

行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 (2/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2314-B-002-314-

執行期間：91年8月1日至 92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：陳慈昕 (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 92 年 5 月 31 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 (2/3)

計畫編號：NSC 91-2314-B-002-314-

執行期限：91年8月1日至92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：陳慈昕(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，其真正致病原因卻令人費解。多年以來，我們期待可以藉由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？本實驗第一年已經建立了一個成功的模型，今年度的實驗結果指出

- ①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。
- ②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。
- ③周邊血液單核球細胞(PBMC)，可以經由尾部靜脈注射進去。
- ④子宮內膜異位症患者的 PBMC 似乎會加強病灶的生長。
- ⑤ 1×10^7 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。

關鍵詞：子宮內膜異位症、NOD 嚴重免疫不全小鼠、周邊血液單核球細胞、皮下荷爾蒙製劑

Abstract

Endometriosis is one of the most common gynecological diseases affecting the pre-menopausal women. We have studied the pathogenesis for many years and found that we might learn something from the establishment of endometriotic lesions on the severe combined immuno-deficient (SCID) mice. First year, we have set up a good animal model, NOD *scid* mice, to grow the human endometrial implants. This year, we further verify that rough surface is mandatory for the growth of the xeno-transplanted tissues. We successfully injected PBMC from normal controls and patients into the

tail vein of SCID mice. However, it could not clearly shown by the flow cytometry after one month. From this study, we seemed to show that PBMC from endometriosis patients might contribute to the growth of the ectopic tissues.

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

二、緣由與目的

雖然早在 1927 年，Dr. Sampson 就已經提出回流的經血，是造成子宮內膜異位症的原因之一，但是，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¹⁻⁸，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⁹。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？第一年的計畫中，我們已經知道

- ①NOD 的 SCID 母小鼠，最適合此實驗。
- ②不用切除卵巢依舊可以達到很好的效

果，並降低死亡率。③雌激素的皮下製劑有助於荷爾蒙的補充，更易於觀察。④20-50天是最適合觀察的時間。

今年度，我們重點在更穩定的動物模型，以及免疫調控。後者，我們利用人類的 PBMC 注射進去 SCID 小鼠的靜脈或腹腔內(什麼時間打？打多少劑量？)，過一陣子(多久？)觀察病灶的大小，與在小鼠體內存在多少 PBMC？其表現又如何？跟病灶有無直接關係？

三、結果與討論

到目前為止，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。

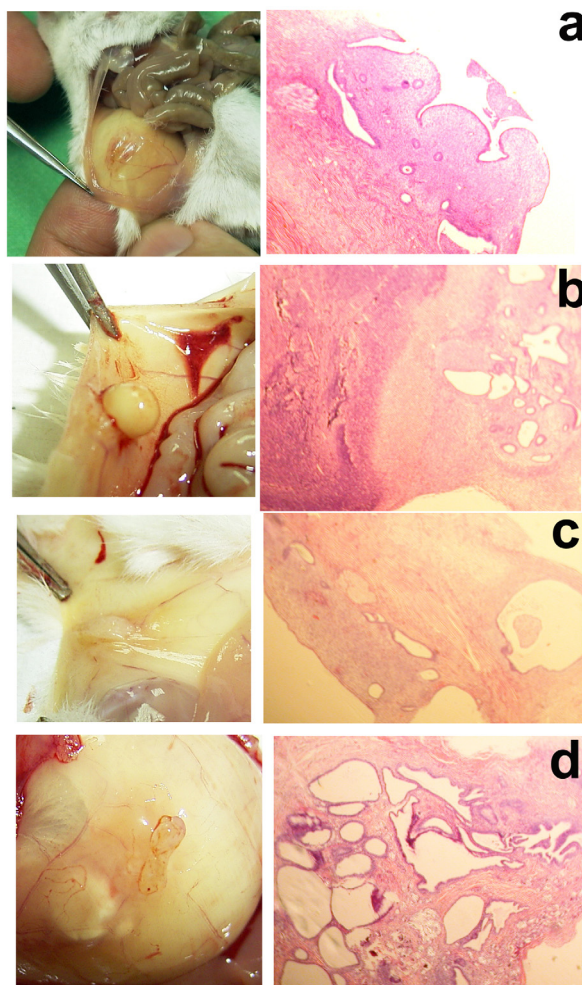
經過經驗的累積，最近一年著床率明顯提高，如果為子宮內膜異位症或腺肌症檢體，成功率為 8/8 (100%)，單純子宮肌瘤者為 1/4 (25%)。合併兩年結果，內膜異位與否會對著床與否有影響(有 15/21 vs. 無 2/9, $P=0.011$)，好像是子宮內膜異位者的病灶長得比較好。

關於 PBMC 的注射，我們平均得到 $1.0\sim 1.5 \times 10^7$ cells in 0.2 mL PBS，使用 #24, #25 的頭皮針或 0.5 c.c. 的 #29 針管來注射小鼠的尾部靜脈，發覺 #29 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。

從右邊圖一，好像可以看出子宮內膜異位症的 PBMC 對於病灶生長有促進作用，但需要更多案例來證實。而且從右圖 4 個案例來看，幾乎所有病灶都集中在剖腹

傷口附近，是創傷面易著床？或靠近 E2 implant 濃度特別高，因此容易生長，則需要更多案例來說明。

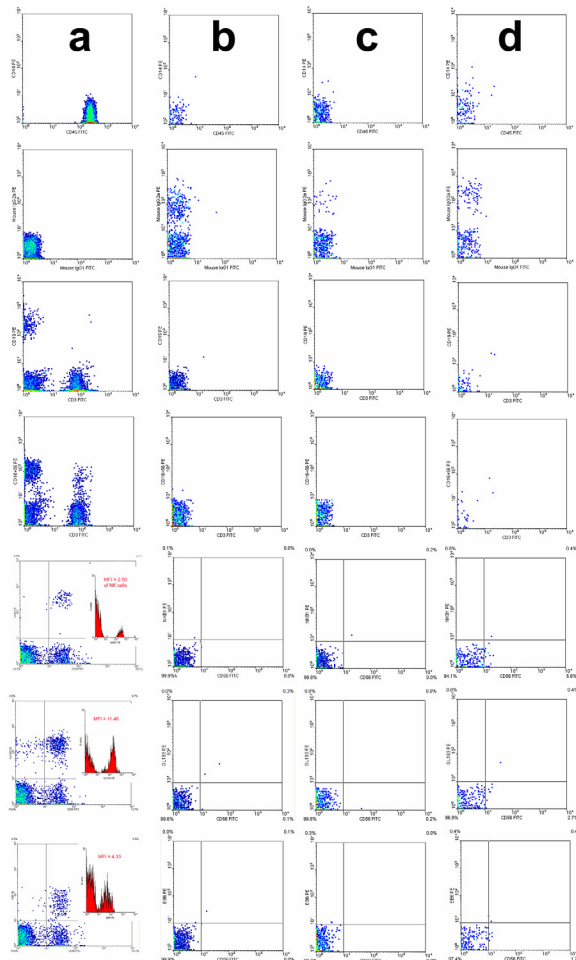


圖一 同一個嚴重子宮腺肌症合併兩側巧克力囊腫的病人，其子宮內膜碎片植入不同四隻 NOD 的 SCID 小鼠(abd 在腹腔內，c 在腹膜外)，一週後，abd 分別打入 $1\sim 1.5 \times 10^7$ cells 的 PBMC，ad 分別來自正常男性(靜脈內)，b 來自另一個子宮內膜異位症婦女(腹腔內)。28 天之後，解剖發覺 4 隻小鼠都有病灶發生，b 小鼠最明顯。

關於人類 PBMC 是否可以在小鼠身上一個月後找到，在本實驗有限的動物數目中，並沒有令人鼓舞的結論出現。參考下一頁圖二，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¹⁰: 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。

本實驗室過去從人類 PBMC 與 PFMC

的研究當中，發覺 KIR 是 NK 細胞毒性，乃至子宮內膜異位症產生，有很大關係，但是在此實驗中，因為 SCID 血中無法得到足夠的人類 NK 細胞，因此並未得到佐證。



圖二 a: PBMC of a normal man (human control). b: a SCID mouse without human PBMC (mouse control). c: with i.v. 1×10^7 human PBMC into tail vein. d: with 1.3×10^7 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。

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，但經驗已經比去年好很多。
2. 雖然 NOD 病灶最完整，可是培養室環境因素在今年更不好，許多 unexpected death 使實驗更難控制。而且許多不確定因素(如 SCID 常需要 order 很久，無法配合檢體取得)，讓實驗憑添不必要

之麻煩。

3. PBMC 可以再加多一點，如 $4-10 \times 10^7$ ，必要時種兩次也可以。而且 tail vein 注射與腹腔注射都要有足夠數目，才知道哪一個影響較大。因為根據江醫師等人的報告¹¹，如果打入腹腔，至少要 2×10^7 才夠。Tail vein 注射，下一次可以選擇 #27 針頭，應該會更好一些。
4. 本年度的實驗進度大略已經完成，並依此進度開始第三年之實驗。下年度，必須作一定數目，來區分有無統計意義。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，如人類卵巢或胚胎幹細胞等等，也容易駕輕就熟。因此這是一個基本技術，可以訓練實驗技術更純熟。

五、參考文獻

- [1] Ho, H.N., Chao, K.H., Chen, H.F. *et al.* (1995) Peritoneal natural killer cytotoxicity and $CD25^+CD3^+$ 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- γ) 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 $CD4^+$ 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] Wu, M.Y., Ho, H.N. (2003) The role of cytokines in endometriosis. [review] *Am. J. Reprod. Immunol.*, **49**, 285-296.
- [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**, 106-11.
- [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.
- [10] 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.
- [11] Chiang, B.L., Chou, C.C., Ding, H.J. *et al.* (1995) Establishment of human IgE system in severe combined immunodeficient mice with peripheral blood mononuclear cells from asthmatic children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **95**, 65-76.