

受体酪氨酸激酶对子宫内膜异位症患者 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路的影响

易金玲¹, 吐比克孜·依比力², 古丽胡马尔·艾尼瓦尔², 腊晓琳¹

(1. 新疆医科大学第一附属医院 生殖助孕中心, 新疆 乌鲁木齐, 830053;

2. 新疆医科大学第五附属医院 妇科, 新疆 乌鲁木齐, 830011)

摘要:目的 探讨受体酪氨酸激酶(Axl)对子宫内膜异位症(EMS)患者哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路的影响。方法 收集5例卵巢EMS患者的在位内膜组织和异位内膜组织,另选择5例正常内膜组织作为对照。分离培养异位子宫内膜间质细胞(HEcESCs)、在位子宫内膜间质细胞(HEuESCs)及正常子宫内膜间质细胞(HEnESCs)并进行免疫组化鉴定,分析在细胞水平靶向上游Axl、mTOR激酶调控PI3K/AKT信号通路影响人类胚胎干细胞(HESCs)凋亡的机制。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)验证HEcESCs、HEuESCs及HEnESCs的Axl、mTOR mRNA的表达差异;在细胞水平选择siRNA转染调控Axl靶点,雷帕霉素调控mTOR靶点,采用蛋白质印迹法、qRT-PCR检测Axl、mTOR、磷酸化mTOR(p-mTOR)及CyclinD1表达差异。结果 与HEnESCs比较,HEuESCs及HEcESCs中Axl mRNA、mTOR mRNA表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$);与空白对照组比较,雷帕霉素处理组、Axl-siRNA处理组Axl mRNA、CyclinD1 mRNA表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$);与雷帕霉素处理组相比,Axl-siRNA处理组中Axl mRNA表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$);与阴性对照组比较,雷帕霉素处理组Axl mRNA、CyclinD1 mRNA表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$);与阴性对照组比较,Axl-siRNA处理组中Axl mRNA、CyclinD1 mRNA表达差异有统计学意义($P < 0.05$);与空白对照组比较,雷帕霉素处理组中mTOR mRNA相对表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。4组mTOR蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$);与空白对照组比较,雷帕霉素处理组、Axl-siRNA处理组中p-mTOR、CyclinD1蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.05$),与阴性对照组的差异也有统计学意义($P < 0.05$)。结论 调控Axl、mTOR可促进HEcESCs凋亡,Axl通过介导mTOR信号通路参与EMS的发生。

关键词: 子宫内膜异位症;受体酪氨酸激酶;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;信号通路;发病机制

中图分类号: R 711.71; R 271.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2353(2023)02-007-06 DOI: 10.7619/jcmp.20223087

Effect of TAM family receptor tyrosine kinases on signaling pathway of mammalian target of rapamycin in patients with endometriosis

YI Jinling¹, Tubikezi·YIBILI², Gulihumaer·AINIWAER², LA Xiaolin¹

(1. Reproductive Assistance Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830053; 2. Department of Gynecology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011)

Abstract: Objective To explore the effect of TAM family receptor tyrosine kinases (Axl) on signaling pathway of mammalian target of rapamycin (mTOR) in patients with endometriosis (EMS). **Methods** The eutopic and ectopic endometrium tissues of 5 patients with ovarian EMS were collected, and 5 normal endometrium tissues were selected as controls. Human ectopic endometrial stromal cells (HEcESCs), human eutopic endometrial stromal cells (HEuESCs) and human normal endometrial stromal cells (HEnESCs) were isolated and cultured for immunohistochemical identification, and the mechanism of regulating PI3K/AKT signal pathway by targeting upstream Axl and mTOR kinase at cell level to affect apoptosis of human embryonic stem cells (HESCs) was analyzed. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to verify the differences of Axl, mTOR mRNA expressions in HEcESCs, HEuESCs and HEnESCs; at the cell level, siRNA transfection was used to regulate Axl targets, rapamycin was used to regulate mTOR targets, and Western blotting and qRT-PCR were used to detect the differences in the expressions of Axl, mTOR, phosphorylated mTOR (p-mTOR) and CyclinD1. **Results** Compared with HEnESCs, the expression levels

of *Axl* mRNA and *mTOR* mRNA in HEuESCs and HEcESCs showed significant difference ($P < 0.05$); compared with the blank control group, the expression levels of *Axl* mRNA and *CyclinD1* mRNA in rapamycin treated group and *Axl*-siRNA treated group showed significant difference ($P < 0.05$); compared with the rapamycin treated group, the *Axl* mRNA expression level in the *Axl*-siRNA treated group showed significant difference ($P < 0.05$); compared with the negative control group, the expression levels of *Axl* mRNA and *CyclinD1* mRNA in the rapamycin treated group showed significant difference ($P < 0.05$); compared with the negative control group, the expressions of *Axl* mRNA and *CyclinD1* mRNA in the *Axl*-siRNA treated group showed significant difference ($P < 0.05$); compared with the blank control group, the relative expression level of *mTOR* mRNA in the rapamycin treated group showed significant difference ($P < 0.05$). There was no significant difference in mTOR protein expression among the four groups ($P > 0.05$); compared with the blank control group, the expressions of p-mTOR and CyclinD1 protein in the rapamycin treated group and *Axl*-siRNA treated group showed significant difference ($P < 0.05$), and the difference compared with the negative control group was also statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Regulation of *Axl* and mTOR can promote apoptosis of HEcESCs, and *Axl* participates in the occurrence of EMS by mediating mTOR signal pathway.

Key words: endometriosis; TAM family receptor tyrosine kinases; mammalian target of rapamycin; signaling pathway; pathogenesis

子宫内膜异位症(EMS)是一种具有恶性肿瘤细胞侵袭、转移特点的常见妇科疾病^[1],在全球育龄期女性中的患病率为5%~10%^[2]。EMS的临床表现包括盆腔疼痛、痛经和不孕症等,近期研究^[3]表明EMS是一种全身性慢性疾病,发病机制涉及多种因素,目前尚无早期诊断的标志物,药物治疗以激素治疗为主,但个体疗效差异大,长期管理较为困难。研究^[4]证实卵巢透明细胞癌和卵巢子宫内膜样癌在组织学方面与EMS密切相关。受体酪氨酸激酶(*Axl*)参与细胞生长、增殖、分化、黏附和迁移等过程的调节,而生长停滞特异性蛋白6(*Gas6*)作为*Axl*的配体,则具有高度结合亲和力^[5]。当*Axl*与*Gas6A*结合触发下游PI3K/AKT信号通路,则能促进肿瘤细胞的侵袭和转移,因此*Axl*作为癌症治疗的新靶点而受到广泛关注^[6]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是多种信号通路的枢纽,可调节细胞生长、细胞周期和营养代谢过程^[7],是PI3K/AKT信号通路的下游激酶之一^[8]。研究^[9]发现EMS患者异位内膜*Gas6*表达上调,但*Axl*在EMS患者中的表达水平却鲜有报道。本研究探讨*Axl*对EMS患者mTOR信号通路的影响,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2019年1月—2021年12月新疆医科大

学第五附属医院确诊卵巢子宫内膜异位囊肿患者5例为研究对象,年龄35~50岁,中位年龄38.9岁,术中切除卵巢EMS病灶取得异位子宫内膜组织,同时刮宫取得患者在位子宫内膜组织。对照组为5例健康者,年龄23~45岁,中位年龄31.4岁,也获得正常子宫内膜组织。所有患者均有规律的月经周期(27~35 d)。纳入标准:明确诊断为卵巢EMS者,且术后病理学确诊为EMS。排除标准:①不明原因的不孕症者;②合并恶性肿瘤者;③6个月内使用类固醇激素者;④合并自身免疫性疾病者;⑤孕妇和哺乳期妇女;⑥病理标本采集不全者。本研究已通过新疆医科大学第五附属医院伦理委员会审核(伦理审批号:XYDWFYLSK-2022-17),所有患者入组前均被明确告知其临床信息的使用情况、标本采集的过程、实验的目的及个人信息的风险保护等,并签署知情同意书。

1.2 样本的采集与保存

手术切除即刻收集5例异位子宫内膜组织最典型部位组织以及在位内膜组织,刮取5例正常子宫内膜组织,并立即投入4℃灭菌盛有青霉素、链霉素及两性霉素B的Ham's F12/DMEM培养液的离心管中,置于干冰壶,2 h内送入实验室进行细胞培养。

1.3 分离和培养

将收集的新鲜异位子宫内膜组织、在位子宫

内膜组织和正常子宫内膜组织切碎,并分别在含有 HEPES(25 mmol/mL)、1%青霉素/链霉素、胶原酶(1 g/L,酶活单位 15 U/mg)和 DNase(0.1 g/L,酶活单位 1 500 U/mg)的 Hank 平衡盐溶液中消化。混合物在 37 °C 下摇晃 60 min。采用 40 μm 细胞过滤器过滤溶液并分离细胞,然后接种在培养瓶中,并置于含 10% FBS 和抗生素(100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 0.25 μg/mL 两性霉素 B)的 Ham's F12/DMEM 培养基中,细胞在 37 °C、5% CO₂ 环境中培养。后续实验步骤使用第 3~5 代培养细胞。

1.4 免疫组化法鉴定细胞

将细胞用 4% 多聚甲醛(PFA)固定在黏合玻璃载玻片中 20 min,采用 0.5% Txition-100 处理 5 min,然后用 3% H₂O₂ 处理 15 min,再用 5% 正常山羊血清封闭 1 min 作为一级抗体;将波形蛋白(1:100, ab92547, Abcam)和 CK19(1:100)孵育过夜,然后将酶标记的山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物在室温下孵育 20 min,再次用 PBS 洗涤。加入新制备的 DAB 显色溶液,将载玻片在室温下孵育 5 min,然后用自来水洗涤。细胞用苏木精染色 20 s,然后在光学显微镜下观察。

1.5 Axl-siRNA 细胞转染及雷帕霉素干预 mTOR

Axl 的 siRNA 购自 GeneChem Corporation。Si-Axl, 序列为 5'-GCGGTCTGCLATGAAGGAATTT-3'。使用 Lipo8000™ (Beyotime Biotechnology, 上海, 中国)进行细胞转染。雷帕霉素干预子宫内膜异位细胞浓度为 1 mmol/L, 干预时间为 4 h, 用 DMSO 溶解。

1.6 细胞实验分组

选择融合率高达 90% 的异位子宫内膜间质细胞,分为以下 4 组: ① 异位子宫内膜间质细胞组(空白对照),细胞正常培养 48 h; ② 异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组,细胞正常培养 44 h 后,采用 1 mmol/L 雷帕霉素干预 4 h; ③ 异位子宫内膜间质细胞 + 阴性对照组,细胞转染 siRNA NC (0.1 μmol/L) 48 h; ④ 异位子宫内膜间质细胞 + AXL-siRNA 组,细胞转染 siRNA-AXL (0.1 μmol/L) 48 h。

1.7 采用实时荧光定量聚合酶链反应

(qRT-PCR)进行基因表达分析

根据制造商的说明,采用 TRIzol (Thermo Fisher Scientific)从细胞中提取总 RNA。使用 PrimeScript RT Master Mix (日本 Shijia Takara

Biotechnology Co. Ltd.)将提取的 RNA 反向转录为互补 DNA(cDNA)。根据制造商(Takara)的说明,使用 TB Green Premix Ex Taq 进行实时 PCR。使用 2^{-ΔΔCt} 方法计算相对基因表达倍数的变化。购自上海生物工程公司的引物序列见表 1。

表 1 PCR 的引物序列

基因	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')
<i>Axl</i>	GAGCGAGAGTTTGGAGCTGT	GAACAGACACCGATGAGCC
<i>mTOR</i>	GCAGCATTTCGCCAGCA	GTGCTCTCATTGATGCCCTG
<i>CyclinD1</i>	GCATGTCGTCGCCCTCTAAG	TTCAATGAATCGTGGGGG
<i>GAPDH</i>	TCTTGCATCAATGACCCCTT	CTCCACGACGTACTACGC

1.8 蛋白质印迹法(Western blot)检测蛋白质表达

使用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液分离细胞中的总蛋白。Western blot 方法参考文献[7]。抗 Axl 抗体(1:1 000, ab219652)、抗 p-mTOR 抗体(1:11 000, ab109268)、抗 mTOR(1:1 000, ab32028)和抗 CyclinD1 抗体(1:100, ab16663)购自 Abcam Biotechnology。

1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5.0 软件和 SPSS 25.0 软件进行统计分析,计量资料符合正态分布时采用均数 ± 标准差描述,比较采用 *t* 检验,不服从正态分布时采用中位数描述,组间分析采用 Kruskal-Wallis 秩和检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子宫内膜间质细胞的培养及鉴定结果

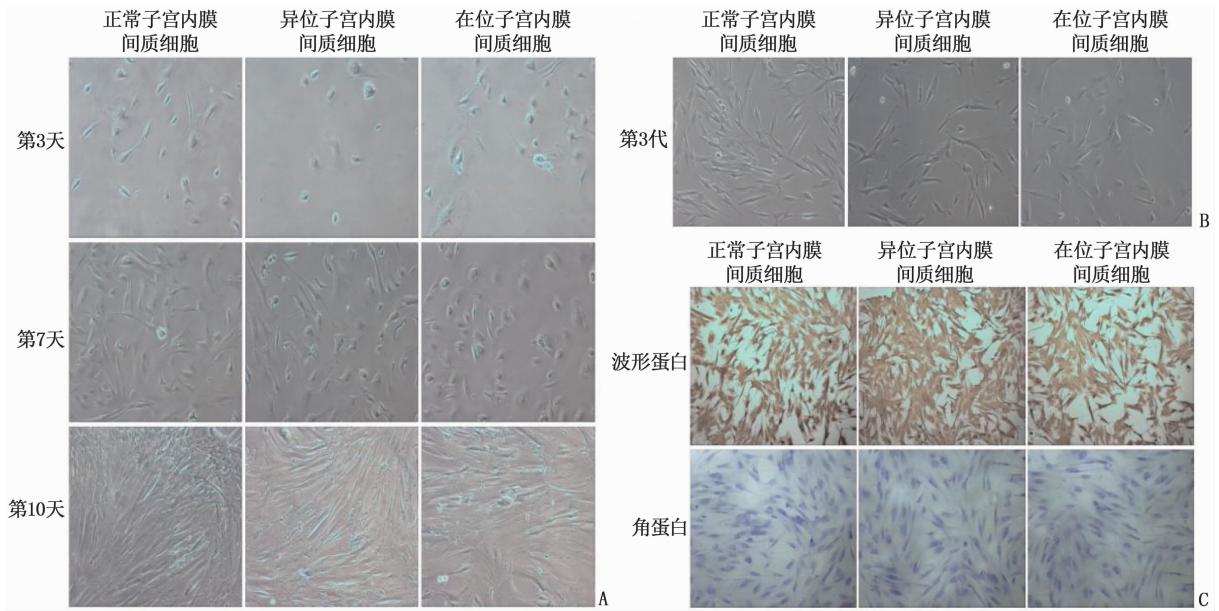
显微镜下观察到子宫内膜间质细胞的大小不一,形态不规则,多为圆形或多边形。培养 24 h 后,椭圆形子宫内膜间质细胞基本黏附在培养板上,有些细胞变为纺锤形;培养第 7 天后,细胞增殖速度加快(图 1A);传代 3 代后,细胞呈纺锤形,均匀健康;培养至第 5 代后,细胞增殖率降低,成簇生长形状变为细长的纺锤形(图 1B)。选择第 3 代细胞进行免疫组化鉴定,染色结果显示,波形蛋白在细胞浆呈深浅不一的棕褐色,表示其呈阳性(阳性率为 100%);细胞呈角蛋白(CK19)阴性,细胞质中未观察到棕色颗粒,显示出间充质细胞的特征(图 1C)。

2.2 3 组内膜细胞中 *Axl* mRNA、*mTOR* mRNA 的表达

采用 qRT-PCR 进行检测,与正常子宫内膜间质细胞比较,在位子宫内膜间质细胞、异位子宫内

膜间质细胞中 *Axl* mRNA、*mTOR* mRNA 的表达差

异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。



A: 第 3、7、10 天的细胞形态; B: P3 的细胞形态; C: 通过免疫组化法检测波形蛋白 (Vimentin) 和角蛋白 (CK19) 的表达 (放大 40 倍)。

图 1 子宫内膜间质细胞的分离、培养和鉴定

表 2 3 组内膜细胞中 *Axl* mRNA、*mTOR* mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	<i>Axl</i> mRNA	<i>mTOR</i> mRNA
正常子宫内膜间质细胞组	5	1.019 ± 0.226	1.020 ± 0.219
在位子宫内膜间质细胞组	5	1.444 ± 0.235*	1.497 ± 0.297*
异位子宫内膜间质细胞组	5	1.499 ± 0.205*	1.615 ± 0.272*

与正常子宫内膜间质细胞组比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 异位子宫内膜间质细胞最佳转染条件

选择生长状态良好、汇合率保持 90% 的子宫内

膜异位间质细胞,按照 90% 灰褐绿分析异位子宫内膜间质细胞,在充分的胰蛋白酶消化下,单细胞悬液可以在无抗生素情况下进行培养,并接种至 24 孔板中, 500 μ L/孔,随后在细胞培养箱中培养 24 h, 条件为 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5% CO_2 。配制 siRNA/lipofectamin RNAiMAX 复合物,混合后的复合物加入细胞培养板,置于细胞培养箱中培养(37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5% CO_2), 最佳转染时间为 48 h。见图 2。

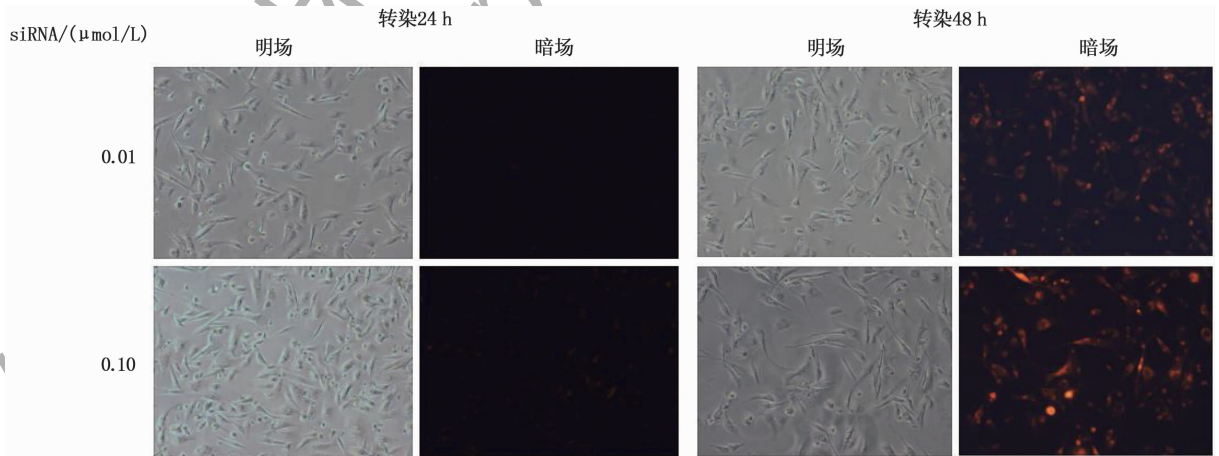


图 2 转染荧光图片 (放大 100 倍)

2.4 调控 *Axl* 对异位子宫内膜间质细胞中 *mTOR* 通路及凋亡的影响

2.4.1 4 组细胞中 *Axl* mRNA、*mTOR* mRNA、*CyclinD1* mRNA 比较: 与异位子宫内膜间质细胞组比较,异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组、异位子宫内膜间质细胞 + *Axl*-siRNA 组 *Axl* mRNA、

CyclinD1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组比较,异位子宫内膜间质细胞 + *Axl*-siRNA 组 *Axl* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与异位子宫内膜间质细胞 + 阴性对照组比较,异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组 *Axl* mRNA、*CyclinD1* mRNA 表达

水平显著降低 ($P < 0.05$)；与异位子宫内膜间质细胞 + 阴性对照组比较, 异位子宫内膜间质细胞 + Axl-siRNA 组中 Axl mRNA、CyclinD1 mRNA 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$)；与异位子宫内膜间质细胞组比较, 异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组中 mTOR mRNA 相对表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。见表 3、图 3A。

2.4.2 4 组细胞中 Axl、mTOR、磷酸化 mTOR (p-mTOR)、CyclinD1 蛋白比较: 与异位子宫内膜间质细胞组比较, 异位子宫内膜间质细胞 +

雷帕霉素组 p-mTOR、CyclinD1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)；与异位子宫内膜间质细胞组比较, 异位子宫内膜间质细胞 + Axl-siRNA 组 Axl、p-mTOR、CyclinD1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)；与异位子宫内膜间质细胞 + 阴性对照组比较, 异位子宫内膜间质细胞 + Axl-siRNA 组 Axl、p-mTOR、CyclinD1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)；4 组细胞中 mTOR 蛋白表达无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 4、图 3B 及图 3C。

表 3 4 组细胞中 Axl mRNA、mTOR mRNA、CyclinD1 mRNA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

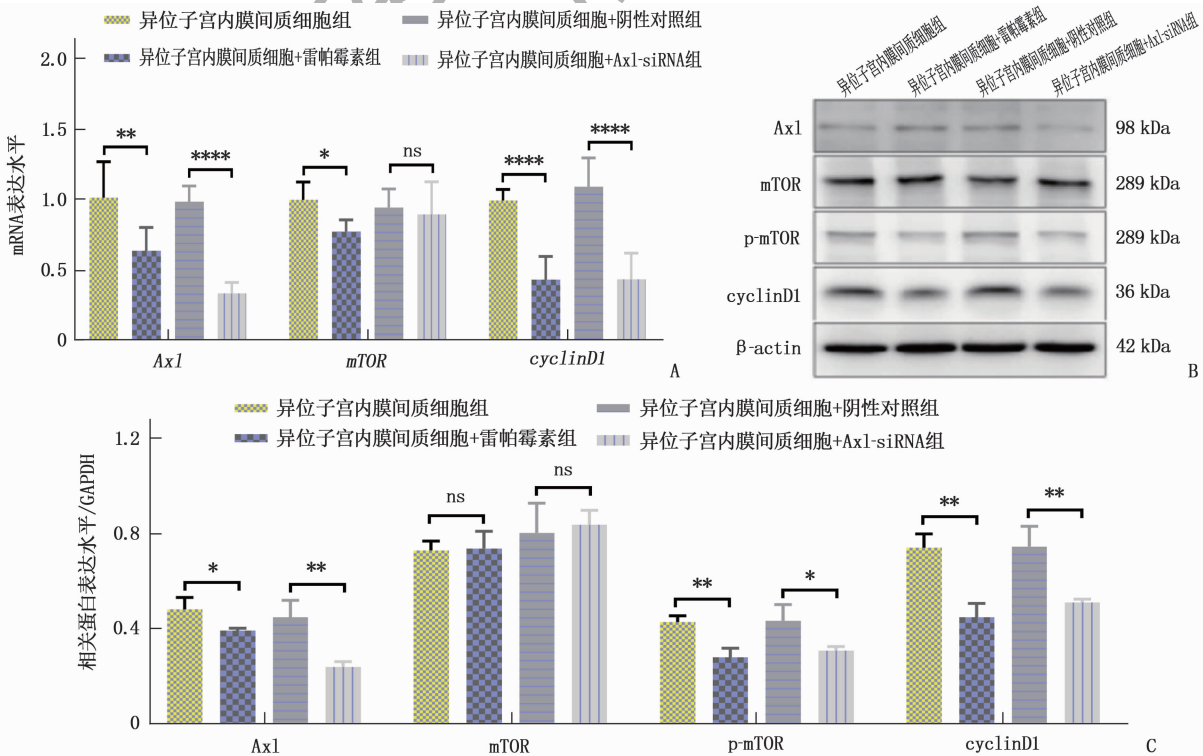
组别	n	Axl mRNA	mTOR mRNA	CyclinD1 mRNA
异位子宫内膜间质细胞组	5	1.023 ± 0.254	1.007 ± 0.128	1.002 ± 0.078
异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组	5	0.648 ± 0.165 [*]	0.782 ± 0.084 [*]	0.444 ± 0.164 [*]
异位子宫内膜间质细胞 + 阴性对照组	5	0.994 ± 0.111 [#]	0.952 ± 0.132	1.101 ± 0.203 [#]
异位子宫内膜间质细胞 + Axl-siRNA 组	5	0.346 ± 0.079 ^{*#Δ}	0.904 ± 0.231	0.445 ± 0.185 ^{*Δ}

与异位子宫内膜间质细胞组比较, * $P < 0.05$; 与异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组比较, # $P < 0.05$;
与异位子宫内膜间质细胞 + 阴性对照组比较, Δ $P < 0.05$ 。

表 4 4 组细胞中 Axl、mTOR、p-mTOR、CyclinD1 蛋白比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Axl	mTOR	p-mTOR	CyclinD1
异位子宫内膜间质细胞组	5	0.487 ± 0.107	0.735 ± 0.039	0.434 ± 0.026	0.746 ± 0.058
异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组	5	0.398 ± 0.010	0.743 ± 0.073	0.287 ± 0.038 [*]	0.454 ± 0.058 [*]
异位子宫内膜间质细胞 + 阴性对照组	5	0.454 ± 0.071	0.808 ± 0.125	0.439 ± 0.078	0.751 ± 0.085
异位子宫内膜间质细胞 + Axl-siRNA 组	5	0.245 ± 0.022 [#]	0.843 ± 0.061	0.314 ± 0.017 ^{*#}	0.516 ± 0.014 ^{*#}

与异位子宫内膜间质细胞组比较, * $P < 0.05$; 与异位子宫内膜间质细胞 + 阴性对照组比较, # $P < 0.05$ 。



A: 采用 qRT-PCR 检测 Axl mRNA、mTOR mRNA、CyclinD1 mRNA 表达; B: Western blot 检测 Axl、mTOR、p-mTOR、CyclinD1 的蛋白表达; C: 灰度值的定量分析。

图 3 调控 Axl 对异位子宫内膜间质细胞中 mTOR 通路及凋亡的影响

3 讨论

EMS 是一种常见的雌激素依赖性慢性炎症性疾病,约 50% 不孕症及 50% ~ 80% 盆腔痛患者最终会确诊 EMS。目前国内外学者认为应从全身疾病的角度出发,研究 EMS 的发病机制^[3],其中异位子宫内膜间质细胞的增殖、侵袭和黏附以及新血管的形成特性与恶性肿瘤的生物学行为相似^[10]。Axl 是 TAM 家族的成员,Axl 蛋白位于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的上游,该通路被认为是调节一系列生理活动如细胞增殖、存活和凋亡的经典信号通路^[11]。EMS 小鼠模型的体外和体内研究^[12]表明,AKT/mTOR 抑制剂可减少异位子宫内膜细胞的增殖。因此,研究^[13]认为 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可能在 EMS 的发生和发展中起作用。Axl 是一种具有独特结构的跨膜蛋白,由 Gas6 编码^[14]。Axl 具有黏附分子的性质和酪氨酸激酶的活性,而酪氨酸激酶通常在正常人体组织中表达。在 Gas6 诱导下 Axl 二聚化后,Axl 受体自身发生磷酸化,激活的 Axl 受体本身具有催化下游分子的酪氨酸蛋白酶活性,从而诱导相关信号转导。在 Axl 受体的作用下,PI3K 被激活,其产物在蛋白激酶的参与下进一步激活 AKT,从而影响下游因子的激活,其中一些下游因子参与细胞凋亡的调节^[15]。AKT 活化后,由于结构域的改变,PI3K 与 AKT 结合,AKT 产生催化活性并转导途径中的下一个分子。催化活性 AKT 从细胞膜转移到细胞质或细胞核,而后继续靶向调节下游信号分子,如 mTOR、Bad、细胞周期蛋白 D1 和核转录因子 κ B(NF- κ B)^[16],而 mTOR 是调节细胞生长、细胞周期和营养代谢的多种信号通路汇聚的中枢。

本研究结果表明,与正常子宫内膜间质细胞相比,在位子宫内膜间质细胞和异位子宫内膜间质细胞之间的 Axl 和 mTOR 基因表达差异有统计学意义($P < 0.05$),这可能表明 EMS 患者的异位子宫内膜和在位子宫内膜具有一定相似的生物学特征,并且可能在组织学上相关,这支持了“在位内膜决定论”理论。本研究结果还表明,在分子水平上,子宫内膜异位间质细胞中 Axl 和 mTOR 基因表达水平增加,这可能与该疾病的炎症和激素依赖性特征有关。这种过度表达也可能导致异位子宫内膜间质细胞在子宫腔外持续增殖,参与子宫内膜异位病灶的形成。本研究结果还表明,

异位子宫内膜间质细胞组中 Axl、mTOR 和 CyclinD1 基因表达无显著差异;与异位子宫内膜间质细胞组相比,异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组中 Axl、mTOR 和 CyclinD1 基因的表达存在显著差异;与异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组相比,异位子宫内膜间质细胞 + 阴性对照组的 mTOR 基因表达无显著差异;与异位子宫内膜间质细胞组相比,异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组中 p-mTOR 和 CyclinD1 基因的表达显著不同,这也证实了 mTOR 是 Axl 信号通路下游的关键因子。Axl 被激活后,继续靶向调节下游信号分子 mTOR,从而最终调节细胞周期及其营养代谢。本研究还发现,与异位子宫内膜间质细胞 + 雷帕霉素组相比,异位子宫内膜间质细胞 + Axl siRNA 组中 Axl、p-mTOR 和 CyclinD1 基因表达水平显著不同,同时证实了 mTOR 信号的作用是通过 PI3K/AKT/mTOR 通路激活而发挥生物学效应,进一步调节下游蛋白的表达,从而调节细胞生长、增殖、自噬和凋亡等生理功能^[17]。这一结果也支持了 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可能在 EMS 的发生和发展中发挥作用的结论。总之,Axl 和 mTOR 基因在异位内膜间质细胞中高度表达,使用雷帕霉素破坏调节细胞周期的 mTOR 可促进细胞凋亡,从而对异位子宫内膜细胞产生抑制作用。PI3K/AKT/mTOR 信号通路和其他相关信号网络参与 EMS 的发病机制。Axl 通过介导 PI3K/AKT 信号通路参与了异位子宫内膜间质细胞的活化与增殖,mTOR 可能通过 PI3K/AKT 信号通路以外的其他机制与 Axl 共同参与 EMS 的发生。调控 Axl、mTOR 可促进异位子宫内膜间质细胞凋亡,Axl、mTOR 激酶可成为非激素靶点药物的研究思路之一,需开展更深入的体内研究验证。

总之,EMS 的发病机制涉及许多方面,例如异常的信号网络、自噬、氧化应激、新生血管和细胞凋亡。深入研究 EMS 发病机制涉及的完整信号网络,并更准确地地在分子水平上筛选出有研究价值的治疗靶点,是非激素靶点药物的研究思路之一。

参考文献

- [1] SAUNDERS P T K, HORNE A W. Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects[J]. Cell, 2021, 184(11): 2807 - 2824.

测慢性肾病患者分泌型 MCAM 参与了肾小管周围微血管丢失,促进肾间质纤维化。因此随着患者的疾病严重程度与肾损伤的加重,其分泌型 MCAM 表达水平增高^[15]。本研究显示,ADPN、分泌型 MCAM 水平诊断 T2DN 的 AUC>0.75,联合诊断的预测效能更高,提示 ADPN、分泌型 MCAM 联合检测可能有助于 T2DN 的诊断。

综上所述,T2DN 患者血清 ADPN 水平随病情的加重而降低,分泌型 MCAM 水平随病情的加重而升高,两者或可作为 T2DN 的诊断及病情评估指标,且联合检测可提高 T2DN 的诊断率,具有一定临床意义。

参考文献

[1] 张乃莹,黎波. 2 型糖尿病相关血清生物标志物检测分析[J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24(21): 79-81.

[2] CHOI GS, MIN HS, CHA JJ, et al. SH3YL1 protein as a novel biomarker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2021, 31(2): 498-505.

[3] 吴恒兰,朱富祥,陈建祥,等. 高糖对人脐静脉内皮细胞表达的黏附分子 CD146 的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(5): 436-438.

[4] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2021, 41(9): 757-784.

[5] 李志超,孟钰,段会然,等. 单核细胞/高密度脂蛋白比值与 2 型糖尿病合并下肢动脉硬化闭塞症的相关性分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(3): 242-246, 252.

[6] 刘莉芳,赵桁,张云良,等. 2 型糖尿病患者血清 Nesfatin-1、HSP60 与下肢血管病变的相关性研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(11): 965-970.

[7] 倪晓英,廖卓君,冯建勋,等. 葡萄糖醛基葡糖胺聚糖硫酸盐对糖尿病肾病的干预效果[J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25(2): 63-66.

[8] 贾爱梅,陈开,宋永视. 脂联素基因多态性与冠心病研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(7): 627-633.

[9] REN X, ZHANG Z, YAN Z. Association between lipoprotein (A) and diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis[J]. Front Endocrinol; Lausanne, 2021, 12: 633529.

[10] 徐丽英,方豫东,曹焯民,等. 血清脂联素、胱抑素 C 与糖尿病肢体动脉闭塞症的糖脂代谢的关系[J]. 中国医药导报, 2020, 17(1): 98-101.

[11] 张铭晖. 糖尿病肾病患者血清脂联素、脂蛋白 A 和白介素 6 水平变化及意义[J]. 河北医药, 2019, 41(17): 2642-2645.

[12] 程春生,李纲. 脂联素、可溶性血管细胞黏附分子-1 在不同分期糖尿病肾病患者中的表达及临床意义[J]. 吉林医学, 2017, 38(12): 2274-2275.

[13] 赵中,陈文智,郑建国,等. 腹型肥胖 2 型糖尿病患者血清 ADP、Apelin、LIF 水平的变化及其意义[J]. 四川医学, 2018, 39(9): 1023-1026.

[14] LIU B, YANG S. Diagnostic Significance of Serum Soluble CD146 Level in Early-stage Diabetic Nephropathy[J]. Journal of China Medical University, 2017, 46(11): 1005-1008.

[15] ABED A, LEROYER A S, KAVVADAS P, et al. Endothelial-specific deletion of CD146 protects against experimental glomerulonephritis in mice[J]. Hypertension, 2021, 77(4): 1260-1272.

(本文编辑:周冬梅)

(上接第 12 面)

[2] AGARWAL S K, CHAPRON C, GIUDICE L C, et al. Clinical diagnosis of endometriosis: a call to action[J]. Am J Obstet Gynecol, 2019, 220(4): 354. e1-354. e12.

[3] TAYLOR H S, KOTLYAR A M, FLORES V A. Endometriosis is a chronic systemic disease; clinical challenges and novel innovations[J]. Lancet, 2021, 397(10276): 839-852.

[4] HEIDEMANN L N, HARTWELL D, HEIDEMANN C H, et al. The relation between endometriosis and ovarian cancer - a review[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2014, 93(1): 20-31.

[5] ZVEEMER A J M, FRENCH C B, MESFIN J, et al. Apoptotic bodies elicit Gas6-mediated migration of AXL-expressing tumor cells[J]. Mol Cancer Res, 2017, 15(12): 1656-1666.

[6] ZHU C J, WEI Y Q, WEI X W. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 153.

[7] LIU Y, QIN X Y, LU X F, et al. Effects of inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on the pain of sciatic endometriosis in a rat model[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2019, 97(10): 963-970.

[8] 刘燕. PI3K/Akt/mTOR 通路和萝卜硫烷对坐骨神经子宫内异位症大鼠模型疼痛机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2021.

[9] 刘畅. 子宫内异位症差异基因筛选及潜在靶标 GAS6 的功能验证[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021.

[10] DAHIYA A, SEBASTIAN A, THOMAS A, et al. Endometri-

osis and malignancy: the intriguing relationship[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2021, 155(1): 72-78.

[11] EDIRIWEERA M K, TENNEKON K H, SAMARAKOON S R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: biological and therapeutic significance[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 147-160.

[12] BARRA F, FERRO DESIDERI L, FERRERO S. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway for the treatment of endometriosis[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(17): 3626-3627.

[13] HUNG S W, ZHANG R Z, TAN Z, et al. Pharmaceuticals targeting signaling pathways of endometriosis as potential new medical treatment: a review[J]. Med Res Rev, 2021, 41(4): 2489-2564.

[14] SUN W S, MISAO R, IWAGAKI S, et al. Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases, Axl and Sky, in human uterine endometrium and ovarian endometriosis[J]. Mol Hum Reprod, 2002, 8(6): 552-558.

[15] LI M F, YE J J, ZHAO G J, et al. Gas6 attenuates lipopolysaccharide-induced TNF-α expression and apoptosis in H9c2 cells through NF-κB and MAPK inhibition via the Axl/PI3K/Akt pathway[J]. Int J Mol Med, 2019, 44(3): 982-994.

[16] TORREALBA N, VERA R, FRAILE B, et al. TGF-β/PI3K/AKT/mTOR/NF-κB pathway. Clinicopathological features in prostate cancer[J]. Aging Male, 2020, 23(5): 801-811.

[17] LIU Y, QIN X Y, LU X F, et al. Effects of inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on the pain of sciatic endometriosis in a rat model[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2019, 97(10): 963-970.

(本文编辑:梁琥)