

SF-1诱导小鼠子宫内膜基质细胞增殖及其机制的研究

牟春风 刘学庆 何俊琳 陈雪梅 高茹菲 王应雄 丁裕斌*

(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学教研室, 重庆 400016)

摘要 该研究分离并鉴定了原代小鼠子宫内膜基质细胞(mouse endometrial stromal cell, mESC)。过表达类固醇生成因子-1(steroidogenic factor-1, SF-1)可显著诱导该细胞的增殖能力、促进增殖相关基因PCNA(proliferating cell nuclear antigen)及PH3(phospho-histone 3)的蛋白质水平表达增高以及激活PI3K-AKT-mTOR信号通路; PI3K信号通路抑制剂LY294002和mTOR信号通路抑制剂Rapamycin等可抑制mESC中SF-1过表达所引起pAKT S473、pmTOR S2448、pp70S6K T389、pS6 S235/236和p4E-BP1 T37/46的蛋白质水平的增高。该研究初步揭示了SF-1表达与mESC增殖的相关性。

关键词 SF-1; 子宫内膜基质细胞; PI3K-AKT-mTOR信号通路; 细胞增殖

SF-1 Induces the Proliferation of Mouse Endometrial Stromal Cells *In Vitro* and Its Mechanism

Mou Chunfeng, Liu Xueqing, He Junlin, Chen Xuemei, Gao Rufe, Wang Yingxiong, Ding Yubin*

(Laboratory of the Reproductive Biology, School of Public Health and Management,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Mouse endometrial stromal cell (mESC) was isolated and identified in this study. Forced expression of steroidogenic factor-1 (SF-1) in mESC induced proliferation increase and upregulation of protein expression in proliferation marker genes PH3 (phospho-histone 3) and PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and activation of PI3K-AKT-mTOR signaling pathway. The PI3K signaling pathway inhibitor LY294002 and mTOR signal pathway inhibitor Rapamycin decreased the expression of pAKT S473, pmTOR S2448, pp70S6K T389, pS6 S235/236 and p4E-BP1 T37/46, which were induced by forced expression of SF-1 in primary cultured mESC. Our study provided preliminary evidences that SF-1 expression might associated with mESC cell proliferation.

Keywords SF-1; endometrial stromal cells; PI3K-AKT-mTOR signaling pathway; cell proliferation

成功的胚胎植入是正常妊娠的关键步骤。胚胎植入前后, 一系列复杂的生理过程参与调节植入的发生, 其中, 包括子宫内膜上皮细胞发生增殖和容受性改变, 子宫内膜基质细胞发生蜕膜化^[1]。子宫内膜蜕膜化是指子宫内膜基质细胞受到一些蜕膜化相关

诱导因子的刺激而发生的广泛增殖、分化并引起子宫重塑^[2]。孕酮(progesterone, P4)和雌激素(estrogen, E2)在这过程中起到了至关重要的作用。小鼠在怀孕第5 d(见孕栓为怀孕第1 d)凌晨, 胚胎植入后, 基质细胞蜕膜化开始发生^[3]。子宫内膜基质细胞增殖和

收稿日期: 2016-07-28 接受日期: 2016-09-30

国家自然科学基金(批准号: 31571190、81671493)和重庆市教委科技项目(批准号: 渝教人(2014)47号、KJ130309)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485008, E-mail: dingyb@gmail.com

Received: July 28, 2016 Accepted: September 30, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571190, 81671493) and the Foundation of Chongqing Education Committee (Grant No.2014-47, KJ130309)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485008, E-mail: dingyb@gmail.com

网络出版时间: 2016-11-04 17:14:04 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161104.1714.006.html>

分化的异常与临床上的反复流产以及不明原因的不孕密切相关。基质细胞的正常增殖对于成功的着床和妊娠至关重要。

类固醇生成因子-1(steroidogenic factor-1, SF-1), 也称Ad4BP(adrenal-4-binding protein)或NR5A1(nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1), 属于核受体超家族成员, 为一种孤儿核受体。SF-1在内分泌组织(如肾上腺、性腺和垂体)的发育及类固醇激素的生成过程中都发挥着关键作用^[4-5]。有研究报道, SF-1可以促进肿瘤间质细胞、睾丸间质细胞和神经细胞、肾上腺皮质细胞的增殖, 也可以通过一种新型的他莫昔芬类似物刺激雌激素受体GPR30的表达增高, 激活SF-1的表达, 从而促进子宫内膜细胞的增殖^[6-8]。妊娠期子宫内膜基质细胞的增殖是否受到SF-1的调控以及调控的信号通路目前均不清楚。磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, PKB, 又称AKT)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)(PI3K-AKT-mTOR)信号通路, 广泛存在于细胞中, 参与细胞增殖、分化调节等, 通过整合一系列细胞外信号, 调节不同细胞功能^[9-10]。现在已经有研究表明, PI3K-AKT-mTOR通路对细胞增殖有着重要的调控作用, 但目前对于SF-1是否可以通过该通路调控子宫内膜基质细胞的增殖还不清楚。因此, 本文研究了上调SF-1的表达与PI3K-AKT-mTOR信号通路的激活及基质细胞增殖的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 30只雌性和6只雄性健康成年清洁级昆明小鼠, 均购于重庆医科大学动物中心[实验动物生产许可号: SCXK(渝)2007-0002、SCXK(渝)2007-0001]。

1.1.2 主要试剂 鼠源pCMV6-SF-1表达质粒购自Origene公司。Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司。D-Hanks购自武汉博士德生物工程有限公司。中性蛋白酶购自Roche公司。胰蛋白酶、胶原酶II、DMEM-F-12培养基、炭吸附胎牛血清购自Sigma公司。青霉素-链霉素、SDS-PAGE蛋白质上样缓冲液(5×)购自上海碧云天生物技术有限公司。SF-1一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。AKT一

抗购自Millipore公司。波形蛋白一抗、 β -actin一抗、pAKT(S473)一抗、mTOR一抗、pmTOR(Ser2448)一抗、p70S6K一抗、pp70S6K(Thr389)一抗、S6一抗、pS6(Ser235/236)一抗、4E-BP1一抗、p4E-BP1(Thr37/46)一抗、兔二抗、鼠二抗、LY294002及雷帕霉素(rapamycin, RAPA)购自Cell Signaling Technology公司。EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司。质粒提取试剂盒购自Omega公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠子宫内膜基质细胞的分离 小鼠子宫内膜基质细胞(mouse endometrial stromal cell, mESC)的分离培养参照Tan等^[11]的方法稍作改动。假孕第4 d小鼠断颈处死, 取出Y型子宫将其系膜剪净, 放入干净的6孔板中用D-Hanks清洗2遍。用高压灭菌的剪刀剪碎子宫, 组织大小为3~4 mm³; 加入酶I(酶I由胰蛋白酶、中性蛋白酶及D-Hanks配成), 在4 °C和37 °C条件下分别消化2 h和30 min。反复吹打消化直到组织成毛躁黏稠丝状, 将其移到15 mL离心管中, 加入适量D-Hanks清洗, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清。加入酶II(由胶原酶II和D-Hanks配成), 放入37 °C培养箱消化30 min, 每10 min吹打1次。取出离心管, 用70 μ m的滤器过滤细胞。将滤液转移至15 mL离心管中, 加入D-Hanks清洗, 1 500 r/min离心5 min, 去上清。加入培养基吹打混匀, 重悬沉淀。每孔加入1.5 mL培养基。将培养皿放入37 °C培养箱中培养1 h。悬浮细胞贴壁后换液。

1.2.2 细胞免疫荧光鉴定基质细胞 培养的小鼠原代子宫内膜基质细胞用冰甲醇固定15 min, 弃冰甲醇, PBS洗3次, 每次10 min, 用5% BSA封闭1 h后敷波形蛋白一抗, 4 °C过夜。用适当的FITC标记的二抗室温孵育1 h, 用PBS洗3次, 每次10 min。DAPI染色5~10 min后, 荧光显微镜照相。

1.2.3 质粒提取 将购买的质粒粉末加蒸馏水溶解, 取质粒涂板, 放37 °C孵箱过夜, 挑单克隆, 摇菌12 h。提取质粒按照试剂盒(Omega公司)说明书进行。将菌液4 000 r/min离心10 min后, 弃上清, 加试剂I吹打重悬, 加试剂II后将EP管上下倒置混匀, 加试剂III中和摇匀, 1 900 r/min离心10 min, 吸取上清弃沉淀, 加HB缓冲液, 1 000 r/min离心1 min弃底液, 加DNA清洗缓冲液, 1 000 r/min离心1 min, 弃底液, 加洗脱液静置2 min, 1 300 r/min离心1 min后, 保存

待用。

1.2.4 质粒转染及实验分组 分离的小鼠子宫内膜基质细胞置于含20%炭吸附胎牛血清的DMEM-F-12培养基中培养24 h, 接种密度达到50%~70%时进行质粒转染。提前3 h给细胞换成无双抗低血清的培养基, 利用Lipofectamine™ 2000转染pCMV6-SF-1的表达质粒和pCMV6-vector空载质粒, 质粒转染后4~6 h换成新鲜的完全培养基, 待其生长72 h后收获细胞。药物处理组在其生长48 h时加药处理24 h后收获细胞。PI3K信号通路抑制剂LY294002的浓度为50 $\mu\text{mol/L}$, mTOR信号通路抑制剂Rapamycin(RAPA)的浓度为100 nmol/L。实验分为4组: 空载体组(pCMV6-vector)、过表达SF-1组(pCMV6-SF-1)、过表达SF-1 48 h后加LY294002处理24 h组(pCMV6-SF-1+LY294002)、过表达SF-1 48 h后加RAPA处理24 h组(pCMV6-SF-1+RAPA)。

1.2.5 Western blot法检测相关蛋白质水平 Western blot法检测细胞中SF-1、AKT、pAKT S473、p70S6k、pp70S6K T389、mTOR、pmTOR S2448、S6、pS6 S235/236等蛋白质水平。将接种在24孔板的细胞(2×10^5 /孔)用200 μL 的 $1 \times$ 上样缓冲液裂解并混匀, 沸水煮10 min, 上样量为20 μL , SDS-PAGE凝胶电泳, 恒压80 V电泳2 h。将蛋白质电转至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h。然后分别孵育一抗SF-1、PCNA(proliferating cell nuclear antigen)、PH3(phospho-histone 3)、AKT、pAKT S473、mTOR、pmTOR S2448、p70S6k、pp70S6K T389、S6、pS6 S235/236、4E-BP1、p4E-BP1 T37/46、 β -actin, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBST洗涤3次, 每次5 min。再与5%脱脂牛奶或5% BSA稀释的二抗室温孵育1 h, PBST洗涤3次, 每次5 min, 化学发光ECL法显影观察条带。

1.2.6 定量PCR(RT-qPCR)检测mRNA水平 按照RNAiso Plus试剂说明(TaKaRa公司)溶解细胞并提取各组细胞总RNA。细胞经RNAiso Plus溶解, 氯仿抽提、异丙醇沉淀、75%乙醇洗涤获得总RNA后, 参照PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒说明(TaKaRa公司)进行逆转录。PCR反应引物均由上海生工生物工程有限公司合成, SF-1上游引物为: 5'-TCC TGA ACA ACC ACA GCC TC-3', 下游引物为: 5'-CTC CAC CAG GCA CAA TAG CA-3'。以Actin基因为内参照。Actin上游引物为: 5'-ATA TCG CTG CGC TGG TCG TC-3', 下游引物为: 5'-AGG ATG

GCG TGA GGG AGA GC-3'。反应总体系为15 μL : SYBR 7.5 μL 、正反引物各0.6 μL 、DEPC处理水5.1 μL 、cDNA 1.2 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 共40个循环, 每个样本设立3个复孔, 以 β -actin作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算方法对目的基因的表达量进行数据分析。

1.2.7 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷处理细胞后检测细胞增殖 在96孔板处理好的细胞中加入50 $\mu\text{mol/L}$ 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)培养基孵育5~6 h, 弃培养基, PBS洗1~2次, 每次5 min。每孔加入50 μL 4%多聚甲醛固定液室温孵育30 min, 每孔加入2 mg/mL甘氨酸中和多聚甲醛, 孵育5 min。用0.5% Triton X-100渗透剂室温孵育10 min, PBS洗1次, 用时5 min。加入Apollo染色反应液, 避光室温孵育30 min。加入100 μL 渗透剂清洗2~3次, 每次10 min。弃渗透剂后加入Hoechst 33342反应液, 避光、室温条件下孵育30 min, 弃染色液。PBS清洗1~3次, 倒置显微镜下观察拍照。

1.2.8 流式细胞术检测细胞周期 将待检测的细胞去除上清, 胰蛋白酶消化2 min。培养基中和胰蛋白酶后, 将细胞收集到1.5 mL的EP管, 1 000 r/min离心5 min, 一边震荡一边向细胞沉淀中加入700 μL 75%预冷乙醇混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 加入50 mg/mL碘化丙啶(Sigma公司)和0.5 mg/mL的核糖核酸酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 流式细胞术进行DNA检测, Modifit软件分析各时相细胞周期的比例。

1.2.9 流式细胞术检测细胞活力 用胰蛋白酶消化收集各组细胞。培养基中和胰酶后, 将细胞收集到1.5 mL的EP管中离心, 1 000 r/min离心5 min, 弃培养基, 震荡同时向细胞沉淀中加入1 mL PBS, 碘化丙啶PBS缓冲液避光冰上孵育10 min。流式细胞术测定细胞存活率, Diva软件分析细胞活性。

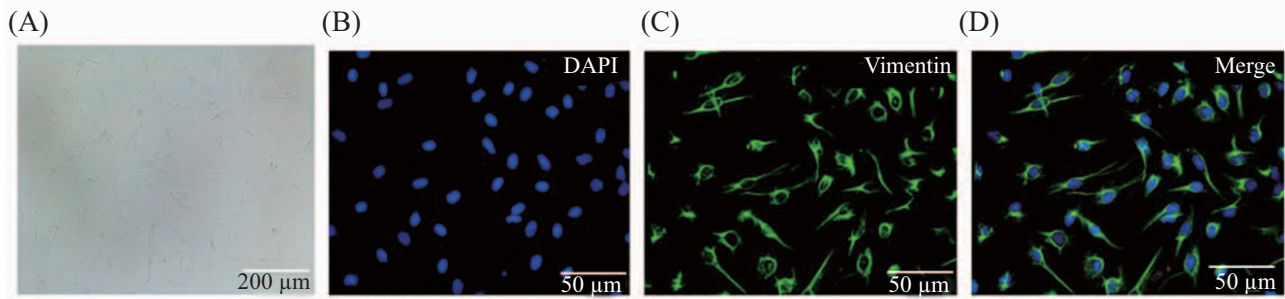
1.3 统计分析

每个实验组至少重复3次, 采用SPSS 20.0软件和GraphPad Prism 5.0软件进行统计分析。数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组之间的数据差异进行评估采用两独立样本 t 检验或单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠子宫内膜基质细胞的形态及纯度鉴定

将分离的小鼠子宫内膜基质细胞培养48 h后, 在倒置显微镜下分别采用白光观察细胞形态(图

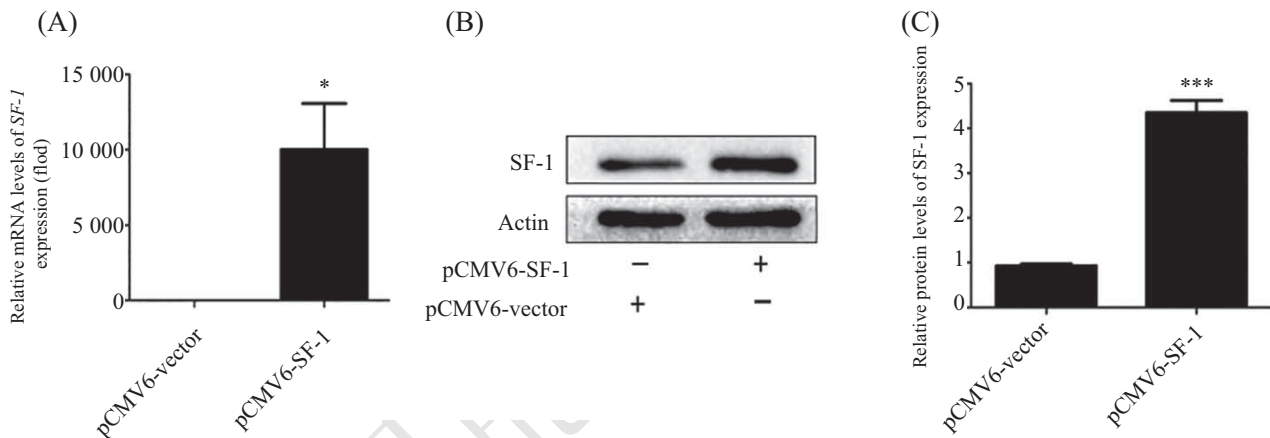


A: 小鼠子宫内膜分离的基质细胞的形态(白光); B: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)免疫荧光鉴定分离的小鼠子宫内膜基质细胞核; C: 波形蛋白(Vimentin)免疫荧光鉴定分离的小鼠子宫内膜基质细胞质; D: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)和波形蛋白(Vimentin)整合后鉴定小鼠子宫内膜基质细胞。

A: morphology of stromal cells isolated from mouse endometrium (white light); B: identification of mouse endometrial stromal cell nucleus by immunofluorescence with 4',6-diamidino-2-phenylindole; C: identification of mouse endometrial stromal cells by immunofluorescence with Vimentin; D: 4',6-diamidino-2-phenylindole and Vimentin integrated identification of mouse endometrial stromal cells.

图1 小鼠子宫内膜基质细胞的形态及纯度鉴定

Fig.1 The morphology and purity identification of mouse endometrial stromal cells



A: 荧光定量PCR检测SF-1 mRNA水平; B: Western blot检测SF-1蛋白质水平; C: 蛋白质灰度相对分析。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与空载体组比较。

A: determination of SF-1 mRNA level by q-PCR; B: determination of SF-1 protein levels by Western blot; C: relative protein level of SF-1 detected by densitometry. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs pCMV6-vector group.

图2 子宫内膜基质细胞过表达SF-1基因的验证

Fig.2 Validation of SF-1 gene over-expression in endometrial stromal cells

1A)。利用波形蛋白(Vimentin)免疫荧光进行纯度的鉴定(图1B~图1D)。结果显示,分离的小鼠子宫内膜细胞纯度超过95%。

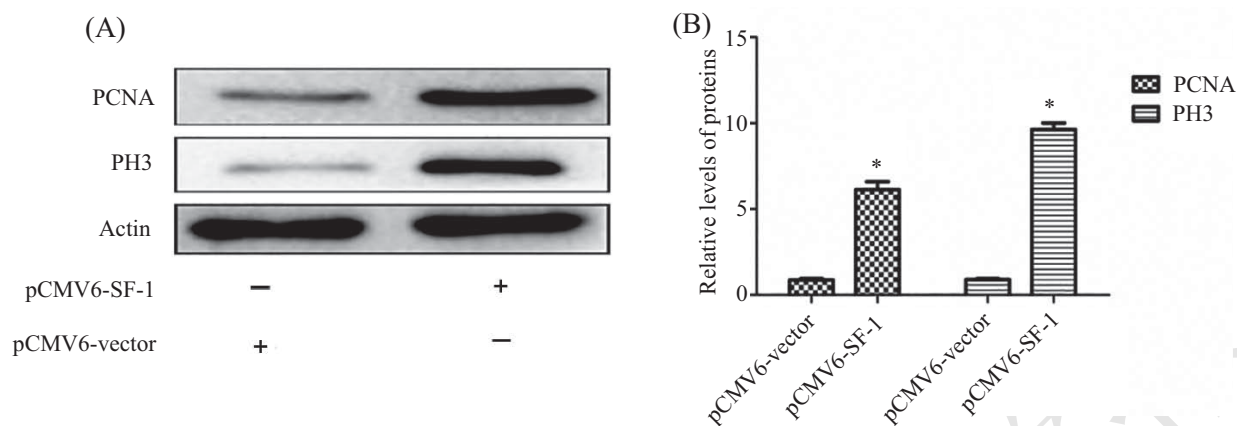
2.2 子宫内膜基质细胞过表达SF-1基因的验证

非孕小鼠子宫内膜基质细胞低表达SF-1。围孕期SF-1的表达增加可能与基质细胞的增殖相关,故采用SF-1表达质粒瞬时转染小鼠子宫内膜基质细胞。转染72 h后,空载体组(pCMV6-vector)和SF-1过表达实验组(pCMV6-SF-1)细胞经流式细胞术检测细胞存活力未受明显影响。荧光定量PCR结果显示,与空载体组(pCMV6-vector)相比,SF-1过表达实验组(pCMV6-SF-1)细胞中SF-1表达水平增加

约10 000倍,差异有统计学意义($P < 0.05$,图2A)。Western blot检测结果显示,与空载体组相比,实验组SF-1的蛋白质水平增高4.35倍($P < 0.05$,图2B和图2C)。以上结果显示,pCMV6-SF-1表达质粒的转染能够有效地增加小鼠子宫内膜基质细胞SF-1基因的表达。实验成功获得瞬时过表达SF-1小鼠子宫内膜基质细胞。

2.3 过表达SF-1基因对小鼠子宫内膜基质细胞增殖的影响

实验分别检测了质粒转染72 h后过表达组与空载体组细胞的增殖相关标志基因[增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)及磷酸化组

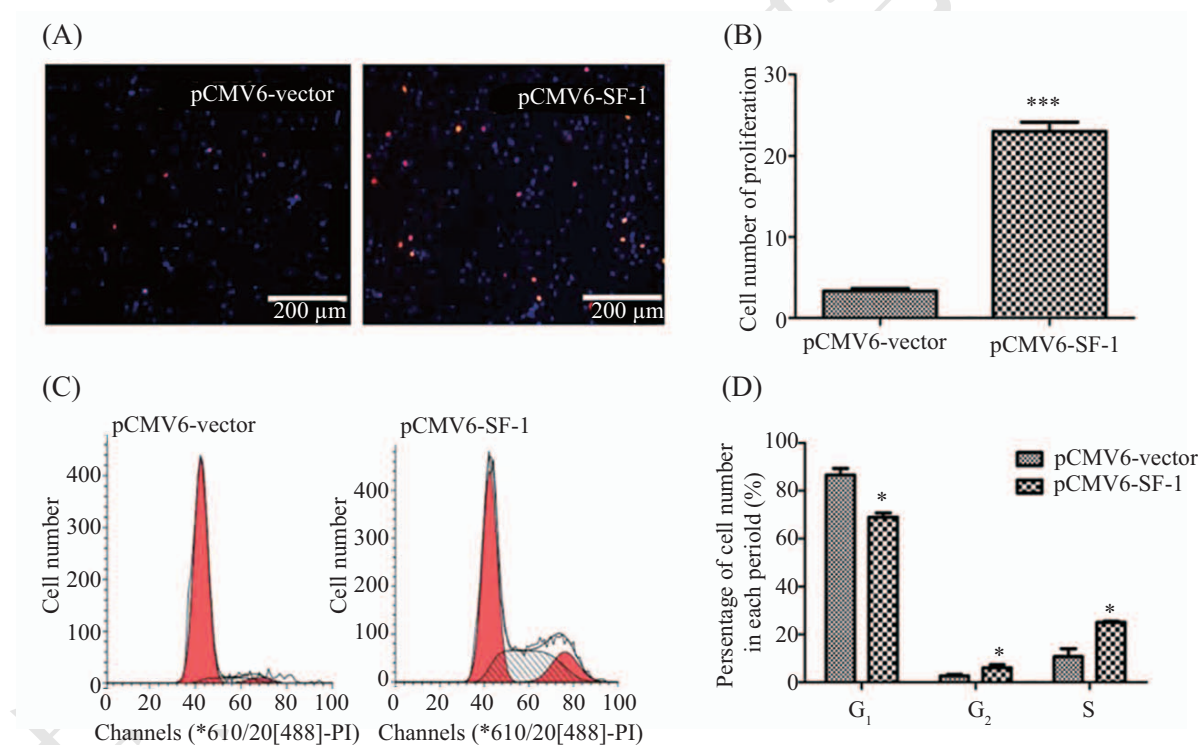


A: Western blot检测PCNA和PH3蛋白质水平; B: 蛋白质灰度相对分析。* $P < 0.05$, 与空载体组比较。

A: determination of PCNA and PH3 protein levels by Western blot; B: relative protein levels of PCNA and PH3 detected by densitometry. * $P < 0.05$ vs pCMV6-vector group.

图3 过表达SF-1基因对小鼠子宫内膜基质细胞增殖标志物表达的影响

Fig.3 The effect of over-expressed SF-1 on the expression of the proliferation markers in mouse endometrial stromal cells



A: EdU检测基质细胞的增殖能力。蓝色: 细胞核; 红色: 增殖的细胞数。B: EdU结果的统计分析。C: 流式细胞术检测细胞周期。D: 细胞周期的统计分析。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与空载体组比较。

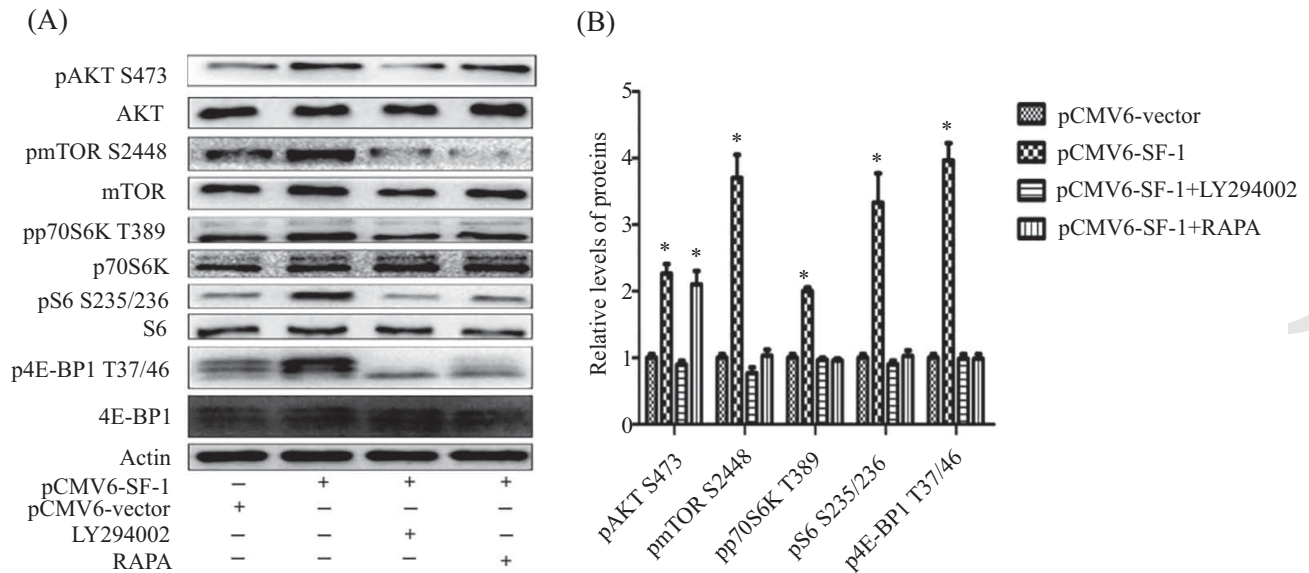
A: determination of the proliferation of stromal cells by EdU. Blue: nucleus; red: the number of proliferating cells. B: statistical analysis of EdU. C: cell cycle detected by flow cytometry. D: statistical analysis of cell cycle. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs pCMV6-vector group.

图4 过表达SF-1基因对小鼠子宫内膜基质细胞增殖的影响

Fig.4 The effect of over-expressed SF-1 on the proliferation of mouse endometrial stromal cells

蛋白H3(phospho-histone 3, PH3)]的表达。Western blot结果显示, 与空载体组相比, 实验组细胞的PCNA和PH3的蛋白质水平分别升高6.3倍和9.5倍, 差异具有统计学显著差异($P < 0.05$, 图3)。

我们采用5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)试剂盒检测细胞增殖。EdU是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶(T)掺入正在复制的DNA分子中, 基于EdU与Apollo荧光染料的特异



A: Western blot检测pAKT S473、pmTOR S2448、pp70S6K T389、pS6 S235/236、p4E-BP1 T37/46的蛋白质磷酸化水平; B: 蛋白质灰度相对分析。
* $P < 0.05$, 与空载体组比较。

A: determination of pAKT S473, pmTOR S2448, pp70S6K T389, pS6 S235/236, p4E-BP1 T37/46 protein levels by Western blot; B: relative protein levels of PI3K-AKT-mTOR signal detected by densitometry. * $P < 0.05$ vs pCMV6-vector group.

图5 *SF-1*基因对PI3K-AKT-mTOR信号通路相关蛋白质表达的影响

Fig.5 *SF-1* gene influenced the expression of proteins related to PI3K-AKT-mTOR signaling pathway

性反应快速检测细胞DNA复制活性。研究结果显示,与空载体组相比, SF-1过表达组细胞的增殖升高8倍(图4A和图4B)。流式细胞术检测上述两组细胞的周期,证实SF-1过表达促进了G₂期和S期的细胞数分别增加了2.3倍和2.4倍($P < 0.05$, 图4C和图4D)。该结果提示, SF-1过表达能够显著增加小鼠子宫内膜基质细胞的增殖。

2.4 SF-1对PI3K-AKT-mTOR信号通路中相关蛋白质水平的影响

为进一步分析SF-1过表达诱导小鼠子宫内膜基质细胞增殖的分子机制,实验分别采用PI3K抑制剂LY294002和mTOR信号通路抑制剂RAPA处理小鼠子宫内膜基质细胞。流式细胞术检测细胞活性,结果表明,50 $\mu\text{mol/L}$ 的LY294002和100 nmol/L 的RAPA处理细胞对其活性无显著影响。Western blot检测结果(图5)显示, SF-1过表达能够显著诱导PI3K/AKT和mTOR信号通路的激活。pAKT S473、pmTOR S2448、pp70S6K T389、pS6 S235/236和p4E-BP1 T37/46, pAKT S473、pmTOR S2448、pp70S6K T389、pS6 S235/236和p4E-BP1 T37/46蛋白质水平分别增高2.7倍、3.7倍、2.0倍、3.3倍、4.0倍。PI3K的阻断剂LY294002可抑制SF-1过表达

所诱导的pAKT S473、pmTOR S2448、pp70S6K T389、pS6 S235/236、p4E-BP1 T37/46蛋白质水平上调。mTOR抑制剂RAPA亦可显著抑制SF-1诱导的pmTOR S2448、pp70S6K T389、pS6 S235/236、p4E-BP1 T37/46蛋白质水平改变。结果提示,在小鼠子宫内膜基质细胞中过表达SF-1激活PI3K-AKT-mTOR信号通路并影响小鼠子宫内膜细胞增殖。

3 讨论

类固醇生成因子-1(SF-1)是在寻找与细胞色素P450(cytochrome P450, *CYPs*)基因启动子元件相互作用的转录因子时发现的一种孤儿核受体蛋白,在人类及多种动物组织中有表达^[12]。已有研究发现, SF-1对肾上腺和性腺的发生、下丘脑以及垂体的发生等均有重要的调节作用,且多种类固醇激素、维生素D、甲状腺激素和视黄醛衍生物等分子的合成受SF-1的调控^[13]。SF-1可以促进各种类固醇合成酶(steroid synthetase)的形成,包括STAR、CYP11A1、CYP17A1及CYP19A1等重要调控因子。SF-1通过结合到这些类固醇合成酶基因如芳香化酶基因启动子区——AGGTCA序列发挥生理功能^[14]。

研究显示,一些癌细胞中过表达SF-1会调节细

细胞增殖和肿瘤发展。下调SF-1时会抑制肿瘤细胞增殖,同时会导致相关腺体的发育受阻^[15]。这提示,SF-1与细胞的生长和增殖相关。SF-1在正常的未孕小鼠子宫内膜中表达极低,且受DNA甲基化调控。本研究通过对小鼠子宫内膜基质细胞转染SF-1基因表达质粒,分析SF-1过表达对细胞增殖的影响。结果显示,SF-1过表达可显著诱导小鼠子宫内膜基质细胞增殖标志物的表达以及增殖细胞比例的增加。这与已有研究报道SF-1表达升高与子宫内膜异位症中基质细胞异常增殖相关具有较好的一致性。子宫内膜基质细胞的增殖对正常妊娠的建立和维持起到了至关重要的作用,而SF-1过表达可显著诱导小鼠子宫内膜基质细胞增殖,说明SF-1可能对妊娠过程起到了一定的调节作用。此外,在宫颈和/或子宫内膜中的SF-1表达在子宫内膜癌、子宫内膜息肉及正常子宫内膜的生长中都起到了调节作用^[16-18]。这些研究结果均揭示了SF-1基因的表达可能与细胞增殖相关。

SF-1可在多种哺乳动物中调节雌激素和孕激素的合成^[19],而后者对胚胎植入、子宫内膜上皮细胞及基质细胞的增殖、子宫内膜基质细胞蜕膜化的形成都起到了非常重要的调节作用^[20]。亦有研究表明,PI3K-AKT信号通路也受到雌孕激素的调控,并进而影响细胞的增殖^[21]。我们的研究显示,子宫内膜基质细胞过表达SF-1伴随着pAKT的S473位点磷酸化激活。在PI3K抑制剂作用下,过表达SF-1诱导的pAKT磷酸化水平降低。这提示,SF-1和PI3K-AKT信号通路的激活参与了基质细胞增殖的调控。

AKT下游的mTOR是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其S2448位点可被前者激活,从而整合细胞外信号,参与体内多条信号通路,影响转录及蛋白质合成,并与细胞凋亡、自噬、生长增殖等过程均有重要联系。我们的研究显示,SF-1表达上调与mTOR(S2448)激活相关联,RAPA则可以抑制这种激活。这提示,SF-1过表达诱导的小鼠子宫内膜基质细胞增殖增加与mTOR信号通路激活相关。此外,我们发现,mTOR信号通路下游核糖体p70S6激酶,如S6K1及4E-BP1均可在SF-1过表达的条件下激活并被RAPA所抑制。这进一步证实,SF-1诱导的小鼠子宫内膜基质细胞增殖与mTOR信号通路激活相关。但是,作为一种孤儿核受体,SF-1通过与核受体辅活

化因子及其他的转录因子相互作用,共同诱导基因的转录,通常都是在转录水平发挥调节作用。本研究发现,过表达SF-1诱导的小鼠子宫内膜基质细胞增殖上调与mTOR信号通路激活相关,而该过程可能不是直接作用,而是一种间接调控,其机制有待进一步阐明。

参考文献 (References)

- 1 Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking A, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update* 2007; 13(2): 121-41.
- 2 Loke Y, King A, Burrows TD. Decidua in human implantation. *Hum Reprod* 1995; 10 Suppl 2: 14-21.
- 3 Das SK. Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation. *Reproduction* 2009; 137(6): 889-99.
- 4 Hanley N, Ball S, Clement-Jones M, Hagan D, Strachan T, Lindsay S, *et al.* Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech Dev* 1999; 87(1/2): 175-80.
- 5 Morohashi K, Omura T. Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB J* 1996; 10(14): 1569-77.
- 6 Sirianni R, Chimento A, Malivindi R, Mazzitelli I, Andò S, Pezzi V. Insulin-like growth factor-I, regulating aromatase expression through steroidogenic factor 1, supports estrogen-dependent tumor Leydig cell proliferation. *Cancer Res* 2007; 67(17): 8368-77.
- 7 Komada M, Takahashi M, Ikeda Y. Involvement of SF-1 in neurogenesis and neuronal migration in the developing neocortex. *Neurosci Lett* 2015; 600: 85-90.
- 8 Lin BC, Suzawa M, Blind RD, Tobias SC, Bulun SE, Scanlan TS, *et al.* Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endometrial cell proliferation. *Cancer Res* 2009; 69(13): 5415-23.
- 9 Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: More than just a road to PKB. *Biochem J* 2000; 346 Pt 3: 561-76.
- 10 Zhou X, Tan M, Hawthorne VS, Klos KS, Lan K-H, Yang Y, *et al.* Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res* 2004; 10(20): 6779-88.
- 11 Tan Y, Li M, Cox S, Davis MK, Tawfik O, Paria BC, *et al.* HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization via cyclin D3 during implantation. *Dev Biol* 2004; 265(1): 181-95.
- 12 Morohashi K, Honda S, Inomata Y, Handa H, Omura T. A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J Biol Chem* 1992; 267(25): 17913-9.
- 13 Hoivik EA, Lewis AE, Aumo L, Bakke M. Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Mol Cell Endocrinol* 2010; 315(1/2): 27-39.
- 14 Michael MD, Kilgore MW, Morohashi K-i, Simpson ER. Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the

- proximal promoter (P1) of the human aromatase P450 (CYP19) gene in the ovary. *J Biol Chem* 1995; 270(22): 13561-6.
- 15 Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, Arhatte M, De Moura J, Cavalli LR, *et al.* Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol* 2007; 21(12): 2968-87.
- 16 Bulun SE, Utsunomiya H, Lin Z, Yin P, Cheng Y-H, Pavone ME, *et al.* Steroidogenic factor-1 and endometriosis. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 300(1/2): 104-8.
- 17 Su T, Sui L. Expression and significance of p63, aromatase P450 and steroidogenic factor-1 in endometrial polyp. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2014; 49(8): 604-8.
- 18 Xue Q, Xu Y, Yang H, Zhang L, Shang J, Zeng C, *et al.* Methylation of a novel CpG island of intron 1 is associated with steroidogenic factor 1 expression in endometriotic stromal cells. *Reprod Sci* 2014; 21(3): 395-400.
- 19 Yazawa T, Inaoka Y, Okada R, Mizutani T, Yamazaki Y, Usami Y, *et al.* PPAR- γ coactivator-1 α regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with SF-1 and LRH-1. *Mol Endocrinol* 2010; 24(3): 485-96.
- 20 Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM, O'Malley BW. Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 56(1-6 Spec No): 67-77.
- 21 Atif F, Yousuf S, Stein DG. Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: Role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; 146: 62-73.

中国细胞生物学