

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.12.019

生长激素和全反式维甲酸拮抗子宫内膜纤维化的机制

田花敏, 佟卫, 李娜, 王丽娟, 高翠, 李沙

(河北省沧州市河间市人民医院妇产科 062450)

摘要:目的 探讨生长激素(GH)和全反式维甲酸(ATRA)拮抗子宫内膜纤维化的机制。方法 选取新鲜子宫内膜组织进行原代人子宫内膜基质细胞(ESCs)培养。实验细胞分别设立正常组、模型组、GH 实验组、ATRA 实验组。用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定细胞骨桥蛋白(OPN)、整合素 $\alpha\gamma\beta 3$ (Itg $\alpha\gamma\beta 3$)、I 型胶原 $\alpha 1$ (COL1A1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)mRNA 的表达水平,用免疫蛋白印迹试验(Western blot)测定细胞中 OPN、Itg $\alpha\gamma\beta 3$ 、COL1A1、 α -SMA 蛋白表达水平。结果 与正常组比较,模型组中细胞的 Itg $\alpha\gamma\beta 3$ 和 OPN mRNA 水平降低($P<0.05$);与模型组比较,GH 实验组细胞的 OPN、Itg $\alpha\gamma\beta 3$ mRNA 表达水平增加($P<0.05$),且与正常组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与正常组比较,模型组 COL1A1、 α -SMA mRNA 的表达量显著增加($P<0.05$);与模型组比较,ATRA 实验组中细胞 COL1A1、 α -SMA mRNA 的表达量减少($P<0.05$),且与正常组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与正常组比较,模型组中细胞 OPN、Itg $\alpha\gamma\beta 3$ 蛋白水平降低($P<0.05$);与模型组比较,GH 实验组细胞中 OPN、Itg $\alpha\gamma\beta 3$ 蛋白表达水平增加($P<0.05$),且与正常组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与正常组比较,模型组中 COL1A1、 α -SMA 蛋白的表达水平增加,与模型组比较,ATRA 实验组中细胞 COL1A1、 α -SMA 蛋白的表达水平下调($P<0.05$),且与正常组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 GH 和 ATRA 可分别通过促进 OPN、Itg $\alpha\gamma\beta 3$ mRNA 的表达及抑制 COL1A1、 α -SMA mRNA 的表达来拮抗子宫内膜纤维化。

关键词:生长激素; 全反式维甲酸; 子宫内膜纤维化

中图法分类号:R657.4+4

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)12-1695-04

Mechanism of growth hormone and all-trans retinoic acid in antagonizing endometrial fibrosis

TIAN Huamin, TONG Wei, LI Na, WANG Lijuan, GAO Cui, LI Sha

(Department of Obstetrics and Gynecology, Hejian People's Hospital, Cangzhou, Hebei 062450, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of growth hormone (GH) and all-trans retinoic acid in antagonizing endometrial fibrosis. **Methods** Fresh endometrial tissue was selected to culture primary human endometrial stromal cells (ESCs). The experimental cells were divided into normal group, model control group, GH test group and ATRA test group. The normal group did not use drug intervention, the model group intervened 48 h with 10 ng/mL TGF- β 1, and the GH experimental group was treated with 10 ng/mL TGF- β 1 after 48 h to add 48 h to 0.1 mol/L GH, and the ATRA experimental group was treated with 10 ng/mL. The levels of OPN, Itg $\alpha\gamma\beta 3$, COL1A1, and α -SMA mRNA were measured by RT-PCR. The Western blot method was used to determine the expression of OPN, Itg $\alpha\gamma\beta 3$, COL1A1 and α -SMA protein in the cells. **Results** Compared with the normal control group, the OPN and Itg $\alpha\gamma\beta 3$ mRNA levels in the model group were significantly decreased ($P<0.05$). The expression levels of OPN and Itg $\alpha\gamma\beta 3$ in the GH group were higher than those in the model group ($P<0.05$), and no significant difference was found when compared with the normal group ($P>0.05$). Compared with the normal group, the expression of COL1A1 and α -SMA mRNA in the model group was significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression of COL1A1 and α -SMA mRNA in the experimental group of all-trans retinoic acid was significantly reduced ($P<0.05$), and no significant difference was found when compared with the normal group ($P>0.05$). Compared with the normal control group, the OPN and Itg $\alpha\gamma\beta 3$ of the cells in the model group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression levels of OPN and Itg $\alpha\gamma\beta 3$ in the GH group were significantly increased ($P<0.05$), and no significant difference was found when compared with the normal group ($P>0.05$). Compared with the normal group, the COL1A1 and α -SMA proteins in the model group was significantly down-regulated in the all-trans retinoic acid group ($P<0.05$), and there was no significant difference with the normal group ($P>0.05$). **Conclusion** GH and all-trans retinoic acid can antagonize endo-

metrial fibrosis by promoting the expression of OPN and Itgαγβ3 mRNA and inhibiting the expression of COL1A1 and α-SMA mRNA.

Key words: growth hormone; all-trans retinoic acid; endometrial fibrosis

子宫内膜包括子宫内膜上皮和子宫内膜基质。生长激素(GH)参与调节机体生长与发育,研究发现 GH 参与了雌性动物生殖发育的许多过程,在繁殖过程中具有十分重要的意义^[1-2]。GH 是由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的一种单一肽链的蛋白质激素,可调节类固醇的生成与促性腺激素的分泌^[3-4]。全反式维甲酸(ATRA)是维生素 A 的衍生物^[5],可以调节细胞增殖、分化和凋亡,对抗纤维化、降低细胞外基质沉积具有重要作用。本研究将通过体外实验探讨 GH 及 ATRA 影响子宫内膜基质细胞转化为肌成纤维细胞的机制。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取因子宫肌瘤行全子宫切除术患者的新鲜子宫内膜(通过术后病理检查排除器质性病变),放入盛有 8~10 mL 预冷的 DMEM/F12 培养液的 15 mL 离心管中,使用培养基调整细胞密度,并转移到 25 cm² 塑料细胞培养瓶内,于 5% CO₂、恒温 37 ℃培养箱中培养;2~3 d 换液 1 次,待细胞生长融合达 80%~90%后,按照 1:3~1:2 比例进行传代培养。通过进行原代人子宫内膜基质细胞(ESCs)培养,建立转化生长因子(TGF)-β1 刺激 ESCs 形成子宫内膜纤维化的细胞模型。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与干预 实验细胞分别设立正常组、模型组、GH 实验组、ATRA 实验组。正常组:不用药物干预。模型组:10 ng/mL TGF-β1 作用 ESCs 共 48 h。GH 实验组:10 ng/mL TGF-β1 作用 ESCs 48 h 后加入 0.1 mol/L GH 作用 48 h;ATRA 实验组:10 ng/mL TGF-β1 作用 ESCs 48 h 后加入 0.1

mol/L ATRA 作用 48 h。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 离心冲洗后得子宫内膜基质细胞沉淀,并裂解红细胞,使红细胞基本去除。然后按照北京全式金公司总 RNA 提取试剂盒说明书操作,在无菌条件下提取细胞总 RNA,确保提取的 RNA OD260/OD280 为 1.6~1.8。同时,测定细胞骨桥蛋白(OPN)、整合素 αγβ3(Itgαγβ3)、I 型胶原 α1(COL1A1)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)mRNA 的表达水平。

1.2.3 逆转录合成互补脱氧核糖核酸(cDNA) 按 RT-PCR 试剂说明书配制逆转录反应体系,在冰上操作,最终在 PCR 仪上自动完成。将合成的 cDNA 置于一 20 ℃的冰箱中保存备用。cDNA 反应体系(20 μL):总 RNA,8 μL;锚定寡聚物(dT)18,0.5 μg/μL,1.0 μL;2×TS 反应混合物,10 μL;TransScript RT-PCR,1 μL。反应条件见表 1,使用北京全式金生物技术公司合成下列相关引物,模板为 cDNA,内参为肌动蛋白 β(β-actin)。对应基因引物序列见表 2。

表 1 RT-PCR 反应条件

步骤	温度(℃)	时间	循环数(个)
预变性	94	10 min	—
变性	95	15 s	36~40
退火/延伸	60	1 min	—
融解曲线分析	94	15 s	—
	60	1 min	—
	94	15 s	—
	60	15 s	—

注:—表示该项无数据

表 2 引物的核苷酸序列

mRNA	5'→3'	3'→5'	长度(bp)
OPN	TAC GAC CAT GAG ATT GGC AGT GA	TAT AGG ATC TGG GTG CAG GCT GTA A	124
Itgαγβ3	TTC AAT GCC ACC TGC CTC AA	CCT TGG CCT CGA TAC TAA AGC TCA	108
COL1A1	AGG GCC AAG ACG AAG ACA TC	CAG ATC ACG TCA TCG CAC AAC	135
α-SMA	GGC TCT GGG CTC TGT AAG G	CTC TTG CTC TGG GCT TCA TC	130
β-actin	GAC GGC CAG GTC ATC ACT AT	CGG ATG TCA ACG TCA CAC TT	140

1.2.4 提取细胞总蛋白 按照凯基全蛋白提取试剂盒操作说明进行,获取细胞后,转移到 1.5 mL EP 管中,低温离心机 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液转移至新的 EP 管中,置于一 80 ℃保存。

1.2.5 免疫蛋白印迹试验(Western blot) 按照碧云天 Western blot 试剂盒操作说明配制凝胶,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,分别进行湿法转膜和电泳。同时,测定细胞中 OPN、Itgαγβ3、COL1A1、α-

SMA 蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件对数据进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测各组细胞 OPN、Itgαγβ3、COL1A1、α-SMA mRNA 水平比较 与正常组比较,模型组中细

胞的 OPN、Itgaγβ3 mRNA 水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,GH 实验组细胞中 OPN、Itgaγβ 表达水平显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),且与正常组差异无统计学意义($P>0.05$)。与正常组比较,模型组 COL1A1、α-SMA mRNA 的表达量显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,ATRA 实验组细胞的 COL1A1、α-SMA mRNA 的表达量显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$),且与正常组差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3、4。

表 3 3 组 OPN 与 Itgaγβ3 mRNA 水平的比较(±s)		
组别	OPN	Itgaγβ3
正常组	1.02±0.02	0.98±0.01
模型组	0.52±0.02*	0.46±0.02*
GH 实验组	0.92±0.01#	0.90±0.02#

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

表 4 3 组 COL1A1、α-SMA mRNA 水平比较(±s)		
组别	COL1A1	α-SMA
正常组	1.03±0.01	1.04±0.02
模型组	1.43±0.04*	1.52±0.02*
ATRA 实验组	1.12±0.01#	1.20±0.03#

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

2.2 Western blot 检测各组 OPN、Itgaγβ3、COL1A1、α-SMA 蛋白表达水平比较 与正常组比较,模型组中细胞的 OPN、Itgaγβ3 蛋白水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,GH 实验组细胞中 OPN、Itgaγβ 蛋白表达水平显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),且与正常组差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。与正常组比较,模型组中 COL1A1、α-SMA 蛋白水平上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,ATRA 实验组细胞的 COL1A1、α-SMA 蛋白水平下降,差异有统计学意义($P<0.05$),且与正常组差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 6。

表 5 3 组 OPN 与 Itgaγβ3 蛋白水平的比较(kD,±s)		
组别	OPN	Itgaγβ3
正常组	0.93±0.02	0.94±0.01
模型组	0.50±0.02*	0.41±0.03*
GH 实验组	0.89±0.01#	0.83±0.02#

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

表 6 3 组 COL1A1 与 α-SMA 蛋白的表达水平比较(kD,±s)		
组别	COL1A1	α-SMA
正常组	0.90±0.02	0.87±0.02
模型组	1.46±0.04*	1.48±0.02*
ATRA 实验组	1.11±0.01#	1.08±0.03#

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

3 讨 论

子宫内膜包括子宫内膜腺上皮细胞与 ESCs 两种

细胞成分^[6]。研究发现,原代 ESCs 通过 TGF-β1 干预,其 α-SMA 表达会显著上调,α-SMA 是肌成纤维细胞特征性标记,其表达上调表明 ESCs 向肌成纤维细胞进行分化^[7]。在组织器官的纤维化进程中,肌成纤维细胞发挥关键作用,其可抑制正常的凋亡程序^[8]。肌成纤维细胞的异常增殖活化可造成细胞外基质大量沉积,从而促进纤维化进程^[9]。同时,GH 与其受体结合,或通过诱导胰岛素样生长因子 1(IGF-1)途径发挥其调节生殖的功能^[10]。有报道证实,难治性子宫内膜反应在应用人绝经期促性腺激素(HMG)与 GH 后,子宫内膜的反应性可以得到迅速恢复^[11]。该结果表明,GH 能够促进子宫内膜组织生长。

人类子宫存在完整的 IGF 调控系统,其通过自分泌与旁分泌的方式调节子宫内膜细胞的代谢与分化^[12]。马新想等^[13]采用 GH 辅助治疗的方法对体外受精-胚胎移植周期中子宫内膜发育不良患者进行治疗,结果表明,GH 组子宫内膜厚度大于对照组,内膜类型则没有明显变化,而 GH 组临床妊娠率则达到 34.15%,与对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。由此推测,GH 可能通过促进子宫内膜发育,进而改善了子宫内膜对胚胎的容受性。本研究发现,与正常组比较,模型组细胞的 OPN、Itgaγβ3 mRNA 水平明显降低($P<0.05$);与模型组比较,GH 实验组细胞 OPN、Itgaγβ mRNA 表达水平显著增加($P<0.05$),且与正常组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。通过 Western blot 检测各组细胞中 OPN、Itgaγβ3 蛋白的表达水平,结果表明,与正常组比较,模型组中细胞的 OPN、Itgaγβ3 蛋白水平明显下调($P<0.05$),与模型组比较,GH 实验组细胞中 OPN、Itgaγβ 蛋白表达水平显著上调($P<0.05$),且与正常组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。这种表达量的变化趋势与 mRNA 变化基本一致。由此表明,GH 可通过促进 OPN、Itgaγβ3 mRNA 及其蛋白的表达来促进子宫内膜发育。

研究发现,ATRA 在体外可抑制 ESCs 转化为肌成纤维细胞,进而降低细胞胶原 COL1A1 的生成,由此发挥其抗子宫内膜纤维化的作用^[14]。ATRA 可通过下调 TGF-β1/smard 信号通路,预防宫腔粘连^[15-16]。平滑肌肌动蛋白是构成细胞骨架的关键成分,其可调节细胞的运动,并赋予细胞进行迁移的能力。α-SMA 是肌动蛋白的表现形式,其也是肌成纤维细胞特征性的标志蛋白^[17]。α-SMA 在外界细胞因子刺激下,细胞形态转化成细长形,α-SMA 蛋白表达量增高,表明肌成纤维细胞已形成,且向成纤维细胞转化。ATRA 是维生素 A 的衍生物,其在人体内为维持机体正常新陈代谢及生长、发育、繁殖等所必需。在抗肿瘤方面,ATRA 可抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞向成熟细胞分化,进而发挥抗肿瘤作用^[9]。此外,ATRA 对纤维化疾病如肺纤维化、肾小球硬化、心肌纤维化等具

有抗纤维化作用^[18-20],以及降低细胞外基质沉积的药理学作用^[21-23]。本实验发现,与正常组比较,模型组 COL1A1、 α -SMA mRNA 的表达量显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,ATRA 实验组中细胞的 COL1A1、 α -SMA mRNA 的表达量显著减少($P < 0.05$),且与正常组差异无统计学意义($P > 0.05$)。同时,本研究表明,与正常组比较,模型组中 COL1A1、 α -SMA 蛋白的表达量上调($P < 0.05$),与模型组比较,ATRA 实验组中细胞的 COL1A1、 α -SMA 蛋白的表达量会发生下调($P < 0.05$),与正常组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),且表达量的变化趋势与 mRNA 变化基本一致。由此提示,ATRA 可通过抑制 COL1A1、 α -SMA mRNA 及其蛋白的表达来拮抗子宫内

膜纤维化。综上所述,GH 和 ATRA 可分别通过促进 OPN、Itga γ 33 mRNA 的表达及抑制 COL1A1、 α -SMA mRNA 的表达来拮抗子宫内

参考文献

- [1] 李小玉.生长激素对子宫内膜异位症患者卵巢颗粒细胞凋亡的影响[D].石家庄:河北医科大学,2016.
- [2] CHRISTIANSEN J S, BACKELJAUW P F, BIDLINGMAIER M, et al. Growth hormone research society perspective on the development of long-acting growth hormone preparations[J]. *Eur J Endocrinol*, 2016, 174(6): C1-C8.
- [3] 何鹏,周青山.重组人生长激素对老年胸外伤患者蛋白质代谢及免疫功能的影响[J]. *贵阳医学院学报*, 2015, 40(3): 307-309.
- [4] LI X L, WANG L, LV F, et al. The influence of different growth hormone addition protocols to poor ovarian responders on clinical outcomes in controlled ovary stimulation cycles: a systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(12): e6443.
- [5] 张磊,陈秀萍,蒋玲,等.全反式维甲酸对肾小球硬化大鼠肾小球 TRPC6 表达的影响[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(23): 3827-3831.
- [6] 李杏婵,梁翠霞,李晶,等.宫腔黏连分离术联合生长激素对子宫内膜血流、容积及 Smad2/3 表达的影响[J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(19): 2309-2311.
- [7] 汤伟钳,胡晓.腭突间充质细胞中 TGF β 1 信号通路介导维甲酸致腭裂的实验研究[J]. *中国实用医药*, 2016, 11(32): 191-193.
- [8] 董千靖,段华,汪沙.肌成纤维细胞在子宫内膜异位症纤维化形成中的作用[J]. *中华妇产科杂志*, 2017, 52(10): 714-716.
- [9] TAGLIAFERRI D, DE ANGELIS M T, RUSSO N A, et al. Retinoic Acid Specifically Enhances Embryonic Stem Cell Metastate Marked by Zscan4[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0147683.
- [10] 朱洁茹,欧建平.生长激素对卵巢功能影响的研究进展[J]. *生殖与避孕*, 2016, 36(6): 489-494.
- [11] 刘志华,王圆.重组人生长激素超促排卵对卵巢反应不良患者的影响分析[J]. *中国实用医药*, 2017, 12(31): 95-97.
- [12] 代聪伟. IGF-1 和 IGF-2 及其受体对子宫内
- [13] 马新想,孙莹璞,苏迎春,等.生长激素在子宫内
- [14] 邵晓平,彭程飞,田孝祥,等.全反式维甲酸联合 IV 型胶原促进胚胎干细胞向平滑肌细胞分化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(2): 119-123.
- [15] SHAROVA L V, SHAROV A A, PIAO Y, et al. Emergence of undifferentiated colonies from mouse embryonic stem cells undergoing differentiation by retinoic acid treatment[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2016, 52(5): 616-624.
- [16] 胡海燕.全反式维甲酸在宫腔粘连模型中抗子宫内
- [17] 鄢力,苟鹏,唐芳,等.重组人生长激素对生长激素缺乏症患儿部分相关激素水平的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2017, 42(5): 557-560.
- [18] SUBRAMANIAN U, NAGARAJAN D. All-Trans retinoic acid supplementation prevents cardiac fibrosis and cytokines induced by methylglyoxal[J]. *Glycoconj J*, 2017, 34(2): 255-265.
- [19] LEEM A Y, SHIN M H, DOUGLAS I S, et al. All-trans retinoic acid attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via downregulating EphA2-EphrinA1 signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(3): 721-726.
- [20] PRIYANKA S H, SYAM S D, NAIR S S, et al. All-trans retinoic acid modulates TNF- α and CYP2E1 pathways and enhances regression of ethanol-induced fibrosis markers in hepatocytes and HSCs in abstaining rodent model [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2018; 1-9.
- [21] 刘霞,马红萍.全反式维甲酸对 5/6 肾大部切除大鼠肾间质纤维化的影响及其作用机制[J]. *复旦学报(医学版)*, 2016, 43(1): 30-35.
- [22] ZHANG S, SHI R, CHEN S, et al. All-trans retinoic acid inhibits the proliferation of SGC7901 cells by regulating caveolin-1 localization via the ERK/MAPK signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 1523-1528.
- [23] CHEN X, QIN Y, ZHOU T, et al. The potential role of retinoic acid receptor alpha on glomerulosclerosis in rats and podocytes injury is associated with the induction of MMP2 and MMP9 [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017, 49(8): 669-679.