

Rictor对小鼠基质细胞蜕膜化的影响及其在人自然流产子宫蜕膜组织中的表达

何立敏^{1,2} 李剑¹ 张悦¹ 刘学庆^{1*}

(¹重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学实验室, 教育部生殖与发育国际合作联合实验室, 重庆 400016;

²重庆医科大学附属第一医院第一分院心内科, 重庆 400015)

摘要 该研究探讨Rictor及SGK1对小鼠基质细胞蜕膜化的影响及其在人自然流产子宫蜕膜组织中的表达。分离和培养小鼠基质细胞, siRNA沉默小鼠基质细胞Rictor基因并人工诱导蜕膜化, 检测Rictor和SGK1的蛋白及mRNA表达情况, 并检测蜕膜化标志物*Dtprp* mRNA的水平; 此外, 过表达SGK1, 检测*Dtprp* mRNA的水平。选取妊娠8~10周无菌新鲜自然流产及正常人工流产的蜕膜组织标本作为实验研究组(自然流产组, $n=17$)及正常对照组(正常妊娠组, $n=34$); 分别用Western blot、免疫组织化学、Real-time PCR检测Rictor及SGK1的蛋白和mRNA表达水平。结果表明, 沉默Rictor基因后, Rictor及SGK1的蛋白和mRNA表达水平均显著降低, 同时蜕膜化指标*Dtprp* mRNA也显著降低, 而过表达SGK1后, 蜕膜化指标*Dtprp* mRNA较前升高且差异有统计学意义。与正常妊娠组相比, Rictor和SGK1的蛋白及mRNA表达水平在自然流产组明显降低。该研究得出, Rictor可通过影响SGK1的表达来抑制基质细胞蜕膜化; Rictor和SGK1在自然流产组的表达均显著低于正常组, 从而可能成为流产发生的原因之一。

关键词 基质细胞蜕膜化; 自然流产; 蜕膜组织; Rictor基因

The Effects of Rictor on Decidualization of Mouse Stromal Cells and Its Expression in Human Spontaneous Abortion Decidual Tissues

HE Limin^{1,2}, LI Jian¹, ZHANG Yue¹, LIU Xueqing^{1*}

(¹Laboratory of the Reproductive Biology, College of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Joint International Research Laboratory of Reproduction & Development, Chongqing 400016, China; ²Department of Cardiology, the First Branch Hospital of the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

Abstract This study was to investigate the effects of Rictor and SGK1 on decidualization of mouse stromal cells and their expression in human spontaneous abortion decidual tissues. Mouse stromal cells were isolated and cultured. siRNA silenced *Rictor* gene of mouse stromal cells and induced decidualization artificially. The protein and mRNA expressions of Rictor and SGK1 were detected by Western blot and Real-time PCR. The mRNA levels of *Dtprp*, a marker of decidualization, was detected by Real-time PCR. In addition, *SGK1* was overexpressed to detect *Dtprp* mRNA levels. The decidual tissue samples of sterile fresh spontaneous abortion and normal induced

收稿日期: 2020-11-22 接受日期: 2021-05-17

国家自然科学基金(批准号: 31801247)和重庆市自然科学基金重点项目(批准号: cstc2019jcyj-msxmX0478)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13368113542, E-mail: cqmu_liuxueqing@126.com

Received: November 22, 2020 Accepted: May 17, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31801247) and the Key Project of the Chongqing Natural Science Foundation (Grant No.cstc2019jcyj-msxmX0478)

*Corresponding author. Tel: +86-13368113542, E-mail: cqmu_liuxueqing@126.com

abortion at 8 to 10 weeks of gestation were selected as the experimental study group (spontaneous abortion group, $n=17$) and normal control group (normal pregnancy group, $n=34$). The protein and mRNA expression levels of Rictor and SGK1 were detected by Western blot, immunohistochemistry and Real-time PCR. The results showed that the protein and mRNA expression levels of Rictor and SGK1 were significantly decreased after silencing the *Rictor* gene, and the decidualization index *Dtprp* mRNA was also significantly decreased. However, after the overexpression of *SGK1*, the decidualization index *Dtprp* mRNA was increased compared with before, and the difference was statistically significant. Compared with the normal pregnancy group, the protein and mRNA expression levels of Rictor and SGK1 were significantly decreased in the spontaneous abortion group. In this study, Rictor inhibited stromal cell decidualization by affecting SGK1 expression. The expression of Rictor and SGK1 in the spontaneous abortion group was significantly lower than that in the normal group, which might be one of the causes of abortion.

Keywords stromal cell decidualization; spontaneous abortion; decidual tissue; *Rictor* gene

流产是指在胎儿具有存活能力之前而出现的自发的妊娠丢失, 主要包括自然流产和复发性流产, 其中约1%的夫妇发生过复发性流产, 约25%~50%的夫妇发生过至少一次的自然流产, 其病因众多且复杂, 目前的研究表明, 在基质细胞蜕膜化过程中一些分子异常的表达会导致流产的发生^[1-3]。基质细胞蜕膜化过程是胚胎植入后最重要的事件之一, 也为早期妊娠的维持和胎盘形成提供重要的营养物质和免疫环境^[4-7]。在此过程中, 基质细胞除了在孕酮(progesterone, P4)及雌二醇(estradiol, E2)的调节下发生蜕膜化之外, 同时也接受其他信号通路的调控, 例如哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路。该通路是细胞代谢、生长、增殖和存活的中枢调节剂, 其包括mTORC1和mTORC2两种不同的多蛋白复合物。mTORC1是与Raptor蛋白特异性结合的信号通路, 其作为细胞生长和代谢的主要调节剂已经被定义为许多通路中的上游信号, 也可调节细胞自噬和增殖^[8-10]。现有研究表明, mTORC2在各种生物过程中也起关键作用, 包括细胞存活、代谢和增殖, 并调控细胞骨架的重组和细胞迁移。Rictor作为mTORC2中一个重要的结合蛋白, 分子中包含多个结构域, 参与细胞增殖、生长、分化以及调节mTORC2信号及其下游靶基因, 如丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine protein kinase, AKT)^[8-9]。目前对Rictor的研究大多集中在肿瘤相关领域^[11-13]。有研究显示, Rictor作为血清和糖皮质激素调节蛋白激酶1(serum and glucocorticoid-regulated kinase 1, SGK1)的上游因子, 其对后者有重要的调控作用^[14-15]。本课题组前期研究发现, Rictor及SGK1在正常小鼠子宫内膜蜕膜化区呈高表达趋

势^[16], 据此推测Rictor基因参与子宫内膜基质细胞蜕膜化过程的调控。且已有的文献证实, Rictor调控的下游基因SGK1表达的动态平衡影响基质细胞蜕膜化和正常妊娠的维持^[17-18]。因此, 为了验证Rictor及SGK1基因是否参与基质细胞蜕膜化过程, 本课题组分离和培养了小鼠子宫内膜基质细胞, 沉默Rictor基因并进行人工诱导蜕膜化。同时为了探索Rictor及SGK1是否对自然流产有影响, 我们分析了自然流产和正常妊娠的子宫蜕膜组织中Rictor及SGK1的差异表达情况, 以期探明自然流产发生的原因打下一定的基础。

1 材料和方法

1.1 临床样本

收取2018年1月至2018年10月在重庆医科大学附属第一医院妇科门诊就诊并行刮宫术的患者子宫内膜蜕膜组织(8~10周, $n=51$), 其中自然流产蜕膜标本17例, 人工流产(正常妊娠)蜕膜标本34例。取材过程均由患者签署知情同意书, 并经重庆医科大学医学伦理委员会批准。两组患者年龄在18~35岁, 且年龄、身高、体重、孕周均无统计学差异(纳入标准: (1) 妊娠试验阳性; (2) 正常的月经周期; (3) 无遗传病史; (4) 无性传播疾病; (5) 无免疫缺陷; (6) 无内分泌疾病; (7) 无染色体异常; (8) 经超声检查子宫形态正常且胚胎大小与孕周相符)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠子宫内膜基质细胞(endometrial stromal cells, ESCs)分离、培养和鉴定 用D-Hanks溶液彻底洗涤离体PD4(假孕第四天)小鼠子宫组织。用无菌剪刀将组织剪碎后, 加入含有适量胰蛋白酶和中性

蛋白酶的HBSS溶液并置于4℃下消化2 h, 然后37℃下消化30 min。反复吹打组织以分离腔上皮细胞。1 000 r/min离心15 min后弃去上皮细胞。剩余的组织用HBSS冲洗2次, 加入含有0.15 mg/mL胶原酶I的HBSS中, 于37℃环境下消化30 min。将基质细胞通过70 μm尼龙过滤器过滤。1 000 r/min离心15 min后除去上清液, 洗涤基质细胞2次。将细胞重悬于含有20%炭吸附胎牛血清的DMEM/F-12培养基中, 以每板 2×10^5 个细胞的密度接种到6孔细胞培养板中, 置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养。

1.2.2 基质细胞鉴定方法 细胞培养长至60%~70%, 用冰甲醇在4℃环境下固定2 h, 4℃孵育一抗(兔抗小鼠Vimentin 1:1 000稀释, 武汉博士德生物工程有限公司)过夜。翌日, 细胞在常温下复温30 min, 使用PBS清洗5 min。在37℃环境下孵育二抗30 min(羊抗兔FITC 1:1 000稀释, 武汉博士德生物工程有限公司), 使用PBS清洗3次, 每次5 min。用DAPI复染细胞核1 min, PBS清洗5 min后, 于荧光显微镜下拍摄。并进行细胞计数及基质细胞纯度计算(计算公式为基质细胞纯度=Vimentin表达阳性细胞/计数细胞总数 $\times 100\%$)。

1.2.3 细胞转染和体外诱导蜕膜化 细胞培养至一定密度时, 特异性靶向沉默小鼠Rictor的siRNA(siRNA-752/940/3286, 50 nmol/L, 上海吉玛制药技术有限公司)以适当比例与Lipofectamine® 2000试剂混合。将混合物在室温下孵育5~10 min。将siRNA-脂质复合物滴入培养基中。吹打混匀后将细胞置于细胞培养箱中, 若6~8 h后观察到细胞毒性, 则除去复合物, 并向细胞中重新加入新鲜的培养基。

将SGK1过表达质粒载体(pCMV6-SGK1, 美国Origene公司)转化至感受态大肠杆菌(DH5α)中后制备菌液。取10 μL菌液加入至30 mL LB培养基(抗生素筛选标志物为卡那霉素)中, 摇菌16 h后, 用质粒提取试剂盒(美国OMEGA公司)提取质粒并检测DNA浓度。

为了研究Rictor的下调是否影响蜕膜功能的建立, 基质细胞先进行转染, 然后再加入含有10 nmol/L E2和1 μmol/L P4的新鲜培养基来人工诱导蜕膜化, 置于37℃、5% CO₂细胞培养箱培养48~72 h后换液。通过测量Dtpmp mRNA的水平来分析Rictor的下调对诱导蜕膜化的影响。再在转染siRNA后的细胞中加入pCMV6-SGK1与Lipofectamine® 3000的混合液进

行过表达SGK1, 处理48 h后人工诱导蜕膜化, 检测Dtpmp mRNA的水平。

1.2.4 人子宫蜕膜的收集、处理和保存 收集自然流产患者和正常妊娠要求行人工流产者的子宫蜕膜组织, 置于冰盒内, 术后1 h内带回实验室使用。生理盐水充分洗蜕膜组织, 尽量除去血块及血细胞, 分装后放入-80℃冰箱冻存。

1.2.5 免疫组化(immunohistochemistry) 蜕膜组织经4%多聚甲醛室温固定4 h后, 依次置于浓度为75%、85%、95%、100%的酒精梯度脱水, 再经由二甲苯透明、浸蜡、包埋后制备蜡块, 将蜡块置于切片机上连续切片, 厚度为4 μm, 贴片后经43℃过夜烤片备用。将切片用二甲苯脱蜡2次、浓度梯度酒精水化后, 滴加3% H₂O₂于组织上, 室温孵育15 min以消除内源性过氧化物酶。置于枸橼酸盐缓冲液中, 于微波炉高火沸腾, 转中低火15~18 min以暴露抗原, 室温冷却。加入山羊血清封闭液, 37℃封闭30 min后, 分别在4℃孵育anti-SGK1(兔抗小鼠单抗1:100稀释, 英国Abcam公司)、anti-Rictor(鼠抗小鼠单抗1:100稀释, 美国Sigma-Aldrich公司)过夜。充分清洗, 滴加生物素标记的二抗(羊抗兔/鼠IgG, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 37℃孵育30 min, PBS清洗3次, 每次5 min。滴加辣根过氧化物标记的链霉素亲和素, 37℃孵育30 min, 充分清洗后用DAB显色, 观察到适度深浅的棕黄色后终止反应并用苏木精复染, 常规脱水、透明后用中性树胶封片, 于显微镜照相系统采集图像分析。

1.2.6 免疫印迹(Western blot) 按照裂解液破碎法提取蜕膜组织蛋白, BCA法检测蛋白浓度, 加入5×SDS-PAGE裂解蛋白, 100℃变性10 min, -80℃保存备用。经SDS-PAGE恒压电泳, PVDF膜转膜后以5%脱脂奶粉于37℃封闭1 h, 再分别于4℃环境下孵育anti-SGK1(兔抗小鼠单抗1:1 000稀释, 英国Abcam公司)、Rictor(鼠抗小鼠单抗1:1 000稀释, 英国Abcam公司)过夜。用含有Tween20的PBS (PBST)溶液清洗3次(每次15 min)后, 加入HRP标记的二抗(山羊抗兔/鼠IgG, 武汉博士德生物工程有限公司), 37℃孵育60 min, PBST洗膜后ECL显影, 以β-actin(鼠抗小鼠单抗1:2 000稀释, 美国CST公司)为内参。采用Quantity One 4.6.2凝胶电泳分析软件进行图像分析。

1.2.7 Real-time PCR 将组织或细胞在RNA提取液Trizol中充分匀浆, 按照RNA提取试剂盒(日本

TaKaRa公司)操作步骤提取总RNA, 所提取RNA加入30 μL无酶灭菌水, 经核酸定量仪测定其浓度和纯度。将1 μg RNA按照TaKaRa逆转录试剂盒操作步骤行20 μL体系逆转录反应, 所得cDNA为模板后, 进行后续15 μL体系的PCR实验。PCR反应体系: 1.2 μL cDNA, 7.5μL TB GREEN, 5.1 μL无酶灭菌水, 正反引物各0.6 μL。反应条件为预变性95 °C 60 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40个循环。以β-actin为内部参照, 数据分析采用公式: 目的mRNA表达水平=2^{-ΔΔCt}。各基因引物序列见表1。

1.3 统计学分析

本研究所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS 20.0软件分析数据, 两组实验数据采用两独立样本t检验, 两组以上数据采用One-Way ANOVA进行分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Rictor对小鼠基质细胞蜕膜化的影响

2.1.1 基质细胞的鉴定结果 分离和培养小鼠基质细胞, 运用细胞免疫荧光技术检测小鼠基质细胞标志物波形蛋白, 鉴定结果显示小鼠子宫内膜基质细胞分离成功(图1), 纯度达到92%。

2.1.2 Rictor基因沉默后Rictor及SGK1的mRNA表达情况 在小鼠基质细胞中沉默Rictor基因后, Rictor及SGK1 mRNA表达水平平均降低, 且在siRNA-940片段组中明显降低(图2)。

2.1.3 Rictor基因沉默后Rictor及SGK1的蛋白表达情况 Western blot检测结果表明, 用3个siRNA分别沉默Rictor基因后, Rictor及SGK1蛋白表达均有降低, 其中siRNA-940组中降低最明显(图3)。

2.1.4 沉默Rictor基因对基质细胞蜕膜化的影响

表1 各基因引物序列

Table 1 Primer sequences of each gene

基因 Gene	物种 Species	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
SGK1	Human	Forward: CAA CAG CAC AAC ATC CAC CTT C Reverse: TAC AAG ACA GCT CCC AGG CAC
Rictor	Human	Forward: CTG AGG TTT CCC ATT TGC TGT C Reverse: GGT TGC TTT GGT GGT GTT G
β-actin	Human	Forward: TCC TAT GTG GGT GAC GAG GC Reverse: TAC ATG CCT GGG GTG TTG AAG GTC T
Dtprp	Mouse	Forward: AGC CAG AAA TCA CTG CCA CT Reverse: TGA TCC ATG CAC CCA TAA AA
SGK1	Mouse	Forward: AGC CTT TGG TGG AGT TAC C Reverse: CAC TGA GAG GAG GAT GTG C
Rictor	Mouse	Forward: TAC GGA TGC CTG TTC GTT Reverse: AGT TGA TGA GGT CGG AAG G
β-actin	Mouse	Forward: TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C Reverse: TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G

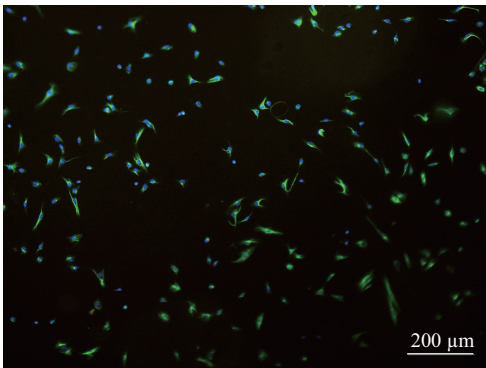


图1 免疫荧光对小鼠基质细胞鉴定的结果

Fig.1 The results of identification of mouse endometrium stromal cells by immunofluorescence

在培养基中加入10 nmol/L E2和1 μmol/L P4连续诱导72 h后, 开始出现蜕膜化的基质细胞, 细胞呈现多边形改变, 核增大明显, 胞体变圆变大, 蜕膜化的基质细胞胞体会随着诱导时间的延长进一步增大(图4B)。而沉默*Rictor*后再诱导基质细胞蜕膜化, 细胞形态呈现长梭形, 蜕膜化明显受阻(图4C和图4D); 同时用Real-time PCR检测了蜕膜化标志物*Dtprp* mRNA表达水平, 结果显示, 沉默*Rictor*基因后*Dtprp* mRNA表达明显下降, 说明蜕膜化被抑制(图5)。

2.1.5 过表达*SGK1*对基质细胞蜕膜化的影响 为了验证*Rictor*与*SGK1*的关系, 在siRNA-940转染基质细胞后, 换液继续转染pCMV6-*SGK1*。再以相同方法人工诱导蜕膜化后, Real-time PCR检测*Dtprp* mRNA的水平。结果显示, 沉默*Rictor*基因后*Dtprp* mRNA表达明显下降, 蜕膜化被抑制; 继续过表达*SGK1*后, 蜕膜化水平较前升高且差异有统计学意义(图6)。以上结果说明, *Rictor*可通过介导*SGK1*影响基质细胞蜕膜化。

2.2 Rictor、SGK1在人子宫内膜组织中的表达

2.2.1 免疫组化检测正常妊娠组织及自然流产组

Rictor、*SGK1*的表达 免疫组化结果表明, *Rictor*、*SGK1*在人子宫内膜组织中表达较高, 阳性表达呈棕色(图7和图8)。

2.2.2 Western blot检测正常妊娠子宫内膜蜕膜组织及自然流产组*SGK1*、*Rictor*的表达 Western blot结果显示, 与正常妊娠组织相比, *SGK1*、*Rictor*在自然流产组子宫内膜组织中的表达量明显降低($P<0.05$)(图9和图10)。

2.2.3 Real-time PCR检测正常妊娠组子宫内膜组织及自然流产组*Rictor*、*SGK1*的表达 Real-time-PCR结果显示, 与正常妊娠组织相比, *Rictor*及*SGK1*在自然流产组子宫内膜组织中的mRNA表达量均明显降低($P<0.05$)(图11和图12)。

3 讨论

蜕膜化是胚胎植入后最重要的事件之一, 它为早期妊娠的维持和胎盘形成提供重要的营养物质和免疫环境^[5-6], 子宫内膜基质细胞不断增殖分化, 在胚泡附着于子宫上皮细胞时分化为分泌性蜕膜细胞, 从而促进胚泡顺利嵌入子宫内膜, 这个过程主要

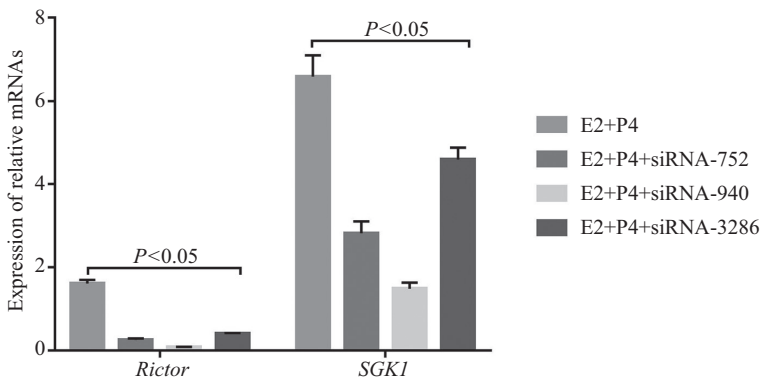


图2 Rictor沉默后Rictor及SGK1 mRNA的表达情况

Fig.2 The mRNA expression of Rictor and SGK1 after Rictor silencing

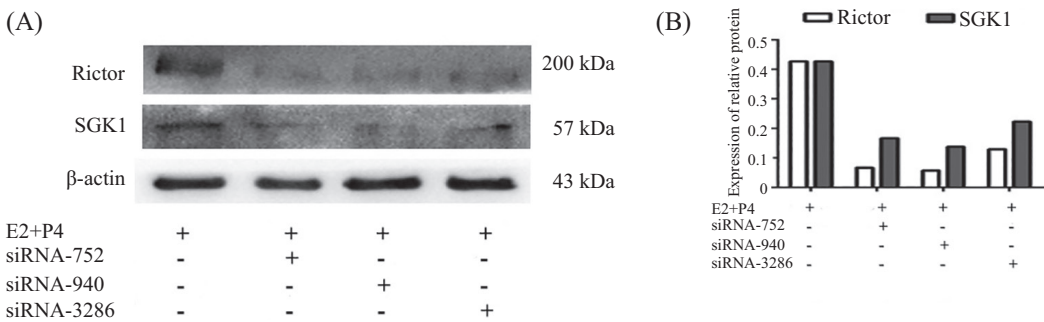
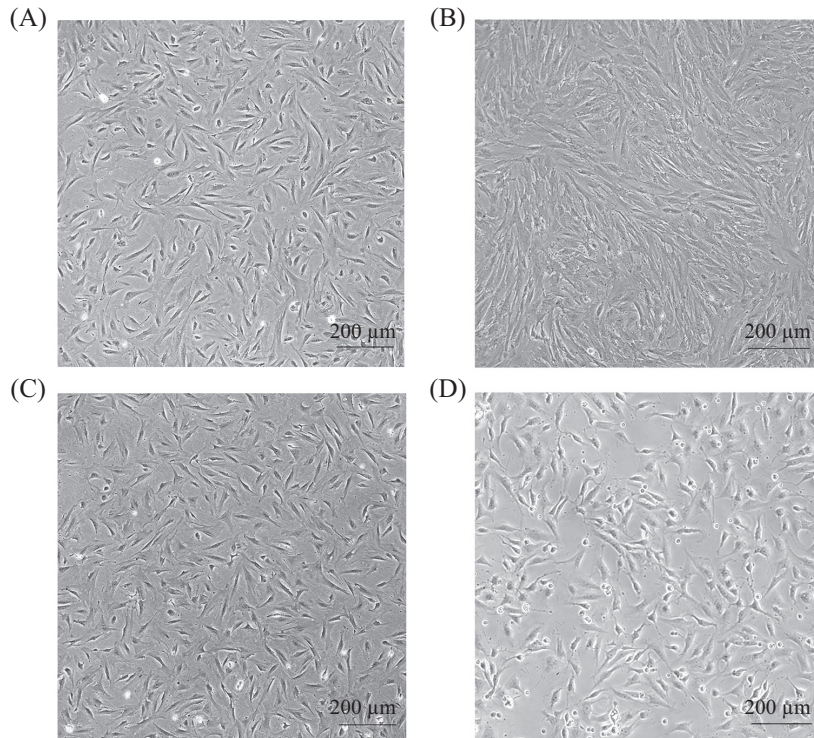


图3 Rictor沉默后Rictor及SGK1蛋白表达情况

Fig.3 The protein expression of Rictor and SGK1 after Rictor silencing



A: 小鼠子宫内膜基质细胞0天; B: 雌激素+孕酮诱导72 h; C: 沉默*Rictor*基因; D: 沉默*Rictor*基因+雌激素+孕酮诱导。

A: endometrial stromal cells for 0 days; B: E2+P4 induction for 72 h; C: silencing *Rictor* gene; D: *Rictor* gene silencing+E2+P4 induction.

图4 小鼠子宫内膜基质细胞生长、形态变化的结果

Fig.4 The results of growth and morphologic changes of mouse endometrial stromal cells

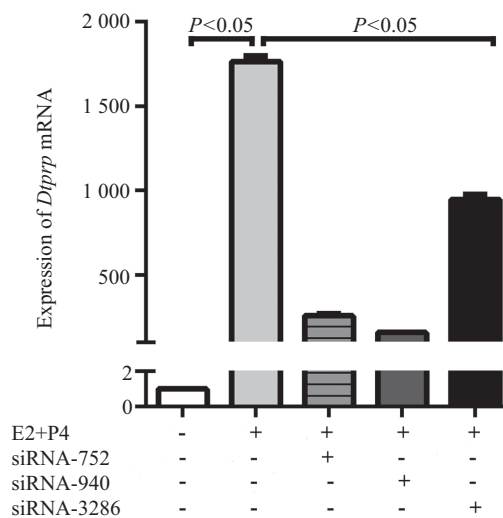


图5 *Rictor*沉默后*Dtprp* mRNA的表达情况

Fig.5 The mRNA expression of *Dtprp* after *Rictor* silencing

由P4诱导^[6,19]。子宫内膜基质细胞蜕膜化和蜕膜细胞的维持对于成功的妊娠至关重要。

本课题组前期研究发现, *Rictor*在正常小鼠子宫内膜蜕膜化区呈高表达趋势, 并通过建立*Rictor*基因敲除模型, 发现子宫内膜容受性受损, 从而导致

胚胎着床失败^[16], 但是*Rictor*对于子宫内膜蜕膜化以及之后的蜕膜细胞的维持是否有影响, 是否对流产有影响则尚不明确。本实验结果表明, 沉默*Rictor*基因后, 蜕膜化标志物*Dtprp* mRNA水平与正常对照组相比明显下降, 差异有统计学意义, 这说明*Rictor*

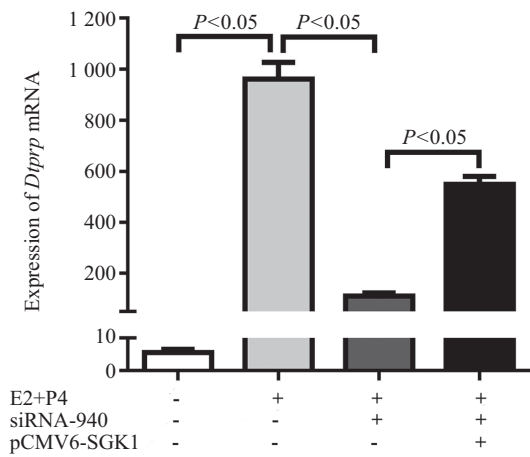
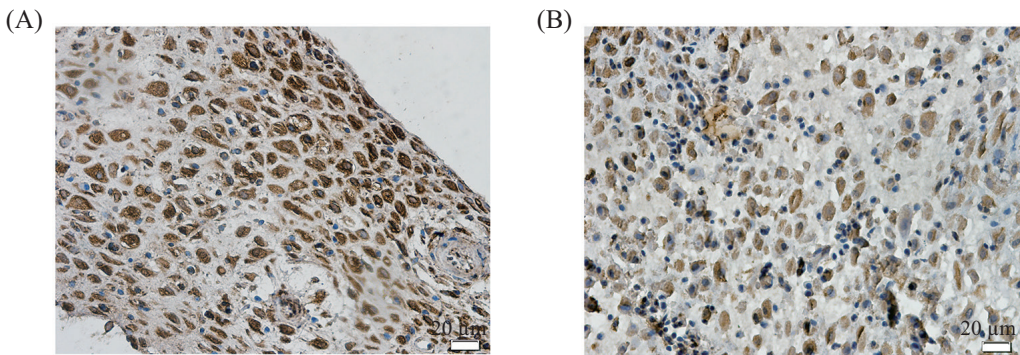


图6 Rictor沉默并过表达SGK1后Dtrp mRNA的表达情况

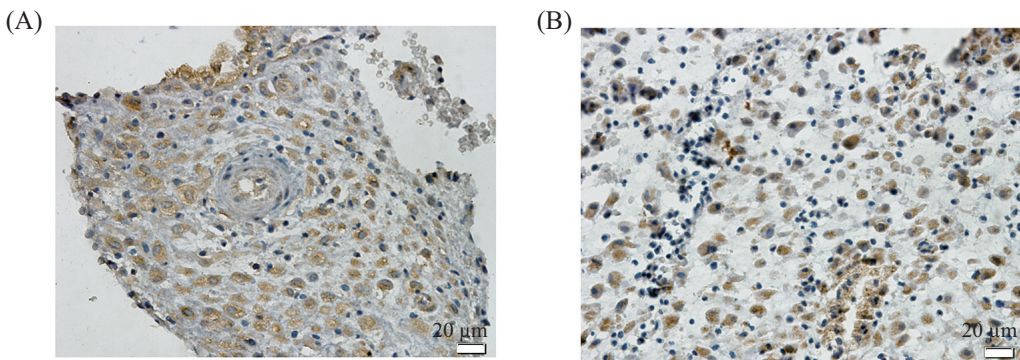
Fig.6 The mRNA expression of *Dtrp* after *Rictor* silencing and *SGK1* overexpression



A: 正常妊娠组; B: 自然流产组。
A: normal pregnancy group; B: spontaneous abortion group.

图7 免疫组化检测人子宫内膜蜕膜组织中Rictor的部分表达结果

Fig.7 The expression of *Rictor* in human endometrial decidual tissue detected by immunohistochemical staining



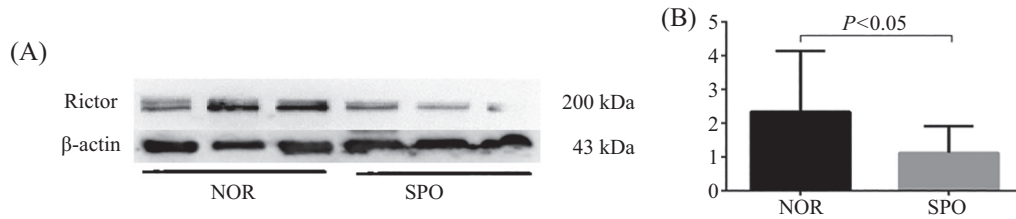
A: 正常妊娠组; B: 自然流产组。
A: normal pregnancy group; B: spontaneous abortion group.

图8 免疫组化检测人子宫内膜蜕膜组织中SGK1的部分表达结果

Fig.8 The expression of *SGK1* in human endometrial decidual tissue detected by immunohistochemical staining

基因的表达下调会抑制基质细胞蜕膜化。继续过表达SGK1后,蜕膜化水平较前升高且差异有统计学意义。据此可以推断, Rictor可通过介导SGK1影响基质细胞蜕膜化。由于Rictor/mTORC2对于细胞的存

活、代谢、增殖和细胞骨架稳定性具有重要作用,而细胞的这些作用对于基质细胞蜕膜化具有重要意义^[20-22]。已有文献报道SGK1位于mTORC2的下游,参与调节细胞增殖、凋亡及离子通道^[21-22]。已有研

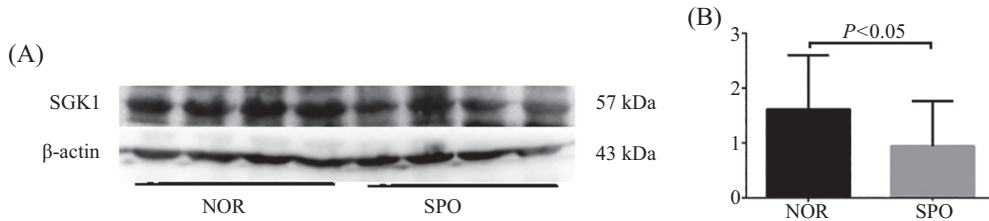


NOR: 正常妊娠组; SPO: 自然流产组。

NOR: normal pregnancy group; SPO: spontaneous abortion group.

图9 Western blot检测人子宫内膜蜕膜组织中Rictor的部分表达结果

Fig.9 The expressions of Rictor protein in human endometrial decidual tissue detected by Western blot

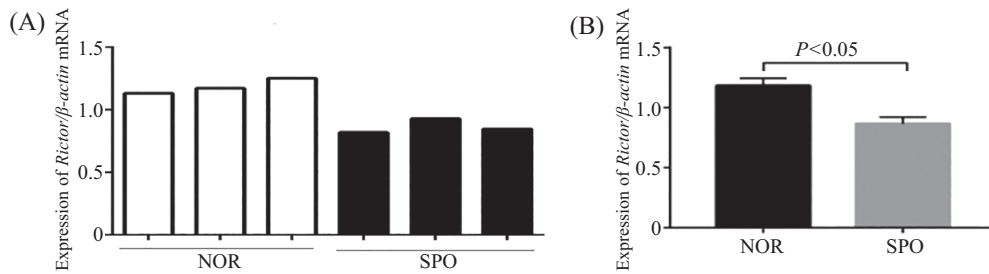


NOR: 正常妊娠组; SPO: 自然流产组。

NOR: normal pregnancy group; SPO: spontaneous abortion group.

图10 Western blot检测人子宫内膜蜕膜组织中SGK1的部分表达结果

Fig.10 The expressions of SGK1 protein in human endometrial decidual tissue detected by Western blot

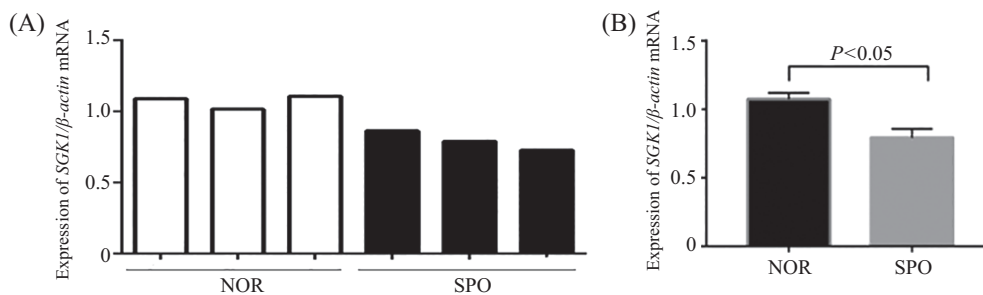


NOR: 正常妊娠组; SPO: 自然流产组。

NOR: normal pregnancy group; SPO: spontaneous abortion group.

图11 Real-time PCR检测人子宫内膜蜕膜组织中Rictor mRNA的部分表达结果

Fig.11 The expressions of Rictor mRNA in human endometrial decidual tissue detected by Real-time PCR



NOR: 正常妊娠组; SPO: 自然流产组。

NOR: normal pregnancy group; SPO: spontaneous abortion group.

图12 Real-time PCR检测人子宫内膜蜕膜组织中SGK1 mRNA的部分表达结果

Fig.12 The expressions of SGK1 mRNA in human endometrial decidual tissue detected by Real-time PCR

究表明, 孕鼠蜕膜中缺乏SGK1会引发一系列类似于人类流产的病理事件, 包括子宫出血、早发性生长限制和胎儿死亡^[5]。因此, 沉默Rictor基因后同时检

测了SGK1基因的表达, 发现与对照组相比, 其有明显的表达下调。这提示, 沉默Rictor所致的基质细胞蜕膜化异常可导致不良妊娠的结局。

子宫内膜基质细胞蜕膜化受损会导致自然流产发生^[5],那么Rictor的异常表达是否会与人的自然流产有关呢?我们进一步检测了人正常妊娠和自然流产子宫内膜蜕膜组织中Rictor、SGK1的表达水平,结果表明,人自然流产组蜕膜组织中Rictor、SGK1的蛋白和mRNA表达水平明显低于正常妊娠对照组。据文献报道,SGK1在不孕症女性黄体中期的子宫内膜中表达相对于正常妇女显著上调,在反复流产或早期流产的女性子宫内膜中表达相对于正常妇女显著下调^[5-6,17-18],说明SGK1的表达下降会导致流产发生,这与本研究的结果一致。而在流产的蜕膜组织中Rictor的表达下调提示Rictor基因可影响蜕膜组织的功能导致流产的发生。但Rictor/mTORC2是否通过调控SGK1影响正常的妊娠过程,还有待进一步证实。

综上所述,Rictor及SGK1基因在小鼠子宫内膜基质细胞中表达,有利于基质细胞蜕膜化的进行,而在人自然流产蜕膜组织中低表达,说明其表达降低所致的基质细胞蜕膜化异常可能是导致流产的原因之一。

参考文献 (References)

- [1] RAI R, REGAN L. Recurrent miscarriage [J]. Lancet, 2006, 368(9535): 601-11.
- [2] HOMER H A. Modern management of recurrent miscarriage [J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2019, 59(1): 36-44.
- [3] DEVAL A J, COOMARASAMY A. Sporadic pregnancy loss and recurrent miscarriage [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2020, 69: 30-9.
- [4] RAMATHAL C Y, BAGCHI I C, TAYLOR R N, et al. Endometrial decidualization: of mice and men [J]. Semin Reprod Med, 2010, 28(1): 17-26.
- [5] SALKER M S, CHRISTIAN M, STEEL J H, et al. Deregulation of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 in the endometrium causes reproductive failure [J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1509-13.
- [6] LOU Y, HU M, MAO L, et al. Involvement of serum glucocorticoid-regulated kinase 1 in reproductive success [J]. FASEB J, 2017, 31(2): 447-56.
- [7] SANG Y, LI Y, XU L, et al. Regulatory mechanisms of endometrial decidualization and pregnancy-related diseases [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2020, 52(2): 105-15.
- [8] LAPLANTE M, SABATINI D M. mTOR signaling at a glance [J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 20): 3589-94.
- [9] SAXTON R A, SABATINI D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease [J]. Cell, 2017, 168(6): 960-76.
- [10] LIU G, SABATINI D. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(4): 183-203.
- [11] ZOU Z, CHEN J, YANG J, et al. Targeted inhibition of Rictor/mTORC2 in cancer treatment: a new era after rapamycin [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2016, 16(4): 288-304.
- [12] GKOUNTAKOS A, PILOTTO S, MAFFICINI A, et al. Unmasking the impact of Rictor in cancer: novel insights of mTORC2 complex [J]. Carcinogenesis, 2018, 39(8): 971-80.
- [13] HUA H, KONG Q, ZHANG H, et al. Targeting mTOR for cancer therapy [J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 71.
- [14] GAO D, WAN L, INUZUKA H, et al. Rictor forms a complex with Cullin-1 to promote SGK1 ubiquitination and destruction [J]. Mol Cell, 2010, 39(5): 797-808.
- [15] GAO D, WAN L, WEI W. Phosphorylation of Rictor at Thr1135 impairs the Rictor/Cullin-1 complex to ubiquitinate SGK1 [J]. Protein Cell, 2010, 1(10): 881-5.
- [16] 文乙先, 耿艳清, 张悦, 等. Rictor/mTORC2在小鼠胚胎植入中的作用[J]. 重庆医科大学学报(WEN Y X, GENG Y Q, ZHANG Y, et al. Role of Rictor/mTORC2 in mouse embryo implantation [J]. J Chongqing Med Univ), 2019, 44(6): 722-7.
- [17] FISHER S J, GIUDICE L C. SGK1: a fine balancing act for human pregnancy [J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1348-9.
- [18] 楼毅云. 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶1在早期自然流产中的机制研究[D]. 杭州: 浙江大学(LOU Y Y. Molecular mechanism of endometrial serum and glucocorticoid regulated kinase 1 in early pregnancy loss [D]. Hanzhou: ZheJiang University), 2017.
- [19] TEPEKOY F, AKKOYUNLU G, DEMIR R. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation [J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32(3): 337-46.
- [20] SHIOTA C, WOO J T, LINDNER J, et al. Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability [J]. Dev Cell, 2006, 11(4): 583-9.
- [21] LANG F, SHUMILINA E. Regulation of ion channels by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 [J]. FASEB J, 2013, 27(1): 3-12.
- [22] DI CRISTOFANO A. SGK1: the dark side of PI3K signaling [J]. Curr Top Dev Biol, 2017, 123: 49-71.