

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002039

芯片技术分析卵巢子宫内膜异位症外泌体 microRNA 表达差异

王礼贤¹, 胡月阳², 李 琰³, 吴建华², 康 山⁴

(河北医科大学第四医院 1. 妇产超声科; 2. 实验动物中心; 3. 分子生物室; 4. 妇科, 石家庄 050011)

【摘要】目的:探讨卵巢子宫内膜异位症(ovarian endometriosis, OEM)外泌体微小 RNA(miRNA)的表达谱。**方法:**采用芯片技术对 3 例 OEM 患者及 3 例健康对照者的在位内膜间质细胞外泌体 miRNA 进行分析,筛选出组间差异 miRNA。**结果:**获得存在差异表达 miRNA 共 12 条,其中 hsa-miR-6829-5p、hsa-miR-5188、hsa-miR-4430、hsa-miR-584-5p、hsa-miR-4485-5p、hsa-miR-4257 在实验组表达上调,hsa-miR-188-5p、hsa-miR-4741、hsa-miR-4516、hsa-miR-1229-5p、hsa-miR-7150、hsa-miR-5787 表达下调。对表达差异较大的外泌体 miRNA 进行靶基因预测及其基因功能(gene ontology, GO)分析和信号通路(pathway)分析,发现靶基因聚集的生物学功能多数参与生物进展过程的调控。**结论:**OEM 患者与健康对照者的在位内膜间质细胞外泌体 miRNA 存在着差异性表达。差异性表达的 miRNA 特异性很高,对进一步阐明该疾病的发病机制和寻找新的诊断标记物具有重要意义。

【关键词】卵巢子宫内膜异位症;外泌体;微小 RNA**【中图分类号】**R711.71**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-11-06

Differential expression profiles of exosomal microRNAs in ovarian endometriosis based on the microarray technique

Wang Lixian¹, Hu Yueyang², Li Yan³, Wu Jianhua², Kang Shan⁴

(1. Department of Gynecology and Obstetrics Ultrasonography; 2. Laboratory Animal Center; 3. Department of Molecular Biology; 4. Department of Gynecology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression profile of exosomal microRNAs(miRNAs) in ovarian endometriosis(OEM). **Methods:** The microarray technique was used to analyze the exosomal miRNAs of eutopic endometrial stromal cells in three patients with OEM and 3 healthy controls, in order to screen out the differentially expressed miRNAs. **Results:** A total of 12 differentially expressed microRNAs were screened out; hsa-mir-6829-5p, hsa-mir-5188, hsa-mir-4430, hsa-mir-584-5p, hsa-mir-4485-5p, and hsa-mir-4257 were up-regulated in the case group, while hsa-mir-188-5p, hsa-mir-4741, hsa-mir-4516, hsa-mir-1229-5p, hsa-mir-7150, and hsa-mir-5787 were downregulated. Target gene prediction, gene ontology analysis, and pathway analysis were performed for exosomal miRNAs with significant differential expression, and the results showed that most of the biological functions of target gene aggregation were involved in the regulation of biological progression. **Conclusion:** There are differentially expressed exosomal miRNAs between OEM patients and healthy controls. The differentially expressed miRNAs have high specificity and can help to further clarify the pathogenesis of OEM and search for new diagnostic markers.

【Key words】ovarian endometriosis; exosome; microRNA

子宫内膜异位症(endometriosis, EMT)是一种良性的妇科疾病,指具有活性的子宫内膜组织(腺体

和间质)出现在子宫腔以外的部位,虽是良性疾病,但却具有转移、种植及侵袭等类似恶性肿瘤的生物学行为,是引起盆腔粘连、疼痛及不孕的主要原因之一,在育龄妇女中发病率为 10%以上。虽然每年都有大量针对 EMT 发病机制的研究报道,但对其明确的分子机制却知之甚少。目前大量的病因学研究都是基于 Sampson 的经血逆流学说,然而却不能解释多数女性存在经血逆流现象,却只有少数人发

作者介绍:王礼贤, Email: 247888324@qq.com,

研究方向:妇产。

通信作者:康 山, Email: ksjq62cn@sina.com。

基金项目:河北省卫生和计划生育委员会医学科学研究重点课题资助项目(编号:20180506)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190325.1736.012.html>
(2019-03-26)

病^[1]。因此有必要对 EMT 转移、种植等分子机制进行深入研究,不仅可完善其发病机制,更有助于确定治疗的潜在分子靶点。

内膜碎片随经血逆流进盆腔,种植于卵巢、腹膜表面等处,必经粘附、侵袭和血管生成 3 个重要的过程。与肿瘤的发生发展相似,逆流的内膜组织细胞与周围微环境存在着“种子”与“土壤”的关系。内膜组织细胞在微环境中存活必须要其环境中的内皮细胞、成纤维细胞等的协助和复杂的信号转导网络调控^[2]。

外泌体作为细胞间通讯的重要介质,引起了研究人员广泛的重视。外泌体可由多种细胞分泌,是一类脂质双分子层的膜性颗粒,直径 30~150 nm,其内含物包括具有活性的蛋白质、信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 及微小 RNA (microRNA, miRNA) 等,参与细胞间的信号传递,作用于靶细胞,调控其增殖、分化及凋亡等病理生理过程。近期研究发现^[3],细胞分泌的外泌体具有异质性,可作为诊断标记和治疗靶点。外泌体来源的 miRNA 能够发挥类似于 RNA 干扰的作用,调节相应靶基因的功能。另外,外泌体来源的 miRNA 相对稳定,并能一定程度代表其分泌细胞的 miRNA 水平。许多研究表明外泌体源性 miRNA 与多种疾病的发生和发展密切相关,但是国内外对于 EMT 外泌体源性 miRNA 的研究报道较少,现在正处于起步阶段,故本研究拟通过对卵巢子宫内膜异位症 (ovarian endometriosis, OEM) 在位内膜基质细胞和对照正常内膜的基质细胞所分泌的外泌体进行针对 miRNA 表达谱的分析,筛选出可能参与调控发病的 miRNA,为进一步研究 EMT 的发病机制、早期诊断和治疗提供理论基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象

OEM 患者的子宫内膜标本 (EMT 组) 的取自 2017 年 5 月至 2017 年 8 月河北医科大学第四医院妇科因卵巢子宫内膜异位囊肿行囊肿剥除术的患者 3 例,年龄 30~36 岁,平均 32.7 岁,另选取同期健康女性 3 例 (对照组),年龄 32~36 岁,平均 33.6 岁;所有入组者既往月经规律,月经周期 28~32 d,经期 5~7 d,3 个月内未服用过激素类药物,亦无其他身体疾病。刮取其入组者子宫内膜,均经病理学证实处于分泌期内膜,且除外子宫内膜息肉、子宫内膜增生等疾病。参与的 EMT 患者及对照者均已签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清 (BI 公司)、DMEM/F12 培养基 (上海赛默飞世尔科技有限公司)、胶原酶 I (北京索莱宝科技有限公司)、鼠抗人细胞角蛋白、波形蛋白单克隆抗体 (美国 Zymed 公司)、DAB 显色试剂盒 (北京中山生物工程公司)、ExoQuick 外泌体提取试剂盒 (美国 SBI 公司)、miRNA Complete Labeling and Hyb Kit 试剂盒和 Gene Expression Wash Buffer Kit 试剂盒 (美国 Agilent 公司)、MicroBioSpin 6 Columns 试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 人子宫内膜间质细胞的分离、纯化和原代培养 子宫体切除后立即在无菌操作下纵剖宫体,刮取子宫内膜组织,即刻装入 4 °C 无菌 DMEM 液 20 mL 的培养瓶中,即送实验室培养。全部标本均留取少部分用 10% 甲醛液固定后送组织学检查,以除外内膜病变。依据 wolff 等的细胞培养方法进行分离、研磨、消化、过滤,然后离心法分离间质细胞,常规进行传代及换液。

1.3.2 人子宫内膜间质细胞的鉴定 细胞计数后,用福尔马林固定制作细胞爬片,随后进行免疫细胞化学染色:PBS 反复冲洗细胞爬片 3 次共 15 min,浸入无水乙醇:丙酮 (1:1) 4 °C 固定 15 min。3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min,蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min,滴加封闭用血清,室温孵育 10~15 min,甩去多余的液体。加入一抗 (细胞角蛋白、波形蛋白抗体) 50 μL, 37 °C 孵育 2 h。PBS 冲洗,加入二抗,37 °C 孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次,15 min。加入 DAB 显色液,置于超微显微镜下观察,适当着色后以流水冲洗终止反映。苏木素复染, PBS 冲洗,常规脱水,3% 明胶封片,在光学显微镜下观察。

1.3.3 外泌体的分离 按 4:1 比例在培养基中加入 Exo-Quick 试剂混匀,4 °C 静置 30 min,1 500 × g 离心 30 min,管底可见沉淀,100 μL PBS 重悬沉淀。

1.3.4 外泌体中总 RNA 的抽提与纯化 采用 Qiagen serum/Plasma Kit,根据生产厂商提供的标准操作流程进行外泌体中总 RNA 抽提,抽提所得总 RNA 经 Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, US) 电泳质检合格后备用。

1.3.5 miRNA 芯片分析 采用上海博豪生物公司的 miRNA Microarray 表达谱芯片进行实验。具有实验过程简要如下:样品进行荧光标记;芯片杂交,在滚动杂交炉中,55 °C,20 r/min,滚动杂交 20 h。杂交完成后在洗缸中洗片。芯片结果采用 Agilent Microarray Scanner 进行扫描,用 Feature Extraction software 10.7.1.1 读取数据,最后采用 R 语言程序包进行归一化处理,所用的算法为 Quantile。

1.3.6 芯片结果生物信息学分析 通过 TargetScan、miRanda、PicTar 三种软件预测 miRNA 靶基因,利用 DAVID 对靶基因进行基因功能 (gene ontology, GO) 分析和信号通路 (pathway) 分析,并通过统计分析计算出一系列基因中最为显著的靶基因; $P < 0.05$ 作为显著靶基因的阈值。

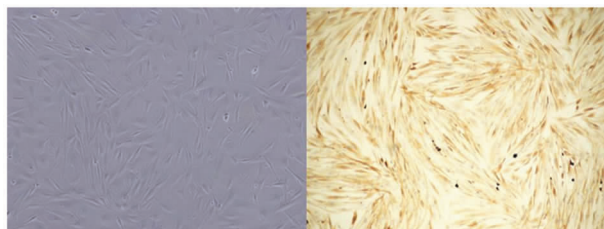
2 结果

2.1 原代培养子宫内膜间质细胞的形态学特点

原代培养后第 2 天显微镜下观察正常人子宫内膜间质细胞(对照组)贴壁生长,细胞较大,轮廓清晰,多为突起的纺锤形或星形的扁平状结构,核仁较大且明显,第 5 天时细胞突起变短,呈纺锤形、梭形或不规则三角形细胞间联系较紧密,呈漩涡状或放射走行,此时期细胞生长较旺盛(图 1A)。

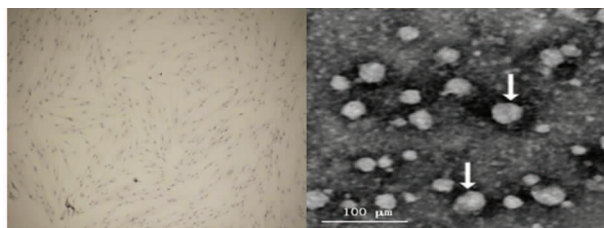
2.2 间质细胞的鉴定

光学显微镜下观察细胞免疫组织化学染色:波形蛋白表达为强阳性,呈棕黄色,位于细胞质内,阳性颗粒在细胞质内分布较均匀,细胞核内染色为阴性,细胞外亦未见阳性表达,细胞核经苏木精复染显示为蓝色,说明细胞来源于外胚间充质(图 1B)。角蛋白表达显示为阴性(图 1C)。



A. 倒置显微镜下子宫内膜间质细胞的形态 (20 ×)

B. 子宫内间质细胞波形蛋白染色 (20 ×)



C. 子宫内间质细胞角蛋白染色 (20 ×)

D. 透射显微镜下子宫内膜间质细胞外泌体的形态

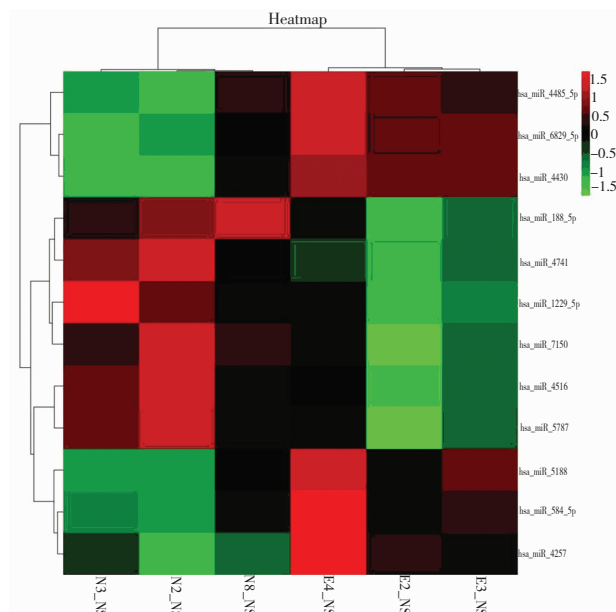
图 1 子宫内膜间质细胞的形态、鉴定及外泌体的形态

2.3 间质细胞外泌体的形态学特点

用 ExoQuick 试剂盒提取间质细胞中的外泌体后,用 PBS 稀释,经负染后于透射电镜下观察,可见大小不均一的圆形或类圆形透亮区,此为囊泡状的外泌体,其外层为脂质包裹,直径在 30nm-200nm 之间(图 1D)。

2.4 间质细胞外泌体 miRNA 的芯片分析结果

在该芯片中,实验组与对照组存在差异表达 miRNA。所检测的 6 例临床标本中,存在差异表达 miRNA 共 12 条,其中 hsa-miR-6829-5p、hsa-miR-5188、hsa-miR-4430、hsa-miR-584-5p、hsa-miR-4485-5p、hsa-miR-4257 在实验组表达上调,hsa-miR-188-5p、hsa-miR-4741、hsa-miR-4516、hsa-miR-1229-5p、hsa-miR-7150、hsa-miR-5787 表达下调(图 2)。



X轴:标本例数;Y轴:差异表达的 microRNA;图中绿色代表表达下调,红色代表表达上调

图 2 OEM 的子宫内膜与正常内膜的外泌体差异 miRNA 表达的热图

2.5 差异表达的 microRNA 生物信息学分析

通过 TargetScan、miRanda、PicTar 3 种软件,对差异表达 miRNA 对应的靶基因进行了预测,被所列软件同时预测到的靶基因共 4 601 个。经过对靶基因筛选,发现其中很多已经报道与 EMT 密切相关的功能基因,调控这些功能基因的 miRNA 也包含本课题组所找到的差异表达 miRNA(表 1)。结果显示,这些 miRNA 可能是 OEM 发生发展过程中的关键 miRNAs。

表 1 OEM 的外泌体相关 miRNA 对应的靶基因

miRNA	对应的靶基因
hsa-miR-188-5p	TNFSF4 MAPK1IP1L
hsa-miR-4741	LDLR HLA-B IL-6 GCKR GDF5 ERBB2 NAT8 PRODH MAPK1 FTO
hsa-miR-6829-5p	GNA12 COMT PRODH PARVB NCOA1 SLC7A5 VEGFA

2.6 靶基因 GO 分析与 Pathway 分析

通过对差异表达的 miRNA 靶基因进行了 GO 分析,可见靶基因的生物学功能比较广泛,包括跨膜受体蛋白酪氨酸激酶激活物活性、RNA 聚合酶 II 启动子转录负调控、负调控白介素-4 的产生等(图 3)。经过进一步 Pathway 分析,发现某些显著的分子功能通路被富集:无翅型 MMTV 整合位点家族成员 (wingless-type MMTV integration site family members, Wnt) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路等(图 4)。

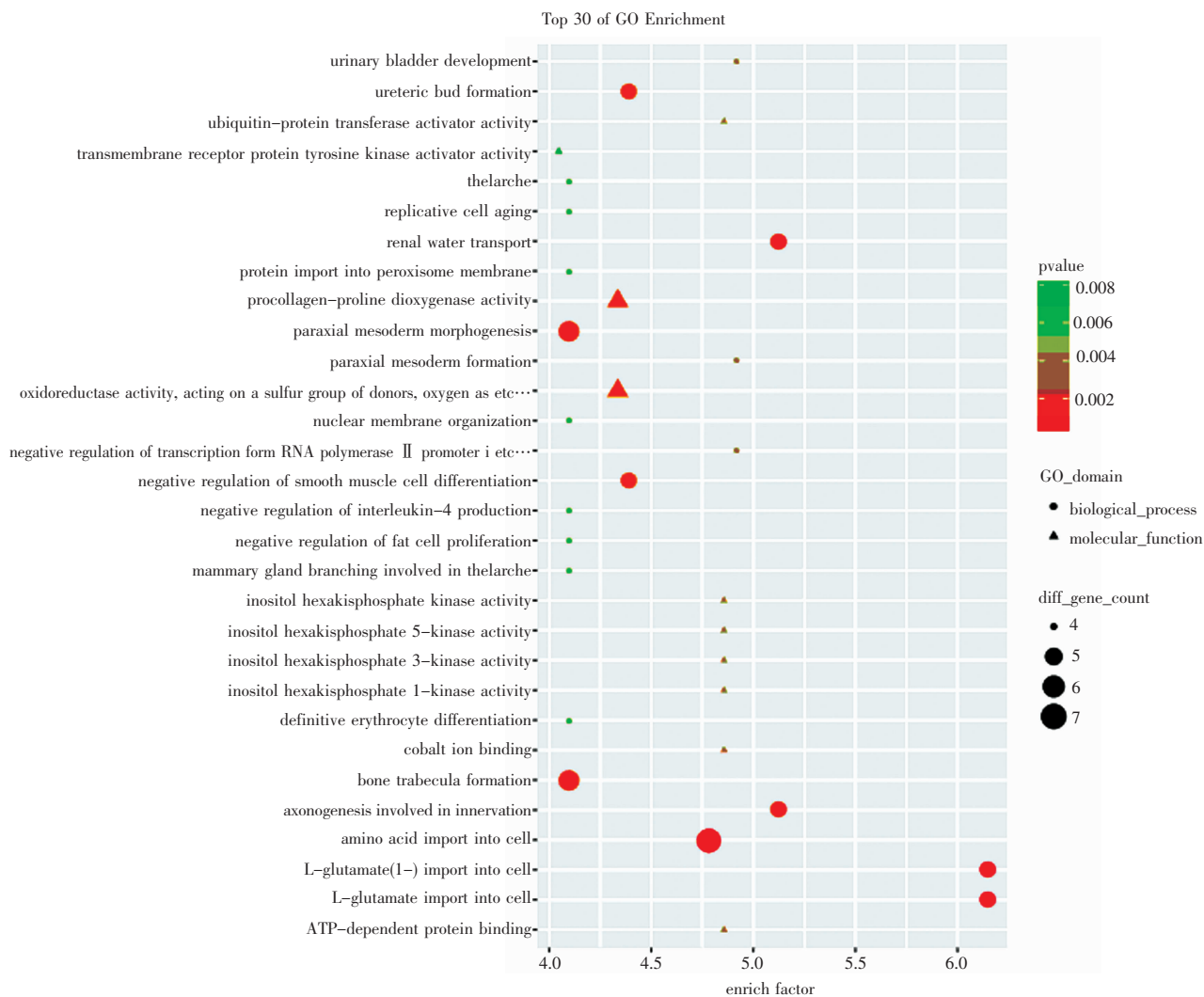


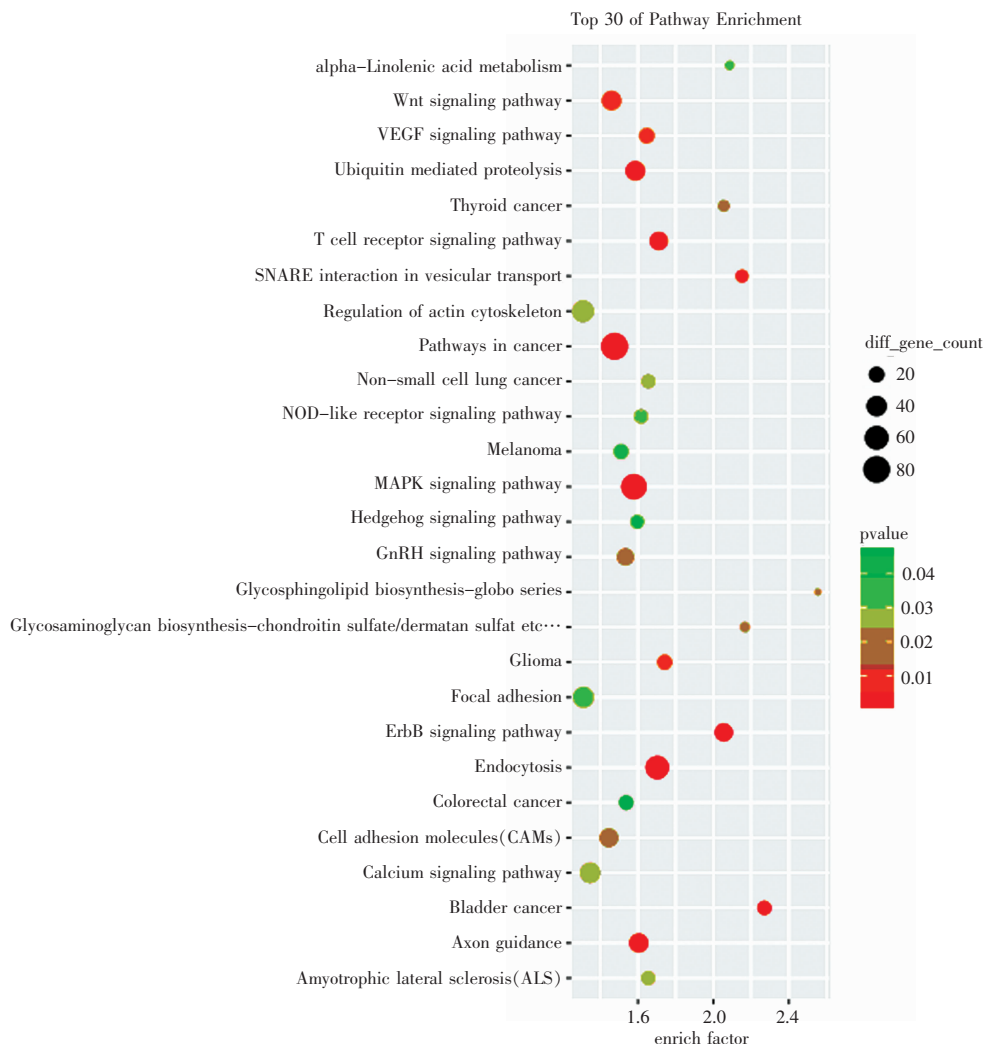
图3 OEM与正常内膜的外泌体差异 miRNA 靶基因的 GO 分析

3 讨论

外泌体源性 miRNA 作为重要的调控因子受到广泛重视,在不同细胞微环境刺激下,细胞能主动、特异包裹 miRNA,并通过外泌体的形式分泌到细胞外环境中,作用于相应靶细胞,介导细胞间的信号转导,参与包括癌症在内的多种疾病的发生发展。许多研究表明,外泌体源性 miRNA 与许多肿瘤密切相关,可能成为其特异性的生物标记物,可用于肿瘤的早期诊断。Taylor 等^[4]发现上皮细胞粘附分子阳性的外泌体在卵巢的良恶性肿瘤内均有表达,并对外泌体源性 miRNA 的表达谱研究,发现有 8 种 miRNA

表达具有统计学差异。Cazzoli 等^[5]研究发现外泌体中 miR-378、miR-200b-5p 可以作为肺癌的生物标志物,且有较高的敏感性及特异性。此外,肿瘤细胞分泌的外泌体中特异性 miRNA 具有免疫抑制的特点,可作用于特异性 T 细胞,从而促进肿瘤的发生。如宫颈癌的发生可能与 miR-21 及 miRNA-146a 有关^[6]。外泌体源性 miRNA 还与肿瘤内皮细胞、血管生成、肿瘤的侵袭和转移之间有关。例如肿瘤细胞外泌体中特异的 miR-92a,通过调控靶蛋白整合素 $\alpha 5$ 的表达,刺激肿瘤细胞的增殖、迁移,促进血管生成,参与肿瘤发生和发展^[7]。因此,外泌体源性 miRNA 或将成为肿瘤靶向治疗的新方向。

关于 EMT 可能的发病原因学说众多,但确切



X轴:富集因子;Y轴:被富集的分子功能通路

图4 OEM与正常内膜的外泌体差异miRNA靶基因的Pathway分析

机制仍不明确。目前被广泛接受的是 Sampson 的种植学说,即经血经过输卵管逆流入盆腔,逃脱免疫监视,在腹腔内粘附、种植和生长。但它不能解释90%的经期妇女具有经血逆流现象,只有10%左右的妇女患有此病。郎景和等提出了“在位内膜决定论”,即不同个体的内膜碎片能否在子宫腔外的地方粘附、种植和生长,起关键作用的是在位内膜^[8]。众所周知,EMT虽是良性疾病,但却具有转移、种植及侵袭等类似恶性肿瘤的生物学行为,Harp等^[9]的研究证实了EMT患者子宫内膜间质细胞释放的外泌体,在子宫腔和腹膜微环境中通过自分泌/旁分泌的方式,促进血管生成。外泌体可通过血流转移进入其他组织,因此,有理由相信其可随逆流的经血进

入腹腔,调控异位内膜的转移、种植。

首先,本课题组通过形态学分析证实了人子宫内膜间质细胞可分泌外泌体,并且EMT患者在位内膜间质细胞与对照组在位内膜间质细胞所分泌的外泌体无形态学差异。通过收集细胞培养基,分离、纯化外泌体,进行miRNA表达谱芯片分析,发现与对照组相比,EMT患者在位内膜基质细胞外泌体中的miRNA确实存在差异表达,结果发现6个miRNA表达上调,6个miRNA表达下调,由于外泌体源性的miRNA比细胞中普遍存在的miRNA更为稳定,故这些差异性外泌体源性miRNA可作为EMT新的生物学标记物。到目前为止,这12个miRNA中研究较多的是miR-584及miR-188,其余miRNA

的功能尚不明确。胞浆内 miR-584 已被证实存在甲状腺癌中高表达,miR-584 可抑制肿瘤细胞凋亡^[10]。miR-188 作为抑癌基因,在胶质瘤中,过表达的 miR-188 抑制了 β -连环蛋白的表达,抑制胶质瘤细胞增殖、细胞周期 G1-S 转换^[11]。这些都为我们今后对 EMT 发生机制的研究提供了新思路。外泌体被靶细胞吸收后,miRNAs 可被重新编辑,与靶基因相互作用,参与调控基因的转录与翻译。本研究通过软件对差异表达 miRNA 对应的靶基因进行了预测,其中 miRNA-188-5p 调控的基因 TNFSF4,miR-4741 调控的基因 IL-6、MAPK1、FTO,以及 miR-6829-5p 调控的基因 COMT、VEGFA 与 EMT 的发生和发展相关之外^[12-15],其余基因在 EMT 中的作用尚无相关报道,仍需进一步研究。本研究又对差异 miRNA 靶基因的信号通路进行分析发现,表达差异的 miRNA 其靶基因主要集中在 Wnt 信号通路和 MAPK 信号通路上,这 2 个信号通路均与 EMT 的发生和发展有着密切的联系。例如:EMT 的发生发展与雌激素水平密切相关,雌激素可以通过启动 Wnt/ β -连环素通路参与疾病的发生和发展^[16];MAPK 信号通路具有介导细胞的粘附、刺激新生血管的生成、抑制细胞的凋亡等功能^[17],最终促进 EMT 的发生和发展。

本研究发现 OEM 患者的在位内膜间质细胞中外泌体源性 miRNA 确实存在差异表达,这对 EMT 的早期诊断和治疗提供了新的思路,但本研究只是初步的探索,得到的数据与疾病的关系还有待于进一步的证实和深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 吴艳欣,王宁宁,谢洪哲. HLA-G14bp 基因多态性和子宫内膜 HLA-G 表达水平与子宫内膜异位症的关系[J]. 新医学,2013,44(9): 656-660.
- [2] 马齐襄,朱晓丹,胡凯文,等.肿瘤转移的种子与土壤学说新认识[J].肿瘤防治研究,2015,42(10):1049-1053.
- [3] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014, 30: 255-289.
- [4] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(1): 13-21.
- [5] Cazzoli R, Buttitta F, Di Nicola M, et al. MicroRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2013, 8(9): 1156-1162.
- [6] Liu J, Sun H, Wang X, et al. Increased exosomal microRNA-21 and microRNA-146a levels in the cervicovaginal lavage specimens of patients with cervical cancer[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(1): 758-773.
- [7] Umez T, Ohyashiki K, Kuroda M, et al. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs[J]. Oncogene, 2013, 32(22): 2747-2755.
- [8] 郎景和. 子宫内异位症的研究与设想[J]. 中华妇产科杂志, 2003, 38(8): 478-480.
- [9] Harp D, Driss A, Mehrabi S, et al. Exosomes derived from endometrial stromal cells have enhanced angiogenic effects in vitro[J]. Cell Tissue Res, 2016, 365(1): 187-196.
- [10] Orlandella FM, Di Maro G, Ugolini C, et al. TWIST1/miR-584/TUSC2 pathway induces resistance to apoptosis in thyroid cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(43): 70575-70588.
- [11] Li N, Shi H, Zhang L, et al. miR-188 inhibits glioma cell proliferation and cell cycle progression through targeting β -catenin[J]. Oncol Res, 2018, 26(5): 785-794.
- [12] Lu JS, Wang H, Yuan FF, et al. Lack of association of tumor necrosis factor superfamily member 4 (TNFSF4) gene polymorphisms (rs3850641 and rs17568) with coronary heart disease and stroke: a systematic review and meta-analysis[J]. Anatol J Cardiol, 2018, 19(2): 86-93.
- [13] Kang YJ, Jeung IC, Park A, et al. An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal fluid of patients with endometriosis via regulation of SHP-2 expression[J]. Hum Reprod, 2014, 29(10): 2176-2189.
- [14] Tong X, Li Z, Wu Y, et al. COMT 158G/A and CYP1B1 432C/G polymorphisms increase the risk of endometriosis and adenomyosis: a meta-analysis[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014, 179: 17-21.
- [15] Egorova A, Petrosyan M, Maretina M, et al. Anti-angiogenic treatment of endometriosis via anti-VEGFA siRNA delivery by means of peptide-based carrier in a rat subcutaneous model[J]. Gene Ther, 2018, 25(8): 548-555.
- [16] Tulac S, Nayak NR, Kao LC, et al. Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(8): 3860-3866.
- [17] Lee DH, Kim SC, Kim HG, et al. Effects of 17 β -estradiol on the release of monocyte chemoattractant protein-1 and MAPK activity in monocytes stimulated with peritoneal fluid from endometriosis patients[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2012, 38(3): 516-525.

(责任编辑:张辉洁)