

乔诗清,王停,闫永煌,等. 非肥胖型多囊卵巢综合征大鼠模型的建立及评价研究[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(8): 965-975.

QIAO S Q, WANG T, YAN Y H, et al. Establishment and evaluation of non-obese polycystic ovary syndrome rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(8): 965-975.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.08.002

非肥胖型多囊卵巢综合征大鼠模型的建立及评价研究

乔诗清¹, 王停^{2,3,4}, 闫永煌², 杨九思², 余钰玲², 王砚敏², 孙亚腾², 吴宇杰⁵,
朱佩轩⁵, 李敏³, 陈聪¹, 苏泽琦^{3,4}, 张偲^{3*}

(1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 3. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 102488; 4. 国家中医药管理局名医名方重点实验室, 北京 102488; 5. 北京中医药大学中医学院, 北京 102488)

【摘要】 目的 建立符合临床特征的、稳定的非肥胖型多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 大鼠模型。**方法** 采用脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 皮下注射法建立 PCOS 大鼠模型。将 3 周龄雌性 SD 大鼠分为正常组、6 mg/kg DHEA 造模组、60 mg/kg DHEA 造模组, 造模组每日按照相应剂量进行 DHEA 皮下注射, 正常组每日给予甘油皮下注射, 连续 21 d, 以卵巢组织病理学为金标准进行模型评价, 明确 DHEA 致 PCOS 大鼠模型的最佳造模剂量。在此基础上, 选取 DHEA 最佳造模剂量, 分别设立停止造模组和继续造模组, 进行 28 d 的模型观察, 考察模型维持情况, 其中停止造模组不再继续给予 DHEA, 继续造模组每 48 h 给予 60 mg/kg DHEA 皮下注射。评价指标包含大鼠体重、动情周期、空腹血糖和血清胰岛素、卵巢组织病理形态和血清性激素水平。**结果** (1) 与正常组相比, 6 mg/kg DHEA 造模组与 60 mg/kg DHEA 造模组体重无显著性差异, 但二者动情周期均失去规律性, 卵巢组织中可见较多囊状扩张的大卵泡, 少见成熟卵泡, 颗粒细胞层数减少且排列稀疏无序, 黄体数量减少; 且 60 mg/kg DHEA 造模组血清 T、E₂ 水平显著升高 ($P < 0.05$)。 (2) 停止造模组: 模型组 (A₂ 组) 与正常组 (A₁ 组) 相比, 两周后恢复规律的动情周期, 卵巢组织中可见各级生长卵泡和黄体, 囊性卵泡减少, 颗粒细胞层数增加, 可见成熟卵泡, 卵母细胞局部形态完整, 且 E₂、AMH 水平降低 ($P < 0.05$)。 (3) 继续造模组: 模型组 (B₂ 组) 与正常组 (B₁ 组) 相比, 长期处于动情后期, 卵巢组织中可见较多囊状扩张的大卵泡, 少见成熟卵泡, 颗粒细胞层数减少且排列稀疏无序, 黄体数量明显减少, 血清 LH、LH/FSH、T 水平升高 ($P < 0.05$)。**结论** 连续 21 d 皮下注射 60 mg/kg DHEA, 能够成功构建符合临床特征的非肥胖型 PCOS 大鼠模型, 在此基础上每 48 h 给予 60 mg/kg DHEA 皮下注射能够保持模型的稳定性。

【关键词】 非肥胖型多囊卵巢综合征; 脱氢表雄酮; 大鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 08-0965-11

Establishment and evaluation of non-obese polycystic ovary syndrome rat model

QIAO Shiqing¹, WANG Ting^{2,3,4}, YAN Yonghuang², YANG Jiushi², YU Yuling², WANG Yanmin², SUN Yateng²,
WU Yujie⁵, ZHU Peixuan⁵, LI Min³, CHEN Cong¹, SU Zeqi^{3,4}, ZHANG Cai^{3*}

【基金项目】 国家科技重大专项“重大新药创制”项目 (2017ZX09301011), 中西医结合周期疗法治疗多囊卵巢综合征方案的制订及培训 (BUCM-2021-JS-FW-103), 北京中医药大学“解码中医”协同攻关项目 (90010961020020)。

Funded by National Science and Technology Major Project “Creation and Production of Major New Drugs” (2017ZX09301011), Development and Training of a Program for the Treatment of Polycystic Ovary Syndrome by Combining Traditional Chinese and Western Medicine With Cyclic Therapy (BUCM-2021-JS-FW-103), Collaborative Research Project “Decoding Chinese Medicine” of Beijing University of Chinese Medicine (90010961020020).

【作者简介】 乔诗清, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治妇科疾病的研究。Email: 1911148135@qq.com

【通信作者】 张偲, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 名老中医经验传承及中药药理学研究。Email: zhangcai6789@sina.com

(1. College of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. College of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 3. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 4. Key Laboratory of Famous Doctors and Famous Prescriptions of National Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 5. College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Corresponding author: ZHANG Cai. E-mail: zhangcai6789@sina.com

[Abstract] Objective To establish a stable rat model of non-obese polycystic ovary syndrome (PCOS) with clinical characteristics. **Methods** Dehydroepiandrosterone (DHEA) was used to establish a PCOS rat model by subcutaneous injection. Three-week-old female SD rats were divided into a normal group, 6 mg/kg DHEA model group, and 60 mg/kg DHEA model group. The model groups were subcutaneously injected with the corresponding dose of DHEA daily, while the normal group was subcutaneously injected with glycerol daily for 21 consecutive days. The model was evaluated with ovarian histopathology as the gold standard to determine the optimal dosage of DHEA to induce a PCOS rat model. On this basis, the optimal DHEA modeling dose was selected, and stop and continue modeling groups were set up to observe the model for 28 days and evaluate its maintenance. The stop modeling group was no longer given DHEA, and the continued modeling group was subcutaneously injected with 60 mg/kg DHEA every 48 h. The evaluation indicators included body mass, estrous cycle, fasting blood glucose, serum insulin, histopathologic morphology of the ovaries, and serum sex hormone levels. **Results** (1) Compared with the normal group, the 6 mg/kg and 60 mg/kg DHEA model groups showed no significant difference in body mass, and their estrous cycles were irregular. There were more cystically dilated large follicles in the ovaries; fewer mature follicles; reduced layers of granulosa cells, which were arranged in a sparse and disorganized manner; and fewer lutea in the 6 mg/kg and 60 mg/kg DHEA model groups than the normal group. Furthermore, serum T and E2 levels were significantly higher in the 60 mg/kg DHEA model group ($P < 0.05$) than the normal group. (2) The stop modeling group (A_2 group) resumed regular estrous cycles after 2 weeks, various growth follicles and corpora lutea were observed in the ovarian tissues, the number of cystic follicles was reduced, the number of granulosa cell layers increased, mature follicles were visible, oocyte morphology was locally intact, and the levels of E₂ and AMH were reduced compared with the normal group (A_1 group) ($P < 0.05$). (3) The continue model group (B_2 group) was in the late stage of estrous cycle for a long period, and there were more large follicles with cystic dilatation, fewer mature follicles, fewer layers of granulosa cells with a sparse and disordered arrangement, and significantly fewer corpus lutea in the ovaries compared with the normal group (B_1 group). The levels of serum LH, LH/FSH, and T were elevated ($P < 0.05$). **Conclusions** Subcutaneous injection of 60 mg/kg DHEA for 21 consecutive days can be used to successfully construct a non-obese PCOS rat model that possesses clinical characteristics. Subcutaneous injection of 60 mg/kg DHEA every 48 hours maintains the stability of the model.

[Keywords] non-obese polycystic ovary syndrome; dehydroepiandrosterone; rat model
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种以月经异常如稀发排卵或无排卵、高雄激素血症的临床表现和/或高雄激素血症以及卵巢多囊样改变为主要特征的女性内分泌紊乱性疾病^[1]。根据患者体重指数 (body mass index, BMI), 将 BMI ≥ 28 kg/m² 者归为肥胖型 PCOS, 将 BMI < 28 kg/m² 者归为非肥胖型 PCOS^[2]。流行病学调查显示, PCOS 群体患病率为 6% ~ 10%, 其中非肥胖型 PCOS 发病率占 PCOS 总发病人群的 30% ~ 50%^[3-4], 目前相关研究更多的关注到肥胖型 PCOS, 对非肥胖型 PCOS 研究较少, 故而现阶段仍然缺少符合临床特征的、稳定的非肥胖型 PCOS 动

物模型^[5-6]。脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 是最主要的肾上腺源性雄激素, 可直接导致雄激素水平增高, 进而导致卵泡发育停滞, 出现排卵障碍以及卵巢多囊样改变。有研究显示相较于来曲唑法、戊酸雌二醇法、胰岛素联合人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 法以及孕激素联合 hCG 法等, DHEA 造模法能够维持 PCOS 大鼠体重的稳定性^[7-8], 但其具体的造模条件和评价指标尚未明确统一, 因此本研究在已发表文献的基础上, 拟采用 DHEA 皮下注射法构建非肥胖型 PCOS 大鼠模型, 以期探讨符合临床表现的、稳定的、可复

制的非肥胖型 PCOS 大鼠模型的构建方法,为后续发病机制研究和药效作用机制研究提供有效载体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

3 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 42 只,体重 90 ± 10 g,由北京斯贝福生物技术有限公司提供【SCXK(京)2019-0010】,饲养于北京中医药大学良乡校区动物实验中心【SYXK(京)2023-0011】,SPF 级环境的温度 $20 \sim 24$ °C,相对湿度 30% ~ 70%,明暗节律 12 h/12 h,动物自由进食、饮水。本研究经北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会批准(BUCM-2023032707-1171)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DHEA(北京酷来搏科技有限公司,CD32193820);甘油(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,#F2223121);改良吉姆萨染液(上海碧云天生物技术有限公司,080422221031);大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒(瑞典 Mercodia 公司,33553);大鼠黄体生成素(luteinizing hormone, LH) ELISA 试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司,L230328183);大鼠卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH) ELISA 试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司,L230719565);大鼠雌二醇(estradiol, E_2) ELISA 试剂盒(美国 Raybiotech 公司,1118227068);大鼠孕酮(progesterone, P) ELISA 试剂盒(美国 Raybiotech 公司,1118227069);大鼠睾酮(testosterone, T) ELISA 试剂盒(美国 SAB 公司,3B289L);大鼠抗苗勒氏管激素(anti-mullerian hormone, AMH) ELISA 试剂盒(美国 SAB 公司,230228)。血糖仪(卓越金采型, Roche, 瑞士);全波长酶标仪(Multiskan GO, Thermo, 美国);正置光学显微镜(ECLIPSE E100, NIKON, 日本);万分之一电子天平(ME204, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备及分组

(1)DHEA 注射液的配置:本研究综合文献报道及前期研究基础^[9],选取 6 mg/kg DHEA 和 60 mg/kg DHEA 2 个剂量进行造模,按 $0.2 \text{ mL}/100 \text{ g}$ 体重皮下注射剂量计算,以甘油为溶剂,其中 6 mg/kg DHEA 配置浓度为 3 mg/mL , 60 mg/kg DHEA 配置浓度为 30 mg/mL 。

(2)非肥胖型 PCOS 大鼠模型制备方法:3 周龄 SD 大鼠适应性饲养 5 d,按照体重将大鼠随机分为正常组、6 mg/kg DHEA 造模组(6 mg/kg 组)和 60 mg/kg DHEA 造模组(60 mg/kg 组),每组各 6 只,造模组每日按照相应剂量进行 DHEA 皮下注射,正常组每日给予甘油皮下注射,连续 21 d,明确造模最佳剂量。

(3)停止造模与继续造模模型稳定性评价实验分组:3 周龄 SD 大鼠适应性饲养 5 d,按照体重将大鼠随机分为停止造模正常组(A_1 组)、停止造模模型组(A_2 组)、继续造模正常组(B_1 组)和继续造模模型组(B_2 组),每组各 6 只,根据上述实验的结果选取 60 mg/kg DHEA 造模,通过连续 21 d 的 DHEA 皮下注射建立非肥胖型 PCOS 大鼠模型,随后继续观察 28 d。在此期间,停止造模组(A_1 组、 A_2 组)不再给予造模因素,继续造模组(B_1 组、 B_2 组)继续皮下注射 14 d,其中 B_2 组每 48 h 给予 60 mg/kg DHEA 皮下注射, B_1 组按体重给予等体积甘油,观察期结束后采集样本并进行模型稳定性评价(实验技术路线见图 1)。

1.2.2 评价方法

(1)大鼠体重比较:每 7 d 对各组大鼠体重进行称量和记录,绘制大鼠体重变化曲线。

(2)大鼠动情周期观察:各组大鼠在注射 DHEA 或甘油 10 d 后,每日进行大鼠阴道脱落细胞涂片,吉姆萨染色后观察阴道脱落细胞形态,记录并监测大鼠动情周期。连续阴道涂片检查 2 个性周期(4 ~ 5 d 为 1 个性周期),观察到大鼠长期处于动情后期或动情间期,则表示造模成功(判定方法见图 2)。

(3)空腹血糖及血清胰岛素检测:禁食 12 h,经尾静脉采血测量大鼠空腹血糖,1%戊巴比妥钠($0.5 \text{ mL}/100 \text{ g}$)腹腔麻醉后腹主动脉取血,于 4 °C、 3500 r/min 离心 15 min 后取上清, -80 °C 冰箱保存备用。ELISA 法检测血清中胰岛素的表达水平。在 450 nm 处获得 OD 值,并进行定量统计分析。

(4)卵巢组织苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色:取出大鼠双侧卵巢制备 $4 \mu\text{m}$ 石蜡切片,HE 染色后在光学显微镜下观察各组大鼠卵巢组织形态。参考 PCOS 病理学观察相关文献^[10],在 4 倍视野下,计数初级卵泡、次级卵泡和三级卵泡数量,3 种卵泡数量之和作为正常卵泡数量,分别统计各组囊性卵泡及黄体的数量,并对相关数据进行定量统计分析。

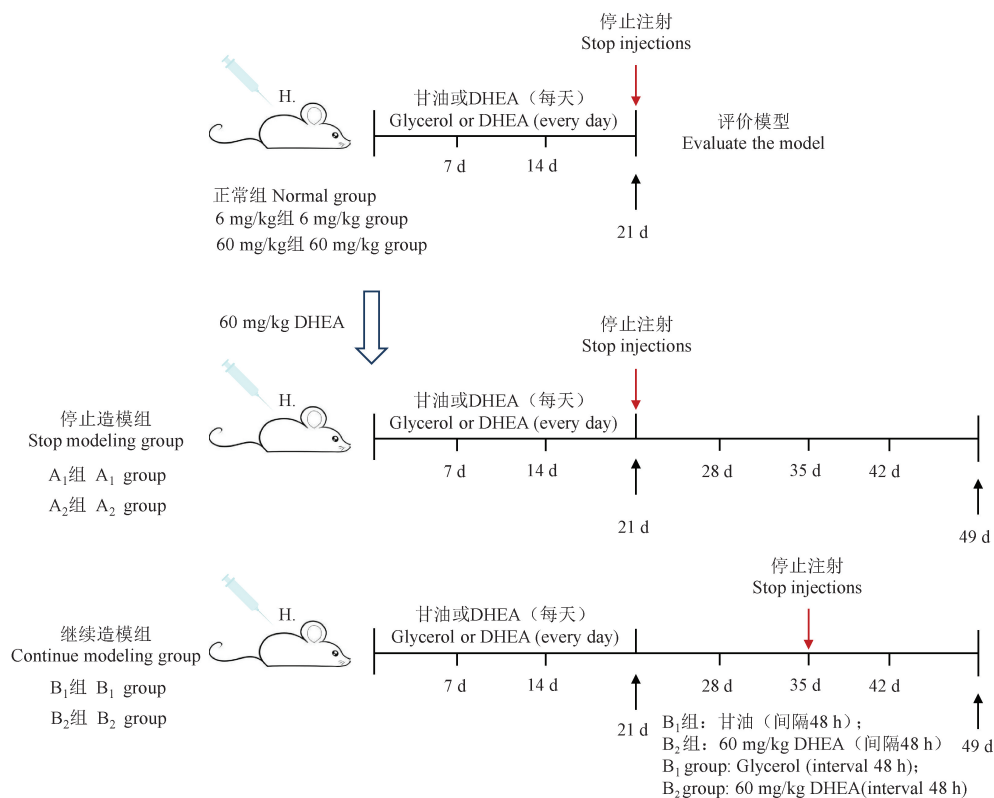


图 1 动物分组及模型制备方法

Figure 1 Animal grouping and model preparation methods

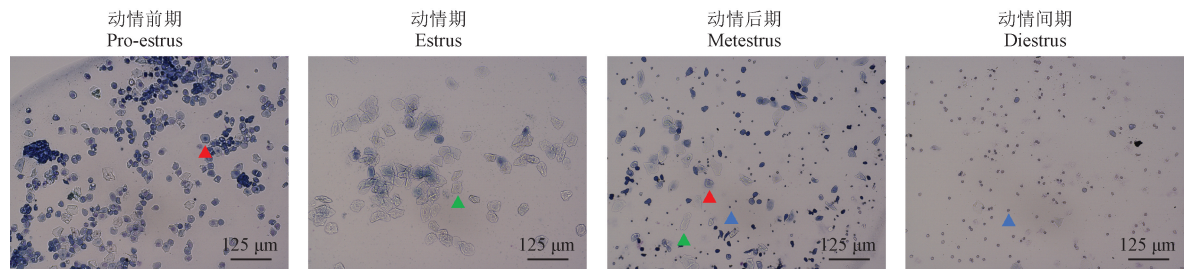


图 2 大鼠阴道脱落细胞观察

Figure 2 Smears observation of vaginal exfoliated cell of rats

(5)血清性激素检测:采用 ELISA 法检测血清性激素 LH、FSH、T、E₂、P、AMH 的表达水平。并进行定量统计分析。

1.3 统计学分析

本研究实验数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,GraphPad Prism 8.0 软件制图,计量资料统计结果以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。对数据进行正态性检验、方差齐性检验,当数据同时满足正态分布及方差齐性时,采用 ANOVA 单因素方差分析,组间比较采用 LSD 法进行分析;方差不齐采用 Dunnett's T3 检验;若统计资料不符合正态分布,组

间比较采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。以检验水平 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 DHEA 不同注射剂量对模型的影响

2.1.1 大鼠体重比较

DHEA 连续注射 21 d,各组大鼠体重稳定增加,与正常组相比,造模组体重均未见显著性差异($P > 0.05$)(见图 3)。

2.1.2 大鼠动情周期变化

正常组大鼠保持规律的动情周期,每个周期为

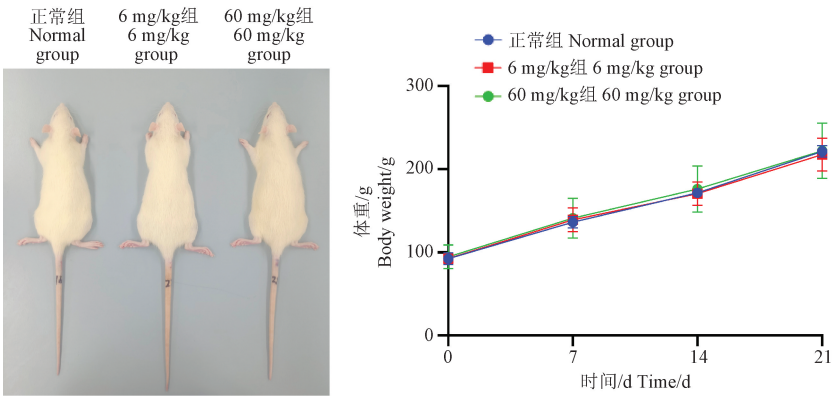


图 3 各组大鼠体重比较($n = 6$)

Figure 3 Body weight of rat($n = 6$)

4 ~ 5 d, 6 mg/kg 与 60 mg/kg 组大鼠动情周期均发生紊乱, 且 60 mg/kg 组大鼠动情周期紊乱明显, 动情期少见, 长期处于动情后期(见图 4)。

2. 1. 3 大鼠空腹血糖及血清胰岛素水平比较

DHEA 连续注射 21 d 后, 各组空腹血糖及血清胰岛素水平的比较均无显著性差异($P > 0.05$)(见图 5)。

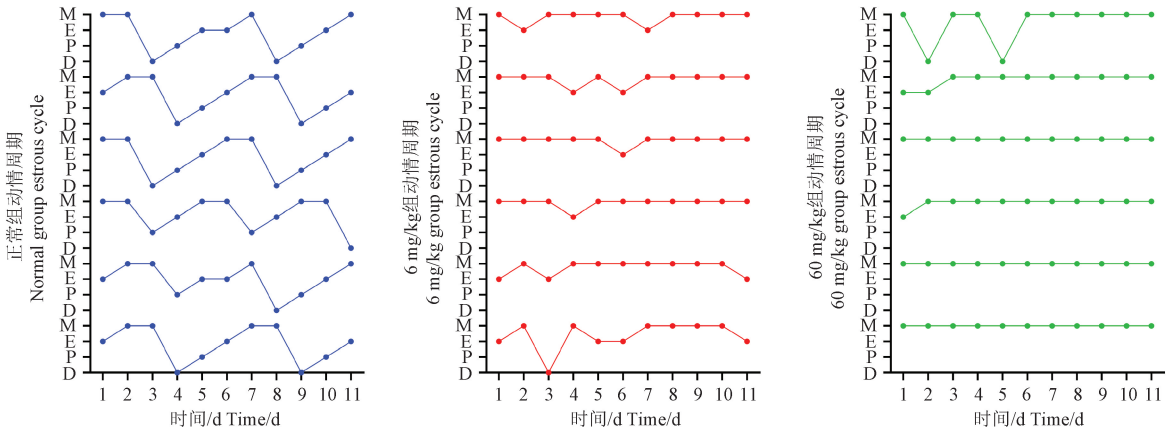


图 4 各组大鼠动情周期变化曲线($n = 6$)

Note. D. Diestrus. P. Pro-estrus. E. Estrus. M. Metestrus. (The same in the following figure)

Figure 4 Estrus cycle variation curves of rats in each group($n = 6$)

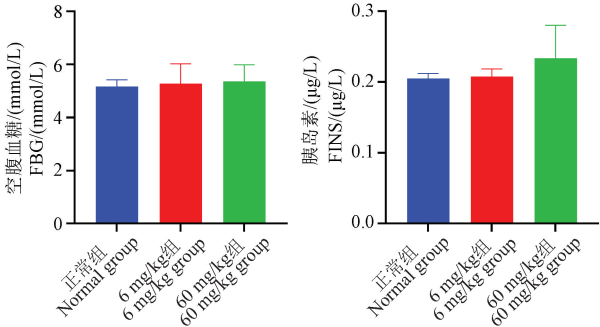


图 5 各组大鼠空腹血糖及血清胰岛素水平比较($n = 6$)

Figure 5 Comparison of fasting blood glucose and serum insulin levels of rats in each group($n = 6$)

2. 1. 4 大鼠卵巢组织病理形态学变化

正常组大鼠卵巢组织可见不同发育阶段的卵泡及成熟卵泡, 成熟卵泡内可见卵母细胞、卵丘和

放射冠, 颗粒细胞多层排列, 结构整齐, 黄体数量较多, 少见囊状扩张卵泡。造模组卵巢中均少见发育成熟的卵泡, 卵泡呈明显囊性扩张, 出现大量体积较大的空囊腔, 颗粒细胞层数明显减少, 排列稀疏无序, 黄体数量减少(见图 6)。

2. 1. 5 大鼠血清性激素水平的比较

与正常组相比, 6 mg/kg 组大鼠血清 LH、FSH、LH/FSH、T、E₂、P、AMH 水平均无统计学意义($P > 0.05$); 60 mg/kg 组大鼠血清 T、E₂ 水平升高($P < 0.05$), LH、FSH、LH/FSH、P、AMH 水平无统计学意义($P > 0.05$)(见图 7)。

2. 2 停止造模与继续造模模型稳定性评价

2. 2. 1 大鼠体重比较

与 A₁ 组相比, A₂ 组体重未见显著性差异($P >$

0.05);与B₁组相比,B₂组体重未见显著性差异($P > 0.05$)(见图8)。

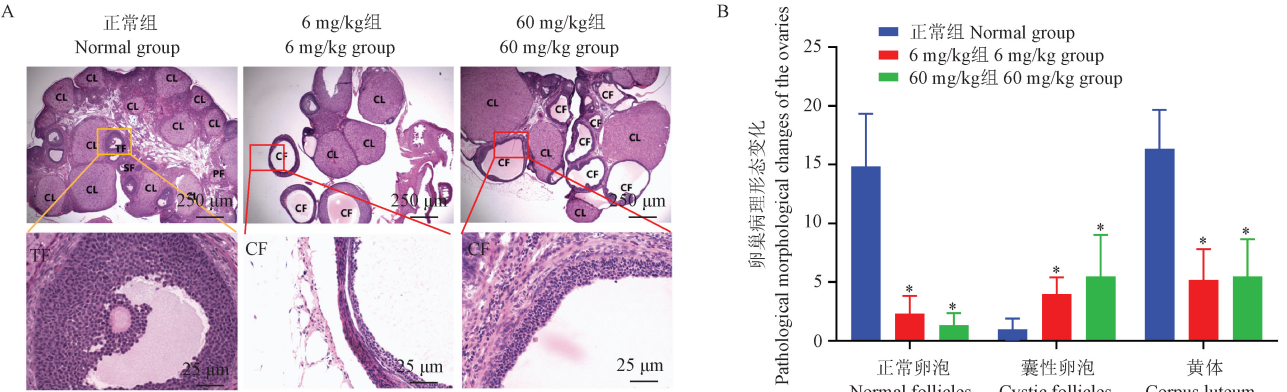
2.2.2 大鼠动情周期变化

A₁组、B₁组大鼠均保持规律的动情周期,A₂组大鼠在14 d后逐渐恢复规律的动情周期,B₂组大鼠

失去规律的动情周期,长期处于动情后期(见图9)。

2.2.3 大鼠空腹血糖及血清胰岛素水平比较

与A₁组相比,A₂组大鼠空腹血糖及血清胰岛素水平未见显著性差异($P > 0.05$);与B₁组相比,B₂组大鼠空腹血糖及血清胰岛素水平未见显著性



注:A:各组大鼠卵巢HE染色;B:各组大鼠卵巢组织内正常卵泡、囊性卵泡、黄体数量;PF:初级卵泡;SF:次级卵泡;TF:三级卵泡;CF:囊性卵泡;CL:黄体;与正常组相比,* $P < 0.05$ 。(下图同)

图6 各组大鼠卵巢组织形态观察($n = 6$)

Note. A. HE staining of the ovary of rats in each group. B. Number of normal follicles, cystic follicles and corpus luteum in the ovarian tissues of rats in each group. PF. Primary follicles. SF. Secondary follicles. TF. Tertiary follicles. CF. Cystic follicles. CL. Corpus luteum. Compared with normal group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 6 Observation of ovarian tissue morphology of rats in each group($n = 6$)

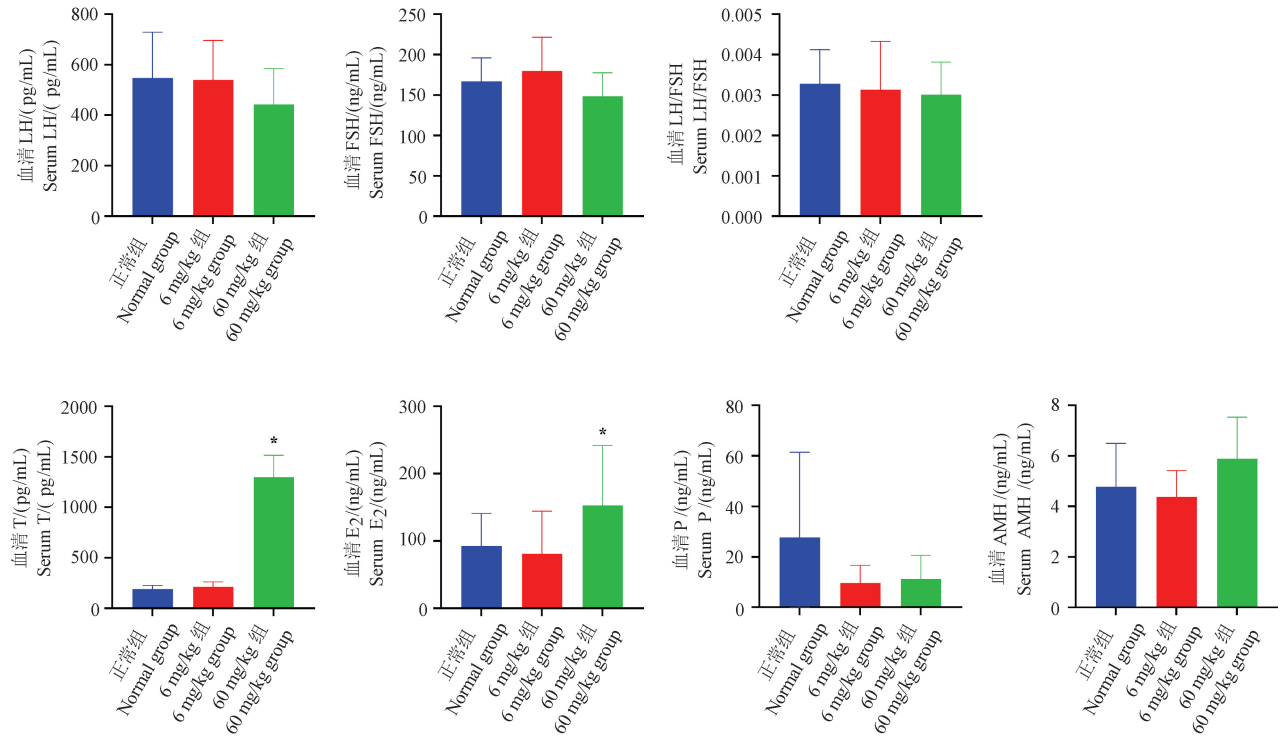


图7 各组大鼠血清性激素水平比较($n = 6$)

Figure 7 Comparison of serum sex hormone levels in rats in each group($n = 6$)

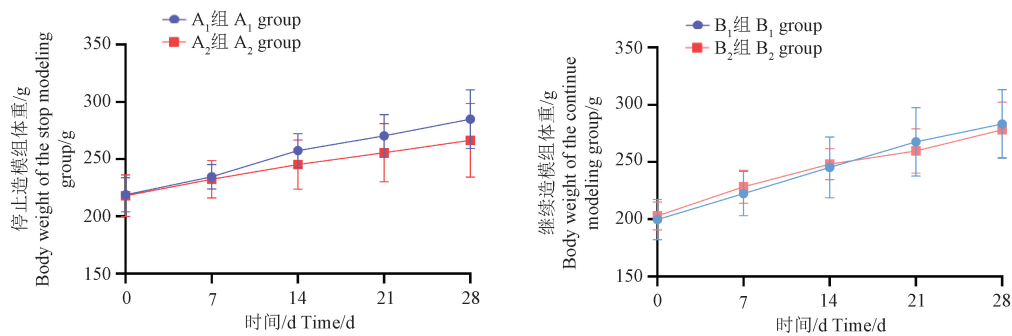


图 8 各组大鼠体重变化曲线($n = 6$)

Figure 8 Curves of body mass change of rats in each group($n = 6$)

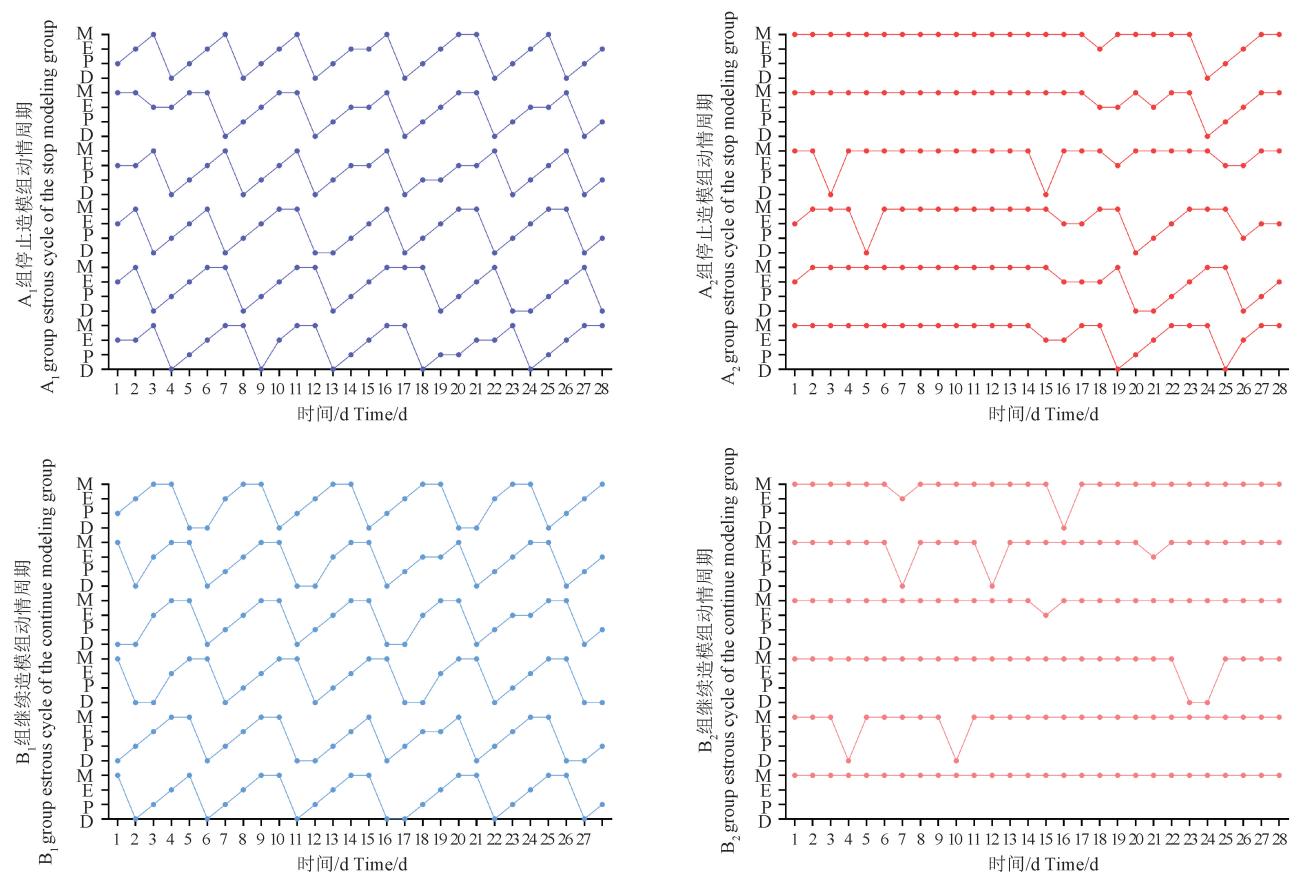


图 9 各组大鼠动情周期变化曲线($n = 6$)

Figure 9 Estrus cycle variation curves of rats in each group($n = 6$)

差异($P > 0.05$)(见图 10)。

2.2.4 大鼠卵巢组织病理形态学变化

A₁ 组、B₁ 组可见不同发育阶段的卵泡及成熟卵泡,成熟卵泡内可见卵母细胞、卵丘和放射冠,颗粒细胞多层排列,结构整齐,黄体较多,少见囊状扩张卵泡;与 A₁ 组相比,A₂ 组成熟卵泡增多,可见卵母细胞、卵丘和放射冠,囊性卵泡减少,黄体数量增多;与 B₁ 组相比,B₂ 组少见发育成熟的卵泡,囊性

卵泡增多,颗粒细胞层数明显减少,排列稀疏无序,黄体数量减少(见图 11)。

2.2.5 大鼠血清性激素水平的比较

与 A₁ 组相比,A₂ 组血清 E₂、AMH 水平降低($P < 0.05$),LH、FSH、LH/FSH、T、P 水平无统计学意义($P > 0.05$);与 B₁ 组相比,B₂ 组血清 LH、LH/FSH、T 水平升高($P < 0.05$),FSH、E₂、P、AMH 水平无统计学意义($P > 0.05$)(见图 12)。

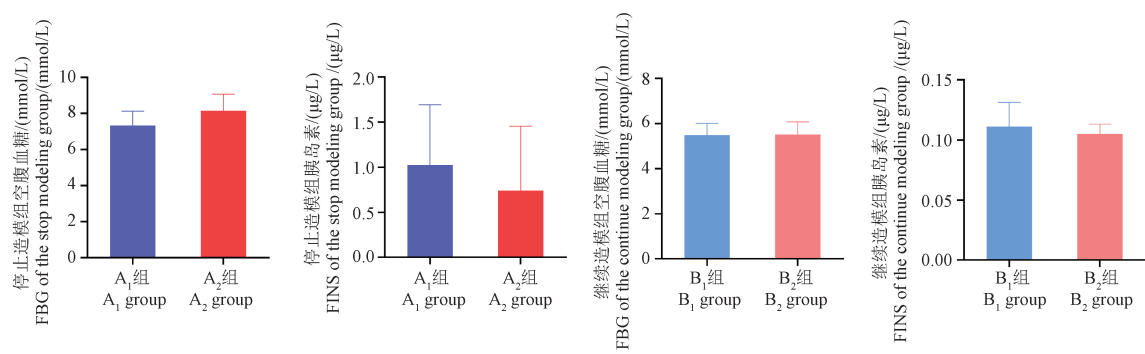
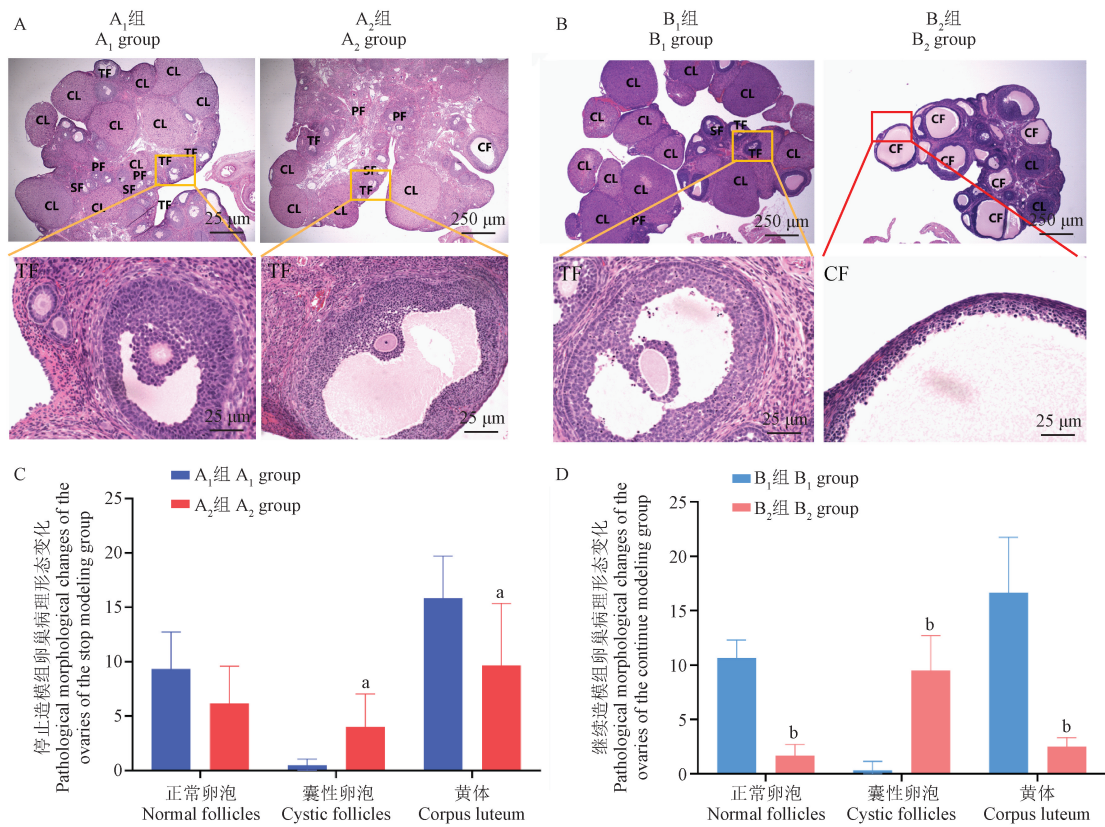


图 10 各组大鼠空腹血糖及血清胰岛素水平比较($n = 6$)

Figure 10 Comparison of fasting blood glucose and serum insulin levels of rats in each group($n = 6$)



注: A: 停止造模组大鼠卵巢 HE 染色; B: 继续造模组大鼠卵巢 HE 染色; C: 停止造模组大鼠卵巢组织内正常卵泡、囊性卵泡、黄体数量; D: 继续造模组大鼠卵巢组织内正常卵泡、囊性卵泡、黄体数量; PF: 初级卵泡; SF: 次级卵泡; TF: 三级卵泡; CF: 囊性卵泡; CL: 黄体; 与 A₁ 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 B₁ 组相比, ^b $P < 0.05$ 。(下图/表同)

图 11 各组大鼠卵巢组织形态观察($n = 6$)

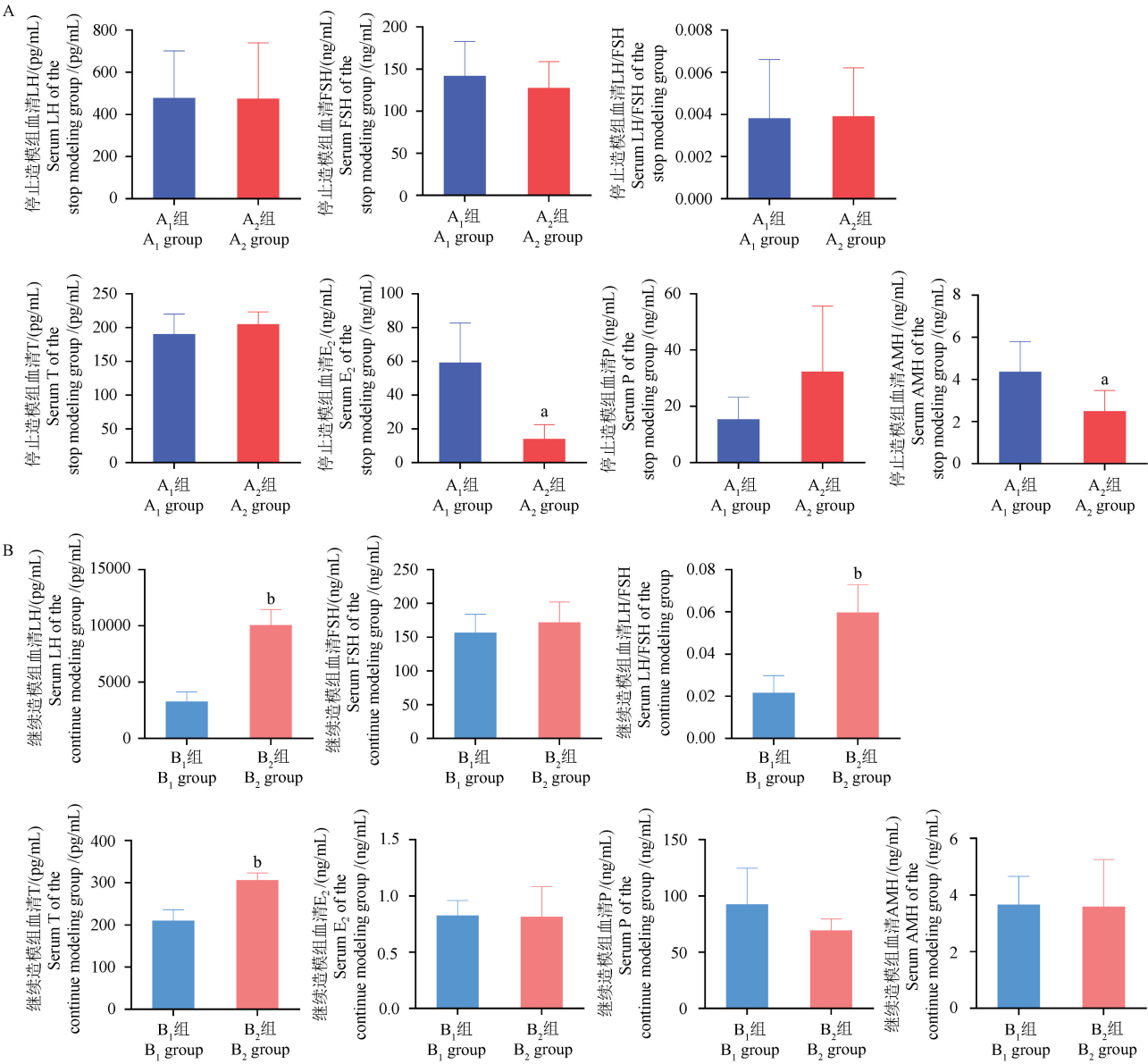
Note. A. HE staining of the ovary of rats in the stop modeling group. B. HE staining of the ovary of rats in the continue modeling group. C. Number of normal follicles, cystic follicles and corpus luteum in the ovarian tissues of rats in the stop modeling group. D. Number of normal follicles, cystic follicles and corpus luteum in the ovarian tissues of rats in the continue modeling group. PF. Primary follicles. SF. Secondary follicles. TF. Tertiary follicles. CF. Cystic follicles. CL. Corpus luteum. Compared with A₁ group, ^a $P < 0.05$. Compared with B₁ group, ^b $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

Figure 11 Observation of ovarian tissue morphology of rats in each group($n = 6$)

3 讨论

PCOS 是育龄期女性最常见的内分泌疾病之

一, 约占无排卵性不孕症的 75%^[11], 其中肥胖型 PCOS 患者 BMI 指数显著升高, 而非肥胖型 PCOS 患者体重正常或偏低, 两者的关键病理特征均为高



注:A:停止造模组大鼠血清性激素水平比较;B:继续造模组大鼠血清性激素水平比较。

图 12 各组大鼠血清性激素水平比较 (n = 6)

Note. A. Comparison of serum sex hormone levels of rats in the stop modeling group. B. Comparison of serum sex hormone levels of rats in the continue modeling group.

Figure 12 Comparison of serum sex hormone levels in rats in each group (n = 6)

雄激素血症、月经异常及卵巢多囊样改变,但非肥胖型 PCOS 与肥胖型 PCOS 在发病机制及临床表现等多方面有所不同,治疗上应区别对待^[12]。大量研究聚焦于肥胖型 PCOS 的典型临床表现及异常代谢角度,形成了较为成熟的肥胖型 PCOS 动物模型构建方法,而非肥胖型 PCOS 因其临床表现的复杂性,尚无符合临床表现的、可复制的、稳定的非肥胖型 PCOS 动物模型。

雌性 SD 大鼠对性激素敏感性高,具有规律的动情周期(4 ~ 5 d),易于操作,经济方便,常用于

PCOS 大鼠模型的构建研究^[13]。文献研究表明,肥胖型 PCOS 动物模型常用的造模方法包括来曲唑联合高脂饲料法、双氢睾酮联合高脂饲料法及 DHEA 联合高脂饲料法等^[14-16],相比之下,非肥胖型 PCOS 动物模型的构建方法鲜有报道。YU 等^[17]发现 6 mg/kg DHEA 可成功构建 PCOS 大鼠模型,且 PCOS 大鼠体重增加;在 DOU 等^[18]的研究中,60 mg/kg DHEA 可成功构建 PCOS 小鼠模型,且 PCOS 小鼠体重未发生明显改变;PRABHU 等^[19]研究发现,60 mg/kg DHEA 可成功构建 PCOS 大鼠模型,且

PCOS 大鼠体重增加。综合文献的研究结果,6 mg/kg 和 60 mg/kg DHEA 作为常用造模剂量均可成功构建 PCOS 大/小鼠模型,但动物体重变化不一致。同时,在已有研究中发现,应用 60 mg/kg DHEA 诱导 PCOS 大鼠模型进行药效学研究时,给药干预阶段未进行模型维持,大鼠可发生自愈现象,恢复正常的动情周期,影响 PCOS 大鼠模型的稳定性及药效评价^[20]。由此可见,PCOS 动物模型的构建需综合造模期及模型维持观察期进行模型评价。因此,本研究参照临床诊疗指南及文献报道^[21],选 6 mg/kg 和 60 mg/kg DHEA 2 个常用剂量构建 PCOS 大鼠模型,探索 DHEA 构建非肥胖型 PCOS 模型的最佳剂量。对造模成功的非肥胖型 PCOS 大鼠进行 28 d 的模型观察。

本研究结果显示,DHEA 连续注射 21 d 后,6 mg/kg 和 60 mg/kg 组体重以及体重增长量与正常组无显著性差异;但是,各造模组大鼠均失去了规律的动情周期,提示大鼠无排卵,卵巢组织病理学发现,各造模组大鼠出现大量囊状卵泡,且囊状卵泡直径扩增,卵巢呈多囊样改变,与 PCOS 的卵巢病理改变特征一致;血清 T 水平均出现不同程度的升高,证实 6 mg/kg 和 60 mg/kg 剂量的 DHEA 均可以构建非肥胖型 PCOS 大鼠模型。同时,本研究观察到,与 6 mg/kg 组相比,60 mg/kg 组动情周期明显紊乱,正常卵泡数量减少,囊性卵泡数量增加,提示 60 mg/kg DHEA 更适合用于构建非肥胖型 PCOS 模型,在下一阶段的模型观察期,选择 60 mg/kg DHEA 作为模型维持剂量。

在 28 d 内的模型观察阶段发现未持续给予 DHEA 的模型组大鼠陆续出现动情期,且恢复规律的动情周期,囊状卵泡减少,出现成熟卵泡,黄体数量增加;同时与正常组相比,未持续给予 DHEA 的模型组血清性激素水平无显著性差异。而持续给予 DHEA 的模型组大鼠,未见规律的动情周期;且卵巢保持囊性卵泡增加、正常卵泡减少、黄体数量减少的卵巢多囊样改变状态;血清性激素结果显示血清 T、LH、LH/FSH 水平升高,P 水平降低,大鼠仍表现出非肥胖型 PCOS 的临床特征,同时由于 LH/FSH 比值显著增加,更表现出了与临床特征的高度一致性。综上研究结果表明,采用间隔 48 h 给予 60 mg/kg DHEA 的方法进行模型维持,可确保非肥胖型 PCOS 大鼠模型的稳定性。

此外,由于本研究中停止造模组与继续造模组

的大鼠属于不同批次的动物,在进行激素检测时研究人员发现大鼠在胰岛素、LH、LH/FSH、E₂ 基础值的表达上有显著性差异。通过对实验结果进行对比分析,研究人员发现不同周龄的大鼠胰岛素和性激素水平同样存在差异,推测动物批次、周龄为影响雌性 SD 大鼠胰岛素、LH、LH/FSH、E₂ 水平的重要因素。为了进一步验证这一推测,研究人员选择不同周龄以及不同批次的雌性 SD 大鼠,对胰岛素、LH、FSH、E₂ 水平进行了检测,发现不同批次以及不同周龄大鼠的激素基础值具有显著性差异。同时,通过对文献筛选整理发现,不同研究中相同周龄雌性 SD 大鼠激素基础值差异最高可达数千倍,不同周龄雌性 SD 大鼠激素基础值也可见明显差异。提示不同周龄、不同批次以及不同来源等因素均可导致雌性大鼠激素表达水平的明显改变,在雌性动物的相关研究中应严格遵照随机、对照、重复三原则,以确保研究结果的真实性。另一方面,本研究还同时评价了空腹血糖和血清胰岛素表达水平,与正常组相比均未出现统计学意义,提示本模型不适用于研究存在胰岛素抵抗的非肥胖型 PCOS。

综上所述,连续 21 d 皮下注射 60 mg/kg DHEA 能够成功构建符合临床特征的非肥胖型 PCOS 大鼠模型,在此基础上每 48 h 给予 60 mg/kg DHEA 皮下注射能够保持模型的稳定性,为非肥胖型 PCOS 发病机制研究、药效评价、药效作用机制研究等提供了较为理想的动物模型。在后续研究中,本研究团队也将继续立足于 PCOS 复杂多样的临床表现,进一步优化模型构建方法,以期为 PCOS 的研究提供更多稳定可复制且符合临床特征的动物模式体系。

参 考 文 献 (References)

- [1] 多囊卵巢综合征诊治路径专家共识编写组. 多囊卵巢综合征诊治路径专家共识 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2023, 43 (4): 337-345.
Expert Consensus Writing Group for Diagnosis and Treatment Pathways of Polycystic Ovarian Syndrome. Expert consensus on diagnosis and treatment pathways of polycystic ovarian syndrome [J]. Chin J Reprod Contracept, 2023, 43(4): 337-345.
- [2] 中华医学会内分泌学分会肥胖学组. 中国成人肥胖症防治专家共识 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27(9): 711-717.
Obesity Group of the Endocrinology Branch of the Chinese Medical Association. Consensus of chinese adult obesity prevention and treatment experts [J]. Chin J Endocrinol Metab, 2011, 27(9): 711-717.
- [3] BOZDAG G, MUMUSOGLU S, ZENGİN D, et al. The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. Hum Reprod, 2016, 31(12): 2841-2855.

- [4] GONZÁLEZ F. Nutrient-induced inflammation in polycystic ovary syndrome: role in the development of metabolic aberration and ovarian dysfunction [J]. *Semin Reprod Med*, 2015, 33(4): 276–286.
- [5] 徐海燕, 杜青, 王红梅, 等. 苍附导痰汤加减对肥胖型多囊卵巢综合征大鼠的干预作用研究 [J]. *湖南中医杂志*, 2022, 38(8): 181–184.
- XU H Y, DU Q, WANG H M, et al. Study on the intervention effect of Cangshu Guiding Phlegm Tang plus reduction on obese rats with polycystic ovary syndrome [J]. *Hunan J Tradit Chin Med*, 2022, 38(8): 181–184.
- [6] 彭洋洋, 张怡, 谢青贞. 脱氢表雄酮联合高脂饮食诱导建立小鼠多囊卵巢综合征模型的研究 [J]. *生殖医学杂志*, 2021, 30(12): 1627–1633.
- PENG Y Y, ZHANG Y, XIE Q Z. Establishment of mouse model of polycystic ovary syndrome induced by dehydroepiandrosterone combined with high-fat diet [J]. *J Reprod Med*, 2021, 30(12): 1627–1633.
- [7] 王胜, 吴林玲. 多囊卵巢综合征动物模型中西医结合研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26(24): 4921–4926, 4931.
- WANG S, WU L L. Research progress in animal models of polycystic ovary syndrome in traditional Chinese medicine and western medicine [J]. *Med Recapitul*, 2020, 26(24): 4921–4926, 4931.
- [8] 贾莉婷, 刘艳丽, 马葆靖, 等. 两种多囊卵巢综合征大鼠模型造模方法的比较 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2011, 46(4): 538–542.
- JIA L T, LIU Y L, MA B J, et al. Comparison of two kinds of polycystic ovary syndrome rat models [J]. *J Zhengzhou Univ (Med Sci)*, 2011, 46(4): 538–542.
- [9] 邓丽玲, 罗佩, 侯丽莹, 等. 脱氢表雄酮诱导多囊卵巢大鼠高雄激素血症模型的实验研究 [J]. *湖南中医杂志*, 2017, 33(3): 146–148.
- DENG L L, LUO P, HOU L Y, et al. Establishment of hyperandrogenism model in rats with polycystic ovary syndrome using dehydroepiandrosterone: an experimental study [J]. *Hunan J Tradit Chin Med*, 2017, 33(3): 146–148.
- [10] 吴晓贞, 何嘉伦, 曾蕾, 等. 基于 TLR-4/NF- κ B 信号通路探讨苍附导痰汤对痰湿型多囊卵巢综合征大鼠的治疗作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(3): 307–312.
- WU X Z, HE J L, ZENG L, et al. Exploring the therapeutic effect of Cang Fu Guiding Phlegm Tang on phlegm-damp polycystic ovary syndrome rats based on TLR-4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Tradit Chin Drug Res Pharmacol*, 2022, 33(3): 307–312.
- [11] SINGH S, PAL N, SHUBHAM S, et al. Polycystic ovary syndrome: etiology, current management, and future therapeutics [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(4): 1454.
- [12] 高悦, 王国华. 王国华教授治疗非肥胖型多囊卵巢综合征不孕症的经验 [J]. *吉林中医药*, 2019, 39(6): 717–721.
- GAO Y, WANG G H. Professor WANG Guohua's experience in treating non-obese polycystic ovary syndrome infertility [J]. *Jilin J Chin Med*, 2019, 39(6): 717–721.
- [13] 付国芳, 孙艳美, 黄秀峰, 等. 子宫内异位症 SD 大鼠模型不同部位异位病灶生长特点分析 [J]. *现代妇产科进展*, 2011, 20(8): 628–630.
- FU G F, SUN Y M, HUANG X F, et al. Growth characteristics of ectopic lesions of endometriosis SD rats model in different planting sites [J]. *Prog Obstet Gynecol*, 2011, 20(8): 628–630.
- [14] LUO X, GONG Y, CAI L, et al. Chemerin regulates autophagy to participate in polycystic ovary syndrome [J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(11): 3000605211058376.
- [15] 尹丽红, 焦琳, 陈裕, 等. 多囊卵巢综合征大鼠子宫内中 P I3 K/AKT 通路相关蛋白表达异常与胰岛素抵抗的关系 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(6): 777–783.
- YIN L H, JIAO L, CHEN Y, et al. Relationship between abnormal expression of PI3K/AKT pathway-related protein and insulin resistance of rats of polycystic ovary syndrome with endometrial insulin resistance [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(6): 777–783.
- [16] 尹萍, 路璐, 陈媛媛, 等. 来曲唑联合 45% 高脂饲料诱导生殖内分泌及代谢型异常的多囊卵巢综合征大鼠模型研究 [J]. *药学实践杂志*, 2019, 37(5): 422–426.
- YIN P, LU L, CHEN Y Y, et al. Effects of letrozole and 45% high-fat diet on induction of rat model of polycystic ovary syndrome with reproductive and metabolic disorder [J]. *J Pharm Pract*, 2019, 37(5): 422–426.
- [17] YU J, ZHAI D, HAO L, et al. Cryptotanshinone reverses reproductive and metabolic disturbances in PCOS model rats via regulating the expression of CYP17 and AR [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 670743.
- [18] DOU L, ZHENG Y, LI L, et al. The effect of cinnamon on polycystic ovary syndrome in a mouse model [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 99.
- [19] DPRABHU Y, VALSALA GOPALAKRISHNAN A. γ -Linolenic acid ameliorates DHEA induced pro-inflammatory response in polycystic ovary syndrome via PPAR- γ signaling in rats [J]. *Reprod Biol*, 2020, 20(3): 348–356.
- [20] 张莹, 文绍敦, 童丽, 等. 针药干预对多囊卵巢综合征胰岛素抵抗模型大鼠生殖内分泌及 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. *中国高原医学与生物学杂志*, 2018, 39(1): 29–33.
- ZHANG Y, WEN S D, TONG L, et al. Effects of acupuncture and medicinal herbs on the reproductive endocrines and PI3K/Akt signaling pathway in polycystic ovary syndrome with insulin resistance model [J]. *Chin High Alt Med Biol*, 2018, 39(1): 29–33.
- [21] 王阳, 刘艳霞, 佟庆, 等. 基于 TLR-4/NF- κ B 信号通路探讨归术益坤方联合粪菌移植对多囊卵巢综合征大鼠的治疗作用 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2023, 18(5): 855–861.
- WANG Y, LIU Y X, TONG Q, et al. Guizhu yikun formula combined with fecal microbiota transplantation treats polycystic ovary syndrome in rats via TLR-4/NF- κ B signaling pathway [J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2023, 18(5): 855–861.