

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002785

骨桥蛋白调控骨髓间充质干细胞抑制宫腔粘连内膜纤维化的作用研究

李满超, 彭金涛, 史亚男, 曾海涛, 曾智, 孙德娟, 郭映纯

(中山大学附属第六医院生殖医学中心, 广州 510000)

【摘要】目的:探究骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在抑制小鼠宫腔粘连(intrauterine adhesions, IUA)后纤维化中的作用。**方法:**分离培养 C57 BL/6 小鼠和 OPN^{-/-}C57 BL/6 小鼠的原代骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs);利用流式细胞仪检测分离的细胞表面抗原。将 30 只雌性小鼠随机分为假手术组、模型组、OPN^{-/-}MSCs 组、MSCs 组、溶剂组,每组 6 只。造模 1 周后,将 MSCs、OPN^{-/-}MSCs 分别注射至小鼠左右宫角;治疗结束 2 周后,二维超声诊断小鼠子宫形态,HE 染色和 Masson 染色检测子宫组织内膜形态变化及纤维化情况,免疫组化染色检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达,Western blot 检测转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、I 型胶原 α 1(type I collagen α 1, COL1A1)、III 型胶原 α 1(type III collagen α 1, COL3A1)蛋白表达。**结果:**成功分离并培养得到 MSCs 与 OPN^{-/-}MSCs 细胞,且在 2 组细胞中均检测到 CD29、CD44 和 CD90 呈阳性表达,CD34 呈阴性表达。与模型组比较,OPN^{-/-}MSCs 组和 MSCs 组子宫形态病变得得到改善,腺体数目不同程度增多,纤维化面积有所减少, α -SMA 表达明显下降($P=0.000$),子宫组织中 TGF- β 1、VEGF、COL1A1 及 COL3A1 蛋白表达水平均明显下降(均 $P=0.000$)。与 OPN^{-/-}MSCs 组比较, MSCs 组子宫形态改善更为明显,腺体数目增多,而纤维化面积减少, α -SMA 表达明显下降($P=0.000$),子宫组织中 TGF- β 1、VEGF、COL1A1 及 COL3A1 蛋白表达水平也明显下降(均 $P=0.000$)。**结论:**MSCs 比 OPN^{-/-}MSCs 注射宫腔粘连小鼠后抑制宫腔粘连内膜纤维化的作用更明显,表明 OPN 具有调控 MSCs 抑制小鼠宫腔粘连内膜纤维化的作用。

【关键词】宫腔粘连;纤维化;骨桥蛋白;骨髓间充质干细胞**【中图分类号】**R711**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-09-24

Effect of osteopontin regulating bone marrow mesenchymal stem cells on inhibiting endometrial fibrosis of intrauterine adhesions

Li Manchao, Peng Jintao, Shi Yanan, Zeng Haitao, Zeng Zhi, Sun Dejuan, Guo Yingchun

(Department of Reproductive Medicine, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University)

【Abstract】Objective: To explore the role of osteopontin(OPN) in inhibiting fibrosis after intrauterine adhesions(IUA) in mice.

Methods: Primary bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs) of C57 BL/6 mice and OPN^{-/-}C57 BL/6 mice were isolated and cultured, and the surface antigens of separated cells were detected by flow cytometry. Thirty female mice were randomized into sham operation group, model group, OPN^{-/-}MSCs group, MSCs group, and solvent group, with 6 mice in each group. One week after modeling, MSCs and OPN^{-/-}MSCs were injected into the left and right uterine horns of the mice respectively. Two weeks after the treatment, two-dimensional ultrasound was conducted for the diagnosis of mouse uterus morphology, HE staining and Masson staining for the detection of the morphological changes and fibrosis of the endometrium of the uterus, immunohistochemical staining for the detection of the expression of α -smooth muscle actin(α -SMA), and Western blot for the detection of the protein expression of transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), vascular endothelial growth factor(VEGF), type I collagen α 1(COL1A1), and type III collagen α 1(COL3A1).

Results: MSCs and OPN^{-/-}MSCs cells were successfully isolated and cultured, and expression of CD29, CD44 and CD90 were positive and expression of CD34 was negative in both groups. Compared with the model group, the morphological changes of the uterus in the OPN^{-/-}MSCs group and the MSCs group were improved, the number of glands increased in varying degrees, the area of fibrosis de-

creased, and the positive expression of α -SMA decreased significantly($P=0.000$). TGF- β 1, VEGF, COL1A1 and COL3A1 protein expression levels were significantly decreased(all $P=0.000$). Compared with the OPN^{-/-}MSCs group, the uterine mor-

作者介绍: 李满超, Email: limch3@mail.sysu.edu.cn,

研究方向: 宫腔粘连。

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金资助项目(编号: A2020541)。**优先出版:** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210412.1729.024.html>

(2021-04-13)

phology of the MSCs group improved more markedly, the number of glands increased, and the area of fibrosis decreased, the positive expression of α -SMA decreased significantly ($P=0.000$), and the expression levels of TGF- β 1, VEGF, COL1A1 and COL3A1 proteins also decreased significantly (all $P=0.000$). **Conclusion:** MSCs are more effective than OPN^{-/-}MSCs in inhibiting intrauterine adhesions and endometrial fibrosis in mice, indicating that OPN has the effect of regulating bone marrow mesenchymal stem cells to inhibit endometrial fibrosis of intrauterine adhesions in mice.

[Key words] intrauterine adhesions; fibrosis; osteopontin; bone marrow mesenchymal stem cells

宫腔粘连 (intrauterine adhesions, IUA) 是由外伤或手术引起的子宫内膜损伤所致, 可导致子宫腔部分或完全粘连消失, 并伴有进行性子宫内膜纤维化^[1]。临床上 IUA 常见症状为月经异常、不孕与反复性流产^[2-3]。宫腔镜下粘连分离术是 IUA 治疗的标准临床手段, 但术后二次复发率较高^[4]。目前, 其他一些治疗方法如插入 Foley 导管球囊和注射透明质酸也已用于 IUA 的临床治疗中^[5]。然而, 这些策略在减轻子宫内膜纤维化和抑制粘连的重建方面均具有一定的局限性, 尤其是在较为严重的 IUA 治疗中, 如何抑制子宫内膜纤维化对 IUA 的临床治疗具有重要的指导作用。

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 具有多向分化潜能, 已运用于多种组织修复中。干细胞工程为宫腔粘连的治疗开辟了一条新的道路。以往的研究已经证明其能通过促进子宫内膜再生来治疗宫腔粘连^[6-7]。骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 广泛存在于组织及细胞中, 具有多项生理功能, 参与免疫调节、组织修复等^[8], 因此推测 OPN 可能是调控 MSCs 参与宫腔粘连内膜纤维化的重要分子。本研究通过观察 OPN 在 MSCs 抑制宫腔粘连内膜纤维化的作用, 为阐明 OPN 治疗宫腔粘连提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康野生型雌性 C57 BL/6 小鼠 35 只, OPN^{-/-}C57 BL/6 小鼠 5 只, 4~5 周龄, 常规饲养。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、青霉素、链霉素、L-谷氨酰胺、胰蛋白酶和 DMEM 培养基购自美国 Sigma 公司, HE 染色试剂和 α -SMA 免疫组织化学染色试剂购自上海碧云天生物公司, Masson 染色试剂和 BCA 蛋白检测试剂盒购自北京索莱宝生物公司, PVDF 膜和 ECL 发光液购自美国 Millipore 公司, 兔抗人 CD29、兔抗人 CD34、兔抗人 CD44、兔抗人 CD90、兔抗人 α -SMA、兔抗人 TGF- β 1、兔抗人 VEGF、兔抗人 COL1A1、

兔抗人 COL3A1 及 HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自英国 Abcam 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 MSCs 分离与培养 取 C57 BL/6 小鼠和 OPN^{-/-}C57 BL/6 小鼠各 5 只, 脱颈处死, 在无菌环境下取出股骨和胫骨, PBS 清洗, 将股骨断开并暴露骨髓腔, 移入含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素与 0.1 g/L 链霉素、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM 培养液中, 采用培养基反复冲洗并收集冲洗液, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清后, 加入新鲜培养液重悬细胞, 调整细胞浓度并按 1×10^6 个/mL 的密度接种于培养瓶内, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 24 h 后换液, 除去悬浮细胞及杂质。之后每 3 d 更换 1 次培养液, 当细胞基本长满瓶底壁时, 滴加 0.25% 胰蛋白酶消化并传代, 继续培养。

1.2.2 流式细胞术检测 收集培养的第 5 代 MSCs, 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 漂洗细胞, 取 100 μL 的 FACS 缓冲液重悬细胞, 加入 5 μL 异硫氰酸荧光素标记的 CD29 (CD29-FITC)、CD34-FITC、CD44-FITC 及 CD90-FITC, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗环境下孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次后, 使用流式细胞仪进行检测分析。

1.2.3 动物造模 C57 BL/6 小鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉, 置于无菌环境下, 双侧背部备皮, 沿腹部切开一切口, 取出右侧子宫角, 在宫体和宫角连接处上方约 1 cm 处剪开一直径为 5 mm 的切口, 使用直径 2 mm 的刮匙, 探入宫腔, 上下搔刮子宫内膜组织, 刮至子宫内膜粗糙、子宫壁菲薄半透明, 损伤长度 3~4 cm 时停止搔刮, 相同的方法处理左侧子宫。处理结束后, 缝合子宫, 逐层缝合小鼠腹部切口。假手术组小鼠开腹后, 腹腔暴露约 15 min 后, 逐层缝合腹部切口, 子宫不予处理。

1.2.4 动物分组与治疗 将造模后 24 只小鼠随机分为 4 组: 模型组、MSCs 组、OPN^{-/-}MSCs 组、溶剂组, 每组 6 只, 同时取 6 只小鼠设置为假手术组。建模结束 1 周后, 用镊子分离粘连的子宫内膜, 给予 MSCs 组小鼠左右宫角注射 100 μL 分离培养的 MSCs 细胞悬液 (2×10^6 个/mL), OPN^{-/-}MSCs 组小鼠左右宫角注射 100 μL 分离培养的 OPN^{-/-}MSCs 细胞悬液 (2×10^6 个/mL), 溶剂组小鼠左右宫角注射 100 μL 的 DMEM 培养液。注射 2 周后, 处死各组小鼠, 收集双侧子宫组织, 观察各组小鼠子宫大体形态, 将一部分使用 4% 多聚甲醛固定, 另一部分置于液氮冷冻后放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.5 HE 染色 将浸泡于 4% 多聚甲醛的子宫组织固定好后取出,经梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋后,切片切成厚度为 5 μm 的连续切片。常规脱蜡分化后,进行 HE 染色实验,中性树胶封片,于光学显微镜下观察组织病理变化并拍摄图像。

1.2.6 Masson 染色 将子宫组织石蜡切片常规脱蜡分化后,用 Weigert 铁苏木素液染处理 10 min,滴加 1% 盐酸乙醇分化数秒,流水冲洗,Masson 染色液反蓝处理 3 min,蒸馏水洗涤,采用丽春红酸性品红液染色 5 min,1% 磷酸水溶液分化 5 min,加入苯胺蓝染液染色 5 min,1% 冰醋酸水溶液浸泡洗涤 1 min,使用 95% 乙醇和无水乙醇依次脱水,二甲苯透明 10 min,中性树胶封片,于光学显微镜下观察并拍摄图像。

1.2.7 免疫组化染色 将子宫组织石蜡切片进行常规脱蜡分化后,置于 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液中进行抗原修复,3% H_2O_2 溶液去除内源性过氧化物酶。加入 $\alpha\text{-SMA}$ (1:100) 为一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,PBS 冲洗后,加入稀释的 HRP 标记山羊抗兔 IgG (1:1 000) 为二抗,室温下孵育 30 min,PBS 冲洗,滴加 DAB 显色,复染,透明,中性树胶封片,于光学显微镜下观察并拍摄图像。

1.2.8 Western blot 检测 将子宫组织在无菌条件下剪碎,加入预冷的 RIPA 裂解液进行裂解,以 12 000 r/min 离心 5 min,获得上清液,BCA 试剂盒说明测定蛋白浓度。取 45 μg 总蛋白通过 10% SDS-PAGE 分离,并转移至 PVDF 膜上。TBST 洗涤,采用 5% 山羊血清在室温下封闭 2 h,TBST 洗涤,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日 TBST 洗膜,加入二抗,室温下孵育 2 h。TBST 洗涤后,滴加 ECL 发光液显影,Image J 图像分析软件统计各条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算蛋白的表达水平。

1.3 统计学处理

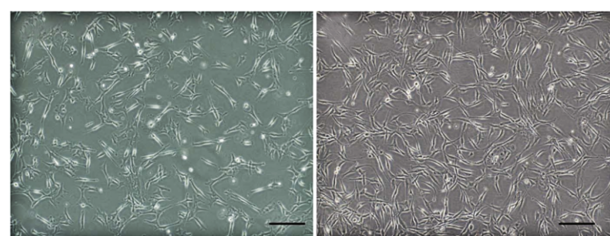
采用 SPSS 21.0 进行统计学分析。计量资料均采用均

数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多样本比较采用单因素方差分析;两两比较采用 LSD 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MSCs 与 OPN⁺MSCs 形态观察

培养 24 h,细胞开始贴壁生长,呈圆形或多边形。培养 3 d,贴壁细胞增大并开始增殖,细胞形态呈梭形或纺锤形,并形成大小不一的集落。继续培养后,贴壁的 MSCs 呈网状或放射状,增殖现象明显,细胞核变大,呈椭圆形(图 1)。



A. MSCs

B. OPN⁺MSCs图 1 骨髓间充质干细胞形态观察 (100 $\times$)

2.2 流式细胞术检测结果

流式细胞术检测结果显示,从小鼠骨髓分离的 MSCs 和 OPN⁺MSCs 中均检测到 CD29、CD44 和 CD90 呈阳性表达,而 CD34 呈阴性表达(图 2)。

2.3 造模后小鼠子宫形态学观察比较

造模后小鼠子宫形态学观察结果显示,假手术组小鼠子宫未见明显异常现象,色泽红润,且弹性良好;与假手术组相比,模型组子宫搔刮损伤 1 周后,出现萎缩现象,并观察到子宫表面苍白,凹凸不平,说明宫腔粘连小鼠模型构建成功(图 3)。

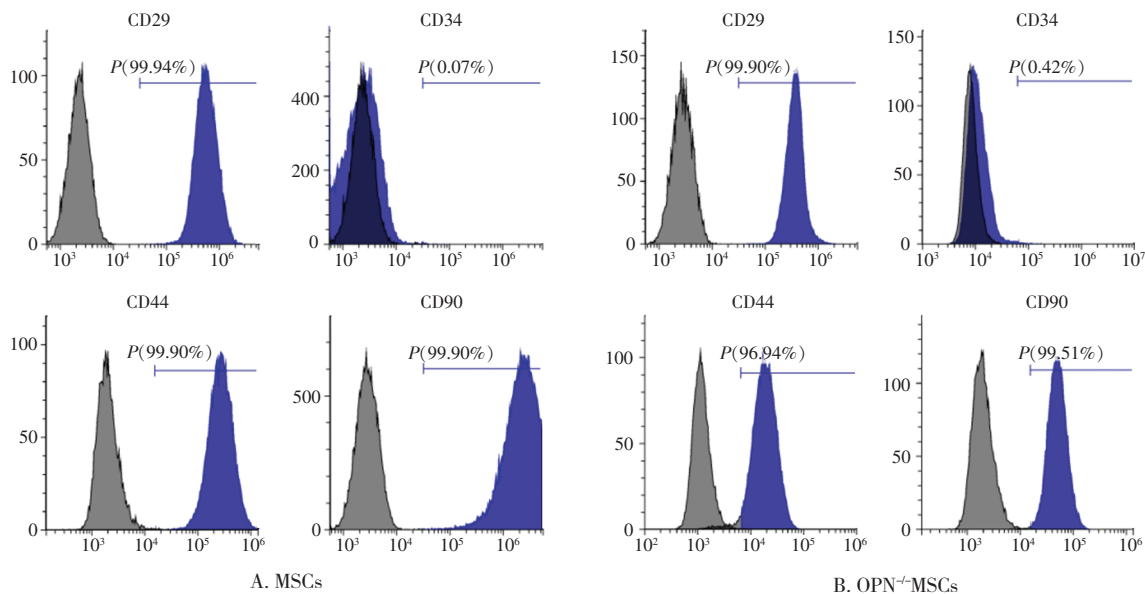


图 2 流式细胞术检测 MSCs 中 CD29、CD34、CD44 及 CD90 表达

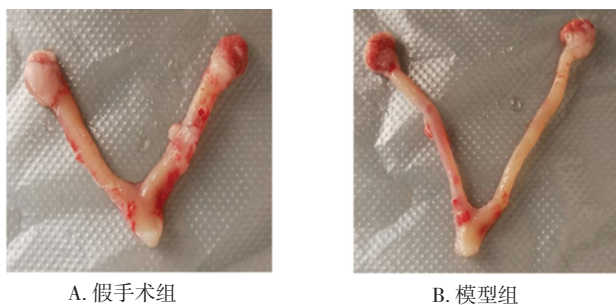


图 3 小鼠子宫形态学观察

2.4 各组小鼠子宫组织 HE 染色结果

HE 染色结果显示,假手术组小鼠子宫腔形态、腺体状态均正常。模型组和溶剂组小鼠子宫均出现子宫腔萎缩,宫腔狭小,内膜变薄,腺体数目变少,内膜基质纤维组织增生等现象。与模型组小鼠比较,经 MSCs 和 OPN⁺MSCs 治疗的小鼠子宫腔萎缩和宫腔狭小的现象有所改善,且 MSCs 小鼠子宫病变现象改善更为明显,子宫形态已趋近于假手术组小鼠正常的子宫形态(图 4)。

2.5 各组小鼠子宫组织 Masson 染色结果

Masson 染色结果显示,与假手术组子宫组织相比,模型组子宫损伤后子宫内组织蓝染胶原纤维逐渐增多,提示在子宫损伤后愈合过程中伴有明显的纤维化。与模型组子宫组织相比,OPN⁺MSCs 组和 MSCs 组子宫内组织蓝染胶原纤维含量减少,且 MSCs 组子宫内组织蓝染胶原纤维含量较 OPN⁺MSCs 组有所减少,而溶剂组子宫内组织蓝染胶原纤维含量与模型组之间无明显差异(图 5)。

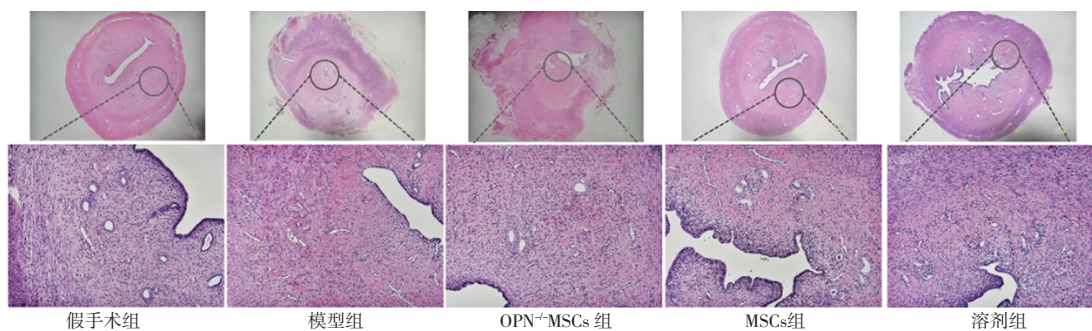


图 4 各组小鼠子宫组织 HE 染色(上图 40×,下图 100×)

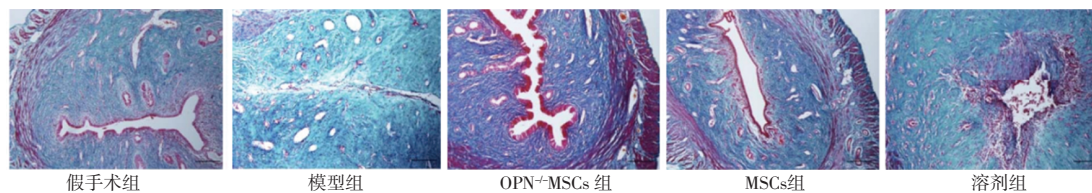


图 5 各组小鼠子宫组织 Masson 染色(100×)

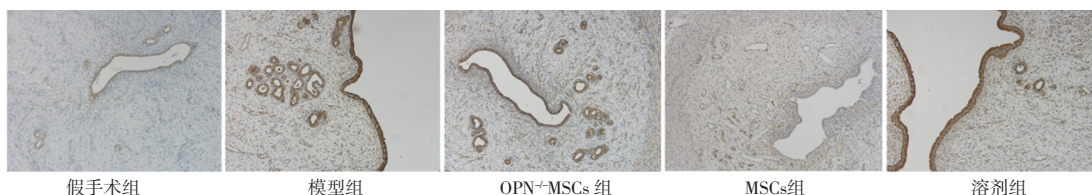


图 6 各组小鼠子宫组织 α-SMA 免疫组化染色(100×)

2.6 各组小鼠子宫组织中 α-SMA 表达比较

各组小鼠子宫组织中 α-SMA 免疫组化染色结果显示,假手术组、模型组、MSCs 组、OPN⁺MSCs 组、溶剂组 α-SMA 表达的差异具有统计学意义($F=232.754, P=0.000$)。两两比较结果显示,与假手术组比较,模型组 α-SMA 表达明显增加($P=0.000$);与模型组比较,OPN⁺MSCs 组和 MSCs 组表达明显下降(均 $P=0.000$),且 MSCs 组 α-SMA 表达低于 OPN⁺MSCs 组($P=0.000$),溶剂组 α-SMA 表达与模型组之间无明显差异($P=0.901$)(图 6,表 1)。

表 1 各组小鼠子宫组织中 α-SMA 阳性表达比较($\bar{x} \pm s$)

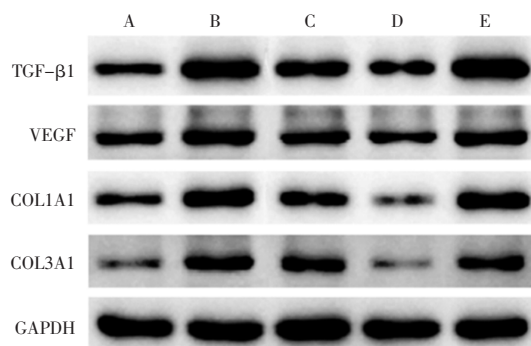
组别	α-SMA 阳性表达率/%
假手术组	12.45 ± 1.16
模型组	41.88 ± 4.23 ^a
OPN ⁺ MSCs 组	30.92 ± 3.27 ^b
MSCs 组	19.18 ± 2.03 ^{bc}
溶剂组	43.67 ± 4.50
<i>F</i> 值	232.754
<i>P</i> 值	0.000

注:a,与假手术组比较, $P<0.05$;b,与模型组比较, $P<0.05$;c,与 OPN⁺MSCs 组比较, $P<0.05$

2.7 各组小鼠子宫组织 TGF-β1、VEGF、COL1A1 及 COL3A1 蛋白表达水平比较

Western blot 检测结果显示,假手术组、模型组、MSCs 组、OPN⁺MSCs 组、溶剂组 TGF-β1、VEGF、COL1A1、COL3A1 蛋白表达水平的差异具有统计学意义($F=118.599, P=0.000; F=$

82.714, $P=0.000$; $F=107.354$, $P=0.000$; $F=119.958$, $P=0.000$)。两两比较结果显示,与假手术组比较,模型组小鼠子宫组织中 TGF- β 1、VEGF、COL1A1 及 COL3A1 的蛋白表达水平均明显升高(均 $P=0.000$);与模型组比较,OPN⁺MSCs 组中 TGF- β 1、VEGF、COL1A1、COL3A1 蛋白表达水平和 MSCs 组中 TGF- β 1、VEGF、COL1A1、COL3A1 蛋白表达水平均明显下降(均 $P=0.000$),且 MSCs 组中各蛋白表达水平较 OPN⁺MSCs 组也下降(均 $P=0.000$),而溶剂组和模型组各 TGF- β 1、VEGF、COL1A1、COL3A1 蛋白表达水平之间没有明显差异($P=0.286$; $P=0.681$; $P=0.642$; $P=0.912$)(图 7,表 2)。



注:A 指代假手术组;B 指代模型组;C 指代 OPN⁺MSCs 组;D 指代 MSCs 组;E 指代溶剂组

图 7 Western blot 检测小鼠子宫组织中 TGF- β 1、VEGF、COL1A1 及 COL3A1 蛋白表达

3 讨论

在先前接受过包括子宫刮除术和宫腔镜检查在内的子宫机械操作外科手术的女性中,均可以检测到 IUA。据统计,在所有流产妇女中,IUA 的发生率为 6%~30%。此外,在分娩后进行子宫刮除术的妇女中,IUA 的发生率可高达 25%^[4]。促进子宫内膜修复、预防术后粘连对于治疗 IUA 患者来说至关重要。从组织学角度来说,IUA 就是内膜基质被纤维组织替代,腺体被不活跃的柱状上皮替代,后者对激素刺激不敏感,最终子宫内膜结构遭到破坏,导

致子宫功能失常^[9-10]。因此,抑制 IUA 后内膜纤维化是其治疗的关键一步。

目前,干细胞疗法已在多种退行性疾病和组织修复与再生中应用,干细胞具有取代子宫内膜中受损细胞的潜力。多项研究表明,子宫内膜中存在的干细胞可能起源于骨髓,在子宫内膜重建中,细胞交换和炎症刺激发挥重要作用,通过宫腔内移植 MSCs 可以治疗 IUA。Santamaria X 等^[11]从外周血中分离出骨髓来源干细胞,通过导管自体移植到 IUA 子宫螺旋动脉中后,16 个 IUA 患者中 15 个恢复了月经,其中 1 名患者成功经阴道分娩足月儿。Yang H 等^[12]研究发现,维生素 C 能促进 PF-127 凝胶包裹的 MSCs 生长,并在 IUA 大鼠中证明维生素 C、MSCs 和 PF-127 三者联合治疗能促进子宫内膜修复,由此推断维生素 C 和 PF-127 可能为 MSCs 创造一个更有利的生存环境,提高 MSCs 治疗作用。

OPN 通过其精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列与细胞表面整合素受体的相互作用而参与多种生物学功能。已经明确的几种整合素中, α v β 3 整合素能够与 OPN 中的 RGD 序列结合^[13]。而整联蛋白在妊娠中的作用已被逐渐揭晓。例如, α v β 3 整联蛋白表达的改变与几种人类不育相关的病理状况有关^[14]。女性宫腔内膜中,OPN 随着月经周期呈现周期性调控,整个月经周期的子宫内膜均可表达 α v β 3,而在分泌期子宫内膜才开始表达 OPN。OPN 在子宫内膜表达的时序性与孕酮的正向调控有关^[15]。在组织修复过程中,由于 OPN 具有 RGD 高度保守序列,且此序列存在凝血酶裂解位点,可与细胞整合素结合介导细胞黏附与迁移,RGD 序列被凝血酶裂解后更能刺激细胞黏附与迁移^[13]。

此外,OPN 促进内皮细胞的增殖、迁移及新生血管的形成,调节血管平滑肌细胞的黏附和迁移,参与血管重塑的作用^[8]。而 MSCs 具有调节免疫、炎症反应及组织修复的作用,宫腔应用中需要有黏附分子协同作用^[16]。MSCs 作为载体携带 OPN 进入宫腔,

表 2 各组小鼠子宫组织中 TGF- β 1、VEGF、COL1A1 及 COL3A1 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF- β 1	VEGF	COL1A1	COL3A1
假手术组	0.36 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.02
模型组	1.25 $\pm$ 0.13 ^a	0.90 $\pm$ 0.10 ^a	0.98 $\pm$ 0.09 ^a	0.88 $\pm$ 0.09 ^a
OPN ⁺ MSCs 组	0.76 $\pm$ 0.08 ^b	0.54 $\pm$ 0.05 ^b	0.71 $\pm$ 0.07 ^b	0.71 $\pm$ 0.08 ^b
MSCs 组	0.43 $\pm$ 0.04 ^{bc}	0.43 $\pm$ 0.04 ^{bc}	0.23 $\pm$ 0.03 ^{bc}	0.18 $\pm$ 0.02 ^{bc}
溶剂组	1.27 $\pm$ 0.14	0.89 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.11	0.83 $\pm$ 0.08
F 值	118.599	82.714	107.354	119.958
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与假手术组比较, $P<0.05$;b,与模型组比较, $P<0.05$;c,与 OPN⁺MSCs 组比较, $P<0.05$

加速新生血管形成,在良好的血管化基础上及 OPN 的促黏附、迁移作用下,促进 MSCs 的黏附及归巢,将有效放大 MSCs 的原有生理功能。本研究观察到,注射 MSCs 的 IUA 小鼠比注射 OPN⁺MSCs 的 IUA 小鼠子宫形态恢复更明显,子宫腔萎缩和宫腔狭小的现象改善也更为明显。说明 OPN 具有促进 MSCs 修复 IUA 小鼠子宫的作用,这一结果为临床上 OPN 协同 MSCs 改善 IUA 的研究提供了一定的实验依据。

纤维化是由慢性和急性刺激引起的器官功能障碍与衰竭的现象,其过程涉及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分的过度积累^[17]。 α -SMA 通常被认为是 ECM 过度积累,以及成纤维细胞和活化成纤维细胞敏感的生物标志物。 α -SMA 在 IUA 内膜组织中的高表达与粘连严重程度相关,并可以分泌 TGF- β 1、I 型胶原和 III 型胶原等细胞外基质^[18]。同时,VEGF 与多种组织器官的纤维化密切相关,在 IUA 的发生发展过程中起重要作用^[19]。本研究与经过 OPN⁺MSCs 治疗的 IUA 小鼠比较,MSCs 治疗的 IUA 小鼠的子宫内膜中 α -SMA、TGF- β 1、VEGF、COL1A1 及 COL3A1 蛋白表达均明显下降,说明 OPN 对 IUA 小鼠的子宫内膜纤维化具有很好的抑制作用。

综上所述,本研究发现 OPN 能够促进 MSCs 抑制 IUA 小鼠宫腔纤维化,并促进小鼠子宫内膜修复。目前,IUA 的临床治疗处于瓶颈状态,在重度 IUA 后引起宫腔基底层大面积受损,并导致子宫内膜功能丧失,术后应用一些方法(如球囊、节育环等)虽可在一定程度上预防 IUA 复发,但不能有效抑制宫腔纤维化发生。本研究取得了良好的实验效果,为临床研究 OPN 在治疗 IUA 方面的作用提供了实验依据,但 OPN 促进 MSCs 改善小鼠子宫内膜恢复维持的机制仍然未知。此外,移植 MSCs 的障碍,如使用的最佳剂量与时机、随着时间延长其分化能力下降等问题需要进一步探究,以期为临床上 IUA 的治疗提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Zhang LP, Wang M, Shang X, et al. The incidence of placenta related disease after the hysteroscopic adhesiolysis in patients with intrauterine adhesions[J]. Taiwan J Obstet Gyne, 2020, 59(4): 575-579.
- [2] Li C, Cai A, Sun C, et al. The study on the safety and efficacy of amnion graft for preventing the recurrence of moderate to severe intrauterine adhesions[J]. Genes Dis, 2020, 7(2): 266-271.
- [3] Huang XW, Lin MM, Zhao HQ, et al. A prospective randomized

- controlled trial comparing two different treatments of intrauterine adhesions[J]. Reprod BioMed Online, 2020, 40(6): 835-841.
- [4] Hooker AB, Lemmers M, Thurkow AL, et al. Systematic review and Meta-analysis of intrauterine adhesions after miscarriage: prevalence, risk factors and long term reproductive outcome[J]. Hum Reprod Update, 2014, 20(2): 262-278.
- [5] 何心勤, 洪玉玉, 江 洪. Interceed 防粘连膜联合 Foley 球囊对行宫腔镜下宫腔粘连分离术治疗的中重度宫腔粘连患者再粘连的预防效果[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(18): 149-151.
- [6] Gan L, Duan H, Xu Q, et al. Human amniotic mesenchymal stromal cell transplantation improves endometrial regeneration in rodent models of intrauterine adhesions[J]. Cytotherapy, 2017, 19(5): 603-616.
- [7] Zhao J, Zhang Q, Wang Y, et al. Uterine infusion with bone marrow mesenchymal stem cells improves endometrium thickness in a rat model of thin endometrium[J]. Reprod Sci, 2015, 22(2): 181-188.
- [8] Fabian F, Sebastian H, Gudrun V, et al. Comparative analysis of integrin alpha 8 expression and its ligands fibronectin and osteopontin in human, rat and mouse placenta[J]. Placenta, 2016, 45: 104.
- [9] Liu X, Duan H, Wang Y. Clinical characteristics and reproductive outcome following hysteroscopic adhesiolysis of patients with intrauterine adhesions: a retrospective study[J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2014, 41(2): 144-148.
- [10] Surgery AEG. AAGL practice report: practice guidelines on intrauterine adhesions developed in collaboration with the European Society of Gynaecological Endoscopy (ESGE)[J]. J Minim Invas Gyn, 2017, 24(5): 695-705.
- [11] Santamaria X, Cabanillas S, Cervello I, et al. Autologous cell therapy with CD133⁺ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study[J]. Hum Reprod, 2016, 31(5): 1087-1096.
- [12] Yang H, Wu S, Feng R, et al. Vitamin C plus hydrogel facilitates bone marrow stromal cell-mediated endometrium regeneration in rats[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 267.
- [13] Li L, Zhou R, Zhen J, et al. Integrin α v β 3 modulates lipopolysaccharide-induced hyperpermeability in cardiac microvascular endothelial cells[J]. Biosci Biotech Bioch, 2020, 84(8): 1614-1620.
- [14] 刘 卓, 宋景艳, 邱 月, 等. 不明原因不孕妇女着床期子宫内膜 α v β 3、Hox10、MMPs 基因的表达[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(3): 501-504.
- [15] 冯丹艳, 汤芝秀. 控制性超排卵治疗过程中晚卵泡期高孕酮对卵巢中反应患者子宫内膜组织学及整合素 α v β 3、LIF 水平的影响[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2018, 15(6): 119-122.
- [16] Liu Y, Tal R, Pluchino N, et al. Systemic administration of bone marrow-derived cells leads to better uterine engraftment than use of uterine-derived cells or local injection[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(1): 67-76.
- [17] 田花敏, 佟 卫, 李 娜, 等. 生长激素和全反式维甲酸拮抗子宫内纤维化的机制[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(12): 1695-1698.
- [18] Tagliaferri D, De Angelis MT, Russo NA, et al. Retinoic acid specifically enhances embryonic stem cell metastate marked by Zscan4[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0147683.
- [19] Subramanian U, Nagarajan D. All-trans retinoic acid supplementation prevents cardiac fibrosis and cytokines induced by methylglyoxal[J]. Glycoconj J, 2017, 34(2): 255-265.

(责任编辑:唐秋姗)