

左旋炔诺孕酮对人子宫内膜细胞体外增殖及 细胞间通讯的影响

谢梅青¹, 唐雪莲², 庄燕燕¹, 刘庆芝², 赵晓苗¹

(1. 中山大学附属第二医院妇产科, 广东 广州 510120; 2. 深圳市妇幼保健院妇产科, 广东 深圳 518028)

摘要:【目的】探讨左旋炔诺孕酮对体外培养的人子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞增殖、间隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)及连接蛋白(connexin, Cx)43、32表达的影响。【方法】采用MTT法观察LNG对人子宫内膜细胞的增殖调节作用,采用划痕染料标记示踪技术,观察左旋炔诺孕酮(levonorgestrel, LNG)对原代培养的人子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞GJIC的影响,采用激光共聚焦显微镜扫描技术,观察LNG对Cx43、Cx32表达的影响。【结果】LNG浓度为 5×10^{-5} mol/L时,对子宫内膜间质和上皮细胞均有抑制生长作用($P < 0.05$),体外培养的人子宫内膜间质细胞的GJIC功能较腺上皮细胞强($P < 0.05$),LNG可显著提高人子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞间荧光黄染料的扩散($P < 0.05$);同种Cx腺上皮细胞表达较间质细胞强($P < 0.05$),LNG对两种细胞Cx的表达没有影响($P > 0.05$)。【结论】LNG可抑制人子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞体外增殖,显著促进细胞GJIC功能,提示其在逆转子宫内膜增殖性病变的阶段扮演重要角色;LNG未影响子宫内膜细胞Cx43、Cx32的表达,提示Cx表达量不能完全反映GJIC功能。

关键词: 左旋炔诺孕酮; 子宫内膜; 间隙连接细胞间通讯; 连接蛋白

中图分类号: R711.71

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)-05-0491-05

Effect of Levonorgestrel on Proliferation and Gap Junction Intercellular Communication of Human Endometrial Cell

XIE Mei-qing¹, TANG Xue-lian², ZHUANG Yan-yan¹, LIU Qing-zhi², ZHAO Xiao-miao¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Shenzhen Municipal Maternal Hospital, Shenzhen 518028, China)

Abstract:【Objective】To explore the effects of levonorgestrel on proliferation, gap junction intercellular communication and Cx43, Cx32 expression of stromal and glandular cells in vitro. 【Methods】The effects of levonorgestrel (LNG) on the proliferation of endometrial stromal and glandular cells were detected by MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) method. The scrap loading dye transfer was used to investigate the effects of LNG on GJIC of endometrial stromal and glandular cells. The influence of levonorgestrel (LNG) on Cx43 and Cx32 expression was investigated with a laser scanning confocal microscope. 【Results】 5×10^{-5} mol/L LNG significantly depressed the proliferation of endometrial stromal and glandular cells. The ability of GJIC function was higher in the endometrial stromal cells than that of the glandular cells in vitro. 5×10^{-5} mol/L LNG leading to greater GJIC after 48h ($P < 0.05$). Cx32 expressions in endometrial stromal and glandular cells were significantly higher than Cx43. 5×10^{-5} mol/L LNG had no effect on Cx expression. 【Conclusions】LNG could inhibit the proliferation of endometrial stromal and glandular cells in vitro. The function of LNG s up-regulation on GJIC of endometrial stromal and glandular cells may be one of mechanisms which invert endometrial hyperplasia. LNG had no effect on Cx expression of endometrial stromal and glandular cells, which indicates Cx expression could not completely reflect GJIC function in vitro.

Key words: levonorgestrel; endometrium; gap junction intercellular communication; connexin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):491-495]

收稿日期: 2006-04-15

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2004年编号31740)

作者简介: 谢梅青(1964-)女, 福建顺昌人, 博士, 副教授. E-mail: mqxieqz@yahoo.com.cn

细胞间隙连接 (gap junction, GJ) 是生物体内细胞间直接进行物质和信息交换的重要通道, 为细胞间通讯提供细胞间信号传递的特殊跨膜亲水性通道^[1], 由这种通道直接进行信息物质交换而形成的信息交流方式称为间隙连接细胞间通讯 (gap junction intercellular communication, GJIC)。GJIC 对细胞的新陈代谢、增殖和分化等生理过程起重要的调控作用^[2]。子宫内膜腺上皮细胞、间质细胞均存在间隙连接, 连接蛋白是间隙连接的基本组成单位, 子宫内膜 Cx 表达受性激素调节^[3]。我们以往的研究发现: 将 LNG-IUD (一种环臂上含有 LNG 的型节育环) 用于治疗子宫内膜增生过长, 子宫内膜病理学观察显示置环 3-6 个月就能使增生过长的子宫内膜逆转^[4]。近几年来, 陆续有研究报道 GJIC 功能及 Cx 与细胞异常增殖和肿瘤发生的关系, GJIC 功能的减弱或丧失已在许多器官的恶性肿瘤细胞中得到明确的证实^[5]。目前, 尚未见抗子宫内膜增殖激素左旋炔诺孕酮 (levonorgestrel, LNG) 等孕激素对体外培养的子宫内膜细胞 GJIC 功能及 Cx 表达影响的研究报道。我们拟在体内研究及细胞增殖抑制试验的基础上, 研究 LNG 对体外培养的子宫内膜细胞 GJIC 功能及 Cx 表达影响, 为探索子宫内膜异常增殖的发生机制以及寻找新的防治措施提供研究依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2003 年 6 月至 2004 年 4 月在我院因子宫肌瘤行全子宫切除的患者 20 例, 36-48 岁, 术前 3 个月未用激素, 月经周期规律 (28-32 d)。术中获取子宫内膜, 之后立即投入盛有 5 mL PBS 的无菌青霉素瓶内, 低温条件下迅速转移到实验室进行分离培养。术后病理诊断未发现子宫内膜存在病变。

1.2 主要试剂

左旋炔诺孕酮; 荧光黄染料 (lucifer yellow, LY); 氟波酯 (TPA); D-MEM/F-12; 胶原酶; 二甲基亚砜 (DMSO); 胎牛血清。

1.3 主要实验仪器

倒置显微镜: 德国 Leica; 荧光显微镜: 德国 Leica TCS ST 型; 图像分析系统: 德国 Kontron 公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养方法 原代细胞培养的方法为差速贴壁法^[6]: 将子宫内膜组织剪成碎块, 加入 1 g/L 的胶原酶, 混匀 37℃ 水浴 60 min, 筛网过滤, 将滤液及滤膜上组织及细胞收集离心分别接种, 利用差速贴壁法纯化腺上皮细胞及间质细胞。

1.4.2 LNG 对人子宫内膜细胞的增殖调节作用 采用 MTT 法, 原代细胞铺满瓶底后, 消化成单细胞悬液, 细胞均调至 2×10^4 /mL, 接种 96 孔板, 培养 48 h 后, 分别加入含 LNG 及 TPA 的培养液 (LNG 及 TPA 溶于 DMSO 中), LNG 终浓度为 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 2.5×10^{-5} 、 5×10^{-5} mol/L, TPA 终浓度为 10 ng/mL, 每个浓度设 4 个重复孔。另设对照孔, 分别培养 24, 48 及 72 h, 在培养终止前 4 h 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L, 继续培养 4 h, 弃培养液, 每孔加二甲基亚砜 150 μ L, 振荡溶解蓝色甲瓖, 在酶标仪上测定光密度 (A) 值, 测定波长为 492 nm。

1.4.3 细胞缝隙连接通讯功能测定 采用划痕染料标记示踪技术, 将细胞接种于直径为 35 mm² 的培养皿中生长至基本融合, 加入 1×10^{-7} 、 5×10^{-5} mol/L LNG 作用 48 h 后, 10 ng/mL TPA 作用 2 h 后 (目前, 有大量文献报道 TPA 可抑制多种细胞 GJIC 的功能, 我们增加 TPA 作为对照), 加入 2 mL 0.5 g/L 的荧光黄染料, 用手术刀片在平皿底部轻轻划线数条, 然后将平皿置于 37℃ 接触染料 10 min, 吸出染液, 再用 PBS 洗 3 次, 置于荧光显微镜下观察细胞间荧光黄染料的扩散情况并拍照。对实验结果采用德国 KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统计算照片上划痕两侧 50 mm \times 60 mm 范围内荧光染料扩散的面积作定量分析。

1.4.4 激光共聚焦显微镜检测 Cx 表达 将原代子宫内膜细胞消化后, 盖片法培养细胞。细胞长至 50% 加入 1×10^{-7} 、 5×10^{-5} mol/L LNG 和 10 ng/mL TPA, 设阴性对照。作用 48 h 后予 40 g/L 多聚甲醛固定。分别滴加鼠抗 Cx43 mAb (1:80)、Cx32 mAb (1:80)。4℃ 冰箱过夜。滴 FITC 标记羊抗鼠 IgG (1:200), 37℃ 孵育 1 h。无荧光缓冲甘油封片, 用 488 nm 波长激发 FITC, 扫描并存储图像, 将上述染色爬片在激光共聚焦显微镜上进行 Cx43 和 Cx32 定位和定量分析。

1.5 统计学处理

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据用 SPSS 11.0 统计软件处理, 组间比较用方差分析及配对 t 检验, 检验水

准 =0.05。

LNG 浓度为 5×10^{-5} mol/L 时, 对子宫内 膜间质和上皮细胞均有抑制生长作用, 并有随作用时间延长, 抑制作用加强的趋势(表 1)。

2 结 果

2.1 LNG 对子宫内 膜细胞的增殖调节作用

表 1 LNG 对子宫内 膜细胞的增殖调节作用

Table 1 The effects of levonorgestrel on the proliferation of endometrial cells (MTT method) (n=20, $\bar{x} \pm s$)

Group(mol/L)	Endometrial stromal cells(A=492 nm)			Endometrial glandular cells(A=492 nm)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1×10^{-9} LNG	0.276 \pm 0.062	0.341 \pm 0.091	0.407 \pm 0.114	0.269 \pm 0.077	0.295 \pm 0.072	0.303 \pm 0.079
1×10^{-5} LNG	0.269 \pm 0.077	0.345 \pm 0.083	0.388 \pm 0.100	0.262 \pm 0.045	0.281 \pm 0.071	0.292 \pm 0.068
2.5×10^{-5} LNG	0.267 \pm 0.071	0.331 \pm 0.068	0.374 \pm 0.105	0.260 \pm 0.063	0.271 \pm 0.053	0.287 \pm 0.068
5×10^{-5} LNG	0.228 \pm 0.094 ¹⁾	0.218 \pm 0.072 ¹⁾	0.210 \pm 0.057 ¹⁾	0.254 \pm 0.072 ¹⁾	0.243 \pm 0.058 ¹⁾	0.231 \pm 0.067 ¹⁾
10 ng/mL TPA	0.278 \pm 0.094	0.327 \pm 0.102	0.389 \pm 0.117	0.274 \pm 0.065	0.282 \pm 0.077	0.296 \pm 0.079
Control group	0.286 \pm 0.078	0.336 \pm 0.098	0.396 \pm 0.125	0.277 \pm 0.075	0.289 \pm 0.053	0.301 \pm 0.061

A=492 nm; Compared with control, 1) P=0.0001, the other LNG of different concentrations and 10 ng/mL TPA compared with control P>0.05

2.2 LNG 对细胞 GJIC 功能的影响

细胞划痕染料标记示踪实验的结果可以看出, 对照组细胞的 GJIC 功能正常, 荧光黄染料在细胞间的扩散距离较远。TPA 可显著抑制荧光黄染料

在细胞间的扩散。浓度为 5×10^{-5} mol/L 的 LNG 作用 48 h 可明显促进荧光黄染料在间质细胞及腺上皮细胞间的扩散 5×10^{-5} mol/L (见表 2, 图 1, 2)。

表 2 LNG、TPA 对子宫内 膜细胞的荧光染料扩散作用的面积 (n=6)

Table 2 The effects of LNG and TPA on the scrap loading dye transfer of endometrial cells

Group	Endometrial stromal cells	P	Endometrial glandular cells	P
LNG 1×10^{-7} mol/L	946.76 \pm 56.47	0.675	248.29 \pm 86.13	0.632
LNG 5×10^{-5} mol/L	1266.82 \pm 230.82 ¹⁾	0.001	357.52 \pm 33.69 ¹⁾	0.001
TPA 10 ng/ml	43.3 \pm 5.53 ¹⁾	0.0001	45.93 \pm 2.63 ¹⁾	0.0001
Control group	992.4 \pm 70.29		224.86 \pm 72.00	

LNG (5×10^{-5} mol/L) leading to greater GJIC after 48 h 1) P< 0.05, TPA down- regulate GJIC function of endometrial stromal and glandular cells 2)P< 0.01

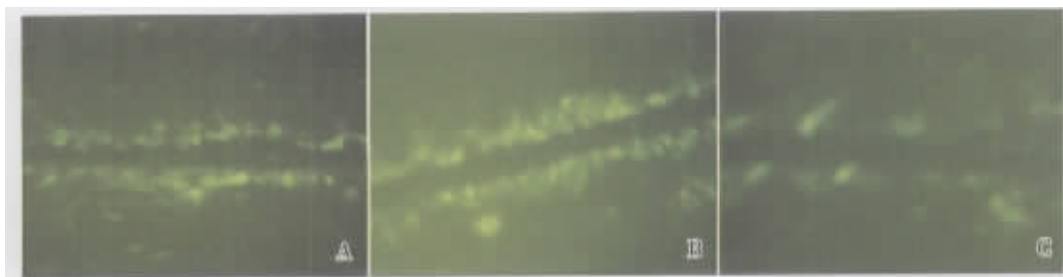


图 1 荧光黄染料在子宫内 膜腺上皮细胞的扩散距离

Fig.1 Scrap loading dye transfer was used to investigate the GJIC function of endometrial glandular cells($\times 200$)

A: control group; B: LNG; C: TPA



图 2 荧光黄染料在子宫内膜间质细胞的扩散距离

Fig. 2 The scrap loading dye transfer was used to investigate the GJIC function of endometrial stromal cells(×200)

A: control group; B: LNG; C: TPA

2.3 LNG 对子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞 Cx43、Cx32 表达的影响

Cx43、Cx32 在两种细胞的膜浆上都有表达, Cx32 在上皮及间质的表达较 Cx43 的表达强, 同

种 Cx 腺上皮细胞表达较间质细胞强 (P<0.05), 1 × 10⁻⁷, 5 × 10⁻⁵ mol/L LNG, 10 ng/mL TPA 作用间质及腺上皮细胞 48 h 后 Cx43、Cx32 表达没有明显变化 (P > 0.05)(见表 3,4,图 3)。

表 3 LNG、TPA 对子宫内膜细胞 Cx43 表达的影响

Table 3 The influence of levonorgestrel and TPA on Cx43 expressions of endometrial cells A=492nm(n=12)

Group	Endometrial stromal cells	P	Endometrial glandular cells	P
LNG 1 × 10 ⁻⁷ mol/L	27.43 ± 4.42	0.523	38.51 ± 4.61	0.573
LNG 5 × 10 ⁻⁵ mol/L	27.99 ± 4.53	0.632	37.85 ± 2.79	0.483
TPA 10 ng/ml	26.18 ± 4.91	0.345	37.48 ± 2.68	0.783
Control group	26.52 ± 4.68		35.87 ± 5.07	

表 4 LNG、TPA 对子宫内膜细胞 Cx32 表达的影响

Table 4 The influence of levonorgestrel and TPA on Cx32 expressions of endometrial cells A=492nm(n=12)

Group	Endometrial stromal cells	P	Endometrial glandular cells	P
LNG 1 × 10 ⁻⁷ mol/L	42.38 ± 4.39	0.756	58.40 ± 4.53	0.674
LNG 5 × 10 ⁻⁵ mol/L	43.02 ± 3.77	0.547	60.06 ± 5.67	0.578
TPA 10 ng/ml	42.40 ± 4.83	0.698	59.56 ± 4.26	0.599
Control group	43.50 ± 4.13		61.37 ± 7.05	

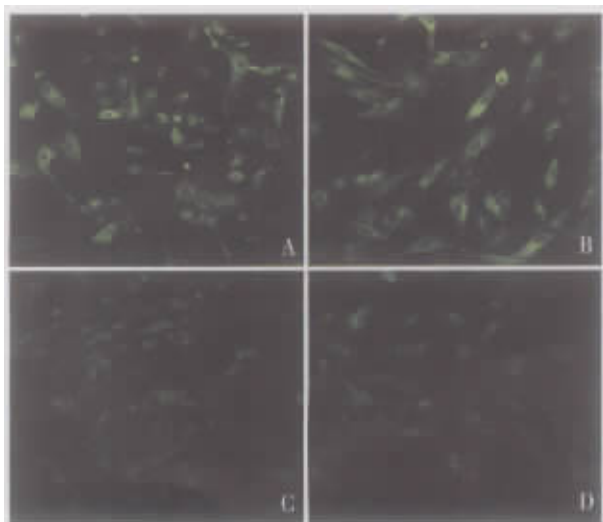


图 3 子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞的 Cx 表达

Fig. 3 Expression of connexin in endometrial glandular and stromal cells

A: glandular cells (Cx32); B: stromal cells(Cx32); C: glandular cells(Cx43); D: stromal cells(Cx43)

3 讨 论

雌激素和孕激素是影响子宫内膜功能最重要的因素, 雌激素在体内具有使子宫内膜增生的作用, 孕激素可使子宫内膜由增生期转变为分泌期, 长期使用孕激素可使子宫内膜萎缩。本研究发现 LNG 对子宫内膜细胞没有促进增殖作用, 这与 Hokaiwado 等^[7]研究孕酮对子宫内膜细胞没有促进增殖作用相似, 5 × 10⁻⁵ mol/L LNG 抑制子宫内膜细

胞增殖,可以认为,当 LNG 的浓度增大到一定程度时候,其抑制子宫内膜细胞增殖作用显著增强,这与临床上使用 LNG-IUD 治疗子宫内膜增生过长,宫腔内局部药物浓度较高,效果较好具有一致性。

GJIC 异常是癌症发生的重要机制之一,已有的研究显示肿瘤和转化细胞普遍存在间隙连接通讯的缺陷。细胞在发生过度增殖过程中,发生 GJIC 功能紊乱和下降,细胞间接触抑制作用的丧失,使前肿瘤细胞或转化细胞失去周围正常细胞的调控而获得自主性生长,是导致癌变的不可忽视的重要因素。GJIC 功能的抑制被认为是促癌变阶段的重要机制。

目前未见 TPA 对体外培养的子宫内膜细胞 GJIC 影响的研究报告,有研究报道 TPA 通过 PKC 所介导的 Cx43 过磷酸化,而导致大鼠肝上皮细胞 GJIC 的抑制^[8]。本研究将 10 ng/mL TPA 作用于体外培养的子宫内膜细胞发现 GJIC 功能下降,因此我们认为 TPA 对体外培养的子宫内膜细胞 GJIC 功能的下调作用与其促进子宫内膜细胞癌变有可能有一定的相关性,有待我们进行动物试验进一步研究。本研究将 5×10^{-5} mol/L 的 LNG 作用于子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞后作用后, GJIC 功能上调,因此,我们认为抗子宫内膜增殖激素—左炔诺孕酮能促进子宫内膜细胞凋亡并能促进 GJIC 的功能,根据促癌物抑制 GJIC,而抗癌作用的物质则提高 GJIC,左炔诺孕酮对子宫内膜细胞的 GJIC 功能的上调,很可能是逆转子宫内膜增殖性病变的机制之一。

目前,大多数关于 Cx 的研究认为, Cx 表达下调会导致细胞的过度增殖。分子水平的研究显示,促癌剂抑制细胞 GJIC 功能,可发生于 Cx 的转录、翻译以及翻译后水平。Cx 的转录受抑,蛋白表达下降; Cx 翻译后的加工(主要是 Cx 磷酸化)对 GJIC 具有重要作用,通过诱导新的 Cx 磷酸化形式,影响通道的通透性,而 Cx 的表达并不一定有改变^[9]。

我们将 LNG 及 TPA 作用于子宫内膜细胞后 GJIC 功能上调, TPA 作用于子宫内膜细胞后 GJIC 功能下调,但 Cx 的表达没有明显变化,考虑可能与细胞的磷酸化状态有关,现有的免疫组化法、免

疫印迹法检测到的连接蛋白的总体含量变化,可能不能完全反映 GJIC 的功能改变,这有待我们进一步研究。

参考文献:

- [1] SEGRETAIN D, FALK M M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1662(1-2): 3-21.
- [2] SALAMEH A, DHEIN S. Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1719(1-2): 36-58.
- [3] GRANOT I, DEKEL N, BECHOR E, et al. Temporal analysis of connexin43 protein and gene expression throughout the menstrual cycle in human endometrium [J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(2): 381-386.
- [4] 谢梅青,翁梅英,郭璇华,等.宫内缓释左炔诺酮治疗子宫内膜增生过长及其对内膜病理影响[J]. *中山大学学报*, 2002, 23(4): 281-283.
- [5] KING T J, FUKUSHIMA L H, YASUI Y, et al. Inducible expression of the gap junction protein connexin43 decreases the neoplastic potential of HT-1080 human fibrosarcoma cells in vitro and in vivo [J]. *Mol Carcinog*, 2002, 35(1): 29-41.
- [6] 唐雪莲,谢梅青,张凤丽.高纯度分离子宫内膜腺上皮及间质细胞和体外培养技术[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2003, 24(6): 589-595.
- [7] HOKAIWADO N, ASAMOTO M, OGAWA K, et al. Transgenic disruption of gap junctional intercellular communication enhances early but not late stage hepatocarcinogenesis in the rat [J]. *Toxicol Pathol*, 2005, 33(6):695-701.
- [8] CARRUBA G, COCCIADAFERRO L, BELLAVIA V, et al. Intercellular communication and human hepatocellular carcinoma [J]. *Ann N Y Acad Sc*, 2004, 1028:202-212.
- [9] RIVEDAL E, OPSAHL H. Role of PKC and MAP kinase in EGF - and TPA -induced connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells [J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(9): 1543-1550.

(编辑 张恩健)