

## 聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜联合间充质干细胞修复子宫内膜损伤

安江茹<sup>1</sup>, 张锦艺<sup>1</sup>, 王秋花<sup>1</sup>, 杨杨杨<sup>1</sup>, 王文双<sup>2</sup>, 张晓晴<sup>1</sup><https://doi.org/10.12307/2025.429>

投稿日期: 2024-02-28

采用日期: 2024-04-23

修回日期: 2024-06-16

在线日期: 2024-07-04

中图分类号:

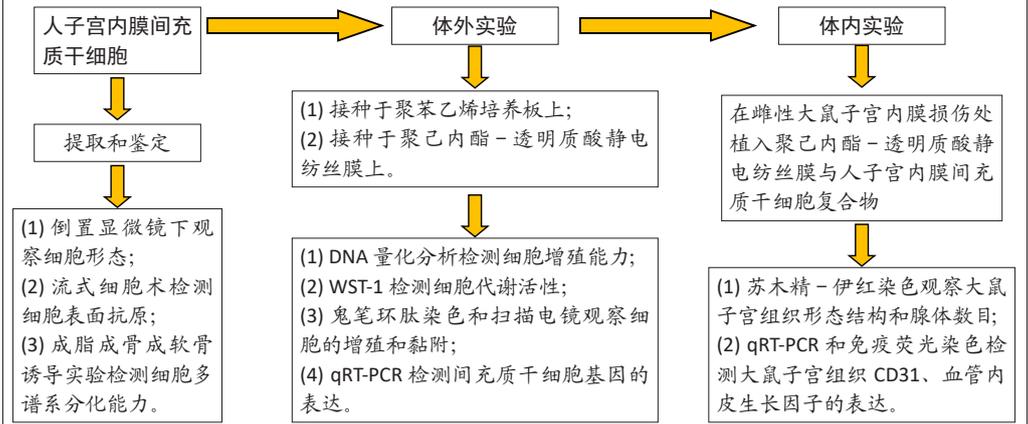
R459.9; R318.08; R713

文章编号:

2095-4344(2025)16-03369-11

文献标识码: A

## 文章快速阅读: 负载干细胞聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜修复子宫内膜损伤



## 文题释义:

**静电纺丝:** 是利用高压静电场对高分子溶液的击穿作用来制备微米纤维材料的方法, 基本原理是在喷射装置和接收装置间施加上万伏的静电场, 从纺丝液的锥体末端形成射流并在电场中被拉伸, 最终在接收装置上形成无纺状态的纳米纤维。

**人子宫内充质干细胞:** 是一种具有多向分化潜能、自我更新能力、低免疫原性、低致瘤性等特性的成体干细胞, 能够直接修复受损的子宫内膜, 促进血管生成, 恢复子宫形态结构。

## 摘要

**背景:** 人子宫内充质干细胞能够直接修复受损的子宫内膜, 促进血管生成、恢复子宫形态结构, 然而将干细胞直接注入受损子宫内膜后的细胞存活率低、滞留时间短, 修复效果有限。

**目的:** 观察聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜复合人子宫内充质干细胞修复大鼠子宫内膜损伤的效果。

**方法:** ①细胞实验: 采用胶原酶消化法提取人子宫内充质干细胞, 静电纺丝技术制备聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜。将人子宫内充质干细胞分别接种于聚苯乙烯培养板与聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜上, 通过DNA定量分析、WST-1细胞活性实验、鬼笔环肽染色、扫描电镜观察细胞的增殖与黏附能力, qRT-PCR检测静电纺丝膜上细胞CD90、Meflin的mRNA表达。②动物实验: 取27只处于动情期的雌性SD大鼠, 通过机械搔刮法建立宫腔粘连模型后随机分为3组, 每组9只: 空白对照组不进行任何治疗, 对照组将聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜植入宫腔损伤部位, 实验组将聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜/人子宫内充质干细胞补片植入宫腔损伤部位。术后第3, 7, 14天取材, 采用苏木精-伊红染色观察子宫形态结构及腺体数量, qRT-PCR和免疫荧光染色观察子宫组织CD31、血管内皮生长因子的表达。

**结果与结论:** ①细胞实验: 与聚苯乙烯培养板相比, 聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜可促进人子宫内充质干细胞的增殖与黏附, 并且聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜支持人子宫内充质干细胞基因CD90和Meflin的表达; ②动物实验: 苏木精-伊红染色显示, 聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜/人子宫内充质干细胞补片可促进子宫内膜损伤后形态结构的恢复, 术后第14天的内膜厚度与腺体数量均多于空白对照组、对照组( $P < 0.05$ ); qRT-PCR和免疫荧光染色检测显示, 实验组术后第7, 14天的CD31、血管内皮生长因子mRNA与蛋白表达均高于空白对照组、对照组( $P < 0.05$ ); ③结果表明: 聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜可以提高干细胞的存活率、延长干细胞与受损组织的接触时间, 二者复合移植可更好地修复受损子宫内膜组织。

**关键词:** 子宫内膜; 宫腔粘连; 人子宫内充质干细胞; 静电纺丝膜; 聚己内酯; 透明质酸

**缩略语:** 聚己内酯-透明质酸: polycaprolactone-hyaluronic acid, PCL-HA; 人子宫内充质干细胞: human endometrial mesenchymal stem cells, hEMSCs

## Mesenchymal stem cells combined with polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane in repair of endometrial injury

An Jiangru<sup>1</sup>, Zhang Jinyi<sup>1</sup>, Wang Qiuhua<sup>1</sup>, Yang Yangyang<sup>1</sup>, Wang Wenshuang<sup>2</sup>, Zhang Xiaqing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>滨州医学院基础医学院, 人体解剖与组织胚胎学教研室, 生物材料与组织再生国际合作联合实验室, 山东省烟台市 264003; <sup>2</sup>烟台毓璜顶医院妇科, 山东省烟台市 264000

**第一作者:** 安江茹, 女, 1999年生, 河南省濮阳市人, 汉族, 硕士, 主要从事生物材料与组织再生研究。

**通讯作者:** 张晓晴, 教授, 滨州医学院基础医学院, 人体解剖与组织胚胎学教研室, 生物材料与组织再生国际合作联合实验室, 山东省烟台市 264003

**通讯作者:** 王文双, 主任医师, 烟台毓璜顶医院妇科, 山东省烟台市 264000

<https://orcid.org/0009-0004-4635-1495> (安江茹)

**基金资助:** 山东省自然科学基金-青年基金项目(ZR2021QC034), 项目负责人: 张晓晴; 泰山学者青年项目(tsqn202103111),

项目负责人: 张晓晴

**引用本文:** 安江茹, 张锦艺, 王秋花, 杨杨杨, 王文双, 张晓晴. 聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜联合间充质干细胞修复子宫内膜损伤[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(16):3369-3379.



<sup>1</sup>School of Basic Medical Sciences, Binzhou Medical University, Department of Human Anatomy and Histoembryology, Joint Laboratory for International Cooperation in Biomaterials and Tissue Regeneration, Yantai 264003, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Department of Gynecology, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, Shandong Province, China

An Jiangru, Master, School of Basic Medical Sciences, Binzhou Medical University, Department of Human Anatomy and Histoembryology, Joint Laboratory for International Cooperation in Biomaterials and Tissue Regeneration, Yantai 264003, Shandong Province, China

**Corresponding author:** Zhang Xiaoping, Professor, School of Basic Medical Sciences, Binzhou Medical University, Department of Human Anatomy and Histoembryology, Joint Laboratory for International Cooperation in Biomaterials and Tissue Regeneration, Yantai 264003, Shandong Province, China

**Corresponding author:** Wang Wenshuang, Chief physician, Department of Gynecology, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, Shandong Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Human endometrial mesenchymal stem cells can directly repair the damaged endometrium, promote angiogenesis, and restore the morphological structure of the uterus. However, after the direct injection of stem cells into the damaged endometrium, the cell survival rate is low, the retention time is short, and the repair effect is limited.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane combined with human endometrial mesenchymal stem cells on endometrial injury in rats.

**METHODS:** (1) Cell experiment: Human endometrial mesenchymal stem cells were extracted by collagenase digestion method. Polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane was prepared by electrospinning technology. The human endometrial mesenchymal stem cells were inoculated on polystyrene culture plate and polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane. The proliferation and adhesion of the cells were observed by DNA quantitative analysis, WST-1 cell activity test, phalloidin staining, and scanning electron microscopy. The mRNA expressions of CD90 and Meflin in electrospun membrane were detected by qRT-PCR. (2) Animal experiments: 27 female SD rats in estrus were selected to establish uterine adhesion model by mechanical scratching method and randomly divided into three groups with nine rats in each group: The blank control group did not receive any treatment; the control group was implanted with polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane; the experimental group was implanted with polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane/human endometrial mesenchymal stem cell mesh. Samples were collected at 3, 7, and 14 days after surgery. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the morphological structure of uterus and the number of glands. qRT-PCR and immunofluorescence staining were used to observe the expression of CD31 and vascular endothelial growth factor in uterine tissue.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Cell experiment: Compared with polystyrene culture plate, polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane could promote the proliferation and adhesion of human endometrial mesenchymal stem cells. Polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane supported the expression of CD90 and Meflin genes of human endometrial mesenchymal stem cells. (2) Animal experiments: Hematoxylin-eosin staining showed that polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane/human endometrial mesenchymal stem cell patch could promote the recovery of endometrial morphological structure after injury. The endometrial thickness and number of gland on day 14 after surgery were higher than those in blank control group and control group ( $P < 0.05$ ). qRT-PCR and immunofluorescence staining showed that the mRNA and protein expressions of CD31 and vascular endothelial growth factor in the experimental group were higher than those in the blank control group and the control group at 7 and 14 days after surgery ( $P < 0.05$ ). (3) The results showed that polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane could improve the survival rate of stem cells and prolong the contact time between stem cells and the damaged tissue, and the composite transplantation of the two could better repair the damaged endometrial tissue.

**Key words:** endometrium; intrauterine adhesion; human endometrial mesenchymal stem cell; electrospinning membrane; polycaprolactone; hyaluronic acid

**Funding:** Shandong Provincial Natural Science Foundation-Youth Fund Project, No. ZR2021QC034 (to ZXQ); Mount Taishan Scholar Youth Project, No. tsqn202103111 (to ZXQ)

**How to cite this article:** AN JR, ZHANG JY, WANG QH, YANG YY, WANG WS, ZHANG XQ. Mesenchymal stem cells combined with polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane in repair of endometrial injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(16):3369-3379.

## 0 引言 Introduction

人子宫内膜是一种高度动态的可再生组织，在女性整个育龄期中经历了 400 多次脱落和再生<sup>[1]</sup>。位于宫腔表面的子宫内膜可分为基底层和功能层两部分，在胚胎着床和妊娠维持中发挥显著作用<sup>[2]</sup>。自青春期起，在卵巢分泌雌激素和孕激素的周期性作用下，正常子宫内膜功能层出现周期性变化，称为月经周期。子宫内膜周期性变化一般分为 3 期，即月经期、增生期和分泌期。反复诊断性刮宫、流产或感染通常会造成功能层损伤，从而导致宫腔粘连，影响生育<sup>[3-4]</sup>。宫腔粘连的主要临床症状包括周期性下腹痛、月经量减少、复发性流产和不孕症<sup>[5]</sup>，目前传统的治疗方法有宫腔镜下经宫颈粘连切除术、应用人工激素治疗、宫内放置节育器等，但是治疗后的子宫内膜仍有损伤，无法避免粘连重新形成<sup>[6]</sup>。因此，迫切需要研究出有效、稳定的宫腔粘连防治方法。研究表明，人子宫内膜间充质干细胞 (human endometrial mesenchymal stem cells, hEMSCs) 具有自我更新和组织再生的能力，能够直接修复受损的子宫内膜，促进血管生成，恢复子宫形态结构<sup>[7-9]</sup>；此外，hEMSCs 具有高增殖活性、长期稳定性和低免疫原性，而且获得方式较为容易，无伦理学困扰，在组织损伤修

复的临床应用中有巨大应用前景<sup>[10]</sup>。然而既往研究发现，直接将干细胞注射到受损子宫内膜中的修复效果有限，因为移植后的干细胞在受损组织中的存活率低，免疫排斥、损伤组织炎症、氧化应激环境等不良因素均可干扰移植干细胞在损伤组织中的存活<sup>[11]</sup>。生物材料可以支持干细胞的附着和增殖，延长干细胞与损伤组织的接触时间，从而达到更好的修复效果<sup>[12]</sup>。

静电纺丝技术已成为制备携带干细胞纳米纤维材料的主流方法，这些纳米材料可用于制备组织修复和伤口愈合的组织补片<sup>[13]</sup>。静电纺丝膜与天然细胞外基质在形态上具有相似性，其特征是超细连续纤维、高表面体积比、高孔隙率和可变孔径分布<sup>[14]</sup>，这种支架结构决定了细胞的附着、迁移、增殖和分化<sup>[15]</sup>。聚己内酯是一种医疗常用的有机聚合物，机械性能强、生物相容性好，可以降解，然而其疏水性可能会限制细胞的黏附和增殖<sup>[16]</sup>。透明质酸是一种源自天然细胞外基质的线形多糖<sup>[17]</sup>，具有极佳的亲水性、生物相容性、生物可降解性和非免疫反应性，参与调控细胞的黏附、增殖、分化等多种细胞生理过程<sup>[18]</sup>，近年来成为天然生物医用材料的研究热点<sup>[19]</sup>。研究发现，透明质酸可作为机械和物理屏障减少子宫毛细血管出血，

改善宫内环境,防止宫腔粘连术后复发<sup>[20]</sup>,然而透明质酸会迅速流出子宫腔,不能长时间形成屏障,限制了治疗效果<sup>[21]</sup>。因此,可以利用静电纺丝技术将具有强大机械性能的合成生物材料聚己内酯和天然生物材料透明质酸结合,生成复合功能纳米纤维膜,利用透明质酸特殊的物理性质和促进细胞迁移的生理功能来改善纳米纤维的局限性,同时结合聚己内酯优秀的力学性质与稳定性来增加透明质酸的可纺性。此次实验将 hEMSCs 种植在聚己内酯-透明质酸 (polycaprolactone-hyaluronic acid, PCL-HA) 静电纺丝膜上形成细胞-材料补片,延长干细胞在组织损伤部位发挥作用的时间,观察补片促进受损子宫内膜组织修复和再生的效果。

血管生成对于子宫内膜健康状态非常重要,良好的血供可以更好地帮助内膜修复<sup>[22]</sup>。血管生成成为胚胎滋养细胞侵入位于底蜕膜的子宫螺旋动脉、形成毛细血管网提供基础,并且提高子宫内膜的容受性,促进胚胎的着床和发育,在胚胎植入后维持妊娠状态<sup>[23]</sup>。血管生成的动态平衡受到促血管生成因子的调节控制,血管内皮生长因子可能是血管发育过程中最特异和最关键的因子<sup>[24]</sup>。血管内皮生长因子是一种特异性有丝分裂原,对血管内皮细胞有生长刺激和趋化作用,促进新血管形成、维持血管壁的完整性和通透性,参与受精着床、胎盘形成和胎儿生长发育等重要过程<sup>[25-27]</sup>。基质微血管密度是评价血管生成的客观指标,CD31 具有特异性,是内皮细胞的敏感标志物,可以用来标记微血管密度<sup>[28]</sup>。

实验将从人子宫内膜组织中分离 hEMSCs,评估 PCL-HA 静电纺丝膜对 hEMSCs 增殖、黏附及间充质干细胞基因表达的影响,进一步将 PCL-HA 静电纺丝膜复合 hEMSCs 移植到受损的子宫内膜中,明确 PCL-HA 静电纺丝膜复合 hEMSCs 是否可以恢复大鼠子宫内膜的形态结构以及促进血管生成,为宫腔粘连治疗提供新的方法和策略。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验+动物实验,两组间的数据分析比较采用两独立样本 *t* 检验,多组间的数据比较分析采用单因素方差分析和 Turkey's 多重比较检验方法。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 7 月至 2023 年 7 月在滨州医学院解剖学教研室-生物材料与组织再生实验室完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康雌性 SD 大鼠 27 只,8-10 周龄,体质量 220-250 g,均购自济南朋悦生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(鲁)2022-0006。实验大鼠饲养于山东省滨州医学院烟台校区清洁级动物房,条件为光照时间 12 h/d,温度 22 °C,相对湿度 50%,鼠粮和水提供充足,

保证定时更换垫料并通风换气,实验条件符合 SPF 级动物实验室的标准,实验开始前适应性喂养 1 周。动物实验已通过滨州医学院伦理委员会审核批准(伦理审批号:动研批第 2021-068 号)。

1.3.2 实验材料与试剂 聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜(纤维膜直径为 780 nm,孔隙率为 82%,厚度为 34 μm,西安昊然);DMEM/F12 培养基、青霉素-链霉素混合液、胎牛血清、成脂分化诱导试剂盒、成骨分化诱导试剂盒、成软骨分化诱导试剂盒(武汉普诺赛);0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液、油红 O 染色液、茜素红染色液、阿利新蓝染色液、结晶紫染色液、罗丹明标记鬼笔环肽、DAPI 溶液、抗荧光衰减封固剂、2.5% 戊二醛固定液、中性树脂、封闭山羊血清(北京索莱宝);胶原酶 I 型、40 g/L 多聚甲醛(中国白鲨);CD90-PE 流式抗体、CD73-PE-cy7 流式抗体、CD45-APC-cy7 流式抗体(美国 BioLegend);WST-1 试剂盒(上海碧云天);Triton/EDTA 细胞裂解液(北京索莱宝);Hoechst 33258 染色液(北京索莱宝);DNA 标准溶液(美国 Sigma);Trizol、反转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒(南京诺唯赞);引物(湖南艾科瑞);苏木精、伊红(上海诺伦);CD31 兔一抗(武汉三鹰);血管内皮生长因子兔一抗(武汉博士德);山羊抗兔 IgG 免疫荧光二抗(美国 Immunoway)。

1.3.3 实验仪器 恒温水浴锅(上海力辰邦西);恒温振荡器(上海一恒);CO<sub>2</sub> 培养箱(上海力新);离心机(长沙湘仪);荧光倒置显微镜(美国 Echo);酶标仪(上海美谷);石蜡包埋机、石蜡切片机(德国 Leica);冰冻切片机(美国 Thermo Fisher);超纯水过滤机(四川优普);流式细胞仪(美国 BD);扫描电镜(德国蔡司);实时荧光定量仪(德国罗氏)。

### 1.4 方法

1.4.1 hEMSCs 的提取及培养<sup>[29]</sup> 人子宫内膜组织从烟台毓璜顶医院获取,供者对实验知情同意并签署了知情同意书,实验已通过滨州医学院伦理委员会批准(伦理审批号:伦研批第 2021-043 号)。

提前准备离心管,加入含 1% 青霉素-链霉素混合液的 PBS,收集人体子宫内膜组织标本,0 °C 低温下运输。用含 1% 青霉素-链霉素混合液的 PBS 将子宫内膜组织冲洗 3 次,清除表面的血液和黏液。用无菌眼科剪将组织剪成糊状,转移到离心管,加入组织二三倍体积的 I 型胶原酶(1 mg/mL),置于 37 °C 恒温振荡器中 80 r/min 消化 60 min。消化过后再加入等体积的 DMEM/F12 完全培养基(含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素混合液)终止消化。经 40 μm 筛网过滤后收集滤液到离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 DMEM/F12 完全培养基重悬细胞沉淀后接种于培养瓶中,得到原代 hEMSCs。原代细胞培

养 24 h 后首次换液，以后每 2 d 换液 1 次。观察细胞融合至 80%–90% 后用胰酶消化，以 1 : 2 比例传代，每隔 3 d 传代 1 次，取第 4 代细胞做后续实验。

人子宫内间充质干细胞的培养及鉴定	
细胞来源	人子宫内组织
培养基介绍	DMEM/F12 培养基
添加材料	体积分数 10% 胎牛血清，1% 青霉素 - 链霉素混合液
原代培养时间	原代细胞培养 24 h 首次换液，以后 2 d 换液 1 次
细胞传代	细胞融合至 80%–90% 用胰蛋白酶消化，以 1 : 2 比例传代，每隔 3 d 可传代 1 次，取第 4 代细胞做后续实验
细胞鉴定	流式细胞术检测细胞表面抗原 CD90、CD73 及 CD45 表达，成脂、成骨、成软骨诱导分化
伦理学批准	实验已通过滨州医学院伦理委员会批准 (伦理审批号: 伦研批第 2021-043 号)

#### 1.4.2 hEMSCs 的鉴定

**细胞形态观察:** 使用倒置显微镜观察 hEMSCs 的形态并拍摄照片。

**流式细胞术检测细胞表面抗原:** 取第 4 代 hEMSCs，弃培养基，用 PBS 清洗，胰酶消化 5 min 后加入 DMEM/F12 完全培养基终止消化，1 500 r/min 离心 10 min，收集细胞沉淀，计数后用无菌 PBS 重悬。取 50  $\mu$ L 细胞悬液至流式管，分别加入 CD90-PE、CD73-PE-cy7 和 CD45-APC-cy7 抗体 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 40 min，用 PBS 清洗后上流式细胞仪检测。

**成脂、成骨、成软骨诱导分化:** 将 hEMSCs 接种于 96 孔板，观察细胞融合至 80% 后，按照试剂盒说明书分别加入成脂、成骨和成软骨诱导培养基，每 2 d 换液一次。诱导 21 d 后，分别进行油红 O、茜素红或阿利新蓝染色，显微镜下观察细胞分化情况并拍照。

**1.4.3 PCL-HA 静电纺丝膜的制备** 分别称取 1.88 g 的聚己内酯与 0.94 g 的透明质酸，一同加入到 10 mL 六氟异丙醇中磁力搅拌 12 h，获得澄清透明的纺丝液。将纺丝液倒入注射器，在静电纺丝机上纺丝，设置纺丝液流速为 1.5 mL/h，纺丝电压为 12.6 kV，纺丝距离为 20 cm。纺丝完成后，将纤维膜在真空干燥箱烘干 48 h 以去除残余溶剂，最后避光储存在干燥器中备用。使用前置于体积分数 70% 乙醇中消毒过夜。

#### 1.4.4 细胞实验

**实验分组及干预:** 用打孔器将 PCL-HA 静电纺丝膜做成大小均一的圆片，放入 48 孔板中，每孔加入体积分数 70% 乙醇消毒过夜，次日加入 PBS 漂洗 3 次，直至去除残留的乙醇。将 hEMSCs 悬浮液分别接种于聚苯乙烯培养板与 PCL-HA 静电纺丝膜上，细胞密度为  $5 \times 10^4$ /孔，置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

**DNA 量化分析细胞增殖:** 培养 1, 3, 7 d 后，每孔加

入 50  $\mu$ L 0.05% Triton/EDTA 细胞裂解液，冰上裂解细胞 1 h，将裂解液转移至 1.5 mL 离心管中剧烈振荡 30 s，65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min (共 2 次); 4  $^{\circ}$ C 下 15 000 r/min 离心 15 min，保留上清，获得样品本液。取 96 孔黑板，在标准孔和样品孔中分别加入 100  $\mu$ L Hoechst 33258 染料溶液 (1 mg/mL)，在标准孔中分别加入 0, 1, 2, 3, 4, 5  $\mu$ L 已知浓度的 DNA 标准溶液，在样品孔中加入 10  $\mu$ L 样品溶液，避光反应 5 min，使用酶标仪在激发波长为 360 nm、发射波长为 460 nm 下进行读数。

**WST-1 法分析细胞活性:** 培养 1, 3, 7 d 后，将 WST-1 试剂和 DMEM/F12 完全培养基体积比 1 : 10 混合后加入孔内，混合溶液体积 200  $\mu$ L，置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1 h，使用酶标仪在波长 450 nm 下测量吸光度值。

**鬼笔环肽染色观察细胞黏附与增殖:** 培养 1, 3, 7 d 后，弃培养基，用 PBS 清洗，室温下用 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 10 min; 用 PBS 清洗，加入 0.5% TritonX-100 溶液透化处理 10 min; 用 PBS 清洗，每孔加入 200  $\mu$ L 鬼笔环肽工作液 (2  $\mu$ L 鬼笔环肽储存液，198  $\mu$ L PBS) 覆盖细胞，室温下避光孵育 30 min; 用 PBS 清洗，每孔加入 200  $\mu$ L DAPI 溶液室温下避光孵育 1 min; 用 PBS 清洗，滴加抗荧光淬灭封固剂封固，置于荧光显微镜下观察并拍照。使用 Image J 软件对荧光面积进行测定分析，每张荧光切片随机选取 4 个高倍镜视野计数细胞，取平均值。

**扫描电镜观察细胞黏附:** 培养 1, 3, 7 d 后，取出细胞 - 材料复合物，用 PBS 轻轻冲洗，2.5% 戊二醛在 4  $^{\circ}$ C 下固定过夜，梯度浓度乙醇脱水，样品干燥后表面喷金，置于扫描电镜下观察并拍摄照片。

**qRT-PCR 检测:** 培养 1, 3, 7 d 后，采用 Trizol 法提取静电纺丝膜上细胞 (或动物实验术后第 3, 7, 14 天的子宫内组织)mRNA，然后按照反转录试剂盒说明书在冰上进行 cDNA 合成。将获得的 cDNA 样品用 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 稀释 10 倍，用于 qRT-PCR。反应体系: 10  $\mu$ L 2 $\times$ ChamQ SYBR qRT-PCR Master Mix、0.4  $\mu$ L 正向引物 (10  $\mu$ mol/L)、0.4  $\mu$ L 反向引物 (10  $\mu$ mol/L)、0.7  $\mu$ L cDNA、8.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。引物序列见表 1。qRT-PCR 条件: 预变性 (95  $^{\circ}$ C 30 s); 40 个循环 (95  $^{\circ}$ C 10 s; 60  $^{\circ}$ C 30 s); 熔解曲线 (95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s)。计算基因的相对表达量，采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法对数据进行分析。细胞实验检测 CD90、Meflin mRNA 表达，动物实验检测血管内皮生长因子、CD31 mRNA 表达。

**1.4.5 动物实验** 将 PCL-HA 静电纺丝膜裁剪成 2.5 cm $\times$ 0.5 cm 大小，置于体积分数 70% 乙醇中消毒过夜。将 50  $\mu$ L hEMSCs 悬液滴于 PCL-HA 静电纺丝膜上 (细胞数量  $1 \times 10^6$ )，置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37  $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后使用。

**宫腔粘连动物模型的建立与分组干预:** 实验大鼠术前禁食、禁饮 12 h。取处于动情期的雌性 SD 大鼠 27 只，

表 1 | qRT-PCR 检测引物序列

Table 1 | Primer sequences for qRT-PCR detection

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')	产物长度 (bp)
CD90	CGC CTT CAC TAG CAA GGA CGA G	CTG ATG CCC TCA CAC TTG ACC A	126
Meflin	CTG GAC CTC AGC CAC AAT CTC A	CAG CTC GTT GCT GTC CAT CTT G	96
GAPDH	GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC	TGG TGA AGA CGC CAG TGG A	138
血管内皮生长因子	CGT CCA ACT TCT GGG CTC TTC	AGC ACT TCT CCC AGC TCC GAT	85
CD31	TCA GCA AGA TTG CCG AGG AGA	GAG CAT TTC GCA CAC CTG GAC	110
$\beta$ -actin	GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA	GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG	150

腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 进行麻醉处理, 在腹部距离尿道口约 3 cm 处作纵行切口, 进入腹腔, 找出“Y”形子宫, 在子宫分叉附近做小切口, 插入改良的 16 G 注射器针头, 以不刮破子宫壁为标准反复进行宫腔搔刮操作, 直至子宫体有明显充血反应及感觉子宫壁变得粗糙时停止刮宫。刮宫完成后, 采用随机数字表法将大鼠分为 3 组, 每组 9 只: 空白对照组不进行任何治疗, 逐层关闭大鼠腹腔; 对照组用针头辅助将裁剪好的无菌 PCL-HA 静电纺丝膜移植到受损子宫内膜表面, 逐层关闭大鼠腹腔; 实验组用针头辅助将 PCL-HA 静电纺丝膜/hEMSCs 补片移植到受损子宫内膜表面, 逐层关闭大鼠腹腔。

**苏木精-伊红染色观察子宫形态结构:** 术后第 3, 7, 14 天, 每组每个时间点各取大鼠 3 只, 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后取子宫内膜组织, 置于 40 g/L 多聚甲醛固定 48 h, 放入包埋盒内, 流水冲洗过夜。将子宫组织依次浸入体积分数 75%, 85%, 95% 乙醇各 2 h, 体积分数 100% 乙醇 I 和 II 各 30 min, 二甲苯 I 和 II 各 30 min, 浸蜡 2 h 后包埋, 调整切片厚度为 4  $\mu$ m 进行切片, 60  $^{\circ}$ C 烤箱烤片 3 h。将石蜡切片依次浸入二甲苯 I 和 II 各 15 min, 体积分数 100% 乙醇 I 和 II 各 10 min, 体积分数 95%, 85%, 75% 乙醇各 5 min, 蒸馏水 1 min, 然后进行苏木精-伊红染色, 体积分数 75%, 85%, 95%, 100% 乙醇脱水各 5 min, 二甲苯 I 和 II 各处理 5 min, 中性树胶封固。每张切片在低倍镜视野下拍照, 每张切片视野选取相互垂直 4 处, 使用 Image J 软件测量内膜厚度, 取平均值; 每张切片随机选择 4 个高倍镜视野, 计数腺体数量, 取平均值。

**免疫荧光染色检测 CD31、血管内皮生长因子蛋白表达:** 术后第 3, 7, 14 天, 取子宫内膜组织, 置于 40 g/L 多聚甲醛中固定至少 24 h, 放入 30% 蔗糖溶液中直至组织沉糖; OCT 包埋后, 冷冻切片切片 (10  $\mu$ m), 用 PBS 清洗; 滴加 0.5% TritonX-100 溶液破膜 10 min, 用 PBS 清洗; 滴加山羊血清封闭液室温封闭 1 h, 滴加 PBS 稀释的 CD31、血管内皮生长因子一抗 (均 1 : 200 稀释) 4  $^{\circ}$ C 避光过夜, 用 PBS 清洗; 滴加与一抗同种属的荧光二抗 (1 : 500 稀释) 室温避光反应 2 h, 用 PBS 清洗; 滴加 DAPI 染色液室温避光反应 5 min, 用 PBS 清洗; 滴加抗荧

光衰减封固剂封固, 倒置荧光显微镜下观察并拍照。使用 Image J 软件对阳性表达荧光面积进行测定分析, 每张荧光切片随机选取 4 个高倍镜视野, 取平均值。

**qRT-PCR 检测:** 取术后第 3, 7, 14 天的子宫内膜组织, 采用 qRT-PCR 检测血管内皮生长因子、CD31 mRNA 表达。检测方法同上。

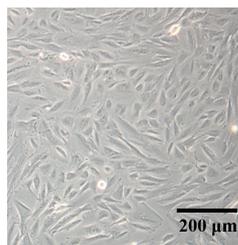
**1.5 主要观察指标** PCL-HA 静电纺丝膜对 hEMSCs 增殖、黏附及间充质干细胞基因表达的影响, 以及 PCL-HA 静电纺丝膜/hEMSCs 补片修复大鼠受损子宫内膜的效果。

**1.6 统计学分析** 所有数据均经过 3 次独立重复实验, 使用 IBM SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间的数据分析比较采用两独立样本 *t* 检验, 多组间的数据比较分析采用单因素方差分析和 Turkey's 多重比较检验方法。P < 0.05 表示数据差异有显著性意义, P < 0.01 表示数据差异有非常显著性意义。该文统计学方法已经滨州医学院生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

### 2.1 hEMSCs 的鉴定

**细胞形态观察:** 倒置显微镜可见 hEMSCs 表现出贴壁特性, 细胞狭长, 呈纺锤状结构, 螺旋形生长, 见图 1。



图注: 第 4 代人子宫内膜间充质干细胞贴壁生长, 呈纺锤状结构, 比例尺 = 200  $\mu$ m。

图 1 | 人子宫内膜间充质干细胞的形态  
Figure 1 | Morphology of human endometrial mesenchymal stem cells

**流式细胞术检测结果:** 细胞表面标志物 CD90 和 CD73 呈高表达, 阳性表达率分别为 (96.5 $\pm$ 0.4)%、(99.7 $\pm$ 0.3)%; CD45 呈低表达, 阳性表达率为 (1.5 $\pm$ 0.1)%, 见图 2。

**成脂、成骨、成软骨分化:** hEMSCs 成脂诱导分化 21 d 后, 油红 O 染色后显微镜下可见透明圆形亮点, 为脂滴, 见图 3A; 成骨诱导分化 21 d 后, 茜素红染色后显微镜下可见细胞呈堆叠生长, 形成明显的矿化结节, 见图 3B; 成软骨诱导分化 21 d 后, 阿利新蓝染色后显微镜下可见细胞形态改变, 呈多角形, 并分泌糖胺聚糖, 见图 3C。

### 2.2 细胞实验结果

**2.2.1 hEMSCs 在 PCL-HA 静电纺丝膜上的增殖和代谢活性** 通过 DNA 定量分析和 WST-1 细胞活性实验研究 PCL-HA 静电纺丝膜对 hEMSCs 增殖和代谢活性的影响, 结果显示: 培养第 3, 7 天, 与聚苯乙烯培养板相比, PCL-HA 静电纺丝膜上的 hEMSCs 显示出更高的增殖能力, 并且随着培养时间的延长, PCL-HA 静电纺丝膜上的细胞数目增加, 见

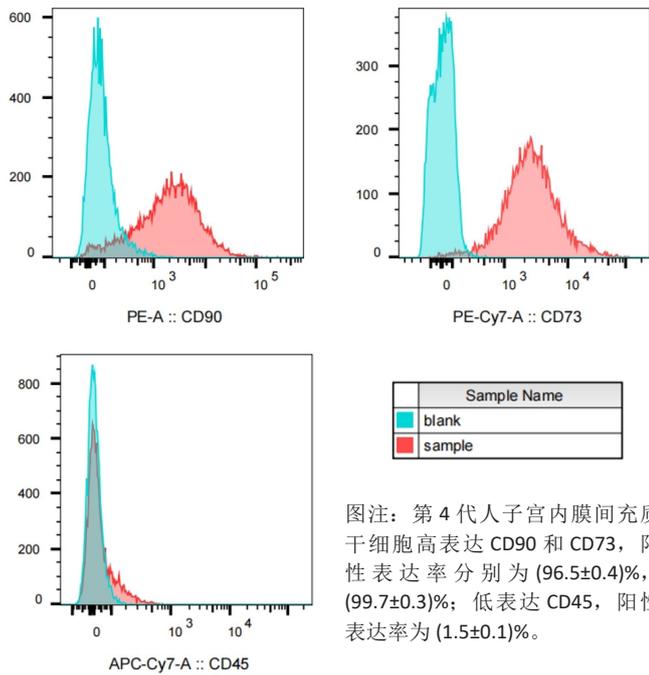
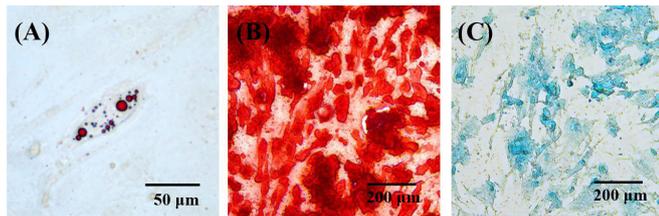


图 2 | 人子宫内膜间充质干细胞流式细胞术检测

Figure 2 | Flow cytometry of human endometrial mesenchymal stem cells



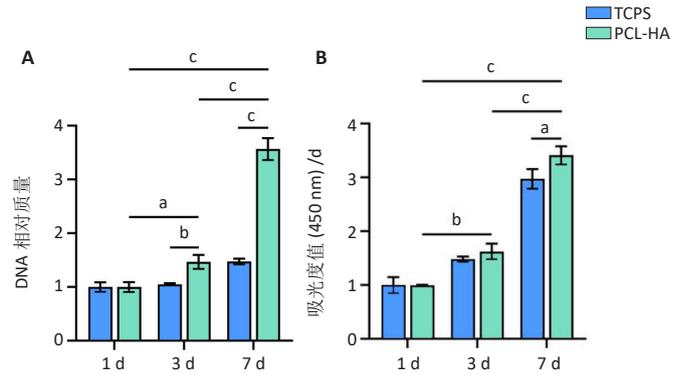
图注: A 为成脂诱导分化后的油红 O 染色, 显示脂滴呈红色, 比例尺 = 50  $\mu\text{m}$ ; B 为成骨诱导分化后的茜素红染色, 可见红色钙结节, 比例尺 = 200  $\mu\text{m}$ ; C 为成软骨诱导分化后的阿利蓝染色, 可见矿盐沉积呈蓝色, 比例尺 = 200  $\mu\text{m}$ 。

图 3 | 人子宫内膜间充质干细胞的多向分化能力

Figure 3 | Multidirectional differentiation of human endometrial mesenchymal stem cells

图 4A; 培养第 7 天, 与聚苯乙烯培养板相比, PCL-HA 静电纺丝膜上的 hEMSCs 具有更高的代谢活性, 并且随着培养时间的延长, PCL-HA 静电纺丝膜的上细胞代谢活性增强, 见图 4B。

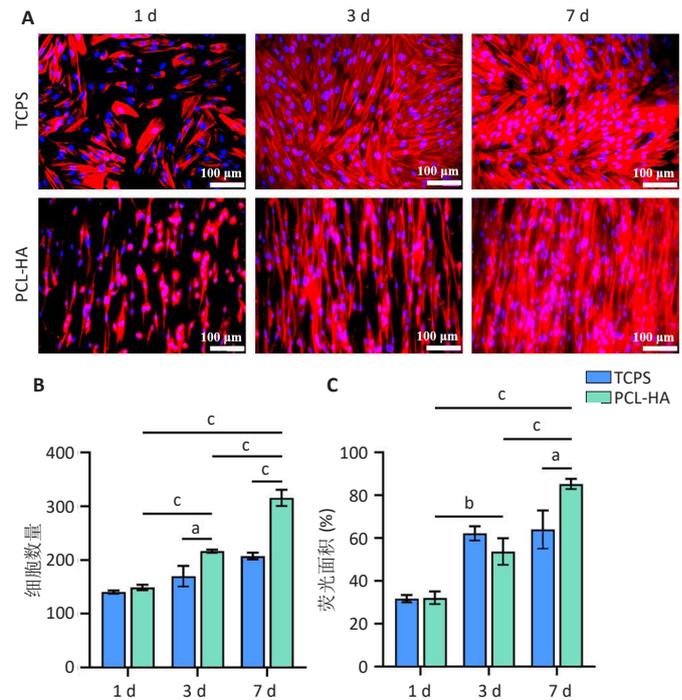
2.2.2 hEMSCs 在 PCL-HA 静电纺丝膜材料上的黏附、排列与增殖 鬼笔环肽染色结果显示 hEMSCs 在 PCL-HA 静电纺丝膜上可以较好地黏附和生长, 细胞沿着静电纺丝纤维呈现平行排列, 而聚苯乙烯培养板上的 hEMSCs 呈随机方向分布, 见图 5A。随着时间的推移, 相对于聚苯乙烯培养板, PCL-HA 静电纺丝膜上的 hEMSCs 黏附面积与细胞数目均明显增加, 见图 5B, C。扫描电镜下可见 PCL-HA 静电纺丝膜具有定向排列的超细纤维及超高孔隙率, 随着培养时间的推移, 生长在 PCL-HA 静电纺丝膜上的 hEMSCs 黏附面积明显增加, 见图 6。



图注: TCPS 为聚苯乙烯培养板。A 为 DNA 定量分析细胞增殖; B 为 WST-1 法分析细胞活性。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$ 。

图 4 | 聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜 (PCL-HA) 对人子宫内膜间充质干细胞增殖与活性的影响

Figure 4 | Effect of polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane on proliferation and activity of human endometrial mesenchymal stem cells

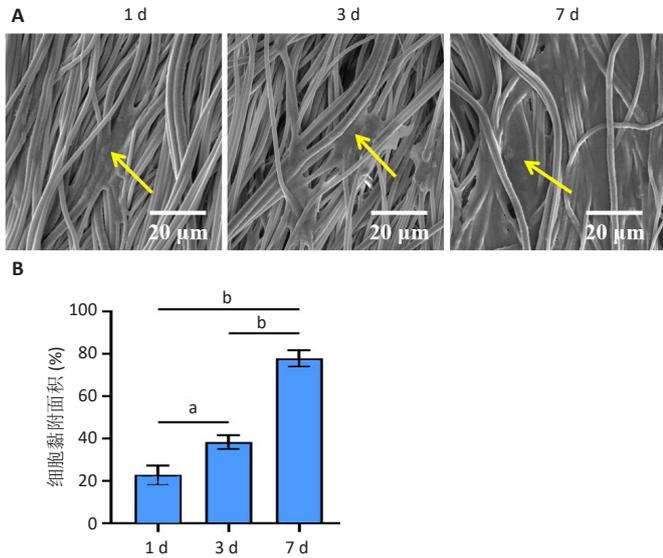


图注: TCPS 为聚苯乙烯培养板。A 为鬼笔环肽染色观察细胞肌动蛋白微丝 (呈红色), DAPI 染色的细胞核呈蓝色, 细胞沿着静电纺丝纤维呈现平行排列, 比例尺 = 100  $\mu\text{m}$ ; B 为鬼笔环肽染色细胞数目定量分析; C 为鬼笔环肽染色细胞荧光面积定量分析。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$ 。

图 5 | 聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜 (PCL-HA) 对人子宫内膜间充质干细胞黏附的影响

Figure 5 | Effect of polycaprolactone-hyaluronic acid electrospun membrane on adhesion of human endometrial mesenchymal stem cells

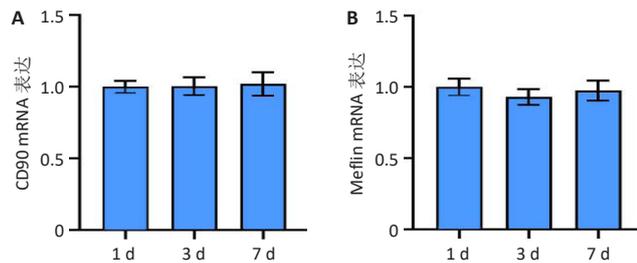
2.2.3 hEMSCs 在 PCL-HA 静电纺丝膜材料上的间充质干细胞表型维持 qRT-PCR 检测结果显示, hEMSCs 接种在 PCL-HA 静电纺丝膜第 1, 3, 7 天后, hEMSCs 间充质干细胞标记物 CD90、Meflin 的表达无差异 ( $P > 0.05$ ), 表明 PCL-HA 静电纺丝膜在培养过程中能够维持 hEMSCs 的间充质干细胞表型, 见图 7。



图注: A 为扫描电镜观察人子宫内膜间充质干细胞接种于聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜上培养 1, 3, 7 d 的黏附, 黄色箭头指向人子宫内膜间充质干细胞, 比例尺=20 μm; B 为扫描电镜下细胞黏附面积定量分析, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$ 。

图 6 | 人子宫内膜间充质干细胞在聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜上的黏附 (扫描电镜)

Figure 6 | Adhesion of human endometrial mesenchymal stem cells on polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane (scanning electron microscope)



图注: A 为培养不同时间点人子宫内膜间充质干细胞的 CD90 mRNA 表达, 3 个时间点间的 CD90 mRNA 表达无差异 ( $P > 0.05$ ); B 为培养不同时间点人子宫内膜间充质干细胞的 Meflin mRNA 表达, 3 个时间点间的 Meflin mRNA 表达无差异 ( $P > 0.05$ )。

图 7 | 聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜对人子宫内膜间充质干细胞 CD90 和 Meflin mRNA 表达的影响

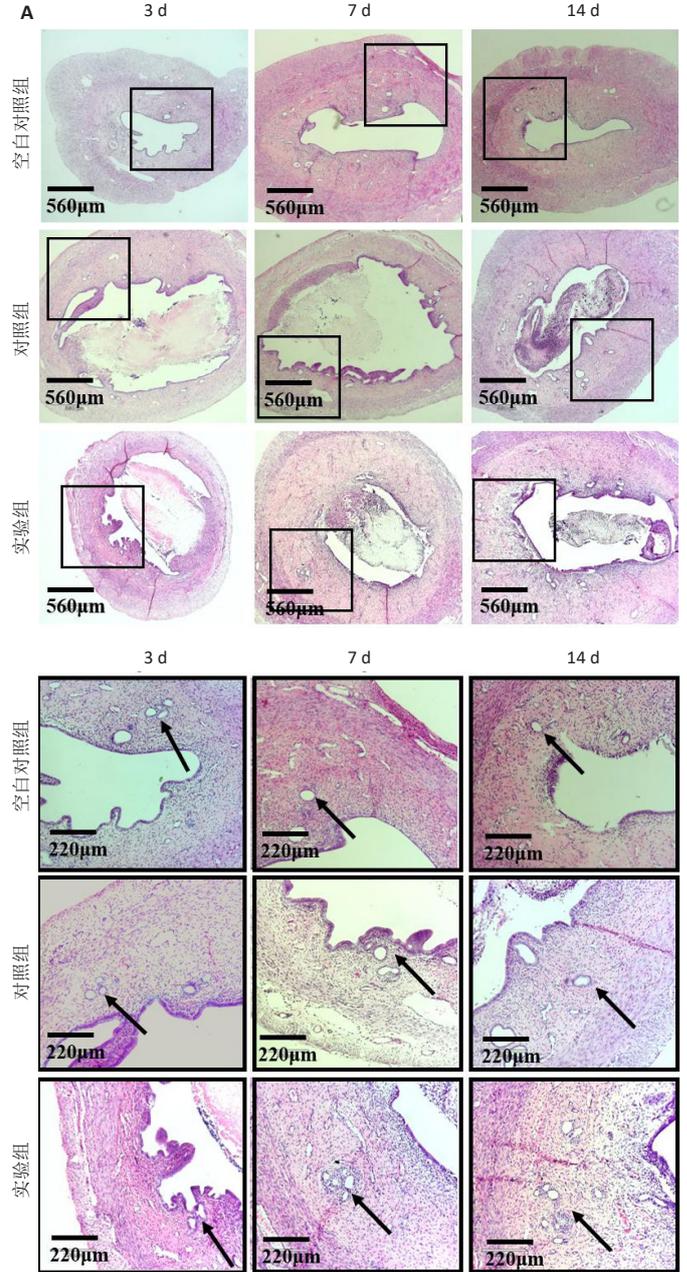
Figure 7 | Effect of polycaprolactone-hyaluronic acid electrospinning membrane on CD90 and Meflin mRNA expression in human endometrial mesenchymal stem cells

### 2.3 动物实验结果

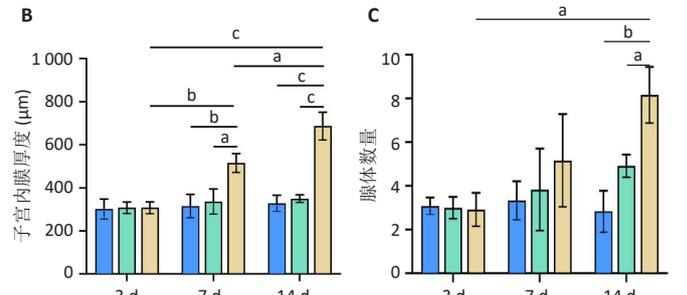
#### 2.3.1 实验动物数量分析 27 只大鼠全部进入结果分析。

#### 2.3.2 PCL-HA/hEMSCs 移植修复宫腔粘连大鼠子宫形态结构

苏木精-伊红染色结果见图 8, 结果显示空白对照组大鼠子宫内膜发育不良, 内膜厚度变薄, 腺体数量减少, 术后第 3, 7, 14 天的子宫内膜厚度和腺体数量比较差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 术后第 7 天, 相比较于空白对照组和对照组, 实验组大鼠子宫内膜厚度明显增加, 腺体数量未见明显增加; 术后第 14 天, 对照组和实验组大鼠宫腔内仍存在未降解的静电纺丝膜材料, 实验组子宫



空白对照组 对照组 实验组

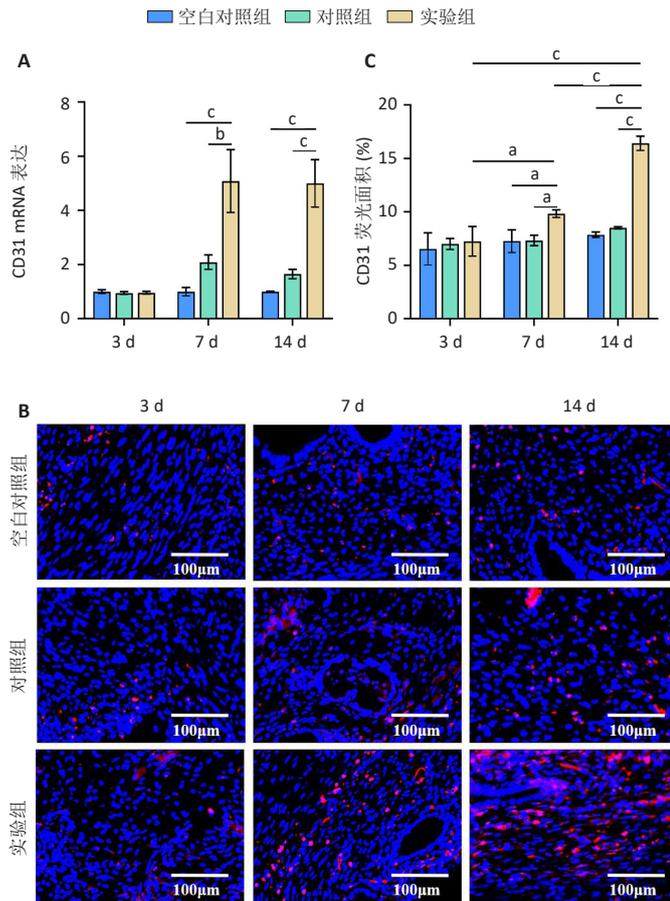


图注: 空白对照组刮宫后不进行任何治疗, 对照组刮宫后将聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜移植到受损子宫内膜表面, 实验组刮宫后将聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜/人子宫内膜间充质干细胞补片移植到受损子宫内膜表面。A 为子宫组织苏木精-伊红染色的代表性图像, 上图为整体图像, 比例尺=560 μm, 下图为上图黑框内进一步放大的图像, 箭头指向腺体, 比例尺=220 μm; B, C 分别为苏木精-伊红染色后的子宫内膜厚度与腺体数量定量分析, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$ 。

图 8 | 各组大鼠子宫内膜形态结构恢复情况  
Figure 8 | Restoration of endometrial morphology and structure in rats of each group

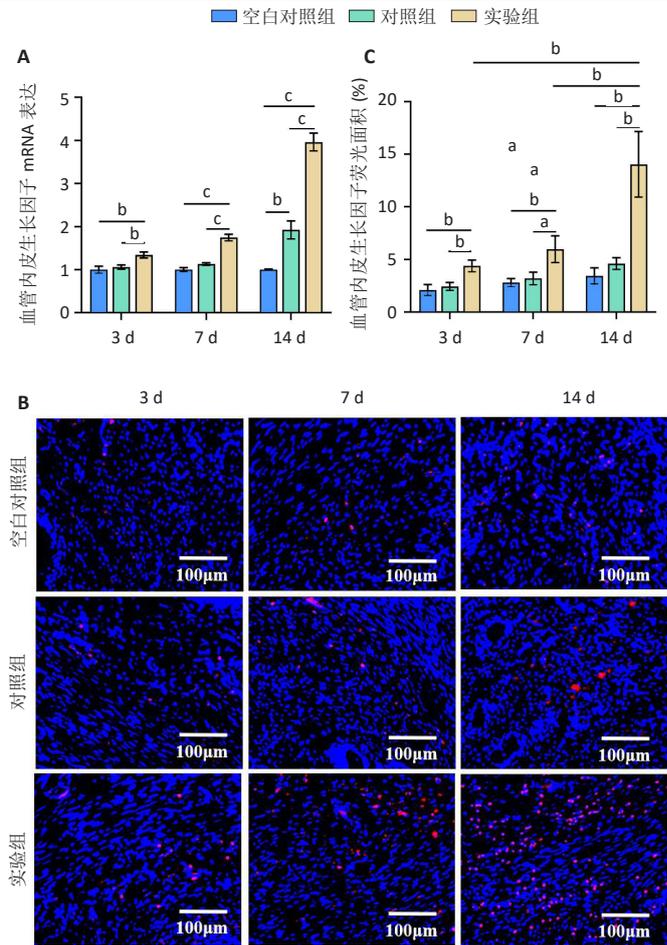
内膜与腺体数目均多于其他两组，证明 PCL-HA/hEMSCs 补片中的 hEMSCs 在大鼠子宫内膜中持续发挥作用。这提示 PCL-HA/hEMSCs 补片能持续在大鼠宫腔内定植，并且 hEMSCs 持续发挥作用并促进损伤子宫内膜形态结构的修复。

**2.3.3 PCL-HA/hEMSCs 移植促进宫腔粘连大鼠子宫内膜血管生长** CD31 存在于内皮细胞间紧密连接处，是血管内皮细胞的标志物。血管内皮生长因子是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子，可以促进血管通透性增加、血管内皮细胞增殖和血管形成。qRT-PCR 检测与免疫荧光染色结果显示，实验组术后第 7, 14 天的 CD31 表达高于空白对照组、对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )，术后第 3, 7, 14 天的血管内皮生长因子表达高于空白对照组、对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )，见图 9, 10。



图注：空白对照组刮宫后不进行任何治疗，对照组刮宫后将聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜移植到受损子宫内膜表面，实验组刮宫后将聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜/人子宫内间充质干细胞补片移植到受损子宫内膜表面。A 为子宫组织中 CD31 mRNA 的表达，B 为子宫组织中 CD31 免疫荧光染色的代表性图像，红色为 CD31 阳性表达，蓝色为 DAPI 染色的细胞核，比例尺 = 100 μm；C 为 CD31 免疫荧光染色的定量分析。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$ 。

**图 9 | 术后不同时间点各组大鼠子宫内膜组织中 CD31 的表达**  
**Figure 9 | Expression of CD31 in endometrial tissues of rats of each group at different time points after surgery**



图注：空白对照组刮宫后不进行任何治疗，对照组刮宫后将聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜移植到受损子宫内膜表面，实验组刮宫后将聚己内酯-透明质酸静电纺丝膜/人子宫内间充质干细胞补片移植到受损子宫内膜表面。A 为子宫组织中血管内皮生长因子 mRNA 的表达；B 为子宫组织中血管内皮生长因子免疫荧光染色的代表性图像，红色为血管内皮生长因子阳性表达，蓝色为 DAPI 染色的细胞核，比例尺 = 100 μm；C 为血管内皮生长因子免疫荧光染色的定量分析。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$ 。

**图 10 | 术后不同时间点各组大鼠子宫内膜组织中血管内皮生长因子的表达**

**Figure 10 | Expression of vascular endothelial growth factor in endometrial tissues of rats of each group at different time points after surgery**

### 3 讨论 Discussion

子宫内膜在人类月经周期中经历复杂的再生和分化，在女性未怀孕时形成月经，在怀孕时为胚胎的生长发育提供充足的营养<sup>[30]</sup>。子宫内膜是成功着床、胎盘形成及胎儿生长和存活直至出生的唯一部位，对人类的生殖至关重要<sup>[31]</sup>。健康的子宫内膜是实现人类生殖及支持母婴健康的先决条件，反复流产、终止妊娠、反复诊断刮宫术和宫内感染均可导致不可逆的子宫内膜受损，从而造成宫腔闭塞，是女性不孕症的重要原因之一<sup>[32]</sup>。目前传统的临床手段治疗效果有限，不能解决重症患者子宫内膜再生的难题。由于间充质干细胞在免疫调节和组织再生

治疗方面具有巨大潜力,近年来在全球范围内备受瞩目。研究发现间充质干细胞能够迁移到组织受损的区域,分泌抗炎细胞因子,重建或促进伤口愈合<sup>[33-35]</sup>。hEMSCs是一种具有自我更新能力、高度分化潜力、较低免疫原性和低致瘤性的成体干细胞,以其为基础的治疗方法在宫腔粘连中取得了一些有前景的成果。既往研究表明,向大鼠子宫内腔损伤处注射hEMSCs后子宫内腔微血管比例增加、子宫内腔厚度增加、腺体形成增加,大鼠生育能力提高,促进了子宫内腔的再生<sup>[36-37]</sup>。在卵巢分泌雌激素和孕激素的作用下,子宫内腔每28d左右发生一次周期性内腔脱落和再生,子宫内腔具有强大的再生能力,其本身被认为是干细胞的极佳来源,在生殖系统疾病治疗方面具有巨大前景<sup>[38]</sup>。此次实验结果表明,hEMSCs呈典型的长梭形间充质干细胞形态,高表达间充质干细胞标志物CD90和CD73,不表达CD45,并且具有较强的三系分化(成脂、成骨和成软骨)潜能,这些发现满足了国际细胞治疗学会间充质和组织干细胞协会提出的定义人类间充质干细胞的最低标准<sup>[39-40]</sup>。hEMSCs可以很容易地从组织中分离,不会给患者带来不便,这对于在临床实践中实施基于干细胞的治疗具有重要价值。

值得注意的是,传统干细胞的移植治疗效果受到干细胞存活率较低的限制,静脉注射间充质干细胞进入血液循环后被巨噬细胞大量吞噬,归巢至损伤部位的间充质干细胞数量明显减少;同时,由于液体的流动性,局部宫腔灌注的间充质干细胞也难以长时间存活<sup>[41-42]</sup>。因此,提高细胞活力和利用率是增强间充质干细胞修复功能的关键。既往研究表明,生物材料支架可以为受损组织的修复提供结构和机械支持,模拟自然环境,促进营养物质的运输和干细胞的募集、黏附、增殖和分化<sup>[43]</sup>。目前在宫腔粘连术后可以使用抗粘连材料,如透明质酸凝胶,在一定程度上可以防止粘连的再次发生,以促进子宫内腔增殖与血管生成<sup>[20]</sup>。既往研究表明,透明质酸联合间充质干细胞可以治疗大鼠子宫内腔损伤,增加子宫内腔厚度,提高腺体数量,修复受损的子宫内腔。然而透明质酸在宫腔内的滞留时间较短,显著限制了间充质干细胞联合透明质酸支架修复受损子宫内腔的潜力<sup>[44]</sup>。静电纺丝是一种易于操作和经济有效的构建组织工程支架方法,其制备的静电纺丝膜具有较高的比表面积、孔隙率和可控的形态尺寸,可以促进细胞的黏附和增殖<sup>[45]</sup>。此次实验制备了PCL-HA静电纺丝膜,进一步将hEMSCs种植在PCL-HA静电纺丝膜上,以提高移植hEMSCs的活性,延长hEMSCs与受损子宫内腔损伤部位的接触时间,使其具有更好的修复潜力。

此次实验探讨了PCL-HA静电纺丝膜对hEMSCs黏附、增殖、间充质干细胞基因表达的影响。DNA量化分析和

WST-1细胞活性测试实验结果表明,种植在PCL-HA静电纺丝膜上的hEMSCs增殖能力和细胞活性都显著增强,这可能与PCL-HA静电纺丝膜的材料结构和性能相关:与聚苯乙烯培养板简单的2D平面不同,PCL-HA静电纺丝膜为3D网状结构,与天然细胞外基质在形态上具有相似性,具有超细连续纤维、高表面体积比和高孔隙率,可以促进细胞的增殖和活性<sup>[14-15]</sup>;此外,PCL-HA静电纺丝膜中的透明质酸是细胞外基质的主要多糖成分,具有调节和增强干细胞再生特性的作用<sup>[46]</sup>。鬼笔环肽染色和扫描电镜实验结果进一步证实了这一结论,随着时间的推移,生长在PCL-HA静电纺丝膜上的hEMSCs细胞数量和黏附面积明显增加。hEMSCs在PCL-HA静电纺丝膜上可以沿着静电纺丝纤维呈现平行排列,而聚苯乙烯培养板上的hEMSCs呈随机方向分布,这可能与PCL-HA静电纺丝膜的表面形貌有关。扫描电镜下观察到与聚苯乙烯培养板的随机取向结构相比,PCL-HA静电纺丝膜纤维呈平行排列,对齐的纤维在一定程度上给予hEMSCs方向信号,使hEMSCs在PCL-HA静电纺丝膜上可以沿着静电纺丝纤维呈现平行排列,这可能也与结构差异或细胞与基质黏附信号传导相关,进一步的具体机制有待研究。qRT-PCR检测显示PCL-HA静电纺丝膜支持hEMSCs间充质干细胞基因CD90和Meflin的表达,说明在培养过程中PCL-HA静电纺丝膜能够维持hEMSCs的间充质干细胞表型,推测与PCL-HA静电纺丝膜中的透明质酸成分具有一定联系。以上实验结果与LIU等<sup>[47]</sup>发现透明质酸通过调节Wnt/ $\beta$ -Catenin信号传导,以剂量依赖方式增强人间充质干细胞的增殖能力而不改变细胞表型的结果相一致。

较薄的子宫内腔显著降低胚胎的种植率,往往导致不良妊娠结局。研究表明,女性子宫内腔厚度小于6mm时明显不利于成功妊娠,胚胎着床率低至29.43%<sup>[48]</sup>。正常子宫内腔含有丰富的腺体,子宫内腔腺体分泌的液体不但可以起到润滑、保护子宫的作用,而且可以维持受精卵的存活和正常胎盘的发育。当腺体发育被抑制时会影响受精卵着床,甚至出现不孕的情况<sup>[49]</sup>。苏木精-伊红染色结果显示,相比较于空白对照组和对照组,PCL-HA静电纺丝膜/hEMSCs移植后第7天的子宫内腔厚度明显增加,移植后第14天的子宫内腔厚度与腺体数量均明显增多;此外直到移植后第14天,对照组和实验组大鼠宫腔内仍存在未降解的支架,说明复合功能生物材料可以防止透明质酸迅速流出子宫腔,使其长时间形成屏障发挥治疗作用。血管形成为周期性子宫内腔再生、胚胎着床、妊娠建立与维持提供了重要的微环境基础<sup>[50]</sup>。子宫内腔蜕膜化始于子宫血管附近,在受孕过程中充足的血供有助于子宫内腔的充分发育,为胚胎提供良好的环境及足够的营养保障,是成功受孕和维持妊娠的关键影响因素<sup>[51]</sup>。

CD31 通常位于血管内皮细胞, 既能维持内皮细胞连接完整性, 又能在炎症形成后加速血管通透性屏障的恢复<sup>[52]</sup>。

CD31 主要用于证明内皮细胞组织的存在, 用于评估组织血管生成<sup>[53]</sup>。子宫内膜是一种高度血管化及动态可循环再生的组织<sup>[54]</sup>。血管内皮生长因子是一种重要的促进血管生长的生长因子, 它随月经周期发生相应变化, 可以特异地作用于血管内皮细胞, 促进细胞迁移、增加微血管的通透性等, 有助于调节血管生成过程<sup>[55-57]</sup>。宫腔粘连患者子宫内膜的毛细血管壁较薄、密度较低, 提示血管生成在子宫内膜修复中起着重要作用<sup>[58]</sup>。qRT-PCR 检测和免疫荧光染色实验结果显示, 相比较于空白对照组和对照组, 实验组大鼠子宫组织 CD31 和血管内皮生长因子的表达水平明显升高, PCL-HA 静电纺丝膜/hEMSCs 移植通过分泌血管内皮生长因子来促进子宫内膜的血管生成。

综上, 此次实验结果表明, PCL-HA 静电纺丝膜可促进 hEMSCs 的黏附和增殖, 可以用作促进细胞生长的生物材料补片; PCL-HA 静电纺丝膜/hEMSCs 移植不但可以修复宫腔粘连模型大鼠子宫形态结构, 促进内膜增厚及腺体的生成, 还可以提高血管内皮生长因子的表达水平, 促进子宫内膜血管的生成, 达到修复受损子宫内膜的目的, 但其作用机制仍有待进一步研究。此外, 后期研究可以通过延长实验周期, 对大鼠宫腔粘连模型展开生育力评估实验, 为此次实验制备的补片应用于临床提供更加全面的研究补充。

**结论:** PCL-HA 静电纺丝膜支持 hEMSCs 更好的黏附、增殖以及间充质干细胞基因的表达, 可以作为生物材料补片来修复受损组织; 将 hEMSCs 种植在 PCL-HA 静电纺丝膜上移植到大鼠子宫内膜损伤部位, 可以提高干细胞的存活率、延长干细胞与受损组织的接触时间, 从而更好地促进子宫内膜增厚、腺体生成和血管生成, 修复受损子宫内膜组织。

**致谢:** 研究由泰山学者青年项目 (tsqn202103111) 和山东省自然科学基金-青年基金项目 (ZR2021QC034) 资助。

**作者贡献:** 安江茹进行实验设计, 实验实施为安江茹, 实验评估为张晓晴, 资料收集为张锦艺、王秋花、杨杨杨, 安江茹成文, 张晓晴、王文双审校。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

- [1] TINELLI A, ANDJIĆ M, MORCIANO A, et al. Uterine Aging and Reproduction: Dealing with a Puzzle Biologic Topic. *Int J Mol Sci.* 2023; 25(1):322.
- [2] FRANKFURTER D, KLIMAN H. Progress on the Endometrium. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2023;50(4):677-694.
- [3] HONG IS. Endometrial stem/progenitor cells: Properties, origins, and functions. *Genes Dis.* 2023;10(3):931-947.
- [4] HONG IS. Endometrial Stem Cells: Orchestrating Dynamic Regeneration of Endometrium and Their Implications in Diverse Endometrial Disorders. *Int J Biol Sci.* 2024;20(3):864-879.
- [5] GRIMBIZIS GF, DI SPIEZIO SARDO A, CAMPO R. Pregnancy-related intrauterine adhesion treatment: new insights. *Fertil Steril.* 2021; 116(4):1188.
- [6] VITALE SG, RIEMMA G, CARUGNO J, et al. Postsurgical barrier strategies to avoid the recurrence of intrauterine adhesion formation after hysteroscopic adhesiolysis: a network meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Obstet Gynecol.* 2022;226(4):487-498.e8.
- [7] ZHANG Y, LIN X, DAI Y, et al. Endometrial stem cells repair injured endometrium and induce angiogenesis via AKT and ERK pathways. *Reproduction.* 2016;152(5):389-402.
- [8] BAUSYTE R, VAIGAUŠKAITE-MAZEIKIENE B, BORUTINSKAITE V, et al. Human endometrium-derived mesenchymal stem/stromal cells application in endometrial-factor induced infertility. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11:1227487.
- [9] TERSOGLIO AE, TERSOGLIO S, SALATINO DR, et al. Regenerative therapy by endometrial mesenchymal stem cells in thin endometrium with repeated implantation failure. A novel strategy. *J Bras Reprod Assist.* 2020;24(2):118-127.
- [10] ZUO W, XIE B, LI C, et al. The Clinical Applications of Endometrial Mesenchymal Stem Cells. *Biopreserv Biobank.* 2018;16(2):158-164.
- [11] LV Q, WANG L, LUO X, et al. Adult stem cells in endometrial regeneration: Molecular insights and clinical applications. *Mol Reprod Dev.* 2021;88(6):379-394.
- [12] KHARBIKAR BN, MOHINDRA P, DESAI TA. Biomaterials to enhance stem cell transplantation. *Cell Stem Cell.* 2022;29(5):692-721.
- [13] CASTAÑO O, ELTOHAMY M, KIM HW. Electrospinning technology in tissue regeneration. *Methods Mol Biol.* 2012;811:127-140.
- [14] ZULKIFLI MZA, NORDIN D, SHAARI N, et al. Overview of Electrospinning for Tissue Engineering Applications. *Polymers(Basel).* 2023;15(11):2418.
- [15] HONG J, YEO M, YANG GH, et al. Cell-electrospinning and its application for tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24):6208.
- [16] BACKES EH, HARB SV, BEATRICE CAG, et al. Polycaprolactone usage in additive manufacturing strategies for tissue engineering applications: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2022;110(6):1479-1503.
- [17] GRAÇA MFP, MIGUEL SP, CABRAL CSD, et al. Hyaluronic acid-Based wound dressings: A review. *Carbohydr Polym.* 2020;241(April):116364.
- [18] YASIN A, REN Y, LI J, et al. Advances in Hyaluronic Acid for Biomedical Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:910290.
- [19] AHMADIAN E, DIZAJ SM, EFTEKHARI A, et al. The Potential Applications of Hyaluronic Acid Hydrogels in Biomedicine. *Drug Res.* 2020;70(1): 6-11.
- [20] HUANG CY, CHANG WH, CHENG M, et al. Crosslinked hyaluronic acid gels for the prevention of intrauterine adhesions after a hysteroscopic myomectomy in women with submucosal myomas: A prospective, randomized, controlled trial. *Life (Basel).* 2020;10(5):67.
- [21] MA J, ZHAN H, LI W, et al. Recent trends in therapeutic strategies for repairing endometrial tissue in intrauterine adhesion. *Biomater Res.* 2021;25(1):40.

- [22] SMYTHE G. Role of Growth Factors in Modulation of the Microvasculature in Adult Skeletal Muscle. *Adv Exp Med Biol.* 2016;900:161-183.
- [23] DEMIR R, SEVAL Y, HUPPERTZ B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem.* 2007;109(4):257-265.
- [24] THEIS V, THEISS C. VEGF-a stimulus for neuronal development and regeneration in the CNS and PNS. *Curr Protein Pept Sci.* 2018;19(6):589-597.
- [25] BINDER NK, EVANS J, GARDNER DK, et al. Endometrial signals improve embryo outcome: Functional role of vascular endothelial growth factor isoforms on embryo development and implantation in mice. *Hum Reprod.* 2014;29(10):2278-2286.
- [26] FAN X, MURUGANANDAN S, SHALLIE PD, et al. Vegf maintains maternal vascular space homeostasis in the mouse placenta through modulation of trophoblast giant cell functions. *Biomolecules.* 2021;11(7):1062.
- [27] BOLATAI A, HE Y, WU N. Vascular endothelial growth factor and its receptors regulation in gestational diabetes mellitus and eclampsia. *J Transl Med.* 2022;20(1):400.
- [28] EL GEHANI K, AL-KIKHIA L, MANSURI N, et al. Angiogenesis in urinary bladder carcinoma as defined by microvessel density (MVD) after immunohistochemical staining for Factor VIII and CD31. *Libyan J Med.* 2011;6(1):1-6.
- [29] EMMERSON SJ, GARGETT CE. Endometrial mesenchymal stem cells as a cell based therapy for pelvic organ prolapse. *World J Stem Cells.* 2016;8(5):202-215.
- [30] VILELLA F, WANG W, MORENO I, et al. Understanding the human endometrium in the 21st century. *Am J Obstet Gynecol.* 2021;225(1):1-2.
- [31] YOKOMIZO R, FUJIKI Y, KISHIGAMI H, et al. Endometrial regeneration with endometrial epithelium: homologous orchestration with endometrial stroma as a feeder. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):1-13.
- [32] LIU T, HE B, XU X. Repairing and Regenerating Injured Endometrium Methods. *Reprod Sci.* 2023;30(6):1724-1736.
- [33] SAAD-NAGUIB MH, KENFACK Y, SHERMAN LS, et al. Impaired receptivity of thin endometrium: therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024;14:1268990.
- [34] LI X, WANG Y, MA R, et al. Reconstruction of functional uterine tissues through recellularizing the decellularized rat uterine scaffolds by MSCs in vivo and in vitro. *Biomed Mater.* 2021;16(3):035023.
- [35] BRENNAN M, LAYROLLE P, MOONEY DJ. Biomaterials Functionalized with MSC Secreted Extracellular Vesicles and Soluble Factors for Tissue Regeneration. *Adv Funct Mater.* 2020;30(37):1909125.
- [36] COUSINS FL, FILBY CE, GARGETT CE. Endometrial Stem/Progenitor Cells-Their Role in Endometrial Repair and Regeneration. *Front Reprod Health.* 2022;3:811537.
- [37] DARZI S, WERKMEISTER JA, DEANE JA, et al. Identification and Characterization of Human Endometrial Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Potential for Cellular Therapy. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(9):1127-1132.
- [38] FIGUEIRA PG, ABRÃO MS, KRIKUN G, et al. Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1221(1):10-17.
- [39] BAGHAEI K, HASHEMI SM, TOKHANBIGLI S, et al. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2017;10(3):208-213.
- [40] MACHADO CDE V, TELLES PD, NASCIMENTO IL. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013;35(1):62-67.
- [41] YANG PJ, YUAN WX, LIU J, et al. Biological characterization of human amniotic epithelial cells in a serum-free system and their safety evaluation. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(8):1305-1316.
- [42] CHEN L, GUO L, CHEN F, et al. Transplantation of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MbmSCs) promotes the regeneration of mechanical injured endometrium. *Am J Transl Res.* 2020;12(9):4941-4954.
- [43] BACKLUND C, JALILI-FIROOZINEZHAD S, KIM B, et al. Biomaterials-Mediated Engineering of the Immune System. *Annu Rev Immunol.* 2023;41:153-179.
- [44] YANG ST, LIU CH, WANG PH. Combination of hyaluronic acid and mesenchymal stem cells for treatment of intrauterine adhesions. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2022;61(1):8-9.
- [45] MAURMANN N, FRANÇA FS, GIRÓN J, et al. Cell Electrospinning: a Review of Materials and Methodologies for Biofabrication. *Adv Biol.* 2023;7(10):e2300058.
- [46] AGARWAL G, AGIWAL S, SRIVASTAVA A. Hyaluronic acid containing scaffolds ameliorate stem cell function for tissue repair and regeneration. *Int J Biol Macromol.* 2020;165(Pt A):388-401.
- [47] LIU RM, SUN RG, ZHANG LT, et al. Hyaluronic acid enhances proliferation of human amniotic mesenchymal stem cells through activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2016;345(2):218-229.
- [48] ATA B, LIÑÁN A, KALAFAT E, et al. Effect of the endometrial thickness on the live birth rate: insights from 959 single euploid frozen embryo transfers without a cutoff for thickness. *Fertil Steril.* 2023;120(1):91-98.
- [49] TEMPEST N, HILL CJ, MACLEAN A, et al. Novel microarchitecture of human endometrial glands: Implications in endometrial regeneration and pathologies. *Hum Reprod Update.* 2022;28(2):153-171.
- [50] CHEN X, MAN GCW, LIU Y, et al. Physiological and pathological angiogenesis in endometrium at the time of embryo implantation. *Am J Reprod Immunol.* 2017;78(2). doi: 10.1111/aji.12693
- [51] LI S, DING L. Endometrial perivascular progenitor cells and uterus regeneration. *J Pers Med.* 2021;11(6):477.
- [52] LERTKIATMONGKOL P, LIAO D, MEI H, et al. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol.* 2016;23(3):253-259.
- [53] FIGUEIREDO CC, PEREIRA NB, PEREIRA LX, et al. Double immunofluorescence labeling for CD31 and CD105 as a marker for polyether polyurethane-induced angiogenesis in mice. *Histol Histopathol.* 2019;34(3):257-264.
- [54] MASSRI N, LOIA R, SONES JL, et al. Vascular changes in the cycling and early pregnant uterus. *JCI Insight.* 2023;8(11):e163422.
- [55] ABU-GHAZALEH N, BRENNECKE S, MURTHI P, et al. Association of Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) with Recurrent Miscarriage: A Systematic Review of the Literature. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11):9449.
- [56] BEHESHTIZADEH N, GHARIBSHAHIAN M, BAYATI M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) delivery approaches in regenerative medicine. *Biomed Pharmacother.* 2023;166:115301.
- [57] GUO X, YI H, LI TC, et al. Role of vascular endothelial growth factor (Vegf) in human embryo implantation: Clinical implications. *Biomolecules.* 2021;11(2):1-16.
- [58] CHEN Y, CHANG Y, YAO S. Role of Angiogenesis in Endometrial Repair of Patients with Severe Intrauterine Adhesion. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(7):1343-1350.

(责任编辑: GW, ZN, QY, LWJ)