

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.07.008

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190128.0847.004.html(2019-01-29)

## 人子宫内膜异位症的可视踪裸鼠模型构建\*

关绮蕙, 史文静<sup>△</sup>, 周龙书, 李露

(广州医科大学附属第二医院妇产科, 广州 510260)

**[摘要]** **目的** 运用异体移植动物模型及活体成像技术, 构建人子宫内膜异位症的可视踪裸鼠模型。**方法** 采集人子宫在位内膜组织, 制成悬液。应用慢病毒载体将荧光素酶和红色荧光蛋白基因转入内膜组织并培养 48 h, 将等体积的悬液(分成 3 组: A 组已转染的内膜组织, B 组未转染的内膜组织, C 组等体积的 DMEM/F12 培养基)注射到 BALB/C 雌性裸鼠腹腔内, 运用活体成像仪监测异位病灶的发展情况。28 d 后分离异位病灶, 运用苏木素-伊红(HE)染色和免疫组织化学鉴定异位病灶的来源并分析成模情况。**结果** 已成功转染内膜组织的裸鼠在活体成像仪监测下显示, 异位病灶的荧光信号在种植后第 7 天至第 14 天减小( $P < 0.01$ ); 第 14 天到第 28 天增大( $P < 0.05$ )。HE 染色和免疫组织化学显示异位病灶均来自于人子宫内膜组织。**结论** 人子宫内膜异位症的可视踪裸鼠模型构建成功。

**[关键词]** 子宫内膜异位症; 可视踪; 裸鼠; 模型, 动物**[中图法分类号]** R711 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)07-1110-04

## Establishment of nude mouse model of endometriosis built by tracing human endometrium\*

GUAN Qihui, SHI Wenjing<sup>△</sup>, ZHOU Longshu, LI Lu

(Department of Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish tracing nude mouse model of human endometriosis, which was transfected by lentivirus-RFP-luciferase and detected by in vivo bioluminescence imaging (BLI) system. **Methods** Human endometrial tissues were collected and made into suspension, which were successfully transfected by lentivirus-RFP-luciferase and cultured for 48 h in vitro. Isometric suspension, which was divided into three groups: the transfected group (group A), the untransfected group (group B) and the DMEM/F12 group (group C), was intraperitoneally injected into female BALB/C nude mice. The development of ectopic lesion was dynamically detected by BLI system. Twenty-eight days later, in order to learn the establishment of model, ectopic lesions were separated and determined by biotechnology such as HE stain and immunohistochemical analysis. **Results** The BLI system showed that the ROI of ectopic lesions decreased from the 7th to the 14th day ( $P < 0.01$ ), and increased from the 14th to the 28th day in group A ( $P < 0.05$ ). Both HE stain and immunohistochemical analysis showed that the ectopic lesions were derived from human endometrial tissues. **Conclusion** The tracing nude mouse model of human endometriosis is successfully established.

**[Key words]** endometriosis; tracing; nude mouse; models, animal

子宫内膜异位症(以下简称“内异症”)是指子宫内膜组织出现在子宫体以外的部位, 其治疗方式主要有手术及药物治疗, 其中药物治疗只能对症治疗而不能去除异位的内膜细胞, 而手术治疗有较高的复发率<sup>[1]</sup>。因此, 如何提高内异症的临床治疗效果是迫切需要解决的问题。目前国内外已建立的内异症动物模型都存在一定的缺陷<sup>[2]</sup>, 限制了基础研究成果向临床转化的可能性。本文将内异症患者的在位子宫内膜制成组织悬液, 应用慢病毒载体将荧光素酶和红色

荧光蛋白基因转入子宫内膜组织, 并注射到裸鼠腹腔内, 以构建可视踪的内异症裸鼠模型, 为内异症的发病机制和新治疗药物的筛选及药理药效学研究提供坚实的实验基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 子宫内膜组织均来自本院因卵巢巧克力囊肿合并子宫肌瘤行全子宫切除术的在位子宫内膜, 所有患者术前 3 个月内均未接受激素类药物治疗, 既往未合并其他内、外科疾病、免疫性及其他恶性

\* 基金项目: 广东省科技计划项目(2012B060300033)。 作者简介: 关绮蕙(1991—), 在读硕士, 主要从事子宫内膜异位症方面的研究。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: swj2003@sina.com。

疾病;36 只无特殊病原体(SPF)级 6~8 周龄 BALB/C 雌性裸鼠购自中山大学动物实验中心, 体质量(16±4)g; LV-RFP-Luc 购自上海汉恒生物有限公司, D-Luciferin 购自美国 Goldbio 公司; 小鼠抗人波形蛋白单克隆抗体-7(V-7)、小鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体-18(CK-18)均购自美国 Santa Cruz 公司; 小鼠抗人单克隆抗体-CD34(CD34)购自广州创科伟生物科技有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 子宫内膜组织采集及体外病毒转染** 用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗新鲜收集的内膜组织并将其剪碎为糊状悬液。将其分为等体积的 A、B 两组, 分别接种于无菌六孔板内, 每孔加入含有 20% 胎牛血清和 0.002 5 μg/mL 17β-雌二醇(E<sub>2</sub>)的 DMEM/F12 培养基 2 mL, A 组每孔加入含有终浓度 5 μg/mL Polybrene 滴度为 1×10<sup>8</sup> IU/mL 的 LV-RFP-Luc, 并于体外转染 24 h; B 组加入等体积的培养基。两组均置入 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 24 h 后将两组子宫内膜组织培养液均换成含有 20% 胎牛血清和 0.002 5 μg/mL E<sub>2</sub> 的 DMEM/F12 培养基 2 mL, 培养 48 h 后在荧光显微镜下观察子宫内膜组织块的荧光表达情况。

**1.2.2 构建动物模型** 将裸鼠等数量分为 A、B、C 3 组, 每组 12 只。3 组中每只裸鼠分别于腹腔内一次性注射等体积的已转染的组织块悬液、未转染的组织块悬液和 DMEM/F12 培养基。注射后参考文献[3]肌内注射 E<sub>2</sub>(0.02 μg/d)。种植后每隔 7 天 1 次在活体成像仪下监测异位病灶的发展情况。

**1.2.3 异位病灶的采集及形态和来源鉴定** 于建模后第 28 天颈椎脱臼处死裸鼠, 剖腹观察异位病灶的生长情况并分离异位病灶。异位病灶分离后分别放入装有 4% 多聚甲醛溶液的离心管中固定, 并分别按试剂盒操作说明行苏木素-伊红(HE)染色及免疫组织化学鉴定。若 HE 染色病灶中有子宫内膜腺体组织、间质细胞及新生血管形成, 且免疫组织化学鉴定子宫内膜腺体组织和间质细胞均来源于人类, 则提示裸鼠内异症模型建模成功[4]。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 秩和检验比较异位病灶荧光信号 ROI 值的差异性。检验水准  $\alpha = 0.05$ , 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 体外 LV-RFP-Luc 转染情况及鉴定** (1)A 组子宫内膜组织体外培养至 48 h 在荧光显微镜下观察示: 子宫内膜组织块红色荧光蛋白表达明亮, 细胞阳性数率多(图 1C); 其快速冰冻切片可见典型的腺体结构(图 1D)。(2)HE 染色结果显示: A 组和 B 组的子宫内膜组织块均保持着完整的子宫内膜腺体结构(图 1A、B)。

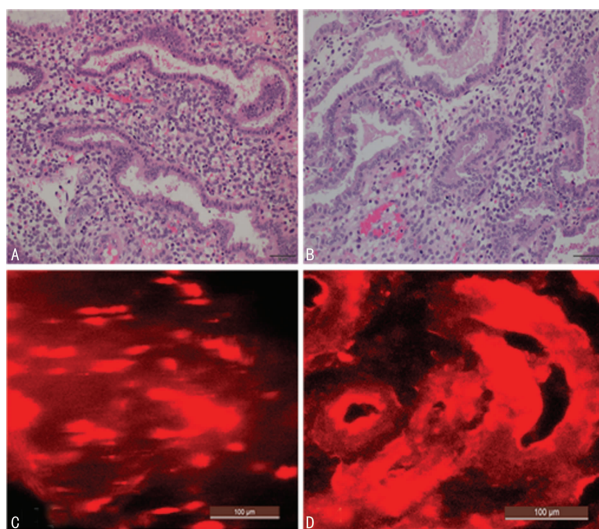


图 1 A: A 组组织; B: B 组组织; C: A 组组织块; D: A 组快速冰冻切片  
图 1 子宫内膜组织转染情况(HE, ×200)

### 2.2 活体成像仪监测异位病灶

**2.2.1 活体成像仪下异位病灶的荧光信号 ROI 表达** 各组裸鼠在整个生长周期中, 生长状况良好, 实验中未发现裸鼠感染和(或)死亡等情况。A 组 11 只裸鼠在活体成像下均能检测到腹腔异位病灶发出的荧光信号; 其中 1 只裸鼠于造模后第 21、28 天均未检测到异位病灶的荧光信号。动态检测到异位病灶发出荧光信号 ROI 值由第 7 天至第 14 天先变小, 由第 14 天至第 28 天逐渐增大。而 B 组和 C 组均未检测到异位病灶荧光信号(图 2)。

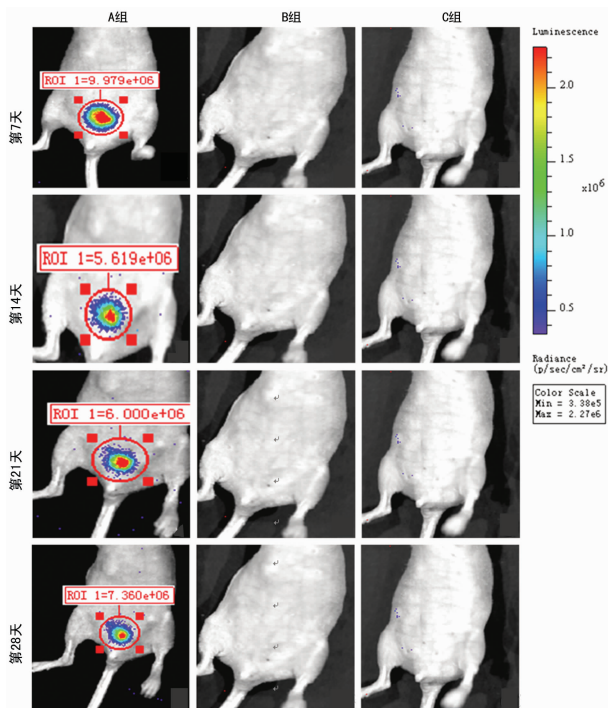


图 2 活体成像仪下异位病灶荧光信号 ROI 表达

**2.2.2 腹腔内异位病灶发出荧光信号 ROI 值** 异位病灶发出荧光信号的 ROI 值先减小后增大: 第 7、14、21、28 天分别为  $(7.008 \pm 1.024) \times 10^6$ 、 $(4.363 \pm$



$0.731) \times 10^6$ 、 $(5.113 \pm 0.696) \times 10^6$ 、 $(6.34 \pm 0.713) \times 10^6$ ，第 7 天至第 14 天，荧光信号 ROI 值先减小，差异有统计学意义( $P < 0.01$ )；第 14 天至第 28 天，ROI 值增大，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，见图 3、4。

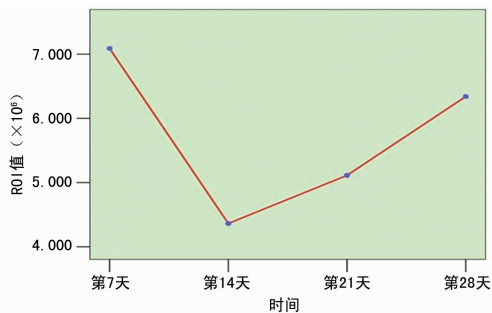
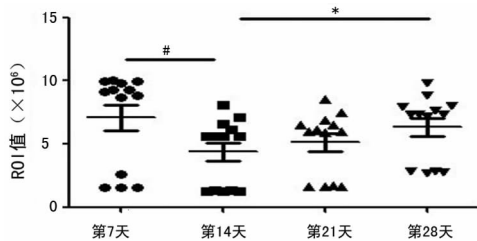


图 3 异位病灶 ROI 值趋势的曲线图



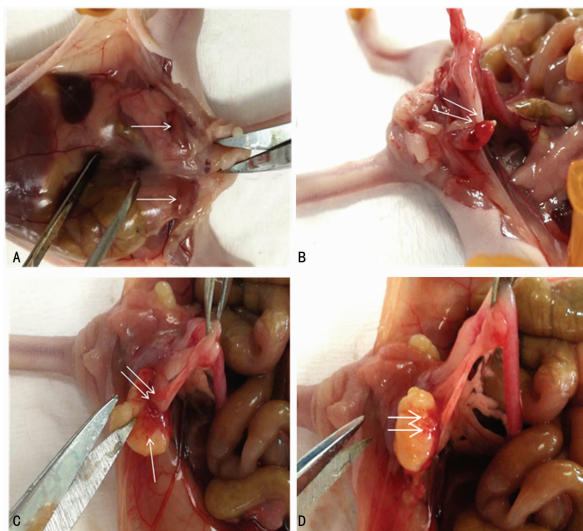
\*:  $P < 0.05$ ; #:  $P < 0.01$ ;  $n = 13$

图 4 异位病灶 ROI 值的比较

**2.2.3 剖腹后裸鼠腹腔内异位病灶形成情况** (1)A 组中腹腔内连续检测到荧光信号的裸鼠剖腹后肉眼可见透明紫色囊肿或白色硬结(图 5A 白色单箭头所指),未见其他游离病灶。异位病灶周围可见丰富血管形成或点状出血,囊内积聚暗红黏稠液体(图 5B 白色双箭头所指)。大部分异位病灶黏附于肠系膜、膀胱旁脂肪垫等处,且与周围组织存在轻度粘连。另外 1 只于第 21、28 天均未能检测到荧光信号的裸鼠剖腹后未见任何异位病灶,提示该个体造模失败。(2)B 组中所有裸鼠腹腔内均可见透明紫色囊肿或白色硬结(图 5C 白色单箭头所指),未见游离病灶。异位病灶周围可见丰富血管形成,囊内积聚清亮液体。大部分异位病灶黏附于肠系膜、膀胱旁脂肪垫等处,且与周围组织存在轻度粘连(图 5D 白色双箭头所指),C 组未见明显异位病灶。

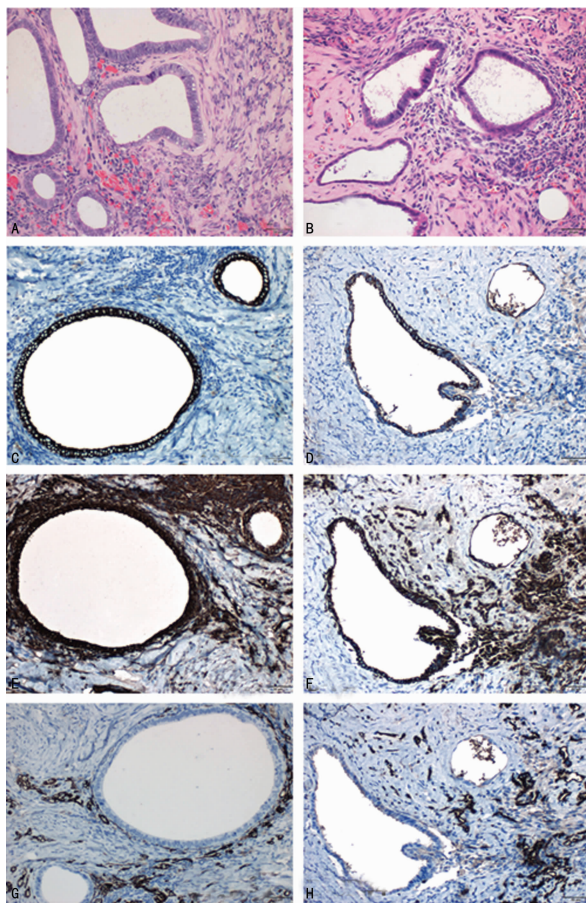
**2.2.4 异位病灶 HE 染色及免疫组织化学鉴定结果** (1)A、B 两组裸鼠的每个异位病灶均可见典型的内膜腺体结构,血管增殖丰富,未侵入腺泡腔。其组织学形态特征和人原发内异症的表现极为相似,无明显病理学改变,且两组的形态学结构未见明显异常(图 6A、B)。(2)A 组和 B 组裸鼠腹腔中种植成功的异位病灶,间质细胞质、腺上皮细胞质、血管内皮细胞质分别被 V-7、CK-18、CD34 染成棕黑色(见图 6C~H)。证明了移植的子宫内膜组织并未改变子宫内膜组织细胞的特异性蛋白表达,确定异位病灶组织与人类的子宫内膜组织同源,提示了可示踪内异症动物模

型建模成功。



A、B: A 组裸鼠; C、D: B 组裸鼠

图 5 A 组和 B 组异位病灶



A、B: 裸鼠的异位病灶组织形态(HE); C、D: CK-18 表达水平(免疫组织化学); E、F: V-7 表达水平(免疫组织化学); G、H: CD34 表达水平(免疫组织化学)

图 6 A、B 两组异位病灶 HE 染色及免疫组织化学鉴定( $\times 200$ )

**2.2.5 各组异位病灶成模率** A 组异位病灶成模率为 91.67%, B 组异位病灶成模率为 100.00%, C 组未见任何异位病灶。

### 3 讨 论

内异症可引起痛经、性交痛、不孕等症状<sup>[5]</sup>,迄今为止其发病机制仍不明确。由于伦理学方面的约束,动物模型已成为研究发病机制和治疗方法的主要途径。动物模型可分为灵长类和啮齿类动物,其中灵长类动物具有成模率低、费用昂贵等问题,限制其在研究中的应用。而啮齿类动物具有费用低廉、易于繁殖等优点,因此可用于内异症的发病机制及治疗等方面的研究<sup>[6]</sup>。

目前应用的啮齿类内异症动物模型有大鼠自体移植模型和免疫缺陷小鼠异体移植模型。大鼠自体移植模型虽然存在很多优点如易于生长、移植物无自身免疫抵抗等<sup>[7-8]</sup>,但移植物本身来源于实验动物,与人类的种属差异性较大,实验结果不能直接应用于人类。在免疫缺陷小鼠异体移植模型中,人子宫内膜被直接种植于小鼠腹腔内,移植的内膜组织保留原来的组织形态和生化特性,可以在动物体内研究人子宫内膜的侵袭演变过程。GREAVES 等<sup>[9]</sup>和 YAMAGATA 等<sup>[10]</sup>将人子宫内膜组织碎片或子宫内膜细胞悬液,注射到裸鼠的腹腔中成功构建内异症病灶。AGOSTINIS 等<sup>[11]</sup>通过把卵巢巧克力囊肿患者的囊内组织和在位内膜的组织碎片,注射到 SCID 小鼠的腹腔内,成功构建内异症病灶。HE 等<sup>[12]</sup>将人子宫内膜细胞注射到裸鼠身上,成功构建内异症病灶,成模率高达 80%。

以往在内异症病灶发展的研究中,常根据在特定时间进行开腹探查后所得的异位病灶体积、大小等来评价病灶发展情况<sup>[13-14]</sup>。该方法缺乏对同一病灶准确、实时的监控,不能明确区分病灶与周围组织,需在不同的时间点牺牲实验动物<sup>[15]</sup>。近年来,活体无创观察方法备受关注。其原理是应用病毒载体将荧光素酶或荧光蛋白基因转入子宫内膜细胞或组织,把已转染的细胞或组织种植于实验动物身上,运用活体成像仪即可监测异位病灶的位置及其大小<sup>[16]</sup>。FERREIRO 等<sup>[17]</sup>成功建立了内异症小鼠模型,通过无创监测来研究内异症病灶早期的生长和进展情况。WANG 等<sup>[18]</sup>将含有红色荧光蛋白基因的腺病毒转染内膜细胞,然后将其注射于裸鼠皮下或腹腔内,通过荧光扫描成像系统监测病灶的生长情况。本实验方法灵敏度高、特异性强,能实时监测活体动物病灶的动态变化,避免了处死动物带来的实验损耗,以及只能单次对同一个体进行病灶生长情况评估等缺点,具有不可比拟的优越性<sup>[19]</sup>。

本实验中 HE 染色及免疫组织化学结果证明了移植的内膜组织并未改变其特异性蛋白表达,确定异位病灶组织与人子宫内膜组织同源,与 ZHAO 等<sup>[20]</sup>报道相符。而通过活体成像系统监测到的异位病灶荧光信号 ROI 值先减小后增大,与 SOHNGEN 等<sup>[21]</sup>和 GROOTHUIS 等<sup>[22]</sup>报道相符。可示踪的内异症

裸鼠模型造模成功。

与以往的大鼠自体移植法建模及有创测量法相比,本方法采取人的子宫内膜组织建立模型,减少了因物种差异带来的结果偏差;使用无创的监测手段,减少实验动物损耗,可连续、实时、准确地观察病灶的生长情况。本研究通过建立可靠、重复性强、可示踪的内异症动物模型,为研究内异症提供坚实的研究平台,可广泛应用于临床前内异症新药疗效测试及内异症的发生机制研究。

### 参考文献

- VERCELLINI P, VIGANO P, SOMIGLIANA E, et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(5): 261-275.
- 金济云, 夏亲华. 子宫内膜异位症动物模型研究进展[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(5): 28-31.
- GRUMMER R, SCHWARZER F, BAINCZYK K, et al. Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(8): 1736-1743.
- EDWARDS A K, NAKAMURA D S, VIRANI S, et al. Animal models for anti-angiogenic therapy in endometriosis[J]. *J Reprod Immunol*, 2013, 97(1): 85-94.
- MEHEDINTU C, PLOTOGEA M N, IONESCU S, et al. Endometriosis still a challenge[J]. *J Med Life*, 2014, 7(3): 349-357.
- KIM S M, YOO T, LEE S Y, et al. Effect of SKI2670, a novel, orally active, non-peptide GnRH antagonist, on hypothalamic-pituitary-gonadal axis[J]. *Life Sci*, 2015, 139: 166-174.
- 曹芳, 黄晓阳, 葛素梅, 等. 子宫内膜异位症大鼠内膜窗口期模型的建立[J]. *重庆医学*, 2015, 44(27): 3805-3807.
- BRUNER-TRAN K L, MOKSHAGUNDAM S, HERINGTON J L, et al. Rodent models of experimental endometriosis: identifying mechanisms of disease and therapeutic targets[J]. *Curr Women Health Rev*, 2018, 14(2): 173-188.
- GREAVES E, COUSINS F L, MURRAY A, et al. A novel mouse model of endometriosis mimics human phenotype and reveals insights into the inflammatory contribution of shed endometrium[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(7): 1930-1939.
- YAMAGATA Y, TAKAKI E, SHINAGAWA M, et al. Retinoic acid has the potential to suppress endometriosis development[J]. *J Ovarian Res*, 2015, 8: 49.
- AGOSTINIS C, ZORZET S, DE LEO R, et al. The combination of N-acetyl cysteine, alpha-lipoic acid, and bromelain shows high anti-inflammatory properties in novel in vivo and in vitro models of endometriosis[J]. *Mediators Inflamm*, 2015(2015): 918089.
- HE H, LIU R, XIONG W, et al. Lentiviral vector-mediated down-regulation of Notch1 in endometrial stem cells results in proliferation and migration in(下转第 1117 页)

- [2] D'AMICO R S, ENGLANDER Z K, CANOLL P, et al. Extent of resection in Glioma — a review of the cutting edge[J]. *World Neurosurg*, 2017, 103: 538-549.
- [3] 《中国中枢神经系统胶质瘤诊断和治疗指南》编写组. 中国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南(2015) [J]. *中华医学杂志*, 2016, 102(7): 485-509.
- [4] KUBBEN P L, TER MEULEN K J, SCHIJNS O E, et al. Intraoperative MRI-guided resection of glioblastoma multiforme; a systematic review[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(11): 1062-1070.
- [5] ZHANG J, CHEN X, ZHAO Y, et al. Impact of intraoperative magnetic resonance imaging and functional neuronavigation on surgical outcome in patients with gliomas involving language areas[J]. *Neurosurg Rev*, 2015, 38(2): 319-330, 330.
- [6] SERRA C, STAUFFER A, ACTOR B, et al. Intraoperative high frequency ultrasound in intracerebral high-grade tumors[J]. *Ultraschall Med*, 2012, 33(7): E306-312.
- [7] SENFT C, BINK A, FRANZ K, et al. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(11): 997-1003.
- [8] ACERBI F, BROGGI M, EOLI M, et al. Fluorescein-guided surgery for grade IV gliomas with a dedicated filter on the surgical microscope; preliminary results in 12 cases[J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2013, 155(7): 1277-1286.
- [9] NEIRA J A, UNG T H, SIMS J S, et al. Aggressive resection at the infiltrative margins of glioblastoma facilitated by intraoperative fluorescein guidance[J]. *J Neurosurg*, 2017, 127(1): 111-122.
- [10] STUMMER W, PICHLMEIER U, MEINEL T, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma; a randomised controlled multicentre phase III trial[J]. *Lancet Oncol*, 2006, 7(5): 392-401.
- [11] LE RHUN E, TAILLIBERT S, CHAMBERLAIN M C. Anaplastic glioma: current treatment and management [J]. *Expert Rev Neurother*, 2015, 15(6): 601-620.
- [12] SIMONETTI G, GAVIANI P, INNOCENTI A, et al. Update on treatment strategies for anaplastic glioma; a review of literature[J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(7): 977-981.
- [13] NUÑO M, BIRCH K, MUKHERJEE D, et al. Survival and prognostic factors of anaplastic gliomas[J]. *Neurosurgery*, 2013, 73(3): 458-465.
- [14] WICK W, WIESTLER B, PLATTEN M. Treatment of anaplastic glioma[J]. *Cancer Treat Res*, 2015, 163: 89-101.
- [15] DILEK O, IHSAN A, TULAY H. Anaphylactic reaction after fluorescein Sodium administration during intracranial surgery[J]. *J Clin Neurosci*, 2011, 18(3): 430-431.
- [16] ROBERTS D W, OLSON J. Fluorescein guidance in glioblastoma resection[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(18): e36.

(收稿日期: 2018-09-28 修回日期: 2018-12-26)

(上接第 1113 页)

- endometriosis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 434: 210-218.
- [13] LU Z, ZHANG W, JIANG S, et al. Effect of oxygen tensions on the proliferation and angiogenesis of endometriosis heterograft in severe combined immunodeficiency mice [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(2): 568-576.
- [14] ERTEN O U, ENSARI T A, DILBAZ B, et al. Vitamin C is effective for the prevention and regression of endometriotic implants in an experimentally induced rat model of endometriosis[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2016, 55(2): 251-257.
- [15] 刘斌, 王宁宁. 子宫内位异位症动物模型活体无创观察研究[J]. *国际妇产科学杂志*, 2009, 36(6): 472-475.
- [16] SIMITSIDELLIS I, GIBSON D A, SAUNDERS P. Animal models of endometriosis; Replicating the aetiology and symptoms of the human disorder[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2018, 32(3): 257-269.
- [17] FERRERO H, BUIGUES A, MARTINEZ J, et al. A novel homologous model for noninvasive monitoring of endometriosis progression[J]. *Biol Reprod*, 2017, 96(2): 302-312.
- [18] 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.
- [19] BADR C E. Bioluminescence imaging; basics and practical limitations[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1098: 1-18.
- [20] ZHAO T, LIU X, ZHEN X, et al. Levo-tetrahydropalmitate retards the growth of ectopic endometrial implants and alleviates generalized hyperalgesia in experimentally induced endometriosis in rats [J]. *Reprod Sci*, 2011, 18(1): 28-45.
- [21] SOHNGEN L, SCHMIDT M, WIMBERGER P, et al. Additional B-cell deficiency does not affect growth and angiogenesis of ectopic human endometrium in T-cell-deficient endometriosis mouse models during long-term culture [J]. *J Reprod Immunol*, 2014, 106: 50-57.
- [22] GROOTHUIS P G. Angiogenesis and vascular remodeling in female reproductive organs [J]. *Angiogenesis*, 2005, 8(2): 87-88.

(收稿日期: 2018-09-18 修回日期: 2018-11-03)