

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.08.006

人羊膜上皮干细胞联合富血小板血浆对宫腔粘连大鼠纤维化因子、炎症因子的作用 *

王 丽¹ 张梦婷² 陈 阳¹ 魏 琳¹ 王建锋^{3Δ}

(1 西安医学院第一附属医院产科 陕西 西安 710000; 2 西安国际医学中心医院产科 陕西 西安 710000;

3 西北大学附属人民医院妇产科 陕西 西安 710005)

摘要 目的:探究人羊膜上皮干细胞(hAECs)联合富血小板血浆(PRP)对宫腔粘连大鼠的治疗效果,为临床中优化宫腔粘连治疗方法理论基础。**方法:**选用 SPF 级雌性 SD 大鼠共 40 只,依照随机数字表法随机分为空白组(A 组)、假手术组(B 组)、hAECs 组(C 组)、PRP 组(D 组)、hAECs+PRP 组(E 组),每组各 8 只。A 组不做任何处理,B 组仅做麻醉、开腹处理,C 组、D 组、E 组使用搔刮法制备宫腔粘连模型。随后 C 组进行 hAECs 治疗,D 组注射等量生理盐水。D 组进行 PRP 治疗,C 组注射等量生理盐水。E 组进行 hAECs 联合 PRP 治疗。观察比较两组大鼠子宫内膜组织基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、盘状结构域受体 2(DDR2)蛋白表达水平、PI3K/Akt/mTOR 通路相关 mRNA 表达量、血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)水平以及各组大鼠妊娠孕囊数量比较。**结果:**与 A 组相比,B 组的子宫内膜组织 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平、p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 水平以及血清 IL-6、IL-8 水平比较无差异 ($P>0.05$);C 组、D 组、E 组大鼠的子宫内膜组织 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平明显下降,IL-6、IL-8 水平、p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。其中,E 组大鼠 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平明显高于 C 组、D 组,IL-6、IL-8 水平及 p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 表达低于 C 组、D 组 ($P<0.05$)。C 组、D 组大鼠 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平、血清 IL-6、IL-8 水平及 p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 表达比较 ($P>0.05$)。妊娠孕囊数量方面,与 A 组比较,B 组大鼠妊娠孕囊数量。**结论:**hAECs 联合 PRP 治疗可能通过上调宫腔粘连大鼠子宫内膜组织 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平并下调 p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 表达,同时降低炎症因子 IL-6、IL-8 水平,进而提高妊娠孕囊数量,起到治疗作用。

关键词:宫腔粘连;人羊膜上皮干细胞;富血小板血浆;纤维化;炎症反应

中图分类号:R-33;R711.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)08-1430-06

Effect of Human Amniotic Epithelial Cells Combined with Platelet Rich Plasma on Fibrotic Factors and Inflammatory Factors in Rats with Intrauterine Adhesions*

WANG Li¹, ZHANG Meng-ting², CHEN Yang¹, WEI Lin¹, WANG Jian-feng^{3Δ}

(1 Department of Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710000, China;

2 Department of Obstetrics, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710000, China;

3 Department of Obstetrics and Gynecology, People's Hospital Affiliated to Northwestern University, Xi'an, Shaanxi, 710005, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutic effect of human Amniotic Epithelial cells (hAECs) combined with platelet rich Plasma (PRP) on intrauterine adhesion in rats, so as to provide a theoretical basis for optimizing the treatment of intrauterine adhesion in clinical treatment. **Methods:** 40 SPF female SD rats were randomly divided into blank group (group A), sham operation group (group B), hAECs group (group C), PRP group (group D) and hAECs+PRP group (group E) according to the random number table method, with 8 rats in each group. Group A did not do any operation, group B did anesthesia and open surgery, groups C, D, E used scratching method to make intrauterine adhesion model. Subsequently, groups C was treated with hAECs, and group D was injected with the same volume of normal saline. Groups D was treated with PRP, and group C was injected with the same volume of normal saline. Group E was treated with hAECs combined with PRP. The protein expression levels of MMP-9 and DDR2, related mRNA expression levels of PI3K/Akt/mTOR pathway, serum levels of IL-6 and IL-8, and the number of gestational sacs in each group were observed and compared between the two groups. **Results:** Compared with group A, there were no differences in the protein expression levels of MMP-9 and DDR2, p-MTOR mRNA and p-Akt mRNA levels, and serum IL-6 and IL-8 levels in group B ($P>0.05$). The protein expression levels of MMP-9 and DDR2 in endometrial tissues of rats in groups C, D and E were decreased, while the levels of IL-6 and IL-8, p-mTOR mRNA

* 基金项目:陕西省科技厅科研基金项目(2020JM-604)

作者简介:王丽(1985-),女,硕士,主治医师,研究方向:产科相关,E-mail: sxlll_1999@163.com

Δ 通讯作者:王建锋(1986-),男,硕士,主治医师,研究方向:妇产科相关,E-mail: sxlll_1999@163.com

(收稿日期:2022-10-14 接受日期:2022-11-10)

NA and p-Akt mRNA were increased ($P<0.05$). The protein expression levels of MMP-9 and DDR2 in group E were significantly higher than those in groups C and D, and the levels of IL-6 and IL-8, p-mTOR mRNA and p-Akt mRNA were lower than those in groups C and D ($P<0.05$). There were no differences in the protein expression levels of MMP-9 and DDR2, serum IL-6 and IL-8 levels, and the mRNA expression of p-mTOR and p-Akt between groups C and D ($P>0.05$). In terms of the number of gestational sacs, compared with group A, the number of gestational sac of rats in group B. **Conclusion:** hAECs combined with PRP may plays a therapeutic role by upregulation of MMP-9 and DDR2 protein expression levels and down-regulation of P-mTOR mRNA and p-Akt mRNA expression in endometrial tissue of rats with intrauterine adhesion, and decreasing the levels of inflammatory factors IL-6 and IL-8, thereby increasing the number of gestational sacs in pregnancy.

Key words: Intrauterine adhesion; Human amniotic epithelial stem cells; Platelet-rich plasma; Fibrosis; Inflammatory reaction

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R711.32 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)08-1430-06

前言

宫腔粘连,又名子宫内膜纤维化、Sherman 综合征,是指纤维化组织替代了子宫内膜,并在宫腔内形成纤维化连束,甚至封闭子宫腔。这种纤维化组织不具备生理功能,对女性周期性对激素变化无反应,且不包含血管的结构^[1]。临床中,宫腔粘连病因包括机械性、放射性、缺血性、感染性等因素引起,其中宫腔操作引起等子宫内膜基底层损伤是引起宫腔粘连的主要因素之一,患者多表现为下腹痛、月经稀发甚至闭经、复发性流产、不孕等症状^[2]。临床中,依据患者病情及生育需求制定治疗方案,可采用电刺激治疗、药物治疗等保守治疗或宫腔镜及腹腔镜监视下粘连分离手术治疗^[3,4]。手术治疗虽可以促进子宫恢复正常形态进而改善临床症状,但术后复发几率较高。因此,寻找有效、低复发率的宫腔粘连治疗方法具有重要临床意义。人羊膜上皮干细胞(Human Amniotic Epithelial cells, hAECs)起源于胚胎囊胚期等外胚层,属于一种胚胎干细胞,具有干细胞的特征。目前在关节损伤、红斑狼疮等系统免疫疾病以及肝脏疾病中取得良好应用效果^[5]。由于 hAECs 无端粒酶,传代 6 代以后发生凋亡,因此输入体内增殖能力有限,无致癌风险。同时 Akle 研究证实, hAECs 在人体内无免疫排斥反应,以及其低免疫原性、细胞纯化度高等优点,是干细胞应用领域中的理想种子^[6]。富血小板血浆(Platelet Rich Plasma, PRP)是通过将全血离心继而获得含有高浓度血小板的血浆。当机体受到创伤后,血小板中的 α 颗粒被激活可释放血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子及血小板源性生长因子等,这些生长因子具有止血、黏附和愈合等作用,可以通过促进基质形成和细胞增殖等途径促进受损组织的恢复和再生^[7]。目前 PRP 已被广泛应用于临床,研究表明,PRP 可以通过调控基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinase, MMP)的合成进而调控胶原蛋白水平,实现皮肤再生,同时还可通过促进子宫内膜细胞增殖进而升高胚胎着床成功率^[8]。本研究通过构建宫腔粘连大鼠模型,给予大鼠人羊膜上皮干细胞联合 PRP 干预以明确其对宫腔粘连的治疗效果和相应作用机制,为临床中优化宫腔粘连的治疗方案积累理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用 SPF 级雌性 SD 大鼠共 40 只,体重 $250 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$,周龄为 8 周。大鼠购于南方医科大学动物实验中心(批准编号:

44002100024680)。大鼠购回后进行一周适应性饲养,每笼 4 只,室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$,空气湿度 80%,12 h 昼夜交替光照,自由进食饮水。

1.2 主要实验仪器与试剂

生理盐水(山东齐都药业,批号:5B200121006),4%多聚甲醛(酷来博科技,批号:SL1830-500ML),磷酸盐(Phosphate-Buffer Saline, PBS)缓冲液(酷来博科技,批号:PM5090-1L),手术器械(新华医疗器械),超洁净工作台(瑞智净化),刮勺(广州吉尼欧生物),冰冻切片机(美国 Thermo),恒温水浴锅(新芝生物),细胞培养箱(美国 Thermo),4℃离心机(德国 Eppendorf)。

1.3 实验材料准备

1.3.1 激活 PRP 制备^[9] 使用无菌 20% CaCl_2 溶液将凝血酶稀释至 1000 U/mL 制备激活剂备用,将机采血小板与激活剂以 20:1 的比例吹打混合均匀,置于 4℃中贮存 12 h 待用。选用无菌注射器对血小板样品进行搅拌,随后使用低温高速离心机,以 4000 rad/min 速度离心 30 min,取上层清液,以 0.22 μm 滤膜对样品进行过滤,即可得到激活 PRP。制备的激活 PRP 需置于液氮中冻存或现用现配。

1.3.2 hAECs 制备^[10] 在经过伦理委员会审批且相关人员知情同意的前提下,将足月剖宫产术后的胎盘组织中胎儿面的羊膜分离,并浸入培养基(1%链霉素-青霉素-两性霉素),保存于 4℃冰盒并快速放置于细胞房内。在培养皿中倒入生理盐水,从培养基中取出羊膜置于培养皿中洗净黏液和血液,放入装有 10 mL 0.05%胰酶/EDTA 离心管中,颠倒 1 min。随后将羊膜取出后放入 25 mL 0.05%胰酶/EDTA 离心管,摇晃后置于水浴锅内,37℃水浴 30 min。随后将消化液和羊膜倒入培养皿中,弃掉羊膜组织后,将混合液体移入离心管,配平后以 $300 \times g$, 4℃,离心 20 min。去除上清液后,将离心管内液体移入培养基(2 mL 谷氨酰胺,1%链霉素-青霉素-两性霉素,10%胎牛血清 FBS),吹打均匀。随后使用 100 μm 过滤器将悬液过滤,取样计数后,将羊膜细胞在 5% CO_2 , 37℃恒温箱内培养,或存入液氮中备用。

1.3.3 宫腔粘连大鼠模型建立 通过机械搔刮法建立选用 SPF 级雌性 SD 大鼠共 40 只,体重 $250 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$,周龄为 8 周。将大鼠依照随机数字表法随机分为空白组(A组)、假手术组(B组)、hAECs 组(C组)、PRP 组(D组)、hAECs+PRP 组(E组),每组 8 只。A 组大鼠不做任何处理,B 组仅做麻醉、开腹腹腔处理,C 组、D 组、E 组使用搔刮法制备宫腔粘连模型。具体操作

如下:(1)每日上午 10:00,通过采集大鼠阴道分泌物以明确其周期,在发情期进行造模处理。术前一晚大鼠禁食。术前,依照 4 mL/kg 剂量,使用 10%水合氯醛将大鼠麻醉,大鼠取仰卧位固定于操作台,下腹部剃毛,暴露术野。(2)使用 75%酒精消毒后,逐层打开腹腔,将双侧子宫角暴露,在子宫体处做 2 mm 创口,使用无菌刮勺在子宫角内充分刮擦,直至子宫角处出现粗糙感。(3)向腹腔内注射青霉素防止炎症反应,逐层缝合腹腔,使用 75%酒精消毒创口。给大鼠做保温处理,防止麻醉后出现低体温。苏醒后放回鼠笼。

1.3.4 干预方法 造模一周后,将大鼠按上述方法麻醉、开腹,向 C 组、E 组大鼠子宫角内分别注射 2×10^7 cells/mL 的 hAECs 混悬液 50 μ L。假手术组和 PRP 组分别向两侧子宫角内注射生理盐水 50 μ L。随后向 D 组、E 组子宫角内注射制备的富血小板血浆 0.3 mL,同时向 C 组大鼠注射等量生理盐水。

1.4 标本采集

1.4.1 血清标本 大鼠麻醉后,取腹主动脉血,以离心半径 10 cm、4℃,3500 rad/min 速度离心 20 min,取上层清液冻存于 -20℃ 冰箱内备用。在检测前,将血清样本置于室温下自然解冻。

1.4.2 子宫角标本 连续治疗 1 周后,使用过量麻醉方法将所有大鼠麻醉后开腹,从卵巢处、子宫颈处分割切开,将子宫取出后,使用并生理盐水对组织进行反复冲洗,洗净后沿子宫中线剖开,将损伤的子宫角处制成标本,放入 -80℃ 冰箱中冻存备用。

1.5 实验指标

1.5.1 大鼠子宫内膜组织中 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平检测 使用 Western Blot 法检测各组大鼠组织样本中 MMP-9、盘状结构域受体 2(Discoidin Domain Receptor 2,DDR2)表达水平^[11,12]。

1.5.2 血清 IL-6、IL-8 水平检测 使用 ELISA 法对各组大鼠血清 IL-6、IL-8 水平进行检测。

1.5.3 大鼠子宫内膜组织 PI3K/Akt/mTOR 通路相关 mRNA 表达量的测量 使用无菌剪将大鼠子宫组织样本剪成碎块,使用 Trizol 裂解液对样品的总 RNA 进行提取,使用紫外分光光度法对总 RNA 浓度进行测定,随后逆转录为 cDNA,使用 PCR 试剂盒对样品进行扩增,在 95℃ 条件下进行反应变性 10 s,退火 60℃ 30 s,依次循环进行 40 次。以 β -actin 作为内参。具体引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

Table 1 Primer sequences for each gene

Primer sequences	
p-mTOR	5'-ACACCCTCCATCCACCTCAT-3'
	5'-TAGCGGATATCAGGGTCAGGA-3'
P-AKT	5'-TGTCTCGTGAGCGCGTGT-3'
	5'-CCGTTATCTTGATGTGCCCGTC-3'
β -actin	5'-GTCGAGTCGCGTCCACC-3'
	5'GTCATCCATGGCGAACTGGT-3'

1.5.4 各组大鼠妊娠结局比较 将各组大鼠与雄鼠依照 2:1 的数量混合饲养、进行交配。7 天后将雌鼠过量麻醉处死,对每组大鼠双侧子宫的胚胎植入数目进行记录比较^[13]。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计学分析,计量资料进行正态性检验。以均数 $\pm$ 标准差的形式表示,组内比较选用配对 t 检验,组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析法。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠子宫内膜组织 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平比较

与 A 组相比,B 组大鼠的 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平无差异($P > 0.05$);C 组、D 组、E 组大鼠的 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$)。其中,E 组大鼠 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平明显高于 C 组、D 组 ($P < 0.05$)。C 组、D 组大鼠 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平比较无差异($P > 0.05$)。详见表 2。

表 2 子宫内膜中 MMP-9 和 DDR2 蛋白表达水平的比较

Table 2 Comparison of protein expression levels of MMP-9 and DDR2 in endometrium

Groups	N	MMP-9	DDR2
Group A	8	0.78 $\pm$ 0.06	0.79 $\pm$ 0.05
Group B	8	0.80 $\pm$ 0.05	0.77 $\pm$ 0.05
Group C	8	0.59 $\pm$ 0.03*	0.59 $\pm$ 0.03*
Group D	8	0.58 $\pm$ 0.03*	0.59 $\pm$ 0.04*
Group E	8	0.71 $\pm$ 0.04* ^{#@}	0.72 $\pm$ 0.03* ^{#@}

Note: Compared with group A, * $P < 0.05$; compared with group C, [#] $P < 0.05$; compared with group D, [@] $P < 0.05$, the same below.

2.2 各组大鼠血清 IL-6、IL-8 水平比较

与 A 组相比, B 组大鼠的血清 IL-6、IL-8 水平无差异 ($P>0.05$); C 组、D 组、E 组大鼠的血清 IL-6、IL-8 水平明显升高

($P<0.05$)。其中, E 组大鼠 IL-6、IL-8 水平明显低于 C 组、D 组 ($P<0.05$)。C 组、D 组大鼠 IL-6、IL-8 水平比较无差异 ($P>0.05$)。详见表 3。

表 3 血清中 IL-6、IL-8 水平的比较
Table 3 Comparison of levels of IL-6 and IL-8 in serum

Groups	N	IL-6(pg/mL)	IL-8(pg/mL)
Group A	8	22.09± 6.45	87.40± 15.09
Group B	8	21.87± 7.10	86.45± 16.32
Group C	8	45.03± 13.29*	118.05± 27.89*
Group D	8	47.04± 13.52*	120.90± 26.85*
Group E	8	36.78± 11.20*#@	96.40± 23.31*#@

Note: Compared with group A, * $P<0.05$; compared with group C, # $P<0.05$; compared with group D, @ $P<0.05$, the same below.

2.3 各组大鼠子宫内膜组织 PI3K/Akt/mTOR 通路相关 mRNA 表达量比较

与 A 组相比, B 组大鼠的 p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 水平无差异 ($P>0.05$); C 组、D 组、E 组大鼠的 p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 水平明显升高 ($P<0.05$)。其中, E 组大鼠 p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 水平明显低于 C 组、D 组 ($P<0.05$)。C 组、D 组大鼠 p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 水平比较无差异 ($P>0.05$)。详见表 4。

表 4 子宫内膜中 p-mTOR mRNA 和 p-Akt mRNA 水平的比较
Table 4 Comparison of levels of p-mTOR mRNA and p-Akt mRNA in endometrium

Groups	N	p-mTOR	p-Akt
Group A	8	1.00± 0.01	1.00± 0.01
Group B	8	1.00± 0.01	1.00± 0.01
Group C	8	2.57± 0.62*	1.98± 0.22*
Group D	8	2.59± 0.61*	1.90± 0.27*
Group E	8	1.72± 0.50*#@	1.42± 0.19*#@

Note: Compared with group A, * $P<0.05$; compared with group C, # $P<0.05$; compared with group D, @ $P<0.05$, the same below.

2.4 各组大鼠妊娠孕囊数量比较

与 A 组相比, B 组大鼠的妊娠孕囊数量无差异 ($P>0.05$); C 组、D 组、E 组大鼠的妊娠孕囊数量明显下降 ($P<0.05$)。其

中, E 组大鼠妊娠孕囊数量明显高于 C 组、D 组 ($P<0.05$)。C 组、D 组大鼠妊娠孕囊数量比较无差异 ($P>0.05$)。详见表 5。

表 5 妊娠孕囊数量的比较
Table 5 Comparison of numbers of gestational sacs

Groups	N	Numbers of gestational sacs
Group A	8	7.88± 1.76
Group B	8	7.63± 1.85
Group C	8	1.50± 0.82*
Group D	8	1.38± 0.90*
Group E	8	2.25± 0.75*#@

Note: Compared with group A, * $P<0.05$; compared with group C, # $P<0.05$; compared with group D, @ $P<0.05$, the same below.

3 讨论

宫腔粘连是指子宫内膜的基底层受损后继而引起子宫的全部或部分闭锁, 胚胎无法正常着床发育, 继而引起女性流产或不孕, 对女性的妊娠结局有较大的影响^[14]。目前临床中, 对于

轻度和中度的宫腔粘连患者多通过药物治疗或物理治疗, 但针对重度宫腔粘连患者上述治疗方法疗效有限, 子宫内膜基底层受损严重, 多采用手术治疗以恢复子宫形态, 但术后患者的子宫内膜不能完全恢复^[15,16], 同时也易复发宫腔粘连, 因此探索有效的宫腔粘连治疗方法十分重要。基于此, 本研究构建大鼠宫

宫腔粘连模型以明确 hAECs 联合 PRP 疗法对其的确切疗效。

宫腔粘连模型主要包括化学损伤、热损伤、感染法以及机械损伤诱导子宫内膜损伤所致。化学损伤是利用化学试剂对子宫内膜造成损伤，热损伤是利用液体的热度损伤子宫内膜，感染法则是通过脂多糖等物质诱导子宫炎症，机械损伤则是由针头、刮匙等利器对宫腔进行搔刮而模拟子宫内膜受损的进程^[17,18]。考虑到近年来的刮宫术、人工流产等机械操作引起的宫腔粘连发病率逐渐升高，故本研究选用机械损伤诱导的方法模拟临床中的宫腔内操作所致宫腔粘连。

MMP 是具有分解细胞外基质作用的蛋白酶，其分布和来源十分广泛，通过降解细胞外基质中的胶原蛋白 V 等，进而减少其堆积。而纤维细胞的主要成分包括胶原蛋白 V，因此 MMP 对已形成的纤维化组织具有一定的分解作用。MMP-9 是 MMP 家族中可调控蛋白水解的酶，具有较好的对弹力蛋白水解的能力^[19]。研究表明，宫腔粘连患者体内的 MMP-9 水平明显降低，且其病情发展程度与 MMP-9 的表达水平呈负相关^[20,21]。DDR2 是 DDR 蛋白的主要形式，广泛存在于人体的器官中，属于酪氨酸蛋白激酶受体。研究中发现，DDR2 在肺成纤维细胞中表达，且对胶原生成和肺纤维化的过程起到调节作用^[22]。同时发现 DDR2 对 MMP-9 具有调节作用，推测二者可能协同发挥对子宫内膜纤维化的调节作用^[23]。本研究中发现，C 组、D 组、E 组大鼠子宫内膜组织 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平明显低于空白组，同时 E 组大鼠的蛋白表达水平高于 C 组和 D 组，提示宫腔粘连发生后 MMP-9、DDR2 蛋白表达水平下降，而 hAECs 联合 PRP 可以有效提升子宫内膜组织的 MMP-9、DDR2 蛋白表达量进而发挥对宫腔粘连的治疗作用，且效果优于单一治疗的应用。

有研究证实，子宫内膜受到创伤后的血管新生以及引起的炎症反应在宫腔粘连的病程中发挥重要作用。血管内皮生长因子通过与血管内皮的特异性结合，促进新血管生成和内皮细胞的增殖。当子宫内膜受损后，局部的损伤和感染可引起血管内皮生长因子的表达水平增加，促进炎症因子的释放导致内皮细胞增殖加速，引起内膜的浸润和增生^[24,25]。IL-6 是一种促炎细胞因子，有巨噬细胞分泌释放，参与多种炎症反应过程^[26]。IL-8 是一种促血管生成因子，也是一种关键的炎症介质^[27]。本研究中发现，C 组、D 组、E 组大鼠血清 IL-6、IL-8 水平明显高于空白组，同时 E 组大鼠的血清炎症因子水平低于 C 组和 D 组，提示子宫内膜损伤后炎症反应激活，炎症因子水平升高，而 hAECs 联合 PRP 可以有效降低炎症因子 IL-6、IL-8 进而发挥对宫腔粘连的治疗作用，且效果优于单一治疗的应用。

研究表明，PI3K/Akt/mTOR 通路在细胞生成、分化、增殖、自噬、凋亡等过程中均发挥重要调控作用，同时与宫腔粘连发生发展关系密切^[28]。在子宫内膜受损的状态下，血管内皮生长因子激活 PI3K，Akt 磷酸化并加速内皮细胞增殖，同时可促进 IL-8 等炎症因子的相关分子表达，促进新血管的生成。而 PI3K/Akt 激活后可激活下游 mTOR，磷酸化的 mTOR 可通过促进内膜细胞的增殖进而加重纤维化^[29,30]。本研究中发现，C 组、D 组、E 组大鼠 p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 水平明显高于空白组，同时 E 组大鼠的 p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 水平低于 C 组和 D 组，提示子宫内膜损伤后 PI3K/Akt/mTOR 通路激活，p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 表达量升高，而 hAECs

联合 PRP 可以有效 p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 的表达，且效果优于单一治疗的应用。

妊娠结局方面，结果提示 C 组、D 组、E 组大鼠的妊娠孕囊数量明显低于空白组，同时 E 组大鼠的妊娠孕囊数量高于 C 组和 D 组，提示宫腔粘连发生后，妊娠功能和妊娠结局受影响，而 hAECs 联合 PRP 可以有效改善妊娠结局，且效果优于单一治疗的应用。

综上所述，hAECs 联合 PRP 治疗可缓解大鼠宫腔粘连，改善其妊娠结局，其机制可能与提升 MMP-9、DDR2 蛋白表达量、降低血清 IL-6、IL-8 水平以及 p-mTOR mRNA、p-Akt mRNA 的表达相关。

参考文献(References)

- [1] Leung RK, Lin Y, Liu Y. Recent Advances in Understandings Towards Pathogenesis and Treatment for Intrauterine Adhesion and Disruptive Insights from Single-Cell Analysis [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28 (7): 1812-1826
- [2] 邱丹儿,张琬琳,王晓红.宫腔粘连分离术后预防复发和改善生殖结局的辅助治疗措施[J].*国际生殖健康 / 计划生育杂志*, 2022, 41(1): 46-51
- [3] Zhang X, Liu W, Zhou Y, et al. Comparison of therapeutic efficacy of three methods to prevent re-adhesion after hysteroscopic intrauterine adhesion separation: a parallel, randomized and single-center trial[J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(6): 6804-6823
- [4] Yang X, Liu Y, Li TC, et al. Durations of intrauterine balloon therapy and adhesion reformation after hysteroscopic adhesiolysis: a randomized controlled trial [J]. *Reprod Biomed Online*, 2020, 40(4): 539-546
- [5] Huang Y, Ma Z, Kuang X, et al. Sodium alginate-bioglass-encapsulated hAECs restore ovarian function in premature ovarian failure by stimulating angiogenic factor secretion [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 223
- [6] Albash R, Fahmy AM, Hamed MIA, et al. Spironolactone hyaluronic acid enriched cerosomes (HAECs) for topical management of hirsutism: in silico studies, statistical optimization, ex vivo, and in vivo studies[J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 2289-2300
- [7] Gupta S, Paliczak A, Delgado D. Evidence-based indications of platelet-rich plasma therapy [J]. *Expert Rev Hematol*, 2021, 14 (1): 97-108
- [8] Zhang S, Li P, Yuan Z, et al. Platelet-rich plasma improves therapeutic effects of menstrual blood-derived stromal cells in rat model of intrauterine adhesion[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 61
- [9] Sharara FI, Lelea LL, Rahman S, et al. A narrative review of platelet-rich plasma (PRP) in reproductive medicine [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2021, 38(5): 1003-1012
- [10] Wei X, Lin H, Zhang B, et al. Phoenixin-20 Prevents ox-LDL-Induced Attachment of Monocytes to Human Aortic Endothelial Cells (HAECs): A Protective Implication in Atherosclerosis[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(6): 990-997
- [11] Yadav SK, Kambis TN, Kar S, et al. MMP9 mediates acute hyperglycemia-induced human cardiac stem cell death by upregulating apoptosis and pyroptosis in vitro [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(3): 186

- [12] Xiao L, Liu C, Wang B, et al. Targeting Discoidin Domain Receptor 2 for the Development of Disease-Modifying Osteoarthritis Drugs[J]. *Cartilage*, 2021, 13(2_suppl): 1285S-1291S
- [13] 闫晓彤,朱婷,章晓乐,等.补肾活血方联合补佳乐对宫腔粘连大鼠 YAP1/TGF- β _1 信号通路的影响 [J]. *陕西中医*, 2022, 43(8): 987-991
- [14] 段华,甘露.宫腔粘连子宫腔整复手术质量控制[J].*中国实用妇科与产科杂志*, 2022, 38(1): 36-40
- [15] 许秀秀,王静.自拟祛瘀益肾汤对中重度宫腔粘连 TCRA 术后患者子宫动脉血流及内膜修复因子的影响[J].*广西中医药*, 2021, 44(6): 23-25
- [16] Kislal S, Jin W, Maesner C, et al. Mismatch between obesogenic intrauterine environment and low-fat postnatal diet may confer offspring metabolic advantage[J]. *Obes Sci Pract*, 2021, 7(4): 450-461
- [17] Mao X, Tao Y, Cai R, et al Cross-linked hyaluronan gel to improve pregnancy rate of women patients with moderate to severe intrauterine adhesion treated with IVF: a randomized controlled trial [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2020, 301(1): 199-205
- [18] Pan LZ, Wang Y, Chen X. A randomized controlled study on an integrated approach to prevent and treat re-adhesion after transcervical resection of moderate-to-severe intrauterine adhesions [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2021, 76(2): e1987
- [19] Mohamed HA, Said RS. Coenzyme Q10 attenuates inflammation and fibrosis implicated in radiation enteropathy through suppression of NF- κ B/TGF- β /MMP-9 pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92(2): 107347
- [20] Diaz-Cueto L, Dominguez-Lopez P, Paniagua L, et al. Cadmium exposure reduces invasion of the human trophoblast-derived HTR-8/SVneo cells by inhibiting cell adhesion and matrix metalloproteinase-9 secretion [J]. *Reprod Toxicol*, 2021, 100 (2): 68-73
- [21] Chen JX, Yi XJ, Gu PL, et al. The role of KDR in intrauterine adhesions may involve the TGF- β 1/Smads signaling pathway[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2019, 52(10): e8324
- [22] Malcor JD, Juskaite V, Gavrilidou D, et al. Coupling of a specific photoreactive triple-helical peptide to crosslinked collagen films restores binding and activation of DDR2 and VWF [J]. *Biomaterials*, 2018, 182(5): 21-34
- [23] Mu N, Gu JT, Huang TL, et al. Blockade of Discoidin Domain Receptor 2 as a Strategy for Reducing Inflammation and Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis Via Altered Interleukin-15 and Dkk-1 Signaling in Fibroblast-Like Synoviocytes [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(6): 943-956
- [24] Xin L, Lin X, Zhou F, et al. A scaffold laden with mesenchymal stem cell-derived exosomes for promoting endometrium regeneration and fertility restoration through macrophage immunomodulation [J]. *Acta Biomater*, 2020, 113(11): 252-266
- [25] Tukia E, Wagner B, Vainio K, et al. The Effect of Uterine Lavage on Soluble CD14, Chemokine Ligand 2, and Interleukin 10 Levels in Mares With Postpartum Metritis [J]. *J Equine Vet Sci*, 2021, 98(5): 103365
- [26] 朱端荣,周秋明,胡玉利,等.宫腔镜下冷刀分离术与电切术治疗宫腔粘连的疗效及对宫腔形态恢复和血清白细胞介素的影响 [J].*现代生物医学进展*, 2021, 21(24): 4786-4790
- [27] 黄丹,尤共平,张晓蕾,等.血清妊娠相关血浆蛋白 -A、白介素 -8 与输卵管妊娠患者保守治疗效果的相关性[J].*中国性科学*, 2022, 31 (8): 114-117
- [28] Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59 (5): 147-160
- [29] Xu XX, Zhang SS, Lin HL, et al. Metformin Promotes Regeneration of the Injured Endometrium Via Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis[J]. *Reprod Sci*, 2019, 26(4): 560-568
- [30] Liu S, Huang X, Liu Y, et al. Functional analysis of miRNAs combined with TGF- β 1/Smad3 inhibitor in an intrauterine rat adhesion cell model[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 470(1-2): 15-28

(上接第 1409 页)

- [27] Culley DJ, Boyd JD, Palanisamy A, et al. Isoflurane decreases self-renewal capacity of rat cultured neural stem cells [J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(4): 754-763
- [28] 史贵秀,孙丽华,张跃新. 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷标记大鼠骨髓间充质干细胞的有效性[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(01): 17-21
- [29] 宋正阳,施晓倩,田云娜,等.基于 AMPK/mTOR 信号通路的细胞自噬对大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(08): 1416-1423
- [30] Ning H, Albersen M, Lin G, et al. Effects of EdU labeling on mesenchymal stem cells[J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(1): 57-63
- [31] Sun Y, Sun Y, Lin G, et al. Multicolor flow cytometry analysis of the proliferations of T-lymphocyte subsets in vitro by EdU incorporation [J]. *Cytometry A*, 2012, 81(10): 901-909