

不同浓度环磷酰胺诱导早发性卵巢功能不全小鼠模型及作用机制研究

贡磊磊¹, 王晓霞², 封学伟¹, 李心蕾¹, 赵 涵¹, 张雪艳¹, 冯 欣¹

(1. 首都医科大学附属北京妇产医院/北京妇幼保健院, 北京 100026; 2. 北京市肛肠医院, 北京 100120)

【摘要】 目的 观察比较不同浓度环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 诱导小鼠早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 模型的效果并探讨损伤机制。**方法** 32只6~8周龄的C57BL/6J雌性小鼠按体重随机区组法分为4组, 每组8只, 分别用75 mg/kg CTX、120 mg/kg CTX、120 mg/kg CTX+12 mg/kg 白消安 (Busulfan) 和同体积生理盐水腹腔单次注射来建立 POI 模型, 测定每组小鼠的卵巢系数、血清中雌二醇 (estradiol, E₂) 和卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 水平, 并通过蛋白质印迹法检测不同造模浓度条件下卵巢组织内 NAD 依赖性蛋白脱乙酰酶 5 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-5, SIRT5) 和叉头框蛋白 O3a (forkhead box protein O3a, FOXO3a) 蛋白表达水平的变化规律。筛选最佳造模浓度后, 将 40 只 6~8 周龄的 C57BL/6J 雌性小鼠按体重随机区组法分为 5 组, 每组 8 只; 以生理盐水作为对照, 用 120 mg/kg CTX 造模后第 1、2、7、14 天, 通过蛋白质印迹法检测不同造模时间内卵巢组织中 SIRT5 和 FOXO3a 蛋白表达水平的变化规律。**结果** 与生理盐水对照组比较, 不同浓度的 CTX (75 mg/kg 和 120 mg/kg) 和 120 mg/kg CTX+12 mg/kg Busulfan 均可以诱导小鼠出现 POI 损伤, 其中 120 mg/kg CTX 造模小鼠的卵巢系数 ($P<0.001$) 和 E₂ 水平变化较小 ($P<0.05$), 120 mg/kg CTX+12 mg/kg Busulfan 组小鼠被毛粗糙, 光泽度下降, 反应迟钝, 状态最差。与生理盐水对照组相比, 75 mg/kg CTX 造模组小鼠的卵巢组织中 FOXO3a 表达显著下调 ($P<0.05$), SIRT5 表达没有显著变化 ($P>0.05$), 而 120 mg/kg CTX 造模组的 SIRT5 ($P<0.05$) 和 FOXO3a ($P<0.05$) 表达均显著下调。120 mg/kg CTX 造模后第 2 和 7 天, SIRT5 ($P<0.01$) 和 FOXO3a ($P<0.001$) 表达均显著下调, 且第 7 天时表达水平变化最大 (SIRT5, $P<0.0001$; FOXO3a, $P<0.0001$)。**结论** 120 mg/kg CTX 诱导小鼠 POI 模型的卵巢损伤小于 75 mg/kg CTX 诱导的 POI 模型, 并且 120 mg/kg CTX 造模第 7 天的 SIRT5 和 FOXO3a 表达变化最为显著, 其作用机制可能与 SIRT5-FOXO3a 通路活性受抑制相关。

【关键词】 环磷酰胺; 早发性卵巢功能不全; 小鼠模型; SIRT5-FOXO3a 通路

【中图分类号】 Q95-33; R-332 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-5817(2025)04-0403-08



A Mouse Model and Mechanism Study of Premature Ovarian Insufficiency Induced by Different Concentrations of Cyclophosphamide

GONG Leilei¹, WANG Xiaoxia², FENG Xuewei¹, LI Xinlei¹, ZHAO Han¹, ZHANG Xueyan¹, FENG Xin¹

(1. Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing Maternal and Child Health Care Hospital, Beijing 100026, China; 2. Beijing Rectum Hospital, Beijing 100120, China)

Correspondence to: ZHANG Xueyan (ORCID: 0009-0007-6631-9363), E-mail: xueyan625@ccmu.edu.cn;

FENG Xin (ORCID: 0000-0002-6296-0321), E-mail: fenxin1115@ccmu.edu.cn

【ABSTRACT】 Objective To observe and compare the effects of different concentrations of cyclophosphamide (CTX) in inducing premature ovarian insufficiency (POI) model in mice and investigate

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金项目“SIRT5 驱动 FOXO3a 去乙酰化保护卵母细胞免受氧化损伤改善早发性卵巢功能不全及坤泰成方干预作用”(82204698)

【第一作者】 贡磊磊 (1989—), 男, 博士, 主管药师, 研究方向: 妇产科中药药理学及临床药学。E-mail: gl890925@ccmu.edu.cn

【通信作者】 张雪艳 (1969—), 女, 学士, 副主任药师, 研究方向: 妇产科临床药学。E-mail: xueyan625@ccmu.edu.cn。ORCID: 0009-0007-6631-9363;

冯 欣 (1965—), 女, 硕士, 主任药师, 研究方向: 妇产科临床药学。E-mail: fengxin1115@ccmu.edu.cn。ORCID: 0000-0002-6296-0321

the mechanism of injury. **Methods** Thirty-two 6~8-week-old female C57BL/6J mice were randomly divided into four groups ($n=8$ per group) using a weight-based block randomization method. The POI model was established *via* a single intraperitoneal injection of 75 mg/kg cyclophosphamide (CTX), 120 mg/kg CTX, 120 mg/kg CTX + 12 mg/kg Busulfan, or an equivalent volume of normal saline (control). Ovarian coefficients, serum estradiol (E_2) and follicle-stimulating hormone (FSH) levels were measured. Western blotting was performed to assess changes in ovarian expression levels of NAD-dependent deacetylase sirtuin-5 (SIRT5) and forkhead box O3a (FOXO3a) under different modeling conditions. After determining the optimal CTX concentration for modeling, an additional forty 6~8-week-old female C57BL/6J mice were randomly divided into five groups ($n=8$ per group) using a weight-based block randomization method: saline control, 120 mg/kg CTX sampling at 1, 2, 7, or 14 days after modeling. Western blotting was used to evaluate temporal changes of ovarian SIRT5 and FOXO3a protein expression. **Results** Compared with the saline control, all concentrations of CTX (75 mg/kg CTX, 120 mg/kg CTX) and 120 mg/kg CTX + 12 mg/kg Busulfan induced POI injury in mice. The 120 mg/kg CTX group exhibited smaller changes in ovarian coefficients ($P<0.001$) and E_2 levels ($P<0.05$), whereas the 120 mg/kg CTX + 12 mg/kg Busulfan group showed rough and reduced luster fur, sluggish response and was in the worst state. Compared with the saline control group, FOXO3a expression was significantly down-regulated ($P<0.05$), while SIRT5 remained unchanged in the 75 mg/kg CTX group ($P>0.05$). In contrast, both SIRT5 ($P<0.05$) and FOXO3a ($P<0.05$) were significantly down-regulated in the 120 mg/kg CTX group. Further analysis revealed that on day 2 and 7 after 120 mg/kg CTX modeling, the expressions of SIRT5 ($P<0.01$) and FOXO3a ($P<0.001$) were significantly down-regulated, with the largest decrease observed on day 7 (SIRT5, $P<0.0001$; FOXO3a, $P<0.0001$). **Conclusion** Ovarian injury in the POI model induced by 120 mg/kg CTX is milder than that in the POI model induced by 75 mg/kg CTX. Moreover, the expression changes of SIRT5 and FOXO3a are most significant on day 7 after modeling induced by 120 mg/kg CTX, which may be related to the inhibition of the SIRT5-FOXO3a signaling pathway.

[Key words] Cyclophosphamide; Premature ovarian insufficiency; Mouse model; SIRT5-FOXO3a pathway

早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 是指女性在 40 岁前出现卵巢功能减退, 主要表现为月经异常 (月经稀发或频发、闭经)、雌激素水平波动性下降和卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 水平升高 ($FSH>25\text{ U/L}$)^[1-2]。根据是否出现过自发月经, 将 POI 分为原发性和继发性。POI 主要病因有遗传因素、医源性因素、自身免疫因素、代谢/酶功能紊乱、社会心理因素等^[3]。近年来 POI 发病率呈上升趋势, 其全球发病率约为 3.5%^[4], 我国发病率约为 2.8%^[5]。过早的雌激素缺乏严重影响女性生存质量, 干预不及时将导致不可逆的卵巢功能衰竭, 即卵巢早衰, 提前进入更年期, 对女性生育健康和心理健康造成巨大影响^[6-7]。因此, 探究 POI 发病机制已成为防治本病的研究重点, 而科学构建病理学特征与实际临床症状相符, 且建模成功率高的动物疾病模型是其研究至关重要的环节。

医源性因素是 POI 的重要致病原因之一, 主要包括肿瘤放化疗过程, 尤其是化疗药物可诱导卵母细胞凋亡或破坏卵巢颗粒细胞功能^[2,8], 其中代表性药物为环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX)。CTX 是一种烷

化剂, 是肝脏细胞色素 P450 代谢生成和转化成磷酸氮芥的主要代谢产物。CTX 可诱导细胞 DNA 断裂, 抑制 RNA 转录和蛋白质合成, 从而产生细胞毒性, 是临床上许多肿瘤 (包括妇科肿瘤如乳腺癌、卵巢癌等) 化疗方案的组成药物^[9]。在 POI 动物模型中, 医源性造模的占比最高, 其中使用 CTX 造模占比最高^[7]。但不同文献中, CTX 造模浓度及时间不尽相同, 药物浓度以 75 mg/kg 或 120 mg/kg 为主, 部分研究用 120 mg/kg CTX + 12 mg/kg 白消安 (Busulfan), 药物处理时间为 1~2 周^[10-12]。目前, CTX 诱导 POI 模型的分子机制尚未完全阐明, 明确 CTX 对卵巢储备损伤的机制是研究及开发有效卵巢保护剂的基础。因此, 本研究基于已发表文献, 对不同浓度 CTX 和不同造模时间下诱导的 POI 损伤进行对比研究, 并对其诱导损伤机制进行初步探索, 以期为 POI 模型建立提供有效的技术理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

6~8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠 72 只 (体重 $20\pm2\text{ g}$),

购自北京大学医学部 [SCXK (京) 2022-0009], 质量合格证号为 110332241100005268、110332241100005326。所有动物饲养于中国中医科学院中药研究所实验动物中心 [SYXK (京) 2023-0077] 的屏障环境中, 12 h/12 h 明暗交替, 室温 22~25 °C, 所有动物均可自由饮水和进食。动物实验经中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理委员会审核 (伦理编号为 2023B354)。

将动物分为两个批次。第一批次按体重随机区组法将 32 只小鼠均分为 4 组, 分别为对照 (Ctl) 组、75 mg/kg CTX 组^[10]、120 mg/kg CTX 组^[11]、120 mg/kg CTX+12 mg/kg Busulfan 组^[12]。第二批次 40 只小鼠同样通过体重随机区组法均分为 5 组, 分别为 Ctl 组以及 120 mg/kg CTX 造模后第 1、2、7、14 天组。

1.2 试剂及仪器

CTX (货号 C126044) 和 Busulfan (批号 B123234) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。小鼠雌二醇 (estradiol, E₂) 酶联免疫检测试剂盒 (货号 CSB-E05109m) 和小鼠 FSH 酶联免疫检测试剂盒 (批号 CSB-E06871m) 购自南京建成生物工程研究所。磷酸盐缓冲液 (货号 P1020)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号 PC0020)、高效 RIPA 裂解液 (货号 R0010)、ECL Plus 超敏发光液 (货号 PE0010)、含 10×Tween 20 的 Tris 缓冲液 (货号 T1081) 和二甲基亚砜 (货号 D8370) 均购自北京索莱宝科技有限公司。兔抗 NAD 依赖性蛋白脱酰酶 5 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-5, SIRT5) 单克隆抗体 (货号 87795)、兔抗叉头框蛋白 O3a (forkhead box protein O3a, FOXO3a) 单克隆抗体 (货号 12829)、小鼠抗 β -actin 单克隆抗体 (货号 3700T) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。医用酒精消毒液 (乙醇含量为 70%~80%) 购自北京贞玉民生药业有限公司 (货号 202307003)。巴比妥酸钠 (货号 11715) 购自德国 Sigma 公司。Eppendorf 5417c 离心机购自德国 Eppendorf 公司。蛋白电泳及配套仪器购自美国 Bio-Rad 公司。WD-9405H 型脱色摇床和 WD-2110A 型恒温金属浴购自北京六一生物科技有限公司。

1.3 小鼠 POI 模型制备

第一批 32 只小鼠适应性饲养 3 d 后, 用生理盐水分别配制 75 mg/kg 和 120 mg/kg CTX。用 DMSO 溶解 Busulfan, 再用生理盐水配制成 12 mg/kg Busulfan (DMSO 终浓度按体积百分比为 0.01%)。不同浓度的 CTX 及 CTX+Busulfan 配制完成后, 对第一批次小鼠按照 1.1 节第一批次分组要求, 单次腹腔注射给各组小鼠

进行造模 (注射剂量: 0.1 mL/10 g), 对照组给予同体积的无菌生理盐水。第一批小鼠造模后第 7 天, 禁食 12 h 称重, 按照 50 mg/kg 剂量腹腔注射 1% 戊巴比妥钠进行麻醉, 眶动脉和眶静脉混合采血法留取血样, 4 °C 冰箱静止 2 h 后, 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清, -20 °C 冷冻备用。取血完成后, 医用酒精棉球消毒腹部, 沿下腹正中线剪开皮肤约 1 cm, 双手向头尾牵拉皮肤暴露腹腔, 用镊子轻提腹膜并剪开, 将肠管向上推移, 可见双侧卵巢 (位于肾脏下方, 呈粉红色或淡黄色菜花状结构, 连接输卵管和子宫角), 用眼科镊夹住子宫角与输卵管连接处, 剪断输卵管系膜及卵巢韧带, 游离两侧卵巢, 将卵巢置于含预冷 PBS 的培养皿中, 剔除周围脂肪和结缔组织, 称重, 卵巢组织于液氮速冻, -80 °C 保存备用。第二批 40 只小鼠适应性饲养 3 d 后, 用生理盐水配制 120 mg/kg CTX, 对第二批小鼠按照 1.1 节第二批分组要求, 单次腹腔注射给各组小鼠进行造模 (注射体积: 0.1 mL/10 g), 对照组给予同体积的无菌生理盐水。第二批小鼠分别于造模后第 1、2、7、14 天, 禁食 12 h 称重, 按照 50 mg/kg 剂量腹腔注射 1% 戊巴比妥钠进行麻醉, 待小鼠呼吸深慢无痛觉反应后, 通过前述方法收取小鼠卵巢, 称重后组织经液氮速冻, -80 °C 保存备用。

1.4 小鼠状态及卵巢系数测定

在采用不同浓度 CTX 造模后, 观察小鼠状态 (包括小鼠毛色和精神状态) 及卵巢系数。卵巢系数高低是反映卵巢损伤的重要标志之一, 卵巢系数越低表明卵巢损伤越重。卵巢系数计算方法如下: 卵巢系数 = 卵巢湿重 (mg) / 小鼠体重 (g) × 100%。

1.5 血清激素水平检测

实验前, 从冰箱取出第一批各组小鼠血清样本和 E₂、FSH 测试盒, 两种试剂盒实验操作方法类似, 具体如下: 试剂盒在室温下平衡半小时, 前期先配制洗涤液、标准品溶液、生物素抗原的稀释液和亲和素-HRP 的稀释液。(1) 标准品孔: 每孔加入稀释好的标准品 50 μ L, 然后加入生物素抗原工作液 50 μ L。(2) 空白孔: 不加样, 只加显色剂 A、B 和终止液用于调零。(3) 样品孔: 加入样品 50 μ L, 然后加入生物素抗原工作液 50 μ L。(4) 轻轻摇晃, 盖上封板膜, 37 °C 培养箱中孵育 30 min。(5) 第一次洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。(6) 加入 50 μ L 亲和素-HRP 到零孔、标准品孔和样品孔中, 轻轻摇晃,

盖上封板膜, 37 °C培养箱中孵育 30 min。(7) 第二次洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。(8) 显色: 每孔先加入显色剂 A 50 μ L, 再加入显色剂 B 50 μ L, 轻轻震荡混匀, 37 °C避光显色 10 min。(9) 终止: 每孔加终止液 50 μ L, 终止反应 (此时孔内液体蓝色立转黄色)。(10) 测定: 以空白孔调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度。测定应在加终止液后 10 min 内进行。(11) 根据标准品浓度与吸光度值绘制标准曲线, 依据标准曲线测定小鼠血清样本中 E_2 和 FSH 水平。

1.6 蛋白质印迹法检测卵巢组织中 SIRT5 和 FOXO3a 蛋白表达

将冻存的各组小鼠卵巢组织用预冷的 PBS 漂洗 2~3 次后, 加入 RIPA 裂解液, 匀浆机充分匀浆, 离心机 14 000 $\times g$ 4 °C 离心 10 min, 取上清蛋白用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。用 RIPA 将所有蛋白样品浓度调整至 5 μ g/ μ L。取 50 μ g 蛋白, 加入样品 1/4 体积的 5 $\times$ loading buffer, 混匀, 100 °C水浴锅加热 10 min。10% SDS-PAGE Gel, 100 V 稳压电泳 (约 1 h)。当样品进入分离胶, 将电压调整到 130 V, 继续稳压电泳, 直至 loading buffer 染料到达胶底部。停止电泳, 拆板, 进行湿转膜。转膜条件为 4 °C 100 V 稳压转膜 60 min。转膜后膜用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 4 °C 水平摇

床一抗孵育过夜, 其中一抗抗体用 3% BSA 以稀释比 1 : 1 000 进行稀释。一抗孵育完成后用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。二抗用 5% 脱脂牛奶稀释 1 000 倍, 膜于二抗中室温孵育 60 min。将膜放入化学发光拍照仪中通过化学发光法显影拍照。应用 Image J 软件分析目的蛋白条带的相对灰度值。

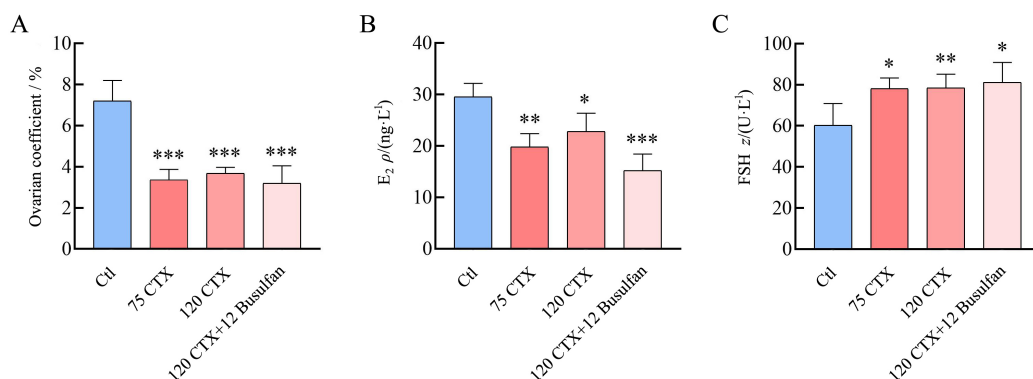
1.7 统计学方法

应用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图, 计量资料采用单因素方差分析比较多组间差异, 组内两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同造模方法对小鼠卵巢系数的影响

不同浓度 CTX 及 CTX+ Busulfan 造模后第 7 天, 与 Ctl 组小鼠相比, 各实验组小鼠均出现精神萎靡、活动量减少、体重下降。造模后第 7 天, 与 Ctl 组相比, 两种浓度 CTX 或 CTX+Busulfan 造模组小鼠卵巢系数均显著降低 ($P < 0.001$, 图 1A); 且与 Ctl 组比较, 两种浓度 CTX 或 CTX+Busulfan 造模组小鼠血清中 E_2 水平显著降低 ($P < 0.05$, 图 1B), FSH 浓度显著升高 ($P < 0.05$, 图 1C), 表明两种浓度 CTX 或 CTX+Busulfan 造模组小鼠卵巢组织均受到损伤。其中 CTX+Busulfan 造

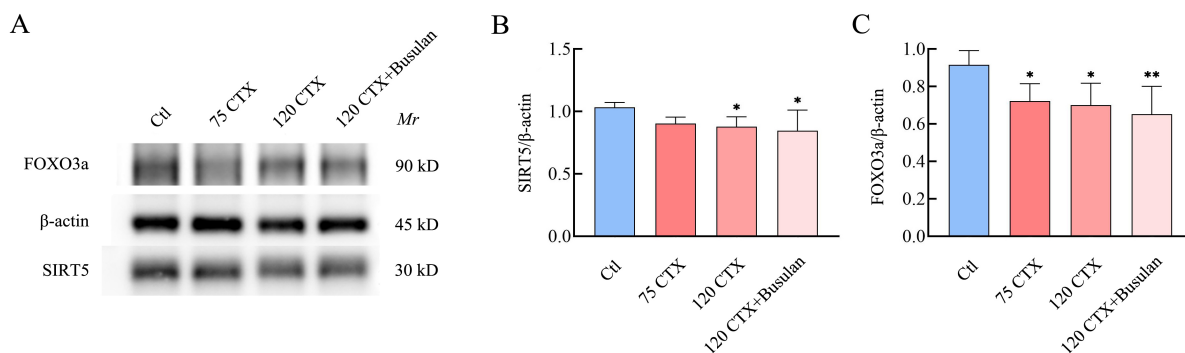


注: A, 第一批小鼠卵巢系数; B, 第一批小鼠血清 E_2 测定值; C, 第一批小鼠血清 FSH 测定值。Ctl 为对照组; 75 CTX、120 CTX、120 CTX+12 Busulfan 分别代表通过腹腔注射 75 mg/kg 环磷酰胺 (CTX)、120 mg/kg CTX、120 mg/kg CTX+12 mg/kg 白消安 (Busulfan) 构建的早发性卵巢功能不全模型组; E_2 为雌二醇; FSH 为卵泡刺激素。与对照组比较 ($n=8$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note: A, Ovarian index of the first batch of mice; B, Serum E_2 levels in the first batch of mice; C, Serum FSH levels in the first batch of mice. Ctl represents control group; 75 CTX, 120 CTX, 120 CTX+12 Busulfan represents premature ovarian insufficiency model group established by intraperitoneal injection of 75 mg/kg cyclophosphamide (CTX), 120 mg/kg CTX, 120 mg/kg CTX+12 mg/kg Busulfan respectively; E_2 represents estradiol; FSH represents follicle-stimulating hormone. Compared with Ctl ($n=8$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图1 CTX或CTX+Busulfan造模后第7天的小鼠卵巢系数和血清激素变化水平

Figure 1 Ovarian coefficients and changes of serum hormone levels in mice on day 7 after modeling with CTX or CTX+ Busulfan



注：A，不同浓度CTX及CTX+Busulfan造模后第7天SIRT5和FOXO蛋白质印迹图；B，不同浓度CTX及CTX+Busulfan造模后第7天SIRT5蛋白表达变化；C，不同浓度CTX及CTX+Busulfan造模后第7天FOXO3a蛋白表达变化。与对照组比较（ $n=8$ ），* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

Note: A, Western blot results of SIRT5 and FOXO3a proteins on day 7 after modeling with different concentrations of CTX and CTX+Busulfan; B, The expression of SIRT5 on day 7 after modeling with different concentrations of CTX and CTX + Busulfan; C, The expression of FOXO3a on day 7 after modeling with different concentrations of CTX and CTX + Busulfan. Compared with Ctl ($n=8$), * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图2 不同浓度的CTX和CTX+Busulfan造模后第7天卵巢组织SIRT5和FOXO3a表达情况

Figure 2 Expressions of SIRT5 and FOXO3a in ovarian tissues on day 7 after modeling with different concentrations of CTX and CTX+Busulfan

模组，小鼠被毛粗糙，光泽度下降，反应迟钝，精神状态最差，卵巢系数和 E_2 下降程度最大，同时FSH升高幅度最大，表明该组小鼠卵巢损伤程度最重；而120 mg/kg CTX造模组小鼠卵巢系数和 E_2 水平变化小于75 mg/kg CTX（ $P<0.001$ ）组和CTX+Busulfan组（ $P<0.001$ ），且该组小鼠精神状态优于75 mg/kg CTX组和CTX+Busulfan组小鼠。

2.2 不同组别卵巢组织中SIRT5和FOXO3a蛋白表达差异

蛋白质印迹结果表明，与Ctl组相比，两种浓度的CTX和CTX+Busulfan造模后第7天，小鼠卵巢组织中SIRT5蛋白表达有降低趋势，其中120 mg/kg CTX组和CTX+Busulfan组的SIRT5蛋白表达水平显著降低（ $P<0.05$ ，图2A和B）。相对于对照组，两种浓度的CTX组和CTX+Busulfan组小鼠卵巢组织中FOXO3a蛋白表达水平均显著降低（ $P<0.05$ ，图2A、C）。

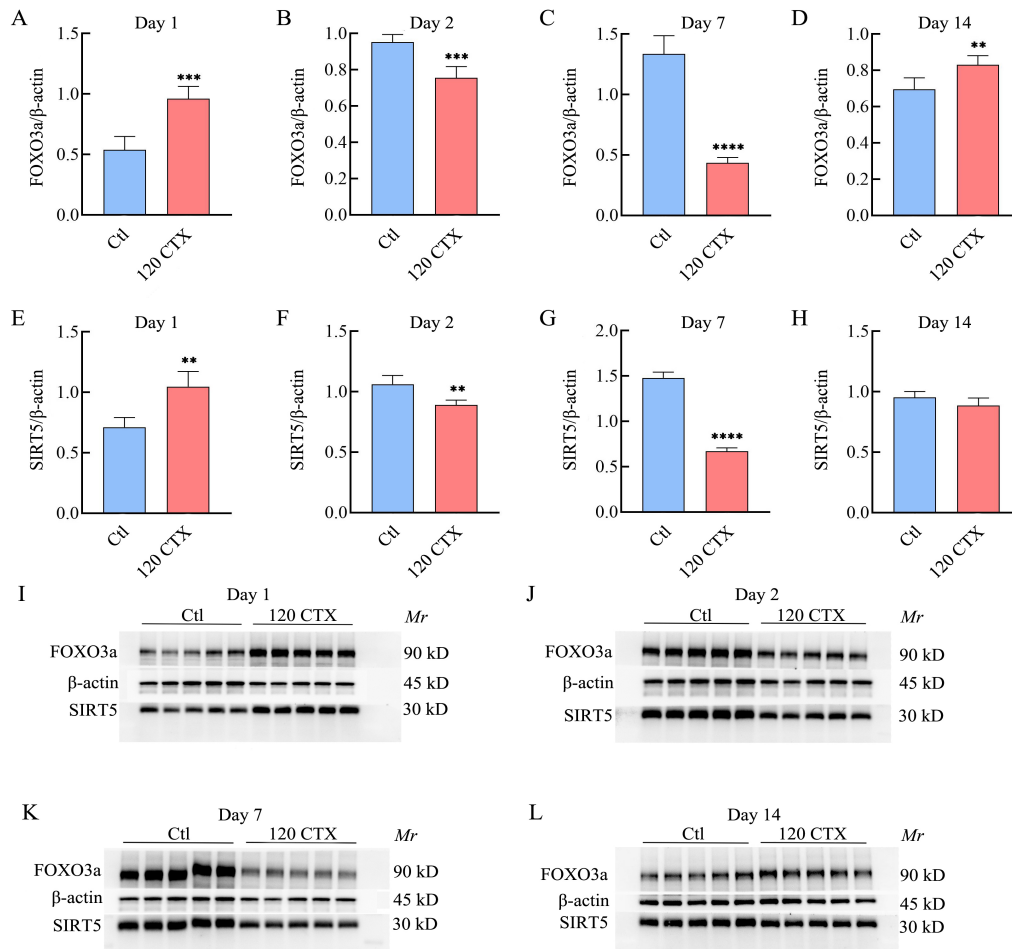
2.3 不同造模时间的卵巢组织中SIRT5和FOXO3a蛋白表达差异

依据第一批实验小鼠造模后状态、卵巢系数、激素水平以及蛋白表达结果，筛选出120 mg/kg作为第二批实验的造模浓度，并于造模后第1、2、7、14天，检测卵巢组织中SIRT5和FOXO3a蛋白水平变化。结果表明，与Ctl组相比，FOXO3a表达在造模后第2和7天显著下降（ $P<0.01$ ，图3B、C、J、K），且在第7天时含量变化最大；而SIRT5同样在造模后第2和7天表达显著降低（ $P<0.01$ ，图3F、G、J、K），且在第7天时含量变化达到最大。

3 讨论

临床研究表明，CTX是一种与POI和卵巢功能障碍有关的化疗药物，具有极强的性腺毒性^[13-16]。由于伦理问题，仅有少数临床研究考察了CTX对人体卵巢组织的影响，这些研究表明，女性在暴露于CTX后，卵巢内原始卵泡数量减少^[17]。在小鼠模型中，CTX不仅可以导致原始卵泡数量和激素水平下降，还会诱导卵巢颗粒细胞凋亡和卵泡闭锁^[18]。且母体孕前CTX暴露会影响其卵母细胞功能^[19]。本研究考察了不同浓度的CTX和CTX+Busulfan诱导小鼠卵巢损伤模型，发现在经不同浓度的CTX造模后，小鼠卵巢系数降低，且 E_2 和FSH激素水平发生紊乱，进一步证实CTX可诱导卵巢损伤。

CTX损伤卵巢的机制之一是诱导细胞凋亡^[20-22]，其中涉及卵母细胞凋亡的途径为磷酸化的毛细血管扩张共济失调突变和RAD-3相关蛋白激酶（phosphorylated ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase, p-ATR）/磷酸化检查点激酶2（phosphorylated checkpoint kinase 2, p-CHK2）/p-p63/细胞质聚（腺苷二磷酸核糖）聚合酶 [cytoplasmic poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase, cPARP]^[22]；另有研究发现卵巢中的p53上调凋亡调节因子（p53 upregulated modulator of apoptosis, PUMA）是CTX诱导DNA损伤后原始卵泡耗竭的重要触发因素^[23]。CTX损伤卵巢的另一机制为激活氧化应激，在小鼠卵母细胞中，CTX通过诱导氧化应激干扰细胞纺锤体形态和微管排列导致卵母细胞



注：A和E，造模后第1天 FOXO3a和 SIRT5表达变化；B和F，造模后第2天 FOXO3a和 SIRT5表达变化；C和G，造模后第7天 FOXO3a和 SIRT5表达变化；D和H，造模后第14天 FOXO3a和 SIRT5表达变化；I，造模后第1天 FOXO3a和 SIRT5蛋白质印迹图；J，造模后第2天 FOXO3a和 SIRT5蛋白质印迹图；K，造模后第7天 FOXO3a和 SIRT5蛋白质印迹图；L，造模后第14天 FOXO3a和 SIRT5蛋白质印迹图。与对照组比较（ $n=5$ ），** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ 。

Note: A and E, The expression of FOXO3a and SIRT5 on day 1 after modeling; B and F, The expression of FOXO3a and SIRT5 on day 2 after modeling; C and G, The expression of FOXO3a and SIRT5 on day 7 after modeling; D and H, The expression of FOXO3a and SIRT5 on day 14 after modeling; I, Western blot results of FOXO3a and SIRT5 on day 1 after modeling; J, Western blot results of FOXO3a and SIRT5 on day 2 after modeling; K, Western blot results of FOXO3a and SIRT5 on day 7 after modeling; L, Western blot results of FOXO3a and SIRT5 on day 14 after modeling. Compared with Ctl ($n=5$), ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

图3 120 mg/kg CTX造模不同时间后小鼠卵巢组织SIRT5和FOXO3a表达变化情况

Figure 3 Expression of SIRT5 and FOXO3a in mouse ovarian tissue at different times after 120 mg/kg CTX modeling

质量下降^[24]；CTX毒性代谢物可通过与胞内还原性谷胱甘肽结合，引发谷胱甘肽耗竭，诱导卵巢颗粒细胞凋亡^[25]；我们前期实验同样发现，在CTX诱导小鼠POI模型中，关键抗氧化酶超氧化物歧化酶2（superoxide dismutase 2, SOD2）表达下调^[26]。已有研究表明，卵巢储备减少或高龄产妇卵丘细胞和颗粒细胞中SIRT5 mRNA和蛋白水平降低会影响卵母细胞质量^[27]。FOXO3a缺失小鼠表现出一种特殊卵巢表型，即卵泡全面活化导致卵母细胞死亡、功能性卵泡早期

耗竭和继发性不孕^[28]。因此SIRT5和FOXO3a表达变化在一定程度上反映了卵巢组织的损伤。本研究在前期基础上进一步探讨了不同CTX浓度及不同造模时间对小鼠卵巢SIRT5和FOXO3a蛋白表达的影响效应，结果发现120 mg/kg CTX和120 mg/kg CTX+12 mg/kg Busulfan造模后，FOXO3a和SIRT5表达均显著下调，75 mg/kg CTX造模后，FOXO3a表达显著下调，而SIRT5表达呈下降趋势，但差异无统计学意义。因此，后续以120 mg/kg CTX作为最终造模浓度，进一步考察

CTX造模后, SIRT5和FOXO3a表达随时间的变化规律, 结果表明造模后第2和7天的FOXO3a和SIRT5表达水平均显著下降, 且在第7天时表达水平最低; 而造模后第14天的SIRT5虽表达下调但无显著性差异, 而FOXO3a表达上调。已有研究表明SIRT5-FOXO3a在维持胞内氧化还原平衡上发挥重要调节作用^[27]。SIRT5通过去乙酰化FOXO3a促进其在细胞核中的定位, 上调抗氧化酶(如SOD2)活性, 参与细胞抗氧化防御效应^[26,29-30]。因此, 我们推测CTX通过抑制SIRT5-FOXO3a通路活性诱导氧化应激在POI模型建立中发挥重要作用。

本文研究也存在一定的不足, 如在各组CTX造模后, 缺乏CTX诱导小鼠POI模型的组织病理研究和氧化应激(如SOD2等相关分子)研究; 不同浓度CTX诱导POI损伤产生差异影响的具体机制有待探讨; CTX诱导小鼠POI的分子机制还需未来进一步研究确证。

综上所述, 本研究考察了不同浓度CTX诱导POI的小鼠模型, 发现75 mg/kg以上浓度的CTX均可造模成功, 且120 mg/kg CTX对小鼠卵巢和E₂激素影响较小, 进一步研究揭示SIRT5-FOXO3a通路可能是CTX诱导POI损伤的重要分子机制之一, 这为阐明CTX化疗诱导卵巢损伤病理机制及开发延缓卵巢衰老药物提供了新的思路。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验均已通过中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理委员会审核(批号:2023B354)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。All animal experiments involved in this study were reviewed and approved by the Animal Welfare and Ethics Committee of the Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences (Approval No. 2023B354). All experimental procedures were conducted in strict compliance with the relevant Chinese laws, regulations, and guidelines on laboratory animal use.

[作者贡献 Author Contribution]

贡磊磊提供实验设计, 参与动物实验取材;
王晓霞负责动物实验;
封学伟负责数据分析;
李心蕾和赵涵负责实验指标的检测;
张雪艳负责整体实验方案指导;
冯欣负责整体实验方案和稿件的修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 中华医学会妇产科学分会绝经学组. 早发性卵巢功能不全的临床诊疗专家共识(2023版)[J]. 中华妇产科杂志, 2023, 58(10):721-728. DOI: 10.3760/cma.j.cn112141-20230316-00122. Menopausal Group of Obstetrics and Gynecology Branch of Chinese Medical Association. Expert consensus on clinical diagnosis and treatment of early-onset ovarian insufficiency (2023 edition)[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2023, 58(10):721-728. DOI: 10.3760/cma.j.cn112141-20230316-00122.
- [2] PANAY N, ANDERSON R A, BENNIE A, et al. Evidence-based guideline: premature ovarian insufficiency[J]. Hum Reprod Open, 2024, 2024(4): hoae065. DOI:10.1093/hropen/hoae065.
- [3] 冯晓玲, 李力, 曲凡, 等. 早发性卵巢功能不全中西医结合诊疗指南[J]. 中医杂志, 2022, 63(12):1193-1198. DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2022.12.017. FENG X L, LI L, QU F, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of premature ovarian insufficiency with integrated traditional Chinese and western medicine[J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(12): 1193-1198. DOI: 10.13288/j. 11-2166/r. 2022. 12.017.
- [4] LI M, ZHU Y, WEI J, et al. The global prevalence of premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis [J]. Climacteric, 2023, 26(2): 95-102. DOI: 10.1080/13697137.2022.2153033.
- [5] 吴洁, 郁琦. 早发性卵巢功能不全的诊断和处理[J]. 中华医学信息导报, 2016(21):21. DOI: 10.3969/j.issn.2095-6606.2024.01.015. WU J, YU Q. Diagnosis and treatment of early-onset ovarian insufficiency[J]. China Med News, 2016(21):21. DOI: 10.3969/j. issn.2095-6606.2024.01.015.
- [6] RUTH K S, DAY F R, HUSSAIN J, et al. Genetic insights into biological mechanisms governing human ovarian ageing[J]. Nature, 2021, 596(7872): 393-397. DOI: 10.1038/s41586-021-03779-7.
- [7] 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. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20230317. 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. DOI: 10.13422/j.cnki. syfjx.20230317.
- [8] HUANG C Z, ZHAO S M, YANG Y J, et al. TP63 gain-of-function mutations cause premature ovarian insufficiency by inducing oocyte apoptosis[J]. J Clin Invest, 2023, 133(5): e162315. DOI:10.1172/JCI162315.
- [9] FANOURIAKIS A, KOSTOPOULOU M, CHEEMA K, et al. 2019 Update of the Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of lupus nephritis[J]. Ann Rheum Dis, 2020, 79(6):713-723. DOI:10.1136/annrheumdis-2020-216924.
- [10] QIN X S, ZHAO Y, ZHANG T Y, et al. TrkB agonist antibody ameliorates fertility deficits in aged and cyclophosphamide-

- induced premature ovarian failure model mice[J]. Nat Commun, 2022, 13(1):914. DOI:10.1038/s41467-022-28611-2.
- [11] DING C Y, ZHU L P, SHEN H, et al. Exosomal miRNA-17-5p derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improves ovarian function in premature ovarian insufficiency by regulating SIRT7[J]. Stem Cells, 2020, 38(9):1137-1148. DOI: 10.1002/stem.3204.
- [12] LIU M Y, ZHANG D, ZHOU X W, et al. Cell-free fat extract improves ovarian function and fertility in mice with premature ovarian insufficiency[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1):320. DOI:10.1186/s13287-022-03012-w.
- [13] MO J H, HU H, LI P D, et al. Human hair follicle-derived mesenchymal stem cells improve ovarian function in cyclophosphamide-induced POF mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16(1):67. DOI:10.1186/s13287-024-04097-1.
- [14] BHARDWAJ J K, BIKAL P, SACHDEVA S N. Chemotherapeutic drugs induced female reproductive toxicity and treatment strategies[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2023, 37(7): e23371. DOI: 10.1002/jbt.23371.
- [15] SWIGONSKA S, NYNCA A, MOLCAN T, et al. The role of lncRNAs in the protective action of tamoxifen on the ovaries of tumor-bearing rats receiving cyclophosphamide[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(23):12538. DOI:10.3390/ijms252312538.
- [16] YAO Y, WANG B, YU K H, et al. Nur77 ameliorates cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in mice by inhibiting oxidative damage and cell senescence[J]. J Ovarian Res, 2024, 17(1):203. DOI:10.1186/s13048-024-01532-y.
- [17] LANDE Y, FISCH B, TSUR A, et al. Short-term exposure of human ovarian follicles to cyclophosphamide metabolites seems to promote follicular activation *in vitro*[J]. Reprod Biomed Online, 2017, 34(1): 104-114. DOI: 10.1016/j.rbmo.2016.10.005.
- [18] YUKSEL A, BILDIK G, SENBABA OGLU F, et al. The magnitude of gonadotoxicity of chemotherapy drugs on ovarian follicles and granulosa cells varies depending upon the category of the drugs and the type of granulosa cells[J]. Hum Reprod, 2015, 30(12):2926-2935. DOI:10.1093/humrep/dev256.
- [19] DI EMIDIO G, D'AURORA M, PLACIDI M, et al. Pre-conceptional maternal exposure to cyclophosphamide results in modifications of DNA methylation in F1 and F2 mouse oocytes: evidence for transgenerational effects[J]. Epigenetics, 2019, 14(11): 1057-1064. DOI: 10.1080/15592294.2019.1631111.
- [20] PETRILLO S K, DESMEULES P, TRUONG T Q, et al. Detection of DNA damage in oocytes of small ovarian follicles following phosphoramidate mustard exposures of cultured rodent ovaries *in vitro*[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 253(2):94-102. DOI:10.1016/j.taap.2011.03.012.
- [21] AI G H, MENG M, GUO J, et al. Adipose-derived stem cells promote the repair of chemotherapy-induced premature ovarian failure by inhibiting granulosa cells apoptosis and senescence[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1):75. DOI:10.1186/s13287-023-03297-5.
- [22] LUAN Y, EDMONDS M E, WOODRUFF T K, et al. Inhibitors of apoptosis protect the ovarian reserve from cyclophosphamide [J]. J Endocrinol, 2019, 240(2): 243-256. DOI: 10.1530/JOE-18-0370.
- [23] NGUYEN Q N, ZERAFA N, LIEW S H, et al. Loss of PUMA protects the ovarian reserve during DNA-damaging chemotherapy and preserves fertility[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6):618. DOI:10.1038/s41419-018-0633-7.
- [24] JEELANI R, KHAN S N, SHAEIB F, et al. Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 110:11-18. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.006.
- [25] CHEN Y, ZHAO Y, MIAO C Y, et al. Quercetin alleviates cyclophosphamide-induced premature ovarian insufficiency in mice by reducing mitochondrial oxidative stress and pyroptosis in granulosa cells[J]. J Ovarian Res, 2022, 15(1):138. DOI:10.1186/s13048-022-01080-3.
- [26] GONG L L, HOU J L, YANG H J, et al. Kuntai capsule attenuates premature ovarian insufficiency by activating the FOXO3/SIRT5 signaling pathway in mice: A comprehensive study using UHPLC-LTQ-Orbitrap and integrated pharmacology[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 322: 117625. DOI: 10.1016/j.jep.2023.117625.
- [27] PACELLA-INCE L, ZANDER-FOX D L, LANE M. Mitochondrial SIRT5 is present in follicular cells and is altered by reduced ovarian reserve and advanced maternal age[J]. Reprod Fertil Dev, 2014, 26(8):1072-1083. DOI:10.1071/RD13178.
- [28] CASTRILLON D H, MIAO L L, KOLLIPARA R, et al. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a[J]. Science, 2003, 301(5630): 215-218. DOI:10.1126/science.1086336.
- [29] KUMAR S, LOMBARD D B. Functions of the sirtuin deacetylase SIRT5 in normal physiology and pathobiology[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2018, 53(3):311-334. DOI:10.1080/10409238.2018.1458071.
- [30] WANG Y F, ZHU Y B, XING S G, et al. SIRT5 prevents cigarette smoke extract-induced apoptosis in lung epithelial cells *via* deacetylation of FOXO3[J]. Cell Stress Chaperones, 2015, 20(5):805-810. DOI:10.1007/s12192-015-0599-7.

(收稿日期:2025-01-02 修回日期:2025-04-22)

(本文编辑:陈毅)

[引用本文]

贡磊磊, 王晓霞, 封学伟, 等. 不同浓度环磷酰胺诱导早发性卵巢功能不全小鼠模型及作用机制研究[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(4): 403-410. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.194.

GONG L L, WANG X X, FENG X W, et al. A mouse model and mechanism study of premature ovarian insufficiency induced by different concentrations of cyclophosphamide[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(4): 403-410. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.194.