



不同浓度顺铂对C57BL/6小鼠卵巢功能的影响

赵玮, 邢彦彦, 李文

引用本文:

赵玮, 邢彦彦, 李文. 不同浓度顺铂对C57BL/6小鼠卵巢功能的影响[J]. 中国临床医学, 2020, 27(1): 106–110.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20191592>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

人脐静脉内皮细胞来源外泌体有助于促进缺血性脑卒中小鼠的康复

HUVECs-exo intravenous injection can promote the recovery of ischemic stroke in transient ischemic mouse model of the middle cerebral artery

中国临床医学. 2019, 26(3): 425–431 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190416>

15-脱氧- Δ 12,14-前列腺素J2对大鼠酸性胃内容物吸入性肺损伤的保护作用

Protective effect of 15 deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 on a rat model of combined acid and gastric particles-induced aspiration lung injury

中国临床医学. 2018, 25(6): 905–909 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180873>

口服N-乙酰半胱氨酸对稳定期慢性阻塞性肺疾病患者Th1/Th2平衡的影响

Effects of N-acetylcysteine on Th1/Th2 balance in patients with chronic obstructive pulmonary disease

中国临床医学. 2018, 25(2): 270–274 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20171048>

帕瑞昔布钠对气管插管全麻患者术后声音嘶哑与咽喉痛的影响

Effect of parecoxib sodium on incidence and severity of postoperative hoarseness and sore throat in general anesthesia patients

中国临床医学. 2017, 24(6): 943–945 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20160602>

不同剂量羟考酮治疗腰-硬联合麻醉剖宫产产妇寒战的疗效分析

Efficacy of different doses of oxycodone for the control of shivering after combined spinal-epidural anesthesia in puerperae undergoing caesarean section

中国临床医学. 2017, 24(2): 242–246 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170113>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20191592

不同浓度顺铂对 C57BL/6 小鼠卵巢功能的影响

赵 玮^{1,2}, 邢彦彦¹, 李 文^{1*}

1. 海军军医大学长征医院生殖中心, 上海 200003

2. 武警内蒙古总队医院妇产科, 呼和浩特 010040

[摘要] **目的:**通过研究不同浓度顺铂对 C57BL/6 小鼠卵巢功能的影响,探讨能够引起 C57BL/6 小鼠卵巢早衰的最低有效浓度,从而为临床研究提供一种安全、可靠、便捷的早发性卵巢功能不全(POI)模型构建方案。**方法:**随机选择 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠(6~8 周)60 只,随机分为对照组、剂量 1.0 组(1 mg/kg)、剂量 1.5 组(1.5 mg/kg)、剂量 2.0 组(2 mg/kg),给药组均连续腹腔注射 7 d 顺铂。**结果:**1.0 组小鼠卵巢受损较轻,卵巢组织形态、卵泡计数及血清激素水平与对照组相比,变化程度较小,无法用于建模;1.5 组小鼠卵巢受损较重,体质量下降平稳,一般状态好,死亡率低,动情周期恢复率低,卵巢组织形态、卵泡计数及血清激素水平与对照组差异均有统计学意义($P < 0.05$),但变化较为平缓,适宜建立 POI 模型;2.0 组小鼠卵巢受损严重,体质量下降明显,全身状况差,出现持续的动情间期,卵巢组织形态、卵泡计数及血清激素水平与对照组差异均有统计学意义($P < 0.05$),但变化大,不利于实验研究。**结论:**1.5 mg/kg 为建立 C57BL/6 小鼠 POI 模型的合适有效浓度,采用该给药方案建立的模型,卵巢组织损伤较为稳定,能够较好地模拟 POI 患者的激素水平变化,动物耐受性好,有利于治疗研究的开展,适用于 POI 治疗方案的评价。

[关键词] 卵巢早衰;顺铂;浓度;模型**[中图分类号]** R 322.6⁺5; R-332 **[文献标志码]** A

Effects of different concentrations of cisplatin on ovarian function in C57BL/6 mice

ZHAO Wei^{1,2}, XING Yan-yan¹, LI Wen^{1*}

1. Reproductive Medicine Center, Changzheng Hospital, Navy Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Inner Mongolia General Hospital of the Armed Police, Hohhot 010040, Inner Mongolia, China

[Abstract] **Objective:** To study the effect of cisplatin of different concentrations on the ovarian function in C57BL/6 mice, and to explore the minimum effective concentration that can cause premature ovarian insufficiency (POI) in C57BL/6 mice, aiming to provide a safe, reliable, and convenient POI model for clinical research. **Methods:** Totally, 60 female C57BL/6 mice (6-8 weeks) of SPF grade were randomly divided into control group, dose 1.0 group (1 mg/kg), dose 1.5 group (1.5 mg/kg), and dose 2.0 group (2 mg/kg), different concentrations of cisplatin were administered by the traditional intraperitoneal route for 7 days in cisplatin group. **Results:** In 1.0 group, ovarian tissue morphology, follicle count, and serum hormone levels were slightly different from those in the control group, but without statistical significance, therefore could not be used for modeling. In 1.5 group, the ovaries of mice were damaged heavily, their weight dropped steadily, but the general state was good, the mortality rate was low, the recovery rate of estrous cycle was low, and the ovarian histomorphology, follicle count, and serum hormone levels had statistical significance changes compared with those in the control group, but the degree of change was relatively gentle, which was suitable for the establishment of POI model. In 2.0 group, the ovaries of mice were severely damaged, their body weight dropped dramatically, the general condition was poor, and there were persistent estrous intervals. The ovarian histomorphology, follicle count, and serum hormone levels were significantly different from those in the control group, but the changes were dramatic, which was not conducive to the experimental study. **Conclusions:** The suitable and effective concentration of cisplatin for establishing POI model in C57BL/6 mice is 1.5 mg/kg. The ovarian tissue damage of the model established by this drug regimen is relatively stable, which can well simulate the changes in hormone levels of POI patients, and the animal has a good tolerance, which is conducive to the development of treatment studies and more suitable for the evaluation of POI treatment regimen.

[Key Words] premature ovarian insufficiency; cisplatin; concentration; mode**[收稿日期]** 2019-09-10**[接受日期]** 2019-10-23**[作者简介]** 赵 玮, 博士生, 主治医师. E-mail: zw19820214@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-63586818, E-mail: 642919042@qq.com

正常卵巢功能的建立和维持决定了女性的生殖寿命,若卵巢功能提前衰退,则会严重影响女性的身心健康。早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)是指女性在40岁以前出现卵巢功能减退,主要表现为月经异常(闭经、月经稀发或频发)、促性腺激素水平升高[卵泡刺激素(FSH)>25 U/L]、雌激素水平波动性下降^[1]。其在一般人群发病率为1%~3%^[2]。近年来,由于受到基因、环境等多种因素的影响,POI的发病率呈上升趋势^[3],然而目前尚缺乏对其有效的治疗方法及药物,因此如何对POI患者进行有效的干预和治疗成为亟待解决的问题^[4]。构建动物模型进行POI的病因及治疗措施的研究是一种有效的方法。目前有多种构建POI动物模型的方法,化疗药物诱导是其中之一。本研究将不同浓度的顺铂作用于小鼠卵巢,探讨能够引起小鼠POI的最低有效浓度,从而为临床研究提供一种安全、可靠、便捷的模型构建方案。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用SPF级雌性C57BL/6小鼠(6~8周)60只,体质量28~30 g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,使用许可证编号:SCXK(沪)2013-0016,于21~25℃、相对湿度50%~70%的条件下,饲养于标准塑料笼内,4只/笼。每日光照12 h,自由饮食、饮水,适应性喂养1周后,每日早晨8点进行阴道涂片,连续10 d,将具有正常动情周期的小鼠纳入实验。

1.2 药物、试剂和仪器 顺铂为粉剂,20 mg/支,购自海南齐鲁制药。用0.9% NaCl溶液将顺铂分别配制成1 mg/mL、0.75 mg/mL、0.5 mg/mL的工作液,随用随配。伊红染液、苏木精染液、40%甲醛溶液,小鼠性激素ELISA试剂盒[FSH批号:201905;雌激素(E2)批号:201905]购自上海沪峰生物科技有限公司。主要实验仪器:光学显微镜(上海光学仪器厂),赛默飞离心机,海尔超低温冰箱等。

1.3 动物分组及给药方案 将C57BL/6小鼠随机分为4组,每组15只(由SPSS 23.0软件计算得出),每组按照2 mL/kg(0.02 mL/10 g)进行腹腔(小鼠左侧腹股沟上方)给药,连续7 d。小鼠腹腔注射顺铂的半数致死量(LD₅₀)为11.93 mg/kg^[5]。参考Lee等^[6]的研究,制定给药方案。(1)对照组:腹腔注射0.9% NaCl溶液;(2)剂量1.0组:腹腔注射

0.5 mg/mL顺铂工作液(即1 mg/kg);(3)剂量1.5组:腹腔注射0.75 mg/mL顺铂工作液(即1.5 mg/kg);(4)剂量2.0组:腹腔注射1 mg/mL顺铂工作液(即2 mg/kg)。

1.4 取材方法 各组于停药后14 d取材。小鼠以0.9%水合氯醛腹腔注射麻醉后,眼眶取血1 mL,然后取双侧卵巢,测量后保存于4%多聚甲醛溶液中备用。

1.5 观察指标

1.5.1 一般状态 小鼠的皮肤色泽、饮食、排便及活动情况,每日记录体质量。

1.5.2 动情周期 每日早晨8:00至9:00对小鼠进行阴道脱落细胞(主要为上皮细胞、角化细胞和白细胞)涂片,方法如下:将消毒婴儿棉签用0.9% NaCl溶液湿润后插入小鼠阴道约0.5 cm,顺时针旋转3~4周,抽出棉签,将其上的阴道脱落物旋转涂抹于玻片上(切勿重叠),以4%多聚甲醛固定后进行苏木精-伊红(H-E)染色。光镜下观察细胞形态,判断小鼠动情周期变化。小鼠的正常动情周期一般为4~5 d,分为动情前期、动情期、动情后期和动情间期。各期阴道涂片的特征如下^[7]:动情前期为椭圆形有核上皮细胞占大多数,角质化上皮细胞和白细胞很少;动情期为角化上皮细胞占大多数,有核上皮细胞和白细胞很少;动情后期为片状角化上皮细胞、有核上皮细胞和白细胞3种细胞均有,比例无明显差异;动情间期为白细胞占大多数,有核上皮细胞和角质化上皮细胞很少(图1)。

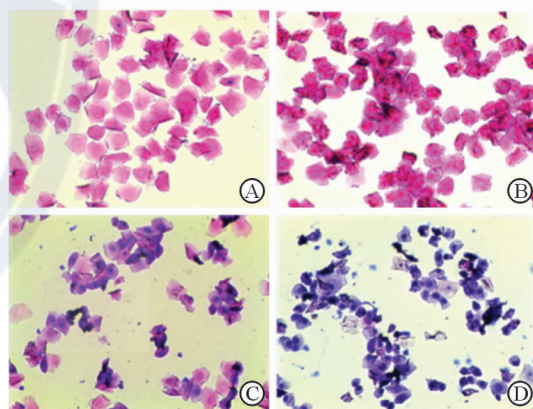


图1 小鼠动情周期阴道涂片特征(H-E染色)^[7]

A: 动情前期; B: 动情期; C: 动情后期; D: 动情间期。Original magnification: ×40

1.5.3 卵巢组织学形态 将以4%多聚甲醛固定后的卵巢进行常规石蜡包埋,制备4 μm切片,H-E染色后,在光镜下计数各类卵泡^[8],分别计算卵泡总

数、生长卵泡数及闭锁卵泡/卵泡总数比值。

1.5.4 性激素水平 将血液标本离心取上清液，采用ELISA法进行小鼠性激素测定。

1.6 统计学处理 采用SPSS 23.0软件进行统计分析和描述，对数据进行正态性检验和方差齐性检验；计量资料采用独立样本 t 检验和单因素方差分析，计数资料采用 χ^2 检验，检验水准(α)为0.05；应用Graphpad Prism 8软件作图。

2 结果

2.1 一般情况 除对照组以外，其余各组小鼠从给药第3天开始均出现摄食减少、精神萎靡、消瘦、体毛枯燥黯淡。1.0组程度较轻，停药后迅速恢复；1.5组停药后1周开始好转；2.0组最为严重，持续恶化。给药过程中对照组和1.0组无死亡；1.5组死亡1只(解剖示腹膜积液)，死亡率为7%；2.0组死亡4只(解剖示腹膜积液1只，3只原因不明)，死亡率为26%。

对照组体质量有所增加，而各给药组在给药3 d起均开始减少。1.0组体质量下降较轻，停药后2 d体质量开始回升，停药2周后处死时，体质量基本恢复到给药前水平，平均下降率为1%；1.5组体质量下降较为明显，停药后6 d体质量趋于平稳，停药8 d开始缓慢回升，停药2周后处死时，体质量仍低于给药前，体质量平均下降率为8.5%；2.0组体质量下降最明显，且持续下降，全身状况差，停药2周后处死时，体质量平均下降率为32.6%。各给药组小鼠体质量与对照组差异有统计学意义($P<0.05$)，1.5组与2.0组差异有统计学意义($P<0.05$)。结果(图2)表明，各给药组小鼠体质量均下降，以2.0组体质量下降最明显，对小鼠全身状态影响较大，小鼠死亡数量较多，不利于实验研究。

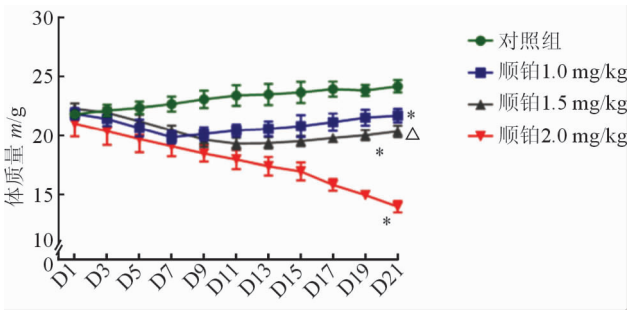


图2 各组小鼠体质量变化曲线

* $P<0.05$ 与对照组比较； $\Delta P<0.05$ 与2.0组比较

2.2 动情周期 停药后第1天开始进行阴道涂片，判断小鼠动情周期变化情况，直至取材当天。结果(图3)表明：对照组小鼠动情周期基本正常，仅2只偶发动情周期紊乱，分别表现为动情前期及动情间期延长，均自然恢复，紊乱率为13.3%(2/15)，恢复率为100%；1.0组4只出现动情周期紊乱，同样表现为动情后期和动情间期延长，停药7 d后陆续恢复正常，其余11只表现正常，紊乱率为26.7%(4/15)，恢复率为100%，与对照组差异无统计学意义；1.5组从停药后第4天陆续出现持续的动情间期或动情后期，停药2周后处死时，仅1只恢复动情周期，紊乱率为100%(14/14)，恢复率为7.1%，与对照组差异有统计学意义($P<0.01$)，与1.0组差异有统计学意义($P<0.01$)；2.0组小鼠阴道干涩，除1只(于第2天开始)外均于停药后第1天出现持续的动情间期，无其余各期出现，停药2周后处死时，均未恢复正常动情期，紊乱率为100%(11/11)，恢复率为0%，与对照组差异有统计学意义($P<0.01$)，与1.5组差异无统计学意义。

2.3 卵巢形态学 结果(图4)表明：对照组及1.0组小鼠卵巢表面有多个不规则颗粒状囊泡，颜色红润，各级卵泡(H-E切片)在光镜下清晰可见。1.5组及2.0组小鼠卵巢体积减小，表面无光泽，略发

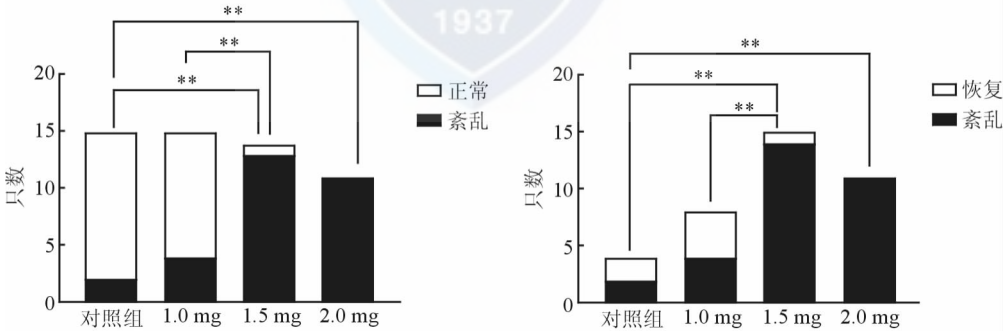


图3 各组动物的动情周期紊乱率和紊乱恢复率对比

** $P<0.01$

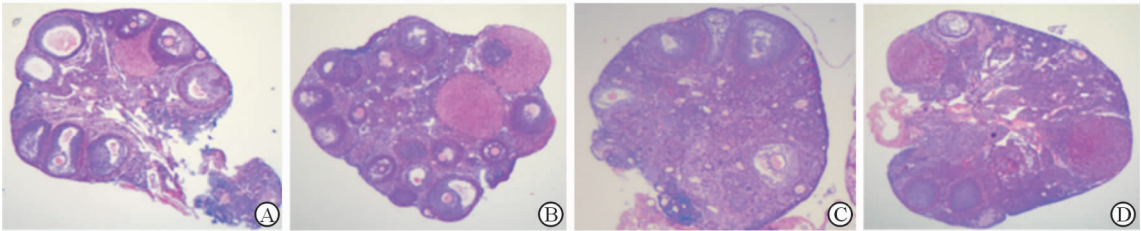


图4 卵巢细胞形态学H-E结果

A:对照组,各级卵泡清晰可见;B:顺铂1.0 mg组各级卵泡可见,结构正常;C:顺铂1.5 mg组,各级卵泡减少,间质纤维化明显,闭锁卵泡数增加,可见较为成熟的卵泡;D:顺铂2.0 mg组,较顺铂1.5 mg组进一步改变,成熟卵泡几乎不可见。Original magnification: ×40

白,颗粒状囊泡明显减少、有不同程度的萎缩;光镜下见卵巢皮质变薄,间质纤维化明显,血管数目减少,各级卵泡明显减少,闭锁卵泡增加,但1.5组可见较为成熟的卵泡,而2.0组几乎没有发育成熟的卵泡。各给药组卵泡总数、生长卵泡数均少于对照组,闭锁卵泡占总卵泡比例均高于对照组,其中1.0组与对照组差异无统计学意义;1.5组及2.0组与对照组差异有统计学意义($P<0.05$);1.5组各项指标与2.0组差异无统计学意义(表1)。

表1 各组小鼠卵泡计数比较

组别	卵泡总数/个	生长卵泡/个	闭锁卵泡占比
对照组	47.45±3.14	45.00±2.36	0.05±0.08
1.0组	45.58±3.67	42.38±3.15	0.07±0.06
1.5组	22.35±4.53*	12.36±3.36*	0.44±0.04*
2.0组	20.49±3.68*	9.44±2.96*	0.54±0.07*

* $P<0.05$ 与对照组比较

2.4 血清激素水平 各给药组与对照组相比,FSH均上升、E2水平均下降,其中1.0组与对照组差异无统计学意义;1.5组及2.0组与对照组差异有统计学意义($P<0.05$);1.5组与2.0组差异无统计学意义(表2)。

表2 各组小鼠血清性激素水平比较

组别	FSH $\mu\text{B}/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	E2 $\text{pg}/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$
对照组	6.44±0.70	75.63±5.43
1.0组	7.55±0.52	70.36±4.22
1.5组	12.35±0.96*	40.38±3.66*
2.0组	11.35±0.23*	38.96±2.76*

FSH:卵泡刺激素;E2:雌二醇。* $P<0.05$ 与对照组比较

3 讨论

POI是卵巢早衰(POF)的前驱阶段,如果在此阶段能够实施有效的治疗措施,会使患者避免或延缓POF的发生。建立动物模型是治疗研究的重要

前提。

顺铂是治疗妇科恶性肿瘤的一线药物,对卵巢的毒性作用缓和^[9],是一种POI动物模型的常用诱导药物^[6]。顺铂能够使不同发育阶段的卵泡受到损伤,并且能够抑制卵巢颗粒细胞生长,促进其凋亡,从而使卵泡发育受阻,引起性激素水平变化,最终导致卵巢功能减退^[10]。国内外多项研究采用小鼠腹腔连续注射顺铂的方法建立POI的模型,但方案差异较大,且对能够引起小鼠最低有效建模浓度的研究较少。

本实验采用1 mg/kg、1.5 mg/kg、2 mg/kg 3种浓度,连续7 d的给药方式,进行最低建模浓度的研究。结果显示:1.0组小鼠卵巢受损程度较轻,停药后一般状态和动情周期迅速恢复正常,取材时卵巢组织形态、卵泡计数及血清激素水平与对照组相比,变化程度较轻,差异无统计学意义,不能导致小鼠POI的发生,无法用于建模;1.5组小鼠卵巢受损较重,体质量下降平稳,一般状态好,死亡率低,动情周期恢复率低,取材时卵巢组织形态、卵泡计数及血清激素水平与对照组差异均有统计学意义,但变化程度较为平缓,更加符合POI发生的自然变化情况,适宜建立POI模型;2.0组小鼠卵巢受损严重,体质量下降幅度大,全身状况差,耐受性不佳,死亡率高,出现持续的动情间期,取材时卵巢组织形态、卵泡计数及血清激素水平与对照组差异均有统计学意义,但变化剧烈,不利于实验研究。

综上所述,本研究结果显示,1.5 mg/kg为建立C57BL/6小鼠POI模型的合适有效浓度,采用该给药方案建立的模型卵巢组织损伤较为稳定,能够较好地模拟POI患者的激素水平变化,动物耐受性好、死亡率低,代谢功能基本正常,有利于治疗研究的开展,适用于POI治疗方案的评价。

参考文献

[1] 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.

[2] KOVanci E, SCHUTT A K. Premature ovarian failure: clinical presentation and treatment[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2015,42(1):153-161.

[3] EBRAHIMI M, AKBARI ASBAGH F. Pathogenesis and causes of premature ovarian failure: an update[J]. Int J Fertil Steril, 2011,5(2):54-65.

[4] QIN Y, JIAO X, SIMPSON J L, et al. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities [J]. Hum Reprod Update, 2015,21(6):787-808.

[5] 黄永平,周世文,邱磊,等. 葡萄糖酸锌对小鼠顺铂半数致死量及体内谷胱甘肽含量的影响[J]. 中国医院药学杂志, 1998,18(2):55-56.

[6] LEE E H, HAN S E, PARK M J, et al. Establishment of effective mouse model of premature ovarian failure considering treatment duration of anticancer drugs and natural recovery time[J]. J Menopausal Med, 2018,24(3):196-203.

[7] 李靖,李炫诚,吴云霞. 确定小鼠动情周期的三种方法[J]. 实验动物科学, 2007,24(3):63-64,62,插2.

[8] MYERS M, BRITT K L, WREFORD N G, et al. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary[J]. Reproduction, 2004,127(5):569-580.

[9] JAMESDANIEL S, DING D, KERMANY M H, et al. Proteomic analysis of the balance between survival and cell death responses in cisplatin-mediated ototoxicity [J]. J Proteome Res, 2008,7(8):3516-3524.

[10] SAID R S, MANTAWY E M, EL-DEMERDASH E. Mechanistic perspective of protective effects of resveratrol against cisplatin-induced ovarian injury in rats: emphasis on anti-inflammatory and anti-apoptotic effects [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2019,392(10):1225-1238.

[本文编辑] 廖晓瑜,贾泽军

撤稿声明

本刊发表于《中国临床医学》2015 年第 22 卷第 6 期第 38 页至第 40 页的《血清 C 反应蛋白联合红细胞压积对重症急性胰腺炎的早期预测价值》在 2016 年第 23 卷第 1 期第 715 页至第 717 页重复发表,现撤销 2016 年的稿件,并郑重向给广大读者致歉。

《中国临床医学》编辑部
2020 年 2 月 24 日

