

宫内节育器避孕大鼠经阴道造模避孕率和行为学评价的研究

彭召云 师伟 李自发 梁娜 岳恒学

【摘要】 目的 探索经阴道建立宫内节育器(IUD)避孕大鼠模型的造模效果。方法 以100只SD已生育大鼠为受试对象,随机分为经阴道组、开腹组、经阴道假手术组、开腹假手术组、空白对照组,各组再随机设立亚组1(合笼)、亚组2(不合笼),10只/亚组。亚组1于造模后第22天开腹观察大鼠避孕率和胚胎计数;亚组2于造模后第3、10、16天,观察大鼠造模前后的一般状态,并进行旷场实验。结果 经阴道与开腹放置IUD,避孕率均为100%,且对侧宫腔内胚胎数差异无显著性($P>0.05$)。较之开腹造模,经阴道造模对大鼠的一般状况影响小。经阴道造模前后大鼠中央格停留时间、水平穿越格数、直立次数、修饰次数的比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 经阴道造模大鼠能为IUD节育副反应研究提供有效的动物模型。

【关键词】 宫内避孕器; 出血; 大鼠; 经阴道建模

Study on the contraception rate and the behavioral assessment by transvaginal modeling method for contraceptive rat with the intrauterine device PENG Zhao-yun*, SHI Wei, LI Zi-fa, LIANG Na, YUE Heng-xue.

*Graduate of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Corresponding author: SHI Wei, Email: sw19781214@163.com

【Abstract】 Objective To investigate contraceptive rat model with the intrauterine device(IUD) transvaginal placement. **Methods** 100 SD female rats were divided into transvaginal operation group, abdomen-incision group, transvaginal sham operation group, abdomen-incision sham operation group and blank control group. Each group includes 20 rats. The groups were further randomly set up subgroup 1 and subgroup 2, which were both include 10 rats. The pregnancy rate and embryo counts would be observed in subgroup 1 on the twenty-second day after modeling. Before making the model and the 3, 10, 16 days after modeling, the rats of each group were performed the open field test. **Results** IUD contraception rate were all 100% between transvaginal operation group to abdomen-incision group. The difference of contralateral intrauterine embryo number in two groups had no significant meaning($P>0.05$). Influence of the general situation of transvaginal operation group was much lower than that of abdomen-incision group. Before and after making models, each index of open field test had no significant difference($P>0.05$). **Conclusion** IUD rat with transvaginal modeling method provide a valid animal model for IUD side effects study.

【Key words】 Intrauterine devices; Hemorrhage; Rats; Transvaginal modeling method

宫内节育器(IUD)出血副反应是指育龄妇女放置IUD后,IUD位置正常,而出现以经期延长或月经过多、非经期阴道流血等异常子宫出血为主症的疾病,其发生率20%~50%,甚至高达60%^[1]。但异常出血以子

宫内膜局部病变为主,标本取材困难,尚不能完全明确其发病及干预机制,因此需建立动物模型进行相关方面的深入研究。开腹^[2]建立动物模型与临床经阴道放置IUD方式不符,本研究经阴道置入大鼠宫腔IUD、考评成模效果,以期建立更适用于IUD出血副反应研究的动物模型。

材料与方法

1. 实验动物: SD 已生育雌性大鼠[山东中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(20050015)],同批出生一起饲养,连续2个以上动情周期正常、12周龄、体重(220±20)g。饲养条件:

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.15.059

基金项目: 国家自然科学基金(81001536); 教育部博士点基金项目(20103731120003); 山东省自然科学基金项目(ZR2010HQ018)

作者单位: 250014 济南, 山东中医药大学研究生(彭召云、李自发、梁娜、岳恒学); 山东中医药大学附属医院妇科(师伟); 山东中医药大学动物实验中心(李自发)

通讯作者: 师伟, Email: sw19781214@163.com

室温 18~28℃, 相对湿度 40%~70%, 光照 200~350 照度, 通风 10 次/h。自由饮水摄食, 饲料相同。

2. 主要实验器械和材料: 鼻腔异物钳、组织剪、眼科剪、血管钳、注射器、灭菌医用缝合针、不可吸收手术缝合线、碘伏消毒液、无菌手套(山东博达医疗用品有限公司)。横截面直径 0.3 mm 聚乙烯塑料棒(安徽省潜山县源潭万隆制刷厂)。含铜 99.8%, 横截面直径 0.1 mm 工业电线紫铜丝(山东阳谷新日辉电缆有限公司)。大鼠固定式自照明阴道窥器(专利号 ZL2012 20023951.7)、经阴道 IUD 放置器械(专利号: ZL2012 20022710.0)。注射用青霉素、甲硝唑注射液(河南省海天动物药业有限公司)。不透明圆柱旷场实验箱(自制: 高 40 cm, 直径 80 cm, 箱底划分为面积相等的 25 格)。

3. 大鼠含铜 IUD: 将聚乙烯塑料棒、工业电线紫铜丝、7 个“0”缝合线分别剪为 35 mm、40 mm、100 mm 的规格, 在每根塑料棒表面, 螺旋缠绕 6 股铜丝固定, 塑料棒前端预留 5 mm 未缠铜丝, 后端将手术线打结连接于塑料棒; 经阴道放置的 IUD, 在塑料棒前端的铜丝未缠绕区, 反向打折 5 mm, 呈钩状。置于 2% 戊二醛浸泡 24 h, 生理盐水冲洗备用(图 1)。

4. 经阴道造模法: 大鼠腹腔麻醉(1% 戊巴比妥钠 30 mg/kg)后, 仰卧位固定, 常规消毒; 戴无菌手套, 暴露并消毒宫颈, 鼻腔异物钳牵拉宫颈, 置入导丝, 至明显阻挡感(约进入宫颈口 8~9 cm); 由导丝尾部套入套管前端, 置入套管(约进入宫颈口 7~8 cm), 至明显阻挡感后, 完整撤出导丝; 在推芯前端分叉处挂 IUD 钩状结构, 由套管尾口平行同步置入推芯至有阻碍感, 快速推入推芯剩余部分, 至套管与推芯尾部相触; 缓慢撤出推芯、套管(图 1), 牵拉 IUD 尾端丝线至有明显拮抗回缩感后, 于宫颈口 1 cm 处剪断丝线, 撤出鼻腔异物钳及阴道窥器。

5. 开腹造模法: 大鼠麻醉仰卧位固定后, 备皮消毒下腹 2/3 面积, 取耻骨上中线 1 cm, 做 1.5~2 cm 纵形切口, 经腹探及子宫联合并暴露一侧子宫, 于近卵巢侧 1.5 cm 处做子宫纵向切口 2 mm, 置入 IUD, 以 IUD 尾部丝线穿线打结固定于宫壁, 无菌生理盐水冲洗腹腔, 注入甲硝唑注射液 2 ml, 依次关腹。

6. 动情周期的测定: 大鼠的动情周期通常为 4~6 d^[3], 分 4 期。各期大鼠阴道组织涂片特征^[4]为: 动情前期: 有核上皮细胞占绝大多数; 动情期: 角化上皮细胞占绝大多数; 动情后期: 白细胞、角化上皮细胞、有核上皮细胞均可见; 动情间期: 白细胞占绝大多数。每天观察大鼠阴道组织涂片, 均选择动情前期一侧子宫造模, 亚组 1 造模后第 22 天, 再次明确动情

周期, 于动情前期分次取标本。

7. 实验过程: 将 100 只大鼠随机分为 5 组, 20 只/组。各组再随机设立亚组 1(合笼)、亚组 2(不合笼), 10 只/亚组。经阴道组采用经阴道造模法。开腹组采用开腹造模法。经阴道假手术组采用经阴道造模法, 术毕拽出 IUD。开腹假手术组采用开腹造模法, 术中置入 IUD 后立即取出。空白对照组: 不处理。术毕各组大鼠肌注青霉素 2 万单位/d, 连续 3 d。亚组 1 于造模后第 7 天合笼 5 d, 雌: 雄=2: 1, 阴道分泌物涂片查到精子(图 2), 拟为妊娠第 1 天, 并于造模后第 22 天, 开腹观察大鼠避孕率与胚胎计数。亚组 2 于造模后第 3、10、16 天观察大鼠的一般状态, 并进行 5 min 旷场实验。

8. 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 统计软件统计, 资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用方差分析, 组内比较采用 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、IUD 避孕率和胚胎数

由表 1 可知, 经阴道组与开腹组比较, 避孕率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 大鼠 IUD 放置侧子宫避孕率

组别	动物数	胚胎数(个)	避孕率(%)
经阴道组	9	0	100
开腹组	8	0	100

注: IUD 脱落: 经阴道组 1 例、开腹组 2 例

由表 2 可知, 经阴道组与开腹组比较, 大鼠 IUD 放置对侧宫腔内胚胎数差异无显著性($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠单侧子宫胚胎数比较(个)

组别	动物数	单侧子宫数	胚胎数($\bar{x} \pm s$)
经阴道组	9	9	3.00±1.12 ^b
开腹组	8	8	2.38±0.92 ^a
经阴道假手术组	10	10	3.95±1.00 ^{cd}
开腹假手术组	10	10	2.85±1.27 ^a
空白对照组	10	10	4.10±1.02

注: 经阴道组和开腹组为大鼠 IUD 放置对侧宫腔内胚胎数, 其余 3 组为大鼠单侧宫腔内胚胎数。与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与开腹组比较, ^c $P < 0.01$; 与经阴道组比较, ^d $P < 0.05$

二、一般状态

经阴道组: 造模后的 16 d 内, 除第 1~7 天出现阴道分泌物增多外, 一般状态良好。

开腹组: 造模后第 3 天大鼠精神不振, 活动度明显降低, 毛发粗糙蓬松, 阴道分泌物增多, 摄食饮水减少, 大便质稀; 第 10 天精神较差, 活动减少, 毛发

粗糙, 饮食摄水较差, 阴道分泌物较多, 大便质稀; 第16天一般状态良好。

开腹假手术组: 造模后第3天大鼠精神不振, 活动度降低, 毛发粗糙耸立, 饮食摄水减少, 阴道分泌物正常, 大便成形; 第10天精神及饮食摄水症状改善明显; 第16天一般状态良好。

经阴道假手术组、空白对照组: 大鼠在造模后16d内, 一般状态良好。

三、行为学检测

1. 各组大鼠中央格停留时间比较: 由表3可知, 造模后第3、10天, 与造模前比较, 开腹组大鼠的中央格停留时间显著延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而经阴道组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2. 各组大鼠水平穿越格数比较: 由表4可知, 造模后第3、10天, 与造模前比较, 开腹组大鼠的水平穿越格数明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而经阴道组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3. 各组大鼠直立次数比较: 由表5可知, 造模后第3、10天, 与造模前比较, 开腹组大鼠的直立次数明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而经阴道组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4. 各组大鼠修饰次数比较: 由表6可知, 造模后第3、10天, 与造模前比较, 开腹组大鼠的修饰次数明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而经阴道组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表3 各组大鼠中央格停留时间比较 (s, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	造模前	造模后第3天	造模后第10天	造模后第16天
经阴道组	10	1.22±0.44	1.29±0.57	1.36±0.43	1.24±0.18
开腹组	10	1.26±0.43	5.39±0.44 ^a	2.19±0.57 ^a	1.46±0.24
经阴道假手术组	10	1.51±0.16	1.37±0.38	1.54±0.54	1.42±0.18
开腹假手术组	10	1.33±0.53	2.53±0.17 ^a	1.65±0.38	1.42±0.22
空白对照组	10	1.40±0.74	1.30±0.47	1.51±0.16	1.36±0.07

注: 与造模前比较, ^a $P < 0.01$

表4 各组大鼠水平穿越格数比较 (格, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	造模前	造模后第3天	造模后第10天	造模后第16天
经阴道组	10	51.80±15.82	47.40±9.50	48.10±9.61	52.80±15.11
开腹组	10	48.20±13.11	19.90±6.28 ^a	38.50±3.21 ^b	46.90±9.17
经阴道假手术组	10	51.60±6.10	48.30±11.06	47.20±11.94	49.00±10.87
开腹假手术组	10	47.30±9.73	32.10±3.45 ^a	44.50±3.75	48.70±9.01
空白对照组	10	50.30±9.86	52.70±10.04	51.20±9.19	48.80±6.84

注: 与造模前比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$

表5 各组大鼠直立次数比较 (次, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	造模前	造模后第3天	造模后第10天	造模后第16天
经阴道组	10	19.40±4.77	18.70±3.27	19.50±4.38	19.20±3.49
开腹组	10	20.30±6.13	9.80±3.05 ^a	15.10±3.70 ^b	18.80±3.71
经阴道假手术组	10	22.90±6.52	19.50±4.25	19.80±5.25	20.50±3.75
开腹假手术组	10	21.70±9.60	14.90±2.88 ^b	20.00±3.46	19.30±4.67
空白对照组	10	21.10±7.20	21.39±6.06	20.50±4.62	20.80±1.62

注: 与造模前比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$

表6 各组大鼠修饰次数比较 (次, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	造模前	造模后第3天	造模后第10天	造模后第16天
经阴道组	10	8.60±3.50	8.60±2.41	8.80±2.74	8.80±2.04
开腹组	10	8.80±1.93	3.60±1.35 ^a	5.30±1.83 ^a	8.50±2.80
经阴道假手术组	10	8.70±3.02	9.00±2.83	8.80±2.20	9.10±2.85
开腹假手术组	10	8.90±3.11	5.10±1.60 ^a	8.40±3.10	8.90±2.69
空白对照组	10	8.70±2.83	8.90±2.28	8.90±2.13	8.90±1.52

注: 与造模前比较, ^a $P < 0.01$

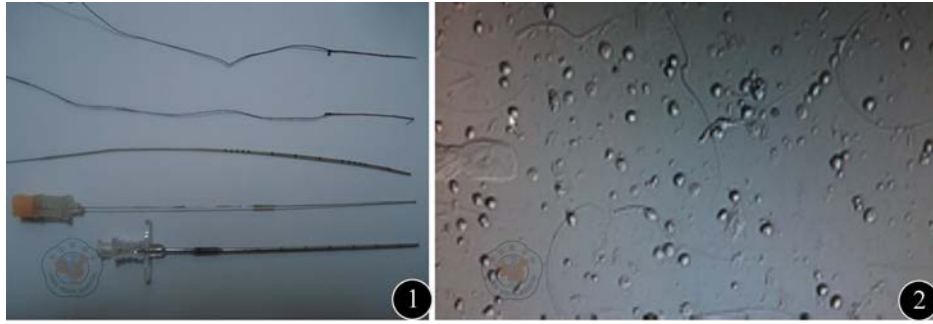


图1 图中从上往下依次为开腹IUD、经阴道IUD、导丝、推芯、套管 图2 光镜下发现精子(×200)

讨 论

1. 经阴道建立 IUD 避孕大鼠模型的优点: 动物模型使用的 IUD, 有学者^[5]根据 IUD 的基本结构, 在硅橡胶管上缠绕铜丝形成。亦有学者^[6]在修剪临床 IUD 含铜有效结构的基础上直接应用。在 IUD 放置途径方面, 有学者采用开腹经宫壁直接将 IUD 置入宫腔并缝扎固定^[7]。亦有学者^[8]在开腹直视下, 经阴道—宫颈途径将 IUD 置入宫腔, 依靠 IUD 的自身弹力固定于宫腔内。与上述研究比较, 本研究采用经阴道放置自行设计 IUD 的方法, 符合临床 IUD 的放置过程, 且考虑大鼠自身生殖特点自行设计的 IUD, 更符合模型要求。

本研究结果示经阴道放置 IUD, 避孕率为 100%, 且两法 IUD 放置对侧宫腔内胚胎数差异无显著性 ($P>0.05$), 说明经阴道建立 IUD 避孕大鼠模型避孕效果良好。

本研究观察大鼠的一般状态, 造模后第 3 天, 开腹组大鼠的一般状态差, 第 10 天有一定程度的改善, 而经阴道组大鼠一般状态变化不明显。得出较之开腹法, 经阴道造模法对大鼠一般状况的影响小。

本研究采用旷场实验对大鼠的行为学进行量化研究。旷场实验主要反映动物对新环境的探索, 习惯以及伴随的情绪变化^[9-10]。本研究结果示: 造模后第 3、10 天, 与造模前比较, 开腹组大鼠的中央格停留时间显著延长, 水平穿越格数、直立次数、修饰次数明显减少, 差异均有显著性 ($P<0.05$), 而经阴道组差异均无显著性 ($P>0.05$)。说明开腹造模法大鼠的空间认知能力降低、兴奋性降低, 对新环境的适应能力减弱, 在陌生环境中的自主活动能力和探究行为减少。得出较之开腹法, 经阴道造模法对大鼠的行为影响小。

综上提示: 经阴道建立 IUD 避孕大鼠模型可能更符合临床 IUD 避孕特征, 为研究 IUD 节育措施副反应发病机制和防治机理较好的实验工具。

2. 本研究引入动情周期的优点: 有学者^[11]采用大鼠卵巢去势后, 建立人工动情周期的方法, 该法可保证取材时大鼠在动情周期的同一时相, 但却破坏了大鼠自身的生殖轴。大多数学者采用造模前阴道涂片确定其动情周期, 达观测时段取标本的方法^[12], 但该方法不能保证取材时所有大鼠在周期的同一时相。本研究采用造模前阴道涂片确定其动情周期, 达观测时段, 再次明确动情周期后, 分次取标本的方法。该法不影响大鼠自身的生殖轴, 还保证了取标本时所有大鼠在动情周期的同一时相。

参 考 文 献

- [1] 张玉珍. 中医妇科学. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 356-357.
- [2] 孟延兵. 宫环出血病证动物模型的建立及其发病机理的实验研究. 长沙: 湖南中医学院, 2002.
- [3] 薛红, 周宜, 陈刚, 等. 调肝止血中药对放置 Cu-IUD 大鼠外周血清及子宫组织 t-PA, PAI 活性的影响. 浙江中医学院学报, 2003, 27: 46-48.
- [4] 王月鹏, 赵行宇, 张慧锋. 成年大鼠动情周期阴道细胞变化探究. 中国科技信息, 2007, 17: 192-193.
- [5] 邱毅, 张美华, 于玲, 等. 新型镍钛记忆合金硅橡胶立式网状宫内节育器研制及大鼠避孕研究. 国际生殖健康计划生育杂志, 2013, 32: 1-5.
- [6] 诸定寿, 定寿, 王兴翠, 等. 雌性大鼠子宫腔内放置不同材料节育器的避孕效果和局部影响. 北京第二医学院学报, 1981, 3: 214-217.
- [7] 陈刚, 薛红, 周宜, 等. 柴胡止血液对置含铜节育器大鼠子宫组织基质金属蛋白酶-9 和金属蛋白酶组织抑制物-1 及内皮素和一氧化氮的影响. 中国计划生育杂志, 2003, 11: 658.
- [8] 周宜. 从大鼠动情周期的分子变化探讨柴胡止血液的作用. 成都: 成都中医药大学, 2005.
- [9] 边秀兰, 曲国立, 刘声, 等. 氯化氨对小鼠的神经行为影响. 现代预防医学, 2008, 35: 3379-3380.
- [10] 梁尚华, 路长林, 邹军, 等. 四君子汤对慢性应激大鼠行为学及免疫指标作用的研究. 成都中医药大学学报, 2005, 28: 38-40.
- [11] 周宜, 陈钢, 沈映君. 柴胡止血液对人工动情周期大鼠置器后子宫内膜 NO 和 NOS 动态变化的影响. 四川中医, 2008, 26: 17-19.
- [12] 周艳玲, 黄海玲, 孟运莲. 动情周期及去卵巢后大鼠输卵管总蛋白含量变化的研究. 右江民族医学院学报, 2002(4): 490.

(收稿日期: 2013-06-04)

(本文编辑: 戚红丹)