

基质金属蛋白酶 MMP-26 能有效促进人绒毛膜上皮癌细胞 JEG-3 浸润能力*

吴晓秋^{1,2)} 李玉侠²⁾ 付雅媛²⁾ 李殿俊¹⁾ SANG Qing-Xiang³⁾ 王雁玲^{2)**}

⁽¹⁾哈尔滨医科大学基础医学院免疫教研室, 哈尔滨 150086;

⁽²⁾中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080;

⁽³⁾Department of Chemistry and Biochemistry and Institute of Molecular Biophysics, Florida State University, Tallahassee, FL 32306, USA)

摘要 胚胎植入过程中, 滋养层细胞浸润与肿瘤的迁移过程非常相似, 但显著的区别在于前者是受严格调控的有节制的浸润, 基质金属蛋白酶 (MMPs) 的许多成员在其中起重要的作用. MMP-26 是近年来发现的 MMPs 家族的新成员, 它在滋养层细胞中的作用所知甚少. 利用国际常用的人滋养层细胞模型——人绒毛膜上皮癌细胞系 (JEG-3) 作为体外实验模型, 探讨 MMP-26 在人滋养层细胞浸润调节中的作用. 将含有 MMP-26 全长 cDNA 的 pCR3.1 质粒转染到 JEG-3 细胞中, 获得过量表达 MMP-26 基因的稳定细胞系 JEG-3/MMP-26; 细胞浸润分析表明 JEG/MMP-26 细胞的浸润能力较母本细胞明显增强; RT-PCR 和明胶酶谱分析显示 JEG-3/MMP-26 细胞中 MMP-9 的表达和分泌水平提高; 双荧光免疫细胞化学进一步显示 MMP-26 和 MMP-9 蛋白在细胞中有共定位现象. 上述结果表明 MMP-26 能有效促进人滋养层细胞浸润, 其作用可能是通过与其他 MMP 分子 (如 MMP-9) 的协调来实现的.

关键词 基质金属蛋白酶, JEG-3 细胞, 细胞浸润, 人滋养层细胞

学科分类号 Q492

胚胎来源的滋养层细胞向母体子宫内膜的浸润是正常胚胎植入以及胎盘形成的关键环节. 滋养层细胞向周围组织浸润的过程中, 需要降解基底膜和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)、丝氨酸蛋白酶、色氨酸蛋白酶等大量蛋白水解酶参与这一过程^[1~3].

MMP-26 是 2000 年发现的 MMPs 家族的一个新成员, 也是该家族中最小的成员, 它能有效降解纤维蛋白原和纤粘连蛋白等多种 ECM. MMP-26 主要存在于上皮起源的肿瘤中, 如肺癌、乳腺癌、子宫内膜癌和前列腺癌及其相应的细胞系, 在正常人体组织中, MMP-26 仅特异表达于子宫、胎盘和肾脏中^[4~7], 推测这一分子在调节雌性生殖系统功能中可能发挥重要的作用.

我们的前期工作发现, MMP-26 广泛存在于人胎盘滋养层细胞中, 其水平于妊娠早期较高, 随着妊娠周龄的增加而降低, 至妊娠中期和足月期达到很低的水平, 提示 MMP-26 可能参与妊娠早期滋

养层细胞的行为调节^[8]. Zhao 等^[9]在前列腺癌细胞中发现 MMP-26 可以通过激活 MMP-9 提高细胞的浸润能力. 由于人胎盘滋养层细胞的浸润行为与肿瘤细胞的迁移行为非常类似, 不同点在于前者是受到严格时空调控的, 因而滋养层细胞被称为“假恶性”细胞. 以往的研究表明滋养层细胞可表达多种 MMP 分子, 它们可通过多种方式促进滋养层细胞浸润^[10]. 那么, MMP-26 是否亦对滋养层细胞的浸润行为起调节作用, 其作用的机制如何, 这些是我们所关注的问题.

目前尚缺乏适宜的人正常滋养层细胞模型, 而绒毛膜上皮癌细胞系——JEG-3 细胞的多种行为与正常滋养层细胞有一定的相似之处, 因而被广泛地应用于人类滋养层细胞行为调节的研究中. 本工作

*国家自然科学基金资助项目 (30530760, 30370542).

** 通讯联系人. Tel: 010-62631832, Fax: 010-62529248

E-mail: wangyl@ioz.ac.cn

收稿日期: 2006-03-15, 接受日期: 2006-04-26

以 JEG-3 细胞为模型, 通过基因转染方法, 研究 MMP-26 对细胞浸润行为的影响及其作用的途径, 以期探讨 MMP-26 参与人滋养层细胞浸润调控的机理.

1 材料与方法

1.1 人绒毛膜上皮癌细胞系 (JEG-3 细胞) 的培养

JEG-3 细胞购买于美国 ATCC 细胞库. 冻存于液氮的 JEG-3 细胞经复苏后, 于 37℃ 5% CO₂ 条件下培养于含 10%胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺和 1 mmol/L 丙酮酸钠的 DMEM 培养液中, 经 3 次传代稳定后, 进行基因转染.

1.2 基因转染和稳定转染细胞株的筛选

采用 LipofectAMINE 2000 (Invitrogen 公司) 系统进行基因转染. pCR3.1 质粒是一种真核表达质粒, 常用来构建特异基因的真核表达体系. 带有 MMP-26 全长 cDNA 的 pCR3.1 质粒 (pCR3.1-MMP26) 由美国佛罗里达州立大学 Zhao 等^[9]构建并赠送. 按照试剂说明将 pCR3.1-MMP26 质粒转染 JEG-3 细胞 24 h 后, 加入 200 mg/L Geneticin (G418; Invitrogen 公司) 筛选一周, 将存活细胞克隆并逐代扩增, 获得稳定转染的细胞株, 命名为 JEG-3/MMP-26. 同时用 pCR3.1 空质粒转染 JEG-3 细胞, 并筛选稳定细胞株作为阴性对照, 命名为 JEG-3/pCR3.1.

1.3 细胞浸润实验

将有 8 μm 小孔聚碳酸酯滤膜的培养小室 (Transwell Insert; CORNING) 上铺 0.05 g/L I 型胶原 (Cellmatrix Type I -A; 生化研究所, Osaka, 日本) 后, 接种 100 μl JEG-3 细胞 (1×10⁵/ml), 培养小室及其下层培养皿中均加入含 10%血清的 DMEM 培养液. 20 h 后, 取出培养小室, 用 2.5%戊二醛固定 15 min, 并以 0.5% Triton X-100 处理 3 min, 苏木精中染核 15 min. 将培养小室倒置, 在光学显微

镜 (Leica, 德国) 下观察、照相, 并计数滤膜底面的细胞数. 以 JEG-3/MMP-26 细胞的浸润细胞数为 100%, 计算其他细胞浸润的百分率.

1.4 蛋白质印迹分析

向细胞内加入 200 μl 蛋白质裂解液 (20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 含 1 mmol/L DTT, 0.2% NP40, 100 μmol/L PMSF, 5 mg/L aprotinin, chymostatin, leupeptin, pristine 和胰蛋白酶抑制剂等), 置于冰上 5~10 min, 吸出裂解液, 于 4℃ 13 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液. 25 μg 蛋白质经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转移至硝酸纤维素膜. 硝酸纤维素膜经 5%脱脂牛奶室温孵育 2 h 后, 用兔抗人 MMP-26 抗体^[9] (1:500) 或 Actin 抗体 (1:1 000, 北京中山公司) 室温孵育 2 h. 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 溶液 (1:2 000, Santa Cruz 公司) 室温孵育 1 h. 按照 ECL 免疫检测试剂盒 (Pierce 公司) 说明进行显色、曝光、X 光片冲洗. 结果扫描后, 经 Gel-Pro Analyzer (软件版本 4.0, 美国 United Bio 公司) 进行灰度定量分析.

1.5 细胞总 RNA 的提取和半定量 RT-PCR

根据 TRIzol 试剂 (Gibco BRL 公司) 的说明提取培养细胞的总 RNA, 紫外分光光度计定量后, 冻存于 -80℃. 取 1 μg 总 RNA, 在 20 μl 体系中用 oligo(d)T 引物和 SuperScript II 逆转录酶进行逆转录反应, 随后取出 1 μl 产物进行 PCR 反应. 根据 NCBI 数据库提供的人 MMP-26 和 MMP-9 cDNA 序列设计特异 PCR 引物 (引物序列等信息见表 1). 经预实验确定 PCR 反应的“指数期”, 选取在“指数期”内, 且经凝胶电泳能检测到反应产物的最小扩增循环数, 进行半定量 PCR 反应. 结果以相同起始模板量的管家基因 GAPDH 扩增产物进行校正. 反应产物经 2%琼脂糖凝胶电泳, 紫外光下凝胶成像, 经 Gel-Pro Analyzer 软件进行灰度定量分析.

Table 1 Primer sequences and reaction conditions for semi-quantitative RT-PCR

Gene name		Primer sequence	Product size / bp	T_m / °C	Cycle number
MMP-26	Sense	5' CATTAAGGTATGTCAGATGAA 3'	232	54	30
	Antisense	5' CCATTTTGACAAGAATGAACA 3'			
MMP-9	Sense	5' GTGCTGGGCTGCTGCTTTGCT 3'	350	68	30
	Antisense	5' GTCGCCCTCAAAGTTTGGA 3'			
GAPDH	Sense	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	452	55	22
	Antisense	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'			

1.6 双荧光免疫细胞化学

细胞在丙酮:无水乙醇=1:1溶液中固定15 min后,用1%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭30 min,同时加入兔抗人MMP-26抗体^[9](1:100)和鼠抗人MMP-9抗体(1:100, Santa Cruz公司),4℃孵育过夜,加入FITC标记的羊抗兔IgG抗体(1:100, Santa Cruz公司)和TRIAT标记的羊抗鼠IgG抗体(1:100, Santa Cruz公司),37℃孵育30 min,最后用Hochester染核2 min,甘油封片,于激光共聚焦扫描显微镜下(Leica公司)观察分析照相.阴性对照实验以兔IgG和鼠IgG代替一抗进行免疫显色反应.

1.7 明胶酶谱分析

取适量细胞培养液,以1:1与样品缓冲液(8% SDS, 40% 甘油, 0.04% 溴酚蓝, 0.25 mol/L Tris-HCl, pH 6.8)混合,37℃放置30 min;样品于含1 g/L明胶的10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳2 h.将凝胶在含2.5% Triton X-100的Tris缓冲液中室温洗1 h,于孵育液(150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6)中37℃孵育过夜.0.1%考马斯亮蓝R-250染色60 min,用脱色液(10% 甲醇, 5% 冰醋酸)脱色.

凝胶经扫描后,用Gel-Pro Analyzer软件进行灰度定量分析.

1.8 统计分析

每组实验均用不同批次的细胞重复至少三次.蛋白质印迹结果和半定量RT-PCR结果分别以相应的Actin和GAPDH作为内参照,计算出相对灰度值.将至少三次的实验结果进行ANOVA统计分析,表示为 $\bar{x} \pm s$, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结 果

2.1 外源转染MMP-26基因在JEG-3细胞中的稳定表达

含有MMP-26全长cDNA的pCR 3.1质粒或pCR 3.1空质粒转染JEG-3细胞,经G418筛选获得的细胞分别命名为JEG-3/MMP-26和JEG-3/pCR3.1.半定量RT-PCR和蛋白质印迹分析显示,JEG-3和JEG-3/pCR3.1细胞中,MMP-26水平非常低,其蛋白质表达量几乎检测不到,而JEG-3/MMP-26细胞中,MMP-26的mRNA和蛋白质水平显著增高(图1),且细胞经10次传代后,仍保持MMP-26的高表达,表明MMP-26 cDNA已成功导入细胞中,呈现稳定的过量表达.

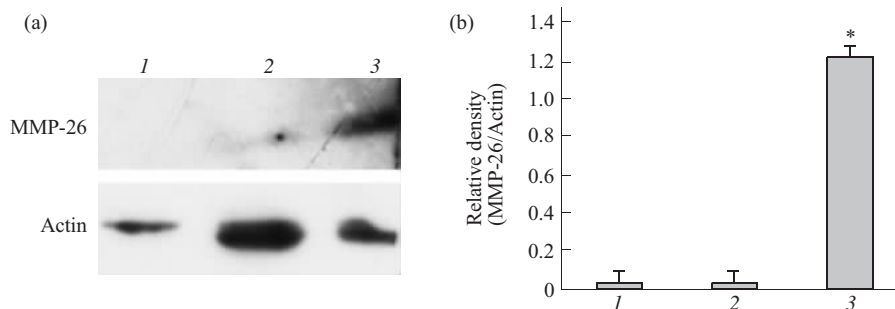


Fig. 1 Western blotting to manifest the gene transfection result of MMP-26 in human choriocarcinoma cell line-JEG-3

(a) A typical result of Western blotting. 1, 2 and 3 represent protein extracts derived from parental JEG-3 cells, JEG-3 cells transfected with pCR3.1 plasmid and JEG-3 cells transfected with pCR3.1 plasmid containing MMP-26 cDNA, respectively.

(b) Statistical analysis by ANOVA for the Western blotting according to three independent experiments. The value of MMP-26 was normalized by that of actin, and the relative amount was presented as $\bar{x} \pm s$. *Compared with the relative density of bar 2, $P < 0.05$. 1: JEG-3; 2: JEG-3/pCR3.1; 3: JEG-3/MMP-26.

2.2 过量表达MMP-26对JEG-3细胞浸润能力的影响

细胞浸润实验显示,在铺有I型胶原的培养小室中,JEG-3和JEG-3/pCR3.1细胞的浸润能力均较弱,而JEG-3/MMP-26细胞的浸润能力明显增强,接种20 h后,侵入胶原并达到培养小室底部

的JEG-3/MMP-26细胞数达到JEG-3/pCR3.1细胞数的约9倍(图2).

2.3 过量表达MMP-26对JEG-3细胞中MMP-9表达的影响

半定量RT-PCR结果显示,JEG-3和JEG-3/pCR3.1细胞中MMP-9的mRNA水平非常

低且无显著差异, JEG-3/MMP-26 细胞中, MMP-9 为 30% (图 3).
水平较 JEG-3/pCR3.1 细胞有所增高, 增加幅度约

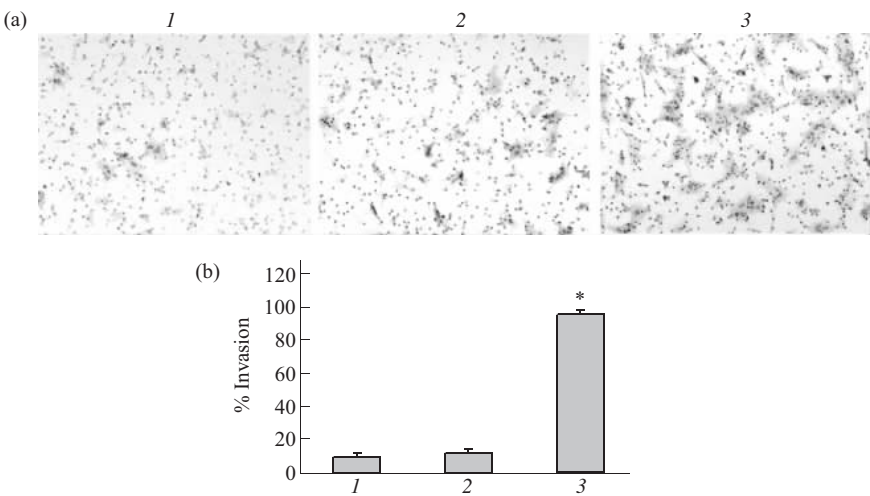


Fig. 2 Transwell invasion assay to show the influence of MMP-26 on JEG-3 cell invasion
(a) A typical result of transwell invasion experiment observed with light microscopy. 1, 2 and 3 represent parental JEG-3 cells, JEG-3 cells transfected with pCR3.1 plasmid and JEG-3 cells transfected with pCR3.1 plasmid containing MMP-26 cDNA, respectively. (b) Statistical analysis by ANOVA for the transwell invasion assay. The invaded cells in 5 random fields per well were counted, and the experiment was repeated for at least three times. *Compared with JEG-3/pCR3.1, $P < 0.05$. 1: JEG-3; 2: JEG-3/pCR3.1; 3: JEG-3/MMP-26.

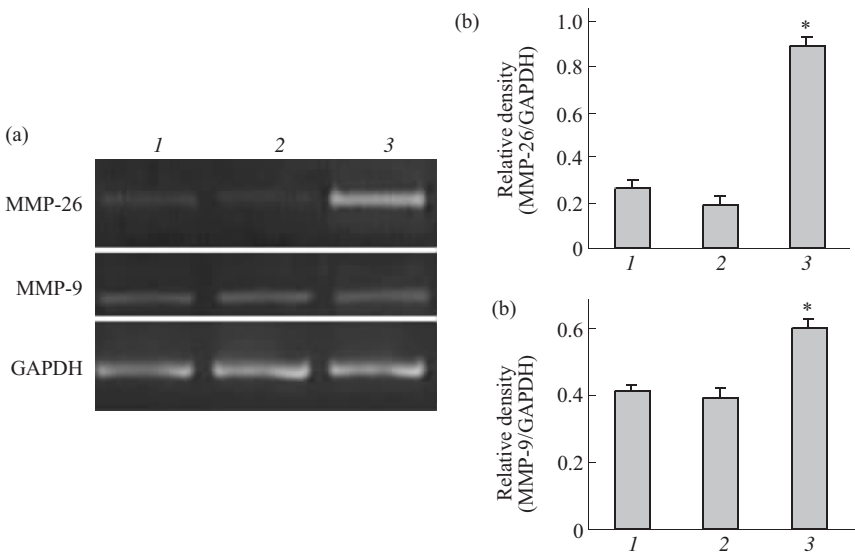


Fig. 3 Semi-quantitative RT-PCR to manifest the change of MMP-9 expression in JEG-3 cells with over-expressed MMP-26

(a) Products of a typical RT-PCR were subjected to 2% agarose gel electrophoresis. 1, 2 and 3 represent RNA extracts derived from parental JEG-3 cells, JEG-3 cells transfected with pCR3.1 plasmid and JEG-3 cells transfected with pCR3.1 plasmid containing MMP-26 cDNA, respectively. (b), (c) Statistical analysis by ANOVA for the semi-quantitative RT-PCR according to three independent experiments. The value of MMP-26 and MMP-9 was normalized by that of GAPDH, and the relative amount was presented as $\bar{x} \pm s$. * Compared with the value of JEG-3/pCR3.1, $P < 0.05$. 1: JEG-3; 2: JEG-3/pCR3.1; 3: JEG-3/MMP-26.

明胶酶谱分析显示, JEG-3 和 JEG-3/pCR3.1 细胞分泌的酶原型 MMP-9 蛋白量非常低, 几乎难以检测到, 而 JEG-3/MMP-26 细胞分泌的酶原型 MMP-9 水平明显增加, 达到 JEG-3/pCR3.1 细胞的 3 倍 (图 4).

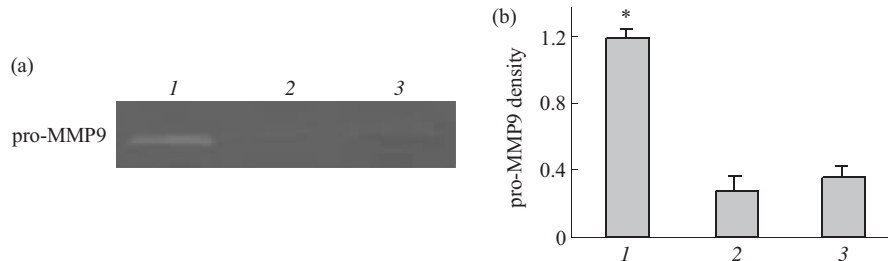


Fig. 4 Gelatin zymography to show the secretion of MMP-9 in JEG-3 cells

(a) A typical result of zymography. 3, 2 and 1 represent media of parental JEG-3 cells, JEG-3 cells transfected with pCR3.1 plasmid and JEG-3 cells transfected with pCR3.1 plasmid containing MMP-26 cDNA, respectively. pro-MMP9 means the zymogen of MMP-9. (b) Statistical analysis by ANOVA for the zymography. The value of pro-MMP9 was presented as $\bar{x} \pm s$. * Compared with the value of JEG-3/pCR3.1, $P < 0.05$. 1: JEG-3/MMP-26; 2: JEG-3/pCR3.1; 3: JEG-3.

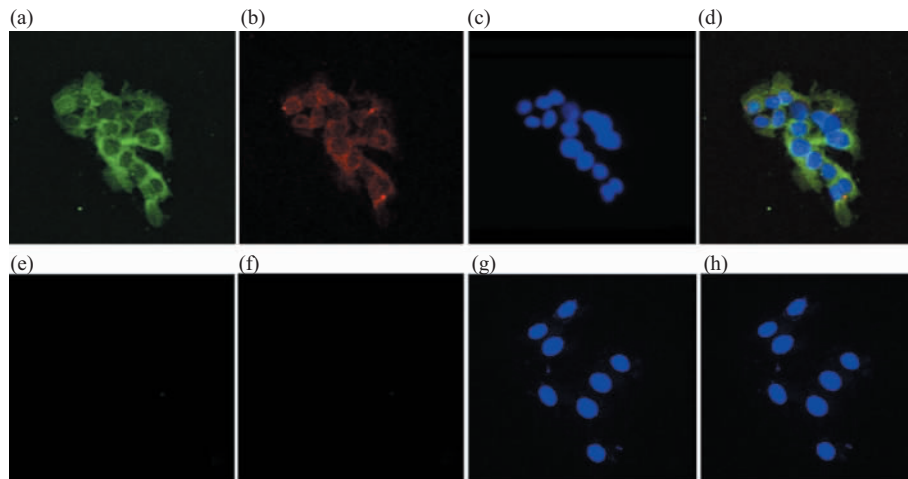


Fig. 5 Double immunofluorescent staining to show the localization of MMP-26 and MMP-9 in JEG-3/MMP-26 cells

(a) Green color represents the immunoreactivity of MMP-26. (b) Red color represents the immunostaining of MMP-9. (c) Cell nuclear was stained by Hoechst as blue color. (d) Overlapping of (a), (b) and (c). (e) and (f) Negative control for (a) and (b), separately. (g) Cells in (e) and (f) were stained by Hoechst to show the cell nuclear. (h) Overlapping of (e), (f) and (g).

3 讨 论

本工作利用人绒毛膜上皮癌 JEG-3 细胞研究了 MMP-26 对细胞浸润的影响及其可能的作用途径。结果表明, MMP-26 能够显著提高 JEG-3 细胞的浸润能力, 其作用可以通过上调 MMP-9 的表达实现。

2.4 MMP-26 和 MMP-9 在 JEG-3 细胞中的共定位

双荧光免疫细胞化学结果显示, JEG-3/MMP-26 细胞中, MMP-26 和 MMP-9 主要定位于细胞质中。激光共聚焦扫描显微图像分析显示, MMP-26 和 MMP-9 的大部分信号发生重叠, 表明这两种分子在细胞内的表达存在共定位现象 (图 5)。

这是首次在人滋养层细胞模型中明确 MMP-26 的作用, 有助于深入理解 MMP-26 参与胚胎植入和胎盘发生的机制。

MMP-26 为新近发现的 MMP 家族成员, 它在月经周期分泌中期的子宫内膜呈现高水平表达, 此

时是子宫内膜对植入胚胎呈现可接收性的重要时期, 提示此分子可能参与子宫内膜组织重建, 以利于胚胎植入^[11,12]. 进而 Qiu 等^[9]的研究发现 MMP-26 大量表达于妊娠早期胎盘滋养层细胞中, 随妊娠周龄增加其水平有所下降, 至妊娠中、晚期达到极低水平, 提示这一蛋白酶参与胚胎植入期滋养层细胞的功能调节. 但这一观点迄今未得到有效的实验证据, 有关 MMP-26 在雌性生殖系统中的作用尚未阐明.

一个已得到共识的观点是, 滋养层细胞的浸润行为与与肿瘤细胞迁移具有很多相似的生化机制. 近来, Zhao 等^[9]和 Uria 等^[5]在肿瘤细胞中的研究表明, MMP-26 本身可能不直接参与细胞浸润行为的调节, 而是通过切割酶原型 MMP-9 的 Ala93-Met94 位点激活 MMP-9, 产生活性形式 MMP-9, 从而促进肿瘤细胞的浸润和迁移. JEG-3 细胞来源于人绒毛膜上皮癌组织, 是目前广泛使用的人滋养层细胞模型. 本工作在 JEG-3 细胞中过表达 MMP-26, 发现细胞的浸润能力显著提高, 提示 MMP-26 可能参与人滋养层细胞浸润能力的调节. 进一步研究表明, 过量表达 MMP-26 的 JEG-3 细胞中, MMP-9 的 mRNA 水平和分泌量均明显增加, 双荧光免疫细胞化学显示, MMP-26 和 MMP-9 在细胞中共定位. 结合我们前期工作中的发现, 即妊娠早期母胎界面上, MMP-26 和 MMP-9 均分布于多种绒毛滋养层细胞中, 且均于妊娠早期维持高水平, 并随妊娠周龄的增加而降低, 二者具有相似的时空变化模式^[8,13], 提示滋养层细胞中 MMP-26 和 MMP-9 之间可能存在协调关系. 以往大量的研究已发现滋养层细胞浸润需要多种 MMPs 分子的参与^[10], MMP-2 和 MMP-9 是其中非常重要的两个分子, Xu 等^[14,15]在体外培养的人细胞滋养层细胞中证实 MMP-9 参与降解细胞外基质以促进滋养层细胞浸润. 上述这些结果提示在人滋养层细胞中, MMP-26 能够有效促进细胞浸润, 其作用可能是直接的, 也可能通过与 MMP-9 等分子的协调而发挥.

有关 MMP-26 激活 MMP-9 表达的机制是值得探讨的问题. 虽然在其他肿瘤细胞中的研究发现, MMP-26 可以激活酶原型 MMP-9, 产生活性 MMP-9, 但由于 JEG-3 细胞中 MMP-9 的水平非常低, 在过表达 MMP-26 的细胞中, 我们利用明胶酶谱分析仍未能检测到活性形式 MMP-9, 只是发现酶原型 MMP-9 的水平有所增高, 所以目前尚不

能确定 JEG-3 细胞中 MMP-26 除了促进 MMP-9 的表达而外, 是否能够进一步激活 MMP-9. 已有的研究表明, 多种 MMP 分子可以通过降解 ECM 成分产生 ECM 生物活性片段或释放结合在 ECM 上的生长因子和细胞因子, 从而调节细胞行为^[10,16]. MMP-26 也可以有效降解纤维蛋白原和纤粘连蛋白等多种 ECM, 推测 JEG-3/MMP-26 细胞中过量表达的 MMP-26 有可能通过上述方式改变了细胞所处的微环境, 从而使 MMP-9 的表达得到上调. 这一推测还需要更多的实验证据加以支持.

本工作中使用的 JEG-3 细胞为人绒毛膜上皮癌细胞系, 国际上广泛用其研究人滋养层细胞功能. 但我们以往的研究也发现这一细胞中一些 MMPs 分子的表达模式与人正常滋养层细胞有明显不同, 如 MMP-26 和 MMP-9 水平就较正常细胞滋养层细胞明显低下^[17,18], 推测其浸润行为的调节与正常滋养层细胞可能有不同之处. 因此, 我们目前尚不能肯定在正常滋养层细胞中 MMP-26 是否也可通过上调 MMP-9 而发挥促进浸润的作用, 这还需要在正常细胞模型中展开深入研究, 但 JEG-3 细胞中的研究结果将成为重要的借鉴和比较资料.

参 考 文 献

- 1 Matrisian L M. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*, 1992, **14** (7): 455~463
- 2 McCawley L J, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*, 2000, **6**: 149~156
- 3 Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**(3): 163~176
- 4 Park H I, Ni J, Gerkema F E, *et al.* Identification and characterization of human endometase (matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. *J Biol Chem*, 2000, **275** (27): 20540~20544
- 5 Uria J A, Lopez Otin C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res*, 2000, **60** (17): 4745~4751
- 6 de Coignac A B, Elson G, Delneste Y, *et al.* Cloning of MMP-26. A novel matrilysin-like proteinase. *Eur J Biochem*, 2000, **267**(11): 3323~3329
- 7 Marchenko G N, Ratnikov B I, Rozanov D V, *et al.* Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin. *Biochem J*, 2001, **356** (pt3): 705~718
- 8 Qiu W, Bai S X, Zhao M R, *et al.* Spatio-temporal expression of matrix metalloproteinase-26 in human placental trophoblasts and fetal nucleated red cells during normal placentation. *Biol Reprod*, 2005, **72** (4): 954~959

- 9 Zhao Y G, Xiao A Z, Newcomer R G, *et al.* Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 2003, **278** (17): 15056~15064
- 10 Woessner J F, Nagase H. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. New York: Oxford University Press, 2000. 14~30
- 11 Chegini N, Rhoton-Vlasak A, Williams R S. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 and -4 in endometrium throughout the normal menstrual cycle and uterine bleeding. *Fertil Steril*, 2003, **80** (3): 564~570
- 12 Pilka R, Whatling C, Domanski H, *et al.* Epithelial expression of matrix metalloproteinase-26 is elevated at mid-cycle in the human endometrium. *Mol hum Reprod*, 2003, **9** (5): 271~277
- 13 Bai S X, Wang Y L, Qin L, *et al.* Temporal and spatial expression of MMP-2, -9 and -14 and the tissue inhibitor (TIMP-1,2,3) at the implantation site during tubal pregnancy of human. *Reproduction*, 2005, **129** (1): 103~113
- 14 Xu P, Wang Y L, Zhu S J, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biology of Reproduction*, 2000, **62** (4): 988~994
- 15 Xu P, Wang Y L, Piao Y S, *et al.* Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9 and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Biology of Reproduction*, 2001, **65** (1): 240~246
- 16 McCawley L J, Matrisian L M. Matrix Metalloproteinases: They're not just for matrix anymore. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13** (5): 534~540
- 17 仇巍, 赵亮, 柏素霞, 等. MMP-26 在人正常胎盘滋养层细胞中的表达及激活素 A 对其表达的调节. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (1): 25~30
- Qiu W, Zhao L, Bai S X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32** (1): 25~30
- 18 Bai S X, Fu Y Y, Kong G, *et al.* Comparative study on the effect of integrin $\alpha\beta 3$ on secretion of matrix metalloproteinases in human normal and carcinoma trophoblasts. *Prog Nat Sci*, 2005, **15** (11): 982~987

Effect of Matrix Metalloproteinase-26 on Cell Invasiveness in Human Choriocarcinoma Cell Line JEG-3 *

WU Xiao-Qiu^{1,2)}, LI Yu-Xia²⁾, FU Ya-Yuan²⁾, LI Dian-Jun¹⁾, SANG Qing-Xiang³⁾, WANG Yan-Ling^{2)**}

¹⁾Department of Immunology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China;

²⁾State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

³⁾Department of Chemistry and Biochemistry and Institute of Molecular Biophysics, Florida State University, Tallahassee, FL 32306, USA)

Abstract Trophoblast invasion during implantation mimics the process of tumor metastasis in some aspects, however with a significant difference in that the former is strictly controlled. Several members of matrix metalloproteinases (MMPs) family have been shown to play crucial roles in regulating trophoblast cell invasion. MMP-26 is a newly identified MMP family member, and its functions in human trophoblast cells have yet to be elucidated. A well-accepted human trophoblast cell model——choriocarcinoma cell line (JEG-3) was used as *in vitro* model to investigate the involvement of MMP-26 in trophoblast cell invasion. Expressing pCR3.1 plasmid containing MMP-26 cDNA was transfected into JEG-3 cells, and a stable cell line with over-expressed MMP-26 was named as JEG-3/MMP-26. Transwell insert invasion assay showed that cell invasiveness in JEG-3/MMP-26 cells was significantly promoted. Data of RT-PCR and gelatin zymography demonstrated that the mRNA expression and zymogen secretion of MMP-9 were increased in these cells. Double immunofluorescent staining revealed co-localization of MMP-26 and MMP-9 proteins in JEG-3/MMP-26 cells. The data indicated that MMP-26 was involved in invasion-promoting regulation of human trophoblast cells, and it may function, at least in part, through coordination with other MMPs such as MMP-9.

Key words matrix metalloproteinases (MMPs), JEG-3, cell invasion, human trophoblast

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30530760, 30370542).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62631832, Fax: 86-10-62529248, E-mail: wangyl@ioz.ac.cn

Received: March 15, 2006 Accepted: April 26, 2006