DOI:10.16016/j.2097-0927.202111235

孕酮通过 RhoA/ROCK 信号通路促进子宫平滑肌收缩的机制研究

严小丽[1],陈 诚[2],王 丹[1],常 青[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院妇产科[1];401147 重庆,中国科学院大学重庆医院(重庆市人民医院)妇产科[2]

[**摘要**] **目的** 探讨孕酮通过 RhoA/ROCK 信号通路影响子宫平滑肌收缩的作用机制。**方法** 收集临产与未临产人子宫平滑肌组织各 5 例,采用 Western blot 和免疫组化检测肌球蛋白轻链 20 磷酸化(phosphorylation of myosin light chain 20,p-MLC20)、ROCK1、ROCK2 的表达;分离培养子宫平滑肌细胞并经免疫荧光技术鉴定,激光共聚焦显微镜检测细胞内游离 Ca^{2+} 浓度([Ca^{2+}]i);孕酮受体拮抗剂米非司酮及孕酮(P4)干预子宫平滑肌细胞,Western blot 检测细胞中 p-MLC20 及 ROCK1、ROCK2 的表达,以及 ROCK 抑制剂 Y-27632 与孕酮干预后子宫平滑肌细胞中 p-MLC20 的表达。**结果** 与未临产组织相比,临产子宫平滑肌组织中 p-MLC20、ROCK1、ROCK2 表达明显上升($P<0.05$);孕酮诱导子宫平滑肌细胞后,细胞内 ROCK1、ROCK2、p-MLC20 水平增加($P<0.05$);Y-27632 与孕酮干预子宫平滑肌细胞后,细胞内 p-MLC20 水平下降($P<0.05$)。**结论** 孕酮通过 RhoA/ROCK 信号通路调控 p-MLC20 水平,促进子宫平滑肌细胞收缩。

[**关键词**] 孕酮;RhoA/ROCK 信号通路;肌球蛋白轻链 20 磷酸化;子宫收缩;平滑肌细胞
[**中图法分类号**] Q579.13;R329.3;R714.3 [**文献标志码**] A

Mechanism of progesterone promoting uterine smooth muscle contraction through RhoA/ROCK signaling pathway

YAN Xiaoli[1], CHEN Cheng[2], WANG Dan[1], CHANG Qing[1] [1]Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Gynecology and Obstetrics, Chongqing Hospital of University of Chinese Academy of Sciences (Chongqing General Hospital), Chongqing, 401147, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of progesterone affecting the contractions of uterine smooth muscle through RhoA/ROCK signaling pathway. **Methods** The tissues of uterine smooth muscle were collected from 5 cases in labor and another 5 of non-labor, respectively. The expression levels of phosphorylation of myosin light chain (p-MLC20), ROCK1 and ROCK2 were detected by Western blotting and immunohistochemical (IHC) assay. Uterine smooth muscle cells were isolated and cultured, and then identified by immunofluorescence assay. Laser confocal microscopy was used to measure the concentration of intracellular free Ca^{2+} ([Ca^{2+}]i) in the cells. In addition, the uterine smooth muscle cells were treated with progesterone + progesterone receptor antagonist, mifepristone, and with progesterone + ROCK inhibitor, Y-27632, respectively. Western blotting was performed to determine the expression of p-MLC20, ROCK1 and ROCK2 in the corresponding groups. **Results** As compared with the non-labor group, the expression of p-MLC20, ROCK1 and ROCK2 in the uterine smooth muscle tissues were significantly increased in the labor

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81771619,81671494)
[**通信作者**] 常 青,E-mail:cqli99@126.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

group ($P<0.05$). Progesterone induced the elevation of p-MLC20, ROCK1 and ROCK2 levels in the cultured uterine smooth muscle cells ($P<0.05$), while after the intervention of Y-27632+progesterone, the p-MLC20 level was greatly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Progesterone regulates p-MLC20 level through RhoA/ROCK signaling pathway and thus promotes the contractions of uterine smooth muscle cells.

[**Key words**] progesterone; RhoA/ROCK signal pathway; phosphorylation of myosin light chain 20; uterine contraction; smooth muscle cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81771619, 81671494). Corresponding author: CHANG Qing, E-mail: cqli99@126.com

孕酮促进子宫肌层松弛,大多数哺乳动物临产时血浆孕酮(P4)水平急剧下降;但人类血浆 P4 水平随妊娠进展增加,妊娠临产后,子宫平滑肌收缩,血浆 P4 水平无下降,推测 P4 发生功能性撤退导致分娩启动,为临产重要机制之一[1-2]。分娩启动的关键是子宫平滑肌从松弛状态转变到强有力的收缩状态,平滑肌发生收缩的细胞内机制包括钙依赖途径,在钙依赖途径中平滑肌细胞内游离 Ca^{2+}浓度([Ca^{2+}]i)是调控平滑肌收缩的重要分子,平滑肌肌球蛋白轻链 20 磷酸化(phosphorylation of myosin light chain 20, p-MLC20)水平上升,促进细胞内[Ca^{2+}]i 增加,是平滑肌收缩的关键步骤[3]。已有研究表明孕酮可以快速增加细胞内[Ca^{2+}]i,促进子宫平滑肌细胞收缩[4-5]。

除细胞外 Ca^{2+}通过钙通道内流引起细胞内 Ca^{2+}的浓度升高外,多种信号通路的激活引起细胞内肌浆网 Ca^{2+}释放是子宫平滑肌收缩的关键,其中最受关注的是与 G 蛋白偶联受体激活相关的信号通路。KARTERIS 等[1]报道孕酮可以通过 MAPK/P38 信号通路参与子宫平滑肌收缩,该过程不依赖于细胞核内基因转录和蛋白翻译,称为孕酮的非基因组效应。多项研究证实 RhoA/ROCK 信号通路在血管平滑肌收缩中发挥重要作用[6-7]。国内有学者报道临产时子宫平滑肌组织中 ROCK 蛋白表达高于未临产组织[6]。目前关于 RhoA/ROCK 信号通路参与子宫平滑肌细胞收缩的分子机制尚未探明。本研究以子宫平滑肌细胞为研究对象,探讨孕酮通过 RhoA/ROCK 信号通路促进子宫平滑肌细胞收缩的分子机制,为了解分娩启动机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织取材 选择 2020 年 10 月至 2021 年 4 月入住陆军军医大学第一附属医院妇产科的低危足月龄临产孕妇(临产组,$n=5$)和足月龄未临产孕妇(未临产组,$n=5$)。临产定义参照第 9 版《妇产科学》:有规律且逐渐增强的子宫收缩,同时伴进行性宫颈管扩张和胎先露部下降;妊娠足月的定义为:孕周≥37 周。本研究已通过陆军军医大学第一附属医院伦理委员会批准(KY201987),研究对象签署知情同意书。获取剖宫产术中需修剪废弃的子宫切口平滑肌组织,分成 3 份,大小约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm,分别置入灭菌预冷、含双倍青霉素-链霉素溶液的 PBS 中,取材后 3 h 内,采用液氮速冻及甲醛固定制备组织切片,分离培养子宫平滑肌细胞。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(FBS)、DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司;ROCK 抑制剂(Y-27632)、孕酮(P4)、米非司酮(Mifepristone,M)购自 Selleck 公司;5×Loading buffer、青霉素-链霉素溶液(penicillin-streptomycin solution, 100×;PS)、Fura-2AM(2mmol/L)钙离子荧光探针购自碧云天生物技术有限公司;蛋白电泳凝胶试剂盒购自深圳市达科为生物工程公司;α-肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)抗体购自美国 Abcam 公司;p-MLC20 抗体购自美国 CST 公司;ROCK1、ROCK2、Tubulin 购自武汉 Proteintech 公司;辣根过氧化酶标记的抗兔、抗鼠二抗购自美国 Bioword 公司。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 检测子宫平滑肌组织 p-MLC20、ROCK1、ROCK2 表达 根据样品量提前配制 RIPA 裂解液,加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂,冰上保存备用;取 0.2 cm×0.2 cm×0.1 cm 大小组织,液氮速冻,放入研钵中碾碎后,转移至 1.5 mL EP 管中,加 200 μL RIPA 震荡混匀、超声波粉碎,冰上裂解 30 min;离心机预冷,4 ℃,12 000 r/min 离心 15 min;取上清,即为总蛋白;通过 BCA 法测定蛋白浓度,将所有样品调整至相同浓度,以蛋白∶5×loading buffer 为 4∶1的比例制样,金属浴中 100 ℃煮 10 min,-80 ℃保存备用。制备好的蛋白样品总上样量 20 μg,根据浓度计算上样体积。

配制10%分离胶,上样,80 V,30 min,130 V,40 min电泳分离总蛋白样品,2.0 A,25 V半干转将检测蛋白转印至PVDF膜上,5%胎牛血清蛋白(5% BSA)室温封闭2 h,4 ℃孵育一抗过夜(p-MLC20、ROCK1、ROCK2稀释比例均为1∶1 000);TBST洗膜3次,每次5 min,室温孵育二抗(1∶5 000),TBST洗膜3次,每次5 min,ECL显影液显影,使用Image Lab分析条带灰度值。

1.2.2 免疫组化(IHC)检测子宫平滑肌组织ROCK1、ROCK2、p-MLC20表达 取临产组及未临组产各2例平滑肌组织,处理、切片由陆军军医大学第一附属医院病理科完成。将组织切片进行脱蜡,柠檬酸缓冲液抗原修复,山羊血清室温封闭2 h,一抗ROCK1(1∶200)、ROCK2(1∶200)、p-MLC20(1∶50)孵育过夜,室温孵育二抗(生物素标记山羊抗兔)30 min,PBS清洗3次,滴加辣根酶标记链霉卵白素,室温孵育20 min,PBS洗3次,进行DAB显色,在显微镜下观察,待组织切片开始显现浅棕色时洗去显色液,苏木精复染,自来水冲洗10 min,树胶封片、风干,显微镜采集图片并进行定量分析。

1.2.3 子宫平滑肌细胞的分离培养 用含1%PS的PBS清洗干净新鲜子宫平滑肌组织血迹后,在培养皿中用眼科剪将组织剪碎、加8 mL基础培养基(含1%PS),转移至15 mL离心管,加胶原酶Ⅱ(2 mg/mL),37 ℃摇床摇晃消化30 min后,第1次用70 mm过滤筛过滤,剩余组织加胶原酶Ⅱ(2 mg/mL)继续消化,30 min后再次过滤。两次收集的滤液1 000 r/min离心5 min,沉淀即为细胞,加2 mL完全培养基(含1% PS和20%FBS)重悬细胞沉淀,接种于6孔板中,在37 ℃、5%CO_2条件下培养24 h后,观察到有贴壁细胞,于48 h时细胞完全贴壁后换液,之后2~3 d更换1次培养液。

1.2.4 免疫荧光鉴定子宫平滑肌细胞 在24孔板中提前铺细胞爬片,平滑肌细胞生长至对数生长期后,取2×10^5个细胞铺24孔板,增殖至密度约50%~60%时,取出24孔板,预冷PBS清洗2次,每孔加4%多聚甲醛固定20 min,PBS清洗3次,每次5 min;0.5% Triton X-100室温通透20 min,PBS清洗3次,每次5 min;5%BSA室温封闭30 min,去除封闭液,4 ℃孵育一抗过夜(α-SMA,根据说明书稀释);取出24孔板,PBS清洗3次,每次5 min,室温孵育FITC标记荧光二抗(1∶800)2 h,避光操作,PBS清洗3次,每次5 min;DAPI稀释1 000倍后,室温避光染核5 min,PBS洗清3次,每次5 min;在载玻片上加抗荧光猝灭剂,从24孔板中取出细胞爬片,倒置于载玻片上,荧光显微镜拍照采集图片。

1.2.5 细胞传代及分组 子宫平滑肌细胞生长至80%~90%密度后,弃去培养基,PBS清洗细胞2次,加0.25%胰蛋白酶消化细胞,室温放2 min后,弃去胰蛋白酶,加4 mL完全培养基终止消化,将细胞吹打成单细胞悬液并转移至15 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清,加完全培养基重悬细胞沉淀,以1∶3比例传代,在37 ℃、5%CO_2条件下培养。

文献[1]报道外源性孕酮(P4 100 nmol/L)诱导培养的子宫平滑肌细胞收缩(15 min后可检测到细胞内p-MLC20水平明显升高),可模拟分娩时子宫平滑肌收缩状态,因此将其作为本实验研究模型。将培养的子宫平滑肌细胞分为3组:对照组、孕酮组(加孕酮100 nmol/L)、孕酮+米非司酮组(米非司酮100 μmol/L干预4 h后加用孕酮100 nmol/L,米非司酮为孕酮核受体拮抗剂),15 min后收集各组细胞蛋白样品。

为研究孕酮通过RhoA/ROCK信号通路促进子宫平滑肌收缩的机制,将培养的子宫平滑肌细胞分为3组:对照组、孕酮组(100 nmol/L)、孕酮+ ROCK抑制剂组(ROCK抑制剂Y-27632 200 nmol/L干预24 h后,加用孕酮100 nmol/L),15 min后收集各组细胞蛋白样品。

1.2.6 细胞蛋白提取与Western blot检测 根据实验需要处理子宫平滑肌细胞后,预冷PBS清洗2次,根据细胞密度每孔加入100~150 μL RIPA,用细胞刮收取细胞,转移至1.5 mL EP管中,冰上裂解30 min;离心机预冷,4 ℃,12 000 r/min离心15 min;取上清,即为总蛋白;通过BCA法测定蛋白浓度,将所有样品调整至相同浓度,以蛋白∶5×loading buffer为4∶1的比例制样,金属浴中100 ℃煮10 min,-80 ℃保存备用。Western blot检测ROCK1(1∶1 000)、ROCK2(1∶1 000)、p-MLC20(1∶1 000)蛋白表达(操作同1.2.1)。

1.2.7 子宫平滑肌细胞内Ca^{2+}浓度检测 在24孔板中铺细胞贴壁后,根据实验需要处理分组,进行Ca^{2+}检测。取出24孔板,PBS清洗1次,将Fura-2 AM∶PBS(含2%FBS)以1∶400比例稀释,37 ℃孵育1 h,PBS清洗1次,DAPI稀释1 000倍后,室温避光染核5 min,PBS清洗3次,在载玻片上加抗荧光猝灭剂,从24孔板中取出细胞爬片,倒置于载玻片上,立即进行激光共聚焦显微镜拍照,采集图片,核定位(即DAPI,蓝色荧光)图片采集时间为150 ms,$[Ca^{2+}]i$(绿色荧光)信号采集时间为3 s。

1.3 统计学分析

采用GraphPad 5.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用独立样本t检验。检验水准:$\alpha=0.05$。实验均进行3次独立重复。

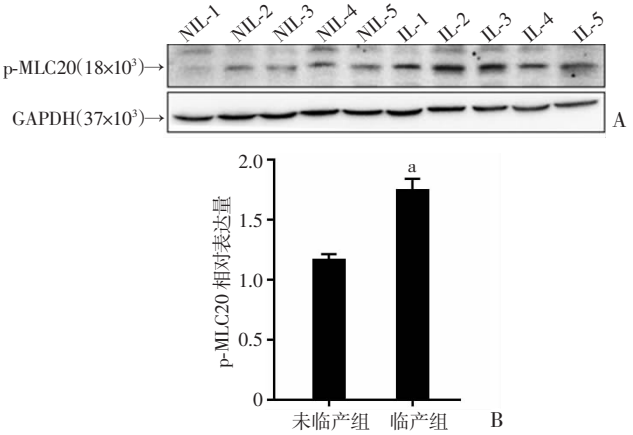
2　结果

2.1　临产子宫平滑肌组织中 p-MLC20 表达升高

临产子宫平滑肌组织中 p-MLC20 表达显著高于未临产组($P<0.05$,图 1)。

2.2　子宫平滑肌细胞的鉴定及两组子宫平滑肌细胞内[Ca^{2+}]i 的测定

分离所得的子宫平滑肌细胞呈圆形或椭圆形、透亮,24 h 后有少量细胞贴壁,48 h 后细胞基本完全贴壁,细胞呈长梭形,不规则排列,72 h 细胞开始增殖。采用免疫荧光检测培养的子宫平滑肌细胞中平滑肌细胞标志蛋白 α-SMA 的表达。结果显示:在临产及未临产组子宫平滑肌细胞中均可检测 α-SMA 蛋白(图 2A 绿色荧光),且在临产组细胞内观察到明显肌丝聚集(图 2A 箭头所示),证明分离的细胞为平滑肌细胞。



A:Western blot 检测　NIL-1~NIL-5:未临产子宫平滑肌组织样本;IL-1~IL-5:临产子宫平滑肌组织样本;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与未临产组比较

图 1　Western blot 检测子宫平滑肌组织中 p-MLC20 表达

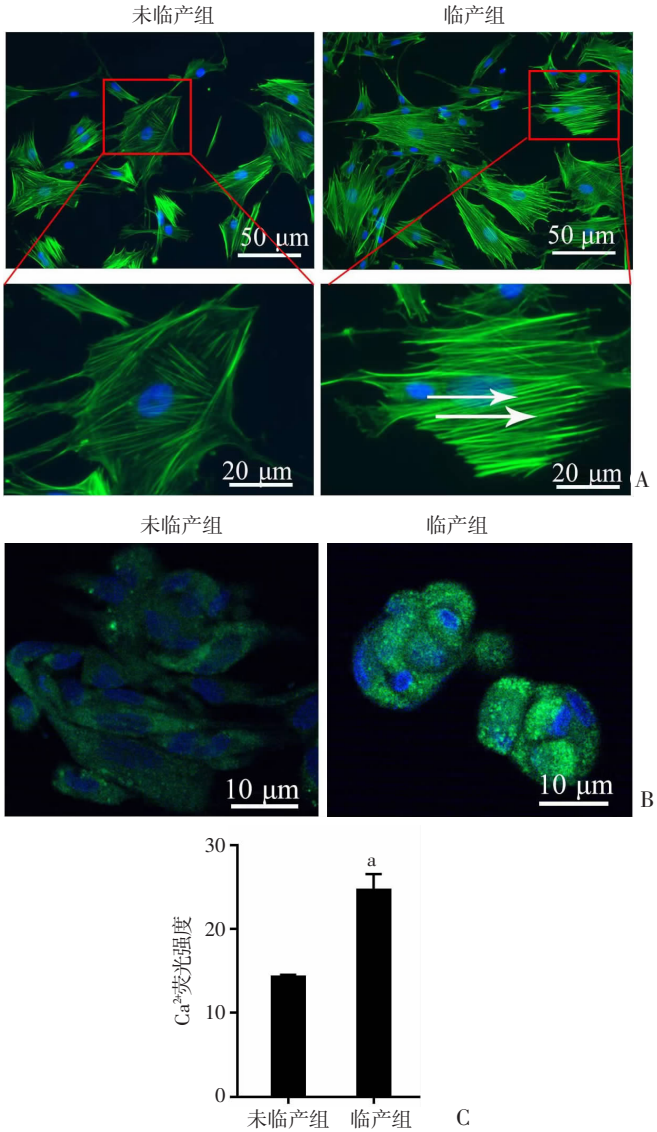
[Ca^{2+}]i 是调控平滑肌收缩的重要分子。分别检测临产组与未临产组子宫平滑肌细胞中[Ca^{2+}]i。激光共聚焦显微镜检测结果显示:临产组细胞中[Ca^{2+}]i 显著高于未临产组细胞($P<0.05$,图 2B、C),表明分离培养的子宫平滑肌细胞具有子宫平滑肌收缩的特征。

2.3　孕酮诱导子宫平滑肌细胞收缩

Western blot 检测对照组、孕酮组(100 nmol/L)、孕酮+米非司酮组(米非司酮 100 μmol/L+孕酮 100 nmol/L)子宫平滑肌细胞内 p-MLC20 的表达,结果显示:孕酮组及孕酮+米非司酮组细胞内 p-MLC20 表达明显高于对照组($P<0.05$),孕酮组与孕酮+米非司酮组间比较差异无统计学意义(图 3)。提示孕酮可快速诱导子宫平滑肌细胞收缩。

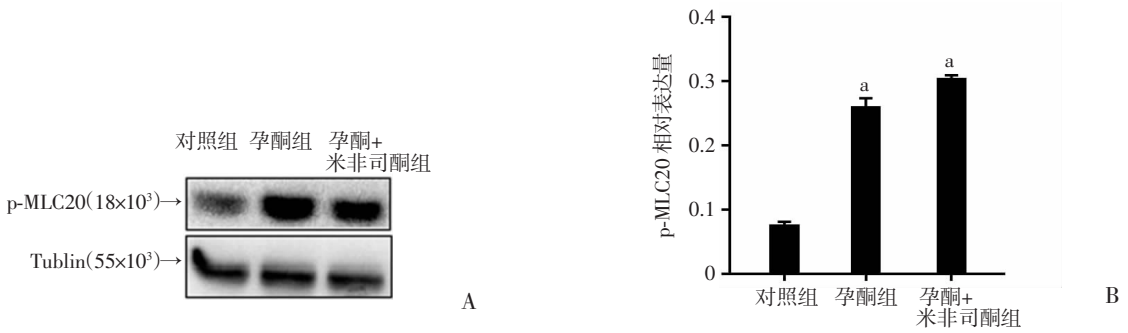
2.4　孕酮可能通过 RhoA/ROCK 信号通路诱导子宫平滑肌细胞收缩

Western blot 及免疫组化检测 ROCK 蛋白的两种亚型 ROCK1、ROCK2 及 p-MLC20 在临产组和未临产子宫平滑肌组织中的表达,结果显示:ROCK1、ROCK2、p-MLC20 在临产组中显著高表达($P<0.05$,图 4A~E)。



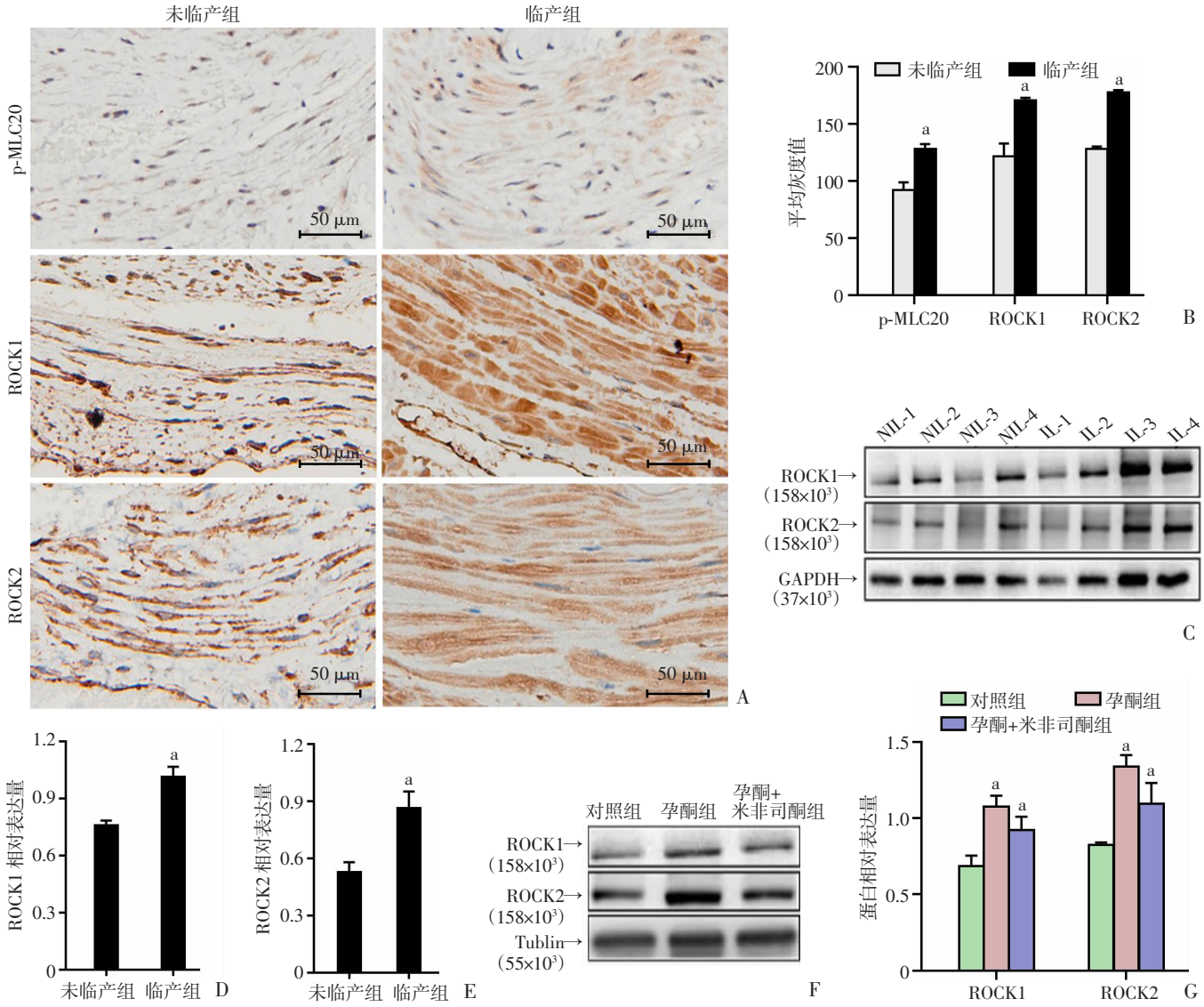
A:免疫荧光显微镜鉴定子宫平滑肌细胞　绿色荧光为 α-SMA 蛋白;↑:肌丝聚集收缩的方向;B:激光共聚焦显微镜测定两组细胞内[Ca^{2+}]i　绿色荧光为胞浆内 Ca^{2+};蓝色荧光为细胞核;C:Ca^{2+} 荧光强度半定量分析　a:$P<0.05$,与未临产组比较

图 2　子宫平滑肌细胞鉴定及两组子宫平滑肌细胞内[Ca^{2+}]i 比较



A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3 孕酮诱导子宫平滑肌细胞收缩



a:$P<0.05$,与未临产组或对照组比较

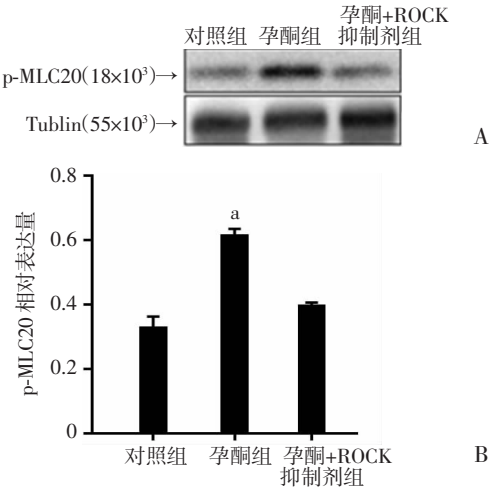
A:免疫组化检测子宫平滑肌组织中 ROCK1、ROCK2、p-MLC20 蛋白表达;B:子宫平滑肌组织中 ROCK1、ROCK2、p-MLC20 蛋白平均灰度值;C:Western blot 检测子宫平滑肌组织中 ROCK1、ROCK2 蛋白表达;D、E:子宫平滑肌组织中 ROCK1、ROCK2 蛋白表达半定量分析;F:Western blot 检测各组子宫平滑肌细胞中 ROCK1、ROCK2 蛋白表达;G:子宫平滑肌细胞中 ROCK1、ROCK2 蛋白表达半定量分析

图 4 RhoA/ROCK 信号通路蛋白在子宫平滑肌组织及细胞中的表达

Western blot 检测对照组、孕酮组、孕酮+米非司酮组子宫平滑肌细胞内 ROCK1、ROCK2 的表达。结果显示:孕酮组与孕酮+米非司酮组 ROCK1、ROCK2 表达显著高于对照组($P<0.05$),孕酮组与孕酮+米非司酮组间比较差异无统计学意义(图 4F、G)。表明 ROCK 蛋白在子宫平滑肌收缩过程中起重要作用,孕酮可能通过 RhoA/ROCK 信号通路诱导子宫平滑肌细胞收缩。

2.5 孕酮通过 RhoA/ROCK 信号通路促进子宫平滑肌收缩的机制

Western blot 检测对照组、孕酮组(孕酮 100 nmol/L)、孕酮+ROCK 抑制剂组(ROCK 抑制剂 Y-27632 200 nmol/L 干预 24 h 后加用孕酮 100 nmol/L)子宫平滑肌细胞中 p-MLC20 的表达。结果显示:孕酮组 p-MLC20 表达明显高于对照组($P<0.05$),孕酮+ROCK 抑制剂组 p-MLC20 表达水平明显低于孕酮组($P<0.05$,图 5)。表明孕酮诱导的子宫平滑肌收缩能被 ROCK 抑制剂 Y-27632 抑制,孕酮可通过 RhoA/ROCK 信号通路促进子宫平滑肌收缩。



A: Western blot 检测各组子宫平滑肌细胞中 p-MLC20 表达;B: 半定量分析 a:$P<0.05$,与其他 2 组比较

图 5 孕酮通过 RhoA/ROCK 信号通路促进子宫平滑肌收缩

3 讨论

分娩启动原因复杂,机制不明。调控分娩启动的分子机制包括炎症诱发机制、内分泌学说、钙敏感机制等[8]。对分娩启动的临床、基础研究发现:足月临产或早产分娩启动存在多因素-多机制的复杂体系,但最终均诱发子宫平滑肌收缩,胎儿娩出。早产是妊娠期的常见并发症,全球早产发病率为 6.2%~11.9%,是新生儿死亡、致残的主要原因[9-10]。目前早产分娩启动机制不明,尚无有效药物预防和治疗。研究子宫平滑肌的收缩与舒张机制对防治早产具有重要意义。

Ca^{2+}是细胞内普遍存在的二级信使,负责调控关键过程,包括细胞增殖、神经信号传导和细胞收缩等[11-12]。平滑肌细胞内[Ca^{2+}]i 和肌球蛋白轻链磷酸化水平的改变是导致各器官和组织平滑肌细胞收缩的关键因素[13-14]。平滑肌细胞在激动剂刺激下,细胞内[Ca^{2+}]i 上升,与钙调蛋白结合,激活肌球蛋白轻链激酶使 MLC20 磷酸化,平滑肌细胞收缩。平滑肌细胞收缩的前提是细胞骨架发生变化,肌细胞中的细肌丝、粗肌丝、中间丝等各自发挥其功能,相互作用,促进子宫平滑肌收缩[15-16]。本研究在临产组子宫平滑肌组织及培养的子宫平滑肌细胞检测出 p-MLC20 表达升高,[Ca^{2+}]i 明显升高,并且在临产组子宫平滑肌细胞中观察到明显肌丝聚集,说明 p-MLC20 水平上升和[Ca^{2+}]i 可以作为平滑肌细胞收缩的代表性指标。

研究表明孕酮所属的甾体类激素可在数秒内激活某些跨膜信号传导通路,或者数分钟内激活环核苷酸和/或蛋白激酶而产生快速生物学效应;孕酮快速增加细胞内[Ca^{2+}]i,促进分娩启动后子宫平滑肌收缩且不受转录抑制物抑制,该效应称为孕酮的非基因组效应[17]。研究报道体外培养的子宫平滑肌细胞加入与牛血清蛋白偶联的孕酮(孕酮不能与核受体结合),15 min 后在细胞内检测到 p-MLC20 水平明显升高,证实孕酮在体外可快速诱导子宫平滑肌细胞收缩[1]。本研究采用孕酮核受体抑制剂米非司酮干预培养的子宫平滑肌细胞,再加用孕酮干预 15 min 后,在细胞内检测到 p-MLC20 水平明显升高,证实孕酮在体外可诱导子宫平滑肌细胞收缩(图 3)。

MLC20 的磷酸化水平除受肌球蛋白轻链激酶调节外,还受 Ca^{2+}非依赖的肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin-light-chain phosphatase,MLCP)调节,抑制 MLCP 可以进一步增强 MLC 磷酸化和平滑肌收缩,增加收缩对 Ca^{2+}的敏感性,称为“钙敏化”[18-19]。RhoA/ROCK 信号传导通路是子宫平滑肌细胞钙敏化的主要调节因素,ROCK 有两种异构体: ROCK1 和 ROCK2[20]。本研究结果显示:临产子宫平滑肌组织中 ROCK1、ROCK2 蛋白表达显著上升;孕酮干预培养的子宫平滑肌细胞,可检测到 p-MLC20 水平快速上升,同时 ROCK1、ROCK2 蛋白表达增加(图 4),表明分娩启动时孕酮在通过 RhoA/ROCK 信号通路促进子宫平滑肌收缩过程中同时发挥基因组和非基因组作用。

Y-27632 是合成的 ROCK 特异性抑制剂,能够抑

制 ROCK 介导的多种生物效应，其中包括平滑肌收缩。目前已经发现 ROCK 在多种器官的平滑肌组织收缩中起作用。研究表明 ROCK 在气管平滑肌细胞中磷酸化 MLCP 的 MYPT1 亚基,抑制其活性并维持平滑肌收缩[19];RhoA/ROCK 信号通路诱导 MLC20 磷酸化水平升高,导致血管平滑肌收缩[20];ROCK 蛋白在临产的子宫平滑肌组织中高表达[21],但相关信号通路的细胞机制不明。本研究证实孕酮可激活 RhoA/ROCK 信号通路,促进子宫平滑肌细胞收缩,加入 ROCK 抑制剂 Y-27632 后,细胞内 p-MLC20 水平明显下降(图 5),推测 Y-27632 可通过抑制 ROCK 影响子宫平滑肌收缩;提示 RhoA/ROCK 信号通路与分娩启动相关,可为精准诊治早产临产提供参考。

早产是产科医生面临的难题之一。妊娠子宫收缩导致早产分娩的确切触发机制尚不明确。本研究通过信号转导通路研究早产分娩启动的机制,验证了 RhoA/ROCK 信号通路参与早产分娩启动的分子机制,期望为今后能够精准防治早产提供理论依据。妊娠临产、子宫平滑肌收缩存在孕激素非基因组和基因组效应共同作用。本研究样本量有限,未进行大量组织样本验证,细胞间可能存在个体差异,且尚未深入研究该通路的上下游调节机制。此外,分娩启动时孕酮是否还有其他作用途径及分子机制,在临床上是否能通过阻断这些快速反应机制来防治早产有待进一步研究。

参考文献:

[1] KARTERIS E, ZERVOU S, PANG Y F, *et al*. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term[J]. Mol Endocrinol, 2006, 20(7): 1519-1534. DOI: 10.1210/me.2005-0243.

[2] SMITH R, MESIANO S, MCGRATH S. Hormone trajectories leading to humanbirth[J]. Regul Pept, 2002, 108(2/3): 159-164. DOI: 10.1016/s0167-0115(02)00105-2.

[3] TONG W C, CHOI C Y, KHARCHE S, *et al*. A computational model of the ionic currents, Ca^{2+} dynamics and action potentials underlying contraction of isolated uterine smoothmuscle[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18685. DOI: 10.1371/journal.pone.0018685.

[4] FITZGERALD A C, PEYTON C, DONG J, *et al*. Bisphenol A and related alkylphenols exert nongenomic estrogenic actions through a G protein-coupled estrogen receptor 1 (Gper)/epidermal growth factor receptor (Egfr) pathway to inhibit meiotic maturation of zebrafish oocytes[J]. Biol Reprod, 2015, 93(6): 135, 1-11. DOI: 10.1095/biolreprod.115.132316.

[5] THOMAS P, TUBBS C, GARRY V F. Progestin functions in vertebrate gametes mediated by membrane progestin receptors (mPRs): identification of mPRalpha on human sperm and its association with sperm motility[J]. Steroids, 2009, 74(7): 614-621. DOI: 10.1016/j.steroids.2008.10.020.

[6] BAI L Y, KEE H J, CHOI S Y, *et al*. HDAC5 inhibition reduces angiotensin II-induced vascular contraction, hypertrophy, and oxidative stress in a mouse model[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 134: 111162. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.111162.

[7] LIU Z W, KHALIL R A. Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 153: 91-122. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.02.012.

[8] SWENARCHUK L E. Nerve, muscle, and synaptogenesis[J]. Cells, 2019, 8(11): 1448. DOI: 10.3390/cells8111448.

[9] LIU L, OZA S, HOGAN D, *et al*. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals[J]. Lancet, 2016, 388(10063): 3027-3035. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31593-8.

[10] BLENCOWE H, COUSENS S, OESTERGAARD M Z, *et al*. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications[J]. Lancet, 2012, 379(9832): 2162-2172. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60820-4.

[11] SHATTOCK M J, OTTOLIA M, BERS D M, *et al*. Na^+/Ca^{2+} exchange and Na^+/K^+-ATPase in the heart[J]. J Physiol, 2015, 593(6): 1361-1382. DOI: 10.1113/jphysiol.2014.282319.

[12] EISNER D A, CALDWELL J L, KISTAMÁS K, *et al*. Calcium and excitation-contraction coupling in the heart[J]. Circ Res, 2017, 121(2): 181-195. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310230.

[13] LU P, CHEN J, ZHANG C H, *et al*. Oscillating calcium signals in smooth muscle cells underlie the persistent basal tone of internal anal sphincter[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(8): 5937-5952. DOI: 10.1002/jcp.30279.

[14] JO M H, KIM B C, SUNGK, *et al*. Molecular nanomechanical mapping of histamine-induced smooth muscle cell contraction and shortening[J]. ACS Nano, 2021. DOI: 10.1021/acsnano.1c01782. [Online ahead of print].

[15] SANDERS K M, KOH S D, RO S, *et al*. Regulation of gastrointestinal motility: insights from smooth muscle biology [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 9(11): 633-645. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.168.

[16] ACKERMAN W E 4th, BUHIMSCHI I A, BRUBAKER D, *et al*. Integrated microRNA and mRNA network analysis of the humanmyometrial transcriptome in the transition from quiescence to labor[J]. Biol Reprod, 2018, 98(6): 834-845. DOI: 10.1093/biolre/ioy040.

[17] SUELDO C, LIU X F, PELUSO J J. Progestin and AdipoQ receptor 7, progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1), and PGRMC2 and their role in regulating progesterone's ability to suppress human granulosa/luteal cells from entering into the cell cycle[J]. Biol Reprod, 2015, 93(3): 63. DOI: 10.1095/biolreprod.115.131508.

[18] SEMIZ A T, TEKER A B, YAPAR K, *et al*. Hydrogen sulfide dilates the isolated retinal artery mainly *via* the activation of myosin phosphatase [J]. LifeSci, 2020, 255: 117834. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117834.

[19] SUN J, TAO T, ZHAO W, *et al*. CPI-17-mediated contraction of vascular smooth muscle is essential for the development of hypertension in obesemice[J]. J Genet Genomics, 2019, 46(3): 109-118. DOI: 10.1016/j.jgg.2019.02.005.

[20] SHIMOKAWA H, SUNAMURA S, SATOH K. RhoA/rho-kinase in the cardiovascular system[J]. Circ Res, 2016, 118(2): 352-366. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306532.

[21] 高洁, 丁依玲. 子宫平滑肌组织中 RhoA 及 Rho 激酶的表达与分娩发动的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2009, 44(5): 345-349. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2009.05.007.
GAO J, DING Y L. Correlation between expression of RhoA and Rho kinase in uterine smooth muscle and the onset of labor[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2009, 44(5): 345-349. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2009.05.007.

(**收稿**:2021-11-30;**修回**:2022-02-24)

(编辑 王 红)