

· 基础研究 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.01.002

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20241111.0908.004\(2024-11-11\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20241111.0908.004(2024-11-11))

ChREBP 网络成员及 TUG1 在宫腔粘连中的表达及意义*

朱玲静¹, 陈明庆², 严子璇³, 闫雪兰⁴, 艾 瑛^{4△}

(1. 昆明理工大学医学院/云南省第一人民医院, 昆明 650500; 2. 贵州盘江煤电集团有限责任公司医院, 贵州六盘水 553000; 3. 岳阳市人民医院妇科, 湖南岳阳 414000; 4. 云南省第一人民医院妇产科/昆明理工大学附属医院/妇科国家级临床重点专科/云南省妇产疾病临床医学研究中心, 昆明 650000)

[摘要] **目的** 探讨碳水化合物反应元件结合蛋白(ChREBP)网络成员[ChREBP、Max 样蛋白 X(Mlx)、癌基因相关因子(Max)、最大二聚蛋白 1(Mxd1)、组蛋白去乙酰化酶 1(HDAC1)]及牛磺酸上调基因 1(TUG1)在宫腔粘连(IUA)中的表达及意义。**方法** 选择 10 只 8 周龄雌性 SD 大鼠为研究对象。采用机械刮宫+脂多糖感染构建 IUA 大鼠模型作为 IUA 组($n=5$), 对照组宫腔不做任何操作($n=5$); 采用 HE、Masson 染色分别评估子宫内膜腺体数量及纤维化程度; 采用 Western blot 法检测细胞核与细胞质中 ChREBP 网络成员蛋白相对表达水平; 采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 TUG1 mRNA 相对表达水平。**结果** 与对照组相比, IUA 组子宫内膜腺体数量减少($P<0.05$), 纤维化面积百分比增加($P<0.05$), 细胞核中 ChREBP 网络成员的蛋白相对表达水平下调, 细胞质中 ChREBP 网络成员的蛋白相对表达水平上调, TUG1 的 mRNA 相对表达水平上调($P<0.05$)。**结论** ChREBP 核易位受阻并减少其下游网络成员的招募可能导致对 TUG1 转录的抑制作用减弱, 从而促进 IUA 的发生。

[关键词] 宫腔粘连; 牛磺酸上调基因 1; 碳水化合物反应元件结合蛋白; 机械刮宫; 脂多糖感染

[中图法分类号] R711.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)01-0007-05

Expression and significance of ChREBP network members and TUG1 in intrauterine adhesion*

ZHU Lingjing¹, CHEN Mingqing², YAN Zixuan³, YAN Xuelan⁴, AI Ying^{4△}

(1. Medical School, Kunming University of Science and Technology/Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650500, China; 2. Hospital of Guizhou Panjiang Coal and Electricity Group Co., Ltd., Liupanshui, Guizhou 553000, China; 3. Department of Gynecology, Yueyang Municipal People's Hospital, Yueyang, Hunan 414000, China; 4. Department of Obstetrics and Gynecology, Yunnan Provincial First People's Hospital/Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology/National Key Clinical Specialty of Gynecology/Yunnan Province Clinical Research Center for Gynecological and Obstetric Diseases, Kunming, Yunnan 650000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and significance of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) network members (ChREBP, Mlx, Max, Mxd1, HDAC1) and taurine-upregulated gene 1 (TUG1) in intrauterine adhesion (IUA). **Methods** Ten female SD rats with 8 weeks old were selected as the study objects. The mechanical curettage plus lipopolysaccharide infection were used to construct the IUA rat model as the IUA group ($n=5$) and the uterine cavity of the control group did not perform any operation ($n=5$); HE and Masson staining were respectively used to assess the number of endometrial glands and the degree of fibrosis; Western blot was used to detect the expression level of ChREBP network members in the nucleus and cytoplasm; RT-qPCR was used to detect the expression level of TUG1. **Results** Compared with the control group, the number of endometrial glands in the IUA group was decreased ($P<0.05$), the percentage of the fibrotic area was increased ($P<0.05$), the protein expression level of ChREBP network members in the nucleus was down-regulated, the protein expression level of ChREBP network members in the cytoplasm was up-regulated and the mRNA relative expression level of TUG1 was up-regulated ($P<0.05$).

* 基金项目: 云南省科学技术厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金(202101AY070001-261); 妇科国家级临床重点专科开放课题(2022FKZDZK-14); 云南省妇产疾病临床医学研究中心开放课题(2022YJZX-FC12)。△ 通信作者, E-mail: 2605329330@qq.com。

Conclusion Blocked nuclear translocation of ChREBP and reduced the recruitment of its downstream network members may lead to attenuate the repressive effect on TUG1 transcription, thereby promoting IUA occurrence.

[Key words] intrauterine adhesion; taurine-upregulated gene 1; carbohydrate response element-binding protein; mechanic uterine curettage; lipopolysaccharide infection

宫腔粘连(IUA)是一种由于子宫内层基底层损伤后创面纤维化修复导致宫腔和/或宫颈管狭窄或闭塞的妇科疾病^[1]。研究发现,沉默长链非编码 RNA(lncRNA)牛磺酸上调基因 1(TUG1)能阻碍上皮-间充质转化过程及炎症因子的表达,从而缓解 IUA^[2]。碳水化合物反应元件结合蛋白(ChREBP)在高糖环境下能进入细胞核抑制 TUG1 转录,这依赖于 ChREBP 下游网络成员参与,包括 Max 样蛋白 X(Mlx)、最大二聚蛋白 1(Mxd1)、癌基因相关因子(Max)、组蛋白去乙酰化酶 1(HDAC1)^[3]。但 ChREBP 网络成员与 TUG1 在 IUA 中是否存在上述潜在调控关系尚无文献报道。本研究通过构建 IUA 大鼠模型,检测子宫内层细胞核与细胞质中 ChREBP 网络成员及总 TUG1 的表达,探讨 ChREBP 网络成员及 TUG1 在 IUA 中的表达及意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选择饲养在 SPF 级动物房的 10 只 8 周龄雌性 SD 大鼠为研究对象,体重 210~220 g,购于昆明医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(滇)K2020-0004]。自由进食全价鼠粮和饮用水,饲养环境温度(25±1)℃,湿度(50±5)%,每天日照和黑暗时间各 12 h,持续换气,上述条件下饲养 1 周。本研究已通过昆明理工大学实验动物伦理委员会审批。

1.1.2 试剂与仪器

试剂:Masson 三色染色试剂盒及核蛋白提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);ChREBP 抗体(美国 Santa Cruz 公司);Mlx、Max、Mxd1、HDAC1 抗体(英国 Abcam 公司);miScript 反转录试剂盒、miScript SYBR Green PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司)。仪器:酶标仪(北京普朗新技术有限公司);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);荧光定量 PCR 仪 QuantStudio3(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及处理

将 10 只大鼠随机分为 2 组,对照组和 IUA 组各 5 只。IUA 组大鼠予腹腔注射 10%水合氯醛(10 mg/kg)麻醉,在子宫分叉处左侧宫腔上方 0.5 cm 处纵向切 0.2 cm 的切口,使用自制微型子宫内膜刮片搔刮宫腔,待子宫壁粗糙时停止刮宫,然后向宫腔内注射脂多糖(10 mg/L)0.1 mL 进行诱导。对照组大鼠手术方式相同,宫腔不做任何处理。

1.2.2 标本采集

造模 2 周后处死大鼠,将造模侧子宫组织分为两

部分,一部分用 4%多聚甲醛固定后制作石蜡切片,用于 HE 及 Masson 染色;另一部分放入-80℃冰箱保存,用于后续蛋白及 RNA 提取。

1.2.3 HE 染色

将制作好的石蜡切片进行常规脱蜡水化,用苏木素染液染色 1 min,自来水洗净,1%盐酸乙醇溶液风化 10 s,自来水返蓝,伊红染液染色 30 s,自来水洗净后脱水,吹干后中性树脂封片,正置光学显微镜拍照,随机选择 5 个视野计数子宫内层腺体数量取平均值。

1.2.4 Masson 染色

染色前步骤同 HE 染色,按 Masson 三色染色试剂盒说明书进行染色,染色完后进行常规脱水及二甲苯透明,吹干后中性树脂封片,正置光学显微镜拍照,随机选择 5 个视野用 Image J 软件计算纤维化面积百分比(胶原纤维面积/组织总面积×100%)取平均值。

1.2.5 Western blot

取 50 mg 子宫组织标本,按核蛋白提取试剂盒说明书操作进行核质蛋白分离及提取。二辛可酸法(BCA 法)测蛋白浓度,计算上样量为 100 μg 蛋白溶液体积。再进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,并用聚偏二氟乙烯膜进行转膜,所得膜用含 5%脱脂牛奶的 1×TBST 封闭液室温下封闭 1 h,再加入用封闭液稀释后的一抗,4℃下孵育过夜。次日予 1×TBST 溶液洗涤后再加入二抗稀释液,室温孵育 1 h 后 1×TBST 溶液洗涤,再进行增强型化学发光液(ECL)显影操作。用 Image J 软件分析所得条带灰度值,目的蛋白相对表达量=目的条带灰度值/相对应内参条带灰度值。

1.2.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

取适量子宫组织标本,用 Trizol 法提取总 RNA,紫外分光光度计法测定 RNA 纯度。逆转录合成 cDNA,反应条件如下:25℃ 5 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min。用 miScript SYBR Green PCR 试剂盒进行 RT-qPCR 反应检测 TUG1 的 mRNA 表达水平,反应条件如下:95℃ 下预变性 20 s,随后进入扩增循环,95℃ 反应 1 s,60℃ 反应 20 s,共 40 个循环,再进入溶解曲线分析阶段,溶解曲线温度设定为 60~95℃,1 个标本设 3 个复孔。目的产物相对于内参的表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.3 统计学处理

采用 SPSS25.0 软件进行数据分析,服从正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验分析;不服从正态分布的计量资料用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,两组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠子宫外观形态

IUA 组大鼠造模侧子宫表面凹凸不平;对照组造模侧子宫外观形态未见明显变化。

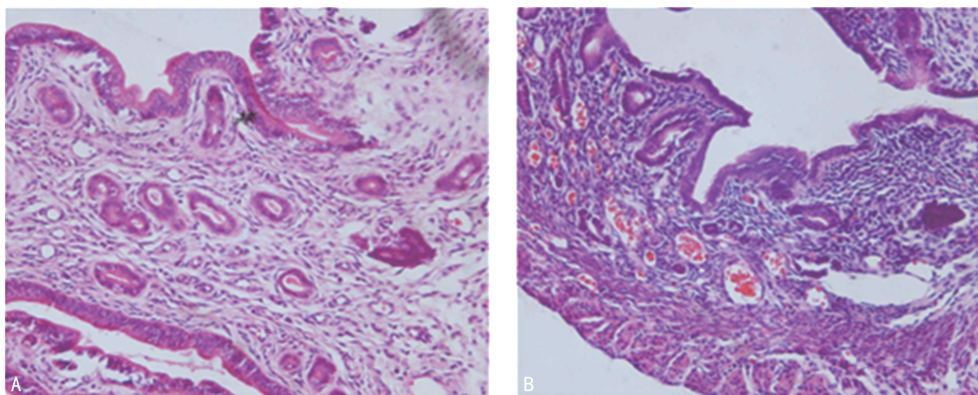
2.2 HE 染色结果

采用 HE 染色观察大鼠子宫内膜形态和腺体数量。对照组子宫内膜腺体丰富,呈圆形或椭圆形,IUA 组腺体数量 $[(6.36 \pm 1.28) \text{ 个}]$ 与对照组 $[(11.36 \pm 2.09) \text{ 个}]$ 相比明显减少 ($t = 10.15, P < 0.05$),并可看到炎性细胞浸润,IUA 大鼠模型造模成

功,见图 1。

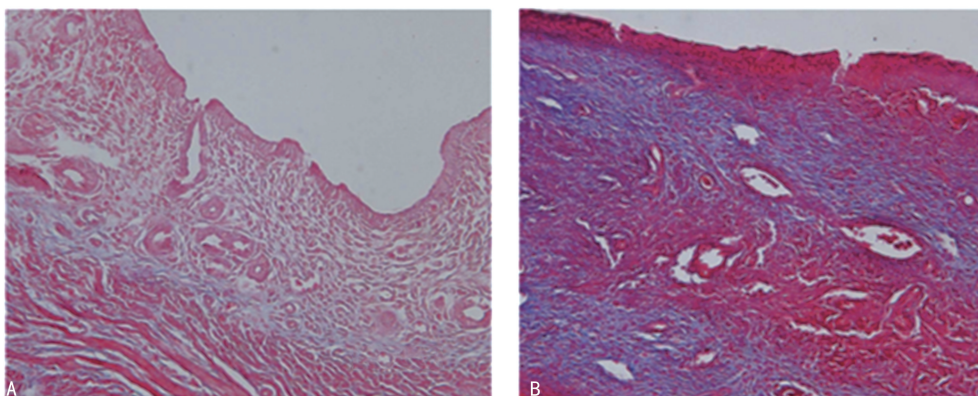
2.3 Masson 染色结果

采用 Masson 染色观察大鼠子宫内膜间质胶原纤维含量,评估子宫内膜纤维化程度。结果显示,对照组蓝染面积小,胶原纤维含量低;IUA 组蓝染面积分布广,胶原纤维含量高,子宫内膜纤维化面积百分比 $[(0.69 \pm 0.13)\%]$ 明显高于对照组 $[(0.14 \pm 0.05)\%]$,差异有统计学意义 ($t = -19.24, P < 0.05$),这说明 IUA 病理表现主要为子宫内膜纤维化,再次验证 IUA 大鼠模型造模成功,见图 2。



A:对照组;B:IUA 组。

图 1 两组大鼠子宫组织形态学改变 HE 染色结果(200×)



A:对照组;B:IUA 组。

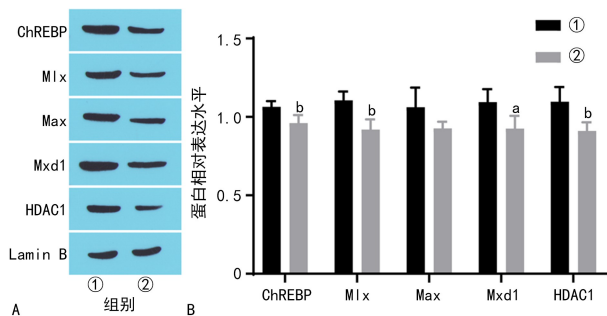
图 2 两组大鼠子宫组织纤维化程度评估 Masson 染色结果(200×)

2.4 ChREBP 网络成员的蛋白表达水平

采用 Western blot 法检测细胞核与细胞质中 ChREBP 网络成员蛋白的相对表达水平。结果显示,与对照组相比,IUA 组细胞核中 ChREBP、Mlx、Max、Mxd1、HDAC1 的蛋白表达下调(Max: $P > 0.05$;其余成员 $P < 0.05$);细胞质中 ChREBP、Mlx、Max、Mxd1、HDAC1 的蛋白表达上调(ChREBP: $P > 0.05$;其余成员: $P < 0.05$),这说明在 IUA 中 ChREBP 网络成员核易位受阻,见图 3、4。

2.5 TUG1 mRNA 相对表达水平

采用 RT-qPCR 检测 TUG1 mRNA 相对表达水平。结果显示,与对照组相比,IUA 组 TUG1 mRNA 相对表达水平上调 ($P < 0.05$),见图 5。



A:ChREBP 网络成员 Western blot 蛋白条带;Lamin B 为内参蛋白;B:ChREBP 网络成员蛋白相对表达水平;^a: $P < 0.05$,与①比较;^b: $P < 0.01$,与①比较;①:对照组;②:IUA 组。

图 3 两组大鼠 ChREBP 网络成员在细胞核中的蛋白表达情况

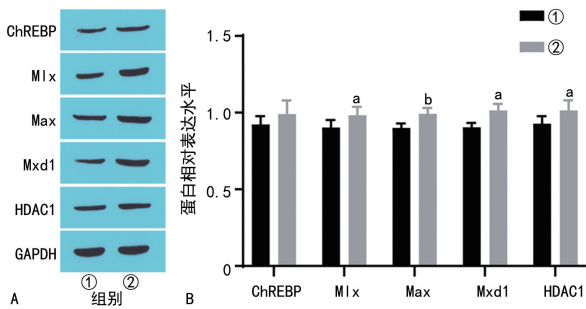


图 4 两组大鼠 ChREBP 网络成员在细胞质中的蛋白表达情况

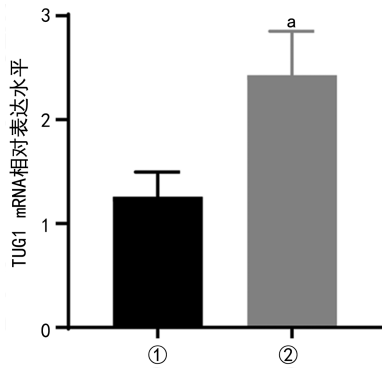


图 5 两组大鼠 TUG1 的 mRNA 表达情况

3 讨论

IUA 是一种复杂的女性生殖系统疾病,常由子宫内膜严重损伤或感染后纤维化修复导致^[4]。其会造成不孕及反复妊娠丢失,并且易增加胎盘植入、前置胎盘等产科并发症的风险,严重威胁患者的生殖健康^[5]。IUA 表现为子宫组织纤维化病理性修复^[6],无特效治疗药物,标准治疗方式为宫腔镜下 IUA 分离术,在镜下分离粘连组织,恢复宫腔解剖结构,保护残留子宫内膜,但存在术后易复发的特点,尤其对于中重度 IUA 患者,复发率更高^[7]。为提高手术疗效,术后常规采取各种措施(如物理屏障治疗、口服雌激素、阿司匹林药物等)来预防粘连复发,但仍不能有效降低复发率^[8-9]。

刮宫等机械损伤与感染是目前公认 IUA 两大病因^[10]。据报道,子宫腔手术操作,特别是与妊娠相关的刮宫,常造成子宫内膜机械损伤导致 IUA 的发生^[11]。感染本身的影响可能是有限的,但继发于感染的炎症反应可以协同造成子宫内膜损伤,诱导子宫内膜发生纤维化^[12]。单一机械损伤子宫内膜多可快速修复,不利于构建稳定的 IUA 动物模型,研究表明多重损伤法在构建 IUA 动物模型中更具优势^[13]。为构建稳定的 IUA 动物模型,更符合临床上 IUA 成因,本研究采用了机械刮宫+脂多糖感染双重损伤法构建

IUA 大鼠模型。HE 及 Masson 染色结果显示,与对照组相比,IUA 组子宫内膜的腺体数量明显下降,并可见炎性细胞浸润,纤维化程度更高。这说明 IUA 的病理特征为子宫内膜纤维化,机械刮宫+脂多糖感染能成功诱导构建 IUA 大鼠模型。

lncRNA 是一种长度大于 200 个核苷酸的内源性 RNA 分子,无蛋白质编码能力,能在转录和转录后水平调节靶基因的表达^[14]。lncRNA 的促纤维化作用在心肌^[15]、肝脏^[16]、肾脏^[17-18]、肺^[19-20]等脏器中均有文献报道。lncRNA HOTAIR 通过激活转化生长因子(TGF)- β 1/Smad 通路促进子宫内膜纤维化^[21],lncRNA 的促纤维化作用使其极有可能成为 IUA 的潜在干预靶点。另一种 lncRNA,即 TUG1,也被发现在包括 IUA 在内的纤维化疾病中发挥重要作用。TUG1 在急性心肌梗死组织和用促纤维化因子 TGF- β 1 处理的心脏成纤维细胞中表达增加,敲低 TUG1 可抑制心肌梗死后的心肌纤维化^[22];TUG1 在肝纤维化组织和活化的肝星状细胞中水平上调,沉默 TUG1 可能通过抑制 TGF- β 1/Smad 通路改善肝纤维化^[23];TUG1 通过上调 CDC27 和激活 PI3K/Akt/mTOR 通路促进肺纤维化进展,敲低 TUG1 可减轻肺纤维化^[24];TUG1 在经 TGF- β 1 诱导的人胚胎干细胞及 IUA 患者及大鼠子宫内膜组织中高表达,沉默 TUG1 能降低间充质细胞标志物和炎症因子的表达,缓解 IUA^[2]。可见 TUG1 是促进 IUA 发生的重要介质,本研究 IUA 组中 TUG1 mRNA 相对表达水平较对照组升高再次验证了这一结论,但其是否受其他因子调控尚待进一步研究。研究调控 TUG1 表达的相关因子,将为临床上 IUA 的预防及早期诊断提供新的生物预测标记物,并提供新的潜在治疗靶点,对临床上 IUA 的防治有着重要指导意义。

ChREBP 是一种转录因子,主要在糖脂代谢调控及肿瘤发生过程中扮演重要角色^[25]。有文献报道,高糖环境下 ChREBP 通过发生核易位并招募下游网络成员来抑制 TUG1 的转录^[3];高糖介导激活 ChREBP/Mix 异二聚体进入细胞核集合到 TUG1 启动子区 ChoRE 元件上,促进 Mxd1/Max 与 ChoRE 相邻的 E-box 元件结合,接着 Mxd1 招募 Sin3A/HDAC1 共抑制复合物,抑制 TUG1 转录。TUG1 已被发现促进 IUA 发生^[2],由此推测 ChREBP 或许可以通过抑制 TUG1 转录成为 IUA 的潜在防治靶点。本研究发现,与对照组相比,IUA 组细胞核中 ChREBP 网络成员蛋白相对表达水平下调,而细胞质中 ChREBP 网络成员蛋白相对表达水平上调。IUA 组 ChREBP 网络成员在细胞核中的低表达说明 ChREBP 进入细胞核

招募其下游网络成员过程受阻。由此推测 ChREBP 核易位受阻或许参与了 TUG1 的转录调控,可能通过减少其下游网络成员的招募对 TUG1 转录的抑制作用减弱,从而导致 IUA 组中 TUG1 高表达。由此可见,ChREBP 可能是调控 TUG1 表达的关键因子,其可能通过抑制 TUG1 转录减少 IUA 的发生,有望成为未来 IUA 防治的潜在干预靶标。IUA 是一种局限于子宫内膜的纤维化疾病,ChREBP 作为转录因子在多种疾病中均有着重要作用,若 ChREBP 作为 IUA 的治疗靶点,在子宫局部应用或许疗效更佳,并能减少全身治疗所产生的不良反应,但尚待进一步探究。

本研究通过探讨 ChREBP 网络成员与 TUG1 在 IUA 中的表达说明了在 IUA 中 ChREBP 与 TUG1 之间可能存在调控关系,即 ChREBP 核易位受阻并减少其下游网络成员的招募,从而使 TUG1 转录的抑制作用减弱,导致 IUA 发生,但此种调控关系还需进一步实验验证。

参考文献

[1] 郭罗培,隋龙. 子宫内膜损伤修复与宫腔粘连形成机制研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019,35(6):706-709.

[2] AI Y, CHEN M, LIU J, et al. LncRNA TUG1 promotes endometrial fibrosis and inflammation by sponging miR-590-5p to regulate FasI in intrauterine adhesions [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86: 106703.

[3] LONG J, GALVAN D L, MISE K, et al. Role for carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) in high glucose-mediated repression of long noncoding RNA Tug1[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(47):15840-15852.

[4] TANG R, ZHANG W, XIAO X, et al. Intrauterine interventions options for preventing recurrence after hysteroscopic adhesiolysis: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2024, 309(5):1847-1861.

[5] 李艳慧,廖明,邓荣,等. 宫腔粘连的危害及影响因素[J]. 生殖医学杂志, 2022, 31(1):130-134.

[6] 刘姝岑,朱雪红,宾力,等. 间充质干细胞在子宫内膜损伤修复中的机制研究进展[J]. 江苏大学学报(医学版), 2023, 33(1):84-92.

[7] HE M, CHEN Q, HE J, et al. Reproductive out-

comes of women with moderate to severe intrauterine adhesions after transcervical resection of adhesion: a systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102(11): e33258.

[8] 邱丹儿,张琬琳,王晓红. 宫腔粘连分离术后预防复发和改善生殖结局的辅助治疗措施[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2022, 41(1):46-51.

[9] LIU T, HE B, XU X. Repairing and regenerating injured endometrium methods [J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(6):1724-1736.

[10] 鲁益朦,谭季春. 宫腔粘连发病的分子机制研究进展[J]. 基础医学与临床, 2023, 43(4):547-553.

[11] 许阡,王祎祎,臧春逸. 宫腔粘连临床病因学及诊疗研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2021, 48(2):224-229.

[12] 丘甜美. 子宫内膜炎性反应与宫腔粘连的相关性[J]. 现代妇产科进展, 2019, 28(4):317-320.

[13] XI J, PAN Y, JIN C, et al. Evaluation of different rat models intrauterine adhesion models and improvement of the technique for their establishment [J]. *Exp Anim*, 2023, 72(2):274-284.

[14] 苏越,梁琳慧,何祥火. 长链非编码 RNA 亚细胞定位和功能的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2023, 43(10):1580-1584.

[15] ZHANG M, ZHANG B, WANG X, et al. LncRNA CFAR promotes cardiac fibrosis via the miR-449a-5p/LOXL3/mTOR axis [J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(4):783-799.

[16] ZHANG R, ZHAN Y, LANG Z, et al. LncRNA-SNHG5 mediates activation of hepatic stellate cells by regulating NF2 and Hippo pathway [J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1):266.

[17] JUNG H J, KIM H J, PARK K K. Potential roles of long noncoding RNAs as therapeutic targets in renal fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8):2698.

[18] ZHAO Y, WANG H, TANG Y, et al. SNHG16/miR-205/HDAC5 is involved in the progression of renal fibrosis [J]. *Biochem Mol Toxic*, 2024, 38(1):e23617.

[19] ZHANG X, SHAO R. LncRNA SNHG8 upregulates MUC5B to induce idiopathic pulmonary fibrosis progression by targeting miR-4701-5p [J]. *Heliyon*, 2024, 10(1):e23233. (下转第 17 页)