# AMH 对暴露于化疗毒性下卵巢功能损伤的评估价值

李晓林　刘思旋　黄　润　马丽思　宗祥云

**摘　要　目的**　探讨 AMH 对于乳腺癌化疗后卵巢储备功能损伤的评估价值。**方法**　检测不同年龄段正常雌性 C57BL/6J 小鼠血清 AMH 水平，并计数不同年龄段小鼠卵巢原始卵泡及生长卵泡的数量。构建乳腺癌荷瘤小鼠模型，于 27 只 6 周龄 BALB/c 裸鼠皮下成瘤，随机分为 3 组，即对照组、CTX100mg/kg 组、CTX200mg/kg 组。分别在干预前和干预后 1、3 周检测血清 AMH 水平，留取不同时期小鼠卵巢，记录原始卵泡和生长卵泡数目。**结果**　4～6 月龄小鼠血清 AMH 水平保持较为稳定，8 月龄后小鼠 AMH 总体下降明显，同时小鼠原始卵泡和生长卵泡数量的减少与 AMH 水平直接相关，HE 染色可见年老小鼠卵泡数量明显减少。另外，高剂量 CTX 处理的小鼠 AMH 水平（$P=0.000$）、原始卵泡和生长卵泡数量均显著下降（$P=0.000$），而低剂量 CTX 组的变化不显著。**结论**　血清 AMH 作为评估卵巢储备功能的指标，对化疗后卵巢损伤的评估具有意义。

**关键词**　抗苗勒管激素（AMH）　卵巢储备功能　环磷酰胺（CTX）　化疗损伤　卵巢早衰（POF）

**中图分类号**　R71　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2020.03.023

**Value of AMH in Evaluating Ovarian Function after Exposured to Chemotherapy.** *Li Xiaolin, Liu Sixuan, Huang Run, et al. Breast Surgery, Shanghai Jiao tong University Affiliated Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China*

**Abstract　Objective**　To explore the predictive value of AMH for ovarian reserve function after chemotherapy. **Methods**　Serum AMH levels of normal females C57BL/6J mice of different ages were detected, and the number of primordial follicles and growing follicles in mice of different ages were counted. Subsequently, BALB/c nude mice with breast cancer, which randomly assigned to three groups: Control, CTX100mg/kg, CTX200mg/kg. Serum AMH levels were detected before chemotherapy and 1week, 3 weeks after treatment, respectively. The ovaries of mice at different stages were collected, and the number of primordial follicles and growing follicles were recorded. **Results**　The overall rate of AMH decline accelerated after 8 months in mice. Meanwhile, the decrease in the number of primordial and growing folliciles correlated directly with the AMH levels in mice. The mice exposed to 200mg/kg CTX endured significant decline of AMH levels ($P=0.000$) and remarkable decrease of primordial and growing folliciles ($P=0.000$), while the changs were not significant in 100mg/kg CTX group. **Conclusion**　Our results indicate that serum AMH is an excellent marker of ovarian reserves which predicting ovarian aging and ovarian injury precisely in mature mice.

**Key words**　Anti－Müllerian hormone (AMH); Ovarian reserve function; Cytoxan(CTX); Chemotherapy injury; Premature ovarian failure (POF)

抗苗勒管激素（anti－Müllerian hormone，AMH）为转化生长因子β（transforming growth factor－β，TGF－β）超家族的一员，是一种二聚糖蛋白，也称为苗勒管抑制物质（Müllerian inhibiting substance，MIS）[1,2]。男性胎儿由发育中的睾丸产生 AMH，可使苗勒管退化[3]。女性 AMH 主要由颗粒细胞产生，其表达开始于初级卵泡，在次级卵泡和小腔卵泡中达到峰值。但 AMH 在原始卵泡和闭锁卵泡中几乎检测不到，其水平在卵泡发育的最后阶段逐渐下降[4,5]。因此，在临床应用中，血清 AMH 可作为评估卵巢储备的一种标志物。既往的详细研究证实血清 AMH 水平可作为体外受精（IVF）和多囊卵巢综合征（PCOS）中卵巢储备和卵巢功能障碍的定量标志物[6,7]。此外，AMH 可能具有抑制原始卵泡向生长卵泡的招募和发育的作用[8]。

在年轻女性恶性肿瘤如淋巴瘤、妇科肿瘤、肺癌、乳腺癌患者中，其预后往往比老年患者差，病死率也较高[9,10]。包括具有生殖毒性药物在内的化疗方案常用于治疗年轻恶性肿瘤患者，而环磷酰胺（cyclophosphamide，CTX）是最常用的细胞周期非特异性细胞毒性药物之一，常对卵巢功能造成不可逆的损害。目前对环磷酰胺破坏卵巢卵泡的机制尚不清楚，但最近的研究表明，环磷酰胺通过 DNA 烷基化和破坏正常细胞过程直接损伤卵泡，并通过损伤颗粒细胞消耗

基金项目：上海市科学技术委员会西医引导项目（15411966500）

作者单位：200233　上海交通大学附属上海市第六人民医院乳腺外科

通讯作者：宗祥云，电子信箱：tigerzong@msn.com

原始卵泡[11]。在 AMH 缺乏的情况下,更多的原始卵泡发育为生长卵泡,卵泡耗竭加快[12,13]。

目前,寻找一种可靠的生物学标志物来预测化疗后患者卵巢功能的损伤情况是十分必要的。虽然 AMH 已经应用于临床卵巢功能的检测,但由于血清 AMH 会受到很多因素的影响,所以一直存在争议。研究表明,AMH 作为卵巢储备的生物学标志物与女性自然生育能力无关[14]。Dezellus 证实绝经前乳腺癌患者化疗后卵巢储备发生快速改变,部分患者血清 AMH 水平会迅速恢复或保持平稳[15]。尽管在人类研究中有这些结果,但在 CTX 给药 10 天后测定血清 AMH 与青春期后小鼠生殖细胞破坏程度(原始卵泡)无相关性[12]。有关 AMH 是否可用于化疗后卵巢功能的评估成为最近研究的热点[16]。本研究检测了血清 AMH 在小鼠不同年龄组的变化,以及不同剂量环磷酰胺对荷瘤小鼠血清 AMH 及各级卵泡的影响,从而明确血清 AMH 在评估化疗后卵巢储备功能损伤中的意义。

## 材料与方法

1. 实验材料:(1)动物:4 ~ 6 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠及 BALB/c 裸鼠,由上海交通大学附属上海市第六人民医院动物实验中心提供[实验动物许可证号:SCXK(沪)2017 - 0008]。标准饲料喂养,室温 15 ~ 25℃,相对湿度 45% ~ 60%,每日正常光照,空气流通,自由摄食、饮水。动物实验经医学实验动物管理委员会批准。(2)药物与试剂:环磷酰胺(CTX)购自江苏恒瑞医药股份有限公司,0.9% 氯化钠注射液购自安徽丰原药业股份有限公司,戊巴比妥购自上海索莱宝生物科技有限公司,小鼠血清 AMH - ELISA 试剂盒购自上海优培诺生物科技有限公司。

2. 实验方法:(1)随机选取 15 只野生型雌性 C57BL/6J 小鼠,分别为 1、4、6、8、12 月龄(每月龄 3 只),麻醉后心脏采血留取血清、卵巢进一步检测。另外,随机选取 27 只 6 周龄、体质量 15 ~ 20g 的雌性近交系 BALB/c 裸鼠,每组小鼠皮下注射 $1 \times 10^7$ 个 MCF7 细胞,每 2 天观察并记录肿瘤生长情况。8 周龄时,将 27 只裸鼠随机分为 3 组(9 只/组),分别单次腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液、CTX100mg/kg、CTX200mg/kg。药物处理前每组随机抽取 3 只小鼠,麻醉后心脏采血,留取卵巢。然后在化疗后 1、3 周,每组随机抽取 3 只小鼠,麻醉后心脏采血,留取卵巢。卵巢用甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片,苏木精 - 伊红染色(HE)。全血静置 1h 后 4℃过夜,离心后,吸取上清液。血清中 AMH 水平通过酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒测定。荷瘤小鼠实验流程如图 1。(2)血清 ELISA 检测:空白孔不加样,只加显色剂和终止液用于调零。标准品孔加入稀释好的标准品 50μl,然后加入酶标试剂 50μl。样品孔加入血清 50μl,然后加入酶标试剂 50μl。轻轻摇晃,盖上封板膜,37℃培养箱中孵育 60min。小心揭掉封板膜,洗涤液清洗 5 次,拍干。每孔加入显色剂 100μl,轻轻震荡混匀,37℃避光显色 10min。每孔加终止液 50μl,终止反应(此时蓝色立转黄色)。以空白孔调零,450nm 波长依序测量各孔的吸光度(*A* 值)。(3)卵泡计数:HE 染色切片厚度为 5μm,每隔 5 张计数一张片子,上下同一个卵泡不重复计数,并应用 5 倍校正因子来估计每个卵巢的卵泡总数。只记录有卵母细胞核的卵泡。卵泡发育经过 5 个阶段,即原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、腔卵泡和黄体卵泡阶段。原始卵泡卵母细胞周围只有一层扁平颗粒细胞。若观察到周围是单层立方颗粒细胞,则为初级卵泡。次级卵泡有多层立方颗粒细胞。如果在颗粒细胞层中观察到腔,则将卵泡归类为腔卵泡。黄体可见异常卵母细胞和多层粘连颗粒细胞时。初级卵泡、次级卵泡和腔卵泡统称生长卵泡。

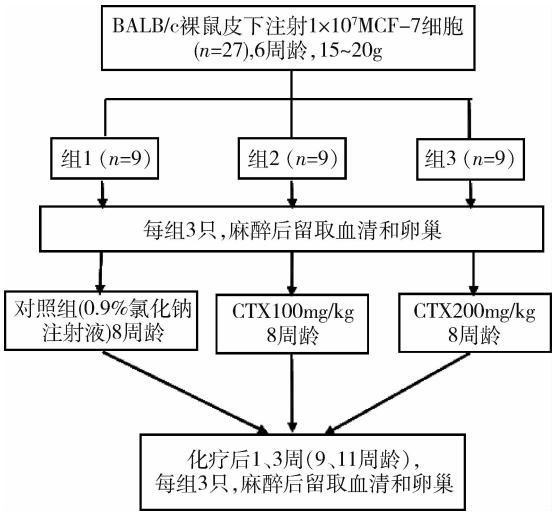


**图 1　荷瘤小鼠实验流程**

3. 统计学方法:运用 GraphPad Prism7 和 SAS 8.02 统计学软件对数据进行统计分析,小鼠卵泡及 AMH 测定数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。小鼠不同月龄段以及化疗前后的各级卵泡数量及血清 AMH 水平统计分析应用方差分析,小鼠生长卵泡数量与血清 AMH 水平的相关性分析采用 *Spearman* 相关性统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结　　果

1. 正常小鼠各年龄组 AMH 水平及各组卵泡数目：为检测不同年龄段 C57BL/6J 野生型雌性小鼠血清 AMH 水平及卵泡数量，分别留取了 1、4、6、8、12 月龄小鼠的血清及卵巢。可以看到血清 AMH 早期呈上升趋势，随着年龄的增长呈显著下降趋势（图 2）。根据小鼠 AMH 水平可将其生殖状态分为 3 个阶段。第 1 阶段血清 AMH 水平在 4 月龄前明显升高（$P=0.000$）。第 2 阶段 4～8 月龄小鼠血清 AMH 水平相对稳定（4 月龄 vs 6 月龄，$P=0.28$；4 月龄 vs 8 月龄，$P=0.98$）。第 3 阶段 8 月龄以上小鼠血清 AMH 水平显著下降（$P=0.000$），表现为小鼠月经周期不规则，进入围绝经期。通过对卵泡计数的分析发现，随着年龄的增长，原始卵泡数量呈下降趋势，6～8 月龄下降较为明显（$P=0.000$，图 3 A）。6 月龄前生长卵泡数量增加（$r=0.91$，$P=0.000$），6～8 月龄保持稳定（$r=0.91$，6 月龄 vs 8 月龄，$P=0.21$），8 月龄后显著下降（$r=0.91$，$P=0.000$，图 3B）。组织学表现见图 4。小鼠血清 AMH 水平与生长卵泡数量之间存在显著相关性（图 5）。

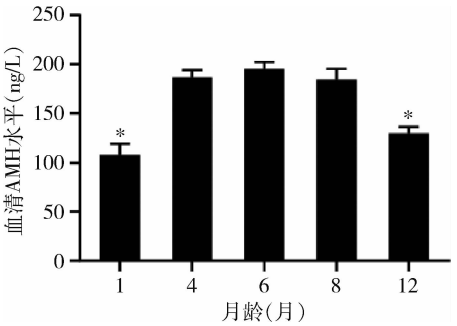


**图 2　正常小鼠不同年龄段血清 AMH 水平**

与 4 月龄比较，$^{*}P=0.000$

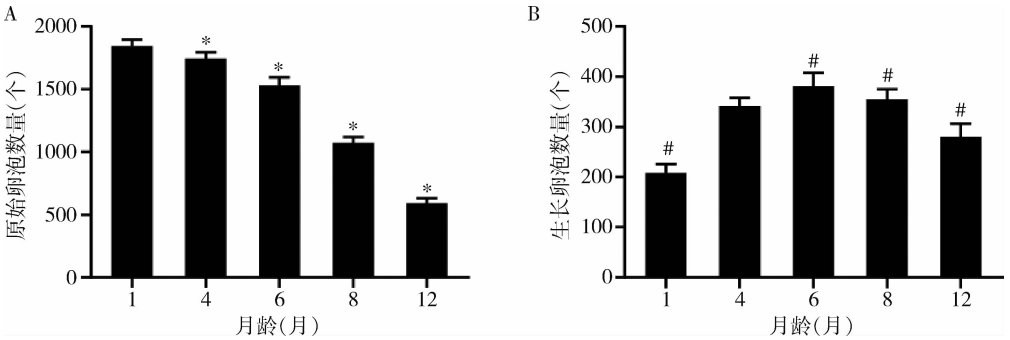


**图 3　正常小鼠不同年龄段原始卵泡与生长卵泡的数量变化**

与 1 月龄比较，$^{*}P=0.000$；与 4 月龄比较，$^{\#}P=0.000$

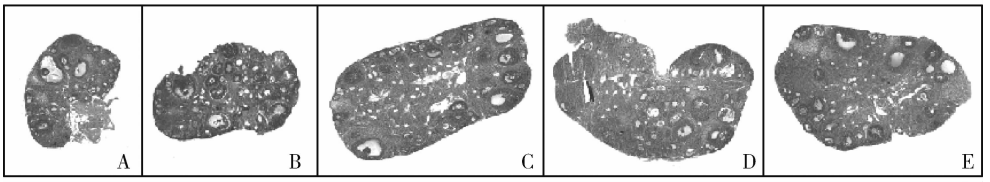


**图 4　不同月龄段小鼠卵巢 HE 染色（×200）**

A. 1 月龄；B. 4 月龄；C. 6 月龄；D. 8 月龄；E. 12 月龄

2. 化疗后荷瘤小鼠 AMH 水平及卵泡数目变化：为观察不同剂量环磷酰胺对小鼠卵巢的损伤情况，分别留取了对照组、CTX100mg/kg 组、CTX200mg/kg 组荷瘤小鼠化疗后不同时期的血清、卵巢。对照组及不同剂量化疗组裸鼠肿瘤生长情况见图 6。3 组荷瘤小鼠化疗前肿瘤体积比较差异无统计学意义，且 CTX100mg/kg 组肿瘤生长与对照组比较差异无统计学意义，而 CTX200mg/kg 组肿瘤生长情况较为缓慢。BALB/c 荷瘤裸鼠 8 周龄（化疗前）、9 周龄（CTX 或 0.9% 氯化钠注射液后 1 周）、11 周龄（CTX 或 0.9% 氯化钠注射液后 3 周）血清 AMH、原始卵泡及生长卵泡计数的变化趋势见图 7、图 8。对照组小鼠血清 AMH 水平在 8～11 周龄无明显变化，且各实验组 8 周龄（化疗前）小鼠血清 AMH 水平较为一致，差异无统计学意义。CTX200mg/kg 组的 AMH 水平显著下降（$P=0.000$）。而在 CTX100mg/kg 组中，

AMH 水平在 9 周时先略有上升,在 11 周时明显下降。各组原始卵泡随时间推移均呈下降趋势($P$ = 0.000),且高剂量 CTX 组原始卵泡数量下降趋势十分显著。而各组生长卵泡的数量与血清 AMH 水平的变化均一致。由 HE 切片可以看到化疗后第 3 周各组生长卵泡数量的情况,以及高剂量 CTX 下卵巢周围组织的改变(图 9)。

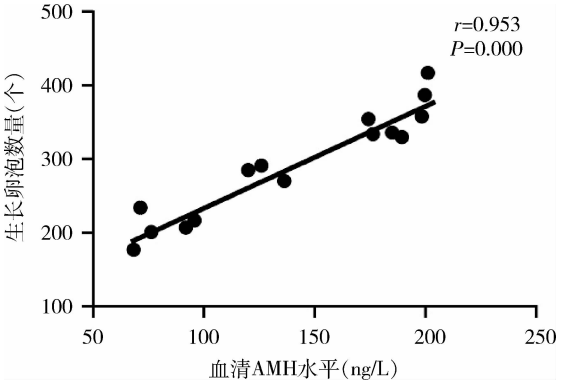


**图 5　小鼠血清 AMH 水平与生长卵泡数量的关系**

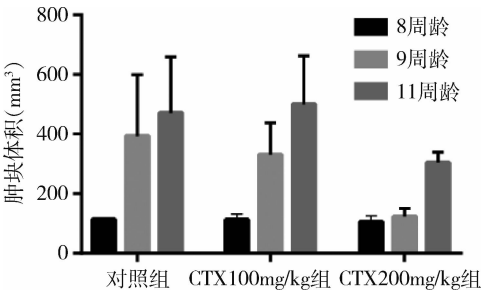


**图 6　各组荷瘤小鼠肿瘤生长情况**

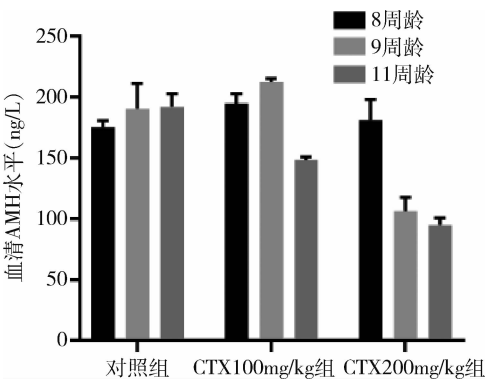


**图 7　不同剂量 CTX 对荷瘤小鼠 AMH 的影响**

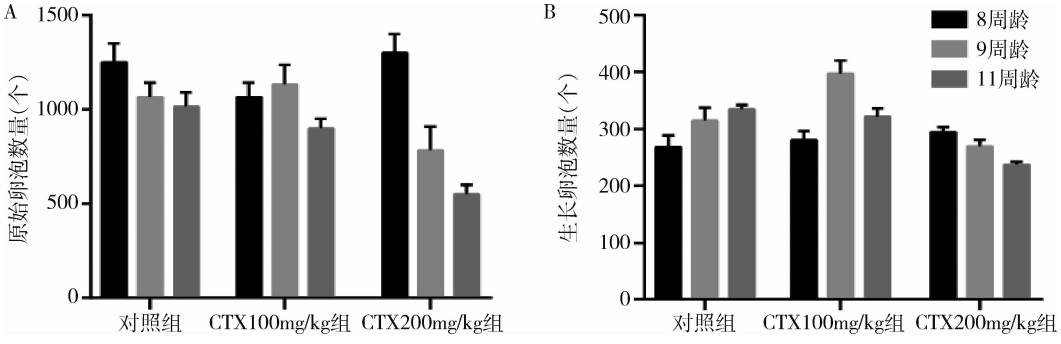


**图 8　不同剂量 CTX 处理对荷瘤小鼠卵泡数量影响**

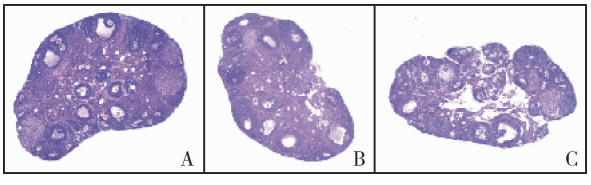


**图 9　化疗后第 3 周各组小鼠卵巢 HE 染色情况**( ×200)

A. 对照组;B. CTX100mg/kg 组;C. CTX200mg/kg 组

## 讨　论

研究证实,随着年龄的增长,生长卵泡中 AMH 的表达水平保持稳定[16]。因此,血清 AMH 水平的下降直接反映了卵巢生长卵泡数量的减少。Scheffer 等[17]也认为生长卵泡的数量反映了女性和小鼠卵巢储备。本研究观察到生长卵泡的数量与原始卵泡以及血清 AMH 水平密切相关。在成熟小鼠中 AMH 水平和原始卵泡数量都随着年龄的增长而呈持续下降趋势。但是在 8 月龄以上的小鼠,血清 AMH 水平和生长卵泡数量均呈稳定下降趋势,此前生长卵泡保持稳定或者增长趋势。由此笔者认为一旦原始卵泡池大小达到一定阈值水平,维持生长卵泡池的补偿机制可能不再有效。更重要的是,在生殖阶段的后期,原始卵泡池的耗竭逐渐减缓,而生长卵泡数量的也在逐渐减少。这意味着原始卵泡的使用率在生殖阶段早期是相对较低的,而在生殖阶段后期有着更高的使用率。

2013 年,Detti 等[18]报道 AMH 不能很好地评估成年小鼠在青春期前暴露于 CTX 时的卵巢功能。此

外，血清 AMH 水平无法预测环磷酰胺诱导的急性卵巢卵泡破坏。本研究发现血清 AMH 水平在前 6 个月是不断升高的，之后随着年龄的增长而下降。在未成熟的雌性小鼠和女性中，AMH 水平随着卵泡的生长而升高。此后，小鼠生殖早期生长卵泡数量保持不变，同时 AMH 水平不变。这表明补偿机制是存在的，以保持不断增长的卵泡的数量。因此，尽管原始卵泡池下降，血清 AMH 水平是恒定的。也有可能，相对较多的原始卵泡从卵泡池中被招募，以维持数量恒定的生长卵泡。因此，笔者的研究表明，血清 AMH 水平对于评估正常年轻小鼠卵巢储备不够准确和合适。

低剂量 CTX 对小鼠 AMH 水平的影响并不显著，原始卵泡略有减少，生长卵泡一过性增多，然后减少，卵巢储备功能的损伤程度较小。不同的是，高剂量 CTX 小鼠 AMH 明显下降，原始卵泡数量明显减少，生长卵泡数量也有下降。因此，血清 AMH 水平对化疗导致的有限的卵巢储备更为敏感，或者说在卵巢储备充裕的个体其卵泡池的消耗无法通过 AMH 体现、而在卵巢储备有限的个体血清 AMH 的波动则能忠实地反映卵巢储备的流失，可用于评估化疗药物对卵巢储备功能的损伤。

本研究的意义在于以下几个方面：(1)验证了小鼠血清 AMH 水平与原始卵泡及生长卵泡之间的关系，与生长卵泡的数量呈正比，当卵巢储备下降到一定界值后，随着原始卵泡的数量减少而降低。(2)明确了不同年龄段雌性小鼠 AMH 的分布，在成熟及年老的小鼠中，AMH 更能反映其卵泡储备的情况。(3)化疗毒性不良反应下，AMH 水平可以反映其卵巢储备功能的损伤情况。

## 参考文献


1 Massague J. The transforming growth factor - beta family[J]. Ann Rev Cell Biol, 1990, 6:597 - 641

2 Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Mullerian - inhibiting substance function during mammalian sexual development[J]. Cell, 1994, 79(3):415 - 425

3 Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, *et al*. Anti - Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary[J]. Endocrinology, 2002, 143(3):1076 - 1084

4 Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, *et al*. Serum anti - mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice[J]. Endocrinology, 2006, 147(7):3228 - 3234

5 Visser JA, de Jong FH, Laven JS, *et al*. Anti - Mullerian hormone: a new marker for ovarian function[J]. Reproduction, 2006, 131(1):1 - 9

6 Dumont A, Robin G, Catteau - Jonard S, *et al*. Role of anti - mullerian Hormone in pathophysiology, diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: a review[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2015, 13:137

7 Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, *et al*. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance[J]. Nature, 1990, 345(6271):167 - 170

8 Dezellus A, Barriere P, Campone M, *et al*. Prospective evaluation of serum anti - Mullerian hormone dynamics in 250 women of reproductive age treated with chemotherapy for breast cancer[J]. Eur J Cancer, 2017, 79:72 - 80

9 Fredholm H, Eaker S, Frisell J, *et al*. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment[J]. PLoS One, 2009, 4(11):e7695

10 Bedoschi G, Navarro PA, Oktay K. Chemotherapy - induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact[J]. Fut Oncol, 2016, 12(20):2333 - 2344

11 Browne HN, Moon KS, Mumford SL, *et al*. Is anti - Müllerian hormone a marker of acute cyclophosphamide - induced ovarian follicular destruction in mice pretreated with cetrorelix? [J]. Fertil Steril, 2011, 96(1):180

12 Durlinger AL, Kramer P, Karels B, *et al*. Control of primordial follicle recruitment by anti - Mullerian hormone in the mouse ovary[J]. Endocrinology, 1999, 140(12):5789 - 5796

13 Steiner AZ, Pritchard D, Stanczyk FZ, *et al*. Association between biomarkers of ovarian reserve and infertility among older women of reproductive age[J]. JAMA, 2017, 318(14):1367 - 1376

14 Freour T, Barriere P, Masson D. Anti - mullerian hormone levels and evolution in women of reproductive age with breast cancer treated with chemotherapy[J]. Eur J Cancer, 2017, 74:1 - 8

15 Wong QHY, Anderson RA. The role of antimullerian hormone in assessing ovarian damage from chemotherapy, radiotherapy and surgery[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obesity, 2018, 25(6):391 - 398

16 Kim HA, Choi J, Park CS, *et al*. Post - chemotherapy serum anti - Mullerian hormone level predicts ovarian function recovery[J]. Endocrine Connect, 2018, 7(8):949 - 956

17 Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW, *et al*. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age[J]. Human Reprod, 2003, 18(4):700 - 706

18 Detti L, Uhlmann RA, Lu M, *et al*. Serum markers of ovarian reserve and ovarian histology in adult mice treated with cyclophosphamide in pre - pubertal age[J]. J Assisted Reprod Genet, 2013, 30(11):1421 - 1429


（收稿日期：2019 - 02 - 26）
（修回日期：2019 - 03 - 05）