

大鼠子宫宫腔粘连模型的建立及评价指标

张璐^{①②} 李莹^{①②} 吕晓丹^{①②} 苏兴^{①②} 马旭^{①②*} 夏红飞^{①②*}

① 国家卫生计生委科学技术研究所遗传优生中心 北京 100081; ② 北京协和医学院研究生院 北京 100730

摘要: 子宫内膜损伤是导致宫腔粘连的最主要原因, 建立有效的子宫内膜损伤动物模型是研究此类疾病发生、发展和治疗反应等不可或缺的支撑条件。通过宫腔注射 95% 的乙醇制造大鼠 (*Rattus norvegicus*) 子宫内膜损伤模型, 检测胚胎植入数目来分析子宫内膜损伤对大鼠生育情况的影响, 观察大鼠子宫内膜厚度、腺体数量和纤维化面积, 分析乙醇处理对子宫内膜的影响; 检测细胞角蛋白 (CK-19) 和波形蛋白 (Vimentin) 的表达水平, 分析上皮细胞和间质细胞的增殖分化及子宫内膜损伤程度。结果显示, 正常组大鼠子宫比损伤组更为平滑且有韧性, 与正常组相比, 损伤组大鼠生育率显著降低 ($P < 0.01$), 子宫内膜厚度变薄 ($P < 0.01$)、腺体数量显著减少 ($P < 0.01$), 纤维化面积显著增大 ($P < 0.01$), CK-19 和 Vimentin 表达量显著下调。结果提示已成功建立大鼠子宫内膜损伤动物模型。

关键词: 大鼠; 子宫内膜损伤; 动物模型; 评价指标

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2017) 01-115-07

Establishment and Evaluation of Rat Model with Intrauterine Adhesions

ZHANG Lu^{①②} LI Ying^{①②} LÜ Xiao-Dan^{①②} SU Xing^{①②} MA Xu^{①②*} XIA Hong-Fei^{①②*}

① *Reproductive and Genetic Center of National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081;*

② *Graduate School, Peking Union Medical College, Beijing 100730, China*

Abstract: Endometrial lesion is the main reason leading to cervical adhesion. Establishing an effective animal model of endometrial injury is an indispensable condition to study the disease occurrence, development and treatment. We established a Rat (*Rattus norvegicus*) model of endometrial injury by intrauterine injection of 95% alcohol. The numbers of embryo implantation were detected to analyze the effect of endometrial injury on the fertility. The thickness of endometrium, gland numbers and the area of fibrosis were observed to analyze the effects of ethanol treatment on the endometrium. The expressions of cytokeratin 19 (CK-19) and Vimentin were detected to analyze the status of epithelium and mesenchymal cells. The results showed that the specimen of Rat uterus in normal group was smooth and showed strong toughness compared with injury group, and the fertility in the injury group was significantly lower than that in control group ($P < 0.01$) (Fig. 1). Rat endometrium in the injury group was much thinner than that in

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 81370720) 和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 015GJZ01);

* 通讯作者, E-mail: genetic@263.net.cn, hongfeixia@126.com;

第一作者介绍 张璐, 女, 硕士研究生; 研究方向: 生殖遗传; E-mail: ZLu7649@163.com。

收稿日期: 2016-04-06, 修回日期: 2016-06-07 DOI: 10.13859/j.cjz.201701013

control group ($P < 0.01$) (Fig. 2e). Moreover, compared with control group, the gland numbers in the injury group was significantly reduced ($P < 0.01$) (Fig. 2f), the area of fibrosis was increased ($P < 0.01$) (Fig. 2g) and the expression of CK-19 and vimentin was remarkably decreased (Fig. 3). The results suggest that the animal model of Rat endometrial injury is successfully established.

Key words: Rat; Endometrial injury; Animal model; Evaluation indicator

子宫内膜损伤是妇产科疾病发展过程中常见的病理过程, 多由炎症或者手术损伤引起 (Berman 2008)。子宫内膜损伤一般分为轻度和重度, 轻度损伤可随体内孕、雌激素水平变化进行自体修复和功能重建, 而重度的子宫内膜损伤机体无法修复, 可能导致宫腔粘连的发生, 引发一系列疾病, 如月经过少、闭经等, 甚至会导致不孕等严重的临床疾病, 宫腔粘连已成为女性继发性不孕的第二大病因 (Yu et al. 2008, Conforti et al. 2013)。目前中重度的子宫内膜损伤治疗方法有限, 损伤很难治愈, 术后再粘连的发生几率较高, 仍有约 20% 的重度宫腔粘连患者不能恢复月经 (Conforti et al. 2013)。因此, 建立子宫内膜损伤动物模型对深入了解子宫内膜损伤的病理生理实质, 对改善子宫内环境、提高妊娠率以及子宫内膜损伤修复具有重要的临床意义。但目前尚少见大鼠 (*Rattus norvegicus*) 宫腔粘连模型报道, 主要是高红等 (2011) 利用 95% 的乙醇处理大鼠子宫 5 min 建立了薄型子宫内膜模型。本研究通过调整 95% 乙醇的处理时间建立大鼠子宫宫腔粘连的动物模型并评价了该动物模型的有效性和行为表象, 为探索人类 (*Homo sapiens*) 宫腔粘连的治疗方法提供了有效的动物模型。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 6 ~ 8 周龄雌性 SD 大鼠 (Sprague-Dawley rat), SPF 级, 购自北京华康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2014-0004]。饲养于国家卫生计生委科学技术研究所 [SYXK (京) 2009-0033], 室温 23 ~ 25°C, 湿度 67% ~ 75%, 光照明暗时间比为 14 h/10 h,

能自由获取食物和水。按性周期一致性原则, 每 4 只合并一笼。

1.1.2 主要试剂 孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG, 宁波第二激素厂, 中国), 苏木精-伊红染液 (hematoxylin-eosin staining, H.E, 中杉金桥, 中国), Masson 染液 (中杉金桥, 中国), CK-19 (Santa, 美国), Vimentin (Abcam, 英国)。

1.2 方 法

1.2.1 实验设计 本实验分为正常组和损伤组, 利用 95% 乙醇损伤大鼠子宫内膜 3 min, 待损伤后两个生理周期, 处死大鼠或合笼, 观察子宫内膜形态、厚度、腺体数量、纤维化程度以及胚胎植入的变化, 评估损伤效果。

1.2.2 实验动物处理方案 实验鼠按 350 mg/kg 10% 水合氯醛麻醉, 光照维持体温在 (37 ± 0.5) °C。在无菌手术条件下切开腹壁, 打开腹腔, 缓慢挑出“Y”型子宫, 动脉夹夹闭每侧子宫上下两端, 在子宫最下端入针, 注射 0.5 ml 95% 乙醇, 3 min 后吸出乙醇, 生理盐水冲洗两遍, 切口创面覆盖湿纱。正常组不作任何处理。

1.2.3 动物处理及取材 取材前 2 天对各组大鼠注射孕马血清促性腺激素 (PMSG), 使各组大鼠的动情周期处于相同时期。将大鼠安乐死后迅速取出子宫组织, 将部分组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 包埋蜡块用于制备组织切片, 部分组织冻于 -80°C 冰箱用于提取 RNA 或蛋白。

1.2.4 生育能力实验 取正常组和损伤组各 7 只与已证明有生育能力的雄鼠合笼交配, 第 2 天检查阴道栓, 查见者即为孕鼠, 记录当天为孕 1 d, 分开饲养, 在第 9 天处死孕鼠, 取出双

侧子宫, 检查胚胎植入情况。

1.2.5 苏木精-伊红染色 (H.E) 将石蜡切片脱蜡、水化。苏木精染色 2 min, 盐酸酒精分化, 伊红染色 10 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明后用中性树脂封片。TE2000-U 倒置相差显微镜 (Nikon, 日本) 下观察大鼠子宫组织形态学变化, 并测量切片中的子宫内膜厚度, 同时计数腺体数量。利用光学显微镜的测微标尺测量子宫内膜厚度, 每组随机选取 5 个切片, 每个切片随机选取上下左右四个方向的视野进行测量, 求取平均值, 计算子宫内膜厚度。同时, 在光学显微镜下, 每组随机选取 5 个切片, 每个切片随机选取 4 个视野进行腺体计数, 取平均值。

1.2.6 Masson 染色 将石蜡切片脱蜡、水化。10%重铬酸钾与 10%三氯乙酸 1:1 混合液染色 40 min, 再用 1%丽春红与 1%酸性品红 1:2 混合液染色 10 min, 1%磷钼酸清洗 5 min, 1%亮绿染色 10 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明后用中性树脂封片。TE2000-U 倒置相差显微镜观察大鼠子宫组织变化, 并对切片中的纤维化面积进行统计。每组选取 3 个切片进行染色, 每个切片随机选取 5 个视野, 计算每个视野下子宫内膜纤维化面积的比例, 即内膜间质纤维化面积占子宫内膜面积的百分比。

1.2.7 免疫组化检测 将石蜡块整修后切片, 切片厚度为 5 μm , 采用超敏二步免疫组织化学方法检测大鼠子宫内膜角蛋白 CK-19 和波形蛋白 Vimentin 的分布。CK-19 按照 1:100 的比例稀释, Vimentin 按照 1:50 的比例稀释。同时, 选取正常组石蜡切片不滴加一抗, 正常加入二抗和 DAB 染色后作为阴性对照组。TE2000-U 倒置相差显微镜下观察并拍照。

1.2.8 Western blot 检测 将大鼠子宫组织提取蛋白后, BCA 法测量蛋白浓度, 70 μg 蛋白加入 12% SDS-PAGE 中电泳, 结束后转印至 NC 膜上, 用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗封闭 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 二抗室温孵育 1 h, X 线胶片曝光显影。

1.2.9 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行统计学分析, 数据以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 对于两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 对于多样本均数间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠子宫解剖形态及胚胎植入情况

大体解剖发现, 正常组大鼠子宫宫壁光滑并且有较强的韧性, 粗细均匀, 子宫弹性丰富, (图 1a); 损伤组大鼠的子宫弹性较差, 宫壁粗糙, 且形态不规则, 韧性极差, 子宫呈红色, 可观察到子宫腔内有明显的血凝块, 部分可见上段子宫积液, 水肿液透明 (图 1b)。将两组大鼠分别按照 1:1 的比例与成年雄性大鼠交配, 见栓 9 d 后取子宫, 观察大鼠胚胎植入情况, 记录植入胚胎数量。正常组大鼠子宫两侧均有胚胎植入, 且胚胎植入数量较多, 胚胎排列紧凑 (图 1c)。损伤组子宫略小, 宫腔部分闭塞, 未见胎鼠 (图 1d), 胚胎植入数量显著低于正常组 (图 1e) ($P < 0.01$)。

2.2 组织染色

H.E 染色显示, 正常组的大鼠子宫结构整齐, 上皮细胞结构完整, 间质中腺体丰富, 组织弹性好 (图 2a); 而损伤组的大鼠子宫内膜明显变薄, 结构松散, 内膜层坏死严重, 腺体缺失, 腔上皮和腺上皮细胞结构不完整, 可见宫腔粘连的发生 (图 2b)。Masson 染色检测子宫组织纤维化的程度, 染色结果显示, 正常组纤维化程度较低 (图 2c), 与其相比, 损伤组的组织纤维化程度严重, 间质细胞过度修复发生宫腔粘连 (图 2d)。与正常组相比, 损伤组大鼠的子宫内膜厚度 (图 2e, $P < 0.01$) 和腺体数量 (图 2f, $P < 0.01$) 均显著降低, 而组织纤维化程度显著增加 (图 2g, $P < 0.01$)。

2.3 子宫内膜角蛋白和波形蛋白

对子宫组织切片进行免疫组织化学染色, 正常组子宫内膜的柱状上皮细胞可见分布均匀的棕黄色颗粒 (图 3a, a1), 即为阳性着色的

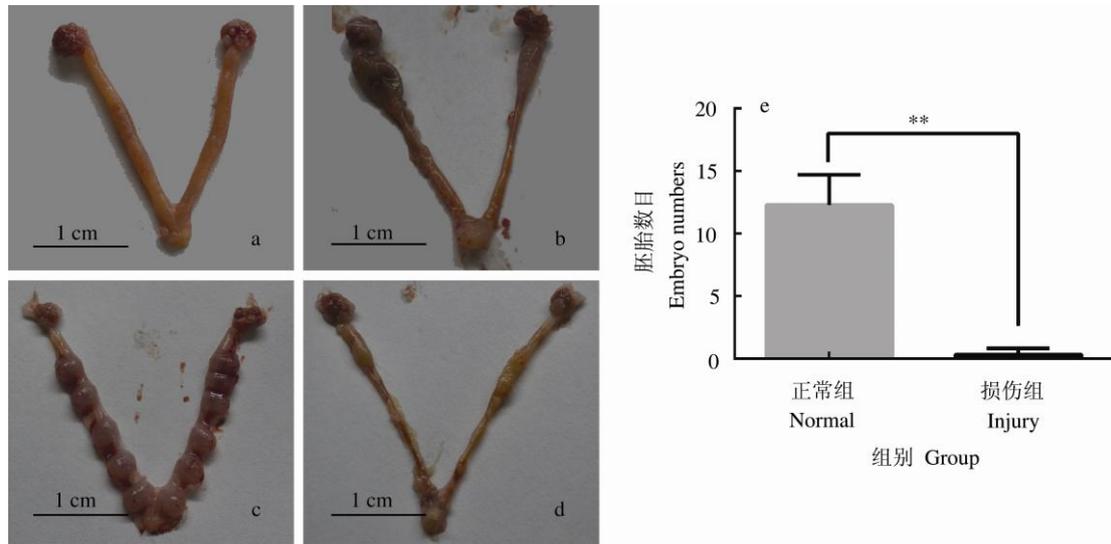


图 1 大鼠子宫大体观察及胚胎植入情况

Fig. 1 The specimen of Rat uterus and Embryo implantation

a. 正常组子宫; b. 损伤组子宫; c. 正常组胚胎植入子宫; d. 损伤组胚胎植入子宫; e. 子宫植入胚胎数统计图。 ** $P < 0.01$ 。

a. Normal group uterus; b. Injury group uterus; c. Normal group of pregnant rat uterus; d. Injury group of pregnant rat uterus; e. The number of embryos implanted in the uterus. ** $P < 0.01$.

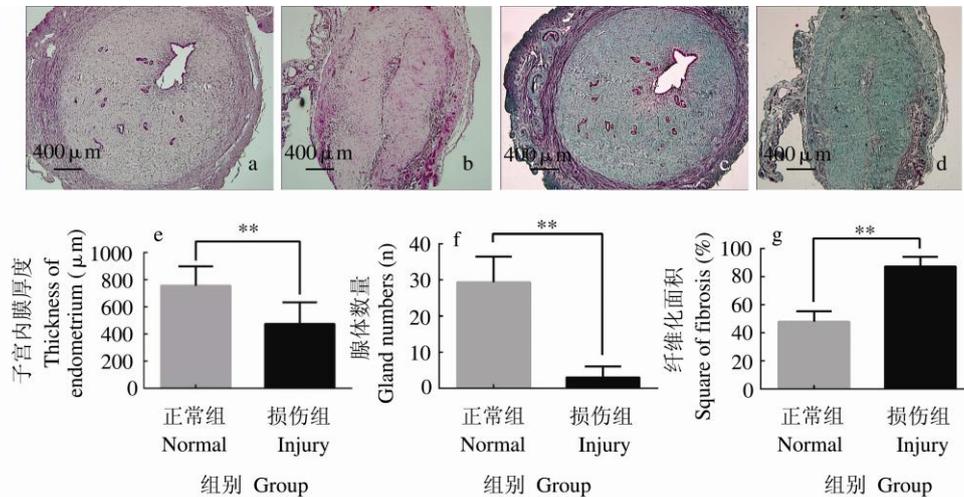


图 2 大鼠子宫内膜检测

Fig. 2 Detection of endometrium in Rats

子宫组织染色: a. 正常组 H.E 染色; b. 损伤组 H.E 染色; c. 正常组 Masson 染色; d. 损伤组 Masson 染色。 e. 子宫内膜厚度的变化; f. 子宫内膜腺体数量的变化; g. 子宫内膜纤维化面积的变化。 ** $P < 0.01$ 。

H.E and Masson staining of Rat uterine tissue: a. Normal group of H.E staining; b. Injury group of H.E staining; c. Normal group of Masson staining; b. Injury group of Masson staining; e. Changes of endometrial thickness; f. Changes in the numbers of endometrial glands; g. Changes in the area of endometrial fibrosis. ** $P < 0.01$.

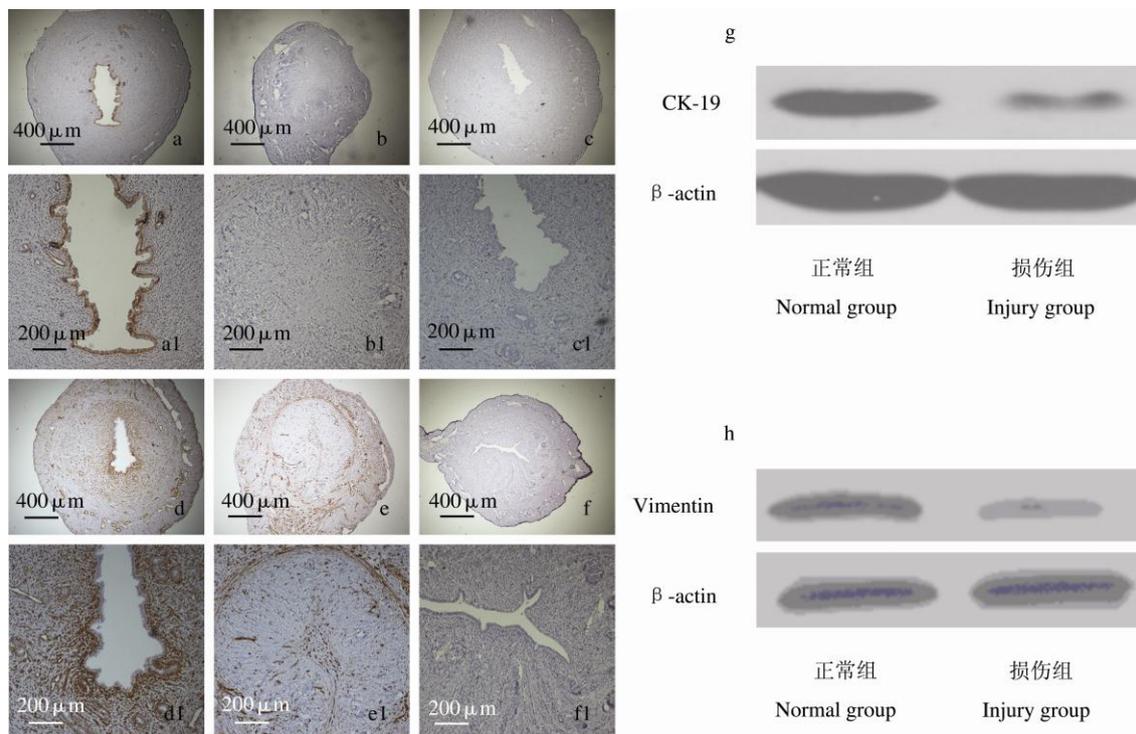


图3 大鼠子宫内膜角蛋白及波形蛋白表达情况

Fig. 3 The expression of CK-19 and Vimentin in Rat uterine endometrium

免疫组化检测角蛋白的表达: a. 正常组, b. 损伤组, c. 阴性对照组, 40 ×; a1 ~ c1 分别为正常组、损伤组和阴性对照组的局部放大, 100 ×。免疫组化检测波形蛋白的表达: d. 正常组, e. 损伤组, f. 阴性对照组, 40 ×; d1 ~ f1 分别为正常组、损伤组和阴性对照组的局部放大, 100 ×。g. Western blot 检测角蛋白的表达量。h. Western blot 检测波形蛋白表达量。

The expression of CK-19 detected by immunohistochemistry: a. Normal group, b. Injury group, c. Negative control group, 40 ×; a1 - c1, normal group, injury group and negative control group shown at 100 × original magnification. The expression of Vimentin detected by immunohistochemistry: d. Normal group, e. Injury group, f. Negative control group, 40 ×; d1 - f1, were normal group, injury group and negative control group shown at 100 × original magnification. g. The expression of CK-19 detected by Western blot. h. The expression of Vimentin detected by Western blot.

角蛋白, 而损伤组阳性着色很少(图 3b, b1), 阴性对照组没有阳性着色(图 3c, c1)。

波形蛋白免疫组化结果显示, 正常对照组子宫内膜间质可见大量棕黄色颗粒沉积于基质细胞和内皮细胞中(图 3d, d1), 相对于正常组, 损伤组有较少棕色颗粒(图 3e, e1), 阴性对照组无阳性着色(图 3f, f1)。

利用 Western blot 实验检测大鼠子宫内膜中角蛋白和波形蛋白的含量, 损伤组的表达量均明显低于正常组(图 3g, h)。

3 讨论

目前, 常用于子宫内膜损伤模型构建的方法主要有物理损伤法(Polishuk et al. 1975)、热损伤法(曲军英等 2011)、化学损伤法(陈学忠等 1956, Yang et al. 2011)等。物理刮除法是一种最贴近临床的损伤方法, 但是受手术器械和实验条件的制约, 其一致性和可重复性较差, 执行度不高; 化学法是利用药物对子宫宫腔进行局部的破坏, 破坏子宫组织结构, 一致

性和可重复性较好。已有报道显示, 95%乙醇处理 5 min 可引起子宫内膜变薄, 本实验尝试着摸索 95%乙醇引起宫腔粘连的条件, 发现 95%乙醇处理 3 min, 大部分子宫会出现宫腔粘连的现象。H.E 染色结果显示, 与正常大鼠子宫组织相比, 损伤后的子宫内膜结构不完整, 内膜褶皱减少, 内膜厚度降低, 腔上皮及腺上皮细胞分布松散, 腺体数量明显减少; Masson 染色结果显示, 损伤组子宫内膜纤维化程度严重, 部分子宫内膜发生宫腔粘连。这些特征与人类子宫内膜损伤后的形态变化相似。

本研究选择 SD 大鼠作为实验动物, 是由于大鼠具有适应性强、生长发育迅速、繁殖率高、自发性排卵、动情周期规律且易于观察、遗传学背景较为一致的特点(项华等 2008)。雌性大鼠性成熟后, 生殖器官发生周期性变化。为了取材时大鼠处于同一周期, 在取材前 2 d 给所有取材的大鼠腹腔注射 PMSG(俞凌 2012), 48 h 后大鼠处于同一动情周期再对大鼠实行安乐死, 然后进行后续实验, 得到的数据更加可信、具有说服力。

在本研究中, 检测波形蛋白和角蛋白表达时提取的是整个大鼠子宫的蛋白而不是子宫内膜的蛋白, 主要是由于目前本实验室尚未建立从大鼠子宫全层中分离子宫内膜的有效方法, 分离不完整或实验组和对照组不一致, 都会影响最终的实验结果。我们采用了免疫组化和 Western blot 两种方法分析了波形蛋白和角蛋白的表达。从免疫组化结果中我们可以看到波形蛋白和角蛋白在子宫全层和子宫内膜的表达情况, 结果显示, 波形蛋白和角蛋白的阳性信号在子宫全层和内膜均降低, 这与 Western 的结果一致。此外, 角蛋白主要存在于内膜上皮柱状细胞中, 波形蛋白主要存在于内膜间质细胞内, 外部的肌层对于角蛋白和波形蛋白的检测影响较小。由此, 我们认为整个大鼠子宫和子宫内膜的角蛋白及波形蛋白的变化趋势是基本一致的。

本研究发现子宫损伤后纤维化程度增加,

波形蛋白表达降低。波形蛋白可以作为子宫内膜细胞的标志物, 但已有研究显示, 波形蛋白会随组织膜纤维化程度的增加而增加(Bargagna-Mohan et al. 2015)。我们分析子宫损伤后子宫内膜纤维化增加而波形蛋白降低可能有以下原因:(一)大鼠子宫内膜损伤后, Masson 染色结果证实, 纤维化程度增加可能是由于组织中纤维结缔组织所占的百分比相对应增高, 但是损伤后大鼠子宫内膜明显变薄, 结构松散, 内膜层坏死严重, 腔上皮和腺上皮细胞结构不完整, 可能最终导致整个子宫内膜中的细胞数量相对减少, 从而即使纤维化程度增加, 但是内膜层细胞量相对减少, 最后导致 Western 中波形蛋白表达降低。(二)由免疫组化结果可见, 正常情况下波形蛋白主要表达在子宫内膜浅层基质, 在深层基质表达量较少, 基本与损伤组表达量相仿。在子宫内膜发生损伤时, 浅层基质已经损伤脱落。我们推测这可能是导致波形蛋白表达降低的另一个原因。

胚胎植入的关键是子宫内膜容受性, 在子宫内膜健全的状态下, 即使是异常的胚胎, 也能成功植入。但是子宫内膜容受性建立的机制极其复杂, 不仅受到卵巢性激素的影响, 而且需要子宫内膜和胚胎分泌的细胞因子和粘附因子等对其进行调节(徐慧颖等 2014)。本实验中损伤大鼠的子宫腺体缺失、内膜变薄、瘢痕较多, 这就严重影响了子宫内膜分泌细胞因子和粘附因子等, 还影响着胚胎的着床过程, 致使胚胎植入数量大幅下降, 甚至不能成功植入胚胎。

综上所述, 本研究发现 95%乙醇处理大鼠子宫内膜 3 min 后能使子宫内膜发生粘连, 腺体数量减少, 间质纤维化面积增多, 角蛋白和波形蛋白含量减少, 并且严重影响了胚胎植入能力, 这与人类子宫内膜损伤后的病理特征极为相似。该研究不仅能为探讨子宫内膜损伤的病理表现和发病机制提供实验性模型, 也能为子宫内膜损伤的治疗提供有效的动物模型。

参 考 文 献

- Bargagna-Mohan P, Lei L, Thompson A, et al. 2015. Vimentin phosphorylation underlies myofibroblast sensitivity to withaferin a *in vitro* and during corneal fibrosis. *PLoS One*, 10(7): e0133399.
- Berman J M. 2008. Intrauterine adhesions. *Seminars in Reproductive Medicine*, 26(4): 349–355.
- Conforti A, Alviggi C, Mollo A, et al. 2013. The management of Asherman syndrome: a review of literature. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1): 118.
- Polishuk W Z. 1975. Endometrial regeneration and adhesion formation. *Samj South African Medical Journal*, 49(12): 440–442.
- Yang X, Zhang M, Zhang Y, et al. 2011. Mesenchymal stem cells derived from Wharton jelly of the human umbilical cord ameliorate damage to human endometrial stromal cells. *Fertility and Sterility*, 96(4): 1029–1036. e4.
- Yu D, Wong Y M, Cheong Y, et al. 2008. Asherman syndrome—one century later. *Fertility and Sterility*, 89(4): 759–779.
- 陈学忠, 舒沪英, 钱振坤, 等. 1956. 活血化瘀方防治子宫内粘连的实验研究. *中西医结合杂志*, 6(12): 740–742.
- 高红, 赵静, 李艳萍. 2011. 大鼠薄型子宫内膜模型的建立和鉴定. *生命科学研究*, 15(5): 426–431.
- 曲军英, 吕一帆, 林茵, 等. 2011. 建立小鼠子宫内粘连模型的实验研究. *福建医科大学学报*, 45(1): 34–36, 44.
- 项华, 章晓玲, 查捷, 等. 2008. SD 大鼠生长发育指标和主要脏器正常参考值的探讨. *中国卫生检验杂志*, 18(2): 299–301.
- 徐慧颖, 李娜, 张云山. 2014. 胚胎植入——子宫内粘连是关键. *生殖医学杂志*, 23(3): 198–202.
- 俞凌. 2012. 人脐带间充质干细胞治疗卵巢早衰的初步实验研究. 北京: 解放军总医院军事进修学院博士学位论文.