

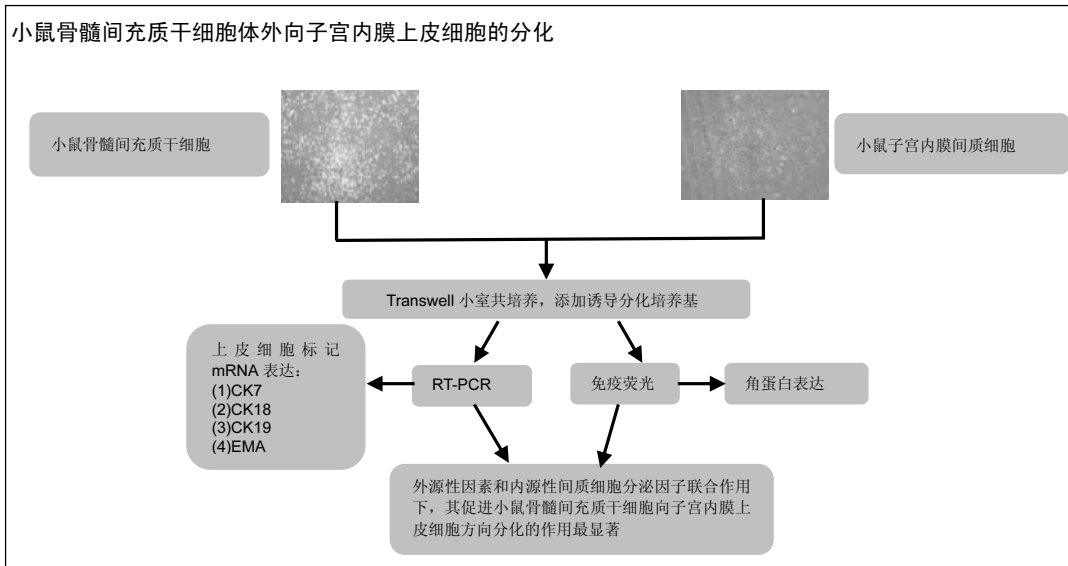
骨髓间充质干细胞体外向子宫内膜上皮细胞的分化

屈莉红¹, 于佳群²(海阳市人民医院, ¹妇产科, ²急诊科, 山东省海阳市 265100)

引用本文: 屈莉红, 于佳群. 骨髓间充质干细胞体外向子宫内膜上皮细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(19):2770-2776.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.19.005 ORCID: 0000-002-7421-8999(屈莉红)

文章快速阅读:



屈莉红, 女, 1971 年生, 江苏省常熟市人, 汉族, 硕士, 副主任医师, 主要从事妇产科方面的研究。

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2016)19-02770-07
稿件接受: 2016-03-21
<http://www.crter.org>

文题释义:

上皮细胞发生间充质转化: 上皮细胞具有极性, 通过细胞膜侧面存在的黏附复合物彼此紧密相连形成层状, 并定位于底部的基底膜, 与其他组织相分离; 间充质细胞由于缺乏极性和细胞间连接而具有可迁移性, 以及合成和分泌细胞基质成分的能力, 大量研究证实上皮细胞和间充质细胞间存在双向的表型转化, 该转化过程参与哺乳动物一系列特定的生理学和病理学过程, 随着这一认知在全球范围内成为共识, 2003 年举行的第一届国际 EMT 会议将上皮细胞发生间充质转化正式定义: 上皮细胞经历多重生物化学改变以获得间充质细胞表型的过程。

细胞角蛋白: 主要分布于上皮细胞, 是角质细胞中的主要骨架蛋白, 这种结构蛋白的主要功能是维持上皮组织的完整性及连续性。研究发现细胞角蛋白具有极高的保守性和组织分化特异性, 与上皮细胞的增殖分化密切相关。目前已得到证实的细胞角蛋白有 20 多种。

摘要

背景: 以往研究表明, 骨髓干细胞是子宫内膜细胞的子宫外来源, 参与损伤后子宫内膜的再生功能重建。

目的: 探讨小鼠骨髓间充质干细胞在体外能否向子宫内膜上皮细胞方向分化。

方法: 将第 2 代骨髓间充质干细胞、子宫内膜间质细胞分别进行以下 4 组不同处理: ①第 1 组为单纯小鼠骨髓间充质干细胞, 用含体积分数为 2% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液培养; ②第 2 组为单纯小鼠骨髓间充质干细胞, 用含体积分数为 2% 胎牛血清、 10^{-7} mol/L β -雌二醇、10 μ g/L 表皮生长因子的 DMEM/F12 培养液培养; ③第 3 组为用 Transwell 小室进行骨髓间充质干细胞与子宫内膜间质细胞共培养, 用含体积分数为 2% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液培养; ④第 4 组为用 Transwell 小室进行骨髓间充质干细胞与子宫内膜间质细胞共培养, 用含体积分数为 2% 胎牛血清、 10^{-7} mol/L β -雌二醇、10 μ g/L 表皮生长因子的 DMEM/F12 培养液培养。上述各组处理第 5 天, 收集培养板底部骨髓间充质干细胞, RT-PCR 检测上皮细胞标记(CK7, CK18, CK19, EMA)的基因表达, 免疫荧光化学方法检测角蛋白表达。第 3 组细胞共培养后的第 1, 3, 5, 7 天, RT-PCR 检测上皮细胞标记(CK7, CK18, CK19, EMA)的基因表达。

结果与结论: ①CK7 mRNA 表达在各组中依次上升, 并在第 4 组中达到最高, 各组之间经比较差异有显著性意义。第 2, 3, 4 组 CK18, CK19 mRNA 的表达均较第 1 组显著升高, 且第 2, 3, 4 组间比较差异无显著性意义。EMA mRNA 在第 2, 4 组的表达比第 1, 3 组升高, 但组间比较差异也无显著性

Qu Li-hong, Master,
Associate chief physician,
Department of Obstetrics
and Gynecology, People's
Hospital of Haiyang,
Haiyang 2265100,
Shandong Province, China

意义。②第4组角蛋白呈强阳性表达,第3组呈弱阳性表达,第1,2组呈阴性表达。③随着时间的推移,CK7 mRNA表达量不断上升,且第5,7天的表达量显著高于第1,3天,不同时间经比较差异有显著性意义。CK18, CK19, EMA mRNA在不同时间的表达量差异无显著性意义。④实验结果表明,小鼠骨髓间充质干细胞在一定条件下可向子宫内膜上皮细胞方向分化。外源性因素和内源性间质细胞分泌因子联合作用下,其促进小鼠骨髓间充质干细胞向子宫内膜上皮细胞方向分化的作用最显著。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 子宫内膜; 上皮细胞; 骨髓间充质干细胞; 细胞分化; Transwell 共培养

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 子宫内膜; 上皮细胞; 细胞分化; 共同培养技术; 组织工程

Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into endometrial epithelial cells *in vitro*

Qu Li-hong¹, Yu Jia-qun² (¹Department of Obstetrics and Gynecology, ²Department of Emergency, People's Hospital of Haiyang, Haiyang 2265100, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have confirmed that as an exogenous origin of endometrial epithelial cells, bone marrow stem cells are involved in the functional reconstruction of the injured endometrium.

OBJECTIVE: To discuss whether bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into endometrial epithelial cells *in vitro*.

METHODS: Passage 2 bone marrow mesenchymal stem cells and endometrial stromal cells were collected and subjected to different treatments: bone marrow mesenchymal stem cells were cultured alone in the DMEM/F12 medium containing 2% fetal bovine serum or in the DMEM/F12 medium containing 2% fetal bovine serum, 10^{-7} mol/L β -estradiol and 10 μ g/L epidermal growth factor as groups 1 and 2, respectively; bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured with endometrial stromal cells by Transwell chamber were cultured in the DMEM/F12 medium containing 2% fetal bovine serum or in the DMEM/F12 medium containing 2% fetal bovine serum, 10^{-7} mol/L β -estradiol and 10 μ g/L epidermal growth factor as groups 3 and 4, respectively. After 5 days culture, bone marrow mesenchymal stem cells at the bottom of the culture plate were collected to detect expressions of epithelial cell markers, such as CK7, CK18, CK1 and EMA by RT-PCR technology, and to determine keratin expression using immunofluorescence assay. Besides, expressions of these epithelial cell markers in the group 3 were detected using RT-PCR at 1, 3, 5 and 7 days of culture, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: mRNA expression of CK7 showed a significant successive rise in the groups 1, 2, 3, 4 and it was highest in the group 4. mRNA expressions of CK18 and CK19 in the later three groups had no significant differences, but all significantly higher than those in the group 1. Compared with the groups 1 and 3, mRNA expression of EMA in the groups 2, 4 were significantly higher, but no significant differences existed between groups. Expression of keratin was strongly positive in the group 4, weakly positive in the group 3 and negative in the groups 1, 2, respectively. Furthermore, with the increase of culture time, mRNA expression of CK7 exhibited a constant increase, which was significantly higher at 5 and 7 days than at 1 and 3 days; but there were no significant differences in expressions of CK19, CK18 and EMA at different time points. These results show that bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into endometrial epithelial cells *in vitro* under certain conditions. Moreover, it can remarkably promote the endometrial differentiation under the combined effects of some exogenous and endogenous factors.

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Endometrium; Epithelial Cells; Cell Differentiation; Coculture Techniques; Tissue Engineering

Cite this article: Qu LH, Yu JQ. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into endometrial epithelial cells *in vitro*. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(19):2770-2776.

0 引言 Introduction

子宫内膜受卵巢激素变化的调节,具有周期性增殖、分泌和脱落性变化。研究表明有20%~40%不孕患者是由于子宫内膜损伤所引起的,受到损伤的子宫内膜会出现明

显的瘢痕化供血不足,造成胚胎无法在子宫内膜上着床,让很多妇女丧失了生育的能力^[1]。由于子宫内环境和功能的有序性与复杂性,目前尚缺乏有效的治疗手段。随着干细胞理论及相关技术的发展,开始研究利用干细胞修复子

宫内膜, 取得了重大进展。2004年, Taylor^[2]在接受骨髓移植患者的子宫内壁上发现了来源于供者骨髓细胞的子宫内壁上皮细胞, 此后不断有研究证明骨髓干细胞是子宫内壁上皮细胞的子宫外来源, 参与损伤后子宫内壁上皮细胞的再生功能重建。骨髓间充质干细胞具有自我更新和多向分化潜能, 是最好的成体间充质干细胞来源, 可用于治疗多种损伤性疾病^[3]。路平等^[4]将体外分离培养的雄性小鼠骨髓间充质干细胞经尾静脉联合宫腔内局部注射植入于子宫内壁上皮损伤小鼠体内, 移植后小鼠损伤侧子宫内壁上皮组织中有SRY阳性细胞的定植, 说明骨髓间充质干细胞可定植于子宫内壁上皮损伤小鼠的子宫内壁上皮组织, 能够用于修复小鼠子宫内壁上皮损伤。为此, 实验将小鼠骨髓间充质干细胞和小鼠子宫内壁上皮细胞进行共培养, 探讨小鼠骨髓间充质干细胞在体外能否向子宫内壁上皮细胞方向分化。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年8至9月在海阳市人民医院完成。

1.3 材料 C57BL/6小鼠20只, 雌雄各半, 雌性未孕, 5周龄, 体质量20 g左右, 健康状况良好, 由北京维通利华实验技术有限公司提供, 许可证号: SCXK(京)2015-0007, 均饲养于SPF动物房。研究相关方案符合动物伦理学要求。

小鼠骨髓间充质干细胞体外向子宫内壁上皮细胞分化实验所用主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12培养液	上海北诺生物科技有限公司
青霉素	南京赛泓瑞生物科技有限公司
I型胶原酶	维森特生物技术(中国)有限公司
Transwell小室	杭州都泰生物科技有限公司
荧光显微镜	大连光耀辉科技有限公司
超净工作台	上海弘顺生物科技有限公司
二氧化碳培养箱	北京方程生物科技有限公司
倒置显微镜	北京瑞科中仪科技有限公司

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠骨髓间充质干细胞培养 麻醉后处死10只雄性小鼠, 乙醇浸泡消毒, 完整取出小鼠的双侧股骨以及胫骨, 剪断股骨干与胫骨干, 用DMEM/F12培养液反复冲洗骨髓腔, 直至骨发白为止。收集冲洗液, 用吸管反复吹打, 制备单细胞悬液, 离心, 去掉上清液, 添加

DMEM/F12培养液, 再次吹打混匀, 离心, 去掉上清液, 添加含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养液重悬细胞, 接种于培养瓶中, 置于37℃, 体积分数为5%CO₂培养箱中进行培养。每天用倒置显微镜观察细胞生长情况, 待细胞铺满瓶底80%左右进行传代培养^[5]。

1.4.2 小鼠子宫内壁上皮细胞培养 麻醉后处死10只雌性小鼠, 乙醇浸泡消毒, 取出子宫, 用PBS洗涤3次, 置入青霉素小瓶中, 加入适量DMEM/F12培养液, 将子宫组织剪成碎块, 加入等体积的I型胶原酶充分混匀, 于37℃恒温振荡培养箱振荡消化, 消化结束加入适量DMEM/F12培养液进行机械吹打, 过100目不锈钢滤网过滤, 收集滤液加入培养液, 离心, 弃去上清液, 添加DMEM/F12培养液, 再次吹打混匀, 离心, 去掉上清液, 添加含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养液重悬细胞, 接种于培养瓶中, 置于37℃, 体积分数为5%CO₂培养箱中进行培养。培养4 h后换液, 以洗掉残留胶原酶, 24 h再换液1次, 每天观察培养细胞的生长情况, 待细胞铺满瓶底后传代^[6]。

1.4.3 实验分组与细胞共培养 将第2代骨髓间充质干细胞、子宫内壁上皮细胞分别进行以下4组不同处理: ①第1组为单纯小鼠骨髓间充质干细胞约2 mL(10⁸ L⁻¹)接种在培养板上, 用含体积分数为2%胎牛血清的DMEM/F12培养液培养。②第2组为单纯小鼠骨髓间充质干细胞约2 mL(10⁸ L⁻¹)接种在培养板上, 用含体积分数为2%胎牛血清、10⁻⁷ mol/L β-雌二醇、10 μg/L表皮生长因子的DMEM/F12培养液培养。③第3组为骨髓间充质干细胞与子宫内壁上皮细胞共培养, 用含体积分数为2%胎牛血清的DMEM/F12培养液培养。④第4组为骨髓间充质干细胞与子宫内壁上皮细胞共培养, 用含体积分数为2%胎牛血清、10⁻⁷ mol/L β-雌二醇、10 μg/L表皮生长因子的DMEM/F12培养液培养。第3组和第4组运用Transwell共培养体系完成培养^[7]。

1.4.4 RT-PCR检测骨髓间充质干细胞的上皮细胞标记CK7, CK18, CK19, EMA mRNA相对表达^[8] 按上述分组进行培养处理5 d后收集骨髓间充质干细胞, 进行RT-PCR实验。分离纯化各组细胞的总RNA, 计算提取的总RNA含量及浓度, 按照试剂盒说明将RNA反转录成cDNA, 再将cDNA进行PCR扩增, 每个扩增反应体系为20 μL, 每个样本重复3次, 以GAPDH为内参, 采用2^{-ΔΔCt}的方法计算mRNA相对表达量。

1.4.5 免疫荧光化学方法检测骨髓间充质干细胞角蛋白表达 按上述分组进行培养处理5 d后收集骨髓间充

质干细胞爬片, 40 g/L多聚甲醛溶液固定30 min, PBS洗涤3次, 添加体积分数为10%山羊血清封闭液室温孵育30 min, 吸去封闭液, 添加鸡抗小鼠角蛋白荧光直标抗体, 空白对照滴加PBS, 暗室中孵育1 h, PBS洗涤3次, DAPI复染细胞核, 暗室反应10 min。荧光显微镜下观察, 如果出现红色荧光则视为角蛋白阳性表达。

引物序列:

基因	序列	产物大小
CK19	F:5'-CTG GGT GGC AAT GAG AAG AT-3' R:5'-TCAAC TTG GTC CGG AAG TC-3'	180 bp
EMA	F:5'-GAG GAT CCG CTC CAC CTC TCAA-3' R:5'-CCAACG TTC TGG GCA CTG AAC TTC TCT GGG TAG-3'	335 bp
CK18	F:5'-CGA TAC AAG GCA CAG ATG GA-3' R:5'-CTT CTC CAT CCT CCA GCAAG-3'	177 bp
CK7	F:5'-AGC TGT GTC CAG CCG CTA TGT-3' R:5'-TAA GCA GTG GAG CGA GAG CTG A-3'	196 bp
GAPDH	F:5'-AGC TGT GTC CAG CCG CTA TGT-3' R:5'-TAA GCA GTG GAG CGA GAG CTG A-3'	226 bp

1.4.6 RT-PCR检测细胞共培养不同时间骨髓间充质干细胞上皮细胞标记CK7, CK18, CK19, EMA mRNA相对表达^[9] 第3组细胞共培养第1, 3, 5, 7天, 收集培养板底部骨髓间充质干细胞进行RT-PCR实验, 检测上皮细胞标记CK7, CK18, CK19, EMA mRNA表达。

1.5 主要观察指标 ①小鼠骨髓间充质干细胞形态和子宫内质细胞形态。②骨髓间充质干细胞上皮细胞标记CK7, CK18, CK19, EMA mRNA相对表达。③骨髓间充质干细胞角蛋白表达。

1.6 统计学分析 使用SPSS 18.0软件进行统计学处理。采用K-W方法进行检验, 组间两两比较采用SNK-q法, P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 小鼠骨髓间充质干细胞形态 培养1 d后细胞开始贴壁, 胞体为多边形或者圆形(图1A); 培养2 d, 可见短梭形、星形的细胞分散贴壁生长(图1B); 培养7 d, 细胞呈成纤维细胞样(图1C)。

2.2 小鼠子宫内质细胞形态 接种后30 min开始发生贴壁, 2 h大部分细胞贴壁; 培养1 d, 细胞大多呈纺锤状, 呈漩涡状生长(图2A); 培养2 d, 细胞体积逐渐增大(图2B); 培养3 d, 细胞质向外伸展突起, 呈成纤维样(图2C)。

2.3 细胞共培养后各组骨髓间充质干细胞上皮细胞标记CK7, CK18, CK19, EMA mRNA相对表达 细胞共培养第5天, 骨髓间充质干细胞CK7 mRNA表达量在各组中依次上升, 在第4组中表达最高, 各组之间经比较差异有显著性意义(P < 0.05)。CK18, CK19 mRNA表达量在第2, 3, 4组均比第1组显著升高(P < 0.05), 但后3组间经比较差异无显著性意义(P > 0.05)。EMA mRNA表达量在第2, 4组的表达比第1, 3组升高, 但第2, 4组组间比较差异无显著性意义(P > 0.05), 见表1, 图3。

表1 各组骨髓间充质干细胞上皮细胞标记 CK7, CK18, CK19, EMA mRNA 相对表达 (x±s)
Table 1 Relative mRNA expressions of epithelial cell markers in each group

上皮细胞标记	第1组	第2组	第3组	第4组
CK7	1±0	1.514±0.125 ^a	3.187±0.988 ^a	5.218±1.875 ^a
CK18	1±0	2.685±1.157 ^a	4.125±0.785 ^a	5.889±2.741 ^a
CK19	1±0	1.514±0.057 ^a	1.785±0.354 ^a	2.957±0.945 ^a
EMA	1±0	2.115±0.141 ^{ab}	1.005±0.005	3.541±1.191 ^{ab}

表注: 第1组: 骨髓间充质干细胞单独培养; 第2组: 骨髓间充质干细胞单独培养+诱导分化培养基; 第3组: 骨髓间充质干细胞与子宫内质细胞共培养; 第4组: 骨髓间充质干细胞与子宫内质细胞共培养+诱导分化培养基。与第1组比较, ^aP < 0.05; 与第3组比较, ^bP < 0.05。

2.4 细胞共培养后各组骨髓间充质干细胞角蛋白的表达 细胞共培养后第5天, 细胞免疫荧光检测结果显示第4组呈强阳性表达, 第3组呈弱阳性表达, 第1, 2组呈阴性表达。

2.5 细胞共培养不同时间骨髓间充质干细胞上皮细胞标记CK7, CK18, CK19, EMA mRNA相对表达 第3组细胞共培养第1, 3, 5, 7天, 随着时间的推移, CK7表达量不断增高, 且第5, 7天的表达量显著高于第1, 3天, 存在时间差异(P < 0.05)。CK18, CK19, EMA mRNA的表达量则无明显时间差异(P > 0.05), 见表2, 图4。

表2 细胞共培养不同时间骨髓间充质干细胞上皮细胞标记 CK7, CK18, CK19, EMA mRNA 相对表达 (x±s)
Table 2 Comparison of the relative mRNA expression of epithelial cell markers at different time points after co-culture

上皮细胞标记	第1天	第3天	第5天	第7天
CK7	1.085±0.198	1.495±0.078	3.795±0.321 ^{ab}	6.375±1.172 ^{ab}
CK18	0.993±0.175	1.675±0.321	1.635±0.095	2.102±0.751
CK19	1.358±0.510	1.567±0.580	2.259±0.138	1.385±0.051
EMA	1.315±0.435	0.870±0.215	0.935±0.089	1.162±0.083

表注: 与第1天比较, ^aP < 0.05; 与第3天比较, ^bP < 0.05。

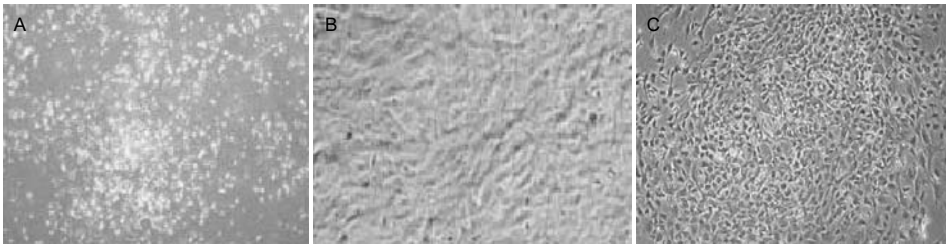


图 1 小鼠骨髓间充质干细胞培养形态($\times 100$)

Figure 1 Morphology of mouse bone marrow mesenchymal stem cells after culture ($\times 100$)

图注: 图中 A 为培养 1 d, 细胞开始贴壁; B 为培养 2 d, 可见短梭形、星形的细胞分散贴壁生长; C 为培养 7 d, 细胞呈成纤维细胞样。

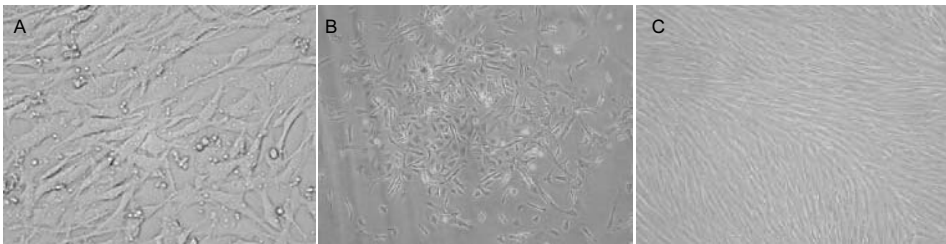


图 2 小鼠子宫内质间质细胞培养形态($\times 200$)

Figure 2 Morphology of mouse endometrial stromal cells ($\times 200$)

图注: 图中 A 为培养 1 d, 细胞大多呈纺锤状; B 为培养 2 d, 细胞体积逐渐增大; C 为培养 3 d, 细胞质向外伸展突起, 呈成纤维样。

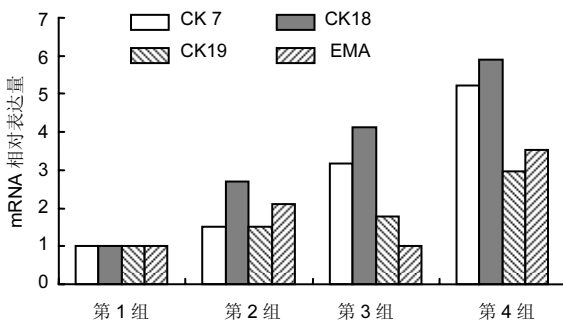


图 3 各组骨髓间充质干细胞上皮细胞标记 CK7, CK18, CK19, EMA mRNA 相对表达

Figure 3 Relative mRNA expressions of epithelial cell markers in each group

图注: 第 1 组: 骨髓间充质干细胞单独培养; 第 2 组: 骨髓间充质干细胞单独培养+诱导分化培养基; 第 3 组: 骨髓间充质干细胞与子宫内质间质细胞共培养; 第 4 组: 骨髓间充质干细胞与子宫内质间质细胞共培养+诱导分化培养基。

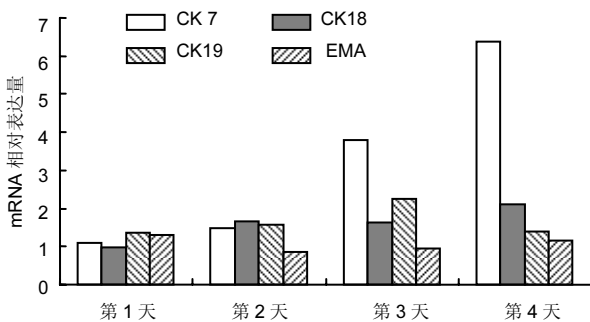


图 4 骨髓间充质干细胞与子宫内质间质细胞共培养不同时间骨髓间充质干细胞上皮细胞标记 CK7, CK18, CK19, EMA mRNA 相对表达

Figure 4 Relative mRNA expressions of epithelial cell markers at different time points after co-culture

3 讨论 Discussion

子宫在维持女性生殖功能等方面发挥出十分重要的作用。子宫内膜分为 2 层, 即功能层和基底层^[10], 功能层随着月经周期不断地更新、脱落、再生; 基底层则主要由疏松结缔组织组成。子宫内膜损伤会导致闭经、不孕、习惯性流产, 严重危害到女性的健康以及正常的生殖功能, 经治疗后均无法获得理想的效果^[11-15]。随着干细胞理论及相关技术的不断发展, 开始积极尝试利用干细胞技术修复子宫内膜损伤^[16]。骨髓来源间充质干细胞具有很强的分化潜能以及可塑性, 在一定条件下可以实现多向分化, 扩增速度很快^[17-20]。骨髓间充质干细胞植入体内后能通过“定向”移动方式到达相应的受损部位, 并对其进行有效修复^[21]。因此, 骨髓间充质干细胞已经成为组织工程以及再生医学等领域的研究热点^[22-23]。实验对小鼠骨髓间充质干细胞进行干预, 探讨其是否能向子宫内壁上皮细胞方向进行分化, 以期能够为临床不同原因导致的子宫内膜受损提供更多的参考依据。

实验通过设置 4 组不同处理来观察内源性和外源性因素在促进骨髓间充质干细胞向上皮细胞分化所起的作用。第 1 组为单纯小鼠骨髓间充质干细胞, 用普通培养基培养, 第 2 组为单纯小鼠骨髓间充质干细胞, 用含 β -雌二醇、生长因子的诱导培养基培养, 即外源性因素干预, 第 3 组为骨髓间充质干细胞与子宫内质间质细胞共培养, 用普通培养基培养, 即内源性因素干预, 第 4 组为骨髓间充质干细胞与子宫内质间质细胞共培养, 用

含 β -雌二醇、生长因子的诱导培养基培养, 即外源性因素+内源性因素共同作用。细胞角蛋白是免疫组织化学中几乎最常用的一类分子标记物, 是上皮性起源标记物, 主要用于上皮组织以及上皮来源肿瘤的诊断与鉴别。角蛋白家族成员众多, 分布广泛而且复杂。在不同上皮或者同上皮的不同生理状态下角蛋白分子的表达模式会有不同或变化, 其中单层上皮模式中包括的分子一般为 CK8/18、CK7/19、CK20(低分子组角蛋白); 而分层上皮模式中包括的分子一般为 CK5/14、CK15、CK6/16、CK17、CK9、CK3/12(高分子组角蛋白)。另外, EMA 也是上皮细胞特异标记物之一。此次实验即选择上述标志物对细胞分化情况进行观察。共培养第 5 天, 采用 Realtime RT-PCR 方法检测各组上皮细胞标记 mRNA 相对表达, 结果发现, CK7 相对表达量在各组中依次上升, 并在第 4 组中达到最高, 各组之间经比较差异有显著性意义, 说明在外源性因素和内源性因素的联合作用在促进小鼠骨髓间充质干细胞向子宫内上皮细胞方向分化的作用最显著。第 2, 3, 4 组 CK18, CK19 mRNA 的表达均较第 1 组显著升高, 且第 2, 3, 4 组间比较差异无显著性意义。EMA 在第 2, 4 组的表达比第 1, 3 组升高, 但组间比较差异也无显著性意义, 说明外源性因子在促进 EMA 表达升高上起主要作用^[24-27]。目前子宫内上皮细胞尚缺乏特异性的细胞标记物^[28-31]。实验采用免疫荧光化学检测骨髓间充质干细胞角蛋白表达, 结果显示第 4 组呈强阳性表达, 第 3 组呈弱阳性表达, 第 1, 2 组呈阴性表达, 说明在外源性因素和内源性因素的联合作用促进小鼠骨髓间充质干细胞向子宫内上皮细胞方向分化的作用最显著, 与 PCR 检测结果一致, 进一步证实了外源性因素和内源性因素联合作用的效果^[32]。实验进一步观察了骨髓间充质干细胞向子宫内上皮细胞方向分化时间方面的差异, 细胞共培养第 1, 3, 5, 7 天, RT-PCR 检测显示随着时间的推移, CK7 表达量不断上升, 且第 5, 7 天的表达量显著高于第 1, 3 天, 不同时间经比较差异有显著性意义。CK18、CK19、EMA 在不同时间的表达量差异无显著性意义。上述结果显示, 骨髓间充质干细胞向子宫内上皮细胞方向分化并成为内异病灶需要一定的微环境条件, 需要作用一定的时间才能最终发展成为子宫内异位症^[33]。

综上所述, 小鼠骨髓间充质干细胞在一定条件下可向子宫内上皮细胞方向分化。外源性因素和内源性间质细胞分泌因子联合作用下, 其促进小鼠骨髓间充质干细胞向子宫内上皮细胞方向分化的作用最显著。

作者贡献: 实验设计、实施、评估为全部作者。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 张雯碧. 小鼠骨髓间充质干细胞向子宫内上皮细胞方向分化的体外研究[D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [2] Taylor HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. JAMA. 2004;292(1):81-85.
- [3] 张晓磊, 卢美松. 骨髓间充质干细胞与子宫内膜再生[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2015, 34(5):433-436, 440.
- [4] 路平, 赵潇丹, 郝玉娟, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞在子宫内皮损伤小鼠子宫内皮中的定位[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2015, 50(1):101-103, 104.
- [5] Ding L, Li X, Sun H, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus. Biomaterials. 2014;35(18):4888-4900.
- [6] Jing Z, Qiong Z, Yonggang W, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells improve regeneration of thin endometrium in rat. Fertil Steril. 2014;101(2):587-594.
- [7] Zemel'ko VI, Kozhukharova IB, Alekseenko LL, et al. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue and endometrium: a comparative study. Tsitologiya. 2013; 55(2):101-110.
- [8] Du H, Naqvi H, Taylor HS. Ischemia/reperfusion injury promotes and granulocyte-colony stimulating factor inhibits migration of bone marrow-derived stem cells to endometrium. Stem Cells Dev. 2012;21(18):3324-3331.
- [9] 彭艳, 何援利, 付霞霏, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞在子宫内皮组织中迁移分化的研究[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(27): 4268-4271.

- [10] 周云帆,杨波,胡祥,等.经血源性子宫内膜间充质干细胞的分离、培养与鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复, 2010,14(32):5952-5956.
- [11] Ishikawa M, Nakayama K, Yeasmin S, et al. NAC1, a potential stem cell pluripotency factor expression in normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. *Int J Oncol.* 2010;36(5): 1097-1103.
- [12] Chen YZ, Wang JH, Yan J, et al. Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-1 in the ectopic endometrium of adenomyosis does not correlate with serum estradiol and progesterone levels. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;173:88-93.
- [13] 周长辉.人脐带Wharton's jelly及子宫内膜间充质干细胞免疫调节作用研究[D]. 郑州:郑州大学,2010.
- [14] 彭艳,何援利,朱少芳,等.大鼠骨髓间充质干细胞的PKH26标记和示踪[J].中国组织工程研究,2012,16(14): 2487-2490.
- [15] 王昕荣.小鼠子宫内膜干细胞的初步研究[D].武汉:华中科技大学,2007.
- [16] Zemelko VI, Grinchuk TM, Domnina AP, et al. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: Isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. *Cell and Tissue Biology.* 2012; 6(1):1-11.
- [17] Domnina AP, Fridlyanskaya II, Zemelko VI, et al. Mesenchymal Stem Cells from Human Endometrium Do not Undergo Spontaneous Transformation during Long-Term Cultivation. *Cell and Tissue Biology.* 2013; 7(3):221-226.
- [18] Borodkina AV, Shatrova AN, Pugovkina NA, et al. Different Protective Mechanisms of Human Embryonic and Endometrium-Derived Mesenchymal Stem Cells under Oxidative Stress. *Cell and Tissue Biology.* 2014;8(1):11-21.
- [19] Revel A. Multitasking human endometrium: a review of endometrial biopsy as a diagnostic tool, therapeutic applications, and a source of adult stem cells. *Obstet Gynecol Surv.* 2009;64(4):249-257.
- [20] Indumathi S, Harikrishnan R, Rajkumar JS, et al. Prospective biomarkers of stem cells of human endometrium and fallopian tube compared with bone marrow. *Cell Tissue Res.* 2013;352(3):537-549.
- [21] 赵静.骨髓间充质干细胞移植治疗薄型子宫内膜的实验研究[D].长沙:中南大学,2013.
- [22] 赵潇丹.小鼠骨髓间充质干细胞对子宫内膜损伤修复的初步研究[D]. 郑州:郑州大学,2012.
- [23] Hyodo S, Matsubara K, Kameda K, et al. Endometrial injury increases side population cells in the uterine endometrium: a decisive role of estrogen. *Tohoku J Exp Med.* 2011;224(1):47-55.
- [24] Horn LC, Hänel C, Bartholdt E, et al. Mixed serous carcinoma of the endometrium with trophoblastic differentiation: analysis of the p53 tumor suppressor gene suggests stem cell origin. *Ann Diagn Pathol.* 2008;12(1):1-3.
- [25] Gao X, Yan J, Shen Y, et al. Human fetal trophoblast matrix and uterine endometrium support better human embryonic stem cell growth and neural differentiation than mouse embryonic fibroblasts. *Cell Reprogram.* 2010;12(3):295-303.
- [26] Uzan C, Cortez A, Dufournet C, et al. Endometrium from women with and without endometriosis, and peritoneal, ovarian and bowel endometriosis, show different c-kit protein expression. *J Reprod Immunol.* 2005;65(1):55-63.
- [27] Zybina TG, Kaufmann P, Frank HG, et al. Genome multiplication of extravillous trophoblast cells in human placenta in the course of differentiation and invasion into endometrium and myometrium. I. Dynamics of polyploidization. *Tsitologija.* 2002;44(11):1058-1067.
- [28] Spitzer TL, Rojas A, Zelenko Z, et al. Perivascular human endometrial mesenchymal stem cells express pathways relevant to self-renewal, lineage specification, and functional phenotype. *Biol Reprod.* 2012;86(2):58.
- [29] Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, et al. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod.* 2009;80(6):1136-1145.
- [30] Wolff EF, Wolff AB, Hongling Du, et al. Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. *Reprod Sci.* 2007;14(6):524-533.
- [31] 彭艳,何援利,刘芳,等.骨髓间充质干细胞参与子宫内膜异位症形成的实验研究[J].实用妇产科杂志,2014,30(7): 515-518.
- [32] 刘芳,何援利.模拟子宫内膜微环境体外诱导兔骨髓间充质干细胞向子宫内膜上皮细胞分化的实验研究[J].现代妇产科进展,2012,21(11):878-881.
- [33] 王永刚.大鼠骨髓间充质干细胞向子宫内膜细胞分化的体外实验[D].长沙:中南大学,2012.