

基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨 子宫内膜来源间充质干细胞抑制子宫内膜纤维化的机制

靳涛¹, 颜望碧², 殷琦¹

摘要 目的 探讨 Wnt/ β -catenin 信号通路介导间质上皮转化(EMT)在子宫内膜来源间充质干细胞(eMSCs)抑制子宫内膜纤维化中的作用机制。方法 将 18 只雌性 SD 大鼠随机分为假手术(Sham)组、模型(Model)组和 eMSCs 组,每组 6 只。Sham 组的大鼠在剖腹手术后不接受任何形式的子宫介入手术。Model 组和 eMSCs 组建立子宫内粘连大鼠模型。eMSCs 组在模型损伤后立即移植 eMSCs 细胞悬液进行治疗,总量为每子宫 0.05 ml(2×10^7 细胞/ml)。3 周后收集单侧损伤子宫进行苏木精-伊红(HE)染色和 Masson 染色。通过蛋白质印迹分析子宫内膜纤维化、EMT、Wnt/ β -catenin 通路蛋白表达。结果 Model 组大鼠宫腔结构破坏,腺体数量明显减少并积聚大量蓝色胶原纤维,但在 eMSCs 治疗后子宫内膜腺体数量显著增加,并且纤维化面积显著降低。与 Sham 组相比,Model 组中 I 型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)蛋白的表达水平显著增加($P < 0.05$),但在 eMSCs 组中均显著减少($P < 0.05$)。在 Model 组中,N-cadherin、Vimentin 和 ZEB1 的表达显著增加,而 E-cadherin 的表达减少。然而,在 eMSCs 组中,上述分子蛋白质的变化完全相反。与 Sham 组相比,Model 组 β -连环蛋白(β -catenin)和 C-myc 表达增加($P < 0.05$)。与 Model 组相比,eMSCs 组中周期蛋白 E(CyclinE)、 β -catenin 和 C-myc 表达增加($P < 0.05$)。结论 eMSCs 可以通过抑制 EMT 和子宫内膜纤维化来促进子宫内粘连大鼠子宫内膜修复,这种作用部分是通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路来实现。

关键词 Wnt/ β -catenin 信号通路;间质上皮转化;子宫内膜来源间充质干细胞;子宫内膜纤维化;大鼠;子宫内粘连模型
中图分类号 R 711.71

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0640-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.013

子宫内粘连(intrauterine adhesion, IUA)是阻碍生育的几大难题之一,其由子宫内膜纤维化引起并导致功能性子宫内膜部分或全部丧失^[1]。目前认

为,子宫内膜修复障碍可能是 IUA 形成的主要机制^[2]。因此,探索恢复子宫内膜的正常组织结构和功能的有效治疗方法,对于改善 IUA 患者的子宫生育功能具有重要意义。近年来研究^[3]强调了干细胞移植作为 IUA 治疗的替代选择策略。研究^[4-5]表明,少量间充质干细胞和子宫内膜干/祖细胞持续存在于子宫内膜中,可促进月经脱落后后的子宫内膜再生。因此,自体或同种异体干细胞移植可用于治疗 IUA^[6]。子宫内膜来源间充质干细胞(endometrial mesenchymal stem cells, eMSCs)位于人类子宫内膜的基底层和功能层,并参与组织重塑,其是维持子宫内膜再生能力所必需的^[7]。有研究^[8]显示,当 eMSCs 异种移植到小鼠肾被膜下时,可重建子宫内膜间质,表明其再生潜力。该研究在 IUA 大鼠模型中评估 eMSCs 促进子宫内膜再生的能力,并探讨其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 DMEM 培养基(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),4% 多聚甲醛、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、PKH26 亲脂性红色荧光连接染料(美国 Sigma 公司),抗 p-Keratin、抗 CK7、Vimentin、N-cadherin、CyclinE、C-myc、Axin2、 β -连环蛋白(β -catenin)、抗 I 型胶原、Vimentin 和抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)(美国 Abcam 公司),RIPA 裂解缓冲液(北京 Solarbio 公司),BCA 蛋白检测试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司),PVDF 膜(美国 Millipore 公司),抗 ZEB1、E-cadherin(美国 CST 公司)。FACS Canto II 流式细胞仪和 FACSCount II 软件(美国 BD Biosciences 公司),直立显微镜、荧光显微镜(日本 Olympus 公司),生物成像系统(美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 细胞培养 人 eMSCs 购自杭州易文赛生物技术有限公司。细胞维持在补充有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。每 3 d 更换一次培养基。在细胞培养物达到汇合后,用 EDTA/胰蛋白酶溶液对细胞进行传代培养。第 3~5 代的 eMSCs 用于研究其特

2024-02-27 接收

基金项目:江苏省卫生健康委员会科研项目(编号:20210265)

作者单位:¹江南大学附属无锡五院妇科,无锡 214007

²无锡市中医院妇科,无锡 214071

作者简介:靳涛,女,主任医师,责任作者, E-mail: hdidhg7548@163.com

性^[9]。

1.3 流式细胞术 使用 FACS Canto II 流式细胞仪表征 eMSCs 的表面标记。将 1×10^6 个细胞用一组抗体染色 1 h: 异硫氰酸荧光素 (FITC)-CD45、藻红蛋白 (PE)-CD34、别藻蓝蛋白-CD90、PE-CD74、PE-CD44、PE-CD106 和同种型匹配的对照。用 PBS 洗涤细胞 2 次。使用 FACSCount II 软件对表面标记表达进行定量。

1.4 PKH26 荧光染料标记的骨髓基质细胞 为了追踪移植后 eMSCs 的分布,收集细胞并用 PKH26 标记。PKH26 亲脂性红色荧光连接染料。当 eMSCs 达到 80% 汇合时,加入含有 1 ml 稀释剂 C 和 4 μ l PKH26 试剂的培养基。然后,将混合物在离心管中混合,并在室温下孵育 5 min。随后,加入 2 ml 胎牛血清以停止染色。弃去上清液,将细胞重新悬浮在新鲜培养基中。在荧光显微镜下检测 PKH26 标记的 eMSCs。在将细胞移植到大鼠的子宫腔中之前,将细胞维持在生长培养基中。

1.5 实验动物 雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自上海 SLAC 实验动物有限公司,体质量 220 ~ 250 g,年龄 8 ~ 12 周。环境温度保持在 22 ~ 24 $^{\circ}$ C,相对湿度为 70% ~ 85%,自由进食和饮水。每天 08:00 - 10:00 取大鼠阴道涂片观察发情周期。选择发情周期正常的大鼠进行实验。所有大鼠在发情期进行手术,手术前 12 h 禁食。

1.6 IUA 大鼠模型的建立 参照文献^[10]方法,通过制造由机械损伤和 LPS 外科缝合组成的双重损伤,建立了 IUA 大鼠模型。将 18 只雌性 SD 大鼠随机分为假手术 (Sham) 组、Model 组和 eMSCs 组,每组 6 只。Sham 组大鼠在剖腹手术后不接受任何形式的子宫介入手术。在 Model 组和 eMSCs 组中,每只大鼠的左侧子宫在剖腹后用机械性子宫内膜损伤和 LPS 溶液的组合进行处理;右侧子宫未进行任何治疗。将大鼠麻醉,以仰卧位固定在手术台上。在子宫的远端做一个小的纵向切口 (长约 0.3 cm)。然后用 16 G 的针刮去子宫内膜。接下来,将 0.3 ~ 0.5 ml LPS 溶液 (10 mg/L) 缓慢注入子宫腔。30 min 后,除去 LPS 溶液。eMSCs 组在模型损伤后立即给予治疗,移植的 eMSCs 细胞悬液总量为每子宫 0.05 ml (2×10^7 细胞/ml)^[11];用 1 ml 注射器将它们注射到子宫浆膜下。在第 3 周对所有大鼠实施安乐死,收集单侧损伤子宫用于以下实验。

1.7 苏木精-伊红 (HE) 染色和 Masson 染色 将子宫内膜组织样品在 4% 多聚甲醛中固定 24 h,然

后在脱水和透明化后包埋在石蜡块中。将石蜡包埋切片切成 4 μ m 连续切片,并根据常规程序进行 HE 和 Masson 染色。使用直立显微镜观察切片。选择 3 个不同的高倍视野,分别用 HE 和 Masson 染色计算子宫内膜腺体数量和纤维化程度。使用 Image J 对各组的平均比例进行统计分析。

1.8 免疫组织化学染色 将样品固定在 4% 多聚甲醛中并包埋在石蜡中。横向石蜡切片使用二甲苯脱蜡,通过一系列酒精梯度再水合。然后,将切片在 3% 过氧化氢中孵育 30 min 以灭活内源性过氧化物酶活性,并与下列一抗孵育 2 h: 抗 p-Keratin (1 : 200)、抗 CK7 (1 : 200)、Vimentin (1 : 200) 和抗 α -SMA (1 : 200)。随后,用抗兔或抗小鼠免疫球蛋白 (IgG) 二抗处理切片。在高倍显微镜下观察阳性染色细胞的数量,并在 5 个随机选择的视野中定量。

1.9 蛋白质印迹分析 从大鼠子宫组织中提取总蛋白样品,并使用 RIPA 裂解缓冲液裂解,然后使用无菌剪刀匀浆。在冰上裂解 1 h 后,将提取物以 12 000 r/min 离心 20 min,然后收集上清液,使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定总蛋白浓度。蛋白质样品 (30 μ g) 在 10% SDS-PAGE 凝胶上分离,并转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭膜 1 h,并在 4 $^{\circ}$ C 下与下列初级抗体一起孵育过夜: 抗 N-cadherin (1 : 1 000)、CyclinE (1 : 1 000)、C-myc (1 : 1 000)、Axin2 (1 : 1 000)、 β -catenin (1 : 1 000)、抗 I 型胶原 (1 : 1 000)、抗 ZEB1 (1 : 1 000)、抗 α -SMA (1 : 2 000)、抗 E-cadherin (1 : 1 000)、抗 Vimentin (1 : 2 000)。用 PBS 洗涤膜 3 次,然后与第二抗体在 37 $^{\circ}$ C 黑暗中孵育 1 h。最后,在生物成像系统中使用 ECL 对蛋白质进行可视化。GAPDH 被用作内部对照来标准化目标蛋白质的相对表达。使用 Image J 软件分析条带的密度。

1.10 统计学处理 使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。所有的统计数据至少重复了 3 次独立实验,以平均值 \pm 标准差表示。两组均数比较采用 *t* 检验,三组及以上均数比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 eMSCs 的体外培养和表型鉴定 当 eMSCs 扩增并传代至第三代,细胞趋于稳定并呈现成纤维细胞样形态,并以螺旋模式排列。然后对 eMSCs 的成脂和成骨分化进行鉴定,结果表明,在相应的分化培养基中培养 3 周后,细胞形态由原来的长梭形变为

圆形,细胞质中出现大量空泡,茜素红染色显示细胞中出现钙化的细胞外基质,表明 eMSCs 可以分化为成骨细胞。油红 O 染色显示细胞内形成脂滴,表明 eMSCs 可以分化为脂肪细胞(图 1A)。通过流式细胞仪检测细胞表面表型。如图 1B 所示,细胞表面标志物 CD44、CD73、CD90 和 CD105 呈阳性表达,而 CD34 和 CD45 阴性表达。这些结果与间充质干细胞特性一致。

2.2 PKH26 标记 eMSCs 的迁移 为了追踪和确定 eMSCs 是否能迁移到受损的子宫内膜以修复组织再生,P3 代细胞用红色荧光细胞膜染料 PKH26 标记并移植到 IUA 模型中。对冰冻 OCT 包埋的子宫组织切片进行观察,发现随着移植时间的延长,子宫内膜腺体周围分散的红色荧光分布增加。表明 eMSCs 可迁移到受损的子宫内膜。见图 2。

2.3 eMSCs 改善子宫内膜损伤 在第 3 周收集各组子宫组织,观察 eMSCs 治疗在促进子宫内膜形态和功能方面的作用。HE 染色结果显示,Sham 组宫腔形态规则,大量单层柱状上皮细胞覆盖子宫和腺腔,上皮细胞结构完整,间质腺体丰富,呈椭圆形。

Model 组宫腔结构破坏,腺体数量明显减少($P < 0.001$),结缔组织碎片增多,但在 eMSCs 治疗后子宫内膜腺体数量显著增加($P < 0.001$)(图 3A、3B)。Masson 染色显示 Sham 组子宫内膜间质中几乎没有蓝色胶原沉积。相比之下,Model 组宫腔内形成并积聚大量蓝色胶原纤维,形成明显的粘连带,但在 eMSCs 治疗后纤维化面积的比例显著降低,胶原纤维排列有序(图 3A、3C)。三组在子宫内膜腺体数量和子宫内纤维化面积的比例存在显著差异($F = 35.47、25.32, P < 0.001$)。

2.4 eMSCs 减少子宫内膜纤维化 三组在 I 型胶原和 α -SMA 的表达水平存在显著差异($F = 14.56、24.71, P < 0.001$);与 Sham 组相比,Model 组中 I 型胶原和 α -SMA 蛋白的表达水平显著增加($P < 0.05$),但在 eMSCs 组中 I 型胶原和 α -SMA 蛋白的表达水平平均显著减少($P < 0.05$)(图 4A)。同时,免疫组织化学染色显示, α -SMA 的表达在 Model 组中显著增加,纤维化程度加重,而在 eMSCs 组中降低(图 4B、4C)。此外,通过免疫组织化学染色评估了 p-Keratin 的表达,一种腺上皮标志物。如图 4B 所

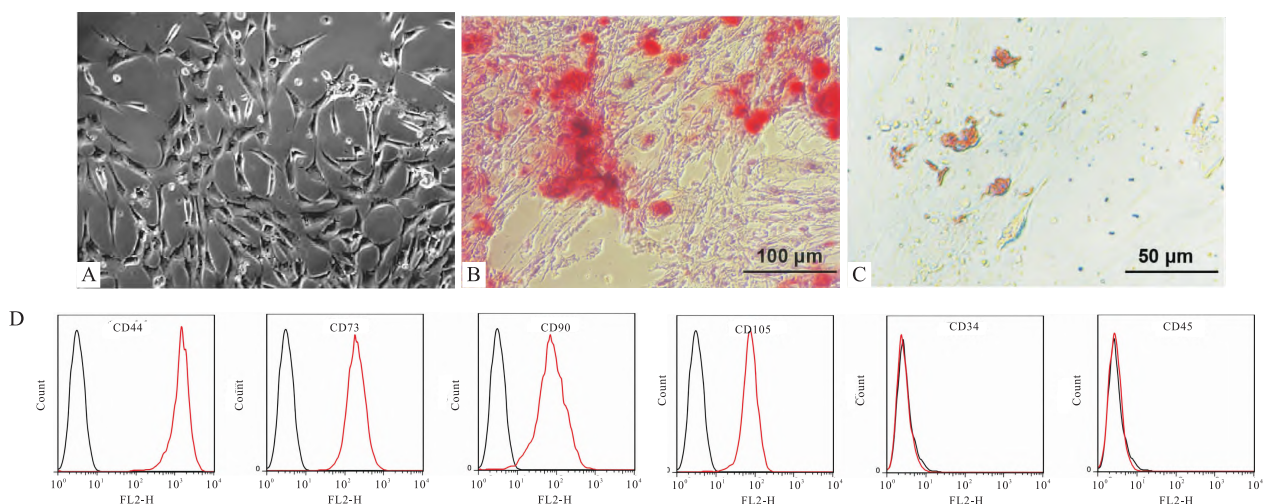


图 1 eMSCs 的体外培养、分化和鉴定

A: P3 代 eMSCs 的细胞形态 $\times 100$; B、C: 在培养 3 周后通过茜素红染色鉴定 eMSCs 的成骨分化情况和油红 O 染色鉴定 eMSCs 的成脂分化; B: $\times 200$; C: $\times 200$; D: 流式细胞术分析 eMSCs 的表面标志物 CD74、CD90、CD106、CD44、CD34 和 CD45 表达

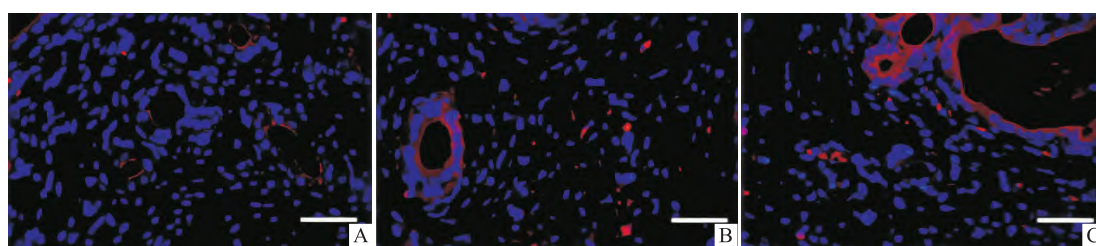


图 2 PKH26 标记的 eMSCs 体内示踪 $\times 100$

A: 1 d; B: 3 d; C: 5 d

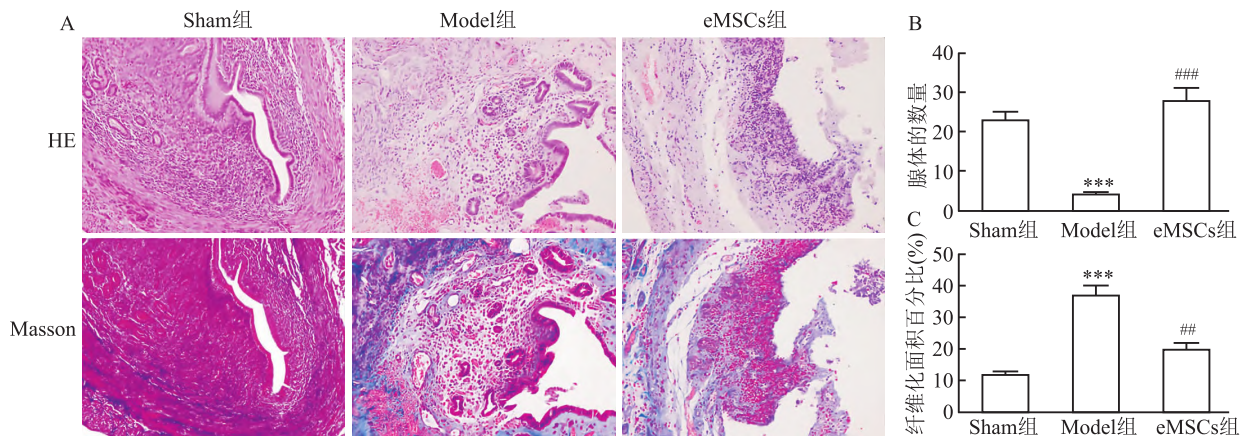


图3 eMSCs对子宫内膜形态恢复的影响

A: HE染色和Masson染色分别检测各组子宫内膜腺体、宫内纤维化变化 $\times 100$; B: 子宫内膜腺体数量变化的统计结果; C: 子宫内膜损伤后子宫内纤维化变化的统计结果; 与Sham组比较: *** $P < 0.001$; 与Model组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

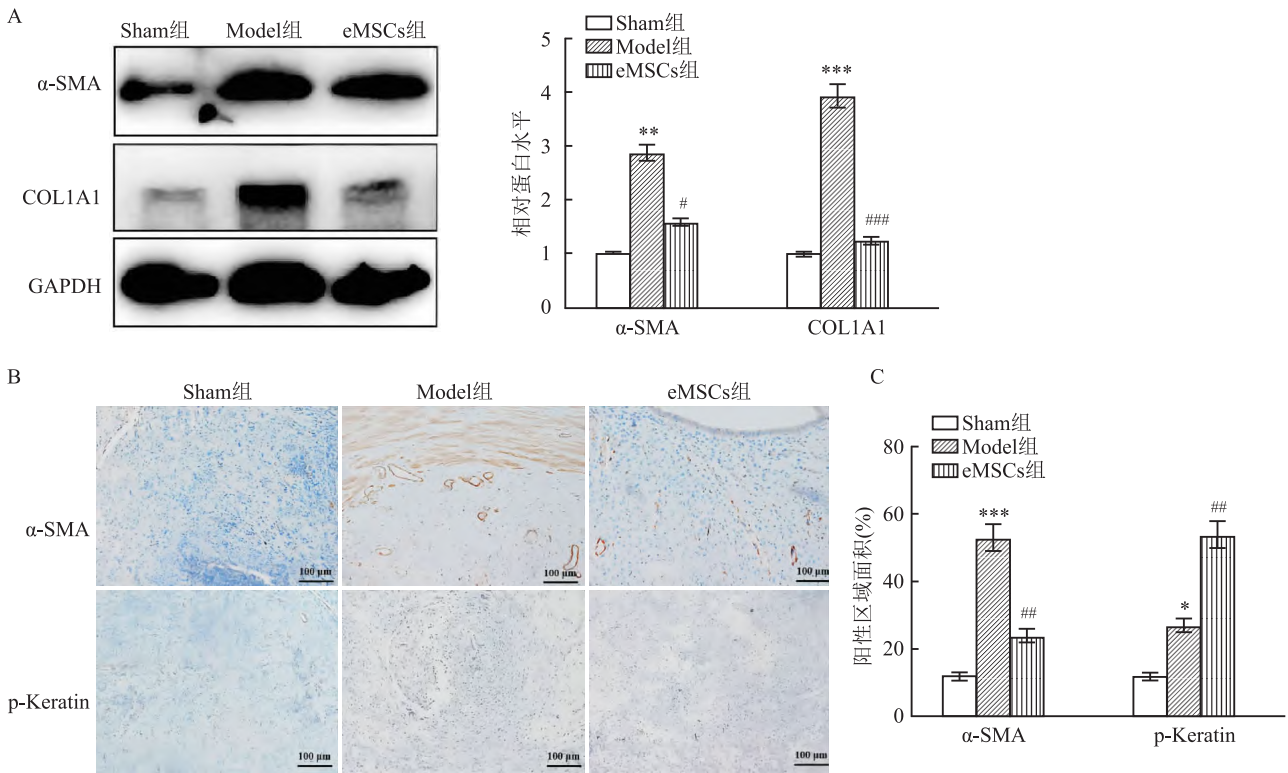


图4 eMSCs治疗后宫内膜纤维化的变化

A: 蛋白质印迹法检测各组子宫内膜组织中纤维化标志物的表达; B: 免疫组织化学染色鉴定不同组中 α -SMA、p-Keratin 的表达 $\times 100$; C: α -SMA、p-Keratin 表达的统计结果; 与Sham组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与Model组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

示,与Sham组相比,Model组中p-Keratin阳性染色显著增加 ($P < 0.05$),并且eMSCs组中p-Keratin阳性染色较Model组进一步增加 ($P < 0.05$) (图4C)。
2.5 eMSCs抑制EMT的发生 三组在N-cadherin、Vimentin、ZEB1和E-cadherin的表达水平存在显著差异 ($F = 12.83、21.37、15.60、14.49, P < 0.001$); 在Model组中,N-cadherin、Vimentin和

ZEB1的表达显著增加,而E-cadherin的表达减少。然而,在eMSCs组中,上述分子蛋白质的变化完全相反(图5A)。为了进一步验证eMSCs治疗对EMT的影响,进行免疫组织化学染色以分析CK7和Vimentin在子宫腔中的丰度和分布。结果显示Model组中CK7几乎不表达,而Vimentin表达显著升高。在eMSCs治疗后,CK7表达显著增加,并且主要位

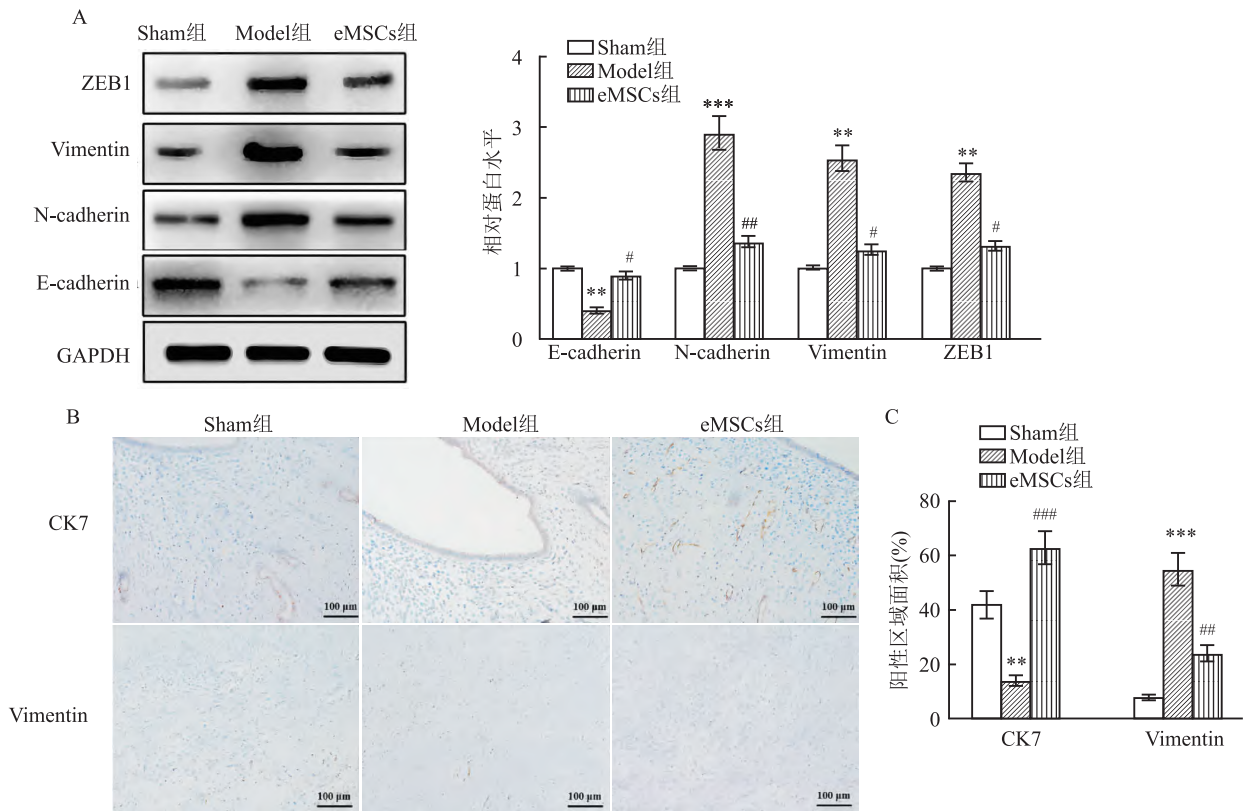


图5 eMSCs抑制EMT的发生

A: 蛋白质印迹用于检测子宫内膜组织中EMT标志物的表达;B: 免疫组织化学染色鉴定不同组中CK7、Vimentin的表达 × 100;C: CK7、Vimentin表达的统计结果;与Sham组比较: ** P < 0.01, *** P < 0.001;与Model组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001

于腺体和周围组织中,而Vimentin的表达减少,并且主要位于子宫内膜间质中(图5B、5C)。

2.6 eMSCs治疗对Wnt/β-catenin通路蛋白表达的影响 三组在β-catenin、C-myc和CyclinE的表达水平存在显著差异(F = 10.96、13.16、8.72, P < 0.001);与Sham组相比,Model组β-catenin和C-myc表达增加(P < 0.05)。与Model组相比,eMSCs组中CyclinE、β-catenin和C-myc表达增加(P < 0.05),见图6。

3 讨论

IUA的常见治疗方案包括宫腔镜粘连松解术和激素治疗。尽管IUA的治愈率有所提高,但复发率仍然很高,治疗仍然是一个挑战[12]。据报道,子宫内膜的再生和修复依赖于基底层干细胞的增殖和分化[10]。最近,用间充质干细胞理论治疗IUA引起了广泛关注。研究[13]表明,eMSCs可以迁移到子宫腔的损伤区域以促进子宫内膜再生。PKH26是一种简单有效的体内示踪标记技术,可以追踪MSC的迁移和分布。本研究将PKH26标记的eMSCs移植到

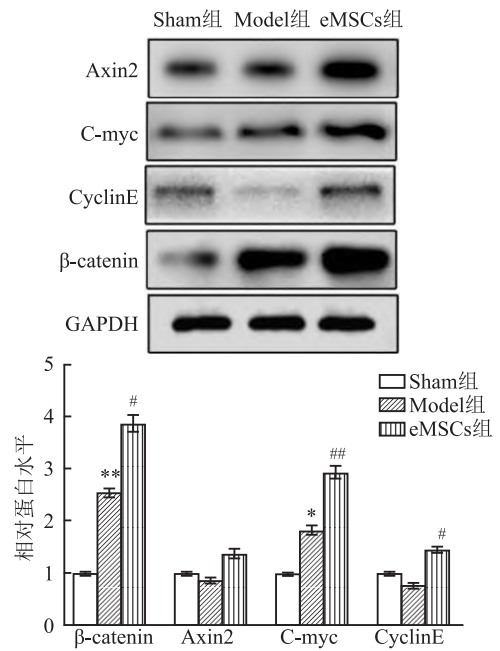


图6 Wnt信号通路核心分子在子宫内膜的表达

与Sham组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01;与Model组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

IUA 模型的子宫腔中,发现 eMSCs 主要位于子宫内
膜腺体和周围基质中,表明 eMSCs 可能分化为上皮
细胞,促进受损子宫内膜修复。此外,随着移植时间
的延长,eMSCs 逐渐增加。这些结果表明,eMSCs 可
能参与促进子宫内膜修复,这与相关研究^[14] 结果一
致。

细胞疗法是临床医学的一个新兴领域。许多成
人干细胞或多能细胞衍生物正应用于治疗慢性和退
行性疾病的临床试验中,最常见的是骨髓间充质干
细胞,其次是干细胞^[4]。尽管用于细胞治疗的间充
质干细胞有很多来源,但用于子宫内膜修复的研究
很少。证据表明,eMSCs 可能为子宫内膜修复提供
一种改进的治疗选择。eMSCs 是具有高增殖潜力
的小群体,其能分化成大的腺样结构,并能在常规活
检中轻易获得^[15]。先前研究^[16] 显示,皮下筋膜缺
损模型大鼠接种了 eMSCs 后,缺损部位血管分布密
度更高,并在接种细胞的周围形成卷曲的、更有组
织的胶原纤维沉积,表明 eMSCs 可能促进生理胶
原的产生,这有助于生物力学性能的改善。在体外,
eMSCs 可分化为表达平滑肌-肌球蛋白重链的平滑
肌细胞和产生胶原的成纤维细胞,伴随着 SUSD2 表
达的下调^[17]。成纤维细胞和平滑肌细胞是再生人
阴道壁以及合成和组织细胞外基质的理想细胞类
型。本研究显示,在 IUA 大鼠模型中施用 eMSCs 明
显增加了子宫内膜腺体的数量并降低了子宫内膜纤
维化的程度,这与以前的研究^[11] 结果一致,表明
eMSCs 治疗可以通过减少子宫内膜纤维化来促进
子宫内膜修复。因此,eMSCs 移植可用于治疗大鼠
子宫内膜损伤。在未来的研究中,将继续深入探讨
如何提高 eMSCs 在子宫内膜修复中的利用率,以更
好地促进 eMSCs 迁移和分化为子宫内膜上皮细胞。

IUA 最重要的病理特征是子宫内纤维化^[18]。
纤维连接蛋白、I 型胶原和 α -SMA 是纤维形成的
特异性标志,与细胞纤维化密切相关。在目前的研究
中,这些标志物的表达在 eMSCs 治疗组中显著降
低,表明 eMSCs 抑制了纤维化的进展,并有助于子
宫内膜上皮的修复。在 IUA 期间,EMT 总是伴随
着纤维化^[19]。因此,本课题组还探讨了 eMSCs 对
EMT 的调节作用,结果表明 eMSCs 治疗组上皮标
志物的表达增加,间质标志物的表达减少,表明
eMSCs 可以通过逆转 EMT 的发生促进上皮再形成。
先前的研究^[20] 表明,Wnt/ β -catenin 信号通路
与子宫内膜纤维化中的 EMT 密切相关。因此,本
研究探讨了 Wnt 信号在 eMSCs 移植治疗 IUA 中
的作用和机制。

在 eMSCs 组 IUA 大鼠模型中,在子宫组织中检测到
Wnt 信号传导中关键蛋白的表达。

参考文献

- [1] 刘磊,严思晴,丘甜美,等. 宫腔粘连患者的子宫内膜代谢组学研究[J]. 现代妇产科进展, 2022, 31(7): 521-5,529.
- [2] 冯晴,张爱倩,徐大宝,等. 生长激素促进宫腔粘连子宫内
膜生长的作用及其潜在机制[J]. 中南大学学报:医学版,
2022, 47(11): 1522-31.
- [3] 于结,张文文,黄佳月,等. Notch 信号通路在人羊膜间充
质干细胞移植治疗宫腔粘连中的作用[J]. 第三军医大学学
报, 2021, 43(14): 1346-57.
- [4] Kong Y, Shao Y, Ren C, et al. Endometrial stem/progenitor cells
and their roles in immunity, clinical application, and endometri-
osis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 474.
- [5] Min J, Lu N, Huang S, et al. Phenotype and biological character-
istics of endometrial mesenchymal stem/stromal cells; a compar-
ison between intrauterine adhesion patients and healthy women[J].
Am J Reprod Immunol, 2021, 85(6): e13379.
- [6] Song Y T, Liu P C, Tan J, et al. Stem cell-based therapy for a-
meliorating intrauterine adhesion and endometrium injury [J].
Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 556.
- [7] 牛丽佳,夏义欣,宋琪,等. 子宫内膜来源间充质干细胞对
子宫内膜癌 HEC-1B 细胞上皮-间质转化的影响[J]. 中华实
用诊断与治疗杂志, 2020, 34(12): 1195-200.
- [8] Gong L, Nie N, Shen X, et al. Bi-potential hPSC-derived
Müllerian duct-like cells for full-thickness and functional endome-
trium regeneration[J]. *NPJ Regen Med*, 2022, 7(1): 68.
- [9] Wang K, Jiang Z, Webster K A, et al. Enhanced cardioprotection
by human endometrium mesenchymal stem cells driven by exosomal
microRNA-21[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(1): 209-
22.
- [10] Hu X, Dai Z, Pan R, et al. Long-term transplantation human
menstrual blood mesenchymal stem cell loaded collagen scaffolds
repair endometrium histological injury[J]. *Reprod Toxicol*, 2022,
109: 53-60.
- [11] Domnina A, Novikova P, Obidina J, et al. Human mesenchymal
stem cells in spheroids improve fertility in model animals with dam-
aged endometrium[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 50.
- [12] 张慧星,徐大宝,胡明月,等. 宫腔镜宫腔粘连分离术后子宫
内膜对不同剂量雌激素的反应及其与生殖预后改善的关系
[J]. 实用妇产科杂志, 2022, 38(1): 48-52.
- [13] Paul K, Darzi S, Del Borgo M P, et al. Vaginal delivery of tissue
engineered endometrial mesenchymal stem/stromal cells in an aloe
vera-alginate hydrogel alleviates maternal simulated birth injury
[J]. *Appl Mater Today*, 2021, 22: 100890.
- [14] Kim Y Y, Park K H, Kim Y J, et al. Synergistic regenerative
effects of functionalized endometrial stromal cells with hyaluronic
acid hydrogel in a murine model of uterine damage[J]. *Acta Bio-
mater*, 2019, 89: 139-51.
- [15] Darzi S, Werkmeister J A, Deane J A, et al. Identification and

- characterization of human endometrial mesenchymal stem/stromal cells and their potential for cellular therapy[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(9): 1127–32.
- [16] Edwards S L, Ulrich D, White J F, et al. Temporal changes in the biomechanical properties of endometrial mesenchymal stem cell seeded scaffolds in a rat model[J]. *Acta Biomater*, 2015, 13: 286–94.
- [17] Hennes D M Z B, Rosamilia A, Werkmeister J A, et al. Endometrial SUSD2⁺ mesenchymal stem/stromal cells in tissue engineering: advances in novel cellular constructs for pelvic organ prolapse [J]. *J Pers Med*, 2021, 11(9): 840.
- [18] 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, 8(1): 897–902.
- [19] Wang L, Liu D, Wei J, et al. MiR-543 inhibits the migration and epithelial-to-mesenchymal transition of TGF- β -treated endometrial stromal cells *via* the MAPK and Wnt/ β -catenin signaling pathways [J]. *Pathol Oncol Res*, 2021, 27: 1609761.
- [20] Chen Y, Sun D, Shang D, et al. miR-223-3p alleviates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and extracellular matrix deposition by targeting SP3 in endometrial epithelial cells [J]. *Open Med*, 2022, 17(1): 518–26.

The mechanism of endometrial mesenchymal stem cells inhibition of endometrial fibrosis based on Wnt/ β -catenin

Jin Tao¹, Yan Wangbi², Yin Qi¹

(¹*Dept of Gynecology, Wuxi Fifth Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214007;*

²*Dept of Gynecology, Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuxi 214071)*

Abstract Objective To explore the mechanism of mesenchymal epithelial transformation (EMT) mediated by Wnt/ β -catenin signaling pathway in the inhibition of endometrial fibrosis by endometrial mesenchymal stem cells (eMSCs). **Methods** Eighteen female SD rats were randomly divided into Sham group, Model group and eMSCs group, with 6 rats in each group. Rats in Sham group merely had laparotomy without any treatment. A rat model of intrauterine adhesion (IUA) was established in the Model group and eMSCs group. In eMSCs group, the total amount of eMSCs cell suspension transplanted immediately after model injury was 0.05 ml (2×10^7 cells/ml) per uterus for treatment. Three weeks later, the uterus with unilateral injury was collected for hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining. Endometrial fibrosis, EMT, Wnt/ β -catenin pathway protein expression were analyzed by protein blot. **Results** In the Model group, the structure of the uterine cavity was destroyed and the number of glands were significantly reduced with a large number of blue collagen fibers were accumulated. However, after eMSCs treatment, the number of endometrial glands increased, and the fibrotic area decreased significantly. Compared with Sham group, the expression levels of type I collagen and α -SMA protein in Model group increased significantly ($P < 0.05$), but decreased significantly in eMSCs group ($P < 0.05$). In the Model group, the expressions of N-cadherin, vimentin and ZEB1 increased significantly, while the expression of E-cadherin decreased. However, in eMSCs group, the changes of protein of the above molecules were completely opposite. Compared with Sham group, the expression of β -catenin and C-myc increased in Model group ($P < 0.05$). Compared with the Model group, the expressions of CyclinE, β -catenin and C-myc increased in eMSCs group ($P < 0.05$). **Conclusion** eMSCs can promote endometrial repair in IUA rats by inhibiting EMT and endometrial fibrosis, which is partly achieved by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words Wnt/ β -catenin signaling pathway; interstitial epithelial transformation; endometrial mesenchymal stem cells; endometrial fibrosis; rats; intrauterine adhesion model