

國立臺灣大學醫學院臨床醫學研究所

博士論文

Graduate Institute of Clinical Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

黏液蛋白 Mucins 在胎盤發育過程的表現

及其與子癩前症的關聯之研究

The expression of mucins in placental development
and its association with preeclampsia

徐明洸

Ming-Kwang Shyu

指導教授：謝豐舟教授

Adivisor: Fon-Jou Hsieh, Professor

協同指導老師：黃敏銓副教授

Co-Advisor: Min-Chuan Huang, Associate Professor

中華民國九十八年一月

January, 2009

誌 謝

經過一千六百多天的'痛苦學習'，終於可以畢業了。

要感謝的人實在太多了。感謝臨床所陳所長的諄諄教導、臨床所多位老師，包括楊偉勛教授的熱心指導。感謝謝豐舟教授的實驗指導以及支持我的口試過關。感謝解剖學暨細胞生物學研究所的黃敏銓老師的協同指導，還有提供了這麼完善的實驗環境，讓我們的研究得以完成。很重要的，謝謝黃老師實驗室的研究團隊：研究助理華文、彥榕、仟惠、怡芳、炯輝，碩士生美英、易玲，大學部學生玫君、佳穎、知瑋。在此也感謝本科李建南主任、施景中、童寶玲醫師的從旁協助。也謝謝所辦大嵐的一路幫忙。

感謝婦產部楊友仕主任的推薦及關心，以及對我們進修的鼓勵。

再來要謝謝家人，包括我的父母兄弟。謝謝我的賢內助坤華、還有小女兒菲柔，雖然她們不頂清楚我在玩甚麼把戲，可是知道我很忙。同時我也希望已經是大學生的鈞洋、鈞信能更用功，成績更好。

要謝謝的人實在太多了，所以如果有遺珠之憾，請提醒我一下，一定另外好好感謝。

最後，祝大家身體健康、萬事如意，事業飛黃騰達。

徐明洸

於 台灣大學醫學院臨床醫學研究所

民國九十八年一月

目 錄

口試委員審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iv
英文摘要.....	vi
圖目錄.....	viii
表目錄.....	ix
緒論.....	1
研究方法與材料.....	23
結果.....	29
討論.....	35
展望.....	55
英文簡述.....	65
參考文獻.....	79
圖表.....	92
附錄.....	104



中文摘要

關鍵詞: 蛻膜、金屬蛋白酶、黏液蛋白、胎盤、懷孕、胞融型滋養層母細胞、滋養層母細胞組織侵襲

胎盤是胎兒賴以生存的生命線。而胎盤內的子宮動脈的末端血管「螺旋動脈」在胎盤發育過程中，能否充分完成動脈的再鑄型(remodeling)，攸關胎盤功能的優劣及胎兒的發育是否正常。而螺旋動脈的再鑄型與絨毛外細胞型滋養層母細胞取代螺旋動脈的血管內皮細胞的程序有關，所以滋養層母細胞在子宮內膜(蛻膜)區是否可以正常地移行(migration)、侵襲(invasion)，滋養層母細胞最後能否靠近及進行螺旋動脈血管內侵襲是十分重要的。

由於黏液蛋白的性狀改變，被認為與細胞的生長、複製、分化、轉型(transformation)乃至於細胞的移動、侵襲有關。而一些胞膜型黏液蛋白在胎盤的表現特別多，所以我們假設黏液蛋白與滋養層母細胞的蛻膜內侵襲作用有關。

我們觀察主要的黏液蛋白(MUC1及MUC15等)在整個懷孕過程中不同時期的基因和蛋白質表現，組織中的分布及它們的可能角色。同時我們會以細胞生物學的研究方法，了解黏液蛋白對於細胞型滋養層母細胞的侵襲作用的影響。我們會用絨毛膜癌的細胞株(主要細胞成分就是滋養層母細胞)，給予transfection之後，在黏液蛋白overexpression的情況下，以matrigel invasion assay來觀察滋養層母細胞的侵襲作用會如何改變，之後再以gelatin zymography或其他研究來尋找可能的機轉。

結果顯示MUC15 在胎盤中的表現最高。MUC1及MUC15的mRNA和protein的表現會隨著週數增加而遞增。(P < 0.05). 組織免疫染色顯示MUC1及MUC15 protein在cytotrophoblasts和syncytiotrophoblasts都有表現，而在apical membrane of syncytiotrophoblasts又特別明顯. 此外，MUC1及MUC15 在蛻膜的腺體上皮細胞也都有表現。而MUC15的Overexpression 明顯降低 JAR and/or JEG-3 cells 在matrigel的invasion，此現象與tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 及

TIMP-2的mRNA expression增加有密切關係。如果以small interfering RNA來knockdown MUC15會逆轉上述現象 ($P < 0.05$)。有趣的是，我們在蜕膜區發現MUC1-positive及MUC1-negative兩種族群的extravillous trophoblasts, 而且MUC1-positive extravillous trophoblasts會隨週數增加而增加。另外，MUC1 overexpression明顯抑制JAR cells在matrigel的 invasion ($P < 0.01$)，而此現象與MMP9 activity下降有關。在重度的子癩前症的胎盤，MUC1的表現也明顯增加。

整體上看來，在human placentas的MUC1及MUC15的differential expression應該與regulation of trophoblast invasion息息相關，所以也可能與preeclampsia的發生產生關聯。有關臨床的影響及將來針對病生理學的研究的建議也會陸續討論。



英文摘要

關鍵詞: decidua, metalloproteinases, mucin, placenta, pregnancy, syncytiotrophoblast, trophoblast invasion

Trophoblast invasion is crucial for the development of normal placentas. One of the primary placental defect in preeclampsia and partly intrauterine fetal growth restriction is shallow invasion of the extravillous trophoblast into the decidua, which leads to incomplete spiral artery remodeling and inadequate uteroplacental perfusion.

Mucins are highly glycosylated proteins expressed by epithelial cells of various organs. The membrane-bound mucins, which possess a single transmembrane domain and a highly conserved cytoplasmic tail, include MUC1, MUC3A, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, and MUC20. Among the known mucins, MUC1 is best studied and plays crucial roles in regulating many cellular properties, including cell proliferation, apoptosis, adhesion, and invasion. Although MUC1 has been found to be expressed by trophoblasts of various species, its expression in the human placenta throughout pregnancy and its potential role in trophoblast invasion remain unclear. MUC15 is a membrane-bound mucin and the mRNA of MUC15 has been detected by RT-PCR in various human tissues. So far, physiological functions of MUC15 have never been investigated. In the present study, we therefore investigated MUC1 and MUC15 expression in the human placenta and the effect on the invasion of trophoblast cells.

MUC15 mRNA in human tissues was analyzed by Northern blot. MUC1 and MUC15 mRNA and protein in human placenta were detected by real-time RT-PCR and Western blot, respectively. The distribution of MUC1 and MUC15 was revealed by immunohistochemistry. The effects of MUC1 and MUC15 on trophoblast invasion *in vitro* were analyzed by matrigel invasion assay in human choriocarcinoma JAR

and/or JEG-3 cells. The results showed that MUC15 was expressed most highly in human placenta. Both MUC1 and MUC15 mRNA and protein increased with gestational age ($P < 0.05$, first versus third trimester). Immunohistochemistry showed that MUC1 and MUC15 protein was expressed by both cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts, especially at the apical membrane of syncytiotrophoblasts. In addition, MUC1 and MUC15 were found to be present in the glandular epithelium of the decidua. Overexpression of MUC15 substantially decreased matrigel invasion of JAR and/or JEG-3 cells, which was closely associated with an increase in mRNA expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2. Knockdown of MUC15 with small interfering RNA significantly reversed these effects ($P < 0.05$). Interestingly, we found two populations of extravillous trophoblasts, MUC1-positive and MUC1-negative cells, in decidua. The numbers of MUC1-positive extravillous trophoblasts were increased during placental development. Furthermore, MUC1 overexpression significantly ($P < 0.01$) suppressed matrigel invasion of trophoblast-like JAR cells which was associated with a decrease in MMP9 activity assessed by gelatin zymography. Besides, MUC1 expression was significantly higher in the placenta of severe preeclampsia if compared with normal ones.

It seems that differential expression of MUC1 and MUC15 in human placentas may play a critical role in the regulation of trophoblast invasion. They may play some role in the disease process of preeclampsia. The clinical implications and further suggestions for pathophysiology studies are discussed here.

圖目錄

- 圖一 胎盤的相關構造。論文正文第 4 頁。
- 圖二 Interstitial 及 endovascular trophoblast invasion 的示意圖。論文正文第 7 頁。
- 圖三 黏液蛋白與不同醣蛋白質示意圖。論文正文第 17 頁。
- 圖四 MUC1 訊息傳遞的示意圖。論文正文第 17 頁。
- 圖五 MUC1CT 的示意圖。論文正文第 17 頁。
- 圖六 人體器官組織的 MUC15 表現。論文正文第 29 頁。
- 圖七 MUC1 mRNA expression 的 Q-PCR。論文正文第 29 頁。
- 圖八 MUC15 mRNA expression 的 Q-PCR。論文正文第 30 頁。
- 圖九 MUC1 protein 的 expression level。論文正文第 30 頁。
- 圖十 MUC15 protein 的 expression level。論文正文第 30 頁。
- 圖十一 胎盤絨毛的 MUC1 的 Immunohistochemistry。論文正文第 31 頁。
- 圖十二 胎盤絨毛的 MUC15 的 Immunohistochemistry。論文正文第 31、32 頁。
- 圖十三 蛻膜層的 MUC1 的 Immunohistochemistry。論文正文第 31 頁。
- 圖十四 不同週數的蛻膜層的 MUC1 Immunohistochemistry。論文正文第 32 頁。
- 圖十五 MUC1 overexpression 抑制 JAR cells 的 invasion 及可能的 mechanism：
MMP9 的活性增加。論文正文第 32 頁。
- 圖十六 MUC15 overexpression 抑制 trophoblasts 的 invasion。論文正文第 33 頁。
- 圖十七 MUC15 overexpression 抑制 JAR 及 JEG-3 cells 的 invasion 的可能的
Mechanism：TIMP-1 及 TIMP-2 的表現增加。論文正文第 33 頁。
- 圖十八 MUC1mRNA 在 severe preeclampsia 的胎盤的表現量。論文正文第 34 頁。
- 圖十九 MUC1 protein 在 severe preeclampsia 的胎盤的表現量。論文正文第 34 頁。
- 圖二十 MUC1 (+) trophoblasts 在 mild preeclampsia 的蛻膜層的數量略增加。論文
正文第 34 頁。

表目錄

表一 PCR 的 primers。論文正文第 22 頁。



第一章 緒論

背景

我們的研究，就從關懷生命開始。人類生命的產生，可以起源於卵子受精(fertilization)。而生命孕育的接續，則端賴胎兒的子宮內「呼吸器」—胎盤的正常運作，聯結母體，提供胎兒安全與舒適的生長空間，然後完成子宮內發育、順利產出。

胚胎著床是胎盤發生的第一步。此步驟的成功與否，需要適當的胚胎發育和合適的子宮內在環境。這兩方的同步進行牽涉到胚胎是否正常發育、懷孕的子宮接受到外來及內部因素，包括：荷爾蒙及多種生長因子的調控而後是否產生正確有效的影響有關。這當然是許多生物現象及分子互動的結果，而這些相關研究報告及未來研究方針將會在以下的文章中一一闡述。

回顧我們婦產科醫生的醫療歷程，無法避免地都要為胎盤的問題而奮鬥。綜觀目前最常見的母體罹病或死亡的原因，包括：高血壓、出血及感染症而言，妊娠性高血壓，以及加上合併蛋白尿、水腫的子癩前症，許多學者已認為與胎盤發育過程中的子宮螺旋動脈(spiral artery)末端在完成再鑄型(remodeling)，以保護胎盤血流順暢的過程中，所經程序(process)是否順利有關。其次有關產科出血的疾病，最嚴重的情況幾乎也都與胎盤的問題有關，例如：前置胎盤、植入性胎盤、胎盤早期剝離、羊水栓塞等等，只要出血來源是胎盤著床的部位，出血量就會很大。此外胎兒發育不良，或稱做「子宮內生長受限」(intrauterine growth restriction, IUGR)，有很大比例的狀況也和不良的胎盤功能有關。而生產過程中如果出現胎兒窘迫的現象(一種胎兒心跳型態異常的情形)，一般判讀時也認定是子宮胎盤功能不足(utero-placental insufficiency)的臨床表現。所以，研究胎盤功能以及胎盤發育過程中，可能的影響因子就變得重要了。

我們在本文的介紹就從胎盤形成及其發育開始說起，然後接著介紹我們研究的主角--黏液蛋白。

胎盤的早期發育

定位 Apposition

一般認為，胎盤發育最早要從胚胎著床開始。第一個步驟稱為同位 (apposition)。胚胎自受精後即開始細胞分裂。藉著不斷的分裂，發展成多細胞的囊胚(blastocyst)，而到受精後的第六到七天，細胞數目可多達 256 個，直徑約 0.3mm。多數的細胞形成囊胚的外層細胞，稱為滋養層母細胞(trophoblast)，是胎盤形成的先鋒部隊；在胚囊腔內有一群體積較大的細胞，稱作內細胞質塊(inner cell mass)，隨後會發育成胚胎母細胞(embryoblast)，這些細胞將來會發育成胚胎、臍帶和羊膜。而胚胎母細胞所在的區域的囊胚部位，稱為胚胎極(embryonic pole)(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006b)。此時位於胚胎極的囊胚外層的滋養層母細胞(trophoblast)便與子宮內膜的上皮細胞發生「第一次接觸」，而此胚胎極亦稱之為著床極(implantation pole)。通常胚胎極與著床極位置很接近，如此胚胎漸次發育時，臍帶進入胎盤的位置才會在胎盤的中央(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006b)。而著床的常見位置也通常在子宮內腔的上後方中線位置，與大部分的哺乳動物類似。

內膜侵襲 Invasion

囊胚外層的滋養層母細胞(trophoblast)與子宮內膜的上皮細胞發生「第一次接觸」--兩種不同細胞的黏附作用(adhesion)，從囊胚在輸卵管中移動時就開始準備，但是真正合適於黏附作用發生的時間卻只有很短，所以早期提出此論調的學者就稱為「著床空窗期」(implantation window) (Edwards, 1988; Sarani, Ghaffari-Novin *et al.*, 1999)。人類胚胎著床成功，必須掌握此階段的時效。在此之後，著床極部的滋養層母細胞開始大量複製，形成兩層細胞。而位於外層的細胞會產生細胞融合，轉型成為胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)；而位於內層的細胞則仍保持單核狀態，稱為細胞型滋養層母細胞(cytotrophoblast)，是滋

養層母細胞持續複製的幹細胞(stem cells)來源。之後幾天，囊胚會繼續深入母體的子宮內膜，滋養層母細胞也會不停的複製及細胞融合，最後達到可觀的厚度，這是形成胎盤的前驅構造。而這時候著床極的胞融型滋養層母細胞質塊已呈現類似指頭分支的形狀，往內膜深部延伸，並且為後續產生腔隙(lacuna)及絨毛(villi)做準備(Sadler TW, 1995)。

形成腔隙及建立早期子宮胎盤血液循環

到了受孕的八天以後，滋養層母細胞質塊內開始出現空泡(vacuoles)。第九天以後，許多空泡融合形成較大的空間，稱為腔隙，故此時又稱所謂的腔隙期(lacunar stage)。這時胚胎內緣產生一層細胞，包圍胚囊內腔，緊連細胞型滋養層母細胞的內層，稱為體腔外空腔(exocoelomic cavity)，其功能是原始卵黃囊(primitive yolk sac) (Sadler TW, 1995)。到了第 12 天，著床的胚囊已經完全包埋在子宮內膜內，意即子宮內膜的上皮細胞已經完全包覆了原先胚囊著床及侵入內膜時所造成的內膜表層缺陷。此時比較重要的發育步驟是胞融型滋養層母細胞更加侵入子宮內膜，侵蝕到母體內膜的微血管內皮，造成這些微血管擴張、充血，形成所謂的靜脈竇(sinusoid)。隨著細胞質塊內的腔隙與母體子宮內膜的靜脈竇相通，代表母血進入了滋養層母細胞質塊內部，而相通區域愈來愈廣，於是初期的子宮胎盤血液循環便成型了。

此時的子宮內膜的基質細胞，受到賀爾蒙的影響，變大變長，型狀可出現圓形、橢圓形或長形(因為組織切片的角度)，鄰近細胞呈平行排列，整體型態特殊，我們稱為蛻膜細胞(decidual cells)。

形成初期絨毛

到了第 13 天以後，由於進入腔隙的母血增加，有時會造成出血。如果出血量稍大，期時間點又剛好是月經週期的第 28 天，那麼經常會被誤以為是下一次月經來潮，有人稱作「假月經」(pseudomenses)，結果造成懷孕週數的誤算。現

在由於藉助超音波儀器可以精確計算胎兒週數，所以在醫療水準進步的區域，應該比較少造成困擾。

細胞型滋養層母細胞不斷地複製細胞，促成更多的融合細胞質塊產生，因此除了縱向深入以外，橫向增生也造成新生融合質塊往腔隙方向突出。經過不停的分支，形成樹枝狀的構造，稱為絨毛(villi)。於是原先滋養層母細胞質塊最厚的部位，也等同是第一次接觸的部位，稱為錨部絨毛(anchoring villi)；而往腔隙突出去，形成的絨毛構造，則在以後被稱為游離型絨毛(floating villi)。此時的絨毛由滋養層母細胞所組成，尚無來自胎兒的間葉細胞(mesenchymal cells)或結締組織，所以又稱為初級絨毛(primary villi)。而接受絨毛突出的腔隙，也就是後來游離型絨毛所在地區，就形成所謂的絨毛間空腔(intervillous space)。(圖一)

(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006b)

形成細胞索(cell columns)及次級、第三級絨毛(secondary and tertiary villi)

錨部絨毛區的細胞型滋養層母細胞會持續增生，細胞聚集成為所謂的細胞索(cell columns)。而細胞索的細胞群在繼續增生的過程，會令錨部絨毛往縱向深處推移，而它們所在的區域，自然而然地會造成胞融型滋養層母細胞層逐漸變薄，最後在 20 天時，讓細胞型滋養層母細胞直接接觸到子宮內膜層。於是這裡就成為將來往內膜深部侵襲的細胞型滋養層母細胞，被稱為絨毛外滋養層母細胞(extravillous cytotrophoblasts, EVT)的產生的細胞來源。

到了第 15 天時，胚胎附近的間葉層(mesenchyme layer)細胞開始往絨毛區侵襲，並且到達絨毛頂端及錨部絨毛區的基底部位，很接近細胞索。此時的絨毛，稱為次級絨毛。到了第 18-20 天以後，來自間葉層細胞的血管母細胞(hemangioblast)開始在絨毛內產生微血管，而這些含有所謂的胎兒微血管的絨毛，就稱作第三級絨毛。(Castellucci, Scheper *et al.*, 1990)從此時一直到足月，幾乎所有的絨毛，型態都表現如第三級絨毛，只有在細胞索附近及新生成的絨毛，才看得到初級或次級絨毛(Demir, Kaufmann *et al.*, 1989; King, 1987)。

形成臍帶(umbilical cord)

在 14 天左右，胚胎外體腔(extraembryonic coelom)逐漸擴張，形成絨毛膜腔(chorionic cavity)。而胚胎外間葉層(extraembryonic mesenchyme layer)形成細胞型滋養層母細胞的內襯，稱作絨毛膜板(chorionic plate)，包圍了整個絨毛膜腔。這裡的細胞除了上述的往絨毛區侵襲形成絨毛內間葉及微血管之外，它們也會穿越連接胚胎與絨毛區的連接柄(connecting stalk)，在連接柄形成血管，讓連接柄在 20 天時形成臍帶的基本構造。(Sadler TW, 1995)

絨毛基本構造

隨著絨毛間空腔逐漸接受胎兒與母體血液循環，此兩種血液循環會非常接近。它們被所謂的「胎盤障壁」分開，靠的是微妙的胎盤絨毛構造。母血進入絨毛間空腔(intervillous space)之後，面對的是游離型絨毛(floating villi)最外一層的細胞：胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)，然後是一層連續或不連續的細胞型滋養層母細胞(cytotrophoblast)，然後是一層基底膜(basement membrane)、一層胎兒血管內皮細胞，最後是進入胎兒微血管。養份及氧氣交換就在這裡進行，有如肺臟的肺泡一般。基底膜之下如果沒有血管，則是進入絨毛基質(stroma)。(圖一)

子宮胎盤血管的形成(Uteroplacental vessels)

胎盤附著在子宮內膜的區域，當生產時會隨著胎盤剝落的部分，稱為基板(basal plate)；相對留在子宮的部分，就稱為胎盤基(placental bed)。為了建立子宮與胎盤之間的血液循環，母體的子宮血管(子宮動脈)，就必須要穿過基板，最後才能灌流到絨毛間空腔，完成初級的子宮胎盤血管系統。通常子宮動脈進入子宮內膜和基板後，稱為「螺旋動脈」(spiral artery)，但是也有學者將「螺旋動脈」定義為未懷孕的子宮，懷孕後稱為「子宮胎盤動脈」，不過目前大多數的文獻均認為它們是同意詞。

有關於人類的胎盤，到底母體的血液循環甚麼時候開始進到絨毛間空腔，研究報告還很分歧(Brosens and Dixon, 1966;Carter, 1997;Castellucci, Scheper *et al.*, 1990;Kaufmann, Black *et al.*, 2003)，也有觀察動物胎盤的報告(Enders and Blankenship, 1997)。有報告顯示，受孕後 28-30 天，螺旋動脈的末梢開口會進入絨毛間空腔，而在絨毛間空腔也出現血液的出口，流回母體的子宮靜脈系統(Carter, 1997;Castellucci, Scheper *et al.*, 1990;Kaufmann, Black *et al.*, 2003))，他們觀察還發現入口和出口數目幾乎一樣。但是也有人認為動脈入口比靜脈出口多(Boyd JD and Hamilton WJ, 1970)，似乎研究方法會影響其結果。在足月的胎盤，有報告基板約每一平方公分有 1 或 0.5 個動脈血管開口(Brosens, 1964)，後續研究報告說足月的胎盤有 120 個動脈血管開口(Brosens, Robertson *et al.*, 1978)。

子宮胎盤血管的形態改變

除了開口數字以外，另外一個重點反而比較重要，就是這些血管的在胎盤發育過程中的生理性變化。其中之一是螺旋動脈的內皮細胞會被滋養層母細胞所置換(Brosens, Robertson *et al.*, 1967;Ramsey, 1962;Ramsey, 1981)。胎兒在母體內生長，必須仰賴母體供應足夠的養分，但是母體必須產生一些變化，以改變母體可能為避免養分流失而產生的生理性及免疫性的「衝突」或「抵禦」。同時在整個懷孕過程中，母體身體產生巨大生理變化時(如血壓改變)，儘可能減少對胎兒的衝擊。螺旋動脈的內皮細胞由原先受母體血液動力學所調控的血管內皮細胞，漸次被不受母體控制的，所謂的血管內絨毛外細胞型滋養層母細胞(endovascular extravillous cytotrophoblasts, endovascular EVT)所取代，多少有這方面的意義(Haig, 1993)。

螺旋動脈的再鑄型(Remodeling of spiral arteries)

上述的血管內絨毛外細胞型滋養層母細胞取代螺旋動脈的血管內皮細胞程序，就是大家公認的螺旋動脈的再鑄型(remodeling)。

Brosens et al 在 1967 稱這個現象叫子宮胎盤動脈的「生理性變化」(physiologic changes)(Brosens, Robertson *et al.*, 1967)。他們認為這個程序包括四個步驟：(1)滋養層母細胞侵襲血管內皮，明顯取代血管內皮細胞及血管中央層的平滑肌細胞，(2)血管失去彈性，(3)血管擴張，變成寬闊、無法收縮的管狀通道，(4)失去血管運動的調控(vasomotor control)。

螺旋動脈的失去彈性及收縮能力，並遠離母體的血管運動的調控，其實對於維持穩定的胎盤血液循環有很大的幫助。同時隨著懷孕進行，胎兒所需營養日漸增加，而母體血流阻抗也會隨之降低，結果子宮胎盤動脈的血流量也可以配合胎兒需要而逐漸增加。

螺旋動脈的再鑄型如果出現欠缺，可能導致胎兒的發育遲滯。這在妊娠性高血壓及子癩前症(preeclampsia)可以看到(Feinberg, Kliman *et al.*, 1991;Kaufmann, Black *et al.*, 2003)。這個部分在後面還會說明。(圖二)

再鑄型的階段性變化

近年來對於子宮胎盤動脈的生理性變化的研究愈來愈多。也因此對於它們的過程有更進一步的了解。目前已經了解這整個過程大約可以分為三階段。

第一階段：螺旋動脈的內皮細胞變為嗜鹼性、出現細胞內空泡、平滑肌細胞失去完整的結構排列及管徑擴大(Craven, Morgan *et al.*, 1998;Kaufmann, Black *et al.*, 2003)。此時血管內皮看不到滋養層母細胞，所以此階段變化與滋養層母細胞的侵襲較無明顯關聯，主要是母體本身子宮內膜(蛻膜)之局部變化有關。

第二階段：螺旋動脈周邊出現絨毛外細胞型滋養層母細胞(EVTs)。當第一階段完成之後，在著床部位的螺旋動脈開始有滋養層母細胞靠近及進行血管內侵襲。這個部分的動物實驗(天竺鼠為主)資料顯示(Hees, Moll *et al.*, 1987;Nanaev, Chwalisz *et al.*, 1995)，血管中層的平滑肌細胞漸次減少，出現類纖維蛋白元(fibroid)沉積，然後滋養層母細胞侵襲進來。他們發現來到螺旋動脈周邊的滋養層母細會分泌一氧化氮(nitric oxide, NO)，一種很強的促進血管擴張的內生物

質，造成螺旋動脈的擴張及有利於滋養層母細胞侵襲到血管內(Nanaev, Chwalisz *et al.*, 1995)。雖然滋養層母細胞會破壞血管中層的平滑肌，也會造成血擴張，但是似乎一氧化氮的效應才是主要的影響因子。

第三階段：螺旋動脈血管內的滋養層母細胞浸潤變得明顯。隨著再鑄型的進行，螺旋動脈的血管擴張現象會愈來愈明顯(Brosens, Robertson *et al.*, 1967)。接近絨毛間空腔(intervillous space)的入口處附近，螺旋動脈的血管內徑擴張將近原先的 5 到 7 倍寬(Boyd JD and Hamilton WJ, 1970)。以精確的電子顯微鏡觀察，他們預估原先螺旋動脈經過子宮肌肉層時的血管內徑是 200 μm ，但是到了接近絨毛間空腔(intervillous space)的附近，血管內徑可以是 500 到 1000 μm ，而動脈開口處大到 2000 μm (Sheppard and Bonnar, 1974b;Sheppard and Bonnar, 1974a)。

滋養層母細胞的浸潤與彈性纖維(elastic fibers)的消退是並行的。雖然螺旋動脈在懷孕過程中仍然會產生新的彈性纖維，但是滋養層母細胞浸潤同時引發的退化性變化(degenerative processes)，會使得新產生的彈性纖維在以後也漸次消失(Blankenship and Enders, 1997;Enders, Blankenship *et al.*, 1997;Pijnenborg, Robertson *et al.*, 1974;Robertson, 1976;Robertson, Manning *et al.*, 1974)。最近的報告顯示，組織蛋白分解酶(tissue proteolytic enzymes)在這裡有扮演一定的角色。所以 interstitial collagenase (MMP-1)，gelatinase A (MMP-2)，stromelysin 1 (MMP-3) 及 gelatinase B (MMP-9)均有被注意到在此有所表現(Blankenship and Given, 1995;Blankenship and King, 1994b;Moll and Lane, 1990)。滋養層母細胞的侵襲也會伴隨螺旋動脈管壁類纖維蛋白元(fibroid)沉積，最後也使得原本有彈性的血管變成硬化的通道(Brosens, Robertson *et al.*, 1967)。雖然如此，他們用 α -smooth muscle actin 抗體去染螺旋動脈管壁，仍然可以片段染色。

滋養層母細胞逐漸形成單層或多層的管內細胞，有時會形成管內細胞塊(plug) (Brosens, Robertson *et al.*, 1967;Carter, 1997)。細胞塊甚至會阻塞血管，其結果有何生物意義目前仍待研究，不過由於螺旋動脈會有分枝，所以不易影響絨毛間空腔(intervillous space)的血流。有些滋養層母細胞進到管內就定位之後，型

態上會變得類似內皮細胞，所以用一般的組織染色不易分辨。如果 anti-cytokeratin 17(CK-17)或 GZ112 去染色(Hartmann, Blaschitz *et al.*, 1997;Proll, Blaschitz *et al.*, 1997)，可以發現大部分的子宮內膜區的螺旋動脈內層細胞和內三分之一的子宮肌肉層區的螺旋動脈內層細胞，均為陽性反應，表示他們的細胞特性是屬於滋養層母細胞來源。

再鑄型的細胞學機轉

滋養層母細胞要進到子宮胎盤動脈，首先要先附著於螺旋動脈。因此細胞粘連分子(cell adhesion molecules, CAMs)的運作應該是首要研究的對象。細胞附著分子(CAMs)應該對於滋養層母細胞的組織侵襲、與細胞外間質(extracellular matrix, ECM)的附著、形成細胞聚落(colonies)及管內浸潤均有關係。

選擇素(Selectins): 螺旋動脈血管內的滋養層母細胞會表現 Sialyl-Lex(Lewis^x)(King and Loke, 1988)。它是 E-selectins 及 P-selectins 的配體(ligands)。科學家認為 Sialyl-Lex 與 selectins 的互動與滋養層母細胞附著於螺旋動脈血管及在血管內移行(migrate)應該有關聯。

ICAM-1: 原先的研究認為 intercellular adhesion molecule-1 主要表現在床處的子宮內膜(Ruck, Marzusch *et al.*, 1995;Ruck, Marzusch *et al.*, 1994)。但是證據顯示大型顆粒淋巴球、巨噬細胞及血管周邊間質型滋養層母細胞及血管內滋養層母細胞也都有表現(Burrows, King *et al.*, 1993a;Burrows, King *et al.*, 1993b;Burrows, King *et al.*, 1994)。ICAM-1 的功用是如何，除了對於滋養層母細胞的組織侵襲有影響之外，其他部分目前還需要進一步研究。

胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)的特性

到了這個階段，母體胎兒或是胎兒母體物質交換開始要展開。外為組織的交換仍舊有限，真正胎盤的代謝作用及內分泌功能主要是要在絨毛(villi)裡發生。在整個胎盤的發育過程，絨毛的型態有很多種，但是基本構造是一致。前已述及，

包括：

1. 絨毛由胞融型滋養層母細胞層所包覆。這一層類似上皮結構的細胞層，將絨毛內部構造(屬於胎兒部分)與母體血液分開。與其他細胞所不同之處，此細胞層不是由一個個單一細胞所構成，它們是一層連續、不間斷、多細胞核及無細胞間隔的細胞組成。
2. 胞融型滋養層母細胞之下，由一層細胞型滋養層母細胞(cytotrophoblast)組成。它們分布較不連續，有時是單一細胞，有時是聚集成團的細胞(Langhans' cells)。這裡的細胞型滋養層母細胞主要是負責胞融型滋養層母細胞的生長及再生(regeneration)。
3. 滋養層母細胞之下的基底膜將上述兩種滋養層母細胞與絨毛的基質(stroma)部分分開。
4. 基質層由多種結締組織細胞、結締組織纖維及基本物質構成。最重要的是，胎兒血管分布於此。在大型的幹絨毛(stem villi)，包含動脈和靜脈；如果是分枝的絨毛，則血管多半是以微血管或靜脈竇為主。(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)

我們要了解胞融型滋養層母細胞的重要性，是必要先知道它們是甚麼樣的細胞特性。我們已經知道，胞融型滋養層母細胞是一層連續、不間斷的細胞，包覆幾乎所有的絨毛表面及部分的 inner surface of chorionic plates 及 basal plates。也就是說，它們也是所有絨毛間空腔(intervillous space)的內襯細胞。即使以電子顯微鏡觀察，它們也是連續的構造，似乎無法將它們分成不同的單位。只有在懷孕的末期，因為胞融型滋養層母細胞的局部退化，而有區域性的 plaques，以及 fibrin-type 的 fibrinoid 填充(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)。

過去有報告顯示，胞融型滋養層母細胞的 brush-border membrane (BBM) (面向母體血液循環)及 basal plasma membrane (BPM)(面向 cytotrophoblast 或是基質層)，是有些不同。據了解它們的 calcitonin、 calcitonin gene-related peptide、muscarinic 及 transferrin receptors，在數目、affinity 及 distribution 均不同。

G-protein subunits、protein kinase C isoform 也有明顯分布上的差異(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)。

胞融型滋養層母細胞的表面，充滿了許多的微絨毛(microvilli)，它們代表了大宗的母體胎兒的交換界面。到了足月，這些微絨毛的存在，造就了交換面積的大量增加。據估計，總絨毛面積可以達到 12m²，大約是增加 7.7 倍。也因此微絨毛也成為免疫學及細胞生物學研究很有興趣的區域(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)。

在微絨毛的表面，有一些糖類，稱為 glycocalyx，一種 polysaccharides，似乎與免疫學上的關聯性，有被注意到。例如有些 lectin-binding sites 就是一個例子。目前我們要研究的 mucins，基本上就是一種高度醣化的蛋白質，而已知的結果顯示它們在胞融型滋養層母細胞的表面有明顯表現。表示有大量的醣類分枝會暴露在細胞膜表面，它們是面向母體血液循環，所以它們的免疫學及細胞生物學上的意義就值得好好研究。

如果以穿透式電子顯微鏡觀察，微絨毛的表面有許多 membrane-bound enzymes，例如 alkaline phosphatase，galactosyltransferase， α -amylase，protein kinase，cyclic 3,5-nucleotide phosphodiesterase，5-nucleotidase 及 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase。其他的分析包括與 transplacental transfer 有關的 surface receptors；其中與 hormones 及生長因子有關的部分也有一些報告。例如 insulin receptor，insulin-like growth factor(IGF-II)，interleukin-6 receptor，VEGF，colony-stimulating factor 及其 receptor 等等(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)。

其中 epidermal growth factor receptor (EGFR)，是 proto-oncogene *c-erbB-1* 的 gene product 及相關的 proto-oncogene *c-erbB-2* 的 gene product，似乎吸引了不少目光(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a;Evain-Brion and Alsat, 1994)。EGFR 已知在胞融型滋養層母細胞及絨毛外細胞型滋養層母細胞(EVTs)有表現。它們在羊水、臍帶血管及胎盤組織均可偵測到。EGF 可以引發滋養層母細胞的分化(分

化成胞融型滋養層母細胞)及增加 human chorionic gonadotropin (hCG)及 human placental lactogen(hPL)的製造。EGF 對於滋養層母細胞的 proliferation 的功能仍不明顯(Muhlhauser, Crescimanno *et al.*, 1993)。

至於 proto-oncogene *c-erbB-2* 的 gene product，屬於 HER family，在許多惡性腫瘤可以被發現與 EGFR 一起表現。它們在發展及維持惡性性狀上有功能。報告顯示，這兩種 receptors 在絨毛的胞融型滋養層母細胞會同時表現，但是在 proliferating 的絨毛外細胞型滋養層母細胞(EVTs)，則只有 EGFR 有表現。在這裡，*c-erbB-2* 似乎只表現在 differentiating 細胞，而不在 proliferating 細胞 (Muhlhauser, Crescimanno *et al.*, 1993)。

絨毛的表面以胞融型滋養層母細胞層為主。可以細分為三個層帶(zones)。
外層：吸收層，充滿 vesicular uptake 的胞器，以及細胞骨幹(cytoskeleton)，

所以又稱 syncytioskeletal layer。

中層：分泌層，主要胞器都在這裏。

基底層：少量的胞器。

中層的厚度的變異就成為絨毛的表面的特異性的變化所在。這在第二孕程以後會漸次出現。為何出現這樣的分別，有許多種說法，但是學者相信，這可能是滋養層母細胞的處於不同 apoptosis cascade 的 stages 所致。從細胞融合、變厚、多細胞、rough endoplasmic reticulum (EM)變化，到包含 apoptotic 細胞核的 syncytial knots 突出細胞膜為止，一連串的不同變化的階段所致。

胞融型滋養層母細胞層到了足月，厚度大約是 2-10 μ m，端視細胞核的位置而定。前已述及，胞融型滋養層母細胞表面會有 microvilli。大部分的胞融型滋養層母細胞層是充滿 rough EM (rEM)，與 energy metabolism 有關(Boyd JD and Hamilton WJ, 1970)。一些區域則出現以 smooth EM (sEM)為主的胞融型滋養層母細胞。這些細胞也會有較多的 tubular type 的粒線體，它們的構造與活躍於 steroid metabolism 的內分泌細胞相似。此區域的 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 及 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 會增加，也就表示此區域的細胞參與了 steroid

metabolism。

隨著胎盤發育的過程，絨毛區的微血管會與滋養層母細胞愈來愈靠近，這樣有利於血液交換。所以微血管的基底膜(basement membrane)與滋養層母細胞層的基底膜便會癒合(fuse)。之後由於靜脈竇的壓力會過來，此時滋養層母細胞的細胞核可能會被排擠到旁邊，所以在該處細胞核與許多胞器會大量集中，稱為胞融結(syncytial knots)。

胞融結(syncytial knots)

胞融結的特色是多層的細胞核聚集，然後稍為往外突出。有時候是絨毛表面的垂直切面所造成，有時要與 syncytial buds, syncytial bridges 及 syncytial sprouts 區別。另外一個鑑別的是 apoptotic knots，裡面則是充滿 aged, dying nuclei (Boyd and Hamilton, 1966; Cattle, Kaufmann *et al.*, 1987; Hamilton and Boyd, 1966; Kaufmann, Luckhardt *et al.*, 1987)。

Syncytial buds 通常是只正常的絨毛表面起伏或分枝的切面所造成。Syncytial bridges 可能與相近的絨毛表面有融合現象相關。也可能因此造成 intervillous space 內的血管相連。大型的，類似 mushroom 的形狀，裡面也是充滿細胞核的稱為 syncytial sprouts。目前此名詞已普遍認為是用於絨毛向外擴張的正常現象。它們在早期懷孕期間很容易看到。通常細胞核排列比較沒那麼緊密。

Apoptotic knots 形狀類似，但是細胞核則更密、稍微細胞有分隔、而且已經看不到胞器，細胞質也出現退化的現象。因為胞融型滋養層母細胞的壽命是有限的，所以 normal aging 所造成的 degenerative change 是合理的。

絨毛部細胞型滋養層母細胞(villous cytotrophoblast)

在絨毛表面，細胞型滋養層母細胞形成第二層的滋養層母細胞。它們不同於第一層的胞融型滋養層母細胞，它們起初是連續的，但是隨著懷孕週數增加，它變得不是連續的。但是一些細胞型滋養層母細胞會型成所謂的 Langhans' cells。

這些 Langhans'cells 會一直持續到足月。曾經有估算過，懷孕 12 週時，Langhans'cells 約重 2g，但是到了足月，也有 12g。所以 Langhans'cells 是持續在增加它們的數目。由於絨毛表面積在快速增加時，cytotrophoblast 無法趕上，所以會比較散。由於細胞型滋養層母細胞不似胞融型滋養層母細胞及內皮細胞具有 Fc- γ receptors，所以無法協助 transfer 免疫球蛋白，因此真正的 maternofetal immunoglobulin transfer 主有在懷孕的晚期，cytotrophoblast 變得 incomplete 以後才會明顯，就是這個道理。(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)

細胞型滋養層母細胞的內分泌活性

細胞型滋養層母細胞不僅是 trophoblastic stem cells 而已，他們也似乎有內分泌器官的活性。過去有人認為 Langhans'cells 是 hCG 的主要來源。當然目前已知 Langhans'cells 的總數，會隨著週數增加而增加，但是 hCG 的血中濃度在懷孕 8 週附近是最高，已後就陸續下降，所以 Langhans'cells 是 hCG 的主要來源是不夠的。當然我們現在已了解 hCG 主要是胞融型滋養層母細胞在製造。

正常情況之下， α -hCG 是在 syncytial fusion 之前表現， β -hCG 是在 syncytial fusion 之後表現，hPL 則是在更晚一些才出現。不過似乎不完全是 syncytial fusion 與否在決定，而是 precess of trophoblastic differentiation 的程度使然。但是在 pathological condition，在 tissue culture，或是一些 condition，如 extravillous 細胞型滋養層母細胞，sequence of gene expressions 未被 delayed，但是 syncytial fusion 被 inhibited 時，也會出現非胞融型滋養層母細胞也分泌 β -hCG 的情況。

已知絨毛內細胞型滋養層母細胞(villous cytotrophoblast)，主要是 Langhans'cells，會分泌 somatostatin。Somatostatin 是許多賀爾蒙的 inhibitor。比如 GH、TSH。Somatostatin 也會抑制胞融型滋養層母細胞分泌的 hCG 及 hPL。villous cytotrophoblast 還會分泌 corticotropin-releasing factor (CRF)，gonadotropin-releasing hormone(GnRH)(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)。

滋養層母細胞的週轉作用(Turnover of trophoblast)

已知的報告顯示，在最後的一個月，胎盤絨毛可以重達 90 公克，其中胞融型滋養層母細胞佔 77.5 公克，細胞型滋養層母細胞佔 12.5 公克。假設一個滋養層母細胞的平均體積為 $1400\mu\text{m}^3$ ，12.5 公克的細胞型滋養層母細胞應該有 9×10^9 個細胞。

每個足月胎盤的滋養層母細胞面積是 12m^2 ，每 $10,000\mu\text{m}^2$ ，70 個滋養層母細胞在四週內行有絲分裂，所以經過運算之後，每天每個胎盤有 3×10^9 的絨毛內滋養層母細胞行有絲分裂。

大約 15-20% 的有絲分裂後滋養層母細胞可能會退化。但是絨毛內滋養層母細胞數目大致上維持穩定。

一般而言，如果胞融型滋養層母細胞 in culture 沒有經過 syncytial incorporation，通常 life span 是有限，可能是 2 weeks 左右。In vitro 胞融型滋養層母細胞沒有細胞型滋養層母細胞繼續 fusion，則 hormone production 會急速下降，甚至幾天內死亡。所以從動物實驗的觀察也一樣可以看到，如果失去細胞型滋養層母細胞，則胞融型滋養層母細胞通常很快也會 degenerative change。

其原因何在目前仍不是很清楚。不過 syncytial fusion 之後 transcription 開始發生 downregulation 似乎是一個可能的理由。研究發現，RNA precursor 最會 incorporation 到細胞型滋養層母細胞和 stromal cells。然而胞融型滋養層母細胞幾乎沒有 uptake。胞融型滋養層母細胞上的有些基因，如：apoptosis inhibitor *bcl-2*、protease caspase 8 以及 anion transporter OAT4，也會出現沒有 transcription 的現象。這些與 apoptosis 有關的基因的 downregulation 顯然會影響胞融型滋養層母細胞的 life span。如果這個現象屬實，那麼胞融型滋養層母細胞的 survival 及 functional activity 似乎就要仰賴 syncytial fusion 以後，從細胞型滋養層母細胞去獲得所需要的 RNA 了。所以 syncytial fusion 的速度會受大量 RNA 的需求而改變了。(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)

mRNA 因為 RNase 到處都存在，所以 half-life 都很短。不過很幸運的，胎

盤是 RNase inhibitors 最多的器官，所以對於 RNA 的 stabilization 有很大的幫忙。所以總括來說，不僅胎盤需要長大，fusion 也是將可消耗的，但是不能製造的物質，從細胞型滋養層母細胞'送'到胞融型滋養層母細胞。只有如此步驟方能維持胞融型滋養層母細胞的存活及維持功能(Huppertz, Frank *et al.*, 1998)。

正常成熟胎盤

在足月的成熟胎盤，主要的結構是 long, slender, mature intermediate villi 然後有 short, grape-like terminal villi 的分枝。大部分的周邊絨毛的橫切面的直徑大約是 60-150 μ m。大致上，<5%的突出結構是 true trophoblast outgrowth，其餘的 95%，大部分是 section artifacts。只有一些比較中心的 villi 會出現 stem villi 或 immature intermediate villi。但是不屬於 persisting immaturity。在 thick section 也比較會出現 trophoblast tangential sectioning，所以在 thin section 就比較不會有 incorrect impression of sprouting 的情況。

滋養層母細胞在子宮內膜的侵入(invasion)及移動(migration)，最有可能是受到滋養層母細胞本身、母體及子宮內膜--此時又稱為蛻膜(decidua)的微環境的影響，近年來隨著分子生物學和細胞生物學的進步，對於此部分的研究也更深入廣泛，而以下要敘述的黏液蛋白，更是息息相關。

黏液蛋白(mucins)的生物角色

認識黏液蛋白的新角色

黏液蛋白(mucins)屬於一種高度醣化的蛋白質，主要表現在人體內不同類型的上皮細胞(Hollingsworth and Swanson, 2004)。它們主要分為分泌型(secretory)和胞膜型(membrane-bound)兩類。前者為上皮細胞所分泌，扮演類似潤滑劑的功能，包括:第 2、5AC、5B、6、7、8 及 19 型(MUC2,5AC,5B,6,7,8,19)；後者附在

細胞膜上而向外突出，有一段貫通細胞膜(transmembrane domain)，而後一段尾節在細胞質內(cytoplasmic tail)，包括：第 1、3A、3B、4、12、13、15、16、17 及 20 型(MUC1,3A,3B,4,12,13,15,16,17,20)(圖三)。科學家認為胞膜型黏液蛋白可以因應外在環境的改變而表現有如反應器(sensors of external environment)的功能。比如它們的胞外區段(extracellular domain)可以結合特定，或稱做「配體」(ligand)的分子，或者因為周圍酸鹼度、離子成分改變，或是其他的物理性質互動造成蛋白質的四維結構改變，於是在細胞質內的尾節可能產生修飾作用(modification)，包含磷酸化等反應，接著引發系列的細胞內訊息傳遞(signal transduction)。因此胞膜型黏液蛋白的性狀改變，也被認為與細胞的生長、複製、分化、轉型(transformation)乃至於細胞的移動、侵襲有關。

目前的文獻報告顯示：第一型黏液蛋白(MUC1)的過度表現(overexpression)，與直腸、胰臟、膽囊及口腔上皮腫瘤的侵襲性及遠處轉移有關。許多研究顯示，第一型細胞內附著分子(intracellular adhesion molecules, ICAM-1)可能就是MUC1的配體(ligand)之一，可以引發鈣離子活化的通路(Rahn, Shen *et al.*, 2004)。 *Pseudomonas aeruginosa* 或它的尾鞭與MUC1結合，也會引發訊息傳遞(signaling)的作用，包括MUC1胞質內尾端(cytoplasmic tail, MUC1CT)磷酸化，接著活化MAP 動力酶(MAP Kinase)通路等等(Lillehoj, Kim *et al.*, 2004; Wang, Lillehoj *et al.*, 2004)。MUC1胞質內尾端(MUC1CT)訊息亦可藉著 β -catenin, p120, catenin, p53及 α 型雌性素受體 (estrogen receptor- α , ER- α)傳至細胞核(Kam, Regimbald *et al.*, 1998; Singh and Hollingsworth, 2006; Wang, Lillehoj *et al.*, 2004)。(圖四)(圖五) MUC1的細胞質尾端 cytoplasmic tail (MUC1CT)其中一段(HGRYVPP)被發現是tyrosine phosphorylation site，而platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR β)在human pancreatic adenocarcinoma cell lines 可以*in vitro* 催化此位置的tyrosine phosphorylation，同時在其他cell lines實驗中，刺激PDGFR β 可以促進cell invasion。所以MUC1與PDGFR β 互動誘發的signal transduction似乎會影響pancreatic adenocarcinoma 的metastatic properties。(Singh, Wen *et al.*, 2007)

而down-regulation of MUC1 protein expression似乎也降低了metastatic potential of pancreatic adenocarcinoma(Tsutsumida, Swanson *et al.*, 2006c)，而此現象與一些被人認為會增加doubling times的基因 (cyclin B1 及 cyclin D3)出現overexpression有關。

第四型黏液蛋白(MUC4) 的過度表現也可能跟乳房、肺臟、直腸及胰臟的癌症有關。而 Singh AP 在 2007 的報告顯示抑制 MUC4 得表現可以壓制胰臟的癌細胞生長及轉移(Singh, Chauhan *et al.*, 2007)。甚至 Ramsauer VP 在 2003，2006 和 Pino V 在 2006 的報告已發現 MUC4 之如何影響細胞行為，應該與透過 ErbB2 及 ERK 的訊息傳遞有關(Pino, Ramsauer *et al.*, 2006;Ramsauer, Carraway *et al.*, 2003;Ramsauer, Pino *et al.*, 2006)。另外，第二十型黏液蛋白(MUC20)在腎臟有很高的 mRNA 表現量，在人類胎盤也有中度的表現量。MUC20 的產生，可能會降低一些蛋白分解酶，如 HGF-induced matrix metalloproteinase (MMP)表現(Higuchi, Orita *et al.*, 2004a)，也使人類胚胎腎細胞株(HEK293 cell line)的細胞複製減少(Higuchi, Orita *et al.*, 2004c)。

黏液蛋白在子宮及胎盤的角色

我們的分析顯示，人類胎盤的胞膜型黏液蛋白以第一、三、十五、二十型的基因表現最為明顯。第一型黏液蛋白(MUC1)的研究特別多，第十五型黏液蛋白(MUC15)則是最近才被定序出來，它的生物功能是何，尚待大家去解密，顯然後面還有很多研究空間，因此特別在此介紹此二型黏液蛋白。

第一型黏液蛋白表現在許多器官的上皮細胞表面，包括：乳腺、肺臟、腎臟、胃、膽囊、胰臟，以及女性生殖道。人類第一型黏液蛋白的基因約長 4 到 7 千對鹼基(kb)，含有七個 exons。蛋白質全長分三段，包括較短的胞質內尾節、貫通細胞膜區段，以及一塊很大的細胞外區段。後者含有一段是由 20 個胺基酸為單位，重複 20 到 125 次的序列，富含 serine, threonine 及 proline 等胺基酸，可以接上許多醣基。核心蛋白分子量約 120 到 225kDa，但是加上醣基以後可以達到 250

至 500kDa。從細胞表面伸展出去甚至可達到 200 到 500nm，遠長於一般的細胞粘連分子，例如 integrins 或 syndecans(它們不超過 50nm)。這些現象符合我們對 mucins 的看法，即黏液蛋白不僅是細胞的保護屏障，更具有調控細胞粘連的性質。Muc1 缺乏的小鼠，會有子宮的慢性感染及發炎。已知子宮內膜細胞的表面富含 MUC1，而體外實驗顯示，內膜上皮細胞表面如果表現出高量的 MUC1，則囊胚就很難附著到內膜。倘若從細胞表面移除 MUC1，則附著現象才會成立。合起來說，就是 MUC1 一部分扮演保護子宮內膜免於微生物的侵犯的角色，但是在胚胎著床時期則必須減少或消失，以利囊胚的附著。

MUC1 的表現，會受類固醇賀爾蒙的調控。例如雌性素會刺激子宮內膜 MUC1 的增加；而黃體素在小鼠實驗中是會對抗雌性素對 MUC1 的效果，但是在人類的子宮內膜，在分泌期(排卵後黃體素增加的狀態)時，MUC1 的表現是增加的。不同物種為何效果不同，其機轉仍待研究。不過我們的研究顯示，MUC1 在胎盤的表現，是隨著懷孕週數增加而遞增，而此現象是否與雌性素有關係則須進一步研究。讓我們好奇的是，MUC1 可以增加許多腫瘤細胞的侵襲及轉移作用，那麼在胎盤是否也表現類似的功能呢?前已述及，滋養層母細胞的細胞學性狀，包括複製、分化、侵襲等等，與胎盤最後可否完整發育及是否引起子癩前症 (preeclampsia, 一種懷孕 20 週以後合併高血壓、蛋白尿及全身水腫的疾病) 可能有關，所以我們進一步想了解 MUC1 對於滋養層母細胞的影響是如何。

第十五型黏液蛋白 MUC15 在人體各組織之中，以在胎盤的表現最為明顯。但是 MUC15 到底對胎盤的影響是如何，卻也耐人尋味。MUC15 是 2002 年才剛從牛奶脂肪球被分離出來。它的核心蛋白有 334 個胺基酸，一樣是全長分三段，包括胞質內尾節、貫通細胞膜區段，以及一塊細胞外區段。目前 MUC15 的生理功能還沒有人研究。我們發現 MUC15 與 MUC1 有許多類似的性質，如:初步數據顯示:表現量均會隨著懷孕週數增加而增加、在胎盤絨毛的胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)及蛻膜區的腺體細胞表現明顯，不過最大的不同點是:MUC15 在 EVT 似乎沒有表現。而 MUC15 會抑制 JAR 及 JEG-3 兩個絨毛膜

癌細胞的細胞株的細胞侵襲特性，但是可能是經由增加 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) 的表現來達成。由於 EVT 沒有表現，所以 MUC15 如何在胎盤或蛻膜區發揮影響力，目前還無法解釋。

黏液蛋白的 Epigenetic regulation

MUC1 目前被視為是 oncoprotein，在許多 cancer 中與 malignant potential 有關。已知的一些 cancer-related genes，*p16* 或是 *E-cadherin*，它們都有受到 epigenetic regulation 的調控。最近的研究顯示 MUC1 在 breast cancer cell line 的表現，似乎也受到 epigenetic regulation (Watanabe, Kashiwagi *et al.*, 2008)。DNA methylation 及 histone H3-K9 modification 被認為與 MUC1 gene expression 有很重要的關聯。所以了解其 epigenetic 的改變，對於癌症產生的風險了解及預測疾病預後，幫助很大。所以同樣地，了解 MUC1 在不同週數的胎盤中的 gene expression 的改變的 mechanism，包括是否有 epigenetic regulation 也是未來的方向之一。



本研究的假說

一、黏液蛋白與滋養層母細胞的蛻膜內侵襲作用有關

前面已經談過，胎盤是胎兒賴以生存的生命線。胎盤可以供應胎兒在子宮內所需的氧氣和養份。而胎盤內的子宮動脈的末端血管「螺旋動脈」在胎盤發育過程中，能否充分完成動脈的再鑄型 (remodeling)，攸關胎盤功能的優劣及胎兒的發育是否正常。而螺旋動脈的再鑄型與絨毛外細胞型滋養層母細胞取代螺旋動脈的血管內皮細胞的程序有關，所以滋養層母細胞在子宮內膜(蛻膜)區是否可以正常地移行 (migration)、侵襲 (invasion)，滋養層母細胞最後能否靠近及進行螺旋動脈血管內侵襲是十分重要的。

由於前面已經說明，黏液蛋白的性狀改變，被認為與細胞的生長、複製、分

化、轉型(transformation)乃至於細胞的移動、侵襲有關。而一些胞膜型黏液蛋白在胎盤的表現特別多，所以我們假設黏液蛋白與滋養層母細胞的蜕膜內侵襲作用有關。

我們會觀察主要的黏液蛋白(主為 MUC1 及 MUC15 等)在整個懷孕過程中不同時期的基因和蛋白質表現，組織中的分布及它們的可能角色。同時我們會以細胞生物學的研究方法，了解黏液蛋白對於細胞型滋養層母細胞的侵襲作用的影響。我們會用絨毛膜癌的細胞株(主要細胞成分就是滋養層母細胞)，給予 transfection 之後，在黏液蛋白 overexpression 的情況下，以 invasion assay 來觀察滋養層母細胞的侵襲作用會如何改變，之後再以 zymography 或其他研究來尋找可能的機轉。

二、 研究黏液蛋白與滋養層母細胞的互動可以提供子癩前症的病生理學研究的參考

同樣的研究方法也將會應用到一些子癩前症的胎盤的變化。黏液蛋白在子癩前症的胎盤的表現量是如何，目前沒有報告。由於我們已知子癩前症的胎盤，其滋養層母細胞侵襲作用是受到抑制而不完全的，所以黏液蛋白如果會對滋養層母細胞的組織侵襲作用有影響，勢必在子癩前症的產生，其病生理學方面，一定有它們的角色。我們將在本研究中觀察 MUC1 及 15 在子癩前症的胎盤中，它們的基因、蛋白質及組織免疫化學的表現及分布狀況，以提供將來後續研究的重要參考依據。

黏液蛋白研究的意義

黏液蛋白的特殊分子結構，使得它們具備了多種生物功能的特性。分泌型黏液蛋白扮演類似潤滑劑的功能，胞膜型可以表現有如因應外在環境的反應器。大分子的黏液蛋白，其胞外區段尚可以做為抵擋微生物入侵的屏障，避免細胞膜與外在環境(包括細胞訊息分子)的直接接觸。而胞外區段的醣化作用，也可能與生

物功能的不同表現相關，而其不同的抗原性，也與細胞組織的免疫反應息息相關。所以研究黏液蛋白的生物角色，方向絕對是多元化的。我們目前的研究數據顯示，MUC1 在重度子癩前症的胎盤表現，似乎不同於正常的胎盤。是否意味著重度子癩前症的胎盤，其滋養層母細胞侵襲作用是有受到的 mucins 的影響。由於我們只能從生產的胎盤觀察，所以重度子癩前症的胎盤在妊娠早期是如何，目前仍不得而知。將來建立母體血中監測 mucins 的方法，似乎可能成為預測懷孕預後的其中一項方法也說不定。總之 MUC1 與 preeclampsia 之因果關係，仍待我們繼續去研究。整體而言，不論是 secretory 抑或是 membrane-bound 的 mucins，它們的生物學角色，應該不只於原來我們所認知的 mucins。

滋養層母細胞的功能攸關胎盤的良莠，所以 mucins 在這裡的角色為何，確實值得我們好好研究。



第二章 研究方法與材料

一、臨床組織之收集

我們收集三個孕程(trimester)的胎盤或絨毛組織，包括正常及有子癩前症的案例。第一孕程(first trimester)是8-14週，第二孕程是15-28週，第三孕程是29到42週。第一孕程收集到的是絨毛組織為主，二、三孕程則是胎盤。組織均由台大醫院婦產部產房取得。實驗步驟已獲醫院之倫理委員會通過，取樣均獲受試者之同意。胎盤取1.5x1.5公分面積，0.5公分厚，面對子宮方向之部分。用於組織免疫染色的胎盤組織以4% 福馬林paraformaldehyde / phosphate buffered saline (PBS) 浸泡。作RT-PCR的組織以RNA later (Qiagen, CA,USA)保存，與作西方墨點檢驗 Western blot analysis的組織存在-80⁰C冰箱。

二、細胞株及細胞培養

我們自新竹食品工業發展研究所購買人類絨毛膜癌(human choriocarcinoma)的細胞株JAR及JEG-3。細胞以Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Biowest, Florida, USA) 保存，加上 10% 的fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories, Linz, Austria)，以及100 IU/ml的 penicillin和100 µg/ml 的 streptomycin (Biowest) 於humidified tissue culture incubator培養，37⁰C及5% CO₂ atmosphere。

三、北方墨點檢驗

我們自Clontech公司(BD Biosciences, CA, USA)購買多種組織北方墨點檢驗試紙 Multiple Tissue Northern (MTNTM) Blot。加上³²P-labeled random-primed之 full-length MUC15 complementary DNA (cDNA)作為探頭。在65⁰C環境下過夜配對 (hybridization)。之後55⁰ C下沖洗一小時，採用含2x standard saline citrate及 0.5% sodium dodecyl sulphate (SDS)之buffer，用Kodak BioMax film之autoradiography判讀signals。

四、RNA萃取及RT-PCR

全RNA以Trizol reagent (Invitrogen, California, USA)依據manufacturer's protocol萃取。取 2 micrograms之全RNA用StrataScript reverse transcriptase (Stratagene, CA, USA)作reverse-transcription (RT-PCR)以取得 cDNA 並收在 25 µl體積中。我們同時作conventional和quantitative PCR。作法是：取 2 µl的cDNA aliquot， PCR primers 參考表一。PCR 產物在2% agarose gel上跑膠，用ethidium bromide觀察。(Argueso, Balaram *et al.*, 2002;Argueso, Spurr-Michaud *et al.*, 2003;Bernacki, Nelson *et al.*, 1999;Gipson, Spurr-Michaud *et al.*, 2003;Higuchi, Orita *et al.*, 2004d;Higuchi, Orita *et al.*, 2004b;Higuchi, Orita *et al.*, 2004c;Higuchi, Orita *et al.*, 2004a;Williams, McGuckin *et al.*, 1999;Williams, Munster *et al.*, 1999)

五、利用 *Escherichia coli* 製造MUC15的recombinant protein

我們以RT-PCR從normal human colon的全RNA clone出partial human MUC15 (Genbank Accession No. BC020912)。sense primer是5'-GGg gta ccG ACA TAA ACA CAA CAC AG-3'。 anti-sense primer是5'-CCG ctc gag GGG ATC TGA CGT ATT TGG-3'。 PCR產物再clone到 pET30a(+) (Novagen, Madison, WI, USA)以製造MUC15-His fusion gene，其insert用DNA sequencing來確定。為表現MUC15 recombinant proteins 我們將pET30a/MUC15 plasmids transform到 *E. coli*的 BL21。而 MUC15-His expression 用 1 mM 的isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)來誘發。

六、建立vectors

以RT-PCR來clone full-length human MUC15 (BC020912)，用的total RNA是來自normal human colon。 sense primer是5'-CGG GAT CCC GAC AAT GTT GGC CTT AGC C-3'，而anti-sense primer是5'-GCT CTA GAG CCG TTC CAT ACA GAA

GTA CG-3'。PCR 產物clone到pcDNA3.1/myc-His (InVitrogen)來generate MUC15/myc-His fusion gene。其insert用DNA sequencing來確認。MUC1的vector則是贈送品：control expression vector pHb-Apr1-neo (Mock) or pHb-Apr1-neo containing full-length human MUC1 (MUC1) (a gift from Dr. Michael A. Hollingsworth, Eppley Institute for Research in Cancer and Allied Diseases, University of Nebraska Medical Center, Nebraska)(Burdick, Harris *et al.*, 1997)

七、Matrigel組織侵襲性檢測(invasion assays)

我們用BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber (BD Biosciences, Massachusetts, USA)來監測細胞的invasion assays。分析方法依據manufacturer的protocol，且可參考以前的描述(Huang, Liang *et al.*, 2007)。簡單來說：JAR細胞株取 5×10^4 或JEG-3取 2×10^5 的細胞量於500 μ l的DMEM中置入chamber中。在humidified tissue culture incubator中，37°C，5%的CO₂ atmosphere環境48hrs後觀察matrigel的invasion的程度。non-invading cells會留在matrigel的membrane的upper surface。我們用cotton-tipped swab刮除這些上層細胞。invaded cells則會跑到membrane的lower surface。我們用100% methanol固定它們，然後以0.5% crystal violet (Sigma)染色。蒸餾水沖洗兩次，將chamber風乾。利用phase contrast microscope計算每一個field有幾個invaded cells。以six random fields per invasion chamber得出 means \pm SD。

八、Mucins的過度表現(overexpression)

取 5×10^5 個JAR或JEG-3細胞，以4 μ g的pcDNA3.1/myc-His control plasmids (標示為Mock)或MUC15/pcDNA3.1/myc-His (標示為MUC15)作transient transfection，或以2 μ g 的control expression vector pHb-Apr1-neo (Mock) 或pHb-Apr1-neo containing full-length human MUC1 (MUC1) ，以Lipofectamine 2000 (InVitrogen) 促進反應。48 h後所有細胞均被回收。

九、抗體來源

Anti-MUC15：將聯結了MUC15的synthetic N-terminal peptide：

hSPPLNLPNNSHGITDFS (MDBio Inc., Taipei, Taiwan)的keyhole limpet hemocyanin (Pierce, Illinois, USA)注入rabbits，以製造 anti-human MUC15 polyclonal antibody。簡單來說：以0.5 mg的conjugated peptide作為每次的 immunization，總共做了nine boosts來enhance titer。Anti-serum使用聯結了MUC15 peptide的CNBr-sepharose beads，以affinity purification的方式純化。

Anti-MUC1：Mouse anti-MUC1 monoclonal antibodies (mAbs) (clone VU4H5及 M2C5)及 mouse anti-cytokeratin (CK)7 (或標示成KRT7) mAb是購自 Santa Cruz (California)。 Mouse anti- β -actin (ACTB) mAb是購自BD Pharmingen (California)。 Goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies 購自 Vector Laboratories (California)。

十、組織免疫化學染色法

胎盤切片以xylene去蠟(de-paraffinize)然後以系列之graded alcohols作 re-hydration。以1% H₂O₂ in PBS，計10min，去除endogenous peroxidase的活性。再以PBS rinse三次，5% non-fat milk/PBS incubate 30 min，以減少non-specific bindings. Sections 與primary antibodies incubate：anti-MUC1 mAb VU4H5(1:400)，for anti-MUC1 mAb M2C5 (1:100)，anti-MUC15 polyclonal antibody (1:400)，anti-cytokeratin (CK) 7 monoclonal antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)，或anti-Ki67 monoclonal antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology)，用5% non-fat milk/PBS稀釋後在4⁰C 16h。用PBS rinse兩次，以Super SensitiveTM link-Label IHC detection System (BioGenex, California, USA)系統，配用 3,3-diaminobenzidine liquid substrate system (Sigma)來判讀免疫染色的結果。所有切片都用hematoxylin，1 min 作為counterstain。以UltraKitt (J.T. Baker, Deventer, Holland)來mount。Negative controls採用同濃度isotype matched control IgG來取代

primary antibodies。

十一、定量real-time PCR

採用Quantitative PCR System Mx3000P (Stratagene)來分析胎盤之 MUC15 expression。依據manufacturer's protocol，簡單來說：在25- μ l 之volume中，含2 μ l cDNA，400 nM個別的sense及anti-sense primers，12.5 μ l Brilliant®SYBR®Green QPCR Master Mix (Stratagene)來做反應。PCRs過程是95⁰C incubation 15 min，接著40個amplification cycles：30-s denaturation at 95⁰C, 50-s annealing at 54⁰C, 30-s extension at 72⁰C. 所有樣品均做三套以資分析，而產品純度皆以real-time PCR cycles結束時的dissociation curves來檢定。MUC1及MUC15 expression的Relative quantity to β -actin是以MxPro Software (Stratagene) normalized之後分析。

十二、西方墨點檢驗(western blot)

胎盤組織在含有1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 160 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride的lysis buffer中讓它homogenized (Huang, Chen *et al.*, 2006)。Insoluble material則以10,000 g離心15 min去除。取40 μ g的proteins去做electrophoresis：6% SDS- polyacrylamide gel，transfer到Hybond enhanced的chemiluminescence nitrocellulose membrane (GE Healthcare, UK)上。MUC1 protein 以mouse anti-MUC1 mAbs來detection。MUC15 proteins是以rabbit anti-MUC15 polyclonal antibodies 來detection。internal control採用 Actin，用 anti-actin monoclonal antibodies (BD Pharmigen, California, USA)來detect。觀察 Bands的方法是以horse-radish peroxidase conjugated secondary antibodies (Vector Laboratories, California, USA)一起incubate後，以chemiluminescence reagents (GE Healthcare)判讀。Mucins的 signals 再用ImageQuant 5.1 software (Molecular Dynamics, CA, USA) normalized to actin signals後做定量分析。

十三、以SiRNA knockdown MUC15 expression

對抗MUC15的表現的small interfering RNA (siRNA) oligonucleotides 及control siRNA是購自Dharmacon Research, Inc. (Illinois, USA)，它們分別是用 custom SMARTpool 及 non-targeting siRNA pool來合成。在MUC15的 knockdown實驗，JAR及JEG-3細胞以Lipofectamine 2000 (Invitrogen)，最後siRNA濃度是100 nmol之下，將siRNA transfect上去。細胞先以serum-free DMEM medium incubate 4h之後，改用complete DMEM medium (含10% FBS)再incubate 48 h，然後再harvest細胞。MUC15 expression 是否有被knockdown是以real-time RT-PCR及western blot來確認。

十四、Gelatin zymography

以Conditioned media在serum-free DMEM下培養transfected cells cultured 48 h，用8% SDS-polyacrylamide gel co-polymerized with 1% gelatin 跑 electrophoresis。之後gels用2.5% Triton X-100洗 30min 兩次，然後在developing buffer (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, and 0.05% Brij35, pH 7.5)下 incubate 16 h。incubation之後，gels用Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.5% in 50% methanol, 10% glacial acetic acid) 染色2 h，再以10% glacial acetic acid及20% methanol做destain。

十五、統計分析

我們以Student t-test 或Mann-Whitney U-test 來做statistical analyses。Data 以 mean \pm SD來呈現。P<0.05表示 statistically significant。

第三章 結果

第一部分 不同人體器官組織的MUC15 mRNA的表現型態

MUC1, 3, 4, 12, 15, 16, 17, and 20的gene transcripts 以RT-PCR分析結果 (表一, 圖六, A): 我們發現MUC1, 3, 15, and 20在足月胎盤的表現量最高。MUC13 及 17表現量中等, 而 MUC4, 12, and 16 則很低。表現量最高的mucins之中, 我們對於MUC15的了解最少, 故我們首先將focus擺在MUC15的研究。為了確認 MUC15 在不同人體器官組織的mRNA的表現型態, 我們用commercialized human tissue northern blot 來分析。在不同人體器官組織裏, MUC15 mRNA在胎盤有最強的表現 (圖六, B), 在肺及腎臟有中等表現量。我們也發現MUC15有兩種不同大小的mRNA product在胎盤, 但是在肺及腎臟則只有一種size。在其他人體器官組織, 包括 brain, heart, skeletal muscle, colon, thymus, spleen, liver, small intestine, 及peripheral blood leukocytes, 幾乎很少或甚至沒有表現MUC15。所以表示MUC15在胎盤表現特別活躍; 此外, 胎盤可以表現兩種forms的MUC15, 推測最有可能是membrane-bound 和 secreted forms這兩種。為了確認, 我們又設計 specific primers, 讓它可以同時amplify membrane-bound form及secreted forms of MUC15, 然後出現different sizes of MUC15 by RT-PCR (表一, 圖六, C). 所以證明 human placentas 同時表現membrane-bound and secreted forms 的MUC15 mRNA。

第二部分 不同懷孕週數之胎盤的MUC1及MUC15 mRNA表現

MUC1: 以Quantitative RT-PCR偵測MUC1 mRNA在不同孕程的胎盤中的表現量發現, 第三孕程明顯高於第一孕程($P < 0.01$)及第二孕程($P < 0.05$) (圖七, A)。第二孕程雖然也高於第一孕程, 但是差異不明顯($P = 0.17$)。代表性的quantitative RT-PCR 的amplification plots顯示在圖七之B。這些結果顯示胎盤中MUC1 mRNA expression是隨著懷孕週數的增加而增加。

MUC15：MUC15 mRNA表現量也是隨著懷孕週數進展而增加(圖八，A)。第二孕程的 MUC15 mRNA 表現量明顯高於第一孕程($P < 0.05$)。第三孕程則明顯高於第二孕程及第一孕程。同樣地，代表性的quantitative RT-PCR 的amplification plots 顯示在圖八之B。這些結果也類似MUC1，顯示胎盤中MUC15 mRNA expression 是隨著懷孕週數的增加而遞增。

第三部分 MUC1及MUC15的蛋白質表現

為了了解mRNA表現量與protein expression量是否一致，我們繼續作western blots，結果如下。

MUC1：以clone VU4H5的anti-MUC1 mAb偵測，我們看到兩個 major bands (170 kDa 及 > 250 kDa)，顯示胎盤中有two isoforms of MUC1 (圖九，A)的可能。此外，第三孕程胎盤的protein expression量，果然明顯高於第二孕程及第一孕程，這與mRNA表現量的趨勢是符合。如果用clone M2C5的anti-MUC1 mAb偵測，可以recognized與VU4H5看到的不同的isoforms(圖九，B)。將signals of VU4H5-and M2C5-reactive MUC1定量，可以得到更明顯的趨勢(圖九，C)。

MUC15：首先我們要先確認自製的anti-MUC15 polyclonal antibodies的 specificity，所以我們就用E. coli lysates，看有誘發及無誘發recombinant MUC15 proteins (~37 kDa)之後的anti-MUC15 polyclonal antibodies的辨識能力來判斷。結果有用IPTG作induction of MUC15 protein expression的才會被binding(圖十，A，+IPTG)，顯示出我們自製的anti-MUC15 polyclonal antibodies的 high specificity。接著我們作western blot，第三孕程胎盤的MUC15 level也是明顯果然明顯高於懷孕早期的胎盤。(圖十，B、C)。此與real-time RT-PCR的結果亦符合。另外MUC15的protein band有出現smear，不過大致是在~120 kDa的位置，此則與以往的結果一致。

第四部分 胎盤的組織免疫化學染色法

MUC1：在第一孕程的胎盤絨毛中，VU4H5-reactive forms of MUC1不容易被偵測到(圖十一，A)；到了第二孕程，在胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)可以染色到(圖十一，B)；第三孕程胎盤則MUC1可以在大部分的絨毛的胞融型滋養層母細胞偵測到(圖十一，C)。以anti-MUC1 mAb M2C5染色，也可以得到類似結果(圖十一，D-F)，不過M2C5抗體在第一孕程的胎盤絨毛中的胞融型滋養層母細胞有部分染色。我們以irrelevant mouse IgG 作為negative control (圖十一，F, inset)。兩種抗體在絨毛的間質細胞(stromal cells)均無法偵測到。結果顯示MUC1在人類胎盤絨毛主要表現在胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)，而且隨著週數增加而表現愈來愈明顯。

MUC15：在第一孕程的胎盤絨毛中，胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)及細胞型滋養層母細胞(cytotrophoblast)均可偵測到MUC15 protein (圖十二，A-C)。CK7可以作為細胞型滋養層母細胞(cytotrophoblast)的cell marker(圖十二，B)。Ki67可以作為細胞型滋養層母細胞的proliferation marker(圖十二，C)。在第二孕程MUC15 在胞融型滋養層母細胞可以偵測到，但是在絨毛外滋養層母細胞(extravillous cytotrophoblasts, EVT)則沒有表現 (圖十二，D-E)。至於negative control，是沒有染色現象(圖十二，F)。在第三孕程胎盤，MUC15就很明顯表現在胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)的apical surface(圖十二，G)。整體結果顯示MUC15 protein在syncytiotrophoblasts的表現量是隨著週數在增加。與MUC1類似，在絨毛的間質細胞(stromal cells)亦無法偵測到MUC15的表現。

第五部分 蛻膜層(decidua)的組織免疫化學染色法

MUC1：蛻膜層主要是為了觀察絨毛外滋養層母細胞(extravillous cytotrophoblasts)的性狀。染色包括anti-KRT7 (圖十三，A)及anti-MUC1 mAbs (圖十三，B)。我們的VU4H5染色顯示第二孕程的蛻膜層的絨毛外滋養層母細胞，出現兩種族群：MUC1-positive及 MUC1-negative的細胞(圖十三)。M2C5染色也顯示類似狀況。

絨毛外滋養層母細胞在三個孕程的胎盤均有出現，我們以KRT7染色可見(圖十四，A、C、E)。值得注意的是在蛻膜層由VU4H5抗體染色的MUC1-positive的絨毛外滋養層母細胞數目隨著週數增加而增加(圖十四，B、D、F)。M2C5染色其顯示狀況也類似。此外，蛻膜層的腺體上皮細胞，在不同的週數均會表現MUC1(如圖十四，D)，顯示蛻膜層腺體也是MUC1的製造來源之一。

MUC15：在不同的孕程，MUC15在蛻膜層的蛻膜上皮、血管、蛻膜細胞均不表現(圖十二，H)，但是在蛻膜層腺體上皮細胞，則與MUC1一樣呈現陽性染色結果(圖十二，I)。

第六部分 MUC1及MUC15的過度表現(overexpression)的影響

MUC1：我們採用trophoblast-like JAR cells 的 matrigel invasion assays。JAR cells 先以control plasmids(Mock)或MUC1-containing plasmids (MUC1)來做transient transfection 48h，然後種入invasion chambers後培養另外48 h後觀察結果。首先我們先以Western blotting，M2C5 mAb 染色來確認MUC1 protein的 overexpression(圖十五，A)。我們發現MUC1 overexpression可以明顯地降低JAR cells的invasion達 $34.6\% \pm 4.5\%$ ($P < 0.01$) (圖十五，B)。我們就matrigel-coated filters上的MUC1-transfected cells以M2C5 mAb染色，結果顯示upper side of the filters的細胞有較高比例的MUC1-high expressers，lower side的細胞MUC1-high expressers的比例就很低(圖十五，C)。這也顯示JAR cells裡面，MUC1-high expressers果然有較低的invasive ability，如果與 MUC1-low expressers比較。我們以gelatin zymography來比較MMP2及MMP9這兩個major metalloproteinases，發現MMP9 activity有被 MUC1 overexpression所抑制 (圖十五，D)。但是MMP2 activity則未受影響 did not change. 這表示MUC1 overexpression會抑制invasion of trophoblast-like cells，可能與MMP9受到抑制有關。

MUC15：我們以JAR及JEG-3 cells兩個細胞株來研究。它們(JAR及JEG-3)先以pcDNA3.1 (Mock), MUC15/pcDNA3.1(MUC15), MUC15/pcDNA3.1 + control

siRNA (MUC15 + control siRNA), 或 MUC15/pcDNA3.1 + MUC15 siRNA (MUC15 + MUC15 siRNA) 作transfection達48 h, 之後種入invasion chambers後培養另外48 h後觀察結果。MUC15 mRNA 及 protein 的overexpression及knockdown是以 real-time RT-PCR及western blot來確認 (data not shown)。結果overexpression of MUC15會明顯降低JAR及JEG-3 cells的invasion能力, 達到分別下降 87.5 ± 1.1 及 $83.8 \pm 5.7\%$ (圖十六)。, 而此降低效應會被MUC15 siRNA阻斷($P < 0.05$), 但是不受control siRNA影響。此結果顯示MUC15 overexpression 會抑制trophoblast-like cell的invasion ability。我們以gelatin zymography來觀察MUC15對MMP activity的影響, 我們發現MUC15 overexpression似乎對MMP-2及MMP-9 的activity 沒有明顯影響, 不論是MMP-2或MMP-9 (圖十七, A、B)。同樣地, MMP-2及MMP-9 mRNA expression以real-time RT-PCR來檢驗亦沒發現明顯改變 (data not shown)。由於我們結果顯示MUC15 overexpression會抑制cell invasion, 但是沒有發現MMP-2及MMP-9 activity有何改變。我們注意到TIMP-1及TIMP-2分別是主要的natural inhibitors of MMP-9 and MMP-2, 所以我們接著研究MUC15 expression是否會影響 TIMP-1及TIMP-2。結果real-time RT-PCR顯示MUC15 overexpression會增加TIMP-1及TIMP-2的mRNA expression, 在JAR cells是分別平均增加4.1-及3.1-倍(圖十七, C)。TIMP-1及TIMP-2 mRNA expression, 在JEG cells則是分別平均增加4.7-及3.7-倍 (圖十七, D)。用MUC15 siRNA去knockdown JAR及JEG-3 cells的MUC15 overexpression, 結果原先可以增加的TIMP-1及TIMP-2 expression, 兩種細胞都顯示其效應明顯被block掉(圖十七, C、D)。所以整體結果顯示: MUC15 overexpression可以確實增加JAR及JEG-3 cells的 TIMP-1 and TIMP-2 mRNA。

第七部分 輕度及重度子癩前症的初步觀察結果

MUC1的mRNA、蛋白質及免疫染色均顯示, 在重度子癩前症的胎盤, MUC1的表現量都會明顯增加($P < 0.05$)。輕度子癩前症與正常的第三孕程差異則不明顯

(圖十八、十九、二十)。

MUC15則無明顯差異，看不出子癩前症的表現趨勢。(data not shown)



第四章 討論

在這個章節，我們先從Mucin 1及Mucin 15的研究結果所引伸出來的意義來討論，然後導入生理機轉及相關臨床意義的探討。接著討論Preeclampsia及intrauterine growth restriction的相關重點。由於我們的研究仍在進行中，所以，有些討論是研究結果所引伸，而有些則是提示未來繼續研究的重要方向。接著再討論其他相關的議題，如：MUC1與ER α 的互動，Epigenetic regulation所扮演的角色，蛻膜與滋養層母細胞的互動中mucins可能的角色。

由於mucins的生物功能是多元的，所以研究mucins的方向，也是多元化的，所以我們也就盡量做多方相關的討論。

Mucin 1 及 Mucin 15 在各孕程的表現

MUC1: 我們的研究結果顯示MUC1 mRNA 及MUC1 protein隨著懷孕週數增加而遞增。在第一孕程與第二孕程的比較中，雖然沒有明顯差異，但是可以看出逐漸上升的趨勢。整個看來，MUC1 mRNA 及MUC1 protein在進入第三孕程後開始快數增加。雖然兩種anti-MUC1抗體 (clone VU4H5及clone M2C5的anti-MUC1 mAb) 的敏感度略有不同，免疫染色的結果也顯示與mRNA及protein一樣的相符情況。

免疫染色提供了組織定位的效果。MUC1 protein在整個懷孕過程中，在胎盤絨毛的部位，仍以胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)的表現較為明顯。在第一孕程，我們可以在游離型絨毛(floating villi)看到較多的細胞型滋養層母細胞(cytotrophoblast)，然而由於MUC1 protein在此時的訊號並不明顯，而且只在外圍胞融型滋養層母細胞的apical surface，所以在內層的細胞型滋養層母細胞是沒有看到染色現象。由於胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)是由細胞型滋養層母細胞(cytotrophoblast)成熟、分化及細胞融合而來，在所有孕程都以在胞融型滋

養層母細胞表現較為明顯，所以MUC1似乎是在細胞逐漸成熟分化後表現出它們的功能。

MUC1 mRNA及MUC1 protein的分子生物學表現，我們是focus在placental villi(取樣以villi為準)，免疫染色則可以觀察到蛻膜層(decidua)的變化。我們發現在蛻膜層，所有細胞型滋養層母細胞(在此處均稱為絨毛外細胞型滋養層母細胞，extravillous cytotrophoblasts, EVT)，可以分為MUC1陽性或MUC1陰性兩種。MUC1陽性的細胞型滋養層母細胞隨著懷孕週數增加，而有逐漸增加的趨勢。同時我們也發現MUC1陽性的滋養層母細胞在週數愈大時，分布位置愈往蛻膜層的深部集中(即愈靠近子宮肌肉層)。顯示這個區域的細胞型滋養層母細胞是以MUC1陽性的細胞為主。其意義為何在下段會再說明。

我們為了了解MUC1在滋養層母細胞的生物性狀的影響，以絨毛膜癌(choriocarcinoma)的細胞株：JAR cell line—主要細胞成分是癌化的細胞型滋養層母細胞作為研究標的。我們發現MUC1 overexpression可以抑制JAR cells在in vitro的invasion。進一步以gelatin zymography來探討，發現MMP9會被MUC1 overexpression所抑制，此與JAR cells在in vitro的invasion被抑制應該有關聯。由MUC1在分子生物學表現及免疫染色在不同懷孕週數的表現，我們初步認為MUC1應該與懷孕期間之絨毛外細胞型滋養層母細胞(extravillous cytotrophoblasts)在蛻膜層的invasion有密切關聯。

過去有研究報告顯示，在macaque的懷孕早期的胎盤，有表現低量的MUC1 expression(Thirkill, Cao *et al.*, 2007)。然而即使是最佳情況，MUC1表現量可以說是很equivocal and weak。他們發現MUC1在懷孕早期的endovascular trophoblasts有表現，另外與trophoblast transendothelial migration有關，而blocking antibody against MUC1可以產生抵銷的效果。所以在macaque的懷孕早期的研究，顯示MUC1似乎與胚胎著床及建立絨毛血液循環有關。由於MUC1在其他器官組織與intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)有互動，所以在胎盤此處，ICAM-1是否也有類似或是不同的效應，也是需要繼續觀察。另外一個報告則顯示MUC1在

第一孕程及第二孕程均有表現(Jeschke, Richter *et al.*, 2002)，他們注意到MUC1是Thomsen-Friedenreich (TF) antigen (Epitope Gal- β 1-3GalNAc α -O-)，一種carcinoma-associated antigen的putative carrier protein，但是進一步的互動仍在研究中，而他們的報告主要是在免疫染色。由於我們研究MUC1 mRNA及MUC1 protein，包括分子生物學的表現，如：定量RT-PCR、西方墨點試驗，也包括免疫組織染色。而且我們是用兩種抗體(clone VU4H5及clone M2C5的anti-MUC1 mAb)在西方墨點試驗及免疫組織染色，也得到相似結果，所以結果應該相當可靠。有報告顯示VU4H5在比較hypoglycosylated MUC1 的染色效果較佳(Ciborowski, Finn *et al.*, 2002)。而M2C5對於natural MUC1和 underglycosylated MUC1的結合效果較好。由於我們的報告顯示定量RT-PCR、西方墨點試驗及免疫組織染色的結果一致性很高，所以我們可以認為MUC1的表現確實是隨著不同懷孕週數的增加而增加。

前已述及：MUC1主要表現在胎盤絨毛的胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)和子宮內膜(此時為蛻膜)區內的絨毛外滋養層母細胞(EVTs)。蛻膜層的滋養層母細胞，有一部分會表現MUC1(MUC1陽性)，有一部分則不表現MUC1(MUC1陰性)。MUC1陽性的滋養層母細胞隨著懷孕週數增加，而有數目逐漸增加的趨勢及分布位置愈往蛻膜層的深部集中的情況。如果我們從細胞外實驗(in vitro)觀察MUC1過度表現(overexpression)的滋養層母細胞細胞株(JAR cell line，分離自絨毛膜癌細胞，細胞性狀類似滋養層母細胞)，發現他們的侵襲能力降低約百分之三十五。這些現象出乎意料，MUC1對於滋養層母細胞細胞株(JAR)的影響居然與MUC1對於一般腫瘤細胞的影響相反，可是我們要知道，JAR細胞原始來源也是癌細胞，為何MUC1對絨毛膜癌細胞的影響是不同的，這顯然還需要繼續去探討。初步結果顯示MUC1對於滋養層母細胞的影響不是刺激而是抑制侵襲。我們的研究也發現：此現象似乎與JAR cell line的MMP9的活性下降有關。如果我們再回過頭來看一下組織切片，在蛻膜區MUC1陽性的EVTs主要分布在較靠近蛻膜深部(即愈靠近子宮肌肉層)，即較靠近蛻膜-肌肉層交界

面。淺層比較接近cell column的部分，MUC1陽性細胞就比較少。所以組織染色的結果，呼應前面的*in vitro*結果，即表示：MUC1對於滋養層母細胞的蛻膜侵襲，應該是一種負性調控者，一種屏障(restraint)、踩剎車的機制。我們很好奇胎盤自從著床起就一直發育，為何長到一定程度會自然減緩，而自然情況之下滋養層母細胞為何會停留在蛻膜區，不會穿透整個子宮肌壁。因為滋養層母細胞在蛻膜層的適度且足夠的侵襲適胎盤建全發育的基本條件，而MUC1似乎在這個部分扮演了極重要的角色。而蛻膜區的腺體細胞均明顯表現出MUC1陽性反應，所以蛻膜區的微環境應該與MUC1抑制滋養層母細胞侵襲功能能否發揮，有直接關係，意即缺少蛻膜區的腺體，滋養層母細胞侵襲可能不易受控制。此點與發生植入性胎盤的地區其往往有蛻膜缺損的現象似乎也吻合。當然此論點仍須累積更多證據才能證實。同時我們對於兩種不同的性狀的絨毛外滋養層母細胞(EVTs)，他們的生物學角色是如何還須進一步釐清。

其實很多proteolytic enzymes都與細胞的組織侵襲有關。而MMP2及MMP9則與胎盤發育時的trophoblast invasion有關(Ferretti, Bruni *et al.*, 2007)，尤其是MMP9。我們的研究報告顯示MUC1 overexpression可以抑制MMP9，這是第一次在文獻上的報告，有其價值，而MUC1 overexpression可以抑制trophoblast-like cells的組織侵襲，可能與MMP9被抑制有關，也是我們的創見。除了我們在introduction的references之外，過去也有review報告說，MUC1在接受外在訊息的時候，可以將訊息經由胞內區域傳遞，最後在細胞體表現出相關的性狀(Singh and Hollingsworth, 2006)。可能的pathways包括：經由Ras、 β -catenin、p120 catenin、p53 及estrogen receptor $-\alpha$ 。因為MUC1CT也可以與一些transcription factors形成複合體，然後以某些尚未知的機轉移位到細胞核(nucleus)內。而目前MUC1在滋養層母細胞如何去影響MMP9的作用，則仍留待我們繼續去研究。

前面已提到，MUC1對於絨毛膜癌細胞株(JAR)的影響是與MUC1對於一般腫瘤細胞的影響相左。我們知道有許多器官組織的腫瘤是會表現MUC1，而且MUC1的表現量大的與腫瘤細胞的侵襲能力增加有關或是促進癌化作用的進行

(Kohlgraf, Gawron *et al.*, 2003; Singh, Wen *et al.*, 2007; Tsutsumida, Swanson *et al.*, 2006b)。前已述及，MUC1的細胞質尾端(MUC1CT)有tyrosine phosphorylation site，而platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR β)可以*in vitro*催化此位置以及RDTYHPM site的tyrosine phosphorylation，同時在其他cell lines實驗中，刺激PDGFR β 可以促進cell invasion。所以MUC1與PDGFR β 互動可以誘發signal transduction，並且影響pancreatic adenocarcinoma的metastatic properties(Singh, Wen *et al.*, 2007)。此外，這些adenocarcinomas所造成的MUC1的overexpression及不同程度的醣化glycosylation，會改變cell surface adhesion properties(經由細胞外區域extracellular domain的tandem repeat(TR))，或是引發morphogenetic signal transduction(經由MUC1CT的tyrosine phosphorylation)等最後影響到腫瘤細胞的invasive及metastatic potential (Kohlgraf, Gawron *et al.*, 2003)。不過他們的human pancreatic tumor cell line S2-013的研究也發現S2-013 cells overexpressing full-length MUC1(完整足量的TR及CT)，反而表現出less invasive and metastatic phenotype，意即lacking the TR domain or CT 的cells會表現invasiveness。有點耐人尋味。所以MUC1CT的tyrosine phosphorylation到底會引發什麼樣的signaling變成一個很重要的研究課題。是否滋養層母細胞由於胎盤發育過程所在的蛻膜其microenvironment有所不同，亦或有其他intracellular pathways，所謂有不同的細胞因子表現(differential expression of cellular factors)，而表現不一樣的生物性狀，這可能需要進一步再研究。之前已述及，MUC1 protein expression如果給與down-regulation，一些會增加doubling times的基因 (cyclin B1 及 cyclin D3)結果出現overexpression，因而降低了metastatic potential of pancreatic adenocarcinoma(Tsutsumida, Swanson *et al.*, 2006a)。目前我們還在研究MUC1 overexpression對於滋養層母細胞的cell proliferation，是什麼效應，屆時有關cell cycle的重要基因，勢必是要列入研究範圍。

我們的研究顯示，足月胎盤的胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)會表現明顯的MUC1 expression。女性生殖器官基本上是對於外界環境是屬open

system，除了支持embryonic development、implantation 及 placentation之外，還必須設法抵禦微生物感染。所以基本上所有reproductive tract mucins，還有研究比較多的Muc1/episialin，應該在implantation related events以及protection from microbial infection 扮演key roles才對。所以在lower reproductive tract表現High levels of mucin expression 應該是保護器官免於感染的重要條件。因此Muc1-null mice (*Muc1^{tm1Gend}*) 因為缺乏Mucin1保護，所以會表現生殖道的chronic infection 以及包括子宮發炎(Brayman, Thathiah *et al.*, 2004a; DeSouza, Surveyor *et al.*, 1999)。而病原菌只是normal bacteria of the reproductive tract！此外，MUC1也被認為有immunoregulatory role的功能，例如soluble MUC1會造成T-cell的 unresponsiveness，而且被活化的T cells也會表現及分泌MUC1(Agrawal, Gendler *et al.*, 1998)，所以MUC1被認為有保護腫瘤免於被免疫細胞所攻擊的效用。另外的研究也顯示，MUC1會*in vitro*抑制human T-cell proliferation，而此現象可以被外加的IL-2 reverse回來(Agrawal, Krantz *et al.*, 1998)。若從臨床的角度來看，我們可以預測MUC1在絨毛的胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)的細胞表層有大量表現，似乎有保護胎盤免於病原體及免疫系統的侵襲的功用。

過去的研究已知，MUC1與estrogen receptor alpha (ESR α)及epidermal growth factor receptor (EGFR)有直接互動，或會調控它們的signalings (Schroeder, Thompson *et al.*, 2001; Wei, Xu *et al.*, 2006)。經由progesterone biosynthetic pathway，靈長類胎盤會受estrogen調控，使得與estrogen receptor結合後控管細胞型滋養層母細胞分化成胞融型滋養層母細胞(Pepe and Albrecht, 1999)。另外有研究顯示，EGF(epidermal growth factor)，與EGFR產生互動之後，也會影響胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)的Nat/Ht exchanger activity及trophoblast apoptosis (Johnstone, Speake *et al.*, 2007; Moll, Jones *et al.*, 2007)，重要的是，EGF可以減少 trophoblast apoptosis resulting from exposure to hypoxia。當然很重要的EGF在placental implantation、 growth 及 differentiation方面都是很有影響的。從以上我們似乎還看不出連貫性，但是如果加上有報告顯示胞融型滋養層母細胞可

以表現ESR1及 EGFR(Evain-Brion and Alsat, 1994)，則產生一個新的interest那就是MUC1對於syncytiotrophoblast的biological functions是否有一部分是經由regulation of ESR1 and EGFR signalings來完成。這部分也需要進一步研究。

MUC15：我們的研究顯示，MUC15在胎盤的表現量是其他許多器官裡面最多的。腎臟和肺臟則中等，其他器官大致上就很少表現了MUC15，顯示MUC15在胎盤應該是頗具意義。我們發現MUC15也與MUC1類似，及在胎盤絨毛的MUC15 mRNA 及MUC1 protein表現，是隨著週數增加而遞增。在第一孕程最低，但是到了第二孕程就開始有意義的增加，到了第三孕程最高。三個孕程的差異都是有統計意義。這個現象在mRNA、 protein及免疫組織染色均一致。過去研究了解，early pregnancy的胎盤所分離的trophoblasts比週數較大的胎盤所分離出來的具有較高的侵襲能力(Dokras, Gardner *et al.*, 2002)。在足月的胎盤，maspin，一種tumour suppressor gene的mRNA expression最高，在JEG-3 和 JAR (choriocarcinoma) cell lines就沒有表現。*in vitro* invasion studies，也顯示添加一些 recombinant maspin，chamber 裡面的cytotrophoblast invasion 明顯下降 40-50 per cent，不論是在那一個trimesters of gestation。顯示生物界對於胎盤中的trophoblasts的調控似乎是傾向於第一孕程有最高的trophoblasts invasion，在大一點的週數就漸漸減少invasiveness的意味。我們再看*in vitro* invasion studies，MUC15 overexpression明顯suppresses invasion of trophoblast-like JAR 及 JEG-3 cells，下降幅度達到統計差異。那麼這樣的結果，是否也是呼應上面的說法，MUC15隨著週數增加而增加，MUC15會suppresses invasion，所以MUC15最後要達到的生物效應也一樣是週數愈大，cytotrophoblast invasion就愈降低。所以MUC15儼然成為trophoblast invasion *in vivo*的negative regulator。

由於在early placental development時，建立uteroplacental vessels時，螺旋動脈(spiral artery)的再鑄型(remodeling)是非常critical的；螺旋動脈的再鑄型如果出現欠缺，可能導致胎兒的發育遲滯甚至子癩前症。而螺旋動脈的再鑄型端賴

trophoblast(EVTs) invasion是否正常，所以此時的low levels of MUC15 expression 是否也是有這樣的含意，值得思考。然而到了end of gestation，是否也要讓 trophoblast(EVTs) invasion減緩，以免過度，所以有MUC15的上升以達到 suppressive signal的產生。不過有一點須要留意的就是：雖然MUC15 overexpression in vitro 降低 trophoblast invasion，然而真正具備invasiveness的 extravillous trophoblast in vivo 反而沒有express MUC15。所以MUC15在 extravillous trophoblast invasion in vivo 的表達影響力的方式，還須研究。當然 extravillous trophoblast可能會「間接」接受MUC15的signaling，但是自己不製造 MUC15。

過去我們已經知道，mucins可以參與許多生理現象的調控，如免疫反應、細胞附著、細胞的生長、複製、分化、轉型(transformation)乃至於細胞的移動、侵襲有關(Hollingsworth and Swanson, 2004)。我們研究顯示MUC15 有統計差異地 suppresses invasion of both trophoblast-like JAR及JEG-3 cells。前以述及，我們的 MUC1及MUC15研究有關於trophoblast invasion的相關影響，是目前文獻報告裡面的頭一次，雖然MUC1 曾經被認為serve as a molecular sensor on the tumor cell surface以及調控invasive and metastatic activities(Kohlgraf, Gawron *et al.*, 2003)，但是還沒有對於cytotrophoblast invasion有很系統性的研究。

在前面也已經提到，在proteolytic enzymes，由尤其是MMP family，MMP-2 及 MMP-9是regulate trophoblast invasion最主要的因子。我們對於MUC15的研究發現，雖然MUC15明顯suppress invasion of both JAR 及JEG-3 cells，可是MMP-2及 MMP-9 活性似乎未受MUC15 overexpression影響，而有明顯有差異的改變。所以我們接著考慮兩個方向：一是尋找其他的proteolytic enzymes，看是那個被 MUC15 overexpression影響，二是尋找MMP的inhibitors，看是那個被MUC15 overexpression影響。結果後者先出現有意義的結果。文獻上得知Two distinct MMP inhibitors，TIMP-1及TIMP-2有報告在human trophoblasts 上有表現 (Huppertz, Kertschanska *et al.*, 1998)。現在最大的問題是，MMP的activity studies

是在gelatin zymography上完成，可是in vivo的inhibitors到了in vitro studies時，MMPs及TIMPs在跑SDS-PAGE是separated，所有TIMPs 的inhibition of MMP activity就無法精確地從gelatin zymography得知。所以我們用real-time RT-PCR 來分析，結果發現MUC15 overexpression，同時在JAR及JEG-3 cells，可以明顯地increased TIMP-1及TIMP-2 expression。到底這有什麼意義呢?過去文獻報告說both TIMP-1 及 TIMP-2 可以降低cytotrophoblast invasion *in vitro* (Librach et al., 1991)。如果以transforming growth factor (TGF) β 1及TGF β 2來做TIMPs 的induction，結果invasion of first trimester cytotrophoblasts明顯降低(Graham and Lala, 1991)。由於有證明顯示cytotrophoblast invasion確實可以因為TIMP-1 及 TIMP-2 的表現增加而產生，所以我們的結果顯示MUC15可以inhibit trophoblast invasion是起碼partly result from the induction of TIMP-1及TIMP-2 expression是應該可以被接受的。

我們研究的MUC15 protein是近年來才被clone出來，所以基本上大家都不是很了解它們的生理作用。MUC15 是一種 membrane-bound 起初是從bovine milk fat globule membranes得到(Pallesen, Berglund *et al.*, 2002)。MUC15 protein它是highly conserved在他得的cytoplasmic domain (有74 amino acids)，它share 81.1% identity及94.6% similarity，如果分別與human或mouse的MUC15 amino acid sequences比較。而這個cytoplasmic tail包括了四個conserved tyrosine 及seven serine/threonine phosphorylation sites。說到這個cytoplasmic tail，我們在MUC15已經討論過，我們知道COS-7 cells 如果被lacking all tyrosines in the cytoplasmic tail的MUC1 所transfect，其invasiveness會增加，而且似乎與ERK 1/2及nuclear factor-kB signaling pathways有關(Thompson, Shanmugam *et al.*, 2006)。此外，MUC1 cytoplasmic tail 可以和 β -catenin 互動而促進breast cancer cells的invasiveness(Schroeder, Adriance *et al.*, 2003)。所以我們假設說MUC15在cytoplasmic tail 的potential phosphorylation sites 可以regulate cytoplasmic tail 與相關的proteins互動，然後影響後續的signal transduction 因而 modulate

trophoblast invasion。

生理機轉及相關臨床意義

前面介紹過，在微絨毛的表面，有一些糖類，稱為glycocalyx，是一種polysaccharides，似乎與免疫學上的關聯性，有被注意到。我們的結果也發現MUC1及MUC15在絨毛的表面(即胞融型滋養層母細胞，syncytiotrophoblast的apical surface)，所以與過去所觀察的微絨毛glycocalix似乎有點重疊的意味。因為mucins除了上述的signaling的功能之外，基本上mucins具有glycocalyx的多種functions。它們有high degree的glycosylation，所以可以提供lubrication、預防dehydration、以及提供protection from proteolysis and microbial infection(Brayman, Thathiah *et al.*, 2004a)。所以這與微絨毛的表面的glycocalyx是否一致，值得比較一下。基本上，MUC1會在female reproductive tract 扮演critical barrier role在microbial infection(DeSouza, Surveyor *et al.*, 1999)。因為MUC15在syncytiotrophoblasts的apical membrane表現特別明顯，所以我們認為MUC15在胎盤絨毛表面是可以形成protective barrier。有些在其他的器官，如gastrointestinal、respiratory、或是genitourinary tract表現量高的應該也會具備保護器官免於外來的侵害。前面也述及，MUC1會出現在surface of endometrium，但是MUC15卻沒有在此表現。MUC1已經被認為在embryo attachment時會形成著床的barrier，所以在其他動物會有其他mechanism來處理這個情況，所以在短時間內在局部出現MUC1減少以利著床的情況(Carson, DeSouza *et al.*, 1998)，但是在人類MUC1可能是blastocysts會表現的selectin的ligand。看來人類的mechinery似乎高明多了(Carson, Julian *et al.*, 2006)。

但是MUC15在endometrial surface，就沒有甚麼表現，此點與MUC1大異其趣。不過MUC1及MUC15在endometrial glandular epithelium的表現量就非常明顯。從結果來看，似乎MUC15在embryo attachment或是endometrium本身有無扮演角色，仍舊等待進一步研究。

我們在MUC1的研究，目前已經了解到MUC1在懷孕其間，在human placenta的 spatial 及 temporal expression。MUC1在syncytiotrophoblasts的expression 以及numbers of MUC1-positive extravillous trophoblasts 均會隨著gestational age而增加。此外MUC1 overexpression會suppresses MMP9 activity 以及降低invasiveness of trophoblast-like JAR cells。依據研究結果，MUC1在trophoblast invasion及human placental development扮演一個critical role。更進一步的研究應該是非常重要的，尤其是有關於preeclampsia 及intrauterine growth restriction的妊娠疾病，似乎都與trophoblast invasion 及placental development的dysfunction有關，所以也應該與MUC1有相關。

我們在MUC15的研究，顯示MUC15在human placental villi的expression是隨著懷孕週數增加而增加。此點與MUC1一致。MUC15 overexpression 可以suppresses trophoblast-like cell invasion，此現象經研究發現與 TIMP-1 與TIMP-2 expression的增加有關。這兩個mucins的研究，似乎給我們打開了一道視野，讓我們在研究trophoblast invasion以及spiral artery remodeling出現insufficiency時，preeclampsia and intrauterine growth restriction發生時，多了一個研究的方向。

Preeclampsia及intrauterine growth restriction的相關討論

子癩前症(Preeclampsia)目前仍是開發國家中most common causes of maternal mortality的重要原因。我們稱為maternal syndrome of pre-eclampsia特徵包括hypertension 及proteinuria。如果pre-eclampsia出現的時間還remote from term那麼fetus的risk of intrauterine growth restriction (IUGR) 也會增加。IUGR 有時在沒有maternal hypertension也會出現，我們有時稱為normotensive IUGR。由於前已述及，pre-eclampsia 及 normotensive IUGR 往往是出現在incomplete placentation的情況。normotensive IUGR也可以因為其他的原因而單獨發生。

過去對於pre-eclampsia的發生，曾經假設是一些placental factor從胎盤release出來，後來進入maternal circulation，造成maternal endothelium 的damages，然後

一個 syndrome of systemic endothelial dysfunction 於焉產生。這在以前應該是非常有力的說法，至今仍然有意義。不過愈來愈多的証據顯示，這些endothelial dysfunction，恐怕是一個廣泛的maternal systemic inflammatory response的一部分，在正常懷孕也會出現，但是似乎是在pre-eclampsia時特別嚴重。

Syncytiotrophoblast microparticles (STBM)的角色

這些始作俑者的placental factors大家並不完全了解，但是candidates卻是很多，例如：sFlt-1, peroxides, eicosanoids, cytokines, and syncytiotrophoblast microparticles (STBM)等等(Smarason, Sargent *et al.*, 1993)。

過去已經有關的報告，包括從正常懷孕製作的STBM，在*in vitro*時會造成endothelial cell dysfunction，或是會造成單一血管的impairment，或是pre-eclampsia的血漿會抑制endothelial cell proliferation (Smarason, Sargent *et al.*, 1996)。STBM可以藉由孕婦血漿作flow cytometry或是enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)來偵測，當然在preeclampsia的孕婦血漿可以發現明顯升高的情況(Knight, Redman *et al.*, 1998)。他們也發現plasma concentration of STBM與endothelial inhibition有出現significant correlation。此外，在preeclampsia的病人，也似乎有excess of circulating cellular syncytial debris的現象(Johansen, Redman *et al.*, 1999)。

Syncytiotrophoblast debris會跑到maternal circulation一般咸信是syncytial apoptosis的結果，也算是一種normal process of turnover and repair and/or necrosis(Huppertz, Kingdom *et al.*, 2003)。在Pre-eclampsia 的情況syncytiotrophoblast apoptosis會增加，所以可以解釋increased debris in the maternal circulation的現象。很重要的一點是increase in apoptosis目前已經高度公認是uteroplacental ischemia，產生oxidative stress之故。其原因很可能就是spiral artery maladaptation，以致blood supply不足。前已述及，spiral artery的remodeling不足是以後產生uteroplacental ischemia的主要原因。除了preclampsia，intrauterine growth restriction (IUGR)也會發生。

此外，syncytiotrophoblast debris可能會引起免疫反應。過去認為這些debris 是會downregulate Th1，activate monocyte，所以excessive placental debris of apoptotic and/or necrotic origin是有機會激起exaggerated maternal inflammatory response，結果出現preeclampsia的症狀。

有報告指出，neutrophil apoptosis的明顯delayed，不正常的levels of antibodies against atherogenic organisms是特別傾向是preeclampsia的特色。也有group發現不少biomarkers似乎也與preeclampsia有關。這些biomarkers包括：Leptin， placenta growth factor， the plasminogen activator inhibitor (PAI-1)/PAI-2 ratio或是 uric acid。這些可能與later pre-eclampsia有關(Goswami, Tannetta *et al.*, 2006)。

STBM開始多量shedding into the maternal circulation的懷孕週數，與pre-eclampsia的發病時間也有關係，報告顯示在early-onset disease，有明顯的increase in circulating placental debris。目前需要去了解的是increased placental debris in the circulation是否可以在臨床症狀出來之前就可能被偵測出來。這一點很重要，到底excess shedding of STBM into the maternal circulation這現象，是一個決定性的原因，抑或是只是反應其他病理狀態的並存的現象而已(Goswami, Tannetta *et al.*, 2006)。

我們的初步結果顯現，severe preeclampsia的placenta，其MUC1在syncytiotrophoblast的apical surface表現量特別多，syncytial knots也特別濃染。所以也呼應這個現象，只是過去未對這些STBM裏面所含的immunogen或是angiopathogen是何方神聖，似乎並未作更深入的探討。從我們的觀察所得，似乎MUC1可能是其中的重要immunogen或是angiopathogen。這就值得研究。

學者認為preeclampsia應該是一連串events的final step，所以它應該是一種end-stage disease，一種遠在徵候已經evident之前就已經在進行的疾病。例如：孕婦如果孕前就帶有某些preexisting的內科疾病，包括容易引起thrombotic lesions(包括autoimmune disease，SLE等等)，或是動脈硬化或其他oxidative stress有增加的狀態，自然產生preeclampsia的機會就大增。所以也曾經有人以大量

vitamins C+E來試圖達到抗氧化及預防preeclampsia的發生。

據了解，preeclampsia 及約半數的IUGR是與某些特定的placental pathologies有關。它們的cytotrophoblasts的interstitial invasion的程度似乎是比較淺的(shallow)，所以endovascular invasion通常是不完整的，所以進入intervillous space的血液流量通常是不足的。目前在對high-risk population作Doppler ultrasound survey也發現，原先在早期placental resistance比較高的孕婦，到了第二孕程就要normalize，否則在第三孕程發生preeclampsia的機會就會大為增加。從這裡就了解，anatomical defects in placentation似乎早在症狀出現以前就已經存在。

有報告特別提到，cytotrophoblast invasion of uterine wall是牽涉到複雜的現象，包括滋養層母細胞要做ectoderm to vascular/mesoderm transformation(Zhou, Fisher *et al.*, 1997)。那些cytotrophoblast progenitors原先表現許多epithelial cells特有的adhesion molecules，如E-cadherin及 $\alpha 6\beta 4$ integrin, 會 downregulate 這些CAM 的expression，如果它們開始要differentiate並且獲得invasion的ability。同時，它們也會開始表現一些endothelial cells的typical 的receptors，如vascular endothelial cadherin, vascular cell adhesion molecule-1, platelet endothelial cell adhesion molecule-1, and $\alpha V\beta 3$ integrin. 甚至有更typical的：它們表現urokinase plasminogen activator及thrombin receptor。

Ectoderm to vascular conversion如果出現不足，cytotrophoblast invasion就會異常。如果invasive cytotrophoblasts仍舊保持原先progenitor cell的adhesion receptors，將無法促進invasion以及 turn on endothelial phenotype 的receptors(Lim, Zhou *et al.*, 1997)。一般cytotrophoblasts 如果已經penetrate spiral arterioles，通常就是 $\alpha V\beta 3$ integrin strong positive。但是preeclampsia的invasive cytotrophoblasts就有許多是negative to $\alpha V\beta 3$ integrin。

有報告顯示，在第一孕程和第二孕程，cytotrophoblast differentiation 及invasion 通常會伴隨downregulation of VEGF receptor (VEGFR)-2。第一孕程的invasive cytotrophoblasts 表現 VEGF-A, VEGF-C, placental growth factor (PIGF),

VEGFR-1及VEGFR-3。到了足月，表現 VEGF-A,PIGF及VEGFR-1。

我們另外可以注意到的是preeclampsia經常是發生在第一胎。只有少數孕婦會在subsequent pregnancies仍然發生。大多數認為是paternal antigens trigger了這些後續的不正常反應。然後母體在下次懷孕時，已經可以適應這個paternal antigens。這個說法在換了partner之後再懷孕時，依然發生preeclampsia的情況相符，因為她又與他是第一胎。所以因此有primi-paternity的說法。當然，也有人認為是interval的關係，因為隔太久，所以原來已經有的ability to remodel the uterine circulation，因為時間隔太久而又失去了。

有些時候，懷孕會合併IUGR，但是不一定是preeclampsia，許多pathology，包括：small placenta，persistent placental immaturity，placental infarction等等都可能是原因，但是不一定與cytotrophoblast differentiation 及invasion有關。那麼在這樣的情況之下，mucin會扮演什麼角色，也是值得研究的。

其他重要相關議題

MUC1與ER α 的互動

MUC1因為在breast cancer 明顯的overexpressed，所以它們與estrogen receptor (ER)之間的互動就有很多的文獻報告，截至目前為止，MUC1與ER在胞融型滋養層母細胞(syncytiotrophoblast)或是細胞型滋養層母細胞(cytotrophoblast)的互動，目前還沒有完整的研究報告。所以在這裡我們的討論是以human MCF-7 breast cancer cell line為主。由於胎盤的發育與estrogen有密切的關係，所以MUC1與estrogen receptor (ER) 之間的互動就相對重要了。

MUC1是aberrantly overexpressed 在大部分的human breast carcinomas。MCF-7 及 ZR-75-1 breast cancer cells 會表現endogenous MUC1而且MUC1 與ER α 關係密切。細胞受到E2 stimulation，可以看到 MUC1 與 ER α 會 Binding。研究結果顯示 MUC1是存在在 ER α transcription complex 裡面，位於 promoters of estrogen-responsive pS2 及 cathepsin D genes。MUC1-CD (cytoplasmic domain)

直接 binds 到 ER α DBD (DNA binding domain) 此處包括兩個 asymmetric zinc fingers 及一個 C-terminal extension (CTE) of ~30 amino acids。藉由降低ER α 的 ubiquitination and degradation，MUC1可以 stabilizes ER α 。

在E2的剌激下，MUC1增加 ER α occupancy of pS2 及 cathepsin D promoters。MUC1的表現也與增加SRC-1 及 GRIP1的 recruitment 到 ER α transcription complex。Estrogen stimulation 也與 SRC-1 recruitment到 EREs (estrogen response elements) of pS2 及 cathepsin D promoters 有關。

在MUC1的存在與協助，可以使 ER α /E2-p160 complexes 更會bind到EREs 上。而SRC-1- 及 GRIP1-dependent的coactivation of ERE-tk-Luc也會被增強。此外，MUC1也會增加 E2-dependent activation of the pS2 及 cathepsin D genes。所以從以上的findings顯示，MUC1對於 ER α /E2-dependent transcription 的活化有明顯貢獻。從這裡我們就須思考，滋養層母細胞(trophoblast)在高E2的環境下，與MUC1的互動情況不知是否也類似。其促進的是proliferation的部分還是 differentiation的部分？而apoptosis的現象，是否有受影響，需要進一步了解。

Mucin為何要Regulate ER α Function?

前已述及，mucins 可以形成physical barrier，可以保護epithelia免於外界的傷害，包括：toxins, free radicals, microorganisms, low pH, 以及其他形式的 stress。這個 highly glycosylated MUC1-N subunit 對於產生 barrier 有明顯貢獻。我們也已經敘述過，MUC1也有對於外界環境作sensor的功能，所以transmembrane MUC1-C會往細胞內部去signaling，以反應外在的environmental stress。ErbB2 activation可以幫忙維持上皮細胞層的完整性；MUC1的extracellular domain有 EGF-like domain，而ErbB2 activation 也會針對cytosolic MUC1-C 作反應到 nucleus 及 mitochondria，因此表示 MUC1-C 對於repair of epithelial integrity也有貢獻。同時針對 normal epithelial cells to stress 的 physiological response，MUC1也可以藉由與ER α 互動，產生prosurvival effect，暫時protect細胞，避免誘

發 apoptosis。

從上述現象看起來，將breast cancer 或其他的 carcinoma cells 的MUC1 signaling 活化，容易維持細胞的性狀，而且穩定地resistant to cell death。所以在MCF-7及 ZR-75-1 cells，MUC1可以協助 E2-dependent growth 及 survival。ER α 的 stabilization 及 activation也需要 MUC1協助，因此在MUC1 (oncoprotein) 的 overexpress 的情況下，可以幫助~90% 的human breast cancers 的 growth及survival。

在女性生殖道上皮均有MUC1的表現(除了卵巢)，它們隨時都會受到steroid hormone的影響，這一點是與乳腺是類似的。目前progesterone在MUC1的影響比較受到注意，因為著床期是高progesterone狀態。

Epigenetic regulation所扮演的角色

前已述及，有報告顯示，一種tumor suppressor gene—maspin (mammary serine protease inhibitor)，在human breast及prostate cancer cells可以產生motility、invasion、metastasis 及angiogenesis的抑制作用。Maspin在胎盤的表現與MUC1及MUC15類似，即第一孕程時表現較低，足月的胎盤則表現較多(Dokras, Gardner *et al.*, 2002)。所以maspin與MUC1及MUC15有何關聯，可能還需要再加以研究。倒是有一點，maspin的epigenetic regulation的研究，發現histone tail modification與maspin expression有關(Dokras, Coffin *et al.*, 2006)，所以這點提醒我們似乎要注意mucins是否也有epigenetic regulation。前已述及，在最近的一份報告顯示，MUC1在breast cancer cell lines被發現有epigenetic regulation的証據。在transcription start site，DNA methylation在MUC1 negative 的cell lines (MDA-MB-453)很高，但在MUC1 positive的cell lines (MCF-7)則很低。此外他們也發現有histone H3-K9 modification現象(Yamada, Nishida *et al.*, 2008)。這個部分的結論可以提供我們後續的研究的參考。

蜕膜與滋養層母細胞的互動

Trophoblasts會增加invasiveness的互動，包括：

1. trophoblasts離開basal lamina，來到interstitium，變成apolar (spindle-shaped) phenotype，可以使trophoblasts變成invasive。
2. 絨毛外滋養層母細胞(extravillous cytotrophoblasts) 變成invasive phenotype時，表現較少的polymorphic (HLA-C)及non-polymorphic (HLA-G,HLA-E) MHC-I 分子，可以避免被 T-cells或是uNK cells所lysis。
3. early invasive 絨毛外滋養層母細胞表現的 ECM deposition，與integrin 延著plasmalemma 的 distribution一致，這種colocalization有助於cell的migration。
4. 絨毛外滋養層母細胞會分泌relaxin，會刺激及活化由絨毛外滋養層母細胞所製造的 MMPs，並且抑制TIMPs。這一點我們的研究顯示MUC1與MMP9有互動；MUC15與TIMP1及TIMP2有互動
5. invasive trophoblasts分泌IDO(indolamine 2,3-dioxygenase)，會代謝分解 extracellular tryptophan，此環境較不利於T-cells proliferation，所以滋養層母細胞受到T-cell- mediated lysis的機會降低。

我們可以研究一下此處的microenvironment的變化，是否與實驗結果方向致。這裡包括：MUC1陽性與陰性的滋養層母細胞，是否表現出來的細胞morphology是不同的，意即MUC1陽性的滋養層母細胞是以apolar phenotype為主，而MUC1陰性的滋養層母細胞則是non-invasive 的polygonal phenotype為主；還有Mucins與滋養層母細胞的MHC-I分子的表現的改變是否有關等等。

Decidual activities會增加invasiveness的互動，包括：

1. 蜕膜(decidua)細胞很有可能是relaxin的來源，會增強MMPs的活性。
2. 蜕膜細胞會分泌transforming growth factor- α (TGF- α)，會促進EVT stem cells的proliferation。

3. Endometrial NK cells (uNK cells) 具有特別的receptors(KIRs及CD94/NKG2)，藉著聯結滋養層母細胞的HLA-G，HLA-C或HLA-E達到抑制NK細胞引發的標靶細胞溶解。

4. 在著床部位的T細胞通常表現較少的T細胞receptors(TCRs)，對於避免T細胞針對EVTs具有表現paternal peptides的HLA-G及HLA-C而引發細胞溶解作用有降低效果。

此外我們也了解黃體素(或助孕酮)progesterone，會刺激子宮內膜細胞轉形成蛻膜細胞(蛻膜化，decidualization)；decidualization之後會與滋養層母細胞一起分泌TGF- α ，促進滋養層母細胞幹細胞的細胞複製。同時黃體素也會同步抑制蛻膜層的巨噬細胞的活性。

Trophoblasts會降低invasiveness的機制，包括：

1. 已知invasive trophoblast cells會分泌TIMPs，可以調控它們自己分泌的MMPs的活性。目前我們的研究顯示MUC15的overexpression，在JAR及JEG-3 cells兩種細胞株，均可以明顯地增加TIMP-1及TIMP-2的expression，可是在正常的生理狀態下，trophoblast cells分泌TIMPs是否受MUC15調控則仍待研究。
2. 隨著懷孕週數增加，invasive spindle-shape的extravillous滋養層母細胞，逐漸變形成為較大型多角型細胞，於是漸漸失去invasiveness。我們後續還要再觀察是否這些細胞是MUC1 positive cells。
3. 往蛻膜層深部去invade的extravillous滋養層母細胞會逐漸聚集，並且甚至發生融合狀態，形成多核巨細胞，一般相信這些細胞已經是noninvasive (Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)。同樣地，我們後續也要再觀察是否這些細胞是MUC1 positive cells。

Decidual activities會降低invasiveness的機制，包括：

1. 蛻膜細胞會表現TIMPs，會抑制滋養層母細胞的MMPs。

2. uNK cells會釋放TGF- β ，會up-regulate滋養層母細胞的TIMP expression，然後down-regulate MMP secretion。從這裡我們就產生疑問：似乎TGF- β 在這裡的功能與MUC15 overexpression的情況是類似。是否MUC15可以產生類似TGF- β 的效果？
3. 蜕膜層的巨噬細胞會產生TNF(tumor necrosis factor)- α ，也會induce tryptophan depletion (note:trophoblasts分泌IDO，也會促進tryptophan 分解)，結果會促使滋養層母細胞行apoptosis，限制它們的活性(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)。而目前我們也正在做cell proliferation及cell apoptosis的assay，希望了解mucin 是否會促進滋養層母細胞行apoptosis。

從以上的條列的生理現象我們不難了解，trophoblast cells invasion 的調控是一個及複雜的機制，不是單一組織就能控管單一功能，事實上是許多細胞、組織在一個綿密的well-balanced的控制系統下運作。而我們的研究發現mucins在加入trophoblast invasion的調控的行列中，其運作的方式一定也會是極其複雜的，我們相信mucins之於trophoblast invasion的影響，需要研究的範圍絕對會是既寬又廣的，在研究的同時，也因為trophoblast invasion與tumor cell behavior的性狀有許多相似點，所以相信也會引發更多tumor biology的相關研究題材。

第五章 展望

我們的研究結果顯示胎盤絨毛的MUC1及MUC15的 mRNA 及MUC1 protein的expression會隨著懷孕週數增加而遞增。而在MUC1的研究，不論採用何種anti-MUC1抗體 (clone VU4H5或clone M2C5的anti-MUC1 mAb) ，其 Western blot及免疫染色的結果均類似。如果拿MUC1及MUC15來比較，MUC1 mRNA 及MUC1 protein在第二孕程還沒有明顯變化，到了進入第三孕程後開始快數增加。而MUC15 mRNA 及MUC1 protein表現，則是到了第二孕程就開始有意義的增加，到了第三孕程最高。所以MUC15升高的timing，很顯然比MUC1早。這個現象到底有何臨床意義，需要我們去了解。

同時我們也觀察到MUC1 overexpression會抑制trophoblast-like cells的invasion，而這現象可能與MMP9活性受到抑制有關。而另一方面，我們的結果也顯示MUC15 overexpression 會抑制trophoblast-like cell的invasion。若以gelatin zymography來觀察MUC15對MMP activity的影響，我們發現MUC15 overexpression似乎對MMP-2及MMP-9 的activity 沒有明顯影響。所以我們又繼續往MMP的自然inhibitor是否被activation來研究，結果顯示：MUC15 overexpression確實可以增加JAR及JEG-3 cells 的 TIMP-1 及 TIMP-2的mRNA表現，意即TIMP-1 及 TIMP-2的表現增加，因而使得trophoblast-like cell的invasion受到抑制。

由於我們從開始研究mucins在懷孕期間的gene及protein的表現，到觀察mucin對於trophoblast invasion的影響的mechanism之後，發現我們必須全盤了解trophoblast invasion的許多相關因素，包括從賀爾蒙、生長因子、細胞附著分子到組織蛋白質分解酵素等等，幾乎所有與細胞活動有關的分子，都涵蓋在裏面，才能真正了解mucins在胎盤及滋養層母細胞所扮演的角色。而且為了明白mucins本身的調控機制，epigenetic regulation也要列入研究的範疇。

所以從這裡開始，我們展望後續的研究可以一步步地打開這些奧秘，也因此

同時可以進一步了解preeclampsia及IUGR與這些結果的關係。以下我們就一一分項說明。

因本研究藉以了解絨毛外細胞型滋養層母細胞的複製及侵襲型態

如果搭配CK-7染色，以³H-thymidine或BrdU作serial section的染色，我們可以找到處於cell cycle 的S-phase的滋養層母細胞。根據報告，只有在basal layer的細胞有mitosis。如果我們以Ki67及MIB-1來染色，則我們可以觀察處於cell cycle 的G₀及G₁除外的所有的滋養層母細胞。根據報告，cell column起算2到6層的細胞可以染色成陽性反應。深層及血管內的滋養層母細胞應該是Ki67及MIB-1來染色呈陰性反應。如果我們以proliferating cell nuclear antigen (PCNA)染色，我們可以觀察所有處於cell cycle 的細胞，但是cycle之後一天的細胞也可以被染色。

(Blankenship and King, 1994a; Muhlhauser, Crescimanno *et al.*, 1993)從以上方式可以觀察proliferative, postproliferative, migratory及invasive phenotype的滋養層母細胞。對照於我們的結果，MUC15在蛻膜層不論是proliferative, postproliferative, migratory及invasive phenotype的滋養層母細胞均無染色反應。MUC1雖然在蛻膜有染色，但是分布區域似乎是在較深層的區域，所以我們屆時可以BrdU或Ki67的分布作對照，可以更確定表現MUC1的細胞的特性，以及其與trophoblast invasion的關聯。

有關各種cytokines與滋養層母細胞的互動

由於許多報告已經顯示，cytokines及賀爾蒙也會調節絨毛外滋養層母細胞的分化。**EGFR**由proto-oncogene *c-erbB-1*所encode，主要是表現在proximal的幾層滋養層母細胞中(Muhlhauser, Crescimanno *et al.*, 1993)。EGF可以從很多細胞來分泌，也曾經有報告絨毛外滋養層母細胞也可能會分泌EGF，但是也有報告認為在此處似乎**TGF- α** 比較像是EGFR的ligand (Loke, King *et al.*, 1995)。這一點有它們的道理，因為TGF與EGF具有一樣的mitogenic effect，會增加細胞生長；而且蛻

膜層の間質細胞與大部分的滋養層母細胞都會製造TGF- α (Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a;Lysiak, Han *et al.*, 1993)。另外一個receptor **C-erbB-2**，是由 *c-erbB-2* proto-oncogene所encode，它與上述的EGFR是相對的，所以已分化及呈invasive phenotype的滋養層母細胞，是EGFR陰性反應的，但是它們就會呈現C-erbB-2陽性反應(Jokhi, King *et al.*, 1994)。我們藉由研究mucins在這裡的表現型態，可以更清楚它們之間是否有transition的機制(是與mucins有關)。

最近的報告注意到另外一個EGF receptor family 的member，**HB-EGF** (heparin-binding EGF-like growth factor)，它可以和*erbB1*及*erbB4*結合，促進滋養層母細胞的分化成invasive phenotype (Leach, Kilburn *et al.*, 2004)。為什麼特別要注意這個factor呢？因為報告認為在preeclampsia的孕婦，HB-EGF是被down-regulate的。我們的報告顯示MUC1在severe preeclampsia的胎盤，是升高的，所以HB-EGF的表現可能與MUC1有互動也說不定。

相較於TGF- α ，**TGF- β** 也是一個重要因子；而**TGF- β R**是它們的receptor。TGF- β R可以在許多細胞中表現，TGF- β 則主要是蜕膜層的NK細胞。已知TGF- β 會down-regulate collagenase，增加TIMPs的活性，所以一般均認為它們是限制滋養層母細胞的invasion(Loke, King *et al.*, 1995;Lysiak, Hunt *et al.*, 1995)。由於TGF- β 也會down-regulate細胞表面的MHC class I antigen的表現，所以可以減少maternal leukocyte對滋養層母細胞的免疫反應，有immunosuppressive的效果。很有意思的是，在整個懷孕過程中，villous syncytiotrophoblast及 extravillous trophoblast cells 的細胞質中均會表現TGF- β ，顯然在第一線與母體免疫細胞會接觸的地區，TGF- β 都會表現，主要功能或許也是要其發揮出immunosuppression的效果也不一定。如果觀察decidual cells的TGF- β 表現，似乎在第一孕程的表現較少，到了第三孕程表現量就很明顯(Lysiak, Hunt *et al.*, 1995)。另外也有報告顯示，TGF- β 的表現也受oxygen的調控。Hypoxia可以誘發**HIF-1 α** (hypoxia-inducible factor-1 α)的升高，然後造成TGF- β 的表現overexpression(Caniggia and Winter, 2002)。所以TGF- β 可以說是HIF-1 α 的down-stream。另外值得注意的是：在

preeclampsia的胎盤組織，HIF-1alpha mRNA 和 protein expression是異常的高，因而間接也使得TGF-β的正常down-regulation失調，結果trophoblast invasion受抑制，導致所謂的shallow trophoblast invasion，這也是preeclampsia的組織觀察的特徵。整體上看來，MUC1及MUC15的表現，也有與TGF-β重疊或類似的部分。所以它們的互動，還需要進一步的了解。

在這裡我們也要觀察tumor necrosis factor-α(TNF-α)。過去的報告顯示，TNF-α是一種cytotoxic cytokine，在in vitro會限制trophoblast invasion。它們與TNF-receptor I結合後可以引發滋養層母細胞apoptosis (Huppertz, Frank *et al.*, 1999b;Huppertz, Frank *et al.*, 1999a)。TNF-α的主要來源是蜕膜層的巨噬細胞和NK細胞，雖然滋養層母細胞自己也製造TNF-α。正常情況之下，滋養層母細胞會侵襲至子宮胎盤動脈的管壁內，但是巨噬細胞很少會進到這裡。但是在preeclampsia的胎盤，似乎可以看到大比例的巨噬細胞浸潤，結果真正需要的endovascular cytotrophoblast反而付之闕如(Reister, Frank *et al.*, 1999)。在preeclampsia的胎盤，報告顯示藉著大量駐紮在placental bed的巨噬細胞，它們可以增加絨毛外滋養層母細胞的apoptosis，達到限制絨毛外滋養層母細胞的invasion到子宮胎盤動脈的目的(Reister, Frank *et al.*, 2001)。此外，巨噬細胞(以及滋養層母細胞)會分泌IDO(indolamine 2,3-dioxygenase)，會代謝分解extracellular tryptophan，造成tryptophan depletion，也會加成TNF-α/TNF-receptor I的效應。in vitro study顯示，添加tryptophan會減少絨毛外滋養層母細胞的apoptosis。有報告認為invasive絨毛外滋養層母細胞分泌TNF-α是隨著週數增加而遞減，這部分則還需要觀察 (Pijnenborg, McLaughlin *et al.*, 1998)。

目前的報告顯示，絨毛的基質和蜕膜細胞會分泌HGF(hepatocyte growth factor)，對絨毛外滋養層母細胞表現paracrine effect。滋養層母細胞會表現c-met，是HGF receptor。在in vitro study顯示，HGF會明顯增加滋養層母細胞的侵襲能力。在preeclampsia的組織觀察發現，絨毛的基質分泌的HGF會很低甚至消失。HGF會促進invasive trophoblast的 NO (nitric oxide)的分泌。

另外一個較新的decapeptide，**kisspeptin-10**，是*KISS-1*的gene product。為什麼值得注意，是因為它的gene(*KISS-1*)似乎只在絨毛的滋養層母細胞表現。然而*KISS-1* receptor則還會在絨毛外滋養層母細胞表現。所以也是經由paracrine 作用。kisspeptin-10會抑制滋養層母細胞的migration，但是不影響cell proliferation。產生效應的方式，報告認為與MMP的分泌有關(Bilban, Ghaffari-Tabrizi *et al.*, 2004)。KISS-1 和它的 G-protein-coupled receptor KISS-1R 在第一孕程的表現較多，在足月胎盤則較低。對照於MUC15只在villous trophoblasts有明顯表現，所以也可能是以paracrine effect來產生作用，至於到底如何互動，則還須研究。

有關各種integrins與滋養層母細胞的互動

絨毛外細胞型滋養層母細胞埋在自己分泌的ECM(extracellular matrix)中，表現出ECM receptor，即integrin(整合素)。整合素基本上是heterodimeric的，它們提供細胞附著於ECM的功能。絨毛外細胞型滋養層母細胞會產生的整合素，包括以下：(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)

$\alpha 3\beta 1$ 是laminin的receptor，主要表現在proliferative trophoblast，即靠近cell column附近的近端滋養層母細胞，和少量絨毛區滋養層母細胞。它們的功能與matrix deposition有關。

$\alpha 6\beta 4$ 通常是basal lamina receptor，所以是proliferative trophoblast和early postproliferative trophoblast的主要integrin，通常這些滋養層母細胞是不太分泌ECM。因為與laminin結合，所以會聯結到collagen IV。在第一、二孕程，幾乎所有接進cell column的近端滋養層母細胞均會表現，但是接近足月的胎盤，由於proliferative activities 減少，所以 $\alpha 6\beta 4$ 的表現也減少。上兩種integrin，也稱epithelial integrin。

$\alpha 5\beta 1$ 是fibronectin receptor，是轉移成invasive phenotype後所表現的，所以剛好與 $\alpha 6\beta 4$ 的表現相對。 **$\alpha v\beta 3$** 及 **$\alpha v\beta 5$** 通常也由invasive phenotype的滋養層母細胞所表現。 **$\alpha 1\beta 1$** 是laminin及collagen I及IV 的receptor，是最後才開始表現的

integrin。α5β1、αvβ3、αvβ5及α1β1也稱interstitial integrin。

絨毛外細胞型滋養層母細胞從表現basal lamina receptor α6β4到表現interstitial receptor α5β1，α1β1及αv integrins，是正常懷孕中的特色，表示是從proliferative phenotype轉移(transition)到invasive phenotype的里程碑，又稱integrin switch。似乎integrin switch與滋養層母細胞的invasion的regulation有關。Mucins與integrin之間的interaction目前的研究報告有限，曾經有報告顯示MUC1 overexpression in vitro會降低一些cancer cell lines (如：melanoma cell line (A375), a transformed epithelial cell line (MDCK-ras-e) 及 human breast epithelial cell line (HBL-100)) 與extracellular matrix 的adhesion，而此現象與β1 integrins有關 (Wesseling, van, V *et al.*, 1995)。由於MUC1及MUC15均有involve滋養層母細胞的invasiveness regulation，所以與integrins的interaction亦值得注意。

有關各種CAM與滋養層母細胞的互動

在胎盤中，**E-cadherin**是重要的細胞附著因子(cell adhesion molecule, CAM)。在proliferative phenotype主要是表現此種細胞附著因子。隨著invasiveness的增加，E-cadherin會被turn off。但是在endovascular trophoblast，E-cadherin又會被up-regulate。一般而言，E-cadherin的表現下降，可能是tumor cells的pre malignant changes。而neural cell adhesion molecule (**N-CAM**)，除了cell-cell contact之外，cell-matrix adhesion也需要。在懷孕早期，N-CAM在所有絨毛外細胞型滋養層母細胞都會表現，包括血管內滋養層母細胞。隨著週數增加，N-CAM則逐漸限制在近端的proliferative trophoblasts。

Connexin 40的分布與E-cadherin類似。它們是gap junction molecules，對於cell proliferation及differentiation均有影響。在近端的proliferative trophoblasts及cell islands可以看到較明顯的表現。到了invasive phenotype，cx40幾乎不表現，與E-cadherin類似，但是在深部的細胞聚集處又會表現，而且endovascular trophoblast似乎也不表現。(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)

Mucins基本上就有類似cell adhesion molecules的功能，尤其它們的extracellular domain是如此龐大，所以如果做為類似CAM的功能，其效應自然會很明顯，所以mucins對於滋養層母細胞的影響，就以和其他cell adhesion molecules是如何互動，就需要好好研究。有報告顯示MUC1帶有selectin ligands，會與selectin互動(Brayman, Thathiah *et al.*, 2004b)，所以這裡的相關部分也需要進一步了解。

氧氣分壓對於滋養層母細胞的影響

胎盤組織的含氧度基本上是隨著懷孕週數而改變。在12週以前，含氧度應該很低。有報告顯示(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)，此時的絨毛間空腔，氧氣分壓預估只有18 mmHg，但是maternal intraarterial 的氧氣分壓則可到95-100mmHg。子宮內膜及子宮肌層的氧氣分壓則藉於兩者之間。看起來從在近端的proliferative trophoblasts到達子宮肌肉層或是子宮胎盤血管，有很明顯的氧氣gradient。但是這個氧氣分壓的壓力差，是否會是細胞複製、分化及侵襲的driving force，可以觀察一下。

有報告顯示，hypoxic condition會*in vitro*刺激滋養層母細胞的細胞複製(Genbacev, Zhou *et al.*, 1997)，同時trophoblast invasion也被down-regulate。所以在hypoxic condition， $\alpha 6$ -integrin的表現是up-regulate，而 $\alpha 1$ -integrin的表現則被down-regulate。

但是也有報告顯示，tissue hypoxia反而刺激trophoblast invasion。Hypoxia似乎會增加MMP的secretion，並且同時抑制TIMP的製造。而結果是增加trophoblast invasion。(Benirschke K, Kaufmann P *et al.*, 2006a)

目前我們實驗室以JAR cell lines研究，在medium加入CoCl₂(cobalt dichloride)，製造chemical hypoxia的condition，初步看來似乎HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α)與MUC1的表現都會增加(in 24 hrs & 48 hrs)。這個部份的研究目前仍在進行中。

細胞外酸鹼值對於滋養層母細胞的影響

如果從trophoblast invasion的起點觀察，cell columns處的PH值是最酸性的。酸性環境刺激EVT的fibronectin的分泌，trigger transition 到 invasive phenotype。Mucin在不同的氧氣分壓或酸鹼度的環境，目前仍不明瞭其各自的表現的變化，這也是須要研究。

因本研究藉以了解子癩前症及子宮內發育受限的病生理學

由於之前在trophoblast invasion的部分已經明示，preeclampsia及部分IUGR與trophoblast invasion及spiral artery remodeling有關，而我們的初步研究也顯示mucins的生物功能，包括MUC1及MUC15，均與trophoblast invasion的表現有關。而MUC1的mRNA、蛋白質及免疫染色均顯示，在重度子癩前症的胎盤，MUC1的表現量都會明顯增加。表示在重度子癩前症，其trophoblast invasion是處於受抑制的狀態。然而這是生產當時的胎盤的狀態，那麼這些重度子癩前症的胎盤，在它們懷孕的早期，是否已經有MUC1 elevation的狀態，這可能就還需要設計研究。如果胎盤是overexpression，是否mucins成分會進到母體血液循環，也可以做為研究的方向。如果可行，研發抽血做ELISA的KIT，來偵測母體血中濃度，是否可以預測將來產生子癩前症的危險因子。

所以可以想像，將上述的多樣變化，設計系統性的研究，將有助於了解正常情況的胎盤發育機轉，同時也有助於對於疾病狀態的懷孕的成因、診斷及治療，獲致具體的結果。

因本研究藉以了解mucins的epigenetic regulation

雖然我們知道MUC1及MUC15的表現是隨著週數在增加而增加，然而甚麼條件造成這種趨勢，以及如何完成應該的調控，這都還在研究的前方。前已述及，最近的報告顯示，MUC1在多種breast cancer cell lines發現有epigenetic regulation

的證據。在MUC1 negative 的 cell lines (MDA-MB-453)，在transcription start site，DNA methylation的很高，所以MUC1表現量較低；但是如果是在MUC1 positive 的 cell lines (MCF-7) DNA methylation則很低，所以MUC1表現量高。此外，histone H3-K9 有modification的現象(Yamada, Nishida *et al.*, 2008)。所以從epigenetic regulation這個部分開始檢驗，結論將可以提供我們後續的研究的參考。當然是誰在調控這個regulation，那是更後面的研究項目。

因本研究藉以了解mucins的signaling

目前在MUC1的研究中，已有文獻報告顯示，它們的cytoplasmic tail(MUC1CT)參與多項 cell signaling。首先它們與ErbB family members有互動，如ErbB1 (EGFR)，ErbB2 (Her2 or neu)，ErbB3 (Her3)及 ErbB4 (Her4)等等。而 β -catenin、p120 catenin、p53及ER- α 也有互動。此外，在Src family所包含的九個 non-RTKs: Src, Yes, Fgr, Yrk, Fyn, Lyn, Hck, Lck 及 Blk之中，c-Src, Lyn 及 Lck 可以 bind 及 phosphorylate MUC1CT 在YEKV motif的tyrosine。它們對於Wnt pathway的 regulation 也有關聯。

前面我們也已述及，MUC1可以enhance E2-dependent growth及survival，同時協助消除proteasomal degradation，因而將ER- α 穩定。MUC1CT 也可以enhances ER- α 去佔住ERE並且促使 steroid receptor coactivator 1 (SRC-1)及 glucocorticoid receptor-interacting protein 1 (GRIP1) transcriptional coactivators的 recruitment最後形成ER- α transcriptional complexes。

MUC1CT 同時也是oxidative stress-induced apoptosis 的 regulator。MUC1的表現可以modulate apoptosis。MUC1CT也會trigger immune responses，以及T cell activation。MUC1CT還可以在不同的signaling pathway擔任crossroad的角色。

MUC1在以上的功能及互動，目前均無在胎盤或是滋養層母細胞上的完整研究。我們目前的初步結論均可說是pilot study。相信其他mucins也有可能是具備有上述特性。

Mucins正常主要都表現在上皮細胞的apical cell surface，然而它們的生物效應卻是多元化的。我們研究mucins對於trophoblast cell的signaling、proliferation及invasion做研究，希望能打開更多懷孕過程所引發的各種合併症，當然包括子癩前症及子宮內胎兒生長受限。

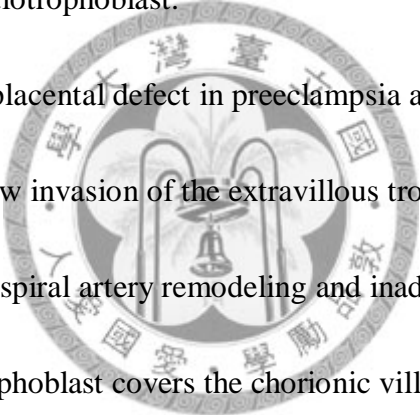


第六章 英文簡述 (Summary)

Introduction

Trophoblast invasion is crucial for the development of normal placentas.

During placental development, fetal cytotrophoblasts proliferate to form aggregates known as cell columns that anchor peripheral villi to the maternal decidua. These cytotrophoblasts, like stem cells of trophoblasts in cell column, just beneath the anchoring basal lamina, start to proliferate and differentiate into the extravillous cytotrophoblast and syncytiotrophoblast.



One of the primary placental defect in preeclampsia and partly intrauterine fetal growth restriction is shallow invasion of the extravillous trophoblast into the decidua, which leads to incomplete spiral artery remodeling and inadequate uteroplacental perfusion. The syncytiotrophoblast covers the chorionic villi and is bathed by maternal blood in the intervillous space. Its primary functions are to remove wastes, exchange oxygen and nutrients, and produce hormones. Its well controlled differentiation and maintenance are also essential for successful pregnancy.

Mucins are highly glycosylated proteins expressed by epithelial cells of various organs. They are classified into two classes: secreted mucins and membrane-bound mucins. The secreted gel-forming mucins, which lack a transmembrane domain, include MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, and MUC19. The

membrane-bound mucins, which possess a single transmembrane domain and a highly conserved cytoplasmic tail, include MUC1, MUC3A, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, and MUC20. These membrane-bound mucins are postulated to serve as sensors of the external environment and can transmit signals into the cell.

Among the known mucins, MUC1 is best studied and plays crucial roles in regulating many cellular properties, including cell proliferation, apoptosis, adhesion, and invasion. Although MUC1 has been found to be expressed by trophoblasts of various species, its expression in the human placenta throughout pregnancy and its potential role in trophoblast invasion remain unclear.

MUC15 is a membrane-bound mucin which was originally isolated from bovine milk fat globule membranes. The mRNA of MUC15 has been detected by RT-PCR in various human tissues. The predicted protein product of human MUC15 (334 amino acids) contains an extracellular domain, a small transmembrane domain, and a highly conserved cytoplasmic tail. In addition, a splice variant of MUC15 encoding a secreted mucin has been detected. So far, physiological functions of MUC15 have never been investigated.

In the present study, we therefore investigated MUC1 and MUC15 expression in the human placenta and the effect on the invasion of trophoblast cells.

Materials and Methods

Clinical tissue collection

The first trimester, second trimester, and third trimester placentas were obtained from the Department of Obstetrics and Gynecology, National Taiwan University Hospital.

The use of human placentas for this study was approved by the local hospital ethic committees and written consent was obtained from patients before the collection of samples. The placental tissue sections were obtained by dissecting a 1.5-cm square segment, 0.5-cm thick, from the maternal part of placentas.

Cell lines and cell culture

Human choriocarcinoma cell lines JEG-3 and JAR were purchased from BCRC (Hsinchu, Taiwan). Cells were maintained with Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin in a humidified tissue culture incubator at 37⁰C, in 5% CO₂ atmosphere.

Northern blot

Multiple Tissue Northern (MTNTM) Blot was purchased from Clontech (BD Biosciences, CA, USA). The blot was probed with ³²P-labeled random-primed full-length MUC15 complementary DNA (cDNA). Hybridization was performed at 65⁰C overnight. The blot was washed at 55⁰C for 1 h in a buffer containing 2x standard saline citrate and 0.5% sodium dodecyl sulphate, and signals were

visualized by autoradiography using Kodak BioMax film.

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted with Trizol reagent (InVitrogen, California, USA) according to the manufacturer's protocol. In both conventional and quantitative PCR, we used a 2-ml aliquot of the cDNA and the following primer sets. PCR primers are indicated in Table 1. PCR products were run on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

Matrigel invasion assays

Cell invasion assays were analyzed in a BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber (BD Biosciences, Massachusetts, USA) according to manufacturer's protocol. The non-invading cells on the upper surface of the membrane were removed by scrubbing with a cottontipped swab, and the invaded cells on the lower surface of the membrane were fixed with 100% methanol and then stained with 0.5% crystal violet. After two washes with distilled water, the chamber was allowed to air dry, and the numbers of invaded cells per field were counted under a phase contrast microscope. The means \pm SD were calculated from six random fields per invasion chamber.

Overexpression of MUC1 or MUC15

A total of 5×10^5 JAR and JEG-3 cells were transiently transfected with $4 \mu\text{g}$ of

pcDNA3.1/myc-His control plasmids (Mock) or MUC15/pcDNA3.1/myc-His (MUC15) or 2 μ g of control expression vector pHb-Apr1-neo (Mock) or pHb-Apr1-neo containing full-length human MUC1 (MUC1) with Lipofectamine 2000. After 48 h of transfection, cells were harvested for experiments.

Quantitative Real-Time PCR

Quantitative PCR system Mx3000P (Stratagene) was used to analyze gene expression in human placentas according to the manufacturer's protocol. PCR reactions were incubated at 95⁰C for 15 min, followed by 40 amplification cycles with 30-sec denaturation at 95 C, 50-sec annealing at 54 C, and 30-sec extension at 72 C. Samples were analyzed in triplicate, and product purity was checked through dissociation curves at the end of real-time PCR cycles. PCR products were confirmed to be correct by DNA sequencing. Relative quantity of specific gene expression normalized to ACTB was analyzed with MxPro Software (Stratagene).

Western Blot

Human placental tissues or cells were homogenized in lysis buffer containing 1% (v/v) Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 160 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, and 1 mM PMSF, followed by ultrasonication (three 5-sec bursts). Insoluble materials were removed by centrifugation. Forty micrograms of total proteins were separated on a 6% SDS-PAGE and transferred to a Hybond enhanced chemiluminescence

nitrocellulose membrane. MUC1 protein was detected with mouse anti-MUC1 mAbs. MUC15 proteins were detected with rabbit anti-MUC15 polyclonal antibodies. Bands were visualized by incubation with anti-mouse HRPconjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence reagents. The signals were quantified and normalized to ACTB signals by the use of ImageQuant 5.1 software.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded human placental sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a series of graded alcohol. After quenching the activity of endogenous peroxidase with 3% (v/v) H₂O₂ in PBS for 30 min, the sections were rinsed twice with PBS for 10 min and then blocked with 5% (w/v) nonfat milk/PBS for 1 h to reduce nonspecific bindings. Sections were incubated with primary antibodies (1:400 for anti-MUC1 mAb VU4H5; 1:100 for anti-MUC1 mAb M2C5; 1:100 for anti-KRT7 mAb, anti-MUC15 polyclonal antibody (1:400)) diluted in 5% (w/v) nonfat milk/PBS for 16 h at 48C. Negative controls were performed by replacing primary antibodies with an isotype-matched control IgG at the same concentration. After rinsing twice with PBS, Super Sensitive Link-Label IHC Detection System (BioGenex, California) was used, and the specific immunostaining was visualized with 3,3-diaminobenzidine liquid substrate system (Sigma, Missouri). All sections were counterstained with hematoxylin for 30 sec and mounted with UltraKitt .

SiRNA knockdown of MUC15 expression

Small interfering RNA (siRNA) oligonucleotides against MUC15 and control siRNA were synthesized by Dharmacon Research, Inc. (Illinois, USA) using their custom SMARTpool and non-targeting siRNA pool, respectively. For knockdown of MUC15, JAR and JEG-3 cells were transfected with siRNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with a final concentration of 100 nmol siRNA. The cells were incubated for 4 h and then serum-free DMEM medium was replaced with complete DMEM medium (10% FBS). After 48 h incubation, cells were harvested for analysis.

Gelatin Zymography

Conditioned media of mock- or MUC1 or MUC15-transfected cells cultured in serum free DMEM for 48 h were electrophoresed on an 8% SDS-PAGE copolymerized with 1% (w/v) gelatin. After electrophoresis, the gels were washed twice for 30 min in 2.5% (v/v) Triton X-100 and incubated for 16 h in developing buffer (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, and 0.05% Brij35; pH 7.5). After incubation, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 for 2 h and destained to reveal zones of gelatinase activity.

Statistical Analysis

Student t-test or Mann-Whitney U-test was used for statistical analyses. Data were presented as mean \pm SD. P < 0.05 was considered statistically significant



Results

MUC1 and MUC15 mRNA Expression in the Human Placenta

MUC1 mRNA expression in the third trimester placenta was significantly higher than that in the first ($P < 0.01$) and second ($P < 0.05$) trimester placenta. These results indicate that the MUC1 mRNA expression in the human placenta is increased during placental development. Similar results were seen for MUC15.

MUC1 and MUC15 Protein Expression in the Human Placenta

Two major bands (170 kDa and >250 kDa) of MUC1 protein were detected by clone VU4H5 of anti- MUC1 mAb in human placentas; these bands represent two isoforms of MUC1. In addition, our results showed that the third trimester placenta expressed significantly higher levels of MUC1 protein than did the first or second trimester placenta. Placentas at term expressed much higher levels of MUC15 than those in early pregnancy, in agreement with the results from real-time RT-PCR.

Immunohistochemistry of MUC1 and MUC15 in Human Placental Villi

MUC1 in human placental villi is mainly expressed by syncytiotrophoblasts throughout pregnancy and is increased during placental development. The expression of MUC15 protein in syncytiotrophoblasts is increased during placental development.

MUC1-Positive and MUC1-Negative Extravillous Trophoblasts Are Present in Human Decidua

Extravillous trophoblasts were present in decidua throughout pregnancy. Interestingly, numbers of MUC1-positive stained extravillous trophoblasts in decidua were increased during placental development.

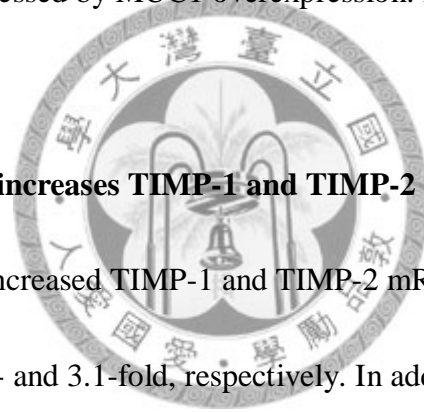
MUC1 and MUC15 overexpression inhibits invasion of JAR and JEG-3 cells

MUC1-high expressers indeed exhibit less invasive ability than do MUC1-low expressers in JAR cells. Overexpression of MUC15 substantially decreased invasion of JAR and JEG-3 cells by 87.5 ± 1.1 and $83.8\pm 5.7\%$, respectively.

MMP9 activity was suppressed by MUC1 overexpression. However, MMP2 activity did not change.

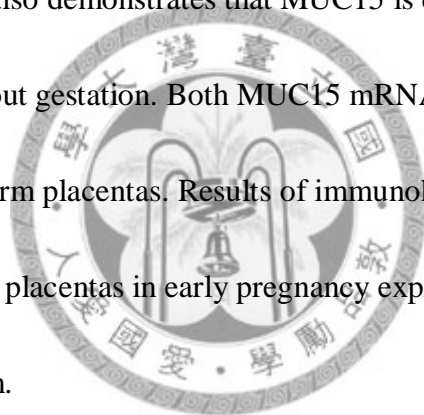
MUC15 overexpression increases TIMP-1 and TIMP-2 expression,

MUC15 overexpression increased TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in JAR cells by an average of 4.1- and 3.1-fold, respectively. In addition, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in JEG cells were increased by an average of 4.7- and 3.7-fold, respectively.



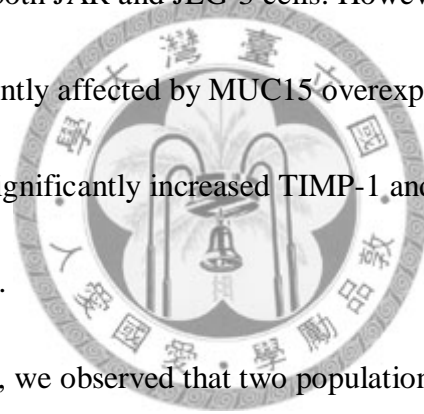
Discussion

The data show that MUC1 mRNA and MUC1 protein increase with gestational stage of human pregnancy. MUC1 protein is mainly expressed by syncytiotrophoblasts in placental villi throughout pregnancy. In addition, we demonstrate that two populations of extravillous trophoblasts, MUC1-positive and MUC1-negative cells, are present in human decidua, and the numbers of MUC1-positive extravillous trophoblasts are increased during human placental development. This study also demonstrates that MUC15 is differentially expressed in human placentas throughout gestation. Both MUC15 mRNA and protein are maximally expressed in term placentas. Results of immunohistochemistry further reveal that trophoblasts of placentas in early pregnancy express lower levels of MUC15 than those at term.



Interestingly, MUC1 overexpression suppresses invasion of trophoblast-like JAR cells in vitro, which is associated with inhibition of MMP9 activity. Our results suggest that MUC1 is differentially expressed in the placenta and decidua during human placental development and may regulate extravillous trophoblast invasion in vitro. Furthermore, MUC15 overexpression significantly suppresses invasion of trophoblast-like JAR and JEG-3 cells, suggesting that MUC15 could also act as a negative regulator of trophoblast invasion in vivo.

To date, mucins have been reported to participate in various physiological functions, such as immune reactions, and cell adhesion, migration, and invasion. Here, we demonstrate that overexpression of MUC1 and MUC15 significantly suppresses invasion of both trophoblast-like JAR and/or JEG-3 cells. Among members of MMP family, MMP-2 and MMP-9 were suggested to regulate trophoblast invasion. MUC1 overexpression suppresses invasion of trophoblast-like JAR cells in vitro, which is associated with inhibition of MMP9 activity. We found that MUC15 overexpression can suppress invasion of both JAR and JEG-3 cells. However, MMP-2 and MMP-9 activity were not significantly affected by MUC15 overexpression. We found that MUC15 overexpression significantly increased TIMP-1 and TIMP-2 expression in both JAR and JEG-3 cells.



In the present study, we observed that two populations of extravillous trophoblasts, MUC1-positive and MUC1-negative cells, in decidua and the numbers of MUC1-positive extravillous trophoblasts are increased during human placental development. In addition, we demonstrate that MUC1 overexpression suppresses invasion of trophoblast-like JAR cells. These results suggest that MUC1 could be a negative regulator of trophoblast invasion and that MUC1-positive extravillous trophoblasts in decidua may exhibit less invasive ability than MUC1-negative extravillous trophoblasts in vivo. It is therefore reasonable to speculate that MUC1

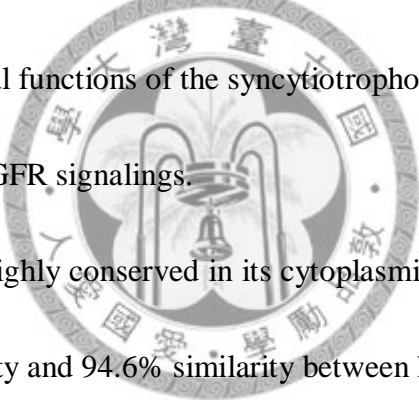
could act as a restraint or brake in trophoblast invasion and could control the invasion of trophoblasts to an appropriate depth in the endometrium, which is essential for normal placental development.

MUC1 has been found to be overexpressed by various types of tumors. Many studies support that MUC1 overexpression enhances tumor cell invasion and promotes tumor malignancy. In sharp contrast, we found that MUC1 overexpression suppresses invasion of trophoblast-like JAR cells in vitro. Interestingly, MUC15 can also suppress invasion of the trophoblast-like cells JAR and JEG-3. These results imply that the role of mucins in trophoblast-lineage cells in terms of invasion is different from that in other types of epithelia. The difference in MUC1 function in regulating cell invasiveness between trophoblast-like and other types of tumor cells may be a result of differential expression of certain cellular factors in trophoblast-like cells.

Our data show that MUC1 is highly expressed by syncytiotrophoblasts in the term placenta. *Muc1*-null mice (*Muc1*^{tm1Gend}) exhibit chronic infection and inflammation of the uterus as a result of increased infection by normal bacteria of the reproductive tract. In addition, MUC1 has been shown to protect cancer cells from immune cell attack. Therefore, we speculate that MUC1 expression on the surface of syncytiotrophoblasts could protect the human placenta from microbial and immune

cell attack. Furthermore, it has been found that MUC1 can interact directly with estrogen receptor alpha (ESR1) and epidermal growth factor receptor (EGFR) and regulate their signalings. It has been shown that estrogen, via interaction with the estrogen receptor, regulates functional differentiation of the syncytiotrophoblast in the primate placenta. EGF, through interaction with EGFR, is able to regulate trophoblast apoptosis and Nat/Ht exchanger activity in the syncytiotrophoblast. Moreover, ESR1 and EGFR have been reported to be expressed by the human syncytiotrophoblast.

Therefore, it is interesting to investigate whether MUC1 can regulate the differentiation or biological functions of the syncytiotrophoblast through the regulation of ESR1 and EGFR signalings.

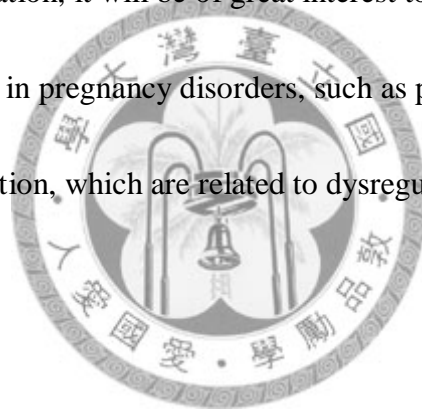


MUC15 protein is highly conserved in its cytoplasmic domain (74 amino acids), which shares 81.1% identity and 94.6% similarity between human and mouse amino acid sequences. The cytoplasmic tail contains four conserved tyrosine and seven serine/threonine phosphorylation sites. We therefore speculate that the potential phosphorylation sites in MUC15 could regulate the interactions of its cytoplasmic tail with proteins involved in signal transduction and thereby modulate trophoblast invasion.

In conclusion, the present studies report the spatial and temporal expression of MUC1 and MUC15 in the human placenta throughout pregnancy. MUC1 expression

in syncytiotrophoblasts and the numbers of MUC1-positive extravillous trophoblasts increase with gestational age during human placental development. In addition, MUC1 overexpression suppresses MMP9 activity and decreases invasion of trophoblast-like JAR cells. Based on these findings, we suggest that MUC1 could play a critical role in trophoblast invasion and may contribute to human placental development. MUC15 overexpression suppresses trophoblast-like cell invasion, which is associated with increased TIMP-1 and TIMP-2 expression.

For further investigation, it will be of great interest to study the roles of MUC1, MUC15 and other mucins in pregnancy disorders, such as pre-eclampsia and intrauterine growth restriction, which are related to dysregulation of trophoblast invasion.



第七章 參考文獻

Reference List

1. Agrawal B, Gendler SJ, Longenecker BM (1998) The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. [Review] [48 refs]. *Molecular Medicine Today*, 4, 397-403.
2. Agrawal B, Krantz MJ, Reddish MA, Longenecker BM (1998) Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2.[see comment]. *Nature Medicine*, 4, 43-49.
3. Argueso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, Keutmann HT, Dana MR, Gipson IK (2002) Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjogren syndrome. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 1004-1011.
4. Argueso P, Spurr-Michaud S, Russo CL, Tisdale A, Gipson IK (2003) MUC16 mucin is expressed by the human ocular surface epithelia and carries the H185 carbohydrate epitope. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 2487-2495.
5. Benirschke K, Kaufmann P, and Baergen R (2006a) *Pathology of Human Placenta*. 5 edn, Springer, New York.
6. Benirschke K, Kaufmann P, and Baergen RN (2006b) Early development of the human placenta. In Benirschke K, Kaufmann P, and Baergen RN (eds) *Pathology of Human Placenta*. Springer, NY, pp. 42-49.
7. Bernacki SH, Nelson AL, Abdullah L, Sheehan JK, Harris A, Davis CW, Randell SH (1999) Mucin gene expression during differentiation of human airway epithelia in vitro. Muc4 and muc5b are strongly induced. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology*, 20, 595-604.
8. Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, Malli R, Sharabi A, Hiden U, Graier W et al (2004) Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *Journal of Cell Science*, 117, 1319-1328.
9. Blankenship TN, Enders AC (1997) Trophoblast cell-mediated modifications

to uterine spiral arteries during early gestation in the macaque. *Acta Anatomica*, 158, 227-236.

10. Blankenship TN, Given RL (1995) Loss of laminin and type IV collagen in uterine luminal epithelial basement membranes during blastocyst implantation in the mouse. *Anatomical Record*, 243, 27-36.
11. Blankenship TN, King BF (1994b) Identification of 72-kilodalton type IV collagenase at sites of trophoblastic invasion of macaque spiral arteries. *Placenta*, 15, 177-187.
12. Blankenship TN, King BF (1994a) Developmental expression of Ki-67 antigen and proliferating cell nuclear antigen in macaque placentas. *Developmental Dynamics*, 201, 324-333.
13. Boyd JD and Hamilton WJ (1970) *The Human Placenta.*, Heffer & Sons, Cambridge.
14. Boyd JD, Hamilton WJ (1966) Electron microscopic observations on the cytotrophoblast contribution to the syncytium in the human placenta. *Journal of Anatomy*, 100, 535-548.
15. Brayman M, Thathiah A, Carson DD (2004a) MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. [Review] [70 refs]. *Reproductive Biology & Endocrinology*, 2, 4.
16. Brayman M, Thathiah A, Carson DD (2004b) MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. [Review] [70 refs]. *Reproductive Biology & Endocrinology*, 2, 4.
17. Brosens I (1964) A STUDY OF THE SPIRAL ARTERIES OF THE DECIDUA BASALIS IN NORMOTENSIVE AND HYPERTENSIVE PREGNANCIES. *Journal of Obstetrics & Gynaecology of the British Commonwealth*, 71, 222-230.
18. Brosens I, Dixon HG (1966) The anatomy of the maternal side of the placenta. *Journal of Obstetrics & Gynaecology of the British Commonwealth*, 73, 357-363.
19. Brosens I, Robertson WB, Dixon HG (1967) The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *Journal of Pathology & Bacteriology*, 93, 569-579.

20. Brosens I, Robertson WB, Dixon HG, Brosens I (1978) Morphologic changes in uteroplacental arteries during pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 132, 233.
21. Burdick MD, Harris A, Reid CJ, Iwamura T, Hollingsworth MA (1997) Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 24198-24202.
22. Burrows TD, King A, Loke YW (1993a) Expression of adhesion molecules by human decidual large granular lymphocytes. *Cellular Immunology*, 147, 81-94.
23. Burrows TD, King A, Loke YW (1993b) Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin. *Human Reproduction*, 8, 475-484.
24. Burrows TD, King A, Loke YW (1994) Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: implications for vascular invasion during implantation. *Placenta*, 15, 21-33.
25. Caniggia I, Winter JL (2002) Adriana and Luisa Castellucci Award lecture 2001. Hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies--a review. [Review] [69 refs]. *Placenta*, 23 Suppl A, S47-S57.
26. Cantele SJ, Kaufmann P, Luckhardt M, Schweikhardt G (1987) Interpretation of syncytial sprouts and bridges in the human placenta. *Placenta*, 8, 221-234.
27. Carson DD, DeSouza MM, Regisford EG (1998) Mucin and proteoglycan functions in embryo implantation. [Review] [82 refs]. *Bioessays*, 20, 577-583.
28. Carson DD, Julian J, Lessey BA, Prakobphol A, Fisher SJ (2006) MUC1 is a scaffold for selectin ligands in the human uterus. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2903-2908.
29. Carter AM (1997) When is the maternal placental circulation established in man? 1941.[see comment]. *Placenta*, 18, 83-87.
30. Castellucci M, Scheper M, Scheffen I, Celona A, and Kaufmann P (1990) The development of the human placental villous tree. *Anatomy And Embryology*, 181, 117-128.

31. Ciborowski P, Finn OJ (2002) Non-glycosylated tandem repeats of MUC1 facilitate attachment of breast tumor cells to normal human lung tissue and immobilized extracellular matrix proteins (ECM) in vitro: potential role in metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 19, 339-345.
32. Craven CM, Morgan T, Ward K (1998) Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta*, 19, 241-252.
33. Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, and Kotowski A (1989) Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anatomica*, 136, 190-203.
34. DeSouza MM, Surveyor GA, Price RE, Julian J, Kardon R, Zhou X, Gendler S, Hilkens J, Carson DD (1999) MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract. *Journal of Reproductive Immunology*, 45, 127-158.
35. Dokras A, Coffin J, Field L, Frakes A, Lee H, Madan A, Nelson T, Ryu GY, Yoon JG, Madan A et al (2006) Epigenetic regulation of maspin expression in the human placenta. *Molecular Human Reproduction*, 12, 611-617.
36. Dokras A, Gardner LM, Kirschmann DA, Seftor EA, Hendrix MJ (2002) The tumour suppressor gene maspin is differentially regulated in cytotrophoblasts during human placental development. *Placenta*, 23, 274-280.
37. Edwards RG (1988) Human uterine endocrinology and the implantation window. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 541, 445-454.
38. Enders AC, Blankenship TN (1997b) Modification of endometrial arteries during invasion by cytotrophoblast cells in the pregnant macaque. *Acta Anatomica*, 159, 169-193.
39. Enders AC, Blankenship TN (1997a) Modification of endometrial arteries during invasion by cytotrophoblast cells in the pregnant macaque. *Acta Anatomica*, 159, 169-193.
40. Evain-Brion D, Alsat E, Evain-Brion D, and Alsat E (1994) Epidermal growth factor receptor and human fetoplacental development. [Review] [56 refs]. *Journal of Pediatric Endocrinology*, 7, 295-302.
41. Feinberg RF, Kliman HJ, Cohen AW, Feinberg RF, Kliman HJ, and Cohen AW (1991) Preeclampsia, trisomy 13, and the placental bed. *Obstetrics & Gynecology*, 78, 505-508.

42. Ferretti C, Bruni L, ngles-Marie V, Pecking AP, Bellet D, (2007) Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. [Review] [305 refs]. *Human Reproduction Update*, 13, 121-141.
43. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ (1997) Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*, 277, 1669-1672.
44. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Argueso P, Tisdale A, Ng TF, Russo CL (2003) Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 2496-2506.
45. Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, Fuchisawa A, Redman CW, Sargent IL, von DP (2006) Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta*, 27, 56-61.
46. Graham CH, Lala PK (1991) Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *Journal of Cellular Physiology*, 148, 228-234.
47. Haig D (1993) Genetic conflicts in human pregnancy. [Review] [338 refs]. *Quarterly Review of Biology*, 68, 495-532.
48. Hamilton WJ, Boyd JD (1966) Trophoblast in human utero-placental arteries. *Nature*, 212, 906-908.
49. Hartmann M, Blaschitz A, Hammer A, Haidacher S, Mahnert W, Walcher W, Dohr G (1997) Immunohistochemical examination of trophoblast populations in human first trimester and term placentae and of first trimester spiral arteries with the monoclonal antibody GZ 112. *Placenta*, 18, 481-489.
50. Hees H, Moll W, Wrobel KH, Hees I (1987) Pregnancy-induced structural changes and trophoblastic invasion in the segmental mesometrial arteries of the guinea pig (*Cavia porcellus* L.). *Placenta*, 8, 609-626.
51. Higuchi T, Orita T, Katsuya K, Yamasaki Y, Akiyama K, Li H, Yamamoto T, Saito Y, Nakamura M (2004b) MUC20 suppresses the hepatocyte growth factor-induced Grb2-Ras pathway by binding to a multifunctional docking site of met. *Molecular & Cellular Biology*, 24, 7456-7468.
52. Higuchi T, Orita T, Katsuya K, Yamasaki Y, Akiyama K, Li H, Yamamoto T,

- Saito Y, Nakamura M (2004a) MUC20 suppresses the hepatocyte growth factor-induced Grb2-Ras pathway by binding to a multifunctional docking site of met. *Molecular & Cellular Biology*, 24, 7456-7468.
53. Higuchi T, Orita T, Nakanishi S, Katsuya K, Watanabe H, Yamasaki Y, Waga I, Nanayama T, Yamamoto Y, Munger W et al (2004c) Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of MUC20, a novel mucin protein, up-regulated in injured kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 1968-1979.
54. Higuchi T, Orita T, Nakanishi S, Katsuya K, Watanabe H, Yamasaki Y, Waga I, Nanayama T, Yamamoto Y, Munger W et al (2004d) Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of MUC20, a novel mucin protein, up-regulated in injured kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 1968-1979.
55. Hollingsworth MA, Swanson BJ (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. [Review] [187 refs]. *Nature Reviews, Cancer*. 4, 45-60.
56. Huang J, Liang JT, Huang HC, Shen TL, Chen HY, Lin NY, Che MI, Lin WC, Huang MC (2007) Beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase III enhances malignant phenotypes of colon cancer cells. *Molecular Cancer Research: MCR*, 5, 543-552.
57. Huang MC, Chen HY, Huang HC, Huang J, Liang JT, Shen TL, Lin NY, Ho CC, Cho IM, Hsu SM et al (2006) C2GnT-M is downregulated in colorectal cancer and its re-expression causes growth inhibition of colon cancer cells. *Oncogene*, 25, 3267-3276.
58. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P (1999a) The apoptosis cascade--morphological and immunohistochemical methods for its visualization. [Review] [103 refs]. *Anatomy & Embryology*, 200, 1-18.
59. Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P (1998) Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochemistry & Cell Biology*, 110, 495-508.
60. Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P (1999b) Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Laboratory*

Investigation, 79, 1687-1702.

61. Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P (1998) Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell & Tissue Research*, 291, 133-148.
62. Huppertz B, Kingdom J, Caniggia I, Desoye G, Black S, Korr H, Kaufmann P, (2003) Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. *Placenta*, 24, 181-190.
63. Jeschke U, Richter DU, Hammer A, Briese V, Friese K, Karsten U (2002) Expression of the Thomsen-Friedenreich antigen and of its putative carrier protein mucin 1 in the human placenta and in trophoblast cells in vitro. *Histochemistry & Cell Biology*, 117, 219-226.
64. Johansen M, Redman CW, Wilkins T, Sargent IL (1999) Trophoblast deportation in human pregnancy--its relevance for pre-eclampsia. *Placenta*, 20, 531-539.
65. Johnstone ED, Speake PF, Sibley CP (2007) Epidermal growth factor and sphingosine-1-phosphate stimulate Na⁺/H⁺ exchanger activity in the human placental syncytiotrophoblast. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 293, R2290-R2294.
66. Jokhi PP, King A, Loke YW (1994) Reciprocal expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-erbB2 by non-invasive and invasive human trophoblast populations. *Cytokine*, 6, 433-442.
67. Kam JL, Regimbald LH, Hilgers JH, Hoffman P, Krantz MJ, Longenecker BM, Hugh JC (1998) MUC1 synthetic peptide inhibition of intercellular adhesion molecule-1 and MUC1 binding requires six tandem repeats. *Cancer Research*, 58, 5577-5581.
68. Kaufmann P, Black S, and Huppertz B (2003) Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. [Review] [57 refs]. *Biology of Reproduction*, 69, 1-7.
69. Kaufmann P, Luckhardt M, Schweikhart G, Cattle SJ (1987) Cross-sectional features and three-dimensional structure of human placental villi. *Placenta*, 8, 235-247.

70. King A, Loke YW (1988) Differential expression of blood-group-related carbohydrate antigens by trophoblast subpopulations. *Placenta*, 9, 513-521.
71. King BF (1987) Ultrastructural differentiation of stromal and vascular components in early macaque placental villi. *The American Journal Of Anatomy*, 178, 30-44.
72. Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL (1998) Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *British Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 105, 632-640.
73. Kohlgraf KG, Gawron AJ, Higashi M, Meza JL, Burdick MD, Kitajima S, Kelly DL, Caffrey TC, Hollingsworth MA (2003) Contribution of the MUC1 tandem repeat and cytoplasmic tail to invasive and metastatic properties of a pancreatic cancer cell line. *Cancer Research*, 63, 5011-5020.
74. Leach RE, Kilburn B, Wang J, Liu Z, Romero R, Armant DR (2004) Heparin-binding EGF-like growth factor regulates human extravillous cytotrophoblast development during conversion to the invasive phenotype. *Developmental Biology*, 266, 223-237.
75. Lillehoj EP, Kim H, Chun EY, Kim KC (2004) *Pseudomonas aeruginosa* stimulates phosphorylation of the airway epithelial membrane glycoprotein Muc1 and activates MAP kinase. *American Journal of Physiology - Lung Cellular & Molecular Physiology*, 287, L809-L815.
76. Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH, Fisher SJ, (1997) Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *American Journal of Pathology*, 151, 1809-1818.
77. Loke YW, King A, Burrows TD (1995) Decidua in human implantation. [Review] [62 refs]. *Human Reproduction*, 10 Suppl 2, 14-21.
78. Lysiak JJ, Han VK, Lala PK (1993) Localization of transforming growth factor alpha in the human placenta and decidua: role in trophoblast growth. *Biology of Reproduction*, 49, 885-894.
79. Lysiak JJ, Hunt J, Pringle GA, Lala PK, (1995) Localization of transforming growth factor beta and its natural inhibitor decorin in the human placenta and decidua throughout gestation. *Placenta*, 16, 221-231.
80. Moll SJ, Jones CJ, Crocker IP, Baker PN, Heazell AE (2007) Epidermal

growth factor rescues trophoblast apoptosis induced by reactive oxygen species. *Apoptosis*, 12, 1611-1622.

81. Moll UM, Lane BL (1990) Proteolytic activity of first trimester human placenta: localization of interstitial collagenase in villous and extravillous trophoblast. *Histochemistry*, 94, 555-560.
82. Muhlhauser J, Crescimanno C, Kaufmann P, Hofler H, Zaccheo D, Castellucci M, (1993) Differentiation and proliferation patterns in human trophoblast revealed by c-erbB-2 oncogene product and EGF-R. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41, 165-173.
83. Nanaev A, Chwalisz K, Frank HG, Kohlen G, Hegele-Hartung C, Kaufmann P, (1995) Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. *Cell & Tissue Research*, 282, 407-421.
84. Pallesen LT, Berglund L, Rasmussen LK, Petersen TE, Rasmussen JT, (2002) Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin. *European Journal of Biochemistry*, 269, 2755-2763.
85. Pepe GJ, Albrecht ED, (1999) Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy. [Review] [34 refs]. *Steroids*, 64, 624-627.
86. Pijnenborg R, McLaughlin PJ, Vercruyssen L, Hanssens M, Johnson PM, Keith JC, Jr., Van Assche FA, (1998) Immunolocalization of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in the placental bed of normotensive and hypertensive human pregnancies. *Placenta*, 19, 231-239.
87. Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, (1974) The arterial migration of trophoblast in the uterus of the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *Journal of Reproduction & Fertility*, 40, 269-280.
88. Pino V, Ramsauer VP, Salas P, Carothers Carraway CA, Carraway KL, (2006) Membrane mucin Muc4 induces density-dependent changes in ERK activation in mammary epithelial and tumor cells: role in reversal of contact inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 29411-29420.
89. Proll J, Blaschitz A, Hartmann M, Thalhamer J, Dohr G, (1997) Cytokeratin 17 as an immunohistochemical marker for intramural cytotrophoblast in human

- first trimester uteroplacental arteries. *Cell & Tissue Research*, 288, 335-343.
90. Rahn JJ, Shen Q, Mah BK, Hugh JC (2004) MUC1 initiates a calcium signal after ligation by intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 29386-29390.
91. Ramsauer VP, Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL (2003) Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 30142-30147.
92. Ramsauer VP, Pino V, Farooq A, Carothers Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL (2006) Muc4-ErbB2 complex formation and signaling in polarized CACO-2 epithelial cells indicate that Muc4 acts as an unorthodox ligand for ErbB2. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 2931-2941.
93. Ramsey EM (1962) Circulation in the intervillous space of the primate placenta. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 84, 1649-1663.
94. Ramsey EM (1981) The story of the spiral arteries. *Journal of Reproductive Medicine*, 26, 393-399.
95. Reister F, Frank HG, Heyl W, Kosanke G, Huppertz B, Schroder W, Kaufmann P, Rath W (1999) The distribution of macrophages in spiral arteries of the placental bed in pre-eclampsia differs from that in healthy patients. *Placenta*, 20, 229-233.
96. Reister F, Frank HG, Kingdom JC, Heyl W, Kaufmann P, Rath W, Huppertz B (2001) Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Laboratory Investigation*, 81, 1143-1152.
97. Robertson WB (1976) Uteroplacental vasculature. *Journal of Clinical Pathology - Supplement (Royal College of Pathologists)*, 10, 9-17.
98. Robertson WB, Manning PJ, Robertson WB, and Manning PJ (1974) Elastic tissue in uterine blood vessels. *Journal of Pathology*, 112, 237-243.
99. Ruck P, Marzusch K, Kaiserling E, Dietl J, Horny HP, Handgretinger R, Vince G, Redman CW (1995) Role of cell adhesion molecules in implantation.[comment]. *Fertility & Sterility*, 63, 1353-1355.

100. Ruck P, Marzusch K, Kaiserling E, Horny HP, Dietl J, Geiselhart A, Handgretinger R, Redman CW (1994) Distribution of cell adhesion molecules in decidua of early human pregnancy. An immunohistochemical study. *Laboratory Investigation*, 71, 94-101.
101. Sadler TW (1995) *Langman's Medical Embryology*. 7 edn, Williams & Wilkins, Baltimore.
102. Sarani SA, Ghaffari-Novin M, Warren MA, Dockery P, and Cooke ID (1999) Morphological evidence for the 'implantation window' in human luminal endometrium. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 14, 3101-3106.
103. Schroeder JA, Adriance MC, Thompson MC, Camenisch TD, Gendler SJ (2003) MUC1 alters beta-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion. *Oncogene*, 22, 1324-1332.
104. Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ (2001) Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 13057-13064.
105. Sheppard BL, Bonnar J (1974a) Scanning electron microscopy of the human placenta and decidual spiral arteries in normal pregnancy. *Journal of Obstetrics & Gynaecology of the British Commonwealth*, 81, 20-29.
106. Sheppard BL, Bonnar J (1974b) The ultrastructure of the arterial supply of the human placenta in early and late pregnancy. *Journal of Obstetrics & Gynaecology of the British Commonwealth*, 81, 497-511.
107. Singh AP, Chauhan SC, Andrianifahanana M, Moniaux N, Meza JL, Copin MC, van S, I, Hollingsworth MA, Aubert JP, Batra SK et al (2007) MUC4 expression is regulated by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreatic adenocarcinoma cells via transcriptional and post-translational mechanisms. *Oncogene*, 26, 30-41.
108. Singh PK, Hollingsworth MA (2006) Cell surface-associated mucins in signal transduction. [Review] [57 refs]. *Trends in Cell Biology*, 16, 467-476.
109. Singh PK, Wen Y, Swanson BJ, Shanmugam K, Kazlauskas A, Cerny RL, Gendler SJ, Hollingsworth MA (2007) Platelet-derived growth factor receptor beta-mediated phosphorylation of MUC1 enhances invasiveness in pancreatic

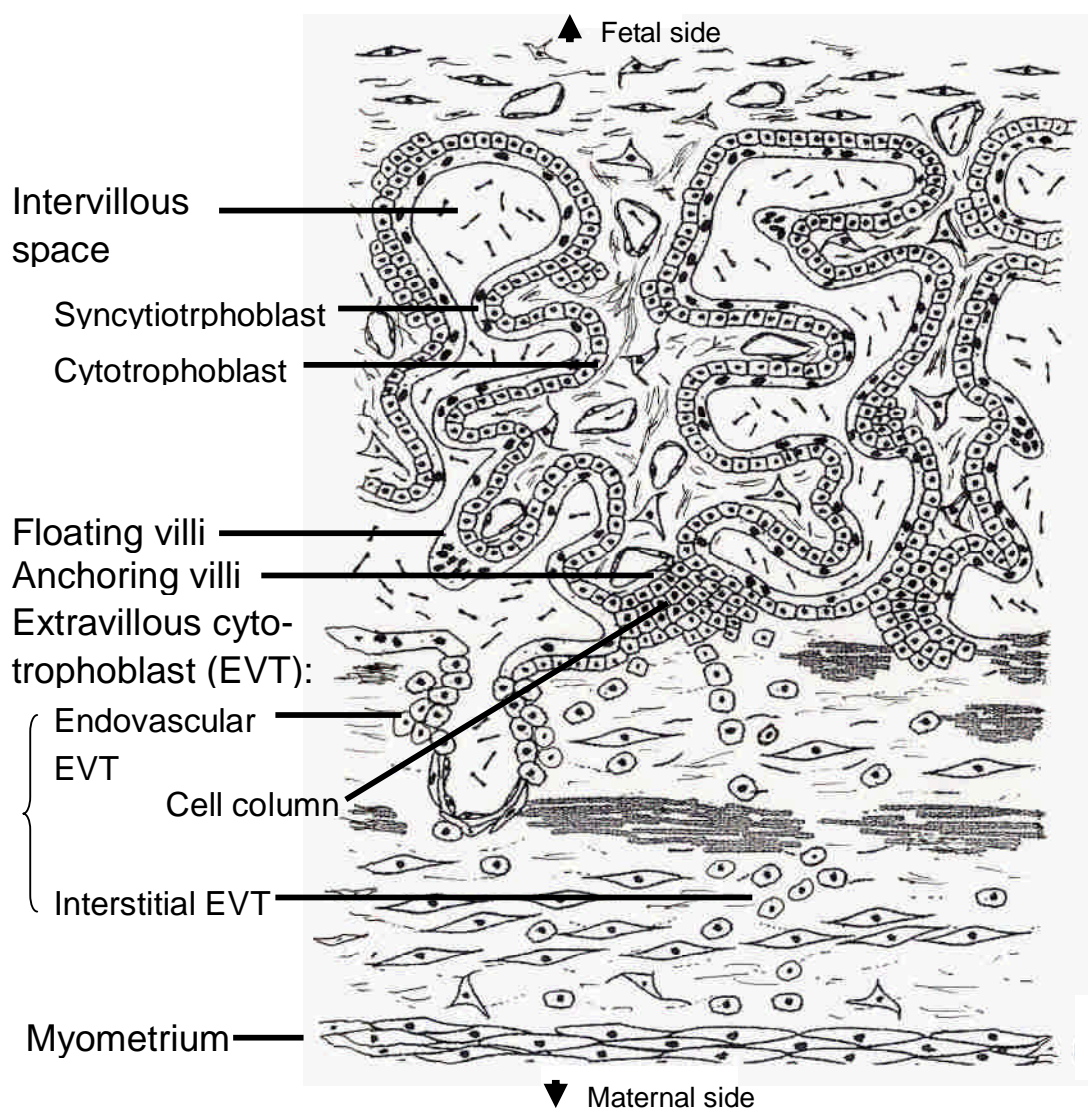
- adenocarcinoma cells. *Cancer Research*, 67, 5201-5210.
110. Smarason AK, Sargent IL, Redman CW (1996) Endothelial cell proliferation is suppressed by plasma but not serum from women with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 174, 787-793.
 111. Smarason AK, Sargent IL, Starkey PM, Redman CW (1993) The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic women on the growth of endothelial cells in vitro.[see comment]. *British Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 100, 943-949.
 112. Thirkill TL, Cao T, Stout M, Blankenship TN, Barakat A, Douglas GC (2007) MUC1 is involved in trophoblast transendothelial migration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773, 1007-1014.
 113. Thompson EJ, Shanmugam K, Hatstrup CL, Kotlarczyk KL, Gutierrez A, Bradley JM, Mukherjee P, Gendler SJ (2006) Tyrosines in the MUC1 cytoplasmic tail modulate transcription via the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and nuclear factor-kappaB pathways. *Molecular Cancer Research: MCR*, 4, 489-497.
 114. Tsutsumida H, Swanson BJ, Singh PK, Caffrey TC, Kitajima S, Goto M, Yonezawa S, Hollingsworth MA (2006) RNA interference suppression of MUC1 reduces the growth rate and metastatic phenotype of human pancreatic cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 12, 2976-2987.
 115. Wang H, Lillehoj EP, Kim KC (2004) MUC1 tyrosine phosphorylation activates the extracellular signal-regulated kinase. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 321, 448-454.
 116. Watanabe Y, Kashiwagi N, Yamada N, Higashi M, Fukuda T, Morikawa S, Onishi Y, Iihara K, Miyamoto S, Naito H et al (2008) Subtraction 3D CT angiography with the orbital synchronized helical scan technique for the evaluation of postoperative cerebral aneurysms treated with cobalt-alloy clips. *Ajnr: American Journal of Neuroradiology*, 29, 1071-1075.
 117. Wei X, Xu H, Kufe D (2006) MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha. *Molecular Cell*, 21, 295-305.
 118. Wesseling J, van d, V, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J (1995) Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to

extracellular matrix components. *Journal of Cell Biology*, 129, 255-265.

119. Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM, (1999) Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. *Cancer Research*, 59, 4083-4089.
120. Williams SJ, Munster DJ, Quin RJ, Gotley DC, McGuckin MA (1999) The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 261, 83-89.
121. Yamada N, Nishida Y, Tsutsumida H, Hamada T, Goto M, Higashi M, Nomoto M, Yonezawa S (2008) MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Research*, 68, 2708-2716.
122. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH (1997) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?[see comment]. *Journal of Clinical Investigation*, 99, 2139-2151.

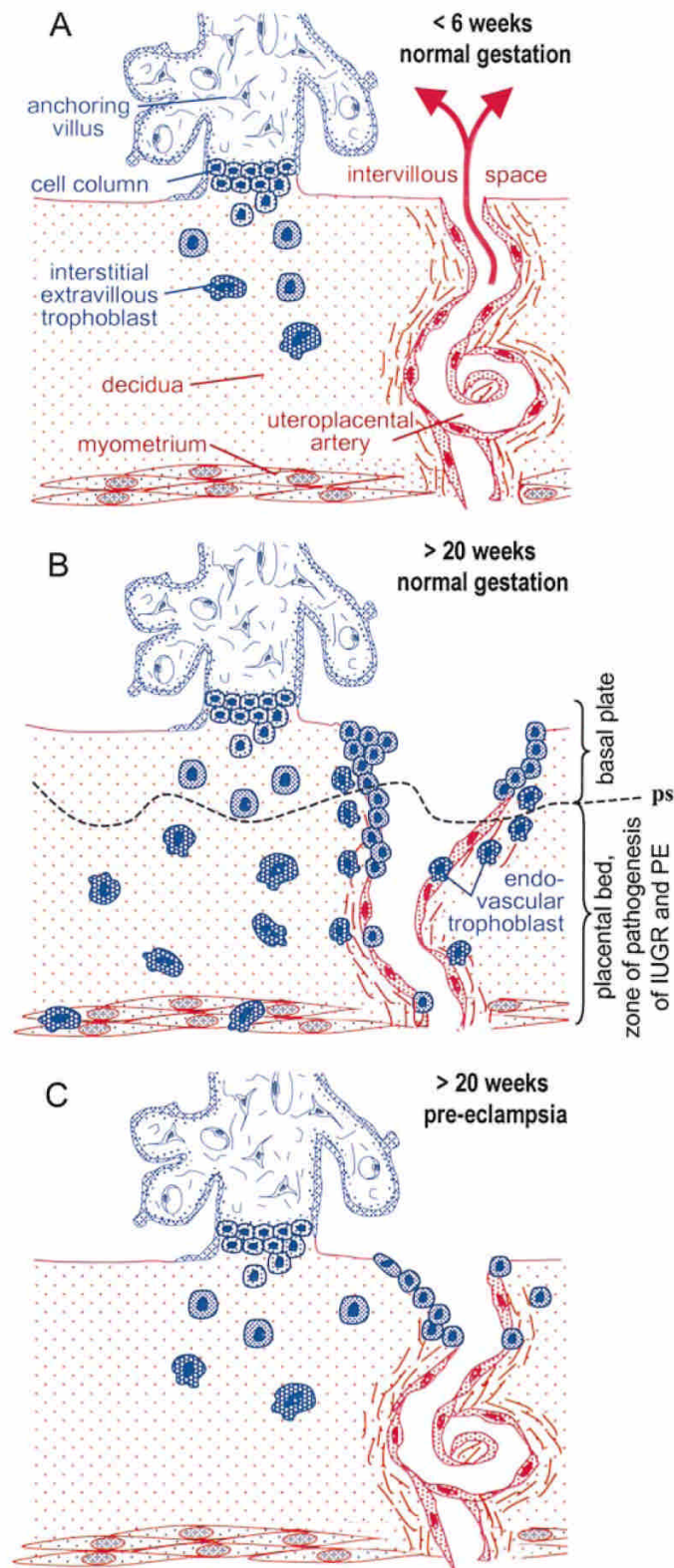


第八章 圖表

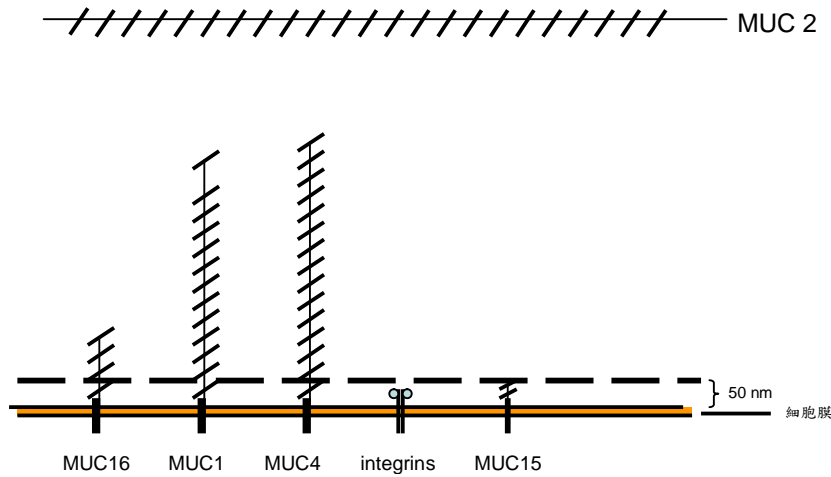


圖一 胎盤的相關構造。留意 Anchoring villi、floating villi、cell column、cytotrophoblasts、syncytiotrophoblasts、intervillous space 及 extravillous cytotrophoblast 的相關位置。

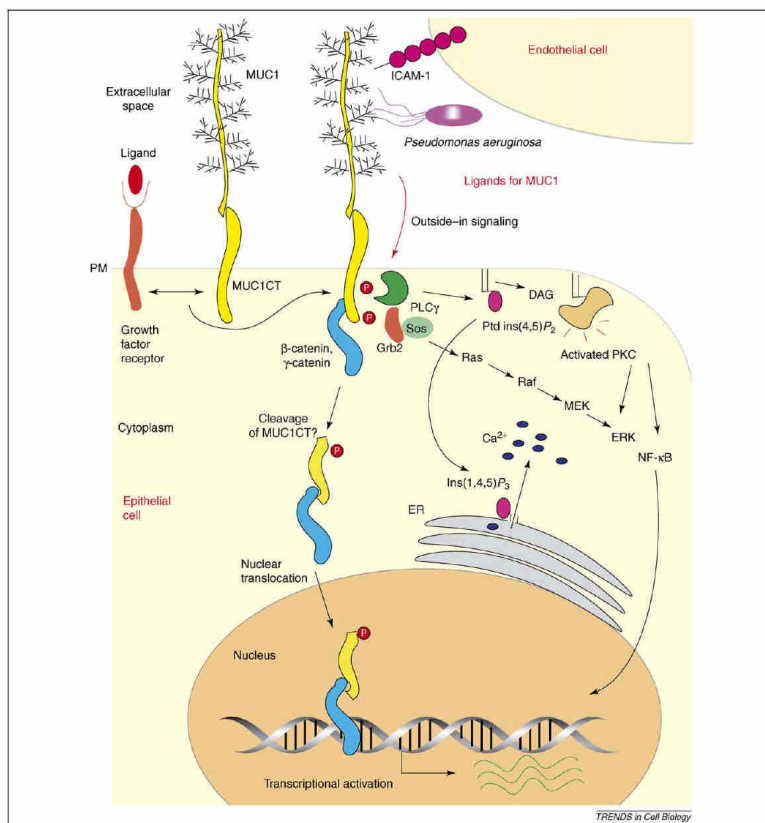
(參考自 Benirschke K, Kaufmann P, and Baergen RN (eds) Pathology of Human Placenta. Springer, NY, 2006)



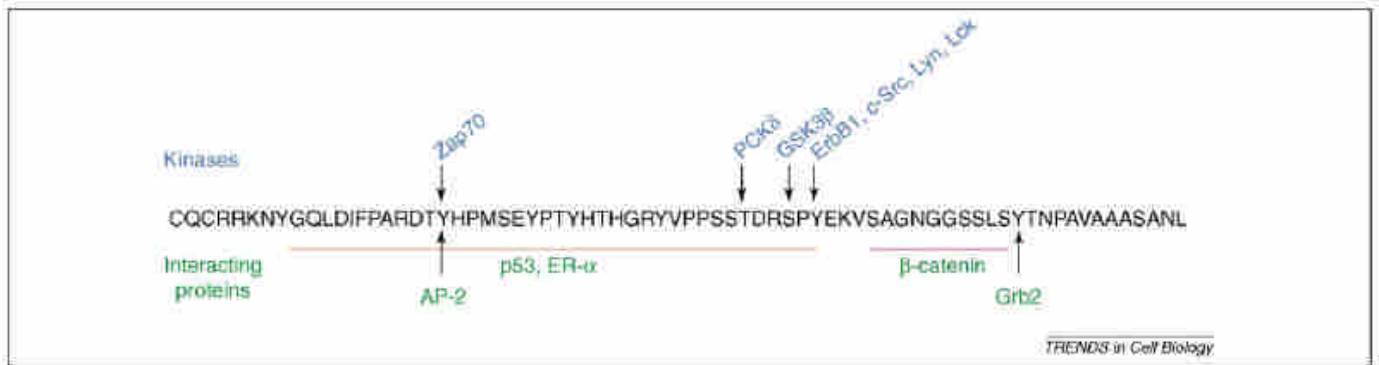
圖二 Interstitial 及 endovascular trophoblast invasion 的示意圖。A 圖是六週內的胎盤。B 圖是在二十週以後的正常胎盤，可以看到 spiral artery 有 remodeling。C 圖是二十週以後的 Preeclampsia 的胎盤，在 placental bed 的 spiral artery 沒有 remodeling。
(參考自 Kaufmann P et al., Biol Reprod 2003,69:1-7)



圖三 黏液蛋白與不同醣蛋白質示意圖。MUC2 是 secretory mucin，MUC1、4、15、16 是 membrane bound mucins。我們可以比較它們的相對分子大小。

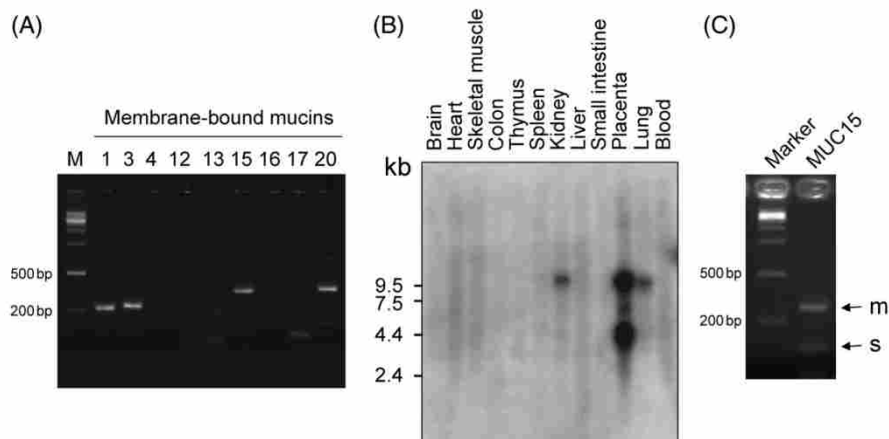


圖四 MUC1 訊息傳遞的示意圖。ICAM-1, *Pseudomonas aeruginosa* 等外來物均可能是配體，均可能引發如圖中所示之訊息傳遞。(參考自 TRENDS in Cell Biology 2006, 16 (9); 467-476)

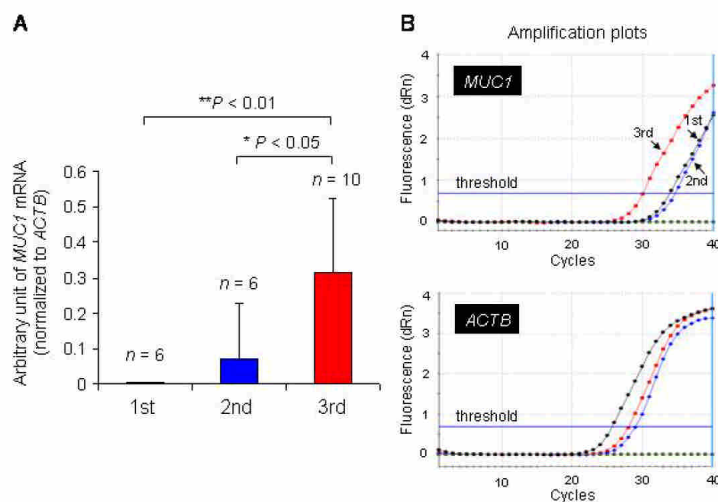


圖五 MUC1CT 的示意圖。上方顯示是 kinase 接合點，可以造成該點之胺基酸的磷酸化。下方顯示是與其他蛋白質的互動點。(參考自 TRENDS in Cell Biology 2006, 16 (9); 467-476)

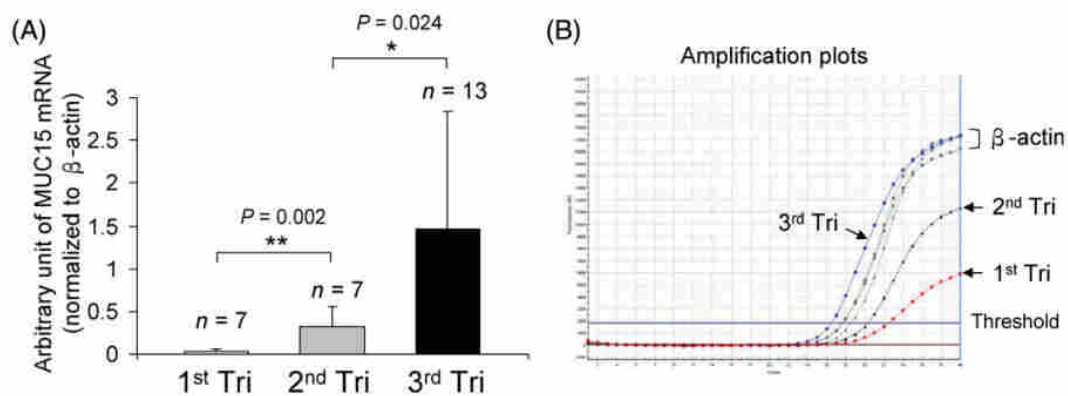




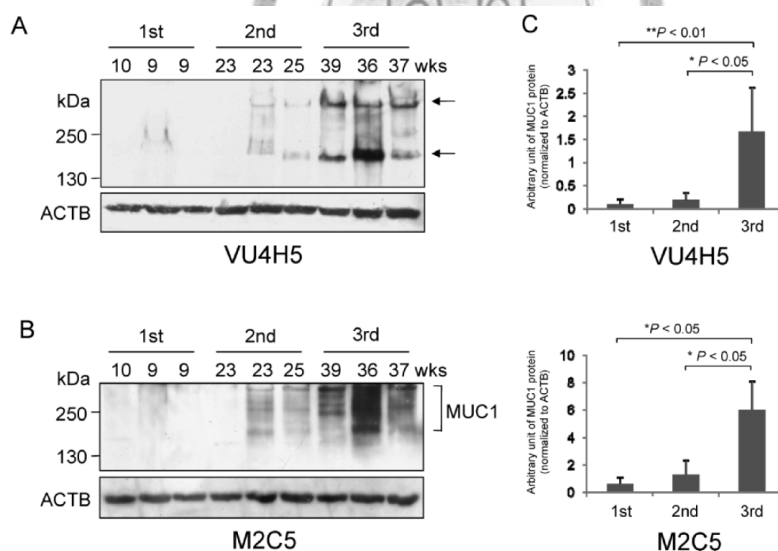
圖六 人體器官組織的 MUC15 表現。(A) Expression of membrane-bound mucins in the human placenta at term. RT-PCR was used to detect membrane-bound mucins MUC1, 3, 4, 12, 13, 15, 16, 17, and 20, as indicated. (B) Northern blot of MUC15 in human tissues. Multiple human tissue Northern blot (MTN I) was probed with a ^{32}P -labeled probe corresponding to full-length MUC15 complementary DNA. Note that MUC15 mRNA was expressed most abundantly in the placenta. (C) Expression of membrane-bound and secreted forms of MUC15 mRNA in human term placentas. Membrane-bound (m) and secreted(s) forms of MUC15 transcripts were detected by RT-PCR, as indicated by arrows (255 bp and 102 bp). Markers are shown at the left.



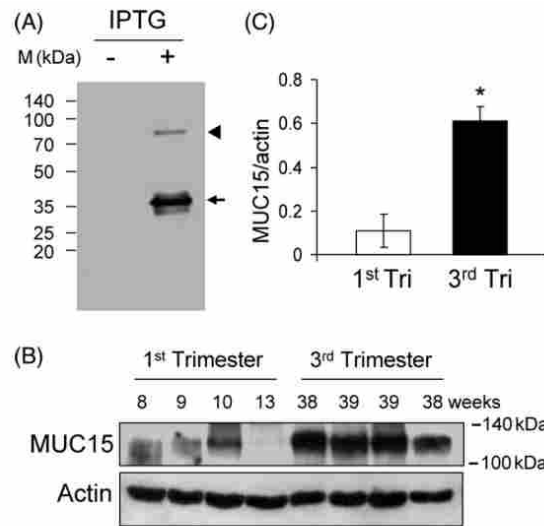
圖七 MUC1 mRNA expression的Q-PCR。表現量隨著懷孕週數而增加。A) Quantitative RT-PCR showed that MUC1 mRNA expression in the human placenta was increased during placental development. The real-time RT-PCR signals of MUC1 were normalized to ACTB(=β actin) and analyzed with MxPro Software; n indicates the placenta number. Mann-Whitney U-test was used for statistical analyses of relative MUC1 mRNA expressions. Results are presented as mean±SD. ** P<0.01; * P<0.05; 1st, first trimester; 2nd, second trimester; 3rd, third trimester. B) The representative amplification plots are shown. The arrows indicate the amplification plots of MUC1 for the first (1st, black circle), the second (2nd, blue diamond), and the third trimester (3rd, red square) placenta, as indicated (upper panel). ACTB signals were used as internal controls (lower panel).



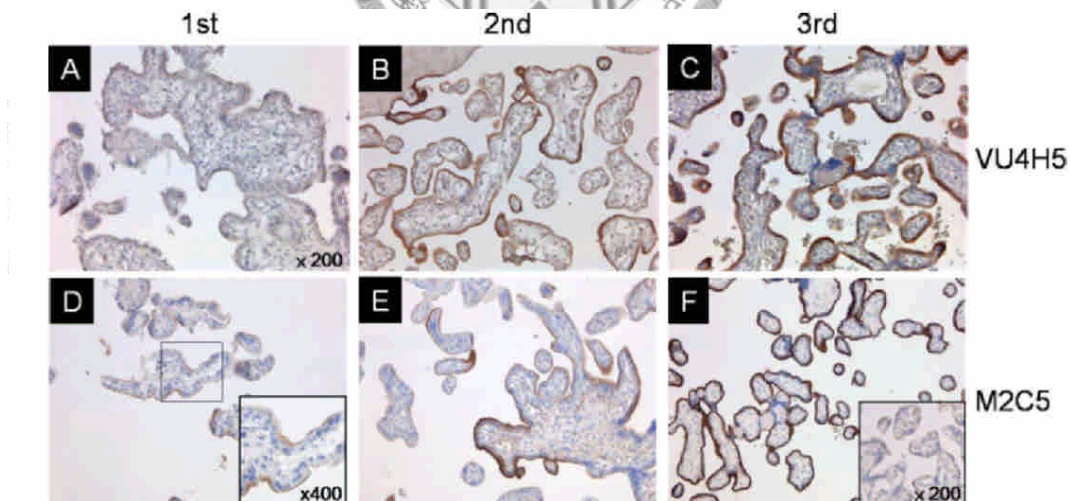
圖八 MUC15 mRNA expression 的 Q-PCR。表現量亦隨著懷孕週數而增加。(A) Real-time RT-PCR revealed that MUC15 mRNA expression in placentas was increased from the first (first Tri) to the third trimester (third Tri). The real-time RT-PCR signals of MUC15 were normalized to b-actin and analyzed with MxPro Software. n indicates the placenta number. Mann-Whitney U-test was used for statistical analyses of relative MUC15 mRNA expression. Results are presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (B) Representative amplification plots are shown. The arrows indicate the amplification plots of MUC15 for the first (first Tri), second (second Tri), and third trimester (third Tri). b-actin signals were used as internal controls.



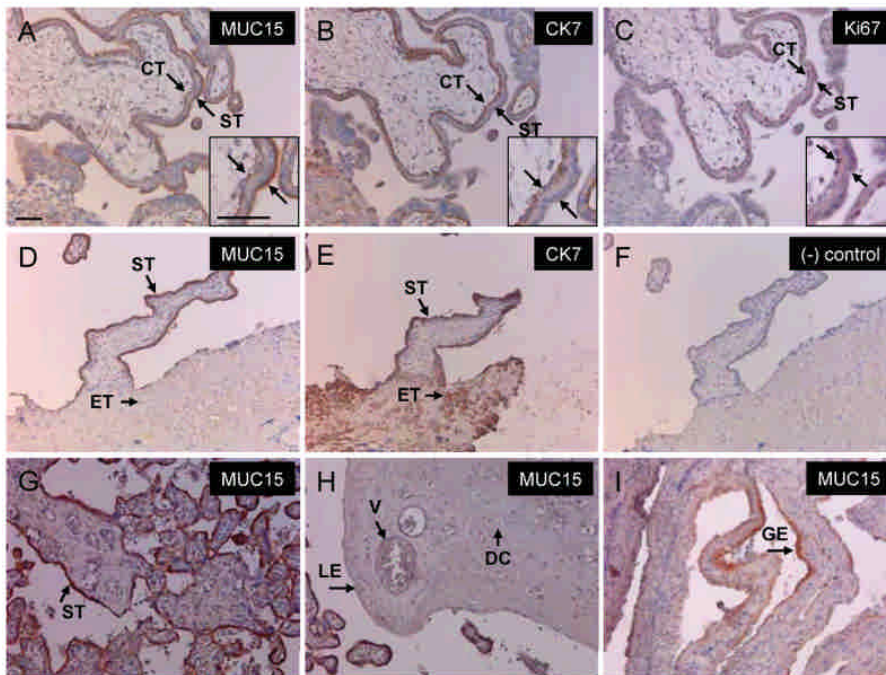
圖九 MUC1 protein 的 expression level。表現量隨著懷孕週數而增加。Protein extracts of human placental tissues from the first trimester (1st), second trimester (2nd), and third trimester (3rd) were subjected to SDS-PAGE analysis and immunoblotted with anti-human MUC1 mAbs VU4H5 (A) and M2C5 (B) as well as anti-ACTB mAb. Representative immunoblots were shown. Arrows and the line at the right indicate MUC1 protein bands. ACTB was used as an internal control (lower panel of A and B). C) The MUC1 signals in the representative immunoblots of A and B were quantified and normalized ACTB signals by Image-Quant 5.1 software. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



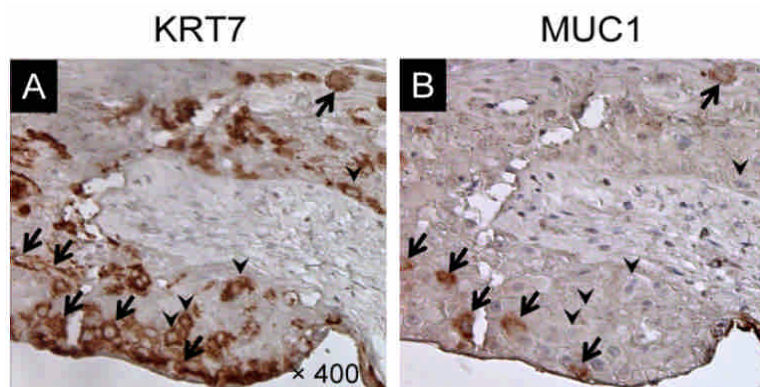
圖十 MUC15 protein的expression level。表現量隨著懷孕週數而增加。(A) Specificity of anti-human MUC15 polyclonal antibodies. Lysates from *E. coli* (BL21) with (t) or without (2) IPTG induction of MUC15 recombinant protein expression (37 kDa) were western blotted with anti-MUC15 polyclonal antibodies. The arrow indicates MUC15 recombinant proteins. The arrow head indicates the aggregated MUC15. Marker scales (M) are shown at the left. (B) Western blot of MUC15 in human placenta. Protein extracts of human placental tissues from the first trimester and third trimester were subjected to SDS-PAGE analysis under reducing conditions and western blotted with antihuman MUC15 polyclonal and anti-actin monoclonal antibody. A representative immunoblot is shown. Molecular weight markers are shown at the right. Actin was used as an internal control (lower panel). (C) The MUC15 signals were quantified and normalized to actin signals by ImageQuant 5.1 software. * $P < 0.05$, compared with the signal of first trimester (first Tri) placenta.



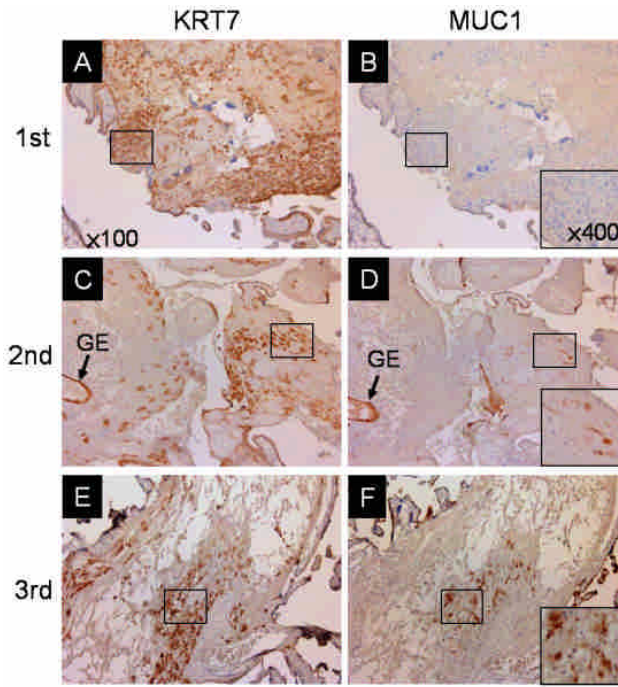
圖十一 胎盤絨毛的MUC1的Immunohistochemistry。MUC1 expression in the representative first trimester placentas (A and D: 9 wk), second trimester placentas (B: 23 wk and E: 19 wk), and third trimester placentas (C: 38 wk and F: 39 wk). The placental tissues were immunostained by VU4H5 (A–C) and M2C5 (D–F). Original magnification x 200. The magnification in the inset of D is x 400. The negative control did not show any specific signals (F, inset).



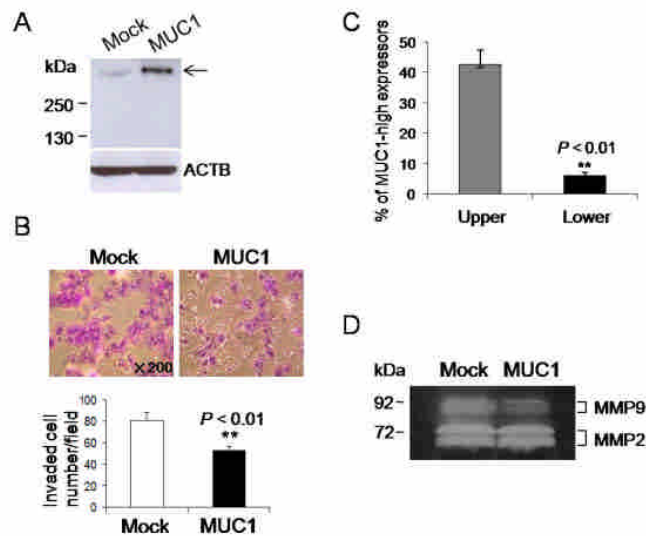
圖十二 胎盤絨毛的MUC15的Immunohistochemistry。Human placentas from the first (A–C), second (D–F), and third trimester (G–I) were stained with anti-MUC15 polyclonal antibodies (A, D, G, H, and I), anti-CK7 (B and E), anti-Ki67 (C) monoclonal antibodies, or without primary antibodies (F), as indicated. Scale bars = 50µm. Original magnification: ×200. (A) MUC15 was weakly stained in cytotrophoblasts (CT) and syncytiotrophoblasts (ST). (B) CT were positively stained for CK7. (C) CT were stained for Ki67. (D) MUC15 was present in ST, but not extravillous trophoblasts (ET). (E) Extravillous trophoblasts (ET) in the decidua were positive for CK7 staining. (F) Negative (-) control did not show any signals. (G) In the representative term placenta (38 weeks gestation), MUC15 was highly expressed on the apical membrane of ST. (H) In the decidua, MUC15 was not detected in the luminal epithelium (LE), blood vessels (V), and decidual cells (DC). (I) MUC15 was expressed in the glandular epithelium (GE)



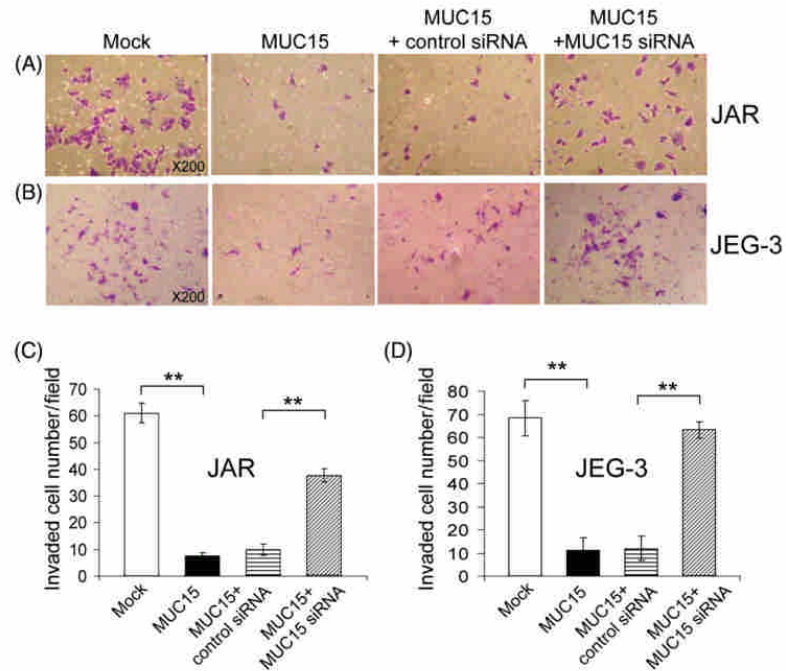
圖十三 蜕膜層的MUC1的Immunohistochemistry。A) Extravillous trophoblasts in the representative decidua (23 wk gestation) were immunostained by anti-KRT7 mAb. B) The serial section of the decidua was stained by anti-MUC1 mAb VU4H5. The arrows indicate MUC1-positive extravillous trophoblasts. The arrowheads indicate MUC1-negative extravillous trophoblasts; only some are pointed out. Magnification × 400.



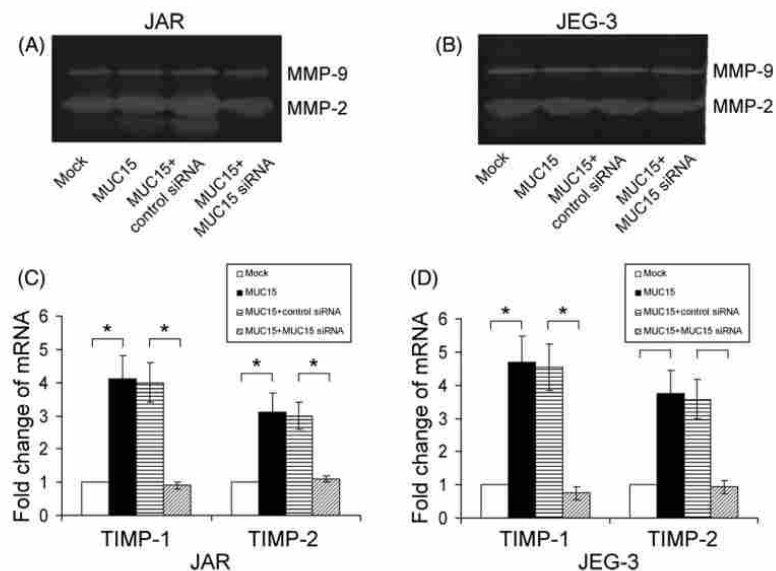
圖十四 不同週數的蜕膜層的MUC1 Immunohistochemistry。Serial sections of the first (1st), second (2nd), and third (3rd) trimester placenta were immunostained for KRT7(=CK7) (A, C, and E) or VU4H5-reactive MUC1 (B, D, and F). The numbers of MUC1-positive extravillous trophoblasts were increased during placental development (right panels). Glandular epithelia (GE) were also positive for KRT7 (C, arrow) and MUC1 (D, arrow). Original magnification $\times 100$. The relative regions in the serial sections for KRT7 and MUC1 staining are shown by small rectangles.



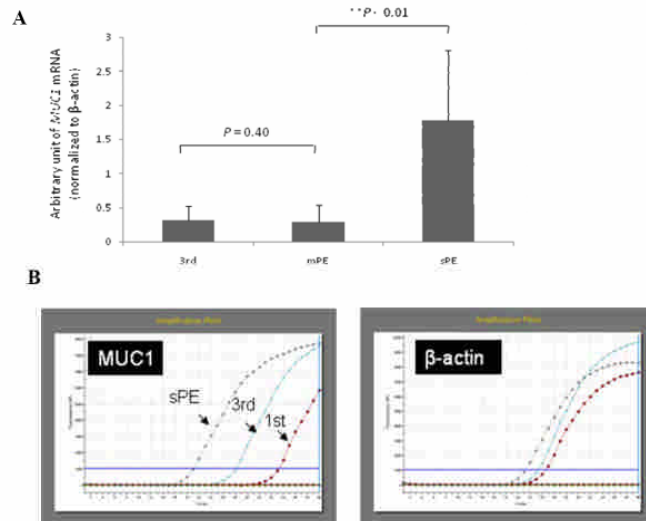
圖十五 MUC1 overexpression抑制JAR cells的invasion及可能的mechanism。A) JAR cells were transiently transfected with pHb-Apr1-neo (Mock) or pHb-Apr1-neo/MUC1 (MUC1) for 48 h. The arrow at the right indicates MUC1 protein. B) JAR (1×10^5) cells transfected with mock or MUC1 plasmids were seeded in each chamber and incubated for 48 h. The representative images of invaded JAR are shown (upper panel). Original magnification $\times 200$. The invaded cell numbers are presented as schematic diagrams (lower panel). The results are presented as mean \pm SD. **, $P < 0.01$. C) The percentage of MUC1-high expressors on the upper side (grey bar) and lower side (black bar) is shown. D) MMP9, but not MMP2, activity was suppressed by MUC1 overexpression.



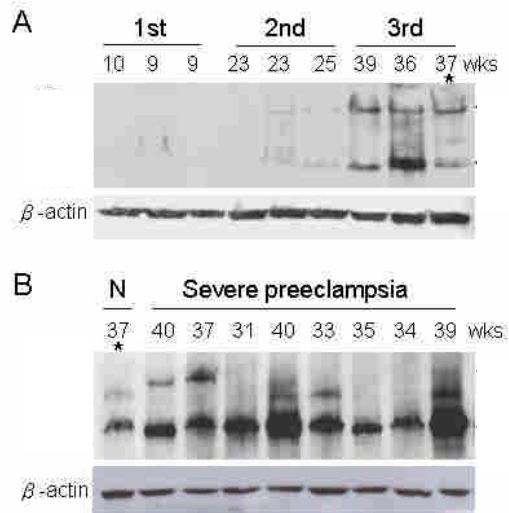
圖十六 MUC15 overexpression抑制JAR及JEG-3 cells的invasion。JAR and JEG-3 cells were transiently transfected with pcDNA3.1 (Mock), MUC15/pcDNA3.1 (MUC15), MUC15/pcDNA3.1 t control siRNA (MUC15 t control siRNA) or MUC15/pcDNA3.1 t MUC15 siRNA (MUC15 t MUC15 siRNA) for 48 h. JAR (5×10^4) or JEG-3 (2×10^5) cells were seeded in each chamber and incubated for another 48 h. The representative images of invaded JAR (A) and JEG-3 (B) are shown. The numbers of invaded JAR (C) and JEG-3 cells (D) are shown as mean \pm SD. **P<0.01



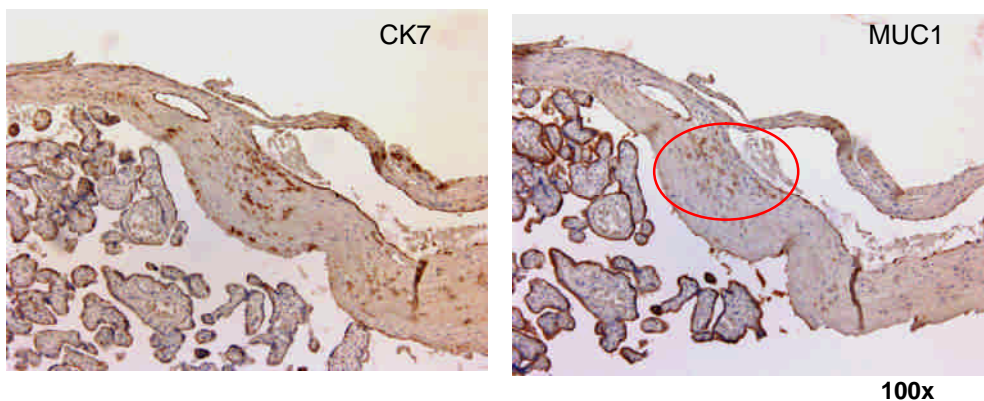
圖十七 MUC15 overexpression抑制JAR及JEG-3 cells的invasion。JAR and JEG-3 cells were transiently transfected with Mock, MUC15, MUC15 t control siRNA or MUC15 t MUC15 siRNA. Gelatin zymography showed that MUC15 overexpression did not significantly affect MMP-2 and MMP-9 activity in the conditioned media of JAR (A) and JEG-3 (B) cells. Real-time RT-PCR showed that MUC15 overexpression increased TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in both JAR (C) and JEG-3 (D) cells. The induction of TIMP-1 and TIMP-2 was significantly blocked by MUC15 siRNA, but not control siRNA. Data are presented as mean \pm SD. *P<0.05.



圖十八 MUC1 mRNA 在 severe preeclampsia 的胎盤的表現量增加。圖示內容請參考圖七。



圖十九 MUC1 protein 在 severe preeclampsia 的胎盤的 western blot 表現量比 first(1st)、second(2nd)、third(3rd) trimesters 增加。



圖二十 MUC1 (+) trophoblasts 在 mild preeclampsia 的蜕膜層的數量略增加。

表一 PCR 的 primers。

Gene	Primer sets	Product size, bp	Reference	GenBank accession number
<i>MUC1</i>	F: 5'-CGA TCG TAG CCC CTA TGA GA-3' R: 5'-TGA GCA GCC CAC CTG AAC TC-3'	220		BC12094
<i>MUC3</i>	F: 5'-CCT CAT TGC AAA CTT CAC TC-3' R: 5'-AGC CCA CAT TTT CTG TAC TG-3'	234	Bernacki <i>et al.</i> (1999)	AF007194
<i>MUC4</i>	F: 5'-GCC CAA GCT ACA GTG TGA ACT CA-3' R: 5'-ATG GTG CCG TTG TAA TTT GTT GT-3'	102	Argueso <i>et al.</i> (2002)	AF058803
<i>MUC12</i>	F: 5'-TGA AGG GCG ACA ATC TTC CTC-3' R: 5'-TAC ACG AGG CTC TTG GCG ATG TTG-3'	511	Williams <i>et al.</i> (1999)	XM_499351
<i>MUC13</i>	F: 5'-TGC TTC TAT CCC TCC AAT GGA-3' R: 5'-TGG GTG AGG CTA GGT TGC A-3'	73	Gipson <i>et al.</i> (2003)	AF286113
<i>MUC15</i>	F: 5'-CTA CAC CTG CTC TGT CTT CA-3' R: 5'-GCA ATG AGA CAC CCA GAA TA-3'	347		BC020912
<i>MUC15-Ex4</i>	F: 5'-CAA CTC TAC AGC CTA CCT TA-3' R: 5'-CAT AAG GTT CCG GTG CAT TG-3'	Membrane-bound: 255 secreted: 102		NM_145650
<i>MUC16</i>	F: 5'-GCC TCT ACC TTA ACG GTT ACA ATG AA-3' R: 5'-GGT ACC CCA TGG CTG TTG TG-3'	114	Argueso <i>et al.</i> (2003)	AF361486
<i>MUC17</i>	F: 5'-GGG CCA GCA TAG CTT CGA-3' R: 5'-GCT ACA GGA ATT GTG GGA GTT CA-3'	91	Gipson <i>et al.</i> , (2003)	AF430017
<i>MUC20</i>	F: 5'-AAC TCC ACG CCC ACG CGC CT-3' R: 5'-GGA AGC ACA CAG ATG GGT G-3'	360	Higuchi <i>et al.</i> (2004a)	AB098731
<i>MMP-2</i>	F: 5'-TCT TGA CCA GAA TAC CAT CG-3' R: 5'-TAC TTC ACA CGG ACC ACT TG-3'	411		NM_004530
<i>MMP-9</i>	F: 5'-CAA CAT CAC CTA TTG GAT CC-3' R: 5'-GGG TGT AGA GTC TCT CGC TG-3'	479		NM_004994
<i>TIMP-1</i>	F: 5'-GGC TTC ACC AAG ACC TAC AC-3' R: 5'-TGG ACA CTG TGC AGG CTT CA-3'	253		BC007097
<i>TIMP-2</i>	F: 5'-ACG GCA AGA TGC ACA TCA CC-3' R: 5'-GCC GTC ACT TCT CTT GAT GC-3'	242		XM_001132362
β -actin	F: 5'-GCT CGT CGT CGA CAA CGG CT-3' R: 5'-AAA CAT GAT CTG GGT CAT CTT CT-3'	326	Huang <i>et al.</i> (2006)	NM_001101

圖六、八、十、十二、十六、十七取材自 Shyu MK et.al 之 Human Reproduction. 22(10):2723-32, 2007 Oct.

圖七、九、十一、十三、十四、十五取材自 Shyu MK et.al 之 Biology of Reproduction. 79(2):233-9, 2008 Aug.

第九章 附錄

列出個人在博士班修業期間所發表之相關論文

1. Shyu MK. Lin MC. Liu CH. Fu YR. Shih JC. Lee CN. Chen HY. Huang J. Huang MC. Hsieh FJ. MUC1 expression is increased during human placental development and suppresses trophoblast-like cell invasion in vitro. *Biology of Reproduction*. 79(2):233-9, 2008 Aug.

2. Shyu MK. Lin MC. Shih JC. Lee CN. Huang J. Liao CH. Huang IF. Chen HY. Huang MC. Hsieh FJ. Mucin 15 is expressed in human placenta and suppresses invasion of trophoblast-like cells in vitro. *Human Reproduction*. 22(10):2723-32, 2007 Oct.

