

· 论著 ·

DOI: 10.12464/j.issn.0253-9802.2024-0018

miR-205-5p 启动子甲基化对子宫内膜异位症患者 子宫内膜细胞功能调控的研究

马蕊¹, 蔡朝霞², 马颖¹✉

(1. 南方医科大学珠江医院妇产医学中心, 广东 广州 510260; 2. 广州市荔湾区妇幼保健院妇产科, 广东 广州 510375)

【摘要】 目的 探讨 miR-205-5p 启动子甲基化对子宫内膜异位症 (EMS) 患者子宫内膜细胞功能的调控作用。方法 选择 2022 年 10 月至 2023 年 12 月在南方医科大学珠江医院行手术治疗且经病理证实的子宫内膜组织标本, 根据术中及病理结果分为不存在 EMS 病灶的对照组 ($n = 9$) 和存在 EMS 病灶的 EMS 组 ($n = 9$)。提取和分离原代子宫内膜基质细胞 (ESC), 采用甲基化特异性聚合酶链式反应 (MSP) 检测细胞 miR-205-5p 启动子甲基化水平, 使用实时聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测去甲基化处理对 miR-205-5p 表达的影响, 分别进行划痕-愈合、细胞增殖、细胞凋亡以及细胞侵袭实验检测去甲基化对功能的调控。将人子宫内膜碎屑埋植入皮下建立 EMS 小鼠模型, 分为去甲基化处理组和对照组, 分别于腹腔注射去甲基化制剂或生理盐水, 观察 2 组小鼠皮下移植病灶体积及 miR-205-5p 表达情况。结果 正常 ESC 启动子呈非甲基化。EMS 组 ESC 启动子呈甲基化或高甲基化, 并且使用去甲基化药物处理后, ESC 的 miR-205-5p mRNA 表达水平升高, 细胞迁移能力、增殖能力、侵袭能力减弱, 细胞凋亡能力增强 (均 $P < 0.05$)。经去甲基化处理后的鼠较对照组小鼠的皮下移植病灶体积缩小, miR-205-5p 表达阳性率升高 (均 $P < 0.05$)。结论 MiR-205-5p 启动子甲基化与 ESC 功能调控有关, 可能参与了 EMS 发生、发展的过程。

【关键词】 子宫内膜异位症; miR-205-5p; 甲基化; 子宫内膜细胞

Regulatory effect of miR-205-5p promoter methylation on endometrial stromal cell function in patients with endometriosis

MA Song¹, CAI Zhaoxia², MA Ying¹✉(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510260, China ;
2. Department of Obstetrics and Gynecology, Liwan District Maternal and Child Health Hospital, Guangzhou 510375, China)

Corresponding author: MA Ying, E-mail: mayingwuzhuoyi@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the regulatory effect of miR-205-5p promoter methylation on endometrial stromal cell (ESC) function in patients with endometriosis (EMS). **Methods** Endometrial tissue samples were collected from patients pathologically diagnosed with EMS undergoing surgery in Zhujiang Hospital of Southern Medical University from October 2022 to December 2023. According to intraoperative and pathological results, all samples were divided into the control group ($n = 9$, without EMS lesions) and EMS group ($n = 9$, with EMS lesions). Primary ESCs were extracted and isolated. Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to detect the methylation level of miR-205-5p promoter. RTPCR was used to evaluate the effect of demethylation on the expression level of miR-205-5p. The regulatory effect of demethylation on ESC function was detected by scratch wound healing, cell proliferation, cell apoptosis and Transwell assays, respectively. EMS mouse models were established by subcutaneous seeding of human endometrial debris. All mouse models were divided into the demethylation and control groups. Demethylating agents and normal saline were injected into abdominal cavity in these two groups, respectively. The lesion size and the expression level of miR-205-5p were observed in two groups. **Results** Normal ESC promoter was unmethylated. In the EMS samples, the miR-205-5p promoter was methylated or hypomethylated. After demethylation, the expression level of miR-205-5p in the ESC samples was significantly upregulated, the capability of cell migration, proliferation and invasion was significantly weakened, while

收稿日期: 2024-01-25

基金项目: 广东省自然科学基金 (2023A1515011688, 2022A1515011880); 南方医科大学珠江医院院长基金 (yzjj2022ms18)

作者简介: 马蕊, 硕士研究生, 研究方向: 妇产科学, E-mail: 2432220435@qq.com; 马颖, 通信作者, 主任医师, 研究方向: 子宫内膜异位症, E-mail: mayingwuzhuoyi@126.com

the ability of cell apoptosis was significantly enhanced (all $P < 0.05$). Compared with the control group, the lesion size was decreased and the positive rate of miR-205-5p expression was increased in the demethylation group (both $P < 0.05$). **Conclusion** MiR-205-5p promoter methylation is related to the regulation of ESC function in patients with EMS, which is probably involved with the incidence and progression of EMS.

【Key words】 Endometriosis; miR-205-5p; Methylation; Endometrial stromal cell

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMS) 是一种由多种因素导致的慢性妇科疾病, 是指子宫内膜组织 (腺体和间质) 出现在子宫体以外的部位^[1]。EMS 具有病变广泛、难以治愈、雌激素依赖性等特点^[2], 其主要症状是盆腔痛, 这无疑会影响患者的生活质量^[3,4]。综合文献报道, 10%~15% 的育龄妇女患有 EMS, 20%~50% 的不孕症妇女合并 EMS^[5], 慢性盆腔痛患者的发病率在近年增加到 70%^[6]。EMS 的发病机制不明, 除根治性手术外, 普通药物或常规手术治疗后的复发率甚至超过 50%^[7]。多种因素导致的子宫内膜基质细胞 (endometrial stromal cell, ESC) 侵袭性增强, 是诱发 EMS 的重要因素^[8]。目前尚无一种学说 (经血逆流、炎症等) 能够独立、全面解释 EMS 的病理机制^[9], 故仍需深入研究 EMS 病因。

微 RNA (microRNA, miRNA) 是真核生物中广泛存在的、一种长约 21~23 个核苷酸的 RNA 分子^[10,11]。其通过与目标 mRNA 上的互补序列结合, 抑制转录后基因的表达, 在调节基因表达、细胞周期进展和生物体发育方面发挥着重要的调控作用。有研究显示, miRNA 可用作 EMS 的辅助诊断工具^[12], 或用于 EMS 的检测、研究进展和预防, 这些 miRNA 参与多种细胞功能调控^[13], 如细胞迁移、侵袭和凋亡^[14]。MiR-205-5p 是笔者团队前期利用基因芯片测序筛选出的 EMS 特异性 miRNA, 该项研究显示, miR-205-5p 低表达可上调 ANGPT2 表达, 增强 ESC 侵袭性, 诱发 EMS^[15]。

已有研究表明, EMS 的发生与发展是遗传易感性与环境因素相互作用的结果, 同时伴随着表观遗传学的改变^[16]。DNA 甲基化是最常见、目前研究的最为清楚的一种表观遗传修饰方式^[17]。根据现有研究, EMS 的发生、发展伴随着 DNA 异常甲基化表达^[18]。因此, 本研究提出科学假说: miR-205-5p 启动子甲基化可影响 EMS 患者 ESC 的功能。本研究进一步探索分子生物水平启动子甲基化对 miR-205-5p 的表达的影响, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选择 2022 年 10 月至 2023 年 12 月在南方医科大学珠江医院行手术治疗且经病理证实的子宫内膜组织标本。对照组入选标准: 术中及病理证实不存在 EMS 病灶 (9 例)。研究组入选标准: 术中及病理证实存在 EMS 病灶 (9 例)。病例纳入标准: ①年龄 22~49 岁; ②月经周期 28~35 d, 月经周期规律, 月经量正常; ③卵巢功能正常。病例排除标准: ①术前 6 个月内服用激素类药物, 包括促性腺激素释放激素激动剂 / 拮抗剂、雌激素、孕激素、绒毛膜促性腺激素或左甲状腺素等; ②术前 6 个月内有哺乳史或妊娠史的患者。本研究获得南方医科大学珠江医院伦理委员会批准 (批件号: 2022-KY-249-01), 并征得所有患者或其家属的知情同意。

1.2 细胞分离及培养

在严格的无菌条件下, 将新鲜获得的子宫内膜组织迅速浸入预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中, 在无菌条件下于 37 °C 下用胶原酶酶解、过滤、离心, 弃上清液, 用 PBS 冲洗、重悬, 于 37 °C 和 5% CO₂ 的培养箱中培养 ESC 原代细胞, 必要时更换培养基以保持最佳的细胞黏附性和对数生长期。

1.3 MiR-205-5p 启动子甲基化检测

待 ESC 细胞在培养瓶中达到最佳生长和覆盖率 (约 90%) 后, 用胰蛋白酶将其从表面分离, 并收集到无酶 EP 管中进行进一步处理。ESC 以 1×10^5 孔的密度在 6 孔板中分离和传代, 并在含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基中培养, 培养条件为 37 °C 和 5% CO₂。培养 24 h 后, EMS 组开始使用不同浓度 (0.1、1.0、10.0 μmol/L) 的 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-dC 处理, 对照组则加入等体积的培养基。随后, 每隔 1~2 天更新 1 次培养基。在处理第 3、5、7 天, 收集细胞。按

照南京诺唯赞生物科技股份有限公司 DNA 提取试剂盒说明书 (FastPure[®] Viral DNA/RNA Mini Kit), 提取 EMS 组和对照组细胞 DNA, 并设加水的空白对照。甲基化特异性聚合酶链式反应 (methylation-specific PCR, MSP) 法处理各组细胞, 抽取扩增样品用琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。

1.4 实时聚合酶链式反应检测去甲基化对 miR-205-5p 表达的影响

按前述方法收集经 10.0 μmol/L 5-Aza-dC 处理 7 d 的 EMS 组 ESC 细胞, 使用 TB Green[™] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) 通过 TB Green 法进行实时聚合酶链式反应 (real time polymerase chain reaction, RT-PCR)。反应条件: 95 °C 30 s 预变性; 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 43 循环, 72 °C 10 min 延伸。使用 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-205-5p mRNA 表达水平。miR-205-5p 引物序列见表 1。

1.5 去甲基化对 ESC 功能的调控

1.5.1 细胞鉴定

取 EMS 组经 10.0 μmol/L 5-Aza-dC 处理 7 d 的 ESC 细胞 (去甲基化处理组) 和未经去甲基化处理的 ESC 细胞 (对照组), PBS 洗培养皿 3 次后固定, 在室温下用 0.5% Triton-X-100 处理 20 min。在每张载玻片上滴加 200 μL 脱脂牛奶, 再用冷 PBS 冲洗 3 次。然后加入一抗, 在室温下结合 30 min, 再转移到温室中在 4 °C 孵育过夜。再加入二抗 37 °C 孵育 1 h; 染核后将玻片转移至载玻片中封片; 共聚焦荧光显微镜观察并采集图片。

1.5.2 细胞迁移实验

取 EMS 组经 10.0 μmol/L 5-Aza-dC 处理 7 d 的 ESC 细胞 (去甲基化处理组) 和未经去甲基化处理的 ESC 细胞 (对照组), 采用划痕-愈合实验检测细胞迁移能力。将 ESC 接种于 6 孔板 (约 5 × 10⁵ 孔), 培养 24 h 后待细胞丰度达 95% 以上时, 用枪头在板中垂直划痕后用 PBS 洗涤 3 次, 加入无血清培养基于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养, 每隔一段时间观察并记录细胞迁移情况。任意选取水

平线, 通过 Image J 软件计算各细胞间的距离。划痕愈合率为最终痕迹面积与初始痕迹面积之差除以初始痕迹面积。

1.5.3 细胞增殖实验

取 EMS 组经 10.0 μmol/L 5-Aza-dC 处理 7 d 的 ESC 细胞 (去甲基化处理组) 和未经去甲基化处理的 ESC 细胞 (对照组), 使用细胞计数试剂盒 -8 (cell counting kit-8, CCK-8) 法检测 ESC 增殖情况。将 ESC 悬液分别接种于 96 孔板 (3 000 个 / 孔), 于培养箱中培养 12、24、48 h 后分别加入 CCK-8 溶液 10 μL, 在酶标仪上测定 450 nm 波长处的光密度 (D) 值, 并计算 2 组的细胞增殖率。细胞增殖率 = (D_{研究组} - D_{空白组}) / (D_{对照组} - D_{空白组}) × 100%。

1.5.4 细胞凋亡实验

取 EMS 组经 10.0 μmol/L 5-Aza-dC 处理 7 d 的 ESC 细胞 (去甲基化处理组) 和未经去甲基化处理的 ESC 细胞 (对照组), 以流式细胞术检测 ESC 凋亡, 从培养箱中取出黏附的细胞, 吸出生长培养基, 然后用冷 PBS 冲洗细胞 3 次, 含乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetra- acetic acid, EDTA) 的适量胰酶消化细胞 1 min, 加入 2 倍体积的基础培养基终止消化, 细胞悬液转移至 5 mL 离心管中 1 000 转 / 分离心 5 min, 弃上清; 预冷 PBS 重悬细胞 2 次, 1 000 转 / 分离心 5 min, 弃上清; 1 mL 预冷 PBS 重悬细胞沉淀。然后将 ESC 悬液转移至 5 mL 流式管中, 避光加入 5 μL Annexin V /FITC 和 10 μL 碘化丙啶, 室温下孵育 0.5 h 后, 在流式细胞仪中分析。

1.5.5 细胞侵袭实验

取 EMS 组经 10.0 μmol/L 5-Aza-dC 处理 7 d 的 ESC 细胞 (去甲基化处理组) 和未经去甲基化处理的 ESC 细胞 (对照组), 应用 Transwell 实验检测 ESC 侵袭能力。将待用的 ESC 在基础培养基中培养 12 h, 用无血清培养基重悬细胞, 将细胞密度调整为 5 × 10⁵/mL。上室加入 100 μL 细胞悬液, 下室加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基 600 μL

表 1 MiR-205-5p 引物序列
Table 1 MiR-205-5p primer sequence

引物	序列
甲基化引物	miR-205-5p-M-F: 5'-GAGTTTAAAGTTGCGTATGGAAGC-3' miR-205-5p-M-R: 5'-AAACAAATATTTCTTTTATAATCCGAA-3'
非甲基化引物	miR-205-5p-U-F: 5'-GGAGTTTAAAGTTGTGTATGGAAGTG-3' miR-205-5p-U-R: 5'-AAACAAATATTTCTTTTATAATCCAAA-3'

及5%双抗的DMEM培养基。24 h后取出小室,用干棉签拭去内表面的细胞,细胞在4%多聚甲醛中固定30 min,室温下用0.1%结晶紫染色20 min,清洗,晾干,随机拍摄5个视野并计数。

1.6 动物实验

1.6.1 人子宫内膜碎屑皮下注射建立EMS小鼠模型

动物实验选用的6~10周龄雌性小鼠(体重18~22 g)购自南方医科大学实验动物中心,每6只放1笼,共12只,动物实验方案经南方医科大学珠江医院伦理委员会审核(批件号:LAEC-2022-179)。EMS小鼠模型的建立:取小鼠下腹部为手术部位,2%碘酊、75%酒精消毒后,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后(约3~5 min),将其固定在手术板上,腹部手术部位再次用2%碘酊、75%酒精消毒,常规铺巾。小鼠腹部皮肤剪开一约0.5 cm切口,钝性分离皮肤与皮下组织直径约4~5 mm,将人子宫内膜碎屑埋植入皮下,缝合后消毒,覆盖无菌输液贴。术后分笼饲养,实验前后称其体重,并观察小鼠情况。术后每天观察小鼠伤口及生活情况,每周检查皮下种植组织3次,观察皮下结节的生长情况,埋植组织处形成粟粒大小的结节为EMS小鼠模型制备成功。

1.6.2 干预方式

12只小鼠随机分为去甲基化处理组与对照组。去甲基化处理组以1 mL无菌注射器抽取10.0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-dC, 75%酒精消毒小鼠腹部皮肤,予小鼠腹腔注射,每周1次,对照组予同时点同方法注射同体积生理盐水。第5周颈椎脱臼法处死小鼠,测量离体腹部皮下移植病灶的长(l)、宽(b)、高(h),然后将皮下移植病灶置于甲醇中常温固定备用。移植病灶体积计算公式为 $V=lbh\pi/6$ 。

1.6.3 原位杂交检测miR-205-5p在皮下移植病灶中的表达

皮下移植病灶标本固定脱水、包埋,切片,连续5张切片,其中一张送常规苏木精-伊红染色,光镜观察以确定诊断。其余4张切片完成后将切片烘干后脱蜡;0.1 mol/L甘氨酸 glycine、0.3%Triton-X-100分别常温浸没;冲洗后使用胃蛋白酶处理;振荡漂洗;在每张切片上滴加40 μL 预杂交液,置于60 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒30 min;去除预杂交,置于摇床上过夜;加入封闭液;切片组织中滴加抗地高辛生物素标记的抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育;滴加缓冲液

覆盖组织,孵育后PBS洗3次,滴加二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色混合液避光2 h终止染色;染核2 min,冲洗切片。镜下随机选取3个高倍视野,拍摄、计算并记录。阳性细胞比例为每个视野下阳性细胞数与每个视野下细胞总数的商乘以100%。

1.7 统计学方法

每个独立实验均重复3次,采用GraphPad Prism 8.0进行统计学分析,正态分布计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,单组比较采用单样本 t 检验,两组比较满足方差齐性用独立样本 t 检验,不满足方差齐性用校正 t 检验;双侧 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-205-5p启动子甲基化的MSP检测

MSP检测子宫内膜组织样本miR-205-5p启动子甲基化情况,结果显示正常ESC启动子呈非甲基化,EMS组启动子呈甲基化或高甲基化并且使用去甲基化药物处理后,MSP检测到相应的启动子甲基化水平降低,见图1A。随着去甲基化药物时间浓度梯度增加,miR-205-5p启动子甲基化水平逐渐降低,见图1B。研究组9例ESC,给予去甲基化药物处理后,ESC的miR-205-5p表达水平较对照组升高($P<0.001$),见图1C。

2.2 去甲基化对ESC的影响

2.2.1 ESC及腺上皮细胞鉴定

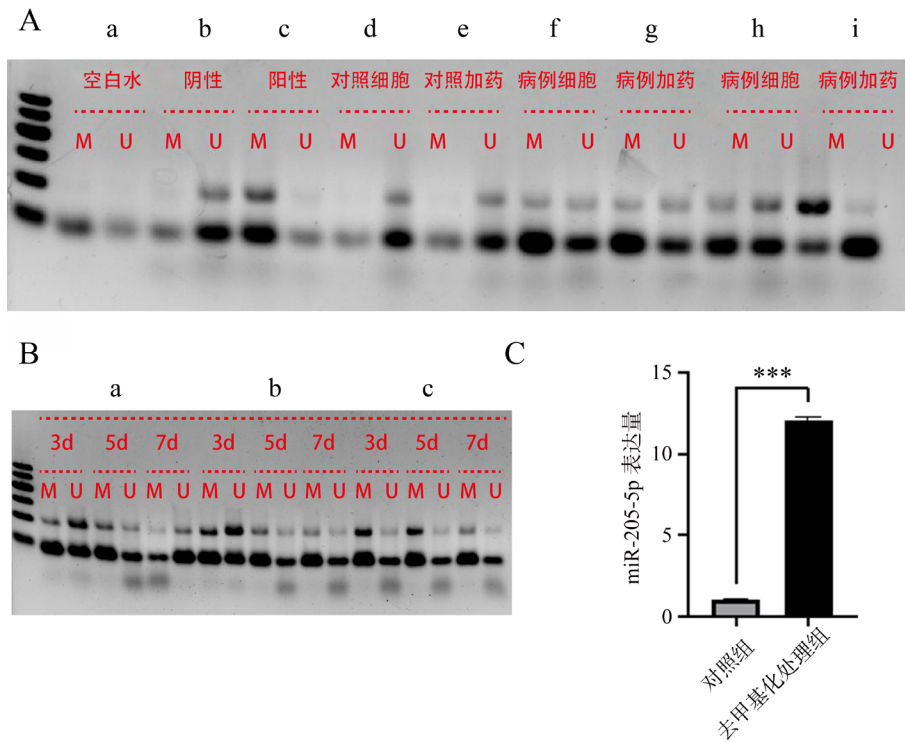
原代培养的ESC及腺上皮细胞在接种后3~8 d接近铺满。ESC可用0.03%EDTA传代,传代后3~5 d铺满,10代以内形态基本不变。采用免疫荧光鉴定ESC为波形蛋白阳性呈棕黄色,而腺上皮细胞为角蛋白阳性呈绿色,见图2。

2.2.2 去甲基化后ESC迁移能力降低

采用划痕试验检测ESC迁移能力,分别培养6、12、48、72、96 h拍照,Image J软件计算各ESC的距离。与对照组比较,去甲基化组ESC划痕愈合率降低,ESC迁移能力明显受抑制($P<0.01$)。见图3。

2.2.3 去甲基化后ESC增殖能力降低

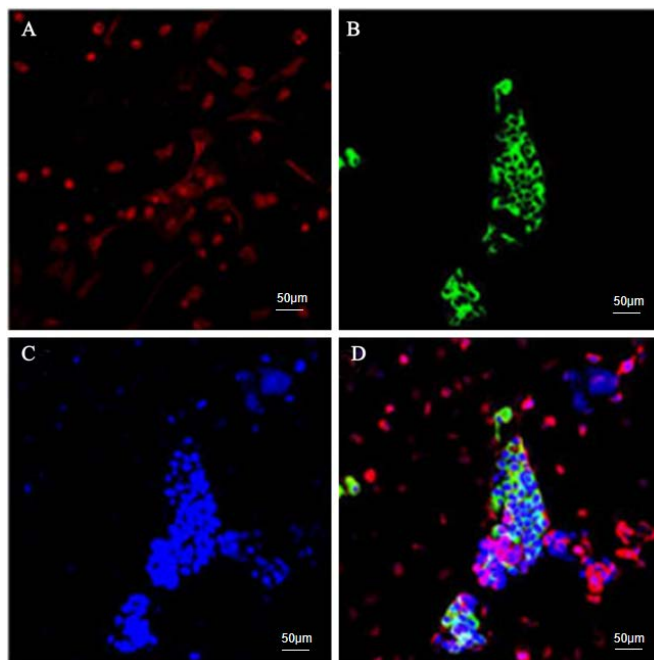
CCK-8法检测18例ESC(对照组9例,去甲基化组9例)活力,在72、96 h组间比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。与对照组相比,去甲基化处理组ESC增殖能力明显降低。见图4。



注：A 为 miR-205-5p 启动子甲基化 MSP 检测结果，a 为空白组（水）甲基化水平，b 为阴性对照，c 为阳性对照，d 为正常 ESC 甲基化水平，e 为正常 ESC 加去甲基化药物后甲基化水平，f、h 为 EMS 组 ESC 甲基化水平，g、i 为 EMS 组 ESC 加去甲基化药物后甲基化水平，M 为甲基化，U 为非甲基化；B 为不同药物浓度、时间的 miR-205-5p 启动子甲基化 MSP 检测结果，a、b、c 分别为 EMS 组 ESC 加入 0.1、1.0、10.0 μL 去甲基化药物于第 3、5、7 天检测去甲基化水平；C 为对照组与去甲基化处理组的 miR-205-5p 定量分析；组间比较，*** $P < 0.001$ ， $n = 9$ 。

图 1 miR-205-5p 启动子甲基化的 MSP 检测

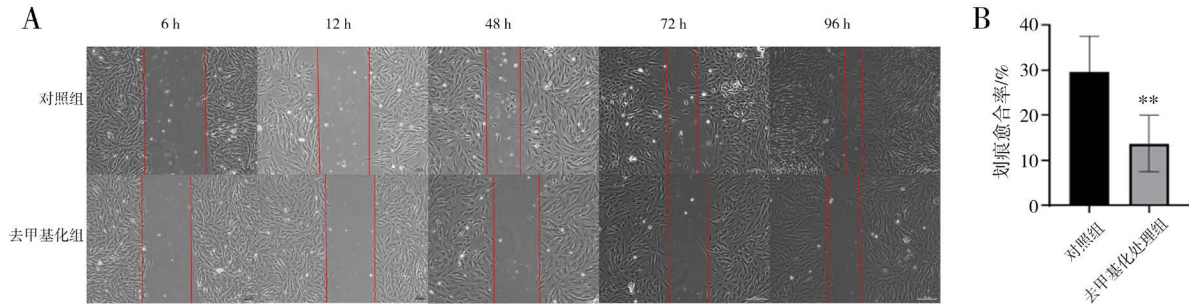
Figure 1 MSP detection of miR-205-5p promoter methylation



注：A 为 ESC 表达波形蛋白阳性；B 为腺上皮细胞表达细胞角蛋白阳性；C 为 DAPI 染色；D 为合成图像。

图 2 ESC 及腺上皮细胞鉴定 ($\times 200$)

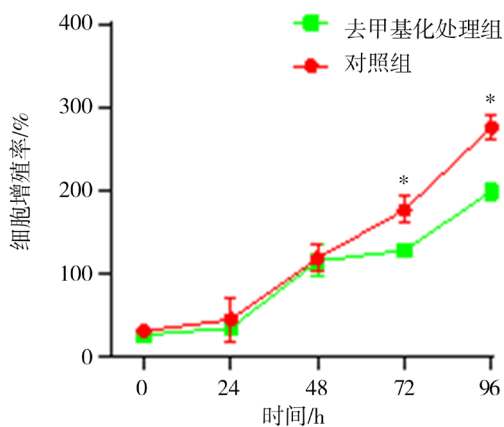
Figure 2 Identification of ESC and glandular epithelial cells ($\times 200$)



注: A 为划痕试验检测对照组及去甲基化处理组 ESC 迁移能力, 标尺 =50 μm ; B 为 48 h 每组随机取 5 个视野拍照计数定量比较; 与对照组相比, ** $P < 0.01$, $n = 9$ 。

图 3 去甲基化对 ESC 迁移能力的影响 ($\times 40$)

Figure 3 Effect of demethylation on ESC migration ability ($\times 40$)



注: 组间比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 去甲基化对 ESC 增殖能力的影响

Figure 4 The effect of demethylation on the proliferation ability of ESC

2.2.4 去甲基化后 ESC 凋亡能力增强

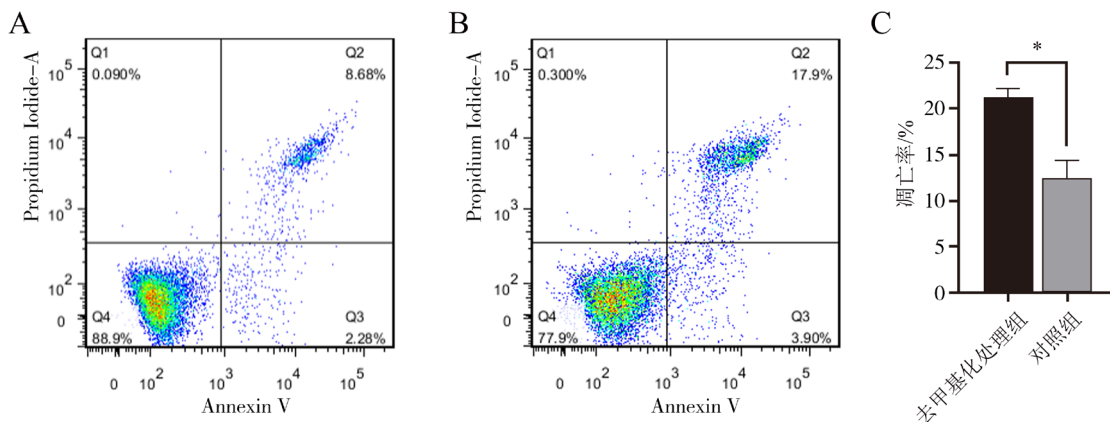
流式细胞仪检测结果显示, 与对照组比较, 去甲基化处理组 ESC 凋亡率升高 ($P = 0.042$), 见图 5。

2.2.5 去甲基化后 ESC 侵袭能力降低

Transwell 实验结果显示, 去甲基化组 ESC 侵袭能力明显下降且差异具有统计学意义 ($P = 0.009$), 见图 6。

2.3 去甲基化抑制小鼠皮下异位病灶生长

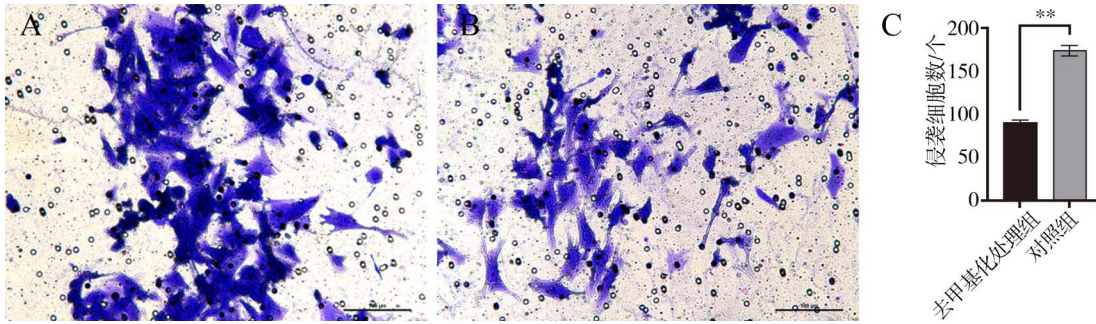
去甲基化处理组较对照组皮下异位病灶体积明显缩小 ($P < 0.001$), 见图 7A。去甲基处理后, 小鼠皮下病灶中 miR-205-5p 表达升高 ($P = 0.010$), 见图 7B、C。



注: A 为对照组 ESC 凋亡率, B 为去甲基化处理组 ESC 凋亡率, C 为去甲基化处理组与对照组 ESC 凋亡率定量分析; 组间比较, * $P < 0.05$, $n = 9$ 。

图 5 去甲基化对 ESC 凋亡能力的影响

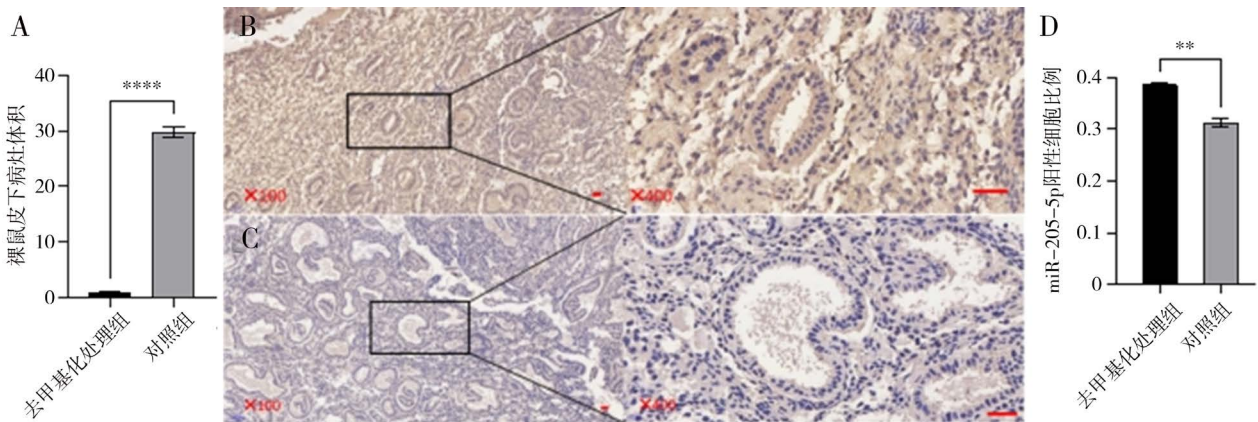
Figure 5 The effect of demethylation on the apoptotic ability of ESC



注: A 为对照组 ESC 侵袭能力 ($\times 200$), B 为去甲基化处理组 ESC 侵袭能力 ($\times 200$), C 为去甲基化处理组与对照组 ESC 侵袭能力定量分析; 组间比较, $**P < 0.01$, $n = 9$ 。

图 6 去甲基化对细胞侵袭能力的影响

Figure 6 The effect of demethylation on cell invasion ability



注: A 为小鼠皮下异位病灶体积定量分析; B 为去甲基化处理组 miR-205-5p 表达; C 为对照组 miR-205-5p 表达量; D 为去甲基化处理组与对照组的 miR-205-5p 阳性细胞比例比较; 组间比较, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$ 。

图 7 小鼠皮下异位病灶体积及病灶中 miR-205-5p 表达

Figure 7 Volume of subcutaneous ectopic lesions in mice and expression of miR-205-5p in the lesions

3 讨论

EMS 是生育年龄妇女的常见病, 其发病与遗传、免疫、雌激素暴露及肠道菌群失调有关^[19], 一直以来都是妇科临床研究的热点。由于 EMS 的复杂性, 目前尚无有效的早期诊断分子标志物^[20]。虽然 EMS 属于良性疾病, 但其临床特征与恶性肿瘤相同, 如增生、浸润、转移和复发等^[21]。本研究从表观遗传学角度出发, 探索 EMS 发生、发展。

MiRNA 是一类长度约为 19~24 个核苷酸的单链非编码 RNA^[22], 近年来多项研究显示 miRNA 在 EMS 的发生、发展中发挥重要作用^[23], 包括介导细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和上皮-间质转化过程^[24]。目前的研究显示, miR-205-5p 参与多种疾病的发生、发展。如 Huang 等^[25] 研究发现, miR-

205-5p 可以抑制氧化修饰低密度脂蛋白诱导的人主动脉血管平滑肌细胞增殖和迁移。Huang 等^[26] miR-205-5p 通过靶向血管内皮生长因子 A 和 PI3K/Akt 信号通路, 为透明细胞型肾细胞癌的治疗提供了潜在的治疗靶点。笔者课题组前期研究发现, miR-205-5p 在 EMS 组织中的表达水平较正常子宫内膜降低, 上调 miR-205-5p 抑制了 EMS 来源 ESC 的迁移和侵袭能力, 且促进了细胞的凋亡^[27]。近年研究显示, 表观遗传学参与调控 EMS 的发生、发展, 主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA。EMS 可能涉及表观遗传变化, 各种表观遗传畸变, 特别是异常的 DNA 甲基化可能在 EMS 的发病机制中起重要作用^[28]。Esfandiari 等^[29] 报道, 与正常子宫内膜相比, 大多数 Hox 簇 (A~D) 和 Hox 辅因子显示异位或在位子宫内膜组织和异位或

在位子宫内膜甲基化改变有差异。Hao 等^[30]报道了粒状头样 2 (grainyhead-like 2, GRHL2) 启动子高甲基化引起的 GRHL2 低表达与卵巢子宫内膜异位。Li 等^[31]报道了子宫腺肌病上皮和间质 DNA 甲基化与正常子宫内膜存在差异。本研究进一步探索启动子甲基化对 miR-205-5p 的表达进行调控, 结果显示, EMS 组 ESC 给予去甲基化处理后的 miR-205-5p 表达水平较前升高, 并且同时可以调控 ESC 功能。

本研究首先使用 MSP 检测 ESC miR-205-5p 启动子甲基化程度在 EMS 患者及非 EMS 人群中的差异。明确了非 EMS 组启动子呈非甲基化, EMS 启动子呈甲基化或高甲基化, 这与既往研究相符。使用去甲基化药物处理 miR-205-5p 表达降低或缺失的细胞后, 相应的启动子甲基化水平降低。本研究通过 RT-PCR 检测到给予去甲基化药物处理后, ESC 的 miR-205-5p 表达量较之前明显升高。动物实验也同时检测到经注射去甲基化制剂的小鼠 miR-205-5p 在皮下移植病灶中的表达较未注射去甲基化制剂的小鼠高。目前的研究结果证实, EMS 人群在 miR-205-5p 启动子区呈高甲基化。这些结果表明, EMS 组 miR-205-5p 的表达缺失或降低, 与其上游调控区的高甲基化状态有关。经过去甲基化处理后的 EMS 启动子区甲基化仍存在, 可能与其染色质异构及分化方向等有关。随后检测 ESC 的功能发现, EMS 组经去甲基化处理后 ESC 的迁移、增殖及侵袭能力明显抑制, 凋亡能力明显增强。

本研究探讨了 miR-205-5p 表达与 EMS 发生、发展之间的关系, 结果显示, EMS 组织中的 miR-205-5p 表达水平比正常子宫内膜组织降低。进一步分析发现, EMS 细胞株中 miR-205-5p 的表达水平下调可能是由于其启动子高甲基化所致。研究结果提示, miR-205-5p 的表达水平及其甲基化状态可能是评价 EMS 的潜在指标, 对 EMS 的预防、诊断和治疗可能有一定价值。

利益冲突声明: 本研究未受到企业、公司等第三方资助, 不存在潜在利益冲突。

参 考 文 献

[1] 中国医师协会妇产科医师分会, 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症诊治指南 (第三

版) [J]. 中华妇产科杂志, 2021, 56 (12): 812-824. DOI: 10.3760/cma.j.cn112141-20211018-00603.

Chinese Obstetricians and Gynecologists Association, Cooperative Group of Endometriosis of Chinese Society of Obstetrics and Gynecology of Chinese Medical Association. Guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis (Third edition) [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2021, 56 (12): 812-824. DOI: 10.3760/cma.j.cn112141-20211018-00603.

[2] 胡晓英, 吴建发, 王鹰, 等. 汉黄芩素调节 SIRT1/Nrf2 信号通路对子宫内膜异位症大鼠铁死亡的影响 [J]. 遵义医科大学学报, 2023, 46 (10): 943-949. DOI: 10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2023.0141.

HU X Y, WU J F, WANG Y, et al. Impact of wogonin on ferroptosis in endometriosis rats by regulating SIRT1/Nrf2 signaling pathway [J]. J Zunyi Med Univ, 2023, 46 (10): 943-949. DOI: 10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2023.0141.

[3] 张婧, 徐影, 代晓微, 等. 肠道菌群与不孕症相关疾病的研究进展 [J]. 新医学, 2023, 54 (2): 115-119. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2023.02.006.

ZHANG Q, XU Y, DAI X W, et al. Research progress on gut microbiota and infertility-related diseases [J]. J New Med, 2023, 54 (2): 115-119. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2023.02.006.

[4] SINGH S S, MISSMER S A, TU F F. Endometriosis and pelvic pain for the gastroenterologist [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2022, 51 (1): 195-211. DOI: 10.1016/j.gtc.2021.10.012.

[5] RAJA M H R, FAROOQUI N, ZUBERI N, et al. Endometriosis, infertility and microRNA's: a review [J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2021, 50 (9): 102157. DOI: 10.1016/j.jogoh.2021.102157.

[6] GARCIA-FERNANDEZ J, GARCÍA-VELASCO J A. Endometriosis and reproduction: what we have learned [J]. Yale J Biol Med, 2020, 93 (4): 571-577.

[7] LA ROSA V L, DE FRANCISCIS P, BARRA F, et al. Sexuality in women with endometriosis: a critical narrative review [J]. Minerva Med, 2020, 111 (1): 79-89. DOI: 10.23736/S0026-4806.19.06299-2.

[8] 邓娟, 贺天虎, 程明军, 等. 血管内皮生长因子及其相关 miRNA 在子宫内膜异位症中的研究进展 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2022, 38 (10): 1047-1050. DOI: 10.19538/j.fk2022100122.

DENG J, HE T H, CHENG M J, et al. Research progress of vascular endothelial growth factor and its related miRNA in endometriosis [J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2022, 38 (10): 1047-1050. DOI: 10.19538/j.fk2022100122.

[9] SAUNDERS P T K, HORNE A W. Endometriosis: etiology, pathobiology, and therapeutic prospects [J]. Cell, 2021, 184 (11): 2807-2824. DOI: 10.1016/j.cell.2021.04.041.

[10] LEONOVA A, TURPIN V E, AGARWAL S K, et al. A critical appraisal of the circulating levels of differentially expressed microRNA in endometriosis [J]. Biol Reprod, 2021, 105 (5): 1075-1085. DOI: 10.1093/biolre/ibab134.

[11] MAIER I M, MAIER A C. miRNAs and lncRNAs: potential non-invasive biomarkers for endometriosis [J]. Biomedicine,

- 2021, 9 (11): 1662. DOI: 10.3390/biomedicines9111662.
- [12] FARSIMADAN M, ISMAIL HAJE M, KHUDHUR MAWLOOD C, et al. MicroRNA variants in endometriosis and its severity [J]. *Br J Biomed Sci*, 2021, 78 (4): 206-210. DOI: 10.1080/09674845.2021.1889157.
- [13] GHAFOURI-FARD S, SHOOREI H, TAHERI M. Role of non-coding RNAs in the pathogenesis of endometriosis [J]. *Front Oncol*, 2020, 10 : 1370. DOI: 10.3389/fonc.2020.01370.
- [14] 王丹丹, 杨清. 微小 RNA 与环状 RNA 在子宫内膜异位症发生发展中的作用 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2020, 36 (4): 370-373. DOI: 10.19538/j.fk2020040118.
- WANG D D, YANG Q. The role of microRNA and circular RNA in the occurrence and development of endometriosis [J]. *Chin J Pract Gynecol Obstet*, 2020, 36 (4): 370-373. DOI: 10.19538/j.fk2020040118.
- [15] ZHOU C F, LIU M J, 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. DOI: 10.1186/s13287-019-1388-5.
- [16] KONINCKX P R, USSIA A, ADAMYAN L, et al. Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory [J]. *Fertil Steril*, 2019, 111(2): 327-340. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.10.013.
- [17] ZHAO L Y, SONG J, LIU Y, et al. Mapping the epigenetic modifications of DNA and RNA [J]. *Protein Cell*, 2020, 11(11): 792-808. DOI: 10.1007/s13238-020-00733-7.
- [18] SZUKIEWICZ D. Epigenetic regulation and T-cell responses in endometriosis-something other than autoimmunity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13 : 943839. DOI: 10.3389/fimmu.2022.943839.
- [19] 韦雅婧, 梁炎春, 杨如玉, 等. 健康女性与子宫内膜异位症患者肠道菌群微生物组学研究 [J]. *实用医学杂志*, 2021, 37 (10): 1279-1283. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2021.10.009.
- WEI Y J, LIANG Y C, YANG R Y, et al. A study on gut microbiome in healthy women versus patients with endometriosis [J]. *J Pract Med*, 2021, 37 (10): 1279-1283. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2021.10.009.
- [20] LAGANÀ A S, SALMERI F M, VITALE S G, et al. Stem cell trafficking during endometriosis: may epigenetics play a pivotal role [J]. *Reprod Sci*, 2018, 25 (7): 978-979. DOI: 10.1177/1933719116687661.
- [21] 谭正兰, 赵家仪. 子宫内膜异位症患者核因子- κ B 相关 miRNA 的表达及意义 [J]. *中国当代医药*, 2023, 30 (34): 115-118.
- TAN Z L, ZHAO J Y. Expression and significance of miRNA associated with nuclear factor- κ B in patients with endometriosis [J]. *China Mod Med*, 2023, 30 (34): 115-118.
- [22] DE SANTIS C, GÖTTE M. The role of microRNA let-7d in female malignancies and diseases of the female reproductive tract [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (14): 7359. DOI: 10.3390/ijms22147359.
- [23] 黄静瑶, 刘俐伶. 子宫内膜异位症相关生物标志物研究进展 [J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41 (3): 458-463. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.03.019.
- HUANG J Y, LIU L L. Research progress on biomarkers related to endometriosis [J]. *J Guangxi Med Univ*, 2024, 41 (3): 458-463. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.03.019.
- [24] AZAM I N A, WAHAB N A, MOKHTAR M H, et al. Roles of microRNAs in regulating apoptosis in the pathogenesis of endometriosis [J]. *Life (Basel)*, 2022, 12 (9): 1321. DOI: 10.3390/life12091321.
- [25] HUANG P, ZHANG Y, WANG F, et al. MiRNA-205-5p regulates the ERBB4/AKT signaling pathway to inhibit the proliferation and migration of HAVSMCs induced by ox-LDL [J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 233 : 153858. DOI: 10.1016/j.prp.2022.153858.
- [26] HUANG J, WANG X, WEN G, et al. miRNA-205-5p functions as a tumor suppressor by negatively regulating VEGFA and PI3K/Akt/mTOR signaling in renal carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2019, 42 (5): 1677-1688. DOI: 10.3892/or.2019.7307.
- [27] CHEN H, MALENTACCHI F, FAMBRINI M, et al. Epigenetics of estrogen and progesterone receptors in endometriosis [J]. *Reprod Sci*, 2020, 27 (11): 1967-1974. DOI: 10.1007/s43032-020-00226-2.
- [28] DING L, YANG L, REN C, et al. A review of aberrant DNA methylation and epigenetic agents targeting DNA methyltransferases in endometriosis [J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21 (11): 1047-1055. DOI: 10.2174/1389450121666200228112344.
- [29] ESFANDIARI F, FAVAEDI R, HEIDARI-KHOEI H, et al. Insight into epigenetics of human endometriosis organoids: DNA methylation analysis of HOX genes and their cofactors [J]. *Fertil Steril*, 2021, 115 (1): 125-137. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.08.1398.
- [30] HAO Y, LI Y, WU J, et al. Hypermethylation of the GRHL2 promoter region is associated with ovarian endometriosis [J]. *Reproduction*, 2022, 163 (6): 379-386. DOI: 10.1530/REP-21-0383.
- [31] LI L, ANTERO M F, ZHANG M, et al. Mutation and methylation profiles of ectopic and eutopic endometrial tissues [J]. *J Pathol*, 2021, 255 (4): 387-398. DOI: 10.1002/path.5778.

(责任编辑: 林燕薇)