

研究论文

XBP1在小鼠早期妊娠子宫的表达和调节

郭思维, 于雯, 王煦, 刘健慧, 张新月, 何成强, 丁乃峥*

山东师范大学生命科学学院, 山东省动物抗性实验室, 济南 250014

摘要: 转录因子X盒结合蛋白1 (X-box binding protein-1, XBP1)在未折叠蛋白反应中起关键作用。本研究旨在分析XBP1在小鼠早期妊娠过程中的表达和调节, 探讨其与胚胎着床的相关性。分别建立小鼠早期妊娠、人工诱导蜕膜化、发情周期和激素调节模型, 通过免疫组织化学染色和实时定量RT-PCR技术检测XBP1在这些动物模型中的表达模式。结果显示, XBP1在小鼠早期妊娠子宫中呈现动态的变化, 第1~4天主要表达在腔上皮和腺上皮, 第5~8天主要表达在蜕膜区; 在人工诱导蜕膜化的子宫中XBP1主要存在于蜕膜区; 在小鼠发情周期模型中, *Xbp1*、*Xbp1u*、*Xbp1s* mRNA在发情前期的表达量最高; 在卵巢切除的子宫中, 雌激素处理后腔上皮和腺上皮细胞XBP1的表达上调。以上结果表明, XBP1参与小鼠胚胎着床和蜕膜化, 其在早期妊娠子宫腔上皮和腺上皮中的表达受到雌激素调控。

关键词: 小鼠; X盒结合蛋白1; 早期妊娠; 子宫; 胚胎着床

中图分类号: Q25

Expression and regulation of XBP1 in mouse uterus during early pregnancy

GUO Si-Wei, YU Wen, WANG Xu, LIU Jian-Hui, ZHANG Xin-Yue, HE Cheng-Qiang, DING Nai-Zheng*

Key Laboratory of Animal Resistance Biology of Shandong Province, College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

Abstract: The transcription factor X-box binding protein-1 (XBP1) plays a key role in unfolded protein reaction. This study was aimed to investigate the expression pattern and regulation of XBP1 in the mouse uterus during early pregnancy. The methods of immunohistochemistry (IHC) and real time quantitative RT-PCR were used to test XBP1 expression in early pregnancy, artificial decidualization, oestrous cycle and hormone-regulated mouse models. The results showed that XBP1 was spatiotemporally expressed in mouse uterus during early pregnancy. The XBP1 protein was mainly detected in the luminal and glandular epithelia on days 1–4 of pregnancy, and was strongly detected in the decidual area on days 5–8 of pregnancy. Similarly, XBP1 expression was also mainly expressed in decidual cells following artificial decidualization. During the oestrous cycle, *Xbp1*, *Xbp1u*, and *Xbp1s* mRNA was predominantly present in proestrus. In the ovariectomized uterus, the expression of XBP1 in luminal and glandular epithelia was up-regulated after estrogen treatment. These results suggest that XBP1 is associated with embryo implantation and decidualization during early pregnancy in mice, and the expression of XBP1 in luminal and glandular epithelia may be regulated by estrogen.

Key words: mouse; X-box binding protein-1; early pregnancy; uterus; embryo implantation

内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 是一个复杂的动态细胞器, ER 内环境的稳定是实现其功能的基本条件^[1]。当未折叠或错误折叠蛋白质在 ER 腔内积累过多时会导致 ER 应激 (endoplasmic

reticulum stress, ERS), 激活 ER 特异性适应程序未折叠蛋白反应 (unfolded protein reaction, UPR) 以增加 ER 的稳态应对机制, 通过减弱蛋白质翻译、增加蛋白质折叠能力、降解未折叠或错误折叠蛋

Received 2020-04-29 Accepted 2020-10-20

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31771659, 31271536).

*Corresponding author. Tel: +86-531-86180745; E-mail: nzding@sdsu.edu.cn

白质等来维持 ER 稳态^[1,2]。UPR 主要包括三种途径: ERS 元件肌醇需求激酶 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α)、激活转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 和 PKR 状内质网激酶 (PKR-like ER kinase, PERK) 途径, 其中 IRE1 α 通路最保守^[3]。在该通路中, 激活的 IRE1 α 利用其核糖核酸酶内切酶活性, 将转录因子 X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1) 的前体型 *Xbp1* (*Xbp1u*) mRNA 中 26 bp 的内含子切除, 形成了剪接型 *Xbp1* (*Xbp1s*) mRNA^[3]。*Xbp1s* mRNA 翻译成有活性的 XBP1s 蛋白, 进一步激活下游 UPR 靶基因的表达。

胚胎着床是哺乳动物妊娠过程中的关键事件, 通过将胚泡滋养外胚层附着到子宫腔上皮开始植入^[4]。附着反应后, 胚泡植入部位发生局部基质细胞蜕膜化和腔上皮细胞凋亡^[5]。小鼠妊娠是一个复杂的过程, 涉及复杂的生长调节机制, 导致子宫和胚胎的分子、细胞、生理和功能发生变化^[4,6]。在该过程中任何一个环节发生异常都会导致不孕。尽管已确定许多特定因素在早期妊娠期间至关重要, 但胚胎植入和蜕膜的分子机制仍存在很多未知。

UPR 在雌性哺乳动物的各种生殖过程中具有广泛的生理作用, 包括胚胎着床、蜕膜化、着床前胚胎的发育、卵泡闭锁和胎盘的发育等^[7]。XBP1 作为 UPR 中的关键调节因子, 在动物发育过程中发挥着至关重要的作用^[8]。研究表明, XBP1 缺失会导致小鼠胚胎致死、乳腺发育不良^[9]、肝脏发育不全^[10]、心肌细胞坏死^[10]等。使用 ERS 的抑制剂牛磺熊去氧胆酸处理怀孕小鼠, 小鼠蜕膜化损伤显著^[11]。尽管有证据支持 XBP1 在小鼠胚胎着床及蜕膜中的作用, 但是在小鼠早期妊娠过程中, XBP1 在子宫的表达模式以及其是否受到激素调控未见报道。

为进一步探讨 XBP1 在小鼠早期妊娠子宫中的表达和调节, 本研究通过构建不同的动物模型, 利用免疫组织化学染色和实时定量 RT-PCR (quantitative RT-PCR, RT-qPCR) 技术检测了 XBP1 在小鼠早期妊娠、人工诱导蜕膜化和发情周期子宫中的表达模式, 并探究了 XBP1 基因表达是否受雌激素 (E_2) 和孕酮 (P_4) 的调节, 为进一步揭示其在小鼠胚胎植入和蜕膜化中的功能和表达调节机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 ICR 小鼠 (6~8 周龄, SPF 级) 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司。实验所用小鼠在人工控制条件下饲养于山东师范大学实验动物房, 给予 12 h 光照和 12 h 时黑暗交替照明环境, 室温控制为 22 °C, 小鼠可自由取食和饮水。所有实验动物的护理和使用操作获得山东师范大学动物伦理委员会批准。

1.2 小鼠模型的建立 早期妊娠模型: 于实验的前一天 17:00 将成年雄鼠和雌鼠以 1:2 的比例进行合笼, 次日早上 8:00 前检查其阴道栓, 见栓当日记为妊娠第 1 天 (D1), 分别于每天早上 10:00 取妊娠小鼠第 1~8 天子宫, 每天各取 6 只小鼠。以输卵管中有 2 细胞胚胎确定为第 2 天妊娠子宫; 以输卵管中有 8 细胞胚胎确定为第 3 天妊娠子宫; 以子宫中有囊胚确定为第 4 天妊娠子宫; 在妊娠第 5 天, 通过给小鼠尾静脉注射 1% 台盼蓝, 以子宫蓝点确定小鼠着床位点。

人工诱导蜕膜化模型: 将性成熟雌鼠与输精管结扎雄鼠进行合笼, 在小鼠假孕的第 4 天, 于小鼠一侧子宫角注射芝麻油 25 μ L, 另一侧不做处理作为对照。在假孕第 8 天的上午取注油子宫和对照子宫。每个处理各取 3 只。

激素调节模型: 切除性成熟雌鼠双侧卵巢, 恢复两周后分组进行以下处理: (1) 对照组: 0.1 mL 芝麻油 / 只; (2) 孕酮 (P_4) 组: 10 mg/mL P_4 ; (3) 雌激素 (E_2) 组: 1 μ g/mL E_2 ; (4) 孕酮 + 孕酮受体拮抗剂 (P_4 +RU486) 组: 10 mg/mL P_4 + 5 mg/mL RU486; (5) 雌激素 + 雌激素受体拮抗剂 (E_2 +ICI) 组: 1 μ g/mL E_2 + 5 mg/mL ICI; (6) 雌激素受体拮抗剂 (ICI) 组: 5 mg/mL ICI。颈背部皮下注射激素 (0.1 mL / 只) 24 h 后收集子宫, 每组 6 只小鼠。

发情周期模型: 根据阴道涂片方法确定成年处女鼠所处发情周期 (发情前期、发情期、发情后期、间情期), 剖腹收集小鼠子宫, 每个发情时期取 6 只小鼠。

1.3 免疫组织化学染色 将子宫组织在 4% 多聚甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 然后进行连续石蜡切片, 片厚 5 μ m。将切片固定在载玻片上进行免疫染色。先将石蜡切片在二甲苯和梯度酒精 (100%, 95%, 85%, 75%, 50%) 中洗涤进行脱蜡和复水; 3% 过氧化氢孵育 15 min 以去除内源性过氧化物酶; 用 1% BSA 在 37 °C 封闭 1 h, 切片在 XBP1 抗体 (1:800,

Abcam) 孵育下 4 °C 过夜, 阴性对照为 1% BSA 替代一抗 4 °C 过夜; PBS 溶液洗涤 3 次后用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1:200, Abcam) 室温孵育 40 min。使用 PBS 洗涤载玻片, DAB 显色, 苏木精复染 2 min, 盐酸乙醇分化 3 s, 自来水返蓝。将上述切片脱水、透明、中性树胶封片, 光学显微镜下观察装片并记录图像信息。使用图像分析系统 (Image-

Pro Plus) 分析平均光密度。XBP1s、XBP1u 均能被该 XBP1 抗体检测。

1.4 RT-qPCR 用于 RNA 提取的子宫样品经液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱备用。提取小鼠子宫组织的总 RNA, NanoDrop 2000 在 260 nm 和 280 nm 处用光密度法测定其含量和纯度, 并使 RNA 终浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。根据反转录试剂盒 (Takara) 说明书,

表 1. RT-qPCR 引物序列
Table 1. Primer sequences for RT-qPCR

Target gene	Primer sequences	Product length
<i>Xbp1s</i>	Forward: GAGTCCGCAGCAGGTG Reverse: AGCAGACTCTGGGAAGGAC	162 bp
<i>Xbp1u</i>	Forward: GGATCCTGACGAGGTTCCAG Reverse: ACAIAGTCTGAGTGCTGCGG	91 bp
<i>Xbp1</i>	Forward: CACTGTTGCCTCTTCAGATTCTGAGTC Reverse: TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG	136 bp
<i>Rpl7</i>	Forward: GCAGATGTACCGCACTGAGATTC Reverse: ACCTTTGGGCTTACTCCATTGATA	129 bp

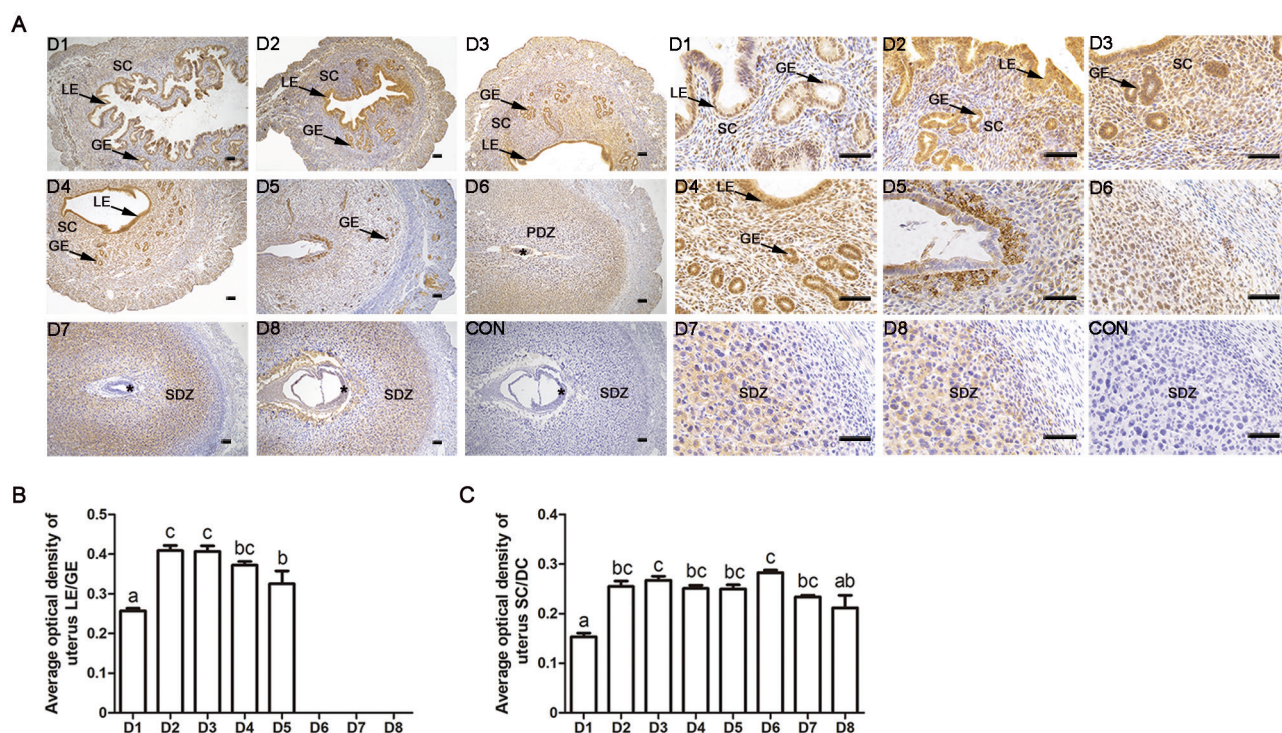


图 1. XBP1 蛋白在小鼠早期妊娠模型子宫中的表达

Fig. 1. Protein expression level of XBP1 in the mouse uterus during early pregnancy. *A*: Immunohistochemical staining results of XBP1 in uterus from 1 to 8 days of gestation. The figures on the left are low magnification diagrams, and the figures on the right are high magnification diagrams. *B*: The mean optical density of XBP1 immunohistochemical staining of luminal and glandular epithelial cells. *C*: The mean optical density of XBP1 immunohistochemical staining of stromal and decidual cells. All the scale bars represent 50 μm . LE, luminal epithelium; GE, glandular epithelium; SC, stromal cell; DC, decidual cell; PDZ, primary decidual zone; SDZ, secondary decidual zone; *: embryo. Data shown represent the mean \pm SEM, $n = 6$. Different letter superscripts (a, b, c) mean significant difference ($P < 0.05$), while the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

将 RNA 产物反转录为 cDNA, 针对 *Xbp1*、*Xbp1u*、*Xbp1s*、*Rpl7* 设计的引物由北京擎科生物科技有限公司青岛分公司合成, 其中 *Xbp1* 引物能检测 *Xbp1u* 和 *Xbp1s* mRNA, *Xbp1u*、*Xbp1s* 引物分别仅能检测 *Xbp1u*、*Xbp1s* mRNA。*Rpl7* 是内参照基因。RT-qPCR 引物序列见表 1。

1.5 统计学分析 对于免疫组织化学染色的定量, 随机选择每组中 3 只小鼠, 每个载玻片选取 6 个以上代表性区域应用 Image-Pro Plus 软件进行分析^[12]。免疫组织化学染色光密度分析及 RT-qPCR 实验数据以 mean \pm SEM 表示。应用 SPSS19.0 统计学软件进行单因素方差分析, 多重比较结果用字母标记法进行标记。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 XBP1在早期妊娠子宫中的表达

本研究采用免疫组织化学染色技术检测 XBP1 在妊娠第 1~8 天小鼠子宫的表达模式, 结果显示 (图 1), 在早期妊娠第 1 天的子宫中, XBP1 蛋白主要表达在腔上皮和腺上皮, 基质中染色较弱; 在第

2~4 天, 腔上皮、腺上皮和基质细胞中免疫染色均逐渐增强; 在第 5 天, 子宫腺上皮和围绕胚胎植入部位的蜕膜细胞中出现较强的免疫染色; 在第 6 天, XBP1 主要在初级蜕膜区表达, 第 7~8 天, 阳性信号主要集中在子宫次级蜕膜区, 且 XBP1 蛋白在第 6 天和第 8 天胚胎中均有表达。由此可见, XBP1 在早期妊娠小鼠子宫中呈时空特异性动态表达。

2.2 XBP1在人工诱导蜕膜化小鼠子宫中的表达

为了进一步分析 XBP1 是否参与了小鼠子宫的蜕膜化, 本研究又建立了人工诱导蜕膜化小鼠模型, 通过免疫组织化学染色技术检测 XBP1 在子宫中的表达。结果显示 (图 2), 在对照子宫 (未注油侧子宫) 的腔上皮和腺上皮细胞中有较强的染色, 基质细胞中没有染色信号; 在人工诱导蜕膜化子宫 (注油侧子宫) 中, XBP1 主要表达在蜕膜细胞中, 且表达模式与妊娠第 8 天子宫相似, 染色主要集中在次级蜕膜区。RT-qPCR 结果显示 (图 2), *Xbp1*、*Xbp1u* 和 *Xbp1s* mRNA 的表达量在人工诱导蜕膜侧子宫的表达均显著高于对照侧。综上所述, XBP1 在小鼠子宫的蜕膜细胞中有较强表达。

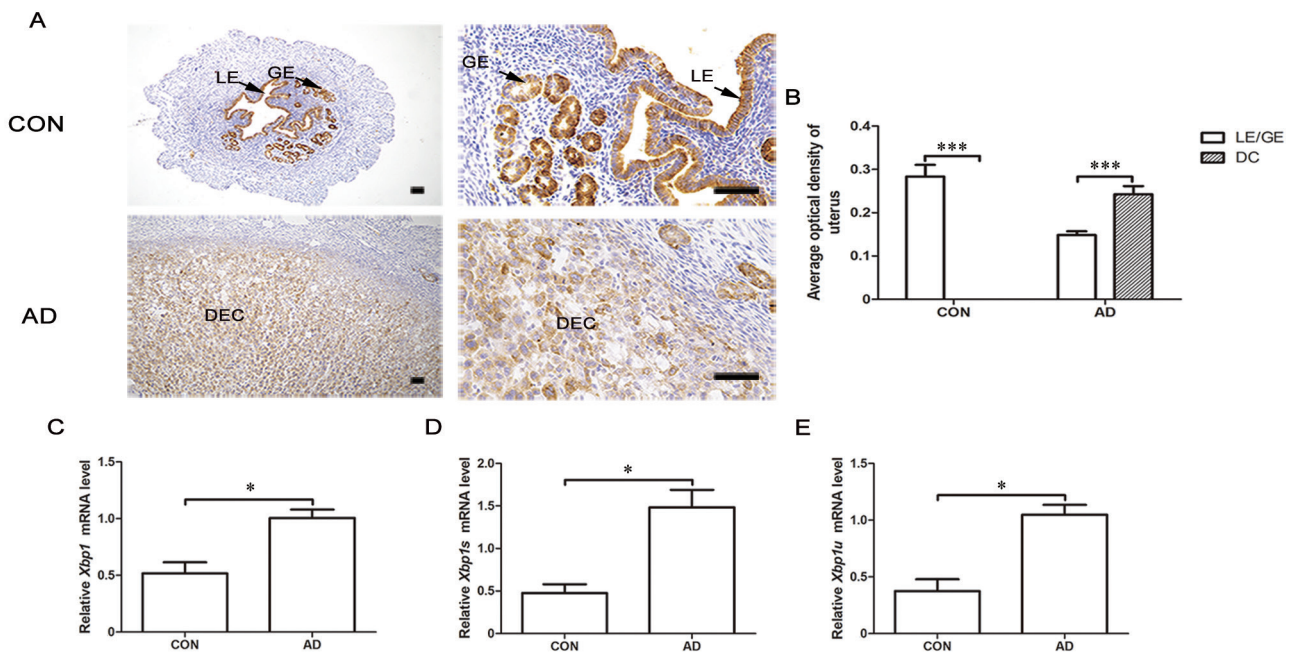


图 2. XBP1在小鼠人工诱导蜕膜模型子宫中的表达

Fig. 2. Expression level of XBP1 in the uterus of artificially induced decidualization (AD) mouse model. A: Results of XBP1 immunohistochemical staining in control (CON) and AD uterus. The figures on the left are low magnification diagrams, and the figures on the right are high magnification diagrams. B: The mean optical density of XBP1 immunohistochemical staining of luminal epithelial, glandular epithelial and decidual cells. C-E: mRNA expression of *Xbp1*, *Xbp1u* and *Xbp1s* in the uterus of AD mouse model. All the scale bars represent 50 μ m. LE, luminal epithelium; GE, glandular epithelium; DC, decidual cell; DEC, decidual basalis. Data shown represent the mean \pm SEM, $n = 3$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

2.3 XBP1 mRNA在小鼠发情周期子宫中的表达

为了研究 XBP1 在小鼠发情周期各阶段子宫的表达是否存在差异, 本研究建立了小鼠发情周期模型, 通过 RT-qPCR 检测总 *Xbp1*、*Xbp1u* 和 *Xbp1s* mRNA 的表达量。结果显示 (图 3), *Xbp1*、*Xbp1u* 和 *Xbp1s* mRNA 均在发情前期表达量最高, 在发情

期和发情后期表达量较低, 间情期又有所回升。因此, XBP1 在小鼠发情周期的表达存在时空变化, 且在发情前期表达量最高。

2.4 小鼠子宫中类固醇激素对XBP1表达的调节

为了解 XBP1 在早期妊娠子宫中的这种复杂动态表达模式的调节机制, 我们构建了 E₂ 和 P₄ 调节的

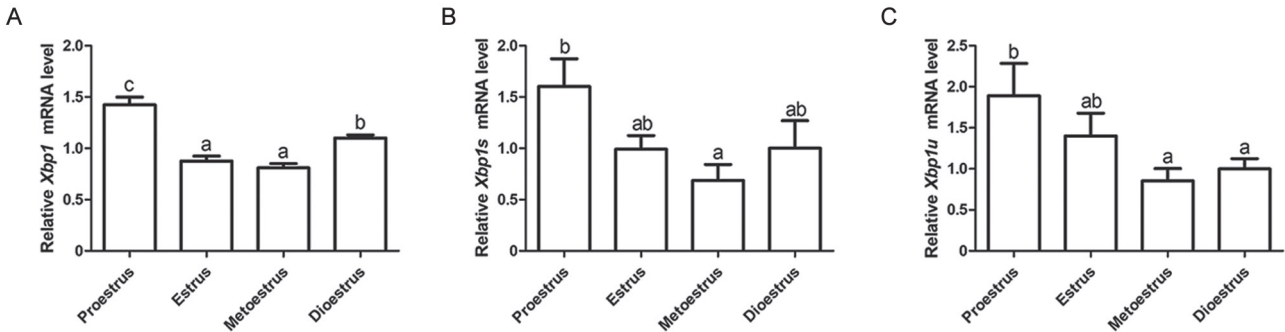


图 3. *Xbp1* mRNA在小鼠发情周期模型子宫中的表达

Fig. 3. Expression level of XBP1 in the uterus of oestrous cycle mouse model. A–C: mRNA expression of *Xbp1*, *Xbp1u* and *Xbp1s* in the uterus of oestrous cycle mouse model. The internal reference gene is *Rpl7*. Data shown represent the mean \pm SEM, $n = 6$. Different letter superscripts (a, b, c) mean significant difference ($P < 0.05$), while the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

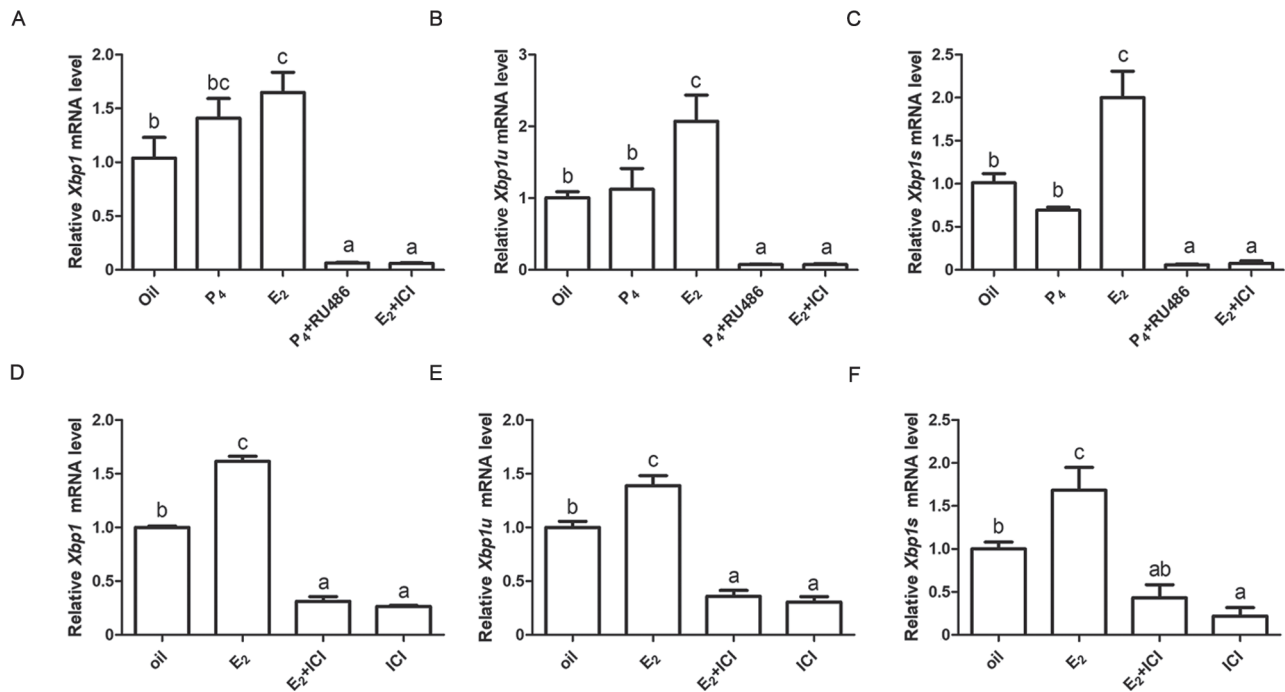


图 4. 类固醇激素处理小鼠子宫中*Xbp1* mRNA表达

Fig. 4. Expression of *Xbp1* mRNA in uterus treated with steroid hormones in mice. A–C: mRNA expression of *Xbp1*, *Xbp1u* and *Xbp1s* in the uterus injected with sesame oil, P₄, E₂, P₄+RU486, and E₂+ICI respectively. D–F: mRNA expression of *Xbp1*, *Xbp1u* and *Xbp1s* in the uterus injected with sesame oil, E₂, E₂+ICI, and ICI respectively. The internal reference gene is *Rpl7*. Data shown represent the mean \pm SEM, $n = 6$. Different letter superscripts (a, b, c) mean significant difference ($P < 0.05$), while the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

动物模型, 通过 RT-qPCR 检测各实验组中总 *Xbp1*、*Xbp1u* 和 *Xbp1s* mRNA 的表达量。结果显示 (图 4), 与对照组相比, *Xbp1*、*Xbp1u* 和 *Xbp1s* mRNA 在 E₂ 处理后表达均明显升高, 而 E₂ 和 ICI 共同处理后, 表达显著下降; 在 P₄ 处理后表达差异不显著, 但 P₄ 和 RU486 共同处理后, 表达显著下降。为了进一步分析 E₂ 对 XBP1 表达的影响, 对去卵巢小鼠分组注射芝麻油、E₂、E₂+ICI、ICI, RT-qPCR 结果显示, E₂ 能显著诱导 *Xbp1*、*Xbp1u* 和 *Xbp1s* mRNA 的表达, 且 E₂+ICI、ICI 处理后其表达量均显著下降 (图 4)。

为了进一步确定 XBP1 蛋白在子宫的哪种细胞

中受激素调节, 本研究通过免疫组织化学染色技术检测了 XBP1 蛋白在激素处理的小鼠子宫中的表达。结果显示 (图 5), 与对照组相比, 腔上皮和腺上皮细胞中 XBP1 的表达在 E₂ 处理后显著增强, 在 E₂+ICI 处理后又明显降低, 而基质细胞中 XBP1 的表达量在 E₂ 和 E₂+ICI 处理后均无明显变化; XBP1 在上皮细胞的表达在 P₄ 处理后显著降低, 在 P₄+RU486 处理后表达量升高但无显著差异, 基质细胞 XBP1 的表达在 P₄ 和 P₄+RU486 处理后均无明显变化。综上所述, XBP1 在小鼠子宫上皮细胞中的表达受雌激素的调节。

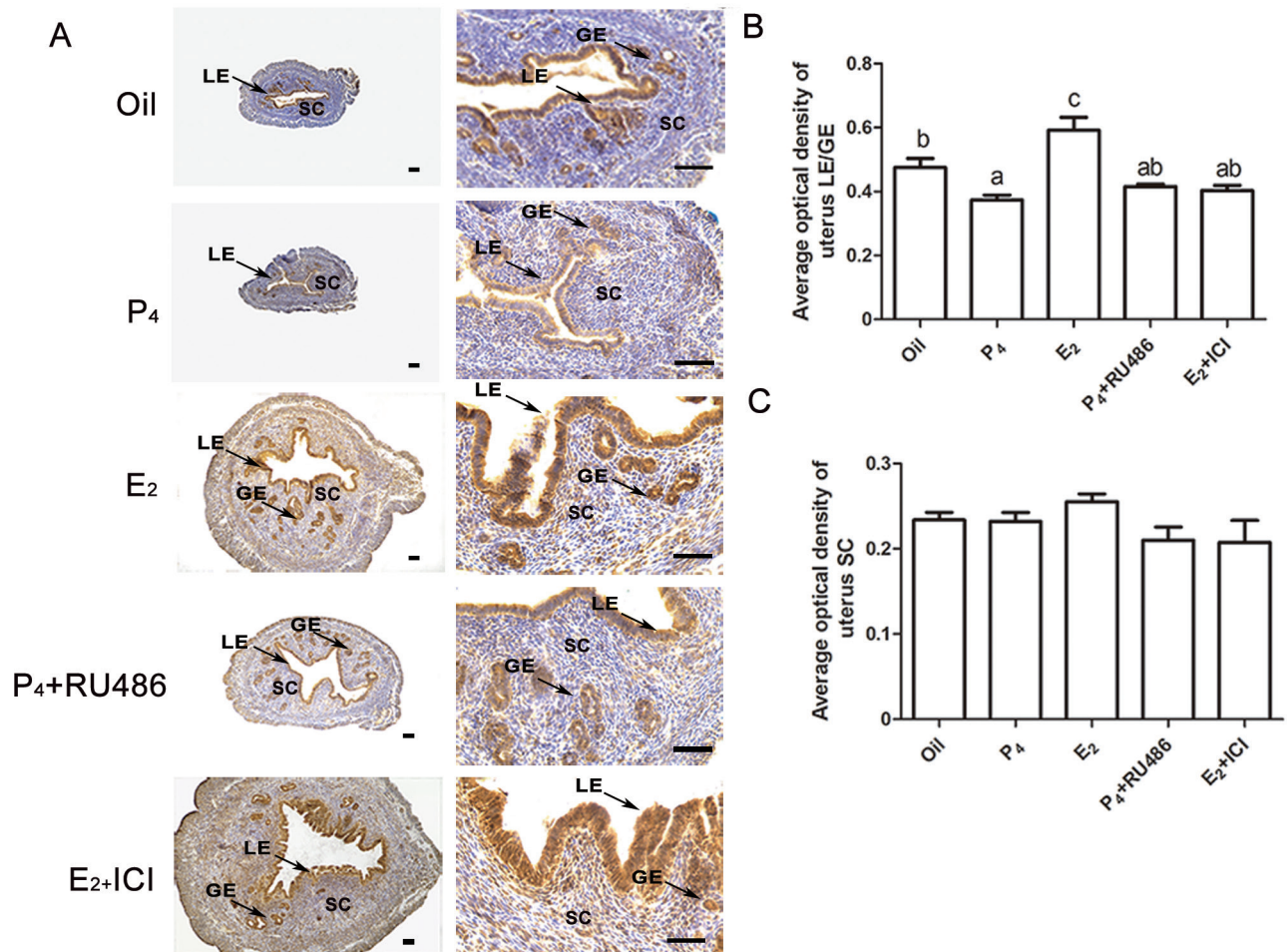


图 5. 类固醇激素处理小鼠子宫中XBP1蛋白的表达

Fig. 5. Expression of XBP1 protein in uterus treated with steroid hormones in mice. A: Results of immunohistochemical staining of XBP1 in mouse uterus with injection of oil as control (Oil), progesterone (P₄), estrogen (E₂), progesterone plus progesterone inhibitor (P₄+RU486), and estrogen plus estrogen inhibitor (E₂+ICI). The figures on the left are low magnification diagrams, and the figures on the right side are high magnification diagrams. All the scale bars represent 50 μm. B: The mean optical density of XBP1 immunohistochemical staining of luminal epithelial and glandular epithelial cells. C: The mean optical density of XBP1 immunohistochemical staining of stromal cells. LE, luminal epithelium; GE, glandular epithelium; SC, stromal cell. Data shown represent the mean ± SEM, n = 6. Different letter superscripts (a, b, c) mean significant difference (P < 0.05), while the same letter superscripts mean no significant difference (P > 0.05).

3 讨论

哺乳动物胚胎着床是子宫和胚泡相互作用的结果,在此过程中它受到各种因素的共同调节,使胚泡的着床能力与子宫内膜的接受态达到同步化^[13,14]。妊娠第1~5天是小鼠胚胎植入的关键时间,妊娠第4~5天被视为植入窗口,在此期间,囊胚附着、黏附和侵入子宫内膜^[4]。研究表明,早期妊娠子宫中蛋白质合成的增加与子宫的接受能力和囊胚附着密切相关^[15]。本研究结果显示,XBP1蛋白在正常妊娠第1~4天的腔上皮、腺上皮和基质细胞中均有表达,且从第2天开始表达量上升,表明XBP1可能参与了早期妊娠小鼠子宫腔上皮和腺上皮细胞增殖和分化。

在妊娠第5天植入位点处,围绕胚胎的腔上皮基质细胞开始增殖并分化成蜕膜化细胞,形成一个无血管的初级蜕膜区;在妊娠第6~8天,初级蜕膜区外侧基质细胞继续增殖和分化为蜕膜细胞,形成次级蜕膜区^[16]。值得注意的是,蜕膜化异常会导致胚胎着床失败以及流产^[17]。本研究中,在早期妊娠第5天胚胎植入部位周围观察到XBP1特异性高表达,表明其可能参与了胚胎植入过程。有研究表明,炎症反应的产生对于胚胎的成功植入至关重要,ERS和UPR是胚胎植入期间无菌炎症反应的诱导剂,而IRE1 α 充当这些过程之间的桥梁^[18]。ERS和UPR也有助于维持与植入相关的无菌炎症^[18]。由此推测,XBP1可能通过调节UPR参与胚胎植入。在妊娠的第6天,主要在初级蜕膜区检测到XBP1阳性信号。在妊娠第7~8天,随着基质细胞增殖和分化,蜕膜区不断扩大,XBP1主要表达在次级蜕膜区。在人工诱导蜕膜化模型中,在对照子宫的基质细胞中没有检测到XBP1的表达,但在注油侧子宫中基质细胞分化成为蜕膜细胞后,XBP1蛋白大量表达,提示XBP1可能参与蜕膜化过程。UPR涉及的信号传导途径与无菌炎症反应的发生以及血管生成相互关联,这两个过程均在蜕膜中起着关键作用^[18]。在子宫蜕膜过程中,蜕膜细胞作为内质网细胞重编程的一部分,具有分泌多种蛋白的能力^[19]。蛋白表达水平的增加使ER蛋白质折叠机制达到饱和,导致错误或未折叠蛋白积累,诱发ERS,激活UPR。因此,XBP1极有可能通过调控UPR参与小鼠子宫的蜕膜化过程。

雌激素和孕激素对于成功的胚胎植入和正常子宫基质细胞的蜕膜化必不可少^[5]。在类固醇激素的

协调作用下整个子宫内膜进行周期性动态重塑^[20]。在小鼠妊娠的第1天,在排卵前卵巢E₂峰的影响下,子宫上皮细胞经历了一定程度的增殖,并持续到第2天^[21]。从第3天起开始,随着P₄水平的提高,E₂水平的降低,子宫上皮细胞停止增殖并开始分化^[13]。在妊娠第4天时,E₂又会急剧增加,刺激子宫进入接受态。从妊娠第1天到第2天,伴随着上皮细胞的增殖,XBP1表达量也急剧增加,并在第3天达到高峰,提示XBP1可能受到雌激素的调节并参与子宫上皮细胞的增殖。本研究结果显示,对卵巢切除的小鼠用E₂处理,子宫中的*Xbp1* mRNA和蛋白表达明显增加,如果用ICI抑制E₂受体,E₂则失去调节作用,表明雌激素确实上调了XBP1的表达。以前的研究显示,雌激素可通过诱导乳腺细胞中XBP1的表达来调节UPR^[22,23]。在小鼠发情周期模型中,*Xbp1*的表达在发情前期达到最高,在发情期降低,发情后期降至最低,间情期又有所回升,与这个时期小鼠体内的E₂浓度变化基本一致^[23]。而且,该表达模式与雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)在小鼠发情周期中的表达变化也相同^[23],表明E₂可能通过ER α 调节XBP1的表达。

此外,本研究结果显示,在P₄处理后*Xbp1* mRNA的表达未见明显变化,其蛋白在基质细胞的表达也无明显变化。已有研究表明,在人肺癌细胞中,P₄仅能通过诱导PERK途径来诱导ERS,不能直接诱导XBP1的表达^[24],这与本研究结果是一致的。但在上皮细胞中XBP1蛋白与mRNA的表达并不完全一致,可能是由于进行mRNA检测的组织是上皮和基质细胞的混合物造成的。另外,特定基因的mRNA丰度不一定与其翻译产物蛋白质的表达量成线性关系;基因表达的调控层次除了转录水平还有转录后调控和翻译及翻译后调控,最终都会影响蛋白的表达量,也可能是造成这种表达不一致的原因。有意思的是,P₄和RU486共同处理后则显著降低*Xbp1* mRNA的基础表达,这提示P₄可能起到维持*Xbp1*高水平基础表达的作用。研究表明,RU486可导致去卵巢小鼠子宫自噬增加^[25],从而进一步降低细胞UPR^[26]。因此,RU486与P₄共同作用后*Xbp1* mRNA的表达降低可能与此途径有关。此外,RU486既是孕酮受体(progesterone receptor, PR)拮抗剂,也是糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)拮抗剂。先前的研究表明,糖皮质激素可激活IRE1 α /XBP1s信号通路^[27,28],其可以通过增强蛋白

质折叠和错误折叠蛋白质的降解来减轻肠道 ER^[27], 且这一过程是通过 GR 驱动发挥作用的^[27]。因此, 我们推测 RU486 也可能通过阻碍糖皮质激素信号转导发挥作用, 从而降低了 *Xbp1* mRNA 的表达。

综上所述, 在早期妊娠期, XBP1 参与了小鼠胚胎植入和蜕膜化过程, 且在子宫腔上皮和腺上皮中的表达受到雌激素上调。深入研究 XBP1 在早期妊娠子宫中的表达和调节, 将有助于我们理解胚胎植入和蜕膜化的分子机制, 为不孕不育等相关疾病的治疗提供理论依据。

参考文献

- József M, Tamás M, Gábor B, Miklós C. Minireview: Endoplasmic reticulum stress: control in protein, lipid, and signal homeostasis. *Mol Endocrinol* 2013; 27(3): 384–393.
- Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci* 2015; 40(3): 141–148.
- Shamu CE, Walter P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J* 1996; 15(12): 3028–3039.
- Mourik MSMV, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol* 2009; 85(1): 4–19.
- Das SK. Regional development of uterine decidualization: Molecular signaling by Hoxa-10. *Mol Reprod Dev* 2010; 77(5): 387–396.
- Spencer TE. Biological roles of uterine glands in pregnancy. *Semin Reprod Med* 2014; 32(5): 346–357.
- Yang Y, Pei X, Jin Y, Wang Y, Zhang C. The roles of endoplasmic reticulum stress response in female mammalian reproduction. *Cell Tissue Res* 2016; 363(3): 589–597.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2656–2664.
- Hasegawa D, Calvo V, Avivar-Valderas A, Lade A, Chou HI, Lee YA, Farias EF, Aguirre-Ghiso JA, Friedman SL. Epithelial *Xbp1* is required for cellular proliferation and differentiation during mammary gland development. *Mol Cell Biol* 2015; 35(9): 1543–1556.
- Olivares S, Henkel AS. Hepatic *Xbp1* gene deletion promotes endoplasmic reticulum stress-induced liver injury and apoptosis. *J Biol Chem* 2015; 290(50): 30142–30151.
- Gu XW, Yan JQ, Dou HT, Liu J, Liu L, Zhao ML, Liang XH, Yang ZM. Endoplasmic reticulum stress in mouse decidua during early pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 434: 48–56.
- Huang B, Butler R, Miao Y, Dai Y, Wu W, Su W, Fujiikuriyama Y, Warner M, Gustafsson JÅ. Dysregulation of Notch and ER α signaling in AhR^{-/-} male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(42): 11883–11888.
- Sandeep P, Hantak AM, Bagchi IC, Bagchi MK. Minireview: Steroid-regulated paracrine mechanisms controlling implantation. *Mol Endocrinol* 2014; 28(9): 1408–1422.
- Dey SK, Lim H, Das SK, Jeff R, Paria BC, Takiko D, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004; 25(3): 341–373.
- Bai ZK, Guo B, Tian XC, Li DD, Wang ST, Cao H, Wang QY, Yue ZP. Expression and regulation of Runx3 in mouse uterus during the peri-implantation period. *J Mol Histol* 2013; 44(5): 519–526.
- Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H, Armant DR. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med* 2013; 34(5): 939–980.
- Shao J, Li MQ, Meng YH, Chang KK, Ying W, Li Z, Li DJ. Estrogen promotes the growth of decidual stromal cells in human early pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(10): 655–664.
- Soczewski E, Grasso E, Gallino L, Hauk V, Ramhorst R. Immunoregulation of the decidualization program: focus on the endoplasmic reticulum stress. *Reproduction* 2020; 159(4): R203–R211.
- Signe A, Jüri R, Outi H, Zhang P, Juha K, Triin L, Merli S, Maire P, Jaak V, Anneli SE. Research resource: interactome of human embryo implantation: identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks. *Mol Endocrinol* 2012; 26(1): 203–217.
- Ashary N, Tiwari A, Modi D. Embryo implantation: war in times of love. *Endocrinology* 2018; 159(2): 1188–1198.
- Bhurke AS, Bagchi IC, Bagchi MK. Progesterone-regulated endometrial factors controlling implantation. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75(3): 237–245.
- Sengupta S, Sharma CG, Jordan VC. Estrogen regulation of X-box binding protein-1 and its role in estrogen induced growth of breast and endometrial cancer cells. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2010; 2(2): 235–243.
- Wang DY, Fulthorpe R, Liss SN, Edwards EA. Identification of estrogen-responsive genes by complementary deoxyribonucleic acid microarray and characterization of a novel early estrogen-induced gene: EEIG1. *Mol Endocrinol* 2004; 18(2): 402–411.
- Dioufa N, Kassi E, Papavassiliou AG, Kiaris H. Atypical induction of the unfolded protein response by mifepristone. *Endocrine* 2010; 38(2): 167–173.

- 25 Choi S, Shin H, Song H, Lim HJ. Suppression of autophagic activation in the mouse uterus by estrogen and progesterone. *J Endocrinol* 2014; 221(1): 39–50.
- 26 Qi Z, Chen L. Endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1206: 167–177.
- 27 Das I, Png CW, Oancea I, Hasnain SZ, Lourie R, Proctor M, Eri RD, Sheng Y, Crane DI, Florin TH. Glucocorticoids alleviate intestinal ER stress by enhancing protein folding and degradation of misfolded proteins. *J Exp Med* 2013; 210(6): 1201–1216.
- 28 Gao Y, Zhu H, Yang F, Wang Q, Feng Y, Zhang C. Glucocorticoid-activated IRE1 α /XBP-1s signaling: an autophagy-associated protective pathway against endotheliocyte damage. *J Physiol Cell Physiol* 315(3): C300–C309.