

TGF- β 1 对人正常胎盘滋养层 细胞表达 E-钙粘素的调节*

赵美蓉¹⁾ 陈志强²⁾ 仇巍¹⁾ 李玉侠¹⁾ 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 100080;

(²⁾湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128)

摘要 E-钙粘素是在胚胎发育中最早表达的分子之一, 它可以与 Catenin 家族成员形成钙粘素/Catenin 复合物参与多种细胞功能, 对于胚胎植入和胎盘发生具有重要作用. 通过 RT-PCR、免疫组织化学、细胞粘附分析等方法, 在人正常妊娠和输卵管妊娠母胎界面上, 发现 E-钙粘素主要定位于绒毛滋养层细胞和滋养层细胞柱, 从滋养层细胞柱近端向远端, 其蛋白质水平逐渐降低. 正常胎盘组织中 E-钙粘素水平在妊娠早期较高, 妊娠中期直至分娩期均维持低水平. 在体外培养的人正常胎盘细胞滋养层细胞系 (NPC 细胞) 中, 转化生长因子 β (TGF β 1) 显著上调 E-钙粘素蛋白和 mRNA 的表达, 并呈现时间和剂量依赖性, 同时, TGF β 1 促进 NPC 细胞之间的粘附. 上述结果表明, 胎盘中存在 E-钙粘素的旁分泌调节机制, E-钙粘素可通过调节滋养层细胞粘附而参与细胞浸润的有节制调控.

关键词 E-钙粘素, 人滋养层细胞, 细胞粘附, 转化生长因子 β

学科分类号 Q492

钙粘素家族是由多基因编码的跨膜糖蛋白, 主要介导 Ca^{2+} 依赖的细胞间粘附, 对于胚胎发育、组织形成和维持成体细胞的分化状态有重要作用. 该家族可分为 I 型钙粘素和 II 型钙粘素亚家族, 其中 I 型主要包括 E-钙粘素, N-钙粘素和 P-钙粘素^[1].

E-钙粘素广泛表达于上皮细胞, 其分子质量为 120~130 ku. 它主要通过和细胞内 Catenin 蛋白的相互作用形成钙粘素/Catenin 复合物, 从而介导细胞间连接, 加强细胞粘附^[2]. 近年来的研究表明, E-钙粘素还参与介导细胞内信号通路, 是调节细胞生长状态的一类重要分子^[3]. 基因剔除 E-钙粘素的纯合小鼠在胚胎发育早期不能形成有功能的滋养外胚层, 在胚胎植入过程中胚胎死亡, 而基因剔除杂合型和野生型小鼠则发育正常, 表明 E-钙粘素在胚胎发育和植入过程中可能起重要作用^[4,5].

胚胎植入过程中, 胚胎外围的滋养外胚层细胞与子宫内膜识别粘附后, 分化成具有快速增殖能力的细胞滋养层细胞 (CTB), 它们突破合体滋养层细胞 (STB) 的包绕, 形成细胞滋养层柱 (CC), 其远端的细胞分化为具有高度浸润能力的绒毛外滋养层细

胞 (EVT), 实现对母体子宫的浸润. 已有的研究发现, 在人胚胎植入的母胎界面上, E-钙粘素主要表达于细胞滋养层细胞和滋养层细胞柱的近端, 随着滋养层细胞浸润能力的加强, 滋养层细胞柱远端和浸润型 EVT 细胞中 E-钙粘素表达水平显著下调^[6,7]. 在人绒毛膜上皮癌组织中, E-钙粘素水平较正常绒毛组织明显降低. 这些研究提示 E-钙粘素可能参与胚胎植入过程中滋养层细胞粘附和浸润的调节^[8]. 在肿瘤细胞中的研究表明, 下调 E-钙粘素的表达可提高胃癌细胞的浸润能力^[9], 而 E-钙粘素发生基因突变或甲基化水平改变也能引起肿瘤细胞浸润能力的提高^[10]. 类似的机制是否发生在人滋养层细胞中, 尚未得到证实.

滋养层细胞向母体子宫内膜的浸润过程受到来源于母体及滋养层细胞分泌的激素、细胞因子和生长因子等的精确调控, 其中转化生长因子 β 1 (TGF β 1) 是来源于母体蜕膜组织的重要因子之一^[11].

*国家自然科学基金资助项目 (30370542 和 30530760).

** 通讯联系人. Tel: 010-62631832, E-mail: wangyl@ioz.ac.cn

收稿日期: 2005-12-09, 接受日期: 2006-02-27

已有研究表明, TGF β 能通过抑制基质金属蛋白酶(MMP-2、-9)、上调 MMPs 的组织抑制因子(TIMPs)的表达, 从而抑制滋养层细胞的浸润^[12]. 在绒毛膜上皮癌细胞系(JEG-3)中发现, TGF β 1 可以上调 E-钙粘素的表达, 提高细胞的粘附能力^[13]. 但由于缺乏人正常滋养层细胞模型, 有关 TGF β 是否能够调节人正常滋养层细胞中 E-钙粘素分子的表达, 从而影响细胞的粘附和浸润能力, 尚未得到系统的研究.

本研究则利用我们自己建立的人正常细胞滋养层细胞系(NPC)模型^[14], 研究了 TGF β 1 对 E-钙粘素的表达调节, 以及对细胞粘附能力的影响, 旨在探讨 E-钙粘素参与人类滋养层细胞有节制浸润的调控机理.

1 材料和方法

1.1 人胎盘组织的收集

人正常胎盘组织取自北京海淀医院妇产科. 正常妊娠妇女在妊娠终止前没有接受特别的药物处理. 胎盘组织的妊娠周龄以患者主诉的月经周期记录为参照, 并通过形态学观察和病理检查作鉴定. 所获取的组织一部分立即放入液氮中冻存, 用于提取 RNA 和蛋白质, 另一部分按照下述方法固定后用于免疫组织化学.

1.2 输卵管妊娠母胎界面标本的收集

输卵管妊娠母胎界面标本由芬兰 Oulu 大学医院病理系提供, 其妊娠周龄是根据病人主诉末次月经, 结合超声波检查和病理分析来确定的.

1.3 石蜡切片的制备

正常胎盘组织和输卵管妊娠母胎界面组织用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后, 在 4%多聚甲醛溶液中固定 8~16 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, 美国)上制备 6 μ m 切片, 并贴附于载玻片上.

1.4 免疫组织化学

免疫组织化学参照 Qin 等^[15]所描述的方法进行. 石蜡切片经常规脱蜡和水合, 在 pH 6.0 的枸橼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 E-钙粘素抗体(Santa Cruz), 4℃孵育过夜. 用辣根过氧化物酶标记 Polymer(DAKO Envision™ 试剂盒提供, 丹麦 DAKO 公司)室温孵育 30 min 后, 加入底物联苯

二氨(DAB)显色, 苏木素复染细胞核后, 常规脱水封片, 显微镜观察并照相. 阴性对照用免疫前免 IgG 代替 E-钙粘素抗体进行上述反应.

1.5 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^[14]建立, 培养方法参照 Li 等的报道, 即在培养皿中预先铺上 I 型胶原(Cell Matrix, 日本), 所用的条件培养基为 F-12/DMEM (1:1) 并添加 10 μ g/L 表皮生长因子(EGF, Sigma Chemical Co)、10 mg/L 胰岛素(Sigma Chemical Co)、0.1% BSA 和 2 mmol/L 谷氨酰胺(Sigma Chemical Co), 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 1 μ g/L、10 μ g/L、50 μ g/L 的 TGF β 1, 于培养 0 h、0.5 h、1 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 后收集细胞, 提取 RNA、蛋白质进行分析.

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. 妊娠 6 周、7 周、8 周、9 周、26 周和足月的胎盘组织中加入适量 Trizol 试剂, 用电动匀浆器(Kinematika, Switzerland)打碎, 培养细胞中直接加入适量 Trizol 试剂. 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-MLV 反转录酶(Fermentas 公司)进行反转录反应.

根据 GenBank 提供的 cDNA 序列, 参照 Das 等^[13]的报道, 设计特异的 PCR 引物, 分别为: 5' GCT GTT CTT CAC GTGCTC AAAATCC 3'(E-钙粘素上游), 5' GCC AAG CAG CAGTACATTCTACACGG 3'(E-钙粘素下游); 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'(GAPDH 上游), 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'(GAPDH 下游). 25 μ l PCR 反应体系中包含: 2 μ l 的反转录产物, 200 μ mol/L dNTPs, 2 mmol/L MgCl₂, 1 U Taq 酶和 10 pmol 引物. E-钙粘素扩增条件为: 94℃变性 15 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 循环 30 次; GAPDH 扩增条件为: 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 循环 22 次. 循环数是通过预实验确定的, 以确保 PCR 扩增在指数增长期. E-钙粘素的扩增片段为 346 bp, GAPDH 为 452 bp. PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳, 紫外下凝胶成像, 并用 Gel-Pro

Analyzer软件分析(United Bio., USA).

1.7 蛋白质印迹分析

向妊娠 6 周、7 周、8 周、9 周、26 周和足月的胎盘组织样品中加入适量裂解液(含蛋白酶抑制剂) 400 μ l, 于冰上用电动匀浆器(Kinematika, Switzerland)打碎, 培养的细胞中加入适量裂解液, 置于冰上 20 min. 吸出裂解液, 4℃离心, 13 000 r/min, 20 min, 吸上清, -20℃保存备用. 制备好 10%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 20 μ g 蛋白质样品与上样缓冲液混合, 100℃变性 5 min 后点样并电泳. 电泳结束后, 按滤纸-凝胶-硝酸纤维膜-滤纸顺序装置 4℃电转过夜. 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 E-钙粘素(1:1 000, 购于美国 Santa Cruz 公司), 鼠抗人抗体 actin(1:1 000, 购于美国 Neomarker 公司). 用含 0.1% Tween-20 的脱脂奶粉洗膜 3 次, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、兔抗鼠 IgG(1:2 000)室温孵育 1 h, 洗膜后按照 ECL 免疫检测试剂盒(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, 印迹的灰度值经灰度分析软件(UnitedBio, 美国)分析, 并以 actin 的灰度值作为内参进行结果均一化处理, 得到相对灰度值.

1.8 细胞粘附分析

细胞粘附测定根据 Yang 等^[16]的方法并略作改进: NPC 细胞以 1×10^5 细胞每孔接种于 96 孔培养板, 加入条件培养基常规培养过夜, 作为底层细胞. 另一部分 NPC 细胞培养于不含 EGF、添加或不添加 10 μ g/L TGF β 1 的培养液中, 24 h 后, 分别消化, 并按每孔 5×10^4 细胞量接种于已有底层细胞的

96 孔培养板中, 加入条件培养基常规培养 2 h, PBS 轻柔地洗去没有粘附的细胞后, 4%多聚甲醛固定 15 min, 2% Giemsa 染液染色 30 min, 加入 100 μ l 甲醇后, 在酶标仪上测定 655 nm 波长吸光值, 以代表细胞量.

1.9 统计分析

每个妊娠阶段的标本至少采集 3 例, 免疫组化、RT-PCR、蛋白质印迹分析和细胞粘附实验采用不同批次的标本重复 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 E-钙粘素在妊娠不同时期正常胎盘中的表达

选取正常妊娠 6 周、7 周、8 周、9 周、26 周和足月分娩的胎盘进行 E-钙粘素的半定量 RT-PCR 分析, 结果表明, 胎盘组织中 E-钙粘素 mRNA 水平在妊娠不同阶段呈现动态变化趋势, 即在妊娠 6、7 周表达水平相对较高, 随后逐渐降低, 并持续至第 26 周, 其 mRNA 水平大约为 7 周时的 45%, 但在足月胎盘中, E-钙粘素 mRNA 表达水平又有所上调, 达到与妊娠 6 周几乎相当的水平(图 1).

蛋白质印迹结果表明, 妊娠不同时期胎盘组织中 E-钙粘素的蛋白质水平也发生相应的变化, 即妊娠 6 周、7 周的蛋白质表达量最高, 从第 8 周开始显著下降, 直至足月, 其水平维持在 6 周水平的约 40%(图 2).

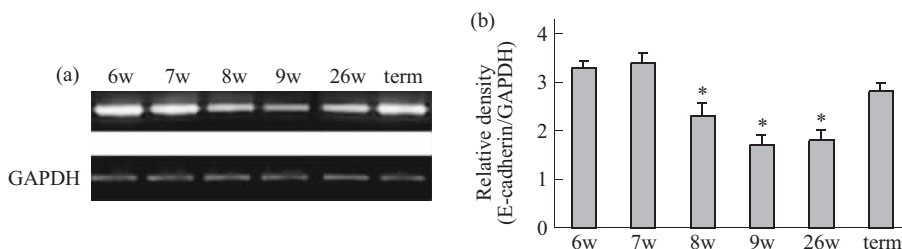


Fig. 1 Semi-quantitative RT-PCR to manifest the expression pattern of E-cadherin in human normal placenta at different pregnant stages

(a) Products of a typical RT-PCR were subjected to 2% agarose gel electrophoresis. 6w, 7w, 8w, 9w, 26w, and term represents RT-PCR products using mRNA derived from placenta tissues at gestational weeks 6, 7, 8, 9, 26 and term, respectively as template. (b) Statistical analysis by ANOVA for the semi-quantitative RT-PCR according to three independent experiments. The value of E-cadherin was normalized by that of GAPDH, and the relative amount was presented as $\bar{x} \pm s$. * Compared with the relative density of week 6, $P < 0.05$.

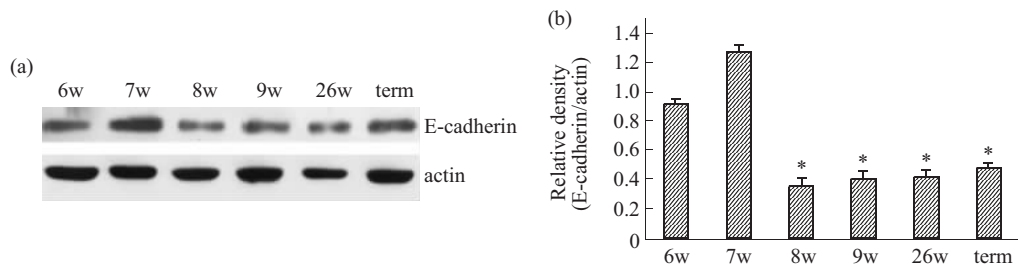


Fig. 2 Western blotting to manifest the expression pattern of E-cadherin in human normal placenta at different pregnant stages

(a) A typical result of Western blotting. 6w, 7w, 8w, 9w, 26w, and term represents protein extracts derived from placenta tissues at gestational weeks 6, 7, 8, 9, 26 and term. (b) Statistical analysis by ANOVA for the Western blotting according to three independent experiments. The value of E-cadherin was normalized by that of actin, and the relative amount was presented as $\bar{x} \pm s$. * Compared with the relative density of week 6, $P < 0.05$.

2.2 E-钙粘素在母胎界面上的分布

选取正常妊娠 7 周龄的胎盘绒毛组织和输卵管妊娠 6 周龄的母胎界面组织, 采用免疫组织化学法分析 E- 钙粘素的分布. 结果显示, 在两种妊娠的绒

毛中, E- 钙粘素蛋白主要分布在细胞滋养层细胞, 而合体滋养层细胞和绒毛间质细胞中未见阳性信号 (图 3).

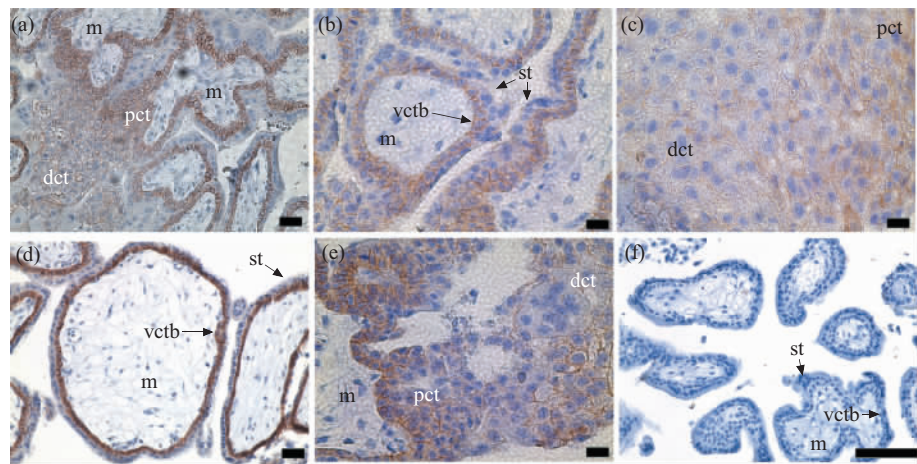


Fig. 3 Immunohistochemistry to show the distribution of E-cadherin on the fetomaternal interface of tubal pregnancy at gestational week 6 (a ~ c) and in normal placenta at gestational weeks 7 (d ~ f)

Bar = 100 μm . vctb, villous cytotrophoblasts; st, syncytiotrophoblasts; pct, proximal column trophoblasts; dct, distal column trophoblasts; m, mesenchyme.

输卵管妊娠标本具有较完整的母胎界面结构, 在这一模型中可见, 随着滋养层细胞向母体组织浸润程度的加深, E- 钙粘素的水平逐渐减弱, 即: E- 钙粘素水平在滋养层细胞柱近端相对较高, 在滋养层细胞柱远端显著减弱, 在母体组织中的间质型滋养层细胞中免疫原性最低.

2.3 TGFβ1 对 NPC 细胞表达 E-钙粘素的调节

2.3.1 TGFβ1 作用的剂量依赖性. 选择 0、1、10、

50 $\mu\text{g/L}$ TGFβ1 分别处理人正常胎盘细胞滋养层细胞(NPC), 24 h 后, 以 RT-PCR 和蛋白质印迹分析法检测细胞中的 E- 钙粘素表达量的变化. 结果表明, TGFβ1 可以显著促进 E- 钙粘素的表达, 以 50 $\mu\text{g/L}$ 为最大刺激剂量, 细胞中 E- 钙粘素 mRNA 和蛋白质表达量分别达到对照组的 2.9 倍和 7 倍 (图 4, 图 5).

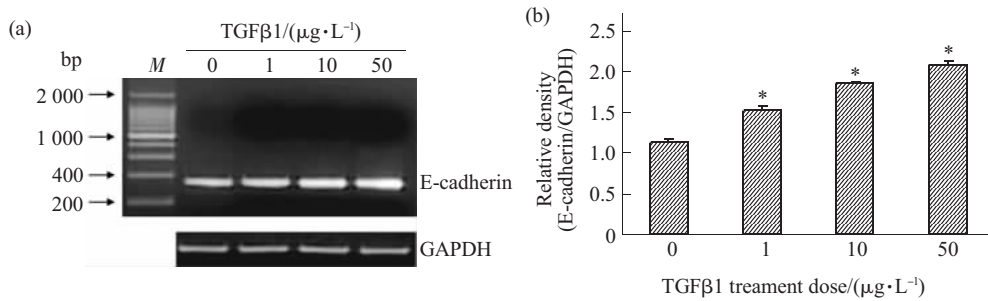


Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR to manifest the dose-dependent regulation by TGFβ1 on E-cadherin mRNA expression in NPC cells

(a) Products of a typical RT-PCR were subjected to 2% agarose gel electrophoresis. 0, 1, 10, 50 represents RT-PCR products using mRNA derived from the NPC cells treated by 0 μg/L, 1 μg/L, 10 μg/L, 50 μg/L TGFβ1 separately. *M*: Molecular mass marker. (b) Statistical analysis by ANOVA for the semi-quantitative RT-PCR according to three independent experiments. The value of E-cadherin was normalized by that of GAPDH, and the relative amount was presented as $\bar{x} \pm s$. * Compared with the relative density of 0 μg/L TGFβ1, $P < 0.05$.

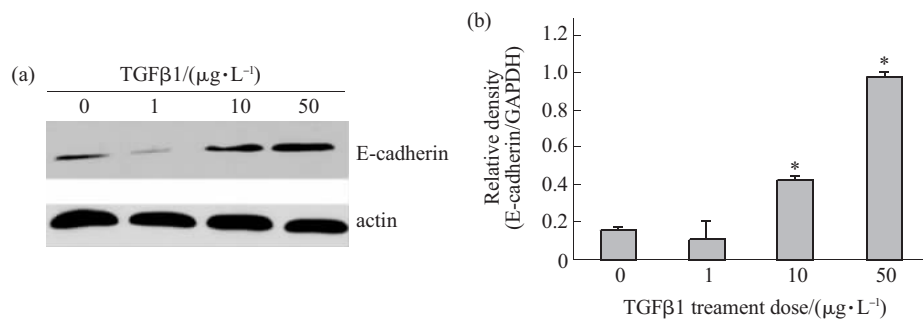


Fig. 5 Western blot analysis to show the dose-dependent regulation by TGFβ1 on E-cadherin protein expression in NPC cells

(a) The Western blotting on 10% SDS-PAGE. 0, 1, 10, 50 represents Western blotting products using protein derived from the NPC cells treated by 0 μg/L, 1 μg/L, 10 μg/L, 50 μg/L TGFβ1 separately. (b) Statistical analysis by ANOVA for the Western blotting according to three independent experiments. The value of E-cadherin was normalized by that of actin, and the relative amount was presented as $\bar{x} \pm s$. * Compared with the relative density of 0 μg/L TGFβ1, $P < 0.05$.

2.3.2 TGFβ1 作用的时间依赖性. 选择 10 μg/L TGFβ1 处理 NPC 细胞, 分别在处理后 30 min、1 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 收集细胞, 以

RT-PCR 检测细胞中的 E- 钙粘素 mRNA 水平. 结果显示(图 6), E- 钙粘素 mRNA 水平在 TGFβ1 处理细胞 30 min 后即开始上调, 于 6 h 达到最高水平,

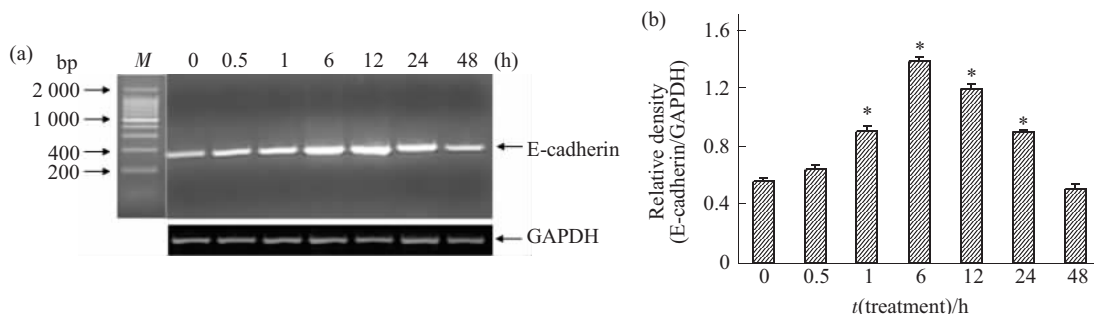


Fig. 6 Semi-quantitative RT-PCR manifested the regulation by TGFβ1 on E-cadherin in NPC cells with time-dependence

(a) Products of a typical RT-PCR were subjected to 2% agarose gel electrophoresis. 0, 0.5, 1, 6, 12, 24, 48 represents RT-PCR products using mRNA derived from the NPC cells treated by 10 μg/L TGFβ1 separately at 0 h, 0.5 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h. (b) Statistical analysis by ANOVA for the semi-quantitative RT-PCR according to three independent experiments. The value of E-cadherin was normalized by that of GAPDH, and the relative amount was presented as $\bar{x} \pm s$. * Compared with the relative density of 0h, $P < 0.05$.

为未处理对照组的 3.4 倍, 这一作用可维持到 12 h, 24 h 起 E-钙粘素 mRNA 量开始降低, 至 48 h 降至与对照组相当的水平。

2.4 TGF β 1 对 NPC 细胞-细胞间粘附的调节

粘附实验结果表明, NPC 细胞经 10 μ g/L TGF β 1 处理 24 h 后, 其细胞-细胞间的粘附能力显著增强, 较未经 TGF β 1 处理的细胞提高了 2.2 倍 (图 7)。

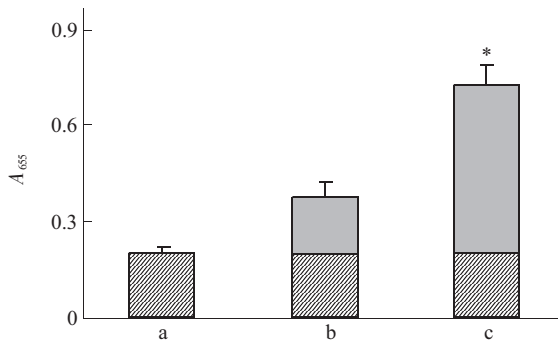


Fig. 7 Adhesion assay to demonstrate the effect of TGF β 1 on cell-cell adhesion in NPC cells

Statistical analysis by ANOVA was performed according to three independent experiments, and the value was presented as $\bar{x} \pm s$. (a) Control with only bottom cells. (b) Adhesion between untreated cells to bottom cells. (c) Adhesion between TGF β 1 treated cells to bottom cells. * Compared with (b), $P < 0.05$. ■: Adherent cell; ▨: Bottom cell.

3 讨 论

本工作利用人输卵管妊娠完整母胎界面组织和正常妊娠胎盘组织, 证实 E-钙粘素表达伴随滋养层细胞向浸润途径分化而逐渐下调。进一步在体外利用已建立的正常细胞滋养层细胞系 (NPC 细胞) 发现, TGF β 1 可以通过上调滋养层细胞表达 E-钙粘素, 从而提高细胞间的粘附能力。上述结果表明, E-钙粘素与滋养层细胞的分化相关, TGF β 1 通过旁分泌机制调节细胞滋养层细胞中 E-钙粘素的表达和细胞间的粘附性, 可能是细胞滋养层细胞有节制浸润的调节机制之一。

钙粘素是胚胎发育早期即开始表达的粘附分子, 它们主要参与介导同类细胞间的粘附, 在调节机体形态发生过程和维持成人组织的结构完整性与极性方面具有重要的作用^[17]。肿瘤生物学领域的研究表明, E-钙粘素在肿瘤的发育和生长中可以发挥肿瘤抑制因子的作用, 其基因突变或甲基化状态的改变都可能导致肿瘤细胞浸润能力的增强^[18]。

人类胚胎滋养层细胞具有很强的浸润能力, 在

胚胎植入过程中, 能够突破母体子宫内膜组织并深入到子宫肌层上 1/3 处, 因而被称为“假恶性”细胞。滋养层细胞行为的调节, 尤其是浸润能力的调节与肿瘤细胞存在许多相似之处。Zhou 等^[9]的研究表明, E-钙粘素主要在绒毛细胞滋养层细胞和滋养层细胞柱中分布, 伴随着向间质滋养层细胞和血管内滋养层细胞的分化, E-钙粘素表达减弱, 而血管内皮钙粘素 (VE-cadherin) 的表达得以升高, 推测 E-钙粘素和 VE-钙粘素之间的转变参与调节滋养层细胞的浸润能力。由于人类正常妊娠早期完整的母胎界面标本非常难以获得, Zhou 等的上述工作尚未得到更多的证据。我们前期的工作表明, 人输卵管妊娠母胎界面上滋养层细胞中多种植入相关分子的表达模式与正常妊娠者非常接近, 故输卵管妊娠可以作为研究人类妊娠早期滋养层细胞行为的独特模型。本工作在输卵管妊娠完整的母胎界面标本中, 得到与 Zhou 等报道基本一致的结果, 即随着滋养层细胞向浸润途径的分化, E-钙粘素的表达水平显著下降, 在分化程度较高的的间质滋养层细胞中, E-钙粘素的水平很低。进一步的研究发现, 随着妊娠周龄的变化, 胎盘绒毛中 E-钙粘素的水平亦有明显的变化, 在妊娠 6~9 周, 随着滋养层细胞分化程度的提高, E-钙粘素 mRNA 和蛋白质的表达水平逐渐下降。上述结果提示, E-钙粘素的变化可能与滋养层细胞的分化程度有关, 其表达的下调与滋养层细胞浸润能力的增强有一定的关联。已有的研究还发现, 在滋养层细胞浸润明显的先兆子痫患者中, 其绒毛组织 E-钙粘素蛋白水平明显高于正常胎盘绒毛组织, 进一步支持了 E-钙粘素与滋养层细胞浸润调节相关的假设^[6,7]。

一般而言, 细胞的浸润能力与其粘附能力是紧密关联的, 滋养层细胞浸润能力的加强常常伴随其细胞-细胞、细胞-基质间粘附特性的改变, 而这一过程是受多种激素、生长因子、细胞因子等的调节。TGF β 1 是妊娠过程中来源于母体蜕膜组织的重要细胞因子, 已有的研究表明, 它可以通过抑制增殖、诱导凋亡而抑制滋养层细胞生长, 同时通过下调基质金属蛋白酶 (MMP-2、MMP-9)、尿激酶型纤溶酶原激活因子 (uPA) 和上调 MMPs 组织抑制因子 (TIMP-1、TIMP-2)、PA 抑制因子 (PAI) 的表达, 抑制滋养层细胞的浸润^[12]。但由于缺乏稳定的人类正常细胞滋养层细胞模型, 有关 E-钙粘素在人正常滋养层细胞中的表达调节和对细胞行为的影响等, 尚未得到系统的研究。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^[14,19]. 本工作中, 在 NPC 细胞中的体外研究发现, TGF β 1 可以上调 E- 钙粘素 mRNA 和蛋白质的表达, 其作用呈现时间和剂量依赖性. 同时粘附实验表明, 在 TGF β 1 的作用下, NPC 细胞 - 细胞之间的粘附率显著提高. 可见, 胎盘中亦存在 E- 钙粘素表达的旁分泌调节机制, 而 TGF β 1 通过上调 E- 钙粘素从而促进滋养层细胞的粘附有可能直接或间接地导致细胞浸润性的下降, 这也可能是滋养层细胞有节制浸润的调节机制之一.

此外, 我们在正常胎盘组织中发现, 妊娠末期 E- 钙粘素 mRNA 水平有上升趋势, 但其蛋白质水平依然维持低水平, 与 mRNA 的变化不一致. 我们在胎盘组织中亦发现其他分子(如 MMP-26)的表达有类似的情况^[20], 推测足月胎盘中可能存在 E- 钙粘素等分子表达的转录后调控过程.

总之, 本工作阐明了人正常胎盘滋养层细胞中 E- 钙粘素的表达模式以及 TGF β 1 对其表达和细胞粘附行为的影响, 体现了滋养层细胞粘附和浸润调节的密切相关性和有节制性.

参 考 文 献

- 1 Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 1991, **251**: 1451~1455
- 2 MacCalman C D, Getsis S, Chen G T. Type 2 cadherins in the human endometrium and placenta: their putative roles in human implantation and placentation. *Am J Reprod.Immunol*, 1998, **39**: 96~107
- 3 Fouquet S, Lugo-Martinez V H, Chambaz J. Control of the survival/apoptosis balance by E-cadherin: role in enterocyte anoikis. *J Soc Biol*, 2004, **198** (4): 379~383
- 4 Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, *et al.* E-cadherin null mutant embryos fails to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 8263~8267
- 5 Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 855~859
- 6 Zhou Y, Fisher S J, Janatpour M, *et al.* Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotypes as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?. *J Clin Invest*, 1997, **99**: 2139~2151
- 7 Zhou Y, Damsky C H, Fisher S J. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?. *J Clin Invest*, 1997, **99**: 2152~2164
- 8 MacCalman C D, Furth E E, Omigbodun A, *et al.* 3rd. Regulated expression of cadherin-11 in human epithelial cells: a role for cadherin-11 in trophoblast-endometrium interactions?. *Dev Dyn*, 1996, **206**: 201~211
- 9 Debruyne P, Vermeulen S, Mareel M. The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta Gastroenterol Belg*, 1999, **62** (4): 393~402
- 10 Hajra K M, Fearon E R. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002, **34** (3): 255~268
- 11 Irving J A, Lala P K. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: Regulation by TGF-beta, IGF-II and IGFBP-1. *Exp Cell Res*, 1995, **217**: 419~427
- 12 Gendie E L, Harry A O, Barbara A I. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGF β 1, 2 and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol Reprod*, 2005, **73** (2): 374~381
- 13 Subhradip K, Das C. Modulation of ezrin and E-cadherin expression by IL-1 β and TGF- β 1 in human trophoblasts. *J Reproductive Immunology*, 2004, **64**: 9~29
- 14 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**: 1328~1333
- 15 Qin L, Wang Y L, Bai S X, *et al.* Expression of integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface during tubal implantation. *Reproduction*, 2003, **126** (3): 383~391
- 16 Yang Y, Todt J C, Svinarich D M, *et al.* Human trophoblast cell adhesion to extracellular matrix protein, Entactin. *Am J Perinatol Immunol*, 1996, **36**: 25~32
- 17 Barry M G. Regulation of Cadherin mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6** (8): 622~634
- 18 Xue W C, Feng H C, Tsao S W, *et al.* Methylation status and expression of E-cadherin and cadherin-11 in gestational trophoblastic diseases. *Int J Gynecol Cancer*, 2003, **13** (6): 879~888
- 19 Li R H, Zhuang L Z. The effect of growth factors on human normal placental cytotrophoblast cell proliferation. *Hum Reprod*, 1997, **12**: 830~834
- 20 Qiu W, Bai S X, Zhao M R, *et al.* Spatio-temporal expression of matrix metalloproteinase-26 in human placental trophoblasts and fetal red cells during normal placentation. *Biology of Reproduction*, 2005, **72**: 954~959

Regulation of E-cadherin by TGF β 1 in Human Normal Placenta Cytotrophoblast Cells*

ZHAO Mei-Rong¹⁾, CHEN Zhi-Qiang²⁾, QIU Wei¹⁾, LI Yu-Xia¹⁾, WANG Yan-Ling^{1)**}

¹⁾State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China;

²⁾College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract E-cadherin was one of the early expressed genes during embryo development. The intact form of E-cadherin can link to cytoskeleton via β catenin, and the complex plays essential roles in cell adhesion. Evidences indicated the essential functions of E-cadherin in processes of embryonic implantation and placentation. Immunohistochemistry and RT-PCR were used to identify the localization of E-cadherin in human placenta. It was found that E-cadherin was expressed mainly in villous cytotrophoblasts and trophoblast column, with the immunoreactivity decreased obviously in distal trophoblast column. Temporally, the mRNA level of E-cadherin in placenta was the highest at gestational week 6, and began to be down-regulated from week 8 on, reaching a nadir at week 9. However, the mRNA expression was up-regulated in placenta at week 26 and full-term. In human normal placenta origin cytotrophoblast cell line (NPC), the mRNA and protein expressions of E-cadherin was significantly stimulated by TGF β 1 in dose- and time-dependent manners. Meanwhile, the cell-cell adhesion of NPC cells was promoted by TGF β 1. All these data indicated that there exists paracrine regulation of E-cadherin in human placenta, and E-cadherin may be involved in regulating trophoblast cell behaviors, likely inhibiting cell invasion through facilitating cell-cell adhesion.

Key words E-cadherin, human cytotrophoblast cell, cell-cell adhesion, transforming growth factor β 1

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30370542, 30530760).

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

Received: December 9, 2005 Accepted: February 27, 2006