

马林纳,马堃,范晓迪,等. 雷公藤多苷致小鼠早发性卵巢功能不全模型的不同时间点进展研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 35-44, 153.

Ma LN, Ma K, Fan XD, et al. Progression of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside in mice with premature ovarian insufficiency at various time points [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 35-44, 153.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.005

雷公藤多苷致小鼠早发性卵巢功能不全模型的不同时间点进展研究

马林纳¹, 马堃^{2*}, 范晓迪^{3*}, 罗洁², 高山凤², 李佳妮², 张涵¹

(1.天津中医药大学,天津 301617;2.中国中医科学院西苑医院,北京 100091;

3.中国中医科学院西苑医院基础医学研究所,北京 100091)

【摘要】 目的 探讨雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全(POI)小鼠模型相关指标的变化,确定采取干预措施的最佳时间点。**方法** 将 40 只 ICR 雌性小鼠随机分为对照组、A、B、C、D 模型组,每组 8 只。对照组灌胃纯水 14 d (0.01 mL/10 g),其余各组给予雷公藤多苷混悬液(80 mg/kg,0.01 mL/10 g)分别连续灌胃 1 d(A 模型组)、3 d(B 模型组)、7 d(C 模型组)、14 d(D 模型组),并分批次取材。称量各组小鼠体重、湿重子宫和双侧卵巢;酶联免疫法检测各组小鼠血清 FSH、LH、E₂、P、AMH、INH-B、T 含量;HE 染色观察各组小鼠各级卵泡、黄体的数量及发育状态;TUNEL 荧光染色法检测各组小鼠卵巢内凋亡面积;IHC 法检测各组小鼠卵巢中 VEGFA、CD34、EPO 蛋白阳性表达;PCR 法检测各组小鼠 HIF-1 α 、SDF-1、CXCR4 的 mRNA 表达量。**结果** 与对照组比较,A 模型组各指标变化不符合 POI 成模标准;B 模型组小鼠卵巢指数、子宫指数、体重显著降低($P<0.01$),C 模型组体重显著下降($P<0.01$),D 模型组卵巢指数明显下降($P<0.05$);B、C、D 模型组血清指标 FSH、LH 含量升高($P<0.05$, $P<0.01$),E₂、PROG、AMH、INH-B、T 含量下降($P<0.01$);B、C、D 模型组始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡、排卵前卵泡及黄体数量明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),闭锁卵泡数量显著增多($P<0.01$);A、B、C、D 模型组 TUNEL 荧光染色凋亡面积明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);B、C、D 模型组 CD34、VEGFA、EPO 阳性表达明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);A、B 模型组 HIF-1 α 、SDF-1、CXCR4 的 mRNA 表达量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与 B 模型组相比,C、D 模型组相关指标发生明显变化,提示 C、D 模型组较严重,趋向 POF 发展。**结论** B 模型组是卵巢功能从受损状态 POI 发展到不可逆卵巢早衰(POF)的转折点,提示雷公藤多苷给药 3 d 是诱导 POI 疾病模型及药物有效干预的最佳时间。

【关键词】 早发性卵巢功能不全;雷公藤多苷;颗粒细胞;血管新生;病理性缺氧

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0035-10

Progression of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside in mice with premature ovarian insufficiency at various time points

MA Linna¹, MA Kun^{2*}, FAN Xiaodi^{3*}, LUO Jie², GAO Shanfeng², LI Jiani², ZHANG Han¹

(1. Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 301617, China. 2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091. 3. Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091)

【基金项目】 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A02406);北京市自然科学基金(7212193);北京市科技计划(Z171100001017104)。

【作者简介】 马林纳(1995—),女,博士研究生,研究方向:中医妇科学。E-mail:malinna18703626180@163.com

【通信作者】 马堃(1962—),女,医学博士,研究员,研究方向:中医妇科学。E-mail:mkun1230@163.com

范晓迪(1985—),女,医学博士,副研究员,研究方向:中药学。E-mail:xiaodi.1018@163.com

* 共同通信作者

[Abstract] Objective Changes in relevant indexes in the mouse model of early-onset ovarian insufficiency caused by *Tripterygium wilfordii* polyglycoside were analyzed, and the optimal time point for intervention was determined. **Methods** Forty female ICR mice were randomly divided into control and A, B, C, and D model groups with eight mice in each group. The control group was gavaged with purified water for 14 days (0.01 mL/10 g), and the remaining groups were administered a *Tripterygium wilfordii* polyglycoside suspension (80 mg/kg, 0.01 mL/10 g) for 1 day (A model group), 3 days (B model group), 7 days (C model group), or 14 days (D model group), and samples were collected. Body weight and wet weights of the uterus and bilateral ovaries of mice were determined in each group. Serum FSH, LH, E2, P, AMH, INH-B, and T contents were measured using enzyme-linked immunoassays. HE staining was used to observe the number and developmental status of follicles and corpus luteum at all levels in mice of each group. TUNEL staining was used to detect the apoptosis in the ovaries of mice in each group. IHC detected expression of VEGFA, CD34, and EPO proteins in the ovaries of mice in each group. mRNA expression of HIF-1 α , SDF-1, and CXCR4 in each group of mice was detected by PCR. **Results** Compared with the control group, changes in indicators in model A mice did not meet the POI modeling standard. The ovarian index, uterine index, and body weight of mice in the B model group were decreased significantly ($P<0.01$), the weight of the C model group was decreased significantly ($P<0.01$), and the ovarian index of the D model group was decreased significantly ($P<0.05$). Serum contents of FSH and LH in B, C, and D model groups were increased ($P<0.05$, $P<0.01$), the E2, PROG, AMH, INH-B, and T contents were decreased ($P<0.01$). The numbers of basal follicles, pre-sinus follicles, sinusoidal follicles, antral follicles, preovulatory follicles, and corpus luteum were decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$) and the number of atresia follicles was increased significantly ($P<0.01$) in B, C, and D model groups. The apoptotic area of TUNEL staining in A, B, C, and D model groups was increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). Expression of CD34, VEGFA, and EPO in B, C, and D model groups was decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). mRNA expression of HIF-1 α , SDF-1, and CXCR4 in A and B model groups was significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the B model group, the relevant indexes of C and D model groups were changed significantly, indicating that C and D models were more serious and tended to develop POF. **Conclusions** The B model group is the turning point of ovarian function from impaired POI to irreversible POF, suggesting that 3 days of administrating *Tripterygium wilfordii* polyglycoside is optimal to induce a POI disease model for effective drug intervention.

[Keywords] premature ovarian insufficiency; *Tripterygium wilfordii* polyglycoside; granule cells; angiogenesis; pathological hypoxia

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 是指由于卵巢功能异常或卵泡过度损耗所引起的女性 (<40 岁) 性腺激素功能减退疾病^[1], 美国生殖协会按照促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 水平、生育能力和月经情况将 POI 疾病进程分为隐性性-生化异常-临床异常 3 个阶段^[2], 其中隐性性仅表现为生育力下降; 生化异常阶段是间隔 4 周的 2 次 FSH 血清检查结果显示 >25 IU/L 伴生育力下降, 但月经规律; 临床异常阶段是生化异常的基础上月经紊乱甚至闭经。中医学中虽无早发性卵巢功能不全这一疾病的记载, 但可归于“不孕”这一疾病, 结合《上古天真论》对女子生殖能力变化的描述“二七而天癸至, 任脉通, 太冲脉盛, 月事以时下, 故有子”, 到“七七, 任脉虚, 太冲脉衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形坏而无子也”, 可以认识到中西医均认为 POI 是一种卵巢功

能渐进型衰退的疾病, 若不及时医治则发展为卵巢功能不可逆衰竭的卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF), 最终引发更年期提前所致的心脑血管、神经退行性病变等一系列疾病^[3]。目前对于女性生殖疾病的研究因受限于临床伦理、患者配合度等因素, 多采用动物模型进行机制探索, 其中啮齿类动物如小鼠因价格低廉、易饲养、与人体遗传学相似度较高^[4] 而在 POI 动物模型中广泛应用。国内较为主流的 POI 小鼠模型以化疗药物如雷公藤多苷 (*Tripterygium wilfordii* polyglycoside, TWP) 灌胃造模为主, 但通过观察发现, 其与 POF 等卵巢功能受损的小鼠动物模型存在造模药、评价指标相同^[5-6], 且不同模型界限判定模糊等情况。此外, 应用此模型进行药效学、机制学研究的实验中, 治疗药物的干预时间点多样, 其中以造模和治疗同时进行^[7]、模型成功后再治疗^[8] 这

两种形式为主。由此引发模型进展程度的评价标准模糊、给药节点无证据支持等系列问题,对界定 POI 疾病模型及寻找治疗 POI 疾病有效治疗药物十分不利。本课题组经过前期实验研究建立 TWP 致小鼠 POI 模型^[9],其造模周期、成模标准均已具有相关基础,基于此对造模过程中不同时间点小鼠的卵巢功能进行检测,以期通过对卵巢衰退过程的生物指标变化监测,探寻到小鼠卵巢“早期”功能衰退且尚有恢复能力的转折点,确定治疗药物对 POI 小鼠模型干预的最佳治疗时间点,为丰富 POI 动物模型的实验方法研究提供可靠的数据支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

ICR 小鼠 50 只,雌性,6 周龄,体重 18~20 g,SPF 级,均购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]。饲养于中国中医科学院西苑医院动物实验中心[SYXK(京)2023-0053]。饲养条件为恒温 24℃ 左右,湿度(45±5)%,光照和黑暗各 12 h 交替进行,饮水不限,自由进食标准颗粒饲料。实验遵循实验动物“3R”原则,实验方案经过中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会审批通过(2021XLC055-2)。

1.2 主要试剂与仪器

雷公藤多苷片(远大医药黄石飞云制药有限公司,批号 Z42021212);小鼠 ELISA 检测试剂盒:促卵泡素(批号 INS-20239)、促黄体激素(批号 INS-21468)、雌二醇(批号 INS-J20231)、孕酮(批号 INS-J20231)、睾酮(批号 INS-J20320)、抗缪勒管激素(批号 INS-20514)、抑制素 B(批号 INS-20808)均购自黄石市艾恩斯生物科技有限公司;瑞氏吉姆萨复合染色液(北京索莱宝生物科技有限公司,批号 G1020);RNA 提取液(批号 G3013)、无酶水(G4700)均购于武汉赛维尔生物科技有限公司;一抗鼠抗 VEGF(批号 GB13034)、CD34(批号 GB13584)、EPO(批号 GB11323)、HRP(批号 GB23303)均购于武汉赛维尔生物科技有限公司;三氯甲烷(批号 10006818)、异丙醇(批号 80109218)、无水乙醇(批号 10009218)均购于国药集团化学试剂有限公司。

酶标仪(美国 Bio-rad 公司,BIO-RAD680);台式高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司,Heraeus MultifugeX3R);显微镜(尼康仪器有限公

司,E100);显微镜载玻片(江苏世泰实验器材有限公司,批号 80302-2101);电子天平(上海精密科学仪器有限公司,FA2204B);荧光定量 PCR 仪(Bio-rad,CFX Connect)。

1.3 实验方法

1.3.1 药品制备

造模药配置:40 mL 纯水中添加 0.1 g 羧甲基纤维素钠、0.125 mL 吐温 80,随后加入 1600 mg 雷公藤多苷片并定容至 50 mL,超声装置中震荡均匀为 4 mg/mL TWP 混悬液,置于-4℃ 冰箱避光保存备用。

1.3.2 实验动物分组

将 50 只 6 周龄,18~20 g ICR 雌性小鼠适应性喂养 3 d 后每日早上 9:00 行阴道涂片,监测动情周期,以 5 d 为 1 个周期循环。10 d 后剔除动情周期紊乱小鼠 10 只,将余下 40 只小鼠采用随机分组法分为对照组、A 模型组、B 模型组、C 模型组、D 模型组,每组 8 只。

1.3.3 动物模型制备和取材

参照前期实验基础制定模型制备方法,于上午 9:00 称重后进行模型制备给药。对照组:每日灌胃纯水 0.01 mL/10 g;A、B、C、D 模型组:每日以 80 mg/kg 灌胃 TWP 混悬液。各组小鼠在最后 1 d 灌胃造模后禁食不禁水,并于第 2 日上午 8:00 行眼眶后静脉丛采血,离心后将血清置于-80℃ 冰箱冻存。精密天平称取脏器质量后,将小鼠两个卵巢分别随机放入 10% 甲醛液固定和-80℃ 冰箱冷冻保存,具体安排如表 1。

1.3.4 检测指标

(1)称重:小鼠体重/g;子宫系数=子宫湿量/mg×100/体重/g;卵巢系数=双侧卵巢湿重/mg×100/体重/g;

(2)血清指标检测:按照试剂盒说明书以酶联免疫法检测各组小鼠血清中促卵泡激素(follicle-stimulating hormone,FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone,LH)、雌二醇(estradiol,E₂)、孕酮(progesterone,PROG)、抗缪勒管激素(anti-Müllerian hormone,AMH)、抑制素 B(inhibin B,INH-B)、睾酮(testosterone,T)浓度水平;

(3)卵巢病理学观察:将小鼠卵巢放入甲醛溶液固定,组织脱水后行石蜡包埋切片,并用苏木精对其染色。每组选取 6 张切片,在×200 倍光学显微镜对每张切片任选 5 个视野,并对始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡、排卵前卵泡、排卵后囊腔、黄体 and 闭

锁卵泡进行数目统计。正常小鼠卵巢皮质、髓质结构清晰;颗粒细胞层清晰且排列整齐;各级卵泡形态正常,卵母细胞无萎缩、核无固缩;闭锁卵泡少或无。以上描述若有一项不符则视为异常卵泡。

(4)TUNEL 染色:将卵巢制成蜡块后进行脱蜡;经 PBS 漂洗和蛋白酶打孔后加入 Nasel 反应液,漂洗后避光滴入 DAPI、甘油混合液,封盖后 48 h 内在荧光显微镜下以激发波长 450~500 nm,发射波长 515~565 nm 进行观察拍照。每组选取 6 个卵巢制片,每张切片在×200 高倍镜下随机拍摄 5 个视野,分析累计光密度(integrated optical density, IOD)及染色区域的面积(Area),计算出平均光密度(average optical density, AOD)=IOD/Area。

(5)免疫组化检测:将卵巢制成石蜡切片并进行脱蜡水洗和抗原修复,之后进行内源性过氧化物

酶阻断;添加一抗进行孵育过夜,PBS 洗涤后加二抗进行室温孵育;在玻片洗涤后滴加 DAB 显色液、自来水冲洗后进行复染;流水冲洗后,将切片依次放入酒精、无水乙醇、正丁醇、二甲苯中脱水,晾干后封片。每组选取 6 个卵巢制片,每张 CD34、EPO 免疫组化切片在×400 高倍镜下随机拍摄 3 个视野,每张 VEGF 免疫组化切片在×200 高倍镜下随机拍摄 3 个视野,检测各蛋白阳性表达。

(6)荧光定量 PCR 检测:抽提卵巢总 RNA 后使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度,定容至 20 μL,最终浓度为 200 ng/μL;混匀离心后在 PCR 仪上完成逆转录;取 0.1 mL PCR 反应板,每个反转录产物配制 3 管;点样后完成封膜,于荧光定量 PCR 仪上进行扩增(表 2),记录 HIF-1α、SDF-1、CXCR4 的 mRNA 表达量,采用 2^{-ΔΔCt} 法进行差异性检验。

表 1 雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全小鼠模型取材时间点

Table 1 Time points when the mice model of premature ovarian insufficiency induced by Tripterygium wilfordii polyglycosides was collected			
组别 Groups	灌胃类型及剂量 Type and dose of gavage	灌胃频次 Frequency of gavage	取材 Material acquisition
A 模型组 A model group	雷公藤多苷 80 mg/(kg·d) TWP 80 mg/(kg·d)	1 次 1 time	造模期第 2 天 Day 2 of the model making period
B 模型组 B model group	雷公藤多苷 80 mg/(kg·d) TWP 80 mg/(kg·d)	3 次 3 times	造模期第 4 天 Day 4 of the model making period
C 模型组 C model group	雷公藤多苷 80 mg/(kg·d) TWP 80 mg/(kg·d)	7 次 7 times	造模期第 8 天 Day 8 of the model making period
D 模型组 D model group	雷公藤多苷 80 mg/(kg·d) TWP 80 mg/(kg·d)	14 次 14 times	造模期第 15 天 Day 15 of the model making period
对照组 Control group	纯水 0.01 mL·20 g/d Water 0.01 mL·20 g/d	14 次 14 times	造模期第 15 天 Day 15 of the model making period

表 2 qRT-PCR 引物序列
Table 2 qRT-PCR primer sequences

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	产物长度/bp Product length/bp
GAPDH-正向 GAPDH-positive	CCTCGTCCCCTAGACAAAATG	133
GAPDH-反向 GAPDH-reverse	TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	
CXCR4(RZ)-正向 CXCR4(RZ)-positive	GCTAAGGAGCATGACGGACAA	232
CXCR4(RZ)-反向 CXCR4(RZ)-reverse	CTGACTGTTGCTGGCGTGGA	
HiF1α-正向 HiF1α-positive	TTGCTTTGATGTGGATACCGATA	223
HiF1α-反向 HiF1α-reverse	CATACTTGGAGGGCTTGGAGAAT	
CXCL12-正向 CXCL12-positive	AGTGACGGTAAACCACTCAGCC	116
CXCL12-反向 CXCL12-reverse	AGGGCACAGTTTGGAGTGTGA	

1.4 统计学方法

运用 ImageJ 6.0 软件计算 TUNEL 图片凋亡区域和免疫组化图片平均光密度值;运用 SPSS 22.0 软件进行统计分析;单因素方差分析进行组间比较和 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义;以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, *n*≥3。

2 结果

2.1 各组小鼠性腺指数以及体重比较

如表 3 所示,与对照组相比,B 模型组卵巢指数、子宫指数和体重显著降低(*P*<0.01),A、C 模型组体重显著降低(*P*<0.01),D 模型组卵巢指数明显下降(*P*<0.05),其余无统计学差异(*P*>0.05)。与 B 模型组相比,C 模型组体重和 D 模型组子宫指数、体重上升(*P*<0.05, *P*<0.01),其余无统计学意义(*P*>0.05)。

2.2 各组小鼠血清生化指标比较

如表 4 所示,与对照组相比,A 模型组各指标无

显著变化(*P*>0.05),B、C、D 模型组血清中 FSH、LH 浓度显著升高(*P*<0.05, *P*<0.01),*E*₂、PROG 浓度显著降低(*P*<0.01)。与 B 模型组相比,C 模型组血清中 FSH 浓度升高(*P*<0.01),*E*₂、PROG 浓度降低(*P*<0.01),D 模型组血清中 FSH、LH 浓度升高(*P*<0.05, *P*<0.01),*E*₂、PROG 浓度降低(*P*<0.01)。

如表 5 所示,与对照组相比,A 模型组血清中 AMH 浓度显著降低(*P*<0.01);B、C、D 模型组血清中 AMH、INH-B、T 浓度降低(*P*<0.05, *P*<0.01),其余无统计学意义(*P*>0.05)。与 B 模型组相比,C 模型组血清 AMH、T 浓度下降(*P*<0.05, *P*<0.01);D 模型组血清 AMH、INH-B、T 浓度降低(*P*<0.05, *P*<0.01),其余无统计学意义(*P*>0.05)。

2.3 各组小鼠卵巢 HE 染色观察

如图 1 所示,与对照组相比,B、C、D 模型组小鼠卵巢中始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡、排卵前卵泡、黄体减少(*P*<0.05, *P*<0.01),闭锁卵泡增多(*P*<0.01),其余无统计学意义(*P*>0.05)。与 B 模型组

表 3 各组小鼠性腺指数以及体重比较(*n*=8)
Table 3 Comparison of gonadal index and body weight of mice in each group

组别 Groups	卵巢指数/(mg/g) Ovarian index	子宫指数/(mg/g) Uterine index	体重/g Weight
对照组 Control group	1.21±0.13	7.69±1.31	29.27±0.92
A 模型组 A model group	1.05±0.19	6.52±1.59	27.20±0.98**
B 模型组 B model group	0.98±0.09**	5.22±0.73**	26.78±1.22**
C 模型组 C model group	1.04±0.24	6.18±2.36	28.46±1.12**△
D 模型组 D model group	1.00±0.19*	7.51±2.83△	29.34±1.74△△

注:与对照组相比,**P*<0.05,***P*<0.01;与 B 模型组相比,△*P*<0.05,△△*P*<0.01。
Note. Compared with the control group,**P*<0.05,***P*<0.01. Compared with the B model group,△*P*<0.05,△△*P*<0.01.

表 4 各组小鼠血清 FSH、LH、*E*₂ 和 PROG 浓度比较(*n*=6)
Table 4 Comparison of serum FSH, LH, *E*₂ and PROG concentrations in each group

组别 Groups	FSH/(mIU/mL)	LH/(mIU/mL)	<i>E</i> ₂ /(pg/mL)	PROG/(ng/mL)
对照组 Control group	32.4±6.32	35.59±3.01	4119.31±284.12	33.82±2.14
A 模型组 A model group	40.12±8.31	33.78±3.28	3833.09±306.9	31.52±2.2
B 模型组 B model group	43.77±6.44*	41.41±3.51*	3439.95±193.53**	29.65±1.3**
C 模型组 C model group	59.02±7**△△	43.12±4.25**	2697.01±226.08**△△	22.49±1.82**△△
D 模型组 D model group	60.72±12.11**△	48.62±4.04**△△	2187.03±244.76**△△	20.7±1.74**△△

注:与对照组相比,**P*<0.05,***P*<0.01;与 B 模型组相比,△*P*<0.05,△△*P*<0.01。
Note. Compared with the control group,**P*<0.05,***P*<0.01. Compared with the B model group,△*P*<0.05,△△*P*<0.01.

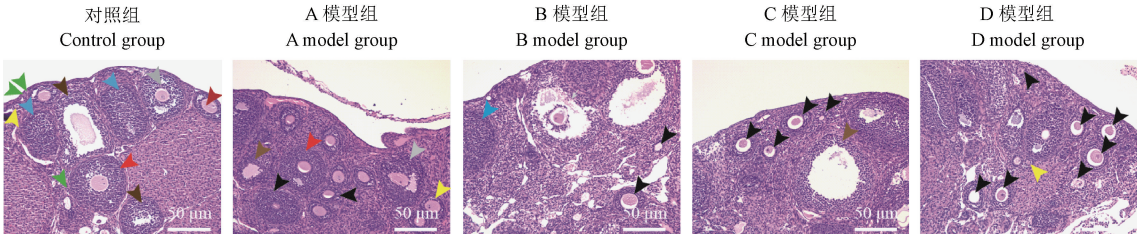
相比,C 模型组始基卵泡、黄体减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),闭锁卵泡显著增多 ($P<0.01$);D 模型组始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡、黄体减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),闭锁卵泡显著增加 ($P<0.01$),其余无统计

学意义 ($P>0.05$),见图 2。
2.4 TUNEL 法检测各组小鼠卵巢颗粒细胞凋亡
如图 3 所示,在卵巢髓质部的各级卵泡内绿色荧光增强,在卵巢皮质部未见绿色荧光表达。与对

表 5 各组小鼠血清 AMH、INH-B、T 浓度比较 ($n=6$)
Table 5 Comparison of serum AMH, INH-B and T concentrations in each group

组别 Groups	AMH/(pg/mL)	INH-B/(pg/mL)	T/(ng/mL)
对照组	3809.36±391.48	40.86±5.59	21.60±1.76
Control group			
A 模型组	3044.5±378.23**	36.28±3.76	20.17±1.87
A model group			
B 模型组	2400.88±102.05**	30.19±5.06**	16.05±1.42**
B model group			
C 模型组	2056.9±261.93**△△	27.42±1.96**	14.45±1.02**△
C model group			
D 模型组	1595.6±501.19**△△	23.59±3.05**△	11.93±2.3**△△
D model group			

注:与对照组相比, ** $P<0.01$;与 B 模型组相比, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared with the B model group, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$.

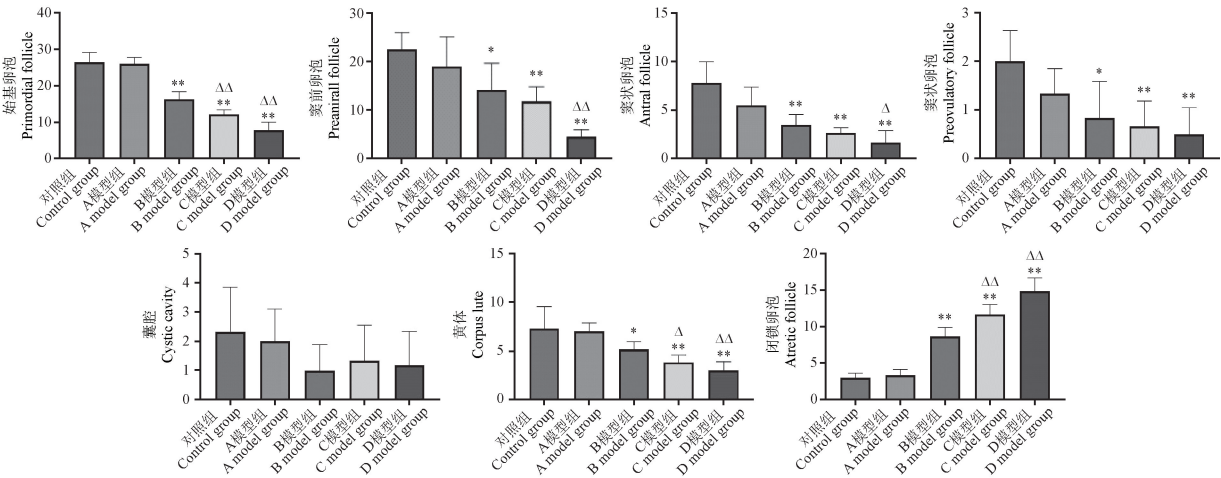


注:绿色三角标示始基卵泡;黄色三角标示窦前卵泡;红色三角表示窦状卵泡;灰色标示排卵前卵泡;棕色标示排卵后囊腔;蓝色三角标示黄体;黑色三角标示闭锁卵泡。

图 1 各组小鼠卵巢 HE 染色病理图

Note. Green triangle marks the primordial follicles. Yellow triangle marking preantral follicles. Red triangles indicate antral follicles. Gray marks preovulatory follicles. Brown marks the postovulatory cystic cavity. Blue triangles indicate the corpus luteum. Black triangles indicate atretic follicles.

Figure 1 Pathological diagram of ovary HE staining in mice in each group



注:与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 B 模型组相比, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ 。

图 2 各组小鼠卵泡计数

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the B model group, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$.

Figure 2 Follicle count of mice in each group

对照组相比,A、B、C、D 模型组小鼠卵巢组织 TUNEL 荧光强度增强($P<0.05$, $P<0.01$)。与 B 模型组相比,D 模型组小鼠卵巢组织 TUNEL 荧光强度增强($P<0.01$),其余无统计学意义($P>0.05$),见表 6。

2.5 各组小鼠卵巢免疫组化指标 CD34、VEGFA 及 EPO 蛋白表达比较

如图 4 所示,与对照组相比,B、C、D 模型组 CD34、VEGFA、EPO 蛋白的表达降低且具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),其余无统计学意义($P>0.05$)。与 B 模型组相比,C 模型组 EPO 蛋白的表达降低($P<0.01$),D 模型组 CD34、VEGFA、EPO 蛋白的表达降低($P<0.05$),其余无统计学意义($P>$

0.05),见表 7。
2.6 各组小鼠卵巢 HIF-1 α /SDF-1/CXCR4 通路相关基因 mRNA 表达比较

如表 8 所示,与对照组相比,A、B 模型组 HIF-1 α 、SDF-1 和 CXCR4 的 mRNA 表达升高($P<0.05$, $P<0.01$);C 模型组 HIF-1 α 的 mRNA 表达显著升高($P<0.01$);D 模型组 HIF-1 α 和 SDF-1 的 mRNA 表达均升高($P<0.05$, $P<0.01$),其余均无统计学意义($P>0.05$)。与 B 模型组相比,C 模型组 SDF-1、CXCR4 的 mRNA 表达明显降低($P<0.05$);D 模型组 HIF-1 α 、SDF-1、CXCR4 的 mRNA 表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),其余无统计学意义($P>0.05$)。

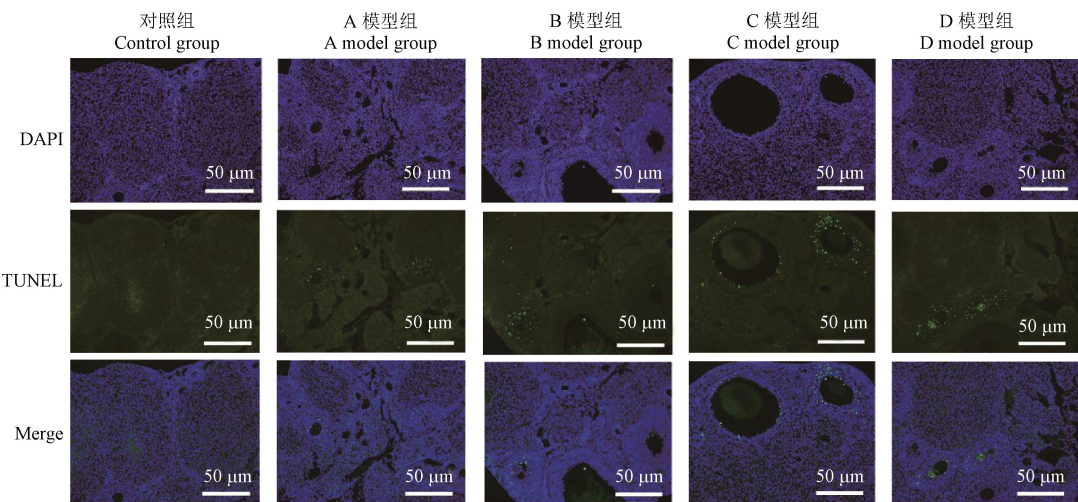


图 3 卵巢颗粒细胞凋亡图

Figure 3 Pathological diagram of ovary HE staining in mice in each group

表 6 各组小鼠卵巢颗粒细胞凋亡平均光密度($n=6,\bar{x}\pm s$)
Table 6 Average optical density of apoptosis in ovarian granulosa cells of mice in each group

组别 Groups	AOD
对照组 Control group	24.46 $\pm$ 3.48
A 模型组 A model group	30.33 $\pm$ 4.86 [*]
B 模型组 B model group	33.58 $\pm$ 6.15 [*]
C 模型组 C model group	38.64 $\pm$ 10.12 ^{**}
D 模型组 D model group	44.82 $\pm$ 7.83 ^{**Δ}

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与 B 模型组相比, ^{Δ} $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$. Compared with the B model group, ^{Δ} $P<0.05$.

表 7 各组小鼠卵巢免疫组化指标比较($n=6,\bar{x}\pm s$)
Table 7 Comparison of ovarian immunohistochemistry indexes in each group

组别 Groups	CD34	VEGFA	EPO
对照组 Control group	0.49 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.07	0.6 $\pm$ 0.1
A 模型组 A model group	0.48 $\pm$ 0.09	0.55 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.07
B 模型组 B model group	0.35 $\pm$ 0.09 [*]	0.38 $\pm$ 0.07 ^{**}	0.51 $\pm$ 0.01 [*]
C 模型组 C model group	0.29 $\pm$ 0.1 ^{**}	0.32 $\pm$ 0.06 ^{**}	0.47 $\pm$ 0.02 ^{*$\Delta$$\Delta$}
D 模型组 D model group	0.24 $\pm$ 0.05 ^{**Δ}	0.3 $\pm$ 0.05 ^{**Δ}	0.42 $\pm$ 0.07 ^{**Δ}

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与 B 模型组相比, ^{Δ} $P<0.05$, ^{$\Delta\Delta$} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$. Compared with the B model group, ^{Δ} $P<0.05$, ^{$\Delta\Delta$} $P<0.01$.

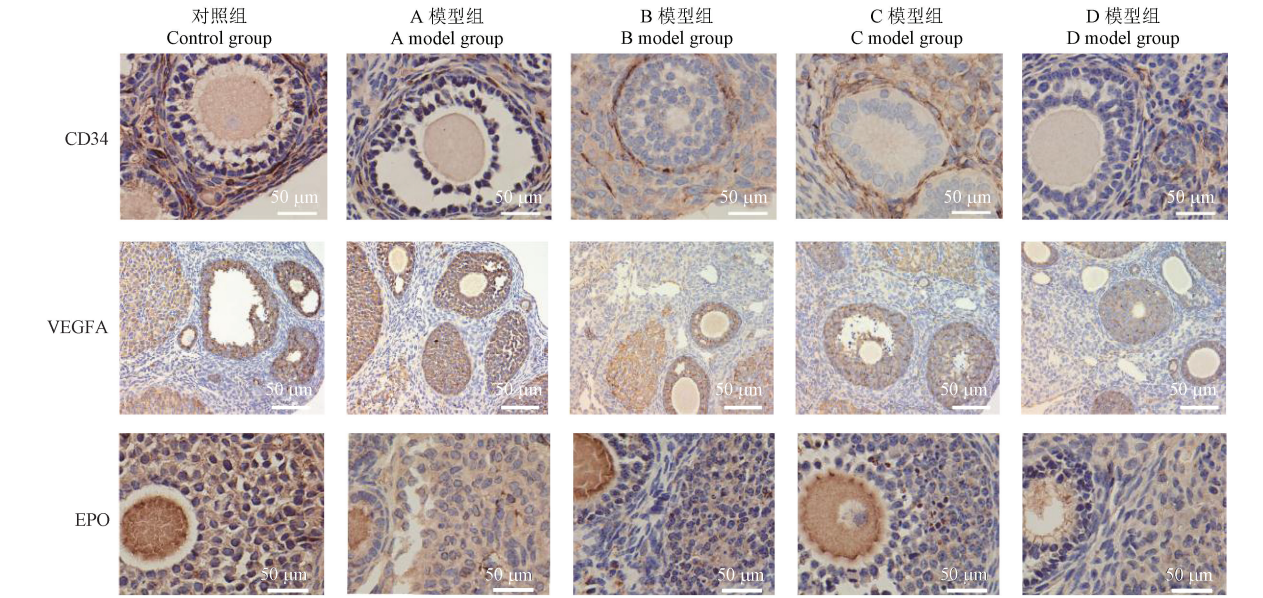


图 4 各组小鼠卵巢 CD34、VEGFA 和 EPO 蛋白染色结果(免疫组化染色)

Figure 4 Results of ovarian CD34, VEGFA and EPO protein staining in mice (immunohistochemical staining)

表 8 各组小鼠卵巢 HIF-1α、SDF-1 和 CXCR4mRNA 表达比较 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 8 Comparison of ovarian HIF-1α, SDF-1 and CXCR4mRNA expression in each group

组别 Groups	HIF-1α	SDF-1	CXCR4
对照组 Control group	0.44±0.02	0.58±0.08	0.31±0.03
A 模型组 A model group	0.96±0.05**	1.34±0.31*	0.39±0.04*
B 模型组 B model group	1.02±0.05**	1.94±0.26**	0.39±0.02*
C 模型组 C model group	1.08±0.02**	1.02±0.37 Δ	0.34±0.01 Δ
D 模型组 D model group	0.92±0.03** Δ	0.88±0.14* $\Delta\Delta$	0.32±0.03 Δ

注:与对照组相比, * P<0.05, ** P<0.01;与 B 模型组相比, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01。
Note. Compared with the control group, * P<0.05, ** P<0.01. Compared with the B model group, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01.

3 讨论

研究发现 TWP 可通过发挥细胞功能毒性,诱导靶器官发生特异性自身免疫,产生促炎效应,破坏卵巢功能,进而影响子宫发育和小鼠生长^[10]。目前临床 POI 病人主要致病原因之一是服用具有生殖毒性药物所致的医源性伤害,而 TWP 所诱导的小鼠 POI 模型是比较符合此发病机制的实验模型。

3.1 评价小鼠 POI 模型不同时间点的相关生物学指标

既往研究证明 FSH 诱导颗粒细胞增殖、分泌 E₂,联合 T 激素促进卵泡发育^[11],LH 作用于成熟卵

泡启动排卵^[12],排卵后囊腔内颗粒细胞分化为黄体并分泌 PROG 维持黄体功能^[13],因此在临床诊断中常根据患者内分泌激素水平来判断卵巢功能状态。本实验以 80 mg/kg TWP 分别灌胃 1 d(A 模型组)、3 d(B 模型组)、7 d(C 模型组)、14 d(D 模型组)监测模型小鼠卵巢功能的发展进程,通过血清激素检测发现 TWP 灌胃 3 d 后 ICR 小鼠血液中 E₂、PROG、T 水平显著下降,FSH、LH 水平显著上升,卵巢和子宫指数下降,这一现象与临床生化异常阶段 POI 患者的血清生化指标趋势和影像学特征相吻合^[14]。此外,始基卵泡、窦前卵泡中颗粒细胞分泌的 AMH,以及窦前卵泡、窦卵泡中颗粒细胞分泌的 INH-B 均呈下降趋势,表明 TWP 对于卵巢的生殖毒性可能与各级卵泡中颗粒细胞的功能状态及凋亡密切相关^[15]。

大量研究已证实 TWP 可以导致小鼠卵巢细胞凋亡水平升高^[16],但缺少 TWP 对小鼠卵巢功能损伤动态监测的相关性研究。本实验采用 TUNEL 荧光检测技术,通过对各组小鼠卵巢凋亡情况进行观察,发现与对照组相比,各模型组卵巢荧光凋亡强度增加,证明了 TWP 诱导了卵巢内细胞凋亡。结合 HE 染色病理结果发现,与对照组相比,B 模型组出现卵巢损伤,颗粒细胞层排列疏松、始基卵泡减少、闭锁卵泡增多,证明了 TWP 通过损伤颗粒细胞,使其凋亡率升高,导致卵泡发育异常、闭锁。C、D 模型组相较于 B 模型组,荧光凋亡强度明显升高,颗

粒细胞层更加稀薄、卵母细胞萎缩和核固缩严重,始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡和黄体数量明显减少,闭锁卵泡数量增加,表明 TWP 对小鼠卵巢损伤程度与作用时长呈正相关,且 TWP 灌胃 3 d 时病理指标符合“POI”动物模型标准且具有统计学意义。

本实验通过免疫组化检测发现,与对照组相比,B 模型组 VEGFA、CD34 蛋白表达明显下降,CD34 作为血管内皮细胞标志物,在卵巢组织中常锚定卵泡膜微血管,其蛋白表达降低抑制卵泡血管新生,影响卵泡成熟^[17]。VEGFA 基因表达下降会降低排卵期卵泡膜血管通透性^[18]、抑制卵泡成熟以及破坏黄体功能^[19],从而导致卵子排出障碍。实验结果表明,TWP 通过抑制卵泡膜血管新生,降低卵泡成熟率,诱导 POI 的发生。与对照组小鼠卵巢 EPO 蛋白阳性表达相比,自 B 模型组起二者在各级卵泡、黄体中的表达量明显下降,且随着造模时间的延长其阳性面积明显减少,EPO 是促进血管新生的主要表达因子之一,其分泌量的减少,使内皮细胞增殖、迁移行为被抑制,造成受损血管修复失败、无法维持血管形态,导致血管新生不足^[20]。由此可以得出 TWP 通过营造卵巢病理性缺氧环境,抑制卵泡血管新生、提高闭锁卵泡率、破坏黄体功能,建立了小鼠 POI 模型。通过检测各组小鼠卵巢中 HIF-1 α 、SDF-1/CXCR4 的 mRNA 表达发现,与对照组比较,A、B、C、D 模型组 HIF-1 α 、SDF-1/CXCR4 mRNA 呈高表达状态,当卵巢组织在受到损伤后试图通过激活 HIF-1 α /SDF-1/CXCR4 通路,影响间充质干细胞归巢于卵巢,以达到修复卵巢组织和内分泌功能,这与已有研究的实验趋势相一致^[21]。与 B 模型组相比,C、D 模型组 SDF-1/CXCR4 的 mRNA 表达量呈明显降低趋势,在 TWP 灌胃第 3 天小鼠通过促进 SDF-1/CXCR4 的 mRNA 表达导致卵巢自我修复能力处于“高位点”,诱导卵巢组织分泌血管生成因子、抑制卵泡凋亡。若此时不采取干预措施,卵巢组织持续受损会造成自我调节和修复能力降低,导致 SDF-1/CXCR4 信号通路表达强度下降^[22],由此可见 B 模型组即 TWP 造模 3 d 不仅是采取药物干预措施的关键点,更是决定是否进展为 POF 的节点。

3.2 POI 动物模型建立的意义与应用

POI 是 POF 的“前哨”,POF 是卵巢功能衰退的“终端”。将对卵巢功能诊断的关口前移,其目的是通过及时治疗,阻止卵巢功能不可逆衰退的到

来^[23]。目前常采用激素替代疗法对 POI 进行干预,但效果仍不理想。流行病学调查显示,POI 发病人群中 30 岁以下女性占比逐年升高^[24],且约有 69.2%继发性闭经女性从月经异常发展到 POI 的过程用时不到 1 年^[25],这提示 POI 发病人群低龄化且病程进展迅速。因此,制作 POI 动物模型时要注意实验动物的生殖寿命,避免造模周期过长^[26]使实验动物在取材时已处在生理性初老阶段^[27],而对实验结果造成干扰。此外,目前临床、动物研究中对于 POI 到 POF 的进展时长均未有明确定义。因此,在建立 POI 动物模型时,既需要符合临床发病规律,也要注意与 POF 动物模型进行区分。既往研究中出现 POI^[28]和 POF^[29]模型动物、造模药、剂量、造模时长均相同的情况,说明 TWP 虽可以造成卵巢功能衰退,但存在长时间损伤而未及时给予干预治疗,进展为 POF 动物模型的可能性;同时引发了因实验动物卵巢功能过度损伤,与临床 POI 患者实际情况存在偏差,导致评估 POI 治疗药物出现遗漏或错误的结果。因此,寻找模型成立及药物干预的最佳时间点对 POI 疾病的治疗具有重要意义。

针对 TWP 灌胃致小鼠 POI 模型实验研究中,发现在 B 模型组时期(造模 3 d)小鼠血清指标、卵巢病理、免疫组化和免疫荧光结果均符合 POI 动物模型标准^[30],同时也是小鼠卵巢丧失自我修复能力的“转折点”,更是药物干预治疗的最佳时间点,此实验方法回答了既往实验模型存在的问题和争议,最大程度体现了 POI 的发病本质(卵巢功能早期的病理状态)和干预原则(早发现、早治疗),同时为 POI 小鼠动物模型药效学研究的干预时间点提供数据支持,也为临床针对 POI 患者在不同时间节点的疾病进程采取更加优质、细化的治疗方案提供理论基础和思考方向。

参考文献:

- [1] CHRISTIN-MAITRE S, GIVONY M, ALBAREL F, et al. Position statement on the diagnosis and management of premature/primary ovarian insufficiency (except Turner Syndrome) [J]. Ann Endocrinol (Paris), 2021, 82(6): 555–571.
- [2] HOMER H A. Senataxin: a new guardian of the female germline important for delaying ovarian aging [J]. Front Genet, 2021, 12: 647996.
- [3] 陈水风, 王婷婷. 卵巢早衰不良健康后果及其干预的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(61): 84–85.
CHEN S F, WANG T T. Research progress on the adverse health

- effects of premature ovarian failure and its intervention [J]. World Latest Med Inf, 2019, 19(61): 84-85.
- [4] 王艳辉, 唐丽, 雷磊. 基于数据挖掘的早发性卵巢功能不全动物模型分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(9): 225-233.
- WANG Y H, TANG L, LEI L. Animal model of premature ovarian insufficiency based on data mining [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(9): 225-233.
- [5] 潘正美, 刘洋. 卵巢早衰小鼠模型综述 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 97-102.
- PAN Z M, LIU Y. Summary of mouse models of premature ovarian failure [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 97-102.
- [6] 黄长盛, 贺守第, 管雁丞, 等. 菟丝子黄酮和槲皮素对雷公藤多苷致卵巢早衰大鼠卵巢功能的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(6): 667-670.
- HUANG C S, HE S D, GUAN Y C, et al. Effects of dodder flavonoids and quercetin on the ovarian function in rat model of premature ovarian failure induced by tripterygium glycosides [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(6): 667-670.
- [7] 王维贵, 郭路, 刘晓程, 等. 二甲双胍通过抑制 NLRP1 等炎症小体改善小鼠卵巢储备的作用 [J]. 老年医学与保健, 2022, 28(2): 390-397.
- WANG W G, GUO L, LIU X C, et al. Metformin improves ovarian reserve in mice by inhibiting NLRP1 and other inflammasomes [J]. Geriatr Health Care, 2022, 28(2): 390-397.
- [8] 张芳, 师伟, 刘震, 等. 基于 Rho/ROCK 信号通路探讨补肾养精颗粒改善早发性卵巢功能不全模型大鼠卵巢功能的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(5): 2678-2683.
- ZHANG F, SHI W, LIU Z, et al. Mechanism of Bushen Yangjing Granules in improving ovarian fibrosis in POI model rats based on Rho/ROCK signaling pathway [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(5): 2678-2683.
- [9] 袁苑, 陈燕霞, 马堃, 等. 探索建立雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全肾虚血瘀证的小鼠模型 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1895-1903.
- YUAN Y, CHEN Y X, MA K, et al. Establishment of premature ovarian insufficiency kidney deficiency and blood stasis pattern mouse model with *Tripterygium wilfordii* polyglycoside for Bushen Culuan Decoction therapy [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(9): 1895-1903.
- [10] 吴静静, 任献青, 苏杭, 等. 基于 CiteSpace 对雷公藤多苷研究趋势及热点的可视化分析 [J]. 中国药事, 2022, 36(2): 170-178.
- WU J J, REN X Q, SU H, et al. Visualized analysis of research trends and hotspots of *Tripterygium wilfordii* glycosides based on CiteSpace [J]. Chin Pharm Aff, 2022, 36(2): 170-178.
- [11] JIN J, HU Q Y, XU W W, et al. Tanshinone IIA attenuates estradiol-induced polycystic ovarian syndrome in mice by ameliorating FSHR expression in the ovary [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(5): 3501-3508.
- [12] ODUWOLE O O, HUHTANIEMI I T, MISRAHI M. The roles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone in spermatogenesis and folliculogenesis revisited [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12735.
- [13] European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, WEBBER L, DAVIES M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency [J]. Hum Reprod, 2016, 31(5): 926-937.
- [14] 姬霞, 傅金英, 王冰玉, 等. 补肾养血方对卵巢早衰大鼠中抗苗勒氏管激素的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(1): 49-53.
- Ji X, FU J Y, WANG B Y, et al. Effect of bushen yangxue prescription on the levels of anti-mullerian hormone in rat with premature ovarian failure [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(1): 49-53.
- [15] CONDE P, MORADO S, ALVAREZ G, et al. Effect of the hematopoietic growth factors erythropoietin and kit ligand on bovine oocyte *in vitro* maturation and developmental competence [J]. Theriogenology, 2019, 123: 37-44.
- [16] 肖潇, 刘艳霞, 危一飞, 等. 益肾疏肝汤含药血清对雷公藤多苷干预的大鼠颗粒细胞凋亡的影响 [J]. 世界中医药, 2022, 17(22): 3148-3153.
- XIAO X, LIU Y X, WEI Y F, et al. Effect of yishen Shugan Decoction-containing serum on apoptosis of granulosa cells in rats treated with *Tripterygium wilfordii* glycosides [J]. World Chin Med, 2022, 17(22): 3148-3153.
- [17] HSIAO Y H, SIDDIQUI S, MAN Y G. Dual use of a single Wilms' tumor 1 immunohistochemistry in evaluation of ovarian tumors: a preliminary study of 20 cases [J]. J Cancer, 2010, 1: 93-97.
- [18] DUNCAN W, VAN DEN DRIESCHE S, FRASER H M. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α in the follicle and corpus luteum [J]. Endocrinology, 2008, 149(7): 3313-3320.
- [19] SHIMIZU T, IJIMA K, MIYABAYASHI K, et al. Effect of direct ovarian injection of vascular endothelial growth factor gene fragments on follicular development in immature female rats [J]. Reproduction, 2007, 134(5): 677-682.
- [20] WANG Y, YANG C, ELSHEIKH N A H, et al. HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(15): 5535-5547.
- [21] 徐基杰, 戴健, 朱彦华, 等. 鹿红方对缺血缺氧心肌细胞 SDF-1/CXCR4 信号通路的影响 [J]. 中国中医急症, 2022, 31(10): 1717-1721.
- XU J J, DAI J, ZHU Y H, et al. Effects of luhong decoction on SDF-1/CXCR4 signaling pathway in ischemic and hypoxic cardiomyocytes [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2022, 31(10): 1717-1721.