

levels.

**【Key words】** Platelet-rich plasma; Rats; Premature ovarian failure; Intraperitoneal injection

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是指40岁以下的女性出现闭经、促卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)>40 IU/L及雌二醇(Estrogen, E<sub>2</sub>)水平降低,伴有潮热盗汗、失眠、性欲低下等围绝经期症状的女性生殖内分泌疾病<sup>[1]</sup>。POF不仅是引起不孕的重要原因,还会增加心血管疾病、骨质疏松等疾病的发生风险<sup>[2]</sup>。近年来,POF的发病率越来越高,且发病年龄有年轻化趋势。目前发现与POF相关的病因主要包括遗传因素、自身免疫性因素、医源性因素等<sup>[3]</sup>。针对各种病因的POF,现阶段治疗方法有限。目前激素替代疗法(hormone replacement therapy, HRT)是POF患者临床最常用的治疗方法,其可以改善POF造成的雌激素水平缺乏,缓解患者因为激素水平下降导致的各种生理不适。然而,它并不能有效恢复卵巢功能<sup>[4]</sup>。由于现阶段治疗方案的临床效果并不明确,需寻求新的有效治疗方式来改善POF。

富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是从自体外周血中分离,采用密度梯度离心法分离提取得到的富含高浓度血小板的血浆制品。PRP中血小板含量为全血的3~5倍<sup>[5]</sup>,广泛应用于疼痛科、骨科、创面修复科等多个临床领域<sup>[6]</sup>。PRP作为唯一的自体内源性复合生长因子,自体来源没有免疫原性,而且具有制备简单、安全性高、价格低廉、副作用小等优点。激活后的PRP中可分泌释放多种生长因子。这些生长因子的浓度比率与体内类似,因而能够发挥最佳协同效应<sup>[7]</sup>。生长因子通过促进血管生成、细胞增殖和组织修复与卵巢组织相互作用,这对恢复卵巢功能至关重要。有研究表明PRP可有效改善POF症状并促进患者生育<sup>[8]</sup>。

本研究旨在通过顺铂建立卵巢早衰大鼠模型,通过注射PRP探讨其对大鼠卵巢早衰的改善作用并探究其时效性,为治疗卵巢早衰提供新的思路。

## 1 对象与方法

**1.1 实验对象** 该实验程序经四川省医学科学院·四川省人民医院生殖医学伦理委员会批准(批准文号:202302),于2023年5月在四川省人民医院实验动物实验室进行。33只8周龄雌性SD大鼠,平均体重约200g,购自成都达硕实验动物科技有限公司。每只大鼠每天被给予12小时的光照,自由饮水和食物,并遵循正常的生物节律。

【基金项目】四川省科技计划资助项目(编号:2022YFS0380)

【通讯作者】吕群

**1.2 方法** 主要试剂:顺铂购于上海碧云天生物技术有限公司;相关激素ELISA检测试剂盒及4%组织细胞固定液购于爱博泰克生物科技有限公司;伊红购于合肥博美生物科技有限责任公司;苏木素购于武汉塞维尔生物科技有限公司。

**1.2.1 化疗性卵巢早衰大鼠模型的建立** 采用随机数字表法将33只8周龄SD雌性大鼠分为正常组( $n=12$ )和模型组( $n=21$ ),在四川省人民医院动物实验中心中饲养,每笼饲养3只大鼠。它们在安静的无菌IVC笼子条件下喂食,可以无限制地获得饮用水和颗粒式饲料。无菌垫层和水每3天更换一次。饲养环境应尽可能通风,进行12小时的光-暗循环,温度控制在25℃,相对湿度为50%~60%。以顺铂为造模药物,模型组每隔一周腹腔内给予顺铂6mg/kg,共2剂,用于诱导POF。同日正常组腹腔注射等量PBS,每日称重。造模结束后两组分别随机取3只大鼠,观察其体重、脱发、血清激素变化及卵巢组织形态学来判定造模是否成功。

**1.2.2 PRP的制备** 取5只实验外SD大鼠采用舒泰50进行麻醉后,心脏取血,用装有枸橼酸钠抗凝剂的5ml注射器分别采血约4ml;留取少量血标本在1h内检测血小板浓度,与之后的PRP血小板翻倍作对比,剩下的液体用于后续实验。制备PRP采用Landesberg2次离心法<sup>[9]</sup>:在20℃条件下,第1次离心将离心机设置为转速200g,离心15min。离心结束后可见全血共分为3层:上层为血清;中层为白细胞-血小板层;下层为红细胞;使用移液枪吸取上中层到新的离心管中。第2次离心将离心机设置为转速300g,离心10min。结束后可见血浆分2层:上层是血清,下层是富含血小板血浆,吸取下层液体备用。将10%CaCl<sub>2</sub>缓冲液与牛凝血酶按照体积9:1的比例进行混合,每毫升PRP中加入20U该混合物并进行充分搅拌,在37℃条件下孵育1h,使之激活。活化后的PRP应在1h内直接应用。

**1.2.3 实验取材** 在造模成功后第2天,将模型组( $n=18$ )进一步分为POF组及PRP组。目前有三个组:PRP组( $n=9$ )、POF组( $n=9$ )和正常组( $n=9$ )。PRP组大鼠腹腔注射200μlPRP1次,POF组和正常组腹腔注射等量无菌水。注射后第5、10、20天后,每组分别随机抽取3只大鼠予以舒泰50麻醉后心脏取血,抽取的血液在离心管中平静放置30min,将离心机设置为1000r/min,离心20min,将上面的血清抽出来,放入EP管中,在-20℃下保存。

用过量的舒泰 50 推注处死大鼠, 检查大鼠按压脚趾时有无呼吸暂停, 无疼痛反应, 消毒后沿腹部中线纵切口进腹, 取出大鼠双侧卵巢组织, 左侧卵巢用 4% 多聚甲醛固定液固定用于后续切片染色, 右侧卵巢则放置-80℃冷冻保存。

**1.2.4 卵巢组织冰冻切片后 HE 染色** 大鼠的卵巢组织样品在 4% 多聚甲醛固定液中进行固定 24 h, 随后进行包埋、切片、脱蜡、复水等一系列处理。所获得的切片使用苏木精染色 10~20 min, 伊红染色 3~5 min。

**1.2.5 卵巢组织观察与卵泡计数** 采用数码断层扫描仪对卵巢组织病理切片进行图像采集。各组大鼠卵泡计数由两名实验员分别单独计数一次, 具体如下: 每 5 张切片进行一次计数, 各级卵泡计数的具体标准如下: 原始卵泡定位于卵巢皮质的浅层区域, 可见一个初级卵母细胞和环绕其的一层梭形前颗粒细胞; 初级卵泡中则含有一个体积较大的次级卵母细胞及小的极体, 且尚未形成液腔; 次级卵泡表现为大的卵母细胞和小的极体, 其中卵母细胞被双层颗粒细胞层所围绕, 并伴随液腔的出现; 成熟卵泡的标志则是卵母细胞被多层颗粒细胞所环绕, 其中卵泡腔明显增大, 颗粒层则相对变薄; 而闭锁卵泡则呈现为卵母细胞核的固缩, 以及颗粒细胞结构的相对紊乱。

**1.2.6 ELISA 检测血清 FSH、E2、AMH 激素水平** 按照要求准备好所必须的样品及试剂, 首先洗板 3 次, 然后向各孔中加入 100 μl 的标准品或待测样本, 并在 37℃ 下孵育 2 h, 之后再洗板 3 次; 向每个孔中加入 100 μl 的生物素化抗体工作液在 37℃ 下

孵育 1 h, 然后洗板 3 次; 之后向其中加入 100 μl 的底物溶液, 在 37℃ 避光条件下孵育 15~20 min 后加入 50 μl 的终止液。在 5 min 内检测 450 nm 波长的 OD 值, 并将校正波长设定为 570 nm 或 630 nm。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS 23.0 统计学软件进行分析处理。符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验; 多组比较采用单因素方差分析, 组内两两比较时则采用 LSD t 检验; 呈偏态分布的计量资料两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 POF 大鼠模型的建立与评价

**2.1.1 正常值与模型组血清激素水平比较** 造模结束后, 与正常组相比, 模型组大鼠血清 E2、AMH 水平降低, 血清 FSH 水平升高, 差异有统计学意义 (P<0.05)。见表 1。

表 1 两组大鼠血清激素水平比较

组别	E2 (ng/L)	AMH (μg/L)	FSH (μg/L)
正常组	119.60±3.30	1.85±0.03	5.67±0.15
模型组	98.16±2.22	1.07±0.15	8.97±0.21
t	9.68	8.72	-22.14
P	0.001	0.001	0.000

**2.1.2 卵巢组织形态学比较** 造模结束后, 正常组大鼠卵巢组织结构清晰, 能够观察到各级卵泡, 并且颗粒细胞层相对较厚; 而模型组大鼠的卵巢组织结构则相对不清晰, 闭锁卵泡明显增多, 同时颗粒细胞层也出现相对较薄的趋势。见图 1。

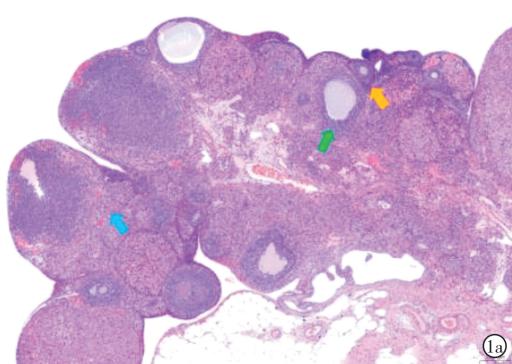
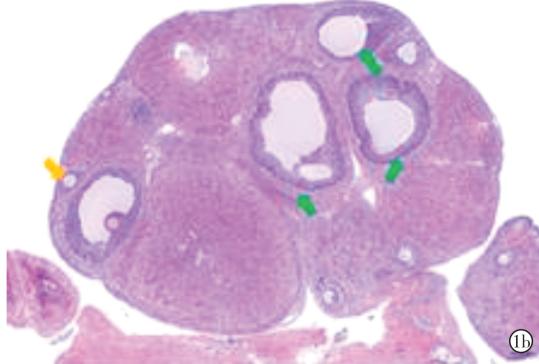


图 1 造模后卵巢组织形态学 (x40) a: 正常组; b: 模型组; 初级卵泡 (↑), 次级卵泡 (↑), 闭锁卵泡 (↑)

**2.1.3 正常值与模型组卵泡计数比较** 与正常组相比, 模型组大鼠的原始卵泡数目、初级卵泡数目、次级卵泡数目、成熟卵泡数目明显减少, 而闭锁卵泡数目则显著增多, 差异有统计学意义 (P<0.05)。见表 2。



**2.1.4 正常值与模型组体重比较** 造模前, 正常组与模型组的大鼠体重比较差异无统计学意义 (P>0.05); 造模结束后, 模型组大鼠体重低于正常组, 差异有统计学意义 (P<0.01)。见表 3。

表 2 两组各级卵泡计数比较(个)

组别	原始卵泡	初级卵泡	次级卵泡	成熟卵泡	闭锁卵泡
正常组	31.67±1.53	12.33±2.08	5.67±1.15	1.67±0.58	5.00±0.00
模型组	7.00±1.00	2.33±0.58	1.00±0.00	0.33±0.58	16.00±2.65
t	23.38	8.02	6.74	2.83	-7.19
P	0.000	0.001	0.002	0.047	0.002

表 3 两组大鼠体重比较(g)

组别	造模前	造模后
正常组	202.33±2.52	207.00±2.65
模型组	203.33±2.52	180.67±3.05
t	-0.49	11.29
P	0.652	0.000

## 2.2 干预后各组大鼠指标比较评价

### 2.2.1 各组大鼠不同时间点血清激素水平比较与正常组比较,建模成功后 POF 组的 E2、AMH 水平

表 4 各组大鼠不同时间点血清激素的比较

组别	激素	D5	D10	D20
正常组	E2(ng/L)	120.93±1.89	121.60±8.38	121.60±3.55
	FSH(μg/L)	5.87±0.31	5.83±0.49	5.97±0.46
	AMH(μg/L)	1.84±0.05	1.71±0.05	1.70±0.13
POF 组	E2(ng/L)	98.87±2.32 <sup>a</sup>	99.20±3.25 <sup>a</sup>	100.53±4.77 <sup>a</sup>
	FSH(μg/L)	8.97±0.80 <sup>a</sup>	9.07±0.72 <sup>a</sup>	8.67±0.51 <sup>a</sup>
	AMH(μg/L)	1.04±0.06 <sup>a</sup>	1.05±0.10 <sup>a</sup>	0.95±0.10 <sup>a</sup>
PRP 组	E2(ng/L)	106.37±1.40 <sup>ab</sup>	112.70±2.46 <sup>ab</sup>	123.70±3.29 <sup>b</sup>
	FSH(μg/L)	7.07±0.38 <sup>ab</sup>	5.67±0.32 <sup>b</sup>	5.23±0.12 <sup>b</sup>
	AMH(μg/L)	1.24±0.03 <sup>ab</sup>	1.35±0.04 <sup>ab</sup>	1.62±0.04 <sup>b</sup>

a 与正常组比较,  $P<0.05$ ; b 与 POF 组比较,  $P<0.05$

**2.2.2 各组卵巢组织形态学比较** 在显微镜下观察到正常组大鼠的卵巢组织结构呈现出有序的排卵特征,各级生长卵泡清晰可见,其中成熟卵泡数量增多,而闭锁卵泡数量则相对较少;然而 POF 组大鼠的卵巢组织结构明显紊乱,各级生长卵泡数量显著下降,闭锁卵泡数量增多;PRP 治疗后大鼠的卵巢组织中各级卵泡数量较模型组有所增多,闭锁卵泡数量则减少。见图 2。

### 2.2.3 各组大鼠不同时间点卵泡计数比较与正

降低,FSH 水平升高( $P<0.05$ )。与 POF 组相比,在 PRP 治疗后第 5、10 天的 E2、AMH 水平升高,但未恢复正常水平( $P<0.05$ ),在 PRP 治疗后第 20 天的血清 E2、AMH 水平与正常组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与 POF 组相比,在 PRP 治疗后第 5 天的 FSH 水平降低,但未恢复至正常水平( $P<0.05$ ),PRP 治疗后第 10、20 天的 FSH 水平与正常组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 4。

表 5 各组大鼠不同时间点各级卵泡计数(个)

组别	卵泡	D5	D10	D20
正常组	原始卵泡	31.33±3.06	30.33±3.79	30.00±2.65
	初级卵泡	12.33±1.15	12.33±1.53	12.67±1.53
	次级卵泡	5.33±0.58	5.00±1.00	5.33±0.58
	成熟卵泡	2.33±0.58	2.67±0.58	2.67±0.58
	闭锁卵泡	4.67±0.58	4.33±0.58	4.67±0.58
POF 组	原始卵泡	10.00±2.00 <sup>a</sup>	10.33±2.08 <sup>a</sup>	9.33±1.53 <sup>a</sup>
	初级卵泡	3.67±0.58 <sup>a</sup>	4.33±0.58 <sup>a</sup>	2.67±1.15 <sup>a</sup>
	次级卵泡	1.33±0.58 <sup>a</sup>	1.67±0.58 <sup>a</sup>	1.67±0.58 <sup>a</sup>

组别	卵泡	D5	D10	D20
PRP 组	成熟卵泡	0.33±0.58 <sup>a</sup>	0.33±0.58 <sup>a</sup>	0.67±0.58 <sup>a</sup>
	闭锁卵泡	14.00±1.00 <sup>a</sup>	14.33±0.58 <sup>a</sup>	15.00±1.00 <sup>a</sup>
	原始卵泡	16.33±0.58 <sup>ab</sup>	18.33±1.53 <sup>ab</sup>	29.00±1.00 <sup>b</sup>
	初级卵泡	6.00±1.00 <sup>ab</sup>	8.67±0.58 <sup>ab</sup>	11.00±1.00 <sup>b</sup>
	次级卵泡	3.00±1.00 <sup>ab</sup>	3.33±0.58 <sup>ab</sup>	4.33±0.58 <sup>b</sup>
	成熟卵泡	1.33±0.58 <sup>a</sup>	1.67±0.58 <sup>ab</sup>	2.33±0.58 <sup>b</sup>
	闭锁卵泡	9.00±1.00 <sup>ab</sup>	7.33±0.58 <sup>ab</sup>	5.33±0.58 <sup>b</sup>

a 与正常组比较,  $P<0.05$ ; b 与 POF 组比较,  $P<0.05$

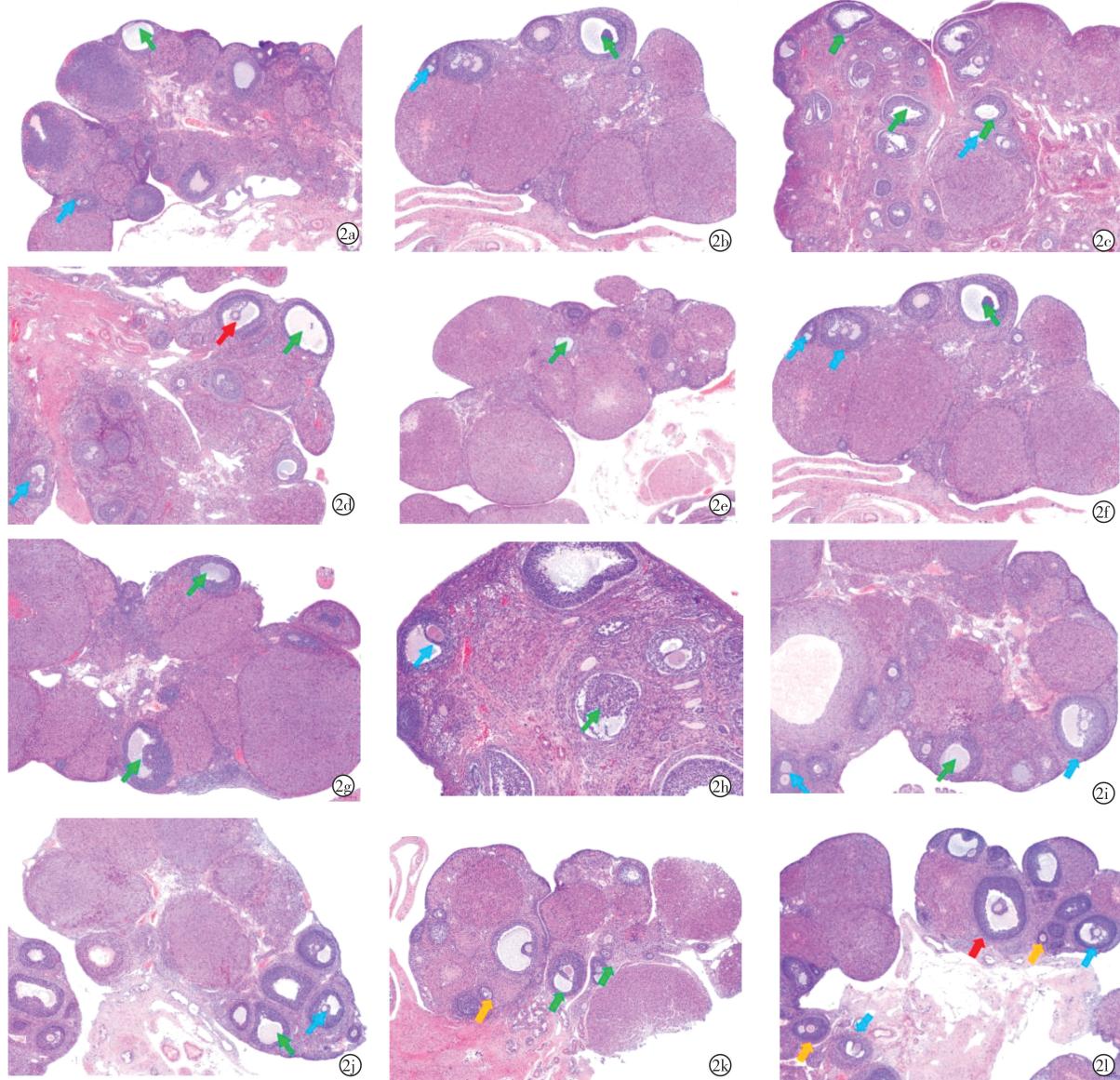


图 2 PRP 治疗后不同时间各组卵巢组织 HE 染色图( $\times 40$ ) 图 a~c:注射 PRP 第 0 天; d~f:治疗后第 5 天; g~i:治疗后第 10 天; j~l:治疗后第 20 天。各级卵泡标注:初级卵泡(↑)次级卵泡(↑)成熟卵泡(↑)闭锁卵泡(↑)

**2.2.4 各组大鼠不同时间点体重比较** 建模成功后 POF 组的大鼠体重均低于正常组 ( $P<0.05$ )。与 POF 组相比,在 PRP 干预后第 5、10 天的体重上升 ( $P<0.05$ ),但仍未恢复至正常水平。第 20 天的大鼠体重与正常组相比,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 6。

表 6 各组大鼠不同时间点体重的比较 (g)

组别	D5	D10	D20
正常组	217.67±2.61	228.33±2.53	255.00±4.13
POF 组	190.87±3.60 <sup>a</sup>	190.87±6.40 <sup>a</sup>	200.53±4.11 <sup>a</sup>
PRP 组	201.57±0.75 <sup>ab</sup>	218.23±5.15 <sup>ab</sup>	247.47±4.74 <sup>b</sup>
$P$	0.000	0.000	0.000

a 与正常组比较,  $P<0.05$ ; b 与 POF 组比较,  $P<0.05$

### 3 讨论

目前研究表明,顺铂对女性患者卵巢的细胞毒性作用影响着卵泡生长发育过程,并且引起卵泡结构破坏、卵巢组织纤维化和卵巢功能减退或丧失<sup>[10]</sup>,从而导致 POF。用顺铂建立的最常见的 POF 模型包括低剂量和高剂量的建模方法<sup>[11]</sup>。低剂量建模主要是每隔周注射 4 mg/kg,共 2 剂。高剂量建模主要是指每隔周注射 6 mg/kg,共 2 剂。实验前,我们建立了 4 mg/kg 剂量的模型,发现 SD 大鼠的体重在后期恢复正常,表现为食欲可,脱发减少。因此本实验选用 6 mg/kg 剂量顺铂建立 POF 模型。

卵巢作为体内分泌性激素的关键器官,其功能评估通常依赖于血清中性激素水平的检测。其中常以血清 FSH、E<sub>2</sub> 及 AMH 水平的变化被认为是评估卵巢功能的主要参考指标。而血清 FSH 水平的升高,E<sub>2</sub>、AMH 水平的下降构成了 POF 的主要生化特征之一。同时从病理学角度来看,化疗诱导的卵巢早衰所导致的卵巢储备功能下降的原因在于各级卵泡损伤数量减少,而闭锁卵泡数量增多。有研究表明,PRP 对环磷酰胺诱导的 POF 大鼠的卵泡生长和卵巢组织修复有积极促进作用<sup>[12]</sup>。此外 Sills 等<sup>[13]</sup>将 PRP 引入 POF 女性人群中应用,通过卵巢内注射 PRP,患者 FSH 下降,E<sub>2</sub> 上升。与我们的研究结果相似。

目前尚不清楚 PRP 对卵巢功能的改善是否存在时间跨度。我们总结了之前的研究,发现大部分研究没有报道对 PRP 注射后不同时间节点的观察。因此,本实验设计在 PRP 注射后第 5 天、10 天和 20 天通过比较性激素变化、卵巢组织形态学和各级卵泡计数,试图探讨 PRP 注射后疗效与时间是否存在相关性。本研究结果表明,在给药后第 5、10 天和第 20 天三个时间点 PRP 组 E<sub>2</sub>、AMH 水平与 POF 组相比逐步上升,但在第 5、10 天该水平仍低于正常组,第 20 天时 PRP 组的 E<sub>2</sub>、AMH 恢复至正常组水平。而 FSH 水平在 PRP 治疗后的三个时间节点与 POF 组相比逐步下降,在 PRP 治疗后第 5 天仍高于正常组,但在 PRP 治疗后第 10、20 天 PRP 组 FSH 水平可下降至正常组水平,FSH 作为最早恢复正常指标,可能提示 FSH 是检测卵巢功能恢复较为灵敏的指标。此外,从各级卵泡计数的结果来看,PRP 组原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡计数与 POF 组相比逐步上升,闭锁卵泡计数逐步下降,但在 PRP 治疗后第 5、10 天上述卵泡计数与正常组相比均有统计学差异,治疗后第 20 天治疗组各级卵泡均恢复至正常水平。其中在 PRP 注射后第 5 天,成熟卵泡与 POF 组相比无明显增加,这提示对成熟卵泡数量的恢复起效较慢,这可能与大鼠生育力的逐步恢复有关。

以上数据提示我们在 PRP 治疗后前 10 天的随访可能不足以观察 PRP 的疗效。但经 PRP 治疗 20 天后可观察到卵巢完全恢复,证明 PRP 疗效可能具有时间依赖性。随后,我们应进行长期监测恢复和随访女性患者妊娠结果,以确定 PRP 的作用是否具有长期可持续性。目前已有 PRP 改善卵巢早衰的临床病例,但长期随访研究样本量少。本研究可以为临床研究提供新的方向。本实验大鼠样本量小,有不足之处,后续可以扩大样本量更深入从机制角度探讨 PRP 对 POF 的改善作用。

### 【参考文献】

- [1] Webber L, Davies M, Anderson R, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency[J]. Hum Reprod, 2016, 31(5): 926-937.
- [2] Chen H, Li J, Cui T, et al. Adjuvant gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy induced premature ovarian failure in premenopausal women[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011(11): Cd008018.
- [3] Freitas ATA, Donovan Giraldo AE, Pravatta Rezende G, et al. Body composition in women with premature ovarian insufficiency using hormone therapy and the relation to cardiovascular risk markers: A case-control study[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2021, 94(1): 111-118.
- [4] Machura P, Grymowicz M, Rudnicka E, et al. Premature ovarian insufficiency - hormone replacement therapy and management of long-term consequences[J]. Prz Menopausalny, 2018, 17(3): 135-138.
- [5] Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective[J]. J Cutan Aesthet Surg, 2014, 7(4): 189-197.
- [6] Mouanness M, Ali-Bynom S, Jackman J, et al. Use of intra-uterine injection of platelet-rich plasma (PRP) for endometrial receptivity and thickness: a Literature review of the mechanisms of action[J]. Reprod Sci, 2021, 28(6): 1659-1670.
- [7] Dawood AS, Salem HA. Current clinical applications of platelet-rich plasma in various gynecological disorders: An appraisal of theory and practice[J]. Clin Exp Reprod Med, 2018, 45(2): 67-74.
- [8] Sfakianoudis K, Simopoulou M, Grigoriadis S, et al. Reactivating ovarian function through autologous platelet-rich plasma intraovarian infusion: pilot data on premature ovarian insufficiency, perimenopausal, menopausal, and poor responder women[J]. J Clin Med, 2020, 9(6): 1809.
- [9] Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2020, 58(3): 297-300.
- [10] Morgan S, Anderson RA, Gourley C, et al. How do chemotherapeutic agents damage the ovary[J]. Hum Reprod Update, 2012, 18(5): 525-535.
- [11] 张丽娟,陶仕英,赵丕文,等.顺铂建立大鼠卵巢早衰模型的实验研究[J].世界中医药,2015,10(10): 1563-1565.
- [12] Hillier SG. Paracrine support of ovarian stimulation[J]. Mol Hum Reprod, 2009, 15(12): 843-850.
- [13] Sills ES, Rickers NS, Li X, et al. First data on in vitro fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium gluconate-activated autologous platelet rich plasma[J]. Gynecol Endocrinol, 2018, 34(9): 756-760.

(收稿日期:2024-12-16;修回日期:2025-03-05)

(本文编辑:彭 羽)