

膜蛋白 CD81 增强滋养细胞的黏附能力及机制研究

沈莉,李玉静,丁锦红,李强*

(南京大学医学院附属鼓楼医院,南京鼓楼医院妇产科,江苏 南京 210008)

摘要:目的 探讨 CD81 对滋养细胞黏附能力的影响及可能机制,以便阐明 CD81 参与子痫前期发病的具体机制。**方法** 体外培养永生化的孕早期绒毛外滋养细胞系 HTR-8/SVneo 细胞,并感染高表达 CD81 的腺病毒(Ad-CD81)或转染抑制内源性 CD81 的干扰 RNA (si-CD81)。采用细胞黏附实验检测 HTR-8/SVneo 细胞的黏附能力,采用免疫印迹法检测 HTR-8/SVneo 细胞中黏着斑激酶(FAK)的表达情况。**结果** 与感染 Ad-CTL 的细胞相比,感染 Ad-CD81 的 HTR-8/SVneo 细胞黏附能力增强,570 nm 处的光密度值显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与转染 si-CTL 的细胞相比,转染 si-CD81 的 HTR-8/SVneo 细胞黏附能力减弱,570 nm 处的光密度值显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。随着 Ad-CD81 浓度的增加,感染 Ad-CD81 的 HTR-8/SVneo 细胞中 FAK 的蛋白表达较 Ad-CTL 感染细胞逐渐下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。随着 si-CD81 浓度的增加,转染 si-CD81 的 HTR-8/SVneo 细胞中 FAK 的蛋白表达较 si-CTL 转染细胞逐渐增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 膜蛋白 CD81 可增强滋养细胞的黏附能力,其分子机制可能与 CD81 抑制滋养细胞中 FAK 的蛋白表达有关。

关键词:子痫前期;CD81;黏附;滋养细胞;黏着斑激酶

中图分类号:R714.2 **文献标志码:**A **文章编号:**2096-3882(2023)12-0869-05

DOI:10.3969/j.issn.2096-3882.2023.12.002

CD81 enhances the adhesion of trophoblasts and related mechanisms

SHEN Li, LI Yujing, DING Jinhong, LI Qiang*

(Department of Obstetrics and Gynecology, Nanjing Drum Tower Hospital,
Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: Objective To explore the effect of CD81 on trophoblast adhesion and related mechanisms, in order to determine the role of CD81 in the pathogenesis of preeclampsia. **Methods** A human first-trimester-derived trophoblast cell line (HTR-8/SVneo cells) was cultivated in vitro before transfection with adenovirus Ad-CD81 which highly expressed CD81 or si-CD81 which inhibited endogenous CD81 through interference RNA. Then, the ability of cell adhesion was detected by adhesion assay. The expression of focal adhesion kinase (FAK) in HTR-8/SVneo cells was detected by Western blot. **Results** Compared with Ad-CTL-infected cells, Ad-CD81-infected HTR-8/SVneo cells showed enhanced adhesion ability and increased optical density at 570 nm ($P<0.05$). Compared with si-CTL-transfected cells, si-CTL-transfected HTR-8/SVneo cells presented weakened adhesion ability and decreased optical density at 570 nm ($P<0.05$). Furthermore, with the increase of concentration gradients, the expression of FAK was down-regulated in the Ad-CD81-infected HTR-8/SVneo cells, but up-regulated in the si-CD81-transfected cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusions** CD81 can enhance the adhesion of trophoblasts, which may be associated with its inhibitory effect on FAK expression in trophoblasts.

Key words: preeclampsia; CD81; adhesion; trophoblast; focal adhesion kinase

子痫前期是妊娠期常见的并发症,发病率达 8%左右,主要临床表现为妊娠 20 周以后发生高血压和蛋白尿。子痫前期对母体和胎儿均可造成不良

结局,母体可能发生多器官功能障碍,胎儿存在流产、早产甚至胎死宫内的风险。子痫前期的发病机制目前尚未确定。有学者认为子痫前期是胎盘疾

基金项目:国家自然科学基金青年基金(8170060753)

* 通信作者, E-mail: somdrlee@163.com

病,绒毛外滋养细胞侵袭不足引起子宫螺旋动脉重塑障碍,导致胎盘“浅着床”,不能形成胎盘低阻力循环,引起胎盘缺血缺氧,导致子痫前期发病^[1-2]。

CD81 是 4 次跨膜蛋白家族 (transmembrane 4 superfamily, TM4SF) 的成员之一,又名抗增生抗体靶抗原-1 (target of an antiproliferative antibody-1, TAPA-1), 在多种细胞中均有表达。作为膜蛋白, CD81 能够与 TM4SF 其他成员或细胞膜上的其他蛋白相互作用,参与细胞膜内外信号通路的传导,参与调节细胞的多种功能。目前有关 CD81 的研究集中于丙型肝炎病毒的感染过程和免疫细胞的功能调节。研究表明,CD81 与丙型肝炎病毒表面包膜蛋白 E2 结合后,激活下游的 ERK/MAPK 通路,从而有利于丙型肝炎病毒的入侵^[3]。Tejera 等^[4]发现,CD81 参与 Rac1 介导的信号通路,进而调节免疫细胞的迁移功能。

我们在早期研究中首次发现 CD81 是参与子痫前期发病的重要分子,其表达量在早发型子痫前期患者的胎盘组织和滋养细胞中均有增加,同时 CD81 抑制滋养细胞的侵袭,影响血管内皮细胞的功能^[5]。另外,我们还发现 CD81 影响滋养细胞的失巢凋亡功能^[6],同时与滋养细胞的合体化功能相关^[7]。绒毛外滋养细胞迁移运动至母体子宫螺旋动脉,而子宫螺旋动脉重塑是胎盘发育的重要过程。细胞的运动力调节涉及细胞黏附、迁移和侵袭,细胞黏附能力增加后可形成较大的黏着斑,从而抑制细胞的迁移和侵袭。本研究拟采用体外实验探讨 CD81 对滋养细胞黏附能力的影响及可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 永生化的妊娠早期绒毛外滋养细胞株 (HTR-8/SVneo 细胞),由加拿大皇后大学的 Charles Graham 馈赠。RPMI 1640 细胞培养液、青/链霉素抗生素、0.25%胰蛋白酶-EDTA 和灭活胎牛血清 (FBS) 购自 Hy-Clone 公司;高表达 CD81 的腺病毒 (Ad-Flag-CD81,带 Flag 标签) 购自吉凯基因公司;靶向人基因 CD81 核酸的 138-156 bp (5'-AUCUGGAGCUGGGAGACAA-3') 的双链小干扰 RNA (si-CD81) 由锐博生物公司合成;转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;Matrigel 胶购自 BD 公司;Bradford 法蛋白浓度检测试剂盒购自 Invitrogen 公司;结晶紫购自上海生工;CD81 抗体购自 Santa Cruz 公司,黏着斑激酶 (FAK) 抗体、

Flag 抗体、GAPDH 抗体均购自 Cell Signal 公司。

1.2 细胞培养 将 HTR-8/SVneo 细胞接种于 100 mm 的细胞培养皿,用 RPMI 1640 培养液、含 10% FBS 和 100 U/ml 青霉素及 100 μg/ml 链霉素,在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中进行培养。当细胞生长密度达到 90%时进行细胞传代,使用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 进行消化。

1.3 细胞感染腺病毒、转染与分组 取对数生长期的细胞接种于 60 mm 的细胞培养皿,待细胞生长密度达到 80%时加入 Ad-CD81 腺病毒,设置病毒感染梯度 50、100、200 MOI,取同公司的 Ad-CTL 作为对照。同样取对数生长期的细胞接种于 60 mm 的培养皿,采用 Lipofectamine 3000 转染试剂转染 si-CD81 (50 nmol/L),si-CTL 作为对照。将转染细胞置于基础培养基培养 6 h 后,更换含 10% FBS 的 1640 培养基。将感染腺病毒或转染 siRNA 的细胞培养 24 h 后提取蛋白。

1.4 免疫印迹法 取感染腺病毒或转染 siRNA 的细胞,用预冷的 PBS 清洗 2 次除去坏死细胞,加 300 μl 的蛋白裂解缓冲液 (50.0 mmol/L Tris pH 7.6、150 mmol/L NaCl、1.0 mmol/L EDTA、1.0% NP-40 和蛋白酶抑制剂),在冰上刮取后收集细胞。4 °C 冰上旋转裂解 30 min 后离心 30 min,收集上清。Bradford 法测定蛋白质浓度后,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并将分离的蛋白转印至 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,加 CD81 (1 : 500)、FAK (1 : 1 000)、Flag (1 : 1 000) 一抗 4 °C 过夜,二抗室温避光孵育 60 min,进行 ECL 显影。经 X 线胶片曝光成像,自动电泳凝胶成像分析仪采集图像,用 Quantity One 软件对图片进行灰度扫描,内参为 GAPDH。

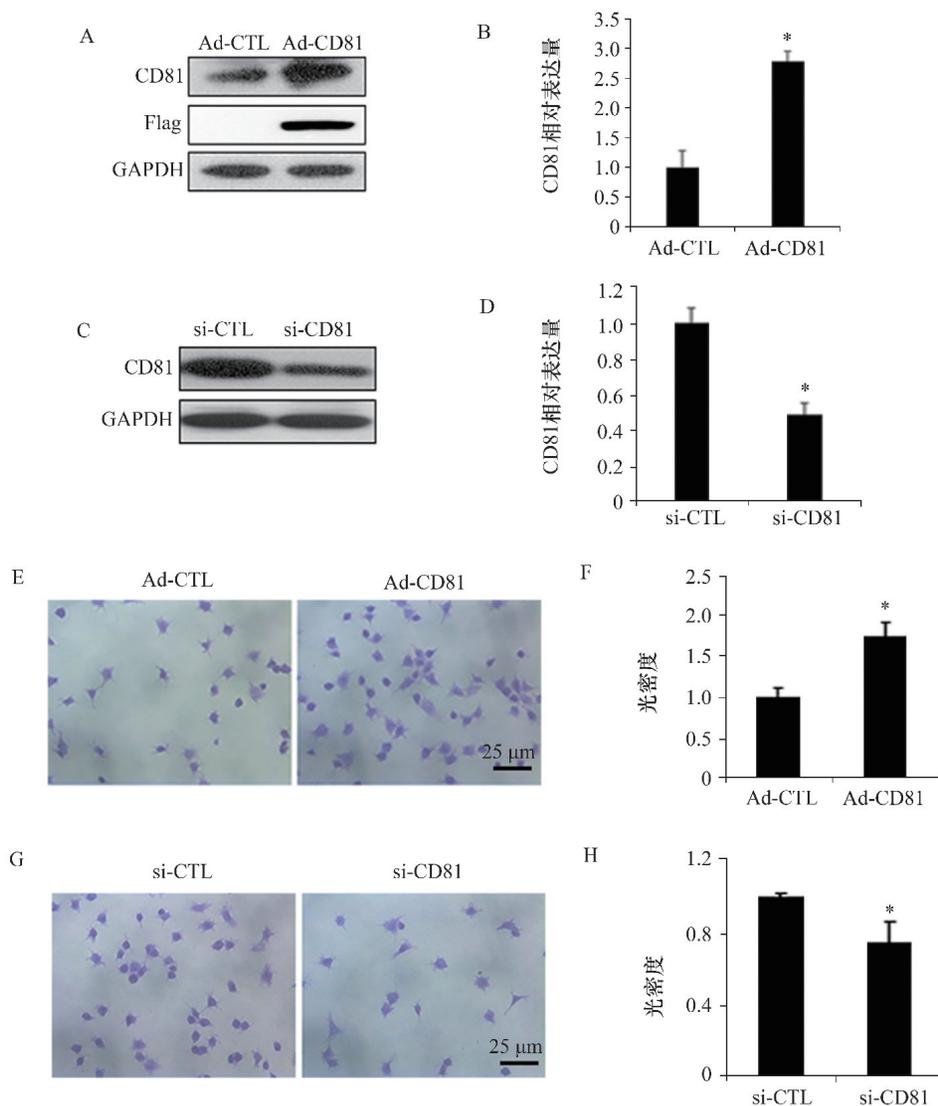
1.5 细胞黏附实验 取感染腺病毒或转染 siRNA 的细胞培养 24 h 后,弃去原培养液,用 PBS 清洗 2 次后,用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化,用培养基终止消化,吹打成细胞悬液,进行细胞计数。以 5 000 个/孔的密度接种于预铺 Matrigel 胶 (1 : 2 000) 的 96 孔板上,孵育 6 h,设置 6 个复孔。然后弃去原培养液,PBS 清洗 2 次后,用结晶紫染色,染色后再用 PBS 清洗 2 次,显微镜下对黏附细胞进行计数。用醋酸将已染色细胞进行脱色,检测 570 nm 处洗脱液的光密度值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。正态分布的计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行 Student *t*-test 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膜蛋白 CD81 增加 HTR-8/SVneo 细胞的黏附能力 绒毛外滋养细胞的黏附、迁移与侵袭对子宫螺旋动脉重塑过程具有重要的作用。我们在前期研究中发现 CD81 抑制滋养细胞的侵袭。为了进一步探讨 CD81 在滋养细胞运动过程中的作用,我们检测了 CD81 对 HTR-8/SVneo 细胞黏附的影响。结果显示,感染 Ad-CD81 的 HTR-8/SVneo 细胞中 CD81 蛋白表达显著增高(图 1A、B);si-CD81 转染的 HTR-8/SVneo 细胞中 CD81 蛋白表达显著下降

(图 1C、D)。细胞黏附实验结果如图 1E、F 所示,与感染 Ad-CTL 的细胞相比,感染 Ad-CD81 的 HTR-8/SVneo 细胞接种于预铺 Matrigel 胶的 96 孔板后,结晶紫染色的黏附细胞数目显著增加,570 nm 处的光密度值显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,转染 si-CD81 的 HTR-8/SVneo 细胞中被结晶紫染色的黏附细胞数显著低于转染 si-CTL 的细胞,其 570 nm 处的光密度值与 si-CTL 组相比显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1G、H。上述结果提示,CD81 促进滋养细胞的黏附。



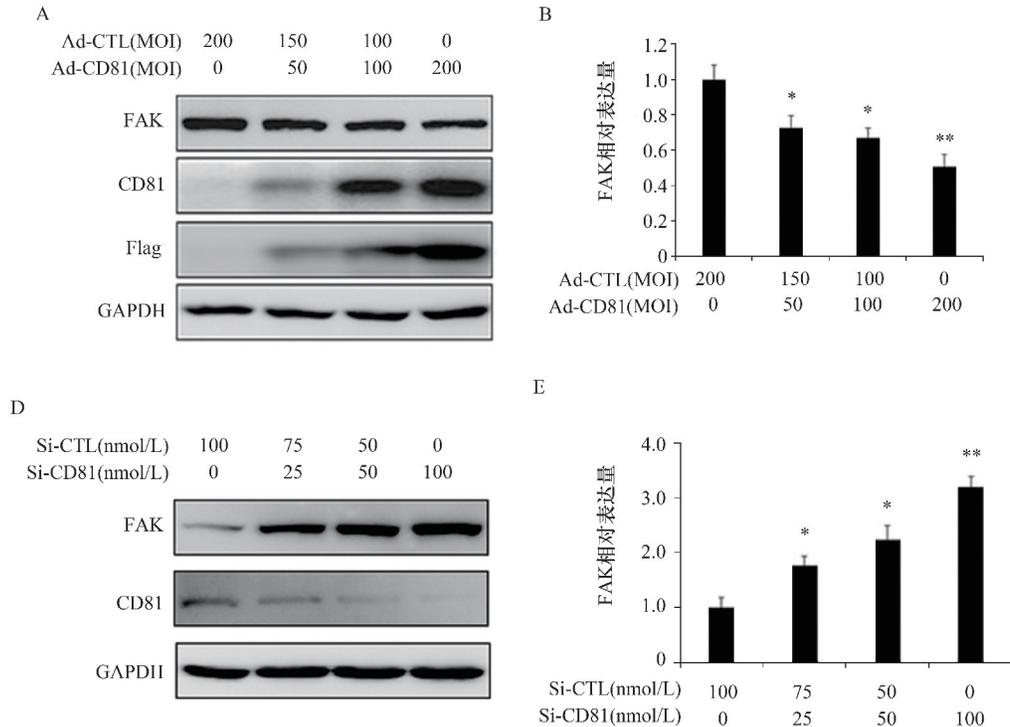
A、B. 感染 Ad-CD81 后 HTR-8/SVneo 细胞中 CD81 的蛋白印迹图(A)和扫描的灰度值统计(B);C、D. 转染 si-CD81 后 HTR-8/SVneo 细胞中 CD81 的蛋白印迹图(C)和扫描的灰度值统计(D);E、F. Ad-CD81 感染对 HTR-8/SVneo 细胞黏附的影响(E)和 570 nm 处洗脱液的光密度值(F)(比例尺=25 μm , * $P < 0.05$);G、H. si-CD81 转染对 HTR-8/SVneo 细胞黏附的影响(G)和 570 nm 处洗脱液的光密度值(H)(比例尺=25 μm , * $P < 0.05$)

图 1 CD81 促进 HTR-8/SVneo 细胞的黏附

2.2 CD81 抑制 HTR-8/SVneo 细胞中 FAK 的表达

FAK 缺失导致黏着斑转化降低,使稳定状态的黏着斑数量增加,导致细胞的黏附能力增强。本研究中我们检测了 CD81 对 HTR-8/SVneo 细胞中 FAK 表达的影响。如图 2A、B 所示,与感染 Ad-CTL 的细胞相比,随着 Ad-CD81 感染浓度的增加,感染 Ad-CD81 的 HTR-8/SVneo 细胞中 FAK 的蛋白表达逐

渐下降,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与转染 si-CTL 的细胞相比,随着 si-CD81 转染浓度的增加,转染 si-CD81 的 HTR-8/SVneo 细胞中 FAK 的蛋白表达逐渐增加(图 2B, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。上述结果提示,CD81 抑制滋养细胞中 FAK 的蛋白表达。



A. 感染 Ad-CD81 对 HTR-8/SVneo 细胞中 FAK 蛋白表达的影响,与感染 Ad-CTL 的细胞相比, * $P < 0.05$ 或 ** $P < 0.01$; B. 转染 si-CD81 对 HTR-8/SVneo 细胞中 FAK 蛋白表达的影响,与转染 si-CTL 的细胞相比, * $P < 0.05$ 或 ** $P < 0.01$

图 2 CD81 抑制 HTR-8/SVneo 细胞中 FAK 的蛋白表达

3 讨论

我们在早期研究中首次发现膜蛋白 CD81 在早发型子痫前期患者的胎盘组织和细胞滋养细胞中表达量增加,此外 CD81 抑制滋养细胞的侵袭能力,影响血管内皮细胞的功能^[5]。细胞的运动力调节涉及细胞的黏附、迁移和侵袭过程,细胞黏附能力增加会引起细胞迁移和侵袭能力下降。在本研究中,我们发现 CD81 促进滋养细胞的黏附功能,其分子机制可能与 CD81 抑制滋养细胞中 FAK 的蛋白表达有关。

滋养细胞的运动能力异常、导致子宫螺旋动脉重塑障碍是子痫前期发病的重要原因之一^[2]。细胞的黏附、迁移和侵袭能力相互影响,构成细胞运动

的整个过程:细胞黏附形成黏着斑,黏附能力增加使细胞迁移减少,细胞透过细胞基质的能力也减弱,细胞的侵袭能力同时下降。我们在前期研究中已发现 CD81 抑制滋养细胞的侵袭。有研究认为,CD81 参与免疫系统细胞的黏附及信号传导过程^[8]。Rohle-na 等^[9]发现,血管内皮的 CD81 促进单核细胞的黏附,是早期动脉粥样硬化的标记分子之一。此外,膜蛋白 CD81 和 CD82 均可增加人幼红细胞的黏附能力^[10]。本研究首次发现 CD81 促进滋养细胞的黏附。滋养细胞的黏附能力增加,使得细胞的迁移和侵袭能力下降,导致子宫螺旋动脉重塑障碍。

我们进一步探究了 CD81 促进滋养细胞黏附功能的可能分子机制。TM4SF 家族蛋白和整合素家族蛋白在细胞膜上相互结合,参与细胞功能的调

节^[10]。研究发现,CD81 激活免疫 B 细胞中整合素 $\alpha 4\beta 1$ 的表达,从而增强 B 细胞的黏附能力^[8]。膜蛋白(CD9/CD81)与整合素 $\alpha v\beta 5$ 形成复合物,参与肿瘤细胞运动能力的调节^[11]。此外,整合素参与调节 FAK 信号通路:整合素激活 FAK,与 Src 和细胞上的其他蛋白形成复合物,从而激活细胞下游通路^[12]。整合素/FAK/Src/ERK/ β -catenin 信号通路在口腔癌细胞中的作用已被证实^[13]。FAK 是公认的抑制细胞黏附的重要分子^[14-15],细胞 FAK 表达增加,细胞的黏着斑减小,细胞的黏附能力下降,从而参与细胞运动力调节。有研究表明,CD81 通过调节 FAK 信号通路参与脂肪祖细胞的增殖和能量平衡^[16]。本研究中我们发现 CD81 抑制滋养细胞中 FAK 的蛋白表达,且存在浓度依赖性。另有研究表明,CD81 促进单核细胞中 ICAM-1 和 VCAM-1 在细胞膜上的定位表达,增加单核细胞的黏附能力;CD81 通过促进内皮细胞 VCAM-1 参与细胞黏附功能的调节^[17]。因此,FAK 是 CD81 影响滋养细胞黏附能力的重要因子,其具体的信号调节过程有待进一步研究。

综上,膜蛋白 CD81 促进滋养细胞的黏附,从而影响子宫动脉的重塑过程,导致胎盘发育异常,参与子痫前期的发病,其中 CD81 促进滋养细胞中 FAK 的蛋白表达是可能的分子机制之一。我们将在后续研究中进一步探讨 CD81 参与子痫前期发病的机制,为子痫前期的临床诊治提供新靶点和新思路。

参考文献:

- [1] Verloren S, Geusens N, Morton J, et al. Inhibition of trophoblast-induced spiral artery remodeling reduces placental perfusion in rat pregnancy [J]. *Hypertension*, 2010, 56(2):304-310.
- [2] Lyall F, Robson SC, Bulmer JN. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome [J]. *Hypertension*, 2013, 62(6):1046-1054.
- [3] Mazzocca A, Sciammetta SC, Carloni V, et al. Binding of hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 up-regulates matrix metalloproteinase-2 in human hepatic stellate cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(12):11329-11339.
- [4] Tejera E, Rocha-Perugini V, Lopez-Martin S, et al. CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase [J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(3):261-273.
- [5] Shen L, Diao Z, Sun HX, et al. Up-regulation of CD81 inhibits cytotrophoblast invasion and mediates maternal endothelial cell dysfunction in preeclampsia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(8):1940-1945.
- [6] 沈莉,刁振宇,薛平平,等.四次跨膜蛋白 CD81 促进人绒毛外滋养细胞失巢凋亡的初步研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2013, 22(9):700-703.
- [7] Dai Y, Diao Z, Sun H, et al. MicroRNA-155 is involved in the remodelling of human-trophoblast-derived HTR-8/SVneo cells induced by lipopolysaccharides [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(7):1882-1891.
- [8] Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 1988, 16:89-109.
- [9] Rohlena J, Volger OL, van Buul JD, et al. Endothelial CD81 is a marker of early human atherosclerotic plaques and facilitates monocyte adhesion [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(1):187-196.
- [10] Spring FA, Griffiths RE, Mankelov TJ, et al. Tetraspanins CD81 and CD82 facilitate $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion of human erythroblasts to vascular cell adhesion molecule-1 [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e62654.
- [11] Kummer D, Steinbacher T, Thölmann S, et al. A JAM-A-tetraspanin- $\alpha v\beta 5$ integrin complex regulates contact inhibition of locomotion [J/OL]. *J Cell Biol*, 2002, 221(4):e202105147.
- [12] Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(5):516-523.
- [13] Jang TH, Huang WC, Tung SL, et al. MicroRNA-485-5p targets keratin 17 to regulate oral cancer stemness and chemoresistance via the integrin/FAK/Src/ERK/ β -catenin pathway [J/OL]. *J Biomed Sci*, 2022, 29(1):42.
- [14] Katoh K. FAK-dependent cell motility and cell elongation [J/OL]. *Cells*, 2020, 9(1):192.
- [15] Le Coq J, Acebrón I, Rodrigo Martin B, et al. New insights into FAK structure and function in focal adhesions [J/OL]. *J Cell Sci*, 2022, 135(20):jcs259089.
- [16] Oguri Y, Shinoda K, Kim H, et al. CD81 controls beige fat progenitor cell growth and energy balance via FAK signaling [J]. *Cell*, 2020, 182(3):563-577.
- [17] Feigelson SW, Grabovsky V, Shamri R, et al. The CD81 tetraspanin facilitates instantaneous leukocyte VLA-4 adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) under shear flow [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(51):51203-51212.

收稿日期:2023-10-19 修回日期:2023-12-06

本文编辑:郭昊