

脐带间充质干细胞移植预防宫腔粘连的研究*

艾 璞¹, 廖诗平^{2**}, 王玉芳², 冯 云¹, 杨德红^{1**}, 刘 嘉¹, 闫雪兰¹

(1. 云南省第一人民医院 昆明理工大学附属医院妇产科, 昆明 650032; 2. 四川大学华西基础医学与法医学院机能学实验室, 成都 610041)

【摘要】 目的:采用机械刮宫建立大鼠宫腔粘连(IUA)模型,研究脐带间充质干细胞(UCMSCs)对IUA的预防作用。**方法:**将雌性未受孕SD大鼠麻醉后进行机械刮宫,分别于术后第3、5、7、9、12天进行大体观察,取子宫刮宫段,Western blot法检测TGF- β 1表达,观察子宫内膜愈合情况。将雌性未受孕SD大鼠随机分为生理盐水组、干细胞组,麻醉后行机械刮宫,术后分别给药,于给药第3天打开腹腔进行大体观察,取刮宫段,Western blot法检测TGF- β 1表达;常规固定组织后进行HE染色、Masson染色,观察受损子宫的愈合程度;免疫组化检测CD34和结缔组织生长因子(CTGF)的表达。**结果:**刮宫后第3天,与其余时间点相比,TGF- β 1表达明显增加,IUA程度最为严重。与生理盐水组相比,干细胞组的IUA评分显著降低($P < 0.05$)。Western blot结果显示,与生理盐水组相比,干细胞组的TGF- β 1表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);HE染色、Masson染色显示,与生理盐水组相比,干细胞组的子宫内膜纤维化程度较低,内膜愈合较好。与生理盐水组相比,干细胞组子宫组织的CTGF染色分值明显下降($P < 0.01$),CD34染色分值明显升高($P < 0.01$)。**结论:**UCMSCs可有效预防术后IUA,促进子宫内膜愈合。

【关键词】 宫腔粘连;动物模型;脐带间充质干细胞;移植

中图分类号:R713.4 文献标志码:A 文章编号:1004-7379(2019)05-0342-04

DOI:10.13283/j.cnki.xdfckjz.2019.05.006

The study of treatment effect of umbilical cord mesenchymal stem cells on intrauterine adhesions. Ai Ying¹, Liao Shiping², Wang Yufang², et al. 1. The First People's Hospital of Yunnan Province, the Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032; 2. West China School of Basic Medicine and Forensic Sciences of Sichuan University, Chengdu 610041

【Abstract】 Objective: To establish a rat model of intrauterine adhesion by mechanical curettage, and to investigate the effect of umbilical cord mesenchymal stem cells (UCMSCs) on intrauterine adhesions. **Methods:** SD female rat without pregnancy were divided into two group: the control group and UCMSCs transplantation group. Mechanical curettage was used by self-made miniature curette to establish the rat model of intrauterine adhesion. HE staining, Masson staining, expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) by Western blot, The expressions of CD34 and Connective Tissue Growth Factor (CTGF) by IHC were used to evaluate the endometrial damage effect on the rats. **Results:** Compared with the control group, the degree of IUA was significantly improved in the transplantation group. The expression levels of TGF- β 1 and CTGF of the transplantation group were lower than that of the control group, whereas the expression level of CD34 was higher than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Umbilical cord mesenchymal stem cells may be useful to prevent IUA after uterine injury.

【Key words】 Intrauterine adhesions; Animal model; Umbilical cord mesenchymal stem cells; Transplantation

宫腔粘连(intrauterine adhesions, IUA)是由于子宫内膜基层损伤脱落、创面裸露、内膜修复失衡等共同作用所导致的宫腔壁粘连。IUA通常发生于刮

宫和宫腔镜术后^[1]。近年来,随着人工流产率的增高及宫腔操作手术的广泛开展,IUA发病率随之升高。目前宫腔镜下宫腔粘连分离术是IUA的主要治疗方

* 云南省卫生科技计划项目(No:2014NS233,2016NS193,2016NS196,2016NS195,2017NS214)

** 共同通讯作者 廖诗平 Email:1064509152@qq.com;杨德红 Email:2605329330@qq.com

法,但术后复发率高达 62.5%^[2],妊娠成功率仅 22.5%~33.3%^[3-4]。脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells,UCMSCs)是存在于新生儿脐带,来源于发育早期中胚层的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的多能干细胞,可在体外培养扩增,能在特定条件下分化成神经细胞、成骨细胞、软骨细胞、肌肉细胞及脂肪细胞等^[5]。UCMSCs 的生物学功能与骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells,BMSCs)相似。研究证明,BMSCs 能修复子宫内膜损伤、改善 IUA^[6-9]。但 BMSCs 的数量及增殖分化潜能随着年龄增加而下降,且供者的 BMSCs 的采集须行骨髓穿刺,且由于疾病的原因,患者常有感染、体质较弱等因素而限制其应用。UCMSCs 具有来源丰富、对供者无影响、易于采集和运输、无异体排斥反应、避免伦理争议等诸多优点,并有更高的增殖特性,有利于临床上短时间内获得更大量的细胞数。本研究旨在探索 UCMSCs 代替 BMSCs 治疗 IUA 的可能性。

1 资料与方法

1.1 实验动物 雌性未受孕 8 周龄 SD 大鼠,体重约 280g,购自成都达硕实验动物公司[生产许可证号:SCXK(川)2014-028]。饲养条件:室温(23±2)℃,湿度 45%~55%,光照时间 12h,自由饮水、摄食,适应性饲养 1 周。

1.2 药品与试剂 人脐带间充质干细胞(云南省干细胞库产),培养第三代,细胞密度 1×10^7 /ml,生理盐水配置,活性检测正常,表型检测显示 CD166 阳性,CD105 阳性,CD90 阳性,CD45,CD34,CD14,CD79A,HLA-DP 均为阴性。TGF-β1 抗体(货号:7666-MB,R&D Systems),CD34 抗体(中杉金桥)。CTGF 抗体(博奥森)。HRP conjugated goat anti-mouse IgG(Cambridge)。

1.3 实验方法

1.3.1 IUA 模型的建立 取雌性未受孕 SD 大鼠,阴道涂片检查确定大鼠动情周期。选择动情后期或间期大鼠,异氟烷麻醉机麻醉,无菌操作,切开腹腔,暴露子宫。将右侧子宫牵拉出腹腔,于卵巢下 0.5cm 处作纵行切口长度为 0.5cm,将直径 3mm 自制刮宫器伸入,刮出内膜组织,感觉子宫壁粗糙时停止搔刮,将宫体缝合卵巢端结扎以避免术后远端内膜爬行。左侧子宫同样剪口,仅暴露内膜,不行刮宫操作,以作自身对照,恢复双侧子宫至正常位置。一次性可吸收缝合线缝合肌肉和皮肤,缝合处滴庆大霉素 0.2ml(2ml:80 万单位)。术后第二天肌肉注射 10 倍稀释后的庆大霉素 0.2ml(2ml:80 万单位),连续给药 3 天。术后第 3、5、7、9 天各处死 2 只,取子宫受损段进行评分,Western blot 法检测 TGF-β1 表达。

1.3.2 实验分组 12 只大鼠随机分为 2 组:生理盐水组(6 只,刮宫后用 1ml 无菌注射器向子宫内注入 0.1ml 生理盐水)、干细胞组[6 只,用 1ml 无菌注射器向舌下静脉内注入 $0.1\text{ml}(1 \times 10^6)$ 细胞 UCMSCs 悬液,3min 后进行刮宫术操作]。

1.4 观察指标 术后 3 天大鼠股动脉放血处死,打开腹腔进行大体观察评分。参照美国生殖协会对 IUA 的评分标准,对 IUA 程度进行半定量评分(宫腔粘连范围:<1/3 为 1 分,1/3~2/3 为 2 分,>2/3 为 4 分;粘连类型:薄膜样为 1 分,薄膜与致密之间为 2 分,致密粘连为 4 分)。收集子宫受损端组织 0.5cm 长,一部分石蜡切片用于 HE 染色、Masson 染色进行腺

体数和纤维化分析,免疫组化法检测子宫内膜组织中 CD34 和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)蛋白表达;一部分裂解获得蛋白,Western blot 法检测转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)表达。

1.5 免疫组化检测子宫内膜组织中 CD34 和 CTGF 蛋白表达

采集子宫组织,置于 FAA 固定液,固定、包埋、切片。免疫组化三步法检测子宫内膜组织中 CD34 和 CTGF 蛋白表达。主要步骤:脱蜡至水、清除内源性过氧化物酶、抗原修复、山羊抗兔血清封闭、一抗孵育(将 PBS 稀释好的 CD34 或 CTGF 一抗滴加在切片组织上,4℃ 过夜,蒸馏水浸泡 2min×2 次,PBS 浸泡 2min)、二抗孵育(滴加生物素标记山羊抗兔 IgG 聚合物二抗,37℃ 孵育 40min,蒸馏水浸泡 2min×2 次,PBS 浸泡 2min)、辣根酶标记链霉卵白素工作液、DAB 显色反应、镜下观察阳性染色。超纯水冲洗,苏木素染液复染、清洗、55℃ 热水返蓝,镜下观察、常规脱水、透明、封片。根据阳性细胞在全部组织细胞中所占比例以及阳性细胞染色强度判定实验结果^[10-11]。按显色细胞数记分:阳性细胞数<1/3 为 1 分,阳性细胞数 1/3~2/3 为 2 分,阳性细胞数≥2/3 为 3 分。按细胞显色深浅记分:无阳性反应细胞为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。积分数=A×B。各组统计学分析按积分数确定。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用非参数检验或方差分析;对各组数据进行正态检验,符合正态分布时采用方差分析,不符合时采用非参数检验。计数数据采用非参数检验(如卡方检验)。P<0.05 为差异有显著的统计学意义。

2 结果

2.1 IUA 建模后子宫修复时间曲线

2.1.1 IUA 建模后在不同时间 IUA 分析 IUA 建模部位在第 3 天可见充血,中、重度粘连,第 5 天轻度粘连,第 7、9、12 天宫腔粘连、水肿逐渐减轻。表明 IUA 在第 3 天到达高峰,5 天后开始修复。

2.1.2 刮宫后不同时间点受损子宫 TGF-β1 表达 IUA 建模后第 3 天的 TGF-β1 表达量与其余时间组比较,差异有统计学意义(P<0.05)。表明机械刮宫术后第 3 天,大鼠子宫 IUA 程度最严重,故选取术后给药第 3 天判断药物对 IUA 的恢复情况最佳。见图 1。

2.2 不同治疗组术后 3 天 IUA 情况 治疗 3 天后,生理盐水组刮宫侧表面凹凸不平呈环状狭窄,部分子宫可见积水、水肿、粘连。干细胞组的子宫侧表面较光滑呈淡红色,较少出现水肿、积水、粘连。与生理盐水组相比,干细胞组的 IUA 评分显著降低,差异有统计学意义[(4.33±0.82)分 vs (6.71±1.25)分,P<0.05];表明舌下静脉注射 UCMSCs 能明显降低机械刮宫后引起的 IUA 评分,预防 IUA 的发生。

2.3 Western blot 法检测受损子宫段组织 TGF-β1 表达 与生理盐水组相比,干细胞组 TGF-β1 表达量明显降低,差异有统计学意义(P<0.01)。表明 UCMSCs 能有效改善由 TGF-β1 引起的子宫内膜纤维化。见图 2。

2.4 受损子宫内膜 HE 染色分析 HE 染色结果显示,治疗后第 3 天,生理盐水组的宫腔部分狭窄,其表

面覆盖扁平或低柱状上皮细胞,部分宫腔表面还可见复层扁平上皮细胞覆盖,子宫内膜腺体稀疏,较多炎细胞浸润;干细胞组的子宫内膜腺体数较多,较少炎细胞浸润。表明 UCMSCs 能有效改善由机械刮宫引起的炎症反应,促进子宫愈合。见图 3A、B。

2.5 受损子宫内膜 Masson 染色结果分析 Masson 染色结果显示,给药后第 3 天,生理盐水组宫腔缩小,腺体稀疏,胶原纤维密度大;UCMSCs 组胶原纤维明显降低。表明舌下静脉注射 UCMSCs 能有效改善由机械刮宫引起的子宫纤维化。见图 3C、D。

2.6 受损子宫的 CD34 和 CTGF 的表达 免疫组化检测结果显示,生理盐水组中 CD34 仅轻度表达,CTGF 中度或大量表达;干细胞组 CD34 中度或重度表达,CTGF 轻度或不表达。免疫组化染色的评分显示,与生理盐水组相比,干细胞组子宫组织的 CD34 染色分值明显升高($P < 0.05$),CTGF 染色分值明显下降($P < 0.05$)。表明 UCMSCs 促进血管增生,使子宫内膜修复,能有效改善由机械刮宫引起的纤维化。见图 3E~H、图 4。

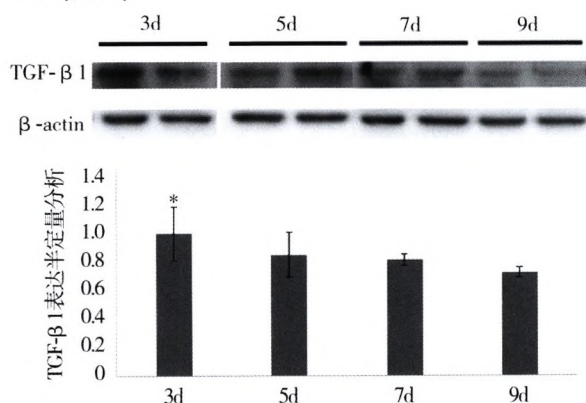


图1 刮宫术后不同时间点受损子宫 TGF-β1 的表达
* $P < 0.05$ vs 其余组

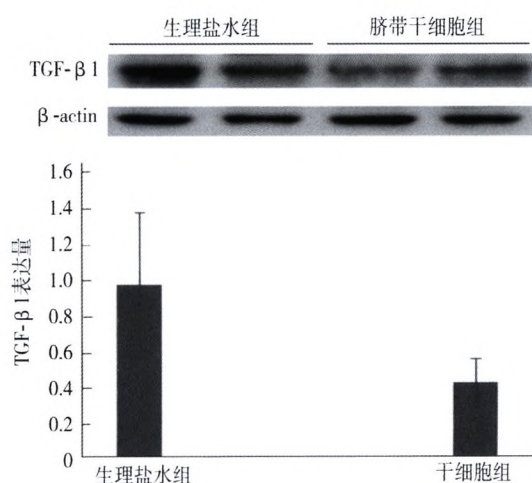


图2 受损子宫 TGF-β1 的表达

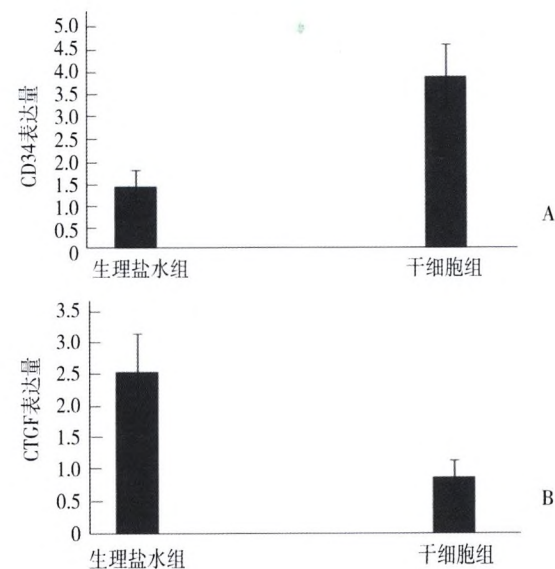


图4 子宫 CD34 和 CTGF 表达水平
A: 子宫 CD34 表达水平; B: 子宫 CTGF 表达水平

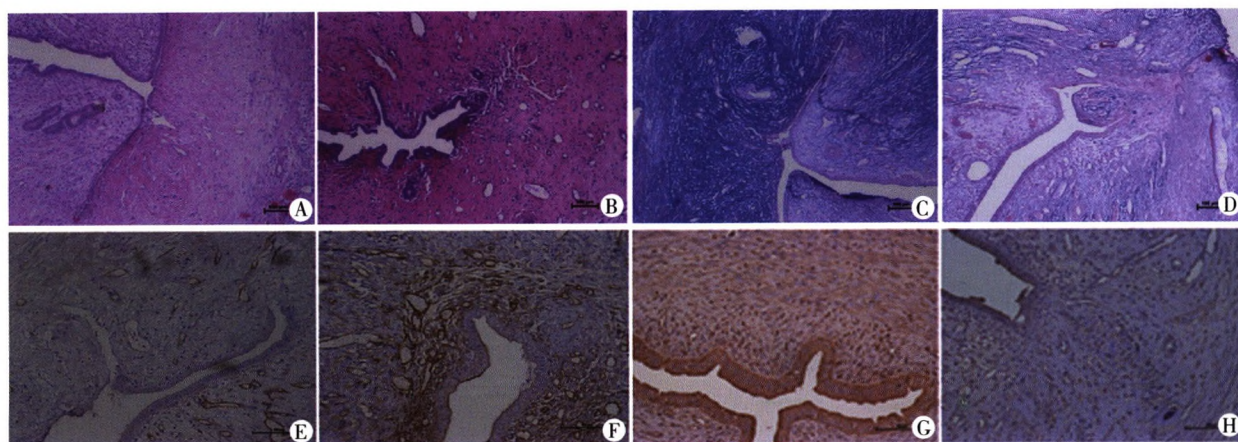


图3 免疫组化染色($\times 100$)

A、B: 子宫 HE 染色(A: 生理盐水组; B: 干细胞组); C、D: 子宫 Masson 染色(A: 生理盐水组; B: 干细胞组); E、F: 子宫 CD34 免疫组化染色(A: 生理盐水组; B: 干细胞组); G、H: 子宫 CTGF 免疫组化染色(A: 生理盐水组; B: 干细胞组)

3 讨论

研究表明,子宫内膜是高度再生的组织,其再生基础是基底层完整。IUA 患者的子宫内膜严重受损,宫腔内纤维组织增生,IUA 形成,严重影响女性的月经及生育能力。目前 IUA 的治疗手段主要是通过手术解除粘连和防止粘连复发。然而,对于中重度 IUA 患者,宫腔镜粘连松解术后粘连复发率高且治疗效果差。宫内节育器和高剂量雌激素的治疗可预防 IUA 的复发和促进子宫内膜的修复^[12-13]。但雌激素的治疗疗效较差,常伴有许多不良反应,限制了其在临床的应用。且这些治疗虽能在一定程度上预防粘连的复发,但无法促进受损的基底层再生,如何恢复正常的子宫及其生育功能一直是 IUA 治疗的难题。

啮齿类动物(大鼠、小鼠)以及兔、小型犬等遗传背景清晰、价格较低廉、实验操作便利,是研究子宫内膜生理性和病理性损伤修复较理想的动物模型^[6]。大鼠是双子宫动物,可形成自身对照,减少实验偏倚,具有繁殖力旺盛、妊娠周期短等特点,而且饲养和实验成本相对较低、可反复实施、实验操作简便、实验结果快速直观,所以本研究选用大鼠建立 IUA 的动物模型。刮宫术造成子宫内膜损伤是人类 IUA 发生的主要病因。本实验通过与引起人类 IUA 发生病因相同的机械性刮宫术模拟 IUA 的大鼠模型。本研究发现,第 3 天子宫粘连程度最为严重,是观察预防 IUA 的最佳时期,故选择刮宫给药后第 3 天作为检测时间。

研究发现,IUA 与子宫内膜干细胞损伤和缺失有关^[2,14],子宫内膜创伤和感染时内膜基底层损伤可能使位于此处的子宫内膜干细胞数减少甚至缺失、功能受损,子宫内膜腺上皮不能完全再生,导致内膜瘢痕性修复,最终引起 IUA^[15]。UCMSCs 可通过“归巢”效应向损伤组织迁徙,参与组织修复^[16]。研究发现,骨髓干细胞不仅可分化为子宫内膜间质细胞,而且还可分化为子宫内膜上皮细胞,补充受损组织中的干细胞,促进损伤组织的修复^[17]。

已有研究证实 UCMSCs 应用于大鼠的安全性^[18]。本研究通过大鼠 IUA 模型,从形态学、功能学对 UCMSCs 预防 IUA 的作用进行了评价。本实验发现,与对照组相比,干细胞组子宫侧表面较为光滑,呈淡红色,较少出现水肿、积水、粘连。TGF- β 1 及细胞因子 CTGF 是导致器官纤维化的重要原因,这些纤维化的相关细胞因子可能对干细胞的分化发生影响,使细胞外胶原蛋白过度沉积而发生纤维化。IUA 形成机制和子宫内膜纤维化与子宫内膜腺上皮细胞 TGF- β 1 过度表达有关^[19]。CD34 为血管内皮细胞的特异性标记物,它可反映子宫内膜新生毛细血管的生长情况,子宫内膜组织中其表达越高表明新生毛细血管越丰富。本实验结果显示,UCMSCs 可有效减少受损子宫局部 TGF- β 1 的表达,表明其能通过降低 TGF- β 1 的表达从而减轻子宫内膜纤维化,防止 IUA。本研究还表明,舌下静脉注射 UCMSCs

可有效减少大鼠受损子宫 CTGF 表达、增加 CD34 的表达。表明 UCMSCs 能有效改善由机械刮宫引起的子宫内膜纤维化,促进血管增生,促使子宫内膜修复。

本实验证明,舌下静脉注射 UCMSCs 可有效防止 IUA 的发生,促进子宫愈合,为临床预防术后 IUA 提供了一种新思路。

参考文献

- [1] Deans R, Abbott J. Review of intrauterine adhesions [J]. J Minim Invasive Gynecol, 2010, 17(5): 555-569
- [2] Yu D, Wong YM, Cheong Y, et al. Asherman syndrome-one century later [J]. Fertil Steril, 2008, 89(4): 759-779
- [3] Yu D, Li TC, Xia E, et al. Factors affecting reproductive outcome of hysteroscopic adhesiolysis for Asherman's syndrome [J]. Fertil Steril, 2008, 89(3): 715-722
- [4] Roy KK. Reproductive outcome following hysteroscopic adhesiolysis in patients with infertility due to Asherman's syndrome [J]. Arch Gynecol Obstet, 2010, 281(2): 355-361
- [5] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147
- [6] 王改, 贺斌, 徐祥波, 等. 子宫内膜损伤与宫腔粘连动物模型的研究进展 [J]. 生殖医学杂志, 2014, 23(10): 856-859
- [7] 张红红, 李文. 宫腔粘连的治疗策略及进展 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2018, 28(3): 248-251
- [8] Romer T, Schmidt T, Foth D. Pre- and postoperative hormonal treatment in patients with hysteroscopic surgery [J]. Contrib Gynecol Obstet, 2000, 20(2): 1-12
- [9] Seo E, Wan Y, Kim J, et al. The Hippo-Salvador signaling pathway regulates renal tubulointerstitial fibrosis [J]. Sci Rep, 2016, 6(1038): 31931
- [10] Jiang ZF, Shao LJ, Wang WM, et al. Decreased expression of Beclin-1 and LC3-II in human lung cancer [J]. Mo Biol Rep, 2012, 39(1): 259-267
- [11] 吴圣, 邵婧怡, 王芳, 等. PD-L1 和 PD-1 在胃癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(6): 821-826
- [12] Lei QY, Zhang H, Zhao B, et al. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(7): 2426-2436
- [13] Shen X, Cheng S, Peng Y, et al. Attenuation of early liver fibrosis by herbal compound "Diwu Yanggan" through modulating the balance between epithelial-to-mesenchymal transition and mesenchymal-to-epithelial transition [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 418
- [14] Gargett CE, Ye L. Endometrial reconstruction from stem cells [J]. Fertil Steril, 2012, 8(1): 11-20
- [15] 陈芳, 隋龙. 干细胞在宫腔粘连治疗中的研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2014, 41(6): 632-635
- [16] Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? [J]. Blood, 2005, 106(6): 1901-1910
- [17] Du HL, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis [J]. Stem Cell, 2007, 25(8): 2082-2086
- [18] 张颖, 李娜, 林箐, 等. 大鼠静脉多次注射人脐带间充质干细胞安全性的研究 [J]. 心肺血管病杂志, 2015, 34(3): 221-227
- [19] 成九梅, 靳琳, 夏恩兰, 等. 雌孕激素受体及转化生长因子 β 1 在宫腔粘连发病机制中的作用 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21(9): 539-541

(收稿日期 2018-10-10)

第一作者简介: 艾瑛(1974-), 女, 云南省第一人民医院副主任医师、博士研究生。主要研究方向: 妇科微创、不孕症。