技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)11-1534-04

兔乳腺增生模型的快速制备及 ERα 分布

黎 升,朱 辉,王智彪

(重庆医科大学生物医学工程系重庆市生物医学工程学重点实验室、重庆市超声医学工程重点实验室、省部共建国家重点实验室培育基地,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨快速制备兔乳腺增生的可行性。方法:用苯甲酸雌二醇(Estradiol benzoate,E2)和黄体酮肌注新西兰大白兔,动态观察有无乳腺增生及模型维持时间,病理类型,雌激素受体 α(Estrogen receptor alpha, ERα)分布情况。结果:20~25 d 即可制备该模型,符合乳腺增生的病理特征,无须切除卵巢,模型可维持 135 d 左右。结论:模型成功率高,稳定性好,具有与人类基本相似的病理特征,快速建模是可行的。

【关键词】兔;乳腺增生;模型;雌激素受体

【中国图书分类法分类号】R332 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-25

Rapid establishment of rabbit model of mammary dysplasia and its estrogen receptor alpha distribution

LI Sheng, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the feasibility of rapidly making rabbit model of mammary hyperplasia. *Methods*: Estradiol benzoate and Progesterone were given intramuscularly to New Zealand white rabbits during different periods.The preparation of the model ,its available time,pathological type and estrogen receptor alpha distribution were observed. *Results*: After 20~25 days,the models were estabished,which fulfilled the features of mammary dysplasia, making ovariectomy unnecessary.The model could be maintained for 135 days. *Conclusion*: The model has the same pathological feature with human. Rapid modeling is feasible,with high successful rate.

【Key words】Rabbit model; Mammary hyperplasia; Estrogen receptor alpha

乳腺增生患病率居中青年妇女乳腺疾病首位[1],该病病程长,易复发;疗程长,治疗相对困难,部分类型有一定的恶变风险,威胁广大妇女的身心健康。国内曾试验多种疗法,常需建立动物模型;但建模周期较长[2-4],较少报道病理类型及维持时间。本实验探讨快速建立兔乳腺增生模型,并分析病理类型及维持时间。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雌性健康新西兰大白兔,未孕,体重 (2.3±0.1) kg,5~6 月龄,单笼饲养,自动饮水,饲喂颗粒饲料(由重庆医科大学实验动物中心提供、饲养)。

1.2 主要试剂及仪器

苯甲酸雌二醇(E2,上海通用药业股份有限公司,批号:070902),黄体酮(浙江仙琚制药股份有限公司,批号:070904),EnvisionTM Detection Kit, Peroxidase/DAB(DAKO 公司,批号:GK500705),ERα 抗体(Lab Vision 公司,批号:Cat. #RB-1521-P0),光镜,游标卡尺,电镜。

1.3 乳腺增生模型的建立

预实验:10 只雌兔每只连续肌肉注射 E2 1 mg/(kg·d),至 14 d 时 70%腹泻而死。将 60 只兔随机分为 5 组,第 5 组 20 只,其余每组 10 只。第 1 组为正常对照组,每兔肌注 2 ml 生理盐水,连续 30 d;余为模型组,每兔注射的 E2 剂量为 0.75 mg/(kg·d),第 2 组连续肌注 E2 15 d;第 3 组连续肌注 E2 20 d;第 4 组连续肌注 E2 20 d,之后肌注黄体酮 1 mg/(kg·d),连续 5 d。第 5 组连续肌注 E2 25 d,之后肌注黄体酮 1 mg/(kg·d),连续 5 d。

作者介绍:黎 升(1982-),男,硕士,研究方向:乳腺疾病。

通讯作者:朱 辉,男,副教授,E-mail:zhuh@haifu.com.cn。

基金项目:重庆市科委攻关项目资助(渝科发计字[2007]11 号 CSTC,2007AA5020)。

1.4 取材及检测

造模后 3 d、1 月、2 月、3 月、4 月、4 月半，以速眠新麻醉，每只兔每次随机切取 1 个乳腺。(1)标本用 10%甲醛固定，石蜡包埋，切片，HE 染色，参照文献光镜下判断有无增生及类型。(2)模型评价标准：由于乳腺增生指的是上皮和间质的增生，其组织学病变繁多，每例由 2～7 种病变组成，以其中 1~2 种为主；病理诊断标准至今尚未完全统一；然其基本病变是比较公认的，即小叶增生，导管增生扩张，间质增生。参照文献[5,6]的乳腺增生病理标准，若有一种基本病变为主，并有其它增生性病变，则为乳腺增生。(3)造模后 3 d 取材，由重庆医科大学电镜室制成电镜标本，观察乳腺上皮细胞线粒体数量和间质胶原纤维。(4)取 2 月后标本，制成 5μm 石蜡切片，免疫组化 Envision 法，按说明书步骤测 ERα，观察其分布。

1.5 统计学方法

用 SPSS 13.0 版进行统计学处理，数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示，用两独立样本 t 检验，$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

肉眼可见模型组兔增生乳腺略隆起，乳头红肿、增大(图 1)。对照组乳头高度、直径明显小于模型组(表 1)。造模后 3 d，各组增生及腹泻的例数见表 2；第 1、2、3、4 月动态观察各组，增生例数及病理类型无变化。4.5 月时，第 5 组死亡 5 只；取该组死亡兔乳腺 HE 染色，发现 4 只乳腺增生，另 1 只因组织自溶无法评价。模型组腹泻发生率较对照组增加(40%(20/50) vs 10 %(1/10)，$P<0.05$)。第 5 月时增生乳腺组织出现改变：成纤维细胞及胶原纤维仍多，腺体和导管减少，脂肪成分增多，与正常兔乳腺接近。

光镜下对照组乳腺组织导管小叶较少，腺腔内无分泌物，脂肪组织多(图 2)，始终无增生。模型组出现典型乳腺增生，表现为乳腺小叶和腺泡数目增加，1 个低倍视野小叶数大于 5 个；导管扩张、导管数增多，复层上皮多见，管腔内有脱落上皮细胞和分泌物；间质纤维显著增加，成纤维细胞增多，原来富于脂肪组织的间质被大量胶原纤维所替代(图 3~5)。对 39 份增生标本进行组织学病变类型统计，增生标本上有 2 种以上病变，如间质纤维增生，小叶增生和导管增生等，出现率分别为 71.8%(28/39)，30.8%(12/39)，41.0%(16/39)，以 1 种为主。电镜下，正常对照组腺上皮线粒体数量不增多，胶原纤维少。增生乳腺组织胶原纤维大量增生(图 7)；胞质内线粒体数量增多(图 8)。

Envision 法示增生乳腺成纤维细胞胞核阳性，导管和腺泡上皮胞浆阳性，其它细胞 ERα 表达阴性

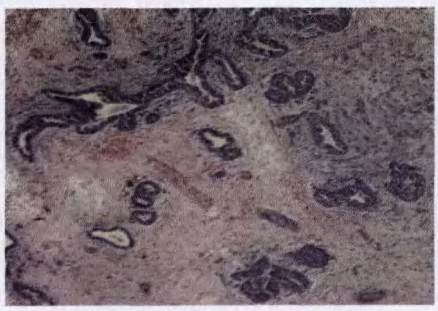


图 1 兔增生乳腺外观图



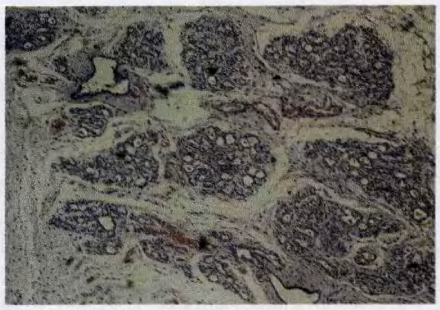
可见图中纤维间质少，小叶导管少见，脂肪组织多，箭头处为大乳管，并非扩张导管

图 2 兔正常乳腺组织图 (HE 染色 ×100)



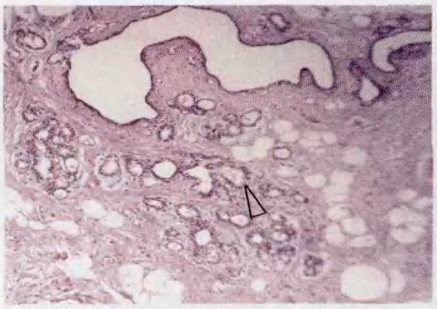
导管上皮呈复层

图 3 乳腺组织增生图(HE 染色 ×100)



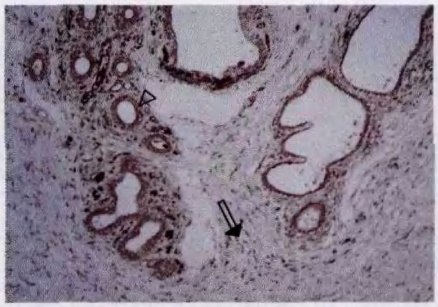
小叶增生显著

图 4 乳腺组织增生图(HE 染色 ×100)



导管扩张,内有分泌物(空心三角形)

图 5 乳腺组织增生图(HE 染色×100)



间质中梭形的成纤维细胞核阳性(箭头),腺泡胞浆阳性,无胞核染色(三角形)

图 6 增生乳腺 ER 分布(Envision 法×100)

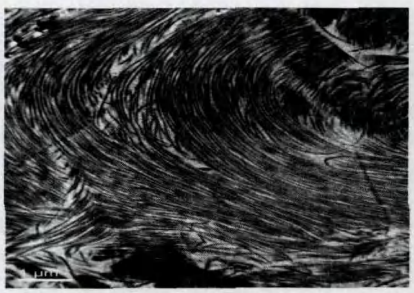


图 7 兔乳腺间质纤维(电镜×12 000)

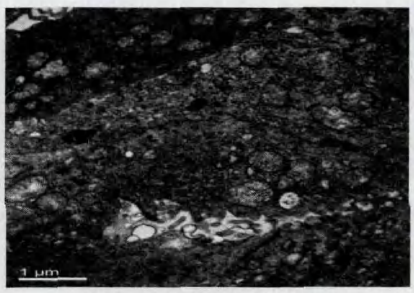


图 8 上皮细胞线粒体增多(电镜×15 000)

表 1 第 2 对右侧乳头高度、直径比较表 (mm)

	模型组	对照组	*P* 值	*t* 值
高度	6.08 ± 0.10	2.09 ± 0.09	<0.000 1	114.6
直径	3.37 ± 0.08	1.49 ± 0.12	<0.000 1	59.5

表 2 造模后 3 d 统计表

	实验动物例数	增生动物比率	发生腹泻比率	死亡例数
1 组	10	0%	10%(1/10)	0
2 组	10	60%	30%(3/10)	0
3 组	10	90%	40%(4/10)	0
4 组	10	90%	40%(4/10)	1
5 组	20	75%	45%(9/20)	5

(图 4);正常乳腺仅导管和腺泡上皮细胞胞浆弱阳性。

3 讨 论

本实验用苯甲酸雌二醇联合孕酮制备兔乳腺增生模型[2,3]。正常兔乳腺组织学特征与人类基本相似[7],适于造模。E2 不断刺激,主要经 ERα 介导作用于乳腺组织[8,9],引起导管特别是间质纤维组织增生,使乳腺不能由增殖转入复旧;增生的细胞特别是间质通过激素受体系统使 ER 合成增加,E2 进一步刺激引起乳腺组织增生和细胞功能活跃[10],而出现乳腺组织增生。电镜下乳腺增生细胞线粒体数量增多是细胞功能活跃的表现。免疫组化法从形态上观察到 ERα 的分布与增生的乳腺组织细胞是一致的:正常乳腺仅导管和腺泡上皮细胞胞浆 ERα 呈弱表达,与静息状态乳腺未予 E2 刺激时 ERα 含量亦少有关;而增生的导管和腺泡上皮细胞胞浆阳性,间质成纤维细胞核 ERα 阳性,其它细胞如脂肪细胞、血管内皮细胞 ERα 表达阴性。反映了 E2 在 ERα 介导下,促进乳腺组织特别是间质胶原纤维增生的作用;间质和上皮的相互作用亦促进乳腺增生[11]。在此基础上,孕酮起协同作用。

在小鼠乳腺增生模型及乳腺癌标本中,ERα 一

般表达在乳腺导管和腺泡上皮细胞核内；而本实验中，模型组仅出现在导管和腺泡上皮胞浆和成纤维细胞核内。国外文献中未查到以兔制备乳腺增生模型的；国内以日本大耳兔制备乳腺增生模型，却未能提供导管和腺泡上皮细胞核阳性的图片。这种现象，可能与使用的实验动物及出现的乳腺增生类型有关。

实验结果表明，模型组乳腺增生，类型多样，以间质纤维增生最多见，具有与人类基本相似的病理特征，动态观察示增生维持 4 月以上。这说明造模是成功的；Envision 法从原理角度进一步验证了这一点。我们采用了 Envision 法测定 ERα 表达，该方法不受内源性生物素干扰，染色背景清晰，操作简单、省时、敏感性高，是一种较好的免疫组化二步法。

目前乳腺增生造模方法有切除和保留实验动物卵巢 2 种方法，我们认为造模不宜切除实验动物双侧卵巢，因为卵巢切除使实验动物本身处于一种病理状态而非生理状态，不能很好地模拟多数人患乳腺增生时的状态——绝经前。切除卵巢动物需术后恢复及用青霉素，延长了实验时间，增加了混杂因素。另外，不切卵巢缩短了造模时间，并不减少造模成功率。

本实验用苯甲酸雌二醇造模，该药可促进乳腺导管和间质增生，主要副作用为腹泻。腹泻兔食欲下降，大便稀，不成形，部分迅速脱水死亡；无感染表现；青霉素无效；雌激素停用 7 d 后腹泻即停止。显微镜下示大便无红细胞、寄生虫、白细胞。尽管兔本身腹泻发生率高，然而使用 E2 后腹泻较普遍，其临床表现、大便常规不支持感染性腹泻，且停用雌激素 7 d 后未再腹泻，提示模型兔腹泻与 E2 相关。所用 E2 剂量参考了预实验结果和文献。

可以观察到：随着造模时间延长，腹泻和死亡率有增高，特别是第 5 组。而单用雌激素（20~25 d）大部分兔出现乳腺增生，具有与人类基本相似的病理特征，模型稳定，相关副作用在可接受范围内。本实验中，不切除实验动物卵巢且单用雌激素这种方法，造模时间比国内同类实验短[2-4]，并降低实验动物相关患病率和死亡率，减少了经济损失，缩短了实验周期。故不切卵巢，快速造模是可行和有益的。

参 考 文 献

[1] 付立晶，金恒善，焦鹏涛，等.乳腺病普查结果分析[J].中国妇幼保健，2007，22(15)：2055-2056.

[2] 陈 晰，张建国，刘 吻，等.乳腺丸 I 号治疗兔乳腺增生的实验[J].中国中西医结合杂志，2007，27(9)：822-826.

[3] 贾 敏，姚秀娟，陈水英，等.雌二醇复制家兔乳腺增生病理模型的方法[J].西北药学杂志，1996，11(6)：259-260.

[4] 甘长清，吴凯南，苏新良.三苯氧胺对大鼠乳腺增生形态学的影响[J]. 重庆医科大学学报，2003，28(04)：448-450.

[5] 刘彤华.病理诊断学[M].第 2 版.北京：人民卫生出版社，2006. 578-581.

[6] 武忠弼，杨光华.中华外科病理学[M].北京：人民卫生出版社，2002.1607-1618.

[7] 周光兴.比较组织学彩色图谱[M].上海：复旦大学出版社，2002. 159-164.

[8] Tekmal R R, Liu Y G, Nair H B, et al. Estrogen receptor alpha is required for mammary development and the induction of mammary hyperplasia and epigenetic alterations in the aromatase transgenic mice [J].J Steroid Biochem Mol Biol, 2005, 95: 9-15.

[9] Vandenberg L N, Wadia P R, Schaeberle C M, et al. The mammary gland response to estradiol: Monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization[J]? J Steroid Biochem Mol Biol, 2006, 101: 263-274.

[10] Clarke R B.Ovarian steroids and the human breast: Regulation of stem cells and cell proliferation[J].Maturitas, 2006, 54: 327-334.

[11] Kass L, Erler J T, Dembo M, et al. Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39: 1987-1994.

（责任编辑：冉明会）

欢迎投稿，欢迎订阅