

多囊卵巢综合征动物模型的研究进展

吕晶武 高月平
(南京中医药大学 江苏南京 210029)

关键词: 多囊卵巢综合征; 动物模型; 综述

中图分类号: R 711.75

文献标识码: A

文献编号: 1671-4040(2009)01-0092-03

多囊卵巢综合征(PCOS)是一种发病多因性、临床表现多态性的综合征,其发病机理迄今尚不明确,是困扰人们多年的内分泌紊乱综合征。进一步探讨其病因病理及临床治疗都需要建立能全面反映本病特点的动物模型以供研究。目前多囊卵巢综合征研究尚无公认的动物模型,笔者就近年来所建立的多囊卵巢综合征动物模型作一综述,以便寻求较为理想、可靠、公认的造模方法。

1 雄激素造模

1.1 丙酸睾酮造模 刘矗^[1]、曹永孝^[2]等参考俞瑾关于肾主生殖实验研究中多囊卵巢小鼠模型的建立方法,选取雌性 5d 龄小鼠于颈背部皮下注射睾酮 1mg/只,造模后由母鼠哺乳至 3 周龄,以后以颗粒饲料喂养,但不给兽用多酶片,至 8 周龄为造模鼠。王莉^[3]、马惠荣^[4]等取 9d 龄雌性 SD 大鼠颈背部皮下注射丙酸睾酮 1.25mg(0.05mL),21d 龄断乳,70d 龄起每日作阴道涂片,连续 11d,观察到阴道上皮持续角化者为造模成功。吴维燕等^[5]以 1mg/100g 体重的丙酸睾酮溶液皮下注射 21d 龄 Wistar 雌性大鼠 28d 造模。该方法造模的基本原理在于过高床实际应用受限。如何将影像学检查、实验室检查与临床症状结合起来以提高其敏感性和特异性,仍是迫切需要解决的实际问题。(2)临床报道缺乏严格的较大样本的随机双盲设计。(3)实验报道相对于临床报道很少且少有远期疗效观察与评估。(4)疗效机制和药理作用环节研究不足。因此,在以后的研究中,首先应建立与临床相匹配的动物模型使研究逐步深入到分子生物水平,为中药多靶点多环节作用特点加强基础研究,早日研制出有效、方便的中药制剂,为临床用药提供客观依据,更充分发挥中医药在防治脂肪肝方面的优势。其次,对于“无证可辨”(无临床症状)的病例,应以中医理论为指导,分析其可能的病因病机,同时结合西医学有关检查指标探讨两者之间的相关性,提高微观辨证的准确度。临床研究应严格遵循临床流行病学原理进行设计,以提高结论的可信度与重复性。

参考文献

[1]范杰华,董德保.降脂复肝汤治疗脂肪肝疗效观察[J].光明中医,2006,21(2): 67-68
[2]陈丽华,刘雪梅.脂肝康治疗非酒精性脂肪肝 84 例观察[J].实用中医药杂志,2006,22(12): 732
[3]郭遂成.从瘀论治非酒精脂肪肝 80 例[J].陕西中医,2006,27(11): 1 355
[4]邓海清,黄国荣,吴瑞林.祛瘀化浊、疏肝解郁法治疗脂肪肝 52 例

的雄激素干扰了卵泡的生长成熟,而出现不排卵。他们认为连续 28d 注射丙酸睾酮诱导的 PCOS 大鼠模型具有高胰岛素血症、性激素异常的内分泌特征和卵巢多囊改变的形态学特点,并且激素和形态变化符合生理规律,具有相对的稳定性。

1.2 脱氢表雄酮(DHEA)造模 张晓薇等^[6]选择 23d 龄幼年 SD 清洁雌性大鼠,实验组及对照组各 20 只,均在 21d 龄断乳,喂以颗粒饲料。实验组皮下注射 DHEA 6mg/ (100g·d)+0.2mL 注射油剂,连续 20d 造模。对照组同期皮下注射 0.2mL 注射用油剂。樊永香等^[7]选用 23d 龄普通级幼年雌性 SD 大鼠,在 23d 龄断乳,喂以颗粒饲料,皮下注射 DHEA6mg/ (100g·d)+0.2mL 注射用水造模。付玉玲等^[8]用 23d 龄 SD 雌性大鼠,每晚 20:00 每 100g 体重皮下注射 DHEA 粉剂 6mg+0.2mL 注射用大豆油剂,连续 20d 造模。张娟等^[9]取未成熟雌性 SD 大鼠于 21d 龄断乳,喂以颗粒饲料,自由饮水,适应性喂养 2d。23d 龄开始每日皮下注射硫酸普拉睾酮钠 9mg/100g (相当于 DHEA 6mg/100g)+0.4mL 注射用水,连续 20d,建立 PCOS 大鼠模型。王玉霞等^[10-12]都以此法造模。

[J].陕西中医,2006,27(1): 24-25
[5]朱初良,殷小兰.疏肝健脾活血法治疗脂肪肝 50 例总结[J].湖南中医杂志,2007,23(2): 23-24
[6]刘玉启,王峰,姚刚.调脂胶囊治疗瘀血阻络型重度脂肪肝临床观察[J].中国中医急症,2006,15(6): 15-16
[7]刘三都.肝脂灵胶囊治疗高脂血症性脂肪肝 65 例临床观察[J].江苏中医药,2006,27(7): 34-35
[8]党中勤,赵长谱,党中方.十味肝脂康胶囊治疗非酒精性脂肪肝(痰瘀内阻型)临床观察[J].河南中医,2007,27(1): 38-39
[9]杨晋原,康永.活血降脂胶囊治疗非酒精性脂肪肝 48 例[J].中西医结合肝病杂志,2006,16(2): 114-116
[10]张春艳,李美朝.护肝散治疗脂肪肝的临床观察[J].现代医药卫生,2006,22(11): 1 608-1 610
[11]严付红.清肝降脂汤治疗非酒精性脂肪肝 50 例[J].中国中西医结合消化杂志,2006, 17(1): 60-61
[12]朱平生,王宇亮.脂消胶囊治疗非酒精性脂肪肝 50 例疗效观察[J].新中医,2006,38(4): 31-32
[13]邓银泉,范小芬.脂肪肝中医证型与生化指标的关系[J].浙江中西医结合杂志,2001,11(3): 138-140
[14]周俊英,姚树坤.中药脂肝宁预防酒精性脂肪肝的实验研究[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2006,6(3): 328-332
[15]杨莉娟,孟宪丽.调脂保肝胶囊防治大鼠脂肪肝的实验研究[J].中药新药与临床药理,2006,17(1): 33-35
[16]戴宁,曾民德.复方中药对酒精性脂肪肝肝细胞色素 P450II E I 表达的影响[J].中华肝脏病杂志,2003,11(11): 657- 659
[17]董子强,赵勇军,史玉霞.益肾洗肝化脂汤对酒精性脂肪肝患者 BUA、TBA 的影响[J].国医论坛,2003,18(2): 20-21
[18]李晓陵,孙树凯,王嘉彦.64 例脂肪肝与 CT 诊断对照研究[J].中医药信息,2002,19(4): 58
[19]刘明,褚玄任.实时 B 超在脂肪肝中的临床应用体会[J].江苏中医药,2000,21(10): 15-16

张晓薇^[6]等认为 DHEA 诱导 SD 幼年雌性大鼠 PCOS 动物模型卵巢病理改变及血内分泌改变与 PCOS 病人相似,并存在着明显的高胰岛素血症,是较理想的 PCOS 动物模型。

2 雌激素造模法

Lara 等^[13]选用成年未交配 SD 大鼠,体重 200~220g,每日保持光照 14h,且出现两次规律的 4d1 次的动情周期,一次性注射戊酸雌二醇(EV) 2mg/只,并分别在 7d、15d、30d、60d 处死,结果提示 60d 时卵巢呈现多囊样改变,造模成功。Elizabeth 等^[14]用戊酸雌二醇造模法,分别一次性注射 EV 1mg/只、2mg/只、4mg/只,并分别在 15d、30d、60d 处死动物,观察卵巢形态及其它改变,最终结果提示 4mg/只剂量组 30d 时卵巢呈现多囊样改变,其余各项指标与人类接近,造模成功。该类方法造模的基本原理在于高雌激素使垂体对下丘脑的 GnRH 的敏感性增加,LH 水平上升,同时持续的雌激素刺激对垂体 FSH 有抑制作用,从而出现 PCOS 典型的垂体内分泌环境。

3 孕激素联合 HCG(人促绒毛膜促性腺素)造模

朱辉等^[15]选用 24d 龄未成年雌性 SD 大鼠皮下埋植左旋 18-甲基炔诺酮硅胶棒(3mm),在 27d 龄时每天 2 次皮下注射 1.5IU 人促绒毛膜促性腺素(HCG),共注射 9d,至 36d 龄成为造模鼠。谈珍瑜等^[16]将 24d 龄清洁级未成年雌性 SD 大鼠皮下埋植左旋 18-甲基炔诺酮硅胶棒,在大鼠 27d 龄时颈背部皮下注射 HCG 1.5IU/只,每天 2 次,共注射 9d,至 35d 龄成造模鼠。孙永生^[17]、江胜芳^[18]等也用此法造模。张娜等^[19]用 24d 龄未成年雌性 SD 大鼠皮下埋植左旋甲基炔诺酮硅胶棒联合腹腔注射 HCG 造模,检测血激素 6 项并称取卵巢质量证实为造模成功。朱辉^[15]等认为此动物模型可以作为一种比较理想的 PCOS 动物模型,无论是病理形态学变化还是血浆激素水平均与 PCOS 相似,而形态学的改变是与其功能变化一致的。

4 胰岛素(INS)联合 HCG 造模法

郝琦蓉等^[20]取雌性 70 d 龄 SD 大鼠采用 Leonid Poretsky 的方法,每日 2 次皮下注射 HCG 3.0IU/d,共 22d,同时 2 次/d 皮下注射胰岛素,共 22d 造模。93d 龄连续阴道涂片 2 个性周期,采血测 T、Leptin、INS,观察到阴道角化细胞持续出现及结合血清 T、INS 测定符合标准者作为模型。黄玉华等^[21]以(54±3)d 龄 SD 雌性大鼠,每周称重 1 次,每日进行阴道涂片检查,4 周后依 Poretsky 法每只动物予皮下注射 HCG 1.5IU,每日 2 次,共 9d;INS 于第 1~11 日自 0.5IU/d 开始,渐递增至 6.0IU/d,并按此剂量维持至第 22 天,以 5%葡萄糖溶液代替日常饮水而成造模鼠。李轶等^[22]将出生 2 个月的雌性 SD 大鼠分为实

验组 and 对照组,第 1~10 天实验组大鼠注射胰岛素,剂量由 0.5IU/d 逐步增加至 6.0IU/d,第 11~22 天注射固定剂量胰岛素 6.0IU/d,并同时加用 6.0IU/d 的 HCG 分 2 次注射造模。王玮^[23]、李晓冬^[24]等也以类似方法造模。胰岛素能刺激卵巢卵泡膜和间质细胞合成雄激素,降低血中性激素结合蛋白(SHBG),使卵巢雄激素浓度增加,导致卵泡闭锁,形成多囊。

5 雄激素联合 HCG 造模

邝少松等^[25]按俞瑾等实验方法致不孕大鼠模型,选用 9d 龄未离乳雌性大鼠皮下注射十一酸睾酮 5mg/kg 体重(中性茶油稀释)。再依照 Poretsky 的方法在大鼠 85d 龄肌注 HCG 1.5IU/只,每天 2 次,连续 9d。在 SD 大鼠 108~122d 龄时取阴道涂片观察排卵情况,以阴道上皮细胞连续出现角化细胞判定为造模成功。谈珍瑜等^[26,27]选用有生育能力、月经规则、经量正常的雌性恒河猴,根据月经周期在经期第 1 天开始皮下注射丙酸睾酮 3mg/kg,隔日 1 次,连用 3 次,在月经周期第 7 天开始使用 HCG 300IU/kg,隔日 1 次,连用 3 次造模。孙林等^[28]比较孕激素联合 HCG 造模法和雄激素联合 HCG 造模法认为,睾酮联合 HCG 造模建立 PCOS 动物模型相对简单易行,是一种较好的造模方法。

6 雄激素联合胰岛素造模

田君等^[29]比较两种多囊卵巢综合征大鼠模型的构建方法。方法 1:模型组大鼠于 42d 龄时开始颈背部皮下注射脱氢表雄酮 3mg/(100g·d)+0.2mL 注射用油剂,腹部皮下注射胰岛素 2IU/d;连续注射 28d 后开始连续阴道涂片检查,观察阴道上皮失去周期性变化提示造模成功,对照组大鼠于 42d 龄开始颈背部皮下注射注射用油剂 0.2mL。方法 2:模型组大鼠于 42d 龄开始每日颈背部皮下注射胰岛素 2IU/d+HCG 3IU/d,连续注射 28d 后开始每日阴道涂片,阴道上皮失去周期性变化提示造模成功,对照组每日注射 0.2mL 注射用水。所有大鼠试验期间均在标准环境内合笼饲养,室温 20℃~28℃,相对湿度 50%,颗粒饲料自由择食,保持每日光照 14h。结果提示使用脱氢表雄酮+胰岛素的造模方法在卵巢形态学改变及胰岛素抵抗程度等指标上较符合目前 PCOS 的特征。

7 芳香化酶抑制剂造模

胡颜霞等^[30]用 6 周龄 SD 清洁级雌性大鼠灌胃服来曲唑 1mg/(kg·d),溶于 1%羧甲基纤维素中,21d 后成造模鼠。刘宏改^[31]、李战飞^[32]等也以此法造模。芳香化酶抑制剂能够阻断雄激素向雌激素的转换。来曲唑为一种非甾体类芳香化酶抑制剂,可导致类固醇激素生成紊乱。胡颜霞等^[30]认为利用来曲唑建立的 PCOS 大鼠模型无论从内分泌改变,还是从局部性腺的解剖、组织学改变来说,都是令人信

随着对 PCOS 研究的不断深入,动物造模方法也在不断发展。PCOS 不仅在人,而且在许多种动物都可以发生,如猴、狗、大鼠等。由于大鼠有较稳定的动情周期,且周期较短(4~5d),容易在较短时间观察到更多的生殖周期,对于实验研究来说较经济方便,使之成为较理想的 PCOS 造模动物。目前,造模方法多样反映了本病发病多因性的特点。雄激素造模、联合用药造模和芳香化酶抑制剂造模的方法成为研究热点。笔者认为上述动物模型从不同角度揭示了 PCOS 发病机理,可用于不同的研究目的,但还不能完全替代临床病人进行实验用药。一种较为理想、可靠、公认的造模方法还有待进一步研究。

参考文献

[1]刘矗,马丽萍,李伟权,等.滋阴疏肝汤对多囊卵巢小鼠内分泌功能的影响[J].中国中西医结合皮肤性病杂志,2005,4(1): 29-30
[2]曹永孝,李克喜,张东海,等.培坤胶囊的补气养血和促孕作用[J].西安交通大学学报医学版,2003,24(1): 67-69
[3]王莉,俞瑾.中药天葵方对雄激素所致不孕大鼠下丘脑前阿黑皮原 mRNA 的影响[J].中国中西医结合杂志,2001,21(7): 519-521
[4]马惠荣,杜惠兰,杨秀芳,等.补肾调经方对雄激素致不孕大鼠卵巢组织抗氧化的研究[J].中华中医药杂志,2005,20(4): 252
[5]吴雏燕,江中立,邱树卫,等.一种新的稳定多囊卵巢综合征大鼠模型的建立[J].中国康复医学杂志,2008,23(4): 334-338
[6]张晓薇,邝健全,曾爱群,等.脱氢表雄酮诱导多囊卵巢综合征动物模型研究[J].广州医学院学报,2000,28(3): 14-17
[7]樊永香,田秀珠,程丽平,等.多囊卵巢综合征大鼠雄激素、胰岛素抵抗及瘦素的关系[J].山西医科大学学报,2007,38(11): 989-992
[8]付玉玲,王燕,周春.青春期多囊卵巢综合征动物模型的实验研究[J].武汉大学学报,2007,28(6): 726-728
[9]张娟,朱桂金,王昕荣,等.硫酸普拉睾酮钠诱导大鼠多囊卵巢综合征动物模型的实验研究 [J]. 中国优生与遗传杂志,2007,15(2): 83-84
[10]王玉霞,孙永玉,邱红玉.实验性多囊卵巢综合征大鼠脂肪组织中抵抗素基因的表达及其意义[J].生殖医学杂志,2005,14(2): 93-97
[11]曹庆忱,李功妍.中药多囊灵胶囊对多囊性 SD 幼年雌性大鼠的药效学研究[J].中医药学刊,2006,24(6): 1 093-1 094
[12]张惠,田秀珠.罗格列酮对多囊卵巢综合征大鼠生殖激素和超微结构的影响[J].中国药物与临床,2008,8(4): 297-300
[13] Lara HE,Dissen GA, Leyton V,et al.An increase intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a

(上接第 86 页)

表 2 4 种中药医院制剂重金属限量(n=3)

药品名称	供试品量	标准铅溶液/mL	限量/ppm
银黄抗栓片	1g	2	≤20
活血化瘀片	1g	1	≤10
补气养血合剂	4mL	2	≤5
风湿愈液	4mL	2	≤5

4 讨论

自然界广泛存在的微量元素无论在土壤和地表植物中还是空气、水中都有一定浓度,自然界中的砷、汞等来源于地壳的风化和火山爆发,其土壤含量差别很大,有机物成分高的页岩含砷 13 ppm,有机物低的砂岩含砷 1ppm,砂土则低于 1ppm,高度工业化生产排污,致使铅、砷、镉、汞的排放不当,污染某些地区,使种植中药材吸收、蓄积,重金属含量增高,此外,农药的污染、产地的不同、采制加工生产中措施不当均可以影响中药材中重金属、砷盐的含量。

principal component of steroid-induce polycystic ovary in the rat[J]. Endocrinology,2000,141:1 059-1 072
[14]Elizabeth SV,Lundeborg T,Waldenstrom U,et al.Effdects of electro-acupuncture on never growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries [J].Biol Reprod,2000,63(5):1 646-1 653
[15]朱辉,倪江,姚兰春,等.大鼠多囊卵巢动物模型的实验研究[J].哈尔滨医科大学学报,1999,33(3): 187-188
[16]谈珍瑜,邹芝香,尤昭玲,等.补肾活血方对 PCO 大鼠瘦素、胰岛素和睾酮影响的实验研究[J].新中医,2006,38(12): 87-88
[17]孙永生,赵秀芝,王秀霞,等.卵巢Ⅱ号对多囊卵巢大鼠垂体及肾上腺超微结构的影响[J].中国中医药科技,2002,9(4): 240
[18]江胜芳,曹书芬,张昌军.多囊卵巢动物模型的实验研究[J].时珍国医国药,2007,18(2): 388-389
[19]张娜,刘复权,李彦群,等.转化生长因子-α 及其受体在卵巢综合征大鼠中的表达[J].河北医科大学学报,2005,26(1): 5-7
[20]郝琦蓉,张引华.多囊卵巢综合征治疗多囊卵巢综合征的实验研究[J].山西医科大学学报,2003,34(5): 447-450
[21]黄玉华,赵子厚,柴松岩,等.益肾健脾养血通利方对 Poresky PCOS 大鼠模型的影响[J].中国中医基础医学杂志,2004,10(1): 38-41
[22]李轶,梁晓燕,杨星,等.胰岛素和人绒毛膜促性腺激素建立高雄激素多囊卵巢大鼠模型 [J]. 国际生殖健康 / 计划生育杂志,2008,27(1): 54-57
[23]王玮,蔡建辉,马毓梅,等.Glut4 在卵巢综合征大鼠子宫内腺中的表达[J].中国病理生理杂志,2007,23(3): 587-590
[24]李晓冬,马毓梅,张杰英,等.二甲双胍治疗后卵巢综合征大鼠子宫内腺 Hoxa10 的表达及意义 [J]. 第四军医大学学报,2007,28(2): 153-156
[25]邝少松,黄小琼,饶子亮,等.大鼠卵巢综合征动物模型血脂代谢及抗氧化作用[J].中国比较医学杂志,2007,17(9): 519-522
[26]谈珍瑜,冯光荣,尤昭玲,等.补肾活血方对恒河猴 PCO 模型卵巢 PAI-1mRNA 表达影响的实验研究 [J]. 中国中医药科技,2007,14(3): 194-195
[27]林洁,冯光荣,尤昭玲,等.补肾活血方对恒河猴 PCO 模型卵巢 MMPs-2 MMPs-9mRNA 表达影响的实验研究 [J]. 中国中医药科技,2007,14(3): 196-197
[28]孙林,魏巍,关咏梅.u-PA、u-PAR 和 PAI-1 在睾酮联合 hCG 致多卵巢大鼠中的表达与意义[J].生殖与避孕,2006,26(10): 579-583
[29]田君,丘彦.多囊卵巢综合征动物模型构建的比较研究[J].重庆医科大学学报,2008,33(4): 419-422
[30]胡颜霞,张展,贾莉婷.来曲唑诱导多囊卵巢综合征大鼠模型的研究[J].中国妇幼保健,2006,21(7): 957-959
[31]刘宏改,贾莉婷,张展,等.CTGf 在 PCOS 大鼠卵巢中的表达及其作用[J].医药论坛杂志,2006,27(23): 1-3
[32]李战飞,贾莉婷,李巍巍,等. HGF uPA 在卵巢综合征大鼠卵巢中的表达及意义[J].医药论坛杂志,2007,28(24): 1-4

(收稿日期: 2008-09-04)

根据医院制剂质量检测条件的实际情况,我们重金属采用纳氏比色法、砷盐采用古蔡氏法对 4 种中药医院制剂进行了考察。发现这 4 种医院制剂砷盐均小于等于百万分之二,而银黄抗栓片的重金属限度为小于等于百万分之二十,活血化瘀片的重金属限度为小于等于百万分之十。中药微量重金属含量的安全限度控制,对每种生药、中成药制剂应根据实际样品情况确立,中国药典 2005 年版一部标准对黄芪、甘草、白芍、丹参、金银花、西洋参、黄连上清丸中重金属规定了限度,但大部分中药材、中药制剂还没有明确统一的限量标准,因此我们应在制定质量标准时对重金属、砷盐进一步加以考察,以提高含重金属及砷中药(制剂)的安全性。

参考文献

[1]Hammond PB.Exposures of humans to lead [J].Anu Rev pharmacol Toxicol,1977,17:197-214
[2]中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].广州:广东科技出版社,2005.附录 46

(收稿日期: 2008-09-12)