

- [8] 胡波, 胡志俊, 张有为, 等. 骨关节炎动物模型: 人工诱导与动物自发[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(33): 6202-6205.
- [9] 张荣凯, 叶志强, 陈琰, 等. 早期骨关节炎软骨下骨趋化因子信号通路的表达[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(11): 1925-1930.
- [10] 王栋栋, 熊健斌. 兔膝关节炎动物模型的构建[J]. 吉林医学, 2013, 34(33): 6883.
- [11] 黄永明, 潘建科, 郭达, 等. II 型胶原蛋白酶诱导 SD 大鼠膝骨关节炎模型的建立[J]. 广东医学, 2015, 36(8): 1145-1148.
- [12] 吴权, 李启运, 王素英, 等. 活血、温经、补益肝肾类中药对膝骨关节炎兔关节软骨形态的影响[J]. 中医正骨, 2014, 26(6): 15-18.
- [13] 石婷, 高戈, 阎祖炜, 等. 兔实验性骨关节炎六种血清学生物标志物的变化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(12): 1620-1623, 1628.
- [14] 曾卫, 向阳, 潘航, 等. NO 与骨关节炎的关系研究进展[J]. 生物技术世界, 2015(12): 88.
- [15] 张其亮, 李云, 刘红云. 骨关节炎患者关节液中白细胞介素-1 $\beta$ /肿瘤坏死因子- $\alpha$  与前列腺素-2 水平及意义[J]. 中国老年学杂志, 2015(24): 7237-7238.

收稿日期: 2016-01-03 修回日期: 2016-02-26 编辑: 王宇

## · 实验研究 ·

# 气滞血瘀型子宫内位症大鼠模型的复制

王哲<sup>1</sup>, 王家历<sup>2</sup>, 李明<sup>2</sup>, 高晓艳<sup>2</sup>

1. 山东中医药大学附属医院妇产科, 山东 济南 250011; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250014

**摘要:** **目的** 采用手术移植法或逆流法加用多因素整合方法建立子宫内位症气滞血瘀证大鼠模型, 以期为研究子宫内位症气滞血瘀证的病理机制和中西医结合治疗提供合适的动物模型。 **方法** 采用逆流法、腹腔种植和皮下种植 3 种方法建立大鼠子宫内位症模型, 采用药物加情志刺激等多因素干预方法造成气滞血瘀证候模型, 观察模型大鼠的外部体征和行为学表现, 在位和异位内膜的组织形态学表现, 对子宫内位症气滞血瘀证大鼠模型进行评价。 **结果** 移植大体呈小囊状, 色白透明或暗红, 显微镜下小囊具有子宫内膜的基本组织结构, 模型动物具有中医“气滞血瘀”的临床症状。各组之间异位内膜未发现有明显差异。 **结论** 气滞血瘀型子宫内位症造模方法简便易行, 周期短, 成活率高, 可应用于中医药研究。

**关键词:** 子宫内位症; 气滞血瘀; 动物模型; 大鼠

**中图分类号:** R-33 R 711.71 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)05-0682-03

子宫内位症(endometriosis, EMT)<sup>[1]</sup> 即有生长能力的子宫内膜(腺体和间质)出现在宫体以外部位, 在育龄妇女中发病率为 10%~15%<sup>[2]</sup>, 占常见妇科手术的 10% 左右, 临床表现主要为下腹痛、痛经、不孕和月经异常等, 药物期待治疗、保守治疗或者手术治疗后再此发病的几率也比较高<sup>[3-5]</sup>。虽然现代对 EMT 的研究逐渐深入, 但异位内膜来源至今尚未阐明, EMT 的治疗主要采用药物和手术, 效果不十分理想, 建立气滞血瘀型 EMT 的大鼠模型, 对进一步研究 EMT 的病因、发病机制以及治疗方法均具有重要的意义<sup>[6]</sup>, 临床研究表明, 在治疗 EMT 上中医疗效比西药更显著且副作用少。现代中医治疗该病的研究也常采用单纯的大鼠 EMT 模型, 而忽略了对证的造模, 以至于不能体现病与证之间的联系。本课题尝试

做到病证结合, 即以 EMT 的气滞血瘀证型为切入点, 采用自体内膜种植或经血逆流结合药物诱导、情志刺激等方法造模, 以期能为今后进一步研究该病的病理机制和中西医结合治疗效果提供合适的动物模型<sup>[7]</sup>。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康性成熟 10 周龄雌性 wistar 大鼠 40 只, 体重 200 g 左右, 由山东大学动物实验中心提供。许可证号: SCXK(鲁)20130009。标准光照周期(14 h 白光, 10 h 黑夜), 室内温度(21 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C, 湿度 45%~55%, 标准饲料和水。40 只大鼠随机分为对照组 10 只, 模型组 30 只。对照组不予造模, 模型组分别采用腹腔种植法(腹腔种植组, 10 只)、皮下种植法(皮下种植组, 10 只)、逆流法(逆流组, 10 只)进行 EMT 造模。

**1.2 实验器械及药品** 无菌手术器械及眼科剪, 大

鼠 ELISA 试剂盒,离心机,鼠固定板,显微镜,3.6%的水合氯醛,注射用青霉素钠,戊酸雌二醇,超净台及酒精碘伏常规消毒药品等。

1.3 动情期观察 仿动物实验学介绍,用细棉签以生理盐水湿润后轻缓插入大鼠阴道约 0.5 cm 取分泌物,做阴道脱落细胞涂片检查,以观察大鼠的动情期(阴道涂片为大量无核角化细胞时),直到所有大鼠均出现连续 2 个动情期,在第 3 个动情期分别对模型组大鼠进行手术。

#### 1.4 模型复制

1.4.1 EMT 造模 (1)种植法:依据杨萍等<sup>[8]</sup>在无菌条件下,以 3.6%的水合氯醛腹腔注射麻醉(用量:10 ml/kg)。对其下腹部进行备皮,并常规消毒,铺无菌洞巾,取尿道口上约 1 cm 处切开长 2~3 cm 的纵切口,进腹、暴露双侧子宫、输卵管,于离右侧宫角 1 cm、卵巢 1 cm 处结扎,并结扎子宫系膜上的血管,切除 1.5 cm 长的子宫组织。然后将取出的内膜放入无菌生理盐水。剪取大小约为 5 mm×5 mm 的内膜 2 块分别进行腹腔和皮下移植。①腹腔种植:将 1 块内膜用 5-0 丝线缝合在左侧腹肌<sup>[9]</sup>;②皮下种植法:右侧腹壁处,在皮下筋膜层腹肌之间打开一隧道口,然后将内膜组织置入该隧道之内,最后关腹,术后肌内注射抗生素 1 周,预防感染。(2)逆流法:开腹方式同种植法组,开腹后,暴露双侧子宫、输卵管,在子宫近输卵管 1 cm 处行 5 mm 的纵行切口,用特制毛刷搔刮子宫内膜 3~5 周,然后用眼科无齿平钳夹起子宫下段,将 2 ml 生理盐水经子宫、输卵管注入腹腔内,使子宫内膜组织逆行流入盆腔内,用 6-0 肠线缝合切口,最后关腹,术后肌内注射抗生素 1 周,预防感染。

1.4.2 气滞血瘀造模 在术后 1 周大鼠腹部切口基本愈合,按顺序行以下证候干预,每天随机选三种方法:(1)19 g/L 的肾上腺素皮下注射,0.2 ml/只;(2)食用油 1 ml/100 g 灌胃;(3)用贴有纱布的夹子夹住大鼠尾部,使之激怒,5 min/次;(4)倾斜:17:00~19:00,45°倾斜鼠笼 2 h;(5)束缚:10:40~12:40 将大鼠放置于束缚笼内(用铁丝网自制长约 30 cm,直径 8 cm 的圆筒,大鼠进入束缚笼后,笼口两端封住,让大鼠固定在内),限制自由活动 2 h;(6)冰水浴:分别在 9:40~9:45,14:40~14:45 行冰水浴 5 min;(7)禁食水:24 h;(8)昼夜颠倒:改变照明 24 h。造模结束后观察两周,常规喂养。

#### 1.5 观察指标与检测方法

1.5.1 大鼠一般行为及体征观察 观察大鼠的日常生活精神状态、活动情况、皮毛、四肢、舌质、大小便和饮食情况等。

1.5.2 血清 CA125 水平检测 测定实验前后血清 CA125 的值,以确定造模是否成功。

1.5.3 组织病理学观察 (1)移植物外观观察:于术后 5 周对大鼠剖腹,观察异位内膜大小及活性,确定异位内膜具有活性的标准:体积明显增大,肉眼呈白色透明或暗红囊肿,移植物被结缔组织覆盖并且有血管形成。(2)病理组织观察:在术后 5 周分别处死各组模型组大鼠,并取异位内膜和正常内膜,放在甲醛中固定,作石蜡切片,待观察。

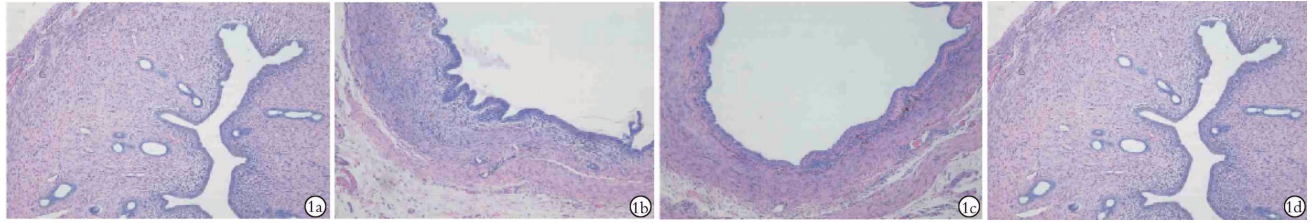
## 2 结果

2.1 大鼠行为、体征观察 造模成功后大鼠表现为:精神异常活跃,脾气暴躁,或喜蜷缩,易激惹,被毛耸立、色黯淡,贴边,尾部红紫不清洁,胡须下垂,眼球凸出,耳缘红紫,四肢青紫,不思饮食,大便干结舌质紫黯等。

2.2 大鼠成模率情况 用游标卡尺测异位病灶长、宽、高,根据 Katsuki 方法:体积(V)=长×宽×高。成模标准:异位内膜生长成椭圆形或圆形样囊肿或囊泡,内有透明或黄色的液体积聚,部分可见液体流出,味腥臭。囊肿表面有血管形成。大鼠共 30 只,造模成功数有 23 只,成功率为 76.7%。腹腔种植组建模数 10 只,成模数 8 只,成模率 80%。皮下种植组建模数 10 只,成模数 7 只,成模率 70%。逆流法组建模数 10 只,成模数 8 只,成模率 80%。

2.3 各组大鼠血清 CA125 水平测定结果 腹腔种植组、皮下种植组、逆流法组血清中 CA125 水平分别为(8.18±0.80)U/ml、(8.25±0.98)U/ml、(8.38±0.81)U/ml。各模型组血清中 CA125 含量均高于正常大鼠组[(5.03±0.68)U/ml],差异有统计学意义(P均<0.01),3 种造模方法组之间相比无显著差异(P>0.05),说明造模后 CA125 的值均升高,表明造模成功。

2.3 组织病理学改变 移植物大小呈小囊状,色白透明或暗红。显微镜下大鼠正常子宫内膜上皮细胞排列完整,肌层较厚,结构完整,腺体和血管丰富。模型组异位内膜的上皮细胞扁平,肌层较薄,结构不清,各模型组之间异位内膜未发现有明显差异。见图 1。



1a:正常大鼠子宫内膜;1b:腹腔种植法异位内膜;1c:皮下种植法异位内膜;1d:逆流法异位内膜

图1 各组病理组织形态观察(HE染色,×200)

### 3 讨论

中医治疗 EMT 的临床研究相对较少,考虑西药对本病的治疗效果常不是很理想,且有较大的副作用,给患者带来痛苦,而中药的副作用不明显,所以考虑通过研究根据中医辨证论治治疗本病。故在造模时候对病和证均兼顾是实验的关键。本实验研究造模方法是两种造模方法的叠加,即在复制 EMT 模型后给予多因素联合的气滞血瘀证造模方法,从而建立气滞血瘀型 EMT 的大鼠模型,并通过观察宏观症状、测定微观指标和病理组织,评价确定造模是否成功和其成功率。子宫内膜组织种植于大鼠腹肌、皮下后或经血逆流后形成的模型,镜下均可找到一个或数个囊腔样组织,腔内有分泌物和炎症细胞存在。现代常见的气滞血瘀型造模方法较多,但已知操作中通常采用局限的几种造模方法,本实验旨在采用多因素结合,以期可以更有效且更快的达到气滞血瘀。本研究通过模拟 EMT 形成的内外环境因素,采用自体内膜移植结合多因素整合建立气滞血瘀型 EMT 大鼠模型,并对模型动物的症状、体征、病理学形态、微观指标等方面进行评价,结果表明该模型基本符合气滞血瘀型 EMT 大鼠的宏观表现和微观特征。认为其可以作为研究该病的病因、病机、诊断及治疗方法的动物模型。气滞血瘀型 EMT 大鼠模型的制作符合中医辨证论治的思想,也为中医中药治疗本病提供较好的模型,可以达到与西药治疗效果更直观的比较。

现代主要以手术方法建立子宫内膜异位症动物模型<sup>[8-9]</sup>,以往经典的 EMT 造模方法即将大鼠自体内膜组织经手术直接种植在身体的其他部位,如缝合

于卵巢表面、腹壁、子宫直肠陷凹<sup>[10]</sup>。而本实验的创新点在于采用的经血逆流法是模拟人体子宫内膜异位症形成的主要机制—经血逆流造模,贴近于临床发病实际。在实际操作过程中发现,该方法具有操作简单、直观、损伤小等优点。

### 参考文献

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社,2010:325.
- [2] 金仙玉,文晓燕,张海珍. 子宫内膜异位症动物模型建立及应用的研发现状[J]. 大连医科大学学报,2007,29(5):506-508.
- [3] Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, et al. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions [J]. *Reproduction*, 2006, 132(3):501-509.
- [4] 张颖,曹洪,张昌军. 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.
- [5] 张春斌,谈西满,罗佳滨,等. 子宫内膜异位症动物模型的研究现状及进展[J]. 黑龙江医药科学,2008,31(3):80-81.
- [6] 刘丹彤,马小娜,张小勇,等. 子宫内膜异位症气滞血瘀型大鼠模型的建立及评价[J]. 中医药学报,2012,40(2):31-35.
- [7] 杨萍,纳冬荃,熊亚龙,等. 大鼠子宫内膜异位模型的建立与组织学观察[J]. 中国实验动物学报,2006,14(2):139-141.
- [8] 常暖,韩冰,同玺. 大鼠子宫内膜异位症模型的建立及其病理学观察[J]. 临床与实验病理学杂志,1998,14(1):67-69.
- [9] Defrère SI, Colette S, Lousse JC, et al. Review: luminescence as a tool to assess pelvic endometriosis development in murine models. [J]. *Reprod Sci*, 2009, 16(12):1117-1124.
- [10] Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis [J]. *Hum Reprod Update*, 2007, 13(4):331-342.

收稿日期:2015-10-21 修回日期:2015-11-20 编辑:王娜娜