

· 基础研究 ·

## 机械和感染双重损伤法建立新西兰大白兔宫腔粘连模型\*

刘芳, 何援利<sup>△</sup>

(南方医科大学珠江医院妇产科, 广州 510282)

**摘要:**目的 建立一个稳定的兔宫腔粘连(IUA)动物模型,以利于深入探讨宫腔粘连的发病机制。方法 60只雌兔随机分为对照组、机械损伤组、感染损伤组和双重损伤组,每组15只。机械损伤组刮宫损伤子宫内膜,感染损伤组宫腔留置脂多糖棉线2d损伤子宫内膜,双重损伤法刮宫后宫腔留置脂多糖棉线2d损伤子宫内膜,对照组行假手术。分别于损伤前,损伤后2、7、14、28d收集子宫组织,行HE和Masson染色,动态观察子宫内膜病理变化过程,并对损伤后7d子宫内膜的腺体数量和纤维化面积进行统计学分析。结果 双重损伤组子宫内膜纤维化面积比率(0.743±0.066)高于机械损伤组和感染损伤组(0.359±0.0614、0.348±0.086),分别比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。双重损伤组兔子宫内膜腺体数量(4.190±1.350)低于另外2组(12.660±1.470、13.590±1.560),分别比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 采用机械和感染双重损伤法可以建立稳定的兔宫腔粘连动物模型。

**关键词:**宫腔粘连;动物模型;损伤;纤维化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.07.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)07-0765-03

Establishment of New Zealand white rabbit intrauterine adhesions model  
by mechanical and infectious double injury\*

Liu Fang, He Yuanli<sup>△</sup>

(Department of Gynecology and Obstetrics, Zhujiang Hospital, Southern Medical  
University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

**Abstract:** Objective To construct a rabbit model of intrauterine adhesions(IUA) to benefit the deepening study of intrauterine adhesions pathogenesis. Methods Sixty New Zealand female rabbits were randomly divided into the control group, mechanical injury group, infection injury group and double-injury group, 15 cases in each group. The mechanical injury group was treated with curettage of uterine, the infection injury group with intrauterine indwelling lipopolysaccharide cotton for 2 d, the double damage group with indwelling lipopolysaccharide cotton for 2 d after curettage for injuring endometrium and the control group was performed the sham-operation. In order to dynamically observe the endometrial pathological changes process, the uterine tissues were collected respectively before modeling, on 2, 7, 14, 28 d after modeling and performed HE and Masson staining. The number of endometrial glands and the ratio of fibrosis area on 7 d after modeling in each group were analyzed by statistical software. Results The ratio of fibrosis area in the double-injury group was 0.743±0.066 and higher than 0.359±0.0614 and 0.348±0.086 in the mechanical injury group and the infection group respectively, showing statistical differences between them( $P<0.05$ ). The number of endometrial glands in the double-injury group was 4.190±1.350 and lower than 12.660±1.470 and 13.590±1.560 in other two groups with statistical differences( $P<0.05$ ). Conclusion The double damage method of mechanical injury and infection can establish stable rabbit uterine adhesion models.

**Key words:** intrauterine adhesions; animal models; injury; fibrosis

宫腔粘连(intrauterine adhesions, IUA)是宫腔操作的严重并发症,可以引起不孕、月经过少、闭经或反复流产<sup>[1]</sup>。近年IUA的发病率和检出率呈上升趋势,已成为女性继发不孕的第二大病因<sup>[2]</sup>。目前,临床针对IUA的治疗尽管能恢复宫腔的形态,但对于子宫生理功能的恢复尚属于临床治疗的难题,导致IUA的治愈率和妊娠率无明显改善,而且中、重度IUA治疗后复发率较高<sup>[3]</sup>,因此,IUA的诊断和治疗日益受到临床的重视。目前研究认为,IUA的病因主要有创伤<sup>[4]</sup>、感染<sup>[5]</sup>、子宫内膜修复障碍和低雌激素状态<sup>[1]</sup>。为此,本研究拟建立兔IUA动物模型,探讨其发病机制和治疗方案,报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 选择普通级成年雌性新西兰大白兔60只,10

~12周龄,体质量2.500~3.500kg,常规单笼饲养适应环境1周后,随机分为4组:对照组15只,机械损伤组15只,感染损伤组15只,双重损伤组15只。

**1.2 脂多糖棉线制备** 细菌脂多糖(LPS,购自SIGMA公司,来源于Escherichia coli 055:B5)溶于生理盐水配成浓度为6mg/L溶液,4℃冰箱保存备用。造模前1d准备20cm长的10号医用无菌手术线,在4℃脂多糖生理盐水中浸泡24h备用。

**1.3 造模方法** 按5mL/kg耳缘静脉注射20%乌拉坦麻醉。机械损伤组随机取一侧子宫,于子宫中下1/3处做0.5cm纵切口,用直径4mm子宫内膜刮勺刮取中上段子宫内膜,当感觉子宫四壁粗糙时,停止刮宫,缝合子宫切口,生理盐水冲洗腹腔。感染损伤组随机取一侧子宫,于子宫中下1/3处做0.5

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270658)。 作者简介:刘芳(1979~),主治医师,博士研究生,主要从事妇科疾病的研究及工作。 △ 通讯作者, Tel:13318807468; E-mail:heyuanli310@yahoo.com.cn。

cm 纵切口, 宫腔留置脂多糖棉线, 棉线残端留置于腹部, 留长约 3 cm 尾丝, 剪去多余棉线, 2 d 后轻拉尾丝, 取出宫腔内棉线。双重损伤组机械损伤后, 将脂多糖棉线置入损伤段子宫, 2 d 后取出子宫内棉线(图 1B)。对照组只开腹, 不损伤子宫。分别于损伤后 2、14、28 d 分批处死 3 只新西兰大白兔, 损伤后 7 d 处死 6 只, 收集子宫组织(图 1)。

**1.4 子宫内膜腺体数量纤维化检测** 兔子组织样本的石蜡切片分别行 HE 和马松三色染色(massons trichrom stain, Masson 染色)。每张 HE 染色切片选取 4 个高倍镜视野, 计数每个视野下腺体数量, 取其平均值。纤维化面积比率计算方法: 每张 Masson 切片选取 4 个视野, 纤维化面积比率为每个视野子宫内间质纤维化的总面积除以子宫内间质和腺体面积之和, 取平均值, 以图像分析系统自动计算完成。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单向方差(One way ANOVA)和 SNK 法分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

子宫内间质微血管丰富。Masson 染色镜下观察见黏

膜、黏膜下层、血管和肌肉呈暗红色; 子宫内间质胶原纤维呈蓝色, 梭状, 排列较整齐(图 2)。子宫内机械损伤后 2 d, 70%~80% 宫腔表面有上皮细胞再生, 但无腺体再生。间质出血、水肿、白细胞浸润, 出现少量凝固性坏死, 间质裸露区有纤维素样渗出; 损伤后 7 d, 宫腔表面几乎全部覆盖上皮细胞, 再生上皮层下出现一些腺体, 上皮表面偶可见腺体开口。间质层纤维组织增多, 胶原聚集, 少量新生毛细血管(图 2B); 损伤后 14 d 宫腔表面上皮和腺体完全再生。间质少量白细胞和巨噬细胞浸润, 部分间质纤维化, 胶原聚集。新生毛细血管增多; 损伤后 28 d 子宫内形态学基本恢复正常, 间质无充血和淋巴细胞浸润, 少数间质区可见纤维化改变。

感染损伤的子宫移去脂多糖棉线 2 d 后宫腔表面均有子宫内细胞覆盖, 上皮下无腺体。间质有炎症反应; 损伤后 7 d, 宫腔表面覆盖柱状上皮细胞, 上皮下多量腺体, 表面可见腺体开口。间质仍可见炎症改变(图 2C); 损伤后 14 d 宫腔表面上皮和腺体完全再生。间质白细胞浸润。毛细血管无扩张、充血; 损伤后 28 d 子宫内形态学恢复正常, 间质无充血和淋巴细胞浸润。

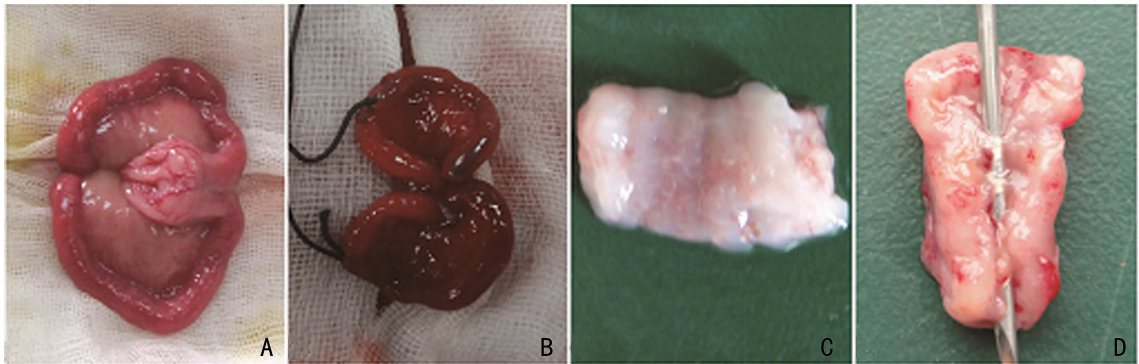


图 1 兔子子宫造模前、后照片

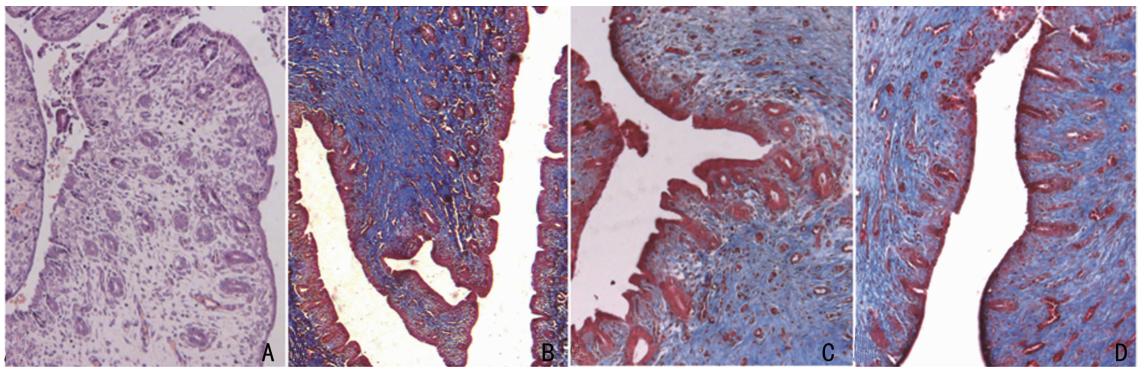


图 2 正常及损伤后 7 d 兔子子宫内膜

表 1 损伤后 7 d 兔子子宫内膜纤维化面积比率与腺体数量比较

组别	n	纤维化面积比率	腺体数量
对照组	15	0.275 ± 0.094*	14.970 ± 1.680*
机械损伤组	15	0.359 ± 0.0614*	12.660 ± 1.470*
感染损伤组	15	0.348 ± 0.086*	13.590 ± 1.500*
双重损伤组	15	0.743 ± 0.066	4.190 ± 1.350

\*:  $P < 0.05$ , 与双重损伤组比较。

腔大量纤维素渗出以及坏死组织碎片。间质出血, 水肿, 淋巴细胞浸润, 部分区域纤维化, 胶原纤维增加。一些毛细血管腔闭锁; 损伤后 7 d, 宫腔部分闭锁, 纵行剖开, 大体可见一些较牢固纤维性粘连带。镜下可见纤维性粘连带增厚, 70%~80% 未粘连区域覆盖扁平上皮细胞, 上皮层下可见极少量腺体。80%~90% 间质区纤维化增生, 胶原纤维聚集, 间质毛细血管稀少; 损伤后 14 d 宫腔改变和损伤后 7 d 类似, 但宫腔未粘连区域基本由无功能的扁平上皮细胞覆盖, 上皮层下腺体稀疏。损伤后 28 d 子宫内形态学未恢复, 宫腔瘢痕修复。损伤后 7

子宫内双重损伤后 2 d, 宫腔偶有扁平上皮细胞再生, 宫

d 兔子宫内纤维化面积比率与腺体数量见表 1。

### 3 讨 论

创伤和感染是 IUA 发生的两个主要高危因素<sup>[6]</sup>。本研究根据 IUA 发生的主要高危因素设计了 3 种方法建立 IUA 动物模型。其中机械损伤方法可以完全刮除子宫内表面上皮以及部分间质,引起新西兰大白兔的子宫内全层损伤,但在损伤后短时间内子宫内上皮细胞即开始再生,子宫内间质的修复过程较慢,损伤后 28 d 少数间质区仍有纤维化改变,但子宫内上皮的形态学基本恢复。这说明仅用机械损伤的方法对子宫内上皮再生过程影响较小。

感染可促使 IUA 进一步发展已基本得到学者的共识<sup>[7]</sup>。宫腔操作引起的继发感染、急慢性子宫内膜炎、产褥感染等均可导致子宫内的炎症反应,抑制子宫内修复,甚至破坏正常子宫内,促进子宫内纤维化增生,导致 IUA 形成<sup>[8]</sup>。本研究中用感染损伤的方法虽然也能引起子宫内的部分脱落和间质的炎症反应,但其引起的损伤是完全可逆的,在损伤后 7 d 子宫内组织完全再生。提示单纯的感染对子宫内腺上皮损伤后修复的影响较小,虽然引起子宫内间质纤维化暂时性增加,但可能由于宫腔表面有腺上皮覆盖,几乎不形成纤维粘连。

采用机械和感染双重方法损伤子宫内后,在损伤后 2 d 宫腔内没有再生的上皮细胞覆盖,致使子宫内间质的纤维化渗出阻塞了宫腔,损伤后 7 d 形成粘连带,损伤发生了不可逆的改变,子宫内瘢痕修复。子宫内损伤后完全再生可能取决于 2 个因素:(1)子宫内表面上皮细胞的迅速再生,覆盖子宫内创面;(2)较轻的炎症反应<sup>[9]</sup>。子宫内损伤后,子宫内表面上皮再生延迟可能是宫腔粘连形成的关键<sup>[10]</sup>,由于缺乏足够的再生上皮细胞覆盖宫腔表面,间质裸露,间质纤维活性增加,加之炎症引起的纤维性渗出,子宫内瘢痕修复,引起宫腔粘连。

随着对 IUA 的研究深入,研究者意识到 IUA 的形成是多种损伤因素共同作用的结果<sup>[11]</sup>。由于子宫内再生能力强,单一的方法损伤后,子宫内在短时间内完全再生,难以构建 IUA 模型,因此,采用两种以上的损伤方法联合可能更易于建立 IUA 动物模型。Chen 等<sup>[12]</sup>根据创伤和低雌激素状态的病因采用刮宫和切除卵巢降低雌激素水平两种方法联合建立了兔 IUA 模型,有助于研究和妊娠子宫内操作后 IUA 发生的机制。而 Li 等<sup>[13]</sup>用刮宫后放置铜丝的方法建立了兔子宫内损伤的模型,但宫腔没有粘连带形成,可能是因为铜丝虽然抑制了子宫内上皮细胞再生,同时也抑制了宫腔内纤维化粘连带的形成,尽管模型没有宫腔粘连形成,但子宫内膜受孕性降低,对于研究子宫内损伤引起的胚胎着床失败有重要的作用。

本研究显示,IUA 的主要病因是创伤和感染,采用机械和感染双重损伤方法建立新西兰大白兔 IUA 动物模型,对子宫内的机械损伤能基本清除子宫内层;同时在术后立即置入脂多糖棉线,2 d 后取出脂多糖棉线,一方面在子宫内再生过程开始之前即抑制子宫内再生,另一方面脂多糖加重了炎症反应<sup>[14]</sup>,有助于瘢痕修复,而且及时取出棉线也不影响宫腔纤维化粘连带的形成。综合以上因素,双重损伤法能建立稳定的 IUA 模型。

该模型的建立可以从基因、蛋白以及干细胞等多个角度深入研究 IUA 的发病机制,而且可以作为一个平台从细胞因子、

生物材料以及干细胞移植等方面探求新的治疗方法并检测其有效性及安全性。

### 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] 李敏, 王嵩明. 宫腔粘连的研究进展[J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(8): 1267-1270.
- [3] Roy KK, Baruah J, Sharma JB, et al. Reproductive outcome following hysteroscopic adhesiolysis in patients with infertility due to Asherman's syndrome[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2010, 281(2): 355-361.
- [4] Taylor PJ, Cumming DC, Hill PJ. Significance of intrauterine adhesions detected hysteroscopically in eumenorrhic infertile women and role of antecedent curettage in their formation[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1981, 139(3): 239-242.
- [5] Gupta N, Sharma JB, Mittal S, et al. Genital tuberculosis in Indian infertility patients[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2007, 97(2): 135-138.
- [6] Panayotidis C, Weyers S, Bosteels J, et al. Intrauterine adhesions (IUA): has there been progress in understanding and treatment over the last 20 years[J]. *Gynecol Surg*, 2009, 6(3): 197-211.
- [7] Czernobilsky B. Endometritis and infertility[J]. *Fertil Steril*, 1978, 30(2): 119-130.
- [8] Schenker JG. Etiology of and therapeutic approach to synechia uteri[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1996, 65(1): 109-113.
- [9] Liechty KW, Kim HB, Adzick NS, et al. Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair[J]. *J Pediatr Surg*, 2000, 35(6): 866-873.
- [10] Bigsby RM. Control of growth and differentiation of the endometrium the role of tissue interactions[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 955: 110-117.
- [11] 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.
- [12] Chen F, Duan H, Zhang Y, et al. Effect and mechanism of formation of intrauterine adhesion at different dose of estrogen[J]. *Zhonghua Fuchanke ZaZhi*, 2010, 45(12): 917-920.
- [13] 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.
- [14] Bannerman DD, Goldblum SE. Direct effects of endotoxin on the endothelium; barrier function and injury[J]. *Lab Invest*, 1999, 79(10): 1181-1199.