

# Wnt 信号通路与哺乳动物生殖\*

孙晓阳 王雁玲\*\*

(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 100080)

**摘要** Wnt 蛋白及其受体、调节蛋白等一起组成了复杂的信号通路, 调控细胞的分化, 参与发育的多个重要过程. 近来的研究表明: Wnt 信号通路也是调节哺乳动物生殖系统正常发育所必需. 它主要参与了缪勒氏管及其派生器官的形成, 调控卵泡的发育、排卵及黄体化, 另外与正常妊娠的建立以及妊娠过程中乳腺的变化也有关.

**关键词** Wnt, Wnt 信号通路, 哺乳动物, 生殖

**学科分类号** Q344

Wnts 是一类从水螅、昆虫到脊椎动物中都能发现的分泌型蛋白. 它们从细胞分泌出来后, 与自身或邻近细胞的膜受体结合, 激发细胞内的信号通路, 调节核内的基因表达, 决定细胞的命运, 在动物发育中起着广泛的作用. 它们异常的时空表达或异常的激活往往与肿瘤的发生有关. 近来研究表明, Wnt 信号通路在生殖系统中也起着重要的

作用.

## 1 Wnt 信号通路

从 1982 年发现 Wnt-1 至今, 大量工作证明了许多蛋白质与 Wnts 的作用相关, 并且形成了级联网络. 现在认为 Wnt 在细胞内的通路至少有 4 条<sup>[1]</sup> (图 1): (1) 典型的 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 信

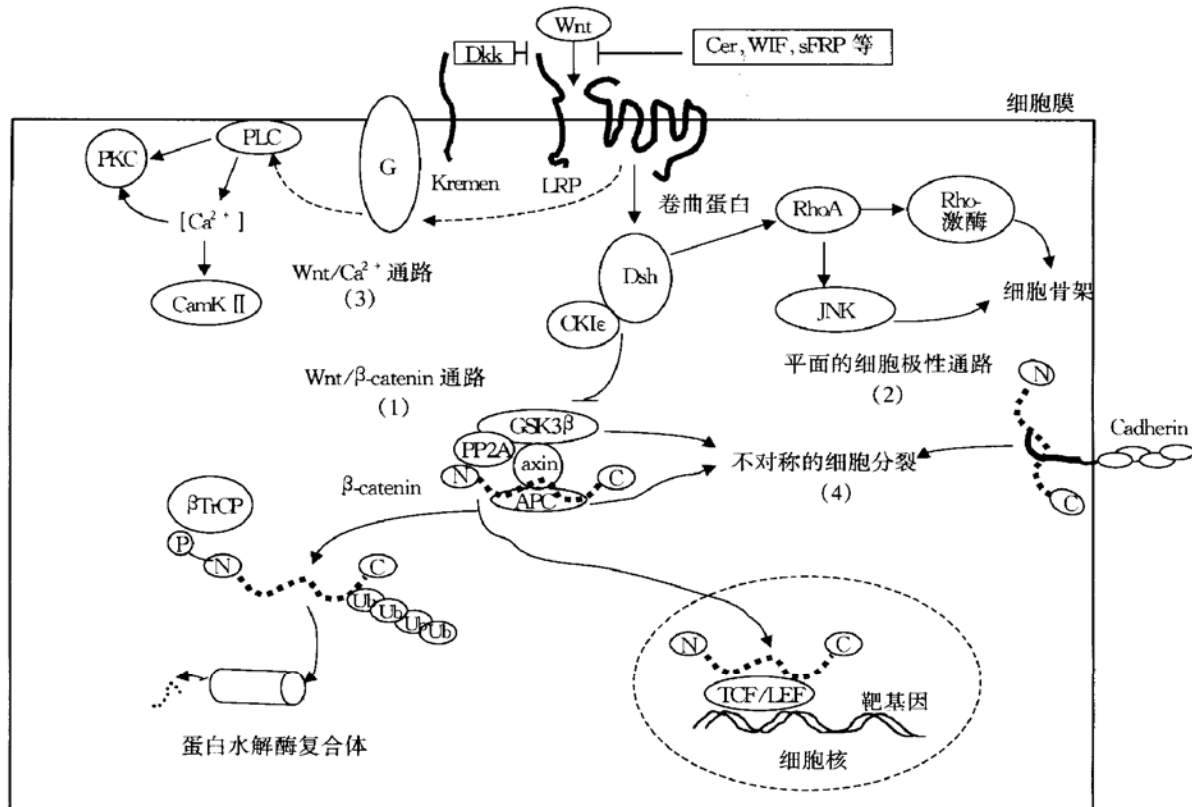


Fig. 1 The four branches of Wnt signaling pathways<sup>[1,2]</sup>

图 1 Wnt 的 4 条信号通路<sup>[1,2]</sup>

\* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999055903) 及中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX-Z SW-201).

\*\* 通讯联系人. Tel: 010-62631832, E-mail: wangyl@panda.ioz.ac.cn 收稿日期: 2002-09-16, 接受日期: 2002-12-27

号通路 (canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway), 调节核内目的基因表达; (2) 平面的细胞极性通路 (planar cell polarity pathway), 涉及到 Jun N 端激酶 (JNK) 和细胞骨架重排; (3) Wnt/ $Ca^{2+}$  通路, 与胞内  $Ca^{2+}$  的增加以及蛋白激酶 C (PLC) 和磷脂酶 C (PKC) 的激活有关; (4) 调节纺锤体定向和不对称细胞分裂的通路. 其中研究最清楚并与生殖最相关的是典型的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路.

在 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中, Wnts 的受体是由两类蛋白质组成: 一类是七次跨膜的卷曲蛋白 (frizzled protein, Fz) 家族成员, Fz 胞外氨基端具有一个结合 Wnt 的富含半胱氨酸的结构域 (cysteine-rich domain, CRD), 人类中 Fz 共有 10 种; 另一类是低密度脂蛋白受体相关蛋白家族 (LRP) 的成员 LRP5/6.

Wnt 与两类受体结合形成三聚体后, 经 Fz 将信号转导给一个胞质蛋白——Dishevelled (Dsh). 经过 Wnt 的上游激活, Dsh 抑制了糖原合酶激酶 (GSK)-3 $\beta$  的活性, 从而阻止了后者对  $\beta$ -catenin 的磷酸化, 使得  $\beta$ -catenin 在细胞质中集聚, 然后转运到核中, 与 T 细胞因子 (TCF/LEF) 家族转录因子相互作用, 最终调节了靶基因的表达.

一个包括结肠癌抑制因子 (APC)、Axin、蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 在内的多蛋白复合体通过 GSK-3 $\beta$  将磷酸基团加到  $\beta$ -catenin 氨基端的丝氨酸-苏氨酸残基上, 磷酸化的  $\beta$ -catenin 再结合到  $\beta$ Trcp 蛋白上, 受泛素的共价修饰, 被蛋白水解酶复合体降解. 当 Wnt 信号不存在时, 由于  $\beta$ -catenin 被快速破坏, 信号传导通路被关闭. 酪蛋白激酶 Ie (CKIe) 是 Wnt 通路的正向调节因子, 作用于 Dsh 之后, 而在 GSK-3 $\beta$  之前, 可以稳定  $\beta$ -catenin.

除了上述胞内的蛋白质调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路外, 胞外的分泌蛋白也能起一定的调控作用. Dickkopf1 (DKK1) 是一种分泌蛋白, 其与 Wnt 受体 LRP5/6<sup>[3]</sup> 及另一类穿膜蛋白 Kremen1/2 结合<sup>[2]</sup>, 形成三聚体, 诱导快速的细胞内吞, 减少了细胞膜上的 LRP5/6, 由此阻断了 Wnt 信号向胞内的传递. 分泌的卷曲相关蛋白 (sFRP) 含有一个 CRD 结构域, 但缺少 Fz 所拥有的七次跨膜域, 它可能与 Fz 竞争结合 Wnt 蛋白. 其他的抑制蛋白还有 Sizzled、WIF-1 和 Cerberus, 它们也直接与 Wnt 蛋白结合, 从而拮抗 Wnt 信号.

大量的研究表明, Wnt 信号通路在胚胎早期发育中的体轴建立、中胚层的模式形成以及随后的

器官发生中起重要作用. 近几年的研究表明, Wnt 信号通路在哺乳动物生殖系统, 特别是在雌性生殖系统中也起着重要的作用.

## 2 Wnt 信号通路与生殖系统早期发育

哺乳动物发育的重要特征之一, 就是从缪勒氏管 (Mullerian ducts) 和沃尔夫管 (Wolffian ducts) 形成性别两型的生殖管道. 在雄性中, Y 染色体上性别决定基因 (SRY) 的激活使睾丸分化, 随后睾丸的支持细胞 (Sertoli cell) 分泌缪勒氏管抑制物 (MIS), 与缪勒氏管中的 MIS 受体结合, 抑制了缪勒氏管的发育; 同时间质细胞 (Leydig cell) 分泌睾酮, 使沃尔夫管分化为附睾、输精管和精囊. 在雌性中, 由于缺少 SRY, 沃尔夫管退化, 卵巢形成, 缪勒氏管发育成输卵管、子宫、子宫颈和阴道上部.

Wnt-4 是缪勒氏管形成的关键, 缺失 Wnt-4 的雌、雄小鼠都没有缪勒氏管. 因此, Wnt-4 突变的雌鼠没有缪勒氏管的派生器官 (即输卵管、子宫、子宫颈和阴道上部), 而沃尔夫管则继续存在<sup>[4]</sup>.

Wnt-4 引发缪勒氏管形成之后的发育可能由 Wnt-7a 进一步调节. 小鼠胚胎发育到 12.5~14.5 天, 其缪勒氏管上皮表达 Wnt-7a, 雄性中缪勒氏管退化后其表达即消失, 但雌性缪勒氏管的派生器官终生都保持有 Wnt-7a 的表达. Wnt-7a 缺失的雄性小鼠缪勒氏管不退化, 可能是由于缺少 MIS 受体. 结果, 由于存在缪勒氏管, Wnt-7a 缺失的雄性小鼠输精管不能正常连接其远端, 精子通路堵塞, 导致不育. 但这种小鼠的睾丸及沃尔夫管派生器官的形态看起来是正常的<sup>[4]</sup>. Wnt-7a 突变的雌性小鼠由于缪勒氏管的派生器官发育异常也不育, 成体雌鼠缺少螺旋状输卵管, 而使子宫成为介于正常子宫和阴道的中间体. 由于卵巢不是缪勒氏管派生而来的, 可以进行正常的卵泡发育、排卵等周期性变化.

Wnt-4 最初在肾管间充质及未分化的性腺中表达. 它在两性未分化的性腺中都表达, 但经过性别特异的分化后, 在雄性性腺中 Wnt-4 表达下降, 而在雌性性腺中一直维持. Wnt-4 缺失的雄性动物其睾丸的发育是不受影响的, 而当发育着的雌性性腺中一旦缺失 Wnt-4 信号, 其结构和功能上都呈现一定的雄性化特征. 在多数病例中, 性腺定位在它们正确的部位, 但其外形比正常的卵巢更圆, 并且像睾丸一样没有包被. 此外, 突变的性腺可以分

泌 MIS 及睾酮。

Wnt-4 突变导致雌性呈现雄性表型, 当其表达增多时则呈现雌性的表型。在人类中, 男性的染色体 1p31~ p35 片段的二倍性导致了 WNT-4 增多, WNT-4 的过量表达使得 DAX1 (SRY 的拮抗分子) 上调, 致使 XY 的男性具有了女性的表型。这说明 WNT-4 可能是一种性别表型的决定基因, 与 DAX1 一起在控制雌性发育及抑制睾丸的形成中起作用<sup>[5]</sup>。

### 3 卵巢不同发育阶段中的 Wnt 信号通路

卵巢是雌性的重要生殖器官, 一方面它提供成熟的卵细胞; 另一方面, 排卵后形成的黄体可以合成类固醇激素, 维持妊娠。在雌性哺乳动物中, 卵母细胞的数量在出生时是固定的, 每个卵母细胞周围有一层原始的颗粒细胞, 颗粒细胞之外还围有一层膜细胞而形成初级卵泡。初级卵泡成批地生长, 但 99% 以上都在开始发育后不久即相继衰萎消亡, 仅有少数卵泡能完全发育并排出成熟的卵子。现在研究表明, Wnt 信号通路在这些过程中起一定的作用。

Wnt-4 在腔前卵泡的颗粒细胞以及排卵前卵泡的颗粒细胞中表达<sup>[6]</sup>, 促黄体激素 (LH) 峰后表达上升, 并在黄体期时达高峰。Wnt-4 可能依赖其不同 Fz 受体而调控颗粒细胞和黄体细胞的不同功能。尽管现在还不清楚哪一种 Fz 受体存在于初级卵泡, 但现在有证据表明, LH 峰后, Fz-1 被短暂地诱导; 在 LH 峰后的 4~ 12 h, 它们定位于排卵卵泡的颗粒细胞上。因此, Fz-1 可能介导调控与排卵相关的基因表达。此外, Fz-4 在黄体中的表达水平很高, 它可能是 Wnt-4 在黄体中的受体。Ricken 等<sup>[7]</sup>近来报道在激素刺激的未成熟大鼠的卵巢中, 颗粒细胞表达 Wnt-2, 但 Wnt-2b 表达于卵巢上皮, 而在颗粒细胞和卵母细胞中没有发现。

Wnt 信号在卵巢的具体功能还不清楚。但结合 Wnt-4 在卵巢和睾丸早期发育中的关键作用, 以及特异的 Wnt 信号表达于不同发育阶段的卵泡, 推测 Wnt 信号通路在卵泡的发育、排卵和黄体化中起重要的作用。

### 4 动情周期及妊娠中的 Wnt 信号通路

子宫是胚胎发育的部位。在哺乳动物中, 特别是啮齿类、灵长类等, 在雌激素和孕激素的作用下子宫具有周期性的变化。并且在妊娠过程中, 子宫

的内膜和基质也发生了一定的变化。现在证明这些变化与 Wnt 信号有一定的相关性。

小鼠子宫中 Wnt-4 及 Wnt-5a 的定位和数量是根据动情周期的时相改变的。Wnt-4 在间情期没有发现, 但在动情前期主要定位于子宫上皮, 而在动情期基质和上皮表达都强烈, 动情后期其表达只限定在邻近腔上皮的基质中。反过来, Wnt-5a 在间情期子宫的基质和上皮都表达, 而在动情前期其表达只限定于基质区域, 尽管在动情期其子宫基质和上皮都表达, 但在动情后期又仅限于基质。Wnt 的这种表达模式表明雌激素可能在其中起了一定的调控作用。Wnt-7a 在动情周期中的表达仅限定于腔上皮, 在间情期和动情后期的表达较高。Wnt-7a 无效突变的小鼠子宫比正常小鼠的小, 并缺少子宫腺体, 间质来源的基质也减少, 这意味着 Wnt-7a 是子宫内膜多种细胞分化所必需的。

在妊娠第四天 09:00 的小鼠子宫中未能发现 Wnt-4<sup>[8]</sup>, 但是从午夜 (24:00) 开始胚泡周围的基质中能检测到其表达, 并在第五天其表达量进一步增加, 此后, 蜕膜中的表达明显增加, 这说明 Wnt-4 可能在蜕膜化过程中起作用。

此外 Wnt 的突变模型也显示了 Wnt 蛋白在胎盘发育过程中起重要作用, 是维持正常妊娠所必需。Wnt-2 突变可以导致胎盘发育异常, 并且胚胎出生前 50% 死亡。Wnt-7b 在绒毛膜的表达是胎盘发育过程中绒毛膜和尿囊融合所必需。Wnt-7b 突变的小鼠由于胎盘发育异常而在妊娠中期死亡。而尿囊绒毛膜融合所需的  $\alpha 4$  整合素在 Wnt-7b 突变的绒毛膜细胞中也不表达。

除了 Wnt 蛋白本身起作用外, Wnt 通路的其他分子在动情周期、胚胎着床及妊娠中也起一定的作用。Fz5 是 Wnt 的一种受体, 敲除以后, 杂合子可存活并能生育, 表型正常。纯合子胚胎发育到 10.25 天时, 在没有观察到任何形态变化之前, 就可以发现在纯合突变胚胎的卵黄囊中, 内皮细胞的增殖明显减少; 到 10.75 天时, 卵黄囊中大血管发育较差, 毛细血管丛紊乱无序。这个阶段, 尽管胚胎发育正常, 但由于缺少血管生成而导致胚胎死亡<sup>[9]</sup>。由此看来, Fz5 可能是卵黄囊血管内皮细胞增殖所必需。sFRP 的同源物 frpHE 表达于人月经周期增生期子宫内膜的基质中, 而在分泌期和经期中难以发现。Fujita 等<sup>[10]</sup>报道在妊娠大鼠的蜕膜细胞中 sFRP-4 表达上升, 并在妊娠 12 天达到高峰。而我们实验室采用恒河猴为实验模型, 发现在着床

点子宫内膜特异表达 sFRP-4 (数据尚未报道). 这些都说明 sFRP 可能在调节子宫基质的增生和蜕膜化中起作用, 为胚泡正常着床及妊娠奠定了基础.

## 5 Wnt 信号通路与乳腺发育

乳腺是一种典型的上皮-间质细胞相互作用而发育成的器官, 并且其发育受激素的调节. 乳腺芽最初在两性中都发育, 但在雄性中由于睾酮的存在而退化. 在整个青春期, 乳腺的上皮导管系统广泛地增生, 在妊娠的后半阶段, 包括雌激素及孕酮在内的激素诱导了新导管的形成, 并且乳腺导管的远端细胞分化成腺泡. 青春期后, 乳腺在每次妊娠中都经历了发育及退化过程.

至少有 6 个 Wnt 基因 (Wnt-4、-5a、-5b、-6、-7a 和 10b) 表达于小鼠的乳腺. 特别是 Wnt-4 和 Wnt-5b 在处女小鼠中表达很低, 但妊娠后表达上升. Bradbury 等将 Wnt-4 基因导入培养的小鼠乳腺上皮细胞, 使其稳定表达, 然后将这种上皮细胞移植到处女小鼠的乳腺中, 待到乳腺发育完好时, 发现 Wnt-4 的表达可使乳腺导管的分枝比正常的更多, 并有一些成熟前的腺泡发育. 这些改变类似于妊娠过程中观察到的结果, 意味着在妊娠早期内源的 Wnt-4 对血液中的激素产生反应, 调节导管的分枝和腺泡的形成.

以下的研究为 Wnt-4 在乳腺发育中的作用提供了进一步的证据. 将 Wnt-4 无效突变小鼠的乳腺芽移植到野生小鼠的乳腺脂肪垫上, 在妊娠 12 天, Wnt-4 突变的植入物比野生型具有较少的乳腺导管分枝, 但到妊娠后期, 两者的分枝数量开始接近. 此结果表明 Wnt 信号通路, 特别是 Wnt-4 在妊娠早期乳腺发育中是必不可少的, 另外也显示了其他的 Wnt 在妊娠后期可能弥补了 Wnt-4 的不足<sup>[11]</sup>.

Cyclin D1 是一种 Wnt 信号通路调控的靶基因, 表达于小鼠整个妊娠期的乳腺中, 能促使乳腺小叶-腺泡生长和分化. Imbert 等<sup>[12]</sup>将持续表达的、缺少 N 端 89 个氨基酸的  $\beta$ -catenin 导入小鼠乳腺, 发现能够诱导腺泡的发育和分化. 这种转基因小鼠的处女型乳腺不适当地表达了 cyclin D1 的 mRNA, 类似于野生型妊娠小鼠的乳腺. 相比于野

生型乳腺在停止泌乳后恢复到处女表型, 转基因乳腺一直处于妊娠中期的状态.  $\beta$ -catenin 的调节蛋白 Axin 具有减弱 cyclin D1 的作用, 当它在乳腺中异常表达时, 转基因的乳腺在性成熟及早期妊娠时可出现正常的导管延伸和分支的过程, 但不能形成小叶-腺泡, 因此不能泌乳<sup>[13]</sup>. 从这些实验可以看到, Wnt 信号在调控乳腺的发育中起着重要的作用, 另外也看出乳腺小叶-腺泡和导管的发育可能是通过不同的调控途径.

## 参 考 文 献

- Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, **11** (5): 547~ 553
- Mao B, Wu W, Davidson G, *et al.* Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Nature*, 2002, **417** (6889): 664~ 667
- Mao B, Wu W, Li Y, *et al.* LDL-receptor related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, 2001, **411** (6835): 321~ 325
- Parr B A, McMahon A P. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature*, 1998, **395** (6703): 707~ 710
- Jordan B K, Mohammed M, Ching S T, *et al.* Up regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet*, 2001, **68** (5): 1102~ 1109
- Hsieh M, Johnson M A, Greenberg N M, *et al.* Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology*, 2002, **143** (3): 898~ 908
- Ricken A, Lochhead P, Kontogiannina M, *et al.* Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology*, 2002, **143** (7): 2741~ 2749
- Paria B C, Ma W G, Tan J, *et al.* Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (3): 1047~ 1052
- Ishikawa T, Tamai Y, Zorn A M, *et al.* Mouse Wnt receptor gene *Fzd5* is essential for yolk sac and placental angiogenesis. *Development*, 2001, **128** (1): 25~ 33
- Fujita M, Ogawa S, Fukuoka H, *et al.* Differential expression of secreted frizzled-related protein 4 in decidual cells during pregnancy. *J Mol Endocrinol*, 2002, **28** (3): 213~ 223
- Brisken C, Heineman A, Chavarria T, *et al.* Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev*, 2000, **14** (6): 650~ 654
- Imbert A, Eelkema R, Jordan S, *et al.* Delta N89  $\beta$ -catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland. *J Cell Biol*, 2001, **153** (3): 555~ 568
- Hsu W, Shakya R, Costantini F. Impaired mammary gland and lymphoid development caused by inducible expression of Axin in transgenic mice. *J Cell Biol*, 2001, **155** (6): 1055~ 1064

## Wnt Signaling Pathways in Mammalian Reproduction\*

SUN Xiao-Yang, WANG Yan-Ling\*\*

(The State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** Wnts, its receptors and regulators compose complex signaling pathways to regulate cell differentiation, and thus play important roles in the developmental processes. Recent studies have shown that Wnt signaling pathways are also involved in the development of reproductive system such as the formation of Mullerian duct and its derivatives, the development of ovarian follicles and mammary gland during pregnancy, ovulation and luteinization, and the establishment of a normal pregnancy.

**Key words** Wnt, Wnt signaling pathway, mammal, reproduction

---

\* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research Project (G1999055903) and The Knowledge Innovation Project of The Chinese Academy of Sciences (KSCX-2-SW-201).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-62631832, E-mail: wangyl@panda.ioz.ac.cn

Received: September 16, 2002 Accepted: December 27, 2002