文章编号:1000-5404(2006)11-1201-03

论著

血管紧张素Ⅱ对滋养细胞侵袭力的影响

王 美,李 力,俞丽丽,郑英如,王 云 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042)

提 要:目的 研究血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)及其受体对体外培养的滋养细胞侵袭力及细胞内局灶黏附激酶(focal adhesion kinase, FAK)活性的影响。**方法** 用AngⅡ及其受体拮抗剂缬沙坦处理体外培养滋养细胞,用Transwell小室模型测定体外侵袭能力,Western blot法检测细胞内FAK(tyr397)的磷酸化水平,同时观察量效及时效关系。**结果** AngⅡ浓度为10^{-6} mol/L时,细胞侵袭力较对照组显著性升高($P<0.01$),浓度为10^{-5} mol/L时,细胞侵袭力低于对照组($P<0.05$)。10^{-5} mol/L AngⅡ处理细胞12 h时侵袭力达高峰,而对照组于48 h时达高峰。FAK(tyr397)的磷酸化水平随血管紧张素Ⅱ浓度升高而增强,10 min时活性最强,同时发现缬沙坦能显著阻断AngⅡ的作用。**结论** AngⅡ通过与受体AT1R结合,可能通过激活细胞内FAK,促进滋养细胞的侵袭力。推测过度升高的AngⅡ通过干扰滋养细胞正常的浸润机制参与子痫前期的发生、发展。

关键词:血管紧张素Ⅱ;滋养细胞;局灶黏附激酶;侵袭力
中图法分类号:R329.25;R714.245;R977.6 **文献标识码**:A

Effect of AngⅡ on invasion of trophoblast cells

WANG Mei, LI Li, YU Li-li, ZHENG Ying-ru, WANG Yun (Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of angiotensin Ⅱ (AngⅡ) and its receptor (AT1R) on the invasion and focal adhesion kinase (FAK) tyrosine phosphorylation of trophoblast cells. **Methods** The human trophoblast cells were isolated and cultured, then respectively treated with either AngⅡ or Valsartan. Transwell model was used to measure the invasion. The FAK phosphorylation on tyr397 was assessed by Western blotting. **Results** The cell invasion was significantly increased by 10^{-6} mol/L AngⅡ ($P<0.01$), while that by 10^{-5} mol/L AngⅡ was lower than control cells ($P<0.05$). The cell invasion peaked in 12 h by 10^{-5} mol/L AngⅡ, while that of the control cells in 48 h. AngⅡ induced a dose-dependent augmentation in FAK phosphorylation. The activity of FAK reached the maximum in 10 min by 10^{-5} mol/L AngⅡ. Valsartan could partly block the function of AngⅡ. **Conclusion** AngⅡ can promote the invasion of trophoblast cells by combining with AT1R and activating the FAK tyrosine phosphorylation. It suggests that excessively increased AngⅡ result in pathogenesis of preeclampsia through disturbing the normally invasive mechanism of trophoblast cells.

Key words: angiotensin Ⅱ; trophoblast cells; focal adhesion kinase; invasion

近年的研究表明肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)在子痫前期(preeclampsia)的发生、发展中起了重要作用[1]。血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,AngⅡ)是整个RAS中维持和升高血压的关键因子,推测AngⅡ在子痫前期的发生中起了重要作用,但其具体作用机制仍不清楚。

本实验拟用人AngⅡ及其受体(AT1R)拮抗剂缬沙坦处理体外培养的滋养细胞,观察细胞侵袭力的变化,同时检测其对细胞内局灶黏附激酶(focal adhesion kinase,FAK)397位点酪氨酸磷酸化活性的影响,初步了解AngⅡ在子痫前期发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Sant Cruz公司提供的兔抗多克隆抗体FAK(Tyr397)、Calbiochem公司提供的人AngⅡ、北京诺华制药公司提供的缬沙坦(AT1受体阻滞剂)、Gene Tech Biotechnology有限公司提供的小鼠抗人Vimentin单克隆抗体、北京中山生物公司提供的小鼠抗人CK-7单克隆抗体、武汉博士德公司提供的SABC-DS免疫组化试剂盒;硝酸纤维素膜为Amersham产品,上海康成生物有限公司提供的KCTM化学发光试剂盒,Transwell培养小室为

作者简介:王 美(1979-),女,山东省泰安市人,硕士研究生,主要从事妊娠期高血压疾病发病机制方面的研究。电话:(023)68719554,E-mail:meiyang308@tom.com

收稿日期:2006-02-21;修回日期:2006-03-23

BD FALCONTM 公司产品，天津 TBD 公司的胎牛血清，Gibco 公司的 DMEM 培养基等。

1.2 人滋养细胞的培养及鉴定

无菌取妊娠 6～8 周发育正常、人流术后的绒毛组织，采用组织贴块法培养，差速贴壁分离滋养细胞，用含 15% 胎牛血清（FBS）的 DMEM 于 5% CO_2、37 ℃培养箱中培养。第 3～6 代细胞用于实验。用小鼠抗人 CK-7 单克隆抗体免疫组化染色阳性细胞占 90% 以上。

1.3 滋养细胞侵袭性的测定

无血清 DMEM 培养基制备单细胞悬液，浓度为 1×10^5/ml，侵袭小室水化后放于 24 孔培养板内，下室为含 15% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液，上室为细胞悬液，贴壁后换以无血清 DMEM 漂洗 1 次。按下列分组加入药物：①对照组（不加任何药物）；②不同浓度 AngⅡ（终浓度为 10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}、5×10^{-6}、10^{-5}mol/L）组：培养 24 h；③$10^{-7}$mol/L 缬沙坦组：作用 24 h；④$10^{-5}$mol/L AngⅡ + 10^{-7}mol/L 缬沙坦组：缬沙坦提前 30 min 加入，再加入 10^{-5}mol/L AngⅡ作用 24 h；⑤$10^{-5}$mol/L AngⅡ组：分别作用 12、24、48、72 h。于不同时相点取出培养小室，用细胞刮棒刮除上室中未迁移、穿膜的细胞，苏木精染色，用 20×20 放大倍数下随机选取 7 个视野计数膜下室面的细胞数，重复 3 次。

1.4 局灶黏附激酶 FAK（tyr397）的磷酸化活性的测定

对体外培养的滋养细胞分组：①对照组（不加任何药物）；②不同浓度 AngⅡ组：作用 10 min；③$10^{-7}$mol/L 缬沙坦组：作用 10 min；④ 10^{-5}mol/L AngⅡ + 10^{-7} mol/L 缬沙坦组：作用 10 min；⑤$10^{-5}$mol/L AngⅡ组（作用 5、10、20、30、60 min）。

于不同时相点取出处理后的滋养细胞，以 SDS 样品裂解液裂解各组细胞，收集样品蛋白，经 10% SDS-PAGE 电泳，转移至硝酸纤维素膜上，洗膜，封闭，与兔抗 FAK（Tyr397）多克隆抗体 4 ℃过夜，与二抗温育，化学发光法显影。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，行单因素方差分析和均数间两两比较。

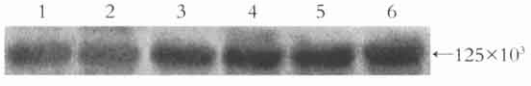
2 结果

2.1 AngⅡ对滋养细胞侵袭特性的影响

以穿过 Transwell 小室膜进行迁移的细胞数目表示细胞体外侵袭能力变化。结果显示：随 AngⅡ浓度升高，穿膜迁移的细胞数增多，当 AngⅡ浓度达到 10^{-6}mol/L 时，迁移的细胞数最多，达到 18 个/HPE，与对照组（9 个/HPE）相比有显著性差异（$P<0.01$）。超过此浓度后，迁移的细胞数减少，当 AngⅡ浓度达到 10^{-5}mol/L 时，迁移的细胞数（5 个/HPE）明显低于对照组（$P<0.05$）。用 10^{-5}mol/L AngⅡ处理细胞，发现细胞侵袭高峰出现在 12 h（35 个/HPE），较对照组显著性升高（$P<0.01$），之后侵袭能力迅速下降，而对照组的细胞侵袭高峰出现在 48 h（38 个/HPE）。两个峰值之间无显著性差异（$P>0.05$）。用 10^{-7}mol/L 缬沙坦阻断受体后，细胞侵袭能力下降，较对照组具有显著性差异（$P<0.05$）。10^{-5}mol/L AngⅡ + 10^{-7}mol/L 缬沙坦处理组细胞的侵袭性较 10^{-5} mol/L AngⅡ处理组和 10^{-7}mol/L缬沙坦处理组的升高，较对照组的降低，均不具有统计学意义（$P>0.05$）。

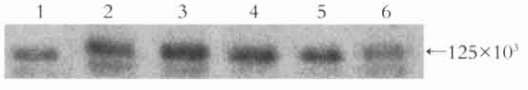
2.2 AngⅡ对细胞内局灶黏附激酶 FAK（tyr397）磷酸化水平的影响

FAK 是一种酪氨酸磷酸激酶，通常以 FAK（tyr397）的磷酸化水平反映其活性。加入不同浓度 AngⅡ刺激细胞 10 min 后，发现 FAK 活性随 AngⅡ浓度增加而增强，AngⅡ浓度为 10^{-5}mol/L时 FAK 活性最强（图 1）。加入 AngⅡ（10^{-5}mol/L）5 min后，FAK（tyr397）磷酸化水平开始增加，较对照组升高；刺激10 min时，FAK 活性最强，之后随时间延长，FAK（tyr397）活性减弱（图 2）。用 10^{-7}mol/L 缬沙坦单独处理细胞后，蛋白条带密度显著降低，提示 FAK 磷酸化水平显著降低，10^{-5}mol/L AngⅡ + 10^{-7}mol/L 缬沙坦共同处理细胞后，FAK 活性较对照组和 10^{-5}mol/L AngⅡ处理组的明显降低，较 10^{-7}mol/L 缬沙坦处理组的显著升高（图 3）。



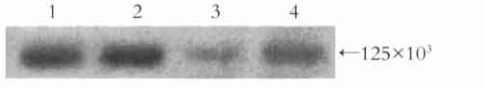
1：对照组；2：10^{-8}mol/L AngⅡ；3：10^{-7} mol/L AngⅡ；4：10^{-6} mol/L AngⅡ；5：5×10^{-6} mol/L AngⅡ；6：10^{-5}mol/L AngⅡ

图 1 不同浓度 AngⅡ对 FAK 磷酸化水平影响



1：对照组；2：5 min；3：10 min；4：20 min；5：30 min；6：60 min

图 2 AngⅡ作用不同时间对 FAK 磷酸化水平的影响



1：对照组；2：10^{-5} mol/L AngⅡ；3：10^{-7} mol/L 缬沙坦；4：10^{-5} mol/L AngⅡ + 10^{-7} mol/L 缬沙坦

图 3 缬沙坦预处理后 FAK 磷酸化水平

3 讨论

3.1 AngⅡ对滋养细胞侵袭能力的影响

子痫前期是妊娠期特有疾病，占妊娠并发症的 5%～7%[2]，是母体与胎儿发病及死亡的主要原因。对子痫前期患者及动物模型的研究[3]显示子宫胎盘灌注压降低，胎盘缺血、缺氧，后期触发胎盘因子的释放，启动细胞和分子级联反应，导致内皮和血管平滑肌细胞功能失调，增加血管抵抗和升高血压。子宫低灌注和胎盘缺血可能是由子宫螺旋动脉内滋养细胞的侵入异常引起[4]。

已知胎盘局部 AngⅡ和 AT1R 的表达异常，影响胎盘血管内皮细胞的正常生长分化，以及促使血管平

滑肌细胞异常增殖迁移，导致胎盘血管网形成不良和动脉粥样硬化的发生，使胎盘血流灌注减少。Xia 等[5]用 100 nmol/L AngⅡ处理滋养细胞系 HTR-8/Svneo 24 h 后，能显著抑制滋养细胞的侵袭，认为它是通过升高纤溶酶原激活物抑制因子（PAI）-mRNA 的水平，使滋养细胞侵袭性下降。但本实验显示，用不同浓度 AngⅡ处理体外培养的滋养细胞 24 h 后，随 AngⅡ浓度增加，细胞侵袭能力加强，10^{-6} mol/L AngⅡ作用最强，并具有显著性差异（$P<0.01$）。当超过此浓度后细胞侵袭力下降，10^{-5} mol/L AngⅡ处理细胞后侵袭性显著低于对照组（$P<0.05$）。当用 10^{-5} mol/L AngⅡ处理不同时间后显示，AngⅡ能促进细胞侵袭高峰提前出现，在 12 h 时达到高峰，而对照组在 48 h 时达高峰，两者峰值差异无统计学意义（$P>0.05$）。推测 AngⅡ水平过度升高后，可能干扰了滋养细胞的正常浸润机制，从而导致滋养细胞着床障碍，进一步导致子痫前期的发生。已知滋养细胞的浸润过程有严格的时空限制，在多种因子的相互调控下，分别于 6～8 周、14～16 周出现 2 次浸润高峰。一旦这种正常的浸润机制被扰乱，调控因子表达紊乱，可能会导致滋养细胞浅浸润或深浸润，进一步产生一系列病理变化。另外，用 10^{-7} mol/L AngⅡ受体拮抗剂缬沙坦预处理细胞 30 min 后，再用 10^{-5} mol/L AngⅡ处理细胞 24 h，发现细胞的侵袭性升高，说明 AngⅡ可通过 AT1R 介导调节滋养细胞侵袭能力。

3.2　FAK 活性在 AngⅡ促滋养细胞侵袭力中的作用

已知 AngⅡ能通过激活多种细胞内信号转导通路发挥生物学作用，多种酪氨酸激酶在 AngⅡ介导的细胞信号通路中发挥重要作用[6]。其中 FAK 是细胞内多条信号转导通路的交汇点，当 FAK 活化以后，第 397 位的酪氨酸发生自身磷酸化，使 Src 与 FAK 结合，形成 FAK/Src 复合体，即而结合接头蛋白 Grb2，Grb2 通过 SH3 功能域与鸟嘌呤核苷酸交换因子 Sos 结合，或者通过与 Shc 结合，激活 Ras，然后活化丝裂原活化蛋白激酶，作用于转录因子 c-fos 和 c-jun，影响基因表达，促进细胞增殖、迁移。研究表明 FAK 是早期滋养细胞分化的关键激酶[7]，参与调节滋养细胞的侵袭、分化、增殖等生物活性。有人认为 FAK（tyr397）的磷酸化水平是滋养细胞侵袭性的标志[8]，本实验显示 AngⅡ能激活 FAK 磷酸化水平，随浓度升高，FAK 磷酸化水平增强，用 10^{-5} mol/L AngⅡ作用 10 min 时 FAK 活性最强，之后逐渐减弱。这与 AngⅡ作用其他细胞如血管平滑肌、脐静脉内皮细胞、肝细胞等时促 FAK 磷酸化活性情况相似[9,10]。用缬沙坦阻断 AngⅡ的作用后，发现 FAK 磷酸化水平显著降低，说明 AngⅡ能通过与 AT1R 结合激活 FAK。另外用 10^{-5} mol/L AngⅡ + 10^{-7} mol/L 缬沙坦处理的细胞内 FAK（tyr397）活性较 10^{-7} mol/L 缬沙坦处理组有显著升高。推测 AngⅡ可通过其他途径激活 FAK，调节滋养细胞的生物学活性。

总之，AngⅡ与 AT1R 结合，可通过激活细胞内 FAK，调节滋养细胞侵袭力。AngⅡ可能一方面通过影响血管内皮细胞及平滑肌细胞的生长、增殖及迁移，一方面通过干扰滋养细胞正常的浸润机制，使血管重铸过程受阻，导致子痫前期的发生。对 AngⅡ介导的信号转导机制的研究可提供另一种调节 AngⅡ作用的途径。因此深入研究 FAK 上下游信号分子以及如何利用 FAK 作为靶点，调节 AngⅡ，将有助于子痫前期发病机制及临床防治的研究。

参考文献：

[1] SHAH D M. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 288(4): F614－F625.

[2] ANTEBY E Y, AYESH S, SHOCHINA M, *et al*. Growth factor receptor-protein bound 2 (GRB2) upregulation in the placenta in preeclampsia implies a possible role for ras signalling[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005, 118(2): 174－181.

[3] KHALIL R A, GRANGER J P. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002, 283(1): R29－R45.

[4] AUSTGULEN R. Recent knowledge on mechanisms underlying development of pre-eclampsia[J]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2004, 124(1): 21－24.

[5] XIA Y, WEN H Y, KELLEMS R E. Angiotensin II inhibits human trophoblast invasion through AT1 receptor activation[J]. J Biol Chem, 2002, 277(27): 24601－24608.

[6] YIN G, YAN C, BERK B C. Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(6): 780－783.

[7] MACPHEE D J, MOSTACHFI H, HAN R, *et al*. Focal adhesion kinase is a key mediator of human trophoblast development[J]. Lab Invest, 2001, 81(11): 1469－1483.

[8] ILIC D, GENBACEV O, JIN F, *et al*. Plasma membrane-associated pY397FAK is a marker of cytotrophoblast invasion *in vivo* and *in vitro*[J]. Am J Pathol, 2001, 159(1): 93－108.

[9] WENG Y I, SHUKLA S D. Angiotensin II activation of focal adhesion kinase and pp60c-Src in relation to mitogen-activated protein kinases in hepatocytes[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1589(3): 285－297.

[10] MONTIEL M, DE-LA-BLANCA E P, JIMENEZ E. Angiotensin II induces focal adhesion kinase/paxillin phosphorylation and cell migration in human umbilical vein endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(4): 971－978.

（编辑　龙　亮）