

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.007

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.007>

枸杞多糖对顺铂化疗诱导的大鼠卵巢早衰模型的卵巢保护作用

孙慧霞, 郭哲, 许静

(南阳市中心医院妇一科, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 探讨枸杞多糖(lycium barbarum polysaccharide, LBP)对顺铂诱导的大鼠卵巢早衰模型的作用。方法: 将80只雌性SD大鼠随机分为对照组、单纯顺铂给药组(DDP组)、顺铂+低剂量LBP处理组(DDP+LBP-L组)、顺铂+高剂量LBP处理组(DDP+LBP-H组)4组。对照组大鼠正常饲养; DDP组大鼠每天腹腔注射2 mg/kg DDP, 持续14 d; DDP+LBP-L组和DDP+LBP-H组大鼠每天分别灌胃5 mg/kg, 10 mg/kg LBP溶液后, 再腹腔注射2 mg/kg DDP, 持续14 d。用药14 d后, 采集股静脉血、卵巢组织和子宫组织。取卵巢组织进行HE染色和DDX4免疫组织化学染色; 对卵巢各发育阶段的卵泡计数和形态进行分析; 检测血清中卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和雌二醇(estradiol, E2)的含量; 取子宫组织进行HE染色。结果: 与对照组相比, DDP组大鼠的卵巢受损, 原始卵泡、初级卵泡、窦前卵泡、窦卵泡和总卵泡数减少, 闭锁卵泡增加。而DDP+LBP组与对照组卵巢相似, 其中高剂量LBP组相似程度更高; 与对照组相比, DDP能升高血清中FSH含量而降低E2含量, LBP可改善此情况; DDP处理可损伤大鼠子宫内膜, 使腺体数目减少, 而LBP处理后子宫内膜损伤情况减轻, 且高剂量LBP改善程度更明显。结论: 顺铂可对大鼠卵巢造成结构和功能的损害, 枸杞多糖可在一定程度上减轻这种损伤, 对卵巢起保护作用。

[关键词] 枸杞多糖; 顺铂; 卵巢早衰

Protective effect of lycium barbarum polysaccharide on premature ovarian failure induced by cisplatin chemotherapy in rats

SUN Huixia, GUO Zhe, XU Jing

(First Department of Gynecology, Nanyang City Center Hospital, Nanyang Henan 473000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of lycium barbarum polysaccharide (LBP) on cisplatin-induced premature ovarian failure in rats. **Methods:** A total of 80 female SD rats were randomly divided into four groups: a control group, a DDP alone group (DDP group), a DDP + low-dose LBP group (DDP + LBP-L group), and a DDP + high-dose LBP group (DDP + LBP-H group). The rats in the control group were raised normally. The rats in DDP group were intraperitoneally injected with 2 mg/kg DDP every day for 14 days. The rats in the DDP+LBP-L group and the DDP+LBP-H group were given 5 and 10 mg/kg LBP solution every day, respectively, followed

收稿日期 (Date of reception): 2019-05-18

通信作者 (Corresponding author): 孙慧霞, Email: 2492619493@qq.com

by intraperitoneal injection of 2 mg/kg DDP for 14 days. After administration for 14 days, femoral venous blood, ovarian tissues and uterine tissues were collected. Ovarian tissues were taken for HE staining and DDX4 immunohistochemical staining. Follicle counts and morphology at different stages of ovarian development were analyzed. The contents of follicle-stimulating hormone (FSH) and estradiol (E2) in serum were detected. Uterine tissue was taken for HE staining. **Results:** Compared with the control group, in the DDP group, the ovary was damaged, the number of primordial follicles, primary follicles, presinus follicles, sinus follicles and total follicles was decreased, and the number of atresia follicles was increased. However, the ovary of the DDP + LBP group was similar to that of the control group, and the high-dose LBP group had higher degree of similarity. Compared with the control group, DDP increased the content of FSH and decrease the content of E2 in serum, and LBP could improve this situation. DDP treatment could damage the endometrium and reduce the number of glands, while the endometrial damage was reduced after LBP treatment, and the improvement degree of high dose LBP was more obvious. **Conclusion:** Cisplatin can damage the structure and function of the ovary of rats, while LBP can weaken the adverse effect and protect the ovary in some cases.

Keywords lycium barbarum polysaccharide; cisplatin; premature ovarian failure

化学药物治疗(以下简称化疗)虽然提高了肿瘤患者的生存率,但化疗对女性生育能力存在有害影响。女性生育能力取决于卵巢功能,而卵巢功能主要反映在卵巢原始卵泡的数量。癌症导向疗法可使卵巢储备减少和萎缩加速,导致卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)[也称为早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)]^[1-2],而造成原始卵泡丢失的机制尚不清楚。抗肿瘤治疗对卵巢的影响可以通过测量不同的标志物来评估,包括血清早期卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和雌二醇(estradiol, E2)水平和窦卵泡计数等。卵巢滤泡对许多化疗药物诱导的细胞凋亡具有高度易感性^[3]。在化疗药中,顺铂具有广谱的抗癌作用,被广泛用于各种肿瘤的化疗^[4]。然而,顺铂杀死癌细胞通常伴有破坏正常组织,特别是损伤分裂细胞而非静止细胞。其不良反应包括神经毒性、肾毒性、耳毒性等^[5-6]。近年的研究^[7-9]发现:卵巢损伤是长期接触化疗药物的后果,而顺铂引起的卵巢功能衰竭的比值比(odds ratio, OR)达到1.77(来自168例癌症病例的结果),这已引起许多渴望正常生育的年轻女性癌症幸存者的高度关注。

卵巢受损与抗癌药物引起的细胞凋亡有关,而枸杞多糖(lycium barbarum polysaccharide, LBP)是一种兼具抗癌活性和提高生育能力的中药提取物。基于LBP的药理作用及顺铂对卵巢的损伤作用,本研究拟探讨枸杞多糖是否能对抗癌药物顺铂诱导的大鼠卵巢早衰,从而发挥卵巢保护作用。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 动物

80只成年雌性SD大鼠(体重200~250 g, 9周龄),从河南省动物实验中心购买。将大鼠置于标准清洁级动物房中喂养,室内通风,温度为(21±2)℃,湿度为(60±5)% ,给予光/暗12 h循环,自由饮水、饮食。动物实验程序均按照南阳市中心医院实验动物护理和使用指南进行。

1.1.2 试剂

苏木精-伊红(HE)染色试剂盒和免疫组织化学检测试剂盒购自上海生物工程有限公司;FSH和E2的ELISA试剂盒购自上海晶抗生物技术有限公司;DDX4抗体购自美国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

将80只雌性SD大鼠随机分为4组,每组20只:对照组(Control组)、单纯顺铂给药组(DDP组)、顺铂+低剂量LBP处理组(DDP+LBP-L组)、顺铂+高剂量LBP处理组(DDP+LBP-H组)。对照组大鼠正常饲养;DDP组大鼠每天腹腔注射2 mg/kg DDP,持续14 d;DDP+LBP-L组和DDP+LBP-H组大鼠每天分别灌胃5, 10 mg/kg LBP溶液后,再腹腔注射2 mg/kg DDP,持续14 d。第15天麻醉大鼠,采集股静脉血、卵巢组织和子宫组织。

1.2.2 HE染色

切取卵巢组织和子宫角组织,立即置于Bouins

溶液中浸泡过夜进行固定, 而后将其包埋在石蜡中, 切成5 μm 厚的连续切片。切片根据HE染色试剂盒说明书的标准程序进行染色。染色后用中性树胶封胶固定于载玻片上, 然后可置于光学显微镜下观察, 并随机拍摄6个视野。

1.2.3 DDX4免疫组织化学

DDX4的免疫组织化学可用于卵巢原始卵泡的鉴定。将卵巢切片贴在聚赖氨酸涂覆的载玻片上。将切片放入抗原提取液(柠檬酸缓冲液, pH 6.0)中, 在压力锅中煮20 min, 冷却至室温20 min后, 用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。清洗切片后, 用3%过氧化氢溶液在室温下阻断内源性过氧化物15 min, 并用PBS清洗。用DDX4抗体于室温孵育60 min, 用PBS冲洗, 用生物素标记二抗孵育20 min, 室温下用链霉亲和素过氧化物酶孵育20 min。最后用Mayer氏苏木精复染1 min, 在自来水中漂洗, 脱水, 在光学显微镜下观察, 并随机拍摄6个视野。

1.2.4 卵泡计数与形态分析

对卵泡进行分类并计数以评估化疗对卵巢卵泡的影响并评估LBP的保护作用。卵泡计数均由2名对实验不知情的研究人员进行。镜下视野中只有卵母细胞核明显可见的卵泡才可用于评分。当卵泡含有完整的卵母细胞时, 卵泡被计为原始卵泡, 所述卵母细胞被单层鳞状卵泡细胞包围; 初级卵泡由单层立方颗粒细胞包围的扩大的卵母细胞; 具有2层或更多层颗粒细胞但在颗粒细胞之间没有可见空间的卵母细胞被鉴定为窦前卵泡; 当可见包含几层颗粒细胞并具有清晰核的卵母细胞时, 记为窦卵泡; 仅在观察到退化的卵母细胞和粘连颗粒细胞时才计数闭锁卵泡。

1.2.5 ELISA法检测性激素

在室温下使股静脉血凝结2 h, 然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以2 000 r/min离心10 min, 收集上清液并于-80 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。实验开始前, 用pH 9.6的碳酸盐包被缓冲液溶解抗原, 之后根据ELISA试剂盒说明书, 经加样、孵育、洗板、显色、读板等步骤分别测量血清中FSH与E2的水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件进行数据分析, 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组定量资料采用单因素方差分析后Tukey多重比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LBP可保护卵巢卵泡的发生发育, 减少DDP所致的卵巢损害

HE染色(图1A)显示: 与对照组相比, 接受DDP处理的大鼠卵巢受损且总卵泡数量减少, 卵泡呈现皮质纤维化和基质细胞形态改变, 而DDP+LBP处理的大鼠卵巢形态较完整, 总卵泡数目相对正常, 且卵泡较少出现皮质纤维化和基质的改变, 而高剂量LBP大鼠卵巢镜下表现与对照组越相似; DDX4免疫组织化学(图1B)显示: DDP处理后卵巢原始卵泡数目减少, 而同时使用LBP的大鼠原始卵泡数目接近于对照组。

2.2 LBP可防止不同类型卵泡的减少, 并减少由DDP治疗引起的卵泡闭锁

与对照组大鼠相比, DDP处理的大鼠中原始卵泡(图2A)、初级卵泡(图2B)、窦前卵泡(图2C)、和窦卵泡(图2D)和总卵泡(图2F)的数量均减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而闭锁卵泡(图2E)的数量增加($P<0.01$), 进一步表明DDP对卵巢具有化学毒性作用; 相对于仅使用DDP的大鼠卵巢, 当LBP与DDP联合使用时, LBP具有恢复不同类型卵泡结构的作用, 其中, 低剂量LBP增加原始卵泡(图2A)、初始卵泡(图2B)、窦前卵泡(图2C)的数量(均 $P<0.05$)和减少闭锁卵泡(图2E)的数量($P<0.05$); 而高剂量LBP增加原始卵泡(图2A)、初始卵泡(图2B)、窦前卵泡(图2C)、窦卵泡(图2D)和总卵泡(图2F)的数量($P<0.05$ 或 $P<0.01$)和减少闭锁卵泡(图2E)的数量($P<0.01$)。

2.3 LBP可使经DDP处理的大鼠血清FSH、E2的含量维持正常

如图3所示, 与对照组相比, 经DDP处理后, 大鼠血清中FSH水平(图3A)升高($P<0.01$), 而E2水平(图3B)降低($P<0.01$), 提示卵巢储备功能不良; 给予不同浓度LBP处理的大鼠, 血清FSH水平(图3A)随LBP浓度的升高而降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 血清E2水平(图3B)随LBP浓度的升高而升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 高浓度LBP处理的大鼠血清FSH和E2浓度更加接近于对照组。提示LBP可使经DDP处理的大鼠血清FSH, E2激素的含量维持正常。

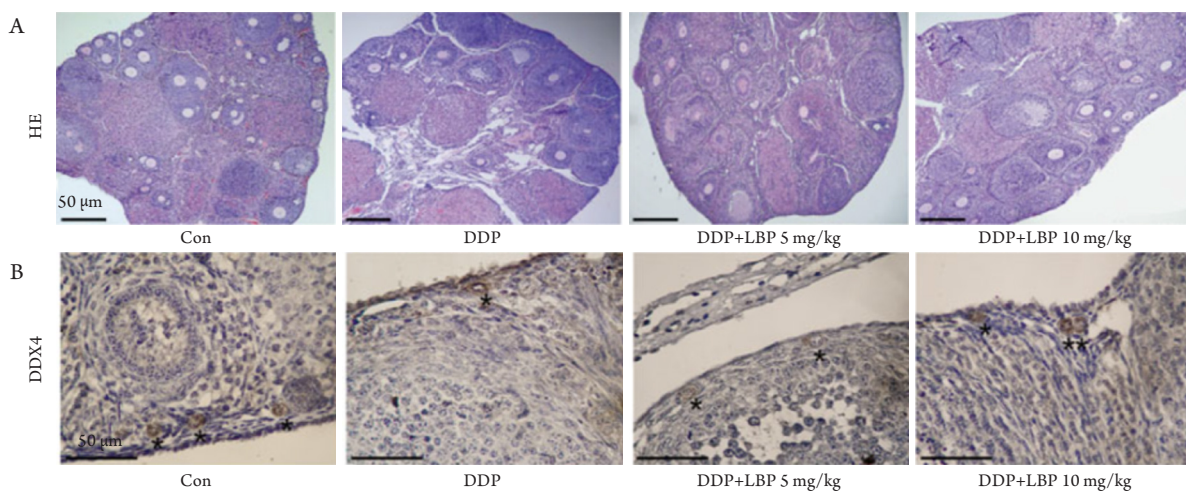


图1 LBP对DDP诱导的大鼠卵巢早衰模型卵巢卵泡发生的影响

Figure 1 Effect of LBP on ovarian follicular development in rats with premature ovarian failure induced by DDP

各组的卵巢组织切片HE染色(A)和DDX4-免疫组织化学(B)的代表性图像(星号表示原始卵泡, 比例尺=50 μm)。

Representative images of HE staining (A) and DDX4-immunostained (B) in ovarian histological sections from each group (asterisks indicate primordial follicles; scale bar =50 μm).

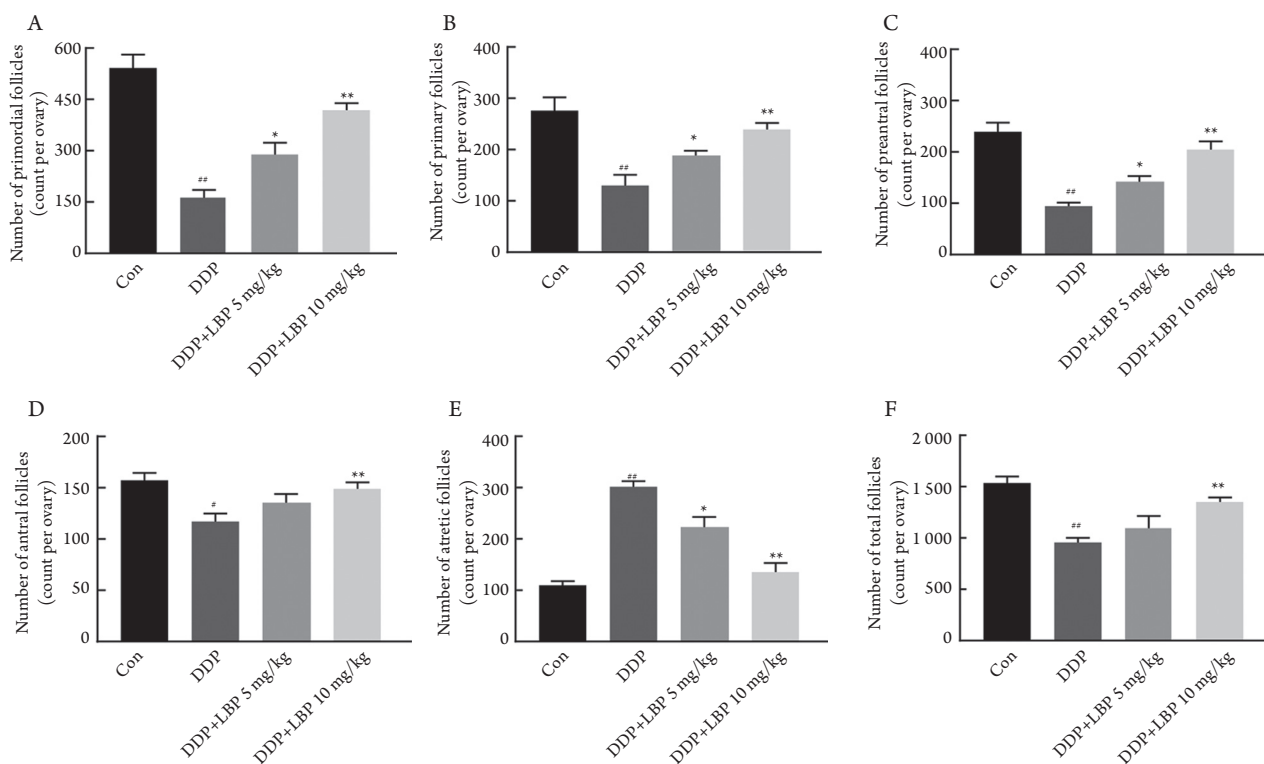


图2 LBP对DDP诱导的大鼠卵巢早衰模型卵巢各类卵泡数目的影响

Figure 2 Effect of LBP on the number of ovarian follicles in DDP-induced rat premature ovarian failure model

各组给药14 d后原始卵泡(A)、初级卵泡(B)、窦前卵泡(C)、窦卵泡(D)、闭锁卵泡(E)和总卵泡(F)的数量。与对照组相比, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01; 与单用DDP组相比, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01。

The number of primordial follicles (A), primary follicles (B), preantral follicles (C), antral follicles (D), atretic follicles (E), and total follicles (F) in each group 14 days after treatment. Compared with the control group, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01; Compared with the DDP alone group, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01.

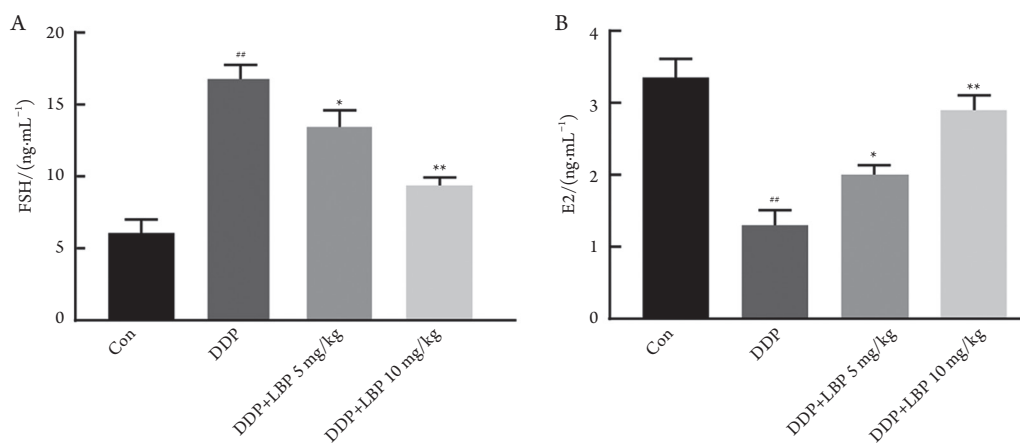


图3 LBP使DDP诱导的大鼠卵巢早衰模型的FSH和E2浓度正常化

Figure 3 LBP normalizes FSH and E2 concentrations in DDP-treated rats

(A) 各组大鼠血清中FSH浓度; (B) 各组大鼠血清中的E2浓度。与对照组相比, ** $P < 0.01$; 与单用DDP组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

(A) Serum concentration of FSH in each group; (B) Serum concentration of E2 in each group. Compared with the control group, ** $P < 0.01$; compared with the DDP alone group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 LBP可改善DDP处理后早衰卵巢子宫内膜的组织学特征

与对照组相比, 仅用DDP处理的大鼠子宫角在上皮和间质都有变化, 而DDP+LBP组表现出与

对照组类似的正常的疏松基质和大量的多面体细胞, 且LBP的浓度越高, HE染色下基质组织和实质细胞结构越正常, 提示LBP可改善DDP诱导的子宫损伤(图4)。

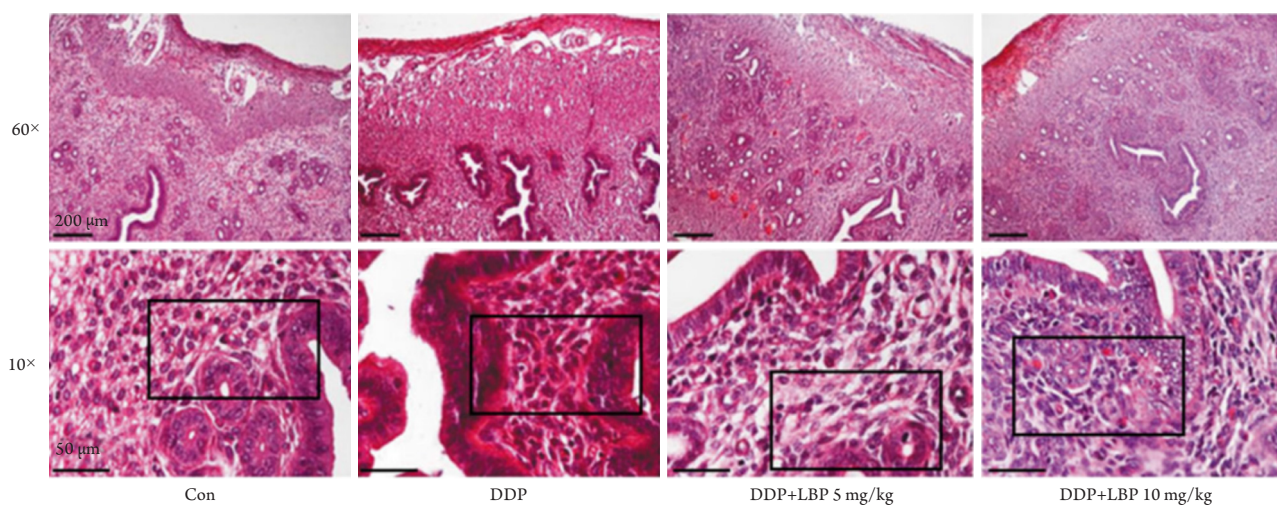


图4 LBP可预防接受DDP治疗的大鼠子宫组织学的改变

Figure 4 LBP prevents the changes of uterine morphology in rats treated with DDP

HE染色切片显示: 各组大鼠子宫的典型组织学特征(方框表示包含间质和腺分支的区域)。

HE stained sections shows typical histological features of the uterus of rats in each group. The box indicates the area containing the interstitial and glandular branches.

3 讨论

以往的研究^[10]显示: 顺铂作为临床一线的抗癌药物, 由于治疗选择性差, 应用于育龄期女性患者时常会造成患者卵巢功能的损伤, 引起卵巢早衰、不孕等并发症。鉴于化疗药物对卵巢存在的损害作用以及女性癌症患者对维持生育能力的需求, 我们期待能找到一种易于取材并对卵巢有明显保护作用的药物来减轻化疗药物对卵巢产生的不良损伤, 枸杞多糖是枸杞的提取物, 易于获得。已知枸杞多糖对顺铂所致的人胚肾细胞毒性具有拮抗作用^[11], 枸杞多糖是否对顺铂化疗造成的卵巢早衰具有保护作用尚未见有研究报道, 因此本研究通过腹腔注射DDP制造大鼠卵巢早衰模型, 并通过用LBP灌胃来初步研究LBP对卵巢的作用, 结果显示: 接受DDP注射的大鼠卵巢结构受损、功能下降, 卵泡生长受限、卵泡储备量降低, 并且血清中FSH水平升高而E2水平降低; 同时给予LBP治疗后, 大鼠卵巢的结构和功能都得以改善, 卵巢内原始卵泡数目增加, 卵泡发生得以恢复, 卵泡储备量良好, 卵巢结构与对照组大鼠相似, 同时子宫的形态和各项生育参数也近正常, 此外, 大鼠体内与生育有关的性激素FSH与E2含量趋向正常水平。

原始卵泡在卵巢内是不可再生的, 且活化的过程不可逆^[12], 是卵泡群体中最重要的种类。原始卵泡的生长以排卵和闭锁为结束的标志, 因此, 静息的卵巢储备对于生育能力的维持是至关重要的一环^[13]。本研究结果提示: 化疗药物顺铂可减少原始卵泡的数量而造成卵巢卵泡储备量的下降, 从而引起卵巢的早衰。给予LBP治疗后, 卵巢中原始卵泡减少的情况得以改善, 表明LBP可通过一定的途径来调节原始卵泡的发生与发育, 从而减轻化疗药物顺铂对卵巢生育能力的损伤。FSH是垂体前叶嗜碱性细胞分泌的一种激素, 成分为糖蛋白, 主要作用为促进卵泡成熟, 并可促进卵泡颗粒层细胞增生分化, 使整个卵巢长大^[14-15]。E2是雌激素的一种, 由卵巢内卵泡的颗粒细胞分泌, 能促使细胞合成DNA, RNA和各种不同的蛋白质^[15-16]。血清中FSH与E2的比例可从激素水平角度提示卵巢的功能状态^[17]。本研究结果显示: LBP有助于恢复DDP诱导的大鼠激素FSH和E2的紊乱, 即能恢复卵泡正常的分泌功能, 从一定程度上反映了LBP对卵巢的保护作用。

综上, LBP可对化疗药物顺铂诱导的卵巢早衰起到保护作用, 有望用作女性肿瘤患者化疗期

间的卵巢保护药, 但由于本研究使用的是动物模型, 能否将本研究的实验结果运用于临床仍有待更多的实验来检验。

参考文献

- Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8772.
- Yahata K, Chikami Y, Umetani E. Morphological study of the ovary in *Hanseniella caldaria* (Myriapoda; Symphyla): the position of oocyte-growth and evolution of ovarian structure in Arthropoda[J]. Arthropod Struct Dev, 2018, 47(6): 655-661.
- Lopes F, Smith R, Nash S, et al. Irinotecan metabolite SN38 results in germ cell loss in the testis but not in the ovary of prepubertal mice[J]. Mol Hum Reprod, 2016, 22(11): 745-755.
- Qin QP, Wang SL, Tan MX, et al. Novel tacrine platinum(II) complexes display high anticancer activity via inhibition of telomerase activity, dysfunction of mitochondria, and activation of the p53 signaling pathway[J]. Eur J Med Chem, 2018, 158: 106-122.
- Rybak LP, Mukherjee D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention[J]. Semin Hear, 2019, 40(2): 197-204.
- Choi J, Im GJ, Chang J, et al. Protective effects of apocynin on cisplatin-induced ototoxicity in an auditory cell line and in zebrafish[J]. J Appl Toxicol, 2013, 33(2): 125-133.
- Lee RFS, Riedel T, Escrig S, et al. Differences in cisplatin distribution in sensitive and resistant ovarian cancer cells: a TEM/NanoSIMS study[J]. Metallomics, 2017, 9(10): 1413-1420.
- Yucebilgin MS, Terek MC, Ozsaran A, et al. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: an animal model of premature ovarian failure and infertility[J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2004, 44(1): 6-9.
- Meirow D, Dor J, Kaufman B, et al. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury[J]. Hum Reprod, 2007, 22(6): 1626-1633.
- 丁艳, 张静, 陶然, 等. 顺铂治疗导致卵巢早衰的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(6): 107-110.
DING Yan, ZHANG Jing, TAO Ran, et al. Research progress in treatment of cisplatin resulted in premature ovarian failure[J]. Basic & Clinical Medicine, 2018, 38(6): 107-110.
- 冷洪涛, 高丽萍, 张海莲, 等. 枸杞多糖对顺铂所致人胚肾细胞毒性的拮抗作用[J]. 广东医学, 2011, 32(22): 2929-2931.
LENG Hongtao, GAO Liping, ZHANG Hailian, et al. Antagonistic effect of lycium barbarum polysaccharide on human embryonic kidney cytotoxicity induced by cisplatin[J]. Guangdong Medical Journal, 2011, 32(22): 2929-2931.

12. Zhang H, Liu K. Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood[J]. Hum Reprod Update, 2015, 21(6): 779-786.
13. da Silva Bitecourt F, Horta COD, Lima KS, et al. Morphological study of apoptosis in granulosa cells and ovulation in a model of atresia in rat preovulatory follicles[J]. Zygote, 2018, 26(4): 336-341.
14. Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, et al. Involvement of bone morphogenetic proteins (BMP) in the regulation of ovarian function[J]. Vitam Horm, 2018, 107: 227-261.
15. Dewailly D, Robin G, Peigne M, et al. Interactions between androgens, FSH, anti-Mullerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary[J]. Hum Reprod Update, 2016, 22(6): 709-724.
16. Serafim MK, Duarte AB, Silva GM, et al. Impact of growth hormone (GH) and follicle stimulating hormone (FSH) on in vitro canine preantral follicle development and estradiol production[J]. Growth Horm IGF Res, 2015, 25(2): 85-89.
17. Bentov Y, Jurisicova A, Kenigsberg S, et al. What maintains the high intra-follicular estradiol concentration in pre-ovulatory follicles[J]. J Assist Reprod Genet, 2016, 33(1): 85-94.

本文引用: 孙慧霞, 郭哲, 许静. 枸杞多糖对顺铂化疗诱导的大鼠卵巢早衰模型的卵巢保护作用[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(3): 578-584. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.007

Cite this article as: SUN Huixia, GUO Zhe, XU Jing. Protective effect of lycium barbarum polysaccharide on premature ovarian failure induced by cisplatin chemotherapy in rats[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(3): 578-584. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.007