

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.08.005

文章编号: 1005-8982 (2025) 08-0024-08

实验研究·论著

前脑啡肽在子宫内膜间质细胞蜕膜化中的作用*

余力¹, 罗伊凡², 张新宝³, 张箴波¹, 覃祚树¹

(1.上海交通大学医学院附属第一人民医院 妇产科, 上海 201620; 2.同济大学附属同济医院 中心实验室, 上海 200065; 3.上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093)

摘要: 目的 探讨前脑啡肽(PENK)在人子宫内膜间质细胞(HESCs)蜕膜化前后的表达情况, 以及分析PENK对蜕膜化发生的影响。**方法** ①采用8-溴腺苷-3',5'-环单磷酸和醋酸甲羟孕酮进行体外蜕膜化诱导, 并通过F-actin染色、实时荧光聚合酶链反应(qRT-PCR)和Western blotting验证蜕膜化诱导的情况。②使用GEO数据库、qRT-PCR和Western blotting验证PENK在HESCs蜕膜化诱导前后的表达水平。③使用不同siRNA敲减HESCs中的PENK, 并通过qRT-PCR和Western blotting检测敲减前后蜕膜标志物的表达, 以此来研究PENK对蜕膜化的影响。④使用GEO数据库分析PENK在反复种植失败患者子宫内膜中的表达情况。**结果** 从形态学、转录水平和蛋白水平上证明了HESCs体外蜕膜化的成功诱导。蜕膜化诱导组PRL、IGFBP1 mRNA和IGFBP1蛋白相对表达量较对照组1高($P < 0.05$)。PENK在HESCs体外蜕膜化诱导过程中表达增加($P < 0.05$)。相比HESCs, PENK敲减的HESCs蜕膜化受到抑制, 表现为蜕膜标志物PRL、IGFBP1和FOXO1表达减少($P < 0.05$)。GEO数据库提示与对照组子宫内膜相比, PENK在反复种植失败患者子宫内膜中表达可能下调($P < 0.05$)。**结论** PENK是子宫内膜蜕膜化发生的关键基因。蜕膜化期间PENK表达增加, 促使子宫内膜容受性建立。PENK表达减少可能与蜕膜化的异常, 以及胚胎反复种植失败有关。

关键词: 子宫内膜间质细胞; 前脑啡肽; 蜕膜化; 子宫内膜容受性; 反复种植失败

中图分类号: R714.1

文献标识码: A

Role of proenkephalin in endometrial stromal cell decidualization*

Yu Li¹, Luo Yi-fan², Zhang Xin-bao³, Zhang Zhen-bo¹, Qin Zuo-shu¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201620, China; 2. Central Laboratory, Tongji Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200065, China; 3. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Objective To explore the expression of proenkephalin (PENK) in human endometrial stromal cells (HESCs) before and after decidualization and to analyze the effect of PENK on decidualization. **Methods** HESCs were subjected to in vitro decidualization using 8-bromoadenosine 3', 5'-cyclic monophosphate and medroxyprogesterone acetate. F-actin staining, qRT-PCR and Western blotting were used to verify the efficiency of decidualization induction. GEO database analysis, qRT-PCR and Western blotting were performed to validate the expression level of PENK in HESCs with or without decidualization stimulation. Different siRNAs were used to knock down PENK expression in HESCs, and the expression levels of decidualization markers before and after knockdown were measured by qRT-PCR and Western blotting to investigate the effect of PENK on decidualization.

收稿日期: 2024-10-30

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No:82371642); 中央高校基本科研业务费专项资金(No:22120230312)

[通信作者] 覃祚树, E-mail: zuoshuqin@tongji.edu.cn; Tel: 15678910829

[作者简介] 覃祚树、张箴波, 现工作单位均为上海市同济医院。

GEO database analysis was conducted to evaluate the PENK expression in the endometrium of patients with recurrent implantation failure. **Results** Successful induction of in vitro decidualization in HESCs was demonstrated at the morphological, transcriptional and protein levels. The mRNA levels of PRL and IGFBP1 as well as the protein level of IGFBP1 were higher in the decidualization-induced group than those in the control group 1 ($P < 0.05$). The expression level of PENK increased with the stimulation of decidualization in HESCs ($P < 0.05$). Compared to HESCs, HESCs with PENK knockdown resulted in significant inhibition of decidualization, as evidenced by decreased expression of decidualization markers PRL, IGFBP1 and FOXO1 ($P < 0.05$). The analysis of data from GEO databases suggested that PENK expression may be downregulated in the endometrium of patients with recurrent implantation failure compared to the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** This study demonstrated that PENK is a key gene in endometrial decidualization. Increased PENK levels during decidualization contributes to the establishment of endometrial receptivity. Decreased expression of PENK may be associated with abnormal decidualization and the occurrence of recurrent implantation failure.

Keywords: endometrial stromal cell; proenkephalin; decidualization; endometrial receptivity; recurrent implantation failure

胚胎的成功植入是妊娠得以维持的重要前提,其取决于胚胎与子宫内膜之间的相互协调,以及子宫内膜对胚胎的接受能力,即子宫内膜容受性^[1-3]。子宫内膜是胚胎着床的土壤,在不同阶段呈现出动态性的规律变化。人类子宫内膜周期主要分为2个阶段:增殖期和分泌期。增殖期在雌激素的作用下基质细胞、上皮细胞和血管细胞活跃生长,分泌期子宫内膜在孕激素的驱动下发生蜕膜化,进而为植入做好准备^[4]。蜕膜化是子宫内膜容受性建立的关键步骤。人类蜕膜化的发生不需要胚胎植入信号,主要表现为人子宫内膜间质细胞(human endometrial stromal cells, HESCs)向分泌性蜕膜细胞的转变,并表达催乳素(Prolactin, PRL)和胰岛素样生长因子结合蛋白1(insulin-like growth factor-binding protein 1, IGFBP1)等经典蜕膜化标志物^[5-6]。然而,子宫内膜蜕膜化的具体调控机制仍不清楚,其中所涉及的关键基因有待明确。

前脑啡肽(Proenkephalin, PENK)基因位于人染色体8q12.1,其编码的PENK蛋白作为神经递质主要位于细胞基质中,大多分布于神经轴突及末梢处^[7]。目前PENK的研究大多聚焦于脑科学^[8-10],其作为一种抑癌基因对肿瘤生长起到抑制作用^[11-12]。此外,有研究表明PENK在人类女性生殖系统的调节中可能发挥一定的生理效应^[13]。在胚胎植入后的小鼠子宫也可检测到PENK,且在植入后的较长一段时间内持续高表达^[14]。然而PENK在HESCs蜕膜化中的作用尚不明确。本研究旨在探索PENK在HESCs蜕膜化前后的表达,以及对蜕膜化发生的影响,为子宫内膜蜕膜化和容受性的调控提供新的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 实验分组

实验首先分为对照组1(诱导0 h)和蜕膜化诱导组(诱导24、48和72 h),以验证HESCs蜕膜化诱导前后PRL、IGFBP1和PENK表达水平及形态改变。随后将HESCs分为对照组2和敲减PENK组(si PENK-1组和si PENK-2组),对照组转染阴性对照(negative control, NC)序列,敲减PENK组分别转染si PENK-1序列和si PENK-2序列,以比较2种PENK的siRNA在HESCs中的敲减效率。后将HESCs分为对照组3(仅转染NC序列)、蜕膜化诱导+NC组(转染NC序列24 h后进行蜕膜化诱导72 h)、蜕膜化诱导+si PENK-1组(转染si PENK-1序列24 h后进行蜕膜化诱导72 h)和蜕膜化诱导+si PENK-2组(转染si PENK-2序列24 h后进行蜕膜化诱导72 h),以比较敲减PENK后蜕膜HESCs中PRL、IGFBP1、FOXO1和PENK表达的改变。

1.2 材料与试剂

HESCs细胞由上海市第一人民医院提供保存,胎牛血清、DMEM/F12培养基、0.25%胰酶、磷酸盐缓冲溶液(phosphate-buffered saline, PBS)、1%青霉素/链霉素双抗(penicillin-streptomycin, PS)均购自上海欲立生物科技有限公司,二甲基亚砜、8-溴腺苷-3',5'-环单磷酸(8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate, 8-bromo-cAMP)和醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone 17-acetate, MPA)均购自美国Sigma公司, RNA提取试剂盒购自美国EZBioscience公司,逆转录和实时荧光定量聚合酶链反应

(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, PENK 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 序列由上海壹学盛生物科技有限公司设计合成, siRNA 转染试剂购自苏州基安生物技术有限公司, PENK 抗体购自美国赛默飞世尔科技公司, IGFBP1、叉头框蛋白 O1 (forkhead box protein O1, FOXO1) 抗体均购自美国 CST 公司, 波形蛋白 (Vimentin) 抗体和兔二抗购自武汉爱博泰克生物技术有限公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自美国 Affinity 公司, 兔 488 荧光二抗购自上海翌圣生物科技股份有限公司, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 和微丝绿色荧光探针 (Actin-Tracker Green-488) 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司, 4% 多聚甲醛购自武汉赛维尔生物技术有限公司, 强放射免疫沉淀法 (radio immunoprecipitation assay, RIP) 裂解液、100× 蛋白酶抑制剂、5× 蛋白上样缓冲液和化学发光成像显影液均购自上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 从液氮罐中取出 HESCs 冻存管于 37 °C 水浴锅中复苏解冻, 在超净台中吸出液体至离心管中, 并加入 5 mL 完全培养基, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。使用含 5% 胎牛血清和 1% PS 的 DMEM/F12 培养基重悬细胞, 移入培养皿中, 于 37 °C、5% 二氧化碳培养箱中培养 HESCs。

1.3.2 HESCs 体外蜕膜化诱导 将含 1 μmol/L MPA 和 0.5 mmol/L 8-bromo-cAMP 的 DMEM/F12 完全培养基用于 HESCs 的培养, 以诱导其体外蜕膜化^[15-16], 体外诱导时间为 72 h。

1.3.3 siRNA 转染 根据 siRNA 转染试剂的说明书进行转染体系的配置及转染操作。转染体系为 46 μL GA-RNA Buffer、4 μL 20 μmol/L siRNA 和 7.5 μL GA-RNA Reagent。将配置好的转染体系室温放置 20 min, 随后加入培养液中, 24 h 后换液。siRNA 序列见表 1。

1.3.4 qRT-PCR 检测 PENK、PRL、IGFBP1、FOXO1 mRNA 的相对表达量 使用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA。根据说明书的步骤使用逆

表 1 用于转染的 PENK siRNA 序列

基因	引物序列	长度/bp
NC	正向: 5'-UUCUCCGAACGAGUCACGUTT-3'	21
	反向: 5'-ACGUGACUCGUCCGAGAATT-3'	21
siPENK-1	正向: 5'-GCUUGCGUAAUGGAAUGUGAATT-3'	23
	反向: 5'-UUCACAUCCAUAACGCAAGCTT-3'	23
siPENK-2	正向: 5'-GCCUUGUAUAGUUGACUUCAUUTT-3'	23
	反向: 5'-AUGAAGUCAACUAACAAGGCTT-3'	23

录试剂盒 (HiScript III RT Super Mix for qPCR + gDNA wiper) 对 RNA 进行逆转录。逆转录体系为 20 μL, 将配置好的逆转录体系按照试剂盒说明书所述直接进行反应, 反应条件: 37 °C 预变性 15 min, 85 °C 变性 5 s。反应后的产物立即用于 qRT-PCR 反应, 或置于 -80 °C 冰箱冷冻保存。将逆转录得到的 cDNA 样品按照 qRT-PCR 试剂盒 (ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix) 说明书的方法进行体系配置并点样。qRT-PCR 体系为 10 μL。点样完成后置入 ABI Quant Studio6 仪中上机, 反应条件见表 2。以 18S RNA 作为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 PENK、PRL、IGFBP1、FOXO1 mRNA 相对表达量。本研究中所使用的引物序列见表 3。

表 2 qRT-PCR 反应条件

步骤	循环数/次	温度/°C	时间/s
预变性	1	95	30
循环反应	40	95	10
		60	30
熔解曲线	1	95	15
		60	60
		95	15

1.3.5 Western blotting 检测 PENK、IGFBP1、FOXO1 蛋白相对表达量 弃去细胞培养液后用 PBS 洗涤细胞 3 遍, 随后用包含 1× 蛋白酶抑制剂的强 RIPA 裂解液于冰上充分裂解细胞 30 min 并超声处理。用双缩脲法进行蛋白定量, 随后加入蛋白上样缓冲液于 98 °C 煮蛋白 10 min。取 20 μg 蛋白样品进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 随后将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上, 转膜条件为 300 mA 恒流 90 min。转膜结束后, 将膜在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, 随后将条带置入配置好的一抗液体中 4 °C 摇

表3 引物序列

基因	引物序列	长度/bp
18S RNA	正向: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	20
	反向: 5'-CTGGAATTACCGCGGCT-3'	17
PRL	正向: 5'-GGAGCAAGCCCAACAGATGAA-3'	21
	反向: 5'-GGCTCATTCAGGATCGCAAT-3'	21
IGFBP1	正向: 5'-TTGGGACGCCATCACTACCTA-3'	21
	反向: 5'-TTGGCTAAACTCTCTACGACTCT-3'	23
FOXO1	正向: 5'-TCGTCATAATCTGTCCCTACACA-3'	23
	反向: 5'-CGGCTTCGGCTCTTAGCAAA-3'	20
PENK	正向: 5'-ATCCTCGCCAAGCGGTATG-3'	19
	反向: 5'-GGTTGTCCCTGTTTCCAGA-3'	20

床孵育过夜。第2天取出条带,用吐温20缓冲盐溶液洗涤3次,10 min/次,随后将条带置入配置好的二抗液体中常温摇床孵育1 h。二抗孵育结束后,用吐温20缓冲盐溶液洗涤3次,10 min/次。最后对条带进行化学发光成像显影。使用Image J软件对显影结果进行灰度分析,使用目的蛋白灰度值与内参蛋白GAPDH灰度值的比值计算PENK、IGFBP1、FOXO1蛋白相对表达量。

1.3.6 免疫荧光染色 使用PBS洗涤共聚焦皿中的细胞3遍,随后用4%多聚甲醛固定细胞15 min,用0.5% Triton X-100通透20 min。在室温下用正常山羊血清封闭1 h后,将细胞与Vimentin抗体4℃孵育过夜。第2天用PBST溶液洗涤3次,5 min/次,随后滴加配置好的兔488荧光二抗进行避光室温孵育1 h,然后用DAPI染核5 min。Actin-Tracker Green-488固定、通透及封闭结束后,直接室温避光孵育1 h进行染色。最后使用倒置荧光显微镜拍照。

1.3.7 在线数据库分析 从基因表达综合数据库(gene expression omnibus database, GEO)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中检索GSE200200、GSE58144、GSE111974 3个转录组测序数据,将数据库中蜕膜化诱导不同时间点,以及正常内膜与反复种植失败内膜PENK mRNA相对表达量进行统计分析。

1.4 统计学方法

数据分析采用GraphPad Prism 9.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用t检验、单因素方差分析或随机区组设计的方差分析,有统计学意义后再用Dunnett或Bonferroni检验进行进一步的两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子宫内膜间质细胞体外蜕膜化的成功诱导

为验证HESCs的纯度,本研究首先用细胞免疫荧光实验验证Vimentin在HESCs中的表达,结果显示Vimentin在HESCs中广泛强表达,证明该细胞确实为间质细胞,且纯度高(见图1)。随后,本研究采用1 μmol/L MPA和0.5 mmol/L 8-bromo-cAMP对HESCs进行体外蜕膜化诱导72 h,通过荧光细胞骨架F-肌动蛋白(Filamentous actin, F-actin)染色,可以看出蜕膜化诱导前后的细胞形态变化^[15]。在诱导前,HESCs呈现梭形纤维样形态;蜕膜化诱导后,HESCs转变为上皮样蜕膜细胞(见图2)。

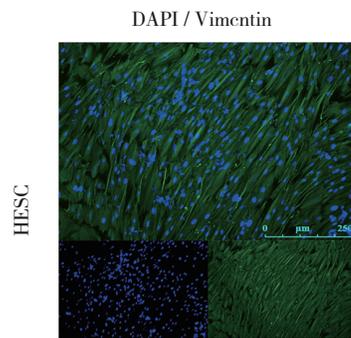


图1 免疫荧光染色图

为进一步验证HESCs体外蜕膜化的诱导成功,本研究分析了诱导不同时间点蜕膜标志物PRL和IGFBP1的表达。不同时间蜕膜化诱导组PRL、IGFBP1 mRNA和IGFBP1蛋白相对表达量比较,经单因素方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$),PRL、IGFBP1 mRNA和IGFBP1蛋白相对表达量随着蜕膜化诱导时间的延长逐渐升高($P < 0.05$)。上述结果表明HESCs体外蜕膜化的成功诱导。见表4和图3。

2.2 PENK在子宫内膜间质细胞蜕膜化过程中表达增加

为验证PENK在HESCs蜕膜化诱导后的表达情况,本研究首先分析GSE200200数据库,该数据库通过mRNA测序分析了永生化人子宫内膜基质细胞系体外蜕膜化诱导不同时间点各个基因的转录水平。蜕膜化诱导0、6、18、24、36、48、72和144 h的PENK mRNA相对表达量分别为(7.03±0.08)、(13.80±3.11)、(19.87±2.45)、(22.82±1.38)、(32.16±4.37)、(30.28±1.46)、(51.69±1.53)、(83.43±5.06),经单因

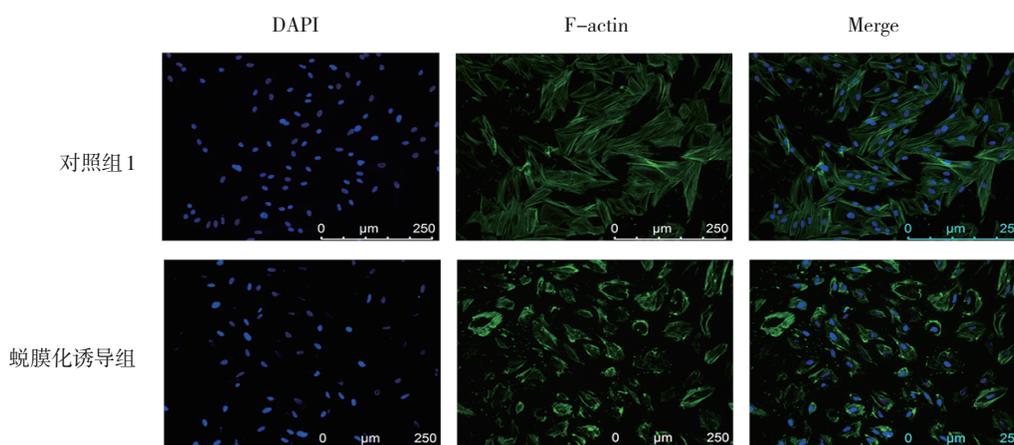
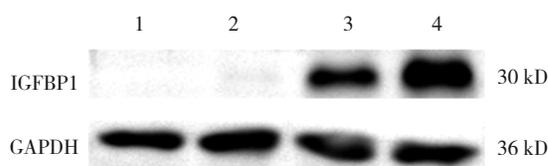


图2 F-actin 荧光染色图

表 4 各组 PRL、IGFBP1 mRNA 和 IGFBP1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PRL mRNA	IGFBP1 mRNA	IGFBP1 蛋白
蜕膜化诱导 0 h 组	1.08 ± 0.49	1.03 ± 0.27	0.01 ± 0.01
蜕膜化诱导 24 h 组	85.37 ± 15.59	29.58 ± 3.54	0.04 ± 0.01
蜕膜化诱导 48 h 组	286.90 ± 26.62	579.50 ± 23.64	1.02 ± 0.05
蜕膜化诱导 72 h 组	674.30 ± 49.80	1451.00 ± 27.90	1.57 ± 0.11
F 值	350.900	5638.000	328.600
P 值	0.000	0.000	0.000



1: 蜕膜化诱导 0 h 组; 2: 蜕膜化诱导 24 h 组; 3: 蜕膜化诱导 48 h 组; 4: 蜕膜化诱导 72 h 组。

图3 不同时间蜕膜化诱导的 IGFBP1 蛋白条带图

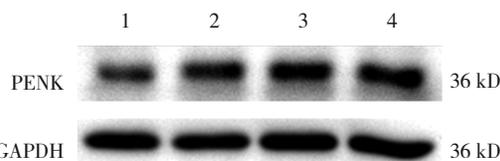
素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=144.500, P=0.000$), 随着诱导时间的延长, PENK 的转录水平随之升高 ($P<0.05$)。不同时间蜕膜化诱导组 PENK mRNA 和蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), PENK mRNA 和蛋白相对表达量随着蜕膜化诱导时间的延长逐渐升高 ($P<0.05$)。上述结果均表明 PENK 在 HESCs 蜕膜化过程中表达增加。见表 5 和图 4。

2.3 敲减 PENK 抑制子宫内 膜间质细胞蜕膜化

由于 PENK 在 HESCs 蜕膜化过程中表达增加, 本研究进一步采用不同的 siRNA 敲减蜕膜化期间 HESCs 中 PENK 的表达以研究 PENK 对 HESCs 蜕膜

表 5 各组 PENK mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PENK mRNA	PENK 蛋白
蜕膜化诱导 0 h 组	1.00 ± 0.00	0.65 ± 0.09
蜕膜化诱导 24 h 组	10.92 ± 1.82	0.86 ± 0.09
蜕膜化诱导 48 h 组	12.58 ± 3.87	0.92 ± 0.09
蜕膜化诱导 72 h 组	13.59 ± 3.43	0.97 ± 0.04
F 值	18.210	7.021
P 值	0.000	0.016



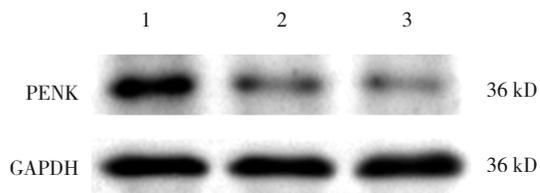
1: 蜕膜化诱导 0 h 组; 2: 蜕膜化诱导 24 h 组; 3: 蜕膜化诱导 48 h 组; 4: 蜕膜化诱导 72 h 组。

图4 不同时间蜕膜化诱导的 PENK 蛋白条带图

化的影响。各组 PENK mRNA 和蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), si PENK-1 组和 si PENK-2 组 PENK mRNA 和蛋白相对表达量较对照组 2 降低 ($P<0.05$), mRNA 敲减率均达到 90% 以上。见表 6 和图 5。

表 6 各组 PENK mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PENK mRNA	PENK 蛋白
对照组 2	1.02 ± 0.21	0.30 ± 0.02
si PENK-1 组	0.01 ± 0.00	0.18 ± 0.01
si PENK-2 组	0.01 ± 0.00	0.13 ± 0.01
F 值	66.380	65.950
P 值	0.000	0.003



1: 对照组 2; 2: si PENK-1 组; 3: si PENK-2 组。

图 5 各组 PENK 蛋白蛋白条带图

PRL、IGFBP1 和 FOXO1 均为 HESC_s 蜕膜化期间的经典上调标志物。在分别转染 NC、si PENK-1 和 si PENK-2 后, 进行蜕膜化诱导, 并观察 3 种蜕膜标志物的表达情况, 以说明 PENK 的有无对蜕膜反应的影响。各组 PRL、IGFBP1、FOXO1、PENK mRNA 相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异均有统

计学意义 ($P < 0.05$); 蜕膜化诱导 + NC 组 PRL、IGFBP1、FOXO1 mRNA 相对表达量较对照组 3 升高 ($P < 0.05$), 说明 HESC_s 蜕膜化的诱导成功, 这与 2.1 的研究结果一致。此外, 蜕膜化诱导 + si PENK-1 组和蜕膜化诱导 + si PENK-2 组 PRL、IGFBP1 和 FOXO1 mRNA 相对表达量较蜕膜化诱导 + NC 组降低 ($P < 0.05$)。尽管蜕膜化诱导会上调 PENK mRNA 相对表达量, 但是蜕膜化诱导 + si PENK-1 组和蜕膜化诱导 + si PENK-2 组 PENK mRNA 相对表达量较蜕膜化诱导 + NC 组仍处于较低水平 ($P < 0.05$), 这进一步说明两种 siRNAs 对 PENK 的敲除效率良好。见表 7。

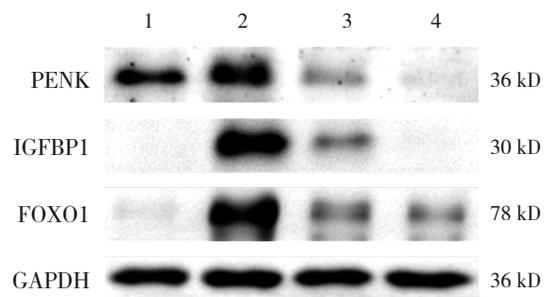
表 7 各组 PRL、IGFBP1、FOXO1、PENK mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PRL mRNA	IGFBP1 mRNA	FOXO1 mRNA	PENK mRNA
对照组 3	0.84 ± 0.47	1.01 ± 0.21	1.00 ± 0.05	1.01 ± 0.18
蜕膜化诱导 + NC 组	705.30 ± 42.24	1 229.00 ± 37.01	26.57 ± 1.61	12.64 ± 0.82
蜕膜化诱导 + si PENK-1 组	558.00 ± 32.88	48.01 ± 2.90	14.29 ± 0.36	0.54 ± 0.04
蜕膜化诱导 + si PENK-2 组	44.55 ± 5.77	4.83 ± 0.94	6.52 ± 0.19	0.05 ± 0.00
F 值	528.100	3 196.000	533.500	630.400
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

各组 IGFBP1、FOXO1、PENK 蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 验证蜕膜化诱导 + si PENK-1 组和蜕膜化诱导 + si PENK-2 组 IGFBP1、FOXO1、PENK 蛋白相对表达量较蜕膜化诱导 + NC 组受到抑制 ($P < 0.05$)。上述结果均表明, 敲减 PENK 抑制 HESC_s 的蜕膜化, 提示 PENK 对 HESC_s 蜕膜化的进程至关重要。见表 8 和图 6。

表 8 各组 IGFBP1、FOXO1、PENK 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IGFBP1 蛋白	FOXO1 蛋白	PENK 蛋白
对照组 3	0.03 ± 0.01	0.18 ± 0.05	0.91 ± 0.10
蜕膜化诱导 + NC 组	1.75 ± 0.14	1.61 ± 0.32	1.07 ± 0.04
蜕膜化诱导 + si PENK-1 组	0.60 ± 0.04	0.77 ± 0.18	0.39 ± 0.04
蜕膜化诱导 + si PENK-2 组	0.05 ± 0.02	0.66 ± 0.26	0.09 ± 0.02
F 值	240.400	13.530	114.000
P 值	0.000	0.015	0.000



1: 对照组 3; 2: 蜕膜化诱导 + NC 组; 3: 蜕膜化诱导 + si PENK-1 组; 4: 蜕膜化诱导 + si PENK-2 组。

图 6 各组 IGFBP1、FOXO1、PENK 蛋白蛋白条带图

2.4 PENK 在反复种植失败患者子宫内膜中表达可能减少

HESC_s 蜕膜化的异常是胚胎反复种植失败发生的重要原因。上述结果表明, PENK 在 HESC_s 蜕膜化过程中表达增加, 且敲减 PENK 抑制 HESC_s 的蜕膜化, 可见 PENK 在 HESC_s 蜕膜化发生中的重要作用。那么在反复种植失败患者中, 是否可能存在 PENK 的异常表达从而导致蜕膜化的缺陷? 于是本研究分析了 GSE58144、GSE111974 数据库中反复种植失

败组和对照组子宫内膜 PENK mRNA 相对表达量情况。反复种植失败组与对照组在 GSE58144、GSE111974 数据库中子宫内膜 PENK mRNA 相对表达量比较,经 t 检验,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),反复种植失败组均较对照组降低 ($P < 0.05$)。进一步表明 PENK 在子宫内膜容受性建立中的可能作用。见表 9。

表 9 反复种植失败组与对照组在 GSE58144、GSE111974 数据库中子宫内膜 PENK mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	GSE58144	GSE111974
对照组	0.15 ± 0.45	8.17 ± 2.73
反复种植失败组	0.00 ± 0.10	6.33 ± 1.97
t 值	2.005	2.681
P 值	0.047	0.010

3 讨论

内源性阿片肽是一组作用于阿片受体的肽,主要来源于 3 种前体蛋白: PENK、前强啡肽和前体阿黑皮素^[8,17]。其中 PENK 蛋白裂解后可产生脑啡肽,主要包括甲硫氨酸脑啡肽和亮氨酸脑啡肽。这些脑啡肽可以激活 μ 和 δ 阿片受体,从而影响疼痛感知和压力反应等生理功能^[18-19]。目前由于 PENK 作为一种神经调质,与其相关的研究主要聚焦于中枢神经系统特别是大脑认知以及镇痛治疗领域。近年来也有文献报道了 PENK 在恶性肿瘤中的作用。如 PENK 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路来抑制骨肉瘤细胞的迁移^[11],PENK 作为肿瘤抑制因子可预测术后胃肠道间质瘤患者的预后^[20]。有研究还表明 PENK 的甲基化检测可预测膀胱癌^[21-22]。然而, PENK 在女性生殖系统中的作用研究较少。怀孕期间激素分泌、疼痛感知和子宫收缩力的调节均与内源性阿片系统有关。有小鼠研究显示,在胚胎植入后不久,子宫中可以检测到前体阿黑皮素、PENK 的表达,且在胚胎植入第 18 天之前,子宫中可持续检测到高水平的 PENK^[14]。人子宫内膜细胞也表达包括 PENK 在内的阿片肽前体基因,其可能参与肌层收缩力的控制^[23]。然而 PENK 在人子宫内膜蜕膜化期间的表达及相应作用尚未见报道。

本研究对 HESCs 进行体外蜕膜化的诱导,以分析 PENK 在蜕膜化期间的表达情况及对蜕膜化的影响。通过 GEO 数据库分析,以及 qRT-PCR 和

Western blotting 检测发现, PENK 的表达水平在蜕膜化诱导期间升高。这与先前 ROSEN 等^[13]在小鼠中的发现一致,其发现在蜕膜转化时,小鼠子宫细胞中的 PENK 表达急剧升高,且主要在植入部位附近。在蜕膜化期间, HESCs 的增殖速度会减慢,表现为增殖细胞核抗原等增殖标志物的下调^[19,24]。此时,细胞增殖和分化处于一种相互协调的状态,这对子宫内膜容受性的获得是必不可少的^[25]。如前所述, PENK 作为一种抑癌基因可能会抑制肿瘤细胞的增殖。此外,胎盘间充质干细胞分泌的 PENK 可通过抑制 p38 MAPK 信号传导以阻断瘢痕疙瘩成纤维细胞的过度增殖^[26]。因此,本研究推测蜕膜化期间 PENK 的上调可能与蜕膜细胞增殖和分化相互协调的维持有关。随后,本研究在蜕膜化刺激前采用不同的 siRNA 敲减了 HESCs 中 PENK 的表达,以抑制蜕膜化期间 PENK 的上调,结果发现, PENK 的抑制明显阻碍了经典蜕膜标志物 PRL、IGFBP1 和 FOXO1 的表达。FOXO1 是蜕膜化过程中的核心转录因子,负责接收 cAMP 和 MPA 的信号,从而导致 PRL 和 IGFBP1 的上调^[27]。由此可见, PENK 对蜕膜反应信号的激活至关重要。蜕膜化异常引起的子宫内膜容受性缺陷是反复种植失败的重要原因。先前研究通过对反复种植失败组和对照组内膜进行蛋白互作网络分析,证明 PENK 是网络中排名前 10 位的核心基因^[28]。为进一步探索 PENK 在反复种植失败组的子宫内膜中的表达水平,本研究从 GEO 数据库分析了 2 个反复种植失败组和对照组子宫内膜基因表达谱的数据,结果均提示在反复种植失败组子宫内膜中 PENK 表达下调。

综上所述,本研究首次证明 PENK 在 HESCs 蜕膜化中的重要作用。在 HESCs 蜕膜化过程中 PENK 表达增加,敲减 PENK 抑制 HESCs 蜕膜化。本研究还发现在反复种植失败患者子宫内膜中 PENK 表达可能减少。PENK 有望成为子宫内膜蜕膜化和容受性调控的新型诊断与治疗靶点,更全面深入的作用机制及调控路径还需要在未来研究中进一步发现。

参 考 文 献 :

- [1] AWONUGAAO, CAMPOG, ABU-SOUD HM, et al. Determinants of embryo implantation: roles of the endometrium and embryo implantation success[J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(8): 2339-2348.
- [2] MUTER J, LYNCH V J, MCCOY R C, et al. Human embryo

- implantation[J]. *Development*, 2023, 150(10): dev201507.
- [3] 鞠文涵, 连方, 赵帅, 等. 基膜结构蛋白在胚胎植入与早期胚胎发育中的作用研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(3): 57-62.
- [4] WANG W X, VILELLA F, ALAMA P, et al. Single-cell transcriptomic atlas of the human endometrium during the menstrual cycle[J]. *Nat Med*, 2020, 26(10): 1644-1653.
- [5] RETIS-RESENDIZ A M, CID-CRUZ Y, VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ D M, et al. cAMP regulates the progesterone receptor gene expression through the protein kinase a pathway during decidualization in human immortalized endometrial stromal cells[J]. *Steroids*, 2024, 203: 109363.
- [6] NG S W, NORWITZ G A, PAVLICEV M, et al. Endometrial decidualization: the primary driver of pregnancy health[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4092.
- [7] GUPTA A, GULLAPALLI S, PAN H, et al. Regulation of opioid receptors by their endogenous opioid peptides[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2021, 41(5): 1103-1118.
- [8] BARSCHKE P, ABU-RUMEILEH S, AL SHWEIKI M H D R, et al. Cerebrospinal fluid levels of proenkephalin and prodynorphin are differentially altered in Huntington's and Parkinson's disease[J]. *J Neurol*, 2022, 269(9): 5136-5143.
- [9] ABU-RUMEILEH S, BARSCHKE P, OECKL P, et al. Prodynorphin and proenkephalin in cerebrospinal fluid of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 2051.
- [10] YOU I J, BAE Y, BECK A R, et al. Lateral hypothalamic proenkephalin neurons drive threat-induced overeating associated with a negative emotional state[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6875.
- [11] ZHANG H P, YU Z L, WU B B, et al. PENK inhibits osteosarcoma cell migration by activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 162.
- [12] LIU X L, LIU W J, CHEN Q, et al. miR-506-loaded gelatin nanospheres target PENK and inactivate the ERK/Fos signaling pathway to suppress triple-negative breast cancer aggressiveness[J]. *Mol Carcinog*, 2021, 60(8): 538-555.
- [13] ROSEN H, ITIN A, SCHIFF R, et al. Local regulation within the female reproductive system and upon embryonic implantation: identification of cells expressing proenkephalin A[J]. *Mol Endocrinol*, 1990, 4(1): 146-154.
- [14] ZHU Y, PINTAR J E. Expression of opioid receptors and ligands in pregnant mouse uterus and placenta[J]. *Biol Reprod*, 1998, 59(4): 925-932.
- [15] DOI-TANAKA Y, TAMURA I, SHIROSHITA A, et al. Differential gene expression in decidualized human endometrial stromal cells induced by different stimuli[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 7726.
- [16] XIONG W Q, JIN J, LIU Y. METTL3-dependent m6A modification facilitates decreased endometrial decidualization via attenuation of MET in endometriosis[J]. *Reproduction*, 2024, 168(3): e230336.
- [17] FRICKER L D, MARGOLIS E B, GOMES I, et al. Five decades of research on opioid peptides: current knowledge and unanswered questions[J]. *Mol Pharmacol*, 2020, 98(2): 96-108.
- [18] LIU C, LIU X L, HE Z W, et al. Proenkephalin-A secreted by renal proximal tubules functions as a brake in kidney regeneration[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 7167.
- [19] LIN L C, CHUAN M H, LIU J H, et al. Proenkephalin as a biomarker correlates with acute kidney injury: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis[J]. *Crit Care*, 2023, 27(1): 481.
- [20] TANG D F, LIN T L, WANG Y Y, et al. High expression of proenkephalin is associated with favorable outcomes in patients with gastrointestinal stromal tumors[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 6681-6690.
- [21] HAN H, OH T J, HEO J E, et al. Clinical validation of the proenkephalin (PENK) methylation urine test for monitoring recurrence of non - muscle-invasive bladder cancer[J]. *Eur Urol Open Sci*, 2024, 62: 99-106.
- [22] BANG B R, ZHONG J, OH T J, et al. EarlyTect BCD, a streamlined PENK methylation test in urine DNA, effectively detects bladder cancer in patients with hematuria[J]. *J Mol Diagn*, 2024, 26(7): 613-623.
- [23] GRAVANIS A, STOURNARAS C, MARGIORIS A N. Paracrinology of endometrial neuropeptides: corticotropin-releasing hormone and opioids[J]. *Semin Reprod Endocrinol*, 1999, 17(1): 29-38.
- [24] JIANG Y L, YUAN X H, LI B, et al. TOB1 modulates the decidualization of human endometrial stromal cells via the Notch pathway[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2021, 38(10): 2641-2650.
- [25] LESSEY B A, KIM J J. Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why[J]. *Fertil Steril*, 2017, 108(1): 19-27.
- [26] WU D, LIU X, JIN Z H. Placental mesenchymal stem cells-secreted proenkephalin suppresses the p38 MAPK signaling to block hyperproliferation of keloid fibroblasts[J]. *Tissue Cell*, 2023, 85: 102218.
- [27] HUANG Y J, DAI F F, CHEN L P, et al. BMP4 in human endometrial stromal cells can affect decidualization by regulating FOXO1 expression[J]. *Endocrinology*, 2024, 165(6): bqae049.
- [28] AHMADI M, PASHANGZADEH S, MORAGHEBI M, et al. Construction of circRNA-miRNA-mRNA network in the pathogenesis of recurrent implantation failure using integrated bioinformatics study[J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(6): 1853-1864.

(李科 编辑)

本文引用格式: 余力, 罗伊凡, 张新宝, 等. 前脑啡肽在子宫内膜间质细胞蜕膜化中的作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(8): 24-31.

Cite this article as: YU L, LUO Y F, ZHANG X B, et al. Role of proenkephalin in endometrial stromal cell decidualization[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2025, 35(8): 24-31.