

不同剂量顺铂腹腔注射建立大鼠 化疗损伤性卵巢早衰模型

董若曦¹, 朱小丹^{2,3}, 樊伯珍^{2,3}, 许文娟^{2,3}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032;

2. 上海中医药大学附属普陀医院妇产科, 上海 200062;

3. 安徽医科大学上海普陀中心临床学院妇产科, 上海 200062)

[摘要] 目的 探索不同剂量顺铂(CP)腹腔注射建立化疗损伤性卵巢早衰(POF)大鼠模型的方法。方法 取48只雌性未生育Wistar大鼠分为6组, 每组8只。在不同时间点腹腔注射不同剂量CP。对照组(A组)无处理; CP腹腔小剂量(1.5 mg/kg)注射1组(B组)、小剂量(2.0 mg/kg)注射2组(C组)和小剂量(2.5 mg/kg)注射3组(D组), 均每日1次, 连续5 d; CP腹腔注射大剂量1组(E组), 4 mg/kg, 间隔一周再次注射4 mg/kg; CP腹腔注射大剂量2组(F组), 4 mg/kg, 间隔一周注射6 mg/kg, 建立大鼠化疗损伤性POF模型。观察大鼠一般情况、动情周期, 检测体质量变化和血清抗苗勒氏管激素(AMH)水平, 以及卵巢病理学改变和各级卵泡数量。结果 与A组比较, 各给药组大鼠动情周期明显紊乱, 体质量明显下降, 血清AMH水平也有明显降低($P<0.05$), 其中E组下降最为明显; 各模型组大鼠卵巢各级卵泡数均有显著减少($P<0.05$), 其中E组、F组各级卵泡数量减少更为明显($P<0.01$)。结论 大鼠腹腔注射4 mg/kg CP, 间隔一周再次注射, 诱导化疗损伤性POF的造模效果更好, 造模方法简便。

[关键词] 顺铂; 腹腔化疗; 卵巢早衰; 抗苗勒氏管激素; 动物模型

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)02-0104-06

卵巢早衰(POF)是由多因素导致的卵巢功能提前减退的一种常见妇科内分泌疾病, 一般定义为女性在40岁以前因卵巢卵泡耗竭引起的闭经、不孕、雌激素过少和促性腺激素水平升高等^[1]。顺铂(cisplatin, CP)是腹腔化疗的常用药物, CP可

诱导卵巢细胞凋亡引起组织坏死, 从而导致卵巢功能早衰^[2]。关于CP腹腔注射建立POF大鼠模型, 目前文献^[3]中多采用小剂量连续注射或大剂量间隔注射。本实验旨在尝试不同时间点、不同剂量的CP腹腔注射, 以求建立更合适的POF大鼠模型, 以供实验研究使用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级未交配雌性Wistar大鼠50只, 8周龄, 体质量(220±10)g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2017-0005], 饲养于上海中医药大学附属普陀医院动物房[SYXK(沪)2013-0055]。予全价营养饲料, 保持室温在22~25℃, 相对湿度在35%~55%, 模拟正常昼夜生理节

[收稿日期] 2019-07-29

[基金项目] 上海市科委基金资助项目(18411970500); 上海市加强公共卫生体系建设三年行动计划(GWIV-26); 上海中医药大学附属普陀医院引进人才基金(2016317A); 上海中医药大学附属普陀医院重点专科建设项目(2016108A)

[作者简介] 董若曦(1994-), 女, 博士研究生。

E-mail: 2403425354@qq.com

[通信作者] 许文娟(1967-), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合妇产科学。

E-mail: farewelltoyou@126.com

律, 予 12 h 光照, 自由饮水和进食。所有动物实验研究均符合上海市普陀区中心医院实验动物伦理委员会有关动物研究指导原则 (伦理批号 PTEC-B-2017-9-3)。

1.2 主要试剂和设备

注射用 CP(冻干型)购自中国齐鲁制药有限公司生产, 注射前用 37 °C 生理盐水配成 1 mg/mL 的新鲜水溶液备用; 大鼠抗苗勒氏管激素(anti-Müllerian hormone, AMH) ELISA 试剂盒(EK-R30586)由 Abcam 公司生产, 上海酶研生物有限公司进口分装。Thermo Varioskan LUX 多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Leica EG1150 包埋机、Leica RM2235 切片机、Leica HI1210 摊片机、Leica HI1220 烘片机、Leica CV5030 全自动玻璃盖片机和 Leica ST5010 病理染色机均购自德国 Leica Biosystems Nussloch GmbH 公司; BX43 显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 大鼠行为学观察

造模后, 每日对比观察各组大鼠的精神状态、活动情况、被毛光泽、对外界的反应和进食量等情况。

1.4 大鼠体质量变化观测

自造模之日起, 每日对大鼠体质量进行称量并记录, 比较各组大鼠在造模各阶段的体质量变化情况。

1.5 大鼠动情周期观察

50 只雌性 Wistar 大鼠在适应性饲养 1 周后, 每日 8:00—9:00 阴道涂片法观察各组大鼠的动情周期, 持续 4 周。

大鼠完整的动情周期主要分为: 动情前期、动情期、动情后期和动情间期^[4]。动情前期: 大鼠处于卵泡发育期; 动情期间: 卵泡发育成熟并在动情期末排卵; 动情后期: 卵巢内黄体形成; 动情间期: 阴道涂片见大量白细胞及少量上皮细胞。大鼠正常的动情周期为 4~5 d^[5], 动情周期持续时间大于 5 d 或小于 4 d, 均被认为动情周期不正常。

1.6 动物分组、模型建立及给药

50 只雌性 Wistar 大鼠排除无明显动情周期 2 只, 共计 48 只大鼠进入实验。采用随机数字表法将大鼠分为 6 组, 每组 8 只(表 1)。

表 1 动物分组及给药方案

组 别	给药方案(腹腔注射)
A(对照)	无处理
B(小剂量 1 组)	1.5 mg/kg 每日 1 次, 连续 5 d
C(小剂量 2 组)	2.0 mg/kg 每日 1 次, 连续 5 d
D(小剂量 3 组)	2.5 mg/kg 每日 1 次, 连续 5 d
E(大剂量 1 组)	4.0 mg/kg, 隔周注射 1 次, 共 2 次
F(大剂量 2 组)	4.0 mg/kg 注射 1 次, 隔周予 6.0 mg/kg 注射 1 次, 共 2 次

1.7 动物处理及留取标本

各组大鼠于造模结束后 24 h 称重, 腹腔注射 0.6 mL 戊巴比妥那进行麻醉, 腹主动脉取血处死。血液收集于 15 mL 离心管中, 室温下静置 2 h 后, 3 000 r/min 离心 15 min。分装血清, 每 500 μ L 一管, -80 °C 冰箱冻存。腹主动脉取血后, 取大鼠双侧卵巢, 将周围脂肪组织剥离干净, 一侧卵巢置于冻存管中, 置于 -80 °C 冰箱冻存。另一侧卵巢用质量分数 4% 的多聚甲醛溶液固定至少 24 h 后, 洗涤, 依次梯度乙醇脱水, 于二甲苯中透明 15 min, 石蜡包埋后切片, 烤干, 脱蜡后再依次梯度乙醇脱水, 苏木精对比染色, 盐酸乙醇分化, 行 HE 染色。光学显微镜下观察不同组别卵巢组织的病理学改变, 计算卵泡内各级卵泡的数量。双盲法评定, 随机选取 5 个不同的视野, 计算卵泡数量。

1.8 血清 AMH 浓度测定

按试剂盒说明书操作。

1.9 统计学方法

统计学分析均使用 SPSS 21.0 软件, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示各组计量资料, 多样本均数比较采用单因素方差分析。先检查数据是否符合正态分布, 符合正态分布时, 均数间两两比较采用 *t* 检验; 当两组之间方差齐时, 则使用 LSD 检验; 当方差不齐时, 采用 Games-Howell 检验。当 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验前后对比, 对照组大鼠无明显异常表现, 精神状态良好, 进食量无明显变化, 活动敏捷, 皮毛光滑。予 CP 腹腔注射的各组大鼠, 随着给药时间

的推移,绝大部分进食逐渐减少,形体逐渐消瘦,反应迟钝,对外界反应淡漠,皮毛暗淡,毛发蓬松。至给药结束时,6组大鼠均未出现死亡。

2.2 动情周期变化情况

如图所示,动情前期涂片可见较多有核上皮细胞,少见白细胞和角化上皮细胞,背景较暗淡,杂质相对较多(图 1A);动情期涂片可见满视野角化上皮细胞,背景较清晰(图 1B);动情后期白细胞、不规则角化上皮细胞和有核上皮细胞均

可见,白细胞相对较多,背景较清晰(图 1C);动情间期,涂片以白细胞为主,细胞体积小,偶见极少量的有核上皮细胞和角化上皮细胞,白细胞颜色较深(图 1D)。剔除无规律动情周期的大鼠 2 只后,各组大鼠 CP 腹腔注射前动情周期规律,周期一般为 4~5 d。用药后,A 组大鼠动情周期无明显变化,而 CP 腹腔注射各组大鼠动情周期均出现紊乱,周期延长至 8~11 d,甚至无明显动情周期。

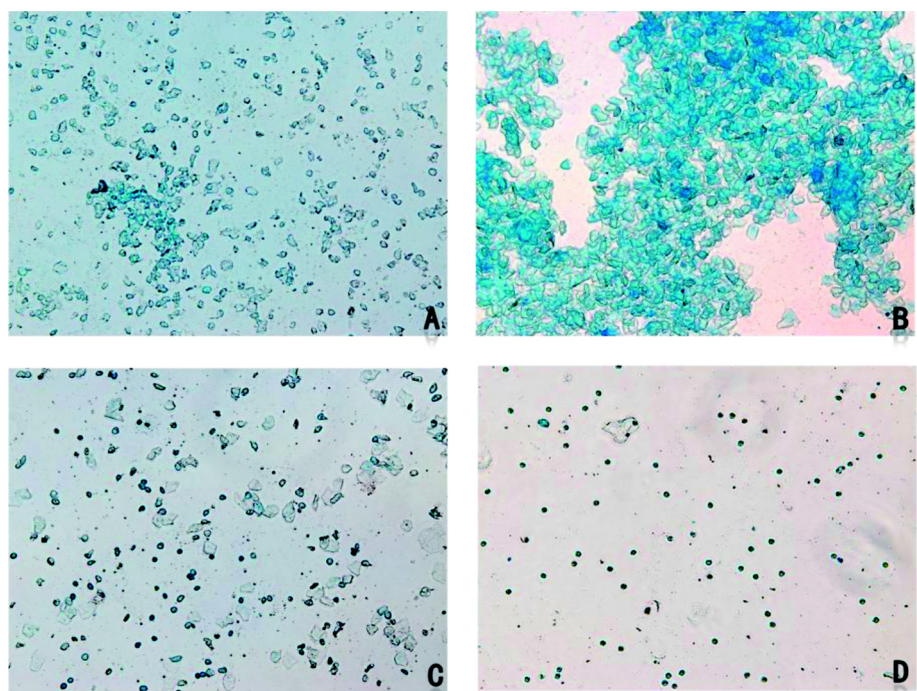


图 1 大鼠动情周期涂片(亚甲蓝染色, × 40)

2.3 体质量变化情况

造模结束后,各给药组大鼠体质量均低于对照组($P<0.05$)。其中小剂量给药组(B、C、D 组)组间比较,大鼠体质量差异无统计学意义,与大剂量给药组(E、F 组)比较,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 2)。

2.4 不同剂量 CP 腹腔注射对大鼠血清 AMH 指标的影响

与 A 组比较,腹腔注射不同剂量 CP 的各组大鼠血清的 AMH 含量均有不同程度降低,其血清 AMH 含量组间差异显著,证明造模成功,E 组和 F 组的 AMH 下降更为明显(表 3)。

表 2 各组大鼠体质量变化情况 (g)			
组别	n	腹腔注射前	腹腔注射后
A 组	8	209.75 ± 4.46	242.25 ± 4.59
B 组	8	208.25 ± 5.70	175.50 ± 8.05**
C 组	8	211.00 ± 4.78	175.25 ± 4.53**
D 组	8	210.50 ± 3.96	177.00 ± 5.55**
E 组	8	210.00 ± 4.41	204.25 ± 5.90***
F 组	8	210.25 ± 3.28	208.25 ± 13.37***
P 值		>0.05	<0.05

注:与 A 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 B 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 下表同

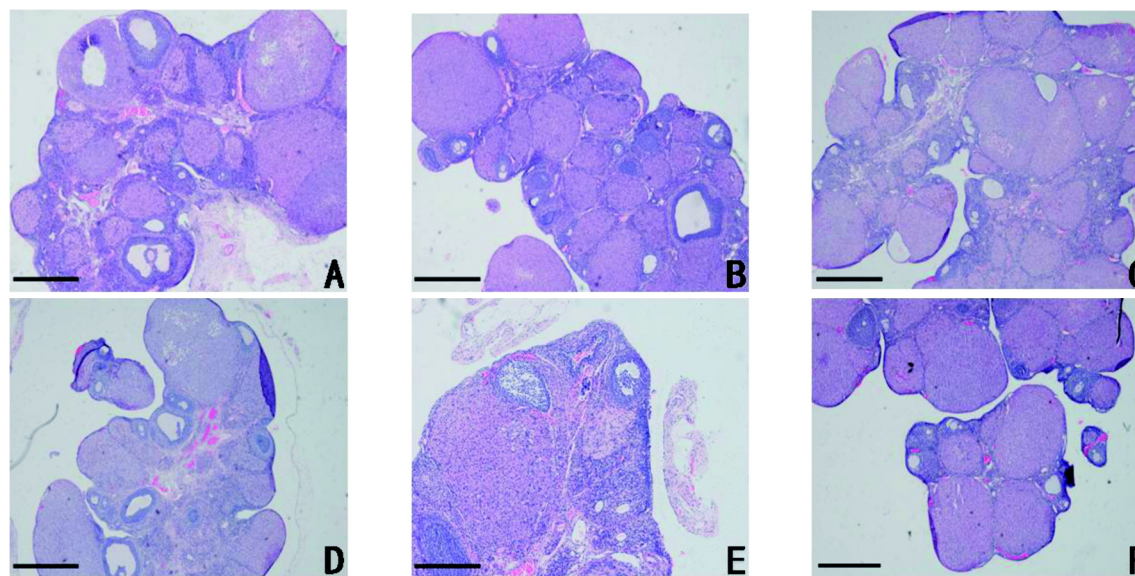
表 3 各组大鼠血清AMH变化情况 (μg/L)

组别	AMH 含量
A 组	1.63 ± 0.06
B 组	1.31 ± 0.08**
C 组	1.21 ± 0.19**
D 组	1.17 ± 0.20**
E 组	0.77 ± 0.16**
F 组	0.83 ± 0.11**

2.5 卵巢病理学改变及各级卵泡数

2.5.1 各组大鼠卵巢大体肉眼观 A 组大鼠卵巢形态正常, 卵巢周围可见光亮脂肪包绕, 表面光

滑, 无明显异常改变; 各 CP 腹腔注射组可见卵巢体积明显缩小, 脂肪组织减少, 卵巢颜色变深, 表面粗糙。部分大鼠卵巢可见有紫红色坏死灶。
2.5.2 各组大鼠卵巢组织病理学改变 镜下观测 A 组大鼠卵巢切片: 卵巢皮、髓质结构清晰, 可见原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、黄体分布。各期卵泡的形态和数量正常, 血管丰富(图 2A)。各 CP 腹腔注射给药组大鼠卵巢切片: 卵巢萎缩, 各期卵泡数均明显减少, 其中生长卵泡和成熟卵泡的数量下降明显, 甚至消失, 可见黄体退化等(图 2B~F)。



A~F 为组别

图 2 各组大鼠卵巢组织病理改变(HE, 比例尺 100 μm)

2.5.3 各组大鼠卵巢各级卵泡计数 与 A 组相比, 各组给药组大鼠卵巢总卵泡数均有显著下降 ($P < 0.05$), 但腹腔注射 CP 小剂量组与 A 组相比, 原始卵泡降低水平不如腹腔注射 CP 高剂量组。原始卵泡数: 与 A 组相比, B 组卵泡数 $P < 0.05$, 其余组 $P < 0.01$, 均有统计学意义; 但 CP 腹腔注射小剂量组与 A 组相比, 原始卵泡降低水平不如 CP 腹腔注射高剂量组。生长卵泡数: 与 A 组相比, 各组大鼠卵巢生长卵泡数均有显著下降, $P < 0.01$, 有统计学意义。但 CP 腹腔注射小剂量组与 A 组相比, 原始卵泡降低水平不如 CP 腹腔注射高剂量组。成熟卵泡数: 与 A 组相比, B

组和 C 组, $P < 0.05$, 其余组 $P < 0.01$, 有统计学意义; CP 腹腔注射小剂量组与 A 组相比, 成熟卵泡降低水平不如 CP 腹腔注射高剂量组(表 4)。

3 讨论

POF 在临床上有多种致病因素, 最主要的相关因素有: 老龄化、妇科手术、放化疗、吸烟、感染、遗传、环境因素及免疫抑制剂和自身免疫性疾病等^[6-7]。医源性因素主要是指化疗、放疗及手术对卵巢的损伤^[8]。化疗损伤是医源性卵巢功能衰退的主要原因。CP 作为妇科常用的

表 4 各组大鼠卵巢内各期卵泡数

组别	原始卵泡	生长卵泡	成熟卵泡	总卵泡数
A 组	36.88 ± 2.42	27.50 ± 2.07	14.75 ± 1.75	79.13 ± 3.00
B 组	34.13 ± 1.46*	24.38 ± 2.00*	13.13 ± 1.73 [△]	71.63 ± 3.25**
C 组	29.38 ± 2.97**	21.38 ± 2.62**	11.25 ± 1.83 [△]	62.00 ± 3.63**
D 组	25.75 ± 2.77**	19.00 ± 2.20**	9.50 ± 0.92**	54.38 ± 3.46**
E 组	19.25 ± 2.25**	15.88 ± 1.36**	6.00 ± 1.20**	41.13 ± 1.89**
F 组	20.50 ± 2.39**	15.50 ± 2.07**	5.88 ± 1.64**	41.88 ± 2.70**

化疗药物,已被广泛应用于各种腹腔化疗中。研究^[9]表明,CP在多种癌症治疗过程中均表现出优良的抗肿瘤活性,但CP亦可对卵巢产生损伤作用,进而诱发POF。

关于POF的动物模型,目前国际上尚无通用的标准,多用雷公藤多苷、环磷酰胺、CP等制作POF模型^[10],造模剂量各有不同,且选用的造模持续时间也有较大差异。本实验旨在用不同剂量的CP行腹腔注射不同时间点,以建立更适宜的大鼠化疗损伤性POF模型。AMH是转化生长因子 β (TGF- β)超家族成员之一,由卵巢窦前卵泡和小窦卵泡的颗粒细胞分泌产生。AMH水平不受下丘脑-垂体-卵巢轴的调控,具有良好的周期性和周期稳定性^[11],近年来被认为是能更直接地反映卵巢储备功能的指标。

综上所述,POF的病因主要是原始卵泡储备过少,卵泡闭锁或耗竭太快^[12]。本实验研究了CP不同时间、不同剂量腹腔注射后大鼠的一般情况、动情周期变化、卵巢病理学、卵泡数量及体内激素水平等变化,为模拟化疗损伤性POF提供了详细的大鼠动物模型参考。从本实验结果可以看出,CP腹腔注射不同的剂量后,各组大鼠体质量均明显下降,呈不同程度的蜷缩不喜动、进食量下降,被毛晦暗无光泽等,整体状态较差。此外,阴道涂片也显示大鼠动情周期紊乱;血清AMH指标显著降低,各级卵泡数明显下降。其中,CP腹腔连续注射小剂量3组(B、C、D组),对大鼠体质量和血清AMH及卵泡数量的影响不如CP腹腔注射大剂量组效果好;CP腹腔注射大剂量2组中的E组,即间隔1周2次CP 4 mg/kg腹腔注射的造模方式,其大鼠的体质量变化、血清AMH、卵巢病理切片、及卵泡数量下降最为明显,各级卵泡分布更加均衡,成模更

理想,卵巢组织的病理学改变与临床病理更为一致,可认为是更适宜的POF造模方法。

参考文献:

- [1] Alvaro Mercadal B, Imbert R, Demeestere I, et al. AMH mutations with reduced *in vitro* bioactivity are related to premature ovarian insufficiency[J]. Hum Reprod, 2015, 30(5):1196-1202.
- [2] 丁艳,张静,陶然,等.顺铂治疗导致卵巢早衰的研究进展[J].基础医学与临床,2018,38(6):845-848.
- [3] Yeh J, Kim B, Liang YJ, et al. Müllerian inhibiting substance as a novel biomarker of cisplatin-induced ovarian damage [J].Biochem Biophys Res Commun, 2006, 348(2):337-344.
- [4] 魏泓.医学实验动物学[M].成都:四川科学技术出版社,1998:164-165.
- [5] 施新猷.现代医学实验动物学[M].北京:人民军医出版社,1999:17-58.
- [6] Aikawa NE, Sallum AM, Pereira RM, et al. Subclinical impairment of ovarian reserve in juvenile systemic lupus erythematosus after cyclophosphamide therapy[J]. Clin Exp Rheumatol, 2012, 30:445-449.
- [7] Ostensen M, Brucato A, Carp H, et al. Pregnancy and reproduction in autoimmune rheumatic diseases[J]. Rheumatology (Oxford), 2011, 50(4):657-664.
- [8] 唐华均,李成志.卵巢早衰的病因及治疗进展[J].重庆医学,2018,47(13):1777-1780.
- [9] 艾浩,牛建昭,薛晓鸥,等.顺铂致小鼠卵巢功能早衰肝肾阴虚证机制研究[J].北京中医药大学学报,2006,29(6):401-403.
- [10] 刘益枫.四种药物致卵巢早衰小鼠模型的构建及比较[A].中国中西医结合学会妇产科专业委员会,2016.
- [11] La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, et al. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle [J]. Hum Reprod, 2006, 21(12):3103-3107.
- [12] 徐文君,高慧,李杨,等.和颜坤泰胶囊对卵巢早衰大鼠性激素水平和VEGF、bFGF mRNA表达的影响[J].重庆医学,2017,46(6):738-741.

Intraperitoneal Injection in Different Dosages of Cisplatin to Establish a Rat Model of Premature Ovarian Failure Induced by Chemotherapy

Dong Ruoxi¹, Zhu Xiaodan^{2,3}, Fan Bozhen^{2,3}, Xu Wenjuan^{2,3}

(1. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine,

Shanghai 200032, China; 2. Department of Gynecology, Putuo Hospital, Shanghai

University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China;

3. Putuo Central Medical College, Anhui Medical University, Shanghai 200062, China)

[Abstract] Objective To investigate a method for establishing a rat model of chemotherapy-induced premature ovarian failure (POF) in rats by intraperitoneal injection with different dosages of cisplatin. **Method** Forty-eight unfertile female Wistar rats were randomly divided into 6 groups, with 8 rats in each group. Different doses of cisplatin were injected intraperitoneally at different time points including: ① control group (group A) without treatment, ② cisplatin intraperitoneal small dose injection group 1 (group B) (1.5 mg/kg once daily for 5 days), ③ cisplatin intraperitoneal small dose injection group 2 (group C) (2.0 mg/kg once daily for 5 days), ④ cisplatin intraperitoneal small dose injection group 3 (group D) (2.5 mg/kg once daily for 5 days), ⑤ cisplatin intraperitoneal high dose injection group 1 (group E) (4 mg/kg once in a week, after a week, re-injection, on total for twice) and ⑥ cisplatin intraperitoneal high dose injection group 2 (group F) (4 mg/kg once in a week, after a week, re-injection for 6 mg/kg, on total for twice), to establish a rat model of chemotherapy-induced injury POF. The general condition, estrous cycle, body weight changes, serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels, ovarian pathological changes, and number of follicles at various levels were observed. **Result** Compared with the control group (group A): the estrous cycle of the rats in each group was significantly disordered, the body weight and serum AMH levels were significantly decreased ($P<0.05$), in which, the group E was decreased most obviously. The number of follicles in the ovary of each group was also significantly decreased ($P<0.05$), but the number of follicles in the groups E and F was more significantly decreased. **Conclusion** Rats can be injected intraperitoneally with 4 mg/kg cisplatin once a week, at intervals of one week, for two weeks. This model method of chemotherapy-induced POF is more effective, and the method of modeling is simple.

[Key words] Cisplatin; Intraperitoneal chemotherapy; Premature ovarian failure; Anti-Müllerian hormone; Animal model