

· 短篇论著 ·

十一酸睾酮饮食诱导多囊卵巢综合征大鼠模型的建立

李春花 王良岸 陈冬梅 刘颖 洪宇 谢梅青

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是女性生殖内分泌及代谢功能异常引起的排卵障碍性疾病^[1]。目前,国内外关于 PCOS 的病因及发病机制尚无定论,建立合适的 PCOS 动物模型对该病的深入研究有重要意义。大鼠具有较稳定的动情周期,故多选择大鼠为 PCOS 造模动物。目前造模方法大致有 5 种:(1)雄激素造模法:皮下注射内酸睾酮^[2],或脱氢表雄酮 (DHEA)^[3],或硫酸普拉睾酮钠^[4]等;(2)雌激素造模法:皮下注射戊酸雌二醇 (EV)^[5];(3)孕激素联合 hCG 造模法:皮下埋植左旋 18-甲基炔诺酮硅胶棒 + 皮下注射 hCG^[6];(4)胰岛素联合 hCG 造模法:连续 28 d 皮下注射胰岛素及 hCG^[6];(5)芳香化酶抑制剂造模法:来曲唑^[7]持续灌胃 21 d。上述建模方法均需通过皮下注射或皮下埋植或灌胃途径来实现,而这些操作本身对大鼠的刺激也会影响造模的效果。本研究参照外源性雄激素建模的方法,通过对幼年雌性 SD 大鼠投放含十一酸睾酮 (TU) 的饲料,饮食诱导 PCOS 大鼠模型的建立,旨在探讨用一种无痛苦、安全、有效的方法来建立 PCOS 大鼠模型。

一、材料与方法

1. 主要材料:(1)实验动物:成年断乳雌性 21~23 d SD 大鼠 40 只(无特定病原体 SPF 级)购自中山大学动物实验中心,体质量 (50±3) g。(2)试剂:TU 粉末为广州齐云生物技术有限公司产品,ELISA 试剂盒购于上海蓝基生物科技有限公司。(3)TU 饲料的制备及动物分组:刚断乳大鼠每天每只约进食普通饲料 30 g,在普通饲料中加入不同剂量的 TU 粉末搅拌均匀,采用 59℃ 高压压缩制成颗粒饲料,配置成浓度分别 1 mg/30 g (TU 粉末质量/鼠质量,低剂量组)、2 mg/30 g (中剂量组)、4 mg/30 g (高剂量组),对照组为普通饲料,每组 10 只 SD 大鼠。(4)饲养条件:室温 20~25℃,相对湿度 40%~70%,颗粒饲料和净化水喂养,自由择食,12 h/12 h 昼夜明暗交替(日光灯照明)。各组均于第 70 日龄起持续每天定时进行阴道涂片,当低、中、高剂量组大鼠失去规律的动情周期时,继续观察,当所有大鼠均出现持续性阴道上皮角化,且角化时间超过 2 个动情周期时,于同一日处死。

2. 方法:(1)模型制备:大鼠麻醉后,经下腔静脉采血,待缺血致死后摘取双侧卵巢。在显微镜下去除卵巢周围脂

肪组织,分别测量卵巢的长、宽、厚,并称重。4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色,电镜下观察。血液标本经 3000 r/min 离心 10 min 后,将血清分装于 1.5 ml 离心管中, -20℃ 保存备用。(2)模型观察指标:动情周期变化;卵巢形态学改变,卵泡计数参照 Tamura 等^[2]实验标准;检测血清促卵泡刺激素 (FSH)、黄体生成素 (LH)、DHEA、性激素结合蛋白 (SHBG)、睾酮、雌二醇水平;计算卵巢体积 (mm³) = 0.5 × 长 (mm) × 宽 (mm) × 厚 (mm);卵巢质量 (g) = 左、右卵巢质量之和/2。(3)PCOS 大鼠模型造模成功标准:参照文献[1,7],无排卵即失去规律的动情周期或持续阴道上皮角化;卵巢体积增大和多囊性改变;符合上述两项即可提示造模成功。

3. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 软件进行数据的统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

二、结果

1. 动情周期变化:低、中、高剂量组中所有大鼠于第 75~89 日龄开始失去规律动情周期,继续观察,各组大鼠均出现持续性阴道上皮角化。中剂量组大鼠开始失去规律的动情周期及开始出现持续阴道上皮角化的时间均明显早于其他各组,且角化持续时间较长,分别与其他各组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。动情周期阴道涂片见大量片状角化上皮细胞持续存在。

表 1 各组大鼠动情周期变化情况 (d, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	失去规律动情周期时间	阴道上皮开始角化时间	阴道上皮角化持续时间
低剂量组	10	81.7 ± 1.9 ^{abc}	102 ± 7 ^{abc}	20 ± 6 ^{abc}
中剂量组	10	79.1 ± 2.2 ^{ac}	91 ± 4 ^{ac}	30 ± 5 ^{ac}
高剂量组	10	85.1 ± 3.4 ^a	106 ± 7 ^a	16 ± 7 ^a
对照组	10	95.6 ± 3.0	113 ± 5	10 ± 5

注:“a”表示与对照组比较,“b”表示与中剂量组比较,“c”表示与高剂量组比较, $P < 0.05$

2. 卵巢形态变化:(1)卵泡发育:低、中、高剂量组闭锁卵泡数、囊状卵泡数增加,黄体数及颗粒细胞层数减少,分别与对照组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);但低、中、高剂量组卵泡膜细胞层数较对照组无显著增加 ($P > 0.05$)。中剂量组与低、高剂量组比较,闭锁卵泡数及囊状卵泡数增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);黄体数及颗粒细胞层数少于低、高剂量组,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。(2)卵巢病理检查:低剂量组见较多的囊状卵泡,部分闭

DOI:10.3760/ema.j.issn.0529-567x.2012.05.014

基金项目:广东省科技计划(2009B060300019)

作者单位:510120 广州,中山大学孙逸仙纪念医院生殖内分泌科

通信作者:谢梅青,Email:mqxiqz@yahoo.com.cn

锁卵泡,黄体数目减少;中剂量组中见囊状卵泡、闭锁卵泡,偶见黄体;高剂量组见 1~2 个成熟卵泡,闭锁卵泡及发育中的小卵泡多见,囊状卵泡较少,可见少量黄体。低、中、高剂量组囊状卵泡中卵泡颗粒细胞层数减少至 3~4 层,卵泡内卵母细胞或放射冠消失,卵泡膜细胞层数增多不明显。对照组见多个黄体及不同发育阶段的卵泡,成熟卵泡内见卵母细胞及放射冠,颗粒细胞排列整齐,多为 6~8 层。见图 1~5。提示建立大鼠 PCOS 模型成功。

3. 性激素及 SHBG 水平变化:低、中、高剂量组较对照组 DHEA 及雌二醇水平升高,SHBG 水平降低,且中剂量组雌二醇高于其他各组,但差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

4. 大鼠一般情况及卵巢变化:低、中、高剂量组大鼠较对照组大鼠体质量、身长、体质指数(BMI)明显增加(P 均 <0.05),卵巢体积明显增大(P 均 <0.05)。低、中剂量组卵巢质量高于对照组,分别比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);高剂量组卵巢质量高于对照组,但两组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

三、讨论

国内外许多学者根据不同的研究目的利用外源性雄激素成功建立了 PCOS 大鼠模型。邱少松等^[8]给 9 日龄未断乳的雌性大鼠皮下注射 TU,大鼠于 108~122 日龄出现持续阴道上皮角化,建模成功,并发现此方法建模可引起血脂代谢异常。Mannerås 等^[9]采用双氢睾酮(DHT)建模时发现,大鼠失去规律的动情周期提示无排卵,卵巢呈多囊性改变,有大量闭锁卵泡,颗粒细胞层退化,但可引起体质量及体内脂肪增加,适用于 PCOS 卵巢形态学及代谢变化的研究。Yin 等^[10]报道,用于治疗男性性功能障碍的 TU 胶丸口服后,TU 与油酸一起经肠道吸收进入淋巴系统,避免了肝脏的首过灭活作用,药物由淋巴系统进入血浆,部分地降解为十一酸双氢睾酮,TU 与十一酸双氢睾酮在血浆和组织中均水解产生天然雄激素,即睾酮和 DHT。DHT 是睾酮在体内非芳香化的代谢产物,具有较高的雄激素活性,可抑制颗粒细胞上 FSH 诱导的芳香化酶活性,抑制雄激素转化为雌激素,外周血循环低雌激素水平使下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)脉冲分泌亢进,垂体对 LH 的敏感性增加,分泌过量

表 2 各组大鼠的卵巢卵泡发育情况($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	闭锁卵泡数(个)	囊状卵泡数(个)	黄体数(个)	颗粒细胞层数	卵泡膜细胞层数
低剂量组	10	33±8 ^{ab}	9.3±2.6 ^{abc}	6.2±1.4 ^a	4.44±0.88 ^a	5.67±0.47
中剂量组	10	43±12 ^{ac}	16.5±3.7 ^{ac}	5.6±2.1 ^{ac}	4.25±0.97 ^a	5.42±0.26
高剂量组	10	36±8 ^a	12.5±2.4 ^{ab}	6.1±2.0 ^a	4.67±1.18 ^a	5.80±0.18
对照组	10	14±5	4.2±0.9	20.4±5.2	6.17±0.24	5.17±0.21

注:“a”表示与对照组比较,“b”表示与中剂量组比较,“c”表示与高剂量组比较, $P<0.05$

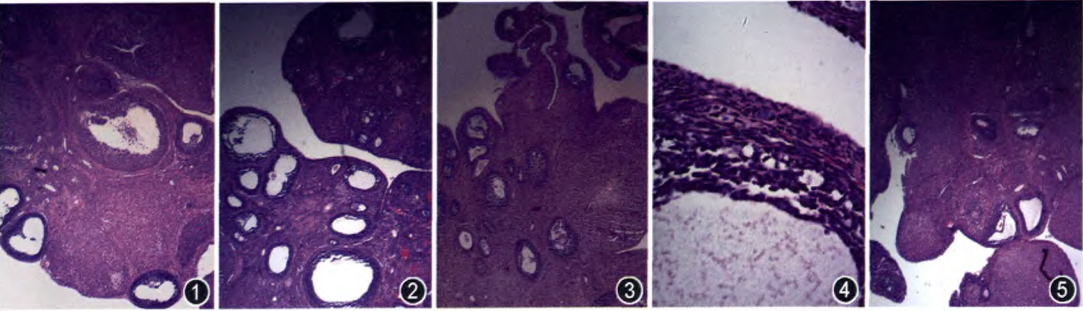


图 1 低剂量组见较多的囊状卵泡、部分闭锁卵泡,黄体数目减少。HE ×10 图 2 中剂量组见囊状卵泡、闭锁卵泡,偶见黄体。HE ×10 图 3 高剂量组见 1~2 个成熟卵泡,闭锁卵泡及发育中的小卵泡多见,囊状卵泡较少,可见少量黄体。HE ×10 图 4 中剂量组囊状卵泡见卵泡颗粒细胞层数减少至 3~4 层,卵泡内卵母细胞或放射冠消失,卵泡膜细胞层数增多不明显。HE ×40 图 5 对照组见多个黄体及不同发育阶段的卵泡。HE ×10

表 3 各组大鼠的性激素及 SHBG 水平($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	FSH(U/L)	LH(U/L)	DHEA(nmol/L)	SHBG(nmol/L)	睾酮(ng/L)	雌二醇(pmol/L)	LH/FSH
低剂量组	10	0.013±0.003	0.058±0.018	10.2±2.7	12.3±1.8	8.0±2.4	226±20	4.35±1.09
中剂量组	10	0.012±0.003	0.035±0.003	10.0±0.9	19.7±1.4	8.9±0.7	269±31	2.99±0.23
高剂量组	10	0.014±0.003	0.038±0.003	11.5±3.5	6.6±1.7	8.6±2.4	225±28	2.83±0.14
对照组	10	0.013±0.003	0.038±0.004	9.9±1.7	24.0±7.4	8.4±2.1	205±25	3.04±0.51

表 4 各组大鼠的一般情况及卵巢质量和体积($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	体质量 (g)	身长 (cm)	BMI (g/cm ²)	卵巢质量 (mg)	卵巢体积 (mm ³)
低剂量组	10	265 ± 9 ^a	18.33 ± 0.17 ^a	0.79 ± 0.03 ^a	38.0 ± 2.9 ^a	45.5 ± 7.5 ^a
中剂量组	10	268 ± 10 ^a	18.50 ± 0.29 ^a	0.78 ± 0.03 ^a	38.2 ± 2.0 ^a	52.5 ± 2.1 ^a
高剂量组	10	279 ± 3 ^a	18.70 ± 0.30 ^a	0.80 ± 0.24 ^a	33.7 ± 1.7	48.9 ± 3.8 ^a
对照组	10	235 ± 13	17.13 ± 0.24	0.80 ± 0.33	29.1 ± 2.6	10.8 ± 4.2

注“a”表示与对照组比较, $P < 0.05$

的 LH、FSH 水平相对较低, FSH 使卵泡募集亢进, 升高的 LH 刺激卵巢卵泡膜细胞产生雄激素, 雄激素在外周组织转化为雌酮, 雌酮对 FSH 负反馈使 FSH 相对不足, 卵泡发育到一定程度即停滞, 无优势卵泡生成, 导致多囊卵巢形成。本研究根据上述建模原理, 通过对幼年雌性 SD 大鼠投放含 TU 的饲料, 成功诱导 PCOS 大鼠模型。因大鼠自由摄食, 实验大鼠无痛苦, 且含药饲料可以长期摄入, 以保持稳定持久的 PCOS 模型。

本研究结果显示, 低、中、高剂量组大鼠体质量、卵巢质量明显增加, 卵巢体积明显增大, 卵巢闭锁卵泡、囊状卵泡增加, 黄体数目减少及颗粒细胞层数减少至 3~4 层, 卵泡膜细胞无增厚, 且中剂量组较低, 高剂量组闭锁卵泡数显著增多 ($P < 0.05$), 黄体数及颗粒细胞层数减少; 符合 PCOS 建模成功标准。其中卵泡膜细胞层数无增厚与丙酸睾酮^[2]建模的无卵巢白膜增厚及卵泡膜间质细胞的增生相符合。低、中、高剂量组所有大鼠自 75~89 日龄均开始失去规律的动情周期, 继续观察发现从第 86~117 日龄开始出现持续性阴道上皮角化, 持续 1~5 动情周期, 且中剂量组大鼠持续阴道上皮角化持续时间较长, 其血清中雌二醇水平高于其他各组, 提示阴道上皮长期受雌激素而未受孕激素的刺激, 卵巢存在排卵障碍^[8]。TU 饮食诱导 PCOS 大鼠模型可以通过持续从饲料中摄入雄激素, 让大鼠保持持续无排卵状态, 克服以往用雄激素建模停药后大鼠自行恢复排卵的缺点。对照组大鼠也出现动情周期紊乱, 但发生时间较晚, 持续时间较短, 可能与长期阴道涂片, 过度刺激导致内分泌失调有关。本研究还发现, 中剂量模型组开始失去规律的动情周期早于低、高剂量组, 持续性阴道上皮角化时间显著长于低、高剂量模型组, 卵巢形态学改变更接近人 PCOS 的卵巢改变, 因此中剂量组建模优于低、高剂量组, 其原因可能与不同浓度的药物在体内吸收、代谢的差异有关, 低剂量达不到有效生物利用度, 雄激素含量过高可能损伤肝肾功能, 从而影响药物的生物活性, 有待于进一步探讨。

综上所述, 通过用含 TU 的饲料饮食诱导的 PCOS 大鼠模型表现为持续无排卵状态, 卵巢组织学改变与人类 PCOS 十分相似, 中剂量 TU 饲料 (2 mg/30 g) 可建立较理想的 PCOS 大鼠模型。

参考文献

- [1] 陈子江. 高度重视多囊卵巢综合征的规范化诊断与治疗. 中华妇产科杂志, 2007, 42: 289-290.
- [2] Tamura N, Kurabayashi T, Nagata H, et al. Effects of testosterone on cancellous bone, marrow adipocytes, and ovarian phenotype in a young female rat model of polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, 2005, 84: 1277-1284.
- [3] Honma H, Endo T, Henmi H, et al. Altered expression of Fas/Fas ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. Apoptosis, 2006, 11: 1525-1533.
- [4] 张娟, 朱桂金, 王昕荣, 等. 硫酸普拉睾酮钠诱导大鼠 PCOS 动物模型的实验研究. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15: 83-85.
- [5] Kim SH, Lee HJ, Kim JS, et al. Hemeo HIM improves ovarian morphology and decreases expression of nerve growth factor in rats with steroid-induced polycystic ovaries. Med Food, 2009, 12: 1348-1352.
- [6] 陈媛, 乔杰. 高雄激素和高胰岛素动物模型的比较研究. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16: 1-2.
- [7] Maharjan R, Nagar PS, Nampoothiri L. Effect of Aloe barbadensis Mill. formulation on Letrozole induced polycystic ovarian syndrome rat model. J Ayurveda Integr Med, 2010, 1: 273-279.
- [8] 邝少松, 黄小琼, 饶子亮, 等. 大鼠多囊卵巢综合征动物模型血脂代谢及抗氧化作用. 中国比较医学杂志, 2007, 9: 519-522.
- [9] Mannerås L, Cajander S, Holmang A, et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. Endocrinology, 2007, 148: 3781-3791.
- [10] Yin AY, Huon M, Swerdloff RS, et al. Re-examination of pharmacokinetics of oral testosterone undecanoate in hypogonadal men with a new self-emulsifying formulation. J Androl, 2012, 33: 190-201.

(收稿日期: 2012-01-30)

(本文编辑: 潘畅)

十一酸睾酮饮食诱导多囊卵巢综合征大鼠模型的建立

作者: [李春花](#), [王良岸](#), [陈冬梅](#), [刘颖](#), [洪宇](#), [谢梅青](#)
作者单位: [中山大学孙逸仙纪念医院生殖内分泌科, 广州, 510120](#)
刊名: [中华妇产科杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology](#)
年, 卷(期): 2012, 47 (5)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhfck201205014.aspx