

左旋-18-甲基炔诺孕酮通过雌激素-Notch 信号轴 对子宫内膜干细胞活性的影响^{*}

李岷鸿 李细艳 许发亚 何琪 古衡芳 莫俊 沈璇 涂皎

(遵义医科大学附属妇幼保健院·遵义市妇幼保健院, 贵州 遵义 563000)

【摘要】 目的 研究左旋-18-甲基炔诺孕酮(LNG)通过雌激素-Notch 信号轴对子宫内膜干细胞活性(EMSCs)的影响。**方法** 将 60 只小鼠随机取 10 只作为假手术组, 剩余 50 只小鼠成功造模子宫内膜异位症模型。将模型鼠随机分为 5 组, 模型组不作处理, LNG 组注射 LNG, LNG+ER 组注射 LNG 和转染的 ER- α cDNA, LNG+ER+ siNC 组注射转染了 LNG、ER- α cDNA 和 siRNA NC 质粒, LNG+ER+siNotch1 组注射 LNG 和转染的 ER- α cDNA 和 Notch1 siRNA 质粒。体外细胞实验: 取假手术和异位模型小鼠子宫内膜全层组织进行细胞提取和培养分为 5 组, 将模型细胞分为模型组不作处理, LNG 组加入 LNG, LNG+ER 组加入 LNG 并转染 ER- α cDNA, LNG+ER+NC 组加入 LNG 并转染 ER- α cDNA 和 siRNA NC, LNG+ER+siNotch1 组加入 LNG 并转染 ER- α cDNA 和 Notch1 siRNA 质粒。以上 5 组均加入等量雌激素。假手术组获取的 EMSCs 细胞不做任何处理, 作为空白组。观察雌激素与 ER-Notch 信号轴之间的关系, 将体外模型中获取的异位内膜 EMSCs 在 96 板孔中培养, 获取生长良好的细胞, 分为 4 组, 对照组不作处理, 雌激素组(E2)加入外源性雌激素 17 β -雌二醇(E2), 雌激素受体抑制剂组(ICI)加入雌激素受体抑制剂 ICI 及等量 E2, Notch 抑制剂组加入 Notch 信号阻断剂 DAPT 及等量 E2。观察小鼠病理和血管密度变化, 检测 EMSCs 的增殖迁移和分化情况及雌激素、ER、Notch1、Hes1、hey2 表达情况。**结果** 与假手术组比较, 模型组小鼠雌激素、ER- α 、Notch1、Hes1、Hey2 水平和血管密度、EMSCs、增值率、迁移率、分化率显著升高($P<0.05$)。雌激素、ER- α 、Notch1、Hes1、Hey2 和血管密度、EMSCs、增值率、迁移率、分化率在 LNG 组显著低于模型组($P<0.05$)。与 LNG 组比较, ER- α 、Notch1、Hes1、Hey2 和血管密度、EMSCs、增值率、迁移率、分化率在 LNG+ER 组较 LNG 组显著增加($P<0.05$)。与 LNG+ER 组比较, ER- α 、Notch1、Hes1、Hey2、EMSCs、增值率、迁移率、分化率在 LNG+ER+siNotch1 组显著降低($P<0.05$)。LNG+ER 组和 LNG+ER+NC 组比较无显著差异($P>0.05$)。使用雌激素 E2 后, E2 组雌激素、ER- α 、Notch1 表达较对照组显著增加, 细胞增值率, 迁移率分化率均增加。使用 ER 抑制剂后, E2+ICI 组 ER、Notch1 表达, 细胞增值率, 迁移率分化率较 E2 组显著低, 使用 Notch1 信号阻断剂后 Notch1 表达较 E2 组显著降低, 细胞增值率、迁移率、分化率均降低($P<0.05$)。**结论** LNG 可能通过下调雌激素-Notch 信号轴降低子宫内膜干细胞活性, 进而实现抑制子宫内膜异位发展的作用。

【关键词】 左旋-18-甲基炔诺孕酮; 雌激素; Notch 信号轴; 子宫内膜干细胞; 子宫内膜异位

【中图分类号】 R711.71 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2025.05.003

Experimental study on the inhibition of endometriosis by L-18-methyl Inorethisterone through down-regulating the estrogen Notch signal axis and reducing the activity of stem cell activity

LI Minhong, LI Xiyan, XU Faya, HE Qi, GU Hengfang, MO Jun, SHEN Xuan, TU Jiao

(Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China)

【Abstract】 Objective To investigate the impact of levonorgestrel (LNG) on endometrial stem cell (EMSC) activity via the estrogen-Notch signaling axis. **Methods** 60 rats were divided into control group with sham surgery (10 rats) and model of endometriosis (50 rats). The modeled rats were then randomly divided into five groups: untreated model group,

基金项目: 遵义市科技局与遵义市妇幼保健院联合项目[遵市科合 HZ 字(2020)283 号]

通信作者: 涂皎, 主任医师, E-mail: tj228887@126.com

引用本文: 李岷鸿, 李细艳, 许发亚, 等. 左旋-18-甲基炔诺孕酮通过雌激素-Notch 信号轴对子宫内膜干细胞活性的影响[J]. 西部医学, 2025, 37(5): 636-642. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2025.05.003

LNG group receiving LNG injections, LNG+ER group given LNG and transfected with ER- α cDNA, an LNG+ER+siNC group transfected with LNG, ER- α cDNA, and siRNA NC plasmid, and an LNG+ER+siNotch1 group transfected with LNG, ER- α cDNA, and Notch1 siRNA plasmid. Parallel in vitro experiments were conducted using EMSCs isolated from both sham surgery and endometriosis model mice, which were cultured and divided into similar treatment groups, all with added estrogen. Sham surgery-derived EMSCs served as an untreated blank control. Observations focused on the interplay between estrogen and the ER-Notch signaling pathway. Cultured EMSCs from ectopic endometrium were further grouped into four: control group, estradiol (E2) group receiving exogenous 17 β -estradiol, E2+ICI group treated with estrogen receptor inhibitor ICI plus E2, and Notch inhibition group treated with the Notch signal blocker DAPT along with E2. Pathological changes, vascular density, and EMSC proliferation, migration, differentiation, as well as estrogen, ER, Notch1, Hes1, and Hey2 expression levels, were assessed. **Results** Indicated that compared to the sham surgery group, the model group showed significantly elevated levels of estrogen, ER- α , Notch1, Hes1, Hey2, vascular density, EMSC counts, proliferation, migration, and differentiation rates ($P<0.05$). These parameters were significantly reduced in the LNG group compared to the model group ($P<0.05$). When compared to the LNG group, the LNG+ER group exhibited significant increases in ER- α , Notch1, Hes1, Hey2, vascular density, EMSC activity, and proliferation, migration, and differentiation rates ($P<0.05$). However, these increases were reversed in the LNG+ER+siNotch1 group, showing significantly lower levels than the LNG+ER group ($P<0.05$), with no significant difference observed between the LNG+ER and LNG+ER+NC groups ($P>0.05$). Supplementation with E2 led to significant increments in estrogen, ER- α , Notch1 expression, and cellular activities. Conversely, application of the ER inhibitor ICI or the Notch inhibitor DAPT alongside E2 resulted in significant decreases in ER and Notch1 expression and cellular proliferation, migration, and differentiation rates ($P<0.05$). **Conclusion** LNG can reduce the activity of endometrial stem cells by down regulating estrogen Notch signal axis, so as to inhibit the development of endometriosis.

【Key words】 LNG; Estrogen; Notch signal axis; EMSCs; Endometriosis

子宫内膜异位症(Endometriosis, EM)是一种与慢性盆腔疼痛和/或不孕症相关的炎性雌激素依赖性疾病,其特征是子宫内膜样组织病变^[1]。其特点是异位的子宫内膜腺体和间质通常伴有纤维化,可引起慢性盆腔疼痛、痛经和不孕症等各种不良临床症状,严重影响妇女的健康、生育能力和生活质量。由于其具有侵袭性、易复发的特点,极易增加癌变的风险^[2]。目前大部分研究认为 EM 一种干细胞疾病,其发生和发展与子宫内膜干细胞(Endometrial stem cells, EMSCs)相关^[3]。左旋-18-甲基炔诺孕酮(Levonorgestrel, LNG)是一种合成的孕酮类紧急避孕药,常用于 EM 术后相关的疼痛或复发治疗^[4]。比如 LNG (20 nmol/L)可抑制卵巢 EM 囊肿的上皮细胞生长^[5],在 EM 大鼠模型的 EM 囊肿中,局部注射荷载 LNG 的聚乳酸微球,可长期抑制 EM 囊肿^[6]。但关于 LNG 在 EM 中作用的分子机制并不清楚。Notch 信号参与几乎所有器官系统的发育,且调节发育后组织内稳态^[7]。研究表明,抑制 Notch 活性的药理学策略可能有助于治疗某些疾病^[8],而子宫内膜 EMSCs 中 Notch 信号分子具有较高水平的表达^[9],但关于 LNG 对雌激素/ER-Notch 的影响的相关研究鲜少,本研究探索性观察 LNG 是否通过调控雌激素/ER-Notch 信号轴受体 Notch1 及其靶向调节物 Hes1、hey2 而降低 EMSCs 的活性,从而抑制 EM 的生长,希望为其发病

机制的研究和临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验小鼠购自中科院上海实验动物中心/上海斯莱克实验动物有限公司,左炔诺孕酮购自拜耳制药有限公司,ELISA 试剂盒和 cck8 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。Notch1、Hes1、hey2 购自 Cell Signaling Technology 公司(美国)。BCA 试剂盒购自上海信裕生物科技有限公司。流式细胞仪购自德国赛多利斯公司。雌激素及受体抑制剂 ICI 购自北京百奥莱博科技有限公司。本研究通过了动物实验伦理审批(ZMU21-2105-109)。

1.2 方法

1.2.1 建立动物模型和分组并观察 LNG 对 EMSCs 中雌激素/-Notch 信号轴的影响 将 65 只小鼠随机取 10 只作为假手术组,剩余小鼠进行造模。采用腹膜种植方法建立子宫内膜异位症(EM)小鼠模型^[10]:术前 1 天通过皮下注射雌激素使小鼠处于同一动情期,无菌麻醉下手术,仰卧固定姿势后,沿尿道上方腹中线切开分离左侧子宫,Y 形两端结扎,剪下中间段约 2 cm 放入氯化钠中,随后将其缝合至右侧腹壁,并逐层缝合腹腔。使用庆大霉素防感染。假手术组腹部切开找到子宫后常规缝合。造模成功标准:移植体积增大,可见囊状小泡和血管形成。成功建模 50 只小鼠。将模型鼠随机分为 5 组,模型组不作处理,

LNG 组注射 LNG, LNG+ER 组注射 LNG 并转染 ER- α cDNA, LNG+ER+ NC 组注射 LNG 并转染 ER- α cDNA 和 NC 质粒, LNG+ER+ Notch1 siRNA (siNotch1) 组注射 LNG 并转染 ER- α cDNA 和 Notch1 siRNA 质粒。使用 Entranster 试剂进行腹膜内注射方式进行局部组织转染。5 组均加入等量雌激素。每周观察小鼠状态 2 次, 每周测定小鼠外周血雌激素水平 1 次, 2 周后处死裸鼠, 收集腹膜组织。

1.2.2 ELISA 法检测 EM 患者血液中雌激素含量 操作方法检测参照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.2.3 小鼠子宫内膜异位组织学观察 取各组小鼠子宫内膜组织标本多聚甲醛固定、包埋和切片, 脱蜡后按照试剂盒说明书进行 HE 染色, 光学显微镜下观察拍照分析子宫内膜异位组织病理变化。

1.2.4 免疫组织化学法检测血管密度 取各组小鼠子宫内膜组织标本蜡块切片脱蜡、水化、0.3% H_2O_2 孵育、洗涤、5% 血清封闭后, CD31 一抗孵育、洗涤后, 采用试剂盒中试剂孵育二抗及进行 DAB 染色, 进行免疫组化染色操作, 光学显微镜下观察拍照, 计算 MVD 参照文献, 清晰的单个棕黄色细胞或细胞簇构成的独条微血管, 在物镜视野下选择血管最集中的区域, 记数被 CD31 染色的血管数(棕黄色), 微血管密度用计数均值表示, 计数 5 个视野中微血管数量, 取平均值折算成 mm^2 。

1.2.5 体外细胞实验 EMSCs 的分离、培养与分组 获取假手术和异位模型小鼠子宫内膜全层组织, 去除肌层后剪成小块, 使用酶消法和机械方法制备单细胞悬液。用滤网分离出基质细胞和上皮细胞, 采用波形蛋白和角蛋白荧光染色鉴定基质细胞和上皮细胞。将分离的细胞培养 15 d, 观察细胞形体及生长特性, 选择生长良好的细胞集落, 制成 $1 \times 10^6/L$ 单细胞悬液, 分别加入 10 μL 细胞抗原 CD90、CD29、CD73、CD34、CD45、CD133 用于标记 EMSCs, 4 $^\circ C$ 避光孵育 30 min, 1 000 r/min 离心, 洗涤, 重悬, 立即采用流式细胞仪检测 EMSCs 数量, 表达 CD90、CD29、CD73 但不表达 CD34、CD45、CD133 的为 EMSCs。将模型鼠获取的 EMSCs 在 96 板孔中培养, 获取生长良好的细胞, 分为 5 组, 将模型细胞分为模型对照组(模型组) 不作处理, LNG 组加入 LNG, LNG+ER 组加入 LNG 并转染 ER- α cDNA, LNG+ER+ NC 组加入 LNG 并转染 ER- α cDNA 和 siRNA 的空白质粒质粒 NC, LNG+ER+ Notch1 siRNA (siNotch1) 组加入 LNG 并转染 ER- α cDNA 和 Notch1 siRNA 质粒。以上 5 组均加入等量雌激素。使用 Lipofectamine2000 转染试剂进行转染, 稀释 DNA 以及 Lipofectamine 2000,

混合 2 种稀释液保温 20 min, 加入培养细胞中孵育 24 h。假手术组获取的 EMSCs 细胞不做任何处理, 作为空白组。各组继续培养 24 h 收获细胞。

1.2.6 克隆形成实验检测细胞增殖 选取各组对数生长期细胞, 将细胞制成 300 个细胞/mL 的细胞悬液, 按分组接种到 35 mm 直径平板培养皿内, 每皿加入 3 mL 的细胞悬液(约 100 个单细胞/ cm^2)。接种完后十字晃动使细胞均匀分散, 放入细胞培养箱进行培养, 培养 48 h, 期间观察细胞生长情况, 计算克隆细胞数, 细胞克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.7 划痕实验检测细胞迁移率 将细胞接种到 6 孔板中, 待细胞会和至 85% 左右时用 20 μL 枪头划痕, PBS 洗去脱落细胞, 分别在 0、24 h 后显微镜观察拍照, 应用 Image J 软件测量划痕面积, 细胞迁移率迁移率=24 h 时迁移区域的面积/0 h 划痕区域的面积, 实验重复 3 次。

1.2.8 细胞分化率检测 将获取的 EMSCs 在 96 板孔中培养, 待细胞长至融合后, 用无菌的条件培养液诱导, 培养箱内培养。对照组用培养液培养。每 3 d 换 1 次液, 连续 21 d。21 d 后用流式细胞仪检测诱导后细胞诱导后标志物 CD13/CD9 阳性细胞数的相对表达, 阳性细胞占总细胞的比率为细胞分化率。

1.2.9 Western Blot 检测 ER- α 和 Notch 信号分子 Notch1、Hes1、Hey2 蛋白表达 提取分离的 EMSCs 细胞总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 每孔加入 40 μg 待测蛋白, 经电泳、转膜、封闭后, 分别加入 ER- α 、Notch1、Hes1、Hey2 一抗 4 $^\circ C$ 孵育过夜, TBST 洗膜后加入二抗, ECL 显影, 以 GAPDH 作为内参, 计算相对表达量。

1.2.10 观察雌激素对雌激素/ER-Notch 信号轴的影响 观察雌激素与 ER-Notch 信号轴之间的关系, 将获取的异位内膜 EMSCs 在 96 板孔中培养, 获取生长良好的细胞, 分为 4 组, 对照组不作处理, 雌激素组(E2)加入外源性雌激素 17 β -雌二醇(E2), 雌激素受体抑制剂组(ICI)加入雌激素受体抑制剂 ICI 及等量 E2, Notch 抑制组加入 Notch 信号阻断剂 DAPT 及等量 E2。培养 24 h 收获细胞。ELISA 法测定细胞中雌激素水平、测定细胞中 ER- α 、Notch1、Hes1、hey2 表达。检测细胞增殖、迁移、分化能力。方法同上。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件行统计学分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料以百分比(%)形式表示, 组间比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠异位膜组织中 Notch 信号分子及血清雌激

素表达比较 与假手术组比较,模型组小鼠雌激素、ER- α 、Notch1、Hes1、Hey2 蛋白水平显著升高($P<0.05$)。雌激素、ER- α 、Notch1、Hes1、hey2 在 LNG 组显著低于模型组($P<0.05$)。与 LNG 组比较,雌激素、ER- α 、Notch1、Hes1、hey2 在 LNG+ER 组和 LNG+

ER + NC 组显著增加($P<0.05$)。LNG+ER 组和 LNG+ER + NC 组比较无显著差异($P>0.05$)。与 LNG+ER 组和 LNG+ER + NC 组比较,雌激素、ER- α 、Notch1、Hes1、hey2 在 LNG+ER + siNotch1 组显著降低($P<0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 小鼠腹膜内 EMSCs 中雌激素/ER-Notch 信号轴相关指标表达比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of expression of estrogen/ER Notch signaling axis related indicators in mouse peritoneal EMSCs

组别	雌激素(pmol/mL)	ER- α	Notch1	Hes1	Hey2
假手术组	4.06 $\pm$ 1.32	1.29 $\pm$ 0.82	0.277 $\pm$ 0.45	7.41 $\pm$ 4.85	7.11 $\pm$ 1.62
模型组	12.43 $\pm$ 3.18 ^①	3.35 $\pm$ 1.06 ^①	1.03 $\pm$ 0.08 ^①	20.13 $\pm$ 5.35 ^①	29.38 $\pm$ 5.35 ^①
LNG 组	6.28 $\pm$ 1.02 ^{①②}	1.82 $\pm$ 0.94 ^{①②}	0.308 $\pm$ 0.52 ^{①②}	9.23 $\pm$ 5.35 ^{①②}	8.23 $\pm$ 2.52 ^{①②}
LNG+ER 组	7.32 $\pm$ 1.39 ^{①②③}	3.37 $\pm$ 2.34 ^③	0.55 $\pm$ 0.84 ^{①②③}	11.82 $\pm$ 4.30 ^{①②③}	17.28 $\pm$ 3.34 ^{①②③}
LNG+ER + NC 组	7.28 $\pm$ 1.48 ^{①②③}	3.39 $\pm$ 1.82 ^③	0.54 $\pm$ 0.06 ^{①②③}	11.76 $\pm$ 3.87 ^{①②③}	18.29 $\pm$ 3.02 ^{①②③}
LNG+ER + siNotch1 组	3.29 $\pm$ 0.69 ^{②③④⑤}	1.65 $\pm$ 0.63 ^{②④}	0.37 $\pm$ 0.07 ^{②④⑤}	9.10 $\pm$ 3.29 ^{①②④⑤}	9.15 $\pm$ 3.23 ^{①②④⑤}

注:与假手术组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与 LNG 组比较,③ $P<0.05$;与 LNG+ER 组比较,④ $P<0.05$;与 LNG+ER + NC 组比较,⑤ $P<0.05$ 。

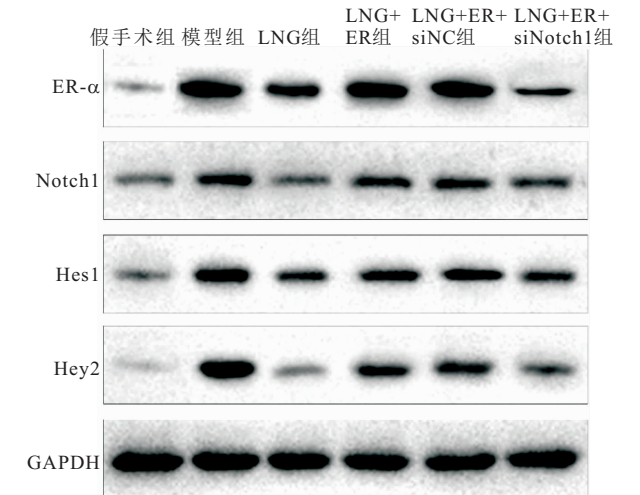


图 1 Western Blot 检测 ER- α 、Notch1、Hes1、Hey2 表达

Figure 1 Western Blot detection of ER- α , Notch1, Hes1, Hey2 expression

2.2 免疫组化观察小鼠异位内膜组织 假手术组小鼠内膜组织皮层结构清晰,纤维结缔组织、囊内白细胞和黏液较少。模型组小鼠可见皮层结构层次不清晰,厚薄不一,腔壁出现结缔组织,膜上出现多囊肿结构,分泌物较多,部分呈现乳头状生长,可见炎性浸润,腺体稀少。LNG 组内膜皮层明显变薄,层次清晰,腺皮萎缩,纤维结缔组织明显减少。LNG+ER 组和 LNG+ER+NC 组与模型组相比异位内膜变化不明显。LNG+ER + siNotch1 组小鼠膜组织变化较 LNG 组稍差,皮层组织部分不够清晰,血管相对较多,皮层萎缩性改变不够明显。见图 2。

2.3 LNG 对小鼠血管密度影响 与假手术组(204.24 $\pm$ 18.29)相比,CD31 阳性细胞表达水平所代表的血管密度在模型组(280.93 $\pm$ 31.22)小鼠子宫内

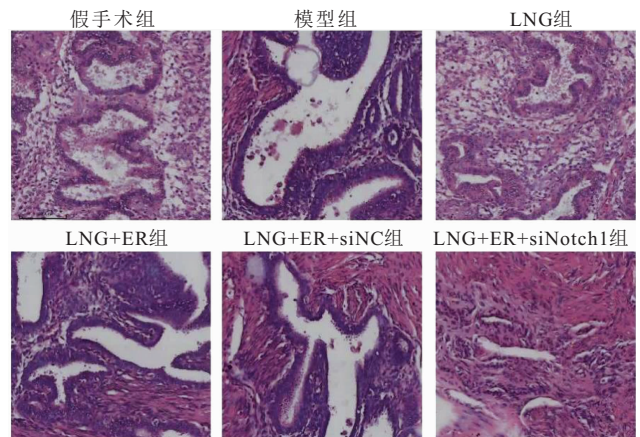


图 2 小鼠腹膜 EMSCs HE 染色结果(200 $\times$)

Figure 2 HE staining results of mouse peritoneal EMSCs

膜异位组织显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,LNG 治疗后 LNG 组(247.29 $\pm$ 23.17)血管密度均显著减少($P<0.05$)。与 LNG 组比较,LNG 和雌激素受体 ER 同时注射的 LNG+ER 组(327.29 $\pm$ 35.64)、LNG+ER + siNC 组(321.29 $\pm$ 33.52)小鼠血管密度有显著升高($P<0.05$)。但 LNG+ER + siNotch1 干预的 LNG+ER + siNotch1 组(202.04 $\pm$ 18.03)小鼠血管密度与假手术组比较无显著变化($P>0.05$),但均低于其他组($P<0.05$)。见图 3。

2.4 体外细胞模型实验研究 LNG 对小鼠腹膜内 EMSCs 雌激素/ER-Notch 信号轴相关指标表达的影响 分离获取异位模型小鼠的 EMSCs,并进行细胞实验,结果显示,与正常膜组织的空白组相比,异位内膜组织模型组 EMSCs、增殖率、迁移率、分化率,显著升高($P<0.05$),LNG 治疗后的 LNG 组较对照组显著降低($P<0.05$),LNG 和 ER 共同转染的 LNG+ER 组

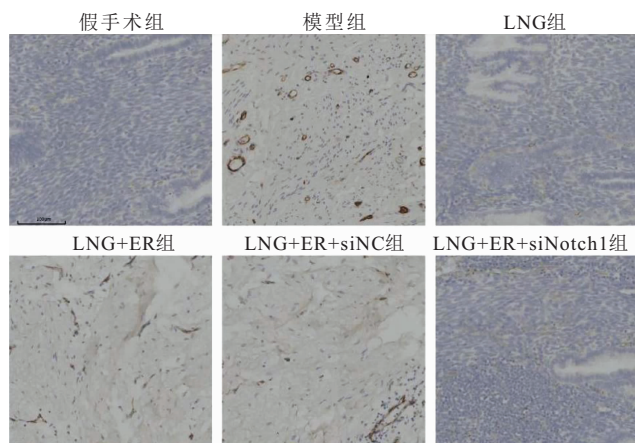


图 3 各组小鼠 CD31 标记的血管密度免疫组化结果(倍数 200×)
Figure 3 Immunohistochemical results of vascular density labeled with CD31 in each group of mice

较 LNG 组显著增加 ($P < 0.05$), LNG 和 ER 及敲低 Notch1 共同转染的 LNG+ER+siNotch1 组较 LNG+ER 显著降低 ($P < 0.05$)。LNG+ER 组和 LNG+

ER+NC 组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 2、图 4~5。

2.5 雌激素及其受体与 EMSCs 中 Notch 信号的关系 为验证雌激素及其受体与 Notch 信号通路之间的关系,本研究分别用雌激素 E2 和雌激素受体抑制剂 ICI 及 Notch1 信号阻断剂 DAPT 刺激异位内膜 EMSCs 细胞。体外细胞实验结果,使用雌激素 E2 后, E2 组雌激素、ER- α 、Notch1 表达较对照组显著增加,细胞增值率,迁移率分化率均增加。使用 ER 抑制剂后, E2+ICI 组 ER- α 、Notch1 表达,细胞增值率,迁移率分化率较 E2 组显著低,使用 Notch1 信号阻断剂后 Notch1 表达较 E2 组显著降低,细胞增值率、迁移率、分化率均降低 ($P < 0.05$),但使用 ER 和 Notch1 抑制剂后雌激素水平未发生明显变化。提示雌激素环境下,雌激素能够促进 ER、Notch1 表达,而抑制 ER- α 、Notch1 表达并不影响雌激素水平,但可降低 Notch1 表达 ($P < 0.05$) 和 ER 水平,见表 3、表 4。

表 2 小鼠腹膜内 EMSCs 的增值迁移及分化情况比较($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 Comparison of incremental migration and differentiation of intraperitoneal EMSCs in mice

组别	EMSCs	增殖率	迁移率	分化率
空白组	19.31 $\pm$ 2.46	27.54 $\pm$ 2.33	20.15 $\pm$ 2.15	9.47 $\pm$ 1.35
模型组	58.14 $\pm$ 8.22 ^①	51.14 $\pm$ 2.24 ^①	36.42 $\pm$ 4.14 ^①	62.25 $\pm$ 9.38 ^①
LNG 组	24.29 $\pm$ 6.81 ^{①②}	33.36 $\pm$ 2.06 ^{①②}	21.35 $\pm$ 2.23 ^{①②}	11.52 $\pm$ 1.46 ^{①②}
LNG+ER 组	71.37 $\pm$ 8.7 ^{①②③}	48.02 $\pm$ 4.02 ^{①②③}	62.64 $\pm$ 7.31 ^{①②③}	51.68 $\pm$ 7.04 ^{①②③}
LNG+ER+NC 组	70.26 $\pm$ 8.26 ^{①②③}	47.40 $\pm$ 4.19 ^{①②③}	63.05 $\pm$ 7.26 ^{①②③}	52.84 $\pm$ 7.13 ^{①②③}
LNG+ER+siNotch1 组	50.21 $\pm$ 6.32 ^{①②③④⑤}	33.28 $\pm$ 1.82 ^{①②④⑤}	36.67 $\pm$ 3.71 ^{①③④⑤}	31.36 $\pm$ 3.27 ^{①②③④⑤}

注:与假手术组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与 LNG 组比较,③ $P < 0.05$;与 LNG+ER 组比较,④ $P < 0.05$;与 LNG+ER+NC 组比较,⑤ $P < 0.05$ 。

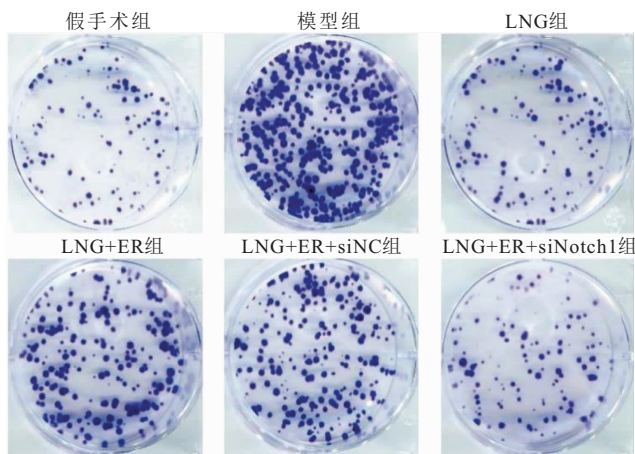


图 4 LNG 对 EMSCs 增值的影响

Figure 4 The impact of LNG on the value-added of EMSCs

3 讨论

由于子宫内膜异位症是一种雌激素依赖性疾病,雌激素受体(ER)在异位病变的生长中起着至关重要的作用,ER 存在两种亚型 ER α 和 ER β ,有研究发现

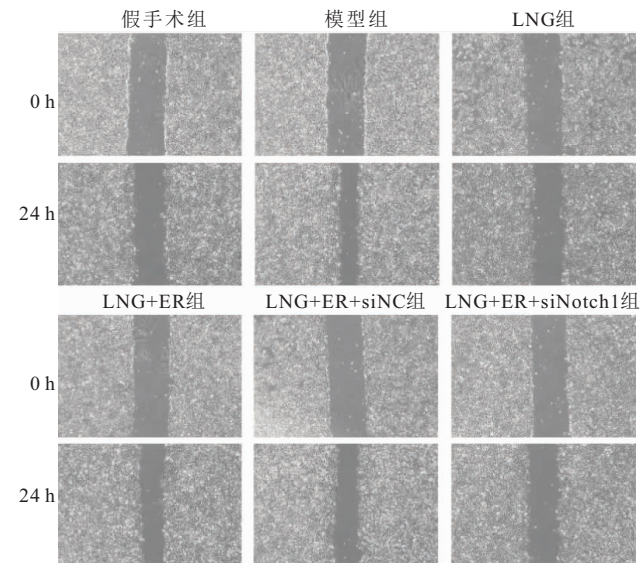


图 5 LNG 对 EMSCs 迁移的影响

Figure 5 The effect of LNG on the migration of EMSCs

ER α 或 ER β 基因升高,可增加小鼠的子宫内膜异位病变风险^[11]。此外,细胞质 ER β 与炎症体复合物相互

表 3 雌激素对 Notch 信号通路的影响($\bar{x}\pm s, \%$)
Table 3 Effects of estrogen on the Notch signaling pathway

组别	雌激素 (pmol/mL)	ER- α	Notch1
对照组	6.04 $\pm$ 0.84	1.05 $\pm$ 0.63	1.01 $\pm$ 0.41
E2 组	13.29 $\pm$ 1.82 ^①	10.22 $\pm$ 2.27 ^①	4.26 $\pm$ 0.35 ^①
E2+ICI 组	13.27 $\pm$ 2.08 ^①	0.56 $\pm$ 0.18 ^{①②}	2.83 $\pm$ 0.40 ^{①②}
E2+DAPT 组	12.28 $\pm$ 2.15 ^①	9.32 $\pm$ 2.06 ^{①③}	0.35 $\pm$ 0.52 ^{①②③}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与 E2 组比较,② $P<0.05$;与 E2+ICI 组比较,③ $P<0.05$ 。

表 4 雌激素对 EMSCs 增殖迁移及分化的影响($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 4 Effects of estrogen on the proliferation, migration, and differentiation of EMSCs

组别	增殖率	迁移率	分化率
对照组	53.82 $\pm$ 3.19	33.52 $\pm$ 4.26	68.24 $\pm$ 8.53
E2 组	74.25 $\pm$ 5.44 ^①	81.53 $\pm$ 5.74 ^①	89.24 $\pm$ 11.48 ^①
E2+ICI 组	24.14 $\pm$ 2.63 ^{①②}	18.47 $\pm$ 2.18 ^{①②}	45.27 $\pm$ 6.62 ^{①②}
E2+DAPT 组	18.35 $\pm$ 2.06 ^{①②③}	16.36 $\pm$ 2.44 ^{①②③}	33.55 $\pm$ 4.25 ^{①②③}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与 E2 组比较,② $P<0.05$;与 E2+ICI 组比较,③ $P<0.05$ 。

作用,增强 IL-1 β 介导的增殖和子宫内膜异位病变的粘附活性,提高其耐久性。ER- α 也可通过下调局部孕酮受体,促进子宫内膜异位症病灶中的孕酮抵抗^[12]。而 LNG 为合成的强效孕激素,具有明显的抗雌激素活性作用,被临床应用于子宫内膜异位的治疗,能够使宫内膜血管扩张、管壁变薄,管周支持组织减少^[13]。本研究发现,LNG 治疗后 EM 小鼠雌激素含量显著降低,内膜组织病理性改善明显,血管数也显著减少,说明 LNG 能有效抑制子宫内膜异位症的发展,具有良好的治疗潜力,这与以往文献中发现雌激素可通过调节雌激素-免疫的相互作用,降低子宫内膜异位症的神经病理性疼痛,促进子宫内膜腺体及间质修复的结果相似。推测其机制可能是 LNG 通过抑制雌激素分泌,减少了与细胞膜上 ER 结合通过通路级联反应的机会,抑制了下游靶基因的转录,最后抑制子宫内膜细胞增生,甚至癌变。另外本研究还发现 LNG 治疗后,雌激素/ER-Notch 信号通路相关因子 Notch1、Hes1、Hey2 表达和 ER- α 水平显著降低。推测这可能是 LNG 通过降低雌激素与其受体 ER 的结合,进一步减少了 ER 对 ER-Notch 信号通路生物效应,但具体机制仍需要进一步探究。

近年来研究发现子宫内膜中存在干细胞,正常女性月经血中也存在干细胞的富集,由于多向分化潜能干细胞无处不在,而逆流经血提供了细胞分化生长环境,所以很多妇女会发生 EM^[14]。有研究发现,低剂量干细胞移植至受损子宫内膜能释放免疫抑制因子,协同调控免疫反应,有效管控局部炎症,并直接干预生态位,加速组织修复与再生过程^[15-16]。而 Notch 信

号在许多疾病中促进疾病的干细胞功能,Notch 信号可促进增殖并增加 CSC 活性^[8],另外 Notch 信号通路作为雌激素的下游信号通路可参与多种疾病的发生和发展^[17]。本研究细胞实验显示 LNG 可显著降低雌激素表达,并抑制 EMCS 的增值活性、迁移率和分化率及 Notch 信号通路相关因子,而当增加 ER 表达后,雌激素表达和 Notch 信号通路相关因子及 EMCS 的增值率、迁移率和分化率得到一定程度恢复,而在抑制 Notch 信号通路后 EMCS 的增值率、迁移率和分化率显著降低,提示 LNG 可能通过抑制雌激素和 Notch 信号实现对 EMCS 活性的抑制作用,这在本研究的体内和体外实验结果中具有一致性。推测其机制可能是:雌激素分泌异常升高可能导致子宫内中 EMCS 细胞稳定性下降。这一过程中,雌激素受体(ER)与 Notch 信号途径共同调节着维持血液与组织分隔的生物学机制。LNG 的作用机制可能是通过抑制 ER 和 Notch 信号通路中 Notch1、Hes1、Hey2 等关键分子的表达。这进而有助于稳定细胞间的粘附连接,同时减弱内皮细胞的增殖、迁移及分化能力,有利于控制子宫内膜异常状态。

Notch 和雌激素途径是细胞增殖和凋亡的关键调节因子,调控干细胞增殖分化的 Notch 信号通路在子宫内膜增殖分化中扮演着重要的角色^[18]。研究发现 ER β 可通过刺激异位病变中的缺氧信号和抑制 IFN α 信号表达促进子宫内膜异位症的进展^[19]。另有研究发现 EGFR 抑制剂吉非替尼比雌激素和 DPN 对 Notch 信号有更强的抑制作用,与单独使用吉非替尼相比,雌激素和 DPN 可诱导更多纤毛,这表明,除了抑制 DLL1 外,雌激素途径在纤毛发生中发挥了重要作用^[20]。本研究发现,雌激素 E2 与 ER 结合后,不仅直接增强细胞活性,还上调 Notch1 表达,进一步放大这一效应。而 ER 抑制剂能显著抑制雌激素介导的细胞增殖、迁移和分化,这说明雌激素受体是这些生物学过程的关键调控节点。抑制 ER 活性减少了 E2 与受体的结合,进而阻碍了 E2 下游信号的传递,包括对 Notch1 表达的促进作用,但并未直接影响雌激素本身的水平。而加入 Notch1 信号阻断剂后,虽然不影响雌激素或 ER 的水平,却能进一步降低细胞增殖、迁移和分化的能力。这表明 Notch1 信号通路在雌激素介导的细胞活动中扮演着独立的、重要的角色。即使在 ER 活性被抑制的情况下,Notch1 通路依然能维持一定程度的细胞活性,但当 Notch1 也被阻断时,这种维持作用消失,导致细胞功能显著下降。这也说明上述发现提示 Notch1 信号通路与雌激素/ER 系统的调控是相对独立的,即 Notch1 信号的激活或抑制并不直

接调控雌激素的合成或分解,也不直接影响 ER 的表达水平。这可能是因为 Notch1 更多地参与到雌激素信号下游的效应放大或特异细胞响应中,而非上游的激素合成调控。当然,细胞内信号传导是一个高度复杂的网络,涉及多种正反馈和负反馈机制。Notch1 和 ER 信号也可能通过与其他信号通路的交叉作用,共同调节细胞行为,而不直接改变对方的表达或活性水平。因此,综合本研究所有研究结果分析,LNG 可能不仅通过降低雌激素水平,减少雌激素与雌激素受体(ER)的结合,打断了雌激素-ER 信号传导的起始步骤。这导致雌激素依赖的细胞增殖减少,间接抑制了子宫内膜异位病灶的生长。LNG 还能直接抑制 Notch 信号通路的关键因子的表达和活性,即使在 ER 活性受阻情况下,也能进一步减少细胞功能,进而影响下游靶基因的转录,导致子宫内膜细胞的增殖和迁移能力减弱。这使得 LNG 通过以上机制减少了干细胞的活性,阻止它们在不适当位置形成异位病灶,有利于维持子宫内膜的正常周期性变化,而非异常增生。这体现了 LNG 对 Notch 信号的抑制作用是 EMCS 活性调控中的一个重要补充机制,同时也突显了雌激素/ER-Notch 信号轴在 EM 发病机理中的重要地位及作为治疗靶点的潜力。

4 结论

LNG 通过综合下调雌激素效应和 Notch 信号通路活动,有效抑制了子宫内膜干细胞的异常活性,减少了异位内膜的生长和病变进程,为子宫内膜异位症提供了一种有效的治疗策略,希望为 EM 发病机制的研究和临床治疗提供指导性参考。

【参考文献】

- [1] KONINCKX P R, FERNANDES R, USSIA A, *et al.* Pathogenesis based diagnosis and treatment of endometriosis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12:745548.
- [2] FRANÇA P R C, LONTRA A C P, FERNANDES P D, *et al.* Endometriosis: A disease with few direct treatment options [J]. *Molecules*, 2022, 27(13):4034.
- [3] KONG Y, SHAO Y, REN C, *et al.* Endometrial stem/progenitor cells and their roles in immunity, clinical application, and endometriosis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1):474.
- [4] ELASSALL G M, SAYED E G, ABDALLAH N A, *et al.* Levonorgestrel-releasing intrauterine system versus systemic progestins in management of endometrial hyperplasia: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*, 2022, 51(8):102432.
- [5] GIBBONS T, GEORGIU E X, CHEONG Y C, *et al.* Levonorgestrel-releasing intrauterine device (LNG-IUD) for symptomatic endometriosis following surgery [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 12(12):CD005072.
- [6] YUAN P, CHEN B, HUANG Y, *et al.* Long-term regression of experimental endometriosis in a rat model treated with local application of levonorgestrel-loaded biodegradable microspheres [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(7):2089-2095.
- [7] 杨一博,徐颖,王璐,等. 基于 Notch 信号通路探索菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷对生理小鼠卵巢生殖干细胞的作用及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(5):9-15.
- [8] 谢韬,曾薇薇,陆齐天,等. 信号通路调控子宫内膜异位症的研究进展 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2021, 48(1):1-4, 40.
- [9] GARCÍA-IBÁÑEZ P, YEPES-MOLINA L, RUIZ-ALCARAZ A J, *et al.* Brassica bioactives could ameliorate the chronic inflammatory condition of endometriosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24):9397.
- [10] 陆杰,杨立,朱远航,等. 高脂饮食对子宫内膜异位症小鼠异位病灶生长及 FABP4 蛋白表达的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2022, 57(5):640-645.
- [11] 王湘炼,朱姝,徐炜,等. 子宫内膜异位症中雌、孕激素及其受体基因甲基化的研究进展 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2023, 50(2):165-169.
- [12] 刘琛,孙蓬明,陈陆飞,等. 雌激素受体相关受体 α 与子宫内膜异位症关系的研究进展 [J]. *海峡预防医学杂志*, 2018, 24(2):23-27.
- [13] 张晖. 促性腺激素释放激素激动剂联合左炔诺孕酮宫内缓释系统对重度子宫内膜异位症患者生育功能的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2022, 37(22):4222-4225.
- [14] LACHEJ N, JONUŠIENĖ V, MAŽEIKĖ A, *et al.* Changes in the expression of notch and wnt signalling molecules in human endometrial cancer [J]. *Acta Med Litu*, 2019, 26(3):181-190.
- [15] 于秀章,郝明蓉,侯敏敏,等. 子宫内膜异位症与干细胞研究现状 [J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2021, 17(2):132-137.
- [16] RADEMACHER K H, SRIPATANA T, PFITZER A, *et al.* A global learning agenda for the levonorgestrel intrauterine system (LNG-IUS): addressing challenges and opportunities to increase access [J]. *Glob Health Sci Pract*, 2018, 6(4):635-643.
- [17] 柳倩,潘丁晨,杜乐,等. Notch 信号通路与不明原因复发性流产的相关性 [J]. *中国计划生育和妇产科*, 2022, 14(7):19-22.
- [18] ZHOU W J, ZHANG J, XIE F, *et al.* CD45RO-CD8+ T cell-derived exosomes restrict estrogen-driven endometrial cancer development via the ER β /miR-765/PLP2/Notch axis. *Theranostics*. 2021;11(11):5330-5345.
- [19] ALMEIDA M, LAURENT M R, DUBOIS V, *et al.* Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology [J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(1):135-187.
- [20] DU M, SHAN J, FENG A, *et al.* Oestrogen receptor β activation protects against myocardial infarction via notch1 signalling [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34(2):165-178.

(收稿日期:2024-06-27; 修回日期:2024-12-31; 编辑:张翰林)