

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.01177

小鼠胚胎致密化起始的调控机制

李超波, 胡丽丽, 王振东, 钟淑琦, 雷蕾

哈尔滨医科大学组织学与胚胎学教研室, 哈尔滨 150081

摘要: 植入前小鼠胚胎的发育事件包括第一次卵裂、胚胎基因组激活、桑椹胚致密、囊胚形成。小鼠受精卵胚胎的致密化发生在 8-细胞阶段晚期, 致密过程中, 胚胎卵裂球本身以及卵裂球之间发生了一系列的变化。这些变化包括卵裂球微绒毛以及胞质成分的极性化分布, 卵裂球之间形成特殊的胞间连接。致密化是哺乳动物胚胎发育过程中的第一个细胞分化事件, 即导致了内细胞团以及滋养外胚层的产生。植入后, 内细胞团将发育成为胚体, 滋养外胚层将发育成为胎盘等胚外组织。细胞粘附分子 E-cadherin 介导的胞间粘附起始了致密化。卵裂球发生粘附所需的组分在致密前已经存在, 但是直至 8-细胞阶段晚期连接复合体才表现出明显的粘附活性。敲除 *E-cadherin* 基因, 发现母源性的 E-cadherin 足以介导致密。E-cadherin 介导的胞间粘附是细胞粘附的第一步。文章综述了 E-cadherin 介导胞间粘附的具体过程以及蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC) 调控该过程的相关机制。

关键词: 胚胎; 致密化; 细胞粘附; 蛋白激酶 C

Regulation of compaction initiation in mouse embryo

LI Chao-Bo, HU Li-Li, WANG Zhen-Dong, ZHONG Shu-Qi, LEI Lei

Department of Histology and Embryology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China

Abstract: Developmental events in preimplantation mouse embryos include the first cleavage, the activation of the embryonic genome, the compaction of the blastomeres to form morula (MO), and the formation of the blastocyst (BL). Compaction, the first cell differentiation event in mammalian development, occurs at the late eight-cell stage in the mouse and may be described in terms of some types of morphological change, which involve reorganization within a cell and intercellular reorganization. Surface microvilli became restricted to a few basal sites and to an externally facing (apical) pole. Prior to compaction, the blastomeres are spherical and lack specialized intercellular junctions. During compaction, the cells were flattened against one another, thus maximizing intercellular contact and obscuring intercellular boundaries. It is believed that the events of compaction have an important influence on the processes involved in blastocyst formation, namely the initiation of inner cell mass and trophectoderm differentiation. The inner cell mass will form the future embryo proper, whereas the trophectoderm cells will form only extraembryonic tissues. Compaction is initiated by E-cadherin mediated cell adhesion, which is regulated post-translationally via protein kinase C. With *E-cadherin* knock-out, maternal E-cadherin is able to mediate the compaction process at the morula stage. Initial adhesion is mediated by homophilic interactions between E-cadherin extracellular domains. In this review, we attempted to describe this process in detail.

Keywords: embryo; compaction; cell adhesion; protein kinase C (PKC)

收稿日期: 2009-08-24; 修回日期: 2009-10-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30671025)和黑龙江省留学归国人员科学技术专项资金(编号: LC07C17)资助

作者简介: 李超波(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 克隆胚胎发育。Tel: 0451-86674518; E-mail: mailto:zl2007cb@yahoo.com.cn

通讯作者: 雷蕾(1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 干细胞与治疗性克隆。Tel: 0451-86674518; E-mail: mailto:leil086@yahoo.com.cn

致密化发生在哺乳动物植入前胚胎发育过程中,是哺乳动物胚胎发育过程中的第一个细胞分化事件,即导致了内细胞团以及滋养外胚层的产生。植入后,内细胞团将发育成为胚体,滋养外胚层将发育成为胎盘等胚外组织,胚胎进一步发育。致密化的过程也就是胞间粘附过程,分为起始、延伸以及完成三部分。细胞粘附分子 E-cadherin 介导的胞间粘附起始了致密化。E-cadherin 起始的瞬时胞间粘附是胞间粘附的第一步。本文关于致密化起始的调控机制,集中于致密时各种连接,比如紧密连接(Tight junction, TJ)、缝隙连接(Gap junction, GJ)等形成之前, E-cadherin 介导瞬时粘附的具体过程,蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)可能涉及其中。目前尚未见到关于致密起始调控机制的综合论述。

1 胚胎致密化

1.1 概念

小鼠胚胎的发育经历了受精卵、2-细胞、4-细胞、8-细胞、桑椹胚、囊胚、植入以及植入后发育等过程。在 8-细胞阶段晚期,先前疏松接触的卵裂球之间更加粘附,形成紧密接触的细胞团,此时卵裂球之间的界限变得不清楚,即形成桑椹胚^[1],该过程即为致密化。

1.2 致密化前后胚胎发生的变化

致密过程中,胚胎卵裂球以及卵裂球之间发生了一系列的变化。

1.2.1 卵裂球本身的变化

(1)表面的变化。在 4-细胞以及 8-细胞阶段早期,卵裂球表面的微绒毛均匀分布。致密化起始,表面微绒毛逐渐地局限分布在顶膜区以及胞间接触的基底区域。随着致密化进展,在即将形成胞间接触的基底区域微绒毛依然存在,但是在胞间粘附彻底完成的区域,微绒毛几乎不存在^[2]。

(2)胞质中的变化。致密化起始,微丝逐渐地聚集在顶膜区质膜下、微管与线粒体呈直线排列,且平行于基底外侧膜分布、胞质小囊泡在顶膜及位于基底的核之间分布,但是偏于核^[3]。

1.2.2 卵裂球之间的变化

致密化前,卵裂球呈球体;致密化后,卵裂球

变扁平,卵裂球之间形成最大的接触且界限变得不清。致密化前,各个卵裂球之间不存在特殊的胞间连接, E-cadherin 介导的胞间粘附可能使各卵裂球相互连接^[4];致密化后,卵裂球顶膜接触区域形成紧密连接,在基底膜接触区域形成缝隙连接。紧密连接最初呈局灶性分布,随着致密化进展,逐渐呈带状分布^[3]。

在 8-细胞阶段之前,各个卵裂球的发育潜能一致,都具有发育全能性。在 8-细胞阶段晚期,随着致密化起始,各个卵裂球出现极性变化。极性一旦建立,在卵裂球的整个发育过程中极性轴能够稳定存在^[3]。胚胎由 8-细胞阶段向 16-细胞阶段卵裂时,出现了两种分化细胞。卵裂平面与胚胎表面垂直的卵裂球,所产生的两个子代细胞遗传有顶膜以及基底区域的胞质,两者都有极性,分布在胚胎的外周。卵裂平面与胚胎表面的切线平行的卵裂球所产生的两个子代细胞中,一个遗传有整个顶膜表面及一部分内部表面;另一个仅遗传有内部表面。因此前者是有极性的,分布在胚胎外周;后者是非极性的,仍然分布在胚胎内部。胚胎由 16-细胞向 32-细胞阶段分裂时,胚胎外周的细胞仍然以垂直或者平行于胚胎表面的方式继续分裂,分别产生两个有极性的外部细胞或者是一个外部极性细胞和一个内部非极性细胞^[5]。

胚胎发育过程中,外部极性细胞之间形成了紧密连接、粘附连接(Adheren junction, AJ)、桥粒以及缝隙连接^[6]。内部细胞之间形成了缝隙连接。缝隙连接是胞间膜通道的聚集位点,允许邻近的细胞之间直接交换小分子物质,并且其介导的胞间偶联参与维持致密化状态^[7]。外部的极性细胞逐渐分化为滋养外胚层细胞,内部的非极性细胞成为内细胞团(ICM)。在 32-细胞阶段时,外部细胞已经形成有功能的滋养外胚层,并且开始进行 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 通道介导的离子转运^[5]。滋养外胚层是哺乳动物早期发育过程中产生的第一个上皮组织,做为一个屏障将 ICM 从子宫环境中隔离以及通过提高流体静力压维持囊胚的紧张度。囊胚的形成需要滋养外胚层中紧密连接的屏障功能,胚胎内部液体的聚集导致了囊胚腔形成。

植入后,内细胞团将发育成为胚体,滋养外胚层将发育成为胎盘等胚外组织,胚胎进一步发育。

2 致密化起始的分子基础

致密化后卵裂球表面微绒毛以及胞质成分发生极生化分布。卵裂球变扁平,相互之间形成缝隙连接以及紧密连接,最终达到最大的接触。在致密化起始过程中,细胞粘附蛋白、细胞连接蛋白以及细胞骨架蛋白起了极其重要的作用^[1]。

2.1 致密化相关的蛋白

2.1.1 细胞粘附蛋白

细胞粘附蛋白分布在细胞表面,在细胞粘附过程中参与细胞胞间以及细胞与细胞外基质间的相互作用。细胞粘附蛋白属于跨膜蛋白,其结构分为:胞质区,与细胞骨架相互作用;跨膜区;胞外区,与其他同型分子或者与非同型分子、细胞外基质相互作用。细胞粘附蛋白可大致分为五类,即钙黏蛋白、选择素、免疫球蛋白超家族、整合素及透明质酸粘素。其中,钙黏蛋白(cadherin)是胞间粘附过程中主要的效应元件^[8]。根据胞外区域以及胞质区域的不同,cadherin可以分为4个主要的亚家族: classical cadherins, desmosomal cadherins, protocadherins, cadherin-like proteins。其中,经典的钙黏蛋白粘附分子存在于粘附连接中,其胞外区域有5个胞外钙黏蛋白(EC)区域。核磁共振以及X光结构研究显示,每个EC区域是一个七股β片层结构,其中含有保守的色氨酸Trp2残基。该片层结构的C-末端含有Ca²⁺结合位点。Ca²⁺可以保护cadherin不受蛋白酶的水解破坏,维持cadherin的三级结构。EC区域介导相邻细胞cadherins之间的相互作用。首先,同一细胞表面的cadherins形成原位二聚体。Trp2的侧链插入另一分子的疏水口袋,发挥连接作用。Ca²⁺结合区域的接触便于Trp介导的这种连接。之后,相对细胞表面的原位二聚体之间发生贯穿反应,从而介导相邻细胞之间的最初粘附。胞质区域是保守的,与链蛋白相互作用,从而使cadherins与细胞骨架相连接,并且形成调控粘附性的动态组建^[9]。研究表明,经典的钙黏蛋白粘附分子E-cadherin介导的胞间粘附起始了致密化^[1]。

2.1.2 细胞连接蛋白

α, β, γ-catenin属于链蛋白,分子量分别为102、88、80 kDa^[4],与E-cadherin形成粘附复合物,参与胞

间粘附。其中,α-catenin是由906个氨基酸组成的,其中的3个区域与肌动蛋白结合蛋白vinculin高度同源^[10]。β-catenin与plakoglobin在蛋白中央部位高度同源,而plakoglobin的结构几乎与γ-catenin相同^[11]。

2.2 致密化相关蛋白 E-cadherin、α, β-catenins 介导的胞间粘附

目前相关研究是以上皮细胞间的粘附为研究对象的。在犬肾细胞(MDCK)中,E-cadherin在内质网中便与β-catenin结合,之后二者共同转运至细胞表面。Caderin的胞质区含有一个PEST (Pro-Glu- Ser-Thr)序列,cadherin-β-catenin复合物的晶体结构显示β-catenin与该序列接触,可能保护其不受泛素连接酶的识别、降解。E-cadherin-β-catenin复合物作为同一单位共同转运至细胞表面^[10]。E-cadherin与β-catenin之间的结合需要位于β-catenin中央部位的4-12 armadillo重复序列^[12]。

α-catenin合成后不与E-cadherin-β-catenin复合物连接。在E-cadherin到达质膜时,一部分α-catenin与β-catenin以1:1结合,形成E-cadherin-β-catenin-α-catenin复合物(CCC)^[13]。其中,β-catenin结合α-catenin N-末端附近的57~146氨基酸残基,突变研究显示,β-catenin的117~149氨基酸残基包含了α-catenin的结合位点^[10]。

在一种细胞中存在着两种不同的连接复合物,一种由E-cadherin、α-catenin及β-catenin组成,另一种由E-cadherin、α-catenin及plakoglobin组成。在不同的细胞中两者的相对含量不同,可能是β-catenin与plakoglobin之间以相互竞争的方式结合E-cadherin的胞质区域导致的^[14]。

除了参与CCC形成之外,两个α-catenin之间能够形成同型二聚体,相互作用的区域为82~264氨基酸残基。该区域与β-catenin的结合位点有部分重叠,所以β-catenin结合α-catenin与α-catenin的二聚体化作用之间存在竞争^[10]。

2.3 E-cadherin-β-catenin-α-catenin 复合物(CCC)与细胞骨架之间的关系

以前研究认为CCC中的α-catenin直接连接至actin细胞骨架结构。但是,近来的研究显示α-catenin不同时结合E-cadherin-β-catenin以及肌动蛋白细胞骨架^[15]。α-catenin以单体或者二聚体的形式存在,两

者有不同的结合性质。单体更好地结合 E-cadherin- β -catenin, 而二聚体优先地结合 actin 细胞骨架, 其结合位点是 C-末端的 697 ~ 906 氨基酸残基。 α -catenin 在不同结合状态下表现出不同的分子构象, 表明 α -catenin 是一个变构蛋白^[10]。

α -catenin 能够使 actin 丝状蛋白成束, 也结合其他的 actin 结合蛋白。这些蛋白包括粘着斑蛋白、 α -辅肌动蛋白、血影蛋白、ZO-1、afadin(F-actin 结合蛋白^[16])、ajuba(一个含 LIM 区域的蛋白, 在决定细胞命运、调控增殖分化以及重组细胞骨架中发挥作用^[17])以及 formins(调控 actin 组装)。

既然 α -catenin 不同时连接 CCC 与 actin 细胞骨架, 那么其中可能涉及一个或者多个与 α -catenin 相连接的蛋白^[18]。直接的结合实验显示, 粘着斑蛋白、 α -辅肌动蛋白不连接该三元复合物至 actin 细胞骨架。或许其他的蛋白比如 ZO-1、afadin、ajuba 以及 formins 中的一个具有该作用, 但是尚未获得实验支持。另外, 在粘附连接中已鉴定出几种可能连接 CCC 至 actin 细胞骨架的蛋白, 如:

(1) nectin(连接素粘附分子), 其胞质区域结合 l-afadin。l-afadin 可以结合 actin、 α -catenin。但是尚且需要检测 afadin 与 nectin、 α -catenin、actin 共同形成四元复合物。

(2) β -catenin 的 C 末端有一保守的 PDZ 结合序列, 该序列与支架蛋白 Lin7 作用, 后者通过 CASK(一支架蛋白, 在神经系统中高表达)结合至 actin 细胞骨架的其他组分。目前尚不清楚这些作用对于胞间粘附是否重要。

(3) Shroom 是另一个含 PDZ 基序的 actin 结合蛋白, 神经管的发生需要该蛋白。

(4) Vezatin 是一个粘附连接的跨膜蛋白, 可以连接肌球蛋白至 CCC。

类 synaptotagmin 蛋白的 Bitesize(其在粘附连接形成位点的附近存在)以及膜突蛋白(Moesin, 是 actin 结合蛋白, 属于细胞骨架蛋白的 ERM 家族)之间存在相互作用。在果蝇细胞分裂过程中, Bitesize 的突变导致粘附连接处的 actin 不能正常组建。

另一种可能是 CCC 与 actin 间的直接作用可能发生在生化方法检测不到的情况下, 比如: α -catenin 结合 actin 的强度, 但是缺乏相关检测^[18]。

2.4 E-cadherin 介导胞间粘附的模式

最近的研究表明, 胞间粘附可以分为 2 个阶段, 即 Rac1、板状伪足介导的粘附起始(E-cadherin 介导的胞间粘附是细胞粘附的第一步)以及 RhoA、肌球蛋白介导的粘附扩展、稳定^[19]。其中的具体过程以及涉及到的分子如下。

在非粘附细胞中, E-cadherin, 也即 CCC 存在于板状伪足的质膜表面。Arp2/3 复合物介导的分枝状 actin 网络的聚合使板状伪足维持着的高动力学状态^[18]。高动力学状态的板状伪足之间的机会性接触导致了 E-cadherin 聚集^[19], E-cadherin 的聚集可能激活磷脂酰肌醇(-3)激酶(PI3K)^[20], 之后 PI3K 激活 Rac1, 进一步增加接触区域周边板状伪足的活性, 进而向外扩展了接触区域, 从而进一步增加了 E-cadherin 的聚集。E-cadherin 的胞外域发生嗜同种受体反应, 起始了胞间粘附^[19]。随着 E-cadherin, 也即 CCC 的聚集, 增加了质膜接触区域 CCC 中 α -catenin 的局部浓度。结合至 CCC 的 α -catenin 能够与分布在胞质溶胶中的 α -catenin 进行交换。从聚集的 CCC 中解离下来的 α -catenin 在局部达到很高的浓度, 便于 α -catenin 同型二聚体的形成。进而 α -catenin 同型二聚体抑制 Arp2/3 复合物, 从而减少 actin 的分枝及板状伪足的活性, 并且诱导肌丝捆扎成束状^[18]。在新形成的胞间接触区域, 板状伪足的运动活性降低, 可能便于维持跨膜 E-cadherin 之间微弱的相互作用^[19]。

胞间接触的延伸不仅需要 E-cadherin 向外扩展, 也需要局部肌球蛋白的激活以及收缩。RhoA 是 Rho 家族中的一个小 GTPase, 其下游效应器为肌球蛋白。活化的 RhoA 可以磷酸化肌球蛋白, 肌球蛋白收缩, 向外牵拉正在发生接触的质膜, 以充分扩展接触区域的宽度。

另外, actin 细胞骨架在胞间粘附过程中经历着动态组建。不存在胞间接触的单个细胞中, 肌丝以皮层维管束的形式存在于整个细胞的外周。胞间接触形成过程中, 皮层肌动蛋白束在接触区域解聚, 肌动蛋白含量渐渐降低。该变化可能是由新形成的胞间接触周边板状伪足活性增强或者随后粘着斑形成导致的^[19]。在成熟的粘附连接区域, 肌丝组建为线性的肌丝束, 平行于质膜分布^[18]。皮层维管束末端支撑扩展的接触边缘。目前, 尚不清楚皮层肌动蛋白束

的毛刺末端是怎样锚定至胞间接触边缘的, 推测可能是由整合素为基础的粘着斑介导的。

通过以上过程, 即 E-cadherin 聚集、Rac1 调控板状伪足活性以及 RhoA 诱导肌动球蛋白收缩, 协调了胞间接触的诱导、扩展以及稳定。

2.5 致密相关蛋白在小鼠胚胎中的表达

致密化起始过程即卵裂球之间粘附起始过程, E-cadherin 介导的胞间粘附起始了致密化。

RT-PCR结果显示, 未受精卵中存在母源性的 E-cadherin、 β -catenin、 α -catenin mRNA。在植入前的发育过程中, 其mRNA进行了从头合成^[4]。在未受精卵以及受精卵阶段E-cadherin不进行合成, 其合成始于 2-细胞阶段晚期。该阶段应用RNA聚合酶 II 抑制剂 α -鹅膏蕈碱能够阻断其合成, 支持E-cadherin的合成依赖合子基因的表达^[21]。E-cadherin蛋白前体形式为 135×10^3 Mr, 存在于未受精卵中。成熟形式为 120×10^3 Mr, 存在于受精后的发育阶段。受精后 E-cadherin 的蛋白含量增加, 2-细胞阶段降低, 4-细胞阶段增加, 8-细胞阶段明显降低^[22]。桑椹胚阶段早期较 8-细胞阶段早期其含量轻微增加, 但是在桑椹胚阶段晚期其量有明显增加^[4]。

β -catenin、 α -catenin 的蛋白含量在植入前各阶段的变化趋势与E-cadherin相似, 但是 β -catenin的含量相对而言更加稳定^[4]。

研究显示, 阻滞在第一次减数分裂双线期的卵母细胞, 很多基因进行了转录以及翻译, 因此储存了足够支持胚胎发育至 8-细胞阶段的蛋白质。减数分裂成熟时, 母源性的mRNA降解, 到 2-细胞阶段时约有 90%的mRNA被降解。进入 8-细胞阶段, 母源性的蛋白质继续合成, 2-细胞阶段合子基因组激活, 支持胚胎进一步发育^[23]。

E-cadherin、 α -catenin、 β -catenin在未受精卵中已经形成粘附复合物(CCC)^[4]。致密起始前的各发育阶段, CCC均匀分布在卵裂球的游离面, 在卵裂球的交接区域有浓缩, 游离面的CCC不与细胞骨架连接, 推测卵裂球交界质膜处的CCC仅微弱地与质膜连接^[4, 24]。在致密起始时, β -catenin, 也即CCC在卵裂球交界质膜处明显地与细胞骨架连接且在整个致密过程中持续^[24]。

Western blotting结果显示: plakoglobin在植入前大部分阶段含量很少, 仅在桑椹胚晚期以及囊胚时期明显可见。免疫荧光结果提示: plakoglobin在未致密以及致密化的 8-细胞阶段不与细胞骨架连接, 在桑椹胚晚期阶段的细胞接触区域有少量的与细胞骨架连接, 在扩张囊胚的滋养外胚层中明显连接至细胞骨架^[4], 说明plakoglobin (γ -catenin)不参与致密过程的起始。

3 胚胎致密化起始的调控机制

如前所述, 卵裂球发生粘附所需的组分在致密前已经存在, 但是直至 8-细胞阶段晚期连接复合体才表现出明显的粘附活性。敲除E-cadherin基因, 发现母源性的E-cadherin足以介导胚胎致密^[25]。致密的起始受翻译后修饰调控, PKC调控该过程^[1]。PKC的激动剂DiC8 能够诱导正常胚胎在 2-细胞阶段或者是 4-细胞阶段提早致密。检测发现, PKC α 是唯一分布至卵裂球粘附质膜以及游离质膜的PKC亚型。PKC的抑制剂能够阻断正常胚胎的致密^[24], 可见致密的起始与PKC的活性状态密切相关。

3.1 PKC α ^[26]

3.1.1 PKC α 的结构

PKC α 是单一的多肽, 分子量为 76 kDa, 含有 4 个保守区域 C1~C4。其中, C1、C2 是调控区域, C3、C4 是催化区域。另外还含有 5 个可变区域 V1~V5, 位于保守序列中, 其功能尚不清楚。

C1 含有两个半胱氨酸基序, 是二酰基甘油(DAG)或巴豆油酯的结合位点。位于C1 区域的 13~30 氨基酸序列是假底物区, 是酶的自我抑制区。假底物区以及位于C4 区域的蛋白底物结合位点之间的相互作用诱导该抑制作用。C2 含有酸性脂质以及Ca²⁺结合位点。

C3、C4 区形成激酶中心 ATP 以及底物结合裂隙。C3 位点含有一个 ATP 结合座位, C4 位点有两个结合座位, 一个结合蛋白底物, 另一个结合 ATP。

3.1.2 PKC α 的激活机制

PKC α 合成后与胞质中的非溶解成分相连接, 之后经过 3 种不同的磷酸化作用成为成熟的、胞质溶胶形式。即激活环处的转磷酸作用, 使酶具有潜

在的催化活性; C 末端的第一次自磷酸化作用稳定催化元件的构象; C 末端的第二次自磷酸化作用将 PKC α 释放至胞质中。此时假底物序列占据活性位点, PKC α 是无活性的。

PKC α 的生理激活剂是二酰基甘油(DAG)。刺激 G 蛋白偶联受体家族、酪氨酸激酶受体或非受体酪氨酸激酶的信号能够快速激活特异的磷脂酶 C 或者慢速地激活磷脂酶 D 来产生磷脂酸, 之后生成 DAG 以及 1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)。

IP3 做为第二信使增加胞内游离Ca²⁺。Ca²⁺与 PKC α 结合, 改变其构象, 暴露疏水区且使酶向细胞质膜迁移。在质膜处, DAG做为疏水性的锚招募 PKC α 至质膜内面, 显著增加了PKC α 与质膜之间的亲和力。PKC α 的N末端调控区(约 20~40 kDa)及C末端催化区(约 45 kDa)由一铰链区分隔, 该分隔在酶结合至质膜时, 因蛋白水解作用变得不稳定。经蛋白水解产生的激酶区会脱离假底物的抑制, 从而具有活性, 进而结合以及催化底物。

3.2 PKC α 在植入前胚胎中的表达以及分布情况

Western blotting分析致密前后PKC α 的含量, 结果显示PKC α 在致密化后的表达高于致密化前^[27]。PKC在激活状态时定位于胞质膜。在 2-细胞以及 4-细胞阶段, PKC α 相对均一地分布于整个卵裂球, 在邻近质膜处无分布, 提示在早期发育阶段 PKC α 处于非活性状态。8-细胞阶段致密起始时, 所有质膜处的PKC α 信号强度增高并且在粘附区域的质膜处强度更高。随着致密化进展, 粘附膜处仍显示高强度^[24]。

3.3 PKC α 调控致密起始的可能机制

PKC α 调控致密的机制可能涉及到两个方面, 即 Ezrin 蛋白磷酸化、细胞骨架 actin 相连蛋白的磷酸化。

致密化前, 微绒毛均匀分布于卵裂球表面。致密化后, 则局限分布于顶膜区, 在卵裂球粘附区域, 即基底区, 微绒毛消失^[2]。致密化前后微绒毛的分布变化如前面所述, 即E-cadherin介导的胞间粘附需要胞间发挥作用的有效距离。Ezrin蛋白属于ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)蛋白家族, 这些蛋白将actin细胞骨架连接至质膜, 在微绒毛的形成以及细胞粘

附中发挥作用。研究显示, 致密时卵裂球基底区微绒毛的缩短直至最终消失需要Ezrin蛋白苏氨酸残基 567(T567)的磷酸化。利用基因突变的方法使T567 呈现非磷酸化状态, 则导致了Ezrin蛋白分布异常。如前所述, 致密的发生需要CCC的正常分布, T567 的非磷酸化状态也导致了CCC分布的异常, 阻断了致密的发生^[28]。但是尚不清楚胚胎发生致密时卵裂球粘附区域质膜上Ezrin蛋白的磷酸化以及降解过程是怎样进行调控的。丝/苏氨酸蛋白激酶PKC α 可能是其中的一个效应元件, 参与Ezrin蛋白的磷酸化以及降解过程。

致密时胞间距离缩小是胞间粘附起始的前提。如前所述, 胞间粘附的起始需要相邻细胞 E-cadherins 之间的相互作用, 即需要细胞质膜上 CCC 与 actin 细胞骨架相连接。该过程中的相关蛋白可能直接或者间接地受 PKC α 修饰。

致密时胞间粘附的扩展以及完成需要actin细胞骨架的参与。有研究显示, 大量的PKC底物, 比如 MARCKS、GAP43、adducin、fascin以及ERM蛋白直接与actin连接^[29]。PKC α 可能在其中发挥作用。

总之, PKC α 与致密起始紧密关联, 但是其中的具体调控机制尚不明确。致密时激活PKC α 的上游信号通路又是怎样的? 有资料表明, 细胞粘附的最早期事件可能涉及酪氨酸激酶c-Src。c-Src活化后可能便于磷脂酰肌醇激酶PI3K募集至含E-cadherin的复合物以及被激活, 生成PtdIns(3,4,5)P₃^[30]。PtdIns(3,4,5)P₃可以激活依赖磷酸肌醇的激酶 1(PDK1), 进而磷酸化PKC α ^[31], PKC α 活化, 参与胞间粘附过程。

4 致密化的意义

致密化在小鼠胚胎发育过程中有重要的意义, 即起始了内细胞团(ICM)以及滋养外胚层的分化。胚胎组织有了定向的发育命运, 形成了囊胚^[3]。

Cadherin 介导的胞间粘附是上皮建立与维持极性以及同种类型的细胞之间发生紧密连接的基础, 在细胞分化、上皮极性与完整性的维持、器官的构成等方面发挥关键作用。临床上, 粘附分子在肿瘤细胞转移过程中的每一步都具有作用。脱落过程, 原发肿瘤细胞的粘附分子表达异常或功能缺失, 肿瘤细胞之间因粘附性下降而脱落。侵袭过程, 肿瘤细

胞通过表面的整合素粘附到细胞外基质或基底膜, 通过胶原酶等将之降解后向深处侵袭并进入循环系统。循环过程, 肿瘤细胞以分散或者聚集的形式在循环系统中运动, 其中一部分到达靶器官, 通过粘附分子粘附并破坏其基底膜进入周围组织。克隆形成过程, 肿瘤细胞通过细胞表面粘附分子粘附到结缔组织成分上, 进入内皮下基质, 在新的位点增殖。研究致密化的起始过程, 也即细胞粘附起始的过程对防止或者降低肿瘤细胞的转移具有重要意义。

体细胞核移植获得克隆胚胎, 和正常受精卵胚胎比较, 克隆胚胎囊胚的细胞数目减少。研究显示克隆胚胎致密起始时的卵裂球数目多是 6 或者 7 个, 这是否与囊胚的细胞数目减少相关联? 另外, 克隆胚胎的产生是卵胞质对体细胞核物质进行重编程之后的发育过程。本文以细胞胞间粘附为基础, 结合所报道的致密化相关调控因素来认识致密化的起始过程以及 PKC 调控该过程的相关机制, 为进一步研究小鼠克隆胚胎致密的相关机制, 以及为体细胞核物质重编程的深入探讨奠定基础。之后, 可以在致密化发生之前施加相关的干预措施, 使得克隆胚胎同样在 8-细胞阶段晚期发生致密, 以期增加克隆胚胎内细胞团的数目, 提高克隆效率。

5 展 望

综上所述, 细胞粘附分子 E-cadherin 介导的胞间粘附起始了致密化。本文详细地描述了在胞间粘附的最初, E-cadherin 介导的胞间瞬时粘附这一更加细化的过程以及 PKC 调控该过程的机制, 以期更好地理解体细胞核移植获得的克隆胚胎的致密化, 提高克隆效率。另外, 在临床上, 可以施加相应的干预措施, 防止或者降低肿瘤细胞的转移。

参考文献(References):

- [1] Cui XS, Li XY, Shen XH, Bae YJ, Kang JJ, Kim NH. Transcription profile in mouse four-cell, morula, and blastocyst: genes implicated in compaction and blastocoel formation. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(2): 133–143. [\[DOI\]](#)
- [2] Ducibella T, Ukena T, Karnovsky M, Anderson E. Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Biol*, 1977, 74(1): 153–167. [\[DOI\]](#)
- [3] Pratt HP, Ziomek CA, Reeve WJ. Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *J Embryol Exp Morphol*, 1982, 70: 113–132.
- [4] Ohsugi M, Hwang SY, Butz S, Knowles BB, Solter D, Kemler R. Expression and cell membrane localization of catenins during mouse preimplantation development. *Dev Dyn*, 1996, 206(4): 391–402. [\[DOI\]](#)
- [5] Plusa B, Frankenberg S, Chalmers A, Hadjantonakis AK, Moore CA, Papalopulu N, Papaioannou VE, Glover DM, Zernicka-Goetz M. Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt3): 505–515. [\[DOI\]](#)
- [6] Violette MI, Madan P, Watson AJ. Na⁺/K⁺-ATPase regulates tight junction formation and function during mouse preimplantation development. *Dev Biol*, 2006, 289(2): 406–419. [\[DOI\]](#)
- [7] Houghton FD. Role of gap junctions during early embryo development. *Reproduction*, 2005, 129(2): 129–135. [\[DOI\]](#)
- [8] Balzac F, Avolio M, Degani S, Kaverina I, Torti M, Silengo L, Small JV, Retta SF. E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. *J Cell Sci*, 2005, 118(20): 4765–4783. [\[DOI\]](#)
- [9] Koch AW, Manzur KL, Shan W. Structure-based models of cadherin-mediated cell adhesion: the evolution continues. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(15): 1884–1895.
- [10] Pokutta S, Drees F, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. Biochemical and structural analysis of alpha-catenin in cell-cell contacts. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(Pt2): 141–147. [\[DOI\]](#)
- [11] Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Plakoglobin and β -catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci*, 2000, 113(Pt18): 3127–3139.
- [12] Piedra J, Martinez D, Castano J, Miravet S, Dunach M, de Herreros AG. Regulation of β -catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 2001, 276(23): 20436–20443. [\[DOI\]](#)
- [13] Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, Nelson WJ. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol*, 1994, 125(6): 1327–1340. [\[DOI\]](#)
- [14] Butz S, Kemler R. Distinct cadherin-catenin complexes in Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion. *FEBS Lett*, 1994, 355(2): 195–200. [\[DOI\]](#)
- [15] Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*,

- 2005, 123(5): 903–915. [\[DOI\]](#)
- [16] Pokutta S, Drees F, Takai Y, Nelson WJ, Weis WI. Biochemical and structural definition of the 1-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *J Biol Chem*, 2002, 277(21): 18868–18874. [\[DOI\]](#)
- [17] Goyal RK, Lin P, Kanungo J, Payne AS, Muslin AJ, Longmore GD. Ajuba, a novel LIM protein, interacts with Grb2, augments mitogen-activated protein kinase activity in fibroblasts, and promotes meiotic maturation of *Xenopus* oocytes in a Grb2- and Ras-dependent manner. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(6): 4379–4389.
- [18] Weis WI, Nelson WJ. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 35593–35597. [\[DOI\]](#)
- [19] Yamada S, Nelson WJ. Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J Cell Biol*, 2007, 178(3): 517–527. [\[DOI\]](#)
- [20] Halet G, Viard P, Carroll J. Constitutive PtdIns (3,4,5) P3 synthesis promotes the development and survival of early mammalian embryos. *Development*, 2008, 135(3): 425–429. [\[DOI\]](#)
- [21] Vestweber D, Gossler A, Boller K, Kemler R. Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol*, 1987, 124(2): 451–456. [\[DOI\]](#)
- [22] Sefton M, Johnson MH, Clayton L. Synthesis and phosphorylation of uvomorulin during mouse early development. *Development*, 1992, 115(1): 313–318.
- [23] Lee DR, Lee JE, Yoon HS, Roh SI, Kim MK. Compaction in preimplantation mouse embryos is regulated by a cytoplasmic regulatory factor that alters between 1- and 2-cell stages in a concentration-dependent manner. *J Exp Zool*, 2001, 290(1): 61–71. [\[DOI\]](#)
- [24] Pauken CM, Capco DG. Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos: roles for PKC and beta-catenin. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54(2): 135–144. [\[DOI\]](#)
- [25] Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(17): 8263–8267. [\[DOI\]](#)
- [26] Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, 1995, 270(48): 28495–28498.
- [27] 陈雅隽, 申景岭, 冯秀清, 单智焱, 阎晓飞, 董建将, 钟淑琦, 雷蕾. 蛋白激酶 C α 在 小鼠孤雌及四倍体胚胎早期发育过程中的分布和作用. *生理学报*, 2008, 60(1): 105–112.
- [28] Dard N, Louvet-Vallee S, Santa-Maria A, Maro B. Phosphorylation of ezrin on threonine T567 plays a crucial role during compaction in the mouse early embryo. *Dev Biol*, 2004, 271(1): 87–97. [\[DOI\]](#)
- [29] Larsson C. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal*, 2006, 18(3): 276–284. [\[DOI\]](#)
- [30] Rivard N. Phosphatidylinositol 3-kinase: a key regulator in adherens junction formation and function. *Front Biosci*, 2009, 14: 510–522. [\[DOI\]](#)
- [31] Paclet MH, Davidson-Moncada JK, Lopez-Lluch G, Shao D, Dekker LV. Protein kinase C as an effector of lipid-derived second messengers. *Methods Mol Biol*, 2009, 462: 253–263.

• 综合信息 •

“科学道德建设和科学伦理热点问题” 征文通知

近年来国内外生命科学包括遗传学领域取得了迅猛发展, 很多科学伦理问题也随之出现, 科学道德建设工作越来越重要。为调动中国遗传学会全体会员的积极性参与到对目前科学道德建设和科学伦理热点问题的讨论中, 同时加深会员联系、加强组织建设, 中国遗传学会将举办“科学道德建设和科学伦理热点问题”专题活动, 鼓励大家投稿。

论文具体要求如下:

1. 围绕“科学道德建设和科学伦理热点问题”, 坚持理论联系实际, 联系工作实际, 深入探讨;
 2. 要求主体鲜明, 逻辑严谨, 具有一定的学术价值和实践意义;
 3. 征文应为未公开发表的文章, 3000 字以内。附 100 字左右内容摘要和 50 字左右作者介绍; 作者联系方式写明(单位、电话、EMAIL);
 4. 论文引文要规范, 注明出处(要求页下注);
 5. 论文题目自拟, 论文截至日期 2010 年 1 月 31 日, 稿件可以直接发送给 geneticsociety@163.com。
- 本次征文将在中国遗传学会网站公布, 并且评出优秀论文给予一定的奖励。