

泌尿生殖医学基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002086

NF- κ B/Snail 在宫腔粘连患者内膜中表达升高郑 静¹, 王继书², 袁 瑞¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016; 2. 重庆市渝北区妇幼保健院妇科, 重庆 401120)

【摘要】目的:探究锌指蛋白 Snail 与转录调节因子核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)在宫腔粘连(intrauterine adhesions, IUAs)患者子宫内膜中的表达。**方法:**选择 34 例宫腔粘连患者作为试验组(IUAs), 非宫腔粘连患者 19 例作为对照组(control), 在宫腔镜直视下取子宫内膜组织。采用实时荧光定量 PCR、免疫组织化学和 Western blot 分别检测 NF- κ B、Snail、E-cadherin、Vimentin mRNA 水平和蛋白水平的表达。**结果:**与对照组相比较, 宫腔粘连患者子宫内膜组织中 NF- κ B(2.478 ± 0.279 vs. 1.459 ± 0.323 , $P=0.013$)、Snail(2.801 ± 0.502 vs. 1.218 ± 0.313 , $P=0.005$)、Vimentin(3.581 ± 0.650 vs. 1.756 ± 0.260 , $P=0.006$)的表达明显升高, E-cadherin(1.324 ± 0.617 vs. 2.784 ± 0.647 , $P=0.023$)表达明显降低。**结论:**NF- κ B 和 Snail 可能参与了宫腔粘连的发生发展。

【关键词】宫腔粘连; 核因子- κ B; Snail**【中图分类号】**R711.6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-11-17Upregulation of NF- κ B and Snail expression in the endometrium of patients with intrauterine adhesionsZheng Jing¹, Wang Jishu², Yuan Rui¹

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Obstetrics, Maternal and Child Health Hospital of Yubei District, Chongqing)

【Abstract】Objective: To examine the expression of zinc finger protein Snail and nuclear factor kappa B(NF- κ B) in the endometrium of patients with intrauterine adhesions(IUAs). **Methods:** Endometrial tissues were collected by hysteroscopy from 34 IUA patients (IUA group) and 19 non-IUA patients(control group). The mRNA and protein expression levels of NF- κ B, Snail, E-cadherin, and Vimentin were determined using real-time quantitative PCR, immunohistochemistry, and Western blot. **Results:** The IUA group had significantly increased expression of NF- κ B(2.478 ± 0.279 vs. 1.459 ± 0.323 , $P=0.013$), Snail(2.801 ± 0.502 vs. 1.218 ± 0.313 , $P=0.005$), and Vimentin(3.581 ± 0.650 vs. 1.756 ± 0.260 , $P=0.006$), but significantly reduced expression of E-cadherin(1.324 ± 0.617 vs. 2.784 ± 0.647 , $P=0.023$), as compared with the control group. **Conclusion:** NF- κ B and Snail may be involved in the development and progression of IUA.

【Key words】intrauterine adhesion; nuclear factor- κ B; Snail

宫腔粘连是指由于子宫内膜基底层损伤, 内膜修复受阻, 宫腔部分或完全封闭, 其主要表现为经量减少、闭经、复发性流产及不孕。Fritsch 于 1894 年首次报道宫腔粘连, Asherman 在 1948 年对其发

病率、病因、症状等进行了详细阐述, 故又称 Asherman 综合征^[1]。人工流产和清宫术是宫腔粘连发病的主要原因, 非孕期宫腔粘连主要为生殖道感染以及先天性子宫畸形^[2]。宫腔粘连已成为我国继发不孕的首要原因^[3], 对育龄期女性造成极大困扰。因此如何预防及治疗宫腔粘连的发生发展亟需进一步的研究。

锌指蛋白 Snail 是上皮间质化转变(epithelial to mesenchymal transition, EMT)主要蛋白, EMT 是指成

作者介绍: 郑 静, Email: 2458231537@qq.com,

研究方向: 宫腔粘连。

通信作者: 袁 瑞, Email: yru96@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目资助项目(编号: 81471417)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190419.1734.008.html>

(2019-04-22)

熟的上皮细胞在刺激因子作用下失去上皮细胞特性向间质细胞转变的过程。在炎症因子刺激下,细胞核内锌指蛋白家族 Snail、Slug 等被激活启动 EMT 进程,Snail 抑制上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)表达,使得细胞间连接变弱,基底膜分解,细胞向间质细胞转变,并表达间质细胞标志蛋白(Vimentin),促进纤维化形成^[4]。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是重要的炎症始动因子,在机体防御、免疫、炎症等进程中扮演重要角色^[5],在正常细胞中 NF- κ B 以非活性形式与抑制因子结合存在细胞质中,但在细胞外因子白介素-1(interleukin-1, IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等作用下, NF- κ B 被激活并迅速转位入核,调节相关基因表达。本实验通过对子宫内膜中 NF- κ B 及 Snail 等因子的研究,探索其在宫腔粘连中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 2017 年 9 月到 2018 年 3 月在我院行宫腔镜检查诊断为宫腔粘连的患者 34 例(试验组),其中 31 例主诉经量减少,3 例闭经,患者平均年龄(29.111 ± 3.620)岁,宫腔粘连评分按照美国生育协会(AFS)分度为中到重度。对照组患者选取因不孕而行宫腔镜检查的子宫内膜正常的患者 19 例,平均年龄(30.667 ± 1.936)岁,2 组患者平均年龄无统计学意义($P=0.301$)。2 组患者的选取均排除糖尿病、高血压、冠心病等慢性全身性疾病;子宫内膜息肉、子宫内膜异位症、薄型子宫内膜、黏膜下肌瘤、内膜结核患者;检查前 3 个月有激素药物服用史。本研究经由重庆医科大学附属第一医院伦理委员会同意审批,并取得患者知情同意。永生化人子宫内膜腺上皮细胞购自广州凯乐生物技术有限公司;兔抗人多克隆抗体 E-cadherin、NF- κ B、Vimentin、Snail 抗体为武汉三鹰公司产品。DAB 显色试剂及免疫组织化学产品购买自北京中杉金桥。逆转录及实时荧光定量产品购自日本 Takara 公司。

1.2 qRT-PCR 检测 NF- κ B、Snail、E-cadherin、Vimentin mRNA 表达

取-80℃冰箱冻存的人子宫内膜组织,按 Takara 公司 mRNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。样品吸光度比值(OD260/OD280)为 1.8~2.0 为有效样品。根据 Takara RT-PCR 逆转录说明进行 cDNA 合成和扩增。反应条件为 95℃ 10 min, 95℃ 30 s 共 40 个循环, 60℃ 45 s。反应结束后,统计各组 CT 值,采用实时荧光定量 PCR 分析方法计算其相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

引物	序列
GAPDH	上游 5' -CGGAGTCAACGGATTGCTCGTAT-3'
	下游 5' -AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'
NF- κ B	上游 5' -GGTTACGGGAGATGTGAAGATG-3'
	下游 5' -AAGGTGGATGATGGCTAAGTGT-3'
Snail	上游 5' -CGAAAGGCCCTTCAACTGCAAAT-3'
	下游 5' -ACTGGTACTTCTTGACATCTG-3'
E-cadherin	上游 5' -GAACGCATTGCCACATACAC-3'
	下游 5' -GAATTCGGGCTTGTGTCAT-3'
Vimentin	上游 5' -AGATGGCCCTTGACATTGAG-3'
	下游 5' -CCAGAGGGAGTGAATCCAGA-3'

1.3 免疫组化检测 NF- κ B、Snail、E-cadherin、Vimentin 表达

新鲜子宫内膜组织固定于 4%多聚甲醛中,石蜡包埋,5 μ m 厚连续切片。常规脱蜡、水化后,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 3 遍,3%过氧化氢室温封闭内源性过氧化物酶 30 min,微波炉抗原修复 10 min,山羊血清室温封闭 30 min,加入一抗(浓度 1:100),4℃过夜。加入生物素标记二抗,DAB 充分显色后,苏木素复染,封片。显微镜下观察。

1.4 Western 免疫印迹技术检测 NF- κ B、Snail、E-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平

分别提取浆蛋白与核蛋白,用 BCA 法测浓度后,加入 5×上样缓冲液后煮沸。SDS-PAGE 每个泳道分别加入 20 μ g 蛋白,电泳约 90 min,常规切胶、转膜,5%脱脂牛奶摇床封闭 1 h。滤纸吸干后分别滴加 GAPDH(1:1 000)、NF- κ B(1:1 000)、Snail(1:1 000)、E-cadherin(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)抗体孵育 4℃过夜。TBST 洗脱 3 次(10 min/次),二抗 37℃孵育 1 h, TBST 清洗 3 次(10 min/次),ECL 化学发光显色,Image-J 图像分析软件分析目标条带吸光度值,统计各组蛋白相对表达量。

1.5 免疫荧光鉴定永生化人子宫内膜腺上皮细胞

永生化人子宫内膜腺上皮细胞以 1×10^6 个/mL 种植于无菌培养瓶,用含 1%双抗和 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基在 37℃,5% CO₂ 的孵箱中培养。在 24 孔板中预先放置好细胞爬片,细胞以 1×10^5 个/mL 种植于孔板中,待细胞长满 80%后用 PBS 冲洗细胞并用 4%多聚甲醛固定爬片 15 min, PBS 清洗爬片 3 次(5 min/次),0.5%Triton 通透细胞 20 min,再次清洗爬片后,加入山羊血清室温封闭 30 min,吸干血清,滴加抗 cytokeratin 一抗(1:50)。4℃过夜,PBS 清洗爬片后,滴加荧光二抗(1:400),用 PBS 洗掉多余的荧光二抗并滴加 DAPI 稀释液(1:5)复染核 3 min。清洗多余 DAPI 后,90%甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.6 Western 免疫印迹检测经脂多糖刺激后的子宫内膜腺上皮细胞

细胞以 5×10^5 个/mL 种植于 6 孔板中,待细胞长满 80%

后换液,加入只含有 DMEM/F12 的培养基饥饿 12 h,后在实验组中加入 $10 \mu\text{g/mL}$ LPS^[6]。经过 24 h 观察到细胞形态变化后收集细胞,提取细胞核蛋白,进行 Western blot。

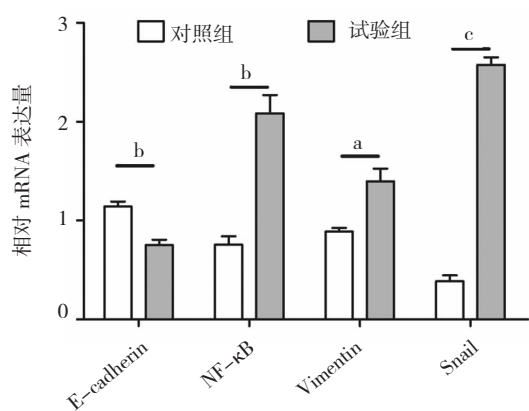
1.7 统计分析

采用 SPSS 22.0 对数据进行统计分析,两组数据间的比较采用非配对 t 检验,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测 NF- κ B 和 Snail、Vimentin、E-cadherin mRNA 含量

用 qRT-PCR 技术分别检测粘连组和对照组子宫内膜中 NF- κ B、Snail、Vimentin、E-cadherin mRNA 的表达,同对照组相比 NF- κ B mRNA 的表达明显高于对照组 (2.084 ± 0.322 vs. 0.756 ± 0.144 , $t=6.515$, $P=0.002$); Snail mRNA 在 IUAs 组患者子宫内膜中表达同样明显增加 (2.574 ± 0.153 vs. 0.385 ± 0.105 , $t=21.083$, $P=0.000$); Vimentin mRNA 的表达量明显高于对照组 (1.396 ± 0.223 vs. 0.888 ± 0.066 , $t=3.779$, $P=0.010$); E-cadherin mRNA 表达量则低于对照组 (0.750 ± 0.096 vs. 1.141 ± 0.103 , $t=-5.107$, $P=0.002$); 如图 1 所示。



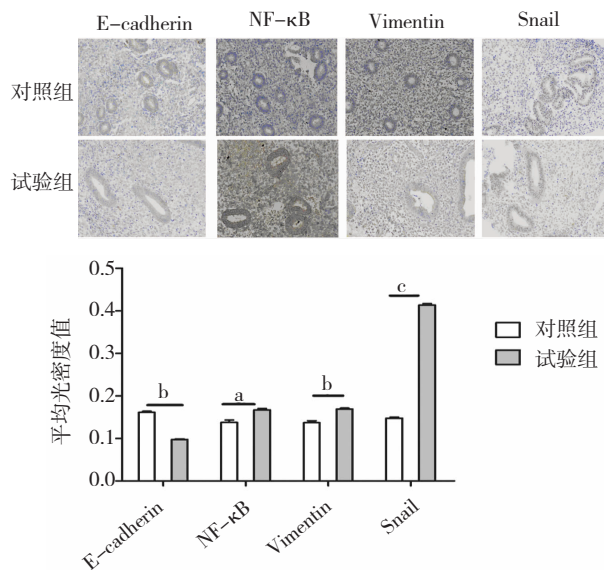
a: 与对照组相比, $P<0.05$; b: 与对照组相比 $P<0.01$; c: 与对照组相比, $P=0.0000$

图 1 试验组患者与对照组患者子宫内膜 NF- κ B、Snail、Vimentin、E-cadherin mRNA 相对表达量

2.2 免疫组织化学染色观察 NF- κ B 和 Snail、Vimentin、E-cadherin 的表达

NF- κ B 在腺上皮细胞和间质细胞中均有表达,激活后主要分布于细胞核中。Snail 在细胞质和胞核中均有表达,阳性染色呈明黄色或棕黄色颗粒。与对照组相比, NF- κ B 在试验组中的表达明显升高 (0.159 ± 0.05 vs. 0.147 ± 0.03 , $t=3.104$, $P=0.018$); Snail 的表达也明显增高 (0.409 ± 0.073 vs. 0.154 ± 0.069 , $t=51.898$, $P=0.000$); Vimentin 分布于间质细胞胞质中,

在宫腔粘连患者子宫内膜的腺上皮中表达有上升 (0.169 ± 0.06 vs. 0.132 ± 0.02 , $t=3.459$, $P=0.007$); E-cadherin 为上皮细胞标志物,主要分布于上皮细胞胞膜,在宫腔粘连患者内膜组织中,表达降低 (0.089 ± 0.113 vs. 0.162 ± 0.054 , $t=-5.472$, $P=0.001$), 如图 2 所示。



a: 与对照组相比, $P<0.05$; b: 与对照组相比, $P<0.01$; c: 与对照组相比, $P=0.000$

图 2 免疫组化检测 IUAs 组和对照组患者子宫内膜中 NF- κ B、Snail、Vimentin、E-cadherin 蛋白的表达

2.3 Western blot 检测 NF- κ B 和 Snail、Vimentin、E-cadherin 的蛋白表达水平

收集对照组与宫腔粘连组患者子宫内膜组织提取总蛋白和核蛋白,用 Western blot 检测 NF- κ B、Snail、E-cadherin 和 Vimentin 的表达。与对照组相比, NF- κ B 的表达明显升高 (2.478 ± 0.279 vs. 1.459 ± 0.323 , $t=3.505$, $P=0.013$), Snail 的表达也明显上升 (2.801 ± 0.502 vs. 1.218 ± 0.313 , $t=4.678$, $P=0.005$); Vimentin 的表达明显高于对照组 (3.581 ± 0.650 vs. 1.756 ± 0.260 , $t=4.513$, $P=0.006$); E-cadherin 的表达则在试验组中降低 (1.324 ± 0.617 vs. 2.784 ± 0.647 , $t=-2.852$, $P=0.023$), 如图 3 所示。

2.4 脂多糖促进细胞形态改变

培养永生化人子宫内膜腺上皮细胞,经免疫荧光鉴定显示上皮细胞标志物角蛋白阳性(图 4),显微镜下细胞排列紧密,呈鹅卵石样。经浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ LPS 作用 24 h 后细胞形态发生改变,细胞间连接变松散,细胞形态向间质细胞变化(图 4)。Western blot 进一步检测 LPS 刺激后蛋白表达量的变化,发现 NF- κ B 激活明显增多 (0.156 ± 0.258 vs. 0.066 ± 0.138 , $t=5.315$, $P=0.003$), EMT 相关蛋白 Snail 的表达同样有异常升高 (0.329 ± 0.056 vs. 0.529 ± 0.032 , $t=5.015$, $P=0.004$), 如图 5 所示,其机制有待进一步研究。

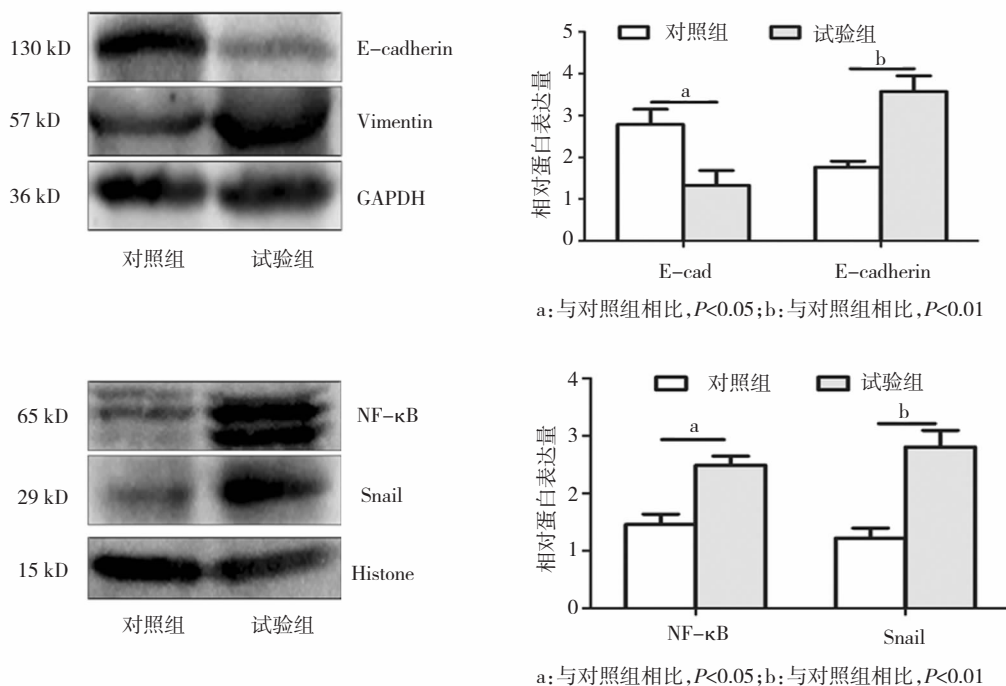


图3 Western blot 检测 IUAs 组和对照组患者子宫内膜中 NF-κB、Snail、Vimentin、E-cadherin 蛋白的表达以及各组相对表达量

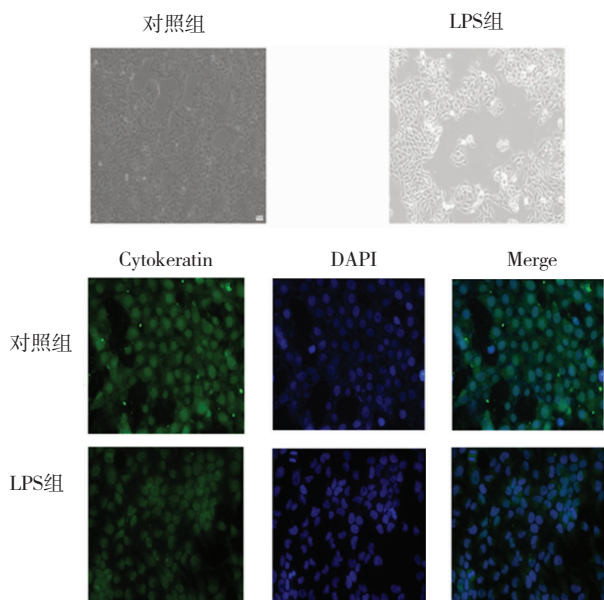


图4 LPS 组和对照组细胞形态变化以及细胞免疫荧光鉴定

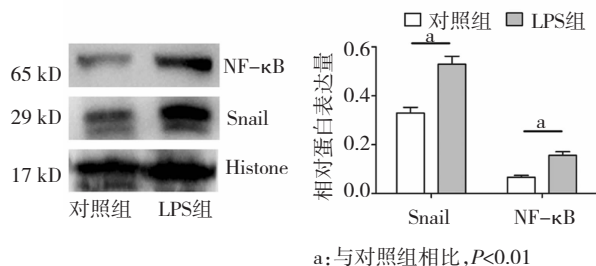


图5 Western blot 检测 LPS 组和对照组细胞中 NF-κB、Snail、Vimentin、E-cadherin 的蛋白表达以及各组相对表达量

3 讨论

子宫内膜有强大的再生修复能力,在基底膜损伤后由附近子宫内膜细胞爬行迁移至损伤处修复内膜,但宫腔粘连患者的子宫内膜损伤后由纤维组织增生取代,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)堆积是纤维化形成的重要原因^[7-8]。目前针对宫腔粘连的治疗主要为宫腔镜下宫腔粘连切除术,但经过治疗后中度患者妊娠率为 66.0%,而重度患者妊娠率仅为 31.9%^[9],亟需进一步研究。

EMT 是指成熟的上皮细胞在诱导因子的作用下失去上皮细胞特性向间质细胞转变^[10],主要表现为细胞和基底部的连接被破坏,细胞形态由立方形细胞向成纤维细胞转变^[11],同时伴有上皮细胞标志物 E-cadherin 表达降低,间质细胞标志物波形蛋白 Vimentin 升高^[6]。长期慢性炎症是 EMT 发生的重要原因,也是纤维化形成的重要驱动因素^[5,12],而 NF-κB 作为重要的炎症调节因子^[13],在其中扮演了重要角色。多篇文献报道 NF-κB 介导的 EMT 直接或间接参与了肝纤维化^[14]、肺纤维化以及肾纤维化^[15]形成。锌指蛋白 Snail 是重要的转录调节因子,是控制上皮间质化转变的主要蛋白,在纤维化形成中有重

要意义^[16]。本研究发现宫腔粘连患者子宫内膜中NF- κ B 和 Snail 的表达均上升。在用 LPS 建立的 EMT 细胞模型中^[17-19],除了细胞形态的变化以及上皮细胞标志物角蛋白的降低,本课题组同样也发现了NF- κ B 和 Snail 的异常表达,结果提示在子宫内膜中 NF- κ B 可能通过 EMT 参与了宫腔粘连的发生。

E-cadherin 是钙依赖的细胞表面粘连蛋白,主要参与上皮细胞间的连接,对维持上皮细胞的稳定性以及正常的细胞功能有重要作用^[20]。Snail 可抑制 E-cadherin 表达^[21],使得细胞间连接变弱,促进 EMT。Vimentin 主要存在于间质细胞中,当上皮细胞向间质细胞转变时,其表达增加。本实验发现在宫腔粘连患者子宫内膜上皮细胞黏附蛋白 E-cadherin 表达减少,以及间质细胞标志物 Vimentin 表达增加,由以上结果本课题组提出假设,宫腔粘连患者的子宫内膜在爬行修复的过程中出现了细胞类型的变化,长期的慢性炎症使得子宫内膜腺上皮细胞转变为成纤维细胞和(或)肌成纤维细胞,使得细胞外基质分泌增多堆积,纤维形成。本试验采用了永生化人子宫内膜细胞,与原代子宫内膜细胞存在一定差异,且缺少体内试验支撑,需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Yu D, Wong YM, Cheong Y, et al. Asherman syndrome—one century later[J]. Fertility and Sterility, 2008, 89(4): 759–779.
- [2] 张红红, 李文. 宫腔粘连的治疗策略及进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2018, 38(3): 248–251.
- [3] 袁 瑞, 周 柳. 宫腔粘连的分类方法与评价[J]. 实用妇产科杂志, 2017, 33(10): 723–726.
- [4] López-Nouoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: An alliance towards organ fibrosis and cancer progression[J]. EMBO Molecular Medicine, 2009, 1(6–7): 303–314.
- [5] Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes[J]. Cell, 2010, 140(6): 821–832.
- [6] Ying J, Zhou H, Liu P, et al. Aspirin inhibited the metastasis of colon cancer cells by inhibiting the expression of toll-like receptor 4 [J]. Cell & Bioscience, 2018, 8: 1.
- [7] Chuang PY, Menon MC, He JC. Molecular targets for treatment of kidney fibrosis[J]. Journal of Molecular Medicine, 2013, 91(5): 549–559.
- [8] Gonzalez DM, Medici D, Hospital RI, et al. Signaling mechanisms of the epithelial–mesenchymal transition[J]. Sci Signal, 2015, 7(344): re8.
- [9] Zupi E, Centini G, Lazzeri L. Asherman syndrome: an unsolved clinical definition and management[J]. Fertility and Sterility, 2015, 104(6): 1380–1381.
- [10] Stone RC, Pastar I, Ojeh N, et al. Epithelial–mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis[J]. Cell Tissue Res, 2017, 365(3): 495–506.
- [11] Wu Y, Zhou BP. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion[J]. British Journal of Cancer, 2010, 102(4): 639–644.
- [12] Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation[J]. Cell, 2010, 140(6): 871–882.
- [13] Pires BRB, Silva RCMC, Ferreira GM, et al. NF- κ B: two sides of the same coin[J]. Genes, 2018, 9(1): E24.
- [14] Zhao Y, Zhu R, Sun Y. Epithelial–mesenchymal transition in liver fibrosis[J]. Biomedical Reports, 2016, 4(3): 269–274.
- [15] Tennakoon AH, Izawa T, Kuwamura M, et al. Pathogenesis of type 2 epithelial to mesenchymal transition (EMT) in renal and hepatic fibrosis[J]. Journal of Clinical Medicine, 2015, 5(1): E4.
- [16] Wu Y, Deng J, Rychahou PG, et al. Stabilization of snail by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion [J]. Cancer Cell, 2009, 15(5): 416–428.
- [17] Zhao L, Yang R, Cheng L, et al. LPS-induced epithelial–mesenchymal transition of intrahepatic biliary epithelial cells[J]. Journal of Surgical Research, 2011, 171(2): 819–825.
- [18] Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells[J]. Journal of Clinical Investigation, 2009, 119(6): 1417–1419.
- [19] Cheng ZX, Sun B, Wang SJ, et al. Nuclear factor- κ B-dependent epithelial to mesenchymal transition induced by HIF-1 α activation in pancreatic cancer cells under hypoxic conditions[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23752.
- [20] Ping FM, Liu GJ, Liu ZJ, et al. Expression of RKIP, E-cadherin and NF- κ B p65 in esophageal squamous cell carcinoma and their correlations[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2015, 8(9): 10164–10170.
- [21] Peinado H, Ballestar E, Esteller M, et al. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/Histone snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/Histone deacetylase1 (HDAC1)/HDAC2 complex[J]. Molecular and Cellular Biology, 2004, 24(1): 306–319.

(责任编辑:唐秋姗)