基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003949

ALKBH5 介导的 m6A 修饰在早孕小鼠子宫内膜蜕膜化中的作用研究

贺思慧，李伟轲，高茹菲，陈雪梅，龙　菁，陈晨曦，代德贤，王应雄，李　娜
（重庆医科大学公共卫生学院生殖与发育教育部国际合作联合实验室，重庆　400016）

【摘　要】目的：探讨烷基化修复同源物 5（alkylation repair homolog 5，ALKBH5）介导的 N6-甲基腺苷（N6-methyladenosine，m6A）修饰在子宫内膜蜕膜化过程中的作用。**方法：**构建妊娠小鼠模型和假孕小鼠模型，通过实时荧光定量 PCR、蛋白质印迹法检测 ALKBH5 在子宫内膜中的表达规律。构建人工诱导蜕膜化的小鼠模型及细胞模型，采用实时荧光定量 PCR、蛋白质印迹法、免疫组织化学法检测蜕膜化相关标志物表达。采用 EpiQuik m6A RNA 甲基化定量试剂盒检测 m6A 水平。构建干扰 ALKBH5 表达的人工诱导蜕膜化小鼠模型及细胞模型，利用实时荧光定量 PCR、蛋白质印迹法、免疫组织化学法检测蜕膜化相关标志物、细胞增殖标志分子和凋亡分子的表达。采用流式细胞分析术检测细胞凋亡率。**结果：**在妊娠小鼠模型中，子宫胚胎着床点 ALKBH5 的表达明显高于着床旁；在人工诱导蜕膜化的小鼠和细胞模型中，与对照组相比，诱导组 ALKBH5 的表达水平明显升高，同时 m6A 水平明显降低。若干扰 ALKBH5 表达，则可导致 m6A 水平升高，进而抑制基质细胞增殖，诱导细胞凋亡，最终损害子宫内膜蜕膜化的正常进程。**结论：**ALKBH5 缺失可导致子宫内膜 m6A 水平升高，从而导致蜕膜化损伤，为 m6A 修饰在蜕膜化的研究奠定了基础。

【关键词】烷基化修复同源物 5；N6-甲基腺苷；子宫内膜蜕膜化；细胞增殖；细胞凋亡
【中图分类号】R114　　**【文献标志码】**A

Role of ALKBH5-mediated m6A modification in endometrial decidualization of mice in early pregnancy

He Sihui，Li Weike，Gao Rufei，Chen Xuemei，Long Jing，Chen Chenxi，Dai Dexian，Wang Yingxiong，Li Na
（*Joint International Research Laboratory of Reproduction and Development，Ministry of Education，School of Public Health，Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the role of alkylation repair homolog 5（ALKBH5）-mediated N6-methyladenosine（m6A）modification in endometrial decidualization. ***Methods*：**The mouse models of pregnancy and pseudopregnancy were established，and quantitative real-time PCR and Western blot were used to measure the expression pattern of ALKBH5 in the endometrium. The mouse and cell models of artificially induced decidualization were established，and quantitative real-time PCR，Western blot，and immunohistochemistry were used to measure the expression levels of decidualization-related markers. The EpiQuik m6A RNA methylation quantification kit was used to measure the level of m6A. The mouse and cell models of artificially induced decidualization with interference of ALKBH5 expression were established，and quantitative real-time PCR，Western blot，and immunohistochemistry were used to measure the expression levels of decidualization-related markers，cell proliferation marker molecules，and apoptosis molecules. Flow cytometry was used to measure cell apoptosis rate. ***Results*：**In the mouse model of pregnancy，the expression level of ALKBH5 at the uterine embryo implantation site was significantly higher than that adjacent to the implantation site，and in the mouse and cell models of artificially induced decidualization，compared with the control group，the induction group had a significant increase in the expression level of ALKBH5 and a significant reduction in the level of m6A. Inhibiting the expression of ALKBH5 led to an increase in the level of m6A，which in turn inhibited the proliferation of stromal cells，induced cell apoptosis，and ultimately impaired the normal process of endometrial decidualization. ***Conclusion*：**ALKBH5 deficiency leads to an increase in the level of m6A and decidualization injury in the endometrium，which lays a foundation for the research on m6A modification in decidualization.

【Key words】alkylation repair homolog 5；N6-methyladenosine；endometrial decidualization；cell proliferation；cell apoptosis

作者介绍：贺思慧，Email：18702307890@163.com，研究方向：m6A 修饰对生殖功能的影响。
通信作者：李　娜，Email：coco0411@126.com。
基金项目：重庆市自然科学基金资助项目（编号：CSTB2022NSCQ-MSX0144）；国家自然科学基金资助项目（编号：82271707）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250923.1546.002（2025-09-24）

人口负增长已形成难以逆转的趋势，女性妊娠成功率降低是人口下降的重要原因。妊娠是一个复杂且不可逆的生理过程，涉及胚胎着床、子宫内膜蜕膜化、胎盘形成和分娩等关键环节[1]。子宫内膜蜕膜化是胚胎着床、胎盘形成及妊娠维持的必要条件。在卵巢类固醇激素的调节下，基质细胞从成纤维样细胞开始向上皮样细胞转变，发生一系列包括基质细胞广泛增殖分化、体积增大，细胞核变大变圆，核仁数目增加等变化。异常的蜕膜化可导致多种不良妊娠结局和妊娠并发症，如胎盘发育缺陷、宫内胎儿生长受限[2]，先兆子痫以及流产[3]等。因此，明确子宫内膜蜕膜化损伤的分子机制对实现健康妊娠、降低妊娠疾病发病率具有至关重要的作用。

研究显示，表观遗传修饰在子宫内膜蜕膜化过程中起着重要作用，包括DNA甲基化[4]、RNA修饰[5]等。其中，N6-甲基腺苷（m6A）作为一种重要的RNA修饰，早在数十年前就被鉴定为一种关键的转录后表观遗传修饰[6]。m6A是哺乳动物基因中最常见的修饰类型之一，能够在转录后调控基因表达，进而参与生理过程和疾病相关基因表达的调控[7-8]。值得注意的是，近年来越来越多的证据表明，m6A修饰异常可能与生殖相关疾病存在密切关联。已有研究报道m6A修饰参与精子发生、调控卵子成熟等生物学过程，例如通过m6A识别蛋白PRRC2A可调控精子发生过程中减数分裂的正常进行[9]；通过m6A识别蛋白YTHDF2能够参与卵母细胞成熟和早期合子发育[10]。异常的m6A修饰可导致女性生殖肿瘤[11]、子痫[12]等女性生殖疾病。尽管如此，迄今为止，关于m6A在子宫内膜蜕膜化过程中的研究报道依然非常有限。因此，深入探讨m6A修饰在这一复杂生物过程中的作用具有重要意义。

m6A修饰主要是通过被称为“编写者”的甲基转移酶、“擦除者”的去甲基化酶以及“读取者”的识别蛋白来调节的[13]。具体而言，甲基转移酶主要催化mRNA上的腺苷酸发生m6A修饰；去甲基化酶的作用是对已经发生m6A修饰的碱基进行去甲基化修饰；而识别蛋白主要识别发生m6A修饰的碱基，从而激活下游的调控通路[14]。α-酮戊二酸依赖的双加氧酶碱性B同源5（α-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homologue 5，ALKBH5）是一种m6A去甲基化酶，是ALKB家族成员之一。ALKB家族是一种依赖亚铁和2-氧代戊二酸的核酸加氧酶，能够催化RNA中m6A的去甲基化反应[15]。研究表明，ALKBH5介导的m6A水平与多种生理和病理过程密切相关[16-19]，如ALKBH5的过表达伴随的m6A低水平会促进胶质母细胞瘤的上皮-间质转化[20]。此外，ALKBH5介导的m6A参与包括增殖和凋亡在内的生理过程，如ALKBH5调节m6A水平，再通过识别蛋白YTHDF1调控心肌细胞增殖和心脏再生[21]；ALKBH5促进非小细胞肺癌细胞增殖并减少细胞凋亡，而干扰ALKBH5表达则可抑制肿瘤生长[22]。子宫内膜蜕膜化过程伴随着细胞增殖和凋亡的动态平衡[23]。在蜕膜化过程中，子宫内膜基质细胞广泛增殖并分化为蜕膜细胞。在小鼠妊娠第4天，胚胎定位、黏附并侵袭子宫内膜腔上皮。随后，围绕胚胎所在部位的基质细胞分化成蜕膜细胞，此时称为初级蜕膜区（primary decidual zone，PDZ）[2]。随着PDZ逐渐凋亡消失，次级蜕膜（secondary decidual zone，SDZ）生成，并伴随着大量多倍体蜕膜细胞和新生血管的形成。已有文献报道了在小鼠妊娠第0、4、6、10和15天的子宫内膜中，ALKBH5 mRNA和m6A水平的差异表达情况，其结果表明m6A修饰及包括ALKBH5在内的调节因子可能在妊娠过程中发挥重要作用[24]。然而，ALKBH5在子宫内膜蜕膜化中的作用目前尚不清楚。

本研究通过构建妊娠小鼠模型以及人工诱导蜕膜化的小鼠模型和细胞模型，探究ALKBH5在子宫内膜蜕膜化中的功能，从而了解ALKBH5调控的m6A修饰在蜕膜化中的作用。

1 材料与方法

1.1 小鼠模型构建和样本收集

昆明小鼠（6~8周龄）从重庆医科大学实验动物中心购及饲养[许可证号：许可证号SYXK（渝）2022-0016]。所有小鼠实验方案均经过重庆医科大学伦理委员会批准（批准号：IACUC-CQMU-2023-0080）。

1.1.1 妊娠小鼠模型 将雌性小鼠与性成熟的雄性小鼠以2:1的比例合笼过夜，构建妊娠小鼠模型。次日10点前检查雌性小鼠阴道口是否有白色栓状物（即阴栓），有阴栓则作为妊娠第1天（day 1，D1）。分别于D1、D4、D5、D6和D7处死小鼠，并收集子宫组织。

1.1.2 假孕小鼠模型 在麻醉状态下对雄性小鼠进行输精管结扎手术。2周后，将雌性小鼠与输精管结扎后的雄性小鼠以2:1比例进行交配。次日10点前检查雌性小鼠阴栓，有阴栓则作为假孕第1天（The first day of Pseudopregnancy，PD1）。在PD1、PD4、PD5、PD6、PD7处死小鼠，收集子宫组织。

1.1.3 人工诱导蜕膜化小鼠模型 获得上述假孕小鼠后，于PD4在麻醉状态下向雌性小鼠一侧子宫角注射玉米油以诱导小鼠子宫内膜发生蜕膜化，玉米油诱导侧子宫作为诱导蜕膜化组（induced decidualization group，ID），未诱导侧子宫作为对照组（induced decidualization control group，IDC）。于PD8处死小鼠，收集子宫组织。

1.1.4 子宫角注射siRNA 在PD2早晨，在麻醉状态下向雌性小鼠一侧子宫角注射ALKBH5 siRNA或阴性对照siRNA（NC siRNA），另一侧不作处理；在PD4早晨，对小鼠进行麻醉后，向注射siRNA的同一侧子宫角注射玉米油，另一侧不作处理。于PD8早晨处死小鼠，收集子宫组织。

1.2 HE染色

将新鲜子宫组织于梯度酒精、二甲苯中浸泡后，利用石蜡进行包埋，并进行切片。将组织切片依次浸泡于二甲苯2 h后浸泡于梯度酒精，即100%、95%、85%、75%乙醇溶液中各5 min。利用苏木精染液浸染2 min，移至盐酸酒精中分化2~3 s，最好移至饱和碳酸锂溶液中返蓝10 s。利用伊红染液浸染1 min，流水缓慢冲洗多余红色染液，显微镜下观察以保证组织结构清晰、染色程度适中。烘干玻片；浸泡于二甲苯中透明5 min。用中性树脂进行封片，利用显微镜观察组织形态。

1.3 免疫组织化学法

切片、脱蜡、水化步骤与HE染色步骤一致。按说明书进行抗原热修复，去除内源性过氧化氢酶。利用PBS溶解的5% BSA以适当比例（按照说明书要求）稀释以下抗体：ALKBH5（货号：NBP2-78817AF594，稀释比1∶200，Novus Biologicals）、BMP2（货号：ab14933，稀释比1∶20，Abcam）、BAX（货号：50599-2-Ig，稀释比1∶20，Proteintech）、BCL2（货号：3498s，稀释比1∶200，Cell Signaling Technology）以及PCNA（货号：2586s，稀释比1∶50，Cell Signaling Technology），4 ℃冰箱过夜孵育12 h以上。滴加反应增强液，37 ℃水浴锅中孵育20 min。滴加二抗，37 ℃水浴孵育20 min。加入适量新鲜配制的DAB显色液，室温孵育1~2 min。苏木精复染与HE染色步骤中一致。将玻片依次浸泡于75%、85%、95%、100%酒精以及二甲苯中进行脱水和透明。用中性树脂进行封片，利用显微镜观察蛋白表达定位情况。

1.4 RNA提取以及实时荧光定量PCR（real-time fluorescent quantitative PCR，qRT-PCR）

从Trizol中提取，RNA混合液：氯仿=5∶1；RNA混合液：异丙醇=1∶1；75%乙醇溶液洗涤RNA，低温离心，弃上清，室温晾干，检测RNA浓度。严格按照RNA逆转录试剂盒（RR036A; TaKaRa）步骤，配制实时荧光定量PCR体系，以预变性95 ℃，3 min；65 ℃，15 s退火；60 ℃，30 s延伸；39个循环，65 ℃~95 ℃检测溶解曲线进行检测。以β-actin为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因的表达量。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，序列见表1。

1.5 蛋白质印迹（Western blot，WB）

按照SDS-PAGE凝胶配制试剂盒说明配制SDS-PAGE胶。按计算后相应体积上样，以电压80 V电泳，待Loading buffer到达凝胶底部则结束电泳。将PVDF膜浸于甲醇溶液激活，将蛋白凝胶、PVDF膜组合后置于电转三明治结构上。电流250 mA，根据目的蛋白分子量大小设置恰当的电转时间。将PVDF膜浸泡在5% BSA中封闭。一抗孵育PVDF膜，PBST溶液洗膜，二抗孵育PVDF膜，PBST溶液洗膜，按照说明书要求配制ECL超敏化学发光液，滴加于PVDF膜上后，曝光成像。抗体信息如表2所示。

表1 qRT-PCR引物序列

转录本	引物序列（5′→3′）
β-actin	F：TCAGGAGGAGCAATGATCTTG
	R：TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA
Dtprp	F：AGCCAGAAATCACTGCCACT
	R：TGATCCATGCACCCATAAAA
Alkbh5	F：CGCGGTCATCAACGACTACC
	R：ATGGGCTTGAACTGGAACTTG
Hoxa10	F：CCTGCCGCGAACTCCTTTT
	R：GGCGCTTCATTACGCTTGC
Bax	F：TGAAGACAGGGGCCTTTTTG
	R：AATTCGCCGGAGACACTCG
Bcl2	F：ATGCCTTTGTGGAACTATATGGC
	R：GGTATGCACCCAGAGTGATGC
Mki67	F：AGCACAAAGAGACGGTCTAAGA
	R：CTCTGCCTCGTGACTGTGTT

表2 抗体信息表

抗体	供应商	货号	WB使用浓度
ALKBH5	abcam	Ab195377	1∶1 000
ALKBH5	Novus Biologicals	NBP2-78817AF594	1∶1 000
HOXA10	SANTA	sc-271428	1∶500
BMP2	abcam	ab14933	1∶1 000
COX2	CST	12282T	1∶1 000
BAX	Proteintech	50599-2-Ig	1∶2 000
BCL-2	CST	3498s	1∶1 000

1.6 流式细胞术

利用0.25%胰酶将培养于6孔板中的细胞消化成单个细胞，加入PBS缓冲液，离心后弃上清，反复2次。最终将约1×10^6个细胞重悬于500 μL PBS（pH=7.2）缓冲液中。使用BD Biosciences系统（San Jose，CA，USA）对细胞进行凋亡的流式细胞术分析。细胞用Annexin V-FITC和碘化丙啶（碧云天，上海）进行染色，使用BD Biosciences公司提供的流式细胞术进行分析。

1.7 小鼠子宫内膜基质细胞分离、培养以及体外诱导蜕膜化

分离小鼠子宫组织并剪碎，酶Ⅰ（胰蛋白酶和中性蛋白酶Ⅱ型）4 ℃冰箱消化1 h，室温消化1 h，37 ℃孵箱消化30 min。再用酶Ⅱ（Ⅱ型胶原蛋白酶）37 ℃孵箱消化30 min；然后用70 μm滤器过滤组织混合液，离心、去上清，HBSS清洗，收集子宫内膜基质细胞（mouse endometrial stromal cells，mESCs）。在处理或转染前，将细胞培养在含10%碳吸附胎牛血清（Gibco）的培养基中，置于37 ℃，5%CO_2条件下孵育。将10 nmol/L的雌二醇（Sigma）和1 nmol/L的孕酮（Sigma）联合添加到诱导培养液中，诱导72 h。对照组培养液则不做处理。

1.8 细胞转染

ALKBH5 siRNA序列由广州RIBOBIO公司合成。用ALKBH5 siRNA混合物或阴性对照混合物转染细胞。以6孔板为例，10 μL NC-siRNA或AlKBH5-siRNA和10 μL Lipofetamine 2000（Invitgen，美国加利福尼亚州）分别在

125 μL DMEM-F12中稀释5~10 min，然后混合15 min，得到270 μL干扰混合物。将270 μL干扰混合物加到1 730 μL含10%胎牛血清的DMEM-F12培养液中，使总体积为2 mL。干扰处理8 h后在含10 %血清的培养基中培养72 h。于37 ℃，5% CO_2条件中进行细胞培养。相关干扰序列如表3所示。

表3 干扰片段序列

名称	靶序列
NC-siRNA	GGCUCUAGAAAAGCCUAUGCdTdT
si-ALKBH5-1	CCTGGAAATGGACAAAGAA
si-ALKBH5-2	GCCTCAGGACATTAAGGAA
si-ALKBH5-3	CAGGATGAGTGCTCCAAGA

1.9 m6A定量测定

根据制造商的说明，使用EpiQuik m6A RNA甲基化定量试剂盒（比色法）（武汉艾美婕科技有限公司）测定m6A RNA含量。在分析孔中加入结合液，将200 ng样品RNA包被在分析孔上。加入检测抗体和诱捕抗体后，加入加强液孵化。用分光光度计（Thermo Scientific，Waltham，MA，USA）测量每个样品在450 nm处的吸光度然后使用微板阅读器（Thermo Fisher，美国）进行比色定量。计算m6A在RNA中的百分比，并与相应的对照样本进行比较，以确定m6A在总RNA中的百分比。

1.10 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计学分析，采用GraphPad Prism 8.0软件进行绘图。每个实验至少包含3个独立样本。正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。比较采用t检验，检验水准α=0.05。

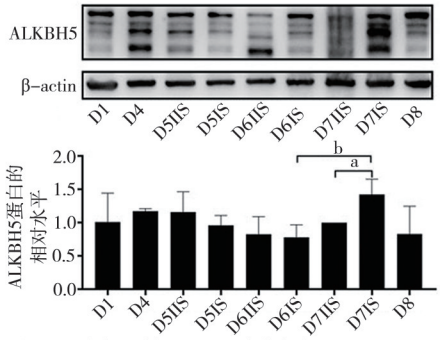
2 结 果

2.1 ALKBH5在小鼠子宫内膜中的表达规律

为了探究ALKBH5在子宫内膜中的表达情况，本课题组构建了妊娠小鼠模型，并检测ALKBH5在D1至D7的子宫内膜中的表达和定位。Western blot结果显示，D7子宫胚胎着床点ALKBH5的表达明显高于着床旁（图1A）。从D5到D7，ALKBH5主要表达定位于胚胎着床旁的腺上皮和腔上皮；而在胚胎着床点，ALKBH5主要表达在蜕膜区（图1B）。该结果提示，ALKBH5可能在小鼠子宫内膜蜕膜化过程中发挥作用。为了排除胚胎因素的潜在影响，构建了假孕小鼠模型。研究结果显示，从PD4到PD7，假孕小鼠子宫内膜中ALKBH5的表达呈现逐渐上调的趋势（图1C）。免疫组化结果显示，ALKBH5主要定位于PD1到PD7的上皮细胞，与D1到D7天的胚胎着床点旁的表达模式相似（图1D）。这表明ALKBH5的表达模式不依赖于胚胎的存在，提示ALKBH5可能参与子宫内膜蜕膜化。

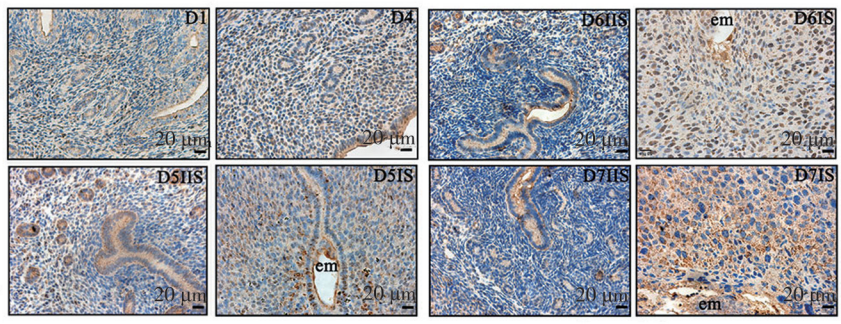
2.2 ALKBH5可能通过m6A依赖的方式参与蜕膜化的调控

为了进一步探究ALKBH5在小鼠子宫内膜蜕膜化中的作用，本课题组构建了人工诱导蜕膜化小鼠模型。与对照侧子宫相比，诱导侧子宫体积明显增加（图2A）。分别称量对照侧和诱导侧子宫湿重，结果显示诱导侧子宫湿重约为对照侧的15倍（图2B）。此外，RT-qPCR结果显示，蜕膜化标志物蜕膜滋养层催乳素相关蛋白（decidual/trophoblast prolactin-related protein，Dtprp）的mRNA水平在诱导侧明显



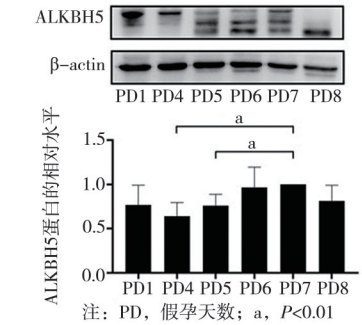
注：D，妊娠天数；IS，胚胎着床点；IIS，胚胎着床旁工，a，P<0.05，b，P<0.01

A.WB分析小鼠子宫内膜中ALKBH5在D1-7的表达



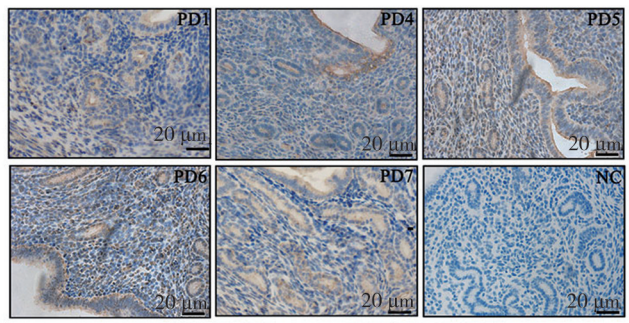
注：em，胚胎

B. D1-7小鼠子宫内膜ALKBH5的免疫组织化学分析



注：PD，假孕天数；a，P<0.01

C. PD1-7小鼠子宫内膜ALKBH5蛋白的WB分析



D. PD1-7小鼠子宫内膜ALKBH5的免疫组织化学分析

图1 ALKBH5在小鼠子宫内膜中的表达规律

上调（图2C）。以上结果表明，人工诱导蜕膜化小鼠模型构建成功。随后，通过Western blot检测发现，ALKBH5的蛋白水平在诱导侧的表达明显高于对照侧（图2D）。免疫组化分析显示，ALKBH5在诱导侧蜕膜细胞中显著表达，而在对照侧主要表达于上皮细胞（图2E）。这些结果进一步提示ALKBH5可能与蜕膜化功能密切相关。

此外，本课题组构建了体外诱导蜕膜化细胞模型。观察结果显示，对照组细胞呈梭形，细胞核较小；而诱导组细胞的胞核明显增大且趋于圆形，核仁数目增加，呈现出典型的蜕膜样变化特征（图2F）。qRT-PCR检测结果显示，诱导组Dtprp表达相较于对照组明显上调（图2G）。蜕膜化相关因子BMP2和HOXA10在诱导组的表达明显高于对照组（图2H）。以上实验结果表明，体外诱导蜕膜化细胞模型构建成功。

随后，本课题组对细胞中ALKBH5的表达进行了检测。Western blot结果显示，在诱导组中ALKBH5蛋白表达明显升高（图2I）。RT-qPCR结果表明，ALKBH5的mRNA水平在诱导组显著高于对照组（图2J）。该结果提示，ALKBH5在正常蜕膜化过程中呈现表达上调的趋势。进一步检测了m6A水平，以探讨ALKBH5是否通过m6A依赖的方式发挥作用。结果显示，相较于对照组，诱导组m6A水平明显降低（图2K）。这些结果提示，ALKBH5可能通过m6A依赖的方式发挥作用，但其在蜕膜化中的作用还需进一步探索。

2.3 抑制ALKBH5的表达可阻碍蜕膜化

基于上述研究结果，本课题组发现ALKBH5在正常蜕膜化过程的子宫内膜中明显高表达。为了明确ALKBH5的表达对蜕膜化的影响，本研究在人工诱导蜕膜化的小鼠及细胞模型中干扰ALKBH5的表达。在PD8时，本课题组发现与假孕小鼠对照侧子宫相比，注射了ALKBH5 siRNA的一侧子宫（即ALKBH5干扰侧）在诱导蜕膜化后的体积明显减小，子宫湿重也明显降低（图3A、B）。HE染色结果显示，ALKBH5干

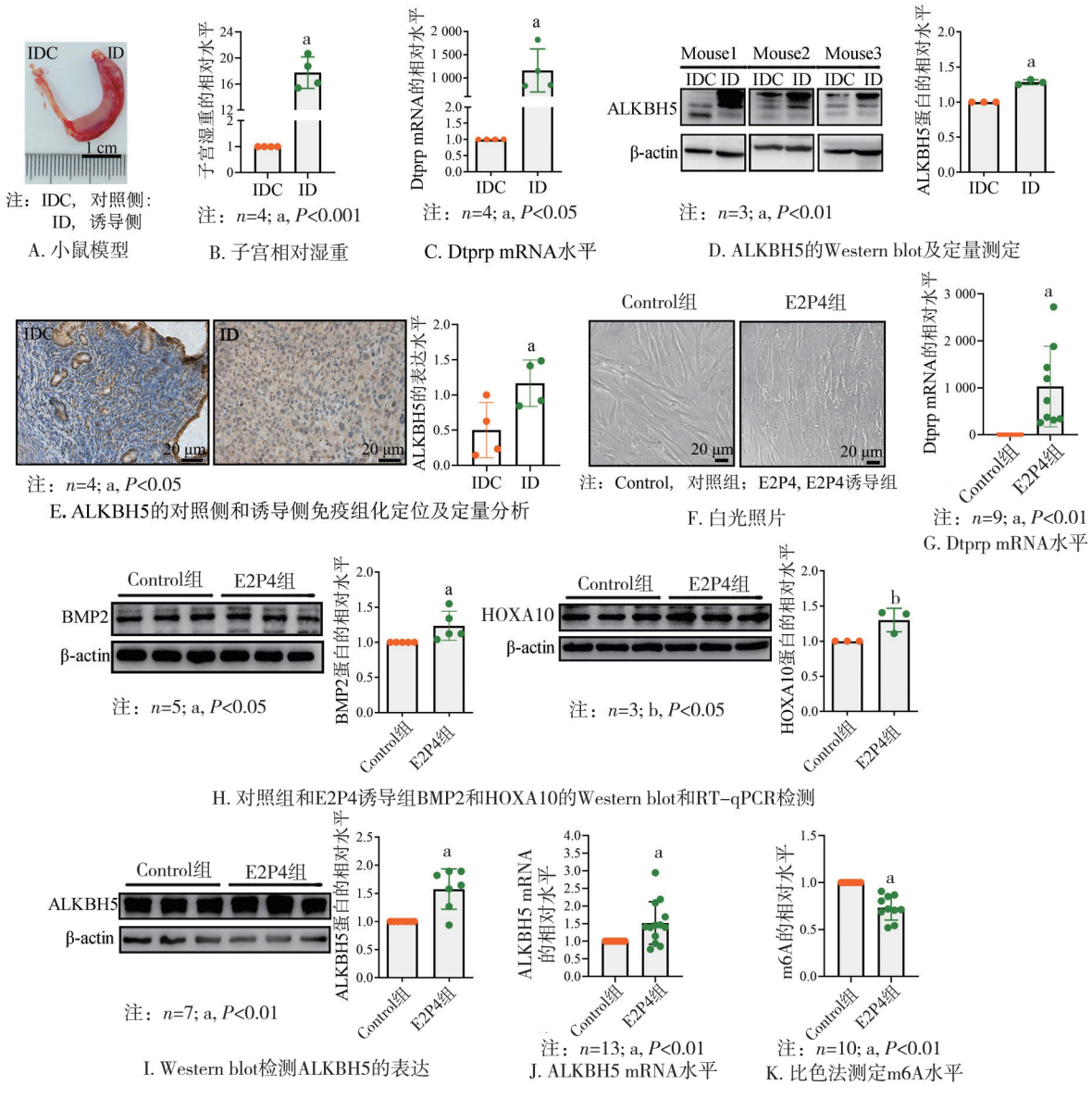


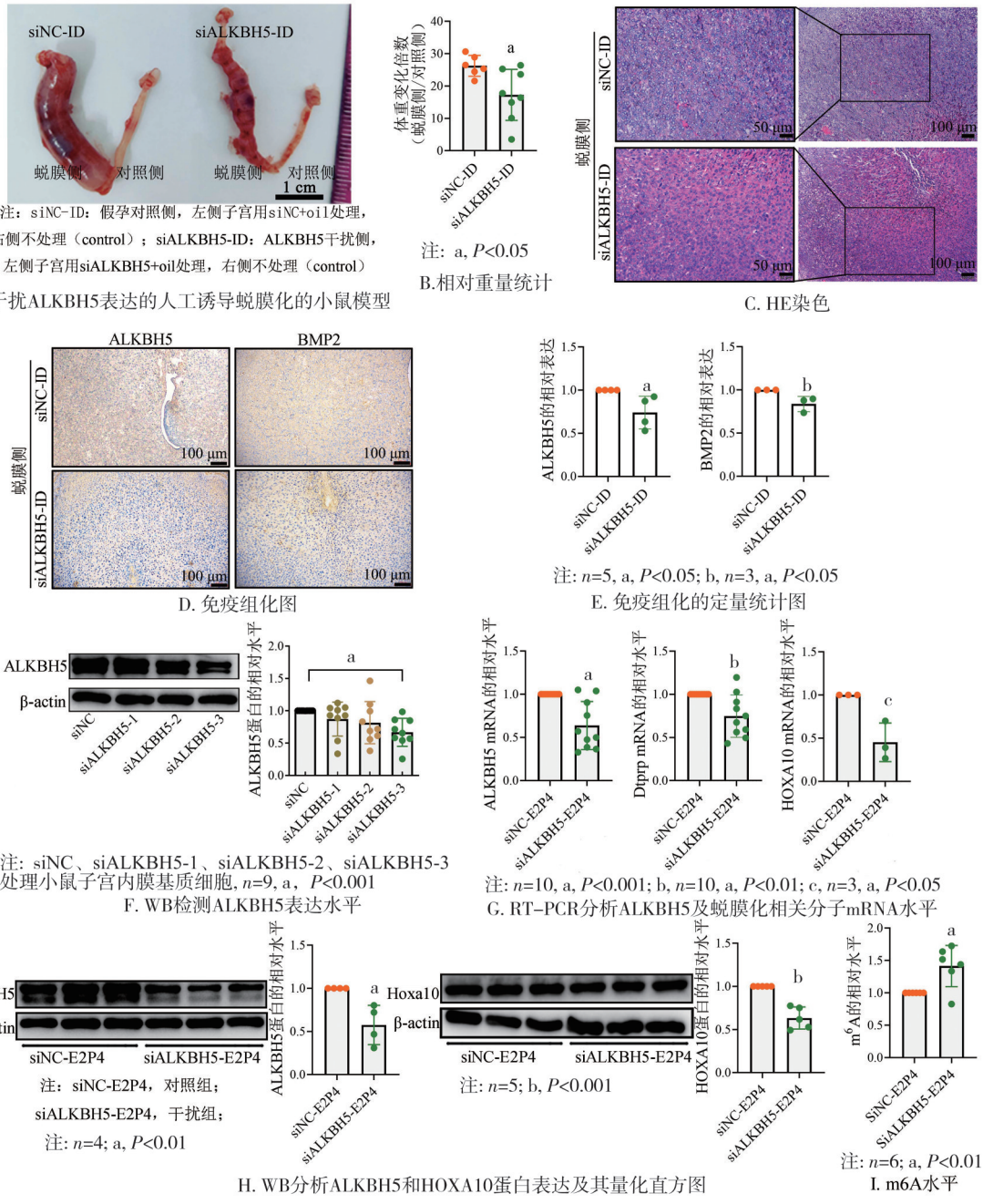
图2 ALKBH5可能通过m6A依赖的方式参与蜕膜化的调控

扰侧的子宫内膜中多核细胞的数量显著减少（图 3C）。此外，ALKBH5 干扰侧子宫内膜中 ALKBH5 和 BMP2 蛋白阳性表达较弱（图 3D、E）。上述结果表明，抑制 ALKBH5 的表达可能阻碍蜕膜化进程。

在人工诱导蜕膜化的细胞模型中，本课题组同样利用 siRNA 抑制 ALKBH5 的表达。结果显示，siALKBH5-3 片段的干扰效率较高（图 3F）。因此选择 siALKBH5-3 作为后续实验所用的干扰片段。RT-RCR 和 Western blot 结果显示，在干扰 ALKBH5 表达的人工诱导蜕膜化细胞模型中，ALKBH5 的 mRNA 水平和蛋白表达均显著降低，提示人工诱导蜕膜化细胞模型的 ALKBH5 表达被明显抑制（图 3G、H）。抑制 ALKBH5 表达后，蜕膜化标志分子 Dtprp 和 HOXA10 的 mRNA 水平及蛋白表达显著低于对照组（图 3G、H）。以上结果表明，抑制 ALKBH5 的表达可损害蜕膜化。此外，还检测了蜕膜化过程中 ALKBH5 表达抑制后的 m6A 水平。如图 3I 所示，干扰组 m6A 水平显著高于对照组。以上结果表明，ALKBH5 表达下调可能引起 m6A 水平升高，进而导致蜕膜化缺陷。

2.4　抑制 ALKBH5 表达可抑制细胞增殖

子宫内膜蜕膜化过程伴随着子宫内膜基质细胞的广泛增殖。为了探索 ALKBH5 表达抑制对小鼠子宫内膜蜕膜化的影响，本研究利用干扰 ALKBH5 的人工诱导蜕膜化小鼠模型以及细胞模型，检测 ALKBH5 表达对蜕膜化过程中细胞增殖的影响。免疫组化结果显示，与小鼠对照侧子宫相比，细



注：siNC-ID：假孕对照侧，左侧子宫用siNC+oil处理，右侧不处理（control）；siALKBH5-ID：ALKBH5干扰侧，左侧子宫用siALKBH5+oil处理，右侧不处理（control）

A. 干扰ALKBH5表达的人工诱导蜕膜化的小鼠模型

注：a, $P<0.05$

B.相对重量统计

C. HE染色

D. 免疫组化图

注：n=5, a, $P<0.05$; b, n=3, a, $P<0.05$

E. 免疫组化的定量统计图

注：siNC、siALKBH5-1、siALKBH5-2、siALKBH5-3处理小鼠子宫内膜基质细胞，n=9, a, $P<0.001$

F. WB检测ALKBH5表达水平

注：n=10, a, $P<0.001$; b, n=10, a, $P<0.01$; c, n=3, a, $P<0.05$

G. RT-PCR分析ALKBH5及蜕膜化相关分子mRNA水平

注：siNC-E2P4，对照组；siALKBH5-E2P4，干扰组；

注：n=4; a, $P<0.01$

注：n=5; b, $P<0.001$

注：n=6; a, $P<0.01$

H. WB分析ALKBH5和HOXA10蛋白表达及其量化直方图

I. m6A水平

图 3　抑制 ALKBH5 表达可阻碍蜕膜化

胞增殖标志物 PCNA 在干扰侧子宫内膜中的表达较弱（图 4A、B）。RT-qPCR 结果显示，干扰组细胞增殖标志物 Mki67 的 mRNA 表达水平明显低于对照组（图 4C）；Western blot 分析显示，干扰组 PCNA 的表达显著低于对照组（图 4D）。以上结果表明，抑制 ALKBH5 表达可抑制蜕膜细胞的增殖能力。

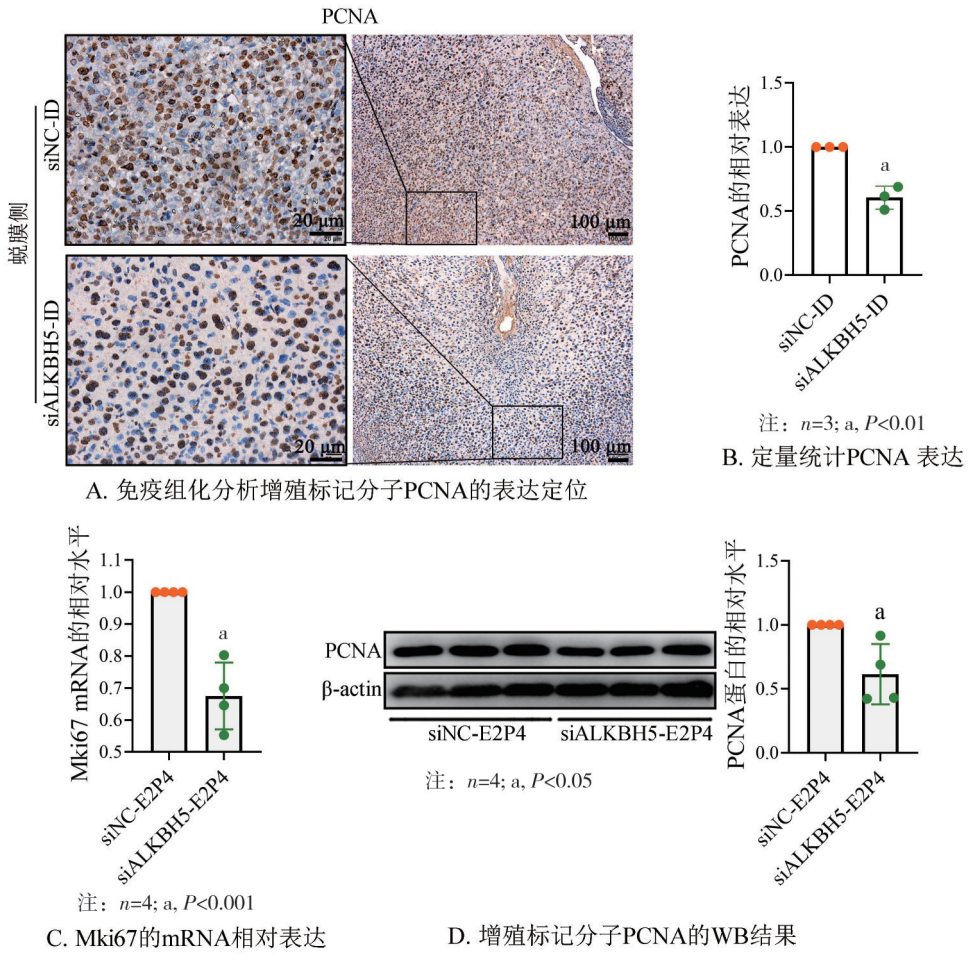
2.5 抑制 ALKBH5 表达可促进细胞凋亡

子宫内膜蜕膜化过程不仅伴随着子宫内膜基质细胞的增殖，还伴随着细胞凋亡现象的发生。因此，本课题组进一步探讨了 ALKBH5 表达抑制对子宫内膜蜕膜化过程中细胞凋亡的影响。在干扰 ALKBH5 的人工诱导蜕膜化小鼠模型中，观察到与对照侧子宫相比，干扰侧子宫细胞核明显变小，细胞形态异常；且干扰侧子宫内膜中抗凋亡蛋白 BCL2 的表达明显低于对照组，而促凋亡蛋白 BAX 的表达无显著变化（图 5A~B）。在干扰 ALKBH5 的人工诱导蜕膜化细胞模型中，干扰组细胞的晚期凋亡率和总凋亡率均显著高于对照组（图 5C）。RT-qPCR 结果显示，干扰组细胞中 BCL2 的表达水平明显低于对照组，而 BAX 水平则显著高于对照组，干扰组 BCL2/BAX 比值较对照组明显降低（图 5D）。此外，Western blot 分析结果与之相符，进一步验证了上述结论（图 5E）。以上数据表明，抑制 ALKBH5 的表达后，可显著促进蜕膜化过程中的细胞凋亡水平。

3 讨 论

近年来的研究表明，表观遗传修饰，如 DNA 甲基化和组蛋白修饰在蜕膜化中发挥重要作用，但对 m6A 修饰在小鼠蜕膜化中的作用知之甚少。

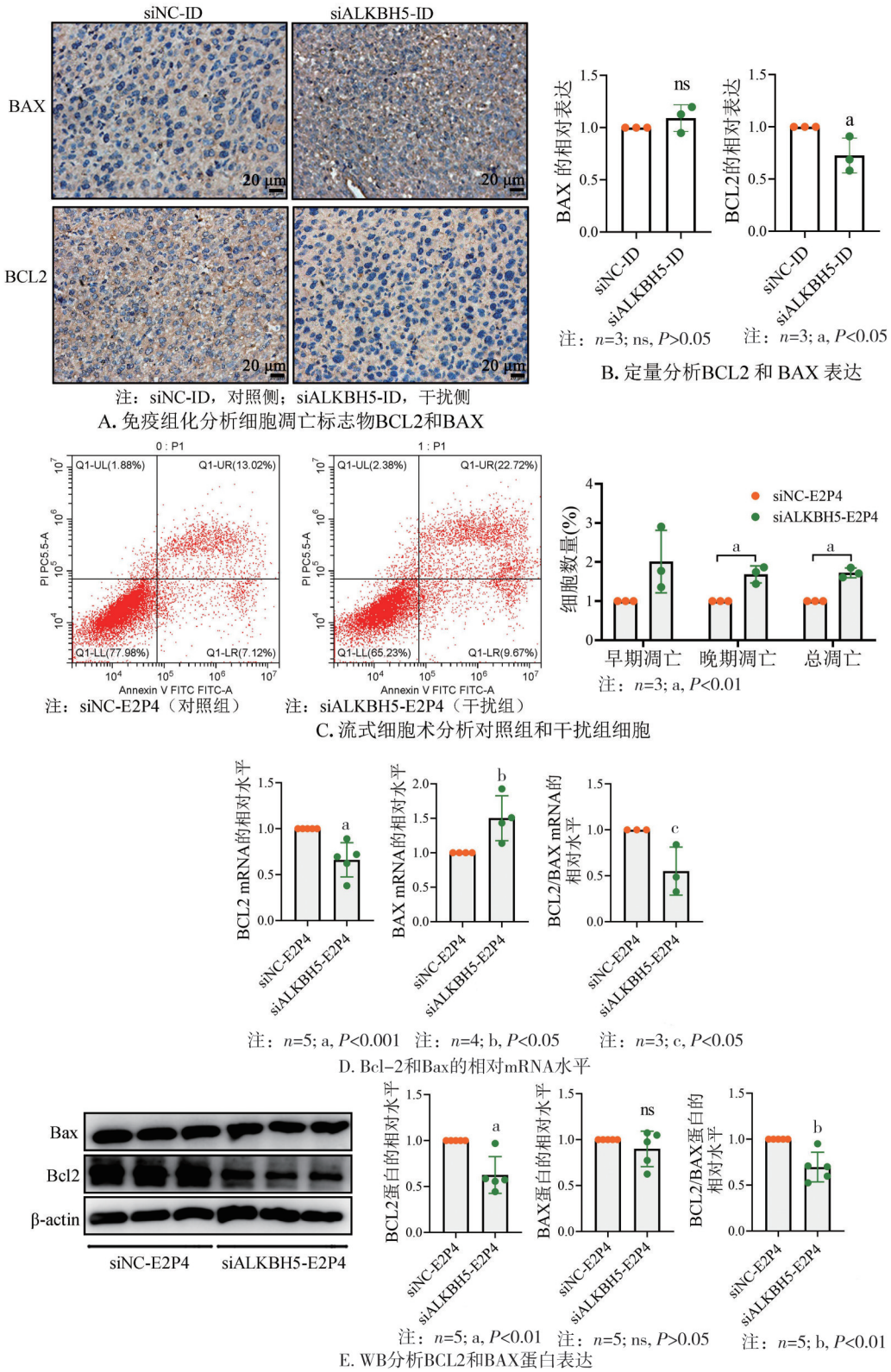
m6A 是一种表观遗传调控机制，是真核生物中最丰富的 mRNA 修饰[6,25]。蜕膜化是胎盘形成和妊娠维持的重要过程[12,26]。蜕膜化受损会导致不良妊娠结局和多种妊娠并发症的风险增加[12]。ALKBH5 介导的 m6A 修饰在滋养层细胞中扮演重要角色，与患者反复流产密切有关[27]。有研究对小鼠妊娠期子宫内膜中 m6A 水平及其相关修饰酶的表达进行了相关检测，结果表明 m6A 水平呈显著动态变化。此外，该研究还从 GEO 数据库中获取了不孕症和复发性流产女性子宫内膜组织的表达数据，分析发现 m6A 调节因子的表达显著失调，包括但不限于 m6A 去甲基化酶 ALKBH5、甲基转移酶 METTL16 和



A. 免疫组化分析增殖标记分子PCNA的表达定位　B. 定量统计PCNA 表达

C. Mki67的mRNA相对表达　D. 增殖标记分子PCNA的WB结果

图 4　抑制 ALKBH5 表达可抑制细胞增殖



注：siNC-ID，对照侧；siALKBH5-ID，干扰侧

A. 免疫组化分析细胞凋亡标志物BCL2和BAX

注：n=3; ns, P>0.05　注：n=3; a, P<0.05

B. 定量分析BCL2 和 BAX 表达

注：siNC-E2P4（对照组）　注：siALKBH5-E2P4（干扰组）

注：n=3; a, P<0.01

C. 流式细胞术分析对照组和干扰组细胞

注：n=5; a, P<0.001　注：n=4; b, P<0.05　注：n=3; c, P<0.05

D. Bcl-2和Bax的相对mRNA水平

注：n=5; a, P<0.01　注：n=5; ns, P>0.05　注：n=5; b, P<0.01

E. WB分析BCL2和BAX蛋白表达

图5　抑制 ALKBH5 表达的体内外诱导蜕膜化模型中细胞凋亡相关因子的表达

WTAP 以及识别蛋白 IGF2BP2。该研究结果表明，m6A 修饰可能在妊娠中起重要的调控作用[24]。在本研究中，本课题组进一步发现 m6A 修饰在小鼠子宫内膜蜕膜化过程中发挥了关键作用。本研究利用人工诱导蜕膜化模型对子宫内膜 m6A 水平和 m6A 相关修饰酶进行检测，在正常妊娠和假孕小鼠模型以及体内外人工诱导蜕膜化的小鼠模型中检测了 ALKBH5 的动态表达模式，证实了 ALKBH5 在小鼠

子宫内膜蜕膜化的正常生理过程中表达显著上调。进一步利用干扰 ALKBH5 表达的人工诱导蜕膜化小鼠和细胞模型，发现 ALKBH5 在子宫内膜蜕膜化过程中发挥重要作用。

ALKBH5 介导的 m6A 修饰在细胞增殖和凋亡过程中具有重要作用。研究表明，ALKBH5 可移除 m6A 修饰并通过识别蛋白 YTHDF2 调控细胞增殖和凋亡[28]，以及通过识别蛋白 YTHDF1 调控心肌细胞增殖[21]。此外，ALKBH5 也可通过 NF-κB 和 MAPK 通路参与细胞增殖和凋亡的调控[29]。在本研究中，本课题组发现抑制 ALKBH5 表达可抑制蜕膜细胞的增殖能力，促进蜕膜化过程中的细胞凋亡水平。然而，ALKBH5 介导的 m6A 修饰通过何种机制调控细胞增殖和凋亡并进一步影响子宫内膜蜕膜化过程，还有待后续深入研究。

参 考 文 献

[1] Makrigiannakis A, Minas V. Mechanisms of implantation. Reprod Biomed Online. 2007 ,14(1):102-109

[2] Cha J, Sun XF, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy[J]. Nat Med, 2012, 18(12): 1754-1767.

[3] Wang J, Gao FC, Zhao XH, et al. Integrated analysis of the transcriptome-wide m6A methylome in preeclampsia and healthy control placentas[J]. PeerJ, 2020, 8: e9880.

[4] Long J, Li WK, Chen MY, et al. Uterine deficiency of Dnmt3b impairs decidualization and causes consequent embryo implantation defects[J]. Cell Biol Toxicol, 2023, 39(3): 1077-1098.

[5] Liang XH, Deng WB, Liu YF, et al. Non-coding RNA LINC00473 mediates decidualization of human endometrial stromal cells in response to cAMP signaling[J]. Sci Rep, 2016, 6: 22744.

[6] Zhao BS, Roundtree IA, He C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(1): 31-42.

[7] Zhou YJ, Kong Y, Fan WG, et al. Principles of RNA methylation and their implications for biology and medicine[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110731.

[8] He PC, He C. M(6) A RNA methylation: from mechanisms to therapeutic potential[J]. EMBO J, 2021, 40(3): e105977.

[9] Tan XS, Zheng CH, Zhuang YH, et al. The m6A reader PRRC2A is essential for meiosis I completion during spermatogenesis[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 1636.

[10] Ivanova I, Much C, Di Giacomo M, et al. The RNA m6A reader YTHDF2 is essential for the post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome and oocyte competence[J]. Mol Cell, 2017, 67(6): 1059-1067.

[11] Hua WF, Zhao Y, Jin XH, et al. METTL3 promotes ovarian carcinoma growth and invasion through the regulation of AXL translation and epithelial to mesenchymal transition[J]. Gynecol Oncol, 2018, 151(2): 356-365.

[12] Garrido-Gómez T, Castillo-Marco N, Cordero T, et al. Decidualization resistance in the origin of preeclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 2022, 226(2S): S886-S894.

[13] Liu L, Li H, Hu DY, et al. Insights into N6-methyladenosine and programmed cell death in cancer[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 32.

[14] Chen YS, Ouyang XP, Yu XH, et al. N6-adenosine methylation (m(6)A) RNA modification: an emerging role in cardiovascular diseases[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2021, 14(5): 857-872.

[15] Liao ZW, Wang J, Xu MR, et al. The role of RNA m6A demethylase ALKBH5 in the mechanisms of fibrosis[J]. Front Cell Dev Biol, 2024, 12: 1447135.

[16] Ning YC, Chen J, Shi YQ, et al. Genistein ameliorates renal fibrosis through regulation snail *via* m6A RNA demethylase ALKBH5[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 579265.

[17] Li Y, Li MF, Liu J, et al. Altered m6A modification is involved YAP-mediated apoptosis response in 4-vinylcyclohexene diepoxide induced ovotoxicity[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 262: 115192.

[18] Bai L, Xiang Y, Tang MY, et al. ALKBH5 controls the meiosis-coupled mRNA clearance in oocytes by removing the N (6)-methyladenosine methylation[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 6532.

[19] Zhang XS, Deng SB, Peng Y, et al. ALKBH5 inhibits TNF-α-induced apoptosis of HUVECs through Bcl-2 pathway[J]. Open Med, 2022, 17(1): 1092-1099.

[20] Tao M, Li XY, He L, et al. Decreased RNA m(6)a methylation enhances the process of the epithelial mesenchymal transition and vasculogenic mimicry in glioblastoma[J]. Am J Cancer Res, 2022, 12(2): 893-906.

[21] Han ZB, Wang XX, Xu ZH, et al. ALKBH5 regulates cardiomyocyte proliferation and heart regeneration by demethylating the mRNA of YTHDF1[J]. Theranostics, 2021, 11(6): 3000-3016.

[22] Zhu ZY, Qian Q, Zhao X, et al. N(6)-methyladenosine ALKBH5 promotes non-small cell lung cancer progress by regulating TIMP3 stability[J]. Gene, 2020, 731: 144348.

[23] Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decidual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation[J]. Apoptosis, 2013, 18(12): 1526-1535.

[24] Zhao SS, Lu JY, Chen YX, et al. Exploration of the potential roles of m6A regulators in the uterus in pregnancy and infertility[J]. J Reprod Immunol, 2021, 146: 103341.

[25] Helm M, Motorin Y. Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: predict and validate[J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(5): 275-291.

[26] Ng SW, Norwitz GA, Pavlicev M, et al. Endometrial decidualization: the primary driver of pregnancy health[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4092.

[27] Li XC, Jin F, Wang BY, et al. The m6A demethylase ALKBH5 controls trophoblast invasion at the maternal-fetal interface by regulating the stability of CYR61 mRNA[J]. Theranostics, 2019, 9(13): 3853-3865.

[28] Shi HL, Wei JB, He C. Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers[J]. Mol Cell, 2019, 74(4): 640-650.

[29] Qu JW, Hou YF, Chen QX, et al. RNA demethylase ALKBH5 promotes tumorigenesis in multiple myeloma *via* TRAF1-mediated activation of NF-κB and MAPK signaling pathways[J]. Oncogene, 2022, 41(3): 400-413.

（收稿：2025-06-24；修回：2025-09-15；录用：2025-09-18）

（责任编辑：李青颖）

本文引用格式：

贺思慧，李伟轲，高茹菲，等. ALKBH5 介导的 m6A 修饰在早孕小鼠子宫内膜蜕膜化中的作用研究[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(11)：1541-1549.