

## 研究论文

# 生长抑制特异性蛋白1(Gas1)在早孕小鼠子宫内膜蜕膜化中的作用

谭淇蔓 徐翰婷 李南燕 刘学庆 何俊琳 丁裕斌 王应雄 高茹菲 陈雪梅\*

(重庆医科大学, 公共卫生与管理学院, 生殖生物学实验室,  
生殖与发育国际合作联合实验室, 重庆 400016)

**摘要** 该文旨在探讨生长抑制特异性蛋白1(growth arrest specific 1, Gas1)在早孕小鼠子宫内膜中的表达规律以及其在子宫内膜蜕膜化中的作用。通过免疫组化、Western blot和RT-qPCR检测Gas1在正常妊娠小鼠、假孕小鼠子宫内膜中的表达变化; 分别构建体内小鼠子宫人工诱导蜕膜化模型和体外小鼠原代子宫内膜基质细胞人工诱导蜕膜化模型, 通过Western blot和RT-qPCR检测Gas1在两种模型中的表达; 在分离的小鼠原代子宫内膜基质细胞中过表达Gas1, 通过Western blot、RT-qPCR和流式细胞术等方法检测其对蜕膜化、增殖和凋亡的影响; 通过Western blot检测Gas1在人正常早孕蜕膜组织和自然流产蜕膜组织中的表达。结果表明, Gas1在小鼠孕D5、D6、D7的着床点表达显著低于着床旁; 在体内和体外人工诱导蜕膜化模型中, Gas1在诱导组的表达明显低于非诱导组; 而Gas1的上调则可通过影响细胞增殖和凋亡抑制蜕膜化。此外, Gas1在自然流产患者子宫内膜组织中的表达明显高于正常早孕组。该研究初步表明了Gas1可能通过介导细胞增殖和凋亡, 影响小鼠子宫内膜基质细胞蜕膜化, 从而在调控胚胎着床过程中起重要作用。

**关键词** 胚胎植入; 子宫内膜蜕膜化; 凋亡; Gas1

## Function of Growth Arrest Specific 1 on Endometrial Decidualization in Early Pregnant Mice

TAN Qiman, XU Hanting, LI Nanyan, LIU Xueqing, HE Junlin, DING Yubin,

WANG Yingxiong, GAO Rufei, CHEN Xuemei\*

(Joint International Research Laboratory of Reproductive and Development, Department of Reproductive Biology,  
School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** The purpose of this study was to explore the expression of Gas1 (growth arrest specific 1) in the endometrium of early pregnant mice and its role in decidualization. The expression of Gas1 in the endometrium of normal and pseudopregnant mice was detected by immunohistochemistry, Western blot and RT-qPCR. *In vivo* and *in vitro* models of artificial induced decidualization were constructed respectively, and the expression of Gas1 in the

收稿日期: 2020-08-01 接受日期: 2020-10-09

国家自然科学基金(批准号: 81573175)和重庆市自然科学基金项目(批准号: cstc2018jcyjAX0315)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485008, E-mail: chenxuemei@cqmu.edu.cn

Received: August 1, 2020 Accepted: October 9, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81573175) and Natural Science Foundation Project of Chongqing (Grant No.cstc2018jcyjAX0315)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485008, E-mail: chenxuemei@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5399>

models was detected by Western blot and RT-qPCR. Gas1 was overexpressed in primary endometrial stromal cells, and its effects on decidualization, proliferation and apoptosis were detected by Western blot, RT-qPCR and flow cytometry. The results showed that Gas1 expression at implantation sites was significantly lower than that at the interimplantation sites of pregnant mice from D5 to D7. Artificial-induced decidualization inhibited the expression of Gas1 both *in vivo* and *in vitro*. Overexpression of Gas1 disturbed the proliferation and apoptosis of stromal cells and impaired decidualization. In addition, the expression of Gas1 in endometrial tissues of spontaneous abortion patients was significantly higher than that in the normal early pregnancy group. This study tentatively demonstrated that Gas1 might affect the decidualization of mouse endometrial stromal cells by mediating cell proliferation and apoptosis, thereby playing an important role in embryo implantation.

**Keywords** embryo implantation; endometrial decidualization; apoptosis; Gas1

在全球范围内, 不孕不育是一个非常普遍的问题, 它影响着约1.86亿个人或8%~12%的育龄夫妇, 其发病率正在增加, 给家庭和社会造成了沉重负担<sup>[1]</sup>。在人类中, 每个周期的自然受孕率很低(约30%), 而75%的怀孕失败被认为是由于植入失败造成的<sup>[2]</sup>。胚胎顺利着床是保证成功妊娠的关键, 当胚泡黏附到子宫内膜上皮后, 胚泡周围的基质细胞开始发生蜕膜化, 主要表现为细胞有序的增殖、分化以及凋亡, 伴随着多倍体细胞及新生血管的形成<sup>[3]</sup>。蜕膜化的进行受到转录因子、细胞因子、形态发生因子、细胞周期和信号通路的调控。蜕膜化的建立与维持在胚胎着床和发育中起着至关重要的作用。

生长抑制特异性基因[growth arrest-specific (gas) genes]是指在培养过程中血清饥饿或细胞接触性抑制时表达上调的基因, 它从血清饥饿的NIH-3T3成纤维细胞中分离, 因此与细胞停滞相关<sup>[4]</sup>。生长抑制特异性基因编码的蛋白产物包括Gas1、Gas2、Gas3……Gas11等, 这些蛋白具有不同的功能, 如Gas2可以调控微丝组装<sup>[5]</sup>; Gas3调控神经细胞生长或分化, 在成纤维细胞中高表达Gas3可引起细胞生长抑制和凋亡<sup>[6-7]</sup>; Gas6的启动子中具有雌激素应答元件, 在上皮细胞中是雌激素诱导的基因<sup>[8]</sup>, 可以调控细胞存活和增殖<sup>[9]</sup>。生长抑制特异性蛋白1(growth arrest specific 1, Gas1)是糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定蛋白, 它是一种多效蛋白, 在多种生命过程中发挥着调控细胞周期、增殖及凋亡的作用。一方面, 它在生长停滞的胚胎鼠成纤维细胞(NIH3T3)中过表达, 并可阻断细胞周期的G<sub>0</sub>/S转变来抑制其增殖<sup>[4]</sup>; 另一方面, 它可以通过抑制细胞生长和诱导细胞凋亡发挥肿瘤抑制因子的作用, Gas1的下调与甲状腺和前列腺癌

恶性肿瘤的发生以及胃癌的不良预后有关<sup>[10-11]</sup>。此外, Gas1在哺乳动物胚胎发育过程中也起着重要作用, 研究表明其在小鼠胚胎的脑、心脏、肾脏、肢体、肺和性腺中均有表达, Gas1能够诱导肢体细胞生长停滞, 并参与指状细胞死亡<sup>[12]</sup>。在女性生殖方面, Gas1参与排卵和黄体早期功能的调节<sup>[13]</sup>。课题组前期进行小鼠胚胎着床窗口期子宫内膜基因表达谱分析, 发现Gas1的mRNA水平在着床点和着床旁组织中存在明显差异, 提示Gas1可能参与胚胎着床过程, 但目前关于Gas1与胚胎着床的研究还未见报道。在小鼠胚胎着床过程中, 着床点的子宫内膜基质细胞会发生蜕膜化反应, 以适应胚泡的植入, 蜕膜化过程伴随基质细胞增殖和凋亡的平衡, 受到细胞周期的调控, Gas1作为调控凋亡的相关因子在这一过程中是否发挥了作用值得我们去探索。因此, 本研究旨在观察Gas1在早孕小鼠子宫内膜的表达规律, 初步探讨了Gas1在小鼠子宫内膜蜕膜化过程中发挥的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 本实验所用动物为SPF级性成熟昆明小鼠(体质量25~30 g), 购于重庆医科大学实验动物中心[实验动物生产许可号: SCXK(渝) 2018-0003, 实验动物使用许可号: SYXK(渝) 2018-0003]。小鼠在SPF级代养室代养, 温度(22±2) °C, 给予12 h光照, 自由饮水摄食。所有动物实验都获得了重庆医科大学伦理委员会审查批准。

本研究的人子宫内膜样本来自2018年5月到2018年9月在重庆医科大学附属第一医院妇产科门诊就诊的孕妇(n=8)。经手术收集8~10周自然流产

蜕膜标本( $n=4$ ), 正常蜕膜标本( $n=4$ )取自接受人工流产手术且没有任何妊娠异常迹象的女性。研究对象的年龄、体重和孕周没有显著差异, 标本收取经患者知情同意, 且获得重庆医科大学生物医学研究伦理委员会批准。

**1.1.2 试剂** 定量PCR试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司; 逆转录试剂盒和引物购于日本TaKaRa公司; DAB显色试剂盒、免疫组化试剂盒、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG、山羊抗小鼠IgG和兔抗山羊IgG购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 雌二醇、孕酮、两性霉素B、玉米油(99%纯度)、胰酶、小鼠抗人单克隆抗体 $\beta$ -actin和兔抗小鼠多克隆抗体CyclinA1购于美国Sigma-Aldrich公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒、青-链霉素、DEPC水和SDS-PAGE凝胶配置试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; 中性蛋白酶购于瑞士Roche公司; 碳吸附胎牛血清、无酚红DMEM/Ham's F-12培养基购于美国Gibco公司; 枸橼酸盐、封闭奶粉和PBS粉末购于武汉博士德生物工程有限公司; D-Hanks缓冲液购于美国Hyclone公司; 山羊抗小鼠多克隆抗体Gas1购于美国RD System公司; 小鼠抗人单克隆抗体Gas1购于美国Proteintech公司; 兔抗小鼠多克隆抗体Caspase 3和兔抗小鼠多克隆抗体Bax购于北京博奥森生物技术有限公司; 兔抗小鼠多克隆抗体Cleaved Caspase 3和兔抗小鼠多克隆抗体CyclinB1购于美国CST公司; ECL化学发光试剂盒、兔抗小鼠多克隆抗体Bcl2购于美国Millipore公司; Gas1过表达质粒CMV>mGas1和对照质粒CAG>Stuffer购于云舟生物科技(广州)有限公司; Lipofectamine 3000转染试剂购于美国Invitrogen Life Technologies公司; 质粒提取试剂盒购于美国Omega公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物模型建立和组织收取** 建立正常妊娠组小鼠模型, 每天17:00将性成熟小鼠按雌雄比例3:1合笼过夜饲养, 次日9:00检查阴栓, 见栓记为怀孕第一天(D1)。计算怀孕天数, 将孕1、4、5、6、7天小鼠用脱颈法处死。收集孕1、4天子宫组织和孕5、6、7天的着床点(implantation site, IS)和着床旁(inter-implantation site, IIS)子宫组织。点和旁的区分采用小鼠尾静脉注射锥虫蓝法。

建立假孕组小鼠模型, 将正常孕龄雌性小鼠与结扎输精管雄性小鼠按3:1比例合笼过夜饲养, 次日

见阴栓记为假孕第1天(PD1), 脱颈处死假孕1、4、5、6、7天的小鼠, 收集子宫组织。

根据已报道的方法建立小鼠体内人工诱导蜕膜化模型<sup>[14]</sup>, 将PD4小鼠子宫一侧注射玉米油作为诱导侧(induced decidualization, ID), 另一侧不做任何处理作为对照侧(induced decidualization control, IDC), 假孕第8天上午将小鼠脱颈处死, 收集一部分子宫材料冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 其余部分放入4%多聚甲醛固定, 用于后续实验。

**1.2.2 免疫组织化学** 取小鼠子宫组织在4%多聚甲醛中固定24 h后, 经75%、85%、95%、100%酒精梯度脱水, 二甲苯透明5~10 s, 浸软蜡4 h后用硬蜡包埋。用石蜡切片机切成 $5\ \mu\text{m}$ 厚的子宫组织切片,  $60^{\circ}\text{C}$ 烘烤5 h。将组织切片放入二甲苯中脱蜡1 h, 梯度酒精水化。枸橼酸盐缓冲液(pH6.0, 0.1 mmol/L)微波炉热修复15 min, 取出自然冷却至室温。用PBS洗3次, 5 min/次, 滴加过氧化物酶阻断剂, 室温孵育10 min。PBS洗3次, 5 min/次, 滴加封闭液,  $37^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min。滴加一抗Gas1(1:100)  $4^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。次日室温复温30 min; PBS洗3次, 5 min/次。滴加山羊二抗(1:3 000)工作液,  $37^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min; PBS洗3次, 5 min/次; 而后滴加辣根过氧化物酶,  $37^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min; PBS洗3次, 5 min/次。滴加DAB显色液, 待见棕色反应后立刻用自来水终止反应。随后用苏木精复染, 梯度酒精脱水, 中性树脂封片。

**1.2.3 Western blot** 将子宫组织称重后, 加入适量RIPA蛋白裂解液放入组织匀浆器内进行研磨, 用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度, 计算蛋白上样量。将蛋白样品溶于 $5\times$  SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(4:1)中,  $100^{\circ}\text{C}$ 金属浴15 min。配置分离胶和浓缩胶, 上样前60 V恒压预电泳15 min, 上样后90 V恒压电泳直至充分分离。截取想要的目的分子量, 250 mA电转至PVDF膜上, 根据分子量大小设定电转时间。5%脱脂牛奶 $37^{\circ}\text{C}$ 封闭PVDF膜80 min。滴加用5%脱脂牛奶配置的抗体Gas1(1:2 000)、 $\beta$ -actin(1:3 000)、Caspase 3(1:1 000)、Cleaved Caspase 3(1:1 000)、Bax(1:1000)、Bcl2(1:1 000)、PCNA(1:1 000)、CyclinA1(1:1 000)、CyclinB1(1:1 000)  $4^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育; 次日PVDF膜用PBST洗3次, 15 min/次。二抗孵育: 滴加5%脱脂牛奶配置的山羊二抗(1:3 000)、鼠二抗(1:3 000)、兔二抗(1:3 000)  $37^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育80 min; PBST洗3次, 15 min/次, ECL法显色。用Quantity One软件进行灰度分析,



表1 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of genes

靶向基因 Target genes	引物序列 Primer sequences
<i>β-actin</i>	Forward: 5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3' Reverse: 5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3'
<i>Gas1</i>	Forward: 5'-GCA GCT ACG CCT ACA GCC AGT-3' Reverse: 5'-AGC TGG ATA AGC GCC GAG AT-3'
<i>Prl8a2</i>	Forward: 5'-CAG TTG GAG TGA AGA CCC GTG A-3' Reverse: 5'-GAG CGA CTT CCC GTA AGA ATT-3'

*β-actin*用作内部对照。

1.2.4 RT-qPCR 用Trizol法提取组织和细胞RNA, 酶标仪测定RNA浓度和纯度。根据逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA后, 利用RT-qPCR检测各基因表达量, 反应条件为: 95 °C初始变性10 s, 95 °C变性15 s, 60 °C退火延伸30 s, 重复39个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达量。由日本TaKaRa公司进行引物合成, 引物合成序列见表1。

1.2.5 小鼠原代子宫内膜基质细胞分离和人工诱导蜕膜化 根据已报道的方法分离小鼠原代子宫内膜基质细胞并诱导蜕膜化<sup>[15]</sup>, 在无菌环境下, 剪取PD4小鼠的子宫, 用HBSS浸洗。按照1只小鼠0.75 mL胰蛋白酶的量, 加入适量的胰蛋白酶消化液。4 °C消化2 h, 37 °C消化30 min, 用1 mL枪头吹打至拉丝状, 培养基终止消化。1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入由HBSS配置的0.5 mg/mL胶原酶II, 37 °C消化30 min, 每10 min振荡摇匀1次。培养基终止消化, 用70 μm滤器过滤后离心, 弃上清, 将沉淀物用HBSS洗2次后, DMEM/Ham's F-12培养基重悬细胞。细胞在含有5% CO<sub>2</sub>的37 °C的孵箱中培育1 h, 待细胞贴壁后换液进一步培养。通过细胞免疫荧光实验, 检测基质细胞标志物Vimentin, 可鉴定基质细胞纯度。

基质细胞贴壁后, 加入E2(10 nmol/L)和P4(1 μmol/L)在完全培养基(含100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素、2.5 μg/mL两性霉素B和20%碳吸附胎牛血清)中诱导72 h。镜下观察基质细胞形态, qRT-PCR检测蜕膜标志物*Prl8a2*验证诱导成功与否。

1.2.6 免疫荧光 用甲醇在4 °C条件下固定细胞30 min。用PBS配置5% BSA封闭液, 室温封闭1 h, 一抗Vimentin(1:200) 4 °C过夜孵育。室温复温30 min, PBS洗3次, 10 min/次, 荧光二抗室温避光孵育1 h。PBS洗3次, 10 min/次, 抗荧光猝灭剂封片, 荧光显微镜拍照。

1.2.7 质粒转染 细胞在正常生长条件下密度达到70%~90%时可进行转染。首先将Lipofectamine 3000与无血清培养基按适当比例混匀; 将过表达质粒CMV>mGas1和空载质粒CAG>Stuffer与P3000<sup>TM</sup>按适当比例混匀; 将已稀释的Lipofectamine 3000和质粒DNA混合物充分混匀, 室温静置10~15 min形成DNA脂质体复合物添加至细胞培养基中, 在含有5% CO<sub>2</sub>的37 °C孵箱中培育48 h, 若转染期间观察到细胞毒性, 则更换新鲜的培养基。

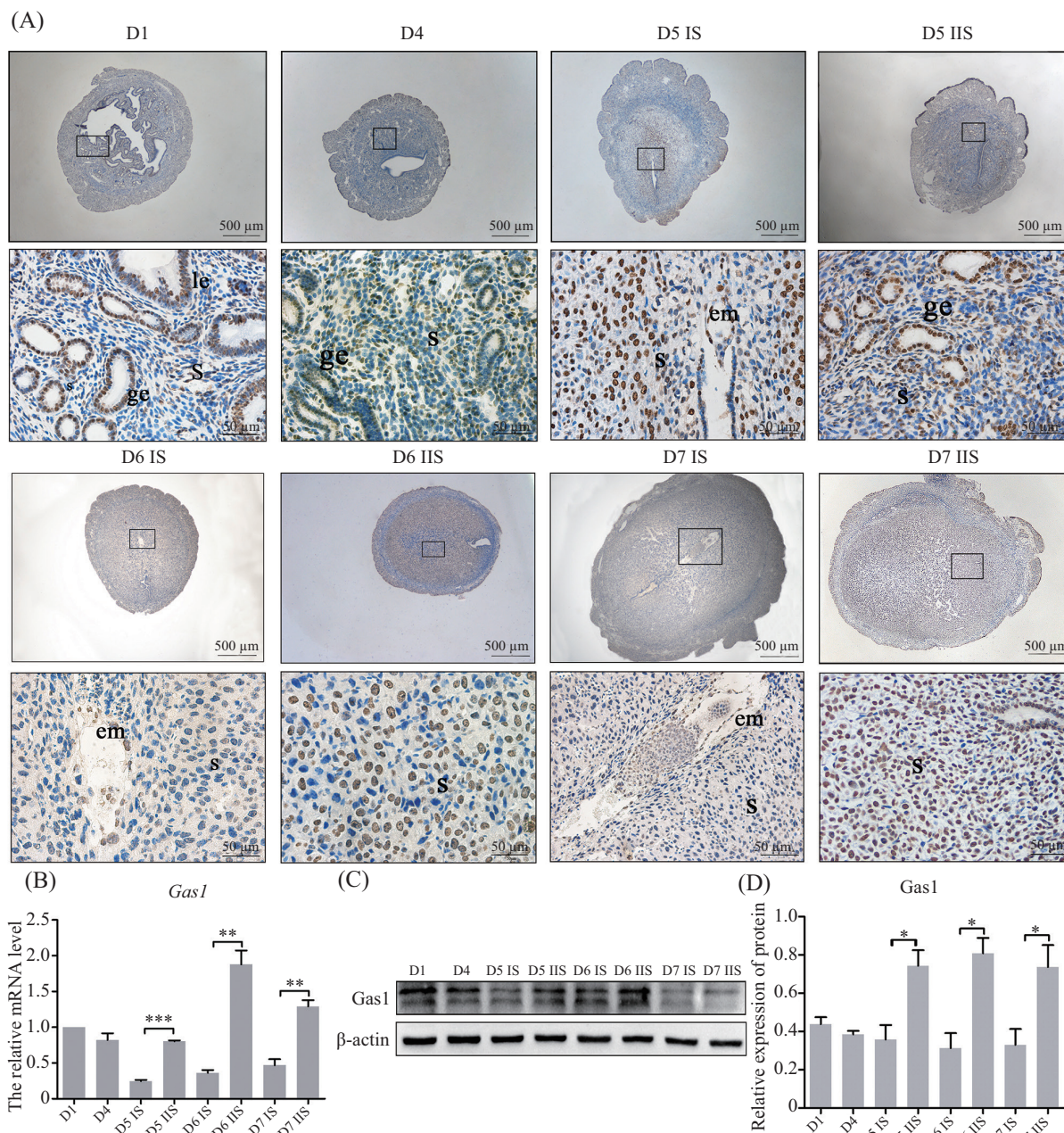
1.2.8 流式细胞术 用2.5%的胰酶消化细胞, 然后用PBS缓冲液1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 重复2次。将1×10<sup>6</sup>个细胞重悬于500 μL PBS缓冲液中。避光孵育PI和Annexin V 15 min, 通过FCS Vantage SE流式细胞仪(BD Biosciences, 美国)来进行定量分析。

1.2.9 统计分析 每个实验独立重复3次, 采用GraphPad Prism 5.0进行统计学分析, 实验结果以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )形式表示。使用t检验或者单因素方差分析对各组差异进行评估,  $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Gas1在早孕小鼠子宫内膜的表达

图1A免疫组化结果显示, 在妊娠第1天, Gas1大量表达于腺上皮和腔上皮, 在基质细胞仅有少量表达。到了妊娠第4天, Gas1主要在子宫内膜基质细胞表达。在第5天发生胚胎植入后, Gas1在着床点的初级蜕膜区(primary decidual zone, PDZ)表达, 着床旁的表达与D1相似。随着妊娠继续进行, Gas1在D6和D7蜕膜区的阳性免疫染色明显减少, 且着床点的表达明显低于着床旁。RT-qPCR检测小鼠孕早期子宫中*Gas1*的mRNA水平, D1和D4无显著差异, Gas1在D5、D6、D7 IIS的表达分别是其IS的3.27、5.21、2.76倍(图1B)。Western blot结果显示, 子宫Gas1蛋白在



A: 免疫组织化学检测Gas1在早孕小鼠子宫内膜中的表达和定位。le: 腔上皮; ge: 腺上皮; s: 基质细胞; em: 胚胎。方框表示放大部位。B: RT-qPCR检测*Gas1* mRNA水平。C: Western blot检测Gas1的蛋白表达水平。β-actin作为内参蛋白。D: Western blot的灰度分析。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: immunohistochemistry was used to detect the expression and localization of Gas1 in the endometrium of early pregnant mice. le: luminal epithelium; ge: glandular epithelium; s: stromal cells; em: embryo. The box indicates the enlarged part. B: the *Gas1* mRNA level was detected by RT-qPCR. C: Western blot was used to detect the protein expression of Gas1. β-actin is an internal reference. D: quantitative analysis of Western blot. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图1 Gas1在小鼠子宫内膜的表达

Fig.1 The expression of Gas1 in endometrium of mice

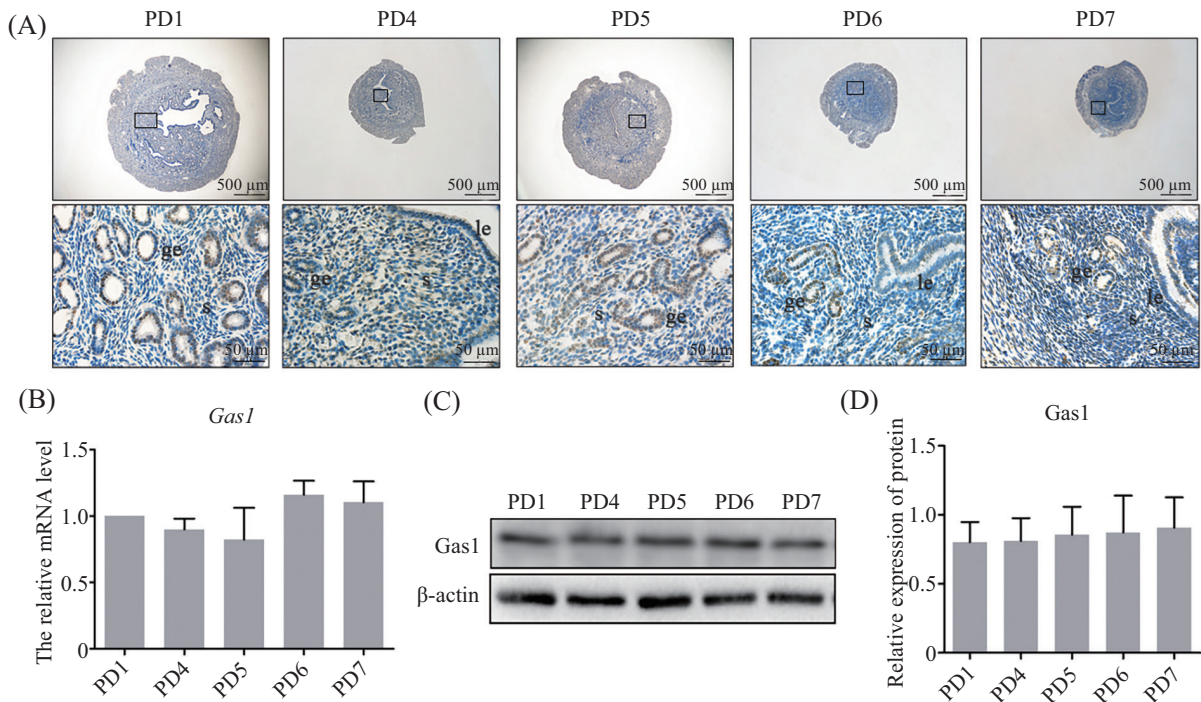
D1和D4的表达没有明显差异,但在妊娠第5天到第7天, Gas1在着床点的表达明显低于着床旁(图1C和图1D)。

## 2.2 Gas1在假孕小鼠子宫内膜的表达

为了验证Gas1在子宫内膜的表达是否受胚胎信

号的影响,我们检测了Gas1在假孕小鼠子宫内膜的表达水平。免疫组化、RT-qPCR和Western blot结果均显示, Gas1在假孕D1至D7小鼠子宫内膜中的表达没有显著差异(图2A~图2D)。这些结果表明, Gas1在早孕小鼠子宫内膜的时空性表达是由胚胎信号触发的。





A: 免疫组织化学检测Gas1在假孕小鼠子宫内膜组织的表达和定位。ge: 腺上皮; le: 腔上皮; s: 基质细胞。方框表示放大部位。B: RT-qPCR检测Gas1在假孕小鼠子宫内膜组织的mRNA水平。C: Western Blot检测Gas1的蛋白水平。β-actin作为内参蛋白。D: Western blot的灰度分析。

A: immunohistochemistry was used to detect the expression and localization of Gas1 in mouse uteri during pseudopregnancy. le: luminal epithelium; ge: glandular epithelium; s: stromal cells. The box indicates the enlarged part. B: the *Gas1* mRNA level in pseudopregnant mice was detected by RT-qPCR. C: Western blot was used to detect the protein expression of Gas1. β-actin is an internal reference. D: quantitative analysis of Western blot.

图2 Gas1在假孕小鼠子宫内膜的表达情况

Fig.2 Expression of Gas1 in the endometrium of pseudopregnant mice

### 2.3 Gas1在人工诱导小鼠子宫内膜蜕膜化模型中的表达

为了确定Gas1是否在蜕膜化过程中发挥作用,我们通过建立人工诱导蜕膜化模型检测Gas1的表达情况。体内人工诱导蜕膜化结果显示,和对照侧相比,诱导侧子宫明显肿大,两侧子宫重量也具有显著差异(图3A和图3B)。蜕膜标志物*Prl8a2*在诱导侧的mRNA水平显著升高(图3C),以上结果表明,人工诱导蜕膜化模型建立成功。Western blot、RT-qPCR和免疫组化结果均显示, Gas1在诱导侧的表达低于对照侧(图3D~图3F)。

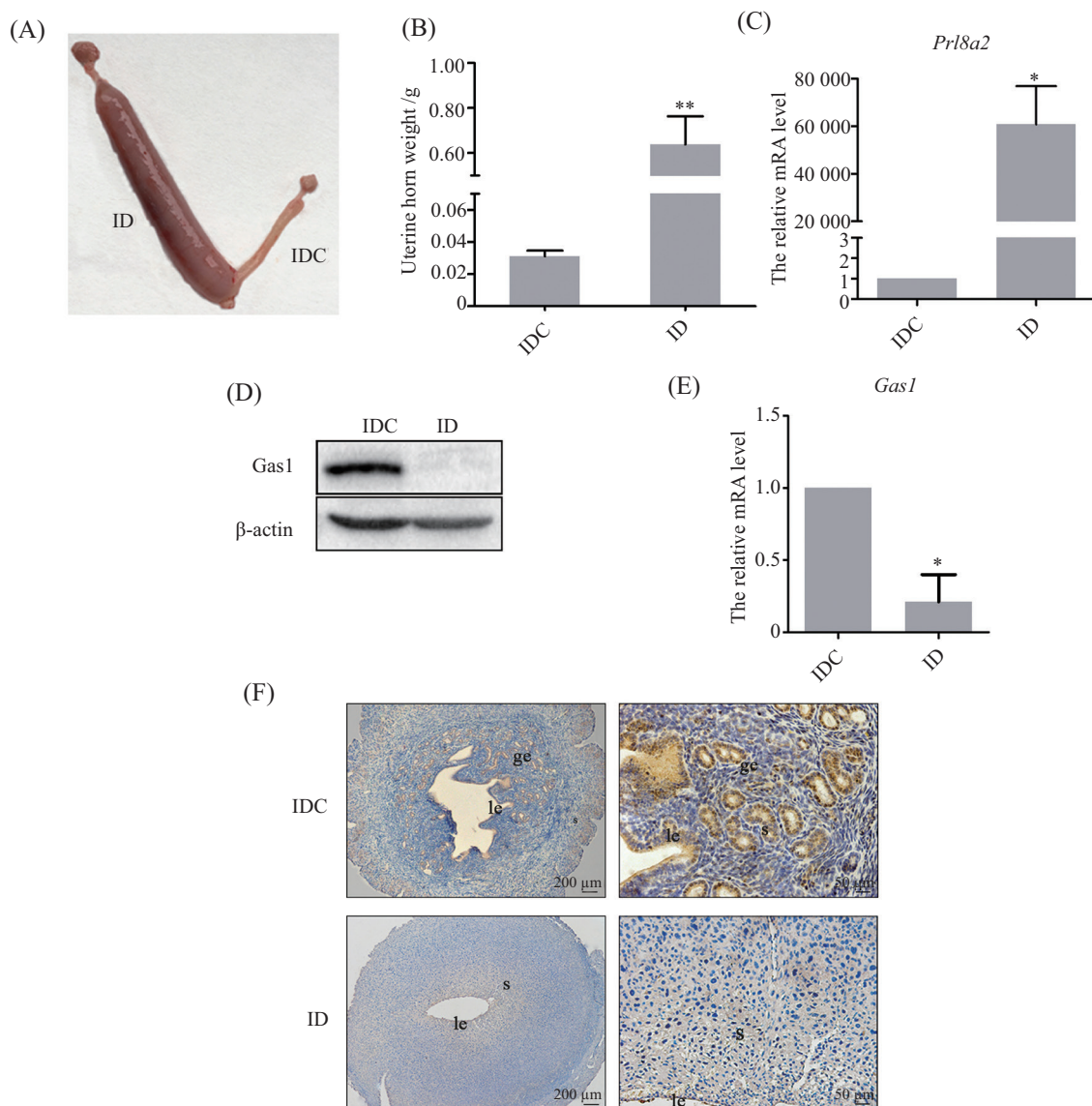
### 2.4 Gas1在体外诱导蜕膜化的小鼠子宫内膜基质细胞中的表达

接下来我们分离了原代小鼠子宫内膜基质细胞进行体外培养,通过免疫荧光检测基质细胞标志物Vimentin以鉴定基质细胞纯度(图4A)。采用E2+P4联合处理,诱导基质细胞发生蜕膜化。诱导后发生蜕膜化的基质细胞体积变大,呈多边形或圆形,核仁变大变圆(图4B),蜕膜化标志物*Prl8a2*表达

水平也在诱导后明显升高(图4C),以上结果表明,体外诱导蜕膜化模型建立成功。且与未诱导的细胞相比,诱导后Gas1的表达降低(图4D和图4E)。

### 2.5 过表达Gas1抑制小鼠子宫内膜基质细胞的蜕膜化

为了进一步确定Gas1在小鼠子宫内膜基质细胞的蜕膜化中的作用,我们在mESC中过表Gas1来观察其对蜕膜化的影响。结果显示与对照组和载体对照组(Vector)相比,用CMV>mGas1载体过表达Gas1后Gas1的mRNA和蛋白水平均上调(图5A和图5C)。人工诱导蜕膜化的实验结果表明, Gas1的过表达显著下调*Prl8a2*的水平(图5B)。上调Gas1后,Western blot检测凋亡(Caspase 3、Cleaved Caspase 3、Bax、Bcl2)和增殖(CyclinA1、CyclinB1、PCNA)相关分子的表达,结合流式细胞术实验结果,表明Gas1的过表达促进了mESC的凋亡而抑制了增殖(图5C~图5E)。以上结果表明,过表达Gas1可以显著抑制人工诱导蜕膜化小鼠子宫内膜基质细胞中蜕膜标志物*Prl8a2*的表达,提示蜕膜化建立受损, Gas1参与早孕



A: 人工诱导蜕膜化后子宫的形态。B: 小鼠子宫重量统计图。C: RT-qPCR检测蜕膜化标志物*Prl8a2*的mRNA水平。D: Western blot检测Gas1在ID和IDC的蛋白表达水平。 $\beta$ -actin作为内参蛋白。E: RT-qPCR检测*Gas1*在ID和IDC的mRNA水平。F: 免疫组织化学检测Gas1的表达。ge: 腺上皮; le: 腔上皮; s: 基质细胞。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与IDC组比较。

A: the morphology of artificially induced decidualization uteri. B: uterine weight of mice. C: the mRNA level of decidual marker *Prl8a2* was detected by RT-qPCR. D: Western blot was used to detect the expression of Gas1 in ID and IDC.  $\beta$ -actin is an internal reference. E: RT-qPCR detected the mRNA levels of *Gas1* at ID and IDC. F: immunohistochemistry was used to detect Gas1 expression. le: luminal epithelium; ge: glandular epithelium; s: stromal cells. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with the IDC group.

### 图3 Gas1在人工诱导蜕膜化模型的表达

Fig.3 The expression of Gas1 in artificially induced decidualization model

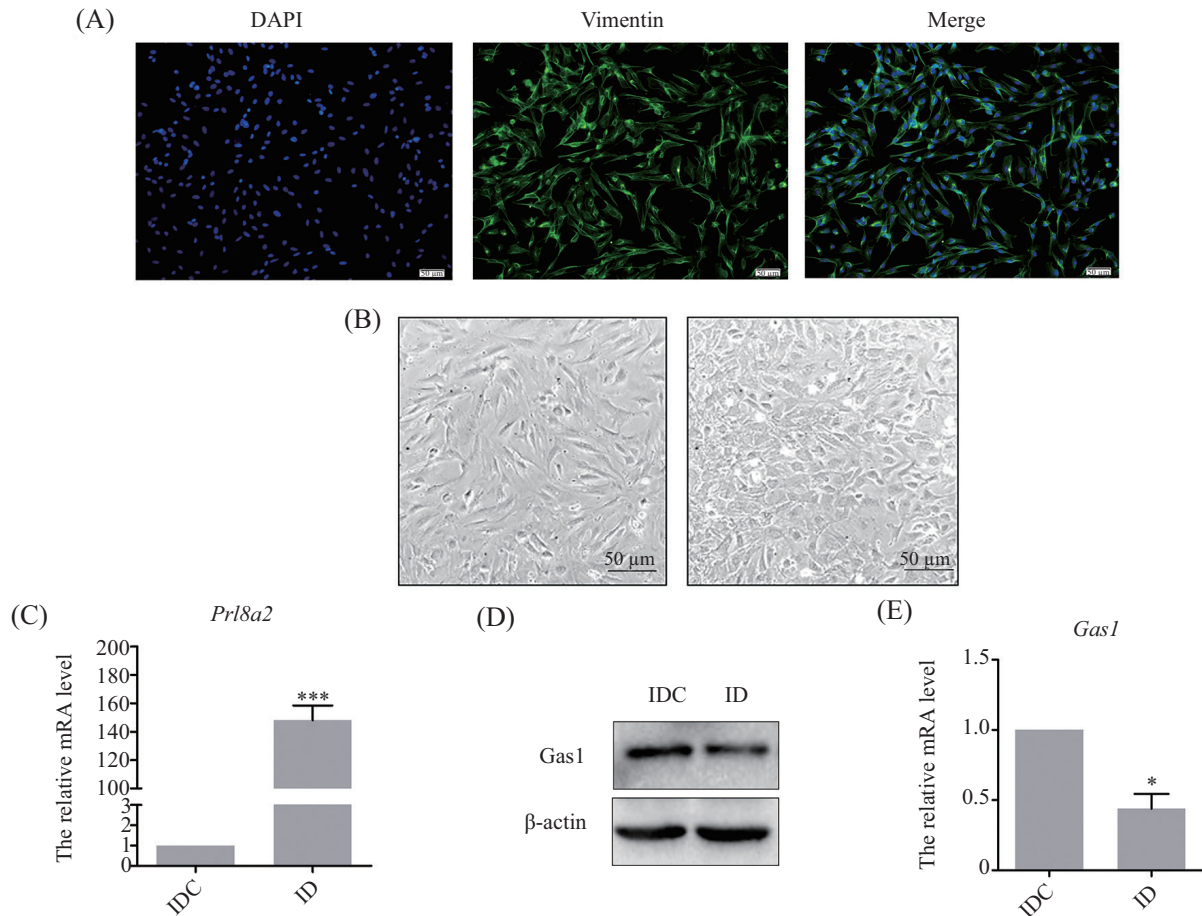
小鼠子宫内膜蜕膜化的调节可能与增殖和凋亡水平紊乱有关。

### 2.6 Gas1在子宫内皮的表达

为了探讨Gas1是否参与人的早期妊娠过程, 我们收集了正常早孕人工流产的蜕膜组织及自然流产蜕膜组织进行研究。结果表明, 自然流产组患者子宫内膜中Gas1的蛋白水平显著高于正常早孕组(图6A和图6B)。

## 3 讨论

胚胎植入子宫内膜是妊娠早期的关键过程。植入需要同步发育的优质胚胎、具有容受性的子宫内膜及胚胎和母体不断进行分子对话来实现<sup>[16]</sup>。胚泡着床位处的基质细胞发生蜕膜化对妊娠的建立和维持至关重要。蜕膜化的发生受到激素以及各种基因表达的调控<sup>[17]</sup>。在小鼠的妊娠早期阶段, D4~D7是胚胎着床的关键时期。在妊娠D4, 子宫内膜处于



A: 免疫荧光鉴定基质细胞纯度; Vimentin: 绿色荧光; DAPI: 蓝色荧光; Merge: 组合图像。B: 诱导蜕膜化的基质细胞形态。C: RT-qPCR检测蜕膜化标志物*Prl8a2*。D: Western Blot检测*Gas1*在基质细胞诱导后的蛋白表达水平。 $\beta$ -actin作为内参蛋白。E: RT-qPCR检测*Gas1*的mRNA水平。 $*P<0.05$ ,  $***P<0.001$ , 与IDC组比较。

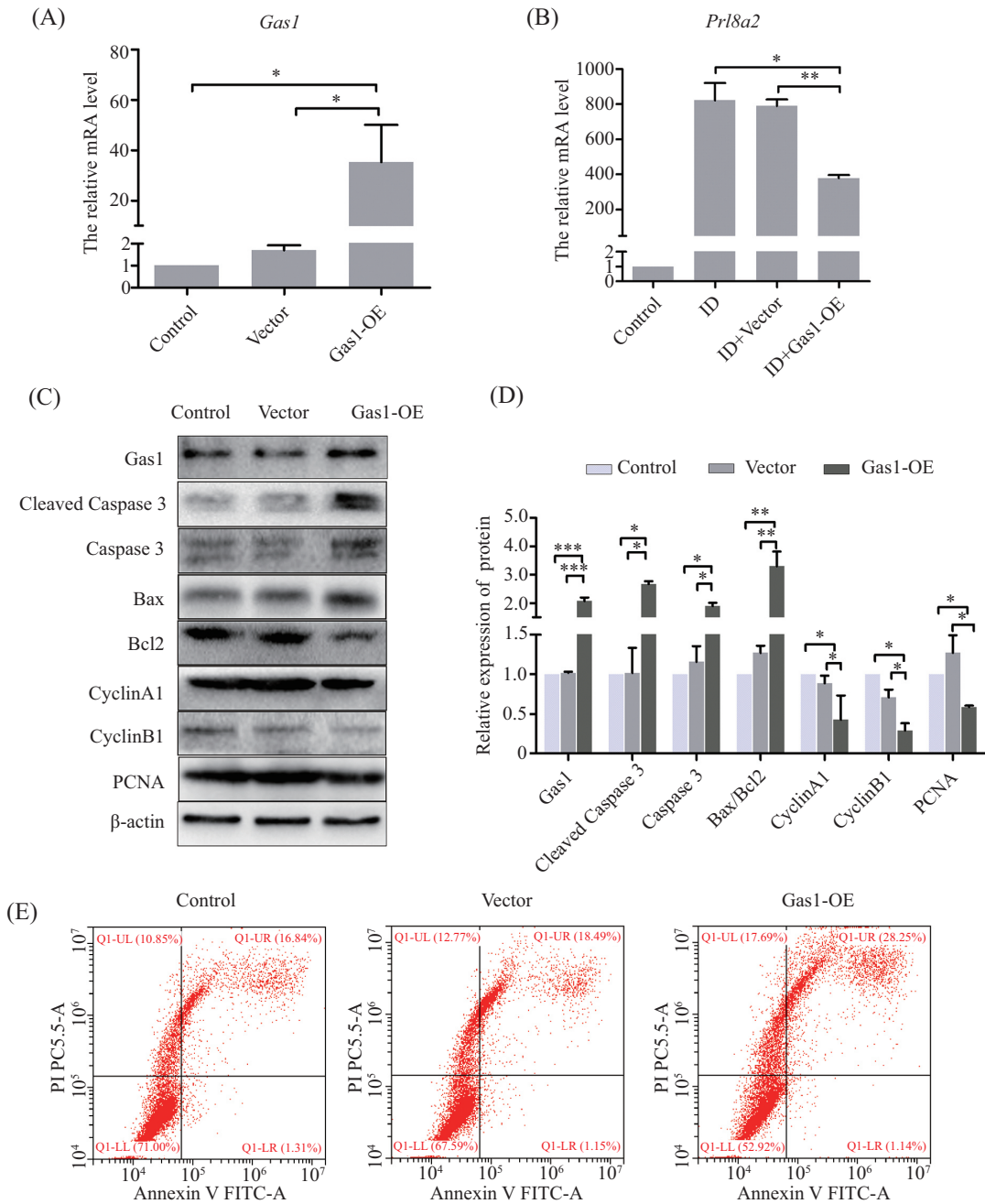
A: the purity of stromal cells was identified by immunofluorescence. Vimentin: green fluorescence; DAPI: blue fluorescence; Merge: combine images. B: image of stromal cells before and after decidualization. C: RT-qPCR was used to detect the decidual marker *Prl8a2*. D: the expression of *Gas1* after decidualization in mESC was detected by Western blot.  $\beta$ -actin is an internal reference. E: the mRNA level of *Gas1* was detected by RT-qPCR.  $*P<0.05$ ,  $***P<0.001$  compared with the IDC group.

图4 *Gas1*在体外诱导蜕膜化的小鼠子宫内膜基质细胞中的表达  
Fig4 The expression of *Gas1* in mESC after induced decidualization

接受态,而后囊胚周围的上皮细胞发生凋亡导致上皮崩解,从而允许囊胚植入。随后,胚泡周围的基质细胞开始增殖并分化为蜕膜细胞,为胚胎着床和胎盘发育提供营养和免疫基质<sup>[18]</sup>。*Gas1*参与调控细胞增殖和凋亡,然而*Gas1*在蜕膜化中的作用尚不清楚。本研究发现,*Gas1*在早孕小鼠妊娠D5、D6、D7着床旁的表达明显高于着床点,且随着蜕膜化进程的发展,着床点*Gas1*的表达显著下降。在体内小鼠子宫人工诱导蜕膜化和体外小鼠原代子宫内膜基质细胞诱导蜕膜化后*Gas1*表达也呈现显著下降趋势,与妊娠小鼠着床点*Gas1*的变化趋势一致,提示*Gas1*参与了蜕膜化过程,且其低表达有利于蜕膜化的进行。在人工诱导蜕膜化的小鼠子宫中*Gas1*的表达几乎检

测不到,可能与缺乏胚源信号的刺激以及蜕膜化的程度差异有关。子宫内膜蜕膜化过程中基质细胞的增殖和分化平衡受到严格的细胞周期调控以确保蜕膜化的正常进行。*Gas1*作为一种生长抑制基因,在多种情况下均发挥着抑制细胞增殖的作用。当*Gas1*在NIH-3T3细胞中过量表达时,会抑制细胞从G<sub>0</sub>期到S期的DNA合成<sup>[4]</sup>。也有研究报道,*Gas1*的过表达会抑制人胶质瘤的增殖并抑制Akt的激活,Akt是介导细胞存活和增殖的关键因子<sup>[10]</sup>。除了NIH-3T3<sup>[19]</sup>,*Gas1*的过量表达也会抑制多种细胞系的增殖,如人肺腺癌A549细胞<sup>[20]</sup>和C6大鼠胶质瘤细胞<sup>[21]</sup>。我们的研究发现,上调*Gas1*表达会诱导细胞周期阻滞,导致CyclinA1和CyclinB1的蛋白表达显著降低,增殖标





A: 转染过表达载体后*Gas1*在mESC中mRNA的相对水平。B: RT-qPCR检测ID+Vector/Gas1-OE处理后*Prl8a2*的表达。C: Western Blot检测过表达Gas1后凋亡、增殖相关蛋白表达。β-actin作为内参蛋白。D: Western blot结果的灰度分析。E: 流式细胞术检测凋亡。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

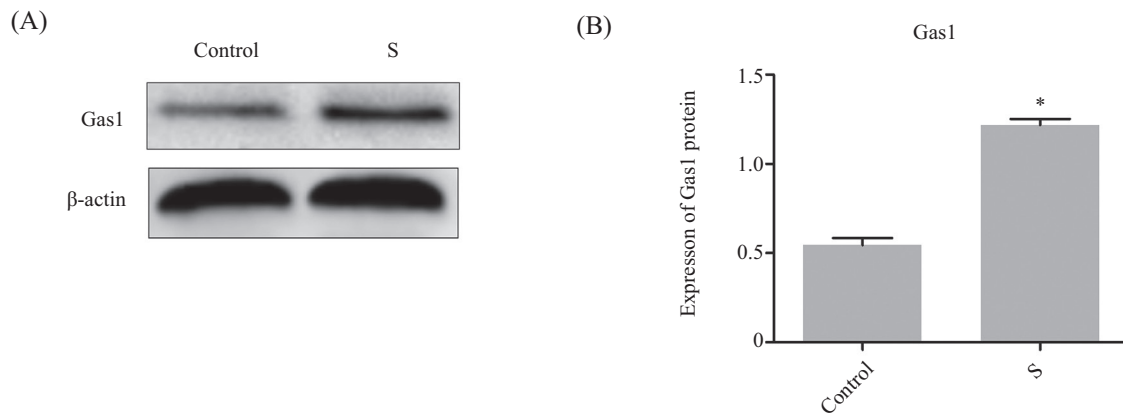
A: the relative mRNA level of *Gas1* in mESC after transfection with the overexpression vector of *Gas1*. B: the relative mRNA expression of *Prl8a2* after treatment with ID+Vector/Gas1-OE. C: Western blot analysis of apoptosis and proliferation-related proteins after overexpressing *Gas1*. β-actin is an internal reference. D: quantitative analysis of Western blot. E: flow cytometry to detect apoptosis. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图5 过表达Gas1对mESC蜕膜化的影响

Fig.5 Effect of overexpression of *Gas1* on decidualization of mESC

志物PCNA也具有相同降低趋势,说明Gas1破坏了基质细胞的增殖分化平衡,从而损害了蜕膜化过程。最近的研究表明,凋亡在女性生殖过程中起重要作用,有利的细胞凋亡是蜕膜化的必要条件<sup>[22]</sup>。抗凋亡蛋白Bcl2与促凋亡蛋白Bax之间的相互作用决定

了细胞的存活或凋亡<sup>[23]</sup>。Caspase 3的激活是执行细胞凋亡的重要终末事件<sup>[24]</sup>。研究报道,胃癌中Gas1的过度表达可以通过调节Bcl2/Bax比例与Caspase 3的活性诱导胃癌细胞凋亡从而抑制肿瘤生长<sup>[25]</sup>。我们的研究结果显示, Gas1在小鼠原代子宫内膜基质



A: Western blot检测Gas1在正常早孕组(control)和自然流产组(spontaneous abortion, S)子宫内膜中的表达。β-actin作为内参蛋白。B: Western blot结果的灰度分析。\* $P < 0.05$ , 与control组比较。

A: Western blot analysis of Gas1 in normal early pregnancy group and spontaneous abortion group. β-actin is an internal reference. B: quantitative analysis of Western blot. \* $P < 0.05$  compared with the control group.

图6 Gas1在正常早孕及自然流产患者子宫内膜中的表达

Fig.6 The expression of Gas1 protein in human endometrium with normal early pregnancy and spontaneous abortion

细胞中的过表达可诱导细胞的凋亡。一些临床研究表明,某些妊娠并发症和疾病比如不明原因复发性自然流产<sup>[26]</sup>、子痫前期<sup>[27]</sup>等与细胞凋亡引起的胎盘发育改变有关。细胞凋亡还可能与自然流产有关<sup>[28]</sup>,滋养细胞和蜕膜细胞的过度凋亡也可能增加复发性流产的概率<sup>[29]</sup>。在自然流产患者的子宫内膜中Gas1的蛋白水平显著增加,提示Gas1可能参与调节自然流产,这与我们前面观察到的Gas1高水平表达不利于蜕膜化的结果一致, Gas1可能是促成流产发生的一个因素,但其具体机制还需要进一步探究。

综上所述, Gas1在小鼠子宫内膜的适度表达对蜕膜化的建立起着重要作用,而其异常表达可能通过打破基质细胞增殖和凋亡之间的平衡而干扰蜕膜化过程,进而对妊娠产生不利影响。这些结果的发现有助于进一步了解胚胎着床失败的分子机制,为开发新的治疗策略和治疗靶点以治疗不育等生殖系统疾病提供实验依据。

### 参考文献 (References)

- [1] BAI R, KUSAMA K, SAKURAI T, et al. The role of endometrial selectins and their ligands on bovine conceptus attachment to the uterine epithelium during peri-implantation period [J]. Biol Reprod, 2015, 93(2): 1-11.
- [2] NORWITZ E R, SCHUST D J, FISHER S J. Implantation and the survival of early pregnancy [J]. N Engl J Med, 2001, 345(19): 1400-8.
- [3] CHA J, SUN X, DEY S K. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy [J]. Nat Med, 2012, 18(12): 1754-67.
- [4] SAL G D, RUARO M E, PHILIPSON L, et al. The growth arrest-specific gene, gas1, is involved in growth suppression [J]. Cell, 1992, 70(4): 595-607.
- [5] BRANCOLINII C, BOTTEGA S, SCHNEIDER C. Gas2, a growth arrest-specific protein, is a component of the microfilament network system [J]. J Cell Biol, 1992, 117(6): 1251-61.
- [6] ZOIDL G, BLASS-KAMPMANN S, D'URSO D, et al. Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth [J]. EMBO J, 1995, 14(6): 1122-8.
- [7] FABBRETTI E, EDOMI P, BRANCOLININI C, et al. Apoptotic phenotype induced by overexpression of wild-type gas3/PMP22: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A [J]. Genes Dev, 1995, 9(15): 1846-56.
- [8] MO R, TONY ZHU Y, ZHANG Z, et al. GAS6 is an estrogen-inducible gene in mammary epithelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(1): 189-94.
- [9] HASANBASIC I, RAJOTTE I, BLOSTEIN M. The role of gamma-carboxylation in the anti-apoptotic function of gas6 [J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(12): 2790-7.
- [10] DOMINGUEZ-MONZON G, BENITEZ J A, VERGARA P, et al. Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh [J]. Int J Dev Neurosci, 2009, 27(4): 305-13.
- [11] ZAMORANO A, MELLSTROM B, VERGARA P, et al. Glial-specific retrovirally mediated gene expression induces glioma cell apoptosis and inhibits tumor growth *in vivo* [J]. Neurobiol Dis, 2004, 15(3): 483-91.
- [12] LEE K K, LEUNG A K, TANG M K, et al. Functions of the growth arrest specific 1 gene in the development of the mouse embryo [J]. Dev Biol, 2001, 234(1): 188-203.
- [13] REN Y A, LIU Z L, MULLANY L K, et al. Growth arrest specific-1 (GAS1) is a C/EBP target gene that functions in ovulation and corpus luteum formation in mice [J]. Biol Reprod, 2016, 94(2): 44.
- [14] LONG X, ZHANG M, CHEN X, et al. Expression of KRAS in the endometrium of early pregnant mice and its effect during embryo implantation [J]. Reprod Biomed Online, 2015, 31(1): 51-61.



- [15] LIANG X H, ZHAO Z A, DENG W B, et al. Estrogen regulates amiloride-binding protein 1 through CCAAT/enhancer-binding protein-beta in mouse uterus during embryo implantation and decidualization [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(10): 5007-16.
- [16] BOEDEKER S J, HESS A P. The role of apoptosis in human embryo implantation [J]. *J Reprod Immunol*, 2015, 108: 114-22.
- [17] ZHANG S, LIN H, KONG S, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation [J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(5): 939-80.
- [18] GELLERSEN B, BROSENS J J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure [J]. *Endocr Rev*, 2014, 35(6): 851-905.
- [19] EVDOKIOU A, COWLED P A. Growth-regulatory activity of the growth arrest-specific gene, GAS1, in NIH3T3 fibroblasts [J]. *Exp Cell Res*, 1998, 240(2): 359-67.
- [20] EVDOKIOU A, COWLED P A. Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines [J]. *Int J Cancer*, 1998, 75(4): 568-77.
- [21] ZAMORANO A, LAMAS M, VERGARA P, et al. Transcriptionally mediated gene targeting of gas1 to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis [J]. *J Neurosci Res*, 2003, 71(2): 256-63.
- [22] HAN M, JIANG Y, LAO K, et al. sHLA-G involved in the apoptosis of decidual natural killer cells following *Toxoplasma gondii* infection [J]. *Inflammation*, 2014, 37(5):1718-27.
- [23] ADAMS J M, CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1322-6.
- [24] JABBOUR H N, SALES K J. Prostaglandin receptor signalling and function in human endometrial pathology [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2004, 15(8): 398-404.
- [25] WANG H, ZHOU X, ZHANG Y, et al. Growth arrest-specific gene 1 is downregulated and inhibits tumor growth in gastric cancer [J]. *FEBS J*, 2012, 279(19): 3652-64.
- [26] WEI D, WU Q, SHI H. Apoptosis and p53 expression in the placental villi of females with unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(1): 191-4.
- [27] CALI U, CAVKAYTAR S, SIRVAN L, et al. Placental apoptosis in preeclampsia, intrauterine growth retardation, and HELLP syndrome: an immunohistochemical study with caspase-3 and bcl-2 [J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2013, 40(1): 45-8.
- [28] XIA S Q, ZHEN Y H, MA H S, et al. Abnormal expression of microRNA-575 leads to missed abortion through regulating apoptosis and angiogenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 3993-4000.
- [29] LV X, CAI Z, LI S. Increased apoptosis rate of human decidual cells and cytotrophoblasts in patients with recurrent spontaneous abortion as a result of abnormal expression of CDKN1A and Bax [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(5): 2865-8.