

## · 基于临床病证特点的动物模型制备规范专题 ·

[编者按] 动物模型是现代生命科学研究不可或缺的研究手段,也是中医药现代研究的重要方法之一。动物模型在疾病发病机制探析与预防、药物筛选及其治疗评价、诊断标志物的发现等研究方面具有重要价值,是生命科学研究的基础和重要组成部分。动物模型的制备方法、模型制备成功与否、模型的指标体系等均是模型制备的关键所在。

基于临床中西医结合病证特点、评价中医药动物模型的新方法以及大量前期实验研究,本专题对子宫发育不良、干眼、慢性前列腺炎、前列腺增生、痛经、雌性不孕症相关动物模型进行了系统分析,探讨影响动物模型的主要因素、模型制备方法、成模标准、模型评价指标等,包括对模型的相关表观指标、生化指标、病理指标等进行分级描述,根据相应临床中西医结合病证特点确定模型相关指标的权重等。可为相关疾病研究提供较规范的动物模型制备及评价方法,还可为药效评价、发病机制探析、诊断标志物确定等研究提供参考,进而促进中医药研究的发展。

# 子宫发育不良动物模型制备规范(草案)

中华中医药学会 中药实验药理专业委员会

[摘要] 子宫发育不良是妇科常见疾病,多因发育过程相关激素低下导致,主要表现为经迟、月经稀少、痛经、甚至发展为闭经,婚后常表现为不孕等。现子宫发育不良模型为病理性模型,以西医指标为主。在基于对子宫发育不良中西医临床病证特点分析及大量动物实验研究基础上,形成了子宫发育不良模型制备规范(草案)。

[关键词] 子宫发育不良; 动物模型; 规范; 草案; 卵巢; 雌激素; 地塞米松磷酸钠

[中图分类号] R24;R22;TU202;R285;R711 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2018)19-0001-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20183004

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180103.1640.005.html>

[网络出版时间] 2018-01-06 15:43

## Specifications for Preparation of Uterine Hypoplasia Animal Models (Draft)

Traditional Chinese Medicine Experimental Pharmacology Professional Committee,  
China Association of Chinese Medicine

[Abstract] Uterine hypoplasia is a common gynecological disease, which is caused by low levels of hormones related to development process. The main symptoms are delayed menstruation, scanty menstruation, dysmenorrhea and even amenorrhea, and often manifested as infertility after marriage. The model of uterine hypoplasia is a pathological model with western medicine as the main index. Based on the analysis of characteristics of clinical symptoms of Chinese and western medicine and a large number of animal experiments, this article forms the following specifications (draft) for the preparation of uterine hypoplasia models (draft).

[Key words] uterine hypoplasia; animal model; specifications; draft; ovary; estrogen; dexamethasone sodium phosphate

## 1 造模动物

可用于制备子宫发育不良模型的动物有雌性大鼠、小鼠。

## 2 造模方法

### 2.1 部分切除卵巢制备大(小)鼠子宫发育不良模型

**2.1.1 原理** 在性成熟前摘除部分卵巢,使雌激素、孕激素等分泌突然下降,与相应受体结合减少,不能有效促进相应靶器官(子宫)发育。但保留部分卵巢,体内还有少量雌激素,与临床特点相似度较高。

**2.1.2 方法** 雌性大鼠,体质量70~80 g,雌性小鼠,体质量11~13 g;大(小)鼠腹腔注射10%水合氯醛(大鼠、小鼠剂量均为 $0.003 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ),麻醉后在背部消毒、切口,将卵巢下输卵管(包括脂肪)用细线结扎,摘除大(小)鼠双侧70%卵巢,术后顺势将子宫角放回腹腔中,缝合肌肉、皮肤。肌内注射用青霉素钠或者头孢唑林钠等( $2.5 \times 10^5 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,大鼠0.1 mL/只,小鼠0.02 mL/只),每天1次,连续3~5 d,以防感染。第14天,可制备大(小)鼠子宫发育不良模型。

### 2.2 切除卵巢制备大(小)鼠子宫发育不良模型

**2.2.1 原理** 在性成熟前切除全部卵巢,使雌激素、孕激素等的分泌突然显著降低,不能与相应的受体结合,不能促进相应靶器官(子宫)的发育,导致子宫发育不良。

**2.2.2 方法** 雌性大鼠,体质量70~80 g,雌性小鼠,体质量11~13 g;大(小)鼠腹腔注射10%水合氯醛(大鼠、小鼠剂量均为 $0.003 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ),麻醉后背部消毒、切口,将卵巢下输卵管(包括脂肪)用细线结扎,摘除大(小)鼠双侧卵巢,术后顺势将子宫角放回腹腔中,缝合肌肉、皮肤。肌内注射用青霉素钠或者头孢唑林钠等( $2.5 \times 10^5 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,大鼠注射体积0.1 mL/只,小鼠0.02 mL/只),每天1次,连续3~5 d,以防感染。第14天,可制备大(小)鼠子宫发育不良模型。

### 2.3 切除卵巢加肌注地塞米松磷酸钠制备大(小)鼠肾虚型子宫发育不良模型

**2.3.1 原理** 在性成熟前摘除全部卵巢,使雌激素、孕激素等的分泌突然显著降低,不能与相应的受体结合,导致子宫发育不良;肌注地塞米松磷酸钠可制备肾虚模型。两者结合,形成大(小)鼠肾虚型子宫发育不良模型。

**2.3.2 方法** 雌性大鼠,体质量70~80 g,雌性小鼠,体质量11~13 g;大(小)鼠腹腔注射10%水合氯醛(大鼠、小鼠剂量均为 $0.003 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ),麻醉后背部消毒、切口,将卵巢下输卵管(包括脂肪)用细线结扎,摘除大(小)鼠双侧卵巢;术后顺势将子宫角放回腹腔中;缝合肌肉、皮肤。肌内注射用青霉素钠或者头孢唑林钠等( $2.5 \times 10^5 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,大鼠注射体积0.1 mL/只,小鼠0.02 mL/只),每天1次,连续3~5 d,以防感染。于手术后第7天,肌注地塞米松磷酸钠注射液(前9 d剂量 $225 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,后5 d剂量 $335 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),每天肌注1次,连续注射14 d。第15天,可制备肾虚大(小)鼠子宫发育不良模型。

## 3 观测指标

**3.1 病理指标** 子宫发育不良模型制备成功后,光镜下可见模型动物子宫壁薄,内膜上腺体减少,部分萎缩。卵巢缺少卵泡,黄体数较多,卵巢萎缩,无血管变化较明显。下丘脑神经细胞明显减少,包浆固缩,神经突触减少,胶质细胞固缩。腺垂体细胞包浆减少,细胞核有固缩,细胞嗜酸性变。电镜下观察可见子宫细胞胞浆内线粒体明显减少,线粒体嵴部分变短或消失,内质网还较为丰富。病理指标是子宫发育不良的直接证据,权重系数选择0.4。

**3.2 生化指标** 子宫发育不良模型制备成功后,生化指标可见血清雌二醇( $E_2$ ),雌激素受体(ER)和孕酮(P)水平降低,血清促卵泡激素(FSH)和促黄体生成素(LH)水平升高。生化指标可反映子宫发育不良的发生、发展及康复,检测指标多,有一定专属性,权重系数选择0.3。

**3.3 表观指标** 子宫发育不良模型复制成功后,表观指标可见子宫指数减少,动物毛发无光泽,倦卧少动、不活跃、反应迟钝,垫料潮湿度增加,进食量减少,体温下降、耐寒能力降低等。肾虚型子宫发育不良模型还可出现精神萎靡、畏寒倦卧、四肢逆冷、大便溏泄、小便清长等。表观指标是子宫发育不良的外在反映,子宫发育不良的直接指标就是子宫湿重及脏器指数明显减小,此类指标较多且具有一定特征性,权重系数选择0.3。

## 4 备注

本规范(草案)基于的是与中西医临床病症特点吻合度较高的子宫发育不良模型,还有一些其他的子宫发育不良模型,如非人灵长类动物模型,但是因成本高、利用少,故未纳入本制备规范(草案)。

# 子宫发育不良动物模型制备规范(草案)起草说明

## 1 造模动物<sup>[1-3]</sup>

现可用于子宫发育不良动物模型制备的动物有雌性鼠类(大鼠、小鼠)以及非人灵长类动物。非人灵长类动物与人类最为类似,是最佳选择,但由于其稀少、昂贵,应用受到了极大的限制。虽然大(小)鼠没有月经,但其有规律性的发情周期,一般成熟大(小)鼠的性周期是在下丘脑-垂体-卵巢(HPO)轴的调节下规则变化,分为动情前期(卵泡期),动情期(排卵期),动情后期(黄体形成期)和动情间期(黄体退化期);有规律性的发情周期,和人类月经周期相似,可作为研究子宫发育不良的造模动物。因子宫发育多在青春前期及青春期,应选择与此相近的鼠龄。大(小)鼠是目前国内外研究子宫发育不良最常用的动物。

## 2 饲养环境<sup>[4-6]</sup>

动物饲养环境应符合《实验动物管理条例》《关于善待实验动物的指导性意见》,GB 14925-2010《实验动物环境及设施》《实验动物国家标准》和《中华人民共和国动物保护法》等规定,符合相应标准及等级动物饲养环境的要求。

## 3 造模原理及评价依据

子宫发育不良模型主要是病理模型,评价模型依据的是西医诊断标准。参考全国高等医药院校教材第7版《妇产科学》<sup>[7]</sup>和第2版《不孕与不育》<sup>[8]</sup>制定,分别为①年龄20~35岁;②婚后夫妇同居,若性生活正常,不采用任何避孕措施,婚后2年内未受孕;③B超测量子宫体纵、横和前后径分别小于正常范围低值,即依次<5,4,3cm;④宫颈较长,多呈锥形,而宫体比正常小,且常因前壁或后壁发育不全而呈过度前屈或后屈,宫颈与宫体的比例呈1:1或3:2;⑤月经稀少、月经不调、原发或继发性闭经、痛经、不孕、流产、无排卵。

中医标准参考《妇产科疾病诊断与治疗》<sup>[9]</sup>和《中医病证诊断疗效标准》<sup>[10]</sup>中子宫发育不良的辨证分型,可概括为肾虚(包括肾阳虚、肾阴虚、肾气虚),肝郁,痰湿及血瘀四型,以肾虚为常见。肾阳虚证的主证为①月经后期;②神疲肢倦;③畏寒肢冷;④腰酸;⑤带下清稀;次证为①月经量少;②经期延长;③色淡质稀;④小腹隐痛,喜温喜按;⑤夜尿多或(和)小便清长;⑥性欲淡漠。肾阴虚证的主证为

①月经先期;②五心烦热;③腰酸;次证为①月经量少或量多;②心烦易怒;③心悸少寐;④带下甚少;⑤口干或(和)腑行干结;⑥头晕眼花。肾气虚证的主证为①婚久不孕;②疲倦无力;③腰骶酸痛;④性欲减退;⑤足软跟痛;次证为①健忘少寐;②眩晕耳鸣;③齿摇发枯发脱;④少腹冷坠、发凉。

目前关于子宫发育不良的病因病机尚未完全清晰,较为公认的是内分泌学说等。基于内分泌学说,相应造模方法有以下3种。

**3.1 部分切除卵巢制备大(小)鼠子宫发育不良模型<sup>[11]</sup>** 原理为切除部分卵巢,可使雌激素、孕激素等分泌突然下降,不能与相应的受体结合,不能促进相应靶器官(子宫)的发育,但因保留了部分卵巢,体内有少量雌激素,与人体相似度较高。与临床指标吻合情况为符合西医临床标准①③④⑤,吻合度 $\geq 80\%$ 。符合中医肾阳虚型证,主证②③④,吻合度 $\geq 60\%$ ;符合中医肾气虚型证,主证②③④,吻合度 $\geq 60\%$ 。注意事项为应尽量保证每只动物所切除的部分卵巢一致,减少实验误差。

**3.2 切除卵巢制备大(小)鼠子宫发育不良模型<sup>[12]</sup>** 原理为基于内分泌学说,子宫发育不良的发生与体内激素失调有关,摘除全部卵巢,可使雌激素、孕激素等分泌突然下降,使之不能与相应受体结合,也不能促进相应靶器官(子宫)发育。与临床指标吻合情况为符合西医临床标准①③④⑤,吻合度 $\geq 80\%$ 。符合中医肾阳虚型证,主证②③④,吻合度 $\geq 60\%$ ;符合中医肾气虚型证,主证②③④,吻合度 $\geq 60\%$ 。注意事项为动物苏醒后,先给动物饮水,3~4h后喂少量饲料。术后应两后肢交替肌注青霉素钠或者头孢唑林钠等预防感染。

**3.3 切除卵巢加肌注地塞米松磷酸钠制备大(小)鼠肾阳虚型子宫发育不良模型<sup>[13-14]</sup>** 原理为该模型具备肾虚的基本特征,且在性成熟前摘除双侧卵巢,导致大(小)鼠子宫发育不良,形成病证结合动物模型。与临床指标吻合情况为符合西医临床标准①③④⑤,吻合度 $\geq 80\%$ 。符合中医肾阳虚型证,主证②③④,吻合度 $\geq 60\%$ 。注意事项为肌注地塞米松磷酸钠造肾阳虚模型,应注意剂量和时间。时间延长可能会导致动物死亡。

## 4 观测指标<sup>[15-16]</sup>

**4.1 病理学——I类核心指标** 子宫发育不良多

因卵巢功能衰退和 HPO 轴失衡造成的。模型复制成功后,光镜下可见子宫壁薄,内膜上腺体减少,部分萎缩。卵巢缺少卵泡,黄体数较多,卵巢萎缩,无血管变化较明显。下丘脑神经细胞明显减少,包浆固缩,神经突触减少,胶质细胞固缩。腺垂体细胞包浆减少,细胞核有固缩,细胞嗜酸性变。子宫病理变化分级参考标准为“-”表示子宫肌层、内膜、腺体均正常;“+”表示子宫壁薄,内膜上腺体减少,部分萎缩;“++”表示子宫壁薄,内膜上腺体明显减少,大量萎缩;“+++”表示子宫壁显著变薄,内膜上腺体减少,大量萎缩。病理观察可准确提示子宫发育情况,是判断子宫发育不良的核心指标,权重系数选择 0.4。

**4.2 表观——Ⅱ类直接相关指标** 表观指标可说明子宫发育情况,子宫发育不良最重要的是观察子宫的变化,子宫比正常小,且质量减轻,用肉眼就可直接观察到,是最直观的指标,可直接反应模型复制成功与否。虽然子宫的质量能直接反映子宫的发育情况,但因个体差异还是有所区别的,故选择子宫质量与体质量的百分比(子宫指数)这一指标来间接反应子宫的发育情况。子宫发育不良模型制备成功,可见子宫体积减小、质量减轻、子宫指数降低;同时动物出现体温降低,毛发光泽度降低,饮水量、饮食量减少,活动性降低等现象。表观指标在子宫发育不良模型的评价中占有重要地位,根据表观指标的特点,可分为三级,分别计 0,1,2 分,以利于模型的判断,见表 1。表观指标可直接反应子宫发育不良模型复制成功与否,是判断子宫发育不良的直接相关指标,权重系数选择 0.3。

表 1 子宫发育不良动物模型主要表观指标的分级  
Table 1 Classification of main apparent indicators of uterine hypoplasia model

等级 评分 /分	子宫指数	体温	饮食、饮水	活动能力	毛发光泽度
0	明显降低	明显降低	明显减少	蜷卧	杂乱无光
1	降低	降低	减少	减少	无光泽
2	正常	正常	正常	正常	正常

**4.3 生化——Ⅱ类直接相关指标** 模型制备成功后,生化指标可见血清  $E_2$ , ER 和 P 水平降低,血清 FSH 和 LH 水平升高。子宫发育不良的主要发病机制是内分泌学说,观察与这些学说相关的指标,如血清  $E_2$ , FSH, LH 和 P 等激素水平,  $E_2$  和 P 大都由卵

巢分泌,血液中 95% 的  $E_2$  来自优势卵泡和黄体,  $E_2$  主要受下丘脑-垂体-性腺轴的调节,也会对下丘脑-垂体有一定的反馈作用,其对维持女子月经周期、产生卵细胞、排卵、受精及妊娠都起着重要的作用,同时会发生周期性的变化。P 是卵巢分泌的天然孕激素,是一种女性荷尔蒙的类固醇,亦称为黄体素、黄体酮,参与到女子与其他雌性动物的月经周期,可以支援怀孕与胚胎形成。FSH 和 LH 是由垂体前叶分泌的 2 种糖蛋白激素,对性腺轴的发挥起着重要作用。其主要作用于卵巢,可促进卵泡的生长、发育、成熟。这些指标可间接反映子宫发育情况,与子宫发育不良关联度高,是直接相关指标,权重系数选择 0.3。

**4.4 指标归类** 子宫发育不良动物模型各类指标均按整体为 1 进行各自的量化积分,同一类指标如果是由多项指标组成,则按同一贡献度计算。例如观察的生化指标有 4 项,积分时各项指标均设定 0.25,该指标最高分值为 0.25。如具体每一类指标中有特殊重要的指标,可参照指标分类时的权重,再对同一类指标中的小指标进行不同的权重分级。其他指标的计算类似。

每一类指标造模后的积分,乘以相应指标的权重,再将三类指标积分相加,即为子宫发育不良模型的总积分。按上述积分计算,部分切除卵巢制备大(小)鼠子宫发育不良模型总积分约 0.88,切除卵巢制备大(小)鼠子宫发育不良模型总积分约 0.80,切除卵巢加肌注地塞米松磷酸钠制备大(小)鼠肾阳虚型子宫发育不良模型总积分约 0.76。子宫发育不良模型成功率相对较高,每次造模可能会出现不同的总积分,为保证每次复制的子宫发育不良模型基本一致,建议总积分可有约 20% 的偏差,以此作为评价子宫发育不良模型成功与否的标准。所得总积分 >0.6 即可认为该模型制备成功。本草案所采用的计算方法及所得总积分仅供参考,研究者可根据模型不同制备方法对所观测指标总积分计算方法进行适当调整。

**4.5 说明** 本草案及起草说明中的权重系数仅提示该类指标在子宫发育不良模型制备及判定中的重要性,不是绝对的。研究者可根据实际情况进行适当调整,在不同的子宫发育不良模型中采用的标准可能不一致,故表观指标、病理指标所采用的分类方法也会有所差异;所列生化指标也未全面涵盖子宫发育不良的所有相关指标。应尽量将单纯的定性描述转变成可量化或半量化的指标,进而提高判定的

可控性。

[起草人] 苗明三, 李艳, 方晓艳, 白明

[参考文献]

- [1] 苗明三, 朱飞鹏. 常用医药研究动物模型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 293.
- [2] 张晓金. 肾虚型大鼠子宫发育不良动物模型的建立及其特性研究——造模对大鼠性激素水平影响的特性研究[J]. 咸阳: 陕西中医学院, 1999.
- [3] 李艳. 鹿角胶治疗子宫发育不良的药效机制研究[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2017.
- [4] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 白癜风动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 1-5.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物环境及设施: GB 14925-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 1-24.
- [6] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 湿疹动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 6-10.
- [7] 乐杰. 妇产科学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 69.
- [8] 罗丽兰. 不孕与不育[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 238-241.
- [9] 曹小燕. 妇产科疾病诊断与治疗[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2014: 345-382.
- [10] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012: 244-245.
- [11] 苗明三. 介绍一种大鼠子宫发育不良模型[J]. 光明中医, 2002, 17(6): 20.
- [12] 杨鉴冰, 崔晓萍, 王宗柱, 等. 毓宫胶囊对子宫发育不良大鼠下丘脑 $\beta$ -内啡肽含量影响的实验研究[J]. 陕西中医学院学报, 2005, 28(2): 52-54.
- [13] 杨鉴冰, 崔晓萍, 王宗柱. 肾虚型大鼠子宫发育不良动物模型的建立[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(9): 17-19.
- [14] 杨鉴冰, 陈梅, 崔晓萍, 等. 毓宫胶囊对肾虚型子宫发育不良大鼠IL-2-IFN-NKC免疫调节网影响的研究[J]. 天津中医药, 2006, 23(1): 58-60.
- [15] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 乳腺增生动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 17-22.
- [16] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 烧(烫)伤动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 11-16.

[责任编辑 刘德文]