

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002050

ACK1 在子痫前期孕妇胎盘中的表达及其对滋养细胞侵袭功能的调控

刘洋铭¹, 车平¹, 袁雨², 谭彬², 王平珍², 漆洪波², 单楠²

(1. 重庆市合川区人民医院产科, 重庆 401520; 2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究活化的 Cdc42 结合激酶(activated Cdc42 associated kinase, ACK1)在正常足月孕妇胎盘与子痫前期(preeclampsia, PE)孕妇胎盘组织中的表达差异及其对滋养细胞功能的调控作用,探讨其在子痫前期发病机制中的作用。**方法:**收集 2015 年 10 月至 2016 年 10 月在重庆医科大学附属第一医院产科行计划性剖宫产手术的 23 例正常足月孕妇胎盘和 23 例 PE 孕妇胎盘组织,使用免疫组化(immunohistochemistry, IHC)及蛋白免疫印迹法(Western blot, WB)检测胎盘组织中 ACK1 的表达及差异情况。滋养细胞株(HTR8/SVneo)分为 3 组:常氧对照组(N 组)、缺氧/复氧组(H/R 组)及 ACK1 基因序列慢病毒敲降组(ACK1 shRNA 组),使用 Transwell 实验分析检测各组细胞的侵袭情况,采用流式细胞仪检测各处理组细胞凋亡率。使用 Western blot 检测各组细胞中 ACK1 蛋白、金属基质蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9 及其特异性抑制因子(the tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)-2 的蛋白表达差异。**结果:**与正常足月孕妇胎盘比较,ACK1 在人类子痫前期胎盘中表达明显降低($t=3.890, P=0.018$)。细胞学实验中,与 N 组比较,ACK1 shRNA 组和 H/R 组 ACK1 蛋白表达明显降低($t=12.260, P=0.000; t=10.740, P=0.000$),ACK1 shRNA 组和 H/R 组 MMP9 蛋白表达均明显降低($t=8.071, P=0.000; t=7.745, P=0.001$),TIMP1 蛋白表达显著升高($t=10.690, P=0.000; t=14.330, P=0.000$)。ACK1 shRNA 组和 H/R 组细胞迁移至下室的细胞数明显减少($t=12.260, P=0.000; t=11.320, P=0.000$),H/R 组细胞凋亡率显著升高($t=2.260, P=0.000$),但 ACK1 shRNA 组细胞凋亡率无明显改变($t=8.317, P=0.088$)。**结论:**ACK1 的表达下调可抑制滋养细胞的侵袭,可能在子痫前期发病机制中有重要的作用。

【关键词】活化的 Cdc42 结合激酶;侵袭;金属基质蛋白酶;子痫前期

【中图分类号】R714.24

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-01-14

Expression of activated Cdc42-associated kinase in the placenta of pregnant women with preeclampsia and its regulatory effect on invasion of trophoblasts

Liu Yangming¹, Che Ping¹, Yuan Yu², Tan Bin², Wang Pingzhen², Qi Hongbo², Shan Nan²

(1. Department of Obstetrics, People's Hospital of Chongqing Hechuan;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of activated Cdc42-associated kinase (ACK1) in the placenta of normal women with full-term pregnancy versus pregnant women with preeclampsia (PE), the regulatory effect of ACK1 on invasion of trophoblasts, and the role of ACK1 in the pathogenesis of PE. **Methods:** Placenta tissue samples were collected from 23 normal women with full-term pregnancy and 23 pregnant women with PE who underwent elective cesarean section in The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from October 2015 to October 2016. Immunohistochemistry and Western blot were used to measure the expression of ACK1 in the placenta. The trophoblast cell line (HTR8/SVneo cells) was divided into normoxia control group (N group), hypoxia/reoxygenation (H/R) group, and ACK1 lentivirus knockdown group (ACK1 shRNA group). Transwell assay was used to evaluate the invasion of cells and flow cytometry was used to measure the apoptosis of cells. Western blot was used to measure the protein expression of ACK1, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP2) in HTR8/SVneo cells.

作者介绍: 刘洋铭, Email: liuyangmingdushu@126.com,

研究方向: 子痫前期的发病机制。

通信作者: 单楠, Email: 31426193@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(编号: 81601304);

重庆市卫计委医学科研发资助项目(编号: 2016MSXM167)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190403.1351.008.html>

(2019-04-04)

Results: The expression of ACK1 in the placenta of PE patients was significantly lower than that in the placenta of normal women with full-term pregnancy ($t=3.890, P=0.018$). Compared with the N group, the ACK1 shRNA group and the H/R group had significant reductions in the protein expression of ACK1 ($t=12.260, P=0.000; t=10.740, P=0.000$) and MMP-9 ($t=8.071,$

$P=0.000$; $t=7.745$, $P=0.001$) and a significant increase in the protein expression of TIMP1 ($t=10.690$, $P=0.000$; $t=14.330$, $P=0.000$). The ACK1 shRNA group and the H/R group had a significant reduction in the number of cells migrating to the lower chamber ($t=12.260$, $P=0.000$; $t=11.320$, $P=0.000$). The H/R group had a significant increase in cell apoptosis rate ($t=2.260$, $P=0.000$), while the ACK1 shRNA group had no significant change in apoptosis rate ($t=8.317$, $P=0.088$). **Conclusion:** Downregulation of ACK1 expression inhibits the invasion of trophoblasts, suggesting that ACK1 may play an important role in the pathogenesis of PE.

【Key words】activated Cdc42 associated kinase; invasion; matrix metalloproteinase; preeclampsia

妊娠期高血压疾病是一种常见的危及母婴健康的产科并发症,它是一种妊娠期特有的全身性疾病,发病率为 5%~10%。子痫前期是妊娠期高血压疾病分类中一种严重的并发症,其病理生理基础是全身小动脉痉挛,外周阻力增加,血管内皮受到损伤而导致多器官功能障碍而出现的一系列严重并发症。目前子痫前期的发病机制尚不明确,普遍公认的子痫前期病因学说为胎盘浅着床、滋养细胞侵袭功能下降以及血管内皮细胞的损伤等^[1]。

活化的 Cdc42 结合激酶(activated Cdc42 associated kinase)又称 ACK1 或 TNK2,因最初被发现是 Cdc42 下游结合蛋白而被命名,其编码基因位于人染色体 3q29,该蛋白分子全长为 1 091 个氨基酸,其分子量约为 120 kD。ACK1 目前被认为是一种非受体酪氨酸激酶,其具有多个结构域来产生生物学作用。其中 SAM 结构域和 ACK1 细胞膜定位存在一定的关联,同时具有和出核序列同源的序列,介导蛋白在细胞核向细胞浆移位的基本过程;Cdc42/Rac 作用结构域介导 ACK1 和上游蛋白 Cdc42 进行结合,使得 Bcr 诱导的 GTP 酶的活性受到抑制^[2];SH3 结构域和具有脯氨酸的部分结合的情况下,能够产生磷酸化作用,引起 ACK1 的磷酸化^[3]。有研究表明,ACK1 作为一种介导小 G 蛋白,是 Cdc42 下游信号通路重要的酪氨酸激酶,在调节细胞骨架重排和细胞运动中发挥重要作用,促进肿瘤细胞迁移和侵袭,与恶性肿瘤的发展及预后有着密切的联系^[4-5]。由于滋养细胞和肿瘤细胞的生物学特性极其相似^[6],本课题组推测 ACK1 在滋养细胞的功能调控方面可能具有一定的作用,但目前关于 ACK1 对滋养细胞的生物学调控方面鲜有研究。因此,本研究借助胎盘组织及细胞模型的相关实验方法,研究 ACK1 在正常足月胎盘及 PE 胎盘中的差异表达,明确其对滋养细胞功能的影响,探讨其在子痫前期发病机

制中可能的作用。

1 材料与方法

1.1 标本采集

通过选择 2015 年 10 月至 2016 年 10 月在重庆医科大学附属第一医院住院分娩的患者的胎盘标本进行采集,其中正常单胎足月行选择性剖宫产的正常孕妇的胎盘样本作为对照组($n=23$),患重度子痫前期的选择剖宫产分娩的单胎患者胎盘样本作为子痫前期组($n=23$),具有显著的胎盘病变如重度胎盘早剥、严重的胎儿宫内窘迫等急症行急诊手术者排除在外。诊断标准采用 2014 年 ACOG 关于妊娠期高血压指南^[7],即妊娠 20 周后出现收缩压 ≥ 140 mmHg 和(或)舒张压 ≥ 90 mmHg,伴尿蛋白阳性。或虽无蛋白尿合并下列任何一项者:血小板减少;肝功能异常;肾功能损害;肺水肿;新发的中枢神经系统异常或视觉障碍。排除既往患高血压、糖尿病、妊娠期肝内胆汁淤积症、甲状腺功能异常等合并症的孕妇纳入研究对象。所有研究对象均无长期服用药物史及吸烟史。标本采集前均予研究对象签署科研知情同意书,同时获得了重庆医科大学附属第一医院伦理委员会的许可。

1.2 主要实验试剂及细胞

实验细胞系采用人类早孕期绒毛外滋养细胞株(HTR8/SVneo),由中国科学院王雁玲教授馈赠;多克隆兔抗 ACK1(SC-323, Santa Cruz Biotechnology, Inc); β -actin 单克隆鼠抗体(BM0627, Boster Biological Technology, 中国武汉),辣根酶标记山羊抗小鼠二抗(ZB2305, 中杉金桥生物技术有限公司, 中国北京),辣根酶标记山羊抗兔二抗(ZB2301, 中杉金桥生物技术有限公司, 中国北京),多克隆兔抗 MMP9(ab38898, Abcam, USA),多克隆兔抗 TIMP1(ab61224, Abcam, USA);RIPA(P0013B, Beyotime, 中国北京),流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, USA);ECL 化学发光试剂盒(Millipore, Darmstadt, Germany);细胞培养相关试剂均采购于美国 Hyclone 公司;免疫组化试剂盒采购于中杉金桥生物技术有限公司;Western blot 相关试剂采购于江苏碧云天生物公司;蛋白 Marker 采购于美国 Bio-Rad 公司;Transwell 小室和 PVDF 膜采购于美国 Millipore 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 胎盘样本采集 胎盘离开母体后,立即对胎盘母体面的 5 个小叶进行取样,避开梗死、钙化点、血肿以及黏液,每个标本取样 1~2 cm³,取样过程中均在胎盘中部使用剪刀剪取,避开胎盘边缘和脐带。

1.3.2 免疫组化方法 将胎盘组织标本用石蜡进行包埋,使用轮转式切片机对其连续切片,注意切片厚度需在 5 μm 左右。免疫组化方法参照试剂盒相关说明书进行。采用 PBS 缓冲液按照 50:1 稀释 ACK1 多克隆兔抗,用兔血清 IgG 代替一抗作为阴性对照,使用二氨基联苯胺染色后显微镜下观察。以细胞胞核和(或)胞质出现棕黄色颗粒视为阳性染色。

1.3.3 细胞培养及慢病毒转染 本研究将滋养细胞 HTR8/SVneo 细胞系作为实验研究细胞系,具体分组及处理方式如下:①常氧培养组(N 组):细胞培养于 37 ℃,5%CO₂,20%O₂ 完全培养基(10%FBS,90%RPMI 1640)中。②ACK1 敲降组(ACK1 shRNA 组):常氧培养条件下转染含 ACK1 敲降序列(5'-GTACCTGCTTCTTCCAGAGAA-3')的慢病毒[®],该慢病毒购买于上海吉玛生物有限公司。首先采用 24 孔板对细胞进行培养,当细胞生长至对数生长期时,使用胰酶消化后,进行细胞计数,据上述公式得知所需加入病毒溶液的体积;培养 24 h 后,将存在慢病毒的细胞培养液去除,进行完全培养基的更换,在感染 48 h 以及 72 h 后,通过荧光显微镜对 HTR8/SVneo 细胞的荧光强度进行观察。培养 5~6 d 后加入嘌呤霉素进行筛选获得稳定的慢病毒转染细胞株。③细胞缺氧复氧组(H/R 组):培养箱(2%O₂)进行缺氧培养 8 h 后,转移至常氧条件培养 16 h(20%O₂),共 2 个循环[®]。

1.3.4 细胞凋亡率检测 采用流式细胞仪监测细胞的凋亡率,具体步骤如下:将细胞消化后并进行细胞计数,每管 2 × 10⁶ 个细胞,1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入 500 μL 预冷 PBS 重悬细胞后再次 1 000 r/min 离心 5 min;弃上清后加入 100 μL 1 × Buffer 重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-PE,并轻轻混匀,4 ℃孵育 15 min;加入 10 μL 7-AAD 避光孵育 15 min,并上机检测。

1.3.5 Western blot 胎盘组织和细胞均用 RIPA 裂解以提

取总蛋白。BCA 法(Beyotime,Beijing,China)测定蛋白浓度。上样后依次进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、5%脱脂奶粉溶液封闭、一抗 4 ℃孵育过夜(ACK1 浓度为 1:500;β-actin 浓度为 1:1 000)、二抗浓度为 1:2 000 常温孵育 2 h,最后采用 ECL 化学发光试剂盒进行显色。使用使用 Bio-Rad 成像系统显影,获得图片使用 Image J 软件分析。

1.3.6 细胞 Matrigel 胶侵袭实验 取预先 1:7 稀释的 Matrigel 胶 60 μL 加入细胞小室上室,覆盖整个聚碳酸酯膜,置于 37 ℃孵育箱 30 min。取 24 孔板,放入已铺好胶的细胞小室,每个细胞小室加入含 2 × 10³ 个细胞的无血清培养基悬液 100 μL (即每孔细胞数为 2 × 10³ 个,但由于缺氧复氧组的细胞凋亡率为 14.115 ± 2.362,故在缺氧/复氧组中多加入 15%的细胞数,即为 3.0 × 10³ 个);下室加 600 μL 完全培养基(10%FBS),连续常规培养 48 h,完成染色和固定。倒置显微镜下随机取 6 个视野照相、计数(100 倍),取平均数进行统计分析。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 20.0 对数据进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行表示,两组间均数差异比较采用两独立样本 *t* 检验分析;多组间差异对比采用单因素方差分析,各组与对照组比较采用 Dunnett-*t* 检验。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 临床资料

临床资料见表 1,正常组和 PE 组比较,2 组孕妇间年龄、BMI 无明显差异(*P*>0.05)。

2.2 ACK1 在子痫前期胎盘中表达明显降低

IHC 结果显示,正常足月孕妇胎盘中 ACK1 表达呈强阳性,且主要定位在滋养细胞中(图 1)。本实验采用 23 例正常孕妇胎盘与 23 例子痫前期孕妇胎盘组织进行 WB 研究,结果证实 ACK1 在子痫前期孕妇胎盘组织中的表达明显低于正常足月胎盘(*t*=3.890,*P*=0.018),其代表性 WB 条带如图 1 所示,差异具有统计学意义(图 1 和表 2)。

表 1 纳入研究对象临床资料

特征	PE组	正常组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
例数(<i>n</i>)	23	23	—	—
年龄(岁)	27.43 ± 0.58	26.13 ± 0.68	1.467	0.149
BMI(kg/m ²)	24.32 ± 0.31	25.12 ± 0.36	1.689	0.098
孕周(周)	35.78 ± 0.40	37.27 ± 0.08	3.650	0.001
收缩压(mmHg)	158.70 ± 1.29	102.40 ± 1.73	26.100	0.000
舒张压(mmHg)	106.43 ± 1.65	62.56 ± 0.97	22.870	0.000
24h 尿蛋白(g)	3.12 ± 0.16	1.21 ± 0.13	9.090	0.000
新生儿体质量(g)	2 632.00 ± 79.34	3 206.00 ± 46.21	6.250	0.000
胎盘质量(g)	432.50 ± 6.43	524.70 ± 8.61	8.580	0.000

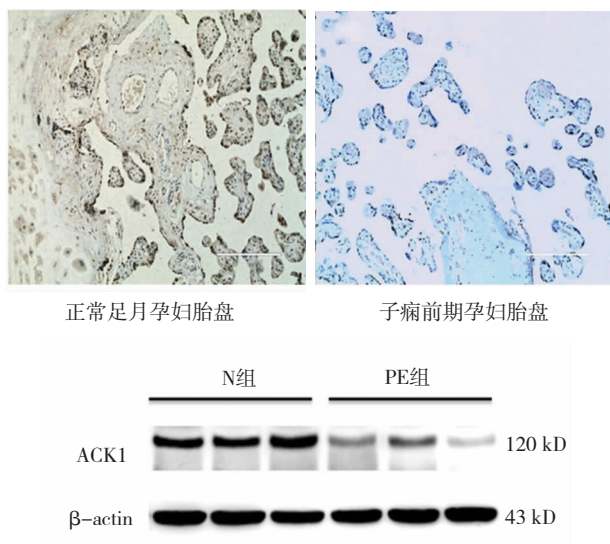


图1 ACK1在正常足月孕妇胎盘及子痫前期孕妇胎盘中表达情况

表2 ACK1蛋白在胎盘组织中的表达半定量分析

组别	例数	ACK1蛋白 相对表达水平
N组	23	0.661 ± 0.081
PE组	23	0.232 ± 0.075

2.2 H/R 和慢病毒转染处理后 HTR8/SVneo 细胞中 ACK1 的表达

经过流式细胞仪检测慢病毒转染 HTR8/SVneo 细胞的转染效率为 99.75%, 并获得稳定的转染株供后续实验用。WB 实验显示 ACK1 敲降序列可明显下调 HTR8/Svneo 细胞 ACK1 蛋白水平(图 2)。通过对 ACK1 蛋白表达的半定量分析, ACK1 蛋白的表达下调约 70%(表 3)。H/R 处理后, ACK1 的表达量较正常组明显下降(图 2 和表 3)。

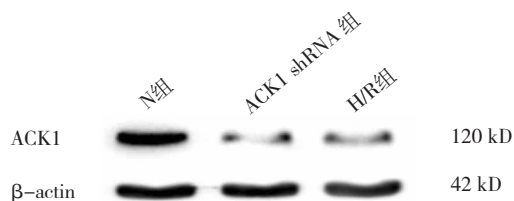


图2 慢病毒敲降及 H/R 处理后 ACK1 蛋白表达情况

表3 不同处理组中 ACK1 蛋白的表达半定量分析

组别	ACK1蛋白相对表达水平
N组	0.889 ± 0.105
ACK1 shRNA 组 ^a	0.256 ± 0.016
H/R 组 ^b	0.334 ± 0.028

注: 总体差异 $F=89.270, P=0.000$; a: N 组和 ACK1 shRNA 组比较, $t_D=12.26, P=0.000$; b: N 组和 H/R 组比较, $t_D=10.74, P=0.000$

2.3 敲降 ACK1 后对 HTR8/SVneo 细胞侵袭的影响

慢病毒敲降 ACK1 后, HTR8/Svneo 细胞穿透至下层小室的细胞为 (29.410 ± 4.236) , 与对照组 (108.62 ± 13.419) 比

较明显减少, 提示侵袭能力明显减弱, H/R 处理后 HTR8/SV-neo 穿透至下层小室的细胞 (35.505 ± 7.241) 与对照组比较, 明显减少, 提示 H/R 处理也可明显抑制细胞侵袭能力(图 3, 表 4)。另外, 对细胞进行敲降 ACK1 和 H/R 处理后, 均可抑制 MMP-9 表达, 并上调 TIMP-1(图 4, 表 5、表 6)。

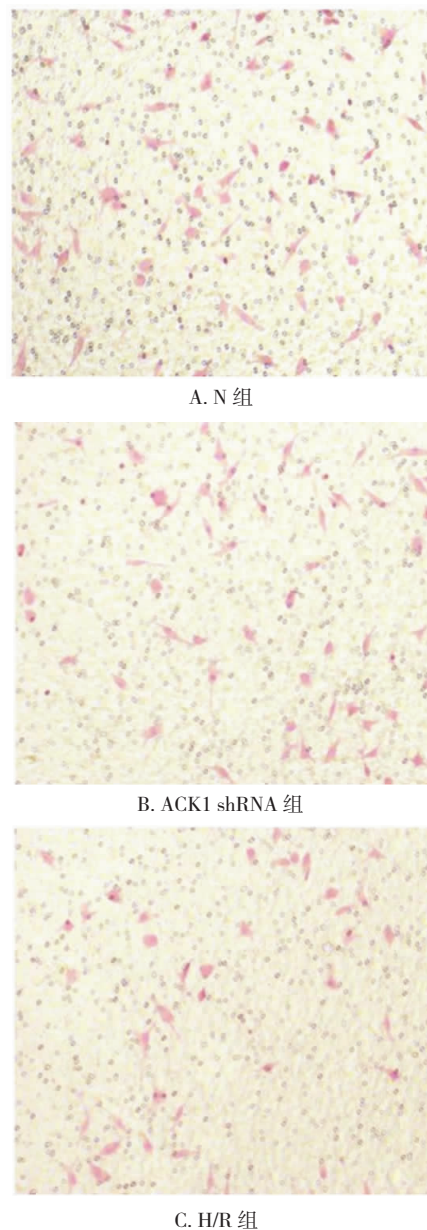


图3 慢病毒敲降及 H/R 处理后的 HTR8/Svneo 细胞侵袭力的改变

表4 慢病毒敲降及 H/R 处理后侵袭至下层 HTR8/Svneo 细胞数

组别	侵袭至下层细胞数
N组	108.620 ± 13.419
ACK1 shRNA 组 ^a	29.410 ± 4.236
H/R 组 ^b	35.505 ± 7.241

注: 总体差异 $F=93.080, P=0.000$; a: N 组和 ACK1 shRNA 组比较, $t_D=12.26, P=0.000$; b: N 组和 H/R 组比较, $t_D=11.32, P=0.000$

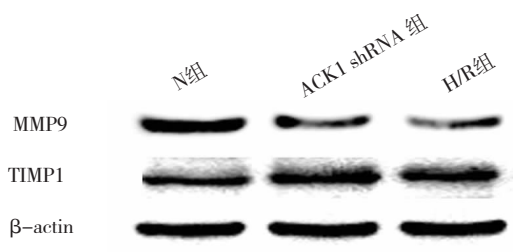


图 4 慢病毒敲降及 H/R 处理后 MMP9、TIMP1 蛋白的表达情况

表 5 各处理组 MMP 蛋白相对表达水平

组别	MMP9 蛋白相对表达水平
N 组	1.034 ± 0.133
ACK1 shRNA 组 ^a	0.481 ± 0.056
H/R 组 ^b	0.504 ± 0.019

注: 总体差异 $F=41.742, P=0.000$; a: N 组和 ACK1 shRNA 组比较, $t_D=8.071, P=0.000$; b: N 组和 H/R 组比较, $t_D=7.745, P=0.001$

表 6 各处理组 TIMP1 蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TIMP1 蛋白相对表达水平
N 组	0.748 ± 0.061
ACK1 shRNA 组 ^a	1.104 ± 0.025
H/R 组 ^b	1.225 ± 0.024

注: 总体差异 $F=110.978, P=0.000$; a: N 组和 ACK1 shRNA 组比较, $t_D=10.690, P=0.000$; b: N 组和 H/R 组比较, $t_D=14.330, P=0.000$

2.4 ACK1 对 HTR8/SVneo 细胞凋亡的影响

通过流式细胞仪检测显示, 敲降 ACK1 以后 HTR8/SVneo 细胞的凋亡率 (6.743 ± 0.802) 与对照组 (3.988 ± 1.636) 比较, 无明显影响, 但 H/R 组细胞的凋亡率 (14.115 ± 2.362) 较对照组明显增加 (图 5, 表 7)。

表 7 各处理组 HTR8/SVneo 细胞的凋亡率

组别	细胞凋亡率
N 组	3.988 ± 1.636
ACK1 shRNA 组 ^a	6.743 ± 0.802
H/R 组 ^b	14.115 ± 2.362

注: 总体差异 $F=36.982, P=0.000$; a: N 组和 ACK1 shRNA 组比较, $t_D=2.26, P=0.000$; b: N 组和 H/R 组比较, $t_D=8.317, P=0.008$

3 讨论

目前有研究报道, ACK1 在多种恶性肿瘤组织中表达增高。ACK1 能够直接磷酸化 AKT 第 176 位酪氨酸而活化 AKT, 促进细胞增殖和抑制细胞凋亡^[10]。关于 ACK1 对肿瘤细胞的迁移和侵袭潜能的影响, 目前研究发现 ACK1 作为 Cdc42 的下游调控蛋白, 能够对 Rho 家族蛋白的酪氨酸进行磷酸化, 促进肌动蛋白发生聚合, 调节细胞运动, 增加肿瘤细胞的迁移和侵袭能力^[9]。但目前尚无关于 ACK1 在子痫前期中的研究。本研究初步实验结果显示, ACK1 在子痫前期孕妇胎盘组织中的表达明显低于正常足月孕妇胎盘组织, 故而推测 ACK1 的下调与子痫前期的发病有关。

人类胚胎的早期发育发育过程中, 由于绒毛外滋养细胞侵袭子宫螺旋动脉, 造成“滋养细胞栓”形成, 阻塞血管, 造成早孕胚胎发育过程中一种生理低氧状态。而这种生理低氧状态对滋养细胞的侵袭十分有利^[11-12]。在妊娠 12 周左右, 绒毛外滋养细胞不仅侵袭子宫蜕膜, 还能沿着螺旋动脉侵袭, 使血管管腔增大, 形成血管重铸, 增加母胎界面的血供。由于绒毛的血流量增加, 氧压快速增加, 氧的自由基产生增多, 形成生理性复氧的过充。在子痫前期的发病机制研究中发现, 由于受到各种因素的影响而造成滋养细胞的侵袭能力下降, 血管重铸能力减弱, 严重影响母胎界面循环的血流量, 从而氧化应激及其产物活性氧 (relative oxygen species, ROS) 升高。有研究表明, 子痫前期胎盘组织中的 ROS 水平较正常组织明显升高, 提示子痫前期的发生可能与 ROS 有关^[13]。本课题组既往研究中发现, 通过对 HTR8/SVneo 细胞进行缺氧/复氧处理可提高细胞内 ROS

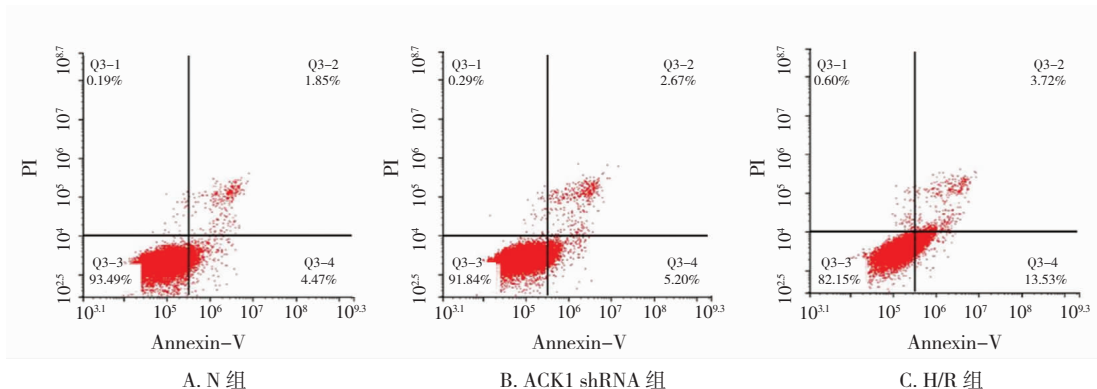


图 5 慢病毒敲降及 H/R 处理后的细胞凋亡率

水平,诱发显著的氧化应激反应,与子痫前期胎盘组织类似。因此,在本次研究中我们采用对 HTR8/SVneo 细胞进行缺氧/复氧处理来模拟子痫前期的缺氧复氧状态。实验结果显示,缺氧/复氧可明显下降 ACK1 的表达,并且可以抑制 HTR8/SVneo 细胞的侵袭能力。此外,实验结果显示,经过转染载有 ACK1 敲降序列的慢病毒后,HTR8/SVneo 细胞中 ACK1 的表达明显下降。且敲降 ACK1 后滋养细胞的侵袭功能明显下降,证明 ACK1 下调可明显抑制滋养细胞的侵袭功能,明确了该基因对滋养细胞侵袭功能的影响。综上实验结果提示 ACK1 可能参与子痫前期的发病机制。

MMPs 是一种具有降解细胞基膜作用的金属蛋白质酶,在肿瘤细胞的侵袭能力调控中起到重要的作用。在肿瘤细胞的体外研究中,ACK1 的表达上调还可促进肿瘤细胞的 MMPs 表达,有利于肿瘤细胞对周围组织进行浸润^[13]。而目前也有研究显示 MMPs 异常表达与子痫前期密切相关^[14]。本研究证实,在 HTR8/SVneo 细胞体外实验中,ACK1 的敲降在减弱滋养细胞侵袭能力的同时,可明显下调 MMPs 的表达,此结果与给予缺氧/复氧处理 HTR8/SVneo 细胞结果一致。然而,ACK1 的敲降并不影响 HTR8/SVneo 细胞的凋亡率。故此,ACK1 敲降减弱滋养细胞的侵袭能力是因为对滋养细胞的侵袭能力发生改变,而非提高了细胞的凋亡率而引起的实验误差。

由以上研究结果得出,ACK1 的蛋白表达下降可导致滋养细胞侵袭能力减弱,进而导致侵袭深度不够,诱导子痫前期的发生。但 ACK1 基因如何参与滋养细胞侵袭能力的调控,及其在子痫前期的发病过程及预后中起到怎样的作用仍然尚未研究清楚,这仍然是我们将来研究的方向。本研究后期实验将从动物实验来进行研究,为子痫前期的发病及诊治提供理论基础。

参 考 文 献

[1] Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, et al. Pre-eclampsia[J]. Lancet, 2016, 387(10022): 999–1011.
[2] Manser E, Leung T, Salihuddin H, et al. A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21cdc42[J]. Nature, 1993,

363(6427): 364–367.

[3] Ahmed I, Calle Y, Sayed MA, et al. Cdc42-dependent nuclear translocation of non-receptor tyrosine kinase, ACK1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314(2): 571–579.
[4] Galisteo ML, Yang Y, Urena J, et al. Activation of the nonreceptor protein tyrosine kinase Ack by multiple extracellular stimuli[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(26): 9796–9801.
[5] Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, et al. Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents[J]. Mayo Clin Proc, 2009, 84(11): 985–1000.
[6] Prieto-Echague V, Gucwa A, Craddock BP, et al. Cancer-associated mutations activate the nonreceptor tyrosine kinase Ack1[J]. J Biol Chem, 2010, 285(14): 10605–10615.
[7] American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy[J]. Obstet Gynecol, 2013, 122(5): 1122–1131.
[8] Mahajan NP, Liu Y, Majumder S, et al. Activated Cdc42-associated kinase Ack1 promotes prostate cancer progression via androgen receptor tyrosine phosphorylation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(20): 8438–8443.
[9] Shan N, Zhang X, Xiao X, et al. Laminin alpha4(LAMA4) expression promotes trophoblast cell invasion, migration, and angiogenesis, and is lowered in preeclamptic placentas[J]. Placenta, 2015, 36(8): 809–820.
[10] Mahajan K, Coppola D, Challa S, et al. Ack1 mediated AKT/PKB tyrosine 176 phosphorylation regulates its activation[J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9646.
[11] Rodesch F, Simon P, Donner C, et al. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy[J]. Obstet Gynecol, 1992, 80(2): 283–285.
[12] Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the fetus, a review[J]. Placenta, 2003, 24(SA): 86–93.
[13] Liu Z, Liu Z, Zhang Y, et al. miR-24 represses metastasis of human osteosarcoma cells by targeting Ack1 via AKT/MMPs pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 486(2): 211–217.
[14] Karampas G, Eleftheriades M, Panoulis K, et al. Maternal serum levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and their complex MMP-9/NGAL in pregnancies with preeclampsia and those with a small for gestational age neonate: a longitudinal study[J]. Prenat Diagn, 2014, 34(8): 726–733.

(责任编辑:张辉洁)