

引用:刘霞,汤之明,杨美春. 丙酸睾酮联合 hCG 诱导 OHSS 倾向 PCOS 大鼠模型的建模与评价[J]. 湖南中医杂志, 2021,37(10):200-203.

丙酸睾酮联合 hCG 诱导 OHSS 倾向 PCOS 大鼠模型的建模与评价

刘霞¹, 汤之明¹, 杨美春²

(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,并对造模方法进行评价。方法:将SD雌性幼鼠60只分为实验组(48只)和空白对照组(12只)。实验组大鼠予颈背部皮下注射丙酸睾酮+中性茶油进行PCOS造模,空白对照组注射中性茶油,连续20 d。造模成功的41只大鼠随机分为PCOS对照组10只、高剂量人绒毛膜促性腺激素(hCG)模型组(简称高hCG组)11只、中剂量hCG模型组(简称中hCG组)10只、低剂量hCG模型组(简称低hCG组)10只。高、中、低hCG组分别给予颈背部皮下注射高、中、低剂量hCG+0.9%氯化钠注射液干预,空白对照组和PCOS对照组注射0.9%氯化钠注射液,连续9 d。比较各组大鼠体质量、卵巢病理形态学改变、卵巢指数、卵巢最大横截面积、腹水评分、腹腔伊文思蓝(EB)含量、血清雌二醇(E₂)水平。结果:模型组大鼠卵巢体积增大,卵巢指数降低,最大横截面积增大,卵巢出现多发性滤泡囊肿和黄体囊肿;E₂水平升高;腹腔毛细血管通透性增加。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,其余各项指标差异均有统计学意义($P<0.05$);低hCG组除腹水评分、卵巢指数外,其余各项指标差异均有统计学意义($P<0.05$)。与PCOS对照组相比,高、中hCG组大鼠卵巢指数、卵巢最大横截面积、腹腔EB含量、血清E₂水平差异均有统计学意义($P<0.05$);低hCG组卵巢指数、卵巢最大横截面积、血清E₂水平差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:丙酸睾酮联合中剂量hCG可以诱导OHSS倾向PCOS大鼠模型,该模型的卵巢病理形态学改变、腹腔毛细血管通透性增加、血清E₂水平明显升高,但未出现明显腹水,接近人类OHSS倾向PCOS患者的改变。

[关键词] 卵巢过度刺激征;多囊卵巢综合征;丙酸睾酮;人绒毛膜促性腺激素

[中图分类号] R271.917.5 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2021.10.061

Establishment and evaluation of a rat model of polycystic ovary syndrome with the tendency of ovarian hyperstimulation syndrome induced by testosterone propionate and human chorionic gonadotrophin

LIU Xia¹, TANG Zhiming¹, YANG Meichun²

(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 the tendency of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), and to evaluate the modeling method. Methods: A total of 60 female young Sprague-Dawley rats were divided into experimental group with 48 rats and blank control group with 12 rats. The rats in the experimental group were given subcutaneous injection of testosterone propionate and neutral tea oil at the neck and back to establish a model of PCOS, and those in the blank control group were given the injection of neutral tea oil, for 20 consecutive days. After successful modeling, 41 rats were randomly divided into PCOS control group with 10 rats, high-dose human chorionic gonadotrophin (hCG) model group (high-dose hCG group) with 11 rats, middle-dose hCG model group (middle-dose hCG group) with 10 rats, and low-dose hCG model group (low-dose hCG group) with 10 rats. The high-, middle-, and low-dose hCG groups were given subcutaneous injection of 0.9% sodium chloride injection and high-, middle-, and low-dose hCG, respectively, at the neck and

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

第一作者:刘霞,女,副教授,主治医师,研究方向:妇产科学(生殖内分泌方向)

back, and the blank control group and the PCOS group were given injection of 0.9% sodium chloride injection, for 9 consecutive days. The groups were compared in terms of body weight, pathomorphological changes of the ovary, ovary index, maximum cross-sectional area of the ovary, ascites score, content of Evans blue (EB) in the abdomen, and the serum level of estradiol (E_2). Results: The rats in the model group had increases in ovarian volume, maximum cross-sectional area of the ovary, E_2 level, and capillary permeability in the abdomen and a reduction in ovary index, with the presence of multiple follicular cysts and corpus luteum cysts in the ovary. There were significant differences in all indices between the blank control group and the high-dose hCG group ($P < 0.05$); there were significant differences in all indices except ascites score between the blank control group and the middle-dose hCG group ($P < 0.05$); there were significant differences in all indices except ascites score and ovary index between the blank control group and the low-dose hCG group ($P < 0.05$). There were significant differences in ovary index, maximum cross-sectional area of the ovary, EB content in the abdomen, and the serum level of E_2 between the high- and middle-dose hCG groups and the PCOS control group ($P < 0.05$), and there were significant differences in ovary index, maximum cross-sectional area of the ovary, and the serum level of E_2 between the low-dose hCG group and the PCOS control group ($P < 0.05$). Conclusion: Testosterone propionate combined with middle-dose hCG and induce a rat model of PCOS with OHSS tendency, and this model shows pathomorphological changes of the ovary, increased capillary permeability in the abdomen, and a significant increase in the serum level of E_2 , without the presence of marked ascites, which are similar to the changes in patients with PCOS with OHSS tendency.

[**Keywords**] ovarian hyperstimulation syndrome; polycystic ovary syndrome; testosterone propionate; human chorionic gonadotrophin

卵巢过度刺激综合征(ovarian hyper stimulation syndrome, OHSS)是一种严重的医源性并发症,主要有卵巢显著增大、血清雌二醇(E_2)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、血栓栓塞及多器官功能衰竭,甚至死亡^[1]。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,临床表现以激素水平紊乱和卵巢增大呈多囊性改变等病理变化为特征^[2]。PCOS在育龄期女性中的发病率为5%~10%,是OHSS的高危人群^[3]。本研究采用丙酸睾丸酮联合人绒毛膜促性腺激素(hCG)造模,比较各组动物之间卵巢的病理形态学改变,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 9日龄清洁级SD雌性幼鼠60只,体质量(17±4)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。母乳喂养至22日龄,断奶后普通全价颗粒饲料饲养。

1.2 药物与试剂 丙酸睾丸酮(华中药业股份有限公司,批号:140801);hCG(丽珠集团丽珠制药厂,批号:140204);中性茶油(江西金海堂药用有限公司,批号:20140330,规格:200 ml/瓶);0.9%氯化钠注射液(湖北天药药业股份有限公司,批号:20140321,规格:10 ml/支);伊文思蓝(EB,南京奥多福尼生物科技有限公司,批号:20140321,规格:1 g/瓶); E_2 放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所生产,批准文号:国药准字S10940095)

1.3 主要仪器 奥豪斯CP153_Textile称量天平(奥豪斯仪

器(上海)有限公司);CUT6062切片机(德国SLEE);BCD-143KAE冰箱(TCL集团股份有限公司);BX53F奥林巴斯三目显微镜+摄像系统;日本奥林巴斯公司;其余实验仪器均由我校科研平台提供。

2 实验方法

2.1 分组及造模 将60只幼鼠随机分为实验组48只和空白对照组12只。实验组48只颈背部皮下注射丙酸睾丸酮(0.1 mg/g)+中性茶油,0.10 ml/只,同期空白对照组12只颈背部皮下注射中性茶油0.10 ml/只,每天1次,连续20 d。随母鼠母乳喂养至22日龄,断奶后分笼喂养。空白对照组死亡2只,存活10只;实验组死亡7只,存活41只。70日龄阴道开口,连续阴道上皮细胞涂片2个动情周期,空白对照组10只均有正常周期改变,实验组中41只阴道上皮细胞无周期改变,提示PCOS大鼠模型制备成功。将其随机分为PCOS对照组10只、高剂量hCG模型组(简称高hCG组)11只、中剂量hCG模型组(简称中hCG组)10只、低剂量hCG模型组(简称低hCG组)10只。79日龄始,高、中、低hCG组分别给予大鼠颈背部皮下注射hCG 0.5 U/g+0.9%氯化钠注射液、hCG 0.25 U/g+0.9%氯化钠注射液、hCG 0.05 U/g+0.9%氯化钠注射液,0.20 ml/只,每天2次,连续9 d,制备OHSS倾向PCOS模型;空白对照组和PCOS对照组大鼠颈背部皮下注射0.9%氯化钠注射液0.20 ml/只,每天2次,连续9 d。

2.2 标本采集和指标检测 1)造模结束后行阴道细胞涂片2个性周期,处死前2 d每2 h涂片1次,取动情前期,皮下注射利多卡因麻醉,鼠尾静脉注射1%的EB 0.1 ml,30 min后称取体质量,脱颈处死,沿腹正中线切开,观察有无腹

水。参照 Leng P^[4] 的方法进行腹水分评:1 分,无腹水;2 分,少量腹水;3 分,中量腹水;4 分,较多量腹水;5 分,大量腹水或腹水从腹部切口溢出。2) 以 5 ml 0.9% 氯化钠注射液冲洗腹腔,收集冲洗液,按照 Ujioka T^[5] 和 Khanna M^[6] 的改良方法进行。通过分光光度计在 700 nm 波长处测定 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 1 ml,以放射免疫法检测大鼠血清 E₂。无菌操作取出大鼠卵巢,肉眼观察卵巢形态,并记录湿重。按以下公式计算卵巢指数:卵巢指数=两侧卵巢总质量(mg)/大鼠体质量(g)。卵巢组织以 10% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,观察卵巢病理形态学变化并测算卵巢最大横截面积:以卵巢长径为中轴向两侧切片,使用目镜测微仪检测最长径切片最大纵轴(D₁)、横轴(D₂),卵巢最大横截面积= $\pi \times D_1/2 \times D_2/2$ 。

2.3 统计学方法 实验数据用 SPSS 24.0 统计学软件分析处理。计量资料各项指标均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 大鼠死亡情况 实验过程中,空白对照组、高 hCG 组、中 hCG 组均死亡 2 只。

3.2 大鼠卵巢病理形态学改变

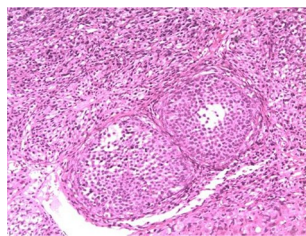
3.2.1 空白对照组 卵巢表面色泽红润,卵泡扩张不明显,卵泡较大,表面见较多黄体。镜下可见:卵巢结构正常,表面有多个黄体,黄体结构正常;卵巢内可见不同发育阶段的卵泡,卵泡内颗粒细胞多为 8~9 层;电镜可见卵泡颗粒细胞内含中量的线粒体、内质网等结构。

3.2.2 PCOS 对照组 卵巢苍白,体积略增大,表面见较多囊性扩张的卵泡,多无黄体。镜下可见:卵巢呈多囊性变;卵巢内可见大量原始卵泡和闭锁卵泡,囊状卵泡比例增加,闭锁卵泡直径明显增大;卵细胞结构不清,卵母细胞或放射冠消失,颗粒细胞层数多为 2~3 层,大部分未见黄体形成;电镜可见卵泡腔内颗粒细胞和间质细胞胞浆内有丰富的线粒体、内质网等结构。

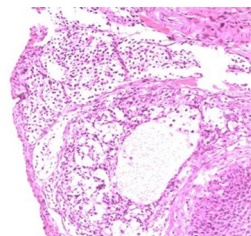
3.2.3 高 hCG 组 卵巢体积明显增大,表面呈现紫蓝色,可见黄体,有多个囊肿形成。镜下可见:卵巢内可见卵泡明显囊性扩张,有多个囊肿形成,主要为黄体囊肿,部分为滤泡囊肿,各级卵泡明显减少,黄体数目较 PCOS 组多,颗粒细胞多为 8~9 层;电镜下,卵泡颗粒细胞内含多量的线粒体、粗面及滑面内质网等结构。

3.2.4 中 hCG 组 卵巢体积明显增大,表面部分呈紫蓝色,颜色不均,可见黄体,有多个囊肿形成。镜下可见:卵巢内可见卵泡明显囊性扩张,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,黄体数目较 PCOS 组多,较高 hCG 组略少,颗粒细胞多为 8~9 层;电镜下,卵泡颗粒细胞内含多量的线粒体、粗面及滑面内质网和脂滴。

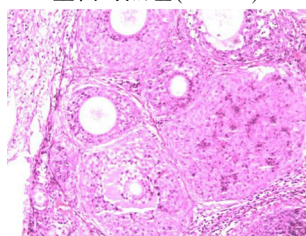
3.2.5 低 hCG 组 卵巢表面苍白,表面可见多个囊性扩张的卵泡,偶可见少数黄体。镜下可见:卵巢囊性扩张,有多个原始卵泡,闭锁卵泡,有少量囊肿和黄体,颗粒细胞层数 5~7 层,电镜下卵泡颗粒细胞内含较多线粒体、粗面及滑面内质网和脂滴。(见图 1)



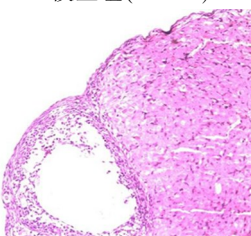
空白对照组(10×10)



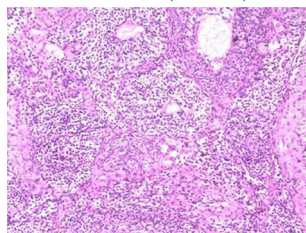
PCOS 模型组(10×10)



高 hCG 组(10×10)



中 hCG 组(10×10)



低 hCG 组(10×10)

图 1 各组大鼠卵巢病理图

3.3 各组大鼠体质量、卵巢指数、卵巢最大横截面积、腹水分评、腹腔 EB、血清 E₂ 水平的变化 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 组除腹水分评外,其余各项指标差异均有统计学意义(*P* < 0.05);低 hCG 组除腹水分评、卵巢指数外,其余各项指标差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。与 PCOS 对照组比较,高、中 hCG 组大鼠卵巢指数、卵巢最大横截面积、腹腔 EB 含量、血清 E₂ 水平差异均有统计学意义(*P* < 0.05);中 hCG 组腹水分评差异有统计学意义(*P* < 0.05);低 hCG 组卵巢指数、卵巢最大横截面积、血清 E₂ 水平差异有统计学意义(*P* < 0.05)。各 hCG 组间体质量比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),而卵巢指数、卵巢最大横截面积、血清 E₂ 水平比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05);中、低 hCG 组与高 hCG 组腹水分评比较,差异均有统计学意义(*P* < 0.01),而低 hCG 组与中 hCG 组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05);中 hCG 组与高 hCG 组腹腔 EB 含量比较,差异无统计学差异(*P* > 0.05),而低 hCG 组与高 hCG 组比较,低 hCG 组与中 hCG 组比较,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。(见表 1)

表 1 各组大鼠体重、卵巢指数、卵巢最大横截面积、腹水分、腹腔 EB 含量及血清 E₂ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	体重(g)	卵巢指数	卵巢最大横截面积 (mm ²)	腹水分 (分)	腹腔 EB (pg/100 g)	血清 E ₂ (pg/ml)
空白对照组	10	275.05±34.91	0.614±0.043	13.03±4.77	1.00±0.00	1.07±0.67	35.80±7.93
PCOS 对照组	10	311.60±26.48 ^a	0.552±0.061 ^a	25.51±5.09 ^a	1.1±0.32	1.85±0.32 ^a	42.37±1.74 ^b
高 hCG 组	9	336.94±42.03 ^a	0.884±0.062 ^{ab}	55.60±3.35 ^{ab}	2.33±0.87 ^a	3.04±0.55 ^{ab}	124.62±4.06 ^{ab}
中 hCG 组	8	324.89±22.68 ^a	0.793±0.054 ^{ab}	38.73±2.66 ^{ab}	1.25±0.46 ^b	2.64±0.52 ^{ab}	112.97±4.44 ^{ab}
低 hCG 组	10	319.39±45.75 ^a	0.650±0.063 ^b	31.37±3.00 ^{ab}	1.20±0.42	1.99±0.51 ^a	85.03±3.74 ^{ab}

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与 PCOS 对照组比较,^b $P<0.05$ 。

4 讨 论

4.1 OHSS 倾向 PCOS 大鼠模型制备 有研究表明,雌性大鼠应用睾酮后,卵巢出现多囊性变,并出现性激素异常的内分泌特征,生殖特征与人类 PCOS 相似,这些变化符合生理规律,具有相对的稳定性^[7-8]。丙酸睾酮制备 PCOS 大鼠模型的基本原理是过高的雄激素干扰大鼠正常发育以及卵泡的生长成熟,导致不排卵。有学者认为,PCOS 的形成也与雄激素自青春期开始发挥生物效应有关^[7]。hCG 的化学结构和生物作用与 LH 类似,大剂量使用 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,进而出现腹水等变化^[9]。本实验选择 9 日龄 SD 大鼠颈背部注射丙酸睾酮进行 PCOS 造模,在 PCOS 模型大鼠基础上,注射大剂量 hCG 刺激卵巢,通过控制 hCG 剂量使大鼠卵巢出现 OHSS 倾向改变。

4.2 OHSS 倾向 PCOS 大鼠模型评价 大鼠颈背部注射丙酸睾酮后,卵巢表面见较多囊性扩张的卵泡,无黄体,镜下可见卵巢呈多囊性变,卵巢内可见大量原始卵泡和闭锁卵泡,囊状卵泡比例增加,闭锁卵泡直径明显增大,符合 PCOS 病理卵巢改变。在此基础上,大鼠颈背部注射不同剂量 hCG,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,以上改变倾向不符合 PCOS 病理卵巢改变,更加倾向于 OHSS 病理改变。随着 hCG 剂量增加,卵巢表面紫蓝色逐渐加深,囊肿数和黄体数逐渐增加。各 hCG 组均有明显的体重增加,且更接近 PCOS 模型,卵巢指数均有所升高,但低 hCG 组不明显卵巢最大横截面积有所增加,均符合 OHSS 倾向改变。根据 Golan 诊断标准^[10],卵巢体积增大、腹腔毛细血管的通透性增加和腹水均出现方可诊断为 OHSS。在 PCOS 模型大鼠基础上,高剂量 hCG 造模后,有明显的腹水产生,更倾向于 OHSS 模型;低剂量 hCG 造模后,腹腔 EB 水平提示腹腔毛细血管通透性增加不明显,没有明显腹水产生,与 PCOS 模型无显著差异;中 hCG 组模型大鼠腹腔血管通透性的增加,但无明显腹水等典型 OHSS 表现。各 hCG 组均有明显的血清 E₂ 水平升高,且与空白对照组和 PCOS 模型差异均有统计学意义,符合 OHSS 倾向改变。

综上所述,在 PCOS 模型大鼠基础上皮下注射大剂量

hCG,可产生腹水等典型 OHSS 表现;通过调整 hCG 的剂量,可使 PCOS 模型大鼠出现不同程度病理形态学和内分泌改变,腹腔血管通透性和腹水量也出现相应的变化。高 hCG 组血管通透性增加,出现腹水,根据模型大鼠卵巢局部的表现、血清 E₂ 水平,提示更接近 OHSS 模型,不符合 OHSS 倾向 PCOS 模型的要求;低 hCG 组各指标均与 PCOS 模型相差不大,无明显 OHSS 相关改变;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,血清 E₂ 水平明显升高,腹腔毛细血管通透性增加,但未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] 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.
- [2] 黄碧琴. 疏肝补肾祛瘀法对 PCOS 大鼠卵巢 TGF- β 1 及 ECM 相关因子表达的影响[D]. 武汉:湖北中医药大学,2017.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] UJIOKA T, MATSUURA K, KAWANNO T, et al. Role of progesterone in capillary permeability in hyperstimulated rats[J]. Hum Reprod, 1997, 12: 1629-1634.
- [6] KHANNA M, CHATURVEDI UC, SHARMA MC, et al. Induced capillary permeability mediated by a dengue virus-induced lymphokine[J]. Immunology, 1990, 69: 449-453.
- [7] 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.
- [8] 吕晶武, 高月平. 多囊卵巢综合征中西医结合研究思路[J]. 实用中西医结合临床, 2009, 9(1): 92-94.
- [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] GOLANA, RONELR, SOFFERY, et al. Ovarian hyper stimulation syndrome: an update review[J]. Obstet Gynecol Survey, 1989 (44): 430.

(收稿日期:2020-12-17)