

γ -氨基丁酸信号对小鼠胎盘早中期建立的影响*

罗文萍 谭冬梅 杨根岭 卢俊杰 赵海 谭毅**

(重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016)

摘要 为了观察 γ -氨基丁酸 B 型受体 R1 亚基(GABAB1R, GB1) 在妊娠小鼠第 1 天至第 8 天(D1~D8)子宫中的表达规律, 探讨 γ -氨基丁酸(GABA)信号是否参与了胎盘早中期建立. 应用半定量 RT-PCR、免疫组织化学及 Western blotting 检测 GB1 在妊娠小鼠 D1~D8 子宫中的表达情况, 原代分离 D8.5 的绒毛膜锥(EPCs)及蜕膜细胞, 检测 GABA 及 GABA B 型受体激动剂 baclofen、拮抗剂 2-hydroxysaclofen 对 EPCs 黏附及外延生长以及对蜕膜细胞侵袭能力的影响. D8 时体内注射 0.05 g/kg、0.5 g/kg 及 5 g/kg 的 GABA, 于 D14 收集胎盘, 制作石蜡切片. 结果显示, GB1 mRNA 及蛋白动态表达于 D1~D8 子宫. 100 μ mol/L GABA 及 5 μ mol/L Baclofen 促进 EPCs 的外延生长, 抑制蜕膜细胞的侵袭, 同时, 20 μ mol/L 2-hydroxysaclofen 成功逆转 GABA 对 EPCs 及蜕膜细胞的侵袭调节作用. 5 g/kg 的 GABA 可导致 D14 小鼠胎盘的迷路层滋养层细胞增多, 母鼠血窦及胎鼠血管减少或发育不良, 海绵滋养层的细胞滋养层细胞变小, 糖原细胞减少或消失. 结果提示, 在小鼠早中期胎盘建立过程中, GABA 信号促进滋养层侵袭至母体蜕膜组织, 而抑制蜕膜细胞积极主动的侵袭行为, 并可损害胎盘的结构.

关键词 γ -氨基丁酸(GABA), 蜕膜细胞, 绒毛膜锥(EPCs), 侵袭, 胎盘

学科分类号 Q492

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00124

哺乳动物的胎盘发生依赖于胚胎滋养层细胞对子宫内膜精确、适度地侵入, 过多的侵袭或者是侵袭不足, 均可以导致异常妊娠, 例如先兆子痫或者绒癌^[1-2]. 在胎盘的形过程中, 滋养层细胞具有与肿瘤细胞相似的侵袭能力和行为方式, 二者都涉及基质金属蛋白酶、多种细胞外基质成分、各种细胞因子等相似调节机制.

小鼠囊胚植入时, 靠近内细胞团(inner cell mass)的滋养层细胞分化为具有侵袭能力的绒毛膜锥(EPC), EPC 再分化产生 spongiotrophoblast(SPT)和 chorionic trophoblasts 两种滋养层细胞参与胎盘的发生. 小鼠是研究人类滋养细胞侵袭调节和胎盘发生的理想动物模型^[3].

γ -氨基丁酸(γ -amino butyric acid, GABA)是一种非蛋白质氨基酸, 是脊椎动物中枢神经系统中主要的抑制性神经递质. GABA 受体根据其不同的药理特征分成 A、B、C 三种类型, 其 B 受体属于 G 蛋白耦联受体家族并相伴有 K^+ 和 Ca^{2+} 通道, 是由扮演功能角色的 R1(GB1)和扮演结构角色的 R2(GB2)两种亚基组成的异型二聚体. 近年来, 关于 GABA 在外周组织中的研究表明, GABA 及其 B

受体参与调节了多种肿瘤细胞的侵袭, 如前列腺癌细胞^[4-6].

我们实验室前期研究发现, GABA 阳性表达于 D7, D8 的母体蜕膜细胞, 及绒癌细胞株 JAR 细胞, 并对 JAR 细胞的侵袭能力具有调节作用. 小鼠的滋养层细胞侵袭是开始于 D8, 而在小鼠子宫胎盘形成过程中, GABA 及其受体的表达以及对于胎盘形成能力的作用尚未知. 因此, 我们首次检测了 GB1 妊娠小鼠子宫中的表达, 并通过体外培养 EPCs、蜕膜细胞及体内注射 GABA, 探讨 GABA 信号在早中期胎盘形成中的作用, 促进我们对胎盘形成分子机制的认识.

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级昆明雌鼠, 6~8 周龄, 体重 20~25 g,

* 国家自然科学基金面上项目(30770816, 31171436)和重庆市教委科学技术研究(KJ110316)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 023-68485997, E-mail: tanyee66@hotmail.com

收稿日期: 2012-03-13, 接受日期: 2012-08-21

由重庆医科大学实验动物中心提供[SCXK(渝)2007-0001], 实验中所涉及的操作方案均通过重庆医科大学伦理委员会批准. 雄鼠与动情期雌鼠 1:2 合笼, 次晨观察到阴栓者记为妊娠第 1 日(D1). 分别于 D4~D8 取材, 收集子宫组织, 注射台盼蓝, 并分离 D5~D8 的植入位点与非植入位点组织. 将一部分组织保存于液氮, 用于 RNA 及总蛋白提取, 另一部分经 4%多聚甲醛固定后, 制作石蜡切片(4 μm).

兔源性 GABA 多克隆抗体购自武汉博士德公司; 兔源性 GB1 多克隆抗体购自 Abcam 公司; SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中衫公司; Matrigel 胶购自美国 BD Biosciences 公司; RT-PCR 试剂盒购于 Promega 公司; GABA、GABABR 激动剂 baclofen、GABABR 拮抗剂 2-hydroxysaclofen 均购自 Sigma 公司, Western blot 相关试剂购自碧云天公司; 胎牛血清, Ham's F-12 培养基和 I 型胶原酶购自 Invitrogen 公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测 GB1 蛋白在 D4~D8 小鼠子宫中的表达. 妊娠小鼠 D4~D8 的子宫组织切片按常规 SP 法进行免疫组织化学染色, 一抗为兔源性 GABA 或 GB1 多克隆抗体, 工作浓度分别为 1:100、1:1000, 阴性对照组采取同种兔正常血清代替一抗. 显微镜下观察 GB1 蛋白在妊娠小鼠 D4~D8 子宫中的表达位置.

1.2.2 半定量 RT-PCR 检测 GB1 mRNA 在 D4~D8 小鼠子宫中的表达. 将液氮中保存的子宫组织, 转移至匀浆器中, 并加入 TRIzol, 按照常规步骤, 提取总 RNA, 随后进行两步法实施半定量 RT-PCR. 根据 GenBank 发布的 GB1 [Gamma-aminobutyric acid (GABA)B receptor, type I isoforms], β -actin 编码区序列, 采用 Primer Premier 5.0 设计引物, 送于上海生工公司合成. GB1 上游引物: 5' TTTCTCATCGGGTGGTATG 3', 下游引物: 5'TTCA-GCCGCTTGGTTAGTT 3', 扩增产物为 92 bp. β -actin 上游引物: 5' AGCCATGTACGTAGCA-TCC 3', 下游引物: 5' CTCTCAGCTGTGGTGGT-GAA 3', 扩增产物为 228 bp. 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min. 所得产物经 2%琼脂糖凝胶电泳, BIO-RAD 凝胶成像仪扫描并对条带灰度值进行半定量分析.

1.2.3 Western blotting 检测 GB1 蛋白在 D4~D8

小鼠子宫中的表达. 以组织裂解液于冰上充分裂解组织, 按照提取试剂盒步骤提取总蛋白, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 采用 BSA 法测定蛋白质浓度后, 实施 SDS-PAGE, 转膜, 丽春红染色后洗脱, 经封闭液室温封闭 1~2 h, 一抗工作浓度为 1:1000, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(16~18 h), 加入羊抗兔二抗, 室温孵育 1~2 h, ECL 显色, 拍照. 以 GAPDH 为内参, 用 BIO-RAD 图像分析软件对条带灰度值进行分析.

1.2.4 免疫荧光检测 GB1 蛋白在蜕膜细胞中的表达. 参考 Peng 等^[7]方法提取小鼠子宫蜕膜细胞, 略有改动. 将细胞以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 接种于铺有细胞爬片的 6 孔板各孔, 培养于含 10%胎牛血清的 Ham's F-12 培养基中, 24 h 后换液, 48 h 后取出细胞爬片, 按免疫荧光常规步骤操作. 兔源性 GABA 或 GB1 多克隆抗体工作浓度分别为 1:100、1:600 稀释, 阴性对照采用正常兔血清代替一抗. 激光共聚焦显微镜扫描成像.

1.2.5 Matrigel 侵袭实验检测 GABA 信号对蜕膜细胞侵袭能力的影响. 将融化后的 Matrigel 胶用无血清培养基作 1:9 稀释, 每个小室上室加入 50 μl 稀释液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min. 随后收集蜕膜细胞, 每孔接种 1×10^5 个细胞, 分别加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ GABA, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ baclofen, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 2-hydroxysaclofen. 下室加入 600~800 μl 含 10%FBS 的 1640 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h. 棉球轻轻地擦净膜上层小室多余的 Matrigel 胶及细胞, 用 PBS 洗小室 2 次, 用甲醇室温固定下层小室的细胞, 10 min. 苏木素、伊红染色, 显微镜下 100 倍随机选择 10 个不同的视野照相并计数. 每组试验重复 3 次.

1.2.6 体外检测 GABA 信号对绒毛膜锥(EPCs)黏附及外延生长能力的影响.

参考 Peng 等^[7]的方法分离 D8.5 的 EPCs, 略有改动. 断颈椎处死小鼠, 取出蜕膜鼓包, 显微镜下分离出 EPCs, 并置于铺有 Matrigel 胶的 24 孔板中培养, 每孔 10 个. 2~4 h 后, 分别加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ GABA, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ baclofen, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 2-hydroxysaclofen, 观察各组 EPC 外延生长的情况.

EPC 的黏附及外延生长的测定参考 Peng 等^[7]方法, 略有改动. 将培养至 24 h 或 48 h 的 EPCs

振动 20 s(1r/s), 随后, 依然黏附于 Matrigel 胶上的 EPCs 视为黏附成功, 随后于显微镜下观察 EPCs 外延生长情况, 并拍照. 每张图片采取 Image J 软件计算从 EPCs 至外延生长最远处的距离, 代表该 EPCs 的外延生长能力. 每组试验重复 3 次.

1.2.7 体内检测 GABA 信号对胎盘组织结构的变化. 妊娠 D8 小鼠药物处理组分别腹腔注射 0.05 g/kg, 0.5 g/kg 及 5 g/kg 的 GABA, 每日一次. 生理盐水组设为药物对照组. 空白对照组不作任何处理. 在妊娠 D14 时获取小鼠胎盘, 制作石蜡切片, 行 HE 染色, 显微镜下观察胎盘的组织形态学变化.

2 结 果

2.1 GB1 mRNA 在 D4~D8 小鼠子宫中的表达

电泳结果显示, GB1 mRNA 表达于 D4~D8 小鼠子宫. 统计学分析显示, D5~D8 子宫中, 植入位点的表达水平均低于对应的非植入位点 ($P < 0.05$). 在各植入位点组织中, 与 D4 比较, D5 的 GB1 mRNA 表达水平较高, 差异显著, 而随后表现为下降趋势, 但差异无统计学意义. 在各非植入位点中, 与 D5 的非植入位点比较, D7 的非植入位点 GB1 mRNA 表达水平下降, 差异具有统计学意义(图 1).

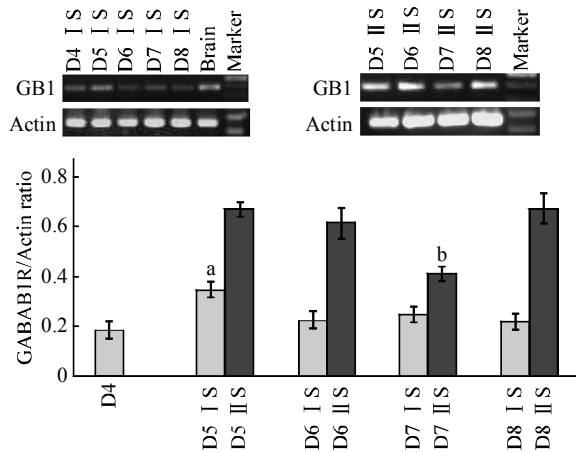


Fig. 1 Expression of GB1 mRNA in mouse uteri from D4 to D8 of pregnancy

I S: Implantation sites; II S: Iner-implantation sites. a: $P < 0.05$, as compared with D4. b: $P < 0.05$, as compared with D5 II S.

2.2 GB1 蛋白在 D4~D8 小鼠子宫中的表达

免疫组织化学结果显示, GB1 蛋白定位在 D4 小鼠子宫的腔、腺上皮及基质细胞的胞质; 在 D5, 强表达于残留的腔、腺上皮的胞质; 在 D6, 弱表达于初级蜕膜带的蜕膜细胞胞质; 而在 D7, 开始

表达于次级蜕膜带的蜕膜细胞胞质; 在 D8, GB1 强表达于次级蜕膜带的细胞胞质, 此外, 还弱表达于 EPCs 的细胞胞质(图 2a).

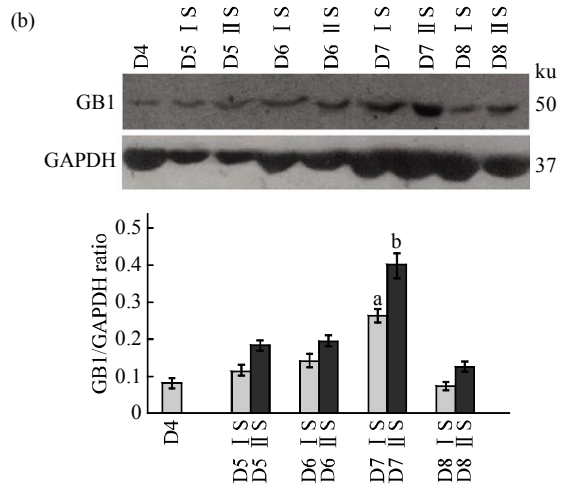
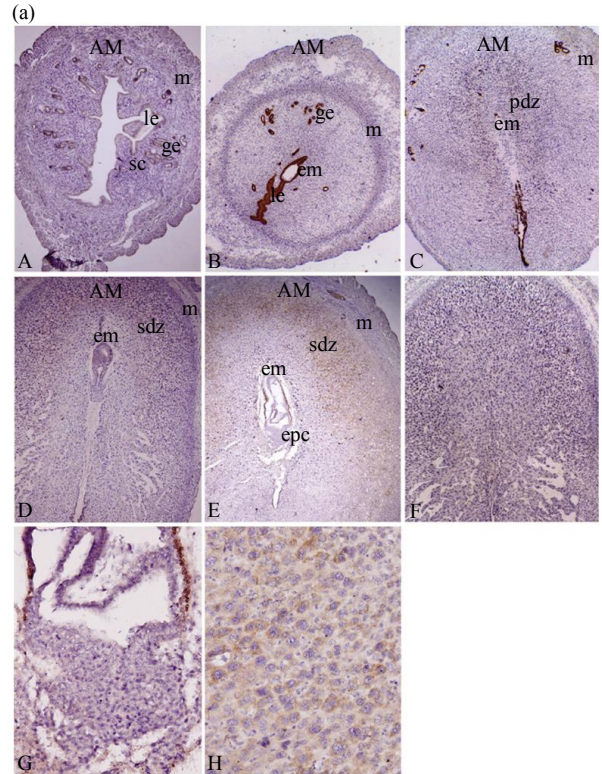


Fig. 2 Expression of GB1 protein in mouse uteri from D4 to D8 of pregnancy

(a) Immunostaining of GB1 in mouse uteri on day 4(A), 5 (B), 6(C), 7(D) and 8(E) and negative control (F) (40 \times). G: A higher magnification of EPC in E (200 \times). H: A higher magnification of sdz in E (200 \times). (b) Western blotting detected GB1 in mouse uteri from D4 to D8. GAPDH was used as a loading control. AM: Antimesometrial pole, ge: Glandular epithelium, le: Luminal epithelium, sc: Stromal cell, pdz: Primary decidual zone, sdz: Secondary decidual zone, em: Embryo, epc: Ectoplacental cones, I S: Implantation sites, II S: Inter-implantation sites. a: $P < 0.05$, as compared with D4. b: $P < 0.05$, as compared with D5 II S.

Western blotting 条带灰度值分析可知, GB1 蛋白表达于 D4~D8 小鼠子宫, 与 D4 比较, D7 子宫的植入位点处 GB1 表达量较高, 具有统计学意义($P < 0.05$). 在非植入位点的蛋白质表达量高于相应的植入位点, 但没有统计学意义, 而同样的, 非植入位点的蛋白质表达峰值, 出现在 D7(图 2b).

2.3 GB1 蛋白在原代蜕膜细胞中的表达

原代提取的蜕膜细胞经 24 h 后贴壁, 细胞为梭形、细胞较大、胞质成分较少、胞核较大、并且少数细胞出现多核情况. 激光共聚焦结果显示, GABA 及 GB1 表达于原代蜕膜细胞胞质, 经激发显出绿色荧光, 红色为 PI 染核. 而阴性对照未见阳性信号(图 3).

2.4 GABA 信号对蜕膜细胞侵袭能力的影响

原代提取蜕膜细胞后, 待细胞贴壁, 生成密度达到 80%时, 进行 transwell 细胞侵袭实验. 下层小室细胞经 HE 染色, 镜下观察发现, 与空白组比较, 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA 及 5 $\mu\text{mol/L}$ GABA B 受体

激动剂 baclofen 均可以抑制细胞侵袭. 随后, 为了进一步研究 GABA 对蜕膜细胞的抑制作用是否是通过 B 受体, 我们采用了 GABA B 受体拮抗剂 2-hydroxysaclofen 预处理, 再经 GABA 作用, 结果发现, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 2-hydroxysaclofen 可成功逆转 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA 对细胞侵袭的抑制作用(图 4).

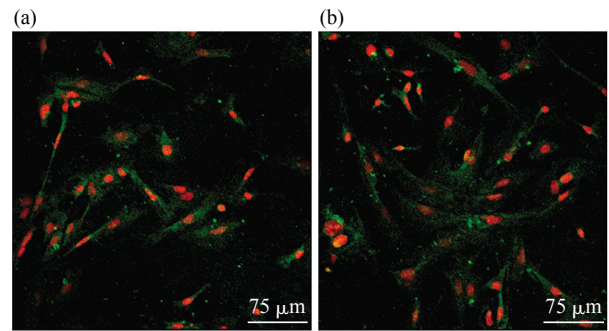


Fig. 3 Expression of GABA and GB1 protein in primary decidual cell

(a) GABA expressed in decidual cell. (b) GB1 expressed in decidual cell.

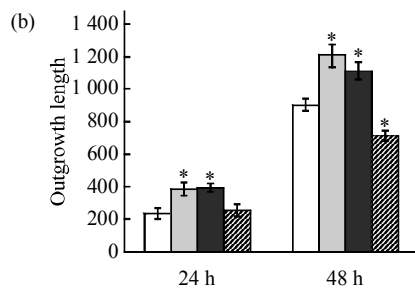
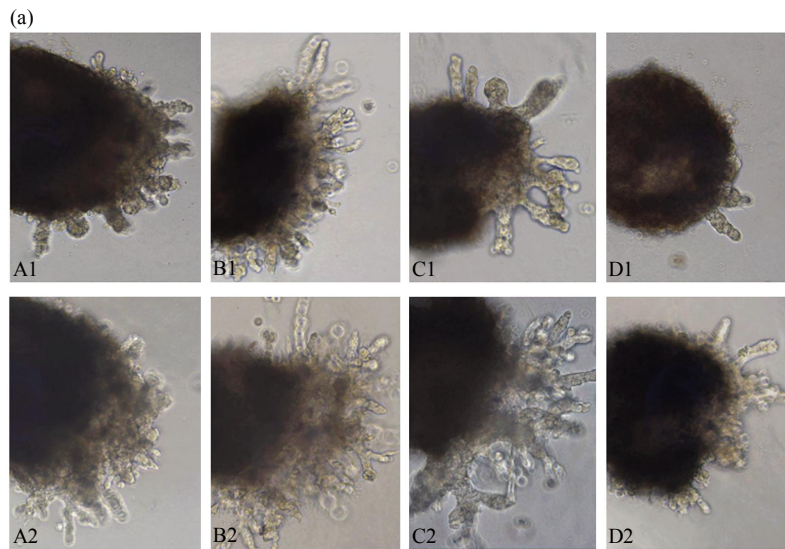


Fig. 4 Effects of GABA, baclofen and 2-hydroxysaclofen on EPCs outgrowth

The effect of GABA, baclofen and 2-hydroxysaclofen on EPCs outgrowth. (a) The image of EPCs cultured up to 48 h in microscope ($\times 100$). At 24 h, the outgrowth length of EPCs after treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA (B1), 50 $\mu\text{mol/L}$ baclofen (C1) and 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA plus 20 $\mu\text{mol/L}$ 2-hydroxysaclofen (D1). A1: As blank control. At 48 h, the outgrowth length of EPCs after treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA (B2), 50 $\mu\text{mol/L}$ baclofen (C2) and 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA plus 20 $\mu\text{mol/L}$ 2-hydroxysaclofen (D2). A2: As blank control. (b) The statistics of the outgrowth length of EPCs. * $P < 0.05$, as compared with blank. □: Blank; ■: GABA; ■: Baclofen; ▨: GABA+2-hydroxysaclofen.

2.5 GABA 信号对绒毛膜锥黏附及外延生长能力的影响

为了研究 GABA 信号对 EPC 侵袭能力的影响, 我们检测了不同浓度 GABA 及其激动剂、拮抗剂对 EPC 黏附及外延生长能力的影响. 研究发现, 在培养至 24 h 时, 不同组的 EPC 均有 90% 以上的黏附率, 各组之间无显著差异. 提示

了 GABA 信号对 EPC 的黏附能力没有影响. 同时, 通过 Image J 软件分析可知, 24 h 及 48 h 时, 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA 及 5 $\mu\text{mol/L}$ baclofen 均可促进 EPC 的外延生长 ($P < 0.05$). 随后, 采用 20 $\mu\text{mol/L}$ 2-hydroxysaclofen 与 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA 联合处理 EPC, 结果表现为其外延生长能力略有降低, 与空白组比较, 无显著差异(图 5).

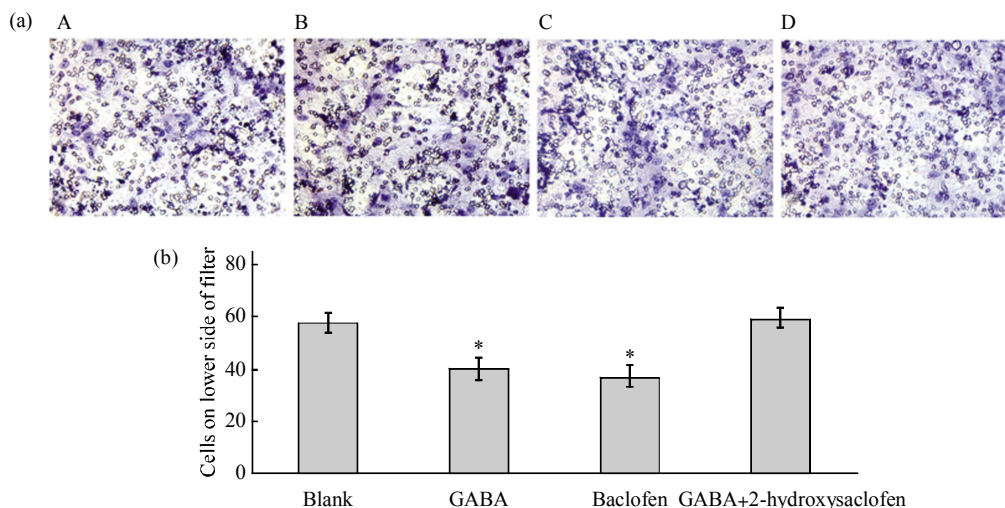


Fig. 5 Effects of GABA, baclofen and 2-hydroxysaclofen on decidual cell invasion

The effect of GABA, baclofen and 2-hydroxysaclofen on decidual cell invasion. (a) The image of decidual cell in lower side of filter cultured up to 24 h in microscope ($\times 100$). The lower side cells of filter after treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA (B), 50 $\mu\text{mol/L}$ baclofen (C) and 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA plus 20 $\mu\text{mol/L}$ 2-hydroxysaclofen (D). (A) As blank control. (b) The statisticse of cells in lower side of filter. * $P < 0.05$, as compared with blank.

2.6 GABA 信号对胎盘组织结构的影响

小鼠的胎盘属于血-绒毛膜型, 妊娠 D13 时胎盘结构已分化完成, 由胎鼠侧至子宫蜕膜侧依次可分为迷路层、海绵滋养层及蜕膜层. 本文通过体内注射 GABA 后发现, 与空白对照组比较, 5 g/kg

的 GABA 组胎盘的的组织形态学发生明显变化, 表现为其迷路滋养层的滋养层细胞较对照组增多, 细胞密集、少量细胞出现、胎儿血窦及母体血管相对减少或发育不良. 海绵滋养层典型的细胞索减少、细胞大多疏松排列、细胞滋养层细胞变小(图 6).

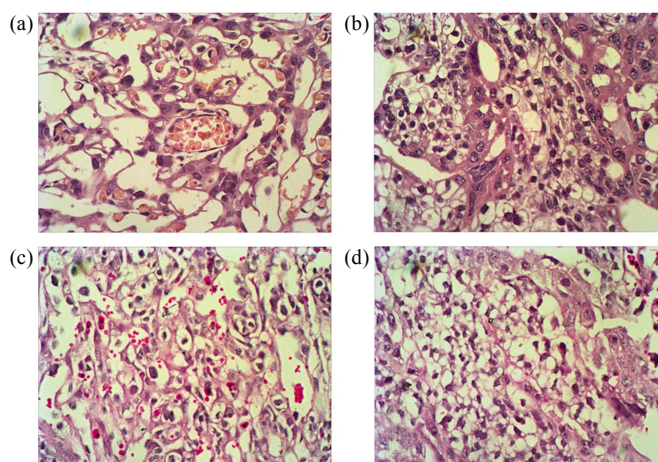


Fig. 6 Effects of GABA on the histological structures of placentas on D14

(a) The layer of labrinthine in blank control. (b) The layer of spongiotrophoblast in blank control. (c) The layer of labrinthine after treatment with 5 g/kg GABA. (d) The layer of spongiotrophoblast after treatment with 5 g/kg GABA. ($400\times$)

3 讨 论

GABA 信号在生殖系统的作用早有文献报道, 其主要集中于研究 A 受体与子宫收缩之间的关系. GABA A 受体 π 亚基在子宫中含量最高, 它可改变 GABA A 受体对孕激素的敏感性, 调节子宫肌肉收缩, 及参与调节子宫内膜容受性和啮齿类动物的蜕膜化进程^[8-10]. 而 GABA 及其受体在外周多种肿瘤组织有广泛表达, 具有众多生理意义. Tatsuta 及其团队是最早发现了 GABA 与肿瘤之间的关系^[11]. 随后, Joseph 等^[12]的实验结果表明, GABA 可通过结合 GABAR (B)降低细胞内环磷酸腺苷浓度, 从而减弱大肠癌细胞株 SW480 的侵袭能力, 并增强肿瘤细胞的转移潜能. 在前列腺癌细胞株 C4-2 中, 研究者发现, GABA B 型受体激动剂可以通过增加 MMPs 的产量, 从而提高细胞的侵袭力, 而拮抗剂作用相反, 且提出经典的 GABA 的 A 型受体不会影响 MMP 的产量及细胞的侵袭力^[13]. 同时, 在 Maemura 等^[14]的研究中也指出, B 受体可能与胃癌细胞 KAT III 细胞的侵袭能力相关.

滋养层细胞侵入母体蜕膜是植入过程中的关键步骤. 在胎盘黏附于子宫中后, 侵袭性的滋养层细胞参与多种生理过程, 包括了调节母体血管的发生, 分泌多种细胞因子、激素, 以及调节母体免疫、代谢、内分泌功能^[15-17]. 在小鼠围植入期中, 于 D5.5 时, 滋养外胚层极化, 临近内细胞团, 细胞仍增殖形成绒毛膜锥(EPCs), 于 D6.5 时, 绒毛膜锥的外层细胞开始分化为侵袭性的次级滋养层细胞. 于 D7.5~D10.5 时, 次级滋养层细胞侵袭至母体蜕膜组织, 形成胎盘. 小鼠的滋养细胞侵袭开始于 D8^[18].

在本实验室的前期研究中发现, GABA 呈时空动态表达于妊娠小鼠 D1~D8 子宫, 并于 D6~D8 时, 在蜕膜区域出现较强表达, 而不表达于 EPCs. 在本文中我们检测了 GB1 在妊娠小鼠子宫中的表达, 研究结果证实, 在 D8, GB1 蛋白强表达于次级蜕膜带的细胞胞质并在 EPCs 中也有弱表达. EPCs 的黏附及外延生长常用于体外模型研究小鼠胚胎植入及滋养层侵袭. 因此, 我们采用体外分离培养 D8.5 的 EPCs, 种植于 Matrigel 胶上, 以不同浓度 GABA 及其 B 受体激动剂、拮抗剂进行干预. 结果提示, 各种浓度的 GABA 及其 B 受体激动剂、拮抗剂均不对 EPCs 的黏附能力产生影响, 而 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA 及 5 $\mu\text{mol/L}$ baclofen 均可促

进 EPC 的外延生长. 随后, 我们采用 GABA B 受体拮抗剂预处理后, 再次采用 GABA 干预, 结果提示, GABA B 受体拮抗剂可成功逆转 GABA 对 EPCs 的作用. 同时, 我们还采用了 A 受体的激动剂以相同的方式对 EPCs 进行干预, 实验发现, GABA A 受体激动剂不对 EPCs 的黏附及外延生长产生影响. 因此推测 GABA 可能通过 B 受体参与调解 EPCs 的侵袭作用. 但目前尚不能区分 GABA 这一作用是通过何种分泌方式进行调节.

在母胎界面, 滋养层和母体组织之间的复杂对话涉及众多的分子机制. 滋养层侵袭到母体蜕膜受到滋养层细胞及母体蜕膜组织的双向调节. 关于滋养层如何降解母体蜕膜组织, 一直是研究的热点, 相关机制, 已有众多文献报道, 如 MMPs 活性的变化及 PI3K/AKT 信号^[19]. 鉴于滋养层细胞与肿瘤细胞的相似性, 而侵袭过程中又出现了区别于肿瘤细胞的有限侵袭性, 越来越多的研究者将目光转移至二者之间的比较性研究, 如 CD82, PENT, TRAIL 基因及 wnt 信号通路^[20-22]. 同时也提示了母体子宫的蜕膜组织可以以旁分泌的方式控制滋养层细胞的有限侵袭包括细胞因子及免疫调节. 但是在这个过程中, 蜕膜组织到底只是扮演被动角色亦或有主动的作用, 还有待进一步的研究.

蜕膜细胞是主要的蜕膜中的细胞成分, 研究证实蜕膜细胞在调节滋养层侵袭中有重要的作用. 传统的观点认为, 蜕膜细胞被动接受滋养层细胞侵袭, 并表现出抑制作用. 近期文献报道在原代提取的人子宫内层基质细胞及永生化的细胞株, 在诱导蜕膜化反应后, 细胞表现出侵袭能力. 当与滋养层细胞直接接触性的共培养或采用滋养层细胞的培养培养基, 均可促进该侵袭能力^[23]. 因此提出, 在母胎对话中, 蜕膜细胞可能还扮演着积极主动的角色. 鉴于 GB1 在 D8 蜕膜区域及原代蜕膜细胞中的表达模式, 我们采用了不同浓度 GABA 及其受体激动剂、拮抗剂处理蜕膜细胞. 研究结果发现, 蜕膜细胞表现出了侵袭能力, 而且发现 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA 及 5 $\mu\text{mol/L}$ GABA B 受体激动剂 baclofen 均可以抑制细胞侵袭, 且 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 2-hydroxysaclofen 可成功逆转 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA 对细胞侵袭的抑制作用.

妊娠早期, 胎盘海绵滋养层有一部分滋养层细胞形成有桥粒连接的上皮索. 妊娠中后期, 上皮索互相吻合成网, 网眼较大, 其中充满特化的糖原细胞, 另一部分滋养层细胞则逐渐演变成富含胎儿血

管的迷路滋养层^[24]。本实验中, 通过腹腔注射 GABA 于 D8 的小鼠可发现, D14 小鼠胎盘的迷路层滋养层细胞增多, 母鼠血窦及胎鼠血管减少或发育不良, 而海绵滋养层内细胞滋养层细胞变小, 糖原细胞减少或消失, 因此提示了 GABA 在体内可能通过某种途径延缓了迷路滋养层的发育, 破坏海绵滋养层结构及功能, 影响胎鼠的正常生长及发育。

本文通过体外实验证实, GABA 信号参与了母胎界面的对话, 并扮演着双重角色。一方面, GABA 可以通过 B 受体促进 EPCs 的外延生长, 从而表现为促进滋养层侵袭至母体蜕膜组织; 另一方面, GABA 还可以通过 B 受体抑制蜕膜细胞的侵袭。而在体内实验中, 我们发现 GABA 可破坏胎盘的结构, 干扰其功能, 从而可能影响胎鼠的生长及发育。

参 考 文 献

- [1] J C Warning, S A McCracken, J M Morris. A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction*, 2011, **141**(6): 715–724
- [2] Zhang H, Long Q F, Ling L, *et al.* Elevated expression of KiSS-1 in placenta of preeclampsia and its effect on trophoblast. *Original Research*, 2011, **11**(2): 99–115
- [3] Hu D, Cross J C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int J Dev Biol*, 2010, **54**(2–3): 341–354
- [4] Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, *et al.* GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol*, 2002, **213**: 1–47
- [5] Calver A R, Robbins M J, Cesio C, *et al.* The C—terminal domains of the GABAB receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci*, 2001, **21**(4): 1203–1210
- [6] Roberts S S, Mendonca-Torres M C, Jensen K, *et al.* GABA receptor expression in benign and malignant thyroid tumors. *Pathol Oncol Res*, 2009, **15**(4): 645–650
- [7] Peng S, Li J, Miao C L, *et al.* Dickkopf-1 secreted by decidual cells promotes trophoblast cell invasion during murine placentation. *Reproduction*, 2008, **135**(3): 367–375
- [8] Hedblom E, Kirkness E F. A novel class of GABAA receptor subunit in tissues of the reproductive system. *J Biological Chemistry*, 1997, **272**(24): 15346–15350
- [9] Quezada M, Henriquez S, Vargas M, *et al.* Proenkephalin A and the gamma-aminobutyric acid A receptor pi subunit: expression, localization, and dynamic changes in human secretory endometrium. *Fertility and Sterility*, 2006, **86**(6): 1750–1757
- [10] Sadeghi H, Taylor H S. HOXA10 regulates endometrial GABAA {pi} receptor expression and membrane translocation. *Endocrinology and Metabolism*, 2010, **298**(4): 889–893
- [11] Tatsuta M, Lishi H, Baba M, *et al.* Inhibition by g-amino-n-butyric acid and baclofen of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Res*, 1990, **50**(16): 4931–4934
- [12] Joseph J, Niggemann B, Zaenker K S, *et al.* The neurotransmitter gamma2 aminobutyric acid is an inhibitory regulator for the migration of S W 480 colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 2002, **62**(22): 6467–6469
- [13] Azuma H, Inamoto T, Sakamoto T, *et al.* γ -Aminobutyric acid as a promoting factor of cancer metastasis, induction of matrix metalloproteinase production is potentially its underlying mechanism. *Cancer Research*, 2003, **63**(23): 8090–8096
- [14] Maemura K, Shiraishi N, Sakagami K, *et al.* Proliferative effects of g-aminobutyric acid on the gastric cancer cell line are associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation. *J Gastroenterology and Hepatology*, 2009, **24**(4): 688–696
- [15] Estellal C, Herrer I, Atkinson S P, *et al.* Inhibition of histone deacetylase activity in human endometrial stromal cells promotes extracellular matrix remodelling and limits embryo invasion. *PLoS One*, 2012, **7**(1): e30508
- [16] Chern S R, Li S H, Ling C, *et al.* ChiuSpatiotemporal expression of SERPINE2 in the human placenta and its role in extravillous trophoblast migration and invasion. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2011, **9**: 106
- [17] Godbole G, Suman P, Gupta S K, *et al.* Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. *Fertility and Sterility*, 2011, **95**(4): 1278–1283
- [18] Laguë M N, Detmar J, Paquet M, *et al.* Decidual PTEN expression is required for trophoblast invasion in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, **299**(6): E936–946
- [19] Qiu Q, Yang M Y, Tsang B K, *et al.* Both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are required in epidermal growth factor-induced human trophoblast migration. *Molecular Human Reproduction*, 2004, **10**(9): 677–684
- [20] Li M Q, Tang C L, Du M R, *et al.* CXCL12 controls over-invasion of trophoblasts *via* up-regulating CD82 expression in DSCs at maternal-fetal interface of human early pregnancy in a paracrine manner. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011, **4**(3): 276–286
- [21] 张晋平, 罗文萍, 张倩, 等. 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TRAIL)基因抑制小鼠子宫基质细胞的蜕膜化. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(3): 288–296
- [22] Zhang J P, Luo W P, Zhang Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(3): 288–296
- [23] Sonderegger S, Pollheimer J, Knöfler M. Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation-review. *Placenta*, 2010, **31**(10): 839–847
- [24] Gellersen B, Reimann K, Samalecos A, *et al.* Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast derived signals. *Hum Reprod*, 2010, **25**(4): 862–873
- [25] Hu D, Cross J C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int J Dev Biol*, 2010, **54**(2–3): 341–354

Effects of GABA Signal on Mouse Placenta Establishment in Early-Middle Phase*

LUO Wen-Ping, TAN Dong-Mei, YANG Gen-Ling, LU Jun-Jie, ZHAO Hai, TAN Yi**

(Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To explore the expression of GB1 in mouse uterus from day 1 to day 8 of pregnancy (D1~D8) and the role in placenta establishment, semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (semi-qRT-PCR), immunohistochemistry and Western blotting were applied to detect the expression levels of GB1 mRNA and protein respectively from D1 to D8. Besides, EPCs and decidual cell were dissected out from D8.5 uterus and then added different concentrations of GABA, GABA B receptor agonists baclofen and antagonists 2-hydroxysaclofen. *In vitro* attachment and outgrowth assays were performed in EPCs, and transwell chamber was performed in decidual cells. *In vivo*, mouse from D8 to D13 were treated by intraperitoneal injection of different concentrations of GABA. On D14, the placenta structure was examined with the histological method. The results suggested that GB1 mRNA and protein dynamic expressed from D1 to D8 uterus. 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA and 5 $\mu\text{mol/L}$ baclofen promoted EPCs outgrowth and suppressed decidual cells invasion. At the same time, 20 $\mu\text{mol/L}$ 2-hydroxysaclofen could reversed both of the functions of GABA on EPCs and decidual cells. The histological structures of placentas changed apparently on D14. In the layer of labyrinthine, the cells arranged crowdly and maternal blood and fetal rat vascular decreased number or dysplasia. In spongiotrophoblast, cytotrophoblast cells became smaller and glycogen cells decreased or disappeared. The combined results indicated during the early-middle mouse placenta establishment GABA signal was in favour of trophoblasts invasion but played converse role in decidual cells and damaged placenta structure.

Key words γ -amino butyric acid(GABA), decidual cell, ectoplacental cones (EPCs), invasion, placenta

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00124

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30770816, 31171436) and Chongqing City Board of Education Science and Technology Research Foundation(KJ110316).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-68485997, E-mail: tanyee66@hotmail.com

Received: March 13, 2012 Accepted: August 21, 2012