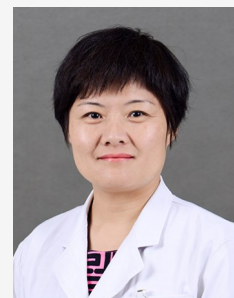




王慧萍, 医学博士, 国家卫生健康委科学技术研究所/国家卫健委生殖健康工程技术研究中心研究员, 北京协和医学院硕士生导师, 中国药物晶体学专业委员会理事, 《中华生殖与避孕杂志》通信编委, 中国药理学会生殖药理分会委员, 妇幼健康研究会生殖免疫学专业委员会委员。专业方向为生殖药理学, 聚焦于新药筛选、药物优势晶型研究。主持及参与“十三五”重点研发计划等多项国家级、部委级及横向课题。曾获妇幼健康科学技术奖、科技成果三等奖; 获8项国家发明专利授权; 在 *Oxid Med Cell Longev* 等杂志发表学术论文30余篇。

王含必, 中国医学科学院北京协和医院妇科内分泌与生殖中心副主任医师, 副教授, 医学博士, 擅长妇科内分泌与辅助生殖技术相关疾病诊治。担任中国优生优育协会孕育与生殖专业委员会常委、北京妇产学会心理分会第一届常委、中国优生科学协会生殖医学与生殖伦理学分会委员、中国医师协会整合医学医师分会整合生殖医学专业委员会委员、中西医结合生殖分会委员、中国康复医学会生殖健康专业委员会委员等, 兼任《中国计划生育学杂志》、《实用妇科内分泌杂志》、《医学综述》杂志编委以及《中华预防医学杂志》审稿专家。以第一作者或通信作者发表SCI及中文核心期刊论文共50余篇, 参与国家级、省部级等各级课题14项, 主持3项院级课题。



阴道萎缩大鼠模型的建立及在药效评价中的应用

杨丽雅¹, 宋涛², 何佳璘³, 郭一鸣³, 齐明康³, 王含必³, 王慧萍¹

(1. 国家卫生健康委科学技术研究所, 北京 100081; 2. 潍坊市妇幼保健院, 潍坊 261021; 3. 北京协和医院妇产科, 国家妇产疾病临床研究中心, 疑难重症及罕见病国家重点实验室, 中国医学科学院北京协和医学院, 北京 100730)

[摘要] **目的** 建立适宜筛选阴道用制剂药效学的动物模型, 给予相应药物并评价监测药物治疗效果的生物学指标。**方法** 采用大鼠双侧卵巢摘除术 (ovariectomy, OVX) 建模, 观察 OVX 后 15~21 d 大鼠动情周期、子宫湿重和阴道组织形态学, 判断术后阴道萎缩模型建立成功的最佳时间。SD 雌性大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、药物1组、药物2组和溶剂对照组, 每组10只。药物1组、药物2组和溶剂对照组每日分别阴道给予普罗雌烯软膏、更宝芬和等质量溶剂, 连续14 d。末次给药后3 d 测定大鼠体质量和子宫湿重, HE 染色法分析阴道组织形态学, 免疫组织化学法检测雌激素受体蛋白 α (estrogen receptors- α , ER α) 表达。**结果** OVX 后 21 d 已造成明显阴道萎缩, 适宜进行后续实验。OVX 后 17~21 d 无动情周期变化, 术后 21 d 阴道上皮厚度显著降低 ($P<0.05$), 阴道褶皱变少, 无鳞状上皮细胞覆盖; 体质量上升 ($P<0.05$), 子宫湿重下降 ($P<0.05$)。药物1组和药物2组阴道萎缩症状明显改善, 给药组大鼠体质量较模型组下降 ($P<0.05$), 阴道组织形态学受损情况得到改善, 组织 ER α 蛋白表达增加 ($P<0.05$), 子宫/体质量比上升 ($P<0.01$), 但子宫内膜厚度未明显增加 ($P>0.05$)。**结论** 大鼠 OVX 模型适宜用作筛选阴道用制剂, 阴道组织形态学、子宫内膜厚度、子宫/体质量比可作为监测药物疗效的指标。

[关键词] 阴道制剂; 阴道萎缩; 去卵巢大鼠模型; 药效评价

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)06-0531-10

Establishment of a Vaginal Atrophy Rat Model and its Application in Pharmacodynamic Evaluation

YANG Liya¹, SONG Tao², HE Jialin³, GUO Yiming³, QI Mingkang³, WANG Hanbi³, WANG Huiping¹

(1. National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China; 2. Weifang Maternal and Child Health

[基金项目] 国家卫生健康委科学技术研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助: POI 发病的网络调控机制及早期干预作用 (2021GJZ08)

[第一作者] 杨丽雅 (1995—), 女, 硕士, 技师, 从事药理学研究。E-mail: yangliya@nrifp.org.cn

[通信作者] 王含必 (1972—), 女, 博士, 副主任医师, 从事妇科内分泌疾病的诊疗研究。E-mail: zhw2005@aliyun.com。ORCID: 0000-0002-7961-1896;

王慧萍 (1974—), 女, 博士, 研究员, 从事药理学研究。E-mail: wanghuiping@nrifp.org.cn。ORCID: 0000-0002-5698-1691

Hospital, Weifang 261021, China; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, National Clinical Research Center for Obstetric & Gynecologic Diseases, State Key Laboratory of Complex Severe and Rare Diseases, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China)

Correspondence to: WANG Hanbi (ORCID: 0000-0002-7961-1896), E-mail: zhw2005@aliyun.com

WANG Huiping (ORCID: 0000-0002-5698-1691), E-mail: wanghuiping@nrifp.org.cn

[ABSTRACT] Objective To establish an animal model suitable for screening vaginal preparations, administering the corresponding drugs, and evaluating biological indicators for monitoring drug treatment effects. **Methods** Bilateral ovariectomy (OVX) was used to establish the disease model of rat. The estrous cycle, uterine wet weight, and vaginal tissue morphology were observed from day 15 to day 21 after OVX to determine the optimal time for successful vaginal atrophy model after the OVX operation. Sprague-Dawley female rats were randomly divided into the following groups: normal group, sham group, model group, drug group 1, drug group 2, and solvent control group ($n=10$). Drug group 1, drug group 2, and solvent control group were treated with promestriene, Colpotrofin®, and solvent control for 14 days, respectively. Three days after the last administration, the body weight and uterus wet weight of the rats were measured, the histological morphology of the vagina was analyzed by HE staining, and estrogen receptors- α (ER α) expression was detected by immunohistochemistry. **Results** Twenty-one days after OVX, the vaginal atrophy model was established, which was suitable for the follow-up experiments. The change of estrous-cycle wasn't observed from day 17 to 21 after OVX. On 21 days after OVX, the vaginal epithelium thickness reduced ($P<0.05$), vaginal folds reduced, no squamous epithelium was observed, body weight increased ($P<0.05$), and uterine wet weight decreased ($P<0.05$). In drug group 1 and drug group 2, the symptoms of vaginal atrophy improved. Compared with the model group, the body weight of rats in drug group 1 and 2 decreased ($P<0.05$), the vaginal histomorphology improved, the expression of ER α protein in vaginal tissue up-regulated ($P<0.05$), and the ratio of uterine wet weight to body weight increased ($P<0.01$), but the endometrial thickness was not significantly thickened ($P>0.05$). **Conclusion** The rat OVX model is suitable for screening vaginal preparations. Vaginal histomorphology, endometrial thickness, and uterine/body weight ratio can be used as indicators to monitor drug efficacy.

[Key words] Vaginal preparations; Vaginal atrophy; Ovariectomized rat model; Pharmacodynamic evaluation

阴道用制剂常用来治疗各种阴道疾病,例如阴道萎缩(vaginal atrophy, VA)、阴道炎等。阴道萎缩的症状主要包括阴道干涩、瘙痒、灼热或性交困难。大多数绝经后妇女在体检时有阴道萎缩的迹象^[1-2],其主要病因是雌激素分泌减少,阴道组织萎缩^[3]。

选择和建立合适的动物模型对于药物筛选和药效学评价至关重要。适宜的动物模型能更好地模拟临床疾病状态,使药效检测指标更加准确,更有利于评价药物疗效和安全性。目前,最常用的诱发阴道萎缩症状的建模方法是对性成熟的大鼠进行手术干预,如双侧卵巢摘除术(bilateral ovariectomy, OVX),这是诱导实验动物绝经的常见手术程序^[4],但术后到建模成功的具体时间不明确,存在多种判断时间点,而且用以评价药物的指标也尚未完善。本研究首先探索 OVX

手术后判断建模成功的最佳时间,然后以最常用的阴道乳膏作用来评价相应的生物学指标,为有效筛选其他阴道制剂提供合适的动物模型和试验方法。

1 材料与方法

1.1 实验药品和试剂

国产普罗雌烯乳膏(用于药物1组)由北京金城泰尔制药有限公司提供,批号200926,规格10 g:0.1 g。更宝芬(通用名为普罗雌烯乳膏,用于药物2组)购自法国 Laboratoires Chemineau 制药有限公司,批号CH101,规格1 g:0.01 g,每支15 g。普罗雌烯乳膏溶剂(用于溶剂对照组)由北京金城泰尔制药有限公司提供,批号200926。戊巴比妥钠购自佛山市化工实验厂。质量分数4%的 Biosharp 多聚甲醛溶液购自北京兰

杰柯科技有限公司, 瑞氏 (Wright) 染液和苏木素-伊红染液购自北京索莱宝科技有限公司, 兔抗鼠雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α) 多克隆抗体购自美国 Proteintech 公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司, DAB 显色试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.2 实验动物及分组

6~8 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 81 只, 体质量为 (200 $\pm$ 5) g, 购自北京维通利华实验动物有限公司 [SCXK (京) 2021-0006], 实验动物合格证编号 110011210110481751。动物饲养于国家卫生健康委科学技术研究所的实验动物屏障系统 [SYXK (京) 2018-0010] 内, 室内温度为 24~26 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 50%~70%, 光照黑暗时间比为 12 h/12 h, 自由饮食。动物实验均符合国家卫生健康委科学技术研究所动物伦理委员会标准 (批号: NRIFH21-2101-9)。随机选取 21 只大鼠作为模型建立组, 用于探索阴道萎缩大鼠模型的建立方法及判断建模成功的时间点。剩余所有动物均随机分为正常组 (不进行手术)、假手术组 (假手术对照)、模型组 (以模型建立组摸索的方法和时间点来建模, 作为对照)、药物 1 组、药物 2 组和溶剂对照组, 每组 10 只; 其中药物 1 组、药物 2 组和溶剂对照组均是先以模型建立组确定的方法和时间点来建模, 然后分别给予不同的普罗雌烯乳膏制剂或其溶剂治疗; 溶剂对照组是排除溶剂的干扰, 观察溶剂是否有治疗作用。

1.3 阴道萎缩大鼠模型建立

选用 6~8 周 SD 大鼠自然喂养 7 d 后, 记录体质量, 将模型建立组、模型组、药物 1 组、药物 2 组、溶剂对照组大鼠行 OVX 手术^[3], 具体方法如下: 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔麻醉, 采用背部切口, 以肋下 1 cm、脊柱 2 cm 处为中心剪除长毛, 常规消毒; 切口长度约 1 cm, 切开皮肤, 扩张、剥离, 离脊柱 1 cm 肋下剪开腰肌, 可见两侧包绕卵巢的脂肪组织及紧密相连的子宫角; 结扎周围血管和输卵管, 摘除卵巢, 另一侧方法相同; 检查无出血后, 将肌层与皮肤一一缝合, 碘伏消毒切口, 定期检查切口并清理。假手术组大鼠按上述步骤切开背皮后, 剪开腰肌暴露腹腔, 暴露时间与手术组时间相等, 后将肌层与皮肤一一缝合, 用碘伏擦拭创口。所有术后大鼠均置于 35~37 $^{\circ}\text{C}$ 的保温台直至苏醒。手术日记为第 0 天。术后自然喂养。

在术后 7 d 开始进行阴道涂片观察动情周期变化。

阴道涂片方法: 移液器取 50 μL 生理盐水于大鼠阴道内吹吸 2~3 次, 吸出后涂于载玻片上。待干燥后, 使用瑞氏染液染色, 光学显微镜下观察。当连续 5 d 没有动情周期改变时, 初步表示模型构建成功。OVX 后 15~21 d 每天从模型建立组中随机选择 3 只大鼠, 过量麻醉处死后解剖并称取子宫湿重, 观测其体质量及子宫/体质量比, 并对其阴道组织进行病理分析, 验证阴道萎缩模型是否建立成功。

1.4 阴道萎缩大鼠分组给药

从阴道萎缩模型建立成功, 即术后 21 日起进行分组给药。正常组、假手术组和模型组不给药。根据人与动物的折算系数换算, 大鼠每日用药量为 79.15 mg/kg。药物 1 组和药物 2 组每日通过阴道分别给予 1% 普罗雌乳膏和更宝芬, 溶剂对照组每日给予同等质量的普罗雌烯乳膏溶剂, 均连续给药 14 d。

1.5 实验取材

末次给药后第 3 天测量大鼠体质量后, 腹腔注射戊巴比妥钠, 眼球取血, 分离子宫。称取子宫湿重后, 取部分组织, 用质量分数 4% 的多聚甲醛溶液固定。另外, 分离阴道组织, 并用质量分数 4% 的多聚甲醛溶液固定。

1.6 阴道和子宫组织 HE 染色和免疫组织化学观察

分别取固定 24 h 的阴道和子宫组织, 乙醇溶液逐级脱水; 二甲苯透明 2 次, 每次各 1 h; 然后浸蜡于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中 30 min, 随后包埋切片, 切片厚度为 5 μm 。取部分阴道和子宫组织切片, 按试剂盒说明书进行 HE 染色, 显微镜下观察阴道和子宫组织形态变化。另取部分阴道切片进行免疫组织化学染色, 操作过程包括抗原修复、血清封闭、免疫杂交及显色、脱水封固, 最后用 Image Pro-Plus 软件进行半定量分析。

1.7 统计学分析

使用 Graphpad Prism 10.0 统计分析软件进行数据分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验; 模型建立组不同时间的指标比较, 以及正常组、假手术组、溶剂对照组与不同药物组间的体质量、子宫湿重、病理和免疫组织化学指标的比较均采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

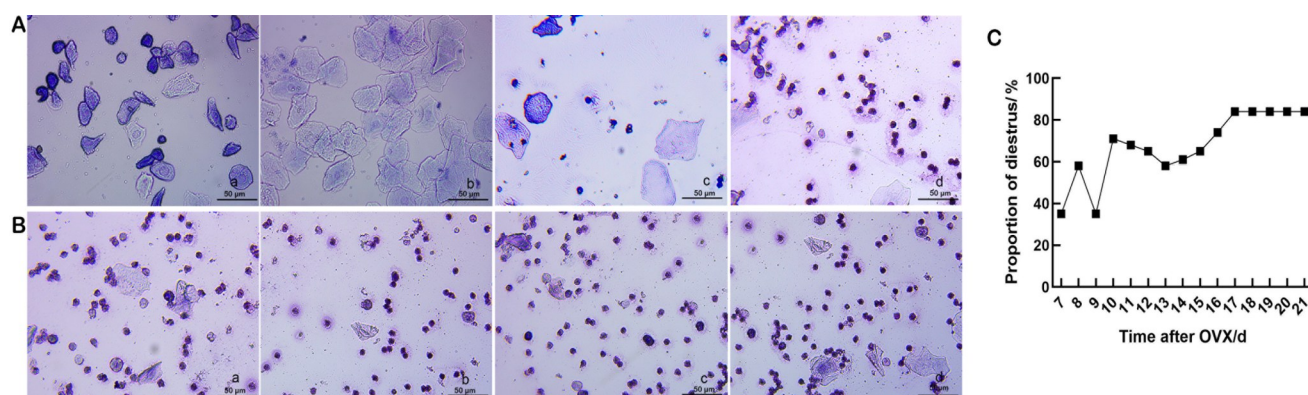
2 结果

2.1 OVX 后大鼠动情周期观察结果

在 OVX 手术后 7~21 d 进行阴道涂片, 观察大鼠

动情周期。正常组的动情周期呈规律性变化(图1A)。而模型建立组大鼠在术后动情周期从紊乱至无变化,大多稳定在间期(图1B)。OVX后9~17 d处于间期的大鼠比例呈增长趋势。17~21 d达到稳定,在此期间

有16.4%(10/61)的大鼠持续处于动情期,提示建模未成功,不参与后续实验;另外83.6%(51/61)的大鼠持续处于间期,无动情周期变化,初步提示建模成功。



注: A为正常组大鼠的阴道涂片可见动情周期规律变化(a~d分别显示动情前期、动情期、动情后期和动情间期)。B为模型建立组大鼠OVX后的阴道涂片(a~d分别为18、19、20、21 d,均显示动情间期)。C为模型建立组(21只)以及模型组、药物1组、药物2组和溶剂对照组(每组各10只)大鼠在OVX后7~21 d的动情间期所占比例($n=61$)。图中比例尺大小均为50 μm 。

Note: A, regular changes in the estrous cycle were observed in the vaginal smears of the normal group (a~d show pre-estrous, estrous, post-estrous, and diestrus periods, respectively). B, vaginal smears after OVX in the model establishment group (a~d was 18, 19, 20, and 21 days after OVX, respectively, showing the diestrus period). C, the proportion of estrus/diestrus on days 7–21 after OVX in the model establishment group (21 rats), model group, drug group 1, drug group 2 and solvent control group (10 rats in each group) ($n=61$). Scale bars in all panels are 50 μm .

图1 各组大鼠在双侧卵巢摘除术(OVX)后的阴道涂片(瑞氏染色, $\times 40$) (A和B)及动情间期所占比例(C)

Figure 1 Vaginal smears after ovariectomy (OVX) of rats in each group (Wright's staining, $\times 40$) (A and B) and the proportion of the diestrus period (C)

2.2 OVX后15~21 d模型鉴定

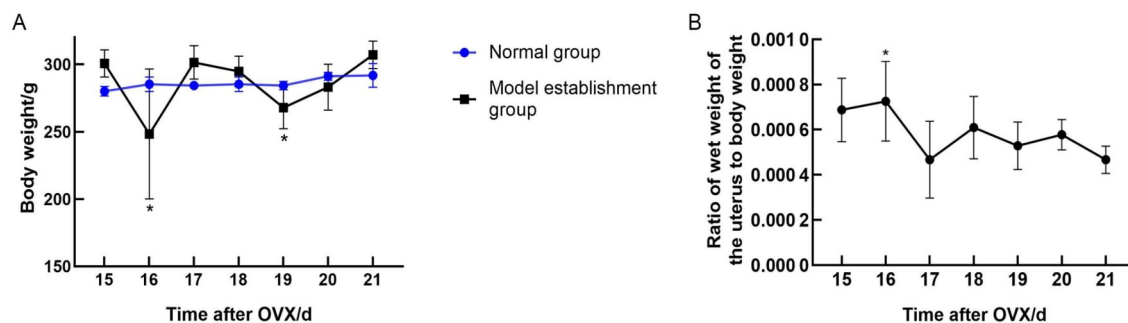
术后第15至21天的模型建立组大鼠体质量变化如图2A所示,可看出:随着术后时间延长,大鼠体质量呈曲线上升趋势,在术后21 d达到最高,与术后16 d有明显差异($P<0.05$)。子宫/体质量比变化如图2B所示,显示子宫/体质量比随时间延长而下降,术后21 d与术后16 d相比明显降低($P<0.05$)。阴道组织HE染色结果显示,正常组大鼠阴道上皮由鳞状上皮细胞覆盖,固有层较紧密;OVX后21 d大鼠阴道上皮由扁平细胞组成,未见鳞状上皮细胞,固有层较疏松,表明阴道已萎缩,建模成功(图3A)。同时,对阴道上皮厚度进行统计分析,发现模型建立组大鼠随OVX后时间延长而阴道上皮厚度下降,且OVX后21 d与OVX后16、18及19 d相比均有明显差异($P<0.05$) (图3B)。由于OVX后21 d的大鼠体质量、脏器指数和阴道上皮组织病理学指标均达到最值,且此时已无动情周期改变,所以选取OVX后21 d为成功建模时间,进行后续药效监测指标评价。

2.3 给药后各组大鼠体质量变化

分别测量OVX手术前和给药后3 d各组大鼠的体质量差异,结果(图4A)显示,OVX前各组大鼠体质量均一($P>0.05$),而给药3 d的各组大鼠体质量有明显差异($P<0.05$)。模型组大鼠体质量较假手术组和正常组显著增加($P<0.001$),溶剂对照组与模型组大鼠体质量相当。与模型组比较,药物1组和药物2组的体质量明显降低($P<0.05$);药物1组与药物2组大鼠体质量之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 给药后各组大鼠子宫组织湿重及病理分析

大鼠处死取材后立即称量子宫湿重(图4B),并计算子宫/大鼠体质量比(图4C)。结果显示,子宫湿重与子宫/体质量比的趋势大致相同。与假手术组相比,模型组的子宫/体质量比明显降低($P<0.001$);与模型组相比,药物1组和药物2组大鼠的子宫湿重和子宫/体质量比升高($P<0.001$);但药物1组和药物2组两者之间差异无统计学意义($P>0.05$)。上述结果提示,OVX去势后的大鼠子宫发生萎缩,药物1和药物2

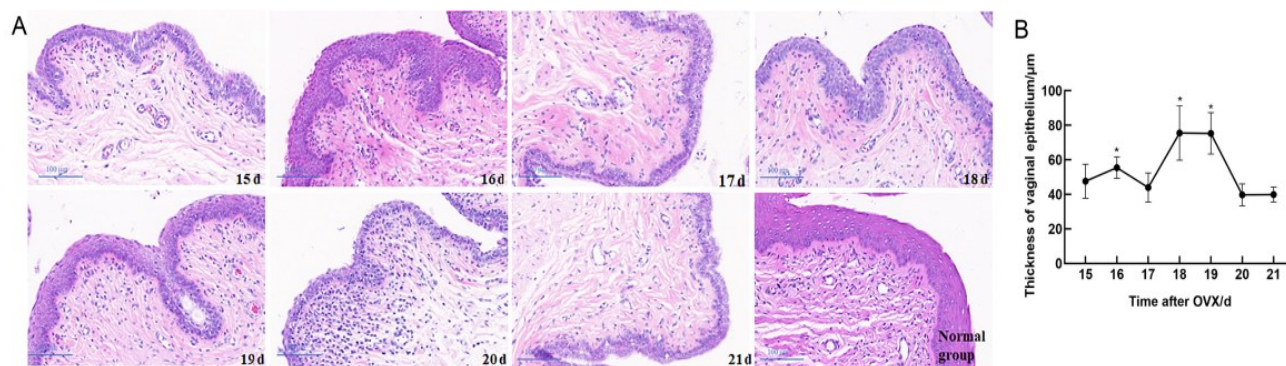


注：A 为正常对照组和模型建立组大鼠 15 ~ 21 d 的体质量变化；B 为模型建立组大鼠 OVX 后 15 ~ 21 d 的子宫/体质量变化。每日大鼠数量 $n=3$ ，与模型建立组术后 21 d 相比，* $P<0.05$ 。

Note: A, weight changes of rats in the normal control and model establishment groups during days 15–21; B, changes in uterus wet weight/body weight at days 15–21 after OVX in the model establishment group. Daily number of rats $n=3$. * $P<0.05$, compared with the model establishment group.

图2 双侧卵巢摘除术(OVX)后大鼠体质量(A)和子宫/体质量比(B)变化

Figure 2 Body weight (A) and uterine wet weight/body weight (B) of rats from day 15–21 after ovariectomy (OVX)



注：A 为模型建立组大鼠 OVX 后 15 ~ 21 d 和正常组大鼠的阴道组织 HE 染色结果（图中比例尺大小为 100 μm）；B 为模型建立组大鼠 OVX 后 15 ~ 21 d 的阴道上皮厚度（ $n=3$ ，与术后 21 d 相比，* $P<0.05$ ）。

Note: A, HE staining of vaginal tissues of rats in the model establishment and normal groups days 15–21 after OVX (scale bar is 100 μm); B, the thickness of the vaginal epithelium in the model establishment group days 15–21 after OVX ($n=3$, compared with 21 days after OVX, * $P<0.05$).

图3 卵巢摘除术(OVX)后大鼠阴道组织病理变化(HE 染色, ×10)和阴道上皮厚度

Figure 3 Histopathological changes of vaginal in rats after ovariectomy (OVX) and the thickness of vaginal epithelium

治疗子宫萎缩均有所改善。

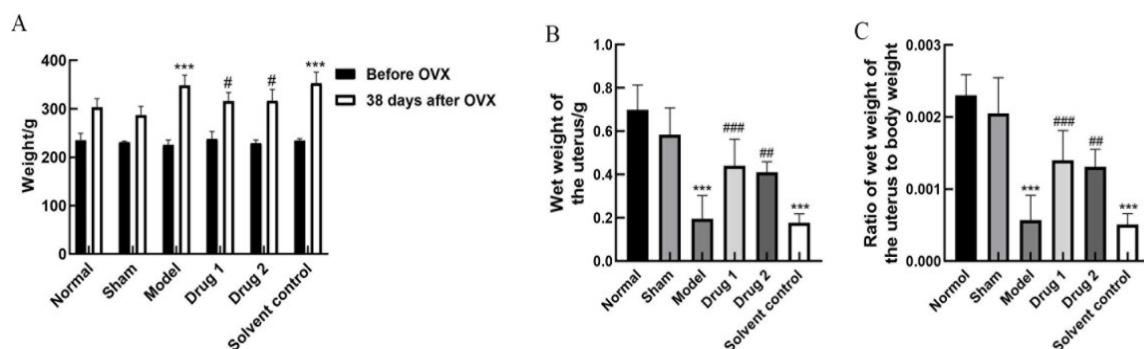
子宫经 HE 染色并测量子宫内膜上下左右的厚度(图5)。结果显示，与假手术组相比，模型组子宫内膜厚度显著降低($P<0.001$)。与模型组相比，药物1组和药物2组的子宫内膜厚度虽有所增加，但差异尚无统计学意义($P>0.05$)。国产普罗雌烯乳膏即药物1组的子宫内膜厚度略低于国外更宝芬即药物2组，但差异不具有统计学意义($P>0.05$)。

2.5 给药后各组大鼠阴道组织分析

HE 染色结果表明，正常大鼠（正常组和假手术组）的阴道上皮由 7 ~ 11 层基底细胞和鳞状上皮细胞组成，上面覆盖着紧密堆积的角化细胞，形成角质层，

同时阴道上皮褶皱较多。与假手术组和正常组相比，模型组大鼠的阴道则由基底层和覆盖在其之上的萎缩的扁平细胞组成，共 4 ~ 7 层，阴道上皮褶皱较少，可见阴道明显萎缩，表示造模成功。药物1组和2组均由 7 ~ 10 层基底细胞和鳞状上皮细胞组成，部分可见角化细胞；阴道上皮褶皱增多，与模型组相比，提示有显著的改善作用；药物1组和2组之间整体形态基本接近(图6A)。

同时，阴道上皮厚度测量结果显示，模型组阴道上皮厚度明显低于假手术组($P<0.05$) (图6B)。与模型组相比，药物1组和药物2组上皮厚度均明显增加($P<0.01$)，基本恢复至正常组水平，与假手术组相比

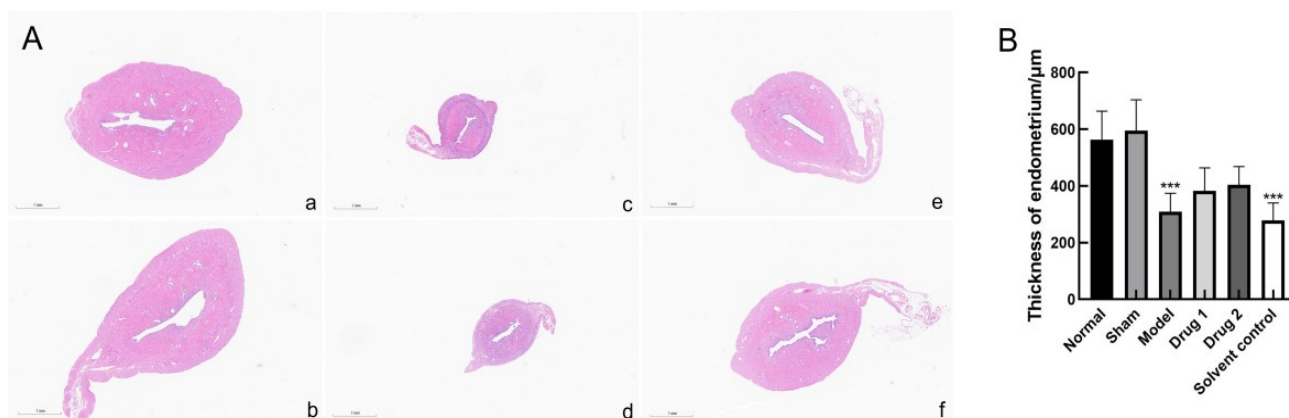


注：药物1组、药物2组和溶剂对照组每日分别阴道给予普罗雌烯软膏、更宝芬和等质量溶剂，连续14 d。每组大鼠 $n=10$ 。与假手术组相比，*** $P<0.001$ ；与模型组相比，# $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。

Note: Drug group 1, drug group 2, and solvent control group were treated with promestriene, Colpotrofin®, and solvent control for 14 days, respectively. In each group, $n=10$. *** $P<0.001$, compared with the sham group; # $P<0.05$, ** $P<0.01$, and *** $P<0.001$, compared with the model group.

图4 用药后各组大鼠体质量(A)、子宫湿重(B)和子宫/体质量(C)变化

Figure 4 Body weight (A), uterine wet weight (B), and uterine wet weight/ body weight (C) of rats in each group after drug treatment



注：a为正常组；b为假手术组；c为模型组；d为溶剂对照组；e为药物1组（普罗雌烯软膏）；f为药物2组（更宝芬）。图中比例尺大小为1 mm。每组大鼠 $n=10$ 。与假手术组相比，*** $P<0.001$ 。

Note: a, normal group; b, sham group; c, model group; d, solvent control group; e, drug group 1 (promestriene); f, drug group 2 (Colpotrofin®). The scale bar of the panel is 1 mm. In each group, $n=10$. *** $P<0.001$, compared with the sham group.

图5 用药后各组大鼠子宫组织病理变化(HE染色, ×2)(A)和子宫内膜厚度(B)

Figure 5 Histopathological changes of uterus tissue (HE, ×2)(A) and thickness of the endometrium (B)

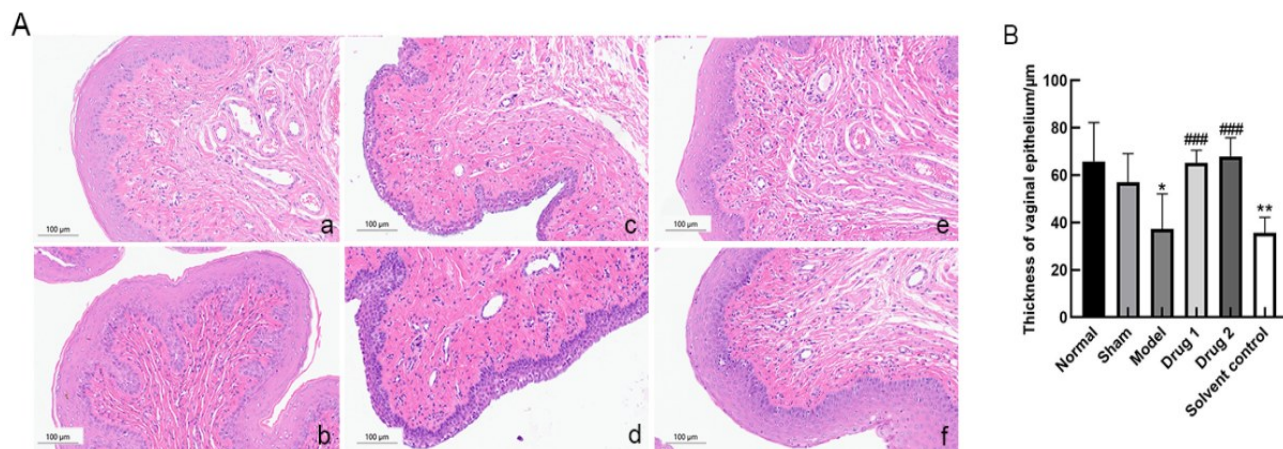
差异没有统计学意义 ($P>0.05$)；药物2组和药物1组厚度相当，没有明显差别 ($P>0.05$)。

2.6 给药后各组大鼠阴道组织中ERα蛋白表达变化

各组大鼠阴道组织经ERα免疫组织化学染色(图7)后计算积分光密度值(IOD)，结果显示：与假手术组相比，模型组大鼠阴道组织中的ERα蛋白表达含量明显降低 ($P<0.05$)，而药物1和药物2均提高了ERα的表达含量，其中药物1组药效更显著 ($P<0.05$)，差异均有统计学意义。

3 讨论

阴道萎缩降低了更年期女性的生活质量。为更好地模拟临床疾病状态，本研究成功构建OVX大鼠模型，并在前人基础上优化了建模时间。本研究利用此模型观察常用阴道乳膏的作用，发现相比于模型组，药物1组和药物2组的阴道组织形态显著改善，体质量显著降低，子宫/体质量比有所下降，ERα表达含量上升，而溶剂对照组则与模型组无显著差异。本研究为监测药物疗效提供了指标，同时为其他阴道制剂筛选

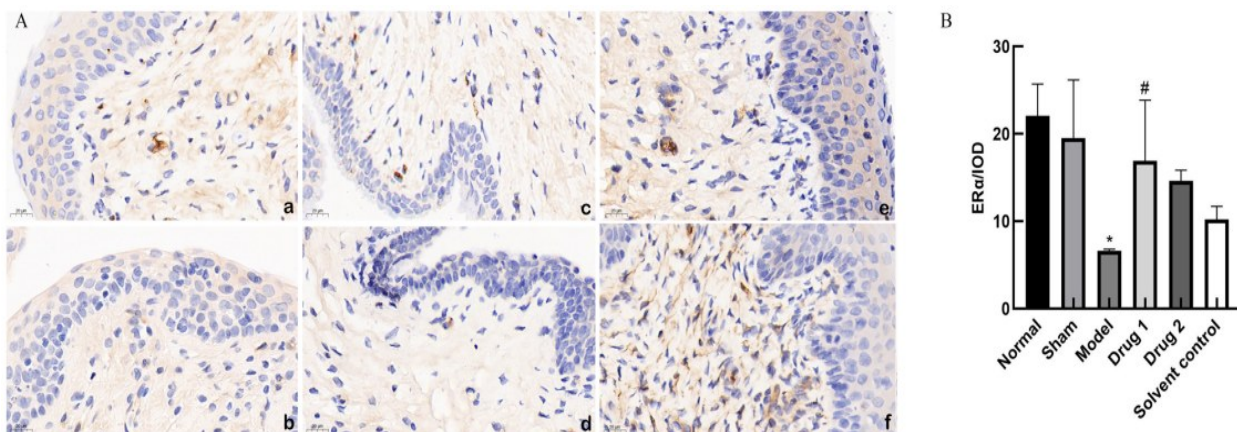


注: a 为正常组; b 为假手术组; c 为模型组; d 为溶剂对照组; e 为药物 1 组 (普罗雌烯软膏); f 为药物 2 组 (更宝芬)。图中比例尺大小为 100 μm 。与假手术组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组相比, ### $P<0.001$ 。

Note: a, normal group; b, sham group; c, model group; d, solvent control group; e, drug group 1 (promestriene); f, drug group 2 (Colpotrofin®). The scale bar of the panel is 100 μm . * $P<0.05$, and ** $P<0.01$, compared with the sham group; ### $P<0.001$, compared with the model group.

图6 用药后各组大鼠阴道组织病理变化(HE, ×20)(A)和阴道上皮厚度统计(B)

Figure 6 Histopathological changes of vaginal tissue (HE, ×20)(A) and thickness of the vaginal epithelium (B)



注: ER α : 雌激素受体蛋白 α 。a 为正常组; b 为假手术组; c 为模型组; d 为溶剂对照组; e 为药物 1 组 (普罗雌烯软膏); f 为药物 2 组 (更宝芬)。图中比例尺大小为 20 μm 。与假手术组相比, * $P<0.05$; 与模型组相比, # $P<0.05$ 。

Note: ER α , estrogen receptors- α . a, normal group; b, sham group; c, model group; d, solvent control group; e, drug group 1 (promestriene); f, drug group 2 (Colpotrofin®). The scale bar of the panel is 20 μm . * $P<0.05$, compared with the sham group; # $P<0.05$, compared with the model group.

图7 大鼠阴道组织中ER α 蛋白表达的免疫组织化学染色结果(DAB染色, ×20)(A)和积分光密度值分析(B)

Figure 7 Immunohistochemistry (DAB, ×20)(A) and integral optical density (B) of ER α protein expression in rat vagina

提供了模型和方法。

阴道萎缩属于退行性疾病, 在卵巢早衰及绝经期女性中较为常见。绝经后雌激素水平降低, 会导致阴道壁萎缩, 阴道内 pH 值升高, 阴道微环境改变, 从而易引发感染^[5], 降低患者生活质量。缺乏雌激素会导致阴道发生很多生理学和解剖学变化, 如褶皱消失, 变得扁平^[6]。常用于治疗阴道萎缩的各种阴道用制剂包括乳膏、凝胶、胶囊、栓剂、隔膜等, 用于筛选这

类制剂的动物模型包括服用卵毒化学物质 4-乙烯基环己烯二氧化物导致卵巢衰竭的大鼠和小鼠模型^[7-8]、服用雌激素受体调节剂 EM-800 的小鼠模型^[4]。但研究阴道萎缩使用的小鼠模型较少, 以上两种模型使用率低, 文献较少, 且缺乏系统的评价。而大鼠 OVX 模型效果良好, 是目前常见的阴道萎缩模型, 可模拟女性绝经后卵巢不再分泌雌激素的状态。因此, 本研究选用 OVX 大鼠作为药物筛选模型来观察。

全身或局部的雌激素治疗是阴道萎缩的标准治疗方法,其中局部雌激素治疗比全身雌激素治疗的不良反应小,可以减少全身作用或对子宫内膜的影响^[9-10]。但一般雌激素局部使用也易吸收入血,也会引起全身不良反应^[11-12];卵巢癌和子宫癌等禁忌雌激素的人群不适用于使用局部雌激素治疗阴道萎缩^[13]。而普罗雌烯阴道局部使用,只作用于阴道黏膜,药物吸收入血量<1%^[14-15],不良反应小于局部使用雌激素,因此普罗雌烯在临床上是治疗阴道萎缩的一线药物。本研究通过观察普罗雌烯的作用来评估治疗阴道萎缩的药物效果的监测指标。

目前,建立阴道萎缩动物模型是以OVX为主。但各研究中术后自然喂养时间不一,有的是术后2周开始给药治疗^[2],有的是术后28 d^[3],也有的是术后15~21 d^[10];没有统一标准,不利于筛选药物的指标质控。本研究为优化OVX后自然喂养时间,首先对OVX后15~21 d的大鼠动情周期进行了评估。阴道涂片实验发现,术后15~17 d大鼠动情周期仍有波动,到17 d后有84%的大鼠稳定在间期,说明已没有动情周期变化;另外26%的大鼠一直到术后21 d仍持续出现大量角化上皮细胞,根据文献^[16]的描述提示处于动情期,考虑是卵巢切除不完全或出现了假动情周期^[17],具体原因尚有待后续研究,为实验统计严谨考虑,这部分动物不计入后续实验分组。其次,本研究观察了大鼠体质量、阴道上皮组织学和子宫湿重随手术时间的变化,结果显示,子宫/体质量比在15~16 d时偏高,而后呈下降趋势,到21 d达到最低,说明子宫在15~21 d呈萎缩趋势,在第21天萎缩最严重。另外,观察发现阴道上皮厚度在术后15~19 d有波动,在术后20~21 d稳定在最薄值,说明术后20和21 d的阴道萎缩情况严重。总之,术后15 d各指标不够稳定,术后21 d各指标趋于稳定且阴道上皮明显变薄,细胞层数减少,失去鳞状上皮细胞覆盖,褶皱少于正常组和假手术组,出现明显的阴道萎缩,提示术后21 d的阴道萎缩程度已足够适宜作为阴道萎缩模型,可以进行后续药理、药效实验,不需再观测术后28 d的阴道萎缩情况,以便节省饲养和时间成本,减少动物痛苦时间。综合考虑,本研究认为OVX后21 d已达到阴道萎缩标准,既可以拥有良好的疾病模拟效果,又可以节省成本,减轻对动物福利的影响。

本研究发现OVX模型组大鼠体质量增加,这可能与雌激素血清瘦素、脂联素、胰岛素抵抗和脂质代

谢等因素有关^[18]。经国产普罗雌烯和国外普罗雌烯阴道乳膏治疗的大鼠体质量较OVX模型组下降,说明2种药物治疗可以缓解因雌激素缺乏引起的肥胖。用药后大鼠阴道上皮出现鳞状上皮细胞覆盖,细胞层数变多,上皮厚度变厚,褶皱增多,接近于假手术组和正常组,说明2种药物均改善了阴道萎缩的阴道组织学症状,这与局部雌激素^[18]、胶原蛋白^[19]治疗的效果一致。上述结果说明,阴道组织学形态可以作为监测药物治疗效果的主要指标,体质量可以作为辅助指标。

已知雌激素受体在局部雌激素发挥作用中扮演着重要的角色,女性进入绝经期后,随着雌激素水平的撤退性下降,雌激素受体也同时下调,由此推测雌激素受体也可以作为药效观察的一个指标。因此,本研究观察了用药前后阴道组织中ER α 水平的表达变化。结果发现,与模型组相比,OVX后大鼠的ER α 水平显著降低,与李淑桢等^[20]研究结果一致;而与模型组相比,药物1组和药物2组可以提高OVX后大鼠阴道组织中雌激素受体ER α 表达含量。有研究发现使用OVX方法构建的骨质疏松大鼠下丘脑和垂体中ER α 表达含量较假手术组下降,服药后ER α 表达上调^[20],这提示药物通过下丘脑-垂体轴调控ER α 表达。也有研究发现,在高脂喂养的小鼠中,去卵巢组小鼠主动脉组织中ER α 表达量低于对照组^[21],而自然衰老法构建的围绝经期更年期大鼠的ER α 表达量则高于正常组,这与本研究结果不符^[22];推测这可能与不同模型观测的时间点不同有关,需建模后进一步通过免疫组织化学和蛋白质印迹等实验互相验证,并用此次实验剩余的组织进行信号通路检测。

有研究发现去卵巢大鼠连续使用另一种普罗雌烯药物Colpotrofin[®]治疗14 d后,子宫明显肥厚,且子宫内膜厚度大于正常组^[10]。本研究结果则显示,用药后药物1组和药物2组大鼠的子宫/体质量比较模型组均明显增大;虽然子宫内膜厚度也有所增加,但与模型组比较并无明显差异,且均小于正常组和假手术组。本研究结果说明,国产普罗雌烯乳膏和国外普罗雌烯乳膏2种药物均可减轻子宫萎缩程度,但未引起显著的内膜增生,提示安全性较高。

综上所述,本研究结果显示大鼠OVX模型适宜作为阴道制剂的筛选模型,大鼠行OVX后21 d的阴道萎缩程度已足够适宜其作为阴道萎缩模型,阴道组织形态、子宫内膜厚度、子宫/体质量比均可作为监测药物疗效的指标或辅助指标。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过国家卫生健康委科学技术研究所动物伦理委员会批准(No. NRIFH21-2101-9)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of National Research Institute for Family Planning (Approval Letter No. NRIFH21-2101-9). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

杨丽雅负责大鼠 OVX 手术及给药、HE 染色、免疫组织化学实验操作、文章初稿撰写;宋涛负责组织形态学分析指导、整体数据整理;何佳璘辅助动物实验,负责大鼠动情周期观察;郭一鸣负责大鼠采血取材;元明康协助大鼠 OVX 手术及其他动物实验操作;王含必负责搜集资料、临床研究方案设计、文章审核及修改;王慧萍为课题负责人,负责整体实验设计、经费管理、文章整体思路构建及修改定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] NAPPI R E, MARTINI E, CUCINELLA L, et al. Addressing vulvovaginal atrophy (VVA)/genitourinary syndrome of menopause (GSM) for healthy aging in women[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10:561. DOI:10.3389/fendo. 2019. 00561.
- [2] MALDONADO P A, MONTOYA T I, ACEVEDO J F, et al. Effects of vaginal conjugated equine estrogens and ospemifene on the rat vaginal wall and lower urinary tract[J]. *Biol Reprod*, 2016, 96(1): 81-92. DOI: 10.1095/biolreprod. 116. 144428.
- [3] YOU S, LIU S B, DONG X J, et al. Intravaginal administration of human type III collagen-derived biomaterial with high cell-adhesion activity to treat vaginal atrophy in rats[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(4): 1977-1988. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.9b01649.
- [4] ZANNI P C, NEGRI M, SALCI T P, et al. Animal models for the effective development of atrophic vaginitis therapies: possibilities and limitations[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2014, 9(3):269-281. DOI:10.1517/17460441.2014.877883.
- [5] 吴琼. 雌激素联合甲硝唑治疗萎缩性阴道炎的临床疗效及其安全性[J]. *临床合理用药杂志*, 2021, 14(21):145-147. DOI:10.15887/j.cnki.13-1389/r.2021.21.053.
- WU Q. Clinical efficacy and safety of estrogen combined with metronidazole in the treatment of atrophic vaginitis[J]. *Chin J Clin Ration Drug Use*, 2021, 14(21):145-147. DOI:10.15887/j.cnki. 13-1389/r.2021.21.053.
- [6] DONDERS G G G, RUBAN K, BELLEN G, et al. Pharmacotherapy for the treatment of vaginal atrophy[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2019, 20(7): 821-835. DOI: 10.1080/14656566. 2019. 1574752.
- [7] MAYER L P, DEVINE P J, DYER C A, et al. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen[J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(1): 130-138. DOI:10.1095/biolreprod.103.016113.
- [8] ACOSTA J I, MAYER L, TALBOOM J S, et al. Transitional versus surgical menopause in a rodent model: etiology of ovarian hormone loss impacts memory and the acetylcholine system[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(9):4248-4259. DOI:10.1210/en.2008-1802.
- [9] SOCIETY N A M. The role of local vaginal estrogen for treatment of vaginal atrophy in postmenopausal women: 2007 position statement of The North American Menopause Society[J]. *Menopause*, 2007, 14(3): 370-371. DOI: 10.1097/gme.0b013e3180533b2a.
- [10] LÓPEZ-BELMONTE J, NIETO C, ESTEVEZ J, et al. Comparative uterine effects on ovariectomized rats after repeated treatment with different vaginal estrogen formulations[J]. *Maturitas*, 2012, 72(4): 353-358. DOI:10.1016/j.maturitas.2012.05.007.
- [11] PUNNONEN R, VILSKA S, GRÖNROOS M, et al. The vaginal absorption of oestrogens in post-menopausal women[J]. *Maturitas*, 1980, 2(4): 321-326. DOI: 10.1016/0378-5122(80) 90034-1.
- [12] CECCARELLI S, D'AMICI S, VESCIARELLI E, et al. Topical KGF treatment as a therapeutic strategy for vaginal atrophy in a model of ovariectomized mice[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(9): 1895-1907. DOI:10.1111/jcmm.12334.
- [13] VAILATI S, MELLONI E, RISCASSI E, et al. Evaluation of the effects of a new intravaginal gel, containing purified bovine colostrum, on vaginal blood flow and vaginal atrophy in ovariectomized rat[J]. *Sex Med*, 2013, 1(2):35-43. DOI:10.1002/sm2.8.
- [14] WOLFF J P, CACHELOU R, GUÉRITÉE N. Absence of systemic hormonal effects in an oestradiol diether topically active on the vaginal mucosa[J]. *Maturitas*, 1982, 4(4): 239-246. DOI: 10.1016/0378-5122(82)90054-8.
- [15] PUP L D. Management of vaginal dryness and dyspareunia in estrogen sensitive cancer patients[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2012, 28(9):740-745. DOI:10.3109/09513590.2011.652717.
- [16] 闫丽, 温和, 唐桂毅, 等. 大鼠阴道细胞涂片不同染色方法在动情周期判定中的价值[J]. *药物评价研究*, 2020, 43(1):72-76. DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.012.
- YAN L, WEN H, TANG G Y, et al. Diagnostic value of three staining methods for rat vaginal cell smears in determination of estrous cycle[J]. *Drug Eval Res*, 2020, 43(1): 72-76. DOI:10. 7501/j.issn.1674-6376.2020.01.012.
- [17] 刘翠萍, 张颖, 李莉. 干扰素联合红外线局部照射治疗人乳头瘤病毒及相关阴道炎和宫颈炎大鼠的作用及相关机制研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(13):1353-1357. DOI:10.3969/j.

- issn.1671-4695.2021.13.003.
- LIU C P, ZHANG Y, LI N L. Effect and mechanism of interferon combined with infrared local radiation in the treatment of rats with HPV related vaginitis and cervicitis[J]. J Clin Exp Med, 2021, 20(13): 1353-1357. DOI: 10.3969/j. issn. 1671-4695. 2021. 13.003.
- [18] LI T, MA Y Y, ZHANG H, et al. Differential regulation of morphology and estrogen receptor- α expression in the vagina of ovariectomized adult virgin rats by estrogen replacement: a histological study[J]. Int J Endocrinol, 2016, 2016:1093512. DOI:10.1155/2016/1093512.
- [19] 游爽. III型胶原蛋白对大鼠阴道萎缩的作用及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.
- YOU S. The effect and mechanism of type III collagen on vaginal atrophy in rats [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2020.
- [20] 李淑桢, 王琦, 李沁园, 等. 基于下丘脑-垂体-卵巢轴探讨藏药二十五味鬼臼丸对绝经后骨质疏松症大鼠的干预作用[J]. 中草药, 2021, 52(20): 6282-6290. DOI: 10.7501/j. issn. 0253-2670.2021. 20.019.
- LI S Z, WANG Q, LI Q Y, et al. Study on intervention effect of Tibetan medicine Ershiwuwei Guijiu Pill on PMOP rats based on HPOA[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(20):6282-6290. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.019.
- [21] YANG Q N, WANG C Y, JIN Y, et al. Disocin prevents postmenopausal atherosclerosis in ovariectomized LDLR^{-/-} mice through a PGC-1 α /ER α pathway leading to promotion of autophagy and inhibition of oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. Pharmacol Res, 2019, 148: 104414. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104414.
- [22] 谢冰颖, 黄景文, 陈赛楠, 等. 补肾法对围绝经期综合征大鼠性激素及卵巢雌激素受体的影响[J]. 福建中医药, 2021, 52(10):11-13, 22. DOI:10.13260/j.cnki.jfjtc.012341.
- XIE B Y, HUANG J W, CHEN S N, et al. Effect of kidney-invigorating method on the levels of sex hormone and ovarian estrogen receptor in perimenopausal syndrome rats [J]. Fujian J Tradit Chin Med, 2021, 52(10): 11-13, 22. DOI: 10. 13260/j.cnki.jfjtc.012341.
- (收稿日期:2022-02-11 修回日期:2022-07-26)
(本文编辑:张俊彦, 富群华, 周烁)

致谢本刊2022年审稿专家

同行评议即外审专家是科技期刊学术质量的重要把关人。《实验动物与比较医学》第42卷终,特向参与2022年本刊审稿工作的所有专家衷心致谢——感谢您的每一次严谨细致审稿,以及每一条客观公正的评审意见! 恭祝各位专家新年快乐、身体安康、万事如意! 愿2023年我们继续携手,更上一层楼!

审稿专家致谢名单(排名不分先后)如下:

艾志福(江西) 白玉(河北) 白玉(北京) 常在(北京) 陈鸿军(上海) 陈丽(安徽) 陈民利(浙江)
陈仁金(江苏) 陈献花(浙江) 陈振文(北京) 程树军(上海) 崔东红(上海) 崔立(上海) 崔轶凡(山西)
崔永春(北京) 代解杰(云南) 戴然然(上海) 邸亚男(北京) 丁玉强(上海) 杜小燕(北京) 范薇(北京)
冯洁(上海) 冯丽萍(上海) 傅江南(广东) 傅婷婷(上海) 富群华(上海) 高晨(甘肃) 高诚(上海)
高虹(北京) 高静(上海) 高巍(吉林) 高耀(山西) 顾为望(广东) 官建中(安徽) 罕园园(云南)
和占龙(云南) 贺争鸣(北京) 侯栋(河南) 华孝挺(浙江) 黄冰(广东) 黄缨(上海) 季樱红(上海)
金帆(浙江) 金叔宣(上海) 邝高艳(湖南) 赖国旗(重庆) 冷颖(上海) 黎立(北京) 黎明(上海)
李峰(上海) 李舸(广东) 李洪涛(广东) 李华(上海) 李静(上海) 李善刚(云南) 李晓波(北京)
李垚(上海) 李英俊(北京) 李长龙(北京) 刘恩岐(陕西) 刘吉宏(上海) 刘静(北京) 刘雨均(上海)
刘向云(上海) 刘月环(浙江) 刘忠华(广东) 娄淑杰(上海) 卢健(上海) 卢静(北京) 倪丽菊(上海)
庞万勇(北京) 庞晓斌(河南) 彭诗宇(浙江) 钱帅伟(湖北) 钱晓庆(上海) 邵奇鸣(江苏) 师长宏(陕西)
施爱民(江苏) 施标(上海) 施恩(上海) 史红艳(吉林) 史利军(北京) 史仍飞(上海) 史晓光(北京)
宋国华(山西) 宋宁宁(上海) 宋兴磊(上海) 孙德明(北京) 孙茂民(江苏) 孙强(上海) 谭毅(重庆)
唐利军(湖北) 唐瑛(上海) 田嘉军(四川) 田雨光(广东) 王朝霞(上海) 王丹(辽宁) 王德军(浙江)
王红平(四川) 王健(上海) 王婧(江苏) 王靖宇(辽宁) 王可洲(山东) 王荣(陕西) 王莎莎(北京)
王爽洁(上海) 王婷玉(上海) 王宇(上海) 王玉珏(广东) 魏强(北京) 魏盛(山东) 吴宝金(上海)
吴建辉(上海) 吴剑(上海) 肖君华(上海) 谢家骏(上海) 谢建芸(上海) 谢淑武(上海) 熊炜(上海)
徐平(上海) 徐汪节(上海) 闫明霞(上海) 杨陈(广东) 杨斐(上海) 杨利峰(北京) 杨伟敏(上海)
姚明(上海) 于士颜(上海) 于志锋(上海) 岳秉飞(北京) 恽时锋(江苏) 曾令烽(广东) 张磊(上海)
张璇(上海) 张钰(广东) 张周(上海) 赵四海(陕西) 赵微(辽宁) 赵彦光(上海) 赵莹(上海)
赵勇(上海) 郑和平(福建) 周光兴(上海) 周晓辉(上海) 周正宇(江苏) 朱德生(北京) 朱佳蕾(上海)
朱彦兵(北京)

《实验动物与比较医学》编辑部