

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.005

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.005>

青春期母鼠抗缪勒管激素暴露对其卵泡发育与生育功能的影响

田卫华¹, 谭顺梓²

(1. 恩施土家族苗族自治州中心医院生殖医学中心, 湖北 恩施 445000; 2. 恩施市人民医院妇产科, 湖北 恩施 445000)

[摘要] **目的:** 探讨青春期抗缪勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)暴露对小鼠成年后生育能力的影响。**方法:** 将4周龄雌性CD-1小鼠分为对照组与AMH暴露组。AMH暴露组小鼠每周腹腔注射2次外源性AMH(0.125 mg/kg), 连续4周。对照组小鼠腹腔注射同体积的生理盐水, 给药频率同AMH组。通过组织学观察评价青春期AMH暴露对小鼠卵泡发育的影响。通过免疫荧光实验检测AMH对小鼠卵巢细胞增殖的影响。随后将雌性小鼠与雄性小鼠交配, 记录交配后50 d内产仔率、产仔数以及产仔时间。**结果:** 与对照组比较, AMH暴露组小鼠在动情前期中卵巢内窦前卵泡增多, 早期窦卵泡和窦卵泡数量明显减少; 在动情期中卵巢内卵母细胞和黄体数量明显减少。免疫荧光结果显示: 与对照组比较, AMH暴露组小鼠卵泡中增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)阳性细胞数比例明显下降。与雄性小鼠交配后, 与对照组比较, AMH暴露组小鼠产仔率、产仔数以及产仔时间均明显下降。**结论:** 青春期AMH暴露可显著降低小鼠成年后生殖能力。

[关键词] 抗缪勒管激素; 卵泡发育; 增殖细胞核抗原; 生殖能力

Effects of exposure to anti-Müllerian hormone on follicular development and reproductive function in adolescent female rats

TIAN Weihua¹, TAN Shunzi²

(1. Center for Reproductive Medicine, Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi Hubei 445000;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Enshi People's Hospital, Enshi Hubei 445000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of puberty anti-Müllerian hormone (AMH) exposure on the fertility of adult mice. **Methods:** Four-week-old female CD-1 mice were divided into a control group and an AMH exposed group. Mice in the AMH exposure group were intraperitoneally injected with exogenous AMH (0.125 mg/kg) twice a week for 4 weeks. Mice in the control group were intraperitoneally injected with the same volume normal saline and were given with the same frequency as AMH group. The effects of AMH exposure during puberty on follicular development in mice were examined by histological staining. The effects of AMH on the proliferation of mouse ovarian cells were examined by immunofluorescence assay. Female mice were then mated with fertile male mice, and the litter rate, litter size and litter time within 50 days were recorded. **Results:** Compared with

收稿日期 (Date of reception): 2019-05-22

通信作者 (Corresponding author): 田卫华, Email: tianweihuappoo@sohu.com

the control group, the number of preantral follicles in the AMH exposed group were increased, while the number of early antral follicles and antral follicles at preoestrus were decreased significantly; the number of oocytes and corpus luteum at oestrus were decreased significantly. Immunofluorescence results showed that, compare with the control group, the proportion of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cells of mouse follicles in AMH exposed group was significantly decreased. After mating with male mice, compared with the control group, the litter yield, litter size and litter time in the AMH exposed group were significantly reduced.

Conclusion: Adolescent AMH exposure can significantly reduce the reproductive capacity of adult.

Keywords anti-Müllerian hormone; follicular development; proliferating cell nuclear antigen; reproductive capacity

抗缪勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)是一种性腺激素,属于转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)超家族成员,是神经细胞、子宫和胎盘的旁分泌调节因子^[1]。在生殖系统中,AMH是一种由睾丸未成熟的Sertoli细胞以及卵巢窦前卵泡和小窦卵泡的颗粒细胞分泌的糖蛋白^[2]。女性卵巢内的小窦卵泡数量越多,AMH的浓度越高;当卵泡随着年龄及各种因素逐渐消耗时,AMH浓度会逐渐降低;当女性接近绝经期时,AMH浓度渐趋于零^[3]。

AMH作为与一种女性生殖功能相关的激素,可用于卵巢功能的评估、卵巢早衰、卵巢颗粒细胞肿瘤以及某些自身免疫性疾病等的诊治^[4]。目前研究^[5]表明:过低的AMH浓度与女性不孕具有相关性。而青春期过度的AMH接触对女性成年后生育能力的影响的相关研究尚少。本研究建立CD-1雌性小鼠模型,旨在探讨青春期AMH暴露对雌性小鼠成年后卵泡生长成熟、卵巢细胞增殖以及生育能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60只4周龄雌性CD-1小鼠和20只成年雄性CD-1小鼠购自武汉大学实验动物中心[SCXK(鄂)2014-0004]。实验动物均饲养在河南利欣制药股份有限公司实验动物公共中心SPF级动物房[SYXK(豫)2017-0007]中,温度设定为(23±1)℃,昼夜循环12 h,动物可自由进食进水。60只4周龄雌性CD-1小鼠被随机分为对照组与AMH暴露组,每组30只小鼠。AMH暴露组小鼠每周腹腔注射2次外源性AMH(0.125 mg/kg),连续4周。对照组小鼠腹腔注射同体积的生理盐水,注射频率同AMH组。本研究经恩施州中心医院动物伦理委员会审批(2018090300423)。

1.2 卵巢组织获取

给药结束后,用巴氏涂片染色检测小鼠动情周期,在小鼠动情前期(在给药处理结束后12 d)和动情期(给药处理结束后15 d),每组分别随机抽取10只小鼠,并对小鼠进行麻醉,快速移除卵巢。卵巢组织采用石蜡包埋后,制作6 μ m厚度的石蜡切片。其中动情前期的卵巢切片用于研究卵泡生长;动情期的卵巢切片用于研究排卵。

卵泡形态学观察:取卵巢组织切片,固定在Bouin氏液中,在显微镜(BX53型, Olympus, 日本)下($\times 200$)观察,每个切片任取5个视野拍照,利用Image J软件进行卵泡和黄体计数。

1.3 免疫荧光

将小鼠动情前期的卵巢切片置于载玻片上,滴加柠檬酸缓冲液(pH 6.0, 10 mmol/L),放入微波炉中加热3次,每次加热5 min,然后置于5%山羊血清(美国Sigma-Aldrich公司)后封闭30 min后,用1:200稀释比例的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体(美国Abcam公司)在4℃孵育过夜。以PBS冲洗后,切片在室温下用1:400稀释的Alexa Fluor 488标记的二抗(美国Invitrogen公司)孵育2 h。用1:200稀释的DAPI(上海碧云天生物技术有限公司)染核后在共聚焦显微镜(TCS SP8 MP型,德国Leica公司)下观察,每个切片任取5个视野拍照,利用Image J软件统计分析。通过免疫荧光方法检测动情前期卵巢的卵泡中PCNA阳性细胞数,评估青春期AMH暴露对小鼠卵巢细胞增殖的影响。

1.4 交配实验

剩余每组10只CD-1雌性小鼠在动情期分别与成年雄性CD-1小鼠交配,每只雌性小鼠仅与1只雄性小鼠同笼7 d,进行交配。小鼠交配后,每天进行分娩检查(产仔或产后出血),记录产仔率、产仔

数量以及交配后产仔时间, 用于评估小鼠的生殖能力。

1.5 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析, 本实验数据均用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组之间比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青春期 AMH 暴露对小鼠卵巢卵泡生长的影响

对不同成熟阶段的卵泡进行计数, 结果显

示: 与对照组相比, AMH暴露组小鼠窦前卵泡显著增多($P<0.001$), 而早期窦卵泡($P<0.05$)和窦卵泡($P<0.001$)均减少(图1)。提示青春期AMH暴露可抑制小鼠卵巢滤泡生长。

2.2 青春期 AMH 暴露对小鼠卵巢细胞增殖的影响

在对照组动情前期小鼠卵巢组织中, 窦前卵泡和早期窦卵泡颗粒细胞中PCNA阳性细胞(绿色染色)数量都较高; 与对照组相比, AMH暴露组动情前期小鼠卵泡中PCNA阳性细胞数显著减少($P<0.001$, 图2)。提示AMH暴露可显著降低小鼠卵巢细胞增殖能力。

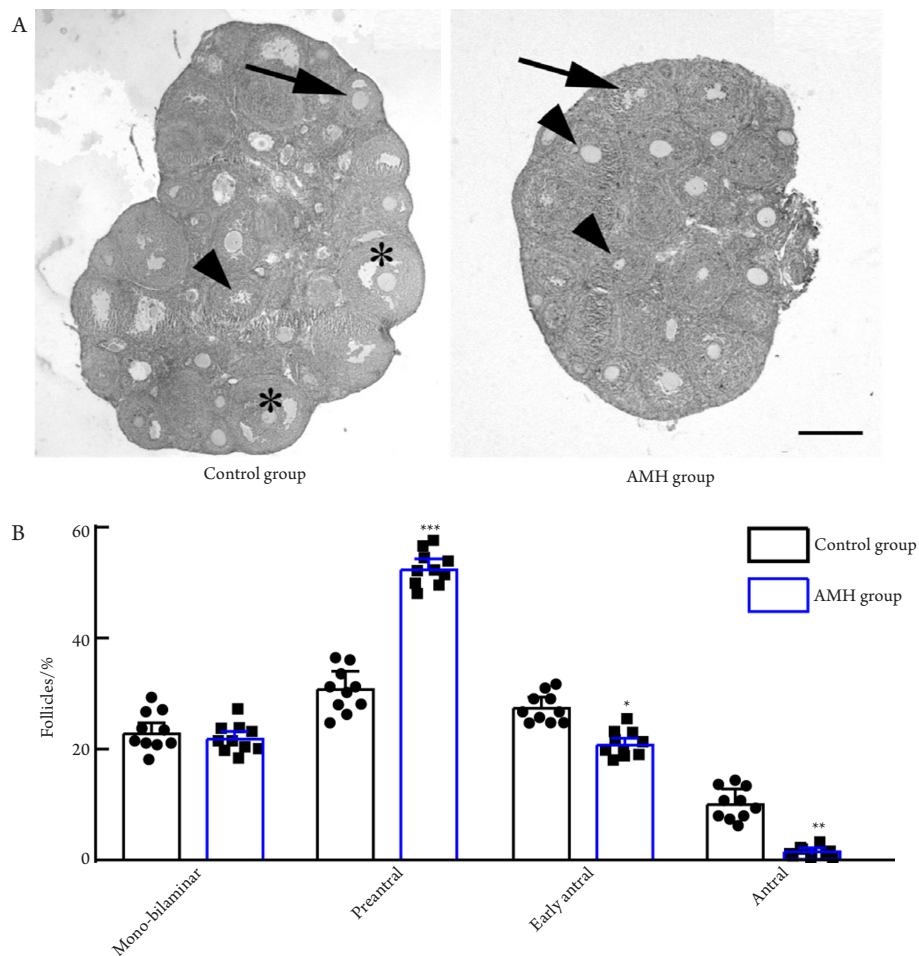


图1 青春期AMH暴露对小鼠卵巢滤泡生长和成熟的影响

Figure 1 Effects of AMH exposure during puberty on the growth and maturation of ovarian follicles in mice

(A)卵巢组织卵泡发育的代表性图像(三角形: 窦前卵泡; 箭头: 早期窦卵泡; 星号: 窦卵泡; 比例尺=50 μm); (B)不同发育阶段的卵泡的统计结果。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; $n=10$ 。

(A) Representative images of follicular development in ovarian tissues (triangle: preantral follicles; arrows: early antral follicles; asterisks: antral follicles; scale bar =50 μm); (B) Statistical results of follicular classification. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs the control group; $n=10$ 。

2.3 青春期 AMH 暴露对小鼠排卵能力的影响

对动情期小鼠卵巢组织的观察结果示: AMH 暴露组小鼠与对照组相比成熟的卵母细胞数量显著减少(图3A, $P < 0.001$)。采用Image J软件统计卵巢中黄体数目的结果(图3B)显示: 与对照组相比, AMH暴露组小鼠的黄体数量明显减少($P < 0.01$), 且含有卵母细胞的窦卵泡体积变大。提示青春期AMH暴露可显著降低小鼠排卵能力。

2.4 青春期 AMH 暴露对小鼠生殖能力的影响

为研究青春期AMH暴露对小鼠生殖能力的

影响, 我们将AMH暴露组小鼠和对照组小鼠分别与成年雄性CD-1小鼠交配, 随后统计了对照组与AMH暴露组小鼠交配后50 d内产仔率、产仔数量以及交配后产仔时间, 结果显示: 与对照组相比, AMH暴露组与雄性CD-1配对后50 d内产仔率显著下降($P < 0.001$, 图4A), 且每次产仔数量也显著下降($P < 0.001$, 图4B)。同时, AMH组小鼠交配后产仔时间显著降低($P < 0.05$, 图4C)。提示青春期AMH暴露可显著降低小鼠生殖能力。

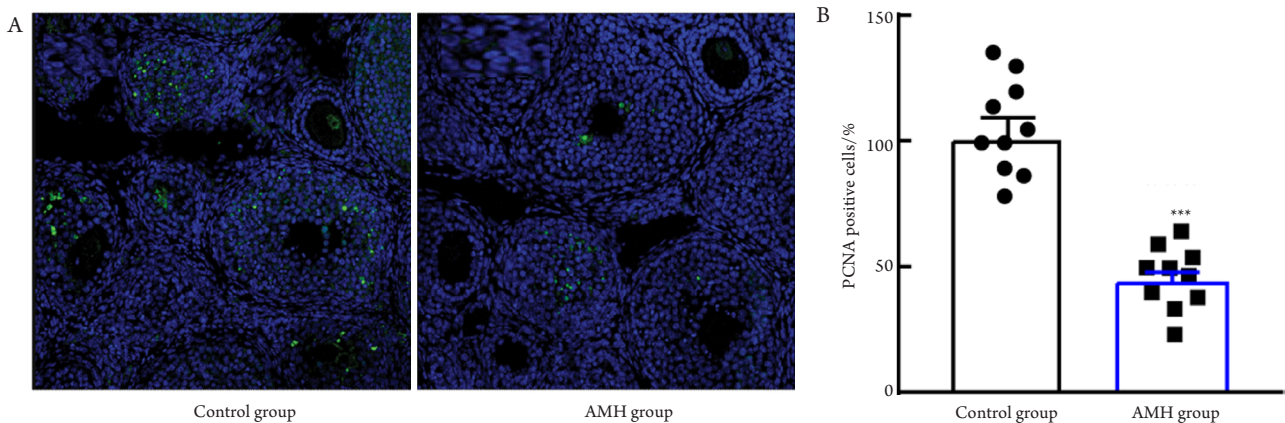


图2 青春期AMH暴露对小鼠卵巢细胞增殖的影响

Figure 2 Effects of adolescent AMH exposure on the proliferation of ovarian cells in mice

(A) PCNA免疫荧光图像($\times 100$); (B) PCNA阳性细胞数的统计结果。与对照组比较, $***P < 0.001$; $n = 10$ 。

(A) PCNA immunofluorescence images ($\times 100$); (B) Statistical results of PCNA positive cell count. $***P < 0.001$ vs the control group; $n = 10$.

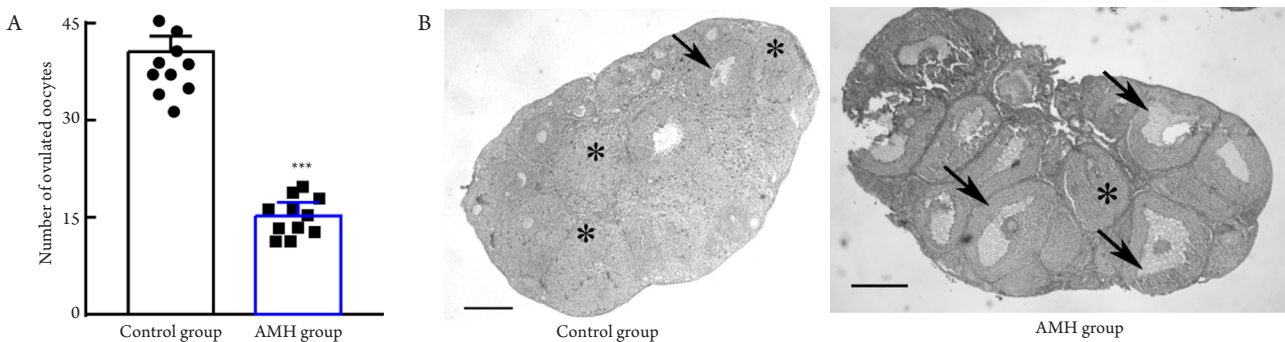


图3 青春期AMH暴露对小鼠排卵能力的影响

Figure 3 Effects of AMH exposure during puberty on ovulation ability in mice

(A)卵巢内卵母细胞数的统计结果。(B)黄体染色的组织学结果(星号: 黄体; 箭头: 窦卵泡; 比例尺=50 μm)。与对照组比较, $***P < 0.001$; $n = 10$ 。

(A) Statistical results of oocyte in mouse ovary; (B) Histological results of luteal staining (asterisks: corpora lutea; arrows: antral follicles; scale bar = 50 μm). $***P < 0.001$ vs the control group, $n = 10$.

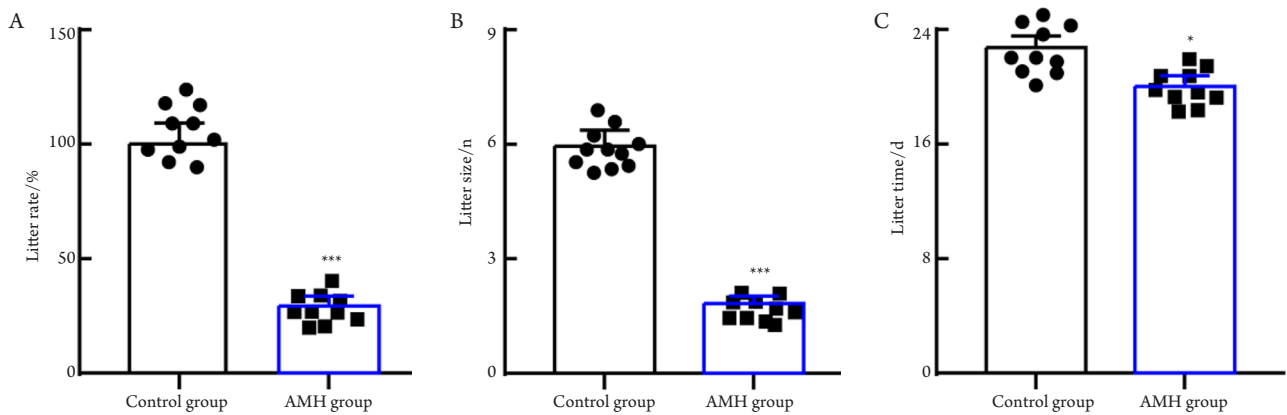


图4 青春期AMH暴露对小鼠生殖能力的影响

Figure 4 Effects of AMH exposure during puberty on reproductive ability of mice

(A) 交配后50 d内产仔率; (B) 产仔数量; (C) 交配后产仔时间。与对照组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; $n = 10$ 。

(A) Litter rate within 50 days after pairing; (B) Litter size; (C) Litter time after pairing. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs the control group, $n = 10$.

3 讨论

AMH是一种两性双态性腺激素^[6],可在一些成熟神经元、子宫、胎盘在内的多种非绒毛层细胞合成^[6-7]。目前研究^[8]表明:在成年女性中,AMH的内分泌和旁分泌都与生殖有关。AMH在月经周期中波动幅度并不明显,但会在妊娠中期和晚期急剧下降,并随着年龄的增长而长期下降^[3]。与此同时,发育过程中的卵泡中的AMH含量也会下降^[9-10]。以上结果提示AMH与女性生殖能力具有重要相关性,但青春期AMH含量的波动对成年女性生殖能力的影响却没有报道。本研究首先用AMH处理青春期CD-1雌鼠,并研究对其成年后生殖能力的影响,结果显示:在青春期AMH处理小鼠的动情前期的卵巢中成熟的卵泡更少,在这些卵巢中,窦卵泡和早期窦卵泡明显减少,表明成年后小鼠卵泡成熟受到阻碍。随后的免疫荧光结果显示:AMH暴露组小鼠PCNA的阳性细胞数显著下降,进一步证明了青春期AMH暴露可抑制小鼠成年后卵泡细胞增殖。

AMH可延缓小鼠衰老,调节卵泡刺激素对颗粒细胞的影响^[11]。然而在乳腺、子宫和胎盘中存在AMH特异性受体(AMHR2)^[12],提示AMH的生理作用可能会扩展到其他生殖器官,进而影响小鼠的生育能力。本研究发现青春期AMH暴露可导致小鼠动情期的卵母细胞及黄体数目下降,说明青春期AMH暴露可显著抑制小鼠排卵能力。为进一步评价青春期AMH暴露对雌性小鼠生育能力的影响,本研究将青春期AMH暴露的雌性小鼠与雄性小鼠进行交配,统计产仔率、产仔数量以及产仔

时间来评估小鼠的生殖能力,结果显示:青春期AMH暴露可显著降低小鼠配对后产仔率和产仔时间,且每次产仔数目也显著下降。产仔的调控是一个复杂的过程,从理论上讲,产仔数是由多种因素决定的,包括排卵的数量、着床的速度,以及胚胎或胎儿阶段对胚胎的吸收^[13]。本研究结果表明:青春期AMH暴露可降低生殖功能,但青春期AMH暴露对成年期小鼠AMH的表达量以及AMH在这些过程中到底扮演怎样的角色,仍然需要进一步研究。

综上,青春期AMH暴露可抑制卵泡发育,降低小鼠生殖能力;此外,对于具有其他疾病的青春期女孩应尽量减少AMH类药品暴露。

参考文献

1. McLennan IS, Pankhurst MW. Anti-Müllerian hormone is a gonadal cytokine with two circulating forms and cryptic actions[J]. *J Endocrinol*, 2015, 226(3): R45-R57.
2. 王静文, 张爱军. 抗苗勒管激素在预测卵泡发育与卵母细胞质量的研究进展[J]. *生殖与避孕*, 2016, 36(6): 495-499.
WANG Jingwen, ZHANG Aijun. Research progress of anti-Müllerian hormone in predicting follicular development and oocyte quality[J]. *Reproduction and Contraception*, 2016, 36(6): 495-499.
3. 邱玲, 李丹丹, 程歆琦. 抗缪勒管激素的临床应用[J]. *协和医学杂志*, 2017, 8(4): 229-234.
QIU Ling, LI Dandan, CHENG Xinqi. Clinical application of anti-Müllerian hormone[J]. *Medical Journal of Peking Union Medical College Hospital*, 2017, 8(4): 229-234.

4. 王柏菊. 血清抗缪勒氏管激素检测在不孕症患者中的临床应用价值[J]. 中国现代药物应用, 2018, 12(15): 72-73.
WANG Baiju. The clinical application value of serum anti-Müllerian hormone in infertile patients[J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2018, 12(15): 72-73.
5. 邵静宜, 马艳萍, 李云秀. 抗苗勒氏管激素与生殖[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(5): 13-15.
SHAO Jingyi, MA Yanping, LI Yunxiu. Anti-Müllerian hormone and reproduction[J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2012, 20(5): 13-15.
6. Wu GC, Tomy S, Lee MF, et al. Sex differentiation and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2010, 167(3): 417-421.
7. Lebeurrier N, Launay S, Macrez R, et al. Anti-Mullerian-hormone-dependent regulation of the brain serine-protease inhibitor neuroserpin[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 20): 3357-3365.
8. 厉英, 李子为. 抗苗勒氏管激素与女性生殖的应用研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(10): 2274-2276.
LI Ying, LI Ziwei. Advances in the application of anti-Müllerian hormone and female reproduction[J]. Maternal & Child Health Care of China, 2017, 32(10): 2274-2276.
9. 单咏梅, 庄严, 杨凡, 等. 血清抗缪勒氏管激素(AMH)在不孕不育症中的临床应用探讨[J]. 医学信息, 2015, 27(45): 44-45.
SHAN Yongmei, ZHUANG Yan, YANG Fan, et al. Serum anti-Müllerian hormone (AMH) tube used in infertility in patients[J]. Medical Information, 2015, 27(45): 44-45.
10. de Kat AC, van der Schouw YT, Eijkemans MJ, et al. Back to the basics of ovarian aging: a population-based study on longitudinal anti-Müllerian hormone decline[J]. BMC Med, 2016, 14(1): 151.
11. 田勇, 赖志文, 石良艳, 等. AMH蛋白在性成熟小鼠卵泡发育不同阶段及自然衰老过程卵巢组织中的表达变化[J]. 现代妇产科进展, 2012, 21(12): 936-940.
TIAN Yong, LAI Zhiwen, SHI Liangyan, et al. The expression of AMH protein between in different developmental stages of the adult mice follicle and in ovarian tissue of different ages[J]. Progress in Obstetrics and Gynecology, 2012, 21(12): 936-940.
12. Namkung J, Song JY, Jo HH, et al. Mullerian inhibiting substance induces apoptosis of human endometrial stromal cells in endometriosis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(9): 3224-3230.
13. Bittner AK, Horsthemke B, Winterhager E, et al. Hormone-induced delayed ovulation affects early embryonic development[J]. Fertil Steril, 2011, 95(7): 2390-2394.

本文引用: 田卫华, 谭顺梓. 青春期母鼠抗缪勒管激素暴露对其卵泡发育与生育功能的影响[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(3): 565-570. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.005

Cite this article as: TIAN Weihua, TAN Shunzi. Effects of exposure to anti-Müllerian hormone on follicular development and reproductive function in adolescent female rats[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(3): 565-570. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.005