论著·基础医学

人羊膜间充质干细胞通过TGF-β1/Smad通路抑制EMT与纤维化修复子宫内膜损伤

谢 婷[1],黄燕明[2],牛嘉颖[3],刘荣霞[4],梁思雨[1],张 瑶[1],陈 璐[2],盛瑛樾[2] [1]武汉科技大学医学部湖北省妇幼保健院研究生培养基地妇科,湖北武汉;[2]华中科技大学附属湖北省妇幼保健院妇科,湖北武汉;[3]焦作市妇幼保健院妇产科,河南焦作;[4]武汉市普仁医院妇产科,湖北武汉

[摘要] **目的** 探究人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs)对子宫内膜损伤的修复作用及机制。**方法** 两酶消化法分离hAMSCs,取P3代细胞通过流式细胞术检测表面分子并鉴定其三系分化能力。将18只8~9周龄体质量250~280 g的未生育雌性SD大鼠通过随机数字表法分为3组(n=6):正常组(control组)、模型组(IUA组)、hAMSCs组。采用机械及脂多糖感染法建立SD大鼠宫腔粘连(intrauterine adhesions, IUA)模型。造模2周后hAMSCs组双侧宫角移植0.2 mL hAMSCs(1.0×10^6/μL),IUA组双侧宫角注射等量PBS。移植2周后处死大鼠,采用HE染色观察子宫内膜厚度和腺体数量;Masson染色观察子宫内膜纤维化面积;RT-qPCR方法检测子宫内膜组织中TGF-β1、Smad3、Smad7以及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志性因子E-cadherin、Vimentin、纤维化因子α-SMA、子宫内膜雌激素受体(estrogen receptor,ER)、孕激素受体(progesterone receptor,PR)等的mRNA表达水平;Western blot方法检测子宫内膜组织中上述因子的蛋白表达水平。**结果** 所获细胞经细胞表面分子及分化能力的鉴定符合hAMSCs特征。与control组相比,IUA组子宫内膜厚度降低,腺体数量减少,纤维化面积增加;与IUA组相比,hAMSCs组子宫内膜厚度及腺体数量增加,纤维化面积减少。IUA组子宫内膜中纤维化相关因子TGF-β1、Smad3、Vimentin、α-SMA的mRNA及蛋白表达水平明显升高(P<0.01);纤维化抑制分子Smad7、EMT标志物E-cadherin以及子宫内膜ER、PR的mRNA及蛋白表达水平明显下调(P<0.01)。与IUA组相比,hAMSCs组上述纤维化相关因子的mRNA表达明显下调(P<0.01),Smad7、E-cadherin、ER及PR的mRNA表达水平则显著上调(P<0.01);hAMSCs组TGF-β1、Smad3、α-SMA的蛋白表达水平明显下降(P<0.05),Smad7、PR的蛋白表达水平明显上升(P<0.05)。**结论** hAMSCs宫腔内移植可促进子宫内膜损伤修复,并可能通过TGF-β1/Smad7信号通路抑制子宫内膜EMT和纤维化。

[关键词] 宫腔粘连;人羊膜间充质干细胞;TGF-β1/Smad;子宫内膜纤维化

[中图法分类号] R329.21;R363.22;R711.4 [文献标志码] A

[基金项目] 湖北省妇幼保健院课题(2021SFYM006)

[通信作者] 黄燕明,E-mail:389680285@qq.com

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:谢婷,黄燕明,牛嘉颖,等. 人羊膜间充质干细胞通过TGF-β1/Smad通路抑制EMT与纤维化修复子宫内膜损伤[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(21):2688-2697. DOI:10.16016/j.2097-0927.202507012.

Citation:XIE T, HUANG Y M, NIU J Y, *et al*. hAMSCs repair endometrial injury through suppressing endometrial EMT and fibrosis *via* TGF-β1/Smad signaling pathway[J]. J Army Med Univ,2025,47(21):2688-2697. DOI:10.16016/j.2097-0927.202507012.

hAMSCs repair endometrial injury through suppressing endometrial EMT and fibrosis *via* TGF-β1/Smad signaling pathway

XIE Ting[1], HUANG Yanming[2], NIU Jiaying[3], LIU Rongxia[4], LIANG Siyu[1], ZHANG Yao[1], CHEN Lu[2], SHENG Binyue[2] [1]Department of Gynecology, Hubei Provincial Maternal and Child Health Hospital Graduate Joint Training Base, School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei; [2]Department of Gynaecology, Hubei Provincial Maternal and Child Health Care Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei; [3]Department of Obstetrics and Gynecology, Jiaozuo Maternal and Child Health Centre, Jiaozuo, Henan; [4]Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhan Puren Hospital, Wuhan, Hubei, China

[**Abstract**] Objective To explore the repair effect and mechanism of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) on endometrial injury. Methods hAMSCs were isolated using a two-enzyme digestion and then cultured. The third-passage (P3) cells were harvested to detect the surface markers by flow cytometry and to identify their trilineage differentiation potentials. Eighteen nulliparous female SD rats (8~9 weeks old, weighing 250~280 g) were randomly divided into 3 groups (n=6): normal control group, model group, and hAMSCs group. A rat model of intrauterine adhesions (IUA) was established in SD rats by using curettage combined with lipopolysaccharide (LPS) infection. In 2 weeks after modeling, the hAMSCs group received a bilateral uterine horn transplantation of 0.2 mL hAMSCs (1.0×10^6 cells/mL), while the model group received a same volume of PBS into both uterine horns. All rats were sacrificed in 2 weeks after transplantation. HE and Masson staining was used to observe endometrial thickness and gland number as well as endometrial fibrosis area. RT-qPCR and Western blotting were performed to detect the mRNA and protein levels of TGF-β1, Smad3, Smad7, epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers (E-cadherin, Vimentin), fibrosis factor α-SMA, and endometrial estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) in endometrial tissues. Results The obtained cells were identified as hAMSCs due to the characteristics of surface markers and differentiation potentials. Compared with the normal control group, the model group showed decreased endometrial thickness, reduced gland number, increased fibrosis area, and enhanced mRNA and protein levels of fibrosis-related factors TGF-β1, Smad3, Vimentin, and α-SMA (P<0.01), while down-regulation of fibrosis-inhibiting molecule Smad7, the EMT marker E-cadherin, and endometrial receptors ER and PR at both mRNA and protein levels (P<0.01). hAMSCs transplantation increased endometrial thickness and gland number, decreased fibrosis area, and down-regulated mRNA expression of the aforementioned fibrosis-related factors (P<0.01), and up-regulated the mRNA expression levels of Smad7, E-cadherin, ER, and PR (P<0.01). The hAMSCs group also exhibited obviously down-regulated protein levels of TGF-β1, Smad3, and α-SMA (P<0.05), while enhanced protein levels of Smad7 and PR (P<0.05). Conclusion Intrauterine transplantation of hAMSCs can promote the repair of endometrial injury, and inhibits endometrial EMT and fibrosis through the TGF-β1/Smad7 signaling pathway.

[**Key words**] intrauterine adhesions; human amniotic mesenchymal stem cells; TGF-β1/Smad; endometrial fibrosis

Supported by the Project of Hubei Provincial Maternal and Children Hospital (2021SFYM006). Corresponding author: HUANG Yanming, E-mail: 389680285@qq.com

宫腔粘连是子宫内膜基底层受损后,功能层再生修复障碍,组织纤维化导致宫腔部分或完全封闭[1],表现为月经量减少、闭经、不孕等,是妇科常见疾病[2],严重影响患者的生活质量及心理健康[3]。目前,宫腔镜下宫腔粘连分离术(transcervical resection of adhesions, TCRA)及术后人工周期及球囊等治疗是常用的治疗方法,但是,术后复粘率高,尤其是中重度宫腔粘连,术后复粘率甚至高达66%,妊娠成功率低至22.5%[4],因此中重度宫腔粘连(intrauterine adhesions, IUA)的治疗仍是临床棘手的问题,必须寻找新的治疗方案。

随着再生医学的发展,干细胞治疗作为目前治疗组织损伤和纤维化的有效的方法之一[5],宋玉婷等[6]的研究证实间充质干细胞能有效地改善宫腔粘连,为包括IUA在内的各种难治性疾病带来了新的希望,但是其免疫原性和致瘤性的不容忽视。其中人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells,hAMSCs)具有低免疫原性、多能性、强旁分泌作用及易获取的特点,对治疗子宫内膜损伤具有良好的应用前景[7],但其具体治疗机制尚不清楚。

宫腔粘连的主要组织学表现为成纤维细胞取代正常的子宫内膜细胞,引起内膜的纤维化[8]。研究发现,TGF-β1是内膜纤维化的关键因子[9],而hAMSCs具有抗纤维化作用[10]。本研究通过建立大鼠IUA模型,探讨hAMSCs通过TGF-β1/Smad通路治疗IUA的作用及机制,为子宫内膜修复寻求新的有效治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 羊膜组织来源

羊膜标本来自2023年6—12月于湖北省妇幼保健院产科足月分娩的,无传染性疾病及基础疾病的的胎盘,获取患者知情同意后,无菌条件下分离羊膜并提取干细胞。研究已经获湖北省妇幼保健院医学伦理委员会批准{[2021]IEC(XM068)号}。

1.2 实验动物

将购自武汉白仟度生物公司的18只8~9周龄体质量250~280 g的未生育雌性SD大鼠,在22 ℃的SPF环境中饲养,环境条件为12 h光照/12 h黑暗周期,自由摄食和饮水,适应性喂养1周。

1.3 主要试剂和仪器

本研究采用的主要试剂和仪器有:DMEM/F12培养基、胰酶细胞消化液及胶原酶Ⅳ购自中国Biosharp公司,胎牛血清(fetal bovine serun,FBS)购自日本HAKATA公司,bFGF(美国Thermo Fisher)、PBS(中国吉诺生物)、一抗(兔抗)TGF-β1(中国武汉博士德)、一抗(兔抗)SMAD3(中国ABclonl)、一抗(鼠抗)SMAD7(美国Santa)、一抗(兔抗)E-cadherin(中国Fine Test)、一抗(兔抗)Vimentin(中国武汉谷歌生物)、一抗(鼠抗)α-SMA(中国武汉博士德)、一抗(兔抗)雌激素受体(estrogen receptor,ER;英国Abcam)、一抗(兔抗)孕激素受体(progesterone receptor,PR;中国武汉三鹰),固定液、二抗、油红O染液及甘油明胶封片剂购自中国武汉百仟度生物公司,PKH26购自中国懋康生物公司。

1.4 方法

1.4.1 hAMSCs的分离培养及鉴定 将羊膜从胎盘分离,加入无血清的DMEM/F12培养基,用PBS冲洗2次后切块。在37 ℃的水浴锅中加入0.05%的胰酶水浴1 h同时进行摇动,每10分钟摇动30 s,消化完毕后,将羊膜用PBS冲洗2次后酶解终止,将羊膜置于50 mL离心管中,再用1 g/L的胶原蛋白酶于37 ℃进行水浴消化,70 μm滤网过滤后,在1 500 r/min下进行5 min的离心,离心后去上清液并依次与PBS、hAMSCs培养液同转速重新悬浮,置于37 ℃ 5%CO_2培养箱中,每隔48小时换液1次,用倒置相差显微镜观察其形态、生长和增殖情况。当细胞汇合度达到80%左右时进行传代,将P3代hAMSCs用胰酶消化,根据流式抗体激发波长,调整细胞密度至1.0×10^6个/mL,取细胞悬液200 μL按组合方案加入荧光标记单抗CD90-FITC、CD105-PerCP-Cv5.5和CD73-APC、CD44-PE、CD45-PE、CD34-PE、CD11b-PE、CD19-PE、HLADR-PE各5 μL,振荡混匀,室温避光孵育。加入PBS后离心弃上清,加入400 μL PBS重悬细胞,立即用流式细胞仪检测,计算细胞表面抗原阳性率。按成脂、成骨、成软骨试剂盒说明书,进行hAMSCs细胞成脂诱导油红O染色。细胞成骨诱导茜素红染色、细胞成软骨诱导阿利辛蓝染色的鉴定[11-12]。

1.4.2 宫腔粘连模型的构建及分组 将18只8~9周龄未生育雌性SD级大鼠按随机数字表法均分为3组,大鼠腹腔注射1%的戊巴比妥钠(50 mg/kg)进行麻醉,待动物角膜反射及翻正反射消失后进行实验操作。正常组(control组):仅进行开腹暴露子宫后逐层关腹;模型组(IUA组):参照刘芳等[13]的方法进行造模,开腹后用于子宫中下1/3处做0.5 cm纵切口,用微型刮勺刮取中上段子宫内膜,当感觉子宫四壁粗糙时,停止刮宫,留置浸泡24 h的10 mg/L脂多糖的10号手术丝线0.5 cm尾丝于腹部后关腹,2 d后撤出丝线,造模2周后再次开腹,双侧宫角注射PBS 0.2 mL[14];hAMSCs组:制模2周后,再次开腹后双侧宫腔内注射hAMSCs细胞悬液0.2 mL(1.0×10^6/μL)。造模2周麻醉后用CO_2窒息法处死各组3大鼠,剩下的大鼠在移植2周后处死,收集双侧子宫标本进行后续研究。

1.4.3 组织学染色、图像采集及分析 hAMSCs移植2周后,麻醉后每组处死3只大鼠,分别取材,各组右侧子宫组织分别置于10%多聚甲醛固定24 h,石蜡包埋,4 μm切片,按照HE和Masson染色试剂盒的操作步骤进行染色,光学显微镜下观察组织病理学变

化。HE染色每组取3张切片,每张切片随机选6个视野200倍放大后对腺体进行计数。Masson染色应用Image-Pro Plus 6.0软件选取相同的蓝色作为判断所有照片胶原纤维的统一标准,通过分析每张照片胶原纤维占整个组织面积的比率计算胶原纤维的面积百分比。对切片拍照后进行计数,并取其平均值进行后续比较。

1.4.4 Western blot检测子宫内膜组织中各检测因子的蛋白表达水平 Western blot检测细胞和子宫组织中TGF-β1、Smad3、Smad7、E-cadherin、Vimentin、α-SMA、ER、PR蛋白表达量,分别收集各组细胞和组织,提取总蛋白。使用BCA法进行蛋白定量,SDS-PAGE电泳后,将样品转移到PVDF膜上进行转膜,封闭液室温封闭1 h,加入稀释好的一抗4 ℃过夜,用TBST洗3次,每次5 min,加入稀释好的二抗,室温孵育30 min,用TBST在室温下摇床上洗4次,每次5 min。用IPWIN60软件处理系统进行灰度分析。将目标蛋白灰度值与内参的灰度值相比得到蛋白的相对表达量,每组实验至少重复3次。以β-actin为内参蛋白。

1.4.5 RT-qPCR检测子宫内膜组织中各检测因子的mRNA表达水平 hAMSCs移植2周后,采用TRIzol试剂及QuickDrop提取子宫内膜组织目的基因RNA并检测RNA的浓度及纯度。根据反转录试剂盒合成CDNA,再用SYBR Gree qPCR试剂盒检测mRNA的表达量。引物序列见表1。qPCR反应扩增条件:95 ℃预变性30 s;95 ℃变性15 s;60 ℃退火30 s,循环40次;以GAPDH为内参,根据$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算目的基因TGF-β1、Smad3、Smad7、E-cadherin、Vimentin、α-SMA,ER、PR mRNA的相对表达水平。

1.5 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件进行统计学,分析TGF-β1、Smad3、Vimentin、α-SMA、Smad7、E-cadherin、ER、PR的表达定量,每组实验重复3次,计量资料服从正态分布,以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较用单因素方差分析(ANOVA)和事后检验(least significant difference,LSD),$P<0.05$为组间差异具有统计学意义,用GraphPad Prism 9.5软件进行绘图。

2 结果

2.1 流式细胞计数及三系分化检测分离到的hAMSCs

培养3代后,显微镜下观察细胞形态,见羊膜间充质干细胞呈梭形,螺旋状排列,两端细中间粗,粘附生长,呈螺旋状排列(图1B)。流式细胞术检测结果显示:CD90(89.60%)、CD105(88.90%)、CD44(94.50%)、CD73(87.20%)呈高表达,CD19(1.10%)、CD45(1.82%)、CD11b(0.05%)、CD34(0.18%)呈低表达,HLA-DR(0.03%)表达呈阴性(图1A)。成脂诱导油红O染色成骨诱导茜素红染色、成软骨诱导阿利辛蓝染色,符合间充质干细胞的基本特性(图1C~E),提示提取到的细胞是hAMSCs。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

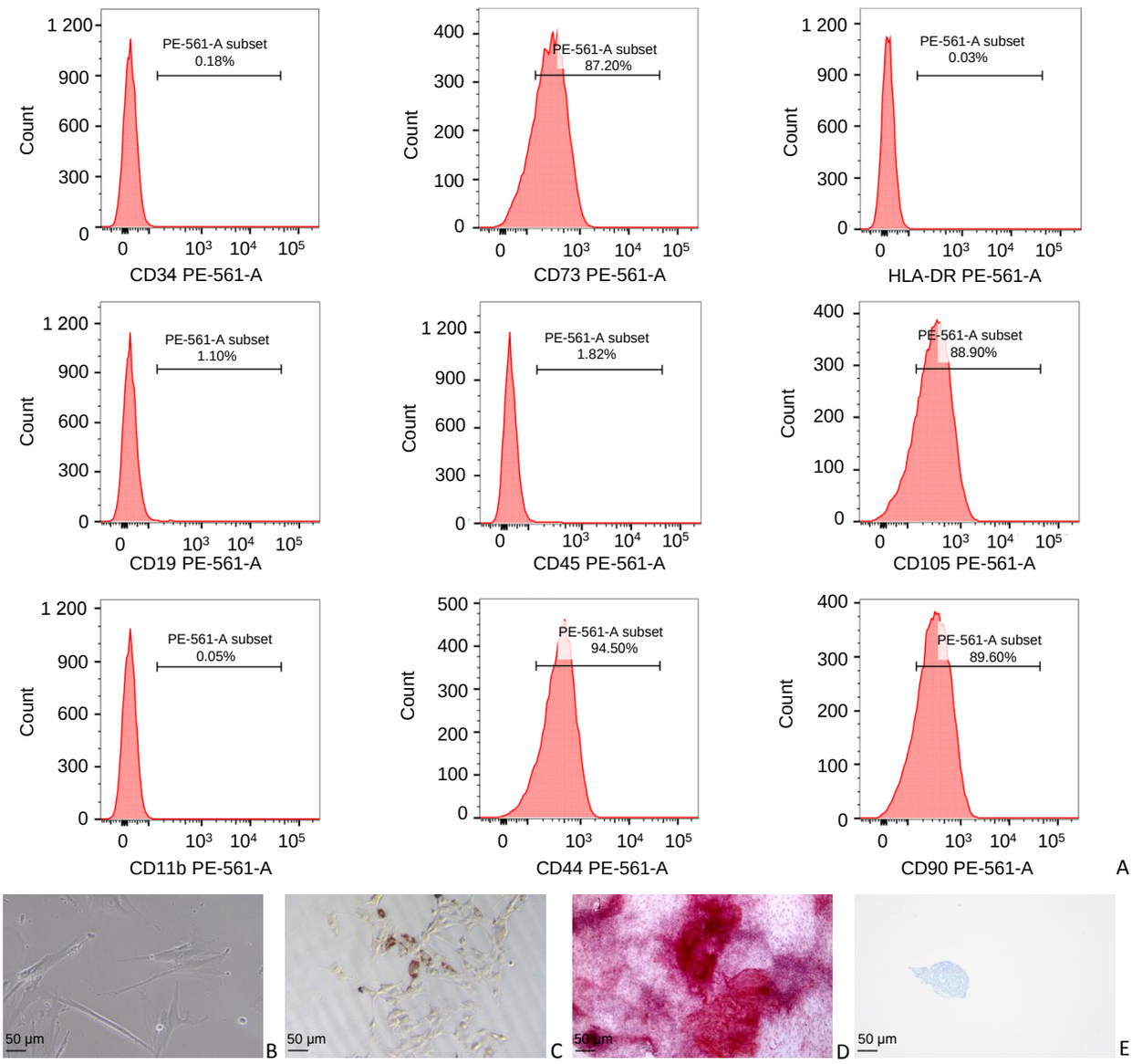
Genes	Sequences(5′→3′)
M-GAPDH	Upsteam:CCTCGTCCCGTAGACAAAATG
	Downsteam:TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT
M-TGF-β	Upsteam:ACCGCAACAACGCCATCTATGAG
	Downsteam:GGCACTGCTTCCCGAATGTCTG
M-Smad3	Upsteam:TCTCCCCGAATCCGATGTCC
	Downsteam:GCTGGTTCAGCTCGTAGTAGG
M-Smad7	Upsteam:TTTCTCAAACCAACTGCAGGC
	Downsteam:CCAGGGGCCAGATAATTCGT
M-α-SMA	Upsteam:GGACGTACAACTGGTATTGTGC
	Downsteam:TCGGCAGTAGTCACGAAGGA
M-ER	Upsteam:CCTCCCGCCTTCTACAGGT
	Downsteam:CACACGGCACAGTAGCGAG
M-PR	Upsteam:CAATCATCCAGAGAGGGGCT
	Downsteam:TAGATCAGAGGCTCCCTTCAG
M-E-cadherin	Upsteam:TCGGAAGACTCCCGATTCAAA
	Downsteam:CGGACGAGGAAACTGGTCTC
M-Vimentin	Upsteam:TTTGCTGACCTCTCTGAGGC
	Downsteam:CTCCAGGGACTCGTTAGTGC

2.2 hAMSCs促进子宫内膜腺体恢复

对各组大鼠子宫内膜组织进行HE染色分析,结果显示:control组大鼠子宫内膜腺体结构清晰完整,数目丰富,呈圆形或椭圆形结构,形态规则,腺体上皮呈柱状或立方状;IUA组大鼠子宫内膜明显变薄、腺体数目显著减少、腺腔变小,腺体开口几乎不可见,腺体上皮为低柱状、扁平状,排列混乱,子宫内膜血管减少,间质水肿,形态明显异常;经hAMSCs移植治疗后,内膜腺体结构恢复,数目增多,形态较规则(图2A)。IUA组腺体数量明显小于control组($P<0.01$),证明大鼠IUA模型建模成功。hAMSCs组腺体数量相对于IUA组有升高趋势,但差异无统计学意义(图2B)。

2.3 hAMSCs改善子宫内膜纤维化

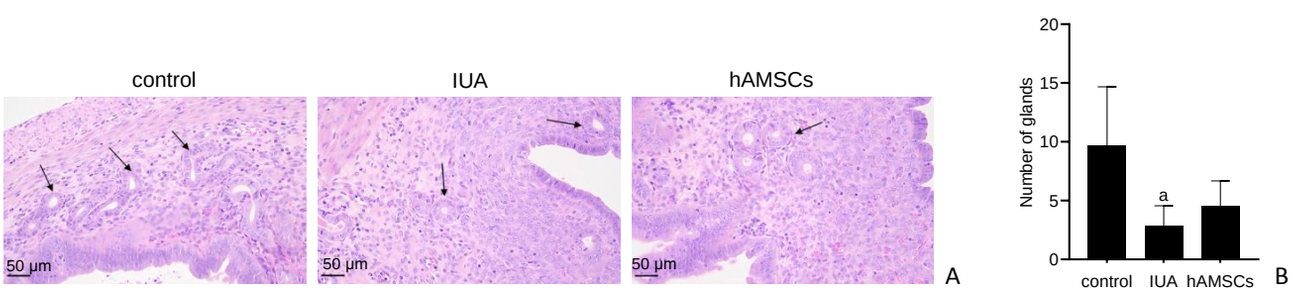
经Masson染色后,胶原纤维呈现蓝色,肌纤维呈



A: Expression of surface markers on hAMSCs; B: Morphology of hAMSCs under an inverted phase contrast microscope; C: Adipogenic differentiation of hAMSCs stained with Oil Red O on day 12; D: Osteogenic differentiation of hAMSCs on day 21; E: Chondrogenic differentiation of hAMSCs on day 21

图1 hAMSCs鉴定结果

Figure 1 Identification of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs)



A: Representative images of HE staining in rat endometrial tissues, and black arrows indicating endometrial glands; B: Quantitative analysis of endometrial gland number in each group. a: $P<0.01$, compared with the control

图2 HE染色观察各组大鼠子宫内膜组织腺体数目

Figure 2 Histological analysis of endometrial glands in rat uterine tissues by HE staining

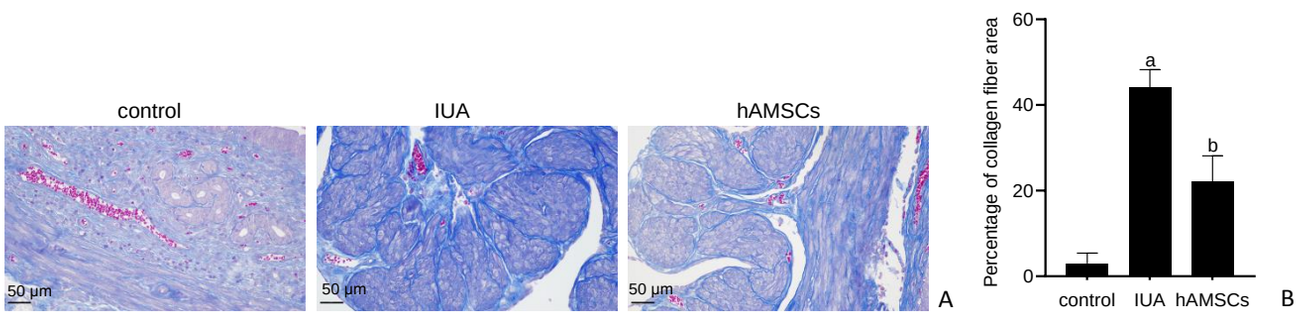
红色,细胞核蓝黑色。各组子宫内膜组织Masson染色结果显示:control组大鼠子宫内膜组织间质分布均匀,子宫肌层连续,内膜下血管清晰可见;IUA组可见大面积蓝色纤维弥漫分布,胶原纤维排列紊乱,纤维化增生明显,腺体数目减少;hAMSCs组镜下可见中量蓝染纤维结缔组织,较IUA组面积明显缩小,腺体数目增加,上皮完整性改善,新生毛细血管增多(图3A)。对各组大鼠子宫内膜纤维化面积统计,结果显示,IUA组胶原纤维占比明显高于control组($P<0.01$),证明IUA大鼠模型建模成功。hAMSCs组胶原纤维占比明显小于IUA组($P<0.01$,图3B)。

2.4　hAMSCs促进纤维化相关蛋白表达量下降

IUA组与control组的数据进行分析,IUA组Smad7、E-cadherin、ER、PR的蛋白表达水平较control组降低($P<0.01$);TGF-β1、Smad3、Vimentin、α-SMA的蛋白表达水平均较control组升高($P<0.01$)。与IUA组相比,hAMSCs组PR、Smad7的蛋白表达水平较IUA组升高($P<0.05$);hAMSCs组TGF-β1、Smad3、α-SMA的蛋白表达水平均较IUA组下降($P<0.05$,图4)。

2.5　hAMSCs移植纤维化基因表达下降

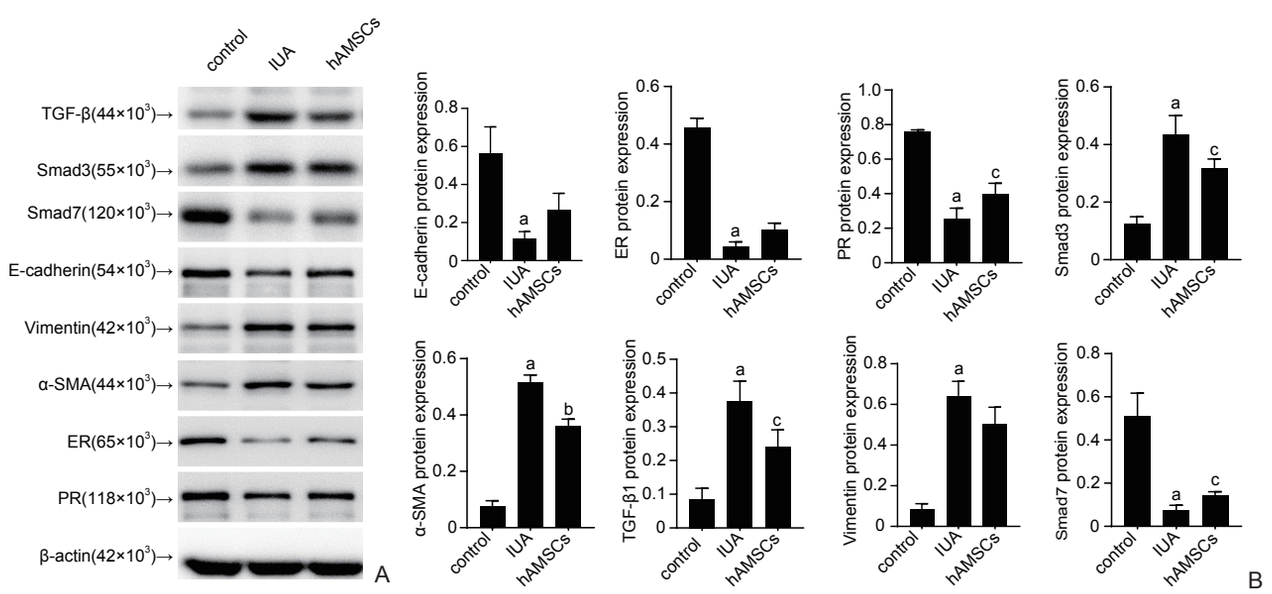
对各组大鼠子宫内膜组织中TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA表达量,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志性因子E-cadherin、



A: Representative images of Masson staining demonstrating the extent of endometrial fibrosis in each group; B: Quantitative analysis of the fibrotic area percentage in rat endometrial tissues. a: $P<0.01$, compared with the control; b: $P<0.01$, compared with the IUA

图3　Masson染色观察各组大鼠子宫内膜组织纤维化占比

Figure 3　Evaluation of endometrial fibrosis in rat uterine tissues by Masson staining



A: Representative Western blot analysis of the relevant protein levels in each group; B: Quantitative analysis of the relative protein levels. a: $P<0.01$, compared with the control; b: $P<0.01$, c: $P<0.05$, compared with the IUA

图4　内膜组织中E-cadherin、ER、PR、Smad3、α-SMA、TGF-β1、Vimentin和Smad7蛋白相对表达量

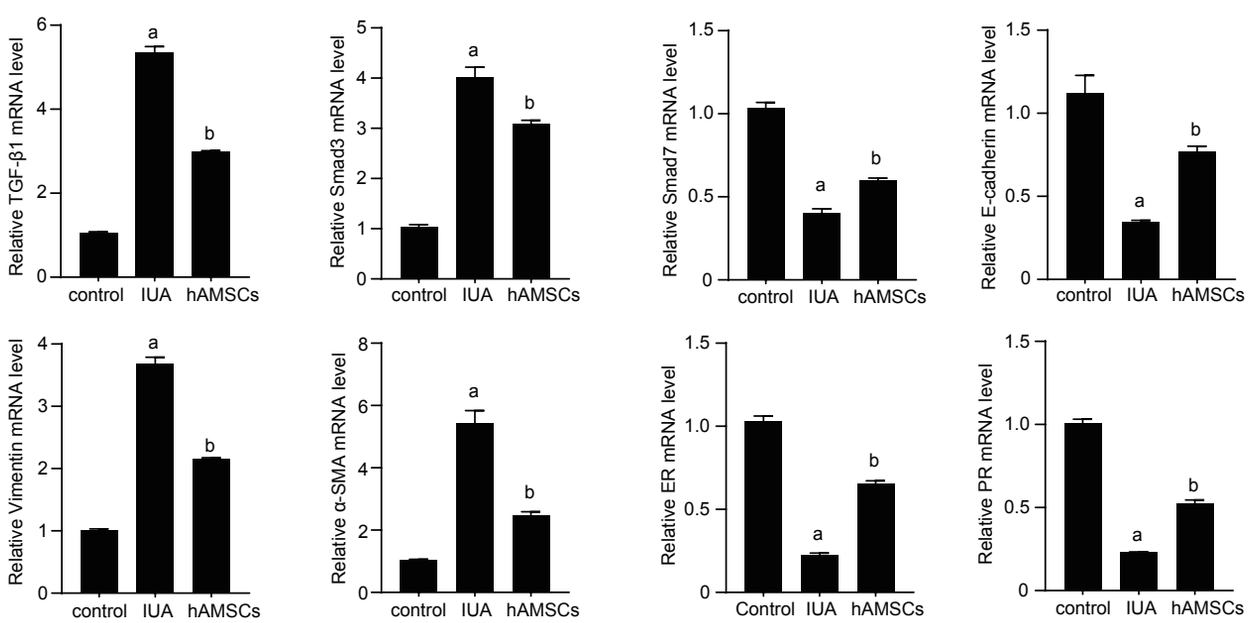
Figure 4　Relative protein expression levels of E-cadherin, ER, PR, Smad3, α-SMA, TGF-β1, Vimentin and Smad7 in rat endometrial tissues

Vimentin mRNA表达水平,纤维化因子α-SMA,子宫内膜激素受体ER、PR mRNA表达量进行检测,计算各组大鼠各检测因子mRNA扩增倍数的平均值。结果显示,IUA组TGF-β1、Smad3、Vimentin、α-SMA mRNA表达水平远高于control组($P<0.01$);IUA组Smad7、E-cadherin、ER、PR mRNA表达量明显低于IUA组($P<0.01$,图5)。

对hAMSCs组和IUA组数据进行两组间LSD比较,hAMSCs组TGF-β1、Smad3、Vimentin及α-SMA的mRNA表达明显低于IUA组($P<0.01$);Smad7、E-cadherin、ER、PR的mRNA含量明显高于IUA组($P<0.01$)。表明hAMSCs可能抑制纤维化相关基因的表达。

3 讨论

IUA常继发于宫腔手术及操作,90%以上的IUA是由刮宫术损伤子宫内膜基底层引起。稽留流产、宫内残留清宫、中晚孕引产术后清宫、多次宫腔操作等是IUA的高危因素。IUA尤其是中重度IUA预后欠佳,严重影响患者生殖健康。TCRA为治疗宫腔粘连的标准手术方法,术后再粘连的预防措施有雌激素促进子宫内膜修复、宫腔内构建物理或生物屏障等。然而中重度IUA术后再粘连仍是治疗的难点。研究表明,子宫内膜纤维化是IUA的主要病理特征。当子宫内膜损伤严重时,会加速内膜纤维化的进程[15]。TGF-β1是目前发现的最重要的致纤维化启动因子,在肝[16]、肾[17]、肺[18]等多种器官纤维化的发生发展中起到关键的调控作用,可激活其下游Smads蛋白家族,调控相关基因表达,诱导EMT,使成纤维细胞分泌大量胶原并减少对细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的降解,形成纤维化[19]。EMT是将固定的上皮细胞转化为具有迁移性的间充质细胞的过程[20],与炎症发生、肿瘤浸润及组织器官纤维化均有密切联系。其发生过程中,细胞的功能与特征发生了变化,如上皮标记物E-cadherin表达下调和EMT标记物Vimentin表达上调[21],TGF-β1与受体结合后,激活Smad2或Smad3,基质蛋白进行基因转录,促进ECM沉积,抑制ECM降解,从而促使纤维化的形成和发展[22]。抑制性Smad结合蛋白如Smad7,通过阻止Smad2、Smad3的激活来抑制TGF-β1信号传导,从而抑制TGF-β1诱导EMT的发生[23]。在生理修复过程中,收缩性肌成纤维细胞是瘢痕修复的主要参与者,肌成纤维细胞是α-SMA表达阳性的成纤维细胞,作为纤维化标志性因子进行检测,在细胞运动、结构及完整性中发挥重要作用[24]。hAMSCs属成体干细胞的一种,具有间充质干细胞强大的再生能力、低免疫原性等特征,且相较于其他来源的间充质干细胞具有无伦理道德问题、分离提取容易、获取数量较多、获取过程无创等优势[25],具有较好



a: $P<0.01$, compared with the control; b: $P<0.01$, compared with the IUA

图5 各组大鼠子宫内膜组织中TGF-β1、Smad3、Smad7、E-cadherin、Vimentin、α-SMA、ER、PR分子的mRNA相对表达量

Figure 5 Relative mRNA expression levels of TGF-β1, Smad3, Smad7, E-cadherin, Vimentin, α-SMA, ER, and PR in rat endometrial tissues from each group

临床应用前景,因此,在本研究中,我们选取hAMSCs分离培养,通过大鼠IUA模型,探讨hAMSCs通过TGF-β/Smad1通路治疗IUA的作用及机制,希望为子宫内膜修复寻求新的有效治疗靶点。

在本研究中,通过机械法+两酶消化法分离得到hAMSCs,hAMSCs成功到达大鼠子宫内膜组织,并在局部发挥治疗作用。对各组子宫内膜组织进行Masson染色后统计比较纤维化面积,hAMSCs组胶原纤维占比明显小于IUA组(P<0.01),印证hAMSCs对纤维化内膜组织起到逆转作用。hAMSCs移植治疗后大鼠子宫内膜腺体数量增加,未见显著性差异,考虑hAMSCs转分化为子宫内膜细胞延迟于逆转纤维化通路[26]。本研究发现,control组TGF-β1、Smad3、Vimentin、纤维化因子α-SMA蛋白及mRNA表达水平远低于IUA组,control组Smad7、E-cadherin、ER、PR蛋白及mRNA表达量明显高于IUA组,提示纤维化子宫内膜组织中TGF-β1/Smad信号通路处于激活状态。纤维化因子α-SMA升高,间质细胞标志物Vimentin增加,且Smad3与Smad7为一对负性调节因子,共同调节子宫内膜纤维化的发生。移植hAMSCs后,大鼠子宫内膜组织内纤维化相关因子TGF-β1、Smad3、α-SMA mRNA表达及蛋白表达水平较IUA组明显降低,组织纤维化程度明显降低,腺体形态得以恢复,表明hAMSCs可能通过下调TGF-β1/Smad信号通路来逆转子宫内膜纤维化过程,改善子宫内膜功能。hAMSCs组部分因子蛋白表达水平无统计学意义,可能由于蛋白翻译后修饰,如E-cadherin的磷酸化导致其降解加速[27]。在后续的RT-qPCR检测中,对hAMSCs组和IUA组数据进行分析整理后发现,在hAMSCs组中,Vimentin mRNA表达减少(P<0.01),EMT标志性因子E-cadherin mRNA的表达增加(P<0.01),即间质细胞减少,上皮细胞增加。证明了EMT可能也参与内膜损伤及修复过程。ER、PR作为调节女性内分泌的重要物质,与子宫内膜的修复密切相关,在子宫全层中均有表达[28],hAMSCs组子宫内膜激素受体ER、PR mRNA的表达量较IUA组升高(P<0.01),表明hAMSCs可促进内膜修复。hAMSCs治疗后,hAMSCs组纤维化相关因子TGF-β1、Smad3、α-SMA mRNA表达低于IUA组(P<0.01);hAMSCs组Smad7 mRNA相对含量明显高于IUA组(P<0.01),进一步验证移植hAMSCs可能通过抑制TGF-β1/Smad3/Smad7信号通路及调控EMT过程,抑制大鼠子宫内膜组织中纤维化因子的基因表达,最终达到改善子宫内膜纤维化及子宫内膜功能的效果。

综上所述,本研究表明hAMSCs宫腔内移植可促进子宫内膜损伤修复,并可能通过TGF-β1/Smad7信号通路抑制子宫内膜EMT和纤维化。但是,本研究也存在一定局限性,虽观察到病理改善,但hAMSCs治疗对于大鼠模型的最终生育力恢复功能尚待进一步研究证实,后续将进行分子机制的进一步研究,并将在后续收集临床IUA样本,验证本研究中发现的分子变化,提升临床意义及转化价值。此外,本课题组希望继续加大样本量,进一步深入研究hAMSCs及其外泌体对子宫内膜修复的作用和分子机制,为解决临床IUA治疗难题提供更多科学依据。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] YANG Y, WANG Y D, HUANG Y, *et al*. Interceed combined with bone marrow mesenchymal stem cells improves endometrial receptivity of intrauterine adhesion[J]. Regen Ther, 2024, 27: 445-454. DOI: 10.1016/j.reth.2024.04.007.

[2] ZHANG X Y. New potential in the treatment of moderate to severe intrauterine adhesions: influencing factors for menstrual improvement[J]. Front Reprod Health, 2025, 7: 1608143. DOI:10.3389/frph.2025.1608143.

[3] 郭华华, 王亚鑫, 王丽丽. IKAP模式综合护理对中重度宫腔粘连患者宫腔镜下宫腔粘连分离术后护理效果[J]. 社区医学杂志, 2023, 21(18): 950-954, 960. DOI:10.19790/j.cnki.JCM.2023.18.06.
GUO H H, WANG Y X, WANG L L. Nursing effectiveness of IKAP mode comprehensive nursing for patients with moderate to severe intrauterine adhesions after hysteroscopic separation of intrauterine adhesions[J]. J Community Med, 2023, 21(18): 950-954, 960. DOI: 10.19790/j.cnki.JCM.2023.18.06.

[4] CAO Y T, WU J H, HUANG J Y, *et al*. Human embryonic stem cell-derived immunity-and-matrix-regulatory cells promote endometrial repair and fertility restoration in IUA rats[J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16(1): 204. DOI:10.1186/s13287-025-04298-2.

[5] XIN L B, WEI C, TONG X M, *et al*. *In situ* delivery of apoptotic bodies derived from mesenchymal stem cells *via* a hyaluronic acid hydrogel: a therapy for intrauterine adhesions[J]. Bioact Mater, 2021, 12: 107-119. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.10.025.

[6] SONG Y T, LIU P C, TAN J, *et al*. Stem cell-based therapy for ameliorating intrauterine adhesion and endometrium injury[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 556. DOI:10.1186/s13287-021-02620-2.

[7] 肖煜璇,肖雁冰,杨秋红,等.HAMSCs移植联合G-CSF有效修复IUA大鼠子宫内膜损伤并抑制其纤维化[J].遵义医科大学学报,2024,47(5):461-470.
XIAO Y X, XIAO Y B, YANG Q H, *et al*. HAMSCs transplantation combined with G-CSF effectively repairs endometrial damage and inhibits fibrosis in IUA rats[J]. J Zunyi Med Univ, 2024, 47(5): 461-470.

[8] 叶可,魏华芳,宋成文.富血小板血浆联合间充质干细胞修复子宫内膜损伤的机制[J].基础医学与临床,2025,45(3):390-394. DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2025.03.0390.
YE K, WEI H F, SONG C W. Platelet-rich plasma combined with mesenchymal stem cells to repair endometrial injury[J]. Basic Clin Med, 2025, 45(3): 390-394. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2025.03.0390.

[9] 宋佳,赵峰,张婷,等.人羊膜间充质干细胞对大鼠子宫瘢痕的修复作用[J].基础医学与临床,2024,44(7):1002-1007. DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2024.07.1002.
SONG J, ZHAO F, ZHANG T, *et al*. Repair effect of human amniotic mesenchymal stem cells on uterine scars in rats[J]. Basic Clin Med, 2024, 44(7): 1002-1007. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2024.07.1002.

[10] LI C J, CAI A Q, SUN C 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. DOI:10.1016/j.gendis.2019.03.003.

[11] 梁波,史明霞,李维佳,等.人羊膜间充质干细胞分离培养及鉴定[J].中国公共卫生,2010,26(11):1410-1411.
LIANG B, SHI M X, LI W J, *et al*. Isolation, culture and identification of human amniotic mesenchymal stem cells[J]. Chin J Public Health, 2010, 26(11): 1410-1411.

[12] 李豫皖.体外共培养条件下定向诱导人羊膜间充质干细胞向人前交叉韧带成纤维细胞分化的实验研究[D].遵义:遵义医学院,2017.
LI Y W. Experimental research of differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells into human anterior cruciate ligament fibroblasts by using co-culture system in vitro[D]. Zunyi: Zunyi Medcial College, 2017.

[13] 刘芳,何援利.机械和感染双重损伤法建立新西兰大白兔宫腔粘连模型[J].重庆医学,2013,42(7):765-767. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.07.019.
LIU F, HE Y L. Establishment of New Zealand white rabbit intrauterine adhesions model by mechanical and infectious double injury[J]. Chongqing Med, 2013, 42(7): 765-767. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.07.019.

[14] 汪玲莉,林岚,韩春龙,等.来源于脂肪间充质干细胞的外泌体促进宫腔粘连大鼠子宫内膜再生和生育能力恢复的机制研究[J].现代生物医学进展,2024,24(7):1221-1227. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2024.07.004.
WANG L L, LIN L, HAN C L, *et al*. The mechanism of exosomes derived from adipose-derived mesenchymal stem cells promoting endometrial regeneration and fertility recovery in rats with intrauterine adhesions[J]. Prog Mod Biomed, 2024, 24(7): 1221-1227. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.07.004.

[15] 陈梅霞.炎性细胞因子IL-33在宫腔粘连中的作用[D].银川:宁夏医科大学,2023. DOI:10.27258/d.cnki.gnxyc.2023.000565.
CHEN M X. Effects of inflammatory cytokine IL-33 in intrauterine adhesion[D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2023. DOI: 10.27258/d.cnki.gnxyc.2023.000565.

[16] WANG Y, SHEN R W, HAN B, *et al*. Notch signaling mediated by TGF-β/Smad pathway in concanavalin A-induced liver fibrosis in rats[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(13): 2330-2336. DOI:10.3748/wjg.v23.i13.2330.

[17] PARK J, LEE S Y, OOSHIMA A, *et al*. Glucosamine hydrochloride exerts a protective effect against unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by attenuating TGF-β signaling[J]. J Mol Med, 2013, 91(11): 1273-1284. DOI:10.1007/s00109-013-1086-1.

[18] 赵存刚,黄文海,王尊元,等.转化生长因子-β在特发性肺纤维化中的研究新进展[J].中国药学杂志,2016,51(5):341-345. DOI:10.11669/cpj.2016.05.001.
ZHAO C G, HUANG W H, WANG Z Y, *et al*. Role of TGF-β in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Chin Pharm J, 2016, 51(5): 341-345. DOI:10.11669/cpj.2016.05.001.

[19] 陈希琦,张晓双,周永坤,等.TGF-β1/Smads信号通路在纤维化疾病中的研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2021,27(2):351-354. DOI:10.3969/j.issn.1007-6948.2021.02.037.
CHEN X Q, ZHANG X S, ZHOU Y K, *et al*. Research progress of TGF-β1/Smads signaling pathway in fibrotic diseases[J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med, 2021, 27(2): 351-354. DOI:10.3969/j.issn.1007-6948.2021.02.037.

[20] THOMPSON E W, NEWGREEN D F, TARIN D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 5991-5995; discussion5995. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-05-0616.

[21] ONDER T T, GUPTA P B, MANI S A, *et al*. Loss of E-cadherin promotes metastasis *via* multiple downstream transcriptional pathways[J]. Cancer Res, 2008, 68(10): 3645-3654. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-07-2938.

[22] POHLERS D, BRENMOEHL J, LÖFFLER I, *et al*. TGF-β and fibrosis in different organs: molecular pathway imprints

[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis, 2009, 1792(8): 746-756. DOI:10.1016/j.bbadis.2009.06.004.

[23] SCHULTZE-MOSGAU S, BLAESE M A, GRABENBAUER G, *et al*. Smad-3 and Smad-7 expression following anti-transforming growth factor beta 1 (TGF-β1)-treatment in irradiated rat tissue[J]. Radiother Oncol, 2004, 70(3): 249-259. DOI:10.1016/j.radonc.2004.01.010.

[24] 朱文枫, 李三强, 宋晓改, 等. 利用CRISPR/Cas9技术抑制Gp96的表达对小鼠酒精性肝纤维化过程中α-SMA和TGF-β1表达的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2020, 29(11): 1279-1282, 1286. DOI:10.3969/j.issn.1006-5709.2020.11.016.

ZHU W F, LI S Q, SONG X G, *et al*. Targeting Gp96 by CRISPR/Cas9 to reflect on the expression of α-SMA and TGF-β1 in alcohol induced liver fibrosis of mice[J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2020, 29(11): 1279-1282, 1286. DOI:10.3969/j.issn.1006-5709.2020.11.016.

[25] LIU Q W, HUANG Q M, WU H Y, *et al*. Characteristics and therapeutic potential of human amnion-derived stem cells[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 970. DOI:10.3390/ijms22020970.

[26] HUANG X Y, YANG X, HUANG J L, *et al*. Human amnion mesenchymal stem cells promote endometrial repair *via* paracrine, preferentially than transdifferentiation[J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 301. DOI:10.1186/s12964-024-01656-0.

[27] 勾亚婷, 张文文, 李长江, 等. NF-κB信号通路在人羊膜间充质干细胞治疗宫腔粘连中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(11): 1101-1108. DOI:10.16016/j.1000-5404.202003065.

GOU Y T, ZHANG W W, LI C J, *et al*. Role of NF-κB signaling pathway in treatment of intrauterine adhesions by human amniotic mesenchymal stem cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(11): 1101-1108. DOI:10.16016/j.1000-5404.202003065.

[28] 陈庆, 赵金燕, 张雪, 等. 雌、孕激素通过TGF-β影响宫腔粘连的形成[J]. 山西医科大学学报, 2021, 52(7): 883-888. DOI:10.13753/j.issn.1007-6611.2021.07.013.

CHEN Q, ZHAO J Y, ZHANG X, *et al*. Estrogen and progesterone affect the formation of intrauterine adhesion through TGF-β[J]. J Shanxi Med Univ, 2021, 52(7): 883-888. DOI:10.13753/j.issn.1007-6611.2021.07.013.

(**收稿**:2025-07-02;**修回**:2025-09-10)

(编辑 张艺霖)