

脂多糖通过 TREK-1 参与妊娠子宫收缩调控的机制研究

汪星星^{1,2}, 俞慧慧^{1,2}, 李璇^{1,2}, 尹宗智^{1,2}

摘要 目的 分别从组织和细胞水平探究脂多糖(LPS)对妊娠子宫平滑肌收缩调控的分子机制。**方法** 将孕16 d的C57BL/6J小鼠随机分为对照组和LPS组,LPS组小鼠腹腔注射20 μg的LPS溶液建立小鼠早产模型,对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水。采用离体子宫肌条检测组织的收缩功能改变,以及收缩关键信号分子双孔钾离子通道(TREK-1)的表达及功能变化。采用原代培养的妊娠小鼠子宫平滑肌细胞,检测LPS调控下细胞TREK-1的表达变化。**结果** LPS作用下,小鼠子宫组织收缩力显著增强,收缩关键信号TREK-1蛋白表达显著降低,激活TREK-1可以使LPS组小鼠子宫组织增强的收缩力出现显著下调。然而,LPS作用于妊娠小鼠原代子宫平滑肌细胞时,妊娠子宫平滑肌中高表达的TREK-1蛋白表达并没有出现显著差异。**结论** 妊娠小鼠子宫组织在LPS作用下通过抑制TREK-1表达及功能,使子宫收缩能力加强,这可能是LPS诱发早产的作用机制之一。但LPS对小鼠妊娠子宫平滑肌细胞上TREK-1的作用可能通过细胞间信号的传递实现,并不是直接作用于子宫平滑肌细胞。提示在炎症性早产的研究中不能完全以离体细胞实验代替整体动物及组织学实验。

关键词 脂多糖;TREK-1;妊娠;子宫;平滑肌细胞;动物模型

中图分类号 R 714.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0634-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.012

早产是指妊娠28周后、37周之前发生的分娩,早产发生危害巨大^[1]。要实现早产的提前干预,需要从源头明确早产的病因。以往的研究^[2-3]表明,炎症感染与早产发生密切相关。但感染如何触发孕早期子宫平滑肌细胞收缩增强引起早产的机制尚不明确。子宫平滑肌细胞由舒张状态转变为收缩状态的过程,是分娩发动的关键节点。子宫平滑肌细胞受到特定信号的刺激,引起细胞膜去极化,产生动作电

位,导致细胞收缩。双孔钾离子通道(TWIK-related K⁺ channel 1, TREK-1)是一种双孔钾离子通道蛋白,在哺乳动物妊娠子宫中高表达,受多种理化因素调控,在开放钾离子外流及维持平滑肌细胞静息状态中发挥重要作用^[4]。然而TREK-1在炎症性早产中发挥的作用尚未可知。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理妊娠小鼠及细胞被广泛用于早产研究^[5]。该研究使用C57BL/6J小鼠和原代妊娠小鼠子宫平滑肌细胞分别建立LPS炎症模型,检测LPS处理组织的收缩变化,以及妊娠子宫平滑肌细胞上高表达的TREK-1蛋白的收缩调控作用,从组织和细胞水平探讨LPS对妊娠子宫平滑肌收缩调控的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 LPS(货号:0111:B4)、TREK-1抗体、花生四烯酸、II型胶原酶、脱氧核糖核酸酶I、牛血清白蛋白购自美国Sigma公司;GAPDH购自北京中杉金桥公司;缩宫素购自美国MedChemExpress公司;KCl购自Biosharp生物技术有限公司;RIPA裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;DAPI染色液及防荧光淬灭封片液购自北京索莱宝生物公司;多通道生理信号采集系统(型号:RM6240E)购自中国成都仪器厂;超高分辨率激光共聚焦显微镜(型号:LSM880)购自德国蔡司公司。

1.2 实验动物 C57BL/6J小鼠,SPF级,8周龄,体重为22~25 g,购自合肥青源生物科技有限公司,饲养于无特定病原体(SPF)环境,12 h的光/暗周期(07:00—19:00),自由获取食物和水。适应性饲养1周后,按雌雄2:1进行合笼,次日清晨观察有无阴道栓,若观察到阴栓记为妊娠第0天。受孕小鼠随机分为对照组、LPS组,LPS组小鼠在妊娠第16天时腹腔注射20 μg的LPS。对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水。注射8 h后以二氧化碳窒息法处死小鼠。所有动物实验均经过安徽医科大学机构动物保护与使用委员会审查和批准(伦理编号:20211044)。

1.3 原代细胞培养及处理 分离原代妊娠小鼠子

2024-02-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82271721、82071679)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

² 国家卫生健康委配子及生殖道异常研究重点实验室,合肥 230032

作者简介:汪星星,女,硕士研究生;

尹宗智,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: dr_yinzongzhi@qq.com

宫平滑肌细胞。取孕晚期小鼠子宫,用无菌刀片将子宫内膜和上皮轻轻刮离子宫肌层表面,然后用组织剪刀将子宫肌层尽量剪碎,向剪碎的子宫组织加入含Ⅱ型胶原酶、脱氧核糖核酸酶、牛血清白蛋白的细胞消化液消化,然后置于摇床上 37 ℃ 孵育 1 h。消化后的溶液经 100 μm 过滤器过滤,去除组织碎片后将滤液转移到无菌离心管中,以 1 000 r/min 离心 5 min,丢弃上层。将细胞沉淀物重悬于 10% 完全培养基中,细胞悬液置于 25 cm² 的细胞培养瓶中,置于含 5% CO₂ 37 ℃ 恒温培养箱中培养。培养 24 h 待细胞贴壁进行第 1 次换液,以后每 2~3 d 换液 1 次,待细胞融合达 80% 时用胰蛋白酶-EDTA 混合液消化传代。将小鼠子宫平滑肌细胞用不同浓度的 LPS 处理,其中 LPS(0 μg/ml)组仅用完全培养基培养 24 h,LPS(10 μg/ml)组和 LPS(20 μg/ml)组分别用含有 10 μg/ml 和 20 μg/ml LPS 的完全培养基处理 24 h。

1.4 等长收缩实验 取离体的小鼠子宫,显微镜下清除结缔组织。立即将子宫浸泡在 Krebs 液(120 NaCl,5.9 KCl,25 NaHCO₃,1.2 NaH₂PO₄,11.5 葡萄糖,2.5 CaCl₂,1.2 MgCl₂,单位:mmol/L)中备用。将子宫组织沿肌肉纵轴切成 7 mm×3 mm 大小的肌条用于收缩实验,肌条垂直悬挂在含有 5 ml Krebs 溶液的 37 ℃ 恒温水浴槽中,含 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体持续泵入 Krebs 溶液。每个子宫条的一端固定在恒温水浴槽底部,另一端连接在张力传感器上。课题组前期研究^[6]证实,子宫肌条在 2 g 拉伸时的收缩性能最优。记录等长收缩的变化,在产生稳定和规则的收缩曲线后,用 96 mmol/L KCl 和不同浓度的缩宫素(10⁻¹¹~10⁻⁶ mol/L)刺激对照组和 LPS 组小鼠的子宫肌条,并记录收缩反应。为了确定 TREK-1 是否参与 LPS 引起的子宫收缩变化,在 TREK-1 激活剂花生四烯酸(arachidonic acid, AA)(10⁻⁵ mol/L)存在的情况下进行收缩实验,最后对子宫肌条进行称重校准。采用多通道生理信号采集系统(RM6240E,中国成都仪器厂)计算收缩曲线的曲线下面积(area of the contraction curve, AUC),然后将该值除以肌肉条的质量,得到 AUC/g,定量分析子宫肌条的收缩力。

1.5 Western blot 检测蛋白表达水平 使用含有磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液分别提取各组妊娠小鼠子宫平滑肌细胞与妊娠小鼠子宫平滑肌组织的总蛋白,BCA 法检测并调整蛋白浓度,通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离总蛋白,然后将蛋白质从凝胶转移到

PVDF 膜上。将膜在用 TBST 缓冲液配置的 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h,然后在 TREK-1(1:200)兔多克隆抗体中 4 ℃ 下孵育过夜,以 GAPDH(1:2 000)作为内参。TBST 缓冲液洗去一抗,室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000)2 h;TBST 缓冲液洗去二抗,加入 ECL 发光液,曝光显影,使用 Image J 软件分析显影条带的灰度值,并对蛋白表达定量。

1.6 免疫荧光

1.6.1 组织免疫荧光 取小鼠子宫,石蜡包埋组织后切片,切片脱蜡水化后分别以 0.5% TritonX-100 通透、改进型柠檬酸钠抗原修复,PBS 清洗后以 10% 驴血清封闭 2 h,一抗(TREK-1:1:100)4 ℃ 过夜孵育。次日回收一抗,复温 40 min 后 PBS 洗涤,滴加荧光二抗室温避光孵育 2 h 后,PBS 洗涤。DAPI 孵育 10 min,PBS 洗涤后滴加防荧光淬灭剂,封片,固定,激光共聚焦成像显微镜下观察、拍照。使用 Image J 软件进行分析,并对荧光强度定量。

1.6.2 细胞免疫荧光 将细胞接种于 6 孔板内的圆形盖玻片上,按照上述分组及处理后,各组去除培养液,加入 PBS 洗涤 3 次,然后加入适量 4% 多聚甲醛固定 30 min 后弃去,PBS 洗涤后加入 0.5% TritonX-100 通透 30 min,加入 5% BSA 封闭 1 h,随后一抗(TREK-1:1:100)4 ℃ 孵育过夜;次日,回收一抗,PBS 洗涤后用荧光标记二抗避光孵育 1 h,期间注意避光操作。PBS 洗涤,DAPI 孵育 10 min,再次用 PBS 洗涤;取适量抗荧光淬灭剂滴加在载玻片上,封片,固定,用激光共聚焦显微镜观察、拍照。使用 Image J 软件进行分析,并对荧光强度定量。

1.7 统计学处理 使用软件 GraphPad Prism 8.0 分析实验数据,结果用均数±标准误($\bar{x} \pm SEM$)表示,“n”值代表受试动物的数量。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析。以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 组小鼠子宫收缩力增强 为了研究 LPS 对子宫收缩的影响,用 96 mmol/L KCl 和浓度递增的缩宫素刺激子宫肌条。LPS 组小鼠子宫肌条对 KCl 刺激反应迅速,收缩力迅速达到峰值,此后一直保持在较高水平。对照组小鼠的子宫肌条对 KCl 反应也迅速,但收缩力峰值低于 LPS 组水平。LPS 组 KCl 刺激子宫肌条 5 min 时产生的收缩力总和显著高于对照组(P<0.000 1),见图 1A。对照组和 LPS 组子宫肌条收缩力对缩宫素的响应呈浓度依赖性,

缩宫素诱导的子宫肌条收缩曲线呈周期性振荡,收缩频率随缩宫素浓度的增加而增加,收缩力峰值随缩宫素浓度的增加而增加。缩宫素处理下,LPS组诱导的子宫肌条收缩力较对照组强($F=9.242, P<0.05$),各浓度亚组缩宫素诱导的收缩均显示LPS组较对照组强($P<0.05$),见图1B。

2.2 LPS组小鼠子宫组织 TREK-1 蛋白表达降低

对妊娠小鼠子宫组织中提取的总蛋白进行 Western blot 分析,在 47 ku 位置检测到 TREK-1 对应的条带。LPS 组小鼠子宫平滑肌组织中 TREK-1 蛋白水平明显低于对照组($P<0.0001$),见图2A。同时采用免疫荧光法观察子宫平滑肌组织中的 TREK-1 表达情况,结果表明 LPS 显著降低组织中 TREK-1 的表达($P<0.0001$),见图2B。

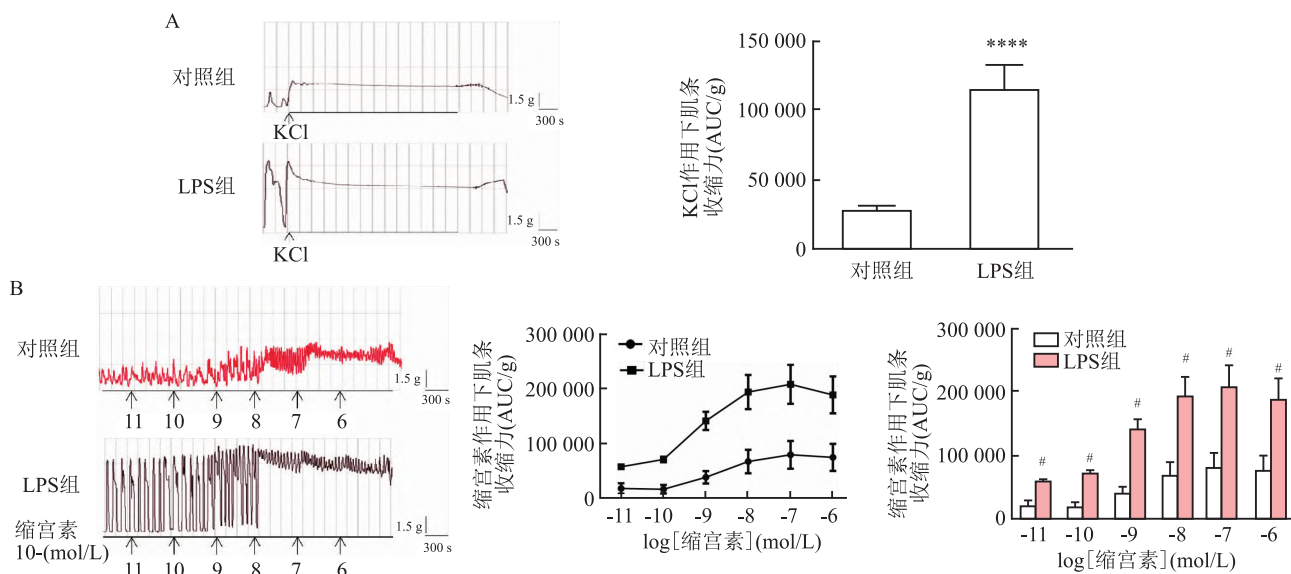


图1 妊娠小鼠子宫组织的收缩力($n=3$)

A: KCl 对对照组和 LPS 组小鼠子宫肌条收缩的影响; B: 浓度递增的缩宫素对对照组和 LPS 组小鼠子宫肌条收缩力的影响; 与对照组比较: **** $P<0.0001$; 与对照组比较: # $P<0.05$

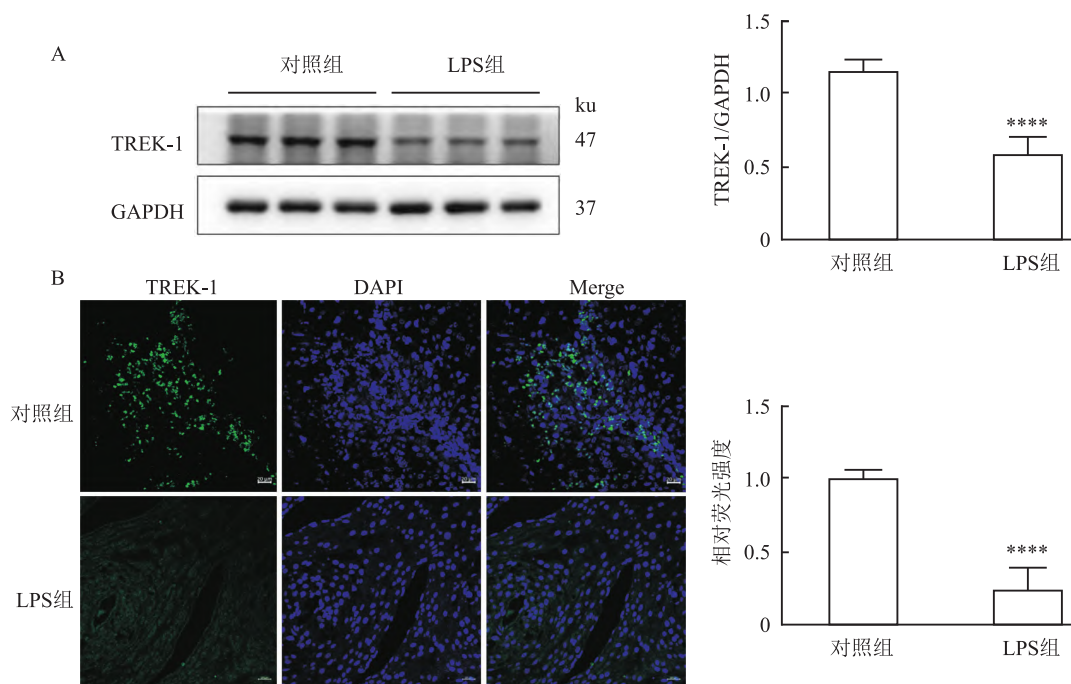


图2 TREK-1 在小鼠子宫组织中的表达 ($n=3$)

A: Western blot 检测两组 TREK-1 蛋白表达; B: 免疫荧光检测 TREK-1 在小鼠子宫平滑肌组织中的表达和位置 $\times 200$; 与对照组比较: **** $P<0.0001$

2.3 激活 TREK-1 可降低 LPS 激发的小鼠子宫收缩 为了确定子宫条之间的收缩差异是否与 TREK-1 有关,使用 TREK-1 激动剂 AA (10^{-5} mol/L) 预处理 LPS 组小鼠子宫条 1 h,与未经 AA 预处理的 LPS 组小鼠子宫肌条相比,发现 AA 可显著降低 LPS 组小鼠 KCl (图 3A, $P < 0.01$) 和缩宫素 (图 3B, $F = 18.48$, $P < 0.05$) 诱导的子宫收缩。各浓度亚组缩宫素诱导的收缩均显示加 AA 处理后子宫组织收缩减弱 ($P < 0.05$),见图 3B。

2.4 LPS 对原代妊娠小鼠子宫平滑肌细胞的 TREK-1 蛋白表达没有影响 对提取的原代妊娠小鼠子宫平滑肌细胞给予不同浓度的 LPS 刺激,Western blot 分析结果显示在 47 ku 位置检测到 TREK-1 对应的条带,但是 LPS 刺激并不能降低小鼠子宫平滑肌细胞 TREK-1 蛋白表达 ($F = 1.67$, $P > 0.05$)。采用细胞免疫荧光观察子宫平滑肌细胞 TREK-1 蛋白的表达和位置,结果显示 LPS 未对子宫平滑肌细胞 TREK-1 蛋白的表达及定位产生影响 ($F = 2.443$, $P > 0.05$)。见图 4。

3 讨论

TREK-1 是在子宫平滑肌组织中表达的双孔钾离子通道蛋白,既往研究^[6-7]表明,TREK-1 激活剂 AA 可显著降低人子宫肌条的收缩力,而在使用

TREK-1 通道特异性抑制剂 L-甲硫氨酸抑制通道功能后,大鼠子宫组织的收缩力显著增强,证实了 TREK-1 在调节子宫收缩力中的重要性。TREK-1 受温度、pH、拉伸、AA、L-甲硫氨酸、黄体酮等因素调节,有研究^[4]也证实 TREK-1 蛋白表达升高在妊娠期糖尿病患者子宫收缩减弱中起重要作用,高糖通过 TREK-1 参与了妊娠期子宫平滑肌收缩的调节。而本研究首次将 TREK-1 与炎症性早产关联,TREK-1 可能是未来调节子宫收缩力和治疗炎症性早产的潜在靶点。然而直接使用 LPS 刺激妊娠小鼠子宫平滑肌细胞发现,TREK-1 蛋白并没有出现与组织上相同的表现,这提示 LPS 通过 TREK-1 实现的收缩调控可能需要细胞间信号的作用。

细胞间相互作用是指在生物体内不同细胞之间通过信号传导、物质交换等方式进行的相互影响和调控。细胞之间可以通过配体、受体、代谢物等信号分子进行信号传递,并构成复杂的相互作用网络,从而与细胞内调控网络一并对细胞形态与功能的动态调控。细胞间相互作用在多细胞生物的发育和功能中起着至关重要的作用^[8-9]。Boros-Rausch et al^[10]在关于 LPS 诱导人子宫肌细胞炎症进而影响收缩的研究中发现,广谱趋化因子抑制剂通过抑制子宫肌细胞促炎细胞因子分泌、收缩相关蛋白表达和破坏肌细胞与组织巨噬细胞的相互作用来阻止感

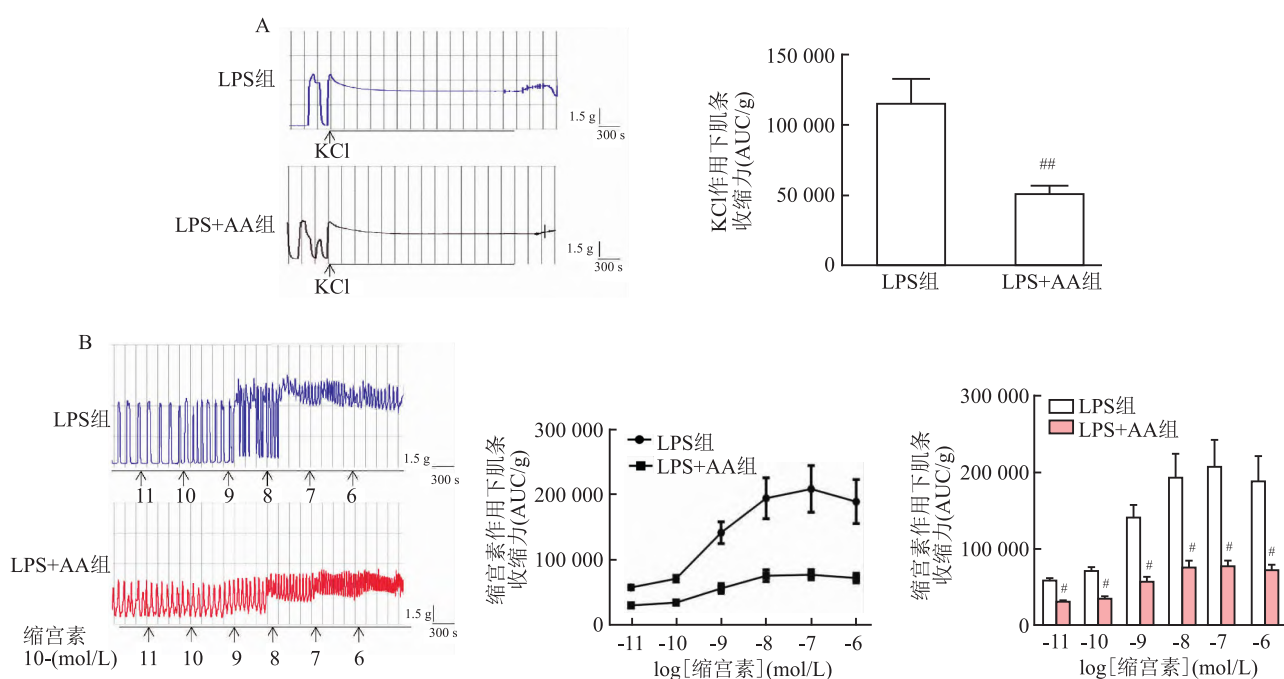
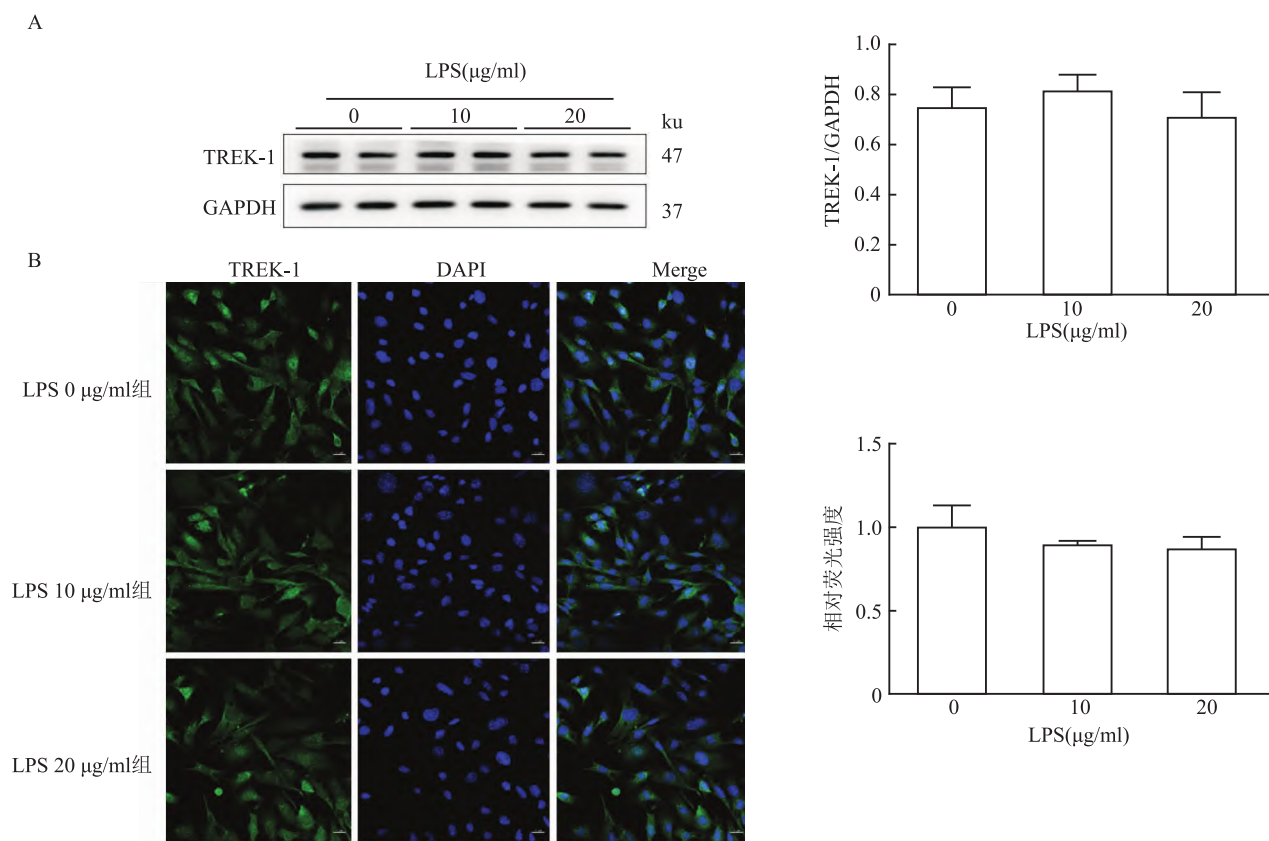


图3 TREK-1 参与的妊娠子宫收缩调控 ($n = 3$)

A: KCl 对 LPS 组和 LPS + AA 组小鼠子宫肌条收缩的影响; B: 缩宫素对 LPS 组和 LPS + AA 组小鼠子宫肌条收缩的影响; 与 LPS 组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

图4 TREK-1 在小鼠子宫平滑肌细胞中的表达 ($n=3$)A: Western blot 检测各组 TREK-1 蛋白表达; B: 免疫荧光显示 TREK-1 在小鼠子宫平滑肌细胞中的表达和位置 $\times 200$

染诱导的子宫平滑肌细胞收缩。Zhang et al^[11] 的另一项研究指出,在 LPS 诱导的小鼠早产模型中,LPS 不仅显著和特异性地诱导肌层中细胞因子 CXCL12 的表达,还可增强免疫细胞的浸润,体外研究中 LPS 处理的原代平滑肌细胞条件培养基有诱导巨噬细胞迁移、M1 极化和上调炎症相关细胞因子的作用。这些研究结果提示,LPS 对子宫平滑肌收缩的影响是通过多种细胞与细胞间相互作用实现的。大量证据表明,早产发生时子宫内胎盘、羊膜、蜕膜和子宫肌层均有炎症发生^[10,12]。在 LPS 诱导的小鼠早产模型中,可能存在子宫平滑肌与子宫内不同组织以及其内的免疫细胞、细胞因子间相互作用。通过多种细胞间相互作用,实现妊娠子宫平滑肌细胞收缩与收缩关键信号 TREK-1 蛋白的调控变化,而非 LPS 直接作用于子宫平滑肌细胞。这进一步提示,在炎症性早产研究中不能完全以离体细胞实验代替整体动物及组织学实验。离体细胞实验无法模拟复杂器官中存在的所有分子和细胞与细胞间相互作用。

综上所述,LPS 通过降低妊娠小鼠子宫组织中的 TREK-1 表达及功能,使得子宫组织的收缩能力

增强,但在细胞层面上却没有发现相同的作用,这可能与细胞间相互作用有关。然而本研究仅从组织和细胞层面对 LPS 以及相关的 TREK-1 蛋白及功能方面进行了初步的探讨,截止目前尚未发现 LPS 影响平滑肌细胞膜上 TREK-1 存在的具体细胞间信号传递通路,需要进一步研究完善。目前已知炎症感染会伴随内环境酸碱度的变化^[13],而 TREK-1 的表达受酸碱度调控^[4]。因此酸碱度是否参与炎症感染对 TREK-1 的调控是未来的重要研究方向。

参考文献

- [1] Cao G, Liu J, Liu M. Global, regional, and national incidence and mortality of neonatal preterm birth, 1990–2019[J]. JAMA Pediatrics, 2022,176(8):787.
- [2] Fettweis J M, Serrano M G, Brooks J P, et al. The vaginal microbiome and preterm birth[J]. Nat Med, 2019,25(6):1012–21.
- [3] Green E S, Arck P C. Pathogenesis of preterm birth: bidirectional inflammation in mother and fetus [J]. Semin Immunopathol, 2020,42(4):413–29.
- [4] Li T, Fei J, Yu H, et al. High glucose induced HIF-1 α /TREK1 expression and myometrium relaxation during pregnancy[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023,14:1115619.

- [5] McCarthy R, Martin-Fairey C, Sojka D K, et al. Mouse models of preterm birth: suggested assessment and reporting guidelines[J]. *Biol Reprod*, 2018,99(5):922–37.
- [6] Yin Z, He W, Li Y, et al. Adaptive reduction of human myometrium contractile activity in response to prolonged uterine stretch during term and twin pregnancy. Role of TREK-1 channel[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018,152:252–63.
- [7] Yin Z, Li Y, He W, et al. Progesterone inhibits contraction and increases TREK-1 potassium channel expression in late pregnant rat uterus[J]. *Oncotarget*, 2018,9(1):651–61.
- [8] Browaeys R, Saelens W, Saeys Y. NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes[J]. *Nat Methods*, 2020,17(2):159–62.
- [9] Armingol E, Officer A, Harisemdy O, et al. Deciphering cell-cell interactions and communication from gene expression[J]. *Nat Rev Genet*, 2021,22(2):71–88.
- [10] Boros-Rausch A, Shynlova O, Lye S J. A broad-spectrum chemokine inhibitor blocks inflammation-induced myometrial myocyte-macrophage crosstalk and myometrial contraction [J]. *Cells*, 2022,11(1):128.
- [11] Zhang L, Mamillapalli R, Habata S, et al. Myometrial-derived CXCL12 promotes lipopolysaccharide induced preterm labour by regulating macrophage migration, polarization and function in mice [J]. *J Cell Mol Med*, 2022,26(9):2566–78.
- [12] Shynlova O, Boros-Rausch A, Farine T, et al. Decidual inflammation drives chemokine-mediated immune infiltration contributing to term labor[J]. *J Immunol*, 2021,207(8):2015–26.
- [13] Weckend M J, Spinelli L M, Grylka-Baeschlin S, et al. Association between increased antenatal vaginal pH and preterm birth rate: a systematic review[J]. *J Perinat Med*, 2019,47(2):142–51.

Research on the mechanism of lipopolysaccharide involvement in regulating uterine contraction during pregnancy through TREK-1

Wang Xingxing^{1,2}, Yu Huihui^{1,2}, Li Xuan^{1,2}, Yin Zongzhi^{1,2}

[¹Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of

Anhui Medical University, Hefei 230022; ²NHC Key Laboratory of Study on

Abnormal Gametes and Reproductive Tract (Anhui Medical University), Hefei 230032]

Abstract Objective To explore the molecular mechanism of lipopolysaccharide (LPS) on the contraction of pregnant uterine smooth muscle at tissue and cellular levels. **Methods** C57BL/6J mice at 16 days of gestation were randomly divided into control group and LPS group. The mice in LPS group were intraperitoneally injected with 20 μ g in LPS solution to establish the model of preterm birth, and the mice in control group were intraperitoneally injected with the same amount of normal saline. Isolated uterine muscle strips were used to detect changes in the contractile function of the tissue, as well as changes in the expression and function of the contraction key signaling molecule TWIK-related K⁺ channel 1 (TREK-1). Primary cultured pregnant mouse uterine smooth muscle cells were used to detect the expression of TREK-1 under the regulation of LPS. **Results** The contractility of mouse uterine tissues was significantly enhanced by LPS, and the protein expression of TREK-1, a key signal for contraction, was significantly reduced, and activation of TREK-1 resulted in a significant down-regulation of the enhanced contractility of mouse uterine tissues in the LPS group. However, there was no significant difference in the expression of TREK-1 protein, which was highly expressed in the smooth muscle of pregnant mice, when LPS acted on the primary uterine smooth muscle cells of pregnant mice. **Conclusion** Uterine contractility is enhanced in pregnant mice uterine tissues by inhibiting TREK-1 expression and function in response to LPS, and it may be one of the mechanisms by which LPS induces preterm labor. However, the effect of LPS on TREK-1 on mouse pregnant uterine smooth muscle cells may be realized through intercellular signaling and not directly on uterine smooth muscle cells. This further suggests that the animal and histological experiments cannot be completely replaced by isolated cell experiments in the study of inflammatory preterm labor.

Key words lipopolysaccharide; TREK-1; pregnancy; uterus; smooth muscle cell; animal model