基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0052-03

人子宫内膜异位症裸鼠模型的建立

王 佳[1],但 阳[1],张光金[1],姚珍薇[2]
(1. 重庆市妇幼保健院妇科,重庆 400014;2. 重庆医科大学附属第一医院,重庆 400016)

【摘 要】目的:为子宫内膜异位症的各项研究提供实验动物模型。方法:选择 6~8 周龄的雌性裸鼠,收集人在位子宫内膜种植于裸鼠腹腔,分别于种植后第 5 d、第 15 d、第 30 d 断颈处死裸鼠,观察子宫内膜种植生长情况和组织形态学变化。对照组:同法置入人大网膜。结果:种植成功率可达 100%。种植后第 5 d 见移植内膜与裸鼠盆、腹腔组织牢固粘附。光镜下见种植物与鼠间皮之间已出现新生的血管网,可见腺体,周围围绕着间质细胞。种植后第 15 d 见病灶与裸鼠组织呈融合状态,周围有血管生长,病灶呈实质性或囊肿样。光镜下见明显的子宫内膜腺体和间质,血液供应丰富。种植后第 30 天病灶萎缩变小,局部粘连较重。光镜下见纤维化严重,腺细胞不完整。对照组植人的大网膜组织部分粘连于腹壁切口,其余游离存在,并逐渐萎缩、吸收。光镜下除炎性反应外,大网膜组织结构无改变。结论:采用人在位子宫内膜构建裸鼠内异症在体模型,移植后的内膜组织仍保持原有的组织形态和生化特征,便于对子宫内膜细胞增殖、新血管形成、激素和免疫应答等机理进行充分的分析和研究。此模型性状显著且稳定,费用低、操作简单、观察周期短,是一种较理想的内异症在体模型。

【关键词】子宫内膜异位症;动物模型;裸鼠;人子宫内膜种植
【中国图书分类法分类号】R711.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-11

Estaldishment of a nude mouse model of endometriosis

WANG Jia, et al
(*Department of Chongqing Health Center for Women and Children*)

【Abstract】 *Objective*: To establish the experimental nude mouse model of endometriosis for human eutopic endometrium. *Methods*: Female nude mouse aged 6~8 weeks were selected. Nude mouse in experimental group(n=20)were implanted with the endometrium of patients with endometriosis or without endometriosis into pelvic and abdominal cavities. Nude mouse in control group(n=3)were implanted with the greater omentum. Nude mouse were killed at 5th, 15th, and 30th day after implantation for observ ation of the growth of endometriotic lesions. The morphological and histological changes of endometriotic lesions from diferent sources and at diferent time points of growth were examined by light microscopy. *Results*: The achievement ratio of transplantation was 100%. At the 5th day, endometriotic lesions were found in the pelvic and abdominal cavities, and the adhesion to mice tissues was already tight. There were nascent vascular net between endometriotic lesions and mice mesepithelium. Endometrial glands around with stroma cells were found under light microscope. At the 15th day, endometriotic lesions mixed with mice tissues. Endometriotic lesions presented parenchymatous and cystiform. A lot of endometrial glands and stroma cells with rich blood supply were seen under light microscope. At the 30th day, endometriotic lesions became atrophied, and the adhension was serve partly. Endometriotic lesions presented severe fibrosis and some endometrial cells were not in integrity under light microscope. In the control group, some of the greater omentum adhered to the incisal opening of abdominal wall, while the others were free and atrophied or merged gradually. There was no change in the constructed greater omentum except for some inflammatory reaction. *Conclusions*: Nude mouse model of endometriosis was good for studying the endometria cell proliferation, neovascularization, hormone, immune response and so on, since the implanted endometrium remain the original morphological and histological features. It is a perfect model of endometriosis because of its significant and steady character, low cost, simple operation and short observation cycle.

【Key words】 Endometriosis; Animal model; Nude mouse; Endometrial implantation

子宫内膜异位症多发于生育期妇女,临床症状主表现为痛经、不孕和性交痛等,因其具有恶性肿瘤的生物学行为,至今其发病机制仍不清楚。限制该疾病研究的 1 个主要原因是这种疾病仅发生于人类和灵长类动物。由于实际操作与伦理学方面的约束,很难在人体中进行内异症的对照研究,更不能反复进行创伤性检查。为更好地研究子宫内膜异位症的病因、发病机制、发生发展、治疗及预防策

作者介绍:王 佳(1969-),女,主治医师,博士,研究方向:妇科肿瘤与子宫内膜异位症。
通讯作者:姚珍薇,女,教授,E-mail:yzw03@sina.com。

略，需建立内异症的动物模型。因此本研究采用人在位内膜组织建立了内异症裸鼠动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本收集选择 2006 年 1 月至 2006 年 4 月在重庆医科大学附属第一医院妇产科因内异症、子宫肌瘤行子宫切除的患者 30 例，年龄 38~48 岁，平均年龄 44 岁，所有患者术前 3 个月均未用过激素治疗，分别为内异症组和非内异症组。在剖腹行子宫切除术后，无菌条件下刮取子宫内膜，置入 DF 培养液中，冰冻条件下 30 min 内送入重庆医科大学实验动物中心实验室。同时收集患者少量大网膜组织作为对照组。

1.1.2 动物选择 6~8 周龄的雌性裸鼠，体重 20~25 g，无菌条件下饲养。

1.1.3 主要试剂与设备 水合氯醛粉剂于重庆医科大学设备处购买，以三蒸水配制为 4%浓度，过滤后 4℃保存备用。DMEM/Ham's-F12 培养基干粉为美国 Gibco BRL 公司产品 SW-CJ-2A 标准型超净工作台为重庆汇诚空调净化设备制造公司产品。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 内膜组织及大网膜组织分别用无菌 PBS 液漂洗 2 次，尽量去除血凝块和细胞碎屑，然后剪成 2 × 2 × 2 mm^3 左右的小块，准备接种。

1.2.2 动物处理 4%水合氯醛以 0.01 ml/g 从麦氏点注入裸鼠腹腔，待其麻醉后，将其仰卧固定于操作板上，腹部乙醇消毒，自腹中线脐下方做一长约 2 cm 的切口，进入腹腔，在肉眼注视下将子宫内膜碎片放置于腹腔各个部位，5-0 无菌微荞线缝合伤口。

2 结 果

2.1 子宫内膜种植生长情况

人子宫内膜置入裸鼠盆、腹腔后，全部自然种植生长。接种后第 5 d 断颈处死裸鼠，剖腹探查见移植内膜与裸鼠盆、腹腔组织牢固粘附，隆起明显，质地稍硬，用眼科镊子可牵拉取下，见图 1。第 15 d 处死的裸鼠盆、腹腔内病灶变硬，部分硬块实质性，部分硬块呈囊肿样，直径约 2~3 mm 左右，剪开后有清亮液体溢出。病灶周围有血管生长，病灶与裸鼠组织呈融合状态，并与周围组织粘连，不易剥离，见图 2。第 30 d 处死的裸鼠盆、腹腔内病灶微微隆起，萎缩变小，局部粘连较重，见图 3。

所有裸鼠腹腔内未见游离子宫内膜，病灶包膜血管形成明显，包膜内子宫内膜逐渐呈干酪样改变。内异症组和非内异症组同期病灶，病灶部位及形态肉眼所见无差异。对照组植人的大网膜组织部分粘连于腹壁切口，其余游离存在，并逐渐萎缩、吸收。与同期实验裸鼠比较，腹腔内粘连程度明显减轻。

2.2 光镜组织学变化

接种后第 5 d，光镜下见种植物与鼠间皮之间已出现新生的血管网，血管网在粘附区域发育良好，扁平的立方状上皮细胞已形成扩张的腺体，周围围绕着间质细胞，见图 4。接种后 15 d，光镜下可见明显的子宫内膜腺体和间质，腺细胞多呈立方形，病灶边缘与裸鼠腹膜间皮细胞层相延续，血液供应丰富，B 淋巴细胞、浆细胞等炎细胞渗出、增生明显，间质细胞、腺细胞、炎细胞及裸鼠脂肪细胞等混合存在，见图 5。接种后 30 d，病灶纤维化严重，部分腺细胞可不完整，见图 6。

全部裸鼠异位病灶均可见变性、坏死，周边炎细胞侵润。内异症组和非内异症组同期病灶，光镜下所见无差异。对照组病灶除炎性反应外，大网膜组织结构无改变。

3 讨 论

1880 年，Breus 最早认识了内异症，在此后一百多年的时间里，内异症的发病机理并未得到清楚的解释。其中，Sampson 提出的经血逆流学说虽已被广泛接受，但是，该学说也不能完全解释 80%~90%的妇女存在经血逆流现象，却只有 10%~15%的人发生异位症的现实，这少部分逆流的内膜碎片是如何完成了粘附、侵袭，及逃避免疫监视而存活和生长的呢？需要构建一种理想的动物模型对子宫内膜细胞增殖、粘附、新血管形成、激素和免疫应答等机理进行充分的分析和研究，以阐释内异症的发病机制。最早的内异症动物模型是由 Arch 于 20 世纪 20 年代构建的家兔自体移植模型，后又发展有大鼠、猴子等自体移植模型[1-3]。但由于这些动物的内膜和人的内膜存在种属发生和生化方面的巨大差异，故以此类动物所建模型存有诸多局限。有些非人灵长类动物如狒狒等有周期性月经，可形成自发性动物模型。但其发病率很低，且饲养条件高、经费昂贵，限制了其在内异症模型中的应用。先天性胸腺缺乏的裸鼠，T 淋巴系统免疫缺陷，缺乏异种间的免疫排斥反应，易于接受人类正常组织、肿瘤组织及骨髓细胞等的移植，移植后的组织仍保持原有的组织形态及生化特征。并且模型性状显著且稳定，质量和规格可选择，价格适中，来源丰富。此外还有体积小、费用低、操作简单、观察周期短，实验结果的临床参考意义大等优点。因此本研究采用裸鼠建立内异症动物模型。

1984 年，Zamah 等[4]将含有卵巢巧克力囊肿（直径约 1~2 cm）的卵巢组织接种于裸鼠腹腔，镜下观察这些异位组织主要为纤维间质、富含铁血黄素的巨噬细胞、散乱的小腺体。国外有学者用小刀刮取巧克力囊肿内壁的异位组织种植于裸鼠腹部皮下[5]，异位组织部分成活并保持了内膜腺体和间质特性的报道，但此模型的重复性不如分泌期在位内膜。王群华等[6]将卵巢巧克力囊肿内壁种植于 NOD / SCID 小鼠腹部皮下，镜下未见子宫内膜腺体和间质，仅见增生的纤维结缔组织。原因可能为卵巢巧克力囊肿内壁腺体成分少，且反复出血导致巧克力囊壁中异位内膜细胞活力减低，增殖能力差，

种植不易成活,即使成活也以纤维结缔组织占优势。Bergvist 等[5]1985 年的研究表明,异位内膜的种植成功率仅是正常内膜的一半。因此把异位内膜作为标本来源,建立内异症动物模型有难度。Beliard 等[7]将正常子宫内膜进行分离纯化,得到纯化的子宫内膜腺上皮细胞、间质细胞,再将其分别接种于裸鼠腹腔,结果发现单纯任意一种细胞均不能形成异位病灶,即使给与雌激素也很难发生粘附。表明子宫内膜纯化细胞移植效果差,建立内异症动物模型同样有难度。并且近年我国郎景和等提出了在位内膜决定论,结合以上研究结果,因此本实验选取子宫在位内膜作为标本来源,建立内异症裸鼠模型。并且本发现内异症组和非内异症组在位内膜所形成的病灶,其组织形态学无明显差异。

Nisolle 等[8]在前人研究基础上观察月经期、增生晚期、分泌晚期正常人子宫内膜在裸鼠腹腔内的种植效果,每个组均 100% 发生了粘附,87% 观察到典型的类似于人的子宫内膜腺体及间质结构,提示不同月经周期取材的内膜并不影响裸鼠模型的构建。但是在形态学观察时注意到无论取材于增生期或分泌期,异位灶仅表现为类似于增生期的变化。只是分泌期内膜形成的异位病灶中腺上皮细胞更加扁平,形成的腺体结构排列更加整齐,间质细胞更为致密。本研究亦发现增生期与分泌期子宫内膜移植效果无明显差异。

Zamah 等[4]观察到经皮下接种者,皮下结节在接种后 3~4 周开始退化,24~32 d 时显微镜下病变消失或仅有少量淋巴细胞及巨噬细胞侵润。Bergvist[5]则观察到皮下种植结节形成的异位灶中腺上皮为纤毛高柱状,腺体呈增生期表现,数量较少且形态各异。皮下接种虽比较直接,能精确地计量异位灶数目和直径,但腹腔种植更能体现移植物在宿主体内的自然生长过程,更好地体现腹腔内微环境的变化。Grummer 等[9]将内膜碎片缝合于肠壁和侧腹壁得到了 66.6% 的种植成功率。本实验将人在位子宫内膜种植于腹腔多个部位,得到了 100% 的种植成功率,病灶于光镜下可见明显的子宫内膜腺体和间质。

对异位灶形成的观察在时间跨度上各研究间有所不同。Nisolle[8]自腹腔放置内膜碎片开始,隔日观察异位灶的生长情况,发现在接种的第 1 d 就发生了内膜碎片中间质细胞与鼠间皮的粘附。到第 3 d,仅有 1 / 9 的移植组织发展为异位病灶,而此异位病灶的镜下表现已经颇为典型,在移植物与鼠间皮之间已出现新生的血管网。第 5 d,8 / 13 的移植物中可见典型的内异症结构,血管网在粘附区域发育良好,扁平的立方状上皮细胞已形成扩张的腺体,周围围绕着间质细胞,这种镜下特征与培养 3 周的移植物表现差别不大。本实验于接种后 5 d 发现腹腔内有异位病灶生长,光镜下可见子宫内膜腺体和间质,与接种后 20d 差别不大,但接种后 30 d 的病灶开始萎缩变小,光镜下见纤维化严重,部分腺细胞不完整。这与王丹波等[10,11]的观察结果基本一致。因此,选取接种后 7、14、21、28 d 为观察点以进一步研究较为合适。

采用内异症患者或非内异症患者在位子宫内膜种植裸鼠腹腔,以构建内异症在体模型,种植成功率均可达 100%,二者无明显差异。移植后的内膜组织仍保持原有的组织形态和生化特征,便于对子宫内膜细胞增殖、粘附、新血管形成、激素和免疫应答等机理进行充分的分析和研究。此模型性状显著且稳定,费用低、操作简单、观察周期短,是一种较理想的内异症在体模型。

参 考 文 献

[1] Sehenken R S,Asch R H. Surgical induction of endometriosis in the rabbit:effects on fertility and concentrations of peritoneal fluid prostaglandins [J]. Fertil Steril,1980,34(6):581-587.

[2] Bailey M T,Coe C L. Endometriosis is associated with an altered profile of intestinal microflora in female rhesus monkeys[J]. Hum Reprod,2002,17(7):1704-1708.

[3] Berkley K J,Dmitrieva N,Curtis K S,et al. Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2004,101(30):11094-11098.

[4] Zamah N M,Dodson M G,Stephens L C,et al. Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude micev[J]. Am J Obstet Gynecol,1984,149(6):591-597.

[5] Bergvist A,Jeppsson S,Kullander S,et al. Human uterine endometrium and endometriotic tissue transplanted into nude mice(morphologie efects of various steroid hormones)[J]. Am J Pathol,1985,121(2):337-341.

[6] 王群华,凌 斌,赵卫东,等.建立人子宫内膜异位症动物模型的方法学研究[J]. 实用妇产科杂志,2005,21(8):473-474.

[7] Beliard A,Noel A,Goffin F,et al. Role of endocrine status and cell type in adhesion of human endometrial cells to the peritoneum in nude mice[J]. Fertil Steril,2002,78(5):973-978.

[8] Nisolle M,Casanas-Roux F,Donnez J,et al. Transplantation of culture explants of human endometrium into nude mice[J]. Hum Reprod,2000,15(3):572-577.

[9] Grummer R,Schwarzer F,Bainczyk K,el al. Peritoneal endometriosis:validation of an in-vivo model[J]. Hum Reprod,2001,16(8):1736-1743.

[10] 王丹波,张淑兰,牛慧彦,等.人子宫内膜异位症裸鼠模型组织形态学变化及血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶 9 基因表达的研究[J].中华妇产科杂志,2004,39(11):759-762.

[11] 刘剑毅.巴马香猪腰腔皮睛种植进子宫内膜建立子宫内膜异位症模型的研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(6):530-532.

(责任编辑:冉明会)