

· 基础研究 ·

大鼠子宫内膜异位症动物模型建立方法的比较

彭艳[#], 何援利[△]

(南方医科大学珠江医院妇产科, 广州 510282)

摘要:目的 采用腹腔种植、皮下移植和皮下注射 3 种方法建立大鼠子宫内膜异位症模型, 探索一种简便有效的子宫内膜异位症造模方法。方法 取性成熟雌性大鼠 15 只, 分别采用腹腔种植、皮下移植和皮下注射将自体子宫内膜组织异位移植, 术后 4 周取出异位组织, 进行组织形态学观察。结果 3 种造模方法成功率及异位病灶体积均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 3 种方法均可以建立大鼠子宫内膜异位症模型, 皮下种植法操作简单, 观察直观, 便于实验研究。

关键词: 子宫内膜异位症; 疾病模型, 动物; 实验室技术和方法; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.25.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)25-2619-02

Comparison of endometriosis model establishment methods in rats

Peng Yan[#], He Yuanli[△]

(Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

Abstract: Objective To establish the rat model of rat endometriosis by three ways of abdominal transplantation, subcutaneous transplantation and subcutaneous injection in order to search for a more convenient and effective method to establish the endometriosis model. Methods 15 adult female Wistar rats were performed the heterotopic transplantation of uterine tissue by abdominal transplantation, subcutaneous transplantation and subcutaneous injection. Heterotopic tissues were taken for pathological examination on 4 weeks after surgery. Results The success rate of establishing model and the volume of heterotopic endometrial tissues had no statistical difference among three ways. Conclusion We establish the rat endometriosis models in three ways. But subcutaneous transplantation is easier, direct-viewing and convenient for experimental study.

Key words: endometriosis; disease models, animal; laboratory techniques and procedures; rats

子宫内膜异位症是指有生长功能的子宫内膜组织出现在子宫腔被覆黏膜以外的身体其他部位的疾病。临床症状可表现为盆腔痛、月经失调、不孕、盆腔包块等^[1], 在育龄妇女中发病率高达 10%~15%^[2], 严重困扰着广大妇女的身心健康。目前子宫内膜异位症的发病机制仍不清楚, 药物和手术治疗后的复发率较高, 治疗效果不理想。子宫内膜异位症动物模型是研究内异症发病机制、治疗方法的主要途径, 所以建立子宫内膜异位症动物模型, 为进一步研究内异症的发病机制、治疗方法等奠定基础, 有着深远的研究意义^[3]。目前国内外已有相关的造模方法, 但是造模方法和成功率存在差异。因此, 本研究旨在探索一种操作简便而且成模率高的子宫内膜异位症动物模型的建模方法。

1 材料与方 法

1.1 材料 (1) 实验动物: 性成熟雌性 Wistar 大鼠 15 只, 体重 150~200 g, 标准光照周期 (14 h 白光, 10 h 黑夜), 室内温度 (20±2)℃、湿度 40%~50%、标准饲料和水。(2) 实验器械及药品: 普通手术器械及眼科剪; 3.6% 的水合氯醛、氨苄西林及常规消毒药品等。

1.2 方 法

1.2.1 手术方法 经阴道涂片检查, 在大鼠动情周期的动情期进行手术造模。根据杨萍等^[4]手术在室温 28~32℃ 环境下进行, 无菌操作, 以 3.6% 的水合氯醛 10 mL/kg 进行腹腔注射麻醉。腹部备皮, 常规消毒后取大鼠下腹正中、耻骨联合上 1 cm 切口 (长 2~3 cm), 进腹后在膀胱背侧找到子宫。近端离右侧子宫角 1 cm 处结扎, 远端离卵巢 1 cm 处结扎。将切下的

子宫组织放入盛有无菌生理盐水的培养皿中纵剖剖开。将子宫内膜与肌层分离 (部分子宫内膜较薄、与肌层粘连紧密者, 内膜与肌层不分离, 只剥去浆膜层), 剪取 3 块 3 mm×5 mm 的内膜, 分别进行腹腔种植、皮下移植和皮下注射法进行子宫内膜异位移植建模。(1) 腹腔种植法: 将 1 块内膜组织用 5-0 丝线缝 1 针固定在左侧远离腹部切口的腹壁上。(2) 皮下移植法: 在腹壁切口右侧从腹肌与皮下筋膜层之间打隧道, 以正好能置入子宫内膜片为宜, 取 1 块子宫内膜组织平整的置入右侧隧道底部。(3) 皮下注射法: 取 1 块内膜组织修剪成 0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm 大小的内膜碎片, 用 9 号头皮针头连接 1 mL 注射器吸取含内膜碎屑的生理盐水, 在尽量远离腹壁切口处皮下注射。0 号丝线分层缝合腹部切口, 常规关腹。术毕肌内注射 16 万 u/kg 氨苄西林。术后正常喂养, 观察大鼠伤口及生活情况。

1.2.2 观察指标 4 周后再次剖腹观察移植物生长状况, 同时切取移植物送病检。根据子宫内膜异位症病理诊断标准, 镜下出现子宫内膜、腺体或腺体样结构、间质和出血这 4 种改变中的 2 种可确诊造模成功。观察腹腔种植、皮下移植和皮下注射法的成模情况。游标卡尺测量内膜异位症病灶的长、高和宽, 计算病灶体积 (V)=0.52×长×宽×高^[5]。比较 3 处病灶的成模率及病灶体积大小。取异位内膜病灶和左侧未行手术的在位内膜标本置于 4% 多聚甲醛固定 24 h 常规脱水, 石蜡包埋, 切片厚 3 μm, HE 染色观察组织病理学变化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析。计数资料用 χ^2 检验, 计量资料用方差分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以

[△] 通讯作者, E-mail: heyuanli310@yahoo.com.cn. [#] 南方医科大学 2009 级在读博士生。

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 成模情况 造模大鼠 15 只,均存活。异位病灶组织形态相似,外观表现为体积增大,呈透明的囊状,质地软,囊内有清亮的液体积聚。在腹腔种植处 15 只大鼠均可见异位病灶,呈单个圆形,表面与大网膜粘连包裹(封 3 图 1a)。在皮下移植处 14 只大鼠可见异位病灶,经皮肤均可触及,呈单个球型突起,表面被结缔组织覆盖并有血管形成(封 3 图 1b)。在皮下注射处 13 只大鼠可见异位病灶,经皮肤均可触及,呈单个椭圆形或圆形突起,表面被结缔组织覆盖并有血管形成,其内可见 1~3 个清亮小水泡黏附聚集生长(封 3 图 1c)。腹腔种植、皮下移植和皮下注射法的造模成功率分别为 100%、93.3% 和 86.7%,差异无统计学意义($P = 0.343$)。

2.2 3 种建模方法的异位病灶体积比较 造模 4 周后 3 种建模方法的异位病灶体积大小差异无统计学意义($P = 0.09$)。见表 1。

表 1 3 种方法造模病灶体积比较($\bar{x} \pm s, \text{mm}^3$)

造模方法	病灶体积
腹腔种植	21.50 ± 12.42
皮下移植	28.60 ± 7.61
皮下注射	20.79 ± 9.36

2.3 组织学光镜检查 3 种造模方法异位病灶显微镜下形态相似。异位病灶生长成 1 个或多个腔样结构,可见腺上皮及间质细胞生长并见腺体形成,腔内壁所衬的上皮细胞层以柱状上皮或立方状细胞形成环形或锯齿状生长,部分上皮细胞可见核下空泡。腺体结构与大鼠正常子宫内膜腺体结构相似,见封 3 图 2。

3 讨 论

自 1860 年首次报道子宫内膜异位症以来,其发病机制至今尚未完全明了。建立理想的动物模型模拟人类子宫内膜异位症,才能有助于研究子宫内膜异位症的病因、发病机制、治疗及预防对策。子宫内膜异位症常用的动物模型有猴、狒狒、大鼠等。猴和狒狒像人一样有月经,是最理想的动物模型,但是价格昂贵、饲养复杂,限制其在实验室广泛使用。大鼠在研究子宫内膜异位症的发病机制和治疗方面运用最多最广^[6-7]。大鼠虽无月经,但其动情周期与人月经周期相似,有一定规律性。利用阴道涂片观察其动情期,在大鼠动情期制作子宫内膜异位症模型,造模成功率高,模型使用可靠。本实验在动情期造模,子宫内膜异位症造模成功率达到 86.7%~100%。

手术移植法是建立子宫内膜异位症动物模型的主要方法^[1]。经典的子宫内膜异位症造模方法为将大鼠自体子宫内膜手术移植至腹腔内单一部位,如缝合于腹壁、卵巢表面、子宫直肠陷凹^[8]。亦有报道将子宫内膜组织移植于皮下(腹肌与皮下筋膜层之间),造模成功率与腹腔种植无差异,有内膜固定好,免去手术缝合,操作简单等优点^[9-11]。亦有报道皮下注射法造模成功率高于皮下移植法^[12]。但是王宁宁等^[13]报道皮下移植法和皮下注射法在造模成功率和病灶体积无差异。本实验比较腹腔种植、皮下移植和皮下注射 3 种方法的子宫内膜异位症造模成功率差异无统计学意义($P > 0.05$)。种植物组织形态相似,体积大小无明显差异。因此,3 种造模方法均可以较好的建立大鼠子宫内膜异位症模型。相对于腹腔种植法,皮下移植法无需缝合子宫内膜组织,符合自然黏附原则,避免缝线的异物刺激改变子宫内膜异位症病灶周围的微环境,并且

病灶位于皮下,观察直观,可进行动态观察,更适用于子宫内膜异位症病灶的连续性观测及治疗研究。相对于皮下注射法,皮下移植法无需将内膜组织修剪成小碎片,操作简单快速,造模成功率无差异。

综上所述,3 种方法均可以建立大鼠子宫内膜异位症模型,但皮下种植法操作简单,观察直观,便于动态观察和连续性实验研究。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 金玉玉, 文晓燕, 张海珍. 子宫内膜异位症动物模型建立及应用的研究现状[J]. *大连医科大学学报*, 2007, 29(5): 506-508, 514.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Berkley KJ, Dmitrieva N, Curtis KS, et al. Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101(30): 11094-11098.
- [7] Defrere S, 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 杨芳, 马颖, 何援利. VEGF 在人子宫内膜异位症裸鼠模型组织中的表达及意义[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(5): 816-818.
- [11] 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.
- [12] 马丽, 谢淑武, 朱焰, 等. 注射法小鼠皮下子宫内膜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.
- [13] 王宁宁, 张红霞, 丁慧娟, 等. 皮下移植和皮下注射构建子宫内膜异位症皮下模型的比较研究[J]. *解放军医学杂志*, 2009, 34(12): 1419-1422.