

基于数据挖掘的原发性痛经动物模型分析

范星宇, 廖晓倩, 王梓仪, 黄淑敏, 胡思远*, 胡志希*
(湖南中医药大学 中医学院, 长沙 410208)

[摘要] **目的:**研究原发性痛经动物模型造模特点,为原发性痛经动物模型的规范化提供参考。**方法:**通过检索原发性痛经动物模型的文献,建立数据库,归纳实验动物种类、造模方法、造模周期、药物剂量、药物注射方式、高频检测指标、阳性药种类等,并进行分析。**结果:**纳入符合标准的171篇文献,原发性痛经动物模型以SD大鼠、Wistar大鼠和昆明种小鼠为主,大部分采用雌二醇+缩宫素联用制备大(小)鼠痛经模型,周期一般在 $9\text{ d}\leq t\leq 12\text{ d}$,大鼠剂量以苯甲酸雌二醇第1天和第10天 $0.5\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$,第2~9天 $0.2\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$,缩宫素为 $2\text{ U}\cdot\text{d}^{-1}$ 的用法最为常见,在小鼠实验中,以己烯雌酚 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、缩宫素 $20\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的用法最为常见,注射方式中,缩宫素基本以腹腔注射为主,雌二醇(苯甲酸雌二醇、己烯雌酚)以皮下注射为主,检测指标偏重于扭体反应的相关行为学指标,或通过酶联免疫吸附测定检测检测子宫或血清中的相关生化指标,阳性药以西药布洛芬为主,中药以痛经宝为主。**结论:**原发性痛经动物模型虽已成为热点,但现有综述阐述或不全面,比较笼统,相关实验文献的模型成膜标准、中医证型评价不够完善,此次通过对动物模型的大数据总结分析,并提出一些针对性看法,为建立规范、理想的原发性痛经动物模型提供指导和参考依据,以便开展此疾病的研究。

[关键词] 数据挖掘; 原发性痛经; 动物模型

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)02-0166-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221616

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20221025.1530.003.html>

[网络出版日期] 2022-10-26 8:32

Primary Dysmenorrhea Animal Models Based on Data Mining

FAN Xingyu, LIAO Xiaoqian, WANG Ziyi, HUANG Shumin, HU Siyuan*, HU Zhixi*
(School of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine,
Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To study the modeling characteristics of primary dysmenorrhea models in animals and to provide references for the standardization of the primary dysmenorrhea animal models. **Method:** The research articles on animal models of primary dysmenorrhea were retrieved to establish a database. The types of experimental animals, modeling methods, modeling cycle, drug dosage, drug injection methods, high-frequency detection indicators, positive drug types, etc., were summarized and analyzed. **Result:** A total of 171 research articles that met the criteria were included. The animals for primary dysmenorrhea model induction were mainly SD rats, Wistar rats, and Kunming mice. Most of them were prepared by combining estradiol and oxytocin with the modeling cycle of $9\text{ d}\leq t\leq 12\text{ d}$. In terms of drug dosage for rats, estradiol benzoate was $0.5\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ on the 1st and 10th days and $0.2\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ on the 2nd to 9th days, while oxytocin at $2\text{ U}\cdot\text{d}^{-1}$ was the most common. In terms of drug dosage for mice, diethylstilbestrol at $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and oxytocin at $20\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$

[收稿日期] 2022-08-01

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82274412,81774208);广东省重点领域研发计划项目(2020B1111100001);湖南省自然科学基金项目(2020JJ4062,2020JJ5408);湖南中医药大学校级研究生创新课题项目(2022CX47,2021CX04,2022CX01,2022CX03)

[第一作者] 范星宇,在读硕士,从事心血管疾病证本质与诊治规律研究,E-mail:394718739@qq.com

[通信作者] * 胡思远,博士,讲师,从事心血管疾病证本质与诊治规律研究,E-mail:634960445@qq.com;

* 胡志希,博士研究生导师,教授,从事心血管疾病证本质与诊治规律研究,E-mail:515800272@qq.com

were the most common. In terms of injection methods, oxytocin was mainly administered by intraperitoneal injection and estradiol (estradiol benzoate and diethylstilbestrol) by subcutaneous injection. The detection indicators were mainly behavioral indicators of the writhing assay or the related biochemical indicators in the uterus or serum by enzyme-linked immunosorbent assay. The positive western medicines were dominated by ibuprofen and Chinese medicines by Tongjingbao. **Conclusion:** Although primary dysmenorrhea animal models have become a hot topic, the existing reviews are not comprehensive, and the modeling standards and traditional Chinese medicine (TCM) syndrome evaluation are inadequate. By summarizing and analyzing the big data of the animal models, this study proposed some specific views to provide guidance and references for establishing the standard and ideal animal models of primary dysmenorrhea, so as to carry out research on this disease.

[Keywords] data mining; primary dysmenorrhea; animal model

痛经是妇女正值经期或经行前后,出现周期性小腹疼痛,或伴腰骶酸痛,甚至剧痛晕厥,影响正常工作及生活的疾病^[1]。现代医学将痛经分为原发性痛经和继发性痛经,无器质性病变的功能性痛经为原发性痛经,临床较为常见^[2],可见于45%~90%的经期妇女^[3]。现代研究表明,痛经患者子宫内膜和月经血中前列腺素 $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)和前列腺素 E_2 (PGE_2)含量均较正常妇女明显升高, $PGF_{2\alpha}$ 含量升高是造成痛经的主要原因, $PGF_{2\alpha}$ 含量高可引起子宫平滑肌过强收缩,血管痉挛,造成子宫缺血、乏氧状态而出现痛经;原发性痛经还与血管加压素、内源性缩宫素以及 β -内啡肽(β -EP)等物质的增加有关,也受精神、神经因素影响^[4];因此,西医学对于原发性痛经多采取激素类药物、解热镇痛药及非甾体抗炎药发挥疗效^[5]。中医学将痛经病机概括为“不荣则痛”或“不通则痛”,通过辨其虚实寒热以进一步运用相应中药复方汤剂、中成药、针灸、耳穴及穴位敷贴等手段调和人体阴阳气血发挥疗效^[1,6]。动物模型是临床治疗与理论研究的的重要桥梁,建立良好的原发性痛经动物模型对于其诊断及临床防治有着重要意义。国内从1986年开始开展原发性痛经体内动物模型实验^[7],发展至今已有相对完善的造模方法,现相关综述阐述了原发性痛经动物模型诸多复制方法^[8-9],但通过文献阅读发现,其讲述造模内容不全面,重点阐述造模方法,但对于具体实施的相关细节描述不完整,导致相关实验文献的模型成模标准不统一、中医证候模型的建立与评价不够完善,造成原发性痛经动物模型难以规范化,故有必要通过对国内外原发性痛经动物模型实验进行大数据整理及提点总结,从实验动物种类、造模方法、造模周期、药物剂量、药物注射方式、高频检测指标、阳性药种类等方面进行归纳,探索原发性痛经动物模型研究的现状与待完善的缺陷,从而促进对

原发性痛经的更深层次的病因病机、新药筛选等方面的研究,为原发性痛经动物模型的规范与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 数据资料来源与检索策略 在中国知网、万方数据库、维普中文期刊服务平台的“高级检索”,以“原发性痛经”并且“动物模型”或“鼠”或“猪”或“兔”或“犬”为主题检索;在PubMed数据库以“primary dysmenorrhea” and “animal model” or “mouse” or “pig” or “rabbit” or “dog”为主题检索,其中时间不限,检索时间截至至2022年3月18日。

1.2 文献筛选标准 ①纳入标准:研究原发性痛经的全部造模成功的动物实验文献。②排除标准:排除非原发性痛经模型、非动物实验、体外实验、综述、文献研究、资料不全、造模药物说明粗略、检测方法未说明清楚、检测指标描述粗略、检测指标方法描述与结果不一致、会议论文、同一实验或同一批实验的文献。

1.3 资料提取与处理 使用NoteExpress标准版进行文献管理。初步检索知网293篇、万方222篇、维普104篇、Pubmed 24篇,共643篇文献。查重后排除216篇,余427篇文献。通过题目与摘要阅读,删除主题不符的文献104篇,余323篇。阅读全文删除不符合纳入标准的文献152篇,最终纳入171篇文献,其中6篇文献中有多个体内动物模型实验。参照《常用医药研究动物模型》^[10]进行规范动物名称、种类。

应用Excel 2019软件,录入文章年份、作者、题目、实验动物种类、造模方法、剂量、阳性对照药、检测指标等信息,建立原发性痛经模型的数据文件,对录入的数据进行整理、统计和分析,定量归纳造模要素^[11]。

2 结果

2.1 原发性痛经动物模型种类应用情况 将涉及原发性痛经动物模型的171篇文献中的实验动物进行分类,其中6篇文献中有多个体动物模型实验,总频数为178。总共7类动物,其中SD大鼠频数为89次,占比50.00%;Wistar大鼠频数为41次,占比23.03%;昆明种小鼠频数为30次,占比16.85%;ICR小鼠频数为14次,占比7.87%;NIH小鼠频数为2次,占比1.12%;野生型小鼠与近交系BALB/c小鼠频数均为1次,分别占比0.56%,见表1。

2.2 原发性痛经动物模型造模方法概况 对171篇中的178次实验进行造模方法统计分类,发现主要以雌二醇、缩宫素或前列腺素联用的基础上,加其他限制条件(冷冻、劳累、肾上腺素、手术等)制造

表1 原发性痛经体内动物模型实验动物类型

Table 1 Primary dysmenorrhea *in vivo* animal model experimental animal type

动物类型	频数/次	占比/%
SD大鼠	89	50.00
Wistar大鼠	41	23.03
昆明种小鼠	30	16.85
ICR小鼠	14	7.87
NIH小鼠	2	1.12
野生型小鼠	1	0.56
近交系BALB/c小鼠	1	0.56

原发性痛经动物模型。其中无论何种雌二醇的作用均为提高子宫的敏感性,然后再注射催产素或者前列腺素以诱发子宫的痉挛性收缩产生的疼痛以此来模拟痛经症状^[8],具体造模方法见表2。

表2 原发性痛经动物模型造模方法概况

Table 2 Summary of modeling method of primary dysmenorrhea animal model

造模因素	造模方法	模型原理	造模周期/d	动物种类	剂量	剂量频数/次	方法总频数/次	占比/%	
双因素造模法	苯甲酸雌二醇+缩宫素/前列腺素	通过注射雌激素类药物提高动物子宫敏感性,然后再注射缩宫素或前列腺素以诱发子宫的痉挛性收缩产生的疼痛以此来模拟痛经症状 ^[8]	3~21	大鼠	苯甲酸雌二醇第1天和第10天0.5 mg,第2~9天0.2 mg;缩宫素均为2 U·d ⁻¹	42	79	44.38	
					苯甲酸雌二醇第1天和第10天0.8 mg,第2~9天0.4 mg;缩宫素均为2 U·d ⁻¹	5			
					苯甲酸雌二醇第1天和第10天0.8 mg,第2~9天0.4 mg;肾上腺素均为0.3 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	2			
					小鼠 苯甲酸雌二醇第1天和第10天5 mg·kg ⁻¹ ,第2~9天2.5 mg·kg ⁻¹ ;缩宫素为100 U·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	2			
					苯甲酸雌二醇10 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ ;缩宫素为100 U·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	2			
	苯甲酸雌二醇0.1 mg·d ⁻¹ ;缩宫素为20 U·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	2							
	己烯雌酚+缩宫素	3~56	大鼠	己烯雌酚第1天和第10天0.8 mg,第2~9天0.4 mg;缩宫素均为2 U·d ⁻¹	15	57			32.02
				己烯雌酚第1天和第10天0.5 mg,第2~9天0.2 mg;缩宫素均为2 U·d ⁻¹	7				
				己烯雌酚第1天和第10天0.8 mg,第2~9天0.4 mg;缩宫素均为0.2 U·d ⁻¹	4				
				己烯雌酚3 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ ;缩宫素均为14 U·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	2				
己烯雌酚2 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ ;缩宫素均为20 U·kg ⁻¹ ·d ⁻¹				2					

续表 2

造模因素	造模方法	模型原理	造模周期/d	动物种类	剂量	剂量频数/次	方法总频数/次	占比/%	
多因素病证结合造模法	戊酸雌二醇+缩宫/前列腺素	全身冷冻法,符合中医“寒凝”“不通则痛”的病证特点 ^[12-16]	7~12	小鼠	己烯雌酚 2 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ ;缩宫素均为 20 U·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	8	11	6.18	
				大鼠	戊酸雌二醇 3 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ ,缩宫素均为 14 U·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	2			
				小鼠	戊酸雌二醇 0.5 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ ,缩宫素均为 2 U·d ⁻¹	3			
多因素病证结合造模法	冰柜持续冷冻+苯甲酸雌二醇+缩宫素	全身冷冻法,符合中医“寒凝”“不通则痛”的病证特点 ^[12-16]	10	大鼠	苯甲酸雌二醇第 1 天和第 10 天 0.5 mg,第 2~9 天 0.2 mg;缩宫素均为 2 U·d ⁻¹	14	14	7.87	
			4~12	大鼠	冰水浴,符合中医“寒”“湿”两种邪气的特点,模拟临床寒湿凝滞型原发性痛经的发病情况 ^[17-20]	戊酸雌二醇 3 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ +缩宫素 14 U·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	2	6	3.37
						腹部放置于冰块上+苯甲酸雌二醇+缩宫素	局部冻伤法,使子宫位置局部受寒,符合中医寒邪所致寒凝血瘀的病证特点 ^[21-24]	12	大鼠
手术病证结合造模法	手术切除背部棕色脂肪+丙硫氧嘧啶+己烯雌酚+缩宫素	手术切除肩胛骨间棕色脂肪并予以丙硫氧嘧啶抑制甲状腺机能,将导致机体产热机能下降,出现全身及局部的产热不足 ^[28] ;再联合雌激素和缩宫素建立寒凝血瘀证痛经模型	12	大鼠	苯甲酸雌二醇第 1 天和第 12 天 0.8 mg,第 2~11 天 0.4 mg;肾上腺素 0.3 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ ;缩宫素均为 2 U·d ⁻¹	2	3	1.69	
			49	大鼠	己烯雌酚 1 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ ;丙硫氧嘧啶 30 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ ,9 个等比剂量组的催产素	1	1	0.56	
			26	小鼠	经激素处理的去势雌性小鼠,在花生油诱导蜕膜化后,用孕酮诱发月经 ^[29] ;冷水浸束缚的实验方法也符合寒湿凝滞型原发性痛经病机特征 ^[30]	15 d ¹ 7d 0.37 nmol 雌二醇+21 d 0.16 nmol 孕酮,0.02 nmol 雌二醇+22~23 d 18.3 nmol 雌二醇+23 d 子宫角 20 μL 花生油、子宫腔 40 μL 花生油+25 d 120mg·kg ⁻¹ 米非司酮	1	1	0.56

将药物剂量统一以 mg 为单位,缩宫素一般单位为 U 或 IU,统一为 U,若有缩宫素注射液,文中用 mL 单位,寻找相关批次并统一计算以 U 为单位。

在 178 次实验中,通过筛选发现拥有大鼠 39 种、小鼠 36 种不同药物不同用法用量,故将除手术病证结合造模法的两种方法之外的频数为 1 次的用法排除,得到表 2 中的剂量与剂量频数。

可以发现,在大鼠实验中,以苯甲酸雌二醇第 1 天和第 10 天 0.5 mg·d⁻¹,第 2~9 天 0.2 mg·d⁻¹,缩宫素为 2 U·d⁻¹ 的用法最为常见;其次为己烯雌酚第 1 天和第 10 天 0.8 mg·d⁻¹,第 2~9 天 0.4 mg·d⁻¹,缩宫素为 2 U·d⁻¹ 的用法。在小鼠实验中,以己烯雌酚 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹、缩宫素 20 U·kg⁻¹·d⁻¹ 的用法最为常见。

2.3 原发性痛经动物模型造模周期 对 171 篇中的 178 次实验进行造模周期统计,在 130 次的大鼠实验中以 9 d≤t≤12 d 的造模周期为最多,共 111 次;48 次小鼠实验中,9 d≤t≤12 d 和 0 d≤t≤4 d 的造模周期偏多,分别为 17 次和 16 次,见表 3。

表 3 原发性痛经动物模型造模周期

Table 3 Periodic table of animal models of primary dysmenorrhea

动物类别	频数/次				
	0 d≤t≤4 d	5 d≤t≤8 d	9 d≤t≤12 d	13 d≤t≤16 d	17 d≤t
大鼠	1	7	111	6	5
小鼠	16	10	17	7	2

2.4 原发性痛经动物模型造模药物注射方式 在注射方式中,缩宫素主要以腹腔注射为主,频数为171次,占比96.07%;雌二醇类药物注射以皮下注射

为主,苯甲酸雌二醇和己烯雌酚频数分别为91次和41次,占比分别为51.12%和22.47%。造模药物注射方式总结,见表4。

表4 原发性痛经动物模型造模药物注射方式

Table 4 Form of drug injection in animal model of primary dysmenorrhea

注射方式	频数/次	占比/%	注射方式	频数/次	占比/%
腹腔注射缩宫素	171	96.07	肌肉注射缩宫素	2	1.12
皮下注射苯甲酸雌二醇	91	51.12	皮下注射戊酸雌二醇	2	1.12
皮下注射己烯雌酚	40	22.47	腹腔注射戊酸雌二醇	1	0.56
灌胃戊酸雌二醇	11	6.18	灌胃丙硫氧嘧啶	1	0.56
腹腔注射苯甲酸雌二醇	10	5.62	灌胃己烯雌酚	1	0.56
灌胃己烯雌酚	9	5.06	肌肉注射苯甲酸雌二醇	1	0.56
腹腔注射己烯雌酚	8	4.49	肌肉注射己烯雌酚	1	0.56
灌胃苯甲酸雌二醇	3	1.69	米非司酮灌胃	1	0.56
皮下注射肾上腺素	3	1.69	皮下注射β-雌二醇	1	0.56
腹腔注射前列腺素	3	1.69	往子宫角、子宫腔注射花生油	1	0.56

2.5 原发性痛经动物模型高频检测指标 将涉及体内动物模型的171篇文献中的178次实验检测指标进行分类,若同一组织检测手段为不同类型,如子宫组织检测苏木精-伊红染色(HE)病理切片和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白等指标,则分开计算;若同一组织检测指标手段相同,如用酶联免疫吸附检测(ELISA)同时检测子宫组织匀浆上清液中的PGF_{2α}、PGE₂及缩宫素(OT)含量,则将其归为一类^[31]。通过对检测指标的梳理,选取频数≥5次的指标,其中30 min内扭体反应次数频数最高,为121次,占比67.98%;其次为扭体反应潜伏期和ELISA法检测子宫组织匀浆上清液相关生化指标,频数分别为71和59次,分别占比39.89%和33.15%。见表5。

2.6 原发性痛经动物模型阳性药种类 在体内动物实验中,涉及到阳性药对照的文献一共有104篇文献,109次实验;其中有7篇文献提供了两种阳性药,故阳性药总频数为116次,见表6。西药以布洛芬用药频数最高,为35次,占比32.11%;中药以痛经宝用药频数最高,为19次,占比17.43%。

2.7 原发性痛经动物模型成功制备标准 在动物实验中,有17篇文献没有提及到模型成功制备标准,绝大部分文献均以扭体反应为原发性痛经动物模型成功制备标准,扭体反应表现为大鼠腹部收缩内凹,躯干与后肢伸展,臀部与一侧肢体内旋^[32],通过子宫的痉挛性收缩产生的疼痛模拟痛经症状。在寒凝血瘀证模型或寒凝证模型类的文献中,有部

分文献会添加寒凝血瘀表征或寒凝表征标准来确认制备成寒凝血瘀证模型或寒凝证模型。寒凝血瘀表征,在扭体反应的基础上出现寒战、蜷缩少动、喜扎堆、呼吸弱、弓背竖毛、爪尾部紫暗、耳色暗红、毛色枯槁、舌质紫暗、舌下脉络增粗增长及粪质不成形^[33-34]。寒凝表征为寒颤、蜷缩少动、耳色暗红、爪甲及唇部紫暗等^[35-37]。其中还有2篇文献会运用寒证表征评分来对大鼠行为进行评分,并进行对照^[38-39]。见表7。

3 结果与分析

3.1 常用实验动物分析 目前用于制备原发性痛经的动物有SD大鼠、Wistar大鼠、昆明种小鼠、ICR小鼠、NIH小鼠、野生型小鼠与近交系BALB/c小鼠。由于鼠类饲养价格和使用成本均较低,繁殖周期短,这是与其他动物对比所特有的优势,所以原发性痛经动物模型基本以选择鼠类为主。并且以SD大鼠和Wistar大鼠使用居多,可能与其生长发育快有关,并且SD大鼠对性激素敏感,Wistar大鼠性周期稳定^[40]。

3.2 常用造模方法分析 ①雌二醇+缩宫素联用制备大(小)鼠痛经模型,通过注射雌激素类药物提高动物子宫敏感性并同步化子宫周期造成人工动情,然后再注射缩宫素或前列腺素以诱发子宫的痉挛性收缩产生的疼痛,表现为扭体反应。基本符合西医对于原发性痛经的诊断,具有痛、无器质性、非盆腔炎及子宫内膜异位症等疾病引起的特点,是原发性痛经动物模型的最基础模型。

表5 原发性痛经动物模型高频检测指标

Table 5 High-frequency detection index table of primary dysmenorrhea animal model

检测指标	频数/次	占比/%
30 min内扭体反应次数	121	67.98
扭体反应潜伏期	71	39.89
ELISA检测子宫组织匀浆上清液相关生化指标	59	33.15
ELISA检测血清相关生化指标	42	23.60
扭体反应抑制率	41	23.03
扭体发生率	33	18.54
20 min内扭体反应次数	23	12.92
Western blot法检测子宫组织相关蛋白	21	11.80
放射免疫法检测子宫组织匀浆上清液相关激素指标	20	11.24
聚合酶链式反应法(PCR)检测子宫组织相关mRNA表达	19	10.67
扭体评分	15	8.43
HE染色检测子宫组织病理学	14	7.87
ELISA检测血浆相关生化指标	14	7.87
血液流变学检测	9	5.06
硝酸还原酶法子宫组织匀浆上清液NO含量	9	5.06
免疫组化法测定子宫组织相关蛋白	8	4.49
放射免疫法检测血浆相关激素指标	8	4.49
噻唑蓝(MTT)比色法检测动物脾脏自然杀伤(NK)细胞活性	8	4.49
子宫指数	6	3.37
甲基百里香酚蓝比色法(MTB)测定子宫组织匀浆上清液Ca ²⁺ 含量	6	3.3
40 min内扭体反应次数	6	3.37

②雌二醇+冷冻+缩宫素联用制备大(小)鼠痛经模型,通过在①的基础上加入冷冻的方式,制造寒凝(血瘀)的特点,从病因方面造模,模仿寒凝(血瘀)证患者的久居寒冷之地感受寒邪特点,是具有中医特色的动物模型。

③雌二醇+水浴使劳累+肾上腺素+缩宫素联用制备大(小)鼠痛经模型,是在②的基础上加入肾上腺素,肾上腺素能加强大鼠应激反应,并且可以促进血瘀形成,形成血液黏、凝之类似“血瘀”改变^[41],使造模成功率上升。

④手术+雌二醇+缩宫素联用制备大鼠痛经模型,通过切除肩胛骨间棕色脂肪并给予丙硫氧嘧啶抑制甲状腺机能,将导致机体产热机能下降,出现全身及局部的产热不足^[28],符合中医阳虚则寒的定义特点,再联合雌二醇+缩宫素的方法制造寒凝血瘀证原发性痛经大鼠模型。

表6 原发性痛经动物模型阳性药种类表

Table 6 List of positive drug types in animal models of primary dysmenorrhea

分类	药名	频数/次	频率/%	
西药	布洛芬	35	32.11	
	阿司匹林	22	20.18	
	吲哚美辛	4	3.67	
	塞来昔布	3	2.75	
	罗通定片	3	2.75	
	双氯芬酸二乙胺乳胶剂	1	0.92	
	色甘酸钠	1	0.92	
	阿托品	1	0.92	
	中药	痛经宝	19	17.43
		田七痛经胶囊	7	6.42
		元胡止痛片	6	5.50
		加味益母草膏	4	3.67
益母草膏		3	2.75	
桂枝茯苓胶囊		2	1.83	
复方益母草膏	2	1.83		
益母冲剂	1	0.92		
乌鸡白凤丸	1	0.92		
妇科千金片	1	0.92		

表7 原发性痛经动物模型成功制备标准

Table 7 Standard table for successful preparation of animal models of primary dysmenorrhea

检测方法	频数/次
扭体反应	148
无	17
扭体反应、寒凝血瘀表征	5
扭体反应、寒凝表征	4
阴道脱落细胞学检查见红细胞	1
扭体反应、甩尾法检测痛阈值	1
甩尾法检测痛阈值	1
扭体反应、旋转杆测定法	1

⑤手术+孕酮+花生油+米非司酮+雌二醇+水浸束缚应激联用制备小鼠痛经模型,通过在受体水平阻断孕酮的作用能够诱导小鼠发生行经样的改变,符合Finn等提出的哺乳动物发生经期样改变的基本要求^[42],并且再②的基础上建造寒凝血瘀证原发性痛经动物模型。

3.3 造模周期、药物剂量、药物注射方式 苯甲酸雌二醇进入血液循环1h后血药浓度可达到高峰,

迅速在体内各组织间代谢,10 d即可将人体内的苯甲酸雌二醇完全代谢,故大部分注射以首日和最后一日加倍或2.5倍剂量注射,并且苯甲酸雌二醇的再增加成熟卵泡数目、子宫内膜厚度、排卵率均优于戊酸雌二醇^[2,43-44],所以选择苯甲酸雌二醇用于注射的实验数量较多,这可能也是造模周期大部分造模周期大部分均在 $9\text{ d}\leq t\leq 12\text{ d}$ 内的原因。

在注射方式中,皮下注射因为皮下组织血管少,血流速度低,药物吸收慢,并且需要延长雌二醇类药物的作用,故雌二醇类药(苯甲酸雌二醇、己烯雌酚)均以皮下注射为主;而注射缩宫素后20~40 min均会观察动物行为学反应,故需要药物吸收速度快,故选择以通过血流量丰富的腹膜吸收的腹腔注射为主。

3.4 高频检测指标分析 在高频检测指标中,扭体反应相关的检测指标较多(30 min内扭体反应次数、扭体反应潜伏期、扭体反应抑制率、扭体发生率);在检测相关生化指标中,以ELISA检测子宫组织匀浆上清液或血清为主,通常检测 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGE_2 、 $\beta\text{-EP}$ 的含量^[45-46],其原因是与 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的含量和 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 与 PGE_2 的比例被现代医学认为是影响痛经的关键: $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量高可引起子宫平滑肌收缩过强,血管挛缩,造成子宫缺血、乏氧状态而出现痛经^[4],而 PGE_2 具有松弛子宫平滑肌、抑制子宫收缩的功能,故女性痛经越严重,其体内的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 越高, PGE_2 越低,且二者的比值 $\text{PGF}_{2\alpha}/\text{PGE}_2$ 亦越高^[47]。 $\beta\text{-EP}$ 作为内源性镇痛作用的神经多肽,研究发现痛经血清中 $\beta\text{-EP}$ 含量与患者疼痛程度呈负相关^[48]。

3.5 阳性药物种类分析 在阳性药物中,西药以选用布洛芬为主,布洛芬为临床常用的止痛药物之一,为非甾体类抗炎药,其可通过抑制前列腺素合成,产生镇痛、解热和抗炎等作用^[48];中药选用痛经宝为主,其主要的药物包括红花、当归、丹参、肉桂、三棱、莪术、五灵脂、木香及延胡索,具有温经化瘀、理气止痛之功效,临床常用于治疗寒凝血瘀型痛经,效果十分显著^[49]。

4 讨论

通过对4种数据库原发性痛经动物模型文献的统计分析可以看出,原发性痛经动物模型主要以鼠类为主要来源,大鼠以Sprague Dawley和Wistar为主,小鼠以昆明种为主;造模方法以雌二醇+缩宫素联用制备大(小)鼠痛经模型为主,简便易行;造模周期大部分均在 $9\text{ d}\leq t\leq 12\text{ d}$ 内;大鼠实验剂量以苯甲酸雌二醇第1天和第10天 $0.5\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$,第2~9天

$0.2\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$,缩宫素为 $2\text{ U}\cdot\text{d}^{-1}$ 的用法最为常见,小鼠实验以己烯雌酚 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、缩宫素 $20\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的用法最为常见;注射方式中,缩宫素基本以腹腔注射为主,雌二醇(苯甲酸雌二醇、己烯雌酚)以皮下注射为主;在高频检测指标中,以扭体反应相关行为学指标和ELISA检测子宫组织匀浆上清液或血清相关生化指标为主;在阳性药物中,西药以选用布洛芬为主,中药选用痛经宝为主。

针对目前原发性痛经动物模型存在的问题提出一下看法:①在检索文献中发现,只有60%左右的文献涉及阳性药对照组,许多文献仅运用相互对照组或只有空白、模型、实验组;无论是从科研涉及角度还是中医药研究角度,实验需要有相应的阳性对照药组进行对比,证实实验具备检测敏感度及相应治疗方法的优势。②纳入171篇文献、178次实验,大部分文献都有对扭体反应的检测或描述,但对于扭体反应严重程度的量化指标-扭体评分^[51]使用次数只有15次,相对较少,后续做原发性痛经实验对于扭体评分应重视。③《痛经动物模型制备规范(草案)》中提出原发性痛经动物模型成功与否的观测指标并初步给出相应权重系数,但目前还未有文献应用,后续研究者或可参考并对成模成功标准做出相应判断,使实验更具有说服力。④现大部分文献均以扭体反应作为原发性痛经动物模型成功制备标准,对于行为学体征还可以联合运用其他的方法如甩尾法检测痛阈值^[26,52]、旋转杆测定法^[53],均可以不同程度地模拟痛经的严重程度。⑤症与证未结合:建造中医模型表征观察仅有2篇文章有寒证表征评分表进行证型评分,仅有9篇文章在观察扭体反应的同时观察了动物的寒证行为学(寒凝血瘀表征、寒凝表征),对于寒证表征评分表应用低。并且有部分文献寒凝血瘀证与寒凝证模型造模方法一样,但证型却有差别,中医证型以宏观表征进行判断,所以关于证型模型的制备应均有相关证型标准评分表来确认动物是否真正有了相关证型。并且相应动物病性模型评价应值得推广,形成专家共识,包括其他病性如血瘀、气滞等,对中医病证结合动物模型的规范化建设有很大的提升。⑥证的病因未完全参与病的形成:目前对于原发性痛经动物模型仅有寒证相关模型的制造方法,并且造成寒证的病因除了直接给予物理冷冻刺激,还有饮食失节,可以进行冰水灌胃等进行模拟,而痛经患者的证型除了寒凝血瘀证外还有气滞血瘀证、湿热蕴结证、气血虚弱证、肝肾亏损证^[1],相关证型的动物模

型是探索中医证型实质的基础,是后续开展中医临床研究的前提^[54]。应通过模拟这些证型的病因病机来构建相关模型,丰富原发性痛经动物模型的构建,更好地为临床治疗服务。⑦通过将能导致“证”形成的单重或多重因素施加于实验动物身上,以模拟人类的病理过程时,可以运用方证对应的原理进行相应“以方测证”研究^[55],并基于特定方药疗效进行反证证候模型的成功^[56],比如寒凝证痛经运用附子理中汤进行反证,血瘀证运用桃红四物汤进行反证等。

动物模型是临床治疗与理论研究的的重要纽带,制备理想的动物模型是开展实验研究的前提^[55]。本文通过对原发性痛经模型的统计、分析、讨论,并针对其个别不足之处提出疑问,促进原发性痛经动物模型制备的规范化,以其为后续中医药的机制研究及原发性痛经的治疗打下稳固基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 谈勇. 中医妇科学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2016:278-289.

[2] 董玉洁,蒋沅岐,刘毅,等. 中医药治疗痛经的研究进展[J]. 中草药,2022,53(12):3842-3851.

[3] IACOVIDES S, AVIDON I, BAKER F C. What we know about primary dysmenorrhea today: A critical review [J]. Hum Reprod Update, 2015, 21 (6) : 762-778.

[4] 谢幸,孔北华,段涛. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2018:351-352.

[5] 杜美容,刘秀敏,于恬,等. 原发性痛经的研究现状及治疗进展[J]. 中国民间疗法,2020,28(10):113-117.

[6] 董玉洁,蒋沅岐,刘毅,等. 中医药治疗痛经的研究进展[J]. 中草药,2022,53(12):3842-3851.

[7] 王永汉,王民,柳树芳,等. 痛经灵治疗原发性痛经的药理研究[J]. 中成药研究,1986(9):23-26.

[8] 中华中医药学会,中药实验药理专业委员会. 痛经动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018,24(19):20-24.

[9] 许咏思,嵇波,胡琅琳,等. 寒凝血瘀证痛经大鼠模型制备和评价方法述评[J]. 中医药学报,2013,41(4): 25-30.

[10] 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,2007:5-604.

[11] 朱正望,朱平生,苗明三. 基于数据挖掘的反流性食管炎动物模型应用分析[J]. 中药药理与临床,2021, doi:10.13412/j.cnki.zyyl.20210615.003.

[12] 罗丽. 针刺不同穴位对寒凝证类痛经大鼠左右三阴

交穴区温度及血管舒缩物质影响的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014:37-62.

[13] 宋越,马良宵,甘莹莹,等. 直刺与沿皮刺三阴交穴对寒凝证类痛经大鼠缩宫素及其受体的影响[J]. 中华中医药杂志,2020,35(4):2046-2049.

[14] 甘莹莹,马良宵,于文颜,等. 平刺与直刺三阴交穴对寒凝证类痛经大鼠子宫微循环及NO、NOS的影响[J]. 中华中医药杂志,2021,36(3):1663-1667.

[15] 邵帅,于天源,耿楠,等. 振腹法治疗寒凝证类原发性痛经模型大鼠优效参数组合的探讨[J]. 环球中医药,2020,13(5):766-771.

[16] 宋越,马良宵,甘莹莹,等. 直刺与沿皮刺三阴交穴对寒凝证类痛经大鼠缩宫素及其受体的影响[J]. 中华中医药杂志,2020,35(4):2046-2049.

[17] 王悦. 乌力吉-18味丸对原发性痛经寒凝血瘀型大鼠PGF2 α 和6-keto-PGF1 α 含量的影响[D]. 呼和浩特:内蒙古医科大学,2021:8-24.

[18] 吴增光,胡鹏,范柏爽,等. 少腹逐瘀汤对寒凝血瘀型原发性痛经大鼠活血作用研究[J]. 天津中医药, 2020,37(8):929-935.

[19] 吴珊,汪蒙蒙,彭代银,等. 桃红四物颗粒对寒凝血瘀痛经大鼠的治疗作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(14):111-116.

[20] 乐心逸,柴程芝,寇俊萍,等. 葛根汤对缩宫素复合寒冷刺激诱导的寒湿凝滞型原发性痛经小鼠模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):174-177.

[21] 翟凤婷,王东梅,马青,等. Th1/Th2平衡对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠血清PG、COX-2、AVP及OT的影响[J]. 海南医学院学报,2021,27(15):1121-1126.

[22] 王丹丹,王东梅,马青,等. 温经化瘀止痛法对寒凝血瘀证痛经大鼠Th17、Treg细胞分化及其细胞因子表达的影响[J]. 时珍国医国药,2019,30(2):308-310.

[23] 马青. 温经化瘀止痛法调控T细胞亚群分化治疗原发性痛经的机制以及原发性痛经现代文献用药规律的研究[D]. 济南:山东中医药大学,2017:3-16.

[24] 曹卫平,马青,师伟,等. 香延止痛方对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠的治疗效果及其作用机制[J]. 山东医药,2017,57(19):40-42.

[25] 周宇博,吴红斌. 壮医药线灸对寒湿凝滞型痛经大鼠血栓素B₂及血液流变学的影响[J]. 陕西中医, 2019,40(10):1330-1332,1389.

[26] 周宇博. 壮医药线灸对寒湿凝滞型痛经大鼠NF- κ B及TNF- α 表达的影响[D]. 桂林:桂林医学院, 2017:10-25.

[27] 胡雷蕾,周宇博,池碧霞,等. 壮医药线灸疗法对寒湿凝滞型痛经大鼠NO、ET-1的影响[J]. 华夏医学, 2016,29(2):5-9.

[28] 卢阿娜,蔡妍阳,宋梦,等. 原发性痛经寒凝血瘀证药

- 效评价模型的建立[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(9): 1242-1245.
- [29] 徐祥波, 贺斌, 王介东. 利用米非司酮药物建立小鼠子宫内膜行经样模型的研究[J]. 生殖医学杂志, 2008, 17(4): 286-289.
- [30] 刘志刚, 张荣春, 刘红梅, 等. 葛根汤对寒湿凝滞型原发性痛经模型小鼠的治疗作用及其机理研究[J]. 江苏中医药, 2020, 52(9): 82-85.
- [31] 马林纳, 朱正望, 姜权, 等. 基于数据挖掘的子宫肌瘤动物模型应用分析[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4): 225-228.
- [32] 沈潜, 张巧娜, 王康, 等. 振腹推拿对原发性痛经大鼠模型的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(9): 1252-1255+1309.
- [33] 王丹丹, 王东梅, 马青, 等. 温经化瘀止痛法对寒凝血瘀证痛经大鼠 Th17、Treg 细胞分化及其细胞因子表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 308-310.
- [34] 曹卫平, 马青, 师伟, 等. 香延止痛方对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠的治疗效果及其作用机制[J]. 山东医药, 2017, 57(19): 40-42.
- [35] 甘莹莹, 马良宵, 于文颜, 等. 平刺与直刺三阴交穴对寒凝证类痛经大鼠子宫微循环及 NO、NOS 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1663-1667.
- [36] 吴珊, 汪蒙蒙, 彭代银, 等. 桃红四物颗粒对寒凝血瘀证痛经大鼠的治疗作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 111-116.
- [37] 宋越, 马良宵, 甘莹莹, 等. 直刺与沿皮刺三阴交穴对寒凝证类痛经大鼠缩宫素及其受体的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 2046-2049.
- [38] 翟凤婷, 王东梅, 王丹丹, 等. 基于 MAPK/ERK 信号通路探讨温经化瘀止痛法治疗寒凝血瘀证原发性痛经的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 66-74.
- [39] 朱世鹏. 不同针刺刺激量对寒凝证类痛经大鼠镇痛效应及与子宫微循环、经穴温度的相关性研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014: 47-70.
- [40] 谭裕洁, 郭玲. 氟斑牙大鼠模型建立的影响因素[J]. 口腔医学研究, 2019, 35(4): 316-318.
- [41] 毛腾敏, 林建和. “血瘀”病理模型探索(一)[J]. 北京医科大学学报, 1985(4): 246-248, 315.
- [42] FINN C A, POPE M. Vascular and cellular changes in the decidualized endometrium of the ovariectomized mouse following cessation of hormone treatment: a possible model for menstruation [J]. J Endocrinol, 1984, 100(3): 295-300.
- [43] 刘惠清, 伍凤群. 苯甲酸雌二醇在克罗米芬促排卵周期中的应用[J]. 中国实用医药, 2013, 8(10): 185-186.
- [44] 张爱君. 苯甲酸雌二醇在克罗米芬促排卵周期中的应用[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(33): 8130-8131.
- [45] 秦中银, 陈盼碧, 杨雯雯, 等. 隔药灸关元穴对原发性痛经大鼠疼痛反应与血清 β -EP、子宫 PGE₂/PGF_{2 α} 、脾脏 NK 细胞活性的影响[J]. 中国中医急症, 2021, 30(10): 1701-1704, 1709.
- [46] 谢海梅, 柳依江, 王培, 等. 针刺强度对类痛经模型大鼠镇痛效应、前列腺素及缩宫素含量的影响[J]. 中医杂志, 2022, 63(5): 475-480.
- [47] HAIDARI F, HOMAYOUNI F, HELLI B, et al. Effect of chlorella supplementation on systematic symptoms and serum levels of prostaglandins, inflammatory and oxidative markers in women with primary dysmenorrhea [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2018, 229: 185-189.
- [48] 朱秀英, 李永平, 孙小月, 等. 五禽戏联合推拿对原发性痛经患者中医证候及血清 TNF- α 、CD4⁺、OT、 β -EP 表达的影响[J]. 新中医, 2021, 53(2): 201-205.
- [49] 金燕, 祝炳军, 顾唯, 等. 温经散寒活血方联合布洛芬缓释胶囊治疗原发性痛经临床研究[J]. 新中医, 2021, 53(9): 78-81.
- [50] 胡伟. 浅析痛经宝颗粒治疗原发性痛经的临床体会[J]. 世界最新医学信息文摘: 连续型电子期刊, 2018, 18(8): 60-61.
- [51] SCHMAUSS C, YAKSH T L. *In vivo* studies on spinal opiate receptor systems mediating antinociception. II. Pharmacological profiles suggesting a differential association of mu, delta and kappa receptors with visceral chemical and cutaneous thermal stimuli in the rat [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1984, 228(1): 1-12.
- [52] 陈冬婷. 帕瑞昔布对原发性痛经大鼠模型的作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2013: 13-67.
- [53] ZHENG W, LI M, WANG Y, et al. Guizhi Fuling capsule exhibits antidysmenorrhea activity by inhibition of cyclooxygenase activity [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 8607931.
- [54] 宋晓丹, 成秀梅, 周湘, 等. 寒凝血瘀证动物模型研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 267-274.
- [55] 张倩, 王梓仪, 黄淑敏, 等. 基于中西医临床病证特点的结直肠癌动物模型分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(10): 5-9.
- [56] 钟森杰, 李静, 李琳, 等. “以方测证”在中医证候模型研究中的应用述评[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 48-50.

[责任编辑 顾雪竹]