

BALB/c 小鼠全子宫切除模型的建立及 机制探讨

常鹏环¹, 杨泽妹¹, 林 铃¹, 陈 霞¹, 林卫琼¹, 王海燕¹, 林莉香¹, 杨照新^{2*}

(1. 海口市人民医院妇产科, 海口 570208; 2. 海南医学院海南省药物安评中心, 海口 571199)

【摘要】 目的 建立 BALB/c 小鼠全子宫切除实验动物模型, 探讨和分析该模型的特征及形成机制。**方法** 分为空白对照组, 假手术组和模型组。空白对照组不予任何处理, 常规饲养; 模型组经腹行全子宫切除术; 假手术组仅切开皮肤, 暴露子宫。术后常规饲养, 动态观察各组小鼠体重变化, 于 4 周末检测外周血雌二醇含量及卵巢组织学改变。**结果** 术后各组实验小鼠均全部存活, 一般症状良好, 切口未见明显炎症, 完全愈合; 各组实验小鼠术前体重未见明显差异, 术后第 2 周末、3 周末和 4 周末, 模型组小鼠体重均高于对照组和假手术组 ($P < 0.05$); 模型组小鼠外周血雌二醇含量明显低于对照组和假手术组 ($P < 0.01$); 空白对照组和假手术组小鼠卵巢组织学检查未见异常, 模型组出现卵泡形态不规则, 颗粒细胞松散、凋亡等异常组织学改变。**结论** 该实验动物模型能够很好地模拟临床术后卵巢功能衰退等临床表现, 是研究子宫切除术后并发症及筛选药物理想的动物模型。

【关键词】 子宫切除术; 卵巢; 雌激素; 肥胖症; 动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0033-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.04.006

Establishment and mechanism of a BALB/c mouse model of total hysterectomy

CHANG Penghuan¹, YANG Zemei¹, LIN Ling¹, CHEN Xia¹, LIN Weiqiong¹, WANG Haiyan¹, LIN Lixiang¹,
YANG Zhaoxin^{2*}

(1. Haikou people's Hospital, Haikou 570208, China; 2. Hainan Medical College, Haikou 571199)

【Abstract】 Objective To establish a BALB/c mouse model of total hysterectomy and to investigate and analyze its characteristics and formation mechanism. **Methods** The control group was fed conventionally without any treatment. The mice in the model group were anesthetized and performed hysterectomy. The animals in the sham-operated group had abdominal cavity opened and only exposing the uterus. The changes of body weight were observed dynamically, and at the end of the fourth weeks. The concentration of serum estradiol was determined and histological structure of the ovaries was examined. **Results** The general status of all the mice after operation was good without obvious inflammation, and the incision healed completely. There was no significant difference in the body weight before operation among the mice, whereas the weight of model group mice was higher than the control group and sham-operation group at the end of the second, third and forth weeks ($P < 0.05$). The estradiol contents of the model group was significantly lower than that in control group and sham operation group ($P < 0.01$). The histological structure of ovaries in the control group and sham-

【基金项目】 海南省自然科学基金面上项目(817144)。

【作者简介】 常鹏环(1978—), 女, 硕士, 研究方向: 妇产科学。E-mail: 1500468054@qq.com

【通信作者】 杨照新(1973—), 男, 副研究员, 研究方向: 药物毒性病理学。E-mail: 277163400@qq.com

operation group was normal, however the model group showed differences, such as irregular shape of the ovaries, changed number of mature follicles, loosely distributed granulosa cells, and apoptosis. **Conclusions** The mouse model of total hysterectomy established in our study can well simulate the clinical manifestations of ovarian dysfunction after operation, and is an ideal model for the study of complications after ovariectomy and screening of drugs.

【Key words】 hysterectomy; ovary; estrogen; obesity; mouse model

全子宫切除术是妇科领域常见的手术,但近代研究表明全子宫切除术对卵巢内分泌功能具有一定程度的影响,易造成卵巢功能衰退^[1-3]。随着学者们不断的深入研究,全子宫切除术实验动物模型越发受到重视。本实验以 BALB/c 雌性小鼠为研究对象,建立全子宫切除术实验动物模型,并对术后卵巢内分泌功能以及组织形态等指标进行了研究和分析,以探讨该模型的优势及特点,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 雌性小鼠 24 只,体重 18 ~ 20 g, 4 ~ 6 周龄,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[SCXK(湘)2016 - 0002];所有动物饲养及无菌手术均在海南省药物安全性评价研究中心屏障动物实验设施内进行[SYXK(琼)2016 - 0013]。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀,福利伦理审查证号 2017006DE。

1.2 主要试剂及仪器

Estradiol Parameter Assay KIT (KGE014, 美国 RD 公司); Multiskan FC 型全波段酶标仪 (Thermo Scientific); VIP 3000 型气体麻醉系统 (美国 Matrx 公司)。

1.3 实验分组及模型建立方法

将 BALB/c 雌性小鼠随机分为空白对照组,假手术组和模型组,每组 8 只;空白对照组不予任何处理,常规饲养;模型组采用 MatrxVIP3000 型气体麻醉系统对实验动物进行持续气体麻醉,麻醉剂为异氟烷^[4-5]。待动物麻醉平稳后,取仰卧位,常规消毒腹部皮肤,于下腹正中横切约 0.5 cm 的切口 (见图 1 A),暴露子宫,分离左右侧双角子宫,在子宫角与卵巢连接处剪断子宫,并完整剥离子宫,切勿损伤卵巢及与子宫伴行的血管 (见图 1B)。然后在子宫颈口与阴道连接部位,先用 0 - 1 号手术线进行结扎 (见图 1C),在子宫颈结扎部位上方剪下子宫 (见图 1D),关闭腹腔,缝合皮肤并消毒 (见图 1E);假手术

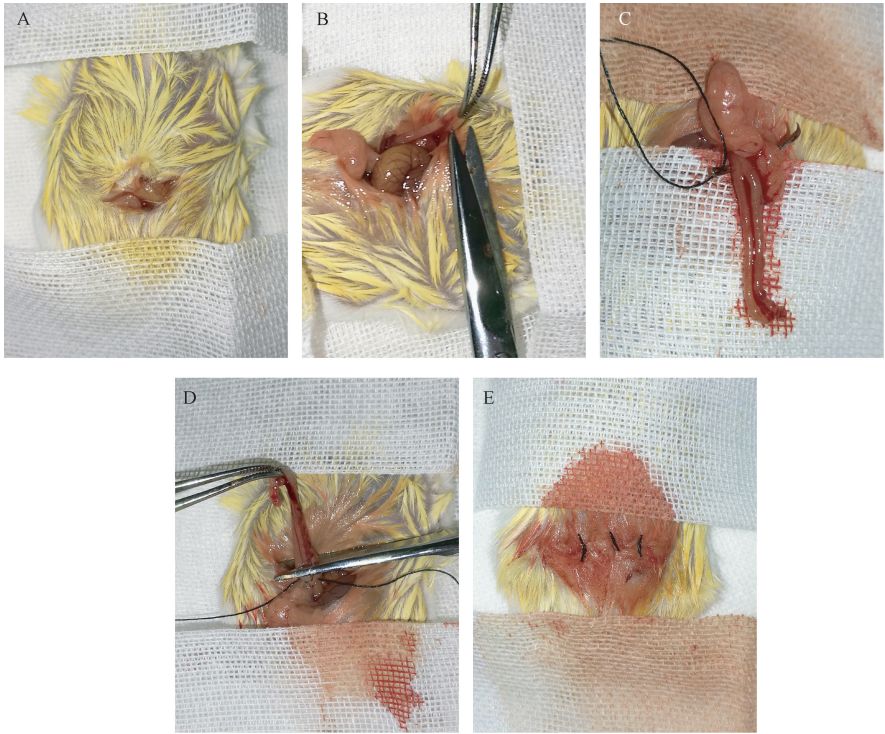


图 1 全子宫切除术式示例图
Fig. 1 Sample pictures of total hysterectomy in the mice

组麻醉后仅切开皮肤,暴露子宫,不做任何操作,于 5 min 后缝合皮肤,关闭腹腔;术前 12 h 禁食禁饮,术后常规饲养,自由饮食,术前术后记录动物体重。于术后 28 d,摘眼球采血,分离血清,采用 ELISA 法检测外周血雌二醇含量;分离左右侧卵巢,4% 中性甲醛固定,常规 HE 染色。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 15.0 软件包分析结果,数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般症状观察

小鼠术后 3 ~ 5 h 内清醒,少动,步态蹒跚,弓

背,轻微颤抖,痛苦状态,12 h 后缓解,并能自由饮食。术后饲养期间各组实验动物均未见明显行为及精神状态等异常表现,腹部切口未见明显渗出及炎症等表现,5 ~ 7 d 切口完全愈合。

2.2 体重变化

各组实验动物术前体重未见明显差异,2 周末和 3 周末模型组小鼠体重较对照组和假手术组高 ($P < 0.05$),至 4 周末已明显高于对照组和假手术组 ($P < 0.01$)。(见表 1)

2.3 外周血雌二醇变化

术后四周模型组小鼠外周血雌二醇含量明显低于对照组和假手术组 ($P < 0.01$),假手术组与空白对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。(见表 2)

表 1 各组实验动物术前及术后体重变化结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Tab.1 Changes of the preoperative and postoperative body weight in the mouse groups

组别 Groups	体重(g) Weight			
	术前 Preoperative	2 周末 End of the second week	3 周末 End of the third week	4 周末 End of the fourth week
空白对照组 Control group	19.6 ± 1.1	20.0 ± 1.4	20.7 ± 1.0	20.6 ± 1.0
假手术组 Sham-operated group	19.4 ± 1.3	19.9 ± 1.2	20.2 ± 1.1	20.3 ± 1.2
模型组 Model group	19.1 ± 1.5	23.0 ± 1.3 ^{**}	23.6 ± 1.7 ^{**}	24.3 ± 1.0 ^{**##}

注:与空白对照组比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$;与假手术组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. Compared with the sham-operated group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$.

表 2 各组实验动物外周血雌二醇检测结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Tab.2 Measurement of estradiol in the mouse groups

组别 Groups	雌二醇(pg/mL) Estradiol
空白对照组 Control group	53.37 ± 7.12
假手术组 Sham-operated group	57.15 ± 9.80
模型组 Model group	39.67 ± 11.54 ^{**}

注:与空白对照组比, $^*P < 0.01$;与假手术组相比, $^{\#}P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, $^*P < 0.01$. Compared with the sham-operated group, $^{\#}P < 0.01$.

2.4 卵巢组织学检查结果

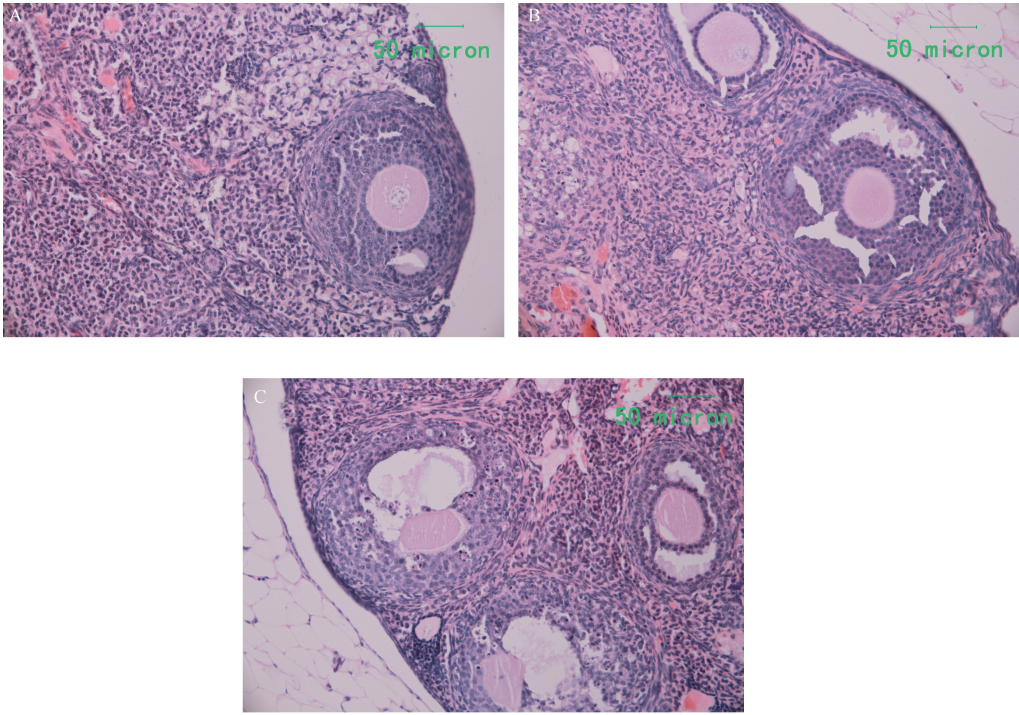
阴性对照组和假手术组为正常卵巢组织;模型组镜下多数卵泡形态不规则,可见偏位,颗粒细胞松散、固缩,部分凋亡。

3 讨论

全子宫切除术自初创以来已有百余年的历史,

是妇科领域常见的手术,适用于子宫肌瘤、恶性肿瘤等多种妇科疾病。但随着学者们不断的研究和发现,子宫不仅是一个受激素作用的靶器官,也是一个功能复杂的内分泌器官,切除子宫术后可影响卵巢的血运及卵巢功能,使卵巢功能衰退^[2-3],而仅仅切除输卵管,并不引起其功能衰退^[6]。随着研究的深入,该术式动物模型越来越受到学者的重视,本实验通过建立 BALB/C 种小鼠全子宫切除术模型,首次在该种小鼠身上模拟出全子宫切除术以及术后卵巢功能衰退、体重增加以及组织形态学等临床表现。该术式模型可满足机制和机理相关研究,并且具有模型动物存活率高,宜操作等优点,主要风险来源于麻醉意外和术后感染。

本研究通过检测外周血清雌二醇含量发现:该造模方法可使模型小鼠外周血雌二醇含量明显降低,较对照组和假手术组存在明显差异。目前已有大量研究表明绝经前行全子宫切除术,可使卵巢功能发生衰退^[7-8]。子宫除了是胎儿繁育场所,也参



注:(A) 阴性对照组;(B) 假手术组;(C) 模型组。
图 2 卵巢组织学检查结果示例图(×400)

Note. (A) Control group. (B) Sham operation group. (C) Model group.

Fig. 2 Examples of histological changes of the mouse ovaries

与调节局部及全身的生理、病理过程,维持机体精确的动态平衡,切除子宫不仅破坏了这种平衡,也使卵巢功能发生衰退^[9]。此外,子宫切除术由于邻近血管的结扎及术后粘连,也影响卵巢的血运,造成卵巢功能的早衰,使血清雌激素水平下降^[10]。这种卵巢功能的衰退和血供受损,在组织形态上主要表现为卵巢内卵泡数量减少及细胞凋亡、间质增生等^[11]。本研究中也发现模型组小鼠镜下多数卵泡形态不规则,可见偏位,颗粒细胞松散、固缩、部分凋亡,与文献报道基本一致。

雌激素对维持女性体重的稳定起着调节作用,在雌激素不足情况下会导致发热、情绪波动、肥胖等症状^[12]。使用雌激素替代治疗能够明显改善这些症状,减轻体重增加并阻止脂肪的重新分配^[13]。在本研究中模型组小鼠术后 2 周末体重已经开始升高,至 3、4 周末明显高于对照组和假手术组,与文献报道相符合。

下丘脑是能量平衡的调节器,在下丘脑中的一些区域,已被证明含有雌激素受体 ER α /ER β 。此外,在脂肪等组织也发现雌激素受体,这些受体被认为雌激素可以对脂肪组织有直接的影响作用^[14]。有文献表明:当雌激素受体缺失或雌激素减少时,

可导致体重增加^[15]。Campello 等^[16]也证实了雌二醇可通过诱导 3T3-L1 脂肪细胞转运载体-4 (GLUT-4) 的调控,提高胰岛素刺激的葡萄糖摄取率,改善胰岛素敏感性。在本研究中也发现模型组卵巢功能的衰退,雌激素分泌减少,可通过雌激素代谢调节作用,引起模型小鼠体重增加。

综上所述,本实验所采用的 BALB/c 种小鼠全子宫切除术模型,可在短时间内建立与人体相似症状和体征的动物模型,该模型可以很好的模拟人全子宫切除术后卵巢功能衰退、体重增加等发病过程,是研究子宫切除术后并发症及筛选治疗药物理想的动物模型。

参考文献:

[1] Atalay MA, Cetinkaya Demir B, Ozerkan K. Change in the ovarian environment after hysterectomy with bilateral salpingectomy: is it the technique or surgery itself ? [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016, 204: 57 - 61.

[2] Yuan H, Wang C, Wang D, et al. Comparing the effect of laparoscopic supracervical and total hysterectomy for uterine fibroids on ovarian reserve by assessing serum anti-mullerian hormone levels: a prospective cohort study [J]. J Minim Invas Gynecol, 2015, 22(4): 637 - 641.

- [3] 易清华, 凌晨荣, 陈克明, 等. 围绝经期妇女子宫良性疾病行子宫切除术同时切除双侧输卵管的临床应用价值探讨 [J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(2): 110-114.
- [4] 田树红, 王日超, 邢桂兰, 等. 裸小鼠肝癌原位移植模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 239-242, 247.
- [5] 荆喜中, 贾欢欢, 罗挺, 等. 小鼠腺毒症模型的建立和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 158-163.
- [6] Qin F, Du DF, Li XL. The effect of salpingectomy on ovarian reserve and ovarian function [J]. Obstet Gynecol Surv, 2016, 71(6): 369-376.
- [7] Singha A, Saha S, Bhattacharjee R, et al. Deterioration of ovarian function after total abdominal hysterectomy with preservation of ovaries [J]. Endocr Pract, 2016, 22(12): 1387-1392.
- [8] 丁森君, 路俊兰, 张慧女. 子宫肌瘤子宫全切术后患者卵巢内分泌功能的变化与研究 [J]. 中国性科学, 2015, 24(1): 26-28.
- [9] 涂蛟, 肖雁冰, 曹丽, 等. 全子宫与次全子宫切除术治疗子宫肌瘤对女性卵巢功能的影响 [J]. 实用妇产科杂志, 2016, 32(4): 278-281.
- [10] Sezik M, Ozkaya O, Demir F, et al. Total salpingectomy during abdominal hysterectomy: effects on ovarian reserve and ovarian stromal blood flow [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2007, 33(6): 863-869.
- [11] Tapisiz OL, Gungor T, Aytan H, et al. Does hysterectomy affect ovarian function? Histopathologic evaluation and serum FSH, inhibin A, and inhibin B levels in an experimental rat model [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008, 140(1): 61-66.
- [12] Hildebrandt BA, Racine SE, Keel PK, et al. The effects of ovarian hormones and emotional eating on changes in weight preoccupation across the menstrual cycle [J]. Int J Eat Disord, 2015, 48(5): 477-486.
- [13] Leeners B, Geary N, Tobler PN, et al. Ovarian hormones and obesity [J]. Hum Reprod Update, 2017, 23(3): 300-321.
- [14] Brown LM, Gent L, Davis K, et al. Metabolic impact of sex hormones on obesity [J]. Brain Res [J]. 2010, 1350: 77-85.
- [15] Frank A, Brown LM, Clegg DJ. The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation [J]. Front Neuroendocrinol, 2014, 35(4): 550-557.
- [16] Campello RS, Fátima LA, Barreto-Andrade JN, et al. Estradiol-induced regulation of GLUT4 in 3T3-L1 cells: involvement of ESR1 and AKT activation [J]. J Mol Endocrinol, 2017, 59(3): 257-268.

[收稿日期] 2017-10-20

(上接第 26 页)

- [14] Sternberg EM, Young WS, Bernardini R, et al. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(12): 4771-4775.
- [15] Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, et al. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(7): 2374-2378.
- [16] 卢晔芬, 郑荣远. 神经内分泌免疫网络与实验性变态反应性脑脊髓炎的关系 [J]. 中国临床神经科学, 2006, 14(4): 435-439.
- [17] 李冰, 刘军, 肖瑜, 等. 抗炎症因子与类风湿性关节炎关系的研究进展 [J]. 天津医药, 2016, 44(8): 1053-1056.
- [18] Ghilardi N, Ouyang W. Targeting the development and effector functions of TH17 cells [J]. Semin Immunol, 2007, 19(6): 383-393.
- [19] 高薇, 鲁静, 赵丽娟. 炎症细胞因子与类风湿关节炎 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(4): 450-453.
- [20] 苗平, 陆梅生, 张冬青. IL-6/IL-6 受体与类风湿关节炎关联性研究新进展 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(4): 355-360.
- [21] 程琦, 宋文刚, 王宁, 等. 类风湿性关节炎滑膜组织中 VEGF 表达及临床意义 [J]. 中国当代医药, 2011, 18(25): 70-71.
- [22] 安新, 高利常, 刘白鹭. 类风湿关节炎患者血清 MMP-13、sICAM-1、IL-10 检测的临床意义 [J]. 现代免疫学, 2014, 34(1): 52-55.
- [23] 寇永锋, 赵新秀. 类风湿性关节炎临床证型研究 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(4): 835-837.
- [24] 赵晓菲, 安高, 郭亚春, 等. 细胞因子在类风湿性关节炎中的研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2016, 33(1): 53-56.

[收稿日期] 2017-09-25