研究报告

宫腔注射无水乙醇对小鼠动情周期的影响

张引红,王春芳,郭　民,张锐虎,陈朝阳*

(山西医科大学实验动物中心,实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原　030001)

【摘要】　目的　探讨宫腔内注射无水乙醇对小鼠动情周期的影响。**方法**　利用阴道脱落细胞染色法选择动情期规律的小鼠 20 只,宫腔注射无水乙醇,术后第一个动情周期内每日测定其动情周期,随机择 10 只在第二个动情周期每 2 h 测一次,观察动情周期的改变程度。**结果**　实验小鼠宫腔注射无水乙醇后动情周期整体发生大幅度延长,且动情期、动情前期等各期时间均发生了不同程度的紊乱。**结论**　本实验通过观测无水乙醇损伤子宫后小鼠动情周期发生紊乱的现象,为临床无水乙醇的使用提供一定的实验基础。

【关键词】　无水乙醇;宫腔注射;动情周期
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2017) 05-0051-04
doi: 10.3969.j.issn.1671-7856. 2017.05.012

Effects of intrauterine injection of ethanol on estrous cycle in mice

ZHANG Yin-Hong, WANG Chun-fang, GUO Min, ZHANG Rui-hu, CHEN Zhao-yang*
(Department of Laboratory Animal Science, Shanxi Key Laboratory of Laboratory Animal and Animal Model of Human Diseases, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】　Objective　To investigate the effect of uterine cavity injection of absolute ethanol on estrous cycle in mice. **Methods**　Twenty mice with regular estrous cycle were selected by vaginal exfoliated cells staining, and then were injected absolute ethanol into their uterine cavity. The estrous cycle was observed and recorded every day. Ten mice were selected randomly to observe the changes of second estrous cycle every two hours. **Results**　After the injection of absolute ethanol into the uterine cavity of the experimental mice, the estrous cycle was greatly prolonged, and the various degree of disorder was observed in estrus and pre-estrus. **Conclusions**　The disorder was observed in estrous cycle of mice after the injection of absolute ethanol, which maybe provides some references for clinical use of absolute ethanol.

【Key words】　Ethanol; Intrauterine injection; Estrous cycle

作为一种采购方便、价格低廉且无毒的化学试剂,乙醇因其对细胞、组织的脱水和蛋白质变性作用在科研实验及临床中被广泛应用[1]。临床治疗中,常常利用无水乙醇直接接触异位、增生等异常的组织或器官进行损伤以达到治疗目的,尤以生殖系统疾病最为常见,如子宫内膜增生、子宫内膜异位、卵巢囊肿,以及子宫内膜炎引起的子宫内膜异常出血等[2,3]。但针对无水乙醇在治疗过程中可能对生殖系统带来的伤害,对内分泌系统可能存在的影响,暂无人进一步研究。规律的动情期作为小鼠生殖系统正常的一个重要指标,有着不可忽视的意义。本实验拟通过观测无水乙醇损伤子宫后小鼠动情期变化,为临床无水乙醇的使用提供一定的思路。

[基金项目]山西省实验动物资源共享服务平台建设(201605D121019);山西省重点实验室建设项目(2015012001-09)。
[作者简介]张引红(1972-), 女, 硕士生,实验师, 研究方向:实验动物学。E-mail:sxndzyh@163.com
[通讯作者]陈朝阳(1972-), 男,副教授, 研究方向:实验动物学。E-mail: ccytycn@163.com

1 材料和方法

1.1 实验动物

C57BL/6J 小鼠,SPF 级,雌性,6 ~ 8 周龄,体重 20 ~ 22 g,20 只,购自山西医科大学实验动物中心[SCXK(晋)2015 - 0001]。饲养于山西医科大学实验动物中心 SPF 级动物实验室[SYXK(晋)2015 - 0001]。饲养环境:温度(25 ± 2)℃ 和湿度(55 ± 2)%,自由采食饮水,光照/黑暗各 12 h。

1.2 主要试剂与仪器

无水乙醇(北京化工厂);醇溶性伊红染液(上海榕柏生物技术有限公司);戊巴比妥钠(Ceres Chemical);生理盐水(山东华鲁制药有限公司);研究级正置显微镜(Olympus IX51)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠动情周期观察

每日上午 8:00 做阴道脱落细胞涂片检查。将装有生理盐水的一次性灌胃针轻轻插入到小鼠阴道口,注入 0.1 mL 生理盐水冲洗阴道,用载玻片接取溢出的阴道冲洗液,并涂抹均匀,晾干。用 95% 乙醇固定 5 min,伊红染色液染色 1 min[1]。200 倍光镜观察阴道脱落细胞染色情况并记录。连续观察三个动情周期。剔除动情期不规律者。

1.3.2 宫腔灌注无水乙醇实验

择动情期规律小鼠在动情期当日进行实验。用 1.5 % 戊巴比妥钠麻醉实验小鼠,剂量为 75 mg/kg。将小鼠固定在实验台上,75% 乙醇对小鼠腹部进行消毒,尿道口上端约 1 cm 处纵行剪开皮肤,切口约 1 cm。逐层分离进入腹腔。拨离膀胱,可见 Y 状子宫。用无齿镊将子宫暴露于体外,周围覆盖无菌纱布。将子宫近输卵管端及近子宫颈端分别用血管夹夹住,拉直子宫,从近宫颈口插入 1 mL 注射器针头,缓慢注射无水乙醇至子宫充盈,等候 3 min,吸走乙醇。恢复子宫位置,用生理盐水冲洗腹腔。取出另一侧子宫,操作同上。关腹,逐层缝合[1]。

1.3.3 结果观察

术后次日继续测定实验小鼠动情周期,测定时间依旧为每日上午 8:00,测定频率为每日一次,将各期观察到的次数作为存在天数并记录。分析记录与术前动情周期及相关文献[8]持续时间的区别及各期变化。

参考第一周测定结果及相关文献记录,随机选择 10 只小鼠将动情周期测定时间变更为每 2 h 测一次(计数方法为测到一次算 2 h),进一步明确各期变化。

2 结果

2.1 小鼠动情周期

小鼠具有规律的动情周期,约为 4 ~ 5 d,周期内各期特征如下:(1)动情前期:大多为椭圆形的有核上皮细胞(见图 1A),持续时间较短;(2)动情期:90% 以上为无核角化细胞(见图 1B);(3)动情后期:为无核角化细胞和白细胞的混合状态(见图 1C);(4)动情间期:90% 以上为白细胞(见图 1D)。

2.2 术后小鼠周期状况

2.2.1 术后第一个动情周期内状态

计数方法为观察到一次算为 1 d。

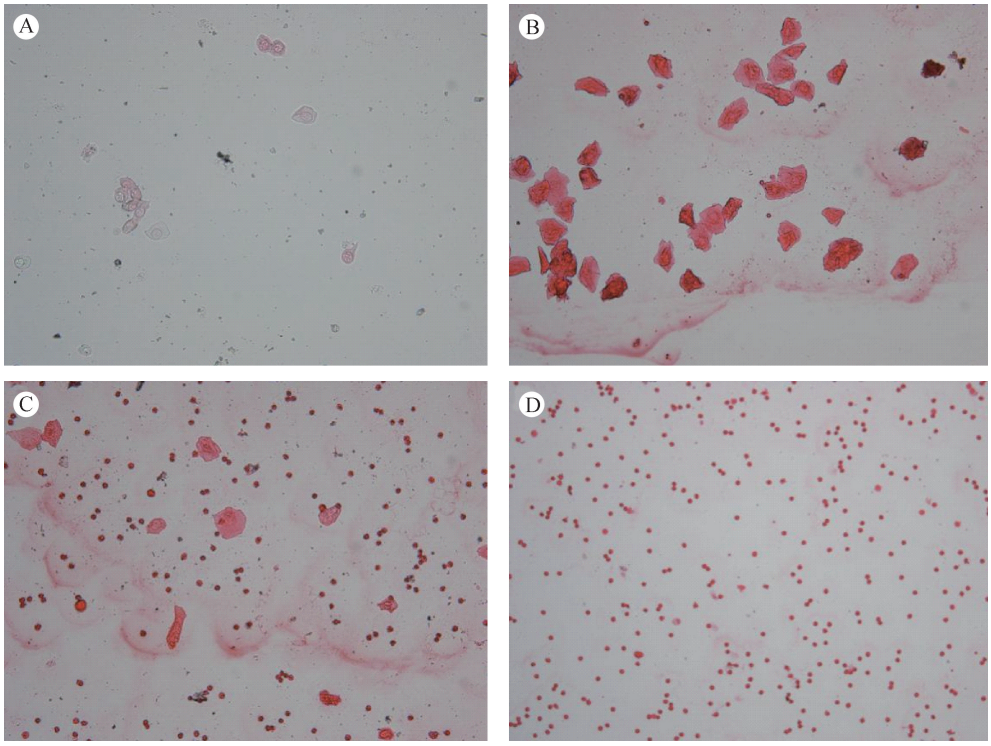
术后小鼠最明显的状况为大部分动情期延长至 2 ~ 3 d,个别甚至高达 4 ~ 5 d,导致整体的动情周期被大幅度延迟。另外,术后动情周期比较紊乱,大部分小鼠动情后期出现 2 ~ 3 d,超过文献记录[8] 12 h;1 只小鼠在经历了 3 d 动情期和 3 d 动情后期后,跳过动情间期和动情前期,直接进入新的动情期;四分之一的小鼠连续 4 ~ 5 d 处于动情间期;超过二分之一的小鼠动情后期结束越过动情前期,直接进入动情间期。具体情况参见表 1。

2.2.2 术后第二个动情周期状况

术后第二个动情周期开始,随机选择 10 只小鼠每隔 2 h 测定一次动情周期并记录。发现术后动情期、动情后期均存在不同程度的时间延长,尤以动情期延长最为明显。另外也观察到大部分小鼠的动情前期还是存在的,只是比文献显示时间相对缩短,因此测定频率较低的时候容易错过。也有个别小鼠未观察到动情期。具体情况参见表 2。

3 讨论

无水乙醇能使细胞脱水,细胞膜蛋白质变性、凝固、坏死,临床上广泛的用于治疗月经过多、子宫内膜增生、子宫肌瘤、卵巢囊肿、甲状腺结节、肝肾囊肿、肝癌及肺癌等[2-7]。同时,临床治疗中无水乙醇使用对医疗设备配置、医护人员技能均要求较低,治疗费用较少,安全性容易控制,因此得到了患者及医生的普遍认可并逐步成为首选[13]。



注:(A)动情前期;(B)动情期;(C)动情后期;(D)动情间期。

图 1　小鼠不同动情周期阴道涂片(×200)

Note. (A) Preoestrus stage; (B) Estrus stage; (C) Meterus stage; (D) Diestrus stage.

Fig. 1　Vaginal smears of the mice at different stages of estrous cycle

表 1　术后第一个动情周期状态(d)

Tab. 1　The state of the first estrous cycle after the operation

鼠号 Number	动情期 Estrus stage	动情后期 Meterus stage	动情间期 Diestrus stage	动情前期 Preoestrus stage	动情周期 Estrus cycle
1	4	1	2	0	7
2	3	2	3	1	9
3	3	2	3	0	8
4	2	1	5	0	8
5	3	3	0	0	6
6	3	1	5	0	9
7	4	2	2	0	8
8	2	3	3	0	8
9	2	1	4	0	7
10	5	1	3	1	10
11	3	3	2	0	8
12	3	2	4	0	9
13	4	1	3	1	9
14	3	2	2	0	7
15	3	2	3	0	8
16	2	3	2	1	8
17	2	2	4	0	8
18	3	2	3	0	8
19	3	1	2	1	7
20	3	1	3	1	8

表 2 术后第二个动情周期状况(h)

Tab. 2 The State of the second estrous cycle after the operation

鼠号 Number	动情期 Estrus stage	动情后期 Meterus stage	动情间期 Diestrus stage	动情前期 Preoestrus stage
文献	48	12	48 ~ 72	10
1	68	10	48	4
3	66	26	52	0
4	30	18	96	4
5	60	52	10	0
9	36	12	80	2
10	102	14	52	10
14	62	30	46	0
17	44	50	108	6
18	66	44	60	2
20	54	42	62	6

周云清等[10]在良性月经过多患者宫腔内注射无水乙醇的方法,达到减少月经量,迅速止血的效果。该方法操作简单、疗效高,且不需要特殊的仪器及操作训练。但该方法的远期疗效、副作用、复发率、失败原因等也都需要进一步探讨。刘家开等[11]在超声介导下通过腹部穿刺注射无水乙醇对卵巢囊肿患者进行治疗,成功率高达 98%,术后并发症及复发率均较低。李秀娥等[12]在超声引导下经皮下子宫肌瘤内注射无水乙醇,分别在术后 6 个月、12 个月观察子宫体积、肌瘤体积、内部血流临床症状等,发现子宫体积、肌瘤体积缩小,肌瘤内部及周边血流明显减少等症状,同时月经量明显减少,部分出现阴道出血及分泌物增多等副作用。石洪柱等在超声引导下宫腔注射无水乙醇治疗子宫内膜增殖症,成功率 100%,副作用较低,且短时间内均消失[4]。另外,同类治疗临床案例均有多次报道[5-7,13],但对术后生殖系统、月经周期、性激素等的影响均未进一步研究。同时,部分案例报道中患者要求为无生育计划者,大幅度缩小了无水乙醇法治疗受用者范围,忽视了无水乙醇对患者的生殖系统可能带来的影响[4,5]。

雌性小鼠具有规律的动情周期,大约为 4 ~ 5 d,在此周期内,由于受到雌激素、孕激素的影响,小鼠生殖系统及内分泌系统发生一系列组织学和生理学的变化[8,9]。阴道黏膜在雌激素及孕激素的作用下发生阴道黏膜细胞增生、角化、脱落的一系列活动[8]。在生殖研究类的以雌性小鼠为对象科研实验中,规律的动情周期作为生殖系统正常运转的重要指标之一,常常影响到实验的发展及进程。无水乙醇作为使用便捷用且创伤较小的一种治疗手段,伴随着日渐发达的超声引导技术,越来越多被应用到临床相关疾病的靶向治疗当中。然而,该方法可能会带来的副作用,尤其是不可逆的损伤,必须得到相关的重视,而不是忽视,或者选择性回避。

本实验通过小鼠宫腔注射无水乙醇,同时在实验过程中通过各种手段避免无水乙醇损伤卵巢、输卵管,保证其单一作用于小鼠子宫,从而进一步观察无水乙醇损伤子宫对小鼠动情周期的影响。实验结果发现实验小鼠的动情周期都发生了不同程度的延长,其动情各期也分别发生了不同程度的紊乱,猜测可能由于子宫受到损伤,影响了相关激素分泌,导致无法进行正常的循环。初步证明无水乙醇可能对实验小鼠的生殖系统产生了负面的影响,为临床使用无水乙醇提供了一定的选择思路,但对于该影响是否可逆,以及深层的紊乱影响机制,仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 高红. 大鼠薄型子宫内膜模型的建立和鉴定[D]. 中南大学, 2011:17 - 18.

[2] Hsieh CL, Shiau CS, Lo LM, *et al*. Effectiveness of ultrasound-guided aspiration and sclerotherapy wim 95% ethanol for treatment of recurrent ovarian endometriomas[J]. Fertil Steril, 2009,91(6):2709 - 2713.

[3] Noma J, Yoshida N. Efficacy of ethanol sclerotherapy for ovarian endometriomas[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2001, 72(1):35 - 39.

[4] 石洪柱,石福宝,王长庚,等. 超声引导下宫腔内注入无水乙醇治疗子宫内膜增殖症[J]. 中国超声诊断杂志,2003,4(3):219 - 220.

[5] 武传中,王勇,等. 刮宫术后宫腔内注入无水乙醇治疗子宫异常出血 38 例报告[J]. 山东医药,2001,41(22):47 - 48.

[6] 肖菊花,朱剑芳,叶军. 超声导引肝内乙醇注射术后动态观察及再生研究[J]. 中国超声医学杂志,2007,23(11):810 - 812.

[7] Huh K; Kwon TH; Shin US, *et al*. Inhibitory effects of DA - 9601 Oil ethanol-induced gastrohemorrhagic lesions and gastric xanthine oxidase activity in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2003, 88(2):269 - 273.

[8] 张俭,伍贤进,马岚,等. C57 BL/6 小鼠繁殖性能的观察与研究[J]. 实验动物科学与管理,2006,23(4):1 - 3.

[9] 李靖,李炫诚,吴云霞. 确定小鼠动情周期的三种方法[J]. 实验动物科学,2007,24(3):62 - 64.

[10] 周云清,吕国荣,李鲁宏. 无水酒精子宫腔内注射治疗良性月经过多[J]. 中国医师杂志,2002,4(11):1273 - 1274.

[11] 刘家开,朱梅,王静依. 超声引导介入治疗卵巢囊肿 180 例[J]. 华西医学,2011,26(8):1195 - 1196.

[12] 李秀娥. 超声引导下瘤内注射水乙醇治疗子宫肌瘤 50 例疗效观察[J]. 中国伤残医学,2008,6(2):51 - 52.

[13] 王金凤,田鹏,张睿. 超声引导下注射无水酒精治疗子宫肌瘤病人的护理[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2013,34(2):281 - 283.

〔收稿日期〕2017 - 01 - 20