

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.25.003

维甲酸对异位内膜基质细胞 Beclin-1 的影响研究*

董少瑞¹,李绍波²,路会侠^{2△}

(1.大理大学 2013 级临床医学专业,云南大理 671000;2.大理大学临床医学院,云南大理 671000)

[摘要] **目的** 探讨不同剂量维甲酸(RA)对正常子宫内膜基质细胞和异位内膜基质细胞(ESC)Beclin-1 的影响。**方法** 体外培养正常子宫内膜基质细胞和 ESC,分为空白对照组(正常子宫内膜基质细胞),氯喹(CQ)组(ESC),CQ+RA 组(ESC)。分别采用 RT-PCR 及 Western blot 检测各组 LC3-II、Beclin-1 mRNA 及蛋白的表达量,PCR 及 Western blot 检测 RA 作用于 CQ 或转染 siRNA Beclin-1 处理的细胞中 Beclin-1 表达的变化,MTT 法检测 RA 细胞毒性。**结果** CQ 组 LC3-II、Beclin-1 mRNA 表达较空白对照组减少,CQ+RA 组较 CQ 组增加,差异有统计学意义($P<0.05$);CQ+RA 组与空白对照组 LC3-II mRNA 表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。随着 RA 浓度的增加,ESC Beclin-1 表达逐渐升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。siRNA Beclin-1 在确定的转染条件下可有效沉默 ESC 的 Beclin-1 基因表达,RA 可解除 siRNA 对 Beclin-1 的沉默作用。不同浓度 RA 对细胞的存活率与对照组比较,差异无统计学差异($P>0.05$)。**结论** RA 可以诱导 ESC 中自噬的发生,升高 ESC Beclin-1 的表达,且与刺激浓度呈正相关。

[关键词] 维甲酸;子宫内膜异位症;自噬;Beclin-1**[中图分类号]** R711.71**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)25-3253-04

Effect of retinoic acid on Beclin-1 of endometriotic stromal cells*

DONG Shaorui¹,LI Shaobo²,LU Huixia^{2△}

(1. Grade 2013, Clinical Medicine Speciality, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China;

2. Clinical College of Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

[Abstract] **Objective** To detect the effect of change of different doses of retinoic acid(RA) on Beclin-1 expression of normal endometrial stromal cells and endometriotic stromal cells (ESC), and to preliminarily discuss the action mechanism of RA in treating endometriosis. **Methods** In vitro cultured normal endometrial stromal cells and ESC were divide into the blank control group (normal endometrial stromal cells), chloroquine(CQ)group(ESC cells) and CQ and RA combined action group(ESC cells). RT-PCR and Western blot were adopted to detect LC3-II and Beclin-1 mRNA and protein expression levels in each group; PCR and Western blot were used to test Beclin-1 expression level in cells by RA acting on CQ or by transfecting siRNA treatment; MTT was used to detect cytotoxicity of RA. The inter-group comparison adopted one-way analysis of variance, and the inter-group pairwise comparison adopted the t test. **Results** The expression of LC3-II mRNA and Beclin-1 mRNA in CQ+RA group was lower than that in blank control group, and the expression of LC3-II mRNA in CQ+RA group was higher than that in CQ group ($P<0.05$). With the increase of RA concentration, the expression of ESC Beclin-1 increased gradually, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). SiRNA Beclin-1 could effectively silence the Beclin-1 gene expression of ESC under certain transfection conditions, and RA could relieve the silencing effect of siRNA. There was no significant difference in survival rate between RA group and control group at different concentrations ($P>0.05$). **Conclusion** RA could induce the occurrence of autophagy in ESC, enhances Beclin-1 expression in ESC and is positively correlated with the stimulation concentration.

[Key words] retinoic acid; endometriosis; autophagy; Beclin-1

子宫内膜异位症(EMs)是育龄妇女常见病,其发病机制至今不明,有研究发现自噬(Autophagy)^[1]可能与 EMs 的发生、发展密切相关^[2];而抑癌基因 Bec-

lin-1 作为自噬过程重要的正向调控因子,参与自噬体形成^[3-4]。维甲酸(RA)是天然维生素 A 的代谢产物,有研究显示 RA 可能与子宫内膜细胞的激素调节有

关,但 RA 对 EMs 的具体机制尚不清楚。本研究拟通过检测不同剂量 RA 作用于正常子宫内膜基质细胞和异位内膜基质细胞(ESC)时 Beclin-1 表达的变化,探讨 RA 治疗 EMs 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 选取 20 例 EMs 患者标本,年龄 24~45 岁,均已婚,月经规则,术前 3 个月未使用激素类药物,均于 2016 年 1—12 月在大理大学第一附属医院行手术,术中剥离卵巢异位囊肿壁待用,病检证实为 EMs。另选同期 20 例因不孕症行诊刮术患者,年龄 23~47 岁,无激素治疗,术后取子宫内膜待用,病检证实为正常子宫内膜。本研究的所有患者均知情并签字同意,且由医院学术伦理委员会讨论批准。所有标本在离体 30 min 内保存于液氮内,需要时分别取出解冻后行正常子宫内膜基质细胞或 ESC 培养,进行细胞试验。

1.1.2 主要试剂 Beclin-1 多克隆抗体(美国 Cell Signal 公司),微管结合蛋白轻链 3(microtubule-associated protein light chain 3,LC3)-II 多克隆抗体(美国 Cell Signal 公司),氯喹(CQ,美国 Selleckchem 公司),兔抗人 Beclin-1 抗体(美国 Santa Cruz 公司),山羊抗兔二抗(联科生物技术公司),Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(美国 Jackson 公司),DAPI(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 正常子宫内膜基质细胞或 ESC 均培养于 37 °C、5%CO₂ 的细胞孵箱内,培养基为 RPMI-1640(美国 HyClone 公司)+10% 新生牛血清(兰州民海公司),分为空白对照组(正常子宫内膜基质细胞)、CQ 组(ESC)、CQ+RA 组(ESC),于对数生长期进行实验。

1.2.2 免疫荧光检测 LC3 是自噬标志物,最初位于细胞质,自噬形成时,胞质型 LC3(LC3-II)转变为胞膜型 LC3(LC3-III)。LC3-III 在自噬体膜内外都有结合,检测 LC3 荧光斑点是观察细胞自噬最直观的方法。两种内膜基质细胞采用免疫荧光染色,观察细胞内 LC3 荧光斑点。分别取正常子宫内膜基质细胞及 ESC,接种在 6 孔板中,每个细胞设置 3 复孔,待 48 h 细胞融合时开始实验。PBS 洗涤 3 次,每孔加入固定液 200 μL 固定 15 min。PBS 洗涤 3 次,每孔加入细胞通透液 200 μL(含 0.1% Triton X-100 的 PBS),室温放置 10 min。PBS 洗涤 3 次,每孔加入封闭液 200 μL,室温湿盒内放置 2 h。去除封闭液,每孔加入 50 μL 稀释的一抗(Anti-LC3-II 抗体稀释度 1:2 000)。4 °C 冰箱湿盒内放置过夜。去除一抗,PBST 洗涤 3 次。每孔加入 50 μL 荧光标记的二抗,Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 稀释度 1:400。37 °C 孵箱内孵育 30 min(避光操作)。去除二抗,PBST 洗涤 3 次。

每孔加入 100 μL DAPI(2 μg/mL),室温放置 10 min。PBST 充分洗涤 3 次。每孔加入 200 μL PBS。倒置荧光显微镜观察(避光操作)。

1.2.3 RT-PCR 正常子宫内膜基质细胞和 ESC 分别接种于 6 孔板中,待生长至大于 80%时,空白对照组不做任何处理,CQ 组加入 CQ,CQ+RA 组加入 CQ 和 RA,药物处理 6 h 后,用 Trizol 法(美国 Invitrogen 公司)进行总 RNA 提取(每 100 g 组织中),1 μg mRNA 用 AMV 反转录酶(美国 Promega 公司)合成 cDNA。反应条件为预变性 95 °C 30 s,变性 94 °C 45 s,退火 55 °C 45 s,延伸 72 °C 1 min,40 个循环。GAPDH:上游引物 5'-GGTCTCCTCTGACT-TCAACA-3',下游引物 5'-AGCC AAATTCGTTGT-CATAC-3';LC3-II:上游引物 5'-GACGGCTTCCT-GTACATGGTTT-3',下游引物 5'-TGGAGTCTTA-CACAGCCATTGC-3';Beclin-1:上游引物 5'-GCTC-CATGCTTTGGCCAATAAC-3',下游引物 5'-ATG-GTCAAACCTGTTGTCCAG-3'。

1.2.4 Western blot 正常子宫内膜基质细胞和 ESC 分别用不同浓度 RA(5、10、20、40、60、80、100 μmol/L)和(或)CQ 处理。取 30 g 细胞总蛋白经 10%凝胶进行电泳分离,转入 PVDF 膜,0.1% Tween 20(TBST;50 mmol/L Tris Cl,pH 7.5,150 mmol/L NaCl)和 3% BSA 封闭 3 h,按稀释浓度 Beclin-1 1:500 加入一抗,4 °C 孵育过夜,按稀释浓度 1:1 000 加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,加入发光剂进行成像分析,观察各实验分组 Beclin-1 光密度差异。

1.2.5 转染 Beclin-1 siRNA 实验分为对照组、阴性对照组、转染组及 RA 处理组,每组设 3 复孔。转染在 24 孔板中进行,转染前 1 d 接种细胞,使得转染时细胞融合达 30%。转染前 1 h 将孔中培养基更换为无血清的 RPMI-1640。24 孔板转染分别用 50 μL RPMI-1640 稀释 20 pmol siRNA 和 1 μL Lipo 2000 Reagent,将 100 μL 复合物滴入细胞中,4 h 后换液,待细胞生长约 80%融合时,荧光显微镜下观察荧光及转染情况。

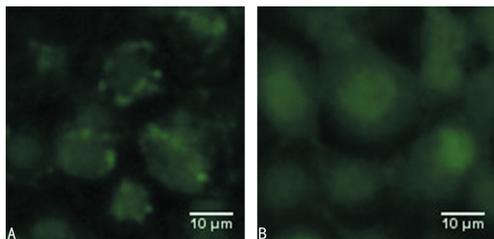
1.2.6 MTT 96 孔板中分别培养 ESC,待细胞生长为 70%~90%时,加入 RA(浓度分别为 1、2、4、6、8 μmol/L),同时设置调零孔(培养液、MTT、DMSO),对照孔(培养液、MTT、DMSO),每个样品和对照均设 3 个平行样,孵育 24 h 后,弃上清液,每孔加入 90 μL 含 1%胎牛血清的 RPMI-1640 和 10 μL 的 5 mg/mL MTT 溶液,培养 4 h 弃上清液,每孔再加入 110 μL 的 DMSO,置于 37 °C 10 min 至紫色结晶完全溶解后,利用酶标仪在 490 nm 测其吸光度值(A 值),计算出细胞存活率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素

方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常子宫内膜基质细胞及 ESC 中 LC3-II 的表达 正常子宫内膜基质细胞内仅个别细胞有少量的 LC3 荧光斑点,细胞维持低水平自噬。ESC 中出现了明显的 LC3 荧光斑点(自噬囊泡),见图 1。



A: 正常子宫内膜基质细胞; B: ESC

图 1 正常子宫内膜基质细胞及 ESC 中 LC3-II 的表达

2.2 RA 对 LC3-II、Beclin-1 mRNA 表达的影响 CQ 组 LC3-II、Beclin-1 mRNA 表达较空白对照组减少,而 CQ+RA 组较 CQ 组增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。CQ+RA 组与空白对照组比较,Beclin-1 mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$),LC3-II mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 2。

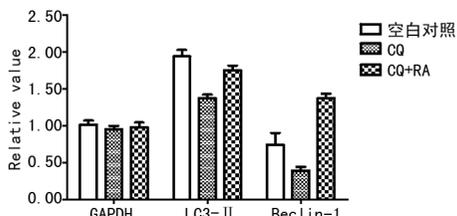


图 2 RA 对 ESC 中 LC3-II、Beclin-1 mRNA 表达的影响

2.3 不同浓度 RA 对 ESC Beclin-1 蛋白表达的影响 随着 RA 浓度的增加,ESC Beclin-1 蛋白表达逐渐升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3。

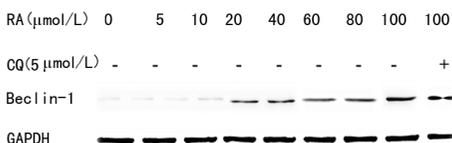
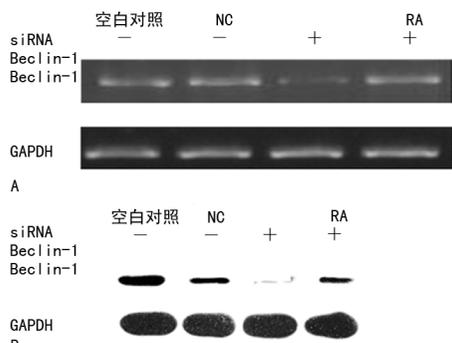


图 3 不同浓度 RA 作用下 ESC Beclin-1 蛋白表达变化



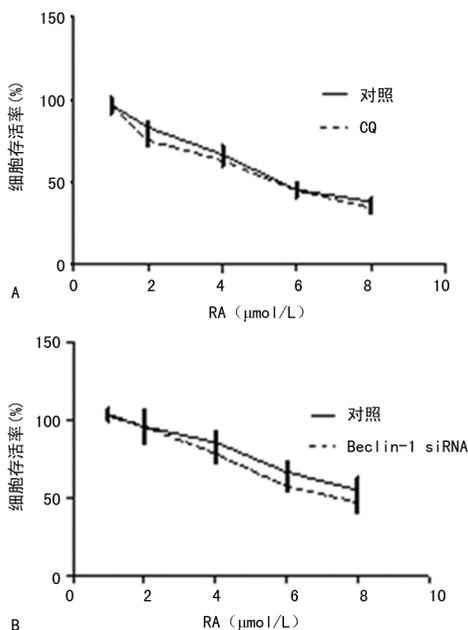
A: PCR; B: Western blot

图 4 RA 对 siRNA Beclin-1 的影响

2.4 RA 对 siRNA Beclin-1 的影响 siRNA Beclin-

1 在确定的转染条件下可有效沉默 ESC 中 Beclin-1 基因的表达,而 RA 可解除 siRNA 对 Beclin-1 的沉默作用,见图 4。

2.5 RA 细胞毒性 通过 CQ 或 siRNA Beclin-1 抑制自噬,不同浓度 RA 对细胞的存活率与对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 5。



A: CQ 抑制; B: siRNA 抑制

图 5 RA 的细胞毒性

3 讨论

自噬是细胞的胞质降解并循环利用产生能量的过程。作为细胞“自我消化”的过程广泛贯穿于真核细胞的诸多生命活动,并在多种疾病的病理过程中扮演重要的角色,尤其在肿瘤的发生、发展过程中起到了极为重要的作用。已有研究发现,与自噬相关的核心调控通路 PI3K/Akt/mTOR 在包括乳腺癌、子宫内膜癌等多种恶性肿瘤的研究中备受关注^[5]。PI3K/Akt 通路激活 mTOR 表达调节细胞增殖,通过调节缺氧诱导因子 1- α (HIF-1)表达诱导 VEGF 及胚胎干细胞产生,诱发血管形成和血管通透性增加^[6-7]。新陈代谢、炎症反应、神经退行性病变等都会对细胞形成应激刺激,mTOR 通路被抑制,使自噬能顺利被诱导。自噬信号的激活可抑制肿瘤血管生成^[6]。但自噬在 EMs 中的作用机制尚不十分清楚。Beclin-1 作为一种单倍体不足的肿瘤抑制基因,Beclin-1/PI3K-III 复合物参与了自噬体的形成及自噬的启动^[8],Beclin-1 的表达亦被用于检测自噬的活性。Beclin-1 下调或缺失可促使肿瘤细胞的恶性生物学效应,而上调其表达将成为某些特定肿瘤的有效治疗手段^[9]。Beclin-1 在卵巢癌中的过表达可有效抑制 SKOV3/DDP 细胞的体外增殖能力及侵袭转移能力^[10]。不同临床分期的 EMs 中 Beclin-1 表达不同,分期越高其表达越低^[11-12]。REN 等^[13]报道 Beclin-1 在异位内膜中的表达远低于在位内膜;HAMACHER-BRADY 等^[14]也

发现 EMs 患者 Beclin-1 mRNA 及蛋白表达低于健康女性。笔者在实验中亦发现 EMs 患者 Beclin-1 mRNA 表达较健康人群减少,与文献报道一致。

RA 有着广泛的生物学作用,如参与调节炎症细胞、免疫细胞的激活,促进发育组织上皮细胞的增殖、分化等^[15]。RA 在人体细胞内的转化受到严格的代谢通路调控,应用于治疗某些细胞增殖性疾病(如白血病)和高 VEGF 表达的恶性肿瘤疾病。TEE 等^[16]发现 RA 对 VEGF 含量丰富的人早幼粒细胞(HL-60)内膜细胞效果明显,主要通过 Tie2 信号途径抑制血管内皮细胞及血管平滑肌细胞的生长。廖伟超等^[17]报道依维莫司联合 RA 能诱导 NB4-R1 细胞分化,且能阻滞细胞周期而不致细胞凋亡,其机制可能与依维莫司联合 RA 抑制 mTOR 信号通路激活自噬作用有关。宋兆侠等^[18]发现 RA 可降低异位内膜组织中 VEGF mRNA 和蛋白表达从而减少病灶内血管分布,减小内异症病灶体积。本研究发现,RA 与 ESC 一起孵育,可以刺激细胞中 Beclin-1 的表达,随着 RA 浓度增加,Beclin-1 的表达亦相应升高。利用自噬抑制剂 CQ 或转染 siRNA Beclin-1 抑制 EMs 细胞的自噬后,发现 RA 可对抗自噬抑制剂 CQ 或基因沉默对 Beclin-1 的抑制作用。这些结果说明 RA 可以诱导自噬的发生,通过刺激 ESC 中 Beclin-1 的表达,而达到控制 EMs 病情进展的可能。

虽然近年国外已有研究表明 PI3K/Akt/mTOR 通路与 EMs 关系密切,但自噬在 EMs 异位灶形成过程中的作用是否与该通路有关,目前国内少见报道。RA 可能通过激活自噬、抑制异位病灶中血管的生长而达到治疗,其中机制有待进一步探索,有可能成为 EMs 的一种新的治疗手段。

参考文献

- [1] 周渊,王汉东.替莫唑胺在胶质母细胞瘤化疗中的自噬作用研究进展[J].中华神经医学杂志,2012,11(10):1069-1072.
- [2] MAKKER A, GOEL M M, DAS V, et al. PI3K-Akt-mTOR and MAPK signaling pathways in polycystic ovarian syndrome, uterine leiomyomas and endometriosis: an update[J]. Gynecol Endocrinol, 2012, 28(3): 175-181.
- [3] WANG J R. Beclin 1 bridges autophagy, apoptosis and differentiation[J]. Autophagy, 2008, 4(7): 947-948.
- [4] ESKELINEN E L, SAFTIG P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1793(4): 664-673.
- [5] GHAYAD S E, COHEN P A. Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR pathway: new hope for breast cancer patients[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2010, 5(1): 29-57.
- [6] KISHORE T K K, GANUGULA R, GADE D R, et al. Gedunin abrogates aldose reductase, PI3K/Akt/mTOR, and NF- κ B signaling pathways to inhibit angiogenesis in a hamster model of oral carcinogenesis[J]. Tumour Biol, 2016, 37(2): 2083-2093.
- [7] FUJII M, AMANSO A, ABRAHÃO T B, et al. Polymerase delta-interacting protein 2 regulates collagen accumulation via activation of the Akt/mTOR pathway in vascular smooth muscle cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 92(1): 21-29.
- [8] CHEKHONIN V P, SHEIN S A, KORCHAGINA A A. VEGF in tumor progression and targeted therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(4): 423-443.
- [9] 张晶,舒丽莎,张林西.自噬通路中 mTOR 和 Beclin1 与肿瘤关系的研究进展[J].河北医药,2016,38(18):2837-2840.
- [10] 孙阳,刘佳华,晋龙,等. Beclin1 基因对 SKOV3/DDP 细胞生长增殖与侵袭转移的影响[J].现代妇产科进展,2014,23(4):266-269.
- [11] 姜晶晶,高姗姗,李春艳. PTEN 与 Beclin1 在子宫内膜异位症的表达和临床意义[J].标记免疫分析与临床,2015,22(12):1226-1229.
- [12] 李月红,张春来,李欧,等.微管相关蛋白轻链 3 和 beclin-1 在子宫内膜异位症中的表达及意义[J].解剖学杂志,2014,37(2):142-145.
- [13] REN Y, MU L, DING X, et al. Decreased expression of Beclin 1 in eutopic endometrium of women with adenomyosis[J]. Arch Gynecol Obstet, 2010, 282(4): 401-406.
- [14] HAMACHER-BRADY A, BRADY N R, GOTTLIEB R A. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes[J]. J Biol Chem, 2006, 281(40): 29776-29787.
- [15] SHI Z, LI C Y, ZHAO S, et al. A systems biology analysis of autophagy in cancer therapy[J]. Cancer Lett, 2013, 337(2): 149-160.
- [16] TEE M K, VIGNE J L, TAYLOR R N. All-trans retinoic acid inhibits vascular endothelial growth factor expression in a cell model of neutrophil activation[J]. Endocrinology, 2006, 147(3): 1264-1270.
- [17] 廖伟超,何莹,王斌生,等.依维莫司联合全反式维甲酸逆转急性早幼粒细胞白血病细胞耐药的研究[J].浙江大学学报(医学版),2015,44(5):525-531.
- [18] 宋兆侠,王毅,陈瑛,等.维甲酸对大鼠子宫内膜异位症的作用研究[J].现代妇产科进展,2014,23(6):480-482,485.

(收稿日期:2018-03-12 修回日期:2018-05-11)