

两种浓度乙醇溶液灌注建立小鼠宫腔粘连模型的组织病理和分子病理表型比较

姜娟¹, 宋宁², 连文博¹, 邵丛丛¹, 顾文文¹, 石燕¹

(1. 国家卫生健康委生育调节药械重点实验室, 上海生殖健康药具工程技术研究中心, 上海市生物医药技术研究院, 上海 200237; 2. 杭州熠禾辉生科技有限公司, 杭州 311101)

[摘要] **目的** 采用两种浓度的乙醇溶液损伤构建宫腔粘连 (intrauterine adhesions, IUA) 小鼠模型, 通过表型比较优化更稳定的 IUA 造模方法。**方法** 将 20 只 8 周龄的雌性 C57BL/6N 小鼠随机分为 2 组, 即 95% 乙醇损伤组和 50% 乙醇损伤组。利用自身对照法, 向左侧子宫角灌注乙醇溶液制作 IUA 模型, 向右侧灌注生理盐水作为假手术。每组分别于造模后第 7 天和第 15 天各安乐术处死 5 只小鼠, 摘取子宫, 通过苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察子宫内膜病理变化, Masson 染色观察子宫内膜纤维化程度。利用实时荧光定量 PCR 检测子宫组织中纤维化标志物和促炎因子的表达情况。**结果** 造模后第 7 天, 与假手术侧相比, 小鼠损伤侧子宫明显失去弹性, 炎症浸润显著增强, 且纤维化程度显著增高 ($P<0.05$); 95% 乙醇损伤组小鼠的右侧子宫内膜厚度显著下降 ($P<0.05$), 而 50% 乙醇损伤组小鼠的右侧内膜厚度无明显改变 ($P>0.05$); 50% 乙醇损伤组的右侧子宫组织纤维化标志分子 IV 型胶原 $\alpha 1$ 链 (collagen type IV alpha 1 chain, Col4A1)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β), 以及促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的表达水平均显著升高 ($P<0.05$), 而 95% 乙醇损伤组的右侧子宫组织相同指标虽有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。造模后第 15 天, 与假手术侧相比, 两个乙醇损伤组的子宫组织病理学变化均不明显; 50% 乙醇损伤组子宫组织中 Col4A1、TGF- β 、TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平仍显著升高 ($P<0.05$), 而 95% 乙醇损伤组子宫组织仅 IL-1 β 显著升高 ($P<0.05$)。**结论** 向子宫角灌注 95% 乙醇溶液制作 IUA 小鼠模型的子宫组织病理学改变比 50% 乙醇损伤组明显, 适合进行组织病理学研究。但灌注 50% 乙醇溶液后小鼠子宫组织中纤维化标志物和促炎因子表达水平升高较 95% 乙醇损伤组更明显, 提示 50% 乙醇溶液构建的 IUA 小鼠模型更适合分子病理学研究。

[关键词] 宫腔粘连; 小鼠模型; 炎症因子; 纤维化; 乙醇

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)04-0393-10



Comparison of Histopathological and Molecular Pathological Phenotypes in Mouse Models of Intrauterine Adhesions Induced by Two Concentrations of Ethanol Perfusion

JIANG Juan¹, SONG Ning², LIAN Wenbo¹, SHAO Congcong¹, GU Wenwen¹, SHI Yan¹

(1. NHC Key Lab of Reproduction Regulation, Shanghai Engineering Research Center of Reproductive Health Drug and Devices, Shanghai Institute for Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Shanghai 200237, China; 2. Bright Prosperity Institute, Hangzhou 311101, China)

Correspondence to: SHI Yan (ORCID:0000-0003-3721-6174), E-mail: shiyan1981@126.com

[ABSTRACT] **Objective** To construct intrauterine adhesion (IUA) mouse models induced by two different concentrations of ethanol injury, compare the phenotypes, and optimize a more stable IUA modeling method. **Methods** Twenty 8-week-old female C57BL/6N mice were randomly divided into two groups: the 95% ethanol injury group and the 50% ethanol injury group. Using a self-control method, the left uterine

[基金项目] 上海市生物医药技术研究院青年科技创新项目“糖酵解代谢重编程对子宫内膜基质细胞命运的调控机制研究”(Q2024-04)

[第一作者] 姜娟(1989—),女,本科,实验师,从事生殖药理毒理学研究。E-mail:jiangjuan06@126.com

[通信作者] 石燕(1981—),女,硕士,高级实验师,从事女性生殖健康研究。E-mail:shiyan1981@126.com。ORCID: 0000-0003-3721-6174

horn was infused with ethanol to establish the IUA model, while the right uterine horn was infused with saline as the sham operation. Five mice from each group were euthanized on day 7 and 15 after modeling, and uterine tissues were collected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the endometrial pathology, and Masson staining was used to assess the degree of endometrial fibrosis. Quantitative real-time PCR was employed to detect the expression levels of fibrosis markers and pro-inflammatory factors in the uterine tissues. **Results** Compared to the sham operation, these two ethanol injury led to a significant reduction in elasticity of the uterus, an increase in inflammatory infiltration, and a marked increase in the degree of fibrosis on day 7 after modeling ($P<0.05$). The 95% ethanol injury group showed a significant decrease in endometrial thickness ($P<0.05$), whereas no significant change was observed in the 50% ethanol injury group when compared to the sham operation ($P>0.05$). The expression levels of fibrotic marker molecules collagen type IV alpha 1 chain (Col4A1), α -smooth muscle actin (α -SMA), transforming growth factor- β (TGF- β), and pro-inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were significantly elevated in the 50% ethanol injury group when compared to the sham operation ($P<0.05$), although there was an increasing trend of the same markers in the 95% ethanol injury group, the differences were not statistically significant ($P>0.05$). On day 15 after modeling, the histopathological changes in both ethanol injury groups were not significant when compared to the sham operation, the expression levels of Col4A1, TGF- β , TNF- α and IL-1 β remained significantly higher in the 50% ethanol injury group ($P<0.05$), while only IL-1 β was significantly elevated in the 95% ethanol injury group ($P<0.05$). **Conclusion** Uterine infusion with 95% ethanol results in more marked histopathological changes in the IUA mouse model compared to the 50% ethanol injury group. The 95% ethanol injury model is suitable for histopathological studies. However, the 50% ethanol injury group shows higher expression levels of fibrosis markers and pro-inflammatory factors compared to the 95% ethanol injury group, suggesting that the 50% ethanol injury model is more suitable for molecular pathological study.

[Key words] Intrauterine adhesions; Mouse model; Inflammatory factors; Fibrosis; Ethanol

子宫是孕育胎儿的重要器官，子宫内膜组织稳态的维持是女性生殖健康最重要的保障之一。宫腔粘连 (intrauterine adhesions, IUA) 又称 Asherman 综合征，主要指由宫腔操作 (尤其妊娠期)、子宫缺血性改变、感染等因素引起子宫内膜基底层受损，继发肌壁粘连，最终导致宫颈管、宫腔部分或全部闭锁。IUA 的组织病理学变化表现为子宫内膜纤维化、子宫内膜变薄或缺失、腺体萎缩、血管间质组织缺乏、微环境缺氧等^[1-2]，这些组织学改变往往造成子宫内膜功能障碍，出现月经紊乱、流产、胎盘植入等问题，是导致子宫性不孕的重要原因^[3-5]。目前，除避免宫腔操作和感染外，尚无有效方法预防 IUA，且现有临床治疗手段非常有限，主要通过宫腔镜经宫颈切除粘连组织 (transcervical resection of adhesion, TCRA)，术后结合物理屏障和药物辅助治疗，其复发率高达 40.0%~62.5%，患者预后不理想^[6-7]。因此，深入研究 IUA 的病理机制并开发新的治疗手段对提升临床疗效和改善患者预后至关重要。

建立合适、稳定且符合临床病理特征的动物模型，

不仅可以为深入研究 IUA 的发病机制提供重要工具，还可以促进临床治疗方案的开发。目前用于 IUA 研究的实验动物主要包括大鼠、小鼠和家兔，其中大鼠和小鼠因来源明确，遗传背景简单，具有较短的动情周期和相对稳定的激素水平，并且成本低廉，是应用最为广泛的动物模型。IUA 诱导方法主要包括机械损伤法、化学损伤法、热损伤法，以及机械损伤感染结合法^[8-9]，这些建模方式各有优劣，尚无合适的评价标准。化学损伤法中的乙醇溶液诱导已广泛用于 IUA 相关研究^[10-12]，但使用的乙醇浓度、作用时间及取材观察时间存在差异，例如 95% 乙醇溶液作用 10 s~1 min，或 50% 乙醇溶液作用 5 min，术后观察 7~15 d^[13-15]。因没有统一的建模方法及检测指标，不利于不同治疗效果之间的比较和筛选。

本研究采用化学损伤法，通过向小鼠子宫角分别灌注两种浓度的乙醇溶液，并优化取材观察的时间点，然后对子宫组织病理学进行检查，检测子宫炎症因子表达情况，为研究人员更合理地选择 IUA 病理模型提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

取8周龄SPF级雌性C57BL/6N小鼠20只,体重为20~22 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2024-0001],质量合格证编号为20240827Abzz0619000336。实验小鼠饲养于上海市生物医药技术研究院[SYXK(沪)2024-0017]的屏障设施内,环境温度22~26℃,相对湿度40%~70%,12 h光照明暗循环,可自由饮水、摄食。动物实验方案通过上海市生物医药技术研究院实验动物伦理委员会审查批准(伦理批件号为2024-44),严格遵守伦理标准进行操作。

1.2 主要试剂和仪器

生理盐水(批号L24091224)购自四川科伦药业股份有限公司。异氟烷(批号2023090501)购自山东安特牧业科技有限公司。阿佛丁(批号2125A)购自南京爱贝生物科技有限公司。无水乙醇(批号J2020053)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。二甲苯、正丁醇、中性树胶均购自国药集团化学试剂有限公司。环保型脱蜡液(批号CR2203105)、通用型组织固定液(批号GP24113021636)、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)高清恒染试剂盒(批号CR2211064)、混合Masson染液套装(批号CR2400069)均购自武汉塞维尔生物科技有限公司。TRIzol RNA提取试剂(批号343911)购自美国赛默飞世尔科技公司。Premix型反转录试剂盒(批号AO20421A)及定量PCR试剂盒(批号AO41901A)均购自日本TaKaRa有限公司。实时荧光定量PCR引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成。LightCycler® 480 II 荧光定量PCR仪购自罗氏诊断产品(上海)有限公司。组织切片机(Leica RM2126)购自徕卡生物系统公司。光学显微镜(Nikon eclipse 50i)购自尼康精机有限公司。数字扫描系统(版本号为C.V.2.4)购自匈牙利3DHISTECH有限公司。电动组织研磨器(TGrinder H24)购自天根生化科技有限公司。多功能酶标仪(Tecan Infinite 200 PRO)购自瑞士帝肯公司。

1.3 IUA模型构建

为避免性激素周期对实验结果的影响,采用小鼠自身左右侧子宫对照的方法。根据文献报道的模型建立方法^[14-15]加以改进。95%乙醇损伤组和50%乙醇损伤组各10只小鼠。小鼠使用1%~2%异氟烷吸入麻

醉后,用碘伏棉球消毒背部皮肤,经背侧中线两端分别切口(约1 cm),暴露出双侧子宫角。左侧子宫角灌注0.25 mL 95%乙醇作用1 min或50%乙醇作用5 min后,将乙醇吸出,并用0.5 mL生理盐水清洗,作为IUA模型;同侧右侧子宫角只灌注0.5 mL生理盐水,作为假手术。造模结束后,用干棉球清理,并逐层缝合背部伤口(图1A)。手术后,将小鼠放回饲养室,密切观察小鼠状态,直至能恢复活动。

1.4 子宫组织取材

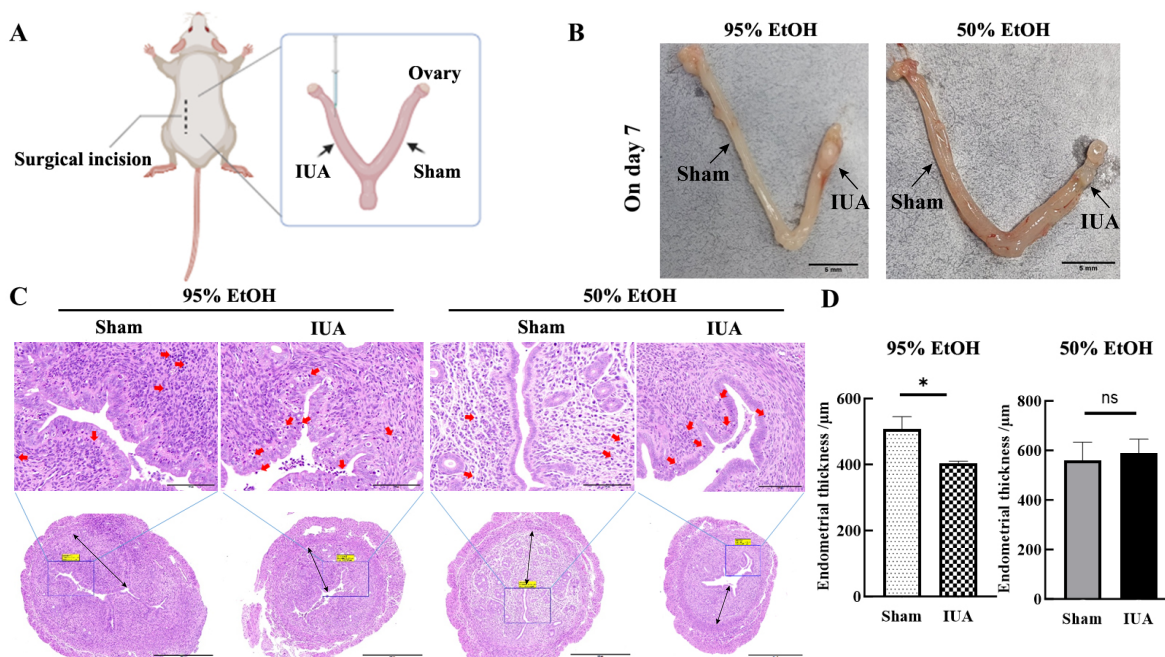
分别于乙醇诱导造模后第7天和第15天,对每组5只小鼠进行子宫组织取材。小鼠经腹腔注射1.25%阿佛丁(20 μ L/g)麻醉后,腹部切口,腹主动脉放血处死,迅速摘取右侧损伤子宫组织和左侧假手术对照子宫组织。子宫部分组织经4%多聚甲醛溶液固定后,用于石蜡切片,进行HE染色和Masson染色检测,观察组织病理学形态。部分子宫组织剪碎后立即放入含有TRIzol的离心管中,并保存于-80℃,用于实时荧光定量PCR检测。剩余子宫组织于-80℃冷冻保存备用。

1.5 子宫组织的HE染色

每组5只小鼠子宫的对照侧和损伤侧组织经4%多聚甲醛溶液固定,经常规石蜡包埋后横向连续切片,厚度约3 μ m。切片脱蜡后放入高清恒染预处理液中处理1 min,苏木精染液染色3~5 min,用自来水清洗并用分化液进行分化,经自来水清洗后置入返蓝液中进行返蓝,最后用流水冲洗。切片放入95%乙醇溶液脱水1 min,放入伊红染液中染色15 s。最后将切片进行脱水和透明,并用中性树胶封片。将制备好的HE染色切片置于光学显微镜下观察,用数字扫描系统进行切片扫描和病理分析。通过扫描系统软件测量子宫内膜厚度(内膜功能层的最长宽度),每只小鼠1张切片,并统计各组内膜厚度平均值。

1.6 子宫组织的Masson染色

依次将制备好的切片放入环保型脱蜡液中进行脱蜡。后将切片浸入Masson A液中浸泡过夜,并用流水冲洗。将切片浸入由Masson B液和Masson C液等比混合的染液中浸染1 min,自来水冲洗后用分化液分化数秒,后用自来水清洗。将切片放入Masson D液中浸染6 min,自来水漂洗。将切片置于Masson E液中浸染1 min。不水洗,稍沥干直接放入Masson F液中染色20~30 s。切片用1%醋酸漂洗分化,随后放入无水乙醇中浸泡5 min,二甲苯浸泡5 min透明,最后用中性树胶封片。将制备好的Masson染色切片置于光学显微镜下观察,



注：A，乙醇灌注模型建立手术过程示意图，Sham为假手术侧，IUA为宫腔粘连模型组（乙醇灌注损伤侧）；B，造模后第7天，取材当天两种损伤方式小鼠子宫组织图片，每一张图中子宫组织左侧为假手术侧，右侧为损伤侧，标尺为5 mm；C，造模后第7天，子宫组织切片HE染色结果，其中上排图片中，标尺为100 μm ($\times 400$)；下排图片中，标尺为500 μm ($\times 100$)；红色箭头所示为炎性细胞浸润；黑线所示为子宫内膜厚度测量的方位；D，假手术侧和IUA模型侧子宫内膜厚度的统计结果， $*P < 0.05$ ， $^{ns}P > 0.05$ 。

Note: A, Schematic diagram of the surgical process for establishing the ethanol perfusion model, Sham represents the sham operation group, and IUA represents intrauterine adhesions (IUA) model group (the ethanol injury group). B, On day 7 after modeling, images of uterine tissues of mice with two types of ethanol injury. In each image, the left side of the uterine tissue is the sham operation group, and the right side of uterine tissue is the injury group. The scale bar indicates 5 mm. C, HE staining results of uterine tissues on day 7 after modeling. In the upper images, the scale bar indicates 100 μm ($\times 400$); in the lower images, the scale bar indicates 500 μm ($\times 100$); the red arrow indicates inflammatory cell infiltration; the black line indicates the direction for measuring the thickness of endometrium. D, Statistical results of endometrial thickness in sham operation group and IUA model group, $*P < 0.05$, $^{ns}P > 0.05$.

图1 两种浓度乙醇损伤小鼠宫腔粘连模型的构建及损伤后第7天子宫组织HE染色结果

Figure 1 Construction of mouse intrauterine adhesion models induced by two concentrations of ethanol injury and HE staining results of uterine tissues collected one day 7 after injury

利用C.V.2.4软件扫描组织病理照片，并用Image J软件Masson Trichrome方法分别测量胶原染色区域面积以及组织染色总面积，计算两者比例作为胶原纤维面积百分比。

1.7 子宫组织总RNA提取与荧光定量PCR检测

取50 mg冻存的子宫组织，剪碎后加入0.5 mL TRIzol，用电动组织研磨器充分碾碎组织块后，每管样品用TRIzol补足至1 mL，按照TRIzol说明书中的方法提取组织总RNA，用多功能酶标仪测定RNA浓度并调整RNA浓度至300~1 000 ng/ μL 。按照试剂盒说明书进行逆转录反应液配制，反应体系：5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix 4 μL ，总RNA 1 μg ，无酶水补充至20 μL 。混匀并离心后，进行逆转录反应，反应条件：37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min，85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。逆转录完成后将产物稀释3~4倍，按照说明书配制荧光定量PCR反应液，反应体系：TB Green Premix 5 μL ，引物F 0.4 μL ，引

物R 0.4 μL ，cDNA模板2 μL ，无酶水2.2 μL 。上机检测反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，40个循环。熔解曲线程序：95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，2.2 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 升温至95 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR引物序列（5'→3'）如下：甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）-F为ACCCAGAAGACTGTG GATGG，GAPDH-R为TTCAGCTCAGGGATGACCTT； α -平滑肌肌动蛋白（ α -smooth muscle actin, α -SMA）-F为GTCCCAGACATCAGGGAGTAA， α -SMA-R为TC GGATACTTCAGCGTCAGGA；转化生长因子- β （transforming growth factor- β , TGF- β ）-F为CTCCCG TGGCTTCTAGTGC，TGF- β -R为GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG；IV型胶原 $\alpha 1$ 链（collagen type IV alpha 1 chain, Col4A1）-F为CTGGCACAAAAGGGACGAG，Col4A1-R为ACGTGGCCGAGAATTTACAC；白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）-F为GCAACTGTTC

CTGAAGTCAACT, IL-1 β -R 为 ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)-F 为 TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC, TNF- α -R 为 TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC。反应结束后导出 C_t 值, 以 $GAPDH$ 为内参, 先计算 $\Delta C_t = C_{t_{\text{目标基因}}} - C_{t_{GAPDH}}$, 再计算相对表达量 $2^{-\Delta C_t}$, 展示目标基因相对于内参基因的比值。

1.8 统计学分析

采用 Graphpad Prism 10.0 软件进行统计分析。实验数据以平均数 $\pm$ 标准误表示, 两组差异比较采用配对 t 检验的方法, $P < 0.05$ 时判定差异有统计学意义。

2 结果

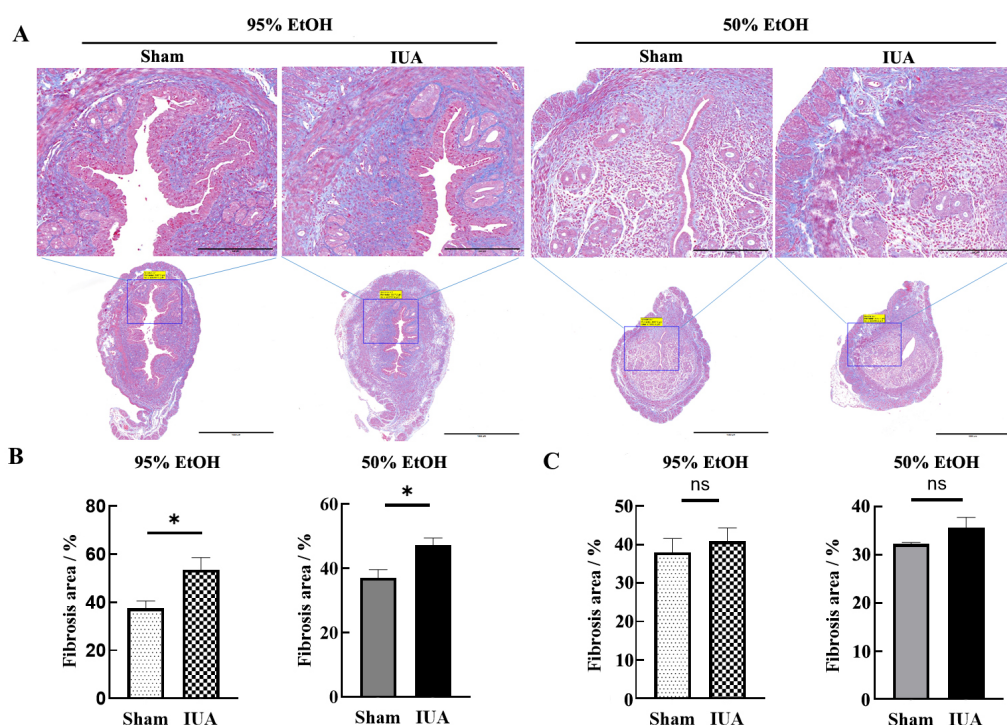
2.1 95%和50%乙醇溶液诱导造模后第7天子宫形态与内膜病理学表型比较

所有模型小鼠经手术后状态均较好, 伤口在术后 3~5 d 基本恢复。子宫组织形态结果显示, 造模后第

7天, 小鼠假手术侧子宫壁光滑富有弹性, 95%乙醇和50%乙醇损伤小鼠子宫与假手术侧子宫比, 组织脱水失去弹性(表现为左右侧子宫自然拉伸长度不同), 其中50%乙醇损伤组的弹性稍强(图1B)。HE染色结果显示, 假手术侧的柱状子宫组织上皮细胞排列紧密, 造模侧的上皮细胞和基质细胞内炎性细胞浸润显著增加, 上皮细胞出现不同程度的缺失, 排列稀疏(图1C)。95%乙醇损伤组子宫内膜($403.67 \pm 11.50 \mu\text{m}$)较假手术侧($508.33 \pm 62.90 \mu\text{m}$)明显变薄($P < 0.05$), 而50%乙醇损伤组($588.40 \pm 99.20 \mu\text{m}$)与假手术侧($558.90 \pm 129.60 \mu\text{m}$)相比没有明显差异($P > 0.05$, 图1D)。

2.2 两种浓度乙醇诱导造模后第7天小鼠子宫内 膜纤维化程度增加

损伤后第7天, Masson 染色结果显示, 95%乙醇损伤组(53.58 ± 4.98)%和50%乙醇损伤组(47.26 ± 2.23)%的子宫组织胶原纤维染色比例较各自假手术



注: A, 造模后第7天, Masson 染色评估胶原纤维含量, 其中上排图片中, 标尺为 $250 \mu\text{m}$ ($\times 400$); 下排图片中, 标尺为 $1000 \mu\text{m}$ ($\times 100$); B, 造模后第7天, 小鼠两侧子宫组织纤维化面积百分比统计结果, $*P < 0.05$; C, 造模后第15天, 小鼠两侧子宫组织纤维化面积百分比统计结果, $^{ns}P > 0.05$ 。

Note: A, On day 7 after modeling, Masson staining was used to assess the content of collagen fibers. In the upper images, the scale bar indicates $250 \mu\text{m}$ ($\times 400$); in the lower images, the scale bar indicates $1000 \mu\text{m}$ ($\times 100$). B, On day 7 after modeling, statistical results of the percentage of fibrotic area in the bilateral uterine tissues of mice, $*P < 0.05$. C, On day 15 after modeling, statistical results of the percentage of fibrotic area in the bilateral uterine tissues of mice, $^{ns}P > 0.05$.

图2 两种浓度乙醇损伤小鼠宫腔粘连模型的构建及损伤后第7天子宫组织 Masson 染色结果

Figure 2 Construction of mouse intrauterine adhesion models induced by two concentrations of ethanol injury and Masson staining results of uterine tissues collected one day 7 after injury

侧 $[(37.50 \pm 3.08) \%、(37.08 \pm 2.57) \%]$ 均明显增加 ($P < 0.05$, 图 2A~B), 提示乙醇诱导后小鼠子宫组织纤维化程度显著提高。损伤后 15 d 的子宫组织, 与假手术侧比, 95% 乙醇损伤组和 50% 乙醇损伤组胶原染色比例均未见明显变化 (图 2C)。

2.3 50% 乙醇诱导造模后第 7 天引起小鼠子宫内膜纤维化和炎症指标表达升高

IUA 模型建立后第 7 天, 与假手术侧比, 95% 乙醇损伤侧子宫组织内纤维化标志分子 Col4A1、 α -SMA、TGF- β , 以及促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平均有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 3A); 50% 乙醇损伤侧子宫组织纤维化标志分子 Col4A1、 α -SMA、TGF- β , 以及促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$, 图 3B)。

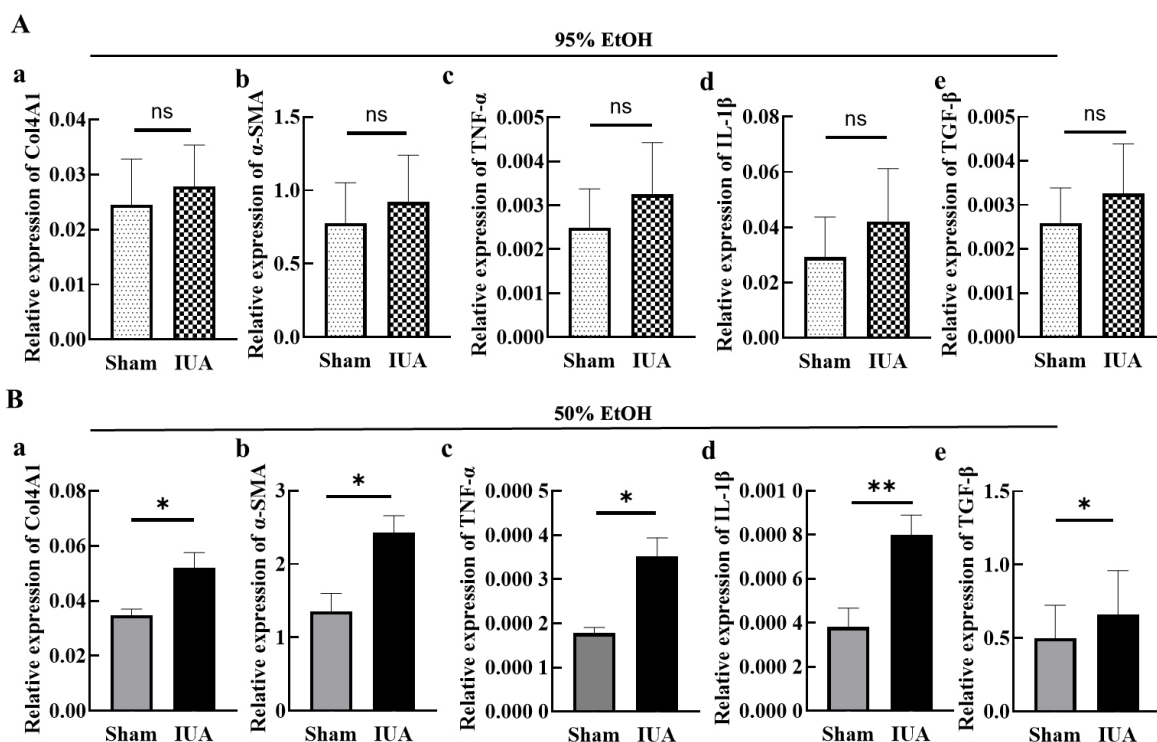
2.4 两种浓度乙醇诱导造模后第 15 天小鼠子宫内膜纤维化及炎症反应变化

造模后第 15 天, 95% 乙醇损伤侧子宫组织中促炎

因子 IL-1 β 的表达水平显著升高 ($P < 0.05$, 图 4A); 50% 乙醇损伤侧子宫组织中纤维化标志分子 Col4A1、TGF- β , 以及促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平均显著提高 ($P < 0.05$, 图 4B)。此外, 与假手术侧相比, 95% 乙醇损伤组和 50% 乙醇损伤组的炎性细胞浸润和子宫内膜厚度未见明显变化 (图 4C~D), 推测组织发生了部分修复。

3 讨论

机械损伤、化学损伤、热损伤、感染损伤和双重损伤 (机械损伤结合感染损伤) 是目前宫腔粘连动物模型常采用的建模方法^[15]。然而, 现有的任何一种动物模型都不能完全模拟 IUA 的临床特征, 每种动物模型都有其优缺点。机械损伤是最接近临床损伤机制的造模方法, 用不同尺寸类型的针头或自制刮宫器械损伤动物子宫是目前应用较为广泛的 IUA 造模方法之一^[16-17]。陈醒等^[18]的研究发现, 仅刮除子宫内膜层

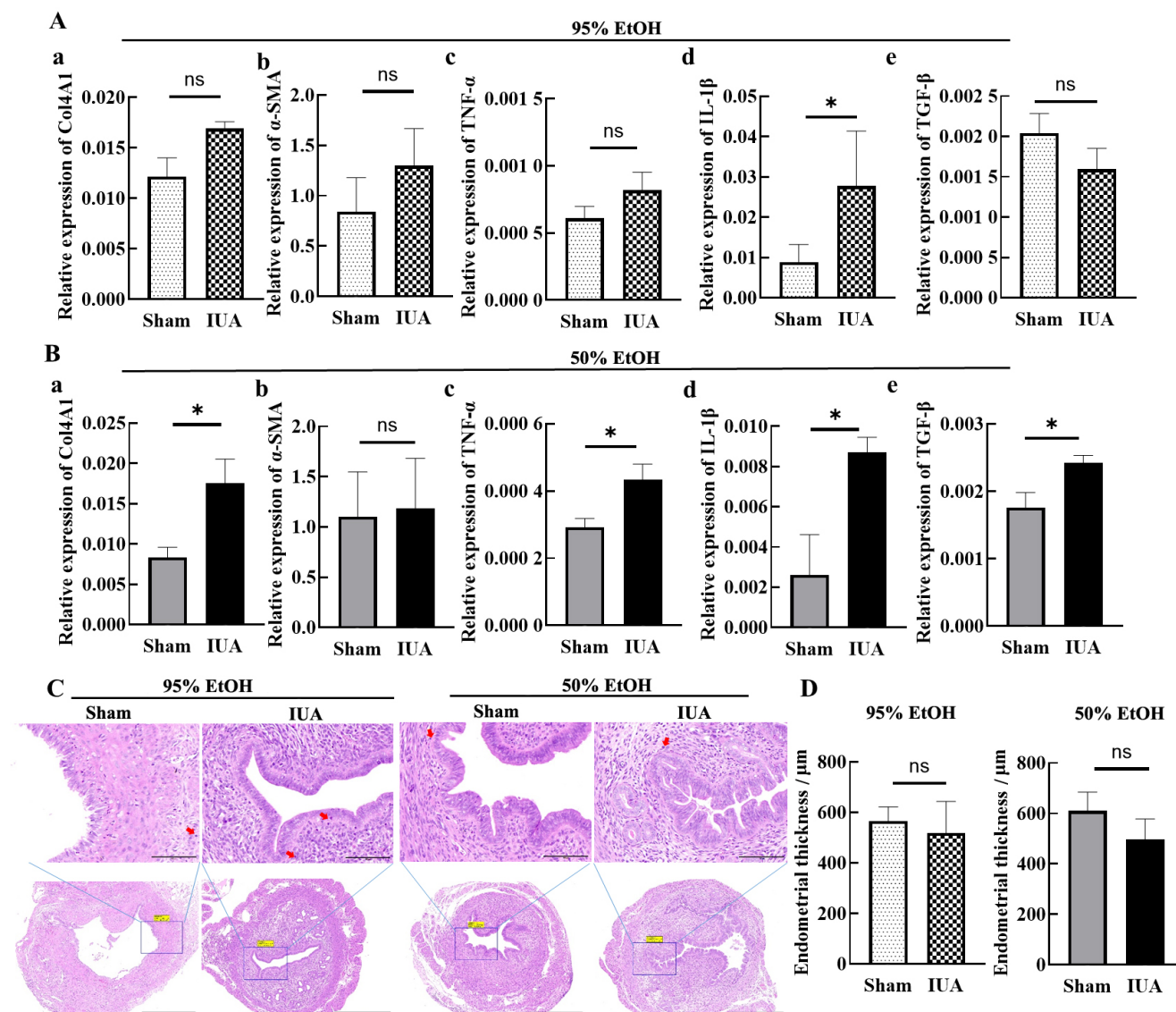


注: A, 95% 乙醇灌注损伤造模后第 7 天子宫组织中 Col4A1、 α -SMA、TNF- α 、IL-1 β 和 TGF- β mRNA 表达水平; B, 50% 乙醇灌注损伤造模后第 7 天子宫组织中 Col4A1、 α -SMA、TNF- α 、IL-1 β 和 TGF- β mRNA 表达水平。ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: A, The mRNA expression levels of Col4A1, α -SMA, TNF- α , IL-1 β and TGF- β in uterine tissues one day 7 after modeling with 95% ethanol injury. B, The mRNA expression levels of Col4A1, α -SMA, TNF- α , IL-1 β and TGF- β in uterine tissues one day 7 after modeling with 50% ethanol injury. ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图 3 宫腔粘连模型小鼠造模后第 7 天子宫组织中纤维化和炎症标志分子表达水平的实时荧光定量 PCR 检测结果

Figure 3 qPCR results of expression levels of fibrosis and inflammation markers in uterine tissues of IUA model mice on day 7 after modeling



注：A，95%乙醇灌注损伤造模后第15天子宫组织中Col4A1、α-SMA、TNF-α、IL-1β、TGF-β mRNA表达水平；B，50%乙醇灌注损伤造模后第15天子宫组织中Col4A1、α-SMA、TNF-α、L-1β、TGF-β mRNA表达水平；C，造模后第15天，子宫组织切片HE染色结果，其中上排图片中，标尺为100 μm (×400)；下排图片中，标尺为500 μm (×100)；红色箭头所示为炎性细胞浸润；D，造模后第15天，假手术侧和IUA模型损伤侧子宫内膜厚度的统计结果。^{ns}*P*>0.05，**P*<0.05。

Note: A, The mRNA expression levels of Col4A1, α-SMA, TNF-α, IL-1β and TGF-β in uterine tissues one day 15 after modeling with 95% ethanol injury. B, The mRNA expression levels of Col4A1, α-SMA, TNF-α, IL-1β and TGF-β in uterine tissues one day 15 after modeling with 50% ethanol injury. C, On day 15 after modeling, HE staining results of uterine tissues. In the upper images, the scale bar indicates 100 μm (×400); in the lower images, the scale bar indicates 500 μm (×100). The red arrow indicates inflammatory cell infiltration. D, On day 15 after modeling, statistical results of endometrial thickness in sham operation group and IUA model group. ^{ns}*P*>0.05, **P*<0.05.

图4 宫腔粘连模型诱导第15天小鼠子宫组织中纤维化和炎症反应的检测结果

Figure 4 Detection results of fibrosis and inflammatory response in mouse uterine tissues on day 15 after IUA modeling

或少量子宫内膜间质，大鼠子宫内膜上皮会在1周内长出；至少将50%子宫内膜间质刮除，才能构建出宫腔粘连大鼠模型。机械损伤模型的成功率常受手术操作者经验、手术器械和实验条件的限制，一致性和可重复性较差。

子宫内膜纤维化是IUA形成和发展的重要特

征^[19]。免疫细胞激活、持续性炎症反应是引起局部组织纤维化和功能丧失的重要诱因^[20-21]。研究者们通过机械损伤联合脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导动物发生IUA类似的病理特征以建立相关动物模型。如有研究者用刮勺损伤家兔子宫内后，放置LPS浸泡的手术缝合线在宫腔中48 h后取出，造成子宫内膜

上皮细胞脱落、间质出血水肿、中性粒细胞浸润、纤维化等病理表现,成功建立IUA模型^[22]。为降低研究成本,后续也有研究人员利用大鼠建立相关的模型并进行了改进^[23-24]。然而,这类建模方法依赖于机械损伤,操作复杂,重复性差,较适合大型动物。

小鼠作为目前使用最为广泛的实验动物,具有成本低、激素周期短、更适合进行基因编辑操作等优势。乙醇损伤法是目前小鼠建立IUA模型的常用方法,目前研究主要选取50%和95%浓度的乙醇,作用时间从10 s到5 min不等,术后观察时间为7~15 d。考虑到实际手术操作的时间和稳定性,且本研究更加关注子宫组织纤维化损伤和炎症相关指标,希望观察到组织自我修复情况,因而比较了两种乙醇浓度刺激方式(95%, 1 min和50%, 5 min)构建小鼠宫腔粘连模型的表型差异。实验结果表明,两种浓度的乙醇损伤7天后均能有效诱导子宫组织的结构改变和内膜病理性损伤,与现有研究报道中观察到的现象基本一致,然而损伤后第15天未见明显的病理学改变,推测是小鼠子宫内膜组织经历了自我更新和修复。

从子宫形态结果看,无论是用95%还是50%的乙醇溶液处理,都会导致子宫组织明显失去弹性,这可能是乙醇直接破坏了子宫壁的细胞结构及其间质成分所致。值得注意的是,50%乙醇损伤组相对于95%乙醇损伤组显示出相对较好的组织弹性恢复能力,提示低浓度的乙醇可能对子宫组织造成的即时损害较小。组织学检测结果显示,两种乙醇处理方式均导致明显的炎性细胞浸润,并且观察到不同程度的上皮细胞缺失,特别是95%乙醇处理后,子宫内膜显著变薄,而50%乙醇处理则未见明显变化,提示高浓度乙醇的脱水效应对子宫内膜的损伤更严重。

从子宫内膜纤维化程度来看,Masson染色显示在损伤第7天,两种乙醇处理组的小鼠子宫组织中胶原纤维含量显著增加,说明短期内高浓度乙醇暴露快速引发子宫组织纤维化,但在第15天时并未持续加剧,表明可能存在一定的自我修复机制或适应过程。与此相符合的是,50%乙醇损伤组表现出更为显著的纤维化标志物上调,如Col4A1, α -SMA, TGF- β 1, 这些分子参与了胞外基质重构过程,是评估纤维化进展的重要指标^[10]。目前仅见一篇研究报道显示95%乙醇诱导SD大鼠IUA模型第15天内膜组织中促炎因子IL-1 β 和抑炎因子IL-10的表达均升高^[25]。本研究的实时荧光定量PCR分析显示,虽然两种乙醇处理都能诱导促

炎因子TNF- α 和IL-1 β 水平上升,但在第7天时仅50%乙醇损伤组达到了统计学意义上的增长,而95%乙醇损伤组检测数据离散度明显较高,可能是因为过高的乙醇浓度和过短的作用时间给操作者带来了模型制作方面的难度,使模型的均一性和稳定性受到影响。到了术后第15天,尽管总体纤维化情况没有显著变化,但50%乙醇损伤组促炎因子TNF- α 和IL-1 β 表达仍显著升高,而95%乙醇损伤组仅IL-1 β 显著升高。以上结果为该类模型的使用及治疗方式和时机的选择提供了参考。

综上所述,本研究表明,不同浓度乙醇溶液可通过诱导局部炎症反应,进而促进子宫组织纤维化,95%乙醇能够引起更加严重的炎症浸润和胶原纤维沉积的病理表现,但是纤维化和炎症相关因子的表达水平升高趋势却不如50%乙醇损伤组明显,推测可能是因为过高的乙醇浓度作用导致内膜变性、细胞死亡和缺失更严重,而50%乙醇的刺激相对较为缓和,引起细胞广泛的炎症反应和基因表达水平的改变,进而导致组织损伤表现。建议研究者根据研究目的选取两种模型,如需利用乙醇损伤法建立薄型子宫模型,或需重度IUA模型,则可选取95%浓度1 min建模法,如研究中更多关注组织纤维化和炎症指标,则可选取50%浓度5 min建模法。

接下来的实验设计中可考虑更多影响因素,如遗传背景、激素变化等,利用免疫荧光和免疫印迹等技术评估造模后子宫内膜血管形成和增殖情况,进一步明确相关机制和贴近临床的多样性,并通过交配实验来观察比较两侧子宫中的着床胚胎数和胎盘发育情况,提高乙醇损伤法在IUA导致子宫性不孕相关研究中的参考价值,为研究宫腔粘连病理机制、评价不同治疗手段的有效性提供更为精准的研究模型。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海市生物医药技术研究院实验动物伦理委员会审批(动物伦理批件号为2024-44)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Shanghai Institute of Biomedical Technology (the approval number for animal ethics is 2024-44). All experimental processes were carried out in accordance with the relevant laws, regulations and rules concerning laboratory animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

姜娟负责动物模型建立和论文撰写;
宋宁负责实验设计和论文修改;
连文博、邵丛丛负责实验动物取材和样本制备;
顾文文负责定量 PCR 检测并参与论文修改;
石燕负责病理染色和研究指导工作。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 帕提曼·米吉提, 范余娟. 宫腔粘连的病因学研究及预防措施探讨[J]. 中国计划生育和妇产科, 2024, 16(7):32-35. DOI:10.3969/j.issn.1674-4020.2024.07.08.
PATIMAN M J T, FAN Y J. Etiological research and preventive measures of intrauterine adhesions[J]. Chin J Fam Plan Gynecotokology, 2024, 16(7): 32-35. DOI: 10.3969/j.issn. 1674-4020.2024.07.08.
- [2] HAN Q X, DU Y Z. Advances in the application of biomimetic endometrium interfaces for uterine bioengineering in female infertility[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 153. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00153.
- [3] SANTAMARIA X, ISAACSON K, SIMÓN C. Asherman's syndrome: it may not be all our fault[J]. Hum Reprod, 2018, 33(8):1374-1380. DOI:10.1093/humrep/dey232.
- [4] ERSOY G S, ZOLBIN M M, COSAR E, et al. CXCL12 promotes stem cell recruitment and uterine repair after injury in Asherman's syndrome[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2017, 4: 169-177. DOI:10.1016/j.omtm.2017.01.001.
- [5] REIN D T, SCHMIDT T, HESS A P, et al. Hysteroscopic management of residual trophoblastic tissue is superior to ultrasound-guided curettage[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2011, 18(6):774-778. DOI:10.1016/j.jmig.2011.08.003.
- [6] CAI Y L, WU F Y, YU Y R, et al. Porous scaffolds from droplet microfluidics for prevention of intrauterine adhesion[J]. Acta Biomater, 2019, 84:222-230. DOI:10.1016/j.actbio.2018.11.016.
- [7] KOU L F, JIANG X, XIAO S Y, et al. Therapeutic options and drug delivery strategies for the prevention of intrauterine adhesions[J]. J Control Release, 2020, 318:25-37. DOI:10.1016/j.jconrel.2019.12.007.
- [8] 黄少凤, 林忠, 朱雪红, 等. 宫腔粘连大鼠模型研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(6):560-565. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.025.
HUANG S F, LIN Z, ZHU X H, et al. Research progress in rat models of intrauterine adhesion[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(6):560-565. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.025.
- [9] 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(8):874-877. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210320-00137.
LIANG S S, ZHI Z F, HUANG Y L. Research progress on the establishment of animal model of intrauterine adhesion[J]. Chin J Reprod Contracept, 2022(8):874-877. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210320-00137.
- [10] CAO Y M, QI J, WANG J, et al. Injectable "homing-like" bioactive short-fibers for endometrial repair and efficient live births[J]. Adv Sci, 2024, 11(20): e2306507. DOI: 10.1002/adv.202306507.
- [11] QI J, LI X X, CAO Y M, et al. Locationally activated PRP via an injectable dual-network hydrogel for endometrial regeneration[J]. Biomaterials, 2024, 309:122615. DOI:10.1016/j.biomaterials.2024.122615.
- [12] HUA Q, ZHANG Y, LI H J, et al. Human umbilical cord blood-derived MSCs trans-differentiate into endometrial cells and regulate Th17/Treg balance through NF- κ B signaling in rabbit intrauterine adhesions endometrium[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1):301. DOI:10.1186/s13287-022-02990-1.
- [13] LIANG Y X, SHUAI Q Z, ZHANG X, et al. Incorporation of decidual stromal cells derived exosomes in sodium alginate hydrogel as an innovative therapeutic strategy for advancing endometrial regeneration and reinstating fertility[J]. Adv Healthc Mater, 2024, 13(13): e2303674. DOI: 10.1002/adhm.202303674.
- [14] ZHANG S H, SUN Y L, JIANG D L, et al. Construction and optimization of an endometrial injury model in mice by transcervical ethanol perfusion[J]. Reprod Sci, 2021, 28(3):693-702. DOI:10.1007/s43032-020-00296-2.
- [15] LIANG S S, HUANG Y L, XIA Y F, et al. Animal models in intrauterine adhesion research[J]. J Obstet Gynaecol, 2022, 42(8):3409-3415. DOI: 10.1080/01443615.2022.2124854.
- [16] LI B N, ZHANG Q W, SUN J Y, et al. Human amniotic epithelial cells improve fertility in an intrauterine adhesion mouse model[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 257. DOI: 10.1186/s13287-019-1368-9.
- [17] PARK M, HONG S H, PARK S H, et al. Perivascular stem cell-derived cyclophilin A improves uterine environment with Asherman's syndrome via HIF1 α -dependent angiogenesis[J]. Mol Ther, 2020, 28(8): 1818-1832. DOI: 10.1016/j.ymthe. 2020. 05.015.
- [18] 陈醒, 毛乐乐, 刁鹭, 等. 大鼠子宫粘连模型的构建与改进[J]. 解剖学报, 2019, 50(1):123-127. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356. 2019.01.021.
CHEN X, MAO L L, DIAO H, et al. A rat model of intrauterine adhesion established by endometrial scraping[J]. Acta Anat Sin, 2019, 50(1):123-127. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356.2019. 01.021.
- [19] LEE W L, LIU C H, CHENG M, et al. Focus on the primary prevention of intrauterine adhesions: current concept and vision[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(10): 5175. DOI: 10.3390/ijms22105175.
- [20] DAI Y Y, XIN L B, HU S T, et al. A construct of adipose-derived mesenchymal stem cells-laden collagen scaffold for fertility restoration by inhibiting fibrosis in a rat model of endometrial injury[J]. Regen Biomater, 2023, 10: rbad080. DOI:10.1093/rb/rbad080.
- [21] TANG P M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(3):144-158. DOI:10.1038/s41581-019-0110-2.
- [22] LIU F, ZHU Z J, LI P, et al. Creation of a female rabbit model for intrauterine adhesions using mechanical and infectious injury[J]. J Surg Res, 2013, 183(1): 296-303. DOI: 10.1016/j.jss.2012.11.009.
- [23] XU X X, ZHANG S S, LIN H L, et al. Metformin promotes regeneration of the injured endometrium via inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. Reprod Sci, 2019, 26(4):560-568. DOI:10.1177/1933719118804424.
- [24] WEN J M, HOU B, LIN W G, et al. 3D-printed hydrogel scaffold-

loaded granulocyte colony-stimulating factor sustained-release microspheres and their effect on endometrial regeneration[J]. Biomater Sci, 2022, 10(12): 3346-3358. DOI: 10.1039/d2bm00109h.

[25] JANG H Y, MYOUNG S M, CHOE J M, et al. Effects of autologous platelet-rich plasma on regeneration of damaged endometrium in female rats[J]. Yonsei Med J, 2017, 58(6):1195-1203. DOI:10.3349/ymj.2017.58.6.1195.

(收稿日期:2024-12-06 修回日期:2025-03-04)
(本文编辑:陈毅)

[引用本文]

姜娟, 宋宁, 连文博, 等. 两种浓度乙醇溶液灌注建立小鼠宫腔粘连模型的组织病理和分子病理表型比较[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(4): 393-402. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.183.

JIANG J, SONG N, LIAN W B, et al. Comparison of histopathological and molecular pathological phenotypes in mouse models of intrauterine adhesions induced by two concentrations of ethanol perfusion[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(4): 393-402. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.183.

《实验动物与比较医学》常用英文缩略词表

英文缩略词	英文全称	中文全称(备注)
BCA	bicinchoninic acid	二辛可宁酸(蛋白浓度测定试剂)
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B淋巴细胞瘤-2 基因
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CCK8	cell counting kit 8	细胞计数试剂盒-8
cDNA	complementary DNA	互补(反向转录)DNA
CT	computerized tomography	计算机体层摄影
DAB	3,3'-diaminobenzidine	3,3'-二氨基联苯胺
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
ddH ₂ O	double-distilled water	双蒸水
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	杜氏磷酸盐缓冲液
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FDA	Food and Drug Administration	食品药品监督管理局
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
HE	hematoxylin and eosin	苏木精-伊红
miRNA	microRNA	微 RNA
MTT	thiazolyl blue	噻唑蓝(细胞增殖活性检测试剂)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
PBST	phosphate-buffered saline with Tween-20	含 Tween-20 的磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PE	phycoerythrin	藻红蛋白
PI	propidium iodide	碘化丙啶
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
Ras	rat sarcoma gene	大鼠肉瘤基因
RIPA	radioimmunoprecipitation assay	放射免疫沉淀法
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
siRNA	small interfering RNA	小干扰 RNA
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SP	streptavidin-peroxidase	链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶
SPF	specific pathogen-free	无特定病原体
TBST	Tris-buffered saline with Tween-20	含 Tween-20 的 Tris 盐酸缓冲液
WHO	World Health Organization	世界卫生组织

《实验动物与比较医学》编辑部