

## Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制剂 MSAB 对人子宫内膜基质细胞纤维化反应的影响

王飞娜<sup>1</sup>, 米旭光<sup>2</sup>, 林秀英<sup>2</sup>, 付建华<sup>2</sup>, 刘磊<sup>2</sup>, 于歆悦<sup>1</sup>, 臧欢欢<sup>1</sup>, 刘霖君<sup>1</sup>, 陈士玲<sup>2</sup>, 方艳秋<sup>1,2</sup>

(1. 长春中医药大学临床医学院, 吉林 长春 130021;

2. 吉林省人民医院生殖医学中心, 吉林 长春 130021)

**[摘要]** **目的:** 探讨 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 信号通路抑制剂 3-(4-甲基苯基磺酰胺基) 苯甲酸甲酯 (MSAB) 对人子宫内膜基质细胞 (HESCs) 纤维化反应的影响, 为 MSAB 应用于宫腔粘连 (IUA) 靶向治疗提供依据。**方法:** 体外培养正常 HESCs, 分为对照组和转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 组; 体外培养 IUA 患者粘连部分的 HESCs, 作为 IUA 组。采用 Western blotting 法检测 TGF- $\beta$ 1 作用不同时间 (0、12、24、48 和 60 h) 后各组细胞中纤维化标志蛋白 I 型胶原  $\alpha$ 1 (COL1A1) 蛋白表达水平。采用 MTT 实验检测各组细胞增殖活性。采用 Western blotting 法检测对照组和 IUA 组细胞中细胞 COL1A1、间质标志蛋白 [N-钙黏蛋白和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)] 以及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白  $\beta$ -catenin 表达水平。根据 MSAB 浓度, 将正常 HESCs 分为 0 (对照组)、0.25、0.50、0.75 和 1.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MSAB 组, MTT 实验检测各组细胞存活率。MSAB 作用后, 将正常 HESCs 分为对照组 (正常 HESCs)、TGF- $\beta$ 1 组 (10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1 诱导正常 HESCs 24 h 后撤药, 更换为完全培养基并继续培养 24 h) 和 MSAB 组 (10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1 诱导正常 HESCs 24 h 后撤药, 更换为含 0.75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MSAB 的完全培养基并继续培养 24 h)。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组细胞中上皮-间质转化 (EMT) 相关转录因子 Snail、Slug、Smuc、ZEB1 和 ZEB2 和 COL1A1 mRNA 表达水平, 采用 Western blotting 法检测各组细胞中 COL1A1 蛋白、N-钙黏蛋白、 $\alpha$ -SMA 蛋白、 $\beta$ -catenin 和 c-myc 蛋白表达水平。**结果:** 与对照组 (TGF- $\beta$ 1 作用 0 h) 比较, TGF- $\beta$ 1 组作用 12、24、48 和 60 h 时 HESCs 中 COL1A1 蛋白表达水平升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与对照组比较, IUA 组和 TGF- $\beta$ 1 组 HESCs 增殖活性差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与对照组比较, IUA 组 HESCs 中 COL1A1、 $\beta$ -连环蛋白、N-钙黏蛋白和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与对照组比较, 0.75 和 1.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MSAB 组细胞存活率降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与对照组比较, TGF- $\beta$ 1 组细胞中 Snail、Slug 和 COL1A1 mRNA 表达水平升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 与 TGF- $\beta$ 1 组比较, MSAB 组细胞中 Snail、Slug 和 COL1A1 mRNA 表达水平降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与对照组比较, 作用 24 h 时 TGF- $\beta$ 1 组细胞中 COL1A1 蛋白、N-钙黏蛋白、 $\alpha$ -SMA 蛋白、 $\beta$ -catenin 和 c-myc 蛋白表达水平升高 ( $P<0.01$ ); 与 TGF- $\beta$ 1 组比较, MSAB 组细胞中 COL1A1 蛋白、N-钙黏蛋白、 $\alpha$ -SMA 蛋白、 $\beta$ -catenin 和 c-myc 蛋白表达水平降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。**结论:** MSAB 可抑制体外培养 HESCs 的纤维化反应, 该结果为 MASB 应用于 IUA 靶向治疗提供了理论基础。

**[关键词]** 子宫内膜纤维化; 转化生长因子  $\beta$ 1; 上皮-间质转化; Asherman 综合征; 宫腔粘连

**[中图分类号]** R711 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2023-10-26

**[基金项目]** 吉林省科技厅科技发展计划项目 (20230204036YY, 20230203051SF, YDZJ202102CXJD076); 吉林省卫生健康委卫生健康技术创新项目 (2021lc059, 2021lc061)

**[作者简介]** 王飞娜 (1996-), 女, 陕西省咸阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事子宫内膜纤维化及其治疗方面的研究。

**[通信作者]** 方艳秋, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: yq.fang@163.com)

## Effect of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway inhibitor MSAB on fibrogenic responses of human endometrial stromal cells

WANG Feina<sup>1</sup>, MI Xuguang<sup>2</sup>, LIN Xiuying<sup>2</sup>, FU Jianhua<sup>2</sup>, LIU Lei<sup>2</sup>, YU Xinyue<sup>1</sup>, ZANG Huanhuan<sup>1</sup>,  
LIU Linjun<sup>1</sup>, CHEN Shiling<sup>2</sup>, FANG Yanqiu<sup>1,2</sup>

(1. School of Clinical Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China;

2. Reproductive Medicine Center, Jilin Provincial People's Hospital, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effect of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway inhibitor methyl 3-[(4-methyl-phenyl)sulfonyl] amino benzoate (MSAB) on the fibrogenic response of the human endometrial stromal cells (HESCs), and to provide the foundation for the application of MSAB in the target therapy of intrauterine adhesion (IUA). **Methods:** The normal HESCs were cultured *in vitro* and divided into two groups: control group and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) group; the HESCs from the adhesion part of the IUA patients were cultured *in vitro*, regarded as IUA group. Western blotting method was used to detect the expression levels of fibrotic marker protein type I collagen  $\alpha$ 1 (COL1A1) in the cells in various groups at different time points (0, 12, 24, 48, and 60 h) after treated with TGF- $\beta$ 1. MTT assay was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups. Western blotting method was used to detect the expression levels of the fibrotic marker protein COL1A1, stromal marker proteins such as N-cadherin and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway-related protein  $\beta$ -catenin in the cells in control and IUA groups. Based on the MSAB concentrations, the normal HESCs were divided into 0 (control), 0.25, 0.50, 0.75, and 1.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MSAB groups, and MTT assay was used to detect the survival rates of the cells in various groups. After treated with MSAB, the normal HESCs were divided into control group (normal HESCs), TGF- $\beta$ 1 group (10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1 induced normal HESCs for 24 h then the drug was withdrawn, replaced with complete culture medium, and the cells continued to be cultured for 24 h), and MSAB group (10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1 induced normal HESCs for 24 h then the drug was withdrawn, replaced with a complete medium containing 0.75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MSAB and the cells continued to be cultured for 24 h). Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related transcription factors Snail, Slug, Smuc, ZEB1, and ZEB2, and COL1A1 mRNA in the cells in various groups. Western blotting method was used to detect the expression levels of COL1A1, N-cadherin,  $\alpha$ -SMA,  $\beta$ -catenin, and c-myc proteins in the cells in various groups. **Results:** Compared with control group (after treated with TGF- $\beta$ 1 for 0 h), the expression levels of COL1A1 proteins in the HESCs after treated with TGF- $\beta$ 1 for 12, 24, 48, and 60 h in TGF- $\beta$ 1 group were increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with control group, there was no significant difference in the proliferation activity of the HESCs in IUA and TGF- $\beta$ 1 groups ( $P>0.05$ ). Compared with control group, the expression levels of COL1A1,  $\beta$ -catenin, N-cadherin, and  $\alpha$ -SMA proteins in the cells in IUA group were increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with control group, the survival rates of the cells in 0.75 and 1.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MSAB groups were decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with control group, the expression levels of Snail, Slug, and COL1A1 mRNA in the cells in TGF- $\beta$ 1 group were increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); compared with TGF- $\beta$ 1 group, the expression levels of Snail, Slug, and COL1A1 mRNA in the cells in MSAB group were decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with control group, after treated with TGF- $\beta$ 1 for 24 h, the expression levels of COL1A1, N-cadherin,  $\alpha$ -SMA,  $\beta$ -catenin, and c-myc proteins in the cells in TGF- $\beta$ 1 group were increased ( $P<0.01$ ); compared with TGF- $\beta$ 1 group, the expression levels of COL1A1, N-cadherin,  $\alpha$ -SMA,  $\beta$ -catenin, and c-myc proteins in the cells in MSAB group were

decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** MSAB can inhibit the fibrogenic responses of the HESCs *in vitro*, and the results provide the theoretical basis for the application of MSAB in the target therapy of IUA.

**KEYWORDS** Endometrial fibrosis; Transforming growth factor- $\beta 1$ ; Epithelial-mesenchymal transition; Asherman syndrome; Intrauterine adhesion

Asherman综合征是由于子宫内膜损伤引起的一种以宫腔粘连(intrauterine adhesion, IUA)为特征的疾病,主要的临床表现有少经、闭经、不孕和反复自然流产<sup>[1]</sup>,其基本组织学表现是子宫内膜纤维化<sup>[2]</sup>。纤维化是对急性或慢性细胞损伤的创伤愈合反应,其特征是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的累积<sup>[3]</sup>。正常伤口愈合受一系列复杂的促纤维化和抗纤维化过程的调节,包括3个独立、连续和重叠的步骤:止血炎症阶段、增殖阶段和重塑阶段<sup>[2]</sup>。在伤口愈合时,肉芽组织中的成纤维细胞被激活,成为肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFs),主要负责合成和沉积ECM成分,同时也表现出收缩特性;MFs在肉芽组织的收缩、牵引和成熟中起重要作用<sup>[4]</sup>。虽然MFs仅在组织生理反应(如正常伤口愈合)中短暂出现,但在纤维化疾病中不断积累<sup>[5]</sup>。促纤维化信号的异常激活导致伤口重塑不良<sup>[2]</sup>。活化的MFs是纤维化形成的关键效应细胞<sup>[6]</sup>,可引起胶原蛋白等ECM过度沉积而导致组织纤维化<sup>[3]</sup>。MFs可通过上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)来源于上皮细胞。发生EMT的细胞主要表达间质标志蛋白如N-钙黏蛋白、波形蛋白、纤维连接蛋白和 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)<sup>[3]</sup>。

研究<sup>[7-9]</sup>显示Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路已成为一种核心促纤维化途径。在多种已发生纤维化的器官中显示出典型的Wnt/ $\beta$ -catenin信号激活,纤维化子宫内膜基质细胞中Wnt/ $\beta$ -catenin信号也被激活<sup>[10]</sup>,但其内在机制尚不清楚。目前已知3-(4-甲基苯基磺酰胺基)苯甲酸甲酯[methyl 3-[(4-methyl-phenyl)sulfonyl]amino]benzoate, MSAB]是一种Wnt依赖性细胞的有效选择性抑制剂,可抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号的激活<sup>[11]</sup>。本研究观察在转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )诱导的子宫内膜纤维化中,MSAB是否通过抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路对子宫内膜纤维化进程进行调控,为初步阐明MSAB在子宫内膜纤维化疾病中的作用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 正常人子宫内膜基质细胞(human endometrial stromal cells, HESCs)和IUA患者的HESCs均由吉林省人民医院中心实验室分离传代保存,前者来源于无子宫内膜粘连女性,后者来源于宫腔镜下行IUA分解术的患者。DMEM/F12购自美国HyClone公司,标准胎牛血清购自美国Clark生物公司,磷酸盐缓冲液、青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶-EDTA、TransZol Up和TransScript<sup>®</sup> miRNA First-Strand cDNA Synthesis SuperMix均购自北京全式金生物技术有限公司,TGF- $\beta 1$ 购自北京翊神州科技股份有限公司,MSAB购自美国MedChemExpress公司,实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)反应体系SYBR Green试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司,RT-qPCR引物序列购自苏州金唯智生物科技有限公司,GAPDH抗体购自上海圣克鲁斯生物技术有限公司,I型胶原 $\alpha 1$ (type I collagen  $\alpha 1$ , COL1A1)抗体、N-钙黏蛋白抗体、 $\alpha$ -SMA抗体和 $\beta$ -catenin抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司,c-myc抗体购自安诺伦(北京)生物科技有限公司,甘氨酸和Tris Base均购自美国苏州瑞诺德生物科技有限公司,甲醇购自北京国药集团化学试剂有限公司,放射免疫沉淀法缓冲液(radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA)购自中国上海碧云天生物科技有限公司,脱脂奶粉购自加拿大BioSharp公司,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司,SDS-PAGE制备试剂盒购自深圳达科为生物工程有限公司,PVDF购自美国Millipore公司。 $CO_2$ 恒温培养箱购自美国赛默飞世尔科技公司,倒置荧光显微镜购自日本Olympus公司,RT-qPCR仪购自美国Applied Biosystems公司。

**1.2 纤维化细胞模型制备和细胞分组** 采用体外纤维化细胞模型模拟IUA患者粘连部位的HESCs。将正常HESCs密度调整至 $0.75 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ,接种于6孔细胞培养板,每孔加入2 mL培养液,细胞

贴壁后设定为0 h。采用 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1处理正常HESCs (TGF- $\beta$ 1组), 0、12、24、48和60 h后收集各孔细胞总蛋白, 诱导0 h的细胞设定为正常HESCs (对照组), 采用Western blotting法检测2组细胞中COL1A1蛋白表达水平。采用 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1处理正常HESCs 0、6、12、24、48和72 h后, MTT法检测对照组(正常HESCs)、TGF- $\beta$ 1组(TGF- $\beta$ 1诱导的正常HESCs)和IUA组(宫腔粘连患者粘连部分的HESCs)细胞增殖活性。以 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1处理HESCs 12、24、48和60 h后, 细胞中COL1A1蛋白表达水平高于处理0 h, 各组细胞增殖活性比较差异有统计学意义, 表明TGF- $\beta$ 1诱导纤维化细胞模型建立成功。采用Western blotting法检测对照组和IUA组细胞中细胞COL1A1、间质标志蛋白(N-钙黏蛋白和 $\alpha$ -SMA蛋白)以及Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关蛋白 $\beta$ -catenin表达水平。后续实验选取 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1处理正常HESCs 24 h, 诱导其纤维化。

采用不同浓度(0、0.25、0.50、0.75和 $1.00\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) MSAB处理正常HESCs 24 h, 采用MTT法检测正常HESCs存活率, 选取的MSAB浓度为细胞存活率达80%~100%时使用的MSAB浓度。因此后续实验选取 $0.75\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MSAB处理HESCs 24 h。各组细胞处理方式: 对照组为正常HESCs; TGF- $\beta$ 1组采用 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1诱导正常HESCs 24 h后撤药, 更换为完全培养基并继续培养24 h; MSAB组采用 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1诱导正常HESCs 24 h后撤药, 更换为含 $0.75\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MSAB的完全培养基并继续培养24 h; IUA组为IUA患者粘连部位的HESCs。

**1.3 MTT法检测各组细胞增殖活性** 取对数生长期HESCs, 采用胰蛋白酶-EDTA消化后, 制成单细胞悬液, 以每孔 $3\times 10^3$ 个细胞的密度接种到96孔细胞培养板中, 置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵箱孵育。细胞贴壁后设置为0 h, 各组细胞分别在0、6、12、24、48和72 h进行MTT实验测定, 步骤如下: 在需要测量的培养孔中加入 $20\ \mu\text{L}$  MTT测定液, 每孔充分混匀,  $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育4~6 h。采用无菌吸管吸出上清液, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$  二甲基亚砜, 在室温下置于摇床上低速振荡3~5 min, 使结晶充分溶解。于酶标仪490 nm处检测各孔吸光度(A)值, 以A值表示各组细胞增殖活性。

**1.4 MTT法检测各组细胞存活率** 取对数期正常

HESCs, 采用胰蛋白酶-EDTA消化后, 制成单细胞悬液, 以每孔 $8\times 10^3$ 个细胞的密度接种至96孔细胞培养板, 置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵箱中孵育。分为对照组和不同浓度MSAB组, 细胞贴壁后弃掉原培养液, 分别加入含0、0.25、0.50、0.75和 $1.00\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MSAB的DMEM/F12培养基, 每组设3个复孔, 分别作用24 h后进行MTT实验测定。于酶标仪490 nm处检测各孔A值, 计算细胞存活率。细胞存活率=(处理组A值-空白孔A值)/(对照组A值-空白孔A值) $\times 100\%$ 。

### 1.5 RT-qPCR法检测各组细胞中EMT相关转录因子和COL1A1 mRNA表达水平

TRIzol法提取对照组、TGF- $\beta$ 1组和MSAB组HESCs中总RNA; RNA定量后参照逆转录试剂盒说明书进行逆转录操作, 合成cDNA, 将cDNA置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 储存备用。每组反应体系的体积为 $20\ \mu\text{L}$ , 并设置3个复孔。采用SYBR Green试剂盒检测细胞中Snail、Slug、Smuc、ZEB1、ZEB2和COL1A1 mRNA表达水平, 采用U6作为内部对照引物。实验重复3次。引物序列: U6 F 5'-AACGAGACGACGACAGAC-3', U6 R 5'-GCAAATTCGTGAAGCGTTCCATA-3'; COL1A1 F 5'-GAGGGCCAA-GACGAAGACATC-3', COL1A1 R 5'-CAGATCAGTTCATCGCACAAC-3'; Snail F 5'-GCGAGCTGCAGGACTCTAAT-3', Snail R 5'-GCCTCC-AAGGAAGAGACTGA-3'; Slug F 5'-CCTGGT-TGCTTCAAGGACAC-3', Slug R 5'-TCCATGCTCTTGCAGCTCTC-3'; Smuc F 5'-GTGAAAA-CGCACTCCAGC-3', Smuc R 5'-AGAGCAGGC-ACCATTGATT-3'; ZEB1 F 5'-TTACACCTTT-GCATAACAGAACCC-3', ZEB1 R 5'-TTTACGATTACACCCAGACTGC-3'; ZEB2 F 5'-GGAGACGAGTCCAGCTAGTGT-3', ZEB2 R 5'-CCAC-TCCACCCTCCCTTATTTTC-3'。反应程序:  $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性5 min;  $94\ ^\circ\text{C}$ 变性1 min、 $55\ ^\circ\text{C}$ 退火30 s、 $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸1 min, 循环40次;  $72\ ^\circ\text{C}$ 、10 min;  $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算靶基因mRNA表达水平。

### 1.6 Western blotting法检测各组细胞中间质和纤维化标志蛋白及Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关蛋白表达水平

收集各组细胞, 加入RIPA缓冲液提取细胞中总蛋白, BCA蛋白定量法测定细胞中蛋白浓度。取 $20\ \mu\text{g}$ 各组细胞总蛋白上样行10% SDS-PAGE凝胶电泳, 将蛋白转移至PVDF上, 5%脱

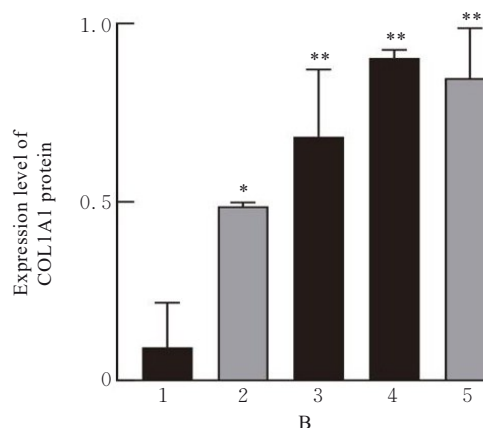
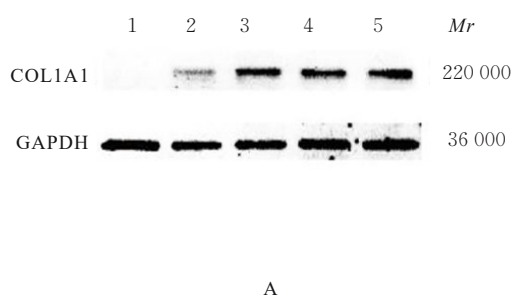
脂奶粉封闭1 h后,加入 GAPDH (1:1 000)、COL1A1 (1:1 000)、N-钙黏蛋白 (1:1 000)、 $\alpha$ -SMA (1:1 000)、 $\beta$ -catenin (1:1 000) 和 c-myc (1:1 000) 抗体 4 °C 孵育过夜。采用 TBST 缓冲液洗涤 PVDF 膜后,加入辣根过氧化物酶偶联的抗小鼠或抗兔 (1:2 000) 二抗在室温下再孵育 2 h。TBST 缓冲液洗涤 PVDF 膜 3 次后,采用极敏感增强型化学发光试剂试剂盒曝光成像,以 GAPDH 作为内参蛋白,采用 Image J 软件量化条带强度,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 蛋白条带灰度值。

**1.7 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。采用 Shapiro-Wilk 检验对各组数据进行正态性检验,各组细胞增殖活性,细胞存活率,

细胞中 Snail、Slug、Smuc、ZEB1、ZEB2 和 COL1A1 mRNA 表达水平及细胞中 COL1A1、N-钙黏蛋白、 $\alpha$ -SMA、 $\beta$ -catenin 和 c-myc 蛋白表达水平均符合正态分布,以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 TGF- $\beta$ 1 处理不同时间后 2 组细胞中 COL1A1 蛋白表达水平** 与对照组比较,TGF- $\beta$ 1 组诱导正常 HESCs 12 h 时细胞中 COL1A1 蛋白表达水平升高 ( $P<0.05$ ); TGF- $\beta$ 1 组诱导正常 HESCs 24、48 和 60 h 时细胞中 COL1A1 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ )。见图 1。



Lane 1: Control group; Lane 2: TGF- $\beta$ 1 group (12 h); Lane 3: TGF- $\beta$ 1 group (24 h); Lane 4: TGF- $\beta$ 1 group (48 h); Lane 5: TGF- $\beta$ 1 group (60 h). 1: Control group; 2: TGF- $\beta$ 1 group (12 h); 3: TGF- $\beta$ 1 group (24 h); 4: TGF- $\beta$ 1 group (48 h); 5: TGF- $\beta$ 1 group (60 h). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group.

图1 Western blotting 法检测 TGF- $\beta$ 1 处理不同时间后细胞中 COL1A1 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 1 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of COL1A1 protein in cells after treated with TGF- $\beta$ 1 for different time detected by Western blotting method

**2.2 各组细胞增殖活性** 与对照组比较,不同时间点 (0、6、12、24、48 和 72 h) IUA 组和 TGF- $\beta$ 1 组细胞增殖活性差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 1。

**2.3 不同浓度 MSAB 作用后各组细胞存活率** 与对照组比较,0.25、0.50、0.75 和 1.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MSAB 组细胞存活率呈现逐渐降低趋势;其中作用 24 h 后,0.75 和 1.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MSAB 组细胞存

表1 不同时间点各组细胞增殖活性

Tab. 1 Proliferation activities of cells in various groups at different time points

( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Group	Proliferation activity					
	(t/h) 0	6	12	24	48	72
Control	0.22 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.07	0.67 $\pm$ 0.03
TGF- $\beta$ 1	0.23 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.02
IUA	0.23 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.01	0.63 $\pm$ 0.07	0.63 $\pm$ 0.03

活率明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 2。

**2.4 对照组和 IUA 组细胞中间质和纤维化标志蛋白及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达水平**  
与对照组比较, IUA 组细胞中纤维化标志蛋白

表 2 不同浓度 MSAB 作用后各组细胞存活率

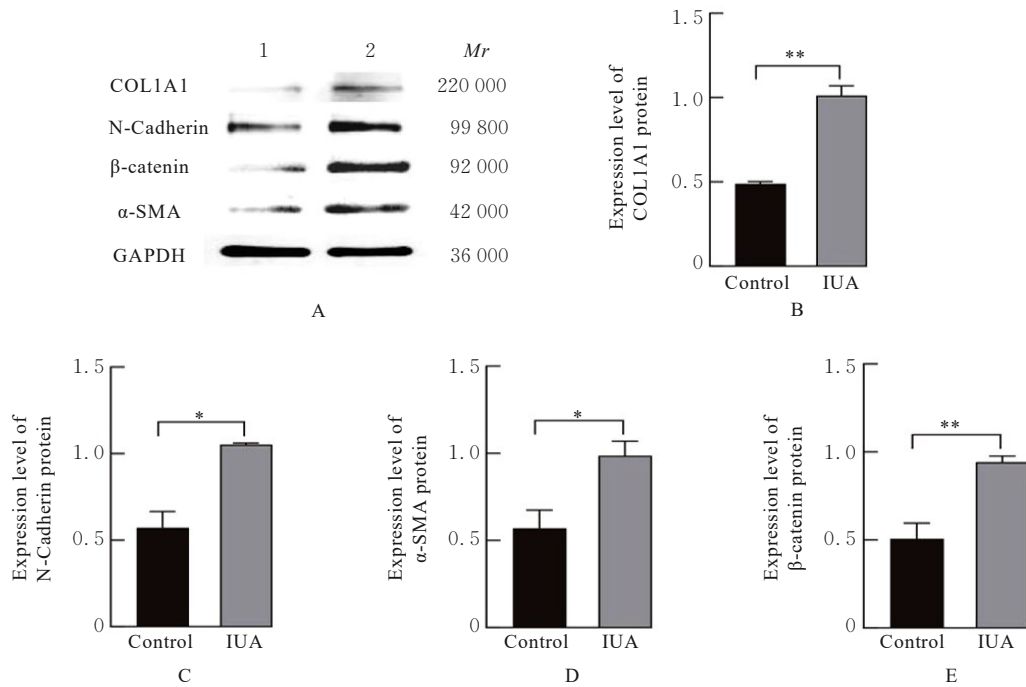
Tab. 2 Survival rates of cells in various groups after treated with different concentrations of MSAB ( $n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$ )

Group	Survival rate	
	(t/h) 0	24
Control	100.00 $\pm$ 1.06	101.30 $\pm$ 3.81
MSAB( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )		
0.25	100.00 $\pm$ 3.57	100.00 $\pm$ 4.25
0.50	100.00 $\pm$ 4.37	92.04 $\pm$ 2.22
0.75	100.00 $\pm$ 3.18	88.15 $\pm$ 0.34*
1.00	100.00 $\pm$ 1.56	80.62 $\pm$ 1.59**

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

COL1A1 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 间质标志蛋白 N-钙黏蛋白和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白  $\beta$ -catenin 表达水平也明显升高 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

**2.5 各组细胞中 EMT 相关转录因子和 COL1A1 mRNA 表达水平** 与对照组比较, TGF- $\beta$ 1 组细胞中 EMT 相关转录因子 Snail mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), Slug mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), COL1A1 mRNA 表达水平也明显升高 ( $P < 0.01$ ), 其余转录因子 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 TGF- $\beta$ 1 组比较, MSAB 组细胞中 EMT 相关转录因子 Snail mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), Slug mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.01$ ), COL1A1 mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.01$ ), 其余转录因子 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3。



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: IUA group); B-E: Histograms; B: Expression level of COL1A1 protein; C: Expression level of N-Cadherin protein; D: Expression level of  $\alpha$ -SMA protein; E: Expression level of  $\beta$ -catenin protein. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图 2 Western blotting 法检测各组细胞中纤维化和间质标志蛋白及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达情况

Fig.2 Expressions of fibrosis marker protein, mesenchymal marker proteins, and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway-related protein in cells in various groups detected by Western blotting method

**2.6 各组细胞中间质和纤维化标志蛋白及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达水平** 与对照组比较, TGF- $\beta$ 1 组细胞中纤维化标志蛋白 COL1A1、

N-钙黏蛋白和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白  $\beta$ -catenin 和 c-myc 蛋白表达水平也升高 ( $P < 0.01$ ); 与 TGF- $\beta$ 1

表3 各组细胞中EMT相关转录因子和COL1A1 mRNA表达水平

Tab. 3 Expression levels of EMT-related transcription factors and COL1A1 mRNA in cells in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	Snail mRNA	Slug mRNA	Smuc mRNA	ZEB1 mRNA	ZEB2 mRNA	COL1A1 mRNA
Control	1.05±0.05	1.04±0.04	1.09±0.07	1.03±0.02	1.03±0.03	1.03±0.02
TGF- $\beta$ 1	1.93±0.58*	3.96±1.59**	1.49±0.42	0.91±0.04	0.99±0.16	1.68±0.32**
MSAB	0.92±0.04 $\Delta$	0.82±0.40 $\Delta\Delta$	1.02±0.15	1.02±0.12	1.08±0.13	0.99±0.09 $\Delta\Delta$

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group;  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$  compared with TGF- $\beta$ 1 group.

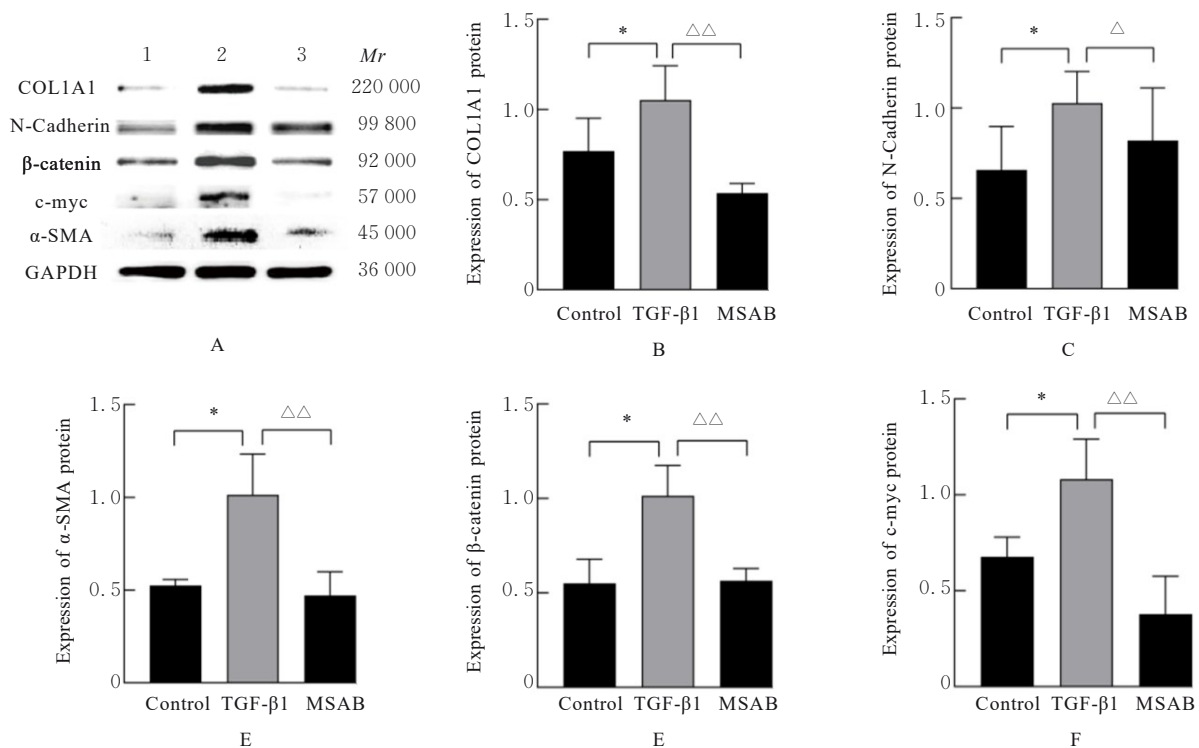
组比较, MSAB组细胞中纤维化标志蛋白COL1A1表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), 间质标志蛋白N-钙黏蛋白和 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平降低 ( $P<0.05$ ), Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关蛋白 $\beta$ -catenin和c-myc蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ )。见图3。

### 3 讨论

IUA是导致不孕的主要原因之一<sup>[1]</sup>。对于有生育要求或者有症状的IUA需要行宫腔镜手术治疗者, 子宫内膜进一步损伤易导致IUA复发<sup>[12]</sup>。术后为预防宫腔再次粘连, 常采用雌孕激素周期疗

法治疗<sup>[13]</sup>, 其预防IUA的效果有限。因此, 探讨高效预防和治理IUA的方法十分重要。

TGF- $\beta$ 1作为TGF- $\beta$ 超家族的一员, 在癌症<sup>[14]</sup>、生理愈合<sup>[15]</sup>、免疫<sup>[16]</sup>和纤维化<sup>[17]</sup>中有重要的调节作用。在肺纤维化和肝肾纤维化等疾病中已证实TGF- $\beta$ 1为纤维化的驱动因素<sup>[18]</sup>。研究<sup>[19]</sup>显示: 在IUA临床样本和动物模型中均发现TGF- $\beta$ 1高表达。TGF- $\beta$ 1通过TGF- $\beta$ 1/Smad信号通路诱导或调控EMT, 是EMT强有力的诱导因子<sup>[17]</sup>。在细胞实验中, 通常采用TGF- $\beta$ 1构建IUA细胞模型。CHEONG等<sup>[20]</sup>研究显示:  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: TGF- $\beta$ 1 group; Lane 3: MSAB group); B-F: Histograms (B: Expression of COL1A1 protein; C: Expression of N-Cadherin protein; D: Expression of  $\alpha$ -SMA protein; E: Expression of  $\beta$ -catenin protein; F: Expression of c-myc protein). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group;  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$  compared with TGF- $\beta$ 1 group.

图3 Western blotting法检测各组细胞中间质和纤维化标志蛋白及Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B-F)

Fig. 3 Electrophoregram (A) and histograms (B-F) of expressions of mesenchymal marker proteins, fibrosis marker protein, and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway-related proteins in cells in various groups detected by Western blotting method

处理HESCs 16 h可以引起细胞中COL1A1和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)的表达水平上调;LIU等<sup>[21]</sup>研究显示:10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1处理HESCs 72 h是建立IUA细胞模型的最佳条件。本研究结果显示:10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1处理HESCs 12 h后细胞中COL1A1蛋白表达水平升高;处理24、48和60 h后细胞中COL1A1蛋白表达水平明显升高,提示HESCs纤维化模型建立成功。

EMT分为3种不同的亚型:1型参与胚胎发生和器官发育;2型与伤口愈合、组织再生和器官纤维化有关;3型与癌症进展相关。IUA的基本组织学表现是促纤维化信号的异常激活导致上皮细胞通过2型EMT转化为MFs<sup>[22]</sup>,表现为迁移能力、侵袭性和抗凋亡能力增强及ECM累积<sup>[23]</sup>。发生EMT时上皮标志分子E-钙黏蛋白表达水平降低,EMT间质标志分子如N-钙黏蛋白、波形蛋白和 $\alpha$ -SMA表达水平升高<sup>[24]</sup>。其中 $\alpha$ -SMA既是间质标志物<sup>[3]</sup>,又是纤维化标志物<sup>[25]</sup>。近期研究<sup>[7-9]</sup>显示:除TGF- $\beta$ 1外,Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路也是促进EMT的有效介质。TGF- $\beta$ 1不仅通过经典通路TGF- $\beta$ 1/Smad信号通路诱导EMT,也可以通过与非经典通路MAPK/ERK、Hedgehog、PI3K/Akt和Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路发生串扰引起EMT,最终导致纤维化标志蛋白的沉积<sup>[26-27]</sup>。本研究结果显示:与对照组比较,IUA组细胞中N-钙黏蛋白、COL1A1和 $\beta$ -catenin表达水平升高,提示IUA组比对照组更易发生EMT及COL1A1沉积,Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路与HESCs纤维化有关。

Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路不仅在肿瘤疾病中发挥关键作用,在许多非肿瘤疾病中也发挥重要作用,如脱发、色素紊乱、伤口愈合、骨骼疾病、神经退行性疾病和慢性阻塞性肺疾病<sup>[28]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的过度激活与子宫内膜纤维化也有密切关联,其是促进EMT的有效介质<sup>[10]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路由EMT相关转录因子启动,包括Snail、Slug、Twist、ZEB1和ZEB2<sup>[22, 29]</sup>。HWANG等<sup>[11]</sup>研究显示:MSAB是Wnt/ $\beta$ -catenin信号传导的选择性抑制剂,可以选择性抑制Wnt依赖性细胞中Wnt信号活性,而对Wnt非依赖性细胞和正常人细胞几乎无影响。本研究结果显示:TGF- $\beta$ 1诱导的HESCs纤维化中,转录因子Snail、Slug和COL1A1 mRNA表达水平升高、N-钙黏蛋白和

COL1A1蛋白表达水平升高;同时 $\beta$ -catenin和c-myc蛋白表达水平升高。MSAB抑制TGF- $\beta$ 1诱导HESCs纤维化时,转录因子Snail、Slug和COL1A1 mRNA表达水平降低,N-钙黏蛋白和COL1A1蛋白表达水平降低;Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关蛋白( $\beta$ -catenin和c-myc)表达水平降低。

综上所述,MSAB干预后HESCs纤维化反应降低,其作用机制与抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路有关。该结果为IUA的发生发展提供了理论基础,有助于开发IUA的新型辅助治疗策略。未来应该在细胞水平和动物水平对MSAB的机制进行深入研究,为MSAB靶向治疗应用至临床及开发IUA的新型辅助治疗策略提供依据。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

王飞娜参与研究设计和论文撰写,于歆悦、臧欢欢和刘霖君参与研究数据的获取和分析,刘磊、林秀英和付建华参与论文修改和审核,米旭光和方艳秋参与研究设计。

#### [参考文献]

- [1] ESFANDYARI S, CHUGH R M, PARK H S, et al. Mesenchymal stem cells as a bio organ for treatment of female infertility[J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2253.
- [2] LEE W L, LIU C H, CHENG M, et al. Focus on the primary prevention of intrauterine adhesions; current concept and vision[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5175.
- [3] HU H H, CHEN D Q, WANG Y N, et al. New insights into TGF- $\beta$ /Smad signaling in tissue fibrosis[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 292: 76-83.
- [4] LODYGA M, HINZ B. TGF- $\beta$ 1 - A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 101: 123-139.
- [5] GYÖRFI A H, MATEI A E, DISTLER J H W. Targeting TGF- $\beta$  signaling for the treatment of fibrosis[J]. *Matrix Biol*, 2018, 68/69: 8-27.
- [6] PAKSHIR P, NOSKOVICOVA N, LODYGA M, et al. The myofibroblast at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2020, 133(13): jcs227900.
- [7] ZHANG Q, WANG L, WANG S Q, et al. Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 78.
- [8] SHREE HARINI K, EZHILARASAN D. Wnt/beta-

- catenin signaling and its modulators in nonalcoholic fatty liver diseases[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2023, 22(4): 333-345.
- [9] HADPECH S, THONGBOONKERD V. Epithelial-mesenchymal plasticity in kidney fibrosis [J]. *Genesis*, 2023: e23529.
- [10] XIONG Z H, MA Y R, HE J, et al. Apoptotic bodies of bone marrow mesenchymal stem cells inhibit endometrial stromal cell fibrosis by mediating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Heliyon*, 2023, 9(11): e20716.
- [11] HWANG S Y, DENG X M, BYUN S, et al. Direct targeting of  $\beta$ -catenin by a small molecule stimulates proteasomal degradation and suppresses oncogenic Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Cell Rep*, 2016, 16(1): 28-36.
- [12] SURGERY A E G. AAGL practice report: practice guidelines on intrauterine adhesions developed in collaboration with the European Society of Gynaecological Endoscopy (ESGE)[J]. *Gynecol Surg*, 2017, 14(1): 6.
- [13] MAGOS A. Hysteroscopic treatment of Asherman's syndrome[J]. *Reprod Biomed Online*, 2002, 4(Suppl 3): 46-51.
- [14] BATLLE E, MASSAGUÉ J. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in immunity and cancer[J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 924-940.
- [15] LICHTMAN M K, OTERO-VINAS M, FALANGA V. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) isoforms in wound healing and fibrosis[J]. *Wound Repair Regen*, 2016, 24(2): 215-222.
- [16] CHEN W J. TGF- $\beta$  regulation of T cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 483-512.
- [17] KIM K K, SHEPPARD D, CHAPMAN H A. TGF- $\beta$ 1 signaling and tissue fibrosis [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(4): a022293.
- [18] BUDI E H, SCHAUB J R, DECARIS M, et al. TGF- $\beta$  as a driver of fibrosis: physiological roles and therapeutic opportunities[J]. *J Pathol*, 2021, 254(4): 358-373.
- [19] GUO L P, CHEN L M, CHEN F, et al. Smad signaling coincides with epithelial-mesenchymal transition in a rat model of intrauterine adhesion[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(8): 4726-4737.
- [20] CHEONG M L, LAI T H, WU W B. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor  $\beta$ -induced collagen expression in human endometrial stromal cells[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210765.
- [21] LIU L M, CHEN G B, CHEN T L, et al. Si-SNHG5-FOXF2 inhibits TGF- $\beta$ 1-induced fibrosis in human primary endometrial stromal cells by the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 479.
- [22] MARCONI G D, FONTICOLI L, RAJAN T S, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): the type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1587.
- [23] KALLURI R, WEINBERG R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1420-1428.
- [24] GAETJE R, KOTZIAN S, HERRMANN G, et al. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin[J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(2): 461-467.
- [25] ZHANG L, LI Y, GUAN C Y, et al. Therapeutic effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on injured rat endometrium during its chronic phase[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 36.
- [26] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338.
- [27] YANG N, ZHANG H, CAI X X, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits inflammation and epithelial-mesenchymal transition through the PI3K/AKT pathway via upregulation of PTEN in asthma[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 818-828.
- [28] LIU J Q, XIAO Q, XIAO J N, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3.
- [29] TAKI M, ABIKO K, UKITA M, et al. Tumor immune microenvironment during epithelial-mesenchymal transition[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(17): 4669-4679.