

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.03.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.03.001>

· 论著 ·

## MiR-17-5p 在子宫内膜异位症间质细胞中的表达及其对基质金属蛋白酶-2 的影响

洪哲晶, 汪玲莉, 郑纾

(福建省人民医院妇科, 福州 350004)

**[摘要]** 目的: 探讨miR-17-5p在子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)间质细胞中的表达及其对基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的影响。方法: MiRNA芯片筛选EMs异位子宫内膜组织中差异表达的miRNA, qRT-PCR验证EMs异位、在位子宫内膜组织和子宫肌瘤正常子宫内膜组织(对照组)中miR-17-5p的表达;提取以上各组组织中原代间质细胞,免疫荧光鉴定表面标志物; qRT-PCR和蛋白质印迹法检测各组间质细胞中miR-17-5p和MMP-2的表达;双荧光素酶报告基因实验验证miR-17-5p和MMP-2的靶向关系;EMs异位间质细胞中转染miR-17-5p mimic和inhibitor, qRT-PCR、蛋白质印迹法和明胶酶谱法检测MMP-2的表达,克隆形成实验检测细胞增殖能力, Transwell实验检测细胞侵袭能力, 划痕实验检测细胞迁移能力。结果: EMs异位子宫内膜组织中miR-17-5p、miR-200b、miR-106b、miR-15b、miR-141、miR-22显著下降, miR-202、miR-150、miR-365表达显著上升;与对照组相比, miR-17-5p在EMs异位、在位子宫内膜组织和间质细胞中表达均显著下降( $P<0.05$ ), 而MMP-2在EMs异位、在位子宫内膜间质细胞中表达均显著升高( $P<0.05$ );与阴性对照组(negative control, NC)相比, 过表达miR-17-5p抑制MMP-2的表达并显著抑制细胞克隆形成数, 细胞侵袭数及细胞迁移率( $P<0.05$ ), 敲低miR-17-5p, 结果相反。结论: MiR-17-5p在EMs间质细胞中表达下降, 抑制miR-17-5p的表达能够促进MMP-2表达升高同时增强细胞增殖、侵袭和迁移能力。

**[关键词]** 子宫内膜异位症; miR-17-5p; MMP-2; 子宫内膜异位症间质细胞; 增殖; 侵袭; 迁移

## Expression of miR-17-5p in endometriosis stromal cells and its effect on matrix metalloproteinase-2

HONG Zhejing, WANG Lingli, ZHENG Shu

(Department of Gynecology, Fujian Provincial People's Hospital, Fuzhou 350004, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the expression of miR-17-5p in endometriosis (EMs) stromal cells and its effect on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). **Methods:** The miRNA chip was used to screen differentially expressed miRNAs in ectopic endometrial tissues of EMs. qRT-PCR was used to verify the expression of miR-17-5p in ectopic, orthotopic endometrial tissue of EMs and normal endometrial tissue of uterine fibroids (control group).

收稿日期 (Date of reception): 2020-01-09

通信作者 (Corresponding author): 汪玲莉, Email: gxtm9a@163.com

Primary mesenchymal cells were extracted from the above groups, and surface markers were identified by immunofluorescence; qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of miR-17-5p and MMP-2 in mesenchymal cells of each group; dual luciferase reporter assay was used to confirm the targeting relationship between miR-17-5p and MMP-2. EMs were transfected with miR-17-5p mimic and inhibitor, qRT-PCR, Western blot and Zymographic detection were used to detect MMP-2 expression; the colony formation test was used to detect cell proliferation ability, the Transwell assay was used to detect cell invasion ability, and the scratch test was used to detect cell migration ability. **Results:** The expressions of miR-17-5p, miR-200b, miR-106b, miR-15b, miR-141, and miR-22 in ectopic endometrial tissue decreased significantly, and the expressions of miR-202, miR-150, and miR-365 increased significantly. Compared with the control group, miR-17-5p expression was significantly decreased in EM ectopic, eutopic endometrial tissue and interstitial cells ( $P < 0.05$ ), while the expression of MMP-2 was significantly increased in ectopic and eutopic endometrial stromal cells ( $P < 0.05$ ); compared with the negative control (NC) group, overexpression of miR-17-5p inhibited the expression of MMP-2 and significantly inhibited the number of clone formation, invading cells and migrating cells ( $P < 0.05$ ). After miR-17-5p was knocked down, the results were reversed. **Conclusion:** The expression of miR-17-5p is decreased in EMs interstitial cells. Inhibition of miR-17-5p can promote the expression of MMP-2 and enhance cell proliferation, invasion, and migration ability.

**Keywords** endometriosis; miR-17-5p; MMP-2; endometriosis stromal cells; proliferation; invasion; migration

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)指子宫内膜组织(包括腺体和间质)在子宫腔外异常生长,是一种常发于育龄期女性的妇科疾病<sup>[1]</sup>。尽管EMs是一种良性疾病,但其病变范围广,伴有高度侵袭性、易复发等恶性临床特征,导致慢性盆腔痛甚至不孕等,严重影响患者生活质量<sup>[2]</sup>。然而其发病机制目前尚无定论。微RNA(microRNA, miRNA)是一类长度为19~22个核苷酸的单链非编码RNA,可参与基因表达的转录后调控并在包括细胞增殖、分化和凋亡在内的多种重要生物过程中发挥作用<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4-6]</sup>表明:miRNA在EMs的发生、发展和预后中扮演重要角色,有望成为EMs的早期筛查及预后的生物标志物,甚至可能成为有效的治疗靶点。因此,本研究通过miRNA芯片筛选异位子宫内膜组织和正常子宫内膜组织中差异表达的miRNA,并选择变化差异较大的一条探讨其在体外细胞中的表达及作用,以期为目标治疗EMs奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本和试剂

选取2015年1月至2017年12月在福建省人民医院就诊,经腹腔镜检查或刮宫切开手术治疗,病理诊断为EM的患者,年龄( $34.3 \pm 5.7$ )岁。EMs异位组织56例,取自手术切除的卵巢异位病灶,术后病理证实符合EMs;EMs在位组织

56例(其中分泌期18例,增殖期38例),取自术前先行诊断性刮宫术的内膜,病理证实子宫内膜无病理性改变;并选择同期单纯子宫肌瘤患者经子宫切除术获得的60例(其中分泌期19例,增殖期41例)正常子宫内膜组织为对照组,患者年龄( $36.2 \pm 3.8$ )岁。所有研究对象就诊前至少6个月未接受激素或抗生素类药物,且月经周期正常。本研究经福建省人民医院医学伦理委员会批准(伦理审批号:2019-KY-0038)。患者及家属均知情同意并自愿签字。

MiR-17-5p mimic、inhibitor购自上海吉玛制药技术有限公司;DMEM/F12培养基(批号:H17030104),胎牛血清(批号:H19010402)购自美国Gibco公司;TRIzol试剂盒(批号:ZQ170458)购自日本TaKaRa公司;蛋白质印迹法试剂盒(批号:SW054129),Transwell试剂盒(批号:SJ061334)购自美国BD公司;反转录试剂盒(批号:TD024709)购自美国Sigma公司;全蛋白质抽提试剂盒(批号:S0112065)购自德国QIAGEN公司;Lipofectamine-3000转染试剂(批号:18061501L),荧光素酶试剂盒(批号:18091600Y)购自美国Vector公司;明胶酶谱检测试剂盒(批号:19091000M)购自南京信帆生物技术有限公司;PBS缓冲液(批号:S1-18-05-12)购自美国Amresco公司;MMP-2(ab97779,批号:0801300089),vimentin(ab92547,批号:0807500042),Cytokeratin(ab9377,批号:0807810020)抗体购自

美国Abcam公司。

## 1.2 MiRNA 表达谱分析

取EM患者异位子宫内膜组织和子宫肌瘤患者正常子宫内膜组织各3例, 分别记为EMs组和对照组。采用Agilent Human miRNA V19.0芯片, 按照miRNA Complete Labeling and Hyb Kit标准程序对实验样品RNA中miRNA分子进行荧光标记和杂交试验。Agilent Microarray Scanner扫描芯片结果, GenePix Pro 6.0软件用于结果分析。

## 1.3 子宫内膜间质细胞原代培养

将子宫内膜组织剪碎至约1 mm×1 mm×1 mm大小, 使用胶原酶VI在37 °C恒温水浴锅中消化60 min, 加入DNA酶I继续消化30 min, 经100目筛网过滤至离心管中, 800 r/min离心5 min。使用含10%胎牛血清和100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的DMEM/F12培养基重悬细胞, 接种于培养皿中, 放入37 °C, 5% CO<sub>2</sub>恒温细胞培养箱中培养, 隔天换液, 当细胞融合度达90%时, 胰蛋白酶消化传代。

## 1.4 免疫荧光检测子宫内膜间质细胞表面 vimentin 和 cytokeratin 的表达

将各组细胞消化后铺至6孔板中, 正常培养24 h后弃培养基, 加4%多聚甲醛固定10 min, PBS冲洗后加0.1% Triton 100通透15 min, PBS冲洗, 5%BSA的封闭液室温封闭30 min, 分别加适量用封闭液稀释的vimentin和cytokeratin一抗, 室温孵育2 h, PBS冲洗干净, 加稀释好的荧光标记的二抗于37 °C避光作用1 h, 用稀释好的DAPI染细胞核, 封片并置于共聚焦显微镜下观察拍照。

## 1.5 细胞转染及分组

子宫内膜间质细胞传代至第5代, 采用lipofectamine 3000通过脂质体介导法将miR-17-5p mimic和inhibitor分别转染至细胞中, 转染按lipofectamine 3000试剂说明书操作。

实验分组: Con组(未转染); NC组(转染miR-17-5p mimic NC); mimic组(转染miR-17-5p mimic); inhibitor组(转染miR-17-5p inhibitor)。

## 1.6 qRT-PCR 检测 miR-17-5p 及 MMP-2 的表达

依据TRIzol法提取各组样本的总RNA, 使用引物如下: miR-17-5p 正向5'-TGTC AAAGTGCTTACAGTG-3', 反向

5'-CCATAATGCTACAAGTGCC-3'; MMP-2 正向5'-CCGTGGTGAGATCTTCTTCT-3', 反向5'-CCTCGTATACCGCATCAATCT-3');  $\beta$ -actin 正向5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3', 反向5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'。反应条件: 75 °C预变性, 2 min, 进入以下循环: 1)90 °C变性, 5 min; 2)60 °C退火, 60 s; 3)72 °C延伸, 30 s; 共40个循环。相对表达量用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>表示。每个样本独立重复实验3次。

## 1.7 蛋白质印迹法检测 MMP-2 的表达

分别收集各组样本, 用总蛋白质提取试剂盒分别提取组织及细胞中总蛋白, BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白质含量。制备蛋白质样品并进行SDS-PAGE凝胶电泳, 然后转至PVDF膜, 加含有5%BSA的封闭液室温下封闭2 h。加入适宜浓度一抗于4 °C封闭过夜。次日用缓冲液清洗PVDF膜3次, 加入二抗, 室温孵育1 h后, 加入显色液曝光显影。

## 1.8 生物信息学预测及双荧光素酶报告基因验证 miR-17-5p 和 MMP-2 的关系

采用miRNA靶基因数据库Target Scan预测miR-17-5p和MMP-2的结合片段。采用PCR扩增含有miR-17-5p结合位点的MMP-2片段, 并将该扩增片段插入荧光素酶载体psi-CHECK中, 构建野生型质粒并记为psi-CHECK-MMP-2-wild, 同时采用基因突变技术对结合片段中的核苷酸进行突变, 并构建突变型质粒psi-CHECK-MMP-2-mutant。将miR-17-5p及阴性对照分别与野生型质粒psi-CHECK-MMP-2-wild和突变型质粒psi-CHECK-MMP-2-mutant共转染至HEK293T细胞。转染后24 h, 根据双荧光素酶检测试剂盒说明书测定荧光素酶活性, 萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶活性值即为报告基因活性。

## 1.9 明胶酶谱法检测 MMP-2 酶活性

制备含有MMP底物蛋白质的SDS-PAGE凝胶, 将从各组细胞中提取的蛋白质样品1:1稀释于2×SDS-PAGE non-reducing buffer, 混匀上样后电泳。电泳结束后用10 mL 1×Buffer A洗涤凝胶2次, 之后放入10 mL 1×Buffer B中室温孵育过夜。使用考马斯亮蓝染色液染色, 脱色后显影。

## 1.10 克隆形成实验检测细胞增殖

转染后细胞培养48 h, 胰蛋白酶消化各组细胞并按5×10<sup>3</sup>个/孔密度铺6孔板继续培养, 隔周更换新鲜培养液, 2周后用考马斯亮蓝染色, 以>30个细胞

的克隆记为一个菌落, 在显微镜下观察并拍照记录菌落形成数量, 每组设3个复孔, 重复实验3次。

### 1.11 Transwell 实验检测细胞侵袭

将40  $\mu\text{L}$  matrigel基质胶铺于Transwell小室中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 静置1 h凝固后备用, 实验前12 h弃原细胞培养液并换成无血清培养基, 0.25%胰酶消化细胞, 1 $\times$ PBS清洗、重悬, 细胞计数后取 $5\times 10^5$ 细胞重悬, 取200~250  $\mu\text{L}$ 细胞悬液至Transwell小室中, 下室加入500  $\mu\text{L}$ 完全培养基, 保证下层完全培养基与Transwell小室间无气泡。置于培养箱内培养24 h, 4%多聚甲醛固定, PBS洗干净, 加0.1%结晶紫染液室温避光染色15 min, PBS漂洗后用棉棒擦Transwell小室内部分, 倒置晾干, 置于倒置荧光显微镜下观察拍照并计数。

### 1.12 划痕实验检测细胞迁移能力

细胞转染48 h后调整细胞密度, 以 $5\times 10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板中, 当细胞汇合率达到90%以上时, 采用200  $\mu\text{L}$ 枪头在板中间划线, PBS清洗3次后加入无血清培养基继续培养, 在普通显微镜下观察并拍摄细胞在0和24 h迁移情况的照片, 分析并计算迁移率。

### 1.13 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行数据分析, 采用Graphpad 5.0作图, 两组间比较采用 $t$ 检验, 相关性分析采用Pearson相关分析,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miRNA 芯片筛选结果

与对照组比较, EMs组miR-202、miR-150、miR-365表达上调(fold change  $>2$ ), miR-17-5p、miR-200b、miR-106b、miR-15b、miR-141、miR-22表达下调(fold change  $<0.5$ ; 图1, 表1)。

### 2.2 qRT-PCR 验证 miR-17-5p 在子宫内膜组织中的表达

采用qRT-PCR分别检测子宫肌瘤在位内膜组织(对照组)、EMs在位和异位内膜组织中miR-17-5p的表达水平, 结果表明: EMs在位和异位组中miR-17-5p的表达均较对照组表达水平降低( $P<0.05$ ); 而与EMs在位组比较, 异位组miR-17-5p的表达差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图2)。

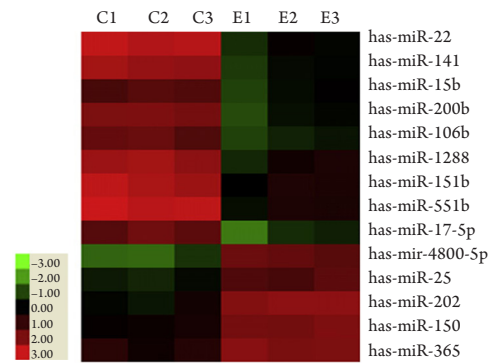


图1 子宫内膜组织中差异表达的miRNA

Figure 1 Differentially expressed miRNAs in endometrial tissues

表1 子宫内膜组织中差异表达的miRNA

Table 1 Differentially expressed miRNAs in endometrial tissues

MiRNAs	倍数	P
上调		
MiR-202	3.341	$<0.001$
MiR-365	3.215	$<0.001$
MiR-150	2.732	$<0.001$
下调		
MiR-17-5p	0.224	$<0.001$
MiR-200b	0.323	$<0.001$
MiR-106b	0.387	$<0.001$
MiR-15b	0.416	$<0.001$
MiR-141	0.425	$<0.001$
MiR-22	0.448	$<0.001$

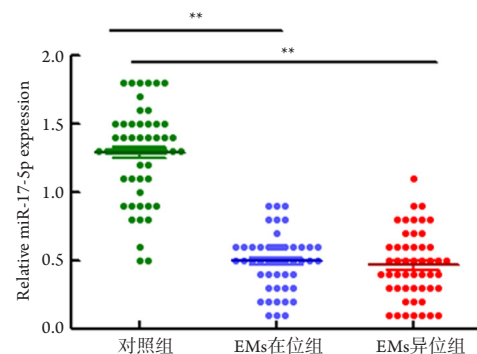


图2 MiR-17-5p在子宫内膜组织中的表达

Figure 2 MiR-17-5p expression in endometrial tissues

与对照组比较,  $**P<0.01$ 。

Compared with control group,  $**P<0.01$ .



### 2.3 免疫荧光鉴定子宫内膜间质细胞

从各组子宫内膜组织中提取原代子宫内膜间质细胞, 贴壁后观察其组织形态, 从子宫肌瘤组织中提取的正常在位间质细胞多呈菱形或椭圆形(图3); 而从EMs在位和异位组织中提取的间质细胞形态相似, 均呈梭形和纺锤样生长。通过免疫荧光鉴定, 发现各组细胞表面均表达间质细胞特有的标志物vimentin, 而上皮细胞标志物Cytokeratin不表达或表达弱阳性, 表明成功培养了子宫内膜间质细胞, 可用于下一步的体外实验研究。

### 2.4 MiR-17-5p 和 MMP-2 在子宫内膜间质细胞中的表达

采用qRT-PCR分别检测子宫肌瘤在位间质细胞(对照组)、EMs在位和异位间质细胞中miR-17-5p和MMP-2 mRNA的表达, 蛋白质印迹法检测MMP-2蛋白表达水平, 结果表明: EMs在位和异位组中miR-17-5p的表达均较对照组降低( $P < 0.05$ , 图4), 而MMP-2 mRNA和蛋白的表达水平较对照组均显著升高( $P < 0.05$ )。EMs在位组和异位组miR-17-5p和MMP-2的表达差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

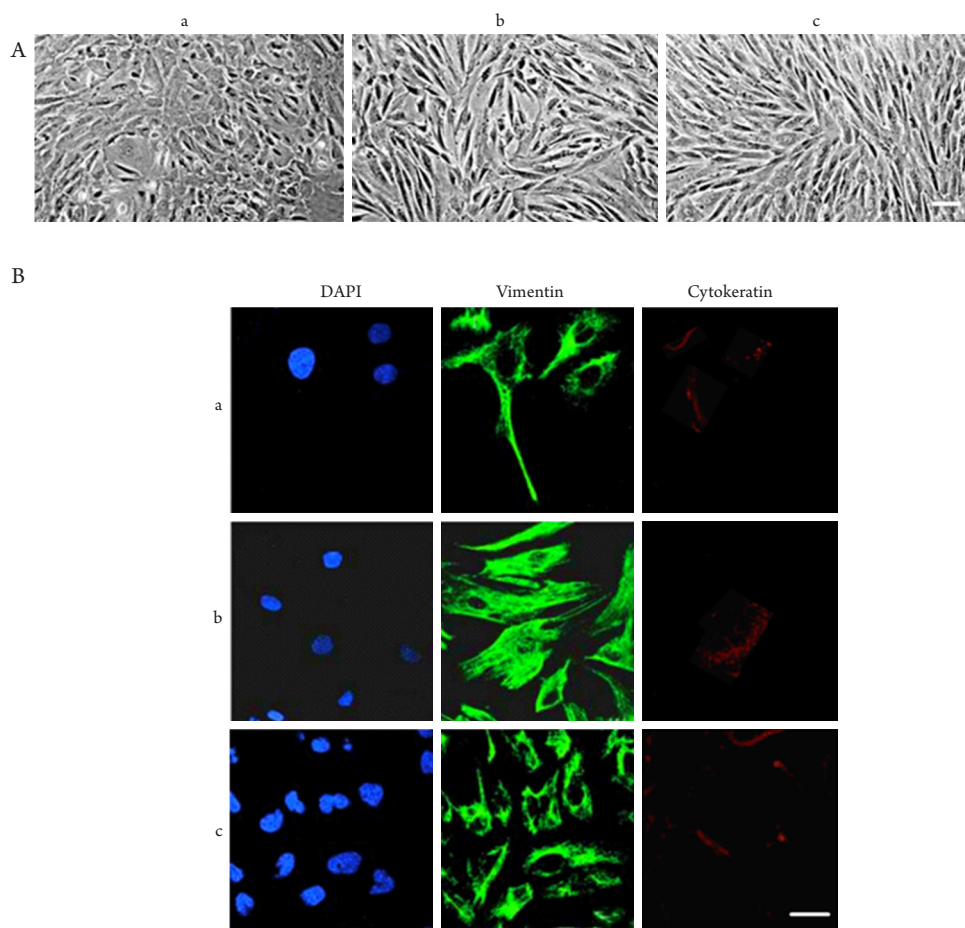


图3 子宫内膜间质细胞形态及表面标志物表达情况

#### Figure 3 Endometrial stromal cell morphology and surface marker expression

(A)光学显微镜下观察子宫内膜间质细胞形态(标尺=50  $\mu\text{m}$ ); (B)免疫荧光检测vimentin和Cytokeratin子宫内膜间质细胞中的表达情况(a: 子宫肌瘤在位间质细胞; b: EMs在位间质细胞; c: EMs异位间质细胞)(标尺=25  $\mu\text{m}$ )。

(A) Morphology of endometrial stromal cells under a optical microscope (scale =50  $\mu\text{m}$ ); (B) Expression of vimentin and cytotkeratin in endometrial stromal cells detected by immunofluorescence (a: uterine fibroid eutopic stromal cells; b: EMs eutopic stromal cells; c: EMs ectopic stromal cells) (scale = 25  $\mu\text{m}$ ).

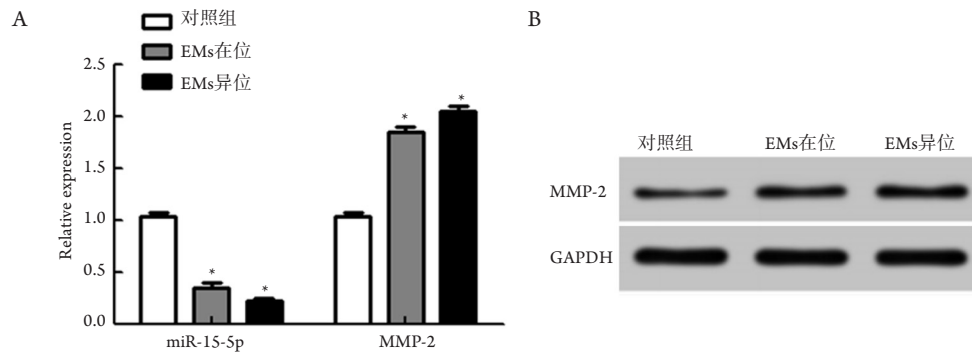


图4 MiR-17-5p和MMP-2在子宫内质间质细胞中的表达

Figure 4 Expression of miR-17-5p and MMP-2 in endometrial stromal cells

(A) qRT-PCR检测miR-17-5p和MMP-2的表达; (B)蛋白质印迹法检测MMP-2蛋白表达水平。与对照组比较,  $*P<0.05$ 。

(A) qRT-PCR detection of miR-17-5p and MMP-2 expression; (B) Western blot detection of MMP-2 expression. Compared with control group,  $*P<0.05$ .

## 2.5 MiR-17-5p 对 MMP-2 的靶向调控

通过Target Scan网站预测miR-17-5p与MMP-2的关系,发现二者具有互补结合序列。荧光素酶报告基因实验结果显示过表达miR-17-5p后能显著抑制转染MMP-2野生型质粒组的荧光素酶活性( $P<0.05$ ,图5),而对突变组的荧光素酶活性无影响( $P>0.05$ )。为进一步探究miR-17-5p是否对MMP-2具有靶向调控作用,将miR-

17-5p mimic及inhibitor分别转染到EMs异位间质细胞中,通过qRT-PCR和蛋白质印迹法检测MMP-2的表达水平,明胶酶谱法检测MMP-2的活性,发现过表达miR-17-5p可明显抑制EMs异位间质细胞中MMP-2的表达并抑制67 kDa的活性形式表达( $P<0.05$ );而抑制miR-17-5p可明显促进MMP-2的表达且出现明显的活性表达条带。

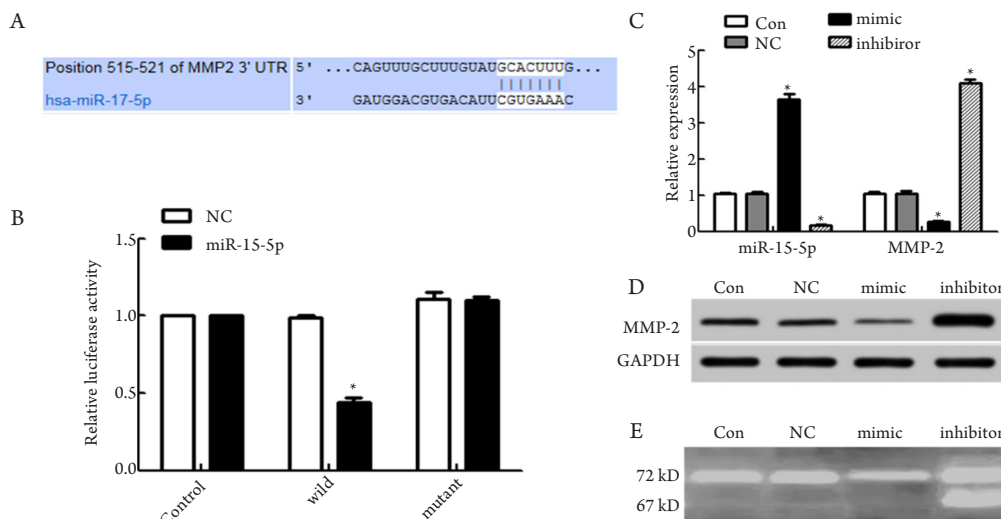


图5 MiR-17-5p对MMP-2的靶向调控

Figure 5 Targeted regulation of MMP-2 by miR-17-5p

(A) Target Scan网站预测miR-17-5p与MMP-2的互补结合序列; (B)双荧光素酶报告基因检测; (C) qRT-PCR检测在miR-17-5p和MMP-2的表达; (D)蛋白质印迹法检测MMP-2蛋白表达水平; (E)明胶酶谱法检测miR-17-5p对MMP-2活性的影响。与NC组比较,  $*P<0.05$ 。

(A) Complementary binding sequence of miR-17-5p and MMP-2 predicted in Target Scan website; (B) Detection of double luciferase reporter gene; (C) qRT-PCR detection of miR-17-5p and MMP-2 expression; (D) Western blot detection of MMP-2 expression; (E) Impact of miR-17-5p activity on MMP-2 detected by gelatin zymography. Compared with NC group,  $*P<0.05$ .

## 2.6 MiR-17-5p 对 EMs 异位间质细胞增殖能力的影响

克隆形成实验检测过表达及抑制miR-17-5p的表达后对EMs异位间质细胞增殖能力的影响, 结果显示: 与NC组相比, mimic组细胞克隆数量明显减少, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ , 图6); 而inhibitor组细胞克隆数明显增多。

## 2.7 MiR-17-5p 对 EMs 异位间质细胞侵袭能力的影响

Tanswell侵袭实验检测过表达及抑制miR-17-5p的表达后对EMs异位间质细胞侵袭能力的影响, 结果显示: 与NC组相比, mimic组细胞matrigel基质胶的数量明显减少, 差异有统计学意义( $P<0.05$ , 图7); 而inhibitor组细胞matrigel基质胶的数量明显增多。

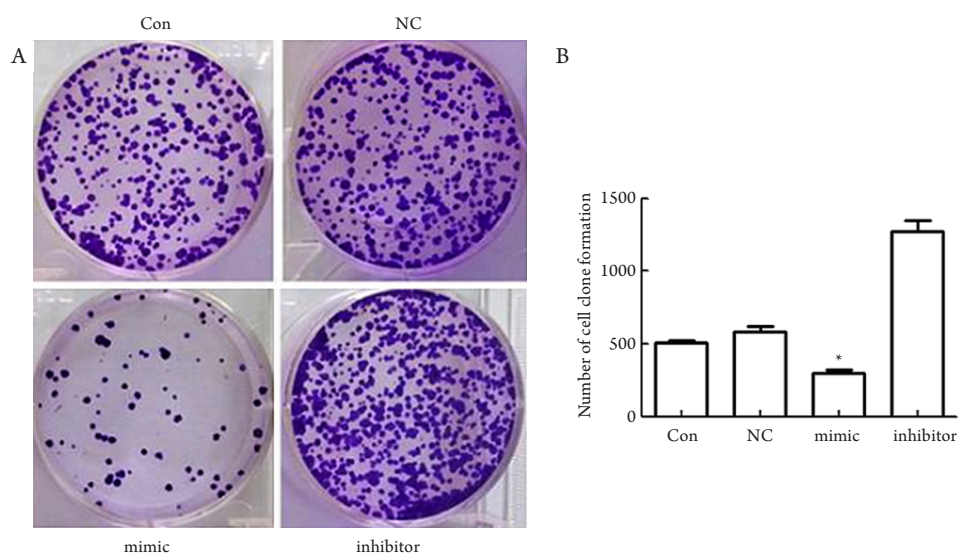


图6 miR-17-5p对EMs异位间质细胞增殖能力的影响

**Figure 6 Effect of miR-17-5p on the proliferation capacity of EM ectopic mesenchymal cells**

(A)细胞克隆形成图; (B)细胞克隆形成率。与NC组相比,  $*P<0.05$ 。

(A) Cell clone formation; (B) Cell clone formation rate. Compared with NC group,  $*P<0.05$ .

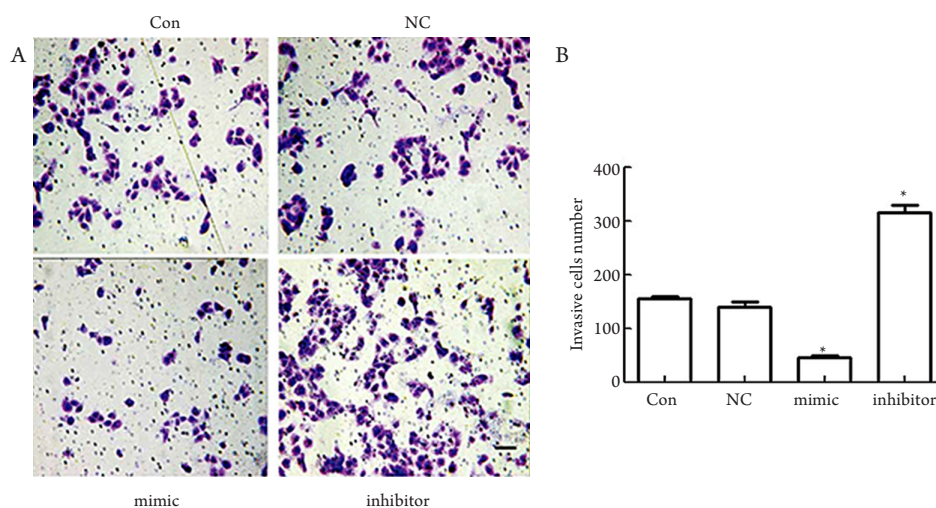


图7 MiR-17-5p对EMs异位间质细胞侵袭能力的影响( $\times 200$ )

**Figure 7 Effect of miR-17-5p on the invasion ability of EM ectopic mesenchymal cells ( $\times 200$ )**

(A)细胞侵袭图(标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ); (B)细胞侵袭数量。与NC组相比,  $*P<0.05$ 。

(A) Cell invasion (scale = 100  $\mu\text{m}$ ); (B) Number of cell invasion. Compared with NC group,  $*P<0.05$ .



## 2.8 MiR-17-5p 对 EMs 异位间质细胞迁移能力的影响

划痕实验检测过表达及抑制miR-17-5p的表达后对EMs异位间质细胞24 h后迁移能力的影响。

24 h后, 结果显示: 与NC组相比, mimic组细胞迁移的数量明显减少, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ , 图8); 而inhibitor组细胞迁移数明显增多。

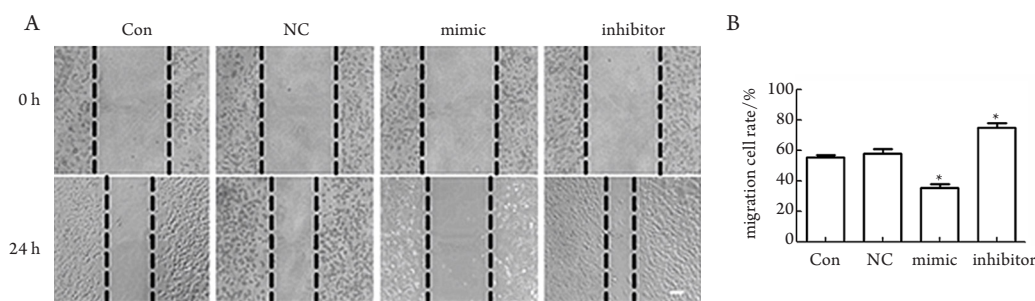


图8 MiR-17-5p对EMs异位间质细胞迁移能力的影响( $\times 200$ )

Figure 8 Effect of miR-17-5p on the migration capacity of EMs ectopic mesenchymal cells ( $\times 200$ )

(A)细胞迁移图(标尺 = 200  $\mu\text{m}$ ); (B)细胞迁移率。与NC组相比,  $*P < 0.05$ 。

(A) Cell migration diagram (scale = 200  $\mu\text{m}$ ); (B) Cell migration rate. Compared with NC group,  $*P < 0.05$ .

## 3 讨论

EM以子宫腔外产生子宫内膜组织为特征, 包括内膜间质和上皮细胞在子宫腔外的异位生长, 进而产生炎症反应、黏连甚至纤维化, 随后导致慢性盆腔疼痛和不孕。关于EMs的发病机制有多种猜测, 如遗传因素、干细胞学说、血管形成、侵袭及迁移等<sup>[7-8]</sup>, 然而均无定论。

近年来miRNA在EMs及其他生育系统疾病中的基因调节作用被相继报道。如Dong等<sup>[9]</sup>发现miR-191可通过调节TIMP3的表达调控EMs的恶性转化; Tian等<sup>[10]</sup>研究表明miR-191可通过靶向作用于DAPK1抑制TNF- $\alpha$ 诱导的卵巢EM和子宫内膜样癌细胞的凋亡; Zhou等<sup>[11]</sup>表明miR-205-5p通过ANGPT2激活ERK/AKT通路进而调控EMs的过程。本研究通过microRNA芯片筛选EMs异位子宫内膜组织和子宫肌瘤正常子宫内膜组织中差异表达的miRNA, 发现异位子宫内膜组织中miR-17-5p、miR-200b、miR-106b、miR-15b、miR-141、miR-22表达显著下降, miR-202、miR-150、miR-365表达显著上升, 另有Jia等<sup>[12]</sup>对EM患者血清中的miRNA变化进行检测, 也发现miR-17-5p的表达明显下调。因此, 本研究选择miR-17-5p进行体外的进一步研究。

子宫内膜组织主要由上皮和间质细胞组成, 而间质细胞具有更强的侵袭能力, 可能在EMs的发生发展中发挥更重要的作用<sup>[1]</sup>。因此本研究依据

Tsuno等<sup>[13]</sup>的方法经原代培养并鉴定获得子宫内膜间质细胞, 用于体外研究miR-17-5p在EMs中的作用。通过qRT-PCR检测miR-17-5p在子宫肌瘤在位间质细胞(对照组)、EMs在位和异位间质细胞中的表达, 发现与对照组相比, EMs在位和异位子宫内膜间质细胞中miR-17-5p表达均明显下降。这提示miR-17-5p表达的丢失可能在EMs的发病中发挥一定的作用。

MMPs是一类Ca<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>依赖性的蛋白酶, 在细胞外基质降解中发挥主要作用<sup>[14]</sup>。此外, 还在胚胎形成、组织重塑、血管生成、伤口愈合和转移及EM等多种生理病理过程中均发挥重要作用<sup>[15-16]</sup>。目前研究逐渐显示出MMP-2在EMs中发挥的功能, 随着MMP-2水平的升高, 其降解病灶表面基底膜成分的能力随之增强, 进一步影响间质细胞间联系, 实现对腹膜的浸润<sup>[17]</sup>。MMP-2还可调节细胞外基质的更新过程, 其过度表达使细胞外基质的合成和降解失去平衡, 进而导致EMs的发生<sup>[18]</sup>。Jana等<sup>[19]</sup>还表明MMP-2能够促进新生血管生成, 使子宫内膜组织在异位生长加速, 病灶扩大, 进一步加重患者病情。通过生物信息学分析, 本研究发现MMP-2是miR-17-5p的靶基因, 进一步通过双荧光素酶报告基因实验验证miR-17-5p能显著降低转染MMP-2野生型质粒组细胞的荧光素酶活性, 并且在EMs异位间质细胞中过表达miR-17-5p能显著抑制MMP-2的表达; 相反, 敲低miR-17-5p会使MMP-2在EMs异位间质细胞中高表达。由于MMP-2以无



活性的酶原形式分泌到细胞外, 被激活为活性形式发挥其蛋白质水解的作用, 因此进一步通过明胶酶谱法检测其活性, 发现过表达miR-17-5p会抑制MMP-2活性形式的表达, 而抑制miR-17-5p后MMP-2表现出明显的活性形式, 表明miR-17-5p能够在子宫内膜异位间质细胞中靶向调节MMP-2的表达及其活性功能的发挥。

为进一步探讨miR-17-5p在EMs异位间质细胞中的作用, 本研究分别通过克隆形成实验、Transwell侵袭实验和划痕实验检测过表达和敲低miR-17-5p后EMs异位间质细胞的增殖、侵袭及迁移能力。结果表明: 过表达miR-17-5p后, 细胞增殖、侵袭和迁移能力均明显降低; 而抑制miR-17-5p后, 细胞增殖、侵袭和迁移能力明显增强, 提示EMs异位间质细胞增殖、侵袭和迁移能力增强可能与miR-17-5p的表达丢失有关。也有其他研究证明miR-17-5p对肿瘤细胞侵袭能力的影响, 如Li等<sup>[20]</sup>研究表明miR-17-5p能够抑制三阴乳腺癌中细胞的增殖和侵袭能力, Audrito等<sup>[21]</sup>研究表明黑色素瘤中PD-L1表达升高进而促进疾病侵袭性, 可能与miR-17-5p丢失有关。本研究猜测miR-17-5p的低表达引起EMs异位间质细胞中MMP-2过度表达, 进而可能发挥其降解基底膜成分, 促进细胞向远处转移和侵袭等生物学功能。

综上, 本研究通过芯片筛选出异位子宫内膜组织中差异表达的miRNA, 并进一步探讨了miR-17-5p在子宫内膜组织和间质细胞中的表达及其对MMP-2表达的影响, 初步证实EMs异位间质细胞中miR-17-5p的异常表达可能是MMP-2表达水平升高, 细胞增殖、侵袭和迁移能力增强的原因之一, 为EMs的治疗提供了新的思路。

## 参考文献

1. Chatterjee K, Jana S, DasMahapatra P, et al. EGFR-mediated matrix metalloproteinase-7 up-regulation promotes epithelial-mesenchymal transition via ERK1-AP1 axis during ovarian endometriosis progression[J]. *FASEB J*, 2018, 32(8): 4560-4572.
2. Bourlev V, Moberg C, Ilysova N, et al. Vasoactive intestinal peptide is upregulated in women with endometriosis and chronic pelvic pain[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2018, 80(3): e12857.
3. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(1): 21-37.
4. Haikalis ME, Wessels JM, Leyland NA, et al. MicroRNA expression pattern differs depending on endometriosis lesion type[J]. *Biol Reprod*, 2018, 98(5): 623-633.
5. Yu H, Zhong Q, Xia Y, et al. MicroRNA-2861 targets STAT3 and MMP2 to regulate the proliferation and apoptosis of ectopic endometrial cells in endometriosis[J]. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2019, 74(4): 243-249.
6. Ma L, Li Z, Li W, et al. MicroRNA-142-3p suppresses endometriosis by regulating KLF9-mediated autophagy in vitro and in vivo[J]. *RNA Biol*, 2019, 16(12): 1733-1748.
7. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, et al. Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory[J]. *Fertil Steril*, 2019, 111(2): 327-340.
8. Laganà AS, Garzon S, Götte M, et al. The pathogenesis of endometriosis: molecular and cell biology insights[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5615.
9. Dong M, Yang P, Hua F. miR-191 modulates malignant transformation of endometriosis through regulating TIMP3[J]. *Med Sci Monitor*, 2015, 21: 915-920.
10. Tian X, Xu L, Wang P. miR-191 inhibits TNF- $\alpha$  induced apoptosis of ovarian endometriosis and endometrioid carcinoma cells by targeting DAPK1[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 4933-4942.
11. Zhou CF, Liu MJ, Wang W, et al. miR-205-5p inhibits human endometriosis progression by targeting ANGPT2 in endometrial stromal cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 287.
12. Jia S, Yang Y, Lang J, et al. Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis[J]. *Hum Reprod*, 2012, 28(2): 322-330.
13. Tsuno A, Nasu K, Kawano Y, et al. Fasudil inhibits the proliferation and contractility and induces cell cycle arrest and apoptosis of human endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis[J]. *JCEM*, 2011, 96(12): E1944-E1952.
14. Voit-Ostricki L, Lovas S, Watts C R. Conformation and domain movement analysis of human matrix metalloproteinase-2: role of associated Zn<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17): 4194.
15. Baharuddin NI, Abdullah N, Tessa T, et al. The role of matrix metalloproteinase2 (MMP2) in serum and peritoneal fluid of endometriotic patients[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2018, 6(2): 104-109.
16. Mahecha AM, Wang H. The influence of vascular endothelial growth factor-A and matrix metalloproteinase-2 and-9 in angiogenesis, metastasis, and prognosis of endometrial cancer[J]. *Oncotargets Ther*, 2017, 10: 4617-4624.
17. Cook R, Sarker H, Fernandez-Patron C. Pathologies of matrix metalloproteinase-2 underactivity: a perspective on a neglected condition[J]. *Can J Physiol Pharm*, 2018, 97(6): 486-492.
18. Li Q, Michaud M, Shankar R, et al. MMP-2: A modulator of neuronal precursor activity and cognitive and motor behaviors[J]. *Behav Brain Res*, 2017, 333: 74-82.

19. Jana S, Chatterjee K, Ray A K, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-2 activity by COX-2-PGE2-pAKT axis promotes angiogenesis in endometriosis[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0163540.
20. Li J, Lai Y, Ma J, et al. miR-17-5p suppresses cell proliferation and invasion by targeting ETV1 in triple-negative breast cancer[J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 745.
21. Audrito V, Serra S, Stingi A, et al. PD-L1 up-regulation in melanoma increases disease aggressiveness and is mediated through miR-17-5p[J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15894-15911.

**本文引用:** 洪哲晶, 汪玲莉, 郑纾. MiR-17-5p在子宫内膜异位症间质细胞中的表达及其对基质金属蛋白酶-2的影响[J]. 临床与病理杂志, 2021, 41(3): 493-502. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.03.001

**Cite this article as:** HONG Zhejing, WANG Lingli, ZHENG Shu. Expression of miR-17-5p in endometriosis stromal cells and its effect on matrix metalloproteinase-2[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2021, 41(3): 493-502. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.03.001