

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.006

## 地诺孕素对异位子宫内膜间质细胞凋亡的影响及其机制研究\*

刘晓娟,张玉虹,王虹

(河北北方学院附属第一医院妇产科,河北张家口 075000)

**摘要:**目的 探究地诺孕素对异位子宫内膜间质细胞的作用及其机制。方法 采用四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法检测地诺孕素对异位子宫内膜间质细胞增殖的作用;采用流式细胞术检测地诺孕素诱导异位子宫内膜间质细胞凋亡情况;用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测地诺孕素作用后 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白的表达。结果 MTT 结果显示地诺孕素对 ECSC 细胞增殖抑制作用强于 NSCS 细胞( $P<0.05$ )。流式细胞术显示地诺孕素诱导 ECSC 细胞凋亡作用强于 NSCS 细胞( $P<0.05$ )。Western blot 结果显示地诺孕素明显减少了 ECSC 细胞中 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白水平。结论 地诺孕素通过降低 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 的水平而有抑制异位子宫内膜间质细胞增殖并诱导其凋亡的作用。

**关键词:**子宫内膜异位症;地诺孕素;细胞凋亡;NF- $\kappa$ B

**中图分类号:**R711

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-8348(2014)34-4434-02

## The effect of dienogest on apoptosis of the ectopic endometrial stroma cells and its mechanism\*

Liu Xiaojuan, Zhang Yuhong, Wang Hong

(Department of obstetrics and gynecology, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, 075000, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of dienogest on apoptosis of ectopic endometrial stroma cells and its mechanism. **Methods** We examine ectopic endometrial stroma cell proliferation induced by dienogest with MTT assay, cell apoptosis by flow cytometry method and check NF- $\kappa$ B, Bcl-2 and Bcl-XL protein levels by Western Blot assay. **Results** MTT assay shows that inhibition cell proliferation induced by dienogest on ECSC is stronger than NSCS cells( $P<0.05$ ). Flow cytometry test shows apoptosis induced by dienogest on ECSC is stronger than NSCS cells( $P<0.05$ ). Western blot shows a significant reduction induced by dienogest in ECSC cells of NF- $\kappa$ B, Bcl-2 and Bcl-XL protein levels. **Conclusion** Dienogest can effectively inhibit ectopic endometrial stroma cell proliferation and induce cell apoptosis by reducing expression of NF- $\kappa$ B and attenuating levels of anti-apoptotic factors such as Bcl-2 and Bcl-XL.

**Key words:** endometriosis; dienogest; apoptosis; NF- $\kappa$ B

子宫内膜异位症以子宫内膜组织的异位生长及相关的盆腔疼痛、痛经、和不孕不育为特点<sup>[1]</sup>,在育龄妇女中有约 10% 的发病率,近年来发病率明显呈上升趋势<sup>[2]</sup>。虽然关于子宫内膜异位症的基础研究和临床研究取得了一定进展,但仍不明确其诱因和发病机制。现阶段临床治疗方法主要是药物或手术,由于患者多为育龄女性,手术治疗有局限性;而药物治疗存在停药复发<sup>[3]</sup>、干扰凝血和脂代谢等不良反应多的问题<sup>[4]</sup>。故而探究子宫内膜异位症的发病机制并寻找到有效的治疗方案,会给患者带来福音。地诺孕素是选择性黄体激素类药物,2010 年它与雌二醇复方作为避孕药在美国上市。有研究表明,地诺孕素具有缓解子宫内膜异位症疼痛、稳定子宫内膜组织的作用<sup>[5-8]</sup>。其作用效果相当于醋酸亮丙瑞林,但地诺孕素具有更好的耐受性,且不良反应率低。本实验设计体外培养异位子宫内膜间质细胞,研究地诺孕素对子宫内膜异位症的治疗作用及其潜在机制。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 地诺孕素(Bayer 公司),胎牛血清(FBS, Gibco 公司),DMEM(Hyclone 公司),胶原酶(Invitrogen 公司),细胞 360 目滤网(上海通善生物科技有限公司),鼠抗波形蛋白抗体(武汉博士德公司),SABC 试剂盒(武汉博士德公司),噻唑蓝(MTT, Sigma 公司),二甲亚砜(DMSO, Sigma 公司),碘化丙

啶(PI, Sigma 公司),抗体: $\beta$ -actin(Human, Origene 公司)、NF- $\kappa$ B(Human, Origene 公司)、Bcl-2(Santa Cruz 公司)和 Bcl-XL(Santa Cruz 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 原代细胞来源于 2013 年 6~12 月,院中妇产科收治的术前无激素类药物服用史的卵巢巧克力囊肿患者。取患者异位子宫内膜和正常子宫内膜组织,进行离体培养。将组织剪碎并用含有双抗的 D-Hanks 液漂洗,加入 4 倍组织体积的胶原酶 37℃ 消化 1 h,悬液过 360 目细胞滤网。滤液 1 000 r/m 离心 10 min 后,弃上清液用 DMEM 重悬,用含有 20% FBS 的 DMEM 培养基于 37℃、80% 相对湿度和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**1.2.2 细胞鉴定** 原代细胞胰酶消化后,加到含有盖玻片的 6 孔板中,细胞贴壁长满后加入 4% 多聚甲醛固定。用鼠抗波形蛋白抗体和 SABC 试剂盒做细胞免疫荧光检测。

**1.2.3 实验分组** NSCS 组:正常子宫内膜组织的原代细胞; NSCS-DNG 组:用 50 nmol/L 地诺孕素作用 NSCS 细胞; ECSC 组:异位子宫内膜组织的原代细胞; ECSC-DNG 组:用 50 nmol/L 地诺孕素作用 ECSC 细胞。

**1.2.4 四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法测定地诺孕素对子宫**

内膜间质细胞的抑制作用 NSCS 细胞和 ECSC 细胞消化后以  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔板中, 培养过夜后正常地诺孕素组和异位地诺孕素组给予 50 nmol/L 地诺孕素干预。给药后在 24、48 h 和 72 h 用 MTT 法测细胞增殖。

**1.2.5 流式细胞仪测定地诺孕素对子宫内间质细胞凋亡影响** 细胞传代于细胞培养瓶中, 24 h 后正常地诺孕素组和异位地诺孕素组给与 50 nmol/L 地诺孕素干预。药物作用 48 h 后收集各组细胞, 调整细胞密度至  $1 \times 10^6$  个/mL, 用 PI 染色法测细胞凋亡率。

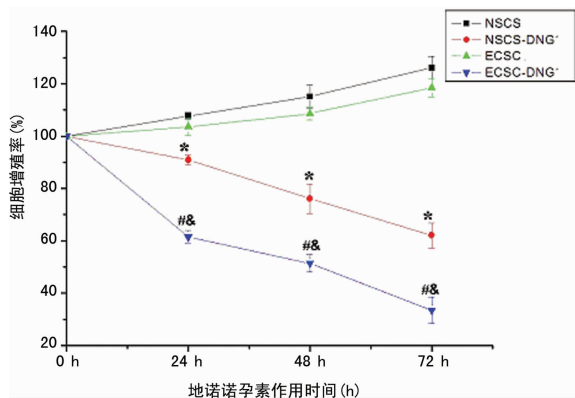
**1.2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测地诺孕素对子宫内间质细胞 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白表达的影响** 50 nmol/L 地诺孕素作用 48 h 后弃去培养基, PBS 洗细胞 2 次。加入含有 PMSF 的细胞裂解液 RIPA, 刮细胞, 冰上裂解 10 min。加入 SDS 缓冲液, 100 °C 煮沸 5 min 后, 冰上冷却 5 min 后, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 5 min, 所得上清液用考马斯亮蓝法测定蛋白含量。用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 电转移到硝酸纤维素膜上。NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 一抗工作液 4 °C 孵育过夜后, 用 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 二抗工作液 37 °C 孵育 30 min, 化学发光显影。

**1.3 统计学处理** 实验数据应用 SPSS18.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间差异采用 *t* 检验方法, 多组差异进行单因素方差 (one-way ANOVA) 分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 细胞鉴定** LEICA 倒置荧光显微镜镜检, 原代细胞培养 24 h 后即可贴壁, 细胞体积较大且多呈梭形。对细胞进行免疫荧光染色后, 95% 以上细胞的细胞质有绿色荧光。

**2.2 地诺孕素对子宫内间质细胞的抑制作用** 用 MTT 法检测地诺孕素对子宫内间质细胞增殖的作用, 如图 1 所示。NSCS 细胞和 ECSC 细胞都表现出随时间的增殖趋势, 但 ECSC 细胞增殖率低于 NSCS 细胞。给予 50 nmol/L 地诺孕素干预后, NSCS 细胞和 ECSC 细胞都表现出了增殖抑制趋势 ( $P < 0.05$ ), 但地诺孕素对 ECSC 细胞抑制作用更强 ( $P < 0.05$ )。



\*:  $P < 0.05$ , 与 NSCS 组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 ECSC 组比较; &:  $P < 0.05$ , 与 NSCS-DNG 组比较。

图 1 地诺孕素对子宫内间质细胞增殖的影响

**2.3 地诺孕素对子宫内间质细胞凋亡的影响** 实验中采用流式细胞术对 50 nmol/L 地诺孕素干预 48 h 各组细胞进行凋亡检测, 检测结果显示: 无地诺孕素干预时, NSCS 细胞和 ECSC 细胞凋亡率低; 当给予 50 nmol/L 地诺孕素干预后, NSCS 细胞凋亡率 ( $6.16 \pm 0.54$ )%, NSCS-DNG 细胞凋亡率 ( $43.41 \pm 3.77$ )%, ECSC 细胞凋亡率 ( $5.98 \pm 0.66$ )%, ECSC-

DNG 细胞凋亡率 ( $69.57 \pm 5.71$ )%。NSCS 细胞和 ECSC 细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而且 ECSC 细胞凋亡率高于 NSCS 细胞 ( $P < 0.05$ )。

**2.4 地诺孕素对子宫内间质细胞 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白表达的影响** 通过 Western blot 法对 NSCS 组、NSCS-DNG 组、ECSC 组和 ECSC-DNG 组进行 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白检测, 发现: 各组均有 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白条带; 与 NSCS 组比较, ECSC 组 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白表达明显增多, 而 NSCS-DNG 组中 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白表达减少; 与 ECSC 组比较, ECSC-DNG 组中 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白表达显著减少。

**3 讨 论**

子宫内细胞程序性凋亡对其保持正常结构和功能具有重要意义, 其周期性变化实际上就是靠月经周期的分泌晚期及月经期的细胞凋亡来实现的。而子宫内异位症患者的内膜细胞凋亡趋势减弱, 凋亡失去周期性。研究发现子宫内异位症患者内膜较正常内膜具有更高的增殖率, 且对凋亡调控不敏感<sup>[9]</sup>。Bcl-2 等抗凋亡基因家族促进了子宫内异位症的发生发展<sup>[10]</sup>, Bcl-2 等的大量表达可以降低子宫内异位症内膜间质细胞对凋亡刺激的敏感性, 使其免于被腹腔中的巨噬细胞吞噬或者以其他方式降解<sup>[11]</sup>。最终凋亡异常导致异位子宫内细胞在腹腔中的存活能力增强, 异位症发生、发展加剧。NF- $\kappa$ B 是介导多种细胞信号通路的关键因子之一, 参与机体免疫应答、参与炎症反应、应激反应等。王芳等<sup>[12]</sup>研究发现, 与正常子宫内组织比较, NF- $\kappa$ B 在子宫内异位症在位内膜表达有增强趋势, 而在异位内膜组织表达增强最显著 ( $P < 0.05$ )。对子宫内异位症研究发现, 患者腹腔液中巨噬细胞数量、炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 等水平均明显高于正常生化指标。NF- $\kappa$ B 可通过调控炎症信号通路中酶的基因转录诱导炎症细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等大量表达。另一方面, NF- $\kappa$ B 可以通过阻断线粒体释放细胞色素 C 而具有抑制细胞凋亡的作用, 研究发现 Caspase3 与 Bcl-2 存在相互制约的关系。因此, NF- $\kappa$ B 对子宫内异位症的发生、发展具有很重要的作用, 极有可能成为潜在治疗内异症的靶点。

子宫内异位症在育龄妇女中有约 10% 的发病率, 严重影响了患者的健康及生活。地诺孕素于 2011 年在加拿大上市, 用于治疗妇女子宫内异位相关疾病。临床研究发现, 地诺孕素可以有效减轻患者内异症引起的骨盆疼痛等症状, 而且其耐受性好、不良反应少。地诺孕素对机体电解质平衡、糖代谢、肾上腺功能和甲状腺功能无明显影响, 而且地诺孕素无肝损伤作用, 其对凝血机制和血脂代谢的影响不能成为诱发心血管疾病的危险因素。头痛、不规则出血和乳房不适是地诺孕素常见的不良反应, 但是其会随着治疗而逐渐减轻。

总之, 地诺孕素有明显诱导异位内膜间质细胞凋亡的作用, 它降低了异位内膜间质细胞对 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白的表达, 这很可能是地诺孕素治疗子宫内异位症的潜在作用靶点及作用机制。

**参考文献:**

[1] Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis[J]. Hum Reprod, 2005, 20(10): 2698-2704.  
 [2] Schreinemacher MH, Backes WH, Slenter JM, et al. Towards endometriosis diagnosis by gadofosveset-trisodium enhanced magnetic resonance imaging[J]. (下转第 4439 页)

存在的问题进行更加深入地研究和评估。

#### 参考文献:

- [1] Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1249-1259.
- [2] Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, et al. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells[J]. *Circulation*, 2003, 108(7): 889-895.
- [3] Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury[J]. *Circ Res*, 2003, 93(2): e17-24.
- [4] Griese DP, Ehsan A, Melo LG, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy [J]. *Circulation*, 2003, 108(21): 2710-2715.
- [5] Liu JF, Du ZD, Chen Z, et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by upregulating endothelial progenitor cells via the nitric oxide system[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(6): 1402-1408.
- [6] Song Y. Association study of circulating endothelial progenitor cells and plasma prostacyclin levels in pulmonary hypertension rats[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(1): 438-444.
- [7] Qiao L, Nishimura T, Shi L, et al. Endothelial fate mapping in mice with pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 2014, 129(6): 692-703.
- [8] Levy M, Bonnet D, Mauge L, et al. Circulating endothelial cells in refractory pulmonary hypertension in children: markers of treatment efficacy and clinical worsening [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65114.
- [9] Lin CP, Lin FY, Huang PH, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 845037.
- [10] Yang JX, Pan YY, Zhao YY, et al. Endothelial progenitor cell-based therapy for pulmonary arterial hypertension [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(8): 1325-1336.
- [11] Diller GP, van Eijl S, Okonko DO, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. *Circulation*, 2008, 117(23): 3020-3030.
- [12] Junhui Z, Xingxiang W, Guosheng F, et al. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. *Respir Med*, 2008, 102(7): 1073-1079.
- [13] Marsboom G, Pokreisz P, Gheysens O, et al. Sustained endothelial progenitor cell dysfunction after chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4): 1017-1026.
- (收稿日期: 2014-06-17 修回日期: 2014-08-14)
- 
- (上接第 4435 页)
- PLoS One, 2012, 7(3): 33241.
- [3] Seyide S, Emin SM, Suzan O, et al. The effects of post-surgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(1): 160-167.
- [4] Schindler AE. Pathophysiology, diagnosis and treatment of endometriosis [J]. *Minerva Ginecol*, 2004, 56(5): e. 419-435.
- [5] Sasagawa S, Shimizu Y, Kami H, et al. Dienogest is a selective progesterone receptor agonist in transactivation analysis with potent oral endometrial activity due to its efficient pharmacokinetic profile [J]. *Steroids*, 2008, 73(2): 222-231.
- [6] Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, et al. Reprint of classification and pharmacology of progestins [J]. *Maturitas*, 2008, 61(1): 171-180.
- [7] Harada T, Momoeda M, Taketani Y, et al. Dienogest is as effective as intranasal buserelin acetate for the relief of pain symptoms associated with endometriosis-a randomized, double-blind, multicenter, controlled trial [J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(3): 675-681.
- [8] Momoeda M, Taketani Y. Randomized double-blind, multicentre, parallel-group dose-response study of dienogest in patients with endometriosis [J]. *Jpn Pharmacol Ther*, 2007, 35(7): 769-783.
- [9] Szymanowski K. Apoptosis pattern in human endometrium in women with pelvic endometriosis [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2006, 68(2): 343-350.
- [10] Harada T, Taniguchi F, Izawa M, et al. Apoptosis and endometriosis [J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 3140-3151.
- [11] Braun DP, Ding J, Shaheen F, et al. Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2007, 87(2): 263-268.
- [12] 王芳, 何援利, 刘木彪. 核转录因子- $\kappa$ B 在子宫内膜异位症中的表达及其意义 [J]. *诊断病理学杂志*, 2005, 12(2): 137-139.
- (收稿日期: 2014-03-11 修回日期: 2014-07-19)