

引用本文:熊露,胡雅君,李金丽,等.促性腺激素释放激素拮抗剂对顺铂化疗中小鼠卵巢的保护作用[J].安徽医药,2021,25(7):1286-1289.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.07.004.

◇ 药学研究 ◇



促性腺激素释放激素拮抗剂对顺铂化疗中小鼠卵巢的保护作用

熊露,胡雅君,李金丽,刘莉

作者单位:武汉市第一医院生殖医学科,湖北 武汉 430022

通信作者:胡雅君,女,主任医师,硕士生导师,研究方向为不孕不育,Email:282314194@qq.com

基金项目:湖北省卫计委科研项目(22090100190004);武汉市临床医学科研项目(WX14C04)

摘要: **目的** 探讨促性腺激素释放激素(GnRH)拮抗剂对化疗中小鼠卵巢的保护作用。**方法** 2018年10月至2019年10月,选取华中科技大学同济医学院动物中心购置的BALB/c雌性小鼠30只,随机数字表法分为A组、B组和C组,每组10只,其中A组腹腔注射等量生理盐水,B组腹腔注射顺铂,C组腹腔注射顺铂和西曲瑞克,采用HE染色观察各组卵巢组织,测量各组卵巢湿重,放射免疫法检测血清促卵泡生成素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇(E_2)、抗苗勒管激素(AMH)和基础抑制数B(INHB)水平,蛋白质印迹法(Western blot)检测卵巢组织凋亡基因(Bax)及凋亡调控基因(Bcl-2)蛋白表达。**结果** B组和C组卵巢湿重明显低于A组($P<0.05$),其中C组卵巢湿重为(15.17 ± 0.88)mg,明显高于B组(8.95 ± 0.91)mg($P<0.05$);B组和C组原始卵泡、生长卵泡和成熟卵泡明显低于A组($P<0.05$),其中C组原始卵泡、生长卵泡和成熟卵泡分别为(402.00 ± 45.50)个、(110.03 ± 21.28)个和(40.03 ± 7.89)分,明显高于B组(230.02 ± 40.10)个、(67.92 ± 19.22)个和(21.11 ± 6.92)个($P<0.05$);与A组比较,B组生长卵泡及成熟卵泡明显减少,颗粒细胞排列紊乱,卵母细胞形态畸形,黄体细胞结构模糊,细胞核固缩,而C组有所改善;B组和C组FSH和LH明显高于A组($P<0.05$),而 E_2 、AMH和INHB明显低于A组($P<0.05$),其中C组FSH和LH分别为(0.96 ± 0.20)IU/L和(3.56 ± 0.91)IU/L,明显低于B组(1.23 ± 0.22)IU/L和(4.80 ± 0.87)IU/L($P<0.05$),而 E_2 、AMH和INHB分别为(18.89 ± 1.14)ng/L、(4.10 ± 0.92)IU/L和(15.51 ± 2.90)mg/ml,明显高于B组(9.89 ± 1.92)ng/L、(2.20 ± 0.54)IU/L和(12.01 ± 2.20)mg/ml($P<0.05$);B组和C组Bcl-2蛋白相对表达量明显低于A组($P<0.05$),而Bax蛋白相对表达量明显高于A组($P<0.05$),其中C组Bcl-2蛋白相对表达量为(0.302 ± 0.097),明显低于B组(0.133 ± 0.076)($P<0.05$),而Bax蛋白相对表达量为(0.682 ± 0.125),明显低于B组(0.982 ± 0.117)($P<0.05$)。**结论** GnRH拮抗剂可降低顺铂对小鼠卵巢的损害,保护小鼠卵巢储备功能。

关键词: 卵巢储备功能; 药物相关性副作用和不良反应; 西曲瑞克; 促性腺激素释放激素; GnRH拮抗剂; 顺铂; 小鼠

Protective effect of GnRH antagonist on ovaries of cisplatin treated mice

XIONG Lu, HU Yajun, LI Jinli, LIU Li

Author Affiliation: Department of Reproductive Medicine Section, Wuhan First Hospital, Wuhan, Hubei, 430022, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effects of GnRH antagonist on ovarian tissue in mice after chemotherapy. **Methods** Thirty female BALB/c mice purchased by the Animal Center of Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology were selected and divided into group A, B and C according to random digital table method from October 2018 to October 2019, with 10 rats in each group. Group A received intraperitoneal injection of normal saline, group B received intraperitoneal injection of cisplatin, and group C received intraperitoneal injection of cisplatin and cetrorelix. HE staining was used to observe ovarian tissue in each group, the wet weight of each group was measured, serum levels of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and estradiol (E_2), anti-mullerian hormone (AMH) and basal inhibitory number B (INHB) were measured by reflex immunoassay, western blot was used to detect the expression of Bax and Bcl-2 protein in ovarian tissue. **Results** The wet weight of ovaries in group B and group C were significantly lower than that in group A ($P<0.05$), the wet weight of ovaries in group C was (15.17 ± 0.88) mg, significantly higher than that in group B (8.95 ± 0.91) mg ($P<0.05$); The primitive follicles, growing follicles and mature follicles in group B and group C were significantly lower than those in group A ($P<0.05$). The scores of primitive follicles, growing follicles and mature follicles in group C were (402.00 ± 45.50), (110.03 ± 21.28) and (40.03 ± 7.89), which were significantly higher than those in group B (230.02 ± 40.10), (67.92 ± 19.22), (21.11 ± 6.92) ($P<0.05$); Compared with group A, the growth follicles and mature follicles of group B were significantly reduced, the arrangement of granulosa cells was disordered, the morphology of oocytes was abnormal, the structure of luteal cells was fuzzy, the nucleus was pyknosis, while group C was improved; The FSH and LH in group B and group C were significantly higher than those in group A ($P<0.05$), while E_2 was significantly lower than those in group A ($P<0.05$). FSH and LH in group C were ($0.96\pm$

0.20) IU/L and (3.56 ± 0.91) IU/L, significantly lower than those in group B (1.23 ± 0.22) IU/L and (4.80 ± 0.87) IU/L ($P < 0.05$), while E₂, AMH and INHB were (18.89 ± 1.14) ng/L, (4.10 ± 0.92) IU/L and (15.51 ± 2.90) mg/ml, which were significantly higher than those in group B (9.89 ± 1.92) ng/L, (2.20 ± 0.54) IU/L and (12.01 ± 2.20) mg/ml ($P < 0.05$); The relative expression of Bcl-2 protein in group B and group C were significantly lower than that in group A ($P < 0.05$), but the relative expression of Bax protein were significantly higher than that in group A ($P < 0.05$), the relative expression of Bcl-2 protein in group C was (0.302 ± 0.097) , significantly lower than that in group B (0.133 ± 0.076) ($P < 0.05$), and the relative expression of Bax protein was (0.682 ± 0.125) , was significantly lower than that in group B (0.982 ± 0.117) ($P < 0.05$). **Conclusion** GnRH antagonist can reduce the damage of cisplatin on the ovary of mice and protect the ovarian reserve function of mice.

Key words: Ovarian reserve; Drug-related side effects and adverse reactions; Cetrotide; Gonadotropin-releasing hormone; GnRH antagonist; Cisplatin; Mice

随着放化疗等抗癌手段的进展,恶性肿瘤病人的生存率得到显著提高。但研究发现高剂量化疗药物应用在控制肿瘤生长、延续病人生命的同时,会出现多种副反应,严重病人还可发生生殖功能障碍,造成卵巢功能减退甚至衰竭^[1]。流行病学研究提示约70%左右病人经抗肿瘤治疗后存在不孕和卵巢功能减退或衰竭的临床症状,严重降低了女性病人生活质量^[2]。

促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)激动剂能够刺激相关性腺激素短时间内快速升高,能够即可抑制促性腺激素水平,更有利于人类生殖内分泌轴的可逆性控制。文献^[3-4]提示GnRH拮抗剂能够减少激动剂1~2周的等待期,进而抑制垂体-性腺轴相关功能,但GnRH也可能存在骨矿物质密度下降、热潮红等副反应,相关研究资料也较为缺乏。故而,本研究深入探讨了GnRH拮抗剂对化疗中小鼠卵巢的保护作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物和药物 2018年10月至2019年10月,选取华中科技大学同济医学院动物中心购置的5~6周龄SPF级BALB/c雌性小鼠30只,体质量范围15~20 g,购自湖北省动物实验中心,自由摄食和饮水,光暗12 h交替,室温范围20~25℃,相对湿度范围50%~65%。将小鼠随机数字表法分为A组、B组和C组,每组10只;顺铂和西曲瑞克均购于法国拜耳医药公司。

1.2 实验方法

1.2.1 分组方法及给药 选取BALB/c雌性小鼠30只,饲养1周左右后随机分为A组、B组和C组,A组腹腔注射等量生理盐水(20 mg/kg),B组腹腔注射顺铂(20 mg/kg),C组腹腔注射顺铂(20 mg/kg)和GnRH拮抗剂-西曲瑞克(5 mg/kg),均于小鼠的2个性周期的第10天。每组研究进行了3次的重复试验,每组小鼠数目10只,

1.2.2 血清测定 所有小鼠眼球取血后,3 000 r/min离心取血清,放射免疫法检测血清促卵泡生成

素(FSH)、黄体生成素(LH)和雌二醇(E₂)水平。

1.2.3 卵巢组织观察 取小鼠适量卵巢组织涂片,HE染色:梯度酒精脱水、苏木素-伊红染色,晾干、树脂封片,高倍显微镜下观察组织结构情况^[5]。原始卵泡,一个卵母细胞被覆部分或单层梭形前颗粒细胞;初级卵泡,一个卵母细胞被覆单层柱状颗粒细胞,卵母细胞与颗粒细胞间形成透;成熟卵泡,一个卵母细胞被覆多层的柱状的颗粒细胞,出现卵泡腔卵泡体积显著增大,卵泡腔增大,出现明显的卵丘,卵泡向卵巢表面突出,卵母细胞周围出现放射冠。将每只小鼠双侧卵巢计数的各级卵泡数分别相加再乘10,即为小鼠各级卵泡的总数。

1.2.4 Western blot检测 取所有小鼠适量卵巢组织,总蛋白使用组织匀浆法提取;取50 μg总蛋白经SDS-PAGE裂解后转膜,牛血清蛋白(30 g/L)2 h封闭、分别加入兔抗鼠凋亡基因(Bax)及凋亡调控基因(Bcl-2)一抗,4℃孵育后加入辣根化的免疫球蛋白G(IgG)二抗,孵育后曝光显影^[6]。Western blot检测定量软件使用image J软件。

1.3 统计学方法 统计分析采用SPSS 19.0软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠卵巢湿重比较 各组小鼠卵巢湿重B组(8.95 ± 0.91)和C组(15.17 ± 0.88)卵巢湿重明显低于A组(18.04 ± 0.82) ($P < 0.05$);三组比较,差异有统计学意义($F = 284.745, P = 0.000$);各组两两比较,均差异有统计学意义($P < 0.05$)

2.2 各组小鼠各级卵泡数量比较 B组和C组原始卵泡、生长卵泡和成熟卵泡明显低于A组($P < 0.05$),其中C组原始卵泡、生长卵泡和成熟卵泡明显高于B组($P < 0.05$),见表1。

2.3 各组小鼠卵巢组织HE染色 与A组比较,B组生长卵泡及成熟卵泡明显减少,颗粒细胞排列紊乱,卵母细胞形态畸形,黄体细胞结构模糊,细胞核

表1 BALB/c 雌性小鼠30只各级卵泡数量比较/(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	原始卵泡	生长卵泡	成熟卵泡
A组	10	560.22±35.49	230.02±24.33	65.59±10.03
B组	10	230.02±40.10 ^①	67.92±19.22 ^①	21.11±6.92 ^①
C组	10	402.00±45.50 ^{①②}	110.03±21.28 ^{①②}	40.03±7.89 ^{①②}
F值		165.704	150.076	70.9348
P值		0.000	0.000	0.000

注:①与A组比较, $P<0.05$ 。②与B组比较, $P<0.05$ 。

固缩,而C组有所改善。见图1。

2.4 各组小鼠血清FSH、LH和 E_2 水平 B组和C组FSH和LH明显高于A组($P<0.05$),而 E_2 、抗苗勒管激素(AMH)和基础抑制数B(INHB)明显低于A组($P<0.05$),其中C组FSH和LH明显低于B组($P<0.05$),而 E_2 、AMH和INHB明显高于B组($P<0.05$)。见表2。

2.5 各组卵巢组织Bax、Bcl-2蛋白表达 B组和C组Bcl-2蛋白相对表达量明显低于A组($P<0.05$),而Bax蛋白相对表达量明显高于A组($P<0.05$),其中C组Bcl-2蛋白相对表达量明显低于B组($P<0.05$),而Bax蛋白相对表达量明显低于B组($P<0.05$)。见表3和图2。

3 讨论

化疗是抗肿瘤治疗常用方法之一,但文献提示化疗在抑制病情进展,延长病人生存时间的同时还可损伤卵母细胞和颗粒细胞的功能及结构,表现出月经不调、不孕、骨质疏松、盗汗、心血管及泌尿系统功能障碍症状,进而严重降低病人生活质量^[7-8]。因而,化疗过程中探寻保护卵巢功能、减少卵巢损害的方法具有一定必要性。

文献提示GnRH激动剂能够抑制女性性腺轴,降低化疗药损伤原始卵泡,进而保护卵巢^[9-10]。但是GnRH激动剂仅对垂体兴奋作用较为短暂,因而在化疗过程中保护卵巢功能的作用受到了一定限制。部分学者提出GnRH能够结合垂体GnRH受体,进而对卵巢功能进行快速抑制,并有相关研究已经证实,GnRH拮抗剂抑制垂体促性腺激素释放激素受体和促性腺激素的作用显著优于GnRH激动剂,但具体作用效果和机制尚不明确^[11-12]。

卵巢体质量尽管无法对卵巢功能进行直接、准确反映,但其与卵泡数量相关,卵巢体质量的下降预示着卵巢可能受到顺铂损伤,进而出现纤维化失重^[13-15]。本研究各组小鼠卵巢湿重比较结果显示B组和C组卵巢湿重明显低于A组,其中C组卵巢湿重明显高于B组。该结果说明GnRH拮抗剂能在降低顺铂对卵巢造成的纤维化损伤,进而保护卵巢。

研究发现卵泡对化疗药物具有较高敏感性,随着化疗时间推移,卵泡自然凋亡后卵泡的丢失数量升高,进而使女性出现卵巢早衰的症状^[16-18]。本研究各组小鼠各级卵泡数量结果显示B组和C组原始卵泡、生长卵泡和成熟卵泡明显低于A组,其中C组原始卵泡、生长卵泡和成熟卵泡明显高于B组;与A组比较,B组生长卵泡及成熟卵泡明显减少,颗粒细胞排列紊乱,卵母细胞形态畸形,黄体细胞结构模糊,细胞核固缩,而C组有所改善。该结果说明GnRH拮抗剂可降低顺铂对小鼠卵泡的损伤,其可能是通过抑制雌激素的分泌进而起到治疗作用。

FSH是由垂体前叶嗜碱性细胞分泌,即卵泡刺

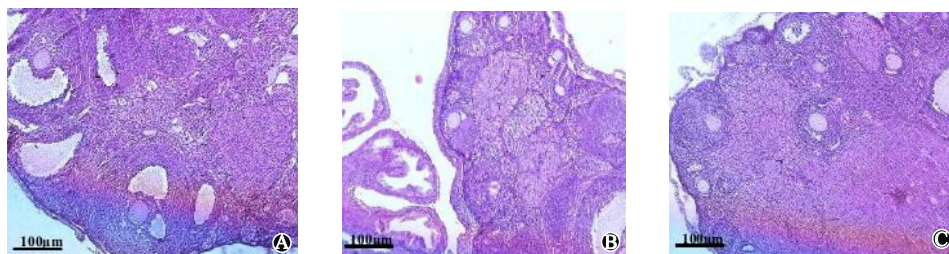


图1 各组卵巢组织染色图(HE×400):A为A组;B为B组;C为C组

表2 BALB/c 雌性小鼠30只血清FSH、LH和 E_2 水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	FSH/(IU/L)	LH/(IU/L)	E_2 /(ng/L)	AMH/(IU/L)	INHB/(mg/mL)
A组	10	0.53±0.12	2.96±0.34	24.38±2.10	6.02±1.10	17.82±3.11
B组	10	1.23±0.22 ^①	4.80±0.87 ^①	9.89±1.92 ^①	2.20±0.54 ^①	12.01±2.20 ^①
C组	10	0.96±0.20 ^{①②}	3.56±0.91 ^{①②}	18.89±1.14 ^{①②}	4.10±0.92 ^{①②}	15.51±2.90 ^{①②}
F值		36.372	15.533	170.871	46.612	11.199
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:FSH为促卵泡生成素,LH为黄体生成素, E_2 为雌二醇,AMH为抗苗勒管激素,INHB为基础抑制数B。

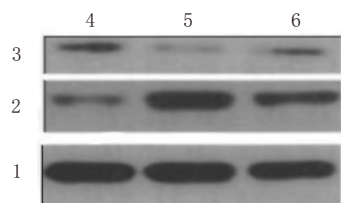
①与A组比较, $P<0.05$ 。②与B组比较, $P<0.05$ 。

表3 BALB/c雌性小鼠30只卵巢组织Bax、Bcl-2蛋白表达 $\bar{x} \pm s$

组别	只数	Bcl-2 蛋白相对表达	Bax 蛋白相对表达
A组	10	0.433±0.101	0.334±0.103
B组	10	0.133±0.076 ^①	0.982±0.117 ^①
C组	10	0.302±0.097 ^{①②}	0.682±0.125 ^{①②}
F值		26.732	79.028
P值		0.000	0.000

注: Bcl-2 为凋亡调控基因, Bax 为凋亡基因。

①与 A 组比较, $P < 0.05$ 。②与 B 组比较, $P < 0.05$ 。



注: 1— β -肌动蛋白, 2—Bcl-2 相关 X 蛋白, 3—B 淋巴细胞瘤-2 蛋白, 4—A 组, 5—B 组, 6—C 组

图2 各组卵巢组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达 (Western blot 检测图)

激素, 对人体的发育、生长以及生殖等生理过程均具有调控作用, 进而促进生殖细胞的成熟; LH 亦称促间质细胞激素, 对作用于卵泡, 而促进排卵并生成黄体; E_2 主要由黄体、卵巢滤泡及妊娠时胎盘生成^[19-20]。本研究激素水平结果显示 B 组和 C 组 FSH 和 LH 明显高于 A 组, 而 E_2 、AMH 和 INHB 明显低于 A 组, 其中 C 组 FSH 和 LH 明显低于 B 组, 而 E_2 、AMH 和 INHB 明显高于 B 组。上述结果说明 GnRH 拮抗剂能够抑制垂体-性腺轴相关功能并促进卵巢激素的分泌, 证实 GnRH 拮抗剂具有改善卵巢储备功能的作用。

Bax、Bcl-2 是常见凋亡蛋白, 能够预示细胞凋亡情况。本研究中 B 组和 C 组 Bcl-2 蛋白相对表达量明显低于 A 组, 而 Bax 蛋白相对表达量明显高于 A 组, 其中 C 组 Bcl-2 蛋白相对表达量明显低于 B 组, 而 Bax 蛋白相对表达量明显低于 B 组。该结果说明 GnRH 拮抗剂能够抑制化疗药物对卵巢正常细胞的凋亡作用, 进而保护小鼠卵巢, 最大限度降低顺铂对小鼠卵巢的损害。在效应方面, Bcl-2 为保护因素, Bax 过表达可拮抗前者的保护效应, 本研究发现 C 组 Bax 蛋白相对表达量低于 B 组, 说明 C 组的细胞凋亡具有更强的保护效应。

综上所述, GnRH 拮抗剂可降低顺铂对小鼠卵巢的损害, 保护小鼠卵巢储备功能。

参考文献

- [1] 门鸿芹, 田海清, 李霞, 等. 克罗米芬与 GnRH 拮抗剂在控制性超促排卵中抑制 LH 峰效果的比较[J]. 生殖与避孕, 2016, 36(1):38-41.
- [2] 杨硕, 李蓉. GnRH 拮抗剂在控制性促排卵中的方案和疗效

[J]. 实用妇产科杂志, 2016, 32(10):721-723.

- [3] 施晓磊, 周铁, 礼嵩, 等. GnRH 拮抗剂在前列腺癌内分泌治疗中的临床应用和发展前景[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(12):1506-1511.
- [4] 罗璐, 陈明晖, 贾梦希, 等. GnRH 拮抗剂方案在体外受精-胚胎移植周期中自发排卵风险的大样本量回顾性研究[J]. 中华妇产科杂志, 2016, 51(5):352-356.
- [5] 黄仲英, 郑莹, 马黔红, 等. 微刺激联合 GnRH 拮抗剂方案 IVF—ET 用于子宫内膜癌患者保守治疗后活产 1 例[J]. 实用妇产科杂志, 2017, 33(4):314-315.
- [6] 高晓红, 周莉娜, 吴煜, 等. GnRH 拮抗剂方案中 HCG 扳机时机对胚胎的影响[J]. 现代妇产科进展, 2017, 26(3):191-193.
- [7] MESSINA A, LANGLET F, CHACHLAKI K, et al. Corrigendum: a microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty[J]. Nat Neurosci, 2016, 19(8):1115.
- [8] 张俊娣, 韩艳, 李玉洁, 等. GnRH 拮抗剂对辅助生殖患者血清及卵泡液中 IGF-I、IGFBP-I 及雌孕激素水平的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(41):86-88.
- [9] WEEMS P W, WITTY C F, AMSTALDEN M, et al. Kappa opioid receptor is co-localized in GnRH and KNDy cells in the female ovine and rat brain. [J]. Endocrinology, 2016, 157(6):2367-2379.
- [10] 袁媛, 徐艳文. PCOS 患者中 GnRH 激动剂和拮抗剂方案的应用及疗效[J]. 实用妇产科杂志, 2016, 32(10):725-727.
- [11] LAMBALK C B, BANGA F R, HUIRNE J A, et al. GnRH antagonist versus long agonist protocols in IVF: a systematic review and meta-analysis accounting for patient type[J]. Human Reproduction Update, 2017, 23(5):560-579.
- [12] 郭萍萍, 陈薪, 刘玉东, 等. 促性腺激素释放激素激动剂联合人绒毛膜促性腺激素诱导卵泡成熟在拮抗剂方案中的疗效比较[J]. 广东医学, 2016, 37(9):1373-1375.
- [13] PENG B, ZHU H, KLAUSEN C, et al. GnRH regulates trophoblast invasion via RUNX2-mediated MMP2/9 expression[J]. Mol Hum Reprod, 2016, 22(2):119-129.
- [14] 孔爱英, 吴和, 李敬来, 等. 超滤法测定不同种属血浆中促性腺激素释放激素拮抗剂十肽化合物的蛋白结合率[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(7):588-591.
- [15] 张学红, 高明霞. GnRH 激动剂在控制性促排卵中的方案和疗效[J]. 实用妇产科杂志, 2016, 32(10):723-725.
- [16] 黄菊, 董梅, 黄莉, 等. GnRH 拮抗剂方案与激动剂方案在多囊卵巢综合征高反应患者的临床应用比较[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(18):2909-2913.
- [17] 孙振高, 王小明, 王天琪, 等. 自然流产患者的卵泡液代谢标志物研究[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(8):18-24.
- [18] 殷慧群, 汪存利, 朱杰, 等. 激动剂长方案与拮抗剂方案囊胚移植妊娠结局分析[J]. 重庆医学, 2020, 49(11):1786-1791.
- [19] 杨硕, 李蓉, 陈新娜, 等. GnRHa 联合低剂量 hCG 扳机在高反应多囊卵巢综合征患者体外受精中的应用[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2017, 37(12):958-962.
- [20] 贺春, 周均霞, 赵玲玲, 等. 基础卵泡刺激素/黄体生成素比值预测卵巢储备功能的价值[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(23):5489-5491.

(收稿日期:2019-12-10, 修回日期:2020-01-15)