

去整合素基质金属蛋白酶 19 抑制人正常胎盘来源滋养层细胞的浸润能力 *

赵美蓉¹⁾ 仇 巍¹⁾ 李玉侠¹⁾ SANG Qing-Xiang²⁾ 王雁玲^{1)**}

(¹⁾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;

²⁾Department of Chemistry and Biochemistry and Institute of Molecular Biophysics, Florida State University, Tallahassee, FL 32306, USA)

摘要 去整合素基质金属蛋白酶 19(ADAM-19)是新近发现的 ADAMs 家族成员, 在胎盘组织中有较高水平的表达, 但其在胎盘发生过程和滋养层细胞浸润中的功能还是未知的. 我们以人正常胎盘来源的细胞滋养层细胞(NPC)为体外模型, 利用基因转染、RT-PCR、蛋白质印迹、免疫组织化学及细胞浸润分析等手段, 证实 ADAM-19 在人胎盘组织中有特异表达, 存在于多种滋养层细胞中; 转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)可以显著上调 NPC 细胞中 ADAM-19 的表达, 呈现剂量依赖性; 过表达 hADAM-19 可使 NPC 细胞中 MMP-9 的 mRNA 和蛋白质表达下调, 并降低细胞的浸润能力. 研究表明, 人滋养层细胞中存在 ADAM-19 表达的旁分泌调节机制, 而 ADAM-19 在调节滋养层细胞浸润中发挥一定作用. 这一结果为阐明 ADAM-19 在胎盘发生中的功能提供了新的科学资料.

关键词 去整合素基质金属蛋白酶 19, 人正常滋养层细胞系, 细胞浸润, 转化生长因子 $\beta 1$

学科分类号 Q492

去整合素基质金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase, ADAM)家族是一类跨膜蛋白, 属于含锌蛋白酶超家族. ADAMs 家族的蛋白质都包含一个去整合素结构域和一个基质金属蛋白酶(MMPs)结构域, 其细胞内结构域可以与多种信号分子相结合, 引发信号转导. ADAMs 分子的功能较为广泛, 可对一些膜锚定蛋白进行加工切割, 还可参与介导细胞粘附、细胞膜融合^[1,2]、细胞迁移^[3]的调节等.

人 ADAM-19(hADAM-19)也称为 adamalysin-19 或 meltrin β , 是新近发现的 ADAM 家族成员^[4], 可以在多种组织和细胞中表达, 特别在胎盘、心脏、脑、肺、脾脏、膀胱、阑尾等一些组织中有较高水平的表达^[5], 它还被认为是免疫系统树突状细胞分化的标志分子^[4].

与其他 ADAM 分子相类似, hADAM-19 分子也包含信号肽、前导肽、MMPs 结构域、去整合素结构域、富含半胱氨酸结构域、表皮生长因子样结构域、跨膜结构域和细胞内结构域. 在其前导肽中含有一个半胱氨酸开关, MMPs 结构域中含有 Zn 离子结合位点. 关于 hADAM-19 功能的推测大

都基于对其结构的分析, 也有体外研究表明, hADAM-19 可以作为激活的 MMPs 分子, 加工巨球蛋白 2-macroglobulin^[3]. 基因敲除实验表明, ADAM-19 纯合缺陷的小鼠在围产期(妊娠 18~22 天)死于心血管发育不全^[6]. 随后进一步的研究发现, ADAM-19 通过蛋白质加工过程调节 ErbB 功能, 从而参与心脏发育^[7]. 新近的研究还发现, ADAM-19 可以抑制多种肿瘤细胞的迁移, 而这种作用是通过 ADAM-19 的去整合素结构域与整合素 $\alpha 4 \beta 1$ 和 $\alpha 5 \beta 1$ 的相互作用实现的^[8].

已知 hADAM-19 在胎盘组织中呈现高表达^[5], Wang 等^[9]的研究亦表明, ADAM-19 在恒河猴的母胎界面上也有特异的时空表达, 并存在于多种类型的胎盘滋养层细胞中, 提示 ADAM-19 可能参与胚胎植入母胎“对话”过程中滋养层细胞的行为调节. 然而迄今关于 hADAM-19 在人滋养层细胞中的功能尚未见报道.

* 国家自然科学基金资助项目(30530760).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64807195, E-mail: wangyl@ioz.ac.cn

收稿日期: 2007-06-15, 接受日期: 2007-09-07

在哺乳动物中, 成功的妊娠是母胎之间精确“对话”的结果. 胚胎植入和胎盘发生过程中的障碍将直接导致妊娠相关疾病, 如习惯性流产、先兆子痫、葡萄胎乃至绒毛膜上皮癌等. 目前普遍认为, 来源于母体子宫、胚胎或卵巢的多种激素、生长因子和细胞因子等相互协调作用, 调节胚胎植入“窗口”的开启和滋养层细胞的行为. 其中母体蜕膜来源的转化生长因子 β (TGF- β) 是一个多功能的分子, 参与滋养层细胞增殖、凋亡、分化和浸润等多种行为的调节, 被认为是胚胎植入和胎盘发生过程中关键的生长因子之一^[10~12].

基于以上事实, 我们就 hADAM-19 在人胎盘中的分布状况及其对人滋养层细胞浸润行为的影响进行了研究, 并探讨了 TGF- β 1 对 hADAM-19 表达的调节. 这些研究将有助于我们深入了解 hADAM-19 在胚胎植入和胎盘发生过程中的功能.

1 材料和方法

1.1 人正常胎盘细胞滋养层细胞系 (NPC) 培养

正常胎盘细胞滋养层细胞系(NPC)为 Li 等^[13, 14]建立, 培养方法参照 Li 等的报道, 即在培养皿中预先涂布 I 型胶原(Cellmatrix Type I -A, 日本), 接种细胞后加入的生长培养基为 F-12/DMEM (1 : 1) 添加 10 μ g/L 表皮生长因子(EGF, Sigma 公司)、10 μ g/L 胰岛素(Sigma 公司)、0.1% BSA 和 2×10^{-3} mol/L 谷氨酰胺(Sigma 公司), 于 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 每 24 h 更换新鲜培养液. 细胞每 7 天按照 1 : 3 的比例传代一次.

对 TGF β 1 处理组, 细胞接种 24 h 后更换为不含 EGF 的培养基, 并分别加入 0 μ g/L、1 μ g/L、10 μ g/L、50 μ g/L 的 TGF β 1(Sigma 公司), 于处理 24 h 后分别收集细胞, 提取 RNA 和蛋白质进行分析.

1.2 人胎盘组织的收集及石蜡切片的制作

人正常妊娠 6~7 周胎盘组织取自北京海淀医院计划生育门诊, 孕妇在妊娠终止前没有接受特别的药物处理; 所获取的绒毛组织用磷酸缓冲液(PBS)漂洗后, 在 4%多聚甲醛溶液中固定 8~10 h, 经 50%、70%、95%及无水乙醇逐级脱水、二甲苯透明后, 于 58℃浸蜡过夜, 次日更换石蜡并继续浸蜡 4 h, 然后包埋. 在转轮石蜡切片机 (Leica, 德国) 上制备 6 μ m 切片, 并贴附于载玻片上.

1.3 免疫组织化学

石蜡切片经常规脱蜡和水合, 在 pH 6.0 的枸

橐酸盐缓冲液中进行抗原热修复, 经 1% H₂O₂、0.5%牛血清白蛋白(BSA)处理后, 加入兔抗人 hADAM-19 抗体^[15](1 : 500), 4℃孵育过夜. 用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1 : 500, Santa Cruz 公司)室温孵育 30 min 后, 加入底物联苯二氨(DAB)显色. 苏木精复染细胞核后, 常规脱水封片, 显微镜观察并照相. 阴性对照用免疫前兔 IgG 代替 hADAM-19 抗体进行上述反应.

1.4 荧光免疫细胞化学

NPC 细胞在丙酮: 无水乙醇(1 : 1)溶液中固定 15 min 后, 用 1% BSA 室温封闭 30 min, 加入兔抗人 hADAM-19 抗体, 4℃孵育过夜, 加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1 : 100, Santa Cruz Biotech) 37℃ 孵育 30 min, 最后用 PI 染核 2 min, 甘油封片, 于激光共聚焦扫描显微镜下(Leica) 观察分析照相. 阴性对照以兔 IgG 代替 hADAM-19 抗体进行反应.

1.5 外源基因的瞬时转染

NPC 细胞按照 2×10^6 皿接种于直径 60 mm 的培养皿中常规培养, 24~36 h 后, 细胞生长至 60%~80% 汇合率. 依 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)的说明书方法进行基因转染. 简言之, 在一管中将 4 μ g hADAM-19/pCR3.1 质粒或 pCR3.1 质粒与 250 μ l 无抗生素的 DMEM 培养基混和, 在另一管中将 5 μ l Lipofectamine 2000 与 250 μ l 无抗生素的 DMEM 培养基混和. 随后将 2 管试剂轻轻混匀并于室温放置 20~30 min. 将待转染的细胞用 PBS 缓冲液洗 2 次, 更换新鲜的培养液, 将质粒与 Lipofectamine 2000 的混合液逐滴缓慢加入培养细胞中, 培养 6 h 后, 换为正常的生长培养基继续培养 24~48 h.

1.6 细胞和组织内总 RNA 的提取和半定量 RT-PCR

总 RNA 的提取按照 Trizol 试剂(Gibco BRL)说明进行. 所提取的总 RNA 经紫外分光光度计定性、定量后, 取 1 μ g 作为模板, 加入随机六聚体引物 (Promega 公司) 和 M-M μ LV 反转录酶 (Fermentas)进行反转录反应.

根据 NCBI GenBank 中提供的 cDNA 序列, 用 Omega 软件设计特异引物(引物序列见表 1), 并由 Invitrogen 公司合成. 25 μ l PCR 反应体系中包含: 2 μ l 反转录产物, 200 μ mol/L dNTPs, 2 mmol/L MgCl₂, 1 U Taq 酶和 10 pmol 引物. 预实验中, 分别于 18, 21, 24, 27, 30, 33 循环中吸取 2 μ l 反

应产物, 经 2%琼脂糖凝胶电泳, 选取能够获得特异扩增条带, 并且反应循环数最低者为半定量 PCR 扩增条件. 经上述预实验选取的 PCR 反应条件见表 1.

凝胶电泳经成像和灰度扫描后, 用 Gel-Pro Analyzer 软件 (United Bio., USA) 分析, 以相同起始模板量的 GAPDH 扩增产物为内参照, 计算特异扩增产物的相对灰度值.

Table 1 The primer sequences and reaction conditions for RT-PCR

Gene name	Sequence of primers	Annealing temperature/℃	Length of PCR product/bp	Number of cycle
MMP-9	Forward 5' CCC TTC TAC GGC CAC TAC TGT G 3' Backward 5' GCA CTG CAG GAT GTC ATA G 3'	58	612	30
MMP-2	Forward 5' CAC CTA CAC CAA GAA CTT CC 3' Backward 5' AAC ACA GCC TTC TCC TCC TG 3'	57	378	29
hADAM-19	Forward 5' CCAGAAGTACCATGACAACG3 3' Backward 5' ACACTCTTCCCCATCTTCC 3'	58	396	28
GAPDH	Forward 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3' Backward 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'	55	452	22

1.7 蛋白质印迹分析

在培养的细胞中加入 200 μl 裂解液(20 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液, 含 1 mmol/L DTT、0.2% NP40、100 μmol/LPMSF、5 mg/Laprotinin、leupeptin 和 trypsin inhibitor 等蛋白酶抑制剂), 置于冰上 20 min 后吸出裂解液, 4℃, 13 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清于-20℃保存备用.

制备 10%的 SDS-PAGE, 20 μg 蛋白质样品与样品缓冲液混合, 100℃变性 5 min 后点样并电泳, 随后电转移过夜. 将转移后的膜用 5%的脱脂奶粉封闭 0.5 h, 加一抗室温孵育 2 h, 所用抗体为兔抗人 ADAM-19 抗体、鼠抗人 actin 抗体(1 : 1 000; Neomarker 公司), 用含 0.1% Tween-20 的脱脂奶粉洗膜 3 次, 分别加辣根过氧化物酶标 记的羊抗兔 IgG 或兔抗鼠 IgG (1 : 2 000 Santa Cruz Biotechnology)室温孵育 1 h, 按照 ECL 检测试剂盒 (Pierce 公司)说明进行显色、曝光、X 光片冲洗. 将 X 光片透视扫描后, 印迹的灰度值经 Gel-Pro Analyzer 软件分析 (UnitedBio 公司), 并以 actin 的灰度值作为内参进行结果的均一化处理, 得到 ADAM-19 的相对灰度值.

1.8 Transwell insert 细胞浸润分析

细胞浸润分析在预先铺有 I 型胶原的细胞小室 (Transwell insert; Costar 公司)中进行. Transwell insert 的底部是有 8 μm 小孔的滤膜, 将小室置于 24 孔细胞培养板内, 并铺设 80 mg/L I 型胶原 (Cellmatrix Type I -A, 日本). 小室内分别接种 2×10⁴

NPC 细胞、转染 pCR3.1 质粒的 NPC 细胞和转染 hADAM19-pCR3.1 质粒的 NPC 细胞, 在小室和下部的 24 孔细胞培养板内均加入无血清的 FD 培养基, 培养细胞 24~36 h. 实验结束时, 取出培养小室, 将滤膜上层的细胞用棉棒轻轻擦去, 对下层细胞行苏木精染色. 在光学显微镜下观察并照相. 随机选取 5 个视野, 计数细胞作为浸润细胞量.

1.9 统计分析

免疫组化、RT-PCR、蛋白质印迹分析和细胞浸润实验均采用不同实验批次的标本重复 3 次. RT-PCR 产物的量经 GAPDH 校正, 蛋白质印迹结果经 Actin 校正, 相对灰度以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 根据 3 次实验结果进行 ANOVA 统计分析, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结 果

2.1 hADAM-19 在人胎盘滋养层细胞中的表达

利用免疫组织化学分析了 hADAM-19 在人正常妊娠 6~7 周龄绒毛组织中的表达. 结果表明, hADAM-19 主要分布在多种滋养层细胞中, 包括细胞滋养层细胞(vctb)、合体滋养层细胞(st)和滋养层细胞柱(ct), 其阳性信号不仅定位于细胞质中, 在细胞核内也有分布(图 1a).

我们同时对 NPC 细胞中 hADAM-19、TGFβ 受体(TβR I 和 TβR II)及其信号通路相关分子 (Smad2 和 Smad4)的表达情况进行了检测. 荧光免疫细胞化学分析显示, NPC 细胞可产生一定水平

的 hADAM-19 (图 1bA); 细胞膜上有 T β R I (图 1bB) 和 T β R II (图 1bC) 的分布, 在细胞质内有 Smad2 的阳性染色 (图 1bE), 细胞质和细胞核内均有 Smad4 阳性信号 (图 1bD).

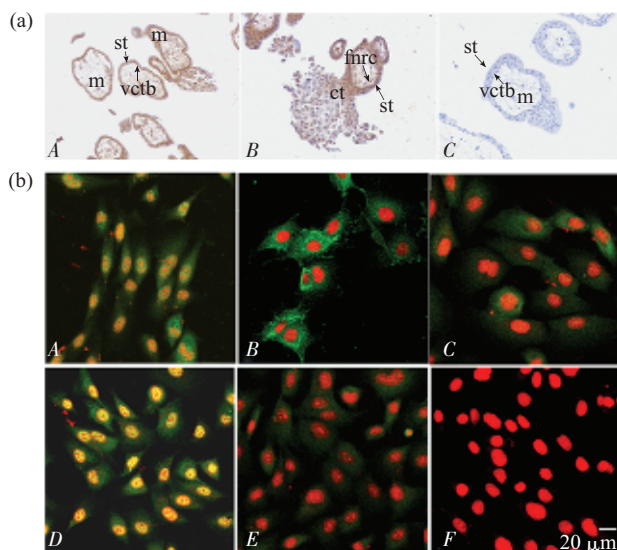


Fig. 1 Immunohistochemical assay and immunofluorescence to demonstrate the existence of hADAM-19, T β R I / II, Smad2/4 in NPC cells and human placenta at the 7th week of gestation

(a) Immunohistochemical assay to show the distribution of hADAM-19 in human placenta villi at the 7th week of gestation. A and B, hADAM-19 staining; C, negative control; vctb, villous cytotrophoblast cells; ct, column trophoblasts; st, syncytiotrophoblast cells; m, mesenchymal cells; fnrc, fetal nucleated red cells inside the villous capillaries. Original magnification: $\times 200$. (b) Immunofluorescence to demonstrate the existence of hADAM-19 (A), T β R I (B), T β R II (C), Smad2 (E), and Smad4 (D) in NPC cells. F, negative control. Green color indicates immunostaining for certain molecule, and red color represents staining of nuclei with PI.

2.2 hADAM-19 基因在 NPC 细胞中的过表达

通过基因瞬时转染, 将含有 hADAM-19 cDNA 的表达质粒导入 NPC 细胞中, 将其命名为 ADAM19/NPC, 以转染了 pCR3.1 质粒载体的 NPC 细胞 (pCR3.1/NPC) 为阴性对照. 结果显示, ADAM19/NPC 细胞中 hADAM-19 的蛋白质水平得到显著提高, 较 pCR3.1/NPC 细胞增加了约 1.4 倍 (图 2).

2.3 hADAM-19 对 NPC 细胞浸润性的影响

以 Transwell insert 浸润分析方法检测细胞浸润能力的变化. 结果表明, 正常 NPC 细胞和 pCR3.1/NPC 细胞的浸润能力没有显著区别, 但 ADAM19/NPC 细胞的浸润能力有一定的下降, 其浸润指数

约为 pCR3.1/NPC 细胞的 70% (图 3).

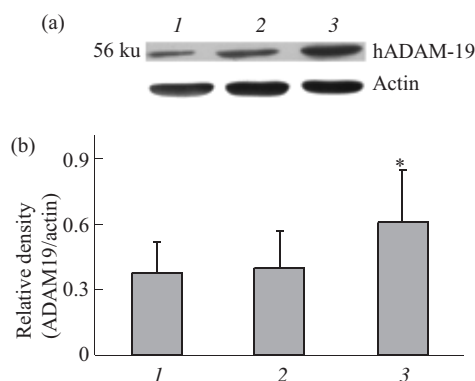


Fig. 2 Western blot analysis to show the expression of hADAM-19 in NPC cells

pCR3.1/NPC, NPC cells transfected with pCR3.1 plasmid; hADAM19/NPC, NPC cells transfected with pCR3.1 plasmid containing hADAM-19 cDNA. (a) A typical result of Western blotting. (b) Statistical analysis according to three independent experiments. The density of hADAM-19 was normalized by that of actin in the same blotting, and the relative density was shown as $\bar{x} \pm s$. * Compared with pCR3.1/NPC, $P < 0.05$. 1: NPC; 2: pCR3.1/NPC; 3: hADAM19/NPC.

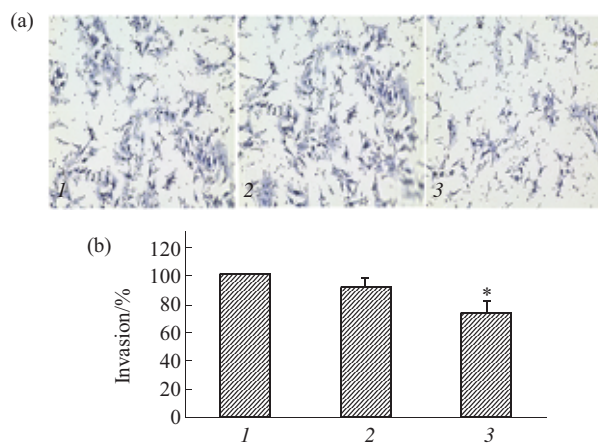


Fig. 3 Transwell invasion assay to show the influence of hADAM-19 on NPC cell invasion

(a) A typical result of invasion assay. (b) Statistical analysis by ANOVA for the transwell invasion assay. The invaded cells in 5 random fields per well were counted, and the experiment was repeated for at least three times. 1: NPC cells; 2: pCR3.1/NPC cells; 3: hADAM19/NPC cells.

* Compared with B, $P < 0.05$.

进一步利用半定量 RT-PCR 方法检测了细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的变化. 结果显示, 在 ADAM19/NPC 细胞中 MMP-9 和 MMP-2 的 mRNA 水平均有下调, 与 pCR3.1/NPC 细胞相比, 分别下降了约 60% 和 40% (图 4).

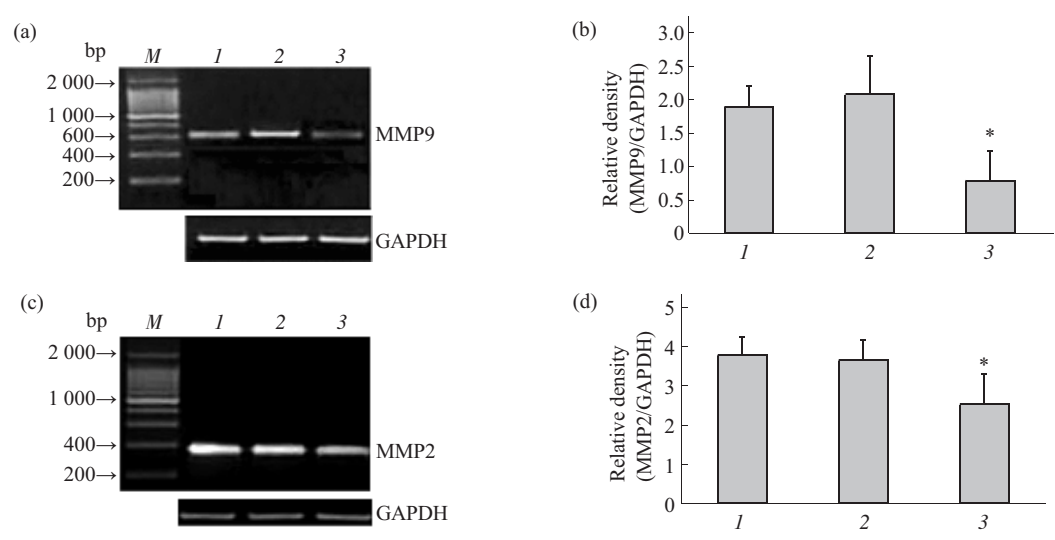


Fig. 4 RT-PCR analysis to determine the expression of MMP-2 and -9 in NPC cells

(a) and (c), Typical results of RT-PCR. (b) and (d), Statistical analysis by ANOVA for the semi-quantitative RT-PCR according to three independent experiments. The value of MMP-2, MMP-9 was normalized by that of GAPDH, and the relative amount was presented as $\bar{x} \pm s$. 1: NPC cells; 2: pCR3.1/NPC cells; 3: hADAM19/NPC cells; M, DNA markers. * Compared with 1 and 2, $P < 0.05$.

2.4 TGF- β 1 对 NPC 细胞表达 ADAM-19 的调节

NPC 细胞经不同剂量 TGF- β 1 处理后, 以半定量 RT-PCR 和蛋白质印迹分析 ADAM-19 表达水平的变化, 结果显示, TGF- β 1 可以上调 NPC 细胞中 hADAM-19 mRNA 和蛋白质的表达, 呈现剂量依

赖性. 其作用的最有效剂量是 10 μ g/L, 使 hADAM-19 mRNA 和蛋白质水平分别达到对照组的 2.8 倍和 4 倍, 高剂量 TGF- β 1(50 μ g/L)仍可上调 ADAM-19 mRNA 的表达, 但并不影响其蛋白质表达(图 5).

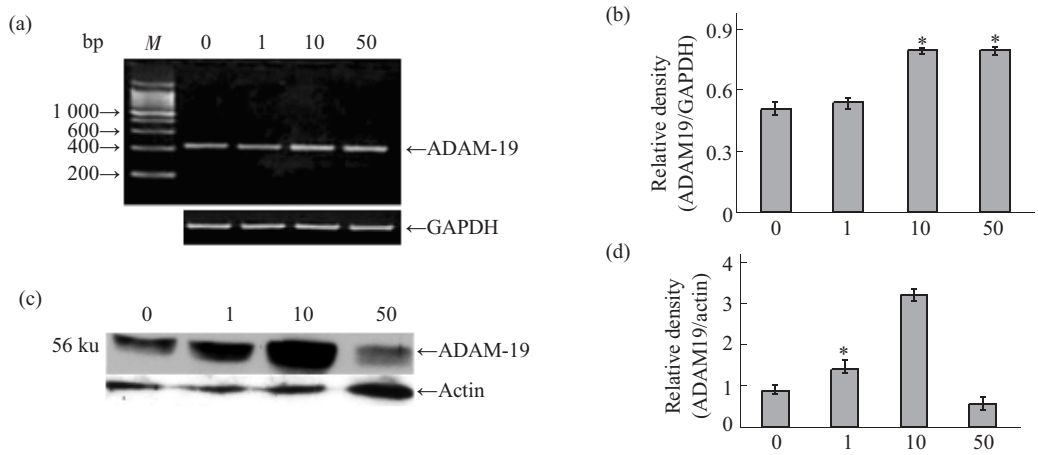


Fig. 5 Semi-quantitative RT-PCR and Western blot analysis to manifest the dose-dependent regulation of hADAM-19 expression by TGF- β 1 in NPC cells

0, 1, 10, 50 represents RT-PCR products using cDNA of the NPC cells treated by 0, 1, 10 and 50 μ g/L TGF- β 1, separately. (a) Products of a typical RT-PCR were subjected to 2% agarose gel electrophoresis. (b) Statistical analysis by ANOVA for the semi-quantitative RT-PCR according to three independent experiments. The value of ADAM-19 was normalized by that of GAPDH, and the relative amount was presented as $\bar{x} \pm s$. * Compared with the value of 0, $P < 0.05$. (c) A typical result of Western blotting. (d) Statistical analysis by ANOVA for the Western blotting according to three independent experiments. The value of ADAM-19 was normalized by that of actin, and the relative amount was presented as $\bar{x} \pm s$. * Compared with the value of 0, $P < 0.05$.

3 讨 论

与 ADAMs 家族的其他分子一样, ADAM-19 为跨膜蛋白, 细胞外部分具有基质金属蛋白酶结构域和去整合素结构域, 在其胞内段结构域中有一个 SH3 配体结合位点, 可以进行信号转导. ADAM-19 结构的复杂性提示它可能是一个多功能的分子, 参与多种细胞行为的调节.

我们的研究发现, hADAM-19 在人妊娠早期胎盘的多种滋养层细胞中都有表达, 如绒毛滋养层、合体滋养层和滋养层细胞柱等, 提示这一分子可能参与胎盘发生过程中滋养层细胞某些行为的调节. 进而, 我们以 NPC 细胞作为体外研究模型, 以期了解 hADAM-19 在人滋养层细胞中的功能. NPC 细胞是我们从妊娠早期胎盘组织中分离并稳定建系的, 以往的研究表明, 此细胞保持了人正常细胞滋养层细胞的大部分功能和对生长因子的反应性, 是研究滋养层细胞行为调控的理想模型^[13-15]. 利用基因转染手段在 NPC 细胞中过量表达 hADAM-19, 导致 NPC 细胞的浸润能力有所下降, 相应的, 细胞中 MMP-9 和 MMP-2 的 mRNA 水平明显下调. 这些结果证实 hADAM-19 在人滋养层细胞中具有抑制浸润的作用. 最近的研究发现, ADAMs 细胞外的 MMPs 结构域具有切割某些蛋白质的功能^[16,17], 这种切割作用是蛋白质翻译后加工的一种方式, 称为“蛋白质外结构域切割 (protein ectodomain shedding)”. 被 ADAMs 加工的分子中, 最常见的是一些膜锚定的细胞因子和生长因子, 它们在细胞的自分泌或旁分泌调节中发挥重要作用, 目前研究最多的是表皮生长因子受体 (EGFR) 的配体分子. 如 ADAM-10, -12, -17 都可以通过蛋白质外结构域切割的方式加工某些膜锚定的 EGFR 配体, 使相应的膜锚定配体分子变为激活形式而参与信号的调节. 已发现 ADAM-19 在体外可以加工多种 EGFR 的配体分子, 如 neuregulin^[17]、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、肝素结合 EGF (HB-EGF) 等. 在胚胎植入和胎盘发生过程中, 母胎界面上有大量生长因子和细胞因子参与调节滋养层细胞的功能, 其中多种 EGFR 配体 (如蜕膜来源的 EGF、TGF- α 和 HB-EGF 等) 发挥关键的作用. 此外, 有体外研究显示, TNF- α 可抑制滋养层细胞浸润, 并下调 MMP-9 和 MMP-2 的表达^[18]. 上述事实提示, ADAM-19 也可能在滋养层细胞中通过蛋白质外结构域切割的方式加工某些细胞因子和生长因子, 以

实现对滋养层细胞浸润功能的调节.

最近, Huang 等^[8]的研究发现, ADAM-19 可以抑制 CHO 细胞的迁移, 而这种抑制作用是通过其去整合素结构域与整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 和 $\alpha 4 \beta 1$ 的相互作用介导的^[8]. Damsky^[19]在人滋养层细胞中的研究发现, 层粘蛋白 (LN) 或 IV 型胶原可以与其受体整合素 $\alpha 1 \beta 1$ 相互作用而促进细胞浸润, 而纤粘蛋白 (FN) 与整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 结合可以抑制滋养层细胞浸润, 表明细胞外基质及其受体整合素的相互作用对于滋养层细胞浸润促进与浸润抑制的平衡有重要的意义. 目前, 我们还无法判断在人滋养层细胞中 hADAM-19 是否通过与某些整合素 (如 $\alpha 5 \beta 1$) 的相互作用参与滋养层细胞浸润的调节, 这仍然有待于更深入而细致的研究.

妊娠过程中, TGF- $\beta 1$ 主要来源于子宫蜕膜, 是滋养层细胞增殖、黏附和浸润等多种行为的重要调节因子, 已有研究表明它能够抑制滋养层细胞浸润并促进细胞黏附^[11,12]. 本研究首次发现, TGF $\beta 1$ 可以促进人滋养层细胞表达 hADAM-19, 一方面表明人胎盘滋养层细胞中存在 hADAM-19 表达的旁分泌调节, 另一方面提示 hADAM-19 可能是 TGF- $\beta 1$ 调节滋养层细胞浸润和黏附的效应分子之一.

综上所述, 本文首次报道了 hADAM-19 在人胎盘中的分布及其在人类滋养层细胞浸润中的功能, 并探讨了 TGF- $\beta 1$ 对 hADAM-19 表达的调节. 这是进一步阐明 hADAM-19 在胚胎植入和胎盘发生过程中所起作用的重要资料.

参 考 文 献

- 1 Blobel C P, Wolfsberg T G, Turck C W, *et al.* A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*, 1992, **356** (6366): 248~252
- 2 Cho C, Bunch D O, Faure J, *et al.* Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science*, 1998, **281** (5384): 1857~1859
- 3 Seals D F, Courtneidge S A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & Development*, 2003, **17** (1): 7~30
- 4 Fritsche J, Moser M, Faust S, *et al.* Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase and production of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. *Blood*, 2000, **96** (2): 732~739
- 5 Wei P, Zhao Y G, Zhuang L, *et al.* Expression and enzymatic activity of human disintegrin and metalloproteinase ADAM19/meltrin beta. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **280** (3): 744~755
- 6 Zhou H M, Weskamp G, Chesneau V, *et al.* Essential role for ADAM-19 in cardiovascular morphogenesis. *Molecular and Cellular*

- Biology, 2004, **24** (1): 96~104
- 7 Kurohara K, Komatsu K, Kurisak T, *et al.* Essential roles of Meltrin beta (ADAM-19) in heart development. *Development Biology*, 2004, **267**(1): 14~28
 - 8 Huang J, Bridges L C, White J M. Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members. *Mol Biol Cell*, 2005, **16**(10): 4982~4991
 - 9 Wang H X, Zhao Y G, Wang H M, *et al.* Expression of adamalysin 19/ADAM19 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) during early pregnancy. *Mol Hum Reprod*, 2005, **11**(6): 429~435
 - 10 Graham C H, Lysiak J J, McCrae K R, *et al.* Localization of transforming growth factor- β at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol Reprod*, 1992, **46** (4): 561~572
 - 11 Zhao M R, Qiu W, Li Y X, *et al.* Dual effect of TGF β 1 on cell adhesion and invasion in human normal placenta trophoblast cells. *Reproduction*, 2006, **132** (2):333~341
 - 12 Zhao M R, Chen Z Q, Qiu W, *et al.* Regulation of E-cadherin by TGF β 1 in human normal placenta cytotrophoblast cells. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, **33**(5): 492~499
 - 13 Li R H, Luo S Y, Zhuang L Z. Establishment and characterization of cytotrophoblast cell line from normal placenta of human origin. *Human Reproduction*, 1996, **11**(6): 1328~1333
 - 14 Li R H, Zhuang L Z. The effects of growth factors on human normal placental cytotrophoblast cell proliferation. *Human Reproduction*, 1997, **12** (4): 830~834
 - 15 Karmakar S, Das C. Regulation of trophoblast invasion by IL-1 β and TGF- β 1. *Am J Reprod Immunol*, 2002, **48** (4): 210~219
 - 16 Shirakabe S, Wasuda T, Kurisaki A, *et al.* Roles of Meltrin β /ADAM19 in the processing of neuregulin. *J Biol Chem*, 2001, **276** (12): 9352~9358
 - 17 Blobel C P. ADAMs key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**(1): 32~43
 - 18 Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, **89** (2): 812~822
 - 19 Damsky C. Cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion receptors. *Annals of New York Academy of Sciences*, 2002, **961**:154~155

Effect of Adamalysin-19 on Cell Invasiveness in Human Trophoblast Cell Line NPC*

ZHAO Mei-Rong¹⁾, QIU Wei¹⁾, LI Yu-Xia¹⁾, SANG Qing-Xiang²⁾, WANG Yan-Ling^{1)**}

¹⁾ State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ Departments of Chemistry and Biochemistry and Institute of Molecular Biophysics, Florida State University, Tallahassee, FL 32306, USA)

Abstract Human ADAM-19 is a newly identified member of ADAM family, and is highly expressed in human placenta. But its functions in human trophoblast cells invasion have yet to be elucidated. A well-accepted human trophoblast cell model, NPC cell line, was used as *in vitro* model to investigate the influence of hADAM-19 on cell invasion in human trophoblasts. The regulation of hADAM-19 expression by transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) was investigated by RT-PCR and Western blotting. It was shown that over-expression of hADAM-19 in NPC cells led to down-regulation of MMP-9, MMP-2 mRNA expression and decrease in cell invasion. In NPC cells, the expression of hADAM-19 was significantly up-regulated by TGF- β 1 in a dose-dependent manner. The data indicated that there existed paracrine regulation of ADAM-19 in human placenta. ADAM-19 was involved in invasion-inhibiting regulation of human trophoblast cells, and it may function, at least in part, through coordination with various MMPs.

Key words adamalysin-19, human cytotrophoblast cell, cell invasion, transforming growth factor β 1

* This work was supported by a grant from The National Nature Science Foundation of China (30530760).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64807195; E-mail: wangyl@ioz.ac.cn

Received: June 15, 2007 Accepted: September 7, 2007