

• 论 著 •

微电场对胎盘滋养细胞迁移/侵袭相关信号通路活性的影响*

张 娟¹, 白 怀², 范 平²

(1. 四川省医学科学院·四川省人民医院检验科, 四川成都 610072;

2. 四川大学华西第二医院西部妇幼医学研究院, 四川成都 610041)

摘 要:目的 探讨滋养细胞迁移/侵袭相关促分裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节蛋白激酶(MAPK/ERK), 磷酸肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(PI3K/Akt) 和蛋白酪氨酸激酶/信号转导和转录活化因子 3(JAK/STAT3)信号传导通路在微电场刺激下的活化水平。方法 将胎盘滋养细胞用场强为 150 mV/mm 的直流微电场加以刺激, 通过蛋白质印迹法(Western blot)测定电刺激前和后各时间点滋养细胞 MAPK/ERK、PI3K/Akt 和 JAK/STAT3 信号传导通路相关活性分子的活化水平。滋养细胞在加电前分别用 MAPK 抑制剂 PD980599(100 μmol/L)和 Akt 抑制剂 LY294002 (20 μmol/L) 处理 1 h, 在上述相应含抑制剂的培养基中用场强为 150 mV/mm 直流微电场刺激 5 h, 观察抑制剂对微电场刺激细胞行为的影响。结果 Western blot 结果显示, 滋养细胞在 150 mV/mm 微电场作用下, p42/44 MAPK Thr202/ Thr204 位点、Akt Ser473 位点于 5 min 开始活化, 10~60 min 内逐渐加强, STAT3 S727 位点在微电场作用下上述各时间点无明显磷酸化水平改变。相应信号通路抑制剂处理后滋养细胞对微电场刺激的应答反应均受到明显抑制。结论 微电场对滋养细胞迁移/侵袭功能的影响与 MAPK/ERK、PI3K/Akt 信号通路的活化有关。

关键词:滋养细胞; 迁移/侵袭; 信号通路

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)16-2292-03

Effect of small direct-current electrical stimulation modulating activity of cell signaling pathways relating to migration/invasion of trophoblast cells*

Zhang Juan¹, Bai Huai², Fan Ping²

(1. Department of Clinical Laboratory, Sichuan Academy of Medical Science & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. West China Second Hospital School of

Sichuan University, West China Institute of Maternal and Child Health, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of small direct-current electrical stimulation modulating activity of p42/44 MAPK, PI3K/Akt and JAK/STAT3 signaling pathways relating to migration/ invasion of trophoblast cells. **Methods** The trophoblast cells (HTR-8/SVneo) were exposed to the DC-EF at 150 mV/mm for 0, 5, 10, 30 and 60 min or 5, 10 and 15 h. Phosphorylation or expression of MAPK/ERK, PI3K/Akt, JAK/STAT3 were measured by Western blot analysis. MAPK and Akt inhibitors were used for treating the trophoblasts and then the effect of EF stimulation on the cell behaviors were observed. **Results** EF-stimulated trophoblast cells demonstrated p42/44 MAPK (Thr202/ Thr204) and Akt Ser473 sites were quickly phosphorylated within 5 min and then became intensively gradually within 60 min. There was no significant change of STAT3 S727 phosphorylation at the above time points for the EF-stimulated trophoblast cells. **Conclusion** The activation of p42/44 MAPK and PI3K/Akt signaling pathways might be involved in the DC-EF mediated directed migration of trophoblasts.

Key words: trophoblasts; migration/invasion; signaling pathways

人类滋养细胞是一群特殊的细胞, 源于胚胎期的胚外层。在受精卵种植的 7~8 d, 胚外层细胞分化, 形成原始滋养细胞, 于受精后两周左右该群细胞形成绒毛的初始结构。此后, 滋养细胞进一步分化为无侵袭能力的绒毛滋养层细胞(VTs)和有侵袭能力的绒毛外滋养层细胞(EVTs)两部分。滋养细胞接受胞外信号的刺激发生相应的应答反应, 产生特定的生物学效应, 具有复杂的细胞内信息传递机制。迄今从化学分子如细胞外基质分子、生长因子、细胞因子和激素等作用于滋养细胞, 促进其迁移作用的研究结果表明, 有多条信号通路参与滋养细胞迁移/侵袭功能的调控, 包括促分裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节蛋白激酶(MAPK/ERK)、磷酸肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(PI3K/Akt)和信号转导及转录活化因子 3

(STAT3)等信号通路的活化。

生物电现象是生命活动的基本属性, 在机体的一切生命活动中都伴随着生物电的产生^[1]。例如在两栖类动物神经管发育时即可产生 10~1 000 mV/mm 的电场。此外, 在皮肤和角膜上皮的伤口部位也能检测到 40~200 mV/mm 的直流电场。化学物质引起的角膜损伤使毛细血管向伤口边缘出芽和生长, 也受伤口微电场的作用。前期的研究工作发现^[2-3], 微电场中培养的滋养细胞能产生定向运动的应答反应, 提示微电场可能作为一种重要信号促进滋养细胞的迁移等功能。

迄今, 关于微电场促进滋养细胞的功能未见其他研究报道。鉴于微电场能促进细胞定向迁移/侵袭, 笔者推测, 微电场可能促进滋养细胞胞内迁移/侵袭相关信号通路 MAPK/

* 基金项目: 国家自然科学基金(30872774); 四川省卫生和计划生育委员会基金(140071)。 作者简介: 张娟, 女, 主管技师, 主要从事临床血液及生化检验工作。

ERK、PI3K/Akt 和 STAT3 的活化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人胎盘滋养细胞 HTR-8/Svneo, 华西二院彭冰教授惠赠。FAK、Phospho-FAK (Tyr397) 抗体、Stat3-phospho(S727) 抗体为 EPITOMICS 公司产品, Akt、Phospho-Akt (Ser473)、Phospho-p42/44 MAPK (Thr202/ Thr 204)、p42/44 MAPK、STAT 3 抗体、Akt 信号通路抑制剂 LY294002、MAPK 信号通路抑制剂 PD98059 均为 Beyotime 公司产品。细胞培养所用 RPMI-1640 及附加成分均为 Gibco BRL 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 滋养细胞的培养及加电 滋养细胞以 RPMI-1640 在 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养, 培养基含有 20 % 的小牛血清、0.04 mmol/L 的谷氨酰胺、青霉素 104 U/L、链霉素 100 mg/L。每次实验前 24 h 将冻存的细胞复苏后以 5×10³ 个细胞/cm 的密度接种于预制的细胞培养槽中, 该培养槽由两片 24 mm × 22 mm 平行放置、相距 10 mm 的盖玻片通过硅酮胶 (Dow Corning) 固定于 100 mm × 20 mm 的组织培养皿的底面而形成一个两端开放的细胞培养小室。对培养小室内细胞电场刺激后, 收集细胞, 用放射免疫沉淀法 (RIPA) 裂解, 提取蛋白, 常规蛋白质印迹法 (Western blot) 检测胞内相关信号通路蛋白的活化水平。

1.2.2 相关信号通路活性分子抑制实验 常规方法消化滋养细胞 HTR-8/SVneo, 种入玻璃器皿中培养过夜, 使细胞充分贴壁; 次日, 吸弃培养基, 加入终浓度为 100 μmol/L 的 MAPK 抑制剂工作液进行加电操作, 方法同前。电场强度为 150 mV/mm, 加电时间为 5 h。对照组细胞操作同上, 只是以二甲基亚砜 (DMSO) 代替抑制剂。加电完成后, 观察细胞形态和迁移变化。Akt 抑制实验操作同上, 其中 Akt 信号通路抑制剂 LY294002 的终浓度为 20 μmol/L。

1.3 统计学处理 每组实验均重复 3 次及以上, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS19.0 统计学软件进行 *t* 检验和方差分析, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微电场对滋养细胞 p42/44 MAPK 信号通路的影响

2.1.1 微电场对滋养细胞 p42/44 MAPK 表达的影响 Western blot 结果显示, 150 mV/mm 微电场刺激滋养细胞后, 于 5、10 min 出现磷酸化 p42/44 MAPK (ERK1-phospho 和 ERK2-phospho) 水平明显升高, 30 min 进一步升高, 60 min 达较高水平, MAPK 总蛋白表达水平无明显改变, 结果见图 1 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.1.2 MAPK 抑制剂对微电场刺激滋养细胞行为的影响 滋养细胞在加电前用 MAPK 抑制剂 PD98059 (100 μmol/L) 处理 1 h, 在相同培养基中用 EF150 mV/mm 刺激滋养细胞 5 h, 细胞对微电场刺激的形态和应答反应包括细胞运动等均受到明显抑制, 见图 2, 提示 MAPK 信号通路与 EF 促进滋养细胞运动功能有关。

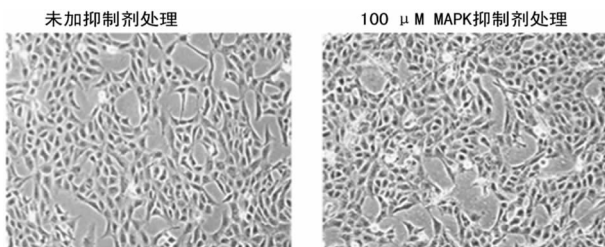


图 2 MAPK 抑制剂对 EF 刺激滋养细胞的影响

2.2 微电场刺激对滋养细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响

2.2.1 微电场刺激对滋养细胞 P-Akt/Akt 表达的影响

Western blot 结果显示, 150 mV/mm 微电场刺激滋养细胞后, 于 5、10 min 出现磷酸化 Akt Ser473 水平明显升高, 30 min 进一步升高, 60 min 达较高水平, Akt 总蛋白表达水平无明显改变, 结果见图 3 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2.2 Akt 抑制剂对微电场刺激滋养细胞行为的影响 滋养细胞在加电前用 Akt 抑制剂 LY294002 (20 μmol/L) 处理 1 h, 在相同培养基中用 EF 150 mV/mm 刺激滋养细胞 5 h, 滋养细胞对微电场刺激的应答反应包括形态和细胞运动等均受到明显抑制, 见图 4 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”), 提示 Akt 信号通路与 EF 促进滋养细胞运动功能有关。

2.3 微电场刺激对滋养细胞 JAK/STAT3 信号通路的影响

Western blot 结果显示, 150 mV/mm 微电场刺激滋养细胞 5、10、30、60 min, P-STAT3 的表达水平改变不明显。结果见图 5 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨论

滋养细胞接受胞外信号的刺激发生相应的应答反应, 产生特定的生物学效应, 具有复杂的细胞内信息传递机制。迄今从化学分子如细胞外基质分子、生长因子、细胞因子和激素等作用于滋养细胞, 促进其迁移作用的研究结果表明, 有多条信号通路参与滋养细胞的迁移功能的调控, 包括 MAPK/ERK、PI3K/Akt 和 JAK/STAT3 等信号通路。本课题应用微电场刺激 EVT, 分析了微电场刺激滋养细胞后这些信号通路的活化情况, 发现微电场刺激滋养细胞能使胞内 p42/44 MAPK 和 Akt 活性分子发生磷酸化而激活胞内相关的信号通路。

MAPK 是一类广泛存在于真核细胞的丝/苏氨酸蛋白激酶, 可以被一系列的细胞外信号或刺激所激活, 如物理应激、分泌细胞因子、生长因子等。MAPK 包括一系列级联反应成分, 是多种细胞刺激信号胞内传递途径的交汇点和共同通路, 能够调节包括细胞迁移等基本的细胞过程。MAPK 信号传导以三级激酶级联的方式进行, 包括促分裂原活化蛋白激酶 (MAPKKK) 受有丝分裂原刺激磷酸化而激活, 活化的 MAPKKK 磷酸化激活促分裂活化蛋白激酶 (MAPKK) 及由 MAPKK 磷酸化 MAPK, 使其活化进而转移到核内。MAPK 家族的信号通路主要包括 ERK、p42/44 MAPK 通路、JNKs (c-Jun-NH2-terminal kinases) 通路和 P38 通路。这些通路可以由不同的刺激因素活化, 激活相应的转录因子, 介导不同的生物学效应。本研究显示, 微电场刺激能促进滋养细胞 p42/44 MAPK 的磷酸化, 促进其信号通路的活化转导。

PI3K 是脂质激酶家族成员, 是肌醇与磷脂酰肌醇的重要激酶。正常情况下, PI3K 可被 G 蛋白偶联受体和/或蛋白酪氨酸激酶受体激活, 也可被 Ras 蛋白激活。PI3K 通路下游的多种效应分子中, Akt 处于其中心环节。Akt 既是 PI3K 的直接靶点, 也是其主要的靶酶。PI3K 激活后的产物与其靶酶 Akt 的同源结构域 (PH) 结合, 可导致 Akt 从胞质转位到胞膜, 并促使其分子构象发生改变, 使 Ser473 和 Thr308 位点磷酸化而活化。激活后的 Akt 主要通过作用于下游底物使其发生磷酸化而产生通路活化的效应。PI3K/Akt 信号通路广泛存在于细胞中, 是调节各种细胞生长、代谢、增殖及迁移的重要信号传导通路。PI3K/Akt 信号通路在调节细胞电场中定向运动方面发挥了重要的作用。Zhao 等^[4]的研究显示, PI3K 基因敲除后, 皮肤上皮细胞在电场的定向迁移发生抑制; 近年 Yao 等^[5]

利用 Akt 抑制剂处理下丘脑神经元后,能抑制其在电场中的定向运动。Meng 等^[6]近年在 ex vivo 模型发现,生理强度的微电场对胚胎和成年大鼠神经元前体细胞具有介导其定向运动的效应,其机制与 PI3K/Akt 信号通路的活化及需要表皮生长因子(EGF)和成纤维细胞生长因子(FGF)的存在有关。本研究发现,150 mV/mm 的直流微电场能激活滋养细胞 Akt 磷酸化活性,Akt 抑制剂可显著抑制滋养细胞对电场的应答反应性,提示 PI3K/Akt 信号通路的活化在 EF 刺激滋养细胞定向迁移中也可能发挥重要作用。笔者前期的研究发现,滋养细胞在电场中的定向运动需血清成分的存在,提示生长因子、微电场和 PI3K/Akt 活化这些因素可能构成滋养细胞定向迁移的重要机制中的几个方面^[2-3]。

STAT3 最初作为转录因子被发现,在静息状态的细胞中,STAT3 存在于胞质,在细胞内、外因子的刺激下,STAT3 被激活,从胞质转入核内,参与调控相关的靶基因表达。在滋养细胞中,STAT3 参与调控滋养细胞肿瘤的增殖、凋亡和转移等。STAT3 作为一种重要的细胞质转录因子,具有信号转导和转录调控的双重功能。有报道显示,当 STAT3 第 705 位酪氨酸(Tyr)发生磷酸化时,滋养细胞的侵袭活性增强^[7];绒癌细胞株中 STAT3 第 727 位丝氨酸(Ser)磷酸化水平高于正常细胞株^[8],提示 STAT3 Ser727 磷酸化能增加滋养细胞的侵袭性。本研究未发现微电场刺激滋养细胞 STAT3 分子发生磷酸化活性的增加,提示微电场对滋养细胞的迁移/侵袭活性的影响,可能与 STAT3 信号通路关系不明显。

此外,研究还发现,微电场刺激能激活 Ras-MAPK 通路中关键的调控点黏着斑激酶(FAK)的 Tyr397 位点,活化其下游 Paxillin 分子,并对这一通路的效应产生重要的影响^[9]。

已有的研究表明,有多条信号通路参与调控滋养细胞的迁移。本研究结果发现微电场刺激能激活 MAPK/ERK、PI3K/Akt 信号通路,对 JAK/STAT3 信号通路影响不大。此外,还有很多较详细的信号调控点及其相关功能尚未阐明。微电场调控滋养细胞迁移功能的信号传导机制尚待进一步研究。

参考文献

[1] McCaig CD,Zhao M. Physiological electrical fields modify cell behaviour[J]. Bio Essays,1997,19:819-826.

[2] 罗薛峰,黄斌,白怀,等. 体外培养滋养细胞受电场作用后迁移行为及形态的变化[J]. 四川大学学报:医学版,2010,41(5):771-774.

[3] Bai H,Forrester JV,Zhao M. DC electric stimulation upregulates angiogenic factors in endothelial cells through activation of VEGF receptors[J]. Cytokine,2011,55(1):110-115.

[4] Zhao M,Song B,Pu J,et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN[J]. Nature,2006,442(2):457-460.

[5] Yao L,Shanley L,McCaig C,et al. Small applied electric fields guide migration of hippocampal neurons[J]. J Cell Physiol,2008,216:527-535.

[6] Meng X,Arocena M,Penninger J,et al. PI3K mediated electrotaxis of embryonic and adult neural progenitor cells in the presence of growth factors[J]. Exp Neurol,2011,227(1):210-217.

[7] Wright EG. Manifestations and mechanisms of non-targeted effects of ionizing radiation[J]. Mutat Res,2010,687(1/2):28-33.

[8] Adfaiens I,Smitz J,Jacquet P. The current knowledge on radiosensitivity of ovarian follicle development stages[J]. Hum Reprod Update,2009,15(3):359-377.

[9] Zhang J,Ren RM,Luo XF,et al. A Small Physiological Electric Field Mediated Responses of Extravillous Trophoblasts Derived from HTR8/SVneo Cells:Involvement of Activation of Focal Adhesion Kinase Signaling[J]. PLoS One,2014,3(9):92252.

(收稿日期:2015-03-16)



(上接第 2291 页)

inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function[J]. Nature,2007,450(7169):566-569.

[3] Niedbala W,Wei XQ,Cai B,et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells[J]. Eur J Immunol,2007,37(11):3021-3029.

[4] Collison LW,Delgoffe GM,Guy CS,et al. The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional[J]. Nat Immunol,2012,13(3):290-295.

[5] Castellani ML,Anogeianaki A,Felaco P,et al. IL-35, AN ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE WHICH EXPANDS CD4⁺ CD25⁺ Treg CELLS[J]. J Biol Regul Homeost Agents,2010,24(2):131-135.

[6] World Health Organization. Global tuberculosis control 2011[Z], 2011.

[7] 马珂,朱莉贞,潘毓萱. 结核病[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:347-359.

[8] Mak JC,Ho SP,Leung RY,et al. Elevated levels of transforming growth factor-beta(1) in serum of patients with stable bronchiectasis[J]. Respir Med,2005,99(10):1223-1228.

[9] Hirsch CS,Hussain R,Toossi Z,et al. Cross-modulation by trans-

forming growth factor beta in human tuberculosis:suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon gamma production[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(8):3193-3198.

[10] Ribeiro-Rodrigues R,Resende T,Rojas R,et al. A role for CD4⁺ CD25⁺ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis[J]. Clin Exp Immunol,2006,144(1):25-34.

[11] Schwander SK,Sada E,Torres M,et al. T lymphocytic and immature macrophage alveolitis in active pulmonary tuberculosis[J]. J Infect Dis,1996,173(5):1267-1272.

[12] Pedrosa J,Saunders BM,Appelberg R,et al. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic Mycobacterium tuberculosis infection of mice[J]. Infect Immun,2000,68(2):577-583.

[13] Barker AF,Bardana EJ. Bronchiectasis:update of an orphan disease[J]. Am Rev Respir Dis,1988,137(4):969-978.

[14] Evans SA,Turner SM,Bosch BJ,et al. Lung function in bronchiectasis:the influence of Pseudomonas aeruginosa[J]. Eur Respir J,1996,9(8):1601-1604.

[15] 张聪. 肺结核伴支气管扩张 11 例临床分析[J]. 中国基层医药,2002,9(1):24-25.

(收稿日期:2015-05-28)