

网络出版时间: 2018-2-11 11:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180210.0835.021.html>

子宫内膜息肉干细胞的提取及内皮抑素对其血管生成的影响

田金¹, 张冬丽², 姚丽¹, 宋璟景³

摘要 目的 探讨子宫内膜息肉(EP)组织中血管内皮生长因子(VEGF)的表达水平和重组人血管内皮抑素对EP血管生成作用的影响。方法 免疫组化法观察EP组织与正常内膜组织中VEGF的表达。胶原酶进行体外分离培养子宫内膜息肉干细胞(EPMSCs),运用RT-PCR和流式细胞术检测干细胞相关标志物,并进行多向分化能力鉴定。ELISA法检测EPMSCs与正常子宫内膜干细胞(EMSCs)VEGF的表达。ELISA法检测内皮抑素对EMSCs VEGF表达的影响。结果 EP组织中VEGF表达明显增强($P < 0.001$)。成功分离出EPMSCs和EMSCs,VEGF的表达前者较后者明显增多($P < 0.001$)。内皮抑素能够使EPMSCs分泌的VEGF显著降低($P < 0.01$)。结论 VEGF与EP的发生有关。EP可能成为成体干细胞的组织来源。内皮抑素能够通过抑制血管生成发挥治疗EP的作用。

关键词 子宫内膜息肉; 干细胞; 内皮抑素

中图分类号 R 3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)02-0215-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.011

子宫内膜息肉(endometrial polyps, EP)是一种可导致子宫异常出血、不孕,甚至内膜恶变的常见妇科疾病。EP可发生于青春期后的女性,总体发病率高达25%。近年来,随着妇科宫腔镜检查的推广和辅助生殖技术的发展,EP的检出率正逐年上升。目前,其发病机制尚不明确。研究^[1]显示,EP的发生可能与局部新生血管形成异常活跃有关。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是EP发生发展过程中重要的血管生成因子,EP患者的VEGF表达水平在子宫内膜息肉中较正常内膜组织显著增高^[1]。因此推测VEGF能够促进局部子宫内组织新生血管的过度增殖,引起局部子宫内膜增生,最终形成子宫内膜息肉。内皮抑素是目前已知效果最好的内源性抗血管生成因子,能够特

异性抑制新生血管形成。目前已经应用于临床肿瘤治疗中,能够有效地抑制血管生成和肿瘤生长^[2]。其对子宫内膜异位症的治疗作用也有相关的实验研究^[3]。但是,应用内皮抑素治疗子宫内膜息肉尚未见报道。因此,该研究通过观察EP组织内VEGF的表达情况,继而从EP中分离提取出干细胞并进行相关鉴定,采用体外培养法,检测不同浓度的内皮抑素对子宫内膜息肉干细胞VEGF分泌水平的影响,探讨血管内皮抑素对EP的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 资料来源 选取郑州人民医院2015年1月~6月因EP行宫腔镜下内膜息肉切除术的患者,收集息肉组织,病理报告均为良性息肉样增生,增殖期子宫内膜。同时选取息肉附近内膜组织用于提取子宫内膜干细胞。所有患者(年龄32~49岁, $n=9$)术前至少三个月未进行激素替代治疗。对照组选取因输卵管性不孕行诊断性刮宫的患者(年龄28~41岁)($n=9$)的正常子宫内膜,排除其他任何子宫病变者。本研究取得了郑州人民医院伦理委员会的批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 无菌获取标本后,部分组织10%中性福尔马林固定,酒精梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋;部分组织置于DMEM/F-12 1:1培养基中4℃保存6h内送至实验室处理。

1.2.2 免疫组化染色 SP法测定 VEGF 蛋白表达 VEGF兔抗人多克隆抗体及SP试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司,一抗工作浓度为1:200。按说明书操作,光镜下观察并采集图像。结果判定:Image Pro Plus 6.0进行积分光密度测量分析,每张图片随机选择5个高倍镜视野(10×20),以阳性区平均积分光密度值(IOD)为测定值。

1.2.3 子宫内膜息肉干细胞(endometrial polyps stem cells, EPMSCs)和子宫内膜干细胞(endometrial stem cells, EMSCs)的提取 将息肉组织和息肉附近子宫内膜转移至培养皿中,无菌PBS冲洗以去掉血液和黏液,剪碎至糊状,加入III型胶原酶(300

2017-11-09 接收

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划(编号: 17A320023)

作者单位: ¹ 郑州人民医院妇产科, 郑州 450001

² 河南大学淮河医院妇产科, 开封 475000

³ 南昌大学医学院, 南昌 330031

作者简介: 田金, 女, 本科, 主治医师, 责任作者, E-mail: tianjin-1125@163.com

$\mu\text{g/ml}$) 和 DNA 酶 I ($40 \mu\text{g/ml}$) 37°C 孵育 1 h, 每 15 min 震荡 1 次。使用 $70 \mu\text{m}$ 孔径的细胞滤器过滤去除腺上皮细胞。收集滤液, 800 r/min 离心 10 min, 弃上清液。含有 10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 青/链霉素双抗的 DMEM/F-12 1:1 培养基 (完全培养基) 重悬细胞沉淀。将上述细胞悬液转移至 25 ml 培养瓶中, 37°C 、5% CO_2 孵育 24 h 后更换新鲜培养基去除未贴壁细胞。同法提取正常子宫内膜干细胞。每 2~3 d 更换培养基。待细胞生长至 90% 融合时, 按 1:2 比例传代, 标记为第一代 (P1), 选取生长良好的 P3~P5 细胞用于后续实验。

1.2.4 逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 对细胞进行干细胞相关基因 OCT-4 鉴定 (两组 $n=5$)。收集细胞, TRIzol 法提取细胞总 RNA, 应用一步法 RT-PCR 试剂盒, 反应条件如下: 42°C 、1 h, 94°C 、15 min, 94°C 、30 s, 57°C 、30 s, 72°C 、30 s, 35 个循环; 72°C 、10 min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。紫外线下观察记录, 以 GAPDH 为内参。见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物大小 (bp)
OCT-4	F: CGTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTG	247
	R: CAAGGGCCGCAGCTTACACATGTTTC	
GAPDH	F: GCTTGTCTCATTAATGGAATCCG	360
	R: TCCACACCCATGACGAACATG	

1.2.5 细胞克隆形成实验 选取 3~5 代生长情况良好的 EPMSCs 和 EMSCs, 以 $250 \text{ 个细胞}/\text{cm}^2$ 接种于 60 mm 培养皿中。每组细胞分别接种 3 个培养皿。 37°C 、5% CO_2 培养箱培养, 每天观察细胞集落形成情况, 每 3 d 换液 1 次。在培养的第 14 天, 出现肉眼可见的细胞克隆时终止培养, 倒置显微镜下计数细胞个数 > 100 的克隆数。克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 细胞生长曲线和群体倍增时间 (population doubling time, PDT) 收集 3~5 代生长情况良好的 EPMSCs 和 EMSCs, 细胞计数板计数, 以 5 000 个细胞/孔的密度接种于 24 孔板中, 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24 h 至细胞贴壁。从第 2 天起, 每天收集并计数 3 个复孔中的细胞数目, 取平均值, 连续计数 10 d, 绘制细胞生长曲线。群体倍增时间根据公式: $\text{DT} = [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)] \times t$ (h) 计算 (N_t = 最终细胞数目; N_0 = 初始细胞数目; t = 培养时间)。

1.2.7 流式细胞术 对细胞进行干细胞表面抗原鉴定。收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 制成细胞浓度为 2×10^4 个/20 μl 的单细胞悬液, 分别加入抗体: 鼠抗人 CD34、CD45、CD73、CD90、HLA-ABC、HLA-DR, 室温避光孵育 20 min, PBS 洗 2 次, 800 r/min 离心 5 min, 300 μl PBS 重悬, 流式细胞仪检测。

1.2.8 多向分化鉴定 收集生长良好的细胞, 分别转移到成骨和成脂肪诱导培养基中, 每 3 d 换液, 完全培养基作对照。分别于 3 周和 2 周后进行茜素红和油红 O 染色, 倒置显微镜进行观察鉴定。

1.2.9 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 EPMSCs ($n=5$) 与 EMSCs ($n=5$) VEGF 的分泌情况。生长状态良好的细胞弃去培养液, PBS 洗涤 2 次, 消化离心, 完全培养基重悬。将各组细胞分别以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 3 个复孔。 37°C 、5% CO_2 孵育, 分别于 24、48、72 h 后, 收集细胞上清液, $2 000 \text{ r/min}$ 离心 20 min。采用人 VEGF ELISA 检测试剂盒, 按说明书操作, 检测每孔细胞培养上清液中 VEGF 的表达水平。完全培养基做阴性对照, PBS 做空白对照。

1.2.10 内皮抑素对 EPMSCs 和 EMSCs 血管生成的作用 收集生长良好的 EPMSCs 和 EMSCs ($n=5$) 如上述方法接种于 6 孔板中, 设置 4 个复孔, 分别加入内皮抑素 0、0.5、1、2 mg, 37°C 、5% CO_2 孵育 48 h 后收集细胞上清液, $2 000 \text{ r/min}$ 离心 20 min。采用 ELISA 法同法检测每孔细胞培养上清液中 VEGF 的表达水平。完全培养基做阴性对照, PBS 做空白对照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EP 组织中 VEGF 的表达 VEGF 蛋白主要分布于子宫内膜腺上皮细胞、血管内皮细胞、间质细胞及平滑肌细胞的胞质中。EP 组织中 VEGF 阳性表达广泛分布。EP 组织 VEGF 表达 ($0.029 6 \pm 0.002 6$) 较正常增殖期内膜表达 ($0.023 4 \pm 0.002 0$) 增强 ($t = 6.903$, $P < 0.001$)。见图 1。

2.2 EPMSCs 及 EMSCs 的分离、培养和鉴定 为获取子宫内膜息肉来源的子宫内膜干细胞, 分离提取了 9 名来自子宫内膜息肉患者的 EPMSCs, 其中 7 例获得成功。同样, 成功培养了 8 例 EMSCs。

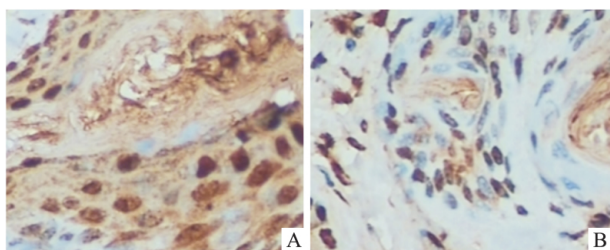


图1 子宫内膜息肉和

正常子宫内膜中 VEGF 的表达 SP × 200

A: VEGF 在子宫内膜息肉中的表达; B: VEGF 在正常子宫内膜中的表达

EPMSCs 及 EMSCs 均表现出贴壁生长的特点,光镜下细胞呈梭型,旋涡状排列,生长迅速,见图2。两种细胞均表达干细胞相关基因 OCT-4,见图2。流式细胞术结果表明:超过 90% 的 EPMSCs 和 EMSCs 表达 MSC 特有的标志物 CD73 和 CD90。相反,不表达已知的造血干细胞标志物 CD34 和 CD45。MHC I 类分子 HLA-ABC 阳性表达,MHC II 类分子 HLA-DR 阴性表达,见图3、4。

2.3 EPMSCs 及 EMSCs 的增殖能力 在细胞克隆形成实验中,EPMSCs 及 EMSCs 在培养的第 24 h 基本全部贴壁。细胞大多呈梭形,外形轮廓尚清晰。单个细胞生长较为缓慢,培养第 6 天左右较大克隆增长迅速,较小克隆生长缓慢。在 14 d 中止培养,可见有含数百个细胞组成的克隆存在。EPMSCs 的

克隆形成率与 EMSCs 的克隆形成率比较,差异有统计学意义($t = 3.199$, $P = 0.033$),见图 5A。两组细胞生长曲线大致呈现“S”型,接种后 2 d 内,细胞增长相对缓慢,从 3 d 起进入对数生长期,7 d 起进入平台期,细胞数目不再增加,见图 5B。由此计算出 EPMSCs 和 EMSCs 的 PDT,二者之间差异有统计学意义($t = -6.594$, $P = 0.003$),见图 5C。

2.4 EPMSCs 和 EMSCs 体外分化能力的鉴定

为了进一步鉴定 EPMSCs 和 EMSCs 在体外是否能够多向分化,本实验研究了其分化成成骨细胞和脂肪样细胞的潜能。在成骨诱导培养基中培养 3 周

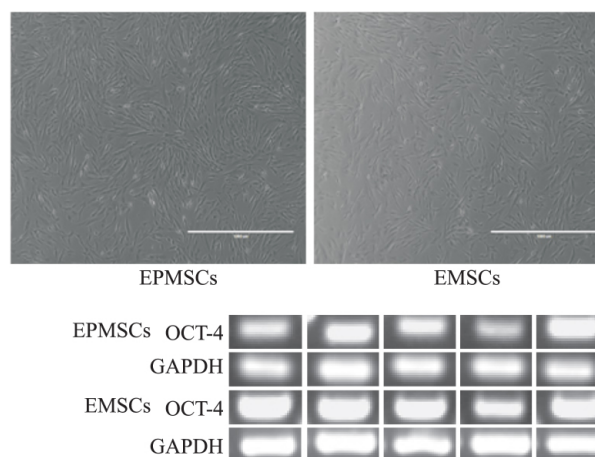
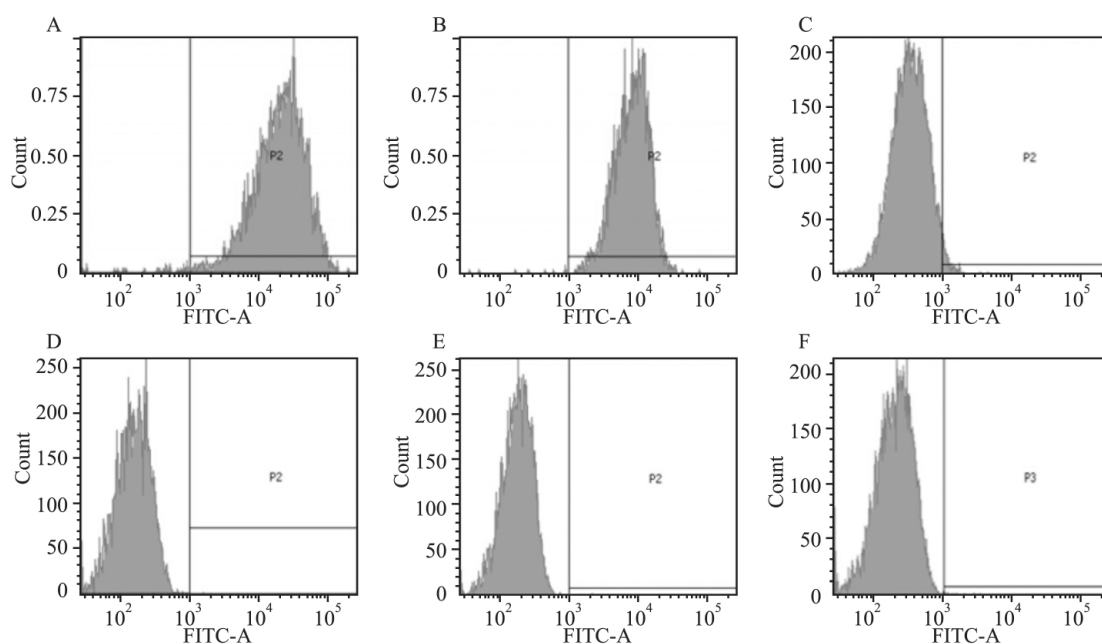
图2 子宫内膜息肉及正常子宫内膜
干细胞形态学和 OCT-4 鉴定

图3 子宫内膜息肉干细胞表面标志物检测

A: CD-73; B: CD-90; C: HLA-ABC; D: CD-34; E: CD-45; F: HLA-DR

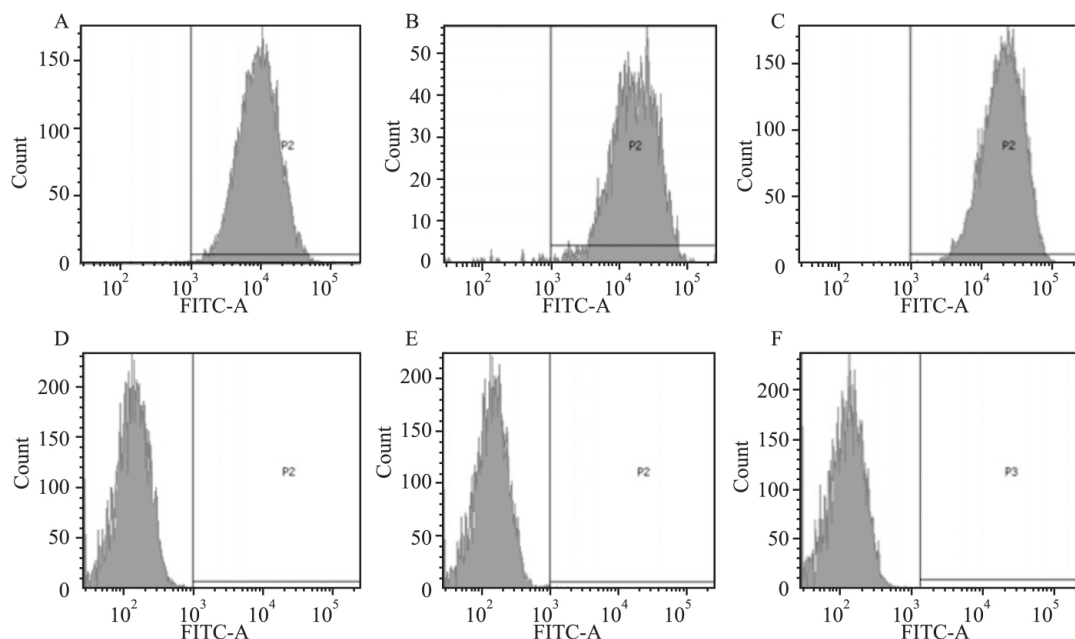


图4 子宫内膜干细胞表面标志物检测结果

A: CD-73; B: CD-90; C: HLA-ABC; D: CD-34; E: CD-45; F: HLA-DR

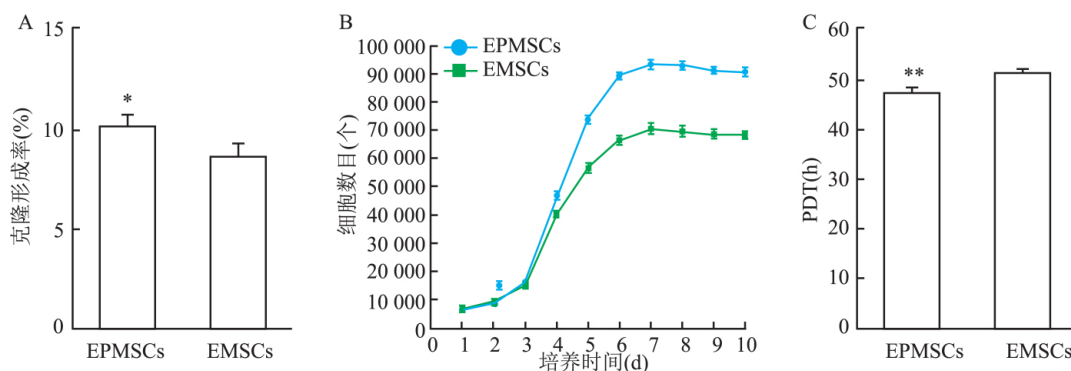


图5 EPMSCs 和 EMSCs 增殖能力

A: 克隆形成率; B: 细胞生长曲线; C: 细胞群体倍增时间; 与 EMSCs 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

后, EPMSCs 沿着细胞膜形成了红色茜素基质, 同时出现大红色的骨质颗粒嵌入到细胞外基质, 标志着成骨细胞化。在成脂肪诱导培养基中培养 3 周后, 油红 O 染色证明 EPMSCs 分化时在胞质内有脂滴形成。见图 6。

2.5 EPMSCs 与 EMSCs 细胞培养上清液中 VEGF 的水平 为了在细胞水平进一步证实 EPMSCs 与 EMSCs 在血管生成能力方面是否具有差异, 本实验应用 ELISA 法检测了细胞培养上清液中 VEGF 的表达水平。48 h 和 72 h 两组细胞 VEGF 的表达量差异均有统计学意义 ($t = 14.989$ $P < 0.001$; $t = 14.795$ $P < 0.001$)。24 h VEGF 表达量差异无统计学意义 ($t = 1.767$ $P = 0.152$)。见图 7。

2.6 内皮抑素对 EPMSCs 和 EMSCs 血管生成的

抑制作用 为了探究内皮抑素对 EP 是否具有潜在治疗作用, 及其是否会对正常细胞产生不良影响, 分别检测了其 EPMSCs 和 EMSCs 细胞培养上清液中 VEGF 的表达水平的影响。在依次加入 0、0.5、1、2 mg 的内皮抑素培养 48 h 后, EPMSCs 细胞上清液中 VEGF 的含量。与非处理组相比, 1、2 mg 组均表现出对 VEGF 表达的抑制作用 ($F = 68.423$, $P < 0.001$)。而 0.5 mg 组与非处理组之间的差异无统计学意义 ($F = 68.423$, $P = 0.095$)。见图 8A。而在依次加入 0、0.5、1、2 mg 内皮抑素培养 48 h 后, 与非处理组相比, 加入 2 mg 内皮抑素后, EMSCs 培养上清液中的 VEGF 分泌量明显降低 ($F = 8.384$, $P = 0.011$)。而 0.5、1.0 mg 组与非处理组之间的差异无统计学意义 ($F = 8.384$, $P > 0.05$)。见图 8B。

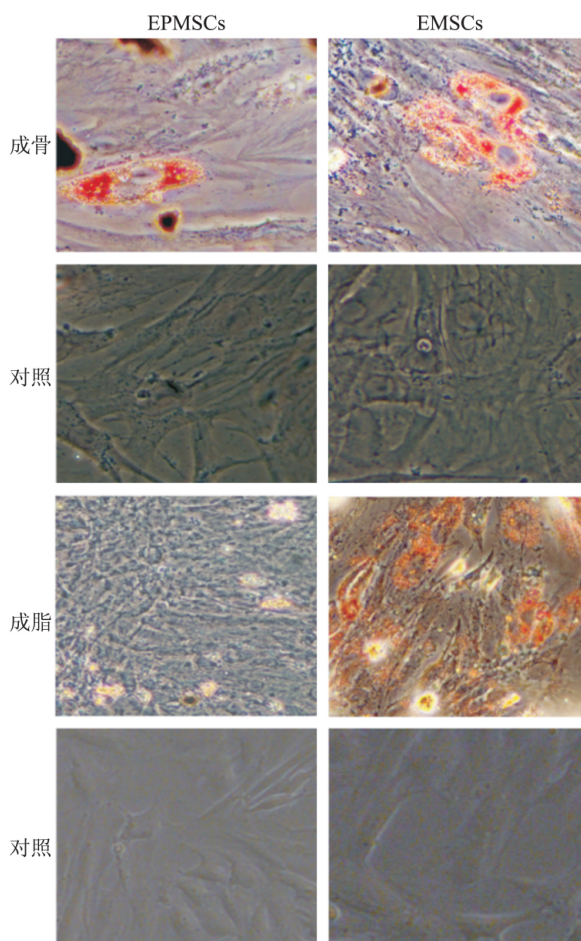


图6 子宫内皮肉和子宫内皮干细胞体外分化
茜素红/油红O $\times 200$

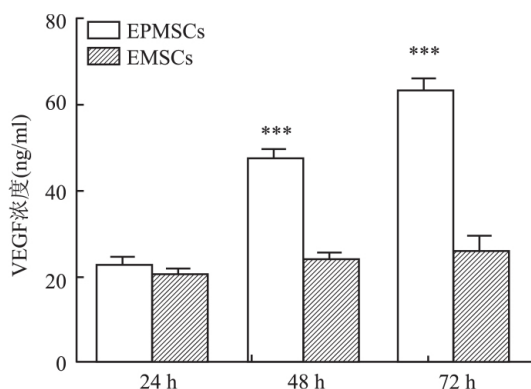


图7 子宫内皮肉和子宫内皮干细胞
细胞培养上清液中 VEGF 的表达
与 EMSCs 比较: *** $P < 0.001$

3 讨论

3.1 子宫内皮肉组织中 VEGF 表达增高 EP 可以发生于任何年龄且发病率有增高趋势,其发病机制不清,缺乏针对性治疗方案,复发率较高。研究^[4]显示,EP 与局部内膜增生和凋亡的失衡、激素失衡和药物应用有关。临床病理诊断EP的唯一标

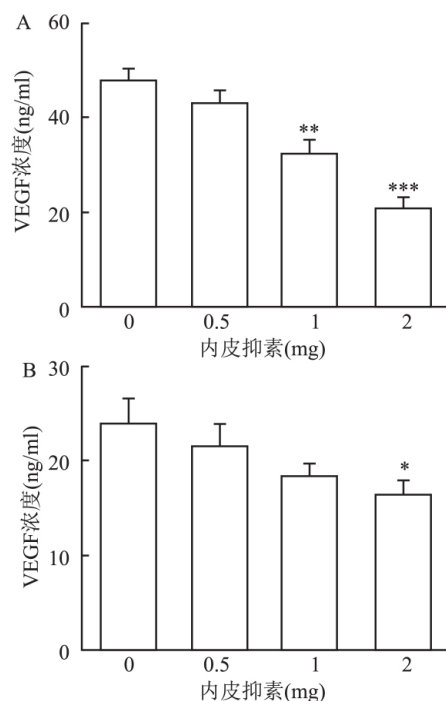


图8 内皮抑素对 EPMSCs 和 EMSCs VEGF 分泌的作用

A: 内皮抑素对 EPMSCs VEGF 分泌的作用; B: 内皮抑素对 EMSCs VEGF 分泌的作用; 与 0 ng/ml 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

准是出现伴有厚壁血管的纤维组织,因此新生血管的形成可能与 EP 发生的关系密切。

VEGF 是一种最有效的促血管生长因子,具有促进内皮细胞增殖和迁移的作用,能增加血管的通透性,使血液中大分子物质进入到细胞外基质中,有利于新生血管的形成。它不但与正常月经周期中子宫内膜的血管生成有关,而且也能够参与以过度血管生成为特点的疾病的发生发展^[5-6]。本实验中 EP 组织 VEGF 表达较正常内膜明显增强,提示 VEGF 可能在 EP 形成过程中发挥作用。在 EP 发生发展过程中,高表达的 VEGF 能够诱发内皮细胞增殖和迁移,促进大量新生血管的形成。因此,可以推测子宫内膜中 VEGF 的过表达引起组织内新生血管的过度增生,最终造成了局部内膜增生形成息肉。

3.2 子宫内皮肉干细胞中 VEGF 表达增高 据报道,子宫内皮肉中 VEGF 表达显著高于正常内膜,且仅发生于增殖期,表明其发生不只是条件致病,其自身子宫内膜的生物学行为与正常子宫内膜有着本质的不同^[7]。因此猜测这种差异可能存在于细胞水平。最新研究^[8-10]显示,人体多种组织中能够提取出原代成纤维样细胞群,如:间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)。为了证实这一结

论 本研究团队分离提取了 EPMSCs 和 EMSCs ,并对其进行了生物学特性的鉴定。实验所分离提取的细胞能够表达干细胞相关性基因 OCT-4 ,这种特点与其他研究中报道的骨髓间充质干细胞和羊水间充质干细胞等 MSCs 相似^[11]。本课题组进一步鉴定了 EPMSCs 和 EMSCs 的表面标志物 ,结果表明其高表达 MSCs 表面标志物 ,不表达造血干细胞表面标志物 ,MHC I 类分子 HLA-ABC 低表达 ,不表达 MHC II 类分子 HLA-DR ,这说明本研究所提取的 EPMSCs 和 EMSCs 具备 MSCs 的表面抗原特性 ,且具有低免疫源性 ,可能成为一种新的 MSCs 组织来源 ,使其在细胞治疗领域具备发展潜力。同时 ,体外多向诱导分化实验也证实了 EPMSCs 和 EMSCs 具有了 MSCs 最重要的特征。EPMSCs 和 EMSCs 在形态学、干细胞相关基因 OCT-4 表达、细胞表面抗原和体外诱导分化能力方面未见明显差异。但 EPMSCs 与 EMSCs 相比 ,具有更强的增殖能力。EP 组织中能够分离提取出具备 MSCs 特性的 EPMSCs ,其多方面特点与已知的 MSCs 相似^[10]。

EP 与正常内膜中 VEGF 的表达在组织水平具有显著差异 ,那么其在细胞水平是否具有差异呢? 鉴于 EP 的发病的血管新生机制 ,局部内膜微环境中 VEGF 的分泌可能与这一机制密切相关。本研究检测了 EPMSCs 与 EMSCs 细胞培养上清液中 VEGF 的水平 ,结果显示 ,细胞接种后 24 h 内 ,两组细胞 VEGF 的表达无明显差异。但从 24 h 后开始至 72 h ,EPMSCs 所分泌的 VEGF 显著且持续增多 ,表达量高于 EMSCs。这说明 EP 细胞具有更强的血管生成能力 ,这不仅证实了笔者之前关于子宫内膜息肉和正常子宫内膜之间差异的猜测 ,而且为子宫内膜息肉的治疗提供了新的想法。

3.3 内皮抑素能够抑制子宫内膜干细胞血管生成作用 为了证实这一想法 ,笔者应用内皮抑素作用于 EPMSCs ,以验证其对 EP 可能产生的治疗作用。内皮抑素是已知的实验效果最好的血管生成抑制剂 ,值得一提的是 ,其能够特异性抑制新生血管的形成 ,而对成熟血管几乎没有作用。本实验表明结果 ,在经过不同浓度的内皮抑素处理后 ,EPMSCs 的 VEGF 表达水平确实有不同程度的降低 ,这说明内皮抑素能够抑制 EPMSCs VEGF 的表达 ,进而抑制 EP 的血管生成和病灶生长。但是 ,作为一种不断再生的组织 ,正常子宫内膜也可能会受到内皮抑素的影响。因此 ,本研究应用同样时间剂量的内皮抑素作用于 EMSCs ,结果表明其分泌的 VEGF 同样能够

被内皮抑素所抑制。由于 EMSCs 48 h 所分泌的 VEGF 显著少于 EPMSCs ,其受内皮抑素的抑制效果不如 EPMSCs 明显 ,但这并不能表明正常子宫内膜的再生不会受到内皮抑素的不良影响。因此 ,应用内皮抑素治疗 EP 的有效和安全时间剂量或给药方式仍需要进一步探索。

综上所述 ,EP 中 VEGF 的表达在组织水平和细胞水平均高于正常内膜。此外 ,内皮抑素能够在细胞水平对 EP 产生抑制作用 ,这填补了关于内皮抑素用于治疗 EP 的基础研究的空白。另外 ,EP 组织中能够提取出 MSCs ,有可能成为一种可选的成体干细胞组织来源。

参考文献

- [1] Xuebing P , TinChiu L , Enlan X , et al. Is endometrial polyp formation associated with increased expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta? [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* , 2011 , 159(1) : 198 - 203.
- [2] Mohajeri A , Sanaei S , Kiafar F , et al. The challenges of recombinant endostatin in clinical application: focus on the different expression systems and molecular bioengineering [J]. *Adv Pharm Bull* , 2017 , 7(1) : 21 - 34.
- [3] Ma Y , He Y L. Study of an antiangiogenesis gene therapy with endostatin on endometriosis in the nude mouse model [J]. *Clin Exp Obstet Gynecol* , 2014 , 41(3) : 328 - 34.
- [4] Indraccolo U , Di Iorio R , Matteo M , et al. The pathogenesis of endometrial polyps: a systematic semi-quantitative review [J]. *Eur J Gynaecol Oncol* , 2013 , 34(1) : 5 - 22.
- [5] Song S H , Jeong I G , You D , et al. VEGF/VEGFR2 and PDGF-B/PDGFR-beta expression in non-metastatic renal cell carcinoma: a retrospective study in 1 091 consecutive patients [J]. *Int J Clin Exp Pathol* , 2014 , 7(11) : 7681 - 9.
- [6] Makabe T , Koga K , Miyashita M , et al. Drospirenone reduces inflammatory cytokines , vascular endothelial growth factor (VEGF) and nerve growth factor (NGF) expression in human endometriotic stromal cells [J]. *J Reprod Immunol* , 2017 , 119: 44 - 8.
- [7] 邱华娟 , 梁朵献 , 孙颖 , 等. 子宫内膜息肉中雌激素受体、血管内皮生长因子和转化生长因子-β1 的表达及相关性研究 [J]. *中国妇幼保健* , 2017 , 32(5) : 928 - 30.
- [8] Gargett C E , Schwab K E , Deane J A. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years [J]. *Hum Reprod Update* , 2016 , 22(2) : 137 - 63.
- [9] Wang P , Liu X , Zhao L , et al. Bone tissue engineering via human induced pluripotent , umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium [J]. *Acta Biomater* , 2015 , 18: 236 - 48.
- [10] Najjar M , Raicevic G , André T , et al. Mesenchymal stromal cells from the foreskin: Tissue isolation , cell characterization and immunobiological properties [J]. *Cytotherapy* , 2016 , 18(3) : 320 - 35.
- [11] Piccinato C A , Sertie A L , Torres N , et al. High OCT4 and low p16(INK4A) expressions determine *in vitro* lifespan of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Int* , 2015 , 2015: 369828.

网络出版时间: 2018-2-11 11:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180210.0835.022.html>

甲状腺功能减退症对成年期 SD 大鼠肾脏超微结构的影响及 $L-T_4$ 替代治疗的效果

刘翔^{1,2}, 王芬¹, 桂丽³, 朱德发¹

摘要 目的 观察甲状腺功能减退症(简称甲减)对成年期 SD 大鼠肾脏超微结构的影响及左旋甲状腺素($L-T_4$)替代治疗的效果。方法 将 30 只健康 3 月龄雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周,随机均分为对照组、甲减组和 $L-T_4$ 治疗组。通过丙基硫氧嘧啶饮水法建立甲减模型,共 6 周。从第 5 周开始 $L-T_4$ 治疗组大鼠给每日予 $L-T_4$ 腹腔注射(剂量按体重 $6 \mu\text{g}/100 \text{g}$ 计算);对照组及甲减组每日予同等剂量生理盐水腹腔注射。造模结束后对所有大鼠进行称重,之后使用放射免疫法检测三组大鼠甲状腺功能,同时使用透射电镜完成肾脏超微结构观察。结果 造模前,三组大鼠体质量水平

比较差异无统计学意义;造模结束后,对照组、甲减组和 $L-T_4$ 治疗组三组大鼠体质量较造模前各增加了 48.14%、22.18%、34.90%。造模后三组间体质量比较显示:甲减组、 $L-T_4$ 治疗组大鼠体质量显著低于对照组($P < 0.05$);与对照组相比,甲减组大鼠血清甲状腺激素(T_3 、 T_4)水平明显降低,促甲状腺素水平显著升高($P < 0.01$)。 $L-T_4$ 治疗组血清甲状腺激素及促甲状腺素水平与对照组相比差异无统计学意义;电镜下观察显示对照组大鼠肾小球足细胞结构完整,足突排列清晰,线粒体发达、内部嵴结构清晰;甲减组大鼠肾小球基底膜结构不规则,足细胞明显肿胀、融合,内部细胞器结构不清晰,线粒体明显空泡变性,内部嵴断裂消失,粗面内质网有脱颗粒现象,间质水肿; $L-T_4$ 治疗组以上超微结构改变明显改善。结论 甲减可致成年期 SD 大鼠肾脏超微结构发生病理学损害, $L-T_4$ 替代治疗有利于上述损伤的恢复。

关键词 甲状腺功能减退症; 大鼠; 肾脏; 超微结构; 左旋甲状腺素

中图分类号 R 581.2; R 977.1+4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)02-0221-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.012

2017-10-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81272152)

作者单位 ¹安徽医科大学第一附属医院老年内分泌科, 合肥 230022

²马鞍山中心医院内分泌科, 马鞍山 243000

³安徽医科大学基础医学院综合实验室, 合肥 230032

作者简介: 刘翔, 男, 硕士研究生;

朱德发, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zdfa0168@sina.com

Isolation of endometrial polyps stem cells and the effect of endostatin on the angiogenesis of endometrial polyps

Tian Jin¹, Zhang Dongli², Yao Li¹, et al

(¹Dept of Gynaecology and Obstetrics, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450001;

²Dept of Gynaecology and Obstetrics, Henan University Huai River Hospital, Kaifeng 475000)

Abstract Objective To explore the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometrial polyps and the effect of endostatin on the angiogenesis of endometrial polyps. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression levels of endometrial polyps tissues and normal endometrial tissues. By using collagenase, EPSCs were isolated and cultured. By using RT-PCR and flow cytometry, the expression of stem cells related markers was detected. The capacity of EPSCs and EMSCs to differentiate *in vitro* was evaluated. The VEGF secreted by EPSCs and EMSCs was detected by ELISA. The effect of endostatin on VEGF of EPSCs was evaluated. **Results** The expression of VEGF increased significantly ($P < 0.001$). EPSCs and EMSCs were isolated successfully and the expression level of VEGF of EPSCs was significantly higher than that of EMSCs ($P < 0.001$). Endostatin could suppress the expression of VEGF secreted by EPSCs ($P < 0.01$). **Conclusion** VEGF is related to the occurrence of endometrial polyps. SP tissues may become a source of adult stem cells sources. Endostatin can play a role in the treatment of EP by inhibiting angiogenesis

Key words endometrial polyps; stem cells; endostatin