

· 技术与方法 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.27.019

## 子宫内膜异位症大鼠内膜窗口期模型的建立\*

曹芳, 黄晓阳, 葛素梅, 许科, 陈莉<sup>△</sup>

(南京医科大学附属常州市妇幼保健院生殖中心 213000)

**[摘要]** **目的** 研究子宫内膜异位症(EMs)患者窗口期的子宫内膜容受性,构建 EMs 大鼠内膜窗口期动物模型。**方法** 取性成熟 SD 大鼠 22 只,通过手术将 SD 大鼠自体子宫内膜组织移植至同侧腹壁及对侧子宫系膜上,建立诱发型 EMs 大鼠动物模型。术后 4 周随机选取 2 只大鼠解剖观察异位内膜的生长情况,确定造模成功后,将 EMs 模型大鼠与雄鼠同笼交配,次日观察阴栓,妊娠第 5 天剖腹观察 20 只模型大鼠异位内膜的存活情况,并对在位子宫内膜及异位内膜进行组织形态学观察。**结果** 20 只妊娠第 5 天大鼠均有明显的异位病灶,在腹壁及系膜上均呈小包块样生长,且与周围组织有不同程度的粘连,光镜下见异位子宫内膜形态具有正常子宫内膜基本组织结构,EMs 大鼠造模成功;所有 EMs 模型大鼠与雄鼠同笼交配次日均见阴栓,妊娠第 5 天大鼠非手术侧子宫腔内不同程度积液,在位及异位内膜均处于分泌期。**结论** 通过自体子宫内膜移植法成功建立了 EMs 大鼠模型;EMs 模型大鼠子宫内膜处于胚胎着床窗口期,为研究 EMs 子宫内膜容受性提供了动物模型。

**[关键词]** 子宫内膜异位症;模型;动物;大鼠

**[中图分类号]** R711.71

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)27-3805-03

### Establishment of the endometriosis rat model in intimal window period\*

Cao Fang, Huang Xiaoyang, Ge Sumei, Xu Ke, Chen Li<sup>△</sup>

(Reproductive Center, Changzhou Women and Children Health Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213000, China)

**[Abstract]** **Objective** To research the endometrial receptivity by established the endometriosis rat model in intimal window period. **Methods** The autologous endometrial tissues of 22 sexually mature SD rats were transplanted into the homonymy abdominal wall and offside uterine mesometrium. After four weeks, we randomly dissected two rats and observed the growth of ectopic endometrium. The EMs rats were mated with male rats in the same cage and vaginal plug was observed in the next day. The histomorphology of eutopic and ectopic endometrial was observed in the fifth day of pregnancy. **Results** Ectopic endometrium was grown in the abdominal wall and mesometrium, which formed a small bulge cystic mass in 20 rats. All foci was showed adhesion to the surrounding tissues in a different extent. In the light microscope, the morphology of ectopic endometrial was as the same as nomal endometrium. The establishment of the endometriosis rat mode is successful. Vaginal plug was positive the next day. Nonoperative side uterine was full of fluid in the fifth day of pregnancy. Eutopic and ectopic endometrium were in the secretory phase. **Conclusion** It is a successful method to establish a rat model of endometriosis by autotransplantation of endometrium. The endometrium of EMs model rats is in embryo implantation window period, and it provides a convenient model for studying endometrial receptivity.

**[Key words]** endometriosis; model, animal; rat

子宫内膜异位症(EMs)是指子宫内膜组织在子宫腔被覆内膜及宫体基层以外的其他部位生长、浸润,主要临床表现为慢性盆腔痛及不孕。育龄妇女是主要患病人群,其中不孕症患者中发病率高达 40%~50%<sup>[1]</sup>。目前体外受精-胚胎移植技术(IVF-ET)是治疗 EMs 合并不孕症的有效手段。随着现代辅助生殖技术的广泛发展,对 EMs 不孕患者行 IVF-ET 时胚胎移植率可达 85%,但妊娠率远低于单纯输卵管因素者<sup>[2]</sup>,表明 EMs 患者子宫内膜可能存在影响胚胎着床的诸多不利因素。目前评价子宫内膜容受性的方法是在子宫内膜窗口期对在位子宫内膜进行分子生物学标志检测,对子宫内膜有一定的创伤,在人体中很难进行对照研究。因此本研究首先建立了 EMs 大鼠子宫内膜窗口期的动物模型,为研究 EMs 患者围着床期的子宫内膜容受性的影响奠定基础。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 健康清洁级 SD 大鼠 22 只,鼠龄 10 周,雌性,未孕。体质量 230~260 g,由南京医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(苏)2008-0004。

### 1.2 方 法

**1.2.1 模型构建** 无菌条件下,氯胺酮麻醉,将大鼠固定在手术板上,腹部备皮,常规消毒,取下腹部正中切口约 2.0~3.0 cm,膀胱背侧找到右侧子宫并游离,近端离右子宫角 1.0 cm 处结扎,远端离卵巢 2.0 cm 处结扎,并结扎两端的子宫系膜血管,切除约 1.5 cm 长的一段子宫,迅速置于盛有 37℃生理盐水的培养皿中,纵向切开子宫腔,剥去浆膜层,取约 4 mm×5 mm 大小的子宫内膜及肌层组织两块。用 1 号不吸收线分别缝至右侧内腹壁膜和左侧子宫系膜处,内膜面朝向腹腔,整理脂肪,逐层连续缝合腹部切口,常规关腹,肌内注射青霉素预防感染,待其自然苏醒,常规喂养。手术 4 周后,随机取 2 只大鼠解剖观察病灶生长的情况。

**1.2.2 妊娠雌鼠模型构建** 采用雌雄合笼交配法,建立妊娠雌鼠模型。将其余 20 只模型大鼠与雄鼠于当日 18:00 合笼饲养,次日雌雄分笼,抓取雌鼠观察阴道口有无阴栓,发现阴栓证明交配成功,受孕妊娠,记录为第 1 天,妊娠后与雄鼠分开饲养。

\* 基金项目:南京医科大学科技发展基金重点项目(2013NJMU213) 作者简介:曹芳(1982-),硕士,助理研究员,主要从事生殖医学研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: shaoshan686@sina.com。

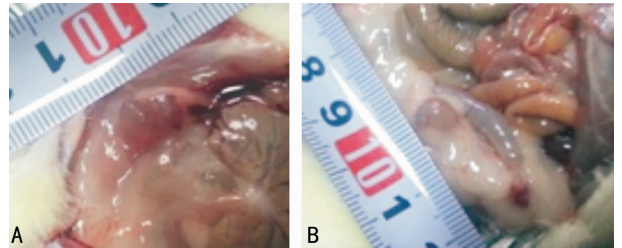
**1.2.3 观察指标** 大体观察:妊娠第 5 天,将大鼠脊椎脱臼处死,常规开腹,观察模型大鼠的异位内膜生长情况,病灶大小,及与周围组织的粘连程度。组织形态学观察:处死大鼠后立即取出模型组和假手术组大鼠卵巢,右侧腹壁异位内膜包块,左侧子宫系膜异位内膜包块及左侧未行手术的在位子宫,立即置于 4% 甲醛溶液中固定 24 h 后,常规石蜡包埋,4  $\mu\text{m}$  厚度连续切片,HE 染色,显微镜下观察在位、异位内膜及正常大鼠子宫内膜的组织形态学特点及差异。

## 2 结果

**2.1 大体观察** 手术 4 周后,随机选取解剖的 2 只大鼠病灶生长良好,形成包块,与周围组织粘连,EMs 大鼠造模完成。20 只 EMs 模型大鼠与雄鼠同笼次日,阴道口均发现阴栓,妊娠第 5 天,常规开腹,肉眼观移植物生长大多良好,腹壁及系膜上异位内膜形成大小不等的包块,呈隆起透亮的小囊状,内部充满透明液体,表面血管清晰可见(图 1)。所有异位病灶都与周围组织有不同程度的粘连,尤其与腹壁、子宫肠管粘连严重,难以分离。大部分病灶被子宫旁韧带的脂肪包裹,EMs 模型大鼠非手术侧子宫腔内充满液体。

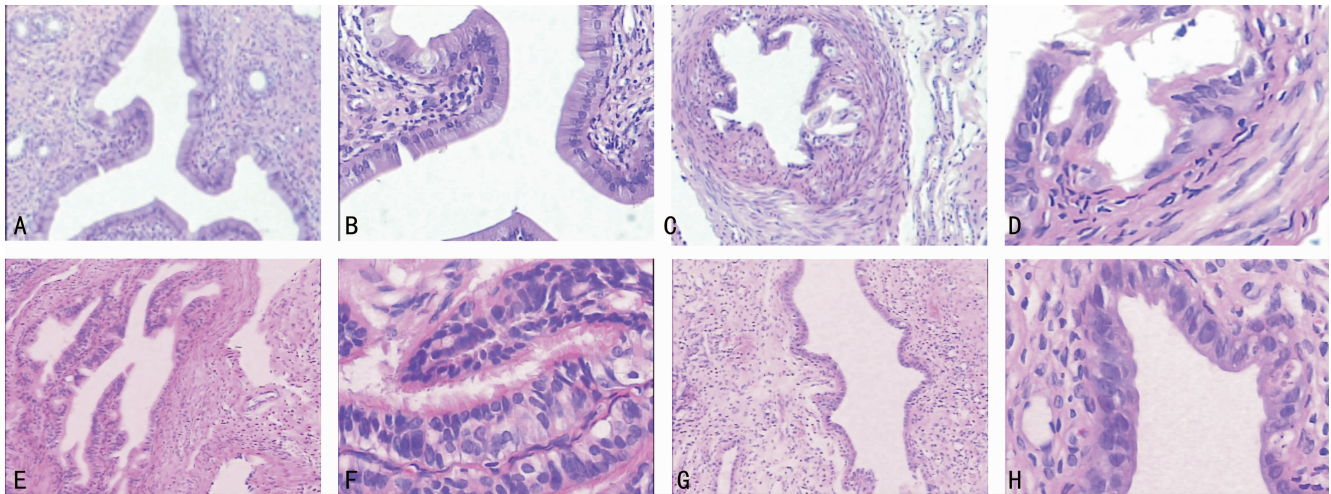
**2.2 组织形态学观察** 低倍镜下见移植物形成的囊壁由内向外分别为上皮细胞层、间质细胞层及少量纤维结缔组织,可见

数个腺腔样结构。腹壁上的异位内膜包块生长在皮下筋膜层与腹肌之间,没有明显的外膜,仅有一些纤维组织包裹;系膜上的异位内膜,腔内面的上皮及周围间质与在位子宫内膜相比变薄。异位内膜腺腔明显扩张,形成了“锯齿状”结构,见图 2。高倍镜下见腹壁及系膜上的异位内膜包块中的肌层变薄甚至消失。在位子宫内膜下层腺体丰富,且腺上皮细胞均为柱状或立方状,异位内膜上皮细胞呈低柱状,增生明显,部分腺腔内有分泌物和炎细胞存在。在位及异位子宫内膜腺体某些细胞出现核下空泡,处于分泌期,见图 2。



A: 异位内膜在腹壁形成包块; B: 异位内膜在子宫系膜形成包块, 左侧子宫腔内充满液体。

图 1 子宫异位内膜包块



A: 大鼠子宫内膜(100 $\times$ ); B: 大鼠子宫内膜(400 $\times$ )。C: 腹壁上异位子宫内膜(100 $\times$ ); D: 腹壁上异位子宫内膜(400 $\times$ )。E: 卵巢上异位子宫内膜(100 $\times$ ); F: 卵巢上异位子宫内膜(400 $\times$ )。G: 系膜上异位的子宫内膜(100 $\times$ ); H: 系膜上异位的子宫内膜(400 $\times$ )。

图 2 子宫内膜 HE 染色结果

## 3 讨论

IVF-ET 是治疗 EMs 合并不孕症的有效手段,胚胎的质量和子宫内膜容受性是成功着床的两个重要环节<sup>[3]</sup>。子宫内膜容受性是指母体子宫内膜在特定时期对胚胎的接受能力,即允许胚胎黏附直至植入的特定阶段。目前 EMs 对子宫内膜容受性的影响尚存在争议<sup>[4-6]</sup>,由于实际操作及伦理学方面的约束,很难在人体中进行 EMs 的对照研究,EMs 动物模型是研究 EMs 发生发展机制的主要途径。大鼠生命力较强,激素水平较高,性周期短且规律,因此选择大鼠造模对移植物的成活和移植后的观察均较为有利。

自体内膜移植建立 EMs 大鼠模型的理论依据主要为子宫内膜种植学说,成功移植的前提是内膜的完整性。部分学者建立大鼠诱发性 EMs 模型时,将大鼠子宫内膜与肌层分离,只种植内膜组织到腹腔<sup>[7-8]</sup>。Uchiide 等<sup>[9]</sup>报道将大鼠完整的子宫片段纵形切开后移植到腹腔内,子宫内膜组织能成活,其生物学行为接近人类 EMs 病灶。为保证子宫内膜基底层完整性,本研究将大鼠右侧完整的子宫片段纵形切开后,取内膜和肌层

组织同时进行移植。

EMs 的发生发展是异位子宫内膜经黏附、侵袭及新血管形成等多阶段逐步演变的过程,异位内膜本身及其周围组织新生血供的建立是子宫内膜异位种植存活的基础条件<sup>[10-13]</sup>。因大鼠子宫系膜薄,脂肪多,在系膜上缝合子宫内膜组织出血多,对技术要求高,常用内膜移植到腹壁的方法建立大鼠 EMs 模型。由于子宫系膜上血供非常丰富,本研究将子宫内膜不仅移植到同侧腹腔,同时对侧系膜上移植,结果发现两处异位内膜均生长良好,呈透亮的小囊状,内部充满积液,表面血管可见。与以往将子宫内膜片放入腹壁肌层与皮下筋膜之间的方法相比,带有肌层组织的内膜易缝合固定,且内膜不易破坏,镜下见肌层及内膜基底层均保持完整,异位内膜细胞形态和组织结构近似于正常子宫内膜基本结构,但是异位内膜包块中的肌层较薄,与在位子宫及正常子宫的肌层相比血管减少,有不同程度的纤维化。大体观察所有异位病灶与腹膜、肠管等周围组织有着不同程度的粘连,甚至难以分离,和临床上患者病灶多与周围组织粘连相符,大鼠 EMs 模型造模成功。

在本研究中发现大部分大鼠子宫系膜异位包块较腹壁上大,与周围组织粘连较严重,镜下观察系膜上的异位内膜腺体也更丰富,可能与系膜上异位内膜得到的血供营养更多有关。通过将术后 4 周造模成功的 EMs 模型大鼠与雄鼠同笼交配,妊娠第 5 天大鼠子宫内膜腺体丰富,腺腔扩张明显,处于窗口期,此时子宫内膜呈现最大程度接收胚胎着床的能力,为后续研究 EMs 患者子宫内膜容受性对胚胎着床的影响提供了有价值的基础模型。

#### 参考文献

- [1] Ulukus M, Ulukus EC, Tavmergen Goker EN, et al. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(3):687-693.
- [2] Coccia ME, Rizzello F, Mariani G, et al. Impact of endometriosis on in vitro fertilization and embryo transfer cycles in young women: a stage-dependent interference[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2011, 90(11):1232-1238.
- [3] 武泽,李蓉,乔杰.辅助生殖技术治疗中子宫内膜容受性变化的研究进展[J]. *生殖与避孕*, 2011, 31(8):538-543.
- [4] Bellelis P, Podgaec S, Bro MM. Environmental factors and endometriosis[J]. 2011, 57(4):448-452.
- [5] Kuivasaari P, Hippelinen M, Anttila M, et al. Effect of endometriosis on IVF/ICSI outcome: stage III/IV endometriosis worsens cumulative pregnancy and live-born rates[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(11):3130-3135.
- [6] Zanatta A, Rocha AM, Carvalho FM, et al. The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis

and its related infertility: a review[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2010, 27(12):701-710.

- [7] 刘爱红,戴淑真,姚琴,等.子宫内异位症大鼠模型复制[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(2):89-92.
- [8] Zou J, Guan Z, Zhang WY, et al. Beneficial effects of the Chinese herbal medicine Sanjie Zhentong Capsule on experimental endometriosis in rats[J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(6):666-672.
- [9] Uchiide I, Ihara T, Sugamata M. Pathological evaluation of the rat endometriosis model[J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(4):782-786.
- [10] Hull ML, Escareno CR, Godsland JM, et al. Endometrial-Peritoneal interactions during endometriotic lesion establishment[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(3):700-715.
- [11] Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis[J]. *Hum Reprod Update*, 2007, 13(4):331-342.
- [12] Lopopolo M, Affaitati G, Fabrizio A, et al. Effects of tramadol on viscerovisceral hyperalgesia in a rat model of endometriosis plus ureteral calculosis[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2014, 28(3):331-341.
- [13] Sevket O, Sevket A, Buyukpinarbasili N, et al. The effects of ranibizumab on surgically induced endometriosis in a rat model: a preliminary study[J]. *Reprod Sci*, 2013, 20(10):1224-1229.

(收稿日期:2015-03-20 修回日期:2015-05-24)

(上接第 3804 页)

列)连接并转入到慢病毒主体质粒中,载体中的 IRES 可以使 STAT3 和 GFP 分别在细胞内表达。将重组载体转染 293 T 细胞验证了 STAT3 插入载体后,Western blot 实验发现转染后的 293 T 细胞 STAT3 表达明显强化,表明其蛋白表达的正确及有效表达。载体质粒及包装质粒共转染 293 T 细胞 48 h 后通过荧光显微镜观察到大量绿色荧光,说明包装产毒成功。病毒滴度测定结果显示,获得的病毒滴度达到  $8.4 \times 10^7$  TU/mL。本实验成功构建了 STAT3 和 GFP 基因共表达的高滴度慢病毒载体,为后继实验打下基础。

#### 参考文献

- [1] Huang SY. Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(5):1362-1366.
- [2] Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(3):151-161.
- [3] de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(1):24-37.
- [4] da Cunha A, Michelin MA, Murta EF. Pattern response of dendritic cells in the tumor microenvironment and breast cancer[J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(3):495-502.
- [5] Masciocchi D, Gelain A, Villa S, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3): a promising

target for anticancer therapy[J]. *Future Med Chem*, 2011, 3(5):567-597.

- [6] See AP, Han JE, Phallen J, et al. The role of STAT3 activation in modulating the immune microenvironment of GBM[J]. *J Neurooncol*, 2012, 110(3):359-368.
- [7] Brady MT, Miller A, Sait SN, et al. Down-regulation of signal transducer and activator of transcription 3 improves human acute myeloid leukemia-derived dendritic cell function[J]. *Leuk Res*, 2013, 37(7):822-828.
- [8] Flanagan SE, Haapaniemi E, Russell MA, et al. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(8):812-814.
- [9] Kaebisch R, Mejias-Luque R, Prinz C, et al. Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A impairs human dendritic cell maturation and function through IL-10-mediated activation of STAT3[J]. *J Immunol*, 2014, 192(1):316-323.
- [10] Masciocchi D, Gelain A, Villa S, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3): a promising target for anticancer therapy[J]. *Future Med Chem*, 2011, 3(5):567-597.

(收稿日期:2015-04-15 修回日期:2015-06-20)