



# BALB/c 小鼠子宫内膜异位症痛经模型的建立

陈景伟<sup>1,2</sup>, 仝瑞晓<sup>1</sup>, 范丽洁<sup>1</sup>, 孙晓换<sup>1</sup>, 马惠荣<sup>2</sup>, 杜惠兰<sup>1,2</sup>

(1. 河北医科大学, 石家庄 050017; 2. 河北中医学院, 中西医结合生殖疾病协同创新中心, 石家庄 050091)

**【摘要】** 目的 建立近交系 BALB/c 小鼠子宫内膜异位症痛经模型。方法 采用自体移植法将小鼠自体子宫组织块移植到腹膜, 复制子宫内膜异位症模型, 将术后的小鼠随机分为 4 组, 手术 + 雌激素 + 缩宫素组、手术 + 雌激素组、手术 + 缩宫素组、手术组, 并设假手术组和雌激素 + 缩宫素组, 术后 1 ~ 12 d 采用不同方案诱发小鼠扭体反应, 记录扭体潜伏期及扭体次数, 并取异位灶行 HE 染色和病理组织学观察, 筛选建立内异症痛经模型的最佳方案。结果 除假手术组、雌激素 + 缩宫素组外, 各组小鼠移植均生长良好, 镜下可见子宫内膜腺体及间质细胞, 证实内异症造模成功, 与手术 + 缩宫素组、手术组相比, 手术 + 雌激素 + 缩宫素组、手术 + 雌激素组移植体积明显增大, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 手术 + 雌激素 + 缩宫素组扭体发生率 100%, 雌激素 + 缩宫素组扭体发生率 80%, 手术 + 缩宫素组扭体发生率 50%, 其余组未出现扭体反应, 组间差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 与手术 + 缩宫素组、雌激素 + 缩宫素组相比, 手术 + 雌激素 + 缩宫素组扭体潜伏期明显缩短 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), 扭体次数明显增多 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), 差异有显著性。结论 手术 + 雌激素 + 缩宫素组为建立内异症痛经模型的最佳方案, 方法简单易行, 可用于内异症痛经发病机制及药物治疗研究。

**【关键词】** 子宫内膜异位症; 痛经; 动物模型; 自体移植法

**【中图分类号】** Q95-33, R711.71 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 01-0083-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.01.017

## Establishment of a mouse model of endometriosis dysmenorrhea

CHEN Jing-wei<sup>1,2</sup>, TONG Rui-xiao<sup>1</sup>, FAN Li-jie<sup>1</sup>, SUN Xiao-huan<sup>1</sup>, MA Hui-rong<sup>2</sup>, DU Hui-lan<sup>1,2</sup>

(1. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center of Reproductive Disease for Integrative Medicine, Shijiazhuang 050091)

**【Abstract】** **Objective** To establish a BALB/c mouse model of endometriosis dysmenorrhea. **Methods** Auto-transplantation of uterine tissue into the peritoneum was applied to generate endometriosis model in 60 healthy, 6-8-week old female BALB/c mice. The mice were divided into 4 groups: operation + estrogen + oxytocin group, operation + estrogen group, operation + oxytocin group, and operation group. Besides, an estrogen + oxytocin group and sham operation group were also set up. Different regimens were applied to treat the mice from 1st to 12th day after operation, observed the writhing response, and collected tissue samples from the ectopic foci to examine the histopathological characteristics in order to screen the best regimen. **Results** Except for the estrogen + oxytocin group and sham operation group, the ectopic foci of all the other groups developed well. The lesion volumes of the operation + estrogen + oxytocin group and operation + estrogen group were significantly larger than that in the other groups ( $P < 0.01$ ). The incidence of writhing response of the operation + estrogen + oxytocin group was 100%, and there were statistically significant differences among different groups ( $P < 0.01$ ). The writhing latency and writhing frequency of the operation + estrogen + oxytocin group were significantly different from that in the other groups ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Operation + estrogen + oxytocin is the best method to establish a mouse model of endometriosis dysmenorrhea, and is simple to perform. This animal model can be used to investigate the mechanisms and treatment of endometriosis dysmenorrhea.

**【Key words】** Endometriosis; Dysmenorrhea; Mouse model; Animal model; Auto-transplantation

[基金项目] 河北省中医药管理局资助项目(编号:2008001)。

[作者简介] 陈景伟(1980-), 女, 讲师, 0311-86265227, E-mail: chenjingwei1999@126.com

[通讯作者] 杜惠兰(1960-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生殖调控障碍的证治规律研究。E-mail: duhuilan@163.com

子宫内膜异位症(endometriosis, EM, 简称“内异症”)是指子宫内膜腺体和间质异位并种植于子宫腔以外的部位,临床表现为痛经、不孕、月经不调、盆腔包块等。痛经往往是患者就诊的主要原因之一,并且严重影响患者的生活质量。近年来,众多学者对内异症痛经的机理进行了多方面的研究,但是内异症痛经的动物模型却未见报道。因此建立子宫内膜异位症痛经动物模型对研究本病发病机制及药物治疗有着深远的意义。本研究尝试建立近交系 BALB/c 小鼠子宫内膜异位症痛经模型,旨在寻求一种简便有效的造模方式,以期对内异症痛经的实验研究提供理想的动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

60 只清洁级近交系 BALB/c 雌性小鼠,6~8 周龄,体重( $20 \pm 2$ ) g,购自河北省实验动物中心【SCXK(冀)2008-1-003】,在恒温( $20 \sim 23^{\circ}\text{C}$ ),恒湿( $45\% \sim 60\%$ ),12 h 光照/黑暗交替循环中饲养。能自由获取食物和水,实验于河北医科大学中医院中药药理实验室进行【SYXK(冀)2011-0047】。

### 1.2 药品及试剂

补佳乐(戊酸雌二醇片),拜耳医药保健有限公司广州分公司产品,批号 222A;缩宫素注射液,上海禾丰制药有限公司,批号 120509;0.9% 氯化钠溶液,石家庄四药有限公司,批号 120731608;硫酸庆大霉素注射液,石药集团欧意药业有限公司,批号 068120311;5% 水合氯醛等。

### 1.3 实验方法

手术前两天以补佳乐 0.5 mg/kg 灌胃,使小鼠处于统一动情期(阴道涂片为大量无核角化细胞)。造模时用 5% 水合氯醛(6 mL/kg)腹腔麻醉<sup>[1]</sup>,碘伏消毒腹部皮肤,铺巾,内异症造模方法参考文献<sup>[2]</sup>并加以改进,尿道口上方约 3 cm 处正中开腹,切口约 2 cm,找到左侧子宫,在离卵巢约 1 cm 处,结扎子宫两头,剪下中间的一段子宫(约 2 cm),立即置于生理盐水中,分离附着于子宫浆膜面脂肪组织,纵形剖开子宫,并注意区分子宫内外面。在距腹部切口约 1.5 cm 处,将分离好的子宫组织内膜面紧贴在右侧腹壁,用无菌 4-0 可吸收线对角固定两头,庆大霉素 0.1 mL 留置腹腔,逐层连续缝合腹部切口,常规关腹。术后连续 3d 肌注庆大霉素 0.1 mL 预防感染<sup>[3]</sup>。术后待其自然苏醒,正常清洁饲养。造模

完成的小鼠按照随机原则分为 4 组,每组 10 只,①手术+雌激素+缩宫素组;②手术+雌激素组;③手术+缩宫素组;④手术组。另设雌激素+缩宫素组 10 只和假手术组 10 只,麻醉、开腹同上,只需找到左侧子宫,缝合腹部切口即可。术后按以下方案进行:手术+雌激素+缩宫素组术后 1~12 d 连续灌胃补佳乐 0.5 mg/kg,第 12 天给补佳乐后 1h,腹腔注射缩宫素每只 2 U;手术+雌激素组术后 1~12 d 连续灌胃补佳乐 0.5 mg/kg,第 12 天给补佳乐后 1h,腹腔注射生理盐水每只 0.2 mL;手术+缩宫素组术后 1~12 d 连续灌胃纯净水每只 0.2 mL,第 12 天腹腔注射缩宫素每只 2 U;手术组术后 1~12 d 连续灌胃纯净水每只 0.2 mL,第 12 天腹腔注射生理盐水每只 0.2 mL;雌激素+缩宫素组灌胃补佳乐 0.5 mg/kg 连续 1~12 d,第 12 天给补佳乐 1 h 后,腹腔注射缩宫素每只 2 U;假手术组灌胃纯净水每只 0.2 mL 连续 12 d,第 12 天腹腔注射生理盐水每只 0.2 mL。

### 1.4 取材及观察指标

#### 1.4.1 扭体反应

腹腔注射缩宫素后记录 30min 内小鼠扭体潜伏期及扭体次数。

#### 1.4.2 大体观察

扭体观察结束后,5% 水合氯醛(6 mL/kg)腹腔麻醉,逐层打开腹腔,观察异位灶形态并用双脚规测量移植物体积(长×宽×高,mm<sup>3</sup>)。

#### 1.4.3 组织形态学观察

测量体积后,迅速取出小鼠异位灶组织和子宫,立即置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚度连续切片,HE 染色,镜下观察子宫、异位灶的组织形态学特点。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对所测定结果进行正态性及方差齐性检验,组间比较用单因素方差分析,计数资料用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 内异症痛经建模成功标准

参考内异症模型标准及痛经模型标准拟定<sup>[4,5]</sup>,在内异症造模成功的基础上出现扭体反应即为建模成功:(1)移植物体积增大;(2)移植物表面有血管形成;(3)移植物呈小囊状,内含清亮液体;(4)病理检查移植物中有子宫内膜腺体和间质

细胞;(5)出现扭体反应。

### 2.2 扭体反应结果

手术 + 雌激素 + 缩宫素组 10 只均出现扭体反应,扭体发生率 100%;雌激素 + 缩宫素组 8 只出现扭体反应,扭体发生率 80%;手术 + 缩宫素组 5 只出现扭体反应,扭体发生率 50%;其余组均未发生扭体反应,扭体发生率组间比较差异有显著性( $P < 0.01$ ,  $X^2$  值 42.656)。与手术 + 缩宫素组、雌激素 + 缩宫素组相比,手术 + 雌激素 + 缩宫素组扭体潜伏期明显缩短,差异有显著性( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。手术 + 缩宫素组与雌激素 + 缩宫素组扭体潜伏期相比,差异有显著性( $P < 0.01$ )。与手术 + 缩宫素组、雌激素 + 缩宫素组相比,手术 + 雌激素 + 缩宫素组扭体次数明显增多,差异有显著性( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。手术 + 缩宫素组与雌激素 + 缩宫素组相比,差异无显著性( $P > 0.05$ )。见图 1(彩插 15),表 1、2。

表 2 各组扭体发生率的比较

Tab.2 Comparison of incidence rate of writhing response in different groups

组别 Groups	扭体个数 Number of writhing	未扭体个数 Number of non-writhing	扭体发生率/% Incidence rate	$X^2$ 值 $X^2$ value	$P$ 值 $P$ value
手术 + 雌激素 + 缩宫素组 Operation + estrogen + oxytocin group	10	0	100		
雌激素 + 缩宫素组 Estrogen + oxytocin group	8	2	80		
手术 + 缩宫素组 Operation + oxytocin group	5	5	50	42.656	0.000
手术 + 雌激素组 Operation + estrogen group	0	10	0		
手术组 Operation group	0	10	0		
假手术组 Sham operation group	0	10	0		

### 2.3 移植物大体观察

除雌激素 + 缩宫素组和假手术组外,其余组均见移植物生长,暴露腹腔可见部分移植物与周围脂肪组织粘连,分离粘连可见腹壁移植物生长良好,呈现隆起的小囊泡,内含清亮液体,表面有血管形成,囊泡大小不一。手术 + 雌激素 + 缩宫素组、手术 + 雌激素组移植物体积明显大于手术 + 缩宫素组及手术组,差异有显著性( $P < 0.01$ )。手术 + 雌激素 + 缩宫素组与手术 + 雌激素组差异无显著性( $P > 0.05$ );手术 + 缩宫素组与手术组差异无显著性( $P > 0.05$ )。见图 2(彩插 15),表 3。

### 2.4 病理学观察

镜下可见移植物已长成一个或数个腔样结构,腔内有分泌物,内层被覆腺上皮,柱状排列,与假手术组及在位子宫内膜相似,异位灶部分区域有腺体形成,假手术组子宫内层肌层厚,肌层的血管、腺体丰富,层次清晰。与假手术组子宫相比异位内膜的结构不完整,肌层薄,平滑肌的环形、纵行结构不清,

表 1 各组扭体次数及扭体潜伏期的比较

Tab.1 Comparison of writhing frequency and latency in different groups

组别 Groups	扭体潜伏期/s Writhing latency	扭体次数/次 Writhing frequency
手术 + 雌激素 + 缩宫素组 Operation + estrogen + oxytocin group	33.1 ± 9.11 *▲	22.6 ± 6.19 *▲
手术 + 缩宫素组 Operation + oxytocin group	97 ± 21.10▲▲	12.4 ± 5.13
雌激素 + 缩宫素组 Estrogen + oxytocin group	48.88 ± 16.61 *	17.00 ± 3.93
假手术组 Sham operation group	—	—
手术 + 雌激素组 Operation + estrogen group	—	—
手术组 Operation group	—	—

注:与手术 + 缩宫素组相比, \*  $P < 0.01$ ;与雌激素 + 缩宫素组相比,▲  $P < 0.05$ ,▲▲  $P < 0.01$ 。

Note: vs. operation + oxytocin group, \*  $P < 0.01$ ; vs. estrogen + oxytocin group, ▲  $P < 0.05$ ,▲▲  $P < 0.01$ 。

表 3 各组移植物体积的比较

Tab.3 Comparison of the implants volumes in different groups

组别 Groups	体积/mm <sup>3</sup> Volume
手术 + 雌激素 + 缩宫素组 Operation + estrogen + oxytocin group	42.62 ± 14.50 *▲
手术 + 雌激素组 Operation + estrogen group	36.30 ± 8.70 *▲
手术 + 缩宫素组 Operation + oxytocin group	20.16 ± 6.76
手术组 Operation group	19.06 ± 7.74
雌激素 + 缩宫素组 Estrogen + oxytocin group	—
假手术组 Sham operation group	—

注:与手术组相比, \*  $P < 0.01$ ;与手术 + 缩宫素组比,▲  $P < 0.01$   
Note: vs. operation group, \*  $P < 0.01$ ; vs. operation + oxytocin group, ▲  $P < 0.01$ 。

内膜中腺体、血管相对较少。见图 3(彩插 15)。

## 3 讨论

子宫内膜异位症动物模型是目前研究子宫内膜

异位症发病机制及评价药物疗效的常用方法,目前已有内异症相关造模方法,如自体移植法<sup>[6-8]</sup>、开放法建模<sup>[9]</sup>、注射法建模<sup>[10-12]</sup>等,各种造模方法各具特点<sup>[13]</sup>,其中自体移植法应用最为广泛。目前存在的内异症动物模型虽然从病理组织学角度符合内异症诊断的标准,但是却忽略了内异症相关临床特征的体现,如痛经、盆腔疼痛、不孕症等。痛经是困扰内异症患者主要原因之一,缓解痛经是临床治疗内异症的主要目的之一,内异症痛经的临床研究屡见报道,却缺乏相应的动物模型,因此本研究尝试采用不同方案建立内异症痛经模型,组间比较筛选最佳方案。

实验结果显示,手术+雌激素+缩宫素组、手术+雌激素组移植物体积明显大于手术+缩宫素组及手术组,说明手术联合雌激素刺激能够促进异位内膜组织生长,提高内异症造模的成功率,同时模拟内异症患者高雌激素水平状态。手术+雌激素+缩宫素组扭体发生率 100%,雌激素+缩宫素组扭体发生率 80%,手术+缩宫素组扭体发生率 50%,未施加缩宫素干预的方案均未发生扭体反应,说明扭体反应的发生与否主要受到缩宫素的影响。缩宫素可以直接作用于子宫肌细胞引起子宫收缩,诱发扭体反应,作用迅速,用药后 2~3 min 即发挥作用,但持续时间短,仅 20~30min,这与我们观察到的小鼠扭体反应多集中在肌注缩宫素 30 min 内是相一致的。此外缩宫素在引起子宫收缩的同时还可以刺激子宫内膜细胞释放 PGF<sub>2</sub> $\alpha$  参与内异症痛经的发生<sup>[5]</sup>。手术+雌激素+缩宫素组扭体潜伏期短而扭体次数多,与手术+缩宫素组及雌激素+缩宫素组差异明显,说明扭体反应出现的时间及扭体次数与内异症的存在及雌激素的刺激密切相关。EM 是一种雌激素依赖性疾病,高水平雌激素不仅能促使子宫内膜生长<sup>[14]</sup>,还能引起一系列内环境紊乱从而引起痛经<sup>[15]</sup>,其机制可能是增高的雌激素刺激前列腺素的产生参与内异症疼痛的发生<sup>[16]</sup>。根据实验结果,手术+雌激素+缩宫素组移物体积、扭体发生率、扭体潜伏期、扭体次数均优于其他组,从病理学角度符合内异症的诊断标准,从行为学角度符合痛经模型的标准,且由于雌激素的刺激,移植物体积增大明显,诱发的扭体反应潜伏期短,扭体次数多,因此确定为内异症痛经模型的最佳方案。其中自体移植手术是基础,术后连续 12d 给予雌激素一方面促进移植内膜生长,另一方面增强子宫肌对缩宫素的敏感性,作为痛经模型的致敏步骤,缩宫素作为致痛步骤引起子宫痉挛性收缩诱发扭体反应。

综上所述,本研究采用不同方案建立内异症痛

经模型,从病理学角度、行为学表现及大体标本三方面进行评价,并进行组间比较,筛选出手术+雌激素+缩宫素方案为最佳方案,造模周期短,成功率高,便于观察。此外本研究采用近交系 BALB/c 小鼠造模,近交系小鼠具有基因高度纯合,反应一致的特点,克服了普通动物的个体差异性,因此实验结果具有均一、重复性好的特点<sup>[17]</sup>,为内异症痛经的实验研究提供了有价值的动物模型。

(本文图 1~3 见彩插 15)。

#### 参 考 文 献

- [1] 张颖,曹洪,张昌军. 改良大鼠子宫内异位症模型的建立及微血管密度观察[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(1): 56-58.
- [2] 杨莉,周忠明. 小鼠子宫内异位症模型的建立及组织学观察[J]. 湖北中医学院学报, 2010, 12(5): 16-18.
- [3] 马芳,段彩芳,黄学惠. 等. 沙利度胺联合孕三烯酮对大鼠子宫内异位症血管生成的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(2): 134-138.
- [4] 刘学军,何援利. 子宫内异位症动物模型的建立及应用. 中国实用妇科与产科杂志, 2002, 18(7): 444-445.
- [5] 嵇波,张露芬,朱江,等. 痛经模型建立和评价方法的思考[J]. 中国药理学通报, 2008, 25(6): 711-714.
- [6] 孙群燕. NF-kappaB p50 基因敲除小鼠子宫内异位症模型的建立及其研究[J]. 现代实用医学, 2012, 24(6): 653-655.
- [7] 张薇,邹移海,张钟广,等. 大鼠深部浸润型子宫内异位症模型的建立和比较[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(9): 1042-1044, 1047.
- [8] 邓时贵,张娟,巫志峰,等. 小鼠子宫内异位症模型的建立及其异位内膜蛋白质的差异表达谱分析[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(7): 535-538.
- [9] 哈春芳,肖成明,张晟宁,等. 开放法大鼠子宫内异位症模型的建立与评价[J]. 山东大学学报(医学版), 2011, 49(1): 62-66.
- [10] 陈琼华,邱娜璇,颜晓红,等. BALB/c 小鼠子宫内异位症模型的建立及其形态学的动态观察[J]. 中国微创外科杂志, 2010, 10(3): 238-242.
- [11] 马丽,谢淑武,朱焰,等. 注射法小鼠皮下子宫内异位症模型及组织学观察[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(3): 192-195.
- [12] 周玲,钱志红,任琼珍. 皮下注射子宫内异位症建立 Lewis 大鼠腹壁子宫内异位症模型[J]. 江苏医药, 2012, 38(13): 1513-1515.
- [13] 彭艳,何援利. 大鼠子宫内异位症动物模型建立方法的比较[J]. 重庆医学, 2012, 41(25): 2619-2620.
- [14] Jiang J, Wu RF, Wang ZH, et al. Effect of mifepristone on estrogen and progesterone receptors in human endometrial and endometriotic cells in vitro[J]. Fertil Steril, 2002, 77(5): 995-1000.
- [15] 王文莉,段华. 子宫内异位症痛经机制的研究进展[J]. 中国微创外科杂志, 2009, 9(12): 1100-1102.
- [16] Giudice LC, Kao LC. Endometriosis[J]. Lancet, 2004, 364(9447): 1789-1799.
- [17] 吴献青,林秋华,丁晔,等. Lewis 大鼠子宫内异位症模型复制[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(1): 27-30.

[收稿日期] 2013-09-09