

抑制巨噬细胞产生促炎性因子对异位内膜孕酮反应的影响

李林翰¹, 林明娟¹, 钱欢欢¹, 徐 炜², 朱 姝², 戴辉华², 王秀丽^{2*}

¹南京医科大学临床医学妇产科系, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学第一附属医院妇科, 江苏 南京 210026

[摘要] 目的:探讨抑制巨噬细胞产生促炎性细胞因子对子宫内膜异位症孕酮拮抗的影响。方法:原代培养15例异位子宫内膜基质细胞(endometrial stromal cells, ESCs),趋化实验检测异位ESCs表达的趋化因子配体12(CXCL12)对巨噬细胞的趋化能力。脂质体法介导核因子(nuclear factor, NF)- κ B诱捕寡核苷酸(oligonucleotide, ODNs)转染巨噬细胞后再用100 ng/mL脂多糖刺激培养巨噬细胞,电泳迁移率分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)法检测脂多糖刺激条件下巨噬细胞中NF- κ B的活化水平,ELISA检测巨噬细胞白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)表达水平的变化。建立异位ESCs和巨噬细胞的共培养系统,检测通过NF- κ B诱捕ODNs抑制巨噬细胞表达促炎性细胞因子对异位ESCs蜕膜化的影响。结果:异位ESCs分泌的CXCL12对巨噬细胞具有趋化作用。NF- κ B诱捕ODNs能显著抑制脂多糖诱导的巨噬细胞表达促炎性细胞因子。在巨噬细胞和异位ESCs的共培养系统中,NF- κ B诱捕ODNs能通过抑制巨噬细胞产生促炎性因子提高异位ESCs对孕酮的反应。结论:通过NF- κ B诱捕ODNs抑制巨噬细胞产生促炎性细胞因子有可能是减轻内异症炎症反应和改善孕酮抵抗的一种方法。

[关键词] 子宫内膜异位症;孕酮抵抗;巨噬细胞;核因子- κ B

[中图分类号] R711.71

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)07-966-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20180718

Amending of progesterone resistance in ectopic endometrial stromal cells via NF- κ B decoy oligonucleotides-mediated inhibition of pro-inflammatory cytokine production from LPS-triggered macrophages

Li Linhan¹, Lin Mingjuan¹, Qian Huanhuan¹, Xu Wei², Zhu Shu², Dai Huihua², Wang Xiuli^{2*}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, NMU, Nanjing 210029; ²Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210026, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of inhibition of proinflammatory cytokines produced by macrophages on the progesterone resistance in endometriosis. **Methods:** The primary ectopic endometrial stromal cells (ESCs) of 15 endometriosis women were cultured. The chemotactic test was used to detect the role of CXCL12 expressed by ectopic ESCs in the recruitment of macrophages. LPS (100 ng/mL) was used to stimulate macrophages to express pro-inflammatory cytokines after macrophages were transfected with nuclear factor (NF)- κ B decoy oligonucleotides (ODNs). The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) assay was used to detect the activation of NF- κ B in macrophages after LPS stimulation, and ELISA was used to detect the expression of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in macrophages. In the co-culture system of ectopic ESCs and macrophages, the effect of NF- κ B decoy ODNs on the decidualization of ectopic ESCs was observed. **Results:** CXCL12 secreted by ectopic ESCs played a role in the recruitment of macrophages in endometriosis. NF- κ B decoy ODNs significantly inhibited the expression of pro-inflammatory cytokines in macrophages. In co-culture system of macrophages and ectopic ESCs, NF- κ B decoy ODNs enhanced the progesterone-induced decidualization of ectopic ESCs by inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines from macrophages. **Conclusion:** This study indicates that NF- κ B targeting therapy of macrophages maybe an opportunity for mitigating the inflammatory response and progesterone resistance in endometriosis.

[Key words] endometriosis; progesterone resistance; NF- κ B; macrophages

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07):966-972]

[基金项目] 江苏省“333”工程(LGY2016003);江苏省妇幼健康项目(F201619);江苏省妇幼健康重点人才(FRC201709)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangxiuli@jsph.org.cn

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)是一种雌激素依赖性疾病^[1]。孕酮能拮抗雌激素的活性,是治疗EMS的经典药物。但是,EMS患者存在孕酮抵抗现象,表现为EMS患者子宫内膜蜕膜化障碍、受精卵种植缺陷和一部分患者对孕酮治疗无效^[2]。EMS也是一种慢性炎症性疾病,EMS的炎症环境和孕酮抵抗密切相关^[3-4]。巨噬细胞是EMS患者腹腔液和内异症病灶中最丰富的免疫细胞,也是促炎性细胞因子的主要产生细胞^[5-6]。减少巨噬细胞中促炎性细胞因子的产生有可能改善EMS的炎症环境和孕酮抵抗现象。核因子- κ B(nuclear factor, NF- κ B)活化是调控巨噬细胞产生促炎性细胞因子的关键环节^[7], NF- κ B 诱捕寡核苷酸(NF- κ B decoy ODNs)能竞争性地和靶基因的启动子区结合而拮抗NF- κ B的活性^[8-9]。在EMS中,是否能通过NF- κ B decoy ODNs抑制巨噬细胞产生促炎性细胞因子来改善EMS的炎症环境和孕酮抵抗现象目前尚未见报道。我们既往研究已证实,雌二醇(E2)诱导的异位子宫内膜基质细胞(endometrial stromal cells, ESCs)能比正常ESCs表达更多的基质细胞衍生因子(SDF-1/CXCL12)^[10-11]。巨噬细胞上有CXCL12的受体CXCR4的表达,异位ESCs产生的CXCL12是否能通过CXCL12/CXCR4轴趋化巨噬细胞目前尚未见报道。本研究原代培养异位ESCs,趋化实验检测异位ESCs表达的CXCL12对巨噬细胞的趋化能力。建立异位ESCs和巨噬细胞的共培养系统,检测NF- κ B诱捕ODNs拮抗巨噬细胞表达促炎性因子的能力和对孕酮诱导的异位ESCs蜕膜化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

2016年3月—2017年3月,选择在南京医科大学第一附属医院妇科因卵巢内异症囊肿接受手术治疗,且术后标本病理证实为EMS的15例患者的异位内膜,r-AFS分期为Ⅲ~Ⅳ期。所有患者术前3个月内均未使用过激素类药物治疗。正常子宫内膜取自本院门诊要求放置宫内节育环的正常女性,在放置节育环前轻轻刮取少许子宫内膜。所有组织标本均经南京医科大学第一附属医院伦理委员会同意和患者知情同意后获得。U937单核细胞购自中科院上海细胞库。

胎牛血清(FBS)、DMEM/F12培养基、RPMI-1640培养基(Gibco公司,美国);17 β -雌二醇(E2)、孕酮(P)、佛波酯(PMA)、环磷酸腺苷(cAMP)、脂多

糖(LPS)(Sigma公司,美国);CXCL12、白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、催乳素(PRL)ELISA检测试剂盒(R&D公司,美国);FITC标记的抗人CD68抗体、PE标记的抗人CXCR4抗体、APC标记的抗人HLA-DR抗体及流式同型对照抗体(BioLegend公司,美国);小鼠抗人胰岛素样生长因子结合蛋白-1(IGFBP-1)抗体(Abcam公司,美国);Boyden趋化小室(Costar公司,美国);NF- κ B decoy ODNs(上海生工生物工程公司);Lipofectamine™ 2000脂质体转染试剂(Invitrogen公司,美国);细胞核提取试剂盒(Panomics公司,美国);共培养系统(Corning Costar公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 异位ESCs的分离、培养和雌激素刺激

异位和正常ESCs的分离、培养和鉴定方法参见文献^[11-12]。原代培养的ESCs 90%汇片时传代到6孔板,6孔板中的细胞80%汇片时用无血清培养基饥饿培养过夜,12 h后换用含有 1×10^{-7} mol/L E2的无血清培养基培养。分别于第12、24、48 h收集上清液,ELISA检测上清液中CXCL12水平。

1.2.2 巨噬细胞分化培养和鉴定

含10% FBS的RPMI-1640培养基中加入50 nmol/L PMA诱导培养U937单核细胞,72 h后用流式细胞仪(FACS)检测细胞表面CD68分子和CXCR4表达水平。用FACS分选出表达CD68分子的巨噬细胞,RPMI-1640培养24 h后换用含有100 ng/mL LPS的培养液培养24 h,FACS检测经典活化的巨噬细胞(M1型巨噬细胞)表面HLA-DR表达水平。

1.2.3 巨噬细胞趋化实验

采用孔径为8 μ m的Boyden趋化小室进行巨噬细胞的趋化实验。在Boyden小室的下室中加入600 μ L E2诱导培养48 h的异位ESCs上清液,对照组下室中加入600 μ L无血清培养液。在Boyden系统的上室中加入200 μ L含 5×10^4 个细胞的巨噬细胞悬液,部分巨噬细胞已预先用CXCR4的特异性拮抗剂AMD3100孵育30 min。将Boyden小室放在37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育12 h,用棉签擦去膜上层的细胞,膜下层的细胞用4%多聚甲醛固定后用0.1%甲苯胺蓝染色计数。结果用趋化指数表示,即条件培养液趋化的细胞数除以无血清培养液趋化的细胞数。

1.2.4 LPS对巨噬细胞分泌促炎性细胞因子的影响

在含10% FBS的RPMI-1640培养基中加入100 ng/mL LPS刺激培养巨噬细胞,在LPS刺激的第6、12、24 h收集上清液用ELISA检测IL-1 β 和TNF- α

表达水平。

1.2.5 NF- κ B 诱捕 ODNs 合成及巨噬细胞转染

NF- κ B 诱捕 ODNs 的合成序列如下:5'-CCTTGAAGGGATTTCCCTCC-3'和 3'-GGAACCTCCCTA-AAGGGAGG-5'。对照的错义 decoy ODNs 序列为:5'-TTGCCGTACCTGACTTAGCC-3'和 3'-AACGGCA-TGGACTGAATCGG-5'。NF- κ B decoy ODNs 和错义 decoy ODNs 的 5'端均带有异硫氰酸荧光素(FITC)标记。当 6 孔板中的细胞 90% 汇片时,换用低血清 Opti-MEM 培养 24 h。24 h 后用脂质体介导 NF- κ B 诱捕 ODNs 或错义 ODNs 转染巨噬细胞,转染后 4 h 用 DMEM/F12 完全培养基培养。

1.2.6 电泳迁移率(EMSA)实验

巨噬细胞转染 NF- κ B 诱捕 ODNs 后 DMEM/F12 完全培养基培养 4 h,4 h 后换用含有 100 ng/mL LPS 的 DMEM/F12 培养,12 h 后提取巨噬细胞的胞核蛋白。与 NF- κ B 诱捕 ODN 一致的探针序列用 [γ - 32 P] 三磷酸腺苷标记。100 倍过量的未标记的 NF- κ B 诱捕 ODNs 和巨噬细胞核提取物混合孵育 15 min,15 min 后把 32 P 标记的探针加入其中继续室温孵育 30 min,非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后放射自显影观察结果。

1.2.7 NF- κ B 诱捕 ODNs 对巨噬细胞分泌促炎性细胞因子的影响

巨噬细胞转染 NF- κ B 诱捕 ODNs 后,DMEM/F12 完全培养基培养 4 h,4 h 后换用含有 100 ng/mL LPS 的 DMEM/F12 培养 24 h。分别在 LPS 刺激后的第 6、12、24 h 收集上清液用 ELISA 检测 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平。

1.2.8 异位 ESCs 和巨噬细胞共培养系统中异位 ESCs 蜕膜化的诱导和检测

选用膜孔径为 0.4 μ m 的 Transwell 小室建立异位 ESCs 和巨噬细胞的共培养系统。巨噬细胞(1×10^5 个/孔)接种至 6 孔板中,在转染 NF- κ B 诱捕 ODNs 后 4 h 换用 100 ng/mL LPS 刺激 24 h。同时,在 Transwell 上室接种异位 ESCs,用完全培养基培养 24 h。24 h 后把有异位 ESCs 生长的上室移至有巨噬细胞的 6 孔板中。继续培养 24 h 以后,换为含有 0.5 mmol/L 8-溴-cAMP 和 100 nmol/L P 的低血清(2% FBS) DMEM/F12 培养液,24、48、72、96 h 后,ELISA 检测上清液中 PRL 水平,收集处理 72、96 h 的细胞蛋白,Western blot 检测异位 ESCs 中的 IGFBP-1 表达水平。

1.3 统计学方法

所有数据使用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。

所有计量数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性时多组均数比较采用单因素方差分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异位、正常 ESCs 和巨噬细胞的鉴定

抗波形蛋白及抗角蛋白抗体免疫细胞化学染色鉴定异位和正常 ESCs,结果显示,分离培养的原代异位和正常 ESCs 纯度均大于 95%,这和我们既往的研究结果一致^[10-11]。50 nmol/L PMA 培养 U937 单核细胞 72 h 诱导巨噬细胞分化,FACS 检测细胞表面 CD68(巨噬细胞标志分子)和 CXCR4 表达水平。结果如图 1A 所示,PMA 诱导 72 h 后 78.1% 的单核细胞分化成了巨噬细胞,65.4% 的巨噬细胞既表达 CD68 分子也表达 CXCR4 分子。用抗 CD68 抗体通过 FACS 分选出巨噬细胞,再用 100 ng/mL LPS 刺激培养这些分选出的巨噬细胞,24 h 后用 FACS 检测巨噬细胞表面 HLA-DR 表达水平,HLA-DR 是经典活化的 M1 型巨噬细胞的表面标志之一。结果显示,90.7% 的巨噬细胞表达 HLA-DR 分子(图 1B),也就是 90.7% 的巨噬细胞分化成了 M1 型巨噬细胞。

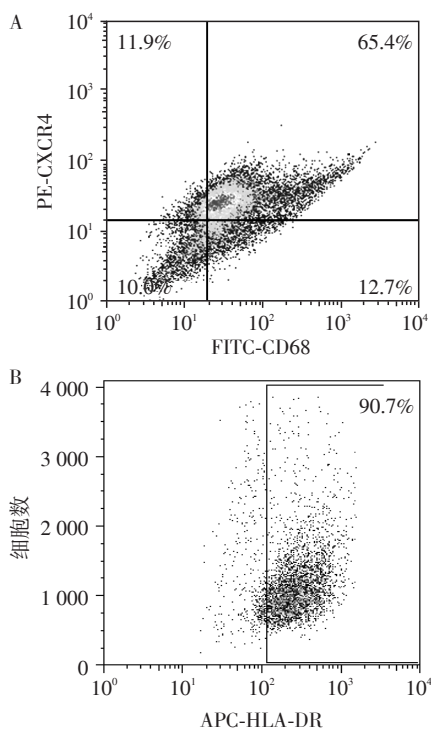


图1 FACS分析巨噬细胞表面CD68、CXCR4(A)和HLA-DR(B)分子

Figure 1 FACS analysis of CD68, CXCR4(A) and HLA-DR(B) on macrophages surface

2.2 E2诱导的异位和正常ESCs表达CXCL12水平

E2(1×10^{-7} mol/L)诱导培养异位和正常ESCs,分别在第12、24、48 h用ELISA检测上清液中CXCL12表达水平。结果如图2所示,在E2刺激培养后的12、24 h,异位和正常ESCs表达CXCL12水平无显著性差异($P>0.05$);E2诱导培养48 h,异位和正常ESCs表达CXCL12水平分别是($1\,349.16\pm 275.76$)pg/mL和(687.44 ± 128.66)pg/mL,异位ESCs表达CXCL12水平显著高于正常ESCs($P<0.05$)。

2.3 E2诱导的异位ESCs上清液对巨噬细胞趋化能力的影响

E2诱导培养异位ESCs 48 h的上清液600 μ L加入到Boyden趋化小室的下室中,上室加入200 μ L巨噬细胞悬液(5×10^4 个),孵育12 h后染色计数穿过膜的巨噬细胞数量。E2诱导的异位ESCs上清液对巨噬细胞的趋化指数是 6.36 ± 1.83 ,趋化的巨噬细胞数量是无血清培养液对照组的6倍。当巨噬细胞用CXCR4的拮抗剂AMD3100预处理30 min后,异位ESCs上清液的趋化指数是 4.24 ± 1.62 ,对巨噬细胞的趋化能力下降了33.33%,和未用AMD3100处理组相比差异有统计学意义($P<0.05,n=3$)。

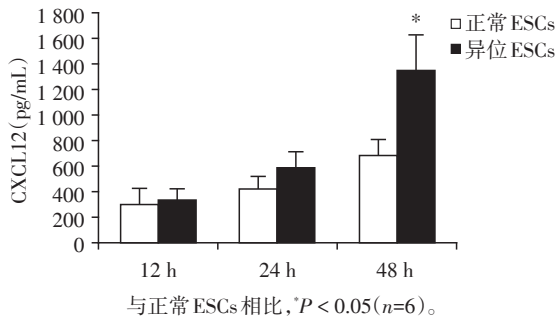


图2 E2诱导异位和正常ESCs表达CXCL12水平
Figure 2 Effect of E2 on CXCL12 expression in normal and ectopic ESCs

巨噬细胞转染NF- κ B诱捕ODNs后用LPS刺激,12 h提取巨噬细胞核蛋白,EMSA检测活化的NF- κ B水平。结果如图5所示,转染NF- κ B诱捕ODNs能显著抑制LPS诱导的巨噬细胞内NF- κ B的活化水平($P<0.05,n=3$)。

2.6 NF- κ B诱捕ODNs对共培养系统中异位ESCs蜕膜化的影响

PRL和IGFBP-1是子宫内膜蜕膜化指标。在巨噬细胞和异位ESCs共培养系统中,以cAMP和P诱导异位ESCs蜕膜化。结果显示,异位ESCs细胞诱导前以梭形为主(图6A),诱导后向椭圆形或多边形

2.4 NF- κ B诱捕ODNs对巨噬细胞表达IL-1 β 和TNF- α 的影响

培养在6孔板中的巨噬细胞先用脂质体转染NF- κ B诱捕ODNs或错义decoy ODNs,转染效率大于95%(图3)。4 h后用LPS(100 ng/mL)刺激培养24 h,ELISA检测第6、12、24 h上清液中的IL-1 β 和TNF- α 水平。结果如图4所示,在LPS刺激12 h后巨噬细胞表达IL-1 β 水平是(84.08 ± 15.31)pg/mL,较未用LPS处理的对照组相比显著上升($P<0.05$);TNF- α 在LPS刺激后的6 h表达就上升至(323.99 ± 97.21)pg/mL,与未用LPS刺激的对照组相比显著增加($P<0.05$)。当巨噬细胞转染NF- κ B诱捕ODNs后再用LPS刺激,在第12、24 h巨噬细胞IL-1 β 的表达量分别为(49.81 ± 10.14)pg/mL和(51.64 ± 10.03)pg/mL,均显著低于单用LPS刺激组($P<0.05$),在第6、12、24 h巨噬细胞表达TNF- α 的水平分别为(155.73 ± 38.2)pg/mL、(241.09 ± 70.13)pg/mL和(245.47 ± 45.84)pg/mL,均明显低于单用LPS刺激组($P<0.05$),转染错义decoy ODNs对LPS诱导的巨噬细胞IL-1 β 和TNF- α 的表达没有影响($P>0.05$)。

2.5 NF- κ B诱捕ODNs对LPS诱导NF- κ B活化的影响

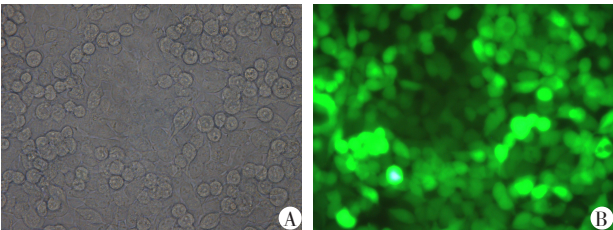
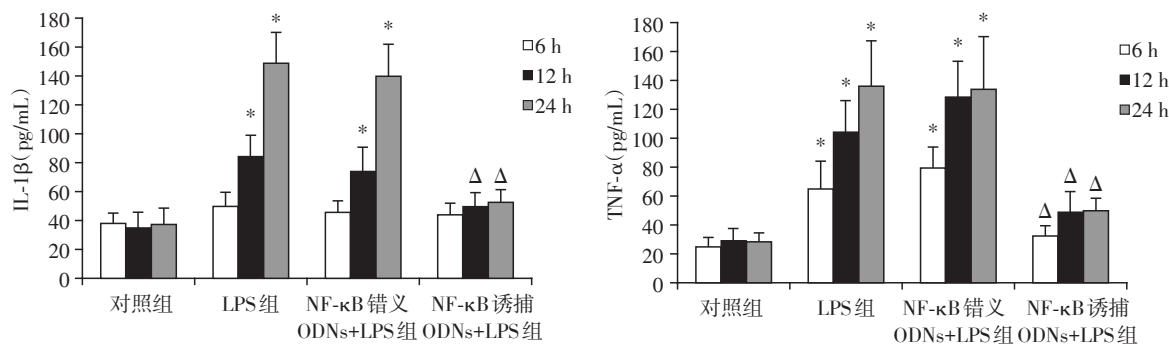


图3 脂质体介导NF- κ B诱捕ODNs(5'端有FITC标记)转染巨噬细胞的转染效率($\times 400$)
Figure 3 Lipofectamine-mediated transfection efficiency of NF- κ B decoy ODNs (FITC was labeled on the 5'-end) in macrophages($\times 400$)

转化(图6B)。PRL和IGFBP-1的表达变化如图7、8所示,当巨噬细胞预先转染NF- κ B诱捕ODNs后,异位ESCs表达PRL的水平在第96 h较转染NF- κ B错义ODNs组增加了1.86倍($P<0.05$),IGFBP-1蛋白的表达水平在第96 h也显著增加($P<0.05$)。错义decoy ODNs对PRL和IGFBP-1的表达水平没有影响($P>0.05$)。

3 讨论

巨噬细胞是EMS患者腹腔液和EMS病灶中最丰富的免疫细胞,在EMS发生和发展中起着关键作



与对照组相同时间点相比, * $P < 0.05$; 与LPS组相同时间点相比, ^Δ $P < 0.05$ ($n=3$)。

图4 NF-κB 诱捕 ODNs 对 LPS 诱导的巨噬细胞表达 IL-1β 和 TNF-α 的影响

Figure 4 Effect of NF-κB decoy ODNs on LPS-induced IL-1β, TNF-α expression in macrophages

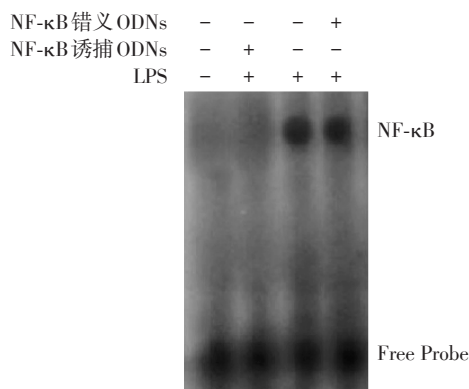
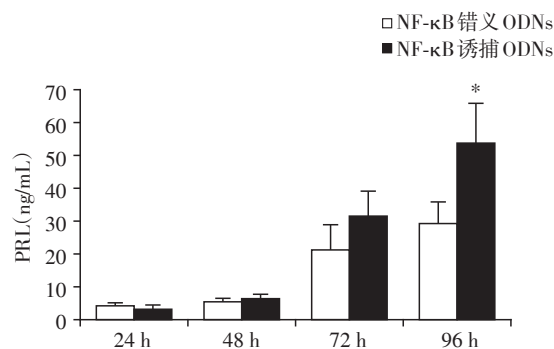


图5 NF-κB 诱捕 ODNs 对 LPS 诱导的 NF-κB 活化的影响
Figure 5 Effect of NF-κB decoy ODNs on LPS-induced NF-κB activation in macrophages



与 NF-κB 错义 ODNs 组相比, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图7 NF-κB 诱捕 ODNs 对共培养系统中异位 ESCs 表达 PRL 的影响

Figure 7 Effect of NF-κB decoy ODNs on PRL expression of ESCs in co-culture system

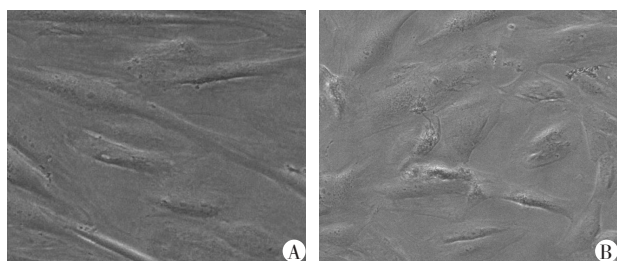
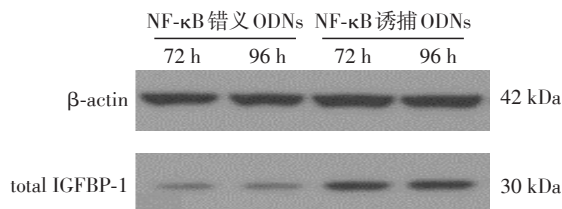


图6 异位 ESCs 蜕膜化诱导前(A)、后(B)的形态学变化(×400)

Figure 6 Morphological changes before (A) and after (B) the decidualization induced by cAMP plus P in ectopic ESCs (×400)

用^[5-6]。一些趋化因子已被证实可以趋化巨噬细胞到 EMS 部位,如单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和 RANTES 等^[13-14]。本研究结果显示,E2 诱导的异位 ESCs 比正常 ESCs 表达更多的 CXCL12,这与我们既往的研究结果一致^[10-11]。趋化实验结果显示,E2 诱导的异位 ESCs 上清液能募集巨噬细胞,当巨噬细胞用 CXCR4 拮抗剂 AMD3100 预处理之后,异位 ESCs



与错义 ODNs 组 72 h 相比, * $P < 0.05$; 与错义 ODNs 组 96 h 相比, ^Δ $P < 0.05$ ($n=3$)。

图8 NF-κB 诱捕 ODNs 对共培养系统中异位 ESCs 表达 IGFBP-1 的影响

Figure 8 Effect of NF-κB decoy ODNs on IGFBP-1 production of ESCs in co-culture system

上清液对巨噬细胞的趋化能力显著下降,说明 CXCR4/CXCL12 趋化轴在异位内膜募集巨噬细胞中起着一定作用。EMS 是一种雌激素依赖性疾病,局部存在高雌激素现象,这种局部高雌激素环境可通过 CXCR4/CXCL12 趋化轴促进巨噬细胞到异位内膜的聚集。

EMS 也是一种炎症依赖性疾病,显著升高的巨噬细胞和促炎性因子是 EMS 的特征之一^[15]。研究已证实,EMS 的慢性炎症环境是 EMS 患者出现孕酮抵抗的原因之一^[16],孕酮抵抗表现为部分 EMS 患者对孕激素治疗无反应或孕囊种植缺陷^[17]。抑制 EMS 的炎症状态有可能是减轻 EMS 孕酮抵抗的方法之一。巨噬细胞分为经典活化的 M1 型巨噬细胞和替代途径活化的 M2 型巨噬细胞^[18]。M1 型巨噬细胞能产生大量的促炎性细胞因子,如 IL-1 β 和 TNF- α 等。M2 型巨噬细胞能产生抗炎性细胞因子,如 IL-10 和 IL-4 等。研究发现,EMS 患者的子宫内膜中巨噬细胞倾向于 M1 型分化^[19]。EMS 中巨噬细胞的激活依赖于 NF- κ B 途径,抑制 NF- κ B 活化能显著减少实验性异位内膜病灶的生长^[20-21]。由此,我们设想通过拮抗巨噬细胞中 NF- κ B 活化来减少巨噬细胞分泌促炎性因子有可能是减轻 EMS 炎性状态的方法之一,也有可能是改善 EMS 孕酮抵抗现象的方法之一。人工合成的 NF- κ B 诱捕 ODNs 已被证实能竞争性抑制 NF- κ B 的活化和靶基因的表达^[22]。由于 NF- κ B 诱捕 ODNs 的高特异性和低不良反应,NF- κ B 诱捕 ODNs 已被用于很多免疫介导的体内和体外疾病动物模型^[23-25]。但是,目前尚未见 NF- κ B 诱捕 ODNs 在 EMS 中抑制巨噬细胞分泌促炎性因子的报道。

本研究结果显示,人工合成的 NF- κ B 诱捕 ODNs 能抑制 LPS 诱导的巨噬细胞分泌 IL-1 β 和 TNF- α 。在巨噬细胞和异位 ESCs 的共培养系统中,当巨噬细胞预先转染 NF- κ B 诱捕 ODNs 时,孕酮能诱导异位 ESCs 表达更多的 PRL 和 IGFBP-1 蛋白。说明 NF- κ B 诱捕 ODNs 能通过抑制巨噬细胞产生促炎性因子提高异位 ESCs 对孕酮的反应。通过 NF- κ B 诱捕 ODNs 拮抗巨噬细胞促炎性细胞因子的产生有可能是改善 EMS 孕酮抵抗的方法之一。

[参考文献]

- [1] Słopeń R, Męczekalski B. Aromatase inhibitors in the treatment of endometriosis [J]. Prz Menopauzalny, 2016, 15(1):43-47
- [2] Patel BG, Rudnicki M, Yu J, et al. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2017, 96(6):623-632
- [3] Al-Sabbagh M, Lam EW, Brosens JJ. Mechanisms of endometrial progesterone resistance [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 358(2):208-215
- [4] Grandi G, Mueller MD, Papadia A, et al. Inflammation influences steroid hormone receptors targeted by progestins in endometrial stromal cells from women with endometriosis [J]. J Reprod Immunol, 2016, 117:30-38
- [5] Capobianco A, Rovere-Querini P. Endometriosis, a disease of the macrophage [J]. Front Immunol, 2013, 4:9
- [6] Kralickova M, Vetvicka V. Immunological aspects of endometriosis: a review [J]. Ann Transl Med, 2015, 3(11):153
- [7] Song JH, Kang HB, Park SH, et al. Extracts of *Porphyra tenera* (Nori Seaweed) activate the immune response in mouse RAW264.7 macrophages via NF-kappaB signaling [J]. J Med Food, 2017, 20(12):1152-1159
- [8] Lin TH, Yao Z, Sato T, et al. Suppression of wear-particle-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine production in macrophages via NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotide: a preliminary report [J]. Acta Biomater, 2014, 10(8):3747-3755
- [9] Vuong TT, Ronning SB, Suso HP, et al. The extracellular matrix of eggshell displays anti-inflammatory activities through NF-kappaB in LPS-triggered human immune cells [J]. J Inflamm Res, 2017, 10:83-96
- [10] Wang X, Mamillapalli R, Mutlu L, et al. Chemoattraction of bone marrow-derived stem cells towards human endometrial stromal cells is mediated by estradiol regulated CXCL12 and CXCR4 expression [J]. Stem Cell Res, 2015, 15(1):14-22
- [11] Shi X, Xu W, Dai HH, et al. The role of SRC1 and SRC2 in steroid-induced SDF1 expression in normal and ectopic endometrium [J]. Reproduction, 2014, 147(6):847-853
- [12] Wang XL, Hang SP, Dai HH, et al. NF-kappaB decoy oligonucleotides suppress RANTES expression and monocyte chemotactic activity via NF-kappaB inactivation in stromal cells of ectopic endometrium [J]. J Clin Immunol, 2009, 29(3):387-395
- [13] Na YJ, Lee DH, Kim SC, et al. Effects of peritoneal fluid from endometriosis patients on the release of monocyte-specific chemokines by leukocytes [J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 283(6):1333-1341
- [14] Yuan DP, Gu L, Long J, et al. Shikonin reduces endometriosis by inhibiting RANTES secretion and mononuclear macrophage chemotaxis [J]. Exp Ther Med, 2014, 7(3):685-690
- [15] Malutan AM, Drugan T, Costin N, et al. Pro-inflammatory cytokines for evaluation of inflammatory status in endometriosis [J]. Cent Eur J Immunol, 2015, 40(1):96-102

- [16] Lessey BA, Kim JJ. Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why[J]. Fertil Steril, 2017, 108(1): 19-27
- [17] Young SL, Lessey BA. Progesterone function in human endometrium: clinical perspectives[J]. Semin Reprod Med, 2010, 28(1): 5-16
- [18] Na YR, Je S, Seok SH. Metabolic features of macrophages in inflammatory diseases and cancer [J]. Cancer Lett, 2018, 413: 46-58
- [19] Takebayashi A, Kimura F, Kishi Y, et al. Subpopulations of macrophages within eutopic endometrium of endometriosis patients [J]. Am J Reprod Immunol, 2015, 73(3): 221-231
- [20] Lousse JC, Van Langendonck A, Gonzalez-Ramos R, et al. Increased activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) in isolated peritoneal macrophages of patients with endometriosis [J]. Fertil Steril, 2008, 90(1): 217-220
- [21] Veillat V, Lavoie CH, Metz CN, et al. Involvement of nuclear factor-kappaB in macrophage migration inhibitory factor gene transcription up-regulation induced by interleukin-1 beta in ectopic endometrial cells [J]. Fertil Steril, 2009, 91(5 Suppl): 2148-2156
- [22] Farahmand L, Darvishi B, Majidzadeh-AK. Suppression of chronic inflammation with engineered nanomaterials delivering nuclear factor kappaB transcription factor decoy oligodeoxynucleotides [J]. Drug Deliv, 2017, 24(1): 1249-1261
- [23] Shimizu H, Nakagami H, Morita S, et al. New treatment of periodontal diseases by using NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides via prevention of bone resorption and promotion of wound healing [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(9): 2065-2075
- [24] Dinh TD, Higuchi Y, Kawakami S, et al. Evaluation of osteoclastogenesis via NFkappaB decoy/mannosylated cationic liposome-mediated inhibition of pro-inflammatory cytokine production from primary cultured macrophages [J]. Pharm Res, 2011, 28(4): 742-751
- [25] Sato T, Pajarinen J, Lin T, et al. NF-kB decoy oligodeoxynucleotide inhibits wear particle-induced inflammation in a murine calvarial model [J]. J Biomed Mater Res A, 2015, 103(12): 3872-3878

[收稿日期] 2018-02-24

参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度,以及读者提供有关信息的出处,应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。
2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料,一般不宜列入参考文献,可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。
3. 参考文献著录应执行GB7714-2005的规定,建议采用顺序编码制。
4. 顺序编码制的要求如下:
 - (1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后,用阿拉伯数字连续编序,将序号置于方括号内,并视具体情况把序号作为上角标,或作为语句的组成部分。如“张××^[1]研究发现……”,“李××等^[2]认为……”,“模型构建参考文献[3]”。
 - (2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全,著录格式为:
主要责任者. 题名:其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地:出版者,出版年,引文页码[引用日期]. 获取和访问路径
 - (3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况,则不需重复著录,按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。