

泌尿生殖医学基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002242

PPCNg 介导人羊膜间充质干细胞治疗大鼠宫腔粘连的研究

陈芯培, 张文文, 毛艳华, 阳 媛, 吴本媛, 李长江, 勾亚婷, 于 结, 孙聪聪, 张应凤, 王 佳

(重庆医科大学附属大学城医院妇产科, 重庆 401331)

【摘要】目的:探讨 PPCNg 聚合物(polyethylene glycol citrate-co-N-isopropylacrylamide gelatin, PPCNg)介导人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs)治疗宫腔粘连(intrauterine adhesions, IUA)的可行性和有效性。**方法:**将 PKH26 标记的 hAMSCs 在不同浓度 PPCNg 中培养, 48 h 后荧光显微镜下观察细胞状态, CCK-8 法分析细胞毒性, 评价 PPCNg 的材料毒性。雌性 SD 级大鼠随机分为假手术组、单纯 IUA 模型组(模型组)、PPCNg 治疗 IUA 组(PPCNg 组)、hAMSCs 治疗 IUA 组(hAMSCs 组)及 PPCNg 联合 hAMSCs 治疗 IUA 组(PPCNg+hAMSCs 组)。建立 IUA 模型 2 周后, 假手术组不处理, 其余建模的各组分别宫腔内注射 PBS、PPCNg、hAMSCs 的 PBS 悬液及 hAMSCs 的 PPCNg 悬液。宫腔注射 2 周后, 行子宫组织石蜡切片 HE 染色和 Masson 染色检测子宫内膜腺体及纤维化情况, 免疫组化检测子宫内膜中转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、波形蛋白(vimentin, VIM)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、细胞角蛋白 19(cytokeratin 19, CK19)及 E-钙粘附蛋白(E-cadherin, E-Ca)表达情况; 冰冻切片荧光显微镜下观察子宫内膜中 hAMSCs 分布情况。**结果:**①在不同浓度 PPCNg 中 hAMSCs 贴壁生长, 状态良好; ②PPCNg 无细胞毒性, 材料毒性分级为 1 级(合格); ③与假手术组相比, 模型组腺体数目减少($P=0.000$), 纤维化面积比增高($P=0.000$); 与模型组相比, PPCNg 组、hAMSCs 组及 PPCNg+hAMSCs 组的腺体数目不同程度增多($P=0.000$), 纤维化面积比不同程度减少; ④与模型组相比, PPCNg 组、hAMSCs 组及 PPCNg+hAMSCs 组 TGF- $\beta 1$ 、VEGF、VIM 及 α -SMA 的表达均不同程度降低, 其中 PPCNg+hAMSCs 组明显降低($P=0.000$), 而 CK19 及 E-Ca 表达则不同程度升高, 其中 PPCNg+hAMSCs 组明显升高($P=0.000$); ⑤PPCNg+hAMSCs 组 PKH26 标记的 hAMSCs 远远多于 hAMSCs 组。**结论:**PPCNg 无细胞毒性, 能显著提高 hAMSCs 治疗 IUA 的有效性。

【关键词】PPCNg 聚合物; 人羊膜间充质干细胞; 宫腔粘连**【中图分类号】**R711**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-03-04

A study of PPCNg-mediated effect of human amniotic mesenchymal stem cells in the treatment of intrauterine adhesion in rats

Chen Xinpei, Zhang Wenwen, Mao Yanhua, Yang Yuan, Wu Benyuan, Li Changjiang,

Gou Yating, Yu Jie, Sun Congcong, Zhang Yingfeng, Wang Jia

(Department of Gynecology and Obstetrics, University Toun Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate polyethylene glycol citrate-co-N-isopropylacrylamide gelatin (PPCNg)-mediated feasibility and effectiveness of human amniotic mesenchymal stem cells(hAMSCs) in the treatment of intrauterine adhesion(IUA). **Methods:** The PKH26-labeled hAMSCs were cultured in different concentrations of PPCNg and were observed for cell status with a fluorescence microscope after 48 hours. CCK-8 assay was used to evaluate the cytotoxicity and material toxicity of PPCNg. The female Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group, IUA group(model group), PPCNg-treated IUA group(PPCNg group), hAMSCs-treated IUA group(hAMSCs group), and PPCNg+hAMSCs-treated IUA group(PPCNg+hAMSCs group); two weeks after IUA modeling, the above five groups except the sham operation group(left untreated) were injected with PBS, PBS-suspended PPCNg, PBS-suspended hAMSCs, and PBS-suspended hAMSCs and PPCNg solution, respectively, in the uterine cavity. Two weeks after the intrauterine injection, paraffin sections of the uterine tissue were treated with HE staining and Masson staining to measure the number of endometrial glands and fibrosis status. Immunohistochemistry was used to determine the expression of transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), vascular endothelial growth factor(VEGF), vimentin(VIM), α -smooth muscle actin(α -SMA), cytokeratin 19(CK19), and E-cadherin(E-Ca) in the endometrium. The distribution of hAMSCs in the endometrium was evaluated

作者介绍:陈芯培, Email: 952731076@qq.com,

研究方向: 妇科内分泌。

通信作者:王 佳, Email: 752203031@qq.com。**基金项目:**国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号: 81401536);

重庆市医学科研计划资助项目(编号: 20141014); 重庆市

医疗特色专科建设资助项目(编号: 2013-46)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190709.0941.006.html>

(2019-07-11)

with a fluorescence microscope using frozen sections. **Results:** In different concentrations of PPCNg, hAMSCs adherently grew well, and PPCNg was not cytotoxic with its material toxicity classified as grade 1 (qualified). Compared with the sham operation group, the model group had a significantly reduced number of glands and a significantly increased fibrosis area ratio (both $P=0.000$). Compared with the model group, the PPCNg group, the hAMSCs group, and the PPCNg+hAMSCs group had different degrees of increase in the number of glands ($P=0.000$) and different degrees of decrease in the fibrosis area ratio; meanwhile, the three groups had different degrees of decrease in the expression of TGF- β 1, VEGF, VIM, and α -SMA (with a significant decrease observed in the PPCNg+hAMSCs group [$P=0.000$]) and different degrees of increase in the expression of CK19 and E-Ca (with a significant increase observed in the PPCNg+hAMSCs group [$P=0.000$]). The PPCNg+hAMSCs group had more PKH26-labeled hAMSCs than the hAMSCs group. **Conclusion:** PPCNg has no cytotoxicity and can significantly improve the effectiveness of hAMSCs in the treatment of IUA.

[Key words] polyethylene glycol citrate-co-N-isopropylacrylamide gelatin; human amniotic mesenchymal stem cell; intrauterine adhesion

宫腔粘连 (intrauterine adhesions, IUA) 又称 Asherman 综合征, 是指由人工流产术、刮宫术等多种原因造成子宫内膜基底层损伤、内膜纤维瘢痕形成, 导致宫腔、宫颈管部分或全部粘连, 临床上表现为月经量少、复发性流产、闭经等, 严重危害女性生殖及身心健康^[1-2]。随着宫腔镜技术的发展, 宫腔镜下粘连分离术 (transeervical resection of adhesions, TCRA) 已成为治疗 IUA 的标准手段, 但因术后创面渗出、感染等因素, 二次 IUA 复发率仍然很高。因此, 促进子宫内膜修复, 预防 TCRA 术后再粘连成为目前的治疗关键, 其中干细胞治疗作为一种新型有效的促进子宫内膜修复再生的治疗方法受到广泛关注。本课题组前期研究发现, 羊膜移植对 IUA 有显著的治疗作用^[3], 并从人羊膜组织中成功提取并分离了人羊膜间充质干细胞 (human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs), 成功建立了 IUA 动物模型^[4], 通过对造模大鼠实施尾静脉注射来实现人羊膜间充质干细胞的体内移植^[5], 结果表明, hAMSCs 能明显促进大鼠子宫内膜再生, 证实 hAMSCs 移植治疗 IUA 的有效性。但是临床上如何将 hAMSCs 有效地移植到宫腔, 发挥其促内膜修复作用, 仍是亟待解决的关键问题之一。

为了将 hAMSCs 有效移植到宫腔, 准确定位, 减少细胞损失, 促进细胞最大限度发挥再生修复作用, 课题组引入一种生物支架材料 PPCNg 聚合物 (polyethylene glycol citrate-co-N-isopropylacrylamide gelatin, PPCNg)^[6], 与 hAMSCs 混合后直接注入 IUA 大鼠子宫, 观察大鼠子宫状态, 探讨 PPCNg 联合 hAMSCs 治疗 IUA 的可行性和有效性, 为 IUA 的治疗提供新思路。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 羊膜组织来源 均取自重庆医科大学附属第一医院产科, 年龄 20~35 岁, 排除各种传染性疾病的正常足月分娩产妇剖宫产分娩的胎盘, 于无菌条件下剥离羊膜组织, 并立即放入预冷的 PBS 缓冲液中, 4℃保存备用。本实验获得重庆医科大学伦理委员会 (20141230) 批准以及产妇知情同意, 所有方法均按照相关规定执行操作。

1.1.2 实验动物 SPF 级健康雌性 SD 大鼠 30 只, 鼠龄 8~10 周, 体质量 220~250 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 5 只/笼, 常规喂养。本研究动物实验符合所在单位实验动物伦理委员会制定的伦理学标准。

1.1.3 实验试剂 DAPI (Sigma 公司, 美国)、PKH26 (Sigma 公司, 美国); Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (同仁, 日本); Hoechst 33342 活细胞染色液 (100 $\times$) (碧云天, 中国); Masson 染液试剂盒 (Servicebio, 中国); 免疫组化一抗 (兔抗大鼠): TGF- β 1, VEGF, VIM, α -SMA, CK19, E-Ca (Servicebio, 中国); 免疫组化二抗 (抗兔) (Servicebio, 中国)。

1.2 实验方法

1.2.1 hAMSCs 的分离提取及培养 剪碎羊膜组织, 加入胰蛋白酶对组织进行 2 次消化, 每次 30 min, 加入胶原酶消化 1 h, 搜集细胞滤液, 离心, 重悬于含 12% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 37℃恒温孵育。

1.2.2 PKH26 标记 hAMSCs 将第 3 代胰蛋白酶消化的 hAMSCs 制成单细胞悬液, PBS 清洗, 离心, 弃上清液, 依照 PKH26 说明书步骤加入稀释液 C 1 mL。配制染色工作液, 将染色液与细胞悬液混合并孵育 5 min, 加入血清终止反应。用 10 mL 完全培养基反复清洗 3 次, 完成细胞标记。

1.2.3 荧光显微镜下观察细胞状态 将 PKH26 标记后的 hAMSCs 接种于 24 孔板中, 细胞贴壁后, 吸出培养基, 加入不

同浓度 PPCNg, 依次为 0.625%、1.25%、2.5%、5% 和 10%, 对照组不加 PPCNg。于 37 ℃ 细胞培养箱中孵育 10 min, 待 PPCNg 呈凝胶状后, 每孔加入 1 mL 培养基。48 h 后将材料与培养基完全吸出, 用 Hoechst 33342 染核后于荧光显微镜下观察细胞形态。

1.2.4 PPCNg 细胞毒性检测 按照 PPCNg 浓度设置实验组 (0.625% 组, 1.25% 组, 2.5% 组, 5% 组和 10% 组), 阴性对照组, 空白对照组。于 96 孔板中培养 PKH26 标记的第 3 代 hAMSCs, 每孔 100 μ L 细胞悬液 (含细胞数约 5000 个), 待细胞贴壁后吸出培养基, 按照相应浓度加入 30 μ L PPCNg, 于 37 ℃ 细胞培养箱中孵育 10 min, 待 PPCNg 凝胶凝固后, 每孔加入 100 μ L 培养基。阴性对照组和空白对照组加入 130 μ L 培养基。48 h 后按 CCK-8 说明书操作, 于全自动酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值, 计算各培养孔细胞的相对增殖率 (RGR), 实验重复 3 次。公式: $RGR = (\text{实验组 A 值} - \text{空白对照组 A 值} / \text{阴性对照组 A 值} - \text{空白对照组 A 值}) \times 100\%$, 据 GB/T 16886.5-2017 标准进行细胞毒性分级, 评价 PPCNg 细胞毒性, 评价标准为: ① RGR 值 $\geq 75\%$, 细胞毒性等级为 0 级 ($\geq 99\%$) 或 1 级 (75%~99%), 合格; ② RGR 值为 50%~75%, 细胞毒性等级为 2 级, 应结合细胞形态综合评价; ③ RGR 值 $< 50\%$, 细胞毒性等级为 3~5 级, 不合格。

1.2.5 单纯机械法构建大鼠 IUA 模型 采取单纯搔刮法^[7]建模。大鼠腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉。无菌环境下, 行常规消毒, 沿腹白线做一纵行 3~4 cm 切口, 确认子宫位置, 取右侧子宫角, 于宫体和宫角连接处往上约 1 cm 位置横切一直径 2 mm 切口, 使用直径 2 mm 的刮匙上下搔刮子宫内膜组织, 子宫损伤长 3~4 cm, 防止刮穿子宫肌层, 子宫壁菲薄半透明停止搔刮, 同法处理左侧子宫角。生理盐水冲洗腹腔, 逐层关腹。假手术组, 开腹, 腹腔暴露约 15 min 后逐层关腹, 子宫不予处理。

1.2.6 动物分组及宫腔注射 30 只雌性大鼠随机分为 5 组: 假手术组、单纯 IUA 模型组 (模型组)、PPCNg 治疗 IUA 组 (PPCNg 组)、hAMSCs 治疗 IUA 组 (hAMSCs 组)、PPCNg 联合 hAMSCs 治疗 IUA 组 (PPCNg+hAMSCs 组), 每组 6 只。建立模型 2 周后, 用镊子分离粘连的子宫内膜, PPCNg 组, 于左右宫角注射 PPCNg 各 100 μ L; hAMSCs 组, 于左右宫角注射含有 hAMSCs (PKH26 标记, 约 2×10^6) 的 PBS 细胞悬液, 各 100 μ L; PPCNg+hAMSCs 组, 于左右宫角注射含有 hAMSCs (PKH26 标记, 约 2×10^6) 的 PPCNg 细胞悬液, 各 100 μ L。各组大鼠于注射 2 周后处死, 收集双侧子宫组织备用。

1.2.7 大鼠子宫内膜腺体数量及纤维化程度的检测 各组大鼠取双侧子宫进行石蜡包埋, 作子宫横断面切片, 进行 HE 和 Masson 染色, 每张切片随机选择 4 个高倍 (100 倍) 视野进行拍照。Image-Pro Plus 6.0 软件对照片进行数据测量: HE 染色切片测量各组子宫内膜腺体数目, 取其平均值; Masson 染色切片测量子宫内膜纤维化面积与子宫内膜总面积的比值, 取其平均值。

1.2.8 免疫组织半定量评估子宫纤维化 免疫组织化学法行 TGF- β 1、VEGF、VIM、 α -SMA、CK19 及 E-Ca 染色, 观察子宫内膜全层, 染色阳性为棕黄色颗粒。每张切片选取高倍镜 (400 倍) 下 10 个视野, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件, 测量每个视野的积分光密度 (integrate optical density, IOD), 阳性细胞的总面积 (area), 计算该区域中阳性颗粒的平均光密度值 (mean optical density, MOD), 公式为 $MOD = IOD / \text{area}$, 取平均值。

1.2.9 荧光共聚焦显微镜下观察 hAMSCs 在大鼠子宫内膜中的分布情况 hAMSCs 移植后 2 周, 收集大鼠子宫组织, 制备冰冻切片, DAPI 染核后于荧光共聚焦显微镜下观察经 PKH26 标记的 hAMSCs 在子宫中的分布状况。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 22.0 进行统计学分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 PKH26 标记的 hAMSCs 在不同浓度 PPCNg 中的生长状态

在不同浓度 PPCNg 中, 细胞贴壁生长良好, 形态呈梭形或多角形, 未见悬浮细胞, 细胞膜染为红色 (PKH26), 细胞核染为蓝色 (Hoechst 33342), 胞膜、胞核完整, 染色均匀, 各组细胞大小形态无明显差异 (图 1)。

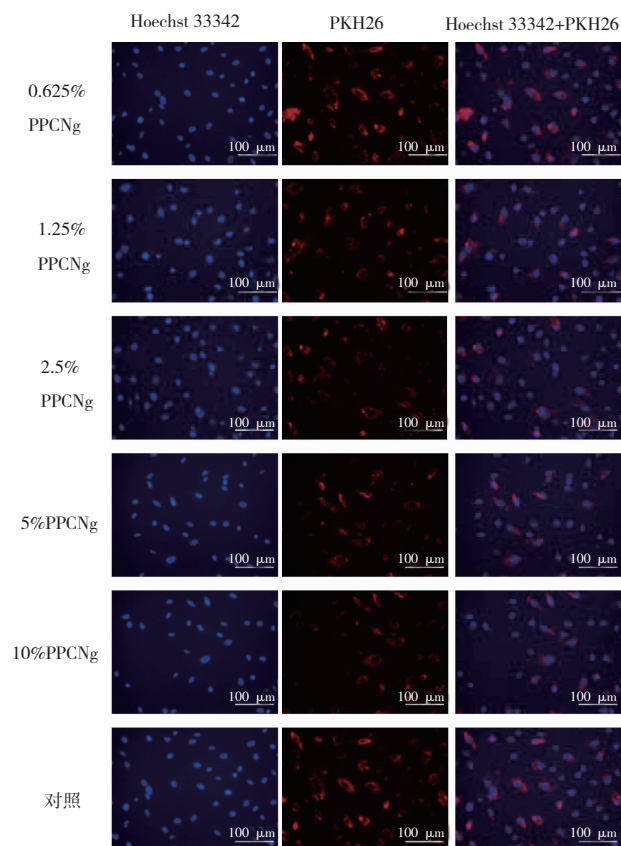


图 1 荧光显微镜下不同浓度 PPCNg 中细胞状态 (200 $\times$)

2.2 PPCNg 细胞毒性检测

CKK-8 检测结果显示:0.625%组、1.25%组、2.5%组、5%组、10%组、阴性对照组、空白对照组的平均吸光度值分别为 1.410 ± 0.022 、 1.353 ± 0.018 、 1.334 ± 0.019 、 1.302 ± 0.007 、 1.257 ± 0.034 、 1.427 ± 0.032 、 0.136 ± 0.007 。方差分析 7 组平均吸光度值的差异,差异具有统计学意义 ($F=856.790$, $P=0.000$)。两两比较结果显示 0.625%组、1.25%组、2.5%组、5%组、10%组、阴性对照组的平均吸光度值均较空白对照组明显增加 ($P=0.000$);而 0.625%组与 1.25%组 ($P=0.350$)、2.5%组 ($P=0.184$)、5%组 ($P=0.079$)、10%组 ($P=0.070$)、阴性对照组 ($P=1.000$) 之间没有明显差异;1.25%组与 2.5%组 ($P=0.991$)、5%组 ($P=0.253$)、10%组 ($P=0.241$)、阴性对照组 ($P=0.368$) 之间没有明显差异;2.5%组与 5%组 ($P=0.603$)、10%组 ($P=0.381$)、阴性对照组 ($P=0.231$) 之间没有明显差异;5%组与 10%组 ($P=0.721$)、阴性对照组 ($P=0.138$) 之间没有明显差异;10%组与阴性对照组 ($P=0.060$) 之间没有明显差异。各浓度 PPCNg 组细胞相对增殖率 (relative growth rate, RGR) 均 $>75\%$, 按照细胞毒性分级均分为 1 级 (合格), 说明 PPCNg 无细胞毒性,有良好的生物相容性。

2.3 子宫内腺体数量及纤维化程度的比较

假手术组子宫腔形态、内膜腺体及纤维化状况均正常。模型组子宫腔部分闭锁,内膜萎缩,腺体数目减少,大量纤维化改变,说明建模成功。腺体数目比较:与假手术组比较,模型组 ($P=0.000$)、PPCNg 组 ($P=0.000$)、hAMSCs 组 ($P=0.000$) 与 PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.023$) 腺体数目均减少。与模型组比较,PPCNg 组 ($P=0.000$)、hAMSCs 组 ($P=0.000$) 与 PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.000$) 腺体数目增多。与 PPCNg 组比较, hAMSCs 组腺体数目减少 ($P=0.006$), PPCNg+hAMSCs 组腺体数目增多 ($P=0.030$)。与 hAMSCs 组比较, PPCNg+hAMSCs 组腺体数目增多 ($P=0.000$)。纤维化程度比较结果:与假手术组比较,模型组 ($P=0.000$)、PPCNg 组 ($P=0.006$)、hAMSCs 组 ($P=0.000$) 及 PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.255$) 纤维化面积比均增高。与模型组比较, PPCNg 组 ($P=0.046$)、hAMSCs 组 ($P=0.993$) 及 PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.001$) 纤维化面积比降低。与 PPCNg 组比较, hAMSCs 组 ($P=0.015$) 纤维化面积比增高, PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.005$) 纤维化面积比降低。与 hAMSCs 组比较, PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.000$) 纤维化面积比降低。如图 2、表 1 所示。

表 1 各组子宫内腺体数目及纤维化面积比 ($n=6$)

组别	腺体数量	纤维化面积比
假手术组	15.056 ± 0.961	0.362 ± 0.079
模型组	4.236 ± 0.938^a	0.726 ± 0.075^a
PPCNg组	11.528 ± 0.929^{ab}	0.582 ± 0.038^{ab}
hAMSCs组	9.445 ± 0.648^{abc}	0.697 ± 0.045^{ac}
PPCNg+hAMSCs组	13.264 ± 0.630^{abcd}	0.461 ± 0.039^{bcd}
F值	124.855	35.057
P值	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 PPCNg 组比较, $P<0.05$;d,与 hAMSCs 组比较, $P<0.05$

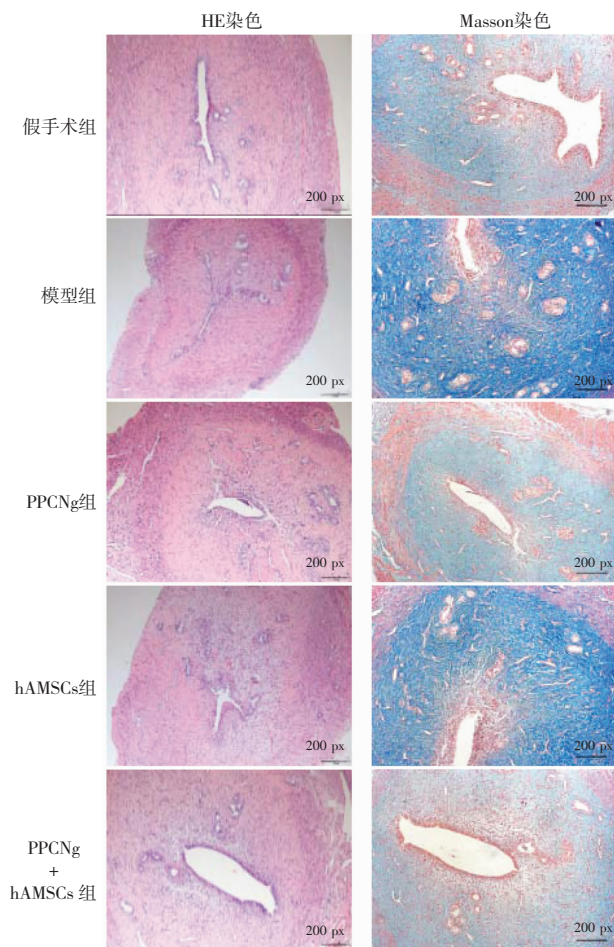


图 2 镜下观察注射 2 周后各组大鼠子宫内腺体形态(100×)

2.4 免疫组化蛋白表达结果

TGF- $\beta 1$ 免疫组化结果显示:假手术组表达最低,见棕黄色颗粒分布于上皮细胞,间质分布极少。模型组的表达最高,见大量棕黄色颗粒分布于上皮细胞和间质细胞。与假手术组比较,模型组 ($P=0.000$)、PPCNg 组 ($P=0.000$)、hAMSCs 组 ($P=0.000$) 及 PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.059$) 表达均升高。与模型组比较, PPCNg 组 ($P=0.000$)、hAMSCs 组 ($P=0.000$) 及 PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.000$) 表达均降低。与 PPCNg 组比较, hAMSCs 组 ($P=0.000$) 表达升高, PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.000$) 表达降低。与 hAMSCs 组比较, PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.000$) 表达降低。如图 3、表 2 所示。

VEGF 免疫组化结果显示:假手术组表达最低,模型组表达最高。与假手术组比较,模型组 ($P=0.000$)、PPCNg 组 ($P=0.011$)、hAMSCs 组 ($P=0.000$) 及 PPCNg+hAMSCs 组 ($P=1.000$) 表达均升高。与模型组比较, PPCNg 组 ($P=0.000$)、hAMSCs 组 ($P=0.000$) 及 PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.000$) 表达均降低。与 PPCNg 组比较, hAMSCs 组 ($P=0.003$) 表达升高, PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.016$) 表达降低。与 hAMSCs 组比较, PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.000$) 表达降低。如图 4、表 2 所示。

VIM 免疫组化结果显示:假手术组表达最低,模型组表达最高。与假手术组比较,模型组 ($P=0.000$)、PPCNg 组 ($P=$

0.001)、hAMSCs 组($P=0.000$)及 PPCNg+hAMSCs 组($P=0.988$)的表达均升高。与模型组比较,PPCNg 组($P=0.000$)、hAMSCs 组($P=0.025$)及 PPCNg+hAMSCs 组($P=0.000$)的表达均降低。与 PPCNg 组比较,hAMSCs 组($P=0.001$)表达升高,PPCNg+hAMSCs 组($P=0.003$)表达降低。与 hAMSCs 组比较,PPCNg+hAMSCs 组($P=0.000$)表达降低。如图 5、表 2 所示。

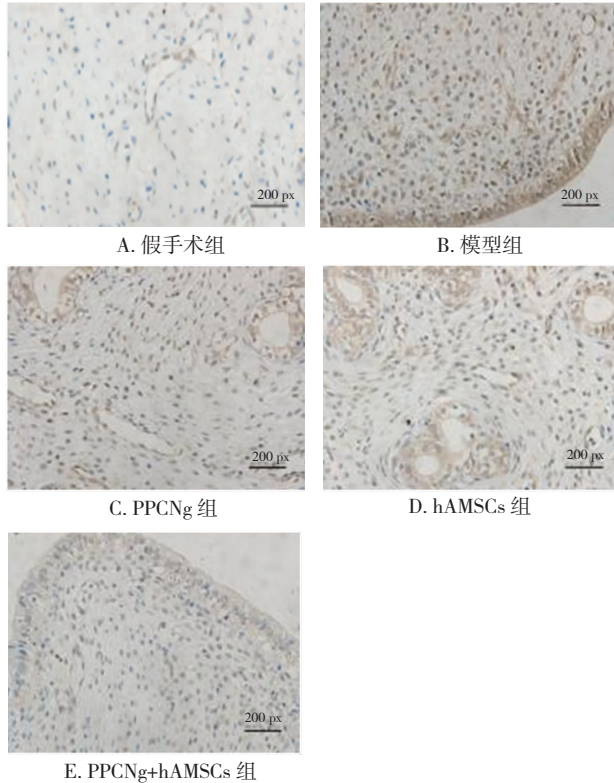


图 3 各组大鼠免疫组化 TGF- β 1 的染色情况 (400 $\times$)

α -SMA 免疫组化结果显示:假手术组表达最低,模型组表达最高。与假手术组比较,模型组($P=0.000$)、PPCNg 组($P=0.000$)、hAMSCs 组($P=0.000$)及 PPCNg+hAMSCs 组($P=0.000$)表达均升高。与模型组比较,PPCNg 组($P=0.000$)、hAMSCs 组($P=0.002$)及 PPCNg+hAMSCs 组($P=0.000$)表达均降低。与 PPCNg 组比较,hAMSCs 组($P=0.000$)表达升高,PPCNg+hAMSCs 组($P=0.003$)表达降低。与 hAMSCs 组比较,PPCNg+hAMSCs 组($P=0.000$)表达降低。如图 6、表 2 所示。

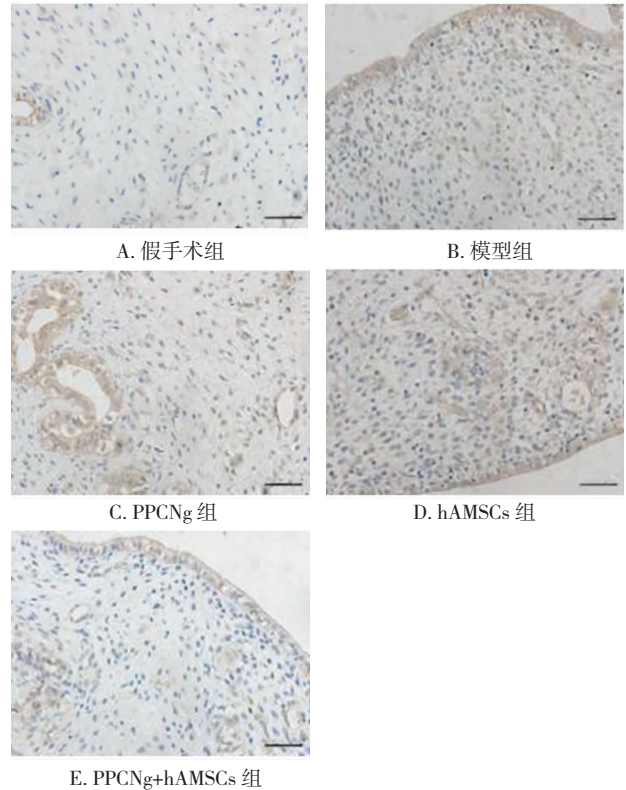


图 4 各组大鼠免疫组化 VEGF 的染色情况 (400 $\times$)

CK19 免疫组化结果显示:假手术组表达最高,模型组表达最低。与假手术组比较,模型组($P=0.000$)、PPCNg 组($P=0.000$)、hAMSCs 组($P=0.000$)及 PPCNg+hAMSCs 组($P=0.007$)表达均降低。与模型组比较,PPCNg 组($P=0.000$)、hAMSCs 组($P=0.006$)及 PPCNg+hAMSCs 组($P=0.000$)表达均升高。与 PPCNg 组比较,hAMSCs 组($P=0.000$)表达降低,PPCNg+hAMSCs 组($P=0.000$)表达升高。与 hAMSCs 组比较,PPCNg+hAMSCs 组($P=0.000$)表达升高。如图 7、表 2 所示。

E-Ca 免疫组化结果显示:假手术组表达最高,模型组表达最低。与假手术组比较,模型组($P=0.000$)、PPCNg 组($P=0.000$)、hAMSCs 组($P=0.000$)及 PPCNg+hAMSCs 组($P=1.000$)表达均降低。与模型组比较,PPCNg 组($P=0.000$)、hAMSCs 组($P=0.002$)及 PPCNg+hAMSCs 组($P=0.000$)表达均升高。与 PPCNg 组比较,hAMSCs 组($P=0.003$)表达降低,PPCNg+hAMSCs 组($P=0.000$)表达降低。如图 8、表 2 所示。

表 2 各组子宫内膜免疫组化的平均光密度值

组别	TGF- β 1	VEGF	VIM	α -SMA	CK19	E-Ca
假手术组	0.321 $\pm$ 0.005	0.359 $\pm$ 0.005	0.340 $\pm$ 0.007	0.302 $\pm$ 0.007	0.394 $\pm$ 0.005	0.414 $\pm$ 0.010
模型组	0.494 $\pm$ 0.017 ^a	0.433 $\pm$ 0.008 ^a	0.516 $\pm$ 0.019 ^a	0.448 $\pm$ 0.012 ^a	0.311 $\pm$ 0.004 ^a	0.336 $\pm$ 0.005 ^a
PPCNg组	0.369 $\pm$ 0.005 ^{ab}	0.376 $\pm$ 0.007 ^{ab}	0.402 $\pm$ 0.016 ^{ab}	0.380 $\pm$ 0.006 ^{ab}	0.358 $\pm$ 0.004 ^{ab}	0.379 $\pm$ 0.007 ^{ab}
hAMSCs组	0.400 $\pm$ 0.004 ^{abc}	0.396 $\pm$ 0.011 ^{abc}	0.473 $\pm$ 0.005 ^{abc}	0.421 $\pm$ 0.011 ^{abc}	0.324 $\pm$ 0.006 ^{abc}	0.358 $\pm$ 0.008 ^{abc}
PPCNg+hAMSCs组	0.334 $\pm$ 0.006 ^{abcd}	0.360 $\pm$ 0.005 ^{abcd}	0.347 $\pm$ 0.016 ^{abcd}	0.354 $\pm$ 0.010 ^{abcd}	0.381 $\pm$ 0.006 ^{abcd}	0.407 $\pm$ 0.009 ^{abcd}
F 值	314.286	233.032	88.137	151.990	84.082	177.516
P 值	0.000	0.000	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 PPCNg 组比较, $P<0.05$;d:与 hAMSCs 组比较, $P<0.05$

hAMSCs 组 ($P=0.000$) 表达升高。与 hAMSCs 组比较, PPCNg+hAMSCs 组 ($P=0.000$) 表达升高。如图 8、表 2 所示。

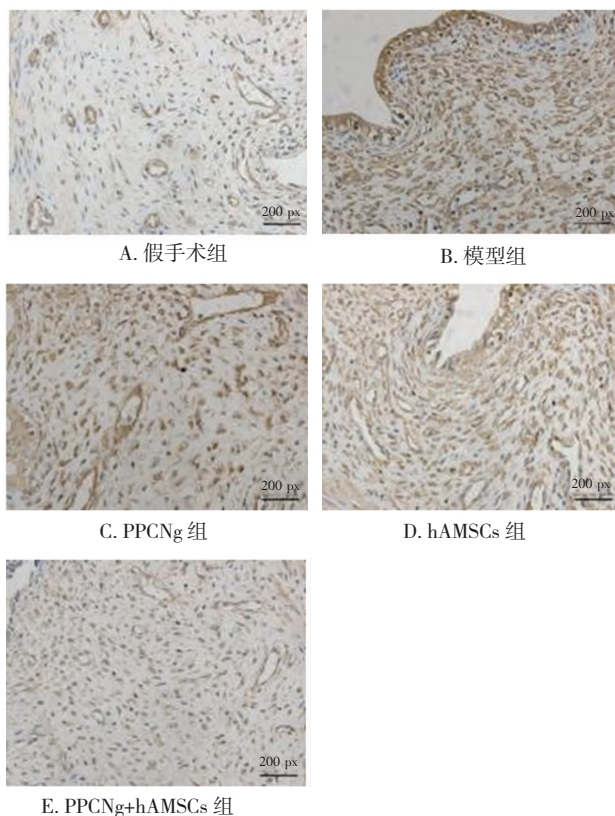


图 5 各组大鼠免疫组化 VIM 的染色情况 (400×)

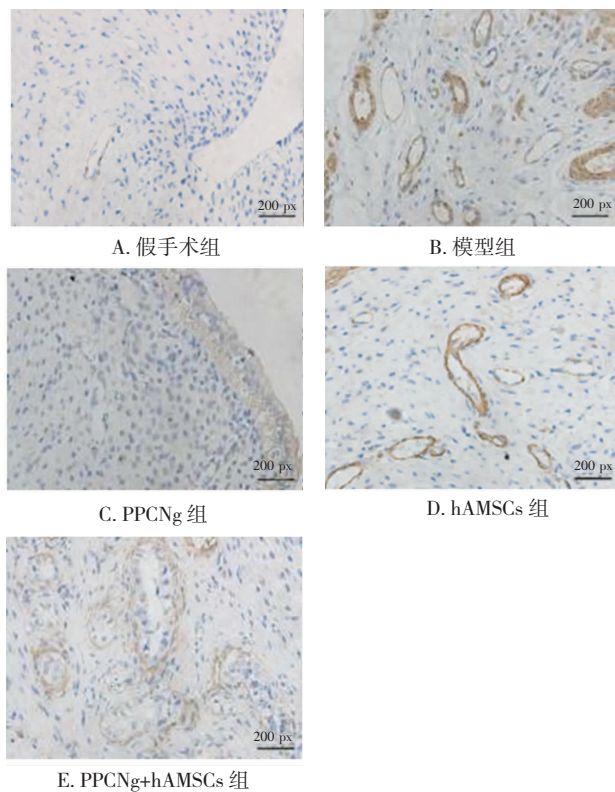


图 6 各组大鼠免疫组化 α-SMA 的染色情况 (400×)

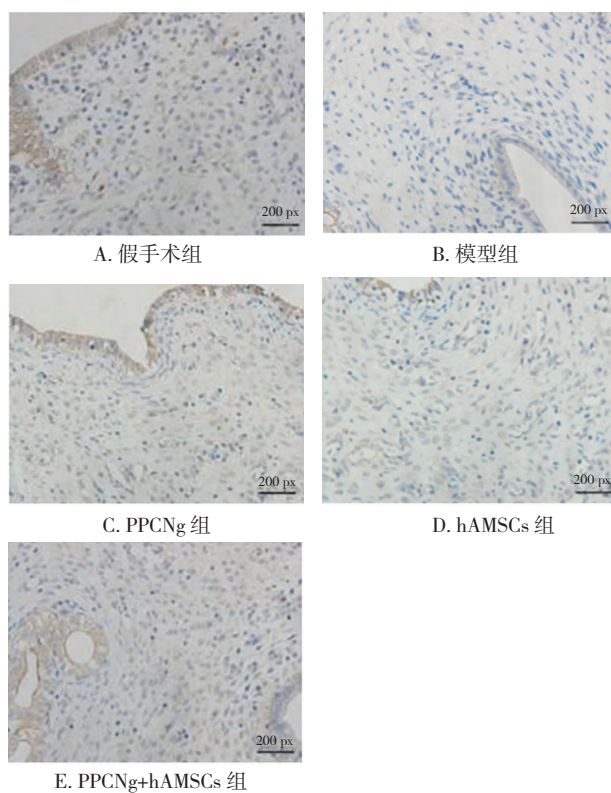


图 7 各组大鼠免疫组化 CK19 的染色情况 (400×)

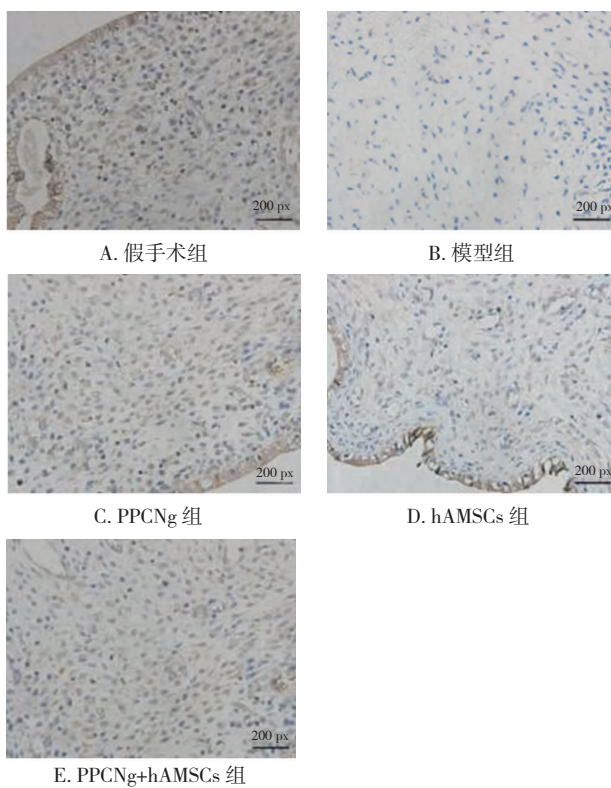


图 8 各组大鼠免疫组化 E-Ca 的染色情况 (400×)

2.5 PKH26 标记的 hAMSCs 在大鼠子宫内膜中的分布情况

荧光显微镜下可见 PKH26 染膜的 hAMSCs 的细胞膜呈红色荧光, 所有被 DAPI 染核的细胞的细胞核呈蓝色荧光。

hAMSCs 组及 PPCNg+hAMSCs 组呈蓝色及红色荧光。hAMSCs 组的红色荧光分布明显少于 PPCNg+hAMSCs 组。如图 9 所示。

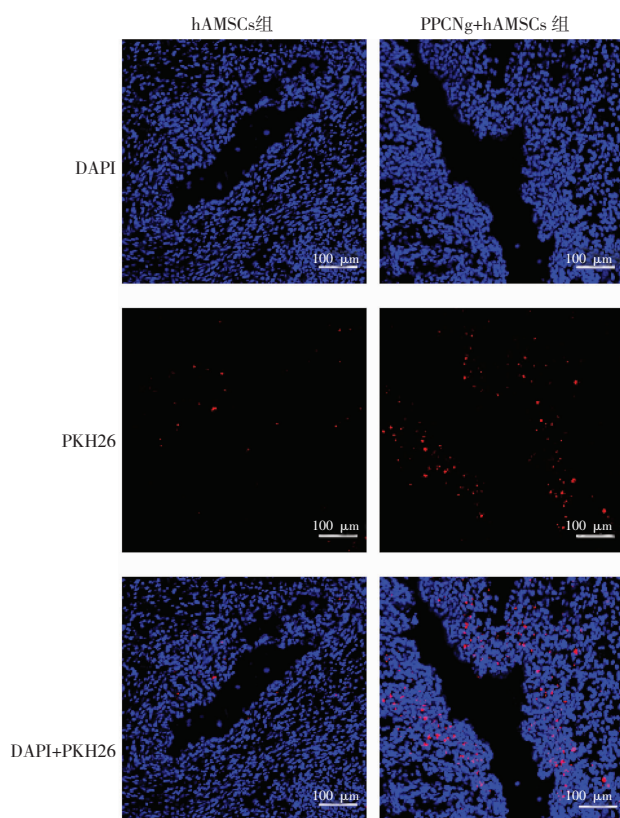


图 9 PKH26 标记的 hAMSCs 在大鼠子宫内膜中的分布情况 (200×)

3 讨论

IUA 组织学上的改变是子宫内膜纤维化,表现为子宫内膜间质被纤维组织取代,而腺体被无分泌功能的柱状上皮细胞覆盖^[8]。任何引起子宫内膜基层脱落和损伤、致使肌层裸露的创伤性或感染性创伤,均可导致子宫壁相互粘着形成子宫腔粘连。IUA 造模后,大鼠子宫内膜的腺体数目下降,纤维化程度严重,与人类子宫内膜损伤后的形态变化相似。TCRA 是目前治疗 IUA 的主要方法^[9]。但中、重度 IUA 术后再粘连发生率较高,预后效果差^[10],重度 IUA 患者 TCRA 术后的复发率高达 62.5%^[11]。因此寻找有效预防术后再粘连的治疗方法是亟待解决的问题。

研究表明^[12],对于中、重度 IUA,宫内节育器联合雌激素、透明质酸钠、球囊导管和羊膜移植,皆可获得一定预防效果。报道称^[13-14],羊膜移植对 TCRA 术后预防宫腔再粘连的效果明显优于宫腔型节育

器及 Foley 球囊。且羊膜制品应用于重度 IUA 松解术后的创面,能改善月经量,降低术后再粘连评分^[15]。而 hAMSCs 是羊膜来源的具有多分化潜能的间充质干细胞,能自我更新。hAMSCs 取自羊膜,原材料易于获取,免疫原性低,移植时无须严格配型^[16]。Nagori 等^[17]采用自体骨髓干细胞宫腔移植,治疗了 1 例严重的 IUA 女性患者,使其成功受孕。Abumaree 等^[18]研究表明,hAMSCs 移植能促进 IUA 大鼠模型损伤后的子宫内膜再生。张燕燕等^[19]研究发现,宫腔粘连分离后注入羊膜干细胞能促进子宫内膜的修复。但如何有效将 hAMSCs 移植到宫腔,仍需要探究。

本研究引入的 PPCNg 是一种温敏性的生物支架材料,其物理状态会随着温度发生变化,常温下呈液体状态,37℃ 条件下变成凝胶状态,具有可注射、可塑形、能自行降解、操作简单等优点^[20]。本研究通过 CCK-8 检测证实 PPCNg 无 hAMSCs 细胞毒性,可联合 hAMSCs 治疗 IUA。根据 PPCNg 特性,预测液态 PPCNg 联合 hAMSCs 注射到子宫腔后在局部会迅速形成凝胶状态,有利于维持粘连分解后的宫腔形态,并且有助于 hAMSCs 集中定位,减少损失,促进子宫内膜再生,有效防止子宫内膜再粘连。且目前使用 PPCNg 与 hAMSCs 联合治疗宫腔再粘连的报道尚未见。

TGF-β1 和 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,研究表明^[21-23],TGF-β1 及 VEGF 在 IUA 的形成过程中明显升高,提示 TGF-β1 与 VEGF 参与了 IUA 的发生发展。VIM 作为间质相关标志物^[24],在粘连的子宫内膜中高表达。α-SMA 也是一种纤维标志物^[25],其在 IUA 内膜组织中的高表达与粘连严重程度相关。CK19 与 E-Ca 均为上皮性标志物^[26-27],与多种组织器官的纤维化相关,研究显示其在 IUA 的子宫内膜中表达降低,下降程度与 IUA 的严重程度有关。

本实验研究结果表明,与模型组相比,hAMSCs 组大鼠子宫内膜腺体数目增加,纤维化面积比降低,TGF-β1、VEGF、VIM 与 α-SMA 的表达均降低,CK19 与 E-Ca 的表达均升高;PPCNg+hAMSCs 组大鼠子宫内膜腺体数目明显增加,纤维化面积比明显降低,纤维化相关标志物 TGF-β1、VEGF、VIM 与 α-SMA 的表达均明显降低,上皮标志物 CK19 与 E-Ca 的表达明显升高,大鼠子宫粘连情况明显改善。提

示 hAMSCs 可改善 IUA,但效果不如 PPCNg+hAMSCs 组明显,这可能与注入宫腔中的 hAMSCs 无法定植,细胞的治疗作用发挥受限有关。由此可知,防治宫腔再粘连时,用 PPCNg 介导 hAMSCs,既能发挥 PPCNg 的支撑作用,又能促进 hAMSCs 的治疗作用。

综上所述,本实验通过建立 IUA 大鼠模型,观察宫腔内粘连严重程度及子宫内膜修复情况,发现 PPCNg 与 hAMSCs 联用能很好地发挥两者的协同作用,优于单用 hAMSCs,能更好地改善宫腔纤维化,防治再粘连,促进子宫内膜修复。

参 考 文 献

- [1] 段 华,甘 露. 宫腔粘连的诊疗现状与进展[J]. 重庆医科大学学报,2017,42(4):373-377.
- [2] 戚亚琴,王素敏. 宫腔粘连发病机制的研究进展[J]. 医学综述,2016,22(5):932-935.
- [3] 蔡艾杞,吴本媛,王 佳. 新鲜羊膜移植对中、重度宫腔粘连月经模式的影响[J]. 重庆医科大学学报,2017,42(4):424-428.
- [4] 阳 媛,毛艳华,王 佳,等. 机械和感染双重法建立中华田园犬宫腔粘连模型[J]. 重庆医科大学学报,2017,42(4):401-405.
- [5] 阳 媛,毛艳华,王 佳,等. PKH26 标记的人羊膜间充质干细胞在宫腔粘连大鼠中的迁移示踪[J]. 生物工程学报,2018,34(10):1660-1667.
- [6] Ye J, Wang J, Zhu Y, et al. A thermoresponsive polydiolcitrate-gelatin scaffold and delivery system mediates effective bone formation from BMP9-transduced mesenchymal stem cells[J]. Biomedical Materials, 2016, 11(2):025021.
- [7] 徐 倩,段 华,汪 沙,等. 机械损伤建立大鼠宫腔粘连模型的实验研究[J]. 医学研究生学报,2016,29(10):1026-1030.
- [8] 武玉萍,冯力民. 宫腔粘连的治疗进展[J]. 现代实用医学,2017,29(3):284-286.
- [9] Surgery AEG. AAGL practice report:practice guidelines on intrauterine adhesions developed in collaboration with the European Society of Gynaecological Endoscopy (ESGE)[J]. Journal of Minimally Invasive Gynecology, 2017, 24(5):695-705.
- [10] 胡建国,蔡留芸,胡丽娜. 宫腔粘连的发生机制及诊治现状[J]. 重庆医学,2018,47(33):4208-4210.
- [11] Yu D, Wong YM, Cheong Y, et al. Asherman syndrome—one century later[J]. Fertility & Sterility, 2008, 89(4):759-779.
- [12] 陈灿明,王奕芳,顾小燕,等. 宫腔粘连病因学及治疗研究进展[J]. 国际妇产科学杂志,2016,43(3):250-253.
- [13] 张 玲,张李钱,高 琳,等. 羊膜移植在宫腔镜下宫腔粘连分离术后预防宫腔粘连的相关研究[J]. 温州医科大学学报,2016,46(6):433-437.
- [14] 周 丽,刘国栋,龚月宾,等. 宫腔镜下粘连分离术联合羊膜移植对复发性重度宫腔粘连的临床疗效[J]. 解放军医学院学报,2017,38(10):931-934.
- [15] 王 欣,段 华. 羊膜制品在重度宫腔粘连治疗中的应用及疗效分析[J]. 中华妇产科杂志,2016,51(1):27-30.
- [16] 陆彦旭,张斌宇. 宫腔粘连的干细胞治疗[J]. 科学咨询(科技·管理),2018,6(2):41-42.
- [17] Nagori CB, Panchal SY, Patel H. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome[J]. Journal of Human Reproductive Sciences, 2011, 4(1):43-48.
- [18] Abumaree MH, Jumah MAA, Kalionis B, et al. Phenotypic and functional characterization of mesenchymal stem cells from chorionic villi of human term placenta[J]. Stem Cell Rev Rep, 2013, 9(1):16-31.
- [19] 张燕燕,许慕慧,马玲璇,等. 羊膜干细胞用于修复损伤子宫内壁的动物实验研究[J]. 现代医院,2016,16(8):1115-1117.
- [20] 任婷婷,卢清侠,郝慧芳,等. 温度敏感型可注射水凝胶的性质及应用研究进展[J]. 动物医学进展,2018,39(1):99-103.
- [21] 徐 力,彭 娟,张荣华. 宫腔粘连患者子宫内膜组织 ArhGAP29、LOXL 2 及 TGF- β 1 的表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(22):2762-2766.
- [22] 吴玺玺,周 勤,胡建国,等. TGF- β 1 和 MMP-9 在宫腔粘连子宫内壁组织中表达上调[J]. 重庆医科大学学报,2017,42(4):394-400.
- [23] 刘智敏,周春慧,龙文香,等. miR-29 及 VEGF 在宫腔粘连患者子宫内膜的表达[J]. 临床医学,2018,38(2):4-7,128.
- [24] 王 雪,刘 芳. 骨髓间充质干细胞来源的 Exosome 修复兔受损子宫内膜的研究[J]. 现代妇产科进展,2018,27(3):170-174,178.
- [25] 周 柳,郑 静,袁 瑞,等. TGF- β 1 诱导的 Postn、 α -SMA 和 Collagen I 在宫腔粘连内膜组织中高表达与粘连严重程度相关[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2018,34(4):446-454.
- [26] 张 璐,李 莹,吕晓丹,等. 大鼠子宫宫腔粘连模型的建立及评价指标[J]. 动物学杂志,2017,52(1):115-121.
- [27] 徐 倩,段 华,汪 沙,等. 宫腔粘连子宫内壁组织中 ArhGAP29、E-cadherin 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2017,33(1):4-7.

(责任编辑:张辉洁)