



分类号: R339.2

UDC: \_\_\_\_\_

密级: \_\_\_\_\_

重 庆 医 科 大 学

# 博 士 学 位 论 文

肿瘤转移抑制因子 CD82 对人滋养层细胞分化的调控及其分子机理研究

论文题目

作者姓名

张 倩

指导教师姓名(职称、单位名称)

谭 毅 研究员

重庆医科大学实验动物中心

申请学位级别

博 士

学科、专业名称

生物医学工程

论文答辩年月

2012 年 5 月

2012 年 4 月

分类号:       R339.2      

UDC:                                  密级:                         

**重 庆 医 科 大 学**

# **博 士 学 位 论 文**

论文题目                                   
**肿瘤转移抑制因子 CD82 对人滋养层细胞分化的调控及其分子机理研究**

作者姓名                                  **张 倩**

指导教师姓名(职称、单位名称)                                  **谭 毅 研究员**  
                                 **重庆医科大学实验动物中心**

申请学位级别       **博 士**       学科、专业名称                                  **生物医学工程**

论文答辩年月                                  **2012 年 5 月**

2012 年 4 月

## 重庆医科大学

### 研究生学位论文独创性声明

本人申明所呈交的论文是我本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得重庆医科大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，与我同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

学位论文作者签名： 张倩 日期： 2012.4.12

### 学位论文版权使用授权书

本人完全了解重庆医科大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在攻读学位期间论文工作的知识产权单位属重庆医科大学。本人保证毕业离校后，发表论文或使用论文工作成果时署名为重庆医科大学，学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布学位论文的全部或部分内容（保密内容除外），可以采用影印、缩印或其他手段保存论文。

论文作者签名： 张倩

指导教师签名： 谭新

日期： 2012.4.12

# 目 录

英汉缩略语名词对照 .....	1
中文名摘要 .....	3
英文摘要 .....	5
论文正文：肿瘤转移抑制因子 CD82 对人滋养层细胞分化的调控及其分子机理研究 .....	8
前 言 .....	8
第一部分 CD82/KAI1 在人胎盘绒毛及不同滋养层细胞系的表达 .....	10
1 材料和方法 .....	10
2 实验结果 .....	15
第二部分 CD82 全长质粒的构建及干扰片段的筛选 .....	19
1 材料和方法 .....	19
2 实验结果 .....	24
第三部分 CD82 对人滋养层细胞浸润和迁移的调控 .....	27
1 材料和方法 .....	27
2 实验结果 .....	30
3 讨论 .....	31
全文总结 .....	44
文献综述 .....	47
参考文献 .....	75
致 谢 .....	92
攻读学位期间的研究成果及发表的学术论文目录 .....	93

## 英汉缩略语名词对照

英文缩写	英文全称	中文全称
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
bp	base pair	碱基对
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
CTB	Cytotrophoblast cell	细胞滋养层细胞
D	Day	天数
DAB	Diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DEPC	Diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Dulbecco 改良 Eagle 培养基
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	脱氧核苷三磷酸
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EVT	Extravillous cytotrophoblast	绒毛外滋养层细胞
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
h	Hour	小时
kD	Kilodalton	千道尔顿
kg	Kilogram	千克
L	Light	光照
mm	Millimeter	毫米
mmol	Millimol	毫摩尔
ml	Milliliter	毫升
min	Minute	分钟
mg	Milligram	毫克
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液

---

PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	蛋白酶抑制剂
rpm	Rotations per minute	转/分
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RT	Reverse transcription	逆转录
s	Second	秒
SDS	Sodium dodecylsulfonate	十二烷基硫酸钠
STB	Syncytiotrophoblast	合体滋养层
Tris	Trishydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
TE	Trophectoderm	滋养外胚层
$\mu$ l	Microliter	微升
$\mu$ g	Microgram	微克
V	Volt	伏
W	Week	周龄

# 肿瘤转移抑制因子 CD82 对人滋养层细胞分化的调控及其分子机理研究

## 摘要

背景：胎盘滋养层细胞在哺乳动物胚胎植入和胎盘发生过程中具有十分重要的作用。在人类早期妊娠进程中，滋养层细胞对母体子宫壁的适度浸润是胎盘形成的关键环节，胎盘滋养层细胞的分化受到多种分子如生长因子、细胞因子和激素的调控，其调控异常会导致多种妊娠相关疾病的发生，如自发流产、绒毛膜癌、子痫前期和胎儿生长受限等。肿瘤转移抑制因子 CD82 在抑制肿瘤细胞的浸润迁移上起着重要的作用。而且，滋养层细胞的侵入特性与肿瘤细胞的侵袭特性十分相似。我们实验室前期的研究表明肿瘤转移抑制基因 CD82 在妊娠前期小鼠子宫中呈现规律表达。但是，CD82 基因在人胎盘滋养层细胞分化中的功能和相关分子机理尚不明确。

目的：研究肿瘤转移抑制因子 CD82 在调控人滋养层细胞细胞浸润迁移中的作用以及发挥作用的相关分子机制。

方法：1. 免疫组化技术检测 CD82 在人妊娠不同时期滋养层细胞中的表达位置。 2. 采用基因工程技术，构建含 CD82 全长基因的 Flag-CMV4 质粒，用于细胞转染，过表达 CD82 基因。3. 筛选具有 CD82 干扰效率的 siRNA 片段，用于细胞转染，干扰 CD82 表达。 4. 利用早期绒毛外植体培养的方法研究 CD82 对绒毛外滋养层细胞迁移的影

响。5.运用 Matrigel 细胞浸润模型和 Transwell 细胞迁移模型检测过表达和干扰 CD82 对 HTR8/SVneo 细胞浸润和迁移能力的影响。6.收集细胞转染上清,明胶酶谱检测 MMPs 的表达,蛋白免疫印迹检测 MMPs 的组织抑制因子 TIMP-1 和-2 的表达。

结果: 1. CD82 在人妊娠早期胎盘绒毛主要定位于细胞滋养层柱 (TC) 和合体滋养层, 足月浸润到母体蜕膜组织的绒毛外滋养层细胞中也有 CD82 的表达。在正常的滋养层细胞系中 CD82 高表达。2. CD82 全长质粒可以过表达 CD82; siRNA 片段可以降调 CD82 的表达。3. CD82 siRNA 促进早期绒毛外植体绒毛外滋养层细胞的迁移。4. Matrigel 细胞浸润模型和 Transwell 细胞迁移模型显示 CD82 siRNA 显著促进 HTR8/SVneo 细胞 (浸润型绒毛外滋养层细胞系) 的浸润和迁移, 相反, 过表达 CD82 可抑制该细胞的浸润和迁移能力。5. CD82 抑制滋养层细胞的浸润可能是通过降调酶原型基质金属蛋白酶 MMP-9 和促进 MMPs 的组织抑制因子 TIMP-1 和-2 的表达实现的。

结论: 综合以上研究, 我们发现肿瘤转移抑制因子 CD82 在人滋养层发育过程中的关键基因, 在调控滋养层细胞正常浸润迁移能力中具有重要作用。

关键词: 肿瘤转移抑制因子 CD82; 浸润/迁移; 滋养层细胞; HTR8/SVneo



# **FUNCTION OF CD82, A METASTASIS SUPPRESSOR, IN THE DIFFERENTIATION OF PLACENTAL TROPHOBLAST CELLS**

## **ABSTRACT**

**Background:** The placental trophoblast cells play an important role in feto-maternal communications during embryo implantation and placentation. Well-controlled trophoblast differentiation and invasion into maternal uterine wall during early human placental development are the prerequisite for successful pregnancy. Although many hormones, growth factors and cytokines have been reported to be involved in trophoblast invasion and migration, the mechanisms of trophoblast differentiation need to be further investigated. Any dysregulation of trophoblast differentiation may lead to pregnancy-related diseases such as recurrent abortion, choriocarcinoma, pre-eclampsia and fetal growth restriction. *CD82* gene, a member of tumor metastasis suppressor factors, plays an important role in inhibiting invasion and metastasis of cancer cells. Comparative research shows that there are striking similarities in behavioral patterns between invasive trophoblastic cells and cancer cells. *CD82* presents a regular expression in the mouse uterus in the early period of pregnancy (day1-day8) in our previous research. However, the role of *CD82* in human trophoblast differentiation is not

clear.

**Objectives:** To research the effects of metastasis suppressor CD82 on trophoblast cell migration and invasion in HTR8/SVneo cell line.

**Methods:** 1. Immunohistochemistry was used to detect the expression of CD82 in human placental villi at different stage of pregnancy 2. Containing human full length CD82 gene was constructed in Flag-CMV4 plasmid. 3. The interference efficiency CD82 siRNA fragments were screened to knockdown the expression of CD82. 4. Placental villi explants culture model was used to detect the effect of CD82 on migration of extravillous trophoblast cells. 4. Matrigel invasion and transwell migration models were used to detect the effect of CD82 on invasion and migration. 5. gelatin zymography was used to detect the expression of MMPs in culture media; Western blotting was used to detect the expression of TIMP-1 and -2.

**Results:** 1. CD82 was found to be strongly expressed in human first trimester placental villous and extravillous trophoblast cells as well as in trophoblast cell lines. 2. CD82 was overexpressed in the cells transfected with CD82 plasmids; the expression of CD82 was knockdown in the cells transfected with siRNA. 3. CD82 siRNA significantly promoted outgrowth of villous explants *in vitro* ( $P<0.01$ ) 4. Knocking-down CD82 expression by siRNA significantly promoted invasion and migration of HTR8/SVneo cells ( $P<0.05$ ). In contrast, over-expression of CD82 markedly inhibited cell

invasion and migration ( $P<0.05$ ), whereas the trophoblast proliferation was not affected. 5. CD82 regulated migration and invasion through gelatinolytic activities of matrix metalloproteinase MMP-9 and tissue inhibitors of MMPs (TIMP)-1 and -2.

**Conclusion:** These results suggest an important role of CD82 in regulation of the invasion and migration of human trophoblast cells during early pregnancy.

**Key words:** CD82; invasion/migration; trophoblast; HTR8/SVneo

# 论文正文：肿瘤转移抑制因子 CD82 对人滋养层细胞分化的调控及其分子机理研究

## 前言

胎盘是哺乳动物妊娠过程中母体与胎儿进行物质和气体交换的场所。胎盘发生是否正常直接关系到胎儿生长和妊娠的成败。胎盘的发生是一个受到高度调控的动态生理过程，关键环节是滋养层细胞的分化。当胚胎植入子宫后，滋养外胚层 (Trophectoderm, TE) 分化为胚外组织，而内细胞团 (Inner Cell Mass, ICM) 分化最终形成胎儿<sup>[1, 2]</sup>。人受精后大约第 15 到 21 天之间，囊胚植入子宫，接下来的胎盘发育主要是胎盘绒毛的发育和分化。在这一时期胎盘绒毛细胞滋养层细胞 (Cytotrophoblast, CTB) 主要沿两个途径 (浸润途径和融合途径) 分化：第一，分化为绒毛外滋养层 (Extravillous cytotrophoblast, EVT) (浸润途径)，第二，分化为合体滋养层 (Syncytiotrophoblast, STB) (融合途径)<sup>[2]</sup>。滋养层细胞的分化过程中受到多种因素的调控，包括母体或胎盘自身来源的细胞因子、生长因子、激素，同时还受各种生理因素的影响，如氧环境、离子浓度对滋养层分化<sup>[2]</sup>。

肿瘤是危害人类健康最严重的疾病之一，在肿瘤细胞的生物学特性中，侵袭和转移最为关键，同时也是恶性肿瘤的重要标志。比较发现，滋养层细胞的侵入特性与肿瘤细胞的侵袭特性十分相似，二者的许多调控机制也完全相同或相似<sup>[3]</sup>，因此在近年来，胚胎植入与肿瘤侵袭的比较研究也越来越多的引起胚胎学和肿瘤学这两个研究领域的关注。

CD82(KAI1)基因定位于人染色体 11p11.2，编码含有 267 个氨基酸的蛋白，属于 TM4SF (transmembrane 4 superfamily) 家族成员，为细胞膜糖蛋白，与肿瘤细胞转移抑制相关，被称为肿瘤转移抑制因子<sup>[4]</sup>。它对食管鳞状细胞癌、宫颈癌、子宫内膜癌肺癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌等具有抑制作用<sup>[5-8]</sup>。我们实验室前期研究结果表明，CD82 在小鼠动情周期、早孕及假孕子宫内膜中有时空特异性表达。但是关于 CD82 基因在胚胎植入后滋养层细胞分化过程中的作用还属未知，相关研究报道极少。

本实验从滋养层细胞浸润迁移与肿瘤侵袭转移相似性的角度出发，首先研究 CD82 在不同怀孕时期人胎盘绒毛中的表达情况，通过构建 CD82 过表达质粒及筛选干扰片段，观察 CD82 蛋白在高表达和敲低的情况下，对滋养层细胞浸润迁移能力的影响，寻找 CD82 在滋养层细胞分化中可能参与的信号通路，以阐明 CD82 在滋养层细胞分化中的作用及相关的分子机理。

# 第一部分 CD82/KA11 在人胎盘绒毛及不同滋养层细胞系的表达

## 1 材料和方法

### 1.1 免疫组化

#### 1.1.1 人胎盘绒毛的收集

人胎盘绒毛来自于妊娠早期人工流产（6-9 周）和足月分娩的胎盘（由北京宣武医院和北京市妇产医院提供）。所选取的组织均来自正常妇女无传染性疾病，无高血压，心脏病等疾病，妊娠周龄根据孕妇主述末次月经的日期，B 超检查以及绒毛发育的不同形态特征综合确定。本实验相关操作均按照重庆医科大学伦理委员会制定的标准执行。胎盘绒毛取出后用预冷的 PBS 洗两遍，一部分置于 4% 多聚甲醛固定 24 h，经梯度酒精脱水、常规石蜡包埋和切片，另一部分冻于 -80℃，用于总 RNA 和总蛋白的提取。

#### 1.1.2 石蜡材料的包埋

1. 组织块从 70%酒精中取出后修块，并在 80%、95%、100%、100%酒精中各脱水 1-2 h。
2. 组织块在 100%酒精/二甲苯（1:1）和二甲苯中透明 15-45 min（其间换一次新鲜二甲苯）；具体透明时间根据组织块大小而定，以组织块完全透明为宜。
3. 浸蜡：组织块在二甲苯/石蜡（1:1）和石蜡中浸蜡 1h、石蜡中透蜡 2h，最后将组织块包埋于包埋盒内，室温保存至切片。

#### 1.1.3 免疫组化

免疫组化步骤按北京中山金桥公司生产的 SP 免疫组化染色试剂盒说明书进行。

1. 石蜡切片经过二甲苯脱蜡和梯度酒精下行复水（100%、100%、95%、80%、75% 各 5 min），PBS 洗 3×5 min。
2. 抗原修复（1.8 mM 柠檬酸；8.2 mM 柠檬酸钠；pH6.0）（92℃—98℃）修复液放入微波炉，100℃沸腾后，降温至 98℃（即刚停止沸腾）左右，将切片放入

- 修复液,每隔 5min 将微波炉转 2.5 转 (约 30 秒左右), 共 15min。
3. 室温自然冷却后 PBS 洗 5min×3 次。
  4. 试剂 A 封闭剂 (即山羊血清), 避光室温封闭 20min (时间也可以适当延长) 顷去, 勿洗。
  5. 滴加适当比例稀释 (稀释比例参考抗体说明书, 稀释使用 1x 的 PBS) 的一抗, 4℃过夜, 对照用血清替代一抗, 孵育结束后用 PBS 洗 5min×3 次。
  6. 3% $H_2O_2$  去离子水孵育 10min 消除内源性过氧化物酶的活性, 之后用 PBS 洗 5min×3。
  7. 滴加二抗, 室温或 37℃孵育 30min, PBS 洗 5min×3 次。
  8. 滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液 (S-A/HRP) 室温孵育 15min, PBS 洗 5min×3 次。
  9. DAB 避光显色, 显微镜观察染色程度, 适时终止染色反应。
  10. 蒸馏水 2min。
  11. 苏木精复染 (此步骤依实验要求做或不做) 15min。
  12. 缓流水冲洗 10min。
  13. 蒸馏水 2min。
  14. 梯度脱水 (75%酒精 5min, 95%酒精 5min, 100%酒精 10min×3)。
  15. 透明 (二甲苯 10min×3)。
  16. 选择适当封片剂封片。(中性树脂永久封片, PBS/甘油 临时封片)

## 1.2 RT-PCR

### 1.2.1 细胞总 RNA 的提取

细胞总 RNA 的提取按 Trizol 试剂说明书进行。提前将离心机预冷。每  $1.0 \times 10^6$  个细胞加入 1 ml Trizol, 室温放置 5 min。加入氯仿 (0.2 ml 氯仿/ml Trizol) 剧烈振荡 15 s, 室温静置 2-3 min,  $12,000 \times g$ , 4℃离心 15 min。收集上层水相, 加入异丙醇 (0.5 ml/ml Trizol), 室温静置 10 min,  $12,000 \times g$ , 4℃离心 10 min 收集沉淀。75%乙醇 (高压 DEPC 水配制)  $12,000 \times g$ , 4℃离心 5 min 漂洗沉淀。沉淀干燥后溶于适量高压 DEPC 水中, 根据  $OD_{260}$  及  $OD_{260}/OD_{280}$  判断 RNA 的浓度及纯度。

### 1.2.2 逆转录反应 (RT)

1. 13.5  $\mu$ l 反应体系中含有 2  $\mu$ g 总 RNA 作为模板、1  $\mu$ l Oligo dT 引物、1  $\mu$ l dNTPs 并用去离子水补足到 13.5  $\mu$ l, 于 65℃反应 5 min, 立即置于冰上, 至少维持 1min。

2. 加入 4  $\mu$ l 5 $\times$ First strand buffer 及 2  $\mu$ l 0.1 M DTT, 于 42 $^{\circ}$ C 反应 2 min。
3. 加入 0.5  $\mu$ l Superscript II 逆转录酶, 充分混匀。于 42 $^{\circ}$ C 作用 50 min, 并于 70 $^{\circ}$ C 作用 15 min。置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.2.3 PCR 反应

根据人 CD82 和 GAPDH 序列设计引物, 并在 GeneBank 中进行 BLAST 分析, 引物序列 (表 2-2-1) 由北京英骏 (Invitrogen) 公司合成。

PCR 反应体系为 25 $\mu$ l:

10 $\times$ PCR Buffer:	2.5 $\mu$ l	2.5 mM dNTP:	2 $\mu$ l
10 pmol/ $\mu$ l 上游引物:	1 $\mu$ l	10 pmol/ $\mu$ l 下游引物:	1 $\mu$ l
RT 产物:	2 $\mu$ l	Taq 酶:	1 U
加水至:	25 $\mu$ l		

PCR 反应的条件为: (1)CD82(Forward: 5'-CTGGGGCTGTACTTTGCTTTC-3'; Reverse: 5'-CAGAAGCCCTTCCTCACAGAA-3'): 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 循环 30 次, 延伸 7 min。(2)GAPDH(Forward: 5'-CTGGGGCTGTACTTTGCTTTC-3', Reverse: 5'-CAGAAGCCCTTCCTCACAGAA-3'): 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 循环 23 次, 延伸 7 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

## 1.3 蛋白免疫印迹 (western blotting)

### 1.3.1 细胞总蛋白提取及样品制备

1. 倒掉培养液, 并将瓶倒扣在吸水纸上使吸水纸吸干培养液 (或将瓶直立放置一会儿使残余培养液流到瓶底然后再用移液器将其吸走)。
2. 每瓶细胞加 3ml 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS (0.01M pH7.2~7.3)。平放轻轻摇动 1min 洗涤细胞, 然后弃去洗液。重复以上操作两次, 共洗细胞三次以洗去培养液。胰酶消化细胞, 用含血清的培养基终止消化, 将细胞悬液收集在 15ml 离心管中, 离心, 沉淀用 1ml PBS 重悬, 离心弃上清, 洗细胞沉淀两次, 充分弃上清。
3. 配裂解液: 按 1ml 裂解液 (4 mM EGTA, 3 mM EDTA, 125 mM NaF, 0.5% NP40,



12.5 mM HEPES, 1 mM DTT, pH 8.0) 加 10  $\mu$ l PMSF (100 mM), 1  $\mu$ l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (100 mM), 0.1  $\mu$ l (100 mM) Aprotinin 摇匀置于冰上。根据细胞沉淀的多少加裂解液, 于冰上裂解 40min。

4. 于 4°C 下 12000rpm 离心 5min (提前开离心机预冷)
5. 将离心后的上清分装转移到新 Eppendorf 管中, 放于 -20°C 保存或用于蛋白浓度测定。

### 1.3.2 蛋白含量的测定

1. 准备: 1.5ml Eppendorf 管, 96 孔板, 标准蛋白 (-20°C 保存), 三蒸水, Bradford 蛋白定量试剂盒 (5X 浓缩液, 用前先在室温放置 30min), 15ml 离心管 (用锡箔纸包裹蔽光)。
2. 根据样品量计算需要多少考马斯亮兰溶液, 1: 5 稀释于 15ml 离心管 (用锡箔纸包裹蔽光) 成工作液。
3. 准备足够数量的 1.5ml Eppendorf 管, 标记清楚, 加入如下溶液:

	标准曲线孔								样品
	A $\mu$ l	B $\mu$ l	C $\mu$ l	D $\mu$ l	E $\mu$ l	F $\mu$ l	G $\mu$ l	H $\mu$ l	
$\mu$ g/ml	50	25	12.5	6.25	3.125	1.563	0.781	0.391	
4mg/ml BSA( $\mu$ l)	5	200	200	200	200	200	200	200	1
ddH <sub>2</sub> O( $\mu$ l)	395	200	200	200	200	200	200	200	199
蛋白稀释液 终体积	200	200	200	200	200	200	200	200	200
1xBradford	200	200	200	200	200	200	200	200	200

4. 将每管进行充分混匀, 室温放置 15min。每管溶液吸取 150 $\mu$ l, 按顺序加入 96 孔板中, 在生物分光光度计 (BioTeK) 上比色分析。

### 1.3.3 Western blotting

将等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳。90V, 转膜 90 min (转移缓冲液: 39 mM

甘氨酸, 48 mM Tris, 0.037% SDS, 20%甲醇)。将膜在 TBST (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, 0.05% Tween 20) 中洗 5min, 用 5% 脱脂奶粉 (溶于 TBST) 中室温封闭 1 h。一抗 (封闭液稀释, CD82 : 1: 500; GAPDH: 1:20000) 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3×10 min。用相应的 HRP 标记的二抗 (TBST 稀释, 终浓度为 0.2 μg/ml) 室温孵育 1 h, TBST 洗 3×10 min, TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5) 洗 10 min。用 MetaView 软件对结果进行灰度扫描分析。

#### 1.4 免疫荧光

1. 细胞接种: 根据实验要求, 选择合适细胞密度, 一般细胞爬片培养, 至汇合度 60-80%为宜。
2. 培养皿中盖玻片用镊子小心夹出, 置于 24 孔板中, 爬有细胞面朝上, 将细胞用 PBS 漂洗三次 (为保持细胞形态, 漂洗时用室温或 37℃ PBS)。
3. 用 -20 ℃ 预冷的甲醇: 丙酮 (1:1) 于 -20 ℃ 固定 10min。
4. PBS 洗 3 次, 3%BSA 室温封闭 1 小时。
5. 湿盒中垫上 Parafilm, 将稀释好的一抗 (CD82: 1:100) 滴在 Parafilm 上, 25μl 一滴, 无一抗的封闭液作为对照。
6. 封闭后的爬片倒扣在滴有一抗或对照封闭液的 Parafilm 上 (爬有细胞面与液滴接触), 4℃, 过夜。
7. 次日, 取出细胞爬片, PBS 清洗 3 次, FITC 标记的二抗, 室温孵育 1 小时。
8. PBS 清洗, 用 2.5 ug/ml DAPI 室温染色 3 min。
9. PBS 浸泡 5 min, 20ul 防淬灭封片剂封片(23.3 mg/ml DABCO, 20 mM Tris, pH8.0, 90%甘油)滴在载玻片上, 爬片倒扣在液滴上, 指甲油点在盖玻片四角, 固定玻片, 荧光显微镜镜检, 照相。

#### 1.5 统计分析

所有条带结果利用密度扫描 MetaView 软件进行统计。PCR 和 Western Blotting 结果均用其自身灰度值与相应内参的比值来进行统计, 所有实验均采用三次不同实验的结果进行扫描。扫描的结果用 SPSS 10.0 分析软件中 *t*-test 方法进行分析,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 实验结果

### 2.1 CD82 在人胎盘绒毛滋养层柱和合体滋养层高表达

我们用免疫组化的方法研究了 CD82 在人妊娠早期、中期和足月胎盘中的时空表达。在妊娠早期第 5W, CD82 在胎盘绒毛的滋养层细胞柱 (TC) 和细胞滋养层细胞 (CTB) 中都有表达 (图 1-1, a)。另外, 在母体的蜕膜细胞当中也有表达 (图 1-1, c)。CD82 在妊娠中期的早些时候 (15W), CD82 只在母体蜕膜组织中高表达, 在 EVT 中不表达, 在锚定绒毛, 我们可以看到 CD82 在合体滋养层有很微弱的表达 (图 1-1, e)。到了妊娠中期的晚些时候 (25W), CD82 在浸润到母体蜕膜组织中的绒毛外滋养层细胞 (EVTs) 中有微弱地表达 (图 1-1, g)。在足月胎盘 (39W) 浸润到母体蜕膜组织中的绒毛外滋养层细胞 (EVTs) CD82 的表达较强, 且合体滋养层也有较高的表达 (图 1-1, i)。对照组织切片中没有检测到阳性信号 (图 1-1, k, l, m, n)。CK7 的免疫染色用于区分胎盘滋养层细胞 (图 1-1, b, f, h, g) 和 vimintin 的免疫染色用于指示子宫内膜蜕膜细胞 (图 1-1, d)。实验结果表明, CD82 在人整个妊娠过程中呈现动态的表达。

### 2.2 CD82 在人滋养层细胞系的表达

我们检测了 CD82 在不同滋养层系中的表达水平。RT-PCR 和 Western blotting 结果 (图 1-2) 显示 CD82 蛋白在 HTR8/SVneo、B6tert 正常滋养层细胞系中高表达而在 JEG-3 绒毛癌细胞系中几乎检测不到。我们又通过免疫荧光的方法检测到 CD82 在 HTR8/SVneo 细胞的膜上表达 (图 1-3)。

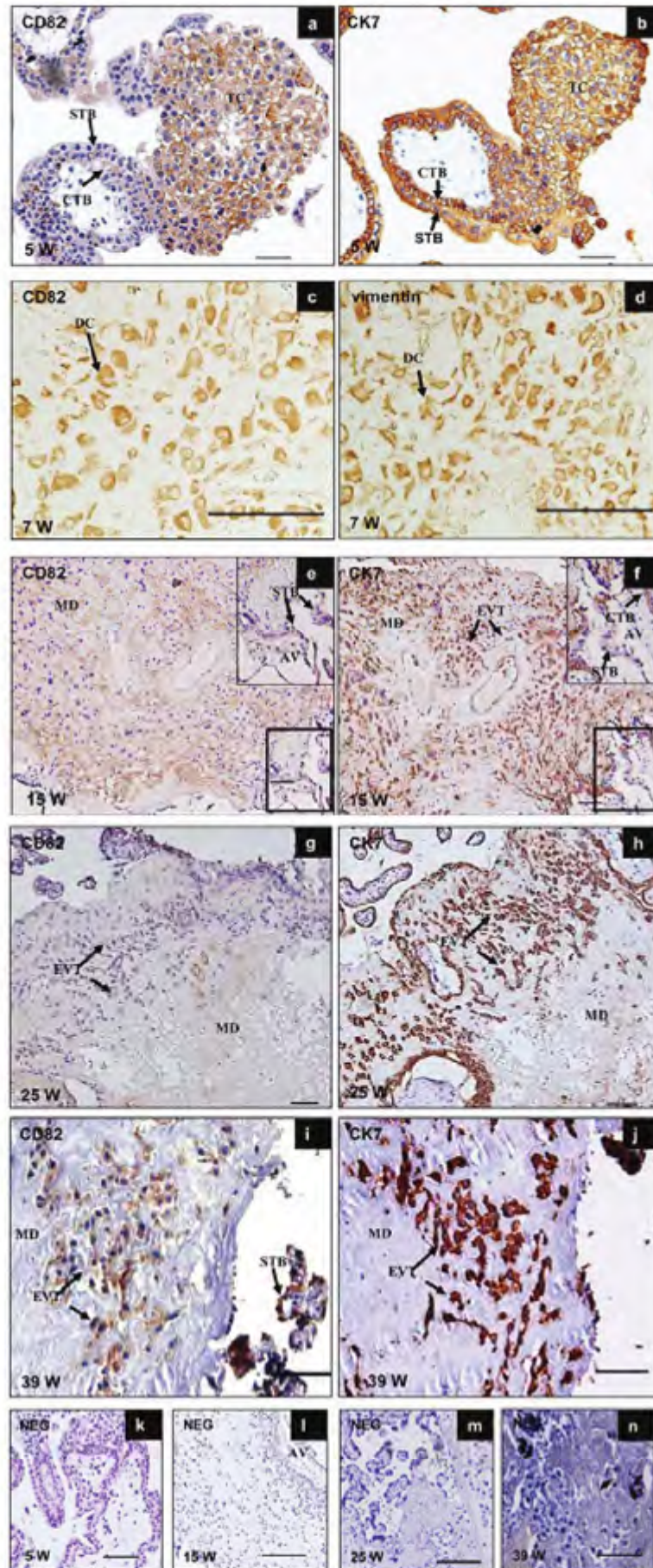


图 1.1 CD82 在不同时期人胎盘绒毛中的表达免疫组织学定位

- (a) 妊娠 5W, CD82 在细胞滋养层(CTB), 和滋养层柱(TC)中均有较强的表达
- (b) 细胞角蛋白 7(CK7)作为细胞滋养层的 marker 分子指示细胞滋养层和滋养层柱的位置
  - (c)妊娠 7W, CD82 在人母体蜕膜组织蜕膜细胞(DC)中高表达
  - (d)波形蛋白(vimentin)作为蜕膜细胞的 maker 指示蜕膜细胞的位置
- (e) 妊娠 15W, CD82 在母体蜕膜组织中高表达, 其他部位几乎不表达
- (g)妊娠 25W, CD82 在浸润到母体蜕膜组织中的绒毛外滋养层细胞(EVT)中有微弱表达
- (i) 足月, CD82 在浸润到母体蜕膜组织中的绒毛外滋养层细胞(EVT)中有较强的表达
- (f, h, j) 细胞角蛋白 7 作为的绒毛外滋养层细胞(EVT)maker 指示 EVT 的位置
- (k, l, m, n)用正常血清代替一抗的阴性对照, 图中标尺均为 100  $\mu$  m

**Figure 1.1 Expression of CD82 in human placental villi**

- (a) CD82 was strongly expressed in STB and moderate in CTB and trophoblast columns (TC) of human placental villi during the first trimester.
- (b) Immunohistochemical staining with anti-cytokeratin7 (CK7)as a marker of CTB, TC in the first trimester placental vill.
- (c) CD82 was highly expressed in decidual cells (DC) during the first trimester.
- (d) Anti-vimentin as a maker of decidual cells.
- (e) CD82 was highly expressed in decidual cells (DC) at 15W.
- (g) CD82 was weakly expressed in the extravillous cytotrophoblast cells invaded into the maternal decidua at 25W;
- (i) CD82 was expressed in the extravillous cytotrophoblast cells invaded into the maternal decidua in the third trimester;
- (f, h, j) Immunohistochemical staining with anti-cytokeratin7 (CK7)as a marker of EVT in the term maternal decidua;
- (k, l, m, n) negative controls (NEG) on sections in which normal IgG was used in place of primary antibody. CTB: cytotrophoblast; STB: syncytiotrophoblast; TC: trophoblast column; EVT: extravillous trophoblast; MD: maternal decidua, W: weeks of pregnancy; Bar represents 100  $\mu$ m.

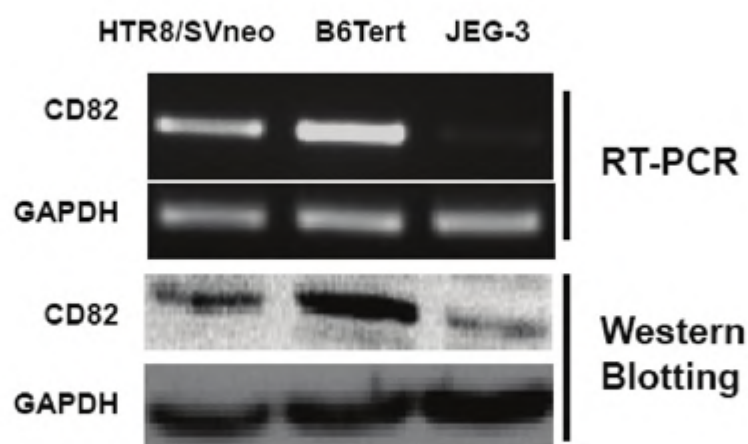


图 1.2 CD82 在不同滋养层细胞系中的表达

RT-PCR 与 Western blotting 结果显示 CD82 在正常的滋养层细胞系 HTR8/SVneo, B6 tert 中高表达, 而在 JEG-3 中几乎检测不到。

Figure 1.2 Expression of CD82 in different trophoblast cell lines

Expression of CD82 in different trophoblast cell lines determined by semiquantitative RT-PCR and Western blotting, respectively. GAPDH was used as an internal control for RT-PCR or loading control for Western blotting. HTR8/SVneo: a human invasive extravillous trophoblast cell line derived from immortalized first trimester trophoblast; B6 tert: immortalized cytotrophoblast cell line; JEG-3: human choriocarcinoma cell lines.

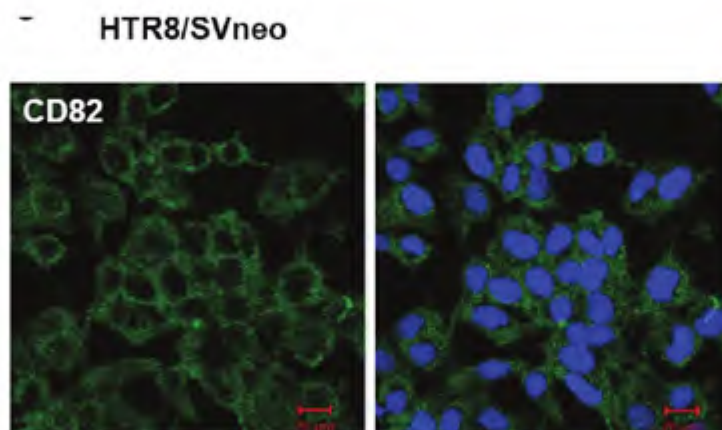


图 1.3 CD82 在 HTR8/SVneo 系中的免疫细胞化学定位

CD82 的信号为绿色, 核用 DAPI 染色为蓝色

Figure 1.3 Immunofluorescence of CD82 in HTR8/SVneo cell lines

Fluorescence signals specific to CD82 antibody were visualized as green, and the nuclei were shown by DAPI staining (blue).

## 第二部分 CD82 全长质粒的构建及干扰片段的筛选

### 1 材料和方法

#### 1.1 CD82 过表达质粒构建

##### 1.1.1 PCR 反应

见第一部分 1.2.3

**CD82** 全长序列设计引物, 所用引物使用 primer 5.0 引物设计软件设计, 引物序列 (Forward: 5'-CCTGCTGCTGTGTGGACGA-3', Reverse: 5'-GCACTGGTTTCGTGGAAGGA--3') PCR 反应时后延伸 7-10min 是必须的, 作用是产物末端加 A。

##### 1.1.2 PCR 产物的回收与纯化 (玻璃毛法)

1. 在紫外凝胶成像仪中找到正确的 PCR 产物的位置, 切胶。
2. 放入带玻璃毛的 0.5ml EP 管中, 底部扎孔, 中间填有玻璃毛, 放入 1.5ml EP 管中, 封口膜封口。
3. 置于液氮中 1-2min, 然后 12000 rpm, 3min 将液体转入 1.5ml EP 管中。
4. 加等体积的酚仿剧烈振, 然后 12000 rpm, 离心 5min。
5. 将上清转入新的 EP 管中+ 1/10 体积的醋酸钠+2.5 倍体积的无水乙醇, 置于 -80°, 沉淀 1h。
6. 12000 rpm, 离心 10min, 倒掉上清, 沉淀用 70%乙醇洗涤, 然后 12000 rpm, 5min 沉淀用 10ul 水溶解, 并测浓度。

##### 1.1.3 pMD-18T 载体连接反应

本实验根据 Takara pMD-18T 载体连接试剂盒的说明进行操作。

1. 在微量离心管中配制下列 DNA 溶液, (pMD-18T vector: 1 $\mu$ l, PCR 产物: 50ng) 全量为 5  $\mu$ l。
2. 加入 5 $\mu$ l (等量) 的 Solution I。
3. 16 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。

4. 全量 (10 $\mu$ l) 加入至 50 $\mu$ l TOP10 感受态细胞中, 冰中放置 30 分钟。
5. 42 $^{\circ}$ C 加热 45 秒钟后, 热击 45—50 秒 (不要振动)。迅速将管子移到冰浴中
6. 在冰中放置 1 分钟。
7. 每管连接反应转化细胞中加入平衡至室温的 950 $\mu$ l SOC 培养基。
8. 在 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 (150rpm) 1.5 小时。
9. 将每个转化培养基 100 $\mu$ l 涂到两个 LB/氨苄/IPTG/X-Gal 平板上。
10. 将平板于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养 (16—24 小时)。长时间孵育或将平板 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后贮存在 4 $^{\circ}$ C, 有助于蓝白斑筛选。白色克隆菌一般包括插入子。

#### 1.1.4 限制性酶切

1. 使用 *HindIII*, *KpnI* 酶切位点, 按说明书要求结合实验需要确定酶切体系和酶切温度; 室温酶切 1h。

酶切体系 (20 $\mu$ l): pMD18-T : 1 $\mu$ g,

*HindIII*: 1 $\mu$ l,

*KpnI*: 1 $\mu$ l,

10 $\times$ M buffer: 2 $\mu$ l

2. 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳检测。送公司测序。

#### 1.1.5 pflag-CMV4 质粒亚克隆

1. 将正确连接 CD82 全长序列的 pMD18-T 质粒, 通过 *HindIII* 和 *KpnI* 两个酶切位点切出与目的基因大小相同的带, 电泳后胶回收, 纯化, 并测浓度。
2. pflag-CMV4 载体通过 *HindIII* 和 *KpnI* 两个酶切位点双酶切后, 电泳, 胶回收纯化, 并测浓度。
3. T4 连接酶, 4 $^{\circ}$ C 连接过夜

连接体系 (20 $\mu$ l): pflag-CMV4: 1 $\mu$ g

CD82 全长序列: 100ng

T4 ligase: 0.5 $\mu$ l

T4 ligase buffer: 2 $\mu$ l

4. 连接产物转化, 涂氨苄板, 挑菌, 质粒抽提, 酶切鉴定。

#### 1.1.6 质粒大提



## 溶液配制

### (一) LB 培养基

每 1000 mL 加分析纯 NaCl 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 用 ddH<sub>2</sub>O 配制, 再用 10 M NaOH 调 pH 至 7.4 (100 mL 一般加 450  $\mu$ L), 高温高压蒸汽灭菌 15 min 冷却后使用。

固体培养基加入琼脂 1.5%。

10 M (或 N) NaOH 配制方法是称 200 g NaOH 加 300 mL, 搅拌充分溶解后定容至 500 mL。

### (二) 溶液 I、II、III

溶液 I: 葡萄糖 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L, pH 至 8.0。可一次配制 100 mL, 在 1.05 kg/cm<sup>2</sup> 高温高压蒸汽灭菌 15 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

溶液 II: NaOH 0.2 mol/L (从 10 N NaOH 中现用稀释), SDS 1%, 用现配现用。

溶液 III: 取 5 mol/L 乙酸钾 60 mL, 冰乙酸 11.5 mL, 混合后 ddH<sub>2</sub>O 至 100 mL。保存于 4 $^{\circ}$ C, 用时置于冰浴中。

1 M Tris-HCl (pH 7.5) 配制方法: Tris (MW 12.1) 12.1 g 加浓 HCl (MW 36.5) 72 mL, 调节 pH 到 7.5 并定容到 1000 mL。1 M Tris-HCl (pH 8.0) 配制方法: 12.1 g Tris 加 800 mL ddH<sub>2</sub>O, 用 HCl (~42 mL) 调 pH 到 8.0。等溶液在室温下冷却, 最后调节 pH 到 8.0 并定容到 1000 mL。高温高压蒸汽灭菌。

### (三) 酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1)

按 25:24:1 的比例混匀平衡酚、氯仿、异戊醇, 保存于棕色玻璃瓶中, 上覆一层 Tris-Cl 水相, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。酚-氯仿-异戊醇混合物在 100 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0) 缓冲液下在不透光的瓶中可保存一个月之久。

### (四) TE (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000 mL。高温高压蒸汽灭菌。或用 100 $\times$ TE 母液稀释。

### (五) STE

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaOH, 1 mM EDTA (pH 8.0), 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000 mL。高温高压蒸汽灭菌。

## 大提质粒

1. 从 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存的甘油菌吸取  $50\ \mu\text{L}$  菌液，接种到  $3\sim 4\ \text{mL}$  的 LB 液体培养基中， $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养至 OD600 大于  $1.6\sim 1.8$ 。
2. 取  $0.5\ \text{mL}$  的菌液于  $200\ \text{mL}$  LB 液体培养基中， $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养至 OD600 大于 2.0 以上。再加入氯霉素至  $170\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ， $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养 12~16 hr。
3. 用摇好的菌液  $4000\ \text{rpm}$  离心 15 min。
4. 弃上清，敞开管口，倒置，尽量让上清全部流尽。
5. 用预冷的  $40\ \text{mL}$  STE 充分悬浮菌体沉淀。
6.  $4^{\circ}\text{C}$ ， $4000\ \text{rpm}$  离心 15 min。
7. 弃上清，敞开管口，倒置，让上清全部流尽。
8. 用预冷的  $4\ \text{mL}$  溶液 I 充分悬浮菌体沉淀。
9. 加入新鲜配制的  $8\ \text{mL}$  溶液 II，上下颠倒数次，液体变得澄清，置于  $4^{\circ}\text{C}$  10 min。
10. 加入预冷的溶液 III  $6\ \text{mL}$ ，上下颠倒充分混匀后，于  $4^{\circ}\text{C}$  中放置 10 min。
11.  $4^{\circ}\text{C}$ ， $12000\ \text{rpm}$  离心 10 min。
12. 收集上清，加等体积的异丙醇， $4^{\circ}\text{C}$  中放置 30 min。
13.  $4^{\circ}\text{C}$ ， $10000\ \text{rpm}$  离心 10 min。
14. 弃上清，用适量的 70% 的乙醇洗沉淀一次，室温吹干，溶于  $1\ \text{mL}$   $1\times\text{TE}$  中。
15. 加  $50\ \mu\text{L}$  RNase A， $37^{\circ}\text{C}$  作用 2 hr。
16. 加入  $1\ \text{mL}$  新配制的 13% PEG8000 溶液（13% PEG8000， $1.6\ \text{M}$  NaCl），充分混匀， $4^{\circ}\text{C}$  中放置 30 min。
17.  $4^{\circ}\text{C}$ ， $12000\ \text{rpm}$  离心 15 min。
18. 吸去上清，用  $400\ \mu\text{L}$   $1\times\text{TE}$  缓冲液溶解沉淀。
19. 加  $1/4$  体积  $4\ \text{M}$  LiCl，室温下放置 5 min， $12000\ \text{rpm}$  离心 5 min。
20. 取上清，用酚、酚-氯仿-异戊醇各抽提一次。
21. 将水相转入一新的 Eppendorf 管中，加入  $1/10$  体积  $4\ \text{M}$  LiCl，2 倍体积的无水乙醇， $-20^{\circ}\text{C}$  下放置 30 min。
22.  $4^{\circ}\text{C}$ ， $12000\ \text{rpm}$  离心 10 min，弃上清，70% 乙醇洗沉淀一次，室温晾干。
23. 加  $200\ \mu\text{L}$   $1\times\text{TE}$  缓冲液溶解沉淀，测定质粒 DNA 的浓度后于  $-20^{\circ}\text{C}$  储存备用。

## 1.2 细胞培养

转化的绒毛外滋养层细胞系 (HTR8/SVneo) 来自于人妊娠前三个月胎盘原代培养细胞 HTR-8, 通过转染 SV40 病毒大 T 抗原 (simian virus 40 large T antigen) 使细胞永生化, 其很多性状与原代滋养层细胞 HTR-8 相似, 不具有肿瘤细胞性状。细胞培养于添加 10% 胎牛血清 (FBS), 1 mM 丙酮酸钠, 2 mM L-谷氨酰胺, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素和 100 IU/ml 青霉素的 RPMI1640 培养基中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。

## 1.3 CD82 过表达质粒的转染

本实验中采用北京康碧泉生物有限公司生产的 Quickshuttle 转染试剂进行转染。具体步骤如下:

1. 细胞的准备: 转染前 1 天将适当密度的细胞接种于 35mm<sup>2</sup> 培养皿, 使其在转染时达 70% 的汇合度, 使用的培养液为含血清不含抗生素的培养基。
2. 转染复合物的准备 (对于每皿细胞): 将 3 $\mu\text{g}$  质粒 DNA 和 9  $\mu\text{l}$  转染试剂分别稀释到 250  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{l}$  生理盐水中; 合并上述两溶液并混匀。
3. 转染: 将上述复合物直接加入到细胞培养基中, 轻轻摇动培养皿混匀。将细胞培养皿移至 37 $^{\circ}\text{C}$ /5%  $\text{CO}_2$  孵箱中进行培养。

## 1.4 CD82 siRNA 的转染

本实验中采用 Invitrogen 公司生产的 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂进行转染。具体步骤如下:

1. 细胞的准备: 转染前 1 天将适当密度的细胞接种于 35mm<sup>2</sup> 培养皿, 使其在转染时达 50% 的汇合度, 使用的培养液为含血清不含抗生素的培养基。
2. 转染复合物的准备 (对于每皿细胞): 将 5 $\mu\text{l}$  siRNA 用 250  $\mu\text{l}$  OPTI-MEM 培养基稀释, 使其终浓度约为 100 nM; 用 250  $\mu\text{l}$  OPTI-MEM 培养基稀释 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂, 5 $\mu\text{l}/\text{皿}$ , 室温孵育 5 min; 将稀释好的 siRNA 与 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂混合, 室温孵育 20 min。
3. 转染: 在转染复合物形成的同时, 将细胞用无菌 PBS 洗两次, 并加入 500  $\mu\text{l}/\text{皿}$  的 OPTI-MEM 培养基。将转染复合物直接加到皿里, 轻轻摇动培养皿混匀。于 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% 的  $\text{CO}_2$  中转染 6 小时, 去掉转染复合物更换新鲜的含 10% 血清

的新鲜培养基。采用 RT-PCR 和 Western Blot 分别从 mRNA 和蛋白水平检测各 siRNA 的沉默效果。在 24-72 小时内检测相关基因和蛋白的表达变化。

## 1.5 免疫沉淀 (IP)

1. 收获细胞，加入适量细胞 IP 裂解缓冲液（含蛋白酶抑制剂），冰上或者 4°C 裂解 30min，12,000g 离心 30 min 后取上清；
2. 取少量裂解液以备 Western blot 分析，剩余裂解液将 anti-Flag beads 加入其中，4°C 缓慢摇晃孵育过夜；
3. 免疫沉淀反应后，在 4°C 以 3,000 g 速度离心 5 min，将 anti-Flag beads 离心至管底；将上清小心吸去，anti-Flag beads 用 1ml 裂解缓冲液洗 3-4 次；最后加入 15 $\mu$ l 的 2 $\times$ SDS 加样缓冲液，沸水煮 10 分钟；
4. SDS-PAGE, Western blotting。

## 1.6 western blotting

见第一部分材料与方法

## 2 实验结果

### 2.1 不同 CD82 干扰片段抑制效果的检测

第一部分的实验结果证明 CD82 在 HTR8/SVneo 细胞中高表达，所以我们的实验采用 HTR8/SVneo 细胞作为细胞模型进行研究。CD82 不同干扰片段 (CD82siRNA-1, CD82siRNA-2) 在 mRNA 和蛋白水平上均能有效降低 CD82 的表达。

### 2.2 CD82 过表达效果的检测

HTR8/SVneo 细胞转染干扰片段和过表达质粒，western blotting 检测 CD82 的表达，我们看到干扰组，CD82 表达降低，过表达组 CD82 内源性的表达没有变化而在内源性条带上方出现了一条明显的过表达条带 (图 2-2, 箭头所示)。为了证明 CD82 抗体位置和条带的特异性，我们又进行了免疫沉淀实验 (IP)。实验结果显示，在内源性的 CD82 的条带上方确实有一条特异的过表达条带 (图 2-3, 箭头

所示), 我们猜测这可能是 CD82 糖基化的一种形式。所有实验结果均表明, 我们的 CD82 抗体是特异的。

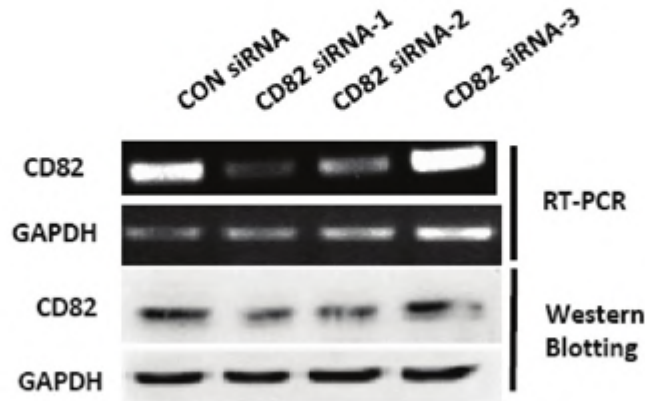


图 2.1 CD82 干扰片段干扰效率的鉴定

Figure 2.1 RNA interference of CD82 was shown by RT-PCR and Western blotting

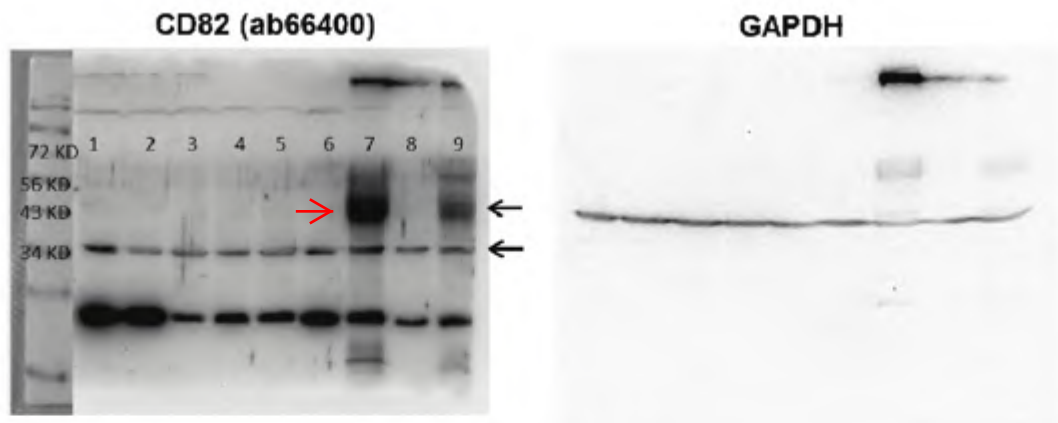


图 2.2 CD82 过表达效率的鉴定

Figure 2.2 over-expression of CD82 was shown by RT-PCR and Western blotting

Line 1: HTR8/SVneo cells transfected with control siRNA

Line 2-4: HTR8/SVneo cells transfected with CD82 siRNA-1,-2,-3.

Line 5: HTR8/SVneo cells with transfection reagent only

Line 6: HTR8/SVneo cells transfected with 3  $\mu$ g pFLAG-CMV4 empty vector

Line 7: HTR8/SVneo cells transfected with 3  $\mu$ g pFLAG-CMV4-CD82 plasmid

Line 8: HTR8/SVneo cells transfected with 2  $\mu$ g pFLAG-CMV4 empty vector

Line 9: HTR8/SVneo cells transfected with 2  $\mu$ g pFLAG-CMV4-CD82 plasmid

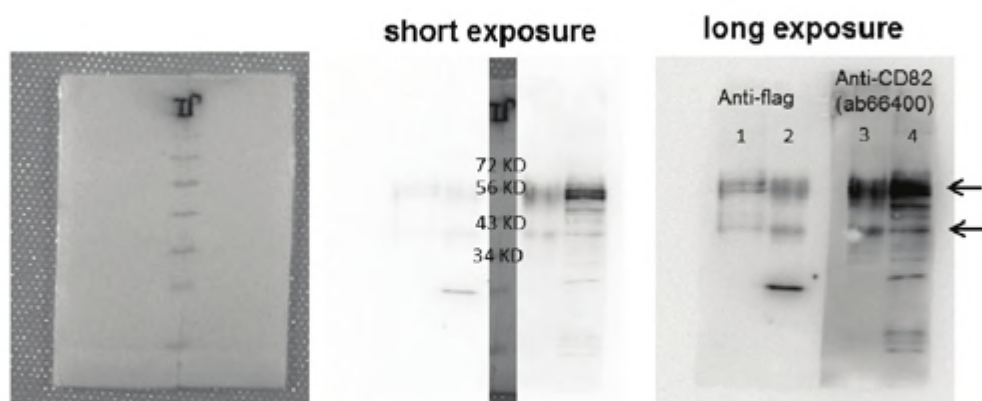


图 2.3 IP 结果显示 CD82 抗体的表达位置

1, 3:全细胞裂解液蛋白 2, 4: 免疫沉淀蛋白

Figure 2.3 The CD82 expression was shown by IP

1, 3: whole lysis protein, 2, 4: IP protein

## 第三部分 CD82 对人滋养层细胞浸润和迁移的调控

### 1 材料和方法

#### 1.1 Western blotting

见第一部分材料与方法

#### 1.2 早期绒毛外植体培养

1. 取 5-14 周人类早期绒毛，在冷的 PBS 中剪成小片段（湿重 15-25mg，有树状结构）
2. 小室 准备：0.2ml 没有稀释过的 matrigel 铺在 Millicell-CM culture dish inserts 24 孔板内加入 0.5ml 含血清的培养基。
3. 绒毛小心移到胶状的 Matrigel 上，加约 0.2ml 无血清培养基(FD 无酚红)
4. 待绒毛锚定在 Matrigel 上之后，小室内加入无血清的培养基，含有 500nM 的干扰片段
5. 每天观察照相

#### 1.3 细胞培养

见第二部分材料与方法

#### 1.4 siRNA 与 CD82 过表达质粒的转染

见第二部分材料与方法

#### 1.5 细胞浸润实验

1. Transwell 小室的准备：
  - (1) Matrigel (BD Biosciences)预先在 4℃ 溶解过夜；
  - (2) 将 Matrigel 置于冰上放入超净台，用无血清培养基将胶作 1:9 稀释，使其终浓度为 1 mg/ml (**NOTE**: 稀释时逐级稀释，如：需要将 10 $\mu$ l Matigel 稀释到 100 $\mu$ l 需先将 10 $\mu$ l Matigel 与 10 $\mu$ l 培养基充分混匀，之后用 20 $\mu$ l 培养基稀释前述混合物，以此法稀释到需要稀释的体积，这样稀释原因是使 Matrigel 与培养基充分混匀。此步骤需要在冰上完成)

(3) 取出 Transwell 小室(直径 6.4 mm, 小室膜上分布有 8  $\mu$ m 直径的孔)放入 24 孔板中, 用 50  $\mu$ l 预先稀释好的 Matrigel 胶包被到小室膜上(此步操作时尽量轻, 且不要用枪打出气泡), 在 37 C 培养箱放置 2-3 h 使胶凝化。

## 2. 细胞的准备:

(1) 用胰酶将细胞消化, 1000  $\times$  g, 离心 10 min;

(2) 用无血清的培养液洗一次后重悬;

(3) 细胞计数(细胞计数是本实验中的关键步骤, 将细胞充分重悬后再吸取细胞进行计数, 计数确保 3 次, 取均值。)

(4) 使 200  $\mu$ l 体系中含有合适的细胞数目(以 HTR8/SVneo 细胞为例, 一般是  $10^5$  个细胞), 将该细胞悬液轻轻加入小室(该体系为无血清体系, 主要是能尽量排除细胞增殖的影响。)该步骤同样要注意不要有气泡产生, 加细胞悬液时使枪垂直 Matrigel 平面, 轻轻打入, 速度过快易造成细胞沉积到孔边缘, 导致细胞不均匀。

(5) 在 24 孔板的空孔中加入 600-800  $\mu$ l 含血清的培养基, 小心将含有细胞悬液的 Transwell 孔置于该孔中(使 Transwell 底面与培养基液面呈一定角度放入, 避免 Transwell 与培养基液面间产生气泡)。显微镜下观察有无气泡, 之后置于 37  $^{\circ}$ C 培养 22-24 小时。(该步骤中的细胞数目和培养时间可以根据细胞系不同进行调整)

## 3. 细胞染色计数:

(1) 用棉球轻轻地擦净 Transwell 孔内多余的 Matrigel 和细胞(切不可擦底部, 穿过的细胞都在底面);

(2) 用 PBS 洗小室两次, 用甲醇固定小室底端的细胞, 室温, 10 min;

(3) PBS 洗两次, 苏木素染色 10 min;(若用本组免疫组化用苏木素可在 37C 染色 5min, 效果比较好)

(4) PBS 洗两次, 伊红染色 10 min, 蒸馏水冲洗;

(5) 在显微镜下 200  $\times$  或 100  $\times$  随机选择十个不同的视野照相并计数。每组试验重复三次, 统计结果。

## 1.6 细胞迁移实验

实验步骤与细胞浸润实验基本相同, 差别在于 Transwell 小室的膜上不包被



Matrigel。同样，实验重复 3 次。

### 1.7 明胶酶谱

1. 收集上清液，将上清液移入离心管中 2000rpm 离心 10min，-70℃ 储存备用。
2. 根据细胞计数调整各组细胞培养上清液中的蛋白浓（或者测定蛋白浓度调整使所上蛋白总量一致）。与 4×上样缓冲液（4%SDS，0.25 mmol/L Tris-HCl，40% 甘油，0.1% 溴酚蓝）按照 1：3 混合。
3. 配制分离胶和浓缩胶，15ul/孔上样（根据表达强忍和蛋白浓度确定上样量），4℃进行 SDS-PAGE 电泳 100v 恒压跑至分离胶和浓缩胶交界处改为 90 毫安恒流，直至溴酚蓝跑出胶外。
4. 电泳结束后,将凝胶置于洗脱液(2.5% Triton X-100, 50mmol/L Tris -HCl , 5mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1μmol/L ZnCl<sub>2</sub>, pH7.6) 中振荡洗脱 2 次,每次 45 分钟,然后用漂洗液(除不含 Triton X - 100 外其余同洗脱液) 漂洗 2 次,每次 20 分钟,接着,将凝胶置于孵育液( 50mmol/L Tris - HCl , 5mmol/ CaCl<sub>2</sub> , 1μmol/L ZnCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35 ,pH7.6) 中 37℃ 孵育 42h。
5. 孵育结束后经染色液(0.05% Coomassie 亮蓝、30%甲醇、10%乙酸) 染色 3h, 及脱色液 A、B、C(甲醇浓度分别为 30%、20%、10% ,乙酸浓度分别为 10%、10%、5%) 分别脱色 0.5、1、2h 后, 显示出 MMP-2 (72KD) 和 MMP-9 (92 KD) 为位于蓝色背景上的透亮带, 用凝胶图像分析系统分析读取条带面积, 宽度和灰度值, 做统计分析。

### 1.8 MTT 法检测细胞增殖

细胞转染前一天在96孔板中以  $1 \times 10^3$  个细胞的密度铺板，待转染前细胞汇合度达到50%。细胞分别转染control siRNA或furin siRNA，继续培养 44 h，细胞换液，每孔加入 100 μl MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 试剂，继续培养 4 h，加入100 μl DMSO（二甲基亚砷）显色。在波长570 nm下，用酶标仪(Beckman DU530)测定每孔的光密度值。实验重复 3 次。

### 1.9 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡

细胞转染 48 h 后，用胰酶消化，重悬成  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 的细胞悬液。取 25 μl 细胞悬液，加入 1 μl Hoechst 33258 染色液。取 10 μl 细胞悬液在荧光显微镜下

计数。随机挑选视野，计 200 个细胞，统计其中凋亡细胞的数目。实验重复 3 次。

## 1.10 统计分析

见第一部分材料与方法

## 2 实验结果

### 2.1 CD82 siRNA 在外植体培养中促进绒毛外滋养层细胞的迁移

基于第一部分CD82在早期绒毛中的免疫组化定位显示CD82在绒毛滋养层柱（将来分化成EVT细胞）有高表达，所以为进一步研究CD82在滋养层细胞分化中的作用，我们使用了早期绒毛外植体培养的模型，外植体在matrigel上生长，绒毛滋养层柱分化出绒毛外滋养层细胞向外迁移，我们把绒毛培养在含有500nM siRNA片段的无酚红培养基中，照相观察CD82干扰片段对绒毛外滋养层细胞迁移的影响。实验结果显示(图3-1)，在24h时，绒毛锚定在matrigel上，并有一定的外延生长，但是与对照组的绒毛相比，CD82干扰片段处理的绒毛之间没有显著的差异( $P>0.05$ )。在48h时出现了显著差异( $P<0.05$ )，在72h时为极显著差异( $P<0.01$ )。为了证明干扰片段的效率，我们转染了带荧光标记的干扰片段。

### 2.2 干扰 CD82 的表达可以促进 HTR8/SVneo 细胞的浸润和迁移

CD82在滋养层细胞表达中的证据表明CD82可能调控滋养层细胞的迁移与浸润。因此，我们进一步实验使用matrigel 浸润实验和Transwell小室的迁移实验模型来验证干扰CD82对滋养层细胞HTR8/SVneo细胞的影响。CD82干扰片段可以有效地干扰CD82的表达（图3-4）。实验结果显示（图3-2，图3-3），干扰CD82表达以后，HTR8/SVneo细胞的浸润和迁移能力均增加，且具有显著性差异（ $P<0.01$ ）。而且，这种对细胞浸润迁移的促进并不是因为干扰片段增强了增殖能力或是降低了凋亡能力引起的。MMT增殖实验和hoechest33258染色实验证明，对照组和干扰组的增殖和凋亡没有显著的差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 过表达 CD82 可以抑制 HTR8/SVneo 细胞的浸润和迁移

我们进一步研究了过表达CD82对对滋养层细胞HTR8/SVneo细胞的影响实验结果显示（图3-5，图3-6），过表达CD82以后，与对照组比较，HTR8/SVneo细胞

的浸润和迁移能力明显受到抑制，且具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。MMT增殖实验和hoechst33258染色实验证明，对照组和过表达组的增殖和调亡没有显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图3-7)

## 2.4 过表达或干扰 CD82 的表达会影响 MMP9 的活性及 TIMP1 和 2 的表达

蛋白酶在细胞的运动中起着重要的调节作用。金属基质蛋白酶(MMP-2 and MMP-9)在滋养层浸润过程中参与细胞外基质的重建。为了鉴定CD82在滋养层细胞浸润过程对基质金属蛋白酶以及它们的抑制因子TIMP-1和2的影响，我们采用明胶酶谱的方法检测上清中细胞分泌的MMP-9和-2的活性。实验结果显示 (图3-8, 图3-9)，干扰CD82后MMP-9的活性增强，过表达CD82后MMP-9的活性降低，而western blotting对上清中的蛋白检测发现它们的抑制因子发生相依的变化。

## 3 讨论

滋养层细胞对母体蜕膜和母体螺旋动脉有节制的浸润是母胎建立血液循环和成功妊娠的关键。在人胎盘发育的过程中有是三种细胞类型：细胞滋养层 (cytotrophoblasts (CTBs))，合体滋养层 (syncytiotrophoblasts (STBs)) 和绒毛外滋养层 (extrovillous trophoblasts (EVTs))，每种细胞在调控滋养层细胞的浸润上都起着重要的作用<sup>[2, 9, 10]</sup>。滋养层细胞的浸润受到严格的时空调节，它被滋养层和子宫细胞自分泌或旁分泌的一系列因子调控着。例如，绒毛外滋养层细胞分泌基质金属蛋白酶MMPs浸润母体子宫，介导细胞与细胞之间的粘附以及细胞的迁移<sup>[11-14]</sup>，而同时它的抑制因子TIMP抑制这种浸润。这之间有各种类型细胞复杂的调控网络，介导因子，信号通路通过不同的激素，生长因子，细胞活化因子，趋化因子来调控滋养层细胞的浸润<sup>[15-22]</sup>。

肿瘤转移抑制因子CD82 (又名KAI1) 是跨膜4超家族的成员之一。CD82在抑制肿瘤细胞的作用是通过基因的扫描鉴定出来的<sup>[23]</sup>。CD82可以与整合素和其他的家族成员相互作用调控细胞间的粘附与转导。它们形成的复合物可以介导细胞间的信号通路广泛的调控细胞的增殖，激活和运动<sup>[24-27]</sup>。到目前，CD82抑制肿瘤的发生过程已经被很好地研究。目前报道的CD82在母胎界面<sup>[28]</sup>是有表达的而且主要

在母体的部分<sup>[29-31]</sup>，但是它在早期绒毛和正常滋养层细胞中的表达仍不明确。但是我们注意到两个microarray分析结果显示CD82在人的胚胎里有很强的表达<sup>[32, 33]</sup>，而且我们在不同的滋养层细胞系里检测到CD82的表达，这些证据提起了我们研究CD82在滋养层细胞的调控中没有被发现的作用。基于这种假设，我们探索了CD82在人母胎界面的时空表达，通过体外早期绒毛外植体的培养以及滋养层细胞系模型去研究CD82在其中的作用。

在这篇文章中，我们给出了CD82不仅在母体蜕膜表达的而且在滋养层细胞系中也有表达并且抑制滋养层细胞迁移和浸润的直接证据。我们的数据证明CD82在整个妊娠时期表达部位呈现动态变化，这与以前发表的microarray的结果，CD82在胎盘中有较强的表达相一致<sup>[32, 33]</sup>。通过体外构建好外植体培养模型，我们的结果进一步证实了敲低CD82将会显著的促进细胞滋养层的外延生长以及绒毛外滋养层细胞的迁移，这与促进一样层细胞浸润和基质金属蛋白酶的分泌增加有关。另一方面，这个发现也与使用HTR-8/SVneo细胞系所得到的结果一致。所以，我们的结果证明了CD82在没有影响细胞增殖和凋亡的情况下对滋养层细胞的浸润可能起着重要的作用。这些可能是通过直接或间接调控蛋白酶的活性来实现的。

CD82的肿瘤抑制特性在肝癌，结肠癌，胰腺癌，胸腺癌等癌症细胞中都得到证实<sup>[34-38]</sup>，而且也有研究发现，降调CD82的蛋白与mRNA可以促进一系列细胞如膀胱，结肠，肺，胰腺，胸腺向癌细胞方向发展，这表明了失去CD82的表达会增加癌细胞的迁移特性。滋养层细胞和肿瘤细胞在增殖和浸润特性上有着惊人的相似<sup>[39]</sup>，而这种生理和病理的差异是通过滋养层与母体蜕膜细胞之间的对话来平衡的。这种平衡涉及到自分泌和旁分泌的方式调节，参与其中的有一系列的生长因子，细胞活化因子和趋化因子<sup>[17, 18]</sup>。CD82在母胎界面调节细胞浸润的潜在功能已被其他实验研究团队鉴定出来<sup>[28]</sup>。I在他们的报道中称，CD82在母胎界面的蜕膜细胞中表达是通过旁分泌的形式控制滋养层细胞的过度浸润<sup>[28-31]</sup>。但是，CD82是否也在滋养层细胞中表达是存在争议的。在第一篇报道中称，他们使用两种(Santa Cruz G2, clone 5B5)抗体检测到CD82在中期绒毛的蜕膜中高表达，在滋养层细胞中的表达是阴性的，但是他们使用的另一种抗体(Santa Cruz C-16)却在滋养层细胞中显出阳性信号。这表明CD82的在滋养层细胞中的表达没有被排除在外，这引发了我们继续探讨这个问题的兴趣。通过存在的microarray数据，我们发现CD82其实在

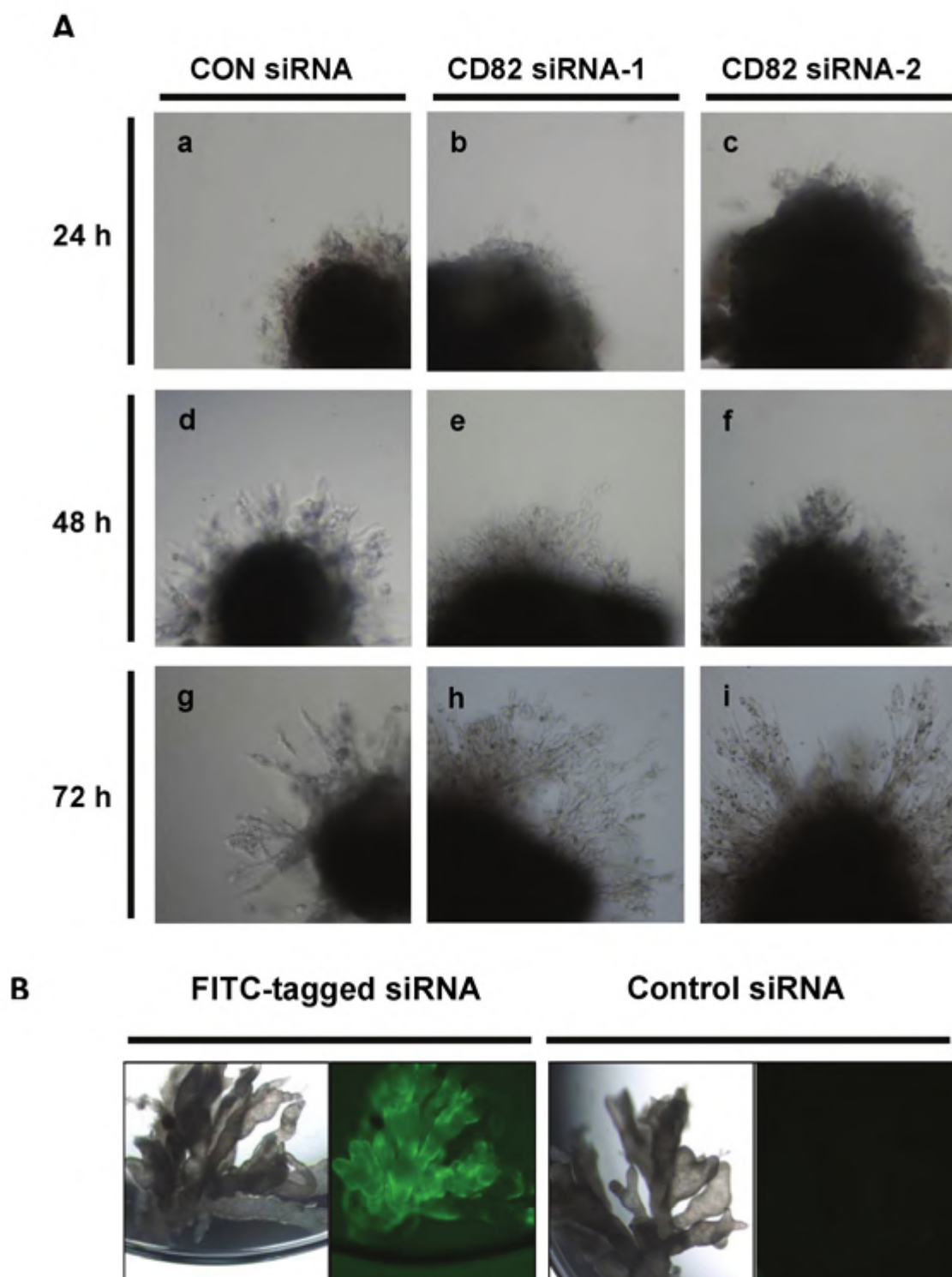
早期的胎盘绒毛中具有很高的表达。我们检测了两个建好系的滋养层细胞系 HTR8/SVneo和B6-tert我们检测到CD82在其中具有很强的转录水平,我们使用两个细胞系JEG-3 和JAR两个绒毛癌细胞均为检测出CD82的表达(这也与其他实验室在绒毛BeWo绒毛癌细胞中没有检测出CD82的结果及其相似)。这些线索增加了CD82在正常滋养层细胞系中其重要作用的可能性。所以,我们首先确定了CD82在滋养层细胞中的表达包括转录水平和蛋白水平。然后,我们使用了几个不同公司几种商业化抗体(Abcam, Santa Cruz, abgent)去检测CD82在母胎界面的表达。与前面发表的数据相比,在我们的检测系统里,其中4个抗体里有3个可以在母体蜕膜和滋养层细胞中表达(SC-5540/ab66400/AP6250a),而且也可以在正常的滋养层细胞系中检测到。这些结果引领我们更加相信CD82在滋养层细胞系中的存在。我们的干扰和过表达功能试验在体外培养和滋养层细胞系中也拿到了直接的证据证明CD82在其中起的作用。

与其他实验室比较得到这样不同的结果,我们认为与取材来自不同时期相关。因为CD82可能在不同的时期的绒毛表达水平处于动态变化相关。这可能是由于在早期绒毛中滋养层细胞高度浸润,CD82需要在其表达抑制这种浸润进程,所以比较容易检测到。另一方面,不同的个体与样本在不同的基因背景下会造成不一样的表达模式。而且据目前我们所知,CD82基因还存在很多的剪切体(14个剪切体,其中有10个可以编码不同的蛋白[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000085117;r=11:44585977-44641913](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000085117;r=11:44585977-44641913))可能每个抗体只能识别CD82的一小部分肽段,这暗示着CD82在母胎界面也会表达不同的模式,这些都值得我们去更进一步的细致研究。

CD82在母胎界面抑制滋养层细胞浸润的下游信号和机制应该和MMPs的表达紧密相关<sup>[40, 41]</sup>,MMPs在降解细胞外基质促进细胞运动中发挥重要作用。所以引发我们观察CD82在MMPs活性上所起的作用。在MMP家族的众多成员中,MMP-2和-9在滋养层细胞浸润过程中是被研究最多且发挥最大作用的因子。事实上,早就有报道称MMP-9活性受到抑制是通过TIMP-1的表达上调造成的,而且这一过程抑制了肿瘤的浸润<sup>[42]</sup>。我们的数据也证明滋养层细胞在调控自身浸润上也分享同样的机制。

总的来讲,我们的实验数据证明 CD82 在早期绒毛母胎界面的滋养层细胞系中

是有表达的。CD82 抑制了滋养层细胞的浸润。CD82 对滋养层细胞的抑制滋养层细胞的浸润是通过对蛋白酶的降调实现的。CD82 可能参与了维持正常胎盘功能起了重要的作用，而它的生理学意义还将进一步去研究验证。



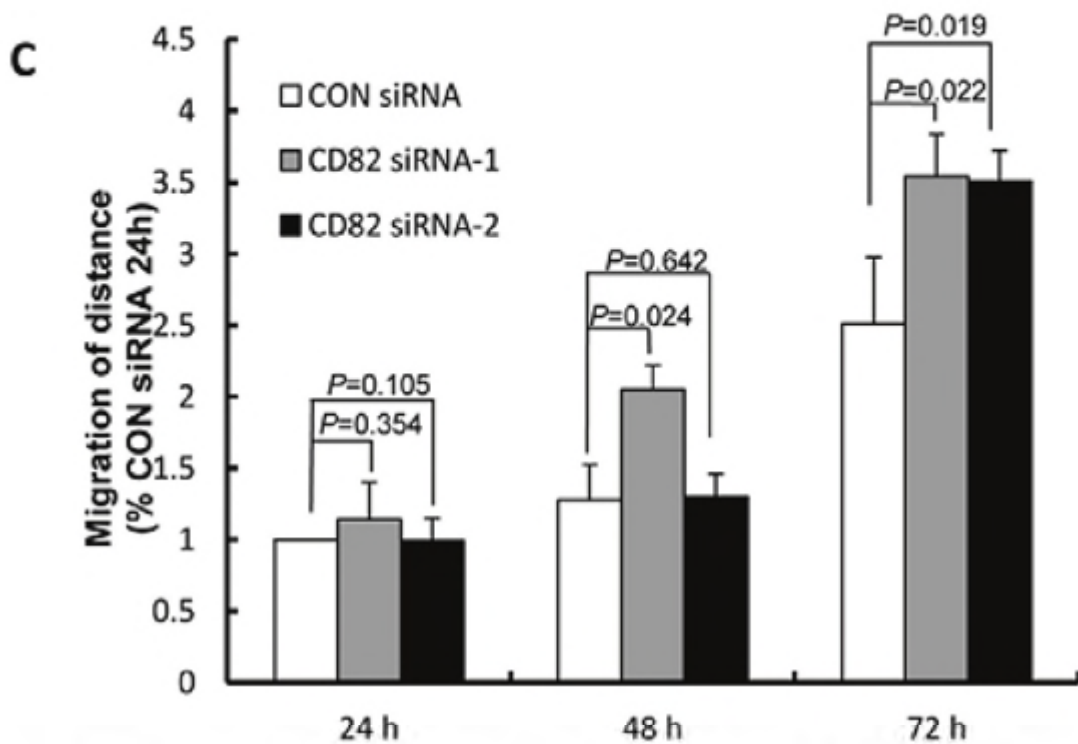


图 3.1 干扰 CD82 可以促进滋养层细胞的外延生长以及绒毛外滋养层细胞的迁移

(A) 5-8 周的早期绒毛在低氧环境下培养 5 天，照相观察。干扰掉 CD82 可以促进绒毛外滋养层细胞(EVT)的外延生长和迁移。

(B)绒毛(a)转染 FITC-标记的干扰片段显示干扰效率，绒毛(c)转染不带荧光标记的干扰片段显示绒毛的自发荧光。

(C)绒毛外滋养层细胞的迁移距离的统计结果。

Figure 3.1 Silencing of CD82 promote trophoblast outgrowth and migration in villous explant cultures.

(A)Villous explants from 5 to 8 weeks of gestation were maintained in culture for 5 days on matrigel under low (3% O<sub>2</sub>) oxygen tension. Villous explants of CD82 siRNA dramatically increase budding and outgrowth of EVT from the distal end of the villous tips comparing with negative control . Serial pictures of villous explants were taken under the light microscope after 24, 48, and 72 h of culture *in vitro*.

(B) Villi (a) transfected with FITC-tagged siRNA, showing the transfection efficiency (b).

Villi (c) as a control transfected nothing, showing the villi background fluorescence(d).

(C) The migration distance of villous tip was shown in C. Data are presented as mean±S.E of one experiment representative of three independent experiments.

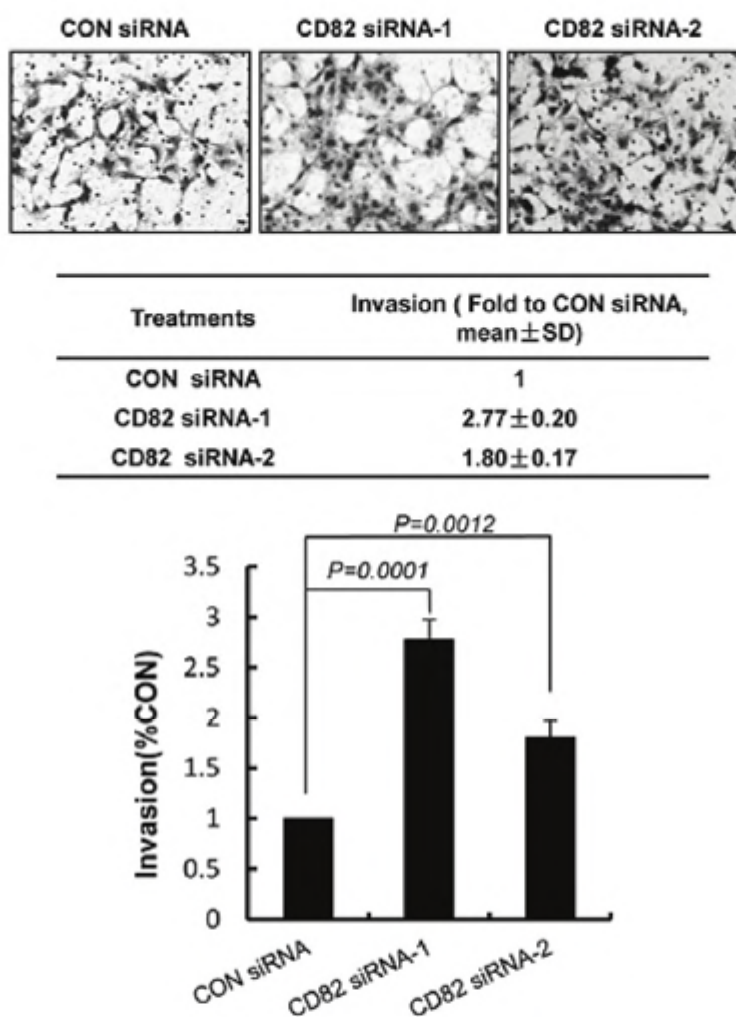


图 3.2 干扰 CD82 后促进 HTR8/SVneo 细胞的浸润

图片代表浸润到 Transwell 小室膜另一侧的细胞，表格和图表为统计结果

Figure 3. 2 Silencing of CD82 promoted invasion of HTR8/SVneo cells.

Representative images of filters containing invaded cells in Matrigel invasion assay is shown.

The statistical bar graphs show the summary of three independent experiments (*t*-test).



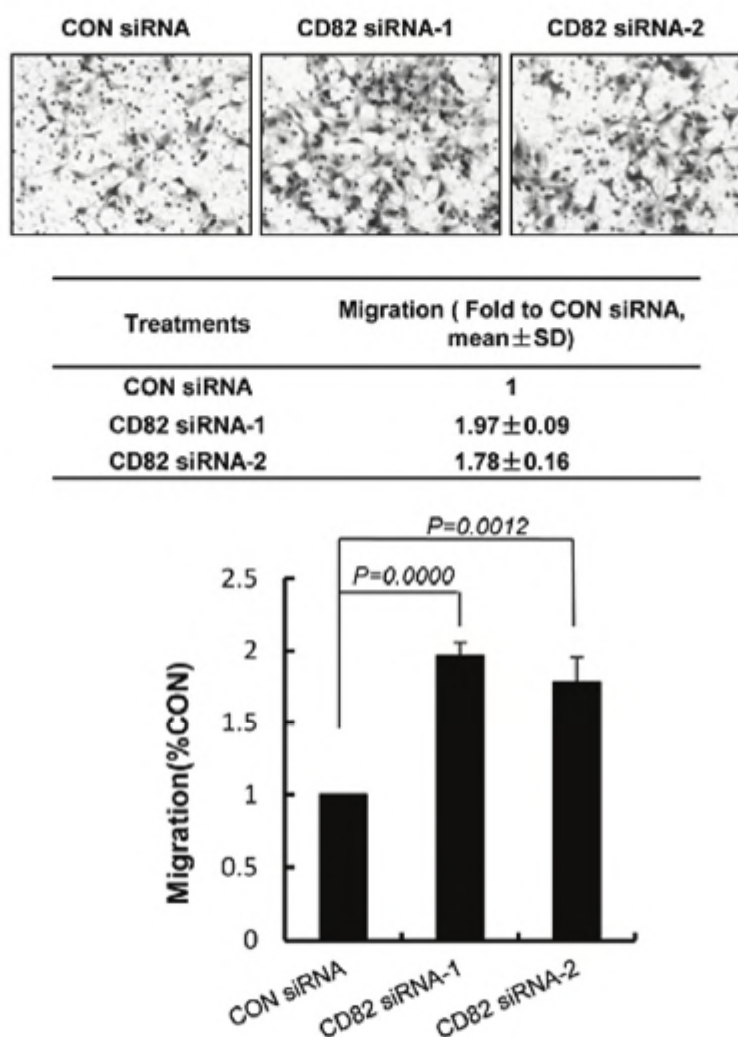


图 3.3 干扰 CD82 后促进 HTR8/SVneo 细胞的迁移

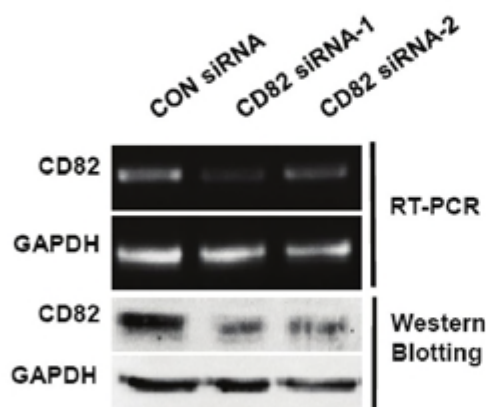
图片代表浸润到 Transwell 小室膜另一侧的细胞，表格和图表为统计结果

Figure 3.3 Silencing of CD82 promoted migration of HTR8/SVneo cells.

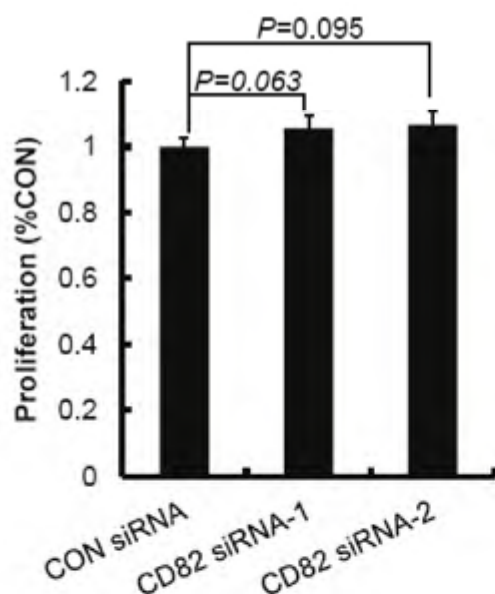
Representative images of filters containing migrated cells in Matrigel invasion assay is shown.

The statistical bar graphs show the summary of three independent experiments (*t*-test).

A



B



C

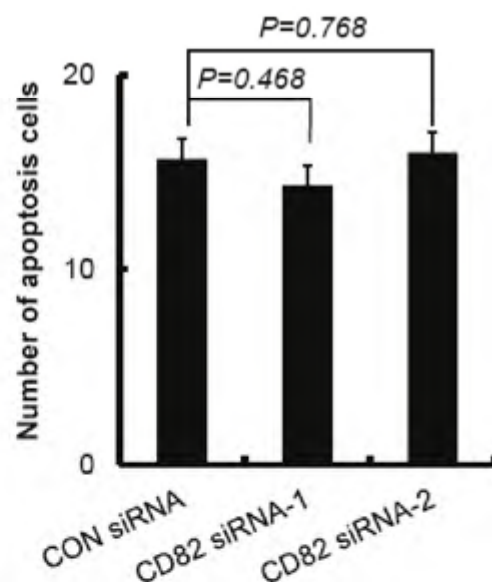


图 3.4 CD82 干扰效率的鉴定以及增殖凋亡的影响

(A) RT-PCR 和 Western blotting 对 CD82 干扰片段效率的检测

(B) MTT 检测 CD82 干扰片段对增殖的影响, 统计结果显示没有显著差异

(C) 检测 CD82 干扰片段对凋亡的影响, 统计结果显示没有显著差异

Figure 3.4 The effect of CD82 siRNA-1,-2on proliferation and apoptosis

(A) Confirmation of RNA interference of CD82 was shown by RT-PCR and Western blotting. GAPDH was used as an internal control in RT-PCR and a loading control in Western blotting.

(B) MTT assay showed no significant difference on proliferation. (*t*-test).

(C) CD82 siRNA-1,-2 had no significant effect on apoptosis of HTR8/Svneo cells.(*t*-test)

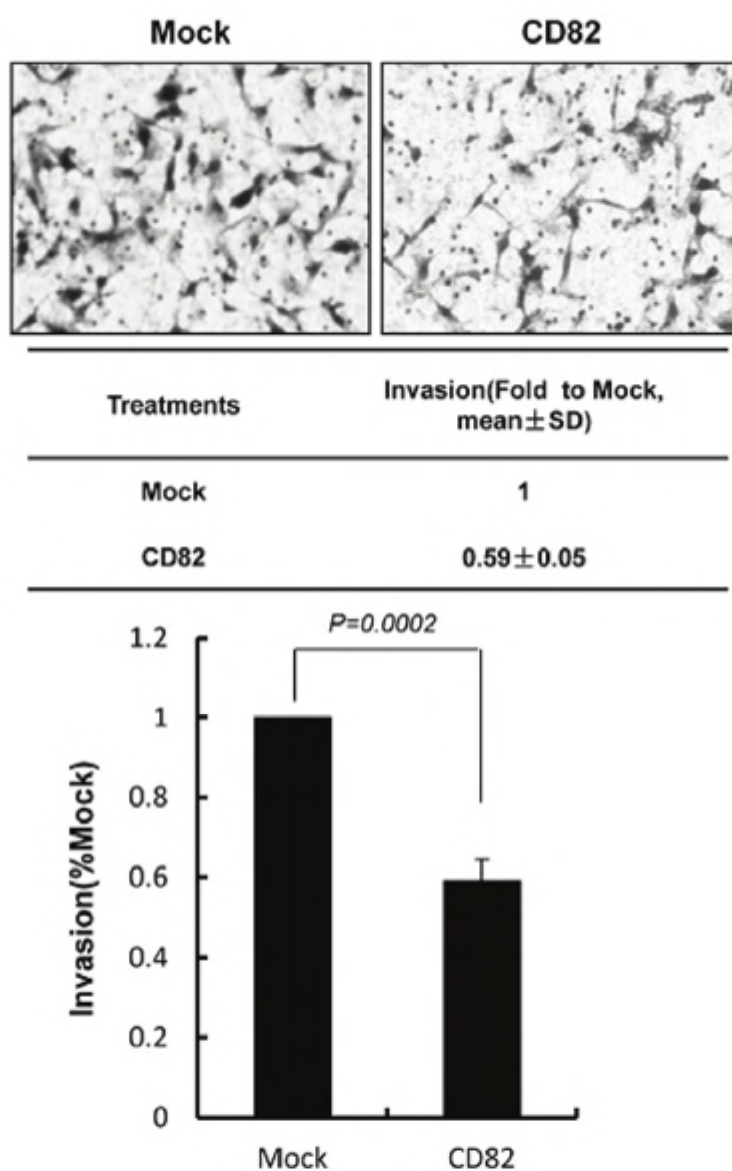


图 3.5 过表达 CD82 后抑制 HTR8/SVneo 细胞的浸润

图片代表浸润到 Transwell 小室膜另一侧的细胞，表格和图表为统计结果

**Figure 3.5 Over-expression of CD82 inhibited invasion of HTR8/SVneo cells. (A, B)**  
**Representative images of filters containing invaded cells in Matrigel invasion assay is shown.**  
**The statistical bar graphs show the summary of three independent experiments (t-test)**

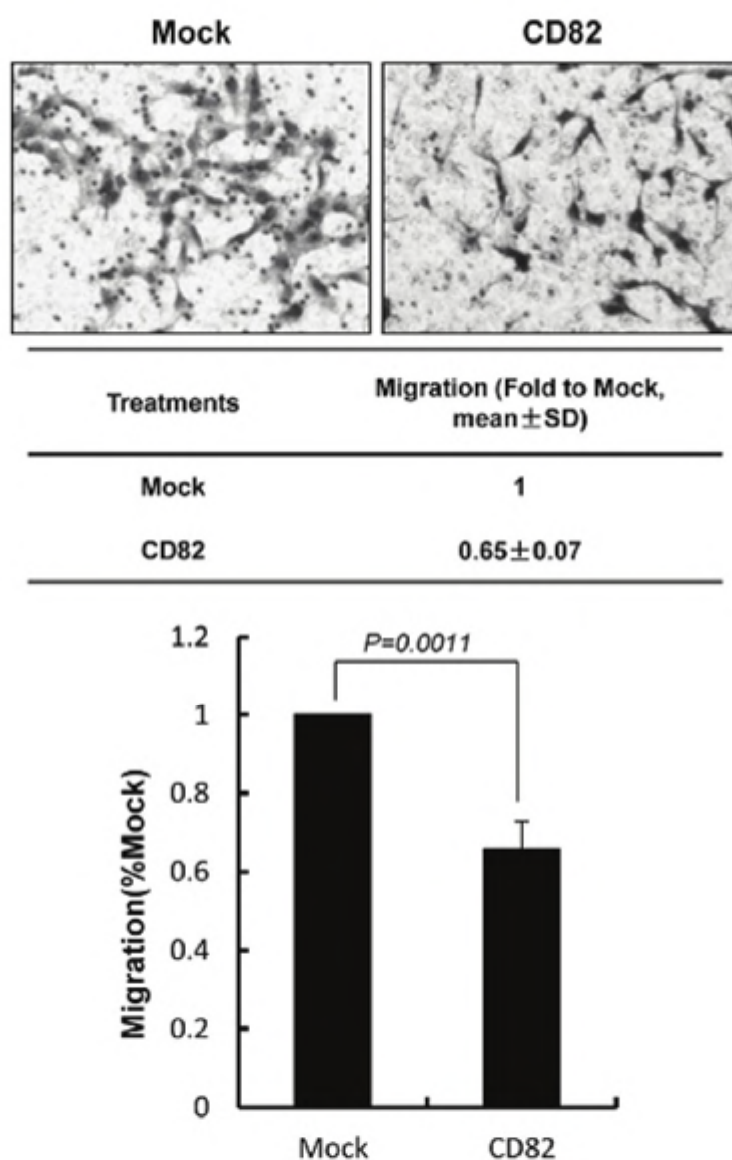
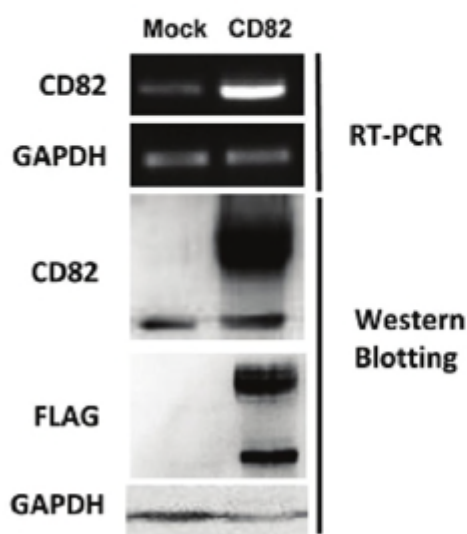


图 3.6 过表达 CD82 后抑制 HTR8/SVneo 细胞的迁移

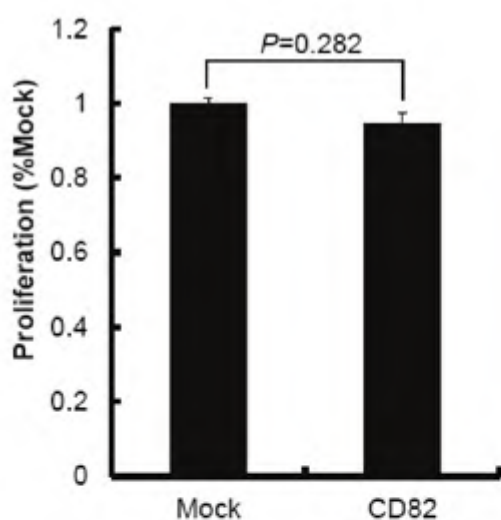
图片代表迁移到 Transwell 小室膜另一侧的细胞，表格和图表为统计结果

**Figure 3.6 Over-expression of CD82 inhibited migration of HTR8/SVneo cells**  
**Representative images of filters containing migrated cells in Matrigel invasion assay is shown.**  
**The statistical bar graphs show the summary of three independent experiments (*t*-test).**

A



B



C

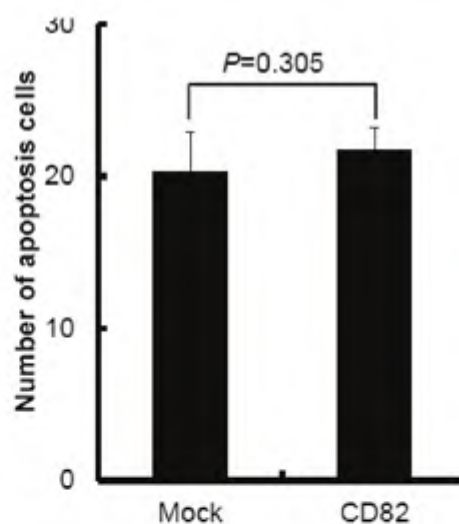


图 3.7 CD82 过表达效率的鉴定以及增殖凋亡的影响

(A) RT-PCR 和 Western blotting 对 CD82 过表达效率的检测

(B) MTT 检测过表达 CD82 质粒对增殖的影响, 统计结果显示没有显著差异

(C) 检测过表达 CD82 质粒对凋亡的影响, 统计结果显示没有显著差异

Figure 3.7 The effect of CD82 siRNA-1,-2on proliferation and apoptosis

(A) Confirmation of over-expression of CD82 was shown by RT-PCR and Western blotting. GAPDH was used as an internal control in RT-PCR and a loading control in Western blotting.

(B) MTT assay showed no significant difference on proliferation. (*t*-test).

(C) Overexpression CD82 had no significant effect on apoptosis of HTR8/Svneo cells.(*t*-test)

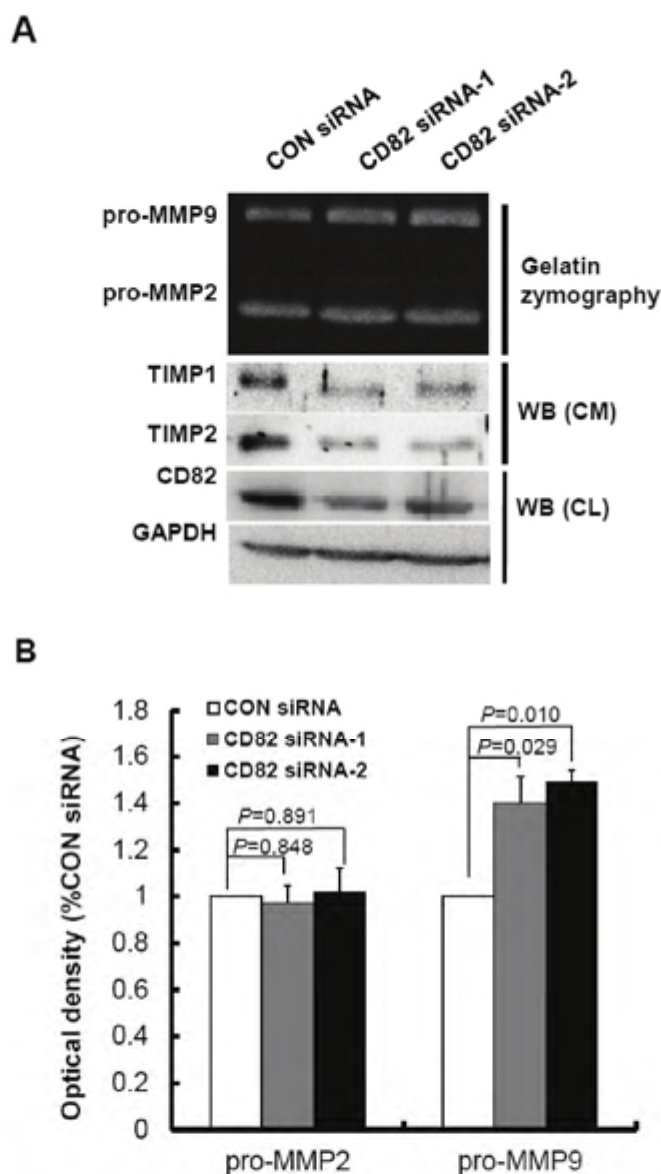


图 3.8 干扰 CD82 对 MMP-2、-9 及其抑制因子 TIMP-1,2 表达的影响

(A)HTR8/SVneo 细胞转染 CD82 干扰片段，提取蛋白检测证明干扰效率，无血清上清培养液纯化用于明胶酶谱和 western blotting 实验。

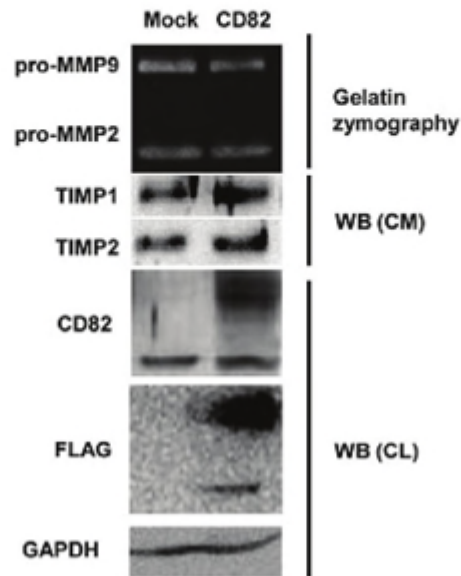
(B)明胶酶谱灰度扫描统计结果

Figure 3.8. The effect of CD82 siRNA-1,-2 on the activities of MMP-2, MMP-9 and expression of TIMP1, TIMP2.

(A)HTR8/SVneo cells were transfected with CD82 siRNA-1,-2. Total proteins were extracted and western blotting (WB) was performed to detect expression of CD82. Serum-free culture medium was collected for gelatin zymography assay and for Western blotting assay. CD82 siRNA decreased protein levels of both TIMP1 and TIMP2. CD82 siRNA increased the activity of pro-MMP9. Activity of pro-MMP2 was not significantly affected.

(B) Statistical assay of the zymographic results in A.

A



B

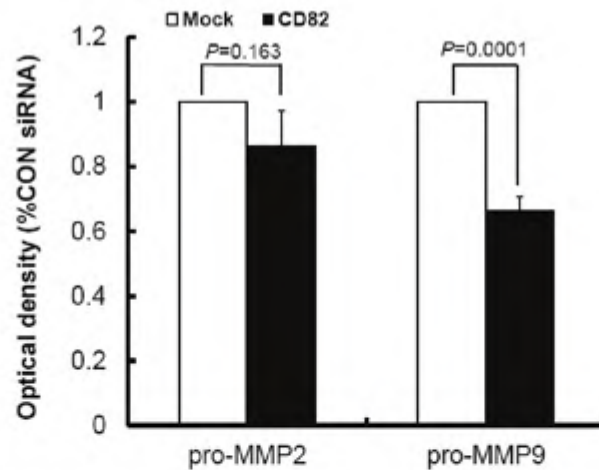


图 3.9 过表达 CD82 对 MMP-2, -9 及其抑制因子 TIMP-1,2 表达的影响

(A)HTR8/SVneo 细胞转染过表达 CD82 质粒, 提取蛋白检测证明过表达效率, 无血清上清培养液纯化用于明胶酶谱和 western blotting 实验。

(B)明胶酶谱灰度扫描统计结果

Figure 3.9 The effect of over-expression CD82 on the activities of MMP-2, MMP-9 and expression of TIMP1, TIMP2.

(A)HTR8/SVneo cells were transfected with pCMV4-CD82 plasmid. Total proteins were extracted and western blotting (WB) was performed to detect expression of CD82. Serum-free culture medium was collected for gelatin zymography assay and for Western blotting assay, over-expression CD82 increased protein levels of both TIMP1 and TIMP2. Over-expressed CD82 decreased the activity of pro-MMP9. Activity of pro-MMP2 was not significantly affected.

(B) Statistical assay of the zymographic results in A.

## 全文总结

1. CD82 在人胎盘绒毛滋养层细胞，滋养层柱和合体滋养层母体蜕膜细胞均有表达。在足月胎盘的绒毛外滋养层细胞中也有较强表达。

2. CD82 通过 RT-PCR 和 western blotting 检测在人正常的滋养层细胞系中高表达，在绒癌细胞系中很难检测到。

3. 构建 CD82 过表达质粒和筛选出具有效率的干扰片段用来进行滋养层细胞分化的功能研究。

4. CD82 siRNA 在外植体培养中促进绒毛外滋养层细胞的迁移。

5. 干扰 CD82 的表达可以促进 HTR8/SVneo 细胞的浸润和迁移。

6. 过表达 CD82 可以抑制 HTR8/SVneo 细胞的浸润和迁移。

7. 过表达或干扰 CD82 的表达会影响 MMP9 的活性，而这种影响可能是通过其抑制因子的 TIMP1 和 2 的表达变化来实现的。



## 主要实验仪器

仪器名称	产地
数码照相系统 (SPOT Cool CCD)	美国 Diagnostic. Instrument. Inc
激光扫描显微成像系统 (LSM510)	德国 Carl Zeiss 公司
荧光倒置显微镜 (Olympus)	日本 Olympus
冰冻切片机 (Leica CM1950)	德国 Leica 公司
多功能酶标仪 (synergy 4)	美国 BioTeK 公司
核酸电泳槽 (DY-III 31A)、电泳仪 (DY-III 8A)	北京六一仪器厂
蛋白电泳槽 (Mini II)、电转移槽 (Mini-TransBlot)	美国 Bio-Rad
电泳仪 (1000/500 Power Supply)	美国 Bio-Rad
-80℃低温冰箱	德国 thremo
全自动高压灭菌锅 (Lab Autoclave MLS-3020)	日本 SANYO
Millipore 超纯水仪	美国 Millipore 公司
二氧化碳培养箱 (Hera Cell)	德国 Thermo
PCR 仪 (Gene Amp 2400)	美国 Perkin-Elmer
暗箱式紫外分析仪	北京新技术应用研究所
紫外分光光度计	德国 eppendoff
20 型 Polytest 恒温水浴锅	德国 Bloblock Scientific
石蜡切片机 2135	德国 Leica
超净工作台	北京昌平空气净化设备公司
高速冷冻离心机 (20PR-52D)	日本 Hitachi
台式冷冻离心机 (Microfuge R)	德国 Eppendorf
台式水平转头离心机 (TDL-50B)	上海安亭离心机厂
透射电子显微镜 (JEM1400)	日本电子株式会社 (JEOL)
液氮罐 (YDS-35-125)	四川乐山市东亚机电工贸公司

## 主要实验试剂

试剂名称	产地
Trizol 试剂、Superscript II 逆转录酶、青霉素、链霉素 Lipofectamine 2000 转染试剂	荷兰 Invitrogen
胎牛血清	美国 Hyclone
限制性内切酶、dNTP 混合物、DNA marker	大连 Takara
Taq DNA 聚合酶	北京鼎国生物公司
PCR 引物	北京英俊生物公司
Transwell 小室	美国 Corning Costar
DAB 试剂盒、ABC 免疫组化试剂盒	北京中山生物技术公司
Bradford 法测定试剂盒、ECL 发光液	美国 Zymed
RPMI 1640、DMEM/F12	美国 Hyclone
BioTrace™硝酸纤维素膜	美国 Pall
质粒提取试剂盒	美国 Qiagen
CD82 抗体	美国 santa cruz
CD82 抗体	英国 Abcam
多聚甲醛、去离子甲酰胺、焦碳酸二乙酯 (DEPC)、 DMSO、牛血清白蛋白 (BSA)、明胶	美国 Sigma-Aldrich
CK7 抗体	美国 Santa Cruz
GAPDH 抗体	英国 Abcam
Anti-FLAG 抗体	美国 Sigma-Aldrich
TIMP-1, 2 抗体	美国 Santa Cruz
Anti-Flag beads	美国 Sigma-Aldrich
预染蛋白 Marker	美国 Fermentas
Matrigel (浸润实验用胶)	美国 BD 公司
Transwell 小室	美国 Corning 公司

## 文献综述

### 第一章 人类胎盘发育与滋养层细胞的分化

#### 1 人类胎盘和滋养层的结构和功能

##### 1.1 人类胎盘的结构

人类孕育是从一个受精卵开始的。受精过程发生在排卵后 24-48 小时，主要部位为输卵管壶腹部，受精卵在受精后 30h 开始卵裂分裂成两个相等的细胞，此后平均每 12 小时分裂进行 1 次，在受精后 72 小时左右会分裂成 16 细胞的桑椹胚 (Morula) 聚集在透明带<sup>[2]</sup>。受精卵在从输卵管向子宫移动的过程中不断进行卵裂，卵裂球的数目剧增但体积却未增大，大小与未受精卵相差不多，主要是为了保证桑椹胚顺利通过细长的输卵管。受精后第 4 日早期囊胚开始到达子宫腔继续发育成晚期囊胚<sup>[43, 44]</sup>。第 6~7 天时，形成早期胚泡，透明带消失，胚泡由滋养外胚层和内细胞团组成，内细胞团一侧的滋养外胚层细胞首先向母体子宫的腔上皮靠近并与腔上皮发生黏附，而滋养外胚层细胞在子宫腔上皮细胞间穿过后，先在基膜上扩展随后侵入子宫内膜基质中，此过程称之为胚胎着床或胚胎植入 (embryo implantation)，在大约受精后 12 天左右胚泡可完全植入子宫内膜基质中<sup>[45-47]</sup> (图 1-1)。内细胞团则继续发育形成胎儿。滋养外胚层的细胞将继续分化形成胚外组织，最终形成胎盘<sup>[2]</sup>。

受精后的 6~7 天滋养外胚层的部分细胞发生最初的分化，融合形成合体滋养层 (Syncytiotrophoblast)，合体滋养层表面的微绒毛与母体子宫内腔上皮细胞接触启动胚胎植入发生。随后，合体滋养层浸润穿透母体子宫内膜。受精后第 10 天，胚胎完全的种植入子宫中，此时单核的细胞滋养层细胞 (Cytotrophoblast cells) 迅速增殖，穿透合体滋养层的包围，与母体子宫接触，并发挥锚定胎儿到母体子宫的作用。最后，细胞滋养层细胞浸润整个子宫内膜肌层直达上 1/3 处，并改建母体的血管，建立子宫与胎儿间的血液循环，从而保证胎儿与母体进行气体，营养物质和代谢产物的交换。

胎盘发育的完成指胎盘功能完全、胎盘大小不再变化。一般在妊娠第 4 个月左右，也就是妊娠中期发育完全。发育完全的胎盘由胚胎的叶状绒毛膜和母体蜕膜

组成<sup>[43]</sup>。叶状绒毛膜构成胎盘的主体部分，其主要结构是胎盘绒毛。绒毛干之间的间隔部位称为绒毛间隙（intervillous space），其中充满着母体血液。此时绒毛分为两种主要类型：漂浮绒毛（Floating villi）是绒毛间隙中游离于母体血的绒毛，锚定绒毛（Anchoring villi）是与母体子宫接触并浸润母体子宫的绒毛为<sup>[2, 43, 48]</sup>（图1-2）。漂浮绒毛主要由两种滋养层细胞组成：内侧单核的、具有增殖能力的细胞滋养层细胞（Cytotrophoblast）；覆盖于细胞滋养层细胞并与母体血液直接接触的合体滋养层细胞（Syncytiotrophoblast）。绒毛锚定在子宫的基底膜上后，绒毛细胞滋养层细胞（vCTB）的原始细胞开始增殖形成绒毛细胞滋养层柱（CC），底端的绒毛细胞滋养层柱停止增殖开始向母体的蜕膜区域迁移，形态从上皮样转换成间质样形成间质滋养层细胞（iCTB），这个过程我们成为上皮到间质的转化（EMT）。间质滋养层细胞DNA内复制在母体肌层的上1/3处形成巨核的巨细胞（GC）。还有一部分细胞浸润至母体的螺旋动脉替代血管的上皮细胞形成血管滋养层细胞（eCTB）并具有上皮样的特性。细胞滋养层细胞另一分化途径就是向外融合形成合体滋养层细胞（STB）（图1-2）。

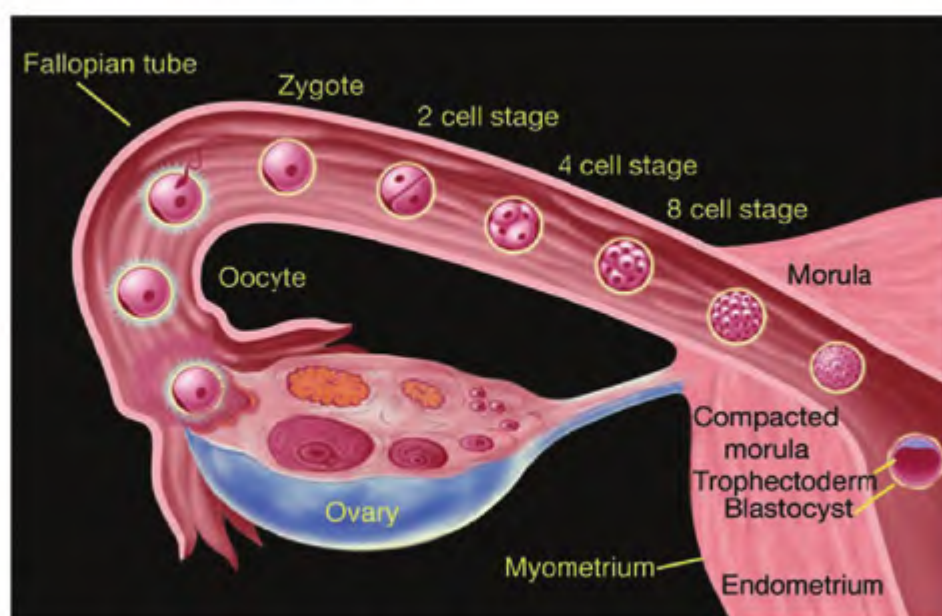


图 1-1 人类早期胚胎发育过程中从受精到囊胚形成过程模式图<sup>[2]</sup>

Fig. 1-1 The early stages of human development from fertilization to blastocyst formation<sup>[2]</sup>

## 1.2 绒毛外滋养层细胞的功能

锚定绒毛顶端的细胞滋养层细胞具有旺盛的增殖能力，大量增殖后冲破合体

滋养层形成细胞滋养层柱 (Cytotrophoblast column) [2, 43, 48], 滋养层柱远端的滋养层细胞发生类似于肿瘤发生过程中的上皮-间质转化 (EMT) 类似的变化, 从而获得较强的浸润和迁移能力, 并且进一步分化为绒毛外滋养层细胞 (EVTs)。绒毛外滋养层细胞 (EVTs) 浸润到母体后继续分化形成两大类细胞, 一类 EVTs 细胞浸润进入母体血管继续增殖, 我们把它称之为血管内皮滋养层细胞 (Endovascular Trophoblast)。妊娠 10 周前, 浸润螺旋动脉的血管内皮滋养层细胞增殖形成一个结节, 它可以堵塞血管, 使母体血不能进入到胎盘绒毛的间隙, 使绒毛处于一个相对低氧的环境<sup>[49]</sup>, 其主要目的是促进漂浮绒毛滋养层细胞的增殖及绒毛内血管的新生, 该过程将持续到胎盘生长至足够维持胎儿发育的体积大小<sup>[50]</sup>。待胎盘主体结构基本形成 (即妊娠 12 周) 之后, 血管内皮滋养层细胞在螺旋动脉口形成的结节便消失, 同时母体螺旋动脉血管也被滋养层细胞重新改建, 使胎盘可获得正常供氧。第二类 EVTs 是间质滋养层细胞 (Interstitial Trophoblast), 它们浸润到蜕膜基质细胞持续的时间很长, 可至妊娠中期 (Second trimester) <sup>[51]</sup>。这些细胞比较倾向于侵入到螺旋动脉周围的母体组织, 使近端的螺旋动脉周围血管壁纤维化, 而无收缩性的螺旋动脉利于血液流向胎盘的绒毛间隙<sup>[52]</sup>。间质滋养层细胞可侵入到整个子宫内膜和肌层上三分之一处, 但是患有子痫前期的病人, 浸润程度通常不足, 而且浸润到子宫内膜的滋养层细胞的数量也明显低于正常妊娠<sup>[53]</sup>。

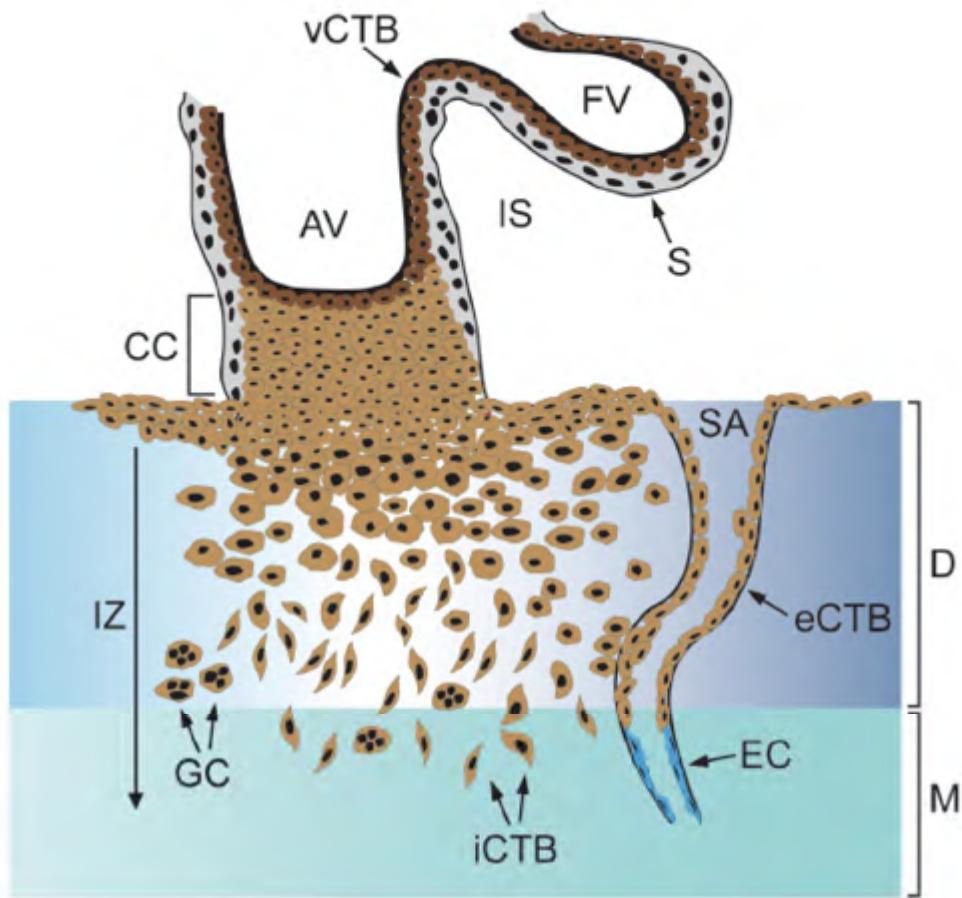


图 1-2 人类母胎界面示意图<sup>[54]</sup>

FV: 漂浮绒毛; vCTB: 绒毛细胞滋养层细胞; S: 合体滋养层细胞; AV: 锚定绒毛; CC: 细胞滋养层柱; eCTB: 血管内皮滋养层细胞; iCTB: 间质滋养层细胞; GC: 巨细胞; SA: 螺旋动脉; IS: 绒毛间空间; EC: 母体血管内皮细胞

Fig. 1-2 Human fetal-maternal interface<sup>[54]</sup>

FV: Floating villi; vCTB: Cytotrophoblast; S: Syncytiotrophoblast; AV: Anchoring villi; CC: Cytotrophoblast Column; eCTB: Endovascular Cytotrophoblast; iCTB: Interstitial Cytotrophoblast; GC: giant cells SA : spiral arteries; IS: intervillous space; EC : maternal endothelial cells

## 2 胎盘功能障碍相关疾病

### 2.1 自然流产自发流产 (Spontaneous miscarriage)

流产或者自发流产是指在胚胎或者胎儿尚不能独立存活的某个妊娠阶段的妊娠的自发终止，一般是在人类妊娠的 20 周之前。自发流产的发生占临床妊娠的大约 14%–19%<sup>[55, 56]</sup>，是最为常见的人类妊娠相关疾病。自然流产分为偶发性流产 (sporadic miscarriage, MC) 和复发性流产 (recurrent miscarriage, RM) 两种类型。

导致自然流产的因素较多,在 40-60%不明病因的自然流产患者中,大多数是由于母体与胎儿双方免疫不适应,进而引起母体对胚胎免疫排斥引起的<sup>[57-59]</sup>。染色体数目和结构异常的胚胎有 50-60%发生早期自然流产。

三次及以上的连续自发流产则一般被称作习惯性(自发)流产,妊娠妇女中的发生率大约在 0.5%-3%<sup>[60-62]</sup>。但也有研究人员认为连续两次以上自发流产即可被归为习惯性流产,另有研究人员则不注重自发流产是否连续;此外,一些研究人员只包括早期妊娠内的自发流产,而另一些则还包括了中期妊娠内的自发流产<sup>[63]</sup>。

妊娠早期滋养层细胞浸润异常也是自然流产的病因之一,Yurdakan等研究者发现在自然流产病人中与滋养层细胞迁移浸润密切相关的分子CD31, CD44, CD106和E-cadherin在病人EVTs中表达显著降低而CAM-1的表达则明显升高,这提示自然流产的发生与滋养层细胞浸润能力不足密切相关<sup>[64]</sup>。有实验室研究发现EVTs细胞浸润不足对子宫螺旋动脉重建异常与自发流产的发生密切相关<sup>[65]</sup>。

## 2.2 胎儿宫内发育迟缓 (intrauterine growth retardation, IUGR)

胎儿宫内发育迟缓是指孕 37 周后新生儿出生体重低于同孕龄胎儿正常平均体重的十个百分数,胎儿出生体重低于同胎龄平均体重的第十个百分位或两个标准差。如果胎龄已达 37 周,新生儿体重低于 2.5 千克,也称为胎儿宫内发育不良,是围产期的重要并发症,宫内发育迟缓是围产期致病乃至致死的最重要疾病,影响了所有妊娠的大约 7%-15%,其中出生时的胎儿体重及其胎龄是造成新生儿缺陷甚至致死的首要原因<sup>[66]</sup>。胎儿宫内发育迟缓的病因复杂而繁多,约 40%的患者病因尚不明确<sup>[67]</sup>。染色体异常及胎儿畸形、宫内病毒感染、多胎妊娠等是造成宫内发育迟缓的主要原因。胎盘发育不良、胎盘功能下降、脐带过长或扭转打结等。孕妇在孕期期间接触有害化学物品、X线照射、生活及工作周围环境污染等,也有一定的影响。生长激素 (growth hormone, GH), 胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor, IGF), 神经生长因子 (Nerve growth factor, NGF), 瘦素等物质在脐带血中的水平下降会影响胎儿内分泌和代谢进而引发宫内发育迟缓。约 17%的 IUGR 胎儿伴有染色体异常,例如 Turner 综合征、性染色体异常、染色体不平衡等胎儿染色体异常基因缺陷也是 IUGR 的重要病因之一<sup>[68, 69]</sup>。

### 2.3 子痫前期

子痫前期的发病是指妊娠前血压正常的妇女在妊娠第20周后收缩压 $\geq 140$  mm Hg或者舒张压 $\geq 90$  mm Hg并且有蛋白尿症状(24小时内所取尿样内蛋白质含量 $\geq 300$  mg)。当严重的高血压(孕妇静卧在床时在间隔至少6个小时的两次血压测量中收缩压均 $\geq 160$  mm Hg或者舒张压均 $\geq 110$  mm Hg)或者严重的蛋白尿(24小时内所取尿样内蛋白质含量 $\geq 5$ g或者间隔至少4个小时的两次随机所取尿样中蛋白质含量评价均 $\geq 3+$ )症状两者之一(或者并发)存在即可被认为是严重子痫前期(severe pre-eclampsia)。此外,24小时之内尿量少于500ml、脑或视觉障碍、肺水肿或紫绀、上腹或右上象限疼痛、肝功能受损、血小板减少以及宫内发育迟缓等也被认为是严重子痫前期的症状。

正常胎盘形成过程中,绒毛外滋养层细胞沿螺旋小动脉逆行浸润,滋养层细胞经历上皮-间质转化使其具有极性的上皮细胞降低或缺失一些典型的上皮成分,如E-cadherin和整合素 $\alpha 6\beta 4$ 等,转化成具有活动能力、可在细胞基质间自由移动的间质细胞。这些浸润型的绒毛外滋养层细胞,浸润子宫蜕膜和螺旋动脉逐渐取代血管内皮,使血管腔扩大,阻力下降,血流量明显增加,从而在母体与胎儿之间建立良好的血液循环<sup>[50]</sup>。

在子痫前期病人的胎盘中,滋养层细胞功能障碍会导致绒毛外滋养层细胞浸润迁移能力的下降。患者母胎界面上滋养层细胞对子宫内膜的浸润非常浅,大量滋养层细胞集中于滋养层细胞柱,间质滋养层细胞数目明显减少,在肌层的螺旋动脉中,血管内滋养层细胞及其罕见。子宫螺旋动脉尤其是肌层螺旋动脉改建不完善甚至在母体子宫内血管中很难找到滋养层细胞。多数螺旋动脉的管腔直径仅为同期正常妊娠者的一半,而且动脉肌层仍然较厚,血管内皮仍未被滋养层细胞替代,致使胎盘缺血缺氧,诱发子痫前期的发生<sup>[50, 70]</sup>。(图1-3)



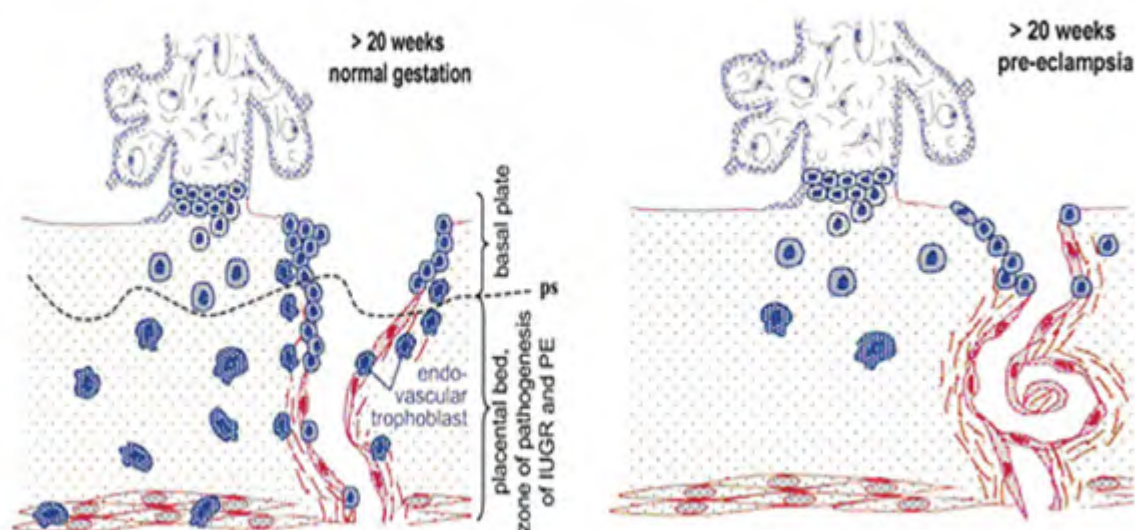


图 1-3 正常妊娠和 IUGR 病人及子痫前期病人胎盘浸润程度比较<sup>[54]</sup>

Fig. 1-3 Comparison of normal pregnancy and preeclampsia placenta in invasiveness

## 2.4 妊娠滋养层细胞疾病——葡萄胎

妊娠滋养细胞疾病 (gestational trophoblastic disease, GTD) 是一组因来源于胎盘滋养层细胞的异常增生为特征的异质性疾病, 包括完全性葡萄胎 (complete hydatidiform mole, CHM), 部分性葡萄胎 (partial hydatidiform mole, PHM), 侵蚀性葡萄胎 (invasive mole), 绒毛膜癌 (choriocarcinoma), 简称绒癌, 胎盘部位滋养细胞肿瘤 (placental site trophoblastic tumor, PSTT), 上皮样滋养细胞肿瘤 (epithelioid trophoblastic tumor, ETT)。各种滋养层细胞疾病的发生分别与胎盘或配子形成的不同阶段的发生病理改变相关, 这组疾病之间有时可以相互发生转化, 彼此之间存在一定的联系, 也常被认为是一类疾病的不同发展阶段<sup>[71, 72]</sup>。

葡萄胎 (hydatidiform mole, HM), 也称为水泡状胎块, 是指妊娠后胎盘绒毛滋养层细胞异常增生, 绒毛间质水肿形成大小不等的水泡, 水泡间相连成串而得名的。葡萄胎分为完全性葡萄胎和部分性葡萄胎两类, 大多数患者为完全性葡萄胎。完全性葡萄胎的发病率为 0.1-0.5% 之间, 在亚洲和拉丁美洲国家的发病率较高, 北美和欧洲国家发病率较低<sup>[73]</sup>。正常妊娠过程中, 内细胞团发育为胚胎, 滋养外胚层细胞形成胎盘, 而在完全性葡萄胎病人中, 胎儿完全消失, 胎体中仅有胎膜, 由于缺乏来自胎儿的血液循环系统把从母体中吸收来的营养物质和液体正常的排泄掉, 使胎盘绒毛发生膨胀和泡状化。完全性葡萄胎可发展为侵蚀性葡萄胎, 具有发生恶变和转移的潜在危险。完全性葡萄胎术后向子宫局部侵袭和向其他组

织转移的发生率约为5-15%<sup>[71]</sup>。

部分性葡萄胎的发病率远远低于完全性葡萄胎，部分性葡萄胎患者在引产或流产时会发现部分胎儿组织，胎儿多已死亡，滋养层细胞增生程度相对较轻且多见于合体滋养层，绒毛中能见到有核的胚胎性成红细胞，水肿的绒毛呈团状水肿程度较轻。部分性葡萄胎发展成为持续性滋养层细胞疾病的几率约为4%，一般不发生转移<sup>[71, 72, 74]</sup>。

侵蚀性葡萄胎又称恶性葡萄胎（malignant mole），病理特点为葡萄胎组织侵入子宫肌层和其他组织，或着伴有向远处组织转移，侵蚀性葡萄胎的性质介于葡萄胎与绒癌之间，在不同程度上兼有两者的特性。侵蚀性葡萄胎理论上讲均应继发于良性葡萄胎，多发生于良性葡萄胎排出后6个月以内，在发现有效化疗药物之前，侵蚀性葡萄胎的死亡率可达25%，自50年代后期证实大剂量甲氨蝶呤能有效治疗该肿瘤以及随后发现了一系列有效化疗药物之后，侵蚀性葡萄胎患者已基本无死亡<sup>[75, 76]</sup>。

完全性葡萄胎的染色体基因组是父系来源，即卵子在卵原核缺失或卵原核失活的情况下和精原核结合后发育形成。染色体核型为二倍体，其中90%为46,XX，由一个空卵（无基因物质卵）与一个单倍体精子（23, X）受精，经自身复制恢复为二倍体（46,XX），再生长发育而成，称为空卵受精。其少数核型为46, XY，这是两个性染色体不同的精子（23, X及23,Y）同时使空卵受精，称为双精子受精。部分性葡萄胎核型常是三倍体，80%为69, XXY，其余是69, XXX或69, XYY，来自一个正常卵子与双精子受精，由此带来一套多余的父方染色体成份；也可由于一个正常的单倍体卵子（或精子）与减数分裂失败的二倍体配子结合所致。

目前认为葡萄胎的恶变也与滋养层细胞的过度浸润相关。E-cadherin能够抑制滋养层细胞的浸润，其阳性信号主要定位于细胞滋养层细胞，而合体滋养层细胞检测不到E-cadherin的表达。在正常早孕绒毛组织中E-cadherin主要表达于胞膜，而在侵蚀性葡萄胎和绒癌，以胞浆表达为主，细胞膜表达较少。随着葡萄胎和绒癌恶化程度的增加，E-cadherin的表达量呈递减趋势<sup>[77, 78]</sup>。ELISA检测早孕绒毛，葡萄胎和绒癌组织中的MMPs和TIMPs的表达水平，结果显示，与早孕绒毛相比，pro-MMP2、pro-MMP9和TIMP-1的表达水平在葡萄胎和绒癌组织中显著升高。TIMP-2的表达水平却显著下降。体外培养早孕绒毛组织和葡萄胎组织也检测到相

同的结果。因此,推测MMP-2、MMP-9和TIMP-1、TIMP-2在病理组织中的异常表达在葡萄胎的恶变过程和绒癌的发生中可能起重要作用。

### 3 研究滋养层细胞浸润的模型

#### 3.1 体外滋养层细胞系

目前建立了很多滋养层的细胞系用来研究滋养层细胞的浸润其来源均为早期胎盘的细胞滋养层细胞。与绒癌细胞相似的 HTR-8/SVneo 细胞转录了一个大 T 抗原变成了永久细胞系。最初培养的 HTR-8 的获得是来自于早期绒毛 EVT 的细胞,此细胞特异的表达细胞角蛋白 18 (cytokeratin 18) 和 EVT 特有的整合素<sup>[79]</sup>。与此类似的 SGHPL-4 和 SGHPL-5 细胞经过早期胎盘的消化和梯度离心后获得较存的细胞滋养层细胞然后转录 SV40 大体抗原变成永久性细胞<sup>[80,81]</sup>。这两种具有 EVT 特性的细胞特异的表达细胞角蛋白 7 (cytokeratin 7) 和 HLAG 尤其在 Matrigel 的诱导下。SGHPL-4 细胞可以迁移到体外培养有纤维包被的螺旋动脉中表明它们具有 EVT 的特性<sup>[82]</sup>。HIPEC 65 细胞系来源与早期的绒毛癌细胞系转录了一个 SV40 大 T 抗原,而且也具有 EVT 细胞的特性,能够表达 EVT 特有的 maker 分子<sup>[83]</sup>。尽管如此,但是很多研究也表明在体外它们不能完全模拟 EVT 的特征和分化<sup>[84-86]</sup>。与培养原代的 EVT 不同,细胞系会渐渐失去细胞角蛋白 7 的表达而且波形蛋白的表达在增加。这表明一些培养过程人为地逆转了 EVT 的特性使其从上皮或间质样变成纤维样。事实上,EVT 与原代培养的滋养层细胞系更为接而不是滋养层细胞系。

#### 3.2 体内小鼠胎盘模型

虽然人类和小鼠胎盘总的详细结构上有些不同,但是其整体结构和胎盘发育的基本分子机制却是非常相似的<sup>[46]</sup>(图1-4)。因此,小鼠越来越多的被用为研究胎盘发育必要因素的模型。小鼠胎盘发育起始于内细胞团分化为滋养外胚层的E3.5的胚泡(图1-5)。在植入的E4.5和与内细胞团没有接触的壁滋养外胚层发育成类似于人类绒毛外滋养层细胞的滋养层巨细胞<sup>[46]</sup>。这些细胞停止分裂,但DNA却在继续复制(核内复制)形成多核。相比之下,临近内细胞团的二倍体细胞产生极滋养层:胚外外胚层和外胎盘锥。随后,胚外外胚层发育成绒毛膜滋养层细胞,然后发育成迷路层。随着发育的进行,迷路层在结构上由外胎盘锥衍生的海绵层所供养。海绵层是在迷路层和巨细胞层之间形成的致密细胞层,它相当于人类胎盘

的滋养层柱<sup>[46]</sup>。孕后期，糖胶质滋养层细胞在海绵层内分化，随后广泛的侵入到子宫壁内<sup>[87]</sup>。

胎盘的一部分血管来源于E8.0晚期形成的胚外中胚层（尿囊）。E8.5,尿囊和绒毛膜相接触，这个过程被称作绒毛膜尿囊附着。此后很快，绒毛膜开始折叠形成绒毛，为胎儿血管从尿囊膜中生长出来制造空间<sup>[88]</sup>。此时，绒毛膜滋养层细胞开始分化成两种类型的迷路层细胞：由融合的滋养层细胞形成的多核的合体滋养层细胞，围绕在胎儿内皮血管周围（见表3）；单核滋养层细胞排列在母体血窦的周围。滋养层和胎儿血管形成迷路层广泛的绒毛分支（相当于人类的绒毛膜绒毛）这种分支越来越大，越来越广泛直到出生（E18.5-19.5）<sup>[87]</sup>。在迷路层，母体与胎儿血流以相反的方式为胎盘提供最多的营养<sup>[87]</sup>。如果迷宫层血管不具有适当的模式，分枝，扩张，胎盘血流灌注将受到损害，导致胎盘缺氧和养分流失<sup>[89]</sup>。

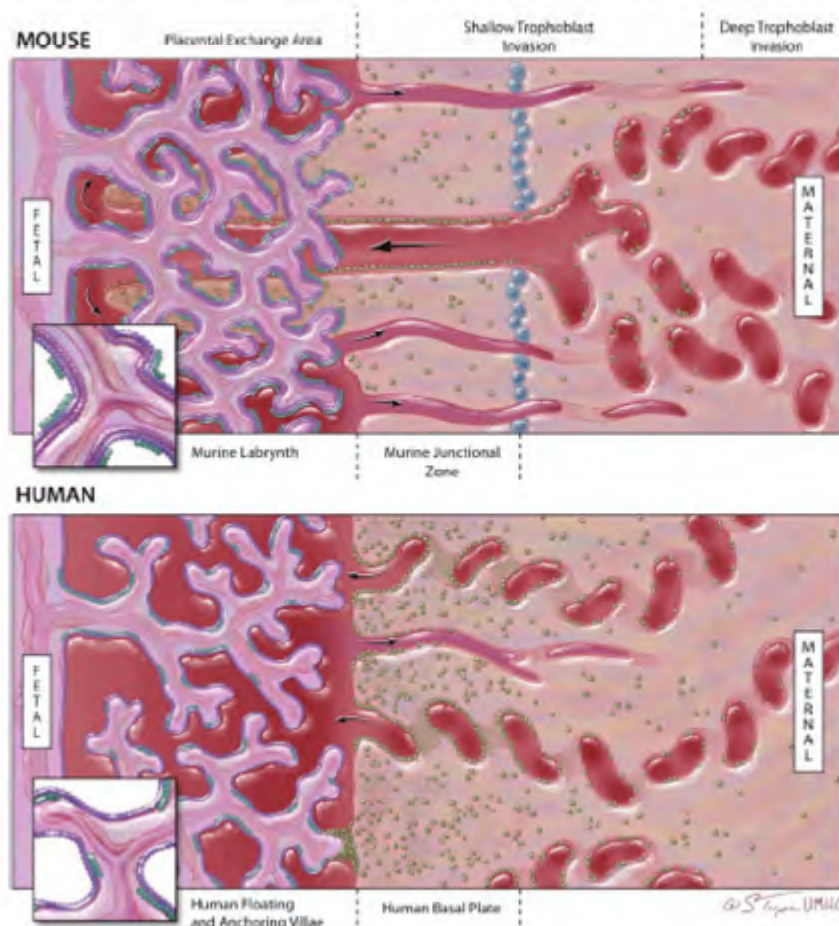


图1-4 人与小鼠胎盘的比较<sup>[90]</sup>

Fig1-3 Comparison of human and mouse placenta<sup>[90]</sup>

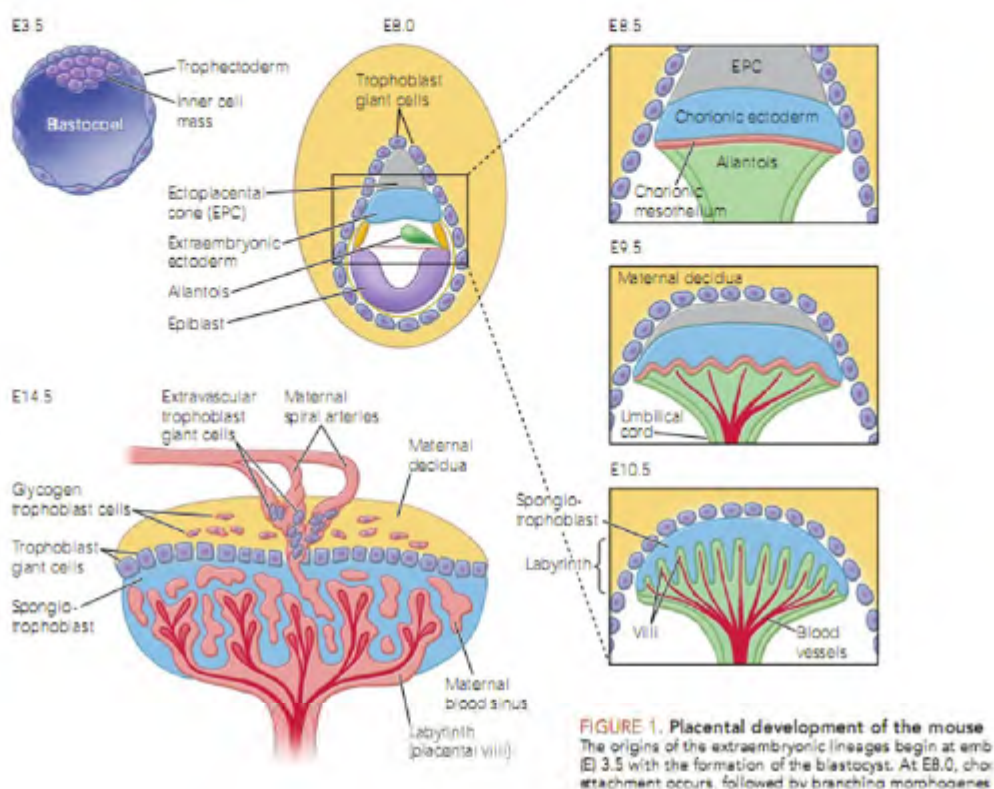


图1-5 小鼠胎盘的发育<sup>[91]</sup>

胚胎外的细胞谱系源于胚泡形成的 E3.5。E8.0，绒毛膜尿囊附着发生，接着迷路层形态学发生分支形成密集的绒毛，养分在此交换 E8.5-10.5）成熟的胎盘（E14.5）包括三层：迷路层，海绵层，母体蜕膜

Fig1-5 Placental development of the mouse<sup>[91]</sup>

The origins of the extraembryonic lineages begin at embryonic day (E) 3.5 with the formation of the blastocyst. At E8.0, chorioallantoic attachment occurs, followed by branching morphogenesis of the labyrinth to form dense villi, within which nutrients are exchanged (E8.5-10.5). The mature placenta (E14.5) consists of three layers: the labyrinth, the spongiotrophoblast, and the maternal decidua.

#### 4 滋养层细胞的浸润迁移与调控因素

滋养层细胞对子宫内膜有节制地浸润是胎盘形成的关键因素，此过程的失调将导致一系列的妊娠相关的疾病，其中滋养层细胞的过度侵入与葡萄胎和绒毛膜癌密切相关，而侵入不足则会造成自然流产、胎儿生长受限、妊娠期高血压疾病或先兆子痫等妊娠相关疾病。滋养层细胞的浸润是一个受到细胞外基质-基质金属蛋白水解酶-细胞粘附分子-生长因子等网络调控过程<sup>[50, 92-94]</sup>（图 1-6）。

#### 4.1 MMPs/TIMPs 对滋养层细胞浸润的调节

滋养层细胞的迁移浸润行为涉及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的降解与重建。在正常情况下, 细胞外基质内环境的稳定是受到多种蛋白水解酶类的调控。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 及组织抑制因子 (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMPs) 就是其中最为重要的一类, 它严格调控 ECM 成分的动态变化来确保细胞的迁移和浸润受到严格的调控。它的表达在空间上仅局限于子宫内膜和肌层的交界处, 而在时间上只限于妊娠早期<sup>[11, 95, 96]</sup>。

MMPs 是一类结构相似、依赖  $Zn^{2+}$  的蛋白水解酶类, 滋养层细胞可通过分泌 MMPs 消化细胞外基质使细胞具有侵入组织的能力。根据结构及识别底物的特异性可以将其分为 5 大类, 分别为基质水解酶、胶原酶、明胶酶、膜型-MMPs (MT-MMPs) 及其它类型 MMPs。基质水解酶包括 MMP-3、MMP-7、MMP-10、MMP-11、MMP-12, 主要作用于 IV、V、VII 型胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、蛋白聚糖与明胶。胶原酶包括 MMP-1、MMP-8、MMP-13, 底物是 I、II、III、VII、X 型胶原, 主要用于消化细胞外基质的胶原成分; 明胶酶包括 MMP-2 和 MMP-9, 底物为基膜的 IV 型胶原和明胶; MT-MMPs 包括 MMP-14、MMP-15、MMP-16, 其底物为 MMP-2 前体, 能在细胞表面激活 MMP-2 的表达<sup>[40, 96, 97]</sup>。

明胶酶性质的 MMP-2 和 MMP-9 被广泛认为是调节细胞迁移浸润能力的两个最关键酶, 能使滋养层细胞浸润母体穿过蜕膜并进入母体的血管系统。研究结果表明, 在恒河猴妊娠早期 MMP-2 和 MMP-9 在具有不同的表达模式。MMP-2 在妊娠第 12 天的子宫内膜蜕膜细胞和邻近的腔上皮细胞表达, 但是妊娠第 18 天主要表达于植入位点附近的胎盘绒毛中, 到第 26 天在胎盘中在滋养层鞘中大量表达。MMP-9 在妊娠第 26 天胎盘绒毛中高表达<sup>[98]</sup>。MMP-2 和 MMP-9 在人妊娠早期滋养层细胞中均有表达, 但是在足月胎盘滋养层细胞中却仅发现 MMP-9 表达, 而 MMP-2 主要在具有很强的浸润能力的 EVT 中表达。在胃癌及乳腺癌等多种浸润性很强的肿瘤中 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 和蛋白是高表达的<sup>[99]</sup>。体外实验也证明 MMP-2 和 MMP-9 在恶性肿瘤的侵袭与转移中发挥极其重要的作用<sup>[100]</sup>。

基质金属蛋白酶组织抑制因子 TIMPs 是组织内 MMPs 的天然抑制剂。目前已克隆出 4 种该家族成员, 分别是 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4。它们的主要作用是抑制 MMPs 的酶原活性, 以及其对 ECM 的降解, 从而调节细胞外基质的重

建以维持细胞正常的生理功能<sup>[101, 102]</sup>。TIMP-1和2能抑制所有活性形式的MMPs, TIMP-1主要结合活性形式和酶原形式的MMP-9, 而TIMP-2主要作用于活性形式和酶原形式的MMP-2。研究表明, TIMP-2还能与MT1-MMP共同激活MMP-2。TIMPs的基因序列较为保守, 其中TIMP-2的序列具备持家基因的性质, TIMP-1和TIMP-3之间的同源性比较高。TIMP-1、TIMP-2和TIMP-4以可溶性形式存在, 而TIMP-3是不可溶的<sup>[103]</sup>。在人妊娠过程中, 滋养层中细胞和子宫内膜中都有TIMPs的表达, TIMPs能够阻止滋养层细胞的过度浸润使胚胎植入受到精确的时空调节<sup>[104]</sup>。

## 4.2 生长因子对滋养层细胞浸润的调节

滋养层细胞浸润过程需要多种生长因子参与, 主要包括胰岛素样生长因子 I / II (Insulin-like Growth Factor- I / II, IGF- I / II)、转化生长因子 (Transforming Growth Factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor, EGF) 和胎盘生长因子 (Placental Growth Factor, PIGF) 等<sup>[105, 106]</sup>。

### 4.2.1 转化生长因子- $\beta$

转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 是属于一组调节细胞生长和分化的TGF- $\beta$ 超家族。TGF- $\beta$ 的这种细胞因子能使正常的成纤维细胞的表型发生转化, 即在表皮生长因子 (EGF) 同时存在的条件下, 改变成纤维细胞中增殖生长特性而获得在琼脂中生长的能力, 并失去生长中密度依赖的抑制作用。

转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor - $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 可以通过自分泌或旁分泌的方式影响滋养层细胞的迁移浸润, 增殖与分化和ECM的形成等重要生理事件。在妊娠过程中, 母体子宫蜕膜会产生大量的TGF- $\beta$ , 而合体滋养层则产生少量的TGF- $\beta$ , 而且子宫内膜间质细胞和绒毛外细胞滋养层细胞内也有TGF- $\beta$ 的表达<sup>[107]</sup>。体外实验发现蜕膜细胞的培养液上清液具有抑制滋养层细胞浸润的功能, 而TGF- $\beta$ 抗体可以中和蜕膜细胞培养液, 从而对滋养层细胞浸润的抑制作用。TGF- $\beta$ 对滋养层细胞浸润的抑制作用是通过促进滋养层细胞分泌TIMP-1和PAI-1来实现的。在体外培养的人足月胎盘绒毛滋养层细胞中, TGF- $\beta$ 抑制滋养层细胞增殖并导致多核细胞的形成。在先兆子痫病人胎盘中, TGF- $\beta$ 表达增加, 使滋养层细胞对子宫内膜浸润能力下降, 可能也是其发病机制之一。TGF- $\beta$ 的抑制滋养层细胞迁移, 主要是通过上调细胞膜表面一些抑制迁移表型的粘附素分子, 导致细胞更牢固的

粘附于ECM上来实现的。TGF- $\beta$ 能够通过下调一氧化氮合酶NOS的表达来拮抗HGF对滋养层细胞的促浸润作用<sup>[105, 108-110]</sup>。体外研究表明, TGF- $\beta$ 能够抑制MMP-9的表达和活性, 但却对MMP-2无影响。此外, TGF- $\beta$ 能促进细胞滋养层细胞中TIMP-1、-2及纤溶酶原激活因子(Plasminogen Activator Inhibitor-1, PAI-1)表达, 从而抑制滋养层细胞的浸润和迁移<sup>[105]</sup>。

TGF- $\beta$ 对正常EVT细胞的增殖, 迁移和浸润具有抑制作用, 而在绒癌细胞中这种抑制效应缺失, 使绒癌细胞对TGF- $\beta$ 产生拮抗能力。正常的EVT细胞表达TGF- $\beta$  I、II、III型受体型受体和所有的Smad信号通路家族成员, 其对TGF- $\beta$ 的效应是通过磷酸化Smad2和Smad3并激活其入核来实现的, 而在绒癌细胞JAR和JEG-3细胞中Smad3表达是缺失的, 这引起TGF- $\beta$ /Smad3信号通路的阻断, 使绒癌细胞对TGF- $\beta$ 产生拮抗能力。在JAR细胞中转入Smad3基因TGF- $\beta$ 对TIMP-1和PAI的上调作用将恢复<sup>[111]</sup>。

#### 4.2.2 表皮生长因子

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)超家族成员包括EGF、转化生长因子 $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )、肝素结合EGF(HB-EGF)等。它的主要功能是促进皮肤细胞的分裂。实验结果表明, EGF能促进上皮细胞、成纤维细胞的增值; 增强表皮细胞的活力; 延缓表皮细胞的老化。高活性的EGF才能促进皮肤细胞的分裂和生长, 另一方面, 它还能刺激细胞外一些大分子(如透明质酸和胶原白等)的合成与分泌、滋润皮肤, 是决定肌肤活力和健康的源泉。

表皮生长因子在人整个妊娠周期中都有表达。在子宫内膜上皮、腺上皮以及妊娠早期蜕膜都有EGF及其受体的大量表达<sup>[112]</sup>。在人绒毛外滋养层细胞系HTR8/SVneo中外部加入EGF的功能性抗体或是其受体的抗体均能降低滋养层细胞的浸润能力。如果再加入EGF进行刺激, 细胞的浸润能力将被恢复<sup>[113]</sup>。在人绒毛膜癌细胞系—Bewo细胞中, EGF以剂量依赖的方式促进细胞的浸润。这种促进作用机制是通过上调整合素 $\alpha 2$ 的表达来实现的, 加入 $\alpha 2$ 的功能性抗体后EGF的促浸润作用将受到明显的抑制。在EVT细胞分化过程中, 整合素从 $\alpha 6$ 向 $\alpha 2$ 型转化, 这一过程是通过EGF家族生长因子激活其受体EGFR或ErbB4/HER4实现的<sup>[114]</sup>。EGF对已失去浸润能力的妊娠后期细胞滋养层细胞的浸润影响较小, 晚孕期滋养层细胞自身的EGF表达和分泌也无明显改变<sup>[115]</sup>。在IUGR病人中, 母体尿液中EGF的浓



度较正常组显著降低，成为在妊娠早期预测IUGR的一个重要指标<sup>[115]</sup>。

#### 4.2.3 胰岛素样生长因子

胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor, IGF) 系统由 IGFs、IGF 受体 (IGFRs)、胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor binding protein, IGFBPs) 组成。是一类多功能细胞增殖调控因子。在细胞的分化、增殖、个体的生长发育中具有重要的促进作用。IGFs 家族由两种低分子多肽 (IGF-I、IGF-II)、两类特异性受体及六种结合蛋白组成。两者 70%以上同源，与人类胰岛素原的结构和功能约 50%相似。IGFs 的生物学功能是通过与特异性的靶细胞表面的受体结合而实现的。目前已发现结构完全不同的两种 IGF 受体：IGF-I 受体和 IGF-II 受体(即甘露糖-6 磷酸受体)分别又称 I 型受体, II 型受体。IGF-I 和 IGF-II 均能促进滋养层细胞的迁移和浸润<sup>[116]</sup>，其功能主要通过 IGF 受体 (IGF-R) 介导，人胎盘中 IGF-1R 在滋养层细胞中也有表达<sup>[117]</sup>。基因敲除 IGF-1 受体发现，小鼠胎儿和胎盘生长均受到限制<sup>[118]</sup>。而胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGF Binding Proteins, IGFBPs) 可通过结合 IGF 调节其功能<sup>[106]</sup>。据 Hamilton 等人的报道，IGFBP1 可与 IGF 结合阻碍其与受体相结合，从而抑制滋养层细胞的浸润和迁移<sup>[106]</sup>。

IGFs 与其它的生长因子不同，不论在血清，细胞外液及细胞培养液中都与特异性的结合蛋白(Binding Proteins, BPs)结合以无活性的复合物形式存在。到目前为止，已发现 6 种 IGFBP1, 2, 3, 4, 5, 6，其特征性的结构构成了一个相关性分泌蛋白家族，均为低分子肽类，50%结构相似 IGFBPs 则与受体竞争性结合 IGF，延长 IGF 的半衰期以及调节其作用，IGFBPs 分为 IGFBP1、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP4、IGFBP5、IGFBP6 种，血液中 IGFs 只有 1%左右是游离的，其余都和 IGFBPs 结合，IGFBPs 蛋白调节 IGFs 作用的发挥<sup>[119, 120]</sup>。

1996 年，Woods 等报道了一例 IGF-I 基因缺失的纯合子男孩，胚胎发育严重滞后，出生体重比正常均值低 5.4 倍，身高比正常均值低 3.9 倍<sup>[121]</sup>。IGF-1 通过上调整合素  $\alpha\beta3$  和  $\alpha5\beta1$  的表达促进原代培养的人胎盘绒毛滋养层细胞的迁移能力<sup>[122, 123]</sup>。IGF-II 主要表达于胎盘绒毛和 EVT 细胞的细胞滋养层细胞中，合体滋养层细胞不表达 IGF-II，侵袭性的绒毛外滋养层细胞分泌 IGF-II，而蜕膜细胞可产生 IGF 结合蛋白 (IGFBP1)，这两种因子在胚胎植入部位距离很接近表明在母胎界面滋养

层细胞浸润及蜕膜形成过程中,可能存在 IGF-II 与 IGFBP1 的相互作用<sup>[124]</sup>。小鼠体外实验发现 IGF-I 促进滋养层细胞的迁移,IGF-II 诱导滋养细胞向合体细胞转化<sup>[125]</sup>。IGFBP1 能与 IGF 结合抑制其活性,对滋养层细胞迁移起降调节作用。滋养层细胞能够大量分泌 IGF-II,母体蜕膜细胞高表达 TIMPs 与 IGFBP1,通过体外实验研究表明,IGF-II 可能通过抑制母体蜕膜细胞中 TIMP-3 和 IGFBP1 的表达,促进滋养层细胞的迁移<sup>[126]</sup>。IGF-I 受体对 IGF-I 的亲和力较高,对 IGF-II 的亲和力要低 2~15 倍;而 IGF-II 受体对 IGF-II 的亲和力较高,对 IGF-I 的亲和力要低 500 倍。EVT 细胞分泌 IGF-II 并且表达 IGF-I 受体,由于 IGF-I 和 IGF-II 的生理功能主要是由 IGF-1R 介导,因此 IGF-II 可能是通过自分泌的方式促进滋养层细胞的迁移,而 IGF-I 可能是通过旁分泌的方式促进滋养层细胞的迁移<sup>[122]</sup>。

#### 4.2.4 肝细胞生长因子

肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 主要在胎盘绒毛间质细胞中表达,其受体c-Met主要表达于细胞滋养层细胞中。HGF则以旁分泌的方式作用于表达c-Met的细胞滋养层细胞发挥生理效应。HGF能够以剂量依赖的方式促进EVT细胞的浸润和迁移<sup>[127]</sup>。在子痫前期病人的胎盘中HGF mRNA和蛋白表达水平显著降低。在进行胎盘绒毛外植体培养时,培养液中分泌的HGF的水平也显著降低。这提示我们低水平的HGF可能与子痫前期病人EVT细胞的低浸润能力相关。HGF来源于组织中的各种间质型细胞其中包括成纤维细胞,因此胎盘来源的HGF对血液中HGF水平有多大贡献目前尚不明确。HGF在妊娠前后血液中表达水平的变化以及在子痫前期病人发病前后血清中的变化也仍需探索<sup>[128, 129]</sup>。

HGF基因敲除小鼠由于完全缺失海绵滋养层细胞造成胎盘发育缺陷而胎儿致死。在基因敲除小鼠胚胎发育至9.5天时,如果单剂量注射HGF,可以明显缓解HGF引起的胎盘缺陷,使小鼠存活直到足月出生<sup>[130]</sup>。在人妊娠早期绒毛外滋养层细胞系SGHPL-4中,HGF通过调控一氧化氮的表达量促进细胞的迁移和浸润。研究表明,TGF- $\beta$ 能够缓解HGF的促浸润作用。TGF- $\beta$ 通过降调HGF引起的一氧化氮合酶iNOS的升高调控HGF对滋养层细胞迁移浸润的作用<sup>[131]</sup>。

### 4.3 促进滋养层浸润的信号转导通路

一系列的磷酸化信号转导通路是调控细胞因子蛋白功能的最普遍机制。多种细胞外因子的刺激像生长因子,激素,细胞因子,趋化因子,与酪氨酸激酶 (RTKs)

受体, G蛋白偶联受体, 整合素和其他一些因子相互作用转导信号。最终导致重要作用的信号通路级联反应如MAPKs, FAK, PI3K-Akt信号通路, 还有JAK信号转导因子, SAKT, 它们控制着大部分的生物过程, 如增殖, 分化, 迁移和凋亡。因此, 不同的信号通路在胎盘发生和分化上起重要的作用并不奇怪。

#### 4.3.1 促有丝分裂蛋白激酶(MAPKs)在滋养层细胞浸润中的作用

MAPKs家族具有庞大的家族成员, 它包括: MAP激酶(MAPK)、MAPK激酶(MEK、MKK或MAPK 激酶)和MEK激酶(MEKK、MKKK或MAPK激酶激酶)。在哺乳动物机体中, 已经发现五种不同的MAPK信号转导通路。家族成员分子具有一系列的磷酸化激活酶系统位点如丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸残基。这些配体与MAPKKK家族的成员RTKs和 GPCRs酶结合, 透过Ras激活, 引发MAPK激酶的活性。其中ERK1/2信号转导通路调控细胞生长和分化, JNK和p38 MAPK信号转导通路在炎症与细胞凋亡等应激反应中发挥重要作用。使用这一芯片试剂盒检测RNA实验标本, 操作者通过杂交反应技术, 即可研究实验系统中与MAPK信号通路相关基因表达水平改变MAPK属于一种Ser/Thr蛋白激酶, 可在多种不同的信号转导途径中充当一种共同的信号转导成份, 且在细胞周期调控中发挥重要的作用。目前MAPK家族中至少有4个成员已被纯化和深入研究。如p42mapk, p44erk1, p54MAPK及p44mpk。MAPK可促进血管内皮细胞增殖和新血管生成。新血管生成后可为肿瘤提供更多的营养, 加速肿瘤的生长, 促进癌细胞的扩散。

一个特殊的Raf蛋白, Raf-B在小鼠胎盘血管发育上起重要的作用<sup>[132]</sup>。Raf的在胎盘发育中的作用目前没有完全的阐释; 但是, 在不同的EVT细胞模型中很多生长因子促发ERKs活性, 这表明Ras-Raf-MEK-ERK可能调控滋养层细胞的运动。事实上IGF-II and IGFBP-1可以激活ERK-1 和-2并且促进HTR-8/SVneo细胞的迁移, 这一过程可以被MEK抑制因子阻断<sup>[133, 134]</sup>。抑制MEK同样可以抑制HGF诱导的SGHPL-4 细胞的运动<sup>[135]</sup>。相似的, uPA的N末端片段如果缺失催化活性, 将会降低MEK的抑制, 刺激HTR-8/SVneo细胞的迁移<sup>[136]</sup>。其他因子促进HTR-8/SVneo细胞的迁移和ERKs的磷酸化<sup>[137-139]</sup>。雌激素hCG通过ERKs的磷酸化可以促进滋养层细胞的运动, 这在SGHPL-5细胞和早期的绒毛外植体培养上都得到了证明<sup>[140]</sup>。MAPK激酶信号通路在滋养层细胞浸润中的作用可以归纳为ERKs的激活<sup>[141]</sup>。

ERK5和JNK在滋养层细胞运动中的调控作用还没有完全阐释,然而MAPK p38 并没有参与其中。p38的激活和未激活形式在SGHPL-4 细胞中没有检测到<sup>[135, 141]</sup>。总的来说, ERKs的激活通过生长因子可以影响一系列的细胞运动,并参与整合素信号,细胞因子骨架的动态变化(Pullikuth and Catling, 2007)。在滋养层细胞中ERKs同样可以调控hCG和EGF-依赖的MMP-2 and MMP-9的诱导。由此证明,蛋白激酶在滋养层细胞浸润过程中靶定不同信号通路上起重要的作用。

#### 4.3.2 磷脂酰肌醇3-激酶 (PI3K- AKT) 细胞通路在滋养层细胞运动中的作用

磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)家族参与多种信号通路,调节细胞的主要功能。在正常情况下,其活化产生的类脂产物 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇[PI(3,4)P<sub>2</sub>]和3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇[PI(3,4,5)P<sub>3</sub>]作为第二信使结合并激活多种细胞内的靶蛋白,形成一个信号级联复合物,最终调节细胞的增殖、分化、存活和迁移等。在PI3K家族中,IA型PI3K和其下游分子丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Akt(或PKB)所组成的信号通路因其与肿瘤发生发展的相关性,备受瞩目。

AKT在胎盘滋养层的发育和分化上起着重要的作用。在小鼠中,如果敲掉AKT1,滋养层细胞的增殖将会严重受损,从而影响胎盘的发育<sup>[142]</sup>。PI3K-AKT也参与啮齿动物胎盘巨细胞的分化<sup>[143]</sup>。AKT在细胞迁移中的作用目前没有完全清楚。在不同的细胞中,AKT的三种形式分别起着不同的作用<sup>[144]</sup>。最近很多实验室的研究证明PI3K-AKT促进滋养层细胞的迁移。母胎界面大量的生长因子如EGF和IGF-II将会大力的促进PI3K-AKT的激活以及依赖AKT信号通路的滋养层细胞系HTR-8/SVneo细胞的迁移<sup>[139, 145]</sup>。另一方面,在SGHPL-5细胞中激活PI3K将引起滋养层细胞运动能力的增强然而,抑制PI3K将降低HGF诱导的迁移运动<sup>[146]</sup>。

#### 4.3.3 粘着斑激酶 (FAK) 在滋养层迁移中的调控作用

粘着斑激酶(Focal Adhesion Kinase; FAK),是一种酪氨酸激酶,它在肿瘤向恶性侵袭表型演进的过程中起着重要的作用。在理论上阻断FAK的表达就有可能达到抑制肿瘤细胞侵袭转移发生的目的。整合蛋白(integrin)是广泛存在于各种哺乳类动物细胞的主要粘附分子之一,它引起细胞与基质成分粘附而介导的信号转导,特别是胞内第一个信号分子——粘着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)。

整合素诱导的FAK信号通路在滋养层细胞的浸润和迁移上起着重要的作

用。滋养层细胞分化浸润的过程中,母胎界面整合素表达的变换以及 FAK 的激活至关重要。在绒毛外植体培养过程中降调 FAK 的表达会抑制滋养层细胞的浸润和迁移<sup>[147, 148]</sup>。氨基酸转运蛋白 CD98 在 EVT 上与整合素  $\alpha_v\beta_3$  共定位并且通过 FAK 促进滋养层细胞的迁移<sup>[149]</sup>。在滋养层细胞中,不用的生长因子可以激活 FAK。IGFBP-1 作用 HTR-8/SVneo 细胞可以刺激促进 FAK 的磷酸化及细胞的迁移<sup>[133]</sup>。IGF-I 处理 EVT 可以诱导 FAK 的活化以及应激纤维的形成<sup>[149]</sup>。

#### 4.3.4 Wnt 信号通路在滋养层细胞分化和浸润中的作用

Wnt 信号通路包括许多可调控 Wnt 信号分子合成的蛋白质,它们与靶细胞上的受体相互作用,而靶细胞的生理反应则来源于细胞和胞外 Wnt 配体的相互作用。尽管反应的发生及强度因 Wnt 配体,细胞种类及机体自身而异,信号通路中某些成分,从线虫到人类都具有很高的同源性。蛋白质的同源性提示多种各异的 Wnt 配体来源于各种生物的共同祖先。经典 Wnt 通路描述当 Wnt 蛋白于细胞表面 Frizzled 受体家族结合后的一系列反应,包括 Dishevelled 受体家族蛋白质的激活及最终细胞核内  $\beta$ -catenin 水平的变化。Dishevelled (DSH) 是细胞膜相关 Wnt 受体复合物的关键成分,它与 Wnt 结合后被激活,并抑制下游蛋白质复合物,包括 axin、GSK-3、与 APC 蛋白。axin/GSK-3/APC 复合体可促进细胞内信号分子  $\beta$ -catenin 的降解。当“ $\beta$ -catenin 降解复合物”被抑制后,胞浆内的  $\beta$ -catenin 得以稳定存在,部分  $\beta$ -catenin 进入细胞核与 TCF/LEF 转录因子家族作用并促进特定基因的表达。

最近几年的研究证据表明,Wnt 信号通路参与了胎盘的发育和滋养层细胞的分化。在小鼠中突变 Wnt2, Wnt7b 和 LEF-1/TCF 会导致不同的病理学发生<sup>[150-152]</sup>。小鼠植入过程也显示 Wnt4 的表达增加有关<sup>[153, 154]</sup>。在人类的胎盘中,Wnt 19 个配体中的 14 个,以及它的 10 个受体当中的 8 个在胎盘中都有检测到,且参与了滋养层的功能调节与分化<sup>[155]</sup>。有趣的是 Wnt 信号通路配体和受体在不同孕期表达有变化直接说明了 Wnt 调控不同滋养层细胞亚型的功能。事实上,体内体外实验均证实核募集因子 TCF 与 EVT 的浸润有关<sup>[156]</sup>。Wnt 配体的募集激活信号通路促进 SGHPL-5 细胞的迁移和浸润是和它特异的抑制了可溶性 DKK1 相关的<sup>[156]</sup>。DKK1 降低滋养层的浸润和迁移表明自分泌

的 Wnt 配体 与 EVT 的浸润和粘附有关。除此之外，经典的信号通路最新结果也表明 Wnt 通过活化 PI3K-AKT 信号通路也可以促进滋养层细胞的迁移。

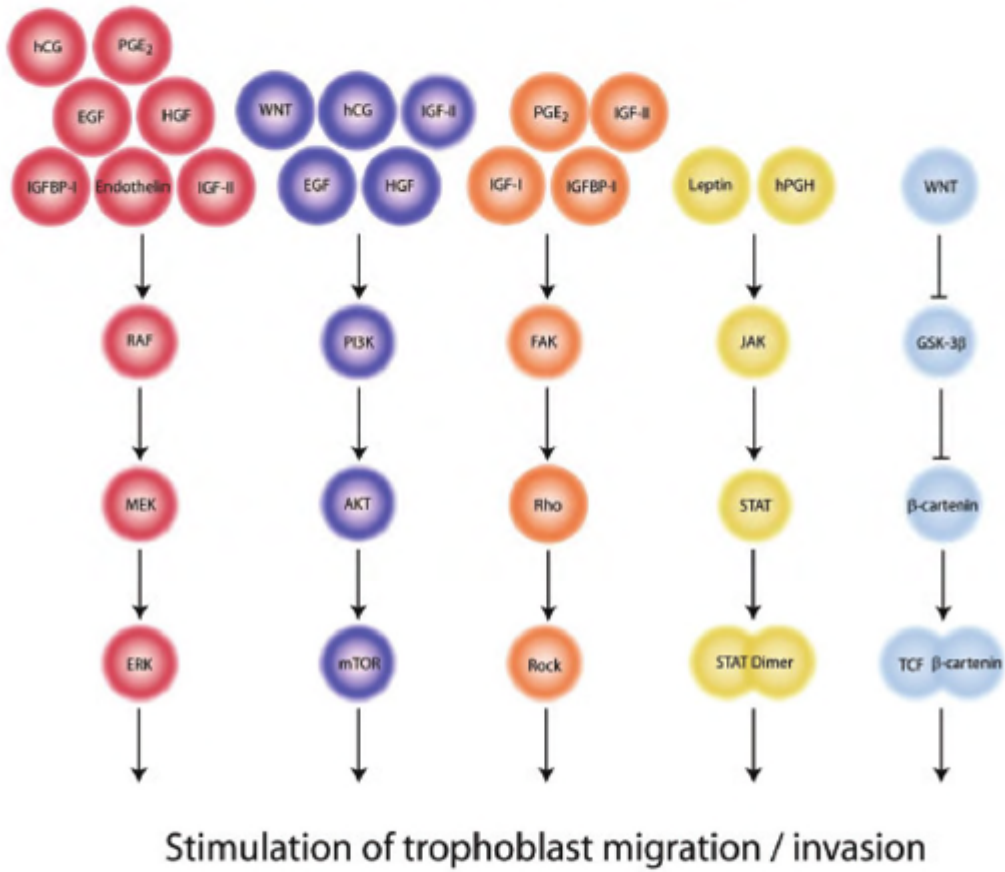


图 1-6 影响滋养层细胞浸润迁移的信号通路<sup>[54]</sup>

Fig 1-6 Schematic presentation of signalling pathways stimulating trophoblast migration and/or invasion. <sup>[54]</sup>

## 第二章 肿瘤转移抑制因子 CD82 的功能及研究进展

### 1 CD82 的发现与生物体中的表达

最早研究发现 CD82 的免疫交联可以触发淋巴细胞和 T 细胞粘连的钙动员,另一方面,细胞的激活及细胞因子刺激可以上调细胞表面 CD82 的表达, CD82 在 T 细胞激活中发挥一定作用。Dong 等<sup>[5]</sup>将具有高转移性的鼠 AT6.1 前列腺癌细胞与无转移性的前列腺癌细胞融合,发现融合后的细胞不具转移性,然后采用微细胞介导染色体转移法,分离出肿瘤转移抑制基因,将其命名为 KAI1 基因。DNA 序列分析证明 KAI1 与 CD82 基因序列是相同的。

CD82 的首次克隆是基于它对一些可识别淋巴细胞表面抗原的单克隆抗体 (R2, IA4, C33,4F9) 的亲合力<sup>[12-16]</sup>,随后,它被归类为分化抗原簇的一员<sup>[157]</sup>。CD82 是 III 型膜蛋白中的 4 次跨膜蛋白超家族 (Tetraspanin) 的一员。人类基因组中共有 33 种 Tetraspanin (表 2-1), Tetraspanin 不仅存在于酵母和细菌中,而且广泛存在于真菌和所有的多细胞有机体中。由于同源 DNA 序列的低保守性,直接对不同物种进行功能比较相对较难。

CD82 和其它一些 Tetraspanin 蛋白的表达无处不在,对人类组织的 Northern 分析显示了 CD82 在脾、胸腺、前列腺、卵巢、小肠、结肠、胎盘、肺、肝、肾和胰脏的高表达。值得注意的是,其在心脏、脑、肌肉和睾丸中呈现低表达。小鼠中 CD82 mRNA 在脾、肾、肺和肝中的表达最为丰富,大鼠中也有相似的表达分布。小鼠组织的免疫印迹显示了亚组织分布的差异。小鼠 CD82 蛋白主要定位于脾脏的淋巴组织、肾脏的髓集合管和远曲小管、肺的动脉平滑肌、肝细胞和窦状隙内侧、胰岛细胞,而且在包括附睾、前列腺、结肠、膀胱、输尿管、尿道、卵巢、输卵管、睾丸和精囊的许多上皮细胞中都有发现<sup>[158, 159]</sup>。CD82 也在除外小动脉和脑的大多数血管内皮中有表达<sup>[160]</sup>。

### 2 CD82/KAI1 的结构

CD82/KAI1 基因位于人染色体 11p11.2 上,该基因全长约 80kb,含 8kb 的 5' 区、10 个外显子、9 个内含子 (图 2-1)。编码区开始于外显子 3 的第 25 个碱基,

Tspan	Alt. names	Tissues	Function
1	NET-1	Liver cancer	Tumorigenesis
2	?	CNS	Oligodendrocyte differentiation
3	OAP-1, TM4SF8	Oligodendrocytes	Migration, proliferation
4	NAG-2, TM4SF7	Fibroblasts	Unkn
5	NET-4, TM4SF9	CNS Osteoclasts	Unkn Osteoclastogenesis
6	TM4SF6	?	X-linked gene
7	TM4SF2, A15	Neurons	Mental retardation
8	CO-029, D6.1A	Colon cancer	Metastasis, angiogenesis
9	NET-5	Ovarian cancer	Amplified 12p gene
10	OOSP, oculospanin	Pigment epithelium	?
11	?	?	?
12	NET-2	?	?
13	NET-6	Breast cancer Osteoclasts	Tumor suppressor Osteoclastogenesis
14	?, TM4SF14	?	?
15	NET-7	?	?
16	TM-8, TM4-B	?	?
17	?, TM4SF17	?	?
18	Neurospanin	Brain, CNS	?
19	?	?	?
20	Uroplakin1b	Bladder	Urine permeability barrier
21	Uroplakin1a	Bladder	Urine permeability barrier
22	RDS/peripherin	Rods/cones	Retinal structure
23	ROM1	Rods	Survival of photoreceptors
24	CD151	Endothelial cells Platelets Kidney Epithelial	Angiogenesis Thrombi stabilization Organ structure Wound healing
25	CD53/OX44	Immune cells Neutrophils	B-cell signaling Immune surveillance
26	CD37	Immune cells	T/B-cell signaling
27	CD82	Epithelial cells Immune cells	Tumor metastasis suppressor T-cell signaling
28	CD81	Oocytes Immune cells Brain Pigment pithelia	Egg/sperm fusion B-cell signaling Astrocyte/glia proliferation Proliferation
29	CD9	Oocytes Immune cells PNS	Egg/sperm fusion T/B-cell function Myelination
30	CD63	Ubiquitous	Protein trafficking
31	SAS	Sarcoma cells	Sarcoma amplified sequence
32	TSSC6	Immune cells Platelets	T-cell proliferation Thrombi stabilization
33	Penumbra	Erythroblasts	Erythropoiesis

表 2-1 tetraspanin 蛋白的 33 种家族成员

Table 2-1 tetraspanin family genes



并一直延伸到外显子 10 的第 75 个碱基。编码 267 个氨基酸属于跨膜糖蛋白家族成员 (TM4SF, tetraspanin)。TM4SF 家族成员具有 4 个疏水的跨膜结构域和一个细胞外亲水性结构域, 在胞外结构域上有 3 个潜在的糖基化位点。TM4SF 有胞内的 N 端和 C 端, 跨膜四次形成一大一小的胞外环。由于糖基化, CD82 一般在 46-60kDa 的位置检测到, 而不是其编码的大小 28KDa。N 端和 C 端, 跨膜四次形成一大一小的胞外环。由于糖基化, CD82 一般在 46-60kDa 的位置检测到, 而不是其编码的大小 28KDa。

### 3 CD82 的分子生物学特性

#### 3.1 转录调控

有很少的证据能够认为基因突变、杂合性消失、启动子突变或者超甲基化可以解释转移性癌的临床隔离群中 CD82 表达缺失<sup>[161-163]</sup>。转录子或者剪切异构体的改变仍然有可能是 CD82 表达缺失的机制。在具有转移和侵袭性的胃和膀胱癌组织及一些细胞系中, 检测到了剪切体 KAI1 的 MRA 的表达<sup>[24, 164]</sup>。然而, 剪切异构体的转录水平只有 mRNA 全长的几分之一, 而且其与侵袭性或者转移性并没有多大的相关性。因此它在转移癌的病因学中的重要性仍然不得而知。

人类 CD82 启动子是富含 G-C 和缺少 Tata 的启动子, 而且包含潜在的启动子元素序列, 包括 Sp1, AP-2, GATA-1, PEA3, NF-IL6, MEP1, Myb, TCF-1, HNF3, NF-1, zeste 和 Ets 结合位点<sup>[165, 166]</sup>。小鼠的启动子包含许多相同的顺式调控元件<sup>[158]</sup>。一些促进 CD82 表达的细胞外刺激物已有报道, 包括细胞因子、生长因子、药物 (染料木黄酮、依托泊甙) 和 8-溴-环磷酸腺苷。事实上, 除了确知 NF- $\kappa$ B 对一些细胞因子的调节作用外, 这些刺激物调控 CD82 转录的机制仍未可知。

对启动子的删除分析最初确定了 CD82 启动子的三个转录区: 增强子、负调节区和最小启动子<sup>[166, 167]</sup>。一种 p-53 样的调控区, 主要作用于依托泊甙对 CD82 的诱导, 定位于促进区的-860 位点, 而且如果假定 p53 在前列腺癌的缺失是与转移进程相关的晚期事件, 这一区域将会很吸引人。尽管过表达的 p53 可以与启动子结合并且促进 CD82 在转染细胞中的表达, p53 与 CD82 在临床样本中的缺失的相关性仍不能成立, 这就颠覆了严格的一对一的关系。其它报道认为不同的 p53、AP2 或者 JunB 结合体在延伸的 AP2-p53-Ap1 序列中的结合与调节 CD82 的完全表

达有关而且这些因子的结合可能在转移进程中有差别地改变<sup>[167, 168]</sup>。

细胞因子在免疫细胞中诱导 CD82 的表达最初通过 NF- $\kappa$ B 介导。在两种 p53 突变上皮细胞系中, TNF  $\alpha$  诱导的 CD82 的表达同样依赖于 NF- $\kappa$ B<sup>[168]</sup>。随后, ChIP 分析揭示了 NF- $\kappa$ B p50, 而不是 p65, 出现于 CD82 启动子中。CD82 启动子招募 NF- $\kappa$ B p50, Bcl3 和 N-CoR/TAB2/HDAC3 共阻遏物复合体, 导致转录的失活。IL-1  $\beta$  的刺激短暂募集 Tip60 到 p50, 并结合于 CD82 启动子上, 这与 N-CoR 复合体的缺失、组织蛋白乙酰化和磷酸化的增加以及 Pol II 的集聚相一致。Tip60/Fe65/APP 复合体的过表达足以置换 N-CoR 复合体。Fe65 转录激活域结合于核小体集合因子 SET, 这一过程需要 Fe65 介导的转活。ChIP 实验揭示了包括 Fe65/APP/Tip60 和 SET 在内的与 CD82 启动子有关的复合体。SET 为 CD82 的完全转录所必需。

然而, Tip60 共激活物复合体并没有在前列腺癌细胞中的 CD82 启动子中聚集, 因为 Tip60 在这些细胞中低表达。IL-1 $\beta$  诱导的 Tip60 的表达和聚集可以通过抑制  $\beta$ -连环蛋白的表达而恢复。Reptin/ $\beta$ -连环蛋白复合体可在 CD82 启动子中检测到而且仅存在于转移细胞中。Reptin/ $\beta$ -连环蛋白复合体可以在通过 Tip60 过表达刺激 IL-1 $\beta$  后被置换。转移细胞或者正常细胞中 Tip60 或者  $\beta$ -连环蛋白水平的修饰各自改变了 IL-1 $\beta$  介导的基质胶侵袭。 $\beta$ -连环蛋白-reptin 复合体的高表达被认为与 Wnt 的激活, 同时还有 Tip60 的负调节有关, 之后二者共同抑制 CD82 的表达以及驱动转移进程的进行。随后的研究显示, reptin 的抑制功能的实现需要通过 SENP1/SUSP1 在 Lys456 上进行的苏素化事件。阻断转移性的前列腺细胞中 reptin 的苏素化能恢复 CD82mRNA 水平和减弱基质胶的侵袭。

最近在转移性乳腺癌细胞中的研究发现 CD82 的转录亦可在基因组结构水平上进行。SATB1 通过募集染色质重建酶和转录因子以及通过特定 DNA 序列拴住多染色体组位点调节基因表达, 从而实现整体转录水平的调控。用 RNA 沉默法减低 SATB1 在转移性 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中的表达能够恢复腺泡的极性以及抑制体内实验中肿瘤的生长和转移。有趣的是, CD82, 连同其它一些已知的转移抑制基因, 包括 nm23, KiSS1, BRMS1, claudin1 和 E-钙粘素, 在删除 SATB1 的肿瘤细胞中竟出现了步调一致的上调。因此, p53 的缺失(这可促进 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白的信号通路)、Jnk 的激活以及 SATB1 的表达增加, 协同或者在不同的复合体中促进 CD82 的表达缺失以及细胞的转移。

### 3.2 转录后水平的调节

在一些临床样本中 CD82mRNA 或者蛋白质的缺失与细胞转移之间的不完全相关性可能反映出另外的消除 CD82 功能的机制<sup>[169]</sup>。抑制 E3 泛素连接酶 gp78 在高转移性 HT1080 肉瘤细胞中的表达抑制细胞的转移，但是对原发性肿瘤的生长<sup>[9]</sup>以及假定的转移抑制基因没有作用。CD82 被确定为 gp78 的主要作用底物。Gp78d 的 E3 连接酶活性是转移进程中所不可或缺的。Gp78 的缺失引起的 CD82 表达的增加以及 gp78 的过表达增进了 CD82 的降解。在人类肉瘤组织样本中可检测到 gp78 和 CD82 表达的负性关系，而且 CD82 在 gp78 阴性细胞中的表达抑制可恢复细胞的转移进程。因此，CD82 在转移性肿瘤中缺失的另一种机制可能是其降解或者转位的增加。

是否其它的转录后或者转录机制能够解释 CD82 在转移性肿瘤中的功能缺失仍需进一步阐明<sup>[104]</sup>。至少有两种类型的转录后水平的修饰，糖基化和棕榈酰化，被确知发生在 CD82 中。对这些化学修饰的抑制会影响 CD82 的功能。是否酶类在转移性肿瘤中对 CD82 的修饰作用发生改变仍不得而知。

## 4 CD82 基因的肿瘤转移抑制作用

CD82/KAI1 最初被认为是前列腺癌的转移抑制因子，后来大量的研究证实大多数实性肿瘤中 CD82/KAI1 亦发挥了抑制侵袭转移的作用。CD82 的分布极其广泛，机体大多数组织均有表达，在前列腺、肺、肝、膀胱、骨髓、胎盘等组织丰度较高，乳腺、胰腺、骨骼肌和胸腺丰度中等，在脑、心脏、卵巢、胃肠道组织中表达较少。CD82 的氨基酸序列在人、猴、狗、兔、牛与犬、小鼠中相当保守。CD82 在组织中的广泛表达以及进化的保守性表明其在肿瘤的发生中也具有重要的生物学功能。

在恶性肿瘤中 CD82 的表达下调或缺失与癌症的临床进展密切相关<sup>[165]</sup>。研究表明 CD82 的表达与肿瘤的侵袭转移潜能呈负相关，对于癌症病人，CD82/KAI1 的正常表达，预示着良好的预后。

## 5 CD82/KAI1 抑制肿瘤侵袭和转移的作用机理

作为一种转移抑制因子的 CD82 基于在免疫细胞中的研究，CD82 在细胞信号通

路、细胞粘附和蛋白质向细胞表面的分类及运输过程中发挥重要作用。是否这些相同的功能也与其在转移抑制中的角色相关，抑或在非免疫细胞中CD82还有其它的作用？虽然CD82的缺失与转移进程相关，更要指出的是，其它Tetraspanin，是否CD82与其它Tetraspanin的相关性在其抑制功能中起决定性作用，或者CD82促进还是抑制它们的活性？CD82抑制哪些转移“加速”因子？总之，CD82的缺失与其它转移抑制基因的缺失是否有功能性的联系，而且需要移除多少转移抑制功能才能产生转移性的癌细胞？这些问题仍然未能解决，但是各个领域的研究都已取得了进展。

是否整合素蛋白是CD82调节的唯一分子？Tetraspanin在调节免疫细胞，即TCR和BCR中的受体酪氨酸激酶信号中起至关重要的作用。另外，髓细胞中受体酪氨酸激酶c-Kit的信号在与Tetraspanin相关联时会被抑制<sup>[138]</sup>。现已揭示CD82会影响存在于非免疫细胞中至少两种受体激酶，EGFR和c-Met介导的信号。

### 5.1 EGFR和c-Met

在正常的乳房上皮细胞系中，HB2和CD82的表达减少了EGF刺激下的创伤迁移、EGFR和Shc酪氨酸磷酸化以及Grb2与EGFR的相关性。Cd82的表达增加了EGF诱导的EGFR的内化作用。CD9在一些肿瘤细胞系中对EGFR有相似的作用。包含CD9或者CD82的EGFR复合体可被检测到，但在这些复合体中并未发现整联蛋白的存在。

CD82在转移性前列腺癌细胞系中的再表达减少了HGF/SF受体c-Met的配体依赖性或非依赖性激活，而且抑制了c-Met依赖性的侵袭进程。在高浓度HGF下，c-Met信号和侵袭进程可以得到恢复，意味着CD82调节c-Met的活化水平而不是完全地将其抑制。C-Met不能在CD82复合体中检测到，在细胞中与CD82亦未呈现共区域化，这暗示了其间接的调控机制。简单说，在H1229肺癌细胞中CD82的再表达减少了HGF诱导的细胞迁移以及Grb2和p85与c-Met的关联性<sup>[140]</sup>。与之相对，通过静默RNA移除唾液腺囊癌细胞的CD151极大减少了HGF刺激下的细胞迁移，而CD151的过表达则增加了c-Met介导的细胞迁移。

### 5.2 神经节苷酯

糖鞘脂类（GSLs）与有组织的膜微区相关。神经节苷酯特意地调节生长因子

刺激受体酪氨酸激酶、整联蛋白与Tetraspanin的复合体，以及下游信号分子如Src何小G蛋白。Tetraspanin尤其是CD82调节RTK和整联蛋白信号的能力可能受神经节苷酯的调节，因为在一些富含Tetraspanin的微区中发现了神经节苷酯的存在。

CD9促进肿瘤细胞运动的能力被GM3神经节苷酯的外源性添加物所抑制。值得一提的是，GM1的添加物没有类似的作用。UDP-Gal 4-表异构酶缺陷的IdID突变CHO细胞不能合成神经节苷酯，除非培养在没有半乳糖的条件下。在没有半乳糖存在时，CD9的表达会促进细胞的运动，而在半乳糖存在时细胞运动则被抑制。CD9/ $\alpha$ 3整联蛋白复合体只有在GM3存在时可通过共免疫沉淀法检测到。在膀胱癌细胞系中亦观察到了相似的关系，有着高GM3水平的细胞与那些低水平细胞相比，侵袭性要低得多。在高GM3表达细胞中观察到了 $\alpha$ 3整联蛋白与CD9之间更强的交互作用。通过去除GM3或者静默RNA减低CD9的表达可使非侵袭性细胞转变成侵袭性细胞。加入GM3可诱导Csk向GEMs的转位和抑制Src的活化。有趣的是，v-Jun诱导的细胞转化降低了成纤维细胞培养中GM3和GM3合酶mRNA的水平。GM3合酶的再表达抑制琼脂中细胞的生长，增加了那些细胞中CD9/ $\alpha$ 5 $\beta$ 1复合体的水平。因此迁移的抑制受到GM3/CD9/整联蛋白之间增加的复合体结构的介导，这说明这一复合体通过降低整联蛋白功能限制细胞迁移。

### 5.3 其他

肿瘤转移抑制因子（基因）很多，例如P53、Pten、Tetraspanin 家族蛋白等。有研究发现，三种Tetraspanin 家族成员之一的CD63/ME491在人体蜕膜NK细胞的表达高于外周血液中的NK细胞，分泌晚期，非常多的NK细胞聚集在蜕膜，甚至占到细胞总数的30-40%。我们及其他学者分别曾研究Tetraspanin 家族的另外两个成员：CD82/KAI1和CD9/MRP1，它们在小鼠动情周期、围着床期子宫内膜的时空表达模式，以及对着床前胚胎发育的影响，表明它们参与调节了胚胎的着床过程，但具体的作用对象和细节不清楚，推测蜕膜细胞和滋养层细胞应该是Tetraspanin 蛋白表达并发挥功能的重要载体。最近有研究发现，在人体母胎界面的蜕膜细胞有CD82的强表达，而滋养层细胞无CD82表达，白介素IL-1 $\beta$ 和cAMP能够刺激体外培养的分娩晚期子宫内膜基质细胞和足月蜕膜细胞上调CD82的表达，提示CD82可能参与滋养层细胞之间的联系和对滋养层细胞侵袭的调节。CD82/KAI1 是非常重要的肿瘤转移抑制因子，它的缺失会导致多种组织类型的肿瘤转移能力升高，

如在肝、结肠、前列腺、肺、膀胱、乳腺等，将CD82基因转染前列腺癌或肺癌细胞株，过度表达其蛋白可以显著抑制细胞的浸润。CD82是跨膜蛋白，它与细胞膜上的EGF、整合素 $\beta$ 1、E-cadherin等相互作用，激活细胞内c-Met等信号通路、增强同质细胞的聚集、诱发细胞内骨架蛋白改变等控制肿瘤细胞的运动或迁移能力。强迫人肺癌细胞株高表达CD82/KAI1后，TIMP-1的生成增加，TIMP-1反过来可以降低MMP-9的活性。总之，CD82/KAI1具有广泛意义的抑制细胞迁移或侵袭的效应。

## 6 展望

CD82 基因的发现和相关的研究为抑制肿瘤转移及滋养细胞侵入的研究提供了新的信息，CD82蛋白在这一过程中发挥的确切作用机制有待进一步研究。而随着现代分子生物学技术的发展，CD82基因在肿瘤组织中的表达的调控机制、生物学功能及抑制肿瘤转移的机制将逐步被阐释。CD82基因也可望为开发新抑制肿瘤转移的药物和进一步提高治疗恶性肿瘤的效果提供新的线索，并为揭示在滋养层细胞分化过程中的分子机理提供新的思路。

## 参考文献

- [1] Cockburn, K. and J. Rossant, Making the blastocyst: lessons from the mouse[J]. *J Clin Invest*, 2010. 120(4): 995-1003.
- [2] Red-Horse, K., et al., Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface[J]. *J Clin Invest*, 2004. 114(6): 744-54.
- [3] Murray, M.J. and B.A. Lessey, Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis[J]. *Semin Reprod Endocrinol*, 1999. 17(3): 275-90.
- [4] Son, B.H., J.S. Choi, and J.H. Lee, Prognostic values of KAI1 and survivin expression in an infiltrating ductal carcinoma of the breast[J]. *Pathology*, 2005. 37(2): 131-6.
- [5] Takeda, T., et al., Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model[J]. *Cancer Res*, 2007. 67(4): 1744-9.
- [6] Maurer, C.A., et al., Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases[J]. *Surgery*, 1999. 126(5): 869-80.
- [7] Schindl, M., et al., The impact of expression of the metastasis suppressor protein KAI1 on prognosis in invasive squamous cell cervical cancer[J]. *Anticancer Res*, 2000. 20(6B): 4551-5.
- [8] Liu, F.S., et al., KAI1 metastasis suppressor protein is down-regulated during the progression of human endometrial cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(4): 1393-8.
- [9] Knofler, M., Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion[J]. *Int J Dev Biol*, 2010. 54(2-3): 269-80.
- [10] Vicovac, L. and J.D. Aplin, Epithelial-mesenchymal transition during

- trophoblast differentiation[J]. *Acta Anat (Basel)*, 1996. 156(3): 202-16.
- [11]Cohen, M., A. Meisser, and P. Bischof, Metalloproteinases and human placental invasiveness[J]. *Placenta*, 2006. 27(8): p. 783-93.
- [12]Fisher, S.J., et al., Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro[J]. *J Cell Biol*, 1989. 109(2): 891-902.
- [13]Bischof, P., et al., Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. *Early Pregnancy*[J], 1995. 1(4): 263-9.
- [14]Sugiura, T. and F. Berditchevski, Function of alpha3beta1-tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) [J]. *J Cell Biol*, 1999. 146(6): 1375-89.
- [15]Bass, K.E., et al., Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process[J]. *Dev Biol*, 1994. 164(2): 550-61.
- [16]Kilani, R.T., et al., Endogenous tumor necrosis factor alpha mediates enhanced apoptosis of cultured villous trophoblasts from intrauterine growth-restricted placentae. *Reproduction*[J], 2007. 133(1): 257-64.
- [17]Hannan, N.J. and L.A. Salamonsen, Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2007. 19(3): 266-72.
- [18]Salamonsen, L.A., N.J. Hannan, and E. Dimitriadis, Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation[J]. *Semin Reprod Med*, 2007. 25(6): 437-44.
- [19]Red-Horse, K., et al., Chemokine ligand and receptor expression in the pregnant uterus: reciprocal patterns in complementary cell subsets suggest functional roles[J]. *Am J Pathol*, 2001. 159(6): 2199-213.
- [20]Wu, X., et al., The expression of CXCR4/CXCL12 in first-trimester human trophoblast cells[J]. *Biol Reprod*, 2004. 70(6): 1877-85.
- [21]Drake, P.M., K. Red-Horse, and S.J. Fisher, Reciprocal chemokine receptor



- and ligand expression in the human placenta: implications for cytotrophoblast differentiation. *Dev Dyn*, 2004. 229(4): 877-85.
- [22]Ren, L., et al., Trophoblast-derived chemokine CXCL12 promotes CXCR4 expression and invasion of human first-trimester decidual stromal cells[J]. *Hum Reprod*, 2011.
- [23]Dong, J.T., et al., KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2[J]. *Science*, 1995. 268(5212): 884-6.
- [24]Lee, J.H., et al., Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression[J]. *Cancer Res*, 2003. 63(21): 7247-55.
- [25]Mannion, B.A., et al., Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associated with integrin alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29) [J]. *J Immunol*, 1996. 157(5): 2039-47.
- [26]Sridhar, S.C. and C.K. Miranti, Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases[J]. *Oncogene*, 2006. 25(16): 2367-78.
- [27]Maecker, H.T., S.C. Todd, and S. Levy, The tetraspanin superfamily: molecular facilitators[J]. *FASEB J*, 1997. 11(6): 428-42.
- [28][28] Gellersen, B., et al., Expression of the metastasis suppressor KAI1 in decidual cells at the human maternal-fetal interface: Regulation and functional implications[J]. *Am J Pathol*, 2007. 170(1): 126-39.
- [29]Li, M.Q., et al., CD82 gene suppression in endometrial stromal cells leads to increase of the cell invasiveness in the endometriotic milieu[J]. *J Mol Endocrinol*, 2011. 47(2): 195-208.
- [30]Li, M.Q., et al., CXCL12 controls over-invasion of trophoblasts via upregulating CD82 expression in DSCs at maternal-fetal interface of human early pregnancy in a paracrine manner[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011. 4(3): 276-86.
- [31]Li, M.Q., et al., The DSCs-expressed CD82 controls the invasiveness of

- trophoblast cells via integrinbeta1/MAPK/MAPK3/1 signaling pathway in human first-trimester pregnancy[J]. *Biol Reprod*, 2010. 82(5): 968-79.
- [32] Su, A.I., et al., A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(16): 6062-7.
- [33] Su, A.I., et al., Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(7): 4465-70.
- [34] Dong, J.T., et al., Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss[J]. *Cancer Res*, 1996. 56(19): 4387-90.
- [35] Yang, X., et al., KAI1, a putative marker for metastatic potential in human breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 1997. 119(2): 149-55.
- [36] Guo, X.Z., et al., KAI1, a new metastasis suppressor gene, is reduced in metastatic hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 1998. 28(6): 1481-8.
- [37] Friess, H., et al., Reduced KAI1 expression in pancreatic cancer is associated with lymph node and distant metastases[J]. *Int J Cancer*, 1998. 79(4): 349-55.
- [38] Aryee, D.N., et al., Frequent low level expression in Ewing sarcoma family tumors and widespread absence of the metastasis suppressor KAI1/CD82 in neuroblastoma[J]. *Pediatr Res*, 2002. 52(2): 279-85.
- [39] Ferretti, C., et al., Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts[J]. *Hum Reprod Update*, 2007. 13(2): 121-41.
- [40] Staun-Ram, E., et al., Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. 2: 59.
- [41] Bilban, M., et al., Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts[J]. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 8): 1319-28.
- [42] Jee, B.K., et al., KAI1/CD82 suppresses tumor invasion by MMP9

- inactivation via TIMP1 up-regulation in the H1299 human lung carcinoma cell line[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 342(2): 655-61.
- [43]Norwitz, E.R., D.J. Schust, and S.J. Fisher, Implantation and the survival of early pregnancy[J]. *N Engl J Med*, 2001. 345(19): 1400-8.
- [44]Cross, J.C., et al., Genes, development and evolution of the placenta[J]. *Placenta*, 2003. 24(2-3): 123-30.
- [45]Paria, B.C., et al., Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges[J]. *Science*, 2002. 296(5576): 2185-8.
- [46]Rossant, J. and J.C. Cross, Placental development: lessons from mouse mutants[J]. *Nat Rev Genet*, 2001. 2(7): 538-48.
- [47]Gootwine, E., Placental hormones and fetal-placental development[J]. *Anim Reprod Sci*, 2004. 82-83: 551-66.
- [48]Gauster, M., et al., Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia[J]. *Placenta*, 2009. 30 Suppl A: S49-54.
- [49]Hempstock, J., et al., The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure[J]. *Hum Pathol*, 2003. 34(12): 1265-75.
- [50]Kaufmann, P., S. Black, and B. Huppertz, Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia[J]. *Biol Reprod*, 2003. 69(1): 1-7.
- [51]Lyll, F., The human placental bed revisited[J]. *Placenta*, 2002. 23(8-9): 555-62.
- [52]Naicker, T., et al., Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2003. 82(8): 722-9.
- [53]Kadyrov, M., et al., Pre-eclampsia and maternal anaemia display reduced apoptosis and opposite invasive phenotypes of extravillous trophoblast[J]. *Placenta*, 2003. 24(5): 540-8.
- [54]Knofler, M., Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion[J]. *Int J Dev Biol*. 54(2-3): 269-80.

- [55]Laferla, J.J., Spontaneous abortion. *Clin Obstet Gynaecol*, 1986. 13(1): 105-14.
- [56]Hammerslough, C.R., Estimating the probability of spontaneous abortion in the presence of induced abortion and vice versa[J]. *Public Health Rep*, 1992. 107(3): 269-77.
- [57]Ball, E., et al., Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion[J]. *J Pathol*, 2006. 208(4): 535-42.
- [58]Nakashima, A., et al., Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abortion[J]. *Am J Pathol*, 2008. 173(3): 653-64.
- [59]Quenby, S.M. and R.G. Farquharson, Predicting recurring miscarriage: what is important? [J]*Obstet Gynecol*, 1993. 82(1): 132-8.
- [60]Tulppala, M., et al., A prospective study of 63 couples with a history of recurrent spontaneous abortion: contributing factors and outcome of subsequent pregnancies[J]. *Hum Reprod*, 1993. 8(5): 764-70.
- [61]Katz, V.L. and J.A. Kuller, Recurrent miscarriage. *Am J Perinatol*, 1994. 11(6): 386-97.
- [62]Daya, S., Evaluation and management of recurrent spontaneous abortion[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1996. 8(3): 188-92.
- [63]Li, T.C., et al., Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis[J]. *Hum Reprod Update*, 2002. 8(5): 463-81.
- [64]Yurdakan, G., et al., Expression of adhesion molecules in first trimester spontaneous abortions and their role in abortion pathogenesis[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2008. 87(7): 775-82.
- [65]Ball, E., et al., Early embryonic demise: no evidence of abnormal spiral artery transformation or trophoblast invasion[J]. *J Pathol*, 2006. 208(4): 528-34.
- [66]Cetin, I. and G. Alvino, Intrauterine growth restriction: implications for

- placental metabolism and transport[J]. *A review. Placenta*, 2009. 30 Suppl A: S77-82.
- [67] Sankaran, S. and P.M. Kyle, Aetiology and pathogenesis of IUGR[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2009. 23(6): 765-77.
- [68] Mahsud-Dornan, S. and J.C. Dornan, IUGR: a contemporary review[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2009. 23(6): 739-40.
- [69] Mandruzzato, G., et al., Intrauterine restriction (IUGR) [J]. *J Perinat Med*, 2008. 36(4): 277-81.
- [70] Kam, E.P., et al., The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries[J]. *Hum Reprod*, 1999. 14(8): 2131-8.
- [71] Altieri, A., et al., Epidemiology and aetiology of gestational trophoblastic diseases[J]. *Lancet Oncol*, 2003. 4(11): 670-8.
- [72] Shih Ie, M., Gestational trophoblastic neoplasia--pathogenesis and potential therapeutic targets. *Lancet Oncol*, 2007. 8(7): 642-50.
- [73] Siu, M.K., et al., Overexpression of NANOG in gestational trophoblastic diseases: effect on apoptosis, cell invasion, and clinical outcome[J]. *Am J Pathol*, 2008. 173(4): 1165-72.
- [74] Cohn, D.E. and T.J. Herzog, Gestational trophoblastic diseases: new standards for therapy[J]. *Curr Opin Oncol*, 2000. 12(5): 492-6.
- [75] Garner, E.I., et al., Gestational trophoblastic disease[J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2007. 50(1): 112-22.
- [76] Ben-Arie, A., et al., Reduction of postmolar gestational trophoblastic neoplasia by early diagnosis and treatment[J]. *J Reprod Med*, 2009. 54(3): 151-4.
- [77] Xue, W.C., et al., Methylation status and expression of E-cadherin and cadherin-11 in gestational trophoblastic diseases[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2003. 13(6): 879-88.
- [78] Xue, W.C., et al., Promoter hypermethylation of multiple genes in hydatidiform mole and choriocarcinoma[J]. *J Mol Diagn*, 2004. 6(4):

326-34.

- [79]Graham, C.H., et al., Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan[J]. *Exp Cell Res*, 1993. 206(2): 204-11.
- [80]Choy, M.Y. and I.T. Manyonda, The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast[J]. *Hum Reprod*, 1998. 13(10): 2941-9.
- [81]Choy, M.Y., G. St Whitley, and I.T. Manyonda, Efficient, rapid and reliable establishment of human trophoblast cell lines using poly-L-ornithine[J]. *Early Pregnancy*, 2000. 4(2): 124-43.
- [82]Cartwright, J.E., W.K. Tse, and G.S. Whitley, Hepatocyte growth factor induced human trophoblast motility involves phosphatidylinositol-3-kinase, mitogen-activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase[J]. *Exp Cell Res*, 2002. 279(2): 219-26.
- [83]Pavan, L., et al., Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPARgamma in cell invasion process[J]. *Carcinogenesis*, 2003. 24(8): 1325-36.
- [84]Logan, S.K., et al., T-antigen inhibits metalloproteinase expression and invasion in human placental cells transformed with temperature-sensitive simian virus 40[J]. *Matrix Biol*, 1996. 15(2): 81-9.
- [85]Aplin, J.D., et al., Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin alpha5beta1[J]. *Biol Reprod*, 1999. 60(4): 828-38.
- [86]Zdravkovic, M., et al., Susceptibility of MHC class I expressing extravillous trophoblast cell lines to killing by natural killer cells[J]. *Placenta*, 1999. 20(5-6): 431-40.
- [87]Adamson, S.L., et al., Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta[J]. *Dev Biol*, 2002. 250(2): 358-73.
- [88]Cross, J.C., D.G. Simmons, and E.D. Watson, Chorioallantoic

- morphogenesis and formation of the placental villous tree[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. 995: 84-93.
- [89]Pardi, G, A.M. Marconi, and I. Cetin, Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses--a review[J]. *Placenta*, 2002. 23 Suppl A: S136-41.
- [90]Aubuchon, M., L.C. Schulz, and D.J. Schust, Preeclampsia: animal models for a human cure. [J] *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(4): 1197-8.
- [91]Watson, E.D. and J.C. Cross, Development of structures and transport functions in the mouse placenta[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2005. 20: 180-93.
- [92]Oldt, R.J., 3rd, R.J. Kurman, and M. Shih Ie, Molecular genetic analysis of placental site trophoblastic tumors and epithelioid trophoblastic tumors confirms their trophoblastic origin[J]. *Am J Pathol*, 2002. 161(3): 1033-7.
- [93]Yamamoto, E., et al., N-acetylglucosaminyltransferase V regulates extravillous trophoblast invasion through glycosylation of alpha5beta1 integrin[J]. *Endocrinology*, 2009. 150(2): 990-9.
- [94]Paiva, P., et al., Interleukin 11 inhibits human trophoblast invasion indicating a likely role in the decidual restraint of trophoblast invasion during placentation[J]. *Biol Reprod*, 2009. 80(2): p. 302-10.
- [95]Ely, T.S., Editorial: Workplace hazards and young humans[J]. *J Occup Med*, 1976. 18(1): 55.
- [96]Cohen, M., et al., Regulation of MMP-9 by p53 in first trimester cytotrophoblastic cells[J]. *Hum Reprod*, 2008. 23(10): 2273-81.
- [97]Bischof, P., K. Truong, and A. Campana, Regulation of trophoblastic gelatinases by proto-oncogenes[J]. *Placenta*, 2003. 24(2-3): 155-63.
- [98]Wang, H., et al., Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, -14, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -2, -3 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) during early pregnancy[J]. *Biol Reprod*, 2001. 65(1): 31-40.
- [99]Isaka, K., et al., Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9

- in human trophoblasts[J]. *Placenta*, 2003. 24(1): 53-64.
- [100]Hussaini, I.M., et al., Matrix metalloproteinase-9 is differentially expressed in nonfunctioning invasive and noninvasive pituitary adenomas and increases invasion in human pituitary adenoma cell line[J]. *Am J Pathol*, 2007. 170(1): 356-65.
- [101]Vempati, P., E.D. Karagiannis, and A.S. Popel, A biochemical model of matrix metalloproteinase 9 activation and inhibition[J]. *J Biol Chem*, 2007. 282(52): 37585-96.
- [102]Seo, D.W., et al., TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism [J]. *Cell*, 2003. 114(2): 171-80.
- [103]Hammani, K., et al., Structure and characterization of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene[J]. *J Biol Chem*, 1996. 271(41): 25498-505.
- [104]Zhou, B., et al., The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity[J]. *Cancer Res*, 2004. 64(20): 7455-63.
- [105]Lash, G.E., et al., Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases[J]. *Biol Reprod*, 2005. 73(2): 374-81.
- [106]Hamilton, G.S., et al., Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1[J]. *Exp Cell Res*, 1998. 244(1): 147-56.
- [107]Staun-Ram, E. and E. Shalev, Human trophoblast function during the implantation process[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005. 3: 56.
- [108]Bischof, P., A. Meisser, and A. Campana, Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review[J]. *Placenta*, 2000. 21 Suppl A: S55-60.
- [109]Bischof, P., A. Meisser, and A. Campana, Involvement of trophoblast in embryo implantation: regulation by paracrine factors[J]. *J Reprod Immunol*,



1998. 39(1-2): 167-77.
- [110] Simpson, H., et al., Transforming growth factor beta expression in human placenta and placental bed during early pregnancy[J]. *Placenta*, 2002. 23(1): 44-58.
- [111] Graham, C.H., et al., Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta[J]. *Exp Cell Res*, 1994. 214(1): 93-9.
- [112] Hofmann, G.E., et al., Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human endometrium, decidua, and placenta[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991. 73(4): 882-7.
- [113] Leach, R.E., et al., Heparin-binding EGF-like growth factor regulates human extravillous cytotrophoblast development during conversion to the invasive phenotype[J]. *Dev Biol*, 2004. 266(2): 223-37.
- [114] Nakatsuji, Y., et al., Epidermal growth factor enhances invasive activity of BeWo choriocarcinoma cells by inducing alpha2 integrin expression[J]. *Endocr J*, 2003. 50(6): 703-14.
- [115] Lindqvist, P., L. Grennert, and K. Marsal, Epidermal growth factor in maternal urine--a predictor of intrauterine growth restriction? *Early Hum Dev*, 1999. 56(2-3): 143-50.
- [116] Aplin, J.D., et al., Growth factor-extracellular matrix synergy in the control of trophoblast invasion[J]. *Biochem Soc Trans*, 2000. 28(2): 199-202.
- [117] Holmes, R., et al., An immunohistochemical study of type I insulin-like growth factor receptors in the placentae of pregnancies with appropriately grown or growth restricted fetuses[J]. *Placenta*, 1999. 20(4): 325-30.
- [118] Forbes, K. and M. Westwood, The IGF axis and placental function. a mini review. *Horm Res*, 2008. 69(3): 129-37.
- [119] Rikhof, B., et al., The insulin-like growth factor system and sarcomas[J]. *J Pathol*, 2009. 217(4): 469-82.
- [120] Perks, C.M. and J.M. Holly, IGF binding proteins (IGFBPs) and regulation

- of breast cancer biology[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2008. 13(4): 455-69.
- [121] Woods, K.A., et al., Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene[J]. *N Engl J Med*, 1996. 335(18): 1363-7.
- [122] Kabir-Salmani, M., et al., Alphavbeta3 integrin signaling pathway is involved in insulin-like growth factor I-stimulated human extravillous trophoblast cell migration[J]. *Endocrinology*, 2003. 144(4): 1620-30.
- [123] Kabir-Salmani, M., et al., The role of alpha(5)beta(1)-integrin in the IGF-I-induced migration of extravillous trophoblast cells during the process of implantation[J]. *Mol Hum Reprod*, 2004. 10(2): 91-7.
- [124] Forbes, K., et al., Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. 294(6): C1313-22.
- [125] Cingel-Ristic, V., A. Flyvbjerg, and S.L. Drop, The physiological and pathophysiological roles of the GH/IGF-axis in the kidney: lessons from experimental rodent models[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2004. 14(6): 418-30.
- [126] Irwin, J.C., et al., Insulin-like growth factor (IGF)-II inhibition of endometrial stromal cell tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and IGF-binding protein-1 suggests paracrine interactions at the decidua:trophoblast interface during human implantation[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(5): 2060-4.
- [127] Lala, P.K. and C. Chakraborty, Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury[J]. *Placenta*, 2003. 24(6): 575-87.
- [128] Furugori, K., et al., Levels of hepatocyte growth factor and its messenger ribonucleic acid in uncomplicated pregnancies and those complicated by preeclampsia[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. 82(8): 2726-30.

- [129]Kauma, S.W., V. Bae-Jump, and S.W. Walsh, Hepatocyte growth factor stimulates trophoblast invasion: a potential mechanism for abnormal placentation in preeclampsia[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(11): 4092-6.
- [130]Uehara, Y., et al., Rescue of embryonic lethality in hepatocyte growth factor/scatter factor knockout mice[J]. *Genesis*, 2000. 27(3): 99-103.
- [131]Tse, W.K., G.S. Whitley, and J.E. Cartwright, Transforming growth factor-beta1 regulates hepatocyte growth factor-induced trophoblast motility and invasion[J]. *Placenta*, 2002. 23(10): 699-705.
- [132]Galabova-Kovacs, G., et al., Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(5): 1325-30.
- [133]Gleeson, L.M., et al., Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(6): 2484-93.
- [134]McKinnon, T., et al., Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(8): 3665-74.
- [135]Cartwright, J.E., et al., Trophoblast invasion of spiral arteries: a novel in vitro model[J]. *Placenta*, 2002. 23(2-3): 232-5.
- [136]Liu, J., et al., Noncatalytic domain of uPA stimulates human extravillous trophoblast migration by using phospholipase C, phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase[J]. *Exp Cell Res*, 2003. 286(1): 138-51.
- [137]Chakraborty, C., et al., Endothelin-1 promotes migration and induces elevation of  $[Ca^{2+}]_i$  and phosphorylation of MAP kinase of a human extravillous trophoblast cell line[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003. 201(1-2):

63-73.

- [138] Nicola, C., et al., Roles of Rho guanosine 5'-triphosphatase A, Rho kinases, and extracellular signal regulated kinase (1/2) in prostaglandin E2-mediated migration of first-trimester human extravillous trophoblast[J]. *Endocrinology*, 2008. 149(3): 1243-51.
- [139] Qiu, Q., et al., Both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are required in epidermal growth factor-induced human trophoblast migration[J]. *Mol Hum Reprod*, 2004. 10(9): 677-84.
- [140] Prast, J., et al., Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling[J]. *Endocrinology*, 2008. 149(3): 979-87.
- [141] Moon, K.C., et al., Expression of extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the invasive trophoblasts at the human placental bed[J]. *Placenta*, 2008. 29(5): 391-5.
- [142] Yang, Z.Z., et al., Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. [J] *J Biol Chem*, 2003. 278(34): 32124-31.
- [143] Kamei, T., et al., The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway modulates the endocrine differentiation of trophoblast cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2002. 16(7): 1469-81.
- [144] Schillhorn van Veen, T.W., et al., Fatal reactions in bison following systemic organophosphate treatment for the control of *Hypoderma bovis*[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1991. 3(4): 355-6.
- [145] Qiu, Q., et al., Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(31): 11047-52.
- [146] Paulson, M.J., et al., A discriminant function procedure for identifying abusing parents[J]. *Suicide*, 1975. 5(2): 104-14.
- [147] Illic, D., et al., Plasma membrane-associated pY397FAK is a marker

- of cytotrophoblast invasion in vivo and in vitro[J]. *Am J Pathol*, 2001. 159(1): 93-108.
- [148]MacPhee, D.J., et al., Focal adhesion kinase is a key mediator of human trophoblast development[J]. *Lab Invest*, 2001. 81(11): 1469-83.
- [149]Kabir-Salmani, M., et al., The membrane-spanning domain of CD98 heavy chain promotes alpha(v)beta3 integrin signals in human extravillous trophoblasts[J]. *Mol Endocrinol*, 2008. 22(3): 707-15.
- [150]Galceran, J., et al., Wnt3a<sup>-/-</sup>-like phenotype and limb deficiency in Lef1<sup>(-/-)</sup>Tcf1<sup>(-/-)</sup> mice[J]. *Genes Dev*, 1999. 13(6): 709-17.
- [151]Monkley, S.J., et al., Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects[J]. *Development*, 1996. 122(11): 3343-53.
- [152]Parr, B.A., et al., Wnt7b regulates placental development in mice[J]. *Dev Biol*, 2001. 237(2): 324-32.
- [153]Mohamed, O.A., et al., Uterine Wnt/beta-catenin signaling is required for implantation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(24): 8579-84.
- [154]Paria, B.C., et al., Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(3): 1047-52.
- [155]Sonderegger, S., et al., Complex expression pattern of Wnt ligands and frizzled receptors in human placenta and its trophoblast subtypes[J]. *Placenta*, 2007. 28 Suppl A: S97-102.
- [156]Pollheimer, J., et al., Activation of the canonical wingless/T-cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast[J]. *Am J Pathol*, 2006. 168(4): 1134-47.
- [157]Engel, P. and T.F. Tedder, New CD from the B cell section of the Fifth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens[J]. *Leuk Lymphoma*, 1994. 13 Suppl 1: 61-4.
- [158]Nagira, M., et al., Mouse homologue of C33 antigen (CD82), a member of the transmembrane 4 superfamily: complementary DNA, genomic structure,

- and expression[J]. *Cell Immunol*, 1994. 157(1): 144-57.
- [159] Suzuki, H., et al., Identification of the rat homologue of KAI1 and its expression in Dunning rat prostate cancers[J]. *Prostate*, 1998. 37(4): 253-60.
- [160] Custer, M.C., et al., Characterization of an antibody that can detect the Kai1/CD82 murine metastasis suppressor[J]. *Prostate*, 2006. 66(6): 567-77.
- [161] Liu, F.S., et al., Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2000. 78(1): p. 10-5.
- [162] Tagawa, K., et al., Down-regulation of KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1999. 90(9): 970-6.
- [163] Miyazaki, T., et al., Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2000. 89(5): 955-62.
- [164] Jackson, P., A. Rowe, and M.O. Grimm, An alternatively spliced KAI1 mRNA is expressed at low levels in human bladder cancers and bladder cancer cell lines and is not associated with invasive behaviour[J]. *Oncol Rep*, 2007. 18(6): 1357-63.
- [165] Kawana, Y., et al., Location of KAI1 on the short arm of human chromosome 11 and frequency of allelic loss in advanced human prostate cancer[J]. *Prostate*, 1997. 32(3): 205-13.
- [166] Gao, A.C., et al., Defining regulatory elements in the human KAI1 (CD 82) metastasis suppressor gene[J]. *Prostate*, 2003. 57(4): 256-60.
- [167] Marreiros, A., et al., Identification of regulatory regions within the KAI1 promoter: a role for binding of AP1, AP2 and p53[J]. *Gene*, 2003. 302(1-2): 155-64.
- [168] Jackson, P., A. Marreiros, and P.J. Russell, KAI1 tetraspanin and metastasis suppressor[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. 37(3): 530-4.
- [169] Tsai, Y.C., et al., The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis

by targeting KAI1 for degradation[J]. Nat Med, 2007. 13(12): 1504-9.

## 致 谢

白驹过隙，时光荏苒，不知道多少形容时间的词语能够描绘这 5 年的求学生涯。马上就要离开，即将告别这紧张但又充实的博士生活。其实，是告别整个的学生时代，22 年的寒窗苦读，造就了今天。一时感慨颇多，一时涌入脑海的人颇多，该从何说起，该从谁来记起，真不知如何下笔。

五年前，怀着对生命科学无比向往的心情，来到重医，从事在别人眼中最枯燥最无聊的基础科学。五年过去，重医，北京记录了我所有的成长，所有的经历，所以我挚爱的老师，同学以及那每天陪伴我的实验仪器。三年前，离开重医，去中科院联培，这是我最为复杂的三年，我失去了重庆给我的一切，一切在北京都是新的开始。现在看来，感谢在重庆失去的一切，它让我成长，感谢北京给予我的一切，它让我长大。感谢谭毅老师作为老板，朋友，父亲给过我的所有关怀和教育，感谢王红梅老师作为老板，朋友，母亲给过我的所有提点与照料。要感谢人太多，事太多。不知能否一一说完。感谢重庆所有的朋友，同学给予我的爱，感谢北京所有朋友，临近实验室的师兄师姐，师弟师妹给予的帮助。感谢北京的星星国际影城，那让我轻松欢畅；感谢北京泰元坊，那让我内心安详；感谢眉州东坡酒楼的小吃和夜宵，它陪伴我度过了所有难熬加班的夜；感谢奥林匹克公园的每一条小径，每一棵树，每一缕风，它们记录了我所有的成长，我挥洒的所有青春。感谢我到过的每一个角落，认识的每一个人带给我的每一份感动。

在这向那些不能一一提及姓名的人道歉，你们知道我是在说你们，你们知道我有多爱你们，我永远是你们眼中的不变的 small，亲爱的，倩倩，Q。

最后，我想把这段留个生我养我教育我成长，让我成为一个对社会无害的人的爸爸妈妈。爸，妈，女儿谢谢你们，没有你们的支持鼓励，女儿永远不会走到今天。22 年，是你们培养了我，27 年，是你们养育了我。无论任何时候，走到哪里，你们都是我最亲最爱的人。

青春无价，学海无涯。别了，我的学生时代。



## 攻读学位期间的研究成果及发表的学术论文目录

1. 张晋平, 罗文萍, 张倩, 彭洪英, 谭冬梅, 王应雄, 谭毅<sup>\*</sup>。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. 37(3): 288-296.
2. 徐倩, 谭毅, 张倩, 罗文萍, 谭冬梅<sup>\*</sup>。骨形态发生蛋白-7 (BMP-7) 促进小鼠子宫内膜蜕膜化研究。生殖与避孕, 2010, 30(1): 15-20
3. 尉晓蔚, 张倩, 谭冬梅, 赵邦霞, 何通川, 谭毅<sup>\*</sup>。重组腺病毒 CD82/KAI1 对小鼠子宫基质细胞内  $\alpha 5$ 、 $\beta 3$ 、MMP-9、E-cadherin 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达的影响。第三军医大学学报, 2009, 31(7): 572-576
4. Qian Zhang, Dongmei Tan, Yi Tan<sup>\*</sup> Expression of CD82 in human trophoblast and its role in trophoblast invasion. *plos one*, 2012, 7(6), e38487
5. Qian Zhang, Xiaoyin Lu, Zhi Zhou, Yi Tan<sup>\*</sup>, Hongmei Wang, \* CUL1 promotes trophoblast cell differentiation via the invasive pathway. **(in revision)**
6. CUL3 and CUL4A promotes trophoblast cell differentiation via the invasive pathway **(in preparation)**

## 学术交流

1. 2008.10, International forum on stem cell, Tianjin, China;
2. 2009.10, the 16<sup>th</sup> annual meeting of China Zoological Society, Chongqing, China
3. 2010.05, the first SKLRB symposia on Frontiers in Periimplantation Biology, Beijing, China;
4. 2011.07, 中国细胞生物学学会第十二次全体会员代表大会, 北京, 中国 (摘要)
5. 2011.09, 2011 诺贝尔奖获得者北京论坛, 北京, 中国
6. 2011.11, the 17<sup>th</sup> annual meeting of China Zoological Society, wuyishan, China (abstract)
7. 2011.11, BD discovery labware 学术论坛, 深圳, 中国

2009010130