基础研究 DOI :10.13406/j.cnki.cyxb.001243

TGF-β1 和 MMP-9 在宫腔粘连子宫内膜组织中表达上调

吴玺玺，周 勤，胡建国，袁 瑞
（重庆医科大学附属第一医院妇产科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨基质金属蛋白酶-9（matrix metalloproteinase-9，MMP-9）和转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）在宫腔粘连（intrauterine adhesions，IUAs）子宫内膜中的表达及其意义。方法：①人群实验：收取 20 例宫腔镜诊断治疗时所得重度 IUAs 患者子宫内膜组织、非 IUAs 者子宫内膜组织 15 例（对照组）。②动物实验：运用 95%无水乙醇持续注射 8 min 构造 IUAs 大鼠模型（对照组注射相应的生理盐水），分别获取对照组及实验组（术后第 1、3、5、10 天）子宫内膜组织。采用组织化学染色方法（HE、Masson、IHC）观察大鼠子宫内膜形态变化并检测子宫内膜相关指标（keratin）的表达情况，分别采用逆转录实时定量 PCR（qRT-PCR）和 Western blot 检测 IUAs 患者和大鼠子宫内膜 MMP-9 及 TGF-β1 的 mRNA 和蛋白水平表达。结果：①临床样本显示 IUAs 患者子宫内膜中MMP-9（F=1.027，P=0.001）及 TGF-β1（F=1.156，P=0.000）的蛋白表达明显高于对照组；②成功构建大鼠 IUAs 动物模型，Masson 染色提示子宫内膜纤维化形成，IUAs形成过程中子宫内膜腺上皮或腔上皮标志物角蛋白（keratin）表达显著降低（与对照组相比，术后 5d：F=35.200，P=0.000；术后 10d：F=26.098，P=0.000）；③术后 1d，3d，5d，10d 组 MMP-9 mRNA 含量分别是对照组的 1.02 倍、1.80 倍、2.33 倍、4.58 倍，TGF-β1 mRNA 含量分别是对照组的 2.53 倍、2.82 倍、3.55 倍、4.33 倍；与对照组（MMP-9：1.405±0.146，TGF-β1：0.251±0.079）相比，术后 1d，3d，5d，10d MMP-9 蛋白含量分别为 1.552±0.093、1.759±0.036、1.577±0.125、3.825±0.712，其中在术后第 10 天显著高于对照组（P=0.000），TGF-β1 蛋白含量分别为 0.709±0.105、0.756±0.090、0.920±0.671、0.717±0.243，总体呈现上升趋势，显著高于对照组（P=0.000，000，0.000，0.003）。结论：TGF-β1 与 MMP-9 在IUAs的形成过程中明显升高，提示IUAs的发生发展可能和 MMP-9 与 TGF-β1 表达上调有关。

【关键词】宫腔粘连；基质金属蛋白酶-9；转化生长因子-β1
【中图分类号】R711.6 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-02-23

The expressions of TGF-β1 and MMP-9 up-regulated in intrauterine adhesions endometrium

Wu Xixi，Zhou Qin，Hu jianguo，Yuan Rui
（*Department of Gynecology and Obstetrics，the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To explore the expression and significance of matrix metalloproteinases（MMP-9）and transforming growth factor-β_1（TGF-β_1）for endometrium with intrauterine adhesions（IUAs）. ***Methods***：Human experiment：A total of 20 endometrium tissues with severe IUAs were collected with confirmed and treated IUAs by hysteroscope（IUAs group），plus 15 patients without IUAs（control group）. Animal experiment：IUAs rat models were structured with 95% ethanol injection for 8min，control group with normal saline. Endometrial tissues of control group and experiment groups（postoperation1、3、5、10d）were achieved，respectively. Histological（HE，Masson）and Immunohistochemistry were employed to observe rat endometrial morphology changes and the expression level of keratin，marker for gland or cavity epithelium. qRT-PCR and Western blot were involved in order to test the mRNA and protein levels of MMP-9 and TGF-β1 in IUAs patient and rat endometrium. ***Results***：①Clinical experiment revealed that the protein expression of MMP-9（F=1.027，P=0.001）and TGF-β1（F=1.156，P=0.000）in endometrium with IUAs was significantly up-regulated compared to the control group. ②IUAs rat models were successfully established using 95% ethyl alcohol injection for 8 min，the expression level of marker for luminal or gland epithelium，keratin，was significantly deceased（compared with control，post-operation 5d：F=35.200，P=0.000；post-operation 10d：F=26.098，P=0.000）and endometrial fibrosis was demonstrated by Masson. ③At post-operation 1d，3d，5d，10d，MMP-9 mRNA expressions were 1.02-fold、1.80-fold、2.33-fold、4.58-fold than con-

作者介绍：吴玺玺，Email：946453461@qq.com，
研究方向：不孕不育症 宫腔粘连）。
通信作者：袁 瑞，Email：yrui96@126.com。
基金项目：国家自然科学基金面上资助项目（编号：81471417）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170426.1139.040.html（2017-04-26）

trol group and TGF-β1 mRNA expressions were 2.53-fold、2.82-fold、3.55-fold、4.33-fold than control group, respectively; On protein, MMP-9 protein expression were 1.552 ± 0.093、1.759 ± 0.036、1.577 ± 0.125、3.825 ± 0.712 (compared with control, P=0.000 merely at post-operation 10d), TGF-β1 protein expression were 0.709 ± 0.105、0.756 ± 0.090、0.920 ± 0.671、0.717 ± 0.243 (P= 0.000, 0.000, 0.000, 0.003 compared with control group, respectively) at post-operation 1d, 3d, 5d, 10d. ***Conclusion*** : The expression of MMP-9 and TGF-β1 were significantly increased in IUAs endometrium, which may supposed that the up-regulation of MMP-9 and TGF-β1 may contribute to the development of IUAs.

[Key words] Intrauterine adhesions; matrix metalloproteinase-9; transforming growth factor-β_1

宫腔粘连（intrauterine adhesions，IUAs）又称 Asherman 综合征，主要由于宫腔操作等原因使得子宫内膜受损，当损伤延伸至子宫内膜基底层后，引起内膜局部缺血、低氧及一系列炎症反应，进而降低子宫内膜的再生修复能力导致纤维化组织大量增生覆盖甚至取代正常的子宫内膜组织[1]，最终导致子宫内膜局部或全部粘连形成。

人工流产、刮宫导致的 IUAs 占所有 IUAs 的 25%~30%，而随着育龄期妇女人流次数的增加，IUAs 发病率逐渐升高，其中多次 IUAs 患者临床症状主要表现为闭经、继发性不孕，且手术治疗后极易复发，严重影响妇女的生育功能[2-3]。目前针对 IUAs 的发病机制尚不明确，这给 IUAs 的治疗及预后带来困难。本研究通过构造 IUAs 大鼠模型、检测基质金属蛋白酶-9（matrix metalloproteinase-9，MMP-9）及转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）的表达，并为 IUAs 治疗及预后提供了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 临床样本 收集 2014 年 10 月至 2015 年 6 月于重庆医科大学附属第一医院妇科日间病房首次于宫腔镜下行宫腔粘连分离术（transcervical resection of adhesion，TCRA）的 20 例重度 IUAs 患者，术中分离纤维粘连组织附带的很少部分内膜组织或冲洗时萃取所得内膜组织为 IUAs 组，平均年龄（30.38 ± 3.70）岁 主诉月经量减少 15 例，闭经 1 例，继发不孕 4 例）；选择 15 例子宫内膜正常、同期行宫腔镜下子宫纵隔切除术、或冲洗萃取所得子宫内膜组织为对照组，平均年龄（28.32 ± 4.20）岁。2 组年龄无统计学差异（P>0.05）。病例纳入标准：①符合美国生殖协会宫腔粘连诊断标准；②血清性激素水平检测在正常范围；③排除内异症，子宫肌瘤，习惯性流产，乳腺癌，内膜癌，骨质疏松，甲状腺疾病，三叉神经痛，某些内科疾患如肾上腺等内分泌疾病、先天性疾病等；④个体间无血缘关系，检查前 3 个月未接受任何性激素治疗；⑤所有活检样本均为TCRA 术时纤维粘连组织附带很少部分内膜组织或冲洗时萃取所得内膜组织，并取得患者及家属知情同意；⑥对照组纳入标准：对照组无宫腔粘连，其余标准与②③④⑤一致。

1.1.2 动物样本 购买未交配雌性 Sprague-Dawley（SD）大鼠 40 只，鼠龄 8~10 周，体质量 220~280 g。每天早晨 8：00 用棉签对大鼠进行阴道涂片并用载玻片在显微镜下判断动情周期，连续涂片 2 个动情周期，选取有正常动情周期大鼠 30 只随机分为对照组，95%无水乙醇灌注 8min 术后 1d 组，术后 3d 组，术后 5d 组，术后 10d 组，每组 6 只大鼠 12 个子宫。动物饲养于西南医院中心实验室，昼夜各 12 h，温度 20 ℃~26 ℃，湿度 50%~60%，自由采食、饮水。

大鼠术前禁食 12 h，按照 0.3 mg/100 g 剂量腹腔注射 10%水合氯醛，待角膜反射和翻正反射消失、呼吸明显深慢后进行手术：大鼠取仰卧位，四肢妥善固定在手术平台，下腹部备皮，75%酒精消毒，铺一次性无菌孔巾；在距离耻骨联合上 1.5 cm，下腹部正中做一长 2.0~3.0 cm 纵行切口，依次切开皮肤、腹壁各层；实验组：探查并分离子宫，于子宫 V 角用一止血夹轻轻将两子宫近端夹住，分别将两子宫远端在不损伤子宫的前提下用细线紧紧打结，以防无水乙醇溢至卵巢损伤卵巢功能；用无齿镊轻轻将子宫拉直，无菌生理盐水纱布保护周围组织以防无水乙醇外溢损伤周围组织；注射器针头吸入足量无水乙醇，在宫角处纵向平行进入宫腔，缓慢推入无水乙醇，确保宫腔处于充盈状态 8 min 后，缓慢吸出腔内无水乙醇并取出针头，轻轻挤压出残留液；另一侧子宫采取相同处理；松开血管夹，解离细线，用生理盐水冲洗腹腔，避免腹腔内脏器粘连，然后用无菌干燥纱布轻轻吸出冲洗液，最后缝合伤口，关闭腹腔。操作中尽量保证无菌操作。

术后大鼠连续 3 d 予以肌注抗生素，每日 1 次；大鼠苏醒前注意保温，术后密切观察大鼠精神状态及食纳状况，分别于术后第 1、3、5、10 天将实验组以及对照组的大鼠安乐死并开腹取双侧子宫，观察大体标本后分别置于-80 ℃冰箱内保存以及用 10%多聚甲醛固定保存并制成石蜡切片。

1.2 方法

1.2.1 HE 染色 将制备好的石蜡切片进行脱蜡至水处理，苏木精染色 3 min 后用流水冲洗，然后在0.6%盐水酒精中分化 5 s，镜检判断染色程度（如果浓度偏深，再次 0.6%盐酸酒精分化），效果合格后用流水冲洗、逐渐脱色，再用 1%醇伊红染色 1.5 min，显微镜下判断染色效果后用梯度无水乙醇逐渐脱水至透明，中性树胶封片后用倒置显微镜（×100）观察子宫内膜形态变化。

1.2.2 Masson 染色 切片脱蜡至水，自来水水洗 3 遍、蒸馏水冲洗两遍后置入哈瑞士苏木素染色液染核 2~3 min，自来水冲洗 3 遍，入 HE 染色分化液 30 s，自来水水洗 3 遍、蒸馏水水洗 2 遍后置入丽春红-酸性复红溶液染色 5 min，蒸馏水水洗 2 遍后置入磷钼酸溶液染色 5 min，沥干，然后置入醋酸溶液 30 s，入亮绿（SF）溶液 5 min，蒸馏水水洗 2 遍后置入醋酸溶液 30 s，脱水、透明、中性树胶封固。

1.2.3 免疫组织化学染色检测角蛋白（cytokeratin）的表达 将石蜡切片脱蜡至水后用流水冲洗 1 min，置于柠檬酸盐缓冲液（中杉 ZL1-9065）中抗原修复 20 min，PBS 洗 3 次（5 min/次）。3%H_2O_2 滴加在切片上，室温静置 10 min，PBS 洗 3 次（5 min/次），然后滴加兔血清工作液室温封闭 15 min，甩去多余液体后滴加 I 抗：cytokeratin（abcam，ab41825，1:100），4 ℃过夜后室温复温。PBS 洗 3 次（5 min/次），滴加 II 抗工作液 37 ℃孵育 30 min，PBS 洗 3 次（5 min/次），滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 37 ℃孵育 30 min。PBS 洗 3 次（5 min/次），DAB（中杉金桥 ZL1-9018）显色，在显微镜下掌握染色程度，PBS 浸泡 10 min，苏木精复染 1 min 后流水冲洗，盐酸酒精分化 5 s；流水冲洗 10 min 后脱水、透明、封片、镜检。所有切片均在高倍显微镜（×100）下分析，分别由 3 位病理学专业人员对目的蛋白分布面积和表达强度进行评分[4]，均分别为 0（无表达）、1 分（面积<30%、强度低）、2 分（面积中等 30%~70%、强度中等）、3 分（面积>70%、强度高），选取 22 个区域进行统计分析，结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。

表 1 实时定量 RT-qPCR 引物序列、产物长度及退火温度

Tab.1 Quantitative RT-qPCR primer sequences、length and annealing temperature

基因	引物序列	退火温度（℃）	产物长度（bp）
TGF-β1	上游 5'-GACCGCAACAACGCAATCTATG-3' 下游 5'-CTCCACAGTTGACTTGAATC-3'	57	153
MMP-9	上游 5'-CCCTACTGCTGGTCCTTCTG-3' 下游 5'-GACCGTCCTTGAAGAAATGCAG-3'	57	125

1.2.4 RT-qPCR 定量检测 MMP-9、TGF-β1 mRNA 的表达水平 按 Trizol 试剂盒说明书提取各组总 RNA，按 Gen Bank 数据库检索目的序列，采用 Primer 5.0 引物设计与分析软件设计引物，各标本 2 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA，并于 20 μL 反应体系（cDNA2.0 μL，上、下游引物各 0.3 μL，2× SYBR Green 10 μL，去离子水补足至 20 μL）中进行反转录反应。反应条件：96 ℃ 5 min，96 ℃ 30 s、57 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s，35 个循环）。反应在CFX PCR 仪上进行，实验结果以各实验组 MMP-9/β-actin及 TGF-β1/β-actin值与对照组 MMP-9/β-actin及 TGF-β1/β-actin值相比的倍数表示。

1.2.5 Western blot 检测 MMP-9、TGF-β1 的蛋白表达水平 严格按照操作说明书提取总蛋白并检测浓度，SDS-PAGE 每个泳道分别加入 50 μg 蛋白，电泳时间约为 2 h。分别根据目的蛋白分子量切胶，并转至 PVDF 膜上，TBST 洗膜后 5%脱脂牛奶封闭 2 h，相应分子量范围 PVDF 膜分别用抗 β-actin（1∶1 000）、MMP-9（1∶1 000）、TGF-β1（1∶1 000）一抗孵育，4 ℃ 过夜。一抗孵育结束后 37 ℃ 复温 1 h，0.1% TBST 洗膜，分别敷上辣根过氧化物酶标记二抗，37 ℃ 孵育 2 h。利用 ECL 发光液显色，Quantity One 图像分析软件分析目标条带光密度值，以各条带与内参 β-actin 的吸光度的比值表示蛋白的相对含量，各组 TGF-β1 及 MMP-9 的表达即 TGF-β1 及 MMP-9 分别与 β-actin 的光密度比值，统计各组蛋白表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计分析，计量数据采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组数据间的比较行单因素方差分析，组间两两均数比较采用 LSD-t 法，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 临床样本检测结果

2.1.1 Western blot 检测临床宫腔粘连患者与对照组的 TGF-β1 和 MMP-9 的表达 与对照组比较，IUAs 患者子宫内膜 MMP-9 和 TGF-β1 的蛋白表达明显高于阴性对照组（P<0.05）具体数值见表 2）。

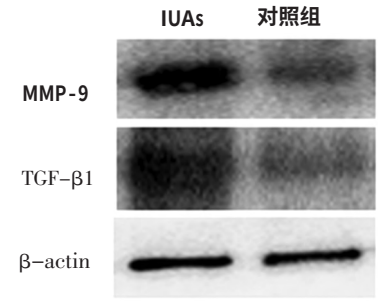


图 1 IUAs 患者（20 例）与对照组（15 例）子宫内膜 TGF-β1 及 MMP-9的蛋白表达水 平

Fig.1 Protein expression of TGF-β1 and MMP-9 of human endometrium in IUAs(20 cases) and control group(15 cases)

表 2　宫腔粘连患者和对照组子宫内膜中 TGF-β1 及 MMP-9 的蛋白表达（$\bar{x}\pm s$）

Tab.2　Protein expression of TGF-β1 and MMP-9 of human endometrium in IUAs and control group（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	MMP-9	TGF-β1
对照组	15	2.490±0.157	2.621±0.106
IUAs	20	4.750±0.348	5.308±0.401

注：MMP-9 的蛋白含量（t=1.027，P=0.001），TGF-β1 的蛋白含量（t=1.156，P=0.000）

2.2　大鼠子宫内膜 HE 染色观察子宫内膜组织形态变化

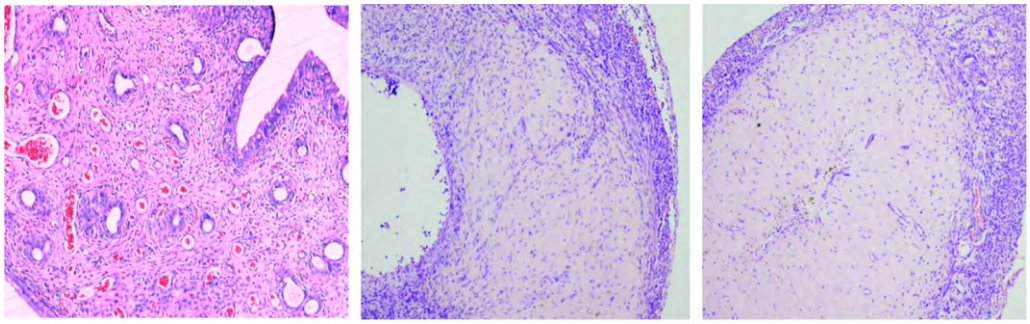
和对照组比较，实验组（第 5 天、10 天）随着术后时间的推移，子宫逐渐变小变硬，颜色由红润变成苍黄。镜下观察发现子宫内膜层腺体逐渐减少，内膜层逐渐纤维化、粘连组织逐渐增加直至子宫内膜前后壁紧密粘连（见图 2）。

2.3　Masson 染色

Masson 染色结果提示，和对照组比较，实验组（术后 5 天、10 天）宫腔及子宫内膜组织逐渐被蓝色胶原纤维替代（见图 3）。

2.4　免疫组织化学染色（IHC）观察角蛋白（cytokeratin）的表达

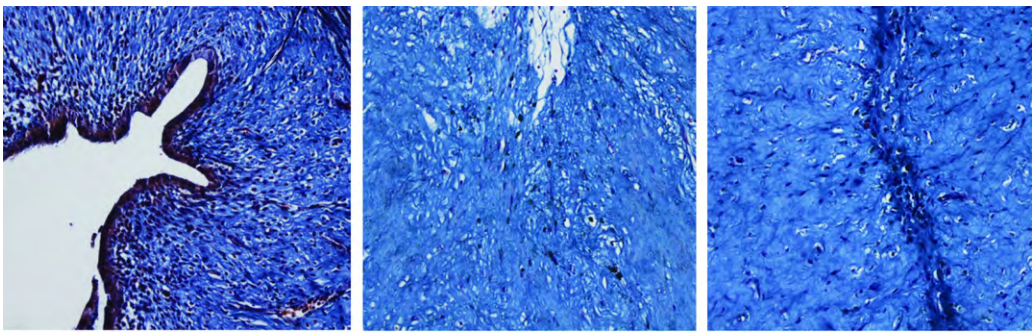
免疫组化（IHC）结果发现，和对照组比较，实验组造模后伴随宫腔粘连的形成，子宫内膜上皮细胞标志物角蛋白（cytokeratin）表达显著降低（P=0.000）。根据大鼠子宫内膜内角蛋白分布面积及强度进行评分，评分结果如下：对照组 8.000±1.477，术后 5 d：1.667±0.492，术后 10 d：0.830±0.577（见图 4、图 5）。



A. 对照组　　B. 术后 5 d　　C. 术后 10 d

图 2　术后大鼠子宫内膜纤维化，宫腔粘连形成（HE，200×）

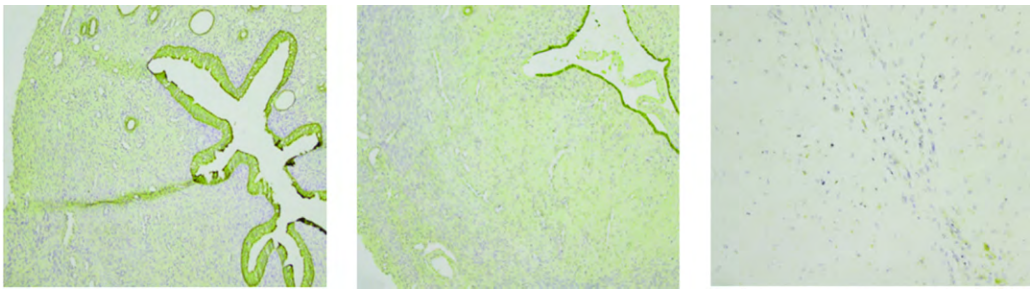
Fig.2　HE staining, intrauterine adhesions developed with endometrial fibrosis in rats postoperative(HE，200×)



A. 对照组　　B. 术后 5 d　　C. 术后 10 d

图 3　大鼠子宫内膜组织的 Masson 染色（200×）

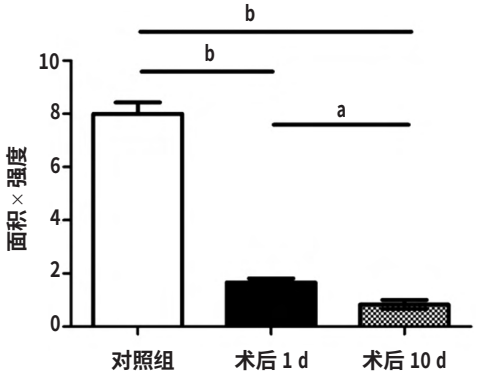
Fig.3　Masson stains for Rat endometrium tissues (200×)



A. 对照组　　B. 术后 5 d　　C. 术后 10 d

图 4　免疫组化检测术后大鼠子宫内膜角蛋白含量变化(200×)

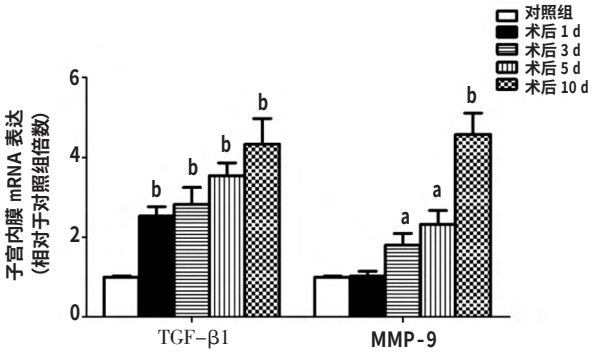
Fig.4　Changes of keratin in rats endometrium by Immunohistochemistry(200×)



a：与对照组相比，$P<0.01$；b：与对照组相比，$P<0.001$

图 5 大鼠子宫内膜角蛋白含量免疫组化评分（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Fig.5 The score of immunohistochemical staining of keratin in rats endometrium（$\bar{x}\pm s$，n=10）



a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与对照组相比，$P<0.01$

图 6 实验组与对照组 TGF-β1 及 MMP-9 mRNA 表达水平（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.6 mRNA expressions of TGF-β1 and MMP-9 of control group and experiment groups（$\bar{x}\pm s$，n=3）

2.5 逆转录实时定量 PCR（qRT-PCR）检测 TGF-β1 及 MMP-9 mRNA 的表达

qRT-PCR 结果发现，随着术后宫腔粘连的形成 TGF-β1 及 MMP-9 mRNA 表达均明显升高。与对照组比较，实验组术后第 1、3、5、10 天 TGF-β1 mRNA 分别是对照组 2.53 倍、2.82 倍、3.55 倍、4.33 倍（F=27.607，P=0.000）；MMP-9 mRNA 分别是对照组 1.02 倍、1.80 倍、2.33 倍、4.58 倍（F=58.607，P=0.000）具体见图 6、表 3）。

2.6 Western blot 检测 TGF-β1 及 MMP-9 的蛋白水平的表达

Western blot 检测结果发现，随着术后宫腔粘连的形成，TGF-β1 及 MMP-9 的蛋白表达明显升高。和对照组比较，实验组术后第 1、3、5、10 天：TGF-β1 表达的蛋白分别是对照组的 2.82 倍、3.01 倍、3.67 倍、2.86 倍（F=23.423，P=0.000）；MMP-9 表达的蛋白分别是对照组的 1.10 倍、1.25 倍、1.12 倍、2.72 倍（F=27.852，P=0.000）具体见图 7、表 4）。

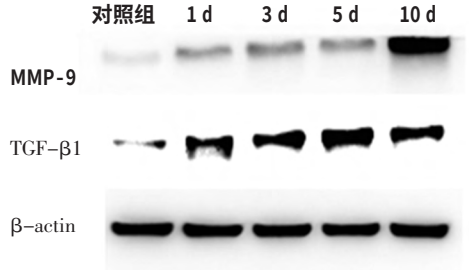


图 7 实验组（术后第 1、3、5、10 天）与对照组 TGF-β1 及 MMP-9 的蛋白表达水平

Fig.7 Protein expression of TGF-β1 and MMP-9 of experiment groups(post-operation 1、3、5、10d) and control group

表 3 与对照组相比，实验组（术后 1 d、3 d、5 d、10 d）中 MMP-9 和 TGF-β1 mRNA 的表达变化分析（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Comparisons that expressions of MMP-9 and TGF-β1 mRNA in control and experimental groups (post-operation 1 d,3 d,5 d,10 d)（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d	术后 10 d
MMP-9	0.030±0.272	0.807±0.272	1.331±0.272	3.584±0.272
TGF-β1	1.530±0.338	1.829±0.338	2.553±0.338	3.360±0.338

注：TGF-β1 均与对照组相比，术后 1 d（P=0.004），术后 3 d（P=0.001），术后 5 d（P=0.000），术后 10 d（P=0.000）；MMP-9 均与对照组相比，术后 1 d（P=1.000），术后 3 d（P=0.044），术后 5 d（P=0.002），术后 10 d（P=0.000）

表 4 与对照组相比，实验组（术后 1 d、3 d、5 d、10 d）中 MMP-9 和 TGF-β1 protein 的表达变化分析（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4 Comparisons that expressions of MMP-9 and TGF-β1 protein in control and experimental groups (post-operation 1 d,3 d,5 d,10 d)（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d	术后 10 d
TGF-β1	0.458±0.730	0.506±0.730	0.669±0.730	0.473±0.730
MMP-9	0.147±0.272	0.354±0.272	0.172±0.272	2.420±0.272

注：TGF-β1 均与对照组相比，术后 1 d（P=0.000），术后 3 d（P=0.000），术后 5 d（P=0.000），术后 10 d（P=0.003）；MMP-9 均与对照组相比，术后 1 d（P=0.950），术后 3 d（P=0.528），术后 5 d（P=0.917），术后 10 d（P=0.000）

3 讨 论

正常育龄期妇女子宫内膜在月经期后或产后几乎可以完全增生修复，目前认为子宫内膜的这种增生修复能力主要由于基底层子宫内膜干细胞增生分化所致[5-7]。子宫内膜受损后，位于功能层和基底层的子宫内膜干细胞受到某些炎性介质、细胞因子或趋化因子的催化、牵引及促进等作用增生分化成子宫内膜细胞，促进子宫内膜的增生修复[8-12]。当子宫内膜受到创伤（人流、肌瘤挖除等）或感染（子宫内膜炎、生殖器结核等）严重损伤基底层后、使得局部组织缺血缺氧、内膜再灌注损伤致使活性氧过量堆积，或引起子宫内膜细胞间信号通路的改变，导致子宫内膜微环境异常进而引起内膜纤维化，出现纤维粘连组织大量增生替代正常子宫内膜[13]，致使宫腔局部或广泛粘连。

多功能细胞因子 TGF-β1 在组织修复或伤口愈合过程中起着总开关调节作用，它的异常表达或激活刺激成纤维母细胞生成大量活化的肌成纤维细胞，合成分泌纤维粘连蛋白、胶原蛋白等，进而导致细胞外基质（extracellular matrix，ECM）异常积聚与沉积，造成内膜纤维化[14-15]，这一过程在众多纤维化疾病如肺纤维化、慢性肾脏疾病、肥厚性心肌病等中均发挥重要作用[16-21]。本课题组前期研究初步发现纤维化指标 TGF-β1 的表达增高很有可能诱导子宫内膜干细胞异常增殖分化为纤维母细胞进而引起宫腔粘连的形成，但该过程的具体机制尚未明确[22]。

上皮细胞—间充质转化（Epithelial to Mesenchymal Transition，EMT），是指上皮细胞通过特定程序转化为间质表型细胞的生物学过程，在慢性炎症、组织重建和多种纤维化疾病中发挥了重要作用，其主要特征有细胞黏附因子表达的减少、细胞角蛋白（keratin）为主的细胞骨架转化为波形蛋白（vimentin）为主的细胞骨架及形态学上具有间充质的特征等。临床上通过对慢性肾病等纤维化疾病的研究发现[16,23]，纤维化疾病的发生发展过程中很有可能与 TGF-β1 和 MMP-9 诱导的 EMT 过程有关。损伤后的组织或器官中常常检测到 TGF-β1 及其下游靶基因 MMP-9 的异常激活，进而通过 EMT 过程发生异常的上皮细胞向间质细胞的转化，最终导致组织或器官的纤维化变性。那么在子宫内膜受损后异常纤维化修复过程中是否也与 TGFβ1 和 MMP-9 的异常表达有关？

本研究通过动态监测造模后相关指标发现，在子宫内膜损伤后宫腔粘连形成的过程中：（1）子宫内膜上皮细胞标志物角蛋白（keratin）表达明显降低子宫内膜腺体逐渐减少、胶原纤维组织显著增多逐渐覆盖或者取代正常内膜组织；（2）纤维化总开关 TGF-β1 表达升高的过程中，MMP-9 的表达也呈现总体上升趋势。该结果是否提示我们在子宫内膜受损后宫腔粘连形成的过程中 TGF-β1 和 MMP-9 有可能发挥了一定的作用？那么是否意味着可以在宫腔粘连分离术后，放置 IUD 或防粘膜等防粘措施的同时，可以使用抑制 TGF-β1 及 MMP-9 活性的制剂来预防 IUA 的再形成？该课题组后续将继续利用构建动物宫腔粘连模型后，阻断和过表达 TGF-β1 和 MMP-9 的表达后，进一步探讨及验证 TGF-β1/MMP-9 是否在宫腔粘连的发生发展过程中起到一定的作用，以望为宫腔粘连临床术后再粘连的预防提供一定的理论依据。

参 考 文 献

[1] Deans R，Abbott J. Review of intrauterine adhesions[J]. Journal of minimally invasive gynecology，2010，17（5）：555-69.

[2] 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]. Human reproduction update，2014，20（2）：262-78.

[3] Xiao S，Wan Y，Xue M，et al. Etiology，treatment，and reproductive prognosis of women with moderate-to-severe intrauterine adhesions[J]. International Journal of Gynecology & Obstetrics，2014，125（2）：121-4.

[4] Chen Y，Chang Y，Yao S. Role of angiogenesis in endometrial repair of patients with severe intrauterine adhesion[J]. International journal of clinical and experimental pathology，2013，6（7）：1343-50.

[5] Gargett CE. Uterine stem cells：what is the evidence[J]? Human reproduction update，2007，13（5）：87-101.

[6] Teixeira J，Rueda BR，Pru JK. Uterine stem cells. StemBook[M]. Cambridge（MA），2008.

[7] Maruyama T，Masuda H，Ono M，et al. Human uterine stem/progenitor cells：their possible role in uterine physiology and pathology[J].

Reproduction，2010，140（1）：11-22.

[8] Hu J，Yuan R. The expression levels of stem cell markers importin13，c-kit，CD146，and telomerase are decreased in endometrial polyps[J]. Medical science monitor：international medical journal of experimental and clinical research，2011，17（8）：BR221-7.

[9] Maruyama T，Yoshimura Y. Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis[J]. Frontiers in bioscience，2012，4：2854-63.

[10] Cervello I，Mas A，Gil-Sanchis C，et al. Somatic stem cells in the human endometrium[J]. Seminars in reproductive medicine，2013，31（1）：69-76.

[11] Carneiro MM. Stem cells and uterine leiomyomas：What is the evidence[J]? Jornal brasileiro de reproducao assistida，2016，20（1）：33-7.

[12] Gargett CE，Ye L. Endometrial reconstruction from stem cells[J]. Fertility and sterility，2012，98（1）：11-20.

[13] Shoae-Hassani A，Mortazavi-Tabatabaei SA，Sharif S，et al. Differentiation of human endometrial stem cells into urothelial cells on a three-dimensional nanofibrous silk-collagen scaffold：an autologous cell resource for reconstruction of the urinary bladder wall[J]. Journal of tissue engineering and regenerative medicine，2015，9（11）：1268-76.

[14] Kramann R，Dirocco Dp Fau-Maarouf OH，Maarouf Oh Fau-Humphreys BD，et al. Matrix Producing Cells in Chronic Kidney Disease：Origin，Regulation，and Activation[J]. Current Pathobiology Report，2013，1（4）.

[15] Barnes JL，Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis：role of NAD（P）H oxidases[J]. Kidney international，2011，79（9）：944-56.

[16] Islam SS，Mokhtari Rb Fau-El Hout Y，El Hout Y Fau-Azadi MA，et al. TGF-beta1 induces EMT reprogramming of porcine bladder urothelial cells into collagen producing fibroblasts-like cells in a Smad2/Smad3-dependent manner[J]. Cell Commun Signal，2014，8（1）：39-58.

[17] Zhao H，Dong Y，Tian X，et al. Matrix metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chronic kidney diseases[J]. World journal of nephrology，2013，2（3）：84-9.

[18] Harris WT，Kelly DR，Zhou Y，et al. Myofibroblast differentiation and enhanced TGF-B signaling in cystic fibrosis lung disease[J]. PloS one，2013，8（8）：e70196.

[19] Sui X，Wei H，Wang D. Novel mechanism of cardiac protection by valsartan：synergetic roles of TGF-beta1 and HIF-1alpha in Ang II-mediated fibrosis after myocardial infarction[J]. Journal of cellular and molecular medicine，2015，19（8）：1773-82.

[20] Li Y，Lua I，French SW，Asahina K. Role of TGF-beta signaling in differentiation of mesothelial cells to vitamin A-poor hepatic stellate cells in liver fibrosis[J]. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology，2016，310（4）：G262-72.

[21] Zepeda-Morales AS，Del Toro-Arreola S，Garcia-Benavides L，et al. Liver fibrosis in bile duct-ligated rats correlates with increased hepatic IL-17 and TGF-beta2 expression[J]. Annals of hepatology，2016，15（3）：418-26.

[22] Hu J，Zeng B，Jiang X，et al. The expression of marker for endometrial stem cell and fibrosis was increased in intrauterine adhesious[J]. International Journal Clinical Experimental Pathology，2015，8（12）：1525-34.

[23] Zhao Y，Qiao X，Wang L，et al. Matrix metalloproteinase 9 induces endothelial-mesenchymal transition via Notch activation in human kidney glomerular endothelial cells[J]. BMC cell biology，2016，17（1）：21.

责任编辑：方　济）

《重庆医科大学学报》
在线投稿网址：cyxb.alljournals.ac.cn