

“青春作伴”论性腺疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003136

双氢睾酮联合高脂饮食诱导多囊卵巢综合征样伴糖脂代谢异常的小鼠模型

吴锦林¹, 张冰寒², 龙江川², 方容花², 陈 婕², 刘东方², 李 杨²

(1. 重庆市中医院内分泌科, 重庆 400021; 2. 重庆医科大学附属第二医院内分泌科, 重庆 400010)

【摘要】目的:联合双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)和高脂饮食建立一种多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)样伴糖脂代谢异常的小鼠模型。**方法:**将 16 只 3 周龄清洁级雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 2 组干预 6 周:实验组($n=8$)予皮下注射 DHT+高脂饮食干预,对照组($n=8$)予皮下注射有机溶剂+普通饮食干预。干预结束后比较 2 组小鼠动情周期、性激素水平、卵巢病理、体质量、血糖、血脂、皮下及内脏脂肪库等,判定模型成功与否。**结果:**干预完毕后,实验组血清 DHT 水平约为对照组的 3 倍($P=0.000$)。连续观察 14 d,实验组均无动情周期,而对照组均有规律动情周期。实验组动情间期明显长于对照组($P=0.001$),而动情前期($P=0.006$)和动情期($P=0.000$)的持续时间均短于对照组。光镜下,实验组小鼠卵巢呈多囊性改变,颗粒细胞层数减少,膜细胞增生、厚度增加,未见黄体,而小窦卵泡($P=0.043$)和大窦卵泡($P=0.000$)数量明显增多,小窦卵泡中不健康卵泡比例($P=0.011$)和大窦卵泡中不健康卵泡比例($P=0.001$)也明显升高。实验组空腹血糖水平($P=0.001$)、腹腔葡萄糖耐量实验($P=0.012$)和腹腔胰岛素耐量实验($P=0.007$)曲线下面积均明显大于对照组。实验组小鼠增加的体质量明显大于对照组($P=0.005$),其腹膜后($P=0.007$)、子宫旁($P=0.006$)和腹股沟($P=0.018$)脂肪库的质量,以及血清甘油三酯($P=0.009$)和总胆固醇($P=0.000$)均大于对照组。**结论:**联合 DHT 和高脂饮食可诱导小鼠卵巢多囊样改变及动情周期改变,伴发糖脂代谢异常,为 PCOS 发病机制的实验研究提供了一种较好的小鼠模型。

【关键词】多囊卵巢综合征;双氢睾酮;高脂饮食;动物模型**【中图分类号】**R588.6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2022-02-11

A mouse model of polycystic ovary syndrome with abnormal glucose and lipid metabolism induced by dihydrotestosterone combined with high-fat diet

Wu Jinlin¹, Zhang Binghan², Long Jiangchuan², Fang Ronghua², Chen Jie², Liu Dongfang², Li Yang²

(1. Department of Endocrinology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital;

2. Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS) with abnormal glucose and lipid metabolism by combining dihydrotestosterone (DHT) and high-fat diet. **Methods:** Sixteen 3-week-old clean grade female C57BL/6 mice were randomly divided into two groups for intervention for 6 weeks: the experimental group (8 mice) was treated with subcutaneous injection of DHT + high-fat diet, and the control group (8 mice) was treated with subcutaneous injection of organic solvent + ordinary diet. After the intervention, the estrous cycle, sex hormone level, ovarian pathology, body mass, blood glucose, blood lipid, subcutaneous and visceral fat depot of the two groups were compared to determine the success of the model. **Results:** After the intervention, the level of serum DHT in the experimental group was about 3 times higher than that in the control group ($P=0.000$). After continuous observation for 14 days, the experimental group had no estrous cycle, while the control group had regular estrous cycle. The time of diestrus in the experimental group was significantly longer than that in the control group ($P=0.001$), while the duration of proestrus ($P=0.006$) and estrus ($P=0.000$) was shorter than that in the control group. Under light microscope, the ovaries in the experimental group showed polycystic changes, the layers of granulosa cells decreased, the proliferation and thickness of theca cells increased, no corpus luteum

was found, the number of small antral follicles ($P=0.043$) and large antral follicles ($P=0.000$) increased significantly, and the proportion of unhealthy follicles in small antral follicles ($P=0.011$) and large antral follicles ($P=0.001$) also increased significantly. The fasting blood glucose level ($P=0.001$), area under the curve of IPGTT ($P=0.012$) and IPITT ($P=0.007$) in the experimental group were significantly larger than those in the control group. The weight increase of mice in the experimental group was significantly higher than that in

作者介绍: 吴锦林, Email: wujinlin1987@163.com,

研究方向: 胰岛素抵抗、衰老与代谢性疾病。

通信作者: 李 杨, Email: 305990@hospital.cqmu.edu.cn。

基金项目: 重庆市科研机构绩效激励引导专项资助项目(编号: cstc2019jxjl130028); 重庆市科卫联合医学科研资助项目(编号: 2022MSXM158)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20221114.1120.038.html>
(2022-11-15)

the control group ($P=0.005$), and the mass of retroperitoneal ($P=0.007$), parametral ($P=0.006$) and inguinal ($P=0.018$) fat depot, serum triglyceride ($P=0.009$) and total cholesterol ($P=0.000$) were higher than those in the control group. **Conclusion:** The combination of DHT and high-fat diet can induce polycystic ovarian changes, estrous cycle changes and abnormal glucose and lipid metabolism in mice, which provides a mouse model for the experimental study of the pathogenesis of PCOS.

【Key words】polycystic ovary syndrome; dihydrotestosterone; high-fat diet; animal model

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是育龄期女性主要的生殖障碍性疾病, 以高雄激素症状、月经紊乱及多囊卵巢为主要特点, 其临床表型和生化特点异质性较大, 发病机制目前仍未完全阐明, 可能与遗传、母体激素和代谢紊乱环境、表观遗传和环境影响等因素相关。动物模型有助于帮助学者研究其病因和病理生理学机制, 了解其发生起源, 以及对其发病进行预测和预防, 但目前因缺乏容易获得的实验诱导的涵盖 PCOS 多种复杂表型的动物模型, 很大程度上阻碍了 PCOS 的基础研究及临床治疗进展^[1]。此外, PCOS 患者存在 β 细胞功能受损及胰岛素敏感性下降, 发生 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)、高脂血症、代谢综合征及心血管疾病风险也会增高, 这大大增加了 PCOS 临床管理的复杂性^[2]。随着体质指数 (body mass index, BMI) 的增加, PCOS 的患病率可从正常 BMI 的 5% 增加到肥胖 BMI 的 15%, 同时会增加 PCOS 表型的严重程度, 还能独立于高雄激素影响 PCOS 女性的生殖功能^[3]。考虑到 30%~50% 的 PCOS 患者体型正常, 故体质量正常和肥胖 PCOS 相关的发病机制可能有不同的分子基础。肥胖和糖代谢异常、脂代谢异常有密切关系, 因此, 建立反映一系列代谢表型的 PCOS 样模型至关重要。

然而, 目前尚无成熟的 PCOS 样伴糖脂代谢异常的模式。新发表的国际 PCOS 评估和管理指南推荐以下 3 项满足 2 项, 同时排除其他内分泌相关疾病即可诊断 PCOS^[4]: 稀发排卵或无排卵; 高雄激素临床表现和 (或) 高雄激素血症; 超声检查卵巢多囊样改变。因没有特定某些物种 PCOS 的诊断标准, PCOS 动物模型并没有金标准, 学者们往往力求复制出 2 个或更多类似于 PCOS 的临床诊断标准的特征组合, 称为 PCOS 样模型。啮齿类动物是一种经济、易于操作、生殖周期短的通用工具, 已有多种 PCOS 大鼠及小鼠模型研究^[2], 包括雄激素、雌激素、芳香化酶抑制剂、光暴露改变和遗传操作等干预方法^[1]。高雄激素血症是 PCOS 最一致的特征, 因此最直接的造模方式就是使用雄激素来建立模型, 包括睾酮、丙酸睾酮、脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone,

DHEA)、双氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT) 和来曲唑。因为雄激素、丙酸睾酮均可在体内转化为雌二醇, 故难以界定 PCOS 病理生理中雄激素介导的机制到底是通过雄激素受体还是雌激素受体而发挥作用, 此法已很少使用。PCOS 女性血清的 DHEA 水平明显升高, 虽然有报道 DHEA 的青春期末鼠短期 (20 d) 干预可诱导 PCOS 无周期和无排卵的生殖特征, 但卵巢主要是大囊状卵泡为主, 与 PCOS 女性的窦前卵泡和小窦卵泡增多不符^[2], 且 DHEA 青春期末鼠长期干预 (90 d) 根本没有任何卵巢、生殖内分泌及糖脂代谢紊乱的改变, 说明 DHEA 对生殖影响可能是短期的^[5]。来曲唑是一种芳香化酶抑制剂, 可以阻止雄激素向雌激素的转化, 从而提高循环和卵巢雄激素水平。用来曲唑干预青春期末鼠^[5]或大鼠^[6], 虽可见多囊样卵巢改变, 但不能诱导腹型肥胖、胰岛素抵抗及血脂等改变。代谢方面的表型不明显, 说明来曲唑诱导的 PCOS 样模型在研究代谢机制方面存在局限性。DHT 为雄激素的非芳香化产物, 不能转换为雌激素, 对雄激素受体亲和力高, 在体内的生物活性明显强于睾酮。已有多项研究提示 DHT 干预能很好地复制 PCOS 的生殖表型^[1-2], 在学术界认可度较高, 但同以上使用其他雄激素方法一样, 单独使用 DHT 并不能完全体现代谢方面的特征。虽然有学者试图联合 DHEA 和高脂饮食诱导 PCOS 伴异常的代谢表型^[7-8], 但考虑到 DHEA 以上的不足, 本研究采取 DHT 和高脂饮食同时干预 C57BL/6 小鼠的方式, 旨在建立一种具备以上诊断标准的生殖表型, 同时伴有糖脂代谢异常的 PCOS 样小鼠模型, 为 PCOS 的发病机制及药物筛选等研究提供一种可操作性的实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 16 只 3 周龄清洁级雌性 C57BL/6 小鼠购于重庆医科大学动物实验中心, 体质量 8.4~10.5 g, 饲养温度 20~24℃, 环境湿度 40%~60%, 每日光照及黑暗时间各 12 h, 自由进食水。本研究符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.1.2 实验主要试剂及器材 5 α -DHT 粉剂购于中国索莱宝公司;高脂饲料(60%由脂肪供能)和标准饲料(10%由脂肪供能)购于美国 Research Diets 公司;甲苯胺蓝染色液购于中国索莱宝公司;诺和灵 R 购于丹麦诺和诺德公司;血糖仪购于美国强生公司(OneTouch Ultra);甘油三酯(triglyceride, TG)测试盒和总胆固醇(total cholesterol, TC)测试盒均购于中国伊莱瑞特生物科技股份有限公司;血清总睾酮(total testosterone, T)试剂盒购于美国 Cayman 公司;DHT 试剂盒购于美国 Biovision 公司;黄体生成素(luteinizing hormone, LH)试剂盒购于英国 Abbexa 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及干预 将 DHT 粉剂用 DMSO 溶解为 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,再用玉米油稀释为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,充分震荡直至充分溶解以供当日使用。小鼠适应性喂养 3 d 后被随机分为 2 组并分别干预 6 周:实验组($n=8$)每日予以腹部皮下注射 DHT 50 μg +高脂饲料干预,对照组($n=8$)每日予以皮下注射同等剂量有机溶剂+标准饲料干预。

1.2.2 体质量测定 每周测量小鼠体质量并记录数值,监测小鼠体质量变化。测量体质量前晚至当日清晨至少禁食 12 h。

1.2.3 动情周期监测 喂养第 5~6 周对每只小鼠进行阴道涂片检查,观察动情周期变化。用沾有生理盐水的棉球擦小鼠外阴去除粪便等杂物,然后用移液器吸取生理盐水约 15 μL ,移液器枪头置于小鼠阴道内反复抽吸 3~5 次,见白色分泌浑浊物吸出后将其平涂至载玻片上风干,甲苯胺蓝染色后显微镜下观察细胞形态。每日上午 10 点涂片,连续 14 d。判读标准:动情前期:涂片全是有核上皮细胞,偶有少量角化细胞;动情期:全是无核角化细胞或间有少量上皮细胞;动情后期:角化细胞、有核上皮细胞、白细胞同时存在;动情间期:白细胞为主。统计各小鼠完成动情周期次数,并计算动情周期各个时期所占时间比例。

1.2.4 糖代谢测定 每周用葡萄糖氧化酶法测定实验小鼠空腹血糖水平(禁食 8 h)。喂养第 6 周对每只小鼠分别进行腹腔葡萄糖耐量实验(intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)和腹腔胰岛素耐量实验(intraperitoneal insulintolerance test, IPITT)。实验小鼠饥饿 6 h 后,尾静脉针刺取血测量基础血糖水平(0 min),再通过腹腔注射 2 g/kg 体质量的葡萄糖(配成 20% 葡萄糖溶液)或 0.5 IU/kg 体质量的胰岛素^[9]后,测取 30 min、60 min 及 120 min 的血糖水平。IPGTT 及 IPITT 各时间点的血糖值均取 0 min 时的百分数计算。

1.2.5 卵巢组织学检查 小鼠喂养第 6 周末用乙醚麻醉处死后解剖、分离并称重双侧卵巢,然后用生理盐水冲洗后置于 4% 多聚甲醛中充分固定,常规脱水、石蜡包埋。将卵巢在最大纵切面附近以 5 μm 厚度连续切 10 个切面放在一个玻片上进行 HE 染色。在光镜下观察卵泡的病理学改变,计数黄体、原始卵泡、小窦前卵泡、大窦前卵泡、小窦卵泡、大窦卵泡的数量,并计算窦前卵泡和窦状卵泡各自的不健康卵泡比例,最后用 Image J 软件计算 2 组小鼠大窦卵泡的颗粒细胞和膜细胞在卵母细胞核层面的面积占比。各阶段发育卵泡的分类依据^[5,10-11]:①原始卵泡(primitive follicle),单层扁

平颗粒细胞包围卵母细胞;②初级卵泡(primary follicle),单层立方颗粒细胞包围卵母细胞;③小窦前卵泡(small preantral),1.5~2 层立方颗粒细胞包围卵母细胞;④大窦前卵泡(large preantral),由 2~5 层立方颗粒细胞包围卵母细胞;⑤小窦卵泡(small antral),5 层以上立方颗粒细胞包围卵母细胞,和(或)1~2 个小面积的卵泡腔;⑥大窦卵泡(large antral),单个大的窦腔形成;⑦排卵前卵泡(preovulatory),单个大的卵泡腔,壁颗粒细胞形成的茎状结构相连有卵丘细胞包围的卵母细胞(卵母细胞逐渐脱离颗粒细胞层)。健康卵泡定义为:卵泡含有完整的卵母细胞,颗粒细胞有组织分布且固缩比例极少(<10%)。不健康卵泡(闭锁卵泡)定义为:不同发育阶段的卵泡含有退化的卵母细胞,颗粒细胞层分布散乱和(或)固缩比例较大($\geq 10\%$)^[12]。闭锁囊样卵泡(Cyst)为卵巢内充满囊液的大囊泡,表现为颗粒细胞层变薄,膜细胞层分散,卵母细胞与颗粒细胞缺乏连接^[5]。为方便统计,本研究将②和③统称为小窦前卵泡(small preantral),⑥和⑦统称为大窦卵泡(large antral),闭锁囊样卵泡归类于不健康的大窦卵泡中。

1.2.6 性激素、血脂及脂肪质量测定 小鼠处死前摘眼球取血离心后留血清 EP 管分装,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。血清 T、DHT 和 LH 均采用 ELISA 法测定。血清 TG 采用单试剂 GPO-PAP 比色法测定,血清 TC 采用单试剂 COD-PAP 比色法测定。处死后立即分离双侧腹股沟脂肪库、子宫旁脂肪库、腹膜后脂肪库并称重。腹股沟脂肪库位于后肢上段前方,代表小鼠的皮下脂肪组织。子宫旁脂肪库位于子宫水平;腹膜后脂肪库位于背部背壁,包裹在一层薄膜中。后二者可用来表示小鼠的内脏脂肪组织^[13]。

1.3 统计学处理

所有数据经 SPSS 22.0 进行统计分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用例(百分比)表示。计量资料的正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验法。正态分布使用独立样本 t 检验进行比较;非正态分布采用 Wilcoxon 秩和检验进行比较。计数资料采用 Fisher 确切概率法比较。采用两因素重复测量方差分析空腹血糖、IPGTT 及 IPITT 的血糖变化情况。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 2 组小鼠一般情况及性激素水平变化

2 组小鼠均发育良好,体毛润泽,反应灵活,行为无明显差异。体征方面,实验组小鼠阴蒂明显增大(图 1A)。实验组血清 DHT 水平较对照组升高,约为对照组的 3 倍[(46.549 \pm 16.398) pg/mL vs. (16.089 \pm 6.896) pg/mL, $t=4.843$, $P=0.000$](图 1B);2 组间血清 T[(51.520 \pm 14.314) pg/mL vs. (58.458 \pm 11.376) pg/mL, $t=-1.073$, $P=0.301$](图 1C)和 LH[(101.295 \pm 14.700) pg/mL vs. (108.155 \pm 15.270) pg/mL, $t=-0.915$, $P=0.375$](图 1D)水平差异无统计学意义。

2.2 2 组动情周期变化

阴道涂片 14 d 判断动情周期。对照组所有小鼠均有规律动情周期(图 2F 为典型周期),而光镜下实验组主要以白细胞为主,提示该组小鼠主要处于动情间期,均无动情周期

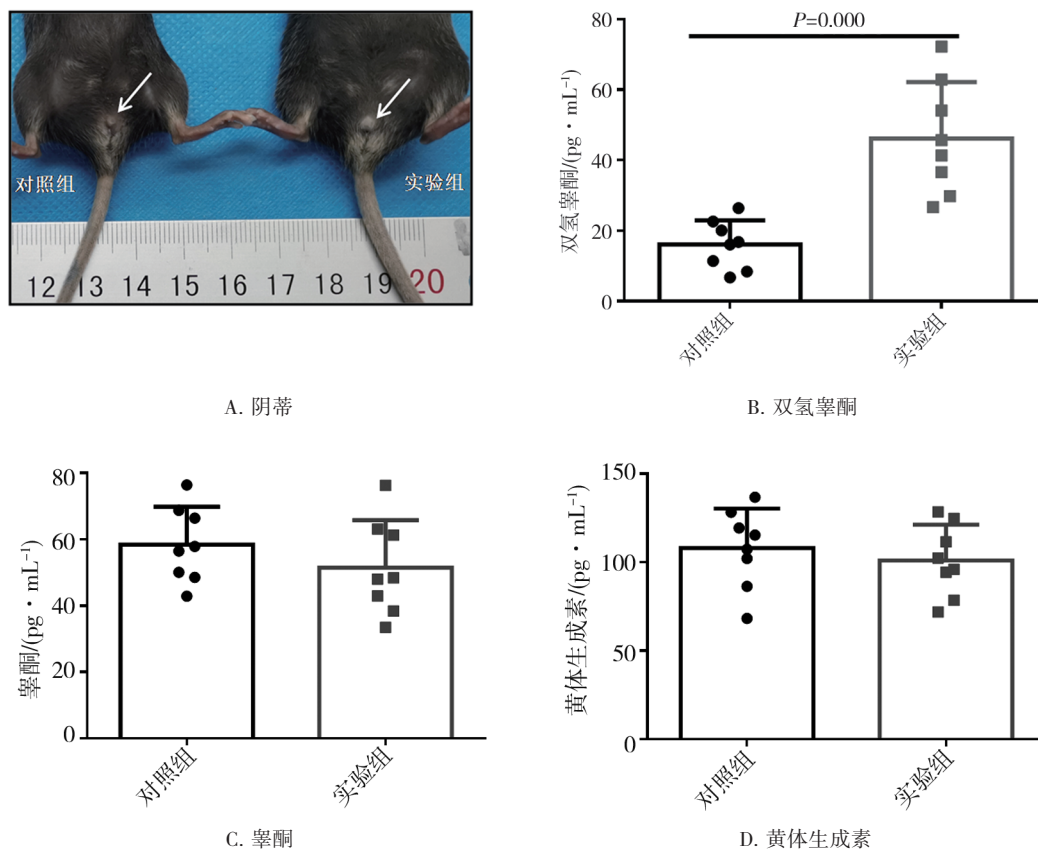


图1 阴蒂及性激素水平

(图2G为典型周期)。其中,对照组完成1个周期(100% vs. 0%, $P=0.000$)和2个周期(75% vs. 0%, $P=0.007$)的小鼠比例均高于实验组(图2A、B),而2组完成3个周期(12.5% vs. 0%)的小鼠比例无统计学意义($P=0.467$)(图2C)。14 d对照组的平均周期数[(1.875 ± 0.690) d]明显高于实验组[(0.000 ± 0.000) d] ($Z=-3.556$, $P=0.000$)(图2D)。进一步分析2组小鼠动情周期中4个阶段所占时间发现,实验组动情前期[(1.125 ± 0.991) d vs. (3.563 ± 1.590) d, $Z=-2.732$, $P=0.006$]和动情期[(0.000 ± 0.000) d vs. (3.938 ± 1.761) d, $Z=-3.596$, $P=0.000$]持续时间均短于对照组,而动情间期明显长于对照组,是对照组的4.2倍[(9.750 ± 1.282) d vs. (2.313 ± 0.799) d, $Z=-3.388$, $P=0.001$](图2E)。

2.3 2组卵巢质量和卵巢组织形态学变化

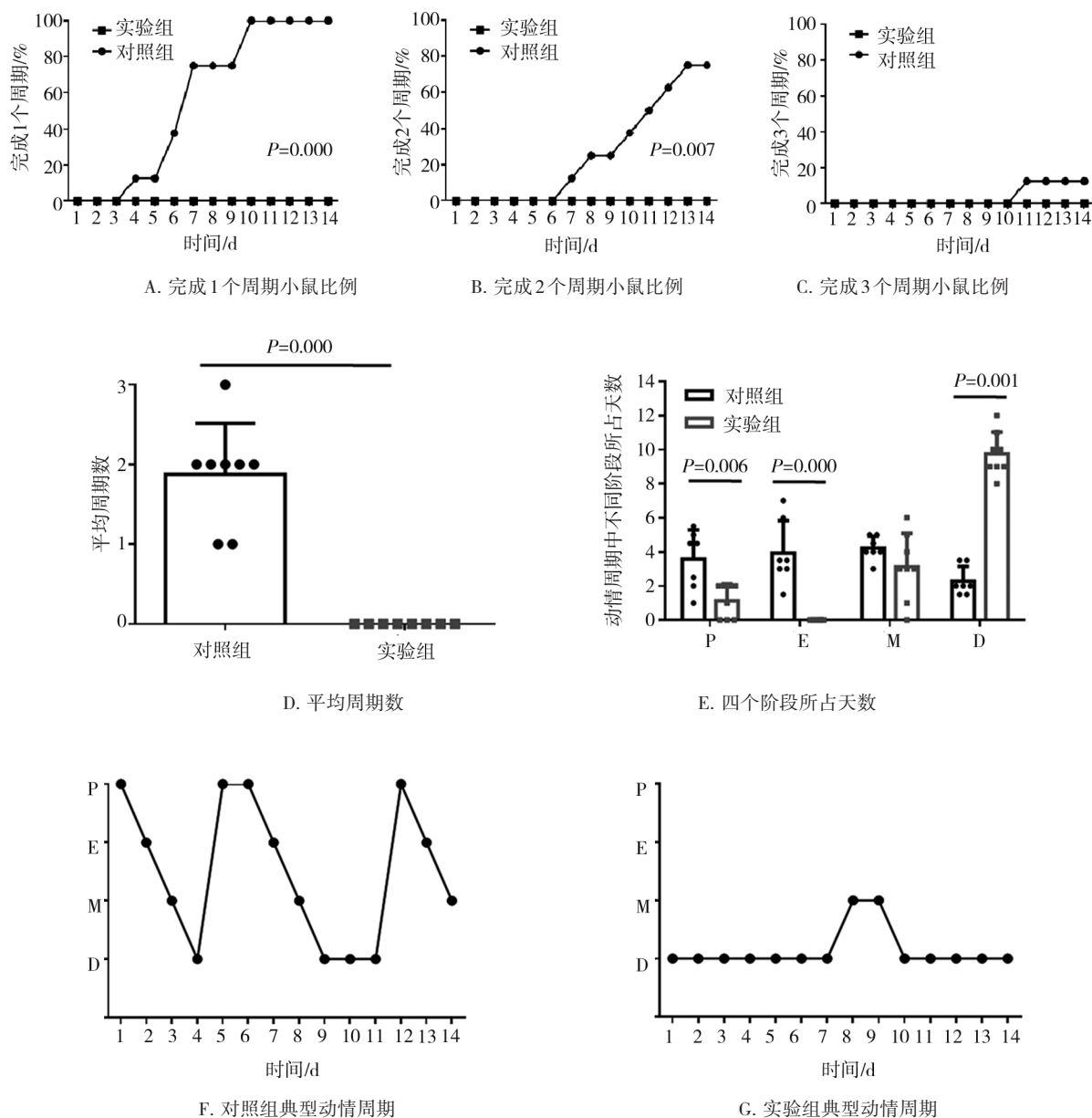
对照组小鼠卵巢表面颜色红润,而实验组卵巢表面苍白,隐约可见大小不等囊状卵泡形成。以矫正体质量后的卵巢质量[(卵巢质量)mg/(体质量)g]更能客观反映卵巢质量大小。本研究中,实验组[(0.199 ± 0.045) mg/g]卵巢质量小于对照组[(0.268 ± 0.048) mg/g],差异有统计学意义($t=-2.954$, $P=0.010$)(图3A)。光镜下,实验组小鼠卵巢呈囊性改变,颗粒细胞层数减少,颗粒细胞固缩、退化,排列疏松,膜细胞增生、分散、厚度增加,与周围间质细胞分界不明(图3F)。与对照组相比,实验组小鼠未见黄体(0.000 ± 0.000 vs. 2.500 ±

0.926, $Z=-3.614$, $P=0.000$)(图3B),而小窦卵泡(8.625 ± 1.685 vs. 6.875 ± 1.458 , $t=2.222$, $P=0.043$)和大窦卵泡(4.625 ± 1.188 vs. 2.125 ± 0.835 , $t=4.871$, $P=0.000$)数量明显升高(图3C)。同样的,小窦卵泡中不健康卵泡比例[(25.889 ± 8.890)% vs. (12.669 ± 5.830)%, $Z=-2.537$, $P=0.011$]和大窦卵泡中不健康卵泡比例[(62.083 ± 5.893)% vs. (12.500 ± 17.252)%, $Z=-3.459$, $P=0.001$]也明显升高(图3D)。实验组小鼠大窦卵泡的颗粒细胞面积占比较对照组少[(49.479 ± 11.973)% vs. (70.063 ± 9.309)%, $t=-5.758$, $P=0.000$],而膜细胞面积占比较对照组多[(22.253 ± 5.166)% vs. (17.429 ± 3.017)%, $t=3.386$, $P=0.002$](图3E、F)。

2.4 2组体质量及糖脂代谢变化

干预结束后实验组小鼠增加的体质量明显大于对照组[(10.063 ± 2.225) g vs. (6.713 ± 1.796) g, $t=3.314$, $P=0.005$](图4A)。实验组矫正体质量后的腹膜后[(6.775 ± 1.501) mg/g vs. (4.732 ± 1.029) mg/g, $t=3.175$, $P=0.007$]、子宫旁[(17.691 ± 2.945) mg/g vs. (13.336 ± 2.339) mg/g, $t=3.275$, $P=0.006$]及腹股沟[(20.519 ± 2.648) mg/g vs. (15.748 ± 4.291) mg/g, $t=2.676$, $P=0.018$]脂肪库的质量均大于对照组(图4B)。同样的,血清TG[(0.879 ± 0.233) mmol/L vs. (0.588 ± 0.052) mmol/L, $t=3.436$, $P=0.009$]和TC[(3.013 ± 0.422) mmol/L vs. (1.655 ± 0.232) mmol/L, $t=7.980$, $P=0.000$])也明显升高(图4C、D)。

实验组[(2.06 ± 0.14) mmol/L]和对照组[(2.04 ±



注:P指动情前期;E指动情期;M指动情后期;D指动情间期

图2 14 d动情周期情况

0.18) mmol/L]基线空腹血糖差异无统计学意义($F=0.104$, $P=0.756$) (图5A)。从6周龄到9周龄,实验组的空腹血糖均高于对照组[分别为第6周:(4.350 ± 1.338) mmol/L vs. (3.150 ± 0.355) mmol/L, $F=7.565$, $P=0.028$;第7周:(5.275 ± 0.947) mmol/L vs. (3.450 ± 0.504) mmol/L, $F=24.952$, $P=0.002$;第8周:(5.225 ± 1.095) mmol/L vs. (3.413 ± 0.318) mmol/L, $F=17.985$, $P=0.004$;第9周:(5.338 ± 0.515) mmol/L vs. (3.725 ± 0.450) mmol/L, $F=28.727$, $P=0.001$] (图5A)。同样的,干预结束后IPGTT提示,实验组60 min[(210.852 ± 58.887)% vs. (126.199 ± 21.439)%, $F=15.858$, $P=0.005$]和120 min[(132.531 ± 25.997)% vs. (101.222 ± 21.171)%, $F=8.472$, $P=0.023$]的血糖

值明显高于对照组(图5B),其曲线下面积明显增大($24\,044.471 \pm 5\,216.302$ vs. $17\,921.021 \pm 1\,579.386$, $t=3.178$, $P=0.012$),表明实验组糖耐量下降(图5C)。而在整个IPITT过程中,实验组的血糖值较对照组高4.970% (95%CI=1.543%~8.397%, $F=11.759$, $P=0.011$) (图5D),其曲线下面积亦增大($6\,316.115 \pm 365.952$ vs. $5\,557.661 \pm 574.619$, $t=3.149$, $P=0.007$) (图5E),表明实验组胰岛素敏感性下降。

3 讨论

近期有研究表明,DHT的持续暴露是PCOS的一种可复制的啮齿类模型干预方式,能有效模拟

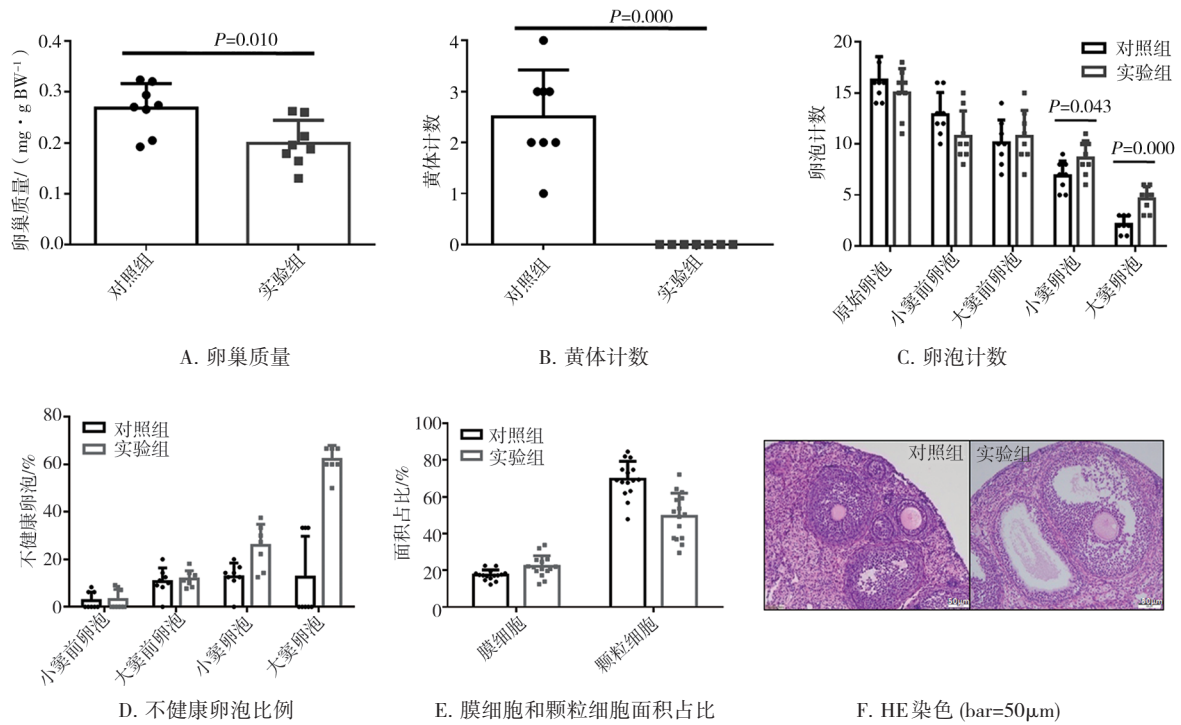


图3 卵巢质量和卵巢组织形态学

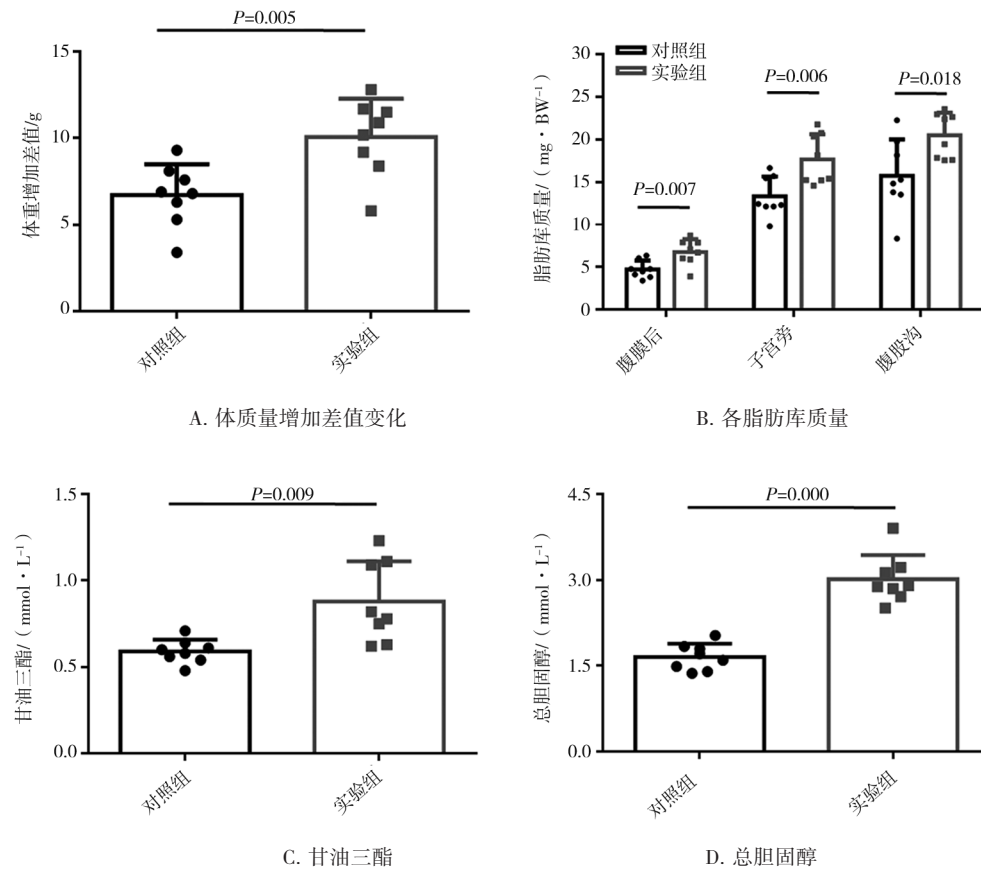
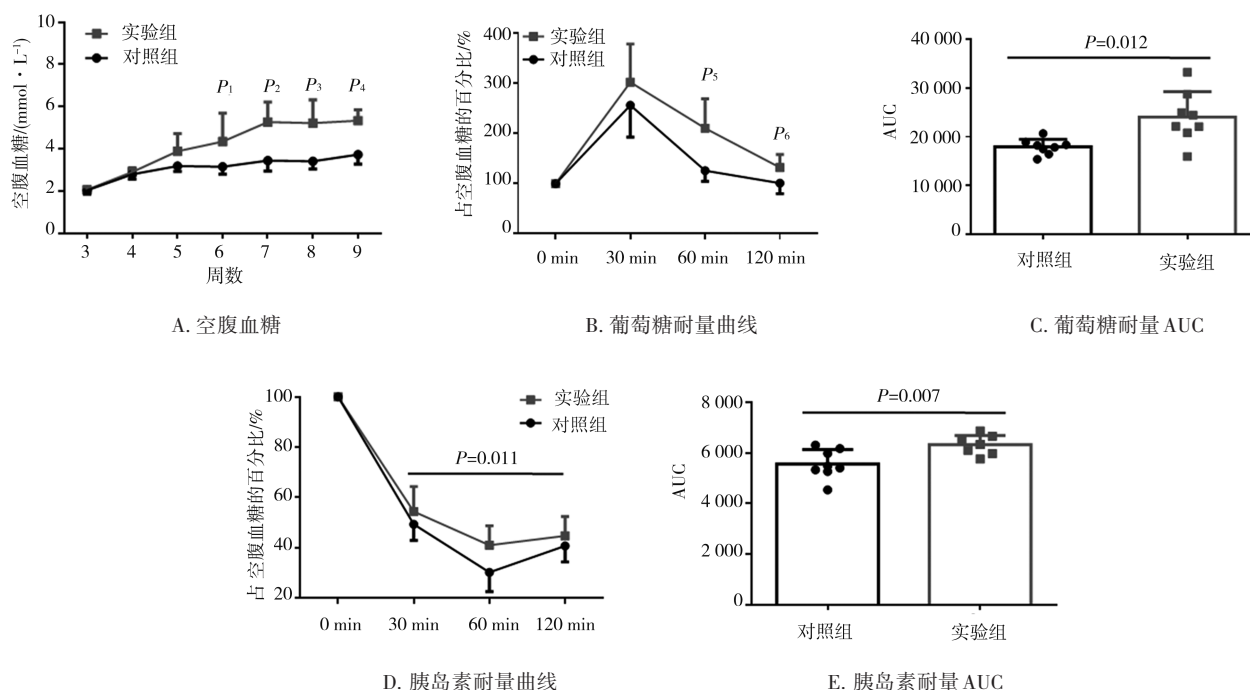


图4 体质量、脂肪质量及血脂



注:与对照组同时时间点相比, $P_1=0.028$, $P_2=0.002$, $P_3=0.004$, $P_4=0.001$, $P_5=0.005$, $P_6=0.023$

图5 糖代谢

PCOS 患者的许多生殖特征,如不规律的动情周期、黄体数量减少、闭锁卵泡数量增加、小窦卵泡数量增加、卵巢多囊样改变等,以及体质量增加^[5-6,9,14-15]。但是,该方法能否引起明显的糖脂代谢异常改变,因评估方法及 DHT 剂量不同,不同实验结果有所差异。Mannerås L 等^[6]将 DHT 的持续缓释剂(7.5 mg DHT)植入青春期(19 d)雌性 Wistar 大鼠皮下 90 d,用正糖高胰岛素钳夹实验评估胰岛素抵抗程度,发现 DHT 处理大鼠胰岛素敏感性下降。而 van Houten ELAF 等^[15]将 DHT 的持续缓释剂(2.5 mg DHT)植入青春期(19 d)雌性 C57BL/6 小鼠皮下 90 d, DHT 的血清浓度较安慰剂组升高 6 倍,同时闭锁小窦和大窦卵泡的数量增加 2~4 倍,颗粒细胞层分散,膜细胞层增厚,可见增生性间质细胞。虽然 IPGTT 后各点血糖均明显升高,提示糖耐量下降,但 2 组小鼠的空腹血糖及胰岛素无明显变化,并未对胰岛素敏感性影响进一步阐明。Caldwell ASL 团队^[5,14]将含有 DHT 的硅胶植入物(10 mg DHT)植入青春期(21~23 d)雌性小鼠皮下 90 d, DHT 的血清浓度较安慰剂组升高 8 倍左右,同时表现为动情周期消失、典型的多囊卵巢、闭锁囊样卵泡、厚度变薄的退化颗粒细胞层和增厚的膜细胞层,但是 2 组空腹血糖无明显差别,且 IPITT 提示胰岛素敏感性无明显变化。另外, DHT 干预啮齿动物的性腺、腹膜后和腹股沟脂肪库的脂肪细胞直径及质量均明显增大^[5-6,15],但貌似对血清 TG^[5,9]及 TC^[6]并无明显影响。

本实验在前人基础上,使用皮下注射 DHT 联合高脂饮食的方式诱导 PCOS 样小鼠,旨在使模型复制的生殖表型和代谢表型更加明显。目前尚无类似研究报道。有研究报道,单独用高脂高糖饮食喂养 23 周龄 SD 大鼠 90 d,发现实验组大鼠空腹血糖、空腹胰岛素、HOMA-IR 均明显升高,而血清雄激素水平无明显改变,卵巢的病理改变以大囊泡增多为主要表现,并不是典型的多囊样改变^[16]。但是,高脂饮食本身可以加重啮齿类 PCOS 模型的糖脂代谢异常^[17-8,17]。同样的,非人灵长类动物在青春期时予以雄激素干预不会导致代谢功能障碍和体质量增加,而联用高脂饮食后可造成代谢相关改变^[18-19]。本研究表明,实验组小鼠表现出阴蒂明显变大、动情周期消失、无排卵、小窦卵泡和大窦卵泡增加、颗粒细胞面积减少、膜细胞面积增大的生殖特征;同时表现出空腹血糖升高、糖耐量减低、胰岛素敏感下降、体质量增加、内脏脂肪和皮下脂肪质量增加、TG 和 TC 升高的糖脂代谢异常特征。实验组黄体消失、小窦卵泡和大窦卵泡不健康比例增多,说明这些卵泡在排卵前均已出现成熟障碍,不能排卵形成黄体;但与 PCOS 患者相反,这些实验小鼠的卵巢质量减少、表面苍白,可能与无黄体、囊状卵泡增多和卵巢血管灌注减少^[16,18]有关。

PCOS 女性 DHT 水平增高,为正常女性的 2~3 倍^[20-21]。因 DHT 缓释剂型暂不能进口,故本研究以皮下注射方式代替,亦未见类似报道。虽然在理论

上给予 50 $\mu\text{g/d}$ 的 DHT 皮下注射剂量较之前 25 $\mu\text{g/d}$ 的 DHT 皮下缓释剂量^[15]大 1 倍,但最终实验组小鼠 DHT 水平仅约为对照组的 3 倍,反而更接近 PCOS 患者的真实情况,这可能与不同的给药方式导致药物利用率不同有关^[5,14-15]。另外,较 3 个月的 DHT 缓释剂干预相比,本研究联合高脂饮食共诱导了 6 周,不但从时间上明显缩短了干预周期,而且糖脂代谢异常也较 DHT 单药诱导的 PCOS 样模型更加明显^[5-6,9,14-15,17]。

PCOS 患者中,大于 75% 的女性 LH 明显升高,可能是由于促性腺激素释放激素(gonadotrophin releasing hormone, GnRH)神经元活动和分泌增加,导致 LH 脉冲频率增加^[2,22]。本研究实验组 T 和 LH 水平并无明显升高,和既往研究一致^[5,9,14-15,17]。T 水平无变化可能与 DHT 代谢物的负反馈有关^[23]。虽然小鼠青春期暴露于 DHT 会导致 LH、GnRH 受体基因在垂体表达增加^[9],但循环中的 LH 和 LH/FSH 比值没有改变,这表明在这个模型中 GnRH 信号并没有增加^[5,9,15],可能与本研究中高水平的 DHT 暴露可激活下丘脑雄激素受体^[24]从而抑制 GnRH 神经元兴奋性有关。事实上,PCOS 女性的性腺类固醇激素负反馈敏感性受损也可能提高 GnRH 神经元的兴奋性^[2]。故如想探索神经内分泌在 PCOS 中的作用,可在本 PCOS 样模型基础上联合基因操作等方式来实现^[2,9,14]。

综上所述,本研究联合 DHT 皮下注射和高脂饮食成功诱导出了小鼠卵巢多囊样改变及动情周期改变,伴随糖耐量及胰岛素敏感性下降,血脂谱及体脂肪质量亦明显升高,造模时间较短,为 PCOS 发病机制的实验研究提供了一种较好的小鼠模型。

参 考 文 献

- [1] Divyashree S, Janhavi P, Ravindra PV, et al. Experimental models of polycystic ovary syndrome: an update[J]. Life Sci, 2019, 237: 116911.
- [2] Stener-Victorin E, Padmanabhan V, Walters KA, et al. Animal models to understand the etiology and pathophysiology of polycystic ovary syndrome[J]. Endocr Rev, 2020, 41(4): bnaa010.
- [3] Rosenfield RL, Ehrmann DA. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS): the hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited[J]. Endocr Rev, 2016, 37(5): 467-520.
- [4] Teede HJ, Misso ML, Costello MF, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril, 2018, 110(3): 364-379.
- [5] Caldwell ASL, Middleton LJ, Jimenez M, et al. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models[J]. Endocrinology, 2014, 155(8): 3146-3159.
- [6] Mannerås L, Cajander S, Holmång A, et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome[J]. Endocrinology, 2007, 148(8): 3781-3791.
- [7] Lai H, Jia X, Yu QX, et al. High-fat diet induces significant metabolic disorders in a mouse model of polycystic ovary syndrome[J]. Biol Reprod, 2014, 91(5): 127.
- [8] Zhang HL, Yi M, Zhang Y, et al. High-fat diets exaggerate endocrine and metabolic phenotypes in a rat model of DHEA-induced PCOS[J]. Reproduction, 2016, 151(4): 431-441.
- [9] Benrick A, Chancón B, Micallef P, et al. Adiponectin protects against development of metabolic disturbances in a PCOS mouse model[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(34): E7187-E7196.
- [10] Walters KA, Allan CM, Jimenez M, et al. Female mice haploinsufficient for an inactivated androgen receptor (AR) exhibit age-dependent defects that resemble the AR null phenotype of dysfunctional late follicle development, ovulation, and fertility[J]. Endocrinology, 2007, 148(8): 3674-3684.
- [11] Myers M, Britt KL, Wreford NGM, et al. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary[J]. Reproduction, 2004, 127(5): 569-580.
- [12] Tomic D, Miller KP, Kenny HA, et al. Ovarian follicle development requires Smad3[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(9): 2224-2240.
- [13] Waldén TB, Hansen IR, Timmons JA, et al. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, white, and beige adipose tissues[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 302(1): E19-E31.
- [14] Caldwell ASL, Edwards MC, Desai R, et al. Neuroendocrine androgen action is a key extraovarian mediator in the development of polycystic ovary syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(16): E3334-E3343.
- [15] van Houten ELAF, Kramer P, McLuskey A, et al. Reproductive and metabolic phenotype of a mouse model of PCOS[J]. Endocrinology, 2012, 153(6): 2861-2869.
- [16] Roberts JS, Perets RA, Sarfert KS, et al. High-fat high-sugar diet induces polycystic ovary syndrome in a rodent model[J]. Biol Reprod, 2017, 96(3): 551-562.
- [17] Zheng YH, Yu JW, Liang CJ, et al. Characterization on gut microbiome of PCOS rats and its further design by shifts in high-fat diet and dihydrotestosterone induction in PCOS rats[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2021, 44(5): 953-964.
- [18] Bishop CV, Mishler EC, Takahashi DL, et al. Chronic hyperandrogenemia in the presence and absence of a western-style diet impairs ovarian and uterine structure/function in young adult rhesus monkeys[J]. Hum Reprod, 2018, 33(1): 128-139.
- [19] True C, Abbott DH, Roberts CT Jr, et al. Sex differences in androgen regulation of metabolism in nonhuman Primates[M]//Sex and Gender Factors Affecting Metabolic Homeostasis, Diabetes and Obesity. Cham: Springer International Publishing, 2017: 559-574.
- [20] Rothman MS, Carlson NE, Xu M, et al. Reexamination of testosterone, dihydrotestosterone, estradiol and estrone levels across the menstrual cycle and in postmenopausal women measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Steroids, 2011, 76(1/2): 177-182.
- [21] Dikensoy E, Balat O, Pence S, et al. The risk of hepatotoxicity during long-term and low-dose flutamide treatment in hirsutism[J]. Arch Gynecol Obstet, 2009, 279(3): 321-327.
- [22] Coutinho EA, Kauffman AS. The role of the brain in the pathogenesis and physiology of polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. Med Sci (Basel), 2019, 7(8): 84.
- [23] Baker ME, Lathe R. The promiscuous estrogen receptor: evolution of physiological estrogens and response to phytochemicals and endocrine disruptors[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2018, 184: 29-37.
- [24] Navarro G, Allard C, Morford JJ, et al. Androgen excess in pancreatic β cells and neurons predisposes female mice to type 2 diabetes[J]. JCI Insight, 2018, 3(12): e98607.

(责任编辑:唐秋娟)