

业盟基金项目结项总结报告

一、项目名称

业盟基金。

二、项目背景

因受河南 7·20 特大暴雨影响，新乡地区遭遇历史罕见特大洪灾，新乡医学院及其附属医院均不同程度受灾，孙永琨课题组受洪灾影响，科研试剂、耗材等损失严重，得知此情况后，南通业盟新材料股份有限公司设立业盟基金向新乡医学院教育基金会（以下简称“基金会”）捐赠 5 万元用于支持新乡医学院基础医学院孙永琨课题组暴雨洪灾后重新开展科学研究及团队建设工作的。

三、运作方式

资金来源：业盟基金由南通业盟新材料股份有限公司自愿、无偿捐赠。

资助对象：新乡医学院基础医学院孙永琨课题组暴雨洪灾后重新开展科学研究及团队建设工作的。

项目目标：孙永琨课题组灾后重新开展科学研究及团队建设工作的。

执行方选择：根据捐赠协议约定，该项目由孙永琨课题组负责执行，孙永琨为项目负责人。

资金使用：业盟基金的资金全部用于资助项目。项目用

款严格按照《新乡医学院教育基金会财务管理办法》执行。

项目评估：项目结束后由受助人提供结项报告。

四、开展情况

基金会于 2021 年 8 月 13 日收到南通业盟新材料股份有限公司捐赠的 5 万元，根据捐赠协议中规定的资金用途，所有资金用于孙永琨课题组相关团队建设和科研工作。截至 2023 年 7 月 20 日，业盟基金共支出 49984.40 元，结余 15.60 元。征得捐赠人和项目负责人意见后，结余资金按照基金会宗旨，统筹用于新乡医学院建设发展。

五、取得成果

项目进展顺利，除本业盟基金资助金额以外，捐赠公司分批次设立相关横向课题，累计资助资金 30 万元。相关研究已发表学术论文一篇，题目《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》（附件 1）；已申报国家发明专利两项，其中国际发明专利一项；为相关产品研发及产业化生产提供了新材料、新技术和新工艺，并为捐赠公司新增销售收入 925 万元，其中利润 341 万元（附件 2）。



六、项目监督

业盟基金接受捐赠人和社会公众的监督, 业盟基金的项目支出定期在基金会网站公示, 并接受第三方审计公司审计, 审计报告在基金会网站公开。



附件 1:

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



中国实验动物学报
Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica
ISSN 1005-4847, CN 11-2986/Q

《中国实验动物学报》网络首发论文

题目: 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
作者: 程怡怡, 赵伟伟, 宋振峰, 童福雯, 刘刚, 张花, 施磊磊, 郭志坤, 王现伟, 潘莹, 孙永琨
收稿日期: 2023-05-03
网络首发日期: 2023-10-26
引用格式: 程怡怡, 赵伟伟, 宋振峰, 童福雯, 刘刚, 张花, 施磊磊, 郭志坤, 王现伟, 潘莹, 孙永琨. 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/OL]. 中国实验动物学报.
<https://link.cnki.net/urlid/11.2986.Q.20231026.1223.018>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

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^{1,2}, 赵伟伟², 宋振峰², 童福雯^{2,3}, 刘刚⁴, 张花¹, 施磊磊⁵,

郭志坤⁴, 王现伟^{1,2,4}, 潘莹^{1✉}, 孙永琨^{1,2,4✉}

(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)

*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。

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、治疗组, 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 7 d 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纤维化情况; Western Blot 检测子宫组织中炎症因子 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平; ELISA 检测小鼠血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的表达。各组剩余的 8 只小鼠按照雌雄比例为 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, 模型组小鼠子宫内厚度变薄, 子宫内纤维化增加, 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 β 和 IL-18 蛋白表达水平以及血清中炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 水平均显著高于假手术组 ($P < 0.05$)。 (2) 与模型组相比, 治疗组小鼠子宫内损伤程度、子宫内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 β 和 IL-18 蛋白表达水平及血清中炎症因子 IL-1 β 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

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

CHENG Yiyi^{1,2}, ZHAO Weiwei², SONG Zhenfeng², TONG Fuwen^{2,3}, LIU Gang⁴, ZHANG Hua¹, SHI Leilei⁵,

GUO Zhikun⁴, WANG Xianwei^{1,2,4}, PAN Ying^{1✉}, SUN Yongkun^{1,2,4✉}

收稿日期: 2023-05-03
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)。

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

Fund: 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).

网络首发时间: 2023-10-26 14:54:55 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.2986.Q.20231026.1223.018>

(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)
*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 β , and IL-18 in uterine tissues. ELISA were used to measure IL-1 β 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 β , and IL-18 in uterine tissue and the serum levels of IL-1 β 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 β , and IL-18 in uterine tissue and the serum levels of IL-1 β 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.

Key words intrauterine adhesions; collagen peptide; sodium alginate; NLRP3 inflammasome

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疤痕^[1]。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^[2-3]。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^[4-5]。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^[6]。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(Procaspase-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^[7-8]。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^[9-11]。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^[12-14],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%, 光照明暗时间比为 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。研究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 β (Abcam, ab9722, 英国), IL-18(ABclonal, A20473, 中国), GAPDH(Proteintech, 6004-1-1, 中国), β -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 β 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^[15-16]。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向宫腔注射 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, 部分组织置于-80℃保存备用, 用于蛋白含量测定。部分组织置入新鲜配置的 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, 中性树脂封固, 随后在显微镜下观察子宫内膜病理形态学变化, 10 \times 4 倍和 10 \times 20 倍显微镜下拍照, 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,中性树脂封片后,在显微镜下观察子宫内膜纤维化程度,10×4倍和10×20倍显微镜下拍照,用Image J软件分析计算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 β 、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 检测各组小鼠血清 IL-1 β 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 β 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。

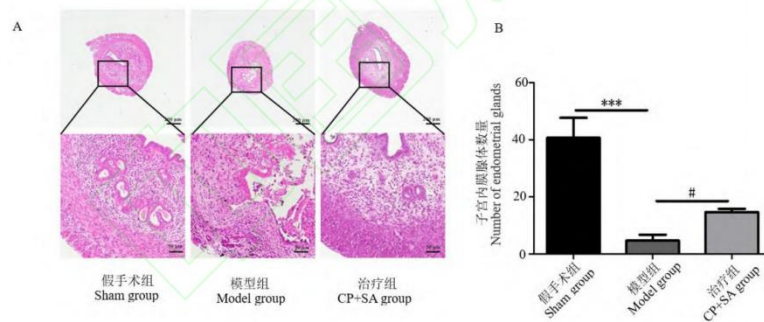
1.3 统计学分析

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 ($P < 0.05$)。



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, # $P < 0.05$ 。

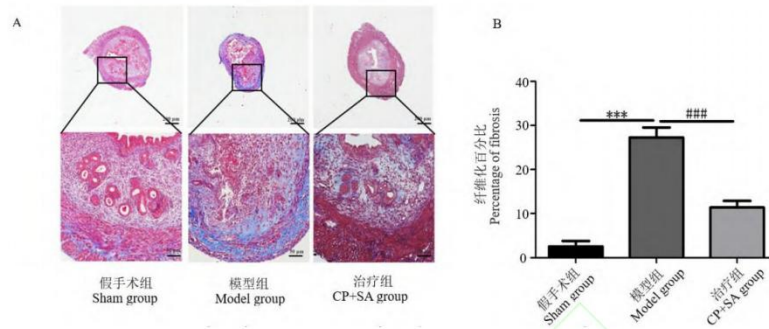
图 1 子宫组织横切形态学观察

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, # $P < 0.05$.

Figure 1 Morphological observation of transverse section of uterine tissue

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 ($P < 0.001$)。



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；与假手术组相比，*** $P < 0.001$ ；与模型组相比，### $P < 0.001$ 。

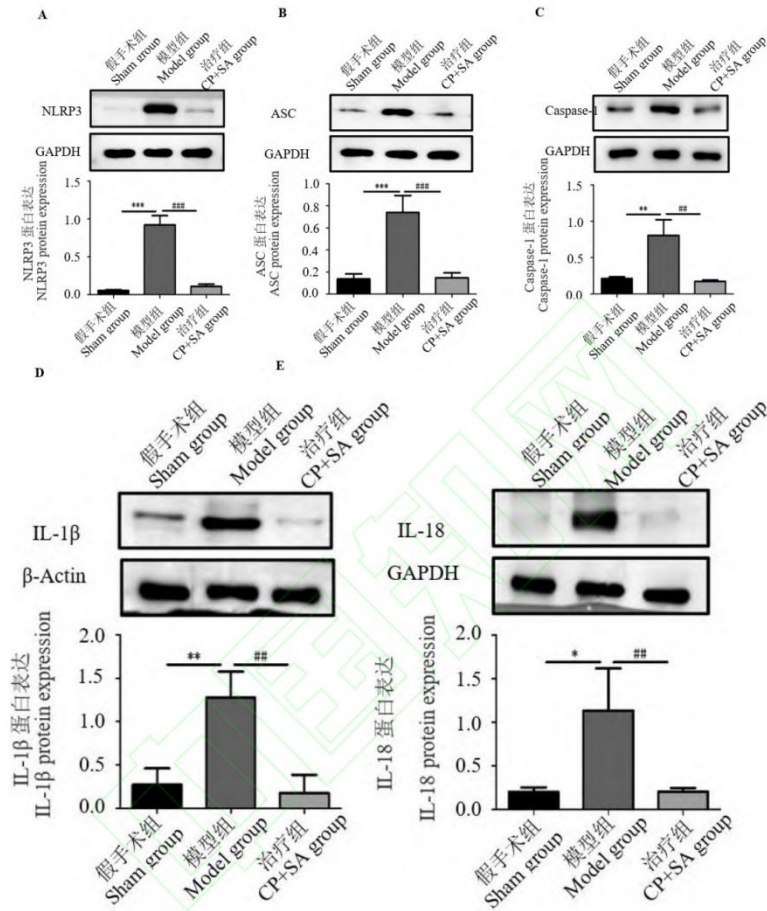
图 2 子宫组织横切纤维程度观察

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 sham group, *** $P < 0.001$. Compared with the model group, ### $P < 0.001$.

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

2.3 Western Blot 检测小鼠子宫组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、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 β 、IL-18 蛋白相对表达量均明显升高，差异具有显著性 ($P < 0.001$, $P < 0.01$ 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 β 、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 $P < 0.01$)。



注: A: NLRP3 蛋白相对表达量; B: ASC 蛋白相对表达量; C: Caspase-1 蛋白相对表达量; D: IL-1 β 蛋白相对表达量; E: IL-18 蛋白相对表达量; 与假手术组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

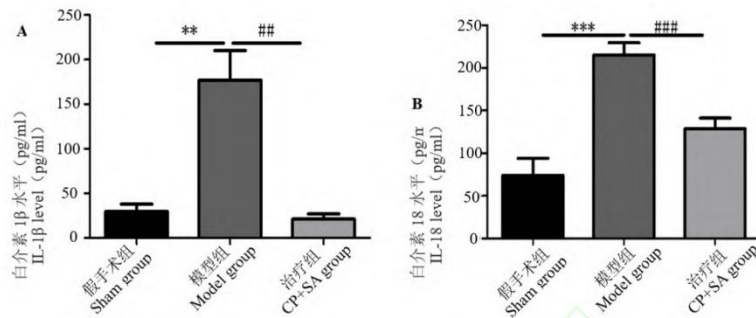
图 3 各组子宫组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达

Note. A. Relative expression of NLRP3 protein. B. Relative expression of ASC protein. C. Relative expression of Caspase-1 protein. D. Relative expression of IL-1 β protein. E. Relative expression of IL-18 protein. Compared with sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the model group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

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

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



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

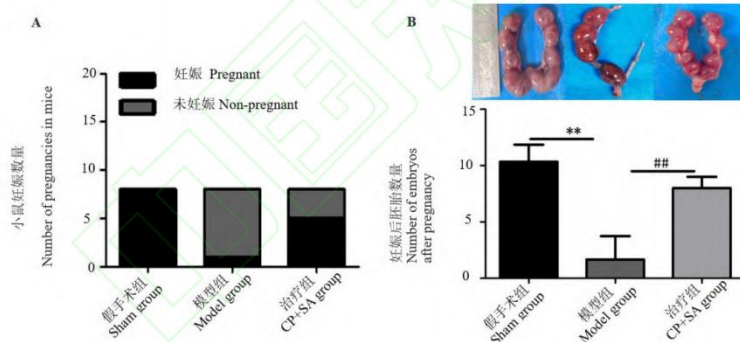
图 4 各组小鼠血清中 IL-1β 和 IL-18 的分泌水平

Note. A. Serum IL-1β secretion level. B. Serum IL-18 secretion level.

Figure 4 Secretion levels of IL-1β and IL-18 in serum of mice in each group

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：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^[6,17]。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、子宫球囊支架、生物屏障、干细胞移植以及药物综合治疗等^[18]。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^[19-20]。SA 作为一种从褐藻中获得的一种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^[13,21]。

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,观察 CP 和 SA 联合应用对子宫内修复的影响。结果显示,与假手术组相比,模型组小鼠子宫内明显受损,子宫内腺体数量减少,子宫内呈现纤维化改变,符合临床 IUA 特征。与模型组相比,CP 和 SA 治疗组小鼠子宫内损伤程度明显改善,子宫内腺体数量明显增加,且子宫内纤维化程度减轻。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^[22-24]。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^[14,25]。胶原蛋白肽混合物可通过降低炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的水平促进糖尿病小鼠的创面愈合^[14]。载药 SA 水凝胶可通过抑制巨噬细胞的聚集降低炎症反应^[26]。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 β 和 IL-18^[27]。本研究结果显示,与假手术组相比,IUA 模型小鼠子宫组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达水平显著升高,血清中 IL-1 β 和 IL-18 的水平也显著升高。与模型组比较,CP 和 SA 治疗组小鼠子宫组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达水平不同程度降低,血清中 IL-1 β 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 β 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 β 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损伤后的炎症反应,加速子宫内修复,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] Salomonsen 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- β /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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 郭罗培, 隋龙. 子宫内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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Fu J, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316.
- [10] Schieffer L, Manzi 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- κ 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.
- [17] 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, Świetlik 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-dihydroxy-docosahexaenoic 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 in fusion 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 Zn²⁺-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.

附件 2:

业盟基金科研课题结项报告

新乡医学院

横向科研项目结题报告

项目编号: 1102020002

项目名称: 胶原蛋白研发

起止时间: 2020.06-2022.08

项目负责人(签名): 孙永琨

所在学院: 基础医学院

联系电话: 13937388281

新乡医学院 科技成果转化服务中心

项目名称		胶原蛋白研发					
项目委托方		南通新材料股份有限公司/江苏雅盟新材料有限公司					
计划完成时间		2022 年 8 月		实际完成时间		2022 年 8 月	
合同额 (万元)		30		到账额 (万元)		30	
最终成果形式 (可多选)		<input checked="" type="checkbox"/> 新产品 (新品种) / 新材料; <input checked="" type="checkbox"/> 新技术 / 新工艺; <input type="checkbox"/> 新装置 / 新仪器设备; <input type="checkbox"/> 标准 / 测试方法 / 临床指南 / 规范; <input type="checkbox"/> 原型样机; <input type="checkbox"/> 集成系统 / 计算机软件 / 集成电路布图设计; <input type="checkbox"/> 示范工程; <input type="checkbox"/> 技术支撑平台 (数据库和技术研发 / 推广 平台); <input type="checkbox"/> 专利; <input type="checkbox"/> 论文 / 著作 / 研究 (咨询) 报告; <input type="checkbox"/> 新理论 / 新原理 / 新方法; <input type="checkbox"/> 应用解决方案; <input type="checkbox"/> 其他形态。					
成果转化/ 应用情况 (单选)		<input type="checkbox"/> 产业化应用 <input checked="" type="checkbox"/> 小批量或小范围应用 <input type="checkbox"/> 试用 <input type="checkbox"/> 未应用 <input type="checkbox"/> 不适宜转化 / 应用					
课题组成员情况	姓名	部门	学位 (学历)	职称	年龄	学科专长	课题分工
	孙永琨	基础医学院	博士 (博 士 研 究 生)	副 教 授	41 岁	再生医用 材料与基 础医学	主持
	闫冬	基础医学院	博士 (博 士 研 究 生)	讲师	36 岁	再生医用 材料与基 础医学	成员
	王淑贤	基础医学院 / 三全学院	学士 (本 科)	硕 士 生 / 助 教	34 岁	再生医用 材料与基 础医学	成员
	程怡怡	基础医学院	学士 (本 科)	硕 士 生	32 岁	再生医用 材料与基 础医学	成员
	宋振峰	基础医学院	学士 (本 科)	硕 士 生	33 岁	再生医用 材料与基 础医学	成员

项目研究总结报告（最终成果是否达到预期目的，最终成果简介）：

本项目分两期签署合同，一期合同编号、二期合同编号分别为 2020410707000035、2022410717000048，均经过河南省技术合同认定登记。受委托项目在项目起止时间内，进展顺利，已达到预期目的。相关成果为委托公司及长城汽车相关胶原蛋白产品研发及产业化生产提供了新材料、新技术和新工艺，并为委托公司新增销售收入 925 万元、利润 341 万元。

项目负责人签字：



2022 年 11 月 09 日

项目委托方验收意见（项目是否按时完成、是否达到预期目标、成果使用情况等）：

委托项目已按时完成，已达到预期目标，成果在 2021 年 6 月长城汽车第 8 届科技节等进行胶原蛋白研发产品推广，已为本公司新增销售收入 925 万元，新增利润 341 万元，同意验收。

委托方签字：



（公章）

2022 年 11 月 09 日

科技成果转化服务中心意见：

负责人签字：




年 月 日