

外源性人 β 防御素-2调节子宫内膜异位症细胞增殖/凋亡及炎性因子的表达

徐丽南, 王子莲, 何科, 陈淑琴*
(中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨体外条件下加入外源性人 β 防御素-2蛋白对子宫内膜异位症(EMs)细胞增殖/凋亡和炎性因子表达的影响。【方法】组织块消化法原代培养EMs细胞, Western Blot法检测EMs细胞h β D-2蛋白、TNF- α 及IL-1 β 的蛋白表达; Western Blot法检测加入重组人h β D-2蛋白(40 μ g/mL)前后EMs细胞内TNF- α , IL-1 β 蛋白表达变化; 按不同梯度浓度(80、40、20、10 μ g/mL)加入人 β 防御素-2蛋白(h β D-2)后, ELISA法检测EMs细胞培养液上清中TNF- α , IL-1 β 细胞因子的浓度; 加入高剂量h β D-2蛋白(120 μ g/mL)并培养EMs细胞24H设为实验组, 对照组为完全培养基培养的EMs细胞, MTT法检测实验组及对照组EMs细胞增殖情况; PI法检测实验组及对照组EMs细胞凋亡情况。【结果】原代培养的EMs细胞可表达h β D-2蛋白、TNF- α 、IL-1 β 蛋白; 加入外源性重组人h β D-2蛋白后, EMs细胞表达TNF- α 、IL-1 β 蛋白下调; EMs细胞培养液上清中可检测出TNF- α , IL-1 β 的表达; 在加入h β D-2后, EMs细胞培养液上清内TNF- α 、IL-1 β 表达下降, 且随着加入h β D-2浓度增高其下降趋势增大, 差异有统计学意义(80>40>20>10 μ g/mL, $P < 0.05$); 在EMs细胞培养基中加入高浓度外源性人 β 防御素-2蛋白孵育后(120 μ g/mL), 与对照组相比, EMs细胞的增殖受到明显抑制, 且凋亡明显增加($P < 0.05$)。【结论】h β D-2可以影响子宫内膜异位症细胞内炎症因子TNF- α , IL-1 β 的表达, 并可抑制EMs细胞的增殖, 促进其凋亡。为治疗EMs提供新的理论依据。

关键词: 子宫内膜异位症, 人 β 防御素-2, 炎性因子, 增殖/凋亡

中图分类号: R711.51 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2012)04-0429-05

Exogenous Human β Defensin 2 Protein Regulate Proliferation/apoptosis and Expression of Inflammatory Factor in Endometriosis Cells

XU Li-nan, WANG Zi-lian, HE Ke, CHEN Shu-qin*

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated of Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】This study was designed to discuss exogenous human β defensin 2 protein how to regulate the proliferation/apoptosis and the expression of inflammatory factor in endometriosis cells in vitro. 【Methods】The endometriosis cells were cultured in vitro, the expression of TNF- α and IL-1 β protein in endometriosis cells with/without 40 μ g/mL h β D-2 protein was detected by Western blot analysis; when the endometriosis cells were cultured with setting concentration gradient (80 μ g/mL, 40 μ g/mL, 20 μ g/mL, and 10 μ g/mL) h β D-2 protein, on the concentration of TNF- α and IL-1 β in the endometriosis cells conditioned medium was detected by ELISA; the endometriosis cells were cultured with adding high-dose h β D-2 (120 μ g/mL) protein 24H as experimental group, the control group was endometriosis cells cultured with complete medium, the proliferation of two groups were detected by MTT. Cell apoptosis in the two groups were dyed by PI and detected by flow cytometry. 【Results】The endometriosis cells expressed h β D-2, TNF- α , and IL-1 β . The expression of TNF- α and IL-1 β protein in the endometriosis cells can be down-regulated by exogenous h β D-2 protein; the expression of TNF- α and IL-1 β protein in endometriosis cells conditioned medium were down-

收稿日期: 2012-01-25

基金项目: 国家自然科学基金(81070472); 广东省科技计划项目(2010B031600313)

作者简介: 徐丽南, 博士, 主治医师, dxulinan@gmail.com; * 通信作者: 陈淑琴, 博士, 副主任医师, chenshuqin1021@yahoo.com.cn

regulated also by exogenous h β D-2 protein, and with dose dependence, the difference have statistical significance ($80 \mu\text{g}/\text{mL} > 40 \mu\text{g}/\text{mL} > 20 \mu\text{g}/\text{mL} > 10 \mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.05$). Compared with control group, high concentration of h β D-2 protein ($120 \mu\text{g}/\text{mL}$) significantly inhibited cell proliferation and promoted apoptosis ($P < 0.05$). 【Conclusion】 h β D-2 can influence on expression of TNF- α and IL-1 β inflammatory factors in the endometriosis cells, and which can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of the endometriosis cells, all of that can provide new theoretical basis for treating endometriosis in the future.

Key words: endometriosis; human β defensin 2; inflammatory factor; proliferation/apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(4): 429-433]

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)好发于育龄女性,作为一种常见良性妇科疾病,常常合并有痛经(80%),不孕不育(50%)等,严重影响患者的生活质量及生育功能和^[1]。目前病因不明,占主导地位的经血逆流学说不能完全解释 EMs 的发病机理,而目前研究证实 EMs 可能与人类自身免疫有关^[2]。在人类庞大的自身免疫系统中, β 防御素(human β defensin, h β D) 是其中一个重要的组成部分,目前发现共有 6 种,其中近些年来发现的的人 β 防御素 2(human β defensin 2, h β D-2)是第一个可以由炎症及细胞因子诱导表达的 h β D。相关研究发现, h β D-2 在维系正常生殖道的粘膜防御中起着重要的作用^[3]。我们在前期研究中发现子宫内膜异位症患者子宫内膜组织中 h β D-2 表达上调,且相关炎性因子(TNF- α , IL-1 β)表达呈正相关,但具体机制不详^[4-5]。本文拟检测外源性 h β D-2 蛋白如何影响体外 EMs 细胞炎性细胞因子(TNF- α , IL-1 β)的表达,并研究外源性 h β D-2 蛋白调节 EMs 细胞增殖凋亡的机制。

1 材料与方 法

1.1 对 象

选择 2009 年 6 月至 2010 年 10 月在中山大学附属第一医院妇科住院的 EMs 患者 15 例,所有患者均接受腹腔镜下行卵巢内膜异位囊肿剥离术,年龄范围为 28 ~ 36 岁,平均 29.3($S = 4.8$)岁。所有患者均月经规律,无其他内分泌、免疫、代谢性疾病等内科疾患,无长期或术前 3 个月内激素用药史。术后切取卵巢异位子宫内膜组织培养,并均经术后病理检查明确诊断。所有患者均签署知情同意书。对照组选取 10 例因子宫肌瘤行腹腔镜下子宫切除术患者子宫内膜组织。两组患者年龄等一般情况比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 材 料

所有细胞培养瓶、培养板购自美国 Corning 公司,高糖 Dulbecco Modified Eagle Media (DMEM)、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司,DMSO(二甲基亚砷)购自美国 Sigma 公司,重组 h β D-2 蛋白购自以色列 ProSpec 公司,h β D-2、TNF- α 、IL-1 β 抗体购自美国 Santa Cruz 公司 TNF- α 、IL-1 β ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司,倒置显微镜(Forma 3110)为日本尼康公司产品,CO₂ 恒温培养箱为美国 Thermo 公司产品,超净工作台为苏州净化设备公司产品,流式细胞仪为美国 BD FACSCalibur 公司。

1.3 原代 EMs 细胞及正常子宫内膜细胞的分离及培养

参照文献报道的原代 EMs 细胞分离、培养方法^[6]: 无菌条件下提取患者异位内膜组织,将其充分剪碎,剪成体积约为 1 mm³ 微小颗粒,再加入 0.1% IV 型胶原酶,消化 3~4 h。重悬细胞并计数,以 10⁶/mL 的细胞密度接种细胞于 25 cm² 培养瓶中,加入 4~5 mL 含 10% FBS, 10 g/L 胰岛素和工作浓度双抗的高糖 DMEM 培养液。37 °C, 体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养, 2 d 后换液, 去除未贴壁细胞, 间断 2~3 d 换液, 倒置显微镜下观察细胞生长情况。

1.4 建立梯度浓度检测体系

将培养好的 EMs 细胞及对照组正常子宫内膜细胞按 1 \times 10⁶ 密度均匀铺在六孔板内, 按 10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 建立梯度浓度培养体系, 24 h 后收集细胞培养液上清, -80 °C 保存待测。

1.5 免疫印迹法检测 EMs 细胞内 h β D-2、TNF- α 、IL-1 β 蛋白的表达情况

收集 EMs 细胞及加入 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ h β D-2 后培养 24 H 的 EMs 细胞, 加入细胞裂解液并抽提总蛋白, 蛋白定量使用 Bradford 法。取 80 μg 细胞总蛋白, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将凝胶中蛋白电转移至 PVDF 上, 以 5% 脱脂奶粉 T-TBS 液封闭后, 加入一抗小鼠抗人 h β D-2、TNF- α 、IL-1 β 单

克隆抗体(1:800稀释)4℃孵育过夜,洗涤后加入辣根过氧化物酶标记二抗,ECL底物化学发光剂1~5 min,显色后曝光显影定影。

1.6 ELISA 检测培养液上清内 TNF- α ,IL-1 β 细胞因子浓度

按 ELISA 试剂盒说明书分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μ L,余孔分别加标准品或待测样品 100 μ L,轻轻晃动混匀,酶标板加上盖或覆膜,37℃反应 120 min。弃去液体,甩干,不用洗涤。每孔加生物素标记抗体工作液 100 μ L(取 1 μ L 生物素标记抗体加 99 μ L 生物素标记抗体稀释液的比例配制,轻轻混匀,在使用前 1 h 内配制),37℃,60 min。温育 60 min 后,弃去孔内液体,甩干,洗板 3 次,每次浸泡 1-2 min,350 μ L/每孔,甩干。每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液(同生物素标记抗体工作液)100 μ L,37℃,60 min。温育 60 min 后,弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次,每次浸泡 1-2 min,350 μ L/每孔,甩干。依序每孔加底物溶液 90 μ L,37℃避光显色。依序每孔加终止溶液 50 μ L,终止反应。酶联仪 450 nm 波长依序测量各孔的光密度。每个样本检测重复 3 次。

1.7 MTT 法检测细胞增殖情况

采用 MTT 法检测细胞增殖情况,将实验组及对照组细胞消化下来,按 1×10^6 /mL 细胞浓度接种于 96 孔培养板,每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μ L,培养箱内培养 4 h 后,吸弃培养液并于每孔内加入 DMSO 150 μ L,充分振荡溶解结晶;酶联检测仪在 570 nm 波长处检测增殖细胞数目,每孔均设 3 个复孔,并设空白孔作为对照调整,所有试验均重复 3 次,取平均值,Excel 2007 软件绘图。

1.8 流式细胞仪检测细胞周期情况及细胞的凋亡率

取实验组及对照组 EMs 细胞消化,PBS 清洗 3 遍后,700 mL/L 预冷乙醇悬浮固定 EMs 细胞。4℃过夜后,加入等量 PBS 再洗 2 遍,加 100 μ L RNase A 37℃水浴 30 min,PI 4℃避光显色 30 min,上流式细胞仪检测坏死、凋亡和正常细胞的百分率。WinMD 软件分析细胞周期。

1.9 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差表示,应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,组间比较应用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EMs 细胞的 h β D-2、TNF- α 、IL-1 β 表达

原代培养的 EMs 细胞表达 h β D-2、TNF- α 、IL-1 β 蛋白,而在加入外源性 h β D-2 蛋白后的 EMs 细胞内 TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达明显下调(图 1)。

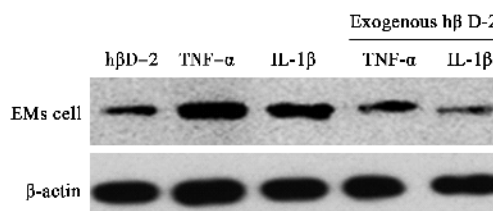


图 1 EMs 细胞蛋白表达图

Fig.1 Expression of protein in EMs

Endogenous h β D-2, TNF- α , and IL-1 β of EMs cells was detected by Western blot analysis. Meanwhile, EMs cell extracts were analyzed by Western blots analysis for TNF- α and IL-1 β with exogenous h β D-2. Results are representative of three independent experiments ($n=3$). β -actin was used as a loading control.

2.2 EMs 细胞培养液上清内 TNF- α ,IL-1 β 细胞因子浓度变化情况

人 β 防御素 2 蛋白处理后的 EMs 细胞培养液上清内 TNF- α 表达明显下降,并随加入 h β D-2 浓度增高而下降,差异有统计学意义($80 > 40 > 20 > 10 \mu\text{g}/\text{mL}, P < 0.05$);IL-1 β 细胞因子的表达亦明显下降,并随加入 h β D-2 浓度增高而下降,差异有统计学意义 ($80 > 40 > 20 > 10 \mu\text{g}/\text{mL}, P < 0.05$;图 2、3)。

2.3 MTT 法检测细胞增殖情况及流式细胞仪检测细胞凋亡情况

MTT 法检测实验组与对照组的 EMs 细胞增殖情况,发现实验组 EMs 细胞增殖较对照组明显抑制,差异有统计学意义($P < 0.05$)。流式细胞仪检测则发现实验组 EMs 细胞 S 期细胞数减少,由 G1 期进入 S 期受到抑制,亚二倍体峰比例明显增加,与对照组相比,EMs 细胞凋亡明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$;图 4)。

3 讨论

子宫内膜异位症是一种与痛经、不育不孕等有密切关系的一种疾病,近年来其发病率逐年上

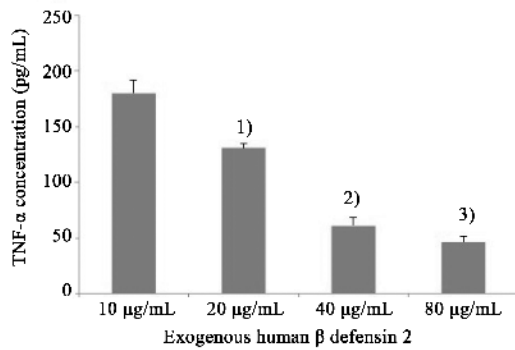


图 2 不同浓度下人 β 防御素 2 蛋白对 EMs 细胞分泌 TNF-α 细胞因子图

Fig.2 Effect of different concentration hβD-2 protein influent on TNF-α in EMs cell

1) $P < 0.05$ vs. 10 $\mu\text{g/mL}$ group ($P = 0.02$); 2) $P < 0.05$ vs. 10 $\mu\text{g/mL}$ group ($P = 0.01$) and 2) ($P = 0.01$); 3) $P < 0.05$ vs. 10 $\mu\text{g/mL}$ group ($P = 0.017$), 2) ($P = 0.001$) and 3) ($P = 0.001$); Results are representative of three independent experiments ($n = 3$)

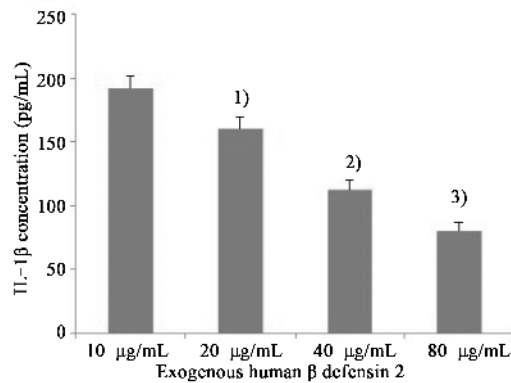


图 3 不同浓度下人 β 防御素 2 蛋白对 EMs 细胞分泌 IL-1β 细胞因子图

Fig.3 Effect of different concentration hβD-2 protein influent on IL-1β in EMs cell

1) $P < 0.05$ vs. 10 $\mu\text{g/mL}$ group ($P = 0.022$); 2) $P < 0.05$ vs. 10 $\mu\text{g/mL}$ group ($P = 0.004$) and 3) ($P = 0.001$); 3) $P < 0.05$ vs. 10 $\mu\text{g/mL}$ group ($P = 0.008$), 2) ($P = 0.001$) and 3) ($P = 0.001$); Results are representative of three independent experiments ($n = 3$).

升。EMs 的病因及发病机制目前尚未明了,而且缺乏满意的治疗方法,有研究表明任何药物治疗后 1 ~ 2 年内复发率高达 50%,用药期间还可出现低雌激素水平等相关副作用^[7]。相关研究发现 EMs 的发生可能与免疫炎症反应有关,我们前期研究^[4-5]证实,EMs 患者异位内膜组织中 TNF-α 和 IL-1β 的基因和蛋白表达水平明显高于 EMs 患者在位内膜组织和非 EMs 患者在位内膜组织

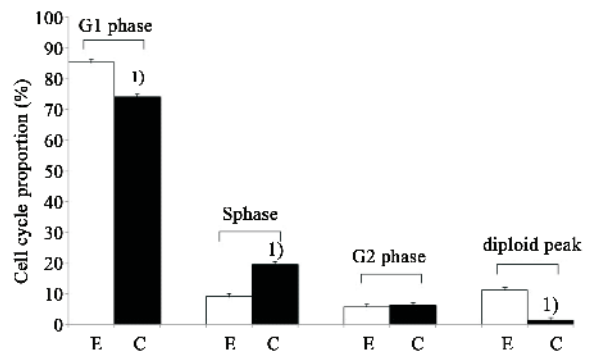
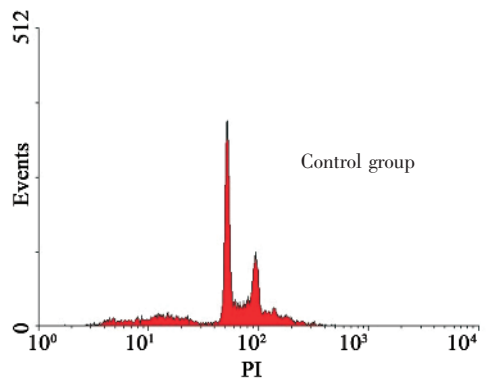
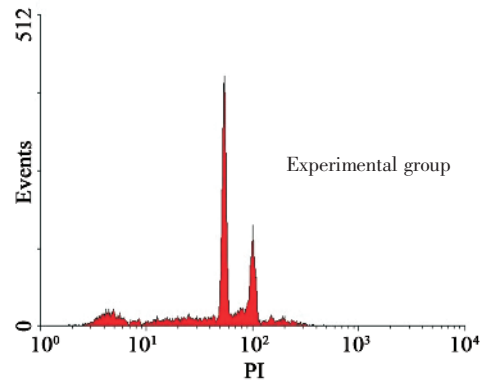


图 4 实验组及对照组 EMs 细胞的凋亡情况图

Fig.4 Apoptosis of EMs cells in control group and experiment group

1) $P < 0.05$ compared with experiment group, $n = 3$ experiments. E: experimental group; C: control group

中的表达,提示免疫炎症反应与 EMs 的发生有关。

人 β 防御素 2 (human β defensin-2, hβD-2) 是内源性抗生素肽的防御素家族中的重要成员,广泛表达于包括生殖器官在内的各种黏膜细胞和上皮组织^[8-9],构成机体抵御外界损伤性因素(如细菌、炎性介质等)侵袭的第一道化学屏障。hβD-2 可通过结合细胞膜上 CCR6 受体,对未成熟树突状细胞及记忆型 T 细胞产生趋化作用,活化 T、B

细胞,达到调节细胞免疫和体液免疫的作用,这是其发挥抗免疫炎症作用机制之一^[10-11]。自然条件下,h β D-2表达水平极低,但是其具有可诱导表达特性,相关研究发现各种病原微生物和前炎症细胞因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等能诱导并上调其表达^[12]。笔者前期参与的一个实验研究^[13]发现,在建立的大鼠肠缺血再灌注肺损伤模型中,大鼠肺组织中的 β D-2的基因及蛋白表达水平与前炎症细胞因子TNF- α 和IL-6的表达呈正相关,与肺损伤程度呈负相关,提示炎症细胞因子可上调 β D-2的表达,而 β D-2则是肺炎性损伤的保护性因素之一。

在我们前期研究基础上,本实验通过加入外源性人h β D-2蛋白干预EMs细胞,发现可以明确抑制EMs细胞内炎症细胞因子IL-1 β 、TNF- α 的表达,且随加入人h β D-2蛋白剂量的增加抑制趋势增大,具有剂量依赖关系。我们的实验还发现在给予高剂量外源性h β D-2蛋白(120 μ g/mL)干预后,EMs细胞的增殖受到明显抑制,而且凋亡增加。通过凋亡可以有效清除子宫内膜细胞,达到维持月经周期内细胞内环境稳定的作用^[12],而EMs组织区域内细胞的凋亡功能则都发生不同程度的损害^[13-14]。还有相关研究发现在肾癌细胞SW156中过表达h β D-1,发现可有效诱导Caspase-3蛋白介导的凋亡^[15],h β D-2蛋白是存在于子宫内膜组织中,但自然条件下其表达水平极低,当致EMs发生的因素如炎症细胞因子(TNF- α 、IL-1 β)水平升高时,其表达也相应增加,从而作为一种自身保护性因素,一定程度上可以限制EMs的发生发展,但当其表达不足以抵消损伤性因素(如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6)作用时,EMs就发生了。高浓度的外源性h β D-2蛋白调节免疫,促进EMs细胞凋亡,以上研究结果可以为治疗EMs提示新的研究方向和作用靶点。但h β D-2蛋白在EMs的治疗中到底起何种作用,尚需要进一步的实验加以证明。

参考文献:

- [1] 郎景和. 子宫内膜异位症的基础与临床研究[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003: 1.
- [2] Olovsson M. Immunological aspects of endometriosis: an update[J]. Am J Reprod Immunol, 2011, 66 (Suppl 1): 101-104.
- [3] Wiechula B, Cholewa K, Ekiel A, et al. HBD-1 and hBD-2 are expressed in cervico-vaginal lavage in female genital tract due to microbial infections [J]. Ginekol Pol, 2010, 81(4): 268-271.
- [4] 陈淑琴, 刘克玄, 牛刚, 等. 子宫内膜异位症患者原位和异位内膜组织中 β 防御素-2的表达[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2009, 30(6): 747-752.
- [5] 陈淑琴, 刘克玄, 牛刚, 等. 人 β 防御素2组织中的表达及其意义[J]. 中华妇产科杂志, 2009, 44(8): 623-626.
- [6] 谭先杰, 刘东远, 郎景和, 等. 子宫内膜腺上皮及基质细胞分离? 培养作为子宫内膜异位症体外细胞模型的探索[J]. 现代妇产科进展, 2002, 11(1): 30-32.
- [7] Bulun SE. Endometriosis[J]. N Eng J Med, 2009, 360(3): 268-279.
- [8] Taniguchi F, Kaponis A, Izawa M, et al. Apoptosis and endometriosis [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2011, 1(3): 648-662.
- [9] Paul S, Bhattacharya P, Das Mahapatra P, et al. Melatonin protects against endometriosis via regulation of matrix metalloproteinase-3 and an apoptotic pathway [J]. J Pineal Res, 2010, 49(2): 156-168.
- [10] Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 [J]. Science, 1999, 286(5439): 525-528.
- [11] Ohara T, Morishita T, Suzuki H, et al. Pathophysiological role of human beta defensin 2 in gastric mucosa [J]. Int J Mol Med, 2004, 124(6): 1023-1027.
- [12] Liu KX, Chen SQ, Zhang H, et al. Intestinal ischemia/reperfusion upregulates β -defensin-2 expression and causes acute lung injury in the rat [J]. Injury, 2009, 40(5): 950-955.
- [13] Qiang S, Zhuo S, Zheng YZ, et al. Protection against pseudomonas aeruginosa pneumonia and sepsis-induced lung injury by overexpression of beta defensin-2 in rats [J]. Shock, 2006, 26(4): 365-371.
- [14] Harada T, Kaponis A, Iwabe T, et al. Apoptosis in human endometrium and endometriosis [J]. Hum Reprod Update, 2004, 10(1): 29-38.
- [15] Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, et al. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8542-8549.

(编辑 张恩健)