

Luminex液相芯片技术测定人早孕滋养层细胞及蜕膜细胞中基质金属蛋白酶的表达

贺晓恒, 陈士岭, 孙玲, 邢福祺(南方医科大学南方医院生殖医学中心, 广东广州 510515)

摘要:目的 研究人正常早孕滋养层细胞与蜕膜细胞中基质金属蛋白酶(MMPs)的表达特点,探讨子宫内膜蜕膜化进程中 MMPs 的变化及对胚胎着床的影响。**方法** 收集正常妇女分泌期子宫内膜及人正常早孕绒毛和相应蜕膜标本各 5 例,分别进行离体培养,鉴定其纯度在 98%以上后,收集培养上清液,利用 Luminex(LumAvidin Beads)测定培养上清液中 MMPs(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-12、MMP-13)蛋白表达的变化,分析 MMPs 在不同培养条件下的表达差异及表达之间的相关性。**结果** ①在不同培养条件下,MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9 均有表达,MMP-12 及 MMP-13 分别在 ESC 及 DSC 中无表达,且 MMP-8、MMP-12、MMP-13 表达均低。②与子宫内膜细胞相比,MMP-1、MMP-3、MMP-7 在 DSC、EVCT 中表达均降低,降低有显著性差异 ($P<0.05$),而 MMP-2、MMP-8、MMP-9 在 DSC、EVCT 中则显著升高,升高有显著性差异 ($P<0.05$)。且在蜕膜细胞中,MMP-1、MMP-3、MMP-2、MMP-7 高表达尤为显著。③与蜕膜细胞相比,MMP-1、MMP-3、MMP-7 在 EVCT 中表达显著降低 ($P<0.05$)。MMP-2、MMP-9、MMP-13 在 EVCT 中升高有显著性 ($P<0.05$)。且在滋养层细胞中,MMP-2、-9 高表达尤为显著。④ MMPs 之间的相关性:MMP-2 与 MMP-9 相关关系显著 ($P<0.05$),且关系较密切($r=0.6645$)。MMP-1、MMP-3、MMP-7 两两间相关关系显著 ($P<0.05$),且关系密切($r>0.7340$)。其他 MMP 之间相关关系不显著。**结论** 首次利用 Luminex xMAP 方法高通量的检测到子宫内膜间质细胞、早孕蜕膜细胞与滋养层细胞的多种 MMPs 的表达,它们均可分泌多种 MMP,但是不同种类组织细胞的表达量不同;MMPs 可能通过调控子宫内膜蜕膜化及母胎界面间 MMPs 的变化而影响胚胎着床,为成功妊娠创造条件。

关键词:绒毛外细胞滋养层细胞;蜕膜细胞;子宫内膜;基质金属蛋白酶;液相蛋白芯片

中图分类号:R339.22 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)08-1136-04

Expression of matrix metalloproteinases in the cytotrophoblasts and decidual stromal cells in human early pregnancy

HE Xiao-heng, CHEN Shi-ling, SUN Ling, XING Fu-qi

Center for Reproductive Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in the decidual stromal cells (DSCs) and extravillous cytotrophoblasts (EVCT) in human early pregnancy and explore the change of MMPs in endometrial stromal cell (ESC) decidualization and its impact on implantation and placentation. **Methods** The decidua and villi from 5 women with early pregnancy and mid-secretory endometrium from 5 normal women were collected and cultured *in vitro*, and the supernatants of the culture media were collected after 48 hours of incubation. The expression of the MMPs in the ESCs, DSCs and EVCTs was detected using Luminex xMAP system simultaneously and the difference in MMPs expression and their correlations were analyzed with SPSS10.0 software. **Results** The MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, and MMP-9) were expressed in ESCs, DSCs and EVCTs, while MMP-12 was not found in ESCs and MMP-13 not in DSCs. Expressions of MMP-8, MMP-12, and MMP-13 were lowered. Compared with the ESCs, DSCs and EVCTs showed significantly lowered expressions of MMP-1, MMP-3, and MMP-7 ($P<0.05$), whereas expression of MMP-2 and MMP-9 increased significantly, and the high expressions of MMP-1, MMP-3, and MMP-7 was especially obvious in the DSCs. The expressions of MMP-1, MMP-3, and MMP-7, however, were significantly decreased in the EVCTs in comparison with the DSCs. Significant correlations were noted between MMP-1, MMP-3, and MMP-7, and MMP-2 was closely correlated with MMP-9. MMP-8 was significantly lower and MMP-12 and MMP-13 showed no obvious variation in the cell culture.

Conclusion MMPs are secreted by ESCs, DSCs and EVCTs. Diverse MMPs play an important role in proliferation and differentiation of the ESC to affect embryo implantation and placentation. All MMPs establish a balance to co-regulate the process of pregnancy.

Key words: endometrial stromal cells; decidual stromal cells; extravillous cytotrophoblasts; matrix metalloproteinases; Luminex

收稿日期:2006-03-13

基金项目:国家自然科学基金(30470657);广东省自然科学基金(04020416)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30470657)

作者简介:贺晓恒(1979-),女,在读硕士生,电话:13570206392, E-mail: xiaoheng722@126.com

通讯作者:陈士岭,女,教授,主任医师,硕士生导师,电话:020-61641908, E-mail: chensl@fimmu.com

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是蛋白水解酶的成员之一, 是一类结构相关、催化活性依赖于 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 的蛋白水解酶家族, 能降解胶原、弹性蛋白、氨基葡聚糖等多钟细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 及穿越 IV 型胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、硫酸类肝素蛋白多糖等基底膜 (basement membrane, BM) 成分, 是 ECM 和 BM 降解与重建的关键^[1], 说明 MMPs 在这一过程中起着重要作用。研究发现人着床前早期胚胎和滋养层细胞分泌多种 MMP^[2], 它们组成复杂的自分泌和旁分泌局域网, 相互作用, 相互影响, 在胚胎着床及胎盘形成中起着重要作用^[3]。本研究利用 Luminex 方法同时多通量的检测子宫内膜间质细胞、早孕蜕膜细胞与滋养层细胞的多种 MMPs 的表达, 为探索正常早期妊娠的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

1.1.1 早孕绒毛和蜕膜的入选标准 标本来源于南方医院 2005.9~2005.11 间自愿来妇产科门诊行早孕人流术的绒毛和蜕膜组织。(1)年龄在 20~35 岁健康妇女;(2)妊娠前 3 个月及妊娠后未使用过影响内分泌的药物(甾体激素);(3)妊娠 6~9 周, B 超证实为宫内妊娠, 符合以上条件的标本共 5 例。(研究经本人及医院伦理委员会同意)

1.1.2 着床窗期子宫内膜入选标准 南方医院生殖医学中心 2005 年 10 月~2005 年 11 月间所获得的生育年龄妇女子宫内膜标本。入选标准: ①因男性不孕或单纯输卵管因素不孕就诊的年龄 23~35 岁的排卵正常妇女; ②月经周期规则为 28~32 d; ③获取标本前 3 个月未使用过影响内分泌的药物(甾体激素); ④取内膜时宫腔内无异常发现(连续阴道 B 超检查); ⑤病检结果为分泌期中期子宫内膜; ⑥在无菌条件下以内膜取样器取出子宫内膜组织。符合以上条件的周期第 21~23 天分泌期中期子宫内膜标准共 5 例(研究经本院生殖伦理委员会讨论同意)。

1.2 主要试剂

Human MMPs-Kit (包括 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-12、MMP-13), 购自 R&D 公司, 小鼠抗人细胞角蛋白 cytokeratin7 购于 Novocastra 公司, 波形蛋白抗体 (Vimentin-Ln) 购于武汉博士德公司。

1.3 各细胞分离纯化与培养

1.3.1 子宫内膜细胞培养 参考文献[4]的方法并加以改进。细胞培养期间, 每天在倒置显微镜下仔细观察每瓶细胞生长情况至少 1 次, 详细记录细胞变化。当

细胞融合达 90% 后, 换成 1 ml 新鲜培养基培养 48 h, 收集上清液准备测定。

1.3.2 蜕膜基质细胞的培养 参考文献[5]的方法并加以改进。24 h 后首次换液, 清除未贴壁的蜕膜细胞及红细胞。视细胞生长情况, 2~3 d 换培养液 1 次。当细胞融合达 90% 后, 换成 1 ml 新鲜培养基培养 48 h, 收集上清液准备测定。

1.3.3 绒毛外细胞滋养层细胞的分离纯化与培养 参照文献[6]的方法并稍加改进。24 h 后首次换液。视细胞生长情况, 2~3 d 换培养液 1 次。当细胞融合达 90% 后, 换成 1 ml 新鲜培养基培养 48 h, 收集上清液准备测定。

1.4 Luminex system (LumAvidin Beads) 检测

将上清液在高速冷冻离心机中 13 000~14 000 r/min 离心 15 min, 弃沉淀。计算标准浓度, 按照标准双份和待测标本需依次垂直放置的工作表位置在 96 孔超滤板上做好标记。每孔加入 100 μ l 缓冲液。避光密闭混匀后室温下 100 r/min 转速摇晃 10 min, 负压真空吸引移除缓冲液。将球形基质 1500 r/min 震荡 5 min 后, 吸取 50 μ l 加入各个孔。对照标准孔内每孔加入 50 μ l 标准蛋白, 而待测孔内每孔加入 50 μ l 上清液。密闭避光后室温摇晃孵育 2 h。负压真空吸引移除孔内液体, 每孔用 200 μ l 洗涤液洗涤 3 次后负压真空吸引移除洗涤液。每孔加入 50 μ l 稀释的生物素抗体混合液。密闭避光后室温摇晃孵育 1 h。负压真空移液, 洗涤 3 次。将 50 μ l 稀释 Streptavidin-PE 加入各个孔。密闭避光后室温摇晃孵育 30 min。负压真空移液, 洗涤 3 次。每孔加入 100 μ l 缓冲液。密闭避光后室温摇晃孵育 2 min。运行 Luminex 进行检测。

1.5 统计学处理

所得计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SSPS10.0 软件包处理数据, 用独立样本 *t* 检验及偏相关进行分析, 显著水平为 $\alpha < 0.05$ 。

2 结果

2.1 MMPs 在分泌期中期子宫内膜间质细胞、早孕蜕膜间质细胞及绒毛外滋养层细胞的表达特点(图 1)

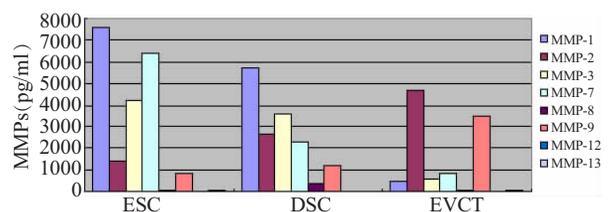


图 1 MMP 在 ESC、DSC 及 EVCT 中表达特点

Fig.1 Expression of MMPs in ESC, DSC and EVCT

在分泌中期子宫内膜间质细胞、蜕膜间质细胞及绒毛外滋养层细胞的培养上清液中, MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9 均有表达, 但其表达水平不同, MMP-12 及 MMP-13 分别在 ESC 及 DSC 中无表达, 且三类细胞培养中 MMP-8、MMP-12、MMP-13 表达均低于 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9 的表达水平。

图 1 显示, 子宫内膜间质细胞中 MMP-1、MMP-7、MMP-3、MMP-2、MMP-9 的表达依次降低, 在蜕膜间质细胞中 MMP-1、MMP-3、MMP-2、MMP-7、MMP-9 的表达依次降低, 在绒毛外滋养层细胞中 MMP-2、MMP-9、MMP-7、MMP-3、MMP-1 的表达依次降低, 但以 MMP-2、MMP-9 高表达尤为显著。

2.2 分泌中期子宫内膜间质细胞和早孕蜕膜间质细胞培养上清液中 MMP 的浓度比较

与分泌中期子宫内膜间质细胞相比, MMP-1、MMP-3、MMP-7 在蜕膜间质细胞中浓度降低, 其中 MMP-1、MMP-7 有显著性差异 ($P < 0.05$), 而 MMP-2、-8、-9 在蜕膜间质细胞中则升高, 其中 MMP-2、-8 有显著性差异 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 子宫内膜间质细胞和蜕膜间质细胞培养上清液中 MMPs 的浓度比较

Tab.1 Comparison of MMP levels between the supernatant of the ESCs and DSCs (Mean±SD, pg/ml)

Cytokine	ESC(n=5)	DSC(n=5)	t	P
MMP-1	75877.10±7072.22	57323.30±2374.30	5.561	0.001
MMP-2	13942.13±2365.38	26540.85±4540.43	5.503	0.001
MMP-3	42134.86±5093.71	36359.35±2779.84	2.226	0.057
MMP-7	63926.79±3479.28	22634.21±3534.34	18.617	<0.001
MMP-8	594.13±45.94	3732.04±308.00	22.532	<0.001
MMP-9	8055.50±4370.29	11631.57±1613.08	1.717	0.124
MMP-12	0.00±0.00	245.69±48.79	11.261	<0.001
MMP-13	404.91±21.76	000±000	41.607	<0.001

2.3 早孕期蜕膜基质细胞和绒毛外滋养层细胞培养上清液中 MMP 的浓度比较

与蜕膜基质细胞相比, MMP-1、MMP-3、MMP-7 在绒毛外滋养层细胞中表达显著降低 ($P < 0.05$)。MMP-2、MMP-9、MMP-13 在绒毛外滋养层细胞中明显升高 ($P < 0.05$), 且以 MMP-2、MMP-9 高表达尤为显著(表 2)。

2.4 分泌中期子宫内膜间质细胞, 早孕蜕膜间质细胞及绒毛外滋养层细胞培养上清液中 MMPs 表达间的相关关系

选 MMP-12、-13 为控制变量, 因其在细胞培养中表达量低, 且其间表达变化不显著, MMP-2 与 MMP-9 相关关系显著 ($P < 0.05$), 且关系较密切($r=0.6645$)。MMP-1、MMP-3、MMP-7、MMP-8 两两间相关关系

表 2 蜕膜间质细胞和绒毛外滋养层细胞培养上清液中 MMPs 的浓度比较

Tab.2 Comparison of MMP levels in the supernatant of DSC and EVCT (Mean±SD, pg/ml)

Cytokine	DSC(n=5)	EVCT(n=5)	t	P
MMP-1	57323.30±2374.30	4587.57±435.97	49.563	<0.001
MMP-2	26540.85±4540.43	46750.99±3569.34	6.998	<0.001
MMP-3	36359.35±2779.84	5647.30±159.89	22.229	<0.001
MMP-7	22634.21±3534.34	8485.12±336.48	12.04	<0.001
MMP-8	3732.04±308.00	545.316±31.49	23.076	<0.001
MMP-9	11631.57±1613.08	35106.91±2443.79	9.933	<0.001
MMP-12	245.69±48.79	240.68±22.38	0.501	0.630
MMP-13	0.00±0.00	438.58±35.63	99.441	<0.001

显著 ($P < 0.05$), 且关系密切 ($r > 0.7340$)。其它 MMP 之间相关关系不显著(表 3)。

表 3 6 种 MMPs(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9)之间的偏相关性分析(n=11)(r 值)(控制变量为 MMP-12、MMP-13)

Tab.3 Partial correlation among the MMPs (controlling for MMP-12 and MMP-13)

Cytokine	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-8	MMP-9
MMP-1	r= 1.0000	-.4549	.9758	.9577	.7340	-.4444
	P= .	.118	.000	.000	.004	.128
MMP-2	r= -.4549	1.0000	-.3773	-.5107	-.0792	.6645
	P= .118	.	.204	.075	.797	.013
MMP-3	r= .9758	-.3773	1.0000	.9349	.7230	-.4370
	P= .000	.204	.	.000	.005	.135
MMP-7	r= .9577	-.5107	.9349	1.0000	.7060	-.5031
	P= .000	.075	.005	.	.007	.080
MMP-8	r= .7340	-.0792	.7230	.7060	1.0000	-.0912
	P= .004	.797	.005	.007	.	.767
MMP-9	r= -.4444	.6645	-.4370	-.5031	-.0912	1.0000
	P= .128	.013	.135	.080	.767	.

3 讨论

本实验结果显示: 在子宫内膜种植窗期, MMP-1、MMP-7、MMP-3 的表达量高于 MMP-2、MMP-9 的表达, 这与既往研究 MMP-2、MMP-9 在子宫内膜的重塑及种植窗期高表达不同, 提示在子宫内膜种植窗期, 起关键作用的不仅仅 MMP-2、MMP-9, MMP-1、MMP-3、MMP-7 可能发挥着更重要的作用 [7-9]。结果同时表明: 在蜕膜间质细胞中, MMP-1、MMP-3、MMP-7 的表达高于 MMP-2、MMP-9 的表达, 但相对于分泌中期子宫内膜细胞而言, MMP-2、MMP-9 在蜕膜间质细胞及绒毛外滋养层细胞中的表达明显升高, 而 MMP-1、MMP-3、MMP-7 则相反, 提示在胚胎植入过程中, 内膜的 ECM 可能发生了广泛的重塑, 导致以分解明胶、IV 型胶原等为主的明胶酶类蛋白酶 MMP-2、MMP-9 在此过程中分泌逐渐升高, 分解 ECM, 启动滋养层黏附、迁移和分

化,滋养层穿透基膜到达母体循环后,受雌、孕激素调节,MMP-1、MMP-3、MMP-7 的表达受到了抑制,从而影响到不同种类细胞表达 MMPs 量的变化。这与 Shimonovitz 等^[8]实验结果相一致,提示它们在防止胚胎侵入过度而造成病理妊娠中起一定作用。研究也表明,在蜕膜间质细胞及绒毛外滋养层细胞中 MMP-1、MMP-3、MMP-7 的表达量与 MMP-2、MMP-9 的表达量,存在着此消彼长的过程,可能提示在胚胎植入与胎盘形成过程中,母-胎界面间分泌的因子间存在着一定的网络级联关系,共同调节着 MMP 的分泌,进而有效的调节着滋养层细胞的有节制的侵入。

本研究结果也表明,在妊娠早期,MMP-2、MMP-9 的表达是逐渐增加的过程,提示 MMP-2、-9 可能是影响滋养层细胞侵入的关键性因子,在母-胎对话中发挥了最关键因素。但 MMP-2 表达高于 MMP-9 这一结论与 Polette 等^[9]的发现不一致,说明 MMP-2 亦可能有其更重要的作用,且可能是人滋养细胞侵入子宫内膜的主要蛋白酶。而相关性分析表明二者之间存在密切关系,进一步提示,可能是二者之间存在相互协调、相互影响关系,或其它 MMPs 及内在调节剂对二者表达影响的结果,这一点尚待扩大样本量或改进实验方法,进一步研究证实。相关性分析同时表明了 MMP-1、MMP-3、MMP-7、MMP-8 两两之间相关关系密切,相对 ESC 而言,MMP-2、MMP-9 在 DSC 与 EVCT 中同时升高,而 MMP-1、MMP-3、MMP-7、MMP-8 则相反,提示 MMP-2、-9 与 MMP-1、MMP-3、MMP-7、MMP-8 可能分别在不同的组织细胞中发挥着主要作用。多种 MMP 之间也可能存在相互调控和平衡的作用,对于重建基质和防止滋养层细胞的异常侵入是很关键的。研究结果也证实了,利用 Luminex 同时检测种植窗期子宫内膜间质细胞、蜕膜基质细胞与绒毛外滋养层细胞培养上清液中多种 MMP 的表达与既往研究单一细胞中少数几个 MMPs 分泌的表达量存在差异,进一步提示母胎对话过程中,调节滋养层细胞侵入的可能不仅仅是单个 MMP 起作用,而是多个 MMP 之间可能存在着相互协调,相互制约的作用,也可能是滋养层自分泌和子宫旁分泌共同作用的结果。

在本实验的 MMPs 谱结果分析中发现,MMP-8、MMP-12、MMP-13 无论在子宫内膜细胞中还是在滋养层细胞及蜕膜细胞中均为低表达或无表达,即使在具有较强的侵蚀生物学特性的滋养细胞中,MMP-8、-12、-13 的表达也明显弱于 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9 的表达量,这可能提示虽然

MMP-8、-12、-13 自身可以降解细胞外基质,但在子宫内蜕膜化、滋养层细胞侵入过程中,其作用有限,可能起着协调 MMPs 平衡表达的作用,以维持妊娠的顺利进行。而关于 MMP-8、MMP-12、MMP-13 研究,国内外少有文献报道,对其在女性生殖生理方面的了解尚不清楚。

总之,利用 Luminex 同时检测着床窗期子宫内膜细胞、早孕期滋养层细胞和蜕膜间质细胞培养上清液中多种 MMP 的表达,与既往研究少数几个 MMP 分泌的表达量存在差异。不同种类组织细胞均可分泌多种 MMP,但所表达的量与种类有所不同,这为探索正常早期妊娠的分子机制提供理论依据。在胚胎着床和胎盘形成过程中,MMP-1、MMP-3、MMP-7 及 MMP-2、MMP-9 分别在蜕膜及滋养层细胞中发挥主要作用,而 MMP-8、MMP-12、MMP-13 则可能起着协调上述 MMPs 分泌量的作用。但本研究仅局限于 MMPs 自身研究,由于缺乏组织金属蛋白酶抑制剂试剂,没有对其内源性抑制剂进行研究,与已有研究相悖的地方尚待扩大样本量或改进实验方法,进一步研究分析。

参考文献:

- [1] Wu EX, Wang FF, Norman M. Matrix metalloproteinases [J]. Life Sci Res, 1999, 3(3): 175-95.
- [2] Nardo L, Nikkas G, Makrigiannakies A. Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinase, cytokines and growth factors[J]. J Reprod Med, 2003, 48(3): 137-47.
- [3] Nuttal RK, Kennedy TG. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor increase the production of matrix metalloproteinases during *in vitro* decidualization of rat endometrial stromal cells [J]. Endocrinology, 2000, 141(2): 629-36.
- [4] 唐雪莲, 谢梅青, 张凤丽. 高纯度分离子宫内膜腺上皮及间质细胞和体外培养技术[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2003, 24(6): 589-92.
- [5] 冷颖, 杨勿妹. 钙调素拮抗剂对离体培养人蜕膜细胞形态和活力的影响[J]. 生殖与避孕, 1997, 17(2): 76-81.
- [6] 彭文, 江森, 戴笙. 白细胞介素 6 在滋养层细胞胎盘生长因子表达调控中的作用[J]. 中华妇产科杂志, 2003, 38(2): 89-90.
- [7] 洪丽华, 周馥贞, 黄荷凤. 不明原因不孕妇女子宫内种植窗期 MMP-9 和 TIMP-1 的表达 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2002, 31(3): 159-62.
- [8] Shimonovitz S, Hurwitz A, Dushnik O, et al. Developmental regulation of the expression of 72 and 92 kD type IV collagenases in human trophoblasts: a possible mechanism for control of trophoblasts invasion [J]. Am J Obstet Gynecol, 1994, 171 (7): 832-8.
- [9] Polette M, Naw Rocki B, Pintiaux C, et al. Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitor by cells of early and term human placenta and gestational endometrium [J]. Lab Invest, 1994, 71(6): 838-46.