

机械损伤构建大鼠宫腔粘连模型效果分析

严子璇¹, 艾 璞², 陈明庆¹, 闫雪兰², 刘 嘉²

(1. 昆明理工大学医学院, 云南 昆明 650032;

2. 云南省第一人民医院/昆明理工大学附属医院妇产科, 云南 昆明 650032)

摘要:目的 通过分析机械损伤构建大鼠宫腔粘连模型的效果, 为进一步揭示宫腔粘连的发病机制及临床治疗提供依据。**方法** 采用机械刮宫法, 将麻醉后的未受孕雌性 SD 大鼠一侧子宫刮宫, 对侧切开暴露内膜进行自身对照, 构建大鼠宫腔粘连模型。在建模后的不同时间点取大鼠子宫标本, 对标本进行大体比较, 常规固定后 HE 染色、Masson 染色观察组织形态, 并用 Western Blot 技术检测大鼠子宫刮宫段 TGF- β_1 的表达水平, 判定不同时间点大鼠宫腔粘连模型效果。**结果** 与对照组相比, 刮宫组子宫直径明显增粗, 宫腔表面可见环形狭窄, 宫腔局部或整体粘连阻塞; 刮宫组子宫内膜厚度薄于对照组、子宫内膜腺体数量少于对照组、子宫内膜纤维化面积比率高于对照组 ($P < 0.05$); 建模后宫腔粘连在第 3 天到达高峰, 第 5 天后开始修复; 刮宫后第 3 天, TGF- β_1 表达水平提高, 宫腔粘连程度最为明显。**结论** 大鼠宫腔粘连模型可以通过机械刮宫构建, 模型建立后子宫内膜变薄、子宫内膜腺体数量减少、子宫内膜纤维化面积增加, 与人类宫腔粘连病理情况相似, 且建模后第 3 天, 受损子宫 TGF- β_1 的表达量最高, 大鼠子宫宫腔粘连程度最为严重。

关键词: 宫腔粘连; 机械刮宫; 动物模型; 子宫内膜形态

中图分类号: R711

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2023.02.012

文章编号: 1006-1959(2023)02-0061-04

Effect Analysis of Rat Intrauterine Adhesion Model Constructed by Mechanical Injury

YAN Zi-xuan¹, AI Ying², CHEN Ming-qing¹, YAN Xue-lan², LIU Jia²

(1. School of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032, Yunnan, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, the First People's Hospital of Yunnan Province/the Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032, Yunnan, China)

Abstract: **Objective** To analyze the effect of mechanical injury on the construction of rat model of intrauterine adhesions, and to provide a basis for further revealing the pathogenesis and clinical treatment of intrauterine adhesions. **Methods** The mechanical curettage method was used to curettage one side of the uterus of unpregnant female SD rats after anesthesia, and the opposite side was cut to expose the endometrium for self-control to construct a rat intrauterine adhesion model. The uterine specimens of rats were taken at different time points after modeling, and the specimens were compared generally. After routine fixation, HE staining and Masson staining were used to observe the tissue morphology, and the expression level of TGF- β_1 in the uterine curettage section of rats was detected by Western Blot technique to determine the effect of rat intrauterine adhesion model at different time points. **Results** Compared with the control group, the uterine diameter of the curettage group was significantly thicker, the surface of the uterine cavity was seen as annular stenosis, and the local or overall adhesion of the uterine cavity was blocked. The endometrial thickness of the curettage group was thinner than that of the control group, the number of endometrial glands was less than that of the control group, and the ratio of endometrial fibrosis area was higher than that of the control group ($P < 0.05$). After modeling, intrauterine adhesions reached a peak on the third day and began to repair after the fifth day. On the third day after curettage, the expression level of TGF- β_1 increased, and the degree of intrauterine adhesion was the most obvious. **Conclusion** The rat model of intrauterine adhesions can be constructed by mechanical curettage. After the model is established, the endometrium becomes thinner, the number of endometrial glands decreases, and the area of endometrial fibrosis increases, which is similar to the pathological condition of human intrauterine adhesions. On the third day after modeling, the expression of TGF- β_1 in the damaged uterus is the highest, and the degree of intrauterine adhesions in rats is the most serious.

Key words: Intrauterine adhesion; Mechanical curettage; Animal model; Endometrial pathologic changes

基金项目: 云南省卫生科技计划项目(编号: 2014NS233、2016NS193、2017NS214、202101AY07001-261、2022YJZX-FC12)

作者简介: 严子璇(1996.5-), 女, 湖南岳阳人, 硕士研究生, 主要从事妇科微创研究

通讯作者: 艾璞(1974.7-), 女, 云南昆明人, 博士, 主任医师, 主要从事不孕症、妇科微创研究

宫腔粘连也称子宫内粘连 (intrauterine adhesions, IUA), 是一种主要由于宫腔内操作, 如人工流产、诊断性刮宫术、宫腔镜下息肉摘除及肌瘤剔除、手取胎盘等, 导致子宫内膜受损后纤维化及异常修复、子宫壁粘连、宫腔容积缩小的常见妇科疾病^[1,2]。该疾病以月经量减少或闭经、下腹痛、不孕、习惯性流产及早产、胎盘位置异常等产科并发症为主要临床表现^[3,4]。近年来, 由于人工流产和宫腔镜手术等宫腔操作的增多, 加重子宫内膜损伤及子宫内膜感染, 使 IUA 患病率逐渐提高^[5], 已成为一种常见的妇科疾病。尽管我国制定了适合国情的分类体系, 临床医生可根据评分标准及临床经验采取不同的治疗方法, 但 IUA 的治愈率仍低下, 治疗后复发率高, 对患者的生育功能、生殖健康及生活质量产生了严重影响^[6]。目前对于 IUA 发病机制、病程进展及临床防治仍然需要进一步探索。合适的动物模型能为研究 IUA 发病机制及预防、治疗策略提供助力。而由于 IUA 的形成机制尚不明确, 建模方法也尚未统一, 造模后也没有固定的评价标准, 因此探索稳定的 IUA 动物模型构建方法及合适的建模时间十分有必要。本研究旨在探索机械损伤构建大鼠宫腔粘连模型的效果与评价, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雌性未受孕 8 周龄 SD 大鼠 20 只, 体重 280 g 左右, 购自成都达硕实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK(川)2014-028。室温 (23±2)℃, 湿度 45%~55% 条件下饲养, 每日光照时间 12 h, 自由摄水进食, 适应性饲养 1 周。该研究符合动物福利和伦理原则、符合国家关于实验动物福利伦理相关规定。

1.2 建模方法 通过阴道涂片方法区分不同动情周期大鼠, 取动情后期或间期的雌性未受孕 SD 大鼠。采用异氟烷麻醉机进行麻醉, 5% 异氟烷诱导麻醉, 2% 异氟烷术中持续麻醉。手术过程严格无菌操作。大鼠腹部备皮, 碘伏消毒, 于阴道口上 3~4 cm 处在皮肤正中线上作 2~3 cm 的纵形切口, 暴露肌肉, 于肌肉腹白线作 2~3 cm 的纵形切口, 暴露腹腔; 用缠有胶带的镊子将右侧子宫牵拉出腹腔, 于卵巢下 0.5 cm 处剪口, 置入微型刮宫器, 刮出内膜组织后缝合宫体, 卵巢端结扎 (刮宫组)。左侧子宫同法牵拉出腹腔后剪口暴露内膜, 不做刮宫操作, 卵巢端结扎, 最后将双侧子宫恢复至正常位置, 可吸收缝合线

缝合切口, 缝合处滴庆大霉素 0.2 ml (2 ml:80 万单位) (对照组)。术后第 2 天, 肌肉注射 10 倍稀释后的庆大霉素 0.2 ml (2 ml:80 万单位), 连续给药 3 d。

1.3 评估标准与方法

1.3.1 机械损伤法建模效果的评估 10 只大鼠通过上述方法建模, 10 只对照组大鼠仅切开暴露内膜, 未进行刮宫操作, 两组通过大体标本观察宫腔形态; 常规固定后 HE 染色、Masson 染色并观察组织形态; HE 染色下于低倍镜下 (×5) 测量子宫内膜厚度, 每组随机选取 3 张切片, 每张切片从不同角度测量 5 次, 取平均值作为结果; 低倍镜下 (×20) 计数子宫内膜腺体数目, 每张切片随机选取 5 个视野作为结果, 取平均值作为结果; Masson 染色下与高倍镜下 (×200) 计算子宫内膜纤维化面积比率 (子宫内间质纤维化面积除以子宫内膜间质及腺体总面积), 每组随机选取 3 张切片, 每张切片随机选取 5 个视野, 取平均值作为结果。

1.3.2 IUA 建模后不同时间宫腔粘连情况 于构建大鼠宫腔粘连模型后第 3、5、7、9 天各处死 2 只大鼠, 观察造模后宫腔形态, 收集子宫受损端组织, 提取蛋白用于 Western Blot 检测 TGF-β₁ 的表达。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后标本的外观比较 对照组大鼠宫腔表面光滑呈粉红, 刮宫组大鼠子宫直径与对照组相比明显增粗, 宫腔表面可见环形狭窄, 宫腔失去正常形态, 局部或整体粘连阻塞, 部分子宫远端可见积水样改变, 子宫内膜与对照组相比苍白, 并有类似纤维化样的改变。

2.2 造模后标本的组织学比较 正常大鼠子宫宫腔形态规则, 分为内膜层、肌层、浆膜层 3 层, 内膜层衬于宫腔表面, 由单层柱状上皮覆盖, 间质内可见腺体排列, 组织间可见血管和成纤维细胞, 巨噬细胞和浆细胞散布其中。从子宫组织学差异分析, 对照组肌层完整, 内膜丰厚, 腺体丰富; 刮宫组宫腔粘连侧子宫可见宫腔狭窄甚至闭塞, 子宫内膜变薄甚至消失, 间质内炎症细胞浸润, 可见大量胶原纤维混乱排列, 腺体减少甚至消失。若刮宫组子宫损伤过度, 可见子宫失去正常结构, 内膜及肌层彻底坏死。两组子宫 HE 染色结果见图 1、图 2。

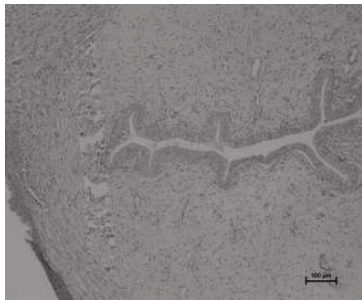


图 1 对照组子宫 HE 染色(×10)

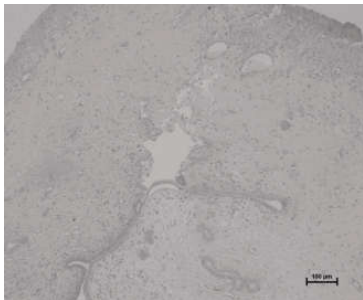


图 2 刮宫组子宫 HE 染色(×10)

2.3 两组子宫内膜指标比较 刮宫组子宫内膜厚度薄于对照组、子宫内膜腺体数量少于对照组、子宫内膜纤维化面积比率高于对照组($P<0.05$),见表 1。

2.4 IUA 建模后不同时间宫腔粘连情况分析 子宫建模部位在第 3 天宫腔粘连程度最高,可见组织充血,宫腔中、重度水肿粘连,第 5 天宫腔轻度水肿粘

连,第 7、9 天宫腔粘连、水肿程度逐渐减轻,即建模后宫腔粘连在第 3 天到达高峰,第 5 天后开始修复。

2.5 刮宫后不同时间点受损子宫 TGF- β_1 的表达 Western Blot 检测结果显示,与其他时间点相比,刮宫后第 3 天受损子宫 TGF- β_1 的表达量最高,见图 3。

表 1 两组子宫内膜指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	子宫内膜厚度(μm)	子宫内膜腺体数量(个)	子宫内膜纤维化面积比率(%)
对照组	10	508.27±130.75	12.13±2.61	0.25±0.04
刮宫组	10	300.75±184.32	6.91±1.71	0.53±0.05
<i>t</i>		2.904	5.290	-13.828
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

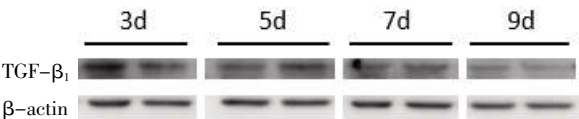


图 3 刮宫后不同时间点受损子宫 TGF- β_1 的表达

3 讨论

目前研究者主要采用大鼠、小鼠、小型犬、新西兰兔以及部分灵长类动物构建宫腔粘连模型。其中,灵长类动物(如恒河猴、狒狒等)虽然在月经周期、生殖解剖生理及基因序列上与人类相似,但由于其成本高、操作复杂,难以广泛使用^[7]。相对而言,大鼠、小鼠以及兔、小型犬等物种遗传背景清晰、成本低、实验操作简单可控,成为研究者构建宫腔粘连模型,研究子宫损伤修复的理想动物。大鼠具有实验操作简便、结果直观迅速、饲养和实验成本低廉等众多优势,且大鼠繁殖力强、妊娠周期短,可大大缩短实验周期,另其双角子宫可构建自身对照,降低实验偏倚。因此,本研究选择以大鼠构建宫腔粘连动物模型。此外,本研究以机械损伤(刮宫法)为建模方法,构建大鼠宫腔粘连模型,因动物来源易于获取、操作

过程便于控制等优点,且该模型的发病机制、子宫内膜形态、组织学改变均类似于人类宫腔粘连,可为研究 IUA 的发病机理、预防、治疗等提供基础。

对于宫腔粘连模型的构建方法,目前主要包括物理性损伤(冷冻损伤、热损伤、宫腔放置铜线或合成纤维细胞的聚乙烯海绵等)、化学性损伤(25%甲醛、2%福尔马林乙醇溶液、硫酸铜无水片剂、苯酚胶浆、氟化物和乙醇等)、机械性损伤(利用手术器械,刮除子宫内膜)、双重病理损伤模型(机械和降低雌激素联合法、机械和感染双重损伤法、双重机械损伤法等)、多重损伤法等^[8,9]。对于不同的建模方法,有研究认为^[10],单一处理方法损伤的子宫内膜容易恢复,无法构建长期有效的宫腔粘连模型,且与人类 IUA 多因素影响的形成机制不符,故多采用双重或多重损伤方法。但临床多数宫腔粘连继发于子宫创伤,刮宫术是常见的损伤因素,对于不完全流产、胎盘残留而反复刮宫者更易发生宫腔粘连,其中 25%见于产后 1~4 周的刮宫术,且其手术次数与 IUA 发生呈正比^[11]。此外,刮宫术等宫腔操作后导致的子宫内膜纤维化、炎症反应、细胞外基质过度沉积等一系列病理

生理变化是人类宫腔粘连发生的主要病因,故本研究采用单一机械损伤法构建大鼠宫腔粘连模型,并探讨单一机械损伤对于构建大鼠宫腔模型的效果。

目前评判是否成功建造宫腔粘连动物模型没有统一的标准,认为可以通过内膜厚度、子宫内腺体纤维面积比率及腺体数目的变化评价造模效果^[12]。本研究结果显示,子宫建模部位在第3天宫腔粘连程度最高,可见组织充血,宫腔中、重度水肿粘连,第5天宫腔轻度水肿粘连,第7、9天宫腔粘连、水肿程度逐渐减轻,即建模后宫腔粘连在第3天到达高峰,第5天后开始修复;刮宫组子宫内腺体厚度薄于对照组、子宫内腺体数量少于对照组、子宫内腺体纤维化面积比率高于对照组($P<0.05$),提示构建的大鼠宫腔粘连模型其子宫内腺体变薄、子宫内腺体数量减少、子宫内腺体纤维化面积比率增高,验证了造模的成功。另外,创伤后的子宫内腺体在修复过程中可发生炎症期、组织形成期、组织重建期3个病理生理变化时期,由大量的细胞、细胞因子及细胞外基质共同参与。成纤维细胞被激活并大量增殖,引起细胞外基质合成降解失衡、沉积增多,从而引起纤维组织形成^[13]。TGF- β 是一类多功能的细胞因子,在成纤维细胞合成细胞外基质,进而导致胶原沉积,并在纤维组织形成的过程中起促进作用,被认为是参与纤维化形成的主要细胞因子^[14]。本研究通过分析宫腔镜粘连分离术后创面渗出液中粘连相关细胞因子浓度,发现与其他时间点相比,刮宫后第3天受损子宫TGF- β_1 的表达量最高,提示刮宫后第3天大鼠子宫宫腔粘连程度最为严重,第5天开始修复,若进行药物防治宫腔粘连的研究,可在术后给药第3天检测宫腔粘连恢复情况,判断药物疗效。Guo LP等^[15]研究发现,IUA大鼠模型子宫内腺体组织中TGF- β_1 的表达高于正常大鼠子宫内腺体组织,认为TGF- β_1 高表达与IUA的发展有关。也有研究发现^[16],TGF- β_1 表达水平与宫腔粘连程度呈正比。以上研究结果提示,在IUA疾病进展中,TGF- β_1 发挥重要作用,并可反映宫腔粘连程度。

综上所述,大鼠宫腔粘连模型可以通过机械刮宫构建,模型建立后子宫内腺体变薄、子宫内腺体数量减少、子宫内腺体纤维化面积增加,与人类宫腔粘连病理情况相似,且建模后第3天,受损子宫TGF- β_1 的表达量最高,大鼠子宫宫腔粘连程度最为严重。

参考文献:

[1]黄倩羽.宫腔粘连患者危险因素及治疗效果分析[J].山西医科大学学报,2016,47(1):80-83.

[2]Pan LZ,Wang Y,Chen X.A randomized controlled study on an integrated approach to prevent and treat re-adhesion after transcervical resection of moderate-to-severe intrauterine adhesions[J].Clinics (Sao Paulo),2021,76:e1987.

[3]Zhang LP,Wang M,Shang X,et al.The incidence of placenta related disease after the hysteroscopic adhesiolysis in patients with intrauterine adhesions[J].Taiwan J Obstet Gynecol,2020,59(4):575-579.

[4]Khan Z,Goldberg JM.Hysteroscopic management of Asherman's syndrome [J].Journal of Minimally Invasive Gynecology,2018,25(2):218-228.

[5]Fei Z,Bin Z,Xin X,et al.Meta-analysis on the use of hyaluronic acid gel to prevent recurrence of intrauterine adhesion after hysteroscopic adhesiolysis[J].Taiwan J Obstet Gynecol,2019,58(6):731-736.

[6]中华医学会妇产科学分会.宫腔粘连临床诊疗中国专家共识[J].中华妇产科杂志,2015,50(12):881-887.

[7]Cao W,Mah K,Carroll RS,et al.Progesterone withdrawal up-regulates fibronectin and integrins during menstruation and repair in the rhesus macaque endometrium [J].Hum Reprod,2007,22(12):3223-3231.

[8]许春燕,宋阳,李坤寅,等.薄型子宫内膜模型的动物选择及其造模方法改进[J].中国实验动物学报,2016,24(2):217-220.

[9]张引红,王春芳,陈朝阳,等.薄型子宫内膜小鼠模型的建立及初步鉴定[J].山西医科大学学报,2017,48(5):432-435.

[10]刘丹,帅汝臻,李娟,等.基于病因学的多重损伤法宫腔粘连大鼠模型的建立和评价 [J].宁夏医科大学学报,2019,41(4):373-378.

[11]Conforti A,Alviggi C,Mollo A,et al.The management of Asherman syndrome:a review of literature[J].Reproductive Biology and Endocrinology,2013,11(1):1-11.

[12]张璐,李莹,吕晓丹,等.大鼠子宫宫腔粘连模型的建立及评价指标[J].动物学杂志,2017,52(1):115-121.

[13]Zheng S,Wang J,Wang X,et al.Feasibility analysis of treating severe intrauterine adhesions by transplanting menstrual blood-derived stem cells [J].International Journal of Molecular Medicine,2018,41(4):2201-2212.

[14]Nanthakumar CB,Hatley RJ,Lemma S,et al.Dissecting fibrosis:therapeutic insights from the small-molecule toolbox[J].Nature Reviews Drug discovery,2015,14(10):693-720.

[15]Guo LP,Chen LM,Chen F,et al.Smad signaling coincides with epithelial-mesenchymal transition in a rat model of intrauterine adhesion [J].American Journal of Translational Research,2019,11(8):4726.

[16]刘琳琳,刘玉环,蒋东桥,等.CTGF和TGF- β_1 的表达与宫腔粘连形成的相关性[J].山东医药,2012,52(12):17-19.

收稿日期:2022-03-08;修回日期:2022-03-22

编辑/杜帆