

annexin A2 体外胚胎着床的功能阻滞研究

叶天民 彭鼎佳 高 晶 王 琨 霍 然 肖 佳 杨树标

摘 要 **目的** 将通过已有的小鼠体外胚胎着床模型对 annexin A2 在胚胎着床中的功能进行相应的研究。**方法** 将孕第 4 天 ICR 小鼠囊胚与 ICR 小鼠的内膜组织进行体外共培养。比较子宫内腔经 annexin A2 抗体预处理以及未经处理之间,各组胚胎黏着率的差异,并在共培养后进行组织学研究。**结果** 小鼠子宫内腔经浓度为 $1.0\mu\text{g/ml}$ 及 $0.1\mu\text{g/ml}$ 的 annexin A2 抗体预处理后小鼠囊胚在其上的黏着率分别为 45.6% 及 53.6%;而抗体浓度为 $1.0\mu\text{g/ml}$ 的正常 IgG 对照及未经抗体处理的空白对照组的黏着率分别为 55.4% 及 59.0%。经过 $1.0\mu\text{g/ml}$ 的 annexin A2 抗体预处理组与两组对照组之间的黏着率比较,差异无统计学意义。免疫组化实验发现,经过 annexin A2 抗体预处理后,未见到 annexin A2 表达明显降低。**结论** annexin A2 在第 4 天的子宫内腔组织表达明显高于第 1 天的子宫内腔组织。运用抗体进行阻滞实验时并不能显著降低体外胚胎在子宫内腔组织的黏着率。

关键词 annexin A2 胚胎着床 模型

中图分类号 R167

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.02.016

In vitro Functional Block Study of annexin A2 during Embryo Implantation. Ye Tianmin, Peng Dingjia, Gao Jing, et al. Center of Reproductive Medicine, The University of Hong Kong – Shenzhen Hospital, Guangdong 518053, China

Abstract Objective The three – dimensional in vitro embryo implantation model was used to study the function of annexin A2 during the embryo implantation. **Methods** In vitro day four ICR pregnant mouse embryo and endometrium was co – cultured. The attachment rates were compared between the groups of annexin A2 antibody pre – treated and control groups. The histological study then followed. **Results** There was no significant different attachment rate between the $1.0\mu\text{g/ml}$ annexin A2 antibody pre – treated group (45.6%) and $1.0\mu\text{g/ml}$ IgG control group (55.4%). And the attachment rates of the $0.1\mu\text{g/ml}$ annexin A2 antibody pre – treated group and no antibody control were 53.6% and 59.0%, respectively. The immunohistochemical study showed that the expression of annexin A2 were not decreased after the annexin A2 antibody pre – treated. **Conclusion** The expression of annexin A2 was un – regulated in day four pregnant mouse endometrium compared with day one pregnant mouse. The annexin A2 antibody pre – treatment can not block or decrease the in vitro embryo attachment rate.

Key words annexin A2; Embryo implantation; Model

随着现代社会的进步,不孕症是整个社会面临的一个问题。1978 年英国诞生了首例试管婴儿,标志着人类拥有了辅助生育技术以及后续不断完善的各种相关技术,在很大程度上帮助了不少不孕症患者,但医学工作者也发现,移植的优质胚胎移植入母体子宫后仍然没有得到成功妊娠。其中的主要问题还是在于胚胎着床尚无法在掌控之中。所以目前辅助生育技术的治疗成功率仍然徘徊在 30% 左右^[1]。胚胎着床是发生在母体内非常重要的生理过程,在哺乳动

物的不同物种中,基本的过程及步骤都很相似。大体分为 3 步,即定位、黏着和侵入。定位是指胚胎在子宫内腔表面不稳定的黏着。此后,黏着步骤是指囊胚滋养细胞开始具有黏着能力并黏于子宫内腔表面。随后,滋养细胞穿破子宫内腔的腔上皮细胞层,进入内腔的间质,即侵入过程^[2]。这个过程需要胚胎和子宫之间非常精密而和谐的对话才能完成^[3]。胚胎着床由诸多分子及其所在通路介导,其中包括了性激素、生长因子、细胞因子、黏着分子和脂质等^[4]。但其中具体的机制如何,仍是一个不解之谜。

annexin A2 是 annexin 成员之一。annexin 是一组通过钙离子依赖方式连接于磷脂阴离子上的蛋白质。目前在高等脊椎动物中发现至少有 12 种^[5]。膜结合 annexin A2 是一个四聚体结构,包括两个 annexin A2 分子和两个 P11 (S100 钙结合蛋白 A10) 分子。an-

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(2015A030310470);广东省深圳市科学技术创新委员会基金资助项目(JCYJ20150331142757399)

作者单位:518053 香港大学深圳医院生殖医学中心及生育调控重点实验室(叶天民、彭鼎佳、高晶、王琨、霍然、杨树标);510632 广州,暨南大学免疫生物学系(肖佳)

通讯作者:叶天民,电子信箱:yetm@hku-szh.org

annexin A2 是 Src (Rous 肉瘤基因) 激酶的底物, 功能涉及细胞转化、分化、分泌功能调节、泌乳素释放和前列腺素形成^[5-7]。研究发现, 在人类子宫内膜中, annexin A2 在内膜接受胚胎着床期高表达而在接受胚胎着床的前期为低表达^[8-10]; 这些结果说明了 annexin A2 在胚胎着床中有相关的功能作用。研究发现, 钙离子在胚胎着床中起着非常重要的作用。因为在孕第 4 天小鼠的宫腔内注入钙通道阻滞剂会导致胚胎着床的失败^[11,12]。另外, 钙离子调节蛋白可以调节细胞内钙的平衡, 并且它在内膜接受胚胎着床期为高表达, 而在接受胚胎着床的前期为低表达^[13]。因为 annexin A2 就是钙通道依赖而发生功能的, 说明它和胚胎着床的关系和机制是这样产生的。近年来, annexin A2 在生殖领域的研究不断深入。目前发现, annexin A2 在胚胎着床中的作用是通过 RhoA 的激活和蛋白的调节而产生的^[14]。一些体外实验发现, 在灵长类子宫内膜上皮细胞及 Ishikawa 细胞系中, 白介素 11 可以上调 annexin A2 的表达^[15]。白介素 11 也是胚胎着床过程中非常重要的一个因子。

笔者之前的一些小鼠子宫内膜表面蛋白的蛋白质组学研究也发现了 annexin A2 在内膜接受胚胎着床期和接受胚胎着床的前期的表达有明显差异^[16]。本研究通过笔者已有的小鼠体外胚胎着床模型对 annexin A2 在胚胎着床中的重要功能进行研究^[17]。

材料与方法

1. 动物模型: 小鼠三维体外胚胎着床模型运用 ICR 小鼠囊胚与子宫内膜组织进行研究: 本研究所有健康雌性及雄性 ICR 小鼠由香港大学实验动物中心提供。所有实验均得到香港大学实验动物伦理学委员会批准。按照笔者已经建立的小鼠体外着床模型进行实验研究, 将孕第 4 天 ICR 小鼠囊胚与子宫内膜组织进行体外共培养。观察各组胚胎黏着率的差异^[17]。本实验共设 4 组: 第 1 组将 ICR 小鼠的内膜组织用 1.0 μg/ml 的 annexin A2 抗体进行预培养 1h (预处理); 第 2 组将 ICR 小鼠的内膜组织用 0.1 μg/ml 的 annexin A2 抗体进行预培养 1h; 第 3 组将 ICR 小鼠的内膜组织用 1.0 μg/ml 的对照 IgG 抗体进行预培养 1h; 第 4 组的小鼠子宫内膜组织未经任何抗体预处理。

2. 免疫组化: 小鼠子宫内膜组织经过固定、石蜡包埋之后, 常规石蜡切片制片。切片组织厚度为 5 μm。切片经脱蜡后进行常规处理。组织切片用传统免疫组化的抗原修复、过氧化氢处理, 加一抗

(1:500)、二抗(1:800)后用 ABC + DAB 法进行显色。其中一抗为兔抗鼠 annexin A2 (购自英国 Abcam 公司), 二抗为羊抗兔 IgG (购自美国 Dako 公司)。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计分析, 两组之间胚胎黏着率的比较, 用 χ^2 检验进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 通过三维体外胚胎着床模型来检测 annexin A2 在胚胎着床中的作用: ICR 小鼠内膜组织用 annexin A2 抗体及正常 IgG 抗体对照进行预培养, 然后运用体外 3D 着床模型进行黏着率检测。小鼠子宫内膜浓度为 1.0 μg/ml 及 0.1 μg/ml 的 annexin A2 抗体预处理后小鼠囊胚在其上的黏着率分别为 45.6% 及 53.6%; 而抗体浓度为 1.0 μg/ml 的正常 IgG 对照及未经抗体处理的空白对照组的黏着率分别为 55.4% 及 59.0%。经过 1.0% 的 annexin A2 抗体预处理组与两组对照组之间的黏着率比较差异无统计学意义 ($P = 0.30, P = 0.15$)。

表 1 经过与未经过 LIF 抗体抑制的内膜与胚胎在体外共培养模型中的黏着率

组别	抗体浓度 (μg/ml)	胚胎总数	黏着的 胚胎数	黏着率 (%)
annexin A2 抗体组	1.0	57	26	45.6
	0.1	56	30	53.6
IgG 抗体对照组	1.0	56	31	55.4
无抗体空白对照组	0	61	36	59.0

2. 小鼠子宫内膜组织 annexin A2 的免疫组化染色: 孕第 1、4 天 ICR 小鼠子宫内膜组织及孕 4 天小鼠内膜组织在与小鼠囊胚共培养之前用 1.0 μg/ml 和 0.1 μg/ml annexin A2 抗体预处理后行免疫组化染色。孕第 4 天小鼠子宫内膜组织的 annexin A2 表达明显高于孕第 1 天小鼠子宫内膜组织; 但是, 经过 annexin A2 抗体预处理后, 未见到 annexin A2 表达明显降低 (图 1)。

讨 论

胚胎着床过程非常精密, 难以全面解开, 直到目前, 已经有很多技术运用到了研究胚胎着床的研究中。比如在母体方面, 对活检内膜组织和宫腔冲洗液的基因组以及蛋白质组学的研究^[18-21]。在胚胎方面, 研究着床前胚胎代谢产物时发现了一些可能与胚胎高着床能力相关的分子。但是, 这些研究的缺陷在于, 用一些静态的方法去观察一个动态的体内过程,

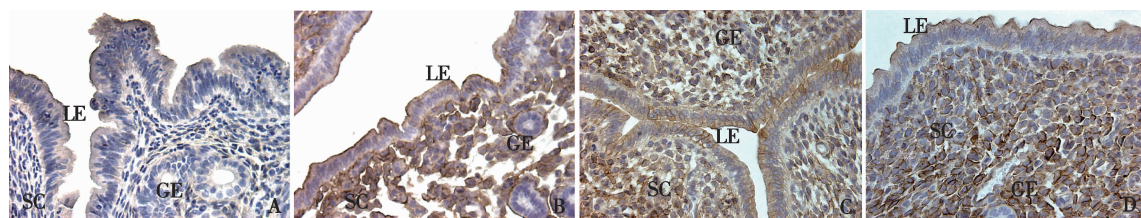


图 1 GFP 小鼠与 ICR 小鼠子宫内膜组织共培养 28h 后组织学图像 (免疫组化染色, ×400)

A. 孕第 1 天小鼠子宫内膜组织; B. 孕第 4 天小鼠子宫内膜组织; C. 经过 0.1 µg/ml annexin A2 抗体预处理后的孕第 4 天小鼠子宫内膜组织; D. 经过 1.0 µg/ml annexin A2 抗体预处理后的孕第 4 天小鼠子宫内膜组织; LE. 腔上皮; GE. 腺上皮; SC. 间质细胞

或者说仅在某个单方面去探究母体子宫内膜或者胚胎。然而,如果建立一个人体体内的着床模型比较困难,首先存在技术和伦理学的问题。所以开发研究胚胎着床的体外模型是一个非常适合的手段及平台。目前,大体有 3 种三维体外着床模型建立并已在着床研究中运用。这 3 类模型中,有一类模型是胚胎和子宫内膜组织共培养的三维体外着床模型,报道相对比较少,这一类模型的优势在于运用原代内膜组织的培养,相比其他模型,它更加接近体内的环境和状况。此类模型的首例报道是在 1961 年,之后 1973 ~ 1993 年也有少数类似的模型相继报道,但总的来说,此类模型报道很少。笔者于香港大学妇产科系建立了一种新型的三维模型。笔者研究发现,在处理过的人类羊膜上培养内膜组织可以维持正常形态的子宫内膜达到 72h。于是,笔者再将囊胚置于其上进行共培养,这是之前其他模型均没有做到的。在此模型中,小鼠囊胚体外的黏附率可以达到 50% 以上;并且,笔者观察到了在靠近胚胎黏附位置附近的子宫内膜组织出现了蜕膜化的改变^[17]。之前同类模型尚无这样的报道。

新型的着床模型建立以后,随后的相关功能性实验也同时开展。很多与胚胎着床相关的分子均用本模型得到了功能上的证实,如白血病抑制因子 (LIF)^[17,22]。在笔者实验室另一项研究中,将小鼠孕第 1 天和第 4 天的子宫内膜表面蛋白质进行标记并纯化,进行对比蛋白质组学的研究,在一系列差异表达蛋白质中,笔者发现 annexin A2 在孕第 4 天的表达和孕第 1 天明显不同,差异在 2 倍以上^[16]。这提示 annexin A2 可能和胚胎着床有着密切的关系。之前也有研究者发现在人类子宫内膜中,annexin A2 在内膜接受胚胎着床期高表达而在接受胚胎着床的前期为低表达^[8-10]。这些结果说明了 annexin A2 在胚胎着床中有相关的功能作用。所以笔者将小鼠孕第 1 天和第 4 天的子宫内膜组织进行免疫组化染色,发现

在第 4 天的表达明显高于第 1 天,这和之前的研究结果是相符合的。为了进行功能性研究及证实,笔者将子宫内膜组织用 annexin A2 抗体进行预处理,实验步骤和笔者对 LIF 进行功能性研究是一样的^[17,22]。但是,胚胎黏着率并没有因为 annexin A2 抗体预处理而显著性降低。虽然从数值上看,运用 1.0 µg/ml annexin A2 抗体预处理组的黏着率低于 2 个对照组,但差异均无统计学意义(表 1)。这有可能和样本数量还不够大有关;随后,笔者又将 annexin A2 抗体预处理过的小鼠子宫内膜组织进行免疫组化染色,结果发现 annexin A2 的表达并没有明显减少(图 1)。从免疫组化染色的图片中还可以发现,annexin A2 的表达主要集中于细胞膜表面,并且在上皮及间质细胞均有表达。annexin A2 又是一种钙离子通道依赖的蛋白质^[5]。所以研究发现它是一种分泌性蛋白质。所以用抗体阻滞的方式未必能够抑制它的功能,原因有可能是:①抗体的浓度及量还不够大;②内膜组织不断分泌 annexin A2 来维持它的功能;③体外实验是敞开式环境,无法使抗体的阻滞作用集中发挥。

综上所述,annexin A2 在第 4 天的子宫内膜组织表达明显高于第 1 天的子宫内膜组织。运用抗体进行阻滞实验时并不能显著降低体外胚胎在子宫内膜组织的黏着率。随后进行相关小鼠体内研究或者将 annexin A2 整体表达量进行降调可能会获得阳性的结果。

参考文献

- 1 Boudjenah R, Molina - Gomes D, Torre A, *et al.* Associations between individual and combined polymorphisms of the TNF and VEGF genes and the embryo implantation rate in patients undergoing in vitro fertilization (IVF) programs[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108287
- 2 McEwan M, Lins RJ, Munro SK, *et al.* Cytokine regulation during the formation of the fetal - maternal interface: focus on cell - cell adhesion and remodelling of the extra - cellular matrix[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(3): 241 - 249
- 3 Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation[J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(6): 731 - 746

- 4 Vigano P, Mangioni S, Pompei F, *et al.* Maternal – conceptus cross talk—a review[J]. *Placenta*, 2003, 24 (Suppl B): S56 – 61
- 5 Kwon M, MacLeod TJ, Zhang Y, *et al.* S100A10, annexin A2, and annexin A2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors [J]. *Front Biosci*, 2005, 10: 300 – 325
- 6 Erikson E, Erikson RL. Identification of a cellular protein substrate phosphorylated by the avian sarcoma virus – transforming gene product [J]. *Cell*, 1980, 21(3): 829 – 836
- 7 Rescher U, Ludwig C, Konietzko V, *et al.* Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho – mediated actin rearrangement and cell adhesion[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(13): 2177 – 2185
- 8 Riesewijk A, Martin J, van Os R, *et al.* Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH + 2 versus LH + 7 by microarray technology[J]. *Mol Hum Reprod*, 2003, 9(5): 253 – 264
- 9 Wang B, Ye TM, Lee KF, *et al.* annexin A2 acts as an adhesion molecule on the endometrial epithelium during implantation in mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139506
- 10 Li J, Tan Z, Li M, *et al.* Proteomic analysis of endometrium in fertile women during the pre-receptive and receptive phases after luteinizing hormone surge[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(3): 1161 – 1163
- 11 Banerjee A, Padh H, Nivsarkar M. Hormonal crosstalk with calcium channel blocker during implantation [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2011, 57(4): 186 – 189
- 12 Banerjee A, Padh H, Nivsarkar M. Role of the calcium channel in blastocyst implantation: a novel contraceptive target[J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2009, 20(1): 43 – 53
- 13 Nie GY, Li Y, Wang J, *et al.* Complex regulation of calcium – binding protein D9k (calbindin – D(9k)) in the mouse uterus during early pregnancy and at the site of embryo implantation[J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(1): 27 – 36
- 14 Garrido – Gomez T, Dominguez F, Quinonero A, *et al.* annexin A2 is critical for embryo adhesiveness to the human endometrium by RhoA activation through F – actin regulation[J]. *FASEB J*, 2012, 26(9): 3715 – 3727
- 15 Yap J, Foo CF, Lee MY, *et al.* Proteomic analysis identifies interleukin 11 regulated plasma membrane proteins in human endometrial epithelial cells in vitro[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, 30(9): 73
- 16 Ye TM, Pang RT, Leung CO, *et al.* Two – dimensional liquid chromatography with tandem mass spectrometry – based proteomic characterization of endometrial luminal epithelial surface proteins responsible for embryo implantation[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(3): 853 – 861
- 17 Ye TM, Pang RT, Leung CO, *et al.* Development and characterization of an endometrial tissue culture model for study of early implantation events [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(6): 1581 – 1589
- 18 Carr BR. Endometrium and implantation[J]. *Semin Reprod Med*, 2014, 32(5): 331 – 332
- 19 Ruan YC, Chen H, Chan HC. Ion channels in the endometrium: regulation of endometrial receptivity and embryo implantation[J]. *Human Reprod Update*, 2014, 20(4): 517 – 529
- 20 Franczak A, Zglejc K, Waszkiewicz E, *et al.* Periconceptional undernutrition affects in utero methyltransferase expression and steroid hormone concentrations in uterine flushings and blood plasma during the peri – implantation period in domestic pigs[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2016, 8(1): 356 – 359
- 21 Kamath MS, Mascarenhas M, BK, *et al.* Uterine flushing with supernatant embryo culture medium in vitrified warmed blastocyst transfer cycles: a randomized controlled trial[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32(2): 225 – 231
- 22 叶天民,肖佳,杨健之,等. 白血病抑制因子在小鼠胚胎着床机制的体外探究[J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(4): 111 – 115

(收稿日期:2017 – 07 – 10)

(修回日期:2017 – 09 – 20)

腺苷脱氨酶在儿童 EB 病毒相关噬血细胞综合征中的意义

高 慧 张俊峰 刘娟娟 沈红强

摘 要 目的 探讨血清中腺苷脱氨酶(ADA)水平在儿童 EB 病毒感染相关噬血细胞综合征(EBV – HLH)中的诊断及预后判断价值。**方法** 选取 2015 年 1 月 ~ 2017 年 12 月期间浙江大学医学院附属儿童医院收治的初诊 EBV – HLH 患者 72 例和慢性活动性 EB 病毒(CAEBV)感染患儿 80 例,HLH 患者均符合 HLH – 2004 诊断标准,同期 50 例健康体检儿童作为健康对照组。应用全自动生化分析仪测定各组患者血清 ADA 水平,采用受试者工作特征曲线(ROC)分析 ADA 临床诊断价值,Youden 指数法确定最佳工作点。**结果** EBV – HLH 组、CAEBV 组及健康对照组儿童血清 ADA 水平分别为 102.4 ± 64.9 U/L、 42.8 ± 22.1 U/L 和 13.3 ± 3.2 U/L。EBV – HLH 组 ADA 水平明显高于 CAEBV 组,差异有统计学意义($Z = 4.709, P = 0.000$);CAEBV 组高于健康

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY15H080003)

作者单位:310051 杭州,浙江大学医学院附属儿童医院实验检验中心(高慧、张俊峰、沈红强),感染科(刘娟娟)

通讯作者:沈红强,电子信箱:shenhq@zju.edu.cn