

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2008)02-0119-04

卵泡刺激素受体在成年化疗大鼠卵巢中的表达

罗璐¹ 杨冬梓¹ 王箴² 莫亚勤¹ 杨炜敏³ (¹ 中山大学第二附属医院妇产科, 广东 广州 510120, ² 深圳市南山区蛇口人民医院儿科, 广东 深圳 518067, ³ 中山大学附属第一医院黄埔院区妇产科, 广东 广州 510700)

In vivo expression of FSHR in rats ovaries after exposure to cyclophosphamide

LUO Lu¹, YANG Dong-Zi¹, WANG Zhen², MO Ya-Qin¹, YANG Wei-Min³

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China, ²Shekou People's Hospital, Shenzhen 518067, China, ³Department Of Obstetrics and Gynecology, Huangpu Division, First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510700, China

【Abstract】 AIM : To examine the pathological changes of ovaries and the effects of the expression of mRNA transcripts of FSH receptor in ovaries of the rats exposed to chemotherapeutic drugs.

METHODS : Twenty rats were randomly assigned into two groups : cyclophosphamide group and normal saline group, who received a single injection of the saline or chemotherapeutic agent cyclophosphamide. Animals were sacrificed after 8 weeks of treatment. Ovarian pathological changes were observed and follicle number was counted. FSH mRNA was quantified using real-time PCR. **RESULTS** : Cyclophosphamide had a detrimental effect on ovarian stromal function. The rats in cyclophosphamide group developed a lower proportion of antral follicles compared with control group ($P < 0.05$). FSHR mRNA content was significantly lower in the cyclophosphamide treatment group than in the control group ($P < 0.05$). There was a significant positive correlation between FSHR and antral proportion and a significant negative correlation between FSHR and duration for estrous cycle ($P < 0.05$). **CONCLUSION** : In ovaries exposed to cyclophosphamide lower, there is lower level of FSHR, which may be involved in antral follicle development blockade and may be associated with prolonged estrous cycle.

【Keywords】 drug therapy ; ovary ; receptors , FSH ; FQ-PCR

收稿日期 2007-09-06 ; 接受日期 2007-10-06

基金项目 : 中国博士后基金(20060390755) ; 国家教育部博士点基金资助项目(20050558093) ; 广东省科技计划项目(2007B080701014) ; 中山大学“临床医学研究5010计划项目(2007-017)”

通讯作者 : 杨冬梓. Tel : (020)87334217 Email : yangdz@mail.sysu.edu.cn

作者简介 : 罗璐. 博士后, 讲师. Tel : (020)87334217 Email : jessicaluolu@sina.com

【摘要】 目的 : 探讨化疗药物所致的卵巢病理损伤以及FSHR在化疗卵巢中的表达。方法 : 将成年大鼠随机分为两组 : 生理盐水组和环磷酰胺组。大鼠单次腹腔注射环磷酰胺, 观察卵巢形态学改变并计数卵泡数目。荧光定量PCR方法检测大鼠卵巢FSHR mRNA的表达。结果 : 环磷酰胺可引起原始卵泡大量丢失, 卵巢间质严重损害, 且卵巢局部发生纤维化。化疗组卵巢窦卵泡比例显著低于对照组($P < 0.05$), 化疗组大鼠动情周期日数[(6.83 ± 1.12)d]显著高于对照组[(4.50 ± 0.82)d, $P < 0.05$]。荧光定量PCR显示, 环磷酰胺组FSHR mRNA水平显著低于对照组($P < 0.05$)。结论 : 化疗大鼠卵巢FSHR表达减少, 可能是导致化疗卵巢局部窦卵泡比例减少和动情周期延长的原因之一。

【关键词】 药物疗法, 卵巢, 受体, FSH, 荧光定量PCR

【中图分类号】R588.6 **【文献标识码】**A

0 引言

临床上, 女性癌症患者在接受化疗药物后多短暂性闭经, 随之月经恢复, 但日后月经紊乱和卵巢早衰的发生率显著升高^[1]。一般认为, 化疗影响卵巢功能的机制有两种可能 : 一为直接影响卵巢激素产生, 二为干扰垂体激素效应, 即通过作用于下丘脑或者垂体而发挥其干预作用。最近的几组临床资料显示了接受化疗的妇女其卵巢局部雌激素水平显著降低^[2]。近年研究发现, 卵泡刺激素受体(follicle stimulating hormone receptor, FSHR)基因与卵泡的发育、雌激素的产生以及性腺的状态密切相关, 卵巢的反应性亦与卵巢局部FSHR表达水平的高低有关^[3]。本研究以大鼠为模型, 检测化疗卵巢局部FSHR的表达情况, 以期深入探讨化疗药物损伤卵巢的具体机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康6 wk龄SD雌性大鼠36只, 购自中山大学动物试验部, 试验动物遗传背景稳定, 所处环境为SPF级。鼠笼、饲料、饮水和室内空气均经消毒处理。动物平均体质量为(200 ± 10)g。采用完全随机分组方法, 将动物随机分为2组 : 生理盐水组和环磷酰胺组(60 mg/kg)。大鼠一次性接受腹腔注射生理盐水或环磷酰胺 ; 注射时注意每次从同一位置同一角度进针。

1.2 方法

1.2.1 卵巢处理 于术后 8 wk(±5 d)将大鼠麻醉,无菌状态下开腹,取双侧卵巢。一侧立即投入 40 g/L 甲醛固定 12~24 h,用于 HE 染色。另一侧无菌取出卵巢,置于冰上,使用生理盐水冲洗局部血液,并用无菌镊轻轻除去周围的脂肪组织,将卵巢置于无菌 Ep 管内(冰上),留待提取 mRNA。取自制微细棉签蘸以生理盐水后,轻轻于大鼠阴道内旋转 1 圈,行阴道涂片,用 950 mL/L 乙醇固定 5 min,HE 染色,显微镜下观察,以确定发情周期。术后 8 wk 于动情期处死大鼠。

1.2.2 卵泡计数 卵泡分类标准描述参考文献[4]。原始卵泡计数以卵母细胞核作为标记物。连续 5 μm 切片,间隔切片计数。初级卵泡、次级卵泡和窦状卵泡计数以卵母细胞核仁为标记物观察每张切片。按照上述方法,计数每个标本原始卵泡和窦卵泡数。采用单盲法独立观察所有切片。

1.2.3 卵巢总 RNA 的提取 无菌状态下分离大鼠卵巢组织,液氮冷冻后置于研钵中捣碎匀浆。将样品组织挑入高压灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管中,每管加 1 mL DEPC 水混匀,吸去上清,重复以上操作。将冲洗后的组织挑出,加液氮,研碎。将研磨好的样本放入新的 1.5 mL Eppendorf 管,加入 1 mL Trizol,混匀,室温静置 15 min。再加入 200 μL 氯仿,颠倒混匀,室温静置 10 min,13 000 g 离心 10 min。取上清液转移至新的 1.5 mL Eppendorf 管,加入等体积异丙醇,颠倒混匀,静置 10 min,13 000 g 离心 10 min。弃上清,加 1 mL 750 mL/L 乙醇(用 DEPC 水配置)洗涤沉淀,8500 g 离心 5 min,吸去上清。空气干燥沉淀,加 40 μL DEPC 水溶解 RNA。-20℃ 冰箱保存备用。

1.2.4 引物设计 设计大鼠 FSHR 荧光定量 PCR 引物。上游引物:5'-GTCCTCATCAAGCGACACCA-3';下游引物:5'-GGAGGCAGAAATGGCAAAGA-3'。片段全长 103 bp。大鼠 GADPH 内参照荧光定量上游引物:5'-CTCCCATTCTCCACCTTTG-3';下游引物:5'-CTCCCATTCTCCACCTTTG-3'。片段全长 110 bp。引物均由 Invitrogen 公司合成。

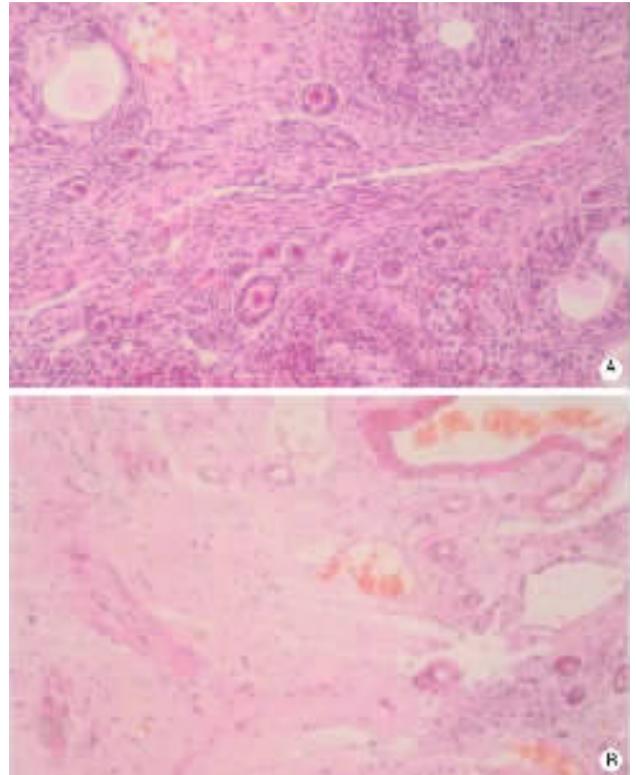
1.2.5 荧光定量 PCR 检测 FSHR mRNA 取 4 μL RNA 模板做逆转录反应,反应体系如下:5×逆转录 buffer 4 μL;上游引物(10 pmol/μL)0.4 μL;下游引物(10 pmol/μL)0.4 μL;dNTPs(10 mmol/μL)0.2 μL;MMLV(200 U/μL)1 μL;DEPC 水 9 μL;RNA 模板 5 μL;总体积 20 μL。逆转录 buffer 成分:50 mmol Tris-HCl(pH8.0),50 mmol KCl,4 mmol MgCl₂,10 mmol DTT。反应条件 37℃ 1 h,然后 95℃

3 min。荧光定量 PCR 反应 样本按以下反应体系进行:5×定量 PCR buffer(美国 ABI 公司)10 μL;上游引物 F(10 pmol/μL)1 μL;下游引物 R(10 pmol/μL)1 μL;SYBR Green I 1 μL;dNTPs(10 mmol/L Sigma 公司)1 μL;Taq 酶 1 μL;cDNA 5 μL;ddH₂O 30 μL;总体积 50 μL。PCR buffer 成分:10 mmol Tris-HCl(pH 8.0),50 mmol KCl,2 mmol MgCl₂。反应条件为 93℃ 3 min,然后 93℃ 45 s,55℃ 1 min,共 40 个循环。反应结束后,由电脑自动分析并记录相应 CT 值。使用 CT 值比较法对结果进行分析,其计算公式是:相对含量(%)=2^{-ΔΔCT}×100%。所用内对照是 GADPH 基因,测定结果均为 C_T 值。计算相对于基准样品的 ΔΔC_T 相对基因含量,处理/未处理。

统计学处理:应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,所用统计分析方法有 t 检验和直线相关分析。

2 结果

2.1 环磷酰胺作用下成年大鼠卵巢的病理特征 术后 8 wk 环磷酰胺作用下的成年大鼠卵巢可见间质血管充血,管壁增厚变性,局部发生纤维化,尚可见残留的卵泡(图 1)。



A 环磷酰胺作用下原始卵泡丢失组大鼠残存的原始卵泡和初级卵泡;
B 环磷酰胺作用下原始卵泡严重丢失组大鼠卵巢间质血管损伤,管腔变窄,卵巢大面积严重纤维化。

图 1 环磷酰胺处理组大鼠卵巢 HE ×200

2.2 环磷酰胺作用下成年大鼠卵巢原始卵泡和窦卵泡计数 与对照组相比,化疗组卵巢原始卵泡数目显著性减少,窦卵泡/窦前卵泡比例显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$).

2.3 环磷酰胺作用下成年大鼠动情周期的变化 动情周期确定:于动情前期见大量有核上皮细胞,动情期见大量无核角化细胞,动情后期见角化细胞和白细胞以及少许有核上皮细胞,动情间期见大量白细胞.环磷酰胺作用下成年大鼠术后动情周期恢复,实验组大鼠动情周期日数为(6.83 ± 1.12)d,显著高于对照组(4.50 ± 0.82)d, $P < 0.05$].

2.4 环磷酰胺作用下成年大鼠 FSHR mRNA 的荧光定量表达 使用荧光定量 PCR 方法,我们检测了化疗大鼠卵巢 FSHR mRNA 的表达.统计结果显示,环磷酰胺组 FSHR mRNA 的水平低于对照组,差异有统计学意义[(0.85 ± 1.03) vs (0.38 ± 0.74), $P < 0.05$].所有检测样本未发现基因组 DNA 的污染,所有阴性对照未见扩增产物.

2.5 相关因素分析 相关分析表明,化疗卵巢 FSHR 与窦卵泡比例呈正相关关系($r = 0.755$, $P < 0.05$),与大鼠动情周期日数呈负相关关系($r = 0.781$, $P < 0.05$).

3 讨论

本研究中,化疗 8 wk 后的卵巢虽然可见一定数量的原始卵泡,动情周期亦可恢复,但卵巢间质的血管损伤和局部纤维化仍为其主要的病理改变.近年发现,卵巢局部血液供给是决定卵巢反应性和状态的重要因素之一.化疗 8 wk 时大鼠卵巢异常的病理学改变,很可能是其表现为动情周期延长的“结构基础”.

FSH 是腺垂体分泌的一种糖蛋白激素,主要促进女性卵巢内的卵泡发育.FSH 主要通过与其卵巢颗粒细胞膜表面的特异性卵泡刺激素受体(FSHR)相结合,激活 FSHR 启动子,活化 RNA 聚合酶,使之与模板 DNA 准确地结合并启动基因转录,引起 FSHR 基因转录后水平的变化,从而介导促性腺激素的反应信号,导致第二信使产生以及激发后续的细胞内反应、颗粒细胞的增殖分化和雌激素的产生,参与卵泡和生殖细胞的发育和成熟,从而影响女性卵巢的生殖和内分泌功能^[5].FSHR 结构、功能和数量发生改变会直接影响到 FSH 作用的发挥.体外将 FSHR 质粒转染大鼠颗粒细胞,证实 FSH 信号传导功能取决于颗粒细胞表面 FSHR 的密度和转染的 FSHR 质粒数量.FSHR 密度越高,信号越强;转染的 FSHR 质

粒越多,信号传导功能越大^[6].一项临床研究结果发现^[7],颗粒细胞 FSHR 表达水平与卵巢的反应性有关,低反应组患者 FSHR 表达低、卵泡发育少、雌二醇峰值低;而高反应组 FSHR 表达高、获卵数多、雌二醇峰值高;另外,FSHR 蛋白的表达量与卵泡数和血清雌二醇峰值呈显著正相关关系.本研究发现,化疗大鼠动情期卵巢局部 FSHR mRNA 表达显著减少,而且与窦卵泡比例和发情周期具有高度相关性,提示我们尽管化疗状态下 FSH 水平可能升高,但卵巢局部较低的 FSHR 密度将削弱 FSH-FSHR 的信号传导强度,影响其生物学作用的发挥,即卵泡发育或成熟受到影响,从而使得大鼠在动情周期方面发生异常表现.本研究未检测卵巢局部雌激素水平的变化,主要是考虑到现有的商品化大鼠卵巢激素检测试剂盒尚存在很多缺陷,可能会对结果分析造成一定的影响.

国外学者进行了重金属铅等对于卵巢生殖毒性的影响,结果发现,铅和镉等都可以明显减少卵巢促性腺激素的结合能力,并改变颗粒细胞甾体激素生成酶的活性,同时这种改变与颗粒细胞膜的改变呈显著正相关^[8].我们的结果与上述研究结果一致.旁分泌因子可能参与 FSHR 表达的调节^[9].用表皮生长因子、成纤维生长因子或胰岛素样生长因子等刺激颗粒细胞,可减弱其对 FSH 作用的反应.因此,有理由推测化疗状态下 FSHR 表达的减少与卵巢局部异常分泌的某些旁分泌因子有关.卵巢局部细胞因子的功能紊乱和生长因子系统的异常调节、以及其与 FSHR 的相关性研究,将有助于深入探讨化疗状态下卵巢功能低下的分子机制.

【参考文献】

- [1] Meirou D, Schiff E. Appraisal of chemotherapy effects on reproductive outcome according to animal studies and clinical data [J]. J Natl Cancer Inst Monogr, 2005, (34) 21-25.
- [2] Oktom O, Liu H, Oktay K. Evidence for altered ovarian stromal function in women previously exposed to chemotherapy [J]. Fertil Steril, 2006, 86(3): S287.
- [3] Vegetti W, Alagna F. FSH and folliculogenesis: from physiology to ovarian stimulation [J]. Reprod Biomed Online, 2006, 12(6): 684-694.
- [4] Flaws JA, Doerr JK, Sipes IG, et al. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide [J]. Reprod Toxicol, 1994, 8(6) 509-514.
- [5] Hermann BP, Heckert LL. Transcriptional regulation of the FSH receptor: new perspectives [J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 260-262: 100-108.
- [6] Donadeu FX, Ascoli M. The differential effects of the gonadotropin receptors on aromatase expression in primary cultures of immature rat granulosa cells are highly dependent on the density of receptors exp-

ressed and the activation of the inositol phosphate cascade[J]. *Endocrinology*, 2005, 146 :3907 - 3916.

[7] Cai J, Lou HY, Dong MY, et al. Poor ovarian response to gonadotropin stimulation is associated with low expression of follicle-stimulating hormone receptor in granulosa cells[J]. *Fertil Steril*, 2007, 87 (6) 1350 - 1356.

[8] Nampoothiri LP, Gupta S. Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells : a cellular model for ovarian toxicity[J]. *Reprod Toxicol* 2006, 21(2) 179 - 185.

[9] Findlay JK, Drummond AE. Regulation of the FSH receptor in the ovary[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 1999, 10(5) 183 - 188.

编辑 王雪萍

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2008)02-0122-01

一种 X-刀治疗计划误差分析

赵品婷 梁 军 邵秋菊 齐宇红

(第四军医大学唐都医院放疗科, 陕西 西安 710038)

【关键词】立体定向适形放射治疗, 误差, 分析

【中图分类号】R815.2 【文献标识码】B

0 引言 立体定向放射治疗(stereotactic radiotherapy, SRT) 作为一种最先进和重要的方法已经在肿瘤治疗中得到普及。与常规放射治疗相比, X-刀作为一种精确放射治疗技术, 具有高精度、高剂量、高疗效的特征, 因此防止误差非常重要。现将我们在执行 SRT 过程中发现的一种误差报道如下, 以供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-01/2006-05 第四军医大学唐都医院放疗科收治的 372 例肿瘤患者的 X-刀治疗计划, 其中头颈部肿瘤 148 例, 胸部肿瘤 113 例, 腹部肿瘤 51 例, 盆腔肿瘤 60 例。应用核动力研究设计院生产的 HMD-IB 放射治疗模拟机。

1.2 X-刀治疗计划照射野等中心的验证方法 ① 测试和校准 HMD-IB 放射治疗模拟机各项参数, 在去除模拟定位机和治疗用直线加速器系统误差前提下; ② 将 X-刀治疗床置于放射治疗模拟定位机的床上, 按照每例患者 X-刀治疗计划的照射野参数, 应用激光灯摆位; ③ 观察 X-刀治疗计划照射野等中心与患者实际等中心是否吻合。不同部位肿瘤患者可辅以不同条件以保证更准确确定实际等中心, 例如, 食道、胃癌患者吞钡, 膀胱经导尿管注入 600 g/L 泛影葡胺, 对某些腹部或者盆腔肿瘤以解剖标志点为参照确定实际等中心; ④ 测量 X-刀治疗计划照射野等中心与实际等中心二者“十”字在 X, Y, Z 方向的误差并记录, 测量方法为: 在机架 0° 时, 分别标记出 X-刀计划等中心和实际等中心, 用直尺测量 X, Z 方向误差, 使用光标尺测量 Y 方向误差; ⑤ 对三维适形放疗, 其照射野中心移位误差严格控制在 3 mm 以内^[1]。对超出以上范围的患者, 分析原因, 及时纠正或重新做计划, 再次验证; ⑥ 记录误差超标的 X-刀治疗计划例数, 纳入统计。

2 结果 应用放射治疗模拟定位机对 372 例 X-刀治疗计划进行治疗过程模拟, 总的误差率为 5.9% (22/372)。其中, 5.1% (19/372) 等中心误差由摆位、器官运动、空腔脏器充盈度不一致、计划设计者的经验等所致, 误差范围 0.3 ~ 2.1 cm。2 例食道癌患者 X-刀治疗计划照射野等中心与实际等中心在 Z 方向上误差 10 cm, 1 例第 8 9 胸椎预照射者 X-刀治疗计划照射野在 Z 方向亦误差 10 cm。

3 讨论 传统放疗方法因受正常组织及关键器官放射耐受剂量影响, 对一些肿瘤局控率较低^[2]。而局控率是预后的影响因素之一, 提高局控率, 有望提高生存率^[2-3]。三维适形放疗(3DCRT) 和调强放疗(IMRT) 可达到在相同正常组织耐受量的情况下提高肿瘤放射剂量, 从而有望提高局控率^[2-4]。3DCRT 是通过三维治疗计划设计, 共面与非共面的多野照射, 使高剂量区域的形态与所放射的肿瘤形态一致。然而在实施其治疗过程中, 即从患者的体摸固定到完成治疗, 存在诸多不确定因素导致的误差, 从而影响放疗的疗效。作为一种精确放射治疗技术, 必须贯穿三精原则于治疗全过程, 即精确定位、精确计划、精确治疗^[6]。因此, 发现、分析、防止任何误差对立体定向放射治疗都具有非常重要的意义。

本组验证发现: 2 例食道癌患者 X-刀治疗计划照射野等中心与实际等中心在 Z 方向上误差 10 cm, 1 例第 8 9 胸椎预照射者 X-刀治疗计划照射野在 Z 方向亦误差 10 cm。分析原因可能为: CT 定位时, CT 扫描面与定位床的纵轴未能保持垂直, 或者 CT 扫描层厚使得某一百位内毫米坐标点与邻近整百毫米坐标点出现在同一扫描层内, 当等中心正好确定在这一扫描层时, 拓能 X-刀 TPS 软件识别 Z 坐标值误差 10 cm。定位床逆时针偏移时 Z 坐标值比实际大 10 cm, 顺时针偏移引起的误差尚未检出, 从理论上分析应当不会出现这种情况。因此, 要按照 SRT 质量控制和保证的要求定期检测定位用 CT 机及其激光灯, 在定位时应用激光灯和定位床两侧的标尺使定位床纵轴与 CT 扫描面保持垂直, 治疗前必须验证治疗计划, 这样才能有助于这一误差的控制。由于我们对每例 X-刀治疗计划必须执行治疗前验证, 使得这些误差得以发现并在照射前得到纠正。

综上所述, 这是 X-刀治疗计划系统中的一种特殊误差, 在立体定向放射治疗中值得注意。治疗前验证是发现、分析和避免各种误差的有效手段。

【参考文献】

- [1] 胡逸民. 肿瘤放射物理学[M]. 北京: 原子能出版社, 1999 : 595 - 598.
- [2] Mornex F, Loubeyre P, Giraud P, et al. Gross tumor volume and clinical target volume in radiotherapy : Lung cancer[J]. *Cancer Radiother*, 2001, 5 : 659 - 670.
- [3] Armstrong JG. Target volume definition for three-dimensional conformal radiation therapy of lung cancer[J]. *Br J Radiol*, 1998, 71 : 587 - 594.
- [4] Bradley JD, Ieumwananonthachai N, Purdy JA, et al. Gross tumor volume, critical prognostic factor in patients treated with three-dimensional conformal radiation therapy for non-small-cell lung carcinoma[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002, 52 : 49 - 57.
- [5] 夏廷毅. $\gamma(X)$ 线立体定向放射治疗临床应用规范和治疗进展[J]. *中国癌症杂志*, 2006, 16(6) : 454 - 458.

收稿日期 2007-10-08 ; 接受日期 2007-10-24

作者简介 赵品婷, 主管技师. Tel : (029) 84777970 Email : Zhaopint-ing2006@163.com

编辑 许福明