

# 长期吸入低浓度七氟醚孕鼠子宫内膜细胞间黏附分子1及基质金属蛋白酶9的表达

舒蕊<sup>1</sup>, 张成明<sup>2</sup>, 张如意<sup>1</sup>, 刘金倩<sup>1</sup>, 宋立娟<sup>1</sup>, 静广建<sup>1</sup>, 于飞<sup>1</sup>

<https://doi.org/10.12307/2023.515>

投稿日期: 2022-07-06

采用日期: 2022-08-24

修回日期: 2022-10-14

在线日期: 2022-11-05

中图分类号:

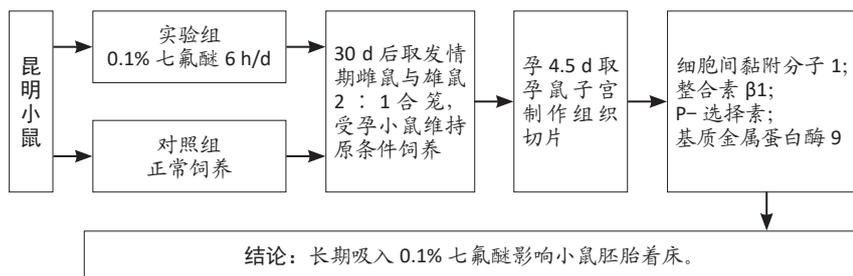
R459.9; R318; R135

文章编号:

2095-4344(2023)28-04456-06

文献标识码: B

文章快速阅读: 低浓度七氟醚染毒致胚胎植入障碍的机制



文题释义:

**七氟醚:** 无色透明, 带香味, 无刺激性液体, 对呼吸道刺激小, 血/气分配系数仅0.63, 诱导迅速, 且组织摄取少, 苏醒较快, 麻醉深度易掌握, 同时对心肌刺激性较轻, 血流动力学稳定, 镇痛效果良好, 是临床上最常见的吸入用麻醉药之一。

**孕鼠子宫内膜:** 在雌、孕激素的作用下, 发生一系列与胚泡发育同步的且有利于胚泡着床的形态结构改变, 构成良好的着床微环境, 使胚泡顺利着床。其发育分化过程及胚胎植入过程中还受重要的细胞因子或酶类影响, 如细胞间黏附分子1、整合素β1、P-选择素及基质金属蛋白酶9等。

摘要

**背景:** 流行病学研究显示, 长期吸入七氟醚废气的女性工作者其生育能力降低, 流产及胎儿畸形的发生率增高。

**目的:** 模拟长期暴露于七氟醚废气的工作环境, 通过观察低浓度七氟醚染毒孕鼠子宫内膜细胞间黏附分子1、整合素β1、P-选择素、基质金属蛋白酶9的表达, 来探讨低浓度七氟醚染毒致胚胎植入障碍机制。拟为临床安全用药、职业防护提供依据, 为下一步从基因水平、分子水平研究吸入麻醉药物对胚胎着床影响的机制奠定基础。

**方法:** 雌性昆明小鼠40只, 雄性昆明小鼠16只, 6周龄, 体质量(20±2) g, 分笼饲养。40只雌鼠随机分为2组, 实验组每天持续吸入0.1%七氟醚6 h, 对照组正常饲养。30 d后取发情期雌鼠与性成熟雄鼠2:1合笼, 合笼第2日晨7:00观察雌鼠是否受孕。受孕雌鼠维持原条件饲养(每组受孕小鼠n≥8)。孕4.5 d取子宫制作组织切片, 经过免疫组化染色, 分析并统计子宫内膜组织中细胞间黏附分子1、整合素β1、P-选择素、基质金属蛋白酶9的表达, 并计算阳性反应物的平均积分吸光度值。

**结果与结论:** ①实验组、对照组分别有17, 15只雌鼠先后进入发情期; 合笼后两组分别有12, 10只雌鼠发现阴栓; 孕4.5 d解剖发现, 两组分别有5, 2只雌鼠为假孕, 故实验组、对照组分别有7, 8只雌鼠怀孕, 实验组空缺数值用本组平均值代替, 进行后续对照实验; ②免疫组化结果显示, 所有孕鼠子宫内膜(腺上皮细胞、腔上皮细胞及基质细胞)均有棕黄色阳性着色, 但实验组孕鼠子宫内膜细胞间黏附分子1、整合素β1、P-选择素、基质金属蛋白酶9的阳性表达(0.019±0.007, 0.017±0.007, 0.015±0.005, 0.012±0.005)分别低于对应对照组(0.032±0.014, 0.025±0.008, 0.021±0.007, 0.023±0.005), 差异有显著性意义(P<0.05); ③提示长期吸入0.1%七氟醚影响小鼠胚胎与子宫内膜的黏附及胚胎着床, 可能与七氟醚通过抑制子宫内膜细胞间黏附分子1、整合素β1、P-选择素、基质金属蛋白酶9的表达有关, 造成子宫内膜的局部免疫调节过程失衡, 滋养层细胞侵入子宫内膜及子宫内膜蜕膜化过程受到抑制, 同时血管内皮破损而致血流产等。

**关键词:** 七氟醚; 细胞间黏附分子1; 整合素β1; P-选择素; 基质金属蛋白酶9

**缩略语:** 细胞间黏附分子1: intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1; 基质金属蛋白酶9: matrix metalloproteinase-9, MMP-9

## Expression of intercellular cell adhesion molecule 1 and matrix metalloproteinase 9 in endometrium of pregnant mice with long-term exposure to low concentration of sevoflurane

Shu Rui<sup>1</sup>, Zhang Chengming<sup>2</sup>, Zhang Ruyi<sup>1</sup>, Liu Jinqian<sup>1</sup>, Song Lijuan<sup>1</sup>, Jing Guangjian<sup>1</sup>, Yu Fei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Weifang Medical University, Weifang 261042, Shandong Province, China

<sup>1</sup>滨州医学院附属医院麻醉科, 山东省滨州市 256603; <sup>2</sup>潍坊医学院, 山东省潍坊市 261042

第一作者: 舒蕊, 女, 1985年生, 山东省博兴县人, 汉族, 2012年潍坊医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事临床麻醉与女性生殖健康方面的研究。

通讯作者: 静广建, 硕士, 主治医师, 滨州医学院附属医院麻醉科, 山东省滨州市 256603,

<https://orcid.org/0000-0003-4275-6642>(舒蕊)

基金资助: 国家自然科学基金(81900269), 项目负责人: 于飞; 滨州医学院“临床+X”项目(BY2021LCX28), 项目负责人: 静广建

引用本文: 舒蕊, 张成明, 张如意, 刘金倩, 宋立娟, 静广建, 于飞. 长期吸入低浓度七氟醚孕鼠子宫内膜细胞间黏附分子1及基质金属蛋白酶9的表达[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(28):4456-4461.



Shu Rui, Master, Attending physician, Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China

**Corresponding author:** Jing Guangjian, Master, Attending physician, Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Epidemiological studies have found that female workers who are exposed to waste sevoflurane for a long time have reduced fertility and increased incidence of abortion and fetal deformity.

**OBJECTIVE:** To imitate the working environment of long-term exposure to waste sevoflurane and investigate the mechanism of embryo implantation disorder induced by low-concentration sevoflurane exposure by observing the expression of intercellular adhesion molecule 1, integrin  $\beta 1$ , P-selectin, and matrix metalloproteinase 9 in endometrium of pregnant mice exposed to low concentrations of sevoflurane, attempting to provide a basis for clinical safe drug use and occupational protection and to lay a foundation for further research on the mechanism of inhalation anesthetics on embryo implantation at gene and molecular levels.

**METHODS:** Forty female Kunming mice and sixteen male Kunming mice, aged 6 weeks, weighting (20 $\pm$ 2) g, were caged separately. Forty female mice were randomly divided into experimental group and control group. Mice in the experimental group were exposed to 0.1% sevoflurane, 6 hours per day, while those in the control group were exposed to the air. Thirty days later, the female mice in estrus were caged with mature male mice at a rate of 2:1. Whether the female mice were pregnant was observed at 7:00 am on the second day after mating. The pregnant mice were kept independently in the original condition ( $n \geq 8$  pregnant mice in each group). Mouse uterus on day 4.5 of gestation was removed and sliced for histological observation. The expression of intercellular adhesion molecule 1, integrin  $\beta 1$ , P-selectin, and matrix metalloproteinase 9 in endometrial tissue was detected by immunohistochemistry and statistically analyzed. The average integrated absorbance value of positive reactants was calculated.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In the experimental and control groups, 17 and 15 female mice were respectively found in estrus; 12 and 10 female mice respectively were found vaginal plugs after mating. Five and two female mice were found pseudopregnant on day 4.5 of gestation in the experimental and control groups, respectively. Therefore, there were 7 and 8 pregnant mice in the experimental and control groups, respectively, and the vacant value in the experimental group was replaced by the average value obtained in the same group, which would be subsequently used in the controlled trial. Immunohistochemical results showed that the endometrium (glandular epithelial cells, luminal epithelial cells and stromal cells) of all pregnant mice were positively stained brownish yellow, but the expressions of intercellular adhesion molecule 1, integrin  $\beta 1$ , P-selectin, and matrix metalloproteinase 9 (0.019 $\pm$ 0.007, 0.017 $\pm$ 0.007, 0.015 $\pm$ 0.005, 0.012 $\pm$ 0.005) in the experimental group were significantly lower than those in the control group (0.032 $\pm$ 0.014, 0.025 $\pm$ 0.008, 0.021 $\pm$ 0.007, 0.023 $\pm$ 0.005) ( $P < 0.05$ ). All these findings indicate that long-term exposure to 0.1% sevoflurane may affect the adhesion of mouse embryos to endometrium and the embryo implantation, which may be related to the inhibitory effects of sevoflurane on the expressions of intercellular adhesion molecule 1, integrin  $\beta 1$ , P-selectin, and matrix metalloproteinase 9, causing the imbalance in endometrial immunoregulation, the invasion of trophoblast cells into the endometrium and the inhibition of endometrial decidualization, and miscarriage and bleeding due to damaged vascular endothelium.

**Key words:** sevoflurane; intercellular adhesion molecule 1; integrin  $\beta 1$ ; P-selectin; matrix metalloproteinase 9

**Funding:** National Natural Science Foundation of China, No. 81900269 (to YF); Binzhou Medical University "Clinical + X" Project, No. BY2021LCX28 (to JGJ)

**How to cite this article:** SHU R, ZHANG CM, ZHANG RY, LIU JQ, SONG LJ, JING GJ, YU F. Expression of intercellular cell adhesion molecule 1 and matrix metalloproteinase 9 in endometrium of pregnant mice with long-term exposure to low concentration of sevoflurane. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(28):4456-4461.

## 0 引言 Introduction

吸入麻醉药现已在临床麻醉中广泛应用, 由于其有挥发性, 且有效的废气回收装置尚未完全应用于临床, 在吸入麻醉药使用过程中, 手术室医护人员可以吸入并在体内蓄积<sup>[1]</sup>, 进而导致肝脏、肾脏、神经系统以及生殖系统的慢性病理生理影响<sup>[2-6]</sup>。七氟醚具有化学性质稳定、呼吸道刺激小、血流动力学影响小等特点, 是目前临床上最常用的吸入麻醉药之一。流行病学研究显示, 长期吸入七氟醚废气的女性工作者, 其生育能力降低, 自然流产风险上升及胎儿畸形的发生率高于未暴露于麻醉废气中的女性工作者<sup>[7]</sup>。黏附分子介导细胞与细胞之间、细胞与细胞外介质之间的识别与结合, 并参与细胞内外信息传递。与胚泡植入和胚胎发育有关的黏附分子包括细胞间黏附分子 1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、整合素  $\beta 1$ 、P-选择素等。基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 是细胞外基质降解的主要介质, 与子宫内膜接受态的建立及蜕膜化过程有关, 且参与滋养细胞的侵入过程。此次研究模拟长期吸入低浓度七氟醚环境, 通过观察染毒孕鼠(暴露组孕鼠) 子宫内膜 ICAM-1、整合素  $\beta 1$ 、P-选择素、MMP-9 的表达, 来探讨低浓度七氟醚染毒致胚胎植入障碍的机制, 为下一步从基因水平、分子水平研究吸入麻醉药物对胚胎发育影响的机制奠定基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验, 采用独立样本  $t$  检验。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 11 月至 2022 年 3 月于滨州医学院麻醉学实验室(滨州)完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 6 周龄 SPF 级健康昆明小鼠雌性 40 只, 雄性小鼠 16 只, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 分笼饲养, 由山东鲁抗医药股份有限公司实验动物室提供, 许可证号: SYXC(鲁)20190003。小鼠分笼饲养 1 周以适应环境, 观察动物进食、活动、粪便、毛发等情况。饲养环境通风清洁, 温度 21-25  $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 45%-55%, 明暗周期为 12 h/12 h(8: 00 开灯, 20: 00 关灯)。供给充足的饮水和全营养饲料。

1.3.2 试剂及仪器 七氟醚(上海恒瑞医药有限公司); 甲醛、无水乙醇、体积分数 95% 乙醇、丙酮、盐酸、乙醚(烟台三合化学试剂有限公司), 二甲苯(莱阳经济技术开发区精细化工厂), APES、PBS(北京中杉金桥生物技术有限公司), 柠檬酸钠( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、枸橼酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )(天津市凯通化学试剂有限公司), 石蜡(上海懿洋仪器有限公司), 胰蛋白酶(郑州市安盛生物科技有限公司), 龙胆紫(天津市博迪化工有限公司), 蒸馏水(滨州医学院附属医院医学研究中心); MMP-9 抗体、整合素  $\beta 1$  抗体、ICAM-1 抗体、P-选择素抗体(北京博奥森生物技术有限公司), 兔超敏二步法

免疫组化检测试剂、浓缩型 DAB 试剂盒、防脱载玻片 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

体积分数 10% 的中性甲醛 (体积分数 40% 甲醛 10 mL, 加入 0.01 mol/L PBS 90 mL 中, 混匀)。0.01 mol/L 枸橼酸钠溶液 (现用现配: 枸橼酸三钠 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O) 3.0 g, 枸橼酸 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O) 0.4 g, 蒸馏水 1 000 mL, 盐酸溶液调 pH 至 6.0)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 分组 6 周龄雌性昆明小鼠 40 只, 按随机数字表法随机分为实验组和对照组, 每组 20 只。性成熟雄性小鼠 16 只, 注意体质量均匀、单独饲养, 实验前雄性小鼠长期禁欲。动物实验按照实验动物护理原则进行 (美国国家卫生研究院出版物第 1 号), 所有动物实验程序均由滨州医学院附属医院伦理委员会批准, 批准号: 20211008-2。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.4.2 造模及取材 实验组每天持续吸入 0.1% 七氟醚 6 h, 对照组正常饲养, 共 30 d。雄性小鼠正常饲养 30 d 后取发情期雌鼠与性成熟雄鼠 2 : 1 合笼, 合笼第 2 日晨 7: 00 观察雌鼠阴栓以确定是否受孕, 发现阴栓者记为孕 0.5 d。各组雌鼠维持原条件饲养, 确保每组怀孕小鼠 n=8 或以上。

#### 组织工程实验动物造模过程中的相关问题:

造模目的	探讨对七氟醚废气女性生殖功能的影响
选择动物的条件	抗病力和适应力强, 繁殖率和成活率高, 价格便宜
模型与所研究疾病的关系	建立长时间吸入低浓度七氟醚孕鼠模型, 探讨低浓度七氟醚染毒致胚胎植入障碍机制
动物来源及品系	SPF 级昆明小鼠, 购自山东鲁抗医药股份有限公司实验动物室
造模技术描述	实验组每天持续吸入 0.1% 七氟醚 6 h, 对照组正常饲养, 共 30 d。雄性小鼠正常饲养。30 d 后取发情期雌鼠与性成熟雄鼠 2 : 1 合笼, 合笼第 2 日晨 7: 00 观察雌鼠阴栓以确定是否受孕, 发现阴栓者记为孕 0.5 d。各组雌鼠维持原条件饲养至孕 4.5 d
动物数量及分组方法	6 周龄 SPF 级雌性健康昆明小鼠 40 只, 随机分为实验组和对照组, 每组 20 只; 雄性小鼠 16 只
造模成功评价指标	吸入七氟醚时间达标, 孕 0.5 d 有阴栓, 孕 4.5 d 剖腹, 子宫中有胚胎
造模后观察指标	子宫内组织细胞间黏附分子 1、整合素 β1、P- 选择素及基质金属蛋白酶 9 的表达, 并计算阳性反应物的平均积分吸光度值
造模后动物处理	实验组、对照组受孕小鼠在孕 4.5 d 行乙醚麻醉, 颈椎脱臼处死, 迅速打开腹腔, 寻找子宫, 显微器械将子宫与周围组织分离, 从子宫 Y 行分叉向输卵管分离, 将分离好的带有 4.5 d 胚胎的子宫轻柔断成长约 0.5 cm 的标本
伦理委员会批准	实验通过滨州医学院附属医院伦理委员会批准, 审批号: 20211008-2

两组受孕小鼠在孕 4.5 d 行乙醚麻醉, 将被乙醚浸湿的纱布置入大烧杯, 将小鼠放入, 密封, 观察小鼠卧倒、肌肉紧张度降低后取出, 颈椎脱臼处死, 迅速打开腹腔, 寻找子宫, 显微器械将子宫与周围组织分离, 从子宫 Y 行分叉向输卵管分离, 将分离好的带有 4.5 d 胚胎的子宫轻柔的断成长约 0.5 cm 的标本。

1.4.3 组织切片制备 冷盐水冲洗标本, 后置于体积分数 10% 中性甲醛中固定, 流水冲洗两小时。于乙醇及二甲苯中进行脱水透明, 后浸蜡包埋, 切片后烤片。标本脱蜡入水, 消除内源性过氧化酶, 滴加一抗 (抗体浓度 1 : 300-500), 滴加试剂 1(Polymer Helper), 滴加试剂 2(poly-HRP anti-IgG), DAB 染色, 复染后脱水透明, 中性树脂胶封固。阴性对照以 PBS 代替一抗, 其余步骤相同。

1.5 主要观察指标 免疫组化切片采用 CMIAS 多功能真彩图像分析系统进行分析, 检测小鼠子宫内腔 ICAM-1、整合素 β1、MMP-9 和 P- 选择素水平的变化, 切片以子宫内腔组织中腔上皮细胞、腺上皮细胞及基质细胞胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。使用 Imagepro-plus 6.0 对免疫组化图片进行分析, 计算平均积分吸光度值 (IA), 每只孕鼠选 10 个视野 (每只选 2 张切片, 每张切片取 5 个视野) 分别测量, 然后计算吸光度值的均数作为该孕鼠的 IA 值。

1.6 统计学分析 所有数据使用 SPSS 19.0 统计软件进行数据统计, 采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用独立样本 t 检验, P < 0.05 认为差异有显著性意义。此文的统计学方法得到滨州医学院的统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验组、对照组分别有 17, 15 只雌鼠先后进入发情期, 给予雌鼠与雄鼠 2 : 1 合笼, 两组分别有 12, 10 只雌鼠发现阴栓, 孕 4.5 d 解剖发现, 两组分别有 5, 2 只雌鼠为假孕, 故实验组、对照组分别有 7, 8 只雌鼠怀孕, 实验组空缺数值用本组平均值代替, 进行后续对照实验。

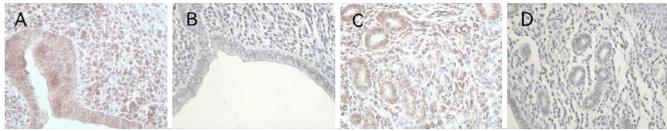
2.2 各组小鼠免疫组化指标的比较 免疫组化结果显示, 所有孕鼠子宫内腔 (腺上皮细胞、腔上皮细胞及基质细胞) 均有棕黄色阳性着色, 但长期吸入低浓度七氟醚后, 实验组孕鼠子宫内腔 ICAM-1、整合素 β1、P- 选择素、MMP-9 阳性表达均低于对应对照组 (P < 0.05), 差异有显著性意义, 见表 1。

表 1 | 各组孕鼠免疫组化指标的比较 (x̄±s, n=8)  
Table 1 | Comparison of immunohistochemical indexes of pregnant mice between groups

指标	对照组	实验组
细胞间黏附分子 1	0.032±0.014	0.019±0.007 <sup>a</sup>
整合素 β1	0.025±0.008	0.017±0.007 <sup>a</sup>
P- 选择素	0.021±0.007	0.015±0.005 <sup>a</sup>
基质金属蛋白酶 9	0.023±0.005	0.012±0.005 <sup>b</sup>

表注: 实验组缺少数值者以本组平均值代替。与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01

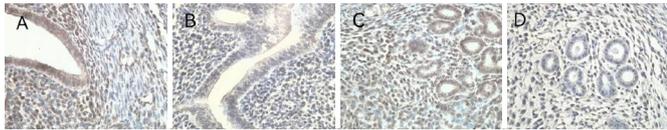
2.3 免疫组化结果 ICAM-1、整合素 β1、P- 选择素、MMP-9 在所有孕鼠子宫内腔的腔上皮细胞、腺上皮细胞及基质细胞中均有表达, 胞浆呈棕黄色, 为阳性染色。在对照组中, 孕鼠子宫内腔腔上皮细胞、腺上皮细胞及基质细胞胞浆中均有大量棕黄色阳性着色, 而相对应的实验组孕鼠子宫内腔的腔上皮细胞、腺上皮细胞及基质细胞中, 棕黄色阳性染色较各自对照组明显减少, 见图 1-4。



图注：图 A, B 为对照组、实验组孕 4.5 d 小鼠子宫内腔上皮细胞及基质细胞；图 C, D 为对照组、实验组孕 4.5 d 小鼠子宫内腔腺上皮细胞及基质细胞

图 1 | 两组孕鼠子宫内腔上皮细胞、腺上皮细胞及基质细胞中细胞间黏附分子 1 的表达 (免疫组化染色,  $\times 400$ )

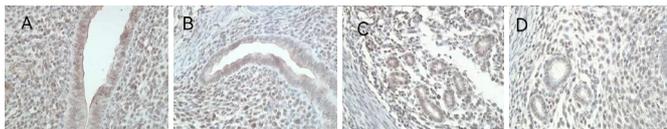
Figure 1 | Expression of intercellular adhesion molecule 1 in endometrial epithelial cells, glandular epithelial cells and stromal cells in pregnant mice (immunohistochemical staining,  $\times 400$ )



图注：图 A, B 为对照组、实验组孕 4.5 d 小鼠子宫内腔上皮细胞及基质细胞；图 C, D 为对照组、实验组孕 4.5 d 小鼠子宫内腔腺上皮细胞及基质细胞

图 2 | 两组孕鼠子宫内腔上皮细胞、腺上皮细胞及基质细胞中整合素  $\beta 1$  的表达 (免疫组化染色,  $\times 400$ )

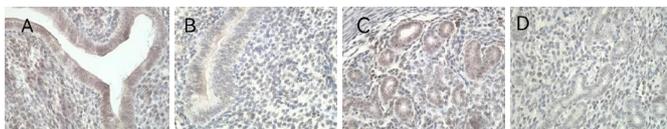
Figure 2 | Expression of integrin  $\beta 1$  in endometrial epithelial cells, glandular epithelial cells and stromal cells in pregnant mice (immunohistochemical staining,  $\times 400$ )



图注：图 A, B 为对照组、实验组孕 4.5 d 小鼠子宫内腔上皮细胞及基质细胞；图 C, D 为对照组、实验组孕 4.5 d 小鼠子宫内腔腺上皮细胞及基质细胞

图 3 | 两组孕鼠子宫内腔上皮细胞、腺上皮细胞及基质细胞中 P-选择素的表达 (免疫组化染色,  $\times 400$ )

Figure 3 | Expression of P-selectin in endometrial epithelial cells, glandular epithelial cells and stromal cells in pregnant mice (immunohistochemical staining,  $\times 400$ )



图注：图 A, B 为对照组、实验组孕 4.5 d 小鼠子宫内腔上皮细胞及基质细胞；图 C, D 为对照组、实验组孕 4.5 d 小鼠子宫内腔腺上皮细胞及基质细胞

图 4 | 两组孕鼠子宫内腔上皮细胞、腺上皮细胞及基质细胞中基质金属蛋白酶 9 的表达 (免疫组化染色,  $\times 400$ )

Figure 4 | Expression of matrix metalloproteinase 9 in endometrial epithelial cells, glandular epithelial cells and stromal cells in pregnant mice (immunohistochemical staining,  $\times 400$ )

### 3 讨论 Discussion

研究表明, 长期吸入 0.1% 七氟醚可干扰胚胎着床, 增加流产概率, 影响受精卵向桑葚胚及囊胚的转变, 减缓胚胎的发育, 影响雌性小鼠生殖功能<sup>[8]</sup>, 但其具体机制尚不清楚,

目前相关报道仍然较少。根据前期实验结果<sup>[8]</sup>, 此次实验继续选用 0.1% 七氟醚浓度环境, 对长期吸入的雌性小鼠进行交配受孕, 观察孕鼠子宫内膜 ICAM-1、整合素  $\beta 1$ 、P-选择素、MMP-9 变化。

胚泡着床包括胚泡在子宫内膜迁移、定位、黏附、侵入等过程<sup>[9]</sup>。胚胎发育过程中, 子宫内膜容受性以及滋养层的黏附性都受到各种调节因子调节<sup>[10-12]</sup>。除雌、孕激素对胚胎着床的过程进行精细调节之外, 一些细胞因子也可以通过自分泌方式或旁分泌方式来实现其对胚胎着床及胚胎侵入过程的调控。ICAM-1、整合素  $\beta 1$ 、P-选择素及 MMP-9 都是子宫内膜发育分化过程及胚胎植入过程中呈现出的重要细胞因子或酶类, 它们是子宫内膜容受性形成过程中非常重要的影响因素<sup>[13-14]</sup>。ICAM-1(CD54) 是一种黏附分子<sup>[15]</sup>, 在滋养层细胞中有表达, 它在子宫蜕膜细胞及滋养层细胞的表达与胚胎着床的发生有着密切相关性, 在母、胎细胞群的相互作用中也发挥了生理功能<sup>[16]</sup>, 可能与胚胎着床过程以及胚泡的黏附过程有关<sup>[17]</sup>, 介导胚胎着床过程中子宫内膜容受性建立及胚泡黏附<sup>[18-19]</sup>。ICAM-1 能与细胞表达的  $\beta$ -整合素配体 (如 LFA-1、Mac-1 等) 结合, 调节细胞之间的黏附过程。研究证明 ICAM-1 定位于子宫内膜腺上皮细胞的顶端、子宫基质细胞和子宫内膜上皮细胞中。小鼠在孕四五天发生胚泡的着床, 而孕 4 d 正是胚胎在子宫腔定位、黏附的关键时期, 而此时, 在孕早期绒毛膜和蜕膜的血管内皮细胞上都有 ICAM-1 mRNA 的表达<sup>[20]</sup>, 孕 4 d 达到最高峰<sup>[21-22]</sup>。由于此期 ICAM-1 的表达量最高, 故推测在早孕期胚泡黏附与着床过程中 ICAM-1 进行了重要参与<sup>[23]</sup>, 它可以作为种植窗的一种分子标志物。此次实验中, 实验组小鼠子宫内膜 ICAM-1 的表达量明显低于对照组, 表明长期吸入低浓度七氟醚影响了胚泡的黏附与着床过程。

子宫内膜中整合素  $\beta 1$  是胚胎植入的重要成员<sup>[24]</sup>, 其表达与卵巢的周期性变化呈现一致性, 子宫内膜增生早期整合素  $\beta 1$  只在子宫内膜腺上皮中表达, 而分泌中期间质细胞也开始表达整合素  $\beta 1$ , 而到植入窗时整合素  $\beta 1$  的表达增加并一直持续到妊娠早期。有研究发现, 胚泡着床期整合素  $\beta 1$  的表达亦增强<sup>[25]</sup>, 在孕 3 d 时开始在子宫基质细胞中有阳性表达, 至孕 4 d 最强, 子宫腔上皮、腺上皮及基质细胞均呈强阳性表达<sup>[26]</sup>, 表明子宫内膜与胚泡滋养层细胞的识别、定位、黏附及侵入过程中极可能有整合素  $\beta 1$  的参与, 可能与整合素参与介导了植入前基质细胞向前蜕膜细胞转变的过程有关系<sup>[27-28]</sup>。整合素  $\beta 1$  可能与由胚胎滋养层细胞分泌产生的细胞外基质相互作用、黏附, 从而介导参与了胚胎细胞外基质的构建, 进一步在滋养层细胞的发育及分化中产生影响, 最终促进滋养层细胞的浸润和迁移过程<sup>[11]</sup>。同时作为细胞外基质受体的主要成员整合素  $\beta 1$ , 植入前子宫内膜基质细胞能够调控其合成及其表达, 进而参与了细胞周围基膜的形成, 同时参与了子宫内膜细胞外基质的重建, 最终整合素  $\beta 1$  为胚胎着床作好准备。此次实验中选择整合素  $\beta 1$  在实验

组中小鼠子宫内膜结构的表达量明显低于对照组, 亦能说明七氟醚的长期吸入可能影响了胚泡与子宫内膜的黏附与胚泡着床, 即可能造成孕鼠最终流产等严重后果。

胚胎的发育依赖于滋养细胞黏附到子宫血管和母体血液转移到胎盘, 滋养细胞黏附过程又是一个整合素依赖的过程<sup>[29]</sup>。P-选择素又称血小板活化依赖性颗粒表面膜蛋白, 属跨膜糖蛋白, 表达于内皮细胞及血小板上<sup>[30-31]</sup>。P-选择素已证实其在受精的起始阶段发挥着重要作用, P-选择素及其配体之间的相互作用对滋养细胞在蜕膜螺旋小动脉内迁移具有重要意义<sup>[29]</sup>。当机体受到物理或生理刺激作用时, 正常血液循环中处于静息状态的血小板, 受到激活并发生变形、黏附、聚集与释放反应, 其在生理性凝血或病理性血栓的形成过程中发挥了重要作用。正常妊娠期妇女在孕中、晚期凝血因子增高、纤溶系统活力降低及抗凝机制减弱, 使得血液处于高凝状态。而妊娠期妇女P-选择素含量增高<sup>[32]</sup>, 推测P-选择素可能在胚泡植入过程中高表达, 可能与防止因血管内皮破损而导致的流血现象发生有关<sup>[33]</sup>。实验组孕鼠子宫内膜中P-选择素的表达低于正常对照组, 表明P-选择素未能正常表达, 因而不能激活血小板发挥凝血作用, 孕鼠则易出现流产现象。

MMP-9 是 MMPs 家族中一种相对分子质量较大的明胶酶, 正常情况下, MMP-9 在子宫内膜增生期、分泌早期、分泌晚期分泌增多, 在内膜的“种植窗期”即孕 4 d 达到顶峰<sup>[34]</sup>, 其参与胚胎的着床过程, 可促进子宫内膜修复与生长, 降解内膜细胞外基质, 调节滋养层细胞的侵袭, 利于胚胎着床<sup>[35-38]</sup>, MMP-9 调节胚泡滋养层细胞降解并侵入子宫内膜及子宫内膜蜕膜化过程<sup>[27]</sup>; 促进新生血管形成, 较快建立子宫胎盘血液循环<sup>[39]</sup>。同时, 着床期前后 MMP-9 分泌入腺腔及宫腔液中, 与胚胎识别有关。MMP-9 是妊娠不可缺少的细胞因子之一, 是胚胎滋养细胞侵入过程的限速酶<sup>[40]</sup>, 是胚泡植入的侵入性标志。研究发现, 敲除 MMP-9 基因的小鼠生殖能力下降, 表现为受孕率减低、胚胎不能发生植入、仔鼠体质量小等等。而此次实验中, MMP-9 在实验组小鼠子宫内膜中的表达明显低于对照组, 表明实验组胚泡在着床过程中, 滋养层细胞侵入子宫内膜及子宫内膜蜕膜化过程受到抑制, 推测七氟醚能阻碍小鼠胚泡的着床过程。

此次研究通过观察长期吸入 0.1% 七氟醚孕鼠子宫内膜 ICAM-1、整合素  $\beta 1$ 、P-选择素、MMP-9 的表达, 发现实验组孕鼠子宫内膜腺上皮细胞、腔上皮细胞及基质细胞中其表达量均低于相应对照组, 推测七氟醚可能通过抑制子宫内膜 ICAM-1、整合素  $\beta 1$ 、P-选择素、MMP-9 的表达, 使细胞之间的黏附过程受到抑制, 胚胎细胞外基质的构建不能顺利进行, 滋养层细胞的浸润和迁移过程受到影响, 子宫内膜的局部免疫调节过程失衡, 滋养层细胞侵入子宫内膜及子宫内膜蜕膜化过程受到抑制, 同时影响了滋养细胞在蜕膜螺旋小动脉内迁移过程, 致血管内皮破损而致流血, 最终影响胚胎与子宫内膜的黏附及着床。此次实验只研究了 0.1% 七氟醚对

孕鼠子宫内膜及胚胎着床的影响, 但长期吸入低于 0.1% 浓度的七氟醚是否也具有该作用未进行研究, 对其发生机制仍不清楚, 需大量实验进行进一步的研究论证, 来证明长期暴露于七氟醚废气对手术室女性工作人员有无生殖功能的影响。

**作者贡献:** 实验设计为舒蕤、张成明, 实验实施为舒蕤、张如意、刘金倩、宋立娟, 实验资料分析为静广建、于飞, 文章撰写为舒蕤、静广建。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

#### 4 参考文献 References

- [1] MUSAK L, SMERHOVSKY Z, HALASOVA E, et al. Chromosomal damage among medical staff occupationally exposed to volatile anesthetics, antineoplastic drugs, and formaldehyde. *Scand J Work Environm Health*. 2013;39(6):618-630.
- [2] CASALE T, CACIARI T, ROSATI MV, et al. Anesthetic gases and occupationally exposed workers. *Environm Toxicol Pharmacol*. 2014; 37(1):267-274.
- [3] HUANG L, HUANG K, NING H. Hispidulin prevents sevoflurane-Induced memory dysfunction in aged rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;97: 412-422.
- [4] DOGRU S, DOGRU HY, BUTUN I, et al. Effects of sevoflurane on female reproductive functions in Wistar rats. *J Pakist Med Ass*. 2017;67(6):877.
- [5] MOLINA ARAGONES JM, AYORA A, BARBARA RIBALTA A, et al. Occupational exposure to volatile anaesthetics: A systematic review. *Occupat Med*. 2015;66(3):202-207.
- [6] TANKO B, MOLNAR L, FULESDI B, et al. Occupational hazards of halogenated volatile anesthetics and their prevention: Review of the literature. *J Anesth Clin Res*. 2014;5(7):1-7.
- [7] LUCIO LMC, BRAZ MG, DO NASCIMENTO JUNIOR P, et al. Occupational hazards, DNA damage, and oxidative stress on exposure to waste anesthetic gases. *Rev Bras Anesthesiol*. 2018;68:33-41.
- [8] 舒蕤, 张成明, 丁国建. 长期吸入低浓度七氟醚对雌性小鼠早期胚胎及妊娠结果的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2020;36(19):2625-2629.
- [9] 李大金. 生殖免疫学 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2008:119-148
- [10] SHARMA S, GODBOLE G, MODI D. Decidual Control of Trophoblast Invasion. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):341-350.
- [11] SOHN JO, PARK HJ, KIM SH, et al. Integrins expressed on the surface of human endometrial stromal cells derived from a female patient experiencing spontaneous abortion. *Hum Cell*. 2020;33(1):29-36.
- [12] BALCI M, ÖZDEMİR G. Differential Expression of EGFR-1, MMP-3, and MMP-9 in Spontaneous Abortions, Induced Abortions, and Tubal Pregnancies. *Turk Patoloji Derg*. 2019;35(1):1-8.
- [13] 张武文, 黄丽丽. 子宫内膜容受性相关调控因子的时序表达及功能 [J]. *国外医学 (妇产科学分册)*, 2007,34(1):12-15.

- [14] MATSUMOTO L, HIROTA Y, SAITO-FUJITA T, et al. A hypoxia-induced Rab pathway regulates embryo implantation by controlled trafficking of secretory granules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(25):14532-14542.
- [15] TANG B, WU K, MENG Q, et al. Comparison of the Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of Xiaoyuningkun Decoction with Cynanchum Paniculatum and Fukeqianjin in a Mouse Model of Pelvic Inflammatory Disease. *Med Sci Monit*. 2019;25:9094-9102.
- [16] SALAFIA CM, HEYNES N, MERLURZI VJ, et al. Distribution of ICAM-1 within decidual and placenta and 1st gestational age associated changes. *Pediatr Pathol*. 1991;11:381-388.
- [17] 张伟,周剑萍,张俊慧. 细胞间粘附分子-1 在着床前小鼠胚胎培养液中的表达 [J]. *生殖医学杂志*, 1999,3(8):33-36.
- [18] 郝翠芳,郎翠红,沈肖方,等. 不同浓度的瘦素在胚胎着床中对细胞间粘附分子-1 和金属蛋白酶-9 的影响 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2011,19(2):95-97.
- [19] LU DP, TIAN L, O'NEILL C, et al. Regulation of cellular adhesion molecule expression in murine oocytes,peri-implantation and post-implantation embryos. *Cell Res*. 2002;12(5-6):373-383.
- [20] DEFRERE S, VAN LA, MOULIN P, et al. Human endometrial cells (EEC) constitutively express more intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 than endometrial stromal cells (ESC) in culture. *Am J Reprod Immunol*. 2005;54(1):5.
- [21] 张伟,刘银坤. 细胞间黏附分子-1 在小鼠早孕期子宫内膜的表达规律及调节的研究 [J]. *生殖与避孕*, 2000,20(1):12-16.
- [22] 张伟,刘银坤. 小鼠孕早期子宫内膜 ICAM-1 mRNA 的表达及调节 [J]. *中国免疫学杂志*, 2000,16(12):678-680.
- [23] 盛敏,任春娥,韩海艳,等. 种植窗口期子宫内膜中 MMP-9、TIMP-1 及 ICAM-1 的表达与体外受精-胚胎移植妊娠结局的关系 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2012,22(8):1827-1830.
- [24] XIONG T, ZHAO Y, HU D, et al. Integrins  $\beta 1$  and  $\beta 3$  are biomarkers of uterine condition for embryo transfer. *J Transl Med*. 2016;14(1):303.
- [25] KANRKO Y, LINDSAY LA, MURPHY CR. Uterine focal adhesions are retained at implantation after rat ovarian hyperstimulation. *Reproduction*. 2016;152(6):753-763.
- [26] 谢芬芬. 植入前小鼠子宫内膜形态学及整合素  $\alpha 4$ 、 $\beta 1$  表达的研究 [D]. 合肥:安徽医科大学, 2008.
- [27] XU B, MAKRI A, LIU CC, et al. Galectin-1-Related Modulation of Trophoblast Endothelial Interactions by Integrins  $\alpha 1$  and  $\beta 1$ . *Reprod Sci*. 2020;27(5):1097-1109.
- [28] ERIKSON DW, BURGHARDT RC, BAYLESS KJ, et al.  $\beta(1)$  and  $\beta(3)$  integrins disassemble from basal focal adhesions and  $\beta(3)$  integrin is later localised to the apical plasma membrane of rat uterine luminal epithelial cells at the time of implantation. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23(3):481-495.
- [29] FENG Y, MA X, DENG L, et al. Role of selectins and their ligands in human implantation stage. *Glycobiology*. 2017;27(5):385-391.
- [30] 曾国良,彭健,张忠栋,等. P-选择素基因多态性与可溶性P选择素浓度、心房颤动血栓栓塞的相关性研究 [J]. *实用医学杂志*, 2009,25(11):1757-1760.
- [31] 李争,史俊玲,马立庆,等. 充血性心力衰竭患者体内血清选择素家族水平的变化 [J]. *实用医学杂志*, 2010,26(18):3364-3366.
- [32] KAUTZKY-WILLER A, FASCHING P, JILMA B, et al. VCAM-1, ICAM-1 and selectins in gestational diabetes mellitus and the risk for vascular disorders. *Future Cardiol*. 2019;15(5):339-346.
- [33] 王志萍. 二氧化硫对作业女工早期妊娠影响及其作用机理的研究 [D]. 济南:山东大学, 2005.
- [34] 高丽丽. Ley、Lex、MMP-2、MMP-9 和 TGF $\beta 1$  在妊娠 1-8 天小鼠子宫内膜的分布 [D]. 大连:大连医科大学, 2003.
- [35] 孟艳岑,张明敏,崔丹丹,等. 补肾、活血对超促排卵小鼠着床期间子宫内膜 MMP-2、MMP-9、TIMP-3 表达的影响 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2013,42(6):627-632.
- [36] HE Y, SUN Q. IFN- $\gamma$  induces upregulation of TNF- $\alpha$ , downregulation of MMP-2 and MMP-9 expressions in abortion rat. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(15):4762-4767.
- [37] BAGHERI D, KAZEMI P, SARMADI F, et al. Low oxygen tension promotes invasive ability and embryo implantation rate. *Reprod Biol*. 2018;18(3):295-300.
- [38] ZHANG S, MESALAM A, JOO MD, et al. Matrix metalloproteinases improves trophoblast invasion and pregnancy potential in mice. *Theriogenology*. 2020;151:144-150.
- [39] 张冬雅,郭红军,邱海峰. GnRH- $\alpha$  联合曼月乐治疗子宫腺肌症患者的疗效及对血清复发相关指标的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2019,35(1):84-87.
- [40] LEA RG, MCINTYRE S, BAIRD JD, et al. IFN- $\gamma$  induces upregulation of TNF- $\alpha$ , downregulation of MMP-2 and MMP-9 expressions in abortion rat. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(15):4762-4767.

(责任编辑:GD, ZN, ZJP)