



Y1852651

The influence of apoptosis exerted by CO2 on the SCID  
mouse ectopic endometrial cells and its significance



Author's signature: Guangchen Liu

Supervisor's signature: Liyun [Signature] Ruijin [Signature]

External Reviewers: Zihua Wang Chief doctor

Xinmei Zhang Chief doctor

Jianhong Zhou Chief doctor

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Examining Committee Chairperson:

Shiming Lv Professor

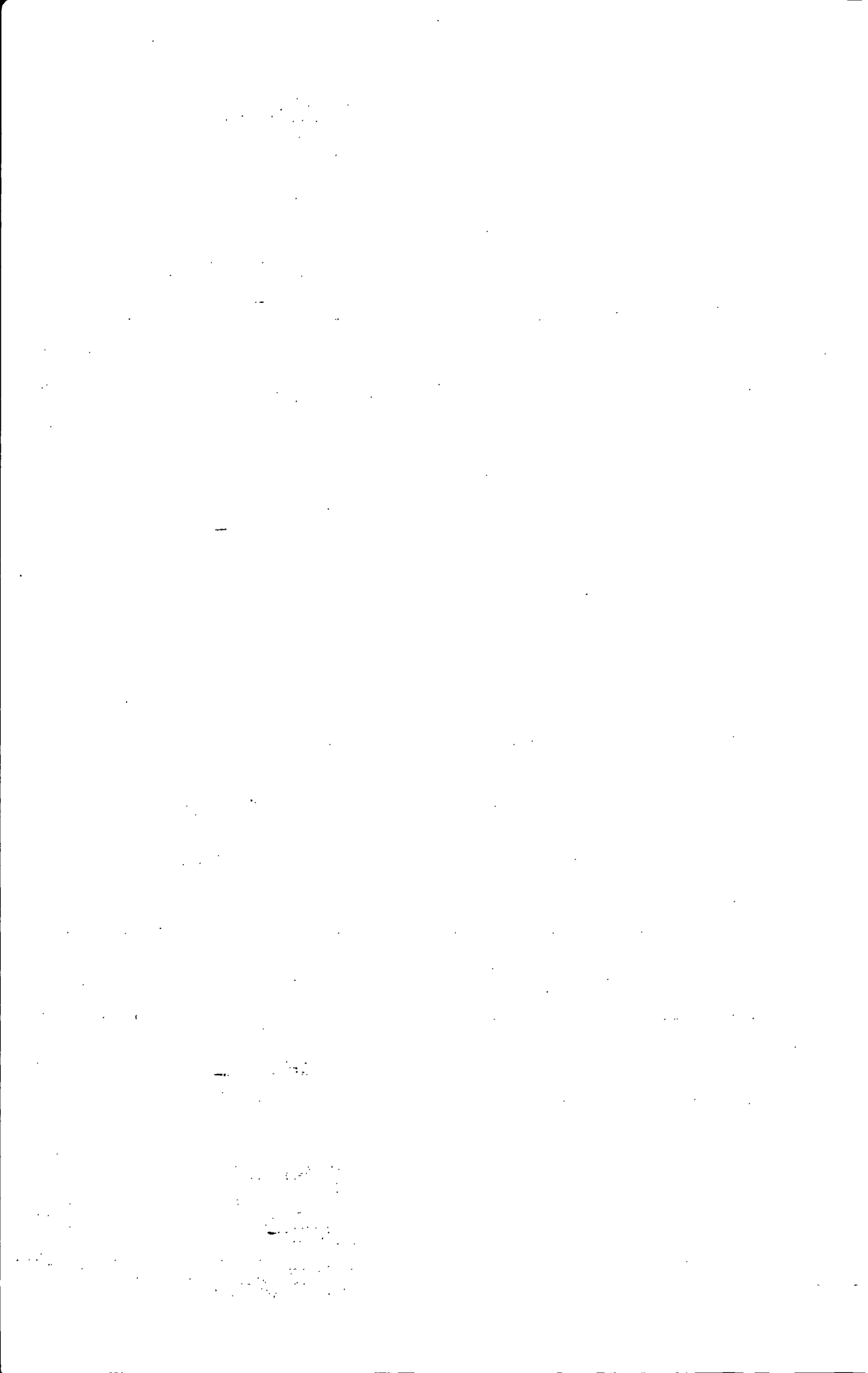
Examining Committee Members:

Kaihong Xu Chief doctor

liangWang Chief doctor


feiRuan Attending physician

Date of oral defence: 11.24.2010



## 浙江大学研究生学位论文独创性声明


本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名:  签字日期: 2010 年 11 月 25 日

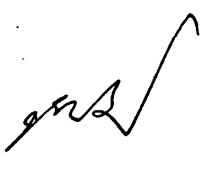
## 学位论文版权使用授权书


本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名: 

签字日期: 2010 年 11 月 25 日

导师签名: 

签字日期: 2010 年 11 月 25 日 



## 致 谢

衷心感谢我的导师林俊教授和吴瑞瑾主任医师对我的精心教导和谆谆教诲，感谢导师两年来对我多方面的关怀和启迪。导师渊博的知识、精湛的医术、敏锐的思维、孜孜不倦的追求以及诲人不倦的精神让我受益匪浅。他们磊落的品质、对事业的执着和热情将对我一生产生深远影响。

衷心感谢中心实验室陈琪老师和费老师在实验过程中的帮助和指导；感谢病理科周彩云老师在检测细胞凋亡过程中给予的热情支持和帮助。

感谢我的师姐陈利青、周琴琴及其他同学在生活和学习中对我的帮助和鼓励！

深深感谢我的家人和朋友！他们的理解和支持永远是我前进的动力和勇气。感谢百忙之中抽出时间评议和评阅我的论文的各位专家学者，感谢他们审阅本文所付出的辛勤劳动。

再次向所有关心和帮助过我的老师、同学、朋友和亲人表示衷心的感谢。

# CO<sub>2</sub> 气体对 SCID 鼠异位子宫内膜细胞凋亡的影响及其意义

浙江大学医学院 妇产科专业

硕士研究生 刘广申

导 师 林 俊 教 授

吴瑞瑾 主任医师

## 中文摘要

### 背 景

子宫内膜异位症 (Endometriosis, EMs) 是指有活力的子宫内膜组织 (腺体和间质) 在子宫腔及子宫肌层以外部分生长, 引起症状, 是育龄妇女的一种常见病, 其患病率约 10%, 有逐年上升趋势, 主要引起不孕、痛经、慢性盆腔痛等症状, 严重影响患者生活质量。自 1921 年 Sampson 教授首次描述该病以来, 至今其病因仍然不是很清楚。近年来 EMs 与细胞凋亡的关系日益受到重视, 细胞凋亡通过消减分泌晚期和月经期功能层失活细胞从而维持子宫内膜月经周期细胞的稳态。越来越多研究表明, 在位内膜细胞和异位内膜细胞自发性凋亡的下降可能促进了 EMs 的发生和发展。

腹腔镜手术比开腹手术具有创伤小、腹部疤痕小, 术后恢复快, 粘连轻, 住院时间短等优点, 是 EMs 诊断和治疗的首选方式。但是 EMs 患者腹腔镜手术术后复发问题一直困扰着妇产科医生, 同时也吸引了越来越多学者的关注。迄今国内尚未见腹腔镜 CO<sub>2</sub> 气腹本身对 EMs 腹腔镜手术术后复发的影响及病理生理改变的报道。

### 目 的

本课题结合细胞凋亡在 EMs 发生、发展中的作用和 CO<sub>2</sub> 气腹引起肿瘤转移

的最新进展,通过构建 SCID 小鼠内异症和气腹模型,旨在探索 CO<sub>2</sub> 气体是否抑制了异位子宫内膜细胞的凋亡从而影响子宫内膜异位症患者腹腔镜手术后复发和转移。

## 材料和方法

选择浙江大学医学院附属妇产科医院患子宫肌瘤行子宫切除患者的增生期子宫内膜,双侧腹壁缝合法构建 SCID 鼠子宫内膜异位症模型(n=60),然后构建 SCID 鼠 CO<sub>2</sub> 气腹模型(n=60),压力维持在 5mmHg,时间分别为 60min 和 120min,实验设置对照组。最后用 Tunel 法检测 SCID 鼠异位子宫内膜细胞的凋亡指数。

所有实验数据用 SPSS16.0 统计软件包进行处理。计量数据结果由均值 ± 标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示; 组间结果比较用方差分析,配对 t 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

## 结果

### 1. SCID 鼠子宫内膜异位症模型

总成模率 61.67% (37/60)。内异囊肿直径 0.2cm~1.0cm 不等,外观呈透明状或新鲜亮白色,内有囊液,囊壁表面覆盖有毛细血管,腹腔少量粘连。HE 染色证实为子宫内膜组织,有腺上皮和间质细胞。

### 2. SCID 鼠 CO<sub>2</sub> 气腹模型

成功率 86.49% (32/37)。

### 3. 细胞凋亡检测结果

(1) 实验组和对照组均可见到明显的凋亡细胞(腺上皮细胞和间质细胞),凋亡细胞荧光显微镜下可见到其染色质浓缩、边缘化,核膜裂解、染色质分割成块状和凋亡小体等典型的凋亡形态。苏木素复染后,光镜下腺上皮和间质凋亡细胞被染成深棕色。

(2) 实验组和对照组中腺上皮细胞随时间延长凋亡指数呈下降趋势,并且气腹时间越长凋亡指数下降越明显,其中 F 组(120min, 2 个月)与 B 组(免气腹, 2 个月)相比差异有显著意义(P<0.05),F 组(120min, 2 个月)与 D 组(60min, 2



个月)相比差异有显著意义( $P < 0.05$ ), F组(120min, 2个月)与E组(120min, 1个月)相比差异有统计意义( $P < 0.05$ ), 其他各组间差异无显著意义( $P > 0.05$ ).

(3)实验组和对照组间质细胞与同组腺上皮细胞相比凋亡指数略低, 但差异无显著意义( $P > 0.05$ ). 与免气腹组相比气腹各组间质细胞凋亡指数均呈下降趋势, 但差异无显著意义( $P > 0.05$ ), 并且充气时间越长凋亡指数下降更明显, 但差异无显著意义( $P > 0.05$ ).

## 结 论

1. 腹壁缝合法构建 SCID 鼠子宫内膜异位症动物模型, 成模率较高, 观察时限长、定位准确、易于观察、重复性强是一种理想的子宫内膜异位症动物模型.

2. 自制气腹装置构建 SCID 鼠  $\text{CO}_2$  气腹模型, 成功率高, 较好的模拟了腹腔镜手术过程中  $\text{CO}_2$  气腹状态, 可以广泛在实验中使用.

3.  $\text{CO}_2$  气体对 SCID 鼠异位子宫内膜细胞的凋亡存在负调控作用, 提示腹腔镜手术过程应用的  $\text{CO}_2$  气体可能对 EMs 患者腹腔镜手术术后复发有一定的促进作用.

**[关键词]** 二氧化碳; 气腹; 腹腔镜; 子宫内膜异位症; SCID; 异位子宫内膜细胞; 细胞凋亡

# The influence of apoptosis exerted by CO<sub>2</sub> gas on the ectopic endometrial cell of SCID mouse and its significance

Zhejiang University: Obstetrics and Gynecology

Postgraduate Guangshen Liu

Supervisor Prof. Jun Lin

Chief physician Ruijin Wu

## ABSTRACT

### Background:

Endometriosis is defined as the presence of endometrial glands and stroma outside the uterus and myometrium, is one of the most frequent benign gynecological diseases that affects 10% of women of reproductive age with pelvic pain, infertility and dysmenorrhea. The pathogenesis of this disease still remains unknown. Sampson first described this disease in 1921. Accumulated evidence suggests that apoptosis helps to maintain cellular homeostasis during the menstrual cycle by eliminating senescent cells from the functional layer of the uterine endometrium during the late secretory and menstrual phase of the cycle. Accumulating evidences also suggest that decreased spontaneous apoptosis in eutpic and ectopic endometrial cells may promote the occurrence and development of EMs.

Compared with laparotomy, laparoscopy has resulted in dramatic decrease in hospital stay, an increase in patient's comfort, and a more rapid return to normal daily activities. Laparoscopic surgery becomes the first choice for endometriosis diagnosis and treatment. But the problem of recurrent endometriosis after laparoscopic surgery

always troubled ,also attract more and more researchers , attention in recent years. So far little research has been emphasized on the influence of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum on recurrent endometriosis after laparoscopic surgery and its pathophysiological changes.

### Objectives:

In this paper, we reviewed the role of cell apoptosis in endometriosis occurrence and development ,and the role of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum in tumor metastasis, then establish endometriosis model and CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum in SCID mice. Our aim is to explore whether CO<sub>2</sub> inhibit the apoptosis in ectopic endometrial cells and influence the recurrence and metastasis of endometriosis after laparoscopic surgery.

### Materials and Methods:

Proliferative phase endometrial tissue was obtained from women during hysterectomy who had uterine myomas. Then establish endometriosis model by suturing the endometrium into the mice bi-abdominal walls and CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum in SCID mice (n=60), CO<sub>2</sub> gas pressure maintained at 5mmHg for 60min or 120min, we then detect apoptosis index of ectopic endometrial cells in SCID mice using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay.

All values were expressed as mean±standard deviation ( $\bar{X} \pm S$ ). Results were analyzed using the Student's t test (T test). When p value less than 0.05 it was considered statistically significant. Use the SPSS15.0 software to analysis.

### Results:

1. Successful implantation of EMs was observed in 37 of 60 surviving mice following suturing , with a success rate of 61.67%. Endometrial cysts within the range 0.2cm ~ 1.0cm in diameter, the appearance of the cyst were transparent or fresh bright white, fill with fluid, cyst wall surface covered with blood vessels, mild abdominal

adhesions. Haematoxylin-eosin staining of implanting lesions demonstrated the presence of endometrial glandular tissue in a background of stromal cells.

2. Successful rate of SCID CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum was 86.49%(32/37)

3. The results of apoptosis cells detected

(1) We could see apoptosis cells (glandular epithelial cells and stromal cells) in experimental groups and control groups, under the fluorescence microscope chromatin condensation, marginalization, nuclear membrane lysis, chromatin is divided into blocks, and the typical apoptotic bodies could be seen. Hematoxylin counterstained, under the light microscope, apoptotic epithelial and stromal cells were stained dark brown.

(2) Apoptosis index of endometrial glandular cells and stromal cells in experimental groups and control groups decreased with time elapsed, in which F group (120min, 2 months) versus B (gasless pneumoperitoneum, 2 months) has significant difference ( $P < 0.05$ ), F group (120min, 2 months) versus the D group (60min, 2 months) has significant difference ( $P < 0.05$ ), F group (120min, 2 months) versus the E group (120min, 1 month) has statistically significant difference ( $P < 0.05$ ), other groups have no significant difference ( $P > 0.05$ ).

(3) Stromal cells have a lower apoptosis index compared with glandular cells in the same groups, but have no significant difference ( $P > 0.05$ ). Apoptosis index of endometrial stromal cells in experimental groups has a decreased trend compared with the gasless pneumoperitoneum groups, the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). And the longer time inflation the more significantly decreased of apoptosis index, but the difference was statistically significant ( $P > 0.05$ ).

## Conclusions:

1. Endometriosis model can be established by suturing the endometrium into the mice bi-abdominal walls, the model has a higher successful rate with a longer effective period and an accurate position and easy to observe, repeatability. It is an ideal animal

model for endometriosis study.

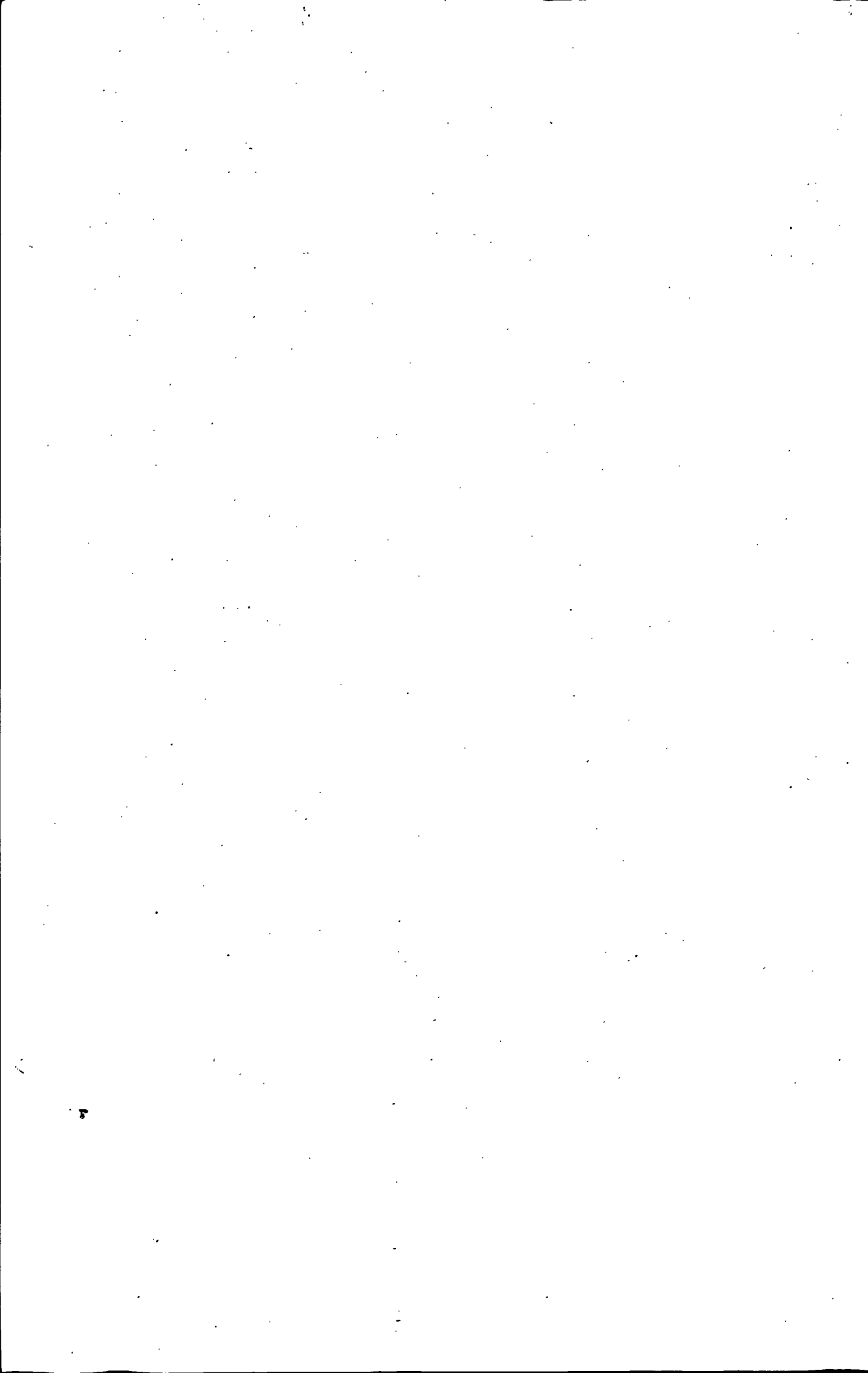
2. Establish pneumoperitoneum CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum in SCID mice using self-made pneumoperitoneum device, has a higher successful rate, the model can simulate the state of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum in laparoscopic surgery and can be widely used in experiment.

3. CO<sub>2</sub> gas has a negative regulation on apoptosis of SCID ectopic endometrial cells, suggesting that CO<sub>2</sub> gas used in laparoscopic surgery may have some role in promoting the recurrence of endometriosis after laparoscopic surgery.

**Key Words:** carbon dioxide; pneumoperitoneum; laparoscopy; endometriosis; SCID; ectopic endometrial cells; cell apoptosis

## 缩略词表

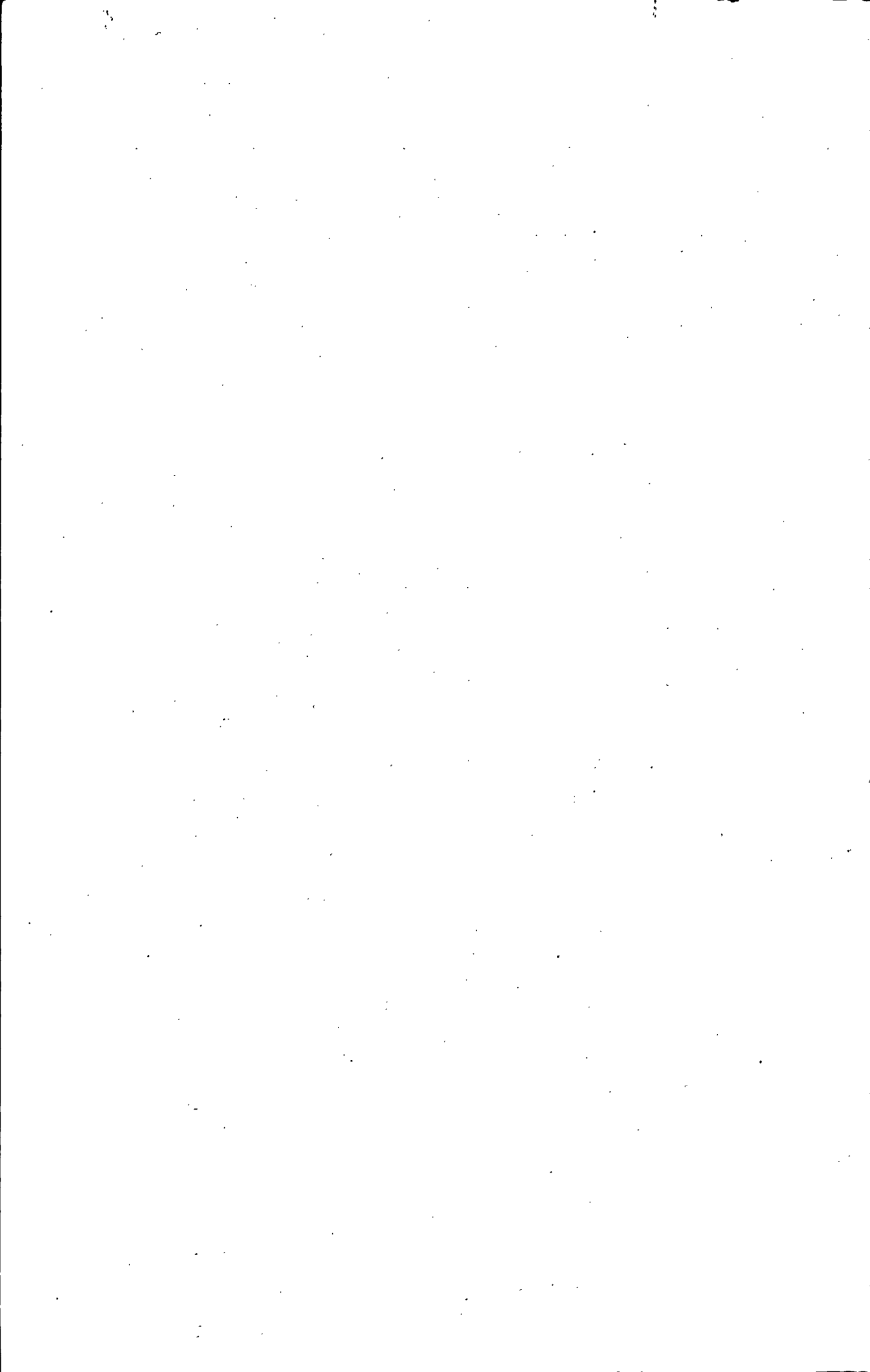
缩略词	英文全称	中文译名
EMs	endometriosis	子宫内膜异位症
CO <sub>2</sub>	carbon dioxide	二氧化碳
SCID	severe combined immune deficiency	严重联合免疫缺陷
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling	原位末端标记
Bcl-2	B- cell lymphoma / leukemia-2	B 细胞淋巴瘤/ 白血病-2
SPF	special pathogen—free	无特殊病原体
IL-1	interleukin 10	白介素 1
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	增殖细胞核抗原
TNFR	tumor necrosis factor receptor	肿瘤坏死因子受体
NK	Natural killer	自然杀伤
Fas	factor associated suicide	自杀相关因子
FasL	factor associated suicide ligand	自杀相关因子受体
HRP	horse-radish peroxidase	辣根过氧化酶
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白



# 目 录

致 谢.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	V
缩略词表.....	IX
目 录	
正 文	
前 言.....	1
材料与方法.....	4
1 材料.....	4
2 方法.....	6
3 统计分析.....	8
结 果.....	9
1 SCID 鼠子宫内膜异位症模型.....	9
2 SCID 鼠 CO <sub>2</sub> 气腹模型.....	9
讨 论.....	19
1 有关 SCID 鼠子宫内膜异位症模型.....	19
2 有关 SCID 鼠 CO <sub>2</sub> 气腹模型.....	21
3 CO <sub>2</sub> 气腹对 SCID 鼠异位子宫内膜细胞凋亡的影响.....	22
4 结语.....	24
结 论.....	25
参考文献.....	26
综 述.....	33
作者简介及在学期间发表的文章.....	42





## CO<sub>2</sub> 气体对 SCID 鼠异位子宫内膜细胞凋亡的影响及其意义

浙江大学医学院 妇产科专业

硕士研究生 刘广申

导 师 林 俊 教 授

吴瑞瑾 主任医师

### 前 言

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 是指有活力的子宫内膜组织 (腺体和间质) 在子宫腔以及子宫肌层以外部分生长, 是育龄妇女的一种常见病, 其患病率约 10%, 有逐年上升趋势, 主要引起不孕、痛经、慢性盆腔痛等症状, 严重影响患者生活质量。自 1921 年 Sampson 教授首次描述该病以来, 至今尚无一个学说能完整解释其发病原因。近年来 EMs 与细胞凋亡的关系日益受到重视, 越来越多研究表明, 子宫内膜细胞自发性凋亡是内膜组织保持正常结构和功能的关键因素。但是子宫内膜异位症患者的在位内膜分泌晚期、月经期和增殖早期腺上皮细胞凋亡成下降趋势, 凋亡失去周期性。在位内膜和异位内膜中一些凋亡抑制基因 (Bcl-2 等) 的表达上调, 而促凋亡基因 (Bax 等) 的表达下降, Bcl-2/Bax 比值上升以及 EMs 异位内膜中 FasL 的高表达, 降低了这些内膜细胞对凋亡的敏感性, 并且逃脱了腹腔吞噬细胞的吞噬作用和其他的调解机制, 从而使内异症患者在位内膜细胞凋亡趋势减弱, 细胞凋亡异常导致逆流至腹腔的内膜细胞存活能力增强, 促进了内异症的发生与发展<sup>[1][2]</sup>。

目前, EMs 的治疗方法有手术治疗和药物治疗, 而手术治疗是其主要的治疗方法。手术可以切除病灶、分离粘连、恢复盆腔解剖结构, 从而达到缓解症状、促进生育以及减少复发的目的。手术治疗主要分为经腹手术和腹腔镜手术, 腹腔镜手术比开腹手术具有创伤小、腹部疤痕小, 术后恢复快, 粘连轻, 住院时间短等

优点,是EMs诊断和治疗的首选方式,能早期发现并清除EMs患者的微小病灶,因此日益受到患者的青睐。虽然腹腔镜手术具有以上独特的优点,但是EMs患者腹腔镜手术后复发问题一直困扰着妇产科医生,同时也是近年来研究的热点。Koga等<sup>[3]</sup>对224例经腹腔镜手术治疗EMs患者进行了至少2年的回顾性调查,复发率为30.4%。Busacca等<sup>[4]</sup>对366例经腹腔镜手术治疗EMs患者进行了非随机的前瞻性调查,结果术后4年累积复发率为11.7%,累积二次手术率为8.2%。与腹腔镜手术对比国外学者报道EMs保守性开腹手术术后3年累计复发率约为13.5%~30%,5年可达36%~57%<sup>[5]</sup>。Punnonen等<sup>[6]</sup>报道保守性手术后约有25%的患者因EMs复发。Namnoum<sup>[7]</sup>为了研究半根治性手术和根治性手术治疗后EMs症状复发及需要再次手术的风险,回顾性研究了138例经子宫切除术证实为EMs的妇女,A组的29例行半根治手术,18例(62%)复发,其中9例(31%)进行了二次手术;B组109例行根治性手术,11例(10%)复发,其中4例(3.7%)进行了二次手术。文献报道腹腔镜下内异病灶切除术后5年累积复发率与开腹术后并无显著差异<sup>[8]</sup>。造成复发率差异的原因,可能与研究对象的入选标准、观察期限、分析方法等的不同有关,但是术后复发却是不争的事实。学者们总结出既往内异症手术史、术前药物治疗史、大的内异囊肿是EMs患者腹腔镜手术后复发的高危因素<sup>[9]</sup>。但是迄今国内外尚未见腹腔镜CO<sub>2</sub>气腹本身对EMs腹腔镜手术后复发的影响及病理生理改变的报道。

子宫内膜异位症虽然是一种良性疾病,但却具有恶性肿瘤的一些特征,如无限生长、新生血管形成和凋亡细胞数量减少等,最显著特征是具有细胞侵袭能力,能局部或远处转移,浸润并损伤其他组织<sup>[10]</sup>。自从1978年Dobronte等<sup>[11]</sup>报道了首例卵巢癌诊断性腹腔镜术后发生腹壁穿刺孔肿瘤转移以来,迄今已有百余篇文献<sup>[12-15]</sup>,报道了数百例不同种类,包括结肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌及宫颈癌等恶性肿瘤患者,在腹腔镜手术后出现穿刺孔和(或)腹膜的肿瘤转移。大多数学支持CO<sub>2</sub>气腹促进了肿瘤细胞的增殖,抑制其凋亡,增强了肿瘤细胞的侵袭性,从而促进了肿瘤的术后转移。CO<sub>2</sub>气腹引起的腹腔局部压力增高、腹腔局部微酸环境、腹腔局部免疫抑制、局部腹膜结构改变

可能是造成复发和转移的机制<sup>[16-18]</sup>。并且随着腹腔镜在妇产科领域的广泛应用，国内外已经陆续发现 EMs 患者腹腔镜手术后出现穿刺点转移<sup>[19-21]</sup>

由于伦理道德的因素，很难对患病妇女进行全程观察，也不能反复进行创伤性检查，更不能在人体进行侵袭性对照性试验。因此，需借助于体外动物模型，对该疾病的发生、发展、治疗等进行研究。最早的 EMs 动物模型是由 Arch 于 20 世纪 20 年代构建的家兔自体移植模型，后又发展有大鼠自体移植模型。非人灵长类动物有周期性月经，可形成自发性动物模型。但这些动物模型都有很大局限性：兔、大鼠与人类存在较大的种属差异，影响实验结果。近年来陆续有 EMs 免疫缺陷鼠的动物模型构建成功，并应用于发病机理、治疗等方面的研究。种植到小鼠体内人子宫内膜的光镜、超微结构、染色体核型均未改变，保留人类特性<sup>[22]</sup>

本课题结合细胞凋亡在 EMs 发生、发展中的作用和 CO<sub>2</sub> 气腹引起肿瘤转移的最新进展，通过构建 SCID 小鼠内异症和气腹模型，旨在探索 CO<sub>2</sub> 气体是否抑制了异位子宫内膜细胞的凋亡从而影响子宫内膜异位症患者腹腔镜手术后复发和转移。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

1.1 标本来源: 取自 2008 年 8 月~2009 年 3 月浙江大学医学院附属妇产科医院患子宫肌瘤行子宫切除患者的增生期子宫内膜, 所取子宫内膜的患者月经正常, 术前 6 个月未接受过激素类药物治疗, 无内科并发症和放置宫内节育器。年龄(43.4 ± 4.9)岁, 所有标本均留部分组织用 10%福尔马林液固定后作病理组织学检查, 经检查均未发现其它病理改变, 其组织学分期为增生期子宫内膜(所有标本均经患者知情同意)。

1.2 实验动物: CB17SCID 纯系小鼠, 雌性, 体重为 (20±5)g, 60 只, 均购自中国医学科学院实验动物研究所。饲养于无特殊病原体(special pathogen—free)SPF 环境, (浙江大学医学院附属第一医院卫生部多器官联合移植研究重点实验室动物房)恒定温度为 25℃, 光照明暗 12/12 h, 饲料、水、垫料均经高温无菌消毒, 小鼠自行取食。

1.3 麻醉剂: 戊巴比妥钠, 上海西唐生物科技有限公司

1.4 雌激素: 苯甲酸雌二醇, 杭州动物药品厂

#### 1.5 主要仪器:

◆内异模型手术器械: 眼科剪、眼科镊、持针器、玻璃培养皿、圆针、三角针、不可吸收缝合线

◆气腹模型所用仪器:

氧气袋: 上海三和医疗器械有限公司

精密气压表: 上海仪川仪表厂

CO<sub>2</sub> 气体 (纯度为 99.99%) 杭州新世纪混合气体有限公司

◆LEICA 组织切片机 (RM2125, 德国)

◆高压消毒锅: 日本三洋公司

◆水浴箱: 上海精宏实验设备公司、

- ◆ 电子天平 (METTLER AT261): 瑞士 TOLEDO 公司
- ◆ 荧光显微镜 (AX70): 日本 OLYMPUS 公司
- ◆ 显微激光切割系统: 德国 Leica 公司

1.6 细胞凋亡检测相关试剂:

- ◆ Tunel 细胞凋亡检测试剂盒 罗氏公司
- ◆ 蛋白酶 K 工作液 (10-20  $\mu\text{g/ml}$  in 10 mM Tris/HCl, pH 7.4-8) 罗氏公司
- ◆ 20 $\times$ DAB 工作液 北京中杉金桥生物科技有限公司
- ◆ DNase 1 (3000 U/ml- 3 U/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA 北京中杉金桥生物科技有限公司
- ◆ PBS、双蒸水、二甲苯、梯度乙醇 (100、95、90、80、70%)、10%中性福尔马林

1.7 主要试剂的配制

◆ 10 mM Tris/HCl:

Tris	121.1g
蒸馏水	800mL
浓 HCl	70mL
用蒸馏水定容至	1000mL

◆ PBS 液配方:

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.56g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g

用蒸馏水定容至 1000mL, 用 5%NaHCO<sub>3</sub> 或稀盐酸调节 PH 值为 7.2~7.4

## 2 方法

### 2.1 SCID 小鼠子宫内膜异位症模型的建立

将取到的子宫内膜标本保存于无菌培养基中,置于冰壶内送实验室。用无菌 PBS 冲洗标本两次去除血块和细胞碎屑后放置于 100IU/ML 的 PBS 中,无菌条件下将内膜切成 4-5mm 的小块。小部分组织用 10%甲醛固定,做常规病理检测证实标本为增生期内膜。

无菌条件下小鼠行 1%戊巴比妥钠 50mg/kg 腹腔内注射麻醉,麻醉后腹部正中做一长 2cm 切口,5-0 非可吸收线缝标本于双侧腹壁血管丰富处,令子宫内膜官腔面对腹壁,双层关腹。动物术后分笼单放,让其自然苏醒,常规喂养。种植后,立即给予苯甲酸雌二醇 0.02ml 腿部肌肉注射,并按 1 次/5 天方式连续注射。

### 2.2 SCID 小鼠 CO<sub>2</sub> 气腹模型的建立

2.2.1 动物分组:内异模型建立 2 周后,小鼠于麻醉状态可在其腹壁表面触摸到内异囊肿形成。采用随机数字法分组:选取形成内异灶的 SCID 小鼠 60 只,先在每只小鼠背上分别标号(01~60 号),再将 60 个号码通过计算机随机编排 6 组,每组 10 个号码,按各排列号码将实验小鼠分为 6 组。

对照组:

A 组:免气腹饲养 1 个月组 (n=3)

B 组:免气腹饲养 2 个月组 (n=3)

气腹组:

C 组:充气 60min 饲养 1 个月组 (n=5)

D 组:充气 60min 饲养 2 个月组 (n=4)

E 组:充气 120min 饲养 1 个月组 (n=5)

F 组:充气 120min 饲养 2 个月组 (n=5)

2.2.2 方法:(1)气腹组:无菌条件下小鼠行 1%戊巴比妥钠 50mg/kg 腹腔内注射麻醉,用内径 0.6mm 小针在小鼠左下腹穿刺形成气腹,压力维持在 5mmHg,

时间分别为 60min 和 120min (CO<sub>2</sub> 气体不加热)。气腹完毕后拔出针头排尽小鼠腹腔内气体。动物术后分笼单放, 让其自然苏醒, 常规喂养。(2) 对照组: 不充气, 只行常规麻醉。

### 2.3 小鼠内异囊肿生物学观察

实验组和对照组小鼠正常饲养 1 个月和 2 个月后, 以颈椎脱臼法处死, 解剖暴露腹腔, 观察腹腔内的异位内膜组织, 观察其颜色、大小。

### 2.4 Tunel 法检测异位内膜细胞凋亡

- (1) 切除小鼠腹腔内的内异囊肿, 用 PBS 液漂洗 3 次
- (2) 10% 中性福尔马林固定过夜
- (3) 常规脱水、石蜡包埋、4 $\mu$ m 切片
- (4) 用二甲苯浸洗 2 次, 每次 5min
- (5) 用梯度乙醇 (100、95、90、80、70%) 各浸洗 1 次, 每次 3min
- (6) PBS 漂洗 2 次
- (7) 用 100 $\mu$ l Proteinase K 工作液处理组织 15-30 min 在 33 $^{\circ}$ C
- (8) PBS 漂洗 2 次
- (9) 制备 TUNEL 反应混合液, 处理组用 50 $\mu$ l TdT + 450 $\mu$ l 荧光素标记的 dUTP 液混匀; 而阴性对照组仅加 50 $\mu$ l 荧光素标记的 dUTP 液, 阳性对照组先加入 100 $\mu$ l DNase 1, 反应在 15~25 $^{\circ}$ C $\times$ 10min, 后面步骤同处理组玻片干后, 加 50 $\mu$ l TUNEL 反应混合液 (阴性对照组仅加 50 $\mu$ l 荧光素标记的 dUTP 液) 于标本上, 加盖玻片或封口膜在暗湿盒中反应 37 $^{\circ}$ C $\times$ 1h
- (10) PBS 漂洗 3 次
- (11) 加 1 滴 PBS 在荧光显微镜下计数凋亡细胞 (激发光波长为 450~500nm, 检测波长为 (515~565nm))
- (12) 玻片干后加 50 $\mu$ l converter-POD 于标本上, 加盖玻片或封口膜在暗湿盒中反应 37 $^{\circ}$ C $\times$ 30min
- (13) PBS 漂洗 3 次
- (14) 在组织处加 50~100 $\mu$ l DAB 底物, 反应 15~25 $^{\circ}$ C $\times$ 10min



(15) PBS 漂洗 3 次

(16) 拍照后再用苏木素复染, 几秒后立即用自来水冲洗。梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂封片

(17) 加一滴 PBS 或甘油在视野下, 用光学显微镜观察凋亡细胞

## 2.5 凋亡指数的计算

荧光素 (fluorescein) 标记的 dUTP 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT Enzyme) 的作用下, 可以连接到凋亡细胞中断裂 DNA 的 3'-OH 末端, 并与连接辣根过氧化物酶 (HRP, horse-radish peroxidase) 的荧光素抗体特异性结合, 后者又与 HRP 底物二氨基联苯胺 (DAB) 反应产生很强的颜色反应 (呈深棕色), 特异准确地定位正在凋亡的细胞, 因而在光学显微镜下即可观察凋亡细胞; 由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 断裂, 因而没有 3'-OH 形成, 很少能够被染色。最终通过计数每张切片上不同视野中 TUNEL 阳性细胞的比例来判断细胞凋亡发生情况。凋亡指数 = 凋亡细胞 / (凋亡细胞计数 + 非凋亡细胞计数) × 100%, 由两个独立不同的人分别在 ×400 显微镜下取五个不同的视野 (左右上下中), 取 100 个细胞应用 IPP 软件 (Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件) 分别计数其中的总的细胞数和凋亡细胞数, 然后计算凋亡率。

## 3 统计分析

所有实验数据用 SPSS15.0 统计软件包进行处理。计量数据结果由均值 ± 标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示; 组间结果比较用方差分析, 配对 t 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 SCID 鼠子宫内膜异位症模型

以 SCID 小鼠位模型动物，采用人增生期子宫内膜缝合于小鼠双侧腹壁进行 EMs 模型构建。总成模率 61.67% (37/60)，内异囊肿直径 0.2cm ~ 1.0cm 不等，外观呈透明状或新鲜亮白色，内有囊液，囊壁表面覆盖有毛细血管，腹腔少量粘连见(图 1.1)。HE 染色证实为子宫内膜组织，有腺上皮和间质细胞，见(图 1.2)。

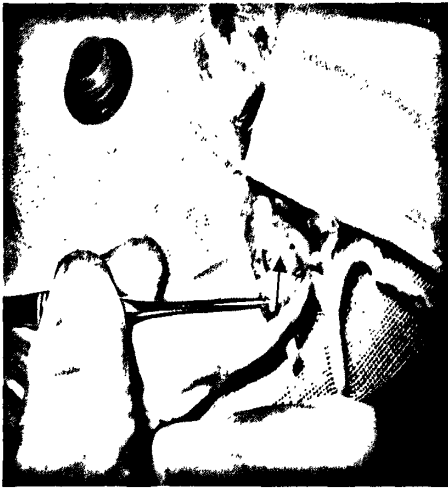


图 1.1 SCID 内异囊肿大体观，(如箭头所示：

图 1.2 SCID 鼠内异组织 (HE, 100×)

小鼠腹壁长出内异灶，囊壁表面覆盖有毛细血管)

### 2 SCID 鼠 CO<sub>2</sub> 气腹模型

气腹模拟小鼠 5 只死于实验过程中，剩余 32 只完成实验，成功率为 86.49% (32/37)，见(图 2.1,2.2)。

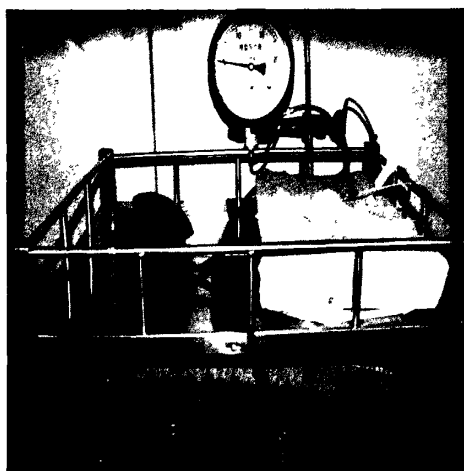


图 2.1 SCID 鼠 CO<sub>2</sub> 气腹模型及气腹装置组成

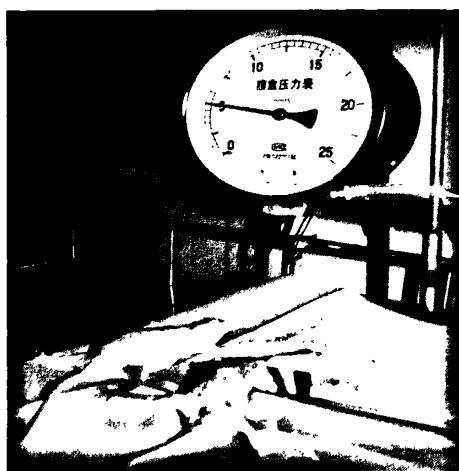


图 2.2 SCID 鼠 CO<sub>2</sub> 气腹模型

## 2.1 细胞凋亡检测结果

2.2.1 实验组和对照组均可见到明显的凋亡细胞（腺上皮细胞和间质细胞），荧光显微镜下调亡的间质细胞呈绿色，而腺上皮细胞可见到其染色质浓缩、边缘化，核膜裂解、染色质分割成块状和凋亡小体等典型的凋亡形态，见图（2.2.1-1，2.2.1-2）。苏木素复染后，光镜下调亡细胞被染成深棕色，未发生凋亡的细胞则被染成淡蓝色，见（图 2.2.1-3,2.2.1-4，2.2.1-5,2.2.1-6）。



图 2.2.1-1（荧光显微镜，400×）



图 2.2.1-2（荧光显微镜，400×）

（如箭头所示：凋亡细胞荧光显微镜下可见到其染色质浓缩、边缘化，染色质分割成块状和凋亡小体等典型的凋亡形态）



图 2.2.1-3 异位子宫内膜凋亡细胞阳性对照  
(光镜, 400×)



图 2.2.1-4 异位子宫内膜凋亡细胞阴性对照  
(光镜, 400×)



图 2.2.1-5 (光镜, 400×)

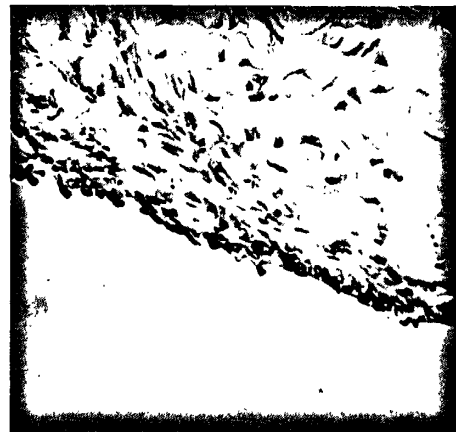


图 2.2.1-6 (光镜, 400×)

2.2.2 腺上皮细胞: 实验组和对照组中腺上皮细胞随时间延长凋亡指数呈下降趋势, 见 (表 2.2.2, 图 2.2.2-1)。其中 A 组 (免气腹, 1 个月) 与 B 组 (免气腹, 2 个月) 相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 见 (图 2.2.2-2)。C 组 (气腹 60min, 1 个月) D 组 (气腹 60min, 2 个月) 相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 见 (图 2.2.2-7)。E 组 (气腹 120min, 1 个月) F 组 (气腹 120min, 2 个月) 相比差异有显著意义 ( $P < 0.05$ ), 见 (图 2.2.2-9)。C 组 (气腹 60min, 1 个月) 与 E 组 (气腹 120min, 1 个月)

相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 见 (图 2.2.2-6)。D 组 (气腹 60min, 2 个月) F 组 (气腹 120min, 2 个月) 相比差异有显著意义 ( $P < 0.05$ ) 见 (图 2.2.2-10)。A 组 (免气腹, 1 个月) C 组 (气腹 60min, 1 个月) 相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 见 (图 2.2.2-3)。A 组 (免气腹, 1 个月) E 组 (气腹 120min, 1 个月) 相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 见 (图 2.2.2-4)。B 组 (免气腹, 2 个月) D 组 (气腹 60min, 2 个月) 相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 见 (图 2.2.2-5)。B 组 (免气腹, 2 个月) F 组 (气腹 120min, 2 个月) 相比差异有显著意义 ( $P < 0.05$ ), 见 (图 2.2.2-8)。

表 2.2.2 不同充气时间腺上皮细胞在 1 个月和 2 个月检测的凋亡指数 (% ,  $\bar{X} \pm S$ )

时间	0min	60min	120min
1 month	A 组: $39.0 \pm 1.80$	C 组: $35.9 \pm 2.34$	E 组: $34.0 \pm 3.47$
2 month	B 组: $38.0 \pm 4.99$	D 组: $34.2 \pm 2.11$	F 组: $28.7 \pm 2.35$

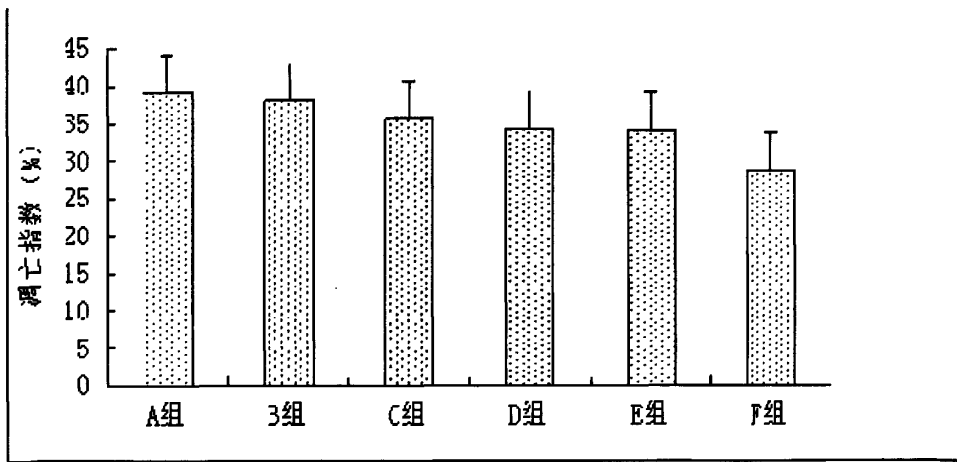


图 2.2.2-1 实验组和对照组腺上皮细胞凋亡指数 (%)

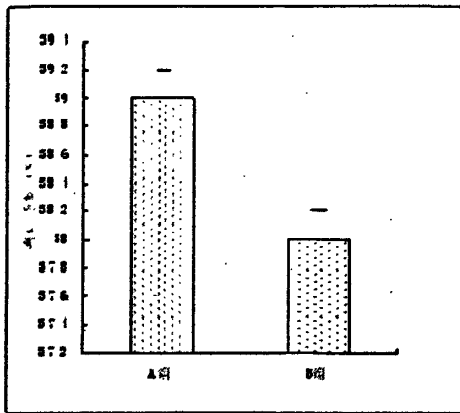


图 2.2.2-2 A 组 versus B 组 (p=0.761)

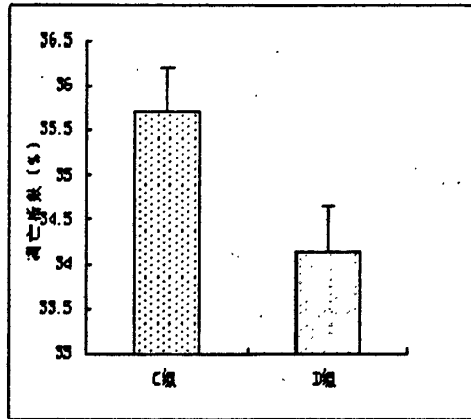


图 2.2.2-3 C 组 versus D 组 (p=0.240)

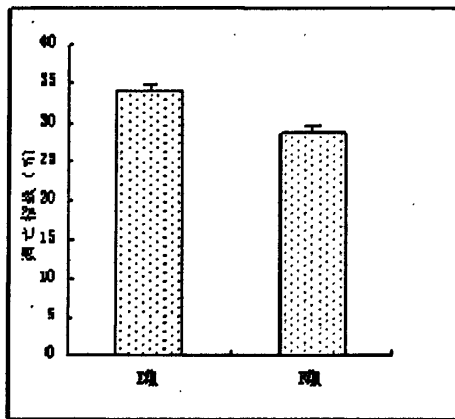


图 2.2.2-4 E 组 versus F 组 (p=0.022)

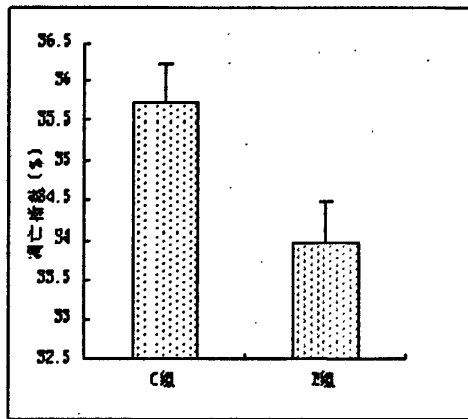


图 2.2.2-5 C 组 versus E 组 (p=0.311)

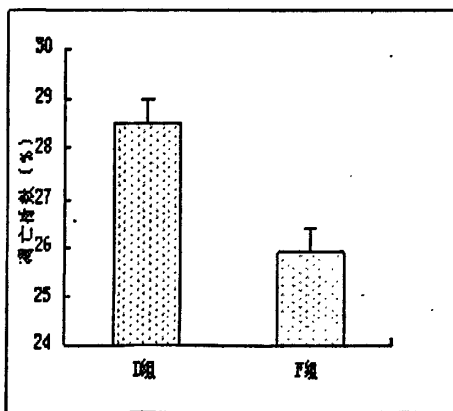


图 2.2.2-6 D 组 versus F 组 (p=0.008)

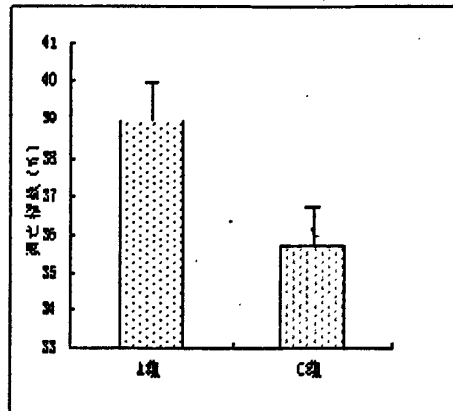


图 2.2.2-7 A 组 versus C 组 (p=0.072)

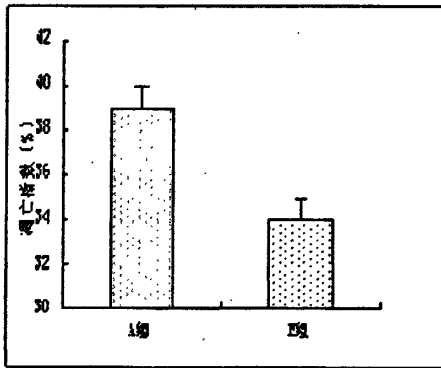


图 2.2.2-8 A 组 versus E 组 (p=0.64)

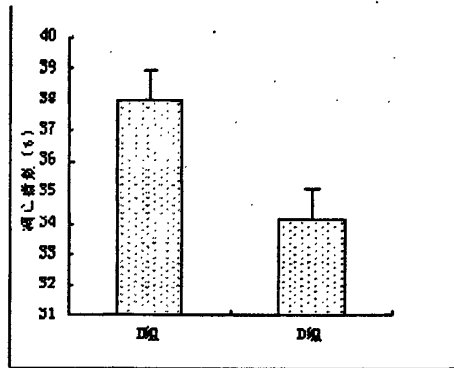


图 2.2.2-9 B 组 versus D 组(p=0.221)

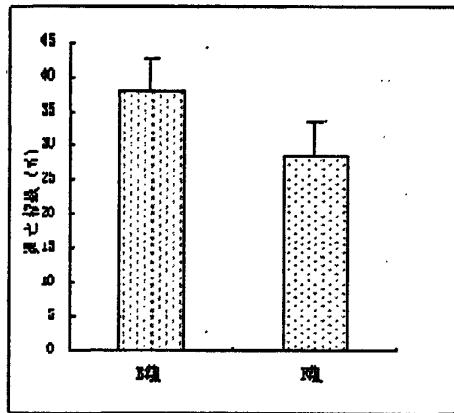


图 2.2.2-10 B 组 versus F 组 (p=0.011)

2.2.3 间质细胞: 实验组和对照组中间质细胞随时间延长凋亡指数呈下降趋势, 见(表 2.2.3, 图 2.2.3-1)。其中 A1 组(免气腹, 1 个月)与 B1 组(免气腹, 2 个月)相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 见(图 2.2.3-2)。C1 组(气腹 60min, 1 个月)D1 组(气腹 60min, 2 个月)相比 ( $P > 0.05$ ), 见(图 2.2.3-3)。E1 组(气腹 120min, 1 个月)F1 组(气腹 120min, 2 个月)相比差异有显著意义 ( $P < 0.05$ ), 见(图 2.2.3-4)。C1 组(气腹 60min, 1 个月)与 E1 组(气腹 120min, 1 个月)相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 见(图 2.2.3-5)。D1 组(气腹 60min, 2 个月)F1 组(气腹 120min, 2 个月)相比差异有显著意义 ( $P > 0.05$ ), 见(图 2.2.3-6)。A1 组(免气腹, 1 个月)C1 组(气腹 60min, 1 个月)相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ),

见(图 2.2.3-7)。A1 组(免气腹, 1 个月)E1 组(气腹 120min,1 个月)相比差异无显著意义 ( $P>0.05$ ), 见(图 2.2.3-8)。B1 组(免气腹, 2 个月)D1 组气腹(气腹 60min, 2 个月)相比差异无显著意义 ( $P>0.05$ ), 见(图 2.2.3-9)。B1 组(免气腹, 2 个月)F1 组气腹(120min,2 个月)相比差异有显著意义 ( $P>0.05$ ), 见(图 2.2.3-10)。

表 2.2.3 不同充气时间间质细胞在 1 个月和 2 个月检测的凋亡指数 (% ,  $\bar{X}\pm S$ )

时间	0min	60min	120min
1 month	A1组: 35.3±3.40	C1组: 34.5±2.61	E1组: 31.4±2.70
2 month	B1组: 35.0±4.26	D1组: 32.3±1.24	F1组: 28.6±4.99

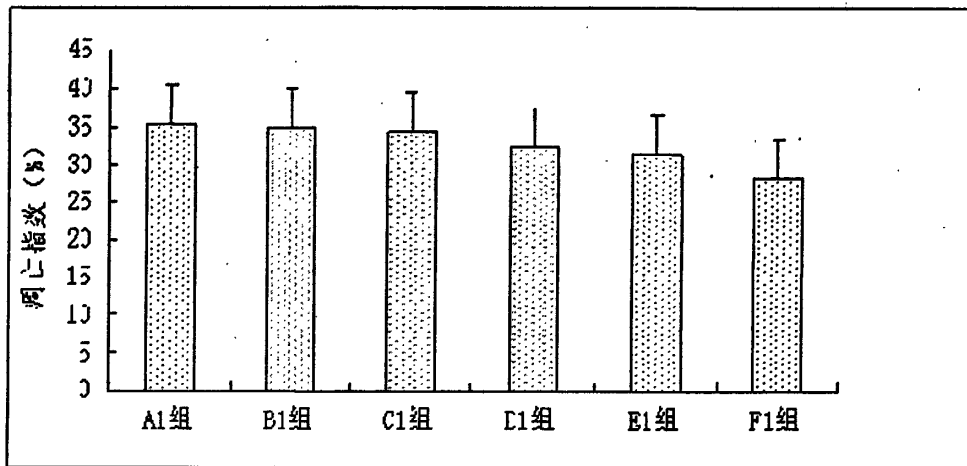


图 2.2.3-1 实验组和对照组腺上皮细胞凋亡指数 (%)



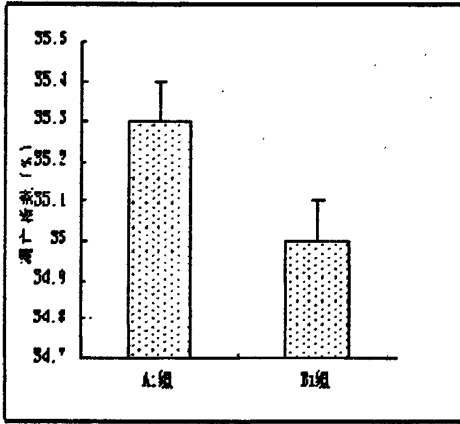


图 2.2.3-2 A1 组 versus B1 组 (p=0.919)

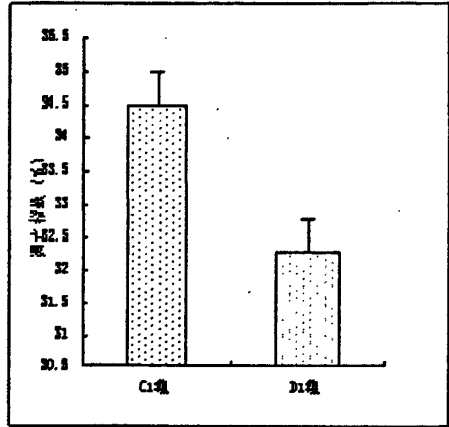


图 2.2.3-3 C1 组 versus D1 组 (p=0.174)

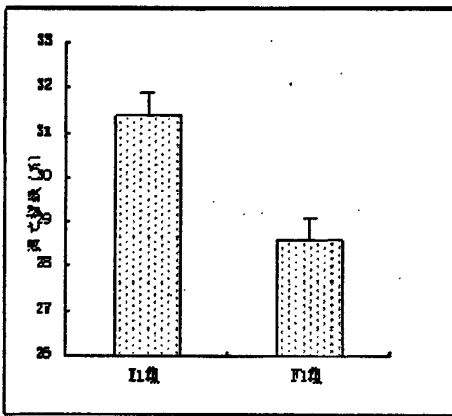


图 2.2.3-4 E1 组 versus F1 组 (p=0.312)

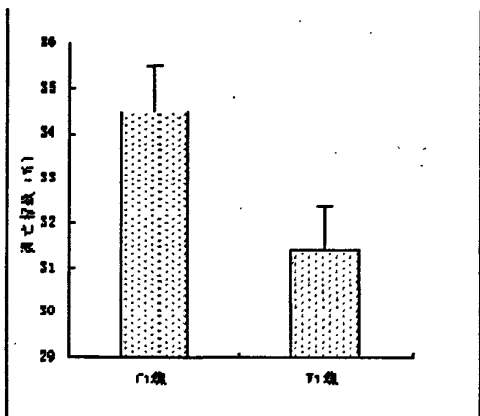


图 2.2.3-5 C1 组 versus E1 组 (p=0.104)

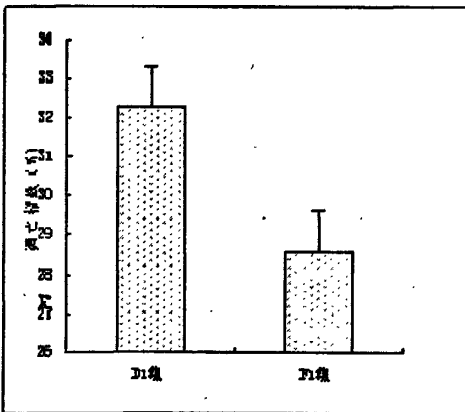


图 2.2.3-6 D1 组 versus F1 组 (p=0.201)

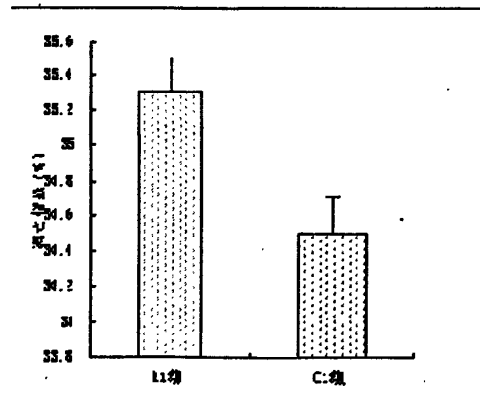


图 2.2.3-7 A1 组 versus C1 组 (p=0.709)

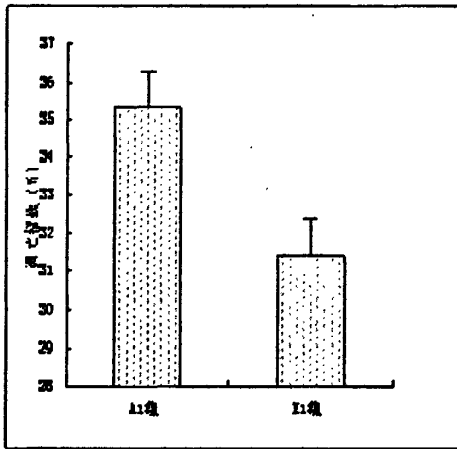


图 2.2.3-8 A1 组 versus E1 组 ( $p=0.120$ )

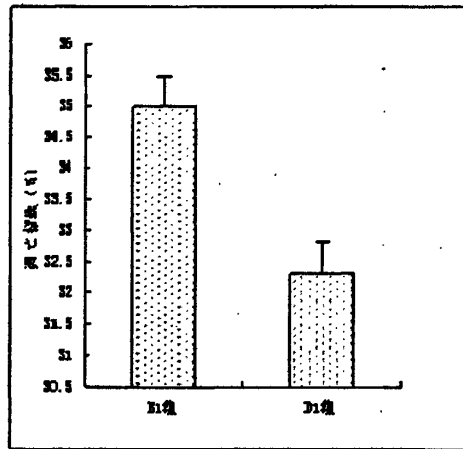


图 2.2.3-9 B1 组 versus D1 组 ( $p=0.280$ )

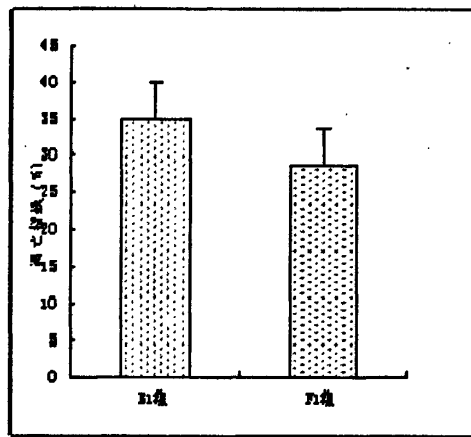


图 2.2.3-10 B1 组 versus F1 组 ( $p=0.119$ )

2.2.4 对照组和实验组中间质细胞与同组的腺上皮细胞相比凋亡指数略低，A 组（免气腹，1 个月）与 A1 组（免气腹，1 个月）相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ )，见（图 2.2.4-1）。B 组（免气腹，2 个月）与 B1 组（免气腹，2 个月）相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ )，见（图 2.2.4-2）。C 组（气腹 60min, 1 个月）与 C1 组（气腹 60min, 1 个月）相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ )，见（图 2.2.4-3）。D 组（气腹 60min, 2 个月）与 D1 组（气腹 60min, 2 个月）相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ )，见（图 2.2.4-4）。E 组（气腹 120min, 1 个月）与 E1 组（气腹 120min, 1 个月）相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ )，见（图 2.2.4-5）。F 组（气腹 120min, 2 个月）与 F1 组（气腹 120min, 2 个月）相比差异无显著意义 ( $P > 0.05$ )，见（图 2.2.4-6）。

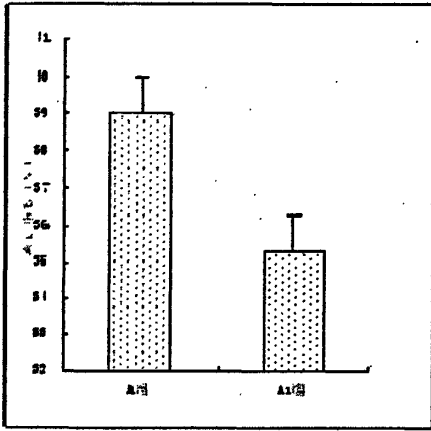


图 2.2.4-1 A 组 versus A1 组 (p=0.177)

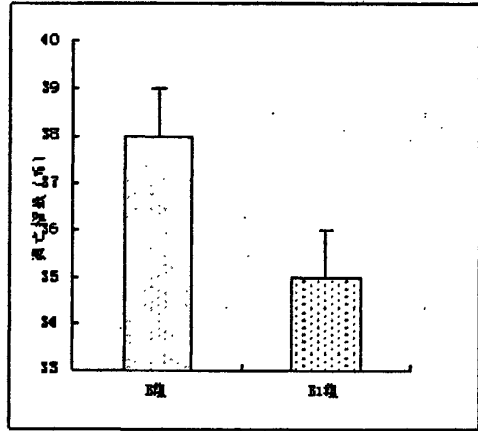


图 2.2.4-2 B 组 versus B1 组 (p=0.475)

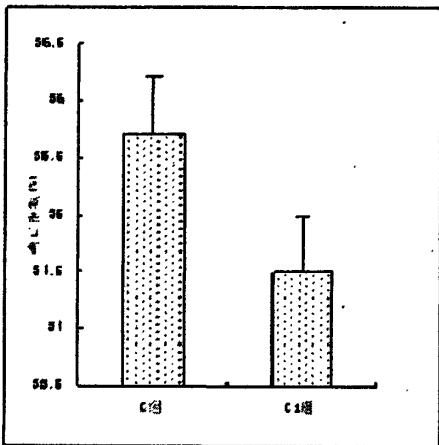


图 2.2.4-3 C 组 versus C1 组 (p=0.361)

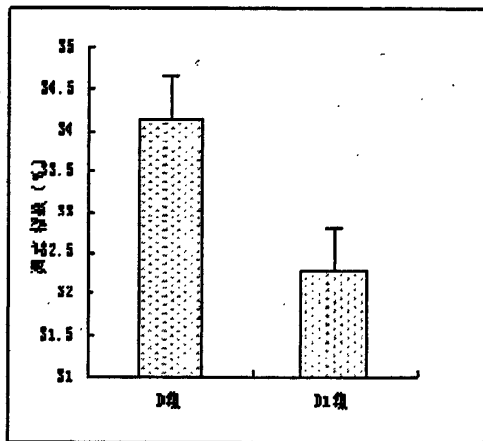


图 2.2.4-4 D 组 versus D1 组 (p=0.176)

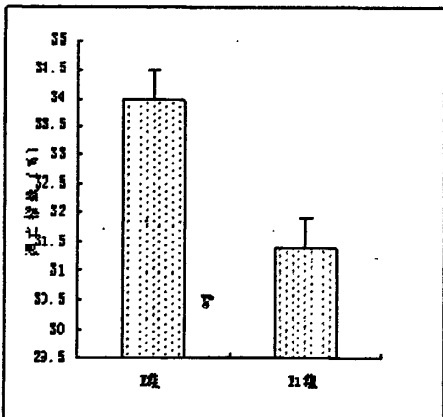


图 2.2.4-5 E 组 versus E1 组 (p=0.03)

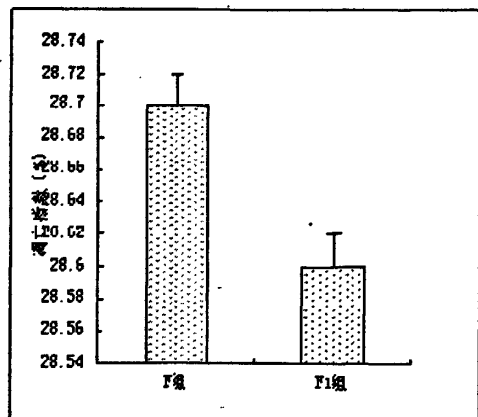


图 2.2.4-6 F 组 versus F1 组 (p=0.224)

## 讨 论

子宫内膜异位症发病率日趋上升,其病因仍然不是十分清楚,最近研究表明细胞凋亡的异常可能促进了子宫内膜异位症的发生和发展<sup>[23]</sup>。腹腔镜手术在诊断和治疗 EMs 中具有独特的优越性,因此在临床广泛应用。但是 EMs 患者腹腔镜手术可能会发生术后复发和转移,学者们认为既往内异症手术史、术前药物治疗史、大的内异囊肿是 EMs 患者腹腔镜手术后复发的高危因素。相对于 EMs 腹腔镜术后复发和穿刺孔转移(port-site metastasis, PSM)国内外肿瘤学在这方面研究较多。1998 年 Schaeff 等<sup>[24]</sup>统计有 90 篇文献报道 194 例内窥镜手术后 PSM 病例中 141 例为腹腔镜术后转移,其中 108 例为腹腔镜消化道手术,29 例为腹腔镜妇科手术,4 例为腹腔镜泌尿外科手术;另有 23 例为胸腔镜手术后转移,临床复发时间平均为 6 个月。1999 年 Paolucci 等<sup>[25]</sup>总结了 1052 篇临床调查表得出结论:腹腔镜下腹腔恶性肿瘤手术后其腹腔壁肿瘤转移率高于开腹手术。许多学者认为腹腔镜近期优点并不是微创方法治疗肿瘤的理由,最终决定腹腔镜技术是否适合恶性肿瘤治疗的是远期的生存率和转移率。综合国内外现有研究 CO<sub>2</sub> 气腹引起的腹腔局部压力增高、腹腔局部微酸环境、腹腔局部免疫抑制、局部腹膜结构改变可能造成了肿瘤腹腔镜术后复发和转移。但迄今为止尚未有 CO<sub>2</sub> 气腹对 EMs 影响的相关报道,肿瘤学虽然关注了 CO<sub>2</sub> 气腹的影响但是并没有学者从细胞增殖和凋亡角度进行研究,而细胞增殖和凋亡分子机制的改变与否将最终决定 EMs 以及肿瘤患者腹腔镜手术术后是否会发生复发和穿刺孔转移。因此本实验用人的子宫内膜在 SCID 小鼠体内构建子宫内膜异位症模型,然后构建 SCID 小鼠 CO<sub>2</sub> 气腹模型,全面模拟 EMs 患者腹腔镜手术过程中 CO<sub>2</sub> 气腹的压力和持续时间。在国内外首次探索 CO<sub>2</sub> 气腹是否对 SCID 小鼠异位子宫内膜细胞的凋亡产生影响。

### 1 有关 SCID 鼠子宫内膜异位症模型

子宫内膜异位症的发病机制和治疗一直是困扰妇科医生的难题。由于实际操

作和伦理学方面的约束,严重限制了对该疾病的研究。因此,需借助于体外动物模型,对该疾病的发生、发展、治疗等进行研究。动物模型总体可以分为两类,一是自发性动物模型,即不需干预就可自发形成类似人类 EMs 的病灶;二是诱发性动物模型,即通过各种方法将内膜组织或细胞移植于动物体内形成 EMs 病灶。用于建立自发性动物模型的动物主要有猕猴和狒狒等非人灵长类动物,它们也可以像人一样发生自发性内异症。其自发形成的 EMs 病灶,与人类疾病过程相似,可用于观察 EMs 的自然病程<sup>[26][27]</sup>。但自发动物模型的应用限制较多,不但动物获取困难、价格昂贵,而且动物的自然发病率很低,观察周期很长,因此应用较少。用于建立诱发性动物模型的动物主要有家兔、大鼠、小鼠和免疫缺陷小鼠<sup>[28]</sup>,主要有自体移植和异体移植两种建模方法。自体移植是将动物自体子宫内膜种植其子宫腔以外部分,异体移植是将人的子宫内膜或异位组织种植到动物子宫腔以外部分。自体移植动物如兔<sup>[29]</sup>、大鼠<sup>[30][31]</sup>、小鼠等与人类存在较大的种属差异,实验结果可能会与临床不一致。近年来国内外陆续有 EMs 免疫缺陷鼠的动物模型构建成功,并应用于发病机理、治疗等方面的研究。其种植物的光镜、超微结构、染色体核型均未改变,人体组织种植到小鼠体内仍保留人类特性,故为很好的 EMs 动物模型。目前实验室广泛使用的免疫缺陷小鼠为裸鼠(T淋巴细胞缺乏)和严重联合免疫缺陷 SCID 小鼠(T、B 淋巴细胞缺乏)。建模方法主要有:组织块腹腔注射<sup>[32]</sup>、组织块腹腔种植<sup>[33]</sup>、组织块皮下种植<sup>[34]</sup>、荧光染色的组织块腹腔和皮下注射<sup>[35]</sup>和细胞腹腔注射<sup>[36]</sup>。与裸鼠相比 SCID 鼠更易于接受人类正常组织,成活率高,模型观察时限长,易发生侵袭和转移,因此本实验采用了 SCID 鼠构建子宫内膜异位症模型。具体建模方法采用了人增生期子宫内膜腹壁缝合法,该方法定位准确,建模 2 周后小鼠在麻醉状态可在其腹壁表面触摸到内异囊肿,从而初步估计建模成功率,增生期子宫内膜比分泌期和月经期子宫内膜更适合缝合。Nissole 等<sup>[37]</sup>观察月经期、增殖期、分泌期正常人子宫内膜在免疫缺陷鼠腹腔内的种植效果,100% 发生了黏附,87% 观察到典型的类似于人的子宫内膜腺体及间质结构,提示不同月经周期取材的内膜并不影响模型的构建。小鼠本身卵巢分泌的激素并不影响种植结果<sup>[38]</sup>,补充雌激素的小鼠与不补充雌激素的小鼠相比其

种植物细胞的坏死和凋亡没有差别<sup>[39]</sup>, 多次开腹对小鼠损伤较大, 所以本研究小鼠卵巢没有去势, 术后补充雌激素维持种植物的生长。本实验 SCID 鼠子宫内膜异位症总成模率为 61.67% (37/60) 低于先前报道的 100% 的成功率<sup>[40][41]</sup>, 其中三只麻醉过程中死亡, 原因可能是个体差异。另外二十只于初始检测时未触到囊肿或最后解剖时在小鼠腹壁、腹腔没有发现内异组织, 而先前腹壁缝合的内膜组织消失或代之为小的钙化点, 最终检测的小鼠在气腹前都在其腹壁表面触摸到囊肿。造成这一结果的原因可能有以下几方面: 一, 初次腹壁表面触摸到的突起并不全为内异囊肿, 我们发现解剖后几乎所有小鼠腹腔内粘连十分严重, 包裹的小鼠肠管和网膜可能造成了假阳性; 二, 由于最后检测要经过一个月和二个月时间, 有可能最初长成的内异囊肿被小鼠这一时间内机化、吸收; 三, 小鼠个体差异造成同一标本不同小鼠建模后结果并不相同。结合我们的实验过程和结果我们认为, SCID 小鼠遗传背景明确, 体内微生物可控制, 模型性状显著且稳定, 质量和规格可选择, 且价格适中, 来源丰富。移植的内膜除了保持其原有的组织学特性和雌激素反应功能, 还保持其特有的结构、生化组成、分泌及免疫化学特性。人增生期子宫内膜腹壁缝合法具有定位准确、易于观察、成模率较高, 观察时限长等优点。缺点是对小鼠创伤较大, 操作复杂。建模过程中要完全无菌操作, 检测成模率要进行二次开腹检测。综合看来人子宫内膜 SCID 腹壁缝合法建立 EMs 模型是一种理想的 EMs 动物模型, 可以广泛用于实验研究。

## 2 有关 SCID 鼠 CO<sub>2</sub> 气腹模型

国内外用于构建 CO<sub>2</sub> 人工气腹模型的小鼠主要是普通小鼠<sup>[42]</sup>和裸鼠<sup>[43-45]</sup>, SCID 小鼠则很少<sup>[46]</sup>。具体方法有两种, 一种用气腹机, 另外一种用自制气腹装置<sup>[47]</sup>。根据各自实验目的不同压力一般维持在 3mmHg ~ 15mmHg, 时间维持在 5min ~ 120min, 气体流量维持在 0.1ml/min ~ 20L/min<sup>[45-50]</sup>, CO<sub>2</sub> 气体分为加热和不加热<sup>[51]</sup>。在预实验过程中 SCID 小鼠在高压力气腹条件下存活力较低, 比较适宜的 CO<sub>2</sub> 压力为 5mmHg, 这也与其他以 SCID 小鼠为实验用鼠的压力相同<sup>[46]</sup>。由

于条件受限, 实验室中的气腹机为人用气腹机, 不适合给 SCID 小鼠充气, 所以在本实验中我们采用了自制的 CO<sub>2</sub> 气腹装置, 气体不加热。本实验 SCID 小鼠 CO<sub>2</sub> 气腹模型成功率为 86.49% (32/37), 其中 5 只小鼠气腹过程中死亡, 死因为小鼠个体差异导致其呼吸抑制, 其余小鼠气腹后状态良好。本实验中采用的自制气腹装置唯一缺点是不能检测气腹过程中的 CO<sub>2</sub> 气体流量。

### 3 CO<sub>2</sub> 气腹对 SCID 鼠异位子宫内膜细胞凋亡的影响

细胞凋亡 (apoptosis) 又称程序性细胞死亡, 是机体正常细胞受到生理或病理刺激后出现的一种自发性的“死亡过程”, 是一个主动、高度有序并受基因控制及一系列相关酶参与的自我保护过程。目前认为细胞凋亡的途径主要两条: 一条为细胞表面死亡受体途径, 死亡受体主要有: Fas、TRAIL 和 TNFR, 均属于肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 基因超家族。另一条为线粒体途径。目前研究较多的凋亡调节基因有 Bcl-2, Bcl-x, c-myc, p53, fas, puma, Bcl-X<sub>L</sub> 和 Bax 等, 其中 c-myc, p53, fas, puma 和 Bax 主要诱导凋亡, 而 Bcl-2, Bcl-x, Bcl-X<sub>L</sub> 则抑制凋亡<sup>[52]</sup>。本实验采用了 TUNEL 法检测 SCID 鼠异位子宫内膜细胞的凋亡情况。

3.1 实验组和对照组腺上皮细胞和间质细胞随时间推移其凋亡指数下降, 但并没有显著差异。间质细胞和腺上皮细胞生化特性的不同可能导致了实验组和对照组间质细胞比同组的腺上皮细胞凋亡指数略低的趋势, 但这种差异仍然无显著意义。

3.2 本实验发现间质细胞气腹组与免气腹组相比凋亡呈下降趋势, 但差异并没有显著差异; 气腹 120min 比气腹 60min 凋亡指数低, 2 个月后检测也比 1 个月后检测拥有较低凋亡指数, 但都没有显著差异。与间质细胞不同腺上皮细胞气腹 120min 2 个月检测比免气腹 2 个月检测拥有显著差异的低凋亡指数; 并且气腹时间越长凋亡指数越低, 差异有显著意义; 另外凋亡指数气腹 120min 2 个月检测比气腹 120min 1 个月低, 差异有显著意义, 这其中可能存在腺上皮细胞的自身凋亡随时间延长凋亡细胞增加, 但是免气腹组以及气腹 60min 检测虽然凋亡指数呈现

下降趋势,差异却无显著差异,是否腺上皮细胞自身凋亡对结果产生影响需要进一步探索。实验结果表明对于气腹处理后长时间生长的小鼠,其CO<sub>2</sub>气腹对SCID鼠异位子宫内腺上皮细胞的凋亡可能呈负调控,并且气腹后时间越长这种作用越明显。提示EMs患者腹腔镜手术过程中用于暴露视野的CO<sub>2</sub>气体可能会对异位子宫内腺细胞的凋亡产生抑制作用,从而对这些患者腹腔镜手术后复发产生促进作用。这一实验结果可能与模拟CO<sub>2</sub>气腹状态造成的低氧状态及酸性环境有关。迄今为止国内外仍未有关于CO<sub>2</sub>气腹对子宫内腺异位症影响及其分子机制的相关报道,基于EMs与肿瘤的相似性肿瘤的相关研究对子宫内腺异位症有借鉴意义,同样EMs的研究对肿瘤也有指导意义。Lee等<sup>[53]</sup>在对小鼠结肠癌模型的研究中发现,气腹组肿瘤细胞的增殖指数显著高于对照组,而凋亡率显著低于对照组,认为CO<sub>2</sub>能刺激肿瘤细胞较高的增值率生长,可能是腹腔镜手术在恶性肿瘤手术中应用的一个潜在威胁。Wittich等<sup>[54]</sup>将CO<sub>2</sub>气腹分为15、4、0mmHg3个压力组,建立气腹后注射入肿瘤细胞并维持气腹60min,11d后处死动物检测,结果显示,15mmHg组肿瘤的发生率明显高于4mmHg组(P=0.039)和10mmHg组(P=0.004),得出的结论是高压CO<sub>2</sub>气腹利于肿瘤生长。本实验由于实验器材受限气腹压力只维持在5mmHg,异位内腺细胞凋亡是否随气腹压力增高而下降需要改进气腹装置进一步检测。CO<sub>2</sub>气体的水溶性很高,人工气腹中高浓度CO<sub>2</sub>气体与水结合反应会产生大量的H<sup>+</sup>,导致腹腔局部呈现微酸性环境,同时会造成腹腔内组织细胞缺氧。有文献认为,肿瘤细胞在缺氧培养一定时间Bcl-2,PCNA(增殖细胞核抗原)及VEGF表达均升高,而Bcl-2抑制肿瘤细胞的凋亡,因此缺氧环境可能促进肿瘤细胞的抗凋亡作用,导致肿瘤细胞增殖活性加强<sup>[55]</sup>。也有研究表明,CO<sub>2</sub>气腹引起细胞内外缺氧,使细胞ATP氧化磷酸化作用明显抑制,胞内游离Ca<sup>2+</sup>浓度显著下降,引起调节细胞内、外环境稳定状态的基本功能参数发生显著变化,导致细胞凋亡下降<sup>[56]</sup>。West等<sup>[57]</sup>通过体外不同气体培养下腹腔巨噬细胞分泌TNF- $\alpha$ 、IL-1(白细胞介素1)及细胞内pH值变化研究表明巨噬细胞分泌TNF- $\alpha$ 、IL-1显著减弱,细胞内pH值显著下降,并认为巨噬细胞胞质酸化pH值降低明显抑制其功能,巨噬细胞功能抑制,对肿瘤细胞的杀伤力大为减弱。



Takeuchi 等<sup>[58]</sup>比较腹腔镜和开腹结肠手术中 NK 细胞的功能变化,将实验小鼠分为:免气腹组、气腹组、开腹组和对照组,于术后 6 h,24 h,96 h 获取脾细胞和肝脏中的 NK 细胞,并检测其活性。结果显示,术后 24 h,气腹组肝脏中 NK 细胞活性受到了明显的抑制。本实验只是初步得出 CO<sub>2</sub> 气体对 SCID 鼠异位子宫内膜细胞的凋亡有负调控作用,只是定性的判定,并没有阐明其负调控的具体分子机制,实验中样本含量较小,需要增大样本含量并做进一步实验检测 CO<sub>2</sub> 气体抑制异位子宫内膜细胞凋亡参与的信号蛋白及传导通路,比如死亡受体途径的 Bcl-2 和 Bax 等细胞凋亡相关蛋白以及线粒体途径的 Fas/FasL 等相关信号蛋白,从而进一步证实 CO<sub>2</sub> 气体对异位子宫内膜细胞的凋亡有负调控作用。针对肿瘤患者腹腔镜手术后复发、转移和穿刺孔种植现象,国内外学者已经提出相对的预防措施:提高腹腔镜操作水平、将套管固定于腹壁上、尽量不接触肿瘤、高位结扎血管、术中和腹腔内均用 5% 聚维酮碘冲洗、从腹腔取出标本前要绝缘化、腹腔内和切口冲洗一定要用一种杀灭肿瘤的方法、减少气腹总用时间、避免采用高气腹压力、采用非气腹腹腔镜装置<sup>[59][60]</sup>、换用其他气体<sup>[61][62]</sup>,这些方法均收到了较好的效果,非气腹腹腔镜建立需要相当的设备,在周边视野暴露等方面并不及气腹腹腔镜,虽有独特优势,但不可能取而代之。虽然目前提倡使用氦气,但毕竟价格昂贵,来源有限,况且有报道指出氦气的使用使得患者术中和术后气体栓塞。基于我们的研究结果,我们希望在不久的将来可以应用凋亡相关蛋白的诱导剂或者灭活剂,从而达到减少 EMs 患者腹腔镜手术后复发和穿刺孔转移的目的,使腹腔镜技术更好的用于临床诊断和治疗。

#### 4 结语

本实验通过构建 SCID 小鼠子宫内膜异位症模型和 CO<sub>2</sub> 气腹模型, TUNEL 法检测初步发现 CO<sub>2</sub> 气体对 SCID 鼠异位子宫内膜细胞的凋亡存在负调控作用。但仍需进一步实验检测其负调控具体分子机制及结合体外实验,全面观察 CO<sub>2</sub> 气体对异位子宫内膜细胞凋亡的影响,以得出更加可靠的实验结果指导临床。

## 结 论

1. 腹壁缝合法构建 SCID 鼠子宫内膜异位症动物模型，成模率较高，观察时限长、定位准确、易于观察、重复性强是一种理想的子宫内膜异位症动物模型。
2. 自制气腹装置构建 SCID 鼠 CO<sub>2</sub> 气腹模型，成功率高，较好的模拟了腹腔镜手术过程中 CO<sub>2</sub> 气腹状态，可以广泛在实验中使用。
3. CO<sub>2</sub> 气体对 SCID 鼠异位子宫内膜细胞的凋亡存在负调控作用，提示腹腔镜手术过程应用的 CO<sub>2</sub> 气体可能对 EMs 患者腹腔镜手术后复发有一定的促进作用。

## 参考文献

- [1] Braun DP, Ding J, Shaheen F, et al. Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril*, 2007, 87(2):263-8. Epub 2006 Nov 13;
- [2] Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, et al. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril*, 2000, 74,760-766;
- [3] K.Koga, Y.Takemura, Y.Osuga, et al. Recurrence of ovarian endometrioma after laparoscopic excision. *Human Reproduction* Vol.21, No.8 pp. 2171-2174, 2006;
- [4] Busacca M. Recurrence of ovarian endometrioma after laparoscopic excision. *Am J Obstet Gynecol*, 1999, 180: 519 ~ 523;
- [5] Beretta. Surgical treatment of symptomatic endometriosis. *Fertil Steril*, 1990, 53 (3): 411;
- [6] Punnonen R. Pain recurrence: a quality of life issue in endometriosis. *nt J Gynaecol Obstet*, 1995, 50 (1) : 27 ~ 42;
- [7] Namnoum AB. Incidence of symptom recurrence after hysterectomy for endometriosis. *Fertil Steril*, 1995, 64 (5) : 898 ~ 902;
- [8] RevelliA, ModottiM, AnsaldiC, et al. Recurrent endometriosis:A review of Biological and clinical aspects. *Obstet Gynecol Sury*.1995:50(10):747 - 754;
- [9] K.Koga, Y.Takemura, Y.Osuga, et al. Recurrence of ovarian endometrioma after laparoscopic excision. *Hum Reprod*. 2006 Aug;21(8):2171-4. Epub 2006 Apr 27;
- [10] Deevey S. Endometriosis internet resources. *Me Ref Serv*, 2005,24 ( 1) : 67 -76;
- [11] Dobronte Z, Wttmann T, KaracsonyG. Rapid development of malignant

- metastasis in the abdominal wall after laparoscopy[J]. *Endoscopy*, 1978, 1: 127- 130;
- [12] Jacobi C A, Bonjer H J, Puttick M I, et al. Oncologic implication of laparoscopic and open surgery . *Surg Endosc*,2002, 16(3): 441- 445;
- [13] Neuhau S S J, Texler M, Hewett P J, et al. Port- site metastases following laparoscopic surgery. *Br J Surg*, 1998, 85(6): 735- 741;
- [14]Curet M J. Port site metastases . *Am J Surg*, 2004, 187(6):705- 712;
- [15] Elbahnassy AM, Hoenig DM, Shalhav A, et al. Laparoscopic staging of bladder tumor: Concerns about port site seeding. *J Endourol* 1998;12:55-59;
- [16] Aurora AA, Shih SP.Peritoneal acidosis mediates immunoprotection in laparoscopic surgery. *Surgery*. 2007 Sep;142(3):357-64;
- [17] Ordemann J, Jakob J, Braumann C Morphology of the rat peritoneum after carbon dioxide and helium pneumoperitoneum:a scanning electron microscopic study. *Surg Endosc*. 2004 Sep;18(9):1389-93. Epub 2004 Jul 15;
- [18] Lee SW, Gleason N, Blanco I, Higher colon cancer tumor proliferative index and lower tumor cell death rate in mice undergoing laparotomy versus insufflation *Surg Endosc*. 2002 Jan;16(1):36-9. Epub 2001 Oct 19;
- [19] Goldberg JM, Bedaiwy MA.Recurrent umbilical endometriosis after laparoscopic treatment of minimal pelvic endometriosis: a case report.*J Reprod Med*. 2007 Jun;52(6):551-2 ;
- [20] Sirito R, Puppo A, Centurioni MG. Incisional hernia on the 5-mm trocar port site and subsequent wall endometriosis on the same site: a case report;
- [21] Healy JT, Wilkinson NW, Sawyer M. Abdominal wall endometrioma in a laparoscopic trocar tract: a case report. *Am Surg*. 1995 Nov;61(11):962-3;
- [22] Ozawa Y, Murakami T, Tamura M, et al. Aselective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis xenografts via antiangiogenic activity in

- severe combined immunodeficiency mice. *Fertil Steril*. 2006 Oct;86(4 Suppl):1146-51. Epub 2006 Sep 7;
- [23] T.Harada, A.Kaponis, T.Iwabe et al. Apoptosis in human endometrium and endometriosis, *Human Reproduction Update*, Vol.10, No.1 pp. 29±38, 2004;
- [24] Schaeff B, Paolucci V, Thomopoulos J, et al. Port site recurrences after laparoscopic surgery. *Arewew[J]. Dig Surg*, 1998, 15 (2): 124—134.
- [25] Paolucci V, Schaeff B, Schneider M, et al. Tumor seeding following laparoscopy : international surgery . *Word j Surg*, 1999, 23(10):989-995;
- [26] D'Hooghe TM. Clinical relevance of the baboon as a model for the study of endometriosis. *Fertil Steril*, 1997, 68 (4) :613;
- [27] Zondervan KT, Weeks DE, Colman R, et al. Familial aggregation of endometriosis in a large pedigree of rhesus macaques. *Hum Reprod*, 2004, 19(2):448- 455;
- [28] Story L, Kennedy S. Animal studies in endometriosis: a review. *ILAR J*. 2004;45(2):132-8;
- [29] Rock JA, Green WR, Prendergast RA, et al. Intraocular endometrium in the rabbit as a model for endometriosis. *Fertil Steril*, 1993, 59 (1) :232;
- [30] Keenan JA, Williams-Boyce PK, Massey PJ, et al. Regression of endometriosis explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. *Fertil Steril*, 1999, 72 (1) :135;
- [31] Rajkumar K, Schott PW, Simpson CW. The rat as an animal model for endometriosis to examine recurrence of ectopic endometrial tissue after regression. *Fertil Steril*, 1990, 53 (5) :921;
- [32] Flores I, Rivera E, Ruiz LA, et al. Molecular profiling of experimental endometriosis identified gene expression patterns in common with human disease. *Fertil Steril*, 2007, 87(5):1180- 1199 ;
- [33] Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Eggermont J, et al. Characterization of

- iron deposition in endometriotic lesions induced in the nude mouse model. *Hum Reprod.* 2004 Jun;19(6):1265-71. Epub 2004 Apr 22 ;
- [34] Grümmer R, Schwarzer F, Bainsczyk K, et al .Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. *Hum Reprod.* 2001 Aug;16(8):1736-43;
- [35] Aoki D, Katsuki Y, Shimizu A, et al. Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice. *Obstet Gynecol.* 1994 Feb;83(2):220-8;
- [36] Fortin M, Lépine M, Merlen Y, et al. Quantitative assessment of human endometriotic tissue maintenance and regression in a noninvasive mouse model of endometriosis. *Mol Ther.* 2004 Apr;9(4):540-7;
- [37] Beliard A, Noël A, Goffin F, et al. Role of endocrine status and cell type in adhesion of human endometrial cells to the peritoneum in nude mice. *Fertil Steril.* 2002 Nov;78(5):973-8;
- [38] Nisolle M, Casanas-Roux F, Marbaix E, et al. Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice. *Hum Reprod.* 2000 Mar;15(3):572-7;
- [39] Aoki, D., Karsuki, Y., Shimuzu, A. et al. (1994) Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice. *Obstet. Gynecol.*, 83, 220–228;
- [40] Zamah, N.M., Dodson, M.G., Stephens, L.C. et al. (1984) Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 149, 591–597;
- [41] Ruth Grümmer, Frauke Schwarzer, Katja Bainsczyk, et al. Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model *Human Reproduction*, Vol. 16, No. 8, 1736-1743, August 2001;
- [42] Claude Darcha. Impact of surgical peritoneal environment on postoperative tumor growth and dissemination in a preimplanted tumor model, *Surg Endosc* Doi10.1007/s00464-008-0174-8, 30 August 2008;

- [43] H. Takeuchi, M. Inomata, K. Fujii, S. Increased peritoneal dissemination after laparotomy vs pneumoperitoneum in a mouse cecal cancer model *Surg Endosc* (2004) 18: 1795-1799;
- [44] Aubert Agostini, François Robin, Martine Aggerbeck. Influence of peritoneal factors on port-site metastases in a xenograft ovarian cancer model, *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* August 2001, Vol. 108, pp. 809±812;
- [45] H. Takeuchi, M. Inomata, K. Fujii, et al. Increased peritoneal dissemination after laparotomy vs pneumoperitoneum in a mouse cecal cancer model, Springer Science+Business Media, Inc. 2004;
- [46] Leister I, Manegold S, Schüller P, et al. Effect of laparotomy and CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum on tumor growth of human colon carcinoma and expression pattern of tumor-associated proteins in the SCID mouse *Int J Colorectal Dis.* 2003 Nov;18(6):508-13. Epub 2003 Apr 9;
- [47] Maria Mercedes Binda AE Bart W. J. Hellebrekers. Effect of Reteplase and PAI-1 antibodies on postoperative adhesion formation in a laparoscopic mouse model, *Surg Endosc* Doi 10.1007/s00464-008-0111-x , 20 July 2008;
- [48] M. M. Binda, C. R. Molinas, A. Bastidas. Effect of reactive oxygen species scavengers, antiinflammatory drugs, and calcium-channel blockers on carbon dioxide pneumo-peritoneum-enhanced adhesions in a laparoscopic mouse model *Surg Endosc* (2007) 21: 1826-1834 ;
- [49] Suematsu T, Shiromizu A, Yamaguchi K et al. Convenient murine pneumoperitoneal model for the study of laparoscopic cancer surgery. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 1999 Aug;9(4):279-81;
- [50] M. B. Pitombo, O. H. Lupi, R. N. Gomes, R. Inflammatory response and bacterial dissemination after laparotomy and abdominal CO<sub>2</sub> insufflation in a murine model of peritonitis;
- [51] Volz J, Köster S, Schaeff B, et al. Laparoscopic surgery: the effects of

- insufflation gas on tumor-induced lethality in nude mice. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Apr;178(4):793-5;
- [52] Susan Elmore, NIEHS, apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007,35(4):495-516;
- [53] Lee SW, Gleason N, Blanco I, et al. Higher colon cancer tumor proliferative index and lower tumor cell death rate in mice undergoing laparotomy versus insufflation, *Surg Endosc.* 2002 Jan;16(1):36-9. Epub 2001 Oct 19;
- [54] Wittich P, Steyerberg EW, Simons SH, et al. Intraperitoneal tumor growth is influenced by pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum. *Surg Endosc.* 2000 Sep;14(9):817-9;
- [55] Molinas CR, Binda MM, Carmeliet P, et al. Role of vascular endothelial growth factor receptor 1 in basal adhesion formation and in carbon dioxide pneumoperitoneum enhanced adhesion formation after laparoscopic surgery in mice. *Fertil Steril*, 2004; 82( 3) : 1149- 1153;
- [56] Tan BJ, Dy JS, Chiu PY, et al. Effects of pneumoperitoneal gases and pressures on transitional cell carcinoma adhesion, growth, apoptosis and necrosis: an in vitro study. *J Urol*, 2005; 174( 4) :1463- 1467;
- [57] West MA, Hackam DJ, Baker J, et al. Mechanism of decreased in vitro murine macrophage cytokine release after exposure to carbon dioxide. *Ann Surg*, 1997, 226 (2) : 179- 190;
- [58] Takeuchi I, Ishida H, Mori T, et al. Comparison of the effects of gasless procedure, CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum, and laparotomy on splenic and hepatic natural killer activity in a rat model. *Surg Endosc*, 2004, 18(2) :255 - 260;
- [59] Gutt CN, Riemer V, Kim ZG, et al. Impact of laparoscopic surgery on experimental hepatic metastases. *Br J Surg*, 2001, 88 (3) :371;
- [60] Waston DI, Mathew G, Ellis T, et al. Gasless laparoscopy may reduce the risk of port - site metastases following laparoscopic tumor surgery. *Arch*



- Surg,1997,132:166;
- [61] Jacobi CA, Sabat R, Bohm B, et al. Pneumoperitoneum with carbon dioxide stimulates growth of malignant colonic cells. Surgery, 1997, 121(1):72;
- [62] Neuhaus SJ, Watson DI, Ellis T, et al. Wound metastasis after laparoscopy with different insufflation gases. Surgery. 1998 May;123(5):579-83;

## 综 述

## Survivin 在子宫内膜异位症中的作用

刘广申 吴瑞瑾 综述      林俊 审校

【摘要】survivin 是近年来新发现的一种凋亡抑制蛋白，与细胞分裂、增殖有关，在胚胎组织和恶性肿瘤中表达，但在正常成年人的分化组织一般不表达或弱表达。子宫内膜异位症(EMs)虽为良性疾病，却具有侵袭、种植和复发等“恶性”生物行为。研究表明 survivin 蛋白的抗凋亡功能在 EMs 发生和发展中可能起着重要作用，本文就其生物学特点及在 EMs 中的作用作一概述。

【关键词】Survivin; 子宫内膜异位症; 细胞凋亡

## The Role of Survivin in the Endometriosis

*LIU Guang-shen, WU Rui-jin, LIN Jun. Affiliated Hospital for Gynecology and Obstetrics of Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China*

【Abstract】survivin is a newly discovered inhibitor of apoptosis proteins in recent years, which has a relationship with cell proliferation and cell division, it always expressed in malignant tumors and embryonic tissues but do not expressed or weakly expressed in normal adult differentiated tissues. Although Endometriosis (EMs) was a benign disease, it has some malignant biological behaviors. Research suggests survivin may plays a important role in the occurrence and development of EMs. In this paper, we reviewed its biological characteristics and the role in EMs.

【Key words】Survivin; Endometriosis; Apoptosis

子宫内膜异位症 (endometriosis, EM) 是一种常见的妇女良性疾病, 在育龄妇女中, 发病率可达 30%。它虽为良性疾病, 却具侵袭、种植和复发等“恶性”生物行为, 且无特效治疗方法, 目前对其发病机制进行了大量的研究, 认为细胞凋亡扮演了重要的角色, 而 Survivin 是近年来发现的凋亡蛋白抑制因子 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族中的一个新成员, 本文就 survivin 在子宫内膜异位症中的作用做一综述。

## survivin 的结构

survivin 蛋白是 6 个内源性凋亡蛋白家族 (inhibitors of apoptosis protein, IAPs) 的成员之一。IAPs 家族成员除 Survivin 外均在成年动物正常组织中广泛表达。IAPs 家族蛋白都包含 2 个或 3 个由 70 个氨基酸组成的杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列即 BIR (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat) 序列。相邻的羧基末端含有一个环指结构。IAPs 家族蛋白发挥抗凋亡的作用, 至少需要一个 BIR 序列。IAPs 家族蛋白发挥抗凋亡作用的机理是通过 BIR 功能区及两个 BIR 功能区之间的连接序列直接与 Caspase 家族蛋白特异性结合抑制细胞凋亡的发生<sup>[1]</sup>。survivin 蛋白结构上与其他 IAPs 家族成员相似, 但只含有一个 BIR 序列, 且没有 C 末端的环指结构, 代替这一结构的是一个包含 42 个氨基酸的高电荷无规则卷曲, 其能和纺锤体微管上的微管蛋白结合。survivin 前体 mRNA 选择性剪接可产生 survivin-2B (降低 survivin 抗凋亡功能)、surviving-EX3 (保留 survivin 抗凋亡功能) 和 survivin-3B 这三种剪接变体<sup>[2]</sup>。

## survivin 的生物学功能

### 一、survivin 与细胞凋亡

细胞凋亡的途径包括内源性和外源性两条, 两条途径最后均通过下游效应 caspase-3、caspase-7 使细胞发生凋亡。目前较公认的关于 survivin 抑制细胞凋亡

的机制总结如下: ①survivin 直接作用于 caspase, 主要抑制凋亡终末效应期 caspase-3 和 caspase-7 的活性或干扰 caspase-9 的活性, 阻断各种刺激诱导的下游细胞凋亡的共同通路。② survivin 与细胞周期调控因子细胞周期蛋白激酶 CDK4 和 p34cdc2 相互作用阻断凋亡信号转导通路, 抑制细胞凋亡<sup>[3]</sup>。survivin 能够与细胞死亡终末阶段分子 Caspase-3 和 Caspase-7 特异性结合, 并由此对于暴露于多种凋亡刺激因素如 Bax、Fas、Caspase 以及化疗药物的细胞起到抑制 Caspase 酶原激活和细胞凋亡的作用, 而在已凋亡的细胞中, survivin mRNA 表达显著下调<sup>[4]</sup>。Ambrosini 等<sup>[5]</sup>, 在 survivin 依赖性前 B 细胞(Pre-B cell)中去除 IL-3, survivin 能抑制 Taxol 诱导 NIH3 T3 的细胞凋亡, 能抑制 Fas, Bax 诱导 293 细胞的凋亡。将反义 survivin 导入 293 细胞, 细胞凋亡增加, 细胞增殖受到抑制。

## 二、survivin 与血管形成

研究表明, 在正常皮肤非增殖性毛细血管内皮细胞中 survivin 无表达, 而在体内肉芽组织新生血管中 survivin 表达较高。用血管内皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、血管形成素 -1 等有丝分裂原刺激静息的内皮细胞下, 可以诱导 survivin 表达水平显著升高; 而炎症因子如 TNF、IL-1 诱导, survivin 无表达, 提示 survivin 在血管形成的中心环节起重要作用, 可能调节生理性修复或病理性肿瘤)的血管形成, 与依赖于新生血管形成的肿瘤细胞生长、浸润、转移密切相关<sup>[6]</sup>。Goteri 等

## 三、survivin 与细胞周期调控

survivin 的表达与细胞增殖密切相关, 在有丝分裂过程中, 当微管聚合过程中断时, survivin 与有丝分裂着丝点联结在一起, 抑制 survivin 表达可以促进细胞凋亡和多倍体形成, 尽管没有 survivin 参与, 细胞可以启动分裂沟和收缩环, 但不能完成有丝分裂的全过程。survivin 过表达会导致细胞加快向 S 期转换, 抑制 G1 期阻滞, 从而促进细胞增殖<sup>[7]</sup>。

## survivin 与 EMs

### 四、survivin 与正常子宫内膜的关系

呈周期性增生和脱落的正常的子宫内膜,是通过细胞增殖与凋亡的方式实现的,凋亡发生于分泌晚期和月经期<sup>[8]</sup>。Konno 等<sup>[9]</sup>运用 RT-PCR 及免疫组化的方法检测了 4 例增生早期、3 例增生中期、3 例增生晚期、及 4 例分泌早期、4 例分泌中期、2 例分泌晚期的子宫内膜标本,发现 survivin 在分泌晚期的腺上皮细胞核中强表达,但在增殖期腺上皮细胞核和间质细胞中无表达,提示 survivin 的高表达可能与孕激素浓度升高有关,在正常子宫内膜周期性变化中 survivin 扮演着重要的角色。但 Kim 等<sup>[10]</sup>研究发现 survivin 蛋白在整个月经周期内膜腺体和间质的胞核和胞质都有着色,并且有周期性,增生期强于分泌期,但在细胞核中表达没有周期性。Kim 是在研究宫颈细胞瘤样变是所检测得出的结果,疾病的本身可能对结果产生影响,而 Konno 是在正常子宫内膜中检测得出的结论。对于 survivin 在正常子宫内膜中的表达方式需要进一步的探索。

### 五、survivin 与 EMs

survivin 在胚胎发育期大量表达,相反在正常成人组织中几乎不表达或表达下调,但是绝大多数癌组织存在 survivin 表达。体外培养发现,在包括乳腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、等 60 余种肿瘤细胞中,均有 Survivin 表达,survivin 参与这些肿瘤细胞的抗凋亡存活、种植和转移<sup>[11]</sup>。EMs 虽然为良性疾病,却有类似恶性肿瘤的侵袭、种植,转移等生物特性。

近年来越来越多的研究表明凋亡是子宫内膜细胞保持周期性结构和功能稳定的关键因素,异位内膜细胞得以在宫腔外种植并继续存活,与其对凋亡的抵抗力增强有关<sup>[12]</sup>。并且随着 EMs 的严重程度增加而进一步降低,推测异位内膜细胞在盆腔内得以继续存活及种植,很可能与其对凋亡的抵抗力增强有关。Tarkowski 等<sup>[13]</sup>研究发现 6 例剖宫产后手术切口 EMs 组织中有 4 例表达 survivin, 2 例会阴切口 EMs 中 survivin 均有表达,说明 survivin 的抗凋亡作用可能参与了子宫内膜的种植生长。

Goteri等<sup>[14]</sup>在卵巢子宫内膜异位灶中发现高表达的survivin。Fujino等<sup>[15]</sup>用RT-PCR方法检测56例EMs异位子宫内膜(16例红色腹膜型EMs, 16例黑色腹膜型EMs, 24例卵巢型EMs)、13例在位子宫内膜(A组)、16例正常子宫内膜(B组), 发现在整个月经周期survivin mRNA在异位内膜中的表达明显比在位内膜高, 异位症在位内膜表达高于正常内膜, survivin mRNA在红色腹膜型EMs比黑色腹膜型EMs高表达。相反, survivin-2B和Surviving-EX3在A和B组的所有内膜组织中显示低表达。survivin及其剪切变体在位和异位内膜中均无周期性表达。虽然surviving-2B/survivin比值在在位和异位内膜中无明显差异, 但survivin-EX3/survivin的比值在腹膜型EMs病灶明显高于在位内膜。survivin和survivin-EX3可能使异位的子宫内膜逃避凋亡, 参与了EMs的发生和发展。Ueda等<sup>[16]</sup>分析63例(有或无色素沉着)EMs异位内膜组织和35例EMs的在位内膜及12例非EMs的内膜组织中survivin mRNA的表达情况, 结果EMs在异位病变组织和EMs的在位内膜组织中表达比非EMs的内膜组织高, 有色素沉着的病变组织的表达比无色素沉着的病变组织高, 提示EMs的survivin上调与EMs的浸润和生长呈正相关。Depalo等<sup>[17]</sup>用免疫组化法检测正常妇女和EMs妇女卵巢上皮细胞中survivin的表达, 结果EMs妇女卵巢上皮细胞中高表达, 从而易发卵巢内膜异位症, 高水平表达的survivin促进了其卵巢EMs的发生。survivin蛋白表达升高导致异位灶内膜细胞抗凋亡能力明显增强, 破坏了细胞增殖和凋亡的平衡, 有利于其在盆腔内种植、存活, 促成了内异症的发生。但survivin蛋白在EMs中是发挥了多大的作用需要进一步的研究, 也将是以后的研究方向。

## 六、survivin与EMs癌变

国外许多回顾性研究亦证实了内异症恶变的现象, 平均恶变率为0.7%-1.0%, 多数发生于卵巢内, 这可能和异位内膜最常见于卵巢有关<sup>[18]</sup>。恶变后的病理类型主要为子宫内膜样癌、透明细胞癌、腺棘癌、浆液性乳头状癌和腺癌等, 其中最常伴发内异症的卵巢癌是透明细胞癌和内膜样腺癌, 分别为54%和42%。有学者研究了103例卵巢上皮性肿瘤中Survivin蛋白的表达, 发现其表达率高低与肿瘤良

恶性及肿块大小密切相关,且 Survivin过表达患者的生存期明显缩短,认为 Survivin过表达在卵巢肿瘤的发展过程中可能起重要作用<sup>[19]</sup>。鉴于EMs中survivin的表达水平,survivin在EMs恶变过程中的作用仍需进一步探索。

## Survivin与EMs治疗

目前治疗EMs主要方法有“假绝经疗法”、“假孕疗法”、促性腺激素释放激素激动剂(GnRHa),其共同作用机制为抑制雌激素合成,使异位种植的子宫内膜萎缩。随着对 survivin 基因结构和功能了解的深入,已有以 survivin 基因为靶点治疗恶性肿瘤的初步研究。通过对 survivin 基因反义核酸、决定基因突变体和调控基因的研究,试图对肿瘤细胞中 survivin 基因的表达进行调控,希望能够达到抑制癌细胞的增殖、促进细胞的凋亡、控制肿瘤的目的。在许多肿瘤细胞系中的实验,如肝癌细胞系、肺癌细胞系、胃癌细胞系、胰腺癌细胞系、卵巢癌细胞系、乳腺癌细胞系等,反义 survivin 寡核苷酸可以诱导这些细胞的凋亡。最近国内有学者在动物模型上进行试验,结果所用中药减少了内异症动物体内 survivin 蛋白的表达,从而促进内异细胞的凋亡<sup>[20]</sup>。结合 survivin 蛋白在 EMs 中高表达的特性,可以推测阻断 survivin 的表达同样可以促进异位内膜细胞凋亡,因此可以考虑对 EMs 患者补充靶向 survivin 基因治疗。

## 结 论

近年来,从分子生物学角度探讨 EMs 的病因已成为研究热点。survivin 作为最小的抗凋亡因子,在肿瘤中研究的比较广泛,虽然在 EMs 中的研究还处于初步的探索阶段,但其与 EMs 的关系已经引起研究者的关注。随着对 survivin 的不断深入研究,必将进一步揭示 EMs 的发病机制,从而更好的指导 EMs 的治疗。

## 参考文献

- [1] Sah NK, Khan Z, Khan GJ, et al. Structural, functional and therapeutic biology of survivin[J]. *Cancer Lett*, 2006, 244(2):164-171.
- [2] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA. Differential expression of survivin and its splice variants, survivin-DeltaEx3 and survivin-2B, in bladder cancer[J]. *Cancer Detect Prev*. 2009;32(4):308-13. Epub 2009 Jan 30.
- [3] Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, et al. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics[J]. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 15;14(16):5000-5.
- [4] Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy[J]. *Cancer Treat Rev*. 2009 Nov;35(7):553-62. Epub 2009 Jun 25.
- [5] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nat Med*, 2007, 3(8):917-921.
- [6] Ohashi H, Takagi H, Oh H, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity[J]. *Circ Res*. 2004 Apr 2;94(6):785-93. Epub 2004 Feb 12.
- [7] Yamamoto H, Ngan CY, Monden M. Cancer cells survive with survivin[J]. *Cancer Sci*. 2008 Sep;99(9):1709-14. Epub 2008 Jun 5.
- [8] Ulukus M, Cakmak H, Arici A. The role of endometrium in endometriosis[J]. *Ann NY J Soc Gynecol Investig*, 2006, 13(7):467-476.
- [9] Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, et al. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium [J]. *Mole Hum Reprod*, 2000, 6(6): 529-534.
- [10] Kim HS, Shiraki K, Park SH. Expression of survivin in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix[J]. *Anticancer Res*, 2002,



22(2A):805-808

- [11] Yamamoto H, Ngan CY, Monden M. Cancer cells survive with survivin [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(9):1709-1714.
- [12] Agic A, Djalali S, Diedrich K, et al. Apoptosis in Endometriosis[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2009, 68(4):217-223.
- [13] Tarkowski R, Kotarski J, Polak G, et al. Expression of the survivin gene in the scar endometriosis and in normal human endometrium[J]. *Ginekol Pol*, 2001, 72(12A):1539-1542.
- [14] Goteri G, Lucarini G, Pieramici T, et al. Endothelial cell survivin is involved in the growth of ovarian endometriotic cysts[J]. *Anticancer Res*, 2005, , 25(6B):4313-8.
- [15] Fujino K, Ueda M, Takehara M, et al. Transcriptional expression of survivin and its splice variants in endometriosis [J]. *Mol Hum Reprod*, 2006 Jun, 12 (6) : 383 - 388.
- [16] Ueda M, Yamashita Y, Takehara M, et al. Survivin gene expression in endometriosis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002 Jul, 87(7):3452-9.
- [17] Depalo R, Cavallini A, Lorusso F, et al. Apoptosis in normal ovaries of women with and without endometriosis[J]. *Reprod Biomed Online*. 2009 Dec;19(6):808-15.
- [18] Blumenfeld Z. Hormonal suppressive therapy for endometriosis may not improve patient health. *Fertil Steril*, 2004, 81(3): 487-92
- [19] Sui L, Dong Y, Ohno M, et al. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors[J]. *Int J Oncol*. 2002 Aug;21(2):315-20.
- [20] Wei SB, Cao YF, Wang Y. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks [J] *Cell Cycle*. 2009 Sep 1;8(17):2708-10. Epub 2009 Sep 7.

国际生殖健康/计划生育杂志2010年3月第29卷第2期 J Int Repro Heal/Family  
Planning Gynecol, March, 2010, Vol.29, No.2

## 作者简历及在学期间发表的文章

### 作者简历

姓名	刘广申
性别	男
籍贯	辽宁省朝阳市
出生年月	1982年

### 学习和工作经历:

2002.9—2007.7	大连医科大学	本科
2007.9—至今	浙江大学医学院	硕士研究生

### 在读期间发表的文章

刘广申 吴瑞瑾 林俊 .survivin 子宫内膜异位症中的作用. 国际生殖健康/计划生育杂志, March 2010.Vol.29.No2

人工全髋关节置换术下肢不等长的临床分析及对策



论文作者签名: 朱均

指导教师签名: 俞志中

论文评阅人 1: 杨丰雄 副教授 浙清中医院

评阅人 2: 匿名译审

评阅人 3: 匿名译审

评阅人 4: \_\_\_\_\_

评阅人 5: \_\_\_\_\_

答辩委员会主席: 于世贵 教授 浙江医学院附属医院

委员 1: 陈锦平 主任医师 浙江省人民医院

委员 2: 吴立东 教授 浙江医学院附属医院

委员 3: 王祥华 教授 浙江医学院附属医院

委员 4: 李杭 主任医师 浙江医学院附属医院

委员 5: \_\_\_\_\_

答辩日期: 2010年11月29日

