

妊娠奶牛 PAPP A 和 PAG mRNA 表达规律的研究

郭 宁, 李 莲, 周 璇, 崔群维, 王根林*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: [目的] 分析 PAPP A (妊娠相关血浆蛋白 A) 和 PAG (妊娠相关糖蛋白) mRNA 在不同妊娠时期奶牛外周血的表达规律。 [方法] 提取奶牛空怀期和妊娠 30 d、60 d、90 d、150 d 和 240 d 血浆中游离 RNA, RT-PCR 扩增 PAPP A 和 PAG 的基因, 分析其在妊娠期的相对表达水平, 并研究其表达规律。 [结果] PAG 基因在空怀组和妊娠牛均有表达, 在牛妊娠 240 d 时相对表达水平达到高峰; PAPP A 从妊娠 30 d 时表达水平开始升高, 并在妊娠 150 d 时达到最高水平。 [结论] 本研究为深入探讨奶牛 PAPP A 和 PAG 基因调控规律和早期妊娠诊断提供了参考。

关键词: 奶牛; PAPP A; PAG; 基因表达

中图分类号: S814.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2011)03-0001-05

妊娠相关血浆蛋白 A (pregnancy-associated plasma protein-A, PAPP A) 是 1974 年 Lin^[1] 等首次从孕妇血清中分离出来的一种大分子糖蛋白质, 它在血清中的含量与妊娠周期密切相关。有研究发现, 妊娠期 PAPP A 由胎盘滋养合体细胞和蜕膜细胞分泌合成并进入血循环^[2], 而 PAPP A 虽在其他组织也有微量表达, 但水平远低于胎盘。目前, 在人医上 PAPP A 已被作为孕妇血清学产前检查的一项重要生化指标, 主要用于妊娠早期诊断。近年来大量的研究发现, 母体外周血中 PAPP A 异常低值与胎儿染色体数目和结构异常相关, 是目前妊娠早期最常用、最有希望的临床筛查指标之一。

妊娠相关糖蛋白 (pregnancy-associated glycoprotein, PAG) 是一种由胎盘分泌的妊娠特异性蛋白, 已经在牛、绵羊、猪等^[3] 动物中发现。PAG 已经被认为在妊娠过程中起着免疫保护作用, 一些研究还表明 PAG 在妊娠期浓度不断增加与牛的免疫抑制有关^[4]。在妊娠奶牛中, PAPP A 和 PAG 都可以作为一种妊娠标记蛋白, 且其在妊娠期均有着重要的作用。本试验通过分析 PAPP A 和 PAG 的 mRNA 在妊娠奶牛外周血中的相对表达量, 研究其表

达规律, 从而为奶牛早期妊娠诊断提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 试验动物来自于扬州大学实验农场无繁殖障碍的 48 头荷斯坦母牛, 将其分为 6 组, 分别为对照组 (健康未经产青年奶牛和经产半年内未配种的奶牛) 8 头, 试验组妊娠 30 d、60 d、90 d、150 d 和 240 d 母牛各 8 头。

1.1.2 主要试剂与仪器 柱式病毒 RNA out (北京天恩泽基因科技有限公司)、反转录酶 (TAKARA)、琼脂、SYBR Green Master (Roche)、7300 型荧光定量 PCR 仪 (ABI)、紫外分光光度计。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集 10 mL 离心管在 0.1% DEPC 水中经过夜处理、干燥、高压等步骤彻底清除外源污染的 RNA。尾静脉采集奶牛血液, 柠檬酸钠抗凝剂与血液以 1 : 6 的比例进行抗凝处理。

1.2.2 引物合成 以看家基因 β -actin 为内参, 从 GenBank 中检索牛 PAPP A 和 PAG 的 mRNA 序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 引物由

* 收稿日期: 2010-12-29 修回日期: 2011-01-19

基金项目: 本研究由国家科技部奶业支撑计划 (2006BAD04A12) 和江苏省科技支撑计划 (BE2008306-2) 共同资助。

作者简介: 郭宁 (1985-), 女, 陕西渭南人, 在读硕士, 专业方向动物繁殖与遗传育种。

* 通讯作者: 王根林 (1957-), 男, 江苏靖江人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生殖生理、生殖调控和养牛学领域的教学和研究工作。

上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 目的基因的引物序列和片段大小

目的基因	引物序列	片段大小
PAPPA (XM_002689953)	F: 5'-atg tgacctttgcctggaag-3' R: 5'-ctggacttacagggtctc-3'	141 bp
PAG (NM_174411.2)	F: 5'-tgagcctgtttttgcttct-3' R: 5'-tactctcattgcctgctt-3'	136 bp
β -actin (NM_173979.3)	F: 5'-tcagccttcttctgggcat-3' R: 5'-ggacagcaccgtgttgccg taga-3'	116 bp

1.2.3 RNA 的提取及检测 所采集的血样于两小时内以 1 600 g/min 离心 10 min, 将获得血浆转移至 DEPC 处理过的 1.5 mL 离心管中。进行低温高速(温度 4 ℃, 离心力 24, 000 g)离心 60 min, 取离心后的血浆 0.2 mL 按柱式病毒 RNAout 说明书提取 RNA。在紫外分光光度计中测定 RNA 的纯度和浓度, 并检测 RNA 的质量。将所提取的 RNA 置于-80 ℃保存备用。

1.2.4 cDNA 的制备 在每个所得的 RNA 样中取 2 μ L, 按 transverse kit(TAKARA)的说明进行反转录, 最终获得 20 μ L 体系的 cDNA 样。所得 cDNA 于-20 ℃冰箱保存备用。

1.2.5 RT-PCR 检测 PAPPA 的相对表达量 采用 20 μ L 的反应体系, 避光操作, 按 Roche 定量的试剂盒依次加入试剂和模板, 在实时荧光定量 PCR 仪进行反应。反应条件如下设置: 94 ℃预变性 2 min,

94 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 2 min, 共 40 个循环。并纪录每个样本所得的 Ct 值。

1.3 数据分折

Δ Ct = 样品 Ct 均值 - 内参照 Ct 均值,
 $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct - (随机阴性对照样品 Ct 均值 - 该样品内参照 Ct 均值), 以 $2^{-\Delta\Delta$ Ct} 表示样品中目的基因mRNA相对表达量。采用 SPSS16.0 对所得实验数据进行单因素方差分析, 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAPPA 在外周血中的相对表达量

以血液中 β -actin 的表达量为参照, 通过 RT-PCR 分析 PAPPA 的 mRNA 在血液中的相对表达量。试验所得数据见表 2。

表 2 PAPPA 的 Ct 值

孕龄	PAPPA 的 Ct 平均值(n=8)	β -actin 的 Ct 平均值(n=8)	Δ Ct
空怀	31.97 $\pm$ 0.55	19.95 $\pm$ 1.26	12.02
30 d	30.86 $\pm$ 0.91	21.27 $\pm$ 0.52	9.61
60 d	28.98 $\pm$ 0.71	20.41 $\pm$ 1.14	9.56
90 d	29.98 $\pm$ 0.70	20.65 $\pm$ 0.67	9.00
150 d	29.78 $\pm$ 0.72	20.84 $\pm$ 0.33	8.93
240 d	29.48 $\pm$ 0.98	20.42 $\pm$ 0.54	9.05

表 3 PAG 的 Ct 值

孕龄	PAG 的 Ct 平均值(n=8)	β -actin 的 Ct 平值(n=8)	Δ Ct
空怀	38.97 $\pm$ 0.81	19.95 $\pm$ 1.26	19.02
30 d	37.28 $\pm$ 1.91	21.27 $\pm$ 0.52	16.02
60 d	35.47 $\pm$ 1.48	20.41 $\pm$ 1.14	15.06
90 d	37.22 $\pm$ 1.60	20.65 $\pm$ 0.67	16.57
150 d	37.19 $\pm$ 1.28	20.84 $\pm$ 0.33	16.35
240 d	34.17 $\pm$ 1.40	20.42 $\pm$ 0.54	13.76

以未妊娠奶牛作为阴性对照, 计算 $2^{-\Delta\Delta$ Ct}, 分析整个妊娠期 PAPPA 的 mRNA 在血浆的表达规律, 结果见图 1。与空怀组相比, 奶牛妊娠期血浆中的 PAPPA 的 mRNA 水平均有显著性提高(P<0.05)。其特征为妊娠初期 mRNA 表达开始增加, 妊娠 30 d 和 60 d 两组表达水平基本相同, 妊娠 150 d 时达到

表达峰值, 妊娠 150 d 与空怀组比较差异极显著(P<0.01)。妊娠 240 d 时表达量有所下降。妊娠 5 个不同时期 PAPPA 的 mRNA 表达水平无显著差异。

2.2 PAG 在外周血中的相对表达量

RT-PCR 检测 PAG 的 mRNA 表达, 所得数据见表 3。

分析 PAG 在整个妊娠期的表达规律, 结果见图 2。虽然在空怀期可以检测到 PAG 的 mRNA 表达, 但其表达水平较低。以空怀期的表达量为对照, 随着妊娠期的开始 PAG 的 mRNA 在血浆中的水平开始增加。与空怀期相比, 在整个妊娠 PAG 的

mRNA 表达量增加, 妊娠 30 d、90 d 和 150 d 显著高于空怀期($P<0.05$), 妊娠 60 d 和 240 d 时极显著地高于空怀期($P<0.01$)。但妊娠 90 d 和 150 d 表达水平下降, 妊娠 240 d 则显著提高。

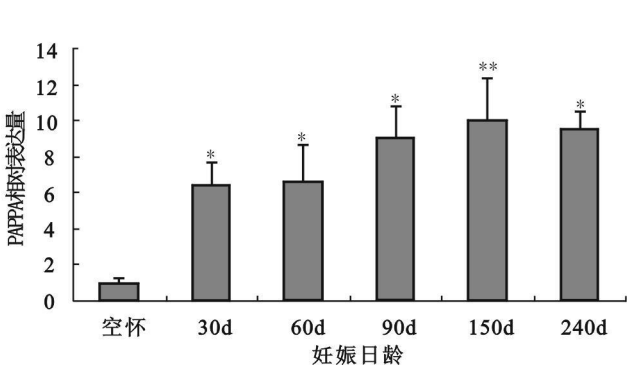


图 1 PAPPa mRNA 在空怀和妊娠牛血浆中的相对表达水平
注: “*”表示与空怀组比较差异显著, “**”表示差异极显著。

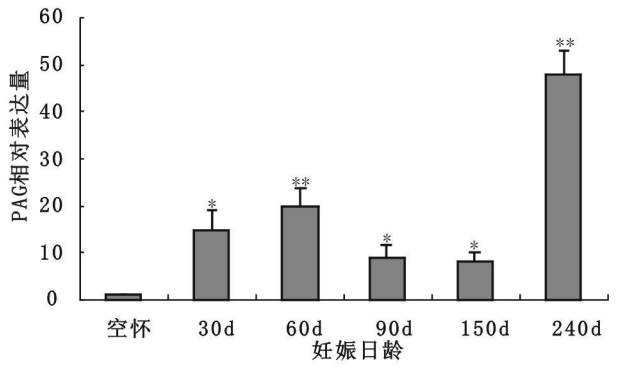


图 2 PAG mRNA 在空怀牛和妊娠牛血浆中的相对表达水平

3 讨论

3.1 血浆中游离 RNA

结果表明, PAPPa 和 PAG 的 mRNA 在血浆中的表达水平低。这两种基因表达水平低的主要原因是由于血浆中游离 RNA 的浓度较低。目前, 关于母体血浆中游离的胎盘或胎儿源的核酸分子认为有三种来源: ①是来源于胎盘, 可直接进入外周血循环; ②是源于母体外周血循环的胎儿有核细胞凋亡所释放; ③是胎儿核酸分子直接通过胎盘转移进入母体外周血循环^[5]。2000 年 Poon 等证实孕妇血浆中也存在着胎儿源的 Y 染色体锌指蛋白 (ZFY) mRNA, 且更易检测到^[6]; Ng 等随后在孕妇血浆中成功检测到胎盘普遍表达的胎盘催乳素 (hPL) 和 β -HCG 的 mRNA, 并认为胎盘是孕妇血浆胎儿游离核酸的主要组织来源^[7]。由于牛的胎盘结构不同于人类, 母体血液中胎盘源 RNA 的来源也可能不同。母体外周血中游离 RNA 的存在形式比较特殊, 其结构类似于病毒, RNA 包裹于蛋白外衣内, 故本试验中 RNA 的提取不同于普通血液中提取 RNA 的常规方法, 特以病毒 RNA 试剂盒提取外周血中游离的 RNA。由于个体差异及单个样本独立处理造成提取出的浓度差异极大, 但因本试验是测定基因的相对表达量, 故不影响最终结果。

3.2 PAPPa 和 PAG 的 mRNA 在血浆中的表达

在妊娠期间, 相对于其他组织, 如肝脏和红细胞

系, 胎盘表达更多的功能性基因, 但只有部分的功能是明确的。对于某些功能未明确的基因, 目前仍有大量的试验在进行中。现在可通过公布的 EST (已表达序列标志) 序列、微阵列分析、构建的 cDNA 文库和联合分析的方法, 作为一种研究分析胎盘表达的基因的资源^[8,9]。在妊娠早期, 如果缺乏某些胚胎自身表达的基因, 将会导致妊娠的终止^[10,11]。本研究主要通过检测 PAPPa 和 PAG 这两种基因的 mRNA 在妊娠奶牛外周血的表达水平, 分析其在妊娠期的表达规律, 根据其不同时期的表达量结合其功能更进一步地认识其在妊娠期发挥的作用。

本研究结果表明, 妊娠开始后 PAPPa 的表达水平开始升高, 到妊娠 150 d 时出现高峰。人医方面也有类似的研究成果^[12], 在妊娠早期单胎受精 32 d 和双胎受精 21 d 后孕妇血清中可检测到 PAPPa, 其含量随孕周而变化, 妊娠 7 周后血清中 PAPPa 水平比未孕时高出 5 倍, 妊娠终止后迅速消失。有大量研究表明, 当妊娠期的 PAPPa 的表达明显降低时, 出现流产、死胎、早产及妊娠高血压等病症的发病率往往较高^[13-15]。虽然 PAPPa 在其他组织也可以检测到, 但是其在妊娠期血浆中的高水平表达, 已将其列为一种妊娠标记蛋白^[14]。

PAG 是一种由胎盘在妊娠期特异产生的一种酸性糖蛋白, 可以进入母体的外周血循环, 因而提供了一种进行早期妊娠诊断的方法。有多项研究表明, 在奶牛配种 28 或 30 d 后, 用 PAG 的抗血清进

行放射免疫测定可以进行妊娠诊断^[16-19]。本试验检测 PAG 的 mRNA 在外周血中的表达, 结果表明, 在空怀期和妊娠期均检测到了 PAG 的 mRNA 在血液中的表达, 但空怀期的表达极低。空怀期牛血液中 PAG 含量并不为零, 而是较低, 小于 1 ng/mL^[20-22], 这一结果与前人所得的研究结果基本一致。本试验中在妊娠末期(240 d)时, PAG 的 mRNA 的表达量极显著地($P < 0.01$)高于空怀期, 与 Patel^[23, 24] 等检测妊娠牛血清中 PAG 蛋白的结果相似, 即血液中 PAG 蛋白含量高峰出现在分娩前。

PAG 属于天冬氨酸蛋白酶家族, 但是部分 PAG 并不具备酶活性, 其功能仍然不清楚^[25, 26]。有研究证明 PAG 在妊娠期间发挥免疫保护作用, 在着床和胎盘形成时有重要的作用^[27]。在妊娠第三周, 妊娠奶牛的外周血中可检测到 PAG^[28], 并且被用于早期妊娠诊断中。有研究报道在妊娠晚期胚胎死亡后, 血清中 PAG 的浓度迅速开始下降^[29], 这些研究都表明在妊娠期 PAG 有着重要的作用, 不同时期可能发挥着不同的功能。

本研究证明, PAPPa 和 PAG 可做为妊娠标记蛋白, 但 PAG 的 mRNA 表达水平与 PAPPa 相比, 在妊娠早期就可达到高水平, 这一结果更有助于早期妊娠诊断的准确性。对于两种蛋白及其基因表达在妊娠期的作用, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lin T M, Galbert S P, Kiefer D, *et al.* Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1974, 118(2): 223-236.
- [2] Lin T M, Halbert S P, Kiefer D, *et al.* Quantitation analysis of pregnancy associated plasma protein in human placenta[J]. *J Clin Invest*, 1976, 57: 466.
- [3] Overgaard M T, Oxving C, Christiansen M, *et al.* Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues[J]. *Biol Reprod*, 1999, 61(4): 1083-1089.
- [4] Haugejorden G, Waage S, Dahl E, *et al.* Pregnancy associated glycoproteins (PAG) in postpartum cows, ewes, goats and their offspring[J]. *Theriogenology*, 2006, (66): 1976-1984.
- [5] 庄岳鹏, 兰风华. 循环游离核酸的检测及意义[J]. *临床检验杂志*, 2007, 25(5): 395-396.
- [6] Poon L L, Leung T N, Lau T K, *et al.* Presence of fetal RNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2000, 46(11): 1832-1834.
- [7] Ng E K, Tsui N B, Lau T K, *et al.* mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(8): 4748-4753.
- [8] Tanaka T S, Jaradat S A, Lim M K, *et al.* Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15, 000 mouse developmental cDNA microarray[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1997, 9127-9132.
- [9] Hemberger M, Cross J C, Ropers H H, *et al.* UniGene cDNA array-based monitoring of transcriptome changes during mouse placental development[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1998, 13126-13131.
- [10] Latham K E, Schultz RM; Embryonic genome activation[J]. *Front Biosci*, 2001, 6: 748-759.
- [11] Han Y M, Kang Y K, Koo D B, *et al.* Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro[J]. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 33-44.
- [12] Folkersen J, Grudzinskas J G, Hindersson P, *et al.* Pregnancy-associated plasma protein A; circulating levels during normal pregnancy[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1981, 139(8): 910-914.
- [13] Milovanov A P, Boltovskaia M N, Fokina T V, *et al.* Non-developing pregnancy: histological and immunohistochemical markers of endocrine disorders in endometrial scrapes[J]. *Arch Patol*, 2008, 70: 22-25.
- [14] Overgaard M T, Oxving C, Christiansen M, *et al.* Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues[J]. *Biol Reprod*, 1999, 61(4): 1083-1089.
- [15] Prefumo F, Canini S, Crovo A, *et al.* Correlation between first trimester fetal bone length and maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21: 3019-3021.
- [16] Humblot P, Camous S, Martal J, *et al.* Diagnosis of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in the plasma of dairy cows[J]. *Theriogenology*, 1988, 30: 257-268.
- [17] Sasser R G, Ruder C A, Jvani K A, *et al.* Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation[J]. *Biol Reprod*, 1986, 35: 936-942.
- [18] Szenci O, Taverne MAM, Beckers J F, *et al.* Evaluation of false ultrasonographic diagnoses in cows by measuring plasma levels of bovine pregnancy-associated glycoprotein[J]. *Vet*

- Reg 1988, 142: 304-306.
- [19] Zoli A P, Guilbault L A, Delahaut P, *et al* . Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis[J] . Biol Reprod, 1992, 46: 83-92.
- [20] Silva E, Sterry R A, Kolb D, *et al* . Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination[J] . J Dairy Sci, 2007, 90(10): 4612-4622.
- [21] Gajewski Z, Melo de Sousa N, Beckers J F, *et al* . Concentration of bovine pregnancy associated glycoprotein in plasma and milk: its application for pregnancy diagnosis in cows[J] . J Physiol Pharmacol, 2008, 59(9): 55-64.
- [22] Green J C, Volkman D H, Poock S E, *et al* . Technical note: A rapid enzyme-linked immunosorbent assay blood test for pregnancy in dairy and beef cattle[J] . J Dairy Sci, 2009, 92(8): 3819-3824.
- [23] Patel O V, Sulon J, Becker J F, *et al* . Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in cow[J] . Eur J Endocrinol, 1997, 137: 423-428.
- [24] Mialon M M, Camous S, Reanand G, *et al* . Peripheral concentrations of a 600-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle[J] . Reprod Nutr Dev, 1993, 33: 269-282.
- [25] Becker J F, Dion P V, Garbayo J M, *et al* . Pregnancy-associated glycoproteins in the ruminants: inactive members of the aspartic protease family[J] . Acta Vet Hung, 1999, 47: 461-469.
- [26] Roberts R M, Xie S, Mathialagan N. Maternal recognition of pregnancy[J] . Biol Reprod, 1996, 54: 294-302.
- [27] Wooding FBP, Roberts R M, Green J A. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications[J] . Placenta, 2005, 26: 807-827.
- [28] Perenyi Z S, Szenci O, Sulon J, *et al* . Comparison of the ability of three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma[J] . Reprod Domest Anim, 2002, 27: 100-104.
- [29] Szenci O, Beckers J F, Sulon J, *et al* . Effect of induction of late embryonic mortality on plasma profiles of pregnancy-associated glycoprotein 1 in heifers[J] . Vet J, 2003, 59: 1941-1948.

Preliminary Study on PAPP and PAG mRNA Expression in Cows

GUO Ning, LI Lian, ZHOU Xuan, CUI Qun-wei, WANG Gen-lin^{*}

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract:【Objective】The expression regularity was analyzed of PAPP (Pregnancy associated plasma protein A) and PAG (Pregnancy associated glycoprotein) mRNA in peripheral blood of Holstein cows. 【Method】Extract free RNA from the plasma of un-pregnant and pregnant cows at the 30 d, 60 d, 90 d, 150 d and 240 d of pregnancy. PAPP and PAG genes were amplified by RT-PCR. 【Result】PAG was detected in both pregnant cows and non-pregnant cows. The relative expression level rose to the highest at the 150 d of pregnancy. PAPP expression began to increase at 30 d and reached to the highest at 150 d. This result provided the reference for further exploring the regulation of PAPP and PAG and for early pregnancy diagnosis in cows.

Key words: cow; PAPP; PAG; gene expression