

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.01.007

三种子宫内膜增生大鼠模型的建立和评价*

张 燕^{1,2}, 吕 饶¹, 钟海涛¹, 高婷丽¹, 袁丽君¹, 涂 星^{1,3△}

1. 湖北民族大学医学部, 湖北恩施 445000; 2. 湖北民族大学附属民大医院病理科, 湖北恩施 445000;
3. 武陵山中药材检验检测中心, 湖北恩施 445000

摘要:目的 探讨子宫内膜增生大鼠模型的建立方法和评价体系。方法 SD 雌性大鼠 60 只, 随机平均分为假手术组(A 组)、去势组(B 组)、雌激素负荷组(C 组)、去势联合雌激素负荷组(D 组)。B 组和 D 组大鼠摘除双侧卵巢后第 3 天起分别以 0.15 mL/100 g 肌肉注射高压灭菌麻油和 1 mg/mL 以高压灭菌麻油稀释的苯甲酸雌二醇注射液; C 组仅以同剂量肌肉注射 1 mg/mL 以高压灭菌麻油稀释的苯甲酸雌二醇注射液; A 组仅行开关大鼠腹部手术, 同法同剂量注射高压灭菌麻油; 均隔 1 天 1 次, 共 14 次。采用吉姆萨阴道涂片染色法剔除 B、D 组有角化现象的大鼠。在末次注射 24 h 后, 处死各组大鼠采集血清、子宫, 采用 ELISA 检测血清中雌激素(E2)、泌乳素(prol)、孕激素(P)、黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)水平, HE 染色法观察子宫形态、内膜厚度和面积。结果 与 A 组比较: B 组大鼠 prol、LH 和 FSH 明显升高, 而 E2、P 明显降低; C 组大鼠 E2、LH 和 FSH 明显升高($P < 0.05$), 而 P 明显降低($P < 0.05$); D 组大鼠 prol、LH 和 FSH 明显升高($P < 0.05$), 而 E2、P 明显降低($P < 0.05$)。B、C、D 3 组大鼠均出现了明显的子宫内膜萎缩, 腺体增多, 肌层变薄, 肌纤维排列紊乱的现象, C 组和 D 组子宫内膜可见嗜酸性粒细胞浸润。结论 采用去势法、雌激素负荷法及两者联合的方法均可较好地诱导子宫内膜腺体增生大鼠模型; 采用雌激素负荷法和去势联合雌激素负荷所建立的模型具有子宫内膜炎性增厚的特征。

关键词: 子宫内膜增生; 去势; 雌激素负荷; 苯甲酸雌二醇; 子宫形态学

中图法分类号: R711.71

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)01-0026-04

Establishment and evaluation of three kinds of endometrial hyperplasia rat models*

ZHANG Yan^{1,2}, LYU Rao¹, ZHONG Haitao¹, GAO Tingli¹, YUAN Lijun¹, TU Xing^{1,3△}

1. School of Medicine, Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China;
2. Department of Pathology, Affiliated Minda Hospital of Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China; 3. Chinese Medicinal Materials Products Quality Supervision and Inspection Center in Wulingshan Mountainous Area, Enshi, Hubei 445000, China

Abstract: Objective To explore the establishment method and evaluation system of endometrial hyperplasia rats model. **Methods** Sixty female SD rats were randomly and evenly divided into the sham-operation group(A), ovariectomized group(B), estrogen-loaded group(C) and ovariectomized combined estrogen-loaded group(D). The rats in the group B and D began to be injected with high-pressure sterilized sesame oil(0.15 mL/100 g) and high-pressure sterilized sesame oil diluted estradiol benzoate injection(1 mg/mL) respectively from 3 d after bilateral ovariectomy. The rats in the group C were only injected with the same dose of 1 mg/mL estradiol benzoate injection diluted with high pressure sterilized sesame oil. The rats in the group A only underwent the open and close abdominal operation, and were injected by the same dose of high-pressure sterilized sesame oil. All groups were injected once every other day for 14 times. The rats with hyperkeratosis in the group B and D were eliminated by adopting the GIEMSA vaginal smear staining method. At 24 h after the last injection, the rats in each group were killed and the serum and uterus were collected. The levels of serum estrogen(E2), prolactin(prol), progesterone(P), lutropin alfa (LH) and follitropin beta(FSH) were measured by ELISA, and the uterine morphology, endometrial thickness and area were observed by HE staining. **Results**

* 基金项目: 湖北省大学生创新创业训练项目(S201910517042); 湖北省教育科学规划重点课题(2016GA024)。

作者简介: 张燕, 女, 技师/医师, 主要从事常见妇科疾病病理学研究。 △ 通信作者, E-mail: kuangsheng1234@126.com。

本文引用格式: 张燕, 吕饶, 钟海涛, 等. 三种子宫内膜增生大鼠模型的建立和评价[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(1): 26-29.

Compared with the group A, the levels of serum prol, LH and FSH in the group B were significantly increased, while the levels of E2 and P were significantly decreased; the levels of E2, LH and FSH in the group C were significantly increased ($P < 0.05$), but the P level was significantly decreased ($P < 0.05$); the levels of prol, LH and FSH in the group D were significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of E2 and P were significantly decreased ($P < 0.05$). In the group B, C and D, there were obvious atrophy of endometrium, increase of glands, thinning of myometrium and disorder of muscle fiber arrangement. The eosinophilic leukocyte infiltration was observed in the group C and D. **Conclusion** The methods of ovariectomy, estrogen loading and their combination all can better induce the hyperplasia of endometrial glands in rats. The models established by adopting the estrogen loading and ovariectomy combined with estrogen loading methods all have the characteristics of endometritis thickening.

Key words: endometrial hyperplasia; castrate; estrogen load; estradiol benzoate; morphology of uterus

子宫内膜增生症(EH)是一种临床上妇科常见疾病,其发病是由于受到多种因素刺激,导致机体内雌激素增加,而无相应的孕激素拮抗作用,从而促使子宫内膜腺体增生、腺体间质比例失调、腺体的数量增多和腺体扩大,产生子宫内膜增厚等一系列病理改变^[1-2],常分为不典型增生和无不典型增生两类^[3],该疾病对患者的身心健康和日常生活带来了极大的危害^[4]。目前认为 EH 与体内雌激素变化关系密切,抑制雌激素分泌的药物都可能导致子宫内膜增生甚至癌变^[5]。

EH 动物模型主要是通过去势法、雌激素负荷法或者两者联合的方法来建立,但缺乏较为客观的评价体系^[6]。本研究拟以上述 3 种方法建立 EH 的大鼠模型,并从子宫病理组织形态和血清中相关激素[雌激素(E2)、泌乳素(prol)、孕激素(P)、黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)]水平进行评价和分析,为子宫内膜增生动物模型的建立和评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雌性大鼠 60 只,6 周龄,体质量(180 ± 18)g,均购于三峡大学实验动物中心,许可证号:SCXK(鄂)2017-0012,饲养环境 20~26℃,湿度 50%~60%,自然通风,自由进食、进水。

1.2 药物与试剂 高压灭菌大豆油(供注射用,浙江田雨山药用油有限公司);苯甲酸雌二醇注射液(剂量:2 mL:4 mg,10 支/盒,杭州动物药品厂,批号:190422);左炔诺孕酮(剂量:0.75 mg×2 片/盒,华润紫山竹药业有限公司,批号:43190405);大鼠 E2、prol、P、LH 的 ELISA 试剂盒均购于上海哈灵生物科技有限公司;大鼠 FSH ELISA 试剂盒购于上海信凡生物科技有限公司。

1.3 主要实验仪器 5810R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);酶标定量测定仪(德国 Thermo 公司);Milli-Q 超纯水机(贝莱美生物科技有限公司);

智能程控生物组织自动脱水机(型号:TC-120,泰维科技实业股份有限公司);生物组织自动包埋机(型号:TB-718E,泰维科技实业股份有限公司);轮转式切片机(型号:R139,泰维科技实业股份有限公司);摊片机(型号:TK-218 II,泰维科技实业股份有限公司);显微镜(日本 Nikon);海尔立式超低温冰箱。

1.4 方法

1.4.1 实验动物分组、造模 将 60 只大鼠随机分为假手术组(A 组)、去势组(B 组)、雌激素负荷组(C 组)和去势联合雌激素负荷组(D 组),每组 15 只。所有大鼠在造模前 3 d 行腹部备皮,进行手术前禁食不禁水 12 h。B 组和 D 组大鼠采用 10%水合氯醛以 0.3 mL/kg 的剂量腹腔注射麻醉,仰卧位固定,腹部行侧横切口,找到卵巢组织,用手术线结扎后摘除双侧卵巢,分层缝合切口;A 组同法在腹部行切口后切除卵巢周围组织与双侧卵巢质量相近的脂肪组织;术后大鼠给予腹腔注射青霉素钠注射液 8 万单位,连续注射 3 d。C 组、B 组与 D 组大鼠以 0.15 mL/100 g 的剂量肌肉注射 1 mg/mL 高压灭菌麻油稀释的苯甲酸雌二醇注射液混合液,共 14 次;A 组术后同法等剂量注射高压灭菌麻油,共 14 次。

1.4.2 模型的评价与筛选 在给药后第 10 天开始,隔 1 天 1 次,连续 20 d 取 B 组和 D 组大鼠阴道分泌物进行阴道涂片后用吉姆萨溶液染色,并于镜下观察大鼠阴道上皮角化情况,剔除角化者。最终,筛选 A 组大鼠 15 只、B 组大鼠 14 只、C 组大鼠 15 只、D 组大鼠 14 只。

1.4.3 指标检测

1.4.3.1 各组大鼠子宫指数测定 末次给药后第 2 天,每组随机选取大鼠 6 只,称重并记录体质量,麻醉后取腹主动脉血,离心分离血清,置于冰箱保存备用。迅速取下各组大鼠完整子宫,并精密称子宫湿重(g),根据公式(子宫指数=子宫湿重/大鼠体质量)计算子

宫指数。

1.4.3.2 HE 染色观察各组大鼠子宫病理情况 将取出的子宫以 4% 多聚甲醛固定液固定 48 h, 截取 Y 型子宫交叉处横截面子宫组织, 常规脱水、浸蜡、包埋、切片后进行 HE 染色, 并固定封片。每组选取染色效果佳、组织较完整的切片 2 张, 在 40 倍和 100 倍镜下分别在子宫内膜四边视野采集图片各 3 张。采用 Image J 1.51 软件进行图像分析, 观察子宫内膜形态。

1.4.3.3 ELISA 检测其血清中性激素水平 取上述 1.4.3.1 中的待测血清, 根据试剂盒上的说明书进行操作, 检测血清中 E2、prol、P、LH 和 FSH 的水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠子宫形态学指标测定 各组大鼠子宫形态学指标测定结果见表 1。与 A 组比较: B 组大鼠子宫指数、内膜厚度和内膜面积均明显下降 ($P < 0.05$); C 组和 D 组子宫指数、内膜厚度均明显增加 ($P < 0.05$), 内膜面积明显下降 ($P < 0.05$), 且 C 组各指标改变更为明显 ($P < 0.05$)。

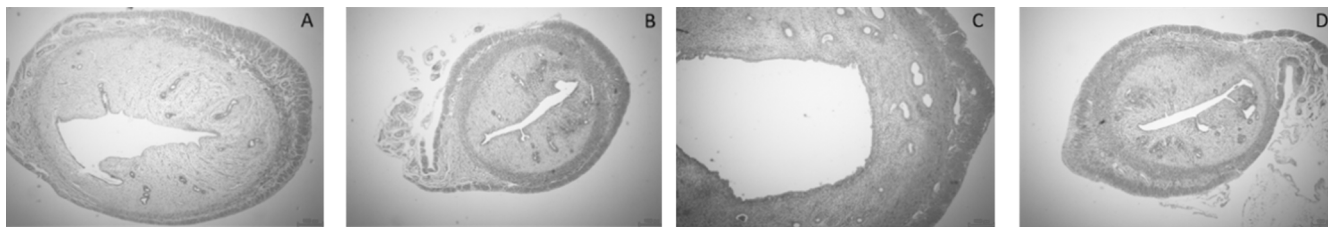
表 1 各组大鼠子宫形态学指标测定结果 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	子宫指数(mg/g)	内膜厚度(μm)	内膜面积(mm^2)
A 组	2.10 \pm 0.14	255.03 \pm 54.36	366.16 \pm 43.11
B 组	0.65 \pm 0.10 ^a	216.65 \pm 30.11 ^a	160.64 \pm 16.07 ^a
C 组	8.48 \pm 1.16 ^{ab}	426.33 \pm 37.98 ^{ab}	135.66 \pm 11.97 ^{ab}
D 组	7.48 \pm 0.57 ^{ab}	368.59 \pm 43.60 ^{abc}	182.37 \pm 9.66 ^{ac}

注: 与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

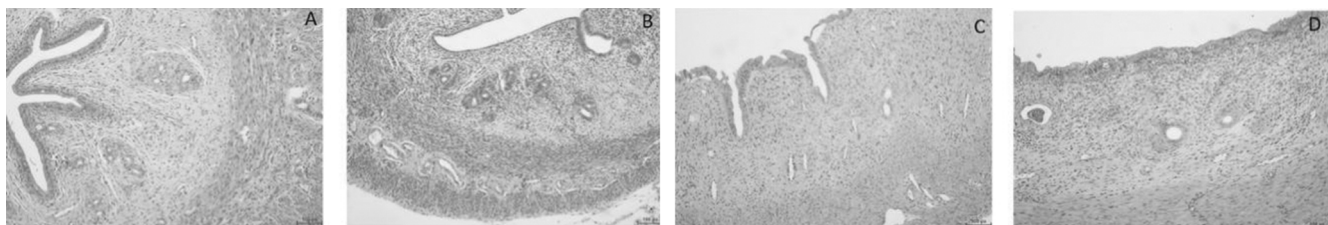
2.2 各组大鼠子宫病理切片观察 A 组大鼠子宫肌纤维细长, 内环外纵, 排列规则, 内膜上皮细胞和腺上皮细胞呈高柱形, 腺体排列较密集, 腺腔大小不等, 细胞底部可见分泌空泡, 肌层纤维形态规则, 浆膜层较光滑(图 1A、图 2A); B 组大鼠子宫体积明显缩小, 子宫内膜明显萎缩, 腺体细胞多为低柱状, 腺体明显增多且拥挤, 肌层变薄, 肌纤维排列较紊乱, 浆膜层萎缩, 不光滑(图 1B、图 2B); C 组肉眼可见部分大鼠子宫出现明显的积水、淤血和大小不一的脓肿, 显微镜下可见内膜上皮细胞和腺上皮细胞呈低柱状, 腺体呈单层或复层柱状, 较 A 组数量明显增多且拥挤, 偶见脓肿形成, 大部分大鼠子宫内膜有明显的嗜酸性粒细胞浸润, 肌层纤维轻度肥大, 排列稍紊乱, 浆膜层萎缩, 不光滑(图 1C、图 2C); D 组大鼠子宫体积明显增大, 偶见积水和淤血, 未见脓肿, 显微镜下可见内膜细胞和腺上皮细胞呈低柱状, 偶见假复层现象, 腺体呈单层或复层柱状, 数量明显增多, 内膜层有明显的嗜酸性粒细胞浸润, 肌层排列较整齐(图 1D、图 2D)。

2.3 各组大鼠血清性激素水平比较 与 A 组比较: B 组大鼠 prol、LH 和 FSH 明显升高 ($P < 0.05$), 而 E2、P 明显降低 ($P < 0.05$); C 组大鼠 E2、LH 和 FSH 明显升高 ($P < 0.05$), 而 P 明显降低 ($P < 0.05$); D 组大鼠 prol、LH 和 FSH 明显升高 ($P < 0.05$), 而 E2、P 明显降低 ($P < 0.05$)。与 B 组比较: C 组大鼠 prol、LH 明显升高 ($P < 0.05$), FSH 明显降低 ($P < 0.05$); D 组大鼠 E2 及 LH 明显升高 ($P < 0.05$), 其他指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 C 组比较: D 组大鼠 E2 及 prol 明显降低 ($P < 0.05$), P 明显增加 ($P < 0.05$), 其他指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。



注: A 为 A 组; B 为 B 组; C 为 C 组; D 为 D 组。

图 1 各组大鼠子宫形态观察(HE 染色, $\times 40$)



注: A 为 A 组; B 为 B 组; C 为 C 组; D 为 D 组。

图 2 各组大鼠子宫形态观察(HE 染色, $\times 100$)

表 2 各组大鼠血清激素水平测定结果 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	E2(pg/mL)	prol(pg/mL)	P(ng/mL)	LH(mIU/mL)	FSH(mIU/mL)
A 组	113.23±3.12	1.09±0.08	9.58±1.04	1.32±0.29	2.12±0.08
B 组	36.89±5.09 ^a	2.08±0.47 ^a	3.32±0.17 ^a	2.61±0.17 ^a	3.47±0.10 ^a
C 组	192.35±11.68 ^{ab}	3.11±0.09 ^{ab}	1.27±0.08 ^{ab}	4.08±0.65 ^{ab}	3.19±0.21 ^{ab}
D 组	86.24±9.18 ^{abc}	2.32±0.52 ^{ac}	2.72±0.91 ^{ac}	3.44±0.41 ^{ab}	3.22±0.33 ^a

注:与 A 组比较, ^aP<0.05;与 B 组比较, ^bP<0.05;与 C 组比较, ^cP<0.05。

3 讨 论

子宫内膜是哺乳类动物体内对雌激素最为敏感的组织,正常情况下,卵巢周期性地分泌雌激素,维持正常的月经周期;病理情况下,在来源于体外或体内的雌激素持续性地过度刺激下,且无孕酮对抗,子宫内膜发生突破性或撤退性出血、两种类型混合性出血,进而引起子宫内膜增生、间质血管以及腺体扩张、炎细胞浸润、子宫脏器系数下降等一系列病理改变^[7-8]。本研究结果表明,采用去势法、雌激素负荷法和去势联合雌激素负荷法均可引起子宫内膜增生病理改变,如水肿和少量上皮细胞变性和坏死,孕激素均处于较低水平,提示这 3 种方法均可建立子宫内膜增生的大鼠模型。

雌激素孕激素维持在一定的水平对于女性建立正常月经周期十分重要,也是女性性成熟和生殖的重要标志。在性激素作用下,子宫内膜发生周期性脱落、生成,因此检测性激素的水平,是目前妇科疾病临床与实验研究的重要手段,一方面可以了解性激素在体内的周期性变化规律,另一方面对于寻找 EH 发生、发展的原因,寻求合适的治疗方法具有重要意义^[9]。有研究发现,雌激素诱导的子宫内膜增生大鼠模型出现了腺体的数量明显减少,上皮细胞和腺体增生,子宫内膜厚度和内径明显升高等病理改变^[10],与本研究结果相似。张丽萍等^[11]以高效孕激素治疗 EH,通过检测患者子宫内膜组织中 TRIM22 在治疗前后的表达情况,表明孕激素可以升高 TRIM22 的表达,抑制子宫内膜腺体的增殖,从而可以治疗 EH。本研究发现,所建立的这 3 种模型 prol、LH 和 FSH 的分泌量均明显增加,E2 和 P 均明显下降(C 组有外源性雌激素的干扰),提示本研究所建立的这 3 种模型也可应用于子宫内膜增生所致不孕症的相关研究。

此外,从研究结果上看,雌激素负荷法和去势联合雌激素负荷法所建立的子宫内膜增生大鼠模型的子宫指数明显增大,其原因可能与子宫内膜炎性浸润引起的水肿有关,提示采用这两种方法所建立的模型

可能具有子宫内膜炎的特征。

参考文献

- [1] 马鸿云,马燕琼,杨伟,等.宫腔镜电切术联合左炔诺孕酮宫内缓释系统治疗早期子宫内膜癌及子宫内膜不典型增生的临床分析[J].中华全科医学,2020,18(1):82-84.
- [2] 王丽,曾佳,张丹妮,等.子宫内膜增殖症诊治研究进展[J].临床军医杂志,2020,48(2):238-239.
- [3] 卜春艳,王素影,索青霞,等.左炔诺孕酮治疗子宫内膜增生症的效果及作用机制研究[J].河北医药,2019,41(15):2346-2348.
- [4] 韩倩,刘永,赵瑞华.子宫内膜增生症的中西医治疗进展[J].现代中西医结合杂志,2019,28(8):908-912.
- [5] 张月华,王路祎,张色华.影响子宫内膜不典型增生诊断及病理升级的相关因素分析[J].中国当代医药,2020,27(3):32-34.
- [6] 樊丽萍,贺丰杰.凋膜止崩方对大鼠子宫内膜增生症组织中 MMP-1 及 TIMP-1 mRNA 表达的影响[J].云南中医中药杂志,2016,37(8):75-77.
- [7] 付珂,黄胜,徐敏,等.止血镇痛胶囊对子宫内膜增生症大鼠子宫的影响[J].现代药物与临床,2019,34(10):2905-2910.
- [8] 王婧婧,王张.调经赞育丸对戊酸雌二醇诱导的大鼠无排卵型功能失调性子宫出血的改善作用[J].现代药物与临床,2019,34(4):955-959.
- [9] 丁芳,王亮,郝蕾,等.坤灵丸对子宫内膜增生模型大鼠的实验研究[J].河北中医医学报,2018,33(6):1-4.
- [10] PAHLEVANI P, MOSAVI S M, RASTGOO HAGHI A R, et al. Study of the effects of stachys lvanulifolia alcoholic extract on histomorphometry of endometrium in polycystic ovarian syndrome rat model [J]. Hamadan Univ Med Sci, 2016, 23(1): 40-48.
- [11] 张丽萍,王玉清,颜磊.子宫内膜不典型增生症孕激素治疗有效性与 TRIM22 表达的相关性[J].现代妇产科进展,2020,29(3):190-193.

(收稿日期:2020-04-14 修回日期:2020-10-29)