

促性腺激素释放激素(GnRH)对人绒毛膜上皮癌细胞系 JEG-3 浸润性的调节*

刘 璟 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 100101)

摘要 促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)是生殖过程中起重要调节作用的激素。近年来的研究发现, I 型 GnRH(GnRH I)和 II 型 GnRH(GnRH II)在胎盘和胎盘来源的滋养层细胞中发挥生理功能。利用人滋养层细胞模型人绒毛膜上皮癌细胞系(JEG-3)细胞, 探讨 GnRH I 和 GnRH II 对人滋养层细胞浸润的调节作用。荧光实时定量 PCR 证实, GnRH I 和 GnRH II 可调节 JEG-3 细胞中经典 GnRH 受体(GnRHR I)的表达。RNA 干扰实验显示, 特异性针对 GnRHR I 的 siRNA 可显著阻断 GnRH I 对 JEG-3 细胞的促浸润作用, 但不能影响 GnRH II 的促细胞浸润功能, 提示 GnRH II 可能通过经典 GnRH 受体以外的其他受体介导, 以发挥促进滋养层细胞浸润的功能。对信号通路的进一步研究表明, GnRH I 和 GnRH II 通过 ERK 和 JNK 激酶级联促进基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的表达, 以调节细胞的浸润。

关键词 促性腺激素释放激素, 人绒毛膜上皮癌细胞系(JEG-3 细胞), 细胞浸润, ERK, JNK

学科分类号 Q492

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00485

促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)是生殖过程中起重要调节作用的激素。迄今为止, 在脊椎动物中已发现十几种同源性的 10%~50% 的 GnRH 亚型, 它们的氨基酸序列不同, 表达部位和来源也有差异。I 型 GnRH(GnRH I)主要由下丘脑的神经分泌细胞合成, 以脉冲方式释放进入下丘脑和垂体的循环体系, 促进垂体卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(luteinizing hormone, LH)的分泌, 从而调节性腺类固醇激素合成和配子发生^[1]。GnRH I 除了在内分泌系统中发挥核心作用, 在一些垂体外组织(例如卵巢、胎盘、子宫和免疫系统)也通过自分泌和旁分泌形式发挥重要调节作用^[2~4]。一些合成的 GnRH I 类似物作为有效的治疗各种生殖内分泌疾病的药物应用于临床, 并用于辅助生育技术中的超排卵过程^[5,6]。在人体内还发现存在 II 型 GnRH(GnRH II), 它有 3 个氨基酸序列与 GnRH I 不同^[7,8]。越来越多的研究发现, GnRH II 在人的垂体外器官和组织中也具有重要的生理作用, 例如可以抑制肿瘤细胞的增殖等^[9,10]。

妊娠过程中, 胎盘来源的滋养层细胞的增殖、分化和对母体子宫内膜的浸润对于维持妊娠、调节

胎儿的发育生长有重要作用^[11]。滋养层细胞的功能受到来自母体子宫和胎盘自身的多种激素、生长因子、细胞因子等的精细调控, 其调节网络的任何失误或异常会引起多种妊娠相关疾病, 如自然流产、宫内生长受限、先兆子痫等^[12~14]。

已有证据表明, GnRH I 和 GnRH II 在胎盘发生中发挥生理功能。GnRH I 广泛表达于妊娠早期和足月胎盘的各类型滋养层细胞中^[15,16], 而 GnRH II 的表达局限于妊娠早期的单核绒毛细胞滋养层(villous cytotrophoblast, VCT)和绒毛外细胞滋养层(extravillous cytotrophoblast, EVT)^[16]。属于 G 蛋白偶联受体成员之一的 I 型 GnRH 受体(GnRH receptor I, GnRHR I)也在胎盘中表达^[17,18]。最近的研究表明, GnRH I 和 GnRH II 在原代培养的滋养层细胞中显著调节基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 以及它们的组织抑制因子 TIMP-1、尿激酶型纤溶酶原激活因子 uPA 及其抑制因子 PAI-1 的

* 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: 2008-09-18, 接受日期: 2008-11-07

活性^[19,20],而这些蛋白酶体系是介导细胞外基质降解的主要分子,在滋养层细胞浸润过程中起重要作用.这些研究结果暗示,GnRH I 和 GnRH II 可能作为自分泌或者旁分泌因子,在胚胎植入和胎盘发生过程中参与调节滋养层细胞的浸润性.然而关于 GnRH I 和 GnRH II 调节滋养层细胞浸润的作用机制如何,二者发挥作用的信号通路是否相同等仍是有待深入探讨的问题.

在本研究中,我们利用人绒毛膜上皮癌细胞系(JEG-3)细胞作为研究模型,分析 GnRH I 和 GnRH II 对滋养层细胞浸润的调节作用,并进一步探讨了 GnRH 受体以及 MAPK 信号级联通路在介导 GnRH I 和 GnRH II 作用中的异同,由此揭示不同亚型 GnRH 在滋养层细胞浸润调节中的生理功能和作用机制.

1 材料与方法

1.1 绒毛膜上皮癌细胞系 JEG-3 细胞的培养

绒毛膜上皮癌细胞系 JEG-3 细胞购自美国 ATCC 细胞库.细胞自液氮中取出复苏后,培养于含 10% FBS 和抗生素的 DMEM 培养液中,于 37℃,5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育,每 3 天按 1:4 传代.

1.2 细胞处理

JEG-3 细胞接种后,用含 0.1% FBS 的 DMEM 培养液培养;分别经过 PD98059(10 μmol/L, Sigma 公司),SP600125 (10 μmol/L, Sigma 公司)或者溶剂 (0.1% DMSO)预处理 30 min,再用 GnRH I (100 nmol/L, Bachem 公司)或 GnRH II (100 nmol/L, Bachem 公司)处理 24 h.收集细胞用于实时定量 PCR 或者蛋白质印迹分析.

1.3 RNA 干扰

按照 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)转染试剂说明书,分别将合成的双链 GnRHR I siRNA 和对照 siRNA(Invitrogen 公司)转染培养的 JEG-3 细胞. GnRHR I siRNA 序列为 5' GCUCUCUG-CGACCUUUAU 3' (正义),对照 siRNA 序列为 5' GCUUCCGAGCCUUCUAAU 3' (正义).转染 24 h 后,收集细胞并提取总蛋白质,检测 GnRHR I 表达变化,另一部分细胞接种于铺有 Matrigel 的细胞小室,进行细胞浸润分析实验.

1.4 总 RNA 的提取和实时定量 PCR

按照 TRIzol 试剂(Gibco BRL)说明书提取细胞中总 RNA.取 1 μg 总 RNA,在 20 μl 反应体系中

用 oligo(d)T 引物(Promega 公司)和 SuperScript II 逆转录酶(Gibco BRL)进行逆转录反应,获得 cDNA 产物.

根据 NCBI 数据库提供的相应基因 cDNA 序列,用 Primer Express Software v2.0 设计特异 SYBR Green Real-time PCR 引物, GnRHR I 引物序列为 5' ACCGCTCCCTGGCTATCAC 3' (反义)和 5' ACTGTCCGACTTTGCTGTTGCT 3' (正义); GAPDH 引物序列为 5' ATGGAA ATCCCA TCA-CCATCTT 3' (反义)和 5' CGCCCCACTTGATTTT-GG 3' (正义).

以上述 cDNA 作为模板,在 ABI PRISM 7000 荧光定量 PCR 仪上的 96 孔板中进行实时定量 PCR 反应.将 cDNA 按照 1:7 体积比稀释后,取 5 μl 为模板,加入 12.5 μl SYBR Green PCR 反应试剂和 7.5 μl 引物混合,进行 PCR 反应,扩增条件为:先 95℃ 10 min,52℃ 2 min,然后 95℃ 15 s,60℃ 1 min,扩增 40 个循环.同一批次实验组每个样品的 PCR 反应做 2 个平行重复(duplicate),取 C_T 平均值. mRNA 相对表达水平计算公式为 2^{-ΔΔC_T},其中 ΔΔC_T = (C_{T, Target} - C_{T, GAPDH})_X - (C_{T, Target} - C_{T, GAPDH})₀,该公式中 X 表示各个时间点或者处理的样本,0 表示对照组.

1.5 细胞浸润分析

细胞浸润分析在预先铺有去生长因子 Matrigel (BD Biosciences 公司)的细胞小室(Transwell insert; BD Biosciences 公司)中进行. Transwell insert 的底部是有 8 μm 小孔的滤膜,将小室置于 12 孔细胞培养板内,并铺设 200 mg/L Matrigel. 每个小室内分别接种 2.5×10⁴ 个 JEG-3 细胞,并按照前述的方式加以处理,在下部的 12 孔细胞培养板内均加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液. 24~48 h 后,取出培养小室,固定细胞后将滤膜上层的细胞用棉棒擦去,对下层的细胞进行苏木精-伊红双染色,再用刀片切下滤膜包埋于树胶.在光学显微镜下观察滤膜下层的细胞,并照相.每组样本同时做 3 个重复,每个滤膜随机选取 15 个视野,计数下层细胞,经对照组校正作为浸润细胞百分比指数.

1.6 蛋白质印迹杂交

细胞处理结束后,于冰上加入裂解液 (20 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液,含 1 mmol/L DTT、0.2% NP40、100 μmol/L PMSF、5 mg/L aprotinin、chymostatin、leupeptin、pristan 和 trypsin inhibitor 等蛋白酶抑制剂),提取细胞内可溶

性总蛋白. 30 μ g 蛋白经 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转移至硝酸纤维素膜. 硝酸纤维素膜经 5% 脱脂牛奶室温孵育 1 h 后, 分别用 GnRHR I (1: 500, NeoMarkers)、MMP-2(1: 500, NeoMarkers) 和 actin(1: 1000, Santa Cruz 公司) 特异性抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 加入 HRP 标记的抗鼠或抗兔 IgG(1: 2000; Promega 公司), 室温孵育 1 h 后, 将硝酸纤维素膜于 ECL 试剂(Pierce 公司)中作用后对 X 光片曝光.

1.7 数据统计

所有实验均用不同培养批次的细胞重复 3 次以上. Western blotting 结果用 Gel-Pro Analyzer 软件进行灰度分析 (software version 4.0; United Bio, USA), 并分别以同一次实验的 actin 结果作为内参照计算相对灰度. 实时定量 PCR 结果以相应 GAPDH 的量为内参照进行校正. 将至少 3 次的实验结果进行 ANOVA 统计分析, 表示为 $\bar{x} \pm s$, 与相应的对照相比, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结 果

2.1 GnRH I 和 GnRH II 对 I 型 GnRH 受体表达的调节

实时定量 PCR 结果显示, JEG-3 细胞中 GnRHR I 的 mRNA 水平受 GnRH I 和 GnRH II 的调节. GnRH I 处理 12 h 后, GnRHR I 表达水平开始显著升高, 至 24 h 达到高峰, 为对照组的 2 倍, 此后至 48 h 其表达水平有所回落 (图 1a). 而 GnRH II 处理 12 h 后 GnRHR I 表达持续上调, 直至 48 h 达到最高值, 为对照组的 2.1 倍 (图 1b).

2.2 GnRH I 和 GnRH II 通过不同的 GnRH 受体促进 JEG-3 细胞浸润

JEG-3 细胞分别经 100 nmol/L 的 GnRH I 或 GnRH II 处理 24 h 后, 进行细胞浸润实验. 如图 3 所示, GnRH I 和 GnRH II 均能明显提高细胞的浸润能力, 细胞浸润性分别达到对照组的 1.8 倍和 2.1 倍.

为了明确介导 GnRH I 和 GnRH II 功能的受体, 采用针对 GnRH 受体 I 的特异性 siRNA (GnRHR I siRNA) 转染 JEG-3 细胞, 图 2 显示, GnRHR I siRNA 可以有效阻断 GnRHR I 的表达, 而作为阴性对照的非特异性 siRNA (scramble siRNA) 对 GnRH 受体的表达没有显著影响. 用外源 GnRH I 或 GnRH II 多肽处理 siRNA 转染的 JEG-3 细胞后进行细胞浸润实验, 结果显示,

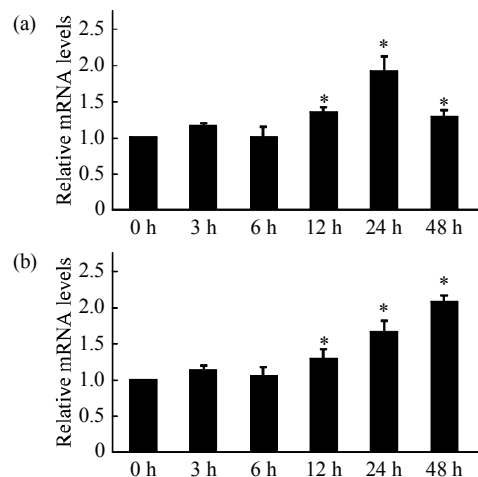


Fig. 1 Effects of GnRH I and GnRH II on the expression of type I GnRH receptor (GnRHR I) in JEG-3 cells

Real-time PCR analysis showing the mRNA levels of GnRHR I in the presence or absence of 100 nmol/L GnRH I (a) or 100 nmol/L GnRH II (b) in JEG-3 cells. Value for the level of the GnRHR I mRNA was normalized to the corresponding GAPDH level, and the relative level at each time point was standardized to that at 0 h. The results derived from at least three independent experiments are statistically analyzed by ANOVA and represented as the column graph. * $P < 0.05$, vs. 0 h group.

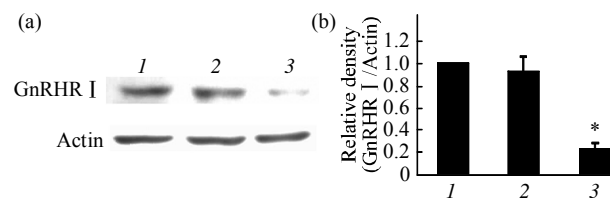


Fig. 2 Knock-down of GnRH receptor I (GnRHR I) by siRNA in JEG-3 cells

(a) A typical result of Western blotting for GnRHR I in JEG-3 cells (control) and JEG-3 cells transiently transfected with scramble siRNA or GnRHR I siRNA. (b) Statistical analysis by ANOVA for the Western blotting according to three independent experiments. The density of GnRHR I was normalized to the corresponding density of actin, and the relative density was standardized to that of the control group. * $P < 0.05$, vs. control. 1: Control; 2: Scramble siRNA; 3: GnRHR I siRNA.

scramble siRNA 对细胞浸润能力没有影响, GnRHR I siRNA 能完全阻断 GnRH I 对 JEG-3 细胞浸润能力的促进作用, 但是对 GnRH II 的促浸润作用没有显著影响 (图 3). 表明, GnRH I 对 JEG-3 细胞浸润能力的调节是通过 GnRHR I 受体介导的, 而 GnRH II 的作用并不通过 GnRHR I 受体介导.

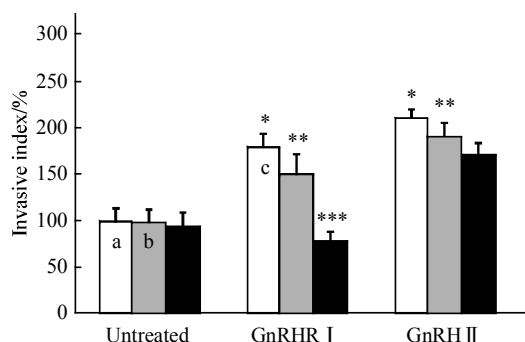


Fig. 3 Effects of GnRH I siRNA on GnRH I and II-induced invasiveness in JEG-3 cells

JEG-3 cells were transiently transfected with or without (control) specific GnRH I siRNA or scramble siRNA. Transwell invasion assay was performed in the cells treated with GnRH I (100 nmol/L) or GnRH II (100 nmol/L). The results derived from at least three independent experiments were standardized to the untreated group and statistically analyzed by ANOVA. * $P < 0.05$, vs. bar a; ** $P < 0.05$, vs. bar b; *** $P < 0.05$, vs. bar c. □: Control; ■: Scramble siRNA; ■: GnRH I siRNA.

2.3 GnRH I 和 GnRH II 通过 ERK 和 JNK 激酶促进 JEG-3 细胞的浸润

为了探讨 GnRH I 和 GnRH II 是否通过 ERK 和 JNK 激酶调节 JEG-3 细胞的浸润能力, 用 ERK 的特异性抑制剂 PD98059 或 JNK 的特异性抑制剂 SP600125 预处理 JEG-3 细胞 30 min 后, 再加入外源性 GnRH I 或 GnRH II 多肽处理 24 h. 细胞浸润实验显示, GnRH I 或 GnRH II 对细胞的促浸润作用均可被 2 种抑制剂明显阻断, 达到和对照组相当的水平. 表明 ERK 和 JNK 的激活是 GnRH I 和

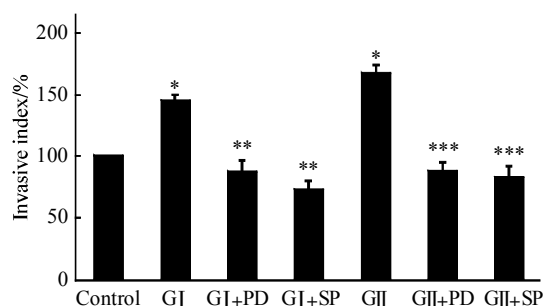


Fig. 4 Involvement of ERK and JNK activity in GnRH I and II-induced invasiveness in JEG-3 cells

JEG-3 cells were treated with 10 μ mol/L PD98059 (PD) or SP600125 (SP) for 30 min, and then treated with 100 nmol/L GnRH I (G I) or 100 nmol/L GnRH II (G II) for 24 h. Transwell invasion assay was performed in these cells. The invasive index at each experimental group was standardized to the untreated control. Data from at least three independent experiments were statistically analyzed with ANOVA. * $P < 0.05$, vs. control; ** $P < 0.05$, vs. G I; *** $P < 0.05$, vs. G II.

GnRH II 调节 JEG-3 细胞浸润所必需的(图 4).

2.4 GnRH I 和 GnRH II 通过 ERK 和 JNK 促进 JEG-3 细胞中 MMP-2 的表达

JEG-3 细胞经上述处理后, 以蛋白质印迹杂交检测细胞中 MMP-2 的表达变化. 结果显示, GnRH I 和 GnRH II 可显著上调 JEG-3 细胞中 MMP-2 的表达, 而 PD98059 或 SP600125 预处理可明显阻断 GnRH I 和 GnRH II 对 MMP-2 表达的上调作用(图 5), 但尚未阻断到对照组的基础水平. 表明 ERK 和 JNK 的激活参与 GnRH I 和 GnRH II 对 JEG-3 细胞中 MMP-2 表达的调节.

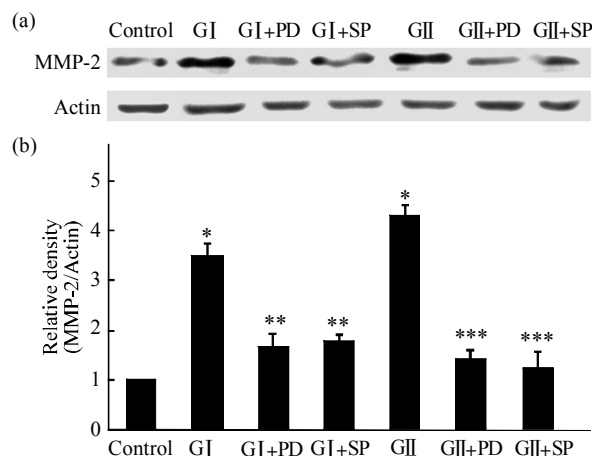


Fig. 5 Involvement of ERK and JNK activity in GnRH I and II-induced MMP-2 production in JEG-3 cells

JEG-3 cells were treated with 10 μ mol/L PD98059 (PD) or SP600125 (SP) for 30 min, and then treated with 100 nmol/L GnRH I (G I) or 100 nmol/L GnRH II (G II) for 24 h. Production of MMP-2 in the cells was detected by Western blotting. (a) A typical result of Western blotting. (b) The density of MMP-2 was normalized by that of actin, and the relative density at each experimental group was standardized to that of the control group. Statistical analysis by ANOVA was performed according to three independent experiments. * $P < 0.05$, vs. control; ** $P < 0.05$, vs. G I; *** $P < 0.05$, vs. G II.

3 讨 论

1978 年 Siler-Khodr 等^[21, 22]首次报道了胎盘组织中存在 GnRH I 活性, 随后又发现胎盘也以脉冲方式分泌 GnRH II, 并且胎盘中的 GnRH II 较 GnRH I 稳定, 不易被降解^[23]. 近年来的研究发现, GnRH I 和 GnRH II 在胎盘中的表达模式存在时空变化. 从细胞定位看, 两种 GnRH 都表达于绒毛细胞滋养层细胞以及绒毛外滋养层细胞, 而 GnRH I 还存在于合体滋养层细胞中^[15, 16]. 从妊娠

时间看, GnRH I 和 GnRH II 的 mRNA 在妊娠早期胎盘中表达水平相对较高, 而这个时期是胎盘中的滋养层细胞浸润母体子宫蜕膜最重要的阶段, 妊娠中期至足月, 胎盘发育逐渐完成, 母胎循环建立, 滋养层细胞的浸润能力亦相对减弱, 此时两种 GnRH 的表达也相应降低, 而 GnRH II 在足月胎盘中已完全检测不到^[16]. 上述结果提示 GnRH 与滋养层细胞的浸润能力密切相关. 本研究则通过体外细胞浸润实验证实, GnRH I 和 GnRH II 可以显著促进滋养层细胞的浸润能力, 这一结果与上述报道的 GnRH 在胎盘中的表达模式相对应.

GnRH II 在胎盘、卵巢和子宫内膜等垂体外组织中的生理功能与 GnRH I 相似^[24], 但是很多研究表明, GnRH II 的作用与 GnRH I 或者 GnRH I 类似物的作用有差异. 例如, 在子宫内膜癌和卵巢癌细胞中, GnRH II 表现出比 GnRH I 更强的抑制细胞增殖的作用^[10]. 在胎盘或滋养层细胞中, GnRH II 对 leptin 分泌的调节作用也比 GnRH I 强^[25]. 在滋养层细胞中, GnRH II 能在比 GnRH I 相对更低的浓度调节 MMPs/TIMP-1 和 uPA/PAI-1 蛋白酶系统^[19, 20]. 本研究中亦发现 GnRH II 比 GnRH I 能更有效地促进滋养层细胞浸润. 有学者提出, 这两种 GnRH 生理作用的差异性可以解释为不同的多肽降解途径、不同的受体亲和率, 甚至可能存在不同的 GnRH 受体, 但是其具体机制尚未阐明. 本研究则从受体和信号级联的角度作了探讨.

已有的研究表明, GnRH I 和 GnRH II 可以通过与经典的特异性 GnRH 受体 (即 I 型 GnRH 受体, GnRHR I) 结合, 在各种人体组织和细胞中发挥其生物功能^[24]. 本研究表明, JEG-3 细胞自身表达 GnRHR I, 并且可以受 GnRH I 和 GnRH II 的调节. 我们在 JEG-3 细胞中利用 siRNA 抑制 GnRHR I 表达, 可以完全阻断 GnRH I 对细胞浸润的作用, 但是并不影响 GnRH II 的作用, 提示 GnRH I 和 GnRH II 对滋养层细胞浸润的作用可能是通过不同的受体介导的. 最近也有一些研究表明, 在垂体外组织中可能存在 GnRH II 的独特受体介导其生物功能. 在子宫内膜细胞和滋养层细胞中, GnRHR I 的特异性抑制剂 Cetrorelix 可以阻断 GnRH I 对 MMPs/TIMPs 和 uPA/PAI 的调节作用, 但是对 GnRH II 的作用没有显著影响^[19, 20, 26]. Emons 和 Grundker 的研究组发现, GnRH II 对子宫内膜癌细胞和卵巢癌细胞的抗增殖作用并非通过经典的 GnRHR I, 还发现在人胎盘和一些生殖系统的肿

瘤组织中存在 II 型 GnRH 受体样抗原活性^[27, 28]. 在前列腺癌细胞中也发现存在与经典的 GnRHR I 不同的 GnRH II 结合蛋白^[29]. 因此学者们推断, 人类细胞中两种 GnRH 可能通过不同的受体发挥作用. 近来的研究已经发现了人 II 型 GnRH 受体基因, 但其阅读框内含有终止密码子, 因而被认为是无功能的假基因^[30, 31]. 目前尚不能确定功能性 II 型 GnRH 受体的存在, 这仍是有待深入研究的问题.

大量研究表明, 在促性腺细胞以及多种垂体外组织的细胞中 GnRH 与受体结合, 可通过诱导 ERK、JNK、p38MAPK 和 BMK 等 MAPK 激酶级联反应, 将信号由细胞表面转导至细胞核并介导对下游靶基因的调控^[32]. 在永生化绒毛外滋养层细胞和 JEG-3 细胞中 GnRH 可激活 ERK 磷酸化, 通过 MAPK 级联传导信号^[33]. 还有研究表明, GnRH 在卵巢癌细胞中通过激活 JNK 促进细胞浸润能力^[34]. 本研究显示, ERK 或者 JNK 激酶活性的抑制能完全阻断 GnRH I 和 GnRH II 对 JEG-3 细胞浸润的促进作用, 表明它们是 GnRH I 和 GnRH II 调节滋养层细胞浸润所必需的信号途径.

基质金属蛋白酶(MMP)是介导细胞外基质降解的主要分子, 在滋养层细胞浸润过程中起重要作用. 有报道表明, GnRH I 和 GnRH II 在原代培养的滋养层细胞中可显著调节 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的活性^[19, 20]. 我们在 JEG-3 细胞中的研究显示, GnRH I 和 GnRH II 均可促进 MMP-2 的表达, 而 ERK 或 JNK 激酶的抑制剂可以部分地阻断 GnRH I 和 GnRH II 对 MMP-2 的调节作用. 表明 ERK 和 JNK 激酶激活参与了两种 GnRH 调节 MMP-2 的作用, 但同时可能还有其他信号分子参与这一过程. 这一结果还提示, 在 GnRH 促进滋养层细胞浸润的过程中, 还有 MMP-2 以外的其他效应分子参与.

总之, 本工作利用人类滋养层细胞体外模型 JEG-3 细胞, 阐明 GnRH I 和 GnRH II 通过 ERK 和 JNK 激酶级联增强 MMP-2 在滋养层细胞中的表达, 并促进滋养层细胞浸润. 同时, 本研究首次揭示, 滋养层细胞中 GnRH I 和 GnRH II 调节细胞浸润的功能是通过不同的受体介导的, 而这种配体依赖性选择不同受体的机制对于理解不同亚型 GnRH 在垂体外组织中的生理功能具有重要意义.

参 考 文 献

- 1 Fink G. Gonadotropin secretion and its control. In: Knobil E, Neill

- JD, eds. The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1988. 1349~1377
- 2 Islami D, Chardonnens D, Campana A, *et al.* Comparison of the effects of GnRH- I and GnRH- II on HCG synthesis and secretion by first trimester trophoblast. *Mol Hum Reprod*, 2001, **7**(1): 3~9
 - 3 Kang S K, Tai C J, Nathwani P S, *et al.* Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*, 2001, **142**(2): 671~679
 - 4 Chen A, Ganor Y, Rahimpour S, *et al.* The neuropeptides GnRH- II and GnRH- I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nat Med*, 2002, **8**(12): 1421~1426
 - 5 Kiesel L A, Rody A, Greb R R, *et al.* Clinical use of GnRH analogues. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2002, **56**(5): 677~687
 - 6 Shalev E, Leung P C. Gonadotropin-releasing hormone and reproductive medicine. *J Obstet Gynaecol Can*, 2003, **25**(2): 98~113
 - 7 Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, *et al.* Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**(12): 3874~3878
 - 8 White R B, Eisen J A, Kasten T L, *et al.* Second form of gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(1): 305~309
 - 9 Choi K C, Auersperg N, Leung P C. Expression and antiproliferative effect of a second form of gonadotropin-releasing hormone in normal and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, **86**(10): 5075~5078
 - 10 Grundker C, Gunthert A R, Millar R P, *et al.* Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH- II) receptor in human endometrial and ovarian cells and effects of GnRH- II on tumor cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**(3): 1427~1430
 - 11 Aplin J. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence *in vivo* and *in vitro*. *J Cell Sci*, 1991, **99**(4): 681~692
 - 12 Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta 4th edition. New York: Springer Verlag, 2000. 1337~1350
 - 13 Van Lijnschoten G, Evers J, Menheere P, *et al.* Occult abortion: not a major cause of infertility. *Fertil Steril*, 1994, **62**(6): 1271~1273
 - 14 Krebs C, Macara L, Leiser R, *et al.* Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. *Am J Obstet Gynecol*, 1996, **175**(6): 1534~1542
 - 15 Khodr G S, Siler-Khodr T M. Placental luteinizing hormone-releasing factor and its synthesis. *Science*, 1980, **207**(4428): 315~317
 - 16 Chou C S, Beristain A G, MacCalman C D, *et al.* Cellular localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II in first-trimester human placenta and decidua. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, **89**(3): 1459~1466
 - 17 Lin L S, Roberts V J, Yen S S. Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in the placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, **80**(2): 580~585
 - 18 Cheng K W, Nathwani P S, Leung P C. Regulation of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in placental cells. *Endocrinology*, 2000, **141**(7): 2340~2349
 - 19 Chou C S, Zhu H, Shalev E, *et al.* The effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II on the urokinase-type plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor system in human extravillous cytotrophoblasts *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**(12): 5594~5603
 - 20 Chou C S, Zhu H, MacCalman C D, *et al.* Regulatory effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II on the levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in primary cultures of human extravillous cytotrophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, **88**(10): 4781~4790
 - 21 Siler-Khodr T M, Khodr G S. Content of luteinizing hormone releasing factor in the human placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 1978, **130**(2): 216~219
 - 22 Khodr G S, Siler-Khodr T M. Localization of luteinizing hormone releasing factor (LRF) in the human placenta. *Fertil Steril*, 1978, **29**(5): 523~526
 - 23 Siler-Khodr T M, Grayson M. Action of chicken II GnRH on the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, **86**(2): 804~810
 - 24 Cheng C K, Leung P C. Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)- I, GnRH- II, and their receptors in humans. *Endocr Rev*, 2005, **26**(2): 283~306
 - 25 Islami D, Bischof P, Chardonnens D. Possible interactions between leptin, gonadotrophin-releasing hormone (GnRH- I and II) and human chorionic gonadotrophin (hCG). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, **110**(2): 169~175
 - 26 Chou C S, MacCalman C D, Leung P C. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone I and II on the urokinase-type plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor system in human decidual stromal cells *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, **88**(8): 3806~3815
 - 27 Grundker C, Schlotawa L, Viereck V, *et al.* Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH- II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol*, 2004, **151**(1): 141~149
 - 28 Eicke N, Gunthert A R, Viereck V, *et al.* GnRH- II receptor-like antigenicity in human placenta and in cancers of the human reproductive organs. *Eur J Endocrinol*, 2005, **153**(4): 605~612
 - 29 Maiti K, Oh D Y, Moon J S, *et al.* Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)- I and GnRH- II on prostate cancer cell signaling and death. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, **90**(7): 4287~4298
 - 30 Faurholm B, Millar R P, Katz A A. The genes encoding the type II gonadotropin-releasing hormone receptor and the ribonucleoprotein RBM8A in humans overlap in two genomic loci. *Genomics*, 2001, **78**(1~2): 15~18

- 31 Neill J D. GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology*, 2002, **143**(3): 737~743
- 32 Naor Z, Benard O, Seger R. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 2000, **11**(3): 91~99
- 33 Kang S K, Tai C J, Cheng K W, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone activates mitogen-activated protein kinase in human ovarian and placental cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, **170**(1~2): 143~151
- 34 Cheung L W, Leung P C, Wong A S. Gonadotropin-releasing hormone promotes ovarian cancer cell invasiveness through c-Jun NH2-terminal kinase-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9. *Cancer Res*, 2006, **66**(22): 10902~10910

Effects of Type I Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) and Type II GnRH on Cell Invasion in Human Choriocarcinoma JEG-3 Cells*

LIU Jing, WANG Yan-Ling**

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

Abstract Mammalian gonadotropin-releasing hormone (termed GnRH I) is a decapeptide that plays key role in the process of reproduction. In addition to its well-known endocrine function, it has become evident that GnRH I and the second GnRH subtype (termed GnRH II) are potentially important autocrine and/or paracrine regulators in placental trophoblast cells. The effects of GnRH I and GnRH II on trophoblastic cell invasion were investigated in human choriocarcinoma cell line (JEG-3) by the methods of invasion assay, RNA interference, Western blot and Real-time PCR. The data revealed that exogenous native peptide of these two forms of GnRH significantly induced the expression of type I GnRH receptor (GnRHR I) in JEG-3 cells. The specific siRNA for GnRHR I was capable of blocking the invasion-promoting effect of GnRH I, but did not influence the effect of GnRH II. The data suggested that the two hormones may be elicited by distinct receptors. Interference of the activities of ERK and JNK was capable of attenuating GnRH I and II-induced MMP-2 expression and trophoblast invasion, indicating that activation of ERK and JNK are required in both GnRH I and GnRH II-mediated MMP-2 production and invasion-promoting effect in human trophoblastic cells.

Key words GnRH, JEG-3 cells, cell invasion, ERK, JNK

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00485

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

**Corresponding author.

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

Received: September 18, 2008 Accepted: November 7, 2008