

# 多重损伤法建立大鼠宫腔粘连模型及其对子宫内膜 LIF 及整合素 $\alpha v \beta 3$ 的影响

张永裕<sup>1</sup>, 谭国胜<sup>1</sup>, 罗灿桥<sup>2</sup>, 马振江<sup>1</sup>, 李艳新<sup>1</sup>, 万婷婷<sup>1</sup>, 陈伟<sup>1</sup>, 杨建勇<sup>1</sup>  
(中山大学附属第一医院 1.放射介入科, 2.病理科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】建立一种稳定的大鼠宫腔粘连(IUA)动物模型,为深入探讨宫腔粘连的发病机制及治疗提供基础。【方法】40只健康雌性SD大鼠随机分为对照组( $n=10$ )及造模组( $n=30$ );造模组内再随机分为A1、A2及A3三个亚组(每组 $n=10$ ),造模组刮宫后,行子宫缺血再灌注,宫腔灌注脂多糖溶液损伤子宫内膜。A1、A2、A3组动物分别于建模后1、2、3个动情周期收集子宫组织,各组动物均于动情期获取子宫标本,行HE和Masson染色,免疫组织化学检测子宫内膜LIF及整合素 $\alpha v \beta 3$ ,动态观察子宫内膜病理变化过程,并对损伤后3个动情周期子宫内膜的腺体数目和纤维化面积比率,内膜LIF及整合素 $\alpha v \beta 3$ 蛋白的表达水平进行统计学分析。【结果】子宫内膜再生受损,造模组A1、A2、A3组大鼠子宫内膜腺体数目分别为 $3.22 \pm 1.21$ 、 $3.91 \pm 1.71$ 、 $4.12 \pm 1.65$ ,均低于对照组 $8.13 \pm 2.31$ ,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),各造模组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。造模组A1、A2、A3组大鼠子宫内膜纤维化面积比率分别为 $0.63 \pm 0.05$ 、 $0.76 \pm 0.08$ 、 $0.79 \pm 0.07$ ,均高于对照组 $0.27 \pm 0.04$ ,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),各造模组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。造模组A1、A2、A3组大鼠子宫内膜LIF蛋白MOD值分别为 $0.278 \pm 0.031$ 、 $0.293 \pm 0.036$ 、 $0.306 \pm 0.036$ ,均低于对照组 $0.389 \pm 0.041$ ,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),各造模组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。造模组A1、A2、A3组大鼠子宫内膜整合素 $\alpha v \beta 3$ 平均光密度(MOD)值分别为 $0.268 \pm 0.035$ 、 $0.291 \pm 0.038$ 、 $0.301 \pm 0.043$ ,均低于对照组 $0.397 \pm 0.036$ ,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),各造模组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。【结论】采用机械损伤、缺血再灌注及局部感染多重损伤法可以建立稳定的大鼠宫腔粘连动物模型,对子宫内膜容受性造成一定程度的负面影响。

**关键词:**宫腔粘连;子宫内膜;损伤;纤维化;内膜容受性

**中图分类号:** R711.74      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2016)01-0015-08

## Establishment of Rat Intrauterine Adhesions Model by Multiple Injury and Its Effect on Expression Levels of Endometrial LIF and Integrin $\alpha v \beta 3$

ZHANG Yong-yu<sup>1</sup>, TAN Guo-sheng<sup>1</sup>, LUO Can-qiao<sup>2</sup>, MA Zhen-jiang<sup>1</sup>, LI Yan-xin<sup>1</sup>, WAN Ting-ting<sup>1</sup>,  
CHEN Wei<sup>1</sup>, YANG Jian-yong<sup>1</sup>

(1. Department of Interventional Radiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: YANG Jian-yong, E-mail: cjr.yangjianyong@vip.163.com

**Abstract:** 【Objective】 To establish a rat model of intrauterine adhesions (IUA) to benefit the further research on the pathogenesis and pathologic changes and new treatment of IUA. 【Methods】 40 female SD rats were randomly divided into control group ( $n=10$ ) and model group ( $n=30$ , further divided into A1, A2, and A3 subgroup, 10/ subgroup). The model group was performed uterine ischemia/reperfusion injury and intrauterine infusion with 0.5 mL lipopolysaccharide solution after uterine curettage. All the animals were sacrificed and obtained uterine specimens in estrus. The A1, A2, and A3 group were obtained specimens at 1, 2, and 3 estrus cycles, respectively after IUA modeling, for observing the endometrial glands, detecting the degree of IUA by Masson staining and evaluating the expression levels of endometrial LIF and integrin  $\alpha v \beta 3$ . 【Results】 Endometrial regeneration was severely impaired

收稿日期: 2015-10-08

基金项目: 国家自然科学基金(81171442/H1816), 广东省科技计划项目(2013B02180252), 广东省医学科研基金(A2014226)

作者简介: 张永裕, 硕士, 主治医师; 杨建勇, 通信作者, E-mail: cjr.yangjianyong@vip.163.com

by multiple injury, the number of endometrial glands was significantly reduced ( $3.22 \pm 1.21, 3.91 \pm 1.71, 4.12 \pm 1.65$ , to  $8.13 \pm 2.31$ ) ( $P < 0.05$ ), and the ratio of the area with endometrial stromal fibrosis to total endometrial area was significantly increased ( $0.63 \pm 0.05, 0.76 \pm 0.08, 0.79 \pm 0.07$ , to  $0.27 \pm 0.04$ ) ( $P < 0.05$ ). The mean optical density (MOD) value of endometrial LIF for the control group and model group were  $0.389 \pm 0.041$  (control group),  $0.278 \pm 0.031$  (A1 subgroup),  $0.293 \pm 0.036$  (A2 subgroup) and  $0.306 \pm 0.036$  (A3 subgroup), respectively. The statistical analysis indicated MOD values of LIF levels in control group were significantly higher than those in A1, A2, and A3 subgroup, respectively ( $P < 0.05$ ); and there were no significant differences between A1, A2 and A3 subgroup ( $P > 0.05$ ). The MOD value of endometrial integrin  $\alpha v \beta 3$  for the control group and model group were  $0.397 \pm 0.036$  (control group),  $0.268 \pm 0.035$  (A1 subgroup),  $0.291 \pm 0.038$  (A2 subgroup) and  $0.301 \pm 0.043$  (A3 subgroup), respectively. The statistical analysis indicated MOD values of integrin  $\alpha v \beta 3$  levels in control group were significantly higher than those in A1, A2, and A3 subgroup, respectively ( $P < 0.05$ ); and there were no significant differences between A1, A2, and A3 subgroup ( $P > 0.05$ ). 【Conclusion】 The multiple injury method of mechanical injury and ischemia-reperfusion injury and infection can establish a stable rat IUA model, and it might lead to negative influence on endometrial receptivity in some extent.

**Key words:** intrauterine adhesions; endometrium; injury; fibrosis; endometrial receptivity

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(1): 15-22]

Asherman综合征 (Asherman Syndrome, AS)是子宫内膜的基底层损伤引起的宫腔粘连 (intrauterine adhesions, IUA) 或纤维化, 常常导致月经过少或闭经, 不孕或习惯性流产<sup>[1]</sup>。子宫内膜容受性是指子宫内膜接受胚胎着床的能力, 与生育功能及正常妊娠密切相关<sup>[2]</sup>, 而白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 和整合素  $\alpha v \beta 3$  已被认为是衡量子宫内膜容受性状态的客观分子标记物<sup>[3-4]</sup>。本研究拟通过多重损伤建立大鼠宫腔粘连动物模型, 观察子宫内膜病理改变, 内膜 LIF 及整合素  $\alpha v \beta 3$  含量的变化, 探讨其发病机制及对子宫内膜容受性可能造成的影响, 为进一步探索其治疗方法提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雌性 SD 大鼠 40 只, 鼠龄约 3 个月, 体质量 220 ~ 280 g。由广州中医药大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(粤) 2013-0034。

1.1.2 主要试剂及器械仪器 脂多糖 (Lipopolysaccharides From Escherichia coli 055:B5, LPS, Sigma, 美国); 兔抗人 LIF 多克隆抗体 (251429) (ABBIOTEC 公司, 美国); 小鼠抗人整合素  $\alpha v \beta 3$  单克隆抗体 (BV3; ab7166; Abcam 公司, 英国); 即用型非生物素免疫组化 EliVision™super 检

测试剂盒 [Elivision™super HRP (Mouse/Rabbit) IHC Kit] 及 DAB 显色试剂盒 (加强型 DAB Plus Kit) (福州迈新生物技术开发有限公司)。显微外科手术器械 (上海医疗器械厂); 光学显微镜系统及数字图像采集系统 (Olympus, 日本), 计算机图像分析系统 Image-Pro Plus 6.0 (Silver Spring, USA) 等。

### 1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及处理 每日上午 8 ~ 10 时行大鼠阴道细胞涂片, 观察大鼠动情周期, 选取 40 只 (80 个子宫) 有正常动情周期的大鼠纳入实验。雌性 SD 大鼠 40 只随机分为两组: 对照组 ( $n = 10$ ) 及造模组 ( $n = 30$ ); 其中造模组再分成 3 个亚组 (A1、A2 及 A3 组, 每组各 10 只)。对照组不进行任何干预操作; 造模组动物经开腹直视下行子宫内膜机械损伤及宫腔灌注脂多糖溶液、子宫缺血再灌注。本研究对动物的处理符合中山大学动物实验伦理学规范。

1.2.2 建模方法及取材 大鼠按照 3 mL/kg 剂量腹腔注射 100 g/L 水合氯醛麻醉, 在无菌条件经开腹直视下分离子宫, 于双侧子宫近端作 0.3 cm 纵切口, 用直径 3 mm 子宫内膜刮勺沿大鼠宫腔前后左右四个不同方向来回搔刮内膜数次, 刮除中上段子宫内膜, 感觉子宫四壁粗糙时, 停止搔刮, 缝合子宫切口。接着用无创伤血管夹夹紧双侧子宫近端和子宫动脉及双侧子宫远端和卵巢动脉-子宫动脉交通支, 注射器针头于子宫下端进入宫腔,

并保持其与子宫纵轴平行,缓慢注入 10 mg/L 脂多糖溶液 0.5 mL,保持宫腔处于充盈状态。30 min 后抽出脂多糖溶液,并松开血管夹行子宫再灌注。同时生理盐水冲洗腹腔,缝合关腹。大鼠苏醒前注意保温。手术后密观大鼠的精神状态、食纳情况。A1、A2、A3 组动物分别于建模后经过 1、2、3 个动情周期的动情期,对照组于动情期,开腹取子宫,观察大体标本,40 g/L 多聚甲醛溶液固定。

1.2.3 大鼠子宫内膜腺体数量比较 大鼠子宫石蜡包埋,行 4  $\mu\text{m}$  连续切片,每个大鼠子宫随机选取 3 张切片行 HE 染色。每张 HE 切片在高倍镜( $\times 100$ )下随机选取 4 个视野,计数每个视野子宫内膜腺体数目,取其平均值。

1.2.4 大鼠子宫内膜纤维化程度检测 大鼠子宫石蜡包埋,行 4  $\mu\text{m}$  连续切片,每个大鼠子宫随机选取 3 张切片行 Masson 染色。每张 Masson 切片在高倍镜( $\times 200$ )下随机选取 4 个视野,应用图像分析系统 Image-Pro Plus 6.0 计算每个视野面积以及子宫内膜间质纤维化面积、子宫内膜间质与腺体面积之和,纤维化比率为每个视野子宫内膜间质纤维化面积除以子宫内膜间质及腺体总面积,取其平均值。

1.2.5 免疫组织化学检测内膜 LIF 及整合素  $\alpha v\beta 3$  的表达 标本切片脱蜡水化,高温高压抗原修复后用 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温下孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶。滴加一抗(兔抗人 LIF 多克隆抗体稀释比例 1:200,小鼠抗人整合素  $\alpha v\beta 3$  单克隆抗体稀释比例 1:50),以 PBS 代替一抗作阴性对照,湿盒内 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜后在常温下复温 30 min。

PBS 冲洗后参照即用型非生物素免疫组化 EliVision<sup>TM</sup>super 检测试剂盒说明书滴加 1 滴放大剂(试剂 A),室温下孵育 10 min。PBS 冲洗后滴加 1 滴辣根过氧化物酶聚合物(试剂 B),室温下孵育 10 min。DAB 室温显色 2~3 min,苏木素复染。酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

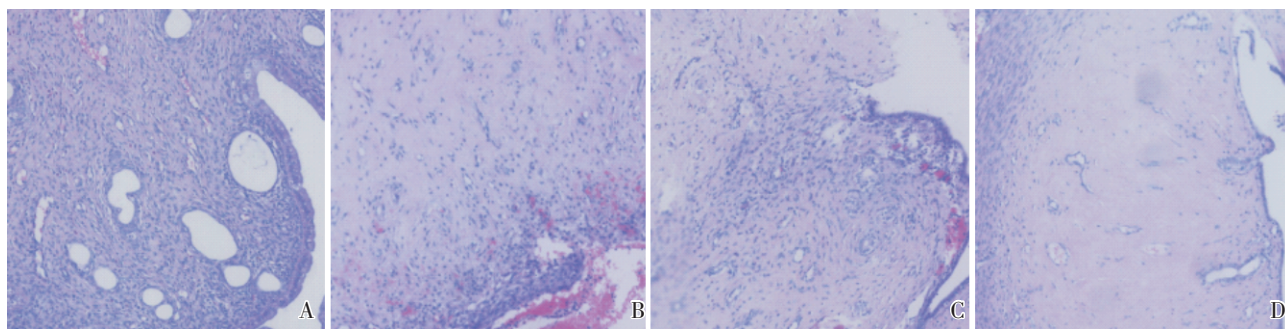
1.2.6 免疫组织化学定量分析 采用显微成像系统,每张切片在高倍镜( $\times 200$ )下随机选取 3 个视野,捕获子宫内膜免疫组化染色切片图像,应用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 分别测量每张图片的累积光密度(integrated optical density, IOD)和累积面积  $A_{\text{sum}}$ ,平均光密度值(mean optical density, MOD) =  $\text{IOD}/A_{\text{sum}}$ ,MOD 值代表免疫组化阳性区域的平均染色强度,采用平均光密度法半定量法比较蛋白的表达强度。每个子宫标本取 3 张切片,每张切片随机观察 4 个视野并计算内膜蛋白的 MOD 值,取其平均值作为该子宫标本的 MOD 数值。

1.2.7 统计学分析 数据采用 SPSS 16.0 软件处理,计量资料以表示,多组均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多组均数间的两两比较采用 Bonferroni 检验。检验水准为双侧检验  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 大鼠子宫内膜 HE 染色观察及内膜腺体数量的比较

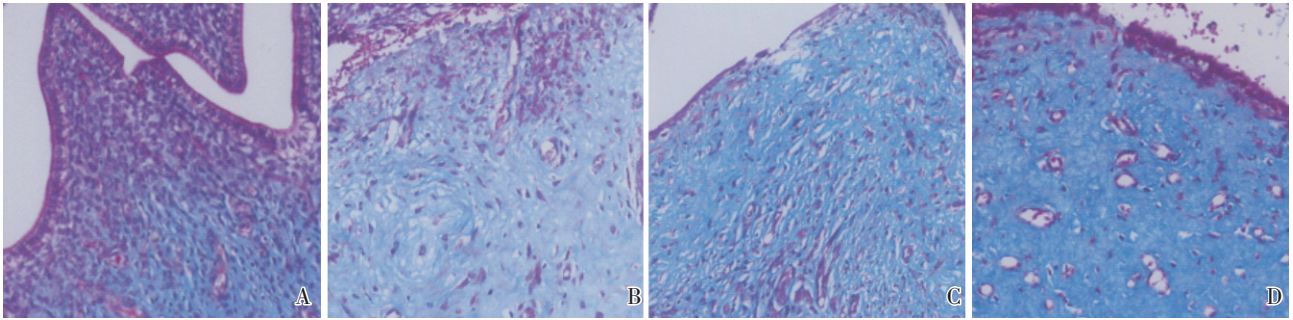
对照组子宫内膜结构完整,宫腔形态不规则,内膜表面呈波浪形,子宫内膜腺体主要位于黏膜



A: Control group; B: A1 group one estrous cycle after uterus damage; C: A2 group two estrous cycles after uterus damage; D: A3 group three estrous cycles after uterus damage.  $\times 100$

图 1 大鼠子宫 HE 染色

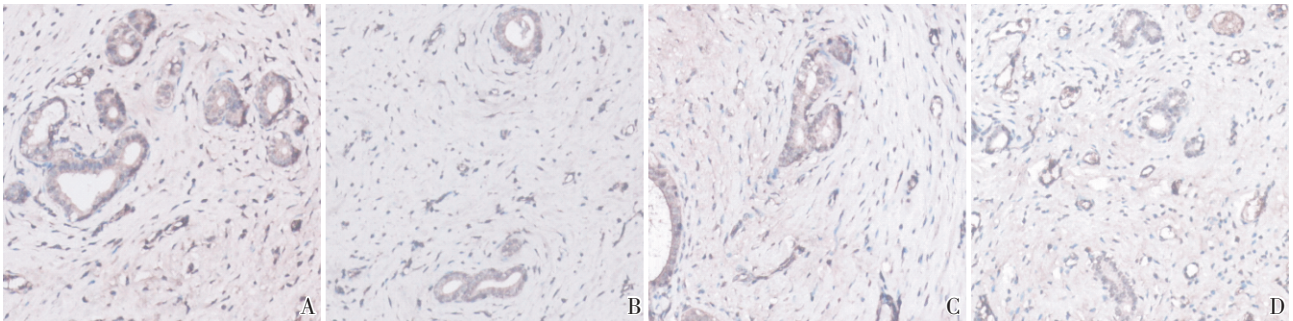
Fig.1 HE stain of rat uterus



A: Control group; B: A1 group one estrous cycle after uterus damage; C: A2 group two estrous cycles after uterus damage; D: A3 group three estrous cycles after uterus damage.  $\times 200$

图 2 大鼠子宫 Masson 染色

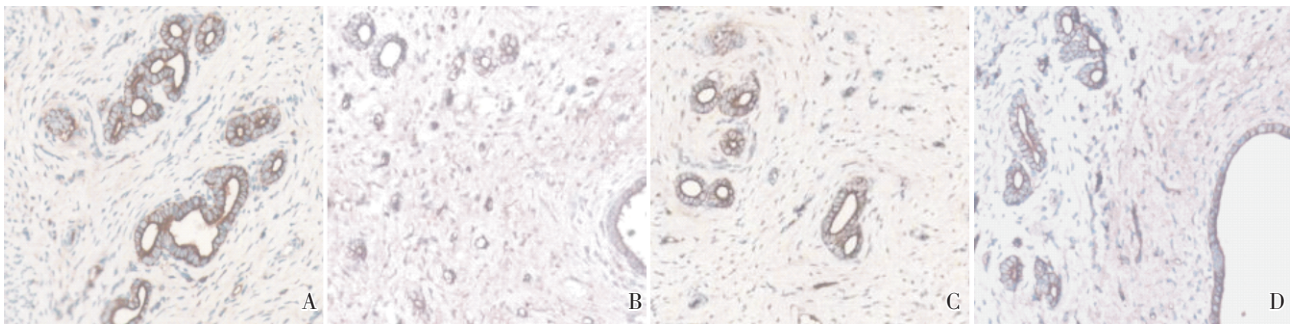
Fig.2 Trichrome stain of fibrosis of rat uterus



A: Control group with high MOD value for LIF level in endometrium. B: A1 group with significantly lower MOD value for LIF level after injury. C: The MOD for LIF level from A2 group was higher than that of A1 group, but not statistically. D: The MOD from A3 group further increased compared with that of A1 group and A2 group, but still lower than that of control group.  $\times 200$

图 3 内膜 LIF 免疫组化染色

Fig.3 Immunohistochemistry staining of endometrial LIF



A: Control group with high MOD value for  $\alpha v \beta 3$  level in endometrium. B: A1 group with significantly lower MOD value for  $\alpha v \beta 3$  level after injury. C: The MOD for  $\alpha v \beta 3$  level from A2 group was higher than that of A1 group, but not statistically. D: The MOD from A3 group further increased compared with that of A1 group and A2 group, but still lower than that of control group.  $\times 200$

图 4 内膜整合素  $\alpha v \beta 3$  免疫组化染色

Fig.4 Immunohistochemistry staining of endometrial integrin  $\alpha v \beta 3$

下层和基底层,呈圆形或椭圆形,黏膜下层腺体开口于内膜表面,腔上皮及腺上皮细胞完整,呈单层柱状或立方状,排列紧密。间质均匀无水肿,微血管丰富(图 1A)。子宫内膜损伤后 1 个动情周期,

内膜偶有上皮细胞再生,宫腔大量坏死组织碎片以及纤维素渗出。间质出血,水肿,白细胞浸润,部分毛细血管扩张、充血,一些毛细血管管腔闭锁(图 1B)。损伤后 2 个动情周期,宫腔可见一些纤

维性粘连带,50%~70%未粘连区域有上皮细胞再生,上皮层下可见极少量腺体,上皮下有较多成纤维母细胞及炎性细胞浸润,可见少量散在的小血管和毛细血管(图 1C)。损伤后 3 个动情周期,宫腔改变和损伤后 2 个动情周期类似,但宫腔未粘连区域基本由上皮细胞覆盖,上皮层下腺体稀疏,少量新生毛细血管(图 1D)。损伤后 3 个动情周期大鼠子宫内膜腺体数量见表 1。与对照组比较,A1、A2、A3 组大鼠子宫内膜单位面积腺体数量均减少,3 个造模组间内膜单位面积腺体数量差异无统计学意义。

表 1 建模后各组子宫内膜腺体数量

Table 1 The number of glands of rat endometrium in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	Number of glands
Control	10	8.13 $\pm$ 2.31
A1	10	3.22 $\pm$ 1.21 <sup>1)</sup>
A2	10	3.91 $\pm$ 1.71 <sup>1)</sup>
A3	10	4.12 $\pm$ 1.65 <sup>1)</sup>
F		297.1
P		0.000

1)  $P < 0.05$ , Compared with control group.

## 2.2 子宫内膜纤维化程度的比较

Masson 染色镜下观察见对照组子宫内膜结构完整,黏膜、黏膜下层、血管和平滑肌呈暗红色;内膜间质均匀无水肿,间质胶原纤维呈蓝色,梭形,排列较整齐(图 2A)。子宫内膜损伤后 1 个动情周期,黏膜结构不连续,宫腔大量坏死组织碎片以及纤维素渗出。间质水肿,部分区域胶原纤维增加(图 2B)。损伤后 2 个动情周期,部分宫腔可见一些纤维性粘连带,上皮下胶原纤维增多聚集(图 2C)。损伤后 3 个动情周期,宫腔未粘连区域基本由上皮细胞覆盖,上皮层下腺体稀疏,间质纤维组织增多,胶原聚集,纤维化较明显(图 2D)。损伤后 3 个动情周期大鼠子宫内膜纤维化面积比率见表 2。与对照组比较,A1、A2、A3 组大鼠子宫内膜间质纤维化面积比均升高,3 个造模组间内膜间质纤维化面积比差异无统计学意义。

## 2.3 子宫内膜 LIF 蛋白的检测及定量分析

LIF 主要表达于子宫内膜腺上皮及腔上皮细胞的胞浆和胞膜,镜下见 LIF 与特异性抗体结合

表 2 建模后各组子宫内膜间质纤维化面积比

Table 2 The percentage of fibrotic area of rat endometrium in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	Percentage of fibrotic area
Control	10	0.27 $\pm$ 0.04
A1	10	0.63 $\pm$ 0.05 <sup>1)</sup>
A2	10	0.76 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>
A3	10	0.79 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>
F		816.5
P		0.000

1)  $P < 0.05$ , compared with control group.

后呈棕褐色或棕黄色颗粒,主要沉积于腺上皮及腔上皮细胞胞浆,少量沉积于胞膜。对照组子宫内膜见大量棕褐色颗粒沉积于上皮细胞胞浆,少量棕褐色颗粒沉积于胞膜;造模组内膜腔上皮及腺上皮胞浆见散在的棕黄色颗粒沉积。子宫内膜 LIF 含量的平均光密度(MOD)值整体比较 4 组间存在统计学差异,与对照组相比,各造模组的平均光密度值显著降低,A1、A2、A3 三个造模组之间两两比较差异无统计学意义(图 3,表 3)。

表 3 各组大鼠子宫内膜 LIF 蛋白 MOD 值

Table 3 The MOD of rat endometrial LIF in the 4 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	MOD
Control	10	0.389 $\pm$ 0.041
A1	10	0.278 $\pm$ 0.031 <sup>1)</sup>
A2	10	0.293 $\pm$ 0.036 <sup>1)</sup>
A3	10	0.306 $\pm$ 0.036 <sup>1)</sup>
F		31.43
P		0.000

1)  $P < 0.05$ , compared with control group.

## 2.4 子宫内膜整合素 $\alpha v\beta 3$ 蛋白的检测及定量分析

整合素  $\alpha v\beta 3$  主要表达于子宫内膜腔上皮和腺上皮细胞胞膜,镜下阳性染色部位主要为细胞周边胞质及胞膜,对照组内膜见大量棕褐色颗粒沉积在腔上皮及腺上皮细胞中,分布较均匀;造模组内膜腔上皮及腺上皮见散在的棕黄色颗粒沉积,分布不均匀且不连续。子宫内膜整合素  $\alpha v\beta 3$  含量的平均光密度(MOD)值整体比较 4 组间存在统计学差异,与对照组相比,各造模组的平均光密

度值显著降低, A1、A2、A3 三个造模组之间两两比较差异无统计学意义(图 4, 表 4)。

表 4 各组大鼠子宫内膜整合素  $\alpha v \beta 3$  蛋白 MOD 值  
Table 4 The MOD of rat endometrial integrin  $\alpha v \beta 3$   
in the 4 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	MOD
Control	10	0.397 $\pm$ 0.036
A1	10	0.268 $\pm$ 0.035 <sup>1)</sup>
A2	10	0.291 $\pm$ 0.038 <sup>1)</sup>
A3	10	0.301 $\pm$ 0.043 <sup>1)</sup>
F		29.04
P		0.000

1)  $P < 0.05$ , compared with control group.

### 3 讨 论

宫腔粘连(IUA)或 Asherman 氏综合征诊断率越来越高,其发生的必要条件是子宫内膜损伤,临床上最常见于不全流产、分娩后刮宫造成子宫内膜基底的创伤<sup>[1,5-6]</sup>。IUA 的其他致病因素包括剖宫产、子宫肌瘤剔除术等机械性损伤<sup>[7]</sup>,子宫动脉栓塞术等缺血性损伤<sup>[8]</sup>,子宫内膜炎、内膜感染等感染性损伤及低雌激素状态等<sup>[1,5-6]</sup>。

#### 3.1 子宫内膜损伤后病理改变

本研究根据 IUA 发生的危险因素,采用机械损伤、缺血再灌注及局部感染损伤的方法建立 IUA 动物模型。机械损伤可以刮除子宫内膜表面上皮及部分间质,引起大鼠的子宫内膜全层损伤,加之感染因素及局部缺血再灌注损伤,子宫内膜损伤后 1 个动情周期,宫腔仅见少量上皮细胞再生,宫腔大量坏死组织碎片以及纤维素渗出。间质出血,水肿,白细胞浸润,部分区域纤维化,部分毛细血管扩张、充血,一些毛细血管管腔闭锁。随着时间延长,纤维组织增生,宫腔形成纤维性粘连带,损伤后 3 个动情周期,宫腔未粘连区域基本由上皮细胞覆盖,但上皮层下腺体稀疏,间质纤维组织明显增多,胶原聚集,少量新生毛细血管,子宫内膜瘢痕修复。模型大鼠子宫内膜 HE 染色及 Masson 三色染色组织形态变化基本符合子宫内膜宫腔粘连的特征。

1970 年代起就有研究者采用多种方法建立动

物子宫内膜损伤模型,包括:物理性损伤,化学性损伤,机械性损伤以及结合 2 种方法的双重病理损伤模型。1972 年 Schenker 等<sup>[9]</sup>建立了子宫内膜冷冻损伤动物模型,但子宫内膜于损伤后 12 天完全修复。随后 Schenker 等<sup>[10]</sup>将 10%福尔马林溶液注入子宫腔内造成子宫内膜损伤且纤维组织增生闭塞子宫腔形成 IUA。这些物理或化学方法对子宫内膜造成了不同程度的损伤,甚至形成粘连,但和实际中 IUA 的病因有所不同,引起的子宫内膜病理改变和体内 IUA 的病理改变并不完全一致。

1975 年 Polishuk 等<sup>[11]</sup>利用家兔及大鼠作为实验动物,刮除其子宫内膜,观察到子宫内膜术后 3 天即完全修复。子宫内膜具有强再生能力,单纯机械损伤后,子宫内膜会在短期内再生修复,难以建立成功的 IUA 模型,采用二种以上的损伤方法或更易于建立 IUA 动物模型。Li 等<sup>[12]</sup>通过刮宫后在宫腔放置铜丝的方法建立兔子宫内损伤的模型,宫腔没有观察到粘连带形成,可能是因为铜丝抑制子宫内膜上皮细胞再生的同时也抑制了宫腔内纤维粘连带的形成。刘芳等<sup>[13-14]</sup>在兔子宫内刮除术后,宫腔留置细菌脂多糖棉线模拟感染,建立了兔 IUA 模型。蔡慧华等<sup>[15]</sup>在大鼠子宫内刮除术后,宫腔留置细菌脂多糖棉线模拟感染,建立了大鼠 IUA 模型。这些综合多种损伤的方法都能成功建立兔或大鼠 IUA 模型,但均需在宫腔留置异物,择期取出异物,增加了建模程序。

本实验采用机械损伤、缺血再灌注及局部感染的方法损伤大鼠子宫内膜。先采取机械刮宫基本清除子宫内膜层,随后缺血再灌注加重了子宫内膜损伤<sup>[16]</sup>,宫腔灌注脂多糖溶液,加重了炎症反应<sup>[17]</sup>,促进胶原合成和分泌,引起纤维化<sup>[18]</sup>。大鼠子宫 HE 和 Masson 三色染色病理结果显示,联合多种损伤法建立的大鼠 IUA 动物模型,子宫内膜上皮变薄、局部缺失,腺体稀疏及间质纤维化的病理改变基本符合临床 IUA 的病理特征,成功建立大鼠 IUA 动物模型。

#### 3.2 子宫内膜损伤对其容受性的影响

子宫内膜容受性是指子宫内膜接受胚胎着床的能力,与生育功能及正常妊娠密切相关<sup>[2]</sup>,而 LIF 和整合素  $\alpha v \beta 3$  已被认为是衡量子宫内膜容受性状态的客观分子标记物<sup>[3-4]</sup>。

LIF 属于白细胞介素 6(IL-6) 家族中的一员, 是一种具有广泛生物学功能的分泌性糖蛋白。在子宫内膜, LIF 在整个月经周期子宫内膜腔上皮及腺上皮细胞中均有表达, 在分泌中期表达明显上调, 在分泌中、晚期, 其表达量达到峰值, 与胚胎种植窗期相吻合<sup>[19]</sup>。在子宫内膜 LIF 可以过分泌或旁分泌方式, 作用于上皮及间质细胞, 促进间质细胞蜕膜化, 并激活蛋白水解酶, 使得细胞外基质降解, 诱导子宫内膜容受性的建立<sup>[20]</sup>。研究表明<sup>[21]</sup>, 不明原因不孕患者胚胎移植失败与子宫内膜 LIF 的低表达相关。转基因动物实验显示<sup>[22]</sup>, LIF 基因敲除小鼠能产生胚胎, 但胚胎不能在子宫内膜成功着床, 若将此胚胎移植到野生型假孕小鼠子宫内膜, 该胚胎能成功着床并发育, 结果表明, 来源于母体的 LIF 在小鼠胚胎成功着床中发挥重要作用, 是维持良好的内膜容受性所必需的细胞因子。

整合素是一类广泛存在于哺乳动物细胞表面的细胞黏附分子<sup>[23]</sup>, 在胚胎着床中执行重要的生理功能。研究表明<sup>[3]</sup>, 子宫内膜上皮细胞中整合素  $\alpha v\beta 3$  在分泌中期表达增加, 与子宫内膜的“种植窗”期相吻合, 可以作为衡量子宫内膜容受性的指标之一。整合素  $\alpha v\beta 3$  在子宫内膜“种植窗”期表达升高, 有助于子宫内膜由非黏附状态向黏附状态的转变, 以利于胚胎黏附及着床。若整合素  $\alpha v\beta 3$  在种植窗期的子宫内膜表达异常或减少, 将导致内膜容受性缺陷, 内膜对胚胎的亲合力和粘附作用下降, 最终引起着床失败和不孕<sup>[24-27]</sup>。

本实验结果显示造模后 1 个动情周期 A1 组子宫内膜 LIF 及整合素  $\alpha v\beta 3$  的 MOD 值均显著低于对照组。随着时间的推移, 子宫内膜 LIF 及整合素  $\alpha v\beta 3$  的 MOD 值稍有增加, 但仍显著低于对照组, 且造模各亚组间差异无统计学意义, 表明采用机械损伤、缺血再灌注及局部感染的方法损伤大鼠子宫内膜可导致其内膜 LIF 及整合素  $\alpha v\beta 3$  的含量减少, 提示造模组大鼠子宫内膜容受性较对照组差, 造模后随着子宫内膜修复, LIF 及整合素  $\alpha v\beta 3$  表达量不排除有逐渐恢复的倾向, 但由于观察时间所限, 对于内膜损伤后减少的 LIF 及整合素  $\alpha v\beta 3$  能否最终恢复至正常水平, 以及哪些损伤因素通过何种机制引起 LIF 及整合素  $\alpha v\beta 3$  表达减少, 及其对内膜容受性及生育功能的影响有待

进一步研究。

### 3.3 结 论

综上所述, 采用机械损伤、缺血再灌注及局部感染的方法损伤大鼠子宫内膜, 通过观察子宫内膜形态和检测子宫内膜容受性标志蛋白 LIF 及整合素  $\alpha v\beta 3$  的表达情况, 鉴定该方法可以成功建立稳定的大鼠子宫内膜 IUA 模型, 对子宫内膜容受性造成一定程度的负面影响, 为深入研究 IUA 的发病机制, 探求新的治疗方法提供了基础。

(致谢: 感谢中山大学附属第一医院病理科朱俊峰博士在病理图像分析方面的指导和帮助, 感谢中山大学中山医学院干细胞与组织工程教育部重点实验室在免疫组化实验方面的帮助)

### 参考文献

- [1] YU D, WONG YM, CHEONG Y, et al. Asherman syndrome--one century later[J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(4): 759-779.
- [2] CRITCHLEY HO, SAUNDERS PT. Hormone receptor dynamics in a receptive human endometrium[J]. *Reprod Sci*, 2009, 16(2): 191-199.
- [3] LESSEY BA. Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(Suppl 3): 247-258, 259-261.
- [4] CHEN QJ, SUN XX, LI L, et al. Effects of ovarian stimulation on endometrial integrin beta3 and leukemia inhibitory factor expression in the peri-implantation phase[J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(5 Suppl): 1357-1363.
- [5] MARCH CM. Asherman's syndrome [J]. *Semin Reprod Med*, 2011, 29(2): 83-94.
- [6] MARCH CM. Management of Asherman's syndrome [J]. *Reprod Biomed Online*, 2011, 23(1): 63-76.
- [7] AHMADI F, SIAHBAZI S, AKHBARI F, et al. Hysterosalpingography finding in intra uterine adhesion (Asherman's syndrome): a pictorial essay [J]. *Int J Fertil Steril*, 2013, 7(3): 155-160.
- [8] SONG D, LIU Y, XIAO Y, et al. A matched cohort study comparing the outcome of intrauterine adhesiolysis for Asherman's syndrome after uterine artery embolization or surgical trauma [J]. *J Minim Invasive Gynecol*, 2014, 21(6): 1022-1028.
- [9] SCHENKER JG, POLISHUK WZ. Regeneration of

- rabbit endometrium after cryosurgery [J]. *Obstet Gynecol*, 1972, 40(5): 638-645.
- [10] SCHENKER JG, POLISHUK WZ. Regeneration of rabbit endometrium following intrauterine instillation of chemical agents[J]. *Gynecol Invest*, 1973, 4(1): 1-13.
- [11] POLISHUK WZ. Endometrial regeneration and adhesion formation[J]. *S Afr Med J*, 1975, 49(12): 440-442.
- [12] LI L, SHI J, ZHANG QF, et al. Effect of curettage and copper wire on rabbit endometrium; a novel rabbit model of endometrial mechanical injury [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(11): 1708-1713.
- [13] 刘芳,何援利. 机械和感染双重损伤法建立新西兰大白兔宫腔粘连模型[J]. *重庆医学*, 2013(07): 765-767.
- LIU F, HE YL. Establishment of new zealand white rabbit intrauterine adhesions model by mechanical and infectious double injury[J]. *Chongqing Med*, 2013(7): 765-767.
- [14] LIU F, ZHU ZJ, LI P, et al. Creation of a female rabbit model for intrauterine adhesions using mechanical and infectious injury[J]. *J Surg Res*, 2013, 183(1): 296-303.
- [15] 蔡慧华,何援利,李慧娟,等. 宫腔粘连大鼠模型的建立及其与白介素 21 的相关性分析[J]. *医学研究生学报*, 2015(04): 346-349.
- CAI HH, HE YL, LI HJ, et al. Correlation between interleukin-21 and formation of intrauterine adhesions in rats [J]. *J Med Postgraduates*, 2015(04): 346-349.
- [16] OKAZAKI M, MATSUYAMA T, KOHNO T, et al. Induction of epithelial cell apoptosis in the uterus by a mouse uterine ischemia-reperfusion model; possible involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(5): 1282-1288.
- [17] BANNERMAN DD, GOLDBLUM SE. Direct effects of endotoxin on the endothelium; barrier function and injury[J]. *Lab Invest*, 1999, 79(10): 1181-1199.
- [18] HE Z, ZHU Y, JIANG H. Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced collagen secretion by phosphoinositide3-kinase-Akt pathway in fibroblasts during acute lung injury[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2009, 29(2): 119-125.
- [19] HASEGAWA E, ITO H, HASEGAWA F, et al. Expression of leukemia inhibitory factor in the endometrium in abnormal uterine cavities during the implantation window [J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(4): 953-958.
- [20] TAPIA A, SALAMONSEN LA, MANUELPIILLAI U, et al. Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2 [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(8): 1724-1732.
- [21] WU M, YIN Y, ZHAO M, et al. The low expression of leukemia inhibitory factor in endometrium; possible relevant to unexplained infertility with multiple implantation failures [J]. *Cytokine*, 2013, 62(2): 334-339.
- [22] SONG H, LIM H, DAS SK, et al. Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14(8): 1147-1161.
- [23] MINAS V, LOUTRADIS D, MAKRIGIANNAKIS A. Factors controlling blastocyst implantation [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10(2): 205-216.
- [24] LI L, XU BF, CHEN QJ, et al. Effects of hydrosalpinx on pinopodes, leukaemia inhibitory factor, integrin beta3 and MUC1 expression in the peri-implantation endometrium [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2010, 151(2): 171-175.
- [25] SRINIVASAN KR, BLESSON CS, FATIMA I, et al. Expression of alphaVbeta3 integrin in rat endometrial epithelial cells and its functional role during implantation [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2009, 160(2): 124-133.
- [26] CASALS G, ORDI J, CREUS M, et al. Osteopontin and alphavbeta3 integrin as markers of endometrial receptivity; the effect of different hormone therapies [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21(3): 349-359.
- [27] PEYGHAMBARI F, AMANPOUR S, FAYAZI M, et al. Expression of alpha4, alphav, beta1 and beta3 integrins during the implantation window on blastocyst of a mouse model of polycystic ovarian syndromes [J]. *Iran J Reprod Med*, 2014, 12(9): 623-632.