

提高大鼠子宫内膜异位症建模成功率的新方法

李龙卫,王艳云,陈琦,王亚萍,韩璐

(大连医科大学附属妇产医院暨大连市妇幼保健院,辽宁 大连 116033)

【摘要】 目的 为子宫内膜异位症治疗新方法的研究提供理想的动物模型。**方法** 取 64 只性成熟、未孕、动情周期规律的 SD 大鼠,于动情期在腹膜、皮下利用“刀划法”行自体子宫内膜移植,术后 4 周比较两移植部位建模情况。**结果** 大鼠动情期自体子宫内膜移植总体成功率为 93.3%,其中腹膜移植成功率为 51.7%,皮下移植成功率为 88.3%,两者比较差异有统计学意义;比较两部位异位病灶的体积,差异无统计学意义。**结论** 利用“刀划法”建立大鼠子宫内膜异位症模型成功率较高,皮下移植比腹膜移植成功率高。

【关键词】 子宫内膜异位症;模型;动物;动情期;啮齿

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0081-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.016

A new method for improving the success rate of the establishment of endometriosis models in rats

LI Long-wei, WANG Yan-yun, CHEN Qi, WANG Ya-ping, HAN Lu

(The Maternity Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian Maternal and Child Health Hospital, Liaoning Dalian 116033, China)

【Abstract】 Objective To provide ideal endometriosis animal models for research new treatment methods. **Methods** 64 Sexual mature without pregnant SD rats who has regular oestrous cycle were underwent operation that autologous endometrium were transplanted to peritoneum and subcutaneous with lancet gently cut tissue of where to transplant in the rut, and compared the model of peritoneum and subcutaneous after 4 weeks. **Results** The general success rate of autologous endometrium transplantation in rat estrus was 93.3%, and the peritoneum transplantation success rate was 51.7%, subcutaneous was 88.3%, the difference of the two place transplantation has statistical significance. Compare the two parts of volume of endometriosis, there was no statistically significant difference. **Conclusion** Using the lancet to establish the endometriosis model has a high success rate, and subcutaneous model is better than peritoneum.

【Key words】 Endometriosis; Model, animal; Estrus; Rodentia

子宫内膜异位症是女性常见良性疾病,近年来发病率呈明显上升趋势,因其在临床行为学上具有类似恶性肿瘤的种植、侵袭、远处转移等特点,影响育龄女性的心理健康及生活质量^[1],使得内异症成

为妇科研究领域的热点课题之一,减少内异症复发的新药也不断研发中,而良好的子宫内膜异位症模型有助于新的治疗方法的研究。因此,此研究旨在探索一种操作简单、成功率高且无人干扰动物激

[作者简介] 李龙卫(1987-),女,住院医师,硕士,妇产科, E-mail: longwei198787@163.com。

[通讯作者] 韩璐,女,教授,硕士生导师, E-mail: 13940801858@163.com。

素水平的子宫内膜异位症模型的建立方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

性成熟未交配清洁级 SD 雌性大鼠 65 只,鼠龄 60 ± 5 d,体重 200 ± 25 g,来源于大连医科大学实验动物中心【SCXK(辽)2013-0003】。标准光照周期(14 h 光照、10 h 黑夜)、室内温度($20 \pm 2^\circ\text{C}$)、湿度 40%~60%、标准饲料和水。无菌手术在大连医科大学动物实验室进行实验进行【SYXK(辽)2013-0006】。

1.2 器械及药品

普通眼科手术器械,电子游标卡尺,5% 水合氯醛,硫酸庆大霉素注射液,硫酸阿托品注射液,生理盐水,医用酒精,载玻片,复合碘消毒棉签及碘伏棉球,无菌敷料包,强生 4-0 可吸收缝线及华利康 4# 和 7# 丝线。

1.3 子宫内膜异位症模型的建立

每日晨 8:00 做阴道分泌物涂片检查,65 只大鼠中,动情周期规律的有 64 只,约为 3~5 d;动情周期不规律的有 1 只。于动情期分别进行手术。手术室室温 25°C ,电子消毒灭菌器行空气消毒。

手术当日,欲行手术的大鼠禁食水,术前称重,5% 水合氯醛按照 7 mL/kg 的用量腹腔内注射麻醉。麻醉成功后,于手术准备区腹部用备皮刀备皮,仰卧位固定大鼠四肢于手术台上,碘伏棉球消毒两次,铺无菌巾,于尿道口上 1 cm 沿腹正中线做 2~3 cm 纵切口,逐层入腹。探及左侧子宫,上距卵巢约 1 cm,下至子宫分叉处以上,结扎剪取约 2~2.5 cm 子宫,沿系膜纵行剖开,自一角用无齿镊钳夹子宫内膜,齿镊钳夹子宫浆膜层,“撕脱法”分离子宫内膜并残留少许肌层组织。将内膜剪成约 5×5 mm 的小段,临时置于腹腔内。腹膜移植:翻开一侧腹膜,寻找远离切口且有血管分支走行处用柳叶刀轻轻划毛腹膜,取小段的子宫内膜,将内膜面朝向腹膜,4-0 可吸收线固定四角(不宜形成张力),同法处理另一侧。皮下移植:锐性沿大鼠皮肤与肌层间隙分离出狭长“隧道”,亦找血管分支走行处用柳叶刀轻轻划毛肌层一侧,将内膜段的内膜面朝向肌层展平,无需缝合,同法处理对侧。腹腔内留置 0.4 mL(1.6 万单位)庆大霉素后分两层关腹。用碘伏将切口周围血渍擦净、切口包扎,单独置于干净饲养笼中,于婴儿抢救床保温直至苏醒。

术后第一日查看有无排便,予食水,肌注庆大霉素 0.1 mL/d 连续 3 d,若有嗝咬缝线导致皮肤缝合口裂开,可每日碘伏棉签消毒切口,并适当延长抗生素用药时间。

建模成功的评定标准:(1)建模成功肉眼观察标准:见到原部位移植物形成透明、半透明囊肿或紫兰色结节;(2)镜下病理检查诊断标准:移植物已生长成一个或数个腔样结构,腔内面的上皮、固有膜及固有膜的基质细胞、腺体样结构与在位子宫内膜相似,腔内可有分泌物和炎细胞存在,可见泡沫细胞反应,陈旧性出血,内膜上皮及上皮下可见少量含铁血黄素颗粒状沉积。腹膜移植有一处成模即算为成功,皮下移植亦如此。

1.4 观察指标

建模后第 4 周再次开腹手术,观察腹膜移植及皮下移植的成模情况;电子游标卡尺测量子宫内膜异位病灶的长、宽和高,并计算其体积(V)= $0.52 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{高}^{[2-3]}$;比较腹膜及皮下的建模成功率和病灶体积大小有无差异。

1.5 统计学处理

数据采用 SPSS13.0 统计软件进行处理,计数资料用 χ^2 检验(1/5 以上格子的期望频数小于 5,改用 Fisher 确切概率检验),计量资料进行对数转换,满足正态分布后使用方差分析,以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠存活及成模情况

64 只建模大鼠,有 3 只因麻醉导致呼吸道分泌物过多,手术当日窒息死亡;1 只术后第 5 天,因咬断皮肤缝线,于麻醉缝合后死亡。存活 60 只大鼠,4 周后再次剖腹探查。

成活异位病灶多呈椭球状或半球状,少数为不规则肾形或三角形,表面有血管生成,直径 2~8.7 mm 不等,质地软,囊内有透明液体或紫蓝色液体,腹膜病灶表面多与大网膜或肠管粘连(图 1D),总体建模成功率为 93.3% (56/60)。

组织学观察可见:异位病灶与子宫内膜结构基本一致,但间质层偏薄,腺体少,囊泡外周可见少量肌层组织残留(图 2B、C)。紫蓝色结节(图 1C)经组织学证实为异位病灶,腔内含中性粒细胞和泡沫细胞。可能与建模时刀划出血有关。

将咬断缝线再次麻醉缝合后死亡的大鼠解剖

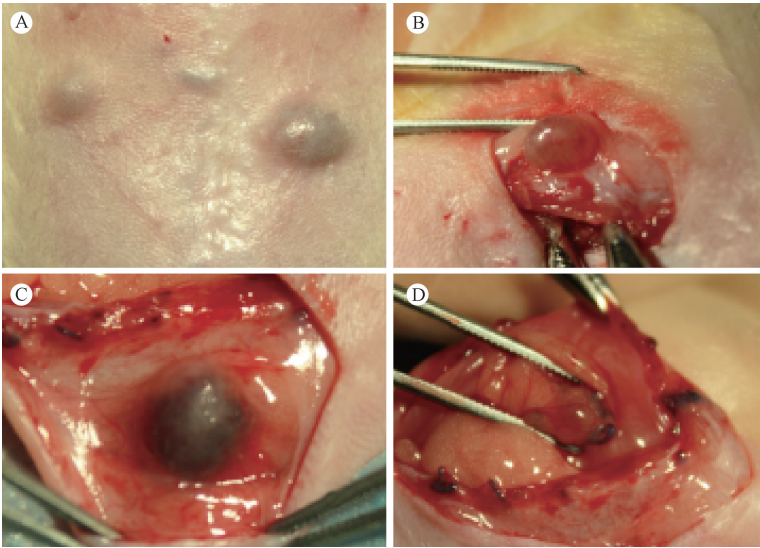


图 1 子宫内膜异位症病灶
Fig. 1 Endometriosis lesions



注:A. 子宫剖面图(×4);B. 子宫内膜异位灶剖面图(×4);C. 子宫内膜异位灶剖面图(×10);a. 子宫内膜层;b. 肌层;c. 浆膜层;d. 增生组织。

图 2 大鼠子宫及子宫内膜异位症病灶 HE 染色切片

Note: A. Uterine section, ×4; B. Endometriosis lesions section, ×4; C. Endometriosis lesions section, ×10; a. Endometrium; b. Myometrium; c. Serosa; d. Hyperplasia tissue.

Fig. 2 Rat uterus and Endometriosis lesions HE staining

表 1 建模大鼠腹膜移植与皮下移植成功率比较(%)

Tab. 1 The comparison of success rate between peritoneal transplantation and subcutaneous transplantation in rats(%)			
移植部位 Transplantation site	改进前 Before improvement (n = 15)	改进后 After improvement (n = 45)	总体 Total (n = 60)
腹膜成功率 Peritoneal success rate	20. 0(3/15)	62. 2(28/45)	51. 7(31/60)
皮下成功率 Subcutaneous success rate	86. 6(13/15)	88. 9(40/45)	88. 3(53/60)
χ ² 值	13. 393	8. 663	15. 404
P 值	0. 001	0. 003	0. 000

发现,皮下移植子宫内膜已基本成活,腹膜移植子宫内膜因缝合存在张力,未成活。此后的 45 只大鼠行建模手术时,移植到腹膜的子宫内膜均采用无张力缝合。

腹膜移植成功 31 例,成功率 51. 7% (31/60); 皮下移植成功 53 例,成功率 88. 3% (53/60); 两部

位建模成功率比较,差异有统计学意义($P < 0. 05$) (表 1)。

2. 2 腹膜及皮下异位病灶体积比较

建模后第四周再次开腹,测量异位病灶体积,腹膜移植病灶的中位体积为 14. 70 (2. 18, 126. 15) mm³,皮下移植病灶的中位体积为 18. 54 (1. 04,

249.02) mm³, 两部位病灶体积差异无统计学意义 ($P=0.609$)。

3 讨论

子宫内异位症是由子宫内膜组织(腺体和间质)在子宫体以外的部位生长、蔓延形成,以卵巢最为多见。1921 年 sampsons 首先提出异位种植学说,1984 年 Jone 等^[4-5]据此学说用动情期 SD 大鼠通过自体子宫内膜移植法建立内异症模型,亦有报道使用手术方法建立灵长类子宫内膜异位症动物模型,但由于此类动物费用昂贵、饲养要求高,使其应用受到限制。而大鼠自发性排卵、周期规律、费用较低,且大鼠子宫内膜异位症模型与人类子宫内膜异位症在组织学特点、炎症免疫等方面较相似,使其成为研究子宫内膜异位症治疗新方法的较理想动物模型^[6]。

文献报道的大鼠子宫内膜异位症建模成功率不尽相同,约 60%~90%,Do Amaral 等^[7]用自体移植法建立 Wistar 大鼠腹膜子宫内膜异位模型,移植时子宫内膜面向腹腔内缝合,术后 30 d ($N_1=15$) 成膜率 83.3%,术后 60 d ($N_2=15$) 成膜率 71.4%,两组病灶大小、数目差异无统计学意义。子宫内膜异位症为雌激素依赖性疾病,张颖等^[8]的研究术前术后均外源性给予雌激素,每日肌注雌二醇 0.1 mg/kg,建模成功率约为 90%。Pereira 等^[9]的研究显示建模时使用雌激素,可使异位病灶的湿重和干重显著增大。Ozer 等^[10]将 Wistar 大鼠带有肌层组织的子宫内膜缝合到血运较丰富的腹膜上,观察 14 d,EMs 造模成功率约为 89.6% (43/48),整个建模过程未使用激素类药物。此次研究建模过程亦未使用雌激素,总体建模成功率为 93.3%。外源性雌激素的使用虽然可以简化大鼠建模过程,提高建模成功率,但动物内异症模型的建立,部分是用于研发新药的疗效的观察,给予外源性雌激素的建模并非正常生理状态,对于内异症治疗新方法的安全性评估是否会造成干扰,目前尚没有相关报道。

卵巢型子宫内膜异位症可能发病机制之一为卵泡排出后卵巢的创面会有利于逆流的子宫内膜腺上皮和间质细胞种植,基于这一理论,本次子宫内膜异位模型的建立,首次采用“刀划法”,即选取腹膜及肌层表面有血管分支走行处、用柳叶刀轻轻划毛后再移植子宫内膜,术中操作注意刀划不宜过深,不能切断血管。其总体建模成功率为 93.3%,

在大鼠内异症建模已有报道的成功率中处于较高水平。

广泛粘连导致肠梗阻和感染是建模大鼠死亡的主要原因,哈春芳等^[11]实验中肠梗阻发生率为 10.81%,感染率为 29.72%。手术大鼠当日晨需禁食水,肠道空虚不仅易于手术操作,还可减少肠梗阻的发生,能有效减少大鼠死亡。手术器械消毒、术中无菌操作严格,可以减少盆腔脓肿的发生,减少大鼠死亡。术后拭净腹部切口周围的血迹,可以减少大鼠噬咬缝线,术后 7 d 内一旦发现咬线现象,应每日消毒腹切口,并适当延长抗生素的使用,不建议再次麻醉缝合,以免大鼠不能耐受麻醉死亡。术时或术后苏醒期若发现大鼠眼部分泌物增多,呼吸时间闻及湿啰音,应及时给予 0.1 mg 硫酸阿托品肌肉注射,可有效减少腺体分泌,减少窒息死亡的发生;术后苏醒期应将大鼠置于恒温保暖处,也可在笼底铺加热垫。

已有文献报道中认为腹膜移植及皮下移植建模成功率差异无统计学意义^[12-13],但本研究中腹膜移植成功率明显低于皮下移植,差异有统计学意义。分析原因,可能与腹腔内免疫监视、免疫杀伤细胞对异位内膜的清除作用较皮下强有关。且皮下移植无需缝合固定,能缩短手术时间,减少缝线引起的排异反应,提高建模成功率。另皮下异位病灶位置表浅,便于观察,可不必二次开腹,通过触摸腹部便可判断建模是否成功,能有效减少动物死亡。在用药治疗子宫内膜异位症的过程中,便于每日观察病灶变化,判断用药效果。

综上所述,使用“刀划法”建立皮下子宫内膜异位症模型,比腹膜移植建模成功率高,且无需外源给予雌激素,便能达到与激素建模相当的成功率,是一种提高大鼠子宫内膜异位症建模成功率的新方法,能为探索子宫内膜异位症治疗新方案提供理想的动物模型。

参考文献:

- [1] Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, *et al.* Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries[J]. *Fertil Steril*, 2011, 96 (2): 366-373.
- [2] 宋淑芳,尹利荣,齐之迎. 来曲唑治疗大鼠子宫内膜异位症模型作用及机制的研究[J]. *现代妇产科进展*, 2011, 20(1): 35-38.
- [3] Zulfikaroglu E, Islimy M, Aydin M, *et al.* Efficacy of anti-tumor necrosis factor therapy on endometriosis in an experimental

- rat model[J]. Arch Gynecol Obstet,2011,283(4):799-804.
- [4] Harirchian P, Gashaw I, Lipskind ST, *et al.* Lesion kinetics in a nonhuman primate model of endometriosis [J]. Hum Reprod, 2012,27(8):2341-2351.
- [5] Donnez O, Van Langendonck A, Defrere S, *et al.* Induction of endometriotic nodules in an experimental baboon model mimicking human deep nodular lesions[J]. Fertil Steril,2013, 99(3):783-789.
- [6] Greaves E, Cousins FL, Murray A, *et al.* A novel mouse model of endometriosis mimics human phenotype and reveals insights into the inflammatory contribution of shed endometrium[J]. Am J Pathol,2014,184(7):1930-1939.
- [7] Do Amaral VF, Dal Lago EA, Kondo W, *et al.* Development of an experimental model of endometriosis in rats[J]. Rev Col Bras Cir,2009,36(3):250-255.
- [8] 张颖,曹洪,张昌军,等. 改良大鼠子宫内膜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.
- [9] Pereira FE, Almeida PR, Dias BH, *et al.* Development of a subcutaneous endometriosis rat model [J]. Acta Cir Bras,2015, 30(1):6-12.
- [10] Ozer H, Boztosun A, Acmaz G, *et al.* The efficacy of bevacizumab, sorafenib, and retinoic acid on rat endometriosis model[J]. Reprod Sci,2013,20(1):26-32.
- [11] 哈春芳,肖成明,张晟宁,等. 开放法大鼠子宫内膜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.
- [12] 胡春萍,王志刚,季夏芸,等. 大鼠子宫异位症模型建立方法的比较[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(10):44-46.
- [13] 彭艳,何援利. 大鼠子宫内膜异位症动物模型建立方法的比较[J]. 重庆医学,2012,41(25):2619-2620.

[修回日期]2015-11-12