



张宏权, 分子遗传学博士, 博士生导师, 北京大学基础医学院新体制长聘教授。北京大学学术委员会委员, 北京大学医学部学术委员会委员, 北京大学基础医学院、药学院、前沿交叉和生物技术学术委员会委员及北京大学第三临床医学院学术委员会委员。北京大学国际癌症研究院副院长, 基础医学院肿瘤、细胞和衰老学科群主任, 人体解剖与组织胚胎学系主任。北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室、北京大学国际癌症研究院、北京大学基础医学院课题组组长 (principal investigator, PI)。担任国家科技部 973 项目、重点基础研究专项课题、国家自然科学基金及北京市自然科学基金的负责人。

在欧美从事肿瘤生物学科研究与教学 15 年, 在国内从事组织学与胚胎学及肿瘤生物学的教学与科研 17 年。主要研究兴趣是基质生物学、肿瘤的发生、侵袭和转移的分子细胞生物学机制、肿瘤干细胞的重编程机制及生殖细胞的调控等。发现了一系列与跨膜受体整合素胞内结构域互作的蛋白, 并阐明了其生理

和病理意义; 揭示了整合素在细胞膜上运输的机制; 发现乳腺癌干细胞诱导的新机制和干预靶点; 发现乳腺癌转移的表观遗传调控机制和干预靶点; 建立了自发产生雌激素受体阳性或三阴乳腺癌的小鼠模型; 发现并鉴定了一系列组蛋白的新修饰类型并阐明其在生理和肿瘤发生发展中的意义。目前担任中国解剖学会副理事长、组织学与胚胎学专业委员会副主任委员, 中国生理学会基质生物学专业委员会前任主任委员, 中国抗癌协会肿瘤转移专业委员会主任委员, 中国抗癌协会血液病转化医学专业委员会副主任委员, 中国抗癌协会肺癌专业委员会委员, 中国病理生理学会蛋白质修饰与疾病专业委员会委员, 国际上上皮间质转化 (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT) 专家委员会唯一中国委员。担任《解剖学报》和《中国组织化学与细胞化学杂志》副主编, *Cellular Signalling*、*Frontier in Oncology* 和《北京大学学报 (医学版)》编委。在 *Cell*、*Nature Cell Biology*、*Molecular Cell*、*Nature Communications*、*Cell Research*、*Cancer Research*、*Journal of Cell Biology*、*Cell Reports*、*Nucleic Acids Research* 和 *Journal of American Society of Nephrology* 等国际一流期刊发表 130 余篇论文。获得 2 项国家发明专利和 1 项国际专利并转化, 获军队科技进步一等奖 1 项。

Kindlin-2 通过 mTOR 和 Hippo 信号通路调节小鼠子宫内膜发育

张 京^{1*}, 宋佳桂^{1,2*}, 王振斌¹, 龚玉清¹, 王天卓¹, 周津羽¹, 战 军^{1Δ}, 张宏权^{1Δ}

(1. 北京大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系, 北京 100191; 2. 北京大学第三医院医学创新研究院基础医学研究中心, 北京 100191)

[摘 要] **目的:** 探讨 Kindlin-2 对小鼠子宫发育及雌鼠生育能力的影响及其作用机制。**方法:** 利用 Cdh16-Cre 工具鼠和 Kindlin-2^{fllox/fllox} 小鼠构建在子宫内膜中特异性敲除 Kindlin-2 的小鼠模型, 观察敲除 Kindlin-2 对雌鼠子宫内膜发育和生殖力的影响。在子宫内膜癌细胞系 HEC-1 和 Ish 中分别进行高表达和敲低 Kindlin-2 的实验, 检测雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路的激活变化, 并且提取特异性敲除 Kindlin-2 的雌鼠 (实验组, 基因型为 Cdh16-Cre; Kindlin-2^{fllox/fllox}) 和未特异性敲除 Kindlin-2 的雌鼠 (对照组, 基因型为 Kindlin-2^{fllox/fllox}) 子宫蛋

基金项目: 国家自然科学基金 (81730071、82172972、31170711、81670626、81902840) 和北京大学双一流建设经费 (PKU2021LCXQ023、BMU2022XKQ004) Supported by the National Natural Science Foundation of China (81730071, 82172972, 31170711, 81670626, 81902840), and Peking University Double First-Class Construction Funds (PKU2021LCXQ023, BMU2022XKQ004)

Δ Corresponding author's e-mail, Zhanjun@bjmu.edu.cn, Hongquan.zhang@bjmu.edu.cn

* These authors contributed equally to this work

网络出版时间:2022-8-30 11:41:35 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20220829.1745.014.html>

白,每组包含 6~8 只小鼠,重复 3 次独立实验,检测 mTOR 信号通路和 Hippo 信号通路关键分子的蛋白水平。**结果:**成功构建了子宫内膜特异性敲除 Kindlin-2 的小鼠模型,通过鼠尾聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、Western blot、免疫组织化学染色 (immunohistochemistry, IHC) 等方法鉴定和验证 Kindlin-2 在小鼠子宫中的敲除效率。子宫内膜特异性敲除 Kindlin-2 的雌鼠与对照组相比体重减轻、生殖能力严重受损、出生仔鼠数量减少,但出生仔鼠中雌鼠和雄鼠的比例未发生改变,通过苏木精-伊红染色实验观察表明实验组子宫内膜发育不完整、子宫壁厚度变薄。机制方面,子宫内膜癌细胞系 HEC-1 和 Ish 中敲除 Kindlin-2 能够下调 mTOR、磷酸化 mTOR、腺嘌呤核糖核苷酸激活蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、磷酸化的 AMPK 和磷酸化的核糖体蛋白 (ribosomal protein S6, S6) 的蛋白水平,在雌鼠子宫中发现特异性敲除 Kindlin-2 能够上调 Mps 结合 1 (Mps one binding 1, MOB1)、磷酸化的 Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 的蛋白水平。**结论:**Kindlin-2 通过抑制 mTOR 信号通路、激活 Hippo 信号通路抑制子宫内膜的发育,进而抑制雌鼠的生育能力。

[关键词] Kindlin-2;小鼠,特异性敲除;子宫内膜;mTOR 信号通路;Hippo 信号通路

[中图分类号] R34 [文献标志码] A [文章编号] 1671-167X(2022)05-0846-07

doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2022.05.012

Kindlin-2 regulates endometrium development via mTOR and Hippo signaling pathways in mice

ZHANG Jing^{1*}, SONG Jia-gui^{1,2*}, WANG Zhen-bin¹, GONG Yu-qing¹, WANG Tian-zhuo¹, ZHOU Jin-yu¹, ZHAN Jun^{1△}, ZHANG Hong-quan^{1△}

(1. Department of Human Anatomy, Histology and Embryology, Peking University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100191, China; 2. Center of Basic Medical Research, Institute of Medical Innovation and Research, Cancer Center, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and mechanisms of Kindlin-2 on uterus development and reproductive capacity in female mice. **Methods:** Cdh16-Cre tool mice and Kindlin-2^{fllox/fllox} mice were used to construct the mouse model of uterus specific knockout of Kindlin-2, and the effects of Kindlin-2 deletion on uterine development and reproduction capacity of female mice were observed. High expression and knockdown of Kindlin-2 in endometrial cancer cell lines HEC-1 and Ish were used to detect the regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. In addition, uterine proteins of the female mice with specific knockout of Kindlin-2 and female mice in the control group were extracted to detect the protein levels of key molecules of mTOR signaling pathway and Hippo signaling pathway.

Results: The mouse model of uterine specific knockout of Kindlin-2 was successfully constructed. The knockout efficiency of Kindlin-2 in mouse uterus was identified and verified by mouse tail polymerase chain reaction (PCR), Western blot protein identification, immunohistochemical staining (IHC) and other methods. Compared with the control group, the female mice with uterus specific deletion of Kindlin-2 lost weight, seriously impaired reproductive ability, and the number of newborn mice decreased, but the proportion of the female mice and male mice in the newborn mice did not change. Hematoxylin eosin staining (HE) experiment showed that the endometrium of Kindlin-2 knockout group was incomplete and the thickness of uterine wall became thinner. In terms of mechanism, the deletion of Kindlin-2 in endometrial cancer cell lines HEC-1 and Ish could downregulate the protein levels of mTOR, phosphorylated mTOR, adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated AMPK and phosphorylated ribosomal protein S6 (S6), and the mTOR signal pathway was inhibited. It was found that the specific deletion of Kindlin-2 could upregulate the protein levels of Mps one binding 1 (MOB1) and phosphorylated Yes-associated protein (YAP) in the uterus of the female mice, and the Hippo signal pathway was activated. **Conclusion:** Kindlin-2 inhibits the development of uterus by inhibiting mTOR signal pathway and activating Hippo signal pathway, thereby inhibiting the fertility of female mice.

KEY WORDS Kindlin-2; Mouse model, specific knockout; Endometrium; mTOR signaling pathway; Hippo signaling pathway

Kindlin-2 是 Kindlin 家族成员之一,该家族由三个成员 Kindlin-1 (基因名为 *FERMT1*)、Kindlin-2 (基因名为 *FERMT2*) 与 Kindlin-3 (基因名为 *FERMT3*) 共同组成^[1]。含有 FERM 结构域的 Kindlin 家族在进化上高度保守,结构上十分相似,其最重要的细胞生物学功能是结合并激活整合素,但是近年来的研究表明,除了整合素信号通路之外,Kindlins 尤其是 Kindlin-2 参与大量整合素非依赖的

信号通路调节,包括 Wnt 信号通路^[2]、转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF β) 信号通路^[3-4]、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 信号通路^[5]、Hedgehog 信号通路^[6]、Hippo 信号通路^[7]等,进而发挥生物学功能。

Kindlin-2 在胚胎发育、肿瘤发生发展和多种疾病进程中发挥重要作用。Kindlin-2 在起源于中胚层的器官中高度表达,但在起源于内外胚层的器官中

弱表达或不表达。此外,在单一器官中,Kindlin-2 在中胚层来源的组织中也高度表达,但在内胚层及外胚层来源的组织中低表达或不表达。这些现象在成人和胚胎中均存在,表明组织中的 Kindlin-2 表达与其胚盘起源高度相关^[8]。在发育过程中,Kindlin-2 影响脊椎动物的体节和神经嵴的发育^[9]。敲除 Kindlin-2 会引起原始内胚层与外胚层从基底膜脱离,导致小鼠在围着床期 7.5 d (E7.5) 胚胎龄内死亡^[10]。Kindlin-2 能够维持血管稳态,调控血小板聚合,缺失 Kindlin-2 能够引起血管分支形成缺陷^[11]。Kindlin-2 能够维持正常心脏功能,在出生后的成年小鼠心肌细胞中敲除 Kindlin-2 会引起进展性心力衰竭^[12]。缺失 Kindlin-2 影响软骨的发育和骨化,骨特异性敲除 Kindlin-2 的小鼠通过影响 Smad2 磷酸化、减少 SOX9 的表达量进而影响软骨细胞分化。Kindlin-2 对平滑肌的形成有重要的作用。在胚胎发育过程中,Kindlin-2 的丢失通过诱导细胞凋亡来损害平滑肌的形成,并通过阻断 Ca^{2+} 内流导致肠梗阻而损害成体平滑肌的收缩^[13]。此外,在乳腺发育过程中,Kindlin-2 能够促进乳腺的生长,表现为更多的导管分支和更大的管腔,以及怀孕期间在乳腺中形成更多的腺泡^[2]。在雄性生殖系统中,小鼠睾丸支持细胞中特异性敲除 Kindlin-2 能够抑制小鼠睾丸发育,引起雄性不育^[14]。然而 Kindlin-2 对子宫内膜的作用还未被揭示。本研究构建泌尿生殖系统上皮特异性敲除 Kindlin-2 的小鼠模型,观察 Kindlin-2 在小鼠子宫内膜发育中的作用,并阐明其机制。

1 资料与方法

1.1 细胞系

HEC-1A 和 Ish 均为人子宫内膜癌细胞系,均购买于国家生物医学实验细胞资源库,并由本实验室冻存保种。

1.2 质粒和抗体

全长 FLAG-Kindlin-2 质粒为本实验室前期构建。Kindlin-2 抗体购自美国 Abcam 公司,β-Actin 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司,雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抗体、p-mTOR 抗体、腺嘌呤核糖核苷酸激活蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 抗体、p-AMPK 抗体、核糖体蛋白 (ribosomal protein S6, S6) 抗体、p-S6 抗体、Mps 结合 1 (Mps one binding 1, MOB1) 抗体、Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 抗体、p-YAP 抗体均购自美国 Cell Signaling (CST) 公司。

1.3 实验动物

Cdh16-Cre 工具小鼠购买自上海南方模式生物科技有限公司;Kindlin-2^{fllox/fllox} 小鼠是本实验室在前期工作中构建,基因背景为 C57BL/6 改造并繁殖;实验动物均在北京大学医学部实验动物科学部 SPF 环境下饲养,动物实验操作均经过北京大学生物医学伦理委员会批准 (批准号:LA2018295)。

Cdh16 (Ksp1.3) 启动子被用于小鼠泌尿生殖系统特异性基因靶向以及细胞谱系追踪的研究,Cdh16-Cre 重组酶特异性表达在肾脏、泌尿生殖道上皮细胞和成年小鼠肾小管中^[15]。将 Kindlin-2^{fllox/fllox} 小鼠与 Cdh16-Cre 工具鼠杂交后,最终获得泌尿生殖系统特异性敲除 Kindlin-2 的小鼠模型。特异性敲除 Kindlin-2 的雌鼠为实验组,基因型为 Cdh16-Cre;Kindlin-2^{fllox/fllox},未特异性敲除 Kindlin-2 的雌鼠为对照组,基因型为 Kindlin-2^{fllox/fllox},实验中每组分别包含 6~8 只小鼠,重复 3 次独立实验。

1.4 统计学分析

子宫内膜厚度统计分析软件为 ZEN2010 及 Image J,数据统计软件为 SPSS17.0,作图软件采用 Graphpad Prism 7.0 和 Adobe Illustrator CS5。数据均以均数 ± 标准误表示,实验均采用双侧独立样本 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鉴定子宫特异性敲除 Kindlin-2 的小鼠模型

如图 1A 所示,获得仔鼠后首先对其进行聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测,图中 4、5、7 号 (红框内) 为实验组小鼠,1、8 号小鼠为对照组小鼠。取 3 对 12 周大小的实验组和对照组雌鼠子宫,提取蛋白进行 Western blot 实验 (图 1B),结果表明实验组小鼠子宫中 Kindlin-2 表达量显著低于对照组,而其它器官 Kindlin-2 的表达水平无显著改变。免疫组织化学染色 (immunohistochemistry, IHC) 结果 (图 1C) 也表明 Kindlin-2 在实验组雌鼠子宫内膜和腺体上皮中的表达水平均明显低于对照组。以上研究表明从基因、蛋白和组织化学定位水平证明实验组雌鼠子宫中 Kindlin-2 被成功特异性敲除。

2.2 子宫内膜特异性敲除 Kindlin-2 的雌鼠生育能力下降

通过雌鼠交配实验来验证雌鼠的生殖能力:选择性成熟 (12 周大小) 的实验组和对照组雌鼠分别与 12 周大小的健康野生型雄鼠交配繁殖。实验组与对照组每笼 2~3 只雌鼠对应一只雄鼠。观察 6

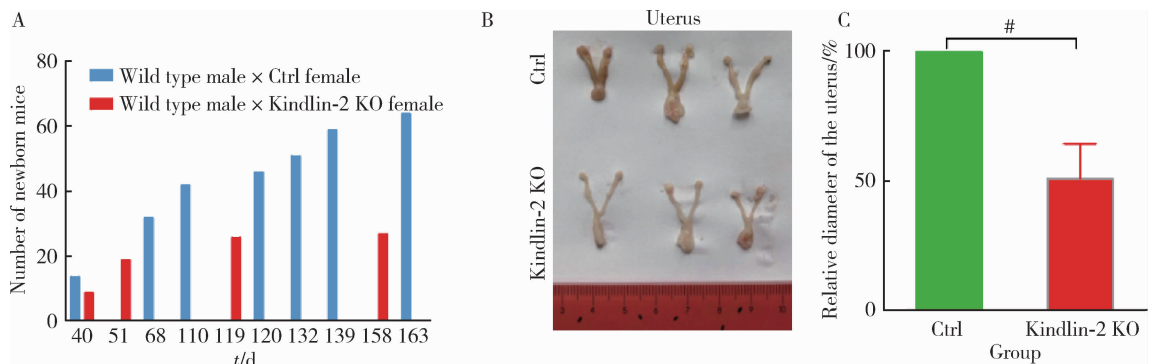
个月,并记录每只雌鼠阴栓形成情况、每次生育仔鼠的只数、仔鼠性别及出生仔鼠的状态等。实验结果表明,实验组雌鼠每次出生小鼠数量少、出生频率低、6个月总出生小鼠数量明显少于对照组(图2A),但出生的雌雄仔鼠数量没有异常,雌雄比例没有差异(表1),出生后仔鼠能够健康成长。上述结果表明敲除 Kindlin-2 能够抑制雌鼠的生殖能力。通过对两组小鼠子宫的观察可以看到,实验组雌鼠子宫比对照组子宫细,子宫壁变薄,差异有统计学意义(图2B、C)。

2.3 特异性敲除 Kindlin-2 导致雌鼠子宫发育异常

小鼠子宫分为子宫内膜层、肌层和外膜层,雌性小鼠性成熟后,生殖器官呈周期性变化,分为动情前期、动情期、动情后期和动情间期。通过阴道脱落细胞涂片可以区分不同时期。动情前期涂片以有核上皮细胞为主,少量角化细胞;动情期时,全部为无核角化细胞,偶尔有少量上皮细胞;动情后期时,白细胞、角化细胞、有核上皮细胞共同存在;动情间期时,以白细胞为主,角化细胞减少。我们尽量选择同窝、同一时期的小鼠子宫进行取材。每次在实验前均进行阴道脱落细胞的涂片确认每只雌鼠所处的周期并进行分组,然后,取12周同窝实验组和对照组雌鼠进行不同时期 HE 染色,通过形态学检测观察 Kindlin-2 敲除后不同动情周期雌鼠子宫的变化。结果表明实验组子宫内膜厚度显著小于对照组,差异有统计学意义(图3)。另外,实验组雌鼠的子宫内膜大部分都不完整,存在部分或大部分缺失,而对对照组雌鼠均具有完整的子宫内膜。

2.4 Kindlin-2 在子宫内膜发育过程中激活 mTOR 信号通路同时抑制 Hippo 信号通路

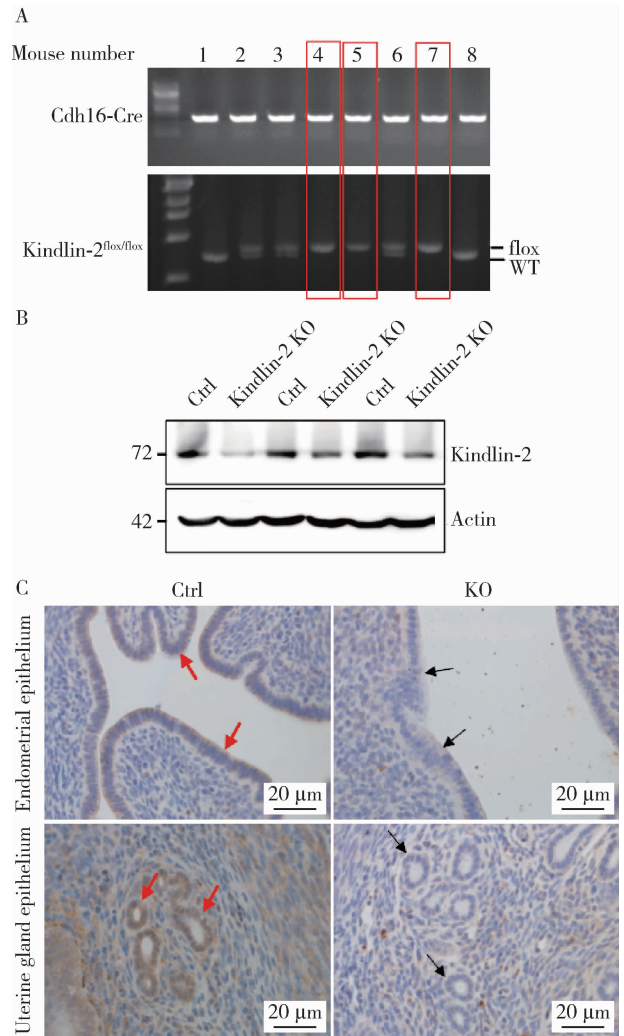
mTOR 信号通路参与调控细胞的生长、增殖和存活,Hippo 信号通路在发育中能够调控器官大小。



A, the number of newborn mice was counted; B, observation of uterine morphology and uterine wall thickness; C, statistics of uterine morphology and uterine wall thickness. # $P < 0.01$. Ctrl, control; KO, knockout.

图2 子宫内膜特异性敲除 Kindlin-2 引起雌鼠生育力下降

Figure 2 Endometrial specific knockout of Kindlin-2 caused fertility decline in female mice



A, mouse tail DNA identification, red boxes show the experimental group; B, the protein level of Kindlin-2 was detected by Western bot; C, immunohistochemistry staining was used to detect the expression and localization of Kindlin-2 in endometrium and glandular epithelium of female mice. Red box, mice in the experimental group; Red arrows, the expression of Kindlin-2 in the endometrium (upper) and glands (lower) in the control group; Black arrows, expression of Kindlin-2 in the endometrium (upper) and glands (lower) in the KO group. Ctrl, control; KO, knockout; WT, wild type.

图1 鉴定子宫内膜特异性敲除 Kindlin-2 小鼠模型

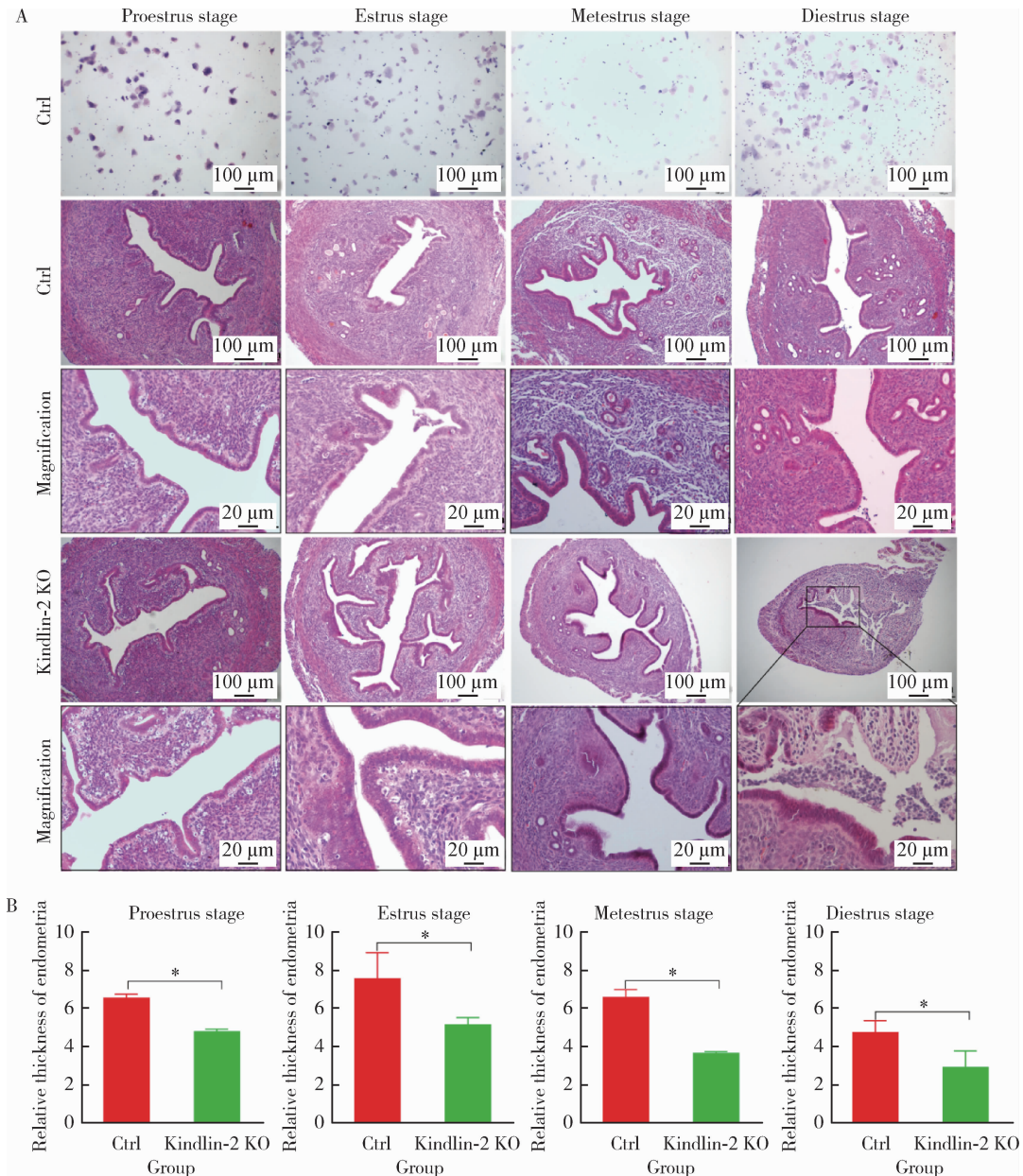
Figure 1 Identification of endometrial specific knockout Kindlin-2 mouse model

表 1 实验组与对照组出生仔鼠雌雄数量

Table 1 Number of male and female newborn mice in the Kindlin-2 KO group and the control group

Items	Female of newborn mice, <i>n</i>	Male of newborn mice, <i>n</i>	Total, <i>n</i>
Ctrl	56	58	114
Kindlin-2 KO	28	25	53
Total	84	83	167

Ctrl, control; KO, knockout.



A, HE staining of uterus of female mice in control group and Kindlin-2 KO group at proestrus stage, estrus stage, metestrus stage and diestrus stage; B, statistics of endometrial thickness. * $P < 0.05$. Ctrl, control; KO, knockout.

图 3 子宫内膜特异性敲除 Kindlin-2 导致雌鼠子宫发育异常

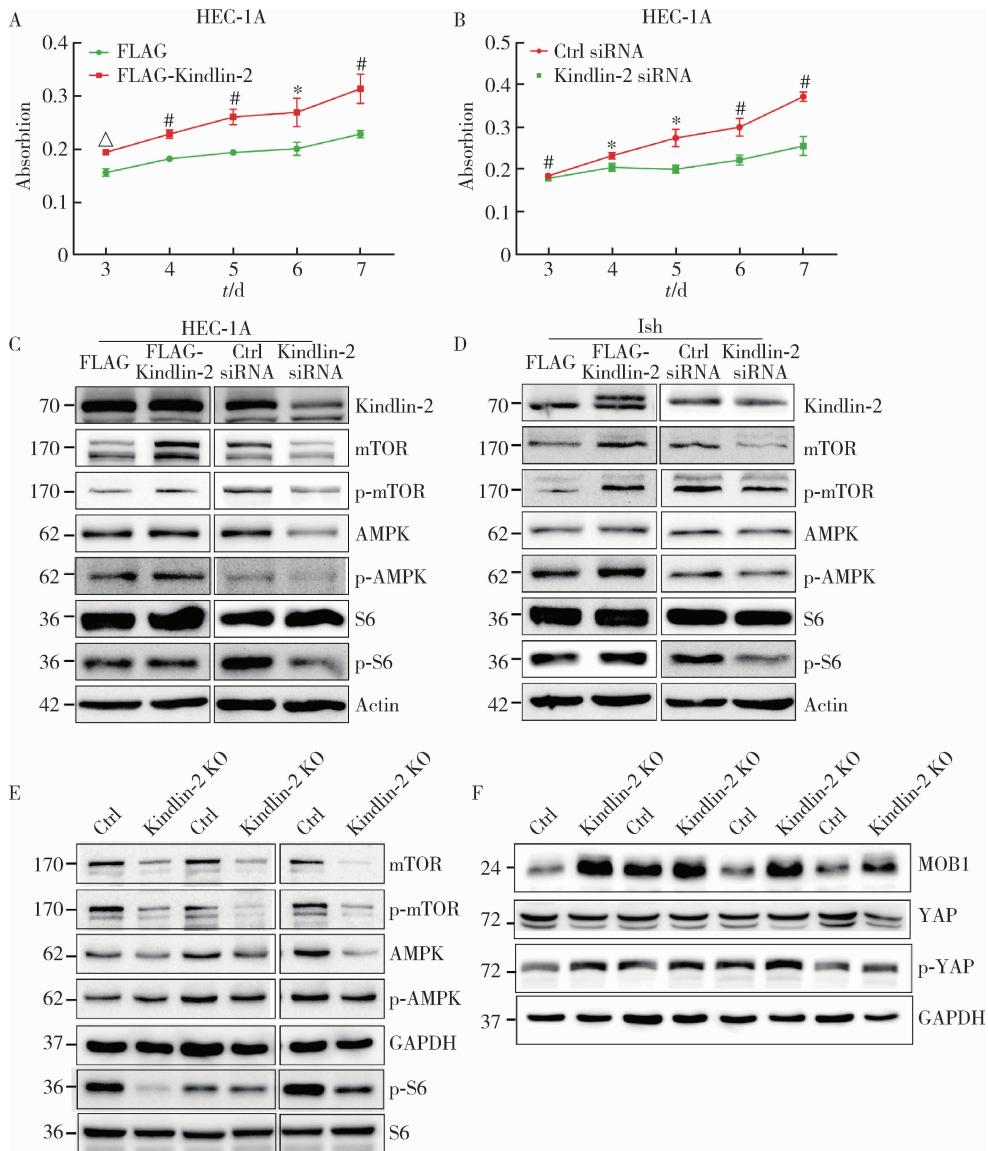
Figure 3 Endometrium specific knockout of Kindlin-2 leads to abnormal uterine development in female mice

第 2.2 小节表明子宫内膜特异性敲除 Kindlin-2 能够使子宫体积减小,抑制雌鼠子宫的发育以及抑制雌鼠的生殖力。在子宫内膜癌细胞系 HEC-1A 中高表达和敲低 Kindlin-2,通过细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测细胞的增殖能力,表明 Kindlin-2 能够

促进 HEC-1A 细胞系的增殖(图 4A、B)。在子宫内膜癌细胞系 HEC-1A 和 Ish 中分别进行了高表达和敲低 Kindlin-2,检测对 mTOR 信号通路的调控作用,实验结果表明,高表达 Kindlin-2 能够上调 mTOR、p-mTOR、AMPK、p-AMPK、p-S6 的蛋白水平,激活

mTOR 信号通路,低表达 Kindlin-2 能够抑制 mTOR 信号通路(图 4C、D)。另外,我们选取 12 周的实验组和对照组雌鼠进行取材,提取子宫蛋白进行 Western blot 实验,检测 mTOR 和 Hippo 信号通路相关分子,实验结果表明,实验组与对照组相比,mTOR 信号通路被抑制,靶蛋白 p-S6 显著降低,与细胞系 HEC-1A 和 Ish 蛋白量表达一致(图 4E),MOB1 的表达量升高、YAP 总量不变而磷酸化 YAP 表达量升高(图 4F)。

这一结果与我们之前在肾小管上皮细胞及肾纤维化中得到的结果^[7]一致,进一步说明小鼠子宫内膜敲除 Kindlin-2 一方面通过抑制 mTOR 信号通路抑制子宫内膜增殖,减少子宫蛋白合成,另一方面通过激活 Hippo 信号通路引起核心分子 YAP 的磷酸化增加,非磷酸化的 YAP 入核减少,进而抑制细胞增殖、减小子宫的总体体积,导致子宫壁变薄、子宫变细,最终引起雌鼠生殖力下降。



A, B, proliferation effects of overexpression of Kindlin-2 and knockdown of Kindlin-2 in endometrial cancer cell line HEC-1A, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, $\Delta P < 0.001$, ns. FLAG-Kindlin-2; C, D, detection of mTOR signaling pathway related molecules after overexpression and knockdown of Kindlin-2 in endometrial cancer cell lines HEC-1A and Ish; E, F, the protein levels of mTOR signaling pathway and Hippo signaling pathway related molecules in Kindlin-2 KO and control mice were detected by Western blot. mTOR, mammalian target of rapamycin; AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; S6, ribosomal protein; MOB1, Mps one binding 1; YAP, Yes-associated protein; Ctrl, control; KO, knockout.

图 4 子宫内膜特异性敲除 Kindlin-2 抑制 mTOR 信号通路、激活 Hippo 信号通路

Figure 4 Endometrial specific knockdown of Kindlin-2 inhibits mTOR signaling pathway and activates Hippo signaling pathway

3 讨论

Kindlin-2 在发育中发挥重要的作用,尤其是对中胚层来源的器官。子宫作为中胚层来源的器官,

其发育也受到 Kindlin-2 的调控。本实验中我们使用泌尿生殖系统上皮特异性敲除 Kindlin-2 的小鼠模型进行研究,发现敲除 Kindlin-2 能够引起小鼠子宫腺体减少,子宫内膜缺失、不连续。在不同的子宫

内膜周期均观察到这一现象,最终引起生殖能力的下降。Cdh16-Cre 是研究泌尿生殖系统上皮的特异性启动子。我们将 Cdh16-Cre 工具鼠与 Kindlin-2^{fllox/fllox} 小鼠进行交配,获得 Kindlin-2 子宫内膜特异性敲除的小鼠。雌性小鼠性成熟后,子宫内膜发生周期性变化,通过其阴道脱落细胞涂片可以区分不同时期,小鼠处于不同子宫周期时子宫内膜、腺体的状态均有所差异。为了尽量减少不同时期子宫内膜状态不同造成的差异,我们选择在相同的周龄和相同周期的子宫进行取材,观察子宫内膜的形态。实验结果表明,敲除 Kindlin-2 能够引起小鼠子宫内膜发育不全,腺体减少,不利于胚胎着床。

在对小鼠的组织器官进行观察时我们发现,敲除 Kindlin-2 的小鼠子宫大体比正常对照组体积小要细,肾脏和睾丸也比正常组偏小。目前已知的能够调控组织器官大小的重要调控途径是 Hippo 和 mTOR 信号通路。Hippo 信号通路激活能够限制组织器官生长,调节细胞增殖、分化以及迁移。Hippo 通路磷酸化激活抑制会导致细胞快速生长以及肿瘤形成。哺乳动物经典的 Hippo 信号通路由一系列的激酶级联组成,包括 MST1/2、SAV1、LATS1/2、MOB1、YAP 和 TAZ。MST1/2 磷酸化并激活 LATS1/2,MOB1 能够辅助激活 LATS1 实现 LATS1 的完全激活,然后激活的 LATS1/2 限制两个转录共激活因子 YAP 以及 TAZ 的激活。而被激活的 YAP/TAZ 进入细胞核,与 TEAD 转录因子家族结合并诱导一系列调节生理功能的基因,例如细胞增殖、生存以及迁移的表达。我们实验室前期发表的研究论文^[7]表明 Kindlin-2 能够通过促进 MOB1 的降解,抑制 Hippo 信号通路,进而促进肾纤维化的发生和发展。在肾小管上皮细胞 HKC 和 HK2 中,我们验证了 Kindlin-2 通过结合 MOB1 和 MOB1 的 E3 泛素连接酶 praja2,促进二者之间的结合,进而造成 MOB1 的降解。敲低 Kindlin-2 时 MOB1 升高、YAP 总量不变、磷酸化 YAP 升高。本实验中,我们对雌鼠的子宫进行取材,提取蛋白并检测 Hippo 通路的变化情况,敲除 Kindlin-2 组与对照组相比,MOB1 的表达量升高、YAP 总量不变而磷酸化 YAP 表达量升高,与本课题前期报道^[7]结果一致,进一步说明 Kindlin-2 对 Hippo 信号通路的调控是普遍存在的。mTOR 信号通路参与调控细胞的生长、增殖和存活。mTOR-S6K-S6 级联激活导致 mTOR 信号通路激活,进而引发下游细胞增殖异常。mTOR 与 Hippo 是调控子宫生长的两条主要的信号通路,是细胞生长发育调控的阴阳平衡的两个方面,二者之间存在密切

的调控关系^[16]。本研究发现 Kindlin-2 一方面激活 mTOR 信号通路,另一方面抑制 Hippo 信号通路,从而完成对子宫内膜发育的促进作用。

本研究揭示了子宫内膜发育的新分子机制,提出 Kindlin-2 是子宫内膜正常发育和正常雌性小鼠生殖能力所必须的。在机制上发现 Kindlin-2 是 mTOR 信号通路的重要内源激活子,丰富了整合素相互作用蛋白 Kindlins 家族对体内 mTOR 信号通路调控的新机制。同时,本研究也为我们提出的 Kindlin-2 在中胚层来源器官发育过程中有着至关重要作用的观点提供了新例证,为因子宫内膜病变引起生殖力下降的部分患者提供了理论依据,为人工治疗干预提供了潜在的分子靶标。

参考文献

- [1] Zhan J, Zhang H. Kindlins: roles in development and cancer progression[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 98: 93-103.
- [2] Li B, Chi XC, Song JG, et al. Integrin-interacting protein Kindlin-2 induces mammary tumors in transgenic mice[J]. *Sci China Life sci*, 2019, 62(2): 225-234.
- [3] Zhan J, Song JG, Wang PX, et al. Kindlin-2 induced by TGF-beta signaling promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression through downregulation of transcriptional factor HOXB9[J]. *Cancer Lett*, 2015, 361(1): 75-85.
- [4] Mia MS, Jarajapu Y, Rao R, et al. Integrin beta1 promotes pancreatic tumor growth by upregulating Kindlin-2 and TGF-beta receptor-2[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10599.
- [5] Guo BH, Gao JC, Zhan J, et al. Kindlin-2 interacts with and stabilizes EGFR and is required for EGF-induced breast cancer cell migration[J]. *Cancer Lett*, 2015, 361(2): 271-281.
- [6] Wang W, Kansakar U, Markovic V, et al. Role of Kindlin-2 in cancer progression and metastasis[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(14): 901.
- [7] Song JG, Wang TZ, Chi XC, et al. Kindlin-2 inhibits the Hippo signaling pathway by promoting degradation of MOB1[J]. *Cell Rep*, 2019, 29(11): 3664-3677.
- [8] Zhan J, Yang M, Chi XC, et al. Kindlin-2 expression in adult tissues correlates with their embryonic origins[J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(7): 690-697.
- [9] Canning CA, Chan JS, Common JE, et al. Developmental expression of the fermitin/kindlin gene family in *Xenopus laevis* embryos[J]. *Dev Dyn*, 2011, 240(8): 1958-1963.
- [10] Dowling JJ, Gibbs E, Russell M, et al. Kindlin-2 is an essential component of intercalated discs and is required for vertebrate cardiac structure and function[J]. *Circ Res*, 2008, 102(4): 423-431.
- [11] Rozario T, Mead PE, de Simone DW. Diverse functions of kindlin/fermitin proteins during embryonic development in *Xenopus laevis*[J]. *Mech Dev*, 2014, 133: 203-217.
- [12] Zhang Z, Mu Y, Veevers J, et al. Postnatal loss of Kindlin-2 leads to progressive heart failure[J]. *Circ Heart Fail*, 2016, 9(8): e003129.
- [13] He XK, Song JG, Cai Z, et al. Kindlin-2 deficiency induces fatal intestinal obstruction in mice[J]. *Theranostics*, 2020, 10(14): 6182-6200.
- [14] Chi XC, Luo WW, Song JG, et al. Kindlin-2 in Sertoli cells is essential for testis development and male fertility in mice[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 604.
- [15] Shao X, Somlo S, Igarashi P. Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract[J]. *JASN*, 2002, 13(7): 1837-1846.
- [16] Papageorgiou K, Mastora E, Zikopoulos A, et al. Interplay between mTOR and Hippo signaling in the ovary: clinical choice guidance between different gonadotropin preparations for better IVF[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 702446.

(2022-06-16 收稿)

(本文编辑:刘淑萍)