



粘附分子 CD146 是影响滋养层细胞侵入行为的关键分子*

刘 琴^{1,2)} 赵心刚¹⁾ 张 莹¹⁾ 沈 毅¹⁾ 刘以训³⁾ 阎锡蕴¹⁾ **

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101;

(²⁾中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100080;

(³⁾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 前期研究观察到一种现象, 在正常妊娠的胎盘中细胞粘附分子 CD146 选择性地表达在侵入性滋养层细胞中, 而在滋养层细胞侵入不足的先兆子痫病人的胎盘中 CD146 表达降低或缺失. 本文进一步研究了 CD146 分子影响滋养层细胞侵入行为的作用机理. 免疫荧光实验显示 CD146 分子选择性地表达在具有侵袭能力的中间滋养层细胞, 而在非侵入性的细胞滋养层细胞和合体滋养层细胞中不表达. 细胞功能实验表明, 影响滋养层细胞侵入性的两个关键要素, 即细胞迁移和基质金属蛋白酶的分泌, 都受到 CD146 特异抗体的显著抑制. 这些研究结果提示, 粘附分子 CD146 是影响细胞侵入行为的关键分子. 这为深入研究胚胎植入和肿瘤浸润的分子调控机理提供了一个关键的分子模型.

关键词 细胞粘附分子 CD146, 滋养层细胞侵入, 基质金属蛋白酶

学科分类号 Q2

在妊娠过程中, 胚胎滋养层细胞侵入到母体蜕膜, 并侵入其中的螺旋动脉, 替代血管内皮细胞, 建立母体/胎儿的交互式循环, 为胚胎的发育提供营养. 滋养层细胞侵入失败会导致一系列的妊娠疾病, 包括自然流产和先兆子痫^[1-4]. 滋养层细胞侵入和肿瘤侵入非常相似, 主要依赖于两方面的因素: 细胞的迁移和细胞分泌基质金属蛋白酶的活性. 细胞粘附分子的动态表达与细胞的迁移性密切相关. 已经有研究表明, 一些细胞粘附分子, 如整合素 $\alpha 5 \beta 3$ 和血管内皮钙粘素 (VE-cadherin) 等的表达对滋养层细胞获得侵入能力有重要影响, 这些粘附分子的表达缺失与滋养层细胞侵入失败密切相关^[5,6].

细胞粘附分子 CD146 是免疫球蛋白基因超家族的新成员. CD146 是一个细胞跨膜蛋白, 胞外区具有典型的 V-V-C-C-C 结构区^[7], 胞内部分相对较短, 具有潜在的蛋白激酶识别位点. CD146 是一个高度糖基化的蛋白质分子, 其中碳水化合物大约占分子质量的 35%^[8]. 最早发现 CD146 分子特异表达在黑色素瘤细胞上, 因此又名黑色素瘤细胞粘附分子 (Mel-CAM 和 MUC18)^[7], 随后发现它表达在血管内皮细胞^[9]、侵入性中间滋养层细胞^[10,11]和激活状态 T 细胞上^[12,13]等部位.

目前有关 CD146 分子的功能还了解不多. 德国慕尼黑大学 Johnson 实验室发现 CD146 分子与黑色素瘤的恶性程度和转移潜力直接相关, 该分子通常高表达于恶性程度高、转移性强的黑色素瘤细胞, 而在转移性差的良性黑色素瘤细胞中往往表达缺失. 他们的研究表明, 将 CD146 基因转入到原本不表达 CD146 的黑色素细胞后, 会诱发转基因细胞的致瘤性, 引起黑色素瘤的快速生长和转移^[14]. 然而, 在具有高度转移性的黑色素瘤细胞中下调 CD146 的表达会降低肿瘤的发生^[15,16].

最近我们的研究发现, 在正常胚胎发育过程中侵入性滋养层细胞表达 CD146 分子, 而在滋养层细胞侵入能力受损的妊娠疾病先兆子痫中, CD146 分子的表达下调, 甚至缺失^[11]. 说明 CD146 的表达和滋养层细胞侵入能力密切相关. 为了证实 CD146 分子参与细胞侵入事件, 本文研究了 CD146 分子在滋养层细胞侵入过程中的功能及其相关机理.

* 国家自然科学基金资助项目 (30070387) 和国家高技术“863 计划”资助项目 (2001AA215321).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888583, E-mail: yanxy@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2004-03-09, 接受日期: 2004-03-19

1 材料与方法

1.1 动物

选用 25 ~ 30 g 成年 ICR 系的雌性小鼠 (购于北京维通利华公司), 与同种成年雄鼠合笼, 次日检出阴栓作为妊娠第 1 天。

1.2 抗体

抗 CD146 的鼠单克隆抗体 AA98 由本实验室制备^[17]。抗角蛋白多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司。Cy3 标记的羊抗鼠 IgG、异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔 IgG 和正常小鼠 IgG (mIgG) 购于美国 Sigma 公司。

1.3 双色免疫荧光检测

正常胎盘组织冰冻切片后, 在 4℃ 冷丙酮中固定 5 min。室温晾干后, 用 PBS 洗。5% 正常羊血清封闭 1 h 后, 加入抗 CD146 和抗角蛋白两种抗体的混合液在 4℃ 孵育过夜, PBS 洗。然后与两种二抗混合液 (Cy3 标记的羊抗鼠 IgG + 异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔 IgG) 在 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗, 用荧光显微镜观察。

1.4 外胎盘锥的分离和培养

从妊娠第 8.5 天的雌鼠子宫蜕膜中取出胚胎, 在胚胎外胚层处将外胎盘锥分离, 经清洗后随机移入 24 孔培养板中进行培养, 培养液为 Ham's F-12 培养基, 并补充 3% 胎牛血清 (Hyclone, South Logan, UT), 1.6 g/L 碳酸氢钠, 0.3 g/L 谷氨酰胺, 0.24 g/L 乳酸钙和 400 U/ml 庆大霉素。24 孔培养板预先用 1 g/L 层粘连蛋白按 10 μ l/孔铺盖, 在超净台内室温风干 3 h 以上。外胎盘锥培养液中加入抗 CD146 抗体 (20 mg/L) 或相同浓度的 mIgG 进行培养, 每隔 12 h 在倒置显微镜下观察一次, 轻轻晃动培养板, 不动者计为粘附的外胎盘锥, 其占总外胎盘锥数目的百分比计为粘附率; 在粘附的外胎盘锥周围迁移出滋养层细胞的计为迁移的外胎盘锥, 其占总外胎盘锥数目的百分比计为扩展率。

1.5 明胶酶谱分析

收集外胎盘锥培养上清, 用 Bradford 法测定培养上清的蛋白质浓度, 调整并使每个样品中的蛋白质含量相同。取等量样品与样品缓冲液混合, 在 37℃ 孵育 0.5 h。然后用含 1 g/L 明胶的 10% 丙烯酰胺凝胶作为分离胶, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后, 用含 2.5% Triton X-100 的 Tris 缓冲液 (pH 7.5) 清洗凝胶 2 次, 每次 30 min。然后, 加

入孵育液 (0.05 mol/L Tris, 0.2 mol/L NaCl, 0.01 mol/L CaCl₂, 1 μ mol/L ZnCl₂, 1% Triton, pH 7.5), 在 37℃ 孵育 18 h。对照组在孵育液中加入 20 mmol/L EDTA 螯合金属蛋白酶活性所必需金属离子。酶谱胶经 0.2% 考马斯亮蓝 R-250 染色后, 脱色照相。

1.6 统计分析

所有的实验至少重复 3 次, 所有的数据都用 *t*-test 分析, 表示为 ($\bar{x} \pm s$)。P < 0.05 被认为是显著性差异。

2 结果

2.1 CD146 分子在侵入性滋养层细胞中的特异表达

为了检测 CD146 分子在不同滋养层细胞上的分布, 我们用双色免疫荧光方法检测了 CD146 在正常胎盘中的表达。结果显示, CD146 分子在漂浮绒毛和锚定绒毛中非侵入性的细胞滋养层细胞 (CT) 和合体滋养层细胞 (ST) 上不表达, 而在锚定绒毛细胞柱中的中间滋养层细胞 (IT) 上强烈表达 (图 1), 这些中间滋养层细胞将从绒毛顶端向母体蜕膜和血管中侵入, 建立母胎循环。

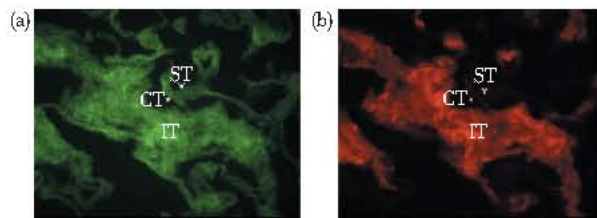


Fig.1 The expression of CD146 in normal placentas

Frozen sections of normal placentas were double stained with anti-cytokeratin (a) and anti-CD146 antibodies (b). CT: cytotrophoblasts; ST: syncytiotrophoblasts; IT: intermediate trophoblasts. ($\times 200$).

2.2 CD146 在滋养层细胞粘附和迁移中的作用

CD146 分子在侵入性中间滋养层细胞中的特异表达, 提示该分子可能参与中间滋养层细胞的侵入行为。为了证实这一假设, 我们从妊娠第 8 天的小鼠子宫中分离外胎盘锥, 培养在含 20 mg/L 抗 CD146 抗体或对照 mIgG 的培养基中。如图 2 所示, 抗 CD146 抗体不影响外胎盘锥滋养层细胞与培养板中的层粘连蛋白粘附, 但是它对滋养层细胞从外胎盘锥中迁移出来的行为有强烈的抑制作用。培养 36 h, 迁移抑制率超过 40%。

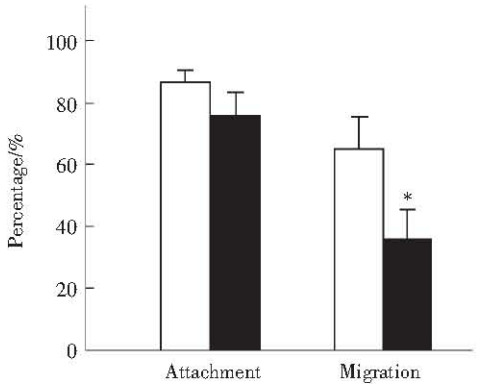


Fig. 2 The effect of anti-CD146 antibody on the attachment and migration of trophoblastic cells
Trophoblastic cells were cultured in medium containing either 20 mg/L anti-CD146 antibody or isotype matched mouse IgG (mIgG) for 36 h. Anti-CD146 antibody significantly inhibited the migration of trophoblasts, but did not inhibit the cell attachment. * $P < 0.05$. □: mIgG; ■: anti-CD146.

2.3 抗 CD146 抗体对滋养层细胞分泌基质金属蛋白酶的影响

金属蛋白酶在滋养层细胞侵入行为中起着非常重要的作用. 为了进一步检测抗 CD146 抗体对金属蛋白酶分泌的影响, 我们用明胶酶谱法检测了外胎盘滋养层细胞培养上清中金属蛋白酶的活性. 结果显示, 用 mIgG 处理的对照组培养液中 MMP9 和 MMP2 的酶活性很高, 而抗 CD146 抗体组中 MMP9 和 MMP2 的酶活性显著下降. 这两种金属蛋白酶活性均能够被金属离子螯合剂 EDTA 所终止.

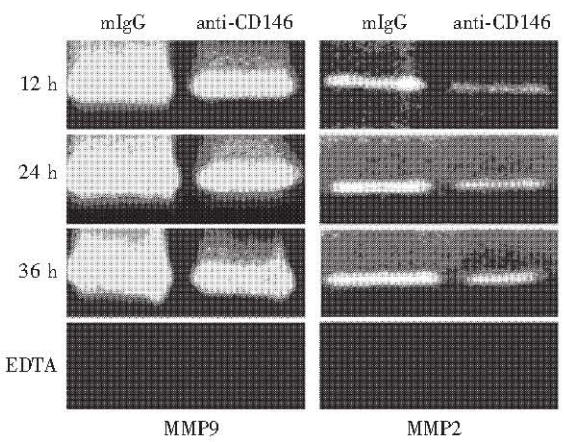


Fig.3 Zymography assay showing that the anti-CD146 antibody decreased the activity of matrix metalloproteinases (MMP) secreted by trophoblastic cells

3 讨 论

胚胎植入与肿瘤浸润存在惊人的相似之处, 因为滋养层细胞和肿瘤细胞一样非常具有侵袭性. 这些细胞分泌的各种蛋白水解酶降解细胞外基质成分, 从而使细胞顺利通过被降解的基质而向细胞外迁移. 然而, 二者之间又存在本质的区别. 主要表现在胚胎植入时, 滋养层细胞的侵入行为受到精确调控, 只能发生在特定的时间和特定的部位, 而且滋养层细胞是短命的, 不具有致瘤性. 因此, 寻找影响滋养层细胞侵袭性的关键分子, 将有助于理解肿瘤浸润和转移机理.

我们观察到在正常胎盘中, CD146 分子选择性地表达在具有侵入能力的中间滋养层细胞中, 而不表达于非侵入性的细胞滋养层细胞和合体滋养层细胞. 这一发现与我们先前在先兆子痫中观察到 CD146 在侵入能力受损的滋养层细胞上不表达或表达低^[11]的现象一致. 这些实验结果不仅提示 CD146 分子可能参与滋养层细胞的侵入行为, 而且为解释先兆子痫与滋养层细胞侵入受损有关的假说提供有力的支持.

本文揭示 CD146 分子在滋养层细胞侵入中的功能是通过调节其分泌金属蛋白酶的能力而实现的. 金属蛋白酶是唯一能降解胞外各类胶原蛋白的酶类, 对侵入过程非常关键^[18]. 我们发现抗 CD146 抗体能抑制滋养层细胞分泌 MMP9 和 MMP2, 这可能是解释 CD146 抗体抑制滋养层细胞迁移的主要原因. 这一结果与 CD146 在黑色素瘤细胞转移过程中的表现相似. Xie 等^[14]曾经报道, 提高黑色素瘤细胞中 CD146 的表达会导致细胞分泌 MMP2 活性升高并促进肿瘤转移, 而 CD146 抗体能强烈抑制 MMP2 启动子和胶原酶的活性, 从而抑制黑色素瘤细胞的浸润^[16]. 但是目前我们还不能排除其他机制参与 CD146 调控滋养层细胞侵入的可能性. 例如 CD146 可能作为信号传导分子参与细胞骨架的重组和焦点粘着斑的形成, 从而对粘附迁移起调控作用. 目前这部分工作正在研究之中.

结合我们的上述发现以及其他实验室在 CD146 分子参与黑色素瘤细胞侵袭性的相关研究, 引发的一个十分有趣的问题是 CD146 分子在滋养层细胞和肿瘤细胞侵袭中所扮演的相似性是通过什么途径调节? 本研究为回答这个问题, 及进一步深入研究胚胎植入和肿瘤浸润的分子调控机理提供了一个分子模型.

参 考 文 献

- Michel M Z, Khong T Y, Clark D A, *et al.* A morphological and immunological study of human placental bed biopsies in miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol*, 1990, **97** (11): 984 ~ 988
- Hustin J, Jauniaux E, Schaaps J P. Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion. *Placenta*, 1990, **11** (6): 477 ~ 486
- Khong T Y, Liddell H S, Robertson W B. Defective haemochorial placentation as a cause of miscarriage: a preliminary study. *Br J Obstet Gynaecol*, 1987, **94** (7): 649 ~ 655
- Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, **187** (1-2): 233 ~ 238
- Zhou Y, Fisher S J, Janatpour M, *et al.* Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest*, 1997, **99** (9): 2139 ~ 2151
- Zhou Y, Damsky C H, Fisher S J. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. *J Clin Invest*, 1997, **99** (9): 2152 ~ 2164
- Lehmann J M, Riethmuller G, Johnson J P. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** (24): 9891 ~ 9895
- Shih I M, Elder D E, Speicher D, *et al.* Isolation and functional characterization of the A32 melanoma-associated antigens. *Cancer Res*, 1994, **54** (9): 2514 ~ 2520
- Bardin N, Frances V, Lesaulle G, *et al.* Identification of the S-Endo1 endothelial-associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **218** (1): 210 ~ 216
- Shih I M, Kurman R J. Expression of melanoma cell adhesion molecule in intermediate trophoblast. *Lab Invest*, 1996, **75** (3): 377 ~ 388
- Liu Q, Yan X, Li Y, *et al.* Pre-eclampsia is associated with the failure of melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) expression by intermediate trophoblast. *Lab Invest*, 2004, **84** (2): 221 ~ 228
- Filshie R J, Zannettino A C, Makriniola V, *et al.* MUC18, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on bone marrow fibroblasts and a subset of hematological malignancies. *Leukemia*, 1998, **12** (3): 414 ~ 421
- Pickl W F, Majdic O, Fisher G F, *et al.* MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *J Immunol*, 1997, **158** (5): 2107 ~ 2115
- Xie S, Luca M, Huang S, *et al.* Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res*, 1997, **57** (11): 2295 ~ 2303
- Satyamoorthy K, Muylers J, Meier F, *et al.* Mel-CAM-specific genetic suppressor elements inhibit melanoma growth and invasion through loss of gap junctional communication. *Oncogene*, 2001, **20** (34): 4676 ~ 4684
- Mills L, Tellez C, Huang S, *et al.* Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res*, 2002, **62** (17): 5106 ~ 5114
- Yan X, Lin Y, Yang D, *et al.* A novel anti - CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. *Blood*, 2003, **102** (1): 184 ~ 191
- Behrendtsen O, Alexander C M, Werb Z. Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development*, 1992, **114** (2): 447 ~ 456

Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM/CD146) Is a Critical Molecule in Trophoblast Invasion*

LIU Qin^{1, 2)}, ZHAO Xin-Gang¹⁾, ZHANG Ying¹⁾, SHEN Yi¹⁾, LIU Yi-Xun³⁾, YAN Xi-Yun¹⁾**

⁽¹⁾ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

⁽³⁾ State Key Laboratory of Reproduction Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Previous study has shown that melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) is highly expressed by invasive trophoblasts in normal pregnancy, but it is absent in pregnancy disorder pre-eclampsia in which the invasion ability of trophoblast is seriously impaired. The mechanism that CD146 affects the trophoblast invasion was investigated. Immunofluorescence staining revealed that CD146 was selectively expressed on invasive intermediate trophoblasts, but was not expressed on non-invasive cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. Functional studies showed that the anti-CD146 antibody significantly inhibited the migration of trophoblasts and the activity of matrix metalloproteinases secreted by trophoblastic cells, which are two critical factors for trophoblast invasion. The results demonstrate that adhesion molecule CD146 plays a critical role in trophoblast invasion, which will provide a valuable molecular model for the study of trophoblast and tumor cell invasion.

Key words CD146, trophoblast invasion, matrix metalloproteinase

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30070387) and State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA215321).

** Corresponding author. Tel: 86-10-64888583, E-mail: yanxy@sun5.ibp.ac.cn

Received: March 9, 2004 Accepted: March 19, 2004