

裸鼠人绿色荧光子宫内位症模型的构建

刘 斌¹, 王宁宁^{1*}, 洪珊珊¹, 张红霞¹, 王子莲¹, 庄广伦¹, 潘秋辉², 董 愉³
(中山大学 1. 附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080, 2. 附属第二医院, 3. 附属第一医院病理科)

摘 要:【目的】探索建立人子宫内位症荧光体外与在体模型的具体方法。【方法】采用增强型绿色荧光蛋白腺病毒(Ad-eGFP)分别转染原代培养人子宫内位腺上皮细胞和基质细胞(细胞转染注射法,即方法1)和子宫内位组织块(组织转染注射法,即方法2),比较两种体外转染的差异;然后采用方法1将绿色荧光腺病毒转染后的腺上皮细胞和基质细胞注入裸鼠皮下形成荧光病灶,并且与方法2相比较,观察直至建模后25 d,计算病灶荧光成模率与病灶荧光存在时间,并予以组织鉴定。【结果】方法1与方法2建模后5 d两种方法病灶荧光阳性率分别达88.9%和22.2%, $P = 0.015$;病灶体外荧光存在时间分别为 (12 ± 8) d与 (7 ± 4) d。病理组织学HE染色和免疫荧光共同鉴定显示病灶来源于人子宫内位。【结论】应用Ad-eGFP转染后人子宫内位腺上皮细胞和基质细胞混悬液注射可成功建立裸鼠皮下人子宫内位症活体荧光观察模型,同时方法成模率高,体外荧光存在时间较长。

关键词: 子宫内位症; 裸鼠; 增强型绿色荧光蛋白腺病毒; 活体无创观察模型

中图分类号: R711.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)02-0298-04

Nude Mouse Models for Green fluorescence Human Endometriosis

LIU Bin¹, WANG Ning-ning¹, HONG Shan-shan¹, ZHANG Hong-xia¹, WANG Zi-lian¹,
ZHUANG Guang-lun¹, PAN Qiu-hui², DONG Yu³

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University;
2. The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, 3. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital,
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To establish a novel noninvasive fluorescent animal model for endometriosis in vitro and in vivo. 【Methods】 Adenovirus encoding enhancing green fluorescent protein (Ad-eGFP) was used to transfect endometrial glandular cells and stromal cells (cells transfection and injection, Method No.1), and fragments (tissues transfection and injection, Method No. 2). Transfection efficiencies were compared between the two methods in vitro. Then GFP transfected glandular cells and stromal cells suspension were injected into nude mice subcutaneously (Method No.1), taking Method No.2 as a comparison. In vivo observation last for 25 days, and positive rates and duration times of fluorescent lesions were calculated. Histological examination was used to confirmed lesion formation. 【Results】 On the fifth day after injection, lesion positive rate of Method No.1 was 88.9%, which was statistically significantly higher than that of Method No.2 (22.2%), $P = 0.015 < 0.05$. The fluorescent positive duration of Method No.1 and No.2 were 12 ± 8 days and 7 ± 4 days. The structures of lesions were all identified as human original endometrium by histological examination, including HE staining and immunofluorescence. 【Conclusion】 Noninvasive animal model of endometriosis can be built up by subcutaneously injection of Ad-EGFP transfected endometrial glandular cells and stromal cells suspension with higher positive rate and longer observation time

Key Words: endometriosis; nude mouse; Ad-EGFP; noninvasive animal model

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(2): 298-301]

收稿日期: 2009-09-25

基金项目: 国家自然科学基金(30672222); 广东省自然科学基金(0400377, 8151008901000119); 广东省科技计划项目(2006B50107001, 2005B34201020, 2007B080701011)

作者简介: 刘斌, 医学硕士博士连续培养研究生, 研究方向: 妇产科内分泌, E-mail: robin520666@163.com; * 通信作者: 王宁宁, 硕士生导师, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 妇科内分泌, E-mail: wangningning21cn@21cn.com

子宫内膜异位症(endometriosis, EM)的病因尚未完全阐明,主要原因之一是尚缺乏理想的观察模型。近年来国际上学者发现采用荧光转染可以获得活体 EMs 动态观察模型,包括使用染料以及基因转染等方法,较为成功的方法是 Fortin 等^[1-2]通过将切成 1 ~ 2 mm³ 的人子宫内膜碎片与携带编码 GFP 基因序列的腺病毒孵育 24 h 后注入鼠皮下或腹腔,建立了 EMs 无创观察模型,但转染率只有 15% ~ 40%。为进一步提高种植物的荧光表达阳性率和减少体外培养时间,在原有裸鼠人子宫内膜异位症模型基础上^[3],我们通过摸索比较,希望寻找更好的体外无创观察的人 EM 模型。

1 材料和方法

1.1 子宫内膜组织标本的获取

病例来源于 2008 年 12 月至 2009 年 1 月在本院妇科接受宫腔镜检查患者 9 例,年龄 20 ~ 44 岁,无内科合并症,月经规律,术前 3 个月内未用过激素治疗。宫腔镜下选取正常子宫内膜,立即放入 4 °C 含体积分数 1% 青霉素和链霉素双抗(Hyclone, USA)的 DMEM 培养基(Gibco, 高糖)中。2 h 内进行分离培养操作。

1.2 实验动物

由南方医科大学实验动物中心提供 SPF 级饲养 BALB/c 裸鼠 9 只,雌性,6 ~ 8 周、体质量 17 ~ 21 g。实验温度:22 ~ 24 °C,湿度:45% ~ 70%,12 h 黑白交替,饲养以水与饲料,每周添加鸡蛋、葵花籽以增加蛋白质等营养的摄入。

1.3 主要试剂及仪器

DMEM/F12 和 DMEM 培养基、胶原酶 I 等购自美国 Gibco 公司。青霉素和链霉素双抗、胎牛血清、胰酶购自美国 Hyclone 公司。鼠抗人波形蛋白(Vimentin, V9)抗体(即用型)、鼠抗人细胞角蛋白(Cytokeratin, AE1/AE3)抗体(即用型)购自日本 Dako 公司、Cy3 标记的羊抗鼠抗体购自美国 Jackson 公司(工作浓度 1:100 稀释)。编码绿色荧光蛋白的腺病毒(Ad-eGFP)购自吉凯生物公司。日本 Olympus 公司荧光倒置相差显微镜(IX71)和荧光体视显微镜(SZX16)系统,摄像设备为 Olympus 公司数码摄像头(DP71),不锈钢细胞过滤网购自广州市海珠区粤申仪器经营部,细胞培养板为美国 Costar 公司生产。

1.4 方法

1.4.1 子宫内膜组织块与细胞的准备 子宫内膜组织块 PBS 冲洗 3 次,剪成约 1 ~ 2 mm³。一部分直接种在 DMEM/F12 培养基(含 10% FCS)做组织培养;另一部分进行基质细胞和腺体分离操作,参照 Ryan 等^[4]进行细胞分离纯化。

1.4.2 Ad-eGFP 腺病毒转染 分别将准备好组织块与细胞的六孔板每个孔中加入的病毒 2×10^8 PFU(终浓度为 1×10^8 PFU/mL)。转染 16 h 后,将组织块、基质细胞和腺体细胞分别用胰酶消化后进行流式细胞仪检测其转染率和凋亡率。

1.4.3 荧光人子宫内膜异位症裸鼠模型制作与观察 转染 16 h 后,将腺上皮细胞团吹打下来并离心,基质细胞用 2.5 mL/L 胰酶消化后离心,取 10 μ L 细胞计数,其余基质细胞和腺体细胞团混合收集于 1.5 mL Ep 管中,加入 DMEM/F12 培养基到 200 μ L,另外将同等重量转染 16 h 内膜组织块收集于另一 1.5 mL Ep 管中,加入同样培养液至 200 μ L。采用方法 1 将细胞混悬液注射到裸鼠一侧肩胛部位皮下,每个病灶的注射细胞量为 1×10^6 ;采用方法 2 将 1 ~ 2 mm³ 大小的内膜组织块 5 片注射到同一裸鼠另一侧肩胛部位皮下,裸鼠注射后,在第 5, 10, 15, 20, 25 天进行体视荧光显微镜观察,比较两种建模方法病灶荧光信号有无,记录每只裸鼠每个病灶荧光标记病灶的持续时间。当病灶体外荧光完全不能探测到时,解剖动物获取病灶进行病理组织学 HE 染色和免疫荧光检测。

1.4.4 统计方法 数据采用 SPSS 13.0 进行输入和统计,病灶持续时间采用均数 \pm 标准差表示,采用独立卡方检验法比较建模后第 5、10、15 天两组建模成功率进行分析统计。

2 结果

2.1 Ad-eGFP 腺病毒转染子宫内膜腺上皮细胞、基质细胞和子宫内膜组织块结果

采用终滴度 1×10^8 PFU/mL Ad-eGFP 腺病毒转染子宫内膜腺上皮细胞、基质细胞和子宫内膜组织块各 12 h 后,开始观察到绿色荧光;流式细胞仪检测结果显示,通过转染 12 h, 18 h, 36 h 和 42 h 观察,以进行转染 18 h 其 GFP 转染率高而凋亡率较低;同时,比较腺上皮、基质细胞与组

表 1 转染后各时点基质细胞、腺上皮、组织块腺病毒绿色荧光阳性率和凋亡率比较

Table 1 GFP positive rate and apoptosis rate of stromal cells, gland cells and endometrium tissue in different time point after Ad-eGFP transfection detected by FCM (%)

Group		12 h	18 h	36 h	42 h
GFP positive rate	Stromal cells	86.3 ± 1.4	86.8 ± 3.5	97.2 ± 0.7	97.8 ± 1.1
	Glandular cells	53.8 ± 26.4	68.7 ± 20.9	84.1 ± 5.1	88.0 ± 10.6
	Tissue	6.2 ± 3.7	6.4 ± 4.9	5.8 ± 5.4	5.2 ± 1.3
	<i>F</i>	13.622	22.469	261.722	134.546
	<i>P</i>	0.031	0.016	< 0.001	0.001
Apoptosis rate	Stromal cells	2.1 ± 1.6	2.2 ± 1.1	3.4 ± 1.9	3.5 ± 1.3
	Glandular cells	11.9 ± 0.0	11.1 ± 1.4	24.6 ± 14.7	25.4 ± 10.4
	Tissue	11.2 ± 13.3	12.4 ± 11.7	10.0 ± 6.4	54.5 ± 40.9
	<i>F</i>	1.001	1.334	2.694	2.207
	<i>P</i>	0.464	0.385	0.214	0.257

织之间不同时间的 GFP 转染率可以看出细胞转染率在上述时间段均明显高于相应组织转染率,同时,其之间凋亡情况并无差异。

2.2 绿色荧光人子宫内膜异位症模型活无创体外观察结果

共注射裸鼠 9 只,成模 9 只。方法 1 种植病灶 9 个成模 9 个,5 d 后可进行体外无创观测病灶 8 个;方法 2 种植病灶 9 个,成模 9 个,5 d 可进行体外无创观测 2 个。连续活体观察种植后 5 d、10 d、15 d,两种方法检测成功率见表 2,结果显示,在同样转染条件下,方法 1 建模成功率高于方法 2。方法 1 可进行无创观察的 8 只裸鼠连续观察体外探测阳性的病灶存在时间(12 ± 8) d,方法 2 可进行无创观察的 2 只裸鼠的体外探测阳性的病灶存在时间(7 ± 4) d,两者暂无显著性差异($t = 0.787, P = 0.454$)。

表 2 两组建模后 5、10、15 d GFP 标记病灶体外观测阳性率

Table 2 Positive rate of GFP-labeled lesions detected by noninvasive imaging on day 5, 10, and 15 after implantation case (%)

Time		Group 1 (n = 9)	Group 2 (n = 9)	Total	χ^2	<i>P</i>
Day 5	Positive	8(88.9)	2(22.2)	10	8.100	0.015
	Negative	1(11.1)	7(77.8)	8		
Day 10	Positive	5(55.6)	1(11.1)	6	4.000	0.131
	Negative	4(44.4)	8(88.9)	12		
Day 15	Positive	4(44.4)	0(0)	4	5.143	0.082
	Negative	5(55.6)	9(100)	14		

2.3 荧光病灶的鉴定

当病灶无法从体外观察到荧光时,则结束无创观察。方法 2 建立 3 例在体外无法检测到荧光时解剖后仍可见病灶内荧光发出。解剖皮下病灶,可见两种方法均能产生典型 EMs 种植病灶,即产生透明水泡样病灶,并有小血管供养病灶(图 1-A)。病灶 HE 染色可看到典型的子宫内膜腺体和基质结构(图 1-B),同时 Cytokeratin (+)和 Vimentin(+)(图 1-C,1-D)。

3 讨论

3.1 腺病毒进行绿色荧光标记人子宫内膜异位症病灶建立的优点

文献报道 EMs 无创观察方法主要有两大类:一种是利用现有的影像学方法,如磁共振成像^[5]、核素显像^[6]等手段对病灶部位进行检测;另一种则是利用分子生物学技术将带有特殊标记的内膜种植到动物身上,利用特殊标记发出的荧光直接对在体病灶进行观察。而后者是近年发展的一种最新方法,包括利用荧光染料^[7]、病毒转染^[1-2,8]、转基因小鼠子宫内膜^[9-10]等。我们采用原代细胞转染和组织转染的方法分别成功建立绿色荧光人 EMs 病灶,并鉴定成模。本实验中采用腺病毒作为标记载体,转染组织和细胞,具有如下优点:①细胞转染率高:在本研究中 18 小时腺上皮细胞和基质细胞转染率已经分别达到 68.7%和 86.8%左右。②表达快:无论细胞或组织转染后 12 h 即可看到荧光。③不依赖于细胞状态:对于尚未贴壁的细胞和组织块均可

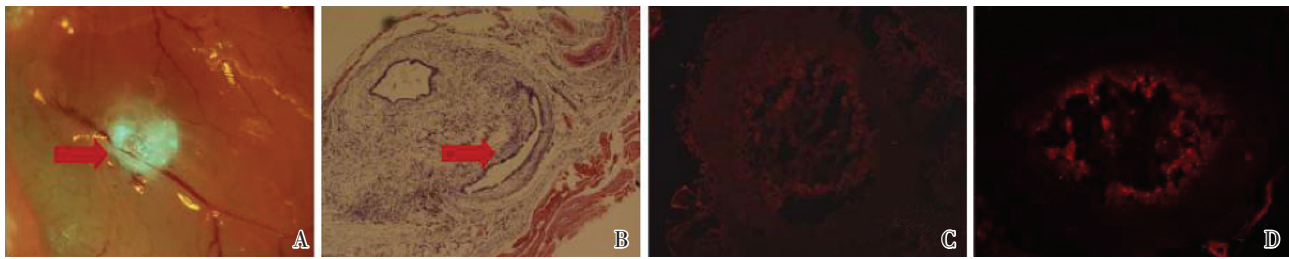


图1 裸鼠人子宫内位症绿色荧光病灶鉴定

Fig.1 Identification of green fluorescence-labeled lesion of human endometriosis in nude mice model

A: In vivo lesion built up by subcutaneous injection of suspension of Ad-eGFP infected endometrial stromal and glandular epithelial cells (5 Day after injection, arrow showed); B: Typical glandular epithelial tissue and stromal tissue can be seen in the lesion by HE staining ($\times 100$, arrow showed); C: Using immunofluorescence to identify stromal tissue in the GFP positive lesion by mouse anti-Human Vimentin (Clone V9) primary antibody followed by Cy3-labeled goat anti-mouse secondary antibody.(red area); D: Use immunofluorescence to identify glandular epithelial tissue in the GFP positive lesion by mouse anti-Human Cytokeratin (Clone AE1/3) primary antibody followed by Cy3-labeled goat anti-mouse secondary antibody.(red area)

转染。但由于腺病毒为瞬时转染体系,转染后病毒DNA不整合到细胞基因组中不随细胞分裂而扩增,出现转染阳性率逐渐下降,表达时间缩短等问题。

3.2 腺病毒转染进行活体无创荧光观察病灶方法的具体探讨

本研究结果表明,腺上皮细胞和基质细胞的转染率远远高于组织块的转染率,同时以18 h转染率高而凋亡少,因此,我们综合GFP阳性率和细胞凋亡率两方面因素,把转染时间确定在18 h。同时比较两种方法成模率建模5天后就可以发现,在相同条件下采用细胞分离纯化法建模成功率明显增高,并可以将病灶荧光表达时间延长到(12 ± 8)天。由此可见,采用细胞转染法进行混合种植病灶后同样可以形成绿色荧光人子宫内位症活体无创观察模型,且成模率高,成模时间较长,更有利于无创观察病灶变化,并进一步应用此模型进行子宫内位症血管生成抑制等相关机理研究。

(本研究得到中山大学干细胞与组织工程研究中心项鹏教授、张秀明老师和王涛博士研究生的大力支持、中山大学公共卫生学院张晋昕副教授的精心指导,在此一并致谢!)

参考文献:

- [1] 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(2): 832-838.
- [2] Fortin M, Lépine M, Merlen Y, et al. Quantitative assessment of human endometriotic tissue maintenance and regression in a noninvasive mouse model of

endometriosis[J]. *Mol Ther*, 2004, 9(4): 540-547.

- [3] 王宁宁,姚书忠,庄广伦,等. 裸鼠人子宫内位症模型建立与病灶血管形成相关检测[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(3增刊): 43-45.
- [4] Ryan IP, Schriock ED, Taylor RN. Isolation, characterization, and comparison of human endometrial and endometriosis cells in vitro[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78(3): 642-649.
- [5] Lenhard SC, Haimbach RE, Sulpizio AC, et al. Noninvasive assessment of ectopic uterine tissue development in rats using magnetic resonance imaging [J]. *Fertil Steril*, 2007, 88(4): 1058-1064.
- [6] Chatziioannou AF. Instrumentation for molecular imaging in preclinical research: Micro-PET and Micro-SPECT[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2(6): 533-536, 510-511.
- [7] Tabibzadeh S, Miller S, Dodson WC, et al. An experimental model for the endometriosis in athymic mice[J]. *Front Biosci*, 1999, 1(4): C4-9.
- [8] Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, et al. Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c (null) immunodeficient mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(6): 1925-1930.
- [9] Hirata T, Osuga Y, Yoshino O, et al. Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(8): 2092-2096.
- [10] Becker CM, Wright RD, Satchi-Fainaro R, et al. A novel noninvasive model of endometriosis for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy[J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(6): 2074-2084.

(编辑 张恩健)