

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001735

分化抑制因子 3 在胚胎植入中的作用

叶 亮, 张 雪, 王 倩, 刘学庆, 张 爽, 陈雪梅, 何俊琳, 高茹菲, 王应雄, 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:检测分化抑制因子 3(inhibitors of differentiation 3, Id3)基因在小鼠早期妊娠模型和人工诱导蜕膜化模型中子宫内膜中的表达规律;探究 Id3 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 Western blot 及 qRT-PCR 检测 Id3 在早期妊娠和人工诱导蜕膜化模型小鼠子宫中的表达;利用分离的原代小鼠子宫内膜基质细胞体外诱导蜕膜化、过表达 Id3 基因,分析 Id3 对基质细胞蜕膜化的影响。**结果:**Id3 在小鼠早期妊娠模型中高表达于子宫内膜容受期形成阶段(孕第 4 天)($P_{\text{蛋白质}}=0.001$, $P_{\text{mRNA}}=0.001$),胚胎着床后基质细胞发生分化的蜕膜化子宫中表达较低($P_{\text{ID3 蛋白质}}=0.026$, $P_{\text{ID3 mRNA}}=0.038$);体内人工诱导蜕膜化小鼠子宫内膜 Id3 的表达明显低于未发生蜕膜化的对照子宫($P_{\text{蛋白质}}=0.005$, $P_{\text{mRNA}}=0.000$);体外人工诱导蜕膜化可抑制 Id3 基因的表达($P_{\text{蛋白质}}=0.000$, $P_{\text{mRNA}}=0.001$);过表达 Id3 可以明显降低体外子宫内膜基质细胞蜕膜化过程;Stat3 信号参与调控 Id3 的表达调控子宫内膜基质细胞蜕膜化过程。**结论:**Id3 参与小鼠胚胎植入并调控子宫内膜基质细胞蜕膜化过程。

【关键词】子宫内膜;蜕膜化;分化抑制因子 3;Stat3**【中图分类号】**R321.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-07-18

Role of inhibitors of differentiation 3 in embryo implantation

Ye Liang, Zhang Xue, Wang Qian, Liu Xueqing, Zhang Shuang, Chen Xuemei,

He Junlin, Gao Rufe, Wang Yingxiong, Ding Yubin

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

【Abstract】Objective: To investigate the expression profile of inhibitors of differentiation 3(Id3) in the endometrium of early pregnant mice and artificially induced pregnant mice, and the role of Id3 gene in decidualization. **Methods:** Western blot and qRT-PCR were used to detect the expression of Id3 in uterus of early pregnancy and artificial induced decidualization model. The effect of Id3 expression on the decidualization of endometrial stromal cells was analyzed by the decidualization and overexpression of Id3 gene induced by the isolated endometrial stromal cells of primary mice *in vitro*. **Results:** The Id3 highly expressed in the early pregnancy model of mice in the endometrial receptivity stage(the fourth day of pregnancy) ($P_{\text{protein}}=0.001$; $P_{\text{mRNA}}=0.001$), and lower expressed in decidualized uterus after embryonic implantation ($P_{\text{ID3 protein}}=0.026$; $P_{\text{ID3 mRNA}}=0.038$). The expression of Id3 in artificial induced endometrium was significantly lower than that in the control group ($P_{\text{protein}}=0.005$; $P_{\text{mRNA}}=0.000$). *In vitro* induced decidualization inhibited the expression of Id3 gene ($P_{\text{protein}}=0.000$; $P_{\text{mRNA}}=0.001$). Overexpression of Id3 significantly reduced the process of decidualization of endometrial stromal cells *in vitro*; Stat3 signaling was involved in the process of decidual stromal cells regulated by Id3. **Conclusion:** Id3 is involved in the mice embryo implantation and regulates the decidualization of endometrial stromal cells.

【Key words】endometrium; decidualization; inhibitors of differentiation 3; Stat3

胚胎植入是人类和哺乳动物的一个极其复杂和精细的生命活动过程,它是妊娠过程中的主要限

制步骤之一^[1]。胚胎植入需要胚胎与子宫内膜之间双向配合并涉及复杂的调控机制,只有在着床胚胎与子宫内膜之间发生“对话”,胚胎才能真正粘附到腔上皮并在子宫中成功着床^[2]。胚胎植入后,着床点周围的基质细胞在雌孕激素和其他因子的作用下发生增殖和分化的蜕膜化过程,是成熟胎盘形成之前重要的营养来源^[3-4]。研究表明,在子宫内膜基质

作者介绍:叶 亮, Email: 305425381@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:81671493)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180522.1001.034.html>

(2018-05-23)

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接受其他信号通路或因子的调控发生蜕膜化,如 MAPK 信号通路、TGF- β 信号通路、mTOR 信号通路、JAK/Stat3 信号通路等的影响,同时一些因子如细胞间粘附因子、糖复合物、核转录因子等也参与其中^[5-6]。基质细胞蜕膜化发生异常可致妊娠失败。

分化抑制因子 3(inhibitors of differentiation 3, Id3)属螺旋-环-螺旋(HLH)转录因子家族,在生物体内广泛表达,对碱性 HLH(bHLH)转录因子活性起负调控作用^[7],通过与 bHLH 结合成异二聚体^[8],从而影响细胞特异性基因的表达,从而抑制细胞分化^[9-11]。同时,在多种重要的生理过程起重要作用,参与多种生物学过程,例如 T 细胞和 B 细胞的发育^[12]、胚胎的神经形成^[13]、骨发生、骨骼肌的分化^[8,14]、血管平滑肌的增殖^[15]等,且 Id3 因子具有抑制分化,促进增殖的作用^[16-17]。信号转导和转录激活因子-3(signal transducer and activator of transcription 3)是一类在进化上十分保守的转录因子,能够与 Id3 相互作用,参与伯基特淋巴瘤增殖、分化^[18]、神经干细胞分化^[19]的调控。Stat3 在妊娠早期小鼠子宫中的表达、激活和调控已有大量报道^[20-22],对胚胎发育至关重要;在小鼠子宫中诱导人工蜕膜化时,Stat3 被激活^[23-24];Stat3 与孕激素受体相互作用参与小鼠子宫蜕膜化过程,调控小鼠胚胎植入^[25-27]。但是 Stat3 信号调控 Id3 的表达对妊娠早期小鼠子宫的调控还暂无相关研究。

本研究应用 Western blot 以及 qRT-PCR 技术定性、定量分析 Id3 基因在小鼠早期妊娠第 1、4、5、6、8 天以及人工诱导蜕膜化子宫内膜的表达,初步探讨 Id3 在小鼠基质细胞蜕膜化过程中的作用,以及 Stat3 信号通路调控 Id3 基因影响基质细胞蜕膜化过程,为进一步探讨 Id3 基因参与调控小鼠基质细胞蜕膜化过程中的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物材料 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[渝]2012-0001)。置于重庆医科大学实验动物中心动物房饲养,给予自由饮食和饮水,严格控制温度、湿度和光线。

1.1.2 主要试剂

1.1.2.1 Western blot 试剂 RIPA 蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试

剂、5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液均购自碧云天生物技术研究;鼠单克隆 Id3 抗体、兔单克隆 Bmp2 抗体均购自 Abcam;兔单克隆 Stat3 抗体、兔单克隆 Phospho-Stat3 抗体均购自 CST;兔单克隆 Hoxa10 抗体购自 GeneTex;小鼠单克隆 β -actin 抗体、山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 均购自中杉金桥。

1.1.2.2 荧光定量 PCR 试剂 氯仿、异丙醇、无水乙醇均购自重庆川东化工;DEPC 水购自碧云天生物技术研究;RNA 逆转录试剂盒 PrimScriptTM RT Master Mix、RT-PCR 试剂盒 SYBR[®] Primix EX TaqTM、Trizol 试剂盒均购自 Takara;PCR 引物购自上海生工生物有限公司。

1.1.2.3 小鼠子宫内膜基质细胞培养及转染试剂 DMEM/F-12 培养基购自 Sigma;碳吸附血清购自 Biological Industries;缓冲液 HBSS 购自博士德;中性蛋白酶 II 购自 Roche;I 型胶原酶、两性霉素 B、胰酶均购自 Sigma;青、链霉素均购自碧云天;脂质体 3000 购自 Invitrogen;Id3 Mouse cDNA ORF Clone 购自 Origene;Stat3 Inhibitor VIII5-15-DPP 购自 Millipore。

1.1.2.4 人工诱导蜕膜化试剂 雌二醇、孕酮、99%纯度玉米油、麻醉用乙醚均购自 Sigma。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立与材料收集 正常妊娠模型:将正常性成熟雌鼠与雄鼠(2:1)合笼交配,次日见阴栓标记为孕 1 d(D₁)。胚胎着床点和着床旁的区分采用小鼠尾静脉注射台盼蓝法。分别于孕 1、4、5、6、8 d 脱颈处死,收集子宫组织。假孕模型:将正常性成熟雌鼠与结扎输精管的雄鼠(2:1)合笼交配,次日见阴栓标记为假孕 1 d(PD₁)。分别于假孕 1、4、5、6、8 d 脱颈处死,收集子宫。人工诱导蜕膜化模型:小鼠假孕 4 d(PD₄)子宫一侧子宫角注射玉米油诱导蜕膜化,对照侧子宫不作处理作为对照,假孕 8 d(PD₈)脱颈处死小鼠,收集子宫组织。1/2 的子宫组织冻存于液氮用于提取 RNA,1/2 冻存于-80℃,用于提取蛋白质。

1.2.2 Western blot 分析 使用组织匀浆器进行子宫内膜研磨,加入蛋白裂解液提取组织总蛋白。细胞裂解可直接加入 RIPA 和 PMSF 培养瓶中裂解。BCA 蛋白定量法测定总蛋白浓度。蛋白样品(约 40 μ g)溶于 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(比例 4:1),沸水煮 15 min。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 左右后进行蛋白上样,80 V 恒压电泳 90 min;待充分电泳,切胶,250 mA 转膜至 PVDF 膜;5%脱脂奶粉或 5% BSA 封闭 PVDF 膜 80 min 后,滴加 5%脱脂奶粉或 5% BSA 稀释的一抗 Id3(1:1 000)、Stat3(1:1 000)、p-Stat3(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;化学发光 ECL 法显色。Quantity One 软件进行灰度分析。

1.2.3 RNA 提取及 RT-PCR 组织总 RNA 提取采用 Trizol 研磨子宫内膜,将悬液转移至 1.5 mL EP 管中;细胞总 RNA 提取,弃细胞培养液,加入 1 mL Trizol,冰上静置 5 min,反复吹打细胞贴壁面,将悬液转移至 1.5 mL EP 管中。4℃离心,12 000 g,5 min。收集上清液转移到新的 EP 管中。加入 200 μ L 氯仿,震荡混匀,静置 5 min,4℃离心,12 000 g,15 min。吸取

上清转移至新的 EP 管中,记录所吸取的上清容积,加入等量异丙醇,轻轻震荡混匀,4 ℃离心,12 000 g,15 min。弃上清,加入用 DEPC 水配制的 75%乙醇洗涤沉淀,7 500 g,5 min。弃上清,晾干沉淀,加入适量 DEPC 水溶解沉淀。超微量核酸蛋白测定仪测定总 RNA 浓度和纯度。RNA 逆转录成 cDNA 采用 PrimScript™ RT Master Mix 试剂盒,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^{-ΔΔC_t} 法计算基因的表达式。在公共引物数据库 PrimerBank 中查询所需引物序列,见表 1。

表 1 qRT-PCR 的引物

Tab.1 Primers for real-time quantitative qRT-PCR

基因	序列: 5'→3'
Id3	正向引物 CTGTCGGAACCTAGCCTGG
	反向引物 GTGGTTCATGTCGTCCAAGAG
Hoxa10	正向引物 GGCAGTTCCAAAGCGCAAAAT
	反向引物 GTCTGGTGCCTCTGTAAGGG
Bmp2	正向引物 GGGACCCGCTGTCTTCTAGT
	反向引物 TCAACTCAAATTCGCTGAGGAC
Dtprp	正向引物 AGCCAGAAATCACTGCCACT
	反向引物 TGATCCATGCACCCATAAAA
ACTB	正向引物 TCAACTCAAATTCGCTGAGGAC
	反向引物 CTGGGACGACATGGAGAAAA

1.2.4 小鼠子宫内膜基质细胞(mESCs)分离和培养 参照 Tan 等^[28]的方法分离 mESCs,具体步骤如下:假孕第 4 天小鼠脱颈处死取出子宫,用含有青链霉素的 HBSS 液冲洗 3 遍后剪碎,加入含 6 mg/mL 中性蛋白酶和 1%胰酶的 HBSS 缓冲液,置于 4 ℃条件下消化 2 h,37 ℃消化 30 min,用剪去头的 1 mL 枪头反复吹打子宫的细碎组织。炭吸附血清终止中性蛋白酶消化反应后,离心后弃上清,加入 2 mL HBSS 洗涤 2 次,采用终浓度为 0.5%的胶原酶,37 ℃消化 30 min,每 10 min 混匀一次。炭吸附血清终止消化反应后,经 70 μm 滤器过滤后离心后弃上清,洗涤 2 次后弃上清。用含有 20%炭吸附血清,100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 2.5 μg/mL 两性霉素 B 的 DF-12 培养基,培养分离细胞。培养 1 h 待细胞贴壁后换液,细胞免疫荧光实验检测基质细胞标志物 Vimentin 鉴定细胞纯度。

1.2.5 细胞转染 Id3 在小鼠子宫内膜基质的过表达。转染前,细胞在正常生长条件下(37 ℃,5%CO₂)密度达到 70%~90%时进行转染,Id3 或空载体的结合质粒(532 ng/μL)以适当比例混合转染试剂 Lipofectamine 3000,在室温条件下预混,形成复合物,添加至细胞培养基中,混匀。在正常生长条件培养细胞 48 h。如果在转染时期观察到细胞毒性,吸出复合物并加入新鲜培养基。

1.2.6 基质细胞的体外诱导及药物处理 参照基质细胞的体外诱导方法^[29],用含有雌激素(10 nmol/L),孕激素(1 μmol/L)的 2.5%完全培养基培养处理小鼠子宫内膜基质细胞 72 h。qRT-PCR 检测小鼠子宫基质细胞蜕膜化标志基因(Dtprp)验证诱导蜕膜化成功与否。

小鼠子宫内膜基质细胞在正常生长条件下,密度达到 70%~90%时加入 Stat3 抑制剂(10 nmol/L)处理细胞 24 h,吸出培养基,HBSS 洗涤细胞并加入新鲜培养基。

1.2.7 免疫荧光 细胞用 4%多聚甲醛固定 25 min,PBS 洗涤 3 次,用 5%BSA 溶液封闭 1 h,敷一抗,4 ℃过夜。次日 PBS 洗涤 3 次后,荧光二抗避光条件下 37 ℃孵育 1 h,DAPI 染核 10 min,在奥林巴斯 BX43 显微镜照相。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 5.0 用于统计分析。每个实验包括至少 3 个独立样品。使用 *t* 检验或单因素方差分析评估组之间的差异,检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 Id3 在小鼠早期妊娠子宫内皮的表达情况

Western blot 分析显示,各组 Id3 蛋白表达表现出不同程度的改变($F=20.210, P=0.001$),D₄ 的 Id3 蛋白表达明显高于其他天数的组织($P_{D1}=0.024, P_{D1S}=0.004, P_{D1SIS}=0.000, P_{D1SIS}=0.002, P_{D1SIS}=0.028, P_{D1S}=0.002$),且在 D₅ 和 D₆ 的着床点表达低于着床旁组织($P_{D5}=0.026, P_{D6}=0.006$),如图 1A 所示。qRT-PCR 测定的 Id3 基因 mRNA 水平在围植入期的表达模式与蛋白表达水平相似($F=56.950, P=0.001$),D₄ 的 Id3 mRNA 表达明显高于其他天数的组织($P_{D1}=0.003, P_{D1S}=0.001, P_{D1SIS}=0.026, P_{D1SIS}=0.001, P_{D1SIS}=0.002, P_{D1S}=0.001$),且在 D₅ 和 D₆ 的着床点表达低于着床旁组织($P_{D5}=0.038, P_{D6}=0.002$),如图 1C 所示。

2.2 Id3 在假孕小鼠子宫内皮中的表达情况

建立小鼠假孕模型来检测 PD₁ 到 PD₈ 的 Id3 的表达是否受胚胎信号影响。Id3 的蛋白水平(图 2A)在 PD₄ 表达高于其他天数($P_{PD1}=0.048, P_{PD5}=0.025, P_{PD6}=0.042, P_{PD8}=0.049$),Id3 的 mRNA 水平(图 2C)在 PD₄ 表达高于其他天数($P_{PD1}=0.010, P_{PD5}=0.001, P_{PD6}=0.019, P_{PD8}=0.001$),表达模式与小鼠正常妊娠孕早期的表达模式相似。结果显示 Id3 在孕早期小鼠子宫内皮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 Id3 在小鼠人工诱导蜕膜化的子宫内皮的表达情况

在小鼠人工诱导蜕膜化模型中,小鼠子宫诱导侧和对照侧的形态差异(图 3A),子宫质量差异有统计学意义($t=10.750, P=0.000$,图 3B),以及蜕膜化标志物 Dtprp 的 mRNA 水平($t=4.599, P=0.001$,图 3C),均显示人工诱导蜕膜化模型建立成功。Western blot 和 qRT-PCR 结果显示 Id3 在诱导蜕膜化组的蛋白水平($t=3.624, P=0.005$)和 mRNA 水平($t=4.577, P=0.001$)明显低于对照组(图 3E、F),提示 Id3 的表达下调与蜕膜化发生相关。

2.4 Id3 在小鼠基质细胞体外诱导蜕膜化过程中的作用

分离小鼠子宫内膜基质细胞(endometrial stromal cell, mESCs)原代培养,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 4A)。加入雌、孕激素诱导基质细胞蜕膜化,小鼠蜕膜化标志基因 Dtprp 在诱导蜕膜化组 Dtprp 显著上调($t=12.160, P=0.000$)(图 4B);同时蜕膜化标志分子 Bmp2(图 4D、H)mRNA 水平($t=5.448, P=0.006$)和蛋白水平

($t=6.197, P=0.003$) 在诱导蜕膜化后上调; *Hoxa10* (图 4E、I) mRNA 水平($t=3.748, P=0.020$)和蛋白水平($t=12.090, P=0.000$) 在诱导蜕膜化后上调, 证明诱导蜕膜化成功。诱导蜕膜化后, *Id3* 基因 mRNA 水平($t=8.644, P=0.001$) 和蛋白水平($t=$

$20.000, P=0.000$) 均下调(图 4C、G), 提示 *Id3* 的表达下调与蜕膜化发生相关。与对照组相比, 在 mESCs 中转染 *Id3* 鼠 cDNA ORF Clone 载体过表达 *Id3* 后, *Id3* 基因 mRNA 水平($t=23.590, P=0.000$) 和蛋白水平($t=5.506, P=0.005$) 均上调

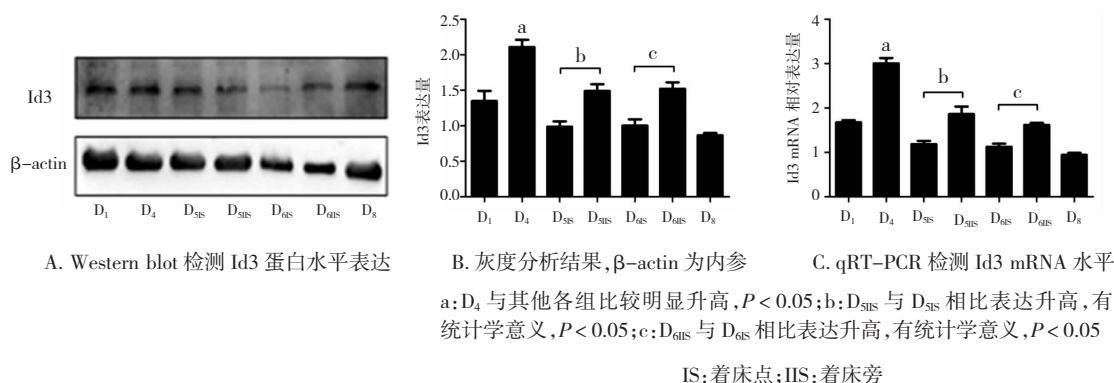


图 1 *Id3* 在小鼠早期妊娠的表达模式

Fig.1 Expression profile of *Id3* during early pregnancy in mice

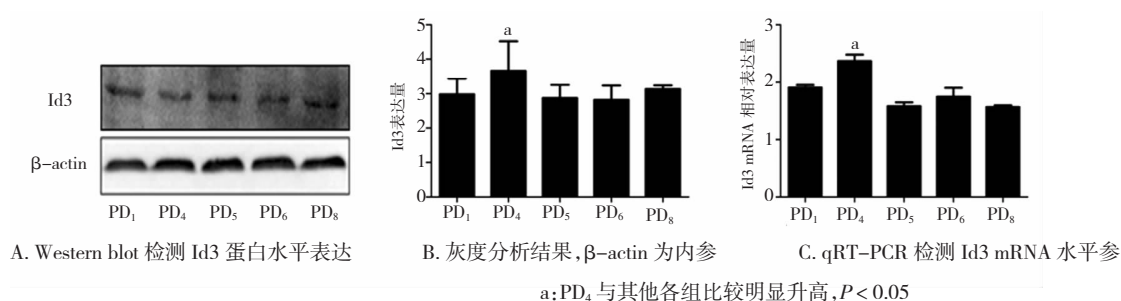


图 2 *Id3* 在假孕小鼠模型中子宫内膜表达

Fig.2 Expression of *Id3* in the endometrium of pseudopregnant mice model

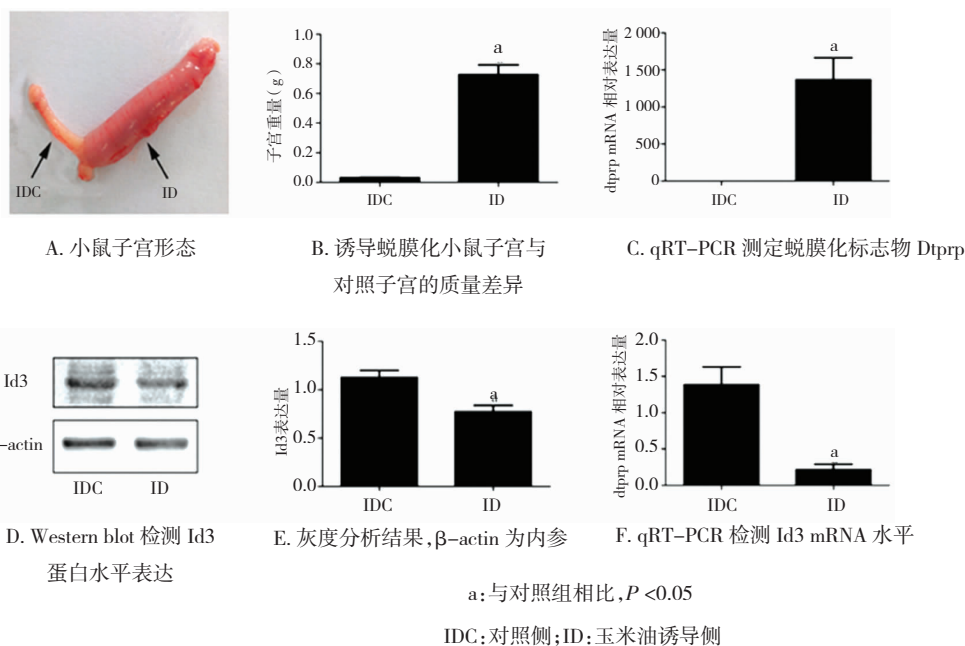


图 3 *Id3* 在小鼠人工诱导蜕膜化模型中的表达

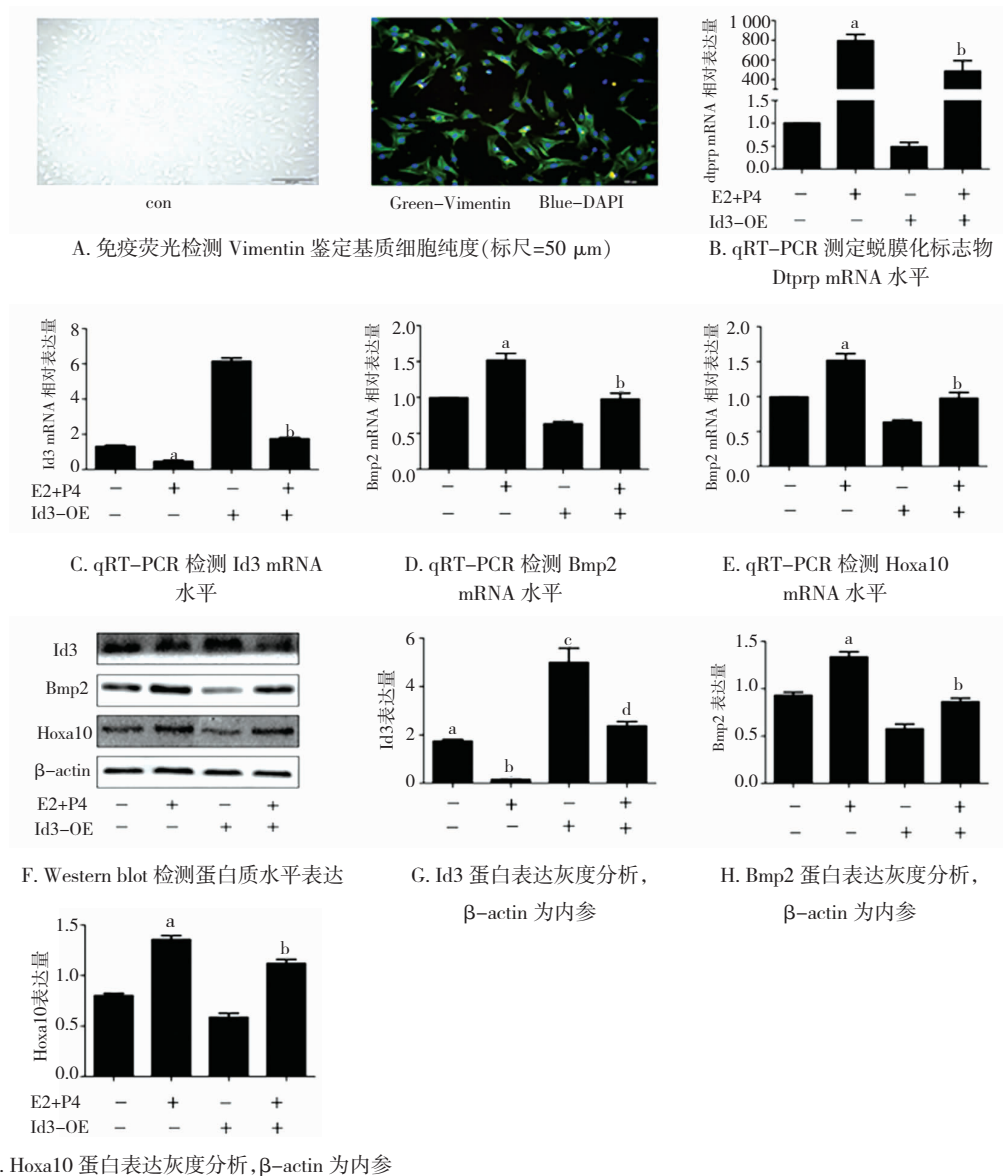
Fig.3 Expression of *Id3* in artificially induced decidualization mice model

(图 4C、G); 蜕膜化标志分子 Dtrp ($t=5.458, P=0.006$)、Bmp2 (图 4D、H)mRNA 水平 ($t=10.760, P=0.000$) 和蛋白水平 ($t=5.788, P=0.004$)、Hoxa10 (图 4E、I)mRNA 水平 ($t=6.247, P=0.003$) 和蛋白水平 ($t=4.617, P=0.010$) 明显下调, 说明 Id3 的过表达可以抑制 Dtrp、Bmp2、Hoxa10 的表达, 即可以显著影响蜕膜化的过程。过表达 Id3 后, 可以显著抑制人工诱导蜕膜化细胞中蜕膜化相关标志分子 Bmp2、Hoxa10 的 mRNA 与蛋白水平, 提示 Id3 可以抑制蜕膜化的过程。

2.5 Stat3 转录因子调控 Id3 调节蜕膜化过程

研究显示 Stat3 转录因子与蜕膜化过程紧密相关^[25], 为了验证 Stat3 是否调控 Id3 从而参与基质细胞蜕膜化, 在分离的

小鼠子宫内膜基质细胞中, 加入雌、孕激素诱导基质细胞蜕膜化后, Stat3 ($t=3.605, P=0.023$) 和 p-Stat3 ($t=3.754, P=0.020$) 蛋白水平出现上调, Id3 表达下调 ($t=6.710, P=0.003$), 蜕膜化相关标志分子 Bmp2 ($t=6.197, P=0.003$)、Hoxa10 ($t=12.090, P=0.000$) 表达上调。加入 Stat3 抑制剂 (Stat3 Inhibitor VIII, 5, 15-DPP), 抑制 Stat3 后, 再进行基质细胞诱导蜕膜化, 与诱导组相比, Stat3 ($t=4.689, P=0.009$)、p-Stat3 ($t=4.407, P=0.012$) 表达下调, Id3 ($t=6.499, P=0.003$) 的表达上调, 蜕膜化相关标志分子 Bmp2 ($t=3.120, P=0.036$)、Hoxa10 ($t=4.476, P=0.011$) 表达下调 (图 5), 提示 Stat3 可以调控 Id3 的表达, 且参与基质细胞蜕膜化的过程。



a: 诱导蜕膜化组与对照组比较有统计学差异, $P < 0.05$

b: Id3-OE 诱导蜕膜化组与诱导蜕膜化组比较有统计学差异, $P < 0.05$

E2: 雌激素; P4: 孕激素; E2+P4: 诱导蜕膜化; Id3-OE: Id3 过表达载体

图 4 Id3 在小鼠基质细胞体外诱导蜕膜化过程中的作用

Fig.4 Role of Id3 expression in the process of decidualization of endometrial stromal cells *in vitro*

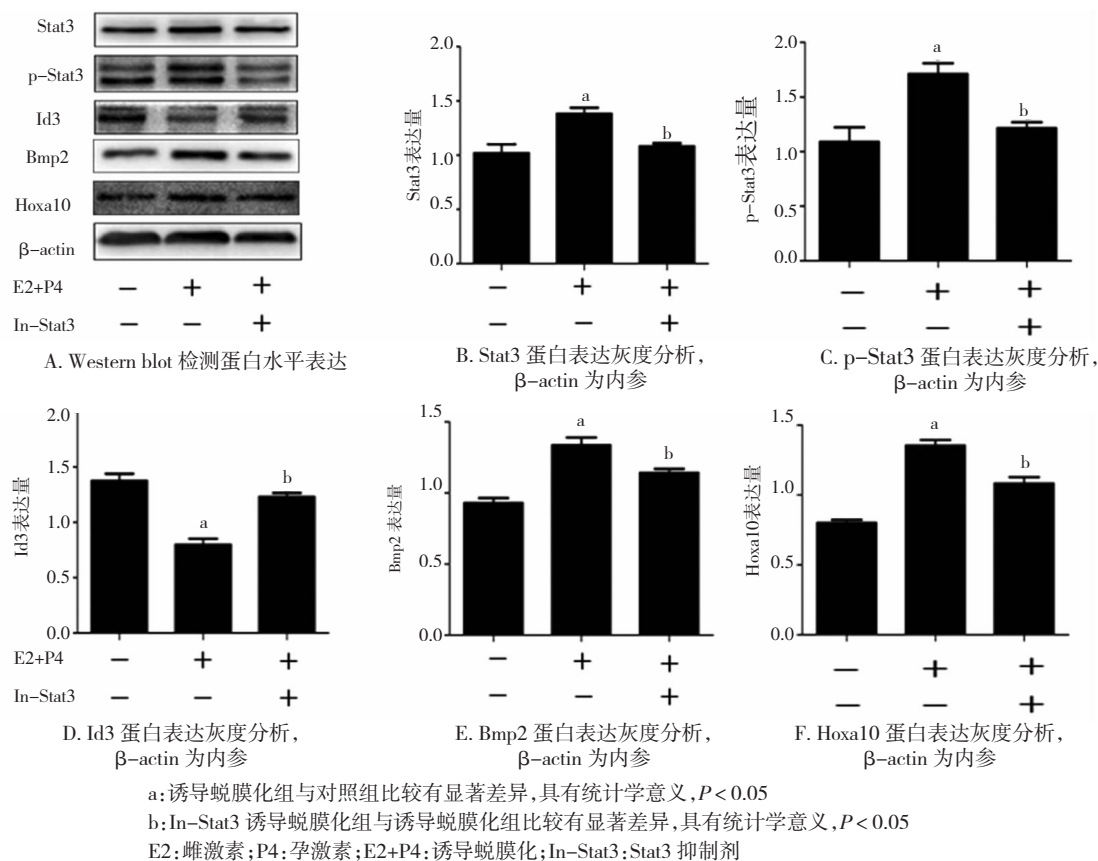


图 5 Stat3 调控 Id3 在蜕膜化过程中的作用
 Fig.5 The effect of Stat3 in the process of decidualization regulated by Id3

3 讨论

成功的妊娠依赖于拥有着床能力的囊胚和处于容受状态的母体子宫两者的协调^[3]。胚胎成功植入后, 围绕胚胎周围的子宫内膜基质细胞受相关因子的诱导刺激, 发生明显增殖, 进而分化为蜕膜细胞, 为胚胎的生长提供营养来源、免疫保护以及其他必要的支持, 它的形成对于妊娠的建立以及维持有十分重要的作用^[2-3, 30], 蜕膜化细胞的形成不仅受到激素的调节, 也与各种不同因子的表达相关。有研究表明, Id3 因子具有 Id 家族共同具有的抑制分化作用。Id3 的表达在胚胎发育过程中呈动态调控状态, 在细胞发育过程中, Id3 基因大量表达于未分化的增殖性细胞; 随着细胞分化和成熟, Id3 基因表达逐渐减少。Id3 的表达水平一般在未分化细胞中比较高, 在分化终末期的细胞 Id3 表达下调^[31]。有研究表明, Id3 是血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 生长增殖的重要调节分子; Id3 对肿瘤细胞分化增殖有重要影响, 对肿瘤细胞有转移和侵袭的作用, 在正常的大脑组织中, Id3 蛋白的表达较

低, 但是在恶性胶质瘤组织中大量表达 Id3^[31]; Id3 反义核酸能通过增强 p21Cip1 蛋白表达而抑制 VSMC 增殖和进入 S 期^[32-33]。Id3 在胚胎植入过程的作用目前未知。小鼠胚胎植入相关基因转录谱结果显示 Id3 在着床点的表达明显低于着床旁, 提示 Id3 低表达有利于子宫内膜基质细胞的蜕膜化 (分化)。本研究采用了小鼠早孕期模型, 分析了 Id3 在不同孕天的表达, 结果显示 Id3 在 D4 的表达明显高于 D5, 且 D5 着床点的 mRNA 和蛋白质表达均低于着床旁, 说明 Id3 在小鼠早期妊娠模型中高表达于子宫内膜容受期形成阶段 (孕第 4 天), 胚胎着床后基质细胞发生分化的蜕膜化子宫中表达较低, 这些均揭示 Id3 的低表达有利于子宫内膜基质细胞分化的进行。这与 Id3 在其他细胞中的功能有相似之处抑制细胞分化^[31-35]。进而, 体内人工诱导蜕膜化可抑制 Id3 的 mRNA 与蛋白的表达水平, 进一步揭示了 Id3 在蜕膜分化过程中作为分化抑制因子的功能。研究进一步利用雌孕激素进行体外人工诱导蜕膜化, 可诱导 Id3 的表达下调, 此外, 体外诱导分化细胞模型中, 过表达 Id3 可抑制蜕膜化标志物 Dtprrp、Bmp2、Hoxa10 的表达^[36-37], 提示 Id3 的表达可抑制基质细

胞蜕膜化的进程,这与 Id3 作为分化抑制因子的生物学功能相一致。

通过对小鼠胚胎植入的研究,推测雌、孕激素可能是表达的重要正向调控因子,表明转录因子 Stat3 可受到雌、孕激素的影响而发挥其在胚胎植入中的作用^[23]。Stat3 敲除鼠会导致不育^[25]。有报道显示,Stat3 负反馈调节 Id3,对细胞周期与分化有重要作用^[27]。此外,Stat3 以负反馈和剂量依赖的方式控制 Id3 转录,在神经元胚胎发现 Stat3 消耗增加 Id3 表达^[18]。在神经干细胞分化的报道中,Stat3 过表达后,Id3 的 mRNA 水平明显降低^[26]。所以本研究在人工诱导蜕膜化条件下,同时采用 Stat3 抑制剂作用于基质细胞,结果显示 Stat3 与磷酸化 Stat3 的表达在诱导蜕膜化组织时上调,在抑制 Stat3 表达后,Id3 的表达上调,蜕膜化发生受到抑制,显示 Stat3 可通过抑制 Id3 参与调控小鼠子宫内膜基质细胞蜕膜化。

本研究结果初步表明 Id3 在早孕期小鼠子宫内膜呈动态表达,且其低表达有利于蜕膜化的进行,并受 Stat3 信号通路的调控。进一步深入研究 Id3 在胚胎植入中的功能,将有助于临床上研究不孕不育发生的机理。

参 考 文 献

- [1] Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models[J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(3): 185–199.
- [2] Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy[J]. *Nat Med*, 2012, 18(12): 1754–1767.
- [3] Dey SK, Lim H, Sanjoy K, et al. Molecular cues to implantation[J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(3): 341–373.
- [4] Zhang S, Lin HY, Kong SB, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation[J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(5): 939–980.
- [5] Attisano L, Wrana JL, López-Casillas F, et al. TGF- β receptors and actions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1222(1): 71–80.
- [6] Correia-Da-Silva G, Bell SC, Pringle JH, et al. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy[J]. *Placenta*, 2004, 25(6): 538–547.
- [7] Ling F, Kang B, Sun XH. Id proteins: small molecules, mighty regulators[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2014, 110: 189–216.
- [8] Christy BA, Sanders LK, Lau LF, et al. An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor-inducible gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(5): 1815–1819.
- [9] Benezra R, Davis RL, Lassar A, et al. Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1990, 61(1): 49–59.
- [10] Norton JD. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis[J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(Pt 22): 3897–3905.
- [11] Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development, cell cycle and cancer[J]. *Trends Cell Biol*, 2003, 13(8): 410–418.
- [12] Pan L, Sato S, Frederick JP, et al. Impaired immune responses and B-cell proliferation in mice lacking the Id3 gene[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 1999, 19(9): 5969–5980.
- [13] Lyden D, Young AZ, Zagzag D, et al. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts[J]. *Nature*, 1999, 401(6754): 670–677.
- [14] Atherton GT, Travers H, Deed R, et al. Regulation of cell differentiation in C2C12 myoblasts by the Id3 helix-loop-helix protein[J]. *Cell Growth & Differentiation*, 1996, 7(8): 1059–1066.
- [15] Deed RW, Jasiok M, Norton JD. Attenuated function of a variant form of the helix-loop-helix protein, Id-3, generated by an alternative splicing mechanism[J]. *Febs Letters*, 1996, 393(1): 113–116.
- [16] Cooper CL, Brady G, Bilal F, et al. Expression of the Id family helix-loop-helix regulators during growth and development in the hematopoietic system[J]. *Blood*, 1997, 89(9): 3155–3165.
- [17] Felty Q, Porter N. Estrogen-induced redox sensitive Id3 signaling controls the growth of vascular cells[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 198(1): 12–21.
- [18] Soldini D, Montagna C, Schüffler P, et al. A new diagnostic algorithm for Burkitt and diffuse large B-cell lymphomas based on the expression of CSE1L and STAT3 and on MYC rearrangement predicts outcome[J]. *Annals of Oncology*, 2013, 24(1): 193–201.
- [19] Gu F, Hata R, Ma YJ, et al. Suppression of Stat3 promotes neurogenesis in cultured neural stem cells[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2005, 81(2): 163–171.
- [20] Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(10): 496–502.
- [21] Santoni M, Conti A, Piva F, et al. Role of STAT3 pathway in genitourinary tumors[J]. *Future Science OA*, 2015, 1(3): FSO15.
- [22] Teng CB, Diao HL, Ma H, et al. Signal transducer and activator of transcription 3(Stat3) expression and activation in rat uterus during early pregnancy[J]. *Reproduction*, 2004, 128(2): 197–205.
- [23] Hewitt SC, Korach KS. Estrogen receptors: structure, mechanisms and function[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2002, 3(3): 193–200.
- [24] Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, et al. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(15): 8680–8685.
- [25] Lee JH, Kim TH, Oh SJ, et al. Signal transducer and activator of transcription-3(Stat3) plays a critical role in implantation via progesterone receptor in uterus[J]. *FASEB Journal*, 2013, 27(7): 2553–2563.
- [26] Akira S. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting[J]. *Oncogene*, 2000, 19(21): 2607–2611.
- [27] Nichane M, Ren X, Bellefroid EJ. Self-regulation of Stat3 activity coordinates cell-cycle progression and neural crest specification[J]. *EMBO J*, 2010, 29(1): 55–67.
- [28] Tan YLM, Cox S, Davis MK, et al. HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization via cyclin D3 during implantation[J]. *Developmental Biology*, 2004, 265(1): 181–195.
- [29] Zhao Y, Park S, Bagchi MK, et al. The coregulator, repressor of e-