DOI:10.16016/j.1000-5404.202102021

Notch 信号通路在人羊膜间充质干细胞移植治疗宫腔粘连中的作用

于 结,张文文,黄佳月,勾亚婷,毛艳华,张应凤,孙聪聪,吴本媛,李长江,刘拟舟,王婷婷,黄吉仁,王 佳
401331 重庆,重庆医科大学附属大学城医院妇产科

[摘要] **目的** 探讨 Notch 信号通路在人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs)移植治疗宫腔粘连(intrauterine adhesions,IUA)过程中的作用。**方法** 体外实验:将细胞分为 3 组,即 hAMSCs 空白对照组、AdRFP 腺病毒转染 hAMSCs 组、AdR-dnNotch1 腺病毒转染 hAMSCs 组;RT-PCR 检测各组中 Notch1 mRNA 水平,Western blot 检测 NICD 的蛋白表达改变。体内实验:40 只 Sprague-Dawley (SD)雌性大鼠分为 4 组,即假手术组、IUA 组、hAMSCs 移植治疗组、腺病毒(AdR-dnNotch1)转染 hAMSCs 后移植治疗组;取各组子宫组织,HE 染色检测子宫内膜腺体数目和子宫内膜厚度变化,Masson 染色检测纤维化程度变化,免疫组化检测 Vimentin、Notch1、NICD、Hes1 蛋白表达变化,Western blot 检测各组子宫组织中 NICD 的蛋白表达量,RT-PCR 检测各组中 Hes1 mRNA 水平。通过雌雄合笼评估各组 SD 大鼠生育力的变化。**结果** 体外实验:Notch1 显性负性突变腺病毒(AdR-dnNotch1)可成功抑制 Notch 信号通路。体内实验:HE、Masson 染色结果显示,与 IUA 组比较,hAMSCs 移植组可使腺体数目增多,子宫内膜厚度变薄,纤维化面积比减少($P<0.05$),而与 IUA 组比较,AdR-dnNotch1 转染 hAMSCs 组变化不明显。免疫组化结果显示,与假手术组比较,IUA 组中 Vimentin 表达升高,Notch1、NICD、Hes1 表达降低($P<0.05$)。与 IUA 组比较,hAMSCs 移植组中 Vimentin 表达下降,Notch1、NICD、Hes1 表达增加($P<0.05$),AdR-dnNotch1 腺病毒转染组 Vimentin、Notch1、NICD、Hes1 蛋白表达变化差异无统计学意义;Western blot、RT-PCR 结果显示,Notch 信号通路在 hAMSCs 移植治疗组中处于激活状态;雌雄合笼结果显示,与 IUA 组比较,hAMSCs 移植组胚胎数量明显增加($P<0.05$),而 AdR-dnNotch1 转染 hAMSCs 移植组胚胎数量无明显增加。**结论** Notch 信号通路参与调控 hAMSCs 生物学功能,抑制 Notch 信号通路后,hAMSCs 移植治疗宫腔粘连的作用降低。

[关键词] 宫腔粘连;Notch 信号通路;人羊膜间充质干细胞;生育力
[中图法分类号] R329.24; R394.2; R711.74 [文献标志码] A

Role of Notch signaling pathway in treatment of intrauterine adhesions through human amniotic mesenchymal stem cells transplantation

YU Jie, ZHANG Wenwen, HUANG Jiayue, GOU Yating, MAO Yanhua, ZHANG Yingfeng, SUN Congcong, WU Benyuan, LI Changjiang, LIU Nizhou, WANG Tingting, HUANG Jiren, WANG Jia Department of Obstetrics and Gynecology, the University-Town Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing, 401331, China

[**Abstract**] Objective To explore the role of Notch signaling pathway in the transplantation of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) for treatment of intrauterine adhesions (IUA). Methods *In vitro* experiments: hAMSCs were isolated from human amnion obtained from term cesarean section, and then

[基金项目] 重庆市渝中区基础研究与前沿探索项目(20190122);重庆市研究生科研创新项目(CYS19195)
[通信作者] 王 佳,E-mail: 800026@ hosPital.cqmu.edu.cn

1000-5404/Copyright © 2021, 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/)

induced and identified. Then the cells were divided into 3 groups: blank control group (hAMSCs only), AdRFP group (Ad-RFP adenovirus + hAMSCs), and AdR-dnNotch1 + hAMSCs group (a recombinant adenovirus expressing the dominant-negative mutant of Notch1+hAMSCs), respectively. Then the mRNA level of Notch1 and the protein level of Notch intracellular domain (NICD) were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. *In vivo* experiments: 40 Sprague-Dawley (SD) female rats were randomized into Sham group, IUA group, hAMSCs group (IUA animals treated with hAMSCs transplantation), AdR-dnNotch1 + hAMSCs group (IUA animals receiving transplantation of AdR-dnNotch1-transfected hAMSCs) ($n=10$). The number of endometrial glands and the thickness of endometrium in each group were observed by HE staining, and the changes of fibrosis were studied by Masson staining. Immunohistochemical assay was adopted to detect the protein expression of Vimentin, Notch1, NICD, and Hes1 in each group, and that of NICD was further tested by Western blotting. In addition, RT-PCR was used to determine the mRNA level of Hes1. Finally, the changes of fertility in each group were evaluated by co-cage of male and female rats. **Results** AdR-dnNotch1 successfully inhibited Notch signaling pathway *in vitro*. *In vivo* experiments: HE and Masson staining showed that when compared with IUA group, the number of glands was increased, and the thickness of endometrium and the ratio of fibrosis area were decreased in hAMSCs group ($P<0.05$), while no significant changes were found in the AdR-dnNotch1+hAMSCs group ($P>0.05$); Immunohistochemical assay indicated that the level of Vimentin was higher and those of Notch1, NICD and Hes1 were lower in the IUA group than the Sham group ($P<0.05$). But the above changes were reversed in the hAMSCs group as compared with the IUA group ($P<0.05$), and there were no significant differences in the AdR-dnNotch1+hAMSCs group ($P>0.05$); Western blotting and RT-PCR results suggested the Notch signaling pathway was activated in hAMSCs group; The co-cage experiment showed that the number of embryos was increased significantly in hAMSCs group ($P<0.05$), though without noticeable changes in AdR-dnNotch1+hAMSCs group ($P>0.05$). **Conclusion** Notch signaling pathway is involved in the regulation of biological functions of hAMSCs, and inhibition of Notch signaling pathway may reduce the effect of hAMSCs transplantation in the treatment of IUA.

[**Key words**] intrauterine adhesions; Notch signaling pathway; human amniotic mesenchymal stem cells; fertility

Supported by the Basic Research and Frontier Exploration Project of Yuzhong District, Chongqing (20190122) and the Postgraduate Scientific Research and Innovation Project of Chongqing (CYS19195). Corresponding author: WANG Jia, E-mail: 800026@hosPital.cqmu.edu.cn

宫腔粘连(intrauterine adhesions, IUA)是由于宫腔操作史如人工流产等手术后引起子宫内膜基底层受损、子宫内膜功能层再生障碍,导致子宫肌壁间的相互粘连所致。目前宫腔镜宫腔粘连分离术是主要的治疗方法,但术后再粘连率高达62.5%,妊娠成功率仅22.5%~33.3%[1-6]。防止重度宫腔粘连治疗后复发是目前临床研究的热点问题。动物研究发现,间充质干细胞可促进受损子宫内膜再生[7-9]。间充质干细胞因其多向分化潜能和免疫调节能力而成为一种有前途的组织再生细胞类型。根据细胞来源的不同,间充质干细胞可分为骨髓来源、脐带来源、脂肪来源和女性经血来源的子宫内膜干细胞等。羊膜来源的间充质干细胞因其易于收集、免疫原性低和高增殖潜能而被认为是基于细胞治疗的有前途的来源[10-11]。本课题组研究发现人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells,hAMSCs)移植可有效促进宫腔粘连的子宫内膜再生修复,并发现hAMSCs具有向子宫内膜细胞分化的潜能,这可能是hAMSCs发挥治疗宫腔粘连作用的主要原因[12-13]。

间充质干细胞分化过程中起调控作用的信号途径成为关注的焦点,Notch受体和配体在细胞分化、增殖和凋亡中起着重要作用[14],有研究发现Notch信号通路影响骨髓间充质干细胞的成骨分化[14]。还有研究发现Notch信号通路中的关键蛋白在宫腔粘连子宫组织中表达异常[15]。因此,本研究主要探讨Notch信号通路是否调控hAMSCs的生物学功能,进而影响其发挥治疗宫腔粘连的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 羊膜来源 羊膜取自重庆医科大学附属第一医院和重庆医科大学附属大学城医院产科 25~30 岁无合并症、传染病的正常足月剖宫产产妇的胎盘组织,本研究获得重庆医科大学伦理委员会批准(20141230)以及产妇知情同意,所有操作均按照相关规定执行。

1.1.2 实验动物 SPF 级健康雌性 SD 大鼠 60 只(由重庆医科大学实验动物中心提供),200~220 g/只,5 只/笼,常规喂养。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 一抗(兔抗)CD29、CD73、CD19、CD34、CD45、NICD 和二抗(山羊抗兔 IgG)均购自 Abcam 公司(美国);一抗(兔抗)Notch1、Hes1、Vimentin、GAPDH 均购自 CST 公司(美国);其他试剂包括:DAPI(Sigma,美国),茜素红染色液、油红 O 染色液(索莱宝,中国),HE 染色、Masson 染色试剂盒(索莱宝,中国);胎牛血清(PAN ES,中国),DMEM/F12 培养液(Gibco,美国),胰蛋白酶(碧云天,中国),Ⅰ型胶原酶(Sigma,美国);免疫组化试剂盒 SP9001(中杉金桥,中国),EDTA 抗原修复液(BOSTER,中国),Triton X-100(V900502,Sigma,美国),抗荧光淬灭剂(美仑,中国)。反转录 PCR 试剂盒、TB green 均购自 TaKaRa 公司(中国)。PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗兔 IgG、二辛可宁酸(bicinchoninic acid,BCA)法蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。重组腺病毒 AdR-dnNotch1、Ad-RFP 购自 denovo 公司(中国)。

1.2 方法

1.2.1 hAMSCs 提取、培养 hAMSCs 提取、培养方法沿用课题组前期 hAMSCs 提取、培养方法[12],于含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养,24 h 后半换液,72 h 后全换液,待细胞融合达 90%时传代,取第 3 代细胞备用。

1.2.2 hAMSCs 免疫表型鉴定 当第 3 代 hAMSCs 达到 80%~90%的融合率后,收集细胞,用 PBS 洗涤后再用 PBS 重悬,分装 hAMSCs 到 5 个流式管中,分别加入适量的一抗(CD29、CD73、CD19、CD34、CD45),孵育 30 min(室温、避光),PBS 洗涤细胞并重悬于 PBS 中,流式细胞仪检测细胞表面标记物表达,实验重复 3 次。

1.2.3 hAMSCs 诱导成骨、成脂分化检测 当第 3 代 hAMSCs 达到 50%~60%的融合率后,更换培养基为成骨诱导培养基和成脂诱导培养基,每 3 天换液 1 次,成脂诱导培养 15 d 后,吸走培养基,PBS 洗 2 次后进行油红 O 染色检测脂滴。成骨诱导培养 20 d 后,吸走培养基,PBS 洗 2 次后,进行茜素红染色检测钙结节,实验重复 3 次。油红 O 染色:加入多聚甲醛固定液固定 30 min,加入配好的油红储存液,染色 10 min,60%异丙醇漂洗,PBS 浸洗 3 次,用 1 mL PBS 覆盖细胞,显微镜下观察,诱导后的 hAMSCs 胞浆中可见橙红色脂滴。茜素红染色:多聚甲醛固定 30 min,吸走甲醛,PBS 洗 2 次,加入茜素红 S 染液染色 3 min,吸去染液,PBS 洗 2 次,显微镜下见细胞内钙沉积染色呈橘红色,实验重复 3 次。

1.2.4 腺病毒转染 hAMSCs 将细胞分为 3 组:空白对照组、AdRFP 转染组、AdR-dnNotch1 转染组($n=3$)。空白对照组:取第 3 代 hAMSCs 于 6 孔板中常规培养;AdRFP 转染组:待 hAMSCs 贴壁后,向培养基中加入 AdRFP 腺病毒,同时加入 Polybrene(4~8 μg/mL)以提高感染效率;AdR-dnNotch1 转染组:为了阻断 Notch 信号传导,待 hAMSCs 贴壁后,向培养基中加入 AdR-dnNotch1 重组腺病毒,表达 Notch1 的胞外结构域(dnNotch1),竞争性抑制 Notch1 的表达,进一步抑制 Notch 信号传导,同时加入 Polybrene(4~8 μg/mL)。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 比较各组细胞 Notch1 mRNA 和各组子宫组织中 Hes1 mRNA 相对表达。按照 RNA 提取试剂说明书提取各组细胞和组织总 RNA,分别以 Notch1、Hes1 为非特异性引物,按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录。Notch1 引物序列:上游 5′-CATCACCTGCCTGTTAGGAG-3′,下游 5′-ACACATGGCAACATCTAACCC-3′;Hes1 引物序列:上游 5′-TGATTTGGATGCTCTGAAGAAAGATA-3′,下游 5′-GCTGCAGGTCCGGAGGT-3′;GAPDH 引物序列:上游 5′-AACAGCCTCAAGATCATCAGC-3′,下游 5′-ATGAGTCCTTCCACGATACCAA-3′,PCR 反应体系:每毛细管反应体系总量为 20 μL。PCR 反应扩增条件为 95 ℃预变性 30 s;95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,循环 40 次;65 ℃ 终末延伸。以 GADPH 为内参,根据 Ct 值计算目的基因 Notch1 mRNA 表达水平,每个基因设置 3 个复孔。实验重复 3 次。计算各组基因相对表达量 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 值。

1.2.6 Western blot 检测细胞和子宫组织中 NICD 的蛋白表达量 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,将样平通过电转移至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭,加入

NICD 抗体(1∶500)4 ℃孵育过夜,洗膜 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1∶500),37 ℃孵育 1 h;洗膜后显影,实验重复 3 次。

1.2.7 宫腔粘连大鼠模型的构建和治疗 将 40 只 8~10 周龄雌性 SD 大鼠分为 4 组:假手术组(Sham 组)、模型组(IUA 组)、hAMSCs 移植治疗组(hAMSCs 组)、Notch1 显性负性突变腺病毒干预 hAMSCs 后移植组(AdR-dnNotch1 组),每组 10 只。重度宫腔粘连模型构建方法同课题组使用方法[12],即采用化学损伤法(95%酒精损伤法)损伤子宫内膜。Sham 组:与建模组做同样的操作,只是宫腔内不注入酒精,改为注射与酒精等量的生理盐水。IUA 组:建立重度宫腔粘连模型后,不进行任何干预或治疗。hAMSCs 组:重度宫腔粘连模型构建后第 2 周末,于大鼠下腹部原切口处开腹,取出右侧子宫,于子宫直径变小、质地变硬处用 1 mL 无菌注射器向子宫内注入 AdRFP 感染的 hAMSCs 200 μL(2×10^7 个),随着 hAMSCs 注入,可见子宫组织肿胀,hAMSCs 移植治疗后,关腹。AdR-dnNotch1 组:处理方法同前 1 组,此时的 hAMSCs 是 AdR-dnNotch1 腺病毒感染后 hAMSCs,实验重复 3 次。

1.2.8 组织化学染色、图像分析 收集各组子宫组织,置于 4% 多聚甲醛固定、包埋、切片。HE 染色、Masson 染色均参考试剂说明书进行操作。HE 染色计算子宫内膜腺体数目并测量子宫内膜厚度,Masson 染色计算纤维化面积百分比(子宫内膜间质纤维化总面积除以子宫内膜间质和腺体面积之和),镜下观胶原纤维呈蓝色。免疫组化三步法检测子宫内膜组织中 Vimentin、Notch1、NICD、Hes1 的表达,试剂使用免疫组化试剂盒。主要步骤:脱蜡至水,EDTA 抗原修复液进行抗原修复,清除内源性过氧化物酶,山羊抗兔血清封闭、一抗孵育,用一抗稀释液按最大比例稀释好的 Vimentin、Notch1、NICD、Hes1 一抗分别滴加在每张切片组织上,4 ℃过夜,二抗(滴加生物素标记山羊抗兔 IgG 聚合物二抗),37 ℃孵育 60 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 15 min,DAB 显色反应、镜下观察阳性染色。超纯水冲洗,苏木精染液复染 20 s,清洗,常规脱水、透明、封片,实验重复 3 次。阳性表达为棕黄色,根据 IOD 值与面积的比值判定实验结果。以 Image J 软件对图片进行数据测量,每组随机选择 3 个标本,每张切片随机选择 3 个高倍视野进行拍照,并取其平均值进行后续比较。

1.2.9 生育力研究 为了研究各组雌性大鼠的生育力,同样将另外 20 只雌性大鼠分为 4 组:Sham 组、IUA 组、hAMSCs 组、AdR-dnNotch1 组,每组 5 只。将雌性大鼠与 SPF 级健康雄性 SD 大鼠(由重庆医科大学实验动物中心提供,8~10 周,200~220 g/只,常规喂养)按照 2 只雌鼠∶1 只雄鼠或者 1 只雌鼠∶1 只雄鼠的比例进行合笼,从看到阴栓那日中午 12:00 计算为怀孕的第 1 天。在妊娠第 14 天,对雌性大鼠进行剖腹手术,并记录大鼠右侧子宫能成功妊娠的大鼠只数,以及每个妊娠大鼠的胚胎数量,实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较使用单因素方差分析,两组间比较用 t 检验。使用 Image-Pro Plus 6.0 绘制直方图,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 hAMSCs 鉴定

2.1.1 表面标志物表达 流式细胞仪检测 hAMSCs 的表面标记物,其中 CD19、CD34 及 CD45 低表达,CD29、CD73 呈高表达(图 1A)。

2.1.2 hAMSCs 的诱导分化能力 hAMSCs 成骨诱导分化 20 d(图 1B~D),茜素红染色后可见细胞内钙化结节呈橘红色,证实 hAMSCs 可成功诱导成骨方向分化(图 1E)。成脂诱导分化 15 d 后,油红 O 染色可见细胞内被染成橙色的脂滴,证实 hAMSCs 可成功诱导成脂方向分化(图 1F)。

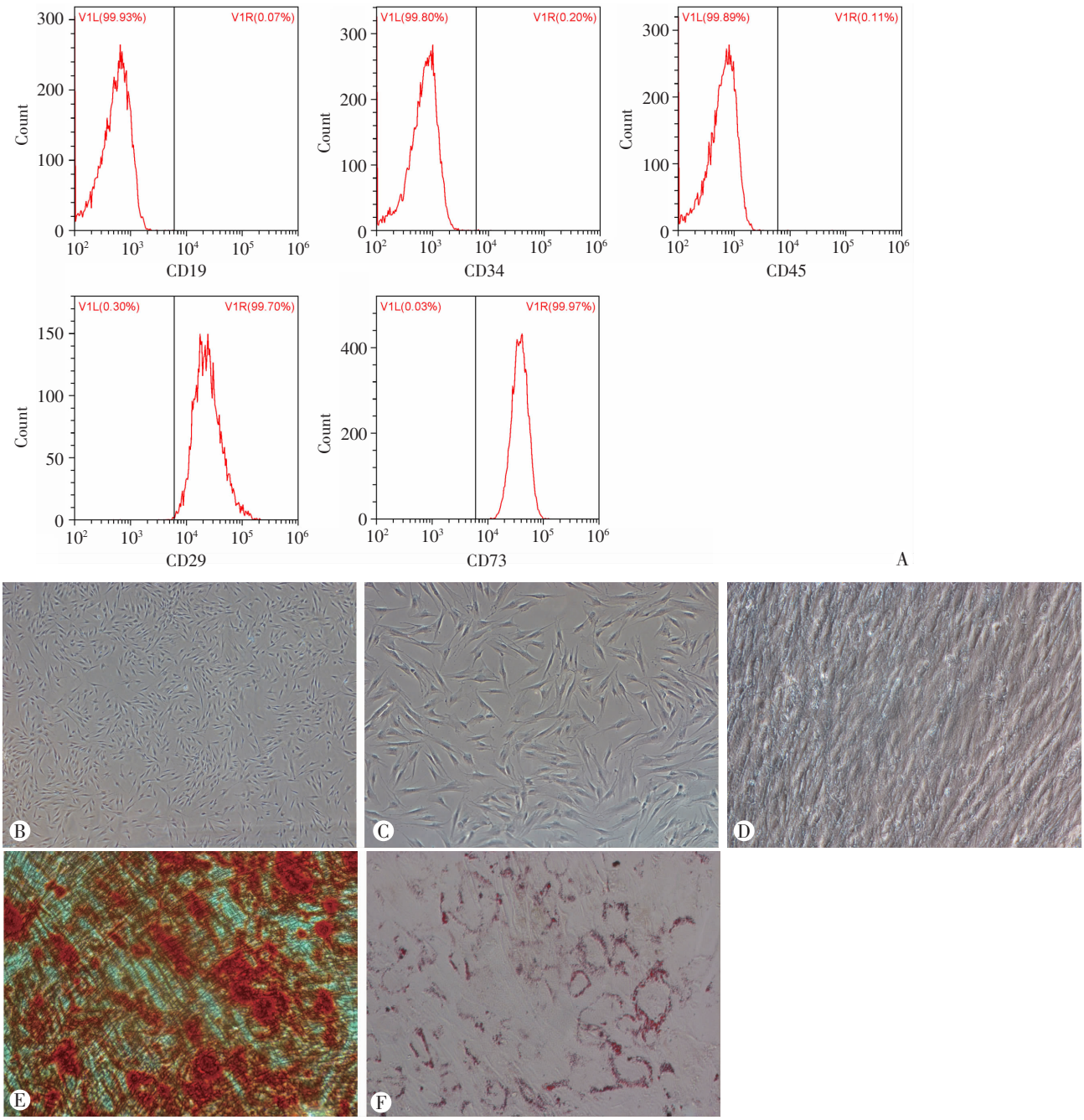
2.2 腺病毒可抑制 Notch 信号传导

为了阻断 Notch 信号传导,用腺病毒载体转染 hAMSCs,表达 Notch1 的显性负性胞外结构域(dnNotch1),竞争性抑制 Notch 受体与配体的结合。用 RT-PCR、Western blot 实验验证腺病毒载体 AdR-dnNotch1 转染细胞的有效性。RT-PCR 结果显示:与空白对照组比较,AdRFP 腺病毒转染组 Notch1 mRNA 表达差异无统计学意义,AdR-dnNotch1 转染组 Notch1 mRNA 表达明显增加($P<0.05$,图 2A),提示在基因表达水平上,AdR-dnNotch1 腺病毒可竞争性抑制 Notch 受体和配体的结合。Western blot 实验结果显示:与空白对照组比较,AdRFP 腺病毒转染组 NICD 蛋白表达差异无统计学意义,AdR-dnNotch1 腺病毒转染组 NICD 蛋白表达明显降低($P<0.05$,图 2B、C),提示 AdR-dnNotch1 腺病毒可抑制 Notch 受体活化形式 NICD 的释放,进而抑制 Notch 信号的传导。

2.3 组织化学染色评估 IUA 模型的建立和治疗效果

组织切片通过 HE 染色结果显示:模型组子宫宫腔形态消失,子宫内膜变薄,子宫各壁粘连致密,宫腔上皮细胞消失;经 AdRFP 腺病毒转染的 hAMSCs 移植

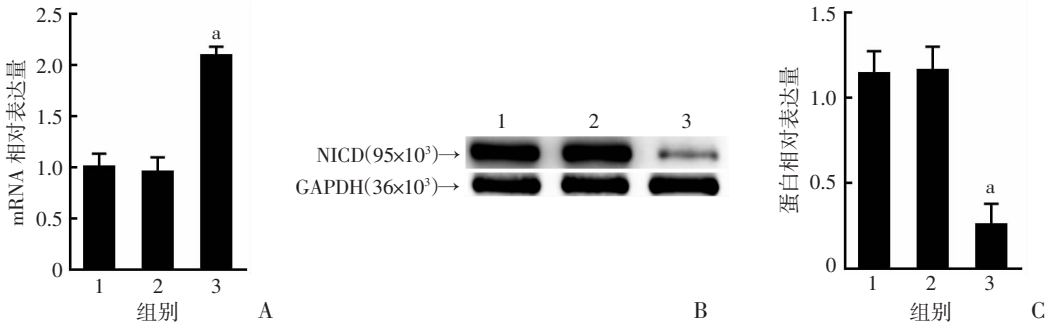
治疗后,子宫宫腔形态恢复,子宫内膜变厚,宫腔柱状上皮细胞恢复;而经 AdR-dnNotch1 转染的 hAMSCs 移植治疗后,宫腔形态和宫腔上皮细胞未恢复(图 3A)。与假手术组相比,模型组腺体数目明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,经 AdRFP 腺病毒转染的 hAMSCs 移植治疗组腺体数目明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,经 AdR-dnNotch1 转染的 hAMSCs 移植治疗组腺体数目差异无统计学意义(图 3B)。与假手术组相比,模型组子宫内膜厚度明显变薄,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,AdRFP 腺病毒转染 hAMSCs 移植治疗组子宫内膜厚度明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,经 AdR-dnNotch1 转染的 hAMSCs 移植治疗组子宫内膜厚度差异无统计学意义(图 3C)。



A:流式细胞仪检测 hAMSCs 表面免疫标志物表达;B、C:第 3 代 hAMSCs,分别为 40 倍和 100 倍;D:培养 20 d 的第 3 代 hAMSCs(×200);E:茜素红染色观察 hAMSCs 成骨诱导分化 20 d 后变化(×200);F:油红 O 染色观察成脂诱导分化 15 d 后变化(×200)

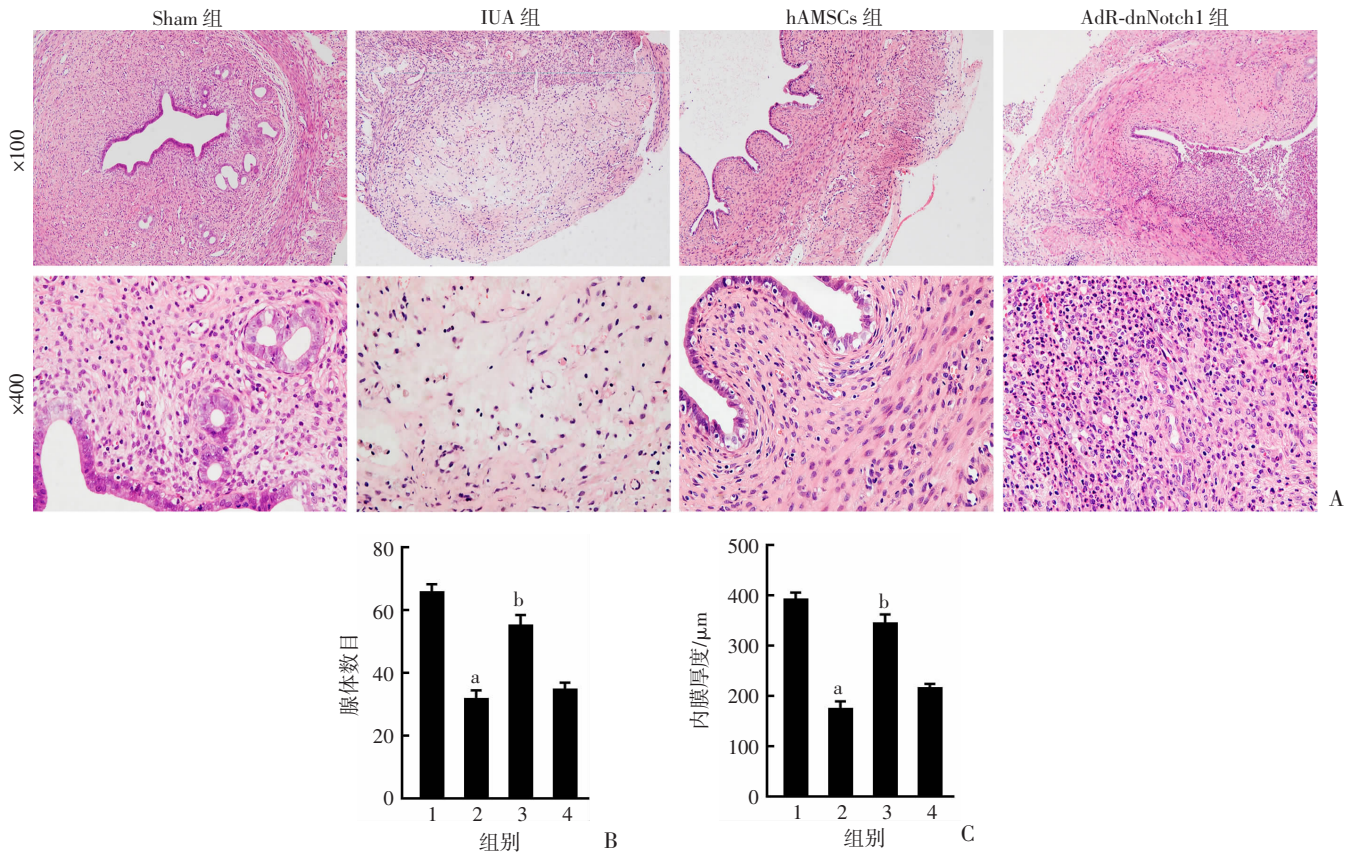
图 1 人羊膜间充质干细胞鉴定

组织切片通过 Masson 染色结果显示:与假手术组相比,模型组纤维化程度增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,经 AdRFP 腺病毒转染的 hAMSCs 移植治疗组纤维化程度减轻,差异有统计学意义($P<0.05$);而与模型组相比,经 AdR-dnNotch1 转染的 hAMSCs 移植治疗组纤维化程度差异无统计学意义(图 4)。免疫组化检测 Vimentin 表达,结果显示:与假手术组相比,模型组 Vimentin 表达量升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,hAMSCs 移植治疗组 Vimentin 表达量降低,差异有统计学意义($P<0.05$);而与模型组相比,经 AdR-dnNotch1 感染的 hAMSCs 移植治疗组 Vimentin 表达差异无统计学意义(图 5)。提示在重度宫腔粘连模型构建成功的基础上,hAMSCs 移植可有效促进子宫内膜再生修复,而抑制 Notch 信号通路后,hAMSCs 生物学功能发生变化,不能促进宫腔粘连子宫内膜再生修复。



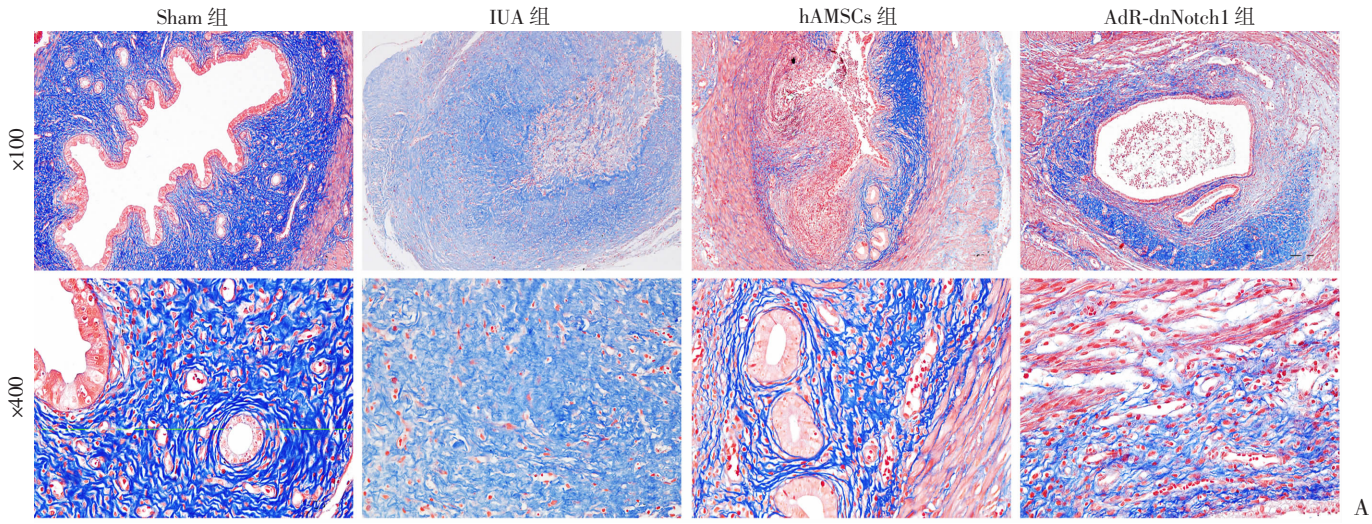
A:RT-PCR 检测各组细胞 Notch1 mRNA 表达;B:Western blot 检测各组细胞 NICD 的表达;C:半定量分析　1:空白对照组;2:AdRFP 腺病毒转染组;3:AdR-dnNotch1 腺病毒转染组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较

图 2　RT-PCR、Western blot 检测各组 hAMSCs 细胞 Notch 信号通路激活情况



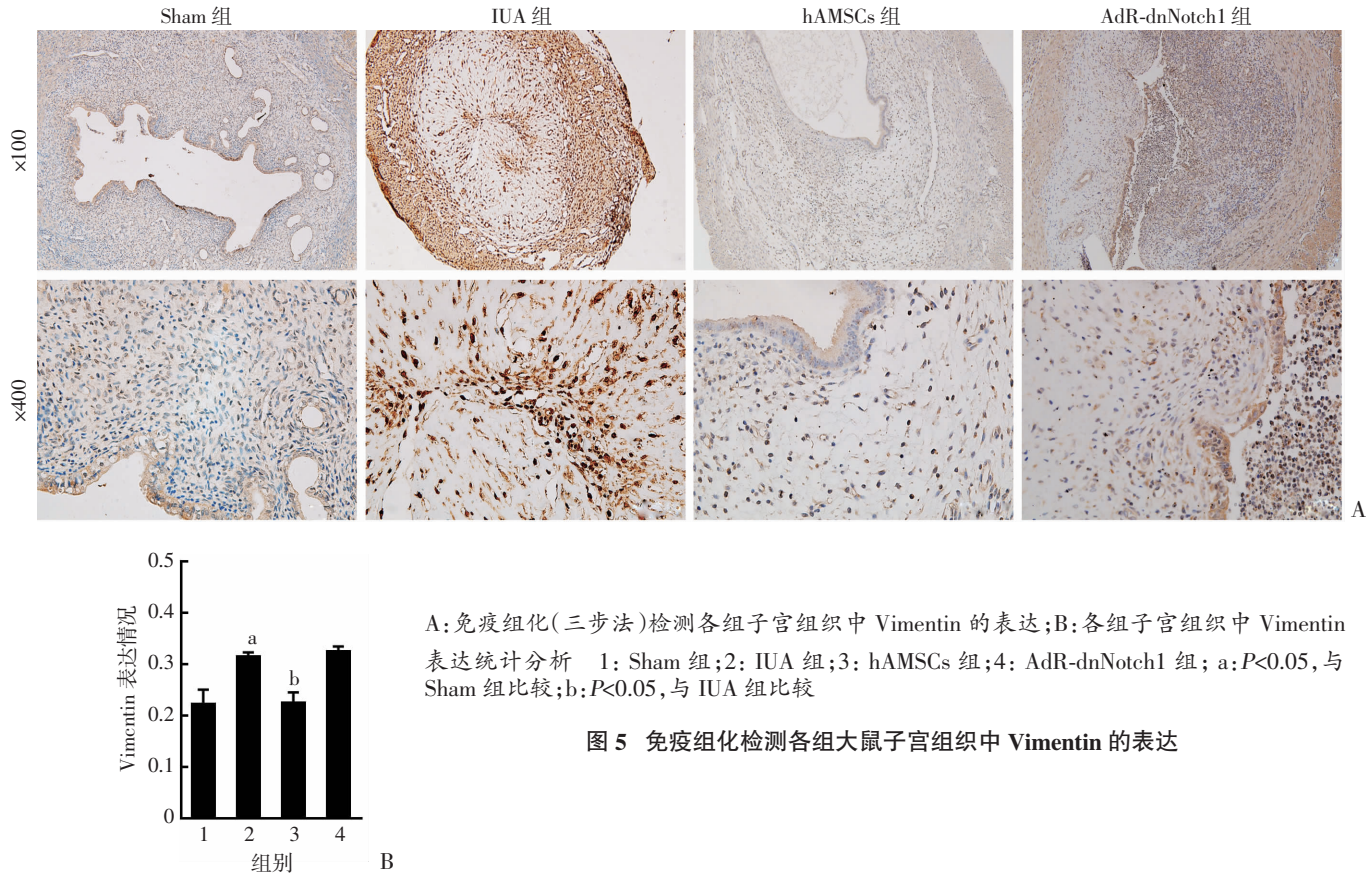
A:HE 染色观察各组子宫组织子宫内膜变化情况;B:各组子宫内膜腺体数目统计分析;C:各组子宫内膜厚度统计分析
1:Sham 组;2:IUA 组;3:hAMSCs 组;4:AdR-dnNotch1 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 IUA 组比较

图 3　HE 染色观察各组大鼠子宫内膜组织中腺体数目和子宫内膜厚度变化



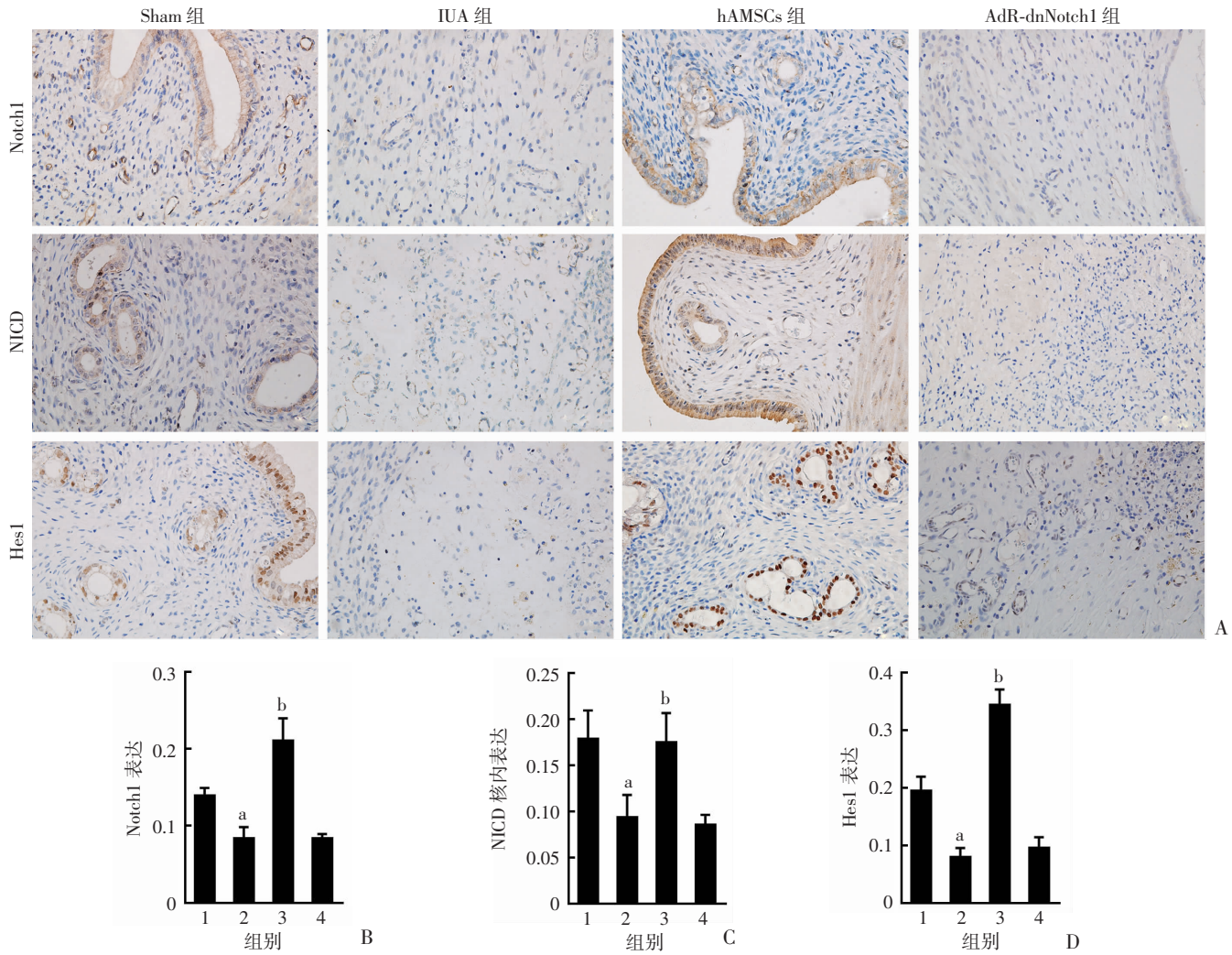
A: Masson 染色评估各组子宫组织纤维化程度;B:各组子宫纤维化百分比 1: Sham 组;2:IUA 组;3:hAMSCs 组;4:AdR-dnNotch1 组;a:$P<0.05$, 与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 IUA 组比较

图 4 Masson 染色检测各组大鼠子宫内膜纤维化程度



A:免疫组化(三步法)检测各组子宫组织中 Vimentin 的表达;B:各组子宫组织中 Vimentin 表达统计分析 1: Sham 组;2: IUA 组;3: hAMSCs 组;4: AdR-dnNotch1 组; a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 IUA 组比较

图 5 免疫组化检测各组大鼠子宫组织中 Vimentin 的表达



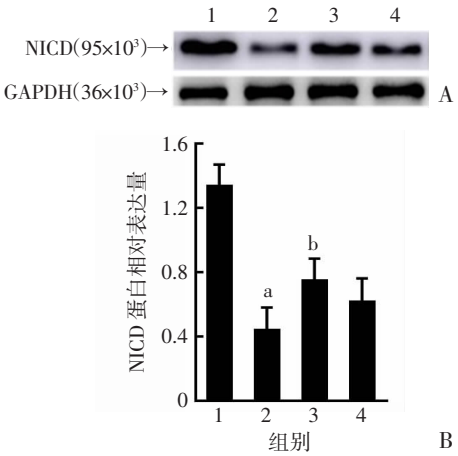
A:免疫组化(三步法)检测 Notch1、NICD、Hes1 在各组子宫组织中的表达(×400);B:各组子宫组织中 Notch1 表达统计分析;C:各组子宫组织中 NICD 核内表达统计分析;D:各组子宫组织中 Hes1 表达统计分析 1:假手术组;2:IUA 组;3:hAMSCs 移植治疗组;4:腺病毒(AdR-dnNotch1)转染 hAMSCs 后移植治疗组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 IUA 组比较

图 6 免疫组化检测各组大鼠子宫组织中 Notch1、NICD、Hes1 的表达

2.4 Notch 通路蛋白在子宫组织中的表达

为了验证 Notch 信号通路在 hAMSCs 移植治疗宫腔粘连的作用,通过免疫组化检测各组子宫组织中 Notch1、NICD、Hes1 的表达。Notch1 表达于胞膜,NICD 主要表达于胞浆,部分表达于胞核,Hes1 表达于包核。Notch1、NICD、Hes1 在假手术组子宫内膜组织中的表达明显,在 IUA 组中表达量较低,在 AdRFP 腺病毒转染的 hAMSCs 移植组中 Notch1、NICD、Hes1 表达明显,而在 AdR-dnNotch1 腺病毒转染 hAMSCs 移植组中三者表达量均很低。与假手术组相比,Notch1、Hes1 在 IUA 组中表达明显降低($P<0.05$);与 IUA 组比较,Notch1、Hes1 在 AdRFP 腺病毒转染 hAMSCs 移植组中表达明显升高($P<0.05$);与 IUA 组比较,Notch1、Hes1 在 AdR-dnNotch1 腺病毒转染 hAMSCs 组中表达差异无统计学意义(图 6)。与 IUA 组比较,NICD 在 AdRFP 腺病毒转染 hAMSCs 移植组中核表达量明显升高($P<0.05$);而 NICD 在 AdR-dnNotch1 腺病毒转染 hAMSCs 移植组中核表达量较 IUA 组差异无统计学意义(图 6)。Western blot 检测各组子宫组织中 NICD 的蛋白表达,结果显示:与假手术组相比,NICD 在 IUA 组中表达明显降低($P<0.05$);与 IUA 组比较,NICD 在 AdRFP 腺病毒转染 hAMSCs 移植组中表达明显升高($P<0.05$);而在 AdR-dnNotch1 腺病毒转染 hAMSCs 组中 NICD 表达量较 IUA 组差异无统计学意义(图 7)。RT-PCR 检测各组中 Hes1 mRNA 水平,结果显示:与假手术组相比,Hes1 mRNA 在 IUA 组中表

达明显降低($P<0.05$);与 IUA 组比较,Hes1 mRNA 在 AdRFP 腺病毒转染 hAMSCs 移植组中表达明显升高($P<0.05$);而在 AdR-dnNotch1 腺病毒转染 hAMSCs 组中 Hes1 mRNA 表达量较 IUA 组差异无统计学意义(图 8),RT-PCR 结果与免疫组化结果一致。提示 Notch 信号通路在 AdRFP 腺病毒转染 hAMSCs 移植组中被激活,Notch 受体释放其活化形式 NICD 并发生了核转位,激活靶基因 Hes1 发挥其调控 hAMSCs 治疗宫腔粘连的作用。而 AdR-dnNotch1 腺病毒转染 hAMSCs 后,hAMSCs 生物学功能发生了变化,不能激活 Notch 信号通路发挥其调控作用。

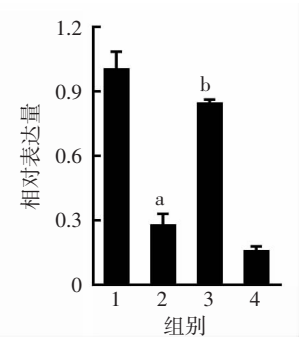


A:Western blot 检测各组子宫组织中 NICD 的表达情况;B:各组子宫组织中 NICD 蛋白表达统计分析　1:Sham 组;2:IUA 组;3:hAMSCs 组;4:AdR-dnNotch1 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 IUA 组比较

图 7　Western blot 检测各组大鼠子宫组织中 NICD 的表达

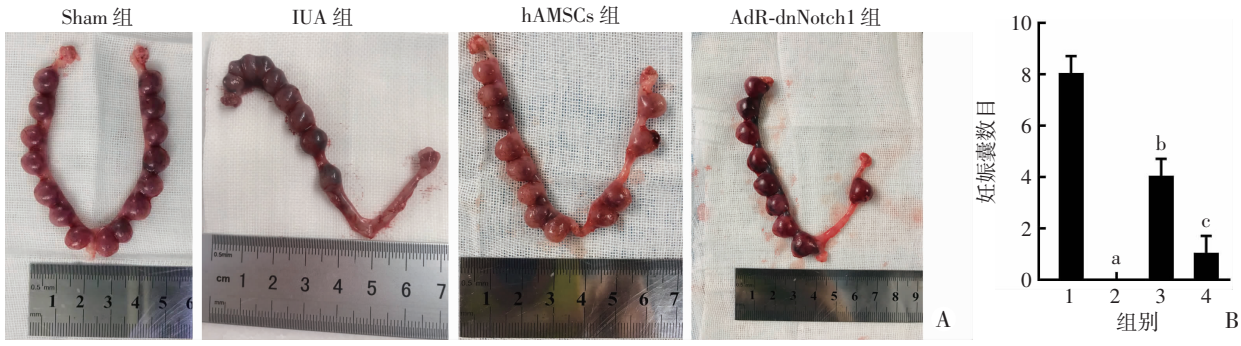
2.5　各组 SD 雌性大鼠生育力评估

每组各 5 只 SD 雌性大鼠左侧子宫均未做处理且均受孕成功,假手术组大鼠右侧子宫均能成功受孕,IUA 组大鼠右侧子宫均不能受孕,AdRFP 腺病毒转染 hAMSCs 移植治疗组右侧子宫生育力恢复,而 AdR-dnNotch1 腺病毒转染 hAMSCs 组生育力恢复不明显。每组每只大鼠右侧子宫平均妊娠囊数量为 8、0、4、1。与假手术组比较,IUA 组大鼠右侧子宫妊娠囊数量明显降低($P<0.01$);与 IUA 组比较,AdRFP 腺病毒转染 hAMSCs 移植组妊娠囊数目明显增加($P<0.01$)。而 AdR-dnNotch1 腺病毒转染 hAMSCs 组右侧子宫妊娠囊数目较 AdRFP 腺病毒转染 hAMSCs 移植组明显降低($P<0.01$,图 9)。结果表明,hAMSCs 移植可以促进受损的子宫内膜的功能恢复以助于受精卵的植入以及胚胎的发育,但是抑制 Notch 信号通路后,hAMSCs 不具有促进子宫内膜修复的作用,说明 Notch 信号通路调控 hAMSCs 生物学功能。



1:Sham 组;2:IUA 组;3:hAMSCs 组;4:AdR-dnNotch1 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 IUA 组比较

图 8　RT-PCR 检测各组大鼠子宫组织中 Hes1 mRNA 表达



A:各组 SD 雌性大鼠妊娠情况;B:各组 SD 雌性大鼠妊娠数量统计　1:Sham 组;2:IUA 组;3:hAMSCs 组;4:AdR-dnNotch1 组;a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 IUA 组比较;c:$P<0.01$,与 hAMSCs 组比较

图 9　各组大鼠生育力评估

3 讨论

宫腔粘连发病率高,严重影响女性生殖生理健康,宫腔镜下粘连松解术联合激素治疗是临床中主要的治疗方法,但是重度宫腔粘连治疗后复发率高[16]。临床中宫腔粘连分级评分标准是根据粘连范围、粘连性质、输卵管开口状态、子宫内膜厚度(增殖晚期)、月经状态、既往妊娠史、既往刮宫史7个方面进行评估。在动物实验中宫腔粘连程度主要根据子宫内膜厚度、腺体数目、纤维化程度等方面进行评估。本团队前期在大鼠宫腔粘连子宫中研究发现hAMSCs移植可促进子宫内膜再生修复,其可能机制为hAMSCs在子宫微环境下具有内膜化潜能[12,17-18]。hAMSCs与其他间充质干细胞一样,适当诱导条件下可发生多向分化,在子宫微环境下可能分化为子宫内膜细胞。间充质干细胞分化受信号通路的调控,有研究表明Notch信号通路调控骨髓间充质干细胞分化,并且有研究发现Notch蛋白在宫腔粘连子宫组织中表达差异明显[19]。由此猜测Notch信号调控hAMSCs的生物学功能,所以,本研究旨在探究抑制Notch信号通路后,hAMSCs是否具有治疗宫腔粘连的作用。

目前已知脊椎动物有4种Notch受体(Notch1-4)和5种Notch配体(Jagged1,2和DLL1,3,4),均包括胞内、胞外和跨膜3个结构域,参与调控细胞增殖和分化等一系列生理活动[20-22]。在相邻细胞的Notch配体和受体结合反应之后,金属蛋白酶ADAM17(亦称TACE)在Notch胞外近膜处酶切,紧接着关键酶γ-分泌酶在胞内近膜处水解切割,Notch胞内段(NICD)被释放,进入细胞核与DNA结合蛋白CSL(RBPjk/CBF1)及MAM蛋白结合,调控靶基因Hes1,5和Hey1等的表达[14]。因此,本研究通过AdR-dnNotch1腺病毒转染hAMSCs,竞争性抑制Notch受体与配体的结合,减少胞内段NICD的释放,达到抑制Notch信号传导的作用,再将受干扰的hAMSCs移植到宫腔,观察其在治疗宫腔粘连中的作用。

在体外实验中,通过干性免疫标记物检测hAMSCs的干性特点,再通过成骨分化和成脂分化染色评估其分化潜能,结果证实其具有其他间充质干细胞的特性。接着,用显性负性突变型Notch1腺病毒(AdR-dnNotch1)抑制Notch信号通路,由于添加了Notch1的胞外结构域,竞争性抑制了Notch受体、配体的结合,所以Notch1的RNA表达升高,而NICD蛋白表达却降低,说明Notch信号通路被成功抑制。将Notch信号通路抑制后的hAMSCs移植入宫腔,观察其是否仍具有治疗宫腔粘连的作用。

在体内实验中,为建立具有可重复性且不受人为操作熟练程度影响的重度宫腔粘连模型,本实验中选择化学损伤法建立重度宫腔粘连模型,即95%酒精损伤子宫内膜组织[23]。由于机械损伤法建立宫腔粘连模型受人为操作熟练程度的影响,子宫内膜受损不均匀,粘连程度不一致,hAMSCs移植治疗结果缺乏真实性。而化学损伤法(95%酒精损伤法),可通过对酒精作用子宫内膜时间长短条件的摸索,以达到对子宫内膜不同程度的损伤。本研究主要探究hAMSCs移植治疗重度宫腔粘的效果,95%酒精作用于子宫内膜3 min即可建立重度宫腔粘连模型,在稳定的模型基础上,治疗效果的评估更加有可比性。因此,本研究选择95%酒精损伤法,在有效的重度宫腔粘连模型的基础上,分别移植hAMSCs和AdR-dnNotch1转染的hAMSCs,比较其治疗效果,结果显示:在重度宫腔粘连模型基础上,hAMSCs移植可促进子宫内膜再生修复(宫腔形态恢复、子宫内膜腺体数目增加、内膜增厚、纤维化程度降低,且间质标志物Vimentin表达降低,并恢复了其生育力),而抑制Notch信号通路后,hAMSCs不具有治疗宫腔粘连的作用(子宫宫腔形态未恢复,内膜腺体数目未增加,内膜未增厚,纤维化程度无减轻,且间质标志物Vimentin表达无降低,生育力未恢复),说明Notch信号通路参与调控hAMSCs的生物学行为,抑制Notch信号通路后,hAMSCs不能发挥治疗宫腔粘连的作用。

本研究通过免疫组化检测各组子宫组织中Notch1、NICD、Hes1的表达情况,发现IUA组子宫组织中表达量少,这表明Notch信号通路在宫腔粘连子宫组织中处于抑制状态。而hAMSCs移植入宫腔后,Notch1表达增加,释放其活化形式NICD,通过对NICD核表达量检测,发现其发生了核转位,并激活靶基因Hes1,发挥其调控作用,说明Notch信号通路激活后调控hAMSCs的作用。而AdR-dnNotch1转染hAMSCs后,hAMSCs生物学功能发生了改变,可能失去了干细胞的多向分化的特点,所以Notch信号通路不参与调控其分化作用,不能发挥治疗宫腔粘连的作用。

本研究主要通过抑制Notch信号通路观察hAMSCs移植治疗宫腔粘连的作用,结果显示抑制Notch信号通路可削弱hAMSCs治疗宫腔粘连的效果,猜测其可能原因是Notch信号通路调控hAMSCs的分化,进而影响其治疗宫腔作用,但具体原因有待继续探究。

参考文献:

[1] 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. DOI: 10.1016/j.jcyt.2017.02.003.

[2] HOOKER A B, LEMMERS M, THURKOW A L, *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. DOI: 10.1093/humupd/ dmt045.

[3] GILMAN A R, DEWAR K M, RHONE S A, *et al*. Intrauterine adhesions following miscarriage: look and learn[J]. J Obstet Gynaecol Can, 2016 , 38(5): 453-457. DOI: 10.1016/j.jogc.2016.03.003.

[4] ROY K K, BARUAH J, SHARMA J B, *et al*. Reproductive outcome following hysteroscopic adhesiolysis in patients with infertility due to Asherman's syndrome[J]. Arch Gynecol Obstet, 2010, 281(2): 355-361. DOI: 10.1007/s00404-009-1117-x.

[5] XIAO S S, WAN Y J, XUE M, *et al*. Etiology, treatment, and reproductive prognosis of women with moderate-to-severe intrauterine adhesions[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2014, 125(2): 121-124. DOI: 10.1016/j.ijgo.2013.10.026.

[6] SHI X, SARAVELOS S H, ZHOU Q, *et al*. Prevention of postoperative adhesion reformation by intermittent intrauterine balloon therapy: a randomised controlled trial[J]. BJOG, 2019, 126(10): 1259-1266. DOI: 10.1111/ 1471-0528.15843.

[7] CHEN G B, LIU L M, SUN J, *et al*. Foxf2 and Smad6 co-regulation of collagen 5A2 transcription is involved in the pathogenesis of intrauterine adhesion[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(5): 2802-2818. DOI: 10.1111/jcmm.14708.

[8] XIAO B, YANG W J , LEI D , *et al*. PGS scaffolds promote the *in vivo* survival and directional differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells restoring the morphology and function of wounded rat uterus[J]. Adv Healthc Mater, 2019, 8(5): e1801455. DOI: 10.1002/adhm.201801455.

[9] XIN L B , LIN X N, PAN Y B, *et al*. A collagen scaffold loaded with human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells facilitates endometrial regeneration and restores fertility[J]. Acta Biomater, 2019, 92: 160-171. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.05.012.

[10] 张冉, 段华. 羊膜移植在预防宫腔粘连中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(6): 470-472. DOI: 10.3760/cma. j.issn.0529-567x.2012.06.016.
ZHANG R, DUAN H. Amniotic membrane transplantation in the prevention of intrauterine adhesions[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2012, 47(6): 470-472. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2012.06.016.

[11] AMER M I , ABD-EL-MAEBOUD K H I, ABDELFATAH I, *et al*. Human amnion as a temporary biologic barrier after hysteroscopic lysis of severe intrauterine adhesions: pilot study[J]. J Minim Invas Gynecol, 2010, 17(5): 605-611. DOI: 10.1016/j.jmig.2010.03.019.

[12] 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.

[13] 陈芯培, 张文文, 毛艳华, 等. PPCNg 介导人羊膜间充质干细胞治疗大鼠宫腔粘连的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44(8): 1016-1023. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.002242.
CHEN X P, ZHANG W W, MAO Y H, *et al*. A study of PPCNg-mediated effect of human amniotic mesenchymal stem cells in the treatment of intrauterine adhesion in rats[J]. J Chongqing Med Univ, 2019, 44(8): 1016-1023. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.002242.

[14] SPITZER T L B, ROJAS A, ZELENKO Z, *et al*. Perivascular human endometrial mesenchymal stem cells express pathways relevant to self-renewal, lineage specification, and functional phenotype[J]. Biol Reprod, 2012, 86(2): 58. DOI: 10.1095/biolreprod.111.095885.

[15] CUI J, ZHANG W W, HUANG E Y, *et al*. BMP9-induced osteoblastic differentiation requires functional Notch signaling in mesenchymal stem cells[J]. Lab Investig, 2019, 99(1): 58-71. DOI: 10.1038/s41374-018-0087-7.

[16] 吕立威, 丘雅波, 符俊娟. 三维能量多普勒超声诊断宫腔粘连的价值分析[J]. 中国超声医学杂志, 2021, 37(1): 70-73. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2021.03.050.
LYU L W, QIU Y B, FU J J. The value analysis of three-dimensional energy Doppler ultrasound in diagnosing intrauterineadhesions[J]. Chin J Ultrasound Med, 2021, 37(1): 70-73. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2021.03.050.

[17] 毛艳华. 羊膜间充质干细胞联合雌激素治疗宫腔粘连的体外实验研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
MAO Y H. *In vitro* experimental study of treatment effect of

human amniotic mesenchymal stem cells combined with estrogen on intrauterine adhesions[D]. Chongqing: Chongqing Medical University,2018.

[18] 阳媛. 羊膜间充质干细胞移植联合雌激素治疗宫腔粘连的动物实验研究[D]. 重庆: 重庆医科大学,2018.
YANG Y. Human amniotic mesenchymal stem cells transplantation combined with estrogen in the treatment of intrauterine adhesions: a rat experimental study [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2018.

[19] 朱大秀, 张真真, 朱利, 等. 子宫内膜干/祖细胞在子宫内膜异位症发病中的作用及研究进展[J]. 华西医学, 2020, 35(1): 84-88.
ZHU D X, ZHANG Z Z, ZHU L, *et al*. The role and advances of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of endometriosis [J]. West China Med, 2020, 35 (1): 84-88.

[20] FAHIM Y, YOUSEFI M, IZADPANAH M H, *et al*. TWIST1 correlates with Notch signaling pathway to develop esophageal squamous cell carcinoma[J]. Mol Cell Biochem, 2020, 474(1/2): 181-188. DOI: 10.1007/s11010-020-03843-2.

[21] WU Y, GAO Q, ZHU S B, *et al*. Low-intensity pulsed ultrasound regulates proliferation and differentiation of neural stem cells through notch signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526(3): 793-798. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.142.

[22] WEI S T, HUANG Y C, HSIEH M L, *et al*. Atypical chemokine receptor ACKR3/CXCR7 controls postnatal vasculogenesis and arterial specification by mesenchymal stem cells *via* Notch signaling[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(5): 307. DOI: 10.1038/s41419-020-2512-2.

[23] SUN L, ZHANG S W, CHANG Q Y, *et al*. Establishment and comparison of different intrauterine adhesion modelling procedures in rats[J]. Reprod Fertil Dev, 2019, 31(8): 1360. DOI: 10.1071/RD18397.

(收稿:2021-02-03;修回:2021-03-31)

(编辑 王 红)