

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.24.001

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20231214.1150.006\(2023-12-14\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20231214.1150.006(2023-12-14))

超声评价大鼠宫腔粘连模型的可行性研究^{*}

蔡瑶瑶¹, 蔡丽君², 夏维婷^{3△}

(温州医科大学附属第一医院:1. 产科;2. 生殖中心;3. 妇科, 浙江温州 325000)

[摘要] **目的** 探讨超声检查评价大鼠宫腔粘连模型的可行性并分析其优势。**方法** 取 16 只成熟未孕雌性 SD 大鼠,采用机械法损伤单侧大鼠子宫腔内膜建立宫腔粘连模型(模型侧),对侧子宫作为对照侧。所有大鼠术前及建模后 2 周行常规超声检查,其中 8 只雌性大鼠建模后 2 周收集双侧子宫组织标本行苏木素-伊红(HE)染色、Masson 染色,并行子宫内膜纤维化半定量评分;另外 8 只雌性大鼠建模后 2 周开始与雄性大鼠交配,妊娠第 17.5 天使用超声检查计数各侧子宫胚胎数目,并开腹分离子宫观察双侧胚胎数目。**结果** 所有大鼠建模后 2 周常规超声检查均可见模型侧子宫内膜线模糊,局部内膜线连续性差,回声中断等表现;而对照侧子宫腔内膜线完整、连续、光滑。形态学分析显示:大鼠模型侧较对照侧子宫内膜纤维化半定量评分明显增加($P<0.01$),且超声检查宫腔粘连阳性率与子宫内膜纤维化半定量评分呈正相关($r=0.927, P<0.01$);功能学评价显示:妊娠第 17.5 天大鼠模型侧子宫胚胎数目明显少于对照侧($P<0.05$),两侧子宫超声与开腹计数胚胎数目均无明显差异($P>0.05$)。**结论** 可通过超声检查观察大鼠子宫内膜形态来评价宫腔粘连模型成功率及生殖功能。

[关键词] 大鼠;宫腔粘连;动物模型;超声检查;生殖功能**[中图分类号]** R-331;R711**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)24-3681-05

Feasibility of ultrasound examination on the evaluation of uterine adhesion in rats^{*}

CAI Yaoyao¹, CAI Lijun², XIA Weiting^{3△}

(1. Department of Obstetrics; 2. Reproductive Medicine Center; 3. Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the feasibility and advantages of ultrasound examination of uterine adhesion in rats model. **Methods** A total of 16 mature and infertile female SD rats were selected to establish uterine adhesion model (model side) by mechanical injury of unilateral uterine endometrium of rats, and the contralateral uterus was used as the control side. Ultrasound examination was used before and two weeks after modeling. Among them, bilateral uterine tissue samples of eight female rats were collected two weeks after modeling for hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining, and semi-quantitative score of endometrial fibrosis was performed. Another eight female rats were mated with male rats two weeks after modeling. At 17.5 days of gestation, the number of embryos in each side of the uterus was counted by ultrasound examination. Then the uterus was separated by laparotomy to observe the number of fetal rats in each side. **Results** Routine ultrasound examination of all rats two weeks after modeling showed blurred endometrial line, poor continuity of local endometrial line, interrupted echo and other manifestations on the modeling side. The endometrial line was complete, continuous and smooth in the control side. Morphological analysis showed that the semi-quantitative score of endometrial fibrosis on the modeling the was apparently increased compared with that on the control side ($P<0.01$), and the semi-quantitative score of endometrial fibrosis was positively correlated with the positive rate of ultrasonic diagnosis ($r=0.927, P<0.01$). Functional analysis showed that the number of uterine embryos on the modeling side of rats was less than that on the control side

^{*} 基金项目:浙江省温州市基础性公益科研项目(Y20220406)。 作者简介:蔡瑶瑶(1991—),住院医师,硕士,主要从事妇产科常见疾病的

诊治与研究。 △ 通信作者, E-mail: 891225063@qq.com。

($P<0.05$),and there was no apparent difference in the number of embryos between the two sides of the uterus counted by ultrasound examination and laparotomy at the 17.5 days of the gestation ($P>0.05$).**Conclusion** Ultrasound examination can evaluate the success rate of the uterine adhesion model and the reproductive function by observing the endometrial morphology of rats.

[Key words] rats;intrauterine adhesion;animal model;ultrasonography;reproductive capability

宫腔粘连(intrauterine adhesion,IUA)是指各种因素导致子宫内膜基底层受到损伤,引起宫腔部分或全部堵塞所致的一系列综合征,主要由医源性宫腔操作引起,临床上主要表现为育龄期女性出现闭经、下腹痛、继发不孕、反复流产、生育能力降低等,其导致的并发症严重威胁女性生殖健康,且目前尚无有效及统一的治疗方法^[1-3]。由此,深入研究宫腔粘连的病因及内膜修复机制,探索可能的干预措施具有重大意义。目前相关研究主要集中于动物实验,而在动物实验过程中,动物模型评价方法十分有限,本文通过对比传统大鼠形态学检查及超声检查评价宫腔粘连模型,探讨超声检查评价大鼠宫腔粘连模型的可行性及优势。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SD 雌性大鼠 16 只,体重 230~250 g;雄性大鼠 4 只,体重 250~280 g。所有实验动物由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,实验大鼠饲养于温州医科大学动物实验中心无特殊病原体(SPF)屏障环境中,实验动物使用许可证号为 SYXK(浙)2015-0009。实验前适应性饲养 1 周,保障动物自由饮水和摄食。

1.1.2 主要仪器与试剂

苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);Masson 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);Olympus43 光学显微镜(日本 Olympus 公司);RM2245 轮转切片机(德国莱卡公司);DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);GE Voluson E8 彩色多普勒超声诊断仪(美国 GE 公司),探头频率 1.5~9.8 MHz。

1.2 方法

1.2.1 造模方法

采用机械法损伤大鼠单侧子宫腔内膜建立宫腔粘连模型(模型侧/模型组),对侧子宫作为对照侧(对照组)。每天观察大鼠阴道涂片,处于动情间期的雌鼠用于模型构建。1%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉大鼠后,下腹部消毒,于尿道上端 1 cm 处切开皮肤进入腹腔,暴露子宫,Y 型子宫分叉处切口,利用刮勺刮除子宫内膜造成病理性子宫内

膜损伤(wydw2016-0213)。

1.2.2 病理学评价

8 只雌性大鼠处死后取子宫组织,多聚甲醛固定标本 24 h 后乙醇梯度脱水,行石蜡包埋,5 μm 厚度连续切片,行 HE 和 Masson 染色,在高倍显微镜下选取视野,每张切片 3 个视野。HE 染色切片行子宫内膜腺体计数,Masson 染色后计算各侧子宫内膜纤维化的面积比,根据上述 2 个参数进行子宫内膜纤维化半定量评分^[4]。

1.2.3 生殖能力评估

另 8 只雌性大鼠术后 2 周开始以 2:1 的比例与雄鼠合笼,以见交配栓当天为妊娠第 0.5 天,妊娠第 17.5 天开腹计数子宫内胚胎数目。

1.2.4 超声检查

(1)大鼠内膜情况判断:子宫内膜线模糊、局部内膜线连续性差、回声中断等表现提示内膜异常,判断为宫腔粘连阳性;而宫腔内膜线完整、连续、光滑则提示内膜正常,判断为宫腔粘连阴性。(2)合笼后妊娠第 17.5 天超声下动态观察并计数每侧大鼠子宫胎鼠数目。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料用例数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用点二系列相关分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠子宫超声检查结果分析

建模后 2 周行常规超声检查(图 1),可见造模侧子宫内膜线模糊、局部内膜线连续性差、回声中断等表现(图 2B、C),而对照侧大鼠宫腔内膜线均完整、连续、光滑(图 2A)。



图 1 大鼠建模后 2 周行常规超声检查

2.2 大鼠子宫病理学检查结果分析

通过组织病理学观察发现:与对照侧比较,模型侧子宫内膜腺体数目明显减少,纤维化面积比例增加(图3);模型侧子宫内膜纤维化半定量评分为(5.50±2.12)分,对照侧为0分,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 大鼠子宫超声与病理检查结果对比分析

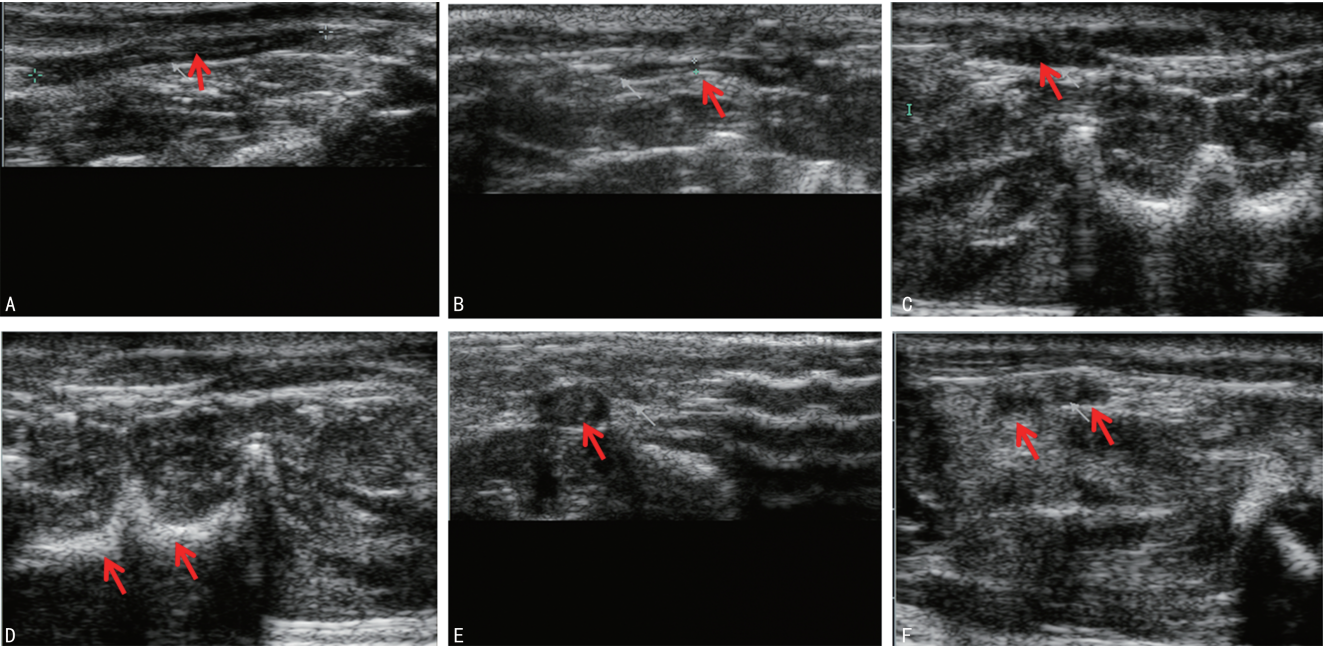
妊娠第17.5天超声与开腹计数两组子宫胚胎数目,模型侧均明显少于对照侧($P<0.05$);而同组两种方法计数结果均无明显差异($P>0.05$),见表1、图4。

模型组超声检查宫腔粘连阳性率为75.0%(6/8),对照组为0,差异有统计学意义($P<0.05$);点二系列相关分析显示,超声检查宫腔粘连阳性率与大鼠子宫内膜纤维化半定量评分呈正相关($r=0.927, P<0.01$)。

表 1 超声与开腹计数胚胎数目比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

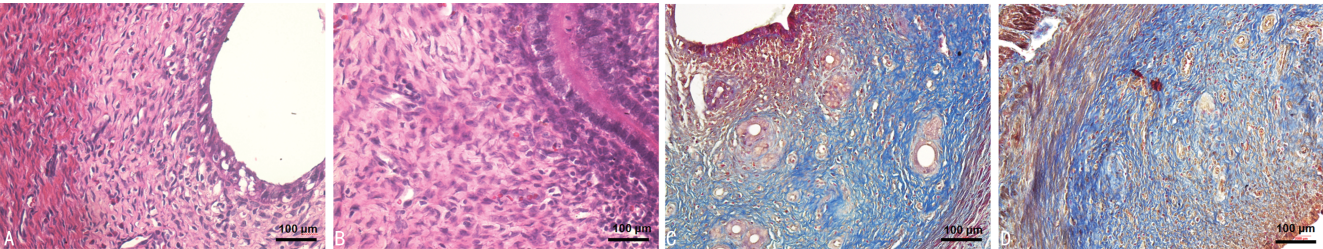
组别	超声	开腹
模型组	4.08±2.02 ^a	2.83±2.25 ^b
对照组	6.33±1.97	6.25±2.26

^a: $P<0.05$,^b: $P<0.01$,与对照组比较。



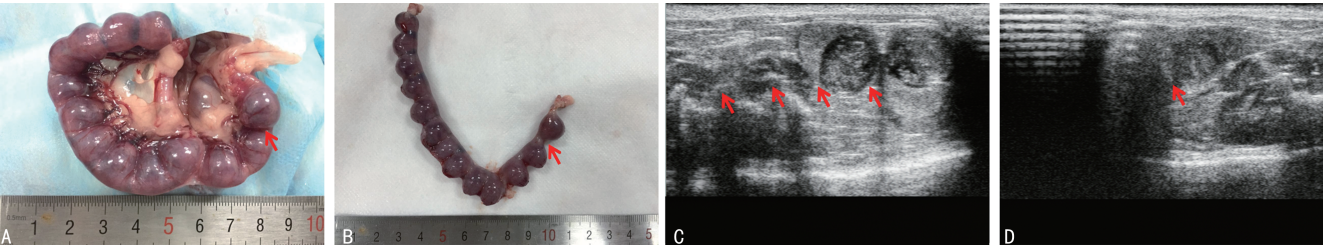
A:大鼠对照侧子宫超声(箭头所示:子宫内膜线光滑连续);B:大鼠模型侧子宫超声(箭头所示:子宫内膜局部连续性差,回声中断);C:大鼠模型侧子宫超声(箭头所示:子宫局部内膜线消失);D:大鼠宫骶骨位置(箭头处);E:大鼠宫颈处(箭头处);F:大鼠宫颈上方分为两侧宫角处(箭头处)。

图 2 大鼠宫腔超声图



A,B:分别为大鼠对照侧及模型侧子宫内膜 HE 染色;C,D:分别为大鼠对照侧及模型侧子宫内膜 Masson 染色。

图 3 大鼠 HE 及 Masson 染色图



A,B:大鼠妊娠第17.5天剖腹探查所见(箭头所示:模型侧宫角妊娠情况);C,D:分别为大鼠妊娠第17.5天超声所见对照侧及模型侧宫角妊娠情况(箭头所示:胚胎)。

图 4 大鼠妊娠第 17.5 天胚胎数目及超声图

3 讨 论

宫腔粘连是妇科常见病之一,我国由于人工流产数逐年增加,宫腔粘连发生率较高^[5]。宫腔镜是目前诊断和治疗宫腔粘连的主要方法,但中、重度宫腔粘连术后再次粘连发生率较高,治疗困难,影响育龄期妇女生殖及身心健康^[6]。虽然宫腔粘连病因学研究不断深入,但其发生机制至今未完全阐明。由于临床宫腔粘连患者病理标本取材困难,大大限制了宫腔粘连的治疗研究进展,因此建立稳定可靠的动物模型是研究宫腔粘连发生机制、预防和治疗方法的关键^[7]。目前,宫腔粘连的建模方法主要有机械损伤、化学损伤和电烧伤等^[8]。大鼠宫腔粘连模型因与临床子宫内膜损伤及宫腔粘连病理状况相似,被广泛用于研究^[9-10]。目前宫腔粘连动物模型的评价主要通过处死动物后的组织病理形态^[8,11-12],表现为子宫内膜组织萎缩,腺体减少且大多无活性,内膜纤维化程度增加,宫腔纤维组织黏稠,血管堵塞造成粘连部位缺血等^[13-14]。该评价方法无法后续观察活体动物模型的病灶动态变化,限制了宫腔粘连在生殖医学领域的深入研究。超声检查以无创、方便和可反复进行的优点在动物实验中逐渐得到广泛应用^[15-17],但目前较少有文献报道将超声评价应用于宫腔粘连相关的动物研究中,本研究通过对比传统大鼠形态学检查及超声检查结果,探讨超声检查评价大鼠宫腔粘连模型的可行性。

检测病理组织的腺体数量和纤维化程度是目前大多数研究评价宫腔粘连动物模型的主要标准。陈醒等^[8]通过子宫内膜刮除法建立大鼠宫腔粘连模型,发现模型组子宫内膜腺体数量较对照组减少,纤维化面积增加。徐倩等^[4]利用两种机械损伤法分别建立宫腔粘连模型,同样通过上述病理学评价模型的有效性。张璐等^[18]则在上述评价指标的基础上,增加了细胞角蛋白-19(CK-19)和波形蛋白(vimentin)免疫组织化学评价。韩华等^[19]通过注射 95%乙醇溶液建立宫腔粘连大鼠模型,发现子宫内膜腺体形成和整合素 $\beta 3$ 表达均受到明显抑制。还有学者联合运用多种发病机制建立宫腔粘连模型,常使用的方法有机械损伤联合不同感染,其稳定性及成模率较单一机制形成的模型更佳^[20-21]。总而言之,目前大部分对于宫腔粘连动物模型的评价都是依赖于病理学检查。

超声在动物实验中应用较为广泛,较为常见的有心脏超声无创评价心功能^[22-23],以及对于肝脏、脑血管等的评价^[24-25],而关于小动物子宫疾病的研究应用较少。李秀梅等^[26]发现超声测量大鼠子宫体厚度可作为判断大鼠子宫腺肌病建模是否成功的无创手段。在临床上超声检查已被广泛用于宫腔粘连的诊断^[27],宫腔粘连患者超声影像通常表现为宫腔线模糊,局部

连续性不佳,内膜回声中断,局部“三线征”消失,内膜与肌层分界不清,局部毛糙;三维超声显示局部呈低回声或者缺损^[28]。本研究中宫腔粘连大鼠的子宫超声形态表现与上述表现相似,且超声检查宫腔粘连阳性率与大鼠子宫内膜纤维化半定量评分呈正相关性,表明超声检查能较好地对模型大鼠进行判断。此外,本研究运用超声计数孕晚期妊娠大鼠的胚胎数目,并与开腹计数胚胎数目进行比较,结果显示二者无明显差异,提示超声检查能较为准确地计数胎鼠数目,对宫腔粘连模型进行生育力评价。

综上所述,本研究结果提示超声检查可通过形态学评价及生殖功能评价两方面全面评价宫腔粘连大鼠模型,能对活体动物模型进行较为准确的评价,避免了处死动物才能评价模型的局限性,这对于采用宫腔粘连动物实验进行的基础研究具有重要意义。

参考文献

[1] DEANS R, VANCAILLIE T, LEDGER W, et al. Live birth rate and obstetric complications following the hysteroscopic management of intrauterine adhesions including Asherman syndrome[J]. Hum Reprod, 2018, 33(10): 1847-1853.

[2] CHEN G, LIU L, SUN J, et al. Foxf2 and Smad6 co-regulation of collagen 5A2 transcription is involved in the pathogenesis of intrauterine adhesion[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(5): 2802-2818.

[3] ZHU X, PÉAULT B, YAN G, et al. Stem cells and endometrial regeneration: from basic research to clinical trial[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2019, 14(4): 293-304.

[4] 徐倩, 段华, 汪沙, 等. 机械损伤建立大鼠宫腔粘连模型的实验研究[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(10): 1026-1030.

[5] 程晓冉, 潘佳欣. 中国人工流产现状及对策分析[J]. 人口与健康, 2019, 27(11): 18-22.

[6] ABUDUKEYOUMU A, LI M Q, XIE F. Transforming growth factor- $\beta 1$ in intrauterine adhesion[J]. Am J Reprod Immunol, 2020, 84(2): e13262.

[7] ZHANG S S, XU X X, XIANG W W, et al. Using 17 β -estradiol heparin-podoxamer thermosensitive hydrogel to enhance the endometrial regeneration and functional recovery of intrauterine adhesions in a rat model[J]. FASEB J, 2020, 34

- (1):446-457.
- [8] 陈醒,毛乐乐,刁嵩,等.大鼠子宫腔粘连模型的构建与改进[J].解剖学报,2019,50(1):123-127.
- [9] 陈艳玲,孙冬岩.大鼠宫腔粘连模型的研究进展[J].中国计划生育和妇产科,2022,14(1):49-51.
- [10] 梁姗姗,植枝福,黄滢岚.宫腔粘连动物模型建立的研究进展[J].中华生殖与避孕杂志,2022,42(8):874-877.
- [11] 朱苗苗,梁升连,张玲玲,等.大鼠宫腔粘连模型的构建[J].江苏医药,2020,46(8):761-764.
- [12] 张奕,胡秀娟,戴志俊,等.多重方法建立大鼠子宫内深度损伤模型[J].中华全科医学,2021,19(6):913-916,1012.
- [13] CHEN Y, CHANG Y, YAO S. Role of angiogenesis in endometrial repair of patients with severe intrauterine adhesion[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(7):1343-1350.
- [14] KOU L, JIANG X, XIAO S, et al. Therapeutic options and drug delivery strategies for the prevention of intrauterine adhesions[J]. J Control Release, 2020, 318:25-37.
- [15] 叶小剑,许宁.大鼠尿道狭窄模型的超声评价方法学探讨[J].中华男科学杂志,2020,26(7):595-600.
- [16] 王小文,胡嘉彪,何向军,等.大鼠移植静脉再狭窄模型构建的标准化步骤及评价[J].上海交通大学学报(医学版),2016,36(11):1568-1574.
- [17] 周伟杰,周正炜,陶娟,等.超声成像在早期干燥综合征小鼠模型中的评价作用[J].中国药理学通报,2020,36(1):140-145.
- [18] 张璐,李莹,吕晓丹,等.大鼠子宫腔粘连模型的建立及评价指标[J].动物学杂志,2017,52(1):115-121.
- [19] 韩华,薛改,李洁,等.宫腔粘连模型大鼠子宫内膜胞饮突发育和整合素 $\beta 3$ 表达[J].现代妇产科进展,2017,26(5):345-348.
- [20] KONG D, ZHANG L, XU X, et al. Small intestine submucosa is a potential material for intra-uterine adhesions treatment in a rat model[J]. Gynecol Obstet Invest, 2018, 83(5):499-507.
- [21] 郭意欣,关婷.机械损伤联合不同感染方法建立大鼠宫腔粘连模型的对比研究[J].现代妇产科进展,2018,27(9):693-695.
- [22] 金玥彤,高艺花,金铨顺.速度向量成像技术评价大鼠不同切面左心室心肌运动的实验研究[J].中国现代医学杂志,2021,31(6):27-31.
- [23] 付明强,周京敏,钱菊英,等.超声心动图评价自发性高血压大鼠左室舒张功能的可行性研究[J].中国超声医学杂志,2012,28(4):300-303.
- [24] HOLEČEK M, VODENIČAROVÁ M. Muscle wasting and branched-chain amino acid, alpha-ketoglutarate, and ATP depletion in a rat model of liver cirrhosis[J]. Int J Exp Pathol, 2018, 99(6):274-281.
- [25] HUANG S L, CHANG C W, LEE Y H, et al. Protective effect of low-intensity pulsed ultrasound on memory impairment and brain damage in a rat model of vascular dementia[J]. Radiology, 2017, 282(1):113-122.
- [26] 李秀梅,张晶,张冰松,等.超声无创评价大鼠子宫腺肌病建模成功的可行性研究[J].中国超声医学杂志,2015,31(8):748-751.
- [27] 王海燕,李北氢,孙清涣,等.经阴道三维彩超在宫腔粘连筛查及治疗中的临床价值研究[J].生殖医学杂志,2018,27(3):213-217.
- [28] 程文漪,倪炯,沈继红,等.经阴道三维超声对宫腔异常不孕症患者宫腔粘连诊断灵敏度及准确性的影响[J].现代医用影像学,2021,30(1):15-17,41.

(收稿日期:2023-05-18 修回日期:2023-10-22)

(编辑:冯 甜)