

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※ 子宮內膜異位症組織在嚴重免疫不全 (SCID) ※

※ 小鼠體內之表現 ※

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：個別型計畫    整合型計畫

計畫編號：NSC 90-2314-B-002-456-

執行期間：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：吳明義 醫師

共同主持人：何弘能 教授

計畫參與人員：王浩文 (實驗助理)

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學醫學院婦產科

中 華 民 國 91 年 5 月 24 日

# 子宮內膜異位症組織在嚴重免疫不全 (SCID)

## 小鼠體內之表現

計畫編號：NSC 90-2314-B-002-456-

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：吳明義 醫師

國立台灣大學醫學院婦產科

共同主持人：何弘能 教授

國立台灣大學醫學院婦產科

計畫參與人員：王浩文 (助理) 國立台灣大學醫學院婦產科

### 一、中文摘要

子宮內膜異位症是生育年齡婦女最常見的疾病之一，其原因卻令人費解。我們也曾發現存在於患者腹腔內的種種免疫變化，但真如我們想的這樣一步一步發生嗎？我們對這些免疫變化的連貫性，並沒有完整的解釋。我們期待可以發現這些人類子宮內膜組織，在小鼠體內如何著床，如何生長，其免疫層面與生化層面的變化又是如何？本實驗初步建立了一個成功的模型，指出 NOD 小鼠最適合，組織來源可以選擇子宮腺肌症或子宮內膜異位症的病人。可以省去切除卵巢步驟，讓實驗更簡單，降低死亡率。60 天份皮下荷爾蒙製劑是很好的選擇，觀察天數約 50 天左右。

**關鍵詞：**子宮內膜異位症、NOD 小鼠、皮下荷爾蒙製劑

### Abstract

Endometriosis is one of the most common gynecological diseases affecting the pre-menopausal women. Although we have also reported several findings that may explain some immunological deviations in endometriosis, whether these immunological modulation in peritoneal cavity is indeed a cause or an effect of endometriosis remains unclear. Severe combined immunodeficient (SCID) mice possess a combined congenital deficiency in T- and B-lymphocyte function, and have been described to host various xenotransplants successfully. This year, we have set up a good animal model, NOD *scid* mice, to grow the human endometrial implants. The tissue from adenomyosis or endometriosis will possess a higher successful rate. The 60-day E2 implant is

adequate for this model and 50 days of observation is enough to find a typical endometriotic lesion grossly.

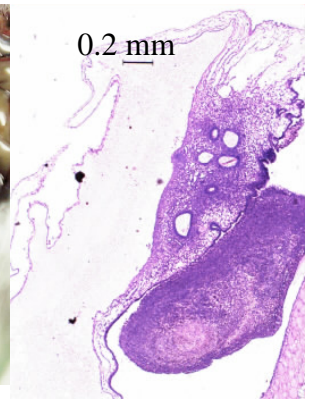
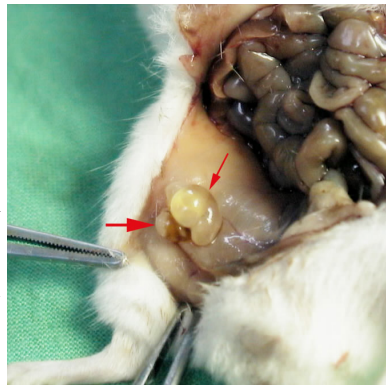
**Keywords:** endometriosis, NOD *scid* mice, subcutaneous E2 implant

### 二、緣由與目的

子宮內膜異位症是生育年齡婦女最常見的疾病之一，其原因有人說是回流的經血經由輸卵管到達腹腔，而形成子宮內膜異位病灶。然而，絕大多數（大於 90%）輸卵管通暢的婦女可見回流的經血，但只有少數婦女會形成子宮內膜異位症，其中的道理令人費解。我們也在近幾年的研究當中，稍稍得到一些結果<sup>1-8</sup>，諸如自然殺手細胞的抑制，T 細胞活化功能受限，巨噬細胞被活化等等。也探討了許多細胞素的改變，或酵素的影響，但是最後這些現象的因果關係，仍然困擾我們與世界上同在研究這個疾病的醫師或學者，於是我們打算從根本做起，建立一個我們隨時可以觀察與嘗試的動物模型來研究。

嚴重免疫不全症(SCID)小鼠，由於缺乏 T 細胞與 B 細胞，無法對外來異種組織產生排斥作用，很適合做這一種疾病發生，擴展與治療過程的觀察<sup>9</sup>。在此一動物模型當中，我們期待可以發現這些人類子宮內膜組織，在小鼠體內如何著床，如何生長，其免疫層面與生化層面的變化又是如何？我們想要知道，哪一種 SCID 小鼠最好，所以我們挑了兩種，分別為 NOD/LtSz-Prkdc <scid>/J (沒有 B cell, T cell, NK cell, macrophage)與 BEIGE scid (沒有 B cell, T cell, NK cell)來做比較。國外大

多切除卵巢，我們比較了不同週數，切不切除卵巢，之後的荷爾蒙補充劑量。還有植入組織的大小，在兼顧小鼠的壽命，皮下荷爾蒙的持久時間，與肉眼及顯微鏡下的檢視，我們比較了 0.1, 0.38, 1-2, 5-6mm 的大小組織被接受的情形。還有是不是只有子宮內膜異位的組織才可以，我們也檢測了子宮肌瘤者，子宮腺肌症與子宮內膜異位症的差別。而且植入位置在腹腔，皮下，卵巢旁或脂肪組織，有什麼差別。



### 三、結果與討論

到目前為止，我們總共做了 42 隻 SCID 小鼠，還在養的有 9 隻，死亡的有 17 隻，其中只有 2 隻是在手術後 10 天之內死亡，可能是跟手術出血或感染有關（手術成功率  $40/42 = 95.2\%$ ），其他 13 隻有可能是植入組織造成疾病或培養環境所引起，有 2 隻死亡當天做解剖，所以得到 18 個組織檢體（見下表）。

成功著床率為 8/18 (44.4%)，其中 BG 與 NOD 小鼠看不出有差異 (3/9 vs. 5/9,  $P=0.341$ )，內膜異位與否好像會有影響，但是 case number 不多，無法做結論 (有 7/13 vs. 無 1/5,  $P=0.182$ )，好像是子宮內膜異位者的病灶長得比較好。放進去的組織如果太小 (< 1 mm)，在 60 天之後，往往沒有辦法用肉眼看得清楚，如果太久，費用高是一回

事，而且考慮這些小鼠的壽命，因此 1-2 mm 的大小是比較適合的。可以在背部消毒後切開小洞 4-5 mm，用塑膠 pipette 吸取約 0.5-1 mL 從洞之間放進去約 15-20 片組織，再用 4-0 的可吸收線縫合。皮下嘗試過幾個，不是很好，因為我們組織是泡在水裡，組織又軟，在皮下常常會溢出來，除非把皮下空間弄大，但又會造成出血，或老鼠受傷太大。

切除卵巢與否，也不影響其著床比率 (有 2/6 vs. 無 6/12,  $P=0.497$ )。荷爾蒙補充，以 Innovative Research of America 所製造的  $17\beta$ -estradiol SE-121 比較好，因為含 1.7 mg/pellet，每天會有大於 900 pg/mL 的血清濃度。以前試過 300 pg/mL，或每 3 週油性的 estradiol cypionate 0.5 mg i.m.，但是效果不好。有沒有效，可以採血去做 E2 的測定，我們做過幾個約 400-500 pg/mL 之間，而有一個 60 天之後看不見 pellet，小鼠子宮也變得很小，也找不到 lesion，所以 E2 的補充是應該注意的。

倒是 BG 看起來雖然體格比較小，操作比較困難，但比 NOD 容易存活 (9/12 vs. 7/20,  $P=0.026$ )，這是可以理解的，因為 BG 還有 macrophage 功能，至少對一些疾病還有抵抗力。尤其培養室的條件在長達 2-3 個月之中，偶爾會出現意外情況，但目前還可接受，將來有更理想的無菌空間，可能會更好。

雖然如此，但是植入組織後來的長大或變形，好像還是 NOD 比較明顯有效，見上圖。目前沒有很好的計分方法，所以無法客觀定量，但是 NOD 體內的內膜異位，尤其採自子宮腺肌症與子宮內膜異位症長得更活躍，幾乎跟人类的內膜異位症的樣

no	種	SCID mice	子宮內膜組織植入	Hormone	Results			
	類	週數-卵巢切除日期	日期-大小-植入位置	supplement	日期-implantation-切片染色			
1	BG	5	90-11-8	11-21	100um 磨碎時 suspension 0.5cc (大小)	IP	(60-day) 0.7mg 17β-estradiol implant (serum >300-400 pg/ml)	12-26 kill → no finding
2	BG	5	90-11-8	11-21	100um 磨碎時 suspension 0.5cc (大小)	IP	(60-day) 0.7mg 17β-estradiol implant (serum >300-400 pg/ml)	12-26 kill → no finding
3	NOD	7.5	90-11-22	11-22	0.15-0.2 gm endometrial tissue from a women in luteal phase	F1c uterine cornu	0.5 mg estradiol cypionate 1m. st (相當重量，因為 paper 纖維 1.7 mg/60day estradiol)	12-10 死亡 (infection?)
4	NOD	7.5	90-11-22	11-22	0.15-0.2 gm endometrial tissue from a women in luteal phase	F1c uterine cornu	0.5 mg estradiol cypionate 1m. st (相當重量，因為 paper 纖維 1.7 mg/60day estradiol)	12-9 死亡 (infection?)
5	NOD	7.5	90-11-22	11-22	0.15-0.2 gm endometrial tissue from a women in luteal phase	F1c uterine cornu	0.5 mg estradiol cypionate 1m. st (相當重量，因為 paper 纖維 1.7 mg/60day estradiol)	12-9 死亡 (infection?)
6	NOD	7.5	90-11-22	11-22	0.15-0.2 gm endometrial tissue from a women in luteal phase	F1c uterine cornu	0.5 mg estradiol cypionate 1m. st (相當重量，因為 paper 纖維 1.7 mg/60day estradiol)	1-9 kill → 在手術處有 mass, but 一部分在 subcutaneous
7	NOD	4.5	90-11-28	11-28	880 um 0.5 cc from luteal endometrium -endometriosis	IP*	0.5 mg estradiol cypionate 1m. st	1-9 kill → no findings
8	NOD	4.5	90-11-28	11-28	880 um 0.5 cc from luteal endometrium -endometriosis	IP*	0.5 mg estradiol cypionate 1m. st	12-11 死亡 (infection?)
9	NOD	4.5	90-11-28	11-28	880 um 0.5 cc from luteal endometrium -endometriosis	IP*	60-day 17β-E2	1-9 kill → 一些小小 mass?
10	NOD	4.5	90-11-28	11-28	100um 0.5cc	IP*	0.5 mg	2-5 kill, finding?
11	NOD	7.5	Nil	12-19	1-2 mm (有管 HE stain) - 10-20 from women with adenomyosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	2-5 kill, finding?
12	NOD	7.5	Nil	12-19	1-2 mm (有管 HE stain) - 10-20 from women with adenomyosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	1-5 死亡 (infection?)
13	NOD	7.5	Nil	12-19	1-2 mm (有管 HE stain) - 10-20 from women with adenomyosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	1-20 死亡 (infection?)
14	BG	5	Nil	12-26	1-2 mm - 10-20 from women with adenomyosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	2-22 kill, bladder?
15	BG	5	Nil	12-26	1-2 mm - 10-20 from women with adenomyosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	2-22 kill, tiny brownish? Spleen 好像有
16	NOD	6	Nil	1-9	1-2 mm - 10-20 from women (磨碎) with endometriosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	1-31 死亡 → autopsy 2/1
17	NOD	6	Nil	1-9	1-2 mm - 10-20 from women (磨碎) with endometriosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	1-31 死亡 → autopsy 2/1
18	NOD	7	Nil	1-22	1-2 mm (有管 HE stain) - 10-20 from women (磨碎) with endometriosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	1-31 死亡 (infection?)
19	NOD	7	Nil	1-22	1-2 mm (有管 HE stain) - 10-20 from women (磨碎) with endometriosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	2-3 死亡 (infection?)
20	BG	7	Nil	2-1	1-2 mm - 10-15 from women (磨碎) with endometriosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	採血 3-29, lesion on skin edge
21	BG	7	Nil	2-1	1-2 mm - 10-15 from women (磨碎) with endometriosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	3-29, no finding?
22	NOD	5	Nil	2-22	1-2 mm - 10-15 from women (磨碎) with endometriosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	採血 4-19, lesion?
23	NOD	5	Nil	2-22	1-2 mm - 10-15 from women (磨碎) with endometriosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	4-8 死亡
24	BG	7	Nil	2-27	1-2 mm - 10-15 from women (磨碎) with endometriosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	3-23 死亡，有皮下出血
25	BG	7	Nil	2-27	1-2 mm - 10-15 from women (磨碎) with endometriosis	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	採血 4-19, lesion?
26	NOD	5	Nil	3-8	1-2 mm, 10-15 from #53 (adenomyosis?)	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	3-21 死亡?(post-op 14 days)
27	BG	3.5	Nil	3-8	1-2 mm, 10-15 from #57 (IU+ adenomyosis?)	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	採血 5-2, lesion 靠 implant 旁
28	NOD	5	Nil	3-8	1-2 mm, 10-15 from #57 (IU+ adenomyosis?)	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	採血 5-2, lesion 大水泡
29	BG	3.5	Nil	3-8	1-2 mm, 10-15 from #57 (IU+ adenomyosis?)	IP	(60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/ml)	4-5 死亡
30	BG	6.5	Nil	3-29	1-2 mm, 10-15 from #59 (endometriosis)	同上	同上	4-17 死亡
31	NOD	8	Nil	3-29	1-2 mm, 10-15 from #59 (endometriosis)	同上	同上	4-18 死亡
32	BG	6.5	Nil	3-29	From #61 (myoma)	同上	同上	採血 5-23, no lesion



子完全一樣。

#### 四、計畫成果自評

1. 動物實驗需累積經驗，因國科會助理常不固定，所以主持人必須充分掌握經驗，如麻醉與器械消毒，術後抗生素使用等等。
2. 雖然 NOD 死亡率較高，但是因為其病灶最完整，最像人類腹腔鏡所發現，所以我們第二年仍然要以 NOD 為主來做實驗。
3. 觀察時間為 45-60 天，越久病變越明顯，但是有兩個問題，有時病變會讓小鼠死亡，或培養室環境因素（例如消毒或敲敲打打），會让其死亡。第二，少數 60 天之後，60 天份的荷爾蒙皮下劑會消失不見(1/18)，子宮也明顯縮小，可能會影響實驗。
4. 動物有關經費在此實驗中(\$20,000)常不夠，尤其最近又調高價錢，平均一隻小鼠約需 \$3,000 (購買費 300+養育費 600+荷爾蒙 1800+病理切片 200)，如要特殊染色更不止，因此無法充分比較各條件的情況。
5. 本年度的實驗進度大略已經完成，並依此進度開始第二年之實驗。並且可以用這一年的經驗，應用在其他方面，如在 SCID 身上培養其他組織，如人類卵巢等等。

#### 五、參考文獻

- [1] Ho, H.N., Chao, K.H., Chen, H.F. *et al.* (1995) Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> lymphocyte subpopulation are decreased in women with Stage III - IV endometriosis. *Hum. Reprod.*, **10**, 2671-2675.
- [2] Ho, H.N., Wu, M.Y., Chao, K.H. *et al.* (1996) Decrease in interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) production and impairment of T lymphocyte proliferation were noted in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **175**, 1236-1241.
- [3] Ho, H.N., Wu, M.Y., Chao, K.H. *et al.* (1997) Peritoneal interleukin-10 increases with decrease in activated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in women with endometriosis. *Hum. Reprod.*, **12**, 2528-2533.
- [4] Ho, H.N., Wu, M.Y., Chen, S.U., *et al.* (1997) Total antioxidant status and nitric oxide do not increase in peritoneal fluids from women with endometriosis. *Hum. Reprod.*, **12**, 2810-5.
- [5] Ho, H.N., Wu, M.Y., Yang, Y.S. (1997) Peritoneal cellular immunity and endometriosis. [review] *Am. J. Reprod. Immunol.*, **38**, 400-412.
- [6] Wu, M.Y., Chao, K.H., Chen, S.U. *et al.* (1996) The suppression of peritoneal cellular immunity in women with endometriosis could be restored after gonadotropin releasing hormone agonist treatment. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **35**, 510-516.
- [7] Wu, M.Y., Ho, H.N., Chen, S.U., *et al.* (1999) Increase in the production of IL-6, IL-10 and IL-12 by LPS-stimulated peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **41**, 106-111.
- [8] Wu, M.Y., Yang, J.H., Chao, K.H. *et al.* (2000) Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. *Fertil. Steril.*, **74**, 1187-1191.
- [9] Awward, J.T., Sayegh, R.A., Tao, X.J. *et al.* (1999) The SCID mouse: an experimental model for endometriosis. *Hum. Reprod.*, **14**, 3107-11.

