

ICS 65.020.30
CCS B44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS xxx-202x

实验动物 大鼠和小鼠痛经动物模型制备和评价技术规范

Laboratory animals - Technical specifications for preparation and evaluation of animal models of
Dysmenorrhea
(征求意见稿)

202x-xx-xx 发布

202x-xx-xx 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国实验动物学会归口。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本文件由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本文件起草单位：河南中医药大学，河北中医药大学，郑州大学，河南中医药大学第三附属医院，郑州大学第五附属医院，西湖大学，暨南大学，重庆中医药大学。

本文件主要起草人：苗明三，宋亚刚，苗晋鑫，刘寒，南硕，张忠献，李汉伟，鲍伟杰，薛夏，包晶晶，贾亚泉，邢会杰，莫宗成。

实验动物 痛经动物模型制备和评价技术规范

1 范围

本文件规定了常见痛经大鼠和小鼠模型的制备和评价方法。

本文件规定了通过药物诱导、物理刺激、手术联合激素处理、假孕联合药物等方法建立大鼠、小鼠痛经动物模型的制备与评价方法。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 35823 实验动物 动物实验通用要求、GB/T 39760 实验动物 安乐死指南和GB/T 42011 实验动物 福利通则、GB/T 35892 实验动物福利伦理审查指南、依据 RB/T 173-2018 核心要点：包含通用评价指标、模型特异性指标、人道终点计划、再评估、安乐死处置全流程，增补时可配套疼痛分级量表、体重下降阈值等量化标准。

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1

痛经 Dysmenorrhea

痛经是指与月经周期相关的下腹部痉挛性疼痛，为妇科最常见症状之一。其核心机制为月经期子宫内膜释放过量前列腺素，引起子宫平滑肌强烈节律性收缩，并压迫肌层血管致短暂缺血缺氧，进而刺激盆腔疼痛神经末梢，经神经传导至中枢而产生痛感。疼痛位于耻骨上区域，可放射至腰骶部或大腿内侧，呈阵发性绞痛，强度各异，常始于经前或经期，持续 48~72 小时。临床分为原发性与继发性两类。

4 模型制备

4.1 冰水物理刺激联合皮下注射苯甲酸雌二醇和缩宫素诱导痛经大鼠模型

4.1.1 实验原理

对大鼠进行冰水浴处理，模拟人体长期受寒邪侵袭的病理状态。辅以药物造模：苯甲酸雌二醇可调节子宫状态，使子宫处于增殖期，显著提升子宫平滑肌对缩宫素的敏感性；缩宫素可直接作用于子宫平滑肌，诱发子宫痉挛性收缩。二者协同作用，可引发子宫异常

收缩、局部缺血及炎性反应，诱导大鼠出现扭体、腹部收缩等痛经疼痛行为，成功构建寒凝型痛经动物模型。该造模方法完美对应临床寒凝血瘀原发性痛经，模拟经期疼痛症状。

4.1.2 实验材料

- a) 实验动物：选择雌性 SD 大鼠。
- b) 实验仪器：1mL 注射器。
- c) 实验试剂：苯甲酸雌二醇注射液，缩宫素注射液。

4.1.3 模型建立技术要求

取大鼠股部皮下给药：苯甲酸雌二醇给药方案为第 1、2 日 0.8 mg/kg，第 3-10 日 0.4 mg/kg，同步设置溶剂对照，给予等体积生理盐水连续皮下注射 10 d，模型组每天上午置于冰水中 20 min。末次苯甲酸雌二醇给药 24 h 后，每只大鼠腹腔 / 皮下注射缩宫素 2 IU 完成造模处理，造模完成后检测相关指标。

注意事项及成模标准：注意冰水温度及其深度，防止冰浴后大鼠的死亡，注射缩宫素后连续观察 30 min，大鼠扭体反应次数 ≥ 20 次判定为模型制备成功。

4.2 手术摘除卵巢联合注射苯甲酸雌二醇+皮下插入黄体酮植入物+子宫角宫腔注射芝麻油诱导痛经小鼠模型

4.2.1 实验原理

通过手术摘除卵巢去除动物内源性激素干扰，精准把控体内激素环境。随后采用外源性雌孕激素序贯干预：注射苯甲酸雌二醇可促使子宫发育，使子宫处于增殖期状态，提升子宫收缩潜能；皮下植入缓释黄体酮可模拟正常生理激素周期变化。最后结合宫腔异物刺激诱发子宫局部炎症与异常收缩，多因素协同模拟痛经病理状态，可稳定构建痛经动物模型。该造模方法包含内膜增殖 $\rightarrow$ 分泌 $\rightarrow$ 蜕膜化 $\rightarrow$ 激素撤退 $\rightarrow$ 内膜脱落、阴道出血全流程，痛经伴随真实经期出血，与人类经期痛病理高度吻合。

4.2.2 实验材料

- a) 实验动物：C57BL/6 雌性小鼠。
- b) 实验仪器：解剖用器械（直镊、弯镊、止血钳、组织剪、缝合针等）。
- c) 实验试剂：苯甲酸雌二醇、黄体酮、芝麻油。

4.2.3 模型制备技术要求

取雌性小鼠行卵巢切除术：术前采用适宜麻醉剂进行麻醉（常用戊巴比妥钠，给药剂量 50 mg/kg，腹腔注射；或异氟烷吸入麻醉，浓度 1.5%~2.0%），待小鼠角膜反射、痛觉

反射消失，确认麻醉平稳后开展手术操作。常规消毒手术区域皮肤，逐层开腹暴露卵巢与输卵管组织，于卵巢与输卵管交界处丝线结扎（规避输卵管、子宫损伤），结扎线外侧 0.5 cm 处完整摘除卵巢，止血确认无活动性出血后回纳子宫角至腹腔。术后待腹腔状态恢复，股部皮下给予苯甲酸雌二醇干预，第 1、2 日给药剂量 0.8 mg/kg，第 3-7 日每日给药 0.4 mg/kg；苯甲酸雌二醇给药周期结束次日，皮下埋置黄体酮缓释植入物。黄体酮植入第 3 日，双侧子宫角注射无菌芝麻油 0.1 mL 完成造模处理。芝麻油注射后计时观察 30 min，统计扭体反应次数并开展相关指标检测。同步对照处理操作：股部连续 10 天皮下给予等体积生理盐水。术后即刻将小鼠置于恒温保温环境中复苏，避免低温应激；单笼隔离饲养，保持饲养环境清洁、通风，温湿度适宜，避免拥挤、打斗造成术区损伤；术后连续 3 d 预防性给予适宜抗生素，规避切口及腹腔感染，自由摄食饮水。小鼠出现持续精神萎靡、拒食拒水、体重大幅下降、手术切口严重感染溃烂、肢体活动障碍及濒死状态时，立即终止实验并实施安乐死处理。

4.3 结扎雄鼠交配诱导假孕联合宫内注射芝麻油+皮下注射米非司酮诱导痛经小鼠模型

4.3.1 实验原理

结扎雄鼠与雌鼠交配，通过交配刺激诱导雌性大鼠产生假孕状态，促使机体持续分泌孕激素；皮下注射米非司酮可拮抗孕激素受体，阻断孕激素作用，造成孕激素撤退，显著提升子宫对致痛、致收缩物质的敏感性。宫腔注射无菌芝麻油，可通过机械刺激与局部炎症反应双重作用，促进子宫前列腺素释放，诱发子宫痉挛性收缩、放大疼痛反应，稳定构建痛经动物模型。该造模方法无需去卵巢手术，雌、孕激素来自自身黄体分泌，激素波动更贴近女性生理周期，适合 HPO 轴紊乱相关痛经研究。

4.3.2 实验材料

- a) 实验动物：选择雌性 BALB/c 小鼠。
- b) 实验仪器：1mL 注射器。
- c) 实验试剂：苯甲酸雌二醇注射液、芝麻油、米非司酮、花生油、缩宫素注射液。

4.3.3 模型建立技术要求

模型组：假妊娠的第 4 天通过宫内注射 100 μ l 芝麻油，假妊娠六天后，皮下注射 10mg/kg 米非司酮在 5% 乙醇和 95%花生油中，对照组：同时注射相同体积的生理盐水。造模结束后进行相关指标检测。

注意事项及成模标准：阴道外有明显出血说明造模成功。

5 痛经动物模型模型评价技术要求

5.1 模型的一般症状观察要求

观察实验动物活动及呼吸情况，精神状态，毛发颜色，营养状态等，有无异常表现，并及时记录大鼠体质量变化和患病或死亡情况。

5.2 模型的行为学检测

5.2.1 扭体反应

大鼠取材前，除空白组外，对其余每组随机选取 6 只进行腹腔注射缩宫素 2 IU/只，从注射缩宫素开始计时，观察大鼠首次扭体时间及 30 min 内的扭体次数，根据扭体反应判断标准确定大鼠的扭体反应，具体为身体非对称性倾斜，倾向一侧，后肢延伸且后足爪背向弯曲，整体躯体延展并伴随骨盆部位持续性的侧向扭转活动，腹部肌群收缩明显。这些症状不仅包含有扭体反应的体征，还额外表现出体温下降引发的寒战、蜷缩、以减少热量散失、呼吸功能减弱等表现。

结果判定：与对照组相比，模型组扭体次数明显增加（ $P<0.05$ ）。

5.3 模型血清 PGE₂、TXB₂、6-keto-PGF₁α、β-EP 水平检测

腹主动脉取血，干燥管取血后置于 2-8℃冰箱静置 2 h，用台式高速离心机进行离心，设置为 3500 rpm/min，离心 15 min 取上清液，血清冻存至 -40℃冰箱备用，用 ELISA 检测大鼠血清 TXB₂、PGE₂、6-keto-PGF₁α、β-EP 水平。

结果判定：与对照组相比，模型组血清 TXB₂、PGE₂ 水平明显升高（ $P<0.05$ ），6-keto-PGF₁α、β-EP 水平明显降低（ $P<0.05$ ）。

5.4 模型血液流变学检测

末次给药 2 h 后，大鼠麻醉，腹主动脉取血，随机选取 6 只雌鼠，使用 SA-9000 自动血液流变测试仪分析系统检测各切变率下的全血黏度。

结果判定：与对照组相比，模型组高切变率（200 s⁻¹）、中切变率（50 s⁻¹）、低切变率（1 s⁻¹）下的全血黏度均明显升高（ $P<0.05$ ）。

5.5 模型子宫组织匀浆 PGF₂α、PROG 水平的检测

取大鼠子宫组织 0.1 g，加入 9 倍量的生理盐水和研磨珠用超离心粉碎机进行组织匀浆，研磨后用台式高速离心机进行离心，设置为 12000 rpm/min，离心 15 min 取上清液放置于 -40℃冰箱中备用。用 ELISA 检测大鼠子宫组织匀浆 PGF₂α、PROG 水平。

结果判定：与对照组相比，模型组子宫匀浆中 PGF₂α 水平显著升高（ $P<0.05$ ），PROG 水平明显降低（ $P<0.05$ ）。

5.6 模型子宫组织形态的影响

取子宫组织，均选取单侧子宫中段完整子宫壁组织，避开子宫角、子宫颈及血管淤血、机械损伤区域。其中大鼠选取距离子宫角 1.5cm、距离子宫颈 2cm 的中段均质组织，小鼠选取距离子宫角 0.8cm、距离子宫颈 1cm 的中段组织，保证各组取材解剖位置统一，规避部位差异引发的形态学检测偏差。用生理盐水清理，放置于多聚甲醛组织固定液中固定 24 h 后，采用 HE 染色，在显微镜下观察大鼠子宫组织形态变化。根据子宫病理分析方法^[50]，通过 Ridit 检验分析，计算各组病理差异。

结果判定：空白组大鼠子宫内壁呈现平滑状态，固有层组织结构排列紧密，且未观测到任何明显异常。模型组大鼠的子宫内膜出现水肿，上皮细胞有空泡样变性，子宫内的小血管呈现出扩张并伴有充血的现象，且存在炎性细胞明显浸润。经 Ridit 检验分析，与空白组比较，模型组大鼠子宫组织出现明显病理变化（ $P<0.05$ ）。

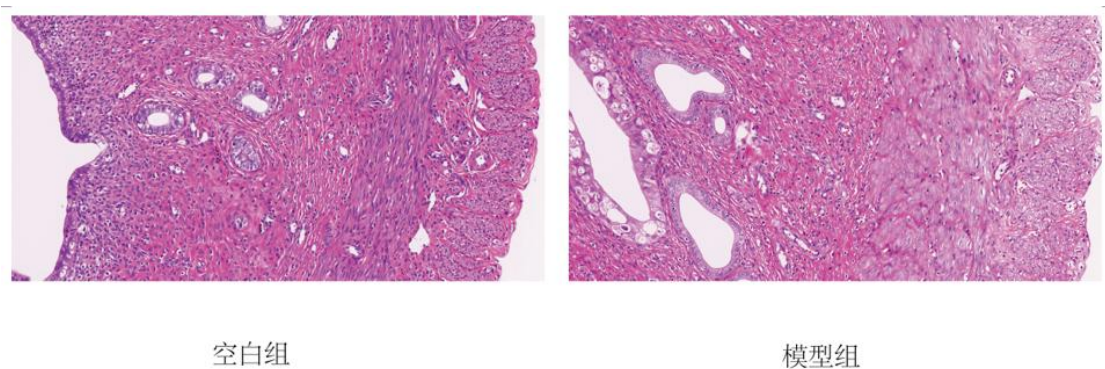


图 1 苯甲酸雌二醇联合缩宫素导致的大鼠痛经动物模型子宫组织 HE 染色代表病理图
(HE 100×)

5.7 模型卵巢、阴道、乳腺组织形态的影响

卵巢组织病理观察：取单侧完整卵巢组织制片观察，主要关注各级卵泡发育形态、卵泡闭锁情况、黄体结构完整性，同时观察卵巢间质是否存在充血、炎性浸润及纤维化等异常，评价模型对卵巢发育与内分泌功能的影响。

阴道组织病理观察：取阴道中段组织制片观察，重点观察阴道上皮厚度、分层及角化状态，判断黏膜是否出现增生、萎缩、脱落及炎性浸润等病理改变，结合动情周期变化评估模型对阴道黏膜结构与生殖周期节律的影响。

乳腺组织病理观察：取单侧腹股沟乳腺组织制片观察，主要观察乳腺腺泡、导管形态结构，关注腺腔扩张、萎缩、上皮紊乱及炎性浸润等病变，同时观察间质增生、水肿等情况，评估模型对乳腺组织结构的影响。

5.8 模型的评价标准

本模型以大小鼠疼痛行为、躯体体态、自主活动、应激状态及消化功能为核心评价指标，采用客观可量化、可重复的分级评分方式，结合扭体反应次数进行综合判定，客观评价模型构建效果。

5.7.1 量化评价指标

共设置 5 项核心评价指标，各项均采用 0~3 分四级量化计分，总分 0~15 分，分值越高代表小鼠疼痛及躯体异常反应越显著，模型成型效果越好。具体量化标准如下：

（1）疼痛行为与牵涉反应：0 分，无异常扭动、弓背、蜷缩行为；1 分，偶发轻微疼痛相关动作，发作稀疏；2 分，阵发性痉挛、弓背、舔舐腰骶后肢，疼痛行为较频繁；3 分，持续躯体痉挛、僵直拘谨，疼痛牵涉反应强烈。

（2）腹部体态表现：0 分，腹部柔软、体态自然舒展；1 分，腹部轻微紧绷，无明显异常体态；2 分，下腹部膨隆紧绷，间断收腹蜷缩；3 分，腹部僵硬，持续蜷缩收腹，腹部疼痛体征显著。

（3）自主活动与精神状态：0 分，行动敏捷、活动正常、精神状态良好；1 分，活动轻度减少，偶有静卧；2 分，活动量明显下降，多数时间静卧蜷缩、精神偏弱；3 分，几乎无自主活动，精神萎靡、肢体乏力。

（4）躯体与环境应激状态：0 分，毛发顺滑、肢端温热、状态平稳；1 分，毛发略杂乱、肢端微凉，轻度呆滞或躁动；2 分，毛发干枯蓬松、肢端偏凉，频繁震颤、焦躁不安；3 分，毛发脏乱倒伏、肢端冰凉，持续震颤、应激反应剧烈。

（5）消化与神经应答功能：0 分，摄食饮水正常、粪便成形、对外界应答灵敏；1 分，摄食饮水略减、粪便偏软，应答轻度迟钝；2 分，摄食饮水明显减少、出现稀便，应答迟缓、偶有肢体僵直；3 分，摄食饮水显著下降、腹泻明显，肢体瘫软、对外界应答微弱。

5.7.2 评价方法与成模判定标准

造模结束后即刻计时，在统一温湿度、光照、无噪音干扰的环境下，采用单笼独立方式连续观察 30 min。依据上述量化标准对小鼠各项指标逐一计分，累加得到模型评价总分（满分 15 分）。

采用量化评分与扭体反应次数双重标准判定模型是否成型：总分 ≥ 8 分且 30 min 内扭体次数 ≥ 15 次，判定小鼠痛经模型制备成功。其中 8~10 分为轻度模型，11~13 分为中度模型，14~15 分为重度模型。

6 动物福利保障

动物实验应符合 GB/T 35892-2018 有关要求，并经过实验动物管理和使用委员会（IACUC）审批。