

均匀设计法用于乳腺增生动物模型复制的研究

罗伦才^{1*}, 季小平¹, 黄兰雅², 李列平¹, 邢晋苓¹, 刘志康¹

(1. 凉山州第二人民医院, 四川 西昌 615000; 2 雅安技术学院药学检验系, 四川 雅安 625000)

[摘要] 目的:规范雌二醇联合黄体酮的乳腺增生造模方法。方法:引入均匀设计方法,通过不同实验方案复制乳腺增生动物模型,测量模型大鼠乳头直径和高度,乳腺组织 HE 染色,镜下观察乳腺导管数目、乳腺导管上皮组织层数及小叶腺泡数,评价造模程度。结果:与空白组比较,各实验组动物的乳头直径和高度均有明显增长,乳腺组织切片均有典型的乳腺增生现象,其中以第 5,6 组最明显。结论:制模最佳条件为苯甲酸雌二醇 0.42~0.5 mg·kg⁻¹,注射时间 25~35 d,黄体酮剂量 3~4.5 mg·kg⁻¹,注射时间为 2~3 d,能达到较好的造模效果。

[关键词] 乳腺增生;动物模型;造模方法;均匀设计

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0204-03

Animal Model Replication of Proliferative Breast by Homogeneous Design

LUO Lun-cai^{1*}, JI Xiao-ping¹, HUANG Lan-ya², LI Lie-ping¹, XING Jin-ling¹, LIU Zhi-kang¹

(1. Pharmaceutical Preparation Section of the Second People's Hospital of Liangshan Prefecture, SiChuan 615000, China;

2. Pharmacy and Test Department, Yaan Vocational College, Sichuan 625000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the methods in copying the animal proliferative breast model.

Method: We copied the animal proliferative breast model with different experimental programs, according to the theory of homogeneous design. And we evaluated varying degrees of success of these models with such indexes as the diameter of the mamilla, height of the mamilla and pathological dye of the galactophore. **Result:** Compared with the blank control group, the experimental group of animals' nipple diameter and height were significantly increased in the breast tissue hyperplasia of mammary glands are typical, with the fifth, sixth group was the most obvious.

Conclusion: The optimal conditions for establishing the model appear to be: estradiol benzoate 0.42-0.5 mg·kg⁻¹, the duration for 25-35 days and progesterone 3-4.5 mg·kg⁻¹, intramuscular injection for 2-3 days.

[Key words] hyperplasia of mammary gland; animal model; method to establish model; homogeneous design

乳腺增生是乳房的一种非炎症性疾病,又称乳腺小叶增生或慢性囊性乳腺病,是临床上 25~40 岁女性的多发病与常见病,以乳房肿块和乳房胀痛为主要临床表现。目前复制乳腺增生动物模型采用最多的方法是联合使用雌二醇和黄体酮,但在激素用量、造模时间等方面极不统一,这样不利于模型的标准。本文利用数理方法设计实验,进行对比分析

和筛选优化,从而总结归纳出一种操作简单、稳定可靠、评价标准确切,与临床症状高度相似的乳腺增生动物模型复制方法,为临床研究和新药开发提供规范、稳定和重现性好的动物模型。

1 材料

1.1 动物 雌性未孕 SD 大鼠 24 只,雌性,体重 150~250 g,购自四川大学实验动物中心,合格证号 SCXK(川)2008-24。于自然光线、自由饮水摄食条件下适应性喂养 1 周备用。

1.2 试剂 苯甲酸雌二醇注射液,1 g·L⁻¹,天津金耀氨基酸有限公司,批号 0807071;黄体酮注射液,20 g·L,浙江仙琚制药股份有限公司,批号 081006。

[收稿日期] 2010-11-16

[基金项目] 四川省中医药管理局项目(2008-14)

[通讯作者] * 罗伦才,副主任中药师, Tel: 134011050588, E-mail: 39344282@qq.com

1.3 仪器 游标卡尺;Olympus BX41 显微镜。

2 方法

2.1 造模方案设计 根据文献和研究报道确定苯甲酸雌二醇和黄体酮范围。确定实验的因素为4个:即苯甲酸雌二醇的造模剂量、苯甲酸雌二醇的造模时间、黄体酮的造模剂量和黄体酮的造模时间,每个因素划分7个水平。列出因素水平表,并根据均匀设计方法安排实验方案。具体的因素水平表及实验方案见表1,2。

表1 因素水平

因素	水平						
	1	2	3	4	5	6	7
苯甲酸雌二醇剂量/mg·kg ⁻¹	0.18	0.24	0.3	0.36	0.42	0.5	0.6
苯甲酸雌二醇造模时间/d	15	20	25	30	35	40	45
黄体酮剂量/mg·kg ⁻¹	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6
黄体酮造模时间/d	2	3	5	7	10	12	15

表2 实验方案(U₇(7⁴))

试验号	因素			
	苯甲酸雌二醇剂量/mg·kg ⁻¹	苯甲酸雌二醇造模时间/d	黄体酮/mg·kg ⁻¹	黄体酮造模时间/d
1	1(0.18)	2(20)	3(4)	6(12)
2	2(0.24)	4(30)	6(5.5)	5(10)
3	3(0.3)	6(40)	2(3.5)	4(7)
4	4(0.36)	1(15)	5(5)	3(5)
5	5(0.42)	3(25)	1(3)	2(3)
6	6(0.5)	5(35)	4(4.5)	1(2)
7	7(0.6)	7(45)	7(6)	7(15)

2.2 分组与处理 将SD大鼠按照体质量随机分为8组,每组3只。除空白组外,各组分别按表2实验方案造模,所有大鼠每天测量1次乳头直径,每3天测量1次乳头高度,每周测量1次体重,以调整造模药物剂量。末次给药12h后,称体质量,用脱颈椎法处死大鼠;取双侧乳头用中性甲醛固定,石蜡包埋、切片、HE染色,光镜观察。

2.3 数据处理方法 所有数据采用SPSS 13.0统计软件和Excel进行统计分析。

3 结果

3.1 体重 测定并计算第1~7周体质量并计算增加值,结果显示体重均有不同程度的增加。

3.2 乳头直径 测定并计算第1~47天的大鼠乳头直径增加值,除1~5d造模时实验组与空白组差异不大外,其余造模阶段实验组和空白组之间的乳头直径存在显著性差异(P<0.05)。造模初期各组

大鼠乳头直径还存在一些波动,随后进入增长期,造模第26~28天时,几乎所有实验组大鼠的乳头直径均在最大值范围内;继续造模,个别大鼠出现平台期,随后各实验组大鼠乳头直径甚至出现负增长。见图1。

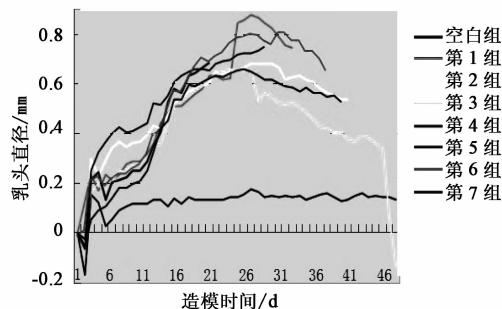


图1 各组大鼠第1~47天乳头直径变化(n=3)

3.3 乳头高度 测定并计算第1~47天的大鼠乳头高度差值,所有实验组与空白组之间乳头高度存在显著性差异。乳头高度均值除了刚开始造模时有一定的波动,直到第38~42天都基本处于上升阶段。随后就处于平台期或负增长阶段。见图2。

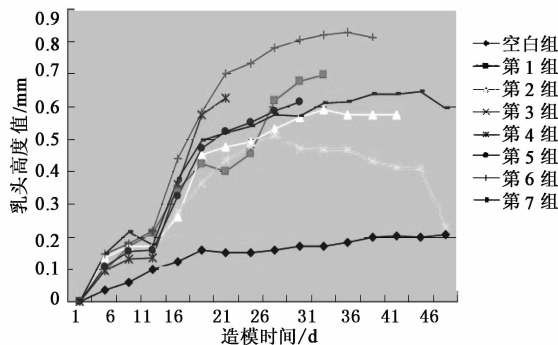


图2 各组大鼠第1~46天乳头高度变化(n=3)

3.4 病理形态观察 空白组大鼠的乳头直径和高度都相对较小且变化不大,而实验组大鼠的乳头直径和高度均明显增大。乳腺组织HE染色光镜下,空白组即正常大鼠乳腺细胞无增生性病变,腺泡少,为2~4个,腺泡上皮呈立方型,核仁不明显,导管无分泌,管腔无扩张。实验组大鼠的乳头切片中均有典型的增生,表现为乳腺导管数目增加;乳腺小叶腺泡个数增加;细胞增生,层数增多;乳腺管扩张,内有不同程度的分泌物。见图3。

4 讨论与分析

均匀设计是一种全新的试验设计方法,是“模拟”走向“数字”的突破,它是我国科学家方开泰和王元元提出的一种全新试验设计方法。该法可在最

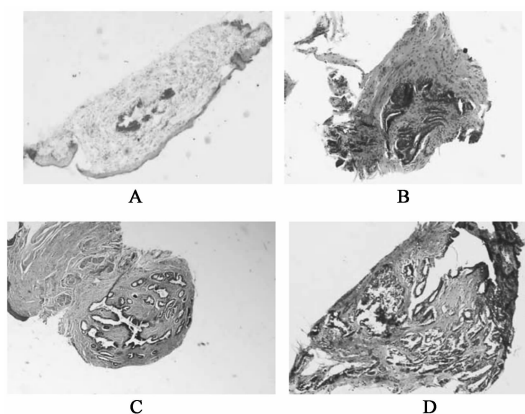


图 3 各组乳腺组织切片 (HE, $\times 40$)

A. 空白组: 只有一个乳腺导管, 管腔内无分泌物; B. 第 1 组: 乳腺导管呈长梭形, 乳腺导管数较多, 导管内也有分泌物; C. 第 5 组: 乳腺导管呈不规则状且数目较多, 导管扩张, 内有较多分泌物; D. 第 6 组: 乳腺导管散在, 形状很不规则, 乳腺导管数很多

短的时间内, 进行最少的试验次数, 寻得优化条件下的理想结果。在以往乳腺增生动物模型的复制过程中, 研究者对实验的各种处理因素多凭主观经验, 标准不一, 可造成实验结果的千差万别, 常常出现假阳性或假阴性结果。采用均匀设计方法筛选确定实验方案可以避免此类情况的发生。本研究采用数理统计方法对大量文献进行筛选。采用均匀设计理念进行试验方案设计, 确定实验的因素有 4 个, 即苯甲酸雌二醇的造模剂量、苯甲酸雌二醇的造模时间、黄体酮的造模剂量、黄体酮的造模时间, 然后根据既往文献报道各因素取值范围, 根据正态分布规律确定各自的水平值。然后选用均匀设计表 $U_7(7^4)$ 得到了上述的 7 种实验方案。本研究首次采用均匀设计方法对乳腺增生动物模型实验的最佳条件进行设计, 为该模型研究的规范化提供了基础理论条件, 具有一定的新颖性且切实可行。

有关乳腺增生动物模型复制的报道多采用乳头直径、高度和乳腺病理检测结果进行评价。本实验造模各组与空白组比较, 大鼠出现了乳头直径和高度的明显增长。黄月玲^[1]等先给大鼠 im 苯甲酸雌二醇 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 共 20 d, 再改用 im 黄体酮 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 共 5 d, 即总造模时间为 25 d, 造模很成功。饶金才^[4]等每天给大鼠 im 苯甲酸雌二醇 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

25 d, 继而改用每天 im 黄体酮 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 5 d, 即总造模时间为 30 d。本实验在造模第 26 ~ 28 d 时, 几乎所有实验组大鼠的乳头直径和高度都到达了最大值, 随后进入了平台期甚至是负增长时期。

临床研究报道证实, 长期使用高剂量雌激素的危险性, 建议临床不提倡使用长效口服避孕药^[3]。由图 1 可见, 激素剂量越高, 体重增加越少, 激素剂量越小, 体重增加上升比较明显。从图 2 中发现, 在 25 ~ 35 d 时间段内第 5, 6 组是最佳的直径增长组, 动物一般状况较其他组好且体重没有出现负增长。病理切片观察发现, 较高剂量给药的组别乳腺导管数目显著增加, 乳腺导管直径增加, 管腔内的分泌物也较多, 尤其是 5, 6 组比较明显 (见图 4), 但是剂量太高时, 组织形态很不规则。剂量较低时, 乳腺导管数目也有所增长, 但没有高剂量时增长明显。由此判断, 剂量较小的实验组造模效果不是很理想。而造模给药剂量很高的实验组乳头直径和乳头高度甚至出现下降的情况, 还容易产生药物毒性作用, 病理切片观察也不是很理想。可见, 给药剂量的选择和给药时间的选择对动物模型造模能否成功或达到预期效果起着很重要的作用。通过本实验提出最佳制模条件为: 苯甲酸雌二醇为 $0.42 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 注射时间为 25 ~ 35 d, 黄体酮剂量为 $3 \sim 4.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 注射时间为 2 ~ 3 d。

本实验结果将推动以乳腺增生为代表的疾病动物模型的规范化研究。首次使用均匀设计方法对实验方案进行筛选和确定, 实验结果证明运用均匀设计方法规范动物模型研究的方法具有可行性、科学性。

[参考文献]

- [1] 黄月玲, 文端成, 韦永芳, 等. 大鼠乳腺增生模型的建立 [J]. 广东医学, 2002, 23(4): 362.
- [2] 饶金才, 李兰珍, 陈云生, 等. 乳腺增生动物模型的复制及病理类型 [J]. 中国病理生理杂志, 1992, 8(6): 112.
- [3] 丁永刚, 方可娟, 周维谨, 等. 我国长效口服避孕药的系统评估 [J]. 中国计划生育学杂志, 2005(6): 12.

[责任编辑 何伟]