

引用:刘霞,曾艺文,杨美春,郭雯雯,伍丽燕,李小梅. hCG 剂量对 OHSS 倾向 PCOS 大鼠模型血管通透性的影响[J]. 湖南中医杂志,2021,37(9):175-177.

hCG 剂量对 OHSS 倾向 PCOS 大鼠模型血管通透性的影响

刘 霞¹,曾艺文¹,杨美春²,郭雯雯¹,伍丽燕¹,李小梅¹

(1. 肇庆医学高等专科学校,广东 肇庆,526020;2. 广西中医药大学,广西 南宁,530001)

[摘要] 目的:制备卵巢过度刺激综合征(OHSS)倾向多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠模型,并对模型动物血管通透性进行评价。方法:将23日龄SD雌性大鼠50只随机分为空白对照组、OHSS对照组、高剂量人绒毛膜促性腺激素(hCG)模型组(简称高hCG组),中剂量hCG模型组(简称中hCG组)、低剂量hCG模型组(简称低hCG组),每组各10只。高、中、低hCG组大鼠予以颈背部皮下注射脱氢表雄酮(DHEA)制备OHSS倾向PCOS大鼠模型;同期,空白对照组予大鼠颈背部皮下注射中性茶油;OHSS对照组于73日龄至76日龄连续4d皮下注射妊娠雌马血清促性腺激素(PMSG),77日龄(PMSG注射后24h)予皮下注射hCG1次,建立OHSS模型。各组大鼠分笼饲养至79日龄,于动情前期处死并采集标本,观察大鼠卵巢外观的改变,比较各组大鼠腹水评分,腹腔伊文思蓝(EB)、卵巢EB含量,血清雌二醇(E₂)、孕酮(P)、白细胞介素-6(IL-6)、血管内皮生长因子(VEGF)水平。结果:高、中、低hCG组各评价指标出现不同程度升高,提示模型大鼠血管通透性增加。其中,与空白对照组相比,高hCG组各项指标差异均有统计学意义($P<0.05$);中hCG组除腹水评分外各项指标差异均有统计学意义($P<0.05$);低hCG组除腹水评分、血VEGF外,其余各指标差异均有统计学意义($P<0.05$)。与OHSS对照组相比,高hCG组腹腔EB、血清E₂和P差异均有统计学意义($P<0.05$);中、低hCG组各项指标差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:DHEA联合中剂量hCG可以诱导OHSS倾向PCOS大鼠模型,模型大鼠的腹腔血管通透性显著增加,但未出现明显腹水,接近人类OHSS倾向PCOS患者的改变。

[关键词] 卵巢过度刺激综合征;多囊卵巢综合征;血管通透性;人绒毛膜促性腺激素;模型制备

[中图分类号]R271.917.5 **[文献标识码]**A **[DOI]**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2021.09.058

Influence of human chorionic gonadotrophin dose on vascular permeability in a rat model of polycystic ovary syndrome with a tendency of ovarian hyperstimulation syndrome

LIU Xia¹, ZENG Yiwen¹, YANG Meichun², GUO Wenwen¹, WU Liyan¹, LI Xiaomei¹

(1. Zhaoqing Medical College, Zhaoqing 526020, Guangdong, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China)

[Abstract] Objective: To establish a rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS) with a tendency of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), and to investigate vascular permeability in model rats. Methods: A total of 50 female Sprague-Dawley rats, aged 23 days, were randomly divided into blank control group, OHSS control group, high-dose human chorionic gonadotrophin (hCG) model group (high-hCG group), middle-dose hCG model group (middle-hCG group), and low-dose hCG model group (low-hCG group), with 10 rats in each group. The rats in the high-, middle-, and low-hCG groups were given subcutaneous injection of dehydroepiandrosterone (DHEA) at the neck and back to establish a model of PCOS with a tendency of OHSS, and meanwhile, the rats in the blank control group were given subcutaneous injection of neutral tea oil at the neck and back; the rats in the OHSS control group were given subcutaneous injection of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) for 4 consecutive days from the age of 73 days to 76 days, followed by a subcutaneous injection of hCG at the age of 77 days (24 hours after PMSG injection), to establish a model of OHSS. The rats were fed to the age of 79 days in separate cages and were sacrificed in proestrus to collect specimens. The change in ovarian appearance was observed, and the above groups were compared in terms of ascites score, Evans blue (EB) content in abdominal cavity and ovary, and serum levels of estradiol (E₂), progesterone (P), interleukin-6 (IL-6), and vascular endothelial growth factor (VEGF). Results: The high-, middle-, and low-hCG groups showed varying degrees of increases

基金项目:广东省肇庆市科技创新项目(2014E232,201704030910,201704030906)

第一作者:刘霞,女,副教授,主治医师,研究方向:生殖内分泌疾病的诊疗

通讯作者:曾艺文,男,主任中医师,研究方向:中医妇科学,E-mail:zengyiwendoctor@163.com

in the above indices, suggesting an increase in vascular permeability. There were significant differences in these indices between the high-hCG group and the blank control group ($P<0.05$), and there were no significant differences between the middle-hCG group and the blank control group in all indices except ascites score ($P<0.05$); there were significant differences between the low-hCG group and the blank control group in all indices except ascites score and VEGF ($P<0.05$). There were significant differences in EB content in abdominal cavity and the serum levels of E₂ and P between the high-hCG group and the OHSS control group ($P<0.05$), and there were significant differences in the above indices between the OHSS control group and the middle/low-hCG group ($P<0.05$). Conclusion: DHEA combined with middle-dose hCG can induce a significant increase in vascular permeability in a rat model of PCOS with a tendency of OHSS, but without ascites, which is similar to the change in PCOS patients with a tendency of OHSS.

[Keywords] ovarian hyperstimulation syndrome; polycystic ovary syndrome; vascular permeability; human chorionic gonadotrophin; model establishment

卵巢过度刺激综合征(ovarian hyper stimulation syndrome, OHSS)是在辅助生殖技术中,因实施促超排卵引起的一种严重的医源性并发症,主要以卵巢显著增大、雌二醇(E₂)水平升高、血管通透性增加,严重者可出现腹水、胸水及心包积液、血栓栓塞及多器官衰竭,甚至死亡^[1-2]。多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种常见的生殖内分泌和代谢紊乱性疾病,发病率约6%~10%,占不孕症的30%~60%,行辅助生育技术患者中约占50%,是OHSS的高危人群,最新研究数据显示,在中国人中PCOS的发病率为5.61%^[3-4]。本研究采用脱氢表雄酮(DHEA)联合人绒毛膜促性腺激素(hCG)制备OHSS倾向PCOS大鼠模型,从腹水评分、腹腔伊文思蓝(EB)、卵巢EB、血清E₂、孕酮(P)、白介素-6(IL-6)、血管内皮生长因子(VEGF)评价模型动物血管通透性,以寻找稳定的OHSS倾向PCOS大鼠模型造模方法。

1 实验材料

1.1 动物 23日龄清洁级SD雌性幼鼠50只,体质量(35±10)g,由广东省医学动物实验中心提供;动物许可证号:SYXK(粤)2014-012。普通全价颗粒饲料饲养。

1.2 药物与试剂 hCG(批号:140204,丽珠集团丽珠制药厂);DHEA(批号:142302,Merck公司);中性茶油(批号:20140330,江西金海堂药用有限公司,规格:200 ml/瓶)。妊娠雌马血清促性腺激素(PMSG)(批号:140307,宁波市三生药业有限公司);E₂放射免疫试剂盒(批准文号:国药准字S10940095,北京北方生物技术研究所);P放射免疫试剂盒(批准文号:国药准字S10940094,北京北方生物技术研究所);IL-6 ELISA试剂盒(产品编号:EK0412,购自武汉博士德生物工程有限公司);VEGF ELISA试剂盒(产品编号:EK0540,购自武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 实验仪器 OHAUS 1/1000电子天平,美国产;HH-S数显恒温水浴锅,江苏省金坛市医疗仪器厂产;5417R型低温高速离心机,德国Eppendorf公司产;BCD-143KAE冰箱,TCL集团股份有限公司产。其他实验仪器均由我校科研平台提供。

2 实验方法

2.1 动物分组 23日龄雌性SD大鼠50只,按随机数字表法分为空白对照组、OHSS对照组、高剂量hCG模型组(简称

高hCG组)、中剂量hCG模型组(简称中hCG组)、低剂量hCG模型组(简称低hCG组),每组各10只,分笼饲养。

2.2 动物造模 参考 Quintana R等^[5]的造模方法,对高、中、低hCG组制备OHSS倾向PCOS大鼠模型。23日龄始,颈背部皮下注射DHEA 60mg/(kg·d)+0.2 ml中性茶油,每天1次,连续20 d;按人体剂量10000 IU/(60 kg·d)、5000 IU/(60 kg·d)、1000 IU/(60 kg·d)等效剂量换算,高、中、低hCG组分别给予大鼠颈背部皮下注射hCG 0.5 IU/g+0.9%氯化钠注射液、hCG 0.25 IU/g+0.9%氯化钠注射液、hCG 0.05 IU/g+0.9%氯化钠注射液,均配制成0.2 ml,隔天注射1次,0.2 ml/只,连续20 d。同期,空白对照组颈背部皮下注射中性茶油0.2 ml/只,每天1次,连续20 d。OHSS对照组,于73日龄至76日龄连续4 d皮下注射PMSG 10 IU+0.9%氯化钠注射液0.2 ml,77日龄(PMSG注射后24 h)予皮下注射hCG 100 IU+0.9%氯化钠注射液(配制成0.2 ml)1次,建立OHSS模型。

2.3 标本采集和指标检测 各组大鼠分笼饲养至79日龄,每2 h行阴道细胞涂片1次,持续2个性周期。取动情前期大鼠,予以称重后,皮下注射利多卡因麻醉,鼠尾静脉注射1%EB 0.1 ml,30 min后,脱颈处死,沿腹正中线切开,观察有无腹水,按Leng P^[6]的方法进行腹水评分:无腹水计1分;少量腹水计2分;中量腹水计3分;较多量腹水计4分;大量腹水或腹水从腹部切口溢出计5分。以5 ml 0.9%氯化钠注射液冲洗腹腔,收集冲洗液,按照Ujioka T^[7]和Khanna M^[8]的改良方法,测定EB的OD值,根据EB标准浓度及其OD值绘制标准曲线,计算腹腔冲洗液EB的含量。心脏采血5~10 ml,以放射免疫法检测大鼠血清E₂、P,ELISA法检测IL-6、VEGF。无菌操作取出大鼠双侧卵巢,0.9%氯化钠注射液洗净,左侧卵巢置于4 ml甲酰胺中萃取,比色测定EB的OD值,根据EB标准浓度及其OD值绘制标准曲线,计算卵巢EB的含量。

2.4 统计学方法 实验数据用SPSS 26.0统计学软件分析处理。计量资料各项指标均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 大鼠死亡情况 实验过程中,OHSS对照组、高hCG组、低hCG组大鼠各死亡1只,成活大鼠共47只。

3.2 大鼠卵巢外观的改变 空白对照组大鼠卵巢表面色泽红润,卵泡扩张不明显,卵泡较大,表面见较多黄体。OHSS对照组卵巢显著增大,表面紫褐色,可见多个黄体,有多个卵泡和囊肿形成。各hCG组大鼠卵巢体积呈不同程度增大,卵巢表面呈蓝紫色,可见黄体和囊肿形成,随着hCG剂量增加,卵巢表面紫蓝色逐渐加深,囊肿数和黄体数目逐渐增加。

3.3 各组大鼠腹水评分,腹腔EB、卵巢EB含量,血清E₂、

表1 各组大鼠腹水评分,腹腔EB、卵巢EB含量,血清E₂、P、IL-6、VEGF水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数(只)	腹水评分(分)	腹腔EB(μg/ml)	卵巢EB(ng/mg)	E ₂ (pg/ml)	P(ng/ml)	IL-6(pg/ml)	VEGF(pg/ml)
空白对照组	10	1.00±0.00	0.32±0.03	35.70±3.84	35.56±5.53	16.54±4.62	13.68±3.51	13.36±4.77
OHSS对照组	9	2.33±0.87	4.32±0.21	75.69±17.71	163.59±4.02	769.67±29.08	45.61±10.22	64.36±7.68
高hCG组	9	2.22±0.44 ^a	3.08±0.49 ^{ab}	75.19±14.74 ^a	154.38±3.11 ^{ab}	727.03±46.67 ^{ab}	43.31±7.69 ^a	62.22±11.83 ^a
中hCG组	10	1.30±0.48 ^b	2.44±0.48 ^{ab}	53.65±7.72 ^{ab}	112.65±4.49 ^{ab}	513.74±44.45 ^{ab}	31.03±3.45 ^{ab}	51.18±8.22 ^{ab}
低hCG组	9	1.22±0.44 ^b	1.98±0.31 ^{ab}	41.83±0.41 ^{ab}	85.96±3.47 ^{ab}	483.82±26.32 ^{ab}	24.65±3.43 ^{ab}	18.81±8.60 ^b

注:与空白对照组比较,^aP<0.05;与OHSS对照组比较,^bP<0.05。

4 讨论

PCOS出现OHSS倾向的标志性病理生理改变就是毛细血管通透性增加^[9]。本实验以DHEA联合hCG造模。DHEA干扰大鼠正常发育以及卵泡的生长成熟,使卵巢出现多囊性变和PCOS内分泌特征。hCG的化学结构和生物作用与黄体生成素类似,大剂量hCG可使卵巢受到过度刺激,分泌并释放血管活性物质,导致毛细血管通透性增加,进而导致腹水产生^[9-11]。

VEGF是一种强烈的特异性地作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子,具有增加微血管与小静脉通透性和加速新血管形成的作用^[12-13];IL-6不但可直接增加血管通透性,还可通过诱导VEGF的产生来加强作用^[14];E₂和P均可通过调节卵巢VEGF的产生影响血管通透性^[15-16];故可作为PCOS患者出现OHSS倾向的评价指标。

造模后,大鼠卵巢体积呈不同程度增大,表面呈蓝紫色,可见黄体和囊肿形成,随着hCG剂量增加,卵巢表面紫蓝色逐渐加深,囊肿数和黄体数目逐渐增加,腹水评分、腹腔EB、卵巢EB及血E₂、P、IL-6、VEGF水平逐渐升高。其中,高hCG组出现明显腹水,多项指标提示OHSS形成,造模失败;低剂量hCG组评价指标提示血管通透性增加不明显,尚不能判断OHSS倾向出现;中hCG组卵巢体积明显增大,有多个囊肿形成,主要为黄体囊肿,部分为滤泡囊肿,各级卵泡明显减少,病理形态学改变介于PCOS和OHSS大鼠卵巢之间,各评价指标均提示大鼠毛细血管通透性增加,但没有出现明显腹水等典型OHSS表现,符合OHSS倾向PCOS改变。

参考文献

- [1] 乌兰.卵巢过度刺激综合征诊断标志物的筛选及“瘀滞”论治疗的临床效应评估[D].南京:南京中医药大学,2016.
- [2] 翟君钰.卵巢过度刺激综合征的发病机制及防治措施研究[D].上海:上海交通大学,2017.
- [3] 黄碧琴.疏肝补肾祛痰法对PCOS大鼠卵巢TGF-1及ECM

P、IL-6、VEGF水平比较 与空白对照组比较,高hCG组各项指标差异均有统计学意义(P<0.05),中hCG组除大鼠腹水评分外各项指标差异均有统计学意义(P<0.05),低hCG组除大鼠腹水评分和血清VEGF外,其余各项指标差异均有统计学意义(P<0.05)。与OHSS对照组比较,高hCG组腹腔EB、E₂和P差异均有统计学意义(P<0.05),中、低hCG组各项指标差异均有统计学意义(P<0.05)。(见表1)

相关因子表达的影响[D].武汉:湖北中医药大学,2017.

- [4] 田烨.多囊卵巢综合征和卵巢过度刺激综合征易感基因相关研究[D].上海:上海交通大学,2016.
- [5] QUINTANA R,KOPCOW L,MARCONI G,et al. Inhibition of cyclooxygenase2(COX-2) by meloxicam decreases the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model [J]. Fertil Steril,2008,90(2):1511-1516.
- [6] LENG P,HO YUEN B,MOON YS. Effect of prolactin in an experimental model of the ovarian hyperstimulation syndrome [J]. Am J Obstet Gynecol,1983(145):847-849.
- [7] UJIOKA T,MATSUURA K,KAWANNO T,et al. Role of progesterone in capillary permeability in hyperstimulated rats [J]. Hum Reprod,1997(12):1629-1634.
- [8] KHANNA M,CHATURVEDI UC,SHARMA MC,et al. Induced capillary permeability mediated by a dengue virus-induced lymphokine[J]. Immunology,1990(69):449-453.
- [9] 莫毅,刘超,崔士龙,等.卵巢过度刺激综合征大鼠模型的建立[J].实验动物科学,2019,36(5):27-30.
- [10] 高磊,吴效科.多囊卵巢综合征动物模型的研究进展[J].国外医学·妇幼保健分册,2009,9(1):92-94.
- [11] 吕晶武,高月平.多囊卵巢综合征动物模型的研究进展[J].实用中西医结合临床,2009,9(1):92-94.
- [12] 祝佩芹,秦琦瑜,边疆.大鼠卵巢过度刺激综合征模型与血管内皮生长因子和白细胞介素-6的相关性研究[J].时珍国医国药,2009,20(3):547-548.
- [13] ERRARAN,HENZELWJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor specific for vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,1989(161):851,858.
- [14] 王欣磊,孙振高,张祎,等.卵泡液重要蛋白分子与OHSS发生的相关性研究进展[J].生殖医学杂志,2020,29(5):689-693.
- [15] 范光升.卵巢过度刺激综合征(OHSS)[J].中国计划生育学杂志,2007,15(8):505-506.
- [16] 吕文杰.血清和卵泡液中血管内皮生长因子及白细胞介素6与卵巢过度刺激综合征相关性的研究[D].合肥:安徽医科大学,2003.

(收稿日期:2021-01-10)