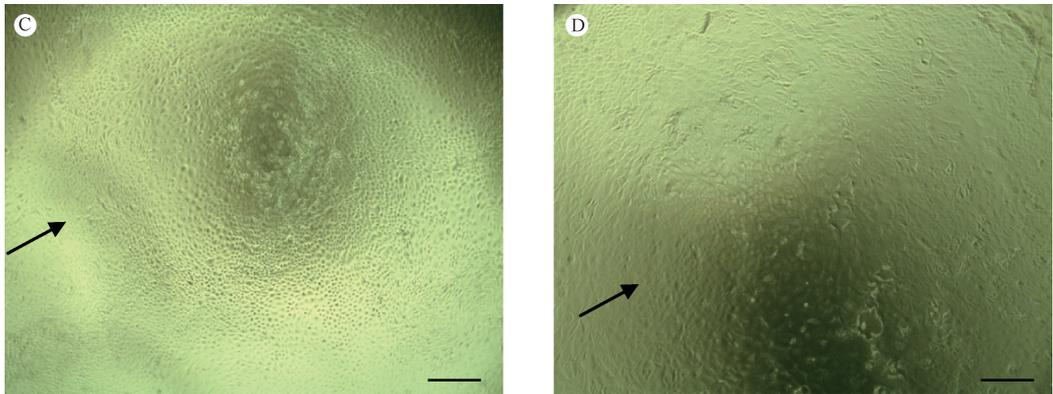


注:A. 箭头所指为子宫内层组织块;B. 箭头所指为原代子宫内层上皮细胞。

图 1 组织块接种第 10 天的原代细胞 (bar = 60 μm , 10 \times 20)

Note. Arrow A indicates bovine uterine tissue bloc. Arrow B indicates the original generation of bovine endometrial epithelial cells.

Fig. 1 Primary bovine uterine endometrial epithelial cells derived from the tissue block cultured for 10 days (bar = 60 μm , 10 \times 20)

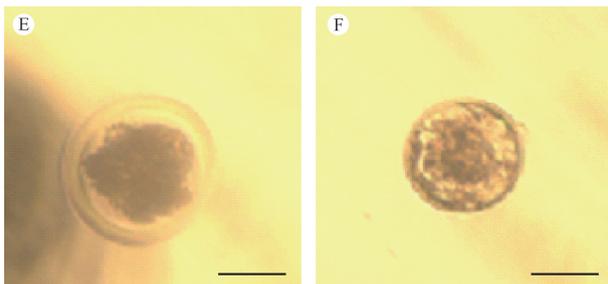


注:C. 箭头所指为 1 代子宫内层上皮细胞;D. 箭头所指为 4 代子宫内层上皮细胞。

图 2 子宫内层上皮传代细胞 (bar = 60 μm , 10 \times 20)

Note. Arrow C and D indicate bovine endometrial epithelial cells.

Fig. 2 Passaged bovine endometrial epithelium cells (bar = 60 μm , 10 \times 20)

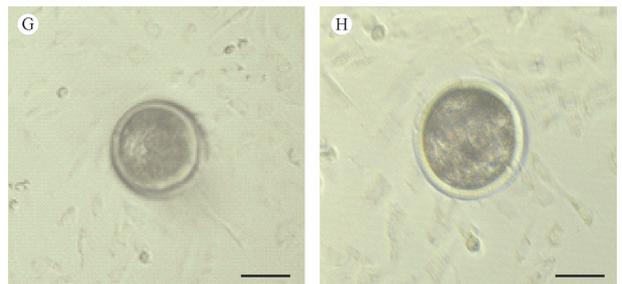


注:E. 为刚解冻的牛桑葚胚;F. 为体外培养 12 h 的牛早期囊胚。

图 3 解冻后的牛体内胚胎 (bar = 80 μm , 10 \times 40)

Note. E indicates a bovine morula; F indicates an early bovine blastocyst after being in vitro cultured for 12 h.

Fig. 3 In vivo bovine embryos after freezing-thawing (bar = 80 μm , 10 \times 40)



注:G. 刚进行共培养的牛囊胚;H. 共培养 24 h 后的牛囊胚。

图 4 共培养前、后的牛体内胚胎 (bar = 80 μm , 10 \times 40)

Note. G indicates a bovine blastocyst co-cultured with endometrial epithelial cells at the beginning.

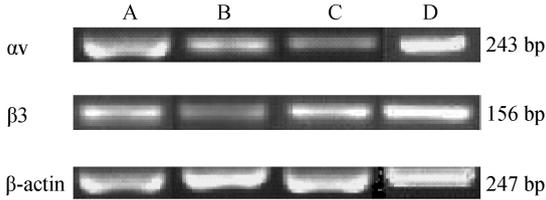
H indicates bovine blastocyst co-cultured with endometrial epithelial cells for 24 h.

Fig. 4 Bovine blastocysts before and after co-culture with endometrial epithelial cell for 24 hours (bar = 80 μm , 10 \times 40)

2.4 子宫内膜上皮细胞 $\alpha v, \beta 3$ 共培养前、后的 RT-PCR 检测结果

2.4.1 凝胶成像

每个 PCR 实验各重复 5 次,从电泳结果看出,看家基因 β -actin 正常表达,表明提取的总 RNA 经反转后,可稳定用于后续实验。见图 5。



注:A. 阳性对照; B. 对照组;
C. 共培养 I 组; D. 共培养 II 组。

图 5 单枚牛体内胚胎与其子宫内膜上皮细胞共培养 24 h 前、后 $\alpha v, \beta 3$ 基因的差异表达情况

Note. A. Positive control sample; B. Control group;
C. Co-culture group I; D. Co-culture group II

Fig. 5 Differential expression of integrin $\alpha v, \beta 3$ after in vivo bovine blastocysts being co-cultured with endometrial epithelial cells

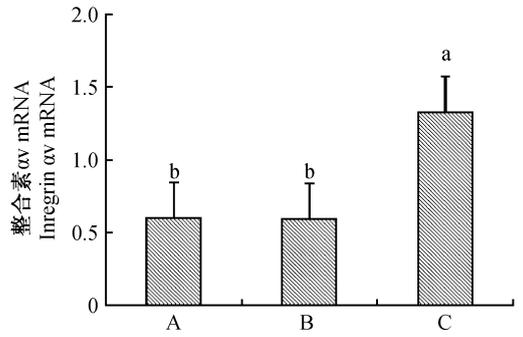
2.4.2 灰度值分析结果

每组实验平行重复 5 次,凝胶成像所得的图片用 ImageJ 软件分析得到灰度值。利用 SPSS 19.0 软件中的 ANOVA 单因素方差分析处理灰度值数据,结果如图 6,图 7 所示:共培养前、后均有整合素 $\alpha v, \beta 3$ 的表达;共培养 I 组(未孵化囊胚组),其共培养后整合素 $\alpha v, \beta 3$ 的表达变化与未共培养对照组相比,差异无显著性($P > 0.05$);共培养 II 组为孵化囊胚组,其共培养后整合素 $\alpha v, \beta 3$ 的表达显著高于未共培养对照组和共培养 I 组($P < 0.05$)。

3 讨论

哺乳动物胚胎着床的过程是通过胚胎与母体子宫间正常的信息交流实现的。不仅需要良好质量的胚胎,也需要母体子宫处于容受态,才能接受附植,否则就会发生妊娠失败。整合素属于粘附蛋白家族因子,主要参与细胞间的粘附,迁移过程。在反刍动物的胚胎着床过程中,大量涉及细胞的粘附,增殖,分化与迁移。因此,我们猜想,整合素可能参与了反刍动物的胚胎着床过程,本试验欲通过体外共培养模型来探究其整合素在胚胎附植中的变化,并对未来体外检测子宫容受态的工作提供实践基础。

20 世纪后期, Fisher 及 Sueoka^[9,10] 两个团队首先在人类的子宫内膜上皮细胞中发现了整合素的表



注: A. 为共培养组; B. 共培养 I 组; C. 共培养 II 组;
上标相同字母表示差异无显著性, $P > 0.05$ 不同字母表示差异有显著性, $P < 0.05$ (下同)。

图 6 牛体内囊胚与子宫内膜共培养 24 h 前后 αv 相对灰度值比较

Note. A: Control group. B: Co-culture group I. C: Co-culture group II. The same superscript letters indicate non-significant difference ($P > 0.05$). The different superscript letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) (same as below).

Fig. 6 Comparison of the mRNA levels of integrin αv mRNA in endometrial epithelial cells before and after co-culture with the bovine blastocyst for 24 h

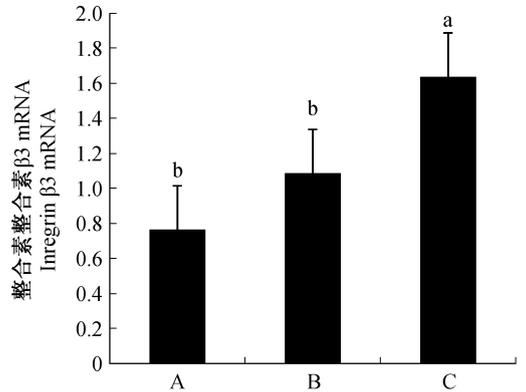


图 7 牛体内囊胚与子宫内膜共培养 24 h 前后 $\beta 3$ 相对灰度值比较

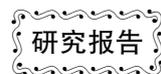
Fig. 7 Comparison of the mRNA level of integrin $\beta 3$ in the endometrial epithelial cells before and after co-culture with bovine blastocyst for 24 h.

达,并证实其参与了子宫容受态的建立,随后, Johnson、Burghardt 等^[11,12] 分别在绵羊和猪的子宫内膜细胞中发现了整合素的表达。1995 年, MacLaren 与 Wildeman^[13-15] 最早在牛的胚胎上检测到了整合素亚基 $\beta 1$, 然而其 α 配体尚不明确,并最终发现,整合素表达于植入期牛子宫胚胎界面,以及整个妊娠中期的胎盘细胞表面。近几年, Zeiler^[16], Nardo 等^[17] 在研究中发现,牛子宫内膜上皮细胞中有整合素 $\alpha v, \beta 3$ 的表达,子宫基质成纤维细胞中有 $\alpha 6 \beta 1$ 的

表达,其中,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在胚泡着床的整个时期都表达。这与我们的试验结果相吻合。有趣的是,我们还发现,虽然前期报道指出整合素 $\alpha_v\beta_3$ 属于一个结合体,但胚胎体外(共培养)诱导试验结果却显示: $\alpha_v\beta_3$ 亚基并没有呈现出相同的变化规律,这可能提示子宫内膜中起到附植关键作用的整合素受体类型,不止 $\alpha_v\beta_3$ 一个,且在着床过程中,可能存在部分变构的现象,即亚基与配体间的亲和力发生了变化。另一方面,我们的实验结果显示:经体外共培养诱导处理后,牛孵化胚胎组整合素表达的增幅远高于未孵化胚胎组。这与 Robert 等^[18]的牛体内胚胎相关实验结果存在一定差异,他们首先在牛的桑葚胚及后期囊胚滋养层细胞中检测到 IFN- τ ,它于妊娠的第 6 或 7 天,即囊胚腔出现扩张时开始表达,此后,随着囊胚的孵化,IFN- τ 分泌量急剧上升,并于妊娠第 14 ~ 16 天达到高峰,并持续到第 19 ~ 21 天。2015 年, Bao^[19] 团队发现 IFN- τ 可上调钙粘蛋白的表达,2016 年 2 月, Keeley^[16] 团队再次证实钙粘蛋白与整合素间有紧密的相互调节作用,而在本实验中,我们发现:整合素明显上升的趋势是在孵化囊胚组,与其滋养层细胞自身 IFN- τ 大量分泌的时间相吻合。因此可以推测:整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的上调是由于 IFN- τ 在囊胚孵化前后的差异分泌所造成的,这也预示着 $\alpha_v\beta_3$ 具有作为牛子宫容受态体外检测标志基因的潜力。

参 考 文 献

- [1] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation [J]. Hum Reprod Update, 2006, 12: 731 - 746.
- [2] Spencer TE, Hayashi K, Hu J, et al. Comparative developmental biology of the mammalian uteri. In: Schatten G (ed.): Current Topics in Developmental Biology [M]. Burlington, MA: Elsevier, 2005, 68: 85 - 122.
- [3] MacIntyre DM, Lim HC, Ryan K, et al. Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix [J]. Biol Reprod, 2002, 66: 1430 - 1436.
- [4] Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA. Interferons and uterine receptivity [J]. Semin Reprod Med, 2009, 27(1): 90 - 102
- [5] Bartol FF, Wiley AA, Floyd JG, et al. Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility [J]. Reprod Fertl Suppl, 1999, 54: 287 - 302.
- [6] Chung TW, Park MJ, Kim HS, et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ are required for leukemia inhibitory factor mediated the adhesion of trophoblast cells to the endometrial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2016, 469(4): 936 - 940.
- [7] Mui KL, Chen CS, Assoian RK. The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces [J]. J Cell Sci, 2016, 129: 1093 - 1100.
- [8] 刘能辉. OPN 和 integrin β_3 在围植期小鼠子宫内膜中的表达及其抗体对着床的影响 [D]. 中南大学, 2008.
- [9] Fisher SJ, Damsky CH. Human cytotrophoblast invasion [J]. Semin Cell Biol, 1993, 4: 183 - 188.
- [10] Sueoka K, Shiokawa S, Miyazaki T, et al. Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation [J]. Fertil Steril, 1997, 67: 799 - 811.
- [11] Johnson GA, FW Bazer, LA Jaeger, et al. Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep [J]. Biol Reprod, 2001, 6(5): 820 - 828.
- [12] Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, et al. Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals [J]. Cells Tissues Organs, 2007, 172: 202 - 217.
- [13] Hernandez-Nieto CA, Soto Cossio LE, Basurto Diaz D. Assisted hatching for improving embryo implantation [J]. Ginecol Obstet Mex, 2015, 83(4): 232 - 239.
- [14] Pfarrer C, Hirsch P, Guillomot M, et al. Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes [J]. Placenta, 2003; 4: 588 - 597.
- [15] MacLaren LA, Wildeman AG. Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression, and localization of the alpha5 and beta1 integrin subunits in bovine trophoblast [J]. Biol Reprod, 1995, 5(3): 153 - 165.
- [16] Zeiler M, Leiser R, Johnson GA, et al. Development of an in vitro model for bovine placentation: a comparison of the in vivo and in vitro expression of integrins and components of extracellular matrix in bovine placental cells [J]. Cells Tissues Organs, 2007, 186(4): 229 - 242.
- [17] Nardo LG, Bartoloni G, Di Memurio S, et al. Expression of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_4\beta_1$ integrins throughout the putative window of implantation in a cohort of healthy fertile women [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2002, 81(8): 753 - 758.
- [18] Pfarrer CD. Characterization of the bovin placenta by cytoskeleton, integrin receptors, and extracellular matrix [J]. In: Michael J. Soares, Joan S. Hunt (Ed.). Placenta and Trophoblast, Methods and Protocols Volume 1. Humana Press, Totowa New Jersey. 2006, 121: 323 - 335.
- [19] Bao ZJ, Zhao S, Haq IU, et al. Recombinant bovine interferon - τ enhances in vitro development of bovine embryos by upregulating expression of connexin 43 and E-cadherin [J]. J Dairy Sci, 2015, 97: 6917 - 6925.



玛咖提取物对小鼠毒性及免疫器官的影响

俞发荣, 张诗爽, 张振南*, 连秀珍, 谢明仁, 李登楼, 杨博

(甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室, 甘肃政法学院, 兰州 730070)

【摘要】 **目的** 探讨玛咖提取物对小鼠毒性及免疫器官的影响。**方法** 给予 BALB/c 小鼠玛咖提取物 15 d, 观察玛咖对小鼠的毒性作用, 称量胸腺和脾重量。**结果** 24 h 内小鼠口服累计剂量为 320 g/(kg·bw), 未见动物出现任何毒性反应。给予玛咖提取物 16.0、32.0、64.0 g/(kg·bw) 15 d, 胸腺重量比对照组分别增加了 36.84%、89.47%、107.89%, 脾脏重量分别增加了 44.83%、62.01%、89.66%, 小鼠碳粒廓清指数分别增加了 30.85%、42.55%、54.79%, 血清溶血素值分别增加了 11.64%、20.03%、31.51%, 与对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。**结论** 玛咖提取物具有增加免疫器官重量和提高免疫功能的作用, 且毒性较低。

【关键词】 玛咖提取物; 免疫器官; 毒性作用; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0279-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.012

Effect of Maca extract on the toxicity and immune organs in mice

YU Fa-rong, ZHANG Shi-shuang, ZHANG Zhen-nan*, LIAN Xiu-zhen, XIE Ming-ren, LI Deng-lou, YANG Bo

(Key Laboratory of Evidence of Science and Technology Research and Application,
Gansu Province Institute of Political Science and Law, Lanzhou 730070, China)

【Abstract】 **Objective** To study the effect of Maca extract on toxicity and immune organs in mice. **Methods** One hundred and fifty SPF BALB/c mice (male: female = 1:1, body weight 20–22 g) were used in this study. The mice received Maca extract for 15 days, and the maca toxic effect on mice, and the thymus and spleen weights were observed. **Results** At 24 hours after oral administration of Maca extract in an accumulated dose of 320 g/kg·bw, no toxic response was seen in the mice. After administration of Maca extract in a dose of 16.0, 32.0, and 64.0 g/kg·bw for 15 days, the thymus weight was increased by 36.84%, 89.47% and 107.89%, respectively, the spleen weight was increased by 44.83%, 62.01%, and 89.66%, respectively, the carbon clearance index was increased by 30.85%, 30.85% and 42.55%, respectively, and the serum hemolysin value was increased by 11.64%, 20.03% and 31.51%, respectively, in the experimental mice, significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ for all). **Conclusions** Maca extract exerts an enhancing effect on the immune organ weights and improve the immune function, and is associated with a lower toxicity.

【Key words】 Maca extract; Immune organs; Toxic effect; Mice

Corresponding author: ZHANG Zhen-nan, E-mail: zzn@gsli.edu.cn

玛咖 (Maca), 十字花科 (Brassicaceae) 独行菜属 (*Lepidium*) 植物, 原产于海拔 3500 ~ 4500 m 的南

美安第斯山区。玛咖在南美的食用历史已经有 5800 多年, 是一种纯天然食品, 营养成份丰富, 有

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (编号:31060283); 国家社会科学基金项目 (编号:07BSH054); 甘肃省基础研究创新群体项目 (编号:145RJIA333); 甘肃省科技支撑计划-社会发展类项目 (编号:1304FKCA082); 甘肃政法学院重点项目 (编号:GZF2014XZDLW17); 兰州市科技计划资助项目 (项目编号:2014-1-128)。

【作者简介】 俞发荣 (1959 -), 男, 博士, 研究员。研究方向: 法医学、社会环境压力对人类健康的影响、药理学和毒理学实验及实验动物学。E-mail: tim9898@163.com.

【通讯作者】 张振南, E-mail: zzn@gsli.edu.cn.