

## ·论 著·

## 利用人异位的子宫内膜细胞建立可视化子宫内膜异位症模型

苏晓华, 宋殿荣, 张英

**【摘要】目的:**分别将不同浓度的在位及异位子宫内膜细胞注射到裸鼠的腹部皮下, 观察各组异位病灶的形成并进行比较分析, 拟建立一种对造模鼠创伤小, 且可连续、动态观察的可视化子宫内膜异位症(EMs)模型。**方法:**收集 20 例 EMs 患者的在位子宫内膜组织和异位病灶子宫内膜组织, 分别消化培养子宫内膜细胞。将在位及异位子宫内膜细胞分别以  $2.5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$ 、 $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  和  $1 \times 10^7/200 \mu\text{L}$  3 个浓度注射到裸鼠腹部皮下, 观察并记录各组病灶开始出现的时间。在注射细胞后第 5、10 和 15 天分别计算各组病灶形成率和体积。第 15 天时取材, 通过形态学分析和免疫组织化学方法鉴定病灶。通过比较, 确定建立可视化 EMs 模型所需的最佳细胞种类、细胞浓度及病灶形成时间。**结果:**在裸鼠腹部皮下分别注射在位及异位子宫内膜细胞后均可成功形成可视化病灶。病理分析显示病灶中密集的间质细胞包绕着腺体, 免疫组织化学鉴定显示病灶均由人子宫内膜细胞形成。各组病灶开始出现的时间差异均无统计学意义 ( $F=0.230, P=0.942$ )。最佳注射细胞浓度为  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$ , 建立模型最佳观察时间是注射细胞后第 10 天。注射  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  浓度的细胞后在第 10 天时异位子宫内膜细胞组病灶发生率为 100%, 而在位子宫内膜细胞组病灶发生率为 75%, 2 组之间差异有统计学意义 ( $\chi^2=9.143, P=0.002$ )。**结论:**异位的子宫内膜细胞比在位子宫内膜细胞更适合建立可视化 EMs 模型。将  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  异位子宫内膜细胞注射到裸鼠腹部皮下, 在第 10 天时即可成功建立可视化 EMs 模型, 成模率为 100%, 该病灶可以无创、连续、动态地观察, 是研究腹壁 EMs 的理想模型。

**【关键词】** 子宫内膜异位症; 腹壁子宫内膜异位症; 子宫内膜; 可视化模型; 疾病模型, 动物; 小鼠, 裸

**Establishing a Visible Endometriosis Model with Human Ectopic Endometrial Cells** SU Xiao-hua, SONG Dian-rong, ZHANG Ying. Ninghe Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301500, China (SU Xiao-hua); The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250, China (SONG Dian-rong); Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China (ZHANG Ying)

Corresponding author: SONG Dian-rong, E-mail: songdr58@126.com

**【Abstract】Objective:** Injecting different concentrations of human eutopic and ectopic endometrial cells into the abdominal subcutaneous tissue in nude mice. The formation of ectopic lesions was observed and compared, in order to establish a visible endometriosis model (EMs) that was non-invasively, continuously and dynamically. **Methods:** Twenty human eutopic endometrial samples and ovarian endometriosis cyst walls were obtained, endometrial cells were digested and cultured respectively. Three different concentrations of  $2.5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$ ,  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  and  $1 \times 10^7/200 \mu\text{L}$  were injected respectively into the abdominal subcutaneous tissue of nude mice. The time when lesions began to appear were observed and recorded. The incidence and volume of lesions on the 5th day, 10th day and 15th day after injection was calculated. On the 15th day after injection, the visible lesions were removed and identified by histologic and immunohistochemical examination. Confirm the best cells, the optimal concentration of cells and the suitable time to observe the lesions through comparison. **Results:** Visible lesions could be successfully induced by injecting human eutopic and ectopic endometrial cells. Pathological analysis of lesions showed that glandular structures were surrounded by dense stromal cells. Immunohistochemical examination results confirmed that the lesions were formed by human endometrial cells. There were no statistically significant differences among the groups on the time when a lesion occurred ( $F=0.230, P=0.942$ ). The optimal concentration of injected cells was  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$ , the best time to establish the model was on the 10th day after injection. Under these conditions, the incidence of lesions on the 10th day was 100% in the ectopic cells group and 75% in the eutopic cells group, the difference was statistically significant ( $\chi^2=9.143, P=0.002$ ). **Conclusions:** The ectopic endometrial cells were more suitable for establishing a visible EMs model compared with the eutopic endometrial cells. Co-cultured ectopic endometrial cells of  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  concentration were injected in the abdominal subcutaneous of nude mice could successfully establish the visible EMs model on the 10th day and the incidence could up to 100%. The lesions could be observed non-invasively, continuously and dynamically. It was an ideal model to

作者单位: 301500 天津市宁河区中医医院(苏晓华); 天津中医药大学第二附属医院(宋殿荣); 天津医科大学(张英)

通信作者: 宋殿荣, E-mail: songdr58@126.com

study the abdominal wall EMs.

**【Keywords】** Endometriosis; Abdominal wall endometriosis; Endometrium; Visible model; Disease models, animal; Mice, nude

(*J Int Obstet Gynecol*, 2018, 45:439-445)

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是妇产科常见疾病,在育龄妇女中发病率为7%~10%<sup>[1]</sup>,其主要症状包括痛经、性交痛、腹痛和不孕,严重影响女性的健康和生活质量,降低其社会功能<sup>[2]</sup>。EMs 病灶通常发生在盆腔,但也可发生在肺、肠、输尿管、脑和腹壁等部位<sup>[3-4]</sup>。发生在腹膜以上部位如皮肤、皮下组织、腹部和盆壁肌肉组织、腹部切口瘢痕组织等的子宫内膜异位病灶均称为腹壁 EMs<sup>[5]</sup>。腹壁 EMs 发病率为0.03%~0.45%<sup>[6]</sup>。近年来,随着腹腔镜技术的广泛应用及剖宫产率的增高,腹壁 EMs 的发生有上升趋势,文献报道剖宫产术后发病率约为1%~2%<sup>[7]</sup>。EMs 虽为良性疾病,却具有恶性肿瘤侵袭、转移和复发的特性,恶变率为0.7%~1%<sup>[8]</sup>。EMs 的发病机制复杂,主要有经血逆流学说、种植学说、免疫学说、上皮化生学说等,目前仍在研究阶段。为了更好地研究该病,国内外研究者已建立了多种 EMs 模型。啮齿类动物由于费用低、操作简单、动物动情周期短和模型稳定而被广泛应用。该项研究将不同浓度的人在位及异位子宫内膜细胞注射到裸鼠的腹部皮下,观察并比较造模效果,拟建立一种对造模鼠创伤小,且可连续、动态观察的可视化 EMs 模型,为进一步深入研究腹壁 EMs 提供较理想模型。

## 1 材料与方法

**1.1 标本采集** 标本取自2012年10月—2013年12月于天津中医药大学第二附属医院妇科因 EMs 行手术治疗的已婚妇女,患者年龄23~45岁,平均(30.36±5.28)岁,既往均月经规律,未放置宫内节育器,术前6个月内未服用抗炎、激素类药物,患者均无其他免疫、内分泌及代谢性疾病。在位子宫内膜组织取自术前行诊断性刮宫术的内膜,异位内膜组织取自术前行诊断性刮宫术患者的卵巢异位病灶,术后病理证实符合 EMs。取材后将标本放入装有全细胞培养基的无菌离心管中,用冰盒将标本30 min内运送至实验室,在紫外线消毒后的超净台中进行操作。共收集在位及异位子宫内膜组织20例。所有标本的采集均得到患者本人或家属知情授权,并经天津中医药大学第二附属医院伦理委员会批准。

### 1.2 细胞培养

**1.2.1 子宫内膜细胞原代培养** 取材后将无菌离心管中的标本倒入消毒后的无菌培养皿中,用无菌冰 Hanks 漂洗3~5次,去除血块,直至组织变白净。用眼科剪将组织剪成约1 mm<sup>3</sup>的碎块,放入15 mL 无菌离心管中,加入3倍体积消化

酶,用移液器轻柔吹打混合均匀后,置于37℃恒温箱中消化40 min,同时轻轻摇晃,使细胞和消化酶充分接触,彻底消化,直至组织呈云雾状。加入含10%胎牛血清的 DMEM/F12 全培养基终止消化,吹打混匀,400 r/min 的速度离心3 min,使组织沉淀,将上清液移入15 mL 离心管中,1 000 r/min 速度离心7 min,弃上清液,加入全培养基(含有1%双抗、10%胎牛血清、89%DMEM/F12)悬浮细胞,进行细胞计数,以1×10<sup>5</sup>/mL 密度接种于25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,置于37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养,24 h后观察细胞贴壁情况并换液,隔48 h换液1次。

**1.2.2 子宫内膜细胞传代培养** 倒置显微镜下观察,当原代细胞长满瓶壁约80%时进行传代,弃去培养瓶中的培养液,无菌磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,加入0.25%含 EDTA 的胰酶3 mL,于37℃培养箱中消化,每3 min 轻摇培养瓶1次,显微镜下观察,当细胞收缩变圆即将离开培养瓶时加入全细胞培养基终止消化,用移液管反复吹打瓶壁细胞,将细胞悬液移入15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心7 min,弃上清,加入全细胞培养基混匀,进行细胞计数,以1:2或1:3比例传代,置于37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养,隔48 h换液1次。将第2代子宫内膜细胞冻存到液氮中备用。

**1.2.3 子宫内膜细胞复苏** 从液氮中取出冻存管,迅速放入37℃温水浴中,轻轻摇晃令其快速解冻;从37℃水浴中取出冻存管,打开管盖,用吸管吸出细胞悬液,移至15 mL 无菌离心管中并滴加10倍以上细胞培养液,吹打混匀;1 000 r/min 离心7 min;吸弃上清液,加入含10%胎牛血清的全细胞培养液重悬细胞,计数并调整细胞密度,接种到75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,置于37℃、含5% CO<sub>2</sub>、95%相对湿度条件下的恒温培养箱中培养。24 h后观察细胞贴壁情况并换液,隔48 h换液1次。

**1.2.4 子宫内膜细胞鉴定** 将造模前的子宫内膜细胞分别接种到6孔板内,待细胞长满40%时用吉姆萨染色进行形态学鉴定,具体步骤如下:4%甲醛固定3 min, PBS 洗涤2 min×3遍,姬姆萨染色液室温染色15 min, PBS 洗涤2 min×3遍,晾干后显微镜下观察。

免疫荧光进行特异性抗体鉴定,具体步骤如下:4%甲醛固定10 min, PBS 洗涤2 min×3遍,0.1% Triton×100 室温透化5 min, PBS 清洗2 min×3遍,2% BSA 室温封闭1 h,吸去 BSA,加入一抗(鼠抗人波形蛋白和鼠抗人角蛋白,1:200浓度), PBS 作阴性对照组,封闭孔板,4℃避光过夜。PBS 清洗2 min×3遍,10 μg/mL 藻红蛋白室温孵育1 h,吸弃, PBS 清洗2 min×3遍,避光,5 μg/mL Hoechst 室温复染核3 min, PBS 清洗2 min×6遍,荧光显微镜观察。

### 1.3 造模方法

**1.3.1 实验动物** 选用鼠龄为5周的健康 SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物

中心提供(许可证号为 SCXK-2012-0004)。裸鼠适应环境 1 周后,将 56 只裸鼠随机分为 A1、A2、A3、B1、B2、B3 和对照组 7 组,每组 8 只,各组裸鼠的体质量分别为 (16.88±0.23)g、(16.98±0.19)g、(17.08±0.21)g、(17.25±0.18)g、(17.16±0.22)g、(16.85±0.21)g 和 (16.79±0.20)g,各组比较差异无统计学意义 ( $F=2.066, P=0.124$ )。裸鼠在无菌净化屏障系统内饲养,环境温度为 (23±2)℃,光照时间为 12 h:12 h(光:暗),空气湿度为 50%~60%,每日紫外线消毒 2 次,30 min/次,每个鼠笼放 4 只裸鼠,空气均经无菌滤膜过滤,所有垫料、饲料和水使用前均高压灭菌。

**1.3.2 细胞浓度及注射方法** 将在位和异位子宫内膜细胞经胰酶消化后用全细胞培养液混悬并计数,分别稀释成  $2.5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$ 、 $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  和  $1 \times 10^7/200 \mu\text{L}$  3 个浓度,常规消毒裸鼠腹部皮肤,用 1 mL 注射器将不同浓度的细胞注射至不同组裸鼠腹部皮下的 4 个象限内,即左上象限、左下象限、右上象限和右下象限。对照组注射不含细胞的培养基 200  $\mu\text{L}$ 。所有操作均在无菌超净台中进行,各组裸鼠注射细胞情况见表 1。

注射完毕后将裸鼠置无菌净化屏障系统内继续饲养,每日观察裸鼠的精神状态、进食状况、体质量变化和注射部位病灶的情况。记录各组病灶开始出现的时间,病灶开始出现后用游标卡尺测量病灶大小,分别于注射细胞后第 5、10 和 15 天计算各组病灶发生率和病灶的体积。病灶体积  $V=\pi/6 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{高}^{\text{[9]}}$ 。于注射细胞后的第 15 天处死裸鼠,用眼科剪剪取病灶后放入装有 4% 福尔马林溶液的离心管中固定。

表 1 各组裸鼠注射细胞浓度

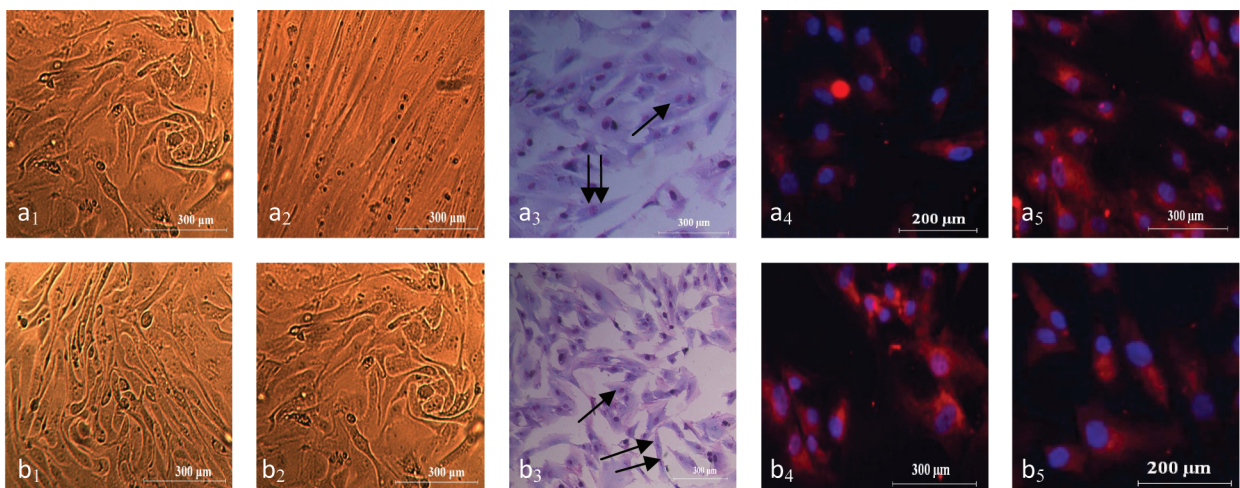
细胞类型	组别	n	细胞数量/200 $\mu\text{L}$	注射部位数
在位内膜细胞	A1	8	$2.5 \times 10^6$	32
	A2	8	$5.0 \times 10^6$	32
	A3	8	$1.0 \times 10^7$	32
异位内膜细胞	B1	8	$2.5 \times 10^6$	32
	B2	8	$5.0 \times 10^6$	32
	B3	8	$1.0 \times 10^7$	32
培养基	对照组	8	0	32

**1.3.3 病灶鉴定** 取出 4% 福尔马林固定的标本,石蜡包埋、固定、切片,用 HE 染色进行形态学鉴定,免疫组织化学法用抗体进行特异性鉴定。

**1.4 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 软件对研究数据进行统计分析。定量资料采用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法;定性资料采用例数(百分比)表示,组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 细胞鉴定** 吉姆萨染色显示,注射前的细胞中长梭形的子宫内膜间质细胞和多角形的子宫内膜腺上皮细胞共同存在。免疫荧光鉴定显示,梭形的间质细胞可被鼠抗人波形蛋白染色,而多角形的腺上皮细胞可被鼠抗人角蛋白染色。见图 1。



注:图 a 为在位子宫内膜细胞鉴定图,其中图 a1 为光镜下抱团生长的腺上皮细胞( $\times 200$ ),图 a2 为光镜下平铺生长的间质细胞( $\times 200$ ),图 a3 为吉姆萨染色鉴定注射前梭形的间质细胞(双箭头指示)与多角形的腺上皮细胞(单箭头指示)共存( $\times 200$ ),图 a4 为免疫荧光鉴定角蛋白染色阳性的腺上皮细胞( $\times 400$ ),图 a5 为免疫荧光鉴定波形蛋白染色阳性的间质细胞( $\times 400$ )。图 b 为异位子宫内膜细胞鉴定图,其中图 b1 为光镜下抱团生长的腺上皮细胞( $\times 200$ ),图 b2 为光镜下平铺生长的间质细胞( $\times 200$ ),图 b3 为吉姆萨染色鉴定注射前梭形的间质细胞(双箭头指示)与多角形的腺上皮细胞(单箭头指示)共存( $\times 200$ ),图 b4 为免疫荧光鉴定角蛋白染色阳性的腺上皮细胞( $\times 400$ ),图 b5 为免疫荧光鉴定波形蛋白染色阳性的间质细胞( $\times 400$ )。

图 1 体外培养的子宫内膜细胞鉴定

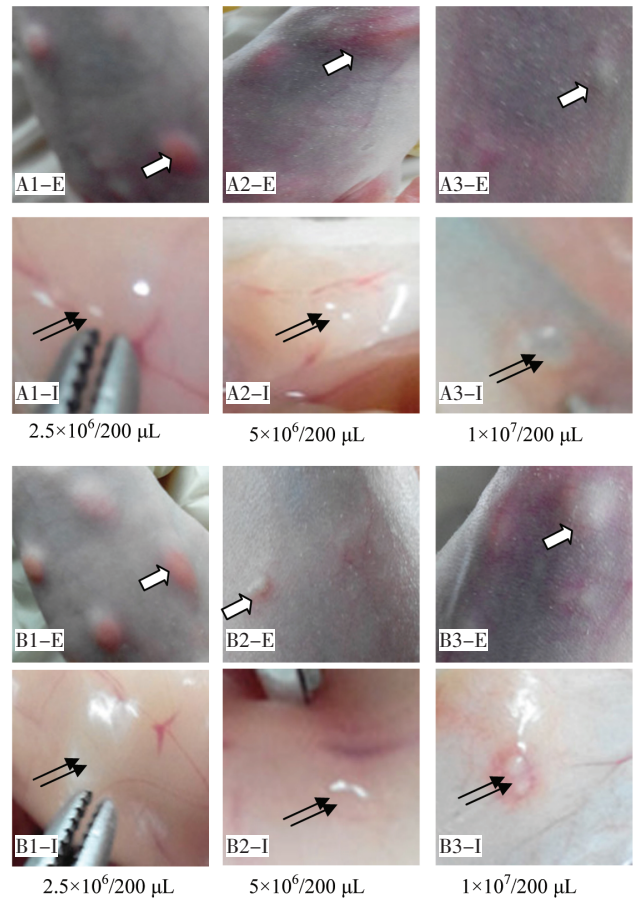
## 2.2 裸鼠 EMs 模型鉴定

**2.2.1 病灶大体观察** 实验中各组裸鼠均活动自如、精神状态良好、体质量正常增长,进食、大小便及反应等均无明显异常,实验结束时无裸鼠感染及死亡。在位及异位子宫内膜细胞注射后,在一定时间内裸鼠腹部皮下均可以观察到大小及数量不等的病灶,各组病灶开始出现的时间分别为 A1 组 (8.50±2.43)d、A2 组 (7.67±2.58)d、A3 组 (7.33±2.85)d、B1 组 (8.33±2.42)d、B2 组 (7.33±2.88)d、B3 组 (6.50±2.74)d,组间比较差异无统计学意义 ( $F=0.230, P=0.942$ )。对照组注射空白培养基后无病灶形成。提示各组病灶开始出现的时间与注射细胞浓度和细胞来源部位均不相关。见图 2。

**2.2.2 各组病灶形成率比较** 注射不同浓度在位子宫内膜细胞后,在第 5 天、10 天和 15 天 A1 组病灶形成率均低于 A2 组和 A3 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),但 A2 组和 A3 组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。注射不同浓度异位子宫内膜细胞后,在第 5 天、10 天和 15 天 B1 组病灶形成率均低于 B2 组和 B3 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),但 B2 组和 B3 组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。提示 A2 组和 B2 组注射浓度是建立模型的最佳细胞浓度,即  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$ 。

注射不同浓度细胞后,第 5 天病灶形成率明显比第 10 天和第 15 天低,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),但第 10 天和第 15 天比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。提示观察病灶的最佳时间为注射细胞后第 10 天。在注射细胞后第 10 天,B2 组病灶形成率高于 A2 组,差异有统计学意义 ( $\chi^2=9.143, P=0.002$ )。见表 2。

**2.2.3 各组病灶体积比较** 注射不同浓度细胞后,第 5 天病灶体积小于第 10 天和第 15 天,差异有统



注:图 A 为注射不同浓度混合培养的在位子宫内膜细胞组,图 B 为注射不同浓度混合培养的异位子宫内膜细胞组。单箭头指皮下,双箭头指皮内。

图 2 各组病灶大体观察

计学意义 ( $P<0.05$ ),但第 10 天和第 15 天比较,病灶体积差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。在注射细胞后第 10 天,B2 组病灶体积与 A2 组比较,差异无统计学意义 ( $F=0.977, P=0.379$ )。见表 3。

**2.2.4 各组病灶鉴定** HE 染色结果显示,裸鼠皮下病灶与人 EMs 形态学相似,可见高立方状腺上皮细

表 2 各组病灶形成率比较

组别	注射部位数	第 5 天		第 10 天		第 15 天		$\chi^2(P)$
		病灶数	病灶形成率(%)	病灶数	病灶形成率(%)	病灶数	病灶形成率(%)	
A1 组	32	4	12.50	8	25.00 <sup>#</sup>	10	40.63 <sup>#</sup>	8.533(0.036)
A2 组	32	16	50.00 <sup>*</sup>	24	75.00 <sup>**</sup>	27	84.38 <sup>**</sup>	12.976(0.005)
A3 组	32	19	59.38 <sup>*</sup>	29	90.63 <sup>**</sup>	30	93.75 <sup>**</sup>	20.385(0.000)
$\chi^2(P)$			16.324(0.000)		32.465(0.000)		26.057(0.000)	
B1 组	32	6	18.75	16	50.00 <sup>#</sup>	18	56.25 <sup>#</sup>	12.485(0.000)
B2 组	32	24	75.00 <sup>△</sup>	32	100.00 <sup>△#</sup>	32	100.00 <sup>△#</sup>	25.600(0.000)
B3 组	32	26	81.25 <sup>△</sup>	32	100.00 <sup>△#</sup>	32	100.00 <sup>△#</sup>	18.885(0.000)
$\chi^2(P)$			31.200(0.000)		38.400(0.000)		32.780(0.000)	

注: \* 与 A1 组比较  $P<0.05$ ; <sup>△</sup> 与 B1 组比较  $P<0.05$ ; <sup>#</sup> 与第 5 天病灶形成率比较  $P<0.05$ 。

表 3 各组病灶体积比较 (mm<sup>3</sup>,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	第 5 天	第 10 天	第 15 天	F(P)
A1	7.842±0.478	11.195±1.174 <sup>#</sup>	11.258±0.636 <sup>#</sup>	22.793(0.000)
A2	9.785±0.827	11.317±0.505 <sup>#</sup>	11.613±0.978 <sup>#</sup>	6.090(0.021)
A3	10.310±0.705	12.297±1.113 <sup>#</sup>	12.858±1.360 <sup>#</sup>	5.995(0.022)
F(P)	14.389(0.002)	1.524(0.269)	2.639(0.125)	
B1	9.795±0.343	11.483±0.755 <sup>#</sup>	11.620±0.634 <sup>#</sup>	11.392(0.003)
B2	10.580±0.666	12.430±1.031 <sup>#</sup>	12.774±1.390 <sup>#</sup>	4.859(0.037)
B3	11.238±0.726	12.644±0.675 <sup>#</sup>	13.133±0.922 <sup>#</sup>	6.331(0.019)
F(P)	5.760(0.025)	2.193(0.168)	2.353(0.151)	

注: # 与第 5 天病灶形成率比较 P<0.05。

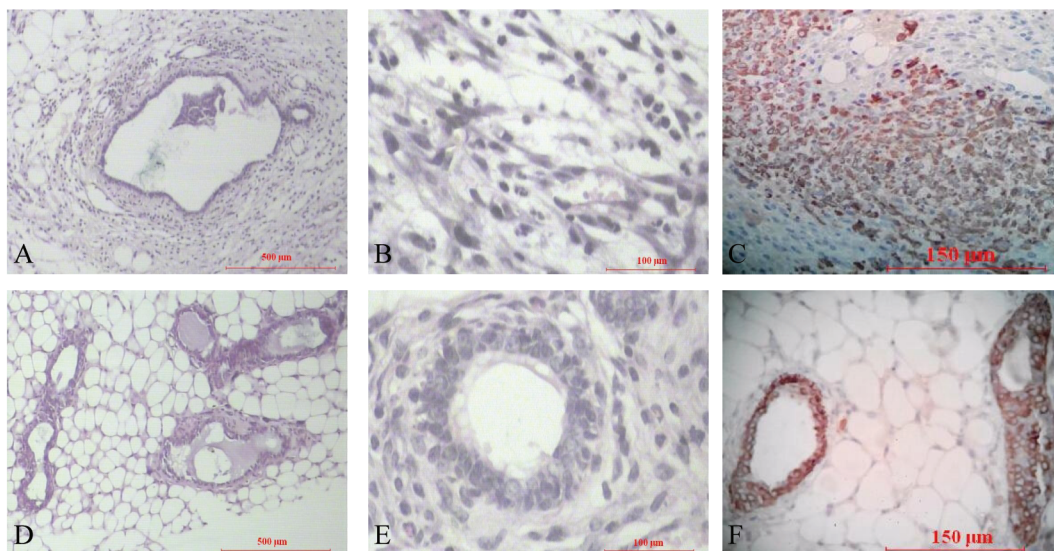
胞扩张形成的完整的腺体,周围围绕着密集的梭形间质细胞。免疫组织化学结果显示,各组裸鼠病灶中间质细胞被波形蛋白染成棕色,腺上皮细胞被角蛋白染成棕色,提示裸鼠皮下异位病灶由人来源的子宫内膜细胞形成。见图 3。

### 3 讨论

**3.1 造模鼠的选择** 啮齿类动物中鼠类动情周期短,激素水平的变化与人类相似,因此国内外多用鼠类建立 EMs 模型。根据诱导模型的组织来源,分为同种移植模型和异种移植模型。同种移植模型是用同类或同基因动物的子宫内膜组织进行造模,由于同种移植模型中所用的内膜取自动物,不能完全代表人 EMs 的特征,故本研究选用裸鼠建立异种移植模型。国内外多数异种移植模型研究中给受体鼠去

势,并予以补充外源性雌激素以支持人子宫内膜组织或细胞的生长<sup>[10-13]</sup>,但是啮齿类动物对雌激素高度敏感,补充雌激素可引起细胞增殖和子宫生长,从而引起动物潜在的全身性改变<sup>[14]</sup>。Beliard 等<sup>[15]</sup>研究表明小鼠的激素水平不影响病灶形成率,Bulun 等<sup>[16]</sup>报道子宫内膜间质细胞特异性表达的甾体激素合成过程中所需的全部基因,足够将胆固醇转化成雌激素促进病灶生长。该实验保留了裸鼠的卵巢,没有给予外源性雌激素支持,减少了去势手术对裸鼠的损伤,避免了雌激素的不良反应。

**3.2 造模部位的选择** 建立 EMs 模型国内外的多数研究是将子宫内膜缝合到造模鼠的腹膜、肠系膜或腹壁上,或将子宫内膜组织剪碎,注射到造模鼠盆腔。虽然腹腔注射对造模鼠创伤小,但是观察病灶时手术不可避免。另外,如果病灶粘连到诸如肝、肾、子宫角、脾、胃、肠系膜等适合病灶生长的部位,通过肉眼很难将病灶识别<sup>[17-18]</sup>。表达绿色荧光蛋白的荧光小鼠模型利用荧光成像系统通过皮肤可以无创地动态监测异位病灶的形成和发展,但绿色荧光蛋白表达仅可持续 3~4 周,且腺病毒仅可转染 15%~40%的内膜细胞,测量病灶大小时,荧光波长由于部分被小鼠组织吸收而引起测量误差<sup>[18]</sup>。该实验选择将人子宫内膜细胞直接注射到皮肤松弛的裸鼠腹部进行造模,其操作简单、方便,可以肉眼直接观察病灶的形成和生长情况,避免反复开腹观察对裸鼠的损伤。每只裸鼠腹部可注射 4 个部位,形成独立的 4 个病灶,



注:图 A 为围绕腺体的子宫内膜间质细胞(HE×100);图 B 为梭形的子宫内膜间质细胞(HE×400);图 C 为波形蛋白染色阳性的子宫内膜间质细胞(免疫组织化学×200);图 D 为子宫内膜腺上皮细胞形成的完整腺体(HE×100);图 E 为高立方状的子宫内膜腺上皮细胞(HE×400);图 F 为角蛋白染色阳性的子宫内膜腺上皮细胞(免疫组织化学×200)。

图 3 各组病灶鉴定

病灶有生长空间,节省了裸鼠数量,降低了实验成本。另外,在裸鼠腹壁形成的子宫内膜异位病灶,可用于腹壁 EMs 的相关研究。

**3.3 注射子宫内膜细胞最佳浓度的确定** 分别将  $2.5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$ 、 $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  和  $1 \times 10^7/200 \mu\text{L}$  3 个不同浓度的在位与异位子宫内膜细胞分别注射到裸鼠腹部皮下后,均可形成肉眼可见的病灶,其中注射  $2.5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  浓度的细胞后病灶形成率明显低于注射  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  和  $1 \times 10^7/200 \mu\text{L}$  浓度的细胞,但两者之间病灶形成率差异没有统计学意义。由于注射细胞浓度过大时,多数细胞沉积在注射器底端,堵塞针头引起注射困难,注射过程中造成细胞的浪费,因此注射  $1 \times 10^7/200 \mu\text{L}$  浓度的细胞和注射  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  浓度的细胞后病灶形成率比较差异无统计学意义。该结果提示  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  为注射细胞的最佳浓度。

**3.4 子宫内膜异位病灶形成最佳时间的确定** 将不同浓度的在位与异位子宫内膜细胞分别注射到裸鼠腹部皮下后,各组病灶开始出现的时间相似,不受细胞浓度和细胞来源部位的影响。注射细胞第 5 天后肉眼即可以观察到病灶,但是各组病灶形成率和病灶体积明显低于第 10 天和 15 天。大部分病灶在注射细胞后第 10 天形成,到第 15 天时仅有少数病灶形成,病灶形成率和病灶体积在第 10 天和 15 天比较,两者之间差异无统计学意义。由于注射细胞 10 天后病灶形成率较高、体积较大且易于肉眼观察,因此观察病灶的最佳时间为注射细胞后第 10 天。

**3.5 建立可视化 EMs 模型细胞的确定** 目前国内研究多用组织移植的方法建立 EMs 模型,但是组织移植的缺点是通过手术移植对小鼠的创伤较大,当组织移植到小鼠皮下时,如果切口愈合不良,组织易从切口逸出,影响病灶形成率。另外,移植组织易形成炎性囊肿<sup>[19]</sup>,且移植的子宫内膜组织寿命有限,不超过 4 周<sup>[20]</sup>。由于 EMs 患者的异位病灶易于获得、细胞培养方法简单且短时间内可以获得大量细胞,多数学者通过不同方法利用混合培养的子宫内膜间质细胞和腺上皮细胞成功建立了 EMs 模型<sup>[21-22]</sup>。本研究分别将  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  浓度的在位与异位子宫内膜细胞注射到裸鼠腹部皮下后,虽然病灶开始出现时间、病灶体积均无差异,但在第 10 天时注射异位子宫内膜细胞后病灶形成率明显高于注射在位的子宫内膜细胞,差异有统计学意义,这可能与异位子宫内膜细胞比在位子宫内膜细胞具有更强的侵袭、转移和血管生成能力有关<sup>[23-24]</sup>。由于异位的子宫内膜细

胞更能代表 EMs 的特征,且病灶形成率高,因此利用异位的子宫内膜细胞建立可视化裸鼠 EMs 模型更适宜。

**3.6 可视化 EMs 模型的鉴定** 裸鼠腹部皮下的病灶经病理证实与人 EMs 形态学相似,病灶中完整的腺体被密集的间质细胞围绕。注射异位子宫内膜细胞后形成的病灶与注射在位内膜细胞形成的病灶病理结果相似。角蛋白是腺上皮细胞的特异性标志物,波形蛋白是间质细胞的特异性标志物<sup>[25-26]</sup>,若角蛋白与波形蛋白均染色阳性提示病灶由子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞形成。该研究中所用的角蛋白与波形蛋白均不与裸鼠组织发生交叉反应,免疫组织化学结果显示病灶中形成腺体的腺上皮细胞可被角蛋白染色,腺体周围密集的间质细胞可被波形蛋白染色,证实裸鼠腹部皮下的异位病灶由人来源的子宫内膜细胞形成。

由于异位的子宫内膜细胞更能代表 EMs 的特征、不受月经周期的影响、注射后病灶形成率高,更适合用于建立 EMs 模型。该实验研究中造模鼠未去势,没有补充外源性雌激素,将  $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$  浓度混合培养的异位子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞注射到裸鼠腹部皮下,可成功建立可视化 EMs 模型。注射细胞 10 天后病灶形成率达 100%。注射细胞后第 5 天病灶体积最小,随着观察时间的延长,病灶缓慢增长,提示建立的可视化模型病灶具有生长潜能。该造模方法病灶形成率高、观察时间短,可肉眼直接连续、动态观察病灶的变化,无需手术开腹观察病灶,对小鼠创伤小。在裸鼠腹壁形成的子宫内膜异位病灶,为腹壁 EMs 的研究提供了一种较为理想的模型。

## 参 考 文 献

- [1] Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis-associated infertility[J]. J Reprod Med, 1989, 34(1):41-46.
- [2] Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries[J]. Fertil Steril, 2011, 96(2):366-373.e8.
- [3] Huang H, Li C, Zarogoulidis P, et al. Endometriosis of the lung: report of a case and literature review [J]. Eur J Med Res, 2013, 18: 13.
- [4] Ecker AM, Donnellan NM, Shepherd JP, et al. Abdominal wall endometriosis: 12 years of experience at a large academic institution [J]. Am J Obstet Gynecol, 2014, 211(4):363.e1-e5.
- [5] Khan Z, Zanfagnin V, El-Nashar SA, et al. Risk Factors, Clinical Presentation, and Outcomes for Abdominal Wall Endometriosis [J]. J Minim Invasive Gynecol, 2017, 24(3):478-484.
- [6] Kang J, Baek JH, Lee WS, et al. Clinical manifestations of abdominal wall endometriosis: a single center experience [J]. Arch Gynecol

- Obstet, 2013, 287(2):301-305.
- [7] Mistrangelo M, Gilbo N, Cassoni P, et al. Surgical scar endometriosis [J]. Surg Today, 2014, 44(4):767-772.
- [8] Lee GH, Kim MS, Choi MC, et al. Endometrioid adenocarcinoma arising from endometriosis of the pelvic peritoneum mimicking advanced ovarian cancer: A case report [J]. J Obstet Gynaecol, 2017, 37(1):129-130.
- [9] Yuan P, Huang Y, Wu H, et al. Induction of a local pseudo-pregnancy via levonorgestrel-loaded microspheres for the treatment of endometriosis in a rabbit model [J]. Hum Reprod, 2010, 25(2):462-469.
- [10] Wang Y, Lin M, Weng H, et al. ENMD-1068, a protease-activated receptor 2 antagonist, inhibits the development of endometriosis in a mouse model[J]. Am J Obstet Gynecol, 2014, 210(6):531.e1-e8.
- [11] Tamura K, Takashima H, Fumoto K, et al. Possible Role of  $\alpha 1$ -Antitrypsin in Endometriosis-Like Grafts From a Mouse Model of Endometriosis[J]. Reprod Sci, 2015, 22(9):1088-1097.
- [12] Li Y, Adur MK, Kannan A, et al. Progesterone Alleviates Endometriosis via Inhibition of Uterine Cell Proliferation, Inflammation and Angiogenesis in an Immunocompetent Mouse Model[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0165347.
- [13] Burns KA, Thomas SY, Hamilton KJ, et al. Early Endometriosis in Females Is Directed by Immune-Mediated Estrogen Receptor  $\alpha$  and IL-6 Cross-Talk[J]. Endocrinology, 2018, 159(1):103-118.
- [14] Edwards AK, Nakamura DS, Virani S, et al. Animal models for anti-angiogenic therapy in endometriosis[J]. J Reprod Immunol, 2013, 97(1):85-94.
- [15] Beliard A, Noël 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.
- [16] Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, et al. Role of estrogen receptor- $\beta$  in endometriosis[J]. Semin Reprod Med, 2012, 30(1):39-45.
- [17] Zamah NM, Dodson MG, Stephens LC, et al. Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice [J]. Am J Obstet Gynecol, 1984, 149(6):591-597.
- [18] Fortin M, Lépine M, Pagé M, et al. An improved mouse model for endometriosis allows noninvasive assessment of lesion implantation and development[J]. Fertil Steril, 2003, 80 (Suppl 2):832-838.
- [19] Laux-Biehlmann A, d'Hooghe T, Zollner TM. Menstruation pulls the trigger for inflammation and pain in endometriosis [J]. Trends Pharmacol Sci, 2015, 36(5):270-276.
- [20] Grümmer R, Schwarzer F, Bainczyk K, et al. Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model [J]. Hum Reprod, 2001, 16(8):1736-1743.
- [21] Banu SK, Starzinski-Powitz A, Speights VO, et al. Induction of peritoneal endometriosis in nude mice with use of human immortalized endometriosis epithelial and stromal cells: a potential experimental tool to study molecular pathogenesis of endometriosis in humans[J]. Fertil Steril, 2009, 91(Suppl 5):2199-2209.
- [22] Wang N, Hong S, Tan J, et al. A red fluorescent nude mouse model of human endometriosis: advantages of a non-invasive imaging method [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014, 176:25-30.
- [23] 苏晓华, 宋殿荣, 张崑, 等. 子宫内膜异位症中子宫内膜间质细胞侵袭、转移能力的研究[J]. 天津医药, 2014, 42(12):1163-1167.
- [24] 苏晓华, 宋殿荣, 张英, 等. 子宫内膜异位症中子宫内膜间质细胞血管生成能力的研究 [J]. 国际妇产科学杂志, 2015, 42 (1):49-53.
- [25] Chang L, Goldman RD. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(8):601-613.
- [26] Bohn W, Wieggers W, Beuttenmüller M, et al. Species-specific recognition patterns of monoclonal antibodies directed against vimentin[J]. Exp Cell Res, 1992, 201(1):1-7.

(收稿日期:2018-02-27)

[本文编辑 王昕]