基础研究 DOI :10.13406/j.cnki.cyxb.001225

机械和感染双重法建立中华田园犬宫腔粘连模型

阳 媛，毛艳华，王 佳，张应凤
（重庆医科大学附属大学城医院妇产科，重庆 401331）

[摘 要]目的：通过机械和感染双重法构建一个犬的宫腔粘连动物模型，并检测血管内皮因子（ascular endothelial growth factor，VEGF）、转化生长因子（ransforming growth factor-β1，TGF-β1）的表达，评估其与宫腔粘连形成的关系，为下一步研究提供实验平台。方法：选取 6 只性发育成熟的健康雌性中华田园犬，所有建模前的犬的一小段右侧宫角组织作为对照组，建模后该部位子宫角组织作为处理组。利用机械搔刮和感染双重法损伤右侧宫角内膜，于建模前后各收集一小段宫角标本，行 HE、Masson 染色及 SP 法免疫组化，整理并统计分析。结果：处理组的内膜厚度[（1.325±0.399）cm]薄于对照组[（1.025±0.466）cm]，差异具有统计学意义（P=0.050）；处理组的内膜腺体数目[（4.388±1.774）个]明显比对照组[（6.518±4.421）个]减少，差异具有统计学意义（P=0.001）；处理组的子宫内膜纤维化面积比例（0.775±0.040）明显高于对照组（0.329±0.062），差异有统计学意义（P=0.000）；处理组的子宫内膜中 VEGF（1.967±0.390）、TGF-β1（0.200±0.306）的表达量高于对照组（0.700±0.823）、（0.100±0.361），差异均具有统计学意义（P=0.000，P=0.001）。结论：采用机械和感染双重法可以成功构建中华田园犬宫腔粘连的动物模型，且 VEGF、TGF-β1 的表达量升高可能与宫腔粘连的发生有关。

[关键词]宫腔粘连；动物模型；损伤；感染；犬科
[中图分类号]R711 [文献标志码]A [收稿日期]2016-12-30

Establishment of Chinese rural dog intrauterine adhesion model by mechanical and infection double injury

Yang Yuan，Mao Yanhua，Wang Jia，Zhang Yingfeng
（*Department of Gynaecology and Obstetrics，University Town Hospital of Chongqing Medical University*）

[Abstract]***Objective***：To establish a stable animal model of intrauterine adhesion by mechanical and infection，to measure the expressions of vascular endothelial growth factor（VEGF）and transforming growth factor-β1（TGF-β1）and to evaluate their relationship with the formation of adhesion，in order to provide a experimental platform for the next research. ***Methods***：The uterus from 6 healthy mature female Chinese pastoral dogs were collected and divided into two groups：the treatment group and the control group. The right uterine endometriums were collected and evaluated using HE staining，Masson's stain and SP immunohistochemistry. ***Results***：The endometrial thickness of treatment group（1.325±0.399）was thinner than that（1.025±0.466）of control group；the number of endometrial glands of treatment group（4.388±1.774）was significantly fewer than that（6.518±4.421）of control group；the endometrial fibrosis area（0.775±0.040）was significantly higher than that（0.329±0.062）of control group. The expression levels of VEGF（1.967±0.390）and TGF-β1（0.200±0.306）in endometrium of treatment group were significantly higher than those（0.700±0.823）and（0.100±0.361）in the control group. ***Conclusion***：The animal model of intrauterine adhesions are constructed successfully by mechanical and infective method. The high expressions of VEGF and TGF-β1 may be closely related with the occurrence of intrauterine adhesion.

[Key words]intrauterine adhesious；animal model；injury；infection；canidae

作者介绍：阳 媛，Email：1342365781@qq.com，
研究方向：主要从事妇产科内分泌研究。
通信作者：王 佳，Email：752203031@qq.com。
基金项目：重庆市卫生计生委医学科研项目（编号：20141014）；重庆市医疗特色专科建设项目（编号：2013-46）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170426.1115.004.html（2017-04-26）

宫腔粘连（intrauterine adhesions，IUA）也称阿谢曼综合征（asherman syndrome，AS），指各种因素使子宫内膜基底层损伤后，在创伤愈合的过程中发生纤维化病变，从而引起宫腔部分或全部粘连的现象[1]。通常发生在刮宫术或任何子宫手术后，包括子宫肌瘤切除术、腹腔镜成形术等，也可见于流产后或剖宫产术后[2]。但大多数情况下与怀孕并发症，如不完全流产、胎盘残留或产后出血刮除相关[3]。可导致月经过少、痛经、闭经或不孕、反复流产等生殖内分泌问题，严重影响广大女性患者的身心健康[4-6]。近年来由于剖宫产术和子宫手术的增加，以及意识的增强和更详细的诊断方法[2]，IUA 的发病率和检出率不断上升，且其发病年龄呈年轻化趋势，已成为女性继发性不孕的主要病因[7]。因此，本研究拟构建接近人类 IUA 的动物模型，进一步探讨 IUA 的发病机制及其治疗策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取性成熟的健康雌性中华田园犬 6 只（重庆医科大学动物中心提供），均为未产母犬，年龄 1~1.5 岁，体质量 9~12 kg，随机编为 1~6 号，所有犬单笼饲养，常规喂养，该实验方案已通过重庆医科大学伦理委员会审核（20141230）。建模前收集的宫角组织作为对照组，建模后 2 个月的该处组织作为处理组。

1.2 脂多糖棉线制备[8]

细菌脂多糖（lipopolysaccharide，LPS，Sigma 公司）溶于 PBS 液中配成浓度为 10 mg/L 的溶液，4 ℃冰箱保存备用。造模前 24 h 将约 40 cm 的 3 号医用无菌手术线浸泡在配好的脂多糖溶液中。

1.3 诱导发情

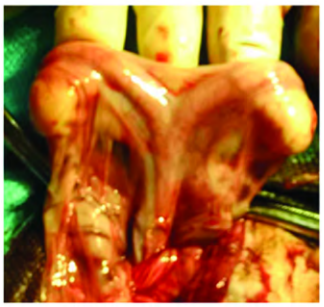
6 只犬分别给予 PMSG（购自 ProSpec 公司，来源于Serum of pregnant mares）肌内注射，250 IU/d，共 5 d，每天上午 9 点注射。观察母犬的行为、外阴变化以及阴道分泌物的情况，以此判断犬是否发情。

1.4 造模的方法[8,12-13]

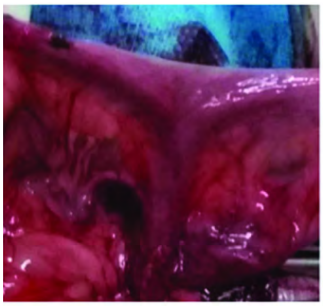
6 只犬均在外阴肿胀且有血色分泌物的第 2~4 天进行手术，按 35 mg/kg 腹腔注射 3%的戊巴比妥钠麻醉。严格遵守无菌原则，于犬的下腹正中部沿身体长轴方向纵行切开一长约 10 cm 的切口，逐层分离组织，然后进入腹腔，推开膀胱，暴露出子宫。在距宫体交界处 5 cm 的右宫角横切开一 1 cm 左右的切口，并在切口处剪一小段宫角组织（作为对照组）。自该切口用自制的小刮勺向宫角远端搔刮右侧子宫腔 5 圈，搔刮长度约 5 cm，停止搔刮。在宫腔内留置已制备好的脂多糖棉线，缝合子宫，生理盐水冲洗腹腔，逐层缝合手术切口。留置约 5 cm 的棉线残端于腹部，48 h 后轻拉尾丝，取出宫腔内棉线，术后常规给予肌内注射青霉素 3 d。2 个月后再次诱导犬发情并在同样的条件下进行手术，开腹后于距离子宫切口远端约 1.5 cm 处剪下一小段子宫角组织（作为处理组），术后缝合伤口，常规抗生素 3 d。

1.5 标本处理

将对照组及处理组的子宫组织标本（图 1）石蜡切片分别进行 HE 染色、Massoon 染色及 SP 法免疫组化染色。



A. 建模前



B. 建模后

图 1 建模前后子宫外观的变化

Fig.1 Changes in the appearance of the uterus before and after modeling

1.6 观察指标及检测方法

HE 染色 4 倍镜下测量子宫内膜的厚度：每组做 3 张切片，每张切片选取上下左右 4 个径线，分别测量子宫内膜的厚度，再求其平均值；400 倍镜下检测腺体的数量：每组做 3 张切片，每张切片随机选取 3 个视野，计算每个视野下腺体的数量，再求其平均值；Massoon 染色在 400 倍镜下随机选取 3 个视野，计算每个视野下子宫内膜纤维化面积的比例为子宫内膜间质纤维化总面积除以子宫内膜间质和腺体面积之和，再求其平均值；转化生长因子（transforming growth factor-β1，TGF-β1）购于博奥森公司生产的兔抗犬 TGF-β1 多克隆抗体，稀释比例 1:100）和血管内皮因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）购于博奥森公司生产的兔抗犬 VEGF 多克隆抗体，稀释比例 1:100）表达水平的检测：采用石蜡切片免疫组化 SP 法，按说明书操作（北京中杉金桥生物

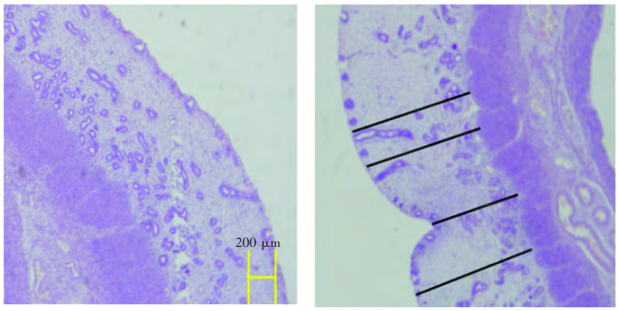
技术有限公司免疫组化试剂盒），用 PBS 液代替一抗作阴性对照。每张切片 400 倍镜下随机选取 5 个视野，将每个视野下染色程度分值与染色范围分值相加求出积分值，再计算其平均值。染色程度评判标准：阴性（0 分）、弱阳性（1 分）、中等阳性（2 分）、强阳性（3 分）；染色范围评判标准：无阳性染色区（0 分）、1%~25%（1 分）、26%~50%（2 分）、51%~75%（3 分）、≥76%（4 分）。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，各组数据用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组样本采用配对 t 检验，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

子宫内膜的厚度处理组（建模后）薄于对照组（建模前），差异具有统计学意义（$P=0.050$；图 2，表 1）。处理组的子宫内膜腺腔囊性扩张、形态不规则、腺体数量明显减少，而对照组的子宫内膜腺体数量多，且腺腔形态规则，差异有统计学意义（$P=0.001$；图 3，表 1）。Masson 染色观察宫腔表面覆盖有上皮细胞，其下层的腺体减少，且有开口；间质纤维增多，有炎性改变。子宫内膜纤维化面积比例高于对照组，差异具有统计学意义（$P=0.000$；图 4，表 1）。通过免疫组化检测 TGF-β1、VEGF 在处理组的子宫内膜的表达水平明显高于对照组，差异具有统计学意义（$P=0.000$，$P=0.000$；图 5，图 6，表 2）。



A. 建模前　　B. 建模后

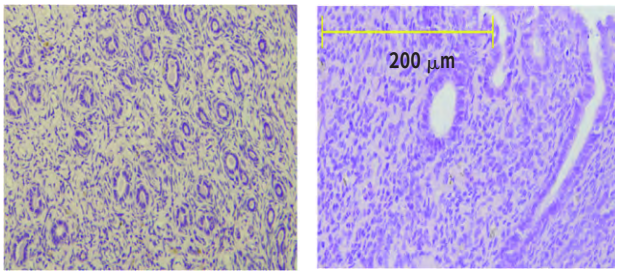
图 2　建模前后子宫内膜厚度的变化(4×)

Fig.2　Changes of endometrial thickness before and after modeling(4×)

表 1　建模前后子宫内膜各指标的变化情况（$n=6$）

Tab.1　Changes of endometrial indexes before and after modeling（$n=6$）

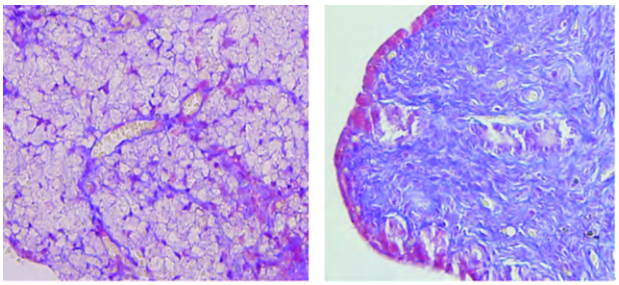
组别	子宫内膜厚度（cm）	腺体的数目（个）	子宫内膜纤维面积比例
处理组	2.325±0.399	4.388±1.774	0.775±0.040
对照组	3.025±0.466	16.518±4.421	0.329±0.062
t 值	2.577	6.499	12.647
P 值	0.050	0.001	0.000



A. 建模前　　B. 建模后

图 3　建模前后子宫腺体的变化(400×)

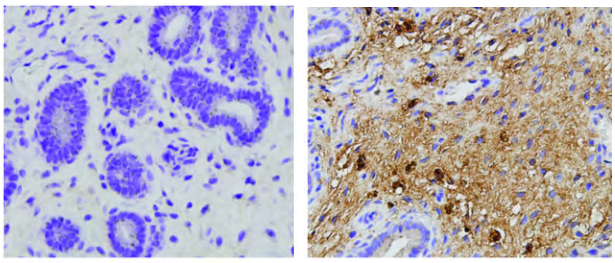
Fig.3　Changes of uterine glands before and after modeling (400×)



A. 建模前　　B. 建模后

图 4　建模前后子宫内膜纤维化变化(400×)

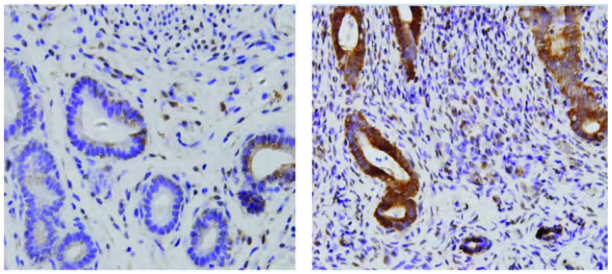
Fig.4　Changes of endometrial fibrosis before and after modeling(400×)



A. 建模前　　B. 建模后

图 5　建模前后 TGF-β1 表达水平的变化(400×)

Fig.5　Expressions of TGF-β1 before and after modeling (400×)



A. 建模前　　B. 建模后

图 6　建模前后 VEGF 表达水平的变化(400×)

Fig.6　Expressions of VEGF before and after modeling (400×)

表 2 TGF-β1 与 VEGF 表达水平的比较（n=6）

Tab.2 The expressions of TGF-β1 and VEGF（n=6）

组别	TGF-β1	VEGF
处理组	6.200±0.306	5.967±0.390
对照组	1.100±0.361	1.700±0.823
t 值	19.462	10.437
P 值	0.000	0.000

3 讨 论

近年来，建立 IUA 动物模型使用较多的动物是小鼠[9]、大鼠[10-12]及新西兰大白兔[8]，但其子宫均较小，不易进行观察及手术操作，而且啮齿类动物无月经周期，与人类差异较大。本实验采用雌性中华田园犬作为实验对象进行研究，是因为其子宫内膜具有增生和脱落的特点，类似于女性的月经周期。2014 年曹兴凤等[13]利用机械法建立了比格犬宫腔粘连的动物模型。但有研究报道[8]，仅用机械损伤的方法对子宫内膜上皮再生过程影响较小，不易成功地建立稳定的 IUA 模型。另外，人们发现 IUA 是由多种因素共同作用形成的[14]，其中创伤和感染被认为是导致 IUA 发生的两大主要高危因素[15]。本研究采用刮宫和感染双重损伤法建立中华田园犬 IUA 模型，首先利用机械刮宫可以基本刮除子宫内膜，使间质裸露。在术后立即放入 LPS 棉线，2 d 后取出棉线，一方面脂多糖加重了炎症反应[8]，有助于瘢痕修复，另一方面及时取出棉线不影响 IUA 的形成。因此，本实验不仅可以更好地模拟人类 IUA 的模型，还可以构建更为理想、稳定的 IUA 模型。然而，由于本实验是小样本基础研究，共建模 6 只，后期仍需进一步加大实验动物量以提高实验结果的可靠性、稳定性。

目前，对于 IUA 模型是否成功建立，国际上并没有公认的的标准。但大多数研究认为可以用子宫内膜腺体数量的减少和子宫内膜纤维面积率的增加来判断建模的成功。本研究结果显示建模后犬的子宫内膜变薄、腺体减少、子宫内膜纤维化增多。由此可确定本研究成功构建了中华田园犬 IUA 的动物模型。

随着对 IUA 的深入研究，大量实验证实 IUA 发病可能与一些纤维化相关细胞因子的异常表达密切相关。迄今为止，TGF-β 是公认的经典的纤维化反应的 启动因子”[16-17]。已发现的 TGF-β 有 3 种，即 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3，其中以 TGF-β1 的活性最强[18]，该细胞因子可诱导成纤维细胞合成和收缩细胞外基质。已有众多实验证实，构建的 IUA 动物模型[13,19]或是 IUA 患者[20-21]的子宫内膜组织中 TGF-β1 的表达量增高。同样的，在前期临床实验中也发现 IUA 患者子宫内膜中 TGF-β1 表达升高，且随粘连严重程度增加[22]。组织创伤后愈合的一个关键过程是血管新生，VEGF 作为血管内皮细胞特异性的有丝分裂原，在子宫组织中，其主要定位于子宫内膜腺上皮的细胞质。有研究发现过表达的 VEGF 在基因水平上可上调 TGF-β1，从而促进细胞纤维化[23]。本次动物实验结果显示建模后犬子宫内膜中 TGF-β1 和 VEGF 的表达水平均增高，说明 IUA 的形成可能与 TGF-β1 和 VEGF 的异常表达有关，这也从另一个层面证实了本次犬 IUA 建模的成功。此外，研究者们[24-25]发现子宫内膜的再生需要一定数量的子宫内膜干细胞及适合的微环境。有文献[26]报道：子宫内膜基层干细胞数量减少甚至缺失和（或）功能受损，不足以很好支持子宫内膜腺上皮的完全再生修复，使得内膜瘢痕化，最终形成 IUA。另外，有研究发现 TGF-β1 上调可能引起子宫内膜干细胞错误诱导，从而导致 IUA 的发生[19]。

目前，临床上针对 IUA 的治疗尽管可恢复其宫腔的形态，甚至部分患者的月经量得以增加或恢复，但对子宫内膜再生、粘连复发及后续的不孕问题可以做的还很少。近年来，羊膜移植在治疗 IUA 中的作用越来越受到关注[27-28]。本研究人员在重庆市已率先于临床上开展了羊膜移植治疗 IUA 的项目，发现羊膜移植能有效改善 IUA 患者的再粘连、月经等情况。但是羊膜在 IUA 中作用尚不清楚，是否是因为羊膜可改变 IUA 患者的纤维化相关因子、子宫内膜干细胞及其微环境？因此，有必要成功构建稳定的 IUA 动物模型，为之后的研究提供一个良好的实验平台。

参 考 文 献

[1] Hooker AB，Lemmers M，Thurkow AL，et al. Systematic review and meta-analysis of intrauterine adhesions after miscarriage:prevalence，

risk factors and long-term reproductive outcome[J]. Hum Reprod Update,2014,20(2):262-278.

[2] March CM. Management of Asherman's syndrome[J]. Reprod Biomed Online,2011,23(1):63-76.

[3] Sevtap KL,Beril YK,Pinarli F,et al. Effect of stem cell application on Asherman syndrome,an experimental rat model[J]. J Assist Reprod Genet,2014,31(8):975-982.

[4] Yu D,Wong YM,Cheong Y,et al. Asherman's syndrome-one century later[J]. Fertil Steril,2008,89(4):759-779.

[5] Conforti A,Alviggi1 C,Mollo A,et al. The management of Asherman syndrome:a review of literature[J]. Reprod Biol Endocrinol,2013,11:118.

[6] Deans R,Abbott J. Review of intrauterine adhesions[J]. J Minim Invasive Gynecol,2010,17(5):555-569.

[7] 李 敏,王蔼明. 宫腔粘连的研究进展[J]. 中国妇幼保健,2011,26(8):1267-1270.

[8] 刘 芳,何援丽. 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,2013,42(7):765-767.

[9] 胡晓晓,林小娜,江寅申,等. 小鼠子宫内膜电凝损伤模型的建立[J]. 中华医学杂志,2014,100(47):3771-3773.

[10] 胡 沙,李 亚,孟维杰,等. 妇康口服液对大鼠实验性宫腔粘连预防效果及对宫内膜组织 TGF-bata1、PAI-1 和 MMP-9 表达影响的实验研究[J]. 四川大学学报(医学版),2013,44(4):540-544.

[11] 蔡慧华,何援丽,李慧娟,等. 宫腔粘连大鼠模型的建立及其与白细胞介素 21 的相关性分析[J]. 医学研究生学报,2015,28(4):346-349.

[12] 马娜娜,王祥珍. 核转录因子 κb 在宫腔粘连大鼠模型中的表达[J]. 中华计划生育和妇产科,2014,33(2):61-65.

[13] 曹兴凤,王蔼明,尹善德,等. 机械刮宫法建立比格犬宫腔粘连模型[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2014,33(5):334-338.

[14] Socolov R,Anton E,Butureanu S,et al. The endoscopic management of uterine synechiae.A clinical study of 78 cases[J]. Chirurgia(Bucur),2010,105(4):515-518.

[15] Panayotidis C,Weyers S,Bosteels J,et al. Intrauterine adhesion(IUA):has there been progress in understanding and treatment over the 20 years?[J]. Gynecol Surg,2009,6(3):197-211.

[16] 王 燕,陆伦根. 纤维化疾病的分子机制和治疗研究进展[J]. 内科理论与实践,2011,6(3):246-248.

[17] Bowen T,Jenkins RH,Fraser DJ. MicroRNAs,transforming growth factor beta-1,and tissue fibrosis[J]. J Pathol,2013,229(2):274-285.

[18] 周曼萍. TGF-β1/Smad2、3 信号通路和 miR-29a 与宫腔粘连相关性的研究[D]. 广州 南方医科大学,2014.

[19] 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 Exp Pathol,2015,8(2):1525-1534.

[20] 刘琳琳,刘玉环,蒋东桥,等. CTGF 和 TGF-β1 的表达与宫腔粘连形成的相关性[J]. 山东医药,2012,52(2):17-19.

[21] 杨峥莉,刘荣霞,郝国荣. PDGF、TGF-β 在宫腔粘连患者子宫内膜中的表达[J]. 河北医药,2013,35(6):2460-2461.

[22] 孙聪聪,王 佳,明 雪,等. 宫腔粘连患者子宫内膜组织中 uPA、PAI-1、TGF-β1 的表达及其相关性研究[J]. 重庆医科大学学报,2016,41(6):690-693.

[23] Li ZD,Bork JP,Krueger B,et al. VEGF induces proliferation,migration,and TGF-β1 expression in mouse glomerular endothelial cells via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2005,334(4):1049-1060.

[24] Gargett CE,Masuda H. Adult stem cells in the endometrium[J]. Mol Hum Reprod,2010,16(1):818-834.

[25] Shoae-Hassani A,Mortazavi-Tabatabaei SA,Sharif S,et al. Differentiation of human endometrial stem cells into urothelial cells on a three-dimensional nanofibrous silk-collagen scaffold:an autologous cell resource for reconstruction of the urinary bladder wall[J]. J Tissue Eng Regen Med,2015,9(1):1268-1276.

[26] Gargett CE,Ye L. Endometrial reconstruction from stem cells[J]. Fertil Steril,2012,98(1):11-20.

[27] Amer MI,Abdelmaeboud KH,Abdelfatah I,et al. Human amnion as a temporary biologic barrier after hysteroscopic lysis of severe intrauterine adhesions:pilot study[J]. Journal of Minimally Invasive Gynecology,2010,17(5):605-611.

[28] 张 冉,段 华. 羊膜移植在预防宫腔粘连中的应用[J]. 中华妇产科杂志,2012,47(6):470-472.

责任编辑:方 济）