

## • 研究论文 •

## 抗苗勒激素及生长分化因子-9 对环磷酰胺体外降低大鼠卵巢储备力机制的研究

张凤英<sup>1</sup>, 夏天<sup>1\*</sup>, 赵丽颖<sup>2</sup>, 宋文嘉<sup>2</sup>, 李爽<sup>2</sup>

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

**摘要:** 目的 研究抗苗勒激素 (AMH) 和生长分化因子-9 (GDF-9) 对环磷酰胺 (Cy) 降低卵巢储备力机制中的作用。方法 成年雌性 SD 大鼠 25 只, 取双侧卵巢组织, 并切制成 500  $\mu\text{m}$  厚的卵巢片, 将卵巢片分为 7 组: 空白组、Cy 组、Cy + 卵泡刺激素 (FSH) 组、Cy + AMH 组、Cy + GDF-9 组、Cy + FSH + AMH 组、Cy + FSH + GDF-9 组, 放入含 DMEM-F12 培养液的培养皿中分别培养 2 d 或 4 d。除空白组外, 其余各组于培养液中分别添加 Cy 100 ng/mL、FSH 10 mIU/mL、AMH 100 ng/mL、GDF-9 100 ng/mL。利用双抗体夹心酶联免疫吸附技术 (ELISA) 检测雌二醇 ( $E_2$ )、抑制素 B (INHB) 的量; 光镜下计数始基卵泡 (PMF) 及闭锁卵泡; 运用 DNA 缺口原位末端标记法 (TUNEL) 检测细胞凋亡情况。结果 ①与空白组相比, Cy 组 PMF 数目明显降低, 闭锁卵泡明显增多; Cy + AMH 组及 Cy + FSH + AMH 组 PMF 数目明显多于除空白组之外的其他各组。各组培养 4 d 较培养 2 d 始基卵泡数目明显降低, 闭锁卵泡数目明显增多。②与空白组相比, Cy 组培养 2 d 和 4 d 时  $E_2$  及 INHB 水平明显降低; 与 Cy 组相比, 培养 2 d 和 4 d 时 Cy + FSH 组、Cy + GDF-9 组及 Cy + FSH + GDF-9 组  $E_2$ 、INHB 明显升高。与 Cy 组相比, 培养 2 d 和 4 d 时 Cy + AMH 组及 Cy + FSH + AMH 组  $E_2$  明显升高。培养 4 d 时 Cy + AMH 组、Cy + FSH + AMH 组 INHB 水平明显升高。③Cy 组与空白组比较, 凋亡细胞明显增多; Cy + FSH 组、Cy + GDF-9 组与 Cy 组相比, 凋亡细胞的数量并没有显著减少。Cy + AMH 组、Cy + FSH + AMH 组与 Cy 组相比凋亡细胞的数量显著减少。结论 Cy 可加速 PMF 的募集与耗竭, 从而使卵巢储备力降低乃至衰竭。FSH 及 GDF-9 可加速 PMF 的募集与发育, 使更多的 PMF 进入生长卵泡阶段而受到 Cy 细胞毒的损害, 以致 PMF 库存逐渐耗竭; AMH 可抑制 PMF 的募集与发育, 从而减缓 Cy 对 PMF 的加速募集与耗竭, 起到保护卵巢储备力的作用。

**关键词:** 环磷酰胺; 卵巢储备力; GDF-9; 抗苗勒激素

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1674 - 6376 (2013) 05 - 0335 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.05.004

## Study on the mechanism of anti-mullerian hormone and growth differentiation factor-9 on cyclophosphamide reducing *in vitro* ovarian reserve of rats

ZHANG Feng-ying<sup>1</sup>, XIA Tian<sup>1</sup>, ZHAO Li-ying<sup>2</sup>, SONG Wen-jia<sup>2</sup>, LI Shuang<sup>2</sup>

1. First Hospital Appiliated to Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To research the effects of anti-mullerian hormone (AMH) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) on cyclophosphamide (Cy) reducing ovarian reserve. **Methods** Twenty-five adult female SD rats were used to remove the bilateral ovarian tissues and cut them into 500  $\mu\text{m}$  slices. The slices were divided into control, Cy, Cy + follicle-stimulating hormone (FSH), Cy + AMH, Cy + GDF-9, Cy + FSH + AMH, and Cy + FSH + GDF-9 groups, and put into petri dishes including DMEM-F12 for 2 or 4 d. Except the control group, the other groups were added with Cy 100 ng/mL, FSH 10 mIU/mL, GDF-9 100 ng/mL, and AMH 100 ng/mL. The contents of estradiol ( $E_2$ ) and inhibitant B (INHB) were detected by ELISA, the numbers of primordial follicles (PMF) and atresic follicles were counted under light microscope, and the rat ovarian cell apoptosis was detected by TUNEL. **Results** ①

收稿日期: 2013-06-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30801479)

\*通信作者 夏天 (1976—), 女, 江苏徐州人, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为生殖内分泌。

Compared with the control group, the numbers of PMF were significantly reduced and the numbers of atresic follicles were increased in Cy group. In Cy + AMH and Cy + FSH + AMH groups, the numbers of PMF were obviously more than those in the other groups except control group. The numbers of PMF were significantly reduced and the atresic follicles were significantly increased in 4 d culture compared with 2 d culture, ② Compared with the control group, the E<sub>2</sub> and INHB contents of rats in Cy group were significantly reduced; Those in GDF-9 groups were significantly increased, and the E<sub>2</sub> content of rats in Cy + AMH and Cy + FSH + AMH groups was significantly increased. At the day 4, the INHB contents of rats in Cy + AMH and Cy + FSH + AMH groups were significantly increased. ③ Compared with the control group, the apoptotic cells in Cy group were significantly increased. Compared with Cy group, the numbers of apoptotic cells in Cy + FSH and Cy + GDF-9 groups were not significantly reduced, and the numbers of apoptotic cells in Cy + AMH and Cy + FSH + AMH groups were significantly reduced. **Conclusion** Cy could accelerate the recruitment and depletion of the PMF, so that the ovarian reserve is reduced and even failure. FSH and GDF-9 could accelerate the recruitment and the development of the PMF, leading to more PMF into the growing follicle stage and suffering from Cy cytotoxic damage, so the PMF stock is gradually depleted. AMH could restrain the PMF recruitment and development, thus slow down the acceleration of the PMF recruitment and depletion by Cy, and protect the ovarian reserve.

**Key words:** cyclophosphamide; ovarian reserve; growth differentiation factor-9 (GDF-9); anti-mullerian hormone

化疗是治疗恶性肿瘤以及防止肿瘤复发的主要方法, 化疗药物中以烷化剂最容易引起卵巢损伤, 而烷化剂中以环磷酰胺 (Cy) 最具有代表性, 是常用的烷化剂类抗肿瘤药<sup>[1]</sup>。化疗不仅会带来骨髓造血和免疫功能的抑制, 还会对女性性腺造成损害。但化疗药物造成卵巢功能损伤的机制目前尚不完全清楚。本实验以体外培养的大鼠卵巢组织为研究对象, 通过观察环磷酰胺作用下的始基卵泡 (primordial follicles, PMF) 募集与卵泡闭锁以及激素分泌, 研究环磷酰胺降低卵巢储备力的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

健康雌性 SD 大鼠 25 只, SPF 级, 10~12 周龄, 体质量 (200±20) g。购自天津实验动物中心。动物生产许可证编号: SCXK (津) 2005-0001。

### 1.2 药品

Cy 由江苏恒瑞医药股份有限公司生产, 批号 08120821。抗苗勒激素 (AMH) (4984-10)、生长分化因子-9 (GDF-9) (4872-20)、卵泡刺激素 (FSH) (4781-50) 均为美国 BioVision 公司产品。Cy 加入肝微粒体混合功能氧化酶 (S9) (由于 Cy 在体外无活性, 须模拟体内环境加入 S9), 溶解于 DMEM-F12 培养液中, 配成 3 μg/mL 储备液, -70 °C 保存。

### 1.3 主要试剂及仪器

DMEM-F12 培养液 (含 1% 胎牛血清、10 μg/mL 胰岛素、10 μg/mL 转铁蛋白、250 IU/mL 青霉素、0.25 mg/mL 链霉素、3.1 μg/mL 两性霉素 B); 大鼠 E<sub>2</sub> 竞争法 ELISA 测定试剂盒 (50R-E.1160), 美国 RB 公司; 大鼠抑制素 B 酶联免疫法 ELISA 测定试剂盒 (50R-E.1663), 美国 RB 公司; 一步法 TUNEL

细胞凋亡检测试剂盒 (ZK-8005), 德国罗氏诊断有限公司产品。鼠抗人 AMH、GDF-9、GDF-15、SCF、GAPDH 单克隆抗体、兔抗人/鼠 AMH、GDF-9、GDF-15、SCF、GAPDH 多克隆抗体、通用型二步法免疫检测试剂盒 PV-6000 (抗兔、小鼠)、小鼠二步法免疫检测试剂盒 PV6002、DAB kit、抗体稀释液、Harris 苏木素液等均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。Millicel 微孔膜、标准规格酶标仪 (美国 MJ Research 公司); 37 °C 恒温箱 (瑞典 LKB 公司), DH-2000 凝胶图象采集分析系统 (德国 Heraeus 公司) 电泳仪 (大连竞迈公司), 垂直板 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳装置; Real-time PCR 仪 Light Cycler (瑞士 Roche 公司)。

### 1.4 方法

**1.4.1 大鼠卵巢组织体外培养** 选取成年雌性 SD 大鼠 25 只, SPF 级, 10~12 周龄, 体质量 (200±20) g。无菌条件下取出双侧卵巢组织, 去除周围结缔组织后, 以最大直径处为中心, 连续冠状切取 500 μm 厚的卵巢片, 放入预冷的切片液中漂洗后转移至六孔板内的 Millicel 微孔膜上, 每个膜上放置 4 片卵巢。每孔培养皿含 DMEM-F12 培养液 0.5 mL (含 1% 胎牛血清、10 μg/mL 胰岛素、10 μg/mL 转铁蛋白、250 IU/mL 青霉素、0.25 mg/mL 链霉素、3.1 μg/mL 两性霉素 B), 培养液的高度刚好达微孔膜底部, 使卵巢片处于液气交界面上。将培养皿放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 温箱中培养 2 d 或 4 d。

**1.4.2 分组** 将卵巢组织分为 7 组: 空白组、Cy 组、Cy+FSH 组、Cy+AMH 组、Cy+GDF-9 组、Cy+FSH+AMH 组、Cy+FSH+GDF-9 组, 每组 4 个微孔膜, 培养 2 d 或 4 d (各半数)。除空白组外,

其余各组于培养液中分别添加 Cy 100 ng/mL、Cy 100 ng/mL+FSH 10 mIU/mL、Cy 100 ng/mL+AMH 100 ng/mL、Cy 100 ng/mL+GDF-9 100 ng/mL、Cy 100 ng/mL+FSH 10 mIU/mL+AMH 100 ng/mL、Cy 100 ng/mL+FSH 10 mIU/mL+GDF-9 100 ng/mL。

**1.4.3 卵巢组织培养液中 E<sub>2</sub>、INH<sub>B</sub> 的含量** 卵巢组织培养 2 d 或 4 d 后, 收集培养液, 用 ELISA 法测定培养液中 E<sub>2</sub>、INH<sub>B</sub> 的量。具体步骤如下: 将标准品各 50  $\mu$ L 依次加入一排孔中, 处理后的标本按 50  $\mu$ L 每孔加入, 并做好标记; 在标准品孔及待测样本孔中分别加入 100  $\mu$ L 酶联亲和物, 充分混匀; 37  $^{\circ}$ C 温育 30 min 后充分弃尽各孔内液体, 用稀释好的洗涤液反复冲洗 5 次并扣干孔内剩余水分; 每孔依次序, 分别加入显色液 A、显色液 B 各 50  $\mu$ L, 充分混匀, 在室温下避光反应 15 min; 反应后每孔加入终止液 50  $\mu$ L, 充分混匀, 终止反应; 用酶标仪在 450 nm 测定吸光度 (*A*) 值; 根据标准品的 *A* 值建立浓度-*A* 标准曲线, 计算出每个样品的浓度。

**1.4.4 始基卵泡及闭锁卵泡计数** 卵巢组织培养 2 d 或 4 d 后, 取出固定、包埋、切片, HE 染色后, 用光镜计数 PMF、生长卵泡、窦状卵泡及闭锁卵泡数目。各级卵泡数目的计数, 参照 Chris 等<sup>[2]</sup>的计数方法: ①始基卵泡的计数: 从卵巢中线开始选取 5 张切片, 每张切片间隔 240  $\mu$ m, 由一名观察者计数 5 张切片上始基卵泡数目的总和。②闭锁卵泡的计数: 由于闭锁卵泡的数目较少, 故将整个卵巢的每第十张切片上各级卵泡的数目分别相加, 代表大鼠卵巢闭锁卵泡的数目。始基卵泡及闭锁卵泡的分类参照 Plowchalk 等<sup>[3]</sup>的分类方法: ①始基卵泡: 卵母细胞周围仅有单层扁平颗粒细胞层环绕。②闭锁卵泡: 卵泡壁凹陷, 卵母细胞形态变得不规则, 细胞核固缩或溶解; 颗粒细胞及卵泡膜细胞松散、萎缩并脱落进入卵泡腔; 透明带塌陷, 巨噬细胞侵入卵泡腔。

**1.4.5 卵母细胞及颗粒细胞的凋亡形态** 用 DNA 缺口原位末端标记法 (TUNEL) 检测。具体步骤如下: 将培养的卵巢组织, 用甲醛固定、石蜡包埋、切片。临近检测时将所有切片 60  $^{\circ}$ C 烤箱中烤 2 h, 脱蜡水合; 用二甲苯浸洗 2 次, 每次 5 min; 用梯度乙醇 (100%、95%、90%、80%、70%) 各浸洗 2 次, 每次 5 min。用 ddH<sub>2</sub>O 漂洗 2 次, 每次 5 min; 用 PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min; 用蛋白酶 K 工作液

处理组织 37  $^{\circ}$ C 15 min (蛋白酶 K 工作液: 2  $\mu$ L 50  $\times$  蛋白酶 K+98  $\mu$ L PBS); 浸入封闭液中, 室温封闭 10 min; 用 PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min; 阳性对照组: 加 DNase I, 37  $^{\circ}$ C 30 min, 用 PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min; 每个样本滴加 50  $\mu$ L, TdT 酶反应液, 加盖玻片 37  $^{\circ}$ C 避光湿润反应 60 min (TdT 酶反应液: 45  $\mu$ L Equilibration Buffer + 1  $\mu$ L FITC-12-dUTP+4  $\mu$ L TdT Enzyme); 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 荧光显微镜检测: 激发波长 450~500 nm, 发射波长 515~565 nm 检测凋亡细胞情况。

## 1.5 统计学方法

所有计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS13.0 统计软件包中的单向方差分析法 (One-way ANOVA) 进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 各组培养液中 E<sub>2</sub>、INH<sub>B</sub> 水平比较

**2.1.1 各组培养液中 E<sub>2</sub> 水平比较** 培养 2 d, 检测各组卵巢组织培养液 E<sub>2</sub> 水平, 结果表明, 与 Cy 组比较, 空白组 E<sub>2</sub> 水平明显升高, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); Cy+AMH 组 E<sub>2</sub> 水平明显高于 Cy 组, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 与 Cy+FSH 组比较, Cy+FSH+AMH 组 E<sub>2</sub> 水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。Cy+FSH 组、Cy+GDF-9 组及 Cy+FSH+GDF-9 组 E<sub>2</sub> 水平明显高于 Cy 组及 Cy+AMH 组, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。培养 4 d, 检测各组卵巢组织培养液 E<sub>2</sub> 水平, 结果表明, 与 Cy 组比较, 空白组 E<sub>2</sub> 水平明显升高, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 与 Cy+AMH 组比较, Cy+FSH 组、Cy+GDF-9 组及 Cy+FSH+GDF-9 组 E<sub>2</sub> 水平明显升高, 差异均有显著性 ( $P < 0.05$ )。

培养 2 d 与培养 4 d 比较, 空白组与 Cy+AMH 组前后 E<sub>2</sub> 水平差异不显著, 其余各组培养 4 d 较培养 2 d E<sub>2</sub> 水平均明显降低 ( $P < 0.01$ )。

**2.1.2 各组培养液中 INH<sub>B</sub> 水平比较** 培养 2 d, 检测各组卵巢组织培养液 INH<sub>B</sub> 水平, 结果表明, 与 Cy 组比较, 空白组、Cy+FSH 组、Cy+GDF-9 组及 Cy+FSH+GDF-9 组 INH<sub>B</sub> 水平明显升高, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ 、0.01); 与 Cy+AMH 组比较, 空白组、Cy+FSH 组、Cy+GDF-9 组及 Cy+FSH+GDF-9 组 INH<sub>B</sub> 水平明显升高, 差异均有显著性 ( $P < 0.05$ 、0.01); 与 Cy+FSH 组比较, Cy+FSH+AMH 组 E<sub>2</sub> 水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。培养 4 d, 检测各组卵巢组织培养液 INH<sub>B</sub> 水平, 结果表明, 与

Cy 组比较, 其他各组 INHB 水平明显升高, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 与 Cy+AMH 组比较, 除对照组以外的其他各组 INHB 水平明显降低, 差异均有显著性 ( $P < 0.05$ )。

培养 2 d 与培养 4 d 比较, 空白组与 Cy+AMH 组前后 INHB 水平差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 其余各组培养 4 d 较培养 2 d INHB 水平均明显降低, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。结果见表 1。

表 1 各组培养液中  $E_2$ 、INHB 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 1 Comparison on  $E_2$  and INHB levels in media of each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	$E_2$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )		INHB/(pg·mL <sup>-1</sup> )	
	培养 2 d	培养 4 d	培养 2 d	培养 4 d
空白	961.0±96.2*	904.1±119.6*	145.6±23.9*	134.1±28.0*
Cy	621.8±76.9	379.9±52.3	79.5±11.6	45.7±12.3 <sup>#</sup>
Cy+FSH	749.5±72.6* <sup>#</sup>	481.1±61.5 <sup>#</sup>	94.8±17.4* <sup>#</sup>	64.1±13.7* <sup>#</sup>
Cy+AMH	646.2±82.0*	612.1±75.4	73.5±12.1	83.4±8.7*
Cy+GDF-9	782.7±90.3 <sup>#</sup>	507.7±66.2 <sup>#</sup>	102.0±14.9 <sup>#</sup>	66.8±14.3* <sup>#</sup>
Cy+FSH+AMH	690.6±66.0 <sup>▲</sup>	552.5±83.3	84.2±15.3 <sup>▲</sup>	70.5±12.2* <sup>#</sup>
Cy+FSH+GDF-9	825.8±125.9* <sup>#</sup>	450.6±55.3 <sup>#</sup>	115.7±16.8* <sup>#</sup>	59.5±11.7* <sup>#</sup>

与 Cy 组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与 Cy+FSH 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ; 与 Cy+AMH 组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 下表同  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs Cy group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs Cy+FSH; <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.01$  vs Cy+AMH; same as below

## 2.2 各组卵巢组织内始基卵泡及闭锁卵泡计数

**2.2.1 始基卵泡** 培养 2 d 或 4 d, 检测各组卵巢组织始基卵泡数目, 结果表明, 各组始基卵泡数目与空白组比较, 均明显降低, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); Cy+AMH、Cy+AMH+FSH 组始基卵泡数目明显多于其他各组 (空白组除外), 差异均有显著性 ( $P < 0.05, 0.01$ ); Cy+AMH、Cy+AMH+FSH 组之间差异无显著性; 与 Cy 组比较, Cy+GDF-9、Cy+FSH、Cy+FSH+GDF-9 组始基卵泡数目均明显降低, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 前三者之间差异无显著性。

各组 2 d 和 4 d 之间相比, 空白组、Cy+AMH 组始基卵泡数目前后差异无显著性, 其余各组培养 4 d 始基卵泡数目明显低于培养 2 d ( $P < 0.05, 0.01$ )。

**2.2.2 闭锁卵泡** 培养 2 d, 检测各组卵巢组织闭锁卵泡数目, 结果表明, 空白组与 Cy+AMH 组较其他各组闭锁卵泡数目均明显减少, 差异有显著性 ( $P < 0.05, 0.01$ ); Cy、Cy+GDF-9、Cy+FSH、Cy+FSH+GDF-9、Cy+FSH+AMH 组之间差异无显著性。培养 4 d, 检测各组卵巢组织闭锁卵泡数目, 结果提示: 空白组与 Cy+AMH 组较其他各组闭锁卵泡数目均明显减少, 差异有显著性 ( $P < 0.05, 0.01$ ); Cy、Cy+GDF-9、Cy+FSH、Cy+FSH+GDF-9 组之间差异无显著性。

各组培养 2 d 和培养 4 d 相比, 空白组与 Cy+AMH 组闭锁卵泡数目前后差异无显著性, 其余各组培养 4 d 闭锁卵泡数目明显多于培养 2 d ( $P < 0.05$ )。结果见表 2。

表 2 各组体外培养大鼠卵巢组织内始基卵泡及闭锁卵泡数目比较 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Numbers of PMF and atresic follicles in ovarian tissue cultured *in vitro* in rats of each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	始基卵泡/个		闭锁卵泡/个	
	培养 2 d	培养 4 d	培养 2 d	培养 4 d
空白	113.25±17.75	108.02±22.64	5.94±1.91	7.29±2.01
Cy	71.25±15.28**	48.31±10.29**	14.40±3.79*** <sup>#</sup>	20.33±4.86*** <sup>#</sup>
Cy+FSH	54.50±14.16**	33.07±8.54** <sup>▲</sup>	12.83±4.61*** <sup>#</sup>	18.77±5.04*** <sup>#</sup>
Cy+AMH	90.13±15.41**	80.05±16.20**	6.89±2.11*	10.52±3.19*
Cy+GDF-9	54.00±18.79**	35.22±10.71** <sup>▲</sup>	13.75±4.10* <sup>#</sup>	17.73±5.92* <sup>#</sup>
Cy+FSH+AMH	88.25±20.33**	72.63±15.20**	10.03±2.78* <sup>#</sup>	15.64±4.11* <sup>#</sup>
Cy+FSH+GDF-9	53.625±13.99**	29.11±9.25** <sup>▲</sup>	11.05±3.13* <sup>#</sup>	17.26±4.01* <sup>#</sup>

### 2.3 体外培养的大鼠卵巢组织内凋亡细胞的情况

空白组可见少量的凋亡细胞。与空白组比较, Cy 组凋亡细胞明显增多。Cy+FSH 组, FSH 干预并没有显著减少凋亡细胞的数量; Cy+AMH 组, AMH 干预使卵泡腔周围凋亡细胞的数量显著减少。

Cy+GDF-9 组, GDF-9 干预并没有显著减少凋亡细胞的数量。Cy+FSH+AMH 组, FSH+AMH 干预使卵泡腔周围凋亡细胞的数量显著减少, 并可见发育良好的卵泡腔。Cy+FSH+GDF-9 组, FSH+GDF-9 干预并没有显著减少凋亡细胞的数量。结果见图 1。

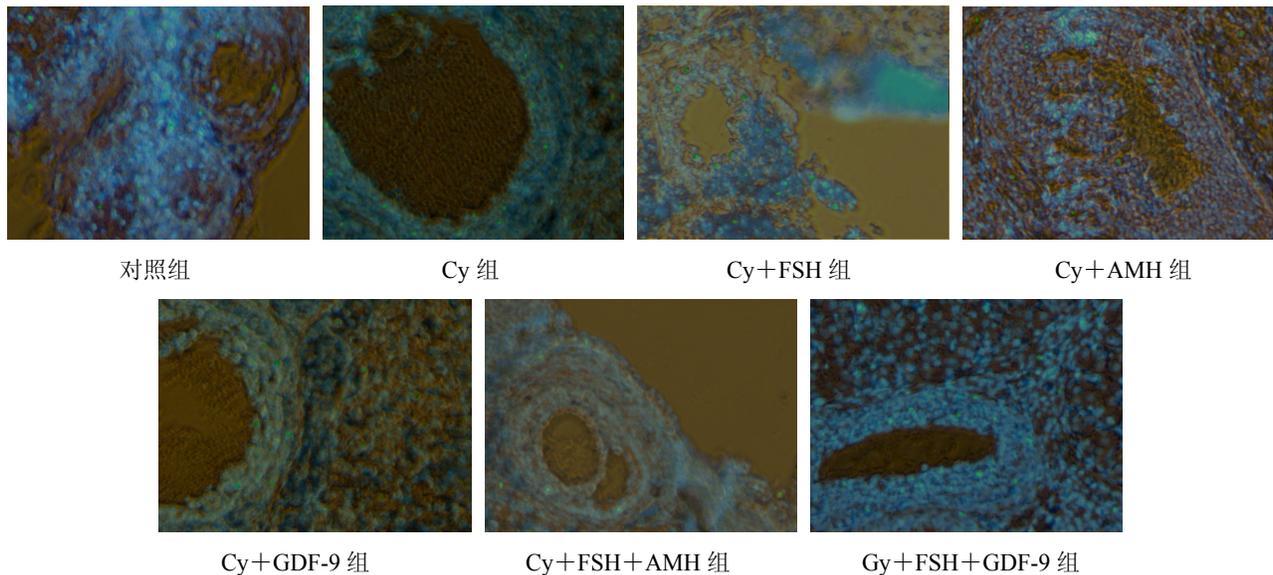


图 1 各组体外培养的大鼠卵巢组织内凋亡细胞的情况

Fig. 1 Cell apoptosis of ovarian tissue cultured *in vitro* in rats of each group

### 3 讨论

化疗是治疗恶性肿瘤以及防止肿瘤复发的主要方法。化疗药物中烷化剂最容易引起卵巢损伤。环磷酰胺是最常用的烷化剂类抗肿瘤药。化疗对卵巢的损伤主要反映在降低卵巢的储备功能<sup>[2]</sup>。化疗药物对卵巢具有细胞毒性作用。细胞毒性药物主要表现为影响卵泡的生长和成熟, 使始基卵泡减少, 卵泡池过早排空, 间质纤维化, 卵巢萎缩, 出现卵巢功能的过早衰竭 (premature ovarian failure, POF)<sup>[3]</sup>。引起月经不规律、不育、过早绝经或合并潮热、盗汗、骨质疏松等症状<sup>[4]</sup>, 严重影响女性的生活质量。

化疗药物造成卵巢功能损伤的机制目前尚不完全清楚。目前研究表明, 育龄期女性化疗后卵巢衰竭的危险性随年龄的增长而增加, 而青春期前儿童的卵巢对化疗药物的敏感性则明显小于育龄期女性。分析原因可能是化疗药细胞毒性作用可造成育龄期女性生长发育中卵泡的损害, 导致细胞凋亡及卵泡闭锁, 使卵泡分泌的  $E_2$  及 INHB 水平降低, 负反馈性升高垂体分泌的 FSH。增高的 FSH 刺激 PMF 加速募集与发育, 导致更多的卵泡受到烷化剂的损害, 形成恶性循环<sup>[4]</sup>。而青春期前儿童的下丘脑-垂

体-卵巢系统处于相对“停滞状态”, 促性腺激素维持在较低水平, 故不致造成 PMF 的加速耗竭。因此有学者提出, 用 GnRH-a 抑制促性腺激素释放, 人为制造青春期状态, 可在一定程度上减缓 PMF 的加速耗竭<sup>[5-6]</sup>。

GDF-9 是转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 超家族成员之一, 是由卵母细胞分泌的细胞因子。GDF-9 在卵泡发育的早期阶段能通过旁分泌方式促进卵母细胞的有丝分裂, 可诱导始基卵泡募集、促进始基卵泡发育。在卵泡的进一步生长中, 影响卵母细胞内细胞器的分布和透明带的完整性; 刺激颗粒细胞增殖和卵丘膨胀, 同时抑制卵泡刺激素 (FSH) 诱导的颗粒细胞过早黄素化; 并能够与 FSH 协同刺激卵泡的生长。

AMH 是目前发现的唯一的 PMF 募集抑制因子<sup>[7]</sup>。AMH 主要由窦前卵泡、小的窦状卵泡的颗粒细胞表达<sup>[8]</sup>, 随卵泡进一步发育或闭锁而消失。AMH 具有调控 PMF 募集、抑制 PMF 池过快消耗的作用。AMH 通过与 PMF 上的特异性受体相结合, 可调控 PMF 卵母细胞信号通道, 从而以卵巢内旁分泌通讯方式, 抑制 PMF 的募集与生长发育。

本研究根据上述理论, 提出化疗药物降低卵巢储备力机制假说如下: ①化疗药物细胞毒性作用可引起细胞凋亡, 导致一部分发育中卵泡闭锁, 使卵泡分泌的  $E_2$  及 INHB 水平降低, 负反馈性升高垂体 FSH。升高的 FSH, 又促进生长卵泡分泌更多的 GDF-9。大量的 GDF-9 通过与 PMF 上的特异性受体结合, 导致大量 PMF 募集发育, 并受到烷化剂的损害。②窦前及小窦卵泡闭锁, 使仅由该阶段卵泡分泌的 AMH 减少, 加之升高的 FSH 加速窦前到窦卵泡发育进程, 进一步降低 AMH 水平。降低的 AMH 抑制 PMF 发育力量不足, 导致 PMF 募集加速, 从而使更多的卵泡受到烷化剂的损害, 形成恶性循环, 直至卵巢衰竭。

本实验用 Cy 体外培养大鼠卵巢组织, 并于培养液中分别添加 GDF-9、AMH 和/或 FSH, 研究 Cy 加速 PMF 募集与耗竭导致卵巢储备力降低的机制。实验结果表明: ①Cy 培养的大鼠卵巢组织中 PMF 数目以及培养液中  $E_2$ 、INHB 水平较对照组均明显减少, 且培养 4 d 较培养 2 d 亦明显减少, 卵巢组织中的闭锁卵泡数目较正常组明显增多。以上均提示 Cy 可加速 PMF 的募集与耗竭, 从而使卵巢储备力降低乃至衰竭。②Cy+FSH 组、Cy+GDF-9 组与 Cy 组培养 2 d 及培养 4 d 相比较, PMF 数目均明显降低。提示: FSH 及 GDF-9 可加速 PMF 的募集与发育, 使更多的 PMF 进入生长卵泡阶段而受到 Cy 细胞毒的损害, 以致 PMF 库存逐渐耗竭。③Cy+AMH 组与 Cy 组、Cy+FSH 组培养 2 d 及 4 d 相比较, PMF 数量明显增多。提示: AMH 通过抑制 PMF 的募集与发育, 减缓 Cy 对 PMF 的加速募集与耗竭, 起到保护卵巢储备力的作用。

研究表明, Cy 可加速 PMF 的募集与耗竭, 从而使卵巢储备力降低乃至衰竭; FSH 及 GDF-9 可加速 PMF 的募集与发育, 使更多的 PMF 进入生长卵泡阶段而受到 Cy 细胞毒的损害, 以致 PMF 库

存逐渐耗竭; AMH 可通过抑制 PMF 的募集与发育, 从而减缓 Cy 对 PMF 的加速募集与耗竭, 起到保护卵巢储备力的作用。此验证了本研究关于“化疗药物降低卵巢储备力机制的假说”。

#### 参考文献

- [1] 罗璐, 杨冬梓, 王箴, 等. 环磷酰胺作用下成年大鼠卵巢干细胞因子和 mRNA 的表达 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(10): 1476-1479.
- [2] 刘萌芳, 白文佩, 魏丽惠. GnRH-a 对化疗药物所致卵巢功能下降的保护作用 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2011, 12(6): 404-405.
- [3] Molina J R, Barton D L, Loprinzi C L. Chemotherapy-induced ovarian failure: manifestations and management [J]. *Drug Saf*, 2005, 28(5): 401-416.
- [4] Blumenfeld Z. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes, or ovaries [J]. *Oncologist*, 2007, 12(9): 1044-1054.
- [5] Blumenfeld Z, Avivi I, Eckman A, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist decreases chemotherapy-induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients with Hodgkin lymphoma [J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(1): 166-173.
- [6] Potolog-Nahari C, Fishman A, Cohen I. Protection of ovarian function and fertility using a combination of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and GnRH antagonist during cancer treatment in young females [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2007, 23(5): 290-294.
- [7] 夏天, 柴淑娟, 马灵芝, 等. 补肾调冲方对半乳糖致 POE 大鼠卵巢储备力及其相关因子 INHB、AMH 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2714-2716.
- [8] Stubbs S A, Hardy K, Da Silva-Buttkus, et al. Anti-müllerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human poly-cystic ovaries [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(10): 5536-5543.