

miR-30b-3p在卵巢型子宫内膜异位症中的表达及意义

刘晓旭¹, 孙晓清^{2*}, 吴小华³, 安莎莎¹, 卢雪景¹, 秦丽欣¹

(1.河北省石家庄市妇幼保健院妇二科,河北石家庄 050000;2.河北省石家庄市妇幼保健院产前诊断科,河北石家庄 050000;3.河北省石家庄市第四医院生殖医学科,河北石家庄 050000)

[摘要] **目的** 探讨 miR-30b-3p 在卵巢型子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)组织中的表达,并阐述可能的作用机制。**方法** 定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术检测 2023 年 1 月—2024 年 12 月于河北省石家庄市妇幼保健院收集的 60 对在位子宫内膜(eutopic endometrium, EU, EMs 患者宫腔内膜组织)和异位子宫内膜(ectopic endometrium, EC, 同一 EMs 患者卵巢囊肿囊壁组织)中 miR-30b-3p 的表达情况。构建 miR-30b-3p 的 mimics 和 inhibitor, 并分别转染 Ishikawa 细胞,应用细胞克隆形成实验、细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK8)实验、划痕实验、Transwell 迁移和侵袭实验测定 miR-30b-3p 对 Ishikawa 细胞增殖、迁移、侵袭等行为的影响。同时应用蛋白质印迹和细胞免疫荧光实验测定上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)蛋白标志物的表达。**结果** 与 EU 组织相比, miR-30b-3p 在 EC 组织中的表达显著下调($P < 0.001$),并且在轻度 EMs 中的表达高于重度 EMs($P = 0.006$)。上调 miR-30b-3p 的表达后, Ishikawa 细胞的克隆形成率、增殖、迁移、侵袭能力显著下降(均 $P < 0.05$);同时, E-cadherin 表达水平上升, N-cadherin 和 Vimentin 表达水平下降(均 $P < 0.05$),且 E-cadherin 的荧光强度显著增强,而 N-cadherin 和 Vimentin 的荧光强度显著减弱。下调 miR-30b-3p 的表达后,得到相反的结果。**结论** miR-30b-3p 在 EMs 组织中差异表达,可能在该病的发生发展中发挥重要作用。

[关键词] 子宫内膜异位症; miR-30b-3p; 上皮-间质转化 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2026.02.010

[中图分类号] R711.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2026)02-0185-11

The expression and significance of miR-30b-3p in ovarian endometriosis

LIU Xiao-xu¹, SUN Xiao-qing^{2*}, WU Xiao-hua³, AN Sha-sha¹, LU Xue-jing¹, QIN Li-xin¹

(1. The Second Department of Gynecology, Shijiazhuang Maternity & Child Healthcare Hospital, Hebei Province Shijiazhuang 050000, China; 2. Department of Prenatal Diagnosis, Shijiazhuang Maternity & Child Healthcare Hospital, Hebei Province Shijiazhuang 050000, China; 3. Reproductive Medicine Center, the Fourth Hospital of Shijiazhuang City, Hebei Province Shijiazhuang 050000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of miR-30b-3p in ovarian endometriosis (EMs) tissue, and to elucidate the potential mechanisms. **Methods** Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction technology was used to detect the expression of miR-30b-3p in 60 pairs of eutopic endometrium (EU: endometrial tissue in the uterine cavity of EMs patients) and ectopic endometrium (EC: ovarian cyst wall tissue of the same EMs patients) from January 2023 to December 2024 at Maternity and Child Healthcare Hospital, Shijiazhuang, Hebei Province. The mimics and inhibitor of miR-30b-3p were constructed, and then transfected into Ishikawa cells separately. Colony formation assay, cell counting kit-8 (CCK-8) assay, wound healing assay, Transwell cell migration and invasion assays were used to detect the effect of miR-30b-3p on the proliferation, migration and invasion behaviors of Ishikawa cells. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein markers were detected by Western blot and immunofluorescence assays. **Results** Compared with the EU group, the expression of miR-30b-3p was significantly

[收稿日期] 2025-10-14

[基金项目] 河北省医学科学重点科技研究计划项目(20240735)

[作者简介] 刘晓旭(1984-),女,满族,河北保定人,河北省石家庄市妇幼保健院副主任医师,医学博士,从事妇科肿瘤诊治研究。

*通信作者。E-mail: liuxiaoxu315@126.com

down-regulated in the EC tissues ($P < 0.001$), and its expression in mild EMs was higher than that in severe EMs ($P = 0.006$). After the expression of miR-30b-3p was up-regulated, the clone formation rate, proliferation, migration, and invasion ability of Ishikawa cells were significantly decreased (all $P < 0.05$); the expression of E-cadherin was up-regulated, while the expression of N-cadherin and Vimentin were down-regulated (all $P < 0.05$). Meanwhile, the fluorescence intensity of E-cadherin was significantly enhanced, whereas the fluorescence intensity of N-cadherin and Vimentin were significantly weakened. When the expression of miR-30b-3p was down-regulated, the opposite conclusion was reached. **Conclusion** miR-30b-3p is differentially expressed in EMs tissues and may play an important role in the occurrence and development of this disease.

[Key words] endometriosis; miR-30b-3p; epithelial-mesenchymal transition

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 是指有功能的内膜组织在子宫腔以外的其他部位存在并生长^[1], 在育龄期女性中发病率为 5%~10%。异位内膜组织在性激素的刺激下会发生周期性的出血、坏死和脱落, 进而导致慢性盆腔痛、痛经和不孕^[2], 严重影响女性健康。由于诊断延迟^[3]、治疗复杂、复发率高, EMs 至今仍是医学界尚未攻克的难题。随着高通量测序技术的出现和生物信息学方法日新月异的发展, 从基因层面深入探索该病的发病机制为其早诊早治带来希望。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类小分子单链非编码 RNA, 通过与特定 mRNA 互补结合, 负性调控靶基因的表达, 抑制蛋白质产生和沉默翻译, 从而参与了细胞增殖、分化和凋亡等多种生物学过程。尽管已有研究^[4-6]表明 miRNA 在 EMs 的发生发展中发挥了重要作用, 但具体的分子机制仍然不明。至今尚未找到具有足够优势成为该病诊断标记物和治疗靶点的分子。卵巢是 EMs 最常见的病变部位, 笔者团队的前期研究从卵巢型 EMs 入手, 应用高通量测序技术, 证实 miR-30b-3p 在异位子宫内膜 (ectopic endometrium, EC) 和在位子宫内膜 (eutopic endometrium, EU) 组织中存在差异表达^[7], 其可能是疾病进展的调控因素。本研究借助体外细胞实验, 旨在进一步探索 miR-30b-3p 的生物学功能, 为 EMs 的病因学研究和分子靶向治疗提供新的策略。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2023 年 1 月—2024 年 12 月于河北省石家庄市妇幼保健院进行手术治疗的 20~45 岁卵巢型 EMs 患者 60 例 (同一患者的 EC 和 EU 组织为一对), 且均由术后病理确诊。其中轻度 EMs (I/II 期) 和重度 EMs (III/IV 期) 各 30 例。所有标本离体后, 立即置于液氮急冻。

本研究经医院伦理委员会批准通过 (批准文

号: 202323), 所有患者术前均签署了知情同意书。

1.2 细胞系 功能实验选用 Ishikawa 细胞系进行, 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 细胞货号 CL-0283。

1.3 主要试剂和仪器 TriQuick Reagent、DAPI 溶液、高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液、PVDF 膜 (0.22 μm) 购自北京索莱宝科技有限公司; 引物购自上海生工生物工程股份有限公司; PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (RR047A)、TB Green[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒 (RR820A) 购自日本 TaKaRa Bio Inc 公司; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青天杭生物公司; Matrigel 基质胶购自德国 BioFroxx 公司; Cell Counting Kit-8、LumiQ 通用型 ECL 发光液购自上海圣尔生物科技有限公司; Lipo2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; 一抗 (兔抗人) E-Cadherin、Vimentin、N-Cadherin、GAPDH 及二抗 HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自杭州景杰生物科技有限公司; 荧光二抗购自上海 Abways Technology 公司; mimics 和 inhibitor 购自苏州吉玛制药技术有限公司; 核酸定量仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增仪购自德国 analytikjena 公司; 激光扫描共聚焦显微成像系统 FV3000 购自日本 Olympus 公司; 多功能酶标仪 SpectraMax M5 购自美国 Molecular Devices 公司; 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; Transwell 小室 (膜孔径 8 μm) 购自美国 Corning 公司。

1.4 研究方法

1.4.1 定量逆转录聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 采用“茎环法”进行引物设计, 并由上海生工生物工程股份有限公司进行合成。miR-

30b-3p引物序列为上游: 5'-TGCGGAGAGGTT-GCCCTTGGTGA-3', 下游: 5'-TGCGGGTGCT-CGCTTCGGCAGC-3', RT Primer: 5'-GTCGT-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTGCACTGGA-TACGACGAATTCAC3'。U6作为内参, 引物序列为上游: 5'-TGCGGGTGCTCGCTTCGGCA-GC-3', 下游: 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3', RT Primer: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGG-TCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAA-ATATGGAAC-3'。Trizol法提取组织和细胞样本中的总RNA, 核酸定量仪测定其纯度和浓度。合格的总RNA首先被逆转录成稳定的cDNA, 再进行扩增。逆转录时, 将TaKaRa反应体系中的RT Primer Mix替换成miR-30b-3p或U6的RT Primer。扩增条件: 预变性95℃ 30 s; PCR反应95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。实验重复3次。

1.4.2 细胞培养及转染 复苏的Ishikawa细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基置于37℃、含有5% CO₂的湿润细胞培养箱培养。将密度为 $1.5 \sim 2 \times 10^5$ 个/mL的细胞均匀接种至6孔板, 第2天细胞汇合率在50%~70%左右时使用Lipo2000试剂进行转染, 随后分别加入mimics (miR-30b-3p mimics组) 和mimics-NC (阴性对照组) 各5 μL, inhibitor (miR-30b-3p inhibitor组) 和inhibitor-NC (阴性对照组) 各7.5 μL (浓度均为20 μmol/L), 转染后48 h提取RNA, 72 h提取蛋白。实验重复3次。

1.4.3 克隆形成实验 将完成转染的细胞消化、重悬后, 接种于6孔板, 每孔500个, 培养10~14 d, 菌落的细胞数达到50个, 终止培养, 固定、染色、晾干后拍照、计数。

1.4.4 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK8) 实验 将完成转染的细胞接种于96孔板, 每孔约3 000个细胞。于0 h、24 h、48 h、72 h和96 h分别使用酶标仪测定每孔450 nm、620 nm双波长吸光度值 [光密度 (optical densit, OD) 值], 进行CCK-8检测。实验重复3次。

1.4.5 划痕实验 将完成转染的细胞接种于6孔板, 密度达90%以上时, 用200 μL的移液器枪头垂直于孔板底部轻轻划痕, 于0 h、24 h分别使用倒置显微镜拍照, 记算划痕面积及愈合度。实验重复3次。

1.4.6 Transwell 细胞迁移和侵袭实验 将Transwell小室置于24孔板中进行细胞迁移实验。

上室加入200 μL细胞悬液 (含 5×10^4 个细胞), 下室加入800 μL培养基 (含20% FBS), 培养24 h后, 取出小室清洗、固定、染色、拍照、计数。Transwell侵袭实验时, 先在上室中加入80 μL Matrigel胶 (Matrigel: DMEM=1: 8), 37℃孵育4 h后, 再接种细胞。实验重复3次。

1.4.7 蛋白质印迹 (Western blotting) 上皮一间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 有助于细胞的种植、生长、侵袭和转移, 是细胞形态及功能的转换, E-cadherin、N-cadherin和Vimentin是该生物学过程中的标志性蛋白。应用Western blotting检测这3种蛋白的表达。使用RIPA细胞裂解液 (含1% PMSF) 提取细胞中的总蛋白, BCA法测定蛋白浓度。每泳道加入20 μL配置好的蛋白上样液, 进行SDS-PAGE电泳, 转膜、封闭后, 加入一抗 (抗体浓度: E-cadherin 1: 3 000、N-cadherin 1: 1 000、Vimentin 1: 500、GAPDH 1: 5 000), 4℃孵育过夜。取出孵育盒, 置于摇床上, 室温复温1 h。PVDF膜用TBST液摇床晃动3次, 每次10 min。弃TBST液, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗稀释液 (1: 10 000), 摇床室温孵育2 h。滴加ECL发光液后曝光显影。各蛋白相对表达量使用Image J软件进行分析 (GAPDH作为内参)。实验重复3次。

1.4.8 免疫荧光实验 将制备好的适宜密度的细胞爬片进行清洗、固定、通透、封闭后, 分别孵育一抗、二抗, 滴加DAPI, 封片后使用激光扫描共聚焦显微成像系统FV3000进行观察及拍照。实验重复3次。

1.5 统计学方法 应用SPSS 21.0和GraphPad Prism7统计软件分析数据。计量资料比较采用独立样本 t 检验、单因素方差分析、SNK- q 检验和重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-30b-3p在EMs组织样本中的表达情况 与EU组相比, miR-30b-3p在EC组中的表达明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表1。miR-30b-3p在重度EMs组织中的表达低于轻度EMs, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表2。

2.2 转染效率的测定 将mimics-NC、miR-30b-3p mimics分别转染至Ishikawa细胞中, 48 h后采用qRT-PCR测定转染效率, 阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); miR-30b-3p mimics组的转染效率高于阴性对照组, 差

表1 miR-30b-3p在60对EC和EU组织中的表达情况

Table 1 Expression of miR-30b-3p in 60 pairs of EC and EU tissues

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

组别	miR-30b-3p 相对表达量
EC组	0.509±0.551
EU组	1.529±0.544
t值	4.902
P值	<0.001

表2 miR-30b-3p在30例重度和轻度EMs中的表达情况

Table 2 Expression of miR-30b-3p in 30 patients with mild and severe endometriosis

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

组别	miR-30b-3p 相对表达量
轻度EMs组	0.723±0.026
重度EMs组	0.411±0.063
t值	2.951
P值	0.006

异有统计学意义 (P<0.05), 见表3。

2.3 miR-30b-3p对Ishikawa细胞生物学行为的影响

2.3.1 miR-30b-3p表达水平变化对Ishikawa细胞增殖能力的影响

2.3.1.1 克隆形成实验 应用平板克隆形成实验测定miR-30b-3p对Ishikawa细胞克隆形成能力的

表3 miR-30b-3p mimics转染效率的测定

Table 3 Detection of miR-30b-3p expression after transfection with mimics

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

组别	miR-30b-3p 相对表达量
空白对照组	1.015±0.329
阴性对照组	1.028±0.244
miR-30b-3p mimics组	19.187±0.609*
F值	122.500
P值	<0.001

*P值<0.05与阴性对照组比较(SNK-q检验)

影响。结果显示, 上调miR-30b-3p的表达后, 细胞的克隆形成率下降, 其中, 阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 (P>0.349), 与miR-30b-3p mimics组相比, 差异有统计学意义 (P<0.001); 下调miR-30b-3p后, 细胞的克隆形成率上升, 其中, inhibitor-NC组与空白对照组比较差异无统计学意义 (P=0.676), 与miR-30b-3p inhibitor组相比, 差异有统计学意义 (P<0.001), 见表4、表5、图1。

2.3.1.2 CCK-8实验 采用CCK-8实验测定Ishikawa细胞的增殖情况, 结果显示, 转染miR-30b-3p mimics后, 细胞增殖能力下降 (P<0.001), 见表6; 转染miR-30b-3p inhibitor后, 细胞增殖能力上升 (P<0.001), 见表7。

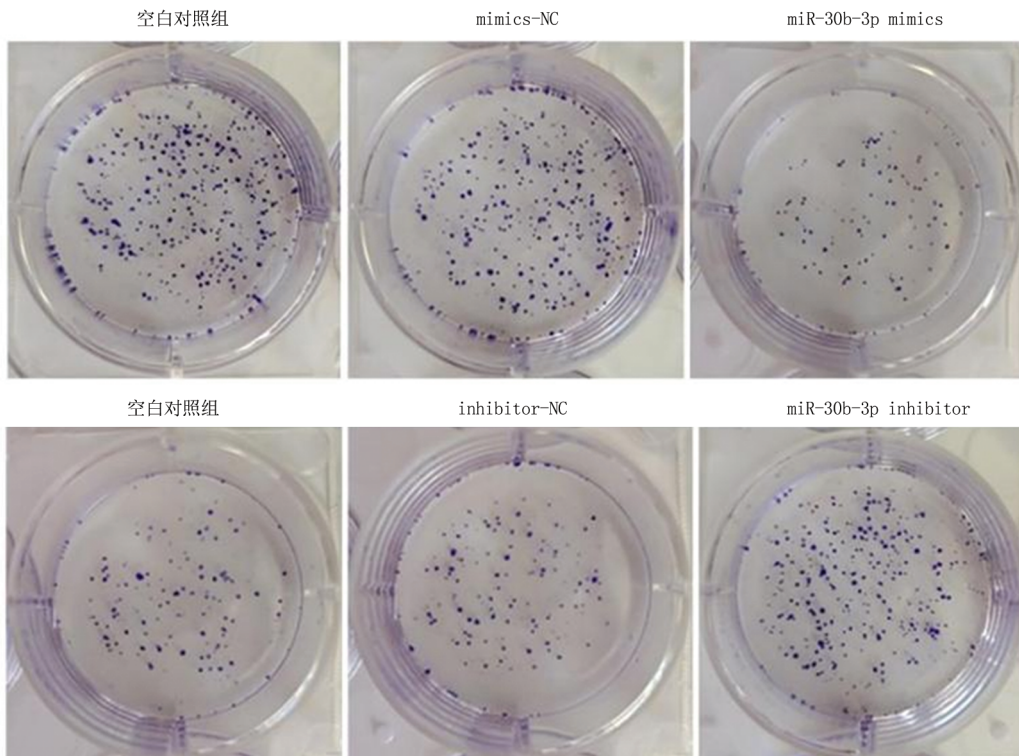


图1 miR-30b-3p水平变化对Ishikawa细胞克隆形成能力的影响

Figure 1 Effect of changes in miR-30b-3p level on clone formation ability in Ishikawa cells

表4 miR-30b-3p水平上调对Ishikawa细胞克隆形成能力的影响

Table 4 Effect of miR-30b-3p overexpression on clone formation ability in Ishikawa cells

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

组别	克隆形成率
空白对照组	44.40±1.06
阴性对照组	45.87±1.40
miR-30b-3p mimics组	18.40±1.06*
F值	510.000
P值	<0.001

*P值<0.05与阴性对照组比较(SNK-q检验)

2.3.2 miR-30b-3p表达水平变化对Ishikawa细胞迁移能力的影响

2.3.2.1 Transwell细胞迁移实验 上调miR-30b-3p的表达后, 阴性对照组与空白对照组比较迁移细胞数量差异无统计学意义($P>0.05$), 而miR-30b-3p mimics转染组迁移细胞的数量明显少于阴

表5 miR-30b-3p水平下调对Ishikawa细胞克隆形成能力的影响

Table 4 Effect of miR-30b-3p silencing on clone formation ability in Ishikawa cells

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

组别	克隆形成率
空白对照组	21.67±1.14
inhibitor-NC组	22.60±1.25
miR-30b-3p inhibitor组	40.33±1.51*
F值	193.500
P值	<0.001

*P值<0.05与inhibitor-NC组比较(SNK-q检验)

性对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 下调miR-30b-3p的表达后, inhibitor-NC组与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$), 而miR-30b-3p inhibitor转染组迁移细胞的数量明显多于inhibitor-NC组, 差异有统计学意义($P<0.001$), 见表8、表9、图2。

表6 miR-30b-3p水平上调对Ishikawa细胞增殖能力的影响

Table 6 Effect of miR-30b-3p overexpression on Ishikawa cell proliferation

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

组别	OD值				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
阴性对照组	0.081±0.005	0.224±0.007	0.742±0.018	1.242±0.037	1.358±0.031
miR-30b-3p mimics组	0.084±0.004	0.117±0.003	0.325±0.012	0.862±0.016	1.069±0.043
组间	F值=1 282.000		P值<0.001		
时点间	F值=4 690.000		P值<0.001		
组间·时点间	F值=147.200		P值<0.001		

表7 miR-30b-3p水平下调对Ishikawa细胞增殖能力的影响

Table 7 Effect of miR-30b-3p silencing on Ishikawa cell proliferation

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

组别	OD值				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
inhibitor-NC组	0.112±0.003	0.121±0.006	0.328±0.008	0.578±0.030	1.131±0.014
miR-30b-3p inhibitor组	0.113±0.003	0.201±0.007	0.566±0.007	0.818±0.007	1.513±0.015
组间	F值=11 305.000		P值<0.001		
时点间	F值=58 773.000		P值<0.001		
组间·时点间	F值=1 366.000		P值<0.001		

2.3.2.2 划痕实验 上调miR-30b-3p的表达后, 细胞的迁移率下降, 其中, 阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$), 与miR-30b-3p mimics组相比, 差异有统计学意义($P<0.05$); 下调miR-30b-3p的表达后, 细胞的迁移率上升, 其中, inhibitor-NC组与空白对照组比较差异无统计学意义($P=0.450$), 与miR-30b-3p inhibitor组相比, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表10、表11、图3。

2.3.3 miR-30b-3p表达水平变化对Ishikawa细胞侵袭能力的影响 上调miR-30b-3p的表达后, 阴性对照组与空白对照组比较侵袭细胞数量差异无统计学意义($P=0.586$), 而miR-30b-3p mimics转染组侵袭细胞的数量明显少于阴性对照组($P<0.05$); 下调miR-30b-3p的表达后, inhibitor-NC组与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$), 而miR-30b-3p inhibitor转染组侵袭细胞的数量明显多于inhibitor-NC组, 差异有统计学意义($P<$

表8 Transwell细胞迁移实验测定上调miR-30b-3p后Ishikawa细胞迁移能力的变化

Table 8 Changes in the migratory capacity of Ishikawa cells following miR-30b-3p overexpression by Transwell assay

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

组别	迁移细胞数量
空白对照组	233.00±12.00
阴性对照组	217.67±13.01
miR-30b-3p mimics组	124.67±12.50*
F值	65.860
P值	<0.001

*P值<0.05与阴性对照组比较(SNK-q检验)

表9 Transwell细胞迁移实验测定下调miR-30b-3p后Ishikawa细胞迁移能力的变化

Table 9 Changes in the migratory capacity of Ishikawa cells following miR-30b-3p silencing by Transwell assay

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

组别	迁移细胞数量
空白对照组	81.67±3.06
inhibitor-NC组	75.00±5.57
miR-30b-3p inhibitor组	184.33±12.90*
F值	163.600
P值	<0.001

*P值<0.05与inhibitor-NC组比较(SNK-q检验)

0.05), 见表12、表13、图4。

2.4 miR-30b-3p对EMT表型的影响

2.4.1 Western Blotting 上调或下调miR-30b-3p的表达水平后, 阴性对照组与空白对照组的EMT

表10 细胞划痕实验测定上调miR-30b-3p后Ishikawa细胞迁移能力的变化

Table 10 Changes in the migratory capacity of Ishikawa cells following miR-30b-3p overexpression by wound healing assays

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

组别	细胞迁移指数
空白对照组	46.27±0.97
阴性对照组	42.63±3.82
miR-30b-3p mimics组	15.49±0.90*
F值	209.800
P值	<0.001

*P值<0.05与阴性对照组比较(SNK-q检验)

表11 细胞划痕实验测定下调miR-30b-3p后Ishikawa细胞迁移能力的变化

Table 11 Changes in the migratory capacity of Ishikawa cells following miR-30b-3p silencing by wound healing assays

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

组别	细胞迁移指数
空白对照组	35.90±3.05
inhibitor-NC组	38.91±2.07
miR-30b-3p inhibitor组	65.30±3.30*
F值	96.180
P值	<0.001

*P值<0.05与inhibitor-NC组比较(SNK-q检验)

蛋白标记物表达水平相比, 差异均无统计学意义(P>0.05)。上调miR-30b-3p的表达水平后, 与阴性对照组相比, miR-30b-3p mimics组E-

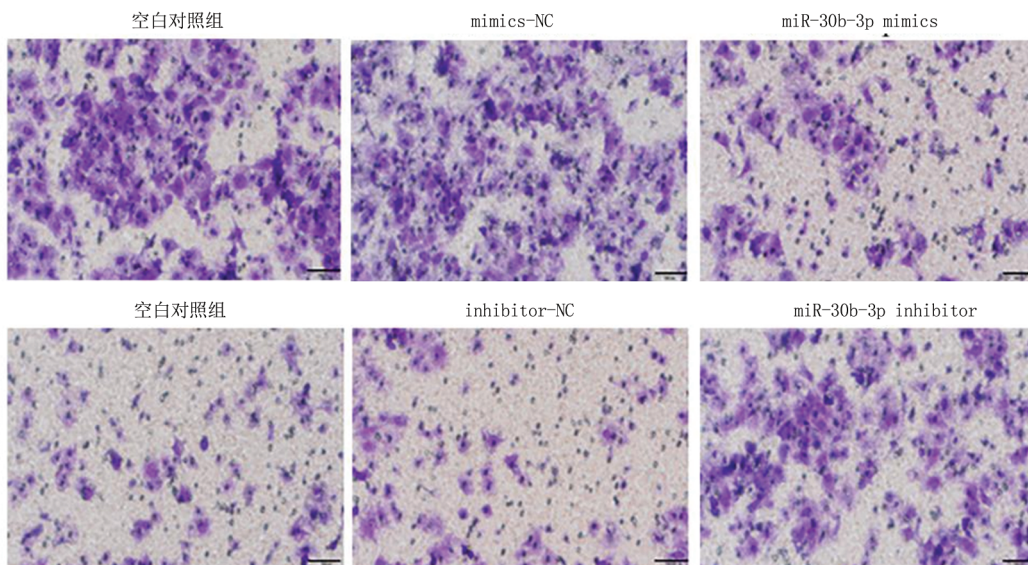


图2 Transwell细胞迁移实验测定上调或下调miR-30b-3p后Ishikawa细胞迁移能力的变化

标尺=100 μm, 结晶紫染色×200倍

Figure 2 Changes in the migratory capacity of Ishikawa cells following miR-30b-3p overexpression or silencing by Transwell assay

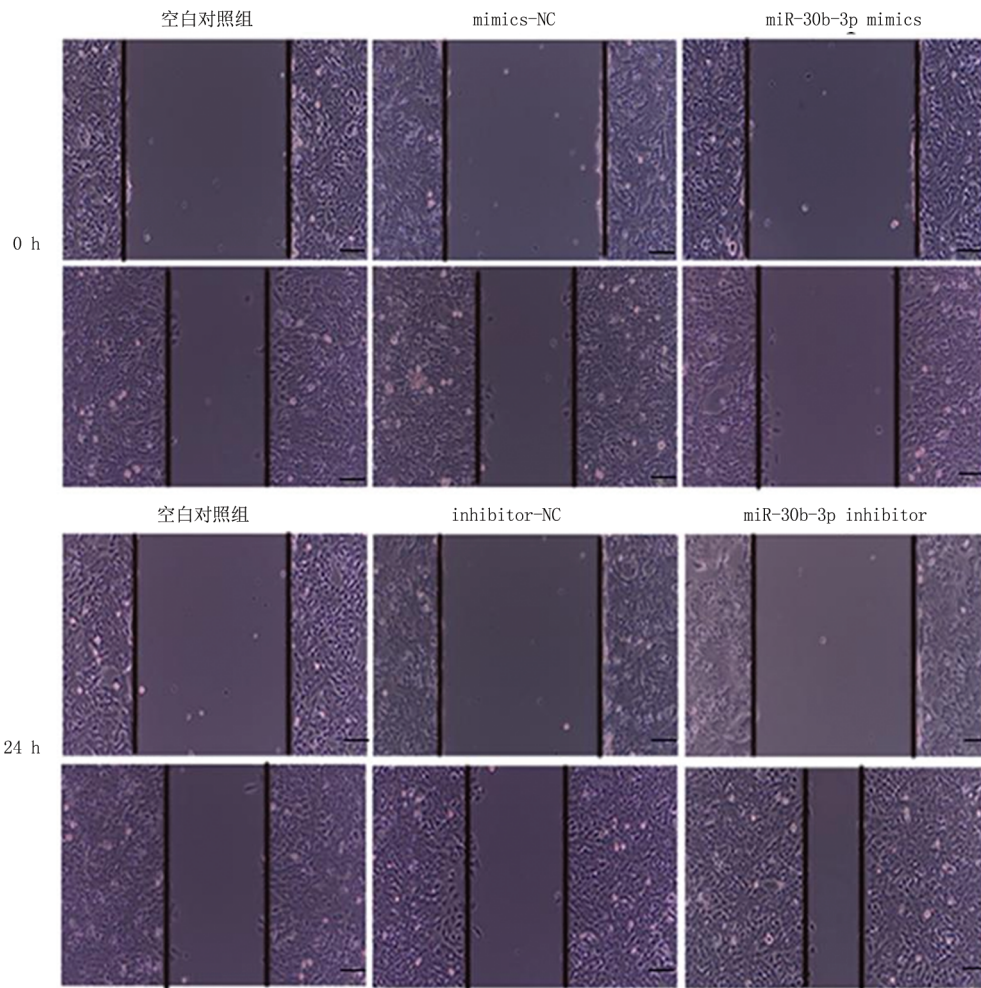


图3 细胞划痕实验测定上调或下调 miR-30b-3p 后 Ishikawa 细胞迁移能力的变化 (×100)

Figure 3 Migratory capacity of Ishikawa cells after miR-30b-3p overexpression or silencing wound healing assays (×100)

表 12 Transwell 细胞侵袭实验测定上调 miR-30b-3p 后 Ishikawa 细胞侵袭能力的变化

表 13 Transwell 细胞侵袭实验测定下调 miR-30b-3p 后 Ishikawa 细胞侵袭能力的变化

Table 12 Changes in invasion ability of Ishikawa cells after miR-30b-3p overexpression by Transwell assays

Table 13 Changes in invasion of Ishikawa cells after miR-30b-3p silencing by Transwell assays

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

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

组别	侵袭细胞数量
空白对照组	207.00 ± 12.00
阴性对照组	216.00 ± 8.00
miR-30b-3p mimics 组	93.67 ± 11.59*
F 值	122.200
P 值	<0.001

组别	侵袭细胞数量
空白对照组	124.00 ± 12.12
inhibitor-NC 组	120.00 ± 7.55
miR-30b-3p inhibitor 组	195.33 ± 9.71*
F 值	54.200
P 值	<0.001

*P 值 < 0.05 与阴性对照组比较 (SNK-q 检验)

*P 值 < 0.05 与 inhibitor-NC 组比较 (SNK-q 检验)

cadherin 表达水平上升, N-cadherin 和 Vimentin 表达水平下降; 下调 miR-30b-3p 的表达水平后, 与 inhibitor-NC 组相比, miR-30b-3p inhibitor 组的 E-cadherin 表达下降, N-cadherin 和 Vimentin 表达上升, 差异均有统计学意义 (P < 0.05), 见表 14、表 15、图 5。

达水平后, 与阴性对照组相比, miR-30b-3p mimics 组 E-cadherin 的荧光强度显著增强, 而 N-cadherin 和 Vimentin 的荧光强度显著减弱。下调 miR-30b-3p 的表达水平后, 与 inhibitor-NC 组相比, miR-30b-3p inhibitor 组的 E-cadherin 荧光强度显著减弱, N-cadherin 和 Vimentin 的荧光强度显著增强, 见图 6。

2.4.2 细胞免疫荧光实验 上调 miR-30b-3p 的表

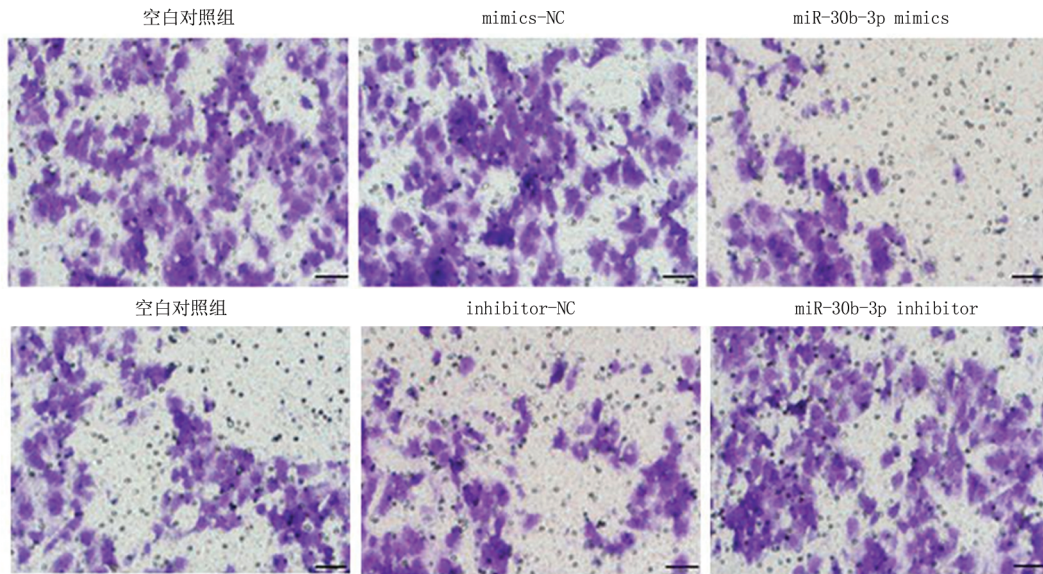


图4 miR-30b-3p水平变化对Ishikawa细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色×200)

Figure 4 Effect on invasion ability of Ishikawa cells after miR-30b-3p overexpression or silencing by Transwell assays (Rrystal violet staining, ×200)

表14 Western blot测定上调miR-30b-3p后EMT标记物的变化

Table 14 Changes of EMT protein markers after miR-30b-3p overexpression by Western blot

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

组别	蛋白相对表达量		
	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin
空白对照组	0.619±0.018	1.174±0.037	1.194±0.052
阴性对照组	0.645±0.024	1.183±0.019	1.172±0.043
miR-30b-3p mimics组	1.022±0.001*	0.532±0.026*	0.733±0.021*
F值	21.840	152.700	25.720
P值	0.002	<0.001	<0.001

*P值<0.05与阴性对照组比较(SNK-q检验)

表15 Western blot测定下调miR-30b-3p后EMT标记物的变化

Table 15 Changes of EMT protein markers after miR-30b-3p silencing by Western blot

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

组别	蛋白相对表达量		
	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin
空白对照组	0.823±0.032	0.615±0.027	0.530±0.054
inhibitor-NC组	0.860±0.019	0.633±0.018	0.493±0.039
miR-30b-3p inhibitor组	0.506±0.025*	1.288±0.041*	1.239±0.025*
F值	12.070	79.900	238.000
P值	0.008	<0.001	<0.001

*P值<0.05与inhibitor-NC组比较(SNK-q检验)

3 讨论

虽然EMs是一种常见的慢性、良性疾病，却具有恶性行为，如增殖、侵袭、转移和复发，严重影响育龄期女性的生活质量，至今仍缺乏有效的早期诊断和治疗的方法。从分子水平深入探索EMs的发病机制，是当前研究的热点。分子诊断和基因疗法，具有光明的前景。miRNA是由18~

22个核苷酸组成的一种小分子非编码RNA，能够负性调控靶基因的表达^[8]，在EMs等多种疾病的病理过程中发挥调节作用^[9-11]。研究^[4, 12-14]证实，miRNA在EMs患者的EU和EC中存在差异表达，并参与了血管生成、免疫调节、孕激素抵抗、炎症和EMT等重要的生物学过程。高通量测序技术的出现，为寻找这些差异表达的miRNA提供了技术支持。

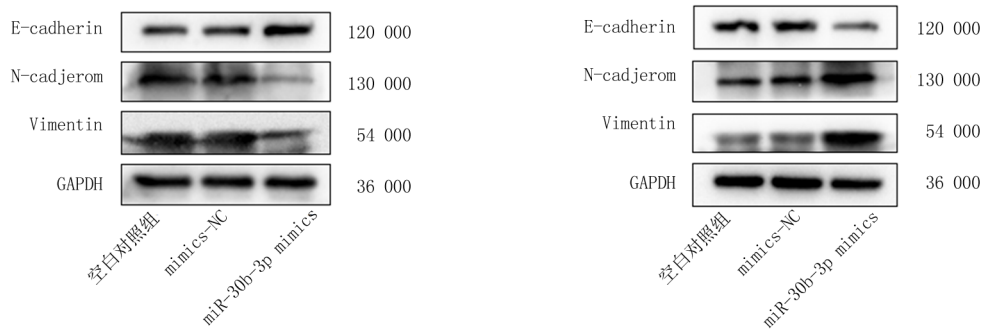


图5 Western blotting测定上调或下调 miR-30b-3p后 EMT 标记物的变化

Figure 5 Changes in EMT protein markers after miR-30b-3p overexpression or silencing by Western blot

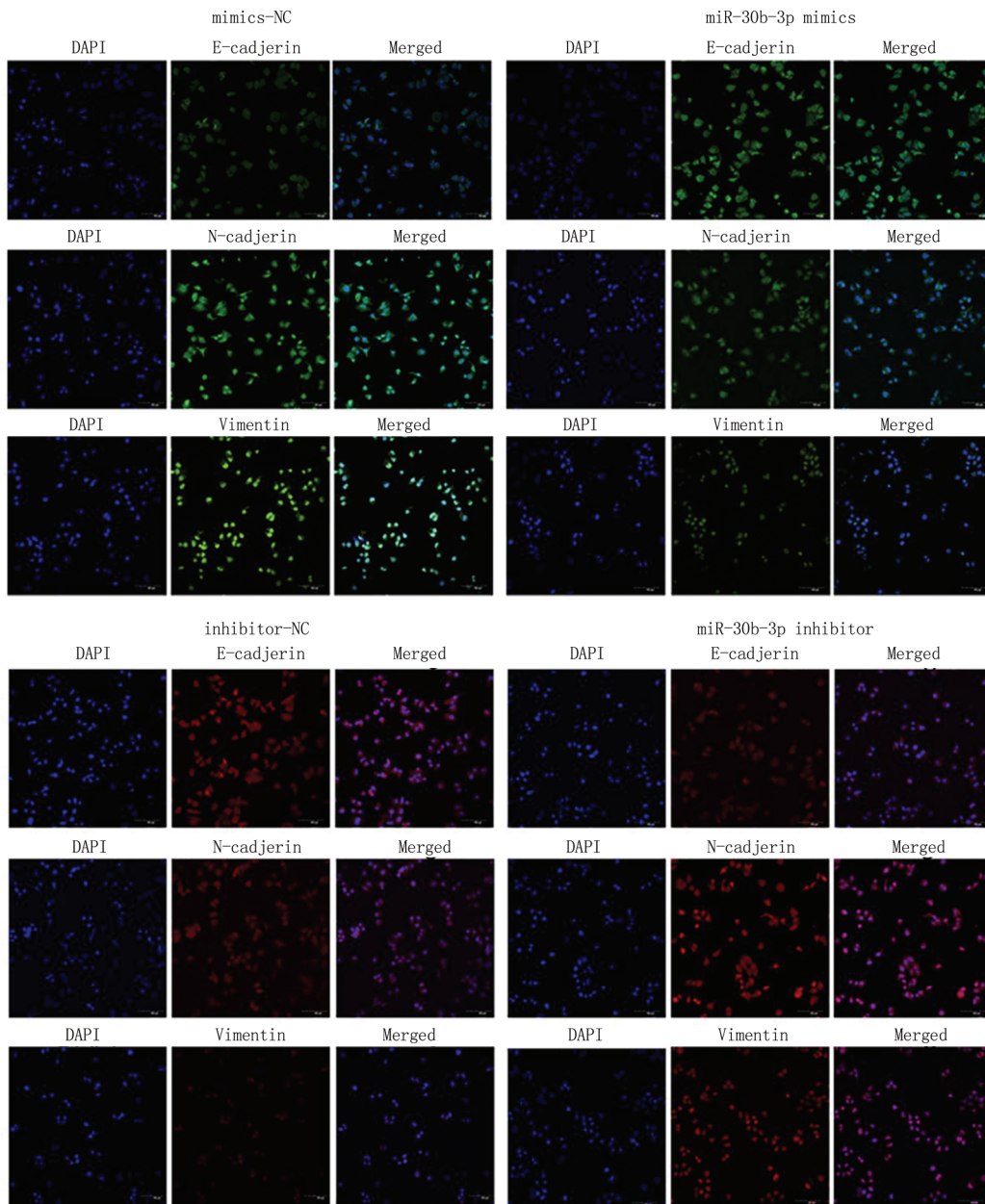


图6 细胞免疫荧光实验测定上调或下调 miR-30b-3p后 EMT 标记物的变化 (×200)

Figure 6 Changes in EMT protein markers after miR-30b-3p overexpression or silencing by immunofluorescence assay (×200)

笔者团队的前期研究^[7]从轻度卵巢型EMs入手,借助高通量测序技术,显示与EU组织相比,EC组织中miR-30b-3p的表达水平显著下降。本研究进一步扩大样本量,证实了这一结论。这种在疾病早期就出现差异表达的miRNA可能在EMs的发生发展中发挥重要作用。miR-30b-3p的表达下降或缺失,可能不仅是该病进展的伴随现象,更是疾病启动或发展的驱动因素之一。研究^[15]表明,miR-30b-3p具有重要的调控功能,参与了多种生物学过程,例如miR-30b-3p靶向ZNR1促进草酸钠诱导的HK-2细胞凋亡和氧化应激,抑制其增殖、侵袭和迁移;miR-30b-3p通过靶向调控COX6B1抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭^[16];miR-30b-3p水平增高还是重症心力衰竭患者预后不良的影响因素^[17]。然而,其在EMs机制中的具体作用鲜有报道。本研究通过体外功能实验证实,上调miR-30b-3p的表达,会抑制Ishikawa细胞的增殖、迁移和侵袭;相反,下调其表达,会促进这些生物学行为。此外,本研究还显示,miR-30b-3p在重度EMs组织中的表达显著低于轻度EMs。以上结果表明,miR-30b-3p对EMs具有负性调控作用,miR-30b-3p的表达下降或缺失,促进了EMs患者子宫内膜细胞的增殖、迁移和侵袭,促进子宫内膜异位囊肿的形成,并导致进行性痛经、慢性盆腔痛、不孕等临床症状。miR-30b-3p对EMs的早期诊断、早期治疗具有重大意义,并对疾病严重程度和预后的评估有巨大价值。

EMT是极化的静止上皮细胞转化为移动的间充质细胞的生物学过程^[18],伴随着上皮标志蛋白(如E-cadherin等)的减少以及间质标志蛋白(如N-cadherin、Vimentin等)的增多^[19]。在这个过程中细胞的黏附力逐渐降低,运动和侵袭能力逐渐增强。miRNA-30家族包括miR-30a、miR-30b、miR-30c、miR-30d和miR-30e等,失调的miR-30家族可以通过调控多种信号通路实现肿瘤细胞的EMT,这在肿瘤侵袭和转移中起着关键作用。例如miR-30家族在乳腺癌的发生、转移、耐药性中具有重要作用,并能够预测乳腺癌患者的预后,有可能成为乳腺癌的分子标志物和治疗靶点^[20]。miRNA-30c能够通过抑制EMT负性调控非小细胞肺癌的进展^[21]。miR-30b-3p作为miRNA-30家族的重要成员,同样具有类似的生物学功能。Li等^[22]研究表明,miR-30b-3p作为一种抗癌基因,可以通过靶向CTHRC1负向调控EMT过程,抑制卵巢癌细胞的迁移和侵袭。本研究通

过转染miR-30b-3p mimics或miR-30b-3p inhibitor改变该miR-30b-3p的表达水平后,采用Western blotting和细胞免疫荧光双染法测定EMT蛋白标志物的变化,显示上调miR-30b-3p后,E-cadherin含量增多,N-cadherin、Vimentin含量减少;而下调miR-30b-3p后,结果恰好相反。这进一步证实了miR-30b-3p对EMT的负性调控作用。

竞争性内源RNA(competitive endogenous RNA, ceRNA)机制是当前研究较为成熟的调控方式,某些非编码RNA,如长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)、环状RNA(circular RNA, circRNA)可以作为分子海绵竞争性的结合miRNA,稀释细胞内游离miRNA的浓度,进而提高目的基因的表达。这构成了“lncRNA/circRNA—miRNA—靶基因”的ceRNA调控模式。研究^[23]表明,ceRNA模式参与了包括EMs在内的多种疾病的发生发展,例如,LINC00662通过结合miR-30b-3p,上调靶基因ELK1的表达,从而促进骨肉瘤的发生发展;circATRNL1通过海绵吸附miR-141-3p和miR-200a-3p,调控Yes相关蛋白1(Yes-associated protein 1, YAP1)的表达,参与EMs的进展^[24]。本研究初步证实了miR-30b-3p的功能,未来将采用生物信息学方法,如miRanda、TargetScan等预测其特定ceRNA和关键靶基因,系统地绘制出一个从上游非编码RNA到下游效应蛋白的完整调控通路。同时通过功能富集分析及通路挖掘,指明后续研究的方向。

但本研究也具有一定的局限性。首先,Ishikawa细胞系虽然是研究子宫内膜生物学功能的常用模型,但无法完全模拟EMs的内膜细胞特性;其次,目前仅限于体外实验,无法准确反映miR-30b-3p在体内复杂的生理和病理环境中的真实作用情况;最后,没有找到miR-30b-3p作用的靶基因。在未来的研究中,需要进行原代EMs内膜细胞培养,并建立动物模型,进一步验证miR-30b-3p的调控功能,并借助生物信息学软件预测其靶基因,进行深层次的机制探索。

综上所述,miR-30b-3p能够抑制Ishikawa的增殖、迁移和侵袭,并在EMs的在位内膜和异位内膜中存在差异表达,可能是EMs发生发展的重要调节因子,EMT是其实现调控作用的重要机制。这为EMs的病因学研究和靶向治疗,提供了理论基础。鉴于其表达改变发生在疾病早期阶段,miR-30b-3p具有成为EMs早期诊断生物标志物的巨大潜力。未来研究可通过检测血清中miR-30b-

3p水平, 评估其无创诊断价值。同时, miR-30b-3p是成为治疗靶点的理想分子, 使用miRNA激动剂可能成为抑制异位内膜生长和侵袭的新策略。

[参考文献]

- [1] Coccia ME, Nardone L, Rizzello F. Endometriosis and infertility: A long-life approach to preserve reproductive integrity[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(10): 6162.
- [2] Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA. Endometriosis[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(13): 1244-1256.
- [3] De Corte P, Klinghardt M, von Stockum S, et al. Time to diagnose endometriosis: Current status, challenges and regional characteristics—a systematic literature review [J]. *BJOG*, 2025, 132(2): 118-130.
- [4] Abbaszadeh M, Karimi M, Rajaei S. The landscape of non-coding RNAs in the immunopathogenesis of Endometriosis [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1223828.
- [5] Zhu J, Xu Z, Wu P, et al. MicroRNA-92a-3p Inhibits Cell Proliferation and invasion by regulating the transcription factor 21/steroidogenic factor 1 axis in endometriosis [J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(7): 2188-2197.
- [6] Xue Y, Lin X, Shi T, et al. miRNA-223 expression in patient-derived eutopic and ectopic endometrial stromal cells and its effect on epithelial-to-mesenchymal transition in endometriosis [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2022, 77: 100112.
- [7] Liu X, Wu J, Yang B, et al. hsa_circ_0005991 promotes epithelial-mesenchymal transition by regulating miR-30b-3p/Cdc42EP1 axis in ovary endometriosis [J]. *Genomics*, 2023, 115(6): 110718.
- [8] Rana TM. Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(1): 23-26.
- [9] He B, Zha Z, Cai Q, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2628-2647.
- [10] Lee A, Moon J, Yu J, et al. MicroRNAs in Dystrophinopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14): 7785.
- [11] Bjorkman S, Taylor HS. MicroRNAs in endometriosis: Biological function and emerging biomarker candidates [J]. *Biol Reprod*, 2019, 100(5): 1135-1146.
- [12] Zhang Z, Wang Y, Zeng L, et al. miR-218-5p in endometrial microenvironment prevents the migration of ectopic endometrial stromal cells by inhibiting LASP1 [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1): 64.
- [13] Hon JX, Wahab NA, Karim AKA, et al. MicroRNAs in endometriosis: Insights into inflammation and progesterone resistance [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19): 15001.
- [14] Nazri HM, Greaves E, Quenby S, et al. The role of small extracellular vesicle-miRNAs in endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2023, 38(12): 2296-2311.
- [15] 于大鹏, 丁友鹏, 李勉洲, 等. miRNA-30b-3p 靶向 ZNRF1 调控草酸钠诱导的 HK-2 细胞凋亡和氧化应激的研究 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2024, 21(1): 9-16.
- [16] 陈琳, 陈新璐, 刘璐, 等. miR-30b-3p 通过靶向调控 COX6B1 抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭 [J]. *中国肺癌杂志*, 2022, 25(8): 567-574.
- [17] 黄刚, 戴大银, 张永红, 等. 基于血清 miR-30b-3p、sST2 表达构建重症心力衰竭患者预后不良的列线图模型 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2024, 16(12): 1461-1466.
- [18] Zaravinos A. The regulatory role of microRNAs in EMT and cancer [J]. *J Oncol*, 2015, 2015: 865816.
- [19] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- [20] Yang SJ, Yang SY, Wang DD, et al. The miR-30 family: Versatile players in breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3): 1010428317692204.
- [21] Zhong Z, Xia Y, Wang P, et al. Low expression of microRNA-30c promotes invasion by inducing epithelial mesenchymal transition in non small cell lung cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(5): 2575-2579.
- [22] Li Y, Zhou J, Wang J, et al. Mir-30b-3p affects the migration and invasion function of ovarian cancer cells by targeting the CTHRC1 gene [J]. *Biol Res*, 2020, 53(1): 10.
- [23] Wang B, Xu Z, Wang X, et al. Knockdown of lncRNA LINC00662 suppresses malignant behaviour of osteosarcoma cells via competition with miR-30b-3p to regulate ELK1 expression [J]. *J Orthop Surg Res*, 2022, 17(1): 74.
- [24] Wang DD, Luo YJ, Wang GW, et al. CircATRNL1 promotes epithelial-mesenchymal transition in endometriosis by upregulating Yes-associated protein 1 in vitro [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 594.

(本文编辑:何祯)