

## 子宫内膜异位症猕猴动物模型的建立

子宫内膜异位症(endometriosis, EM)是指有活动功能的子宫内膜出现于正常子宫内壁以外的部位, 人群发病率达10%~15% (其中50%不孕), 且有逐渐增加的趋势[1]。由于EM只发生在人类和类灵长类动物, 因伦理因素我们很难对患病的妇女进行全过程的观察, 也很难在人类身上作侵袭性实验, 因此, 目前人们对EM的发病机制与发病过程尚无确切结论。本研究成功建立了EM灵长类动物模型, 旨在为深入研究EM的发病机制奠定实验基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物

选择5只健康、月经规律的雌性猕猴(由军事医学科学院动物中心提供), 其中4只为实验猴、1只为对照猴, 年龄6~8岁, 生育1~3次, 体质量6~7 kg。给予标准光照周期(12 h光明、12 h黑暗), 室内温度(20±2) °C, 单个兽笼饲养, 标准饲料加苹果, 每日喂养2次。

#### 1.2 实验动物的观察

手术前观察实验动物精神状态、习惯体位和月经周期, 每日行阴道涂片, 检测猕猴血清雌二醇水平; 手术后观察实验动物的生命体征、精神状态、饮食、体位的改变、体质量增长情况、月经周期和月经量的改变。

#### 1.3 实验药品及器械

戊巴比妥钠、生理盐水、止血敏、催产素、肝素、常规消毒药品、青霉素。无影手术灯、麻醉机、呼吸机、腹腔镜(德国产, ruddfr MEDIZINTECHNIK)及配套器械、普通眼科手术器械、腹腔拉钩、电刀、气管插管。

#### 1.4 子宫内膜异位症模型的建立

猕猴月经后的第8日开始, 每日上午8时抽取外周血2 ml, 检测血清雌二醇水平, 在雌激素水平高峰的第3~5 d, 在解放军总医院动物手术室行开腹手术, 由专业动物手术麻醉师行气管插管, 戊巴比妥那(15~20 mg/kg·b.w.)静脉用药全麻下常规消毒, 选取下腹部正中切口约3 cm切开皮肤, 电刀切开皮下及腹直肌前鞘, 钝性分离腹直肌, 剪开腹膜并留取腹水(如无腹水, 往盆腔注入3 ml生理盐水, 收集腹腔冲洗液于抗凝管中), 暴露子宫及双侧附件, 在子宫前壁作一1 cm长的垂直切口剖开子宫, 从子宫腔粘膜面取出约100 mg的子宫内膜, 置于0.9%的无菌盐水中, 4~0肠线全层缝合子宫切口。将切下的子宫内膜切成直径2~3 mm的碎片, 于接受位点上先用小刀划一痕, 再用丝线将子宫内膜碎片的一边缝至划痕上, 接受点有膀胱子宫反折腹膜、子宫切口、左阔韧带、子宫直肠陷凹和右卵巢实质处, 对照组取约1 mg的网膜脂肪组织, 切碎, 置于0.9%盐水中, 同样种植到上述5处, 然后逐层关闭腹部切口。术后肌注青霉素80万单位, 连续5 d。术后7 d腹部伤口完全愈合。

#### 1.5 猕猴子宫内膜异位症模型建立后的剖腹或腹腔镜探查

5只猕猴均于术后第2个月, 月经周期的第8~15天探查(其中3只实验猕猴和1只对照猕猴行开腹探查, 1只实验猕猴行腹腔镜探查), 2只形成内异症的猕猴于术后第4个月再次行腹腔镜手术探查, 手术均在动物手术室, 气管插管, 戊巴比妥那(15~20 mg/kg·b.w.)静脉用药全身麻醉下进行, 术中观察盆腔粘连, 内膜异位生长情况, 留取腹水, 异位种植的内膜组织。

## 2 结果

### 2.1 阴道涂片与月经周期和雌激素水平的关系

猕猴月经周期各个阶段的阴道涂片中脱落细胞的成分和形态与人类非常相似。例如, 月经中期, 检测血清雌激素水平达高峰时, 阴道涂片中脱落细胞亦表现为雌激素高度作用, 细胞都属表层, 60%以上角化, 黏液清淡, 几乎无白细胞, 涂片背景明朗, 红蓝相间的角化细胞和角化前细胞显得非常艳丽(图1), 与正常妇女排卵期的阴道涂片一致。月经前雌激素低落时, 脱落细胞多属中间层, 杂有表层嗜兰色细胞, 有1只猕猴的阴道涂片见到较为典型的底层细胞。

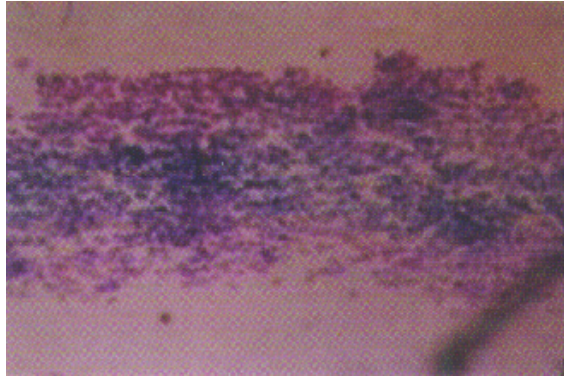


图1 月经中期时的正常猕猴阴道涂片(原始放大倍数, ×100)  
 Fig.1 Midmenstrual vaginal smear of normal rhesus  
 (Original magnification, ×100)

## 2.2 猕猴子宫内膜异位症模型建立情况

2.2.1 一般情况 种植内膜组织的4只猕猴术后精神状态和进食均较术前差, 其中3只体位明显改变, 喜好侧卧和俯卧位, 尤其是月经期。月经周期均有不同程度缩短(缩短5~8 d), 月经量和月经期的长短无明显改变。2只成功构建子宫内膜异位症模型的猕猴分别于建模后的2.5个月和4.5个月死亡, 死亡原因均为肠套叠。对照的猕猴精神状态非常好, 进食和体位, 月经周期均无明显改变(表1)。

表 1 盆腔异位症建模手术前后猕猴的一般情况改变

Tab.1 General condition and focal formation in the pelvis of the rhesus after operation

Rhesus No.	Mental status	Dietary status	Posture	GB (kg/month)	Menstrual cycle (d)		Menstrual blood (ml)		Menstrual time (d)		IS	PA	CC	ES
					Pre	Pos	Pre	Pos	Pre	Pos				
1	Moderate	Better	PP	0.20	35	27	5	6	2	3	+	++	+	+
2	Worse	Worse	LPP	0.10	32	28	5	5	1	1	-	-	-	-
3	Moderate	Moderate	PP	0.10	31	23	20	22	4	5	+	++	-	+
4	Moderate	Moderate	PP	0.25	29	24	8	10	2	2	-	++	+	+
Control	Good	Good	Normal	1.00	35	34	7	8	3	3	-	+	-	-

GB: Gain weight; Pre:Pre-operation; Pos: Post-operation; IS: Intussusception.; PA: pelvic adhesion; CC: Chocolate cyst;  
 ES: Endometrium survived; PP: Prone position; LPP: Lateral prone position

2.2.2 术后第2个月猕猴盆腔情况 4只实验猕猴中有3只盆腔粘连明显, 盆腔内膜种植部位可见存活的内膜组织, 其中2只形成异位囊肿(1只位于左侧阔韧带及右侧卵巢, 另1只位于左侧阔韧带), 囊肿内均能抽出暗红色不凝的液体, 3只猕猴子宫底部种植点及卵巢均有紫蓝色样结节病灶。1只实验猕猴盆腔无任何粘连, 种植的内膜组织被吸收, 仅见缝线的线头。对照猕猴盆腔有轻度粘连, 种植点未见种植的组织, 种植的大网膜组织均被吸收(图2)。

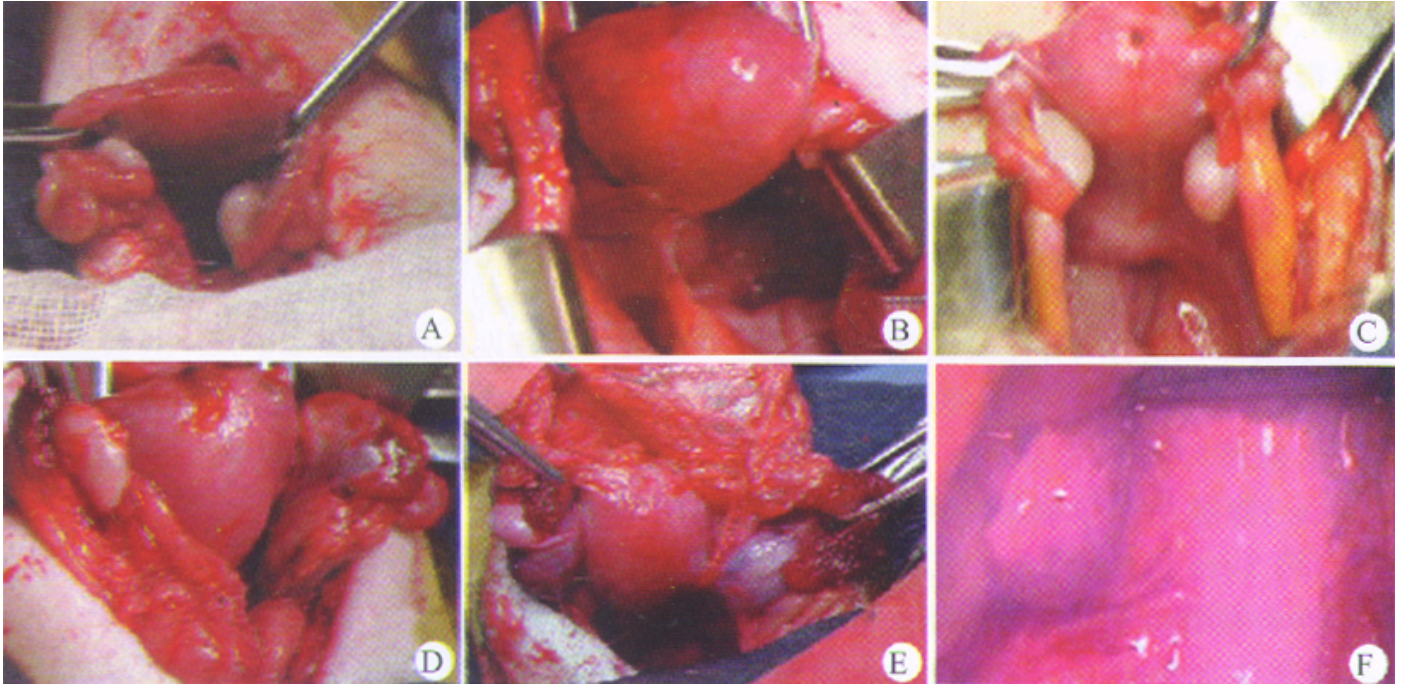


图2 建立子宫内膜异位症模型前后猕猴的盆腔

Fig.2 Comparison of the pelvis pre- and post-operation in rhesuses

A: The normal genitalia of rhesus; B: Light peritoneal adhesion in the pelvis of control rhesus; C: No peritoneal adhesion and absorption of the implanted endometrium can be noted in the pelvis of experimental rhesus without endometriosis; D: Obvious peritoneal adhesion in the pelvis of rhesus with endometriosis. Growth of the implanted endometrium in the uterine fundus and right ovary; E: Obvious pelvic adhesion and chocolate cysts in the left broad ligament and right ovary in the rhesus with endometriosis; F: Chocolate cysts in the left broad ligament and obvious pelvic adhesion in the laparoscopic vision of the pelvis of the rhesus with endometriosis.

2.2.3 术后第4个月猕猴盆腔情况 2只实验猕猴于建模4个月再次行腹腔镜探查，盆腔粘连情况及内膜异位生长情况于建模后2个月基本一致。

2.2.4 异位内膜组织病理 取动物卵巢、子宫底部及阔韧带的异位种植组织作病理检查，HE染色有两种表现，子宫底部的异位内膜与在位子宫内膜相似，有完整的内膜腺体；取自卵巢及阔韧带异位囊肿的异位内膜与人类异位囊肿内膜相似，以间质细胞为主，内膜腺体不典型，有腺体样结构，见图3。

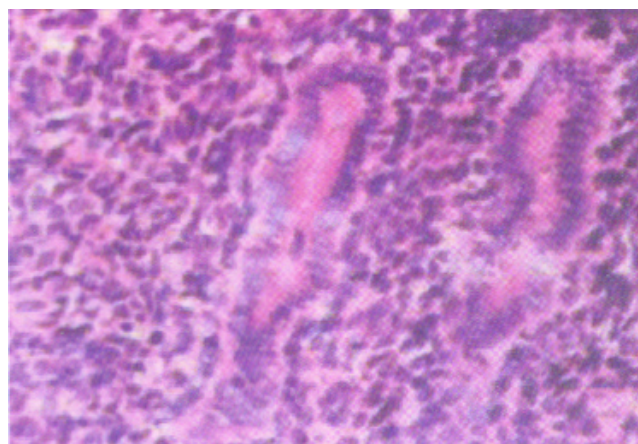


图3 猕猴异位内膜的组织病理切片（原始放大倍数，×200）

Tab.3 Histopathological section of the ectopic endometrium of the rhesus (Original magnification, ×200)



最理想的EM动物模型为灵长类动物[2]，原因在于：首先，它们的遗传背景与人类有很多相似；第二，非人类的灵长类动物，恒河猴、猕猴等具有自发性的子宫内膜异位症；第三，它们的内分泌、月经周期和解剖结构上与妇女有许多相同之处[3]。狒狒是最为理想的子宫内膜异位症模型，但在我国为国家保护动物，很难获得，因此至今为止，非人类灵长类动物中最广泛应用于医药领域的是猕猴。

本研究首先观察了9岁以后的猕猴，发现猕猴的月经周期已经不规则，可能与长期室内饲养有关，因而选择了6~8岁的猕猴，观察9个月中，仅出现1次动情期，即春天的4月，几只猕猴同时出现，持续7~10 d，表现性情烦躁，面部、臀部充血。本研究提示，选择饲养的猕猴作为研究子宫内膜异位症的动物模型，最佳年龄为6~8岁，与生育史无明显关系。

进行实验前，我们对猕猴的月经生理作了仔细的观察，5只猕猴的月经周期为26~40 d，月经期为1~5 d，整个月经周期每天作阴道涂片，发现阴道涂片与人类非常相似，阴道复层鳞状上皮的脱屑细胞的成份(底层细胞、中层细胞、表层细胞)随月经周期的不同时期改变，通过观察阴道涂片能大致了解猕猴体内雌激素水平，提示猕猴是可以作为研究女性月经生理及内分泌疾病的最佳的动物模型。

本实验成功构建了EM猕猴模型，发现猕猴内膜异位生长，从大体形态到组织病理改变与人类子宫内膜异位症很相似；子宫内膜异位生长对猕猴平素的体位及月经周期有一定影响，发生肠套叠的危险性增加；同样身体素质的对照猕猴，盆腔种植大网膜，二月后开腹探察也有盆腔粘连，但精神状态、饮食、体质量增加情况均较构建了子宫内膜异位症的猕猴好。肠套叠是实验猕猴死亡的主要原因，说明子宫内膜种植在盆腔不仅仅产生盆腔粘连，对猕猴全身状态均有明显的影响，这一现象能够从另一方面支持免疫异常是子宫内膜异位症的结果的观点，也为子宫内膜种植学说提供一个客观依据。有文献报道[4]，通过大样本的观察猕猴群体，发现猕猴内异症自发性的发展过程及病灶形态学与人类相同。临床表现包括腹部膨隆、盆腔包块和行为改变，特别是月经的改变可能与不适有关，如果没引起重视，内异症可导致动物肠梗阻而死亡。

本研究还发现并不是所有异位的内膜均能形成内异症，4只建模型的猕猴中有1只未形成盆腔内异症，重要的是这只猕猴盆腔无任何粘连(对照猕猴有盆腔粘连)，此现象说明内异症的发生与个体遗传因素有关。遗传因素在猕猴的内异症发生中起重要作用，我们可以应用猕猴研究遗传因素与内异症发病的相关性，对确认内异症的高危因素，判断疾病的预后有重大价值。

本实验留取的血清、腹水、组织可以动态的观察内异症形成过程体液免疫，血清标记物，相关的细胞因子的动态变化。为进一步从分子水平及遗传基因方面研究EM的发病机制，提供有力证据，并为临床诊治提出新思路。

(责任编辑：段咏慧)

#### 参考文献：

- [1] Giudice LC, Tazuke SI, Swiersz L. Status of current research on en-dometriosis[J]. J Reprod Med, 1998, 43(3 Suppl): 252-62.
- [2] Vernon MW. Experimental endometriosis in laboratory animals as a research model[J]. Prog Clin Biol Res, 1990, 323: 49-60.
- [3] Fazleabas AT, Brudney A, Gurates B, et al. A modified baboon model for endometriosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 955: 308-17.
- [4] Zondervan K, Cardon L, Desrosiers R, et al. The genetic epidemiology of spontaneous endometriosis in the rhesus monkey[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 955: 233-8.

#### 参考文献：

- [1] Giudice LC, Tazuke SI, Swiersz L. Status of current research on en-dometriosis[J]. J Reprod Med, 1998, 43(3 Suppl): 252-62.
- [2] Vernon MW. Experimental endometriosis in laboratory animals as a research model[J]. Prog Clin Biol Res, 1990, 323: 49-60.
- [3] Fazleabas AT, Brudney A, Gurates B, et al. A modified baboon model for endometriosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 955: 308-17.
- [4] Zondervan K, Cardon L, Desrosiers R, et al. The genetic epidemiology of spontaneous endometriosis in the rhesus monkey[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 955: 233-8.