论著

文章编号:1000-5404(2008)06-0506-04

小鼠卵巢早衰动物模型的构建

李彩霞,王凤英,李玉艳,俞炽阳 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨用化学药物及放射性处理,建立小鼠卵巢早衰动物模型的方法。**方法** 将80只昆明小鼠分为化学药物处理组、放射组、对照组、去势组。化学药物组使用环磷酰胺和白消安干预,放射组采用^{60}Coγ射线放射。通过观察阴道脱落细胞监测小鼠动情周期变化、雌激素水平、卵巢及子宫内膜组织学改变等指标,判断建模效果。**结果** 化学药物组、放射组与对照组相比动情期构成比降低、动情间期构成比增加($P<0.01$);雌激素水平明显降低($P<0.01$),接近去势组水平($P>0.05$);两个处理组小鼠均可见卵巢萎缩、生长卵泡数明显减少、间质纤维化;卵巢未闭锁原始卵泡数显著减少($P<0.01$),且随建模后时间的延长而呈进一步下降趋势,但化学药物组与放射组各相同时间段之间无明显差异。**结论** 以化学药物及放射方法能够成功建立小鼠卵巢早衰模型。

关键词:卵巢早衰;化学治疗;放射治疗;动物模型;小鼠

中图法分类号:R-332;R711.75 **文献标识码**:A

Establishment of mouse model of premature ovarian failure

LI Cai-xia, WANG Feng-ying, LI Yu-yan, YU Chi-yang (Department of Gynaecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To develop a mouse model of premature ovarian failure (POF) by chemical treatment or radiotreatment. **Methods** Eighty Kunming mice were divided into four groups, including chemical treatment group that were administered Cyclophosphamide and Busulfan, radiotreatment group receiving ^{60}Co γ ray irradiation, control group and castrated group. To evaluate the animal model, vaginal smears were collected daily for estrous cycle determination, and serum hormone levels and histological changes in ovaries were examined. **Results** Estrous cycles became irregular after chemical treatment or radiotreatment ($P<0.01$). The serum estrogen levels of chemical treatment group and radiotreatment group were markedly lower than those of control group ($P<0.01$), but close to those of castrated group ($P>0.05$). Compared to control group, ovaries from chemical treatment and radiotreatment groups showed ovarian atrophy and interstitial fibrosis. The number of growing follicles and non-atretic primordial follicles was notably reduced ($P<0.01$) in an increasingly descending way, but showed no significant difference between chemical treatment group and radiotreatment group. **Conclusion** The mouse model of POF is successfully established by applying experimental irradiation of ^{60}Co γ ray or injection of Cyclophosphamide and Busulfan.

Key words: premature ovarian failure; chemotherapy; radiotherapy; animal model; mouse

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是指妇女40岁以前由于卵巢内卵泡耗竭或因医源性损伤而发生的卵巢功能衰竭。医学进步使肿瘤患者的生存率明显提高,但放疗、化疗导致的女性性腺损害逐渐升高的趋势引起人们注意[1]。因此,如何在放疗、化疗的同时保护妇女的卵巢功能、改善其生活质量是妇产科学及生殖医学研究的重要内容。本实验模拟临床放疗、化疗过程,探讨环磷酰胺(Cyclophosphamide, CTX)、白消安(Busulfan, BUS)等化疗药物及^{60}Coγ射线处理建立小鼠POF模型的方法及效果,为深入研究物理化学等因素导致的POF的发病机制、预防和治疗提供研究模型。

基金项目:第三军医大学西南医院优生优育技术中心专项基金(2005)
Supported by the Funds to the Technical Center for Improving Birth Outcome and Child Development by Southwest Hospital of Third Military Medical University (2005)

作者简介:李彩霞,女,湖北省监利县人,硕士研究生,主要从事辅助生殖方面的研究。电话:(023) 68765903, E-mail:caixia111@21cn.com.

通信作者:俞炽阳,电话:(023) 68765410

收稿日期:2007-10-15;**修回日期**:2007-12-11

1　材料与方法

1.1　动物分组及模型建立

雌性昆明鼠 80 只、5 ~ 6 周龄、体质量约 29 g,购自第三军医大学实验动物中心,经阴道脱落细胞涂片检查确定其动情周期正常。实验分组如下:CTX + BUS 化学药物处理组(A 组)30 只,给予 CTX 120 mg/kg 腹腔注射、BUS(购于 sigma 公司) 12 mg/kg 皮内注射。分别于干预后 10 d 内(包括 1、5、10 d 各 3 只,计数未闭锁原始卵泡数量)、30、60 d 三个时间点取材,每个时间点 10 只或 11 只。^{60}Coγ 射线放射处理组(B 组)30 只,给予总剂量为 0.5GY^{60}Coγ 射线放射,照射率 60 cGy/min, 照射野 20 cm × 20 cm,距离 80 cm,照射后在无特殊致病原(SPF) 级条件下饲养。取材时间及样本数同 A 组。对照组(C 组)10 只,不作干预,30 d 后处死。手术去势组(D 组)10 只,经腰背部切口逐层进入腹腔,寻找肾上缘大量脂肪堆,可见卵巢包裹其中,切除双侧卵巢后缝合,30 d 后处死。

1.2　观察指标

1.2.1　动物的一般状态　　观察处理后各组小鼠的活动、饮食及皮毛变化等情况。

1.2.2　阴道细胞学检查　　每日 8:00 行阴道脱落细胞涂片检查,观察脱落细胞变化。用消毒棉签插入小鼠阴道约 0.5 cm,轻轻转动后取出,将棉签上的阴道脱落细胞均匀涂于洁净的载玻片上,待涂片自然风干后 HE 染色镜检,根据脱落细胞类型按标准[2]分析动情周期,以动情期或动情间期占总观察时间的百分比为其构成比。

1.2.3　卵巢组织形态学观察及卵泡计数　　测量卵巢大小,然后用 10% 福尔马林固定 24 h,石蜡包埋,5 μm 厚度连续切片,每隔 20 μm 取一张,取 20 张切片,常规 HE 染色后 400 倍光镜下计数 A、B、C 组各时间段 3 个标本的切片中全部未闭锁原始卵泡数目,乘以常数 5 后得到最终未闭锁始基卵泡数目[3],同时观察卵巢中生长卵泡、颗粒细胞、黄体及间质等的组织学变化。

1.2.4　子宫组织学观察　　动物处死后,取出整个子宫,修剪周围组织,固定标本,行子宫组织切片,观察子宫内膜变化。

1.2.5　血清雌激素(E_2)水平　　标本来源于 A 组和 B 组的 30、60 d、C 组、D 组实验鼠,用摘眼球法取血,2 000 r/min 离心 10 min 取血清,化学发光法测定血清 E_2 水平,使用 Roche 公司 E170 电化学发光分析仪、配套试剂及标准品。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较采用单因素方差分析 Scheffe 法。

2　结果

2.1　一般情况

A 组处理后出现一过性活动减少、精神萎靡、摄食少、皮毛光泽度下降等变化,持续 3 d 左右,无明显体质量下降。其中 4 只小鼠出现皮内注射处皮肤小溃疡,后自愈。B 组照射后动物均精神萎靡、活动明显减少,脱毛,体质量下降 1.0 ~ 2.0 g,照射后2 d 有 1 只小鼠死亡,1 w 后上述症状逐渐好转。C 组动物活动、摄食等一般情况正常、体重无下降、对外界刺激的反应性好,灵活性强。D 组术后 2 h 内恢复活动,手术切口无感染,术后 2 d 恢复正常状态。

2.2　阴道脱落细胞变化

根据阴道脱落细胞变化来判断小鼠动情周期,A 组和 B 组在处理后即出现动情周期紊乱:A 组在出现较长时间上皮细胞及白细胞后偶有一个角化细胞类型变化,随着时间的延长角化细胞出现的频率减少;B 组偶有角化细胞出现,其中 2 只小鼠在放疗 2 d 及放疗 10 d 后出现持续无角化状态。C 组呈上皮细胞、白细胞、角化细胞交替的周期性变化;D 组阴道上皮呈持续性无角化状态;各组动情期、动情间期构成比比较有显著差异,具体见表 1。

表 1　放射及化学药物对昆明鼠动情周期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	动情期构成比(%)	动情间期构成比(%)
A 组 30 d	10	19.2 ± 5.6^{ab}	58.8 ± 9.9^{ab}
A 组 60 d	11	18.4 ± 4.9^{ab}	57.1 ± 10.0^{ab}
B 组 30 d	10	9.4 ± 6.4^{ab}	62.5 ± 17.0^{ab}
B 组 60 d	10	6.9 ± 5.0^{a}	79.9 ± 11.3^{a}
C 组	10	20.7 ± 9.1^{b}	23.5 ± 3.3^{b}
D 组	10	0.9 ± 1.6	96.7 ± 2.7

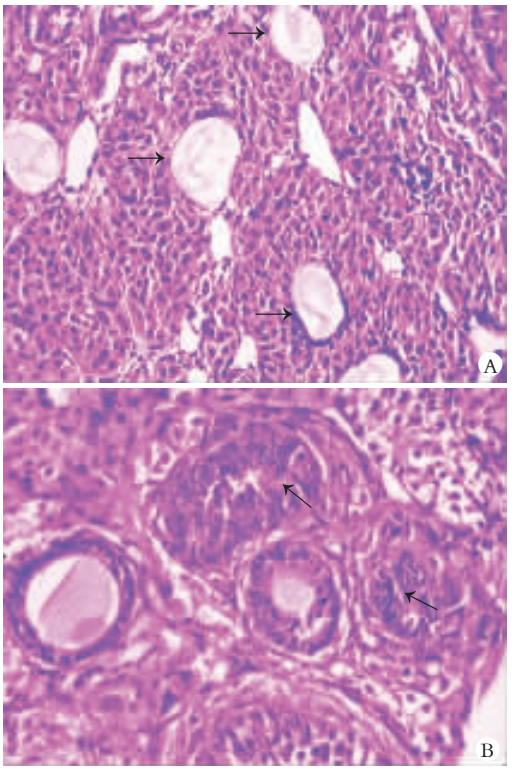
a: $P < 0.01$, 与 C 组比较; b: $P < 0.01$, 与 D 组比较

2.3　卵巢组织学改变

与 C 组相比,A 组、B 组处理后 1、5、10 d 的卵巢未闭锁原始卵泡数目明显减少,但有各个阶段的生长卵泡存在,卵巢萎缩不明显。A 组、B 组处理 30、60 d 后卵巢萎缩明显,光镜下见卵巢皮质增厚、结构混乱、各阶段生长卵泡数目明显减少,闭锁卵泡增多、卵母细胞及透明带形态异常、呈变性、固缩或消失等退行性变化及空泡样改变;卵母细胞周边颗粒细胞层次减少、排列紊乱、细胞间隙增大,黄体纤维化、数目增加;血管减少,间质纤维化、坏死(图 1)。有少数未闭锁原始卵泡及较多凋亡闭锁原始卵泡,病理损伤随观察时间延长而加重(图 2A)。B 组病理变化最重,表现为卵巢间质严重纤维化,皮质中仅存极少量或所有的原始卵泡均消失,生长、成熟期卵泡数目锐减或完全消失,正常的皮质基质细胞也大量丢失,卵巢由多个大的黄体样物质形成,偶有淋巴细胞浸润(图 2B)。连续切片计数非闭锁原始卵泡数, A 组、B 组各时间段与 C 组相比有显著差异($P < 0.01$);A 组 1 d、A 组 5 d 与 A 组 60 d 相比有显著差异($P < 0.01$);B 组 1 d 与 B 组 60 d 相比有显著差异($P < 0.01$);A 组与 B 组各相同时间段间比较无统计学差异($P > 0.05$),具体见图 3。

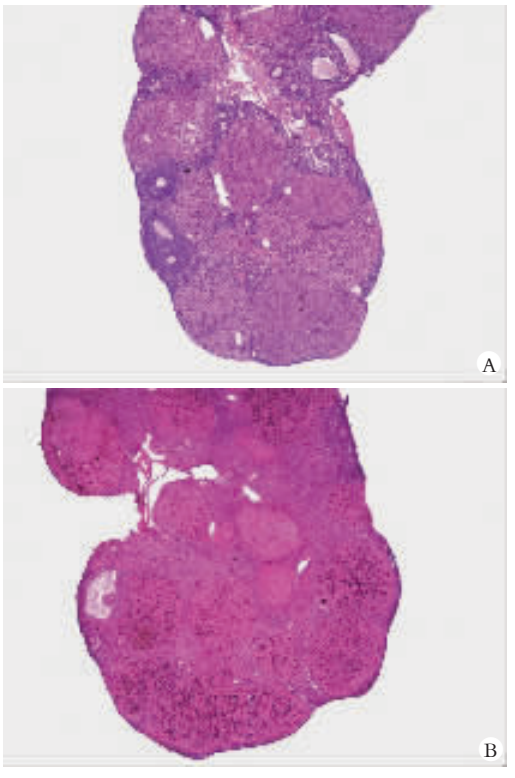
2.4　子宫组织学观察

A 组和 B 组子宫,胞质中分泌泡少,固有层结缔组织分布广泛,子宫腺少,腺腔小其中 A 组有 1 例子宫出现积水,镜下可见宫腔内大量炎性细胞充盈。C 组正常子宫内膜厚,上皮以分泌细胞为主,胞质中有大量分泌泡,固有层有大量子宫腺,腺腔大,腔内有分泌物,结缔组织疏松,其中有丰富的毛细血管及小动、静脉。D 组子宫萎缩,子宫内膜薄,腺体少 。



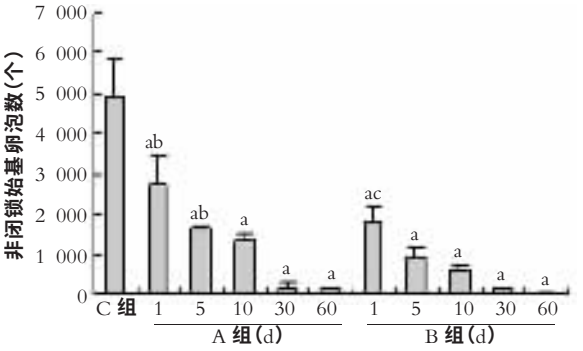
A：射线照射后卵泡闭锁、卵母细胞崩解、残留透明带(箭头所示)；B：化学药物处理后卵泡闭锁(箭头所示)

图1 卵母细胞病理变化 (HE ×400)



A：化学药物处理60 d后卵巢，各组卵泡数目明显减少，卵母细胞呈退行性变化；B：^{60}Coγ射线照射60 d后卵巢，卵巢中仅单个窦卵泡，陈旧性黄体样物质多，有淋巴细胞侵润

图2 卵巢组织学观察 (HE ×40)



a：$P<0.01$，与C组比较；b：$P<0.01$，与A组60 d比较；c：$P<0.01$，与B组60 d比较

图3 连续切片计数非闭锁始基卵泡数 ($\bar{x}\pm s$)

2.5 血清 E_2 水平

与C组(30.93 ±4.05 pg/L)相比，A组30、60 d血清 E_2 水平[(19.8 ±0.78)，(16.88 ±2.06) pg/L]，和B组30、60 d血清 E_2 水平[(18.51 ±1.51)，(15.5 ±1.17) pg/L]明显下降($P<0.01$)，A组、B组和D组(14.82 ±2.13 pg/L)之间无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

POF是许多恶性肿瘤患者接受放疗或化疗后的一个主要远期并发症，大剂量、长时间的放射线和/或化疗药物会损害各年龄段卵巢功能，导致闭经、生殖能力下降或丧失[4]。如何在提高患者生存率的同时保护卵巢功能，减轻或避免化疗所致的POF，提高其生活质量成为重要研究内容。建立有效的放疗和/或化疗后POF动物模型对研究放疗、化疗对卵巢损伤机制及其预防、治疗措施具有重要意义。

卵巢是女性生殖系统中对辐射最为敏感的部位，其损伤与放射剂量有直接关系[5]。化学药物对卵巢的损害同样与剂量有关，卵泡丢失随CTX剂量增加而呈指数上升，100 mg/kg CTX可使小鼠卵泡储备丢失一半以上[6]。目前明确有卵巢毒性损害的化疗药物包括如环磷酰胺、左旋苯丙氨酸氮芥、白消安、氮芥等烷化剂。因此本研究选择120 mg/kg CTX腹腔注射联合12 mg/kg BUS皮内注射、0.5 Gy ^{60}Coγ射线放射处理。

小鼠动情周期可以反映其卵巢的功能[7]。本研究中动情周期监测表明放射处理或化学药物处理后小鼠卵泡不能发育成熟或不能排卵，与POF患者的卵巢有卵泡丢失、闭锁、无排卵相符。而且放射致卵巢损伤比化学药物导致的损伤更严重，与临床放疗后易出现永久性闭经一致。研究认为卵巢内存活始基卵泡计数为评估卵巢受损的确切有效方法[8]。本实验计数结果表明放射或化学药物处理后卵巢原始卵泡丢失严重，且卵巢损伤随处理后时间延长而加重。虽然没有显著差异，但放射导致损害较化学药物更为严重。子

宫内膜生长与卵巢组织学改变相一致。由于放射或化疗处理小鼠卵巢皮质有不同程度的纤维化、各级生长卵泡闭锁丢失、颗粒细胞不能分泌雌、孕激素，雌激素降低反馈性作用于下丘脑，促进促性腺激素释放激素（GnRH）的分泌，GnRH 又促进垂体促黄体生成素（LH）和促卵泡生成素（FSH）的分泌，从而出现血清 LH 和 FSH 水平的升高、E_2 水平的降低。本实验中血清 E_2 值显著低于正常对照，而与去势组相近与此一致。

综上，小鼠接受 CTX 和 BUS 注射或接受放射处理后短期内即出现卵巢储备下降、卵泡闭锁；处理后 30 d 及 60 d 后，体内出现雌激素水平下降、排卵功能下降，动情期减少或消失，卵巢组织纤维化，子宫内膜改变等。类似卵巢早衰患者激素失调、继发闭经等临床改变，说明模型构建成功。

一般认为 POF 的发生机制为始基卵泡池储备不足、卵泡闭锁加速、优势卵泡募集的改变、卵泡成熟障碍等[9]。而放疗、化疗导致卵泡的破坏和卵巢组织纤维化的具体机制尚不十分明确。体外研究显示 CTX 致卵巢损伤的靶细胞为颗粒细胞，卵泡内的某些特定信号被激活而促使细胞发生凋亡，进一步使卵泡过早排空和导致卵巢生殖与内分泌功能丧失而发生 POF[10]。CTX 及 BUS 为细胞周期非特异性烷化剂，其毒性不仅作用于分裂增殖期细胞，也可作用于未发育的卵母细胞或原始卵泡中的前颗粒细胞，影响卵泡的发育和成熟，因此，化疗一段时间后卵巢的各级卵泡受损，导致卵泡破坏、卵巢储备减少、组织纤维化，卵巢发生不可逆损伤，并出现子宫、性激素等的一系列病理变化，最终导致 POF。本研究中 CTX 及 BUS 处理组生长卵泡和成熟卵泡减少，同时未闭锁原始卵泡数目亦显著下降（$P<0.01$），也说明 CTX 与 BUS 不仅影响生长发育中的卵泡，而且对静止原始卵泡也有破坏作用。

放射线可与细胞的任何分子相互作用，但最重要的是作用于细胞核，等于或大于损伤剂量的射线导致 DNA 复制能力无法恢复，细胞凋亡加剧，使受照射器官结构和功能受到影响[11]。有丝分裂 G_2 和 M 期的细胞比 S 期的细胞对时线敏感性较高。卵子大部分时间相当于有丝分裂的分裂期即 M 期，对射线敏感。射线使卵细胞死亡主要是破坏周围的颗粒细胞，终止卵细胞的营养供应所致，而颗粒细胞在其繁殖时期特别是卵泡早期及卵泡成熟期最易受损伤。

现有的 POF 模型主要为使用粗制的卵巢抗原、透明带（ZP）抗原或纯化 ZP3 抗原等免疫动物，或者切除初生小鼠胸腺的自身免疫卵巢炎的小鼠模型[12]。有研究者通过敲除连接蛋白 37（Cx37）基因、生长分化因子-9（GDF-9）基因、Bcl2 基因等建立卵巢早衰的转基因动物模型[13]。利用半乳糖代谢方法使小鼠出现类似 POF 改变，也成为一种探讨 POF 的发病机制和病理改变的实验性模型[14]。但上述动物模型均不能模拟临床放化疗对卵巢的损伤，不能达到进一步研究物理化学 POF 的目的。本研究利用 CTX、BUS 及 $^{60}Co\gamma$ 射线成功建立了 POF 模型。本模型构建方法简便、成功率高、可行性强。在医源性 POF 研究中与其他建模方法相比具有很大优势。

参考文献：

[1] Meskhi A, Seif M W. Premature ovarian failure[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2006, 18(4): 418 – 426.

[2] 顾为望, 袁　进. 常用实验动物的特点及其在医学生物学中的应用-小鼠[M]//魏　泓. 医学实验动物学. 第 2 版. 成都：四川科学技术出版社, 2001: 205 – 224.

[3] Tilly J L. Ovarian follicle counts--not as simple as 1, 2, 3[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2003, 1: 11.

[4] Wallace W H, Thomson A B, Kelsey T W. The radiosensitivity of the human oocyte[J]. Hum Reprod, 2003,18(1): 117 – 121.

[5] Gosden R G, Wade J C, Fraser H M, *et al*. Impact of congenital or experimental hypogonadotrophism on the radiation sensitivity of the mouse ovary[J]. Hum Reprod, 1997, 12(11): 2483 – 2488.

[6] Meirow D, Lewis H, Nugent D, *et al*. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool[J]. Hum Reprod, 1999, 14(7): 1903 – 1907.

[7] 谢荣凯, 陈波洁, 成　娅, 等. 大鼠胚胎卵巢移植的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(20): 2051 – 2053.

[8] Bolon B, Bucci T J, Warbritton A R, *et al*. Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: results from continuous breeding bioassays[J]. Fundam Appl Toxicol, 1997, 39(1): 1 – 10.

[9] Luborsky J L, Meyer P, Sowers M F, *et al*. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition[J]. Hum Reprod, 2003, 18(1): 199 – 206.

[10] De-Felici M, Klinger F G, Farini D, *et al*. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death[J]. Reprod Biomed Online, 2005, 10(2): 182 – 191.

[11] Yu X, Kamijima M, Ichihara G, *et al*. 2-Bromopropane causes ovarian dysfunction by damaging primordial follicles and their oocytes in female rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1999, 159(3): 185 – 193.

[12] Kelkar R L, Meherji P K, Kadam S S, *et al*. Circulating auto-antibodies against the zona pellucida and thyroid microsomal antigen in women with premature ovarian failure[J]. J Reprod Immunol, 2005, 66(1): 53 – 67.

[13] Liu G, Shi F, Blas-Machado U, *et al*. Dietary galactose inhibits GDF-9 mediated follicular development in the rat ovary[J]. Reprod Toxicol, 2006, 21(1): 26 – 33.

[14] Bandyopadhyay S, Chakrabarti J, Banerjee S, *et al*. Galactose toxicity in the rat as a model for premature ovarian failure: an experimental approach readdressed[J]. Hum Reprod, 2003, 18(10): 2031 – 2038.

（编辑　王　红）