

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.09.004

OPN 干预子宫内膜异位症腺上皮细胞中 NF- κ Bp65 表达及其对细胞侵袭性的影响*

白治苗¹, 卢玉凤¹, 杨眉¹, 李望舒¹, 哈春芳^{2 Δ}

(1. 宁夏医科大学, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院妇产科/宁夏生育力保持重点实验室, 银川 750004)

[摘要] **目的** 探讨子宫内膜异位症(EMS)患者在位内膜腺上皮细胞中骨桥蛋白(OPN)对核因子 κ B(NF- κ B)p65 表达的影响及其与细胞侵袭的关系。**方法** 原代分离培养 12 例 EMS 患者在位内膜腺上皮细胞。采用 OPN siRNA 干扰细胞 24 h 后收集, Western blot, RT-PCR 方法分别检测干预前、后细胞中 OPN、NF- κ Bp65 蛋白及其 mRNA 表达情况; Transwell 试验检测干预前、后细胞侵袭性的变化。采用相同剂量的无 RNA 酶水干预 EMS 患者在位内膜腺上皮细胞作为未干预组。**结果** 与干预前比较, OPN siRNA 干扰后细胞中 OPN 蛋白、mRNA 的表达明显下降($t_1=7.92, t_2=9.87, P<0.05$); 与未干预组比较差异无统计学意义($P>0.05$); OPN siRNA 干扰后细胞中 NF- κ Bp65 蛋白及 mRNA 的表达明显减弱($t_1=-2.13, t_2=-8.61, P<0.05$), 与未干预组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。OPN siRNA 干扰后原代腺上皮细胞的侵袭性明显降低($t=2.38, P<0.05$), 与未干预组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。OPN、NF- κ Bp65 在 EMS 患者在位内膜腺上皮细胞中的表达呈明显的正相关($r=0.87$)。**结论** OPN siRNA 沉默 EMS 患者腺上皮细胞中的 OPN 后 OPN、NF- κ Bp65 的表达及细胞的侵袭性均明显降低, 且二者呈明显正相关, 揭示二者极有可能在异位细胞的侵袭中发挥同步协调作用。

[关键词] 子宫内膜异位症; 骨桥蛋白; 核因子- κ Bp65**[中图分类号]** R574**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)09-1163-04

Expression of NF- κ Bp65 in glandular epithelial cells of endometriosis after OPN intervention and its influence on cell invasiveness*

Bai Zhimiao¹, Lu Yufeng¹, Yang Mei¹, Li Wangshu¹, Ha Chunfang^{2 Δ}

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. General Hospital of Ningxia Medical University/Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ningxia, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the influence of OPN in eutopic glandular epithelial cells of endometriosis on the NF- κ Bp65 expression and its relationship with the cell invasion. **Methods** The eutopic primary glandular epithelial cells in 12 cases of endometriosis were performed the primary isolation and culture. The cells were collected after 24 h OPN siRNA intervention. Western blot and RT-PCR methods were adopted to detect the expressions of OPN, NF- κ Bp65 protein and its mRNA before and after intervention. The Transwell experiment was used to detect the change of cell invasiveness before and after intervention. **Results** The expression of OPN protein and mRNA after interfering primary glandular epithelial cells by OPN siRNA was significantly decreased, and the difference was statistically significant ($t_1=7.92, t_2=9.87, P<0.05$). the expression of NF- κ B p65 protein and mRNA after OPN siRNA interfering primary glandular epithelial cells was obviously weakened, the difference was statistical significant ($t=2.38, P<0.05$). the invasiveness of primary glandular epithelial cells after OPN siRNA intervention was significantly decreased, the difference was statistically significant ($t=2.38, P<0.05$). The expression of OPN and NF- κ Bp65 had a significantly positive correlation in eutopic endometrial glandular epithelial cells ($r=0.87$). **Conclusion** The expression of OPN and NF- κ Bp65 is significantly decreased after OPN siRNA interfering eutopic endometrial glandular epithelial cells, therefore OPN most likely lead to the occurrence and development of endometriosis via the NF- κ B pathway.

[Key words] endometriosis; osteopontin; NF- κ Bp65

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)简称内异症,是指具有活性的子宫内膜组织(腺体和间质)出现于子宫内以外的部位,导致临床上常见的痛经或慢性盆腔痛、不孕等为主要临床症状的疾病,目前病因及发生机制尚不十分明了,因而临床缺乏有效的根治性治疗方法,是妇科医生亟待解决的难题之一^[1-2]。基础和临床研究显示 EMS 是一种子宫内膜活性增高所致的内膜异常性基因疾病,与内膜细胞的异地黏附和侵袭性增强有关^[3]。EMS 的黏附、侵袭、远处转移及术后易复发等特性类似于恶性肿瘤。肿瘤学研究显示,骨桥蛋白(osteopontin, OPN)通过与其受体结合后激活依赖 MAPK/PI3K 通路的核因子- κ B(NF- κ B)通路,进而促进细胞中尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)和基质金属蛋白酶 9(MMPs)的分泌,介导细胞侵

袭过程与细胞迁移,进而诱导肿瘤的发生与转移^[4]。因此国内外很多学者将血管生长因子或黏附分子 OPN、MMP9 及 NF- κ B 等与 EMS 的发生、发展联系起来,并揭示了这些因子可能与内膜的异位黏附、侵袭性相关^[5-6]。但二者的相关性及其与细胞侵袭性的确切机制不清。故本研究旨在通过 OPN siRNA 干扰原代腺上皮细胞探讨 OPN、NF- κ Bp65 与 EMS 发病及细胞侵袭性的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 标本获取 收集 2013 年 12 月至 2014 年 12 月于宁夏医科大学总医院妇产科因 EMS 行子宫全切除术患者 12 例,用棉拭子将宫腔内的黏液蘸掉,用手术刀的刀背刮取内膜,快速于

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160078)。 作者简介:白治苗(1991-),硕士,住院医师,主要从事妇科肿瘤方面的研究。

 Δ 通讯作者, E-mail: hachunfang@163.com。

低温下转移至细胞间,进行原代细胞分离培养。

1.1.2 纳入标准 所有研究对象的年龄 20~45 岁,平均(32.41±5.43)岁,患者手术前月经周期均正常(28~35 d),均处于Ⅱ期(按照 1985 年 AFS 提出的修正 EMS 分期法),近 3 个月均未接受过激素类药物的治疗,无生殖道炎症及其他妇科疾病,无慢性肝炎、糖尿病、肿瘤等慢性疾病。

1.2 方法

1.2.1 原代腺上皮细胞培养 选取 EMS 患者行子宫全切除术后的子宫,术后用棉拭子蘸除黏液,手术刀刀背刮取内膜,置于含 10 mL 培养液的灭菌小瓶中,内含 1% 胎牛血清、DMEM/F12(Penicillin 及链霉素各 100 U/mL),冰浴快速转运至实验室细胞间,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗掉新鲜的子宫内膜组织中的血液成分,用眼科剪将内膜剪成约 1 mm³ 大小的组织块,加入含有 0.25% 胶原酶/dispase(终浓度为 1 mg/mL)的培养液中,于 37 °C 用一次性吸管吹打消化 3 次,每次 10 min,加入含血清的培养液终止消化,500 r/30 s 离心,取上清液重复离心 5 次,沉淀中加入培养液,制成细胞悬液。细胞计数后,均匀将细胞接种于 60 mm 培养皿中,置于 37 °C 5%CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2.2 OPN siRNA 干扰 待上述原代细胞融合度为 70%~90% 时,进行 siRNA 干扰。分别用 500 μL Opti-MEM 无血清培养基稀释 10 μL TransLipid HL,500 μL Opti-MEM 无血清培养基稀释 10 μL OPN 特异性 siRNA 及干扰 siRNA(稀释前的 siRNA 浓度 20 μM),于室温静置 5 min 后,将稀释好的 OPN 特异性 siRNA(OPN siRNA 干预组)及干扰 siRNA(siRNA 干预组)与 TransLipid HL 轻柔混合后室温静置 20 min 后,将混合物分别加入含 5 mL Opti-MEM 无血清培养液的 60 mm 培养皿中,其中一组加入相同剂量无 RNA 酶水干预的培养液作为空白对照组(未干预组)。放入培养箱中培养 4~6 h 后更换培养液继续培养 24 h。

1.2.3 RT-PCR 总 RNA 的提取 直接在 60 mm 培养皿中加入 600 μL 裂解液 RZ 裂解细胞并反复抽打至溶液透明,将匀浆样品室温放置 5 min,加入 150 μL 氯仿,剧烈震荡 15 s 后室温放置 3 min,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,将水相转移至新的 Ep 中。加入 150 μL 无水乙醇,混匀后将溶液转入吸附柱 CR3 中,再次离心,弃掉收集管中的废液,向吸附柱 CR3 中加入 500 μL 去蛋白液 RD,离心,弃废液,将 CR3 放回收集管中,再次向吸附柱 CR3 中加入 500 μL 漂洗液 RW,室温静置 2 min,离心,弃废液,将吸附柱放入 2 mL 收集管中,离心去掉残余液体,最后将吸附柱 CR3 转入一个新的 1.5 mL 离心管中,加 30 μL 无酶的双蒸水,室温放置 2 min,4 °C 12 000 r/min 离心 2 min 后于 BioTek ELx808 酶标仪上行 RNA 纯度及浓度的测定。

1.2.4 Western blot 检测 按照凯基蛋白质说明书提取试剂盒提取细胞总蛋白,并于酶标仪中进行蛋白定量。根据待测蛋白分子的大小制备适宜浓度的 SDS 分离胶及浓缩胶,插入相应大小的梳子,加入相应分组中蛋白样品及标准蛋白标志物,电泳分离蛋白质后,转运蛋白于硝酸纤维素膜;载有蛋白的硝酸纤维素膜经 5% 脱脂牛奶封闭后,加入 NF-κBp65、OPN 及内参照 β-actin 等一抗 4 °C 过夜,经 TBST 换洗 1 次(5 min),5 次后加相应二抗孵育 2 h,增强型 ECL 显影,于 BIO-RAD 成像仪中曝光成像并测定各蛋白条带光密度值,计算相应的光密度比值。

1.2.5 穿膜实验(transwell) 待预先培养于 60 mm 培养皿中的 EMS 原代腺上皮细胞以及 OPN siRNA 干扰 24 h 后的细胞融合至 80%~90% 时,用 0.25% 的胰酶将其消化,采用无血清培养液将其制成细胞悬液,用一次性吸管吸取 1 滴进行细胞

计数后,将悬液加入小室中(细胞数目大约为 10⁵),于小室的下室中加入有血清的培养液后置于 37 °C,5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h,洗掉培养液,用棉拭子将小室正面的细胞轻轻擦掉后 PBS 冲洗 2~3 次,用无水乙醇固定 30 min 后 PBS 冲洗 2~3 次,0.4% 台盼蓝染色 10 min 后,将小室的膜固定于载玻片上在显微镜下进行细胞计数。

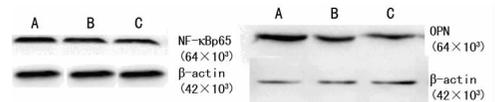
1.2.6 结果判定标准 (1)Western blot 结果分析:采用 BIO-RAD 成像仪扫描滴加 DAB 显色剂后的蛋白条带,成像并保存图片,采用软件 Quality One 进行灰度值扫描。(2)RT-PCR 结果分析:用 BIO-RAD 凝胶扫描系统分析摄像,用 Roche-Lightcycler 96 对产物进行半定量分析。(3)Transwell 结果:0.4% 台盼蓝染色 10 min 后,将小室膜刮下贴于载玻片上,滴加二甲苯,盖上盖玻片封片,置于 Leica DC 300F 正置显微镜下固定选取 16 个视野于 10 倍镜下进行细胞计数。

1.3 主要试剂 OPN siRNA、干扰 siRNA(上海 Invitrogen 贸易有限公司);TransLipid HL Transfection Reagent(北京全式金生物技术有限公司);细胞全 RNA 提取试剂盒(上海田根有限公司);RNA 反转录试剂盒(Thermol 公司);免疫荧光定量试剂盒(Thermol 公司);兔抗人 NF-κBp65、OPN 多克隆抗体分别由北京中杉生物工程公司、美国 Abcam 生物公司生产(稀释浓度分别为 1:100、1:80)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 医用统计学软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析、配对 *t* 检验、Pearson 相关系数等统计方法。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

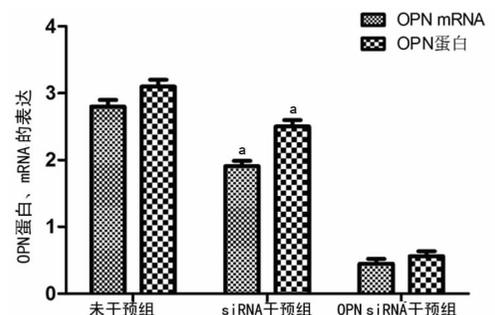
2 结果

2.1 OPN siRNA 干扰前后 OPN、NF-κBp65 蛋白表达比较 与 siRNA 干预组比较,OPN siRNA 干扰 EMS 患者在位内膜腺上皮细胞后 OPN 蛋白及 mRNA 明显下降(OPN 蛋白 3.10±0.26 vs. 0.40±0.07, *t*₁ = 7.92; OPN mRNA 2.80±0.25 vs. 0.30±0.08, *t*₂ = 9.87, 均 *P* < 0.05)。siRNA 干预组与未干预组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),见图 1~3、表 1。



A: 未干预组; B: siRNA 干预组; C: OPN siRNA 干预组。

图 1 OPN siRNA 干扰前后 OPN、NF-κBp65 蛋白在腺上皮细胞中的表达



a, *P* < 0.05, 与 OPN siRNA 干预组比较。

图 2 OPN siRNA 干扰前后 OPN 蛋白、mRNA 蛋白在腺上皮细胞中的表达

2.2 OPN siRNA 干扰前后 NF-κBp65 蛋白、mRNA 的表达比较 与 siRNA 干预组比较,OPN siRNA 干扰后细胞中 NF-κBp65 蛋白及 mRNA 的表达明显减弱,且差异具有统计学意义(NF-κBp65 蛋白 2.90±0.26 vs. 1.20±0.09, *t*₁ = -2.13, mRNA 3.50±0.28 vs. 1.30±0.10, *t*₂ = -8.61, 均 *P* <

0.05)。siRNA 干预组与未干预组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),见图 1、3、4、表 1。

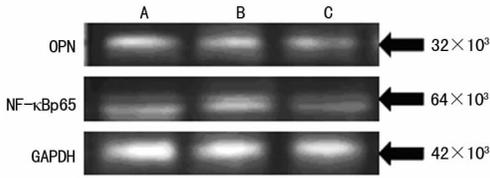
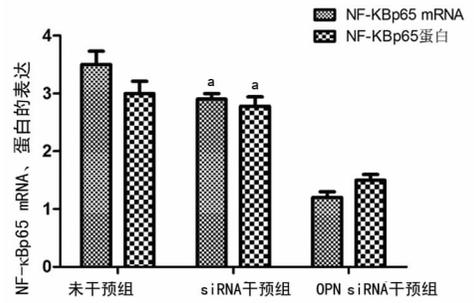


图 3 OPN siRNA 干扰前后 OPN、NF-κBp65 mRNA 在腺上皮细胞中的表达

2.3 OPN siRNA 干扰前后细胞侵袭性比较 与 siRNA 干预组比较,OPN siRNA 干扰后原代腺上皮细胞的侵袭性明显降低,差异有统计学意义 (65.0 ± 3.78 vs. 24.0 ± 1.56 , $t=2.38$, $P<0.05$),siRNA 干预组与未干预组比较,差异无统计学意义

($P>0.05$),见图 5、6、表 1。



^a: $P<0.05$,与 OPN siRNA 干预组比较。

图 4 OPN siRNA 干扰前后 NF-κBp65 蛋白、mRNA 在腺上皮细胞中的表达

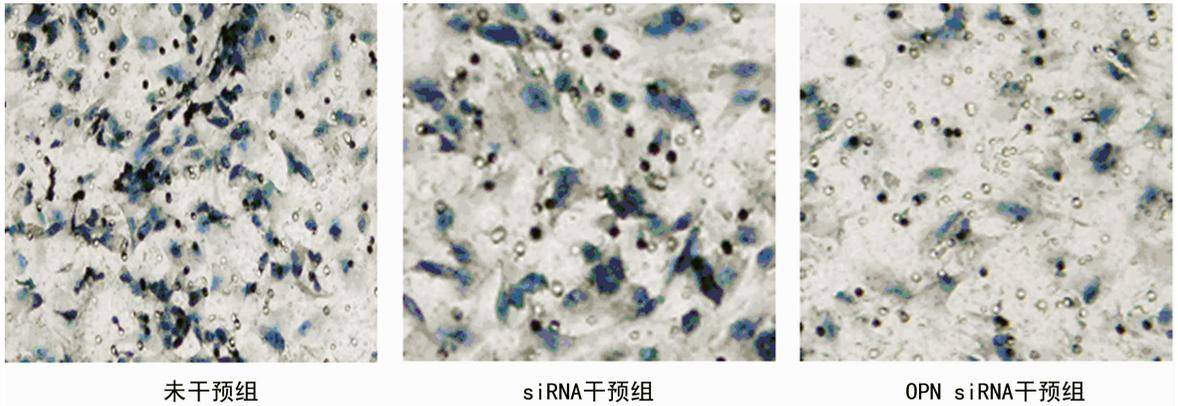
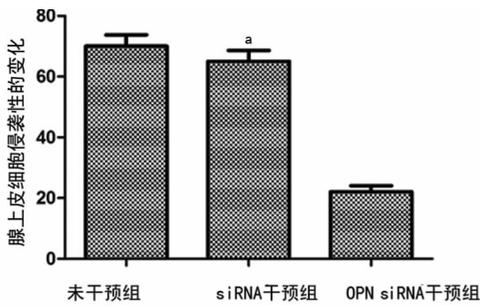


图 5 3 组显微镜下图像



^a: $P<0.05$,与 OPN siRNA 干预组比较。

图 6 OPN siRNA 干扰前后原代腺上皮细胞的侵袭性比较

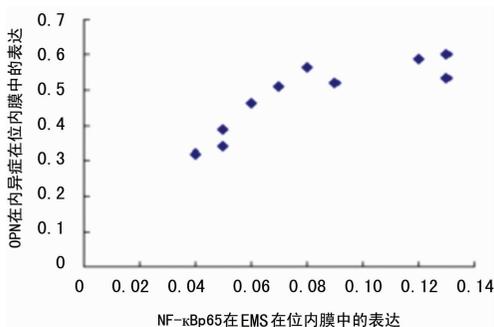


图 7 OPN、NF-κBp65 在腺上皮细胞中的表达关系

2.4 OPN、NF-κBp65 在细胞中的表达关系 OPN、NF-κBp65 在 EMS 患者在位内膜腺上皮细胞中的表达呈明显的正相关 ($r=0.87$),见图 7。

表 1 OPN siRNA 干扰前后 OPN、NF-κBp65 蛋白、mRNA 积极细胞侵袭性的变化 ($\bar{x} \pm s$)

项目	未干预组	siRNA 干预组	OPN siRNA 干预组
OPN 蛋白	3.10 ± 0.26	2.80 ± 0.12	0.40 ± 0.07
OPN mRNA	2.80 ± 0.25	2.10 ± 0.16	0.30 ± 0.27
NF-κBp65 蛋白	2.90 ± 0.26	2.70 ± 0.24	1.20 ± 0.09
NF-κBp65 mRNA	3.50 ± 0.28	2.90 ± 0.26	1.30 ± 0.10
细胞侵袭性	65.00 ± 0.78	61.00 ± 0.74	24.00 ± 0.56

3 讨论

OPN 是从骨组织中分离出来的一种磷酸化糖蛋白,组成结构中富含精氨酸-谷氨酸-天冬氨酸序列。有研究表明,OPN 与恶性肿瘤的发生、发展密切相关,它通过与其受体 $\alpha v \beta 3$ 结合后激活依赖 MAPK/PI3K 通路的 NF-κB 通路,进而促进细胞中尿激酶型纤溶酶原激活物 (uPA) 和 MMPs 的分泌,介导细胞侵袭过程、MMPs 的降解和重塑、细胞迁移、宿主免疫细胞的逃逸和新生血管的形成及发挥抑制细胞凋亡、促进肿瘤血管的生成及肿瘤细胞的转移进而诱导肿瘤的发生^[7-9]。NF-κB 是 Sen 与 Baltimore 于 1986 年首次在成熟的淋巴细胞中发现的一种真核细胞转录因子,它是 NF-κB/Rel 蛋白家族成员之一,以最常见 p50/p65 异源性二聚体形式存在于细胞核中参与许多基因转录的起始调节,如众多的细胞因子、黏附分子、蛋白酶类及炎症因子^[10]。在人体的正常情况下,NF-κB 存在于细胞质并与其抑制蛋白 (IκB) 结合,当受到外界异常刺激时,使 IκB 磷酸化并被水解使 NF-κB 与抑制剂分离从细胞质进入细

胞核参与细胞的转录调控^[11]。近几年,NF- κ B 在 EMS 中的研究颇受关注。本课题组的前期试验已经在 EMS 患者及大鼠 EMS 模型的组织及细胞水平证实 OPN、NF- κ Bp65 在 EMS 的在位、异位内膜中高表达且呈正相关,且二者与细胞的侵袭性明显相关,通过雌孕激素及其激活剂、抑制剂干预 EMS 患者在位内膜腺上皮细胞后发现,OPN、NF- κ Bp65 的表达及细胞的侵袭性也相应增加及减弱^[12]。国内孙群燕^[13]建立小鼠 EMS 模型并给予基因 NF- κ Bp50 敲除后发现与雌激素介导的痛觉过敏和炎症性疼痛密切相关的 PKCepsilon 因子的表达明显减弱,与激素类药物缓解 EMS 患者症状的机制相符,进一步验证了 NF- κ B 在 EMS 的发病过程中发挥重要作用,与本课题组前期试验结果基本一致。

EMS 在病理上虽为良性疾病但其有着与恶性肿瘤相似的特征,如异地黏附、侵袭、转移及复发等,EMS 的治疗手段很有限,主要以手术治疗为首选,但手术常难以清除所有药物治疗病灶^[14-15]。国内有学者通过构建 OPN-siRNA 的慢病毒载体,发现可以明显抑制结肠癌 SW480 细胞、胃癌细胞系 GC9811 的增殖,进而为恶性肿瘤的治疗奠定了基础^[16-17]。故本试验通过探索导致 EMS 的关键因子进而通过阻断其表达来达到 EMS 的靶向治疗。本研究在前期试验结果 OPN、NF- κ B 于 EMS 患者在位、异位内膜腺上皮细胞中高表达的基础上,通过质粒构建 OPN 特异性 siRNA 干扰 EMS 患者在位内膜腺上皮细胞后经 Western blot、RT-PCR 及穿膜实验等方法检测发现 OPN、NF- κ Bp65 蛋白、mRNA 的表达明显下降,且腺上皮细胞的侵袭性也相应降低。因此,本研究结果提示,OPN 可能是通过 NF- κ B 通路促进 uPA、MMPs 的分泌,加速细胞外基质及基底膜降解,促进异位内膜的黏附、种植和生长,进而诱导 EMS 的发生。但是确切的分子机制还需要进一步的实验证实。因此,笔者认为 NF- κ B 极有可能是 OPN 诱导 EMS 发生的关键枢纽,也是 EMS 药物靶向治疗的关键点。

参考文献

- [1] Zhang J, Leng J, Dai Y, et al. Significance of symptom and physical sign to diagnosis of deeply infiltrating endometriosis[J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2014, 49(8): 599-603.
- [2] Brown J, Farquhar C. An overview of treatments for endometriosis[J]. *JAMA*, 2015, 313(3): 296-297.
- [3] Kobayashi H, Higashiura Y, Shigetomi H, et al. Pathogenesis of endometriosis: the role of initial infection and subsequent sterile inflammation[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(1): 9-15.
- [4] Riku D, Subha PD, Ganapati H, et al. Osteopontin: it's role in regulation of cell motility and nuclear factor κ B-mediated urokinase type plasminogen activator expression [J]. *Iubmb Life*, 2005, 57(6): 441-447.
- [5] 刘玉锋, 哈春芳, 马远. OPN 与 MMP-9 在子宫腺肌症内膜上皮细胞的表达和意义[J]. *宁夏医学杂志*, 2014, 36(7): 580-581.
- [6] 杨眉, 蒋春樊, 年妍, 等. 雌激素对子宫内位异位症内膜 OPN 与 MMP-9 表达及腺上皮细胞侵袭性的影响[J]. *宁夏医学杂志*, 2014, 36(7): 577-579.
- [7] Xiao Y, Li T, Xia E, et al. Expression of integrin β 3 and osteopontin in the eutopic endometrium of adenomyosis during the implantation window[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2013, 170(2): 419-422.
- [8] Xu ST, Guo C1, Ding X, et al. Role of osteopontin in the regulation of human bladder cancer proliferation and migration in T24 cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(5): 3701-3707.
- [9] Liu J, Liu Q, Wan Y, et al. Osteopontin promotes the progression of gastric cancer through the NF-kappaB pathway regulated by the MAPK and PI3K[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(1): 282-290.
- [10] Wei W, Yuan YH, Gao YN, et al. Polygalasaponin F inhibits secretion of inflammatory cytokines via NF- κ B pathway regulation[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(8): 865-875.
- [11] Heyninc K, Lahtela-Kakkonen M, Van der Veken P, et al. Withaferin A inhibits NF-kappaB activation by targeting cysteine 179 in IKK β [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 91(4): 501-509.
- [12] 哈春芳, 肖成明, 张晟宁, 等. 开放法大鼠子宫内位异位症模型的建立与评价[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2011, 49(1): 1671-1675.
- [13] 孙群燕. NF-kappaB p50 基因敲除小鼠子宫内位异位症模型的建立及其研究[J]. *实用医学杂志*, 2012, 24(6): 243-245.
- [14] Vercellini P, Vigano P, Somigliana E, et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(5): 261-275.
- [15] Anborgh PH, Mutrie AB, Chambers AF. Role of the metastasis-promoting protein osteopontin in the tumour microenvironment[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(8): 2037-2044.
- [16] 唐红卫, 潘阳林, 聂勇战, 等. Osteopontin 特异性 siRNA 真核表达载体的构建及其在 GC9811 胃癌细胞中沉默效应的鉴定[J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(3): 202-205.
- [17] 邢译文, 白静, 范维宁, 等. OPN siRNA 慢病毒载体的构建及其对大肠癌细胞增殖的抑制作用[J]. *基础医学与临床*, 2014, 34(3): 350-354.

(收稿日期: 2015-10-08 修回日期: 2015-12-22)