

基于免疫性卵巢早衰小鼠模型的建立研究卵巢早衰的免疫机制

王佩娟, 陈思, 卢燕

南京中医药大学附属中西医结合医院 江苏省中医药研究院妇产科, 江苏 南京 210028

摘要: **目的** 建立免疫性卵巢早衰(POF)动物模型,探讨模型小鼠 POF 的免疫调节机制,为临床研究 POF 的免疫机制提供实验依据。**方法** 选取 B6AF1 雌鼠 40 只,分为空白组(20 只)与模型组(20 只)。模型组小鼠用透明带 3 (ZP3) 的多肽片段(pZP3)为免疫原免疫小鼠建立自身免疫性 POF 小鼠模型。比较两组小鼠一般情况,以判断 pZP3 对模型小鼠状态的影响。14 d 后两组小鼠均取脏器称重,计算脏器指数。两侧卵巢组织病理切片分别进行 HE 染色和免疫荧光染色,检测卵巢组织形态、淋巴细胞浸润和透明带抗体分布的情况。采用实时定量 PCR 检测叉状/翼状螺旋转录因子(Foxp3)及维甲酸相关孤儿核受体 γ t (ROR- γ t)mRNA 表达情况。**结果** 经 pZP3 免疫的 B6AF1 小鼠一般情况较差,容易出现烦躁和愤怒等现象。与空白组相比,模型组小鼠脾脏指数升高($P < 0.01$),胸腺指数和卵巢指数均下降(P 均 < 0.05),子宫指数有所下降,但无统计学差异($P > 0.05$);空白组卵巢组织中未见炎性细胞浸润及透明带抗体荧光,模型组小鼠卵巢组织中出现了不同程度的炎性细胞浸润,且有强度不等的透明带抗体荧光的显现。实时定量 PCR 结果显示,与空白组相比,模型组小鼠脾脏中 Foxp3 mRNA 相对表达水平明显下降($P < 0.01$),ROR- γ t mRNA 相对表达水平明显上升($P < 0.05$)。**结论** 采用 pZP3 免疫 B6AF1 雌性小鼠能够成功建立免疫性 POF 模型,其中调节性 T 细胞(Treg 细胞)和辅助性 T 细胞(Th)17 中的特异性转录因子 Foxp3 和 ROR- γ t 表达水平出现失衡,这有助于研究卵巢早衰的免疫调节机制。

关键词: 卵巢功能减退; 卵巢早衰; 动物模型; 免疫调节

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)03-0298-04

Study on immune regulatory mechanism of premature ovarian failure in mouse model

WANG Pei-juan, CHEN Si, LU Yan

Department of Gynecology and Obstetrics, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine (Jiangsu Province Traditional Chinese Medicine Research Institute), Nanjing, Jiangsu 210028, China

Abstract: Objective To establish animal model of immune premature ovarian failure (POF) and explore the immune regulatory mechanism of mice POF in to provide experimental basis for clinical research of immune POF. **Methods** Forty female B6AF1 mice were selected and divided into blank group and model group ($n = 20$ each). Using mice zona pellucida 3 (ZP3) polypeptide fragment (pZP3) as immunogen, the autoimmune POF mouse model was established by immunizing mice with pZP3 in model group. General conditions of mice in two groups were compared to judge the influence of pZP3 on the state of model mice. After 14 days, mice organs were taken for weighing and calculating organ indexes in two groups. HE staining and immunofluorescence staining were respectively performed on bilateral ovary pathological sections to detect ovarian tissue morphology, lymphocyte infiltration and distribution of zona pellucida antibody. Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) method was used to detect the expressions of forkhead or winged helix transcription 3 (FOXP3) mRNA and retinoid-related orphan nuclear receptor- γ t (ROR- γ t) mRNA. **Results** The general situation of B6AF1 mice immunized with pzp3 was poor, and the mice were prone to irritability, anger, etc. Compared with blank group, in the model group, spleen index increased ($P < 0.01$); thymus index and ovarian index decreased (all $P < 0.01$); uterus indexes were similar between two groups ($P > 0.05$), though it was lower somewhat in model group than that in blank group. No infiltra-

tion of inflammatory cells in ovarian tissues and fluorescence of zona pellucida antibody were observed in blank group. There were inflammatory cell infiltration of different degrees in ovarian tissues and fluorescence of zona pellucida antibody with different intensity in model group. The results of qRT-PCR showed that compared with blank group, in model group, the relative expression level of Foxp3 mRNA in spleen significantly decreased ($P < 0.01$); the relative expression level of ROR- γ t mRNA in spleen significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** The method of immunizing B6AF1 female mice with pZP3 can establish the immune POF model successfully. Expression levels of specific transcription factor Foxp3 and ROR- γ t in regulatory T cells (Tregs) and helper T 17 cells (Th17) present imbalance in immune POF mice which is helpful to study the immune regulatory mechanism of POF.

Key words: Hypoovarianism; Premature ovarian failure; Animal model; Immune regulation

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指 40 岁前由于各种原因引起卵巢生殖内分泌功能减弱, 导致女性性激素缺乏、生育能力下降的一种综合征。流行病学调查显示, POF 发病率约占一般人群 3% ~ 10%, 且有日益增长的趋势^[1]。POF 病因复杂、病机不明, 家族遗传、自身免疫、酶缺陷、手术、放化疗等均可导致 POF 的发生^[2]。有结果显示约 30% POF 的发病与自身免疫异常密切相关。迄今为止, POF 的免疫学机制研究进展十分缓慢, 其主要原因之一是缺乏标准化的动物模型。因此建立一种方法可靠、操作简便、并与实际临床特征相符的动物模型十分重要。本研究根据近几年 POF 相关动物模型研究进展, 选取 [(C57/BL6 \times A/J) F1, B6AF1] 雌鼠作为研究对象, 采用透明带多肽 (pZP3) 建立免疫性 POF 动物模型, 该模型在卵巢形态学的表现与人类 POF 自身免疫性卵巢炎相似, 成功建立免疫性 POF 动物模型有助于进一步探究 POF 的免疫调节机制。

调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 和辅助性 T 细胞 17 (helper T 17 cells, Th17) 对 POF 的重要影响逐渐成为生殖免疫的研究焦点, Th17 可调节自身免疫及感染性疾病的发生及转归, 尤其是在自身免疫性疾病中的作用显得越来越重要^[3-5]。叉状/翼状螺旋转录因子 (Foxp3) 是调控 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞表达的一种关键性转录因子, 而 Th17 的特异性转录因子为维甲酸相关核受体 (ROR- γ t), 因此本研究从 Foxp3 和 ROR- γ t mRNA 角度探讨 POF 的免疫调节机制。

1 材料与方法

1.1 动物 A/J 雄鼠 5 只, C57/BL6 雌鼠 15 只, 鼠龄 7 ~ 9 周, SPF 级, 中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 小鼠合格证号: SCXK - (军) 2007-004, 于江苏省中医药研究院清洁级动物房饲养并繁殖 B6AF1 [(C57/BL6 \times A/J) F1] 雌鼠 40 只; 空白组 20 只, 模型组 20 只。体重 21 ~ 23 g, 自由摄食

饮水, 每天保持 12 h 明暗交替环境, 温度 20 ~ 25 $^{\circ}$ C, 湿度 40% ~ 50%。

1.2 建立模型 用透明带 3 (ZP3) 330 ~ 342 氨基酸系列的多肽片断 [pZP3, ZP3330-342 (NSSSSQFQIHG-PR), 分析纯度 > 95%, 上海吉尔生化有限公司] 配制成为 1 mmol/ml 的溶液; 用弗氏不完全佐剂 (IFA) (美国 Sigma 公司) 配制成为含有 5 mg/ml 结核杆菌 H37Ra (美国 BD Difco 公司) 的完全弗氏佐剂 (CFA)。将 CFA 和 pZP3 溶液按等比例混合配成免疫乳化剂, 在第 0 天和第 14 天分别用 0.1 ml 乳化剂注射脚掌和尾根皮下免疫小鼠。

1.3 取材与脏器指数测定、卵巢 HE 染色和透明带荧光染色 脏器指数: 14 d 后取小鼠子宫、双侧卵巢、脾脏、胸腺并称量, 计算脏器指数 (脏器重量/小鼠体重)。卵巢组织 HE 染色和透明带荧光染色: 将左侧卵巢放入 Bouin 氏固定液 (750 ml 饱和苦味酸液, 250 ml 37% 甲醛, 50 ml 乙酸) 中, 固定 24 h 后脱水包埋, 常规石蜡切片 5 μ m, 进行 HE 染色。右侧卵巢进行冰冻切片, 直接用抗透明带抗体染色, 再进行二抗 6 荧光淬灭封片液。卵巢组织 HE 染色和透明带荧光染色病理切片在倒置显微镜下进行拍照观察。透明带抗体的阳性率 = (弱阳性 + 阳性 + 强阳性) / 总只数 \times %。

1.4 实时定量聚合酶链反应 (PCR) 检测脾脏 Foxp3 mRNA 及 ROR- γ t 的表达 用 TRIzol (美国 Invitrogen 公司) 提取小鼠脾脏总 RNA, 提取过程参考 TRIzol 说明书。利用试剂盒 (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit) 在普通 PCR 仪中将 mRNA 逆转录成为 cDNA, 利用试剂 Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas 公司) 在实时定量 PCR 仪中测定 Foxp3 及 ROR- γ t 基因表达情况, 扩增程序设定按照说明书, 以 GAPDH 作为内参, 引物设计见表 1。以靶基因与 GAPDH 电泳条带密度比值计算各靶基因 mRNA 相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物设计

基因名称	引物序列
GAPDH	上游引物:5'-CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA-3'
	下游引物:5'-GCGGCACGTCAGATCCA-3'
Foxp3	上游引物:5'-AGAGCCCTCACAACCAGCTA-3'
	下游引物:5'-CCAGATGTTGTGGGTGAGTG-3'
ROR- γ t	上游引物:5'-ATCTAAGGGCTGAGGCACCC-3'
	下游引物:5'-AACCCGCTAGTGATCCAG-3'

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验;脏器指数、小鼠脾脏细胞中 Foxp3 和 ROR- γ t mRNA 相对表达量的组间比较以直条图表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

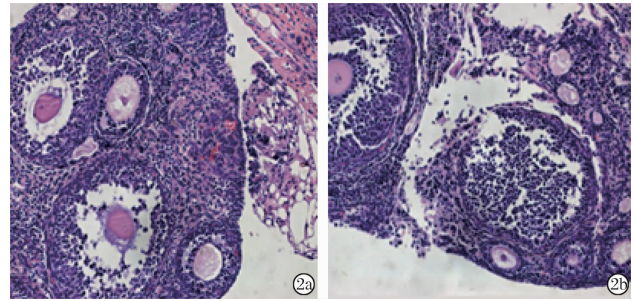
2 结果

2.1 一般情况 pZP3 多肽免疫 B6AF1 小鼠后,模型小鼠精神状态明显烦躁易怒,精神萎靡不振,反应迟钝,行动迟缓。

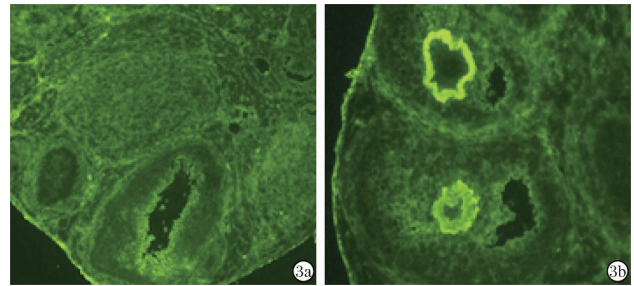
2.2 脏器指数 与空白组相比,模型组小鼠脾脏指数升高($P < 0.01$),卵巢指数、胸腺指数均下降(P 均 < 0.05),子宫指数有所下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。如图 1。

2.3 卵巢 HE 染色和透明带荧光染色 左侧卵巢 HE 染色后,空白组卵巢各级卵泡清晰可见,未见炎性细胞浸润(图 2a);模型组卵巢较正常组萎缩,形态细长,卵泡数目较空白组变少,甚至无明显卵泡,而始基卵泡较多,在卵泡和间质中多见淋巴细胞和浆细胞浸润(图 2b);右侧卵巢荧光染色后,空白组无透明带荧光显现(图 3a),模型组有强度不等的透明带荧光(图 3b)。模型组中透明带抗体的阳性率(90%)远远高于空白组(10%, $P < 0.01$) (表 3),这说明模型组卵巢组织中自身透明带抗体大量表达,免疫性卵巢早衰模型成功建立。

2.4 基因表达情况 实时定量 PCR 结果显示,pZP3 免疫 B6AF1 小鼠后,模型小鼠脾脏 Foxp3 mRNA 相对表达量明显下降($P < 0.01$),而 ROR- γ t mRNA 相对表达量表达上升($P < 0.05$)。如图 4。



注:2a:空白组,卵巢组织中各级卵泡清晰可见,卵泡及卵母细胞形态规则,颗粒细胞排列整齐,淋巴细胞和浆细胞很少浸润;2b:模型组,可见大量闭锁卵泡,卵泡细胞形态不规则,颗粒细胞排列紊乱,卵泡及间质见淋巴细胞及浆细胞浸润。

图 2 小鼠模型卵巢病理图(HE 染色, $\times 200$)

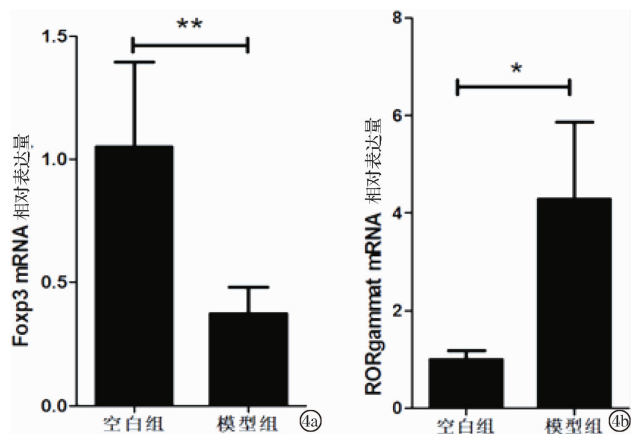
注:3a:空白组,卵泡中未见透明带荧光;3b:模型组,可见 2 个卵泡周围的透明带荧光区,颜色为亮绿色和黄绿色。

图 3 小鼠卵泡透明带免疫荧光染色图($\times 400$)

表 3 两组卵巢透明带抗体阳性率比较 (只数)

组别	例数	阴性	弱阳性	中阳性	强阳性	阳性率(%)
空白组	20	18	1	1	0	10.0
模型组	20	2	2	8	8	90.0*

注:与空白组比较,* $P < 0.01$ 。

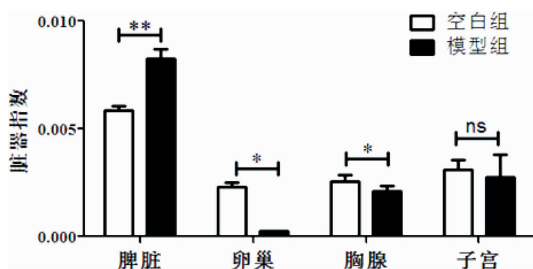


注:4a:Foxp3 mRNA 表达;4b:ROR- γ t mRNA 表达;两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 4 各组小鼠脾脏细胞中 Foxp3 mRNA 和 ROR- γ t mRNA 表达的变化

3 讨论

卵巢功能减退是一种严重影响妇女生殖健康和心理健康的疾病,自身免疫因素导致卵巢功能减退正逐渐成为共识。免疫性 POF 患者多表现为卵巢周围



注:两组间比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,^{ns} $P > 0.05$ 。

图 1 脏器指数

浆细胞及淋巴细胞浸润,外周血淋巴细胞亚群的失衡,血循环中存在针对卵巢的抗体,也可能伴有其他自身免疫性疾病。而标准化动物模型是研究免疫性 POF 的关键,因此,根据前期造模成功经验,本研究选用成模率较高的 B6AF1 雌鼠作为研究对象^[6],用 pZP3 多肽建立自身免疫性 POF 动物模型,不仅操作方法简单,而且卵巢形态学的表现与人类 POF 自身免疫性卵巢炎相似。本研究中模型小鼠脾脏致炎性 Th17 细胞转录因子 ROR- γ t mRNA 水平明显高于空白组,且模型组小鼠脾脏指数升高,胸腺指数下降,提示 pZP3 多肽免疫小鼠后,产生炎症性损伤的免疫器官不在胸腺,可能在脾脏组织聚集、水肿,这与文献报道一致^[7]。卵巢形态学结果显示模型小鼠卵巢较正常组形态细长萎缩,卵巢炎症及透明带荧光染色存在,与卵巢脏器指数下降相符。说明用 pZP3 多肽可成功免疫 B6AF1 小鼠,发生自身免疫性卵巢炎,导致卵巢功能减退。这一动物模型为研究 POF 免疫学机制奠定了良好的基础。

Tregs 和 Th17 是两类新发现的 T 细胞亚群^[8-9],这两类细胞之间的平衡能够影响多种肿瘤和自身免疫性疾病。CD4⁺CD25⁺Treg 是目前研究最为广泛的可能影响免疫生殖功能损害转归的 Treg 细胞亚群之一^[10-11]。Tregs 分化紊乱导致免疫异常的卵巢功能损害的相关研究尚不明确。Th17 介导中性粒细胞和巨噬细胞吞噬受感染组织,发挥宿主对外源性病原体的宿主防御功能,在多种炎症和自身免疫性反应中起着重要作用^[12],但其能否介导免疫性 POF 的相关研究有待揭示。Foxp3 和 ROR- γ t 分别是 Tregs 和 Th17 的特异性转录因子,它们的表达对 Treg 细胞和 Th17 细胞的表型和功能具有重要的调控作用^[13-14]。本研究实量定量 PCR 结果显示,与空白组相比,模型组 Tregs 主要分子标志物 Foxp3 mRNA 水平明显下降,Th17 特异性转录因子 ROR- γ t mRNA 水平对应升高。因此,基于 pZP3 多肽成功建立的 POF 动物模型可能通过 Foxp3 mRNA 和 ROR- γ t mRNA 发挥免疫调控作用。

综上所述,本研究在成功建立免疫性 POF 动物模型的基础上,不仅阐释了 pZP3 对 B6AF1 小鼠动物模型形态学和细胞学的影响,同时探讨了模型小鼠的

Foxp3 和 ROR- γ t 基因的变化,为研究免疫性 POF 提供了实验依据,对寻找治疗新策略具有潜在临床意义。

参考文献

- [1] Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S. Assessment of ovarian reserve-should we perform tests of ovarian reserve routinely? [J]. Hum Reprod, 2006, 21 (11): 2729 - 2735.
- [2] Maclaran K, Panay N. Premature ovarian failure [J]. J Fam Plan Reprod H, 2011, 37 (1): 35 - 42.
- [3] 冯静, 李杏杏, 王佩娟. 免疫性卵巢早衰与 T 淋巴细胞亚群相关性研究 [J]. 吉林中医药, 2013, 33 (5): 441 - 443.
- [4] Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-) evolutionary perspective [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9 (12): 883 - 889.
- [5] Fu L, Feng W, Li SR, et al. ZP3 peptides administered orally suppress murine experimental autoimmune ovarian disease [J]. J Reprod Immunol, 2007, 75 (1): 40 - 47.
- [6] Wheeler KM, Samy ET, Tung KS. Cutting edge: normal regional lymph node enrichment of antigen-specific regulatory T cells with autoimmune disease-suppressive capacity [J]. J Immunol, 2009, 183 (12): 7635 - 7638.
- [7] Otsuka N, Tong ZB, Vanevski K, et al. Autoimmune oophoritis with multiple molecular targets mitigated by transgenic expression of matter [J]. Endocrinology, 2011, 152 (6): 2465 - 2473.
- [8] Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance [J]. Immunology, 1971, 21 (6): 903 - 914.
- [9] Gershon RK, Cohen P, Hencin R, et al. Suppressor T cells [J]. J Immunol, 1972, 108 (3): 586 - 590.
- [10] Uhlenhaut NH, Treier M. Forkhead transcription factors in ovarian function [J]. Reproduction, 2011, 142 (4): 489 - 495.
- [11] Haque R, Lei F, Xiong X, et al. The regulation of FoxP3-expressing regulatory T cells [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2011, 11 (4): 334 - 346.
- [12] Ivanov IL, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells [J]. Cell, 2006, 126 (6): 1121 - 1133.
- [13] Huehn J, Beyer M. Epigenetic and transcriptional control of Foxp3⁺ regulatory T cells [J]. Semin Immunol, 2015, 27 (1): 10 - 18.
- [14] Chen Z, Lin F, Gao Y, et al. FOXP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17 [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11 (5): 536 - 542.

收稿日期: 2016 - 10 - 08 修回日期: 2016 - 11 - 21 编辑: 王宇