

低强度脉冲超声对环磷酰胺致卵巢早衰大鼠卵巢 GDF9 和 BMP15 表达的影响

唐华均 杨 欢 范艺巾 李成志

摘 要 **目的** 探讨低强度脉冲超声通过调节卵母细胞自分泌因子即生长分化因子 9(GDF9)和骨形态发生蛋白 15(BMP15)的表达在预防环磷酰胺致大鼠卵巢早衰发病中的作用。**方法** 选取 63 只雌性 SD 大鼠,其中 13 只为空白组,其余 50 只连续 5 d 腹腔注射环磷酰胺 30 mg/kg,建立卵巢早衰动物模型。将造模成功的 43 只大鼠分为实验对照组($n=21$)和治疗组($n=22$),治疗组给予低强度脉冲超声辐照,空白组和实验对照组采用与治疗组相同的方法治疗,但仪器无功率输出。Western blotting 检测 GDF9 和 BMP15 的表达情况。**结果** 最终共纳入大鼠 48 只,其中空白组 11 只,实验对照组 17 只,治疗组 20 只。实验对照组大鼠腹腔注射环磷酰胺后食欲下降,毛发无光泽,活动差;治疗组大鼠超声辐照后较实验对照组一般情况明显好转,毛色恢复光泽,反应较为灵敏。与空白组比较,实验对照组超声辐照后 GDF9 和 BMP15 表达均显著下降(均 $P=0.00$);与实验对照组比较,治疗组超声辐照后 GDF9 和 BMP15 表达均显著增强($P=0.01, 0.00$)。**结论** 低强度脉冲超声能促进大鼠卵巢 GDF9 和 BMP15 的表达,从而修复卵巢功能,促进卵泡的发育。

关键词 脉冲超声;低强度;卵巢早衰;生长分化因子 9;骨形态发生蛋白 15;大鼠

[中图分类号]R711.75;R445.1

[文献标识码]A

Effects of low intensity pulsed ultrasound on expression of GDF9 and BMP15 in ovaries of premature ovarian failure rats induced by cyclophosphamide

TANG Huajun, YANG Huan, FAN Yijin, LI Chengzhi

College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

ABSTRACT **Objective** To explore the preventive effect of low intensity pulsed ultrasound on cyclophosphamide induced premature ovarian failure through regulation of expression of oocyte autocrine factor growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15). **Methods** Sixty-three rats were selected. 13 rats were randomly selected as normal group, and the other 50 rats were intraperitoneally injected with cyclophosphamide 30 mg/kg for 5 d to establish the animal model of premature ovarian failure. The successfully established 43 animal model rats were randomly divided into control group ($n=21$) and treatment group ($n=22$). The treatment group was treated with low-intensity pulsed ultrasound, and the normal and control group were treated with the same method as the treatment group, but the instrument had no power output. Western blotting was used to detect the expression of GDF9 and BMP15. **Results** A total of 48 rats were enrolled in this study, 11 rats in normal group, 17 rats in control group, and 20 rats in treatment group. In control group, the appetite was decreased, hair was no lustrous and activity was poor in rats after the intraperitoneal injection of cyclophosphamide. Compared with control group, the general situation of the rats in treatment group was improved significantly after ultrasonic irradiation, and the hair was recovered lustrous and the reaction was sensitive. Compared with normal group, the expression of GDF9 and BMP15 decreased significantly after ultrasonic irradiation in control group (both $P=0.00$). Compared with control group, the expression of GDF9 and BMP15 increased significantly after ultrasonic irradiation in treatment group ($P=0.01, 0.00$). **Conclusion** Low intensity pulsed ultrasound can promote the expression of GDF9 and BMP15, repair the function of the ovary and promote the follicular development.

KEY WORDS Pulsed ultrasound, low-intensity; Premature ovarian failure; Growth differentiation factor 9; Bone morphogenetic protein 15; Rat

基金项目:国家自然科学基金项目(11574039、11604034);重庆市自然科学基金项目(cstc2016jcyjA0098、cstc2016jcyjA0599)

作者单位:400016 重庆市,重庆医科大学生物医学工程学院 省部共建国家重点实验室培育基地——重庆市超声医学工程重点实验室 重庆市

生物医学工程重点实验室 重庆市微微创医学协同创新中心

通信作者:李成志, Email:lichengzhi@cqmu.edu.cn

卵巢早衰是指女性 40 岁前出现闭经,以高促卵泡刺激素和低雌激素水平为特征,临床症状以潮热盗汗、不孕为主。研究^[1]发现,低强度脉冲超声辐照可以促进 SD 大鼠的卵泡发育,促进围绝经期大鼠卵巢功能的修复。卵巢的功能是由促性腺激素、促卵泡刺激素、促黄体生成素及卵巢局部影响因子如骨形态发生蛋白 15 (bone morphogenetic protein 15, BMP15) 和生长分化因子 9 (growth differentiation factor 9, GDF9) 等联合调节的^[2]。静止期和生长早期卵泡的生长主要由卵巢的自分泌及旁分泌因子调控,其中 GDF9 和 BMP15 是近年研究较多的两个重要的卵母细胞自分泌因子。GDF9 和 BMP15 是由卵母细胞分泌的糖蛋白,可以调节大多数哺乳动物的生育能力^[3-4]。GDF9 和 BMP15 的适当表达在哺乳动物的卵泡发育中十分重要。本实验旨在观察低强度脉冲超声对卵巢早衰大鼠卵巢组织 GDF9 和 BMP15 表达的影响,进一步阐明低强度脉冲超声通过调节卵母细胞自分泌因子的表达对卵巢的保护作用。

材料与方法

一、实验动物

健康雌性 SD 大鼠,月龄 3 个月,体质量 180~200 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。自由饮食,室温控制在 25℃,湿度 70%,通风良好。适应性喂养 5 d 后,每天上午相同时间点对大鼠进行阴道涂片,连续观察 10 d,将连续出现 2 个规律动情周期的 63 只大鼠纳入本实验。

二、主要试剂与仪器

1. 试剂:环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司);自制碱性美蓝染液;GDF9 抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司]和 BMP15 抗体(Gene Tex, Inc.)。

2. 仪器:低功率聚焦超声实验装置(重庆海扶医疗科技股份有限公司研制),频率 0.5~1.5 MHz, I~Ⅷ档连续可调,治疗探头直径 ≤ 2 cm,脉冲波。

三、实验方法

1. 动物模型的制备:采用腹腔注射环磷酰胺的方法^[5]建立卵巢早衰动物模型。50 只 SD 大鼠腹腔注射环磷酰胺 30 mg/kg,每天 1 次,持续 5 d。从腹腔注药第 1 天开始,连续 15 d 每日定时观察,阴道涂片出现持续动情周期表示造模成功。

2. 分组及干预方式:将造模成功的大鼠随机分为实验对照组和治疗组,另 13 只大鼠为空白组。治疗组采用低强度脉冲超声每天辐照 30 min, 频率 900 kHz, 声强 0.8 W/cm², 共辐照 10 d。空白组和实验对照组采用与治疗组相同的方法治疗,但仪器无功率输出。

3. 取材及处理方法:各组大鼠分别于超声辐照结

束后 5 d 处死,处死前禁食 4 h,戊巴比妥钠麻醉后剖腹迅速取出卵巢,将卵巢组织置于 EP 管中, -80℃ 保存,用于检测蛋白表达情况。

4. Western blotting 检测:取保存于 -80℃ 的各组卵巢组织,按照蛋白提取试剂盒说明书提取卵巢蛋白, Bradford 法测定蛋白质浓度。蛋白样品在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,然后采用湿转法将凝胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜上(300 mA, 90 min), 5% 脱脂奶粉封闭 4 h, 先后加入 GAPDH、GDF9 抗体(1:1000)、BMP15 抗体(1:1000)及相对应的二抗山羊抗兔 IgG (1:1000), 最后经化学发光法显像。使用美国 Bio-RAD Gel Doc 2000 凝胶成像系统进行图像分析, 计算光密度值, 进行半定量分析, 蛋白相对表达量以目的蛋白/β-actin 值统计。

四、统计学处理

应用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 若满足方差齐性或正态性采用单因素方差分析; 不满足方差齐性或正态性行非参数检验。多次重复测量数据采用重复测量资料方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

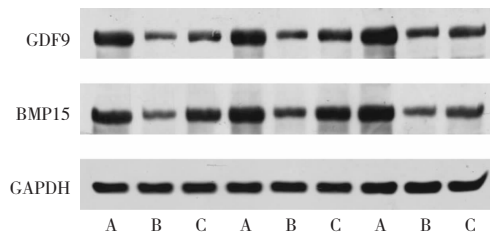
将最终造模成功的 43 只大鼠纳入本实验, 随机分为实验对照组 21 只和治疗组 22 只。实验过程中大鼠共死亡 8 只(3 只因恶病质, 2 只因麻醉剂过量, 3 只原因不明), 故最终纳入 48 只大鼠, 其中空白组 11 只, 实验对照组 17 只, 治疗组 20 只。

一、各组大鼠一般情况

空白组大鼠进食好, 毛发光亮, 反应灵敏。实验对照组大鼠腹腔注射环磷酰胺后食欲下降, 毛发无光泽, 活动差; 治疗组大鼠超声辐照后较实验对照组一般情况明显好转, 毛色恢复光泽, 反应较为灵敏。

二、超声辐照后各组大鼠卵巢 GDF9 和 BMP15 表达变化

超声辐照后 Western blot 检测结果显示各组均有 GDF9 和 BMP15 表达(图 1)。与空白组比较, 超声辐照后实验对照组 GDF9 和 BMP15 表达均显著下降(均



A: 空白组; B: 实验对照组; C: 治疗组。

图 1 超声辐照后各组大鼠卵巢 GDF9 和 BMP15 表达情况

$P=0.00$);与实验对照组比较,治疗组 GDF9 和 BMP15 表达均显著增强($P=0.01, 0.00$)。见表 1。

表 1 超声辐照后各组大鼠卵巢 GDF9 和 BMP15 相对表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	GDF9	BMP15
治疗组(20)	1.17±0.17 [△]	1.34±0.12 [△]
实验对照组(17)	0.78±0.80 [*]	0.83±0.22 [*]
空白组(11)	1.97±0.76	2.09±0.16

与空白组比较, ^{*} $P<0.05$;与实验对照组比较, [△] $P<0.05$ 。GDF9:生长分化因子 9;BMP15:骨形态发生蛋白 15。

讨 论

卵巢功能的影响因素主要有个体性因素(遗传学因素及免疫学因素等)和卵巢破坏性因素(化疗、放射治疗及盆腔手术等)。目前临床发现患者在接受化疗后卵巢功能受损的情况日益增多,并逐渐成为卵巢早衰发病的重要原因,故本研究使用环磷酸胺来建立卵巢早衰的动物模型。

卵泡的发育可分为促性腺激素不依赖阶段和促性腺激素依赖阶段。尽管卵泡刺激素是调节优势卵泡发育的主要因素,但卵母细胞自身分泌的生长因子(主要有 GDF9 和 BMP15)可通过自分泌或旁分泌的方式调节卵泡的发育,影响优势卵泡的选择和闭锁卵泡的形成。GDF9 仅在卵巢或卵母细胞中表达,对卵泡的生长发育和生殖功能等有重要影响。GDF9 的表达产物可以形成非共价异二聚体,与卵母细胞周围颗粒细胞的功能具有协同作用^[6];GDF9 还可以改变颗粒细胞的增殖和分化能力^[7-10]。BMP15 是一种分泌型信号分子,也仅在卵母细胞中特异性表达,具有刺激颗粒细胞生长、调节卵泡颗粒细胞对卵泡刺激素敏感、阻止颗粒细胞凋亡及促进卵母细胞发育能力的作用^[11-13]。Pierre 等^[14]研究发现,BMP15 还可以刺激抗苗勒氏管激素(AMH)和苗勒管激素 2 型抗体受体在初级卵泡中的表达或维持其在窦状卵泡中的表达。AMH 是转化生长因子 β 超家族成员,是由卵巢窦前卵泡和小窦卵泡的颗粒细胞所分泌的一种糖蛋白。卵巢内的小窦卵泡数量越多,AMH 的浓度便越高;反之,当卵泡随着年龄及各种因素逐渐消耗,AMH 浓度也会随之降低,接近绝经期时,AMH 渐趋于 0,可作为预测卵巢储备的标志物,说明 GDF9 和 BMP15 是哺乳动物卵泡发育至关重要的因素。此外,GDF9 和 BMP15 均属于转化生长因子 β 超家族的重要成员,有研究^[15]证实低强度脉冲超声可以增强 TGF- β mRNA 的表达和蛋白产物的增加。故本实验旨在观察低强度脉冲超声能否通过增加 GDF9 和

BMP15 的表达来促进卵巢早衰模型大鼠的卵泡发育。

本实验结果表明,腹腔注射环磷酸胺而未采取任何治疗措施实验对照组大鼠卵巢 GDF9 和 BMP15 表达下降,说明非细胞周期抑制剂环磷酸胺导致的卵巢损伤,可以影响卵巢的自身分泌调节功能,抑制卵巢组织 GDF9 和 BMP15 的分泌,从而干扰卵泡的发育,最终导致卵巢早衰的发生。而经低强度脉冲超声辐照后,治疗组大鼠卵巢组织 GDF9 和 BMP15 表达明显增加,说明低强度脉冲超声对卵巢组织具有修复和保护作用,能够促进卵巢组织中 GDF9 和 BMP15 的表达,从而促进卵泡的发育。但因低强度脉冲超声还具有促进血管生成、改善组织纤维化等作用,且卵泡的生长、发育及成熟是一个精细而复杂的过程,影响因素众多,故本实验仅是一个初步探索。

综上所述,低强度脉冲超声能促进卵巢 GDF9 和 BMP15 的表达,从而修复卵巢功能,促进卵泡的发育。本实验的不足是未排除其他影响卵巢功能的因素,且样本量有限,今后尚需更加深入和大样本的研究。相信随着研究的不断深入,可以揭示卵泡的发育和闭锁机制,阐明卵巢储备功能减退的发病机制,对防治卵巢早衰具有重要意义。

参考文献

- [1] 翟蓓,方廖琼,李成志,等.低强度脉冲超声波对围绝经期大鼠卵巢功能的影响[J].中国超声医学杂志,2012,28(3):207-210.
- [2] Kumar R, Alwani M, Kosta S, et al. BMP15 and GDF9 gene mutations in premature ovarian failure[J]. J Reprod Infertil, 2017, 18(1):185-189.
- [3] Matzuk MM, Burns KH. Genetics of mammalian reproduction: modeling the end of the germline[J]. Annu Rev Physiol, 2012, 74(3):503-528.
- [4] Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function[J]. Mol Reprod Dev, 2011, 78(1):9-21.
- [5] Zhang Y, Yu B, Chen J, et al. Effects of acupuncture on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in rats with premature ovarian failure[J]. Zhongguo Zhen Jiu, 2015, 35(1):53-58.
- [6] Yan C, Wang P, DeMayo J, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function[J]. Mol Endocrinol, 2001, 15(6):854-866.
- [7] Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis[J]. Reprod Biomed Online, 2007, 14(6):758-764.
- [8] Hennet ML, Combelles CM. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation[J]. Int J Dev Biol, 2012, 56(10-12):819-831.
- [9] Peng J, Li Q, Wigglesworth K, et al. Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(8):776-785.
- [10] Dias FC, Khan MI, Adams GP, et al. Granulosa cell function and oocyte competence: super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle[J]. Anim Reprod Sci, 2014, 149(1-2):80-89.
- [11] Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, et al. The fundamental role of

bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders[J].Hum Reprod Update, 2014, 20(6): 869-883.

[12] Persani L, Rossetti R, Cacciatore C, et al. Genetic defects of ovarian TGF- β -like factors and premature ovarian failure[J].J Endocrinol Invest, 2011, 34(3):244-251.

[13] Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction[J].Endocr Rev, 2004, 25(1): 72-101.

[14] Pierre A, Estienne A, Racine C, et al. The bone morphogenetic protein 15 up-regulates the anti-Müllerian hormone receptor expression in granulosa cells[J].J Clin Endocrinol Metab, 2016, 101(6):2602-2611.

[15] Mukai S, Ito H, Nakagawa Y, et al. Transforming growth factor- β 1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes[J].Ultrasound Med Biol, 2005, 31(12):1713-1721.

(收稿日期:2017-10-12)

• 病例报道 •

Fetal intracranial aneurysm with Galen vein tumor diagnosed by ultrasound: a case report

超声诊断胎儿颅内动脉瘤合并 Galen 静脉瘤 1 例

唐 琪 张厚胜

[中图法分类号]R714.5;R445.1

[文献标识码]B

孕妇, 23 岁, 孕 38 周, 既往无畸形胎儿分娩史。超声检查: 宫内单活胎, 右上腹见胎头光环, 双顶径 9.4 cm, 头围 34.5 cm, 腹围 34.0 cm, 股骨径 7.0 cm; 脊柱、双肾、膀胱及心脏均未见明显异常。胎盘位于宫底, 厚 3.3 cm; 羊水指数 20.6 cm; 胎心 141 次/min; 脐动脉收缩压与舒张压比值 2.32, 阻力指数 0.57。胎儿颅内丘脑下方见一 2.5 cm×1.6 cm 椭圆形囊性结构, 彩色多普勒示湍流

(图 1), 脉冲多普勒示高速低阻型频谱(图 2)。胎儿左侧大脑半球后方内见一 3.9 cm×3.0 cm 椭圆形囊性结构, 彩色多普勒示“阴阳征”(图 3), 脉冲多普勒示低速高阻型频谱(图 4)。上述二者之间通过扩张的血管相连, 前者又汇入扩张的直窦。超声诊断: ①单活胎, 臀位; ②胎儿颅内左侧大脑半球后方囊性占位(考虑动脉瘤); ③胎儿颅内丘脑下方囊性占位(考虑 Galen 静脉瘤); ④羊水较多。

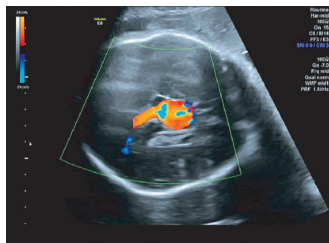


图 1 Galen 静脉瘤彩色血流图

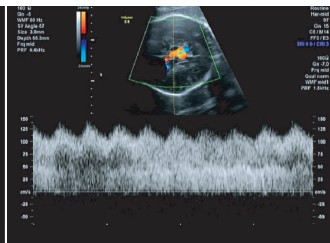


图 2 Galen 静脉瘤脉冲多普勒图

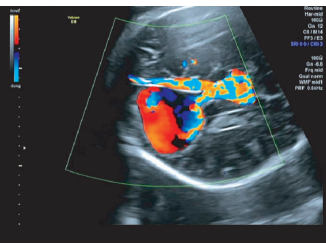


图 3 颅内动脉瘤彩色血流图

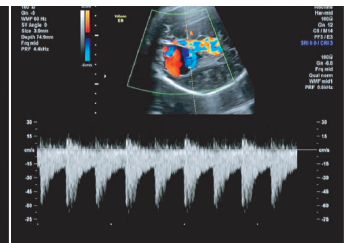


图 4 颅内动脉瘤脉冲多普勒图

讨论: 胎儿 Galen 静脉瘤是一种少见的散发性血管畸形, 其发病机制是由于动脉血通过动静脉瘘道直接注入 Galen 静脉, 导致 Galen 静脉呈瘤样扩张, 其供血动脉为起源于 Willis 环或椎-基底动脉系统的一条或多条小动脉^[1]。Galen 静脉瘤特征性超声表现为颅内丘脑下方探及椭圆形囊性结构, 囊壁光滑, 形态规则; 彩色多普勒示囊性结构内见血流信号; 脉冲多普勒示静脉动脉化频谱。颅内动脉瘤特征性超声表现为颅内椭圆形囊性结构, 壁光滑; 彩色多普勒示囊性结构内见“阴阳征”; 脉冲多普勒示动脉频谱。本病例符合颅内动脉瘤合并 Galen 静脉瘤声像图特征。

胎儿颅内动脉瘤合并 Galen 静脉瘤罕见, 主要应与胎儿颅内其他囊性占位(如蛛网膜囊肿、脑穿通囊肿及第三脑室扩张

等)相鉴别。彩色多普勒超声是产前鉴别胎儿颅内囊肿与颅内血管瘤的理想方法。颅内囊肿表现为囊性占位内无血流信号; 颅内血管瘤则表现为囊性占位内有血流信号, 再根据频谱类型可确诊。胎儿颅内血管瘤预后较差, 但多数在晚孕期才能被检出, 掌握其发病机制及特征性超声表现可做出准确诊断。

参考文献

[1] 李胜利. 胎儿畸形产前超声诊断[M]. 北京: 人民军医出版社, 2011: 163-164.

(收稿日期:2017-02-12)