

miRNA 的重要调节者 Dicer 和 Drosha 与子宫内膜异位症的相关性研究 *

林蓓蓓¹⁾ 张 怡^{1)**} 徐 扬²⁾ 裴琛琳¹⁾ 曹娥香¹⁾

彭国庆¹⁾ 朱 欣¹⁾ 赵延华¹⁾ 蔡净亭³⁾

(¹⁾中南大学湘雅医院妇产科, 长沙 410008; ²⁾长沙市妇幼保健院, 长沙 410007; ³⁾湖南省肿瘤医院, 长沙 410006)

摘要 利用荧光定量 PCR 和 Western blot 检测证实, 在异位的子宫内膜组织中 Dicer 和 Drosha 的表达低于在位子宫内膜组织, 随后体外培养在位子宫内膜组织, 采用 siRNA 干扰 Dicer 和 Drosha, 发现与干扰对照组相比, 子宫内膜细胞的增殖加快而凋亡减少; 同时 ELISA 检测显示转化生长因子- β 1(transforming growth factor-beta 1, TGF- β 1)的表达上调; Western blot 检测显示凋亡抑制蛋白 Bcl2 表达增加而促凋亡蛋白 Bax 的表达减少。结果表明, miRNA 的重要调节者 Dicer 和 Drosha 可以影响 TGF- β 1 及 Bcl2/Bax 的表达进而影响细胞的增殖和凋亡, 从而参与了子宫内膜异位症的形成。

关键词 子宫内膜细胞, Dicer, Drosha, 转化生长因子 β 1

学科分类号 R71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00264

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是妇科最常见的良性疾病之一, 发病率高达 10%~15%, 有逐年上升趋势。EMs 主要引起不孕、痛经、慢性盆腔痛等症状。EMs 的病因尚不明确, 目前存在多种假说, 如种植学说^[1]、免疫学说^[2-3]、疾病来源的子宫内膜干细胞存在异位^[4]等, 仅用一种或几种学说解释所有 EMs 的发生机制都有一定局限性。因此, 进一步探究 EMs 的病因对于指导并寻找新的诊疗方法, 有着十分重要的意义。

MicroRNA(miRNA)是近几年在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的 RNA, 其大小长约 20~25 个核苷酸, 主要通过和靶 mRNA 的互补配对而在转录后水平上对基因的表达进行负调控, 导致 mRNA 的降解或翻译抑制^[5-7]。作为重要的调节分子, miRNA 参与生命过程中一系列的重要进程, 包括病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢、肿瘤发生等。人类基因组中确认的 miRNA 已有上千个, 约 30%的编码蛋白基因受其调控^[8]。miRNAs 的产生涉及到两种关键的酶类: 首先是转录后长片段的 RNA 分子在细胞核内被双链 RNA 特异的核酸酶 Drosha 处理

成为 70~100 个核苷酸组成的发夹结构 RNA (pre-miRNA)^[9]。这一发夹结构 RNA 运输到细胞质, 再被另一个双链 RNA 特异的核酸酶 Dicer 剪切^[10], 最终就得到 19~23 个核苷酸组成的成熟的 miRNA。鉴于 Dicer 和 Drosha 所起到的重要作用, 研究人员推测疾病中 miRNA 表达谱的变化可能是由于这两种重要的酶类发生变化引起的。最近的研究也证实在乳腺癌^[11]、卵巢癌^[12]、肺癌^[13]、神经母细胞瘤^[14]等多种疾病中均存在 Dicer 和 Drosha 的表达降低。那么在异位子宫内膜(ectopic endometrium, EC)中是否存在 Dicer 和 Drosha 的变化? 在位子宫内膜细胞(eutopic endometrium, EU)中的 Dicer 和 Drosha 发生变化后是否会影响细胞的增殖和凋亡? 且其影响细胞增殖凋亡的可能途径是什么? 本研究拟检测异位和在位子宫内膜中 Dicer 和 Drosha 的变化情况, 并原代培养在位子宫内膜细胞, 检测在

* 湖南省科技厅科学基金资助项目(2010F53071)。

** 通讯联系人。

Tel: 15116287006, E-mail: xy6868@yahoo.cn

收稿日期: 2011-06-09, 接受日期: 2011-08-15

干扰 Dicer 和 Drosha 后细胞 TGF- β 1 和凋亡相关基因的表达, 并观察细胞增殖和凋亡的变化情况, 以期阐明 Dicer 和 Drosha 在 EMs 形成中的作用并为临床治疗 EMs 提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

TRIzol 和 Lipofectamine 2000 (lipo2000) 购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒为 Promega 公司产品; TGF- β 1 ELISA 试剂盒为 Usenlife 产品; 兔抗人 Dicer、Drosha、Bcl2 和 Bax 均购自 Cell Signaling 公司, Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天公司。

1.2 标本采集和处理

人体组织取样规程由中南大学湘雅医院伦理委员会批准。所收集的组织样本来源于在中南大学湘雅医院妇产科就诊的卵巢子宫内膜异位症患者, 在征得患者同意之后共收集了 6 例样本, 异位内膜取自卵巢内膜异位囊肿, 在位内膜为同一患者的在位子宫内膜组织(表 1)。

Table 1 Source of human eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis

Patient	Age/years	Weight/kg
1	28	49
2	33	56
3	35	53

取得上述患者的异位子宫内膜和在位子宫内膜组织后, 将组织冻存于液氮, 随后用 TRIzol 提取细胞总 RNA。用三去污裂解液裂解细胞, 于 4℃, 12 000 g 离心 10 min 去除沉淀, BCA 法测定蛋白质含量。

1.3 在位子宫内膜细胞原代培养

子宫内膜细胞的培养参照文献[15]报道的方法, 将术中取材的内膜组织用含双抗的生理盐水洗涤 5 次, 加入 2~2.5 倍 0.1% 胶原酶消化液及等量 0.25% 胰酶消化液, 移至 25 ml 玻璃培养瓶内, 混匀后于 37℃、5% CO₂ 培养箱中放置 30~50 min 不等, 每 5 min 振荡一次。将消化的细胞悬液分别通过孔径为 105 μ m、88 μ m、37 μ m 的筛网, 并重

复一次, 收集过滤在筛网上的细胞, 0.4% 台盼蓝染色, 活细胞计数密度为 1×10^5 /ml 种入 75 ml 的培养瓶中, 加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液 5~10 ml, 置入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2~3 天换液一次。

1.4 siRNA 干扰 Dicer 和 Drosha 细胞的构建

针对 Dicer 和 Drosha 的特异性 shRNA 序列(表 2)^[6], 由上海吉玛公司合成并连接入含荧光素酶报告基因的载体中。

Table 2 Target sequences for shRNA

shRNA	Target sequence
shluc	TCCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG
shDicer	GCTGGCTGTAAAGTACGACTA
shDrosha	GCCAGATGAGACTGAAGACAT

待原代培养的细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 2×10^5 个接种于 6 孔板中, 培养细胞至生长密度为 70%~80% 的融合, 加入 15 μ l Lipofectamine 2000 于 100 μ l 无血清培养基中混匀静置 15 min, 稀释 10 μ g DNA 于 100 μ l 无血清培养基中, 混合上述 Lipofectamine 2000 与 DNA 稀释液, 室温放置 30 min, 分别用 Hank's 液与无血清培养基洗涤细胞, 将上述混合物加入 6 孔板中, 然后再加 800 μ l 无血清培养基, CO₂ 培养箱中, 37℃ 培养 5 h, 弃上清, 加入完全培养基继续培养 48 h, 48 h 后提取蛋白质检测干扰效果。

1.5 qRT-PCR 检测 Dicer 和 Drosha mRNA 表达水平

收集样本后冻存于液氮, 取出后把组织放入已预冷的研钵中进行研磨, 待组织样本成粉末状后, 加入 TRIzol, 随后按 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA。采用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测 RNA 的纯度和浓度。荧光定量 PCR 法扩增各组织 Dicer 和 Drosha 的 mRNA。按定量 RT-PCR 试剂盒说明取 1 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA, 然后以 SYBR Green I 作为荧光标记物, 在 Light Cycler 荧光实时定量 PCR 仪(购自德国 Roche 公司)上进行 PCR 反应, 引物序列见表 3。通过融解曲线分析和电泳确定目的条带, $\Delta\Delta CT$ 法进行相对定量。

Table 3 PCR primers for target gene

Target gene	Sense	Antisense
Dicer	GTACGACTACCACAAGTACTTC	ATAGTCACCTGCCAGACTGT
Drosha	CATGTCACAGAATGTCGTTCCA	GGGTGAAGCAGCCTCAGATTT
GAPDH	ATCAAGATCATTGCTCCTCTGAG	CTGCTTGCTGATCCACATCTG

1.6 Western blot 法测定 Dicer、Drosha、Bcl2 和 Bax 的表达

组织标本冻存于液氮, 取出后把组织放入已预冷的研钵中进行研磨, 待组织样本成粉末状后, 加入 200 μ l 预冷的细胞裂解液, 置冰上 30 min, 4℃、12 000 g 离心 10 min, 取上清液进行蛋白质分光光度仪定量(BCA 法). 各组 shRNA 细胞在转染后 48 h 用 D-Hanks 液洗 3 次后加入预冷的细胞裂解液, 置冰上 30 min, 4℃、12 000 g 离心 10 min, 取上清液进行蛋白质分光光度仪定量(BCA 法). 每组取 30 μ g 蛋白质加热变性后, 7% SDS-PAGE 分离检测 Dicer 和 Drosha, 12% SDS-PAGE 分离检测 Bcl2 和 Bax, 电转移至 PVDF 膜上, 含 5% 脱脂奶粉的 TBS 缓冲液封闭 1 h, 分别加入 1:1 000 稀释的兔抗人多克隆抗体, 4℃ 孵育过夜. 用含 Tween-20 的 TBS 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 随后加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔第二抗体, 37℃ 孵育 1 h. TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 化学发光法(ECL)检测条带. β -肌动蛋白作为内参照.

1.7 ELISA 法检测 TGF- β 1 的表达

取对数生长期子宫内膜细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化, 10% 胎牛血清 DMEM 培养液调整细胞浓度, 接种 10^4 个 /ml 的细胞至 96 孔细胞悬液, 24 h 后使用 Lipofectamine 2000 转染不同的 shRNA 和阴性对照质粒, 转染 48 h 后取各组上清 50 μ l 用于人 TGF- β 1 的检测, 操作步骤参照试剂说明书进行, 酶联免疫仪 450 nm 处测吸光度值.

1.8 MTT 法检测细胞增殖

接种 5×10^3 个 /ml 的细胞至 96 孔细胞悬液, 24 h 后使用 Lipofectamine 2000 转染不同的 shRNA 和阴性对照质粒, 转染 48 h 后开始分批检测细胞增殖, 每孔加入 20 μ l MTT(5 g/L), 继续培养 4 h 后去除培养基, 加入 150 μ l DMSO 室温震荡混匀

30 min, 使结晶物成分溶解, 使用酶标仪在 490 nm 波长测定各孔的吸光度值并记录结果. 每组细胞设阴性对照 1 孔, 11 个平行孔, 并重复进行 3 次实验.

1.9 Annexin V-FITC 标记流式检测细胞凋亡

待原代培养的细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 2×10^5 个于 6 孔板中, 培养细胞至生长密度为 70%~80% 的融合, 使用 lipo2000 转染不同的 shRNA 和阴性对照质粒, 转染 24 h 后采用无血清饥饿法诱导细胞凋亡, 无血清培养基培养细胞 48 h 后把各组 shRNA 细胞培养液吸出至一合适离心管内, PBS 洗涤贴壁细胞一次, 胰酶消化细胞后加入细胞培养液, 转移到离心管内, 1 000 g 离心 5 min, 收集细胞, PBS 重悬细胞并计数. 取 $5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 重悬的细胞, 1 000 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μ l Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞. 加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀. 室温避光孵育 10 min. 1000 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 190 μ l Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞. 加入 10 μ l 碘化丙啶染色液混匀, 冰浴避光放置. 随即进行流式细胞仪检测.

1.10 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据显著性检验用方差分析, 并进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 qRT-PCR 检测在位和异位子宫内膜组织中 Dicer 和 Drosha 的表达

收集组织样本并按 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, qRT-PCR 检测 EU 和 EC 中 Dicer 及 Drosha 的表达, 结果显示在 EC 中 Dicer 和 Drosha 的表达低于 EU(图 1).

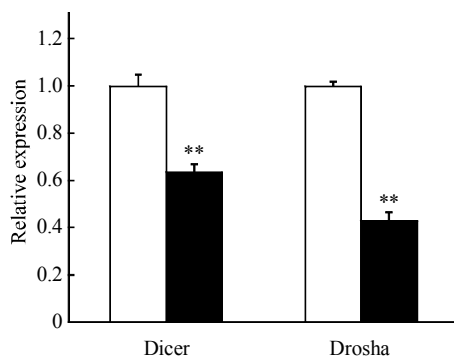


Fig. 1 The mRNA expression of Dicer and Drosha in eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis

Total RNA was extracted from 3 paired of eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis, and was used to assess the expression of Dicer and Drosha by quantitative real time RT-PCR. Data is presented as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$, $**P < 0.01$). □: EU; ■: EC.

2.2 Western blot 检测在位和异位子宫内膜组织中 Dicer 和 Drosha 的表达

收集组织样本并提取细胞总蛋白, Western blot 检测 EU 和 EC 中 Dicer 及 Drosha 蛋白的表达, 结果显示在 EC 中 Dicer 和 Drosha 蛋白的表达低于 EU(图 2).

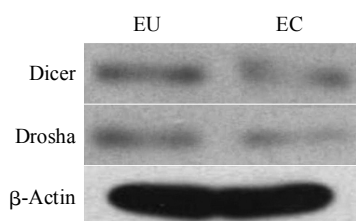


Fig. 2 The protein expression of Dicer and Drosha in eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis

The protein was extracted from 3 paired of eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis, and was used to assess the expression of Dicer and Drosha by Western blot.

2.3 在位子宫内膜细胞采用 shRNA 干扰 Dicer 和 Drosha 的效果检测

待原代培养的细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 2×10^5 个于 6 孔板中, 培养细胞至生长密度为 70%~80% 的融合, 分别取 shLuc、shDicer 和

shDrosha 转染入细胞, 48 h 后提取蛋白质检测干扰效果. Western blot 结果显示干扰后 Dicer 和 Drosha 的表达分别明显减少(图 3).

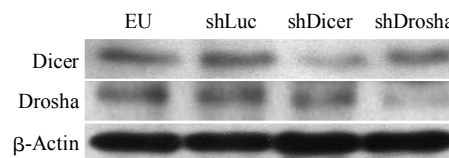


Fig. 3 Effect of shRNAs on Dicer and Drosha protein expression in eutopic endometrium

Eutopic endometrium cells were transfected with shRNA against Dicer and Drosha. Scrambled shRNA was used as control. The effect of shRNAs on Dicer and Drosha protein expression was determined by Western blot.

2.4 MTT 检测干扰 Dicer 和 Drosha 对在位子宫内膜细胞增殖的影响

接种 5×10^3 个/ml 的细胞至 96 孔细胞悬液, 24 h 后使用 Lipofectamine 2000 转染不同的 shRNA 和阴性对照质粒, 转染 48 h 后采用 MTT 检测 shRNA 对 EU 增殖的影响, 结果显示 shDicer 和 shDrosha 均能促进体外培养的 EU 细胞的增殖(图 4).

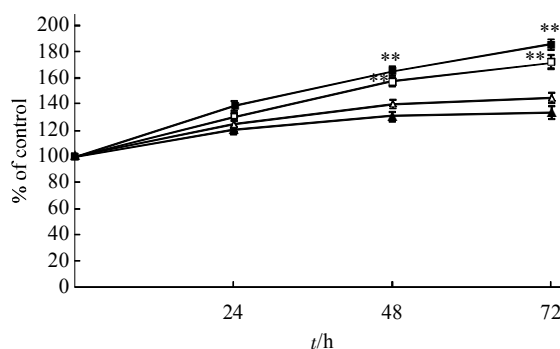


Fig. 4 Effect of Dicer or Drosha on the eutopic endometrium cell proliferation

Eutopic endometrium cells were transfected with shRNA against Drosha (shDrosha), Dicer (shDicer), or luciferase (shLuc). The cell proliferation was measured by MTT. Data is presented as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$, $**P < 0.01$). △—△: EU; ▲—▲: EU+shLuc; □—□: EU+shDicer; ■—■: EU+shDrosha.

2.5 Annexin V-FITC 流式检测干扰 Dicer 和 Drosha 对在位子宫内膜细胞凋亡的影响

待原代培养的细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 2×10^5 个接种于 6 孔板中, 培养细胞至生长密度为 70%~80% 的融合, 使用 Lipofectamine 2000

转染不同的 shRNA 和阴性对照质粒, 转染 24 h 后采用无血清饥饿法诱导细胞凋亡, 无血清培养基培养细胞 48 h 后用 Annexin V-FITC 标记流式细胞仪

检测细胞凋亡, 结果显示 shDicer 和 shDrosha 均能抑制体外培养的 EU 细胞的凋亡(图 5).

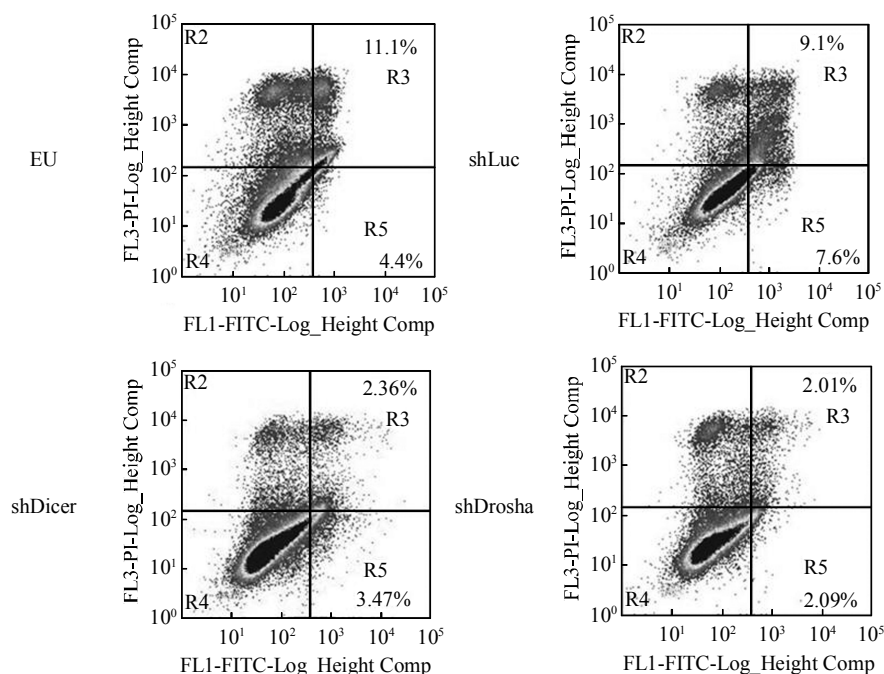


Fig. 5 Effect of knockdown Dicer or Drosha on the eutopic endometrium cell apoptosis

Eutopic Endometrium cells were transfected with shRNA against Drosha (shDrosha), Dicer (shDicer), or luciferase (shLuc). The cell apoptosis was measured by Annexin V-FITC.

2.6 干扰 Dicer 和 Drosha 对在位子宫内膜细胞分泌 TGF- β 1 表达的影响

取对数生长期子宫内膜细胞, 接种 10^4 /ml 至 96 孔细胞悬液, 24 h 后使用 Lipofectamine 2000 转染不同的 shRNA 和阴性对照质粒, 转染 48 h 后取各组上清 50 μ l 用于人 TGF- β 1 ELISA 检测, 结果显示干扰 Dicer 和 Drosha 均能增加细胞上清 TGF- β 1 的表达(图 6).

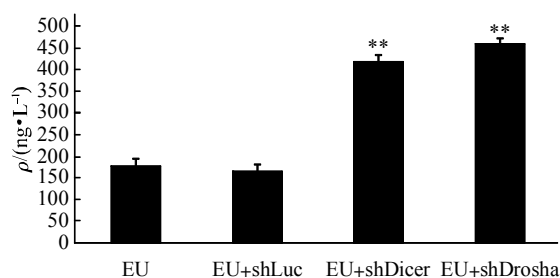


Fig. 6 Effect of Dicer and Drosha shRNAs on protein levels of TGF- β 1

EU were seeded, grown to 70% confluence and transfected with shRNA after 48 h, the effect of Dicer and Drosha shRNAs on protein levels for TGF- β 1 was assessed by ELISA. Data is presented as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$, ** $P < 0.01$).

2.7 干扰 Dicer 和 Drosha 对在位子宫内膜细胞 Bcl2 和 Bax 蛋白表达的影响

待原代培养的细胞生长至对数生长期时, 将细胞按 2×10^5 个接种于 6 孔板中, 培养细胞至生长密度为 70%~80%的融合, 分别取 shLuc、shDicer 和 shDrosha 转染入细胞, 48 h 后提取蛋白质检测 Bcl2 和 Bax 的表达. Western blot 结果显示, 干扰 Dicer 和 Drosha 后凋亡抑制蛋白 Bcl2 表达增加而促凋亡蛋白 Bax 的表达减少(图 7).

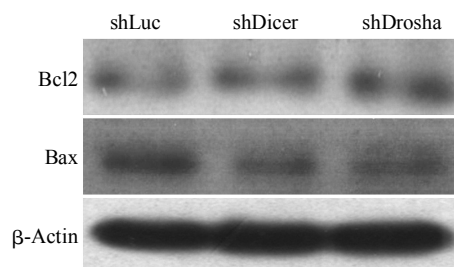


Fig. 7 Effect of Dicer and Drosha shRNAs on protein levels of Bcl2 and bax

EU were seeded, grown to 70% confluence and transfected with shRNA after 48 h, the effect of Dicer and Drosha shRNAs on protein levels for Bcl2 and Bax was assessed by Western blot.

3 讨 论

近年,随着大量子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)相关临床基础研究的开展,人们对此病的认识不断深入,EMs 的临床诊治也逐渐规范,但该病的彻底治疗及预防复发依然是临床上的棘手问题,且 EMs 的发生发展过程仍是未解之谜。由于它的某些生物学行为与恶性肿瘤类似,具有组织侵袭、局部播散、远处转移和复发等恶性行为,而肿瘤与 miRNA 及其重要的调节酶 Dicer 和 Drosha 的相关性已获得了大量研究的证实^[17-20],于是我们推测子宫内膜异位症的形成与 miRNA 及调节 miRNA 产生的酶类也有着密切联系。

miRNA 的表达谱会发生变化已经在多种疾病包括异位子宫内膜中得到了证实^[21-22]。最近 Nicoletta 等^[23]通过 qRT-PCR 在 13 位患者中明确 5 个 miRNA 在异位子宫内膜中发生了变化,分别为 hsa-miR-200a、hsa-miR-200b、hsa-miR-200c、hsa-miR-182 和 hsa-miR-202。鉴于 miRNA 的产生涉及到了细胞核内特异的核酸酶 Drosha 和细胞浆内特异的核酸酶 Dicer,近期人们又开展了对 Dicer 和 Drosha 的研究,通过大量组织样本检测发现,Dicer 和 Drosha 在许多疾病中,如卵巢癌、乳腺癌、肺癌等肿瘤,其表达水平降低且与临床进展相关,并进一步证实 Dicer 和 Drosha 的表达降低与患者的生存率也存在相关性^[11-14]。因此我们研究了 Dicer 和 Drosha 在异位子宫内膜和在位子宫内膜中的表达,发现在异位子宫内膜中 Dicer 和 Drosha 的表达低于在位子宫内膜,提示异位子宫内膜 miRNA 的表达发生变化与其产生相关的两个核酸酶有一定的联系。此外,功能方面的研究显示,敲除 Dicer 的小鼠胚胎干细胞分化紊乱在生长早期容易死亡^[24]。Dicer 表达水平降低还能影响细胞的免疫反应,干扰 Dicer 和 Drosha 的表达能促进细胞转化并更具有致癌性^[25]。我们的实验发现,在干扰 Dicer 和 Drosha 后细胞出现了增殖加速和凋亡减少的现象,进一步说明 Dicer 和 Drosha 能影响子宫内膜细胞的生长表型,使其更具恶性行为。

大量研究显示细胞凋亡异常是 EMs 发生发展的重要原因之一。细胞凋亡过程是受基因的精确调控而实现的,根据相关基因的作用不同可分为两类:一类是诱导细胞凋亡的基因,一类是抑制细胞凋亡的基因。在子宫内膜细胞凋亡的研究中,报道较多的是 Bcl2/Bax。Bcl2 为凋亡抑制基因, Bax

为促凋亡基因。Bcl2 与 Bax 的比例决定细胞对某一凋亡刺激的敏感性^[26]。当 Bcl2 在细胞内过度表达, Bcl2/Bax 比例增高,凋亡被抑制,凋亡细胞减少;当 Bax 在细胞内过度表达, Bcl2/Bax 比例降低,则使细胞凋亡加剧^[27]。当各种因素引起在位内膜 Bcl2/Bax 比例增高,则在位内膜细胞的凋亡减少、异常增生,而异位内膜细胞 Bcl2/Bax 比例增高后则使异位内膜细胞存活期延长。在位和异位内膜细胞对凋亡敏感性降低,易于逃避凋亡原的刺激,使异位内膜细胞处于增生状态^[28]。因此我们继续探讨了干扰 Dicer 和 Drosha 对 Bcl2/Bax 表达的影响,结果发现,干扰 Dicer 和 Drosha 均能引起 Bcl2 表达增加而 Bax 表达减少,这也解释了我们观察到干扰二者的表达后凋亡减少的现象,说明细胞易于逃避凋亡原的刺激与 Bcl2/Bax 表达异常是相关的。此外,我们还检测了生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- β , TGF- $\beta 1$), TGF- $\beta 1$ 为异位内膜细胞的重要促增殖因子,已有研究表明 TGF- $\beta 1$ 受到 miRNA 的调控。miR-21 和 miR-141 分别抑制 TGF- $\beta 1$ 和 TGF- $\beta 2$ 的转录^[29-30],而在 EMs 病灶中 miR-21 和 miR-141 的表达水平降低,这可能起到促进 TGF- β 转录的作用。我们采用 shRNA 特异性干扰 Dicer 和 Drosha 的表达后,观察到 TGF- $\beta 1$ 表达明显增加,说明 Dicer 和 Drosha 表达降低后影响了 miRNA 表达谱的变化,从而使某些生长因子的表达也发生了变化,进而导致子宫内膜细胞的异常增生,促进异位内膜细胞的存活。

本研究证实 miRNA 的重要调节酶 Dicer 和 Drosha 在异位子宫内膜的表达低于在位子宫内膜。于在位子宫内膜细胞中干扰 Dicer 和 Drosha 的表达可增加 TGF- $\beta 1$ 的表达,同时影响凋亡抑制基因 Bcl2 和促凋亡基因 Bax 的表达,导致细胞增殖加速,凋亡减少,使得在位子宫内膜出现异位子宫内膜的增生特质。因此,恢复 miRNA 的调节酶 Dicer 和 Drosha 的表达有可能成为防治子宫内膜异位的新策略。

参 考 文 献

- [1] Kruitwagen R F, Poels L G, Willemsen W N P, *et al.* Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertility and Sterility*, 1991, **55**(2): 297-303
- [2] Rana N, Braun D P, House R, *et al.* Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 1996, **65**(5): 925-930

- [3] Rier S E, Parsons A K, Becker J L, *et al.* Altered interleukin-6 production by peritoneal leukocytes from patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 1994, **61**(2): 294–299
- [4] Sasson I E, Taylor H S. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, **1127**(1): 106–115
- [5] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, **431**(7006): 350–355
- [6] Li S C, Tang P, Lin W C. Intronic microRNA: discovery and biological implications DNA. *Cell Biol*, 2007, **26**(4): 195–207
- [7] Bushati N, Cohen S M. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, **23**: 175–205
- [8] Sage C, Agami R. Immense promises for tiny molecules uncovering miRNA functions. *Cell Cycle*, 2006, **5**(13): 1415–1421
- [9] Lee Y, Ahn C, Han J, *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, **425**(6956): 415–419
- [10] Macrae I J, Zhou K, Li F, *et al.* Structural basis for doublestranded RNA processing by Dicer. *Science*, 2006, **311**(5758): 195–198
- [11] Konstantin J, Rachael N, Maryou B, *et al.* Down-regulation of the miRNA master regulators Drosha and Dicer is associated with specific subgroups of breast cancer. *European J Cancer*, 2011, **47**(1): 138–150
- [12] William M, Yvonne G, Liz H, *et al.* Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med*, 2008, **359** (25): 2641–2650
- [13] Karube Y, Tanaka H, Osada H, *et al.* Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*, 2005, **96**(2): 111–115
- [14] Lin R J, Lin Y C, Chen J, *et al.* microRNA signature and expression of Dicer and Drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma. *Cancer Res*, 2010, **70**(20): 7841–7850
- [15] Bruner-Tran K L, Eisenberg E, Yeaman G R, *et al.* Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**(10): 4782–4791
- [16] Lin R J, Lin Y C, Chen J, *et al.* microRNA signature and expression of Dicer and Drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma. *Cancer Res*, 2010, **70**(20): 7841–7850
- [17] Lu J, Getz G, Miska E A, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, **435**(7043): 834–838
- [18] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, *et al.* Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, 2006, **25**(17): 2537–2545
- [19] Kida Y, Han Y P. MicroRNA expression in colon adenocarcinoma. *Jama*, 2008, **299**(22): 2628–2629
- [20] Yu S L, Chen H Y, Chang G C, *et al.* MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell*, 2008, **13**(1): 48–57
- [21] Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, *et al.* The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod*, 2007, **13**(11): 797–806
- [22] Burney R O, Hamilton A E, Aghajanova L, *et al.* MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, 2009, **15**(10): 625–631
- [23] Nicoletta F, Ilaria G, Paolo P, *et al.* Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *J Biomedic and Biotech*, 2010: 369549(doi:10.1155/2010/369549)
- [24] Bernstein E, Kim S Y, Carmell M A, *et al.* Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, 2003, **35**(3): 215–217
- [25] Kumar M S, Lu J, Mercer K L, *et al.* Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet*, 2007, **39**(5): 673–677
- [26] Cory S, Adams J M. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch. *Cancer Cell*, 2005, **8**(1): 5–6
- [27] Lang-Rollin I, Maniati M, Jabado O, *et al.* Apoptosis and the conformational change of Bax induced by proteasomal inhibition of PC12 cells are inhibited by bcl-xL and bcl-2. *Apoptosis*, 2005, **10**(4): 809–820
- [28] Harada T, Kaponis A, Iwabe T, *et al.* Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update*, 2004, **10**(1): 29–38
- [29] Lu Y, Xiao J, Lin H, *et al.* A single anti-microRNA antisense oligodeoxynucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(3): e24
- [30] Burk U, Schuhert J, Wellner U, *et al.* A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep*, 2008, **9**(6): 582–589

The Main miRNA Regulators Drosha and Dicer Are Associated With Ectopic Endometrium*

LIN Bei-Bei¹⁾, ZHANG Yi^{1)**}, XU Yang²⁾, PEI Chen-Lin¹⁾, CAO E-Xiang¹⁾,
PENG Guo-Qing¹⁾, ZHU Xin¹⁾, ZHAO Yan-Hua¹⁾, CAI Jing-Ting³⁾

¹⁾ Department of Obstetricians and Gynecologists, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China;

²⁾ Maternal and Child Care Service Centre of Changsha, Changsha 410007, China; ³⁾ Hunan Provincial Tumor Hospital, Changsha 410006, China)

Abstract Endometriosis is a common gynecological disease often resulting in chronic pelvic pain and infertility. The pathogenesis of endometriosis is likely multifactorial and several hypotheses have been suggested to explain the presence of ectopic endometrial tissue and stroma. There is a growing body of evidence indicating that miRNA is involved in the etiology of endometriosis, so this study explored the possible roles of Dicer and Drosha in endometriosis formation. Paired eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis was collected and cultured. Quantitative RT-PCR and Western blot of pairs of eutopic and ectopic endometrium demonstrated mRNA and protein levels for Dicer and Drosha in ectopic endometrium (EC) were decreased significantly compared with eutopic endometrium (EU). When transfected with Dicer or Drosha small hairpin RNA (shRNA) in EU, a significant increase in cell proliferation and decreased in cell apoptosis was detected. Furthermore, the Bcl2 was increased and Bax was decreased. In comparison, a scramble siRNA transfection did not affect protein levels for these molecules. Results demonstrate the low expression of Dicer and Drosha significantly correlates with EC, and shDicer or shDrosha can affect cell proliferation and apoptosis, manipulating Dicer and Drosha in EC may result in novel treatment strategies for EMs.

Key words endometriosis, Dicer, Drosha, TGF- β 1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00264

*This work was supported by a grant from Hunan Funded Project Department of Science (2010F53071).

**Corresponding author.

Tel: 86-15116287006, E-mail: xy6868@yahoo.cn

Received: June 9, 2011 Accepted: August 15, 2011