

前蛋白转换酶 Furin 和 PC7 在小鼠母胎界面的动态表达及其在胚胎粘附和扩展中的作用*

周 智^{1,2} 张保华^{2, 3} 祝 诚² 薛立群^{1**} 王红梅^{2**}

1. 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128

2. 中国科学院动物研究所 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101

3. 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘 要 通过免疫组化、免疫荧光和小鼠胚胎-子宫内膜上皮细胞共培养体系, 研究了前蛋白转换酶 Proprotein Convertases (PCs) 家族中的 Furin 和 PC7 在小鼠妊娠早期子宫和胚胎中的表达及对胚胎植入的影响。结果显示: Furin 和 PC7 在妊娠 D1- D4 小鼠子宫的腺上皮和 D5- D7 小鼠子宫的蜕膜、腺上皮高表达; PC7 在植入前胚胎的 2-细胞和 4-细胞期表达很低, 8-细胞期表达开始增加, 囊胚期滋养外胚层有显著的高表达。Furin 的抑制剂 Dee-RVKR-CMK 可显著抑制共培养体系中胚胎的粘附和扩展。以上结果表明, Furin 在植入期胚胎的粘附和扩展中发挥重要作用。此外, Furin 和 PC7 可能参与子宫内膜蜕膜化和早期胚胎发育 [动物学报 54 (5): 877- 884, 2008]。

关键词 前蛋白转换酶 Furin PC7 胚胎 子宫内膜 粘附 扩展 小鼠

Dynamic expression of Furin and PC7 at the maternal-fetal interface and their roles in adhesion and outgrowth of mouse embryos*

ZHOU Zhi^{1,2}, ZHANG Bao-Hua^{2, 3}, ZHU Cheng², XUE Li-Qun^{1**}, WANG Hong-Mei^{2**}

1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract The expression and function of Furin and PC7 during mouse embryo implantation was investigated using immunohistochemistry, immunofluorescence and an *in vitro* embryo-endometrial epithelial cells co-culture system. Results showed that Furin and PC7 were mainly localized in the glandular epithelial cells from D1 to D4 of pregnancy and in decidual cells and glandular epithelium on days 5- 7 of pregnancy. Expression of PC7 was hardly detectable in embryos at the 2-cell and 4-cell stages, but was significantly upregulated at 8-cell stage and the expression level of PC7 was the highest at the blastocyst stage, with strong PC7 expression in trophoctodem. Dee-RVKR-CMK, a Furin inhibitor, significantly inhibited adhesion and outgrowth of embryos in the co-culture system. These results suggest that Furin plays an important role in embryonic adhesion and outgrowth on endometrial epithelial cells. Furthermore, Furin and PC7 may also be involved in decidualization of mouse uterine stromal cells and early embryonic development [Acta Zoologica Sinica 54 (5): 877- 884, 2008].

Key words Proprotein convertases, Furin, PC7, Embryo, Endometrium, Adhesion, Outgrowth, Mouse

2008-05 收稿, 2008-06-26 接受

* 国家自然科学基金面上项目 (No. 30670262), 中国科学院院长特别基金资助项目和湖南省重点科技项目 (No. 01NKY1002-01) [This study was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30670262; to HM Wang), a special fund from the President of Chinese Academy of Sciences to HM Wang, and Key Program of Hunan Science and Technology Plan (No. 01NKY1002-01)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: liqun_xue@yahoo.com.cn; wanghm@ioz.ac.cn

© 2008 动物学报 Acta Zoologica Sinica

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

胚胎植入是哺乳动物成功妊娠的关键环节, 该过程受到多种激素、生长因子和细胞因子的精细调控。成功的胚胎植入需具备两个先决条件: 胚胎具有浸润能力的同时, 子宫内膜恰好处于可接受状态 (Wang et al., 2004)。胚胎植入过程中, 子宫在形态和生理功能上发生了一系列变化, 如内膜基质细胞的蜕膜化。小鼠子宫内膜蜕膜化始于胚胎植入早期, 在胚胎粘附部位、靠近子宫腔的基质细胞发生蜕膜化, 形成蜕膜区。

前蛋白转换酶 (Proprotein convertases, PCs) 是 Ca^{2+} 依赖性的丝氨酸蛋白酶家族, 其主要功能是剪切无生物活性的蛋白或肽链的前体, 使之变成有活性的功能分子。哺乳动物细胞中已发现的 PCs 家族成员主要有七种, 分别为: Furin、PACE4、PC1/3、PC2、PC4、PC5/6 和 PC7 (Thomas, 2002)。其中 PC1/3、PC2 在神经和内分泌组织中特异表达, PC4 特异表达于生殖器官和胎盘, Furin、PACE4、PC5/6 和 PC7 在多种组织中表达。包括神经肽类物质、多肽类激素、生长因子及其受体和基质金属蛋白酶家族 (MMPs) 等在内的许多蛋白的活性都受 PCs 的调控 (Thomas, 2002)。

PCs 活性的正常发挥与胚胎植入及妊娠的成功与否密切相关。PC5 在妊娠第 5 天 (植入期) 子宫中表达显著升高, 向胚胎植入前的小鼠子宫角注射 PC5 的反义寡核苷酸显著抑制胚胎植入 (Nie et al., 2005)。人的子宫内膜中有 Furin、PACE4、PC5/6 和 PC7/8 的表达, 但检测不到 PC1/3 和 PC2 (Freyer et al., 2007)。PC4 与胎儿宫内发育迟缓有关, 抑制 PC4 的表达显著抑制人滋养层细胞系 HTR8/SVneo 细胞的增殖, 其原因是胰岛素样生长因子-II 前体 (pro-IGF-II) 不能被加工成熟 (Qiu et al., 2005)。

弗林蛋白酶 (Furin) 是最早发现也是最重要的 PCs 家族成员, Furin 基因敲除后, 小鼠胚胎发育停滞, 胚胎发育至第 10.5 天左右死亡 (Scamuffa et al., 2006), 说明 Furin 在胚胎发育过程中发挥至关重要的作用。很多胚胎发育相关的分子, 如 IGF 及其受体、转化生长因子- β (TGF- β) 家族成员等 (Brar et al.), 都是在 Furin 作用下加工成活性形式的。参与胚胎植入过程中细胞外基质重建的 MMPs 家族的许多成员也是经 Furin 加工成熟的。Furin 在很多肿瘤组织中特异高表达, 它对增殖相关的生长因子如 PDGF-B (Siegfried et al., 2005) 和血管内皮生长因子-C (VEGF-C) (Siegfried et al., 2003) 有剪

切作用。特异抑制 PCs 被视为抑制肿瘤的一个新途径。Decanoylated CMK-peptide 是一种人工合成的 PCs 抑制剂, 能抑制 Furin 表达 (Qiu et al., 2005)。胚胎植入过程中胚胎对子宫内膜的浸润与肿瘤细胞对组织的浸润有很大程度的相似性, 提示我们 Furin 在胚胎植入过程中滋养层细胞对子宫内膜的浸润中可能有重要作用。

PC7 也是一类广泛表达的前蛋白转换酶, 在细胞内, PC7 和 Furin 的功能有一定的协同作用, 主要原因是 Furin 和 PC7 在细胞内具有相似的定位、转运和发挥作用的机制 (Scamuffa et al., 2006; Seidah et al., 2008)。

Furin 和 PC7 在小鼠胚胎植入过程中子宫和胚胎中的表达定位和功能尚无报道。因此, 本研究拟通过免疫组化和免疫荧光方法研究 Furin 和 PC7 在早期妊娠小鼠子宫和胚胎中的表达, 并利用小鼠胚胎-子宫内膜上皮细胞共培养模型研究它们对小鼠胚胎粘附及扩展的影响, 以探讨两种分子在胚胎植入过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

兔抗人 Furin 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司; 小鼠抗人 PC7 单克隆抗体购自美国 USBiological 公司; Furin 抑制剂购自德国 Calbiochem 公司; Ham's-F12 培养基购自 Gibco 公司; 兔免疫组化检测试剂盒 (SP-9001) 购自北京中杉金桥公司; Histomount 封片剂购自 Invitrogen 公司。

1.2 实验动物

性成熟昆明小鼠购自北京维通利华实验动物中心, 雄鼠 8 周龄以上, 雌鼠 6-8 周龄, 饲养于中国科学院动物研究所清洁级鼠房。实验动物饲养和相关操作均按照中国科学院动物研究所伦理委员会的规定执行。小鼠在下午按雌雄比 2:1 合笼, 次日清晨检查阴栓, 有阴栓者记为 D1 (妊娠第一天)。分别收集妊娠 D1、D2、D3、D4、D5、D6 和 D7 的小鼠子宫 (D1-D4 每天样品为 3 个, D5 样品数为 5 个, D6 和 D7 样品数为 4 个), 用 4% 多聚甲醛固定, 梯度酒精脱水, 再经二甲苯透明, 浸蜡, 进行石蜡包埋。

1.3 免疫组化

免疫组化按“兔 SP 检测试剂盒”说明书进行。简言之, 石蜡切片 (5 μ m) 经二甲苯脱蜡 2 \times 10 min, 酒精梯度复水, 微波 (91 $^{\circ}$ C-94 $^{\circ}$ C) 抗原修

复 15 min (抗原修复液: 1.8 mmol/L 柠檬酸, 8.2 mmol/L 柠檬酸钠), 自然冷却。将切片用含 3% 双氧水的甲醇处理 20 min, 以灭活内源性的过氧化物酶; 用正常山羊血清封闭 20 min, 加一抗 (Furin, 1: 300; PC7, 1: 250), 37℃ 孵育 2 h, PBS 洗 3 × 5 min, 加相应的二抗 37℃ 孵育 20 min, PBS 洗 3 × 5 min, 加三抗 37℃ 孵育 15 min, PBS 洗 3 × 5 min 后, DAB 显色。用正常山羊血清代替一抗作为阴性对照。切片经苏木精负染后, Histomount 封片剂封片, 在显微镜下观察。

1.4 免疫荧光

8 周龄性成熟小鼠于 18: 00 注射 PMSG (8 IU/只), 48 h 后注射 hCG (8 IU/只) 以诱导超数排卵, 然后按 1: 1 与雄鼠合笼。次日验栓, 出现阴栓记为 D1 (妊娠第一天)。在妊娠第 2-4 天, 从输卵管或子宫中冲出小鼠 2-细胞、4-细胞、8-细胞胚胎和桑椹胚及囊胚。各期胚胎先经 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 漂洗后, 在 0.2% Triton X-100/PBS 中穿透 20 min, 再用 PBS 洗涤 3 次。胚胎于 5% BSA/PBS 中室温封闭 45 min, 加入小鼠抗人 PC7 (1: 200) 单克隆抗体 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤, 加入 FITC 标记的二抗, 37℃ 孵育 1 h, 经 PI (碘化丙锭, 0.01 mg/ml) 染核 10 min 后在激光共聚焦显微镜下观察。用 5% BSA/PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.5 子宫内膜上皮细胞与胚胎共培养体系

经超排处理的小鼠于妊娠第 4 天 (D4) 早晨, 用 Ham F-12 培养液冲子宫收集囊胚, 培养于含有 0.4% BSA 的 Ham F-12 培养液中, 培养 24 h 至孵出透明带; 同时, 将子宫纵切, 暴露内膜于含 0.6% 胰蛋白酶的 Hank's 液中 4℃ 消化 2 h, 再室温消化 30 min, 收集上清, 过 100 目细胞筛, 1000 r/min 离心, 用 Ham F-12 培养液重悬细胞沉淀, 反复 3 次, 收集小鼠子宫内膜上皮细胞, 以 1×10^6 细胞/孔接种于 96 孔板, 培养于 Ham F-12 培养液中, 培养 24 h 后, 更换培养基 (含不同浓度的 Furin 抑制剂 Dee-RVKR-CMK, 溶于甲醇), 加入孵出透明带的囊胚 (每孔约 10 枚) 继续培养 24 h 和 48 h 后, 观察胚胎粘附 (24 h) 和扩展 (48 h) 情况并计算粘附率和扩展率 (Li et al., 2005)。实验共分 5 组, 对照组 I 为正常培养液, 对照组 II 培养液中含 1% 甲醇, 实验组 I、II 和 III 培养液中分别含 1、50 或 100 $\mu\text{mol/L}$ Dee-RVKR-CMK。每次实验设置 3 个平行孔; 实验重复 3 次。

1.6 统计方法

实验数据以均值 ± 标准差表示。应用 SPSS10.0 统计软件的 One-sample K-S 进行分布型检验, 并用 One-way ANOVA 进行方差分析与显著性检验。所有数据均符合正态分布。P < 0.05 为差异显著; P < 0.01 为差异极显著。

2 结果

2.1 Furin 和 PC7 蛋白在小鼠妊娠子宫中的表达定位

用免疫组化方法检测了 Furin 和 PC7 在小鼠围植入期子宫中的表达变化。结果表明, 妊娠 D1-D4, Furin 主要表达于子宫内膜的腺上皮, 而基质中 Furin 的表达水平很低 (图 1, D1-D4); 妊娠第 5 天到第 7 天, Furin 在腺上皮、胚胎以及粘附胚胎的蜕膜区均有高表达 (图 1, D5-D7)。妊娠第 6 天子宫作为阴性对照, 无阳性信号 (图 1, Control)。

PC7 在小鼠围植入期子宫中的表达也呈动态变化: 妊娠 D1-D4, PC7 主要表达于子宫的腺上皮 (图 2, D1-D4); 妊娠第 5 天到第 7 天, PC7 在腺上皮、胚胎以及蜕膜区均有高表达 (图 2, D5-D7)。妊娠第 5 天子宫作为阴性对照, 无阳性信号 (图 2, Control)。

2.2 PC7 蛋白在小鼠植入前各期胚胎中的表达定位

免疫荧光结果表明, 2-细胞和 4-细胞胚胎中 PC7 表达水平很低, 随着胚胎发育至 8-细胞直至桑椹胚, PC7 的表达显著升高。囊胚期胚胎 PC7 表达最强, 内细胞团和滋养外胚层中均能检测到 PC7 的表达, 且滋养外胚层细胞中表达显著高于内细胞团。PC7 主要分布于胞浆 (图 3)。以桑椹胚为阴性对照, 无阳性信号 (图 3, Control)。

2.3 用胚胎-子宫内膜上皮细胞共培养模型研究 Furin 抑制剂 Dee-RVKR-CMK 对小鼠胚胎粘附和扩展的影响

用 1、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ Dee-RVKR-CMK 分别处理孵出透明带的囊胚, 同时设置两个对照: 不加任何处理因素的培养液对照 (对照组 I) 和加入与实验组相同浓度甲醇的对照 (对照组 II)。共培养 24 和 48 h, 对照组 II 和对照组 I 小鼠胚胎的粘附和扩展率无显著差异, 说明 1% 甲醇溶剂本身不影响小鼠胚胎的粘附和扩展。1 $\mu\text{mol/L}$ Dee-RVKR-CMK 处理胚胎对共培养体系中胚胎的粘附 (图 4B) 和扩展 (图 5B) 无显著影响 (粘附 P = 0.066, 扩展 P

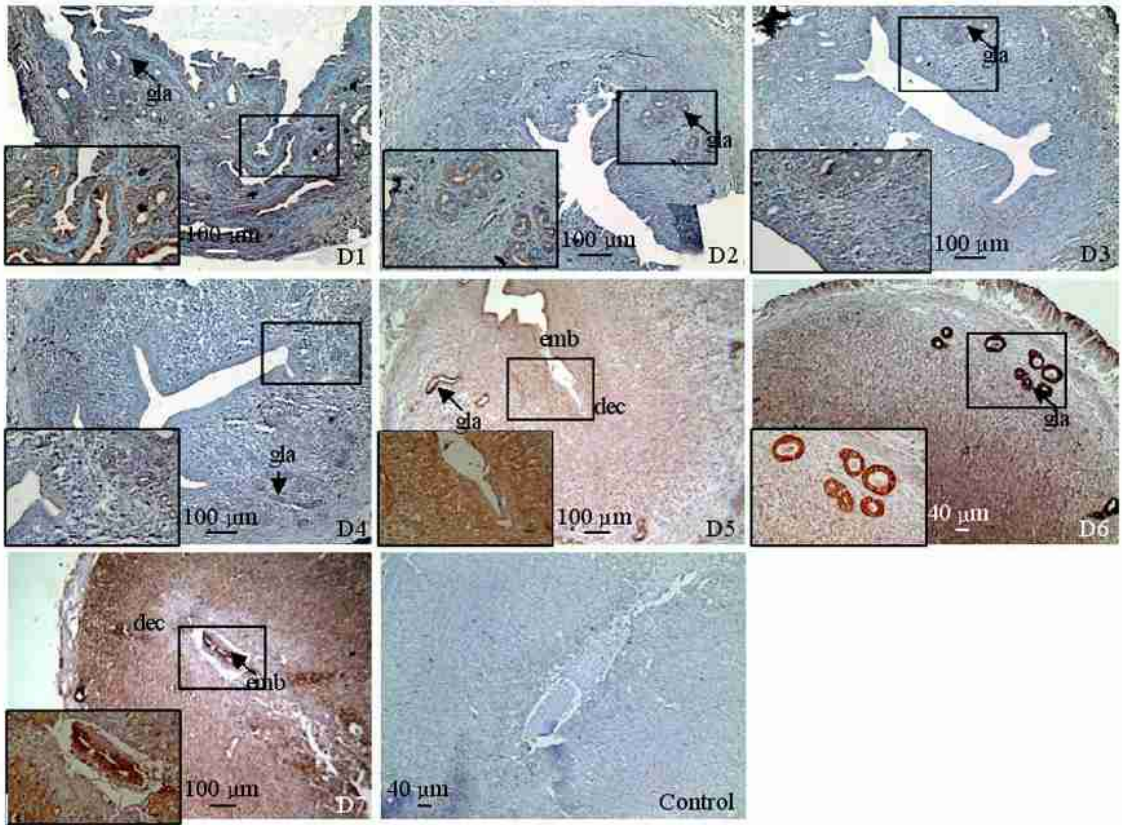


图1 免疫组化显示 Furin 在小鼠妊娠早期 (D1- D7) 子宫和胚胎中的表达

图示3组独立实验中的代表性结果。D1- D7: 妊娠第1到第7天。emb: 胚胎。gla: 腺体。dec: 蜕膜。妊娠第6天的子宫用于对照 (Control), 无阳性信号。每幅图左下角的插入图为图中方框部位的放大, 显示腺体、蜕膜和胚胎。Bar= 100 μm。

Fig 1 Expression of Furin in mouse endometrium and embryos during early pregnancy by immunohistochemical analysis

Representative results of 3 separate experiments are shown. D1- D7: Days 1- 7 of pregnancy. emb: embryo. gla: gland. dec: decidual cells. Uterus at Day 6 of pregnancy was used as control which exhibits no positive staining. Magnifying inserts showing glands, decidual cells and embryo are on the bottom left quarter of each picture. Bar= 100 μm.

= 0.185; ANOVA), 但 50 μmol/L 抑制剂显著抑制小鼠胚胎的粘附 (图 4B) 和扩展 (图 5B) (粘附 $P = 0.037$, 扩展 $P = 0.023$; ANOVA)。当抑制剂浓度增至 100 μmol/L 时, 小鼠胚胎的粘附 (图 4B) 和扩展 (图 5B) 被极显著抑制 (粘附 $P < 0.001$, 扩展 $P < 0.001$; ANOVA)。24 h 粘附: $F_{4,40} = 94.025$; 48 h 扩展: $F_{4,40} = 24.260$ 。

3 讨论

生物体内很多重要蛋白质或肽类都以无活性的前体形式合成, 通过翻译后加工, 而成为有生物活性的成熟体。前蛋白转换酶 (PCs) 家族的主要功能就是剪切蛋白质的未成熟前体, 使之成为能发挥生物功能的蛋白质。PCs 参与多种重要的生物过程, 如酶原激活、肽类激素的合成、病毒蛋白加工和受体成熟等, 其主要剪切底物包括神经肽类物质、多肽类激素、生长因子及其受体和 MMPs

(Thomas, 2002)。研究表明, PCs 家族成员如 Furin、PC7、PC5 和 PACE4 与肿瘤发生密切相关, 其中 Furin 和 PC7 在多种肿瘤中高表达。下调其表达后, 对于肿瘤细胞的浸润和转移有抑制作用 (Lapierre et al., 2007; Page et al., 2007)。胚胎植入过程中, 滋养层细胞对子宫内膜的浸润在一定程度上和肿瘤的浸润具有相似性, 因此, 我们推测 Furin 和 PC7 对胚胎植入过程可能也有一定影响。本研究以此为出发点, 通过免疫组化、免疫荧光和小鼠胚胎-子宫内膜上皮细胞共培养体系, 研究了前蛋白转换酶 PCs 家族中的 Furin 和 PC7 在小鼠妊娠早期子宫和胚胎中的表达及对胚胎植入的影响。

植入前胚胎发育和子宫内膜的蜕膜化是成功植入的必要条件。我们的研究发现, PC7 在植入前小鼠胚胎中随着发育进程, 表达逐渐升高, 并在囊胚期滋养外胚层中显著高表达, 提示 PC7 对早期胚胎发育可能有重要影响。

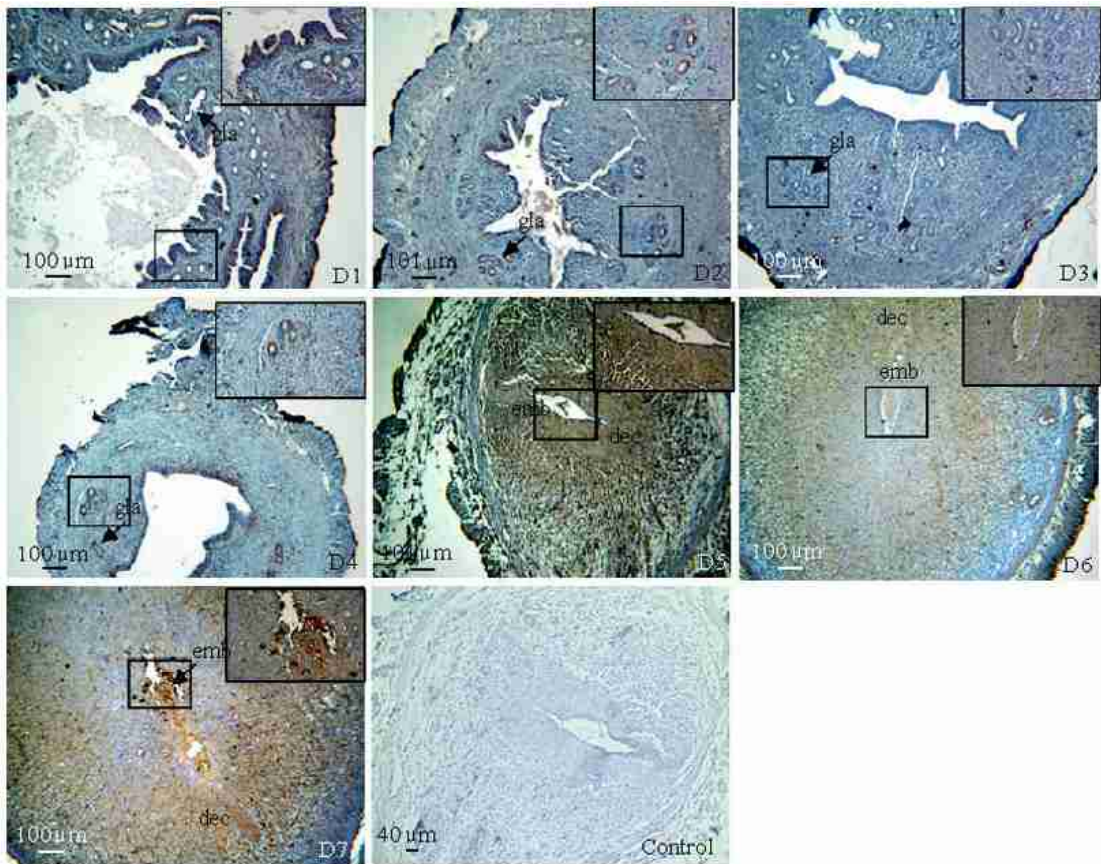


图2 免疫组化显示 PC7 在小鼠妊娠早期 (D1- D7) 子宫和胚胎中的表达

图示3组独立实验中的代表性结果。D1- D7: 妊娠第1到第7天。emb: 胚胎。gla: 腺体。dec: 蜕膜。妊娠第5天的子宫用于对照 (Control), 无阳性信号。每幅图右上角的插入图为图中方框部位的放大, 以显示腺体、蜕膜和胚胎。Bar= 100 μm。

Fig 2 Expression of PC7 in mouse endometrium and embryos during early pregnancy (D1- D7) by immunohistochemical analysis

Representative results of 3 separate experiments are shown. D1- D7, Days 1- 7 of pregnancy. emb: embryo. gla: gland. dec: decidual cells. Uterus at day 5 of pregnancy was used as control which exhibits no positive staining. Magnifying inserts showing gland, decidual cells and embryo are on the top right quarter of each picture. Bar= 100 μm.

胚胎和子宫内膜之间信号分子的传递是保证成功植入的另一关键因素 (Wang and Dey, 2006)。胚胎粘附到子宫内膜上皮后, 引起子宫内膜基质细胞的广泛蜕膜化, 蜕膜化的重要意义在于确保子宫内膜接受态的启闭和妊娠维持。已知卵巢分泌的孕酮启动了子宫内膜的蜕膜化, 同时子宫中表达的各种因子和激素激活了 cAMP 通路, 共同启动了蜕膜细胞的增殖和分化 (Gellersen and Brosens, 2003), 参与这个过程的因子包括 VEGF、PDGF、IGF 和 TGF-β 家族成员 (Kusakabe et al., 2008) 等, 它们都需要经过 PCs 家族成员的剪切加工才能发挥功能。PC5 在小鼠子宫的蜕膜化过程中发挥重要作用, 在胚胎植入的 D5 可观察到蜕膜细胞中有 PC5 的高表达, 其影响植入的分子机制目前还不清楚 (Nie et al., 2005), 而 PCs 家族中的其他成员是否参与该

过程尚未见报道。我们的研究结果显示, Furin 和 PC7 在小鼠妊娠早期的子宫中随胚胎植入过程呈动态变化, 并在定位上具有特异性和相似性, 提示 Furin 和 PC7 可能协同参与了胚胎的粘附、扩展和子宫内膜蜕膜化等植入的关键步骤。

胚胎对子宫内膜的粘附和扩展是滋养层细胞浸润的先决条件。参与胚胎粘附和扩展过程的分子包括整合素 (Mayer et al., 2003)、粘附分子和 MMPs (Guo et al., 2005; Lapierre et al., 2007; Wu et al., 2007) 等。以前体形式分泌的 MMP2、MMP9 等广泛参与胚胎植入过程中细胞外基质的重建, 在滋养层细胞的浸润过程中发挥重要作用 (Zhang et al., 2004)。抑制 MMPs 的表达可抑制胚胎的植入 (Chen et al., 2007)。Furin 和 PC7 在 MMPs 的酶原激活中起关键作用 (Remacle et al., 2006)。此外,

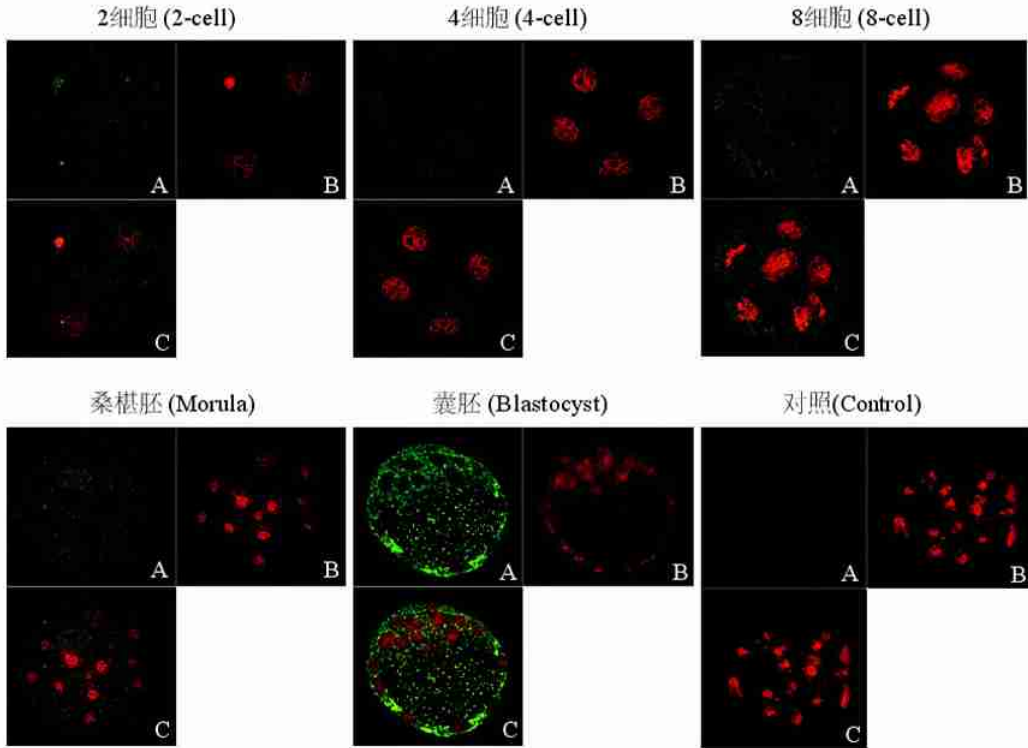


图3 免疫荧光显示PC7在小鼠植入前各期胚胎中的定位

图示3组独立实验的代表结果。A: 绿色为FITC染色示PC7阳性信号。B: 红色为PI染色示细胞核。C: A与B的叠加。桑椹胚用作对照(Control), 无阳性信号。

Fig 3 Expression of PC7 in mouse embryos at different stages of development by immunofluorescence

Representative results of 3 separate experiments are shown. A: Green-FITC staining showing PC7 positive signals. B: Red-PI staining of the nuclei. C: Merged image of A and B. Morula was used as control which exhibits no positive signals.

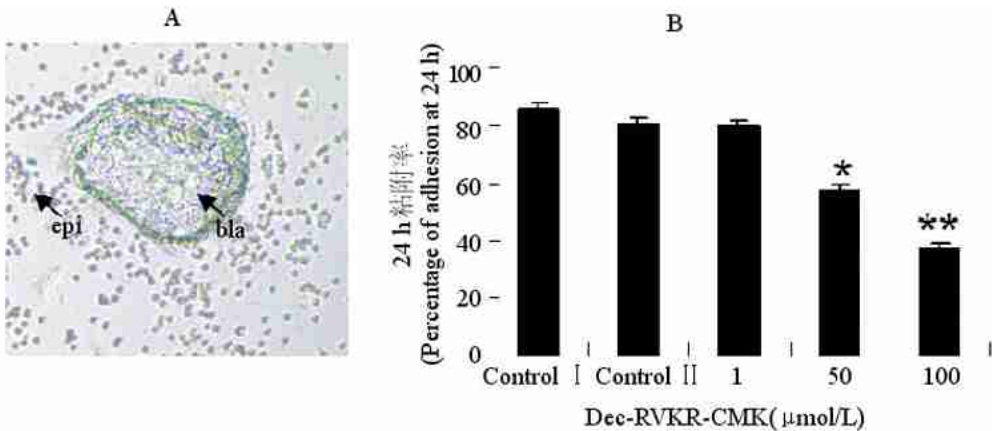


图4 Furin的抑制剂Dee-RVKR-CMK对共培养体系中小鼠胚胎粘附的影响

A. 胚胎粘附的代表性结果。bla: 囊胚; epi: 子宫内膜上皮细胞。B. Furin抑制剂处理24 h后共培养体系各组粘附率的统计结果。对照组I为正常培养液, 对照组II培养基中含1%甲醇, 实验组I、II和III培养液中分别含1、50和100 μmol/L Dee-RVKR-CMK。结果显示1 μmol/L抑制剂对胚胎粘附无显著影响, 50和100 μmol/L抑制剂显著抑制胚胎粘附。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ ($n = 3$), $F_{4,40} = 94.025$, One-way ANOVA。

Fig 4 Effect of Dee-RVKR-CMK, a Furin inhibitor, on embryo adhesion in an embryo-endometrial epithelial cells co-culture system

A. Representative results of embryo adhesion. bla: blastocyst. epi: epithelial cells of uterus. B. Statistical results of the percentages of adhesive embryos after 24 h of co-culture. Furin inhibitor at the concentration of 1 μmol/L had no significant effect on embryo adhesion, whereas 50 and 100 μmol/L of Furin inhibitor markedly reduced embryo adhesion. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ ($n = 3$), $F_{4,40} = 94.025$, One-way ANOVA.

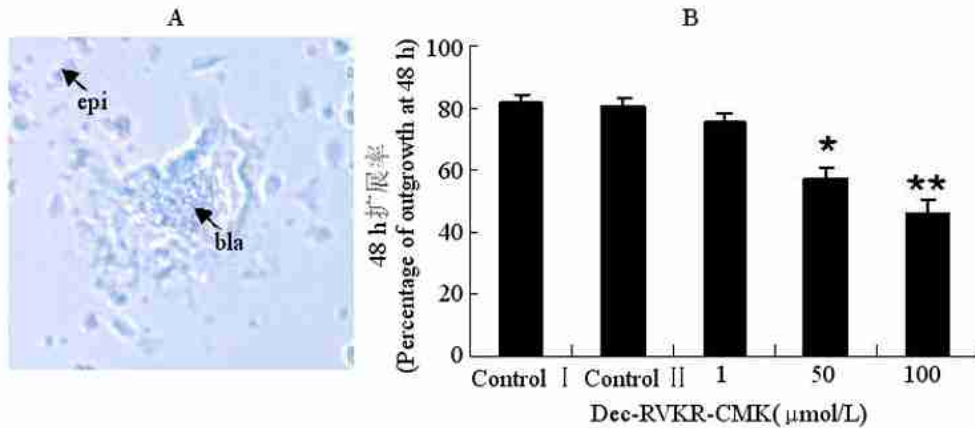


图5 Furin 的抑制剂 DEC-RVKR-CMK 对共培养体系中小鼠胚泡扩展的影响

A. 胚泡扩展的代表性结果。bla: 囊胚。epi: 子宫内上皮细胞。B. Furin 抑制剂处理 48 h 后共培养体系各组扩展率的统计结果。对照组 I 为正常培养基, 对照组 II 培养基中含 1% 甲醇, 实验组 I、II 和 III 培养基中分别含 1、50 和 100 μmol/L Dec-RVKR-CMK。结果显示, 1 μmol/L 抑制剂对胚泡扩展无显著影响, 50 和 100 μmol/L 抑制剂显著抑制胚泡扩展。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n = 3$), $F_{(4,40)} = 24.260$, One-way ANOVA。

Fig 5 Effect of DEC-RVKR-CMK, a Furin inhibitor, on embryo outgrowth in an embryo-endometrial epithelial cells co-culture system

A. Representative results of embryo outgrowth. bla: blastocyst, epi: epithelial cells of uterus. B. Statistical results of the percentages of embryo outgrowth after 48 h of co-culture. Furin inhibitor at a concentration of 1 μmol/L had no significant effect on embryo outgrowth, whereas 50 and 100 μmol/L of Furin inhibitor significantly reduced the outgrowth. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ ($n = 3$), $F_{(4,40)} = 24.260$, One-way ANOVA.

整合素家族和很多粘附分子也被证明在胚胎粘附和向子宫内膜的浸润中发挥重要作用 (Minas et al., 2005), 它们也以前体形式分泌, 经 PCs 剪切而成熟 (Deryugina et al., 2002)。我们用小鼠胚胎和子宫内上皮细胞共培养体系研究 Furin 对胚胎粘附和扩展的影响。结果显示, 抑制 PCs 的活性可以显著抑制胚胎的粘附和扩展, 提示 PCs 的活性对于正常的胚胎粘附和扩展必不可少。

综上所述, 本研究首次证明了 Furin 和 PC7 在妊娠早期小鼠子宫和胚胎中呈时空特异表达。Furin 的活性对于小鼠胚胎的粘附和扩展具有重要作用。

参考文献 (References)

Brar AK, Handwerker S, Kessler CA, Aronow BJ, 2001. Gene induction and categorical reprogramming during *in vitro* human endometrial fibroblast decidualization. *Physiological Genomics* 7 (2): 135–148.
 Chen L, Nakai M, Belton RJ Jr, Nowak RA, 2007. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinases during mouse embryonic development. *Reproduction* (Cambridge, England) 133 (2): 405–414.
 Deryugina EI, Ratnikov BI, Postnova TI, Rozanov DV, Strongin AY, 2002. Processing of integrin alpha (V) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (12): 9749–9756.
 Freyer C, Kilpatrick LM, Salamonsen LA, Nie G, 2007. Pro-protein convertases (PCs) other than PC6 are not tightly regulated for implantation in the human endometrium. *Reproduction* (Cambridge, England) 133 (6): 1189–1197.

Gellersen B, Brosens J, 2003. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *The Journal of Endocrinology* 178 (3): 357–372.
 Guo C, Jiang J, Elliott JM, Piacentini L, 2005. Paradigmatic identification of MMP-2 and MT1-MMP activation systems in cardiac fibroblasts cultured as a monolayer. *Journal of Cellular Biochemistry* 94 (3): 446–459.
 Kusakabe M, Cheong PL, Nikfar R, McLennan IS, Koishi K, 2008. The structure of the TGF-beta latency associated peptide region determines the ability of the proprotein convertase furin to cleave TGF-betas. *Journal of Cellular Biochemistry* 103 (1): 311–320.
 Lapierre M, Siegfried G, Scamuffa N, Bontemps Y, Calvo F, Seidah NG, Khatib AM, 2007. Opposing function of the proprotein convertases furin and PACE4 on breast cancer cells' malignant phenotypes: role of tissue inhibitors of metalloproteinase 1. *Cancer Research* 67 (19): 9030–9034.
 Li J, Zhang JV, Cao YJ, Zhou JX, Liu WM, Fan XJ, Duan EK, 2005. Inhibition of the beta-catenin signaling pathway in blastocyst and uterus during the window of implantation in mice. *Biology of Reproduction* 72 (3): 700–706.
 Mayer G, Boileau G, Bendayan M, 2003. Furin interacts with proMT1-MMP and integrin alpha V at specialized domains of renal cell plasma membrane. *Journal of Cell Science* 116 (Pt 9): 1763–1773.
 Minas V, Loutradis D, Makrigiannakis A, 2005. Factors controlling blastocyst implantation. *Reproductive Biomedicine Online* 10 (2): 205–216.
 Nie G, Li Y, Wang M, Liu YX, Findlay JK, Salamonsen LA, 2005. Inhibiting uterine PC6 blocks embryo implantation: an obligatory role for a proprotein convertase in fertility. *Biology of Reproduction* 72 (4): 1029–1036.
 Page RE, Klein-Szanto AJ, Litwin S, Nicolas E, Al-Jumaily R, Alexander P, Godwin AK, Ross EA, Schilder RJ, Bassi DE, 2007. Increased expression of the pro-protein convertase furin predicts decreased survival in ovarian cancer. *Cell Oncol* 29 (4): 289–299.
 Qiu Q, Basak A, Mbikay M, Tsang BK, Gruslin A, 2005. Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America 102 (31): 11047– 11052.
- Remacle AG, Rozanov DV, Fugere M, Day R, Strongin AY, 2006. Furin regulates the intracellular activation and the uptake rate of cell surface-associated MMP-1-MMP. *Oncogene* 25 (41): 5648– 5655.
- Scamuffa N, Calvo F, Chretien M, Seidah NG, Khatib AM, 2006. Proprotein convertases: lessons from knockouts. *FASEB J.* 20 (12): 1954– 1963.
- Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousset E, Nassoury N, Poirier S, Essalmani R, Prat A, 2008. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (6– 7): 1111– 1125.
- Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, Benjannet S, Marcinkiewicz J, Chretien M, Seidah NG, Khatib AM, 2003. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 111 (11): 1723– 1732.
- Siegfried G, Basak A, Prichett-Pejic W, Scamuffa N, Ma L, Benjannet S, Veinot JP, Calvo F, Seidah N, Khatib AM, 2005. Regulation of the stepwise proteolytic cleavage and secretion of PDGF-B by the proprotein convertases. *Oncogene* 24 (46): 6925– 6935.
- Thomas G, 2002. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nature Reviews* 3 (10): 753– 766.
- Wang H, Dey SK, 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews* 7 (3): 185– 199.
- Wang HM, Zhang X, Qian D, Lin HY, Li QL, Liu DL, Liu GY, Yu XD, Zhu C, 2004. Effect of ubiquitin-proteasome pathway on mouse blastocyst implantation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9. *Biology of Reproduction* 70 (2): 481– 487.
- Wu YI, Munshi HG, Snipas SJ, Salvesen GS, Fridman R, Stack MS, 2007. Activation-coupled membrane type 1 matrix metalloproteinase membrane trafficking. *The Biochemical Journal* 407 (2): 171– 177.
- Zhang X, Wang HM, Lin HY, Liu GY, Li QL, Zhu C, 2004. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) during mouse peri-implantation: role of nitric oxide. *Placenta* 25 (4): 243– 252.