

网络出版时间: 2020-9-4 09:44 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200903.1447.004.html>

槲皮素通过调控 CLDN6 基因表达量对子宫内膜异位症细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制研究

黄山鹰,唐国玲,王佳慧,姚秀华,刘 凯,罗智华,刘庆芝

摘要 目的 探讨槲皮素(Que)对紧密连接蛋白6(CLDN6)的表达及子宫内膜异位症细胞增殖、迁移和侵袭的影响,并初步分析其可能作用机制。方法 选取40例子宫内膜异位症患者为研究对象,活检时切取异位子宫内膜组织,分离与培养异位子宫内膜间质细胞(EcSCs)。以不同浓度(0、12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$) Que 干预 EcSCs,通过 MTT 法检测不同浓度 Que 对 EcSCs 细胞增殖的影响,Western blot 检测增殖细胞核抗原(PCNA)与 CLDN6 蛋白表达。应用 Transwell 迁移及侵袭实验检测细胞迁移及侵袭情况。EcSCs 中转染阴性对照(si-control)、si-CLDN6,并分析沉默 CLDN6 表达对 EcSCs 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。后续实验分为4组:NC 组、Que 组、Que + pcDNA 组、Que + pcDNA-CLDN6 组,MTT 与 Transwell 迁移及侵袭实验分别检测各组 EcSCs 增殖、迁移及侵袭能力,Western blot 法检测 PCNA、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9、上皮-间质转化(EMT)及整合素连接激酶(ILK)信号通路相关蛋白表达。结果 Que 干预后 EcSCs 增殖、迁移及侵袭能力受到抑制,且呈剂量依赖性,可抑制 CLDN6、PCNA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达;沉默 CLDN6 表达后能够抑制 EcSCs 增殖、迁移及侵袭能力;Que 可抑制神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、ILK、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)蛋白表达,促进 E-cadherin 蛋白表达,但转染 CLDN6 过表达载体后可逆转 Que 对 EcSCs 增殖、迁移及侵袭的抑制作用。结论 Que 可通过抑制 CLDN6 表达而抑制子宫内膜异位症细胞增殖、迁移及侵袭,其可能作用机制为抑制 ILK 信号通路活化及 EMT 转换进程。

关键词 槲皮素;紧密连接蛋白6;子宫内膜异位症;增殖;迁移;侵袭

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)10-1497-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.004

子宫内膜异位症是临床常见妇科疾病且育龄女性的发病率较高,应用传统药物治疗子宫内膜异位症效果不佳,患者不良反应较多^[1-2]。研究^[3]表明

槲皮素(Quercetin, Que)对大鼠子宫内膜异位症模型的异位内膜具有抑制作用。紧密连接蛋白6(Claudin 6, CLDN6)在子宫内膜癌中高表达,抑制其表达可以降低子宫内膜癌细胞的增殖和迁移^[4-5]。Periostin 及大黄素可以调控子宫内膜间质细胞和异位子宫内膜间质细胞的增殖、黏附力以及迁移和侵袭能力^[6]。研究^[7]表明通过构建子宫内膜异位症体外细胞共培养模型有助于研究细胞迁移和侵袭等行为变化。该研究通过分离培养异位子宫内膜间质细胞(ectopic endometrial stromal cells, EcSCs)分析 Que 对 EcSCs 增殖、迁移及侵袭的影响,探讨其是否可通过调控 CLDN6 表达而发挥作用,为 Que 治疗子宫内膜异位症提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 Que 购自中国食品药品检定研究院;DMEM 购自美国 Sigma 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司;青霉素-链霉素混合溶液与 ECL 发光液均购自美国 Millipore 公司;兔抗人 Vimentin、E-cadherin、N-cadherin、磷酸化蛋白激酶 B(phospho-AKT, p-AKT)、总蛋白激酶 B(total-AKT, t-AKT)、整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体均购自美国 CST 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔或山羊抗鼠 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PVDF 膜购自美国 PALL 公司;LipofectamineTM2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;siRNA-CLDN6 及其阴性对照均购自上海吉玛制药技术有限公司;MTT 试剂与 DMSO 均购自美国 Sigma 公司;Transwell 小室购自美国 Corning Coster 公司;Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 病例资料 选取2016年7月~2017年3月本院收治的40例子宫内膜异位症患者,所有患者均

2020-06-08 接收

基金项目:广东省科技计划项目(编号:2010B031600197)

作者单位:南方医科大学深圳妇幼保健院妇科,深圳 518000

作者简介:黄山鹰,男,副主任医师,责任作者, E-mail: hsy0203179

@sina.com

进行腹腔镜或宫腹腔镜检查,并经手术病理确诊为卵巢子宫内膜异位症,本研究经本院伦理委员会批准,患者及家属知情且签署同意书。入选标准:年龄 25~50 岁;月经规律;无性激素相关疾病;术前均未服用避孕药等药物。排除标准:合并恶性肿瘤者;术前接受性激素治疗者。活检时切取异位子宫内膜组织,置于 -80°C 超低温冰箱内保存。

1.2.2 EcSCs 分离与培养 预冷 PBS 缓冲液冲洗异位子宫内膜组织,加入 IV 型胶原酶溶液后剪碎组织,放入 37°C 恒温振荡器内振荡消化组织,收集消化后的内膜组织置于离心管内,用 200 目筛网过滤,反复研磨冲洗后离心,制备细胞悬浮液,重悬后的细胞用 400 目筛网重新过滤,收集滤液并离心($1\,000\text{ r/min}$ 、 10 min),离心后加入含有 10% FBS 的 DMEM 完全培养基重悬细胞,将重悬细胞接种于另一培养皿,置于 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱内培养,每 2 d 更换 1 次培养液,并置于倒置显微镜下观察细胞生长状态,鉴定 EcSCs。待 EcSCs 生长融合度达到 80%~90% 时弃培养基进行传代培养,预冷 PBS 缓冲液冲洗 2 次 $\times 5\text{ min}$,加入胰蛋白酶消化细胞,当细胞收缩变圆时加入 DMEM 完全培养基消化, $1\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min 后弃上清液,加入 DMEM 完全培养液,置于恒温培养箱培养,每 2~3 d 更换 1 次培养液,待细胞稳定传代 2 次后收集细胞进行后续研究。

1.2.3 细胞转染、Que 处理及分组 将 EcSCs 细胞接种于 24 孔细胞培养板,使用不同浓度 Que 处理 EcSCs 细胞,剂量分别为 0、12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$,并筛选出 Que 适宜使用浓度用于后续研究。EcSCs 生长融合度达到 30% 时进行转染,分别将空白质粒(normal control, NC)、阴性对照质粒(si-control)、siRNA-CLDN6 质粒转染 EcSCs,观察 CLDN6 表达变化对 EcSCs 生物学行为的影响。后续实验中为明确 Que 是否通过抑制 CLDN6 而影响 EcSCs 生物学行为,实验分为 4 组:NC 组:未进行任何处理的 EcSCs;Que 组:EcSCs 中加入适宜浓度的 Que 作用 24 h;Que + pcDNA 组:EcSCs 中转染 pcDNA 质粒 12 h 后加入适宜浓度的 Que 作用 24 h;Que + pcDNA-CLDN6 组:EcSCs 中转染 pcDNA-CLDN6 质粒 12 h 后加入适宜浓度的 Que 作用 24 h。转染 6 h 后将不含 FBS 的 DMEM 培养基更换为含有 10% FBS 及青霉素-链霉素混合溶液的 DMEM 培养基。

1.2.4 Western blot 检测 CLDN6、PCNA、MMP-2、MMP-9、上皮-间质细胞转化(epithelial to mesen-

chymal transition, EMT) 及 ILK 信号通路相关蛋白表达 收集各组 EcSCs,加入 1 ml 蛋白裂解液,经 $12\,000\text{ r/min}$ 离心 20 min 提取细胞总蛋白,加入 buffer 使蛋白变性,取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳反应,转膜,脱脂奶粉封闭 1 h, 4°C 条件下孵育各蛋白一抗(CLDN6、PCNA、MMP-2、MMP-9 稀释比 1:1 000) 24 h, TBST 洗涤 4 次 $\times 5\text{ min}$, 加入二抗(稀释比 1:5 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次 $\times 5\text{ min}$, 滴加 ECL 显色,置于成像系统并用 Image J 软件分析各条带灰度值,同时以目的蛋白条带与 $\beta\text{-actin}$ 条带灰度值的比值为衡量标准,分析样品中 CLDN6、PCNA、MMP-2、MMP-9、EMT 及 ILK 信号通路相关蛋白的相对表达量。

1.2.5 MTT 检测 EcSCs 细胞增殖活性 收集对数生长期 EcSCs,胰蛋白酶消化后调整细胞密度为 5×10^4 个细胞/ml,以每孔体积 100 μl 接种于 96 孔板,Que 分别干预 24、48、72 h 时每孔加入 20 μl MTT 溶液,恒温培养箱内继续培养 4 h,弃培养基,加入 DM-SO(150 μl /孔),振荡混匀 10 min,选取 490 nm 波长应用酶标仪检测各孔光密度(optical density, OD) 值。

1.2.6 Transwell 实验检测细胞迁移 收集各组 EcSCs,用不含血清的 DMEM 培养基重悬细胞,取 200 μl 细胞悬液接种于 Transwell 小室的上室(2×10^5 个细胞/孔),同时取 600 μl 含 20% FBS 的 DMEM 培养基加入 Transwell 小室的下室,置于恒温培养箱内继续培养 48 h 后,多聚甲醛固定 20 min,结晶紫溶液染色 15 min,收集 Transwell 小室的下室内穿膜细胞,显微镜下随机选取 5 个视野计算穿膜细胞数。实验均设置 3 次生物学重复。

1.2.7 Transwell 实验检测细胞侵袭 Matrigel 基质胶稀释后铺于 Transwell 小室底部的上室面,各组 EcSCs 细胞接种于 Transwell 小室的上室,Transwell 小室的下室中加入含胎牛血清 DMEM 培养基,继续培养 48 h,其余步骤同细胞迁移实验,显微镜下观察侵袭细胞个数。实验均设置 3 次生物学重复。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据,计量资料均符合正态分布且均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验或单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的 Que 对 EcSCs 增殖、增殖相关蛋白和 CLDN6 蛋白表达的影响 用不同浓度(0、

12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ Que 处理 EcSCs,随着药物浓度的增加细胞增殖活性降低,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比,Que 浓度为 12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞增殖活性降低 ($P < 0.05$);与 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 相比,Que 浓度为 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞增殖活性降低 ($P < 0.05$)。见图 1A。Western blot 检测细胞增殖相关蛋白及 CLDN6 蛋白表达,结果显示随着 Que 浓度的增加,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比,PCNA 与 CLDN6 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$),与 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 比较,PCNA 与 CLDN6 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$),且呈剂量依赖效应,差异有统计学意义。见图 1B、1C。

2.2 不同浓度的 Que 对 EcSCs 迁移和侵袭的影响

用不同浓度 Que 处理 EcSCs 细胞,通过 Transwell

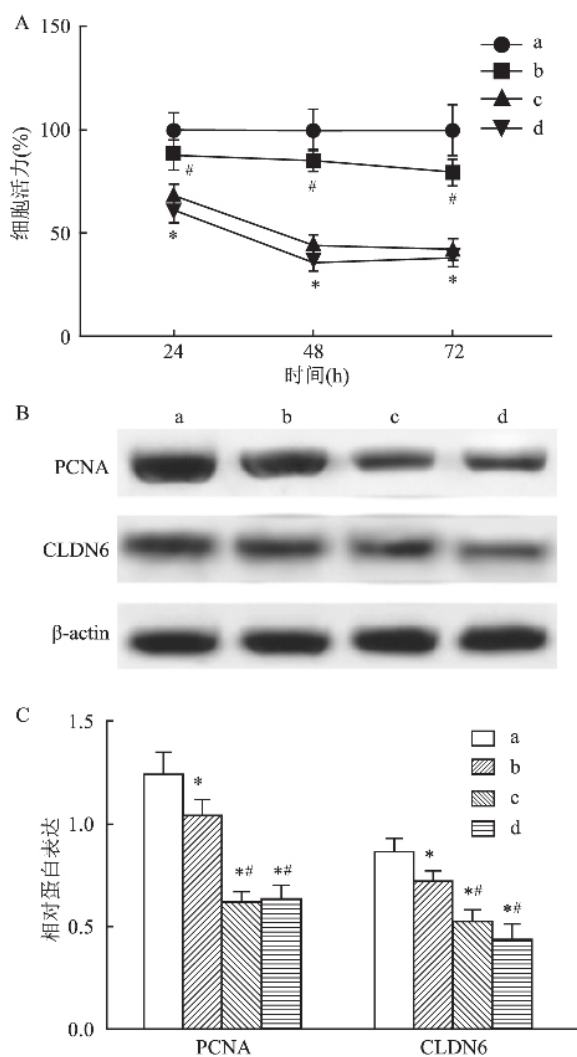


图1 不同浓度 Que 对 EcSCs 增殖、增殖相关蛋白和 CLDN6 蛋白表达的影响

A: 不同浓度 Que 抑制 EcSCs 增殖; B: Western blot 检测 EcSCs PCNA 和 CLDN6 蛋白表达; C: 不同浓度 Que 抑制 EcSCs PCNA 和 CLDN6 蛋白表达; a: 0 $\mu\text{mol/L}$; b: 12.5 $\mu\text{mol/L}$; c: 25 $\mu\text{mol/L}$; d: 50 $\mu\text{mol/L}$; 与 a 组比较: * $P < 0.05$; 与 b 组比较: # $P < 0.05$

迁移及侵袭实验检测 EcSCs 迁移及侵袭能力变化,结果显示(图 2A、2B),与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比,Que 不同浓度组 EcSCs 迁移及侵袭细胞数均减少 ($P < 0.05$);与 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 相比,Que 浓度为 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 时 EcSCs 迁移及侵袭细胞数均减少 ($P < 0.05$),而 25 $\mu\text{mol/L}$ 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 比较无明显差异,由此本研究后续实验选用 Que 浓度为 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 处理 EcSCs。Western blot 检测结果显示随着 Que 使用剂量的增加,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比较,MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2C、2D。

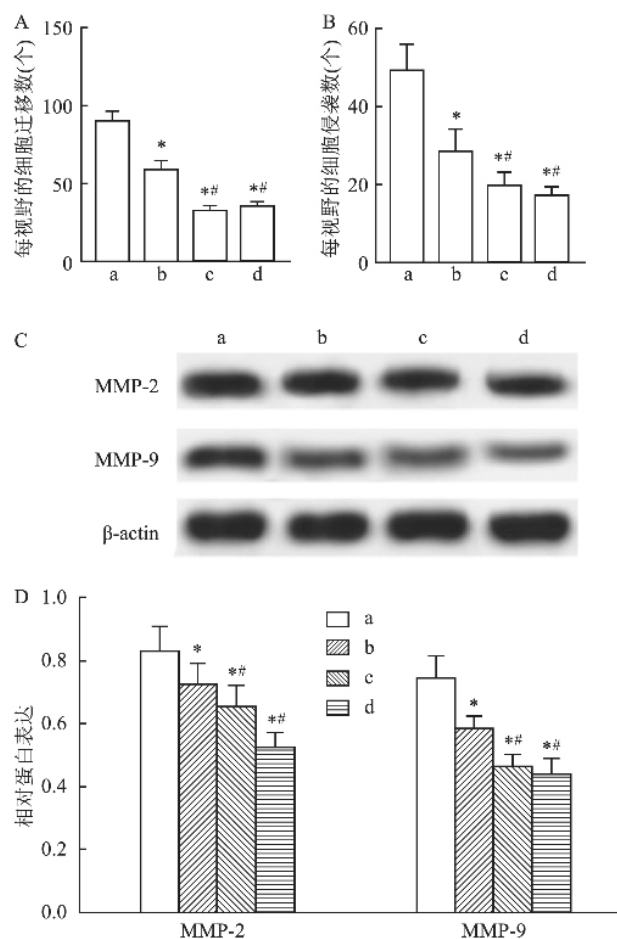


图2 不同浓度 Que 抑制 EcSCs 迁移和侵袭

A: Transwell 检测不同浓度的 Que 抑制 EcSCs 迁移能力; B: Transwell 检测不同浓度的 Que 抑制 EcSCs 侵袭能力; C: Western blot 检测 EcSCs 迁移相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达; D: 不同浓度的 Que 抑制 EcSCs 迁移相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达; 与 a 组比较: * $P < 0.05$; 与 b 组比较: # $P < 0.05$; a: 0 $\mu\text{mol/L}$; b: 12.5 $\mu\text{mol/L}$; c: 25 $\mu\text{mol/L}$; d: 50 $\mu\text{mol/L}$

2.3 沉默 CLDN6 对 EcSCs 增殖、迁移和侵袭的影响

通过脂质体转染技术沉默 CLDN6 表达并分析其对 EcSCs 增殖、迁移和侵袭的影响。Western blot

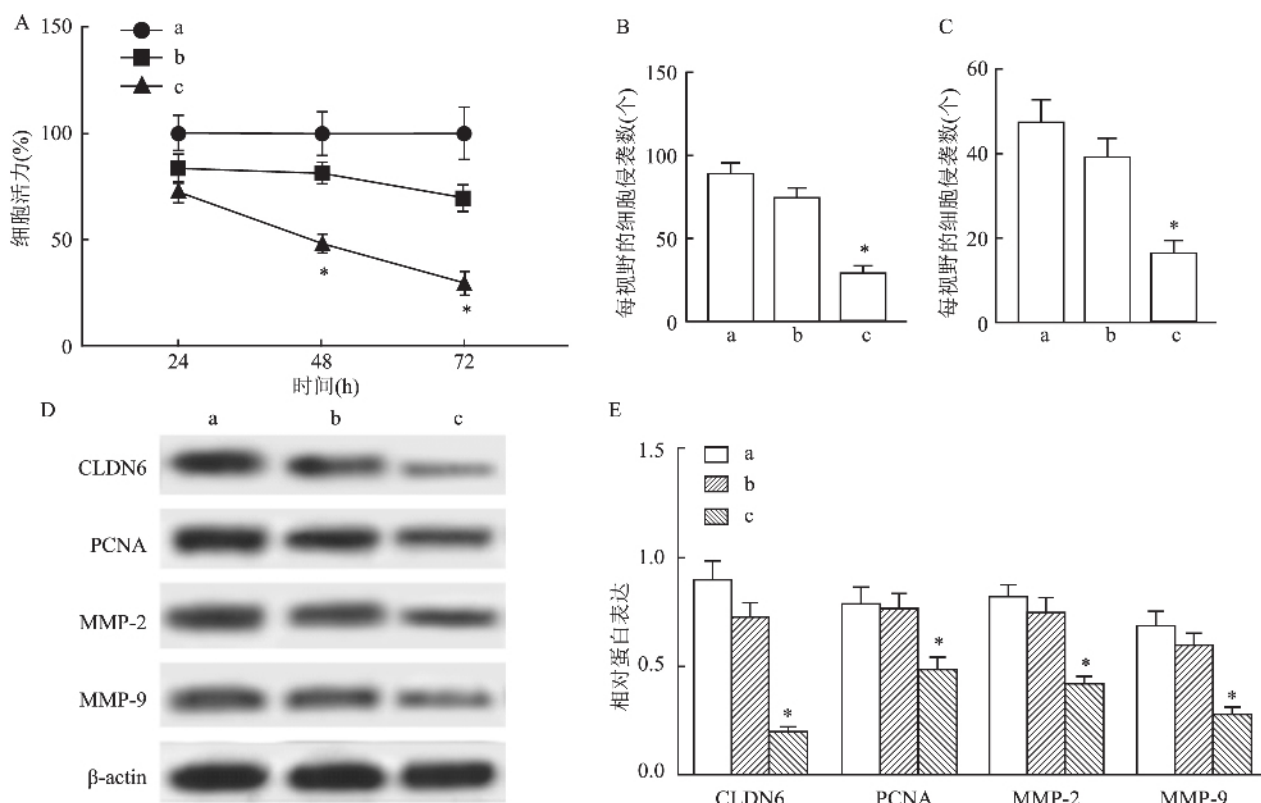


图3 沉默 CLDN6 抑制 EcSCs 增殖、迁移和侵袭的影响

A: 沉默 CLDN6 抑制 EcSCs 增殖; B: Transwell 检测沉默 CLDN6 抑制 EcSCs 迁移能力; C: Transwell 检测沉默 CLDN6 抑制 EcSCs 侵袭能力; D: Western blot 检测 EcSCs 增殖相关蛋白 PCNA、迁移相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达; E: 沉默 CLDN6 抑制 EcSCs 增殖相关蛋白 PCNA 和转移相关蛋白 MMP-2、MMP-9 表达; a: 空白组; b: 转染 si-con 组; c: 转染 si-CLDN6 组; 与转染 si-con 组比较: * $P < 0.05$

检测结果显示 si-CLDN6 组 EcSCs 中 CLDN6 表达水平低于 NC 组、si-control 组 ($P < 0.05$), NC 组与 si-control 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 NC 组、si-control 组比较, si-CLDN6 组 EcSCs 增殖活性降低 ($P < 0.05$); 与 NC 组、si-control 组比较, si-CLDN6 组迁移及侵袭细胞数减少 ($P < 0.05$), PCNA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。见图 3。表明沉默 CLDN6 后能够抑制 EcSCs 增殖、迁移及侵袭。

2.4 过表达 CLDN6 与 Que 对 EcSCs 增殖、迁移和侵袭的影响 为探究 Que 是否通过抑制 CLDN6 表达而影响 EcSCs 增殖、迁移及侵袭, 通过构建 CLDN6 过表达载体并转染 EcSCs, 随后使用 Que 处理细胞, 结果显示, 相较于 Que + pcDNA 组, Que + pcDNA-CLDN6 组 EcSCs 增殖活性升高 ($F_{72h} = 63.128, P < 0.05$), 迁移及侵袭细胞数均增加 ($P < 0.05$), PCNA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。见图 4。表明 CLDN6 可逆转 Que 对 EcSCs 增殖、迁移和侵袭的抑制作用。

2.5 过表达 CLDN6 与 Que 对 EcSCs 中 EMT 发生的影响 为探究 Que 影响 EcSCs 迁移及侵袭的作用机制, 通过 Western blot 方法检测 EcSCs 中 EMT 相关蛋白表达, 结果显示 (图 5), Que 处理 EcSCs 后 E-cadherin 蛋白表达水平升高 ($F_{E-cadherin} = 7.032, P < 0.05$), 而 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平降低 ($F_{N-cadherin} = 21.236, F_{Vimentin} = 16.665, P < 0.05$), 表明 Que 可抑制 EcSCs 细胞 EMT 转化进程。上调 CLDN6 表达后 Que + pcDNA-CLDN6 组 EcSCs 细胞 E-cadherin 蛋白表达水平 (0.350 ± 0.050) 降低 ($P < 0.05$), 而 N-cadherin (0.550 ± 0.050)、Vimentin (0.740 ± 0.080) 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。表明 CLDN6 过表达可逆转 Que 对 EcSCs 细胞 EMT 发生的抑制作用。

2.6 过表达 CLDN6 与 Que 对 EcSCs 中 ILK 信号通路的影响 探究 Que 对 ILK 信号通路的影响, 结果发现 Que 处理后 EcSCs 中 ILK、p-AKT 表达水平均降低 ($F_{ILK} = 16.405, F_{p-AKT} = 28.090, P < 0.05$), 差异有统计学意义, 表明 Que 可抑制 ILK 信号通

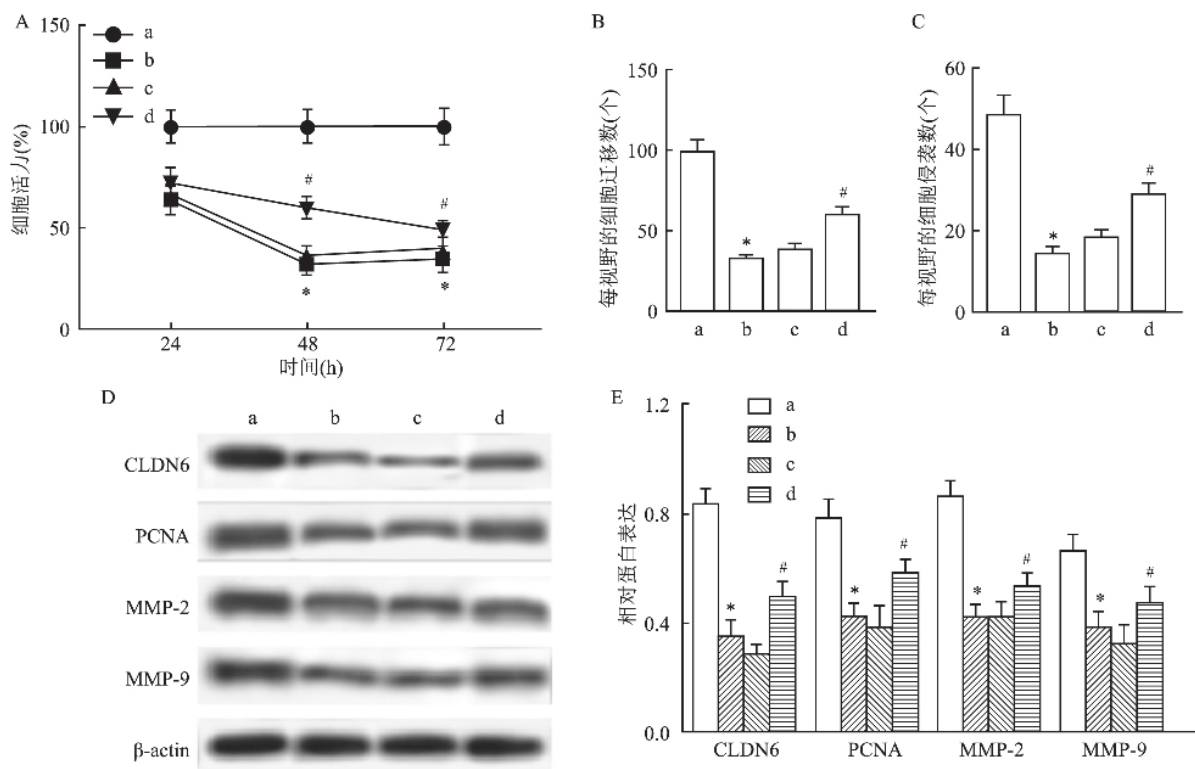


图4 过表达 CLDN6 逆转 Que 处理 EcSCs 增殖、迁移和侵袭的抑制作用

A: 过表达 CLDN6 逆转 Que 处理 EcSCs 增殖的抑制作用; B: Transwell 检测过表达 CLDN6 对 Que 处理 EcSCs 迁移能力的影响; C: Transwell 检测过表达 CLDN6 对 Que 处理 EcSCs 侵袭能力的影响; D: Western blot 检测 EcSCs 增殖相关蛋白 PCNA、迁移相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达; E: 过表达 CLDN6 对 EcSCs 增殖相关蛋白 PCNA 和转移相关蛋白 MMP-2、MMP-9 表达的影响; a: 空白组; b: Que 25 μmol/L 组; c: Que 25 μmol/L + pcDNA 组; d: Que 25 μmol/L + pcDNA-CLDN6 组; 与 a 组比较: * $P < 0.05$; 与 c 组比较: # $P < 0.05$

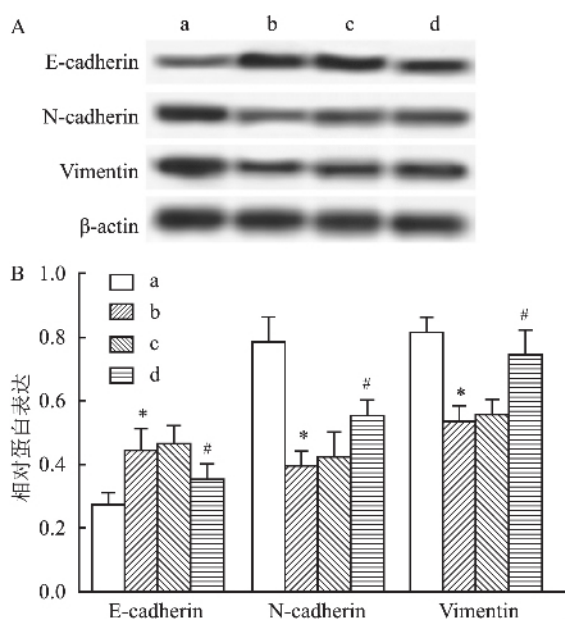


图5 过表达 CLDN6 与 Que 对 EcSCs 中 EMT 发生的影响

A: Western blot 检测 EcSCs 中 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达; B: 过表达 CLDN6 对 Que 处理 EcSCs E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 表达的影响; a: 空白组; b: Que 25 μmol/L 组; c: Que 25 μmol/L + pcDNA 组; d: Que 25 μmol/L + pcDNA-CLDN6 组; 与 a 组比较: * $P < 0.05$; 与 c 组比较: # $P < 0.05$

路。过表达 CLDN6 后发现 EcSCs 中 ILK (0.350 ± 0.050)、p-AKT (0.550 ± 0.050) 表达水平较 Que + pcDNA 组 (0.170 ± 0.060 ; 0.320 ± 0.080) 升高 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义, 而各组间 t-AKT 表达水平 (0.810 ± 0.050 ; 0.830 ± 0.050 ; 0.852 ± 0.050 ; 0.840 ± 0.080) 均无明显差异性 ($F_{AKT} = 0.252$, $P > 0.05$)。见图 6。

3 讨论

子宫内膜异位症具有极强的侵袭性与复发性, 导致其成为临床治疗难点问题^[8-9]。普通药物治疗可在一定程度上缓解疼痛但其副作用较多^[10]。因此, 寻找不良反应小且可明显降低雌激素水平的药物成为临床治疗的重要突破口。

Que 还可通过下调 MMP-2、MMP-9 等基质金属蛋白酶表达进而抑制乳腺癌细胞迁移及侵袭能力^[11]。研究^[12]指出 Que 可通过抑制 PI3K / AKT 信号转导通路进而抑制 EMT 过程。本研究用不同浓度 Que 处理 EcSCs 细胞, 结果发现随着 Que 使用剂量的增加, EcSCs 细胞增殖活性降低, PCNA 表达

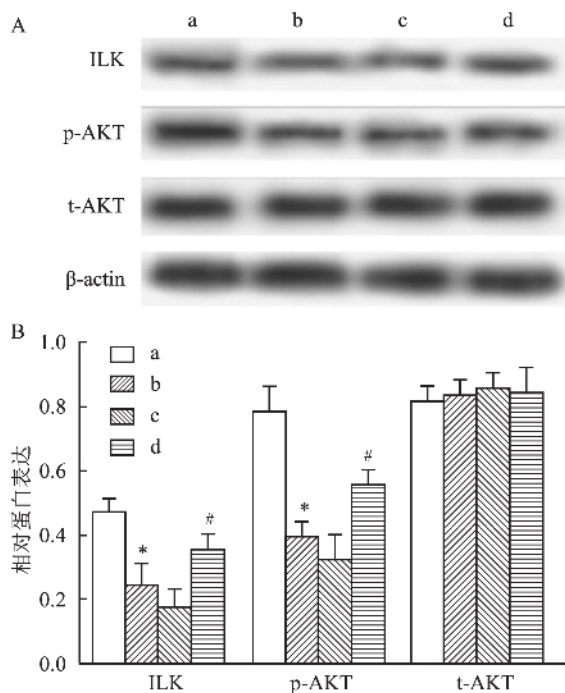


图6 过表达 CLDN6 与 Que 对 EcSCs 中 ILK 信号通路的影响

A: Western blot 检测 EcSCs 中 ILK、p-AKT 和 t-AKT 蛋白表达; B: 过表达 CLDN6 对 Que 处理 EcSCs ILK、p-AKT 和 t-AKT 蛋白表达的影响; a: 空白组; b: Que 25 μmol/L 组; c: Que 25 μmol/L + pcDNA 组; d: Que 25 μmol/L + pcDNA-CLDN6 组; 与 a 组比较: * $P < 0.05$; 与 c 组比较: # $P < 0.05$

明显下调。本研究结果提示 Que 可能通过抑制 PCNA 表达而抑制新生血管生成进而抑制子宫异位内膜细胞增殖。本研究结果发现 Que 处理 EcSCs 细胞后细胞迁移及侵袭细胞数均明显减少,并可抑制 MMP-2、MMP-9 蛋白表达,提示 Que 可能通过抑制 MMP-2、MMP-9 蛋白表达进而抑制 EcSCs 细胞迁移及侵袭。

CLDN6 作为紧密连接蛋白家族成员可在细胞连接及上皮组织通透性等方面均可发挥重要作用,研究^[13-14]表明 CLDN6 异常表达可参与乳腺癌等多种恶性肿瘤发生及发展过程,通过抑制 CLDN6 表达可抑制乳腺癌细胞迁移及侵袭。本研究结果显示沉默 CLDN6 表达后 EcSCs 细胞增殖、迁移及侵袭能力降低,PCNA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平下降,说明沉默 CLDN6 表达可抑制 EcSCs 细胞增殖、迁移及侵袭。提示 CLDN6 基因可能作为治疗子宫内异位症的潜在靶点。为验证 Que 是否可通过抑制 CLDN6 表达而抑制 EcSCs 细胞增殖、迁移及侵袭,本研究构建 CLDN6 过表达载体转染入 EcSCs 细胞,使用 Que 处理后发现 EcSCs 细胞增殖、迁移及侵袭

能力均相对增强,提示 Que 可通过抑制 CLDN6 表达而减弱 EcSCs 细胞增殖、迁移及侵袭能力,最终达到治疗目的。本研究结果显示 Que 处理 EcSCs 细胞后 E-cadherin 表达升高,而 N-cadherin、Vimentin 表达降低,说明 Que 可通过抑制 EMT 转化过程而减少异位子宫内膜间质细胞进而抑制子宫内膜异位症进展过程。同时 CLDN6 过表达后 EcSCs 细胞 E-cadherin 表达降低,而 N-cadherin、Vimentin 表达升高,说明 CLDN6 过表达可促进 EMT 进程进而促进子宫内膜异位症发展。提示 Que 可抑制 CLDN6 表达并通过抑制 EMT 转化进而减缓子宫内膜异位症发生及发展。Zheng et al^[15]研究表明 ILK 信号通路可通过促进 EMT 转换进而增强人子宫内膜基质细胞的迁移和侵袭能力。本研究结果表明 Que 处理 EcSCs 细胞后 ILK、p-AKT 蛋白表达均降低,说明 Que 可抑制 EcSCs 细胞 ILK 信号通路激活进而抑制 EMT 转换过程。进一步研究发现上调 CLDN6 表达后 ILK、p-AKT 蛋白表达均升高,说明上调 CLDN6 表达可激活 ILK 信号通路激活进而促进 EMT 转换过程。本研究结果提示 Que 可抑制 CLDN6 表达并通过抑制 ILK 信号通路进而抑制 EMT 转换过程最终抑制 EcSCs 细胞增殖、迁移及侵袭。

综上所述,Que 对 EcSCs 细胞增殖、迁移及侵袭具有抑制作用,其作用机制为通过下调 CLDN6 表达,抑制 ILK 信号通路及 EMT 转换过程而发挥作用,Que 有望成为治疗子宫内膜异位症的理想新药。但子宫内膜异位症患者临床服用效果及其在体内实验中的作用效果是否一致均需进一步证实。

参考文献

- [1] Dowlut-McElroy T, Strickland J L. Endometriosis in adolescents [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2017, 29(5): 306-9.
- [2] 何 晔, 魏兆莲. 子宫内膜异位症的治疗新进展 [J]. 国际生殖健康计划生育杂志, 2015, 34(3): 255-9.
- [3] 张 曦, 王 鑫, 王红静, 等. 槲皮素对子宫内膜异位症的抑制作用及机理探讨 [J]. 四川大学学报(医学版), 2009, 40(2): 228-31, 244.
- [4] Cao X, He G Z. Knockdown of CLDN6 inhibits cell proliferation and migration via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in endometrial carcinoma cell line HEC-1-B [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 6351-60.
- [5] 杨安强, 杨晓滨, 李 平. 脑膜瘤组织中 CLDN6 基因表达量与 MMPs/TIMPs、EMT 基因表达量的相关性研究 [J]. 海南医学院学报, 2017, 23(17): 2419-22.
- [6] 郑巧梅. Periostin 及大黄素通过 ILK 通路调控子宫内膜异位症迁移、侵袭能力的作用及机制研究 [D]. 济南: 山东大学,

- 2016.
- [7] 董 喆. 子宫内膜异位症体外细胞共培养模型的建立及细胞迁移和侵袭的研究 [J]. 北京: 中国协和医科大学, 2010.
- [8] 周 华, 齐 聪, 杨碧蓉, 等. 消瘤方对子宫内膜异位症模型大鼠子宫内膜细胞 Wnt 通路的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(4): 61–4, 68.
- [9] 郎景和. 关于子宫内膜异位症的再认识及其意义 [J]. 中国工程科学, 2009, 11(10): 137–42.
- [10] 马华姝, 乔宗旭, 赵贵芬, 等. 二甲双胍对子宫内膜异位症在位内膜细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中华妇幼临床医学杂志 (电子版), 2014, 10(5): 81–5.
- [11] 孙 怡, 顾 君. 槲皮素抑制乳腺癌细胞迁移侵袭及分子机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 1144–50.
- [12] 贾雪峰, 陈文明, 孙道萍, 等. 槲皮素抑制胃癌上皮-间质转化的研究 [J]. 海南医学院学报, 2015, 21(8): 1030–2.
- [13] Yang M, Li Y, Shen X, et al. CLDN6 promotes chemoresistance through GSTP1 in human breast cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 157.
- [14] Lu Y, Wang L, Li H, et al. SMAD2 inactivation inhibits CLDN6 methylation to suppress migration and invasion of breast cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9): E1863.
- [15] Zheng Q M, Chen X Y, Bao Q F, et al. ILK enhances migration and invasion abilities of human endometrial stromal cells by facilitating the epithelial – mesenchymal transition [J]. Gynecol Endocrinol, 2018, 34(12): 1091–6.

The mechanisms and effects of quercetin on the proliferation, migration and invasion of endometriosis cells by regulating the expression of CLDN6 gene

Huang Shanying, Tang Guoling, Wang Jiahui, et al

(Dept of Gynaecology, Shenzhen Maternal and Child Health Hospital

Affiliated to Southern Medical University, Shenzhen 518000)

Abstract Objective To investigate the effect of quercetin (Que) on the expression of claudin 6 (CLDN6) and the proliferation, migration and invasion of endometriosis cells, and then analyze its possible mechanism. **Methods**

Forty patients with endometriosis were selected. Endometrial tissue was harvested during operation, and ectopic endometrial stromal cells (EcSCs) were cultured. EcSCs were treated with Que at different concentrations (0, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$). The effects of different concentrations of Que on the proliferation of EcSCs were detected by MTT assay. The expressions of proliferating cell nuclear antigen and CLDN6 were detected by Western blot. Transwell migration and invasion assays were used to detect cell migration and invasion. Si-control and si-CLDN6 were transfected into EcSCs, and the effects of silencing CLDN6 expression on the proliferation, migration and invasion of EcSCs were analyzed. Subsequent experiments were divided into 4 groups: NC group, Que group, Que + pcDNA group, Que + pcDNA-CLDN6 group. MTT and Transwell migration and invasion assays were used to detect the proliferation, migration and invasion ability of EcSCs. Western blot was used to detect the expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, epithelial-mesenchymal transitions and integrin-linked kinase (ILK) signaling pathway-related proteins. **Results** The proliferation, migration and invasion of EcSCs were significantly inhibited by Que, which was dose-dependent and significantly inhibited the expressions of CLDN6, PCNA, MMP-2 and MMP-9. Silencing CLDN6 expression could significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of EcSCs. Que could significantly inhibit the expression of N-cadherin, Vimentin, ILK and p-AKT proteins and promote the expression of E-cadherin protein. While transfection of CLDN6 overexpression vector significantly reversed the inhibitory effect of Que on proliferation, migration and invasion of EcSCs. **Conclusion** Que can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of endometriosis cells by inhibiting the expression of CLDN6, which may inhibit the activation of ILK signaling pathway and EMT transition.

Key words quercetin; claudin 6; endometriosis; proliferation; migration; invasion