

程怡怡, 赵伟伟, 宋振峰, 等. 胶原蛋白肽联合海藻酸钠通过下调 NLRP3 炎症小体表达改善小鼠宫腔粘连 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1296-1303.

Cheng YY, Zhao WW, Song ZF, et al. Collagen peptide combined with sodium alginate improve intrauterine adhesions in mice by downregulating expression of NLRP3 inflammasome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1296-1303.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.007

# 胶原蛋白肽联合海藻酸钠通过下调 NLRP3 炎症小体表达改善 小鼠宫腔粘连

程怡怡<sup>1,2</sup>, 赵伟伟<sup>2</sup>, 宋振峰<sup>2</sup>, 童福雯<sup>2,3</sup>, 刘刚<sup>4</sup>, 张花<sup>1</sup>, 施磊磊<sup>5</sup>,  
郭志坤<sup>4</sup>, 王现伟<sup>1,2,4</sup>, 潘莹<sup>1\*</sup>, 孙永琨<sup>1,2,4\*</sup>

(1. 新乡医学院第三附属医院, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003;  
3. 新乡医学院三全学院, 河南 新乡 453003; 4. 河南省医用组织再生重点实验室, 河南 新乡 453003;  
5. 南通业盟新材料股份有限公司, 江苏 南通 226000)

**【摘要】** 目的 探讨胶原蛋白肽(collagen peptide, CP)联合海藻酸钠(sodium alginate, SA)对子宫内膜损伤的修复作用及机制。方法 将48只SPF级雌性C57BL/6N小鼠随机分为假手术组、模型组和治疗组, 每组各16只。模型组采用微创法经小鼠子宫颈向宫腔注射95%乙醇造成子宫内膜损伤, 制备小鼠宫腔粘连模型; 假手术组向宫腔注射0.9%生理盐水; 治疗组向宫腔注射95%乙醇后给予宫腔注射CP+SA混合液。于造模7d后每组分别取8只小鼠采集样本用于各项检测。HE染色观察小鼠子宫组织病理形态学变化; 改良Masson三色染色观察子宫内膜纤维化情况; Western Blot检测子宫组织中炎症因子NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18蛋白表达水平; ELISA检测小鼠血清中炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-18的表达。各组剩余的8只小鼠按照雄雌比例为1:2合笼, 记录各组小鼠妊娠数量, 于妊娠第14天处死妊娠小鼠, 记录胚胎数量。结果 (1)与假手术组相比, 模型组小鼠子宫内膜厚度变薄, 子宫内膜纤维化增加, 并有炎症细胞浸润。此外, 模型组子宫组织中炎症因子NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 和IL-18蛋白表达水平以及血清中炎症因子IL-1 $\beta$ 和IL-18水平均显著高于假手术组( $P < 0.05$ )。 (2)与模型组相比, 治疗组小鼠子宫内膜损伤程度、子宫内膜纤维化程度及炎症细胞浸润均减轻; 此外, 治疗组子宫组织中炎症因子NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 和IL-18蛋白表达水平及血清中炎症因子IL-1 $\beta$ 和IL-18水平均显著低于模型组( $P < 0.05$ )。 (3)与假手术组相比, 模型组小鼠生殖能力下降( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 治疗组小鼠生殖能力明显改善( $P < 0.01$ )。结论 CP和SA联合应用可有效改善宫腔粘连模型小鼠子宫组织病理改变, 减轻子宫内膜损伤、炎症反应及纤维化程度, 改善小鼠生殖能力, 其作用机制可能与下调NLRP3炎症小体表达有关, 为CP和SA联合应用治疗宫腔粘连提供可靠的实验依据。

**【关键词】** 宫腔粘连; 胶原蛋白肽; 海藻酸钠; NLRP3 炎症小体

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023)10-1296-08

**【基金项目】** 国家重点研发计划资助(2018YFC1105800), 新乡医学院第三附属医院开放课题(KFKTYB202127, KFKTZD202106), 新乡医学院研究生科研创新支持计划(YJSCX202124Z)。

Funded by the National Key R&D Program Grant (2018YFC1105800), Open Project of the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University (KFKTYB202127, KFKTZD202106), Postgraduate Scientific Research Innovation Support Program of Xinxiang Medical University (YJSCX202124Z).

**【作者简介】** 程怡怡(1990—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 宫腔粘连。Email: 1397339622@qq.com

**【通信作者】** 潘莹(1970—), 女, 博士, 研究方向: 妇产科学。Email: panying@xxmu.edu.cn;

孙永琨(1981—), 女, 博士, 研究方向: 创伤修复, 再生医学与组织工程。Email: sun@xxmu.edu.cn。

\* 共同通信作者

# Collagen peptide combined with sodium alginate improve intrauterine adhesions in mice by downregulating expression of NLRP3 inflammasome

CHENG Yiyi<sup>1,2</sup>, ZHAO Weiwei<sup>2</sup>, SONG Zhenfeng<sup>2</sup>, TONG Fuwen<sup>2,3</sup>, LIU Gang<sup>4</sup>, ZHANG Hua<sup>1</sup>,  
SHI Leilei<sup>5</sup>, GUO Zhikun<sup>4</sup>, WANG Xianwei<sup>1,2,4</sup>, PAN Ying<sup>1\*</sup>, SUN Yongkun<sup>1,2,4\*</sup>

(1. the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China. 2. School of Basic Medical Sciences College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003. 3. Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003. 4. the Key Laboratory of Medical Tissue Regeneration in Henan Province, Xinxiang 453003. 5. Nantong Yemeng New Material Co., Ltd, Nantong 226000)

Corresponding author: PAN Ying. E-mail: panying@xxmu.edu.cn; SUN Yongkun. E-mail: sun@xxmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the repairing effect and mechanism of collagen peptide (CP) combined with sodium alginate (SA) on endometrial injury. **Methods** Forty-eight SPF female C57BL/6N mice were randomly divided into sham, model, and CP + SA groups, with 16 mice in each group. In the model group, the intrauterine adhesion model was established by injecting 95% ethanol into the uterine cavity through the cervix to induce endometrial injury. In the sham operation group, 0.9% normal saline was injected into the uterine cavity. The treatment group was injected with a mixture of CP and SA after injection of 95% ethanol into the uterine cavity. At 7 days after modeling, eight mice in each group were selected to provide samples. HE staining was used to observe pathological changes in mouse uterine tissue. Modified Masson tricolor staining was used to observe endometrial fibrosis. Western Blot was used to measure protein expression levels of proinflammatory factors NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in uterine tissues. ELISA were used to measure IL-1 $\beta$  and IL-18 in serum. The remaining eight mice in each group were cohoused in accordance with a male : female ratio of 1 : 2, and the number of pregnant mice in each group was recorded. Pregnant mice were euthanized on day 14 of pregnancy, and the number of embryos was recorded. **Results** (1) Compared with the sham operation group, the model group had a thinner endometrial thickness and increased endometrial fibrosis and inflammatory cell infiltration. Additionally, the protein expression levels of proinflammatory factors NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in uterine tissue and the serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in the model group were significantly lower than those in the sham operation group ( $P < 0.05$ ). (2) Compared with the model group, the treatment group showed reductions in the degree of endometrial injury, endometrial fibrosis, and inflammatory cell infiltration. Additionally, the protein expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in uterine tissue and the serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in the model group were significantly lower than those in the sham operation group ( $P < 0.05$ ). (3) Compared with the sham group, the reproductive ability of the model group was decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the reproductive ability of the treatment group was significantly improved ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Combined application of CP and SA effectively improved pathological changes of uterine tissue, reduced endometrial injury, inflammatory responses and fibrosis, and improved the reproductive ability of mice. The mechanism may be related to downregulation of NLRP3 inflammasome expression, which provides a reliable experimental basis for combined application of CP and SA for treatment of intrauterine adhesion.

**【Keywords】** intrauterine adhesions; collagen peptide; sodium alginate; NLRP3 inflammasome

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

育龄期女性子宫内膜在性激素的作用下经历周期性的脱落、修复和再生,其中子宫内膜修复不会形成瘢痕<sup>[1]</sup>。然而当子宫内膜基底层损伤后易导致子宫内膜修复障碍从而形成宫腔内粘连<sup>[2-3]</sup>。宫腔粘连(intrauterine adhesion, IUA)是女性生殖系统中常见的一种子宫内膜纤维化疾病,主要因子宫内膜损伤或感染引起子宫内膜基底层损伤,诱发异

常的炎症反应,造成大量胶原纤维沉积在子宫腔内,导致子宫内膜纤维化,主要表现为宫腔堵塞、盆腔疼痛、月经紊乱、闭经、继发性不孕、妊娠异常等,严重影响女性的身心健康<sup>[4-5]</sup>。目前,尚缺乏有效治疗 IUA 的方法,因此有效预防 IUA,减少 IUA 并发症,对提高 IUA 患者的生活质量具有重要的临床意义<sup>[6]</sup>。NLRP3 炎症小体是涉及免疫调节和炎症

反应的蛋白质复合物,主要是由 NLRP3 受体蛋白、凋亡相关的斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 和效应蛋白半胱氨酸的天冬氨酸酶-前体 (Pro-caspase-1) 3 种不同类型的蛋白质组成,在机体免疫和疾病发生过程中起到重要作用<sup>[7-8]</sup>。研究发现 NLRP3 炎症小体参与肾、肝、肺等多器官纤维化的发生发展,而抑制 NLRP3 炎症小体活化可减轻炎症反应和纤维化程度<sup>[9-11]</sup>。然而,NLRP3 炎症小体在 IUA 中的作用尚未见报道。研究显示胶原蛋白肽 (collagen peptide, CP) 和海藻酸钠 (sodium alginate, SA) 具有抗炎、促进创面的愈合等功能<sup>[12-14]</sup>,但其对 IUA 的作用机制还需要进一步的研究。因此,本研究将 CP 和 SA 应用于损伤后的小鼠子宫内膜,探讨其对 IUA 形成的影响,为临床防治 IUA 提供新的治疗思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

48 只 SPF 级性成熟且未交配雌性 C57BL/6N 小鼠,9 ~ 12 周龄,体重 19 ~ 24 g,购于河南斯克贝斯生物科技股份有限公司动物实验中心【SCXK(豫)2020-0005】。每笼 5 只,饲养环境:温度 20 ~ 26℃,湿度 40% ~ 70%,光照明暗时间为 12 h/12 h,循环照明,饲养期间各组小鼠自由获取标准鼠食和水,饲养于新乡医学院实验动物中心 SPF 级环境【SYXK(豫)2020-0011】。常规适应 1 周后用于实验。实验中所涉及操作均符合新乡医学院第三附属医院实验动物伦理学的相关要求(K2021-033-01)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

胶原蛋白肽和海藻酸钠(南通业盟新材料股份有限公司,中国),异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,中国),多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司,中国),HE 染色试剂盒(Beyotime, C105S, 中国),改良 Masson 三色染色试剂盒(Solarbio, G1345, 中国),NLRP3/NALP3(Adipogen, AG-20B-0014-C100, 美国),ASC(ABclonal, A11433, 中国),Anti-Caspase-1(Abcam, ab138483, 英国),Anti-IL-1 $\beta$ (Abcam, ab9722, 英国),IL-18(ABclonal, A20473, 中国),GAPDH(Proteintech, 6004-1-1, 中国), $\beta$ -Actin(Beyotime, AF5003, 中国),辣根酶标记山羊抗兔(ZSGB-BIO, ZB-2301, 中国),辣根酶标记山羊抗小鼠(ZSGB-BIO, ZB-2305, 中国),小鼠 IL-1 $\beta$  ELISA

试剂盒(CUSABIO, CSB-E08054m, 中国),小鼠 IL-18 ELISA 试剂盒(MULTI SCIENCES, EK218-96, 中国)。小动物呼吸麻醉机(瑞沃德, 中国),研究级正置多功能显微镜(Nikon NI-U, 日本),小型垂直电泳转印系统(Bio-Rad, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠 IUA 模型的建立

本模型的构建以 95%乙醇作用于子宫内膜引起子宫内膜化学性损伤、炎症反应及纤维化为基础,构建稳定且有效的小鼠 IUA 模型<sup>[15-16]</sup>。选取正常发情周期的小鼠,于动情期造模,操作步骤如下:使用小动物呼吸麻醉机进行麻醉,令小鼠吸入 2% ~ 3%浓度的异氟烷麻醉剂诱导麻醉后,将小鼠置于小动物操作台上给予持续吸入 1.5% ~ 2.5%异氟烷维持麻醉,再使用连接注射器的灌胃针探查宫颈口,经宫颈注入 95%乙醇直至观察到有乙醇从阴道口流出,维持 1 min,再经宫颈注射 0.9%生理盐水 2 mL 冲洗子宫腔内残余的乙醇。

#### 1.2.2 实验动物分组及处理

将 48 只小鼠随机分为 3 组,分别为假手术组、模型组和治疗组(CP + SA),每组 16 只。模型组按上述方法经小鼠子宫颈宫腔注射 95%乙醇进行子宫内膜损伤,制备 IUA 模型。假手术组经小鼠子宫颈向宫腔注射 0.9%生理盐水。治疗组(CP + SA)经小鼠子宫颈向宫腔注射 95%乙醇进行造模后再向宫腔注射 5%CP + 2.5%SA 混合液。各组小鼠造模后均饲予正常食物和水。

#### 1.2.3 样本取材及处理

造模 7 d 后每组随机取 8 只小鼠取材,采用 2% ~ 3%异氟烷吸入麻醉,取血后,离心,取上层血清冻存,用于 ELISA 实验。取子宫组织,部分置于-80℃保存备用,用于蛋白含量测定;部分置入新鲜配置的 4%多聚甲醛液中固定,常规石蜡包埋切片,用于后续组织形态学染色以及改良 Masson 三色染色。

#### 1.2.4 生殖能力检测

剩余各组小鼠于造模 7 d 后按照雄鼠与雌鼠比例 1:2 于 20:00 合笼,第 2 天 8:00 阴道涂片检查,以显微镜下见精子记为妊娠第 1 天,观察小鼠怀孕情况,记录各组妊娠小鼠数量,于妊娠第 14 天处死妊娠小鼠,记录胚胎数量。

#### 1.2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察子宫内膜形态学变化

子宫组织切片常规脱蜡至水,苏木素染色

5 min, 浸入流动自来水中冲洗约 10 min, 伊红染色 1 min, 脱水透明, 中性树胶封固, 随后在  $10 \times 4$  倍和  $10 \times 20$  倍显微镜下观察子宫内膜病理形态学变化并拍照, 用 Image J 软件计数子宫内膜腺体数量。

1.2.6 改良 Masson 三色染色观察子宫内膜纤维化程度

子宫组织切片常规脱蜡至水, 切片入 Bouin 液媒染 2 h, 天青石蓝染色 2 min, Mayer 苏木素染色 2 min, 酸性乙醇分化液分化 10 s, 磷钼酸溶液处理 10 min, 苯胺蓝染色 5 min, 弱酸处理 2 min, 脱水透明, 中性树胶封片后, 在显微镜下观察子宫内膜纤维化程度,  $10 \times 4$  倍和  $10 \times 20$  倍显微镜下拍照, 用 Image J 软件分析各组子宫内膜纤维化程度。

1.2.7 Western Blot 检测各组子宫组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白表达情况

将各组小鼠子宫组织匀浆后, 提取蛋白后测定蛋白浓度, 依次进行配胶、上样、电泳、电转、封闭, 分别孵育对应的一抗和二抗, 洗膜后在 Azure 电化学发光成像系统显影, 用 Image-Pro Plus 软件分析计算目的蛋白及内参蛋白的灰度值。

1.2.8 ELISA 检测血清 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的含量

取各组小鼠血清, 严格按照 ELISA 检测试剂盒的操作流程, 检测各组小鼠血清 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的含量, 以标准品浓度作纵坐标, 以 OD 值作横坐标, 作标准曲线, 计算各血清样本中所测指标的水平。

### 1.3 统计学分析

本研究数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 Image J、Image pro-plus 进行定量分析, 采用

GraphPad Prism 8.0 进行统计学分析作图。多组间数据比较采用单因素方差分析 (One way-ANOVA) 和多重比较检验进行分析。以  $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 小鼠子宫组织 HE 染色形态学观察

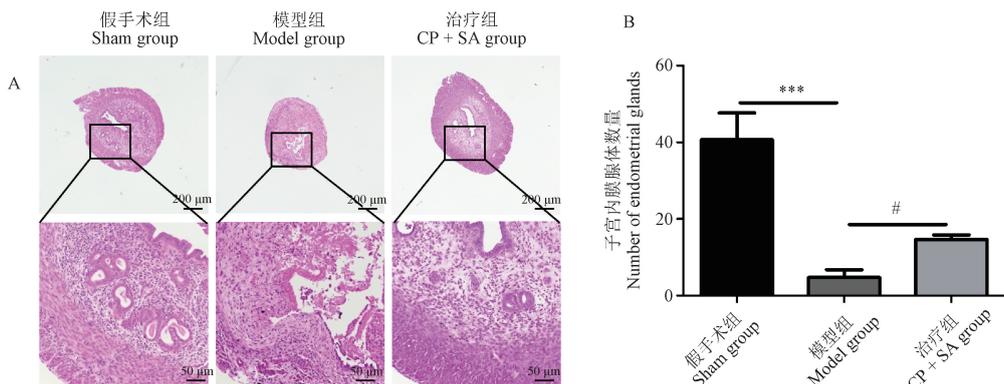
由图 1 可见, 与假手术组相比, 模型组子宫内膜变薄、破坏, 子宫腔上皮消失, 子宫内膜腺体数量减少, 差异具有显著性 ( $P < 0.001$ ), 并伴有较多炎性细胞浸润。与模型组相比, 治疗组子宫内膜损伤程度明显改善, 子宫内膜厚度较前增加, 炎性细胞浸润减轻, 子宫内膜腺体数量也相应增加, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 小鼠子宫组织改良 Masson 三色染色结果

由图 2 可见, 与假手术组相比, 模型组显示子宫组织内可见蓝染面积明显增加, 提示胶原纤维增多, 差异具有显著性 ( $P < 0.001$ )。子宫内膜间质细胞和胶原纤维排列紊乱, 分布不均, 且胶原纤维与肌层粘连, 子宫腔内炎性细胞浸润增多, 提示小鼠子宫腔粘连造模成功。与模型组相比, CP + SA 治疗组子宫组织内蓝染胶原纤维面积明显减少, 差异具有显著性 ( $P < 0.001$ )。

### 2.3 Western Blot 检测小鼠子宫组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白表达量

由图 3 可见, 与假手术组相比, 模型组小鼠子宫组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白相对表达量均明显升高, 差异具有显著性 ( $P < 0.001$ ,

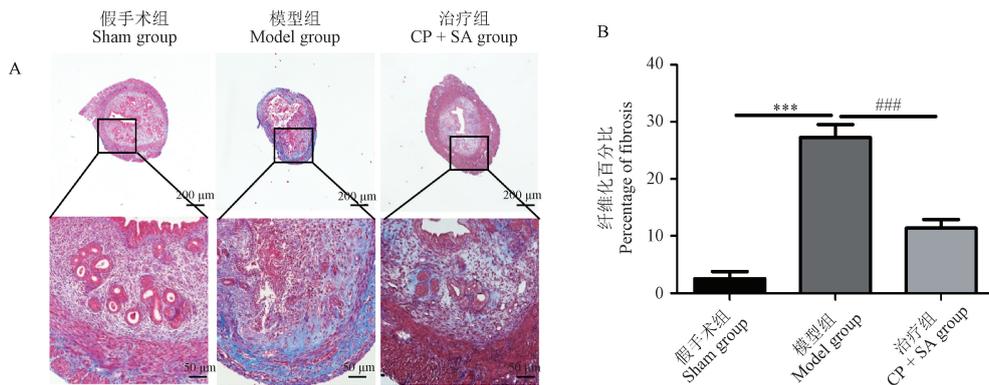


注: A: HE 染色评估子宫组织形态学变化; B: 用 Image J 定量子宫内膜腺体数量; 与假手术组相比,  $*** P < 0.001$ ; 与模型组相比,  $\# P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 子宫组织横切形态学观察

Note. A. HE staining was used to evaluate the morphological changes of uterine tissues. B. Image J was used to quantify the number of endometrial glands. Compared with sham group,  $*** P < 0.001$ . Compared with model group,  $\# P < 0.05$ . (The same in the following figures)

Figure 1 Morphological observation of transverse section of uterine tissue

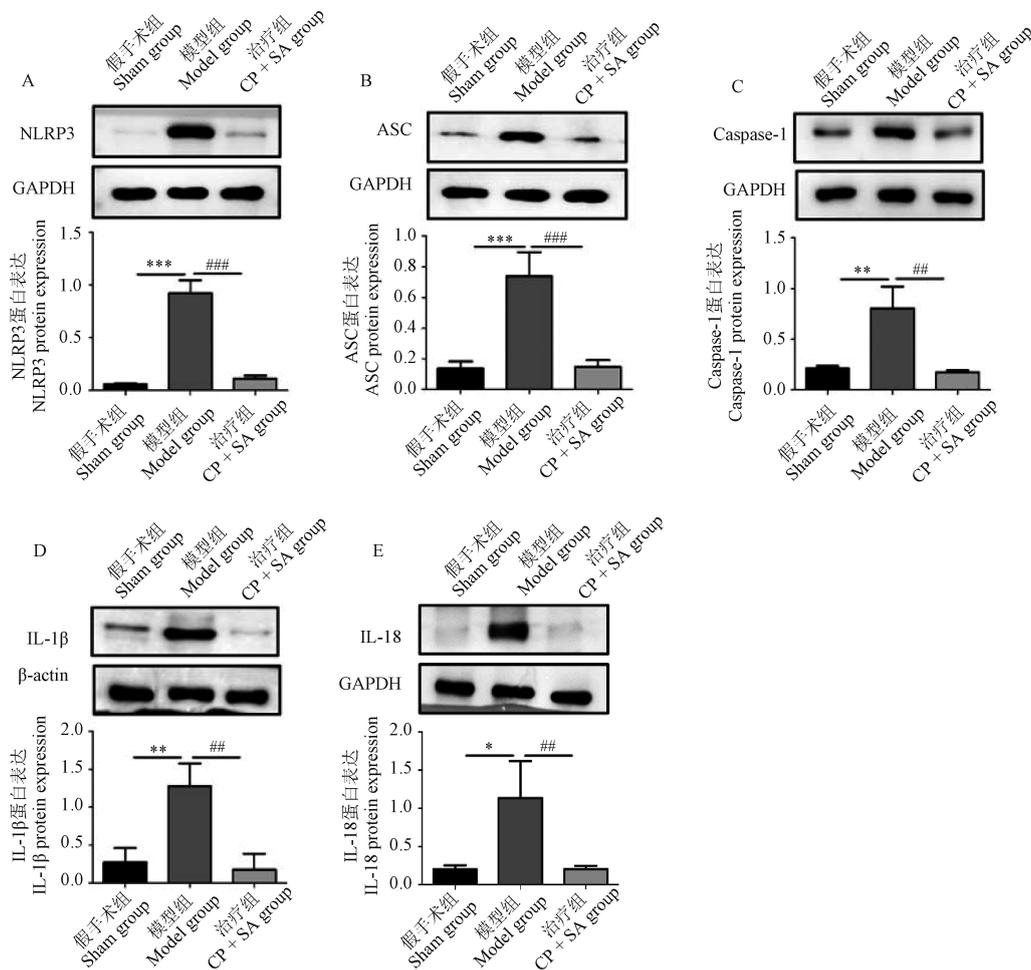


注: A:改良 Masson 三色染色评估纤维化程度,胶原纤维被染成深蓝色,肌纤维被染成红色;B:用 Image J 定量子宫内膜纤维化面积;与模型组相比,### $P < 0.001$ 。(下图同)

图 2 子宫组织横切纤维程度观察

Note. A. Modified Masson tri-color staining was used to assess the degree of fibrosis. The collagen fibers were dyed blue and the muscle fibers were dyed red. B. Image J was used to quantify the area of endometrial fibrosis. Compared with the model group, ### $P < 0.001$ . (The same in the following figures)

Figure 2 Observation of the degree of transverse fibrosis in uterine tissue



注:与假手术组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。(下图同)

图 3 各组子宫组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 的蛋白表达

Note. Compared with sham group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Compared with the model group, ## $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

Figure 3 Protein expression electrophoresis of NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1β and IL-18 in uterine tissues of each group

$P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。与模型组相比,CP + SA 治疗组小鼠子宫组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白相对表达量均明显降低,差异具有显著性( $P < 0.001$  或  $P < 0.01$ )。

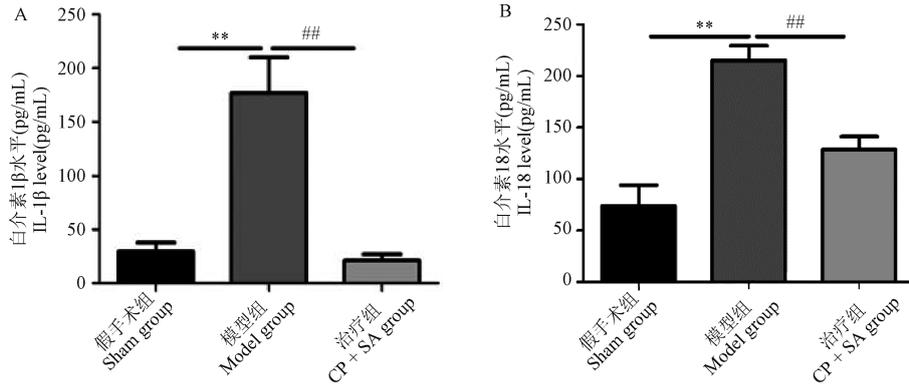
## 2.4 小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 和 IL-18 炎症因子分泌水平的影响

由图 4 可见,与假手术组相比,模型组小鼠血清中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的水平均明显升高,差异具有显著性( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。与模型组相比,治疗

组小鼠血清中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的水平均明显降低,差异具有显著性( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。

## 2.5 小鼠生殖能力检测

由图 5 可见,与假手术组相比,模型组小鼠妊娠能力下降,子宫呈现不同程度受损,子宫内妊娠胚胎数量也相应降低,差异具有显著性( $P < 0.01$ )。与模型组相比,CP + SA 治疗组小鼠妊娠能力改善,子宫内妊娠胚胎数量明显升高,差异具有显著性( $P < 0.01$ )。

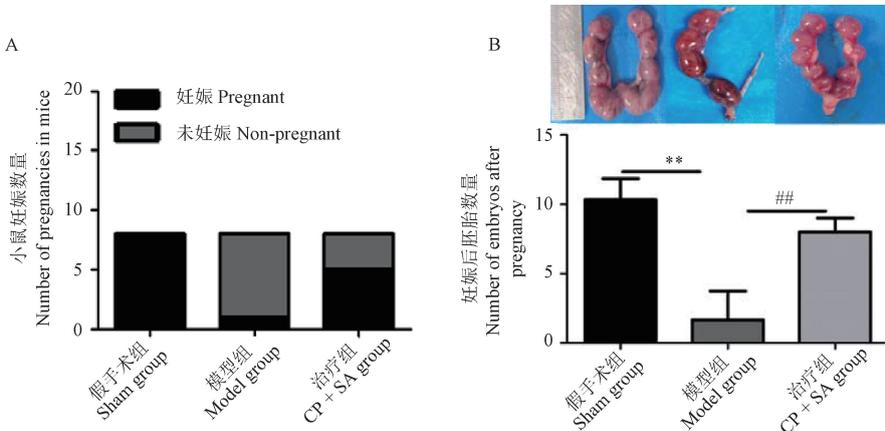


注:A:血清中 IL-1 $\beta$  的分泌水平;B:血清中 IL-18 的分泌水平。

图 4 各组小鼠血清中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的分泌水平

Note. A. Serum IL-1 $\beta$  secretion level. B. Serum IL-18 secretion level.

Figure 4 Secretion levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in serum of mice in each group



注:A:小鼠妊娠数量;B:妊娠后胚胎数量量化图。

图 5 各组小鼠妊娠情况

Note. A. Number of pregnancies in mice. B. Quantitative map of number of embryos after pregnancy.

Figure 5 Pregnancy of mice in each group

## 3 讨论

IUA 是多种子宫手术或感染后的严重并发症,最终引起子宫腔内异常纤维化。患有 IUA 的女性可伴有因月经不调引起的周期性盆腔疼痛、月经过少、闭经,甚至出现月经逆行导致子宫内膜异位症

的发生,还会出现不孕不育或反复流产,导致胎儿宫内生长受限和胎盘植入<sup>[6,17]</sup>。目前在临床上对于 IUA 的预防措施,主要包括术后宫腔内放置节育器、子宫气囊支架、生物屏障、干细胞移植以及药物综合治疗等<sup>[18]</sup>。其中生物屏障因其刺激性小、可降解性、低毒性、低免疫原性等优点,在 IUA 的防治中发

挥着重要作用。CP 是从动物组织中提取的一种具有抗氧化特性的生物活性肽,具有较高的营养价值、良好的保湿性能、良好的生物相容性和生物降解性等特性,可促进成纤维细胞的生长和透明质酸的合成,减轻炎症反应,从而促进伤口的愈合,在制药、保健和食品保鲜等方面应用广泛<sup>[19-20]</sup>。SA 作为一种从褐藻中获得的天然存在的阴离子多糖聚合物,能与阳离子接触形成凝胶,在制药中得到了广泛的应用。因其具有低毒、低成本、良好的生物相容性和生物降解性而成为创面敷料的首选材料<sup>[13,21]</sup>。

因此,在本研究中,通过制备了一种由 CP 和 SA 组成的可注射混合液,作用于受损后的小鼠子宫内膜,观察 CP 和 SA 联合应用对子宫内膜修复的影响。结果显示,与假手术组相比,模型组小鼠子宫内膜明显受损,子宫内膜腺体数量减少,子宫内膜呈现纤维化改变,符合临床 IUA 特征。与模型组相比,CP 和 SA 治疗组小鼠子宫内膜损伤程度明显改善,子宫内膜腺体数量明显增加,且子宫内膜纤维化程度减轻。提示 CP 和 SA 联合应用对 IUA 的形成有明显的改善作用。

以往研究表明,炎症反应与组织再生修复过程密切相关,如皮肤再生修复、血管再生修复和神经再生修复<sup>[22-24]</sup>。多种生物材料,如 CP、SA 等,已被证明能够调节伤口愈合中的炎症反应<sup>[14,25]</sup>。胶原蛋白肽混合物可通过降低炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的水平促进糖尿病小鼠的创面愈合<sup>[14]</sup>。载药 SA 水凝胶可通过抑制巨噬细胞的聚集降低炎症反应<sup>[26]</sup>。本研究结果显示,CP 和 SA 联合应用可减少由 95% 乙醇诱导的 IUA 所产生的炎症反应。

NLRP3 炎症小体信号通路在炎症过程中发挥重要作用。NLRP3 炎症小体是由 NLRP3、ASC 和 Pro-caspase-1 组成的多蛋白质复合体。正常情况下,NLRP3 炎症小体处于抑制状态,当机体受到炎症等刺激后,NLRP3 与 ASC 之间相互作用,ASC 与 Pro-caspase-1 之间相互作用,激活 Caspase-1 诱导自我切割,促进促炎症细胞因子的成熟和分泌,如 IL-1 $\beta$  和 IL-18<sup>[27]</sup>。本研究显示,与假手术组相比,IUA 模型小鼠子宫组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 IL-18 蛋白表达水平显著升高,血清中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的水平也显著升高。与模型组相比,CP 和 SA 治疗组小鼠子宫组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 IL-18 蛋白表达水平不同程度降低,血清中 IL-

1 $\beta$  和 IL-18 的水平也显著降低。此外,还检测了造模后小鼠的生殖能力,发现模型组小鼠妊娠数量及妊娠后胚胎数量下降,而 CP 和 SA 治疗组小鼠妊娠数量及妊娠后胚胎数量明显高于模型组,提示 CP 和 SA 联合应用可有效改善小鼠生殖能力。以上研究表明,CP 和 SA 联合应用明显抑制 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 IL-18 的表达,提示 CP 和 SA 联合应用可能通过抑制 NLRP3 炎症小体,进而抑制了 IL-1 $\beta$  和 IL-18 炎症因子的分泌,减轻了产生的炎症级联反应,促进子宫内膜修复,从而提高小鼠生殖能力。

综上所述,CP 和 SA 联合应用可有效抑制子宫内膜损伤后的炎症反应,加速子宫内膜修复,改善小鼠生殖能力。其作用机制可能与下调 NLRP3 炎症小体表达有关。CP 和 SA 联合应用有助于改善受损后子宫内微环境,提高其在子宫内膜损伤中的治疗效果,为预防 IUA 的发生提供了一种新的途径。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] Salmonsens LA, Hutchison JC, Gargett CE. Cyclical endometrial repair and regeneration [J]. *Development*, 2021, 148 (17): dev199577.
- [2] Yao Y, Chen R, Wang G, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells reverse EMT via TGF- $\beta$ 1/Smad pathway and promote repair of damaged endometrium [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 225.
- [3] 陈醒,毛乐乐,周应芳,等. 三种胶原纤维染色法评价宫腔粘连的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(5): 34-38, 45.  
Chen X, Mao LL, Zhou YF, et al. Comparison of three special staining methods for collagen fibers in evaluation of intrauterine adhesion [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(5): 34-38, 45.
- [4] Zheng S, Wang J, Wang X, et al. Feasibility analysis of treating severe intrauterine adhesions by transplanting menstrual blood-derived stem cells [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 2201-2212.
- [5] 郭罗培,隋龙. 子宫内膜损伤修复与宫腔粘连形成机制研究进展 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2019, 35(6): 706-709.  
Guo LP, Sui L. Research progress on mechanism of endometrial injury repair and intrauterine adhesion [J]. *Chin J Pract Gynecol Obstet*, 2019, 35(6): 706-709.
- [6] Mentula M, Männistö J, Gissler M, et al. Intrauterine adhesions following an induced termination of pregnancy: a nationwide cohort study [J]. *BJOG*, 2018, 125(11): 1424-1431.
- [7] Fu J, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316.

- [ 8 ] Schieffer L, Manzl C, Schatz C, et al. Nrf2 in the field of dentistry with special attention to NLRP3 [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(1): 149.
- [ 9 ] He S, Wang Y, Liu J, et al. Activating SIRT1 deacetylates NF- $\kappa$ B p65 to alleviate liver inflammation and fibrosis via inhibiting NLRP3 pathway in macrophages [J]. *Int J Med Sci*, 2023, 20(4): 505–519.
- [ 10 ] Huang G, Zhang Y, Zhang Y, et al. Chronic kidney disease and NLRP3 inflammasome: Pathogenesis, development and targeted therapeutic strategies [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2023, 33: 101417.
- [ 11 ] Zhang X, Zhang W, Chen X, et al. Prevention of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice by bilobalide [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2023, 2023: 1973163.
- [ 12 ] Zhang Z, Li Z, Li Y, et al. Sodium alginate/collagen hydrogel loaded with human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes wound healing and skin remodeling [J]. *Cell Tissue Res*, 2021, 383(2): 809–821.
- [ 13 ] Zhang M, Qiao X, Han W, et al. Alginate-chitosan oligosaccharide-ZnO composite hydrogel for accelerating wound healing [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 266: 118100.
- [ 14 ] Xiong X, Liang J, Xu Y, et al. The wound healing effects of the *Tilapia* collagen peptide mixture TY001 in streptozotocin diabetic mice [J]. *J Sci Food Agric*, 2020, 100(7): 2848–2858.
- [ 15 ] Zhang S, Sun Y, Jiang D, et al. Construction and optimization of an endometrial injury model in mice by transcervical ethanol perfusion [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(3): 693–702.
- [ 16 ] 祖珍玉, 罗敏, 申东翔, 等. 四种新西兰大白兔宫腔粘连模型的建立与评价及其对子宫内膜容受性的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(9): 30–38.
- Zu ZY, Luo M, Shen DX, et al. Establishment and evaluation of four models of intrauterine adhesion and its effects on endometrial receptivity in New Zealand white rabbits [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(9): 30–38.
- [ 17 ] March CM. Management of asherman's syndrome [J]. *Reprod Biomed Online*, 2011, 23(1): 63–76.
- [ 18 ] 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.
- [ 19 ] Sato K. The presence of food-derived collagen peptides in human body-structure and biological activity [J]. *Food Funct*, 2017, 8(12): 4325–4330.
- [ 20 ] Xie Z, Wang X, Yu S, et al. Antioxidant and functional properties of cowhide collagen peptides [J]. *J Food Sci*, 2021, 86(5): 1802–1818.
- [ 21 ] Jadach B, Swietlik W, Froelich A. Sodium alginate as a pharmaceutical excipient: novel applications of a well-known polymer [J]. *J Pharm Sci*, 2022, 111(5): 1250–1261.
- [ 22 ] Tian H, Lu Y, Shah SP, et al. Autacoid 14S, 21R-dihydroxydocosahexaenoic acid counteracts diabetic impairment of macrophage prohealing functions [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(4): 1780–1791.
- [ 23 ] Baba N, Wang F, Iizuka M, et al. Induction of regional chemokine expression in response to human umbilical cord blood cell infusion in the neonatal mouse ischemia-reperfusion brain injury model [J]. *PLoS One*, 2019, 14(9): e0221111.
- [ 24 ] Tao B, Lin C, Qin X, et al. Fabrication of gelatin-based and Zn<sup>2+</sup>-incorporated composite hydrogel for accelerated infected wound healing [J]. *Mater Today Bio*, 2022, 13: 100216.
- [ 25 ] Raguvaran R, Manuja BK, Chopra M, et al. Sodium alginate and gum acacia hydrogels of ZnO nanoparticles show wound healing effect on fibroblast cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 96: 185–191.
- [ 26 ] Wang X, Guan S, Zhang K, et al. Benlysta-loaded sodium alginate hydrogel and its selective functions in promoting skin cell growth and inhibiting inflammation [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(18): 10395–10400.
- [ 27 ] Rathinam VAK, Chan FK. Inflammasome, inflammation, and tissue homeostasis [J]. *Trends Mol Med*, 2018, 24(3): 304–318.

[ 收稿日期 ] 2023-05-03