

外源性雌孕激素联合给药诱导雌性大鼠人工动情周期的方法学探讨

刘 坤 王玉杰 李亚琼 张 浩 张胜男 魏 盛

摘 要 **目的** 对 Wistar 雌性性成熟大鼠在卵巢切除术后进行外源性雌、孕激素注射以诱导人工动情周期,为诱导大鼠同步且规律的动情周期提供一种可靠的方法。**方法** 用阴道电阻仪测量 Wistar 雌性大鼠阴道电阻值,按照动情周期是否规律将大鼠分为两组,对两组大鼠均进行卵巢切除术,恢复 1 周后进行雌孕激素联合给药法诱导大鼠的动情周期(动情周期规律大鼠作为对照),测量大鼠阴道电阻值,观察电阻值的变化趋势,判断其动情周期的规律性和同步性。**结果** 对筛选出的 10 只动情周期规律的大鼠及 90 只动情周期不规律的大鼠均进行卵巢摘除术后,外源性雌孕激素联合给药诱导,大鼠的阴道电阻值显示诱导后的人工动情周期均呈现以 4 天为 1 个周期,持续两个周期的特点。**结论** 外源性雌孕激素联合给药法可以诱导大鼠规律且同步的动情周期。

关键词 Wistar 雌性大鼠 激素诱导 动情周期 阴道电阻法

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.03.015

Methodological Study on Induction of Artificial Estrous Cycle in Female Rats by Exogenous Estrogen and Progesterone Combined Administration. Liu Kun, Wang Yujie, Li Yaqiong, et al. *Animal Behavior Experimental Platform of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong 250355, China*

Abstract **Objective** To provide a reliable method for inducing synchronous and regular estrous cycle in Wistar female mature rats by injecting exogenous estrogen and progesterone after ovariectomy. **Methods** Vaginal resistance of Wistar female rats was measured by vaginal resistance meter. According to whether the estrous cycle was regular or not, the rats were divided into two groups. Ovariectomy was performed in both groups, and estrogen and progesterone combined administration was used to induce the estrous cycle of rats one week later (estrous cycle regular rats as control). Vaginal resistance of rats was measured to observe the change trend of resistance value, and to judge the regularity and synchronization of estrous cycle. **Results** Ten rats with regular estrous cycle and 90 rats with irregular estrous cycle were induced by combined administration of exogenous estrogen and progesterone after ovariectomy. The vaginal resistance values of rats showed that the induced artificial estrous cycle was characterized by a cycle of 4 days and lasted for two cycles. **Conclusion** Exogenous estrogen combined with progesterone can induce regular and synchronous estrous cycle in rats.

Key words Wistar female rats; Hormone induction; Estrous cycle; Vaginal resistance method

雌性性成熟大鼠规律的动情周期一般为 4~5 天,分为动情前期、动情期、动情后期和动情间期^[1]。在动情周期的不同阶段大鼠的生殖及内分泌系统会发生组织学与生理学上的变化^[2]。动情周期规律的雌性大鼠作为一种动物模型在探索女性月经周期相关疾病的发生机制、评价药物的作用效果以及相应药物开发的实验中应用广泛。但自然状态下动情周期规律的雌性大鼠只占 10% 左右,并且其动情周期并不同步,极大干扰了相关研究工作的进行^[3]。探索

人工诱导雌性大鼠动情周期的方法可以在诱导大鼠规律动情周期的同时保证其同步性,以便于在进行动物数量较多的实验中进行平行对照。同时,通过掌握对大鼠进行激素诱导的时间可推断大鼠所处动情周期的阶段,避免了在确定大鼠动情周期的阶段时进行的实验操作并可以减少其对大鼠的刺激与影响。此方法在实验研究中无疑具有重要的应用价值。

人工诱导雌性大鼠动情周期的方法在国内外鲜有报道。Ho 等^[4]通过注射苯甲酸雌二醇、雌二醇和孕酮的方式成功诱导出与正常雌性大鼠阴道的周期性改变一致的动物模型,并运用于 PMS 大鼠模型的制备中,验证了此种方法的可靠性。笔者课题组在前期的研究中已经证实此种方法可以诱导出动情周期

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81703941);山东省中医药科技发展计划项目(2017-005);山东中医药大学 SRT 项目(2018097)

作者单位:250355 济南,山东中医药大学动物行为学实验平台

通讯作者:魏盛,电子信箱:waysaint@163.com

规律且同步的大鼠,本实验在前期经验的基础上将溶解的溶剂由麻油改为二甲基亚砷(DMSO),以解决激素在麻油中不能充分溶解的问题,应用于大鼠动情周期的人工诱导中。

本研究用阴道电阻仪检测大鼠阴道电阻值,将动情周期规律与不规律的大鼠分为两组(将动情周期规律的大鼠组作为对照),均进行卵巢切除术后行雌、孕激素联合给药以人工诱导大鼠同步且规律的动情周期,为相关的实验提供可靠的大鼠模型。

材料与方法

1. 实验动物:100只SPF级雌性性成熟Wistar大鼠,6~8周龄,体质量120~160g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[生产许可证号:SCXK(京)2016-0006]。进入实验室后,所有大鼠均在屏障环境[使用许可证号:SYXK(鲁)2017-0022]中单笼饲养,保持12h/12h明暗周期,昼夜颠倒(8:00时关灯,20:00时开灯)。饲养大鼠房间保持室温 $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度45%,自由采食和饮水。实验前进行7天的适应性饲养以适应环境,定时进行抓握以平行操作^[5]。所有实验操作遵从于美国NIH颁布的《实验动物护理和使用指南》,并由山东中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号:DWSY201703013)。

2. 器材和试剂:大鼠受孕期分析仪(MK-11)购自室町机械株式会社;苯甲酸雌二醇、雌二醇购自麦克林(上海)贸易有限公司;孕酮购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;青霉素钾购自江苏南农高科动物药业有限公司;水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司。苯甲酸雌二醇(0.5微克/只)、雌二醇(0.5微克/只)、孕酮(0.5毫克/只)在使用前用DM-SO溶剂配成相应浓度溶液,青霉素钾使用前用0.9%氯化钠注射液配成相应浓度溶液(2单位/只),水合氯醛使用前用0.9%氯化钠注射液配成10%浓度溶液。

3. 阴道电阻法检测大鼠动情周期并根据动情周期是否规律对大鼠进行分组:通过测量大鼠的阴道电阻值并观察其变化趋势可以判断大鼠的动情周期是否规律。动情周期规律大鼠的阴道电阻值满足以4天为1个周期,且非接受期(动情后期、动情间期)阴道电阻值 $<3\text{k}\Omega$,接受期(动情前期、动情期)阴道电阻值 $\geq 3\text{k}\Omega$ 的规律。对实验的100只雌性成熟Wistar大鼠进行阴道电阻值测量。正常大鼠的动情周期一般为4天,少数为5天。因此阴道电阻值至少需测量两个周期,即9天左右。为避免测量时间不合适导

致数据偏差及傍晚测量造成假孕,阴道电阻的测量时间选择在下午13:00时~15:00时。阴道电阻测量方法:打开大鼠受孕分析仪电源开关,检查设备相关状况,确认设备初始值为10.00k Ω 后,用0.9%氯化钠注射液清洗阴道探头并消毒,放置在一侧待用。左手抓取大鼠,将其头部置于中指和示指之间,使其处于仰卧位,抓握大鼠时应尽量保持动作轻柔温和,减少大鼠的痛苦^[6]。待大鼠四肢放松在最舒适状态时进行测量。将阴道探针轻轻的插入大鼠阴道内约30s测量阴道电阻,每次测量前用0.9%氯化钠注射液清洗。待电阻仪显示数值稳定后读取数据并做好记录。测定完成,检查仪器正常,关闭电源并消毒探针。

4. 卵巢切除术后雌孕激素联合给药诱导:进行阴道电阻值测量后,通过观察大鼠阴道电阻值的特点将大鼠分为两组,10只为动情周期规律的大鼠,90只为动情周期不规律的大鼠,为验证激素诱导实验的可靠性,笔者对两组大鼠均进行了卵巢切除术后的雌孕激素联合诱导。

(1) 卵巢切除术:术前大鼠禁食禁水(12h)。用水合氯醛(10%)按照3ml/kg剂量注射进行麻醉。麻醉指征:呼吸平稳、角膜反射小或迟钝、皮肤夹捏反应消失、全身肌肉松弛。仰卧位固定大鼠四肢。以腹正中线距离阴道口2.5cm处为中心,半径1.5cm的范围用剪刀剪掉大鼠皮毛,碘伏消毒。在低于触诊肋骨的1.5cm处做一切口,逐层钝性分离,进入腹腔,使用弯镊从切口处向腹腔下方找到子宫角,顺着子宫可以慢慢拉出脂肪包裹呈粉红色桑葚状的卵巢,然后在大鼠卵巢与输卵管相交部位0.5~1.0cm处按照缝合打结的方法进行结扎,结扎完成剪下大鼠卵巢^[7]。青霉素消炎后将子宫送回腹腔,分层缝合后青霉素消炎,术后恢复1周。卵巢摘除后的大鼠于每天下午的14:00、15:00、16:00、17:00时检测阴道电阻,检测1个动情周期。

(2) 激素诱导:卵巢切除术后的大鼠于0h(第1次皮下注射激素作为计时开始)、32h、44h分别皮下注射苯甲酸雌二醇、雌二醇、孕酮^[4]。第1次注射激素时间(即0h)选择在中午11:30时注射苯甲酸雌二醇,32h后即第2天下午19:30时注射雌二醇,44h即第3天早上7:30时注射孕酮,第4天不注射。连续激素诱导两个动情周期,检测此期间大鼠阴道电阻值。注射时左手拇指和示指掀起背部皮肤1cm左右,手掌蒙住大鼠眼睛并起固定作用,右手持针从掀

起的两层皮肤中间进针,保持进针方向与皮肤平行,感觉到针尖传来突破感即针尖突破皮质,此时便可推动注射器注入激素。注射激素过程中要确保针尖在皮肤里,防止用力过大导致针尖穿透两层皮肤而刺出皮肤外。

5. 统计学方法:采用 GraphPad Prism 7.0 统计学软件对数据进行统计描述。

结 果

1. 阴道电阻法检测大鼠动情周期的结果:动情周期规律大鼠各时期阴道表皮细胞的电阻值符合一定规律:满足 4 天 1 个周期循环,且接受期电阻值 $\geq 3\text{k}\Omega$,非接受期电阻值 $< 3\text{k}\Omega$,说明大鼠动情周期规律(图 1)。动情周期不规律大鼠的阴道电阻值曲线未呈现共同的电阻值变化规律,因此笔者列举了两种典型的电阻图情况。大鼠的阴道电阻值保持 $< 3\text{k}\Omega$

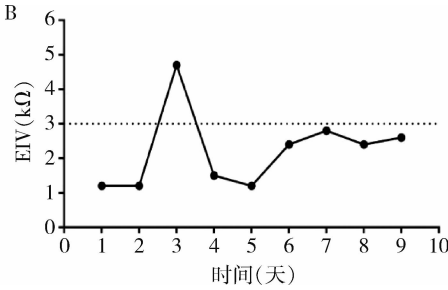
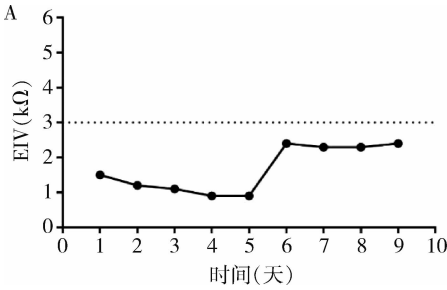


图 2 动情周期不规律大鼠两种典型的阴道电阻波动情况

A. 大鼠的阴道电阻值保持 $< 3\text{k}\Omega$ 的水平而无周期性波动;B. 大鼠的阴道电阻值仅出现一个动情周期而无连续的周期性变化

2. 卵巢切除后大鼠的阴道电阻值结果:连续检测 5 天卵巢切除后的大鼠的阴道电阻值,阴道电阻值失去周期性变化,且处于 $< 3\text{k}\Omega$ 的水平(图 3)。

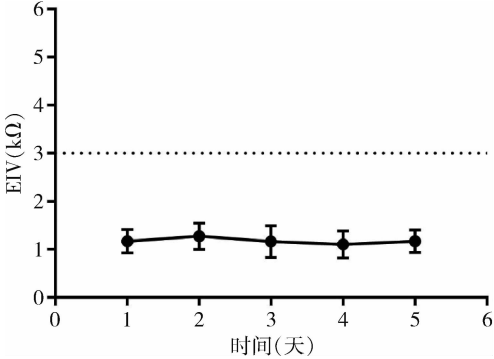


图 3 卵巢切除后大鼠的阴道电阻波动情况 ($n = 100$)

3. 激素诱导后大鼠的阴道电阻值结果:由图 4 中电阻值的变化规律可知,进行雌孕激素诱导后两组大鼠的阴道电阻值均出现以 4 天为 1 个周期,连续两个

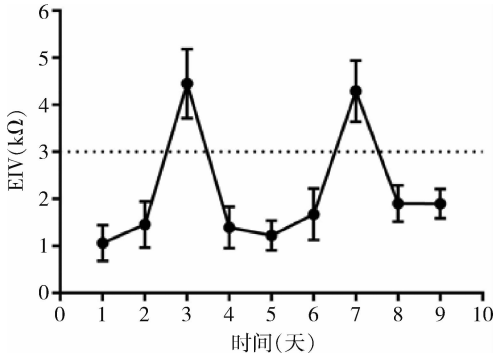


图 1 动情周期规律大鼠阴道电阻波动情况 ($n = 10$)

此图对动情周期规律大鼠不同时间测得的阴道电阻值进行了同步化调整

的水平而无周期性波动(图 2A);大鼠的阴道电阻值仅出现一个动情周期而无连续的周期性变化(图 2B)。此类大鼠的动情周期不规律。

周期的动情周期变化趋势。其第 1、2、4 天阴道电阻值 $< 3\text{k}\Omega$,第 3 天 $\geq 3\text{k}\Omega$,证明外源性雌孕激素联合给药可以诱导雌性大鼠规律且同步的动情周期。

讨 论

雌性性成熟大鼠动情周期的变化与其体内卵巢分泌雌孕激素的状况密切相关。卵巢内性激素导致的卵泡和黄体发生的一系列变化对应了大鼠动情周期的不同阶段。本实验依据动情周期与雌孕激素的相关性,通过雌孕激素联合给药的方法诱导雌性大鼠的人工周期,为相关研究提供可靠的大鼠模型。

Iwasaki 等^[8]的研究指出由阴道电阻法测得大鼠的阴道电阻值与大鼠动情周期的相关性较高。Jaramillo 等^[6]通过检测大鼠阴道电阻值的方法确定了大鼠的动情前期,提出此种方法准确率高,并可以降低大鼠假孕的概率。在使用阴道电阻值筛选动情周期规律的大鼠时,合格大鼠的阴道电阻图呈现动情周期持续 4 天,接受期电阻值 $\geq 3\text{k}\Omega$,非接受期电阻值 $<$

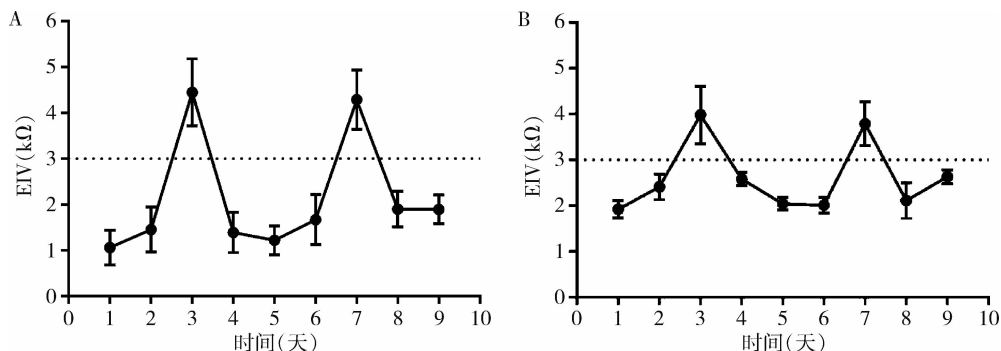


图4 激素诱导两个周期后大鼠的阴道电阻波动情况 ($n=100$)

A. 动情周期规律大鼠; B. 动情周期不规律大鼠

3kΩ 的特点。而动情周期不规律大鼠的阴道电阻值无相同的规律可寻。郭浩等^[9]在文献中提出电阻值的变化主要是由于在动情周期的不同阶段,激素发生周期性变化,其作用于阴道,使黏液的分泌量及内容物发生了改变,从而阴道内的导电性发生改变,所以电阻值表现为从发情前期到发情期的不同变化状态。而 $\geq 3\text{k}\Omega$ 的峰值出现的原因可能与黄体分泌的高峰期有关。而这些研究发现佐证了激素与大鼠动情周期的相关性。但并非所有雌性性成熟大鼠的动情周期都是规律变化的,很多大鼠的动情周期并不规律,出现这一现象的原因可能为大鼠本身及外界因素的影响,比如一些气味的的影响以及过频的电阻仪测量可能会作为一种刺激影响动物的发情。

卵巢切除术后大鼠阴道电阻值的波动特点显示,两组大鼠的阴道电阻值在进行卵巢切除术后均处于较低的水平。动情周期规律的大鼠其阴道电阻值失去其周期性变化处于较低的水平,其 $\geq 3\text{k}\Omega$ 的峰值也消失。Wistar 雌性性成熟大鼠在切除卵巢后不能持续分泌性激素,大鼠的子宫内膜及阴道不能受到来自性激素的调控,其生理学变化消失,因此大鼠的阴道电阻值处于较低的水平且其周期性变化消失;卵巢切除后,卵泡及黄体的生理学变化消失,在此基础上发生的激素分泌水平的变化随之消失,由黄体分泌的孕酮即处于低水平状态,这与大鼠的阴道电阻值失去其峰值有关^[10]。动情周期不规律大鼠的阴道电阻值不再无规律可循,同处于低水平。这也证实了卵巢切除后大鼠的动情周期排除了内源性激素的影响。

进行雌孕激素联合给药诱导后两组大鼠连续两个动情周期的阴道电阻图均呈现规律且同步的变化。同时证明了此方法同样适用于动情周期不规律的大鼠群体。即在对大鼠进行激素诱导之前已经排除了其自身激素的影响。在注射苯甲酸雌二醇及雌二醇

的第1、2天及未注射激素的第4天,大鼠的阴道电阻值水平 $< 3\text{k}\Omega$,其与大鼠处于非接受期的特点一致;在注射孕酮的第3天,大鼠的阴道电阻值 $\geq 3\text{k}\Omega$,与大鼠处于接受期的特点一致。Marcondes 等^[11]研究报道雌二醇在大鼠的发情期开始升高,发情前达到峰值,发情时回到基线,孕酮分泌在动情间期和动情后期增加,随后减少。此项研究发现在一定程度上证实了体外激素注射诱导动物动情周期的可靠性。苯甲酸雌二醇与雌二醇均为雌激素类药物,但其代谢途径及代谢产物不尽相同,另外3种激素在大鼠体内的代谢速率也会影响大鼠体内的激素水平从而表现为阴道电阻值的变化。

本实验通过测量阴道电阻值的方法确定大鼠的动情周期并通过外源性雌孕激素注射的方法成功诱导大鼠规律的动情周期,为制备动情周期同步且规律的大鼠模型提供了新的方法。同时,笔者在前期的PMDD药效实验证实了在雌孕激素联合给药诱导大鼠人工动情周期的过程中如果进行其他的药物试验并不会对其产生影响。但关于如何对激素注射后的大鼠体内的内分泌代谢改变进行实时检测以掌握激素在大鼠体内的详细代谢机制等问题的解答仍需要开展进一步的实验研究。

参考文献

- 1 Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears [J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43 (6): 776 - 793
- 2 王洁, 吴素慧, 尚海霞. 性成熟雌性 SD 大鼠动情周期的观察 [J]. *当代医学*, 2013, 28: 25 - 26
- 3 Hubscher C, Brooks D, Johnson J. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle [J]. *Biotech Histochem*, 2005, 80 (2): 79 - 87

(下转第 69 页)

如凋亡、增殖、转化等^[19,20]。本研究发现,二氮嗪能够显著抑制冠心病大鼠心肌细胞 ERK1/2 的表达。

综上所述,线粒体 ATP 敏感性钾离子通道开放剂二氮嗪能够对心肌组织结构有显著的保护作用,并且能够缓解冠心病大鼠心肌细胞的凋亡,其作用机制可能为抑制体内炎症反应,以及降低冠心病大鼠心肌组织中 ERK1/2 的表达,从而抑制心肌细胞的凋亡,但具体的治疗机制还需要进一步探讨。

参考文献

- 1 王阶,李军,毛静远,等. 冠心病心绞痛主要证型的辨证诊断标准[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(2):154-155
- 2 钱鲁,殷日鹏. MIF 基因启动子区-173 多态性与冠心病相关性研究[J]. 医学研究杂志, 2018, 47(4):32-35
- 3 王维铁,张旭,许日昊,等. 冠心病患者冠状动脉病变程度与颈动脉粥样硬化及脑梗死的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(2):171-174
- 4 高爽,王臻楠,顾耘. 血管内皮细胞功能障碍与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(20):2966-2970
- 5 成红,李超,贾慧群. 心肌缺血预处理与胞膜 ATP 敏感性钾通道[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2018, 39(5):517-521
- 6 孙朝阳,周坤,马翔. 线粒体 ATP 敏感性钾离子通道开放剂改善冠心病大鼠模型心肌氧化应激损伤的分子机制[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2019, 18(2):136-140
- 7 苏浩,杨莹莹,谭文,等. 二氮嗪再灌注处理通过抑制细胞内 ROS 信号保护心肌细胞[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(6):2702-2707
- 8 李清,崔薇,刘刚,等. ERK1/2 信号通路和 STAT3 信号通路在大鼠二氮嗪后处理心肌保护作用中的关系[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 5:628-631
- 9 钟巧青,朱凌燕,张国刚. 动脉粥样硬化性心血管疾病合并糖尿病患者发病机制与临床特点及治疗对策[J]. 中国心血管病研究, 2018, 16(12):1069-1072

- 10 梅红芳,蔡晓. ATP 敏感性钾离子通道在脑缺血缺氧中的双重作用[J]. 医学综述, 2016, 22(6):1088-1091
- 11 Yuanyuan L, Xiumei G, Min C, *et al.* Role of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel in hydrogen sulfide-induced inhibition of high glucose-induced osteoblast damage[J]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2017, 35(5):473-478
- 12 张琳,喻田,任思宏,等. 二氮嗪后处理对大鼠缺血再灌注损伤心肌线粒体蛋白质表达的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(38):32-34
- 13 赵剑,夏大胜,李彬,等. 冠心病患者血清内脂素水平与炎症标志物及组织因子的关系[J]. 新医学, 2014, 45(10):652-655
- 14 魏景迅,徐会圃,程艳丽,等. 凋亡和自噬在氧化应激所致心肌细胞损伤中的作用[J]. 临床心血管病杂志, 2016, 32(3):308-313
- 15 Dong Y, Liu C, Zhao Y, *et al.* Role of noncoding RNAs in regulation of cardiac cell death and cardiovascular diseases[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(2):291-300
- 16 Meng X, Ji Y, Wan Z, *et al.* Inhibition of miR-363 protects cardiomyocytes against hypoxia-induced apoptosis through regulation of Notch signaling[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90:509-516
- 17 Zhang Y, Li X, Huang Z, *et al.* Enhancement of cell permeabilization apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles by ATP surface decoration. [J]. Nanomedicine, 2013, 9(1):74-84
- 18 Li X, Feng K, Li J, *et al.* Curcumin Inhibits apoptosis of chondrocytes through activation ERK1/2 signaling pathways induced autophagy[J]. Nutrients, 2017, 9(4):414-429
- 19 Chen G, Liu J, Jiang L, *et al.* Peiminine protects dopaminergic neurons from inflammation-induced cell death by inhibiting the ERK1/2 and NF- κ B signalling pathways[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3):821-831
- 20 Satoh R, Hagihara K, Matsuura K, *et al.* Identification of ACA-28, a 1'-acetoxychavicol acetate analogue compound, as a novel modulator of ERK MAPK signaling, which preferentially kills human melanoma cells[J]. Genes Cells, 2017, 22(7):608-618

(收稿日期:2019-07-01)

(修回日期:2019-09-18)

(上接第 64 页)

- 4 Ho HP, Olsson M, Pharm M, *et al.* The serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sex steroid-related aggression in female rats: an animal model of premenstrual irritability[J]. Neuropsychopharmacology, 2001, 24(5):502-510
- 5 Rygula R, Abumaria N, Gabriele F, *et al.* Anhedonia and motivational deficits in rats: Impact of chronic social stress[J]. Behav Brain Res, 2005, 162(1):130-134
- 6 Jaramillo C, Lorenza M, Balcazar IB, *et al.* Using vaginal wall impedance to determine estrous cycle phase in Lewis rats[J]. Lab Animal, 2012, 41(5):122-128
- 7 Marques DA, Débora de C, Silva GSFD, *et al.* Ventilatory, metabolic and thermal responses to hypercapnia in female rats: effects of estrous

cycle, ovariectomy and hormonal replacement[J]. J Appl Physiol, 2015, 119(1):61-68

- 8 Iwasaki S, Inoue K. Maternal-infant separation impedes changes in feeding behavior during estrous cycle of rats[J]. Exp Animals, 2015, 64(4):383-390
- 9 郭浩,王林,陈新,等. 警母犬阴道黏液电阻值测定检测排卵试验[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2017, 2:36-37
- 10 Bäckström T, Bixo M, Johansson M, *et al.* Allopregnanolone and mood disorders[J]. Prog Neurobiol, 2014, 113:88-94
- 11 Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations[J]. Brazil J Biol, 2002, 62(4a):609-614

(收稿日期:2019-02-20)

(修回日期:2019-03-08)