

正交设计法研究羟基脲和米非司酮的优选 配比制作大鼠流产模型

郜洁¹, 巫海旺¹, 杜鑫¹, 林娜², 罗颂平^{1*}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:筛选制作肾虚-黄体抑制流产大鼠流产模型药物羟基脲和米非司酮的优选配比。方法:将 100 只雌性 SD 大鼠与 50 只雄性 SD 大鼠合笼,按照正交表 $L_9(3^4)$ 设计,共有 9 个受试样品,再平行增设阴性组(生理盐水),共 10 个组。妊娠第 1 天开始除阴性组灌服蒸馏水外各组动物灌服羟基脲按照正交设计表的剂量进行造模,配种后第 1,4,9 天测量动物的体重,第 10 天除外各组动物早上分别按照正交设计表的剂量加灌米非司酮。分别观察大鼠一般情况,测定体重变化、胚胎直径、计算胚胎流产率。**结果:**模型 1~4,6~8 组在怀孕第 11 天的胚胎直径与阴性组比较显著降低($P < 0.05$)。模型 1~9 组在怀孕第 11 天的流产率与阴性组比较显著增高($P < 0.05$)。在流产率和胚胎直径方面,米非司酮贡献度大于羟基脲。**结论:**以直观指标流产率和胚胎直径为衡量评价指标,初步筛选了模型 2,3,6 组的米非司酮与羟基脲的优选配比。

[关键词] 流产;动物模型;正交设计;羟基脲;米非司酮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0114-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160114

Orthogonal Design Method to Study Optimal Ratio of Hydroxyurea and Mifepristone in Miscarriage Models of Rats

GAO Jie¹, WU Hai-wang¹, DU Xin¹, LIN Na², LUO Song-ping^{1*}

(1. First Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To screen optimal ratio of hydroxyurea and mifepristone of kidney deficiency and luteum inhibition models of miscarriage rats. **Method:** After cohabitating 100 female SD rats and 50 male rats, there were 9 subjects according to the orthogonal table $L_9(3^4)$ design. In addition to this, control group (normal saline) was added. Therefore, there were 10 groups altogether. Beginning with first day of pregnancy, the control group was administered with distilled water while other groups were administered with hydroxyurea according to orthogonal design table. All weights of the rats were measured in the 1st, 4th, 9th day after mating. During the 10th day, all groups were administered with mifepristone according to orthogonal design table except the control group. Then observed the general conditions of the rats, measured the weights, embryo diameter, calculated the miscarriage rate. **Result:** The embryo diameter of model group 1-4, 6-8 decreased significantly ($P < 0.05$) comparing with control group during the 11th day of pregnancy. The miscarriage rate of model group 1-9 increased significantly ($P < 0.05$) comparing with control group during the 11th day of pregnancy. Therefore, mifepristone is more of contribution than hydroxyurea in miscarriage rate and embryo diameter. **Conclusion:** The miscarriage

[收稿日期] 20160401(012)

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81001533);中国博士后科学基金项目(20110490557);2015 年中医药强省专项基金医院中药制剂建设项目(粤中医办函[2015]102 号)

[第一作者] 郜洁,博士,副主任医师,从事自然流产的中医药研究,Tel:13760605046,E-mail:gjfkts@qq.com

[通讯作者] *罗颂平,博士,教授,从事生殖健康与生殖障碍的中医药研究,Tel:020-36585434,E-mail:songpingluo@hotmail.com

rate and embryo diameter are as the core indicators to evaluate pregnant rats and to screen the optimal ratio of hydroxyurea and mifepristone of model group 2, 3, 6.

[Key words] miscarriage; animal models; orthogonal design; Hydroxyurea; Mifepristone

自然流产(SA)是常见的生殖障碍,且有反复发作的趋势,严重影响女性的生殖健康甚至是家庭的幸福。中医药治疗 SA 有其特色与优势^[1-3],然而直接进行妊娠期妇女母胎界面取材研究有悖伦理,因此迫切需要模拟临床 SA 的病理特点与中医证候特征的动物模型。

我国最早的妇科动物模型是山西医学院于 1975 年用甲基胆蒽挂线法建立的子宫颈癌小鼠模型^[4]。此后妇科动物模型开始逐步发展,至今妇科动物模型研究进入飞速发展的时期^[5]。研究团队带头人罗颂平教授于 20 世纪初首创了肾虚-黄体抑制(病证结合)流产大鼠模型^[6],并将该模型应用于补肾安胎复方药物筛选研究及基础研究,动物模型的制作需要在大量、多次、规范的基础上不断反复验证并优化。笔者在前期对补肾安胎经典方寿胎丸配伍规律的研究中^[5]发现米非司酮和羟基脲对制作流产模型影响较大,同时初步总结制定了模型的标准制作流程。希冀引入数学方法正交设计以不同剂量组合的羟基脲和米非司酮给药造模,观察不同剂量米非司酮和固定剂量羟基脲联合用药后 SD 大鼠流产模型直观指标影响,寻找更为合适的造模剂量(全流产和不同程度的部分流产)为优化模型服务,为抗流产类补肾安胎复方的研发提供更合适的大鼠模型。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠,雌性 100 只,雄性 50 只,实验开始时雌性体重 247.2 ~ 291.9 g,雄性体重 405.6 ~ 450.7 g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2012-0001。

1.2 药物 羟基脲片(齐鲁制药有限公司,批号 112038LC),米非司酮(湖北葛店人福药业有限责任公司,批号 111003)。

1.3 仪器 550 型紫外-可见分光光度计(上海优尼柯仪器有限公司),AL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 造模方法 饲养大鼠 1 周并进行观察同时进行检疫,以雌-雄 2:1 进行合笼,合笼后第 2 天清晨检查雌性大鼠的阴道涂片,判断妊娠第 1 天的标准是以阴道图片出现大量精子,然后将每天配种后的孕

鼠随机平均分配到各正交水平组内,除阴性组灌服蒸馏水外从妊娠第 1 天开始各组动物灌服羟基脲,按照正交设计表的剂量进行造模,配种后第 1,4,9 天分别测量动物模型的体重,除阴性组外妊娠第 10 天各组动物早上分别按照正交设计表的剂量加服米非司酮。见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Level of factor			mg·kg ⁻¹
水平	A 羟基脲	B 米非司酮	
1	600	5	
2	450	4	
3	300	3	

2.2 实验因子和水平设置 按照正交表 L₉(3⁴)设计原则,设羟基脲为因素 A,米非司酮为因素 B,水平 3(药物配伍方法及水平设置见表 1),考虑 A 和 B 因素可能存在交互作用,因此选择 L₉(3⁴)正交表,将羟基脲和米非司酮配比为 9 种不同的组合。见表 2。

表 2 羟基脲与米非司酮正交配比 L₉(3⁴)正交表

Table 2 Orthogonal table L₉(3⁴) of study on orthogonal mixing rate experiment with hydroxyurea and mifepristone

组别	A 羟基脲 贡献度	B 米非司酮 贡献度	A × B 两者交互 作用贡献度	系统误差 检测
模型 1	1	1	1	1
模型 2	1	2	2	2
模型 3	1	3	3	3
模型 4	2	1	2	3
模型 5	2	2	3	1
模型 6	2	3	1	2
模型 7	3	1	3	2
模型 8	3	2	1	3
模型 9	3	3	2	1

2.3 分组 按照正交表 L₉(3⁴)设计,共分为 9 个受试组,从模型 1 组至模型 9 组,再平行增设阴性组(生理盐水),共 10 个组。

2.4 剂量设置 (药量计算方法)按公斤体重公式。

$$\frac{d_B}{d_A} = \frac{R_B}{R_A} \times \left(\frac{W_B}{W_A} \right)^{\frac{2}{3}}$$

折算大鼠的等效剂量,作为给药剂量。 R . 比重系数; B . 大鼠; A . 人。

2.5 检测指标 每天观察大鼠的精神、形态、毛色、饮食、大便等。每 4 d 称体重,并测量水料 1 次。

计算活胎数、流产数及流产率:剖开动物模型子宫后,计算总胎数、活胎数、流产数与流产率。并用游标卡尺测量固定一侧固定位置的胚胎直径。

$$\text{流产率} = \frac{\text{流产胚胎数}}{\text{流产胚胎数} + \text{正常胚胎数}} \times 100\%$$

2.6 统计学分析 用 Excel 2013 输入公式,采用正交设计的方差分析进行统计处理,检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 一般情况观察 阴性组大鼠一般状态良好,毛色光亮,精神较好,动作灵活,体重呈稳步增长,大便正常。各模型组大鼠配种前未发现异常。模型 1 组孕鼠在给予羟基尿后第 2 天陆续出现进食量和饮水量均减少,体重下降,注射米非司酮后个别出现兴奋的现象。模型 2,4,5,7 组孕鼠给予羟基尿后的进食量和饮水量均减少,体重有增长缓慢的现象,注射米非司酮后个别出现兴奋。模型 3,6,8,9 组一般状态良好,毛色光滑,进食量正常,体重稳步增长,未发现异常情况。

3.2 羟基脲与米非司酮对妊娠期肾虚-黄体抑制流产大鼠体重的变化 模型 6 组孕鼠在造模第 4 天的体重与阴性组比较具有统计学意义 ($P < 0.01$);模型 1~3,5,6 组孕鼠在造模第 9 天的体重与阴性组比较无统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 羟基脲与米非司酮的不同正交配比模型对模型大鼠怀孕期间体重的影响

Table 3 Weight of pregnant rats caused by different orthogonal mixing rate experiment with hydroxyurea and mifepristone ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 1 天	第 4 天	第 9 天
阴性	9	271.6 ± 13.5	292.5 ± 16.0	305.7 ± 17.1
模型 1	8	272.8 ± 14.4	273.0 ± 23.0	266.2 ± 37.6 ¹⁾
模型 2	10	25.8 ± 5.8	261.4 ± 11.0	254.0 ± 9.4 ²⁾
模型 3	10	277.2 ± 18.4	269.4 ± 25.2	276.9 ± 25.1 ¹⁾
模型 4	9	269.1 ± 7.4	282.5 ± 7.0	291.9 ± 11.0
模型 5	8	272.6 ± 12.3	275.4 ± 15.0	284.1 ± 14.7 ¹⁾
模型 6	9	264.2 ± 18.8	263.9 ± 15.3 ²⁾	273.6 ± 14.2 ²⁾
模型 7	9	274.4 ± 19.8	289.7 ± 19.9	298.2 ± 20.3
模型 8	8	266.0 ± 11.4	276.3 ± 15.2	287.0 ± 17.2
模型 9	9	279.0 ± 23.1	288.5 ± 19.2	300.4 ± 19.7

注:与阴性组比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.3 羟基脲与米非司酮正交对比对妊娠期肾虚-黄体抑制流产大鼠模型造模效果的影响 实验结果表明,模型 1~4,6~8 组在怀孕第 11 天的胚胎直径与阴性组比较,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型 1~9 组在怀孕第 11 天的流产率与阴性组比较显著增高 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 羟基脲与米非司酮的不同正交配比模型对模型大鼠的胚胎直径、流产率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Embryo diameter, abortion rate of model rats caused by different orthogonal mixing rate experiment with hydroxyurea and mifepristone ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胚胎直径/mm	流产率/%
阴性	9	3.48 ± 0.56	0
模型 1	8	1.97 ± 0.16 ²⁾	77.7 ± 37.3 ²⁾
模型 2	10	2.14 ± 0.53 ²⁾	56.4 ± 43.3 ²⁾
模型 3	10	2.14 ± 0.36 ²⁾	48.0 ± 38.7 ²⁾
模型 4	9	2.07 ± 0.36 ²⁾	100.0 ± 0.0 ²⁾
模型 5	8	2.72 ± 0.70	43.4 ± 36.6 ²⁾
模型 6	9	2.51 ± 0.56 ²⁾	31.9 ± 36.4 ²⁾
模型 7	9	1.96 ± 0.31 ²⁾	88.9 ± 24.8 ²⁾
模型 8	8	2.40 ± 0.47 ²⁾	65.2 ± 41.3 ²⁾
模型 9	9	2.91 ± 0.44	36.2 ± 41.6 ²⁾

3.4 羟基脲与米非司酮正交对比对妊娠期肾虚-黄体抑制流产大鼠的影响正交分析

3.4.1 对妊娠期肾虚-黄体抑制流产大鼠胚胎直径的影响 正交分析组间比较显示,模型 1~4,6~8 组在怀孕第 11 天的胚胎直径与阴性组比较显著性降低,具有统计学差异 ($P < 0.05$)。直观分析,在研究范围内,第 11 天时当羟基脲取一水平、米非司酮取一水平时,孕鼠的胚胎直径最小。方差分析显示,在胚胎直径方面中,怀孕第 11 天时米非司酮的贡献度最大 ($F = 8.39$),具有统计学差异 ($P < 0.05$);羟基脲次之 ($F = 4.37$),无统计学差异;两者之间未见明显的协同作用。见表 2,4,5。

3.4.2 对妊娠期肾虚-黄体抑制流产大鼠流产率的影响正交分析 组间比较显示,模型 1~9 组在怀孕第 11 天的流产率与阴性组比较显著性升高,具有统计学差异 ($P < 0.05$)。直观分析,在研究范围内,第 11 天时当羟基脲取三水平、米非司酮取一水平时,孕鼠的流产率最大。方差分析显示,在流产率方面中,怀孕第 11 天时米非司酮的贡献度最大 ($F = 29.37$),具有统计学差异 ($P < 0.01$);羟基脲次之 ($F = 0.281$),无统计学差异;两者之间未见明显的协同作用。见表 2,4,6。

表 5 羟基脲与米非司酮的正交配比对模型大鼠第 11 天胚胎直径的影响方差分析

Table 5 Variance analysis of model rats' embryo diameter on day 11 of pregnancy

因素	来源	<i>l</i>	<i>v</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
1	羟基脲	0.238 2	1	0.238 2	4.37	>0.05
2	米非司酮	0.456 8	1	0.456 8	8.39	<0.05
3	羟 × 米	0.016 8	1	0.016 8	0.31	>0.05
4	系统误差	0.217 8	1	0.217 8	4	>0.05

表 6 羟基脲与米非司酮的正交配比对模型大鼠第 11 天流产率的影响方差分析

Table 6 Variance analysis of model rats abortion rate on day 11 of pregnancy

因素	来源	<i>l</i>	<i>v</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
1	羟基脲	37.6	1	37.6	0.281	>0.05
2	米非司酮	3 929.3	1	3 929.3	29.37	<0.01
3	羟 × 米	55.4	1	55.4	0.414	>0.05
4	系统误差	535.2	1	535.2	4	>0.05

4 讨论

随着实验动物的质量与造模的科学性越来越为重视,研究模型不规范,研究结论的科学性无从谈起。RU486 是孕酮受体拮抗剂^[7],在受体水平特异性阻断孕酮作用,引起蜕膜退变,对妊娠大鼠有抗生育效果,模仿了流产的过程。羟基脲能明显抑制核苷酸的代谢,是一种核苷酸还原酶抑制剂^[8],使蛋白质代谢发生相应的改变,导致虚损症状,可造成体重和体温下降、体毛枯槁、活动迟缓、萎靡、生殖机能减退等肾虚症状,并出现脏器重量减轻, DNA 合成减少等指征。本实验周期时间为 10 d,大鼠妊娠生理时间为 21 d,研究针对孕鼠早中期阶段。在前期研究中发现,既往流产模型溴隐停致黄体不健流产模型^[9]、米非司酮致黄体抑制流产模型(病理模型)对制作该模型影响较大,故研究羟基脲和 RU486 药物剂量的比例关系及其有无无交互作用,期望寻找最佳造模关系,为制作更贴近临床病理特点的肾虚-黄体抑制模型奠定基础。

正交试验设计方法^[10]是一种多因素多水平实验的数学方法,可以用于科学地挑选实验条件,合理安排实验。据报道运用正交设计来研究动物模型的研究较少^[11-12],本实验以羟基脲和米非司酮作为影响因素,设置 3 水平 2 因素 9 次实验的正交设计,水平范围的选择是根据前期的研究基础及文献报道筛选出来的剂量范围,通过直观核心指标综合评价,来优化制作模型药物的配比。

正交设计统计需要结合临床特点及核心指标,明确所制作的动物模型的用途,此实验需要筛选的模型是为了可以较好评估补肾安胎中药复方的药效。模型的直观核心指标是胚胎流产率和胚胎直径,既不能选择流产率太高(完全流产),亦不能选择流产率过低的模型(模型制作欠成功),选择能够体现补肾复方安胎逆转药效的模型。结果表明,从胚胎直径排除了模型 5,9 的组合,与阴性组均没有差异,模型差异较小无法衡量补肾安胎药效。从流产率综合分析模型组 1,4,7,8 组的流产率均高于 60%,倾向于完全流产,与临床脱节,无法使用中药干预。而模型组 9 流产率过低,补肾安胎药效的逆转效果也不利于评价药效。故以流产率和胚胎直径为衡量评价指标,初步筛选出了模型 2,3,6 组的优选配比。同时研究结果表明无论是胚胎直径还是流产率,米非司酮的贡献度大于羟基脲,但二者没有交互作用,为以米非司酮制作流产“病”的模型因素,以羟基脲制作“肾虚证”的模型因素的设定提供了证据。

从造模后模型动物的宏观表现判定所属证候^[13],即模型动物宏观体征、行为表现地判定以及超氧化物歧化酶(SOD)指标,结果表明流产模型大鼠出现类似肾虚症状,“肾虚证”量化指标不足,体重下降,毛发枯槁,喜蜷缩,精神萎靡,摄食饮水减少等,评价方法无法量化,缺乏客观化。由于在动物宏观的行为与体征观察中遇到的困难,学者参考证候生物学基础研究的成果^[14-15],到目前为止引入 SOD 指标均不特异,不能作为证候诊断的特异性指标。

在本研究中,在规范其他造模因素条件下,研究结果以直观指标流产率和胚胎直径为衡量评价指标,初步筛选了模型 2,3,6 组的优选配比,但是这些优选配比需要进一步通过经典补肾安胎复方以方测证的验证,才能成为较好评价中药复方的工具,为筛选母胎安全的药物研究提供优质的模型工具奠定基础。

[参考文献]

[1] 李艳芳,李相宜,罗颂平. 复发性流产患者成功妊娠后妊娠结局研究[J]. 广州中医药大学学报,2015,32(6):979-983.

[2] 刘新玉,黄长盛,罗颂平. 60 例复发性流产患者中药安胎治疗的疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志,2013,22(14):1485-1486.

[3] 倪婷婷,卫爱武. 中医药治疗复发性流产及其安全性研究概况[J]. 中医杂志,2011,52(23):2058-2061.

[4] 尤昭玲. 妇产科学实验动物学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:63-64.

- [5] 郜洁, 谢蓝, 巫海旺, 等. 中医妇科病证结合动物模型研究思路[J]. 中医杂志, 2016, 57(4): 299-301.
- [6] 宁艳, 罗颂平. 补肾健脾中药复方对肾虚黄体抑制妊娠大鼠流产模型的实验研究[J]. 中国医药学报, 2000, 15(6): 28-30.
- [7] 张俊慧, 周剑萍, 陆湘云, 等. 米非司酮对人蜕膜雌, 孕激素受体及血清生殖激素的影响[J]. 中华妇产科杂志, 1996, 31(10): 610-613.
- [8] 周莉, 吴纯启, 姜忠彩, 等. 羟基脲对大鼠生育能力的影响[J]. 毒理学杂志, 2006, 20(3): 167-168.
- [9] 卢颖莹, 谢淑武, 归绥琪, 等. 补肾益气方对改良溴隐亭致大鼠流产模型黄体功能的影响[J]. 生殖与避孕, 2009, 29(2): 65-69.
- [10] 于立芬. 数理统计方法[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 170.
- [11] 赵艳玲, 蔡光明, 刘军, 等. 正交试验法优选小鼠四氯化碳肝损伤模型[J]. 解放军药学报, 2001, 17(4): 215-217.
- [12] 楚博, 江涛, 唐春萍, 等. 正交试验优化大鼠子宫内膜异位症模型[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(7): 973-975.
- [13] 梁茂新, 范颖. 中医证和病证结合动物模型研制的利弊与症结[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(7): 1656-1664.
- [14] 郑洁, 朱莹, 高昂, 等. 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的研制[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016(3): 182-187.
- [15] 王忆勤, 郭睿, 许朝霞, 等. 中医四诊客观化研究在冠心病诊断中的应用[J]. 中医杂志, 2016, 57(3): 199-203.

[责任编辑 邹晓翠]

《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database, 简称 CSCD)”定量遴选、专家定性评估,《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)。

2015—2016 年度 CSCD 收录来源期刊 1200 种, 其中中国出版的英文期刊 194 种, 中文期刊 1006 种。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分, 其中核心库 872 种(以备注栏中 C 为标记); 扩展库 328 种(以备注栏中 E 为标记)。

CSCD 具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点, 自提供使用以来, 深受用户好评, 被誉为“中国的 SCI”。CSCD 是我国第一个引文数据库, 曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。