DOI:10.16016/j.2097-0927.202403072

GNMT 通过 TGF-β1/Smad3 信号通路抑制宫腔粘连纤维化及其机制研究

辜 鸿,王 佳,张文文,杨 肖,黄玺玥,张应凤,毛艳华,李长江,陈秋宏,黄靖麟,刘 琪,韦 玲,孙聪聪
401331 重庆,重庆医科大学附属大学城医院妇产科

[**摘要**] **目的** 探究甘氨酸 N-甲基转移酶(glycine N-methyl transferase, GNMT)对宫腔粘连(intrauterine adhesion,IUA)纤维化的影响及其相关机制。**方法** 体内实验:采用 36 只 SPF 级健康雌性 SD 大鼠(周龄为 6~8 周,体质量 180~220 g)。分别构建 SD 大鼠 IUA 模型及 GNMT 过表达大鼠 IUA 模型,利用 RT-qPCR、免疫荧光检测正常子宫与模型组子宫 GNMT 表达水平;进一步利用 RT-qPCR 及 Western blot 检测各组子宫纤维化相关分子 mRNA 和蛋白水平以及 TGF-β1/Smad3 信号通路激活情况;HE 染色观察各组子宫内膜腺体数量;Masson 染色分析各组子宫内膜纤维化程度。体外实验:利用 TGF-β1 构建人子宫内膜间质细胞(transformed human endometrial stromal cells,THESCs)纤维化表型模型,使用 TGF-β1 处理稳定转染过表达 GNMT 慢病毒的 THESCs,RT-qPCR 及 Western blot 检测纤维化表型相关分子 mRNA 和蛋白的表达情况;Western blot 检测 TGF-β1/Smad3 信号通路相关蛋白表达;通过 TGF-β1/Smad 信号通路激活剂(SRI-011381)激活 TGF-β1/Smad3 信号通路,Western blot 检测 TGF-β1/Smad3 信号通路及纤维化表型关键分子蛋白表达情况。**结果** 体内实验:与对照组比较,IUA 大鼠 GNMT mRNA 和蛋白表达水平下降($P<0.05$)。过表达 GNMT 可降低 IUA 大鼠子宫组织纤维化相关分子 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、FN mRNA 及蛋白水平($P<0.05$),并降低 TGF-β1 及其下游的 Smad3 蛋白磷酸化水平($P<0.05$);HE 和 Masson 染色显示过表达 GNMT 可增加 IUA 大鼠子宫内膜腺体数量并减轻纤维化程度($P<0.05$)。体外实验:过表达 GNMT 可降低 THESCs 纤维化表型相关分子 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 FN 的 mRNA 和蛋白水平($P<0.05$),并降低 TGF-β1 下游的 Smad3 蛋白磷酸化水平($P<0.05$);TGF-β1/Smad3 信号通路激活后,LV-GNMT+SRI-011381 组中 TGF-β1/Smad3 信号通路及下游的纤维化表型相关分子 Collagen Ⅲ、FN 的蛋白水平均明显降低。**结论** 过表达 GNMT 通过调控 TGF-β1/Smad3 信号通路抑制子宫内膜纤维化,进而达到治疗 IUA 的作用。

[**关键词**] GNMT;宫腔粘连;纤维化;TGF-β1/Smad3
[**中图法分类号**] R345; R394.6; R711.32 [**文献标志码**] A

GNMT inhibits intrauterine adhesion fibrosis through TGF-β1/Smad3 signaling pathway and its mechanism

GU Hong, WANG Jia, ZHANG Wenwen, YANG Xiao, HUANG Xiyue, ZHANG Yingfeng, MAO Yanhua, LI Changjiang, CHEN Qiuhong, HUANG Jinglin, LIU Qi, WEI Ling, SUN Congcong Department of Obstetrics and Gynecology, University-Town Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing, 401331, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of glycine N-methyl transferase (GNMT) on intrauterine adhesion (IUA) fibrosis and its related mechanism. **Methods** *In vivo* experiment: A total of 36 healthy female SD rats (SPF grade, 6~8 weeks old and weighing from 180~220 g) were subjected in this study. IUA model of SD rats and IUA model of GNMT overexpressed rats were established. RT-qPCR and immunofluorescence assay were applied to detect GNMT expression level in normal uterus and model group. RT-qPCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein levels of fibrosis-related molecules

[**基金项目**] 重庆市教委科研项目(KJQN202100460,KJQN202200462)
[**通信作者**] 孙聪聪,E-mail: 800344@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

and the activation of TGF-β1/Smad3 signaling pathway in each group. The number of endometrial glands in each group was observed by HE staining. Masson staining was used to analyze the severity of endometrial fibrosis in each group. *In vitro* experiment: transformed human endometrial stromal cells (THESCs) fibrotic phenotype model was constructed using TGF-β1, and THESCs stably transfected with GNMT overexpression lentvirus were treated with TGF-β1. RT-qPCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of fibrosis-related molecules. The expression of TGF-β1/Smad3 signaling pathway was detected by Western blotting. TGF-β1/Smad3 signaling pathway was activated by TGF-β1/Smad signaling pathway activator (SRI-011381), and the expression of TGF-β1/Smad3 signaling pathway and key molecular proteins of fibrosis phenotype was measured with Western blotting. **Results** *In vivo* experiment, the mRNA and protein expression levels of GNMT were significantly decreased in the IUA rats than the control rats ($P<0.05$). Overexpression of GNMT decreased the mRNA and protein levels of fibrosis related molecules, Collagen Ⅰ, Collagen Ⅲ and FN in the IUA rats ($P<0.05$), and decreased the phosphorylation levels of TGF-β1 and its downstream Smad3 protein ($P<0.05$). HE and Masson staining showed that overexpression of GNMT could increase the number of endometrial glands and reduce the severity of fibrosis in the IUA rats ($P<0.05$). *In vitro* experiments: overexpression of GNMT decreased the mRNA and protein levels of Collagen Ⅰ, Collagen Ⅲ and FN associated with fibrotic phenotype of THESCs ($P<0.05$), and reduced the phosphorylation level of Smad3 protein, downstream of TGF-β1 ($P<0.05$). After activation of TGF-β1/Smad3 signaling pathway, the protein levels of TGF-β1/Smad3 signaling pathway and downstream fibrosis phenotype molecules, Collagen III and FN, were significantly decreased in the LV-GNMT+SRI-011381 group. **Conclusion** Overexpression of GNMT can inhibit endometrial fibrosis by regulating TGF-β1/Smad3 signaling pathway, thus achieving therapeutic effect on IUA.

[**Key words**] glycine N-methyl transferase; intrauterine adhesion; fibrosis; TGF-β1/Smad3

Supported by the Scientific Research Project of Chongqing Education Commission (KJQN202100460, KJQN202200462). Corresponding author: SUN Congcong, E-mail: 800344@hospital.cqmu.edu.cn

宫腔粘连(intrauterine adhesions,IUA)是一种因宫腔有创操作、感染等多种病因引起的子宫内膜基底层损伤,引发异常的子宫内膜细胞增殖与分化,妨碍内膜正常的修复机制,进而导致子宫腔部分或完全粘连的疾病[1-2],其主要临床表现为月经失调、流产及不孕[3]。然而,IUA 的发病机制尚未完全明确,目前存在多种假说和理论[4]。相关研究表明,DNA 甲基化与多种纤维化疾病关系密切[5]。而 GNMT 作为甲基代谢中的核心调节酶,具有不可或缺的功能[6],它通过将甲基从 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)向甘氨酸的转移,生成 S-腺苷高半胱氨酸(SAH)和肌氨酸,进而参与多种甲基转移酶反应,其在细胞中还发挥着积极的防御 DNA 损伤的作用,对维持细胞稳态和基因组完整性至关重要[7-8]。LIU 等[9]的研究揭示了 GNMT 对细胞外基质(extracellular matrix,ECM)积累的调控作用,发现当 GNMT 过表达后,ECM 的积累减少;相反,当 GNMT 基因被敲低后,ECM 的积累增加。另一项由 FANG 等[10]进行的研究进一步支持了 GNMT 在纤维化过程中的作用,发现 GNMT 敲除小鼠出现了肝纤维化,而在过表达 GNMT 后,肝纤维化相关指标得到了改善。上述证据突出 GNMT 在调节纤维化发生发展中的关键作用,由此推断,过表达 GNMT 有望减轻组织纤维化程度。

已有研究报道指出,在 IUA 患者和相应的动物模型中,子宫内膜组织的 TGF-β1 及 Smad3 表达水平显著升高,这提示 TGF-β1/Smad3 信号通路可能促进了 ECM 和胶原纤维的沉积,进而促进 IUA 的形成[11]。TGF-β1 是目前已知致纤维化效果最明显的因子之一,能与其特异性受体紧密结合,进而触发下游的 Smad3 信号通路,发挥促纤维化作用[12-14]。鉴于子宫内膜纤维化是 IUA 的关键病理过程[1],抑制子宫内膜纤维化成为预防和治疗 IUA 的关键所在[3,15-16]。因此,通过靶向干预 TGF-β1/Smad3 信号通路以抑制子宫内膜纤维化,成为治疗 IUA 的有效策略。然而,关于 GNMT 如何改善 IUA 的具体机制仍不明确,特别是它是否通过调控 TGF-β1/Smad3 信号通路来抑制 IUA 纤维化的发生和发展,这仍有待进一步的深入研究。为此,本研究旨在通过过表达 GNMT,来探究相关纤维化分子(Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、FN)的表达变化及 TGF-β1/Smad3 信号通路激活情况,从而证明 GNMT 可能通过调控 TGF-β1/Smad3 信号通路来发挥抑制子宫内膜纤维化的作用。这将有助于更深入地理解 IUA 的发病机制,并为 IUA 的预防和治疗提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本实验采用了由重庆医科大学实验动物中心提供的36只SPF级健康雌性SD大鼠,周龄介于6~8周,体质量180~220 g。大鼠均按照常规条件进行饲养,以确保其健康状态。本动物实验方案已通过重庆医科大学实验动物管理和使用委员会的伦理审查(IACUC-CQMU-2024-0021),确保研究符合动物福利和伦理标准。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12培养基购自美国Gibico公司,而胎牛血清购自德国PAN公司。此外,实验所需的DAPI、抗荧光淬灭封片液、RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒以及0.25%胰酶细胞消化液均采购自上海碧云天生物技术有限公司,而TGF-β1/Smad信号通路激活剂(SRI-011381)、二甲基亚砜(DMSO)则购自美国MCE公司。关于Western blot实验的关键试剂,一抗(兔抗)p-Smad3和Smad3购自英国Abcam公司,其他一抗如GNMT、Collagen Ⅰ、GAPDH、β-actin(鼠抗),TGF-β1 Tubulin、FN(兔抗),以及对应的二抗(山羊抗鼠IgG、山羊抗兔IgG)均购自武汉三鹰生物技术有限公司。另外,一抗(鼠抗)TGF-β1购自圣克鲁斯生物技术公司,而Collagen Ⅰ和Collagen Ⅲ(兔抗)则购自杭州华安生物技术有限公司。对于分子生物学实验,实验所用的TRIzol试剂、反转录PCR试剂盒和TB green购自日本TaKaRa公司。快速RNA提取试剂盒则购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。PCR引物购自上海生物工程有限公司。HE染色试剂盒和Masson三色染色试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司,用于组织切片染色分析。慢病毒LV-GNMT和对照慢病毒LV-GFP均购自北京擎科生物科技股份有限公司,而腺相关病毒AAV-GNMT和对照腺相关病毒AAV-GFP购自北京和元生物科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及构建模型 将12只健康雌性SD大鼠按随机数字表法分为2组:假手术组(Sham组)和模型组(IUA组)。在Sham组中,大鼠仅接受开腹操作,不进行其他任何手术处理。而在IUA组,参照文献[17]中描述的方法构建IUA动物模型:选择大鼠发情期造模,使用棉线将大鼠左侧子宫近端和远端结扎,将95%乙醇注射到结扎后的宫腔内,2 min后可见大鼠子宫表面变为白色,此时吸出95%乙醇,再使用生理盐水冲洗宫腔2~3遍,剪开子宫两端结扎的棉线。大鼠子宫组织包含子宫体和子宫颈,而子宫体包含子宫内膜层、肌层和浆膜层,因子宫内膜层取材较为困难,遂选取子宫体组织进行实验。造模后2周,选择在大鼠发情期收集大鼠子宫组织,进行HE染色和Masson染色,以准确评估造模的效果。

为了更深入地研究GNMT在宫腔粘连中的作用,将24只健康雌性SD大鼠随机分为4组:假手术组(Sham组)、模型组(IUA组)、AAV-GFP组和AAV-GNMT组。与前述操作相同,Sham组的大鼠仅接受腹腔打开的操作。而IUA组、AAV-GFP组和AAV-GNMT组的大鼠则均按照文献[17]中的方法构建IUA模型:选择大鼠发情期造模,使用棉线将大鼠左侧子宫近端和远端结扎,将95%乙醇注射到结扎后的宫腔内,2 min后可见大鼠子宫表面变为白色,此时吸出95%乙醇,再使用生理盐水冲洗宫腔2~3遍,剪开子宫两端结扎的棉线。AAV-GFP组中,在造模前4周向左侧子宫腔内注射滴度为2×10^{11}的对照腺相关病毒液20 μL,并在注射10 min后松开近端和远端缝扎线。而在AAV-GNMT组中,同样在造模前4周向左侧子宫腔内注射滴度为2×10^{11}的过表达GNMT腺相关病毒液20 μL,并在注射10 min后松开近端和远端缝扎线。在造模完成后的2周,选择在大鼠发情期收集各组的大鼠子宫组织,并进行深入的分子生物学和病理学分析。

1.2.2 细胞培养及处理 子宫内膜间质细胞(transformed human endometrial stromal cells,THESCs)购自ATCC。培养于含10%优质胎牛血清和1%青-链霉素溶液的DMEM/F12培养基中。首先使用慢病毒对THESCs进行转染,将THESCs接种于6孔板中。当细胞生长至占据培养孔底面积的20%~30%时,加入滴度为1×10^{8}TU/mL、病毒感染复数(MOI)为6的慢病毒(LV-GNMT)和对照慢病毒(LV-GFP),并以浓度为4 μg/mL的Polybrene作为促转染试剂。转染24 h后,更换新鲜的培养基,继续培养48 h。随后,观察细胞的荧光转染情况,并通过RT-qPCR检测GNMT在各组中的相对表达量。在确认GNMT成功转染THESCs后,进一步进行分组培养。分组如下:空白对照组(仅使用含10%胎牛血清和1%青-链霉素溶液的DMEM/F12培养基进行常规培养),TGF-β1组(仅给予含5 ng/mL TGF-β1的10%胎牛血清和1%青-链霉素溶液的DMEM/F12培养基进行刺激),LV-GFP组(转染对照慢病毒成功的THESCs,并给予与TGF-β1组相同的刺激),LV-GNMT组(转染GNMT过表达慢病毒成功的THESCs,并给予与TGF-β1组相同的刺激)。经过72 h的培养后,收集各组细胞,利用RT-qPCR和Western blot检测纤维化表型相关分子的mRNA和蛋白表达水平,以及p-Smad3和Smad3蛋白的表达情况。为进一步验证GNMT对TGF-β1/Smad3信号通路具有抑制作

用,使用 TGF-β1/Smad 信号通路激活剂(SRI-011381)(10 μmol/L)激活 LV-GFP 组和 LV-GNMT 组的 TGF-β1/Smad3 信号通路,以二甲基亚砜(DMSO)作为对照,经过 48 h 的培养后,收集各组细胞,利用 Western blot 技术深入检测 TGF-β1/Smad3 信号通路及纤维化表型相关分子的蛋白表达水平。

1.2.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 检测 收集子宫组织样本和细胞,采用 TRIzol 试剂和快速 RNA 提取试剂盒提取子宫组织和细胞的总 RNA,并测得 RNA 浓度。根据反转录试剂盒说明书,反转录 RNA 合成 CDNA,再使用 SYBR Green RT-qPCR 检测试剂盒检测 mRNA 的相对表达量。扩增程序为:首先在 95 ℃下预变性 30 s,确保模板与引物的有效结合。随后,在 95 ℃下变性 5 s,60℃下退火并延伸 30 s,这一步骤重复 40 次,以确保 PCR 产物的充分扩增。最后,在 60 ℃下进行了额外的 30 s 延伸,以确保 PCR 产物都充分合成。内参为 GAPDH,以相应的对照组为 1,然后用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 计算其他各组的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

种属	引物名称	引物序列(5′→3′)
人	GAPDH	上游 AACAGCCTCAAGATCATCAGC
		下游 ATGAGTCCTTCCACGATACCAA
	GNMT	上游 ACTGGATGACTCTGGACAA
		下游 ACTGAGGATGTGGTCGT
	Collagen Ⅰ	上游 GAGGGCCAAGACGAAGACATC
		下游 CAGATCACGTCATCGCACAAAC
	Collagen Ⅲ	上游 TTGAAGGAGGATGTTCCCATCT
		下游 ACAGACACATATTTGGCATGGTT
	FN	上游 ACAACCCCTACAAACGGCCA
		下游 TAGTCAATGCCCGGCTCCAG
大鼠	GAPDH	上游 ATGGCTACAGCAACAGGGT
		下游 TTATGGGGTCTGGGATGG
	GNMT	上游 CCACCCTAAGACCATCGC
		下游 GGCAAGGGAAGGCTGTATT
	Collagen Ⅰ	上游 CGATCCTGCCGATGTCGCTATCC
		下游 GTCTTGCCCCAAGTTCCGGTGTG
	Collagen Ⅲ	上游 TTTGTGCAATGTGGGACCTG
		下游 AATGGGATCTCTGGGTTGGG
	FN	上游 AAGTGGGATCGTCAGGGAGA
		下游 CACTGGGGTGTGGATTGACC

1.2.4 Western blot 检测相关蛋白表达 采用 RIPA 裂解液提取蛋白,测出蛋白吸光度,并计算出样品蛋白浓度。根据蛋白浓度决定上样量,进行电泳。完成电泳后,将样品转印到 PVDF 膜上。随后,使用脱脂奶粉在常温下封闭 1 h,以减少非特异性结合。将一抗加入并与膜在 4 ℃下孵育 12~16 h,以确保充分结合目标蛋白。完成一抗孵育后,用 1× TBST 缓冲液仔细清洗膜 3 次,每次 10 min,以去除未结合的抗体,再将二抗加入并与膜在常温下孵育 1 h。同样地,孵育完成后,又用 1× TBST 缓冲液清洗膜 3 次,每次 10 min。最后,在曝光机上进行了显影和采图。

1.2.5 HE 和 Masson 染色 大鼠均选取左侧子宫组织,并对其进行横切面的石蜡包埋与切片处理。根据苏木素-伊红(HE)高清恒染试剂盒、Masson 三色染色液的说明书,进行 HE 和 Masson 染色操作。HE 染色能够清晰地观察各组子宫内膜腺体的数量从而了解不同处理条件对子宫内膜的影响。而 Masson 染色则用于评估子宫内膜胶原纤维的沉积情况,镜检下胶原纤维呈现为蓝色。

1.2.6 免疫荧光检测 将石蜡切片经脱蜡至水、抗原修复、封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAPI 复染细胞核、淬灭自发荧光、封片等操作步骤后,于电子显微镜下采集图像,观察 GNMT 蛋白的表达,GNMT 阳性为红色。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism9.0 统计软件对数据进行深入分析。所有数据均以计量数据的形式呈现,具体表示 $\bar{x}\pm s$。在比较两组数据时,采用独立样本 t 检验。对于多组间的比较,则选择单因素方差分析。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

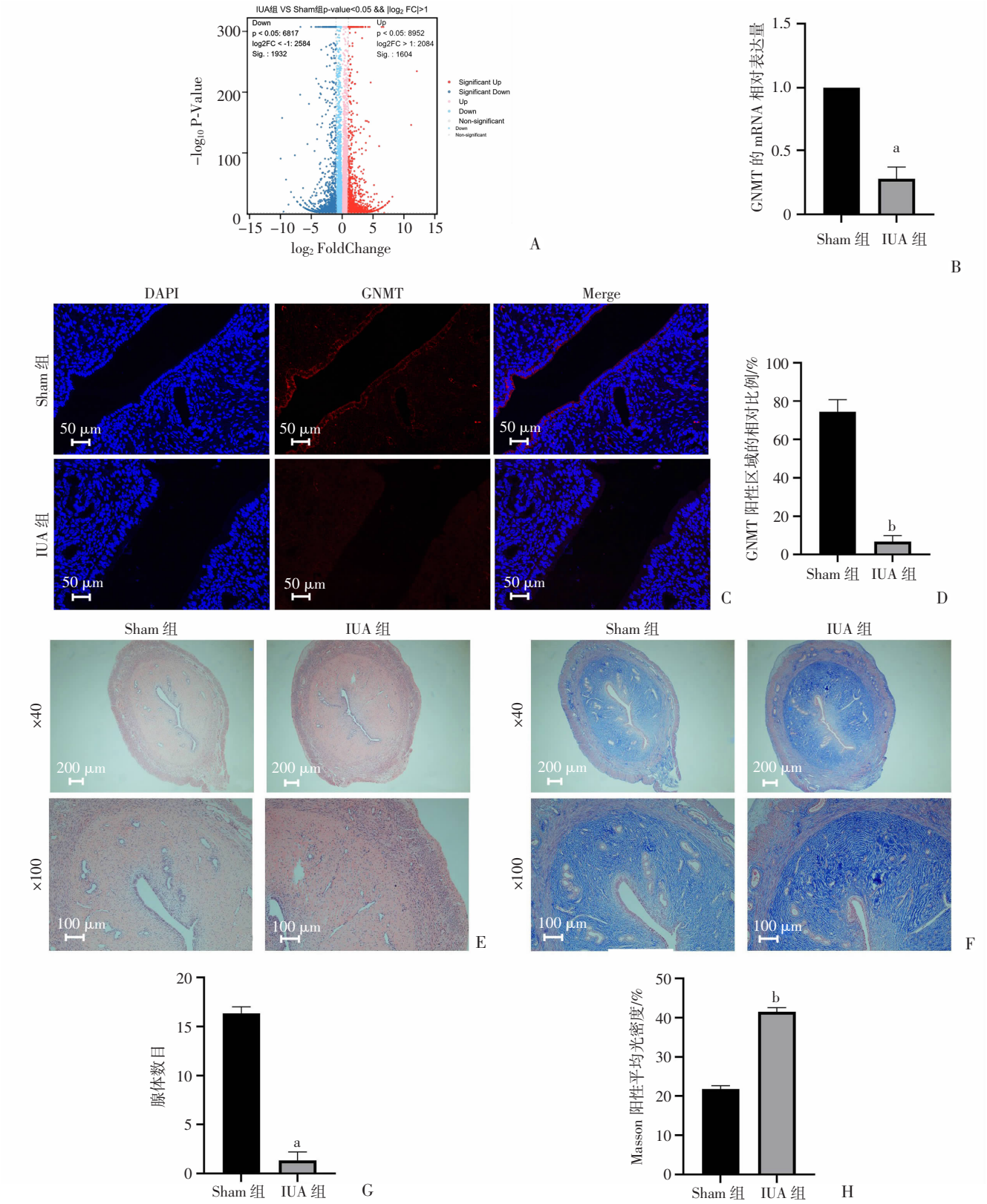
2 结果

2.1 IUA 大鼠模型中 GNMT 的表达明显下调

在正常子宫腔结构中,腺体均匀分布于子宫内膜,胶原纤维分布均匀且排列有序(图 1E、F)。IUA 大鼠的宫腔形态明显狭窄,腺体数量显著减少,同时胶原纤维沉积显著增加(图 1E~H,$P<0.001$),提示 IUA 大鼠造模成功。对 Sham 组大鼠与 IUA 大鼠子宫组织进行转录组测序,结果显示:与 Sham 组(对照组)比较,IUA 组中 GNMT 的表达水平显著下调(图 1A)。为进一步验证这一发现,采用 RT-qPCR 和免疫荧光技术对 GNMT mRNA 和蛋白表达水平进行检测。结果显示:与 Sham 组比较,IUA 大鼠子宫 GNMT 表达水平明显下降(图 1B~D,$P<0.05$)。

2.2 过表达 GNMT 抑制 IUA 大鼠子宫纤维化

转染 AAV-GNMT 后,采用 RT-qPCR 检测大鼠子宫 GNMT mRNA 水平,发现其显著上调(图 2A,$P<0.05$),证实 AAV-GNMT 转染成功。进一步构建 IUA 大鼠模型,收集各组子宫组织行 RT-qPCR 和 Western blot 分析。结果显示:与 Sham 组比较,IUA 大鼠子宫纤维化相关分子 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ 和 FN 的 mRNA 及蛋白水平均显著上升;与 IUA 组比较,AAV-GNMT 组大鼠的 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ 及 FN 的 mRNA 和蛋白水平均显著下调(图 2B~D,$P<0.05$)。这一发现表明,过表达 GNMT 可显著抑制 IUA 大鼠子宫中纤维化相关分子的表达。

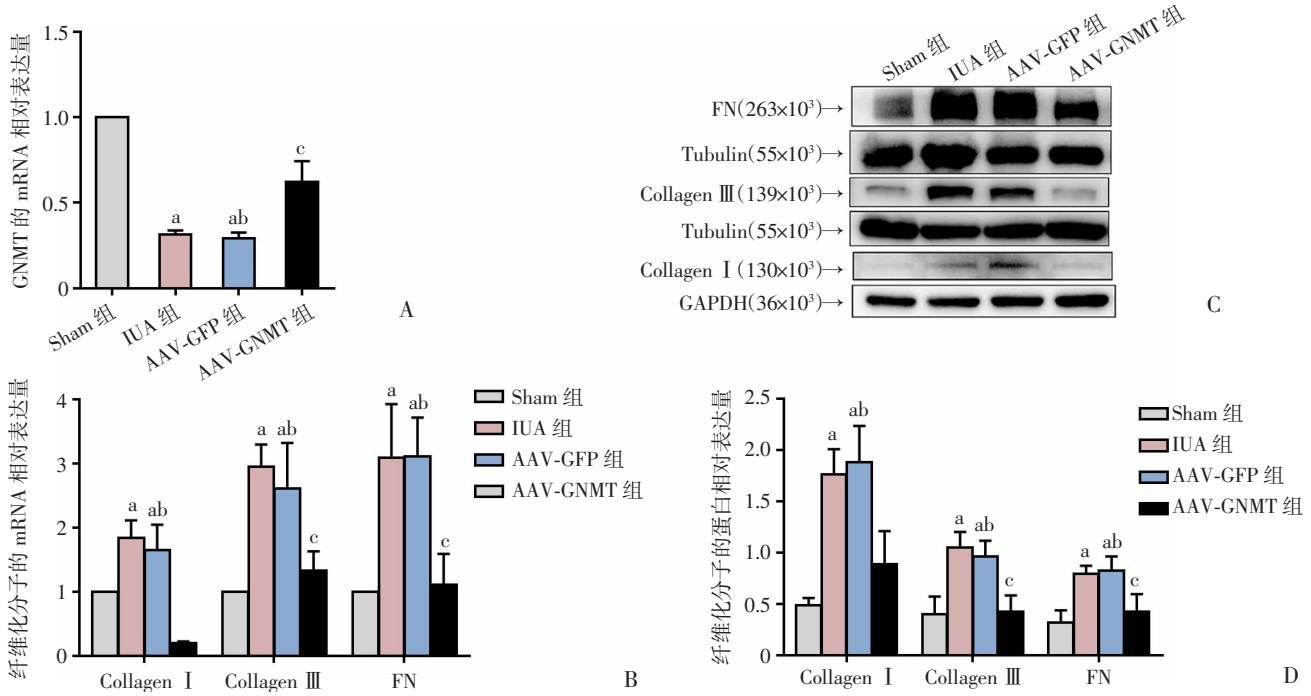


A:转录组测序结果分析;B:RT-qPCR 检测 GNMT 在 Sham 组、IUA 组的 mRNA 表达情况 a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;C:免疫荧光检测 GNMT 在 Sham 组、IUA 组的蛋白表达情况;D:免疫荧光半定量分析,b:$P<0.001$,与 Sham 组比较;E:HE 染色结果;F:Masson 染色结果;G: Sham 组和 IUA 组子宫内膜腺体的数目统计分析 a:$P<0.001$,与 Sham 组比较;H:Sham 组和 IUA 组子宫内膜胶原纤维平均光密度分析 b:$P<0.001$,与 Sham 组比较

图 1 IUA 大鼠子宫 GNMT 表达明显下降

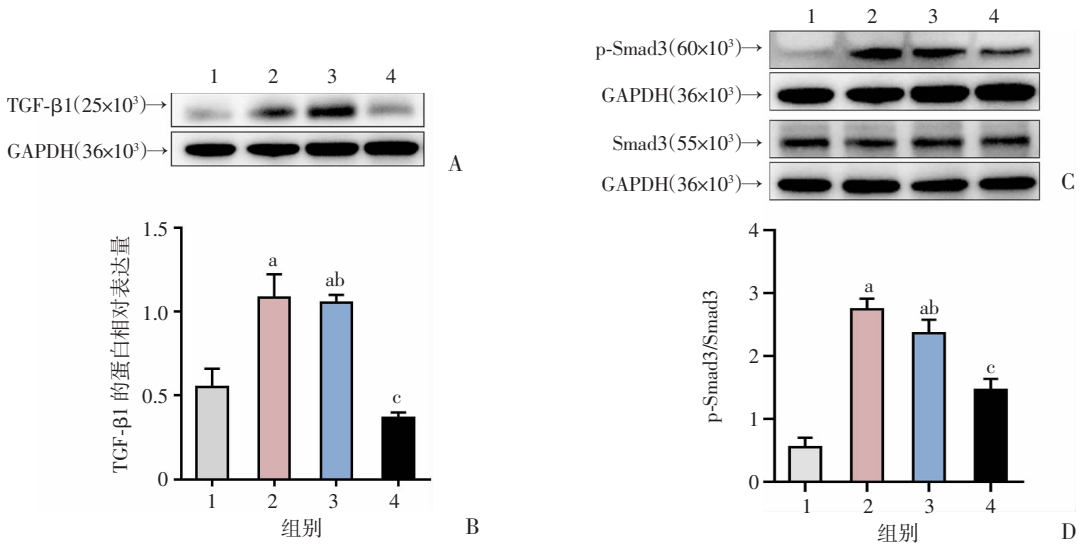
2.3　过表达 GNMT 抑制 IUA 大鼠子宫中 TGF-β1/Smad3 信号通路

Western blot 检测各组大鼠子宫中 TGF-β1/Smad3 信号通路关键分子表达情况,结果显示:与 Sham 组比较,IUA 大鼠子宫中 TGF-β1 及其下游的 Smad3 蛋白磷酸化水平均显著上调;与 IUA 组相比,AAV-GNMT 组大鼠子宫的 TGF-β1 及其下游的 Smad3 蛋白磷酸化水平均出现显著下调(图 3,$P<0.05$),提示过表达 GNMT 对 IUA 大鼠子宫的 TGF-β1/Smad3 信号通路具有显著抑制作用。



A:RT-qPCR 检测各组子宫组织 GNMT 的 mRNA 水平　a:$P<0.001$,与 Sham 组比较;b:$P\geq0.05$,与 IUA 组比较;c:$P<0.05$,与 IUA 组比较; B:RT-qPCR 检测各组子宫纤维化分子的 mRNA 水平　a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P\geq0.05$,与 IUA 组比较;c:$P<0.05$,与 IUA 组比较;C:Western blot 检测各组子宫 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、FN 蛋白水平;D:纤维化相关分子蛋白水平半定量分析　a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P\geq0.05$,与 IUA 组比较;c:$P<0.05$,与 IUA 组比较

图 2　过表达 GNMT 抑制 IUA 大鼠子宫纤维化相关分子水平



1: Sham 组; 2: IUA 组; 3: AAV-GFP 组; 4: AAV-GNMT 组

A: Western blot 检测各组子宫中 TGF-β1 蛋白水平;B:TGF-β1 蛋白水平半定量分析　a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P\geq0.05$,与 IUA 组比较;c:$P<0.01$,与 IUA 组比较;C:Western blot 检测各组子宫中 Smad3 蛋白磷酸化水平;D:Smad3 蛋白磷酸化水平半定量分析 a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P\geq0.05$,与 IUA 组比较;c:$P<0.05$,与 IUA 组比较

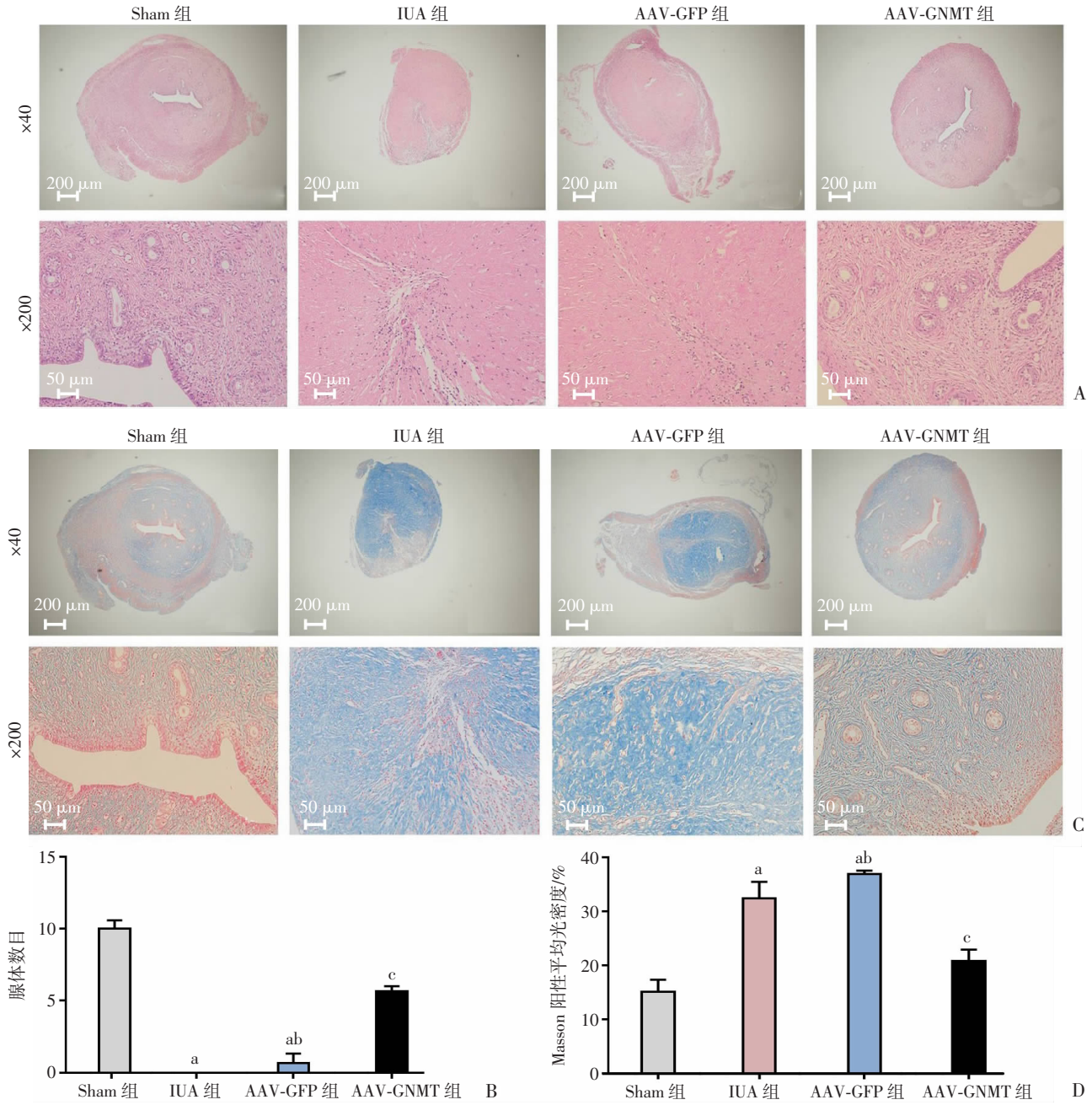
图 3　过表达 GNMT 抑制 IUA 大鼠子宫中 TGF-β1/Smad3 信号通路相关蛋白表达

2.4 过表达 GNMT 抑制 IUA 大鼠子宫内膜纤维化进程

利用 HE 和 Masson 染色评估各组大鼠子宫内膜病理形态,结果显示:与 IUA 组比较,AAV-GNMT 组大鼠的腺体数量显著增加,胶原纤维沉积减少,宫腔形态基本恢复(图 4,$P<0.05$)。这些结果表明,过表达 GNMT 有效促进子宫内膜腺体样结构的生长,并显著抑制子宫内膜纤维化进程。

2.5 过表达 GNMT 抑制 THESCs 纤维化表型

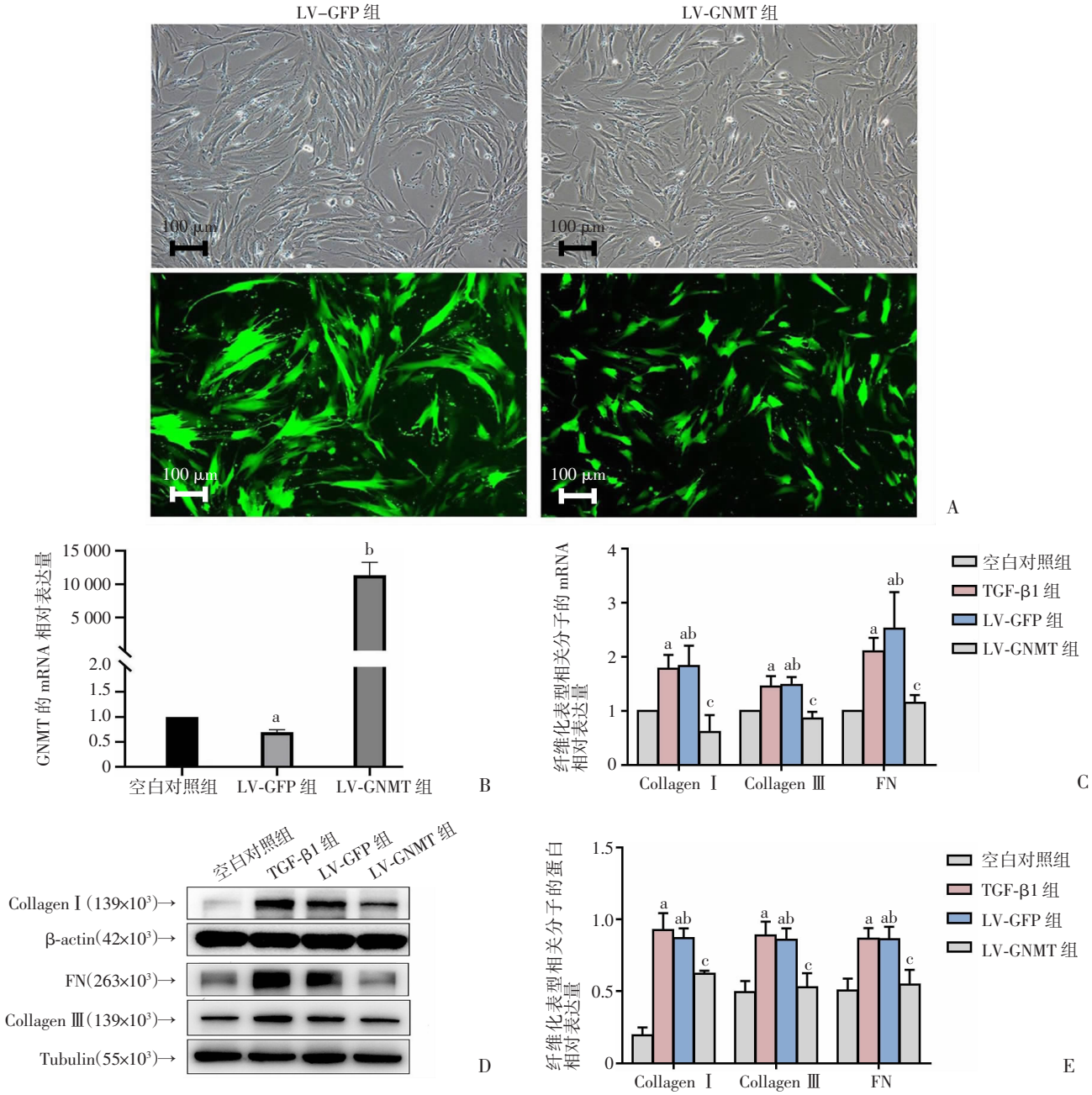
转染 GNMT 过表达慢病毒(LV-GNMT)及其对照病毒(LV-GFP)至 THESCs 72 h 后,利用 RT-qPCR 检测各组细胞中 GNMT 的 mRNA 水平。结果显示:相较于 LV-GFP 组,LV-GNMT 组的 GNMT 表达显著上调(图 5A、B,$P<0.05$),这一结果表明,GNMT 在 THESCs



A:HE 染色观察各组子宫内膜腺体的数量变化情况;B:各组子宫内膜腺体的数目统计分析 a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P\geq0.05$,与 IUA 组比较;c:$P<0.01$,与 IUA 组比较;C:Masson 染色观察各组子宫组织胶原纤维沉积情况;D:各组子宫组织胶原纤维平均光密度分析 a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P\geq0.05$,与 IUA 组比较;c:$P<0.05$,与 IUA 组比较

图 4 过表达 GNMT 抑制 IUA 大鼠子宫内膜纤维化进程

中过表达成功。随后,在给予 TGF-β1 处理后,收集空白对照组、TGF-β1 组、LV-GFP 组和 LV-GNMT 组的细胞样本。RT-qPCR 和 Western blot 检测纤维化表型相关分子的 mRNA 和蛋白水平。结果表明,相较于空白对照组,TGF-β1 组中的 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 FN 的 mRNA 和蛋白水平均显著上调,证实 TGF-β1 可有效诱导 THESCs 纤维化表型;与 TGF-β1 组比较,LV-GNMT 组中,Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 FN 的 mRNA 和蛋白水平均呈现明显的下调趋势(图 5C、D、E,$P<0.05$)。上述结果表明:过表达 GNMT 能够有效抑制 THESCs 纤维化表型。



A:慢病毒转染 THESCs 成功;B:RT-qPCR 检测 GNMT 的 mRNA 水平　a:$P\geq0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.001$,与 LV-GFP 组比较;C:RT-qPCR 检测纤维化表型相关分子的 mRNA 水平　a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P\geq0.05$,与 TGF-β1 组比较;c:$P<0.05$,与 TGF-β1 组比较;D:Western blot 检测细胞各组中纤维化表型相关分子蛋白水平;E:纤维化表型相关分子蛋白水平半定量分析　a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P\geq0.05$,与 TGF-β1 组比较;c:$P<0.05$,与 TGF-β1 组比较

图 5　过表达 GNMT 抑制 THESCs 纤维化表型相关分子的表达

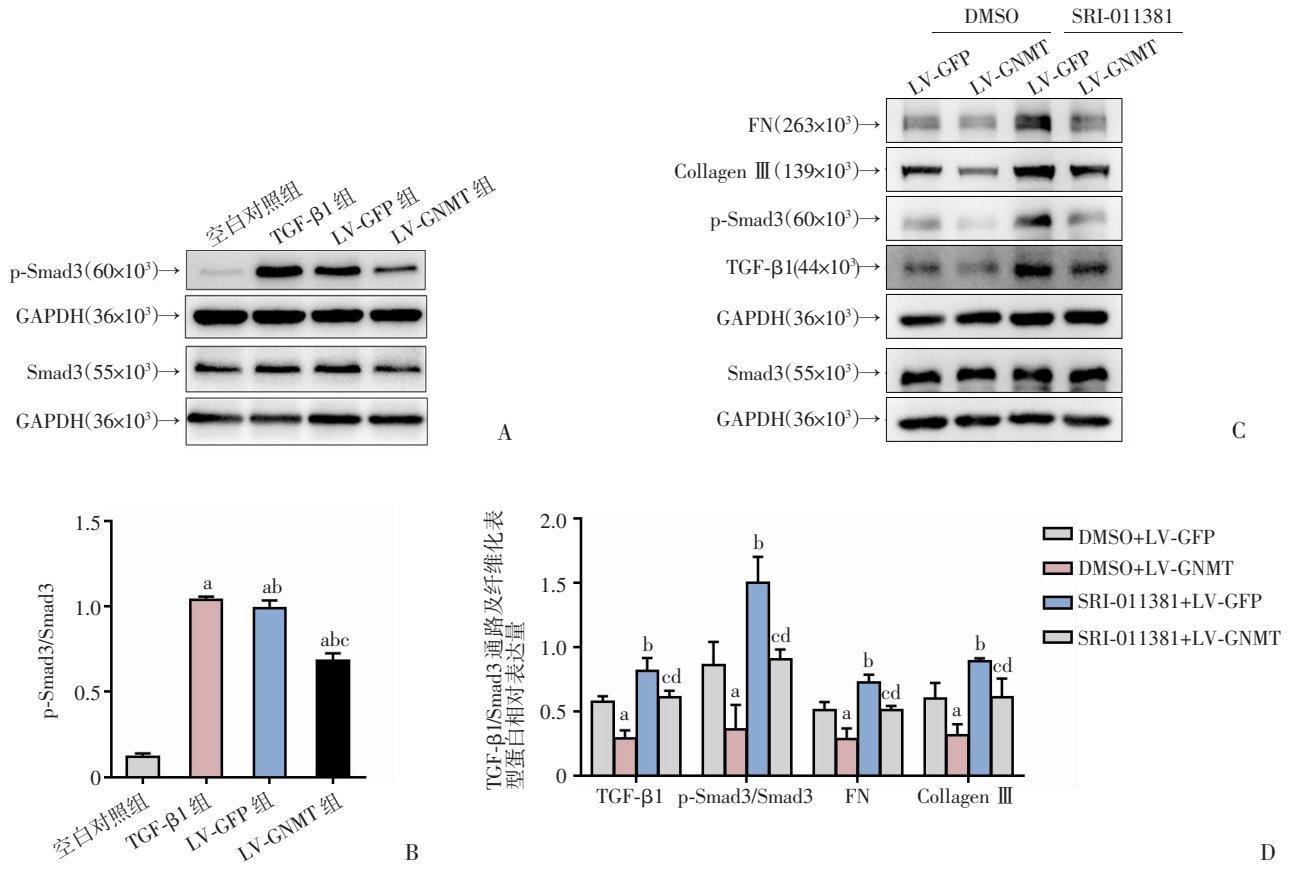
2.6 过表达 GNMT 通过 TGF-β1/Smad3 信号通路抑制 THESCs 纤维化表型

Western blot 检测 TGF-β1/Smad3 信号通路及 THESCs 纤维化表型中的关键蛋白水平。结果表明,相较于空白对照组,TGF-β1 组中 TGF-β1 下游的 Smad3 蛋白磷酸化水平显著上升;相较于 TGF-β1 组,LV-GNMT 组中这一蛋白磷酸化水平明显下降;相较于 LV-GFP+DMSO 组,LV-GFP+SRI-011381 组中 TGF-β1/Smad3 信号通路及下游的纤维化表型相关分子蛋白水平均明显上升;相较于 LV-GFP+SRI-011381 组,LV-GNMT+SRI-011381 组中 TGF-β1/Smad3 信号通路及下游的纤维化表型相关分子蛋白水平均明显降低。(图 6,$P<0.05$)。这一结果表明,过表达 GNMT 通过 TGF-β1/Smad3 信号通路抑制 THESCs 纤维化表型相关分子的表达。

3 讨论

宫腔粘连的主要病理特征是子宫内膜发生纤维化,这一病理变化在 IUA 患者及大鼠子宫组织的活检中得到了明确证实,表现为纤维组织取代了大量内膜组织[15]。因此,有效遏制子宫内膜纤维化的发生与发展,成为预防和治疗宫腔粘连的核心策略[3,15-16],对于维护女性生殖健康具有重要的意义。

在本研究中,采用转录组测序技术对 IUA 组和 Sham 组大鼠子宫进行了对比分析。结果显示:与 Sham 组比较,IUA 组大鼠子宫中 GNMT 表达显著下调。随后的实验进一步证实了测序结果的准确性。GNMT 作为一种关键的调控因子,通过精细控制 SAM 和 SAH 的比例,实现对细胞甲基化过程的调节[9]。SAM 作为一种重要的甲基供体,在氧化应激反应中发



A:Western blot 检测细胞各组中 Smad3 蛋白磷酸化水平;B:Smad3 蛋白磷酸化水平半定量分析 a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P\geq0.05$,与 TGF-β1 组比较;c:$P<0.05$,与 TGF-β1 组比较;C:Western blot 检测细胞各组中 TGF-β1/Smad3 信号通路及下游的纤维化表型相关分子蛋白水平;D:TGF-β1/Smad3 信号通路及下游的纤维化表型相关分子蛋白水平半定量分析 a:$P<0.05$,与 DMSO+LV-GFP 组比较;b:$P<0.05$,与 DMSO+LV-GFP 组比较;c:$P<0.05$,与 DMSO+LV-GNMT 组比较;d:$P<0.05$,与 SRI-011381+LV-GFP 组比较

图 6 过表达 GNMT 通过 TGF-β1/Smad3 信号通路抑制 THESCs 纤维化表型相关分子的表达

挥着化学预防的作用,有助于阻止纤维化进程的推进[18]。此外,SAM 对肝纤维化具有缓解作用[19-20],其机制之一是通过降低 TGF-β1 的水平,从而减轻纤维化刺激[19]。TGF-β 在促纤维化过程中发挥至关重要的作用,并在多个纤维化组织中大量表达[21]。特别是 TGF-β1,它是当前已知致纤维化效果最为显著的因子之一,其经典的信号转导途径涉及与受体的紧密结合,进而激活下游的 Smad 蛋白,从而在促纤维化过程中扮演着举足轻重的角色[12-14]。因此,GNMT 通过调控 SAM 的比例,降低 TGF-β1 的水平,进而抑制 TGF-β1/Smad3 信号通路,达到抑制子宫内膜纤维化的作用。

近年研究表明,GNMT 对肝脏和肾脏的纤维化疾病具有积极的改善效果,其主要作用机制在于通过减少 ECM 的沉积来抑制纤维化进程[9-10]。鉴于 IUA 的病理特征是子宫内膜纤维化[15],调控 GNMT 的表达可能为 IUA 的治疗和预防提供新的有效途径。为了更深入探究 GNMT 与 IUA 之间的潜在联系,课题组进行了体内和体外两方面实验。结果显示:当 GNMT 过表达后,无论是体内还是体外环境,Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 FN 的 mRNA 及蛋白水平均显著下调。此外,通过 HE 染色发现,子宫腔的形态在 GNMT 过表达后基本恢复,子宫腺体的数量也有明显的增加。Masson 染色则进一步揭示了子宫内膜的纤维化程度在 GNMT 过表达后得到了显著的减轻。综上所述,过表达 GNMT 能够抑制子宫内膜纤维化相关分子的 mRNA 和蛋白水平表达,有效促进子宫内膜修复。

FANG 等[10]研究发现,过表达 GNMT 可能干扰肝细胞中的 TGF-β/Smad 信号通路,从而阻止肝细胞凋亡并促进肝细胞再生。SALMA 等[22]的研究发现,在 IUA 患者和 IUA 家兔模型中,TGF-β1 和 Smad3 的 mRNA 及蛋白水平均显著高于对照组。结合上述研究,推测 GNMT 可能通过抑制 TGF-β1/Smad3 信号通路来减轻 IUA 纤维化程度。为验证这一推测,课题组设计了体内和体外实验。体内实验结果表明,当过表达 GNMT 时,TGF-β1 及其下游的 Smad3 蛋白磷酸化水平均有所下降。体外实验也得出了相似的结论:GNMT 过表达后,TGF-β1 下游的 Smad3 蛋白磷酸化水平下降。在使用 TGF-β1/Smad 信号通路激活剂(SRI-011381)激活通路后,过表达 GNMT 组 TGF-β1/Smad3 及纤维化表型相关分子蛋白水平均有所下降。因此,得出结论:过表达 GNMT 通过抑制 TGF-β1/Smad3 信号通路来减轻 IUA 纤维化程度。

综上所述,通过过表达 GNMT,观察到其抑制 TGF-β1/Smad3 信号通路并降低 IUA 子宫内膜纤维化相关分子 mRNA 和蛋白水平。这一作用不仅促进了子宫腔形态的恢复,刺激子宫内膜腺体增生、降低纤维化面积,从而达到治疗 IUA 的作用。这一发现不仅为深入理解 IUA 的发病机制提供理论基础,还为未来预防和治疗 IUA 研究指明了新方向。

参考文献:

[1] WU F L, LEI N J, YANG S Y, *et al*. Treatment strategies for intrauterine adhesion: focus on the exosomes and hydrogels [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1264006. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1264006.

[2] 段华, 甘露. 子宫内膜损伤与修复存在的问题和规范化管理[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2022, 38(9): 865-868. DOI: 10.19538/j.fk2022090101.
DUAN H, GAN L. Problems in endometrial injury and repair and the standardized management[J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2022, 38(9): 865-868. DOI: 10.19538/j.fk2022090101.

[3] 桑宇超, 李淑仙, 傅松涛. 干细胞修复宫腔粘连的研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2023, 32(6): 476-478. DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2023.06.032.
SANG Y C, LI S X, FU S T. Research progress of stem cells in repairing intrauterine adhesions[J]. Prog Obstet Gynecol, 2023, 32(6): 476-478. DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2023.06.032.

[4] 操媛, 王俊杰. 宫腔粘连临床治疗研究进展[J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2023, 10(20): 35-37.
CAO Y, WANG J J. Progress in clinical treatment of intrauterine adhesions [J]. Electron J Pract Gynecol Endocrinol, 2023, 10(20): 35-37.

[5] 俞曼殊, 史俊, 盛梅笑. DNA 甲基化在纤维化疾病中的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(9): 2177-2181. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2018.09.031.
YU M S, SHI J, SHENG M X. Research progress of DNA methylation in fibrotic diseases[J]. J Chin Med, 2018, 36(9): 2177-2181. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2018.09.031.

[6] LUKA Z, PAKHOMOVA S, LOUKACHEVITCH L V, *et al*. Differences in folate-protein interactions result in differing inhibition of native rat liver and recombinant glycine N-methyltransferase by 5-methyltetrahydrofolate [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1824(2): 286-291. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.10.008.

[7] CHANG M M, LIN C N, FANG C C, *et al*. *Glycine* N-methyltransferase inhibits aristolochic acid nephropathy by increasing CYP3A44 and decreasing NQO1 expression in female mouse hepatocytes[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 6960. DOI: 10.1038/s41598-018-22298-6.

[8] WANG Y C, LIN W L, LIN Y J, *et al*. A novel role of the tumor suppressor GNMT in cellular defense against DNA

damage[J]. Int J Cancer, 2014, 134(4): 799-810. DOI: 10.1002/ijc.28420.

[9] LIU X Q, JIANG L, LEI L, *et al*. Carnosine alleviates diabetic nephropathy by targeting GNMT, a key enzyme mediating renal inflammation and fibrosis[J]. Clin Sci, 2020, 134(23): 3175-3193. DOI: 10.1042/CS20201207.

[10] FANG C C, WU C F, LIAO Y J, *et al*. AAV serotype 8-mediated liver specific GNMT expression delays progression of hepatocellular carcinoma and prevents carbon tetrachloride-induced liver damage[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 13802. DOI: 10.1038/s41598-018-30800-3.

[11] 郭罗培, 隋龙. TGF-β在宫腔粘连纤维化中的研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2018, 27(5): 394-396. DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2018.05.021.
GUO L P, SUI L. Research progress of TGF-β in intrauterine adhesion fibrosis[J]. Prog Obstet Gynecol, 2018, 27(5): 394-396. DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2018.05.021.

[12] VANDER ARK A, CAO J C, LI X H. TGF-β receptors: in and beyond TGF-β signaling[J]. Cell Signal, 2018, 52: 112-120. DOI: 10.1016/j.cellsig.2018.09.002.

[13] MACIAS M J, MARTIN-MALPARTIDA P, MASSAGUÉ J. Structural determinants of Smad function in TGF-β signaling[J]. Trends Biochem Sci, 2015, 40(6): 296-308. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.03.012.

[14] 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.

[15] 龚滢欣, 隋龙. 上皮间质转化在宫腔粘连中的研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2022, 38(5): 574-576. DOI: 10.19538/j.fk2022050122.
GONG Y X, SUI L. Research progress of epithelial-mesenchymal transition in intrauterine adhesion[J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2022, 38(5): 574-576. DOI: 10.19538/j.fk2022050122.

[16] 李满超, 彭金涛, 史亚男, 等. 骨桥蛋白调控骨髓间充质干细胞抑制宫腔粘连内膜纤维化的作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(8): 897-902. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.002785.
LI M C, PENG J T, SHI Y N, *et al*. Effect of osteopontin regulating bone marrow mesenchymal stem cells on inhibiting endometrial fibrosis of intrauterine adhesions[J]. J Chongqing Med Univ, 2021, 46(8): 897-902. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.002785.

[17] 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.

[18] WANG K F, FANG S H, LIU Q, *et al*. TGF-β1/p65/MAT2A pathway regulates liver fibrogenesis via intracellular SAM[J]. EBioMedicine, 2019, 42: 458-469. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.03.058.

[19] NIETO N, CEDERBAUM A I. S-adenosylmethionine blocks collagen I production by preventing transforming growth factor-beta induction of the COL1A2 promoter[J]. J Biol Chem, 2005, 280(35): 30963-30974. DOI: 10.1074/jbc.M503569200.

[20] SIMILE M M, BANNI S, ANGIONI E, *et al*. 5′-Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication[J]. J Hepatol, 2001, 34(3): 386-394. DOI: 10.1016/s0168-8278(00)00078-7.

[21] 杨慧楠, 吕达, 王乐, 等. TGF-β/Smad信号通路中关键基因在肺纤维化进程中的功能[J]. 环境与职业医学, 2022, 39(7): 745-751. DOI: 10.11836/JEOM21599.
YANG H N, LYU D, WANG L, *et al*. Functions of key genes involved in TGF-β/Smad signaling pathway in progression of pulmonary fibrosis[J]. J Environ Occup Med, 2022, 39(7): 745-751. DOI: 10.11836/JEOM21599.

[22] SALMA U, XUE M, ALI SHEIKH M S, *et al*. Role of transforming growth factor-β1 and smads signaling pathway in intrauterine adhesion[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 4158287. DOI: 10.1155/2016/4158287.

(**收稿**:2024-03-24;**修回**:2024-05-19)

(编辑 张艺霖)