

大鼠子宫内膜异位症模型的建立及其组织学观察

郑澄宇, 杨冬梓, 谢梅青, 谢宇芬, 蔡雪影, 邝健全

(中山医科大学孙逸仙纪念医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】研究大鼠子宫内膜异位症模型的建立及异位病灶的组织学形态。【方法】采用外科诱导法对 80 只大鼠行建模手术, 在术后的第 3 周、第 5 周、第 7 周和第 12 周动态观察病灶的生长情况和大鼠的动情周期变化, 取健侧子宫角中段的在位内膜、异位内膜行组织学研究。【结果】建模成功率为 65%; 生长良好的囊肿囊内壁有内膜上皮细胞生长, 有与正位子宫内膜接近同步的发情周期改变; 病灶随移植时间的推延先逐渐增大之后又有缩小趋势 ($P < 0.05$), 同一时间内子宫旁韧带处病灶明显大于肠系膜处病灶 ($P < 0.05$)。【结论】将实验动物自体子宫内膜移植到子宫旁韧带或肠系膜上形成子宫内膜异位病理模型, 是子宫内膜异位病实验研究的简便方法, 此种异位内膜随动情周期有周期性改变, 生理特性与正位子宫内膜基本相同。

关键词: 疾病模型, 动物; 子宫内膜异位症/病理学

中图分类号: R332 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)02-0106-04

The Establishment of Endometriosis Model in Rats and its Histological Observation

ZHENG Cheng-yu, YANG Dong-zhi, XIE Mei-qing, XIE Yu-fen, CAI Xue-ying, KUANG Jian-quan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Sun Yat-sen Memorial Hospital,
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To establish the experimental endometriosis in rats and study its histological structure. 【Methods】 Endometriosis was surgically induced in 80 SD rats. The growth of the transplant and rats' estrus cycle was observed in different times after the implantation operation. The endometrium of the uninjured side and the ectopic endometrium were taken for observing by microscope and electroscope. 【Results】 There was 65% transplant to develop. The inner wall of the cyst had endometrium epithelial cells, and it altered cycle with the normal endometrium. The cyst enlarged gradually at first and had contracted tendency after that, and cysts on the utero ligament were bigger than ones on the mesentery in the same time. 【Conclusion】 The model of endometriosis in rat established by implanting the self-endometrium to utero ligament or mesentery is the convenient method to study and research the endometriosis. This ectopic endometrium can change correspond to the reproductive cycle, and has physiological functions alike the normal endometrium.

Key words: disease model, animal; endometriosis/pathology

子宫内膜异位症是一种较常见的妇科疾病。在育龄妇女中发病率为 2%~5%^[1]; 近年来随着诊断技术的不断进步, 越来越多的子宫内膜异位症患者被早期诊断, 子宫内膜异位症患者呈年轻化趋

势, 青春期少女的子宫内膜异位症逐步引起重视; 资料显示子宫内膜异位症在青春期少女的发病率与生育期妇女通过腹腔镜诊断的 4%~17% 相近达 6%^[2]; 其中, 有妇科慢性盆腔痛的少女 45% 患

收稿日期: 2000-06-20

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(991019); 广东省卫生厅医学科研基金资助项目(A1999170)

作者简介: 郑澄宇(1974-), 男, 广东汕头人, 临床硕士, 医师

有子宫内膜异位症。Reese等^[3]和Laufer等^[4]则发现青春期少女因痛经而常规药物治疗无效行腹腔镜检查,70%诊断有子宫内膜异位症。子宫内膜异位症的发生机制、病理生理、治疗等方面的研究成为近年来研究的热点,而掌握子宫内膜异位症动物模型的建立技术尤显必要,国内对该模型建立的具体方法报道仍较少。本文介绍了SD大鼠子宫内膜异位症模型建立的具体步骤及关键,对异位病灶的组织学观察表明该方法确实可靠,是子宫内膜异位症试验研究的适宜对象。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

健康、性成熟的普通级SD雌性大鼠,鼠龄60~80 d,体质量200~300 g。给予标准光照周期(14 h光照、10 h黑夜)、室内温度(20±2)℃、湿度40%~50%、标准饲料和水。

1.2 实验器械及药品

普通眼科手术器械,生理盐水,浓度为43 g/L的水合氯醛,常规消毒药品等。

1.3 子宫内膜异位症模型的建立

每日定时做阴道涂片检查,选择动情周期4~5 d,并连续有2个正常动情周期的大鼠为试验对象。手术于各只大鼠的动情期中分别进行,室内温度28~32℃环境下进行,无菌操作,以浓度为43 g/L的水合氯醛300 mg/kg作腹腔注射麻醉;大鼠腹部剪毛,皮肤常规消毒后取下腹正中、耻联上1 cm切口长2~3 cm,选择一侧子宫峡部上切下1~2 cm子宫段,置于生理盐水中纵行切开;将子宫内膜与肌层分离(部分子宫内膜较薄、与肌层粘连紧密者,内膜与肌层不分离,只剥去浆膜层),分别切取5 mm×5 mm的内膜片段,将上层反向对着种植部位,用3/0无损缝线缝两针以固定在对侧子宫旁韧带和肠系膜血管丰富处。然后全层缝合皮肤和腹壁,常规饲养。再次开腹后出现移植灶体积增大,呈透明的结节状、囊状,有澄清液体积聚(积液高度≥2 mm),移植物被结缔组织覆盖并有血管形成,质地软;病检有内膜上皮细胞及间质生长,有分泌活动,可见核下空泡者为建模成功。

1.4 实验检测指标

在建模术后的第3周所有大鼠均开腹,选择建模成功的大鼠分层随机分成两组分别在第5周、第

7周再次开腹,第5周组中又随机选择部分大鼠在第12周开腹,每次开腹均用两脚规测量移植灶体积(mm³),观察病灶的大小变化;建模术后的第3周,第5周,第7周和第12周分别连续4 d每日作阴道涂片,以判断大鼠的动情周期变化;取健侧子宫角中段的在位内膜、异位内膜行组织学研究。

1.5 统计分析

数据由SPSS软件包进行处理,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同移植部位组间异位病灶大小的比较用成组设计的多个样本两两比较的秩和检验(推广t检验),同组内不同移植部位异位病灶大小的比较用成组设计的两个样本比较的秩和检验,双侧检验,显著性水准P值为0.05。

2 结 果

2.1 模型建立情况

试验对80只大鼠行建模;52只出现积液清,生长良好的囊肿;11只为炎性坏死囊肿,或异位囊肿伴炎症;1只为单纯性囊肿;10只异位病灶呈低度生长或未长;6只在建模后死亡,死因为盆腹腔脓肿。建模成功率65%,脓肿和死亡率22.5%,萎缩或未生长率12.5%。生长良好的囊肿如图1~4所示。

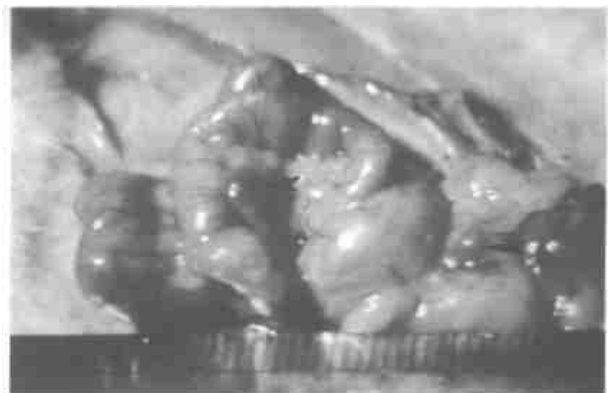


图1 子宫旁韧带处异位囊肿

Fig. 1 Ectopic cyst on the utero ligament

外观表现为体积增大,呈透明的结节状、囊状;囊内有清亮的液体积聚;移植物被结缔组织覆盖并有血管形成;质地软。病检囊内壁有内膜上皮细胞生长,有的可见核下空泡,有分泌活动,并可见脱落现象;有的区域内膜成分呈乳头状生长,有的整个呈结节状、囊状;间质多较薄,生长不活跃;腺体极少见。

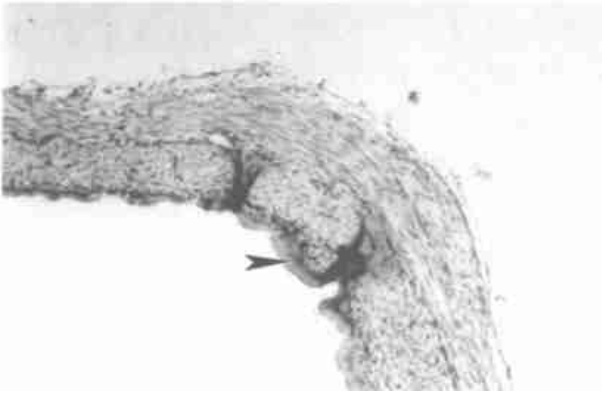


图2 子宫旁韧带处异位囊肿内膜上皮细胞
Fig. 2 Ectopic cyst on the utero ligament showing the endometrium epithelial cells (HE×200)

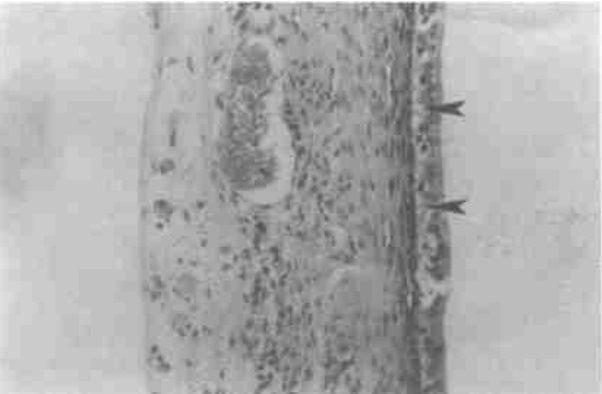


图3 肠系膜异位囊肿内膜上皮细胞的核下空泡
Fig. 3 Ectopic cyst on the mesentery showing the basal vacuolation and holocrine of endometrium epithelial cells (HE×400)

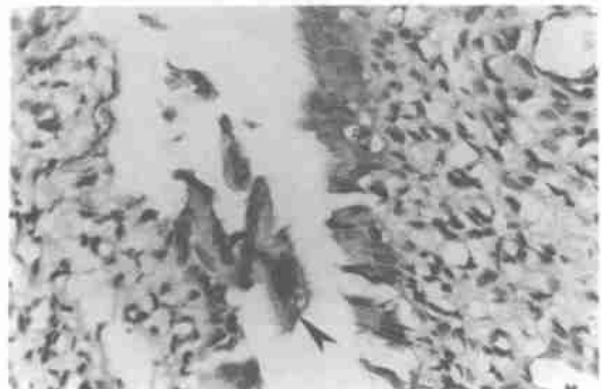


图4 子宫旁韧带处异位囊肿脱落的内膜上皮细胞
Fig. 4 Ectopic cyst on the utero ligament showing the shedding of endometrium epithelial cells (SP×400)

炎性坏死囊肿外观表现为体积增大极明显,呈混浊、黄白色的结节状、囊状;质地稍硬;切开囊肿见黄白色膏脂样物;病检囊内为大量炎性、坏死细胞,囊内壁未见子宫内膜,为成纤维样细胞,囊壁间

质有较多炎性细胞浸润。囊肿伴炎症外观表现为体积增大,灰白色的结节状、囊状;质中;积液稍混浊;病检囊内及间质炎性,坏死细胞较少,囊内壁有内膜上皮细胞生长,并可见核下空泡。

单纯性囊肿外观与生长良好的内膜异位囊肿相似,但积液稍混浊;病检囊内及囊壁无炎性细胞,囊内壁未见子宫内膜,为成纤维样细胞。

2.2 子宫内膜异位病灶大小随种植时间的变化

由表1可见,建模术后3周即可见明显的病灶生长,随着时间的延长,病灶体积先逐渐增大,达到一定体积后保持较稳定状态一段时间,之后又逐渐缩小,3周与5周相比有较显著差异,5~7周病灶体积达到最大并保持较一段时间的稳定,12周与5周相比缩小有差异;移植部位的不同,病灶生长体积有一定差异,同一时间内的子宫旁韧带处病灶明显大于肠系膜处病灶。

表1 子宫旁韧带处和肠系膜处异位病灶大小随种植时间的变化

Table 1 The change of ectopic cysts' size on utero ligament with the time than those on the mesentery (mm³, $\bar{x} \pm s$)

Time(W)	Case	Ectopic cysts' size on the utero ligament	Ectopic cysts' size on mesentery
3	52	74.35±52.49 ²⁾	52.27±39.53 ^{1),2)}
5	32	171.70±119.23	115.96±83.45 ¹⁾
7	15	151.04±133.23	100.47±72.23 ¹⁾
12	12	68.80±54.33 ²⁾	46.83±30.01 ^{1),2)}

1) vs ectopic cysts' size on utero ligament in the same time, $P < 0.05$; 2) vs 5-week-group on the same focus, $P < 0.05$

2.3 建模术后大鼠动情周期的变化

建模术后的第3、5、7、12周时,所有大鼠的阴道涂片均有正常的动情周期变化。

2.4 正位内膜、异位内膜的组织学表现

正位子宫内膜呈分泌早期至分泌晚期改变;内膜上皮细胞为高柱状或柱状;腺体数量多,腺上皮细胞多为柱状,个别为立方状,可见到核下空泡和顶浆分泌。异位内膜光镜下可见囊肿内膜呈增殖早期至分泌中期改变;内膜上皮柱状,立方状或扁平状,部分可见到核下空泡和顶浆分泌;间质极其致密,间质细胞小而稀疏,绝大多数未见腺体。电镜下内膜上皮绒毛整齐,分泌颗粒丰富,线粒体、内质网形态正常,胶原纤维、血管内皮细胞生长好。

3 讨论

子宫内膜异位症的病因学研究,主要有种植学说,具体又分为经输卵管移行学说、良性转移学说、医源性直接转移学说;化生学说;基因学说和细胞免疫学说。目前,子宫内膜经输卵管移行学说、医源性直接转移学说已被多数妇产科工作者所接受。因此,本模型符合临床上子宫内膜异位症的主要病因。

基于上述的子宫内膜种植学说,1985年Vernon和Wilson^[5]尝试用3种方法诱导SD大鼠的子宫内膜异位症,他们将大鼠分为3组:第一组将自体的子宫内膜片段缝扎于卵巢、子宫旁韧带或肠系膜,第二组从阴道往子宫腔注入一定压力的生理盐水,第三组则将含有自体子宫内膜碎屑的生理盐水直接注入腹腔;结果发现子宫内膜片段缝扎组在14d后内膜移植处长出了含澄清积液的囊泡,病理检查示内囊壁含有子宫内膜上皮细胞,且囊肿体积在60d后基本稳定,而第二、三组大鼠盆腹腔内则未见病灶生长或病灶生长不良,作者认为外科手术移植法是建立大鼠子宫内膜异位症模型简便、可靠的方法,此后不少国外学者都借鉴这一方法建立大鼠子宫内膜异位症模型。

本试验采用SD大鼠为实验对象,主要考虑到大鼠是周期性自发排卵动物,性周期短且规则、易于观察,可以较好反映血清性激素水平在整个动情周期的变化,适于对依赖性激素疾病的研究。试验中对80只大鼠以自体内膜手术移植法行建模,有52只大鼠出现积液清,生长良好的囊肿;11只为炎性坏死囊肿,或异位囊肿伴炎症,这在Vernon等^[5]的报道中也有类似的情况。生长良好的囊肿组织学观察则显示囊内壁有内膜上皮细胞生长,可见核下空泡、分泌活动和脱落现象,囊肿内膜表现出与正位子宫内膜接近同步的发情周期改变;表明异位内膜上皮细胞功能代谢仍然活跃,有类似正位子宫内膜的周期性变化,其生理特性与正位子宫内膜基本相同;但异位病灶的间质多较薄,腺体极少见,又说明异位囊肿间质生长不活跃,其原因可能是:异位病灶被增生的纤维结缔组织包裹,血供较差,内分泌激素到达异位内膜的量相对较少,不利于病灶的生长;异位囊肿生长到一定程度后,囊内液体的内压力和囊壁外结缔组织的外压力一定程度地限

制异位囊肿的生长;故不能完全以正位子宫内膜的生理特性来类推于异位内膜。本试验建模成功率65%,较文献报道的75%~85%低^[6],考虑建模手术操作的严格无菌能进一步降低炎性坏死囊肿的生成和大鼠死亡率;而准确的选择在动情期建模则有利于种植内膜的成活和生长。

研究发现在建模后的12周内,所有大鼠的阴道涂片均有规则的动情周期变化。提示大鼠的下丘脑-垂体-卵巢轴(HPOA)未受到影响,有正常的卵巢功能及周期性排卵,表明该大鼠模型适于对甾体类激素药物的研究。研究还发现内膜移植植物在3周后即可判断是否成活;病灶先逐渐增大到一定程度并保持一段时间,之后又逐渐缩小。考虑与SD大鼠的性成熟龄为60d,繁殖适龄期为80~110d^[7]有关,建模术后5周正是大鼠生殖功能活跃的时期,体内性激素水平高,病灶体积随之增大;而建模术后8周生殖功能已逐步减退,部分病灶也随之缩小;建模术后第12周时大鼠性功能已低下,故病灶缩小有统计学差异。这与Vernon等^[5]的研究中认为大鼠异位病灶在移植后60d内病灶积液高度随时间逐步增高,在60d后则部分病灶继续增大、部分病灶逐步缩小有一定的相似;文献也报道临床上个别无症状内膜异位症患者未经治疗而发现异位病灶缩小甚至消失;说明异位内膜有一定的自然消退率。同一时间内的子宫旁韧带处病灶明显大于肠系膜处病灶,考虑与肠系膜处的血供相对较差、性激素到达异位内膜的量相对较少,对异位内膜细胞生长的促进作用降低有关。

总的来说,将大鼠自体子宫内膜移植到子宫旁韧带或肠系膜上形成子宫内膜异位病理模型,是子宫内膜异位症动物模型建立的简便方法,此种子宫内膜移植物镜检时可见到存活的子宫内膜上皮细胞,与Vernon等^[5]实验结果一致,表明该大鼠模型确实可靠。该模型复制周期短,技术和经济可行,利于对该病发生机制、病理生理、临床治疗等方面动物试验研究的开展。

参考文献:

- [1] 马良坤,郁琦,张以文. GnRH-a与HRT联合应用治疗子宫内膜异位症[J]. 国外医学·妇产科分册, 1997, 24(5): 290.
- [2] Lubianca J N, Gordon C M, Laufer M R. "Add-back" therapy for endometriosis in adolescents[J]. J Reprod

Med 1998, 43(3): 164.

- [3] Reese K A, Reddy S, Rock J A. Endometriosis in an adolescent population: the experience[J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 1996, 9(3): 125.
- [4] Laufer M R, Goitein L, Bush M, *et al.* Prevalence of endometriosis in adolescent women with chronic pelvic pain not responding to conventional therapy[J]. J Pediatr Adolesc Gynecol 1997, 10(4): 199.
- [5] Vernon M W, Wilson E A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat[J]. Fertil Steril 1985, 44

(5): 684.

- [6] Rajkumar K, Schott P W, Simpson C W, *et al.* The rat as an animal model for endometriosis to examine recurrence of ectopic endometrial tissue after regression[J]. Fertil Steril 1990, 53(5): 921.
- [7] 苗明三. 实验动物的繁殖. 见: 苗明三主编. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997. 323 ~ 324.

(编辑 关淡庄)

(上接第 105 页)

株的交叉免疫力仅 20%, 应用受到限制。近年来人们发现, NS3 蛋白所诱导的特异性 CD₄⁺ T 细胞反应与急性 HCV 感染者病毒清除密切相关, 并对异源毒株在 T 细胞水平有较高的交叉免疫反应^[9], 现已证实它的 CD₄⁺ T 细胞识别位点分别位于 1 207 ~ 1 278 氨基酸残基和 1 271 ~ 1 488 氨基酸残基, 故我们选用 1 201 ~ 1 500 氨基酸残基间的区域为又一目标抗原。

我们在设计引物时, 为便于定向连接于载体中, 提高连接效率, 在各引物 5' 端均引入相应的限制性内切酶酶切位点。我们在构建嵌合重组质粒 pcDNA3-C-E2-NS3 时, 采用逐个定向连接的方法, 虽然较费时费力, 但易保证连接及亚克隆的正确性, 测序结果示该重组质粒与已知序列相符, 符合表达框架, 为下一步的真核细胞表达打下了基础。

参考文献:

- [1] 毕胜利, 白宽鹤, 丛勉系, 等. 中国人丙型肝炎病毒基因组的一级结构及其变异[J]. 病毒学报, 1993, 9(2): 114.
- [2] 李 刚, 姚集鲁, 彭文伟, 等. HCV 广东株包膜蛋白区 cDNA 的序列测定[J]. 病毒学报, 1997, 13(1): 24.
- [3] 姜 泊, 张亚历, 周殿元, 主编. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 2~4.

- [4] Patrizia B, Mauerizia R, Maria A, *et al.* T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical course of infection[J]. Gastroenterology, 1993, 104(2): 580.
- [5] Robert M, Helmut M, Reinhart Z, *et al.* Mapping of immunodominant CD₄⁺ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection[J]. Hepatology, 1995, 21(3): 632.
- [6] Shih C M, Lo S J, Miyamura T, *et al.* Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells[J]. J Virol, 1993, 67(10): 5823.
- [7] Choo Q L, Kuo G, Ralston R, *et al.* Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus[J]. Prol Natl Acad Sci USA, 1994, 91(4): 1294.
- [8] Isao N, Geert M, Marian E, *et al.* Immunization with plasmid DNA encoding hepatitis C virus envelope E2 antigenic domains induces antibodies whose immune reactivity is linked to the injection mode[J]. J Virol, 1997, 71(9): 7101.
- [9] Helmut M, Reinhart Z, Robert M, *et al.* Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection[J]. The Lancet, 1995, 346(8981): 1006.

(编辑 黄小延)