

前列腺增生动物模型制备规范(草案)

中华中医药学会 中药实验药理专业委员会

[摘要] 近年来,前列腺增生发病率呈现不断上升的趋势,且越来越年轻化。现有前列腺增生模型多为病理性,且以西医指标为主。在基于前列腺增生模型中西医临床病证特点分析及大量实验研究的基础上,形成了如下前列腺增生动物模型制备规范(草案)。

[关键词] 前列腺增生; 动物模型; 规范; 草案; 丙酸睾酮; 性激素

[中图分类号] R24;R22;TU202;R285;R697+.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0015-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20183003

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180102.1044.006.html>

[网络出版时间] 2018-01-03 13:11

Specifications for Preparation of Prostatic Hyperplasia Animal Models (Draft)

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

[Abstract] In recent years, the incidence of prostatic hyperplasia shows a rising trend, and the age of onset tends to be younger. Most of the prostatic hyperplasia models are pathological with western medicine as the main indicators. Based on analysis of clinical characteristics of the Chinese and western medicine for prostatic hyperplasia, and a large number of experimental studies, this article forms the following specifications (draft) for the preparation of prostatic hyperplasia models (draft).

[Key words] prostatic hyperplasia; animal models; specifications; draft; testosterone propionate; sex hormone

1 造模动物

大鼠、小鼠、犬、猴等可作为前列腺增生的模型动物,其中大鼠、小鼠最为常用^[1-2]。

2 造模方法

2.1 丙酸睾酮诱导(非去势/去势)大(小)鼠制备前列腺增生模型^[3]

2.1.1 原理 丙酸睾酮可干扰机体内源性激素平衡,导致前列腺增生。

2.1.2 非去势法(小鼠) 取质量均一的 ICR 小鼠,体质量 18~22 g,采用腹腔注射的方式,按剂量 5 mg·kg⁻¹连续给予丙酸睾酮 31 d。

2.1.3 非去势法(大鼠) 取质量均一的雄性 SD 大鼠,体质量 250~270 g,为使大鼠更加适应环境,

可先饲养 7 d,然后进行造模,每隔 1 d 对大鼠进行皮下注射丙酸睾酮(50 mg·kg⁻¹),丙酸睾酮可溶于橄榄油,给药质量浓度为 0.001 mL·g⁻¹,皮下注射连续 4 周。

2.1.4 去势法(大鼠)^[4] 取体质量 280~320 g 的 Wistar 雄性大鼠,先采用腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)的方式进行麻醉,对大鼠皮肤进行消毒,经阴囊摘除双侧睾丸,此操作要在无菌环境下进行。手术后为防止大鼠感染,可对大鼠连续 3 d 肌肉注射青霉素(2.5×10⁵ U·kg⁻¹)。手术后,大鼠进行恢复 7 d,于第 8 天选取已去势且状态恢复较好的模型大鼠,每天按剂量 4 mg·kg⁻¹皮下注射造模药物丙酸睾酮(可将丙酸睾酮溶于植物油中,如大豆

[收稿日期] 20171211(011)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI53B09);国家中医药管理局中医药标准化专项(2017-149-11);国家自然科学基金项目(81173474)

油等),持续30 d制备大鼠前列腺增生模型。

2.1.5 去势法(小鼠)^[5] KM 雄性小鼠,体质量20~23 g,腹腔注射2%戊巴比妥钠($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)进行麻醉,麻醉后经阴囊摘除双侧睾丸,此操作在无菌环境下进行;为防止感染,对手术后的小鼠进行肌肉注射青霉素($2.5\times 10^5\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$),注射连续3 d。注射3 d青霉素后,可取去势成功、状态良好的小鼠,每日按剂量 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 皮下注射丙酸睾酮(可溶于大豆油中),连续3周,制备小鼠前列腺增生模型。

2.2 小鼠尿生殖窦植入法制备前列腺增生模型

2.2.1 原理 刺激成年动物前列腺、尿道周围区域,胚胎组织生长能力重新恢复,可致前列腺增生。

2.2.2 方法 雄性小鼠,体质量25~30 g,给小鼠腹腔注射10%水合氯醛($3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),分离前列腺腹叶,并在腹叶内植入3个16 d同品系胎鼠的尿生殖窦组织(尿生殖窦的准备:取受孕16 d的母鼠子宫内的胎鼠,取出胎鼠的尿生殖窦组织,放在玻璃平面皿中,备用),此操作过程可在体视显微镜下进行操作,立即缝合。为防止手术感染,可对术后模型小鼠连续3 d肌肉注射青霉素($2.5\times 10^5\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$)。植入16 d胎鼠尿生殖窦组织的模型小鼠21 d后即可形成小鼠前列腺增生模型。该模型可维持的时间最少3个月。

2.3 雌、雄激素诱导老龄大鼠制备前列腺增生模型

2.3.1 原理 雌激素与二氢睾酮 DHT(DHT)协同,可导致老龄大鼠体内激素紊乱,诱发前列腺增生。

2.3.2 方法 将18月龄左右雄性大鼠,用乙醚麻醉,经阴囊摘除双侧睾丸;为防止手术感染,可对已摘除睾丸的模型大鼠采用肌肉注射的方式,连续注射5 d青霉素($2.5\times 10^5\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$)。恢复7 d后,连续30 d对每只大鼠进行皮下注射丙酸睾酮-苯甲酸雌二醇(60:1)橄榄油液($0.001\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$),每天1次。该模型维持时间不少于3个月。

3 观测指标

3.1 表观指标、尿流动力学指标 表观指标可直观评价前列腺模型是否成功,模型制备成功后前列腺

脏器指数增加、垫料潮湿度增加、活动次数减少。表观指标中可量化的指标如前列腺指数、饮水量等可直接用数据表示;对无法量化的表观指标如垫料潮湿度、活动情况等,可进行3级积分(无、轻度、显著,分别计0,1,2分)。为表达出前列腺增生后对膀胱出口梗阻的影响,可对模型动物的膀胱组织进行造瘘,测定模型动物相关最大膀胱压、膀胱压及排尿间隔等指标。表观指标及尿流动力学指标是前列腺增生临床诊断的重要指标,亦是模型制作成功的核心指标,其权重系数选择0.5。

3.2 病理学指标 模型制备成功后,光镜下可见整个前列腺腺腔充满增生的腺上皮细胞,上皮细胞及间质组织出现了不同程度的明显增生;电镜下观察前列腺,可见细胞胞浆内线粒体明显减少,具有丰富的内质网,且线粒体嵴部分变短甚至消失。该指标是前列腺增生病理变化的直接依据,亦是判定该模型是否成功的决定因素,权重系数选择0.3。

3.3 生化指标^[6] 前列腺增生时,基于生长因子学说,其中碱性纤维母细胞生长因子(bFGF),胰岛素样生长因子 I(IGF-I)及表皮生长因子(EGF)阳性表达量升高,转化生长因子- β (TGF- β)表达降低;基于内分泌学说,雄激素[睾酮(T)和DHT等]水平显著升高,而雌二醇(E_2)水平降低;基于凋亡学说,模型复制成功时,细胞凋亡相关基因促凋亡基因(Bax)表达降低,B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)^[7]表达升高。生化指标可直接地反映前列腺增生的发生及发展程度,权重系数选择0.2。

4 备注

本模型规范(草案)的制备主要是基于中西医结合临床病证特点,列举与前列腺增生临床吻合度较高,且在研究中应用较多的动物模型。还有一些其他的前列腺增生模型,如细胞模型是完全的体外研究,仅能反映相关细胞改变,且易污染;如甾体 5α -还原酶抑制剂法、异种移植法致前列腺增生伤模型等,与临床病证特点吻合度低;如转基因法等致前列腺增生模型,成本高、应用不多等因素,并未收入本制备规范(草案)。

前列腺增生动物模型制备规范(草案)起草说明

1 实验动物

目前,大鼠、小鼠、猩猩、猴及犬等均作为前列腺增生的模型动物。但猴的价高量少,限制了相关

实验的应用;体质量10~18 kg(约7~15岁)的雄性老龄犬自发性前列腺增生模型与人类前列腺增生最为接近,但前列腺增生的老年犬价格高、难获得,应

用受限;小鼠、大鼠具有种纯、量大、价廉等优点,常被作为建立良性前列腺增生模型的实验动物。

2 饲养环境^[8-10]

动物的饲养环境应根据国家质量监督检验检疫总局制定的《实验动物环境及设施》及全国实验动物标准化技术委员会出版的《实验动物环境及设施》对动物进行饲养管理。符合相应标准《中华人民共和国动物保护法》及等级动物饲养环境《关于善待实验动物的指导性意见》的要求。

3 造模原理及评价依据^[11-14]

生长因子学说、凋亡学说及内分泌学说等是目前前列腺增生现有的主要病因病机。多根据已有学说制备相应动物模型,如采用直接给去势或非去势动物一定量雄性激素,造成动物体内性激素水平紊乱,诱发前列腺增生;或以鼠胚胎尿生殖窦诱导,可激发模型动物的前列腺尿道周围的胚胎组织增殖,诱发前列腺发生增生等。

现有前列腺增生模型为病理性模型,其主要体现的是西医临床诊断相关指标。依据 2011 年版《良好前列腺增生诊断治疗指南》,目前前列腺增生的诊断可依据国际前列腺症状评分、生活质量评估、体格检查及直肠指诊、尿液分析、超声检查、尿流率的测定等检测项目。临床表现为①核心指标:前列腺增生最普遍的 3 种表现为前列腺增大、排尿异常和尿路梗阻。②主要表现及并发症:常见的临床表现主要为刺激性症状和梗阻性症状;其常见临床相关并发症有急性尿潴留、尿路感染、膀胱结石及肾功能损害等症状。③生化指标:临床上前列腺增生患者最常见的血清检测包括雌激素检测及雄激素检测。

前列腺增生属中医学《素问·五常政大论篇》“癰闭”范畴,以排尿困难,点滴而下,甚则闭塞不通为特点。前列腺增生的根源是肾气虚衰,其他脏器的病变亦可加重前列腺的病情,如肺、脾、肝的异常变化,中医所讲湿热、痰瘀、败精等亦可导致前列腺增生的发生。中医标准依据 2002 年版《中药新药临床研究指导原则》制定,临床症状为①排尿无力或困难,尿线变流细、淋漓不尽以及尿频、尿急甚至尿失禁;②肛诊:患者前列腺侧叶增大、中间沟变浅或消失;③超声检查:前列腺形态变大且饱满,内外腺厚度比异常。临床肛诊和超声检查在动物实验中可用病理检查代替。

3.1 丙酸睾酮诱导(非去势/去势)大(小)鼠制备前列腺增生模型 原理为基于内分泌学说,前列腺增生的发病与体内激素失调有关。非去势法是直接

给予动物雄性激素,导致其体内激素水平紊乱,致前列腺增生;去势法则是通过摘除雄性模型动物的两侧睾丸,进而减少雄激素的分泌,使动物体内雌、雄激素比例失去平衡,再给模型动物注射外源性的雄激素,人为干扰模型动物的性激素水平,进而导致前列腺增生。该模型相关病理指标符合西医诊断指标①②③,吻合度高 $\geq 90\%$;符合中医临床诊断指标②③,吻合度 $\geq 66.6\%$ 。应注意减少手术对动物整体的影响,同时,应注意激素用量要准确。

3.2 尿生殖窦植入法制备小鼠前列腺增生模型 原理为以鼠胚胎尿生殖窦为诱导,模拟人类发生的胚胎重唤醒,并能反映前列腺增生发病过程中间质-上皮相互作用机制,可激发模型动物前列腺尿道周围胚胎组织增殖能力。符合西医诊断指标①②③,吻合度高 $\geq 90\%$;符合中医诊断指标③,吻合度 $\geq 33.3\%$ 。造模关键因素是取尿生殖窦的胎鼠应属于同品系,胎龄为 16~18 d。应注意动物手术后预防感染。

3.3 雌、雄激素诱导老龄大鼠制备前列腺增生模型 原理为模拟临床老龄人群前列腺状况,给予老龄大鼠雌、雄激素诱导,可造成模型动物体内性激素水平紊乱。与临床诊断标准吻合度高,符合西医诊断指标①②③,吻合度 $\geq 90\%$;符合中医诊断指标②③。吻合度 $\geq 66.6\%$ 。应保证老龄大鼠鼠龄一致,同时应注意大鼠体质量应相近。

4 观测指标

4.1 表观指标及尿流动力学指标——I 类指标(核心指标) 表观指标可直观评价前列腺模型是否成功,检测表观指标中可量化的指标(前列腺脏器指数、尿量等)可直接用数据表示,模型制备成功后前列腺脏器指数及尿量增加;对无法量化的表观指标(如垫料潮湿度、活动情况等)可进行 3 级分级,分别为无、轻度、显著,分别计 0,1,2 分。表观指标、尿流动力学指标是临床诊断前列腺增生的核心指标。权重系数选择 0.5。见表 1。

表 1 前列腺增生模型各表观指标的分级

Table 1 Classification of each apparent index of prostatic hyperplasia models

分级评分/分	垫料潮湿度	活动情况
0	基本正常	基本正常
1	可见潮湿	可见活动减少
2	潮湿显著	活动减少明显

采用膀胱造瘘方法。手术前禁食,按剂量 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠水溶液麻醉大鼠,大鼠仰卧位固定,75% 乙醇消毒下腹部,下腹部耻骨弓上部沿着腹白线逐层开一 1.5 cm 长的纵向切口,用棉签暴露膀胱颈,游离前列腺段尿道。采用荷包缝合的方法(5-0 丝线)固定于膀胱顶部开口向膀胱植入充满生理盐水的聚乙烯(PE)管道,PE 管的另一端口通过大鼠的皮下固定于大鼠颈背部。各组织恢复腹腔位置,4-0 丝线逐一缝合基层和皮层的手术切口,手术完毕后正常饲养,连续 3 d 内每天注射抗生素溶液,以防感染。实验前大鼠禁食,清醒大鼠放于自制的小盒子,小心剪开大鼠颈背部的线,取出固定于大鼠颈背部的 PE 管道,与充满生理盐水的尿流动力学仪连接,让大鼠在尿流动力学仪内环境适应约 1 h 后,以 $120 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率开始向大鼠膀胱灌注无菌生理盐水平衡 2 h,继续灌注,然后收集 3 个排尿峰数据,实验完毕,测定前列腺增生动物膀胱压、排尿间隔及最大膀胱压,以反映前列腺增生对膀胱出口梗阻的影响。主要尿流动力学指标及其他变化情况为排尿间隔及最大膀胱压变大。

4.2 病理指标——Ⅱ类指标(直接相关指标) 病理学观察可以更加准确、直接地说明前列腺增生的具体情况以及增生的部位,模型制备成功后,光镜下可见前列腺腺体增生,腺上皮细胞明显增生,间质显著增生。前列腺增生模型动物前列腺病理变化分级参考标准^[11]:“-”表示前列腺组织基本正常,腺体、腺上皮细胞及间质未见增生;“+”表示部分腺上皮出现增生,呈现假乳头状,间质基本正常或有少量纤维结缔组织增生;“++”表示前列腺腺体有轻微增生现象,腺上皮及间质平滑肌亦出现轻微增生现象,呈现假乳头状;“+++”表示前列腺腺体及其部分腺上皮可见明显的增生,出现较多乳头或假乳头状突起,间质明显增生且平滑肌出现明显增生。权重系数设定 0.3。

4.3 生化指标——Ⅱ类指标(直接相关指标) 前列腺增生模型成功时,主要生化指标的变化情况为 bFGF, EGF 和 IGF-I 平均吸光度升高, TGF- β 平均吸光度降低; T 和 DHT 水平升高, E_2 水平降低; Bax 平均吸光度降低, Bcl-2 平均吸光度升高。前列腺腺体内的活性成分是 DHT, DHT 浓度的异常增加即可使前列腺出现增生情况,而 DHT 又是由 T 的增加引起的。雄性体内雄激素含量的异常增高,亦可导致 bFGF 及 EGF 水平的增加,两者含量增加与前列腺的发生密不可分。Bax 为促凋亡蛋白, Bcl-2 是抗凋

亡基因,两者失衡可导致细胞凋亡系统失去平衡。IGF-I 主要位于前列腺基质细胞的细胞质中,可直接激活雄激素受体或增强雄激素受体核易位,同时具有较强的促有丝分裂作用。观察前列腺增生学说的有关指标可以直接反映前列腺增生的情况及发病过程,能够直接揭示激素等的改变情况,因此是直接相关的指标,权重系数选择 0.2。

4.4 指标分类 前列腺增生模型 I, II 类指标可参照文献[14]中方法,将各观测指标整体比率计为 1,其所包含项下各指标按同一贡献度计算。如表观指标包含由前列腺脏器指数、垫料潮湿度、活动情况 3 项组成,进行积分计算时每项权重均为 1/3。针对重要的相关指标,根据分类时的权重划分,再对同类指标的不同小指标进行不同的权重分级。其他指标的计算同此。计算出前列腺增生模型各类指标各自的总积分,乘以相应指标的权重,将三类指标积分相加,即前列腺增生模型制备后的总积分。按照上述方法计算后,其中丙酸睾酮诱导去势/非去势大(小)鼠制备的大(小)鼠前列腺增生模型总积分约 0.88;胎鼠尿生殖窦组织植入法制备的前列腺增生模型总积分约 0.82;雌、雄激素诱导老龄大鼠致前列腺增生模型的总积分约 0.711。在制备模型时,为保持一致性,总积分允许有 20% 左右的偏差。模型制备成功时,总积分应 ≥ 0.52 。在具体操作中,根据模型方法的不同以及检测指标的不同,实验者可另行计算,作适当调整。

4.5 说明 在模型制备及其判定中,实验者可根据具体实验情况适当调整本规范(草案)所介绍的各类指标的权重系数,不具有绝对性。前列腺增生的相关生化指标,在本规范(草案)中可能并未全部涉及,在不同模型制备中所依据的标准不同,会使得表观及病理指标的分级也会有所差异,实验者在具体评价中,可尽量将相关定性指标进行量化,以提高评价的可控性。

[起草人] 苗明三, 闫晓丽, 方晓艳, 苗艳艳

[参考文献]

- [1] 吴建辉,徐斯翀,潘琦,等. 自发性及睾酮诱导犬前列腺增生模型的比较[J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(3): 21-26, 94.
- [2] 马雷,高英英,辛华,等. 益母草总碱在治疗丙酸睾酮诱导大鼠前列腺增生模型中的应用研究[J]. 黑龙江医药科学, 2015, 38(3): 82-83.
- [3] 郭琳,苗明三. 基于前列腺增生症临床病症特点的动物

- 物模型分析[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(1): 261-264.
- [4] 苗明三, 肖开, 高渐联, 等. 益母草总碱对老龄大鼠前列腺增生模型的影响[J]. 中草药, 2015, 46(13): 1937-1943.
- [5] 刘绍龔, 佐艇, 白明, 等. 乌鸡白凤丸对小鼠前列腺增生模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 180-183.
- [6] 左艇, 郭琳, 苗明三. 乌鸡白凤丸对前列腺增生大鼠模型的生化指标及组织形态的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(9): 3253-3256.
- [7] 张自刚, 刘铁柱, 张宁. 益母草总生物碱对前列腺增生模型大鼠 Bcl-2 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(20): 4951-4953.
- [8] 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: GB14925-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 1-24.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 郭琳. 定坤丹对大、小鼠前列腺增生模型的影响[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2016.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 马瑞娟, 苗明三. 一种中药药效的多指标评价新方法——综合权重法[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 569-572.

[责任编辑 刘德文]