

脂肪间充质干细胞外泌体对人子宫内膜异位症细胞纤维化形成的影响

李冰冰¹, 丁美琪¹, 孙新慧^{2*}, 王 荣¹

1. 济宁医学院, 山东 济宁 272000

2. 北京中医药大学, 北京 100029

摘要: 目的 探讨脂肪间充质干细胞外泌体 (ADSCs-Exos) 对子宫内膜异位症细胞 (12Z) 增殖以及纤维化相关因子表达的影响。方法 采用超速离心法提取 ADSCs-Exos, 并通过透射电镜 (TEM)、纳米颗粒跟踪分析 (NTA)、Western blotting 鉴定; 采用 PKH26 标记外泌体法观察 12Z 细胞对外泌体的吞噬内化情况; 采用 CCK-8 法检测 ADSCs-Exos (12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对 12Z 细胞增殖的影响; 将 12Z 细胞分为: 对照组、模型组、ADSCs-Exos (12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组, 除对照组外, 其余各组采用 TGF- β 1 (5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 诱导细胞纤维化, 给药 24 h 后采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测纤维化因子基因 mRNA 的表达。结果 提取的 ADSCs-Exos 呈现圆形颗粒, 清晰可见; 总萃取物的平均粒径为 122.6 nm, 浓度为 1.8×10^6 颗粒 $\cdot\text{mL}^{-1}$; CD9、CD63 和 TSG101 在 ADSCs-Exos 均有表达, 且 Calnexin 蛋白未表达, 符合外泌体的特征。12Z 细胞可以成功将 ADSCs-Exos 吞噬内化; CCK-8 检测结果显示, 与对照组相比, 采用 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ADSCs-Exos 干预 24 h 后 12Z 细胞的相对存活率显著降低 ($P<0.01$)。qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, 模型组细胞的 CTGF、COL1A1、 α -SMA mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 12.5、25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ADSCs-Exos 组 CTGF、COL1A1、 α -SMA mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001); 50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ADSCs-Exos 组 α -SMA mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.001$)。结论 ADSCs-Exos 可被 12Z 细胞所吞噬, 抑制 12Z 细胞的增殖, 并且降低细胞纤维化相关因子基因的表达水平。

关键词: 脂肪间充质干细胞; 外泌体; 子宫内膜异位症; 纤维化; 吞噬

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 09-2032-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.010

Effect of adipose derived stem cell exosomes on fibrogenesis of human endometriosis cells

LI Bingbing¹, DING Meiqi¹, SUN Xinhui², WANG Rong¹

1. Jining Medical College, Jining 272000, China

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To investigate the effects of adipose-derived stem cell-derived exosomes (ADSCs-Exos) on the proliferation and fibrosis-related factor expression of endometriosis cells (12Z). **Methods** The ADSCs-Exos were extracted by ultracentrifugation, identified by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis (NTA), and Western blotting. The uptake of exosomes by 12Z cells was observed by PKH26 labeling exosome method. The effects of ADSCs-Exos (12.5, 25.0, 50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on the proliferation of 12Z cells were detected by CCK-8 assay. The 12Z cells were divided into four groups: control group, model group, and ADSCs-Exos (12.5, 25.0, 50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) group. Except for the control group, the other groups were induced to fibrosis by TGF- β 1 (5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 24 h, and the expression of fibrosis-related gene mRNA was detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) after drug treatment. **Results** The ADSCs-Exos extracted showed round particles that were clearly visible. The average particle size of the total extract was 122.6 nm, and the concentration was 1.8×10^6 particles $\cdot\text{mL}^{-1}$. CD9, CD63, and TSG101 were expressed in ADSCs-Exos, and Calnexin protein was not expressed, consistent with the characteristics of exosomes. 12Z cells successfully internalized and phagocytosed ADSCs-Exos. The CCK-8 assay results showed that compared with the control group, the relative

收稿日期: 2024-06-18

基金项目: 国家自然科学基金委员会项目 (82104920); 山东省自然科学基金委员会项目 (ZR2021QH129); 山东省中医药重点学科方剂学 (鲁卫中医药科教学 (2022) 4 号)

第一作者: 李冰冰 (1988—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为子宫内膜异位症的中医药防治研究。E-mail: lilucky0829@126.com

*通信作者: 孙新慧 (1995—), 女, 博士生在读, 研究方向为子宫内膜异位症的基础及临床研究。E-mail: weimo0827@163.com

survival rate of 12Z cells was significantly lower after 24 h of treatment with $25.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ADSCs-Exos ($P < 0.01$). The qRT-qPCR results showed that compared with the control group, the expression levels of *CTGF*, *COL1A1*, and α -SMA mRNA in the model group were significantly increased ($P < 0.001$). Compared with the model group, the expression levels of *CTGF*, *COL1A1*, and α -SMA mRNA in the 12.5, and $25.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ADSCs-Exos groups were lower ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the expression level of α -SMA mRNA in the $50.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ADSCs-Exos group was significantly lower ($P < 0.001$). **Conclusion** Adipose mesenchymal stem cell exosomes can be swallowed by endometriosis cells, which can further inhibit the proliferation of endometriosis cells and reduce the expression level of cell fibrosis-related factor genes, thus playing a role in the treatment of endometriosis.

Key words: adipose-derived stem cells; exosomes; endometriosis; fibrosis; phagocytosis

子宫内膜异位症(EMs)为子宫内膜组织(腺体和间质)在子宫腔被覆内膜及子宫以外的部位出现、生长、浸润,反复出血,继而引发疼痛、不孕及结节或包块等^[1]。EMs高发于育龄期女性,在育龄期女性的发病率约为10%^[2],影响全球高达1.9亿育龄妇女^[3]。EMs是一种慢性炎症性疾病,其病变内部和周围组织存在纤维化,纤维化造成不同程度的盆腔黏连形成,可导致疼痛和不孕症,也是增加手术困难的主要原因^[4-5]。EMs相关纤维化是一种复杂的表现,纤维化发生、发展以及调控机制尚不明,因此揭示EMs纤维化的分子机制,寻找到特定而有效的治疗靶点而抑制甚至逆转纤维化,对从根本上解决EMs纤维化、降低疼痛、不孕等一系列症状,从而改善患者生活质量有着至关重要的作用。

脂肪间充质干细胞(ADSCs),是从脂肪组织中分离得到的一种具有多向分化潜能的多功能干细胞,是人体储量最为丰富的干细胞。研究表明,ADSCs的潜在作用主要取决于旁分泌介导机制。脂肪干细胞来源的外泌体(ADSCs-Exos)作为旁分泌信号的组成部分之一,更可能在细胞间通信中发挥重要作用。外泌体是一种纳米级的囊泡结构,直径为40~160 nm,由多种细胞分泌,外泌体中含有蛋白质、细胞因子、miRNA等多种调节性物质,可被远处的细胞吸收,在不同类型的细胞之间充当“沟通者”,通过外泌体进行细胞间通信可能与各种疾病的发病机制有关^[6]。研究显示ADSCs-Exos在纤维化^[7-9]相关疾病中发挥重要的调节作用,并显示出抗纤维化治疗的潜力。ADSCs-Exos显示着强大的作用,然而其在EMs中的影响尚不清楚。本实验通过研究人子宫内膜异位症细胞(12Z)对ADSCs-Exos的吞噬内化效应,以及ADSCs-Exos对12Z细胞增殖、纤维化相关因子基因水平表达的影响,初步探究ADSCs-Exos在EMs中的可能作用。

1 材料

1.1 细胞株

人ADSCs(货号CP-H202)由武汉普诺赛生命科技有限公司自行培养提供。永生化人子宫内膜异位症细胞(12Z)(CTCC-001-0695)由浙江美森细胞科技有限公司提供。

1.2 主要试剂

胎牛血清(10099141C, Gibco公司); 0.25%胰蛋白酶(25200056, Gibco公司); 人ADSCs完全培养基(CM-H202, 普诺赛公司); 去外泌体胎牛血清(UR50202, 上海宇玫博生物科技有限公司); DMEM/F12细胞培养基(SH30023.01, Hyclone公司); 青霉素-链霉素溶液(UB89609, BIOODIN公司); 磷酸盐缓冲盐水(PBS)(PB180327, 武汉普诺赛生命科技有限公司); 无血清细胞冻存液(C40100, 苏州新赛美生物科技有限公司); 细胞计数Kit-8(CCK-8)试剂盒(C0038, 碧云天生物技术公司); 转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白(TGF- $\beta 1$, 10804-HNAC, 北京义翘神州公司); PKH26红色荧光标记试剂盒(UR52302, 上海宇玫博生物科技有限公司); Oak Ridge超速离心管(3139-0050PK, 赛默飞公司); 抗CD9抗体(ab236630, Abcam公司); 抗CD63抗体(ab134045, Abcam公司); 抗TSG101抗体(ab125011, Abcam公司); 抗Calnexin抗体(10427-2-AP, Proteintech公司); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(S0001, Affinity公司); Trizol试剂(AG21101, AG公司); 反转录试剂盒(试剂盒(R323-01, Vazyme公司); 实时聚合酶链反应(RT-qPCR)试剂盒(Q312-02, Vazyme公司); BCA蛋白定量检测试剂盒(AQ526, 北京翊擎生物科技有限公司); PAGE凝胶快速制备试剂盒(10%)(PG112, 上海雅酶生物医药科技有限公司); SDS上样缓冲液(P0015L, 碧云天生物技术公司); TBS/Tween缓冲液(PS103S, 上海雅酶生物医药科技有限公司); 电化学发光(ECL)

试剂盒(WBKLS0100, Millipore 公司)。

1.3 主要仪器

低温超速离心机、恒温培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司; 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; 倒置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司; 激光扫描共聚焦显微镜购自德国徕卡; 透射电镜(TEM)购自日本 JEOL 公司; 凝胶电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 ADSCs 和 12Z 细胞培养

使用人 ADSCs 完全培养基培养 ADSCs 细胞, 常规置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中。每 3 天更换 1 次培养基, 待细胞生长至密度为 80% 以上后, 用胰蛋白酶消化细胞, 按照 1:2 的比例移入新的培养瓶中。使用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基培养 12Z 细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养, 待细胞融合 80% 以上时, 使用胰酶消化并传代, 取对数生长期细胞用于后续实验。显微镜下观察细胞形态, 并委托武汉普诺赛生命科技有限公司进行 DAPI、CD90 免疫荧光鉴定。

2.2 ADSCs-Exos 提取

将 ADSCs 在去外泌体血清的完全培养基中培养 48 h 收集细胞上清液。采用超速离心法提取外泌体, 具体步骤如下: 4 °C、300×g 离心 10 min, 去除活细胞和死细胞, 保留细胞上清液, 更换离心管, 2 000×g 离心 10 min, 去除细胞碎片, 保留上清液, 更换离心管, 10 000×g 离心 10 min, 去除较大的囊泡, 转移细胞上清液至超速离心管中, 然后在 4 °C、100 000×g 下超速离心 90 min, PBS 洗涤沉淀, 然后用 0.22 μm 滤器滤过除去细菌及微囊泡, 再次 100 000×g 下超速离心 90 min, 纯化外泌体, 用适量 PBS 重悬沉淀, 最后用 BCA 法测定外泌体蛋白的浓度, 质量浓度为 0.75 μg·μL⁻¹, 并于 -80 °C 冰箱保存。

2.3 ADSCs-Exos 的鉴定

2.3.1 TEM 观察外泌体 将制备好的悬液样品, 用移液器吸取、滴于带有支持膜的铜网上。根据悬液内的样品浓度, 立即或放置数分钟后, 用滤纸从液珠边缘吸去多余液体, 即可滴上染色液, 染色时间为 3~5 min。然后用滤纸吸去染液, 干燥、TEM 观察。

2.3.2 纳米颗粒跟踪分析(NTA) 采用 NTA 方法分析 ADSCs-Exos 粒径分布和浓度: 首先, 用去离子水清洗样本池, 仪器以聚苯乙烯微球(100 nm)校

准, 然后以 PBS buffer 清洗样本池。最后, 将样本以 PBS buffer 稀释, 进样检测外泌体样本的粒径分布和浓度。

2.3.3 Western blotting 鉴定 外泌体特异性标志蛋白鉴定: 将外泌体放置于冰上, 裂解 20 min, 加入 5×SDS 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min, 用 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 80 V 电泳 30 min 后 120 V 电泳 60 min, 湿转, 250 mA 恒流转膜 120 min, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入一抗(CD9, 稀释比为 1:1 000; CD63, 稀释比为 1:1 000; TSG101, 稀释比为 1:1 000; Calnexin, 稀释比为 1:1 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗(1:3 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜, ECL 显色, 通过凝胶电泳系统拍摄显影条带。

2.4 外泌体荧光标记实验检测细胞摄取外泌体的情况

为了检测 12Z 细胞摄取外泌体的情况, 采用 PKH26 红色荧光标记试剂盒制备浓度为 100 μmol·L⁻¹ 的工作染料溶液。将 20 μg ADSCs-Exos 加入到 50 μL 的工作染料溶液中, 纯化的外泌体与工作染料溶液孵育 10 min, 然后在 100 000×g 超速离心 90 min, 以去除多余的染料。首先, 将 12Z 细胞以 2×10⁵ 个的密度接种在直径为 35 mm、圆形玻璃底直径为 14 mm 的共聚焦培养皿, 接种后 6 h 待细胞完全贴壁后将离心后重悬的 PKH26 标记的外泌体加入, 与 12Z 细胞共孵育 4、8 h, 4% 的多聚甲醛固定 15 min, DAPI 染核, 并使用共聚焦显微镜进行观察拍照。

2.5 CCK-8 检测 12Z 细胞活性

将生长状态良好的 12Z 细胞以每孔 5 000 个的密度接种于 96 孔板, 待细胞贴壁密度达 70%~80% 时, 更换新鲜的培养基, 并加入终质量浓度分别为 12.5、25.0、50.0 μg·mL⁻¹ 的 ADSCs-Exos, 对照组则加入相同体积的 PBS 溶液。置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱培养, 在培养 24 h 后, 去除培养基, 每孔加入 100 μL 配制好的 CCK-8 工作液, 37 °C 培养箱孵育 1 h, 用酶标仪定量 450 nm 处的吸光度(A)值, 并计算细胞存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.6 qRT-PCR 实验检测纤维化相关因子结缔组织生长因子(CTGF)、I 型胶原蛋白 α1(COL1A1)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA) mRNA 的表达水平

选择对数生长期的 12Z 细胞, 将细胞以每孔

2×10^5 个的密度接种在 6 孔板中。将细胞分为 5 组：对照组、模型 ($5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- $\beta 1$) 组和 ADSCs-Exos (12.5 、 25.0 、 $50.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组。接种 12Z 细胞 6 h 待细胞完全贴壁后,先饥饿培养细胞 6 h,除对照组以外,其余各组以 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- $\beta 1$ 因子诱导细胞纤维化模型,外泌体组则再加不同浓度的 ADSCs-Exos 干预。待干预 24 h 后,收集细胞用于进一步分析。

分析 ADSCs-Exos 对 12Z 细胞纤维化相关因子 *CTGF*、*COL1A1*、 α -SMA mRNA 水平的影响。收集 12Z 细胞,依据试剂盒说明书提取细胞总的 RNA,检测 RNA 浓度后,首先将其逆转录为 cDNA 然后进行 qRT-PCR 检测。qRT-PCR 扩增循环方案如下: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 40 个循环。表 1 所示的引物序列由北京擎科生物科技股份有限公司(北京,中国)设计。基于参考基因 GAPDH 的水平标准化靶 mRNA 表达水平,随后使

用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析,评价各组 *CTGF*、*COL1A1*、 α -SMA 的水平差异。

2.7 统计分析

实验所得的数据均为计量资料,使用 GraphPad Prism 9 统计分析软件进行统计分析并作图,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计学处理。

3 结果

3.1 ADSCs 和 12Z 细胞培养

ADSCs 细胞呈长梭形,细胞质透明,细胞轮廓清晰;间充质干细胞的重要标志物 CD90 呈阳性表达。结果见图 1。

3.2 ADSCs-Exos 的鉴定

ADSCs-Exos 从 ADSCs 上清液中成功提取,并进行鉴定。如图 2 所示,在透射电镜下,外泌体呈现圆形颗粒,清晰可见。NTA 分析结果表明,总萃取物的平均粒径为 122.6 nm,符合外泌体的特征,浓度

表 1 各基因引物序列
Table 1 Primer sequences of each gene

基因	引物序列(5'→3')		产物长度/bp
<i>CTGF</i>	Forward:	GTTTGGCCCAGACCCAACTA	143
	Reverse:	GGCTCTGCTTCTCTAGCCTG	
<i>COL1A1</i>	Forward:	GAGGGCCAAGACGAAGACATC	140
	Reverse:	CAGATCACGTCATCGCACAAAC	
α -SMA	Forward:	GGCATTACGAGACCACCTAC	84
	Reverse:	CGACATGACGTTGTTGGCATAAC	
<i>GAPDH</i>	Forward:	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	158
	Reverse:	AAATGAGCCCCAGCCTTCTC	

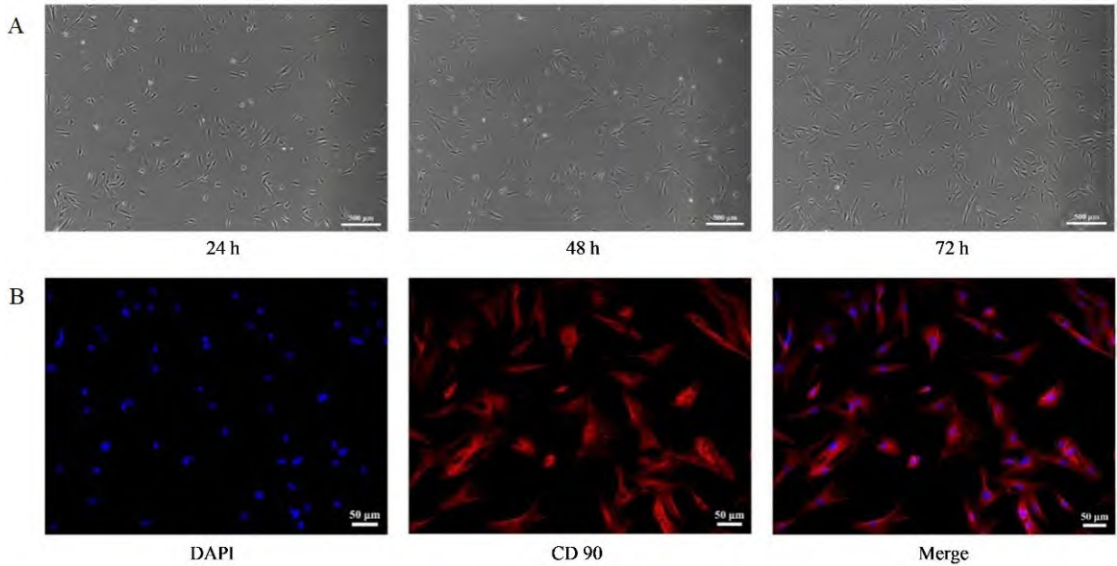


图 1 ADSCs 细胞大体形态(A, $\times 40$)及鉴定结果(B, $\times 200$)
Fig. 1 ADSCs cell morphology (A, $\times 40$) and identification results (B, $\times 200$)

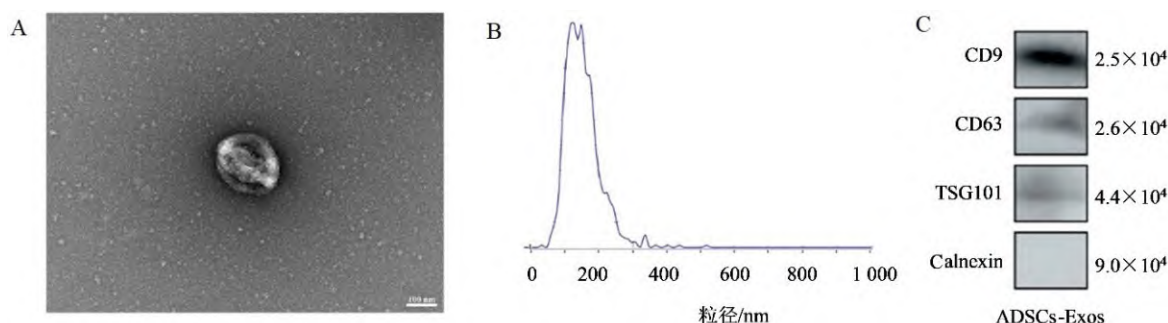


图2 ADSCs-Exos透射电镜(A)、NTA(B)、Western blotting(C)鉴定结果

Fig. 2 Identification results of ADSCs-Exos using transmission electron microscopy (A), NTA (B), and Western blotting (C)

为 1.8×10^6 颗粒 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过 Western blotting 检测外泌体特异性表面标志物,观察到 CD9、CD63 和 TSG101 在 ADSCs-Exos 均有表达,且 Calnexin 蛋白未表达,表明成功提取到 ADSCs 衍生的外泌体。

3.3 外泌体荧光标记实验检测细胞摄取外泌体的情况

红色 PKH26 染料标记外泌体,蓝色 DAPI 染料标记 12Z 细胞的细胞核,2者共孵育 4、8 h 后,共聚焦显微镜下观察到外泌体可以被 12Z 细胞吞噬内化,外泌体主要富集在细胞核周围,而且共孵育 4 h 时即可观察到镜下几乎所有细胞都将外泌体吞噬内化,见图 3。

3.4 CCK-8 检测 12Z 细胞活性

与对照组相比,采用 12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ADSCs-Exos 干预 12Z 细胞 24 h 后细胞相对存活率均降低,其中中剂量组差异显著 ($P < 0.01$)。见图 4。

3.5 qRT-PCR 检测纤维化相关因子 CTGF、COL1A1、 α -SMA mRNA 的表达水平

与对照组相比,模型组的 CTGF、COL1A1、 α -SMA mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,12.5、25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ADSCs-Exos 组 CTGF、COL1A1、 α -SMA mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001),50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ADSCs-Exos 组 α -SMA mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。结果见图 5。

4 讨论

EMs 虽然是一种良性疾病,但它表现出类似恶性肿瘤的生物学特征^[11]。EMs 的过度纤维化不仅会导致痛经、性交困难和慢性盆腔疼痛,而且还会影响输卵管的功能,减少卵泡储备,导致 EMs 患者不孕^[4],严重影响患者的生活质量。有研究表明^[12],纤维化是机体面临损伤时的一种自我保护反应,导致细胞外基质沉积。EMs 异位病灶纤维化是一种异常增殖性的疾病,随着异位囊肿内周期性出血而

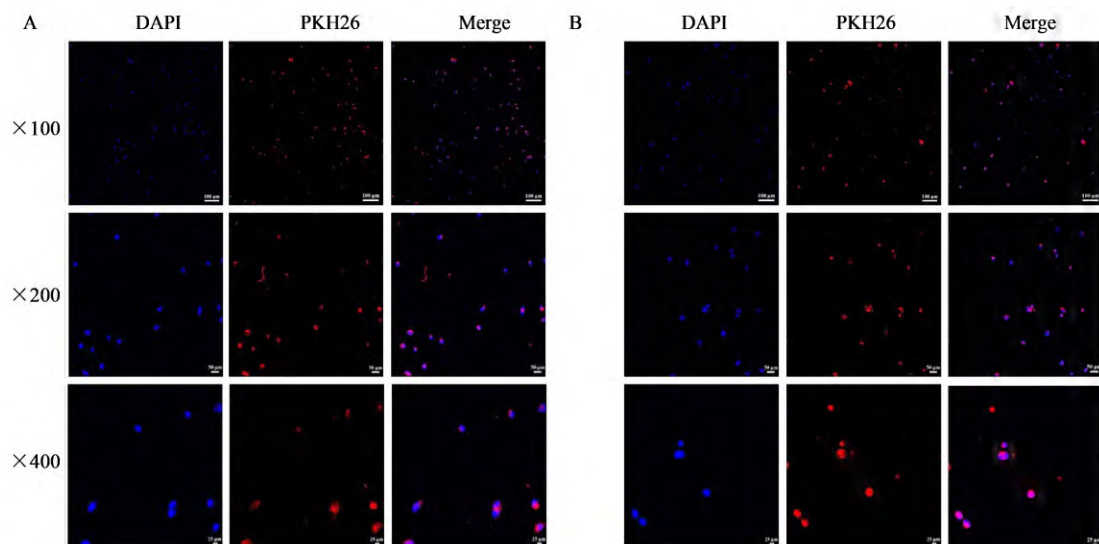
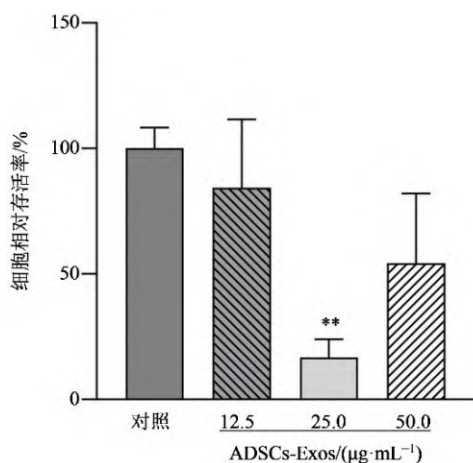
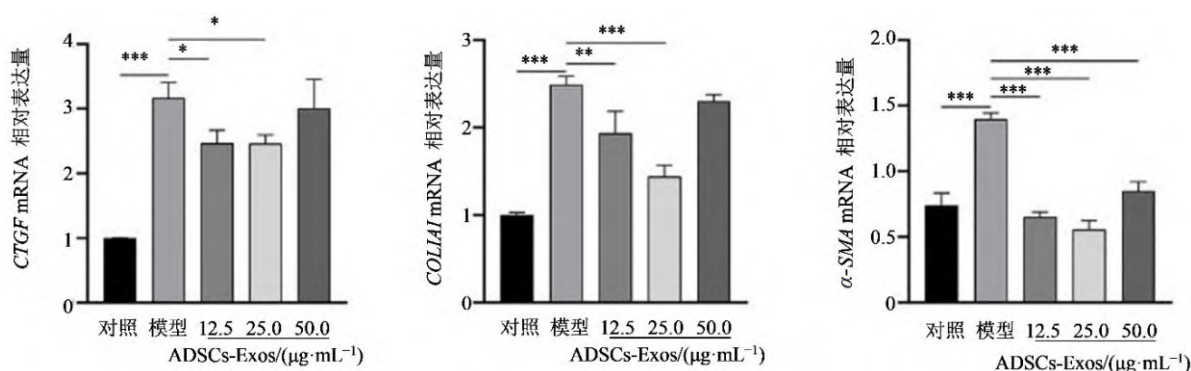


图3 激光共聚焦显微镜下观察共孵育 4(A)、8(B) h 后 12Z 细胞对 ADSCs-Exos 的摄取

Fig. 3 ADSCs-Exos uptake by 12Z cell under laser confocal microscopy after co-incubation for 4 (A) and 8 (B) h

与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。** $P < 0.01$ vs control group图4 CCK-8检测培养24 h后12Z细胞存活率($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Survival rate of 12Z cells after 24 h culture was measured by CCK-8($\bar{x} \pm s, n=3$)* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。图5 ADSCs-Exos对12Z细胞纤维化相关因子mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 5 Effect of ADSCs-Exos on mRNA expression of 12Z fibrosis-related factors($\bar{x} \pm s, n=3$)

CTGF是TGF- β 的下游分子,研究显示CTGF是EMs异位病灶组织中的关键纤维化标志物,可能影响上皮间质转化(EMT)的基质成纤维细胞表型转变为肌成纤维细胞样表型^[20-21]。COL1A1与EMs纤维化密切相关,可能是其治疗的良好靶点^[22]。 α -SMA是一种在子宫内膜异位病灶组织中高度过表达的促纤维化标志物^[23]。 α -SMA表达升高标志着成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化,这是纤维化的关键过程^[24-25]。在患侧卵巢中可发现皮质纤维化生成并伴随皮质特异性基质的丧失^[26],另外EMs深部结节的主要成分不是子宫内膜组织,而是纤维肌组织^[27]。所以,纤维化是EMs疾病发生发展中的重要环节,寻找到特定而有效的治疗靶点,抑制纤维化形成可能是作为EMs治疗的一种潜在目标和新

导致囊腔内压力增大,囊壁发生反复的破裂,囊内容物流出刺激邻近的组织,继而发生局部性的炎症反应和纤维化形成。EMs异位病灶的组织病理学特征除内膜腺体和间质细胞外,其主要构成是大量的纤维化组织^[13]。纤维化造成不同程度的盆腔黏连形成,而盆腔黏连可能是导致EMs引发疼痛和不孕的主要原因,而且纤维化所导致的盆腔黏连还增加了手术的困难。TGF- β 1作为致纤维化关键因子,可促进细胞外基质(ECM)的生成和纤维母细胞的增殖^[14]。TGF- β 1可以增强子宫内膜细胞的增殖活力,促进子宫内膜异位病变的发展,在异位病灶中显示出活性增加^[15],与病变相邻的腹膜较远端部位存在高表达^[16],并在EMs患者的腹膜液、血清中的水平升高^[17-18]。TGF- β 1可以激活Smad信号通路破坏细胞外基质,促进卵巢EMs异位病灶周围组织的纤维化^[19]。TGF- β 1通过CTGF介导纤维化过程,

视角^[28]。

ADSCs已被认为在缓解纤维化疾病进展方面发挥着重要作用^[29]。外泌体由细胞分泌到细胞外环境中,具有稳定性高、无免疫排斥、归巢效应强、易于控制剂量和浓度等优点,与ADSCs相比,ADSCs-Exos可能是一种更有前途的治疗方法^[30-31]。Zhang等^[5]研究发现人ADSCs-Exos能够内化并整合到肝星状细胞中并抑制其增殖,可有效抑制肝硬化模型小鼠胶原沉积和EMT过程,该作用可能和调控磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)/雷帕霉素(PI3K/AKT/mTOR)信号通路有关。ADSCs-Exos被认为是一种治疗肝损伤的新策略,有望成为改善肝纤维化的无细胞疗法^[32]。此外,ADSCs-Exos可以通过调控心脏成纤维细胞自噬和Nod样

受体蛋白3(NLRP3)炎症小体的平衡,抑制不良心血管重塑^[33]。同时有研究表明,ADSCs-Exos可以通过调控TGF- β /Smad相关信号通路及Wnt/ β -catenin信号通路进而起到治疗特发性肺纤维化的作用^[9]。此外,miRNA-19a在ADSCs-Exos明显富集,miR-19a可通过抑制肿瘤抑制因子同源结构域相互作用蛋白激酶-2(HIPK2)的表达从而抑制角膜细胞分化为成肌纤维细胞,研究结果表明其在角膜纤维化治疗中的潜在用途^[34]。在皮肤纤维化疾病研究方面发现,ADSCs-Exos可通过抑制TGF- β 1/Smad通路的表达,从而防止瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖和迁移^[35]。Li等^[36]研究显示ADSCs-Exos可促进伤口愈合,并缓解胶原蛋白沉积和成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化,通过miR-192-5p/IL-17RA/Smad轴抑制肥厚性疤痕纤维化形成。而有研究表明,ADSCs-Exos可被成纤维细胞吸收和内化,以剂量相关的方式刺激细胞迁移、增殖和胶原合成,增加N-钙黏蛋白(N-cadherin)、I、III型胶原的基因表达,表明外泌体促进早期伤口的愈合,而在晚期外泌体可能会抑制胶原蛋白的合成,说明ADSCs-Exos在不同阶段发挥作用不同^[37]。另外,ADSCs-Exos在组织修复损伤中也发挥重要作用,Shao等^[38]研究表明ADSCs-Exos中的lncRNA-MIAT可以通过靶向miR-150来缓解子宫内膜纤维化,经ADSCs-Exos干预治疗后可降低纤维化标志物 α -SMA和TGF- β 受体1的表达从而抑制内膜纤维化。以上研究结果均显示ADSCs-Exos在纤维化相关疾病中发挥着重要作用,而且有望成为治疗该类疾病的潜在方法。

Meligy等^[39]采用ADSCs ip干预EMs模型大鼠,发现其可以降低异位症病变的大小,减少CD68阳性巨噬细胞和促炎细胞因子的表达,有效缓解EMs相关的慢性炎症反应。Hirakawa等^[40]将ADSCs iv干预EMs模型小鼠后,在子宫内膜异位病变中可被检测到,并且干预后还可降低异位病灶组织中促炎和促纤维细胞因子白细胞介素6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和TGF- β 1等的表达,同时还伴随着异位病变的减小。Huang等^[41]采用ADSCs条件培养基通过ip干预EMs模型小鼠,发现其可抑制异位病灶生长,并可改善小鼠子宫内膜容受性和妊娠结果。然而,目前关于ADSCs-Exos在EMs中的作用尚不清楚。本实验通过超高速梯度离心法从ADSCs培养上清中提取到外泌体,并通过透射电镜、NTA以及Western blotting鉴定特异性标志蛋白3种方法对提取到的外泌体进行鉴定。外泌

体通过被细胞吞噬内化,在不同类型的细胞之间充当“沟通者”,所以实验首先采用外泌体荧光标记法检测人EMs细胞12Z对外泌体的摄取情况,在共孵育4 h时即可观察到12Z细胞对外泌体成功进行了吞噬内化。然后,为了初步探究ADSCs-Exos对12Z细胞纤维化因子表达的影响,本实验采用TGF- β 1干预12Z细胞构建模型,以不同梯度浓度的外泌体进行干预,通过qRT-PCR检测纤维化相关因子CTGF、COL1A1、 α -SMA mRNA的表达水平,实验结果发现ADSCs-Exos干预后可以降低12Z细胞纤维化相关因子基因的表达水平。

本研究的结果表明了12Z细胞可以对ADSCs-Exos进行吞噬内化,而ADSCs-Exos进一步可抑制12Z细胞的增殖,并且降低细胞纤维化相关因子基因的表达水平。但是,外泌体发挥作用的具体机制还不清楚,外泌体包含的内容多种多样,起作用的分子也没有明确,这些方面还需充分阐明。本实验只是在体外细胞模型中做了初步的探究,还未在动物模型上开展干预治疗和作用机制探讨。另外,外泌体本身或作为药物有效载荷的载体,正在作为治疗剂进行积极探索^[6],这些方面都有望在后续对于EMs的研究实验中逐步探讨。所以,ADSCs-Exos在EMs中的干预机制还需要广泛和深入的研究来阐明。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症的诊治指南[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(3): 161-169.
Endometriosis Collaboration Group of the Obstetrics and Gynecology Branch of the Chinese Medical Association. Guidelines for diagnosis and treatment of endometriosis [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2015, 50(3): 161-169.
- [2] 子宫内膜异位症疼痛管理指南(2024年实践版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2024, 40(1): 50-61.
Guidelines for Pain Management of Endometriosis (2024 Practice Edition) [J]. Chin J Pract Gynecol Obst, 2024, 40 (1): 50-61
- [3] Monsivais D, Liao Z A, Tang S N, et al. Impaired bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathways disrupt decidualization in endometriosis [J]. Res Sq, 2023: rs.3. rs-rs.3471243.
- [4] Garcia Garcia J M, Vannuzzi V, Donati C, et al. Endometriosis: Cellular and molecular mechanisms leading to fibrosis [J]. Reprod Sci, 2023, 30(5): 1453-

- 1461.
- [5] 王安琪, 孙佳凡, 徐炜, 等. 子宫内膜异位症纤维化相关细胞及其活化机制研究进展 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2022, 42(11): 1637-1642.
Wang A Q, Sun J F, Xu W, et al. Research progress of fibrosis-related cells and their activation mechanism in endometriosis [J]. J Nanjing Med Univ Nat Sci, 2022, 42(11): 1637-1642.
 - [6] Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.
 - [7] Zhang Z L, Shang J, Yang Q Y, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells ameliorate hepatic fibrosis by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway and remodeling choline metabolism [J]. J Nanobiotechnol, 2023, 21(1): 29.
 - [8] Liu Y X, Sun J M, Ho C K, et al. Advancements in adipose-derived stem cell therapy for skin fibrosis [J]. World J Stem Cells, 2023, 15(5): 342-353.
 - [9] 汪望佳, 王敏, 李翊翊, 等. 脂肪源性干细胞来源分泌体在特发性肺纤维化中作用机制的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(8): 1514-1519.
Wang W J, Wang M, Li C C, et al. Role of ADSCs-derived exosomes in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Chin J Pathophysiol, 2022, 38(8): 1514-1519.
 - [10] Feng Y, Hu J P, Liu F, et al. Collagen triple *Helix* repeat containing 1 deficiency protects against airway remodeling and inflammation in asthma models *in vivo* and *in vitro* [J]. Inflammation, 2023, 46(3): 925-940.
 - [11] Chen B Q, Zhao L P, Yang R L, et al. New insights about endometriosis-associated ovarian cancer: Pathogenesis, risk factors, prediction and diagnosis and treatment [J]. Front Oncol, 2024, 14: 1329133.
 - [12] Yang G M, Deng Y P, Cao G M, et al. Galectin-3 promotes fibrosis in ovarian endometriosis [J]. PeerJ, 2024, 12: e16922.
 - [13] Muzii L, Bianchi A, Bellati F, et al. Histologic analysis of endometriomas: What the surgeon needs to know [J]. Fertil Steril, 2007, 87(2): 362-366.
 - [14] Zubrzycka A, Migdalska-Sęk M, Jędrzejczyk S, et al. The expression of *TGF-β1*, *SMAD3*, *ILK* and miRNA-21 in the ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2453.
 - [15] Jianu E M, Pop R M, Gherman L M, et al. The effect of *Rubus idaeus* polyphenols extract in induced endometriosis in rats [J]. Molecules, 2024, 29(4): 778.
 - [16] Young V J, Brown J K, Saunders P T, et al. The peritoneum is both a source and target of TGF-β in women with endometriosis [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e106773.
 - [17] Pizzo A, Salmeri F M, Ardita F V, et al. Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis [J]. Gynecol Obstet Invest, 2002, 54(2): 82-87.
 - [18] Janša V, Pušić Novak M, Ban Frangež H, et al. TGFBI as a candidate biomarker for non-invasive diagnosis of early-stage endometriosis [J]. Hum Reprod, 2023, 38(7): 1284-1296.
 - [19] Wen Y, Pang L L, Fan L X, et al. β-sitosterol inhibits the proliferation of endometrial cells via regulating Smad7-mediated TGF-β/smads signaling pathway [J]. Cell J, 2023, 25(8): 554-563.
 - [20] Chen L, Chen R J, Kemper S, et al. Suppression of fibrogenic signaling in hepatic stellate cells by Twist1-dependent microRNA-214 expression: Role of exosomes in horizontal transfer of Twist1 [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 309(6): G491-G499.
 - [21] Yang Y T, Jiang X Y, Xu H L, et al. Autoimmune disease-related hub genes are potential biomarkers and associated with immune microenvironment in endometriosis [J]. Int J Gen Med, 2023, 16: 2897-2921.
 - [22] Yoshino O, Ono Y, Honda M, et al. Relaxin-2 may suppress endometriosis by reducing fibrosis, scar formation, and inflammation [J]. Biomedicines, 2020, 8(11): 467.
 - [23] Kula, Ilgen O, Kurt S, et al. Patterns of proliferation and fibrosis in a rat model of endometriosis following administration of *Allium cepa* [J]. Clin Exp Reprod Med, 2024, 51(2): 112-119.
 - [24] Duan J, Liu X S, Wang H L, et al. The M2a macrophage subset may be critically involved in the fibrogenesis of endometriosis in mice [J]. Reprod Biomed Online, 2018, 37(3): 254-268.
 - [25] Malmström J, Lindberg H, Lindberg C, et al. Transforming growth factor-beta 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus [J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3(5): 466-477.
 - [26] Kitajima M, Defrère S, Dolmans M M, et al. Endometriomas as a possible cause of reduced ovarian reserve in women with endometriosis [J]. Fertil Steril, 2011, 96(3): 685-691.
 - [27] Yela D A, Silva M S S, Eloy L, et al. Correlation between anatomopathological aspects and pelvic pain in women with deep infiltrating endometriosis [J]. Rev Bras Ginecol Obstet, 2023, 45(12): e770-e774.
 - [28] Vigano P, Candiani M, Monno A, et al. Time to redefine endometriosis including its pro-fibrotic nature [J]. Hum Reprod, 2018, 33(3): 347-352.

- [29] 王扶凝, 代会博, 唐蕾, 等. 脂肪间充质干细胞在纤维化疾病治疗中的作用 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2024, 44(3): 429-434.
- Wang F N, Dai H B, Tang L, et al. The role of adipose-derived stem cells in the treatment of fibrotic diseases [J]. J Nanjing Med Univ Nat Sci, 2024, 44(3): 429-434.
- [30] Stoorvogel W, Kleijmeer M J, Geuze H J, et al. The biogenesis and functions of exosomes [J]. Traffic, 2002, 3 (5): 321-330.
- [31] Baglio S R, Pegtel D M, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy [J]. Front Physiol, 2012, 3: 359.
- [32] Wu B T, Feng J X, Guo J Y, et al. ADSCs-derived exosomes ameliorate hepatic fibrosis by suppressing stellate cell activation and remodeling hepatocellular glutamine synthetase-mediated glutamine and ammonia homeostasis [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 494.
- [33] 王建军, 李晶, 马旭明, 等. 脂肪间充质干细胞分泌体通过调控心脏成纤维细胞自噬和NLRP3炎症小体平衡抑制心肌梗死后不良心室重塑 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(8): 654-662.
- Wang J J, Li J, Ma X M, et al. Adipose derived mesenchymal stem cell exosomes inhibit adverse ventricular remodeling after myocardial infarction by regulating autophagy of cardiac fibroblasts and NLRP3 inflammasome balance [J]. Chin J Atheros, 2024, 32(8): 654-662.
- [34] Shen T, Zheng Q Q, Luo H B, et al. Exosomal miR-19a from adipose-derived stem cells suppresses differentiation of corneal keratocytes into myofibroblasts [J]. Aging, 2020, 12(5): 4093-4110.
- [35] Wu Z Y, Zhang H J, Zhou Z H, et al. The effect of inhibiting exosomes derived from adipose-derived stem cells via the TGF- β 1/Smad pathway on the fibrosis of keloid fibroblasts [J]. Gland Surg, 2021, 10(3): 1046-1056.
- [36] Li Y, Zhang J, Shi J H, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells attenuate hypertrophic scar fibrosis by miR-192-5p/IL-17RA/Smad axis [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 221.
- [37] Hu L, Wang J, Zhou X, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts [J]. Sci Rep, 2016, 6: 32993.
- [38] Shao X W, Qin J L, Wan C D, et al. ADSC exosomes mediate lncRNA-MIAT alleviation of endometrial fibrosis by regulating miR-150-5p [J]. Front Genet, 2021, 12: 679643.
- [39] Meligy F Y, Elgamal D A, Abdelzاهر L A, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reduce endometriosis cellular proliferation through their anti-inflammatory effects [J]. Clin Exp Reprod Med, 2021, 48 (4): 322-336.
- [40] Hirakawa T, Yotsumoto F, Shirasu N, et al. Trophic and immunomodulatory effects of adipose tissue derived stem cells in a preclinical murine model of endometriosis [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 8031.
- [41] Huang S J, Huang C Y, Huang Y H, et al. A novel therapeutic approach for endometriosis using adipose-derived stem cell-derived conditioned medium- A new hope for endometriotic patients in improving fertility [J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1158527.

[责任编辑 兰新新]