· 基础研究 ·

三种卵巢早衰大鼠造模方法比较研究

王　洋[1, 2]　张　斐[1, 2]　许洁夏[1]　朱景茹[1, 2]　徐云浩[1, 2]　王　敏[1]　李灿东[1, 2]

摘要　目的　探讨建立简洁稳定高效的卵巢早衰（POF）的大鼠模型。**方法**　将 40 只具有规律动情周期的 SD 大鼠按随机数字表法分为正常组、环磷酰胺（CTX）组、二氧化乙烯基环己烯（VCD）组、雷公藤（TG）组，每组 10 只。大鼠适应性喂养 1 周后，分别采用 CTX、VCD、TG 造模。在造模过程中观察大鼠的一般情况和动情周期，每周检测大鼠体重，采用 HE 染色在光镜下观察卵巢组织形态变化；采用 TUNEL 法检测卵巢颗粒细胞凋亡情况；采用 ELISA 检测大鼠血清促卵泡激素（FSH）、雌二醇（E_2）含量；采用实时荧光定量 PCR 法（RT-PCR）和 Western Blot 检测卵巢组织 B 细胞淋巴瘤 -2（Bcl-2）、促凋亡蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 assaciated X protein，Bax）mRNA 及蛋白表达水平。**结果**　与正常组比较，各模型组大鼠出现动情周期紊乱，卵巢组织缺血苍白伴不同程度的萎缩，卵泡数减少、卵巢颗粒细胞凋亡率均升高（P<0.05，P<0.01），血清 FSH 含量（除 TG 组外）均明显升高（P<0.01），血清 E_2 含量均明显降低（P<0.01），Bcl-2/Bax mRNA 和蛋白表达均降低（P<0.05，P<0.01）；与 VCD、TG 组比较，CTX 组大鼠体重减轻（P<0.05），成熟卵泡率明显减少（P<0.01），FSH 含量显著降低（P<0.05）。**结论**　CTX 诱导建立 POF 大鼠模型，造模方法简便易行，成功率较高，造模效果优于 VCD 和 TG，是更为理想的 POF 造模方法。

关键词　卵巢早衰；环磷酰胺；二氧化乙烯基环己烯；雷公藤；实验模型

Comparative Study on Three Modeling Methods of Premature Ovarian Failure Rats

WANG Yang[1, 2], ZHANG Fei[1, 2], XU Jie-xia[1], ZHU Jing-ru[1, 2], XU Yun-hao[1, 2], WANG Min[1], and LI Can-dong[1, 2]　*1 College of Traditional Chinese Medicine*, *Fujian University of Chinese Medicine*, *Fuzhou*（*350122*）; *2 Fujian Provincial University Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome Research*, *Fuzhou*（*350122*）

ABSTRACT　Objective　To observe the establishment of a simple, stable and efficient rat model of premature ovarian failure（POF）. **Methods**　Forty SD rats with regular estrous cycles were divided into normal group, cyclophosphamide（CTX）group, vinylcyclohexene dioxide（VCD）group, and *Tripterygium wilfordii*（TG）group according to random number table, 10 in each group. After 1 week of adaptive feeding, the rats were modeled with CTX, VCD, and TG. During the modeling process, the general condition and estrous cycle of the rats were observed. The body weight of the rats was detected every week. The morphological changes of ovarian tissue were observed by HE staining under light microscope. The apoptosis of ovarian granulosa cells was detected by TUNEL method. Serum levels of follicle-stimulating hormone（FSH）and estradiol（E_2）in rats were detected by ELISA. Real-time quantitative PCR（RT-PCR）and Western Blot were used to detect mRNA and protein expression levels of B-cell lymphoma-2（Bcl-2）and Bcl-2 associated X protein（Bax）. **Results**　Compared with normal group, estrous cycle disorder, ovarian tissue ischemia and pallor with different degrees of atrophy, decreased follicle number, increased ovarian granulosa cell apoptosis rate（P<0.05, P<0.01）, serum FSH content significantly increased（except TG group）（P<0.01）, and significantly decreased serum E_2 content（P<0.01）, decreased mRNA and protein expressions of Bcl-2/Bax（P<0.05, P<0.01）occurred in each model group. Compared with VCD and TG groups, the body weight of rats was reduced（P<0.05）, the rate of mature follicles significantly decreased（P<0.01）,

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（No.82004257）；福建省自然科学基金资助项目（No.2021J01933）
作者单位：1. 福建中医药大学中医学院（福州 350122）；2. 福建省高校中医证研究重点实验室（福州 350122）
通讯作者：李灿东，Tel：0591-22861513，E-mail：fjzylcd@126.com
DOI：10.7661/j.cjim.20220820.307

中国中西医结合杂志

and the content of FSH was significantly lowered（P<0.05）in CTX group. **Conclusions** CTX was a simple and easy method to establish rat model of POF with higher success rate. The modeling effect of CTX was better than that of VCD and TG and became a more ideal method of POF modeling.

KEYWORDS premature ovarian failure；cyclophosphamide；ethylene oxide cyclohexene；*Tripterygium wilfordii*；experimental model

卵巢早衰（premature ovarian failure，POF）是一种好发于 40 岁之前女性的的妇科内分泌疾病，其特征是在出现卵巢功能衰退，伴随着闭经、血清促卵泡激素（follicle-stimulating hormone，FSH）升高和雌二醇（estradiol，E_2）降低等表现[1]。多发于早发性卵巢功能不全（premature ovarian insufficiency，POI）的末期阶段[2]，POF 会引起类围绝经综合征的表现，也会引起骨质疏松、缺血性心脏病、自身免疫性等疾病，严重影响了女性的生育，对女性的身心和生殖健康产生严重的危害[3，4]。引起 POF 发病的原因较多，自身免疫、遗传、环境、药物和应激因素等都可能引起卵巢功能的减退，同时发病机制尚未完全明确[5，6]。因此模拟 POF 发病病因建立合适的 POF 动物模型具有重要的意义。目前 POF 的动物模型涉及化疗药物造模法、半乳糖代谢造模法、化学损伤物质造模法、基因敲除造模法等多种造模方法，造模效果不一[7]，本研究拟对目前最常用的 3 种化疗药物造模法环磷酰胺（cytoxan，CTX）造模法、二氧化乙烯基环己烯（vinylcyclohexene dioxide，VCD）造模法、雷公藤（*Tripterygium wilfordii*，TG）造模法进行对比性研究，力求找到更理想的 POF 动物模型，为 POF 的实验研究提供参考价值。

材料与方法

1 动物 SPF 级 2 月龄雌性 SD 大鼠 40 只，购自浙江杭州医学院［实验动物合格证号：SCXK（浙）2019-0002］。验全程均在福建中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障系统中进行操作。适应性喂养 1 周后按随机数字表法分为正常、CTX、VCD、TG 组，每组 10 只。饲养温度（20±2）℃，湿度 40%~60%，光照环境为 12 h 周期性日夜交替，自由摄食饮水。所有实验操作均符合福建中医药大学实验动物伦理委员会要求（No.2021050）。

2 药物 CTX（每支 5 g，上海源叶生物科技有限公司，货号：X22D8Y51136）；VCD（每支 100 mL，美国 Sigma-Aldrich 公司，货号：BCBW6333）；TG（每片 10 mg，宿州亿帆药业有限公司，货号：200504）。参照文献［8-10］，以上药物用生理盐水配置成本实验所需浓度。

3 试剂 FSH 试剂盒（上海酶联生物科技有限公司，货号：20210120A）；E_2 试剂盒（上海酶联生物科技有限公司，货号：20210121A）；TUNEL 试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，货号：050621210901）；Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒（湖南艾科瑞生物工程有限公司，货号：A3A1201）；SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒（湖南艾科瑞生物工程有限公司，货号：A3A1395）；B 细胞淋巴瘤 -2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体、促凋亡蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 assaciated X protein，Bax）抗体（均为武汉三鹰生物技术有限公司，货号：00100789、00102164）；β-actin（美国 Cell Siganling 公司，货号：4970S）；山羊抗兔 IgG 二抗（美国 Immuno Way 公司，货号：RS0002）。

4 仪器 Veriti 基因扩增仪（美国 ABI）；Quan Studio Flex 荧光定量 PCR 仪（美国 ABI）；Infinite M200 Pro 多功能酶标仪（奥地利 TECAN）；Chemi Doc XRS+ 化学发光凝胶成像系统（美国 Bio-Rad）。

5 造模方法 正常组予 10 mL/kg 的生理盐水灌胃并腹腔注射 15 天；CTX 组予 10 mL/kg 生理盐水灌胃 15 天，第 1 天 50 mL/kg CTX 注射液首次腹腔注射，再连续每天 8 mg/kg CTX 注射液腹腔注射 15 天[8]；VCD 组每天 160 mg/kg VCD 注射液腹腔注射 15 天，并予 10 mL/kg 生理盐水灌胃 15 天[9]；TG 组予 75 mg/kg TG 混悬液灌胃，并予 10 mL/kg 生理盐水行腹腔注射，连续 15 天[10]。根据阴道脱落细胞图片，若显示大鼠动情周期紊乱提示造模成功[11]。造模结束后，在麻醉状态下收集大鼠腹主动脉血及双侧卵巢，大鼠卵巢在生理盐水中漂洗后置于滤纸上吸干，使用电子秤称量双侧卵巢，将左侧卵巢浸入 4% 多聚甲醛溶液中固定，右侧卵巢切分两份，分别装入 2 个冻存管，置于 -80 ℃冰箱保存。

6 观察项目及检测方法

6.1 一般情况及动情周期观察 观察大鼠的皮毛、活动情况、大小便和体重变化并记录。自造模第 1 天起，每天同一时间对大鼠阴道脱落细胞进行采集，来观察大鼠动情周期变化，动情周期 >5 天为大鼠动情周期紊乱[12]。各组大鼠动情周期紊乱率（%）= 动

情周期紊乱大鼠只数 / 各组大鼠总只数 ×100%。

6.2　卵巢组织形态学观察　取出卵巢，剔除脂肪组织后，采用体式显微镜进行拍照。放入 4% 多聚甲醛溶液中固定脱水、透明、包埋、切片（厚度 4μm）、HE 染色，光镜下观察卵巢形态，计算各级卵泡数量，各级卵泡率（%）= 每只大鼠各级卵泡数 / 每只大鼠总卵泡数 x100%。

6.3　血清 FSH、E_2 检测　全血静置 1 h，离心机 4 ℃，3 000 r/min 离心 15 min，抽取上层血清，根据 ELISA 试剂盒说明书检测血清 FSH、E_2。

6.4　卵巢颗粒细胞凋亡　采用 TUNEL 法检测，石蜡切片（4μm），用蛋白酶 K 溶液进行孵育，滴加末端脱氧核糖核酸转移酶避光反应，避光封片、显微镜拍照。计算卵巢颗粒细胞的凋亡率。

6.5　卵巢组织 Bax、Bcl-2 mRNA 检测　采用实时荧光定量 PCR 法（real-time PCR，RT-PCR）检测。用 Trizol 提取卵巢组织中总 RNA，反转录为 cDNA。引物委托湖南艾科瑞生物工程有限公司制备，序列见表 1。内参基因选用 β-actin，将各扩增反应产生的 Ct 值带入 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法计算，所得结果作为目的基因的 mRNA 相对表达量。

表 1　基因引物序列

基因名称	引物序列	长度（bp）
Bax	F：5’-CAGGACGCATCCACCAAGAAG-3’	137
	R：5’-GCTGCCACACGGAAGAAGAC-3’	
Bcl-2	F：5’-GACTGAGTACCTGAACCGGCATC-3’	135
	R：5’-CTGAGCAGCGTCTTCAGAGACA-3’	
β-actin	F：5’-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3’	150
	R：5’-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3’	

6.6　卵巢组织 Bax、Bcl-2 蛋白检测　采用免疫印迹法检测卵巢组织中 Bax、Bcl-2 的蛋白表达水平。使用裂解液提取卵巢组织中总蛋白，采用 BCA 法测定总蛋白浓度，随后进行凝胶电泳、转膜、封闭。兔抗多克隆 Bax 抗体、兔抗多克隆 Bcl-2 抗体均按 1∶5 000 的比例稀释，兔抗 β-actin 内参抗体按 1∶1 000 的比例稀释，4 ℃过夜，1∶2 000 稀释的 HRP 标记的二抗室温 45 min 孵育后进行化学发光法显影。Image J 软件对显影条带进行灰度分析，将目的蛋白与 β-actin 灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达水平。

7　统计学方法　采用 SPSS 22.0 统计软件，计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 *LSD* 或 *SNK-q* 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1　各组大鼠一般情况及体重比较（表 2）　正常组大鼠反应迅速、毛发色白浓密、活动度正常、二便正常，体重增加；CTX、VCD、TG 组造模后活动度均减少并出现不同程度的脱毛、便溏等变化。VCD、TG 组大鼠体重亦有增加，而 CTX 组大鼠体重下降。与正常组比较，CTX 组造模后体重减轻（$P<0.05$），与 CXT 组造模后比较，TG、VCD 组大鼠体重增加（$P<0.05$）。

表 2　各组大鼠造模前后体重比较（g，$\bar{x} \pm s$）

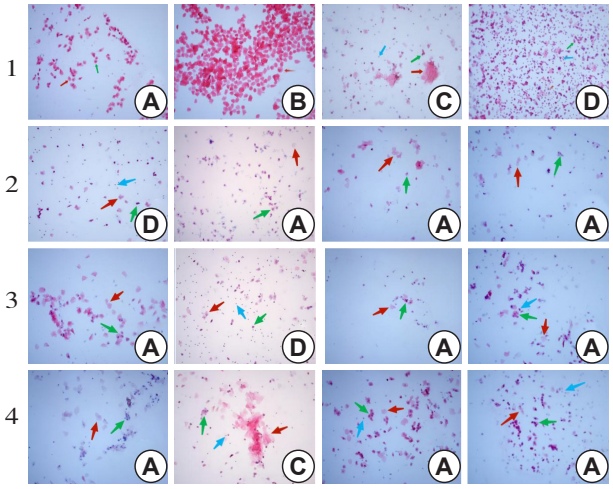
组别	*n*	体重	
		造模前	造模后
正常	10	253.20 ± 13.33	300.40 ± 17.05
CTX	10	259.33 ± 9.71	257.83 ± 23.42*
VCD	10	278.28 ± 14.86	285.71 ± 28.61△
TG	10	271.00 ± 11.25	295.50 ± 17.00△

注：与正常组比较，*$P<0.05$；与 CTX 组比较，△$P<0.05$

2　各组大鼠动情周期变化比较（图 1）　正常组大鼠动情周期规律，包括动情前期、动情期、动情后期和动情间期。大鼠处于动情前期时，阴道脱落细胞中有核上皮细胞相间分布和片状无核角化细胞，数量相近；大鼠处于动情期时，偶尔有少量上皮细胞存在，角化细胞占绝大多数；大鼠处于动情后期时，较多的角化细胞和大量的白细胞共存，上皮细胞数量较少；动情间期时，有大量白细胞，上皮细胞数量也会增多，角化细胞数量逐渐减少，此时上皮细胞与角化细胞数量相当。各模型组大鼠动情周期紊乱，CTX、VCD、TG 均出现动情前期延长。造模结束后，正常组大鼠动情周期紊乱率为 0%，CTX、TG 组均为 70%（7/10），VCD 组为 30%（3/10）。

3　各组大鼠卵巢形态学观察（图 2，表 3）　正常组大鼠卵巢颗粒饱满色泽红润，各模型组大鼠卵巢缺血苍白，且有不同程度的萎缩，其中 CTX 组卵巢萎缩最明显，TG 组次之。光学显微镜观察各组卵巢组织病理形态可见，正常组卵巢皮质区各级卵泡、黄体相间分布，比例正常；CTX 组卵巢皮质区出现大量闭锁卵泡，初次级卵泡数量减少，成熟卵泡数量减少，黄体缩小；VCD 组卵巢皮质区整体卵泡数量减少，初次级卵泡数量减少，成熟卵泡数量减少，闭锁卵泡数量增多，黄体占比增多；TG 组卵巢皮质区，成熟卵泡数量减少，闭锁卵泡数量增多，黄体占比变化不明显。与正常组比较，CTX、VCD 组初级卵泡率，成熟卵泡率均明显减少（$P<0.05$，

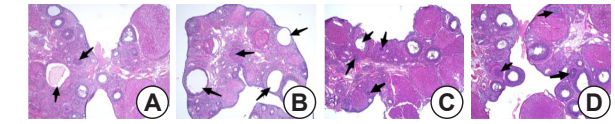
中国中西医结合杂志



注：1 为正常组；2 为 CTX 组；3 为 VCD 组；4 为 TG 组；A 为动情前期；B 为动情期；C 为动情后期；D 为动情间期；红色箭头为角化细胞；绿色箭头为上皮细胞；蓝色箭头为白细胞

图 1 各组大鼠动情周期阴道脱落细胞比较 （HE，×100）

P<0.01），闭锁卵泡率均增多（*P*<0.05，*P*<0.01）；与 CTX 组比较，VCD、TG 组成熟卵泡率增多（*P*<0.01），TG 组闭锁卵泡率明显减少（*P*<0.01）；与 VCD 组比较，TG 组初次级卵泡率增多，闭锁卵泡率明显减少（*P*<0.01）。



注：A 为正常组；B 为 CTX 组；C 为 VCD 组；D 为 TG 组；箭头为闭锁卵泡

图 2 大鼠卵巢组织病理形态图（HE，×50）

表 3 各组大鼠各级卵泡数量变化比较（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	*n*	初级卵泡率	成熟卵泡率	闭锁卵泡率
正常	10	67.60 ± 3.46	22.39 ± 1.06	10.01 ± 2.50
CTX	10	58.46 ± 4.07*	6.79 ± 1.55**	34.74 ± 3.85*
VCD	10	56.67 ± 5.77*	11.43 ± 2.47**△	31.90 ± 3.30**
TG	10	64.81 ± 3.21▲	11.11 ± 0.57**△	24.07 ± 3.21*△▲

注：与正常组比较，*P<0.05，**P<0.01；与 CTX 组比较，△P<0.01；与 VCD 组比较，▲P<0.01

4 各组大鼠血清 FSH、E_2 含量比较（表 4） 与正常组比较，CTX、VCD 组血清 FSH 含量明显升高，各模型组血清 E_2 含量均明显降低（*P*<0.01）；与 CTX 组比较，VCD、TG 组血清 FSH 含量均明显降低，TG 组血清 E_2 含量明显升高（*P*<0.01）；与 VCD 组比较，TG 组血清 FSH 含量明显降低，血清 E_2 含量明显升高（*P*<0.01）。

5 各组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率比较（表 5） 与正常组比较，CTX、VCD、TG 组卵巢颗粒细胞凋亡率均升高（*P*<0.05，*P*<0.01）。3 模型组间比较，差异均无统计学意义（*P*>0.05）。

表 4 各组大鼠血清 FSH、E_2 含量比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	*n*	FSH（IU/L）	E_2（pmol/L）
正常	10	6.47 ± 0.65	41.89 ± 4.73
CTX	10	9.71 ± 0.89*	16.43 ± 3.05*
VCD	10	8.29 ± 1.22*△	19.57 ± 2.20*
TG	10	7.13 ± 1.73△▲	29.99 ± 5.40*△▲

注：与正常组比较，*P<0.01；与 CTX 组比较，△P<0.01；与 VCD 组比较，▲P<0.01

表 5 各组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率比较（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	*n*	凋亡率
正常	10	3.12 ± 0.07
CTX	10	14.38 ± 1.47**
VCD	10	10.74 ± 3.72*
TG	10	14.32 ± 2.71**

注：与正常组比较，*P<0.05，**P<0.01

6 各组大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2 mRNA 表达水平比较（表 6） 与正常组比较，各模型组大鼠卵巢 Bcl-2、Bcl-2/Bax mRNA 表达水平降低（*P*<0.05，*P*<0.01）；与 VCD 组比较，TG 组 Bax mRNA 表达水平降低（*P*<0.05）。

表 6 各组大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2 mRNA 表达比较 （$\bar{x}\pm s$）

组别	*n*	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
正常	10	1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.02	1.00 ± 0.07
CTX	10	1.25 ± 0.30	0.79 ± 0.03*	0.66 ± 0.15**
VCD	10	1.02 ± 0.12	0.78 ± 0.09*	0.78 ± 0.08*
TG	10	0.88 ± 0.31△	0.63 ± 0.18*	0.74 ± 0.07*

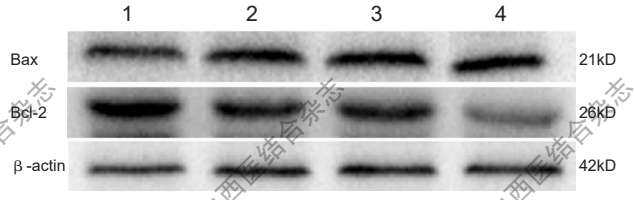
注：与正常组比较，*P<0.05，**P<0.01，与 VCD 组比较，△P<0.05

7 各组大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达比较（表 7，图 3） 与正常组比较，CTX、VCD 组大鼠卵巢 Bax 蛋白表达升高（*P*<0.05），TG 组大鼠卵巢 Bcl-2 蛋白表达降低（*P*<0.05），各模型组大鼠卵巢 Bcl-2/Bax 蛋白表达比值均下降（*P*<0.05）。

表 7 各组大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平比较 （$\bar{x}\pm s$）

组别	*n*	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
正常	10	0.98 ± 0.05	0.46 ± 0.06	0.47 ± 0.08
CTX	10	1.37 ± 0.22*	0.36 ± 0.06	0.27 ± 0.08*
VCD	10	1.37 ± 0.21*	0.33 ± 0.06	0.25 ± 0.09*
TG	10	1.25 ± 0.17	0.31 ± 0.09*	0.25 ± 0.07*

注：与正常组比较，*P<0.05



注：1 为正常组；2 为 CTX 组；3 为 VCD 组；4 为 TG 组

图 3 各组大鼠卵巢组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达电泳图

中国中西医结合杂志

讨　论

POF 是年龄小于 40 岁的女性由于医源性损伤或卵巢内卵泡耗竭而引发的卵巢功能衰竭 [12]。随着肿瘤发病的年轻化，临床上由于放化疗副作用导致的年轻女性卵巢功能过早衰竭约占 POF 患病人群的 25%，是生殖医学界治疗的难题 [13-15]。中医学典籍中无“卵巢早衰”这一病名，但根据其月经异常、生育能力减弱等症状，可将其归于“闭经”“不孕”“月经过少”等范畴，以肾虚为主要病变基础。中医药治疗 POF 具有明显的特色和优势，能够提高患者免疫功能、减轻化疗所带来的的毒副作用，缓解化疗后不适症状，近年来，中医药对卵巢癌药效机制的现代药理学研究也越来越多，为中医药治疗 POF 提供了一定的科学依据。因此，研究化疗药物诱导的 POF 模型对研究中医药作用机制具有重要的意义。本研究选用了生长发育较快，繁殖能力强且内分泌特征也与人类较为相似的 SD 雌性大鼠为研究对象 [16]，分别采用 CTX、VCD、TG 这 3 种最常见的化疗药物模型进行对比。观察造模大鼠一般情况，各模型组的大鼠均表现出活动度降低、脱毛、便溏等化疗药物导致的典型症状，体重亦均有减轻，其中以 CTX 组体重下降最为明显；在动情周期的变化上，各模型组亦都出现动情周期紊乱，其中 CTX、TG 组的动情周期紊乱率最高；卵巢外观形态的改变和病理学切片光镜下观察可以直观地发现 POF 大鼠发病的具体情况，因此是判断 POF 模型是否成功的直接相关指标之一 [17]，从卵巢外观改变看，各模型组卵巢缺血苍白，且有不同程度的萎缩，其中 CTX 组卵巢萎缩也是最明显；光镜下亦观察到各模型组成熟卵泡减少，闭锁卵泡增多。整体说明建立 POF 大鼠模型较为成功，同时这些症状符合中医学“肾虚”这一病理特点，与 VCD、TG 比较，CTX 的造模效果最好。

FSH 在人体中是由垂体前叶分泌，作用是促进卵泡生长发育和成熟，并与 E_2 的分泌也密切相关 [18]。FSH 的作用不仅为卵泡的正常生长发育提供良好的微环境，同时的调控着卵泡的生长发育，因此 FSH 与多囊卵巢综合征、POF 的疾病密切相关，临床发现 POF 患者 FSH 水平明显升高，并伴有促黄体生成素升高，E_2 水平明显降低 [19，20]。FSH 和 E_2 是 POF 诊断标准中的相关指标，高水平的 FSH 提示卵巢储备降低，而低水平的 E_2 则提示卵泡的生长发育速度减慢。本研究显示，各模型组在服用化疗药物后处于正常生长发育的卵泡颗粒细胞大量凋亡，血清 FSH 含量均升高，血清 E_2 含量明显降低，各模型组大鼠血清中所分泌的 E_2 和 FSH 变化特点与临床 POF 患者表现出来的内分泌特征高度吻合。而 CTX 对 POF 模型大鼠血清 FSH 和 E_2 含量变化的影响程度大于 VCD、TG 组。

现代医学认为，POF 是由各种原因卵巢内卵泡池的储备减少或卵泡闭锁加速，卵巢组织内各级卵泡消耗殆尽，卵巢储备功能下降，卵泡功能失调而引发的，而颗粒细胞及卵母细胞异常凋亡引起的卵泡闭锁则是而 POF 发病的病理基础 [21]。Bcl-2 的作用是促进颗粒细胞分裂，抑制颗粒细胞的凋亡。Bax 与 Bcl-2 是同源且相互对立的一对基因，Bax 蛋白可与 Bcl-2 形成异二聚体，对 Bcl-2 产生阻抑作用，诱导凋亡或抑制凋亡过程，两者的比例关系是细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素 [22，23]。本研究表明，各模型组的凋亡率均高于正常组，相关凋亡基因和蛋白 Bcl-2 与 Bax 的比值均降低，其中，CTX 组凋亡率较高，相关凋亡基因和蛋白 Bcl-2 与 Bax 的比值降低更明显。

综上所述，本研究证实 3 种化疗药物诱导建立 POF 大鼠模型均具有一定的可行性，且符合 POF 的中医病理特点，通过大鼠一般情况、动情周期、卵巢形态学观察、血清 FSH、E_2 含量变化、卵巢组织 Bax、Bcl-2 基因及蛋白等表达比较发现，以 CTX 造模效果最佳，因此认为，CTX 造模可作为探讨 POF 发病机制和临床用药研究的较为理想的动物模型建立方法。

利益冲突：无。

参 考 文 献

［1］ Jankowska K. Premature ovarian failure[J]. Menopause Rev，2017，16（2）：51–56.

［2］ European Society for Human Reproduction and Embryology（ESHRE）Guideline Group on POI，Webber L，Davies M，et al. ESHRE Guideline：management of women with premature ovarian insufficiency[J]. Hum Reprod，2016，31（5）：926–937.

［3］ 张秀，鲁雅，王佩娟 . 卵巢早衰的病因研究进展 [J]. 湖北中医药大学学报，2017，19（1）：118–120.

［4］ Zhang X，Lu Y，Wang PJ. Progress of study on pathogenesis of premature ovarian failure[J]. J Hubei Univ Chin Med，2017，19（1）：118–120.

［5］ Slopien R，Warenik SA. Premature ovarian

中国中西医结合杂志

failure：diagnosis and treatment[J]. Clin Exp Obstet Gynecol，2014，41（6）：659–661.

［6］ 严大为，周莉，孙祖越 . 卵巢功能早衰动物模型的建立及其评价指标的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2015，29（3）：486–492.

［7］ Yan DW，Zhou L，Sun ZY. Research progress in establishing animal models of premature ovarian failure and its evaluation indices[J]. Chin J Pharmacol Toxicol，2015，29（3）：486–492.

［8］ 刘慧莹，任春娥，姜爱芳 . 两种造模方法导致大鼠卵巢早衰模型的比较研究 [J]. 中国妇幼保健，2015，30（28）：4869–4872.

［9］ 王吉菊，刘建，黄旭春，等 . 养阴舒肝颗粒对 VCD 诱导卵巢功能下降大鼠 Bcl-2，Bax 及 Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（20）：159–163.

［10］ 刘柳青，刘雁峰，潘雪，等 . 补肾调肝方对卵巢储备功能下降大鼠卵巢 / 海马功能及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响 [J]. 环球中医药，2021，14（5）：822–829.

［11］ 朱景茹，陈姝婷，卓泽伟，等 . 补肾健脾方对卵巢早衰大鼠下丘脑 – 垂体 – 性腺轴功能的影响 [J]. 福建中医药，2021，52（2）：14–17.

［12］ 王昭，赵晓旻，刘鹏飞，等 . 基于颗粒细胞自噬探讨补肾养精汤对卵巢储备功能降低模型大鼠卵巢储备功能的影响 [J]. 中药药理与临床，2022，38（2）：169–173.

［13］ 陈峰荣，周彤，尚坤 . 二至丸对卵巢早衰大鼠治疗作用及机制的实验研究 [J]. 中华中医药学刊，doi：10.13193 /j.issn.1673 -7717.2022.07.036

［14］ 李慧，王双杰，叶雪，等 . 卵巢早衰动物模型的建立 [J]. 中国医药生物技术，2020，15（6）：572–576.

［15］ 张永芳，马会明，王永峰，等 . 环磷酰胺所致卵巢早衰大鼠模型的研究 [J]. 宁夏医科大学学报，2015，37（8）：874–878.

［16］ Zhao XJ，Huang YH，Yu YC，et al. GnRH antagonist cetrorelix inhibits mitochondria-dependent apoptosis triggered by chemotherapy in granulosa cells of rats[J]. Gynecol Oncol，2010，118（1）：69–75.

［17］ 马瑞，崔晓萍，李祖昂，等 . 卵巢早衰动物模型的研究进展 [J]. 宁夏医科大学学报，2021，43（3）：310–314.

［18］ 中华中医药学会中药实验药理专业委员会 . 雌性不孕症动物模型制备规范（草案）[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（19）：25–30.

［19］ 梁策，高慧，张腾 . 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠性激素水平和卵巢 Bcl-2/Bax 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（19）：100–104.

［20］ Atanabe T，Yamaguchi N，Akiba T，et al. Effects of cyclophosphamide on spermatogenesis[J]. Toxicol Sci，2000，25（9）：129–137.

［21］ 滕秀香，李培培，姚海洋，等 . 加减毓麟汤治疗卵巢早衰脾肾阳虚证的临床研究 [J]. 中华中医药杂志，2017，32（8）：3849–3851.

［22］ Gracia CR，Sammel MD，Freeman E，et al. Impact of cancer therapies on ovarian reserve[J]. Fertil Steril，2012，97（1）：134–140.

［23］ 刘雪玲，胡春艳，刘港，等 . 卵巢早衰发病机制及相关治疗机制的最新研究进展 [J]. 江苏大学学报（医学版），2021，31（6）：541–548.

（收稿：2022–05–02　在线：2022–09–09）

责任编辑：段碧芳

英文责编：张晶晶

中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志