

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.03.02

❖ 基础研究 ❖

不同浓度 PEBP 凝胶对大鼠子宫内膜纤维化的抑制作用

党家凤¹, 谌伦华², 张娟², 沈成义³, 王冰^{4,5}

(川北医学院, 1. 临床医学系; 2. 附属医院妇产科; 3. 形态学研究所; 4. 影像四川省重点实验室; 5. 基础医学院化学教研室, 四川南充 637000)

【摘要】目的: 探讨不同浓度聚乙二醇-b-聚 L-苯丙氨酸嵌段聚合物凝胶 (PEBP 凝胶) 对大鼠子宫内膜损伤导致的纤维化的抑制作用。**方法:** 24 只雌性 SD 大鼠随机分为 4 组 (B、C、D、E 组, $n=6$), 采用刮宫兼感染双重损伤法制作大鼠宫腔纤维化模型。B、C、D、E 组双侧子宫造模后, 随机一侧子宫注入 PEBP 浓度分别为 0、8、125、16.25、32.5 mg/mL 的凝胶 0.3 mL; 另一侧子宫注入 0.3 mL 生理盐水作为模型组 (A 组)。损伤 14 d 后取子宫组织固定、包埋、切片, 行苏木素伊红 (HE) 染色以观察各组大鼠的子宫愈合情况, 行 Masson 染色以观察子宫内膜纤维化程度, 并通过免疫组化法检测子宫内膜组织中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 的表达情况。**结果:** 实验组与模型组相比, 损伤后宫内植入 PEBP 凝胶可显著缓解损伤造成的子宫内膜纤维化 ($P < 0.05$), 缓解程度随 PEBP 在凝胶中浓度的升高而升高; PEBP 凝胶组子宫内膜组织 TGF- $\beta 1$ 的表达随凝胶中 PEBP 含量的增加而降低。与模型组相比, PEBP 含量最高的 E 组 TGF- $\beta 1$ 的表达显著降低 ($P < 0.05$)。**结论:** PEBP 凝胶对大鼠子宫内膜损伤导致的纤维化具有抑制作用, 且抑制作用随着凝胶中 PEBP 浓度的升高而增强, 高浓度 PEBP 凝胶也可抑制损伤后子宫内膜 TGF- $\beta 1$ 的表达。

【关键词】 子宫内膜; 纤维化; PEBP 凝胶; 转化生长因子- $\beta 1$; 大鼠

【中图分类号】 R711.74 **【文献标志码】** A

Inhibitory of different dose of PEBP gel on endometrial fibrosis in rats

DANG Jia-feng¹, SHEN Lun-hua², ZHANG Juan², SHEN Cheng-yi³, WANG Bing^{4,5}

(1. School of Preclinical Medicine; 2. Department of Gynecology and Obstetrics of Affiliated Hospital; 3. Morphological Research; 4. Sichuan Key Laboratory of Medical Imaging; 5. Department of Chemistry, School of Preclinical Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To evaluate the effect of different dose of poly (ethyleneglycol)-b-poly (L-phenylalanine) block polymer (PEBP) gel on inhibition of fibrosis induced by endometrial injury in rats. **Methods:** A total of 24 female SD rats were randomly divided into groups B, C, D and E ($n=6$). The model of intrauterine adhesions was established by double injury of curettage and infection in rats. For rats in each group, one side of their uterus was given 0.3 mL of PEBP gel with a dose of 0, 8, 125, 16.25 and 32.5 mg/mL respectively after modeling, while the other side of their uterus was treated with 0.3 mL saline, serving as the model group (group A). 14 d after injury, the uterine tissues were fixed, embedded and sliced. Hematoxylin and eosin (HE) and Masson staining was respectively used to observe the healing of uterus and the degree of endometrial fibrosis. Also, the expression of transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) in endometrium was detected by immunohistochemistry. **Results:** Compared with the model group, intrauterine implantation of PEBP gel significantly alleviated the endometrial fibrosis induced by injury ($P < 0.05$), and the degree of remission increased with the increase of PEBP concentration in the gel. The expression of TGF- $\beta 1$ in endometrial tissue of PEBP gel group decreased with the increase of PEBP content in the gel. The expression of TGF- $\beta 1$ was significantly decreased in E group with the highest PEBP gel concentration than the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** PEBP gel inhibited the fibrosis induced by endometrial injury in rats, and the inhibitory effect increased with the increase of PEBP dose in the gel. The high-dose PEBP gel also inhibited the expression of TGF- $\beta 1$ in the endometrium after injury.

【Key words】 Endometrial; Fibrosis; PEBP gel; Transforming growth factor- $\beta 1$; Rat

宫腔粘连, 通常是在子宫刮宫术后子宫内膜基底层受到创伤所致^[1], 以子宫内膜纤维化为主要特征, 可导致经量减少、流产, 甚至不孕。目前, 宫腔粘连的主要治疗方法包括术后宫腔内放置气囊、Foley

基金项目: 2020 中央引导地方科技发展专项自由探索基础项目 (2020ZYD056)

作者简介: 党家凤 (1994 -), 女, 硕士研究生。E-mail: 772813130@qq.com

通讯作者: 谌伦华。E-mail: hua969@189.cn

导管、宫内节育器、新鲜或冻干羊膜、硅胶片及宫腔内注射透明质酸钠或自体交联透明质酸钠^[2-9]。然而,大多数固体装置无法根据不同形状和大小的子宫腔发生适应性改变^[7],进而导致防止子宫边缘位置粘连的成功率较低。此外,Foley导管甚至还会增加子宫内组织膜的压力,阻碍子宫内膜的再生,诱发子宫内膜坏死^[10]。透明质酸钠或自交联透明质酸钠可适应不同形状和大小的子宫腔,但却无法长期有效。为此,设计并制备既可通过物理阻隔防止组织粘连,又可抑制成纤维细胞增殖的可被机体吸收的聚乙二醇-b-聚 L-苯丙氨酸 [poly(ethyleneglycol)-b-poly(L-phenylalanine),PEBP] 聚合物凝胶有一定的应用前景,以用于预防损伤后子宫内膜纤维化。本研究初步探讨不同浓度 PEBP 凝胶对大鼠子宫内组织膜损伤所致纤维化的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 24 只,鼠龄 7~8 周,体重 220~240 g,由川北医学院动物实验中心提供。实验操作均在川北医学院动物实验中心进行 [SYXK(川)2013-076],对动物的处置要求符合相关动物伦理学。饲养条件:室温 22~26℃,湿度 40%~70%,损伤术后单笼饲养,可自由获取食物。

1.1.2 手术材料 无菌干纱布(40 mm×50 mm)、医用脱脂棉、一次性注射器、4-0 可吸收缝线、6-0 可吸收缝线、血管钳、剪刀、持针器、镊子、手术刀柄、手术刀片、止血钳等(均采用高压蒸汽法灭菌)。

1.1.3 主要试剂 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, Sigma)、苏木素伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒(碧云天)、MASSON 染色试剂盒(碧云天);转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)单克隆抗体(Abcam)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将 24 只 SD 雌性大鼠随机分为 4 组(B、C、D、E 组),每组各 6 只。A 组:模型组(因大鼠为“Y”字型双子宫,造模无凝胶侧随机抽取 6 只子宫组织作为模型组);B 组:PEBP 浓度 0 mg/mL;C 组:PEBP 浓度 8.125 mg/mL;D 组:PEBP 浓度 16.25 mg/mL;E 组:PEBP 浓度 32.5 mg/mL。

1.2.2 实验造模 如研究^[11]所述,采用刮宫加感染双重损伤法建立大鼠宫腔粘连模型。将 SD 雌性大鼠准确称重后,腹腔注射戊巴比妥钠(0.69 mg/kg)麻醉,腹部备皮、仰卧位固定于手术台上,常规消毒、铺

巾,暴露腹部手术区域。于耻骨联合上 1.5 cm 沿腹正中线上做 3 cm 切口,逐层打开腹腔,暴露子宫,置于无菌巾上,双侧子宫在宫颈上方约 5 mm 作横行切口,长约 4 mm,对大鼠行刮宫术,宫腔四壁出现粗糙感时停止刮宫,6-0 可吸收线缝合切口,将制作好的 LPS 棉线(4 号医用无菌手术线浸泡于 6 mg/L 的 LPS 生理盐水中,4℃放置 24 h)置入已行刮宫术的宫腔,生理盐水冲洗腹腔,0.3 mL 不同浓度的 PEBP 凝胶随机注入大鼠的一侧子宫,对侧子宫注入 0.3 mL 生理盐水,4-0 可吸收线逐层关腹,缝合皮肤,碘伏棉球消毒伤口,48 h 后取出 LPS 棉线。

1.2.3 取材及处理 各组均于术后第 14 天采用颈椎脱臼法处死实验大鼠,立即剖腹取子宫组织,剔除脂肪及结缔组织后,剪取大鼠子宫组织置于 10% 中性福尔马林中固定 24 h,常规石蜡包埋切片。

1.2.4 组织染色及图像分析 高倍显微镜下观察并选取视野。(1)HE 染色观察创伤组织愈合情况;(2)Masson 染色观察子宫内组织膜纤维化程度;(3)免疫组化染色检测子宫内组织膜 TGF-β1 表达水平。采用 Image-Pro plus 图像处理软件收集各组数据。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠子宫内组织膜愈合状况

术后 14 d,各组大鼠子宫横切面 HE 染色后均见丰富的内组织膜腺体开口,见图 1。各组间的单位面积腺体计数无明显差异(A = 27.553 ± 19.702, B = 31.625 ± 21.714, C = 24.335 ± 15.962, D = 26.500 ± 22.346, E = 31.600 ± 19.586, F = 0.467, P = 0.760),损伤组织愈合情况良好,大鼠子宫内组织膜因机械损伤后,诱发炎症反应,巨噬细胞的数量增多,在 HE 染色后大鼠子宫内组织膜可见巨噬细胞(图 1 中箭头所指为巨噬细胞)。

2.2 各组大鼠的单位面积纤维化比较

各组大鼠的单位面积纤维化程度分别为 A = 54.001 ± 8.171、B = 47.699 ± 10.148、C = 41.187 ± 10.076、D = 36.121 ± 8.560、E = 27.173 ± 10.364 (F = 21.339, P < 0.001)。实验组与模型组相比,宫内植入 PEBP 凝胶可显著降低损伤所致子宫内组织膜纤维化程度,且纤维化程度随凝胶中 PEBP 含量增加而降低。见图 2。

2.3 各组大鼠 TGF-β1 表达结果比较

各组大鼠子宫内组织膜 TGF-β1 表达情况分别为 A

$= 0.051 \pm 0.006$ 、 $B = 0.067 \pm 0.005$ 、 $C = 0.063 \pm 0.011$ 、 $D = 0.057 \pm 0.017$ 、 $E = 0.046 \pm 0.012$ ($F = 3.119$, $P = 0.039$)。实验组与模型组相比,PEBP 含量为 0 的 B 组子宫内膜组织 TGF- β 1 的表达显著升高 ($P < 0.05$),PEBP 含量最高的 E 组子宫内膜组织

TGF- β 1 的表达显著下降 ($P < 0.05$),C、D 两个 PEBP 凝胶组子宫内膜组织 TGF- β 1 表达与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。四个凝胶组间 TGF- β 1 表达对比可见,TGF- β 1 的表达随凝胶中 PEBP 含量增加而依次降低,见图 3。



图 1 术后 14 d 各组大鼠子宫组织 HE 染色结果

A.模型组;B.0 mg/mL PEBP 凝胶组;C.8.125 mg/mL PEBP 凝胶组;D.16.25 mg/mL PEBP 凝胶组;E.32.5 mg/mL PEBP 凝胶组。

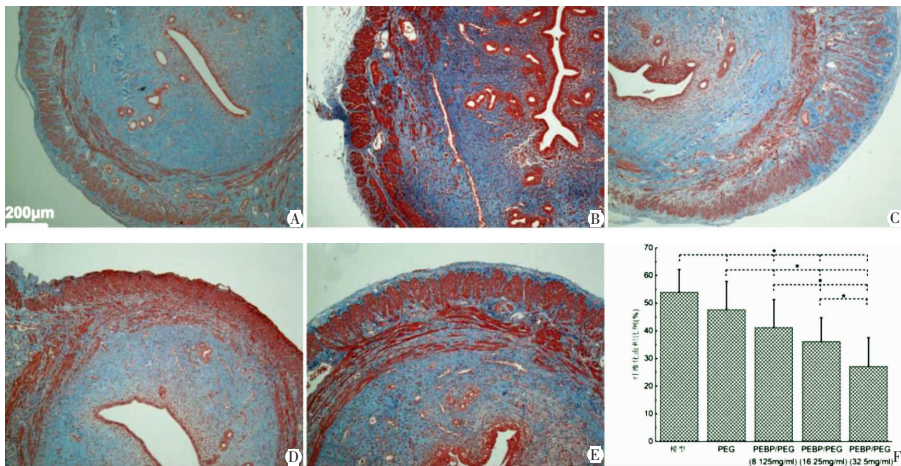


图 2 术后 14 d 大鼠子宫组织 Masson 染色结果

A.模型组;B.0 mg/mL PEBP 凝胶组;C.8.125 mg/mL PEBP 凝胶组;D.16.25 mg/mL PEBP 凝胶组;E.32.5 mg/mL PEBP 凝胶组;F.各组内膜层纤维面积占比统计。*表示组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

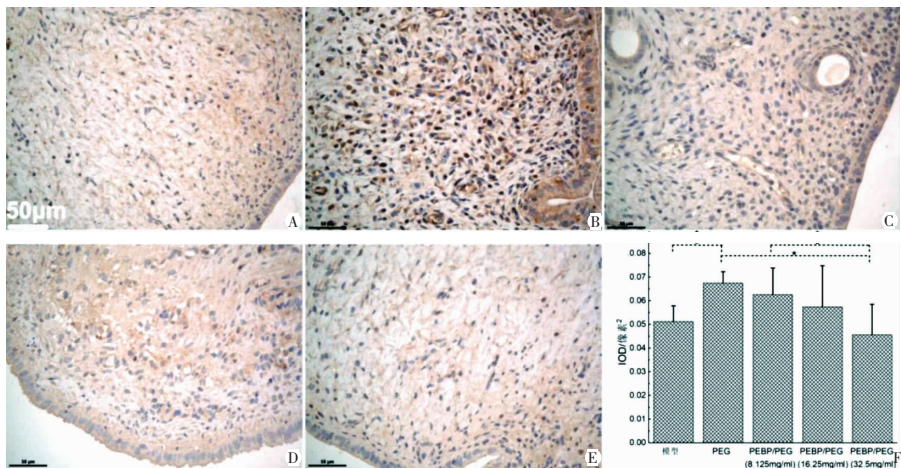


图 3 术后 14 d 大鼠子宫组织 TGF- β 1 免疫组化结果

A.模型组;B.0 mg/mL PEBP 凝胶组;C.8.125 mg/mL PEBP 凝胶组;D.16.25 mg/mL PEBP 凝胶组;E.32.5 mg/mL PEBP 凝胶组;F.各组内膜层 TGF- β 1 免疫组化 IOD 值统计。*表示组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

成纤维细胞是机体损伤的主要修复细胞,而成纤维细胞过度生长是纤维化形成的主要原因^[12]。前期研究^[13]发现,L-苯丙氨酸(L-phenylalanine, L-Phe)可以通过调控细胞膜表面钙离子敏感受体(calcium sensitive receptor, CaSR)实现抑制成纤维细胞过度增殖的作用。为此,本研究设计并制备了可以通过肽键释放 L-Phe 的 PEBP 凝胶以用于预防损伤导致的大鼠子宫内膜纤维化,并探讨凝胶中 PEBP 含量对纤维化抑制作用的影响。

PEBP 凝胶应用于损伤子宫中可有效抑制损伤导致的子宫内膜纤维化,且纤维化程度随凝胶中 PEBP 浓度的增加而降低,说明 PEBP/PEG 凝胶中可以抑制纤维化发生的有效成分是 PEBP,这可能是由于 PEBP 嵌段聚合物中的聚 L-苯丙氨酸链段,植入体内肽键被水解或酶解后,可释放出抑制成纤维细胞增殖的 L-Phe,从而抑制纤维化的发展。此外,与模型组相比,纯 PEG 的 B 组子宫内膜组织 TGF- β 1 的表达显著升高,PEBP 中 PEG 链段的分子量为 2 kDa, B 组不含 PEBP 的凝胶主要成分为 PEG 2000 及 PEG 400,分子量大于 2 kDa 的 PEG 在体内的代谢主要依靠巨噬细胞的吞噬作用,而巨噬细胞也可以分泌 TGF- β 1,即 PEG 的应用刺激了 TGF- β 1 的过度表达^[14]。值得注意的是,随着凝胶中 PEBP 含量的增加,大鼠子宫内膜组织的 TGF- β 1 表达依次下降,且应用最高 PEBP 含量凝胶的 E 组 TGF- β 1 表达则显著低于模型组。这表明 PEBP 的应用可以降低组织中 TGF- β 1 的表达。除巨噬细胞之外,成纤维细胞也是 TGF- β 1 的主要分泌细胞,应用 PEBP 后 TGF- β 1 表达的下降表明 PEBP 抑制了损伤组织中成纤维细胞的过度增殖。而 TGF- β 1 作为促纤维化因子又可促进纤维化组织的形成,应用 PEBP 降低 TGF- β 1 的表达可有效缓解损伤导致的组织纤维化。

综上所述,PEBP/PEG 凝胶可以有效抑制损伤导致的大鼠子宫内膜纤维化,源于 PEBP 对损伤组织中成纤维细胞过度增殖的抑制作用,并通过这一作用调控子宫内膜组织中促纤维化因子 TGF- β 1 的表达实现抑制纤维化的作用。

参考文献

[1] Heinonen PK. Intrauterine adhesions-Asherman's syndrome[J]. Duo-

decim;lääketieteellinen aikakauskirja,2010,126(21):2486-2491.

[2] Bosteels J, Weyers S, Mol BWJ, et al. Anti-adhesion barrier gels following operative hysteroscopy for treating female infertility: a systematic review and meta-analysis[J]. Gynecological Surgery, 2014, 11(2): 113-127.

[3] Lin XN, Zhou F, Wei ML, et al. Randomized, controlled trial comparing the efficacy of intrauterine balloon and intrauterine contraceptive device in the prevention of adhesion reformation after hysteroscopic adhesiolysis[J]. Fertil Steril, 2015, 104: 235-240.

[4] Lin YH, Jang TN, Hwang JL, et al. Bacterial colonization with balloon uterine stent placement in the uterus for 30 days: a randomized controlled clinical trial[J]. Fertility and Sterility, 2015, 103(2): 513-518.

[5] Peng X, Li TC, Zhao Y, et al. Safety and Efficacy of Amnion Graft in Preventing Reformation of Intra-Uterine Adhesions[J]. Journal of Minimally Invasive Gynecology, 2017, 24(7): 1204-1210.

[6] Zheng F, Xin X, He F, et al. Meta-analysis of the use of hyaluronic acid gel to prevent intrauterine adhesions after miscarriage-Science-Direct[J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2020, 244: 1-4.

[7] Azumaguchi A, Henmi H, Saito T. Efficacy of silicone sheet as a personalized barrier for preventing adhesion reformation after hysteroscopic adhesiolysis of intrauterine adhesions[J]. Reproductive Medicine and Biology, 2019, Doi:10.1002/rmb2.12294.

[8] Amer MI, Abd-El-Maeboud KH, Abdelfatah I, et al. Human amnion as a temporary biologic barrier after hysteroscopic lysis of severe intrauterine adhesions: pilot study[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2010, 17(5): 605-611.

[9] Stephanie H, Herve F, Pierre V, et al. Application of a Hyaluronic Acid Gel after Intrauterine Surgery May Improve Spontaneous Fertility: A Randomized Controlled Trial in New Zealand White Rabbits[J]. Plos One, 2015, 10(5): e0125610.

[10] Xiao S, Wan Y, Xue M, et al. Etiology, treatment, and reproductive prognosis of women with moderate-to-severe intrauterine adhesions[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2014, 125(2): 121-124.

[11] 蔡慧华, 何援利, 李慧娟, 等. 宫腔粘连大鼠模型的建立及其与白细胞介素 21 的相关性分析[J]. 医学研究生学报, 2015, 28(4): 346-349.

[12] 杨猛, 周树柏, 刘凤岐. 智能水凝胶的研究进展[J]. 化工科技, 2015, 23(1): 66-71.

[13] Wang B, Wen A, Feng C, et al. The in vivo anti-fibrotic function of calcium sensitive receptor (CaSR) modulating poly(p-dioxanone-co-L-phenylalanine) prodrug[J]. Acta biomaterialia, 2018, 73: 180-189.

[14] Chen B, Huang S, Su Y, et al. Macrophage Smad3 Protects the Infarcted Heart, Stimulating Phagocytosis and Regulating Inflammation[J]. Circulation Research, 2019, 125(1): 55-70.

(收稿日期:2020-09-04

修回日期:2020-12-12)