

大鼠子宫肌瘤模型的建立以及雌孕激素两种联用方法造模结果的比较

吴晓贞, 何嘉仑, 刘思诗, 马丹丽

广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 建立子宫肌瘤大鼠模型并比较两种模型制备方法的优劣。方法: 27 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、全程联用组、后期加入孕激素组。正常对照组: 每周 3 次仅肌注生理盐水, 持续 12 周。全程联用组: 全程每周 3 次肌注苯甲酸雌二醇 0.05 mL, 及每周 1 次肌注黄体酮 0.05 mL, 连续 12 周进行造模。后期加入孕激素组: 开始每周 3 次仅肌注苯甲酸雌二醇 0.05 mL, 连续 8 周, 从第 9 周起每周 1 次加注黄体酮 0.05 mL, 连续 4 周, 整个造模过程持续 12 周。观察大鼠子宫形态, 检测血清雌激素受体 (ER) 和孕激素受体 (PR) 水平及大鼠子宫 ER、PR 的表达。结果: 正常对照组大鼠子宫质地均匀, 未见结节或囊肿, 后期加入孕激素组和全程联用组 2 个模型组大鼠解剖时可见子宫形态改变、增生, 个别子宫角可见肿块。正常组大鼠子宫平滑肌肌层较薄, 平滑肌细胞细长, 排列整齐。后期加入孕激素组、全程联用组大鼠子宫平滑肌呈不同程度的增生, 平滑肌细胞排列紊乱, 肌纤维排列疏松, 肌纤维或较长或粗短, 肌纤维束之间有或多或少的结缔组织纤维。与正常对照组比较, 后期加入孕激素组、全程联用组大鼠血清雌激素受体 (ER) 与孕激素受体 (PR) 水平均明显升高, 子宫 ER 和 PR 的阳性表达率明显较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 两种方法均能成功制备子宫肌瘤大鼠模型, 其中全程联用法较优。

[关键词] 子宫肌瘤; 雌激素; 孕激素; 动物模型; 大鼠

[中图分类号] R285.5; R711.74

[文献标志码] A

[文章编号] 0256-7415 (2017) 07-0006-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.07.002

Modeling of Hysteromyoma Rats and Result Comparison of Two Methods of Combination Usage of Estrogen and Progesterone

WU Xiaozhen, HE Jialun, LIU Sishi, MA Danli

Abstract: Objective: To establish model rats with hysteromyoma, and to compare the advantages and disadvantages. Methods: Selected 27 SD rats and divided them into the normal control group, whole processing combination group, adding progesterone in latter period group. The normal control group was given intramuscular injection with saline three times a week, and the treatment lasted for twelve weeks. The whole processing combination group was given whole processing intramuscular injection with estradiol benzoate of 0.05 mL three times a week and was given intramuscular injection with progesterone of 0.05 mL once a week, and modeling lasted for twelve weeks. The adding progesterone in latter period group was given intramuscular injection with estradiol benzoate of 0.05 mL three times a week only, and the treatment lasted for eight weeks. Form the ninth week, the group was given intramuscular injection with progesterone of 0.05 mL once a week in addition, which lasted for four weeks, and the whole modeling process lasted for twelve weeks. Observed uterine formation of rats, detected level of serum estrogen receptor(ER) and progesterone receptor(PR) and expression of uterine ER and PR. Results: Uterine texture of normal control group was homogeneous, and there was no nodule or cyst. Change and hyperplasia in uterine formation and mass in several uterine horn were found in the whole processing combination group and adding progesterone in latter period group while anatomizing. In the normal control group, muscular layer was thinner, muscular layer cells were thin and long and arranged in line. In the whole processing combination group and adding progesterone in latter period group, there was hyperplasia of different degree, and the muscular layer cells were arranged in disorder, muscle fiber was loose arranged, and the muscle fiber was longer or thick and short, and there was more or less connective tissue fiber among muscle fiber bundles. Comparing with the normal control group, serum ER and PR were increased significantly, and the positive expression rate of uterus was obviously higher($P < 0.01$). Conclusion: Both of the two

[收稿日期] 2017-03-15

[基金项目] 广东省药学会科学研究基金项目 (2014D05)

[作者简介] 吴晓贞 (1986-), 女, 主治医师, 研究方向: 女性生殖内分泌及妇科肿瘤。

methods can make hysteromyoma rats model , but complete combination method is better.

Keywords : Hysteromyoma ; Estrogen ; Progesterone ; Animal Model ; Rat

子宫肌瘤是女性生殖器官最常见的良性肿瘤,在育龄期妇女中发病率高达77%,且有逐年上升的趋势,其中有症状者占20%~50%^[1],但其病因尚不完全明确,因此,探讨本病的发病机制和治疗方法已成为国内外医家较为关注的研究课题之一。动物实验在该病发病机制研究及临床前药物筛选中起着极其重要的作用,制备适宜的动物模型成为其中的关键^[2]。子宫肌瘤是包含大量细胞外基质的平滑肌单克隆肿瘤^[3-4],雌、孕激素能促进肿瘤的增长^[5-6]。本研究分别通过雌、孕激素全程联用以及雌激素全程给药、后期加入孕激素建立大鼠子宫肌瘤模型,探讨孕激素的开始注射时间,筛选出较优的模型建立方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF级雌性SD大鼠27只,体质量180~220g,实验动物批号:20141105。实验动物由广东省医学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2013-0002;饲养环境:SPF级动物实验室。

1.2 试剂和仪器 雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)多克隆抗体、EDTA抗原修复液、PBS缓冲液购自武汉谷歌生物科技有限公司。山羊抗兔鼠通用二抗组化试剂盒、DAB显色剂购自丹科医疗器械技术服务有限公司。ER、PR激素受体测定试剂盒购自上海酶联生物技术有限公司。RM2016型病理切片机构购自上海徕卡仪器有限公司。Nikon Eclipse Ti-SR型倒置荧光显微镜、Nikon DS-U3型成像系统购自日本尼康公司。Motic Images Advanced 3.2显微图像分析软件购自Motic中国有限公司。

1.3 子宫肌瘤动物模型的建立 27只SD大鼠随机分为正常对照组、全程联用组、后期加入孕激素组。正常对照组:每周3次仅肌注生理盐水,持续12周。全程联用组:全程每周3次肌注苯甲酸雌二醇0.05mL(含药0.1mg),及每周1次肌注黄体酮0.05mL(含药量1mg),连续12周进行造模。后期加入孕激素组:开始每周3次仅肌注苯甲酸雌二醇0.05mL(含药0.1mg),连续8周,从第9周起每周1次加注黄体酮0.05mL(含药量1mg),连续4周,整个造模过程持续12周。

1.4 血液标本采集 实验结束后,所有大鼠用2%戊巴比妥钠麻醉(30mg/kg,腹腔注射),腹主动脉取血,分离血清,采用双抗体夹心法检测大鼠血清ER和PR水平。

1.5 子宫标本采集 动物处死后,于相同部位在无菌条件下取2份0.5~1.0mm³大小子宫平滑肌组织,分别保存于10%福尔马林溶液和液氮。

1.6 大鼠子宫病理组织学观察 子宫组织经10%福尔马林液固定48h后,石蜡包埋,5μm切片,HE染色。染色切片于

显微镜下观察。

1.7 免疫组化法测定子宫雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)的表达 切片常规脱蜡至水化;组织切片置于盛满EDTA抗原修复缓冲液(pH 8.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。切片放入3%过氧化氢溶液,室温避光孵育25min,将玻片置于PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5min。按1:200稀释ER或PR抗体,37℃孵育1h,PBS冲洗3次。滴加生物素化二抗,室温孵育50min,PBS冲洗3次。DAB显色,常规脱水、封片。组织切片中出现棕黄色颗粒聚集为阳性反应,每组选择6个标本,每张片子观察5个视野,用图像分析软件分析平均光密度,计算ER和PR的阳性表达率。

1.8 统计学方法 采用SPSS20.0软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析法进行检验。

2 结果

2.1 各组大鼠子宫形态观察 见图1。正常对照组大鼠子宫质地均匀,未见结节或囊肿。后期加入孕激素组和全程联用组2个模型组大鼠解剖时可见子宫形态改变、增生,个别子宫角可见肿块。

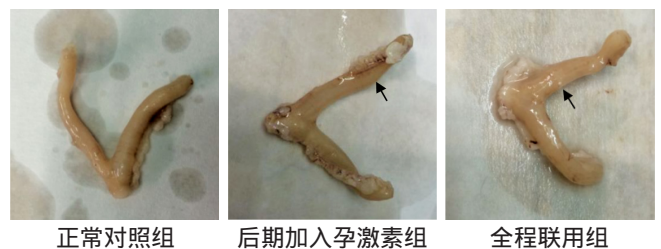


图1 各组大鼠子宫形态观察

2.2 各组大鼠血清ER与PR水平比较 见表1。与正常对照组比较,后期加入孕激素组、全程联用组大鼠血清雌激素受体(ER)与孕激素受体(PR)水平均明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 各组大鼠血清ER与PR水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ER(ng/L)	PR(pmol/L)
正常对照组	9	44.07±7.90	132.58±27.91
后期加入孕激素组	9	83.94±5.61 ^①	227.47±28.92 ^①
全程联用组	9	92.01±6.95 ^①	314.34±13.37 ^①

与正常对照组比较,① $P < 0.01$

2.3 各组大鼠子宫病理组织学比较 见图2。正常对照组大鼠子宫平滑肌肌层较薄,平滑肌细胞细长,排列整齐。后期加

入孕激素组、全程联用组大鼠子宫平滑肌呈不同程度的增生，平滑肌细胞排列紊乱，肌纤维排列疏松，肌纤维或较长或较短，肌纤维束之间有或多或少的结缔组织纤维。

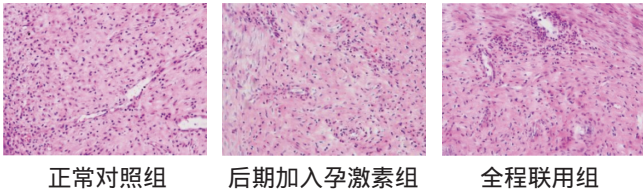


图2 各组大鼠子宫病理组织学图片 (×200)

2.4 各组大鼠子宫 ER 与 PR 表达结果比较 见表2。与正常对照组比较，后期加入孕激素组、全程联用组大鼠子宫 ER 和 PR 的阳性表达率明显较高，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠子宫 ER 与 PR 表达结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ER(%)	PR(%)
正常对照组	9	25.17± 6.24	30.38± 9.52
后期加入孕激素组	9	55.24± 5.31 ^①	56.28± 8.62 ^①
全程联用组	9	56.01± 2.33 ^①	57.24± 5.58 ^①

与正常对照组比较，^① $P < 0.05$

3 讨论

子宫肌瘤作为女性生殖器最常见的良性肿瘤，其发病原因复杂，确切病因尚不明确，无论临床经验或是实验研究，目前普遍认为子宫肌瘤为性激素依赖性肿瘤，肌瘤中的雌激素受体浓度明显高于周边肌组织，肌瘤组织局部对雌激素敏感性高，而孕激素有促进肌瘤细胞有丝分裂、刺激肌瘤生长的作用，长期高水平卵巢甾体激素的刺激是导致子宫肌瘤发生的重要致病因素^[7]。

国内外出现了多种多样的造模方法，国外多采用自发性 Eker 大鼠模型，国内多采用外源性性激素诱导的方法。雌、孕激素联合的双模法造模成型稳定，且与子宫肌瘤的发病机理吻合，更易观察到药物的预防和实验治疗作用，综合评价优于单用雌激素造模的方法^[8]。实验结果表明全程联用法与雌激素全程给药、后期加入孕激素组法均能成功制备子宫肌瘤大鼠模型，其中全程联用法较优。

在子宫肌瘤的发病机理中，卵巢甾体激素及其受体起着关键性作用。近年来研究发现雌激素可刺激子宫肌瘤的增生，瘤体雌激素受体含量与肌瘤的生长速度成正比，另外孕激素与

孕酮受体(PR)可通过调节肌瘤细胞的有丝分裂活动促进肌瘤增殖^[9]。雌激素和孕激素之间通过自分泌和旁分泌作用互相调节，雌激素可增加肌瘤细胞孕激素受体含量，孕激素反过来又可进一步促进和维持雌激素的变化，二者互相影响，共同促进肌瘤的生长^[10]。雌孕激素在人体内是呈现一个周期性改变，在月经周期的不同时期会分别出现高峰，因此模拟人的激素周期来造模能更加接近于人子宫肌瘤的形成过程，更易观察到药物的预防和实验治疗作用^[8]。

[参考文献]

- [1] Ciarmela P, Critchley H, Christman GM, et al. Pathogenesis of endometriosis and uterine fibroids[J]. *Obstet Gynecol Int*, 2013; 656571.
- [2] 李文, 刘新敏. 子宫肌瘤动物模型构建方法的实验研究概况[J]. *现代妇产科进展*, 2014, 23(11): 917-919.
- [3] Sankaran S, Manyonda IT. Medical management of fibroids [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2008, 22(4): 655-676.
- [4] Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas [J]. *Fertil Steril*, 2007, 87 (4): 725-736.
- [5] Grings AO, Lora V, Ferreira GD, et al. Protein expression of estrogen receptors α and β and aromatase in myometrium and uterine leiomyoma[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2012, 73(2): 113-117.
- [6] Ishikawa H, Ishi K, Serna VA, et al. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma[J]. *Endocrinol*, 2010, 151(6): 2433-2442.
- [7] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 310-313.
- [8] 李冬华. 子宫肌瘤大鼠模型制备方法之比较[J]. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(24): 3700-3702.
- [9] 丰有吉, 沈铿, 马丁. 妇产科学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 331-332.
- [10] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 2082-2085.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)