

Active β -catenin 在 小鼠 子宫 胚胎 着床 前后的 表达 变化 及其 生物学 意义

陈世知^{1,2} 何俊琳¹ 刘学庆¹ 丁裕斌¹ 黄 静¹ 陈雪梅¹ 王应雄^{1*}

(¹ 重庆医科大学生殖生物学研究室、遗传优生教研室, 重庆 400016; ² 重庆医科大学附属第二医院, 重庆 400010)

摘要 采用免疫组化、间接免疫荧光、Western 印迹方法定量、定性、定位检测动情期未孕小鼠和妊娠第 3~7 天子宫内膜组织中 active β -catenin 的表达规律。免疫组化结果显示, 与对照组相比, 妊娠子宫内膜 active β -catenin 的表达量明显升高($P < 0.05$), 且于妊娠第 3 天在腺上皮和腔上皮、基质细胞膜表达; 妊娠第 4 天在腺上皮、基质细胞表达增加, 在腔上皮表达强烈; 妊娠第 5 天后表达在血管内皮、基质细胞膜和核, 腔上皮表达减弱或消失, 并大量表达在胚胎和初级蜕膜带。间接免疫荧光分析显示 active β -catenin 与 E-钙粘着蛋白在妊娠第 3、4 天的子宫内腺上皮和腔上皮、基质细胞膜上有共定位表达, active β -catenin 与 VEGF 于妊娠第 5 天后共表达在基质细胞和血管内皮。Western 印迹结果显示 active β -catenin 在小鼠胚胎着床前后存在持续表达, 表达高峰在妊娠第 4 天, 妊娠第 5 天后表达量有所下降但仍高于着床前水平。实验结果提示 active β -catenin 在小鼠胚胎着床前后的时空表达具有相对固定的模式, 同时呈现明显的部位和表达量的变化, 推测 active β -catenin 可能通过促进黏附、侵袭、和血管生成在胚胎着床前后起重要作用。

关键词 active β -catenin; 子宫内腺; 胚胎着床; 小鼠

β -连环蛋白(β -catenin)是一个多功能的细胞内蛋白质, 含 781 个氨基酸, 是重要的黏附因子和转录复合子。其基因定位于人染色体 3p21.3-p22, 由 16 个外显子组成, 编码一种分子量约为 92~95 kDa 的蛋白质, 蛋白质结构中包含有 α -catenin、APC 和 E-钙粘着蛋白、Tcf-4 的结合位点, 可形成多种复合体(如 β -catenin/Tcf-4)。 β -catenin 氨基端上含有 S33、S37、T41、S45 等 GSK-3 β 磷酸化位点, 使得 β -catenin 翻译后保持稳定。 β -catenin 已知的一个作用是连接细胞骨架和钙粘着蛋白跨膜蛋白^[1]; 钙粘着蛋白的细胞外基序能在相邻细胞间形成黏附连接^[2], 因此, β -catenin 在保持组织形态、结构上起着重要作用。 β -catenin 特异氨基酸的磷酸化状态和 β -catenin 相互作用蛋白 1 (ICAT) 调节 β -catenin 参与黏附作用^[3]。其另一作用是进入细胞核起共转录复合子作用, 表达大量靶基因^[4], 而 β -catenin 的 N 端氨基酸残基的磷酸化状态在此过程起重要作用。由于细胞内存在 GSK-3 β 依赖的降解途径, 在正常情况下细胞质内的 β -catenin 水平很低, 此时 β -catenin 的 N 端 S37 和 S33 氨基酸残基被磷酸化, 并通过包含 F-box 的 β -TrcpE3 连接酶快速降解。当 β -catenin 的 N 端 S37 和 S33 的氨基酸残基未被磷酸化(如 Wnt 信号通路被

激活)时, 经典的 Wnt 信号途径阻止 β -catenin 的降解, β -Trcp 不能结合到 β -catenin 的 N 端, β -catenin 不能被泛素化降解, 此时的 β -catenin 可参与黏附和转录活性的调节^[5]。人们把此时 N 端氨基酸 S37 和 S33 的氨基酸残基处于脱磷酸化状态的 β -catenin 称为 active β -catenin^[6]。Wnt 信号通路是调控细胞生长、发育和分化的关键途径。近来研究发现 Wnt 信号转导途径在胚胎着床过程中起重要作用, 敲除 Wnt 会引起胚胎死亡。在 β -catenin 基因敲除小鼠的胚胎中, 一些表达前后轴极化标志分子的前端内脏内胚层细胞错误地定位在远端内脏内胚层, 而不是重新定位在前端, 从而不能形成中胚层和外胚层, 导致胚胎在形成后的第 7 天死亡^[7]。Mohamed 等^[8]用 sFRP2 (Wnt 信号通路的抑制子)子宫腔注射, 结果显示 sFRP2 显著抑制 Wnt- β -catenin 信号, 胚胎植入明显减少。因此, 我们想观察 active β -catenin 在小鼠胚胎着床前后的变化以明确它在着床过程中的作用。

1 材料与方法

收稿日期: 2009-01-09 接受日期: 2009-05-04

重庆市自然科学基金重点项目(渝科发计字[2004]47 号)

* 通讯作者。Tel: 023-68485926, E-mail: wyx61221@yahoo.com.cn

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 anti-ABC (anti-active β -catenin) 购自 Millipore 公司。anti-VEGF、anti-E-钙粘着蛋白购自武汉博士德生物技术公司。Western 印迹及 IP 细胞裂解液、SDS-PAGE 上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、Cy5 标记的山羊抗小鼠 IgG、BCA 试剂盒均购自碧云天生物技术研究, Western blot Luminol Reagent:SC-2048 购自 Santa Cruz 公司。TRITC 标记的山羊抗兔 IgG、通用型 SP9000 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根酶标记山羊抗兔 IgG、辣根酶标记抗小鼠 β -肌动蛋白抗体均购自北京中杉金桥生物公司。

1.1.2 动物和分组 鼠龄 10~12 周, 体重 25~30 g 的昆明小鼠雌性 36 只、雄性 10 只由重庆医科大学实验动物中心提供, 饲养温度 25 °C 左右, 光照 12L/12D, 自由采食、饮水。根据阴道涂片结果鉴别雌鼠的动情周期, 动情期雌鼠 6 只设为对照组。动情前期或动情期将雌雄鼠按 1:2~1:3 合笼, 次晨 7 时检查雌鼠阴道栓阳性者即为妊娠, 定为妊娠第 1 天(D1)。将妊娠 D3~D7 小鼠作为实验组, 共 5 组(D3~D7 组), 每组 6 只, 分别于每日上午 10 时颈椎脱臼处死, 在超净工作台上剖腹分离出子宫, 取一侧子宫用 4% 多聚甲醛 4 °C 固定, 另一侧子宫(其中 D5~D7 小鼠子宫需在显微镜下剔除着床胚胎)刮取内膜立即置入消毒 EP 管中, -80 °C 保存待测。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学、间接免疫荧光化学检测 active β -catenin、VEGF、E-钙粘着蛋白的表达 分别将妊娠 D3~D7 小鼠及动情期小鼠子宫用 4% 多聚甲醛 4 °C 固定 24 h, 70% 乙醇 4 °C 脱水 24 h, 随后在梯度酒精中脱水, 二甲苯透明, 然后石蜡包埋, 常规组织学切片 5 μ m 贴在多聚赖氨酸包被过的玻片上, 60 °C 烤箱过夜, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 水化, 95 °C 枸橼酸盐缓冲液热修复, 室温自然冷却。PBS 洗涤。用 Sp9000 试剂盒检测 VEGF、active β -catenin、E-钙粘着蛋白的表达情况。一抗的工作浓度分别为 VEGF(1:100)、active β -catenin (15 μ g/ml)、E-钙粘着蛋白(1:100)。阴性对照分别用一抗血清来源动物的正常血清替代, DAB 显色。棕黄色为阳性结果。每组标本随机选取 5 张切片, 每张切片随机选取 5 个视野分析, 根据细胞染色的深浅分为 4 个等级: 无着色为阴性; 浅黄色弱阳性; 棕黄色为中度阳

性; 棕褐色为强阳性。利用北航 CM-2000B 生物医学图像分析系统进行图像采集分析, 测定 VEGF、ABC、E-钙粘着蛋白的相对表达量。

间接免疫荧光组织切片厚度为 9 μ m, 脱蜡水化, 抗原热修复, 同上。5% 山羊血清 37 °C 封闭 30 min, 一抗(工作浓度同上, 比例为 VEGF:active β -catenin=1:1 混合, E-钙粘着蛋白:active β -catenin=1:1 混合) 4 °C 温育过夜, TBST 振洗 5 min 共 3 次, TRITC 标记的山羊抗兔 IgG (1:1 000 稀释)、Cy5 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:1 000 稀释), 以 1:1 混匀。25 °C 避光温育 60 min, TBST 振洗 5 min 共 3 次, 50% PBS 甘油封片, 用激光共聚焦显微镜观察。阳性结果分别为红色、蓝色荧光信号。结果用 Leica Confocal 软件分析, 每组标本随机选取 2 张切片, 每张切片取 2 个视野, 每个视野选 10 个阳性表达细胞, 每组标本共 40 个阳性结果计算平均荧光强度。

1.2.2 Western 印迹分析 active β -catenin、VEGF、E-钙粘着蛋白的表达 用 Western 及 IP 细胞裂解液按试剂的操作程序提取动情期和妊娠 D3~D7 小鼠子宫内膜组织总蛋白, 并用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度。SDS-PAGE 分离总蛋白, 每孔上样 20 μ g, 随后湿转法将 PAGE 分离的蛋白质转移到 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶的 TBST 溶液在摇床上封闭 3 h, 用含 5% 脱脂奶 TBST 溶液稀释一抗, 稀释浓度为 anti-active β -catenin (1 μ g/ml)、VEGF (1:100)、E-钙粘着蛋白 (1:100) 4 °C 温育过夜。TBST 摇床上振洗 3 次, 每次 10 min。然后分别用二抗辣根酶标记山羊抗兔 IgG (1:1 000), 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (1:1 000), 辣根酶标记抗小鼠 β -肌动蛋白 (1:100), 37 °C 温育 1 h, 用 TBST 摇床上振洗 3 次, 每次 10 min。Western blot Luminol Reagent:SC-2048 显色。利用 Quantity One 4.4.0 软件对 Western 印迹成像图各条带强度的光密度值进行分析, 以 VEGF、active β -catenin、E-钙粘着蛋白与 β -肌动蛋白光密度比值作为目的蛋白的相对含量。

1.3 统计学处理

数据用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Active β -catenin、VEGF、E-钙粘着蛋白在着床前后的表达部位

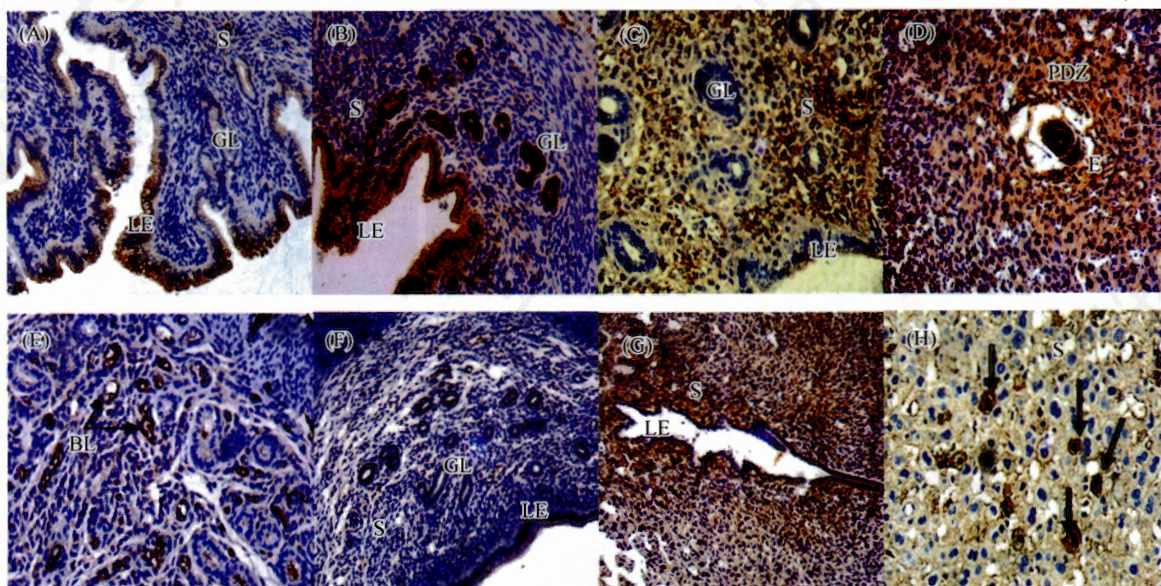


Fig.1 Immunohistochemical localization of active β -catenin protein in the mice endometria

A: D3 (200 $\times$); B: D4 (200 $\times$); C: D5 (200 $\times$); D: D6 (200 $\times$); E: D7 (200 $\times$); F: D0 (200 $\times$); G: D5 (200 $\times$); H: D5 (400 $\times$). Mice endometria stained with DAB and nucleus stained with hematoxylin. LE: luminal epithelium; S: stroma; E: embryo; BL: blood; GL: glandular epithelium; PDZ: primary decidual zone.

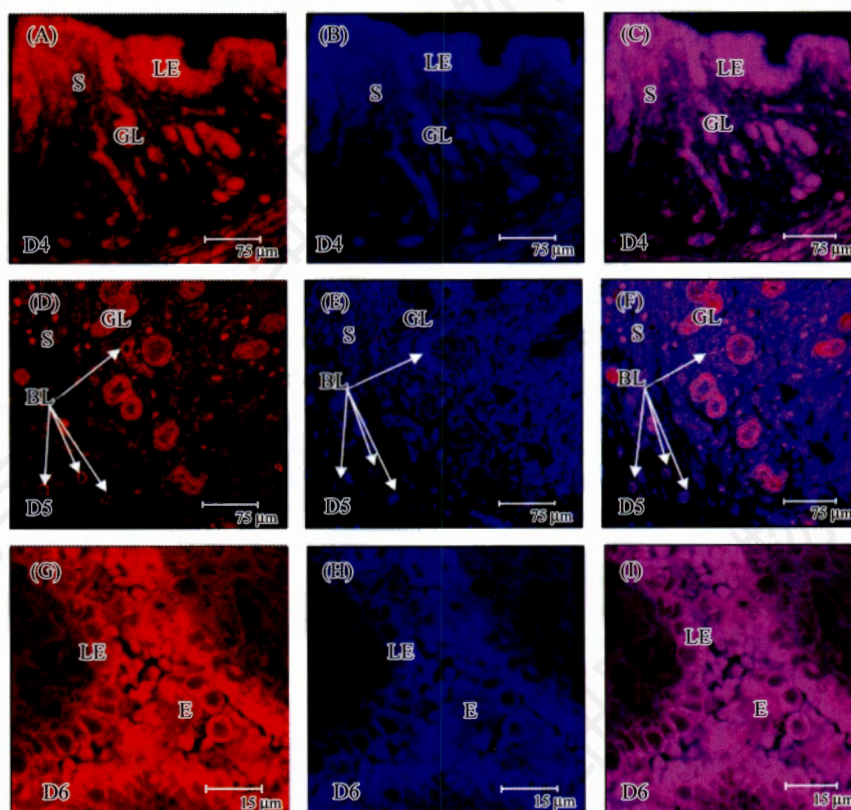


Fig.2 Immunofluorescence localization of active β -catenin, VEGF, E-cadherins in the mice endometria

A: E-cadherins red stain was determined as positive; B: active β -catenin blue stain was determined as positive; C: merge of E-cadherins and active β -catenin prunosus stain was determined as positive; D: VEGF red stain was determined as positive; E: active β -catenin blue stain was determined as positive; F: merge of active β -catenin and VEGF prunosus stain was determined as positive; G: E-cadherin red stain was determined as positive; H: active β -catenin blue stain was determined; I: merge of E-cadherin and active β -catenin prunosus stain was determined as positive. LE: luminal epithelium; S: stroma; E: embryo; BL: blood; GL: glandular epithelium.

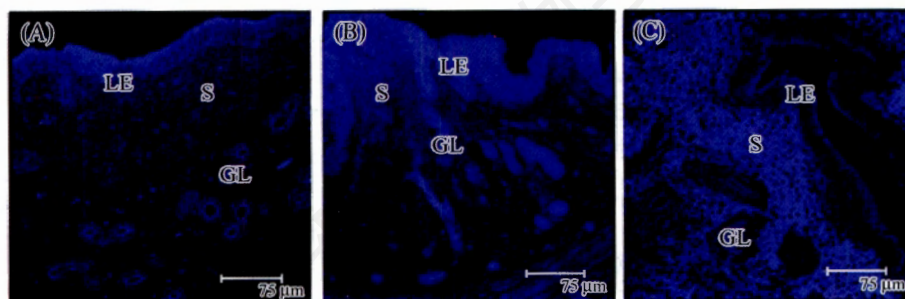


Fig.3 Immunofluorescence localization of active β -catenin in the mice endometria

A: D3; B: D4; C: D5. Active β -catenin blue stain was determined as positive. LE: luminal epithelium; S: stroma; GL: glandular epithelium.

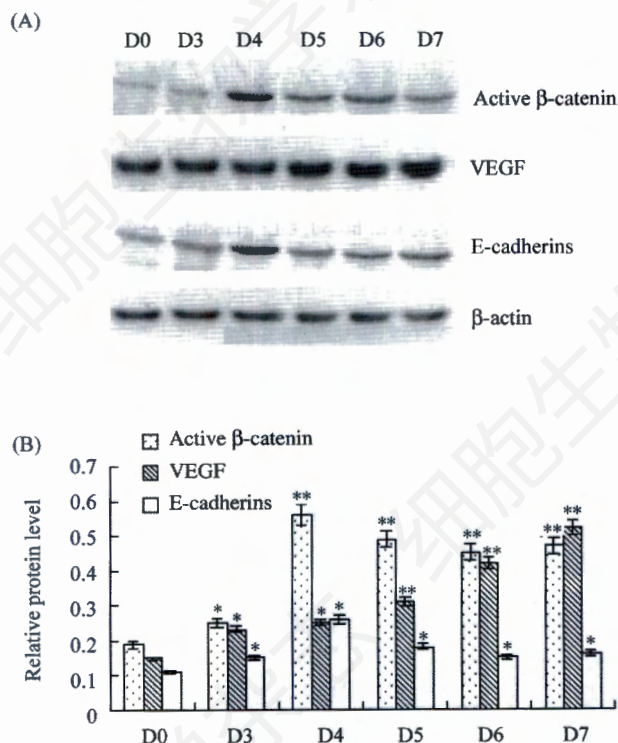


Fig.4 The result of Western blot in the mice endometria

A: active β -catenin, E-cadherins and VEGF protein expression in non-pregnant and early pregnant mice endometria; B: active β -catenin, E-cadherins and VEGF relative protein level. The relative amounts of these protein were relatively to β -actin. D0 means no pregnancy. D3, D4, D5, D6, D7 mean day 3, day 4, day 5, day 6, day 7 of pregnancy. * $P < 0.05$ versus day 0; ** $P < 0.01$ versus day 0.

免疫组化显示(图1),与动情期相比,妊娠子宫内膜表达active β -catenin的表达量明显升高($P < 0.05$), active β -catenin于妊娠第3、4天在腺上皮、腔上皮和基质细胞浆、细胞膜呈棕褐色表达,胞核不着色;妊娠第4天强烈表达在子宫腔上皮细胞浆和细胞膜,表达量最高;妊娠第5、6、7天表达在血管内皮、腔上皮基质细胞膜,且有细胞核转导(图1H),

腔上皮表达减弱或消失(着床部位减弱见图1G,非着床部位减弱或消失见图1C),表达量有所下降但仍高于妊娠前水平。妊娠第6、7天在胚胎和初级蜕膜带及血管内皮细胞大量表达(图1D和图1E)。间接免疫荧光结果显示(图2、图3)妊娠第3、4天VEGF少量表达在基质细胞;于妊娠第5天胚胎着床期在血管内皮及腔上皮基质细胞大量表达;且于妊娠第5天后与active β -catenin共定位表达在血管内皮、基质细胞(图2F)。E-钙粘着蛋白在妊娠第3天开始在腔上皮、腺上皮和基质细胞膜和细胞浆表达,妊娠第4天表达最强(图2A);妊娠第5天腔上皮表达减弱或消失,腔上皮基质细胞膜表达增强;妊娠第3、4天与active β -catenin与有共定位表达(图2C)。

2.2 Active β -catenin、VEGF、E-钙粘着蛋白在子宫内膜的表达量

Western印迹结果显示,与动情期相比,妊娠子宫内膜active β -catenin的表达量明显增加,在妊娠第4天达高峰,此后有所下降但仍高于妊娠前。VEGF在妊娠第3、4天表达量较低,与动情期相比无显著性差异($P > 0.05$),妊娠第5、6、7天表达量显著升高($P < 0.05$)。E-钙粘着蛋白于妊娠第4天达高峰($P < 0.05$),第5、6、7天逐渐下降,但仍高于妊娠前($P < 0.05$) (图4)。

3 讨论

胚胎的成功着床包括附着、黏附、侵袭,在小鼠体内这一过程发生在妊娠第4~5天,此后新生血管的形成也是妊娠得以维持的关键。Active β -catenin在着床窗口期和着床后的高表达以及表达部位的变化表明active β -catenin可能与着床的成功密切相关。Tsukita等^[9]认为 β -catenin与黏附有关,它与E-钙粘着蛋白形成E-钙粘着蛋白/ β -catenin/ α -catenin功能

复合体(ECCU),从而影响细胞黏附性和运动性,进而影响组织结构和形态形成。我们发现在小鼠妊娠第3、4天 active β -catenin 主要分布在腺上皮和腔上皮和基质细胞膜,腔上皮的表达显著比基质细胞强,并且激光共聚焦扫描显示 active β -catenin 与 E-钙粘着蛋白有共定位表达。我们推测此时 active β -catenin 可能参与改变细胞骨架形成和保持紧密连接,增强以 E-钙粘着蛋白为基础的细胞间黏附。正常细胞中 E-钙粘着蛋白的细胞间黏附可引起 β -catenin 结合到细胞膜上的钙黏着蛋白,胞浆中的 β -catenin 由于这种结合或 APC- β -catenin-GSK-3 β -MAN 多聚蛋白复合体的降解,胞浆中游离的 β -catenin 减少,从而阻止 β -catenin 进入细胞核。在我们实验中这个时期也未观察到有 active β -catenin 的核转位。说明在这个时期 active β -catenin 主要参与细胞间黏附有利于胚泡黏附到子宫内膜。此外,子宫腺体的分泌物对子宫的容受性和成功着床密切相关^[10]。此期 active β -catenin 在腺上皮的大量表达可能与子宫的分泌功能和子宫对胚胎的容受性有关。我们推测此期 active β -catenin 主要在引导胚胎附着、黏附及子宫的容受性方面发挥作用。

妊娠第5天后 active β -catenin 表达在近腔上皮的基质细胞,并有核转位,提示在这个时期 active β -catenin 的功能从主要参与细胞间黏附转到协同各种旁分泌、自分泌因子参与子宫内膜血管的发生、基质的降解和细胞凋亡等过程。Active β -catenin 可入核形成 β -catenin/Tcf-4 复合体诱导下游的大量靶基因表达,如 Hoxa-10、Hoxa-11、COX-2 等在妊娠中起重要作用的细胞因子^[11]。Easwaran 等^[12]在结肠癌细胞中发现 β -catenin 调节 VEGF 的表达。胚胎的着床与肿瘤的侵袭有许多的相似之处。我们发现在妊娠第5天后 active β -catenin 表达在血管内皮、基质细胞,并且激光共聚焦扫描也显示 active β -catenin 与 VEGF 共同表达在血管内皮、基质细胞,提示在此时 active β -catenin 可能参与基质的降解、内膜血管的形成。

在小鼠妊娠第6天随着子宫上皮的屏障功能的丧失,胚胎从上皮到基质,此时初级蜕膜带的屏障功能尤为重要,它可以屏蔽来自母体的伤害性刺激,使胚胎这个“半同种的异体”得以成功植入。在妊娠第6、7天 active β -catenin 表达在胚胎和初级蜕膜带,提示 active β -catenin 可能与胚胎的发育和母胎屏障的建立有关,并且在调节胚胎滋养层和子宫之间的

细胞-细胞、细胞-细胞外基质相互作用上发挥作用,从而影响成功着床。成功的着床还与基质的降解、滋养层的侵袭有关,在着床后新生血管的形成、母胎循环的建立也与早孕的成败密切相关。总之, active β -catenin 在胚胎着床前后的高表达以及时空精妙协调的变化可能与胚胎的成功着床以及妊娠的维持密切相关。胚胎着床是由一个精密协调的网络控制的, active β -catenin 只是其上的一个小节点,对于它在妊娠过程中的调控功能以及在核转位后所调节的靶基因都有待进一步的研究确认。对此进行更深入的研究将有助于我们更好地理解 and 认识胚胎着床机制,对不孕和自然流产机制的阐明将有重要的理论意义和临床实践价值。

参考文献(References)

- [1] Ozawa M, Kemler R. Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex, *J Cell Biol*, 1992, 116(4): 989-996
- [2] Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120^{cas}, *J Cell Biol*, 1998, 141(3): 779-789
- [3] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β -Catenin, and cadherin pathways, *Science*, 2004, 303(5663): 1483-1487
- [4] Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development, *Genes Dev*, 1997, 11(24): 3286-3305
- [5] Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity, *J Cell Biol*, 2000, 148(3): 399-404
- [6] Van Noort M, Meeldijk J, Van der Zee R, et al. Wnt signaling controls the phosphorylation status of β -catenin, *J Biol Chem*, 2002, 277(20): 17901-17905
- [7] Haegel H, Larue L, Ohsugi M, et al. Lack of β -catenin affects mouse development at gastrulation, *Development*, 1995, 121(11): 3529-3537
- [8] Mohamed OA, Dufort D, Clarke HJ. Expression and estradiol regulation of Wnt genes in the mouse blastocyst identify a candidate pathway for embryo-maternal signaling at implantation, *Biol Reprod*, 2004, 71(2): 417-424
- [9] Tsukita S, Naqafuchi A, Yonemura S, et al. Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions, *Curr Opin Cell Biol*, 1992, 4(5): 834-839
- [10] Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, et al. The role of the endometrium and embryo in human implantation, *Hum Reprod Update*, 2007, 13(4): 365-377
- [11] Tulac S, Nayak NR, Kao LC, et al. Identification, characterization and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium, *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(8): 3860-3866
- [12] Easwaran V, Lee SH, Inge L, et al. β -catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer, *Cancer Res*, 2003, 63(12): 3145-3153

The Expression and Role of Active β -catenin in Mice Endometria during Early Pregnancy

Shi-Zhi Chen^{1,2}, Jun-Lin He¹, Xue-Qing Liu¹, Yu-Bin Ding¹, Jing Huang¹, Xue-Mei Chen¹, Ying-Xiong Wang^{1*}

⁽¹⁾Laboratory of Reproductive Biology, Department of Genetics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

⁽²⁾The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract To investigate distribution and role of active β -catenin in mice endometria during early pregnancy, we have detected the expression of active β -catenin in endometrium from non-pregnant mice and pregnant mice (3–7 days) by immunohistochemistry, Western blotting and immunofluorescence. The results showed that the expression of active β -catenin in endometria of pregnant mice was higher than that of non-pregnant mice, and gradually increased from pregnancy day 3, reaching a maximum level on day 4 and then declining on day 6 and 7. Immunohistochemistry analysis showed that active β -catenin was present in gland epithelium, luminal epithelium and stromal cells on pregnancy day 3, enhanced gradually in gland epithelium and stromal cells and expressed significantly in luminal epithelium on day 4. Active β -catenin was enhanced significantly in stromal cells, vascular endothelium and embryo on day 5, but the expression was weakened or vanished in luminal epithelium. Indirect immunofluorescence analysis showed both of active β -catenin and E-cadherins antigens expressed concomitantly in luminal epithelium and gland epithelium on day 3 and day 4, and both of active β -catenin and VEGF antigens expressed concomitantly in stromal cells, vascular endothelium and embryo after day 5 of pregnancy. These findings of the spatio-temporal expression of active β -catenin in mice endometria suggest that active β -catenin might be involved in adhesion/invasion of the blastocyst to endometrium and angiogenesis of endometrium and it might play an important role in embryo implantation and maintenance of pregnancy in mouse.

Key words active β -catenin; endometrium; embryo implantation; mouse

Received: January 9, 2009

Accepted: May 4, 2009

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (No.2004-47)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485926, E-mail: wyx61221@yahoo.com.cn