

子宫内膜干细胞的研究进展

庄盼¹ 刘军权^{1,2*}

(¹浙江卫未生物医药科技有限公司, 杭州 310053; ²杭州金域医学检验所有限公司, 杭州 310053)

摘要 人子宫内膜是由胚胎发育过程中中胚层组织融合而成, 是人体新陈代谢和自我更新最活跃的组织之一, 其位于子宫肌层和子宫腔之间, 分为致密层、海绵层和基底层三层。基底层最为靠近子宫肌层, 不受卵巢性激素周期性变化的影响, 在月经期不发生脱落。子宫内膜干细胞是一种具有自我更新、多向分化以及高度增殖潜能的未分化子宫内膜细胞。大量研究证明, 子宫内膜干细胞参与子宫内膜的修复与再生并能改善特定疾病症状; 多种妇科疾病的发生与其生物学行为异常有关, 同时子宫内膜干细胞在其他器官和组织修复中也发挥着重要作用。该文对子宫内膜干细胞的定义、存在依据、来源、分离方法、生物学特性、临床研究和应用等方面的进展进行综述。

关键词 子宫内膜干细胞; 再生; 生物学特性; 临床应用

Progress in the Study of Endometrial Stem Cell

Zhuang Pan¹, Liu Junquan^{1,2*}

(¹Zhejiang Weiwei Biomedical Science and Technology Co., Ltd, Hangzhou 310053, China;

²Hangzhou Golden Domain Medical Laboratory Co., Ltd, Hangzhou 310053, China)

Abstract The human endometrium which formed by the fusion of mesoderm tissues in the process of embryonic development is one of the most active tissues in human metabolism and self-renewal. It is located between the myometrium and uterine cavity and divided into three layers: compact layer, spongy layer and basal layer. The basal layer is closest to the myometrium, which is not affected by the periodic changes of ovarian sex hormones and does not fall off during menstruation. Endometrial stem cells are undifferentiated endometrium cells with self-renewal, multidirectional differentiation and high proliferation potential. Numerous studies have demonstrated that endometrial stem cells are involved in endometrial repair and regeneration and can improve the symptoms of specific diseases; the occurrence of various gynecological diseases is related to its abnormal biological behavior. This article reviews the progress in the definition, basis, origin, separation methods, biological characteristics and clinical application of endometrial stem cells.

Keywords endometrial stem cell; regeneration; biological characteristics; clinical application

干细胞是指一类具有高度增殖、自我更新和多向分化潜能的细胞群体, 贯穿人类生命的整个阶段。干细胞不仅在血液、表皮中等存在, 在以前认为已经不能再生的神经系统中也发现了神经干细胞。近年来有大量研究报道, 女性的子宫内膜存在着具有高度增殖、自我更新以及分化潜能的干细胞。子宫

内膜是一个高度再生的组织, 主要由腺上皮细胞、基质细胞和血管组成。在结构上分为功能层和基底层, 基底层与子宫肌层相连, 在月经期间不会发生脱落。功能层靠近宫腔, 受到卵巢激素的影响从而发生周期性变化。1978年, Prianishnikov^[1]最早提出了子宫内膜干细胞(endometrial stem cell, EMSC)的概

收稿日期: 2018-10-22 接受日期: 2019-02-27

*通讯作者。Tel: 0571-86690968-225, E-mail: xzlj19600115@sina.com

Received: October 22, 2018 Accepted: February 27, 2019

*Corresponding author. Tel: +86-571-86690968-225, E-mail: xzlj19600115@sina.com

网络出版时间: 2019-08-12 14:46:34

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190812.1446.004.html>

念, 认为它位于基底层, 并提出子宫内膜的再生是通过EMSC完成。

1 EMSC的存在依据

子宫内膜异位症病灶虽然是多中心起源, 但每一局部病灶细胞均呈现了明显的克隆性, 而且有增殖潜能, 在一定条件下具有自我更新、形成集落和分化的干细胞特性, 提示子宫内膜异位症病灶可能是干细胞来源。

Chan等^[2]通过比较子宫内膜基质细胞和上皮细胞形成克隆能力的实验, 发现基质细胞比上皮细胞更易形成克隆; 子宫内膜基质细胞还能稳定传代30次以上, 提示EMSC的存在, 且其具有高度的增殖潜能。Smalley等^[3]发现, 子宫内膜上皮细胞在分泌期克隆活性更强, 而基质细胞则在增生期克隆能力更强。Gargett等^[4]通过标记滞留技术(LRCS)从小鼠组织中分离出子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞并分别对其进行定位, 证实子宫内膜确实存在这两种细胞, 两者都具有自我更新能力和集落形成能力, 并共同参与调控子宫内膜腺体与基质周期性变化和再生。

Schwab等^[5]通过实验证实, 女性子宫内膜中存在上皮细胞和基质细胞, 这两种细胞月经周期前后无变化, 在绝经期女性的子宫内膜中亦可检测出, 并且能够自我增殖和更新, 具有集落形成能力, 这提示子宫内膜细胞会在人体内终身存在。Masuda等^[6]将人子宫内膜细胞移植到NOD/SCID小鼠肾包膜下, 观察到部分细胞在小鼠体内能够良好地存活并进一步增殖。检测发现, 植入的细胞含有人类腺体和基质, 其子宫内膜腺体上皮细胞可分泌孕激素, 并在雌激素作用下能增生, 孕激素刺激下进一步分化形成子宫内膜蜕膜层。这证实, 部分子宫内膜细胞在异种移植中能够自我更新, 并且具备一定分化潜力和高度的增殖能力, 这些条件都符合干细胞标准。因此, 提示了子宫内膜中存在干细胞。

在不需要干细胞标记的前提条件下, 标记滞留技术(LRCS)是应用于确定成体干细胞定位的一个可靠途径。其方法是用溴脱氧尿苷(BrdU)在细胞S期取代胸腺嘧啶, 参与DNA合成, 从而标记有增殖潜能的干细胞。标记程度和细胞增殖能力有关, 原代细胞BrdU标记最多, 随着细胞增殖分化逐渐减少, 如此即可通过鉴别是否具有滞留BrdU能力来识

别成体干细胞。Gargett等^[4]研究发现, 6%的子宫内膜基质细胞可被BrdU标记, 并且维持标记可达84天, 40%用LRCS标记的细胞群分布在邻近内膜与肌层的连接处, 这些标记的细胞可能就是子宫内膜基层的干细胞。Amamli等^[7]分析了正常人与子宫内膜异位症患者的子宫内膜组织胚胎干细胞标记物特性基因表达类型, 发现正常子宫内膜均不同程度表达干细胞的13种特性基因(*Bmi1*、*Dppa2*、*Eras*、*Gdf3*、*Klf4*、*Nanog*、*Oct4*、*Sox2*、*Sox15*、*Sall4*、*Tcl1*、*Utl1*和*Zfp42*), 这也提示子宫内膜中可能存在干细胞。

2 EMSC的来源

女性的生殖系统成形于胚胎时期中胚层。普遍认为, 成人子宫内膜能够自我更新是因为在子宫内膜细胞中还残留着胎儿时期的上皮以及间充质干细胞。

EMSC还有可能的来源是骨髓。目前已证实骨髓来源的干细胞可进入血液循环, 人体各个组织器官中都存在着少量的骨髓间充质干细胞, 尽管数量极小但当机体受损时会到达受损部位并在其中增殖从而来修复损伤的组织和器官。Talyor等^[8]应用HLA分型法, 在4例接受骨髓移植手术的女性患者子宫内膜中发现来源于骨髓供体的EMSC, 在此4例子宫内膜活检标本中, 发现了来源于骨髓供体的子宫内膜上皮细胞占到了0.2%~48.0%, 而基质细胞占0.3%~52.0%。同时, 在未接受骨髓移植的正常对照患者中, 未发现子宫内膜HLA分型有差异。这表明, 4例患者的EMSC可能起源于供体的骨髓细胞。提示骨髓间充质干细胞能分化成子宫内膜基质细胞^[10]。但是也有研究表明, 这些骨髓来源的细胞在性激素的刺激下并没有克隆能力, 无法自我更新和分化, 说明这类细胞只来源于骨髓, 而非骨髓干细胞^[9]。Cervelló等^[10]将人骨髓干细胞用CD133⁺标记后注入小鼠子宫中, 追踪检测到这些细胞的一部分黏附在子宫内膜血管周围, 并未分化为EMSC, 而是引起周围细胞通过例如血小板反应蛋白-1和胰岛素样生长因子1等旁分泌分子扩散, 来促进子宫内膜的修复。综上所述, 子宫内膜中存在少量骨髓来源的干细胞, 但是这类干细胞对子宫内膜的修复及再生影响有限, 子宫内膜中固有的干细胞才是组织修复重要细胞来源^[11]。

3 EMSC的分离方法

3.1 组织消化法

目前最为常用的分离EMSC的方法为组织消化法。在宫腔镜内刮取一定量的子宫内膜组织,反复冲洗后剪成1 mm³的小块组织,将组织置于含胶原酶的F12/DMEM消化液消化1 h,终止消化后离心去上清液,将未消化的组织重复上述操作。组织全部消化后离心去上清,细胞重悬,常规贴壁培养后即可得到子宫内膜上皮及基质细胞。

3.2 筛网过滤法

李春霞等^[12]通过不同直径的滤网分离子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞。先将子宫内膜组织经过0.1% I型胶原酶, 37 °C恒温水浴消化2 h,期间多次震荡使其充分消化,当单个腺体开始脱落时即终止消化。之后,得到的细胞悬液用100目细胞筛分离未消化的大块组织及黏液,此时的滤液包括单个间质细胞和腺体的团块,这两种细胞可用300目细胞筛分离,基质细胞能通过筛网而腺上皮细胞不能通过细胞筛,收集筛网上的腺上皮细胞和上述过网的基质细胞分别种瓶培养,将培养成功的细胞以CK19和Vimentin染色进行腺上皮细胞和基质细胞鉴定。实验结果表明,腺上皮细胞特异表达角蛋白、CK19染色阳性, Vimentin染色阴性;而基质细胞特异表达波形蛋白、CK19染色阴性, Vimentin染色阳性,证明将这两种细胞成功分离。

3.3 磁珠分选法

磁性活化细胞分选系统(magnetic activated cell sorting, MACS)分离EMSC^[13]:将子宫内膜组织清洗后剪成1 mm³大小的组织块,用胶原酶消化1 h后收集滤液,通过ficoll离心去除红细胞。1 mL DMEM/F12/1% NCS(N-氯代丁二酰亚胺)重悬,用抗-PTPRC(CD45)的磁珠分离弃去粒细胞,调整细胞浓度为1×10⁸细胞/mL,然后取细胞悬液80 μL,加入标记有羊抗鼠EpCAM抗体的免疫磁珠20 μL, 4 °C冰箱孵育15 min后离心弃上清,将剩余细胞用500 μL PBS重悬,用分选仪获得EpCAM⁻的基质细胞和EpCAM⁺的上皮细胞,加入培养液分别培养。检测结果显示,培养的基质细胞Vimentin表达呈阳性, CD90阳性率为77.48%, CD146阳性率为63.53%,并具有克隆形成能力。

Kato等^[14]用Hoesht33342染色通过流式细胞分选法从子宫内膜组织中分离出一组细胞亚群为侧群(side population, SP)的细胞,这群细胞无论在体外还

是在有免疫缺陷的小鼠体内都有稳定增殖并分化出成熟的上皮细胞、基质细胞和内皮细胞的潜能。也有研究发现,从新鲜组织中分离出SP细胞培养的上皮细胞、基质细胞和内皮细胞具有成体细胞相对静止的特性,大多数处于静息的G₀期,克隆能力较低,而经过培养后的细胞克隆能力有明显增强,处于G₁、G₁/M/S期。

3.4 荧光活化细胞分选法

荧光活化细胞分选系统(fluorescence activated cell sorting, FACS)与MACS合称细胞表面特异性标记法, FACS与MACS相比,更加简便、成本更低,因此被普遍使用,但是FACS对细胞活性的影响相对较大,而且会把相互粘连的细胞团也一起分选出来,影响分选的纯度^[15]。

3.5 经血提取法

经血被证实是EMSC的另一种来源。从2007年开始,陆续有成功分离培养出经血源性EMSC报道。谭季春等^[16]收集6位健康女性志愿者的月经血,与PBS等体积混合后缓慢加入到淋巴细胞分离液上层, 2 000 r/min离心10 min,吸取中间白膜层,离心洗涤两次后加入培养基进行培养,动态观察细胞的增殖情况和形态特征。采用CCK-8法检测细胞的增殖能力,流式细胞术检测细胞表面抗原,并对细胞进行成脂和成骨诱导分化验证。结果表明:细胞能在体外稳定增殖传代30~50次,表达CD44、CD73、CD90、CD105和Oct-4,不表达CD38、CD34、CD45;成脂诱导22天后油红O染色阳性,成骨诱导2周后茜素红染色阳性。这表明,经血源性细胞有稳定增殖、自我更新和分化的能力,并表达各类干细胞表面抗原。来源于经血的干细胞和来源于子宫内膜组织的干细胞可能存在一定程度上的差异,共同点是这两类细胞同时具有间充质干细胞和胚胎干细胞的表面标记。这说明,EMSC是介于胚胎干细胞和成体干细胞之间的一种细胞类型^[17]。

4 EMSC的培养特性

EMSC具有一般的干细胞生长特性。体外培养原代EMSC能够在2~24 h内贴附在培养皿或者培养瓶的底面,并逐渐形成多个单层放射状的成纤维样细胞集落。细胞状态良好的EMSC在倒置显微镜呈梭形或者纺锤形,初始呈放射性生长,在密度达到一定程度时,呈现漩涡状生长。细胞核较大且不规则,

核仁明显。

以较低密度接种的EMSC在体外培养过程中,单个细胞能够不断地分裂增殖形成集落。单个子宫内膜腺体或若干腺体可能均来源于同一克隆。子宫内膜基底层的极少数细胞就能够形成4 000多个细胞的单克隆,这些细胞群体倍增的次数超过30次。这证明EMSC有强大的增殖潜能。EMSC也和其他干细胞一样,具有多向分化能力,能在体外诱导成脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞、平滑肌细胞,并表达上述细胞的组织特异性标志物。

在众多体外培养EMSC的实验研究中,我们发现其倍增时间为26~29 h,而原代骨髓干细胞的倍增时间则需要超过60 h。另外,接近60%的高克隆形成效率也说明EMSC的高度增殖潜能^[18]。另有报道称^[19],EMSC原代细胞的倍增时间在18~36 h之间,出现这么大的差异主要因为分离及培养条件不同所导致。

Patel等^[18]将经血源性EMSC体外培养扩增至12代时,检测出其还能维持相当于胚胎干细胞50%的端粒酶活性,而包括骨髓间充质干细胞在内的其他多种干细胞则不具备这种特性。虽然,端粒酶活性跟细胞永生和恶化密切相关,但这也能够证明经血源性EMSC拥有高度增殖的潜能。Dominina等^[20]研究证实,EMSC在体外培养时染色体核型并不会因为多次传代而改变,且染色体异常及致瘤性在动物实体研究中只表现出极小的发生概率。EMSC的增殖活性会随着细胞的传代而逐渐减小,随着传代次数增多,细胞逐渐呈现扁平、体积增大,不易形成单层细胞。但是细胞的表面标记物并不会发生变化,即使在经历50次的传代之后也是如此^[20]。

5 EMSC的标记物

目前还没有文献报道发现小鼠或者人类子宫内膜上皮细胞的特异性标记物,而子宫内膜的间充质干细胞特异性标记物已有报道。EMSC可参考国际细胞治疗协会^[21](ISCT)制定的间充质干细胞的表型特征及基本功能特征:(1)在体外培养扩增时具备贴壁生长能力;(2)具备横向分化成脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞的能力;(3)细胞表型:高表达CD73、CD90和CD105,阳性率大于95%,不表达CD34(造血祖细胞表型)、CD45(白细胞表型)、CD14/CD11b(单核细胞和巨噬细胞表型)、CD79a/

CD19(B细胞表型)和HLA-DR,这些表型阳性率应小于2%。Schwab等^[5]发现,使用CD146和PDGF-R β 作标记物可以从子宫内膜中分离出具有间充质干细胞特性的细胞,用该方法分选得到的CD146⁺PDGF-R β ⁺细胞具有分化潜能,分布在基底层和功能层的血管周围,其分布特点提示,EMSC可能会脱落到经血中并附着到宫腔外从而形成子宫内膜异位症。

Siddall等^[22]报道,Musashi-1是一种成体干细胞标记物,它是一种存在于神经干细胞中的RNA结合蛋白,主要由胃黏膜、乳腺、肠、表皮以及毛囊中的上皮祖细胞表达,其与神经细胞、上皮祖细胞维持和不对称分裂有关,并可直接调节靶蛋白Numb和P21(CIP-1)的表达。Musashi-1功能降低会影响干细胞的分化和平衡,导致干细胞未成熟分化。Gotte等^[23]首次发现了子宫内膜也表达Musashi-1,并且在增生期Musashi-1⁺细胞数量明显增加,说明Musashi-1⁺细胞具有祖细胞样功能的增殖特性,也提示子宫内膜内Musashi-1⁺细胞可能与子宫内膜的增殖有着密切联系。Musashi-1也是引起子宫内膜黏连、侵袭及转移的重要分子,有研究提出Musashi-1通过调节细胞的自分泌,将Wnt/ β -catenin信号转导通路的下游靶基因激活,从而使细胞增殖、分化并成熟,进而出现子宫内膜异位^[24]。

CD133⁺虽然在子宫内膜癌中提取的EMSC中处于高表达状态,但是在正常的EMSC中并不表达,所以不可作为鉴定EMSC的表面标记物。关于CD117、SSEA-4、NANOG等干细胞标记表达研究目前也无统一结果,很多报道称EMSC不表达或者低表达CD117,但Patel等^[18]从分子和细胞水平证实,EMSC高表达CD117。Rossignoli等^[25]发现,在EMSC的流式细胞图中有一小群细胞亚群SSEA-4⁺标记高达19.4%;Zemel'ko等^[26]通过免疫荧光分析也发现了EMSC的SSEA-4呈高水平表达,这和骨髓间充质干细胞具有相似性。但是Meng等^[27]却发现,EMSC不表达SSEA-4。大多数报道称,EMSC不表达多能干标记NANOG,不过Borlongan等^[28]通过对体外培养的EMSC进行免疫化学分析,发现其也表达干细胞标记OCT4、SSEA-4、NANOG,呈阳性表达的细胞超过了90%,并且这些标记能够维持到9代以后,我们实验结果也表明,EMSC表达OCT4、SSEA-4、NANOG标记。产生上述差异可能原因是:经血中分离到的EMSC是一异质群体,从中能检测到多种侧

群细胞^[29], 因此不难解释不同学者分离到的EMSC具有不同的表型特征甚至是分化潜能。此外, 不同的样本处理方式以及培养方式和条件也会导致原始细胞群体结构的改变。

2012年, Masuda等^[30]发现了EMSC的一个新标记物W5C5: 采用CFU(集落形成法)分析方法, 将免疫磁珠分选法与流式细胞法分选进行了比较, 发现W5C5作标记物在分选EMSC时特别有效。W5C5⁺细胞主要位于子宫内膜的基底和功能层的血管周围, 它的克隆能力比W5C5⁻和未分选的细胞要大得多, 并且W5C5⁺细胞能够分化为脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、肌细胞和内皮细胞。用W5C5分离的细胞与用CD146和PDGF-R β 分离出的细胞有共同的生物学特性, 将W5C5⁺细胞接种到免疫缺陷的小鼠肾包膜下, 可生长出子宫内膜间质组织。但该标记物的特异性还是需要更多的研究和验证。

6 EMSC的生物学特性

EMSC相较于其他干细胞具有较高的成瘤性, 表现在体内的成瘤能力和体外的克隆形成能力。EMSC与干细胞一样具有自我更新不对称的生物学特性^[31], 自我更新是指干细胞通过对称或者不对称分裂产生至少一个保留干细胞特性子细胞过程。EMSC在分化成两个子细胞过程中, 其中一个与亲代细胞保持同一个分化等级, 而另外一个则发生定向分化。自我更新能够维持干细胞具有多分化的潜能, 对于组织特异性干细胞而言, 自我更新是维持其终生具有分化潜能的基础。

研究表明, EMSC可分化成脂肪源性干细胞、心肌源性干细胞、成骨细胞、软骨细胞等谱系, 与骨髓间充质干细胞的分化效率相当^[31-32]。EMSC也符合间充质干细胞的分化标准, 但并不局限于向中胚层谱系细胞分化。在一定条件诱导下, 甚至能

够跨胚层分化成神经细胞、心肌细胞、胰岛细胞等。Neda等^[33]通过对在纤维蛋白凝胶中对EMSC进行三维培养, 使其分化成Schwann细胞, 再利用FGF2/FSK/HRG/RA等诱导介质来研究分化的Schwann细胞标记的表达; 并利用细胞免疫组化技术, 发现了分化的细胞表达S100和P75标记。这些结果表明, 人类EMSC在二维和三维培养中, 首次可以分化为Schwann细胞。但也有学者提出了不同的观点。Musina等^[34]报道, EMSC与骨髓、脂肪干细胞相比成脂分化潜能较低, 且分化率较低, 在第5周时只有不到30%。EMSC的生物学特性见表1。

7 EMSC的研究及应用

目前国内外研究未分化干细胞大多来源于人体组织和器官, 由于从组织或器官中采集干细胞样本有技术难度, 从而影响研究深入开展。而EMSC取材方便, 并且与BMSC有着相同的体外培养特征, 在体外能够高度增殖, 具有稳定的核型, 可传代至50代以上, 一个供体的细胞扩增后能够提供1万个以上病人使用, 具备药用干细胞开发基本条件。

7.1 脑卒中的修复

EMSC对神经元能起到保护作用, 在进行经血EMSC移植脑卒中小鼠模型的试验中, 不同部位注射均不会影响小鼠的自体神经修复功能, 不会导致其神经功能的缺失, 并发现移植EMSC的小鼠脑部梗死面积显著减少; 此外还发现, 小鼠接受EMSC注射后, EMSC不仅出现在注射点, 还会迁移到其他部位, 且仍然表达原始标记, 未进行分化。这证明, EMSC在脑组织中修复机制并不是细胞分化, 可能与EMSC高表达BDNF等脑源性营养因子有关^[25]。

7.2 帕金森病的治疗

Wolff等^[35]在对帕金森动物模型的试验研究发现, 将EMSC分化的多巴胺神经元移植到帕金森小

表1 EMSC的生物学特性
Table 1 Biological characteristics of EMSC

项目 Item	生物学特性 Biological characteristic
Cell morphology	Adherent growth, cells spindle or spindle-shaped
Multiplication capacity	More than 50 generations <i>in vitro</i>
Oncogenicity	High tumorigenicity
Self-renewal	Self-renewal asymmetry
Differentiative capacity	Trilineage differentiation and transdifferentiation of germ layer

鼠的脑部可以明显改善动物行为的异常。研究人员将EMSC移植到有免疫缺陷的小鼠身上,并在移植后的5周内,用多种示踪方法在小鼠体内发现了移植的细胞。首先用PCR法,在移植小鼠的大脑中检测到人类基因组DNA,其次使用了一种人类线粒体抗体技术找到了在大脑皮层注射点周围的EMSC,而且还发现迁移到黑质(*substantia nigra*)的EMSC。另外,研究人员在移植EMSC之前采用了两种不同类型的荧光标记:PKH26用于表面标记,而绿色荧光蛋白(GFP)转染被用于细胞质标记,移植后他们在大脑皮层注射点周围以及黑质区都发现了PKH26红色标记的EMSC,这些结果都表明,EMSC能够长期且稳定存在于移植部位或者迁移到邻近受损部位发挥相应的功能。

7.3 器官修复

Chen等^[36]利用透射电镜、免疫印迹分析、免疫细胞荧光以及RT-PCR等技术验证了EMSC分化成平滑肌细胞(SMC)的可能,并认为其可用于治疗女性盆腔器官脱垂(POP)等疾病。Alireza等^[37]通过将EMSC在胶原水凝胶中进行三维培养,并添加多种生长因子使EMSC分化成人SMC,利用RT-PCR及免疫痕迹等技术成功证实了SMC在水凝胶中生长状态良好,并检测到平滑肌肌动蛋白、肌间线蛋白、黏着斑蛋白和钙蛋白在内的特异性SMC标记物,证明了EMSC可分化为人SMC。

Peng等^[38]将EMSC注入到肾缺血再灌注损伤的实验小鼠中,对比其与未注入EMSC小鼠的变化,结果表明注入EMSC的小鼠显示出更好的肾脏功能及更少的病理变化,并且在脾、肾中CD4⁺CD8⁺T细胞的数量大大减少,而脾内CD4⁺CD25⁺调节性T细胞和浸润M2巨噬细胞的百分比显著增加,提示EMSC治疗缺血性急性肾损伤也许有效。他们也尝试用EMSC修复小鼠因四氯化碳诱发的急性肝损伤,在移植EMSC 30 min后,相较于未移植EMSC的小鼠,经过EMSC治疗的小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的活性降低,肝组织病理异常改善,而增殖细胞核抗原(PCNA)也有所增加,同时细胞追踪研究表明,pkh26标记的EMSC可在肺、脾脏和受伤的肝脏中存在,证实了EMSC通过促进肝细胞增殖、抗炎和免疫调节作用,保护肝脏免受急性损伤^[39]。

Bockeria等^[40]在通过心肌梗塞动物模型进行

EMSC注射后发现,EMSC能够分化成为心肌细胞,并且在接受注射后心肌功能恢复迅速。Jiang等^[41]首先对冠状动脉粥样硬化的实验小鼠肌钙蛋白(TnT)和胶原蛋白行双重免疫荧光染色,以测量梗死区的存活心肌,经过28天观察发现,移植EMSC实验组的存活心肌区域增加,证明EMSC移植对于内源性心肌再生起到促进作用。而后,用特定抗体对修复的心肌组织进行免疫染色,结果表明,只有极少细胞被染色,它们比宿主心肌细胞要小,并且与宿主的纹状肌分开,说明EMSC分化对于心肌的修复和保护没有显著作用。于是研究人员在常氧和缺氧两种环境下分别培养EMSC,并用酶联免疫吸附法(ELISA)测定细胞因子,结果显示,EMSC的细胞因子信使RNA表达谱和骨髓间充质干细胞有着显著差异,与骨髓间充质干细胞相比,EMSC分泌的EGF、周期蛋白、Ang1、PDGF、TGFβ2和一氧化氮(NO)的水平明显提高,并且在缺氧环境下还会分泌VEGF,这些独特的细胞因子和生长因子对于心肌的修复起着非常重要作用。

7.4 血管生成

EMSC参与高度血管化的子宫内膜组织周期性更新和恢复,猜测该细胞可能具有较高的血管生成能力。Angle^[42]将EMSC移植到有临界性下肢缺血的实验小鼠中,发现其能够有效防止因大腿骨动脉结扎而引起的坏死,说明其有血管再生的应用潜能。

Pence等^[43]研究了子宫内膜上皮细胞和人类脐血血管内皮细胞在三维胶原蛋白支架内的反应,发现添加外源性雌二醇(E2),促使子宫内膜上皮细胞产生内源性VEGF,可使脐带血管内皮细胞群促血管生成能力上调。这证实子宫内膜三维模型在再生医学应用中促进血管生成的可能性。

7.5 肿瘤的发生和抑制

Han等^[44]证实,不论是通过静脉注射或是鞘内注射EMSC,均不同程度减缓了颅内胶质瘤的生长。这与EMSC移植对肿瘤血管生成的抑制和CD133⁺肿瘤细胞数量的减少有关。因此,他认为可以将EMSC作为一种肿瘤抑制细胞应用于临床。

分泌型肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(sTRAIL)可通过激活癌细胞的凋亡途径从而诱导其凋亡,Wang等^[45]将sTRAIL与EMSC相结合来靶向治疗恶性胶质瘤。该研究表明,当用作治疗药物的基因递送载体时,EMSC显示出了对恶性胶质瘤的靶向性。将

EMSC用表达sTRAIL的有效腺病毒血清型35载体感染,制成EMSC-sTRAIL细胞,作为肿瘤位点特异性靶向给药的一种优良的局部给药系统,在人神经胶质瘤(U-87 MG)细胞的动物异种移植瘤模型中获得了显著的治疗效果,通过显著增加凋亡诱导体外抗肿瘤作用,降低了体内肿瘤负担,并且肿瘤细胞的增殖明显减少。

7.6 自身免疫性疾病治疗

Zhong等^[46]首次报道EMSC治疗4位多发性硬化症病人,所有患者同时接受了静脉注射以及鞘内注射EMSC 3~5次,总细胞量为 $1.6 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^7$,注射结束后通过超声影像学等检查未发现任何不良反应,在治疗结束的半年或一年后接受了胸透、全血细胞计数、血清生化等一系列医疗评估检测,未出现异常情况。后续对4位患者分别进行电话回访,均表示身体感觉无任何异常,且病情明显缓解。

8 EMSC相关疾病

EMSC是表达特定表型以及功能的干细胞,在维持组织动态平衡、参与生理性细胞更新和组织损伤后自修复等方面发挥这重要作用。但是,当EMSC的生长环境或者其生物学特性发生异常,就很有可能导致子宫内膜增生异常,产生一系列妇科疾病,如子宫内膜异位症、子宫内膜增生、子宫内膜癌等。

8.1 子宫内膜异位症

子宫内膜异位症的发病机制有多种解释,普遍认为经血逆流所致,但不能解释发生在腹腔外的病灶。EMSC可能与子宫内膜异位症的发生和发展有关。Pittatore等^[47]证明,异位的子宫内膜细胞经过体外培养后也具有和间充质干细胞类似的集落形成能力和多分化潜能,并在小鼠模型中具有侵袭性,这说明异位的子宫内膜中存在干细胞类细胞。另外也有研究证明,从异位的子宫内膜中获取的EMSC和正常人的EMSC相比,在形态和生物学特性上有着显著的区别^[48]。研究发现,在整个月经周期中,子宫内膜异位症患者的子宫内膜所表达的Musashi-1要明显高于正常人,这说明,Musashi-1与子宫内膜异位症的发生密切相关^[19]。

8.2 子宫内膜增生及子宫内膜癌

正常的成体干细胞在自我更新过程中的某些信号通路蛋白的改变(如Wnt/-catenin)和某些基因的突变(如PTEN基因)会导致一些肿瘤干细胞、耐药基

因、变异基因的产生,并且产生的肿瘤干细胞在经过多次克隆更新后累积多种遗传或非遗传变化,使其具有选择性生长优势,从而无限制克隆扩张。因此,肿瘤干细胞是肿瘤的发生、发展以及保持克隆起源和异质性的的重要因素。

子宫内膜癌是发生于子宫内膜中的上皮性恶性肿瘤,最常见的是源于子宫内膜腺体的腺癌。Hubbard等^[49]证实,子宫内膜癌中的部分细胞具有克隆形成能力,并且这些细胞在免疫缺陷的小鼠体内观察到具有一定的肿瘤形成能力,而这些通过克隆形成的子代肿瘤细胞具有和前代肿瘤相同的细胞结构及标记物,包括孕酮受体(PR)、雌激素受体 α (ER- α)、Vimentin和角蛋白等。磷酸酶基因对AKT介导的信号下游通道进行负调控,肿瘤抑制基因P53的突变等一系列的因素都有可能是子宫内膜癌发生的原因^[50]。Mohsen等^[51]通过实时定量PCR和免疫印迹技术对手术切除的人体子宫内膜组织标本研究发现,子宫内膜癌患者的FOXO1蛋白水平显著降低,虽然P-FOXO1蛋白表达水平跟正常人差异并不明显,但P-FOXO1/FOXO1的比例明显升高,表明子宫内膜细胞的FOXO1的活性在子宫内膜癌发生与发展中起了非常重要的作用。Nakamura等^[52]研究表明,从子宫内膜样腺癌中分选的CD133⁺细胞对于顺铂和紫杉醇的细胞毒作用具有耐受效应。相比于CD133⁺细胞,实验中分选出来的CD133⁺细胞在体外培养表现出了更强的增殖潜能,并且在实验小鼠体内检测出更强的致瘤性,其主要表现在接种了CD133⁺细胞的小鼠体内肿瘤体积较大且形成瘤体所需的时间更短。CD133⁺细胞致瘤能力虽相比较小,但也具有肿瘤形成能力。因此,目前无法确定CD133⁺EMSC是否代表肿瘤发生的关键标记指标仍需更多相关实验证实。

8.3 不孕症

正常妇女在进入妊娠期后,EMSC会增生并分化成一种特殊组织,促进各种分子信号转导、细胞因子、垂体激素和转录因子的分泌,这个过程称之为蜕膜化。它对于胚泡的顺利植入、胎盘的形以及正常妊娠的维持发挥准确调控作用。而子宫内膜炎会导致子宫内膜充血、水肿,不利于精子上行及孕卵的植入和发育,并且还会释放出大量炎性渗出物以及细菌毒素,增加白细胞吞噬等炎症反应,造成精子死亡或活动力降低,从而影响生育。而子宫内

膜异位症也是导致不孕症的重要原因, 已经占到了女性不孕的50%左右, 其原因为子宫内膜异位会导致盆腔粘连、输卵管梗阻等。因此子宫内膜蜕膜化及容受性是胚胎着床的重要因素。

9 结语

随着对EMSC研究深入, EMSC的来源、功能、标记物也有了更多的报道, 其在人类生殖生物学和医学上的潜在优势是显而易见。EMSC在体外或体内实验中都显示出了其参与子宫内膜的再生以及修复, 为子宫内膜异位症、子宫内膜增生症、子宫内膜癌和不孕症等子宫内膜相关疾病的发病机制研究提供了新的证据, 也为这些疾病的临床治疗提供了一种新的选择。EMSC可能成为子宫内膜疾病临床治疗新手段。

EMSC的研究还是一个全新的领域, 需要更多的实验研究来证明EMSC的特性及功能, 进而为其临床细胞药物的应用打下基础。

参考文献 (References)

- 1 Prianishnikov VA. On the concept of stem cell and a model of functional morphological structure of the endometrium. *Contraception* 1978; 18(3): 213-23.
- 2 Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 2004; 70(6): 1738-50.
- 3 Smalley MJ, Clarke RB. The mammary gland "side population": a putative stem/progenitor cell marker? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10(1): 37-47.
- 4 Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod* 2010; 16(11): 818-34.
- 5 Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod* 2007; 22(11): 2903-11.
- 6 Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T, *et al.* Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c(null) immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(6): 1925-30.
- 7 Forte A, Schettino MT, Finicelli M, Cipollaro M, Colacurci N, Cobellis L, *et al.* Expression pattern of stemness-related genes in human endometrial and endometriotic tissues. *Mol Med* 2009; 15(11/12): 392-401.
- 8 Taylor HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant. *JAMA* 2004; 292(1): 81-5.
- 9 Cervelló I, Gil-Sanchis C, Mas A, Faus A, Sanz J, Moscardó F, *et al.* Bone marrow-derived cells from male donors do not contribute to the endometrial side population of the recipient. *PLoS One* 2012; 7(1): e30260.
- 10 Cervelló I, Gil-Sanchis C, Santamaría X, Cabanillas S, Díaz A, Faus A, *et al.* Human CD133⁺ bone marrow-derived stem cells promote endometrial proliferation in a murine model of Asherman syndrome. *Fertil Steril* 2015; 104(6): 1552-60.
- 11 Cervelló I, Mas A, Gil-Sanchis C, Simón C. Somatic stem cells in the human endometrium. *Semin Reprod Med* 2013; 31(1): 69-76.
- 12 李春霞, 王蕊, 柴奇, 魏静, 罗小燕, 姚路. 人子宫内膜纯化方法的研究. *中国全科医学*(Li Chunxia, Wang Rui, Chai Qi, Wei Jing, Luo Xiaoyan, Yao Lu. Study on purification method of human endometrium. *Chinese General Practice*) 2010; 13(9): 964-6.
- 13 杨新园, 陈葳, 李旭. 子宫内膜基质干细胞培养方法的比较研究. *山西医科大学学报*(Yang Xinyuan, Chen Wei, Li Xu. Comparative study on culture methods of endometrial stromal stem cells. *Journal Of Shanxi Medical University*) 2011; 42(8): 624-8.
- 14 Kato K, Yoshimoto M, Kato K, Adachi S, Yamayoshi A, Arima T, *et al.* Characterization of side population cells in human normal endometrium. *Hum Reprod* 2007; 22(5): 1214-23.
- 15 龙行涛, 王东, 田桂兰, 胡建国. Importin 13在子宫内膜异位症和子宫内膜癌中的表达及意义. *中国癌症杂志*(Long Xingtiao, Wang Dong, Tian Guilan, Hu Jianguo. The expression and significance of Importin 13 in endometriosis and endometrial cancer. *China Oncology*) 2012; 22(1): 10-4.
- 16 谭季春, 李雅璇, 王秋实, 李小妮. 利用月经血建立的经血源性基质干细胞系. *中国组织工程研究*(Tan Jichun, Li Yaxuan, Wang Qiushi, Li Xiaoni. Menstrual blood-derived stromal stem cell lines were established from menstrual blood. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*) 2015; 19(50): 8155-60.
- 17 Allickson J, Xiang C. Human adult stem cells from menstrual blood and endometrial tissue. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012; 13(5): 419-20.
- 18 Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Sliva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant* 2008; 17(3): 303-11.
- 19 Patel AN, Silva F. Menstrual blood stromal cells: the potential for regenerative medicine. *Regen Med* 2008; 3(4): 443-4.
- 20 Dominina AP, Fridliandskaia II, Zemel'ko VI, Pugovkina NA, Kovaleva ZV, Zenin VV, *et al.* Mesenchymal stem cells of human endometrium do not undergo spontaneous transformation during long-term cultivation. *Tsitologiya* 2013; 55(1): 69-74.
- 21 Galipeau J, Krampera M, Barrett J, Dazzi F, Deans RJ, Debruijn J, *et al.* International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy* 2016; 18(2): 151-9.
- 22 Siddall NA, McLaughlin EA, Marriner NL, Hime GR. The RNA-binding protein Musashi is required intrinsically to maintain stem cell identity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(22): 8402-7.
- 23 Götte M, Wolf M, Staebler A, Buchweitz O, Kelsch R. Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-1 in endometriosis and endometrial carcinoma. *J Pathol* 2008; 215(3): 317-29.
- 24 Chen YZ, Wang JH, Yan J, Liang Y, Zhang XF, Zhou F. Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-1 in the ectopic endometrium of adenomyosis does not correlate with serum estradiol and progesterone levels. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 173: 88-93.

- 25 Rossignoli F, Caselli A, Grisendi G, Piccinno S, Burns JS, Murgia A, *et al.* Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *Biomed Res Int* 2013; 901821: 14.
- 26 Zemel'ko VI, Kozhukharova IB, Alekseenko LL, Domnina AP, Reshetnikova GF, Puzanov MV, *et al.* Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue and endometrium: a comparative study. *Tsitologiya* 2013; 55(2): 101-10.
- 27 Meng XL, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin ZL, Jackson J, *et al.* Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med* 2007; 5: 57.
- 28 Borlongan CV, Kaneko Y, Maki M, Yu SJ, Ali M, Allickson JG, *et al.* Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev* 2010; 19(4): 439-52.
- 29 Kato K, Yoshimoto M, Adachi S, Yamayoshi A, Arima T, Asanoma K, *et al.* haracterization of side-population cells in human normal endometrium. *Hum Reprod* 2007; 22(5): 1214-23.
- 30 Masuda H, Anwar SS, Buhning HJ, Rao JR, Gargett CE. A novel market of human endometrial mesenchymal stem-like cells. *Cell* 2012; 21(10): 2201-14.
- 31 Wolff Erin F, Wolff Andrew B, Hongling Du, Taylor Hugh S. Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. *Reprod Sci* 2007; 14(6): 524-33.
- 32 Gargett CE. Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod Update*. 2006; 13(1): 87-101.
- 33 Neda B, Somayeh EB, Mohammad MMA, Jafar A. Human endometrial stem cells may differentiate into Schwann cells in fibrin gel as 3D culture. *Neur Med* 2015; 06(04): 160-4.
- 34 Musina RA, Belyavski AV, Tarusova OV, Solovyova EV, Sukhikh GT. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. *Bull Exp Biol Med* 2008; 145(4): 539-43.
- 35 Wolff EF, Gao XB, Yao KV, Andrews ZB, Du HL, Elsworth JD, *et al.* Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. *J Cell Mol Med* 2011; 15(4): 747-55.
- 36 Chen X, Kong X, Liu D, Gao P, Zhang Y, Li P, *et al.* In vitro differentiation of endometrial regenerative cells into smooth muscle cells: A potential approach for the management of pelvic organ prolapse. *Int J Mol Med* 2016; 38(1): 95-104.
- 37 Alireza SH, Shiva S, Alexander MS, Rezaie S, Verdi J, Abdolreza S, *et al.* Endometrial stem cell differentiation into smooth muscle cell: a novel approach for bladder tissue engineering in women. *BJU Inter* 2013; 112(6): 854-63.
- 38 Sun P, Liu J, Li W, Xu X, Gu X, Li H, *et al.* Human endometrial regenerative cells attenuate renal ischemia reperfusion injury in mice. *J Transl Med* 2016; 14: 28-40.
- 39 Lu S, Shi G, Xu X, Wang G, Lan X, Sun P, *et al.* Human endometrial regenerative cells alleviate carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *J Transl Med* 2016; 14 (1): 300.
- 40 Bockeria L, Bogin V, Bockeria O, Le T, Alekyan B, Woods EJ, *et al.* Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cell enters the clinic. *J Transl Med* 2013; 11: 56.
- 41 Jiang Z, Hu X, Yu H, Xu Y, Wang L, Chen H, *et al.* Human endometrial stem cells confer enhanced myocardial salvage and regeneration by paracrine mechanisms. *J Cell Mol Med* 2013; 17(10): 1247-60.
- 42 Angle N. Regenerative medicine with endometrial regenerative cells for critical ischemia: limb salvage from the cradle of life?. *Future Cardiol* 2008; 4(6): 547-50.
- 43 Pence JC, Clancy KB, Harley BA. The induction of pro-angiogenic processes within a collagen scaffold via exogenous estradiol and endometrial epithelial cells. *Bio Bioen* 2015; 112(10): 2185-94.
- 44 Han X, Meng X, Yin Z, Rogers A, Zhong J, Rillema P, *et al.* Inhibition of intracranial glioma growth by endometrial regenerative cells. *Cell Cycle* 2009; 8(4): 606-10.
- 45 Wang XJ, Xiang BY, Ding YH, Chen L, Zou H, Mou XZ, *et al.* Human menstrual blood-derived mesenchymal stem cells as a cellular vehicle for malignant glioma gene therapy. *Oncotarget* 2017; 8(35): 58309-21.
- 46 Zhong Z, Patel AN, Ichim TE, Riordan NH, Wang H, Min WP, *et al.* Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *J Transl Med* 2009; 7: 15.
- 47 Pittatore G, Moggio A, Benedetto C, Bussolati B, Revelli A. Endometria adult/progenitor stem cells:pathogenetic theory and new antiangiogenic approach for endometriosis therapy. *Reprod Sci* 2013; 21(3): 296-304.
- 48 Nikoo S, Ebtekar M, Jeddi-Tehrani M, Shervin A, Bozorgmehr M, Vafaei S, *et al.* enstrual blood derived stromal stem cells from women with and without endometriosis reveal different phenotypic and functional characteristics. *Mol Hum Reprod* 2014; 20(9): 905-18.
- 49 Hubbard SA, Friel AM, Kumar B, Zhang L, Rueda BR, Gargett CE. Evidence for cancer stem cells in human endometrial carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69(21): 8241-8.
- 50 Pratibha S, David G. Update on prognostic markers for endometrial cancer. *Women's Health* 2014; 10(3): 277-88.
- 51 Mohsen K, Soudabeh F. Evaluating the p-FOXO1/FOXO1 ratio: an alternative strategy for endometrial cancer diagnosis. *Int J Clin Med* 2015; 06(03): 217-26.
- 52 Nakamura M, Zhang X, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, *et al.* Molecular characterization of CD133⁺ cancer stem-like cells in endometrial cancer. *Int J Oncol* 2014; 44(3): 669-77.