

夏良君, 崔础婷, 李军威, 等. 两种方法清除大鼠子宫内膜巨噬细胞的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(4): 84-91.  
Xia LJ, Cui CT, Li JW, et al. A comparative study of two methods for the clearance of macrophages from rat endometrium [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(4): 84-91.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.04.010

# 两种方法清除大鼠子宫内膜巨噬细胞的比较研究

夏良君<sup>1</sup>, 崔础婷<sup>1</sup>, 李军威<sup>1</sup>, 程洁<sup>1</sup>, 夏有兵<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学针灸推拿学院·养生康复学院, 南京 210023; 2. 南京医科大学, 南京 211166)

**【摘要】 目的** 通过比较氯膦酸二钠脂质体不同给药途径的作用差异, 探索更有效的大鼠子宫内膜巨噬细胞清除方法。**方法** 雌性 8 周龄 SD 大鼠随机分为单侧对照组(左侧宫腔注射磷酸缓冲盐脂质体 100  $\mu$ L)、单侧清除组(右侧宫腔注射氯膦酸二钠脂质体 100  $\mu$ L)、双侧对照组(双侧宫腔注射磷酸缓冲盐脂质体 100  $\mu$ L)、双侧清除组(双侧宫腔注射氯膦酸二钠脂质体 100  $\mu$ L)、全身对照组(尾静脉注射磷酸缓冲盐脂质体 500  $\mu$ L)和全身清除组(尾静脉注射氯膦酸二钠脂质体 500  $\mu$ L)。注射后 48 h, 获取组织样本。采用 HE 染色观察子宫、卵巢组织形态结构, 免疫组化观察子宫、卵巢组织中巨噬细胞阳性表达, 流式细胞术检测子宫、卵巢组织中巨噬细胞数量的变化。**结果** 各组大鼠子宫、卵巢组织结构与形态并无明显差异。免疫组化结果显示, 与对照组相比, 单侧及双侧清除组中子宫巨噬细胞阳性表达明显降低( $P<0.001$ ), 卵巢巨噬细胞阳性表达无影响( $P>0.05$ ), 全身清除组子宫和卵巢组织中巨噬细胞阳性表达均减少( $P<0.01, P<0.01$ ); 与单侧及双侧清除组相比, 全身清除对卵巢组织中巨噬细胞阳性表达的影响更大( $P<0.05$ )。流式细胞术检测显示, 与对照组相比, 各清除组均能有效降低子宫组织中巨噬细胞百分比( $P<0.001, P<0.001, P<0.05$ ), 与全身清除组相比, 单侧及双侧清除组子宫内膜巨噬细胞清除效果更好( $P<0.05, P<0.05$ ); 各清除组卵巢组织中巨噬细胞数量与对照组相比均有所下降, 其中全身清除组巨噬细胞数目减少最明显( $P<0.05$ ), 单侧及双侧清除组与对照组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 局部宫腔注射氯膦酸二钠脂质体清除子宫巨噬细胞的方式优于尾静脉注射, 并可避免其对卵巢巨噬细胞的影响, 是建立理想的子宫局部巨噬细胞清除模型的最佳方法。

**【关键词】** 子宫内膜巨噬细胞; 宫腔注射; 氯膦酸二钠脂质体

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 04-0084-08

## A comparative study of two methods for the clearance of macrophages from rat endometrium

XIA Liangjun<sup>1</sup>, CUI Chuting<sup>1</sup>, LI Junwei<sup>1</sup>, CHENG Jie<sup>1</sup>, XIA Youbing<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina of Nanjing University of Chinese Medicine, School of Health Preservation and Rehabilitation of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China.  
2. Nanjing Medical University, Nanjing 211166)

**【Abstract】 Objective** A comparison of different routes for the administration of clodronate disodium liposomes to determine the most effective method of rat endometrial macrophage clearance. **Methods** Female 8-week-old SD rats were randomly divided into a unilateral control group (injected with 100  $\mu$ L PBS liposomes into the left uterine cavity), unilateral clearance group (injected with 100  $\mu$ L clodronate liposomes into the right uterine cavity), bilateral control group (injected with 100  $\mu$ L PBS liposomes into the bilateral intrauterine), bilateral clearance group (injected with 100  $\mu$ L clodronate liposomes into the bilateral intrauterine), whole-body control group (injected with 500  $\mu$ L PBS liposomes into the caudal vein), and whole-body clearance group (injected with 500  $\mu$ L clodronate liposomes into the caudal vein). Hematoxylin and eosin staining was used to observe the morphology and structures of uterine and ovarian tissues,

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82205251, 82274638); 江苏省高校自然科学研究重大项目(23KJA360006); 国家自然科学基金校配套项目(XPT82205251)。

**【作者简介】** 夏良君(1992—), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 针灸治疗子宫内膜病变。E-mail: 270771@njucm.edu.cn

**【通信作者】** 夏有兵(1968—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 针灸辅助生殖。E-mail: xybd1968@njucm.edu.cn

immunohistochemistry was used to observe the presence of macrophages in uterine and ovarian tissues, and flow cytometry was used to detect changes to macrophage cell counts in uterine and ovarian tissues. **Results** There were no significant differences in the structures or morphology of the uterus and ovary among the groups. Immunohistochemical staining showed that, compared to the control group, the unilateral and bilateral uterine clearance groups' population of uterine macrophages was significantly decreased ( $P < 0.001$ ), but there was no difference in the accumulation of macrophages in the ovary ( $P > 0.05$ ). The number of macrophages in both uterine and ovarian tissues decreased in the whole-body clearance group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the unilateral and bilateral clearance groups, the whole-body clearance group had more macrophages in the ovarian tissues ( $P < 0.05$ ). Flow cytometry showed that, compared with the control group, each clearance group's percentages of macrophages in the uterine tissue were significantly reduced ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ). Compared to the whole-body clearance group, the unilateral and bilateral clearance groups' endometrial macrophages had superior clearance activity ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ). In addition, the number of macrophages in ovarian tissue decreased in all clearance groups compared to the control group. The decrease in macrophage number was most pronounced in the whole-body clearance group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference in numbers between the unilateral and bilateral clearance groups and the control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** Local injection of clodronate liposomes was more effective than caudal injection for clearing uterine macrophages, and the impact on ovarian macrophages was largely avoided. Thus local clodronate liposome injection is an improved method for establishing a local uterine macrophage clearance model.

**【Keywords】** endometrial macrophages; intrauterine injection; clodronate liposome

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

巨噬细胞是月经周期中参与子宫内膜修复和再生的关键异质性细胞群。既往研究表明,巨噬细胞在子宫内膜重构中起着重要作用,与蜕膜化和正常妊娠的建立与维持有关,有助于妊娠期间的组织重塑,并在月经期间清除子宫内膜碎片,介导子宫内膜组织的修复、再生和生长<sup>[1-2]</sup>。巨噬细胞呈现较强的可塑性,可在不同微环境刺激和信号下极化,并产生促炎和抑炎两种功能表型<sup>[3]</sup>。巨噬细胞极化和功能异常与子宫内膜异位症<sup>[4]</sup>、宫腔粘连<sup>[5]</sup>、子宫内膜癌<sup>[6]</sup>以及不良妊娠结局<sup>[7]</sup>等病变的发生密切相关。针对调控巨噬细胞极化,改变内膜病理进程及疾病预后,已成为未来临床开展免疫治疗的可能靶点之一。氯膦酸二钠脂质体(clodronate liposomes, CL)利用巨噬细胞的内吞机制,将氯膦酸二钠带入细胞内,其达到一定浓度时,可引发巨噬细胞的凋亡<sup>[8]</sup>。研究表明,CL可通过静脉注射、腹腔注射、鼻腔内注射等多途径,去除骨髓、肺、肝、肿瘤等组织中的巨噬细胞<sup>[9-12]</sup>,但不同给药方式的清除效果略有差异,目前对不同注射途径清除巨噬细胞的效率研究较少。有学者通过宫腔注射 CL 观察子宫巨噬细胞清除后对胚胎着床的影响<sup>[13]</sup>,但其研究只采用了宫腔局部注射的单一途径,对不同注射途径的清除效率和作用差异并未做过多探讨。本研究中,笔者在雌性 SD 大鼠的动情期,分别采用宫腔内局部注射和尾静脉注射 CL 两种方法,观察不同注射

途径清除子宫内膜巨噬细胞的效果,为后期相关研究提供更加合理高效的宫腔巨噬细胞清除方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级健康雌性 SD 大鼠,体重( $200 \pm 20$ )g,由上海必凯科翼生物科技有限公司提供[SCXK(沪)2023-0009]。动物实验操作及饲养均在南京中医药大学实验动物中心进行[SYXK(苏)2023-0077]。每笼 5 只大鼠,昼夜节律各 12 h,室温 20~26℃,湿度 50%~60%,自由摄食饮水。本实验对动物的处理均遵照中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》,并获南京中医药大学伦理委员会批准(202307A012),严格按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

氯膦酸二钠脂质体(上海翌圣生物科技股份有限公司,40337ES08,生产批号:C3103070),浓度为 5 mg/mL;HE 染色试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,BL700A,生产批号:23114870);即用型 SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,SA1022,生产批号:18B21F20B0122);组化用 CD68 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,25747-1-AP,生产批号:00107083);APC 标记抗大鼠 CD45 流式抗

体(杭州联科生物技术有限公司,F3104503,生产批号:A20843);FITC 标记抗大鼠 CD68 流式抗体(美国 ebioscience 公司,MA5-28262,生产批号:XL3774766);破膜固定液试剂盒(美国 biolegend 公司,426803,生产批号:B355889)。

小动物吸入式气体麻醉机(深圳瑞沃德生命科技有限公司,R550IP);全自动组织包埋机(日本樱花公司,TEC5);全封闭组织脱水机(德国徕卡仪器有限公司,HistoCore PEARL);石蜡切片机(德国徕卡仪器有限公司,RM2145);光学显微镜(德国徕卡仪器有限公司,DMi8);多色分析型流式细胞仪(美国碧迪公司,FACSCalibur)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验动物分组

大鼠适应性饲养 7 d 后,每天上午 9:00~10:00 进行阴道脱落细胞涂片并观察其动情周期,选取有 2 个连续正常动情周期的雌鼠进行实验。将 48 只雌性 SD 大鼠按随机数字表法随机分为单侧对照组、单侧清除组、双侧对照组、双侧清除组、全身对照组和全身清除组,共 6 组,每组 8 只。

#### 1.3.2 脂质体注射

取动情期雌性 SD 大鼠,异氟烷充分麻醉后固定,宫腔注射组逐层分离腹部组织,暴露子宫。单侧清除组从右侧子宫近卵巢侧子宫角部向阴道端,使用微量注射器向宫腔内缓慢注入 100  $\mu$ L CL。单侧对照组向左侧宫腔内注射等体积的包裹有磷酸盐缓冲液的脂质体(phosphate buffer liposomes,PL)。双侧清除组大鼠两侧子宫均注射 CL 各 100  $\mu$ L,双侧对照组向双侧宫腔内注射等体积 PL。全身清除组从尾静脉注射 500  $\mu$ L CL,全身对照组从尾静脉注射 500  $\mu$ L PL。注射剂量依据既往研究中局部注射和静脉注射的用量<sup>[10,14]</sup>。注射完毕后缝合并消毒皮肤,待大鼠恢复神志后,送返动物房。

#### 1.3.3 HE 染色

每组中选择 5 只大鼠用于形态学观察。注射 48 h 后,处死大鼠,获得子宫及卵巢组织。一部分组织于 4% 多聚甲醛中固定,石蜡包埋、切片,厚度为 6  $\mu$ m。每只大鼠随机选取两张切片脱蜡至水,苏木素染色 3 min,水洗 2 s,1% 盐酸酒精分化 1 s,流水冲洗 10 min,伊红染色 3 min,85% 乙醇、90% 乙醇、95% 乙醇各脱水 15 s,无水乙醇脱水 3 min $\times$ 2 次,二甲苯透明 3 min $\times$ 2 次,中性树胶封固。每张切片随机选取 5 个低倍镜视野,光学显微镜下观察各

组大鼠子宫、卵巢基本形态。

#### 1.3.4 免疫组织化学染色

包埋、切片步骤同 HE 染色。每只大鼠随机选取两张石蜡切片脱蜡至水,3%  $H_2O_2$  溶液孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶活性,PBS 冲洗 5 min $\times$ 3 次后,加入枸橼酸盐缓冲液进行抗原修复,加热沸腾后自然冷却至室温,PBS 浸泡切片 10 min,组织表面滴加 5% BSA 后,置于 37  $^{\circ}$ C 孵育箱内封闭 30 min,加入 CD68 抗体(1:1500)置于 4  $^{\circ}$ C 过夜;次日 37  $^{\circ}$ C 孵育复温 30 min,PBS 冲洗 5 min $\times$ 3 次后滴加二抗(1:300),37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 冲洗 5 min $\times$ 4 次后滴加 DAB 显色剂,显色充分后蒸馏水浸没终止反应,苏木素复染、梯度乙醇脱水,中性树胶封片固定。光学显微镜下观察,每张切片随机选取 5 个高倍镜视野,棕黄色颗粒为 CD68 阳性表达,Image J 图像处理软件计算目标蛋白平均光密度值(mean optical density,MOD),此值反映目标蛋白表达量。

#### 1.3.5 流式细胞术检测巨噬细胞百分比

每组中选择 8 只大鼠用来观察计算组织中的巨噬细胞百分比。取材后,采用机械酶联合消化法制备单细胞悬液。Hank's 液冲洗新鲜子宫和卵巢组织后,分别剪成 1~2 mm<sup>3</sup> 的小块,置于 5 mL 消化液(1640 培养基+0.1% IV 型胶原蛋白酶+0.1% 透明质酸酶+25  $\mu$ g/mL DNase I)中,在 37  $^{\circ}$ C 下消化 1 h,充分研磨组织后,用含 2% FBS 的 1640 培养基冲洗,收集各组消化液离心 5 min,转速 1500 r/min。离心后弃上清,细胞沉淀用 PBS 重悬后,先进行细胞膜表面抗体 CD45-APC 染色,之后破膜、固定再行 CD68-FITC 染色,染色均在 4  $^{\circ}$ C 环境下避光孵育 20 min。之后用流式细胞仪进行检测。两种注射途径的清除效率=(单侧对照组-单侧清除组)/单侧对照组。

### 1.4 统计学方法

应用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 22.0 软件统计并分析数据。符合正态分布的计量资料用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。采用单因素方差分析,方差齐采用最小显著性差异检验,方差不齐采用 Dunnett's T3 检验。以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

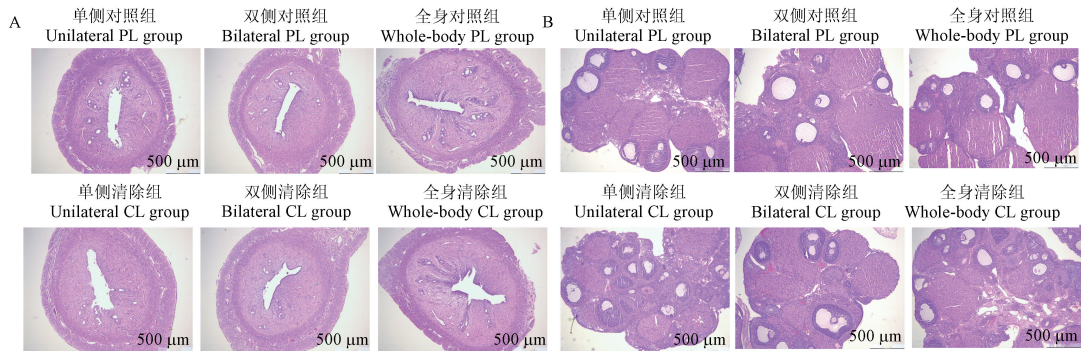
### 2.1 氯膦酸二钠脂质体对各组大鼠子宫、卵巢组织形态的影响

HE 染色结果显示,各组大鼠子宫内膜的结构

并无明显差异,组织中腺体、血管等结构完整,宫腔通畅,无明显出血、炎性渗出和粘连等异常情况(图 1A);各组大鼠卵巢组织中各级卵泡结构正常,卵巢未见明显充血、水肿(图 1B)。

2.2 氯膦酸二钠脂质体对各组大鼠子宫、卵巢组织 CD68 蛋白表达的影响

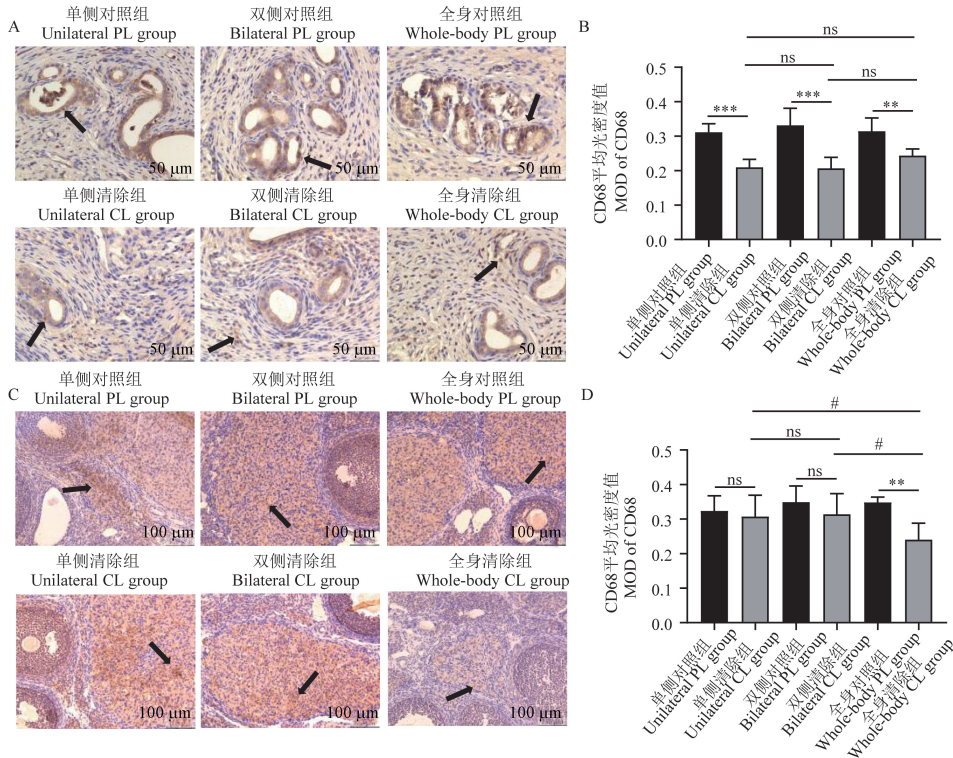
如图 2 免疫组织化学染色结果显示,正常情况下,巨噬细胞主要分布在子宫内膜腺体周围及上皮



注:A:大鼠子宫组织 HE 染色;B:大鼠卵巢组织 HE 染色。  
图 1 大鼠子宫及卵巢组织 HE 染色

Note. A, HE staining of rat uterine tissue. B, HE staining of rat ovary tissue.

Figure 1 HE staining of rats uterus and ovary



注:A:大鼠子宫 CD68 免疫组织化学染色,图中箭头所示棕黄色或棕褐色颗粒为阳性表达;B:大鼠子宫组织 CD68 阳性表达的比较;C:大鼠卵巢组织 CD68 免疫组织化学染色,图中箭头所示棕黄色或棕褐色颗粒为阳性表达;D:大鼠卵巢组织 CD68 阳性表达的比较。与对照组相比, \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ ;与全身清除组相比, #  $P<0.05$ 。

图 2 大鼠子宫及卵巢组织中 CD68 阳性表达( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Note. A, CD68 immunohistochemical staining of rats uterus. The brown-yellow or brown-brown particles shown by arrows in the figure are positively expressed. B, Histogram shows the comparison of CD68 positive expression in uterus of rats. C, CD68 immunohistochemical staining of rats ovary. The brown-yellow or brown-brown particles shown by arrows in the figure are positively expressed. D, Histogram shows the comparison of CD68 positive expression in ovary tissue of rats. Compared with the PL group, \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ . Compared with the Whole-body CL group, #  $P<0.05$ .

Figure 2 Positive expression of CD68 in rats uterus and ovary

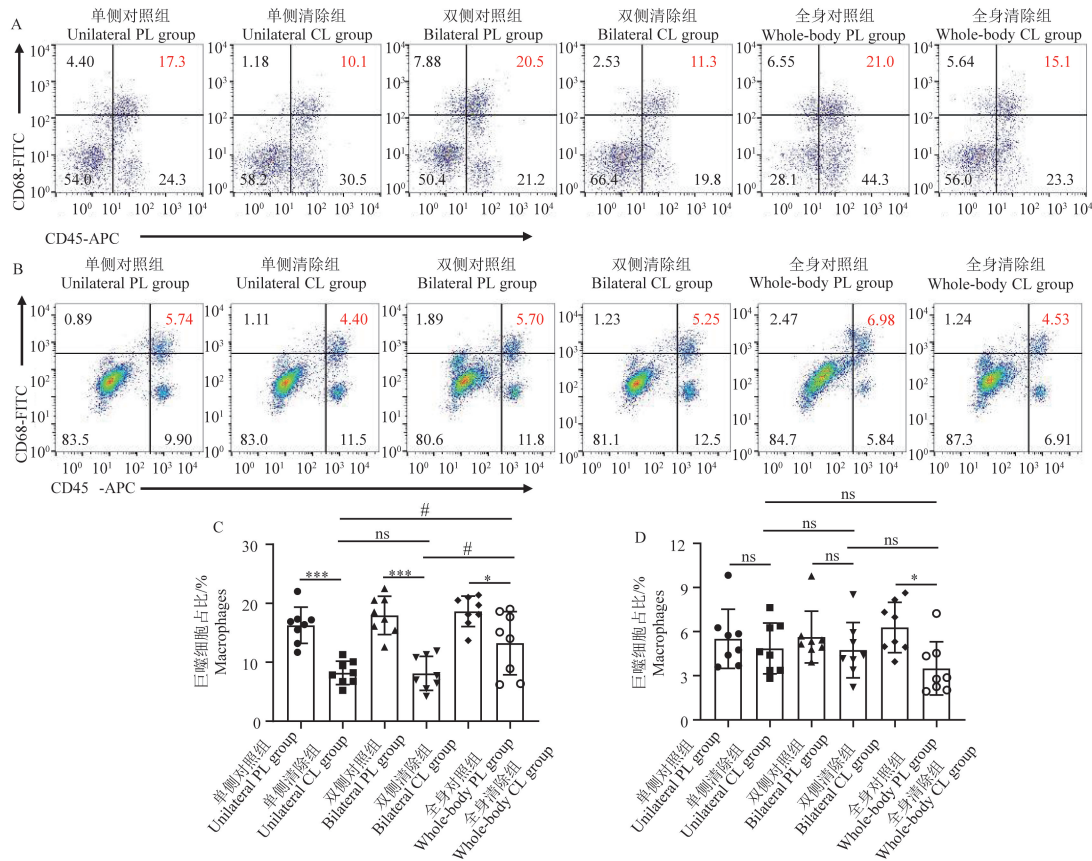
组织中,少量分布在间质组织。与对照组相比,单侧清除组、双侧清除组及全身清除组子宫内膜组织中阳性细胞棕黄色颗粒沉积的含量均有所下降( $P<0.001,P<0.001,P<0.01$ )。各清除组间子宫组织巨噬细胞阳性表达差异均无统计学意义( $P>0.05,P>0.05,P>0.05$ )。

卵巢组织中的巨噬细胞主要分布在基质及血管周围。与对照组相比,单侧及双侧清除组大鼠卵巢组织中的巨噬细胞表达无明显变化( $P>0.05,P>0.05$ ),但全身清除组卵巢中的阳性细胞棕黄色颗粒沉积的含量明显减少,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。与局部单侧或双侧清除组相比,全身清除对卵巢组织中巨噬细胞表达的影响更大( $P<0.05,P<0.05$ ),单侧清除组与双侧清除组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.3 氯膦酸二钠脂质体对各组大鼠子宫、卵巢组织中巨噬细胞清除效果的影响

流式细胞术结果发现(图 3A、3C),与对照组相比,单侧清除组、双侧清除组和双侧清除组均能有效降低子宫组织中巨噬细胞百分比( $P<0.001,P<0.001,P<0.05$ )。经进一步计算得知,单侧清除组较单侧对照组子宫巨噬细胞占比下降了 49.6%,双侧清除组比双侧对照组子宫巨噬细胞占比降低 54.7%,全身清除组子宫巨噬细胞占比较全身对照组下降了 29.0%。与全身清除组相比,宫腔单侧清除组和双侧清除组的清除效果更好,差异具有统计学意义( $P<0.05,P<0.05$ ),单侧清除组与双侧清除组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

本研究同时检测了各组大鼠卵巢组织巨噬细胞的数量,结果显示(图 3B、3D),与对照组相比,通



注:A:流式细胞计数检测子宫组织 CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>Mφ 相对计数;B:流式细胞计数检测卵巢组织 CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>Mφ 相对计数;C:各组大鼠子宫组织 CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>Mφ 计数的比较;D:各组大鼠卵巢组织 CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>Mφ 计数的比较。与对照组相比,\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;与全身清除组相比,# $P<0.05$ 。

**图 3** 大鼠子宫及卵巢组织 CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>巨噬细胞计数百分比( $n=8,\bar{x}\pm s$ )

Note. A, Counts of CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>Mφ in the uterus were measured by FACS. B, Counts of CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>Mφ in the ovary were measured by FACS. C, Comparison of CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>Mφ count in uterine tissue of rats. D, Comparison of CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>Mφ count in ovarian tissue of rats. Compared with the PL group, \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ . Compared with the Whole-body CL group, # $P<0.05$ .

**Figure 3** CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> macrophage count percentage in rats uterus and ovary

过宫腔及尾静脉注射 CL 后,卵巢中的巨噬细胞数量均有一定程度的减少,其中全身清除组卵巢组织中巨噬细胞数目减少的最为明显,占比下降 44.3%,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。单侧清除组和双侧清除组卵巢组织中巨噬细胞占比依次下降了 12%、15.8%,与对照组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ , $P>0.05$ )。其余各清除组间相比,差异均无统计学意义( $P>0.05$ , $P>0.05$ , $P>0.05$ )。

### 3 讨论

巨噬细胞是子宫内膜中主要的免疫细胞之一,在女性整个生殖周期发挥多种重要作用。他在子宫内膜内的位置、表型和数量也随月经周期的变化而变化<sup>[15]</sup>。生理状态下,巨噬细胞发挥吞噬作用,清除子宫内膜碎片,产生多种生长因子,促进子宫内膜组织的修复和再生。未怀孕时,巨噬细胞少量存在于子宫内膜中,受精后和怀孕期间内膜中巨噬细胞的数量增加,并大量存在于蜕膜组织中<sup>[16]</sup>。早期妊娠阶段,除了局部免疫功能外,巨噬细胞可以通过促进螺旋动脉重塑、调节滋养层植入和血管生成,影响胎盘发育<sup>[17-18]</sup>。此外,巨噬细胞在分娩前流入子宫肌层和蜕膜,并支持子宫收缩、胎儿排出、胎盘排出和子宫复旧<sup>[19-20]</sup>。然而,高水平活化的巨噬细胞通常会导致不良的妊娠结局,如流产、先兆子痫等<sup>[21-22]</sup>。相关临床研究也发现,宫腔粘连患者子宫内膜活检组织中,活化增多的 M1 型巨噬细胞通过产生促纤维化介质,促使子宫内膜基质细胞向肌成纤维细胞分化,导致子宫内膜间质被纤维组织取代<sup>[23]</sup>。鉴于巨噬细胞在子宫内膜中的重要作用,进一步明确其参与子宫内膜功能调控的作用机制,对探索内膜病变可能的治疗靶点至关重要。

有研究在小鼠结扎冠状动脉左前降支后注射白喉毒素消除巨噬细胞,建立巨噬细胞消除的心肌梗死模型,进而探究巨噬细胞在心梗过程中的作用<sup>[24]</sup>。但研究发现,心梗模型建立后,白喉毒素并不能显著清除巨噬细胞,在增加给药频率和浓度后,虽清除效果提高,但成活小鼠生存状态极差,无法用于后续实验。本研究中采用的氯膦酸二钠脂质体是将游离的氯膦酸二钠包裹进磷脂双分子层的水相中形成的氯膦酸盐脂质体,当 CL 进入体内后,特异性地被巨噬细胞吞噬,在巨噬细胞溶酶体磷脂酶的作用下,释放溶解在脂质体水相中的氯膦

酸二钠,并累积在细胞质内。当其达到一定浓度时可以诱导巨噬细胞凋亡,从而起到清除巨噬细胞的作用。该药物靶向巨噬细胞产生一定的清除作用,不会对动物个体造成任何毒副作用<sup>[8]</sup>。目前 CL 的注射途径多样,使用剂量不一,得到的清除效果有所差异。选择何种有效且简便的注射方式,在节省实验用药成本的同时,便于开展后续研究,是目前尚待解决的问题。本研究尝试用局部注射和全身注射两种给药途径清除子宫内膜巨噬细胞,采用组织形态学、免疫组化法和流式细胞术等实验技术,多角度比较二者的清除效果和差异,力求寻找一种更为有效的巨噬细胞清除方法。

在本研究中,为了更好地避免大鼠个体间差异及手术操作产生的实验误差,利用 SD 大鼠双角子宫这一特性,实验同时设立了宫腔单侧注射组,以另一侧子宫注射 PL 作为 CL 注射的自身对照。此外,考虑到尾静脉注射 CL 对全身其他脏器的影响,且卵巢和子宫同为生殖系统的脏器,故选择同时观察使用巨噬细胞清除剂后,卵巢组织中巨噬细胞是否发生变化。组织形态学结果显示,无论是局部宫腔注射还是全身静脉注射 CL,均对大鼠子宫和卵巢的形态、结构无影响,可进一步开展后续实验。

CD68 是一种在巨噬细胞中高表达的跨膜糖蛋白,他在巨噬细胞侵入和黏附捕获病原体、细胞垃圾等过程中发挥作用。此外,CD68 还参与巨噬细胞分化、调节细胞外基质降解、调节免疫反应等生物学过程<sup>[25]</sup>。为了观察使用巨噬细胞清除剂后,巨噬细胞在子宫和卵巢组织中的分布与变化,本研究采用免疫组化检测 CD68 蛋白在组织中的阳性表达。结果显示,巨噬细胞标志物 CD68 阳性表达主要分布在子宫内膜腺体周围及上皮组织中,少量分布在间质组织,而在卵巢中主要分布在基质及血管周围。局部和全身注射 CL 均能减少子宫中 CD68 蛋白的表达,此外,全身清除组卵巢中 CD68 的表达也有所下降。但宫腔注射 CL 对卵巢中的 CD68 蛋白表达无明显影响,这与宫腔局部注射的 CL 无法通过输卵管到达卵巢,继而不能有效作用于卵巢中的巨噬细胞有关。

为了更准确地表明组织中巨噬细胞的清除效率,本研究将各组大鼠子宫、卵巢组织分别制备为单细胞悬液后进行 CD68 和 CD45 双阳性染色,通过流式细胞仪计数组织中巨噬细胞的百分比。结果

显示单侧、双侧清除组子宫巨噬细胞百分比较单侧、双侧对照组依次下降了 49.6%、54.7%,全身清除组巨噬细胞较全身对照组巨噬细胞占比降低 29.0%。与全身清除组相比,宫腔直接注射 CL 的清除效果更好。虽然全身清除组通过尾静脉注射 CL 也能起到一定的子宫巨噬细胞清除作用,但同时该组卵巢组织中的巨噬细胞占比也下降了 44.3%。有研究尝试使用注射白喉毒素以敲除全身巨噬细胞,来研究巨噬细胞在妊娠早期的重要作用。结果发现卵巢巨噬细胞被敲除后,严重影响卵巢排卵功能并造成孕激素分泌的失调,在妊娠早期巨噬细胞耗竭还会导致胚胎着床停止<sup>[26]</sup>。本研究结果也表明,相对于全身清除而言,局部清除对大鼠卵巢组织中的巨噬细胞影响更小,也可排除由于卵巢原因导致的变量影响后续研究。

综上,本研究表明,将氯膦酸二钠脂质体局部作用于子宫,可有效减少子宫巨噬细胞的数量,并避免其对卵巢巨噬细胞的影响,不会进一步影响子宫正常的形态和功能。此外,局部注射相较于全身注射也可大大减少 CL 的用量,有效节约实验用药成本,是建立理想的子宫局部巨噬细胞清除模型的最佳方法。

参考文献:

[ 1 ] BROWN E, MARTÍNEZ-AGUILAR R, MAYBIN J A, et al. Endometrial macrophages in health and disease [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2022, 367: 183–208.

[ 2 ] CRITCHLEY H O D, MAYBIN J A, ARMSTRONG G M, et al. Physiology of the endometrium and regulation of menstruation [J]. *Physiol Rev*, 2020, 100(3): 1149–1179.

[ 3 ] 吴红宁, 林超龙, 黄承浩. 巨噬细胞极化中糖代谢重编程的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(9): 1650–1657.

WU H N, LIN C L, HUANG C H. Research progress of glucose metabolism reprogramming in macrophage polarization [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2023, 39(9): 1650–1657.

[ 4 ] HOGG C, PANIR K, DHAMI P, et al. Macrophages inhibit and enhance endometriosis depending on their origin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(6): e2013776118.

[ 5 ] 常品, 张胜辉, 陈童彤, 等. 经宫颈机械损伤联合脂多糖灌注法构建小鼠宫腔黏连模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(3): 400–407.

CHANG P, ZHANG S H, CHEN T T, et al. Establishment of a mouse intrauterine adhesion model by transcervical mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion [J]. *Acta Lab*

*Anim Sci Sin*, 2022, 30(3): 400–407.

[ 6 ] WANG L, LV Q, WU P, et al. RNA-seq and ATAC-seq analysis of CD163<sup>+</sup> macrophage-induced progestin-insensitive endometrial cancer cells [J]. *Cancer Med*, 2023, 12(5): 5964–5978.

[ 7 ] 马丽娜, 张多加, 吴效科. 子宫巨噬细胞在正常妊娠及病理性妊娠中的作用 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2023, 50(1): 65–69.

MA L N, ZHANG D J, WU X K. Mechanism of uterine macrophages in the normal pregnancy and pathological pregnancy [J]. *J Int Obstet Gynecol*, 2023, 50(1): 65–69.

[ 8 ] NGUYEN T, DU J, LI Y C. A protocol for macrophage depletion and reconstitution in a mouse model of sepsis [J]. *STAR Protoc*. 2021, 2(4): 101004.

[ 9 ] 王玉寒, 刘志婷, 徐紫洁, 等. 氯膦酸二钠脂质体不同给药剂量和方式对骨髓巨噬细胞清除效果的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(21): 41–48.

WANG Y H, LIU Z T, XU Z J, et al. Research of effect of different doses and modes of liposome administration on the clearance of bone marrow macrophages [J]. *China J Mod Med*, 2023, 33(21): 41–48.

[ 10 ] XIA L, ZHANG C, LV N, et al. AdMSC-derived exosomes alleviate acute lung injury via transferring mitochondrial component to improve homeostasis of alveolar macrophages [J]. *Theranostics*, 2022, 12(6): 2928–2947.

[ 11 ] 李爽, 刘金玉, 武晓玉, 等. 氯膦酸二钠脂质体清除肝内巨噬细胞对 CCl<sub>4</sub> 诱导的慢性肝损伤大鼠门脉高压的影响 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2020, 23(4): 484–487.

LI S, LIU J Y, WU X Y, et al. Depletion of intrahepatic macrophages by clodronate liposomes in rats with CCl<sub>4</sub>-induced chronic liver injury and portal hypertension [J]. *J Pract Hepatol*, 2020, 23(4): 484–487.

[ 12 ] WU L, KOHNO M, MURAKAMI J, et al. Defining and targeting tumor-associated macrophages in malignant mesothelioma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(9): e2210836120.

[ 13 ] 王京, 谢多, 刘勉, 等. 子宫内膜巨噬细胞通过调控血管内皮生长因子 A 的表达影响胚胎着床 [J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(7): 909–914.

WANG J, XIE D, LIU M, et al. Uterine macrophages affect embryo implantation via regulating vascular endothelial growth factor A in mice [J]. *J South Med Univ*, 2016, 36(7): 909–914.

[ 14 ] WU H, XU X, LI J, et al. TIM-4 blockade of KCs combined with exogenous TGF-β injection helps to reverse acute rejection and prolong the survival rate of mice receiving liver allografts [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1): 346–358.

[ 15 ] YANG F, ZHENG Q, JIN L. Dynamic function and composition changes of immune cells during normal and pathological pregnancy at the maternal-fetal interface [J]. *Front Immunol*,

2019, 10: 2317.

[16] LASH G E, PITMAN H, MORGAN H L, et al. Decidual macrophages: key regulators of vascular remodeling in human pregnancy [J]. J Leukoc Biol, 2016, 100(2): 315-325.

[17] PARASAR P, GURU N, NAYAK N R. Contribution of macrophages to fetomaternal immunological tolerance [J]. Hum Immunol, 2021, 82(5): 325-331.

[18] SUN F, WANG S, DU M. Functional regulation of decidual macrophages during pregnancy [J]. J Reprod Immunol, 2021, 143: 103264.

[19] GOMEZ-LOPEZ N, GARCIA-FLORES V, CHIN P Y, et al. Macrophages exert homeostatic actions in pregnancy to protect against preterm birth and fetal inflammatory injury [J]. JCI Insight, 2021, 6(19): e146089.

[20] JENA M K, NAYAK N, CHEN K, et al. Role of macrophages in pregnancy and related complications [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2019, 67(5): 295-309.

[21] 鲁小红. 黄芩苷调节 PI3K/AKT 通路对 LPS 诱导大鼠流产子宫巨噬细胞的影响 [J]. 东南大学学报(医学版), 2021, 40(5): 683-689.

LU X H. Effects of baicalin on uterine macrophages in LPS-induced abortion animal model by regulating PI3K/AKT pathway and its mechanism [J]. J Southeast Univ Med Sci Ed, 2021, 40(5): 683-689.

[22] 邓茜茜, 徐婷婷, 詹泳池, 等. 高迁移率族蛋白 1 在子痫前期母胎界面表达及其对巨噬细胞的作用 [J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2022, 18(1): 30-39.

DENG X X, XU T T, ZHAN Y C, et al. Expression of high mobility group box 1 at maternal-fetal interface and its effect on macrophages in preeclampsia [J]. Chin J Obstet Gynecol Pediatr Electron Ed, 2022, 18(1): 30-39.

[23] LIU D, WANG J, ZHAO G, et al. CSF1-associated decrease in endometrial macrophages may contribute to Asherman's syndrome [J]. Am J Reprod Immunol, 2020, 83(1): e13191.

[24] 向晨莹, 钟嘉俊, 郝琰琰, 等. 冠状动脉左前降支结扎对巨噬细胞消除模型构建的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(2): 141-150.

XIANG C Y, ZHONG J J, HAO Y Y, et al. Effect of ligation of left anterior descending coronary artery on establishment of macrophage elimination model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(2): 141-150.

[25] CHISTIakov D A, KILLINGSWORTH M C, MYASOEDOVA V A, et al. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker [J]. Lab Invest, 2017, 97(1): 4-13.

[26] CARE A S, DIENER K R, JASPER M J, et al. Macrophages regulate corpus luteum development during embryo implantation in mice [J]. J Clin Invest, 2013, 123(8): 3472-3487.

[收稿日期]2024-01-10