

[文章编号] 1671-587X(2024)06-1557-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240609

## 双酚A对子宫内充质干/基质细胞干性的影响及人脐带间充质干细胞源性上清对细胞损伤的改善作用

王爱乔<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>, 王琳<sup>1</sup>, 张文琦<sup>1</sup>, 邓玲<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:** 探讨双酚A (BPA) 对子宫内充质干/基质细胞 (eMSCs) 增殖活性和干性特征的影响, 阐明人脐带间充质干细胞源性上清(hUCMSC-Sup)对细胞损伤的改善作用。**方法:** 体外培养eMSCs, 以0、200、250、300、350、400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA处理。将eMSCs分为对照组(仅培养液培养)、BPA组(含200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA的等体积培养液培养)、BPA+hUCMSC-Sup组(含200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA及50%体积比hUCMSC-Sup的等体积培养液培养)和BPA+CHIR-99021组(含200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA及10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CHIR-99021的等体积培养液培养), 使用干细胞成球培养液培养eMSCs干细胞球, 其余细胞均使用DMEM/F12完全培养基培养。噻唑蓝(MTT)法检测各组eMSCs存活率, 球体形成实验检测各组eMSCs干细胞球数和直径, CCK-8法检测各组eMSCs干细胞球中细胞增殖活性, 流式细胞术检测各组eMSCs中CD73+细胞百分率, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组eMSCs中性别决定区Y框蛋白2 (Sox2)、八聚体结合转录因子4 (Oct4) 和Nanog mRNA表达水平, Western blotting法检测各组eMSCs中 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)蛋白表达水平。**结果:** MTT法检测, BPA作用24和48 h, 与0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA组比较, 200、250、300、350和400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA组eMSCs存活率均明显降低( $P<0.01$ )。药物作用24 h时, 与对照组比较, BPA组eMSCs存活率明显降低( $P<0.01$ ); 药物作用48 h时, 与对照组比较, BPA组eMSCs存活率明显降低( $P<0.01$ ); 与BPA组比较, BPA+hUCMSC-Sup组eMSCs存活率明显升高( $P<0.05$ )。球体形成实验检测, 与培养3 d组比较, 培养4和5 d组eMSCs干细胞球数和直径均明显增加( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ); 与对照组比较, 培养48 h时BPA组eMSCs干细胞球数和直径均明显减少( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。CCK-8法检测, 处理24和48 h时, 与对照组比较, BPA组eMSCs干细胞球中细胞增殖活性均明显降低( $P<0.01$ ); 与BPA组比较, BPA+hUCMSC-Sup组eMSCs干细胞球中细胞增殖活性均明显升高( $P<0.01$ )。流式细胞术检测, 与对照组比较, BPA组eMSCs中CD73+细胞百分率明显降低( $P<0.01$ ); 与BPA组比较, BPA+hUCMSC-Sup组eMSCs中CD73+细胞百分率明显升高( $P<0.01$ )。RT-qPCR法检测, 与对照组比较, BPA组eMSCs中Sox2、Oct4和Nanog mRNA表达水平均明显降低( $P<0.01$ ); 与BPA组比较, BPA+hUCMSC-Sup组和BPA+CHIR-99021组eMSCs中Sox2、Oct4及Nanog mRNA表达水平均明显升高( $P<0.01$ )。Western blotting法检测, 与对照组比较, BPA组eMSCs中 $\beta$ -catenin蛋白表达水平明显降低( $P<0.01$ ); 与BPA组比较, BPA+hUCMSC-Sup组和BPA+CHIR-99021组eMSCs中 $\beta$ -catenin蛋白表达水平均明显升高( $P<0.01$ )。**结论:** BPA能够抑制eMSCs的干性特征, 损伤子宫内膜的自我更新及修复作用, 其机制可能与下调细胞中Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路活性有关。hUCMSC-Sup可以促进受损eMSCs的增殖, 并对BPA诱导的eMSCs干性损伤起到改善作用。

**[关键词]** 双酚A; 子宫内充质干/基质细胞; 人脐带间充质干细胞; 干细胞球

**[中图分类号]** Q254 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2023-11-29

**[基金项目]** 吉林省科技厅科技发展计划项目(20240602029RC, 20230204036YY, 20230203051SF, YDZJ202102CXJD076); 吉林省卫健委卫生健康技术创新项目(2021lc059)

**[作者简介]** 王爱乔(1996—), 女, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 在读硕士研究生, 主要从事生殖医学基础和干细胞治疗方面的研究。

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

## Effects of bisphenol A on stemness of endometrial mesenchymal stem/stromal cells and improvement effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived supernatant on cell injury

WANG Aiqiao<sup>1</sup>, MI Xuguang<sup>2</sup>, LIN Xiuying<sup>2</sup>, FU Jianhua<sup>2</sup>, LIU Lei<sup>2</sup>, WANG Lin<sup>1</sup>, ZHANG Wenqi<sup>1</sup>,  
DENG Ling<sup>1</sup>, CHEN Shiling<sup>2</sup>, FANG Yanqiu<sup>1,2</sup>

(1. School of Clinical Medical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China; 2. Reproductive Medicine Center, People's Hospital, Jilin Province, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of bisphenol A (BPA) on the proliferation activity and stemness characteristics of endometrial mesenchymal stem/stromal cells (eMSCs), and to elucidate the improvement effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived supernatant (hUCMSC-Sup) on the cell injury. **Methods:** The eMSCs were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of BPA (0, 200, 250, 300, 350, and 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The eMSCs were divided into control group (only cultured with culture solution), BPA group (cultured with isovolumetric culture solution including 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA), BPA+hUCMSC-Sup group (cultured with isovolumetric culture solution including 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA and 50% volumetric ratio of hUCMSC-Sup), and BPA+CHIR-99021 group (cultured with isovolumetric culture solution including 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CHIR-99021). The survival rates of eMSCs in various groups were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The numbers and diameters of the spheroids in various groups were detected by spheroids formation assay, the proliferation activities of the cells in eMSCs stem cell spheroids in various groups were detected by CCK-8 assay; the percentage of CD73+ cells in eMSCs in various groups were detected by flow cytometry; the expression levels of sex determining region Y-box 2 (Sox2), octamer-binding transcription factor 4 (Oct4), and Nanog mRNA in the eMSCs in various groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method, the expression levels of  $\beta$ -catenin protein in the eMSCs in various groups were detected by Western blotting method. **Results:** The MTT results showed that after treated with BPA for 24 and 48 h, compared with 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA group, the survival rates of eMSCs in 200, 250, 300, 350, and 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA groups were significantly decreased ( $P<0.01$ ). At 24 and 48 h after treatment, compared with control group, the survival rate of the eMSCs in BPA group was significantly decreased ( $P<0.01$ ); at 48 h after treatment, compared with BPA group, the survival rate of the eMSCs in BPA+hUCMSC-Sup group was significantly increased ( $P<0.05$ ). The spheroids formation assay results showed that compared with culture 3 d group, the numbers and diameters of stem cell spheroids of the eMSCs in culture 4 d group and culture 5 d group were significantly increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); compared with control group, after 48 h of culture, the number and diameter of the cells in eMSCs stem cell spheroids in BPA group were significantly decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The CCK-8 results showed that after 24 and 48 h of treatment, compared with control group, the proliferation activity of the cells in eMSCs stem cell spheroids in BPA group was significantly decreased ( $P<0.01$ ); compared with BPA group, the proliferation activity of the cells in eMSCs stem cell spheroids in BPA+hUCMSC-Sup group was significantly increased ( $P<0.01$ ). The flow cytometry results showed that compared with control group, the percentage of the CD73+ cells in the eMSCs in BPA group was significantly decreased ( $P<0.01$ ); compared with BPA group, the percentage of the CD73+ cells in eMSCs in BPA+hUCMSC-Sup group was significantly increased ( $P<0.01$ ). The RT-qPCR results showed that compared with control group, the

expression levels of Sox2, Oct4, and Nanog mRNA in the cells in BPA group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ); compared with BPA group, the expression levels of Sox2, Oct4, and Nanog mRNA in the cells in BPA+hUCMSC-Sup group and BPA+CHIR-99021 group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression level of  $\beta$ -catenin protein in the eMSCs in BPA group was significantly decreased ( $P < 0.01$ ); compared with BPA group, the expression levels of  $\beta$ -catenin protein in the eMSCs in BPA+hUCMSC-Sup group and BPA+CHIR-99021 group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** BPA can inhibit the stemness characteristics of the eMSCs, and injury the self-renewal and repair of endometrium; its mechanism may be related to down-regulating the activity of Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway in the cells. hUCMSC-Sup can promote the proliferation of injured eMSCs, and has improvement effect on the stemness injury induced by BPA.

**KEYWORDS** Bisphenol A; Endometrial mesenchymal stem/stromal cell; Human umbilical cord mesenchymal stem cell; Stem cell spheroid

子宫内膜间充质干/基质细胞 (endometrial mesenchymal stem/stromal cells, eMSCs) 具有多向分化和高增殖的潜能, 受激素严格调控, 在子宫内膜周期性再生中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。eMSCs 受损后会发生子宫内膜功能障碍, 最终导致胚胎着床失败和早期流产, 是女性不孕的主要原因之一<sup>[2]</sup>。当 eMSCs 聚集成三维球状体时, 其整体功能增强, 如参与组织再生的关键因子血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 分泌增加, 多能基因 Nanog 和性别决定区 Y 框蛋白 2 (sex determining region Y-box 2, Sox2) mRNA 表达上调<sup>[3]</sup>。

双酚 A (bisphenol A, BPA) 的结构与雌激素类似, 可与雌激素受体或其他激素受体结合干扰细胞的正常生理进程, 是最常见的内分泌干扰物 (endocrine disrupting chemicals, EDCs)<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>显示: BPA 暴露与多种疾病的发生发展有关, 包括生育能力受损、乳腺癌、糖尿病、肥胖、认知障碍和心血管疾病。HARNETT 等<sup>[6]</sup>发现: BPA 及其类似物对大鼠和人类干细胞有细胞毒性并能够诱导细胞凋亡。目前, BPA 对子宫内膜干细胞的影响尚未完全阐明。WANG 等<sup>[7]</sup>研究表明: 人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 与受损的人子宫内膜基质细胞 (human endometrial stromal cells, hEndoSCs) 在体外共培养后, 受损的 hEndoSCs 增殖率明显升高。本研究以 BPA 作用 eMSCs, 探讨 BPA 对 eMSCs 干性的影响, 阐明 hUCMSCs 源性上清 (hUCMSC-derived supernatant, hUCMSC-Sup) 对细胞损伤的改善作用。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** eMSCs 和 hUCMSCs 为吉林省人民医院中心实验室传代保存。BPA (货号: #K2116009) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, CCK-8 试剂盒 (货号: C0039) 购自上海碧云天生物技术有限公司, DMEM/F12 基础培养基 (货号: SH30023.01) 购自美国 HyClone 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (货号: FB15015) 购自美国 Clark 生物公司, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) (货号: FG701-01)、1% 青-链霉素 (货号: FG101)、含 EDTA 的胰蛋白酶 (货号: #FG301-01)、RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司, 选择性糖原合酶激酶 3 (glucogen synthase kinase-3, GSK-3) 抑制剂 CHIR-99021 购自美国 MCE 公司, 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 反应体系 SYBR Green 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司, RT-qPCR 引物序列由苏州金唯智生物科技公司合成,  $\beta$  连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 抗体 (货号: #8480S) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, CD73 抗体 (货号: #560847) 购自美国 BD 公司。电泳仪购自美国 Wealtec 公司, 酶标仪购自美国 Thermo 公司, 流式细胞仪购自美国 BD 公司, CO<sub>2</sub> 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 细胞培养、分组和处理** 采用含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 DME/F12 完全培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 eMSCs, 采用含 EDTA 的胰蛋白酶消化传代。培养 P3~P5 代 hUCMSCs, 收集细胞对数生长期培养液, 3 000 g 离心 15 min, 清

除细胞和细胞碎片,制备为hUCMSC-Sup,分装后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。不含血清的DMEM/F12培养基中添加 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  EGF、 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  bFGF和2% B27 (50 $\times$ ),配制干细胞成球培养液。

将eMSCs分为对照组(仅培养液培养)、BPA组(含 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA的等体积培养液培养)、BPA+hUCMSC-Sup组(含 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA及50%体积比hUCMSC-Sup的等体积培养液培养)和BPA+CHIR-99021组(含 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA及 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CHIR-99021的等体积培养液培养),使用干细胞成球培养液培养eMSCs干细胞球,其余细胞均使用DMEM/F12完全培养基培养。

**1.3 噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法检测不同浓度BPA组eMSCs存活率** 取对数生长期的eMSCs,以每孔 $1\times 10^4$ 个细胞的密度接种于96孔细胞培养板,待细胞生长至约70%后,分别加入0、200、250、300、350和 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BPA。并于加药处理后的24和48 h,每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$  MTT试剂,4 h后采用酶标仪检测波长 $492\text{ nm}$ 处吸光度(A)值,计算细胞存活率。细胞存活率=(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值) $\times 100\%$ 。

**单层培养细胞存活率检测:**球体形成实验培养1周后收集细胞球,吹打分散为单细胞悬浮液后再次接种于96孔细胞培养板,待细胞生长至约70%后,分别加入培养液(对照组)、含BPA的培养液(BPA组)和含BPA及hUCMSC-Sup的培养液(BPA+hUCMSC-Sup组),于加药处理后24和48 h每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$  MTT试剂,4 h后采用酶标仪检测波长 $492\text{ nm}$ 处A值,计算细胞存活率。细胞存活率=(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值) $\times 100\%$ 。每组实验重复4次。

**1.4 球体形成实验检测各组eMSCs干细胞球体形态表现** eMSCs经胰酶消化后悬浮于干细胞成球培养液中,以每孔 $1\times 10^4$ 个细胞的密度接种于低黏附6孔细胞培养板中培养5 d,于培养第3、4和5天拍照并记录eMSCs干细胞球数和直径变化。干细胞球培养至3 d时按上述eMSCs干细胞球体分组处理,于加药24和48 h后拍照并计数eMSCs干细胞球数和直径。采用Image J软件测量eMSCs干细胞球直径,球体直径 $\geq 50\text{ }\mu\text{m}$ 则为1个球体。

**1.5 CCK-8法检测各组eMSCs干细胞球中细胞增殖活性** 将eMSCs以每孔 $5\times 10^3$ 个细胞的密度接

种于低黏附24孔细胞培养板,干细胞成球培养液培养3 d,按上述干细胞球体分组,于加药处理后0、24和48 h,每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$  CCK-8试剂,4 h后采用酶标仪检测波长 $450\text{ nm}$ 处A值,以仅加入培养液的空白孔为对照孔调零。以A值代表各组eMSCs干细胞球中细胞增殖活性。

**1.6 流式细胞术检测各组eMSCs中CD73+细胞百分率** 将eMSCs接种于6孔细胞培养板,按照上述eMSCs分组处理24 h后,加入APC-A标记的CD73抗体,避光冰上孵育30 min后PBS缓冲液洗涤3次。采用流式细胞仪和FlowJo软件检测各组eMSCs中CD73+细胞百分率。

**1.7 RT-qPCR法检测各组eMSCs中Sox2、八聚体结合转录因子4(octamer-binding transcription factor 4, Oct4)和Nanog mRNA表达水平** 将eMSCs铺于6孔细胞培养板,并按照上述细胞分组处理24 h后,采用TRIzol试剂提取总RNA,反转录试剂盒合成cDNA,以cDNA作为模板,使用SYBR Green qPCR Master Mix进行RT-qPCR扩增,检测各组细胞中Sox2、Oct4和Nanog mRNA表达水平。引物序列: GAPDH F 5'-TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT-3', R 5'-ATGCACATCCTTCGATAAGACTG-3'; Sox2 F 5'-GCCGAGTGGAACCTTTTGTTCG-3', R 5'-GCAGCGTGTACTTATCCTTCTT-3'; Oct4 F 5'-AAGCGATCAAGCAGCGACTA-3', R 5'-CAGAGTGGTGACGGAGACAG-3'; Nanog F 5'-CCCCAGCCTT-TACTCTTCCTA-3', R 5'-CCAGGTTGAATTGTTCCAGGTC-3'。反应条件:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性1 min、 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,循环40次;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。使用GAPDH进行归一化处理,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因表达水平。

**1.8 Western blotting法检测各组eMSCs中 $\beta$ -catenin蛋白表达水平** 将eMSCs接种于6孔细胞培养板,按照上述细胞分组处理24 h后,收集eMSCs进行裂解获取蛋白,经SDS-PAGE电泳分离蛋白样品,转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉TBST溶液室温封闭1 h,分别加入抗体 $\beta$ -catenin (1:1 000)和GAPDH (1:1 000)  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜3次,加入HRP标记的抗小鼠或抗兔二抗(1:2 000)室温孵育2 h,再次洗膜后加入ECL发光检测试剂使条带显像。采用Image J软件分析蛋

白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平, 实验重复3次。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。

**1.9 统计学分析** 采用SPSS 25.0统计软件进行统计学分析。各组eMSCs干细胞球数和直径及细胞增殖活性, 各组eMSCs存活率和CD73+细胞百分率, 各组eMSCs中Sox2、Oct4和Nanog mRNA表达水平及β-catenin蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 各组eMSCs存活率** BPA作用24和48 h, 与0 μmol·L<sup>-1</sup> BPA组比较, 200、250、350和400 μmol·L<sup>-1</sup> BPA组eMSCs存活率均明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表1。药物作用24 h时, 与对照组比较, BPA组eMSCs存活率明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与BPA组比较, BPA+hUCMSC-Sup组eMSCs存活率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。药物作用48 h时, 与对照组比较, BPA组eMSCs存活率明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与BPA组比较, BPA+hUCMSC-Sup组eMSCs存活率明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表2。

**表1 不同浓度BPA组eMSCs存活率**

**Tab. 1 Survival rates of eMSCs in different concentrations of BPA groups** ( $n=4, \bar{x} \pm s, \eta/\%$ )

Group	Survival rate		
	(t/h)	24	48
0 μmol·L <sup>-1</sup> BPA		100.00±0.00	100.00±0.00
200 μmol·L <sup>-1</sup> BPA		77.69±3.03*	75.48±2.93*
250 μmol·L <sup>-1</sup> BPA		72.82±1.97*	62.53±2.96*
300 μmol·L <sup>-1</sup> BPA		63.41±1.58*	38.59±2.60*
350 μmol·L <sup>-1</sup> BPA		37.23±3.40*	29.32±6.56*
400 μmol·L <sup>-1</sup> BPA		32.41±3.10*	17.68±3.63*

\* $P < 0.01$  compared with 0 μmol·L<sup>-1</sup> BPA group.

**2.2 各组eMSCs干细胞球体形态表现** 与培养3 d组比较, 培养4和5 d组eMSCs干细胞球数和直径均明显增加 ( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。见图1和表3。与对照组比较, 培养24 h时BPA组eMSCs干细胞球数和直径差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 培养48 h时BPA组eMSCs干细胞球数和直径均明显减少 ( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。见表4。

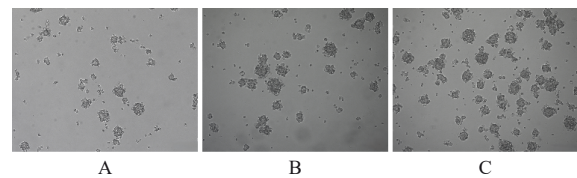
**表2 各组eMSCs存活率**

**Tab. 2 Survival rates of eMSCs in various groups**

( $n=4, \bar{x} \pm s, \eta/\%$ )

Group	Survival rate		
	(t/h)	24	48
Control		100.00±0.00	100.00±0.00
BPA		72.15±2.59*	67.39±3.02*
BPA+hUCMSC-Sup		80.03±4.62	75.21±3.32 <sup>△</sup>

\* $P < 0.01$  compared with control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with BPA group.



A: Culture 3 d group; B: Culture 4 d group; C: Culture 5 d group.

**图1 eMSCs干细胞球形态表现(×10)**

**Fig. 1 Morphology of eMSCs stem cell spheroid(×10)**

**表3 培养不同时间组eMSCs干细胞球数和直径**

**Tab. 3 Number and diameter of eMSCs stem cell spheroids in cultured for different time groups** ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	Spheroid number	Spheroid size (l/μm)
Culture 3 d	18.00±1.00	54.26±2.39
Culture 4 d	29.00±2.00**	61.25±3.39*
Culture 5 d	37.33±2.52**	63.65±2.52**

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with culture 3 d group.

**表4 2组eMSCs干细胞球数和直径**

**Tab. 4 Numbers and diameters of eMSCs stem cell spheroids in two groups** ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	Spheroids number		Spheroids size (l/μm)	
	(t/h)	24	24	48
Control		29.00±3.00	38.00±2.65	57.64±1.62
BPA		28.67±0.58	31.67±2.08*	57.18±2.70
			52.95±1.21**	

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

**2.3 各组eMSCs干细胞球中细胞增殖活性** 处理0 h时, 各组eMSCs干细胞球中细胞增殖活性比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。处理24和48 h时, 与对照组比较, BPA组eMSCs干细胞球中细胞增殖活性均明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与BPA组比较, BPA+hUCMSC-Sup组eMSCs干细胞球中细胞增殖活性均明显升高 ( $P < 0.01$ )。见表5。

**2.4 各组eMSCs中CD73+细胞百分率** 与对照

表5 各组 eMSCs 干细胞球中细胞增殖活性

Tab. 5 Proliferation activities in eMSCs stem cell spheroids in various groups ( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Group	Proliferation activity		
	(t/h) 0	24	48
Control	1.17±0.04	1.24±0.02	1.29±0.04
BPA	1.18±0.01	1.12±0.03*	1.09±0.02*
BPA+hUCMSC-Sup	1.17±0.01	1.22±0.01 <sup>△</sup>	1.29±0.01 <sup>△</sup>

\* $P<0.01$  compared with control group; <sup>△</sup> $P<0.01$  compared with BPA group.

组 (98.20%±0.98%) 比较, BPA 组 eMSCs 中 CD73+ 细胞百分率 (44.63%±18.66%) 明显降低 ( $P<0.01$ ); 与 BPA 组比较, BPA+hUCMSC-Sup 组 eMSCs 中 CD73+ 细胞百分率 (91.53%±7.38%) 明显升高 ( $P<0.01$ )。见图 2。

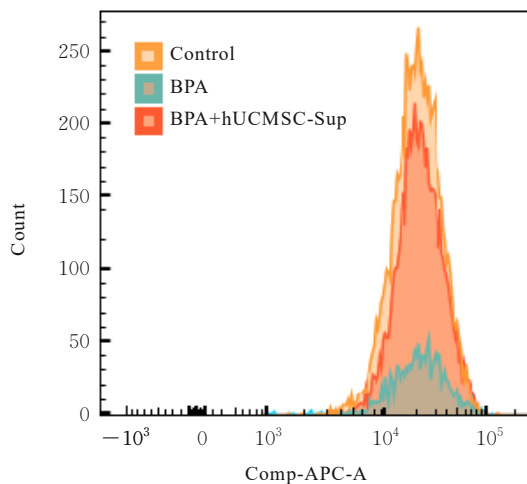


图2 流式细胞术检测各组 CD73+ 细胞百分率

Fig.2 Percentages of CD73+ cells in various groups detected by flow cytometry

**2.5 各组 eMSCs 中 Sox2、Oct4 和 Nanog mRNA 表达水平** 与对照组比较, BPA 组 eMSCs 中 Sox2、Oct4、Nanog mRNA 表达水平均明显降低 ( $P<0.01$ ); 与 BPA 组比较, BPA+hUCMSC-Sup 组和 BPA+CHIR-99021 组 eMSCs 中 Sox2、Oct4 及 Nanog mRNA 表达水平均明显升高 ( $P<0.01$ )。见表 6。

**2.6 各组 eMSCs 中  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平** 与对照组比较, BPA 组 eMSCs 中  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ); 与 BPA 组比较, BPA+hUCMSC-Sup 组和 BPA+CHIR-99021 组 eMSCs 中  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平均明显升高 ( $P<$

表6 各组 eMSCs 中 Sox2、Oct4 和 Nanog mRNA 表达水平

Tab. 6 Expression levels of Sox2, Oct4, and Nanog mRNA in eMSCs in various groups ( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Group	Sox2	Oct4	Nanog
Control	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
BPA	0.05±0.12*	0.21±0.15*	0.26±0.09*
BPA+hUCMSC-Sup	0.55±0.09 <sup>△</sup>	2.18±0.16 <sup>△</sup>	0.60±0.17 <sup>△</sup>
BPA+CHIR-99021	0.76±0.14 <sup>△</sup>	3.53±0.21 <sup>△</sup>	1.36±0.20 <sup>△</sup>

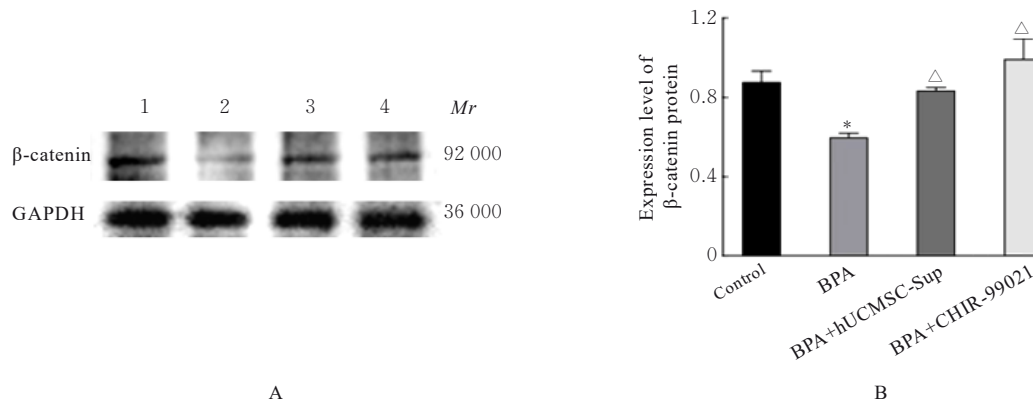
\* $P<0.01$  compared with control group. <sup>△</sup> $P<0.01$  compared with BPA group.

0.01)。见图 3。

### 3 讨论

BPA 能够提高塑料和合成产品的耐用性和柔韧性, 被广泛用于塑料食品、液体容器、金属罐内衬、个人护理产品包装、运动器材及医疗和牙科设备中<sup>[8]</sup>。因此, 人类日常接触 BPA 是不可避免的。研究<sup>[9-10]</sup>显示: BPA 暴露增强子宫内膜基质细胞侵袭能力, 并通过 WD 重复域蛋白 5/甲基胞嘧啶双加氧酶 2 (WD repeat-containing protein 5/tet methylcytosine dioxygenase 2, WDR5/TET2) 介导的表观遗传途径上调子宫内膜中雌激素受体  $\beta$  (estrogen receptor beta, Er $\beta$ ) 表达, 从而促进子宫内膜异位症发生发展。CASERTA 等<sup>[11]</sup>发现: BPA 促进核雌激素相关受体  $\gamma$  易位, 通过表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 依赖性和非 EGF 依赖性途径促进 I 级子宫内膜癌细胞增殖。此外, 长期接触 BPA 严重损害子宫内膜基质细胞向蜕膜细胞的分化, 并会损害孕酮受体及其下游靶基因通路, 对胚胎着床和妊娠产生不利影响<sup>[12]</sup>。本研究结果显示: BPA 对 eMSCs 存活率有抑制作用。

子宫内膜的再生能力与子宫内膜干细胞存在密切关联。研究<sup>[13-14]</sup>证实: 人类和部分动物子宫内膜中存在基质干细胞。干细胞的“干性”包括自我更新能力和多向分化能力即多能性<sup>[15]</sup>。干细胞的特征是在悬浮培养下形成球体, 球体形成实验可检测干细胞自我更新能力。WANG 等<sup>[16]</sup>证实: 与体外单层髓核细胞比较, 髓核细胞球体表现出优秀的自我更新和细胞外基质合成能力。本研究结果显示: BPA 干预后 eMSCs 干细胞球数和直径明显减少, 细胞增殖活性明显降低, 提示 BPA 能够抑制 eMSCs 干细胞活性。



Lane 1: Control group; Lane 2: BPA group; Lane 3: BPA+hUCMSC-Sup group; Lane 4: BPA+CHIR-99021 group. \* $P < 0.01$  compared with control group;  $^{\Delta}P < 0.01$  compared with BPA group.

图3 各组 eMSCs 中  $\beta$ -catenin 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 3 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of  $\beta$ -catenin protein in eMSCs in various groups

Oct4、Sox2 和 Nanog 等干性相关转录因子在维持胚胎干细胞的多能性和自我更新能力方面也发挥着重要作用<sup>[17]</sup>。KESHAVARZ 等<sup>[18]</sup>研究表明: 敲低长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) ES1 会下调乳腺癌细胞中 Oct4 和 Sox2 的表达, 抑制 ES1 可能会限制癌细胞增殖和细胞周期进展, 诱导细胞凋亡和细胞衰老。本研究结果显示: 与对照组比较, BPA 组 eMSCs 中 Sox2、Oct4 和 Nanog mRNA 表达水平明显降低, eMSCs 中 CD73+ 细胞百分率明显降低, 提示 BPA 可抑制 eMSCs 的干性。

多种信号通路参与损伤后组织再生和发育, 其中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在维持各种干细胞类型的自我更新和分化调节中发挥重要作用。研究<sup>[19]</sup>显示: Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在子宫内膜干细胞群的调节中具有重要作用。DAVIDSON 等<sup>[20]</sup>证实: Wnt/ $\beta$ -catenin 信号的激活会促进干细胞表面标志物的表达。LI 等<sup>[21]</sup>发现: 谷氨酰胺酶 1 (glutaminase 1, GLS1) 通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导调节细胞干性, 敲除 GLS1 可减少干性相关基因的表达并抑制体内肝癌干细胞致瘤性。本研究结果显示: BPA 可明显降低 eMSCs 中  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平。提示 BPA 可能是通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路激活, 降低 eMSCs 的干性, 损伤子宫内膜的周期性再生能力。

hUCMSCs 具有自我更新和多向分化的特性, 可以修复受损组织, 被用于治疗多种疾病<sup>[22]</sup>。CHIR-99021 作为 GSK-3 抑制剂, 可以使 GSK-3 $\alpha/\beta$  失活, 从而激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路。

GOVARTHANAN 等<sup>[23]</sup>发现: CHIR-99021 处理后, 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 中  $\beta$ -catenin 的核定位增加且 MSCs 的分化潜力提高。本研究结果显示: hUCMSC-Sup 可显著增强被 BPA 抑制的 eMSCs 干细胞球中细胞增殖活性, 上调 CD73+ 细胞百分率。eMSCs 中干性相关因子 Sox2、Oct4 和 Nanog mRNA 表达水平及  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平明显升高, 与 CHIR-99021 处理结果相似。提示 hUCMSC-Sup 具有改善 eMSCs 干性的能力, 可能与 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路激活有关。

综上所述, BPA 能够抑制 eMSCs 的干性特征, 损伤子宫内膜的自我更新及修复作用, 其机制可能与下调细胞中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活性有关。hUCMSC-Sup 可以促进受损 eMSCs 的增殖, 并对 BPA 诱导的 eMSCs 干性损伤起到改善作用。

#### 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:

王爱乔参与研究设计和论文撰写, 王琳、张文琦和邓玲参与研究数据获取及分析, 刘磊、林秀英和付建华参与论文修改及审校, 米旭光和方艳秋参与研究设计。

#### [参考文献]

- [1] BOZORGMEHR M, GURUNG S, DARZI S, et al. Endometrial and menstrual blood mesenchymal stem/stromal cells: biological properties and clinical application[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 497.
- [2] SKLIUTĖ G, BAUŠYTĖ R, BORUTINSKAITĖ V, et al. Menstrual blood-derived endometrial stem cells'

- impact for the treatment perspective of female infertility[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6774.
- [3] DOMNINA A, NOVIKOVA P, OBIDINA J, et al. Human mesenchymal stem cells in spheroids improve fertility in model animals with damaged endometrium[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 50.
- [4] STREET M E, ANGELINI S, BERNASCONI S, et al. Current knowledge on endocrine disrupting chemicals (EDCs) from animal biology to humans, from pregnancy to adulthood: highlights from a national Italian meeting[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1647.
- [5] KODILA A, FRANKO N, SOLLNER DOLENC M. A review on immunomodulatory effects of BPA analogues[J]. *Arch Toxicol*, 2023, 97(7): 1831-1846.
- [6] HARNETT K G, CHIN A, SCHUH S M. BPA and BPA alternatives BPS, BPAF, and TMBPF, induce cytotoxicity and apoptosis in rat and human stem cells[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 216: 112210.
- [7] WANG J Y, HU R M, XING Q, et al. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate mifepristone-induced human endometrial stromal cell injury [J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020: 6091269.
- [8] RUSSO G, BARBATO F, MITA D G, et al. Occurrence of bisphenol A and its analogues in some foodstuff marketed in Europe[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 131: 110575.
- [9] WEN X, XIONG Y, JIN L, et al. Bisphenol A exposure enhances endometrial stromal cell invasion and has a positive association with peritoneal endometriosis[J]. *Reprod Sci*, 2020, 27(2): 704-712.
- [10] WEN X, XIONG Y, GENG T, et al. BPA modulates the WDR5/TET2 complex to regulate ER $\beta$  expression in eutopic endometrium and drives the development of endometriosis[J]. *Environ Pollut*, 2021, 268(Pt B): 115748.
- [11] CASERTA D, DE MARCO M P, BESHARAT A R, et al. Endocrine disruptors and endometrial cancer: molecular mechanisms of action and clinical implications, a systematic review [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 2956.
- [12] CASERTA D, COSTANZI F, DE MARCO M P, et al. Effects of endocrine-disrupting chemicals on endometrial receptivity and embryo implantation: a systematic review of 34 mouse model studies [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(13): 6840.
- [13] BUKOWSKA J, ZIECIK A J, LAGUNA J, et al. The importance of the canonical Wnt signaling pathway in the porcine endometrial stromal stem/progenitor cells: implications for regeneration [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(24): 2873-2885.
- [14] BAUSYTE R, VAIGAUŠKAITE-MAZEIKIENE B, BORUTINSKAITE V, et al. Human endometrium-derived mesenchymal stem/stromal cells application in endometrial-factor induced infertility [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1227487.
- [15] PHAN T N, FAN C H, YE H C K. Application of ultrasound to enhancing stem cells associated therapies [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19(6): 1709-1725.
- [16] WANG Y Y, WANG H M, ZHUO Y Y, et al. Spheroid formation enhances the regenerative capacity of nucleus pulposus cells via regulating N-CDH and ITG $\beta$ 1 interaction [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(9): 3676-3696.
- [17] SOHN E J, MOON H J, LIM J K, et al. Regulation of the protein stability and transcriptional activity of OCT4 in stem cells [J]. *Adv Biol Regul*, 2021, 79: 100777.
- [18] KESHAVARZ M, ASADI M H. Long non-coding RNA ES1 controls the proliferation of breast cancer cells by regulating the Oct4/Sox2/miR-302 axis [J]. *FEBS J*, 2019, 286(13): 2611-2623.
- [19] NGUYEN H P T, SPRUNG C N, GARGETT C E. Differential expression of Wnt signaling molecules between pre- and postmenopausal endometrial epithelial cells suggests a population of putative epithelial stem/progenitor cells reside in the basalis layer [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(6): 2870-2883.
- [20] DAVIDSON K C, ADAMS A M, GOODSON J M, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(12): 4485-4490.
- [21] LI B H, CAO Y J, MENG G, et al. Targeting glutaminase 1 attenuates stemness properties in hepatocellular carcinoma by increasing reactive oxygen species and suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *EBioMedicine*, 2019, 39: 239-254.
- [22] XIE Q X, LIU R, JIANG J, et al. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 519.
- [23] GOVARTHANAN K, VIDYASEKAR P, GUPTA P K, et al. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibitor- CHIR 99021 augments the differentiation potential of mesenchymal stem cells [J]. *Cytotherapy*, 2020, 22(2): 91-105.