临床研究 DOI :10.13406/j.cnki.cyxb.001242

PLGA生物可降解膜用于预防宫腔粘连的初步研究

朱　轶，胡丽娜，任　艳
重庆医科大学附属第二医院妇产科，重庆　400010）

【摘　要】目的：研究聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly（lactic-co-glycolic acid），PLGA]膜作为生物可降解材料用于预防宫腔粘连的可行性初步研究。方法：制备不同单体比例的 PLGA 膜，分别于模拟宫腔液以及昆明小鼠宫腔中进行体外和体内降解实验。将 30 只昆明小鼠随机分为假手术组、宫腔粘连组、PLGA 膜组，每组各 10 只，运用 Masson 染色和 Western blot 观察各组昆明小鼠子宫内膜纤维化程度和相关蛋白的表达。结果：不同单体比例的 PLGA 膜体外降解时间不同，PLGA 膜（50:50）的降解速度最快，在 4 周时质量损失达 98.5%；PLGA 膜（90:10）降解速度最慢，在 12 周时其质量损失仅为 7.8%；PLGA（75:25）降解速度介于前两者之间，于 12 周时质量损失达 95.7%。不同单体比例的 PLGA 膜体内降解时间不同，PLGA 膜（50:50）7 d 后在宫腔内完全降解，而 PLGA 膜（75:25）、PLGA 膜（90:10）仍然滞留于宫腔中。与假手术组相比，PLGA 膜组（75:25）增加了昆明小鼠子宫内膜纤维化面积（P=0.000）以及相关蛋白的表达（P<0.01）；与宫腔粘连组相比，PLGA 膜组（75:25）子宫内膜纤维化面积以及相关蛋白的表达无明显差异（P>0.05）。结论：PLGA 生物可降解材料用于预防宫腔粘连，具有宫腔内降解速度可调节、不增加宫腔粘连组子宫内膜纤维化程度的特点，在预防宫腔粘连方面具有潜在的应用价值。

【关键词】PLGA；宫腔粘连；生物可降解
【中国分类号】R318.08　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-10-15

Primary research of biodegradable PLGA film used for intrauterine adhesion prevention

Zhu Yi，Hu Lina，Ren Yan
（*Department of Obstetrics and Gynecology，the Second Affiliated Hospital，Chongqing Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To primarily research about feasibility of biodegradable poly（lactic-co-glycolic acid）（PLGA）film used for intrauterine adhesion prevention.***Methods***：PLGA film of different proportions of LA：GA was prepared. The film was immersed into the simulated uterine fluid to test the in vitro degradation. They were also placed in animal uterine lumen to test the in vivo degradation. Thirty Kunming mice were divided randomly into three groups：sham operation，intrauterine adhesion and PLGA film. Masson's stain and Western blot was used to exam the fibrotic effect of PLGA film on endometrium of uterus. ***Results***：In vitro degradation，the degradation time of PLGA film（50:50）was the fastest（98.5% weight loss at four weeks）while PLGA film（90:10）was the slowest（7.8% weight loss at 12 weeks）. The degradation time of PLGA film（75:25）was between PLGA film（50:50）and PLGA film（90:10）. Most weight of PLGA film（75:25）was degraded at 4 weeks（95.7% weight loss at 4 weeks）. In vivo degradation，PLGA film（50:50）was degraded completely in 7 days while PLGA film（75:25）and PLGA film（90:10）were detained in the uterine cavity after 7 days. PLGA film（75:25）increased the fibrotic area（P=0.000）and expression of fibrotic proteins（P<0.01）compared with sham operation group in Kunming mice. There was no significant difference in fibrotic area（P>0.05）and expression of fibrotic proteins（P>0.05）in endomtrium between intrauterine adhesion group and PLGAfilm group in Kunming mice. ***Conclusion***：PLGA has a potential application value for intrauterine adhesion prevention，of which degradation time can be regulated without changing the fibrotic degree of endometriumin intrauterine adhesion.

【Key words】poly（lactic-co-glycolic acid）；intrauterine adhesion；biodegradable

作者介绍：朱　轶，Email：17609325@qq.com，
研究方向：围产医学，超声医学、生殖医学。
通信作者：胡丽娜，Email：cqhulina@126.com。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170426.1137.038.html
（2017-04-26）

宫腔粘连又名子宫腔粘连综合征（Asherman syndrome），是指宫腔前后壁之间形成的纤维粘连带[1]。它是宫腔手术如人工流产、诊断性刮宫、黏膜下肌瘤切除术等后的常见并发症，其最为严重的后果是继发不孕。目前临床上已有的预防宫腔粘连的措施包括：①术后口服雌激素促进子宫内膜修复[2]；②术后放置宫腔内节育器[3]；③宫腔内安置气囊尿管[4]；④宫腔内注射透明质酸凝胶[5]；⑤干细胞疗法[6]。第②③④三种方法运用了物理屏障的作用使子宫内膜的前后壁分隔开，但这几种方法存在一定弊端。宫内节育器以及尿管的安置需要再次手术取出。而透明质酸凝胶在宫腔内滞留时间较短，难以起到长时间的隔离作用。因此本课题组提出一个比较理想的预防宫腔粘连的材料应当具备以下特点：能够在宫腔内滞留较长时间；此种材料具有生物可降解或者生物可吸收的特点，在达到预防宫腔粘连作用以后能够被生物体降解或者吸收，不需要再次手术取出；当然，这种生物材料还必须对生物体无毒害作用。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly（lactic-co-glycolic acid），PLGA]由 2 种单体，即乳酸（lactide，LA）和羟基乙酸（glycolide，GA）随机聚合而成，是一种可降解的高分子有机化合物，具有良好的生物相容性、无毒、良好的成囊和成膜性能，被广泛应用于制药[7]、医用工程材料[8]。在美国 PLGA 通过 FDA 认证，被正式作为药用辅料收录进美国药典。PLGA 的降解速度取决于其不同单体的比例[9]，这一特点使其具有体内降解速率可控的特点，其降解产物为乳酸和羟基乙酸，同时也是人体代谢途径的副产物，它应用于医药和生物材料时不会产生毒副反应。目前已被制作为人工导管，药物缓释载体，组织工程支架材料。基于以上观点，本文拟利用在生物材料领域广泛得到应用的生物可降解材料 PLGA 制作宫腔防粘连膜，并通过 PLGA 不同的单体比例实现其降解可控性。另外就 PLGA 膜对子宫内膜纤维化的影响作一初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物选择 6 月龄大的雌性昆明小鼠作为研究对象，均购买自重庆医科大学动物实验中心，此动物均在重庆医科大学动物实验中心进行标准饲养，12 h 白昼及 12 h 夜晚。

1.1.2 主要试剂 免疫组化试剂盒（SP 9000）及 DAB 显色试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司）；anti-CTGF goat polyclonal antibody（Santa Cruz Biotechnology，Inc.，USA）；anti-转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）rabbit polyclonal antibody、anti-Ⅰ型胶原蛋白（collagenI，COI）rabbit polyclonal antibody（北京博奥森生物技术有限公司）；Masson 染色试剂盒（南京森贝伽生物科技有限公司）；全蛋白提取试剂盒（南京凯基生物科技发展有限公司）；BCA 蛋白测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒（江苏碧云天生物技术研究所）；PLGA（50:50）（MW：8.8 万~11.7 万）、PLGA（75:25）（MW：12.7 万）、PLGA（50:10）（MW：40 万）（济南岱罡生物工程有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 PLGA 膜的制备 将 PLGA 不同 LA：GA 比例分别按照 10%（质量体积比）溶解于二氯甲烷中，保存于密闭容器，常温过夜。待 PLGA 完全溶解后，倒入 4 cm×4 cm 聚四氯乙烯模具，放置于超净工作台上，鼓风干燥 48 h 后揭膜，翻面后再次鼓风干燥 24 h，后真空干燥 24 h。

1.2.2 PLGA 膜的体外降解 参照中华人民共和国国家标准 GB/T16886.13-2001 医疗器械生物学评价第 13 部分进行 PLGA 膜的体外降解时间研究。降解溶液采用宫腔模拟液[10]进行，试验样品为 0.5 g，完全浸泡于 5 mL 模拟宫腔液中，每个样品单独使用 1 个容器。然后放置于 37 ℃恒温摇床，60 r/min 至 12 周。每周更换 1 次新的宫腔模拟液。试验时间选择 4、8、12 周，3 个样品平行实验。于设定的时间点将膜与降解溶液经过滤纸过滤（实验前称取滤纸质量），并用双蒸水冲洗 3 次，采用真空干燥器将滤器和滤出物干燥至恒重，然后测定质量。降解后样品质量为滤器及滤出物质量减去滤器质量。质量消耗（%）=（试验前样品质量-降解后样品质量）÷试验前样品质量×100%

1.2.3 PLGA 膜的体内降解 将 PLGA 膜裁剪成长（1.5×0.1）cm 长条状，对小鼠进行麻醉后，消毒进腹，找到小鼠子宫，于子宫中下段作切口，将 PLGA 膜放置于宫腔内，并关腹。7 d 后观察其在子宫内的降解情况。

1.2.4 实验分组 30 只昆明小鼠随机分为 3 组，每组 10只。第 1 组为假手术组，乙醚吸入麻醉后仅进行腹部切口开腹及关腹手术，剔除小鼠腹部毛发，消毒铺巾，取下腹部正中纵切口并不进行宫腔的任何操作；第 2 组为宫腔粘连组，麻醉成功后，找出小鼠 Y 形子宫，于一侧子宫中下 1/3 交界处横行剪开子宫浆肌层，运用自制刮匙沿宫腔纵轴伸入宫腔，每个方向各进行 4 次搔刮，另一侧子宫同样操作[11-12]，手术完毕以后，将子宫送回腹腔，并逐层关腹。第 3 组为 PLGA 膜组，小鼠在宫腔损伤后宫腔内植入 PLGA 膜。待小鼠苏醒后继续饲养，1 周后断颈处死，每条子宫部分保存于福尔马林溶液中用作组织切片以及 Masson 染色实验，另取部分保存于-80 ℃冰箱用于 Western blot 实验。

1.2.5 Masson 染色检测 PLGA 膜对子宫内膜纤维化面积的影响组织固定、切片、脱蜡至水，Masson 复合染色液 5 min，0.2%醋酸水溶液稍洗，5%磷钨酸 5~10 min。0.2%醋酸水溶液浸洗 2 min，亮绿染色液 5 min，0.2%醋酸水溶液洗 2 次，无水

乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。利用 Nikon Element AR 4.0 软件测量子宫内膜纤维化面积与子宫内膜面积的比值。

1.2.6 Western blot 检测 PLGA 膜 对子宫内膜纤维化相关蛋白表达的影响 昆明小鼠子宫内膜全蛋白提取，运用 BCA 法进行蛋白定量，SDS-PAGE 凝胶分离电泳，湿转法转到 PVDF 膜（美国 Millipore 公司）上（80 V，20 min；100 V，40 min），5%脱脂奶粉室温封闭 2 h，TGF-β1、COI 一抗（1∶1 000）4 ℃过夜，次日以 TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h，TBST 洗膜 3 次，于暗室中曝光 3 min。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析，多组比较采用单因素方差分析，多重比较采用 Student-Newman-Keuls，非正态分布数据进行对数转换，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 PLGA 膜的体外降解

不同单体比例的 PLGA 膜体外降解时间不同，PLGA 膜（50∶50）的降解速度最快，在 4 周时绝大部分发生降解，质量损失达 98.5%，PLGA 膜（90∶10）降解速度最慢，在 12 周时其质量损失仅为 7.8%，PLGA 膜（75∶25）降解速度介于前两者之间，于 12 周时大部分发生降解，质量损失达 95.7%。因此随着 PLGA 中 LA 成分比例的增加，其降解速度减慢（图 1）。

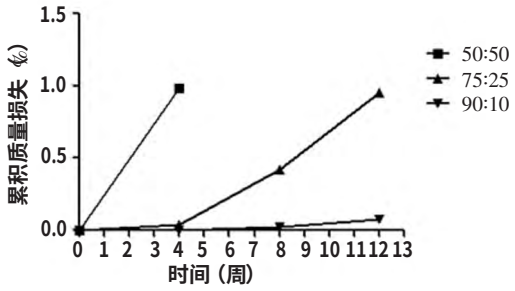


图 1 不同单体比例的 PLGA 膜的体外降解质量损失

Fig.1 *In vitro* degradation profile of PLGA films of different proportion of LA:GA

2.2 PLGA 膜的体内降解

PLGA 膜通过手术放置于昆明小鼠宫腔内，7 d 后开腹观察 PLGA 膜的体内降解情况。研究发现 PLGA 膜（50∶50）在昆明小鼠宫腔内无残留，PLGA 膜（75∶25）、PLGA 膜（90∶10）仍然滞留于宫腔中，并能轻易地从宫腔中取出（图 2）。

2.3 PLGA 膜对昆明小鼠子宫内膜纤维化程度的影响

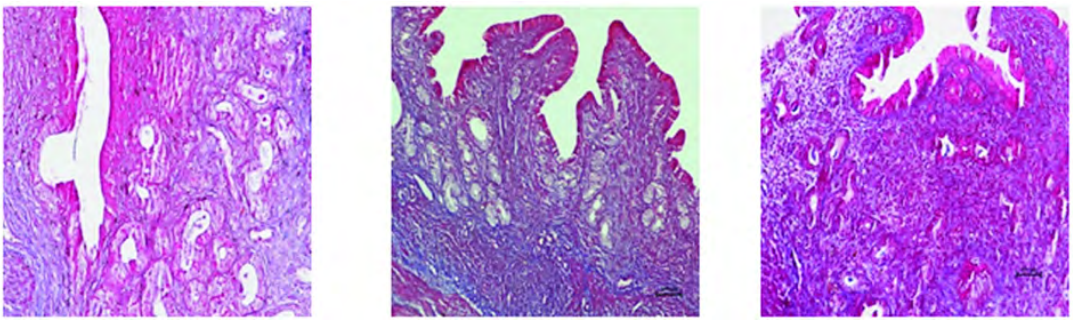
假手术组、宫腔粘连组、PLGA 膜组（75∶25）子宫内膜纤维化面积比例分别为（0.072 ± 0.027）、（0.597 ± 0.145）和（0.568 ± 0.192），3 组比较差异具有统计学意义（F=100.633，P=0.000）；进一步两两比较：与假手术组相比，宫腔粘连组、PLGA 膜组增加了子宫内膜纤维化面积，差异有统计学意义（P=0.000，P=0.000），而后两组比较差异无统计学意义（P=0.680），如图 3、图 4 所示。



A. PLGA 膜（50∶50） B. PLGA 膜（75∶25） C. PLGA 膜（90∶10）

图 2 不同单体比例的 PLGA 膜的体内降解比较

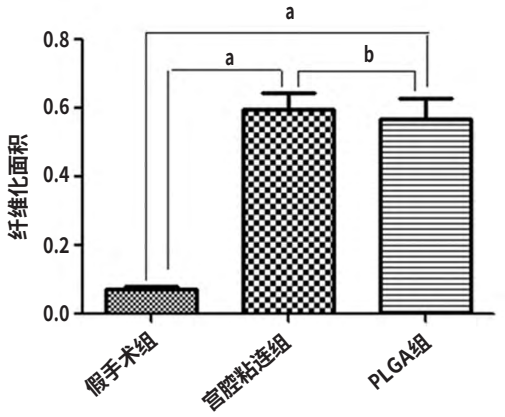
Fig.2 *In vivo* degradation profile of PLGA films of different proportion



A. 假手术组 B. 宫腔粘连组 C. PLGA 膜组

图 3 昆明小鼠子宫内膜 Masson 染色（20×）

Fig.3 Masson stain for endometrium of Kunming mice（20×）



a. P<0.001 与 b. P>0.05

图 4 假手术组、宫腔粘连组、PLGA 组子宫内膜纤维化面积比较

Fig.4 Analysis of fibrotic area of endometrium in sham operation, intrauterine adhesion and PLGA groups

假手术组、宫腔粘连组、PLGA 膜组（5∶25）子宫内膜 TGF-β1 蛋白的表达差异具有统计学意义（F=22.003，P=0.002）。进一步两两比较：与假手术组相比，宫腔粘连组、PLGA 膜组增加了子宫内膜 TGF-β1 蛋白的表达，差异有统计学意义（t=0.001，P=0.002），而后两组比较差异无统计学意义（t=0.271）。3 组子宫内膜 COI 的表达差异具有统计学意义（F=16.145，P=0.004）。进一步两两比较：与假手术组相比，宫腔粘连组、PLGA 膜组增加了 COI 的表达，差异有统计学意义（t=0.002，P=0.004），而后 2 组比较差异无统计学意义（t=0.630），如图 5、图 6 所示。

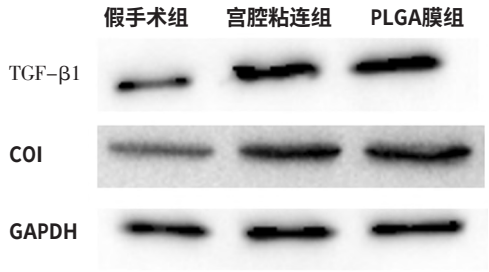
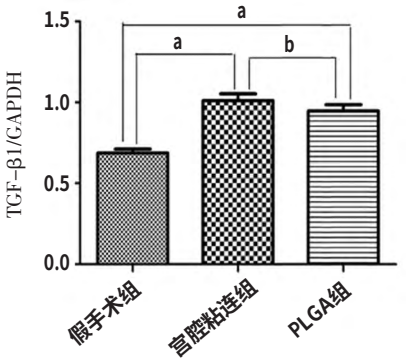
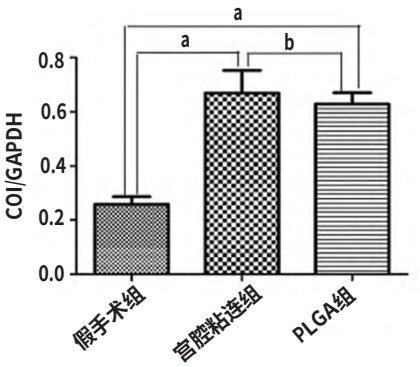


图 5 假手术组、宫腔粘连组以及 PLGA 膜组子宫内膜的 TGF-β1、COI 的表达

Fig.5 Expression of fibrotic proteins in endmetrium in sham operation, intrauterine adhesion and PLGA film groups



A. 假手术组、宫腔粘连组以及 PLGA 膜组子宫内膜 TGF-β1 蛋白表达的比较



B. 假手术组、宫腔粘连组以及 PLGA 膜组子宫内膜 COI 蛋白表达的比较

a：P<0.01 与 b：P>0.05

图 6 假手术组、宫腔粘连组以及 PLGA 膜组子宫内膜纤维化相关蛋白表达的比较

Fig.6 Comparison of expression of fibrotic proteins in endometrium among sham operation, intrauterine adhesion and PLGA film groups

3 讨 论

PLGA 由两种单体随机聚合而成，是一种可降解的功能高分子有机化合物。在本文中，利用 PLGA 作为预防宫腔粘连的材料进行了初步的研究。既往研究发现 PLGA 作为生物可降解材料在体内的降解速度是与单体比例以及分子量相关的[13]。通常情况下 LA 的比例越高，分子量越大，其降解速度越慢。在本研究中发现不论是在模拟宫腔液还是在动物宫腔中，不同单体比例的 PLGA 降解速率存在差异，LA 比例越高，降解越慢，宫腔内滞留时间越长。目前临床上已运用透明质酸预防宫腔手术后的宫腔粘连。为起到更为持久的宫腔隔离作用，有学者利用交联透明质酸预防宫腔粘连，其在宫腔内滞留时间可达到 72 h[14]。本实验中通过提高 PLGA 中 LA 的比例，使 PLGA 膜在宫腔内停留时间至少达到 7 d（5∶25，90∶10）。

TGF-β1 和 COI 被认为参与了许多人体重要器官的纤维化进程[15-16]。TGF-β1 在肾脏的致纤维化作

用主要通过 TGF-β/Smad 信号通路来实现[17]，它使 Smad2/3 发生磷酸化，进而促进纤维化相关蛋白的表达。近年来也有研究报道宫腔粘连患者子宫内膜中 TGF-β1/Smad2、Smad3/miR29 信号通路的过度激活参与了宫腔粘连的病理过程[18]。因此 TGF-β1 与子宫内膜的纤维化密切相关。PLGA 作为异物植入宫腔后是否会增加器官纤维化的形成呢？在本文中通过设计对照组的实验发现植入 PLGA 膜后增加了昆明小鼠假手术组子宫内膜纤维化面积以及 TGF-β1、COI 的蛋白表达，但并未明显增加宫腔粘连组的子宫内膜纤维化面积和 TGF-β1、COI 的蛋白表达。由此可见，PLGA 的植入可能对子宫内膜的纤维化产生一定程度的影响。PLGA 已广泛用于载药系统的研究[19]，在未来的研究中，可在 PLGA 膜的基础上，加载药物以减少其对子宫内膜纤维化的影响。

综上所述，本研究通过对 PLGA 的相关性质研究，认为 PLGA 膜作为预防宫腔粘连材料具有降解速度可控，不增加宫腔粘连组子宫内膜纤维化程度的特点。同时 PLGA 具有易于修饰的特点，在预防宫腔粘连的生物材料领域，具有较好的应用前景。

参 考 文 献

[1] Asherman JG. Amenorrhoea traumatica (atretica) [J]. J Obstet Gynaecol Br Emp，1948，55（）：23-30.

[2] 王雪峰，陈燕英，刘海叶，等. 大剂量戊酸雌二醇预防重度宫腔粘连分离术后复发的疗[J]. 实用医学杂志，2013，29（6）：2716-2718.

[3] 左 欣，杨慧云，陈 芳，等. 两种方法预防宫腔粘连分离术后再粘连疗效分析[J].实用妇产科杂志，2015，31（）：540-542.

[4] 夏良斌，李爱斌，杨 菁，等. 宫腔镜术后宫腔持续放置球囊导尿管治疗重度宫腔粘连 312 例疗效分析[J]. 实用医学杂志，2006，22（6）：1870-1872.

[5] Mais V，Cirronis MG，Peiretti M，et al. Efficacy of auto-crosslinked hyaluronan gel for adhesion prevention in laparoscopy and hysteroscopy：a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol，2012，160（）：1-5.

[6] Ding L，Li X，Sun H，et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus[J]. Biomaterials，2014，35（8）：4888-4900.

[7] Ramazani F，Chen W，van Nostrum CF，et al. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres：state-of-the-art and challenges[J]. Int J Pharm，2016，499（1-2）：358-367.

[8] Pan Z，Duan P，Liu X，et al. Effect of porosities of bilayered porous scaffolds on spontaneous osteochondral repair in cartilage tissue engineering[J]. Regen Biomater，2015，2（）：9-19.

[9] 赵 莉，何晨光，高永娟，等. PLGA 的不同组成对支架材料性能的影响研究[J]. 中国生物工程杂志，2008，28（5）：22-28.

[10] Cai S，Xia X，Xie C. Corrosion behavior of copper/LDPE nanocomposites in simulated uterine solution[J]. Biomaterials，2005，26（5）：2671-2676.

[11] Hu J，Zeng B，Jiang X，et al. The expression of marker for endometrial stem cell and fibrosis was increased in intrauterine adhesious [J]. Int J Clin Exp Pathol，2015，8（1）：1525-1534.

[12] Zhu Y，Hu J，Yu T，et al. High molecular weight hyaluronic acid inhibits fibrosis of endometrium[J]. Med Sci Monit，2016，22：3438-3445.

[13] Di Toro R，Betti V，Spampinato S. Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly（DL-lactide-co-glycolide）copolymers[J]. Eur J Pharm Sci，2004，21（1-3）：161-169.

[14] Guida M，Acunzo G，Di Spiezio Sardo A，et al. Effectiveness of auto-crosslinked hyaluronic acid gel in the prevention of intrauterine adhesions after hysteroscopic surgery：a prospective，randomized，controlled study[J]. Hum Reprod，2004，19（6）：1461-1464.

[15] Kuma A，Tamura M，Otsuji Y. Mechanism of and therapy for kidney fibrosis[J]. J UOEH，2016，38（）：25-34.

[16] Xie WL，Jiang R，Shen XL，et al. Diosgenin attenuates hepatic stellate cell activation through transforming growth factor-beta/Smad signaling pathway[J]. Int J Clin Exp Med，2015，8（1）：20323-20329.

[17] Zhang S，Liu Q，Xiao J，et al. Molecular validation of the precision-cut kidney slice（PCKS）model of renal fibrosis through assessment of TGF-β1-induced Smad and p38/ERK signaling[J]. Int Immunopharmacol，2016，34：32-36.

[18] 周曼萍，何援利，刘 芳. miR-29a、TGF-β1、Smad2 及 Smad3 在宫腔粘连中的表达及意义[J]. 实用医学杂志，2014，30（8）：1231-1234.

[19] Mahapatro A，Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines[J]. J Nanobiotechnology，2011，9：55.

责任编辑：方 济）