

# 子宫腺肌病组织中的雌激素、雌激素受体、miR-21 致病作用和调控作用

曾玉燕<sup>1</sup>, 贾金金<sup>2</sup>, 卢洁<sup>1</sup>, 曾诚<sup>2</sup>, 耿红玲<sup>1</sup>, 陈颐<sup>1</sup>

<sup>1</sup>广州中医药大学第二附属医院妇科, 广东 广州 510120; <sup>2</sup>广州中医药大学第一附属医院妇科, 广东 广州 510405

**摘要:**目的 探讨miR-21、雌激素(E2)及其受体(ER)在子宫腺肌病发病中的具体机制。方法 采用qRT-PCR检测miR-21在子宫腺肌病组织中水平,以宫颈病变为对照组。体外原代培养子宫腺肌病细胞,qRT-PCR检测E2激活组、ICI82780(ER抑制剂)+E2激活组、E2剥夺组、E2剥夺+ER抑制组及对照组各组miR-21水平。miR-21 mimic、miR-21 inhibitor转染子宫腺肌病细胞,分别过表达和干扰miR-21,从正反两方面验证miR-21对子宫腺肌病细胞增殖、凋亡、迁移及细胞自噬等超微结构的影响。结果 miR-21在子宫腺肌病病灶组织中的表达水平明显高于正常子宫肌层中表达水平( $P<0.05$ ),与其余各组的差异无统计学意义( $P>0.05$ );E2激活状态下,E2激活组miR-21表达水平较ER抑制+E2激活组及对照组升高( $P<0.05$ );E2剥夺状态下,E2剥夺+ER抑制组miR-21表达水平较E2剥夺组及对照组降低( $P<0.05$ );干扰miR-21可以抑制子宫腺肌病细胞增殖和迁移,使线粒体内质网不同程度扩张、溶酶体增多、自噬小体出现,促进细胞的凋亡;而过表达miR-21则发挥相反的作用。结论 MiR-21在子宫腺肌病细胞中通过改变细胞超微结构而发挥促增殖、迁移及抗凋亡的作用,可能与疾病的早期形成有关;ER除与E2结合调控miR-21外还可通过其他途径调控miR-21,这可能是子宫腺肌病的发病机制之一,其中ER对miR-21的调控作用大于E2。

**关键词:**子宫腺肌病;miR-21;雌激素;雌激素受体

## Estrogen, estrogen receptor and miR-21 in adenomyosis: their pathogenic roles and regulatory interactions

ZENG Yuyan<sup>1</sup>, JIA Jinjin<sup>2</sup>, LU Jie<sup>1</sup>, ZENG Cheng<sup>2</sup>, GENG Hongling<sup>1</sup>, CHEN Yi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gynecology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;

<sup>2</sup>Department of Gynecology, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

**Abstract: Objective** To explore the pathogenic roles of miR-21, estrogen (E2), and estrogen receptor (ER) in adenomyosis. **Methods** We examined the expression levels of miR-21 in specimens of adenomyotic tissue and benign cervical lesions using qRT-PCR. In primary cultures of cells isolated from the adenomyosis lesions, the effect of ICI82780 (an ER inhibitor) on miR-21 expression levels prior to E2 activation or after E2 deprivation were examined with qRT-PCR. We further assessed the effects of a miR-21 mimic or an inhibitor on proliferation, apoptosis, migration and autophagy of the cells. **Results** The expression level of miR-21 was significantly higher in adenomyosis tissues than in normal myometrium ( $P<0.05$ ). In the cells isolated from adenomyosis lesions, miR-21 expression level was significantly higher in E2 activation group than in ER inhibition + E2 activation group and the control group ( $P<0.05$ ); miR-21 expression level was significantly lower in cells in E2 deprivation+ER inhibition group than in E2 deprivation group and the control group ( $P<0.05$ ). The adenomyosis cells transfected with miR-21 inhibitor showed inhibited proliferation and migration, expansion of mitochondrial endoplasmic reticulum, increased lysosomes, presence of autophagosomes, and increased cell apoptosis, while transfection of the cells with the miR-21 mimic produced the opposite effects. **Conclusion** MiR-21 plays an important role in promoting proliferation, migration, and anti-apoptosis in adenomyosis cells by altering the cell ultrastructure, which may contribute to early pathogenesis of the disease. In addition to binding with E2, ER can also regulate miR-21 through other pathways to participate in the pathogenesis of adenomyosis, thus having a stronger regulatory effect on miR-21 than E2.

**Keywords:** adenomyosis; miR-21; estrogen; estrogen receptor

子宫腺肌病(AM)是具有活性的子宫内膜腺体和间质异位到正常的子宫肌层,同时伴有周围子宫肌层细胞的肥大、增生和纤维化的一种常见妇科疾病<sup>[1]</sup>,其典型的临床表现为月经量多和进行性痛经,并对女性的生育

收稿日期:2023-09-07

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81904233,82104913);广东省中医院朝阳人才课题(ZY2022KY04)

Supported by Natural Science Foundation for the Youth (NSFY) of China (81904233, 82104913).

作者简介:曾玉燕,博士,副主任医师,硕士生导师,E-mail:459577808@qq.com

通信作者:陈颐,主任医师,硕士生导师,E-mail:rwei\_yuyan@163.com

能力有负面影响。AM患病率逐年上升且呈年轻化趋势<sup>[2,3]</sup>。AM发病机制尚未明确,有学者认为AM为一种雌激素(E2)依赖性疾病,伴随病灶局部E2表达明显升高,局部增多的E2一方面通过E2受体(ER)- $\beta$ 使内膜增殖和修复,另一方面能够通过ER- $\alpha$ 使催乳素分泌增加,导致子宫收缩过强,长期慢性的异常子宫收缩和过强蠕动可能会导致子宫内膜-肌层结合带的微损伤<sup>[4-6]</sup>;"在位内膜决定论"认为在位内膜是子宫内位症发病的决定因素,由于在位内膜干细胞、免疫因素、分子基因等机制异常引起内膜向肌层浸润而诱导疾病发生<sup>[7,8]</sup>。亦有研究发现,由于局部分子生物机制的影响,子宫平滑肌

具有化生或由成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的机能,因此子宫肌层在AM的发病机制中也起重要作用<sup>[9,10]</sup>。

近年来,miRNAs在疾病的发病机制方面取得了重大研究进展,并拓宽了我们对其靶向治疗的了解,尤其是在癌症方面<sup>[11,12]</sup>。研究表明miR-21在肝癌、结直肠癌、子宫肌瘤、子宫内膜异位症等多中疾病组织中异常表达,通过调控多种信号通路,参与到细胞的增殖、迁移和侵袭、细胞凋亡等生物学过程<sup>[13-16]</sup>。但miR-21在AM在位内膜、异位病灶组织中的表达如何在国内外文献中报道罕见,其与E2及ER在AM发病机制中的相关性亦未明确。本研究旨在观察miR-21在人AM在位内膜、异位病灶组织中的表达情况,通过体外原代培养AM病灶细胞,检测E2激活及剥夺两种状态下miR-21的表达水平,并通过过表达及干扰miR-21水平从正反方面验证miR-21对AM细胞增殖、凋亡、迁移及超微结构的影响,探讨E2、ER与miR-21在AM发病中的相关性。

表1 两组一般资料

Tab.1 General data of the patients with adenomyosis and cervical lesions (n=12)

Index	Adenomyosis group	Cervical lesions group	P
Age (year, Mean±SD)	45±3.59	44.33±5.87	0.740
No. of pregnancies [M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]	3.5 (1.25, 4.75)	3 (2.25, 4)	0.837
No. of births [M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]	2 (1, 2.75)	2 (1, 2.75)	0.760

1.1.2 组织取材 手术室中离体子宫立即由专人无菌操作“Y”形剖开,取子宫肌层组织约1 cm<sup>3</sup>及刮取宫腔内暴露的子宫内膜组织于冻存管中-80℃冻存,用于后续总RNA提取。体外细胞培养时取肌层约硬币大小的异位病灶至无菌培养管(内容5 mL含有1%双抗的PBS溶液)用作原代异位病灶细胞分离培养,另刮取宫腔内暴露的子宫内膜组织于冻存管中-80℃冻存,用于后续总RNA提取。

1.1.3 主要试剂及仪器 Trizol、Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen); 荧光定量PCR试剂、Oligod(T) Primer、Random Primer (TaKaRa); ICI182780 (Cayman); MTT (MCE); 17β-雌二醇 (Sigma); Penicillin-Streptomycin Solution (HyClone); 无酚红高糖DMEM (吉诺生物); 胎牛血清、高糖DMEM (1×)、0.25% Trypsin-EDTA (Gibco); 无酚红胎牛血清 (GEMINI); I型胶原酶 (Invitrogen); 广谱细胞角蛋白、波形蛋白、DAB显色剂 (中衫金桥), 0.01 mol/L (pH 7.4) PBS磷酸盐缓冲溶液、0.01 mol/L (pH 7.8) 柠檬酸缓冲溶液 (蓝吉生物); Mayer's 苏木素染液 [基因科技 (上海)]; 中性树胶 (MACKLIN); 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、二甲苯、无水乙醇 (天津市大茂化学试剂厂); PCR仪 (BIO-RAD); 实时荧光

## 1 资料和方法

### 1.1 组织样本的选择

1.1.1 一般资料 选取2020年1月~2022年7月于广东省中医院住院行手术治疗、年龄20~50岁的AM患者子宫在位内膜及病灶组织共12例作为实验组,选取同期因宫颈CINI~III等宫颈病变行全子宫切除患者正常子宫在位内膜及肌层组织12例作为对照组。纳入标准:术后均经病理确诊。排除标准:内膜病变;绝经和(或)年龄≥50岁;术前3月激素类药物应用史或宫内节育器置入史;合并严重内外科疾病及盆腔炎症性疾病;临床病历资料不完整者。纳入患者均知情同意,本研究获广东省中医院伦理委员会批准(批号:BF2020-123-01)。

实验组年龄40~51(45±3.59)岁,孕次1~11次,产次1~4次;对照组年龄34~51(44.33±5.87)岁,孕次2~10次,产次1~7次。两组患者的年龄、孕产次等基本资料的差异无统计学意义(P>0.05,表1)。

光定量仪器(cycleer)(BIO-RAD);台式高通量DNA合成仪(ABI3900);恒温CO<sub>2</sub>培养箱(Harris);全自动显微照相倒置式系统显微镜(OLYMPUS)。

1.1.4 主要试剂配制 E2:无水乙醇配制成浓度1 g/mL储存液,-20℃避光保存。ICI182780(ER抑制剂):DMSO配制成浓度1×10<sup>-3</sup> mol/L储存液,-20℃避光保存,DMSO最终浓度小于0.5%。

### 1.2 实验方法

1.2.1 qRT-PCR法检测AM患者子宫组织miR-21表达引物探针合成:GenBank上查找目的基因mRNA序列,采用Primer express 2.0软件设计特异性引物,引物探针由Invitrogen公司合成,引物序列如下:miR-21上游引物:GCTGTGGTAGCTTATCAGACTG;下游引物:GTGCAGGGTCCGAGGT;Gapdh上游引物:GATTCACCCATGGCAAATT;下游引物:TCTCGCTCCTGGAAGATGGT。

组织中miR-21表达水平检测:手术室无菌收集标本,根据TaKaRa试剂盒说明书,用TRIzol法提取组织中总RNA并检测RNA浓度、纯度及完整性,取1.857 μg总RNA使用两步法逆转录合成cDNA,并对目标基因进行实时荧光定量PCR检测,配置20 μL反应体系,

95 °C 预变性 10 min。逆转录反应条件:37 °C 60 min, 95 °C 3 min; 荧光定量反应条件:95 °C 3 min, 93 °C 15 s, 55 °C 35 s, 共循环 40 次。溶解曲线参数:60 °C 60 s, 95 °C 15 s。并设立阴性对照组,用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算样本组织中 miR-21 基因相对表达量。

1.2.2 AM 病灶细胞培养、传代和鉴定 手术室无菌收集 AM 患者病灶组织于预冷 PBS 中,0.5 h 内送至实验室,无菌 PBS 清洗组织 2~3 遍后,剪碎至肉末状,2~3 倍体积的 0.1% I 胶原酶消化 4~6 h,终止消化后分别用 100  $\mu\text{m}$  和 400  $\mu\text{m}$  滤网过滤并收集滤液,后离心(1000 r/min, 8 min)后弃去上清液,以含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 重悬后接种至 25  $\text{cm}^2$  的细胞培养皿进行原代间质细胞培养,5~10 d 传代 1 次,根据前期实验结果<sup>[13]</sup>,取第 3~7 代细胞用于研究。免疫细胞化学法对第 1 代细胞进行鉴定。

1.2.3 qRT-PCR 法检测 E2 激活及剥夺状态 AM 病灶细胞 miR-21 的表达 E2 激活状态:E2 激活组:1 $\times 10^{-6}$  mol/L 的 E2 处理 AM 病灶细胞 72 h; E2 激活组+ER 抑制:1 $\times 10^{-6}$  mol/L ICI182780 处理 24 h 后加入 1 $\times 10^{-6}$  mol/L 的 E2 处理 72 h; 不含血清的高糖 DMEM 为对照组。E2 剥夺状态:E2 剥夺组:含 10% charcoal-treated 胎牛血清、无酚红的 DMEM 处理 AM 病灶细胞 96 h; E2 剥夺+ER 抑制组:剥夺 E2 后,加入 1 $\times 10^{-6}$  mol/L 的 ICI182780 处理 24 h,以不含血清的高糖 DMEM 为对照组。

1.2.4 AM 细胞转染及对细胞增殖、迁移、凋亡及超微结构的影响 转染分组:miR-21 mimic 是 miR-21 模拟物,为化学合成的成熟 miRNA 双链,可使 miR-21 过量表达。miR-21 inhibitor 是 miRNA 抑制物,为化学修饰的成熟 miR-21 互补单链,可抑制 miR-21 表达。按照 1.2.2 方法培养原代 AM 细胞,取第 3 代处于对数生长期、生长状态良好的 AM 原代间质细胞,以 5 $\times 10^3$  孔接种于细胞培养 96 孔板,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。将细胞分为 5 组:AM cells 组、AM cells+mimics NC 组、AM cells+miR-21 mimics 组、AM cells+inhibitor NC 组、AM cells+miR-21 inhibitor 组(以下分别简称:AM cells 组、mimics NC 组、miR-21 mimics 组、inhibitor NC 组、miR-21 inhibitor 组)

转染步骤:对于每个转染样品,均按下面的方法准备:用 10  $\mu\text{L}$  无血清 opti-MEM 稀释 0.5  $\mu\text{L}$  siRNA (20  $\mu\text{mol/L}$ ),并用枪头轻轻混匀,室温下静置 5 min,然后取 0.25  $\mu\text{L}$  的经摇匀的 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 稀释在 10  $\mu\text{L}$  opti-MEM 中,室温下静置 5 min 后,轻轻混匀 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 和 siRNA 的稀释液(总体积为 20  $\mu\text{L}$ ),室温下静置 20 min; 20 min 后在每个培养孔分别加混合液 20  $\mu\text{L}$ ,摇匀后将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,6 h 后吸出混合液换入正常培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h。

qRT-PCR 法检测细胞 miR-21 表达水平:同上述合成引物探针,将 5 组对数生长期细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中同步培养,依照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA 并储存于 -80 °C 备用。余步骤与本文组织中 miR-21 表达水平的检测步骤相同。操作完成后通过 PCR 仪检测各组细胞中 miR-21 的表达量。

MTT 检测细胞增殖率:细胞转染 48 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT 后,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2 h,2 h 后吸出培养基,加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 震荡 10 min,最后用酶标仪 A<sub>570</sub> 测定各孔吸光度。细胞生长增殖率(%)= $(A_{\text{实验组}}-A_{\text{空白组}})/(A_{\text{对照组}}-A_{\text{空白组}})\times 100\%$ 。

划痕实验检测细胞迁移能力:细胞转染 48 h 后,胰酶分别消化收集各组细胞,用马克笔在 6 孔板背后借助直尺均匀地划横线,以 1 $\times 10^6$  孔将细胞接种于 6 孔细胞培养板中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中过夜。观察细胞完全贴壁融合率达 90% 以上时,用枪头比着直尺,尽量垂至于背后的横线做划痕。用 PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基,每组细胞在 0、24 h 选择 3 个视野 40 $\times$  镜下取样拍照。

流式细胞术检测细胞凋亡:细胞转染 48 h 后,用胰酶消化收集各组细胞,用 PBS 将细胞清洗 2 次,1200 r/min 离心 5 min。按照 AnnexinV-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒使用说明书进行操作:在细胞沉淀中加入 500  $\mu\text{L}$  Binding Buffer,枪头轻轻吹打重悬细胞后每组加入 5  $\mu\text{L}$  AnnexinV-APC 和 5  $\mu\text{L}$  7-AAD,轻柔涡旋混匀后室温避光反应 5 min,上机进行流式细胞检测并分析各组细胞凋亡率。

透射电镜观察 AM 病灶细胞超微结构:细胞转染 48 h 后,胰酶分别消化收集各组细胞,加入等体积的 2.5% 戊二醛固定液制成细胞混悬液,2000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。加入 10% 体积分数含有胎牛血清的 2.5% 戊二醛固定液,用吸管轻柔吹散细胞后再次 2000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。缓慢加入含有 2.5% 戊二醛、2% 多聚甲醛和 0.1% 磷酸盐缓冲液的混合液固定 30 min 后,PBS 冲洗 3 次,3 min/次。加 1 g/L 四氧化锇再次固定 30 min 后弃固定液,PBS 冲洗 3 次,3 min/次。经乙醇梯度脱水后包埋,烤箱中聚合 72 h 后修块切片,经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后,透射电镜下观察并拍片。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS29.0 软件进行数据统计分析。首先采用 Levene 方差齐性检验,若资料满足正态分布与方差齐性,以均数 $\pm$ 标准差表示,总体差异的比较行方差分析法;当总体之间的差异有统计学意义时,采用 LSD 法进行两两比较;若资料不满足方差齐性,以中位数及上下四分位数表示,采用 Wilcoxon 评分后,再进行 Kruskal-Wallis 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 VAS评分与病程的相关性

实验组 VAS 疼痛评分 5~9 ( $7 \pm 1.54$ ) 分, 病程为 0.08~30 ( $6.12 \pm 8.56$ ) 年, Pearson 相关性分析提示随着病程的延长, 痛经程度逐渐加重(图 1)。实验组 9 例为增殖期内膜, 3 例为分泌期内膜; 病理报告中, 2 例伴黄体囊肿, 1 例伴单纯性卵巢囊肿, 4 例伴副中肾管囊肿。对照组 8 例为增殖期内膜, 4 例为分泌期内膜。11 例病理报告为 CIN, 其中 6 例为宫颈 CIN III 级并累及腺体, 4 例病例报告为宫颈锥切术后, 未见 CIN 病变, 1 例为局灶 CIN I 级; 另 1 例为宫颈中分化腺癌, 癌组织浸润宫颈壁浅层, 阴道切缘、双侧宫旁组织未见癌累及。

### 2.2 AM 原代细胞培养的培养及鉴定

AM 原代细胞培养(图 2A)。本实验共成功培养 4 例细胞(成功率 100%), 第 1 代细胞经免疫细胞化学鉴定, 细胞波形蛋白、角蛋白镜下阳性表达(图 2B), 所培养细胞均为 AM 细胞。

### 2.3 miR-21 在 AM 患者病灶组织中表达上调

AM 异位病灶和在位内膜组织中 miR-21 的平均表达水平分别为  $2.07 \pm 0.19$  和  $1.42 \pm 0.34$ , 均高于相应的正

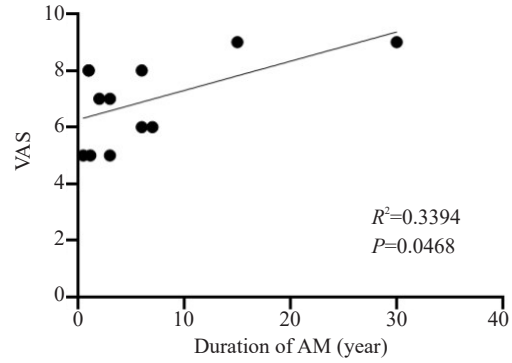


图 1 VAS 评分与病程的相关性分析

Fig.1 Correlation analysis between VAS score and disease duration in patients with adenomyosis.

常子宫肌层( $1.04 \pm 0.24$ )和内膜组织( $1.36 \pm 0.22$ )。miR-21 在 AM 病灶中表达水平最高, 且与正常子宫肌层组织中表达水平的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而 AM 在位内膜与正常内膜相比、AM 在位内膜与异位病灶相比、正常子宫内膜与正常子宫肌层相比 miR-21 表达水平的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ), 但在正常子宫组织中, 在位内膜中 miR-21 的表达水平高于肌层, 而 AM 在位内膜中 miR-21 的表达水平低于异位病灶(图 3)。

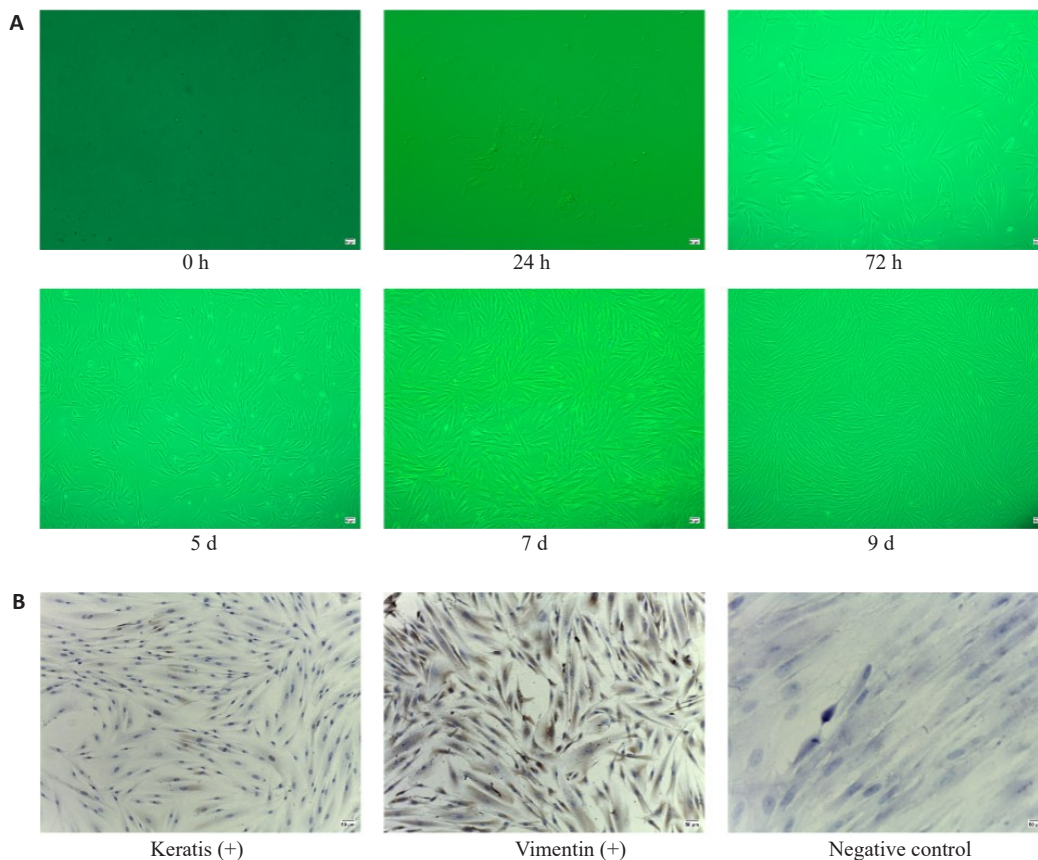


图 2 AM 原代细胞培养及鉴定

Fig.2 Primary culture and identification of adenomyosis cells. A: Primary adenomyosis cells (Inverted microscope, original magnification:  $\times 40$ ). The adenomyosis cells became adherent after culture for 24 h, proliferated rapidly at 3-5 d, reaching 80%-90% confluency and entering the plateau phase at 7 d. B: Identification of adenomyosis cells by immunocytochemistry ( $\times 200$ ).

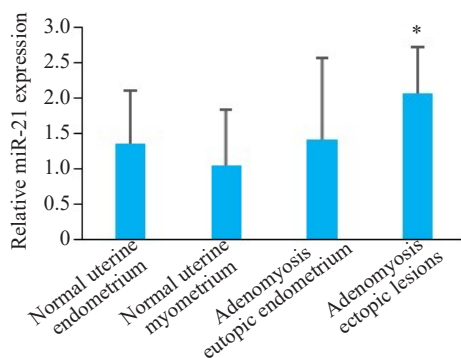


图3 AM异位病灶、内膜与正常子宫肌层及内膜miR-21表达水平比较

Fig.3 MiR-21 expressions in adenomyosis lesions, eutopic endometrium, normal uterine myometrium, and endometrium detected by qRT-PCR. \* $P<0.05$  vs normal uterine myometrium.

## 2.4 qRT-PCR检测不同处理因素人AM病灶细胞miR-21表达水平

2.4.1 E2激活状态下人AM病灶细胞中miR-21表达水平上调 E2激活状态下,ER抑制+E2激活组、E2激活组、对照组miR-21表达水平分别为 $5.05\pm 0.95$ 、 $13.81\pm 5.09$ 、 $2.22\pm 1.07$ 。E2激活组AM病灶细胞miR-21表达水平高于其余两组( $P<0.01$ );当阻断ER表达后,miR-21表达水平下降,与对照组的差异无统计学意义(图4A)。

2.4.2 E2剥夺状态下人AM病灶细胞miR-21表达水平下调 E2剥夺状态下,E2剥夺组、E2剥夺+ER抑制组、对照组的miR-21表达水平分别为 $279.45\pm 95.36$ 、 $65.89\pm 22.31$ 、 $338.82\pm 48.55$ 。E2剥夺+ER抑制组AM病灶细胞miR-21表达水平明显低于其余两组( $P<0.01$ ),E2剥夺组miR-21表达水平与对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图4B)。

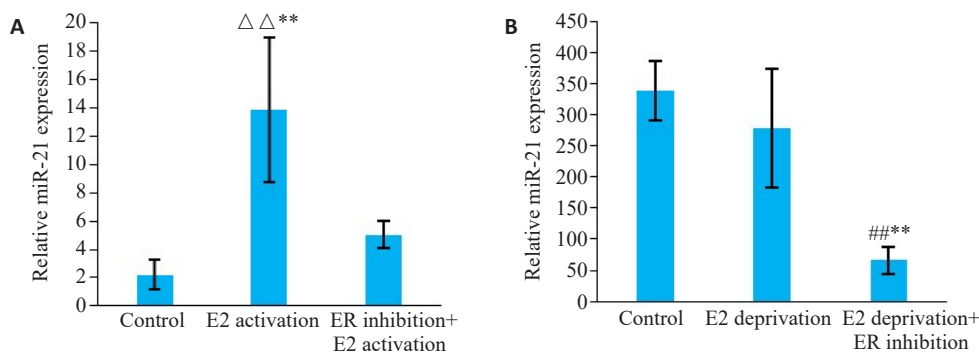


图4 E2激活或剥夺状态下人AM细胞中miR-21表达

Fig.4 Effect of ER inhibitor on miR-21 expression in adenomyosis cells with E2 activation (A) or deprivation (B). \*\* $P<0.01$  vs control group;  $\Delta\Delta$   $P<0.01$  vs ER inhibition+E2 activation; <sup>###</sup>  $P<0.01$  vs E2 deprivation group.

## 2.5 AM细胞转染后qRT-PCR验证各组miR-21表达变化

AM细胞转染情况(图5A、B)。与AM细胞组miR-21表达水平相比,miR-21 mimics组miR-21表达水平上升( $1.00\pm 0.00$  vs  $3.60\pm 0.20$ ,  $P<0.01$ );而miR-21 inhibitor组miR-21表达水平( $0.28\pm 0.02$ )下降( $P<0.01$ ,图5C)。

## 2.6 MiR-21促进AM病灶细胞增殖

MiR-21 mimics组细胞增殖率最高,与AM细胞组及mimics NC组相比,细胞增值率的差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。抑制miR-21表达后,与AM细胞组相比,miR-21 inhibitor组增殖率降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ ,图6)。

## 2.7 miR-21促进AM细胞的迁移

划痕实验结果显示。转染miR-21使其过表达后,AM细胞的迁移能力增加;反之,抑制miR-21表达后,AM细胞迁移能力下降(图7A)。和未经转染的AM细胞组

比较,miR-21 mimics组细胞的迁移距离增加( $P<0.01$ ),miR-21 inhibitor组细胞的迁移距离减少( $P<0.01$ ,图7B)。

## 2.8 miR-21抑制AM细胞凋亡

流式细胞术实验结果显示,与AM细胞组和阴性对照组相比,经miR-21 inhibitor转染后的AM细胞凋亡率上升( $P<0.01$ ,图8)。

## 2.9 各组AM细胞超微结构的改变

透射电镜观察结果显示,AM细胞组电镜下可见细胞核形态较规则,核仁较大,胞浆中线粒体形态较规则,未见明显肿胀,胞浆内溶酶体不多,内质网丰富且形态正常;miR-21 mimics组细胞核形态不规则,核中细胞质较多,胞浆中线粒体较多,结构正常,见极少数溶酶体,内质网未见扩张;miR-21 inhibitor组细胞核形态缩小,胞质肿胀,胞质中正常线粒体减少、形态不规则,发生肿胀并出现空泡化改变,溶酶体增多,出现较多自噬溶酶体,内质网扩张(图9)。

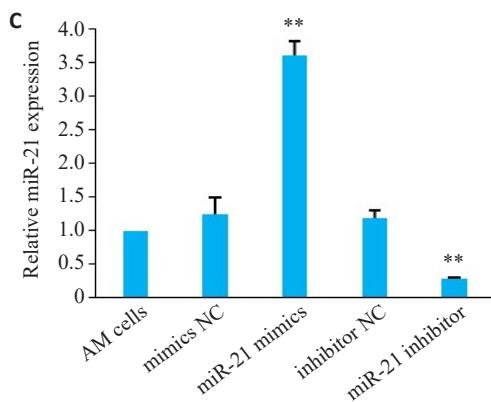
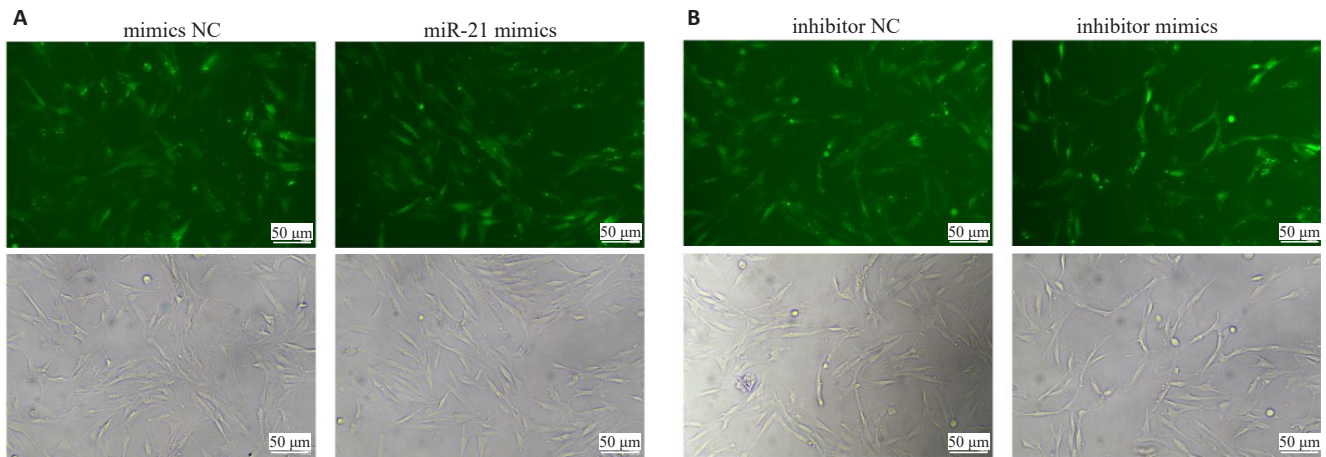


图5 AM细胞转染情况

Fig.5 Transfection of adenomyosis cells with miR-21 mimic or miR-21 inhibitor. A: miR-21 activation group. B: miR-21 inhibition group. C: Bar chart of miR-21 expressions. \*\* $P < 0.01$  vs AM cells.

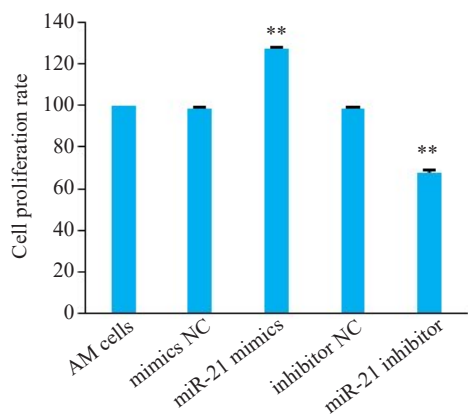


图6 AM细胞转染后MTT检测细胞增殖率

Fig.6 Proliferation of adenomyosis cells measured by MTT assay after transfection. \*\* $P < 0.01$  vs AM cells.

### 3 讨论

AM对育龄期女性的健康有着较多的负面影响,包括异常子宫出血、严重贫血,慢性盆腔痛及生育力下降等<sup>[2,3,17]</sup>。由于缺乏诊断该疾病的精确标准,AM治疗起来较为棘手,目前的治疗措施也有限<sup>[18]</sup>。近年来,科研工作者对AM的关注越来越多,对其背后的病因病机也在不断探索。体外及体内多项实验认为子宫内膜生物微环境下特定的分子特征、表观遗传学差异以及E2诱导的上皮间质转变等是AM的主要发病机制<sup>[7,13,19]</sup>。

MicroRNAs是由生物体基因组编码的一组含有19~25个核苷酸的非编码的小RNAs,通过核苷酸互补结合信使RNA在转录后翻译水平调控基因表达。miRNAs功能的异常可促进细胞增殖、抑制凋亡、增强转移潜能等而导致肿瘤的发生发展,并在肿瘤诊断和预后方面担任重要角色<sup>[20-23]</sup>。miR-21基因位于17号染色体上,是目前肿瘤领域研究最为广泛的miRNAs之一,其通过与靶基因相互作用,调控多种细胞的增殖、分化、凋亡及代谢等生物学过程<sup>[24,25]</sup>。一项对肝癌中miR-21的研究表明,富含miR-21的外泌体可以显著促进肝癌细胞的增殖,抑制其凋亡,促进细胞侵袭<sup>[25]</sup>。亦有研究报道miR-21在子宫肌瘤、子宫内膜异位症病灶组织中过高,通过影响细胞凋亡转移等过程参与疾病的发生<sup>[25-27]</sup>。但有关miR-21在AM中发病机制的报道较少,且颇有争议。如国外一项描述性研究使用4例AM患者的在位子宫内膜类器官分化为分泌期和妊娠期,并通过下一代测序分析每阶段类器官分泌的细胞外囊泡中miRNA的表达,结果显示miRNA测序鉴定出分泌期细胞外囊泡及妊娠期细胞外囊泡均含有miR-21表达,与AM发病机制、着床失败、先兆子痫和流产等密切相关,提示miR-21参与AM进展、胚胎着床受损和妊娠并发症等过程<sup>[28]</sup>;但另有研究显示<sup>[29]</sup>,通过对比分析可生育组及AM组子宫内膜miR-21表达水平,发现AM组中

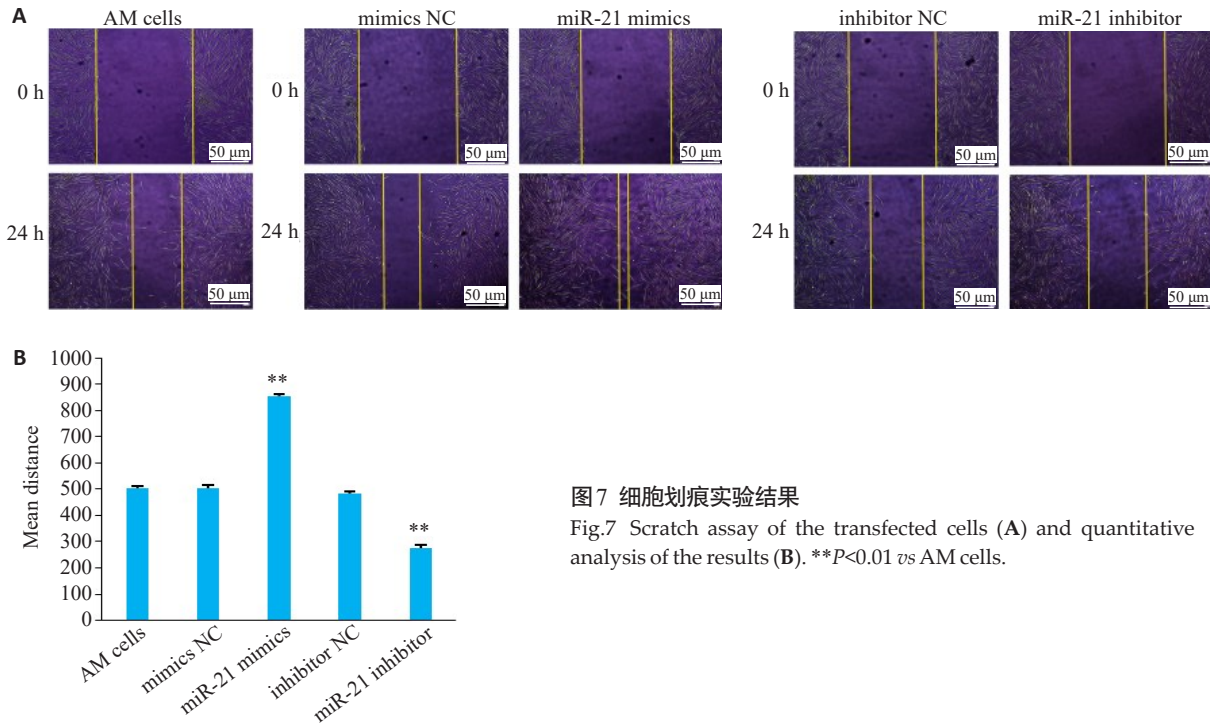


图7 细胞划痕实验结果

Fig.7 Scratch assay of the transfected cells (A) and quantitative analysis of the results (B). \*\*P<0.01 vs AM cells.

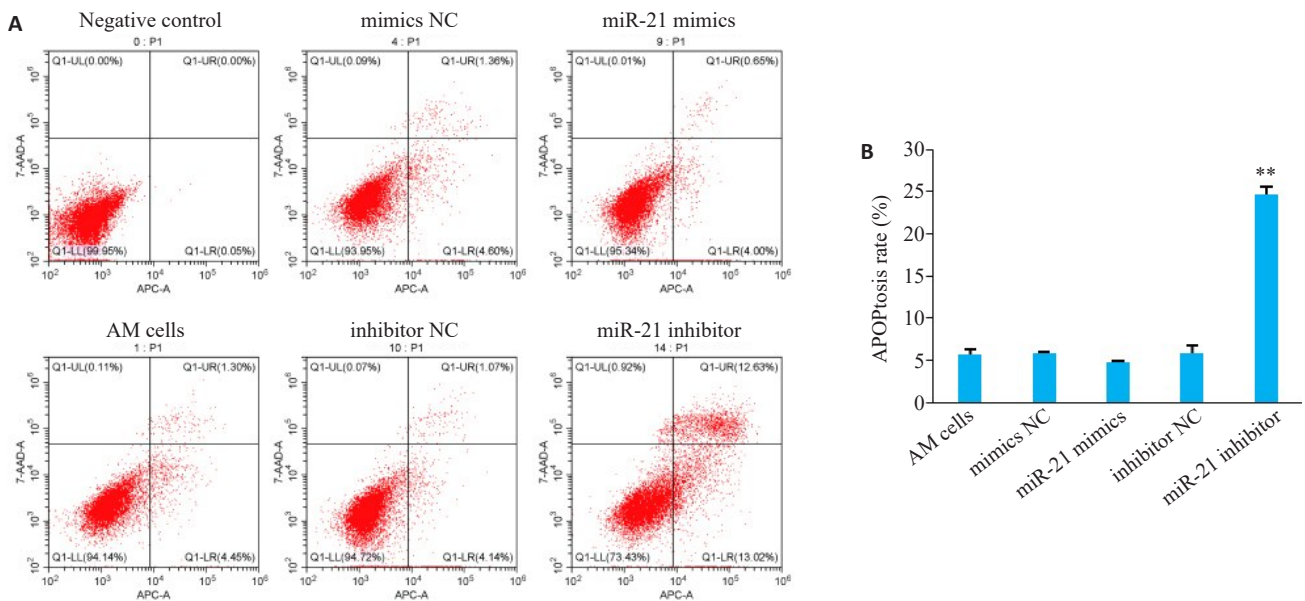


图8 流式细胞检测结果

Fig.8 Flow cytometry of the transfected cells (A) and quantitative analysis of the apoptotic rate (B). \*\*P<0.01 vs AM cells.

miR-21 被下调,并认为 miR-21 通过抑制 KLF12 促进子宫内膜蜕膜化,而 miR-21 的过表达则可逆转体外 AM 患者的内膜蜕膜不良反应,故认为 miR-21 在 AM 内膜中表达降低,抑制子宫内膜蜕膜化,是 AM 患者不孕的主要原因。

本研究在人 AM 在位内膜及异位病灶中均检测到有 miR-21 表达,在异位病灶中的表达明显高于其他组,但 AM 在位子宫内膜与正常子宫内膜相比 miR-21 表达无明显差异,这与既往研究得出的 AM 内膜中 miR-21

表达水平高于或低于正常子宫内膜 miR-21 表达水平的结论有所不同。究其原因,有以下几点:第一,在本实验中,对照组选择的是患有宫颈病变的子宫肌层和内膜。研究表明,miR-21 表达水平与宫颈病变诊断严重程度之间存在显著相关性,miR-21 在伴有人乳头瘤病毒感染的宫颈上皮内病变组织中的表达高于正常宫颈组织,而宫颈癌组织中 miR-21 的表达要明显高于宫颈上皮内病变的表达<sup>[30, 31]</sup>。对于子宫上皮内病变的子宫内膜情况的研究较少,其子宫内膜相关基因的表达是否会受到宫

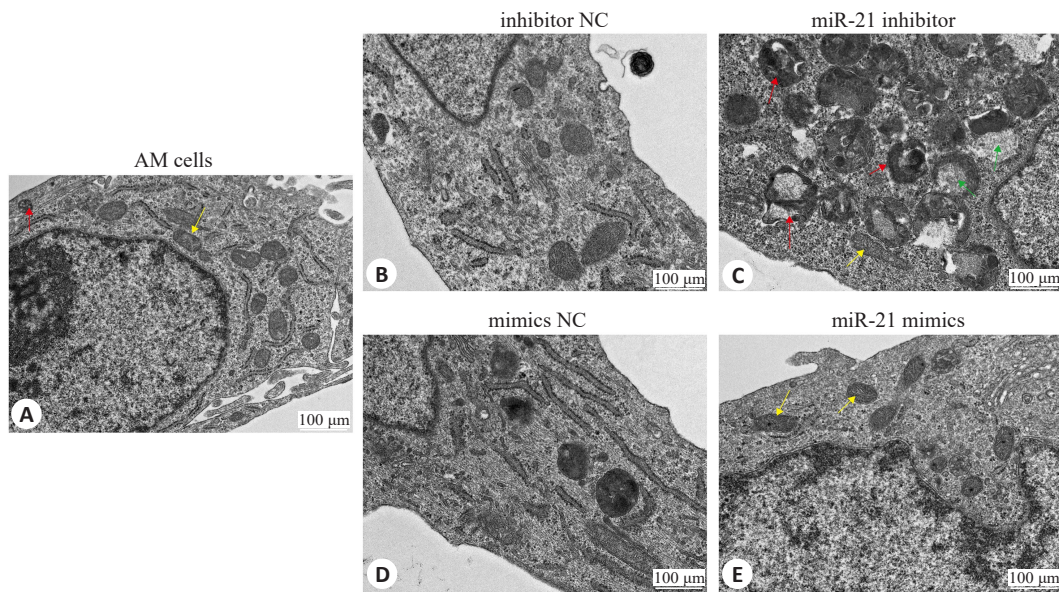


图9 各组AM细胞超微结构比较

Fig.9 Transmission electron microscopy for observing ultrastructures of adenomyosis cells in each group. Red arrows indicate autolysosomes, green arrows indicate abnormal mitochondria, and yellow arrows indicate normal mitochondria.

颈病变的影响亦未可知,本实验中所取的正常内膜亦是相对于AM患者而言。第二,我们推测miR-21可能主要在AM病程初期表达异常而推动疾病的发展。在AM病程初期,在位内膜miR-21受相关因子刺激后发挥特定的一系列分子基因效应,导致在位内膜向肌层浸润,而随着病情的进展,异位的内膜开始活跃,使得局部病灶开始增殖,而在位内膜中miR-21表达水平反而下降。本研究所取标本均为病程较久、病程严重需行手术治疗的AM患者,故在AM病灶形成之后检测到在位内膜miR-21表达水平与正常子宫内膜无明显差异,但异位病灶表达水平明显升高。第三,miR-21可能受到AM病情分级、病程、子宫内膜增殖及分泌状态的影响。此外,组织样本量也是一个影响因素,后续可扩大样本量作进一步研究。

为进一步探究miR-21对AM细胞的影响,本研究用miR-21 mimic和miR-21 inhibitor转染AM细胞,利用MTT检测、划痕实验、流式细胞检测和透射电镜对AM细胞增殖、迁移及凋亡方面的作用进行研究。结果显示miR-21在AM细胞中发挥促增殖、促迁移及抗凋亡的作用。反之,降低miR-21表达后AM细胞内出现细胞核固缩,内质网扩张,细胞质溶酶体增多,出现自噬溶酶体等细胞超微结构的改变,从而促进细胞的凋亡。由此可见,miR-21在AM细胞中发挥促增殖及抗凋亡的作用,有望成为AM的潜在治疗靶点。

AM被认为是一种E2依赖性疾病,E2通过与其受体结合形成激素-受体复合物而发挥生物学效应,在AM

的发生、发展以及痛经的发生机制中起重要作用<sup>[32]</sup>。有学者的研究结论证实了既往研究,其通过转录学分析,对AM患者基因表达进行特征分析,发现E2受体相关信号通路异常激活<sup>[33]</sup>。我们的前期实验研究证实AM子宫组织E2表达水平明显高于正常子宫组织<sup>[34]</sup>。为研究miR-21与E2及ER与关系,本研究通过建立E2激活状态及剥夺状态、阻断E2受体后检测AM细胞中miR-21表达的情况,结果显示在E2激活状态下,E2激活组能明显上调AM细胞miR-21表达,这与既往研究<sup>[35,36]</sup>结果一致。但激活E2后阻断其受体,miR-21表达水平明显下降,这提示E2需与ER结合才能发挥诱导AM细胞中miR-21的表达。相反,当仅在E2剥夺状态下,未阻断ER作用时,AM细胞miR-21表达水平明显下降,当阻断ER时,miR-21的表达再次明显降低,这说明ER除与E2结合发挥作用外,本身还可通过其他途径影响AM细胞中miR-21表达从而诱导AM细胞增殖。

综上所述,miR-21可能在AM病变早期发挥关键作用,可促进AM细胞的迁移和增殖,并通过改变病灶细胞的超微结构抑制细胞凋亡,促进AM的进展。miR-21有望成为AM治疗的靶点之一,课题组也将在后续的研究中完善对疾病分期、病程及月经周期的管理,行进一步的阐述。值得关注的是,本研究从E2激活及剥夺状态正反两方面揭示了ER除与E2结合诱导AM病灶细胞miR-21表达外,还可通过其他途径调控miR-21表达,其中ER对miR-21的调控作用大于E2,这可能是AM的发病机制之一,具体机制有待进一步探讨。



## 参考文献:

- [1] Bulun SE, Yildiz S, Adli M, et al. Adenomyosis pathogenesis: insights from next-generation sequencing[J]. *Hum Reprod Update*, 2021, 27(6): 1086-97.
- [2] Petraglia F, Dolmans MM. Iron deficiency anemia: impact on women's reproductive health[J]. *Fertil Steril*, 2022, 118(4): 605-6.
- [3] Vercellini P, Viganò P, Bandini V, et al. Association of endometriosis and adenomyosis with pregnancy and infertility [J]. *Fertil Steril*, 2023, 119(5): 727-40.
- [4] Guo SW. The pathogenesis of adenomyosis vis-à-vis endometriosis [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(2): 485.
- [5] Xie TT, Xu XY, Yang Y, et al. The role of abnormal uterine junction zone in the occurrence and development of adenomyosis[J]. *Reprod Sci*, 2022, 29(10): 2719-30.
- [6] Bulun SE, Yildiz S, Adli M, et al. Endometriosis and adenomyosis: shared pathophysiology[J]. *Fertil Steril*, 2023, 119(5): 746-50.
- [7] García-Solares J, Donnez J, Donnez O, et al. Pathogenesis of uterine adenomyosis: invagination or metaplasia?[J]. *Fertil Steril*, 2018, 109(3): 371-9.
- [8] Stratopoulou CA, Donnez J, Dolmans MM. Origin and pathogenic mechanisms of uterine adenomyosis: what is known so far [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(8): 2087-97.
- [9] Yen CF, Huang SJ, Lee CL, et al. Molecular characteristics of the endometrium in uterine adenomyosis and its biochemical microenvironment[J]. *Reprod Sci*, 2017, 24(10): 1346-61.
- [10] Guo SW. Cracking the enigma of adenomyosis: an update on its pathogenesis and pathophysiology [J]. *Reproduction*, 2022, 164(5): R101-21.
- [11] Tan YX, Hong Y, Jiang S, et al. MicroRNA-449a regulates the progression of brain aging by targeting SCN2B in SAMP8 mice[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(4): 1091-102.
- [12] Fuchs H, Theuser M, Wruck W, et al. MiR-27 negatively regulates pluripotency-associated genes in human embryonal carcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111637.
- [13] Hashemi M, Mirdamadi MSA, Talebi Y, et al. Pre-clinical and clinical importance of miR-21 in human cancers: Tumorigenesis, therapy response, delivery approaches and targeting agents [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 187: 106568.
- [14] Shi S, Luo L, Peng F, et al. Potential mechanism of Taohong Siwu Decoction in uterine fibroid treatment based on integrated strategy of network pharmacology and experimental verification [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 95.
- [15] Zhang QC. METTL3 is aberrantly expressed in endometriosis and suppresses proliferation, invasion, and migration of endometrial stromal cells[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2023, 39(3): 266-77.
- [16] Rodrigues Pedro M, Afonso Marta B, Simão André L, et al. MiR-21-5p promotes NASH-related hepatocarcinogenesis[J]. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*, 2023, 43(10): 2256-74.
- [17] Tsovala AO, Aguilar RM, Maybin JA, et al. Pre-clinical models to study abnormal uterine bleeding (AUB) [J]. *EBioMedicine*, 2022, 84: 104238.
- [18] Moldassarina RS. Modern view on the diagnostics and treatment of adenomyosis[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2023, 308(1): 171-81.
- [19] Liu XS, Shen MH, Qi QM, et al. Corroborating evidence for platelet-induced epithelial-mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in the development of adenomyosis[J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(4): 734-49.
- [20] Shah V, Shah J. Recent trends in targeting miRNAs for cancer therapy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(12): 1732-49.
- [21] Pozniak T, Shcharbin D, Bryszewska M. Circulating microRNAs in medicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3996.
- [22] Goradel NH, Mohammadi N, Haghi-Aminjan H, et al. Regulation of tumor angiogenesis by microRNAs: state of the art [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1099-110.
- [23] Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-65.
- [24] Farasati Far B, Vakili K, Fathi M, et al. The role of microRNA-21 (miR-21) in pathogenesis, diagnosis, and prognosis of gastrointestinal cancers: a review[J]. *Life Sci*, 2023, 316: 121340.
- [25] Cao LQ, Yang XW, Chen YB, et al. Exosomal miR-21 regulates the TETs/PTENp1/PTEN pathway to promote hepatocellular carcinoma growth[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 148.
- [26] Karmon AE, Cardozo ER, Rueda BR, et al. MicroRNAs in the development and pathobiology of uterine leiomyomata: does evidence support future strategies for clinical intervention[J]? *Hum Reprod Update*, 2014, 20(5): 670-87.
- [27] Fitzgerald JB, Chennathukuzhi V, Koohestani F, et al. Role of microRNA-21 and programmed cell death 4 in the pathogenesis of human uterine leiomyomas[J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(3): 726-34.e2.
- [28] Juárez-Barber E, Segura-Benítez M, Carbajo-García MC, et al. Extracellular vesicles secreted by adenomyosis endometrial organoids contain miRNAs involved in embryo implantation and pregnancy[J]. *Reprod Biomed Online*, 2023, 46(3): 470-81.
- [29] Yan Q, Yan GJ, Zhang CX, et al. MiR-21 reverses impaired decidualization through modulation of KLF12 and NR4A1 expression in human endometrial stromal cells [J]. *Biol Reprod*, 2019, 100(5): 1395-405.
- [30] Deftereos G, Corrie SR, Feng QH, et al. Expression of miR-21 and miR-143 in cervical specimens ranging from histologically normal through to invasive cervical cancer [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28423.
- [31] Park S, Eom K, Kim J, et al. MiR-9, miR-21, and miR-155 as potential biomarkers for HPV positive and negative cervical cancer [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 658.
- [32] Humaidan P, Garcia Velasco JA, Cozzolino M. Local intraendometrial estrogen biosynthesis leading to progesterone resistance impacts implantation in adenomyosis and endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2023, 120(4): 927.
- [33] Herndon CN, Aghajanova L, Balayan S, et al. Global transcriptome abnormalities of the eutopic endometrium from women with adenomyosis[J]. *Reprod Sci*, 2016, 23(10): 1289-303.
- [34] 曾玉燕. 子宫腺肌病ER及miR-21介导的Ras/Raf通路作用机制及加味芍药甘草汤对其的干预[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [35] Petrović N, Mandušić V, Dimitrijević B, et al. Higher miR-21 expression in invasive breast carcinomas is associated with positive estrogen and progesterone receptor status in patients from Serbia[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(6): 977.
- [36] Kalinina T, Kononchuk V, Alekseenok E, et al. Associations between the levels of estradiol-, progesterone-, and testosterone-sensitive miRNAs and main clinicopathologic features of breast cancer[J]. *J Pers Med*, 2021, 12(1): 4.