

行政院國家科學委員會專題研究計畫 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(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-002-153-

執行期間：92年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院婦產科

計畫主持人：吳明義

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 94 年 11 月 1 日

政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

## 子宮內膜異位症組織在嚴重免疫不全 (SCID)

### 小鼠體內之表現 (3/3)

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2314-B-002-153-

執行期間：93年8月1日至94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：張靜芳 (實驗助理)

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

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

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學醫學院婦產科

中華民國 94 年 10 月 31 日

## 摘要

子宮內膜異位症是生育年齡婦女最常見的疾病之一，其原因大多數人認為是回流的經血細胞經由輸卵管到達腹腔，而形成子宮內膜異位病灶。然而，從腹腔鏡手術的經驗發現，絕大多數輸卵管通暢的婦女可見回流的經血，但其中只有少數婦女會形成子宮內膜異位症，其真正致病原因卻令人費解。多年以來，雖然我們在近幾年的研究當中，稍稍得到一些結果，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，但是最後這些現象之間的因果關係為何？仍然困擾我們與世界上同在研究這個疾病的醫師或學者。因此，我們期待可以藉由發現這些人類子宮內膜組織，在 SCID 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？本實驗第一年已經建立了一個成功的模型，實驗結果指出子宮內膜組織來源雖然可以選擇一般子宮肌瘤病人，但是子宮腺肌症或子宮內膜異位症更好。病灶通常位於粗糙的創傷面，一般未固定的游離組織在腹腔內不容易著床。第二年的經驗，告訴我們周邊血液單核球細胞(PBMC)，可以經由尾部靜脈注射進去，子宮內膜異位症患者的 PBMC 似乎會加強病灶的生長。但以  $1 \times 10^7$  周邊血液單核球細胞在此實驗中，無法清楚地從小鼠血液中辨認。第三年的實驗，我們試圖用綠茶茶葉的萃取物注射入 SCID 小鼠的腹腔，初步結果並沒有明顯的效果。反而，實驗組一些的著床病變好像更 active，而且實驗組腹膜黏連特別明顯，幾乎每一隻都有黏連，這可能是粗萃取物不適合於腹腔注射有關。由以上實驗，我們學習到 (1) 如何精準地讓 SCID 小鼠得到內膜組織。(2) 經由更低侵襲性手術，使小鼠存活率更高。(3) 血液單核球細胞的移植技術，可以再更熟練，也許就可以模擬人體內之免疫反應。(4) 藥物治療的模型，可以再加以改進。

## ABSTRACT

Endometriosis is characterized by the presence of abnormally located tissue resembling the endometrium with glands and stroma. Several hypotheses have attempted to explain the development of such tissue. The most often cited theory, “implantation”, proposes that the physiological phenomenon of endometrial reflux in the fallopian tubes during menstruation may overcome local defense mechanisms, implant, and proliferate. Retrograde menstruation is a so common phenomenon that over 90% were found with menstrual tissues in the pelvic cavity via laparoscopy. But, endometriotic lesions were not so common. Through our previous studies on the workup of the pathogenesis of endometriosis, we have explored some mechanisms of local immunological dysfunction. However, we are still not to answer whether it is a true cause or just an effect of endometriosis. In this study, we tried to use a model of the transplantation of cultured explants of human endometrium and the transplantation of human endometrium into SCID mice to answer those questions. In the 1<sup>st</sup> year of this study, we have set up a promising model to take human endometrium on the SCID mice. We also demonstrated adenomyosis/endometriosis tissue had higher taking rates than tissues from myoma or normal controls. To avoid trauma, we created a minor incision from the posterior muscle to introduce 1-2 mm-sized endometrial tissue. Due to the 60-day release of E2 implant, it is better to take a look at the tissue implantation before 50 days. In the 2<sup>nd</sup> year, we have tried to inject  $10^7$  PBMCs into each SCID mouse. However, it is not easy to trace them after 5 to 6 weeks. So we can not evaluate the “in vivo” interactions between the PBMCs and endometriotic tissue. In the 3<sup>rd</sup> year, we also injected some green tea extracts (GTE) into the SCID mouse abdomen. There were not significant differences on the tissue implantation between GTE users and controls. However, prominent intraabdominal adhesions were noted in GTE users that might indicate the GTE itself was not suitable for the route of intraperitoneal use. From the above, we have learned (1) accurately predict the taking rates of endometrial tissue on the SCID mice. (2) Less trauma leads higher survival rates of mice. (3) The transfusion of PBMCs may need some improvements to make it possible to test the in vivo immunological alterations in SCID mice just like in human body. (4) A modified therapeutic test may result in better and reasonable treatments for endometriosis.

## 目 錄

|          | 頁次 |
|----------|----|
| 1. 前言    | 1  |
| 2. 研究目的  | 1  |
| 3. 文獻探討  | 2  |
| 4. 研究方法  | 3  |
| 5. 結果與討論 | 3  |
| 6. 附錄    | 6  |

# 子宮內膜異位症組織在嚴重免疫不全 (SCID)

## 小鼠體內之表現 (3/3)

計畫編號：NSC 92-2314-B-002-153-

執行期限：93 年 8 月 1 日至 94 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：張靜芳(助理) 國立台灣大學醫學院婦產科

### 前言

子宮內膜異位症(endometriosis)是生育年齡婦女最常見的疾病之一，其原因大多數人認為是回流的(retrograde)經血細胞經由輸卵管到達腹腔，而形成子宮內膜異位病灶。然而，從腹腔鏡手術的經驗發現，絕大多數(大於 90%)輸卵管通暢的婦女可見回流的經血，但其中只有少數婦女會形成子宮內膜異位症，因果的道理令人費解。我們也在近幾年的研究當中，稍稍得到一些結果<sup>1-15</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，但是最後這些現象之間的因果關係，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>16</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？如果接受了人類的淋巴球組織，到底可以在 SCID 小鼠體內存活多久？可以當作活體環境(*in vivo*)來看待嗎？最後並初步去試驗一些可能的治療方式，在 SCID 小鼠體內是否可行？

### 研究目的

1. 首先，我們想要知道哪一種 SCID 小鼠最好：所以我們挑選了兩種 SCID mice，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。我們也比較了公老鼠跟母老鼠的差別。而且植入位置在腹腔，皮下，卵巢旁或脂肪組織，有什麼差別。
2. 我們想要知道哪一種子宮內膜異位組織最好：到底是腹膜型的子宮內膜異位組織或原位組織比較好？是濾泡期或黃體期比較好？還是月經期比較好？因為我們在 MMP/TIMP 的探討上發現，有出血的當時，MMP-1 與 MMP-9 上升得特別明顯(*unpublished data*)。此外，切多大塊的組織較容易著床？因為太大血液循環一定比較慢建立，如果較小，方便於用針頭注射，對 SCID 傷害較少，但是如果變成單細胞，沒有組織間的合作，是不是不容易著床？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，細胞取出到植入的時間(warm ischemic time)，會不會影響？加入雌激素藥片的時間，或從事其他藥物治療的時間，跟植入時間必須隔多久？觀察病灶產生需要多少時間？
3. 我們想要知道人類血液中的單核細胞注入 SCID 內可活多久：到底要多少量的 PBMC 才能在 SCID 小鼠體內找得到？留多少量才能有實際作用？從靜脈注入跟腹腔注射到底有什麼差別？這些細胞在 flow cytometry 上的分類如何？有如同在人體內 NK cell 受抑制，與 Th1 細胞不活化的現象發生嗎？跟老鼠本身的白血球互動關係如何？

4. 我們想要知道血管新生狀況如何：組織著床一定得要有新生血管，到底這些 SCID 老鼠體內血管新生狀態為何？如何評估？如果我們用已知的抗血管新生劑來治療，會不會有效果？或有什麼副作用？

## 文獻探討

- [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. *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] Wu, M.Y., Ho, H.N., Chen, S.U. *et al.* (2000) Decreased levels of transforming growth factor- $\beta$  1 in peritoneal fluid in early stage endometriosis. *Taiwanese J. Obstet. Gynecol.*, **39**, 99-103.
- [10] Wu, M.Y., Chen, S.U., Chao, K.H. *et al.* (2001) Mouse embryo toxicity of IL-6 in peritoneal fluids from women with or without endometriosis. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, **80**, 7-11.
- [11] Wu, M.Y., Yang, Y.S., Ho, H.N. (2001) Impaired natural killer cell activity in endometriosis? - A technical challenge for validation. *Fertil. Steril.*, **76**, 422-3.
- [12] Lin, K.C., Chen, H.F., Huang, P.T. *et al.* (2001) Effectiveness of postoperative adjuvant therapy in improving reproductive outcome of endometriosis-associated infertility. *J. Formos. Med. Assoc.*, **100**, 466-70
- [13] Wu, M.Y., Ho, H.N. (2003) The role of cytokines in endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **49**, 285-296.
- [14] Wu, M.Y., Chao, K.H., Yang, J.H. *et al.* (2003) Nitric oxide synthesis is increased in the endometrial tissue of women with endometriosis. *Hum. Reprod.*, **18**, 2668-71
- [15] Chen, M.J., Yang, J.H., Yang, Y.S. *et al.* (2004) Increased occurrence of tubo-ovarian abscesses in women with stage III and IV endometriosis. *Fertil. Steril.*, **82**, 498-9.
- [16] 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.
- [17] Guo, Z., Wu, T., Sozen, H. *et al.* (2003) A substantial level of donor hematopoietic chimerism is required to protect donor-specific islet grafts in diabetic NOD mice. *Transplantation*, **75**, 909-915.

## 研究方法

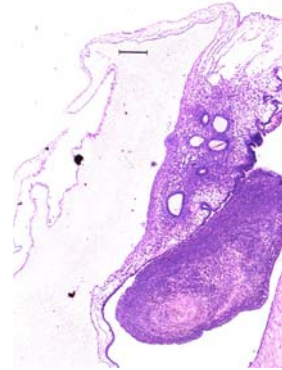
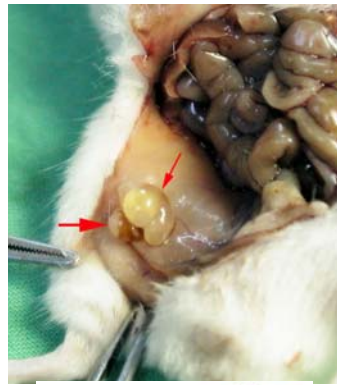
1. 購買 SCID 小鼠：從台大醫學院實驗動物中心即可購買，6 週附近的 NOD 與 BG 小鼠，寄養在無菌房裡面，做實驗也是在無菌房的操作台裡面。我們也曾購買國家動物實驗中心的 nude mice，但是死亡率沒有比較好(not shown in this report)，所以本實驗主要是以 NOD scid 小鼠為主。
2. 取得子宮內膜異位組織：經過本院醫療倫理委員會(IRB)同意，因應本實驗研究之需要，得以取得部分的手術病人之檢體，並有每個病人之書面同意函為根據。在術中，由計畫執行者(PI)親自評估整個手術過程中，骨盆腔的病變，癌症、停經或發炎者都不在考慮之內。另外，因擔心 warm ischemic time 的效果，LAVH 的案例往往花費時間較久，也不收這類檢體。在手術台上取下子宮，立即以無菌刀片刮除少術子宮內膜，到無菌的收集盒內，立即送到實驗室，以 PBS 清洗掉血跡，用刀片切碎成  $1\text{ mm}^3$  以下的碎片(第一年的計畫，有嘗試較大的切片)。放進 HTF (human tubal fluid) 中，在一個小時內植入到 SCID 小鼠體內。
3. SCID 小鼠的事先處理：經過麻醉後，從背後切除卵巢，並埋進 60-days 效果的雌激素藥錠於皮下，予以縫合，並給予抗生素 2-3 天。經過至少一週的觀察，才植入人類子宮內膜組織。並在犧牲時，眼窩採血測量血中 E2 的濃度，發覺相當高，所以後來實驗(2<sup>nd</sup> & 3<sup>rd</sup> year)就沒有多一個卵巢切除步驟，老鼠死亡率就比較少。
4. 內膜組織植入：一開始，從腹部進入，將內膜組織用不吸收的 5-0 nylon 線縫合在腸繫膜、卵巢旁、或腹膜上，也有放進腎臟被膜下。但後來發覺老鼠死亡率高，2<sup>nd</sup> & 3<sup>rd</sup> 年的實驗，就從背部進行，後來發覺用 #18 號的針頭，打進 0.1~0.15 mL 的子宮內膜組織懸浮液，效果就很好，而且死亡率低。如果隔 7 天再植入一次，則成功著床率幾乎可達 100%。但是多少片組織得到多少個病灶？或大小跟原來的相比之間的比例，則根據取得檢體的品質不同，有些差異。
5. 評估內膜組織植入成功率：大約 21-28 天之後，就可殺掉 SCID 小鼠，肉眼即可見到一些組織已經著床很牢，如果時間更久，例如 2 個月以上，可以看到 cyst formation。但是由於 estrogen implant 的有效期間只有 60 天，所以最好在一個半月內完成實驗。經照相存證後，用剪刀剪下組織，用 2% PFA 在室溫下固定 1 hr，就送到病理科做 paraffin 切片，並做 H & E 染色。

## 結果與討論

1. NOD 與 BG 的 SCID 小鼠在著床率方面沒有差別：1<sup>st</sup> year 的實驗，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(見下圖一)。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( $< 1\text{ mm}$ )，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(後來的實驗證實  $< 1\text{ mm}$  也是可以的，但量可能要多一些，例如 0.1~0.15 mL)。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。



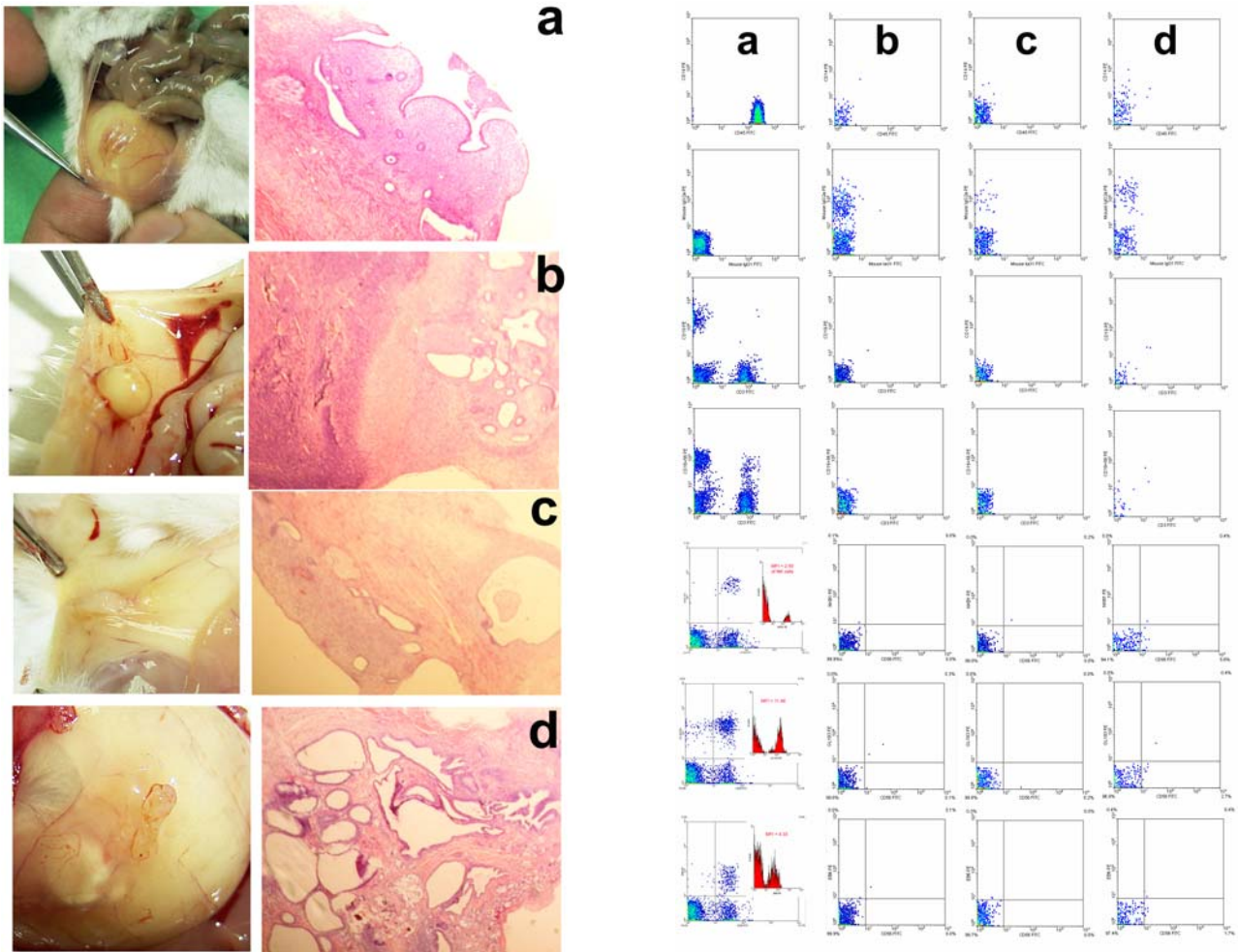
| no | SCID mice |     |          | 子宮內膜組織植入 |  | Hormone supplement   | Results                                      |
|----|-----------|-----|----------|----------|--|--|--|
|    | 種類        | 週數  | 卵巢切除日    | 日期       | 大小-植入位置  |  |  |
| 1  | BG        | 5   | 90-11-8  | 11-21    | 100µm 懸浮液 0.5cc (水+9)                                      | 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    | 100µm 懸浮液 0.5cc (水+9)                                      | IP   | 12-26 kill → no finding                      |
| 3  | NOD       | 7.5 | 90-11-22 | 11-22    | 0.5-0.2 gm endometrial tissue from a woman in luteal phase | IP 0.5 mg estradiol cypionate i.m. st. utazine (相當高濃，因為sup or 週藥 1.7 mg/60day estradiol) | 12-10 死亡 (infection?)                        |
| 4  | NOD       | 7.5 | 90-11-22 | 11-22    |  |  | 12-9 死亡 (infection?)                         |
| 5  | NOD       | 7.5 | 90-11-22 | 11-22    |  |  | 12-9 死亡 (infection?)                         |
| 6  | NOD       | 7.5 | 90-11-22 | 11-22    |  |  | 1-9 kill → 在手術處有 mass, but 一部分在 subcutaneous |
| 7  | NOD       | 4.5 | 90-11-28 | 11-28    | 300 µm 0.5 cc from luteal endometrium                      | IP* 0.5 mg estradiol cypionate i.m. st   | 1-9 kill → no findings                       |
| 8  | NOD       | 4.5 | 90-11-28 | 11-28    | endometriosis  | IP*  | 12-11 死亡 (infection?)                        |
| 9  | NOD       | 4.5 | 90-11-28 | 11-28    |  | IP* 60-day 17β-E2  | 1-9 kill → 一些小小 mass?                        |
| 10 | NOD       | 4.5 | 90-11-28 | 11-28    | 100µm 0.5cc  | IP*  | 2-5 kill, finding?                           |
| 11 | NOD       | 7.5 | Nil      | 12-19    | 1-2 mm (有膿+IE stain) - 10-20 from women with               | IP (60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/mL)                              | 2-5 kill, finding?                           |
| 12 | NOD       | 7.5 | Nil      | 12-19    | adenomyosis  | IP   | 1-5 死亡 (infection?)                          |
| 13 | NOD       | 7.5 | Nil      | 12-19    |  | IP   | 1-20 死亡 (infection?)                         |
| 14 | BG        | 5   | Nil      | 12-26    | 1-2 mm - 10-20 from women with                             | IP (60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/mL)                              | 2-22 kill, bladder?                          |
| 15 | BG        | 5   | Nil      | 12-26    | adenomyosis  | IP   | 2-22 kill, tiny brownish? Spleen 好像有         |
| 16 | NOD       | 6   | Nil      | 1-9      | 1-2 mm - 10-20 from women (帶 P) with                       | 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      | endometriosis  | IP   | 1-31 死亡 ⇒ autopsy 2/1                        |
| 18 | NOD       | 7   | Nil      | 1-22     | 1-2 mm - 10-20 from women (帶 P) with                       | IP (60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/mL)                              | 1-31 死亡 (infection?)                         |
| 19 | NOD       | 7   | Nil      | 1-22     | endometriosis  | IP   | 2-3 死亡 (infection?)                          |
| 20 | BG        | 7   | Nil      | 2-1      | 1-2 mm - 10-20 from women (帶 P) with                       | 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      | endometriosis  | IP   | 3-29, no finding?                            |
| 22 | NOD       | 5   | Nil      | 2-22     | 1-2 mm - 10-20 from women (帶 P) with                       | IP (60-day) 1.7 mg 17β-estradiol implant (serum >900 pg/mL)                              | 採血, 4-19, lesion?                            |
| 23 | NOD       | 5   | Nil      | 2-22     | endometriosis  | IP   | 4-8 死亡                                       |
| 24 | BG        | 7   | Nil      | 2-27     | 1-2 mm - 10-15 from women (帶 P) with                       | 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     | control  | IP   | 採血, 4-19, lesion?                            |
| 26 | NOD       | 5   | Nil      | 3-8      | 1-2 mm - 10-15 from #53                                    | 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      | adenomyosis?   | IP   | 採血, 5-2, lesion 靠 implant 旁                  |
| 28 | NOD       | 5   | Nil      | 3-8      | 1-2 mm - 10-15 from #57 (IU + endometriosis?)              | 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      |  | IP   | 4-5 死亡                                       |
| 30 | BG        | 6.5 | Nil      | 3-29     | 1-2 mm - 10-15 from #59 (endometriosis)                    | IP 同上  | 4-17 死亡                                      |
| 31 | NOD       | 8   | Nil      | 3-29     |  | IP 同上  | 4-18 死亡                                      |
| 32 | BG        | 6.5 | Nil      | 3-29     | From #61 (myoma)   | IP 同上  | 採血, 5-23, no lesion                          |



圖一 NOD 與 BG 的 SCID 小鼠在著床率方面沒有差別，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。右上圖(#28 小鼠)，植入較久(55 days)，就看到水泡的發生，但裡面不是 chocolate content，這一點跟人類的不太一樣。

2. 切除卵巢與否，也不影響其著床比率：切除卵巢與否，並不影響其著床比率(有 2/6 vs. 無 6/12,  $P=0.497$ )。荷爾蒙補充，以 Innovative Research of America™ 所製造的 17β-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，我們做過幾個血液測定，E2 值約 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。所以建議觀察時間為 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，會讓其死亡。2<sup>nd</sup> year 以後，著床率幾乎可以達 100%，如果為子宮內膜異位症或腺肌症檢體，成功率為 8/8 (100%)，單純子宮肌瘤者為 1/4 (25%)。合併兩年結果，內膜異位與否會對著床與否有影響 (有 15/21 vs. 無 2/9,  $P=0.011$ )，好像是子宮內膜異位者的病灶長得比較好。
3. PBMC 的注射成功率可以達六七成，但細胞存活量不多：2<sup>nd</sup> year 的重點在 PBMC 的注射，我們總共做了 62 隻 SCID 小鼠，死亡的有 27 隻，其中 1 隻是在做靜脈注射 PBMC 時不慎麻醉死亡，另有 3 隻是在第一次或第二次手術(剖腹探查無病灶再加入第二次檢體)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 58/62 = 93.5%)，其他 23 隻有可能是植入組織造成疾病或培養環境所引起，有 4 隻在死亡當天做解剖，所以得到 39 個組織檢體。我們平均從健康 AB 型血型的男性得到  $1.0\sim 1.5 \times 10^7$  cells in 0.2 mL PBS，使用 #24G, #25G 的頭皮針或 0.5 c.c. 的 #29G 針管來注射小鼠的尾部靜脈，發覺 #29G 最好，成功率可以達六七成。小鼠的抽血，可以從尾部，眼窩，心臟或腹腔主動脈。結果發覺，使用眼窩先得到 1 c.c. 左右，再迅速剪開胸骨，用 heparin 的 #25 針管，抽心臟可以多得到 0.3 mL 左右，大約每一隻都可以獲得 1 c.c. 以上的血液來分析。但是，眼窩採血容易造成血液凝固，需注意。參考圖二，不論是腹腔內注射或靜脈內注射 PBMC，使用 flow cytometry 的檢測，並沒有清楚看出人類 PBMC 的存在，只有 d 小鼠的血中，人類 NK 細胞的抗體

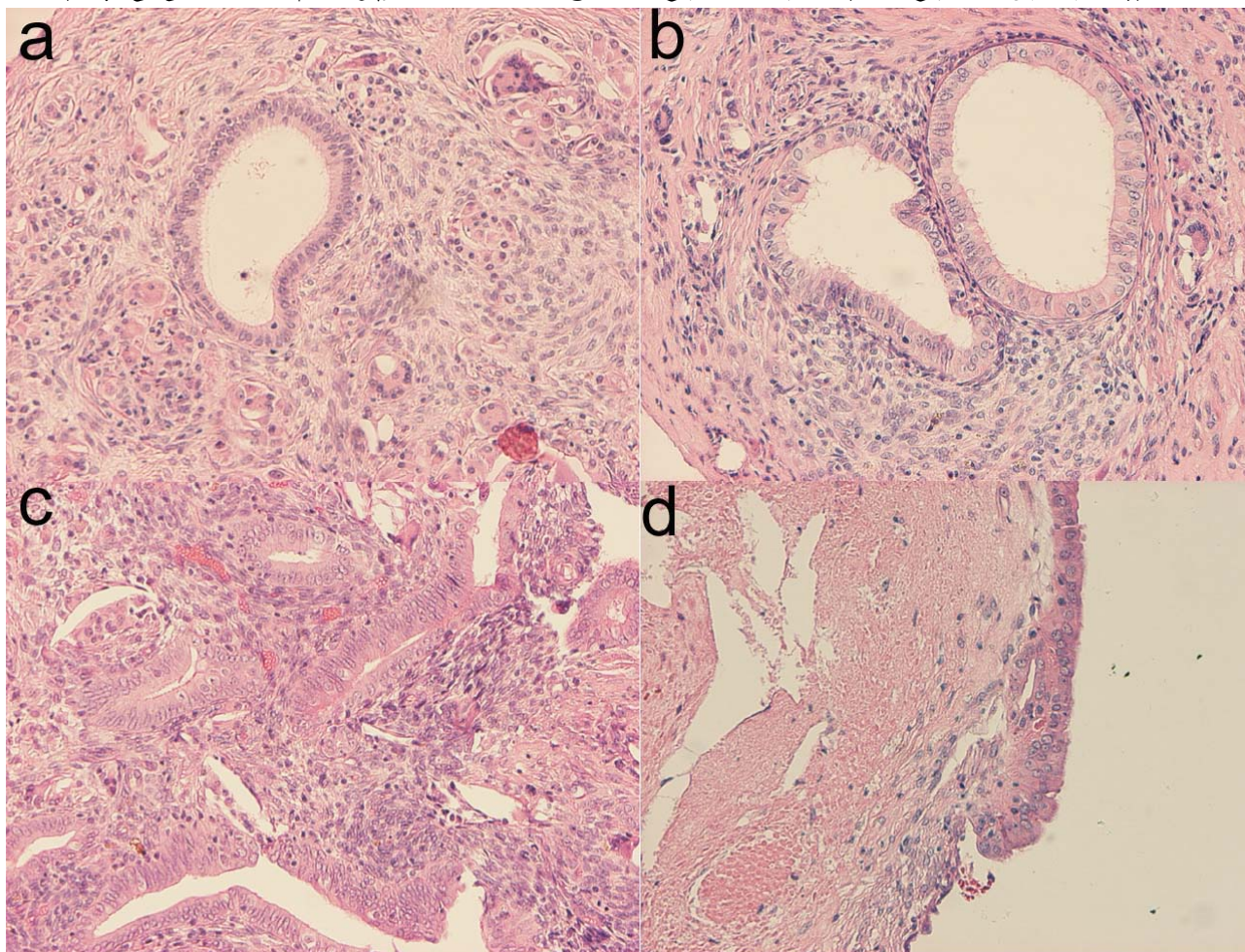
陽性率大於 1% (根據 Guo 等人的定義<sup>17</sup>: Mixed chimerism was defined if percentage of donor-derived cells detected in the recipient was at least 1%.)，勉強算是有看到，但是需要進一步更多的案例來佐證。



圖二 (左) 同一個嚴重子宮腺肌症合併兩側巧克力囊腫的病人，其子宮內膜碎片植入不同四隻 NOD 的 SCID 小鼠(abd 在腹腔內，c 在腹膜外)，一週後，abd 分別打入  $1-1.5 \times 10^7$  cells 的 PBMC，ad 分別來自正常男性(靜脈內)，b 來自另一個子宮內膜異位症婦女(腹腔內)。28 天之後，解剖發覺 4 隻小鼠都有病灶發生，b 小鼠最明顯。(右) SCID 小鼠的血液分析：a: PBMC of a normal man (human control). b: a SCID mouse without human PBMC (mouse control). c: with i.v.  $1 \times 10^7$  human PBMC into tail vein. d: with  $1.3 \times 10^7$  human PBMC into peritoneal cavity (due to failure to vein). 所有細胞都 gating 在淋巴球區域，第一列為 CD45 與 CD14，可以看出有無人類淋巴球。第二列為 negative control，可是小鼠的 IgG2 有部份陽性。第三列看 B 細胞與 T 細胞。第四列看 NK 細胞。第五到七列為 NK 上的 KIR 表現。

4. 綠茶並沒有明顯減少子宮內膜組織的著床率：我們初步在體外培養的情況發現，茶葉尤其是綠茶，可以降低子宮內膜組織的分裂速度(用 MTT assay)以及減弱血管新生因子的活性(用 CAM 當測試標準)。所以 3<sup>rd</sup> year 我們試圖用綠茶茶葉的萃取物(GTE, green tea extract)注射入 SCID 小鼠的腹腔，初步結果並沒有明顯的效果。我們一共做了 24 隻 SCID 小鼠，為了公平起見，每一隻都注入同樣劑量的子宮內膜異位組織，第一次是在埋 E2 implant 時，從後腹壁切一個小洞注入。並打 2-3 天抗生素。一週後，用 18 號針頭，打入 0.1 西西的子宮內膜異位組織的懸浮液，從前腹腔，但不打抗生素。共有 8 隻存活，4 隻為實驗組，自第一次內膜植入後第四天即開始打 GTE (劑量為 100 mg/kg/day qod x 6 doses, i.p.)，另 4 隻為對照組，打的是 PBS，三個禮拜後，犧牲老鼠，發覺對照組好像比較多(4/4 vs. 2/4,  $P = 0.063$  by Fisher's exact test) (見圖三)，但是實驗組的著床病變好像更 active (見圖三之 c) 其中有一例雖然沒著床，但有一個 0.2x0.2 cm 的組織，游離在腹腔當中，經切片後仍可看見

子宮內膜的上皮(見圖三之 d)，而且實驗組腹膜黏連特別明顯，幾乎每一隻都有黏連，有一隻黏連部分還有小腸黏膜組織，因為對照組的 PBS 仍然有 DMSO 的成分，所以兩組的不同處是 GTE，所以這種 raw extract 應該只適合於口服，不太適合於腹腔內注射。



圖三 使用綠茶茶葉萃取物(GTE)於子宮內膜異位組織移植於 SCID 小鼠的結果切片。a, b (100X)為對照組，只是打入 PBS 液體，含少量 DMSO，因為 DMSO 是用來溶解 GTE 的。出現的子宮內膜異位病灶很典型，跟過去的實驗沒什麼不同。c (100X), GTE 使用之後，發覺腸子跟腸子或跟腹壁之間，黏連情形嚴重，在可疑病灶處，切一塊做 H&E 染色，可以發覺 endometrial gland 長得還比對照組更嚴重，其間血管分佈也比較密集(不知道是不是新生血管)。有另一隻雖然有一些黏連，但沒有看到明顯病灶，計算為 negative，但有一塊 free movable 在腹腔內滾動的 mass，切片後發覺仍有一些 endometrial epithelium 存在。

5. 結論：(1)我們要選擇 NOD scid 作為將來的實驗模型。(2) 我們將採取 minimal surgery，所以不切除 scid mice 卵巢，但從背後做個小洞放進組織。(3) 組織最好在 1-2 mm 之間，用吸管吸會比較好。(4) E2 implant 以 60 天效期的比較好。(5) endometrial tissue 以 adenomyosis 尤其是月經期的內膜較佳。(6) PBMC 的注射，可能要多次，且量要多一些，最好從靜脈注射較佳。(7) 如果要嘗試 anti-angiogenic treatment，建議用 Sigma™的 EGCG 比較能夠做 I.P.注射，如果只是 GTE 就必須改口服。並且可與目前常用之 anti-VEGF 或 TNP-470 來做比較。(8)由於 SCID 小鼠實驗昂貴，一個更乾淨的手術與養育環境，是可以提高動物術後的存活率，比較可以在有限的動物數目之下，得到有用的資訊。

## 附錄