

·基础研究·

运动对多囊卵巢综合征大鼠血清激素和
卵巢形态学的影响*邱树卫¹ 江钟立^{1,3} 吴雏燕¹ 李红卫¹ 吴亚文¹ 陈玲²

摘要 目的:探讨运动对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠胰岛素、性激素和卵巢形态学的影响。方法:17只21日龄Wistar大鼠随机分为PCOS运动组(n=6)、PCOS非运动组(n=6)和非PCOS对照组(n=5)。注射丙酸睾酮诱导PCOS模型,对照组注射相应容积茶油。运动程序为每天游泳2h,连续15d。实验结束后取血测定葡萄糖、胰岛素、雌二醇、黄体酮和睾酮浓度;卵巢病理切片运用图像分析软件Image-Pro Plus 6.0进行形态学分析。结果:PCOS运动组胰岛素、雌二醇和睾酮水平均显著低于非运动组($P<0.05$),空腹血糖与空腹胰岛素(FBG/FINS)比值显著高于非运动组($P<0.05$),接近于对照组水平。血糖和血清黄体酮水平三组间差异没有显著性。卵巢病理显示,PCOS运动组窦前卵泡数和闭锁卵泡显著减少($P<0.05$),而窦状卵泡和黄体数目则显著升高($P<0.05$),均接近于对照组水平。结论:短期运动能改善PCOS大鼠胰岛素敏感性,降低血清雄激素和雌激素水平,恢复正常卵巢形态,提示运动是PCOS的基础治疗方法。

关键词 运动;多囊卵巢综合征;胰岛素抵抗;性激素;卵巢形态学

中图分类号:R493,R246.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-04-0330-04

The effect of exercises on serum hormone and ovarian morphology in rats with polycystic ovary syndrome/
QIU Shuwei, JIANG Zhongli, WU Chuyan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(4):
330—333

Abstract Objective:To explore the effect of exercises on serum insulin, serum sex hormone and ovarian morphology in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Method:**Seventeen Wistar rats of 21-day-old were randomly divided to PCOS exercises group (n=6), PCOS non-exercises group (n=6) and non-PCOS control group (n=5). PCOS models were induced by injection of testosterone propionate dissolved in tea oil, while control rats were injected with tea oil. The exercises rats were trained with swimming 120 min/d for 15 days. At the end of experiment, blood glucose and insulin (INS), estrogen (E2), progesterone (P) and testosterone (T) in serum were determined by RIA and ovarian morphology was evaluated by Image-Pro Plus 6.0. **Result:**The levels of INS, E2, P and T in serum were significantly lower in PCOS exercises group than that in non-exercises group ($P<0.05$). The ratios of FBG/FINS in PCOS exercises group elevated significantly compared with PCOS non-exercises group ($P<0.05$). The levels of serum sex hormones in PCOS exercise group were similar to non-PCOS control group. There were no differences in blood glucose and serum progesterone among three groups. Ovarian morphology showed that the amounts of preantral follicles and atretic follicles significantly decreased ($P<0.05$) and the amounts of antral follicles and corpus luteum significantly increased ($P<0.05$) in PCOS exercises group compared with PCOS non-exercises group. The changes of ovarian morphology in PCOS exercises group were similar to non-PCOS control group. **Conclusion:** Short-term exercises could improve insulin sensibility, reduce the levels of serum androgen and E2, and recover normal ovarian morphology. It suggested that exercises training might be a basic therapeutic means for patients with PCOS.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029

Key words exercises; polycystic ovary syndrome; insulin resistance; sex hormone; ovarian morphology

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS)是导致育龄期妇女不孕的重要内分泌代谢疾病,其典型的特征包括高雄激素血症和胰岛素抵抗及其代偿性的高胰岛素血症。胰岛素抵抗及高胰岛素血症已经被认为是PCOS主要发病环节之一。业

* 基金项目:南京医科大学创新基金项目资助课题(CX2004005)

1 江苏省人民医院康复医学科,南京,210029

2 南京医科大学生理学系

3 通讯作者:江钟立(江苏省人民医院康复医学科,210029)

作者简介:邱树卫,男,硕士研究生

收稿日期:2007-11-19

已证明, 运动锻炼能增强糖尿病患者机体对胰岛素的敏感性, 改善胰岛素抵抗。运动锻炼作为 PCOS 治疗的第一线治疗的观点已经逐渐为人们所接受, 但运动锻炼改善 PCOS 机制尚缺乏充分的证据, 本研究探讨了运动锻炼对 PCOS 大鼠的胰岛素、性激素和卵巢形态的作用, 为临床有效干预提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

21 日龄 Wistar 雌性大鼠, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供[许可证号: SCXK(沪)2003-0003], 饲养于南京医科大学实验动物中心, 常规饲料和饮水, 室温 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 65%—70%, 12h/12h 明暗周期。

1.2 PCOS 动物模型的建立

将 12 只 Wistar 大鼠制作成 PCOS 大鼠模型, 另外 5 只 Wistar 大鼠作为非 PCOS 对照组。PCOS 模型制作参照 Beloosesky^[1]方法, 即每天 1 次皮下注射 25mg/ml 浓度的丙酸睾酮注射液 (天津金耀氨基酸有限公司, 批号 H12020531), 注射量为 1mg/100g 体重+适当体积注射用茶油, 连续注射 28d, 最后经阴道涂片显示大鼠始终处于动情间期, 无动情周期变化、无排卵; 血清激素检测显示高胰岛素、高雌激素和高睾酮血症, 表明成功建立 PCOS 大鼠模型。然后将 PCOS 模型大鼠分为运动组 (n=6) 和非运动组 (n=6) 进入实验程序。非 PCOS 对照组大鼠同期注射相应容积的注射用茶油 (n=5)。

1.3 运动方案

PCOS 运动组采用 Masashi 的游泳训练方案^[2], 将大鼠置于水深 50cm, 水温 35°C 桶中进行无负荷自由泳运动, 运动强度为 120min/次, 6d/周, 持续 15d。PCOS 非运动组和非 PCOS 对照组不予运动, 定时将鼠笼置于 PCOS 运动组大鼠运动时的桶旁, 摒除环境噪音的影响。

实验期间定期测量体重和体长 (鼻肛身长), 计算 Lee 指数:

$$[\text{Lee 指数} = \sqrt[3]{\text{体重}(\text{g}) \times 1000 / \text{体长}(\text{cm})}]^{[3]}。$$

1.4 标本采集和处理

PCOS 运动组在最后一次运动结束后 24h 取材, PCOS 非运动组和非 PCOS 对照组大鼠也在饲养 15d 后取材。取材前所有大鼠禁食 12h, 自由饮水, 测量血糖和胰岛素。3% 戊巴比妥腹腔内注射麻醉后, 从腹主动脉取血, 分离血清, 置 -20°C 保存, 用于测定血清葡萄糖 (BG)、胰岛素 (INS)、雌二醇 (E2)、黄体酮 (P) 和睾酮 (T)。摘取双侧卵巢, 去除表面结缔组

织, 称重, 保存于福尔马林溶液, 用于 HE 染色。

血糖采用 Surestep Plus 血糖仪 (强生, 美国) 测定, 血清胰岛素测定采用放免分析试剂盒 (北京北方生物技术研究所, 中国) 测定。胰岛素抵抗指数采用空腹血糖 (FBG) 与空腹胰岛素 (FINS) 比值 (FBG/FINS) 确定^[4]。血清性激素 (E2、P、T) 测定采用放射免疫分析试剂盒 (北京北方生物技术研究所, 中国) 测定。根据大鼠体重和卵巢重量计算卵巢器官指数, 即卵巢重量/体重 $\times 10^{-3}$ 。

1.5 卵巢形态学分析

观察卵巢大体形态, 每个大鼠的 1 只卵巢做病理切片, HE 染色, 采用 Liu^[5]方法, 即沿最长轴在面积最大处进行连续切片, 然后选择其中 1 张面积最大的切片进行分析, 计数窦前卵泡、窦状卵泡、闭锁卵泡、黄体、囊状卵泡、总卵泡数。采用 Olympus BX51 拍照系统 (日本) 采集照片, 运用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 进行卵巢形态学分析, 计算卵巢面积、黄体面积、颗粒层厚度、膜层厚度、黄体/卵巢面积比、黄体/卵泡数目比、闭锁卵泡/总卵泡数目比。颗粒层厚度与膜层厚度选择 3 个 200 倍镜下视野的卵泡进行分析计算。

1.6 统计学分析

各组数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 三组间差异性检验采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 Scheffe 法, 数据由 Stata 8.0 统计软件包进行处理, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 大鼠体重、体长和卵巢重量比较

运动组大鼠的体重和 Lee 指数明显低于非运动组, 与对照组没有显著差异。非运动组的卵巢器官指数明显低于运动组和对照组, 见表 1。

表 1 三组大鼠体重、体长、Lee 指数、卵巢重量和器官指数比较

	PCOS 运动组 (n=6)	PCOS 非运动组 (n=6)	非 PCOS 对照组 (n=5)
体重 (g)	167.17 $\pm$ 4.79	177.00 $\pm$ 6.69 ^①	171.00 $\pm$ 5.83
体长 (cm)	19.07 $\pm$ 0.29	18.87 $\pm$ 0.59	18.68 $\pm$ 0.24
Lee 指数	288.92 $\pm$ 1.72	297.74 $\pm$ 7.19 ^①	297.16 $\pm$ 6.17
卵巢重量 (mg)	16.77 $\pm$ 1.99	14.07 $\pm$ 1.05	16.15 $\pm$ 1.80
卵巢器官指数 ($\times 10^{-3}$)	0.10 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01 ^①	0.09 $\pm$ 0.01

①与运动组比较 $P < 0.05$

2.2 大鼠空腹血糖、血清胰岛素和性激素比较

FBG 三组间无显著差异, FINS 在非运动组显著高于运动组和对照组, FBG/FINS 比值在非运动组显著低于其他两组。E2 在运动组显著低于非运动组, P 三组间差异无显著性, T 在非运动组显著高于运动

组,见表2。

2.3 卵巢切片观察和形态计量学分析

运动组和对照组卵巢色泽红,而PCOS非运动组卵巢表面较苍白,见囊状扩张的卵泡;镜下三组皆可见黄体,运动组和对照组大鼠可见发育中的各期卵泡,闭锁卵泡少;非运动组大鼠窦前卵泡和闭锁卵泡较多并有囊性扩张,卵巢包膜增厚,卵泡膜内层与外膜细胞分层明显,卵泡膜细胞层厚度增加,卵巢间质增生,如图1(见前置彩色插页5)。

运动组与对照组卵巢面积接近,显著高于非运动组。黄体面积和数目在非运动组明显低于对照组。颗粒层厚度、窦状卵泡数和黄体/总卵泡数比值在运动组和对照组相近,且明显高于非运动组;而其膜层厚度、窦前卵泡数、闭锁卵泡数和闭锁卵泡数/总卵泡数比值在运动组和对照组均显著降低,见表3。

表2 三组大鼠血糖、胰岛素和性激素比较 ($\bar{x} \pm s$)

	PCOS 运动组 (n=6)	PCOS 非运动组 (n=6)	非 PCOS 对照组 (n=5)
FBG(mmol/L)	4.63±.56	4.13±.42	4.70±.25
FINS(μIU/ml)	17.19±1.35	20.11±1.66 ^①	17.50±1.36 ^②
FBG/FINS 比值	0.27±0.05	0.21±0.03 ^①	0.27±0.02 ^②
E2(ng/ml)	1.22±0.11	1.63±0.30 ^①	1.33±0.16
P(ng/ml)	0.59±0.12	0.53±0.19	0.56±0.23
T(ng/ml)	0.05±0.02	0.14±0.07 ^①	0.11±0.01

①与运动组比较 $P<0.05$;②与非运动组比较 $P<0.05$

表3 三组大鼠卵巢形态学数据分析 ($\bar{x} \pm s$)

	PCOS 运动组 (n=6)	PCOS 非运动组 (n=6)	非 PCOS 对照组 (n=5)
卵巢面积(mm ²)	6.04±0.83	4.97±0.31 ^①	6.34±0.72 ^②
黄体面积(mm ²)	1.77±0.50	1.39±0.56	2.14±0.65 ^②
卵泡颗粒层厚度(μm)	30.63±3.86	23.66±3.71 ^①	30.25±2.32 ^②
卵泡膜层厚度(μm)	13.59±1.44	16.59±1.84 ^①	14.204±1.36 ^②
窦前卵泡数	4.33±1.37	6.83±0.75 ^①	4.8±1.30 ^②
窦状卵泡数	6.17±1.47	3.33±1.21 ^①	7.00±1.00 ^②
闭锁卵泡数	1.67±1.03	4±0.89 ^①	2.2±0.84 ^②
总卵泡数	12.17±2.48	14.17±1.94	14±1.58
黄体数目	6.17±1.72	4±1.79	8±3.08 ^②
黄体/卵巢面积比值	0.30±0.084	0.28±0.11	0.35±0.12
黄体/总卵泡数比值	0.54±0.21	0.29±0.13 ^①	0.57±0.21 ^②
闭锁卵泡数/ 总卵泡数比值	0.14±0.09	0.28±0.03 ^①	0.16±0.06 ^②

①与运动组比较 $P<0.05$;②与非运动组比较 $P<0.05$

3 讨论

多囊卵巢综合征的发病机制目前仍然不清楚。育龄期妇女中,PCOS的患病率为5%—10%,是生育期妇女月经紊乱最常见的原因,表现为血清胰岛素、雄激素和黄体生成素(LH)升高,50%的患者合并有肥胖^[6]。既往对其治疗主要以降低雄激素和LH为主,现已逐渐认识到胰岛素抵抗在其发病机制中的重要作用,因此低热量饮食和运动锻炼已经被推荐为PCOS患者的第一线治疗手段^[6]。我们的前期临

床研究发现,运动不仅能降低高LH血症,而且能改善胰岛素抵抗,降低高胰岛素血症,从而达到调经促排卵的功效^[7]。目前国内外主要研究体重降低和胰岛素增敏剂对其治疗作用,运动锻炼的研究较少,而利用动物模型观察运动锻炼改善PCOS的效应的研究更是鲜见。

由于多囊卵巢综合征并非一种简单独特的疾病,而是一种多病因、临床表现多态性的综合征,病理生理变化涉及广泛,包括神经、内分泌及代谢紊乱和卵巢局部的调控障碍,任何环节的调节机制不平衡都会引起各种反馈失常和连锁反应。因此,有学者认为没有必要也不可能有一个“万能”的PCOS动物模型,动物模型的适合与否取决于所要研究的PCOS相关疾病^[8]。本课题依据Beloosesky等的造模方法,连续观察阴道涂片发现实验组呈现持续性动情间期,而对照组动情周期存在;实验组呈现多囊状改变,窦前卵泡募集,膜层增厚,颗粒层变薄,而对照组未发现明显变化;同时实验组表现为显著的胰岛素抵抗状态,而对照组未见异常。因此该模型既有卵巢形态特征,又有代谢内分泌的疾病特征,符合我们的实验需求。

高胰岛素血症和高雄激素血症是PCOS的两个显著特征,但是其因果关系现今仍不明晰,大多数学者认为高胰岛素血症是主导因素。高胰岛素血症主要通过如下机制促进雄激素生成:①胰岛素直接刺激垂体LH分泌,促进卵巢卵泡膜细胞增生,CYP17酶活性增强,增加雄激素的合成;②抑制肝脏合成性激素结合蛋白(SHBG)和胰岛素样因子结合蛋白(IGFBP-1),导致游离的SHBG和IGF-1浓度升高,前者是机体对雄激素的生物利用度增加,后者又可与胰岛素交互作用,促进卵巢膜细胞增生;③胰岛素直接刺激肾上腺分泌雄激素增多^[9]。我们的实验发现,给青春前大鼠外源性注射雄激素可以出现胰岛素抵抗,引发高胰岛素血症,提示高雄激素血症与高胰岛素血症互为因果,与既往的一些临床研究相符^[10]。其机制可能与雄激素减少PCOS患者细胞上胰岛素结合位点和降低亲和力以及胰岛素受体的自身磷酸化下降有关^[11]。亦有研究表明很可能与睾酮直接作用于骨骼肌组织使胰岛素敏感型的肌纤维数目减少,对胰岛素抵抗型的肌纤维增加和肌肉毛细血管减少有关^[12]。最终高胰岛素血症和高雄激素血症两者间的相互作用导致恶性循环形成,促进了PCOS发生和进展。

改善胰岛素抵抗状态,降低胰岛素水平,阻断上述恶性循环,可以达到对PCOS治疗作用。研究发

现,二甲双胍、体重减轻和噻唑烷二酮类药物都可改善胰岛素状态,恢复内分泌状态,甚至排卵^[9]。当前,运动锻炼可改善糖尿病胰岛素抵抗状态已经为大家所认识,其机制是通过激活非胰岛素依赖性的 AMPK 信号转导通路,促进 GLUT4 的表达,从而增加骨骼肌葡萄糖的摄取,提高胰岛素的利用效率。反映胰岛素抵抗的间接指标有 FBG/FINS 比值和 Lee 指数^[13]。本实验发现,给予 PCOS 大鼠 15d 的游泳运动锻炼,运动组空腹胰岛素显著低于非运动组,且 FBG/FINS 比值也显著高于非运动组,提示短期运动锻炼就能够明显改善胰岛素的抵抗,提高胰岛素敏感性。Lee 指数与腹部脂肪含量呈正相关,本实验中体重与 Lee 指数的降低与胰岛素抵抗改善相一致。上述改变与 Masashi 的实验的结果雷同^[2],进一步揭示了运动锻炼具有降低高胰岛素血症的作用。Khorram 等^[13]研究发现,给予肥胖的 PCOS 患者短期(2 周)服用二甲双胍可以显著降低血清胰岛素和胰岛素抵抗,甚至在 2 型糖尿病患者中,使用二甲双胍仅 10 天就可见到胰岛素敏感性的改善^[13],而本实验采用两周的短期运动方案得到了相类似的结果。

本研究中,短期运动导致的睾酮浓度降低可能是胰岛素浓度降低所致,与阻断了高雄激素和高胰岛素的恶性循环有关,而雌二醇是睾酮的下游产物,其降低也是必然。在 Khorram 的研究中,虽然没有发现总睾酮和游离睾酮浓度降低,但却发生 SHBG 浓度升高,而 Pirwany 等^[14]给 PCOS 患者服用 1 周二甲双胍就出现了血清睾酮和 LH 的降低。可见,SHBG、睾酮和 LH 都与胰岛素抵抗和高胰岛素血症呈现相关关系,提示运动和二甲双胍降低胰岛素水平后均可降低雄激素水平。黄体酮的水平在三组间没有差异,可能与造模中黄体酮的合成受到抑制有关^[1],提示短期的运动锻炼不足以使其呈现显著改变。

PCOS 患者卵泡发育障碍基本表现是卵泡募集数量较多、卵泡选择及优势化受阻、卵泡发育停滞及无排卵发生。囊状卵泡通常被认为是充满液体的大囊泡,其颗粒层减少,而膜层增厚,一般认为,它是由于窦状卵泡的卵母细胞和颗粒层凋亡以及颗粒层基层的上皮化所形成的。既往研究表明,雄激素可能是导致多囊样改变、膜层增厚和卵泡闭锁的原因;而现在愈来愈多的研究发现胰岛素和 IGF-1 具有分裂作用,可以促进卵泡膜层和间质增厚,导致皮下小卵泡聚集,卵泡发育闭锁,从而形成 PCOS 样卵巢^[9-10]。

本实验中,外周注射睾酮导致卵巢重量明显缩小,这与青春期雄性化大鼠的卵巢重量变化一致,其

机制尚未明确,推测可能缘于长期大剂量的睾酮对大鼠卵巢发育具有抑制作用,但是最近有人给大鼠连续注射 7d,发现卵巢切面面积增大,但不能认为其重量增加,因为睾酮可导致囊状卵泡的出现,从而增大卵巢切面面积,而且注射的时间较短,诱导的凋亡不显著^[1]。本实验发现,PCOS 运动组卵巢膜层显著降低,颗粒层厚度增厚,基本恢复到正常水平,归因于囊状卵泡和闭锁卵泡的减少;窦前卵泡和闭锁卵泡数目显著减少,而窦状卵泡数目升高到正常水平,表明胰岛素对卵泡的募集和抑制发育作用减弱,则卵泡能够按正常轨迹发育,从而证明运动改善 PCOS 大鼠的胰岛素抵抗状态对卵巢形态产生一定的影响,反过来,同时也证明了胰岛素确实是导致大鼠多囊样改变的因素。Manni^[15]的研究也发现自发运动可以预防多囊卵巢的出现。然而也有相反的结果,即 Misugi^[16]研究发现,同时给大鼠注射雄激素和胰岛素增敏剂能显著降低卵巢睾酮水平,却未能改善皮下多囊样形态。黄体的出现表明有排卵发生,本实验中黄体面积所占卵巢面积的比例在三组间没有差异,这也与黄体酮浓度在三组间没有差异相一致。而 PCOS 非运动组卵巢面积和黄体面积均减低,可能与卵巢的重量和大小减少有关。PCOS 非运动组黄体数目明显少于其余两组,但运动组基本上接近对照组,提示运动组更多卵泡被募集和发育成熟,有更多的排卵发生。Manni^[15]发现自发运动可增加黄体数目,且表现为新鲜黄体,而非运动组主要为退化黄体,也验证了我们的结果,即运动可促进排卵。本研究从形态学上观察了卵巢组织学变化,细胞支架蛋白和凋亡因子在运动改善卵巢形态中的作用尚有待进一步研究。

4 结论

为期两周的游泳运动可显著改善丙酸睾酮诱导的 PCOS 大鼠胰岛素抵抗状态,降低血清睾酮和雌二醇水平,恢复多囊卵巢的正常形态,论证了运动改善多囊卵巢综合征的组织学的变化,为临床深入开展多囊卵巢综合征的运动疗法提供了理论依据。

参考文献

- [1] Beloosesky R, Gold R, Almog B, et al. Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: Modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio [J]. *Int J Mol Med*, 2004,14(2):207.
- [2] Morifuji M, Sanbongi C, Sugiura K. Dietary soya protein intake and exercise training have an additive effect on skeletal muscle fatty acid oxidation enzyme activities and mRNA levels in rats

(下转 338 页)