

泌尿生殖医学基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002178

组氨酸三聚体核苷结合蛋白 1 (Hint1) 在胚胎植入中的作用

王倩, 刘太行, 陈雪梅, 张爽, 张雪, 叶亮, 丁裕斌

(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)

【摘要】目的:检测组氨酸三聚体核苷结合蛋白 1(histidine triad nucleotide binding protein 1, Hint1) 基因在小鼠早期妊娠过程中子宫内膜中的表达规律;探究 Hint1 基因在小鼠子宫内膜基质细胞蜕膜化过程的作用。**方法:**应用免疫组化、原位杂交、Western blot 和 RT-qPCR 检测 Hint1 在早期妊娠、假孕和人工诱导蜕膜化模型小鼠子宫中的表达;siRNA 敲低原代分离的小鼠子宫内膜基质细胞 Hint1 的表达。LC-MS 分析 Hint1 对基质细胞蜕膜化过程中脂质组学的影响。**结果:**在妊娠的第 1 至第 8 天 Hint1 表达逐渐升高,且在胚胎植入部位的表达明显高于非植入点;体内人工诱导蜕膜化小鼠子宫内膜 Hint1 的表达明显高于未发生蜕膜化的对照子宫;利用 siRNA 干扰小鼠子宫内膜基质细胞中 Hint1 的表达可显著影响其蜕膜化过程及脂质代谢。**结论:**Hint1 在基质细胞蜕膜化过程中表达升高,并可能与蜕膜化过程中基质细胞的脂质代谢相关。

【关键词】蜕膜化;Hint1;脂质代谢;LC-MS**【中图分类号】**R714.7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-03-27

Role of histidine triad nucleotide binding protein 1 in embryo implantation

Wang Qian, Liu Taihang, Chen Xuemei, Zhang Shuang, Zhang Xue, Ye Liang, Ding Yubin

(Laboratory of the Reproductive Biology, Joint International Research Laboratory of Reproduction & Development School of Public Health and Management, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of histidine triad nucleotide binding protein 1 (Hint1) gene in the endometrium during early pregnancy in mice and its role in decidualization of endometrial stromal cells. **Methods:** Immunohistochemistry, in situ hybridization, Western blot, and RT-qPCR were used to measure the expression of Hint1 in the uterus in mouse models of early pregnancy, pseudopregnancy, and artificially-induced decidualization, and siRNA was used to knockdown the expression of Hint1 in primary endometrial stromal cells. LC-MS was used to analyze the effect of Hint1 on lipidomic profile in stromal cells during decidualization. **Results:** The expression of Hint1 gradually increased from day 1 to day 8 of pregnancy, and the expression at implantation sites was significantly higher than that at non-implantation sites. The mice with artificially induced decidualization had significantly higher expression of Hint1 in the endometrium than the control mice without decidualization. The siRNA interference with Hint1 expression significantly affected decidualization and lipid metabolism in endometrial stromal cells. **Conclusion:** There is an increase in the expression of Hint1 in endometrial stromal cells during decidualization, which may be associated with lipid metabolism in endometrial stromal cells during decidualization.

【Key words】decidualization; Hint1; lipid metabolism; LC-MS

胚胎植入是妊娠过程的关键步骤,需要胚泡与子宫内膜之间双向配合并涉及复杂的调控机制。胚胎植入后,围着床点的基质细胞发生增殖和分化的蜕膜化过程,是成功妊娠的重要事件之一^[1-2]。在子

宫内膜基质细胞发生蜕膜化的过程中,母体子宫内膜基质细胞除了在雌孕激素的调节下发生蜕膜化的同时也受到多种相关信号通路和因子以及代谢作用的调控^[3]。

组氨酸三聚体核苷结合蛋白 1(histidine triad nucleotide binding protein 1, Hint1)属于组氨酸三聚体(histidine triad, HIT)蛋白核苷酸转移酶和水解酶家族成员^[4],广泛表达于原核生物和真核生物,但其生物学功能尚未完全阐明^[5-6]。目前研究发现,Hint1

作者介绍:王倩, Email: 405511055@qq.com,

研究方向:胚胎植入。

通信作者:丁裕斌, Email: dingyb@gmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81370731)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190529.1654.018.html>

(2019-05-31)

在调控基因转录的通路中具有抑制作用^[7],能够与 CDK7^[8]、转录因子 Mi^[9]、USF^[10]、Pontin/Reptin/ β -catenin/TCF4 复合物^[11]、API^[12]相互作用并抑制其活性。有证据表明,Hint1 可能影响细胞的代谢功能,例如 Hint1 的敲除会导致小鼠肝脏脂质代谢表型重塑^[13]。然而,Hint1 在胚胎植入过程中的作用目前还不清楚。

本研究探索 Hint1 在小鼠早孕模型、假孕模型和人工诱导蜕膜化模型的表达规律,体外诱导蜕膜化模型检测 Hint1 基因是否受雌激素和(或)孕酮调节作用,了解该基因在蜕膜化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物的饲养均符合实验室动物保护和指南。本实验选用的性成熟昆明小鼠为 8 周龄(25~30 g),均购自重庆医科大学实验动物中心(证书编号:SCXK[X] 2018-0003)。置于重庆医科大学实验动物中心动物房饲养,给予常规自由饮食和饮水,提供严格控制温度、湿度和光线。

将雌性小鼠与相同种属的可育或经输精管结扎后的雄性交配以获得妊娠或假孕小鼠。查到阴栓的当天确定为妊娠第 1 天(D₁)或假孕第 1 天(PD₁)。从第 1 天(D₁)到 D₄,通过冲洗来自输卵管或子宫的胚胎来确认是否怀孕。D₅ 子宫的植入部位通过静脉注射 1%台盼蓝染料(Sigma-Aldrich)确定着床位点。在 D₁(PD₁)、D₅(PD₅)、D₆(PD₆)和 D₈(PD₈)($n=3\sim5$ /组)处死小鼠。

人工诱导的蜕膜化小鼠模型:在 PD₄($n=3\sim5$ /组)小鼠子宫角的一侧注入 10 μ L 芝麻油(Sigma-Aldrich),对侧向子宫角注射等量 PBS 用作对照,在 PD₈ 收集样品。从形态学和蜕膜化标记物 dtprp(也称为 prl8a2)的 mRNA 表达水平评估蜕膜化程度。

将新鲜的子宫内层在冰上快速收集,4.0%多聚甲醛中固定,或在液氮快速冷冻后于-80 $^{\circ}$ C 下储存以待进一步实验。

1.2 小鼠子宫内层基质细胞(mESC)分离培养

将 PD₄ 小鼠的子宫纵向分开,切成小块(2~3 mm),并用 HBSS (Boster)洗涤后,加入含有 6 mg/mL dispase II (Roche Applied Science)和 1%(w/v)胰蛋白酶(Sigma-Aldrich)的 HBSS 缓冲液,在 4 $^{\circ}$ C 条件下消化 2 h,然后在 37 $^{\circ}$ C 下消化 30 min。将样本与 0.5 mg/mL 胶原酶(Sigma-Aldrich)(在 HBSS 中稀释)在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,每 10 min 剧烈摇动直到上清液变混浊。炭吸附血清(biological industries)终止消化反应后,将上清液通过 70 μ m 尼龙过滤器以消除上皮细胞团块,离心弃上清。将细胞沉淀物用 HBSS 洗涤 2 次并悬浮于完全培养基

中,该培养基由含有 20%炭吸附血清、100 U/mL 青霉素(Be-yotime)、100 μ g/mL 链霉素(Beyotime)和 2.5 μ g/mL 两性霉素 B(Sigma-Aldrich)的 DMEM/F-12 培养基(Sigma-Aldrich)。细胞以 1×10^6 个细胞/培养皿或 2×10^5 个细胞/孔用于 24 孔培养板。在含有 5.0%CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 培养箱中初始培养 1 h 待细胞贴壁后换液,将分离的基质细胞在新鲜完全培养基中进一步培养。细胞免疫荧光实验检测基质细胞标志物 Vimentin,鉴定其为细胞纯度($\geq 95.0\%$)的基质细胞。

1.3 细胞转染

由上海吉玛基因设计并合成特异性靶向小鼠 Hint1(si-Hint1)基因的小干扰 RNA。细胞在正常生长条件下(37 $^{\circ}$ C、5%CO₂)密度达到 70%~90%时进行转染实验,操作方法如下:将 5 μ L Lipofectamine 3000(Invitrogen)转染试剂与 50 nmol/L siRNA 双链体(si-Hint1 和空载体 siRNA)在室温条件下预混以形成复合物,然后将该混合物分散到细胞培养基中,在正常生长条件培养细胞 24 h,敲低 Hint1 表达。收取细胞材料进行后续实验。

1.4 体外诱导蜕膜化

将 mECS 在含有 E2(10 nmol/L)、P4(1 μ mol/L)的完全培养基(含有 20%炭吸附血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和 2.5 μ g/mL 两性霉素 B 的 DMEM/F-12 培养基)中培养 72 h。通过 RT-qPCR 检测小鼠子宫基质细胞的蜕膜化标记物 dtprp 以验证诱导蜕膜化的成功与否。

1.5 免疫组织化学

免疫组织化学染色按照试剂盒说明书(Zhongshan Biosciences)进行操作:将子宫内层组织石蜡切片在二甲苯中脱蜡并在梯度酒精中脱水,然后用枸橼酸盐缓冲液微波炉抗原热修复。在室温下,3%的 H₂O₂ 孵育 10 min 以抑制内源性过氧化物酶。10%正常山羊血清在 37 $^{\circ}$ C 预孵育 30 min,然后在 4 $^{\circ}$ C 下与 Hint1 一抗(Proteintech Group)以 1:100 稀释浓度孵育过夜。第 2 天,将切片在 PBS 中洗涤,并与生物素标记的二抗(Zhongshan Biosciences)在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min,然后与辣根过氧化物酶(Zhongshan Biosciences)在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。用 DAB 试剂盒(Zhongshan Biosciences)进行显色反应,并显示为棕色染色。自来水冲洗终止反应,随后用苏木精复染,中性树脂(Solarbio)封片。

1.6 Western blot

将子宫组织置于含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液 RIPA 和 PMSF(Beyotime)中,匀浆器研磨后离心以提取总的蛋白质,或者将培养的细胞以 2×10^5 个细胞/孔直接收集在裂解缓冲液中。使用 BCA 试剂盒(Beyotime)测量子宫组织的蛋白质浓度。按照目的蛋白分子量配制分离胶以及浓缩胶,60 V 恒压预电泳 10 min 后进行蛋白上样,80 V 恒压电泳 90 min;250 mA 转膜至 PVDF 膜(Millipore);5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 80 min 后,滴加 5%脱脂奶粉稀释的一抗 Hint1(1:1 000)、

BMP2(1:1 000)、Hoxa10(1:1 000)、兔单克隆 β -actin(1:1 000),4℃冰箱过夜;次日 PBST 清洗 3 次,15 min/次;置于 5%脱脂奶粉稀释的二抗的室温孵育 80 min 后,PBST 清洗 3 次,15 min/次;ECL 法显色。Quantity One 软件进行灰度分析,ACTB(β -actin)用作内部对照。

1.7 原位杂交

Hint1 探针由鼎国生物技术有限公司设计和合成。将冷冻切片(10 μ m)置于防脱载玻片上,并在 4%多聚甲醛溶液(由 PBS 稀释)中固定 1 h。1%Triton(由 PBS 稀释)(Beyotime)浸泡 20 min。预杂交在室温下进行 15 min,在 58℃下杂交 16 h,洗涤封闭,将切片与地高辛(1:5 000,Roche)一起温育后,碱性磷酸酶显色试剂盒(Beyotime)显色,原位杂交的阳性信号为深棕色。甲基绿(Beyotime)复染后封片。

1.8 qRT-PCR

参照 RNAiso Plus(TaKaRa)RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA 并测定浓度。参考 PrimeScript™ RT Master Mix(逆转录试剂盒)将 RNA 逆转录成 cDNA。用于 RT-qPCR 的引物序列见表 1。使用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒(TaKaRa)在 BIO-RAD iQ5 荧光实时定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。每组实验至少重复 3 次, β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的表达量。

1.9 免疫荧光检测

培养的细胞采用 4.0%多聚甲醛固定 25 min 后,用 5% BSA 封闭 60 min。将 Vimentin 一抗(Cell Signaling Technology)于 4℃温育过夜。次日 PBS 洗涤 3 次后,荧光二抗(Beyotime)避光条件下 37℃孵育 1 h。DAPI(Beyotime)染核 10 min,Olympus BX43 显微镜拍摄图像。

1.10 脂质组学分析

收集由 si-Hint1 转染并经 E2 和 P4 诱导蜕膜化后的细胞,置于液氮、水浴 37℃中(浸泡 5 min)反复冻融 2 次,再放

入-80℃冰箱保存备用。细胞溶于 20 μ L 水/甲醇(43:57, v/v),涡旋 30 s,转移至玻璃管。加内标(溶于 CHCl_3 ;80 μ L),涡旋混匀 30 s。室温静置 5 min,再进行涡旋。4 000 r/min 4℃离心 30 min,提取有机相(最下层),并在通风橱中蒸发至干燥,储存在-20℃。将蒸发的萃取物溶于氯仿/甲醇(1:1, v/v; 20 μ L),涡旋混匀 30 s。加入 propan-2-ol/water/acetonitrile 丙烷-2-醇/水/乙腈(50:25:25, v/v;200 μ L),涡旋混匀 30 s。然后 4 000 r/min 4℃离心 20 min,吸取上清液 150 μ L 加入到 UPLC 注射小瓶中。

使用 ORA 数据库来筛选评估重要的代谢产物和丰富的数据列表。IMPALA 用作数据信号通路分析的工具。

1.11 统计学处理

每个实验包括至少 3 个独立样品,且至少重复 3 次。使用 GraphPad Prism 5.0 用于统计分析。使用 *t* 检验或单因素方差分析评估组之间的差异,结果显示为均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Hint1 在小鼠早期妊娠子宫内膜中的表达规律

免疫组化结果(图 1A)显示 Hint1 蛋白在妊娠第 1 天(D_1)和 D_4 的腔上皮,腺上皮和部分基质细胞中表达。在 D_5 胚胎附着于子宫内膜后,Hint1 在植入部位(IS)周围的初级蜕膜区(PDZ)中广泛表达。在 D_6 和 D_8 ,在植入部位(IS)周围的次级蜕膜区(SDZ)内的蜕膜细胞中观察到 Hint1 的强阳性免疫染色。在 D_5 和 D_6 的非植入位点处(IIS)的 Hint1 的免疫染色类似于在 D_1 和 D_4 上观察到的染色。原位杂交结果(图 1B)显示,在 D_1 和 D_4 的子宫内壁上皮细胞中有强 Hint1 mRNA 信号。在 D_5 的初级蜕膜区和 D_6 和 D_8 上的次级蜕膜区中检测

表 1 qRT-PCR 的引物

基因	检索号		序列:5'→3'	温度(℃)
Hint1	NM_008248	正义链	GCGACACGATCTTCGGCAA	62.0
		反义链	GGTGCTTGAGGGGAAATGTCA	
dtprp	NM_010088	正义链	AGCCAGAAATCACTGCCACT	59.0
		反义链	TGATCCATGCACCCATAAAA	
cox2	NM_011198	正义链	GCGGACTAATCTTCAACTCCTACA	60.0
		反义链	CAGATTTCAGAGCATTGACCGTA	
fas	NM_001146708	正义链	CATCTGGACCCTCTACCTCTG	60.0
		反义链	AGGACAGGGCTTATGGCAGA	
pemt	NM_008819	正义链	GCCTGCTACTCTCTAAGCGTCA	60.0
		反义链	GAACACGGTCACTCTCGCCT	
pld	NM_001164056.1	正义链	TTCTTCAAGGAGGTGTGGGTTT	60.0
		反义链	TGCTCCCAACAGAAGGCAGTA	
sptlc2	NM_011479	正义链	TTGTTTATGGTCAGCCTCGGA	60.0
		反义链	CATAACATCCACATCCTCGGG	

到特异性 Hint1 mRNA 信号,在非植入位点处的基质细胞中有微弱的表达。qRT-PCR 检测妊娠早期小鼠子宫中 Hint1 的 mRNA 水平显示(图 1C),子宫 Hint1 mRNA 表达从 D₁ 至 D₄ 逐渐增加。植入期间(D₅ 和 D₆)在 IS 和 IIS 之间 Hint1 mRNA 存在显著差异表达。与 D₅ 和 D₆ 的 IIS 相比,Hint1 在 IS 的表达水平分别上调 1.39 倍和 1.25 倍。Western blot 结果(图 1D)显示,D₄、D₅、D₆ 和 D₈ 的 Hint1 蛋白表达明显高于 D₁,并且 Hint1 在 D₅ 和 D₆ 上 IS 的表达明显高于 IIS。

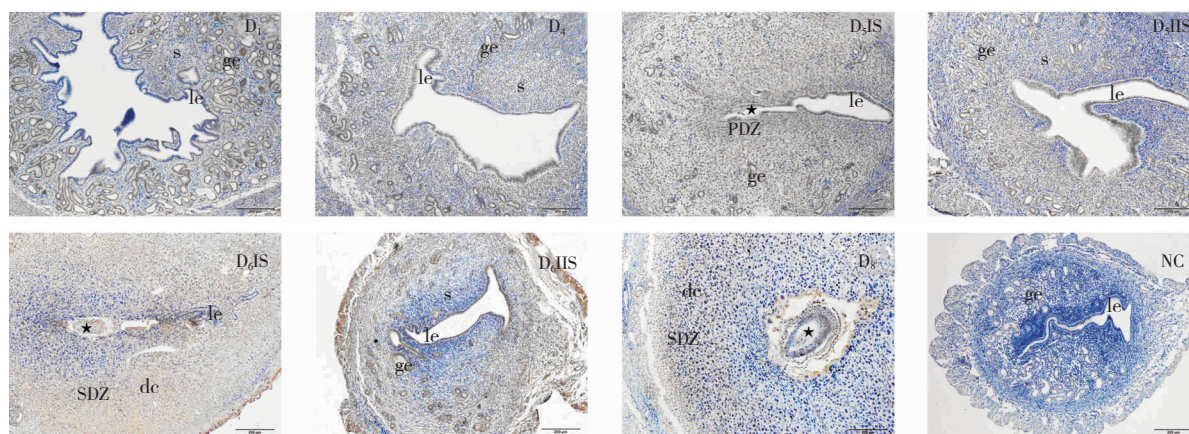
2.2 Hint1 在假孕小鼠子宫内膜中的表达规律

为了检测 Hint1 表达是否依赖于胚胎信号,检查它在假

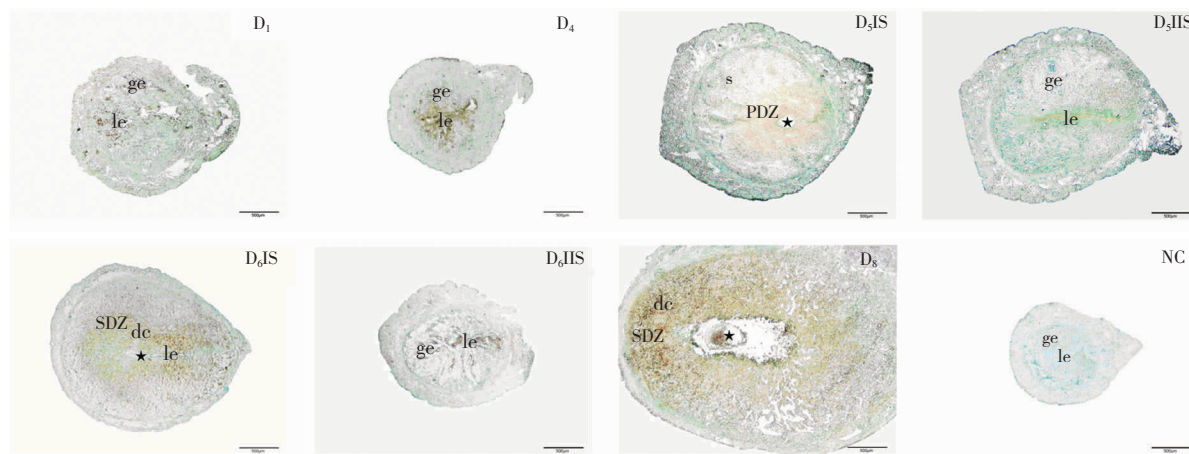
孕小鼠子宫内膜中的水平(图 2)。Hint1 在假孕 D₁ 至 D₅ 的小鼠子宫内膜基质区域和腺上皮细胞中存在表达。结果显示 Hint1 在早孕期小鼠子宫内膜的时空性表达主要依赖于激素作用,并不依靠胚胎信号激发。

2.3 Hint1 在小鼠人工诱导蜕膜化的子宫内膜的表达规律

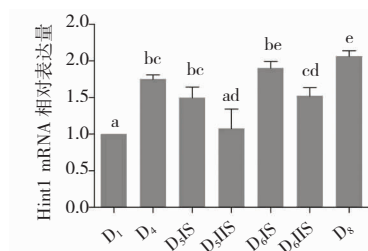
为了观察蜕膜组织中 Hint1 的表达是否依赖于胚胎的存在,建立了人工诱导蜕膜化的小鼠模型。根据小鼠子宫诱导侧和对照侧的形态学差异(图 3A)、子宫两侧质量(图 3B)和小鼠蜕膜标记基因 dtpr 的 mRNA 水平(图 3C)证明该模型的成功建立。



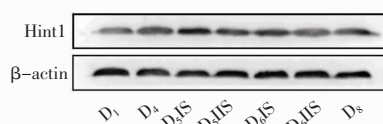
A. 免疫组织化学



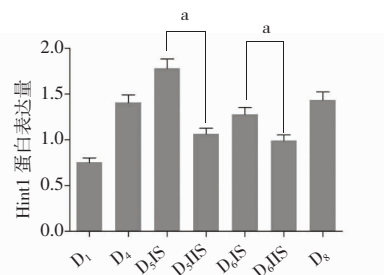
B. 原位杂交



C. qRT-PCR



D. Western blot

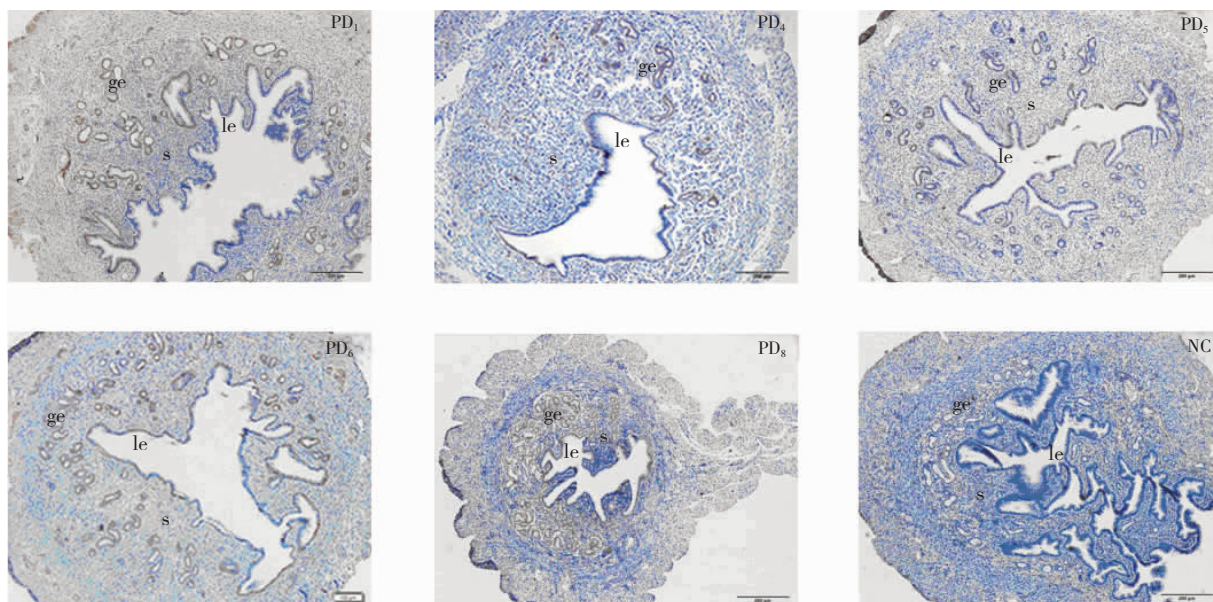


E. Western blot 灰度分析

le:腔上皮;ge:腺上皮;s:基质细胞;dc:蜕膜细胞;★:胚胎;PDZ:初级蜕膜区;SDZ:次级蜕膜区;IS:着床点;IIS:着床旁

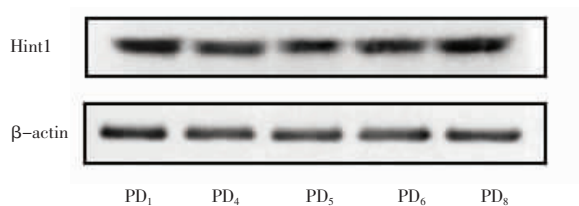
a:2 组数据间有统计学差异

图 1 小鼠早孕期间的 Hint1 表达规律

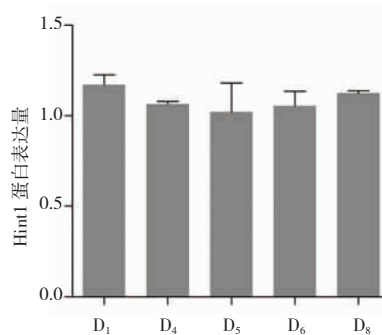


le:腔上皮;ge:腺上皮;s:基质细胞

A. 免疫组织化学



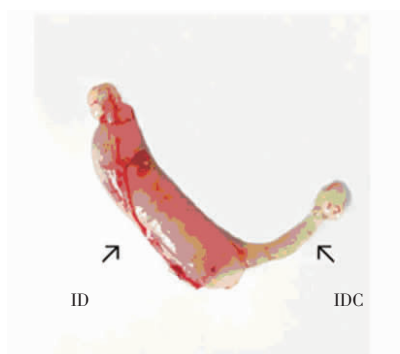
B. Western blot



C. Western blot 灰度分析

标有相同小写字母的栏表示组间数据无显著性差异;标有不同小写字母的栏表示组间的数据有显著性差异

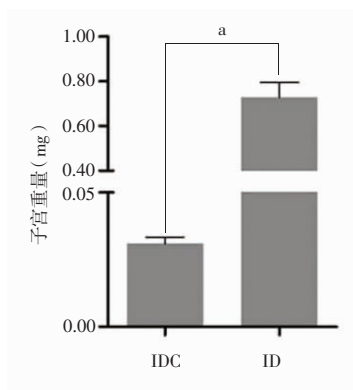
图2 小鼠假妊娠期间的 Hint1 表达规律



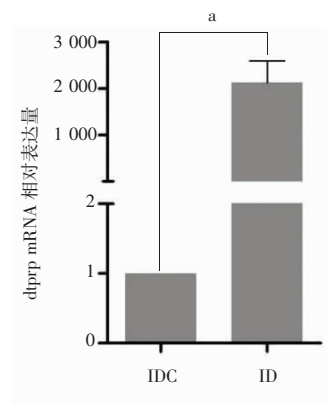
ID:玉米油诱导蜕膜化侧;IDC:对照侧

A. 小鼠子宫的形态学分析

a:2 组数据间有统计学差异



B. 小鼠子宫重量比较



C. qRT-PCR

图3 成功建立体内诱导蜕膜化

免疫组化(图 4A)和原位杂交(图 4B)结果显示 Hint1 在诱导蜕膜化子宫中的蛋白水平和 mRNA 水平明显高于对照组。qRT-PCR 结果也表明,在诱导蜕膜化子宫中 Hint1 的

mRNA 表达是对照组的 2.25 倍(图 4C)。Western blot 也证实了诱导蜕膜化组中 Hint1 表达高于对照组。提示 Hint1 在蜕膜中高表达。

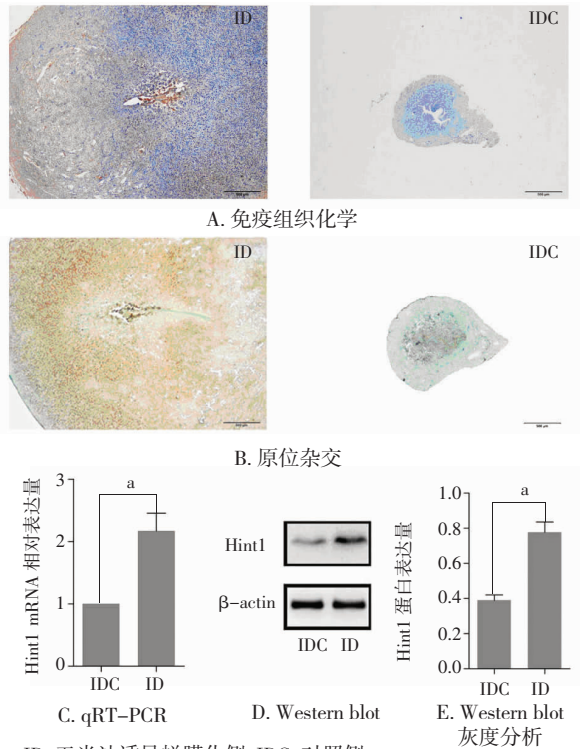


图 4 Hint1 在人工诱导蜕膜化小鼠子宫内膜的表达

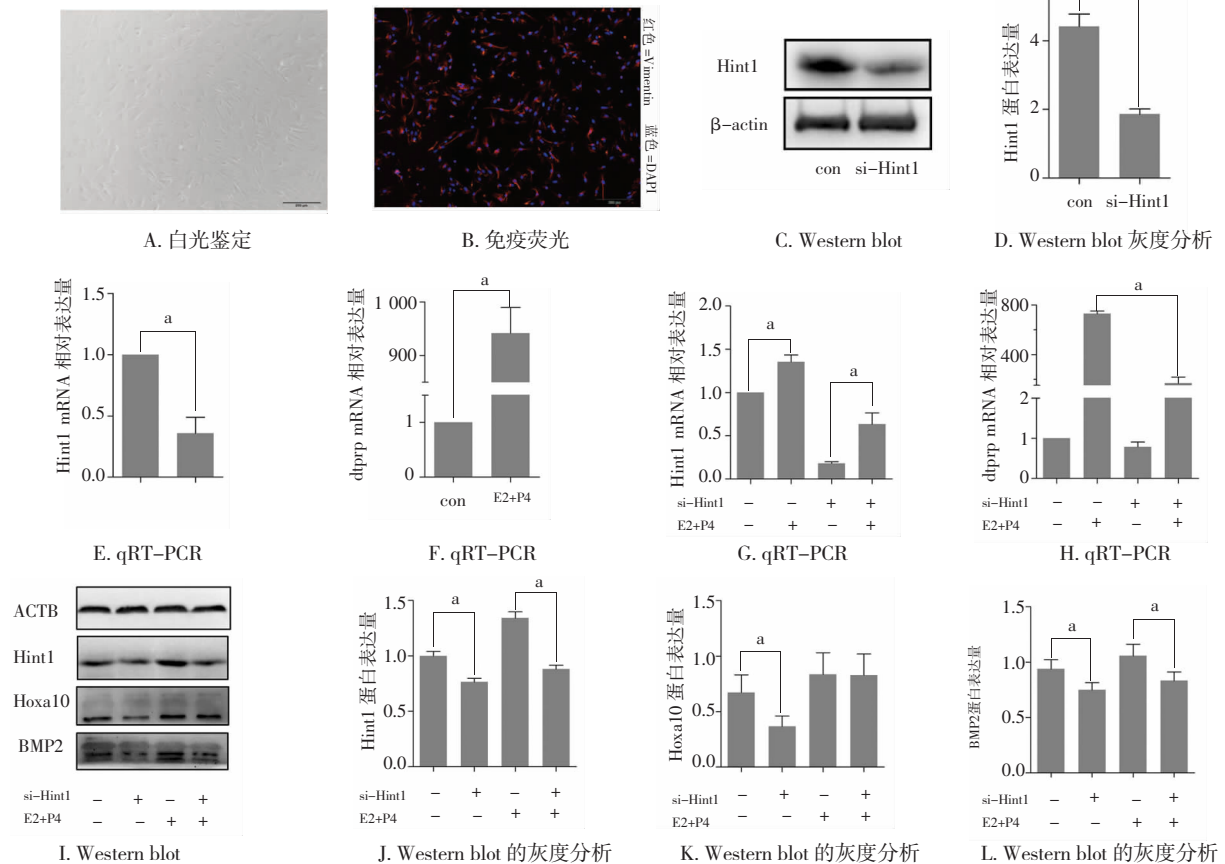


图 5 Hint1 敲低对 mESC 中蜕膜化的影响

2.4 Hint1 表达降低对于小鼠基质细胞体外诱导蜕膜化的影响

为了进一步探讨 Hint1 在子宫内膜基质细胞蜕膜化中的作用,分离了小鼠子宫内膜基质细胞(mESCs)体外培养,采用细胞免疫荧光检测基质细胞标志物 Vimentin 鉴定细胞纯度(图 5B)。并使用靶向 siRNA 干扰基质细胞中 Hint1 的表达,通过 Western blot (图 5C)和 RT-qPCR (图 5E)验证 Hint1 干扰模型建立成功。同时,在 mESC 中检测小鼠蜕膜标记物 dprp 的 mRNA 表达,并验证 E2 和 P4 在体外成功诱导蜕膜化(图 5F)。与对照组相比(图 5G,H),体外蜕膜化诱导的小鼠基质细胞中 Hint1 的 mRNA 水平明显上调,并且在 Hint1 干扰组中 dprp 的表达被抑制。si-Hint1 干扰后,加入 E2 和 P4 体外诱导蜕膜化,Hint1 的表达水平略有回升。Western blot 检测蜕膜化标记物:BMP2 和 Hoxa10^[14],以验证 Hint1 在体外诱导蜕膜化中的作用(图 5I)。结果显示,与对照组相比,Hint1 干扰后 BMP2 和 Hoxa10 的表达下调。在加入 E2 和 P4 诱导蜕膜化后,与对照组相比,Hint1 干扰组中 BMP2 的表达下调。进一步证明 Hint1 可显著影响蜕膜化过程。

2.5 Hint1 参与细胞脂质代谢

为了研究 Hint1 在小鼠子宫内膜基质细胞脂质代谢中的作用,本研究进行了液相色谱-质谱联用(LC-MS)检测蜕膜化前后以及 Hint1 干扰后的脂质代谢变化。通过数据库 (<http://nonlinear.com/>)筛选和文献查阅,得到 11 种受 Hint1 调控影响的相关脂质(图 6): Isoleucyl-Methionine、2-(4-Methyl-5-thiazolyl)ethyl、Gestrinone、20-Hydroxy-leukotriene E4、Sisomycin、Sphingomyelin(SM)、Phosphatidyl cholines/Phosphatidyl ethanolamine (PC/PE)、Galactosylceramide (d18:1/16:0)、Diacylglycerol (DG)、Galactosylceramide (d18:1/24:1)、5-Hexyltetrahydro-2-furanooctan。结果显示,与诱导蜕膜化组相比,干扰 Hint1 表达后,Isoleucyl-Methionine、Sisomycin、SM、

PC/PE、Galactosylceramide (d18:1/16:0) 含量下调,并且 2-(4-Methyl-5-thiazolyl)ethyl、Gestrinone、20-Hydroxy-leukotriene E4、DG、Galactosylceramide (d18:1/24:1)、5-Hexyltetrahydro-2-furanooctanoic acid 含量上调。这一结果表明,Hint1 与细胞脂质代谢密切相关。

同时使用 IMPaLA 分析获得了其代谢相关信号通路(表 2)。根据分析结果,有 171 个相关信号通路受到影响。其中值得关注的是,有部分基础膜结构成分的代谢受到影响:phosphatidylserine(PS)、PE、PC、phosphatidic acid(PA)、high density lipoprotein (HDL)、arachidonic acid (AA)、anandamide (AEA) 等。本研究还利用 RT-qPCR 检测了几种与脂质合成和蜕膜化相关酶的表达:结果显示(图 7)si-Hint1 组中 cox2、fas、sptlc2、pld 和 pemt 的 mRNA 均明显下调。

表 2 IMPaLA 信号通路分析

通路名称	来源	代谢物重叠数	重叠代谢物	代谢物总数	P 值	Q 值
Sphingolipid metabolism	Wikipathways	4	HMDB10708#HMDB10712; HMDB13464;HMDB08988; HMDB07965	51 (67)	1.09E-06	0.0025
Synthesis of PS	Reactome	2	HMDB08988;HMDB07965	5 (6)	3.84E-05	0.0187
Acyl chain remodelling of PE	Reactome	2	HMDB08988;HMDB07965	5 (13)	3.84E-05	0.0187
Synthesis of PC	Reactome	2	HMDB08988;HMDB07965	22 (28)	0.000874	0.192
Glycosphingolipid metabolism	Reactome	2	HMDB10708#HMDB10712; HMDB13464	31 (41)	0.00174	0.334
Metabolism of lipids	Reactome	4	HMDB10708#HMDB10712; HMDB13464;HMDB08988; HMDB07965	334 (620)	0.002	0.367
Phospholipid metabolism	Reactome	2	HMDB08988;HMDB07965	50 (103)	0.00452	0.544
Glycerophospholipid metabolism	EHMN	2	HMDB08988;HMDB07965	61 (96)	0.00669	0.722
Arachidonic acid metabolism – Homo sapiens (human)	KEGG	2	HMDB12639;HMDB07965	65 (75)	0.00757	0.797
Phosphatidylcholine catabolism	Wikipathways	1	HMDB13464	4 (7)	0.00875	0.819
metabolism of anandamide an endogenous cannabinoid	BioCarta	1	HMDB08988	5 (6)	0.0109	0.959
phosphatidylcholine biosynthesis pathway	BioCarta	1	HMDB07965	7 (8)	0.0153	1
Acetylcholine Synthesis	Wikipathways	1	HMDB07965	9 (9)	0.0196	1
HDL remodeling	Reactome	1	HMDB07965	10 (17)	0.0218	1
Synthesis of PG	Reactome	1	HMDB07965	10 (13)	0.0218	1
Synthesis of PA	Reactome	1	HMDB07965	15 (26)	0.0325	1
PI Metabolism	Wikipathways	1	HMDB07965	17 (29)	0.0368	1
Alpha Linolenic Acid and Linoleic Acid Metabolism	SMPDB	1	HMDB07965	17 (18)	0.0368	1
Synthesis of PE	Reactome	1	HMDB08988	19 (21)	0.041	1

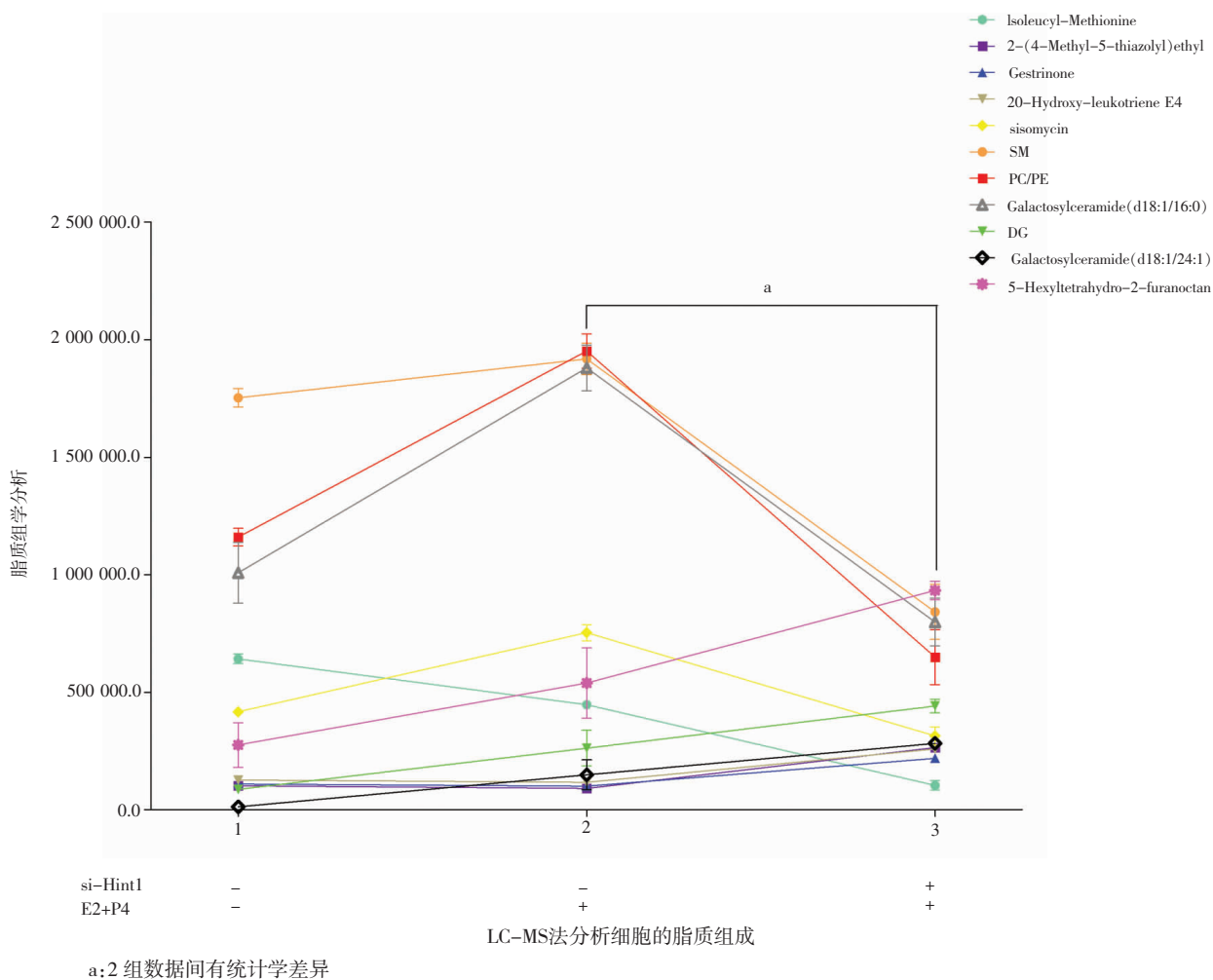


图 6 mESC 中的脂质组学分析

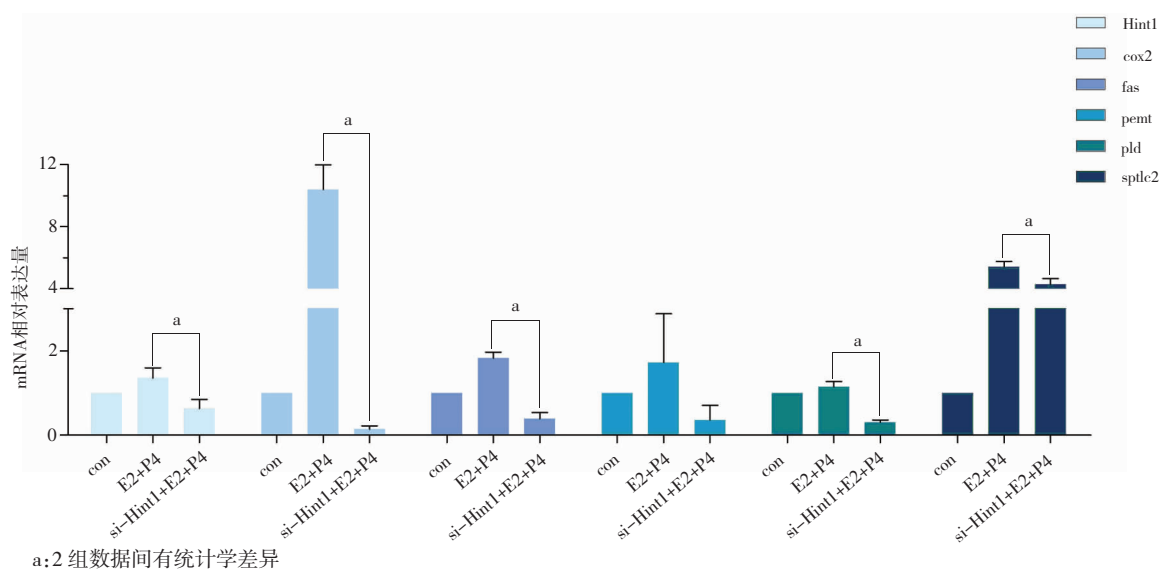


图 7 在体外脱膜化过程中验证 Hint1 对 mESC 中脂质代谢的影响

3 讨论

Hint1 具有肿瘤抑制因子的作用^[15-17]。Hint1 基

因的缺失增强小鼠胚胎成纤维细胞的生长^[17],而 Hint1 的过表达抑制癌细胞的生长^[12]。同时,Hint1 也是基因转录的重要调节因子,在调控基因转录的通路中具有抑制作用^[7],与 CDK7^[8]、转录因子 Mi^[9]、

USF^[10]、Pontin/Reptin/ β -catenin/TCF4 复合物^[11]、AP1^[12]相互作用并抑制其活性。Pontin 和 Reptin 两种蛋白对于核蛋白逆转录酶端粒酶的形成非常重要,Hint1 可与 Pontin 和 Reptin 直接相互作用,形成 β -catenin 的直接结合配体,以此来抑制 T 细胞因子- β -catenin 介导的转录调控作用,如细胞周期蛋白 Cyclin D1 的转录^[18]。子宫内膜蜕膜化过程伴随着显著的细胞增殖和分化^[19-21]。本研究结果显示,Hint1 在小鼠子宫内膜的初级蜕膜和次级蜕膜区广泛表达且在胚胎植入部位的表达明显高于非植入部位。人工诱导的小鼠子宫蜕膜化体内和体外模型进一步验证 Hint1 与蜕膜化之间的相关性。这提示 Hint1 表达促进蜕膜化过程中的基质细胞的增殖。

此外,Hint1 参与细胞分化。已知 Hint1 与胃癌细胞^[22]、肝细胞的分化水平密切相关,Hint1 的缺失影响肝组织的再生功能;且从流产的人类胎儿的组织中发现的早期生命蛋白中包括 Hint1,其作用为参与胎儿的神经分化^[23]。提示 Hint1 与细胞的增殖和分化功能相关,这与本研究结果相似,即 Hint1 的表达促进蜕膜化过程基质细胞的分化。

有研究表明,Hint1 与脂质代谢相关。在 Hint1 敲除鼠中,血清的脂质组学分析结果显示 PC/SM 下调、LPC 上调,肝脏脂质组学分析结果显示 SM/CER 下调、PC/DG 上调^[13]。现已知脂肪酸内源性大麻素 (endocannabinoids, AEA) 被证实为生殖中的信号传导介质,在妊娠早期起着至关重要的作用^[24]。花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 是蜕膜化的重要因子^[25],可能参与调节蜕膜 PRL 的合成和分泌^[26],其代谢产物在妊娠的建立和维持中具有推进作用^[27]。鞘脂代谢途径在妊娠期间在蜕膜中高度活化,并且破坏 Sphk 途径会导致蜕膜缺陷且伴有子宫血管的严重受损,导致妊娠早期流产^[28-30]。此外,在小鼠蜕膜化过程中,神经鞘脂的从头合成被激活,并证明鞘脂的从头合成途径对于蜕膜化是必不可少的^[31]。溶血磷脂酸 (lysobisphosphatidic acids, LPA) 是脂蛋白合成重要因子^[32-33],可通过 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 作为脂质介质发挥多种功能^[34]。有研究表明,LPA3 在围产期在子宫上皮高表达^[35],在妊娠早期起着关键的作用。Lpar3 KO 小鼠显示出许多生殖缺陷,包括影响 cox2、延迟植入、异常胚胎间隔、胎盘形成和胎儿发育缺陷以及减少产仔数^[36-38]。

本研究结果显示,干扰 Hint1 后,包括基础膜结

构成分在内的部分脂质受到了影响,例如 SM、PC/PE、DG 等。由 IMPaLA 数据库分析获得的相关信号通路结果显示 171 个脂质合成通路受到影响,其中部分脂质已被证明是细胞基础代谢及蜕膜化的重要因子,例如 PS、PE、PC、PA、HDL、sphingolipid^[31,39]、arachidonic acid、anandamide^[24,40-42]等。现已知,与脂质合成和蜕膜化相关的酶,如 fas (fatty acid synthase)、sptlc2^[31]、pld (phospholipases D)^[32-33]、pemt^[43]、cox2^[13,44-45]等。本研究结果显示,随着 Hint1 的敲低,下调上述几种基因的表达,提示 Hint1 可能通过影响细胞中脂质代谢的重塑影响蜕膜化。

参 考 文 献

- [1] Ma X, Gao F, Rusie A, et al. Decidual cell polyploidization necessitates mitochondrial activity[J]. PLoS One, 2011, 6(10): E26774.
- [2] Pelucchi C, Talamini R, Negri E, et al. Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer[J]. Ann Oncol, 2003, 14(11): 1677-1681.
- [3] Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models[J]. Nat Rev Genet, 2006, 7(3): 185-199.
- [4] Brenner C, Garrison P, Gilmour J, et al. Crystal structures of HINT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins[J]. Nat Struct Biol, 1997, 4(3): 231-238.
- [5] Klein MG, Yao Y, Slosberg ED, et al. Characterization of PKCI and comparative studies with FHIT, related members of the HIT protein family[J]. Exp Cell Res, 1998, 244(1): 26-32.
- [6] Zhang F, Fang Z, Wang JB. Hint1 knockout results in a compromised activation of protein kinase C gamma in the brain[J]. Brain Res, 2015, 1622: 196-203.
- [7] Wang L, Li H, Zhang Y, et al. HINT1 inhibits beta-catenin/TCF4, USF2 and NFkappaB activity in human hepatoma cells[J]. Int J Cancer, 2009, 124(7): 1526-1534.
- [8] Korsisaari N, Makela TP. Interactions of Cdk7 and Kin28 with Hint/PKCI-1 and Hnt1 histidine triad proteins[J]. J Biol Chem, 2000, 275(45): 34837-34840.
- [9] Razin E, Zhang ZC, Nechushtan H, et al. Suppression of microphthalmia transcriptional activity by its association with protein kinase C-interacting protein 1 in mast cells[J]. J Biol Chem, 1999, 274(48): 34272-34276.
- [10] Lee YN, Razin E. Nonconventional involvement of LysRS in the molecular mechanism of USF2 transcriptional activity in FcepsilonRI-activated mast cells[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(20): 8904-8912.
- [11] Weiske J, Huber O. The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 14): 3117-3129.
- [12] Wang L, Zhang Y, Li H, et al. Hint1 inhibits growth and activator protein-1 activity in human colon cancer cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(10): 4700-4708.

- [13] Beyoglu D, Krausz KW, Martin J, et al. Disruption of tumor suppressor gene Hint1 leads to remodeling of the lipid metabolic phenotype of mouse liver[J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(11):2309–2319.
- [14] Deb K, Reese J, Paria BC. Methodologies to study implantation in mice[J]. *Methods Mol Med*, 2006, 121:9–34.
- [15] Li H, Zhang Y, Su T, et al. Hint1 is a haplo-insufficient tumor suppressor in mice[J]. *Oncogene*, 2006, 25(5):713–721.
- [16] Klein MG, Yao Y, Slosberg ED, et al. Characterization of PKCI and comparative studies with FHIT, related members of the HIT protein family[J]. *Experimental Cell Research*, 1998, 224(1):26–32.
- [17] Su T, Suzui M, Wang L, et al. Deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1/PKC-interacting protein in mice enhances cell growth and carcinogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(13):7824–7829.
- [18] Weiske J, Huber O. The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF- β -catenin-mediated transcription[J]. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(Pt14):3117–3129.
- [19] Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation; strategies for successful pregnancy[J]. *Nat Med*, 2012, 18(12):1754–1767.
- [20] Dey SK, Lim H, Das SK, et al. Molecular cues to implantation[J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(3):341–373.
- [21] Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, et al. Endometrial decidualization: of mice and men[J]. *Semin Reprod Med*, 2010, 28(1):17–26.
- [22] Huang H, Wei X, Su X, et al. Clinical significance of expression of Hint1 and potential epigenetic mechanism in gastric cancer[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(6):1557–1564.
- [23] Liu P, Liu Z, Wang J, et al. HINT1 in neuropsychiatric diseases: a potential neuroplastic mediator[J]. *Neural Plast*, 2017, 2017:5181925.
- [24] Correa F, Wolfson ML, Valchi P, et al. Endocannabinoid system and pregnancy[J]. *Reproduction*, 2016, 152(6):R191–200.
- [25] Tessier-Prigent A, Willems R, Lagarde M, et al. Arachidonic acid induces differentiation of uterine stromal to decidual cells[J]. *Eur J Cell Biol*, 1999, 78(6):398–406.
- [26] Handwerger S, Barry S, Barrett J, et al. Inhibition of the synthesis and secretion of decidual prolactin by arachidonic acid[J]. *Endocrinology*, 1981, 109(6):2016–2021.
- [27] Boone DL, Currie WD, Leung PC. Arachidonic acid and cell signalling in the ovary and placenta[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1993, 48(1):79–87.
- [28] Mizugishi K, Li C, Olivera A, et al. Maternal disturbance in activated sphingolipid metabolism causes pregnancy loss in mice[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(10):2993–3006.
- [29] Parham KA, Zebol JR, Tooley KL, et al. Sphingosine 1-phosphate is a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- γ that regulates neoangiogenesis[J]. *FASEB J*, 2015, 29(9):3638–3653.
- [30] Mizugishi K, Inoue T, Hatayama H, et al. Sphingolipid pathway regulates innate immune responses at the fetomaternal interface during pregnancy[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(4):2053–2068.
- [31] Ding NZ, Qi QR, Gu XW, et al. De novo synthesis of sphingolipids is essential for decidualization in mice[J]. *Theriogenology*, 2018, 106:227–236.
- [32] Hong Y, Zhao J, Guo L, et al. Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses[J]. *Prog Lipid Res*, 2016, 62:55–74.
- [33] Brunnert D, Sztachelska M, Bornkessel F, et al. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate metabolic pathways and their receptors are differentially regulated during decidualization of human endometrial stromal cells[J]. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20(10):1016–1025.
- [34] Nishimasu H, Okudaira S, Hama K, et al. Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, 18(2):205–212.
- [35] Nishioka T, Arima N, Kano K, et al. ATX-LPA 1 axis contributes to proliferation of chondrocytes by regulating fibronectin assembly leading to proper cartilage formation[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:23433.
- [36] Ye X, Hama K, Contos JJ, et al. LPA 3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing[J]. *Nature*, 2005, 435(7038):104–108.
- [37] Hama K, Aoki J, Inoue A, et al. Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice[J]. *Biology of Reproduction*, 2007, 77(6):954–959.
- [38] Aikawa S, Kano K, Inoue A, et al. Autotaxin-lysophosphatidic acid-LPA3 signaling at the embryo-epithelial boundary controls decidualization pathways[J]. *EMBO J*, 2017, 36(14):2146–2160.
- [39] Burnum KE, Cornett DS, Puolitaival SM, et al. Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(11):2290–2298.
- [40] Almada M, Cunha S, Fonseca BM, et al. Anandamide interferes with human endometrial stromal-derived cell differentiation: An effect dependent on inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 release[J]. *Biofactors*, 2016, 42(3):277–286.
- [41] Cui N, Wang C, Zhao Z, et al. The roles of anandamide, fatty acid amide hydrolase, and leukemia inhibitory factor on the endometrium during the implantation window[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017, 8:268.
- [42] Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. Anandamide restricts uterine stromal differentiation and is critical for complete decidualization[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 411:167–176.
- [43] Dutta M, Anitha M, Smith PB, et al. Metabolomics reveals altered lipid metabolism in a mouse model of endometriosis[J]. *J Proteome Res*, 2016, 15(8):2626–2633.
- [44] Wang H, Dey SK. Lipid signaling in embryo implantation[J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2005, 77(1–4):84–102.
- [45] Almada M, Piscitelli F, Fonseca BM, et al. Anandamide and decidual remodelling: COX-2 oxidative metabolism as a key regulator[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851(11):1473–1481.

(责任编辑:唐秋姗)