

# Toll 样受体 4 促进子宫腺肌病子宫内膜间质细胞增殖、迁移和侵袭的机制研究

荣敏<sup>1\*</sup>, 李青梅<sup>2</sup>, 杨树星<sup>2</sup>

基金项目: 吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金(项目编号: 320. 6750. 2020-06-09)

作者单位: 030000 山西 太原, 太原市中心医院, 1. 妇产科; 2. 妇科

作者简介: 荣敏, 毕业于陆军军医大学, 本科, 主治医师, 主要研究方向为子宫内膜异位症

\* 通信作者, E-mail: xinra335@163. com

**【摘要】目的** 探讨 Toll 样受体 4 (TLR4)/核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 通路对子宫腺肌病子宫内膜间质细胞 (ESCs) 通道蛋白 4 (aquaporins 4, AQP4) 表达的影响, 并阐明其可能的分子机制。**方法** 分离并培养原代 ESCs, 将细胞分为对照组、脂多糖组、TAK-242 组, 按照分组加入 TLR4 激活剂脂多糖和抑制剂 TAK-242。另外将一批 ESCs 分为对照组、脂多糖组、脂多糖 + si-NC 组、脂多糖 + si-AQP4 组, 按照分组, 进行 si-NC 和 si-AQP4 细胞转染。细胞转染 48 h 后, 向细胞中添加脂多糖。Western blot 检测细胞 TLR4、p-p65、p65 和 AQP4 蛋白表达; qRT-PCR 检测细胞 AQP4 mRNA 表达; 细胞增殖、迁移和侵袭水平通过 CCK-8、细胞划痕和 Transwell 实验测定; 细胞划痕实验检测细胞迁移能力; Transwell 实验检测细胞侵袭能力。**结果** 成功分离并传代培养 ESCs。与对照组相比, TAK-242 组 ESCs 中 AQP4 mRNA 表达水平和 AQP4、TLR4 和 p-p65/p65 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞增殖能力、划痕愈合率和侵袭细胞数明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与对照组相比, 脂多糖组和脂多糖 + si-NC 组 ESCs 中 AQP4 mRNA 表达水平和 AQP4、TLR4、p-p65/p65 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 细胞增殖能力、划痕愈合率和侵袭细胞数明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与脂多糖组和脂多糖 + si-NC 组相比, 脂多糖 + si-AQP4 组 ESCs 中 AQP4 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而 TLR4 和 p-p65/p65 蛋白表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 细胞增殖能力、划痕愈合率和侵袭细胞数明显降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 通过激活 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路上调 AQP4 的表达可以促进子宫腺肌病 ESCs 增殖、迁移和侵袭。

**【关键词】** 子宫腺肌病; 子宫内膜间质细胞; Toll 样受体 4; 核因子- $\kappa$ B; 水通道蛋白 4

**【中图分类号】**R 711. 74 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1674-4020(2024)04-052-07

doi: 10. 3969/j. issn. 1674-4020. 2024. 04. 11

## The mechanisms of toll-like receptor 4 in promoting the proliferation, migration and invasion of endometrial stromal cells in adenomyosis

Rong Min<sup>1\*</sup>, Li Qingmei<sup>2</sup>, Yang Shuxing<sup>2</sup>

1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of Gynecology, Taiyuan Central Hospital, Taiyuan Shanxi 030000, P. R. China

\* Corresponding author, E-mail: xinra335@163. com

**【Abstract】Objective** To investigate the effects of toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway on the expression of aquaporins 4 (AQP4) in adenomyosis endometrial stromal cells (ESCs) and elucidate the possible molecular mechanisms. **Methods** Primary ESCs were isolated and cultured, the cells were divided into control group, lipopolysaccharide (LPS) group and TAK-242 group, and TLR4 activator LPS and inhibitor TAK-242 were added according to the group. In addition, another groups of ESCs were divided into control group, LPS group, LPS + si-NC group, LPS + si-AQP4 group, and transfected si-NC and si-AQP4 according to the grouping. After 48 h the cells were transfected, LPS was added to the cells. TLR4, p-p65, p65 and AQP4 protein expression was detected by Western blot; qRT-PCR was used to detect the expression of AQP4 mRNA expression in cells; cell proliferation, migration, and invasion levels were measured by CCK-8, cell scratch, and Transwell assays. **Results** ESCs were

successfully isolated and subcultured. Compared with control group, AQP4 mRNA expression levels and AQP4, TLR4 and p-p65/p65 protein expression levels of ESCs in TAK-242 group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), with cell proliferation ability, wound closure rate and invasion cell number were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the AQP4 mRNA expression levels and the AQP4, TLR4 and p-p65/p65 protein expression levels in the ESCs of the LPS group and the LPS + si-NC group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), cell proliferation capacity, wound closure rate and number of invasive cells were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the LPS group and the LPS + si-NC group, the expression levels of AQP4 mRNA and protein in the ESCs of the LPS + si-AQP4 group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), while there was no statistical difference in the expression levels of TLR4 and p-p65/p65 protein ( $P > 0.05$ ). Meanwhile the cell proliferation capacity, wound closure rate and number of invasive cells were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Activating the TLR4 /NF- $\kappa$ B pathway could promote the proliferation, migration and invasion of adenomyosis ESCs by up-regulating the expression of AQP4.

**【Key words】**adenomyosis; endometrial stromal cells; toll-like receptor 4; nuclear factor- $\kappa$ B; aquaporin 4

子宫腺肌病 (adenomyosis, AM) 是一种异质性妇科疾病,其典型特征是子宫增大。在 AM 患者中,异常子宫出血、月经过多、痛经或不孕是最常见的症状,但 1/3 的 AM 患者没有症状<sup>[1]</sup>。既往一份报告显示,早产、胎膜早破、宫缩乏力和异位妊娠也与 AM 有关<sup>[2]</sup>。然而,AM 确切的发病机制和病因尚未完全阐明。子宫切除术是 AM 的标准治疗方法,抑制性激素治疗可以用来暂时抑制 AM 并改善症状。然而,目前还没有治愈 AM 的药物疗法<sup>[3]</sup>。研究表明,AM 是一种特征为子宫内膜组织异常侵入子宫肌层的异质性妇科疾病。这种病变不仅改变了子宫的结构和功能,还影响了子宫内膜间质细胞 (endometrial stromal cells, ESCs) 的正常行为。在 AM 的发展中,ESCs 显示出过度的增殖、迁移和侵袭性,这些变化与子宫内膜的异位增生密切相关<sup>[4]</sup>。细胞免疫的重要成员 Toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4) 可介导促炎因子的释放,其异常表达可能引发一系列疾病或癌症<sup>[5]</sup>。在 AM 中,TLR4 诱导的炎症反应促进 ESCs 过度增殖并赋予其侵袭性表型,导致细胞侵袭子宫肌层<sup>[6]</sup>。水通道蛋白 (aquaporins, AQPs) 是一类膜水通道家族,广泛分布于不同器官和组织的特定细胞类型中,主要调节细胞内和细胞间的水流量<sup>[7]</sup>。既往研究结果表明,AM 在位内膜和异位病灶中 AQP4 表达明显增多。雌激素可能通过上调 AQP4 表达促进子宫内膜基质细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[8]</sup>。因此,本研究旨在探讨 TLR4 和 AQP4 对 AM 的 ESCs 增殖、迁移和侵袭的影响,并进一步探究 AM 中 TLR4 和 AQP4 的作用机制,以期 AM 的治疗提供可能的新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

胎牛血清、DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司;TLR4 激活剂脂多糖 (lipopolysaccharide) 和抑制剂 TAK-242 购自美国 MedChemExpress;E-CADPDH、cadherin 和 Vimentin 抗体购自北京义翘神州生物技术有限公司;siRNA 阴性对照 (si-NC) 和 AQP4 特异性 siRNA (si-AQP4) 购自武汉金开瑞生物工程有限公司;TLR4、p-

p65、p65 和 AQP4 抗体购自英国 Abcam 公司;CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;2 × SYBR Green Mix 试剂盒购自美国 Bimake 公司;小室 (Transwell) 购自美国 Corning 公司;细胞恒温培养箱和酶标仪购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司;凝胶成像系统购自美国 BIO-RAD 公司;倒置显微镜购自日本尼康。

### 1.2 临床资料

选取 2021 年 1 月至 2022 年 6 月太原市中心医院接受全子宫切除术的 83 例 AM 患者的内膜组织。患者年龄 25 ~ 45 岁,平均 (34.12 ± 5.45) 岁,中位年龄 34.2 岁。纳入标准:患者月经规律,无心血管疾病史;无内分泌疾病史;无自身免疫性疾病,且均签署知情同意书。排除标准:妊娠或者是哺乳期患者;有放化疗史的患者。本研究经我院伦理委员会审批通过。

### 1.3 细胞分离及培养

参考文献<sup>[9]</sup>将收集的子宫内膜组织剪成 1 mm<sup>3</sup> 大小的方块,D-Hanks 液反复清洗组织块。随后加入含 IV 型胶原酶的 DMEM/F12 培养基,于 37℃ 条件下消化 2 h。用 80 目滤网和 300 目滤网依次过滤,收集滤液,离心弃上清液,所得细胞沉淀即为 ESCs。沉淀用 DMEM/F12 培养基清洗 1 遍后,再次离心收集细胞。将细胞接种至含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞每两天更换 1 次新鲜培养基。

### 1.4 免疫组化检测细胞 E-cadherin 和 Vimentin 的表达

将对数期生长的 2 × 10<sup>6</sup> 个 ESCs 接种于有盖玻片的 6 孔板中,待细胞密度达到 80% 时,弃上清,PBS 清洗并用 4% 多聚甲醛在室温条件下固定细胞 15 min,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温条件下封闭 10 min。依次加入一抗 E-cadherin (1:200) 和 Vimentin (1:100),二抗 (1:500) 孵育,条件为 37℃ 下各 30 min 后。最后加入 BAB 显色剂,显微镜下观察。

### 1.5 流式细胞术检测 E-cadherin 和 Vimentin 阳性细胞

将预冷的 70% 乙醇加入 ESCs 并于 4℃ 条件下固定过夜。收集细胞,加入 0.1% TritonX-100 室温孵育 15 min 后,加入 E-cadherin (1:200) 和 Vimentin (1:100) 抗

体,37℃条件下孵育1 h。加入荧光二抗(1:500),孵育条件同一抗。PBS重悬细胞,流式细胞仪检测 E-cadherin 和 Vimentin 阳性细胞比例。

### 1.6 细胞给药处理

将对数期生长的  $5 \times 10^5$  个 ESCs 接种于6孔板中。将细胞随机分为对照组(添加 PBS)、脂多糖组(添加脂多糖)和 TAK-242 组(添加 TAK-242),按照分组,分别向细胞中添加 PBS、脂多糖(终浓度 100 ng/mL)<sup>[10]</sup>、TAK-242(终浓度 200 nmol/L)<sup>[11]</sup>。细胞继续培养 24 h、48 h 和 72 h 后,进行后续实验操作。

### 1.7 细胞转染

将对数期生长的  $5 \times 10^5$  个 ESCs 接种于6孔板中。将细胞随机分为对照组(添加 PBS)、脂多糖组(添加脂多糖)、脂多糖 + si-NC 组(添加脂多糖和转染 si-NC)、脂多糖 + si-AQP4 组(添加脂多糖和转染 si-AQP4),按照分组,进行 si-NC 和 si-AQP4 的转染,细胞继续培养 48 h。细胞更换新鲜培养基,根据分组,添加 PBS 和脂多糖(终浓度 100 ng/mL),细胞继续培养 24 h 后,进行后续实验操作。

### 1.8 Western blot 检测细胞 TLR4、p-p65、p65 和 AQP4 蛋白表达

收集各组 ESCs, RIPA 裂解液裂解细胞并收集上清。取 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。随后将蛋白转至 PVDF 膜上。5% BSA 室温封闭 2 h, 加入 TLR4(1:1 000)、p-p65(1:2 000)、p65(1:1 000) 和 AQP4(1:1 000) 一抗, 4℃ 条件孵育过夜。加入二抗, 室温孵育 1 h。滴加 ECL 显色液, 对蛋白条带凝胶成像并通过 Image J 软件分析条带灰度值。

### 1.9 qRT-PCR 检测细胞 AQP4 mRNA 表达

收集各组 ESCs 并提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA。采用 2 × SYBR Green Mix 进行 qRT-PCR 检测。反应条件 95℃、10 min; 95℃、15 s, 60℃、30 s, 72℃、10 s, 40 个循环。AQP4 上游引物: 5'-AGGCTTCAATTACCCACTGGA-3', AQP4 下游引物: 5'-GTGAGCACCGCTGATGTGA-3'; GAPDH 上游引物: 5'-CCAGGTGGTCTCTCTGA-3', GAPDH 下游引物: 5'-GCTGTAGCCAAATCGTTGT-3'。AQP4 以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 AQP4 mRNA 表达。

### 1.10 CCK-8 检测细胞增殖能力

将对数期生长的  $1 \times 10^4$  个 ESCs 接种于96孔板中, 根据分组, 添加 PBS、脂多糖(终浓度 100 ng/mL)、TAK-242(终浓度 200 nmol/L)。继续培养 24 h、48 h 和 72 h 时, 加入 10% CCK-8 溶液。37℃条件下孵育 4 h 后, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值。

### 1.11 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

用枪头垂直于培养板在各组 ESCs 中划线, PBS 清洗细胞, 显微镜观察并拍照, 此为 0 h 的细胞。随后将根据分组, 添加 PBS、脂多糖(终浓度 100 ng/mL)、TAK-

242(终浓度 200 nmol/L)。细胞继续培养 24 h 后, 显微镜观察并拍照, 此为 24 h 的细胞。Image J 软件分析细胞划痕面积, 细胞划痕愈合率(%) = (1 - 划痕面积 24 h / 划痕面积 0 h) × 100%。

### 1.12 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

Transwell 上室中加入 20% 浓度的 Matrigel, 待 Matrigel 凝固。将该 Transwell 上室置于 24 孔板内。用无血清培养基重悬 ESCs, 将  $5 \times 10^4$  个 ESCs 接种于 Transwell 上室; 将 600 μL 含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基加至下室, 细胞继续培养 24 h。取出小室, 4% 多聚甲醛固定并加入结晶紫染色, 各 15 min。显微镜观察细胞迁移情况。

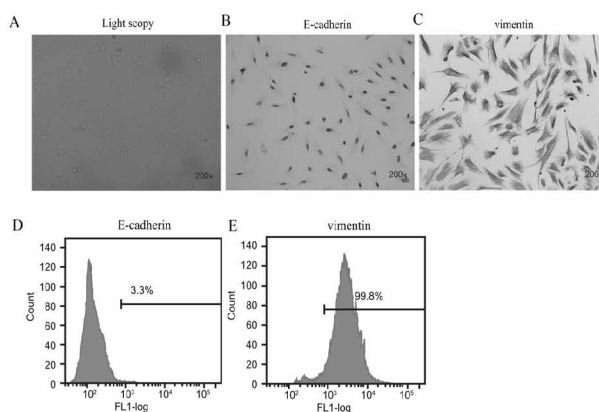
### 1.13 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析。实验数据均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 子宫内质间质细胞分离与鉴定

显微镜观察 ESCs, 可见细胞呈长梭形和典型的成纤维细胞样形态(图 1A)。免疫组化结果显示, 上皮细胞特异性标志物 E-cadherin 呈阴性表达(图 1B), ESCs 中间质细胞特异性标志物 Vimentin 呈阳性表达(图 1C)。流式细胞术检测 Vimentin 和 E-cadherin 阳性细胞比例, 结果显示, ESCs 中 E-cadherin 阳性细胞比例为 3.3%(图 1D), Vimentin 阳性细胞数比例为 99.8%(图 1E)。



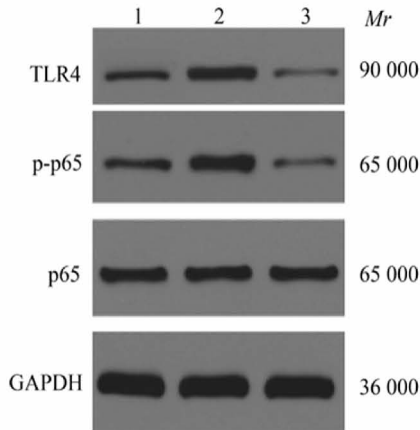
注: A: 光学显微镜下观察 ESCs 形态; B: 免疫组化检测 ESCs 内 E-cadherin 的表达; C: 免疫组化检测 ESCs 内 Vimentin 的表达; D: 流式细胞术检测 E-cadherin 阳性 ESCs; E: 流式细胞术检测 Vimentin 阳性 ESC 细胞

图1 子宫内质间质细胞的分离和鉴定

### 2.2 脂多糖和 TAK-242 对 ESCs 中 TLR4 /NF-κB 通路的影响

与对照组相比, 脂多糖组 ESCs 中 TLR4 和 p-p65/

p65 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 TAK-242 组 ESCs 中 TLR4 和 p-p65/p65 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2 和表 1。



注:泳道 1 为对照组;泳道 2 为脂多糖组;泳道 3 为 TAK-242 组

图 2 Western blot 法检测各组 ESCs 中 TLR4、p-p65 和 p65 蛋白表达的电泳图

表 1 各组 ESCs 中 TLR4、p-p65 和 p65 蛋白表达水平 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	TLR4	p-p65/p65
对照组	$0.28 \pm 0.02$	$0.53 \pm 0.04$
脂多糖组	$0.57 \pm 0.04^*$	$1.04 \pm 0.09^*$
TAK-242 组	$0.17 \pm 0.01^*$	$0.21 \pm 0.01^*$

注:与对照组相比,  $*P < 0.05$

### 2.3 TLR4 /NF- $\kappa$ B 通路对 ESCs 增殖的影响

与对照组相比, 脂多糖组 ESCs 在 24 h、48 h 和 72 h 时间点细胞增殖能力明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 TAK-242 组 ESCs 在 24 h、48 h 和 72 h 时间点细胞增殖能力明显降低 ( $P < 0.05$ ), 详见表 2。

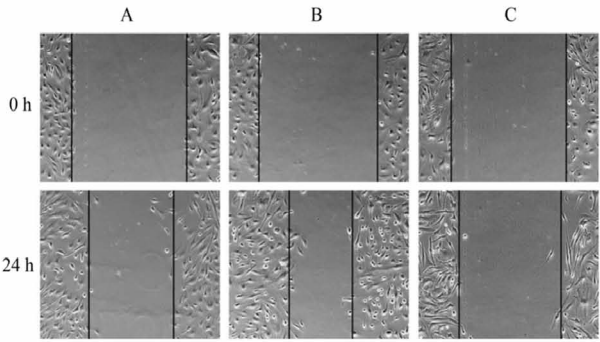
表 2 不同时间点各组 ESCs 增殖活性 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	吸光度值		
	24 h	48 h	72 h
对照组	$0.43 \pm 0.03$	$0.79 \pm 0.05$	$1.27 \pm 0.11$
脂多糖组	$0.58 \pm 0.04^*$	$1.02 \pm 0.08^*$	$1.56 \pm 0.12^*$
TAK-242 组	$0.31 \pm 0.03^*$	$0.57 \pm 0.04^*$	$0.92 \pm 0.06^*$

注:与对照组相比,  $*P < 0.05$

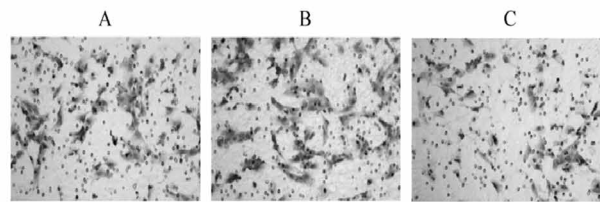
### 2.4 TLR4 /NF- $\kappa$ B 通路对 ESCs 迁移和侵袭的影响

与对照组相比, 脂多糖组 ESCs 划痕愈合率、侵袭细胞数明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 TAK-242 组 ESCs 划痕愈合率、侵袭细胞数明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3、4 和表 3。



注: A 为对照组; B 为脂多糖组; C 为 TAK-242 组

图 3 细胞划痕实验检测各组 ESCs 迁移能力 ( $\times 200$ )



注: A 为对照组; B 为脂多糖组; C 为 TAK-242 组

图 4 Transwell 实验检测各组 ESCs 侵袭能力 (结晶紫,  $\times 200$ )

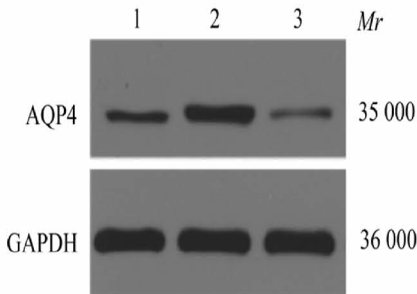
表 3 各组 ESCs 划痕愈合率和侵袭细胞数 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	划痕愈合率 (%)	迁移细胞数
对照组	$12.85 \pm 1.16$	$65.73 \pm 1.03$
脂多糖组	$24.32 \pm 21.74^*$	$108.13 \pm 8.61^*$
TAK-242 组	$7.06 \pm 0.65^*$	$31.73 \pm 2.34^*$

注:与对照组相比,  $*P < 0.05$

### 2.5 TLR4 /NF- $\kappa$ B 通路对 ESCs AQP4 表达的影响

与对照组相比, 脂多糖组 ESCs 中 AQP4 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 TAK-242 组 ESCs 中 AQP4 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 5 和下页表 4。



注:泳道 1 为对照组;泳道 2 为脂多糖组;泳道 3 为 TAK-242 组

图 5 Western blot 法检测各组 ESCs 中 AQP4 蛋白表达

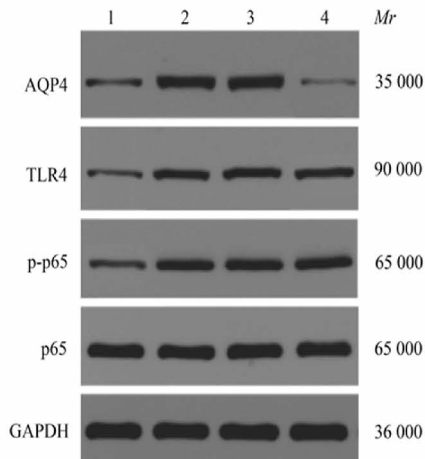
表4 各组 ESCs 中 AQP4 mRNA 和蛋白表达水平  
( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	AQP4 mRNA	AQP4 蛋白质
对照组	1.00 ± 0.05	0.31 ± 0.02
脂多糖组	3.52 ± 0.28 *	0.92 ± 0.09 *
TAK-242 组	0.42 ± 0.03 *	0.16 ± 0.01 *

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$

## 2.6 敲低 AQP4 对 ESCs 中 TLR4 /NF- $\kappa$ B 通路和 AQP4 表达的影响

与对照组相比,脂多糖组和脂多糖 + si-NC 组 ESCs 中 AQP4 mRNA 表达水平和 AQP4、TLR4、p-p65/p65 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ );与脂多糖组相比,脂多糖 + si-NC 组 ESCs 中 AQP4 mRNA 表达水平和 AQP4、TLR4、p-p65/p65 蛋白表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );与脂多糖组和脂多糖 + si-NC 组相比,脂多糖 + si-AQP4 组 ESCs 中 AQP4 mRNA 表达水平和 AQP4 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ),而 TLR4、p-p65/p65 蛋白表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见图 6 和表 5。



注:泳道 1 为对照组;泳道 2 为脂多糖组;泳道 3 为脂多糖 + si-NC 组;泳道 4 为脂多糖 + si-AQP4 组

图6 各组 ESCs 中 AQP4、TLR4、p-p65 和 p65 蛋白表达

表5 各组 ESCs 中 AQP4 mRNA 和 AQP4、TLR4、p-p65/p65 蛋白表达水平 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	AQP4 mRNA	AQP4 蛋白质	TLR4 蛋白质	p-p65/p65 蛋白质表达之比
对照组	1.00 ± 0.08	0.26 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.20 ± 0.01
脂多糖组	3.87 ± 0.31 *	1.06 ± 0.09 *	0.74 ± 0.06 *	1.05 ± 0.10 *
脂多糖 + si-NC 组	3.76 ± 0.34 *	1.08 ± 0.10 *	0.78 ± 0.07 *	1.08 ± 0.09 *
脂多糖 + si-AQP4 组	0.35 ± 0.03 <sup>#</sup> △	0.14 ± 0.01 <sup>#</sup> △	0.79 ± 0.08	1.07 ± 0.10

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ;与脂多糖组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与脂多糖 + si-NC 组相比, △ $P < 0.05$

## 2.7 敲低 AQP4 逆转脂多糖对 ESCs 增殖的影响

与对照组相比,脂多糖组和脂多糖 + si-NC 组 ESCs 在 24 h、48 h 和 72 h 时间点的细胞增殖能力明显升高 ( $P < 0.05$ );与脂多糖组相比,脂多糖 + si-NC 组 ESCs 在 24 h、48 h 和 72 h 时间点的细胞增殖能力差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );与脂多糖组和脂多糖 + si-NC 组相比,脂多糖 + si-AQP4 组 ESCs 在 24 h、48 h 和 72 h 时间点的细胞增殖能力明显降低 ( $P < 0.05$ ),详见表 6。

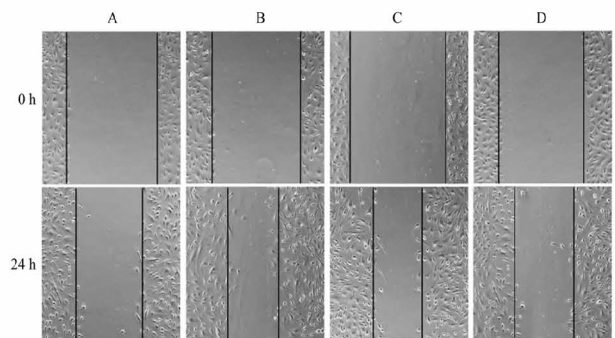
表6 不同时间点各组 ESCs 增殖活性 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	吸光度值		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0.45 ± 0.03	0.73 ± 0.06	1.21 ± 0.11
脂多糖组	0.61 ± 0.05 *	0.96 ± 0.07 *	1.64 ± 0.14 *
脂多糖 + si-NC 组	0.62 ± 0.04 *	0.99 ± 0.08 *	1.67 ± 0.13 *
脂多糖 + si-AQP4 组	0.48 ± 0.04 <sup>#</sup> △	0.64 ± 0.04 <sup>#</sup> △	1.35 ± 0.12 <sup>#</sup> △

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ;与脂多糖组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与脂多糖 + si-NC 组相比, △ $P < 0.05$

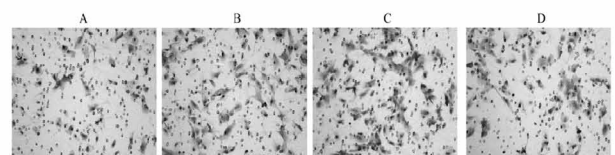
## 2.8 敲低 AQP4 逆转脂多糖对 ESCs 迁移和侵袭的影响

与对照组相比,脂多糖组和脂多糖 + si-NC 组 ESCs 划痕愈合率、侵袭细胞数明显升高 ( $P < 0.05$ );与脂多糖组和脂多糖 + si-NC 组相比,脂多糖 + si-AQP4 组 ESCs 划痕愈合率、侵袭细胞数明显降低 ( $P < 0.05$ ),见图 7、8 和下页表 7。



注:A 为对照组;B 为脂多糖组;C 为脂多糖 + si-NC 组;D 为脂多糖 + si-AQP4 组

图7 各组 ESCs 迁移能力 (×200)



注:A 为对照组;B 为脂多糖组;C 为脂多糖 + si-NC 组;D 为脂多糖 + si-AQP4 组

图8 各组 ESCs 侵袭能力 (结晶紫, ×200)



表 7 各组 ESCs 划痕愈合率和侵袭细胞数

(n = 3,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	划痕愈合率 (%)	迁移细胞数
对照组	14.23 ± 1.26	38.80 ± 2.27
脂多糖组	22.87 ± 2.15 *	80.93 ± 6.89 *
脂多糖 + si-NC 组	23.34 ± 2.27 *	81.27 ± 4.88 *
脂多糖 + si-AQP4 组	17.49 ± 1.33 # <sup>△</sup>	58.67 ± 4.76 # <sup>△</sup>

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ;与脂多糖组相比, #  $P < 0.05$ ;与脂多糖 + si-NC 组相比, <sup>△</sup>  $P < 0.05$

### 3 讨论

AM 的患病率在 5% ~ 70% 之间波动。在 40 岁之前,该疾病的发病率为每 10 例妇女中有 2 例,而在 40 ~ 50 岁之间,发病率上升到每 10 例妇女中就有 8 例<sup>[12]</sup>。AM 可能伴有其他轻度雌激素依赖性良性疾病,如子宫内膜异位症(70%)、子宫肌瘤(50%)和子宫内膜增生(35%)。AM 治疗不及时可能导致月经量过多、贫血、痛经等症状,严重影响生活,甚至引发不孕<sup>[13]</sup>。目前,AM 的发病机制尚不清楚。

脂多糖是革兰氏阴性菌外膜的主要成分。脂多糖感染会触发许多宿主细胞,如单核细胞、中性粒细胞和巨噬细胞,释放促炎细胞因子,导致炎症<sup>[14]</sup>。TLR4 是一种天然免疫系统的跨膜受体蛋白,属于 I 型跨膜糖蛋白受体家族。它广泛表达于各种细胞类型<sup>[15]</sup>。此外,TLR4 还是一种被脂多糖识别的模式识别受体。TLR4 激活招募下游接头来激活核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 通路从而介导炎症反应<sup>[16]</sup>。TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路与子宫内膜功能障碍密切相关。Hu 等<sup>[17]</sup>研究结果显示,TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路参与子宫内膜炎疾病进展,抑制 TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路的激活可减轻炎症反应。此外,TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路还促进子宫内膜异位症的疼痛反应,阻断 TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路可能是治疗子宫内膜异位症疼痛的潜在策略<sup>[18]</sup>。目前,已有相关研究证明,脂多糖通过 TLR4 信号通路刺激炎症反应和间质细胞侵袭性生长,从而诱导 AM。而阻断 TLR4 信号通路可明显抑制 AM 中 ESCs 增殖和侵袭相关分子的表达,从而阻滞 AM 疾病进程<sup>[19]</sup>。Liang 等<sup>[20]</sup>研究也表明,在 AM 中,TLR4 信号可诱导炎症反应,造成 ESCs 恶性增殖。TLR4 也有望成为 AM 的生物标志物。本研究首先成功分离培养 AM 患者的 ESCs,随后应用 TLR4 激活剂脂多糖和 TLR4 抑制剂 TAK-242 处理细胞,结果显示,脂多糖可明显升高 ESCs 中 TLR4 蛋白表达和 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化水平,促进 ESCs 增殖、迁移和侵袭。此外,TAK-242 可明显抑制 ESCs 中 TLR4 蛋白表达和 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化水平,抑制 ESCs 增殖、迁移和侵袭。本研究结果表明,TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路可介导 AM 中 ESCs 的侵袭性生长。

AQPs 是一类具有通道功能的蛋白质家族,位于质膜上,介导水的转运。AQPs 在呼吸系统疾病(急性肺损

伤、哮喘和慢性阻塞性肺疾病等)、恶性肿瘤(食管癌、胃癌和大肠癌等)、肾脏疾病(急性肾损伤、糖尿病肾病)、中枢神经系统疾病(脑水肿)的病理生理过程中起着关键作用<sup>[21]</sup>。已有研究表明,AQP1 在子宫内膜异位症中表达上调。AQP1 基因沉默可抑制异位内膜细胞的黏附和侵袭能力,抑制血管生成,促进细胞凋亡,阻滞子宫内膜异位症小鼠疾病进展<sup>[22]</sup>。另有相关研究表明,小鼠 AM 模型中,子宫在位内膜和异位内膜组织中 AQPs 家族成员 AQP2、AQP5 和 AQP8 表达上调。敲低 AQP5 可抑制 ESCs 的存活、迁移、侵袭和上皮间质转化<sup>[23]</sup>。既往研究结果表明,AM 中 AQP4 表达上调与 AM 疾病进程密切相关<sup>[8]</sup>。目前,已有相关的研究表明,TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路的激活可上调 AQP4 的表达,而应用 TLR4 抑制剂可明显下调 AQP4 的表达<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,脂多糖可明显升高 ESCs 中 AQP4 的表达,而 TAK-242 可明显抑制 ESCs 中 AQP4 的表达。该结果表明,TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路可能通过调控 AQP4 的表达在 AM 中发挥作用。进一步实验结果显示,敲低 AQP4 对 ESCs 中 TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路无明显影响。但是,敲低 AQP4 能明显减弱脂多糖对 ESCs 增殖、迁移和侵袭的促进作用。该研究结果表明,TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路通过上调 AQP4 的表达促进 AM 中 ESCs 的侵袭性生长。

综上所述,TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路通过上调 AQP4 的表达促进 AM 中 ESCs 增殖、迁移和侵袭,而敲低 AQP4 可明显减弱 TLR4 / NF- $\kappa$ B 通路对 ESCs 增殖、迁移和侵袭的促进作用。该研究结果为明确 AM 的发病机制及开发 AM 治疗新靶点提供了新的科学资料。

### 【参考文献】

- [1] Lacheta J. Uterine adenomyosis: pathogenesis, diagnostics, symptomatology and treatment [J]. Ceska Gynekol, 2019, 84(3): 240-246.
- [2] Loring M, Chen TY, Isaacson KB. A systematic review of adenomyosis; it is time to reassess what we thought we knew about the disease [J]. J Minim Invasive Gynecol, 2021, 28(3): 644-655.
- [3] Osada H. Uterine adenomyosis and adenomyoma: the surgical approach [J]. Fertil Steril, 2018, 109(3):406-417.
- [4] Xu W, Song Y, Li K, et al. Quercetin inhibits adenomyosis by attenuating cell proliferation, migration and invasion of ectopic endometrial stromal cells [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 3815-3826.
- [5] Rogero MM, Calder PC. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids [J]. Nutrients, 2018, 10(4):432-441.
- [6] Guo J, Chen L, Luo N, et al. LPS/TLR4-mediated stromal cells acquire an invasive phenotype and are implicated in the pathogenesis of adenomyosis [J]. Sci Rep, 2016, 6(3):214-226.
- [7] Li C, Wang W. Molecular biology of aquaporins [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 969(1):1-34.
- [8] 黎星森. 水通道蛋白介导子宫内膜细胞迁徙在子宫腺肌病发病机制中的研究 [D]. 杭州:浙江大学,2019.
- [9] 李艳辉,耿育红,刘琳,等. 脂氧素 A4 下调自噬活性对子宫内膜

- 间质细胞侵袭和迁移的影响及其作用机制 [J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(8): 547-553.
- [10] 郭静, 陈丽, 罗宁, 等. TLR4 信号介导内质网间质细胞侵袭增殖促子宫腺肌症发病的研究 [J]. 现代妇产科进展, 2015, 24(9): 672-676.
- [11] Wang B, Yang Y, Deng X, et al. Interaction of M2 macrophages and endometrial cells induces downregulation of GRIM-19 in endometria of adenomyosis [J]. Reprod Biomed Online, 2020, 41(5): 790-800.
- [12] Szubert M, Koziróg E, Olszak O, et al. Adenomyosis and infertility-review of medical and surgical approaches [J]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 18(3): 1235-1244.
- [13] 吴晚英. 子宫腺肌病的临床诊疗研究进展 [J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2023, 10(6): 36-39.
- [14] Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, et al. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2293-2302.
- [15] Qu D, Wang L, Huo M, et al. Focal TLR4 activation mediates disturbed flow-induced endothelial inflammation [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(1): 226-236.
- [16] Ju M, Liu B, He H, et al. MicroRNA-27a alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis through modulating TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway [J]. Cell Cycle, 2018, 17(16): 2001-2018.
- [17] Hu X, Wang M, Pan Y, et al. Anti-inflammatory effect of astragaloside and chlorogenic acid on escherichia coli-induced inflammation of sheep endometrial epithelium cells [J]. Front Vet Sci, 2020, 7(3): 201-215.
- [18] Su W, Cui H, Wu D, et al. Suppression of TLR4-MyD88 signaling pathway attenuated chronic mechanical pain in a rat model of endometriosis [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 65-77.
- [19] Liu L, Chen L, Jiang C, et al. Berberine inhibits the LPS-induced proliferation and inflammatory response of stromal cells of adenomyosis tissues mediated by the LPS/TLR4 signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(6): 6125-6130.
- [20] Liang N, Zhang W, Wang H, et al. Levonorgestrel ameliorates adenomyosis via lncRNA H19/miR-17/TLR4 pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14(3): 3449-3460.
- [21] Magouliotis DE, Tasiopoulou VS, Svokos AA, et al. Aquaporins in health and disease [J]. Adv Clin Chem, 2020, 98(5): 149-171.
- [22] Shu C, Shu Y, Gao Y, et al. Inhibitory effect of AQP1 silencing on adhesion and angiogenesis in ectopic endometrial cells of mice with endometriosis through activating the Wnt signaling pathway [J]. Cell Cycle, 2019, 18(17): 2026-2039.
- [23] Jia L, Liu Y, Han Y, et al. Differential expression and inhibitory effects of aquaporins on the development of adenomyosis [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(5): 3840-3850.
- [24] Sun L, Li M, Ma X, et al. Inhibition of HMGB1 reduces rat spinal cord astrocytic swelling and AQP4 expression after oxygen-glucose deprivation and reoxygenation via TLR4 and NF- $\kappa$ B signaling in an IL-6-dependent manner [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 231-245.

(收稿日期: 2023-10-09 编辑: 吕永胜)

(上接第 51 页)

- [5] Haque A, Brazeau D, Amin AR. Perspectives on natural compounds in chemoprevention and treatment of cancer; an update with new promising compounds [J]. Eur J Cancer, 2021, 149: 165-183.
- [6] Jiang H, Li Y, Xiang X, et al. Chaetocin: a review of its anticancer potentials and mechanisms [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 910: 174459.
- [7] Wen C, Wang H, Wu X, et al. ROS-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway is involved in the antitumor effects of thioredoxin reductase-1 inhibitor chaetocin [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11): 809.
- [8] He J, Chen X, Li B, et al. Chaetocin induces cell cycle arrest and apoptosis by regulating the ROS-mediated ASK1/JNK signaling pathways [J]. Onco Rep, 2017, 38(4): 2489-2497.
- [9] Han X, Han Y, Zheng Y, et al. Chaetocin induces apoptosis in human melanoma cells through the generation of reactive oxygen species and the intrinsic mitochondrial pathway, and exerts its anti-tumor activity in vivo [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0175950.
- [10] Liu X, Guo S, Liu X, et al. Chaetocin induces endoplasmic reticulum stress response and leads to death receptor 5-dependent apoptosis in human non-small cell lung cancer cells [J]. Apoptosis, 2015, 20(11): 1499-1507.
- [11] Li Z, Huang L, Wei L, et al. Chaetocin induces caspase-dependent apoptosis in ovarian cancer cells via the generation of reactive oxygen species [J]. Oncol Lett, 2019, 18(2): 1915-1921.
- [12] Chen MY, Zhang ZH, Ke JF, et al. Chaetocin attenuates atherosclerosis progression and inhibits vascular smooth muscle cell phenotype switching [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2022, 15(6): 1270-1282.
- [13] Sepsa A, Levidou G, Gargalionis A, et al. Emerging role of linker histone variant H1x as a biomarker with prognostic value in astrocytic gliomas: a multivariate analysis including trimethylation of H3K9 and H4K20 [J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0115101.
- [14] Luo Z, Luo Y, Liang X, et al. Alantolactone-loaded pegylated prodrug nanocarriers for synergistic treatment of cisplatin-resistant ovarian cancer via reactivating mitochondrial apoptotic pathway [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2022, 8(6): 2526-2536.
- [15] Raninga PV, Di Trapani G, Vuckovic S, et al. TrxR1 inhibition overcomes both hypoxia-induced and acquired bortezomib resistance in multiple myeloma through NF- $\kappa$ B inhibition [J]. Cell Cycle, 2016, 15(4): 559-572.
- [16] Li X, Bao C, Ma Z, et al. Perfluorooctanoic acid stimulates ovarian cancer cell migration, invasion via ERK/NF- $\kappa$ B/MMP-2/-9 pathway [J]. Toxicol Lett, 2018, 294: 44-50.
- [17] Huang X, Teng Y, Yang H, et al. Propofol inhibits invasion and growth of ovarian cancer cells via regulating miR-9/NF- $\kappa$ B signal [J]. Braz J Med Biol Res, 2016, 49(12): e5717.
- [18] Ruan Z, Zhao D. Long intergenic noncoding RNA LINC00284 knockdown reduces angiogenesis in ovarian cancer cells via up-regulation of MEST through NF- $\kappa$ B1 [J]. FASEB J, 2019, 33(11): 12047.

(收稿日期: 2023-04-28 编辑: 牟术容)