

miRNA-221 在 EMS 组织及间质细胞中的 表达及对细胞增殖的影响*

杜小航^{1,2}, 石 钢^{1,2△}, 吕东昊^{1,2}, 王宇翻^{1,2}, 陈洁婷^{1,2}, 郑 倩^{1,2}, 尹 霞^{1,2}

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨 microRNA-221(miRNA)在子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)患者组织及细胞中的表达及对 EMS 间质细胞增殖的影响。方法 收集非 EMS 患者在位内膜(正常子宫内膜)及 EMS 患者卵巢异位内膜,分离培养及鉴定子宫内膜间质细胞,采用茎环法实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测在位、异位内膜组织及间质细胞中 miRNA-221 的表达;雌激素($17\beta\text{-E}_2$, 终浓度为 10^{-8} mol/L)刺激间质细胞 48 h 后检测 miR-221-3p 表达变化;异位间质细胞转染 miR-221-3p inhibitor 和 inhibitor 阴性对照(NC)后,观察其对 miR-221-3p、人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(*PTEN*)表达和增殖的影响。结果 miR-221-3p 在 EMS 组织中的表达为正常子宫内膜组织的 4.2 倍($P=0.039$),在 EMS 间质细胞中的表达为正常子宫内膜间质细胞的 2.66 倍($P=0.029$)。与正常子宫内膜组织及间质细胞相比,miR-221-5p 在 EMS 组织及间质细胞中表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。雌激素处理正常及异位间质细胞 48 h 后 miR-221-3p 表达差异无统计学意义。抑制 miR-221-3p 功能后,异位间质细胞增殖抑制($P=0.018$),*PTEN* 基因表达上调($P=0.021$)。结论 miRNA-221 在 EMS 组织及间质细胞中表达上调,抑制 miR-221-3p 功能可促进 *PTEN* 表达从而抑制 EMS 间质细胞增殖。

【关键词】 子宫内膜异位症 microRNA-221 *PTEN* 细胞增殖

The Expression of microRNA-221 in Endometriosis and Its Impact on Endometrial Stromal Cells DU Xiao-hang^{1,2}, SHI Gang^{1,2△}, LÜ Dong-hao^{1,2}, WANG Yu-he^{1,2}, CHEN Jie-ting^{1,2}, ZHENG Qian^{1,2}, YIN Xia^{1,2}. 1. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second University Hospital, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: gang-shi@163.com

【Abstract】 Objective To determine the expression of microRNA-221 (miR-221) in endometrial tissues and its impact on the proliferation of ectopic endometrial stromal cells. Methods Endometrial stromal cells were isolated, cultured and identified from normal endometrial tissues (taken from patients without endometriosis) and ectopic endometrial tissues (taken from patients with ovarian endometriosis). The expression of microRNA-221 was detected by stem-loop qRT-PCR. Changes in the expression of miR-221-3p in endometrial stromal cells exposed to estradiol (10^{-8} mol/L) for 48 h were detected. The effects of miR-221-3p inhibitor on the expressions of miR-221-3p, phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (*PTEN*) and cell proliferations were compared with those of the negative control (NC, 10 nmol/L). Results The expression of miR-221-3p in ectopic endometrial tissues was 4.2 times higher than that in normal endometrial tissues ($P=0.039$); 2.66 times higher in ectopic endometrial stromal cells compared with normal endometrial stromal cells ($P=0.029$). But no differences in the expression of miR-221-5p were found ($P>0.05$). No differences in the change of miR-221-3p expression after exposure to estrogen for 48h were found between normal and ectopic stromal cells. Inhibition of miR-221-3p function was associated with decreased cell proliferation ($P=0.018$) and increased expression of *PTEN* gene ($P=0.021$). Conclusion The expression of microRNA-221 is upregulated in ectopic endometrial tissues and ectopic endometrial stroma cells. Inhibiting the function of miR-221-3p may result in increased *PTEN* expression and decreased cell proliferation in endometrial stromal cells.

【Key words】 Endometriosis microRNA-221 *PTEN* Cell proliferation

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)是常见于育龄期女性的一种激素依赖性的慢性炎症性疾病,发病率为 10%左右^[1]。由于子宫内膜的间质及

* 四川省科技厅支撑计划项目(No. 2014SZ0001)资助

△ 通信作者, E-mail: gang-shi@163.com

腺体出现在宫腔以外的地方,EMS 具有种植、侵蚀及远处转移的能力,可以引起慢性盆腔痛、月经紊乱、不孕等^[2]。根据欧洲人类生殖与胚胎学协会(ESHRE)指南,目前对于 EMS 的治疗主要有药物和手术去除病灶组织,但两种治疗方式都存在局限性^[3]。因此,通过研究 EMS 的发病机制探索长期有效的治疗方式极为重要。

microRNA(miRNA)是长度约为 22 核苷酸的单链非编码 RNA,通过靶向靶基因的 3'UTR 抑制或者降解靶基因的表达,从而达到调控基因表达的目的^[4],成为目前表观遗传学研究的热门。研究发现,EMS 中 miRNA 存在异常表达,且 miRNA 可能参与了 EMS 的发生发展^[5],其中 miR-221(成簇分布的 miRNA)在多个基因筛查谱中存在异常表达^[6],但结果不尽相同,本研究对 miR-221 在 EMS 中的表达及功能进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本来源 收集 2015 年 11 月至 2016 年 9 月四川大学华西第二医院收治的首发卵巢型 EMS 囊肿患者 17 例及非 EMS 患者(正常子宫内膜),即在位内膜 9 例(其中 6 例为输卵管积水或堵塞行宫腔腹腔镜检患者的正常内膜,3 例为子宫内膜息肉患者的正常内膜组织)的组织标本。冰盒收集组织标本,一部分用于细胞分离培养,一部分用 RNAwait 液 -20 °C 保存。所有组织均经病理学诊断证实;患者年龄均小于 35 岁,术前 3 月未曾使用激素类药物。获取组织标本患者知情并签字同意,本研究获得四川大学华西第二医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 RNAwait 组织保存液、Trizol(Ambion, 美国), miR-221-3p、miR-221-5p 茎环引物、U6 茎环引物(产品批号: ssD809230256、ssD089261711、ssD0904071008、ssD0904071007、ssD0904071006)、miR-221-3p inhibitor 和 inhibitor 阴性对照(NC)转染试剂盒(锐博生物有限公司,广州),逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(宝生物有限公司,中国大连),DMEM/F12 1 : 1 培养基(Hyclone, 美国),胎牛血清(GIBCO, 美国),葡聚糖活性炭处理胎牛血清(FBS, 四季青,浙江杭州),胶原酶 IV (Invitroge, 美国),直径 70 μm 和 40 μm 尼龙筛网(Corning, 美国),青链霉素(Hyclone; 美国),Alexa-flour 488 荧光标记的波形蛋白抗体(anti-vimentin Alexa-flour 488) 和 Alexa-flour 647 荧光

标记的角蛋白抗体(anti-human cytokeratin Alexa-flour 647)(BD, 美国), $17\beta\text{-E}_2$ (Sigma, 美国),CCK-8 试剂盒(同仁, 日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 内膜间质细胞的分离培养 将 DMEM/F12 培养基收集的在位、异位内膜组织冰盒运送至实验室,内膜组织用含 3% 双抗的 PBS 缓冲液冲洗至澄清,去掉血块及纤维膜,剪碎至糊状;加入 5 倍体积的 1 mg/mL 胶原酶 IV,37 °C 振荡培养箱中消化 30 ~ 45 min,加入 2 倍体积含 10% FBS 的 DMEM/F12 终止消化;经直径 70 μm 和 40 μm 的尼龙筛网过滤,滤液主要为间质细胞,将滤液经 1 000 r/min 离心 5 min;弃掉上清,含 15% FBS 的 DMEM/F12 培养基重悬细胞,细胞接种至培养板,37 °C、体积分数 5% CO_2 孵箱中培养;根据贴壁情况 6 ~ 18 h 内换液。待铺满至 90% 传代培养,传代纯化第 3 代(P3 代)进行细胞实验。本研究成功分离培养在位子宫内膜(NESC)间质细胞 6 例,异位子宫内膜间质细胞(EESC)12 例。

1.2.2 间质细胞鉴定 收集 P3 代细胞样本,含 30% FBS 的 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,300 $\times g$,离心 5 min,固定及破膜 30 min,洗涤细胞后分别加入 Alexa-flour 488 荧光标记的波形蛋白抗体和 Alexa-flour 647 荧光标记的角蛋白抗体,室温孵化 30 min,洗涤细胞后 300 μL 重悬细胞,流式机检测波形蛋白和角蛋白的表达。

1.2.3 组织、细胞总 RNA 提取及茎环法实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 采用 TRIzol 法提取组织、细胞总 RNA,总 RNA 经紫外分光光度计测定吸光度(A)在 1.8 ~ 2.0 之间。逆转录按照试剂盒说明操作,得到 cDNA,然后进行基因片段扩增。miR-221-3p 及 5p 茎环内参 U6 引物购于锐博生物有限公司(产品批号如上述);人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(*PTEN*)和 *GADPH* 引物序列通过查询 NCBI 设计。*PTEN* 序列: F: 5' TTTGAAGACCATAACCCACCAC-3'; R: 5' CCAGTAGAGGCAGGGATGAT-3'。*GADPH* 引物序列: F: 5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCA-3'; R: 5'-CCAGTAGAGGCAGGGATGAT-3'。引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。配制 20 μL 反应体系: SYBR primer Ex Taq II (Tli RNaseH plus) 10.0 μL ; Forward primer 0.8 μL ; Reverse primer 0.8 μL ; ROX reference Dye II 0.4 μL ; cDNA 模板 2.0 μL ; ddH₂O 6.0 μL 。反应条件:预变性与变性

条件各基因基本一样,预变性:95 °C 30 s, 95 °C 40 s,60 °C 34 s,40 个循环。最后在95 °C 30 s,60 °C 1 min,95 °C 30 s,60 °C 15 s 条件下溶解。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.2.4 雌激素刺激对间质细胞 miR-221-3p 表达的影响 以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种间质细胞至 6 孔板,24 h 后换液,以葡聚糖活性炭处理后的血清和无酚红 DMEM/F12 配制 10% 完全培养基,饥饿处理 24 h,加入 $17\beta\text{-E}_2$ (终浓度为 10^{-8} mol/L),以不加 $17\beta\text{-E}_2$ 为空白对照,培养 48 h 后提取细胞 RNA,按 1.2.3 茎环法 qRT-PCR 检测 miR-221-3p 表达。

1.2.5 转染 miR-221-3p inhibitor 对 EESC 增殖、miR-221-3p、PTEN 表达的影响 将培养的 EESC 分为 2 组,按说明书分别转染 miR-221-3p inhibitor (10 nmol/L)和 inhibitor NC(10 nmol/L)。EESC 转染后 miR-221-3p、PTEN 表达检测:以 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种 EESC 至 12 孔板,24 h 后换液,同上分组转染细胞,培养 24 h 后收集细胞,提取 RNA,按 1.2.1 qRT-PCR 检测 miR-221-3p、PTEN

表达,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖。以 $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种 EESC 至 96 孔板,24 h 后换液,每组接种 5 孔,同上分组转染细胞,48 h 后细胞换液,加入 CCK-8 后 4 h 后酶标仪测定吸光度(A)值。以上试验设置重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 间质细胞鉴定结果

分离培养的子宫内膜细胞波形蛋白表达阳性,阳性率 90% 以上,而角蛋白表达阴性(仅 5%~10% 表达阳性),确定所分离的细胞为子宫内膜间质细胞,且纯度满足细胞实验要求。

2.2 正常及异位子宫内膜组织及间质细胞 miR-221 的表达

见图 1。miR-221-3p 在异位内膜组织的表达为

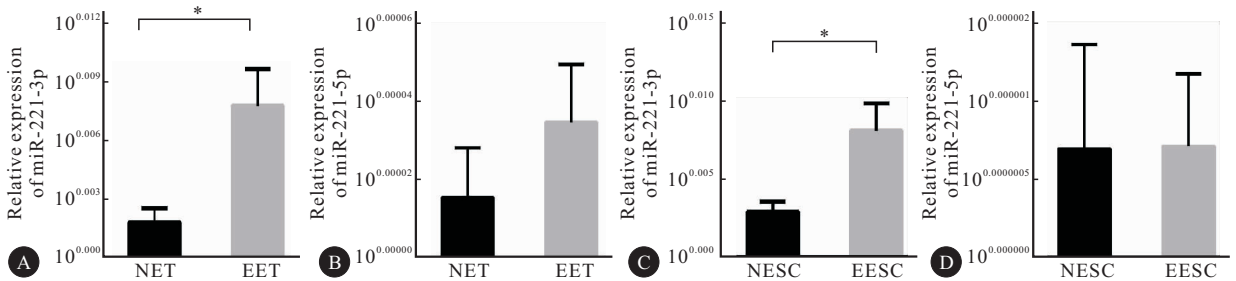


图 1 内膜组织(A,B)及间质细胞(C,D)中 miR-221 的表达

Fig 1 miR-221 expression in endometrial tissues (A,B) and cells (C,D)

NET: Normal endometrial tissues; EET: Ectopic endometrial tissues; EESC: Ectopic endometrial stromal cells; NESC: Normal endometrial stromal cells. A, C: miR-221-3p; B, D: miR-221-5p. * $P < 0.05$

正常宫内膜组织的 4.2 倍($P = 0.039$),EESC 的 miR-221 为 NESC 的 2.66 倍($P = 0.029$),差异均具有统计学意义。与正常内膜组织及 NESC 相比,异位组织($P = 0.08$)及 NESC 的 miR-221-5p 表达差异无统计学意义($P = 0.7$)。

2.3 雌激素刺激对子宫内膜间质细胞 miR-221-3p 表达的影响

见图 2。 $17\beta\text{-E}_2$ (10^{-8} mol/L)作用 48 h 后,与空白对照组比较,无论是在 NESC($P = 0.48$)还是在 EESC($P = 0.26$)miR-221-3p 表达差异均无统计学意义。

2.4 转染 miR-221-3p inhibitor 对 EESC 增殖、miR-221-3p、PTEN mRNA 表达的影响

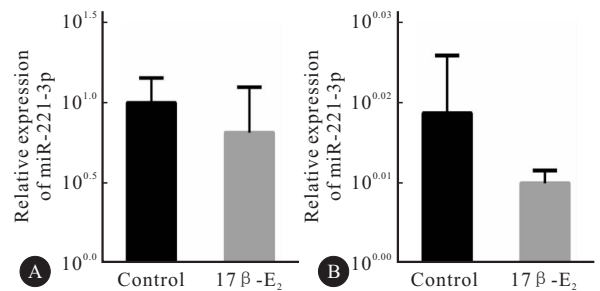


图 2 雌激素刺激后间质细胞 miR-221-3p 的表达

Fig 2 miR-221-3p expression in endometrial cells after exposure to $17\beta\text{-E}_2$

A: NESC; B: EESC

见图 3。结果显示,与阴性对照组相比较,EESC 转

染 miR-221-3p inhibitor 24 h, miR-221-3p 表达差异无统计学意义。而 *PTEN* mRNA 表达上调

1.29 倍, 差异有统计学意义 ($P=0.021$); 转染 48 h 后, 与阴性对照组相比较, EESC 增殖受到抑制, 差

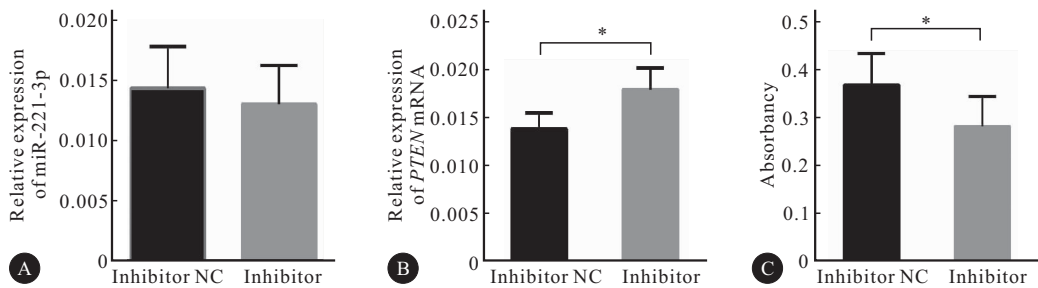


图 3 miR-221-3p inhibitor 转染 EESC 后 miR-221-3p(A)、*PTEN* mRNA 表达(B)和 EESC 增殖结果(C)

Fig 3 The expressions of miR-221-3p (A), *PTEN* mRNA (B) and cell proliferation (C) in cells transfected with miR-221-3p inhibitor

* $P<0.05$

异有统计学意义 ($P=0.018$)。

3 讨论

EMS 的种植、侵蚀及远处转移的生物学行为与恶性肿瘤极其相似。而 miRNA 在人类多种肿瘤中不仅表达异常, 且与肿瘤发生发展、侵袭转移关系密切。miR-221 位于 X 染色体上 Xp11.3。生理情况下, miR-221/222 参与血管生成、重塑等过程^[7-8], 而 miR-221/222 在多种疾病中表达增高, 参与到疾病的发生机制中, 检测 miR-221/222 的表达在疾病的诊断、治疗及预后中具有一定的作用^[10]; BEG 等^[9]将 MRX34(miR-34 模拟物脂质体)应用于难治性实体肿瘤中, 对药物的安全性、药代学、临床活性等进行了探索, 使 miRNA 的研究进入了一个新的阶段。如抑制 miR-221 的功能后, 成纤维滑膜样细胞迁移侵袭能力减低^[11]。

关于 miR-221 在 EMS 的表达研究结果不尽一致, 有的结果 miR-221 表达上调, 有的结果为表达下调, 可能与样本来源不同有关; 本研究通过组织和细胞验证, 采用特异性更高的茎环法 qRT-PCR 检测, 发现卵巢型 EMS 患者中 miR-221-3p 表达不管是在相应组织或细胞中均表达上调。

EMS 具有雌激素依赖性, 已经发现甲羟孕酮能够下调子宫内膜间质细胞 miR-221/222 表达^[12]; 在月经周期中, 正常内膜及卵巢异位内膜组织中 miR-221 在增生期表达较分泌期增高^[13]。本研究中采用雌激素刺激子宫内膜间质细胞 48 h 后, 发现正常及异位子宫内膜间质细胞 miR-221-3p 表达与空白对照组比较无差异, 分析其原因可能是 miR-221 的表达除与雌激素有关外, 孕激素也参与了其表达的调节。雌激素是 EMS 形成的必需因素, 但可能不是

EMS 发展中的唯一因素^[14]。

目前关于 miR-221 在 EMS 中的具体作用尚无研究, 本研究结果显示, 与阴性对照比较, 转染 miR-221-3p inhibitor 24 h, miR-221-3p 表达与阴性对照比较, 差异无统计学意义, 其原因是 miR-221-3p 抑制剂进入细胞胞质中, 与胞质中的 miR-221-3p 形成杂合双链, 从而达到抑制 miR-221-3p 在细胞中的作用, 而在 PCR 预变性阶段杂合双链解开, 使得 miR-221-3p 表达无差异; *PTEN* 基因是具有编码磷酸酶活性的抑癌基因, 在 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中能够将 PIP3 去磷酸为 PIP2 阻断细胞信号的传递^[14]; 84.4% EMS 患者存在 *PTEN* 杂合性丢失 (LOH), 免疫组化发现子宫内膜异位组织中 *PTEN* 蛋白表达减低^[16]; 过表达 *PTEN* 能够促进子宫内膜间质细胞凋亡、抑制其细胞周期^[17]。本研究发现抑制 miR-221 功能后, 子宫内膜间质细胞增殖受到抑制, miR-221 可能通过调节促进 *PTEN* 表达参与子宫内膜间质细胞增殖。但实验中 *PTEN* 表达上调虽然差异存在统计学意义, 但倍数变化不明显, 分析其原因可能是除 *PTEN* 外, 存在其他增殖基因参与了间质细胞增殖的调节, 因此, 在后续对 miR-221-3p 的进一步研究中, 应检测其他由 miR-221-3p 调节的参与细胞增殖或细胞周期相关的靶基因及蛋白水平表达; 此外, 在动物 EMS 模型中进一步研究拮抗 miR-221-3p 能否改变病变大小及组织中增殖或凋亡相关基因或蛋白表达差异。

综上所述, 本研究结果显示: miR-221-3p 在子宫内膜异位中存在高表达, 单一的雌激素并不能改变 miR-221-3p 在子宫内膜间质细胞中的表达, 而抑制子宫内膜间质细胞中 miR-221-3p 功能后可以抑制子宫内膜间质细胞增殖。

参 考 文 献

- [1] ESKENAZI B, WARNER ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1997, 24(2): 235-258.
- [2] VERCELLINI P, VIGANO P, SOMIGLIANA E, *et al.* Endometriosis; pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(5): 261-275.
- [3] WEBBER L, DAVIES M, ANDERSON R, *et al.* ESHRE guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod*, 2016, 31(5): 926-937.
- [4] HAWKINS SM, CREIGHTON CJ, HAN DY, *et al.* Functional microRNA involved in endometriosis. *Mol Endocrinol*, 2011, 25(5): 821-832.
- [5] TEAGUE EM, PRINT CG, HULL ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update*, 2010, 16(2): 142-165.
- [6] WEI S, XU H, KUANG Y. Systematic enrichment analysis of microRNA expression profiling studies in endometriosis. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(5): 423-429.
- [7] CELIC T, METZINGER-LE MEUTH V, SIX I, *et al.* The mir-221/222 cluster is a key player in vascular biology via the fine-tuning of endothelial cell physiology. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15(1): 40-46.
- [8] CHISTIYAKOV DA, SOBENIN IA, OREKHOV AN, *et al.* Human miR-221/222 in physiological and atherosclerotic vascular remodeling. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 354517 [2017-07-22]. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/354517>.
- [9] BEG MS, BRENNER AJ, SACHDEV J, *et al.* Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*, 2017, 35(2): 180-188.
- [10] SONG J, OUYANG Y, CHE J, *et al.* Potential value of miR-221/222 as diagnostic, prognostic, and therapeutic biomarkers for diseases. *Front Immunol*, 2017, 8: 56 [2017-07-22]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00056>.
- [11] YANG S, YANG Y. Downregulation of microRNA221 decreases migration and invasion in fibroblastlike synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 2395-2401.
- [12] QIAN K, HU L, CHEN H, *et al.* Hsa-miR-222 is involved in differentiation of endometrial stromal cells *in vitro*. *Endocrinology*, 2009, 150(10): 4734-4743.
- [13] RAMÓN LS A, BRAZA-BOÏLS A, GILABERT-ESTELLÉS J, *et al.* microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Human Reproduction*, 2011, 26(5): 1082-1090.
- [14] GALVANKAR M, SINGH N, MODI D. Estrogen is essential but not sufficient to induce endometriosis. *J Biosci*, 2017, 42(2): 251-263.
- [15] KIM TH, YU Y, LUO L, *et al.* Activated AKT pathway promotes establishment of endometriosis. *Endocrinology*, 2014, 155(5): 1921-1930.
- [16] GOVATATI S, KODATI VL, DEENADAYAL M, *et al.* Mutations in the PTEN tumor gene and risk of endometriosis: a case-control study. *Hum Reprod*, 2014, 29(2): 324-336.
- [17] LV J, ZHU Q, JIA X, *et al.* In vitro and in vivo effects of tumor suppressor gene PTEN on endometriosis: an experimental study. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 3727-3736 [2017-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5070632/>. doi:10.12659/MSM.901091.

(2018-01-02 收稿, 2018-04-02 修回)

编辑 沈 进