



子宫内膜异位症动物模型研究进展

冯 雪, 黄 薇

(四川大学华西第二医院, 成都 610041)

【摘要】 为更好的利用动物模型进行子宫内膜异位症的病因、发病机制及治疗的研究, 本文对子宫内膜异位症的啮齿类和灵长类动物模型的构建方法和应用、优缺点进行综述, 以期对子宫内膜异位症动物模型的研究提供参考。

【关键词】 子宫内膜异位症; 动物模型; 综述

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 12-0067-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 012. 013

Research advances in animal models of endometriosis

FENG Xue, HUANG Wei

(West China Second University Hospital of Sichuan University, Chengdu 61400, China)

【Abstract】 In order to study of etiology, pathogenesis, and therapy of endometriosis(EM) through animal models, we review the literature on rodent and primate models of endometriosis, including establishment of models and their applications. We hope that animal models provide useful tools for the studies of endometriosis.

【Key words】 Endometriosis; Animal models; Review

子宫内膜异位症(简称内异症)是育龄期妇女的常见病及多发病,主要表现为慢性盆腔疼痛、痛经和不孕等,但病因和发病机制尚不明确。由于实际操作和伦理学方面的约束,在人体进行内异症的发病机制和治疗研究受到限制,因此,动物模型被广泛地运用于内异症的基础和临床研究中。动物涉及大鼠、小鼠、家兔、猕猴、狒狒、巴马香猪、鸡胚绒毛膜尿囊膜(CAM)等,其中以啮齿类、灵长类动物模型研究最多,本文就这两类最常见的内异症动物模型研究进展进行文献复习和综述。

1 啮齿类模型

啮齿类动物繁殖能力强,动情周期短而规律,约4~5 d,因无内膜脱落,不能自发形成异位病灶,但是,将内膜组织移植到宫外如腹腔部位则可形成病

灶。依据移植组织来源分为自体移植模型和异体移植模型两类。

1.1 自体移植模型

1.1.1 自体移植模型的特点:自体移植指将自体或同源性子宫内膜移植于到同种自体或异体免疫活性动物中,常用动物是性成熟的雌性大鼠及小鼠。常见的大鼠有SD或Wistar,小鼠有BALB/C、C57BL等品种。造模方法:切除自体或同种异体子宫,并切成小块,移植到腹腔内。大多数研究未分离子宫内膜和肌层,而是将两部分一起移植;也有研究将浆膜、肌层去除,仅移植子宫内膜层的^[1]。张春斌等^[2]发现大鼠造模后8周异位子宫内膜形态和结构与在位子宫内膜基本相同,病灶外观呈囊泡状,并与周围组织有不同程度的粘连。Korbel等^[3]发现移植物的尺寸会影响病灶的形成和发展,尽管直径

[基金项目] 国家自然科学基金(NO:81370693)。

[作者简介] 冯雪(1987-), 硕士生在读,研究方向:子宫内膜异位症。Email: xuefeng1309@163.com。

[通讯作者] 黄薇(1964-), 博士生导师,研究方向:子宫内膜异位症,不孕症,月经失调。Email: weihuang64@163.com。

3 mm 子宫内膜组织比 2 mm 组织生长慢,但形成病灶大且囊肿更多。

1.1.2 自体移植模型的应用:有关内异症类固醇激素及相关调节的研究多采用自体移植模型,为消除大鼠/小鼠发情周期的差异,往往去势后给予肌注外源性雌激素造模。Burns 等^[4]发现雌激素受体(ER) α 敲除小鼠的异位病灶小且数量少,而 ER β 敲除小鼠的异位病灶与野生型小鼠差别不大,说明 ER α 在介导内异症的发生过程中占主导地位,ER α 和 ER β 相互作用可能会对内异症的发生发挥作用。

此外,自体移植模型也是研究内异症免疫炎症机制及治疗的良好模型。Umezawa 等^[5]通过微点阵分析技术检测 ICR 小鼠自体移植模型中移植物附着的腹膜(除去移植物)的早期各基因的表达,发现造模后 24 h~96 h,炎症因子、粘附分子、细胞外基质基因呈高表达,而血管生成因子的表达降低,表明早期介导异位病灶形成的是粘附分子和炎症反应,而非血管生成。Efsthathiou 等^[6]发现不同非甾体类抗炎药抑制病灶的能力不同,塞来昔布、吲哚美辛、萘普生、布洛芬均有效,以塞来昔布作用最强,而阿司匹林则无效。

内异症对妇女生育力的影响的机制复杂,可能涉及卵泡发育、受精和着床等方面。Julie 等^[7]发现 Sprague-Dawley 大鼠造模后卵巢功能发生改变,形成的卵泡数量减少,黄素化未破裂卵泡增加,胚胎发育异常如染色体错位、核与细胞质分裂以及自发性流产增加。这些大鼠的雌性子代鼠也表现出类似的生殖异常,推测患子宫内膜异位症患者的后代可能存在永久的表观遗传变化。Lee 等^[8]发现造模后 14 周的 CD1 小鼠的在位内膜基因表达异常,HOXA10 表达下降甲基化明显,胰岛素样生长因子结合蛋白 1(IGFBP1)表达降低,而 PGR($\alpha + \beta$) mRNA 表达增加且 PGR β /PGR($\alpha + \beta$)的比率增加,说明正常子宫内膜出现在异常位置且形成内异症后,可以通过信号传导途径,导致在位内膜的基因表达发生改变。

慢性盆腔疼痛是内异症的主要症状,疼痛发生机制及治疗是近年来的研究热点。Alvarez 等^[9]将大鼠的子宫内膜组织自体移植到腓肠肌中,鞘内注射白介素 6 受体、神经生长因子酪氨酸激酶受体和肿瘤坏死因子受体 mRNA 的反义寡脱氧核苷酸后,发现阻断前两个因子的表达后可有效降低移植部位的机械痛敏,表明异位病灶产生的痛觉介质是导致内异症性盆腔疼痛的主要原因之一。

1.2 异体移植模型

1.2.1 异体移植模型的特点:异体移植是将人在位

内膜或异位组织移植到免疫缺陷动物体内,动物包括裸鼠、SCID 小鼠及 NOD/SCID 小鼠等。不论是增生期、分泌期还是月经期在位内膜都能成功地移植到裸鼠皮下或腹腔内,形成的异位病灶在宏观上和组织学上都类似于人异位内膜样病灶^[10]。一般移植 5 d 后即可见异位病灶与移植部位牢固粘附,常发生在腹壁、膀胱旁脂肪等部位,时间越长,病灶与裸鼠组织融合越明显,盆腹腔粘连越重^[11]。有研究发现人在位内膜移植到 SCID/NOD-SCID 小鼠有更高的成活率,4 周后也能更好的保持形态学特征和表达类固醇激素受体,因而,实验周期 3 周以上时宜选用 SCID 或 NOD/SCID 鼠^[12]。SCID/NOD-SCID 小鼠缺乏 T 和 B 淋巴细胞,但有 NK 细胞活力,而 NOD/SCID)/ γ Cnull (NOG) 小鼠无 NK 细胞活力。Kikuchi-Arai M 等^[13]将生育期妇女的分泌期子宫内膜移植入到去势的 NOD/SCID)/ γ Cnull (NOG) 小鼠腹腔内,给予补充雌孕激素模拟人工周期,在组织学的水平上观察到 NOG 小鼠在位内膜表现出规律的月经周期,类似人子宫内膜的规律变化。

1.2.2 异体移植模型的应用:基质金属蛋白酶(MMPs)是细胞外基质降解过程中最重要的一组蛋白酶,它的周期性表达对子宫内膜生长和重建至关重要,同时 MMPs 表达又受到甾体激素和细胞因子的调节。夏玉芳等^[14]研究发现异位内膜较正常内膜 MMP-2、VEGF 蛋白表达增强,TIMP-2 蛋白表达减弱。

血管生成在内异症发生发展中起重要作用。在异体模型中发现异位病灶血管发生并非来自裸鼠或 SCID 鼠,而来自于移植物,人子宫内膜在黏附于宿主时保留自身的血管并发挥功能,表明异位病灶的血管生成或血管发生非常活跃^[15]。研究发现多巴胺激动剂卡麦角林(CB2)和喹高利特通过阻断血管生成因子受体 2(VEGFR2)发挥抗血管生成作用,从而减小异位病灶的大小^[16]。

由于异体移植模型小鼠是免疫缺陷鼠,因此,不用于评估内异症免疫调节药物疗效的研究。

1.3 啮齿类模型病灶检测方法

光学成像技术利用非常灵敏的检测仪器,可更好的定位和观察植入组织的生长黏附、无创伤动态检测异位病灶的形成和发展。目前,绿色荧光蛋白(GFP)生物发光技术在內异症动物模型中应用最为广泛,标记子宫内膜组织或细胞方式有 2 种:腺病毒表达载体转染和 GFP 转基因动物。利用腺病毒表达载体系统标记人内膜组织,产生的病毒滴度高,转染效率高,且可在体外较长期较稳定表达,但 GFP

基因转染入人子宫内膜组织效率较低,而且荧光会随着时间延长逐渐减弱,荧光大约 3~4 周后表达减退,因此该模型不太适合长期依赖荧光鉴别的组织^[17]。而增强型绿色荧光蛋白(eGFP)转基因小鼠同系异体移植模型具有更强的稳定性,其移植的内膜永久表达 GFP,而且能清楚地辨别 GFP 标记的内膜组织^[18]。

另外,有学者使用 Vevo 770 小动物超声技术检测小鼠腹腔子宫内膜异位病变,该超声探头最高频率达 40MHz,分辨率达到 30 μ m,能够很清楚的区分异位囊肿,且操作过程无创、可重复,是一项有前途的诊疗措施^[19]。

1.4 啮齿类模型的评价

大鼠、小鼠价格便宜、饲养方便、来源广泛,可以大规模使用同基因的动物进行实验,并且可以在不同的时间间隔观察异位病灶,了解不同药物和治疗的效果,可用于研究异位病灶引起机体免疫方面的改变、药物疗效评价和副反应的观察,但是啮齿类动物和人类的生殖生理有很多不同,且造模时通常将子宫内膜和肌层一起移植,可能会影响病灶的发展。当评价异位病灶的生长和大小时,肌层会占相当大的部分,不能完全代表异位病灶的内膜情形。异体移植模型可保留人类组织的形态学,对早期研究内异症发病机制、药物治疗方面更具说服力。但是,由于异体移植选用的是免疫缺陷小鼠,没有完整的免疫系统,饲养条件高,不能耐受多次手术和采血检测,并且仍存在不同程度的免疫应答而对移植植物发生排斥反应,因而不适于研究环境因素及长效药物。

2 灵长类动物模型

2.1 灵长类动物模型的特点

灵长类动物与人类的遗传背景很相似,生殖生理和盆腔解剖也与人类最相近,且有规律月经周期,有月经内膜脱落,是最理想的内异症模型。但因其价格昂贵、物种稀有,大多是受保护的濒危动物,所以研究使用往往受到限制。

尽管目前已有灵长类动物自发性内异症的报道,但是发生率低,且发展缓慢,往往需要较长时间,因此一般都采用人为诱导产生内异症模型。灵长类模型多选择狒狒、猕猴等。在早期的研究中,有学者将月经血通过宫颈复位转移进恒河猴盆腔,或者通过闭塞宫颈增加月经逆流诱导产生内异症模型^[20]。目前大多采用开腹或腹腔注射将内膜组织接种到腹腔,内膜来源于灵长类动物的月经期

膜或切除其子宫来获取内膜组织。造模时,颗粒状的内膜组织较内膜上清液成分移植成功率更高^[21]。采用腹腔镜连续观察狒狒内异症病灶形成情况,发现移植后 1 月大多为红色病灶,随着病情进展,病灶可变成黑色、蓝色或白色等多种颜色,最终病灶可持续生长至接种后 15 个月^[22]。

2.2 灵长类动物模型的应用

早在 1996 年就有学者在狒狒模型发现轻度内异症不影响其妊娠率,而 II-IV 期内异症动物的生育力下降^[23],近年来关于异位病灶对在位内膜的影响成为研究热点。Afshar 等^[24]将狒狒月经期内膜接种至其腹腔内各个部位,然后于造模后 1、3、6~7、10~12 和 15~16 月收集分泌中期在位内膜,利用基因芯片技术进行分析,发现术后 1 月即有 4331 个基因表达异常;每个采样阶段均有数个信号通路失调,包括表皮生长因子、ERK/MAPK 和 PI3/AKT 等;造模后 15 月发现孕激素抵抗更加明显。说明在位内膜不是固有缺陷的子宫内膜,它受到异位病灶的影响后,导致基因表达发生异常。另有学者发现狒狒模型中异位病灶中端粒酶与核仁素表达增加, γ -H2AX 表达缺失,6~12 月后在位内膜也出现同样的改变,说明异位病灶有很强的增殖潜能,同时对在位内膜产生了影响^[25]。

灵长类动物模型也是研究内异症遗传模式和环境影响因素的最佳模型。越来越多证据提出内异症有遗传基础,基因倾向是发病的高风险。Zondervan 等^[26]对 9 个核心家族 1602 只雌性猕猴进行内异症发病率的群落和系谱分析,发现内异症组比对照组的平均血缘系数和同胞患病率增高,说明猕猴发生内异症具有家族聚集性。Fakis 等^[27]在猕猴模型中研究芳香胺 N-乙酰转移酶 2 (NAT2) 对多种环境毒物的乙酰化作用及和抗体的结合能力,说明 NAT2 代谢活性的差异和某些环境污染物与内异症易感相关。

3 结论

综上,灵长类动物模型仍然是最适合研究子宫内膜异位症的模型,因为它最接近人类生理特点,包括盆腔解剖,生殖生理的特点和免疫特征。内异症动物模型对研究内异症的发病机制和探索新的治疗方案都有极大的价值,但现有的建模方法都有各自的不足之处,因此在设计实验方法时必须衡量它们的实用性,充分发挥动物模型的优点,更好地揭示内异症的病因及发病机制,指导临床实践。

参考文献:

- [1] Katayama H, Katayama T, Uematsu K, et al. Effect of dienogest administration on angiogenesis and hemodynamics in a rat endometrial autograft model [J]. Hum Reprod, 2010, 25 (11): 2851–2858.
- [2] 张春斌, 谈西满, 刘东璞, 等. 子宫内异位症大鼠模型的建立及其病理学改变 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18 (6): 25–27.
- [3] Körbel C, Menger MD, Laschke MW, et al. Size and spatial orientation of uterine tissue transplants on the peritoneum crucially determine the growth and cyst formation of endometriosis-like lesions in mice [J]. Hum Reprod, 2010, 25 (10): 2551–2558.
- [4] Burns KA, Rodriguez KF, Hewitt SC, et al. Role of estrogen receptor signaling required for endometriosis-like lesion establishment in a mouse model [J]. Endocrinology, 2012, 153 (8): 3960–3971.
- [5] Umezawa M, Tanaka N, Tainaka H, et al. Microarray analysis provides insight into the early steps of pathophysiology of mouse endometriosis model induced by autotransplantation of endometrium [J]. Life Sci, 2009, 84(23/24): 832–837.
- [6] Efsthathiou JA, Sampson DA, Levine Z, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs differentially suppress endometriosis in a murine model [J]. Fertil Steril, 2005, 83(1): 171–181.
- [7] Stilley JA, Woods-Marshall R, Sutovsky M, et al. Reduced fecundity in female rats with surgically induced endometriosis and in their daughters: a potential role for tissue inhibitors of metalloproteinase [J]. Biol Reprod, 2009, 80(4): 649–656.
- [8] Lee BI, Du H, Taylor HS. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium [J]. Biol Reprod, 2009, 80(1): 79–85.
- [9] Alvarez P, Levine JD. Screening the role of pronociceptive molecules in a rodent model of endometriosis pain [J]. J Pain, 2014, 15(7): 726–733.
- [10] 孙俊杰, 马洪达, 宋洁, 等. 人子宫内异位症裸鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(4): 296–298.
- [11] 王丹波, 张淑兰, 牛慧彦, 等. 人子宫内异位症裸鼠模型的建立及雌、孕激素受体的表达 [J]. 中国实验动物学报, 2004, 12: 10–13.
- [12] Grummer R, Schwarzer F, Bainczyk K, et al. Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model [J]. Hum Reprod, 2001, 16(8): 1736–1743.
- [13] Kikuchi-Arai M, Murakami T, Utsunomiya H, et al. Establishment of long-term model throughout regular menstrual cycles in immunodeficient mice [J]. Am J Reprod Immunol. 2010, 64(5): 324–332.
- [14] 夏玉芳, 郭新华, 姜艳辉, 等. 外源性雌、孕激素对裸鼠子宫内异位症病灶中 MMP-2、TIMP-2 及 VEGF 蛋白表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 7: 1243–1245.
- [15] Alvarez Gonzalez ML, Franken F, Galant C, et al. A Mixed origin of neovascularization of human endometrial grafts in immunodeficient mouse models [J]. Hum Reprod, 2009, 24(9): 2217–2224.
- [16] Delgado-Rosas F, Gómez R, Ferrero H, et al. The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis [J]. Reproduction, 2011, 142(5): 745–755.
- [17] Liu B, Wang NN, Wang ZL, et al. Improved nude mouse models for green fluorescence human endometriosis [J]. J Obstet Gynaecol Res. 2010, 36(6): 1214–1221.
- [18] Nowak NM, Fischer OM, Gust TC, et al. Intraperitoneal inflammation decreases endometriosis in a mouse model [J]. Hum Reprod, 2008, 23(11): 2466–2474.
- [19] Laschke MW, Körbel C, Rudzitis-Auth J, et al. High-resolution ultrasound imaging: a novel technique for the noninvasive in vivo analysis of endometriotic lesion and cyst formation in small animal models [J]. Am J Pathol, 2010, 176(2): 585–593.
- [20] D'Hooghe TM, Bambra CS, Suleman MA, et al. Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papioanubis*) [J]. Fertil Steril, 1994, 62(3): 635–638.
- [21] Kyama CM, Falconer H, Cuneo S, et al. Menstrual endometrial supernatant may induce stromal endometriosis in baboons [J]. Front Biosci (Scholar), 2014, S6: 16–28.
- [22] Harirchian P, Gashaw I, Lipskind ST, et al. Lesion kinetics in a non-human primate model of endometriosis [J]. Hum Reprod, 2012, 27(8): 2341–2351.
- [23] D'Hooghe TM, Bambra CS, Raeymaekers BM, et al. The cycle pregnancy rate is normal in baboons with stage I endometriosis but decreased in primates with stage II and stage III-IV disease [J]. Fertil Steril, 1996, 66(5): 809–813.
- [24] Afshar Y, Hastings J, Roqueiro D, et al. Changes in eutopic endometrial gene expression during the progression of experimental endometriosis in the baboon *Papio Anubis* [J]. Biol Reprod, 2013, 88(2): 44.
- [25] Hapangama DK, Turner MA, Drury J, et al. Aberrant expression of regulators of cell-fate found in eutopic endometrium is found in matched ectopic endometrium among women and in a baboon model of endometriosis [J]. Hum Reprod, 2010, 25(11): 2840–2850.
- [26] Zondervan KT, Weeks DE, Colman R, et al. Familial aggregation of endometriosis in a large pedigree of rhesus macaques [J]. Hum Reprod, 2004, 19(2): 448–455.
- [27] Fakis G, Boukouvala S, Kawamura A, et al. Description of a novel polymorphic gene encoding for arylamine N-acetyltransferase in the rhesus macaques (*Macaca mulatta*), a model animal for endometriosis [J]. Pharmacogenet Genomics, 2007, 17(3): 181–188.

[修回日期]2014-10-04