
Progress in Establishment of Endometriosis in Vitro Histological Models

Ma Di

Obstetrics and Gynecology Department, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, China

Email address:

MD06112018@163.com

To cite this article:

Ma Di. Progress in Establishment of Endometriosis in Vitro Histological Models. *Science Discovery*. Vol. 6, No. 6, 2018, pp. 551-554.

doi: 10.11648/j.sd.20180606.37

Received: November 6, 2018; **Accepted:** December 11, 2018; **Published:** December 27, 2018

Abstract: The etiology and pathogenesis of endometriosis are hotspots in the field of obstetrics and gynecology today. With the rapid development of experimental studies of endometriosis, the establishment of in vitro histological models is increasingly important. The establishment and application of in vitro histological model provides a new research platform for exploring the pathogenesis and treatment of endometriosis. It is an important method to study endometriosis. Recently a variety of models have been successfully constructed, but still have many deficiencies. Up to now, studies on in vitro histological models have been qualitative, and no studies have involved quantitative analysis. Whether peritoneal mesothelial defect is the cause or result of adhesion, that is, peritoneal mesothelial defect itself exists in the patient, or the damage of the mesothelial during operation, or the destruction of the mesothelial by some cytokines secreted by implanted endometrial tissue? These problems have not yet been decided. Therefore, the choice of appropriate histological model to establish a method is conducive to further reveal the etiology of endometriosis, pathogenesis and evaluation of treatment. This paper reviews the research progress about the development of endometriosis with establishment of in vitro histological models, to further explore the best and stable culture conditions of human endometriosis histological model, and to establish a good model basis for further study of endometriosis.

Keywords: Endometriosis, Establishment of Vitro Histological Models, Research Progress

子宫内膜异位症体外组织学模型建立方法研究进展

马迪

哈尔滨医科大学附属第一医院妇产科, 哈尔滨, 中国

邮箱

MD06112018@163.com

摘要: 子宫内膜异位症的病因及发病机制是当今妇产科领域的研究热点之一。随着子宫内膜异位症实验研究的快速发展,体外组织学模型的建立日益重要。体外组织学模型的建立和应用为探索子宫内膜异位症的发病机制及治疗方法提供了一个新的研究平台,是研究内异症的重要手段,尽管已成功构建了多种模型,但仍然存在许多不足。迄今为止,关于体外组织学模型的研究均为定性研究,尚未有研究涉及到定量分析。腹膜间皮层缺损究竟是粘附发生的原因还是结果,即腹膜间皮层缺损本身就存在患者体内,还是操作过程间皮层损伤,还是种植的子宫内膜组织分泌某些细胞因子破坏了间皮层?这些问题至今还没有定论。因此选择合适的组织学模型建立方法有助于进一步揭示子宫内膜异位症的病因、发病机理及评价治疗效果。现对国内外子宫内膜异位症体外组织学建模研究进展予以综述,进一步探索内异症人体组织学模型的最佳而稳定的培养条件,为进一步研究子宫内膜异位症建立良好的模型基础。

关键词: 子宫内膜异位症, 体外组织学模型, 研究进展

1. 引言

子宫内膜异位症(endometriosis)是育龄妇女中常见的妇科疾病,是一种雌激素依赖性、慢性炎症性疾病,以子宫内膜组织(腺体和间质)种植于子宫以外为表现[1],可引起痛经、下腹痛和不孕症等。有文献[2]报道育龄妇女中子宫内膜异位症的发病率为10%~15%,近年来呈上升趋势,其中在25-45岁女性中发病率为5%,在不孕症及下腹疼痛的患者中高达32%-48%。目前,子宫内膜异位症的病因和发病机制尚不明确,可能与基因、环境、免疫系统、激素、炎症等相关[3-4],确诊需要依靠腹腔镜检查或病理组织学检查。从发现子宫内膜异位症起,其发病机制有多种学说阐述,但并无任何一种学说可以为大家的一致支持。1984年Halme[5]等发现在月经期行腹腔镜检查约有90%的女性出现经血逆流现象。1991年Oosterlynck[6]提出免疫学说,认为盆腔清除脱落内膜碎片能力减弱导致子宫内膜异位症。也有人相继提出体腔上皮化生学说和淋巴血管播散学说,但仍不能清楚的解释内异症的种种问题。现今在诸多的发病学说中,Sampson的经血逆流学说[7]占主导地位。1921年Sampson提出月经血中间质内膜细胞和腺内膜细胞可经输卵管进入盆腹腔,继而种植于卵巢和邻近的盆腔腹膜器官,并在该处继续生长和蔓延,最终发展成盆腔子宫内膜异位症。但部分人指出 Sampson的经血逆流学说难以解释仅小部分人发生子宫内膜异位症,且无法解释盆腔或腹腔以外子宫内膜异位症的问题[8]。最新的在位内膜决定论[9-10]提出,在位内膜与正常人相比在超微结构、基因表达产物和机能状态存在明显差异,这些差异导致了子宫内膜异位症患者临床易感性比一般人强。

2. 发展现状

近年来子宫内膜异位症研究热点是体内外模型的构建。啮齿类动物子宫内膜结构与人类相似,价格低廉极易饲养,许多人以此建立模型研究EM的发病机制等[11]。目前比较常用的体外模型是细胞培养和组织培养两种。其中人体组织学模型是近10年来出现的一种新型模型,是用人的子宫内膜组织在体外分离成组织碎片后接种于腹膜组织间皮,以供培养和探索子宫内膜异位症的发病机制。关于内异症人体组织学建模方法国内外均报道尚未有系统阐述最适用于子宫内膜异位症人体组织学模型的培养条件,由于培养条件均不一致,所得结论差异也较大。子宫内膜与腹膜共同培养模型具体建模方法:内膜标本来源于内膜活检、刮宫、月经血或手术切除的子宫。腹膜标本可通过腹腔镜或开腹手术采集,然后将内膜机械分离或酶消化至1-2mm大小的碎片,小心剔除腹膜下脂肪和血管,将腹膜间皮面朝上铺于培养皿中,再将子宫内膜碎片种植在间皮面上,培养一段时间后,将子宫内膜和腹膜一起固定切片观察子宫内膜与腹膜粘附部位的细胞学表现。操作时需注意:腹膜很薄,间皮层脆弱易损伤,处理时要轻柔;酶消

化的子宫内膜碎片粘附能力减弱;月经血收集用专用的月经杯置于阴道顶部,收集月经第1-3天经血,离心过滤收集内膜碎片,月经血由单个细胞,细胞团和腺体结构组成,组织碎片体外培养5天仍存活。

3. 国外情况

国外研究的有Alessandro Fasciani[12]等报道将人子宫内膜碎片剪至1mm大小,包埋于纤维蛋白原和凝血酶混合形成的凝胶中持续培养存活100天,子宫内膜碎片细胞能增生,侵袭基质,形成新的腺体和血管。Groothuis等人[13]将获取的腹膜移入6孔培养板内,使其间皮细胞面朝上,边缘用不锈钢环固定避免卷曲,然后直接在环内接种子宫内膜碎片,放37℃培养 16小时。发现子宫内膜只粘附那些间皮层缺损的羊膜和腹膜,认为腹膜完整的间皮层可以防御子宫内膜的粘附生长;并发现增殖期子宫内膜较分泌期子宫内膜在羊膜细胞外基质上更能扩展生长。Witz等人[14]直接将获取的腹膜放于6孔培养板中(间皮细胞朝上),将子宫内膜组织碎片直接种植在间皮细胞面上培养。为区分子宫内膜腺上皮、基质细胞和腹膜间皮细胞的方法,即用免疫荧光CK8染色标记子宫内膜腺上皮和腹膜间皮细胞,用免疫组化CD10染色标记子宫内膜基质细胞。结果显示,大多数黏附部位腹膜间皮层缺损或断裂;少数标本黏附处能见到完整的腹膜间皮层。Osteen等[15]人将增殖期和分泌期的子宫内膜切成1mm×2mm大的碎片,培养于细胞培养小室的气液交界面处,小室底部为微孔滤膜,培养液能自由流通,每室置8~10块组织块,连续培养 30 小时。发现与正常人来源的微血管内皮不同的是,子宫内膜异位症患者来源的微血管内皮细胞分泌细胞外基质成分的明显增多,和过量表达量的灶性黏附成分共同导致了患者来源的子宫内膜碎片黏附能力增强。Nair等[16]的研究显示,与腹膜间皮层的共培养能够改变内膜基质细胞的基因表达,并能够提高其侵袭能力。但是,子宫内膜基质细胞和腹膜间皮层之间的相互作用仍存在很多谜团,值得深入探讨。Debrock等[17]研究了67例因不育腹腔镜检查的患者,18例正常盆腔,49例子宫内膜异位症,采集每位患者的内膜和腹膜,内膜来源于增殖期,分泌期和月经期,将每例患者内膜剪碎后种植于自身腹膜上培养3-7天,结果发现81%的标本发生粘附,内膜粘附处腹膜间皮层断裂,粘附与月经周期无关,与是否有内异症和内异症分期无关。其结果与witz等进行了一系列研究的结论相反。国外不乏学者热衷于三维模型的构建,Matsuzaki和Darcha即通过三维模型研究纤维化微环境对子宫内膜间质细胞增殖过程的影响[18-19]。

4. 国内情况

国内有多位学者也对子宫内膜组织的多种特性进行了研究。阳艳军等[20]通过观察气液面培养和培养基中培养对于子宫内膜组织及子宫内膜组织粘附腹膜的影响以及子宫

内膜接种腹膜后在培养的不同时间点收集标本用光镜观察子宫内位膜与腹膜粘附发生的时间粘附部位的细胞学行为,并选用了滤膜贴于腹膜下使腹膜牵张平整接近体内腹膜光滑平整有张力的生理状态。发现子宫内位膜组织气液平面培养较培养基中培养组织结构维持好,离体培养时间长。子宫内位膜组织和腹膜组织在气液平面培养能较早发生粘附和侵袭。子宫内位膜组织可以通过腺体和基质细胞与腹膜间皮面粘附,粘附处大部分腹膜间皮层缺损,小部分能见到完整的间皮细胞层;离体培养时间延长,间皮层逐渐缺失。子宫内位膜组织接种腹膜组织离体培养3天后能观察到子宫内位膜基质细胞明显侵袭腹膜间皮层;内位症患者子宫内位膜发生侵袭可能要早于非内位症患者子宫内位膜。郭勇等[21]将增殖晚期子宫内位膜组织切成1mm×3mm小块,将组织块置于培养皿内的微孔滤纸上,加培养液DMEM+5%胎牛血清至液体淹没组织块,在二氧化碳孵育箱内培养100小时,电镜观察出现分泌期改变。发现经期脱落的子宫内位膜碎片体外和间皮细胞共培养能使间皮细胞退变,皱缩,缝隙增宽。郑澄宇等[22]将大鼠子宫内位膜切成2mm的小条置于不锈钢架上的擦镜纸上,使组织块位于气液平面培养,并成功培养5小时。此后国内多位学者成功模仿他们的培养方法对子宫内位膜组织的多种特性进行了研究。钟洁等[23]将内位膜患者在位子宫内位膜碎屑接种于8天胚龄的鸡胚绒毛尿囊膜的相对无血管区,再将鸡胚放入37.6-38.0℃,60%相对湿度的恒温孵育箱内,每天翻蛋2次,共孵育一周,结果24小时即可发现子宫内位膜腺体和基质细胞发生侵袭,72小时绒毛尿囊膜下的中胚层出现内位膜基质细胞围绕腺体的内位症样病灶并有鸡胚血管长入其中供给营养,用核酸探针检测病灶确系人来源细胞。但研究中并未发现单个腺细胞发生侵袭,可能与腺细胞发生侵袭的前提条件是彼此之间须有连接和同基质细胞发生接触有关。

迄今为止,关于体外组织学模型的研究均为定性研究,且各家培养条件不一,结果差异也较大,尚未有研究涉及到定量分析。腹膜间皮层缺损究竟是粘附发生的原因还是结果,即腹膜间皮层缺损本身就存在患者体内,还是操作过程间皮层损伤,还是种植的子宫内位膜组织分泌某些细胞因子破坏了间皮层?这个问题至今还没有定论。

5. 小结讨论

组织学模型能最大限度模仿体内内位症早期发病过程,具有细胞模型无法比拟的优点同时研究对象来源于人体组织,没有动物模型的种属差异性。现在公认得建模方法是用人体子宫内位膜组织体外分离成组织碎片,然后接种到腹膜组织的间皮细胞培养,用以探索子宫内位膜发病的发病机制。它的优点是:(1)可以直接反映人体子宫内位膜与人体腹膜的相互作用,也可以间接反映组织内不同细胞间的相互影响,模拟程度较高。(2)可动态观察内位症患者在发病早期的在位内位膜与腹膜组织粘附、侵袭并形成新生血管的连续过程,可得到直接组织学证据。(3)可比较分析内位症和非内位症患者在位内位膜和腹膜的不同之处,探讨其发病危险因素。现在认为组织学模型在子宫内位膜发病机制、发病过程和药物治疗研究方面有广

阔的应用前景,但组织学模型也有其弊端:(1)由于标本主要来源于人体,人体组织学模型还要同时获取腹膜,标本来源受到很大限制;(2)组织离体培养的时间局限性导致模型只适用于早期发病机制研究,(3)另外组织离体培养后其生理特性会发生变化,且脱离了在体的腹腔微环境影响,不能完全反映在体情况;(4)组织学模型的绒毛膜尿囊膜和人腹膜有相当的差异。各种模型都有其优缺点的局限,实验前都可根据自身的目的,选择合适的模型[24]。为进一步探索病因提供途径资源丰富,可行性好,建立内位症的人体组织学模型的关键点在于:随经血逆流入腹腔的子宫内位膜碎片,必须首先迅速与腹膜粘附,并进一步穿透腹膜基层发生侵袭和形成新生血管才能存活并致病,粘附和侵袭是内位症发病启动的关键步骤。用人体组织学模型了解这一过程,并了解在位内位膜在这一过程中的作用,对最终阐明内位症的发病机制具有重大意义。本文拟进一步探索内位症人体组织学模型的最佳而稳定的培养条件,为进一步研究子宫内位膜建立了良好的模型基础。

参考文献

- [1] Giudice LC, Kao LC. Endometriosis [J]. Lancet, 2004, 364: 1789-1799.
- [2] 路淑媛, 周立娟, 左娅. 子宫内位膜异位症治疗进展 [J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(6): 126-128.
- [3] Arends MJ, White ES, Whitelaw CB. Animal and cellular models of human disease[J]. J Pathol, 2016, 238: 137-140.
- [4] Parazzini F, Esposito G, Tozzi L, et al. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016: 1-5.
- [5] Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in Patients with endometriosis [J]. Obstet Gynecol 1984. 164: 151-154.
- [6] Oosterlynek DJ, Cornillie FJ, Waer M, V ande Putte M, K Oninecx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium [J]. Fertil Steril 1991. 56:45-51.
- [7] Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the pelvic cavity [J]. Am J Obstet Gynecol 1927. 14: 422-469.
- [8] 全佳丽, 郎景和. 子宫内位膜异位症的在位内位膜病变研究进展 [J]. 现代妇产科进展, 2010, 06: 465-467.
- [9] 梁颖, 冉青珍. 子宫内位膜异位症离体模型的研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 09: 1347-1349.
- [10] Jonecko A. The human peritoneum and human peritonitis in ultrastructural and immunohistochemical studies [J]. Zmikrosk Anat Forsch, 2009, 104: 907-943.
- [11] Kim SM, Yoo T, Lee SY, et al. Effect of SK 12670, a novel, orally active, non-peptide Gn RH antagonist, on hypothalamic-pituitary-gonadal axis [J]. Life Sciences, 2015, 139: 166-174.

- [12] Alessandro Faseiani, M. D, Guido Bocci, M. D, Jing Xu, M. D., Ph.D, Ryszard Bielecki, D. V. M, Ellen Greenblatt, M. D, Nicholas Leyland, M. D, and Robert F. Casper, M. D, Three-dimensional in vitro culture of endometrial explants mimics the earliest ages of endometriosis. *Fertil Steril*. 2003. 80(5), 1137-1143.
- [13] Groothuis PG, Koks CA, Dunselman GA, et al. Adhesion of human endometrium to the epithelial lining and extracellular matrix of amnion in vitro: an electron microscopic study [J]. *Hum Reprod*, 2009, 13(8): 2275-2281.
- [14] Witz CA, Thomas MR, Montoya-Rodriguez IA, et al. Short term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium [J]. *Fertil Steril*, 2011, 75(2) : 385-390.
- [15] Osteen KG, Rodgers WH, Gaire M, et al. Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 91(21):10129-10133.
- [16] Nair AS, Nair HB, Lucidi RS, et al. Modeling the early endometriotic lesion: mesothelium-endometrial cell co-culture increases endometrial invasion and alters mesothelial and endometrial gene transcription [J]. *Fertil Steril*, 2009, 90: 1487-1495
- [17] Debrock S, Vander Perre S, Meuleman C, et al. In-vitro adhesion of endometrium to autologous peritoneal membranes: effect of the cycle phase and the stage of endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2012, 17: 2523-2528.
- [18] Matsuzaki S, Darcha C. Co-operation between the AKT and ERK signaling pathways may support growth of deep endometriosis in a fibrotic microenvironment in vitro [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(7):1606-1616.
- [19] 陈振振, 贡欣. 子宫内膜异位症体外模型研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(20):4029-4032。
- [20] 阳艳军, 冷金花, 郎景和等. 子宫内膜异位症体外组织学模型的构建 [J]. *现代妇产科进展*, 2010, 17(11): 831-834。
- [21] 郭永, 赵爱华, 苏晨, 丁宁, 张瑶楠, 刘庆, 王乾兴. 米非司酮抑制人子宫内膜基质细胞增殖 [J]. *生殖医学杂志*, 2014, 06:475-479。
- [22] 郑澄宇, 杨冬梓, 谢梅青, 谢宇芬, 蔡雪影, 邝健全. 大鼠子宫内膜异位症模型的建立及其组织学观察[J]. *中山医科大学学报*, 2011, 02:106-110。
- [23] 钟洁, 何援利, 刘木彪. 地塞米松治疗子宫内膜异位症鸡胚尿囊膜模型的实验研究 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(15) :2423-2425。
- [24] Koukoura O, Sifakis S, Spandidos DA. DNA methylation in endometriosis (Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13:2939-2948.
- [25] 周青平. 子宫内膜异位症患者血清糖类抗原125、血管内皮生长因子和胰岛素样生长因子-1的表达及意义[J]. *中国妇幼保健*, 2017 (32) :1841-1844。
- [26] 何海美. 子宫内膜异位症患者异位及在位内膜组织中BCAR1的表达及其意义[J]. *中国妇幼健康研究*, 2017 (28) :1418-1421。
- [27] 王家美. 体外GnRH- α 预处理对子宫内膜异位症黄体中期子宫内膜细胞HOXA10表达的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2017 (16) :2235-2238。