

围绝经期动物模型的研究进展

蔡熙, 黄晖*, 王岚

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 为围绝经期疾病的动物模型的选择和制备提供参考。方法: 查阅近10年来在围绝经期动物模型方面的研究概况, 分析比较各主要模型的特点及主要用途。结果: 在主要模型中: 去卵巢大、小鼠使用较为广泛, 而自然衰老大鼠模型更贴近于人类围绝经期变化。针对某一症状的模型中, 去卵巢大、小鼠的复合模型运用较多。结论: 鼠类围绝经期动物模型已成功应用于围绝经期病症的研究。但模型的内分泌水平等指标确定应更加标准化。

[关键词] 围绝经期; 去卵巢; 动物模型

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2007)10-0071-03

Progress of Research on Female Animal Models of Perimenopause

CAI Xi, HUANG Hui*, WANG Lan

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

[Abstract] **Objective:** To offer the references for selecting and preparing animal models of perimenopause. **Methods** We summarized the studies on animal models of perimenopause in the last 10 years with analyzing and comparing the characteristics of these models. **Results:** In the main animal models, Ovariectomy rats or mice are frequently used. Old rat model is more similar with human being of perimenopause. According to the symptom, the multiplex models of ovariectomy rats or mice are used mostly. **Conclusions:** Female rat of perimenopause has been used in the study of perimenopause successfully. However, endocrine levels should be standardized for the animal models.

[Key words] perimenopause; ovariectomy; animal models

围绝经期(perimenopausal)指从接近绝经出现绝经有关的内分泌、生物学和临床特征起至绝经一年内的期间,即绝经过渡起至绝经后一年^[1]。围绝经期的模型是病症结合的模型。为了便于进一步研究围绝经期病症,本文将近年来的围绝经期动物模型分为主要模型和针对主要症状的围绝经期模型两部分进行综述,而将一些伴随症列为其他另述。本文还介绍比较了各主要模型的特点及优、缺点,为围绝经期动物的研究和选择提供部分参考。

1 主要模型

造成围绝经期变化的主要原因是卵巢功能的下降从而雌激素水平降低。故目前主要的造模方法是造成卵巢功能丧失。

1.1 去卵巢模型 使用雌性大、小鼠去卵巢,如:徐叔云介绍选取健康的大鼠或小白鼠,麻醉后切除双侧卵巢。术后5 d起,对动物进行阴道涂片检查,1次/d连续5 d,以不出现动情期反应为造模成功^[2]。模型动物E2及子宫指数降低,FSH/LH值升高,NE的含量下降,大脑皮质和海马背侧的乙酰转移酶活性下降,5-HT和5-HIAA的含量与5-HT/NE的比值显著升高,脾脏淋巴细胞数目减少,出现了更年期表现,替代应用外源性雌激素可以缓解这些症状^[3]。此模型比较经济、易得,多用于研究更年期妇女伴随骨质疏松^[4]、动脉粥样硬化^[5]、脑缺血^[6]、肥胖^[7]等病症。去卵巢模型还可用于雌激素作用相关因素的研究,如:雌激素与神经免疫的关系^[8]、雌激素与癌症的关系^[9]等的研究。去卵巢模型用途较广。

去卵巢模型和人类围绝经期还有不同:卵巢不仅合成雌激素,还有分泌合成其他激素和参与免疫的作用^[10],人类围绝经期卵巢的功能并未完全丧失,而去卵巢则把这些功能完全去除了。

[收稿日期] 2007-01-15

[通讯作者] * 黄晖, Tel: (010) 84046004; E-mail: xiaodish@tom.com

com

1.2 X 光破坏卵巢模型 曲显俊等用 X 光照射破坏卵巢所致症状来反映更年期的主要临床表现。将大鼠固定于平板上,暴露下腹部“卵巢区”,置于电子直线加速器下照射。X 线照射后(3~5) d,大鼠出现明显放射性肠炎症状,且有少数动物死亡。照射后第 10 d 起体重明显减轻,照射后 21 d 大鼠子宫、卵巢重量显著降低,垂体重量明显升高,提示卵巢受到损伤后,垂体反馈性增殖。自主活动显著增多,甘油三酯和胆固醇含量明显升高^[11]。这种方法由于实验室设备和条件的限制,以及照射时间、强度不好掌握,因而减小了其使用范围。

1.3 VCD 卵泡耗竭模型 国外有人用化工原料 4 乙烯基环乙烯(VCD)选择性的作用于原始的和初级卵泡。VCD 不能作用于源于卵泡激素产生的大量卵泡,所以这些卵泡的耗竭只有在原有的原始卵泡停止再生后表现出来,并且不再作为发生池来招募增大的卵泡。一旦卵巢雌激素和抑制产物作为卵泡耗竭停止了,对下丘脑的负反馈作用消失,以及血浆促卵泡生成素(FSH)和促黄体生成素(LH)上升,在 LH 水平提高的情况下,在残留的卵巢组织中的细胞,有可能起源于间质,继续产生类固醇,主要为黄体酮和雄性激素。由于卵泡逐渐损失并且试验动物还残留有生成类固醇的卵巢组织,使用 VCD 的小鼠具有的内分泌状态比卵巢切除小鼠更接近于人类更年期^[12]。此种方法,国外已用于试验研究。

1.4 酒精损伤卵巢模型 在无菌的条件下,将 0.2 mL 无水乙醇注射到大鼠双侧卵巢内,每周观察血清雌二醇、孕酮的变化及卵巢病变情况。结果与假手术组相比。模型组血清雌二醇在 4 周内持续降低,但孕酮无显著变化。病理检查显示,在前 2 周内病变以炎症为主,在后 2 周内病变以囊肿、萎缩为主,尤其以 4 周卵巢萎缩更为严重。结论乙醇引起大鼠卵巢的部分萎缩,雌二醇水平下降与临床更年期综合征有相似之处,该模型为更年期综合征的研究与相关药物的开发提供了一个新的途径^[13]。

1.5 自然衰老模型 人们发现自然衰老的大鼠激素、器官、表现等更贴近人的围绝经期水平,这也符合中医顺应自然的理论。程化奇等研究发现:雌性大鼠(11~17)月龄为发情休息期,此期大鼠不仅出现生殖内分泌功能降低、神经递质紊乱,其它机体状态也明显降低。其阴道脱落细胞涂片呈现无规则动情周期变化,血清雌二醇(E₂)水平降低,黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)水平升高,下丘脑、垂体、卵巢、脾脏的雌激素受体(ER)及 ER mRNA 的表达量呈进行性下降;卵巢呈现原始卵泡及初、次级卵泡减少,退化卵泡增多;肾上腺皮质总厚度和束状带变薄,球、网状带增厚,结构出现紊乱并有出血;脑内多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)等单胺类递质逐渐减少,5-羟色胺(5-HT)和 5-羟色氨酸(5-HIAA)等吲哚类递质的含量随增龄而增加。胸腺萎缩,血清 IL-2 含量及活性均下降,心肌呈衰老趋势。上述表现均提示雌性大鼠自 11 月龄开始就进入更年期,与人更年期生物学特性相仿,可作为动物模型。自然衰老动物存在个体差异,

在应用前应对其阴道分泌物涂片,进行动情周期观察,选取连续 5 d 不出现动情期的动物进行实验^[14]。与去卵巢模型相比,缺点是周期长,费用高;而优点是自然衰老比较符合围绝经期变化过程,更贴近于人类。并且能避免因去卵巢造成动物死亡对试验结果的影响,因而在中医药研究,特别是中药治疗围绝经期综合征的研究中使用比较广泛。

2 围绝经期主要症状模型

围绝经期综合征早期主要见血管舒缩症状如烘热、出汗等;情绪改变如烦躁、忧郁、焦虑等,且性活动能力开始减退;到围绝经晚期则可见明显的骨质疏松症、记忆力衰退、认知力减弱、心脑血管病、老年痴呆和帕金森病等^[15]。

2.1 潮热症状 急性撤退吗啡成瘾模型:急性撤退对吗啡成瘾大鼠的吗啡以造成模型。因为当潮热发生时,其皮肤温度、心血管和神经内分泌变化与围绝经期妇女很相似,因此认为可以用快速撤退对吗啡成瘾大鼠的模型以研究更年期潮热发生的神经机制及解热作用^[16]。雌激素可改变大鼠中缝背核、中缝正中核 5-HT 样阳性物质表达,从而影响其神经元的功能,导致绝经期潮热发生^[17]。国外也有人用去卵巢的短尾猴进行围绝经期潮热^[18]方面的研究。

2.2 抑郁症状 慢性刺激模型:大鼠卵巢摘除后,单笼饲养,每天接受一种刺激,刺激项目分别为电击足底,冰水游泳,热应激,摇晃,夹尾,禁水,禁食和昼夜颠倒。动物对刺激产生应激,表现出 E₂ 水平降低,FSH、LH、GnRH 水平升高,而 5-HT 水平降低,行为学评分(OperField 法)中,垂直活动和水平活动均降低,糖水消耗量明显减少。该模型不仅具备围绝经期内分泌的失调,更重要的是表现了抑郁症的神经递质和行为学改变,可作为研究治疗更年期抑郁症药物的模型^[19]。

2.3 失眠症状

2.3.1 慢性应激模型 常用的慢性应激方法有:1、电刺激法:用电极有规律的刺激大鼠或小鼠。2、制动法:将动物(小鼠或大鼠)捆绑或放入制动瓶内,使其不能动弹。3、吊尾法:将动物(小鼠或大鼠)尾尖部用胶布固定于棒上,头部下垂悬吊,下部置一水盆,使动物必须抬头才不致于鼻部进入水中。为了加强应激效果可以几种方法交替进行。我们发现,用慢性应激制动的方法可以使成年大鼠生殖内分泌功能显著退化,可见无性周期交替或性周期紊乱,血浆雌二醇水平和孕酮水平降低。睡眠实验表明,慢性应激小鼠也显示入睡困难的现象。

2.3.2 去势加慢性应激模型 围绝经期综合征患者病因也有社会精神因素,因此采用切除卵巢小鼠加应激法,将去卵巢小鼠放入电刺激盒中,接受电刺激应激,小鼠出现自主活动增加,戊巴比妥钠睡眠潜伏期明显延长,睡眠时间缩短,血清 E₂ 降低而 FSH 升高^[20]。这些造模方法是通过刺激动物使之产生应激,从而打乱其内分泌,产生失眠症。这些模型不但用于围绝经期失眠的治疗研究,而且可用于研究社会、精神等因素造成内分泌紊乱的研究。

2.4 阴虚内热模型 “围绝经期综合症”属中医“绝经前后

诸症”范畴。根据临床症状,中医认为本病发生的根本原因是肾气渐衰,天癸将竭,冲任虚损,精血不足,阴阳失调所致。妇女由于精血不足表现出阴虚内热之烦躁、多汗、失眠等,由于肾虚而致腰膝酸软等骨骼方面的改变。其模型也多是围绕阴虚内热、肾阳虚来制备的。给去势大鼠或小鼠灌服造成阴虚内热的药物,使其产生近似于围绝经期的症状。如:尤劲松等在大鼠摘除卵巢 7 d 后,连续灌服热性中药 14 d 造模。停止造模后第 10 d,可观察到模型动物血清 E₂ 下降, LH、FSH 上升,子宫重量减轻,还出现了血浆 NE、E、5-HT 值升高、体重增长缓慢、舌尖色红、饮水量增加、肛温上升等阴虚内热证^[21]。此模型是在去卵巢基础上使之突出表现某一证候,用中医辨证来治疗,更体现出中医辨证论治的特色。

3 其他

围绝经期后期还常伴有骨质疏松、动脉粥样硬化、记忆力减退等病症。这些伴随病症也是独立疾病,其模型可单列出来作为专门病模型进行研究,故在此不再赘述。

4 结语

目前,在围绝经期病症模型的研究中,去卵巢大鼠、小鼠用途最广;自然衰老的大鼠指标更接近人类围绝经期。围绝经期动物模型的研究也还有许多问题:其一,围绝经期与绝经期的划分还不是很明确,这两个时间段的动物模型目前还是通用。其二,对围绝经期动物模型比较性研究较少。特别是大、小鼠的去卵巢模型与自然衰老模型进行系统的比较性研究较少。其三,去单侧卵巢是否能做围绝经期动物模型以及取单侧和双侧卵巢模型的区别的研究也不多。其四,如围绝经期伴随多汗的症状,现还没有较好的模型,只有在治疗围绝经期诸症的药效学研究中用汗液着色法利用颜色反应观察药物对足趾部汗液分泌的影响,汗腺上皮组织形态观察法,汗液定量测定法^[22]等。其五,动物模型的指标标准化研究甚少。但随着国内外对围绝经期的研究不断发展,关于制备围绝经期动物模型更贴近人类生理状态,特别是在中医辨证理论指导下制造的模型比较符合自然规律,可能是今后模型制备的方向。

[参考文献]

[1] 乐杰. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002. 382.
[2] 徐叔云, 卞如濂. 药理试验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1991. 1293-1294.
[3] 孙艳红, 金若敏. 女性更年期综合征动物模型制备的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(7): 657-658.
[4] 程群, 乔伟伟. 雷罗昔芬治疗卵巢切除大鼠的实验研究[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(2): 73-76.
[5] Loretta P. Mayer, Cheryl A. Dyer, Rebecca L. Eastgard, et al. Atherosclerotic Lesion Development in a Novel Ovary-Intact Mouse Model of Perimenopause [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25: 1912-1923.
[6] Maryvonne Le Saux, MSc; Thérèse Di Paolo, PhD. Changes in

5-HT_{1A} receptor binding and Gprotein activation in the rat brain after estrogen treatment: comparison with tamoxifen and raloxifene[J]. Rev Psychiatr Neurosci, 2005, 30(2): 110-118.
[7] Andre Tchernof, Annie Desmeules, Christian Richard. Ovarian Hormone Status and Abdominal Visceral Adipose Tissue Metabolism [J]. Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(7): 3425-3430.
[8] Istvan Merchenthaler, Gloria E. Hoffman, Malcolm V. Lane. Estrogen and Estrogen Receptor- β (ER β)-Selective Ligands Induce Galanin Expression within Gonadotropin Hormone-Releasing Hormone-Immunoreactive Neurons in the Female Rat Brain [J]. Endocrinology, 2005, 146(6): 2760-2765.
[9] S Lotinun, K C Westerlind, R T Turner. Tissue-selective effects of continuous release of 2-hydroxyestrone and 16 α -hydroxyestrone on bone, uterus and mammary gland in ovariectomized growing rats [J]. Journal of Endocrinology, 2001, 170(5): 165-174.
[10] 池芝盛. 内分泌基础与临床[M]. 北京:北京科学技术出版社, 1992. 423.
[11] 曲显俊, 崔淑香, 李凤琴, 等. 骨维素注射液对 X 线致大鼠更年期综合征模型的治疗作用观察[J]. 山东医药工业, 1998, 17(4): 123-128.
[12] Loretta P. Mayer, Cheryl A. Dyer, Rebecca L. Eastgard, et al. Atherosclerotic Lesion Development in a Novel Ovary-Intact Mouse Model of Perimenopause [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25: 1912-1923.
[13] 卢金福, 洪敏, 朱荃, 等. 酒精性更年期综合征大鼠模型的研究[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(3): 363-364.
[14] 左萍萍, 林守清, 隋亚, 等. 切除卵巢大鼠脑内单胺类含量及应激的影响[J]. 基础医学与临床, 1995, 15(2): 37.
[15] 高平, 万德光. 中医药治疗围绝经期综合征机制研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(4): 550-553.
[16] 马堃, 李连达. 中医药治疗更年期综合征药效学试验的基本要求[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 214-216.
[17] 罗晓梅, 陈亚琼, 辛晓燕, 等. 雌激素对去卵巢大鼠中缝核簇 5-羟色胺能神经元的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(3): 175.
[18] Appt SE. Usefulness of the monkey model to investigate the role soy in postmenopausal women's health [J]. ILAR, 2004, 45(2): 200-211.
[19] 董莉, 吕荣, 洪岩, 等. 补肾解郁清心方对更年期抑郁症模型大鼠 HPO 轴及单胺类神经递质的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(2): 38-40.
[20] 马堃, 李连达. 中医药治疗更年期综合征的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(6): 570-572.
[21] 尤劲松, 胡随瑜, 向群辉, 等. 地贞颗粒对更年期拟阴虚内热证大鼠儿茶酚胺递质及促性腺激素水平的影响[J]. 湖南医科大学学报, 2001, 26(1): 33-35.
[22] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000. 238.