

本文引文格式:黄品秀,文秋月,梁卓. SOX4在复发性流产中的作用及其机制研究[J].
右江民族医学院学报,2023,45(1):57-61.

【论著与临床报道】

SOX4在复发性流产中的作用及其机制研究

黄品秀,文秋月,梁卓

(广西柳州市妇幼保健院,广西 柳州 545001)

摘要:目的 研究SOX4在复发性流产患者蜕膜组织中的表达情况。方法 在正常妊娠蜕膜组织和复发性流产蜕膜组织中使用Q-PCR、免疫印迹和免疫组化检测SOX4、PGR、IGFBP1、FOXO1的mRNA和蛋白的表达。结果 在复发性流产患者蜕膜组织中的SOX4与SOX4相关的调控分子PGR、FOXO1和IGFBP1均比正常人均下降($P < 0.05$)。结论 SOX4在妊娠的维持过程中发挥重要的作用。

关键词: 子宫内蜕膜化;SOXC转录因子类;流产,习惯性

中图分类号:R714.21

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)01-0057-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.01.010

The role and mechanism of SOX4 in recurrent abortion

Huang Pinxiu, Wen Qiuyue, Liang Zhuo

(Liuzhou Maternity and Child Healthcare Hospital, Liuzhou 545001, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of SOX4 in decidual tissues of patients with recurrent abortion. **Methods** Q-PCR, Western Blot and immunohistochemistry technique were adopted to detect the mRNA and protein expressions of SOX4, PGR, IGFBP1 and FOXO1 in decidual tissues of normal pregnancy and those of recurrent abortion. **Results** In comparison with those of normal people, the decidual issues of patients with recurrent abortion had decreased levels of SOX4 and SOX4-related regulatory molecules PGR, FOXO1 and IGFBP1 ($P < 0.05$). **Conclusion** SOX4 plays an important role in the maintenance of pregnancy.

Key words: decidualization of endometrium; subclass of SOX4 transcription factor; abortion, recurrent

妊娠的成功需要具有植入能力的胚胎和处于接受态的子宫内蜕膜之间的对话^[1]。在升高的孕酮和细胞内环磷酸腺苷(cAMP)的作用下子宫内蜕膜基质细胞发生重塑从而启动蜕膜化是子宫内蜕膜处于接受态的先决调节,在胚胎植入之后蜕膜化发生更加广泛的转化^[2]。蜕膜化反应在妊娠的建立及整个妊娠过程中发挥重要的作用。蜕膜化不足与胚胎植入失败^[3]、不明原因不孕^[4]、复发性自然流产^[5]、宫内生长受限^[6]、和子痫^[7]密切相关。然而人子宫内蜕膜化机制仍然不清。

对基质细胞蜕膜化起重要的多种转录因子已被成功鉴定^[2]。人叉头框蛋白O1(FOXO1)是FOXO转录因子家族的成员,是在人子宫内蜕膜基质细胞中最早发现对孕酮和cAMP有响应的转录因子之一^[8]。有足够的证据表明FOXO1通过与其启动子的直接结合来调节PRL和IGFBP1的转录^[9]。孕酮受体(PGR)是子宫内蜕膜间质细胞蜕膜化的关键核心分子,通过与P4配体结合及其核移位使子宫内蜕膜处于接受态。在人类和小鼠中,一系列PGR直接靶向基因已经被

基金项目:国家自然科学基金项目(82001553,82160296);广西自然科学基金项目(2019JJB140179);柳州市科技计划项目(2022CAC0115)

第一作者简介:黄品秀(1982-),女,博士,副主任医师,研究方向:妇产科-生殖医学,E-mail:huangpinxiu@163.com

PGRChIP-Seq 所揭开^[10]。PGR 的异常表达与不明原因不孕和子宫内膜异位症(EMS)密切相关^[11]。尽管小鼠和人类蜕膜化过程中的许多转录因子和下游事件已被阐明^[12],但子宫内膜蜕膜化的转录调控网络的精确机制仍未完全探索。

SOX4 是一种高度保守的转录因子,属于 SOX (SRY 盒)家族。研究表明^[13],SOX4 对多种生物过程至关重要,包括胚胎发生、神经发育和分化。此外,有研究发现 SOX4 敲除小鼠在妊娠第 14 天死于心脏畸形,表明 SOX4 在胚胎发育中的关键作用^[14]。此外,越来越多的报道表明 SOX4 与肿瘤细胞增殖、转移和上皮-间质细胞转化有关^[15]。还有报道显示 SOX4 在乳腺癌中孕酮的调节下高度表达^[16]。此外,SOX 家族的另一个成员 SOX17,在上皮细胞中 SOX17 被观察到是 PGR 调节 IHH 表达的直接靶点^[17]。

本研究前期通过 ChIP-Seq 和 RNA-Seq 技术揭示,SOX4 在 P4-PGR 的调节下,通过调节 FOXO1 的表达来促进人子宫内膜基质细胞(HESCs)的蜕膜化。还发现了 SOX4 通过抑制泛素 E3 连接酶 HERC4 在维持 PGR 蛋白稳定性的机制。此外,前期也证实了 SOX4 和 PGR 在植入失败的子宫内膜异位症患者的子宫内膜中异常下调^[18]。本研究继续研究 SOX4 在复发性流产(recurrent abortion,RA)患者蜕膜组织中的表达情况,使用 Q-PCR、免疫印迹和免疫组化探讨 SOX4 在妊娠维持过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于 2020 年 1 月至 2021 年 12 月在柳州市妇幼保健院收集复发性流产患者蜕膜组织(孕 6~10 周)作为病例组,因意外妊娠正常胚胎妇女的蜕膜组织(孕 6~8 周)作为对照组。该研究得到了本院伦理委员会的批准,所有参与者都签署了知情同意书。所有女性的年龄在 20~38 岁,平均(32±5)岁,体重指数(BMI)在 18~23(21±2)。月经周期(28±7) d,卵

巢储备功能正常。入组标准:①自然妊娠流产次数≥2 次;②夫妻双方染色体正常。排除标准:女方免疫学检查异常、血栓前状态、生殖道解剖异常、内分泌异常、男性精液异常、生殖道感染、生活环境中存在导致流产高危因素等。每一组筛选出 12 名符合标准的。收集 2 份蜕膜组织样本,一个用甲醛固定送病理科,另一个储存在-80℃提取蛋白和 RNA。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及逆转录 称取约 100 μg 组织,加入 1 mL TRIzol(北京莱博润科生物科技有限公司)用匀浆仪进行匀浆处理。根据在培养皿的大小加入适量的 TRIzol(3.5 cm 的培养皿加 0.5 mL)裂解细胞,用移液器吸打几次;室温放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离;加入 0.2 mL 氯仿(济南启光科贸),上下颠倒 15 s,室温放置 10 min;4℃ 10 000 g 离心 15 min。离心后的样品分为 3 层:底层为黄色有机相,上层为无色水相和中间层。RNA 主要分布在水相中,水相体积约为所用 TRIzol 试剂的 60%。把上层水相转移到新管中,加入 0.5 mL 的异丙醇,室温放置 10 min;4℃ 10 000g 离心 10 min,离心后在管侧和管底出现胶状沉淀,弃上清;用 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀,每使用 1 mL TRIzol 至少加 1 mL 75%乙醇,4℃ 不超过 7 500 g 离心 5 min,弃上清;室温放置干燥 RNA 沉淀;加入 10~20 μL 无 RNase 的水,55~60℃放置 10 min 使 RNA 溶解。RNA 浓度测定后,用于 RNA 逆转录实验,或者保存于-80℃冰箱,用于测序或者后续反转录实验。根据逆转录试剂盒(takara)进行逆转录保存于-80℃冰箱。

1.2.2 Q-PCR 反应 PCR 引物从 NCBI Genbank 中获取 mRNA,并使用 NCBI 网站设计引物,序列引物序列见表 1。根据 Q-PCR 试剂盒(takara)说明进行。使用荧光定量 ABI 7500 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

表 1 引物表

QPCR primer	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
GAPDH	ACGGATTTGGTCGTATTGGG	CGCTCCTGGAAGATGGTGAT
IGFBP1	AGAGTCGTAGAGAGTTTAGC	ACACTGTCTGCTGTGATAA
FOXO1	GGCAGCCAGGCATCTCAT	TGGGTCAGGCGGTTTCATAC
PGR	TGTATTTGTGCGTGTGGGTG	TACAGCCCATTCCCAGGAAG
SOX4	CCCAGCAAGAAGGCGAGTTA	CATCGGCCAAATTCGTCACC

1.2.3 免疫印迹(WB) 将 100 mg 子宫内膜组织加入 1 mL 包含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,用匀浆器进行裂解处理。裂解后的组织经过超声处理后,4℃ 14 000~20 000 g 离心 20 min,收集上清。利用 BCA

试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定蛋白浓度,相关方法见说明书。加入含有巯基乙醇的蛋白 loading buffer,99℃煮蛋白 10 min,煮后的蛋白可保存于-80℃或者-20℃冰箱;按说明配制 SDS-

PAGE 蛋白分离胶和浓缩胶,根据测得的蛋白浓度上样。使用电泳条件:90 V 跑蛋白浓缩胶 30 min,120 V 跑蛋白分离胶 1 h;转膜条件,300 mA 恒流转膜 1.5 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;5%牛奶封闭 30~60 min;一抗 SOX4 抗体(abcam, ab80261),PGR(CST, 8757),FOXO1(abcam, ab39670),IGFBP1(abcam, ab228741)4 °C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;二抗(欣博盛生物科技公司),室温孵育 2 h;TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,曝光显色。

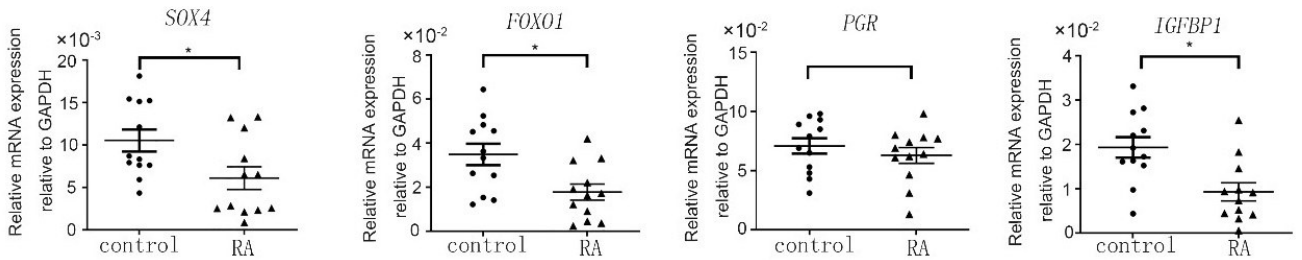
1.2.4 免疫组化 石蜡切片脱蜡至水:①二甲苯 I、II,各 10 min,梯度酒精:100%,2 min 95%,2 min 80%,2 min 70%;蒸馏水洗 5 min,2 次(置于摇床)。高压锅处理技术:枸橼酸钠缓冲液(10 mM,pH 6.0),高压锅内煮沸,上汽 5 min 后缓慢冷却;PBS:5 min,2 次(置于摇床);过氧化氢封闭内源性过氧化物酶:3% H₂O₂,室温 10 min(避光);蒸馏水洗 5 min,2 次(置于摇床);常血清封闭:5%BAS 血清常温封闭 1 h。添加一抗 SOX4 抗体(abcam, ab80261)、PGR(CST, 8757)、FOXO1(abcam, ab39670)、IGFBP1(abcam,

ab228741)4 °C 过夜;PBS:5 min,2 次;添加二抗,常温,1 h;PBS:5 min,2 次(置于摇床);DAB 显色,镜下观察,适时终止(自来水冲终止)。苏木素复染,室温,30 s,自来水冲洗返蓝,30 min;梯度酒精脱水:80%,2 min 95%,2 min 100%,2 次,5 min;二甲苯透明:I、II(二甲苯)各 5 min;封片:加拿大树胶(或中性树胶)封片。所有的免疫组化的片子使用相同浓度的抗体,相同浓度的 DAB 显色液和显色时间,相同的苏木素染色时间和复染时间。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组使用独立样本 *t* 检验,三组以上进行方差分析,百分率比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

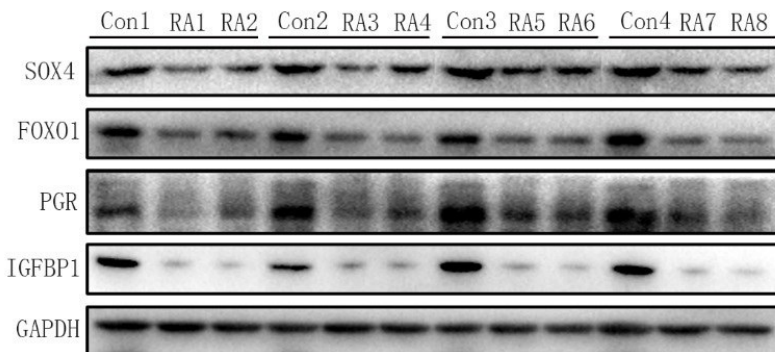
2 结果

Q-PCR 中除了 PGR 外其余在复发性流产患者的蜕膜组织中均显著下降,见图 1。复发性流产患者蜕膜组织中的 SOX4 与 SOX4 相关的调控分子,FOXO1 和 IGFBP1 的免疫印迹(见图 2)和免疫组化(见图 3)结果均比正常人显著性下降。



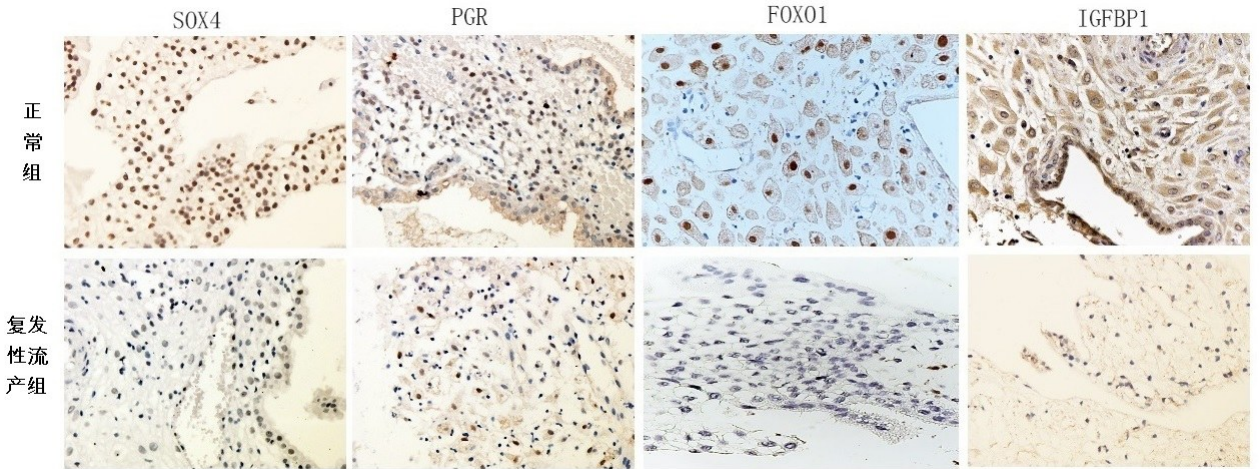
注:使用 Q-PCR 检测两组患者组织中 SOX4,FOXO1,PGR 和 IGFBP1 的 mRNA 表达量,* $P < 0.05$ 。

图 1 两组患者组织中 SOX4,FOXO1,PGR 和 IGFBP1 的 mRNA 表达情况



注:免疫印迹检测 SOX4,FOXO1,PGR 和 IGFBP1 在对照组 4 例(Con1~Con4)和复发性流产 8 例(RA1~RA8)的蜕膜组织中的蛋白表达情况。4 个分子在复发性流产患者的蜕膜组织中均表达下降。

图 2 使用免疫印迹检测 SOX4,FOXO1,PGR 和 IGFBP1 在对照组和复发性流产蜕膜组织中的蛋白表达情况



注:SOX4、FOXO1、PGR 和 IGFBP1 在复发性流产患者的蜕膜组织中均表达下降。

图 3 使用免疫组化检测 SOX4、FOXO1、PGR 和 IGFBP1 在对照组和复发性流产蜕膜组织中的表达及定位情况

3 讨论

子宫内膜基质细胞的正常蜕膜分化对胚胎的植入以及后期胚胎的正常发育、正常妊娠的维持具有重要的临床意义。该过程出现异常会导致反复妊娠失败诸如:反复植入失败、反复生化妊娠、复发性自然流产、胎儿生长受限、胎盘植入等各种妊娠期相关疾病。所以研究子宫内膜基质细胞蜕膜化机制具有深远的意义。目前虽然越来越多的信号分子被发现参与蜕膜发育的时空调节,但是到目前为止,胚胎与子宫内膜之间对话、人类对蜕膜化的启动、维持潜在的分子调控机制仍未完全阐明。

PGR 是人子宫内膜发生蜕膜化的关键核心分子,任何影响孕酮—孕酮受体信号通路势必影响妊娠的发生,所以 PGR 在胚胎植入和妊娠的维持中必不可少^[19]。KELLER D W 等^[20]发现有些不孕患者行子宫内膜活检提示内膜分化不良,但其卵泡期和黄体期血清激素水平正常,提出这些子宫内膜中可能存在 PGR 受体缺陷,经检查发现是由于组织中 PGR 受体含量降低,导致子宫内膜对孕激素的反应性降低而出现分泌不良,补充外源性孕激素也不能纠正子宫内膜分泌不良状态,所以导致不孕。P-PGR 信号上任何环节出现异常均有可能影响胚胎着床和妊娠的维持。

本课题前期研究表明 SOX4 敲低后不影响 PGR 的 mRNA 表达水平,但是影响 PGR 的蛋白表达水平,接着通过蛋白稳定性实验、泛素化实验等证实 SOX4 在维持 PGR 蛋白稳定性发挥重要的作用。SOX4 和 PGR 蛋白表达水平在反复种植失败患者的子宫内膜种植窗期中比正常人的均显著性下降,说明 SOX4 通过维持 PGR 蛋白稳定性在胚胎种植过程中发挥重要的作用。大量的临床案例表明,导致复发性流产中最主要的是孕酮的响应性而不是激素本身的含量,而孕

酮的响应性主要由 PGR 的表达缺陷以及其功能所决定^[21-22]。但是复发性流产蜕膜组织中 PGR 表达缺陷的具体机制不详。

本课题的前期研究提供的证据表明 SOX4 通过调节蜕膜化相关的关键因子 FOXO1 和调节 PGR 蛋白稳定性在人子宫内膜基质细胞蜕膜化过程中起着关键作用。子宫内膜异位症的反复种植失败妇女的种植窗子宫内膜中异常 SOX4 表达与 PGR 和 FOXO1 降低密切相关,这意味着 SOX4 与胚胎植入有高度临床相关性。本课题继续研究 SOX4 在复发性流产患者蜕膜组织中的表达情况,结果在复发性流产患者蜕膜组织中的 SOX4 与 SOX4 相关的调控分子 PGR、FOXO1 和 IGFBP1 均比正常人均显著性下降。说明 SOX4 在妊娠的维持过程发挥重要的作用。

参考文献:

- [1] CAO R, YANG Z S, HU S L, et al. Molecular mechanism of mouse uterine smooth muscle regulation on embryo implantation[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12494.
- [2] GELLERSEN B, BROSENS J J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure[J]. *Endocr Rev*, 2014, 35(6): 851-905.
- [3] PETER DURAIRAJ R R, ABERKANE A, POLANSKI L, et al. Deregulation of the endometrial stromal cell secretome precedes embryo implantation failure[J]. *Mol Hum Reprod*, 2017, 23(7): 478-487.
- [4] DAMBAEVA S, BILAL M, SCHNEIDERMAN S, et al. Decidualization score identifies an endometrial dysregulation in samples from women with recurrent pregnancy losses and unexplained infertility[J]. *F S Rep*, 2020, 2(1): 95-103.
- [5] TEMPEST N, HILL C J, MACLEAN A, et al. Novel microarchitecture of human endometrial glands; implications

- in endometrial regeneration and pathologies[J]. *Hum Reprod Update*, 2022, 28(2): 153-171.
- [6] OCHOA-BERNAL M A, FAZLEABAS A T. Physiologic events of embryo implantation and decidualization in human and non-human primates[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 1973.
- [7] GARRIDO-GOMEZ T, DOMINGUEZ F, QUIÑONERO A, et al. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(40): E8468-E8477.
- [8] UJVARI D, JAKSON I, BABAYEVA S, et al. Dysregulation of in vitro decidualization of human endometrial stromal cells by insulin via transcriptional inhibition of forkhead box protein O1 [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0171004.
- [9] KUSAMA K, TAMURA K, BAI H, et al. Exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) promotes transcriptional activation of the decidual prolactin gene via CCAAT/enhancer-binding protein in human endometrial stromal cells[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2018, 30(11): 1454-1461.
- [10] CHI R P A, WANG T Y, ADAMS N, et al. Human endometrial transcriptome and progesterone receptor cis-trome reveal important pathways and epithelial regulators[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(4): e1419-e1439.
- [11] PEI T J, LIU C, LIU T T, et al. miR-194-3p represses the progesterone receptor and decidualization in eutopic endometrium from women with endometriosis[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(7): 2554-2562.
- [12] DEMAYO F J, LYDON J P. 90 years of progesterone: new insights into PROGESTERONE receptor signaling in the endometrium required for embryo implantation [J]. *J Mol Endocrinol*, 2020, 65(1): T1-T14.
- [13] MORENO C S. SOX4: the unappreciated oncogene[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67: 57-64.
- [14] YA J, SCHILHAM M W, DE BOER P A, et al. Sox4-deficiency syndrome in mice is an animal model for common trunk[J]. *Circ Res*, 1998, 83(10): 986-994.
- [15] LI L N, LIU J, XUE H S, et al. A TGF- β -MTA1-SOX4-EZH2 signaling axis drives epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Oncogene*, 2020, 39(10): 2125-2139.
- [16] MORENO C S. SOX4: the unappreciated oncogene[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67(Pt1): 57-64.
- [17] WANG X Q, LI X L, WANG T Y, et al. SOX17 regulates uterine epithelial-stromal cross-talk acting via a distal enhancer upstream of Ihh[J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 4421.
- [18] HUANG P X, DENG W B, BAO H L, et al. SOX4 facilitates PGR protein stability and FOXO1 expression conducive for human endometrial decidualization[J]. *Elife*, 2022, 11: e72073.
- [19] ZHOU C, ZOU X M, WEN X S, et al. Association of the PROGINS PGR polymorphism with susceptibility to female reproductive cancer: a meta-analysis of 30 studies [J]. *PLoS One*, 2022, 17(7): e0271265.
- [20] KELLER D W, WIEST W G, ASKIN F B, et al. Pseudocorpus luteum insufficiency: a local defect of progesterone action on endometrial stroma[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1979, 48(1): 127-132.
- [21] PATEL B G, RUDNICKI M, YU J, et al. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2017, 96(6): 623-632.
- [22] 陈建海, 李海, 杨洁, 等. 雌激素受体- β 基因多态性对广西壮族绝经后妇女促卵泡激素、黄体生成素和雌孕激素的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2018, 40(6): 529-532.

收稿日期: 2022-11-08; 修回日期: 2022-12-11