

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000736

血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶-1 和缺氧
在子痫前期发病作用的研究

战玉峰,董晓静,张雪蕊,任 艳

(重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010)

【摘要】目的:研究血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶-1 (serum and glucocorticoids-inducible kinase-1, SGK1) 在子痫前期胎盘组织中的分布和表达,以及缺氧对胎盘滋养细胞 SGK1 表达的影响。**方法:**选择 2012 年 12 月至 2013 年 11 月在重庆医科大学附属第二医院剖宫产分娩的 50 例子痫前期孕妇为研究对象,其中子痫前期轻度组 25 例,子痫前期重度组 25 例,以同期行择期性剖宫产术的 25 例正常孕妇为对照组。免疫组化检测 SGK1 在胎盘组织的分布及表达,Western blot 检测 SGK1 在胎盘组织蛋白水平的表达。在常氧条件下(21% O₂、5% CO₂)和缺氧条件下(1% O₂、5% CO₂)培养 HTR-8/SVneo 滋养层细胞,Western blot 检测 SGK1 蛋白的表达。**结果:**免疫组化结果表明子痫前期轻度组、重度组 SGK1 的蛋白表达量均较对照组明显增加($P=0.000$),子痫前期重度组 SGK1 的蛋白表达量较子痫前期轻度组明显增加($P=0.028$)。Western blot 结果表明子痫前期轻度组、重度组 SGK1 的蛋白表达量均较对照组明显增加($P=0.000$),子痫前期重度组 SGK1 的蛋白表达量较子痫前期轻度组明显增加($P=0.000$)。Masson 染色结果显示子痫前期轻度组、重度组的纤维化率均较对照组明显增加($P=0.000$),子痫前期重度组纤维化率较子痫前期轻度组明显增加($P=0.000$)。细胞实验部分:Western blot 结果表明缺氧组 SGK1 的蛋白表达量较常氧组明显增加($P=0.000$);缺氧组 CTGF 的蛋白表达量较常氧组明显增加($P=0.001$)。Masson 染色结果显示缺氧组纤维化率较常氧组明显增加($P=0.000$)。**结论:**SGK1 在子痫前期胎盘组织表达明显升高,提示 SGK1 可能在子痫前期的发病中发挥重要作用,缺氧通过刺激 SGK1 表达升高,参与子痫前期的发生。

【关键词】子痫前期;血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶-1;缺氧;胎盘屏障

【中图分类号】R714.24*6

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-01-26

Expression of protein kinase SGK1 in preeclampsia placenta tissue and
effects of hypoxia on the expression of SGK1 in placental trophoblast cells

Zhan Yufeng, Dong Xiaojing, Zhang Xuerui, Ren Yan

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objectives: To study the expression and distribution of SGK1 in preeclampsia placenta tissues, and to explore the effects of hypoxia on the expression of SGK1 in placental trophoblast cells. **Methods:** Twenty-five cases of normal pregnancies, mild preeclampsia and severe preeclampsia were chosen, and all of these cases were delivered by cesarean section in The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from 2012 December to 2013 November. The expression level of SGK1 in placenta was detected by immunohistochemistry and Western blot. HTR-8/SVneo cells were cultured in normoxia conditions (21% O₂, 5% CO₂) and hypoxic conditions (1% O₂, 5% CO₂). The expression level of SGK1 in human trophoblast cells was detected by Western blot. **Results:** Immunohistochemistry revealed that the expression level of SGK1 in mild preeclampsia group and severe preeclampsia group was higher than that in control group ($P=0.000$). The expression level of SGK1 in severe preeclampsia group was higher than that in mild pre-eclampsia group ($P=0.028$). Western blot revealed that the protein expression level of SGK1 in mild pre-eclampsia group and severe preeclampsia group was higher than that in control group ($P=0.000$). The protein expression level of SGK1 in severe preeclampsia was higher than that in mild pre-eclampsia group ($P=0.000$). Masson staining revealed that normal placenta tissue existed fibrosis,

作者介绍:战玉峰, Email: zhanyufeng01@163.com,

研究方向:围产期并发症。

通信作者:董晓静, Email: xfdactor@163.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150805.1543.010.html>

(2015-08-05)

and the extent of fibrosis was increased in mild pre-eclampsia group and severe preeclampsia group ($P=0.000$). The extent of fibrosis in severe preeclampsia was higher than mild pre-eclampsia group ($P=0.000$). *In vitro*, Western blot revealed that hypoxia increased SGK1 and CTGF transcription in HTR-8/SVneo cells

($P=0.000$; $P=0.001$), and masson staining revealed that hypoxia increased the production of collagen fibers ($P=0.000$). **Conclusion:** Expression of SGK1 in preeclampsia placenta tissue is significantly increased, suggesting that SGK1 may play an important role in the pathogenesis of preeclampsia, hypoxia increased by stimulating the expression of SGK1, involved in preeclampsia.

【Key words】preeclampsia; serum and glucocorticoids-inducible kinase-1; hypoxia; placental barrier

子痫前期是妊娠期特发且严重的并发症,我国发病率约为 9%,主要以妊娠 20 周后高血压、蛋白尿为主要特征,并伴有全身多器官功能损害或功能衰竭,严重者可发生抽搐、昏迷,甚至死亡,是导致孕产妇和围生儿死亡的重要原因之一。目前学者倾向于认同胎盘滋养层浅着床学说,但子痫前期具体发病机制至今仍不明确^[1-2]。

血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶-1 (serum and glucocorticoids-inducible kinase-1, SGK1) 是新近发现的一种快速诱导型蛋白激酶,是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的成员之一,与蛋白激酶有极高的同源性。SGK1 存在于人体多种组织细胞中,在胰腺组织中表达量最高,其次是胎盘、肾脏和肺^[3-4]。SGK1 生理功能丰富,参与了人体许多重要的生理过程,如:细胞增殖、凋亡调节、离子通道活化,并可能在糖尿病肾病、肝硬化、肾小球肾炎、肺纤维化及纤维性胰腺炎等疾病中发挥重要作用。SGK1 对多种外界因素刺激反应敏感,从酶活性、转录水平和亚细胞分布等方面受到调控,并在多种纤维化疾病中体现了其重要性^[5-6],SGK1 是否参与胎盘纤维化从而影响胎盘屏障物质交换,进一步加重子痫前期呢?

本文旨在探讨 SGK1 在子痫前期胎盘组织中的表达及其作用,并探讨缺氧对 SGK1 促进纤维化的影响,为子痫前期的防治提供线索。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

兔抗人 SGK1 抗体(abcam 公司),羊抗兔二抗(abcam 公司),兔抗人 GAPDH 抗体(上海生工公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司),蛋白提取试剂盒及 ECL 发光试剂盒(凯基生物公司)。免疫组化染色试剂盒及 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥公司),RPMI-1640 培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(Gibco 公司)。电泳仪、转膜仪、化学发光成像仪(美国 Bio-Rad 公司),超净工作台,三气培养箱,细胞培养恒温箱,倒置显微镜,离心机,正置显微镜。

1.2 对象和分组

选择 2012 年 12 月至 2013 年 11 月在重庆医科大学附属第二医院产科住院剖宫产分娩的 50 例子痫前期孕妇为研究对象,其中子痫前期重度组 25 例,子痫前期轻度组 25 例。以同期行择期剖宫产术的 25 例正常孕妇为对照组,各组孕妇年龄、孕周、产次比较,差异均无统计学意义。所有研究对象均为单胎、剖宫产分娩,所有病例均排除其他产科并发症及内科合并症,所有研究对象均签署知情同意书。

1.3 方法

1.3.1 标本的收集和处理 胎盘娩出后,立即于胎盘母体面分四象限中心取胎盘无钙化区组织约 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 大小, 4°C 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)反复冲洗,去除血液,一部分组织固定在 4% 多聚甲醛,另一部分组织用灭酶灭菌的锡箔纸包好放入冻存管后,迅速放入液氮中保存备用。

1.3.2 免疫组化方法检测胎盘组织 SGK1 的定位和表达 切片脱蜡后,操作按试剂盒步骤进行(SP 法)。兔抗人 SGK1 多克隆抗体用 PBS 稀释至 1:500, PBS 代替一抗作为阴性对照,阳性结果为细胞内出现棕黄色着色。

1.3.3 Masson 染色检测胎盘组织胶原纤维沉积 Masson 染色步骤参照试剂盒说明书进行操作。

1.3.4 Western blot 方法检测胎盘组织 SGK1 蛋白的表达 组织裂解、离心后得蛋白样品,测蛋白浓度,电泳后转移至 PVDF 膜,5% 牛奶封闭,兔抗人 SGK1 多克隆抗体(1:1 000 稀释)及内参 GAPDH(1:800 稀释) 4°C 孵育过夜。羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000 稀释) 37°C 孵育 1 h,最后曝光、显影、成像。用 Quantity One 4.62 版图像分析软件进行分析。

1.4 细胞培养与实验分组

1.4.1 培养条件 HTR-8/SVneo 滋养层细胞系由加拿大女王大学 Charles H. Graham 教授馈赠。用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 37°C 、5% CO_2 培养箱培养,细胞贴壁生长,每 3 d 传代 1 次。

1.4.2 细胞分组、缺氧培养 细胞生长汇合度达 80% 后,胰酶消化,吹打均匀,离心后用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基重悬,细胞计数,接种于 6 孔板(5×10^5 个/孔),接种于 24 孔板(5×10^4 个/孔)。细胞分成 4 组,6 孔板的细胞一组置于三气培养箱中(1% O_2 、5% CO_2 , 37°C)培养,6 孔板另一组细胞置于常氧培养箱中(21% O_2 、5% CO_2 , 37°C)培养,两组细胞均培养 48 h。24 孔板细胞一组置于三气培养箱中(1% O_2 、5%

CO₂, 37 ℃) 培养, 24 孔板另一组细胞置于常氧培养箱中 (21% O₂, 5% CO₂, 37 ℃) 培养, 两组细胞均培养 7 d。

1.4.3 Western blot 方法检测 SGK1 在常氧条件和缺氧条件下培养的 HTR-8/SVneo 滋养层细胞中蛋白的表达 取出常氧条件和缺氧条件下培养 48 h 的 6 孔板细胞, 弃培养液, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 加入细胞裂解液, 4 ℃ 12 000 r/min, 离心 15 min, 取上清液, 测蛋白浓度, 其余步骤按说明书操作步骤进行。

1.4.4 Masson 染色检测 HTR-8/SVneo 滋养层细胞纤维沉积 取出常氧条件和缺氧条件下培养 7 d 的 24 孔板细胞, Masson 染色步骤参照试剂盒说明书进行操作。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 所得数值均以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 2 组间比较采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SGK1 在子痫前期及正常孕妇胎盘组织中的定位表达

SGK1 在胎盘合体滋养细胞、内皮细胞和一些基质细胞的胞质中均有阳性表达, 但主要表达在合体滋养细胞胞质中。子痫前期轻度组着色较浅, 淡棕色染色; 子痫前期重度组呈棕黄色浓染。对照组、子痫前期轻度组、子痫前期重度组的平均吸光度值分别为: 0.360 ± 0.027 、 0.740 ± 0.035 、 0.140 ± 0.142 。3 组 SGK1 蛋白表达水平的差异有统计学意义 ($F=103.326$, $P=0.000$)。两两比较结果显示子痫前期轻度组、重度组 SGK1 的蛋白表达量均较对照组明显增加 ($P=0.000$), 子痫前期重度组 SGK1 的蛋白表达量较子痫前期轻度组明显增加 ($P=0.028$), 见图 1。

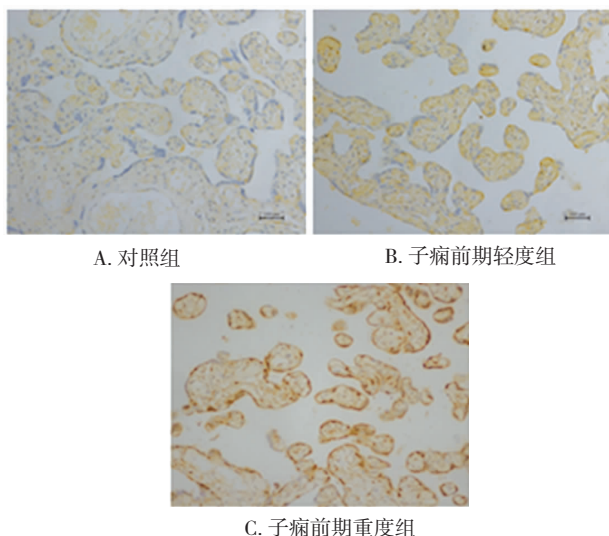


图 1 免疫组化检测 SGK1 蛋白在各组胎盘组织中的表达 (20 ×)

Fig.1 Expression of SGK1 protein in placenta in every group detected by immunohistochemistry (20 ×)

2.2 SGK1 在子痫前期及正常孕妇胎盘组织中的定量表达

Western blot 结果显示, 以蛋白 Marker 为参照, 各组均在 68 kD 处有明显条带, 说明各组均有 SGK1 的表达。以 GAPDH 作为内参, GAPDH 表达位于 38 kD 处。采用 Quantity One 4.6.2 软件定量分析各组 SGK1 的蛋白表达水平。对照组、子痫前期轻度组、子痫前期重度组分别为: 0.260 ± 0.007 、 0.550 ± 0.020 、 0.750 ± 0.029 。方差分析 3 组 SGK1 蛋白表达水平的差异, 差异有统计学意义 ($F=411.141$, $P=0.000$)。两两比较结果显示子痫前期轻度组、重度组 SGK1 的蛋白表达量均较对照组明显增加 ($P=0.000$), 子痫前期重度组 SGK1 的蛋白表达量较子痫前期轻度组明显增加 ($P=0.000$)。见图 2。

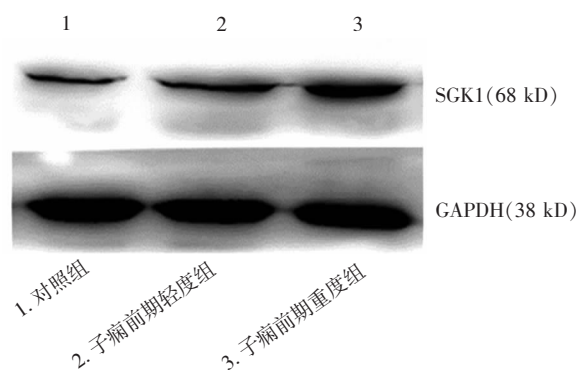


图 2 Western blot 检测 SGK1 蛋白在各组胎盘组织中的表达
Fig.2 Expression of SGK1 protein in placenta in every group detected by Western blot

2.3 Masson 染色检测胎盘组织纤维

Masson 染色结果显示对照组蓝色着色较少, 子痫前期重度组蓝色着色较多。对照组、子痫前期轻度组、子痫前期重度组纤维化率分别为: $(37.5 \pm 1.56)\%$ 、 $(57.01 \pm 1.60)\%$ 、 $(77.53 \pm 1.98)\%$ 。方差分析 3 组纤维化率的差异, 差异有统计学意义 ($F=401.135$, $P=0.000$)。两两比较结果显示子痫前期轻度组、重度组纤维化率均较对照组明显增加 ($P=0.000$), 子痫前期重度组纤维化率较子痫前期轻度组明显增加 ($P=0.000$)。见图 3。

2.4 SGK1、滋养细胞结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 在胎盘滋养细胞中的定量表达

Western blot 结果显示, 以蛋白 Marker 为参照, 2 组均在 68、36 kD 处有明显条带, 说明 2 组均有 SGK1、CTGF 的表达。以 GAPDH 作为内参, 采用 Quantity One 4.6.2 软件定量分析两组 SGK1、CTGF 的蛋白表达水平。SGK1 在常氧组、缺氧组分别为: 0.31 ± 0.02 、 0.71 ± 0.03 , *t* 检验分析 2 组 SGK1 蛋白表达水平的差异, 差异有统计学意义 ($t=-19.215$, $P=0.000$), 缺氧组 SGK1 的蛋白表达量较常氧组明显增加。CTGF 在常氧组、缺氧组分别为: 0.206 ± 0.025 、 0.42 ± 0.03 , *t* 检验分析 2 组 CTGF 蛋白表达水平的差异, 差异有统计学意义 ($t=-9.481$,

$P=0.001$), 缺氧组 CTGF 的蛋白表达量较常氧组明显增加。见图 4。

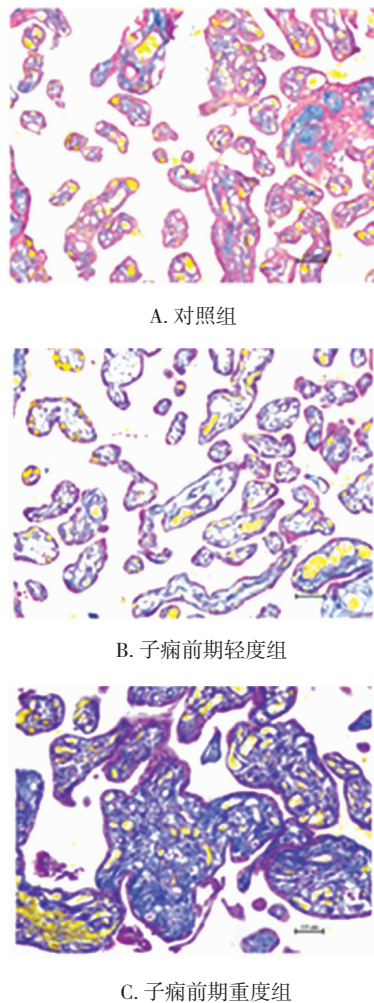


图 3 Masson 染色检测胶原纤维在各组胎盘组织中的沉积 (20 ×)
Fig.3 The accumulation of collagen fibers in placenta in every group detected by Masson trichrome staining (20 ×)

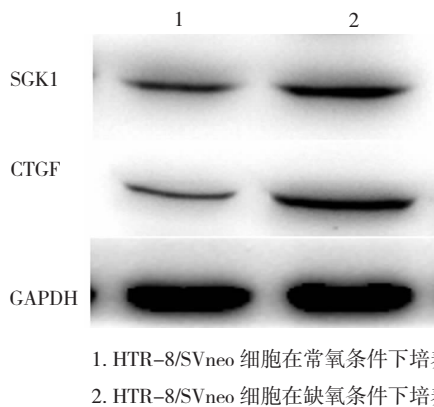


图 4 Western blot 检测 SGK1 蛋白在不同条件下培养的 HTR-8/SVneo 细胞中的表达
Fig.4 Expression of SGK1 protein in HTR-8/SVneo cells cultured in different conditions detected by Western blot

2.5 Masson 染色检测胎盘滋养细胞纤维化

Masson 染色结果显示常氧组蓝色着色较少, 缺氧组蓝色着色较多。常氧组、缺氧组分别为: $(46.2 \pm 1.49)\%$ 、 $(81.53 \pm 1.42)\%$, t 检验分析 2 组纤维化率的差异, 差异有统计学意义 ($t=-29.605, P=0.000$), 缺氧组纤维化率较常氧组明显增加。见图 5。

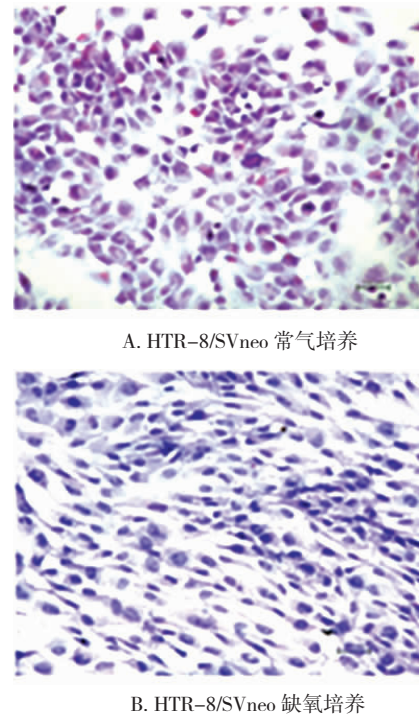


图 5 Masson 染色检测胶原纤维在不同条件下培养的 HTR-8/SVneo 细胞中的沉积 (20 ×)

Fig.5 Collagen fibers accumulation detected by Masson trichrome staining (20 ×)

3 讨 论

子痫前期是严重威胁孕产妇和围产儿健康的妊娠期并发症, 其病因和发病机制至今仍不明确, 该病造成母体全身多器官损伤, 出现心脏、肝脏、肾脏等器官的衰竭, 同时导致胎儿宫内生长受限、胎儿宫内窘迫、胎盘早剥、胎死宫内等严重不良后果^[7]。临床治疗长期以来以“对症治疗结合终止妊娠”为主, 治疗效果差。子痫前期发病机制主要有以下几个学说: ①滋养细胞侵袭不足, 胎盘浅着床; ②血管内皮损伤; ③免疫调节功能异常; ④炎症反应; ⑤遗传因素。其中胎盘形成因素在子痫前期发病中占主导地位^[8-9]。胎盘是连接母胎的重要器官, 是维持胎

儿在宫内营养、发育的重要器官,胎盘结构和功能异常会导致多种妊娠合并症的发生。胎盘屏障是母胎之间进行气体和物质交换的场所,胎盘屏障异常,影响母胎之间的物质交换,导致多种妊娠合并症的发生,增加围生期发病率。

本研究通过检测子痫前期胎盘组织中 SGK1 表达、子痫前期胎盘组织纤维化程度以及缺氧对胎盘滋养细胞的影响,初步探讨了 SGK1 在子痫前期发生过程中的作用。本研究发现,SGK1 蛋白主要表达在合体滋养细胞细胞质中,且子痫前期胎盘组织 SGK1 表达量明显高于对照组,同时 Western blot 结果显示子痫前期胎盘组织 SGK1 蛋白表达水平明显高于对照组。Masson 染色结果显示子痫前期胎盘大量胶原蛋白沉积。本研究结果表明子痫前期胎盘组织发生明显纤维化,且 SGK1 在子痫前期胎盘组织表达明显增高,近年来研究发现 SGK1 作为纤维化因子参与多种纤维化疾病,进一步表明 SGK1 也参与子痫前期纤维化的进程。胎盘纤维化表现为绒毛间隙、胎盘表面、绒毛板出现纤维蛋白沉积,基底膜增厚,绒毛间隙和绒毛血管是母胎之间进行气体和物质交换的场所,胎盘绒毛间隙内纤维素沉积可导致流经绒毛间隙的母体血液减少,有效功能组织结构减少,影响物质交换,进一步影响胎盘功能,是造成其围生期发病率显著增高的病理基础,参与了子痫前期发展进程。

体外培养胎盘滋养细胞,细胞培养 48 h 达对数期,提取细胞蛋白,行 Western blot 检测,结果显示在缺氧条件下培养的滋养细胞中 SGK1 表达明显增高,同时缺氧条件下培养的滋养细胞结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)表达也升高,CTGF 是新近发现的一种促纤维化生长因子,是多种器官纤维化的关键因子^[10]。细胞合成胶原纤维、基质成分从 4~5 d 开始,6~7 d 达高峰,因此胎盘滋养细胞缺氧条件下培养 7 d 后,行 Masson 染色检测细胞胶原纤维表达量,结果进一步表明缺氧条件下培养的胎盘滋养细胞胶原纤维明显增加,细胞发生明显纤维化,提示缺氧作为诱因加重了纤维化

进程参与子痫前期进展。

本研究表明,子痫前期胎盘 SGK1 表达增高,进一步引起胎盘组织发生纤维化,参与了子痫前期的发展,从而导致一系列变化可能参与子痫前期孕妇物质交换过程。SGK1 在子痫前期发病中的作用,对预防和治疗子痫前期提供依据。

参 考 文 献

- [1] Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia [J]. *Microvasc Res*, 2008, 75(1): 1-8.
- [2] Wang Y, Walsh SW. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia [J]. *Placenta*, 1998, 19(8): 581-586.
- [3] Waldegger S, Barth P, Raber G, et al. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(9): 4440-4445.
- [4] Alliston TN, Gonzalez-Robayna IJ, Buse P, et al. Expression and localization of serum/glucocorticoid-induced kinase in the rat ovary: relation to follicular growth and differentiation [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(1): 385-395.
- [5] Fillon S, Wärntges S, Matskevitch J, et al. Serum- and glucocorticoid-dependent kinase, cell volume, and the regulation of epithelial transport [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2001, 130(3): 367-376.
- [6] Friedrich B, Wärntges S, Klingel K, et al. Up-regulation of the human serum and glucocorticoid-dependent kinase 1 in glomerulonephritis [J]. *Kidney and Blood Pressure Research*, 2002, 25(5): 303-307.
- [7] Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia [C]// *Seminars in Perinatology*. WB Saunders, 2009, 33(3): 130-137.
- [8] Cockell AP, Learmont JG, Smáráson AK, et al. Human placental syncytiotrophoblast microvillous membranes impair maternal vascular endothelial function [J]. *Br J Obstet Gynaecol*, 1997, 104(2): 235-240.
- [9] Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, et al. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction [J]. *Placenta*, 2006, 27(1): 56-61.
- [10] Dammeier J, Beer HD, Brauchle M, et al. Dexamethasone is a novel potent inducer of connective tissue growth factor expression. Implications for glucocorticoid therapy [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(29): 18185-18190.

(责任编辑:关蕴良)