



薄型子宫内膜模型的动物选择及其造模方法改进

许春燕¹, 宋阳^{1*}, 李坤寅¹, 关永格², 范为之¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

【摘要】 薄型子宫内膜是影响体外受精-胚胎移植的一个重要因素,而目前对于薄型子宫内膜的治疗缺乏有效的治疗手段。探讨稳定有效的薄型子宫内膜的动物模型,可为探索薄型子宫内膜疾病发病机制及治疗研究提供实验基础。本文从国内外多种动物子宫内膜损伤模型造模方法进行分析探讨,总结出大鼠宫腔内注射 95% 乙醇是目前比较适合用于薄型子宫内膜模型的建立,并在该法基础提出一些经验总结和改进的方法。

【关键词】 薄型子宫内膜;动物模型;造模方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 02-0217-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.02.021

Animal selection for thin endometrium model and improved technique for its establishment

XU Chun-yan¹, SONG Yang^{1*}, LI Kun-yin¹, GUAN Yong-ge², FAN Wei-zhi¹

(1. Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China;

2. the First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine 510405)

【Abstract】 Thin endometrium is an important factor influencing the in vitro fertilization and embryo transfer, and there is a lack of effective therapy in the treatment of thin endometrium. The aim of this study was to explore a stable animal model of effective thin endometrium, and to promote the research on thin endometrium pathogenesis and provide experimental basis of treatment. To analyze a variety of establishments of endometrial damage animal model reported in the domestic and foreign literatures, it is concluded that perfusing 95% ethanol into uterine cavities of rats can establish a rat model of thin endometrium, and put forward some experience and methods for its improvement.

【Key words】 Thin endometrium; Animal models; Establishment method.

Corresponding author: SONG Yang, Email: fau20@126.com

薄型子宫内膜是指子宫内膜厚度低于能够获得妊娠的阈值^[1]。各种因素引起的薄型子宫内膜影响子宫内膜容受性,导致体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)失败,不能维持妊娠,目前是生殖医学领域的难题之一。有效的薄型子宫内膜动物模型可以为研究其病理特点及探索有效治疗方法提供实验研究基础。子宫内膜损伤引起的薄型内膜是生殖医生临床上经常遇到的问题,其治疗目的就是要促进子宫内膜再生、修复,增加子宫内膜厚度,从而提供妊娠成功率。但对于因重度或广泛的损伤而引起薄型内膜患者,各种

治疗方法效果较差,子宫内膜厚度难以增加,这是临床上常见的棘手难题。由于伦理问题等,某些实验性治疗方法及病理机制的探讨等难以直接在病人体内进行。所以需要建立一种薄型内膜的动物模型进行研究。目前,国内外对于建立薄型子宫内膜的动物模型的均有一定的研究和报道,简述如下。

1 国内外子宫内膜损伤模型

1.1 大鼠

大鼠是医学实验研究中应用最多、应用领域最为广泛的实验动物之一,在子宫内膜损伤的模型中

[基金项目] 国家自然科学基金(81303000)。

[作者简介] 许春燕(1986-),女,2013级博士研究生,主要从事补肾活血法治疗法妇科肿瘤及月经病的研究。

[通讯作者] 宋阳(1978-),男,博士,副教授,主要从事促进女性生殖健康等方面的研究,Email: fau20@126.com

主要有三种方式,包括子宫全层损伤模型,子宫缺血模型和子宫内膜化学损伤模型。具体造模方法简述如下:

1.1.1 子宫全层损伤模型

子宫全层损伤的大鼠模型^[2],是对麻醉后的大鼠,开腹,子宫中段子宫系膜对侧缘纵形剪开子宫,将(0.5~1.5) cm × 0.5 cm 大小的子宫组织剪掉,6-0 锦纶线标记创缘。实验发现,损伤后大鼠子宫内膜上皮具有较强的再生能力,术后 1 周,约经历两个动情周期后,不同损伤范围(0.5 cm × 0.5 cm ~ 1.5 cm × 0.5 cm)子宫内膜上皮层均可完全愈合,呈单层柱状上皮细胞,排列紧密,与其下内膜固有层界限清晰。该造模方法可以使子宫全层损伤的子宫内膜薄弱,但仅手术区域的子宫内膜偏薄,与临床上人的子宫内膜整体偏薄的情况不同,此造模方法将局部子宫内膜及肌层同时损伤,很难做到大鼠整体的内膜偏薄,可用于薄型子宫内膜局部组织修复重建等方面研究。

1.1.2 子宫缺血模型

薄型子宫内膜发病机制至今尚不明确,但有研究^[3]指出子宫内膜供血减少可能和薄型子宫内膜的发病有关。因此部分研究者^[4]提出了通过夹闭 SD 大鼠子宫动脉来实现薄型子宫内膜动物模型。其具体方法是麻醉大鼠后,开腹暴露子宫,结扎双侧子宫角动脉,术后 3 个月,于发情期处死大鼠取子宫组织,发现 SD 大鼠子宫内膜缺血过后,子宫内膜变薄,子宫内膜腺体减少,腺上皮细胞受损。该造模方法术后 3 个月才成模,成模时间过长及大鼠的老龄化均可能对实验研究存在一定的影响。后有研究者^[5]使用这个模型造子宫内膜缺血再灌注损伤模型,进行夹闭子宫动脉的时间控制在 30 min 或 60 min,这样的短暂夹闭也对子宫内膜造成一定的损伤,但是其损伤的程度及子宫内膜自我修复时间不明确,模型成功率及模型稳定性有待进一步探讨。

1.1.3 子宫内膜化学损伤模型

该造模方法通过使用 95% 乙醇对大鼠子宫内膜进行化学损伤,主要利用无水乙醇对组织、细胞的脱水作用,以及可使蛋白质变性的特点。具体造模方法^[6-8]为大鼠麻醉后,依次切开皮肤、腹壁各层;分离子宫,一侧子宫近端和远端分别用个血管夹轻轻夹住,用无齿镊轻轻把子宫拉直,无菌盐水纱布保护周围组织以防无水乙醇外溢损伤;注射器针头进入宫腔,且保持其与子宫纵轴平行,于子宫一端缓慢注入无水乙醇,保持宫腔处于充盈状态,针头停留 4

~5 min 缓慢取出;轻轻挤压出残留的无水乙醇,再用生理盐水冲洗次,松开血管夹;另一侧子宫采用同样方法处理。为防止粘连,腹腔用生理盐水冲洗,并用无菌纱布吸干,把子宫恢复至正常位置后逐层关腹。后测量子宫内膜厚度、观察形态学特点以及检测角蛋白、波形蛋白和子宫内膜容受性标志蛋白整合素 $\beta 3$ 的表达情况来评估造模情况,认为 95% 乙醇宫腔内注射可成功有效建立薄型子宫内膜模型。该造模方法经济、成模时间短,模型稳定,比较适合用于药物疗效及机制探讨的薄型子宫内膜动物模型,本课题组亦沿用此模型,实践中总结了一些经验及方法,后面详述。

1.1.4 其他造模方法

国外学者 Guney^[8-16]做过多种方法致大鼠子宫内膜损伤的动物模型的研究,氟化物加入大鼠饮水中,使用甲基对硫磷或者敌敌畏(有机磷杀虫剂)灌胃,通过 900 兆电磁辐射影响等,主要是观察这些损伤引起氧化应激反应而导致大鼠子宫内膜的损伤。但这些方法或不能形成薄型子宫内膜,或损伤过大,或操作复杂,均不宜作为薄型子宫内膜的动物模型方法的首选。

1.2 小鼠

利用小鼠来进行子宫内膜损伤模型的建立,常见的是热损伤和机械损伤两种造模方法。曲军英等^[17]利用水热损伤的方法来造子宫内膜损伤的动物模型,其主要是利用宫腔导管贯穿小鼠 Y 型宫腔的一侧,给予预温 85℃ 流动热水经 80 s 热损伤小鼠子宫内膜组织,达到子宫内膜广泛剥脱目的,来建立子宫内膜损伤的动物模型,可使子宫宫腔变狭窄、瘢痕与粘连。后路平等^[18]研究小鼠骨髓间充质干细胞的相关作用研究,继续参考该法进行子宫内膜损伤模型的制作,选择 100℃ 水源,计时 10 s 停止。胡晓晓^[19]采用电热损伤模型方法,使得该法更具可控性,温度损伤维持可恒定,选用低于子宫全层损伤的功率,设置不同的电热功率,于近卵巢侧用剪刀剪开一小破口,从中穿刺法置入直径 1 mm 宫腔导丝(表面绝缘只有顶端可导电,使用点放电以不同的电热功率,固定时间损伤迅速抽回导丝,并电凝子宫内壁。综合以上热损伤建立的小鼠内膜损伤模型来看,热损伤主要是以去除子宫内膜的原理建立模型,模型的子宫内膜完全损伤,而不是单纯的损伤后变薄,所以该法不适合用于薄型子宫内膜模型的建立。

关硕^[20]通过机械损伤建立小鼠子宫内膜损伤模型,利用自制的表面粗糙的不锈钢针(直径约 0.5

mm) 探入左侧宫腔内,并划伤子宫内膜。国外学者^[21]有用 C57BL/6 雌性小鼠通过机械损伤来建立 Asherman 综合征子宫内膜损伤小鼠模型,用 4 号注射器针头,从宫角处进入至三分之二处,进行旋转和来回搔刮 4 次。此法主要是通过参照临床宫腔操作引起子宫内膜机械损伤,但是机械的损伤力度及损伤程度无法量化,可因不同的操作者甚至同一操作者均可能使模型存在一定的差异性,可用于建立宫腔粘连的动物模型。

1.3 其他动物

国外学者通过使用刮匙搔刮兔子的子宫内膜建立宫腔粘连的模型^[22,23]。刘芳等^[24]通过对兔子的子宫进行刮勺刮取子宫内膜达到机械损伤,同时留置脂多糖棉线于宫腔内两天引起宫腔内膜感染损伤,可建立稳定的兔宫腔粘连的动物模型。也有同样使用机械刮宫法建立比格犬宫腔粘连模型^[25]。国外学者使用光动力学方法对恒河猴进行子宫内膜消融损伤^[26]。

2 薄型子宫内膜的动物选择

综上所述,目前国内外关于子宫内膜损伤的模型选用上,大鼠、小鼠、新西兰兔、比格犬及恒河猴都有相关的报道,方法有机械损伤、感染损伤、热损伤、化学损伤、光学损伤等等。其中大鼠的使用是最多及广泛的,造模方法相对较多;小鼠主要是机械损伤及热损伤的造模方法居多,较少见其关于化学损伤报道。新西兰兔多见机械损伤造模为主,比格犬和恒河猴的造模报道不多见,且一般用于手术治疗等观察,不适合大样本量的实验研究。以上大部分的子宫内膜损伤的造模方法可能损伤过度造成宫腔粘连,或者损伤不足,均难形成薄型子宫内膜。目前薄型子宫内膜模型的建立首选高红等^[6-8]通过 SD 大鼠宫腔内注射 95% 乙醇建立的动物模型。

3 薄型子宫内膜 SD 大鼠模型造模方法改进及分析

薄型子宫内膜动物模型的是高红等最先建立的 SD 大鼠薄型子宫内膜模型,夹住大鼠子宫一端,注射 95% 的乙醇对子宫内膜进行化学损伤,但造模后存活率为 70%,并常常造成大鼠腹腔严重粘连。赵静等进一步完善该造模方法,使用血管夹同时夹住子宫近阴道端及卵巢端,再向子宫腔内注入 95% 乙醇。本课题组亦参照该法进行了造模,在这提出一

些经验及建议。本课题在造模过程中遇到的问题及改良方法;采用的造模方法参照赵静^[7]的造模方法基础上做了以下改良:

3.1 关于子宫分离

术中分离子宫系膜血管会引起出血,术后影响大鼠子宫的正常血供,大鼠子宫为一个“Y”型子宫,主要造模选取上部分“V”段两侧,常规麻醉消毒后开腹,因双侧子宫内侧的子宫系膜血管丰富,一般不做分离,只需暴露好其中一侧子宫的近阴道端及卵巢端即可(图 1)。

3.2 关于术中血管夹的使用

术中使用血管夹钳夹子宫近阴道端及卵巢端处发白薄如纸,甚者可能出现断裂;因子宫组织本身不耐过度钳夹,用血管夹钳夹,容易造成子宫钳夹伤甚至断裂。如果仍想使用血管夹,术者可通过双手控制血管夹钳夹力度,但是这种方法,需两人以上进行手术,如果造模量大时,容易造成术者双手因长时间控制钳夹而乏力甚至抽搐,导致乙醇渗漏至腹腔;术中不用血管夹钳夹,改用 0 号缝合丝线进行子宫两端活结结扎(图 2),选用 0 号缝合丝线,因其线较粗,结扎子宫两端时压强相对细线的压强小,注意结扎时无需打死结,控制力度进行结扎,以注射 95% 乙醇使子宫充盈为度。

3.3 关于宫腔内乙醇残留

宫腔内注射残留的 95% 的乙醇容易造成宫腔粘连及腹腔粘连,注射无水乙醇结束后挤压出无水乙醇后,仍容易残留,建议子宫内 95% 乙醇充盈 4 ~ 5 min,保持注射器针头在宫腔内,把 95% 乙醇抽出后拔出注射器,换用生理盐水冲洗子宫腔内 1 ~ 2 遍,再行腹腔生理盐水冲洗,后关腹。

3.4 其他

术后保温方面,可使用暖光灯照射可以达到较好的保温效果。许多研究在术后 3 d 予常规使用抗生素肌注或者腹腔注射,实验过程中发现 SD 大鼠自身抗感染能力强,手术只要严格做好无菌操作,手术器械采用高压灭菌,术前术后都做好消毒,本实验无需术后连续 3 d 使用抗生素,只需在缝合肌层后,于肌层撒每只 0.5 g 青霉素钠粉剂后缝合皮肤,大鼠无一感染,术口愈合良好(图 3)。

采用上述改良方法进行造模,本课题共造模 110 例,术后 3 d 均存活,无感染,术口愈合良好,2 例因麻醉原因死亡,造模后存活率 100%。