

· 论 著 ·

来曲唑联合 45% 高脂饲料诱导生殖内分泌及代谢表型异常的多囊卵巢综合征大鼠模型研究

尹萍, 路璐, 陈媛媛, 李丽, 李赞, 童国庆 (上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200120)

[摘要] **目的** 建立来曲唑联合高脂饲料诱导 SD 雌性大鼠多囊卵巢综合征(PCOS)内分泌及代谢异常的动物模型。**方法** 选取 18 只 21 日龄雌性大鼠喂养 45% 高脂饲料 16 周, 第 6 周龄开始服用来曲唑直至造模结束; 8 只对照组大鼠常规饲料喂养, 第 6 周龄服用生理盐水。观察阴道涂片及卵巢组织学变化, 比较每周体重变化, 测定脏器重量、血清睾酮水平、糖耐量、血脂水平、空腹胰岛素以及胰岛素敏感指数。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠体重增加, 卵巢、腹股沟脂肪质量增加, 子宫、垂体质量及脏器指数显著减少。模型组大鼠卵巢呈多囊样改变, 颗粒细胞层减少, 白膜增加。模型组大鼠的三酰甘油和低密度脂蛋白升高, 糖耐量曲线下面积增加, 血清睾酮水平上升, 空腹胰岛素水平升高, 胰岛素敏感性降低。**结论** 来曲唑联合高脂饲料可以建立有效的内分泌及代谢表型异常 PCOS 动物模型。

[关键词] 来曲唑; 高脂饲料; 多囊卵巢综合征; 内分泌; 糖脂代谢; 动物模型

[中图分类号] R711.75 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)05-0422-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.007

Effects of letrozole and 45% high-fat diet on induction of rat model of polycystic ovary syndrome with reproductive and metabolic disorder

YIN Ping, LU Lu, CHEN Yuanyuan, LI Li, LI Yun, TONG Guoqing (Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China)

[Abstract] **Objective** To establish rat polycystic ovary syndrome model with letrozole combined high fat diet. **Methods** Eighteen 21-day-old female rats were fed with 45% high-fat diet for 16 weeks. Letrozole was started at the 6th week of age until the end of modeling. Eight rats in control group were fed with regular diet and Saline without letrozole at the 6th week of age. The vaginal smear and ovarian histological changes were investigated. The changes in body mass, organ weight, blood testosterone level, glucose tolerance, blood lipid level, fasting insulin and insulin sensitivity index were measured. **Results** In the model group, the ovary of the rats showed a multi-cystic change, the granulosa cell layer decreased, and the tunica albuginea increased. Compared with the control group, the body weight of the model group increased, the weight of the ovary and inguinal fat increased, the weight and weight index of the uterus and pituitary gland decreased, the triglyceride and low density lipoprotein increased, the area under the glucose tolerance curve increased, the blood testosterone level increased, the fasting insulin increased, and the insulin sensitivity decreased. **Conclusion** Letrozole combined with high fat diet could establish an effective PCOS model of abnormal endocrine and metabolic phenotype.

[Key words] letrozole; high-fat diets; polycystic ovary syndrome; reproductive endocrine; glucose and lipid metabolism; animal model

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是以稀发排卵或不排卵、高雄激素血症为临床特征的生殖内分泌疾病,患病率高达 6%~10%,研究发现 50%~60%的 PCOS 患者会合并胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)高胰岛素血症^[1]。该病

因及发病机制至今仍不完全清楚,因此,建立有效的生殖内分泌及代谢异常型多囊卵巢综合征动物模型对其发病机制研究有重要意义。本研究采用来曲唑(letrozole)联合 45%高脂饲料饮食建模,探讨更理想的生殖内分泌及代谢异常的 PCOS 大鼠造模方法。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

3 周龄 SPF 级 SD 雌性大鼠 26 只,由上海中医药大学动物实验中心提供。置于室温(18~22)℃,相对湿度 40%~60%的动物房内,自由摄食、饮水,每天

[基金项目] 上海中医药大学 2016 年预算内项目(2016N47)

[作者简介] 尹萍,助理研究员,研究方向:中西医结合基础, Email:120042559@qq.com

[通讯作者] 童国庆,主任医师,博士生导师,研究方向:辅助生殖技术, Email:drivfongguoqing@hotmail.com

12 h 光照。普通饲料供能比:蛋白(20%)、碳水化合物(70%)、脂肪(10%),由上海斯莱克公司提供;高脂饲料供能比:蛋白(20%)、碳水化合物(35%)、脂肪(45%),由深圳睿迪生物科技公司提供(D12451)。

SD 大鼠随机分为 2 组:对照组(普通饲料喂养) 8 只,另 18 只大鼠用于建立 PCOS 大鼠模型(45%高脂饲料喂养)。

1.2 药物和试剂

来曲唑片(江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字 H19991001);羧甲基纤维素钠(美国 Sigma-aldrich 公司);胰岛素酶免试剂盒(瑞典, Mercodia 公司),睾酮酶免试剂盒(美国, Immunoway 公司),罗氏血糖仪及血糖试纸(美国, Roche 公司)。

1.3 PCOS 模型的建立

参考文献[2]方法:3 周龄 SD 大鼠适应性喂养 3 d,然后以高脂饲料喂养实验组大鼠 16 周,第 6 周龄时开始每日灌胃来曲唑溶液[1mg/(kg·d)来曲唑溶于 0.5%羧甲基纤维素钠溶液中],连续 13 周;普通饲料喂养对照组大鼠 16 周,第 6 周龄时开始每日灌胃 0.5%羧甲基纤维素钠溶液,连续 13 周,期间每周称重。从造模第 15 周开始,每周对模型组和对照组大鼠尾静脉采血,检测空腹胰岛素水平(FINS)和空腹血糖(FBG),计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)。ISI=ln[1/(FINS×FBG)]。

模型建立成功标准:模型组大鼠体重比对照组平均体重增加 20%,模型组大鼠 ISI 比对照组 ISI 均值减去 1.96 个标准差,阴道涂片染色镜检处于动情间期。第 19 周,12 只大鼠满足此条件,建模率达 66.67%。

1.4 检测指标

1.4.1 阴道涂片

大鼠灌胃第 12 周,每天早上阴道涂片,HE 染色,显微镜下观察动情周期的变化,连续 14 d。

1.4.2 体重增长情况比较

每周测量大鼠的体重并且记录。

1.4.3 器官质量及脏器指数测定

大鼠腹主动脉采血取血后,将大鼠的双侧卵巢、子宫、下丘脑、垂体及腹股沟脂肪取出。组织常规称湿重,测定脏器指数。

1.4.4 卵巢组织学检查

卵巢组织常规去除表面脂肪称重后,一侧卵巢置入 4%多聚甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋后切片,做 HE 染色,中性树脂胶封片,显微镜下观察各组大鼠卵巢组织学变化。

1.4.5 大鼠腹腔糖耐量检测(intra-peritoneal glucose tolerance test, IPGTT)

采用罗氏血糖仪及试纸测定,步骤如下:将大鼠

禁食、禁水 12 h,次日晨测取大鼠空腹血糖,然后将 25%葡萄糖溶液按 10 μl/g 体重腹腔注射注入大鼠体内,注射后分别于 15、30、60、90、120 min 时通过尾静脉取血,测量血糖值。

1.4.6 血脂分析

大鼠禁食 12 h 后,尾静脉采血,离心分离血清,测定血清中三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)的含量。

1.4.7 胰岛素抵抗相关指标测定

造模结束次日晨 8:00,大鼠测空腹血糖,并且从腹腔采血,测 FINS 以及 FBG,并计算 ISI。

1.4.8 血清性激素测定

大鼠禁食,2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,腹主动脉采血,以 3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,置 -80℃备用,检测血清性激素睾酮(testosterone, T)水平。

1.5 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,结果以($\bar{x} \pm s$)表示,两个独立组比较采用 *t* 检验,组间差异性比较采用方差分析,方差不齐用 Satterthwaite 校正,以 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 实验结果

2.1 大鼠动情周期观察

对照组大鼠始终保持规律的动情周期变化。来曲唑灌胃后,模型组大鼠持续处于动情间期,仅见大量白细胞,偶见少量角化细胞。

2.2 大鼠体重的变化

各组大鼠在建模前体重比较无统计学差异。与对照组相比,模型组大鼠从高脂喂养第 9 周龄开始,体重增加极显著($P < 0.001$),见图 1。

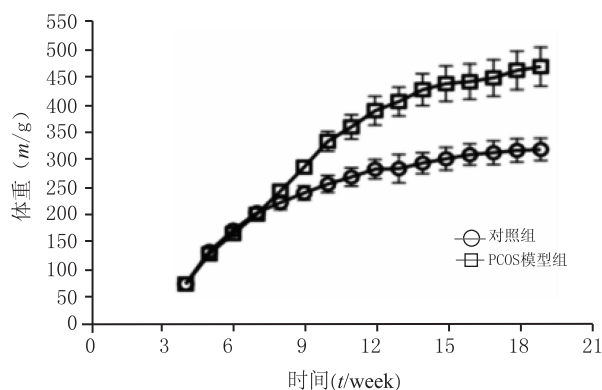


图 1 两组大鼠每周体重比较

2.3 大鼠脏器质量及脏器指数比较

模型组大鼠卵巢质量显著高于对照组($P <$

0.05);而模型组子宫及垂体质量以及子宫指数、垂体指数显著低于对照组($P<0.001$);对照组腹股沟脂肪显著低于模型组($P<0.001$);下丘脑质量在两组间无显著差异(表1)。

表1 各组大鼠脏器质量及脏器指数比较($\bar{x}\pm s$)

指标	对照组(n=8)	模型组(n=12)
下丘脑(g)	0.035±0.008	0.039±0.013
下丘脑指数(g/kg)	0.103±0.026	0.076±0.040
垂体(g)	0.017±0.002	0.013±0.001***
垂体指数(g/kg)	0.050±0.004	0.024±0.008***
子宫(g)	0.513±0.123	0.227±0.068***
子宫指数(g/kg)	1.531±0.360	0.4198±0.187***
卵巢(g)	0.141±0.0250	0.168±0.023*
卵巢指数(g/kg)	0.422±0.080	0.321±0.111
腹股沟脂肪(g)	1.188±0.368	2.682±0.939***
腹股沟脂肪指数(g/kg)	3.536±1.054	5.079±2.373

* $P<0.05$, *** $P<0.001$,与对照组比较

2.4 卵巢形态学变化

对照组大鼠卵巢上为正常发育的卵泡,可见多个不同发育阶段的卵泡,卵泡内颗粒细胞呈多层(图2A、2B)。模型组卵巢为多囊样改变,可见多个囊性扩张的卵泡,颗粒细胞层减少,膜细胞层增厚(图2C、2D)。

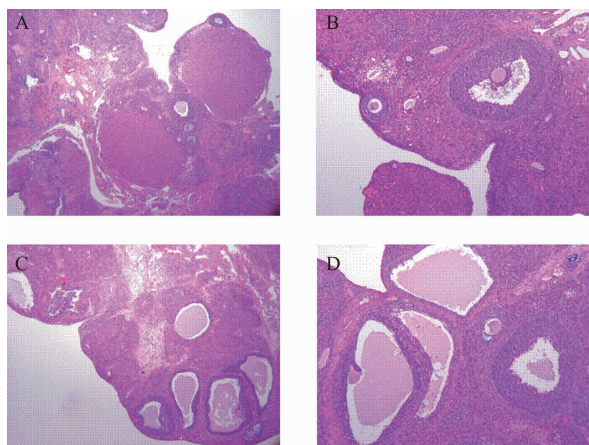


图2 各组大鼠卵巢组织病理变化的比较

2.5 大鼠腹腔糖耐量检测

各组大鼠空腹血糖浓度无明显差异,模型组大鼠在IPGTT后的15、30、60、90、120 min时检测的血糖值均极显著高于对照组($P<0.001$),见图3,模型组糖耐量曲线下面积(AUC)极显著增加($P<0.001$),见图4。

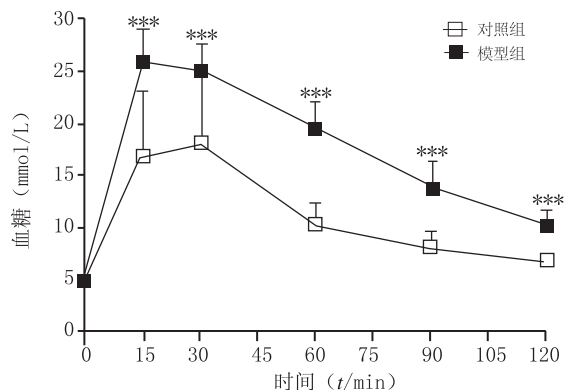


图3 各组大鼠IPGTT血糖比较

*** $P<0.001$,与对照组比较

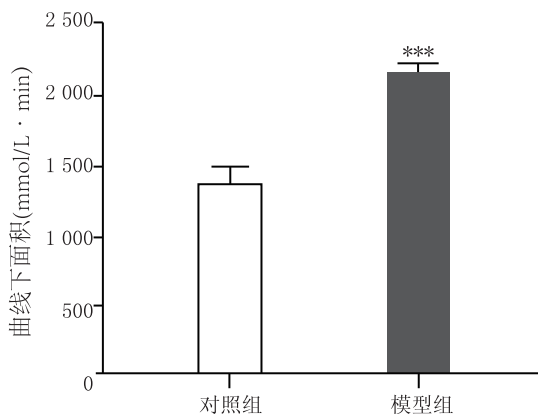


图4 各组大鼠糖耐量曲线下面积比较

*** $P<0.001$,与对照组比较

2.6 大鼠血脂代谢指标比较

由表2可见,PCOS模型组大鼠与对照组比较,TG及LDL均显著升高($P<0.05$),TC及HDL数值无差异。

表2 各组大鼠全身血清脂代谢水平变化

组别	例数	TG(c_B /mmol·L ⁻¹)	TC(c_B /mmol·L ⁻¹)	HDL(c_B /mmol·L ⁻¹)	LDL(c_B /mmol·L ⁻¹)
对照组	8	1.46±0.47	2.34±0.27	0.60±0.025	0.16±0.029
模型组	12	3.14±1.41*	2.24±0.21	0.62±0.086	0.20±0.033*

* $P<0.05$,与对照组比较

2.7 大鼠FINS及ISI变化比较

与对照组相比,模型组大鼠FINS活力显著升高($P<0.001$),ISI敏感性显著下降($P<0.001$),见

表3。

2.8 大鼠血清睾酮水平的变化

由表4可见,模型组血清睾酮水平显著高于对

照组($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠空腹胰岛素水平及胰岛素敏感指数的比较

组别	例数	FINS($z_B/mU \cdot L^{-1}$)	ISI
对照组	8	11.181 ± 2.98	-4.361 ± 0.30
模型组	12	25.798 ± 5.12***	-5.224 ± 0.345***

*** $P < 0.001$, 与对照组比较

表 4 各组大鼠血清睾酮水平的比较

组别	例数	睾酮($\rho_B/ng \cdot ml^{-1}$)
对照组	8	0.525 ± 0.07
模型组	12	1.525 ± 0.135*

* $P < 0.05$, 与对照组比较

3 讨论

PCOS 是影响育龄期女性最常见的生殖内分泌疾病,近年来的研究表明,该疾病与胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、心血管疾病等密切相关。有 50%~60% 的 PCOS 患者存在不同程度 IR, IR 促进高雄激素血症产生,又与高雄激素血症、高黄体生成素血症等相互作用,影响下丘脑-垂体-卵巢轴功能,导致卵泡发育异常。在一项长达 15 年的回顾性分析中, Hart 等的研究结果显示 PCOS 女性患上肥胖、糖尿病、高血压的概率要显著高于正常人群^[3]。在 Moran 等的 Meta 分析结果也表明 PCOS 女性患上 2 型糖尿病的概率是正常人群的 4 倍^[4]。PCOS 不仅是生殖内分泌疾病,更是一种治疗上较为棘手的复杂代谢性疾病。

目前,国内外报道的 PCOS 的动物模型常用造模方法^[5-10]中的雄激素(脱氢表雄酮、睾酮)造模法、孕激素联合人绒毛膜促性腺激素(HCG)造模法、胰岛素联合 HCG 造模法及高脂饲料法,均有不同程度的胰岛素抵抗,而雌激素(多采用戊酸雌二醇)造模法无明显胰岛素抵抗。多项研究^[11-13]表明来曲唑造模可达到与临床 PCOS 卵巢病理学改变最为接近的效果,来曲唑作为芳香化酶抑制剂,能够阻断雄激素向雌激素转化,导致类固醇激素生成紊乱,卵巢局部雄激素增加,导致持续不排卵以及多囊样改变,而来曲唑造模法糖脂代谢异常表现不明显。大量实验研究报道单独给大鼠喂高脂肪和高蔗糖饲料^[14-16],可以造成大鼠肥胖高血糖及高胰岛素血症,可复制出较稳定可靠的糖脂代谢异常大鼠模型,但其性激素水平变化及卵巢形态学改变不明显。因此,依据 PCOS 和糖脂代谢异常在发病学方面的联系,采用来曲唑灌胃联合高脂饲料喂养的方法,更适

合研究 PCOS 发病中生殖内分泌及糖脂代谢的异常。林莺等^[2]利用来曲唑配合 60% 高脂饲料成功建立了胰岛素抵抗型 PCOS 大鼠模型,朱磊等^[17]单纯利用不同高脂饲料构建了 SD 大鼠肥胖模型,发现 45% 高脂饲料较 60% 饲料具有建模快、建模率高的特点。Priya 等^[18]连续饲喂 6 周 45% 高脂饲料,肥胖模型大鼠生殖内分泌功能显著下降。因此,在本研究中运用来曲唑配合 45% 高脂饲料造模方法,在高脂饲料喂养第 6 周时,模型组体重较对照组已出现显著差异,在连续喂养 16 周后,成功确立了生殖内分泌及代谢异常的 PCOS 模型大鼠,造模率达到 66.67%。

在本研究中,在来曲唑联合高脂饲料喂养后,模型组大鼠动情周期失去规律性变化,阴道涂片并行瑞氏染色后见模型组大鼠均处于动情间期,仅见大量白细胞,可确定大鼠无排卵,模型组大鼠子宫质量减少,垂体及卵巢质量增加,卵巢 HE 染色可见较多囊状扩张的卵泡,而其颗粒细胞层数明显减少,此模型解剖及组织学改变与人 PCOS 相似,并且模型组大鼠的睾酮水平明显上升,这与临床 PCOS 内分泌状态相似,与国内外研究一致^[12-13,19]。在高脂饲养条件下,模型组大鼠体重及腹股沟脂肪质量极显著高于对照组,模型组大鼠 AUC、FINS、ISI、TG 及 LDL 等指标均高于对照组,这些表型符合临床胰岛素抵抗 PCOS 的代谢特点。

综上所述,利用来曲唑联合 45% 高脂饲料诱导的 PCOS 大鼠模型表现出高雄激素、排卵障碍、卵巢多囊样改变及糖脂代谢异常,是兼具研究 PCOS 内分泌及代谢异常的动物模型。

【参考文献】

- [1] ROSENFELD R L, EHRMANN D A. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome(PCOS): the hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited[J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(5): 467-520.
- [2] 林莺, 张宏, 黄鸣清, 等. 来曲唑配合高脂膳食诱导胰岛素抵抗多囊卵巢综合征大鼠代谢表型的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(3): 9-13.
- [3] HART R, DOHERTY D A. The potential implications of a PCOS diagnosis on a woman's long-term health using data linkage[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(3): 911-919.
- [4] MORAN L J, MISSO M L, WILD R A, et al. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Human Reprod Update*, 2010, 16(4): 347-363.
- [5] 李明明, 潘文, 康开彪, 等. 不同造模方法对大鼠多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗模型的影响[J]. *西部中医药*, 2015, 28

- (4);11-14.
- [6] PADMANABHAN V, VEIGA-LOPEZ A. Animal models of the polycystic ovary syndrome phenotype[J]. *Steroids*, 2013, 78(8):734-740.
- [7] 牡丹峰, 李雪莲. 多囊卵巢综合征动物模型的胰岛素抵抗表现[J]. *国际妇产科学杂志*, 2013, 40(1):24-26, 39.
- [8] PAIXAO L, RAMOS R B, LAVARDA A, et al. Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017, 15(1):12.
- [9] PAIXAO L, RAMOS R B, LAVARDA A, et al. Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017, 15:12.
- [10] MANNERAS L, CAJANDER S, HOLMANG A, et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(8):3781-3791.
- [11] GOZUKARA I, DOKUYUCU R, ÖZGÜR T, et al. Histopathologic and metabolic effect of ursodeoxycholic acid treatment on PCOS rat model [J]. *Gynecolog Endocrinol*, 2016, 32(6):492-497.
- [12] MALIQUEO M, SUN M, JOHANSSON J, et al. Continuous administration of a P450 aromatase inhibitor induces polycystic ovary syndrome with a metabolic and endocrine phenotype in female rats at adult age[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(1):434-445.
- [13] SKARRA D V, HERNANDEZ-CARRETERO A, RIVERA A J, et al. Hyperandrogenemia induced by letrozole treatment of pubertal female mice results in hyperinsulinemia prior to weight gain and insulin resistance[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(9):2988-3003.
- [14] 韩静, 余俊达, 潘秋, 等. 四种高脂饲料诱发胰岛素抵抗的实验研究[J]. *江西中医学院学报*, 2010, 22(4):64-66.
- [15] 张涛, 刘源, 赵爽, 等. 不同高能饮食诱发胰岛素抵抗大鼠模型比较[J]. *实验动物科学*, 2011, 28(3):29-33.
- [16] RESSLER I B, GRAYSON B E, ULRICH-LAI Y M, et al. Diet-induced obesity exacerbates metabolic and behavioral effects of polycystic ovary syndrome in a rodent model[J]. *Am J Physiol-Endocrin Metab*, 2015, 308(12):E1076-E1084.
- [17] 朱磊, 路瑛丽, 冯连世, 等. 不同配方高脂饲料构建 SD 大鼠肥胖模型的实验研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2016, 35(7):642-647.
- [18] BALASUBRAMANIAN P, JAGANNATHAN L, MAHAL-EY R E, et al. High fat diet affects reproductive functions in female diet-induced obese and dietary resistant rats [J]. *J Neuroendocrinol*, 2012, 24(5):748-755.
- [19] REZVANFAR M A, SHOJAEI SAADI H A, GOOSHE M, et al. Ovarian aging-like phenotype in the hyperandrogenism-induced murine model of polycystic ovary [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014:1-10.

【收稿日期】 2018-12-15 【修回日期】 2019-04-22

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 405 页)

- [27] NIAN Z Q, SUN Z Q, YU L X, et al. Fat-specific protein 27 undergoes ubiquitin-dependent degradation regulated by triacylglycerol synthesis and lipid droplet formation [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(13):9604-9615.
- [28] FUJIMOTO T, OHSAKI Y. Proteasomal and autophagic pathways converge on lipid droplets [J]. *Autophagy*, 2006, 2(4):299-301.
- [29] OUMET M, MARCEL Y L. Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(3):575-581.
- [30] TILL A, LAKHANI R, BURNETT S F, et al. Pexophagy: the selective degradation of peroxisomes [J]. *Int J Cell Biol*, 2012, 2012:512721.
- [31] SARGENT G, VAN ZUTPHEN T, SHATSEVA T, et al. PEX2 is the E3 ubiquitin ligase required for pexophagy during starvation [J]. *J Cell Biol*, 2016, 214(6):677-690.
- [32] JAIN A, LAMARK T, SJØTTEM E, et al. P62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(29):22576-22591.

【收稿日期】 2019-06-23 【修回日期】 2019-07-23

【本文编辑】 李睿旻