

SWAP-70 在小鼠正常动情周期和围植入期 子宫中的表达及其调节*

刘 璟 李斐雪 李玉侠 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 SWAP-70 是鸟苷酸交换因子家族成员之一, 是 PI3K 介导的酪氨酸磷酸化受体下游通路的信号分子之一. 以往的研究及我们的前期工作初步表明它在小鼠子宫和恒河猴胚胎植入位点有高表达, 提示此分子可能参与了胚胎植入的调节. 为此, 本研究在小鼠模型中, 采用原位杂交、免疫组化和半定量 RT-PCR 方法, 系统地研究了 SWAP-70 在妊娠初始期胚胎植入位点、妊娠期子宫和动情周期子宫中的表达及其受雌、孕激素的调节. 结果表明 SWAP-70 在植入位点有非常显著的高表达, 其 mRNA 和蛋白分布于胚泡以及对系膜侧的腔上皮细胞和临近胚泡的子宫基质细胞, 而在非植入位点表达强度很弱; 在妊娠第 7 天和第 9 天的母胎界面上, 滋养层巨细胞、迷走滋养层和海绵滋养层都维持较强的 SWAP-70 表达; 正常动情周期中, SWAP-70 在动情期子宫中表达明显上调; 卵巢切除模型显示雌激素显著上调 SWAP-70 的表达, 孕激素能够阻断雌激素的作用. 以上结果提示, SWAP-70 可能参与胚胎植入过程中多种细胞行为的调节, 如胚泡黏附、基质细胞的增殖与蜕膜化以及滋养层细胞的浸润和分化过程, 同时在动情周期子宫内膜细胞功能调控中发挥一定作用.

关键词 SWAP-70 子宫 围植入期 动情周期 小鼠

SWAP-70 分子是从小鼠 B 淋巴细胞中分离出来的一个与免疫球蛋白重链类型转换相关的蛋白质, 分子质量为 70 ku^[1]. 它在活化的 B 细胞核内以及未成熟的肥大细胞胞质中大量表达, 参与了 B 细胞的活化以及肥大细胞的活化、迁移和黏附等行为^[2-4]. 从 SWAP-70 的蛋白质结构上看, 它具有 DNA 结合域, 因而能参与细胞核内事件; 同时它还有一个 Dbl homology (DH) 结构域和一个 pleckstrin homology (PH) 结构域, 这两种结构域在胞质和细胞膜的信号转导中具有重要作用^[1,5,6]. 最近的研究表明, SWAP-70 是鸟苷酸交换因子(GEFs)家族的成员之一, 依赖 PI3K 介导 Rac 蛋白的激活, 即将 Rac 分子由结合 GDP 的非活性形式(GDP-Rac)转换为结合 GTP 的活性形式(GTP-Rac)^[5],

GTP-Rac 蛋白则在细胞迁移、细胞黏附以及细胞生长等多种细胞行为中扮演重要角色^[7].

有关 SWAP-70 基因在生殖系统中功能的报道非常少, Borggreffe 等^[1]对 SWAP-70 基因在小鼠 22 种不同组织中进行特异性表达分析, 证实此分子在子宫和早期胚胎中有相对较强的表达, 提示 SWAP-70 可能参与雌性生殖功能的调节. 近来, 我们通过抑制性消减杂交(SSH)筛选恒河猴胚胎植入初始期植入位点差异基因的表达谱, 发现 SWAP-70 基因在恒河猴植入位点有十分显著的上调表达^[8]. 由此我们推测该分子可能在胚胎植入和/或妊娠维持过程中发挥一定的作用.

基于上述事实, 本工作在小鼠模型中, 系统研究了 SWAP-70 在动情周期子宫以及围植入期植入位点、

2006-04-03 收稿, 2006-05-19 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划(批准号: G1999055903)和中国科学院知识创新工程重要方向(批准号: KSCX-2-SW-201)资助项目

** 通讯作者, E-mail: wangyl@ioz.ac.cn

子宫和胎盘中的表达模式,同时利用卵巢摘除模型研究了雌、孕激素对该分子表达的调节,以探讨 SWAP-70 在小鼠子宫功能调节和胚胎植入中的作用。

1 材料与方 法

1.1 动物处理及取材

成年 CD-1 小鼠(5—6 周龄, 25—30 g)购自北京维通利华实验动物公司,饲养温度在 25℃左右,光照周期为 12L:12D,自由采食、饮水。实验组一,选取无交配史的雌性小鼠,阴道涂片检测情期^[9],分别于动情前期、动情期、动情后期和间情期处死动物,收集子宫;每一情期至少取 3 只动物。实验组二,选取至少有两个连续 4 d 周期的雌性小鼠,与成年雄鼠交配,以出现阴栓的当天作为妊娠第 1 天;部分小鼠于妊娠第 5 天 6:00—7:00 尾静脉注射 1%伊文思蓝染料 0.1 mL, 3 min 后断颈处死动物,分别收集蓝色的植入点和未着色的非植入点子宫组织^[10];另一部分于妊娠第 7 天和第 9 天 6:00—7:00 处死,收集植入点子宫组织;每一妊娠阶段至少取 3 只动物。实验组三,对 12 只雌性小鼠行卵巢切除术,术后 2 周接受皮下注射性激素,分别为:17- β 雌二醇(E_2)处理(E 组, 200 ng/只·d),孕酮(P_4)处理(P 组, 1 mg/只·d), E_2/P_4 合并处理(EP 组, E_2 200 ng+ P_4 1 mg/只·d)和对照溶剂油组(C 组, 100 μ L 花生油/只·d);每一处理组包含 3 只小鼠;连续注射 3 d,在最后一次注射 24 h 后收集子宫^[11]。

所有材料收集后立即置于液氮内冷冻并随后置于-80℃保存。部分组织经 4%多聚甲醛固定 12 h 后,常规脱水、浸蜡、包埋,在石蜡切片机(Leica, 德国)上制备 6 μ m 切片。

1.2 总 RNA 的提取和半定量 RT-PCR

按照 TRIzol 试剂(Gibco BRL)说明书提取小鼠子宫组织中总 RNA。取 1 μ g 总 RNA,在 20 μ L 反应体系中用 oligo(d)T 引物(Promega)和 Super-Script II 逆转录酶(Gibco BRL)进行逆转录反应,获得 cDNA 产物。根据 NCBI 数据库提供的小鼠 SWAP-70 基因的 cDNA 序列设计特异 PCR 引物,引物序列为 5'-CCGCCAATGAAAACAAGC-3'(上游)和 5'-AAGACTCTTCCCTCCAGCAACC-3'(下游),以 1 μ L cDNA 为模板进行 PCR 反应,扩增条

件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s, 53.5℃ 30 s, 72℃ 30 s 扩增 25—30 个循环;72℃ 延伸 7 min。小鼠 SWAP-70 cDNA 预期扩增长度为 339 bp。反应产物经 1.8%琼脂糖凝胶电泳,以 Gel-Pro 软件(Unit-ed Gene 公司)进行灰度分析。扩增结果以相同起始模板的管家基因 GAPDH 的扩增产物进行校正。

1.3 原位杂交探针的制备

如上所述扩增小鼠 SWAP-70 cDNA 片段,扩增产物经 QIAquick Spin 层析柱(QIAGEN 公司)纯化后,连接至 pGEM-T easy 载体(Promega)并经测序确认。重组质粒用 *Sal* I 或 *Nco* I 限制性内切酶(Promega)酶切,并经凝胶电泳回收纯化后,采用 DIG-RNA 标记试剂盒(ENZO DIAGNOSTICS 公司)分别标记正义与反义探针,以 0.1 μ g/ μ L 的浓度储存于-80℃备用。

1.4 原位杂交

参照文献[12]的方法。石蜡组织切片经常规脱蜡、水合,在 2×SSC 溶液中于 70℃变性后,用 4 μ g/mL 蛋白酶 K(Gibco BRL)处理,随后经 4%多聚甲醛固定和 0.5%乙酰酐溶液乙酰化;切片在预杂交液(50% 甲酰胺, 20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA, 0.5 mg/mL tRNA Coli, 100 mmol/L DTT)中于 58℃预杂交 4 h 后,加入地高辛标记探针于 58℃杂交 18 h。杂交后经 SSC 缓冲液洗涤,用 0.5%封闭剂(Boehringer Mannheim)封闭,与碱性磷酸酶偶联的地高辛抗体(1:500)孵育后,以 NBT 和 BCIP (Boehringer Mannheim)为底物显色;常规脱水封片。阴性对照是用正义探针代替反义探针进行杂交。

1.5 免疫组织化学

参照文献[12]的方法。石蜡组织切片经常规脱蜡水合,于 pH 6.0 的枸橼酸盐缓冲液中热修复;用 1% H_2O_2 室温孵育以消除内源性过氧化物酶活性;加入特异性兔抗鼠 SWAP-70 抗体^[1](1:500;美国 Mount Sinai 医学院 Rolf Jessberger 博士赠送)4℃孵育过夜。用辣根过氧化物酶标记的 Polymer (DAKO Envision™ 试剂盒提供)室温孵育,再经 DAB 显色;苏木精复染,常规脱水,树脂封片。阴性对照是用非免疫正常兔血清代替特异性抗体。

1.6 数据统计

所有实验均用不同批次采集的样本重复至少3次; RT-PCR 扩增产物的灰度值经 GAPDH 校正后, 以平均值 \pm SD 表示相对灰度, 经 ANOVA 统计分析, $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 SWAP-70 在小鼠动情周期子宫中的表达模式

原位杂交和免疫组化检测 SWAP-70 表达的结

果基本相符。

小鼠子宫中 SWAP-70 的 mRNA 和蛋白水平在动情期达到高峰, 在腔上皮、腺体上皮和基质细胞中均有强烈表达, 子宫肌层中亦有一定量的表达; 至动情后期表达水平显著降低; 在间情期和动情前期保持中等水平的表达, 主要分布于腔上皮和腺上皮细胞, 一些基质细胞中也有阳性信号, 但肌肉层中表达均较少(图 1(a)–(h))。

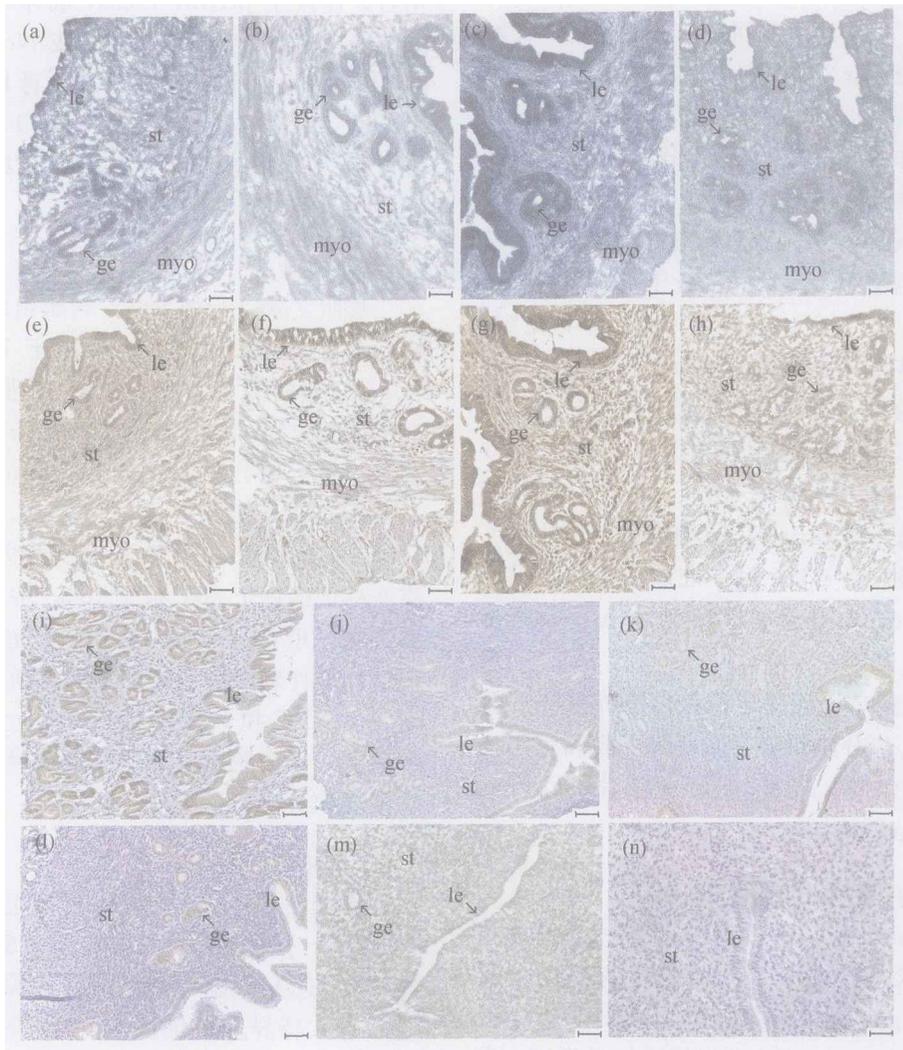


图1 SWAP-70 在正常和卵巢摘除小鼠子宫中的表达

(a)–(d), 原位杂交显示 SWAP-70 mRNA 在小鼠间情期(a)、动情前期(b)、动情期(c)和动情后期(d)子宫中的表达; (e)–(h), 免疫组化显示 SWAP-70 在小鼠间情期(e)、动情前期(f)、动情期(g)和动情后期(h)子宫中的表达; (i)–(l), 免疫组化显示 SWAP-70 在卵巢摘除小鼠经雌二醇(i)、孕酮(j)、雌二醇和孕酮合并(k)以及对照溶剂油(l)处理后的子宫中的分布; (m) 正义核酸探针杂交的阴性对照; (n) 正常兔血清代替 SWAP-70 抗体的阴性对照。标尺 = 40 μ m。

ge, 腺上皮; le, 腔上皮; myo, 肌肉层; st, 基质

2.2 雌孕激素对小鼠子宫SWAP-70基因表达的调节

对卵巢切除的小鼠加以雌、孕激素处理, 半定量 RT-PCR 结果表明, SWAP-70 的 mRNA 在卵巢切除小鼠子宫中呈现一定的基础水平表达; 雌二醇能显著诱导其 mRNA 的表达, 水平达到对照组的约 2.1 倍; 孕酮本身对 SWAP-70 的基础表达没

有影响, 但它可以部分阻断雌二醇的作用(图 2).

免疫组织化学的结果显示 SWAP-70 蛋白在卵巢切除小鼠子宫中主要位于腺体上皮和腔上皮细胞中, 仅在个别基质细胞中有分布. 免疫阳性信号的强度变化与半定量 RT-PCR 检测到的 mRNA 表达变化相一致(图 1(i)–(l)).

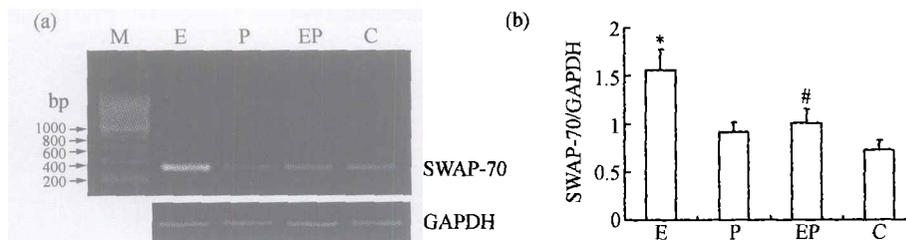


图 2 半定量 RT-PCR 显示雌、孕激素对卵巢摘除小鼠子宫中 SWAP-70 mRNA 表达的调节

(a) RT-PCR 结果显示 SWAP-70 mRNA 在雌二醇处理组(E)、孕酮处理组(P)、雌二醇和孕酮合并处理组(EP)以及对照溶剂油组(C)子宫中的表达; (b)根据 3 次独立实验结果进行的 ANOVA 统计分析结果. 电泳结果经灰度扫描并经 GAPDH 灰度值校正后, SWAP-70 的相对灰度值以平均值 \pm SD 表示, *, 与对照溶剂油组相比 $p < 0.01$; #, 与雌二醇处理组相比, $p < 0.01$

2.3 SWAP-70 在小鼠围植入期植入位点、子宫和胎盘中的表达模式

原位杂交和免疫组化检测 SWAP-70 表达的结果基本相符.

妊娠第 5 天, 即胚胎植入发生初始, SWAP-70 mRNA 和蛋白在胚胎植入位点有显著表达, 强阳性信号主要定位于胚泡、对系膜侧的子宫腔上皮细胞以及胚泡周围的基质细胞, 而在远离胚泡的未分化子宫基质细胞中信号相对较弱(图 3(a), (b), (d), (e)); 在非植入位点 SWAP-70 表达强度很弱, 信号主要分布在腔上皮和腺上皮细胞(图 3(c), (f)).

妊娠第 7 天的母胎界面上, SWAP-70 强烈表达于胚胎和滋养层巨细胞中(图 3(g), (j)), 至第 9 天, 强阳性信号分别位于迷走滋养层和海绵滋养层细胞中(图 3(h), (k)). 母体子宫的蜕膜细胞中亦有中度阳性信号, 但子宫肌层中信号较弱(图 3(k)).

3 讨论

本文通过原位杂交、免疫组织化学和半定量 RT-PCR 等方法研究了 SWAP-70 在小鼠妊娠早期植入位点和母胎界面以及动情周期子宫中的表达变化, 并通过卵巢摘除小鼠模型研究了雌孕激素对该

分子在子宫中表达的调节. 这一工作是基于前期研究基础上开展的, 即发现 SWAP-70 在恒河猴妊娠初始的植入位点有显著的上调表达^[8]. 在小鼠模型中的这一研究是揭示该分子在雌性生殖过程中作用的重要基础.

近年来的研究表明 SWAP-70 蛋白是一种鸟苷酸交换因子(GEFs), 参与了 PI3K 介导的酪氨酸磷酸化受体的下游信号通路, 主要作用于 Rac 蛋白^[5]. Rac 是 Rho 家族小 G 蛋白(Rho GTPase)的成员之一, 能够参与细胞的极性调节、细胞黏附、生长、运动和细胞骨架重组等生理过程, 还可能参与肿瘤细胞的浸润和转移^[13]. 细胞内 Rac 蛋白有两种存在形式: 结合 GTP 的活性形式与结合 GDP 的无活性形式. 在信号转导过程中, 活性与非活性 Rac 的循环转变是通过 GEFs 调节的, 因而 GEFs 的表达和活性调节是 Rac 介导的信号通路中重要的控制步骤^[14]. Shinohara 等^[5]的研究证实 SWAP-70 是 Rac 蛋白的 GEF, 在一些具有酪氨酸激酶受体的生长因子诱导下, SWAP-70 通过其 DH 结构域与 PIP3 结合, 具有催化活性的 PH 结构域与 Rac 蛋白结合, 促使 Rac 蛋白上 GDP 释放并结合 GTP, 从而激活 Rac, 进一步引发下游信号级联.

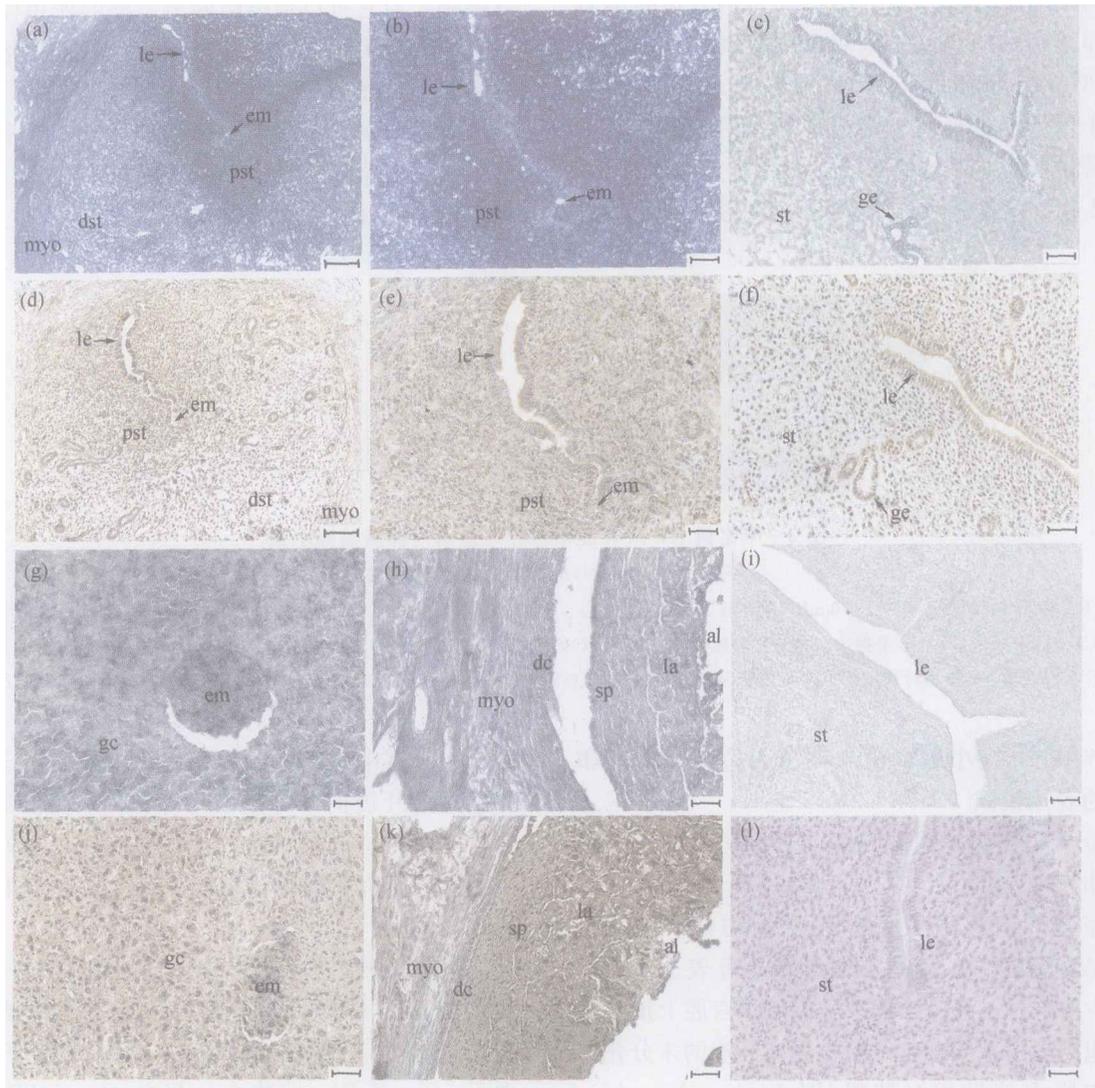


图3 SWAP-70 在妊娠不同阶段小鼠植入位点、子宫和胎盘中的表达

(a)–(f), 原位杂交(a–c)和免疫组化(d–f)显示 SWAP-70 在妊娠第5天小鼠植入位点(a, b, d, e)和非植入位点(c, f)的表达; (b)为(a)的局部放大, (e)为(d)的局部放大, (a)和(d)的标尺 = 100 μm; (b), (c), (e)和(f)的标尺 = 40 μm; (g)和(h), 原位杂交显示 SWAP-70 在小鼠妊娠第7天(g)和第9天(h)母胎界面的表达, 标尺 = 40 μm; (i), 正义核酸探针杂交的阴性对照, 标尺 = 40 μm; (j)和(k) 免疫组化显示 SWAP-70 在小鼠妊娠第7天(j)和第9天(k)母胎界面的表达, 标尺 = 40 μm; (l)正常兔血清替代 SWAP-70 抗体的阴性对照, 标尺 = 40 μm. al, 尿囊层; dc, 蜕膜细胞; dst, 远离植入胚泡的子宫基质; em, 胚胎; gc, 滋养层巨细胞; ge, 腺上皮; la, 迷走滋养层; le, 腔上皮; myo, 肌肉层; pst, 植入胚泡周围的子宫基质; sp, 海绵滋养层; st, 基质

胚胎植入和妊娠是复杂而精密的过程, 涉及母体子宫与胚胎细胞间的相互作用以及细胞增殖、分化、凋亡、黏附、迁移与浸润等多种细胞行为. 本工作发现 SWAP-70 分子在胚胎植入早期母胎界面上有特异的分布, 推测这一分子及其参与的 Rac 信号通路可能与上述细胞行为的调节密切相关. 小鼠胚胎与子宫内膜黏附并开始浸润发生于妊娠第 4.5 天^[10]. 此时,

胚泡表层的一部分滋养外胚层细胞分化为具有浸润能力的初级滋养层巨细胞, 引导胚泡植入母体子宫^[15]. 在此转化过程中, 滋养外胚层细胞需要发生极化, 细胞表面的整合素和 E-cadherin 分布改变^[16,17], 同时细胞骨架发生重组, 使滋养层细胞形成伪足, 这对胚泡黏附并进一步侵入于子宫内膜至关重要^[18]. Rac 是调节细胞骨架的重要分子, 活化的 Rac 可以使细胞产生

板状伪足和细胞膜褶皱,促进细胞的运动和迁移能力^[7,13];并且Rac可以与整合素以及E-cadherin相互作用^[19,20],调节细胞的黏附能力.本研究发现SWAP-70的mRNA和蛋白在小鼠胚胎植入发生初始的胚泡中有很强信号,结合David等^[21]的发现,即Rac在胚泡中的表达模式与滋养外胚层细胞的极化相关,我们推测植入初期,胚泡中的SWAP-70可能通过激活Rac来调节滋养外胚层细胞的骨架变化,参与胚泡的黏附反应.

小鼠胚胎植入发生于子宫对系膜侧,植入位点的基质细胞增殖并分化成为蜕膜细胞,形成初级蜕膜带^[22].蜕膜细胞对成功的胚胎植入起到关键性的作用,但是关于蜕膜化过程中细胞周期事件的启动和调控机理尚不十分清楚^[22,23].Tan等^[23]的研究表明调节细胞G1期的关键分子cyclin D3和cdk4共表达于初级蜕膜带,与P21和cdk6等共同参与基质细胞的增殖和蜕膜化调控.已有的研究证实Rac可以通过调控cyclin D和P21等分子的表达^[24],诱导细胞G1期的启动以及DNA的合成^[25],在细胞周期调控中起重要作用.本工作中发现SWAP-70在小鼠妊娠第5天植入位点胚泡周围的子宫基质细胞中有显著上调,而这些细胞即将分化为初级蜕膜带,这一结果暗示SWAP-70可能通过调节Rac活性诱导细胞G1期的启动,参与基质细胞增殖与蜕膜化的过程.

随着胚胎植入的进行,滋养层细胞开始大量增殖和分化,至妊娠第9—10天,小鼠胎盘发育完全,由滋养层巨细胞分化而来的迷走滋养层中具有大量的褶皱和分支,是与母体血管交换营养和气体的部位;海绵滋养层中主要有母体血管穿过^[15,18].已有的研究发现,滋养层巨细胞的伸突活性(protrusive activity)对于其浸润子宫基质、形成血窦、吞噬凋亡的蜕膜细胞有重要作用^[18,26].Caron等^[27]发现Rac激活可诱导细胞形成伪足,促进细胞的伸突活性,对细胞吞噬作用必不可少.另有研究发现Rac可调节滋养层巨细胞的细胞骨架和细胞运动能力的变化,参与滋养层巨细胞的分化过程^[28].与上述结果相应的是,本研究发现小鼠妊娠第7天和第9天的母胎界面上,SWAP-70高水平表达于滋养层巨细胞、迷走滋养层和海绵滋养层,提示SWAP-70在滋养层细胞中也可能通过激活Rac蛋白来实现

对分化和运动能力的调控.

此外,SWAP-70在小鼠子宫中也有特异的周期性变化,即在动情期达到高峰,在动情后期降低,至间情期和动情前期有所回升.小鼠子宫的结构及功能伴随卵巢激素水平的改变发生着周期性的变化,已知血清中的雌激素水平在动情期最高,到动情后期降低,间情期和动情前期又有所升高;孕酮水平则在动情后期达到最高,在间情期迅速下降^[29].上述事实暗示SWAP-70的表达可能受到雌孕激素的调节.这一推测在摘除卵巢的小鼠模型得到证实,即雌激素能显著上调SWAP-70在子宫中的表达,而孕酮能够部分阻断雌激素的作用.可见SWAP-70是性类固醇激素(尤其是雌激素)的靶分子,这也暗示它可能参与子宫周期性变化的调节.已有的研究表明,子宫进入动情期伴随着细胞形态结构和新陈代谢的改变^[30],其中上皮细胞的形态改变包括顶端微绒毛的收缩和细胞边缘形成突触^[31],这些变化涉及到细胞骨架蛋白的重组.Tan等^[32]曾通过基因芯片技术分析小鼠动情期与间情期子宫的基因表达谱差异,发现肌球蛋白、微管蛋白、Tektin等多个细胞骨架蛋白分子在动情期有差异表达;最近的研究发现SWAP-70可以与肌动蛋白纤维(F-actin)作用并调节细胞骨架的变化^[33,34].子宫上皮细胞中的SWAP-70是否能通过与某些细胞骨架蛋白相互作用,调节动情周期子宫细胞的形态变化,是值得深入探讨的问题.

总之,本文报道了SWAP-70在小鼠子宫和母胎界面的表达模式及性激素对其表达的调节,是进一步探讨此分子在雌性生殖系统中功能的重要基础.

致谢 作者感谢美国Mount Sinai医学院Dr. Rolf Jessberger提供的SWAP-70抗体.

参 考 文 献

- 1 Borggreffe T, Wabl M, Akhmedov, et al. A B cell specific DNA recombination complex. *J Biol Chem*, 1998, 273(27): 17025—17035
- 2 Masat L, Caldwell J, Armstrong R, et al. Association of SWAP-70 with the B cell antigen receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(5): 2180—2184
- 3 Brigitte Grossl, Borggreffe T, Jessberger R, et al. SWAP-70-deficient mast cells are impaired in development and IgE-mediated

- degranulation. *Eur J Immunol*, 2002, 32: 1121—1128
- 4 Sivalenka R R, Jessberger R. SWAP-70 Regulates c-kit-induced mast cell activation, cell-cell adhesion, and migration. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(23): 10277—10288
 - 5 Shinohara M, Terada Y, Iwamatsu A, et al. SWAP-70 is a guanine nucleotide exchange factor that mediates signaling of membrane ruffling. *Nature*, 2002, 416(6): 759—763
 - 6 Borggrefe T, Masat L, Jessberger R, et al. Cellular, intracellular, and developmental expression patterns of murine SWAP-70. *Eur J Immunol*, 1999, 29: 1812—1822
 - 7 Hall A. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, 1994, 10: 31—54
 - 8 李斐雪, 孙晓阳, 王雁玲. 恒河猴植入位点差异基因筛选及蛋白激酶 H11 的克隆. *自然科学进展*, 2005, 15(1): 53—59
 - 9 Nelson J F, Felicio L S, Randall P K, et al. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice. I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Bio Reprod*, 1982, 27(2): 327—339
 - 10 Paria B C, Huet-Hudson Y M, Dey S K. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 10159—10162
 - 11 Kurita T, Lee K J, Cooke P S, et al. Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor and lactoferrin by progesterone in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 2000, 62(4): 831—838
 - 12 Qin L, Wang Y L, Bai S X, et al. Temporal and spatial expression of integrins and their extracellular matrix ligands at the maternal-fetal interface in the rhesus monkey during pregnancy. *Biol Reprod*, 2003, 69(2): 563—571
 - 13 Arndt A P, Eve-Ellen G, Benjamin B, et al. Rho GTPases: Signaling, migration, and invasion. *Exper Cell Res*, 2000, 261: 1—12
 - 14 Heidi W, John C, Stephens R, et al. Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Letters*, 2003, 546: 93—97
 - 15 Cross J C. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2000, 11: 105—113
 - 16 Wang J, Mayernik L, Armant D R. Integrin signaling regulates blastocyst adhesion to fibronectin at implantation; Intracellular calcium transients and vesicle trafficking in primary trophoblast cells. *Dev Biol*, 2002, 245: 270—279
 - 17 Fleming T P, Sheth B, Fesenko I. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophoblast differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front Biosci*, 2001, 6: 1000—1007
 - 18 Ann Sutherland. Mechanisms of implantation in the mouse: Differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. *Dev Biol*, 2003, 258: 241—251
 - 19 GrandeGarcial A, Echarril A, DelPozo M A. Integrin regulation of membrane domain trafficking and Rac targeting. *Biochem Soc Tran*, 2005, 33(4): 609—613
 - 20 Evers E E, Zondag G C M, Malliri A. Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *E J Cancer*, 2000, 36: 1269—1274
 - 21 David R N, Andrew J W. Rac-1 and IQGAP are potential regulators of E-cadherin-catenin interactions during murine preimplantation development. *Mech Dev*, 2002, 119S: S21—S26
 - 22 Dey S K, Lim H, Das S K, et al. Molecular cues to implantation. *Endo Rev*, 2005, 25(3): 341—373
 - 23 Tan J, Raja S, Davis M K, et al. Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation. *Mech Dev*, 2002, 111: 99—113
 - 24 Kevin P, Channing J D. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Letters*, 2001, 171: 1—10
 - 25 Olson M F, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, 1995, 269: 1270—1272
 - 26 Martin P M, Sutherland A E. Exogenous amino acids regulate trophoblast differentiation through an mTOR-dependent pathway. *Dev Biol*, 2001, 240: 182—193
 - 27 Caron E, Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*, 1998, 282: 1717—1721
 - 28 Mana M P, Sean A, Ann E S. Trophoblast giant-cell differentiation involves changes in cytoskeleton and cell motility. *Dev Biol*, 2001, 230: 43—60
 - 29 Fata J E, Chaudhary V, Khokha R. Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle. *Biol Reprod*, 2001, 65(3): 680—688
 - 30 Burroughs K D, Fuchs-Young R, Davis B, et al. Altered hormonal responsiveness of proliferation and apoptosis during myometrial maturation and the development of uterine leiomyomas in the rat. *Biol Reprod*, 2000, 63: 1322—1330
 - 31 Paria B C, Jeff Reese, Das S K, et al. Deciphering the cross-talk of implantation; Advances and challenges. *Science*, 2002, 296(21): 2185—2188
 - 32 Tan Y F, Li F X, Wang Y L, et al. Global gene profiling analysis of mouse uterus during the oestrous cycle. *Reproduction*, 2003, 126(2): 171—182
 - 33 Hilpela P, Oberbanscheidt P, Hahne P, et al. SWAP-70 identifies a transitional subset of actin filaments in motile cells. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(8): 3242—3253
 - 34 Ihara S, Oka T, Fukui Y. Direct binding of SWAP-70 to non-muscle actin is required for membrane ruffling. *J Cell Sci*, 2006, 119: 500—507