

景彦林,杨修昭,白振军,等. 高脂饮食诱导肥胖对雌性生育大鼠卵巢功能的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 106-110.

Jing YL, Yang XZ, Bai ZJ, et al. Effect of obesity induced by a high-fat diet on ovarian function in female rats of reproductive age [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 106-110.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.08.017

高脂饮食诱导肥胖对雌性生育大鼠卵巢功能的影响

景彦林¹,杨修昭²,白振军¹,贺千里¹,彭志锋³

(1.山西大同大学中医药健康服务学院,山西 大同 037009; 2.大同市第五人民医院,山西 大同 037009;
3.山西大同大学医学院,山西 大同 037009)

【摘要】 目的 评估高脂饮食诱导肥胖对雌性大鼠卵巢功能的影响,并探讨其作用机制。**方法** 80只雌性Wistar大鼠随机分为高脂饮食(HFD)组($n=40$)和正常饮食(对照)组($n=40$)。饲养60d后评估各组大鼠发情周期及大鼠卵泡发育各个阶段细胞数量及凋亡情况,并检测各组大鼠血清孕酮和雌二醇浓度。然后按1:2比例雄雌大鼠合笼3周。**结果** HFD诱导大鼠产生肥胖和高血糖,但是不影响大鼠血清甘油三酯、胆固醇和C-反应蛋白浓度。肥胖也改变卵巢功能,HFD大鼠发情间期延长,血清雌二醇浓度降低及窦闭锁卵泡数量增加。此外,HFD组大鼠也出现卵泡囊肿。而且HFD组大鼠怀孕晚于对照组大鼠。**结论** 肥胖诱导大鼠出现卵泡囊肿,并干扰排卵,导致妊娠延迟。

【关键词】 大鼠;发情周期;肥胖;雌二醇;闭锁卵泡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 08-0106-05

Effect of obesity induced by a high-fat diet on ovarian function in female rats of reproductive age

JING Yanlin¹, YANG Xiuzhao², BAI Zhenjun¹, HE Qianli¹, PENG Zhifeng³

(1. College of Traditional Chinese Medicine Health Service, Shanxi Datong University, Datong 037009, China.
2. Datong Fifth People's Hospital, Datong 037009. 3. Medical College, Shanxi Datong University, Datong 037009)

【Abstract】 Objective To evaluate whether high-fat diet-induced obesity affects ovarian function in rats and to contribute to an understanding of the mechanisms involved. **Methods** Female 5-week-old Wistar rats were fed a high-fat diet (HFD group, $n=40$) or a normal diet (control group, $n=40$). After 2 months of feeding, the estrous cycle and the number of cells in each stage of rat follicular development were evaluated. The levels of serum progesterone and estradiol in each group were also measured. Male and female rats (1:2) were then mated over a period of 1 week. **Results** HFD induced obesity and hyperglycemia, without altering levels of serum triglycerides, cholesterol, or C-reactive protein. HFD also altered ovarian function by prolonging diestrous phases, decreasing serum estradiol concentrations, and increasing the number of antral atretic follicles. Moreover, the HFD group developed follicular cysts and became pregnant later than control group rats. **Conclusions** HFD induces follicular cyst development and disturbs the ovulatory process, leading to delayed pregnancy.

【Keywords】 rats; estrous cycle; obesity; estradiol; atretic follicles

[基金项目] 山西省基础研究项目(2015021178)。

[作者简介] 景彦林(1974—),女,副主任医师,讲师,研究方向:不孕不育的治疗。E-mail: pxx181@sina.com

肥胖是世界范围内的一个公共健康问题。肥胖可影响女性的生殖能力。肥胖妇女发生不孕症几率为正常体重者 3 倍^[1]。肥胖导致女性无排卵周期和月经不规则,降低植入率和妊娠率,还可能与多囊性卵巢综合征有关^[2]。以往研究表明,肥胖可通过影响卵子生长发育、排卵、内膜生长、胚胎发育和胚胎种植等多方面影响女性生育能力^[3]。也有研究指出,高脂饮食(high-fat diet, HFD)诱导肥胖可促进卵泡发育及卵泡丢失,导致卵巢早衰^[4]。还有研究表明,机体中过多脂肪不仅对女性,而且对肥胖动物模型生殖功能均有负面影响^[5]。然而,过量脂肪干扰正常卵巢功能机制还不清楚,特别是性激素及凋亡在其中作用。因而,本研究采用高脂肪/高热量饲料喂养,建立 Wistar 雌性大鼠肥胖模型,深入探讨肥胖对 Wistar 雌性大鼠卵巢功能的影响机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

80 只雌性 SPF 级 Wistar 大鼠(5 周)由山西医科大学实验动物中心提供[SCXK(晋)2015-0001],体重 120~130 g。饲养于山西医科大学实验动物中心 SPF 级环境中[SYXK(晋)2015-0001]。动物实验严格按照山西医科大学实验动物管理委员会制定的操作规程(IACUC 号:2015011),符合 3R 原则。Wistar 大鼠随机分为正常饮食组(对照组, $n=40$)和高脂饮食组(HFD 组, $n=40$)。正常饮食大鼠以标准饲料配方饲养;而 HFD 大鼠以高脂肪/高碳水化合物饮食饲养,高脂饮食主要包括 20%蛋白、35%碳水化合物和 45%脂肪(购于中国医学科学院实验动物研究所)。饲养周期为 2 个月,每周测 2 次体重。肥胖判定标准:HFD 大鼠体重超过 control 组 20%,而且 Lee's 指数显著高于 control 组,即肥胖模型成功^[6]。

1.2 实验试剂

马松三色染料(美国 Sigma 公司);TUNEL 细胞凋亡试剂盒(武汉博士德生物科技有限公司);放射免疫分析试剂盒(武汉博士德生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠阴道涂片方法

饲养 50 d 时,在 9~11 点间对每只大鼠进行大鼠阴道涂片,通过显微镜检查及时准确判断大鼠的

发情周期。

1.3.2 生化检测及马松三色染色

40 只大鼠(每组各 20 只)在饲养 60 d 后第 1 个发情周期中的发情期麻醉后经心脏穿刺采血。血液储存在试管,立即检测血糖。血液进行离心处理,留取上部血清,置于-70℃冰箱中储存。通过生化分析仪检测甘油三酯、胆固醇和 C-反应蛋白。然后取出卵巢,称重,固定,脱水,切片,贴片,马松三色染色。

1.3.3 怀孕准备

饲养大鼠 60 d 时,40 大鼠(每组各 20 只)与有生育能力健康雄性大鼠合笼交配 3 周,雌雄大鼠比例为 2:1。分离雌鼠继续饲喂,直至怀孕。

1.3.4 雌二醇和孕酮测定

从冰箱中取出储存的血液。采用放射免疫分析试剂盒分别检测血液中雌二醇和孕酮。

1.3.5 卵泡计数

如前面所述的大鼠卵巢马松三色染色。在光学显微镜下观察大鼠卵泡发育不同阶段的细胞数量,包括原始、初级、次级、窦状和排卵前卵泡^[7]。

1.3.6 凋亡检测

取出进行马松三色染色的卵巢切片,参照试剂盒说明进行 TUNEL 原位染色,凋亡细胞核呈棕色。

1.4 统计学方法

数据用 SPSS 21.0 统计软件分析,结果以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用 t 检验或方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 体重与代谢标志物

在研究开始之前,两组大鼠体重无统计学差异。不同形式喂养后,两组大鼠体重均增高。饲养 60 d 后,HFD 组大鼠体重高于对照组大鼠,有统计学差异($P<0.05$)(图 1),而且 HFD 组大鼠 Lee's 指数高于对照组($P<0.05$)。尽管 HFD 组大鼠体重增高,但是 HFD 组大鼠血清甘油三酯、胆固醇和 C-反应蛋白浓度未发生明显改变。相比较,HFD 组大鼠空腹血糖浓度高于对照组,有统计学差异($P<0.001$),提示 HFD 诱导肥胖和高血糖。

2.2 发情周期分析

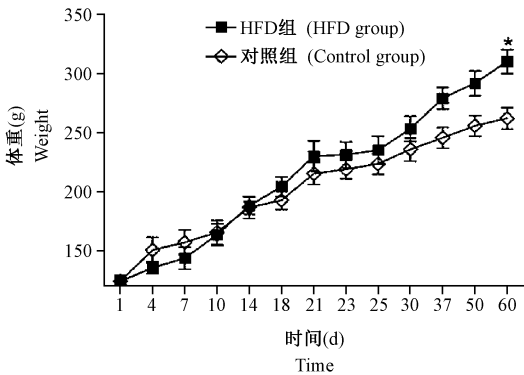
如图 2 所示,阴道细胞学检查发现,与对照组相比,HFD 组大鼠发情周期较长,而发情后期持续时间较长,发情间期也较长。

表 1 研究前 1 d 及饲养 60 d 体重及代谢参数变化 (n=40)

Table 1 Changes of body weight and metabolic parameters in the rats at first day of study and 60 days of feeding

参数 Parameter	时间 (d) Time	Control 组 Control group	HFD 组 HFD group
体重 (g) Weight	1	128.73 ± 5.20	127.09 ± 4.76
	60	262.56 ± 9.04	310.41 ± 10.13 ^{*#}
空腹血糖 (mg/dL) Fasting blood glucose	1	170.83 ± 7.86	172.81 ± 8.37
	60	191.50 ± 9.84	324.73 ± 31.68 ^{*#}
甘油三酯 (mg/dL) Triglyceride	1	72.58 ± 10.53	48.06 ± 20.35
	60	70.45 ± 12.78	51.05 ± 25.57
胆固醇 (mg/dL) Cholesterol	1	0.97 ± 0.29	1.23 ± 0.07
	60	0.95 ± 0.23	1.26 ± 0.19
C-反应蛋白 (mg/dL) C-reactive protein	1	7.46 ± 1.45	7.24 ± 2.06
	60	7.51 ± 2.72	7.64 ± 2.58

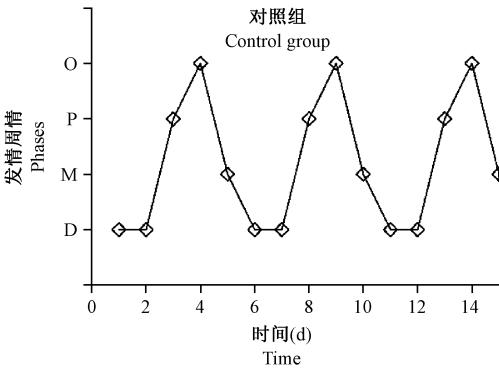
注:与对照组相比, * P<0.01;与第 1 天相比, #P<0.01。
Note. Compared with the control group, * P < 0.01. Compared with the first day, #P < 0.01.



注:与对照组相比, * P<0.05。
图 1 两组饲养大鼠体重变化 (n=40)
Note. Compared with the control group, * P < 0.05。
Figure 1 Weight change of the rats in two groups

2.3 血清孕酮和雌二醇测定

由于大鼠发情周期发生变化,下面进一步分析卵巢功能是否受到肥胖的影响。因而对血清孕酮和雌二醇浓度进行分析。其中两组大鼠血清孕酮



浓度无统计学差异;而 HFD 组大鼠血清雌二醇浓度低于对照组 (P<0.05) (图 3)。

2.4 卵巢形态分析

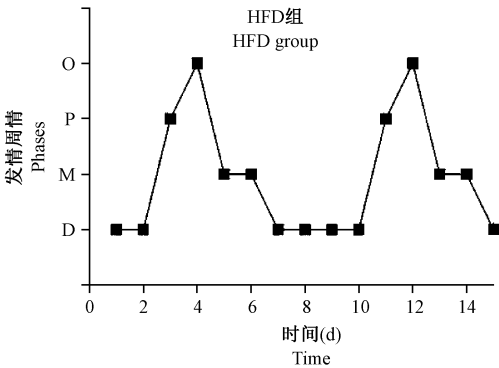
肥胖导致大鼠血清雌二醇浓度降低,下面进一步观察肥胖对卵泡发育各阶段的影响。如图 4 所示,两组大鼠卵泡发育各个阶段(原始、初级、次级、窦状和排卵前卵泡)卵泡数量无统计学差异。此外,两组大鼠黄体数量也无统计学差异。然而,在 HFD 组大鼠发现卵泡囊肿。

2.5 凋亡分析

TUNEL 分析显示,两组大鼠窦状前、窦状、排卵前卵泡及黄体均有凋亡细胞(图 5)。其中 HFD 组大鼠窦状卵泡凋亡数量高于对照组,有统计学差异 (P<0.001);然而两组间窦状前、排卵前卵泡及黄体凋亡细胞数量无统计学差异(图 6)。

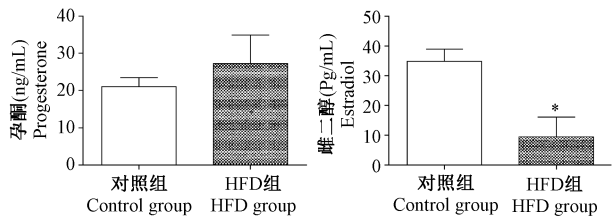
2.6 妊娠分析

与雄性大鼠合笼 3 周,绝大多数 HFD 组大鼠



注: D;发情间期; M;发情后期; P;发情前期; O;发情期。
图 2 肥胖对大鼠发情周情的影响 (n=20)
Note. D, Interestrus. M, Late estrus. P, Preestrus. O, Estrus.

Figure 2 Effects of obesity on estrous cycle in the rats



注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 肥胖对大鼠血清孕酮和雌二醇影响 ($n = 20$)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Effects of obesity on serum progesterone and estradiol in the rats

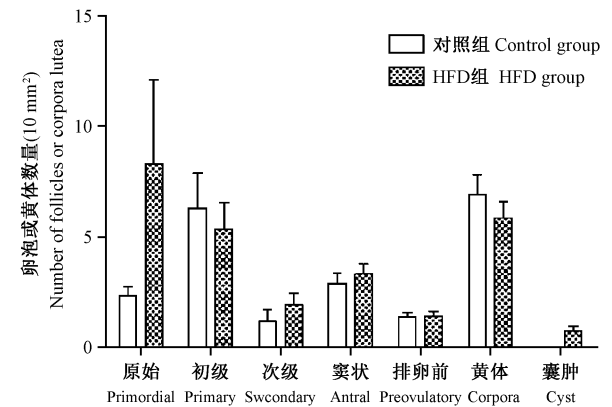


图 4 定量分析原始、初级、次级、窦状、排卵前卵泡及黄体 and 囊肿 ($n = 10$)

Figure 4 Quantitative analysis of primitive, primary, secondary, sinusoidal, preovulatory follicles, corpora lutea and cyst in the rats

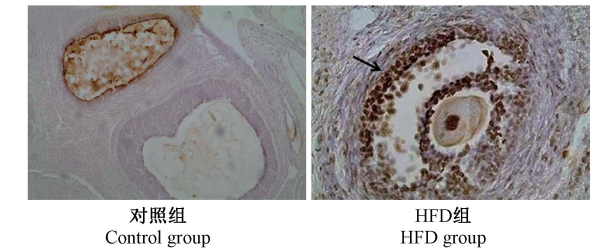


图 5 典型卵巢切片 TUNEL 染色 (箭头指示凋亡细胞, $\times 400$)

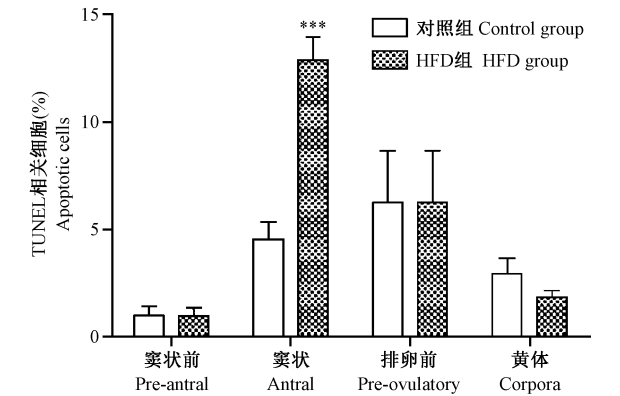
Figure 5 Typical histology of a rat ovary. An arrow indicates apoptotic cells. TUNEL staining

(9/10)均怀孕。然而,HFD 组大鼠怀孕晚于对照组大鼠。HFD 组大鼠在发情周期循环 2~3 次才能怀孕,而对照组大鼠在第 1 个发情周期内怀孕 ($P < 0.01$) (图 7)。

3 讨论

本研究结果表明,HFD 诱导的肥胖可影响雌性大鼠生殖功能。以往研究表明,肥胖与葡萄糖稳态

紊乱密切相关,可能与胰岛素调节外周组织葡萄糖代谢能力下降有关^[8]。这些失衡也存在于 HFD 诱导的肥胖中^[9]。因为 HFD 可增加动物能量摄入,并引起肥胖。在本研究中,HFD 喂养的老鼠不仅发生肥胖,而且血糖浓度异常升高,从而也支持上述观点,HFD 可减少胰岛素调节糖代谢的能力。肥胖与炎症状态有关,而且膳食中脂肪含量影响炎症^[10]。为了检测 HFD 是否引起炎症反应,测定大鼠中血清 C-反应蛋白浓度,但无变化。结果提示肥胖老鼠不形成炎症反应。一个可能的解释是 HFD 中除了脂肪,碳水化合物含量也较高,再加上饲养时间只有 2 个月,所以没有提供足够脂肪来激活炎症通路^[11]。此外,也有报道称饮食诱导胰岛素抵抗初始阶段与炎症不相关^[12]。



注:与对照组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 6 定量分析大鼠动情周期中各期卵泡和黄体的凋亡细胞情况 ($n = 10$)

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure 6 Analysis of the apoptotic cells in the rat follicles and corpora lutea during the estrous cycle

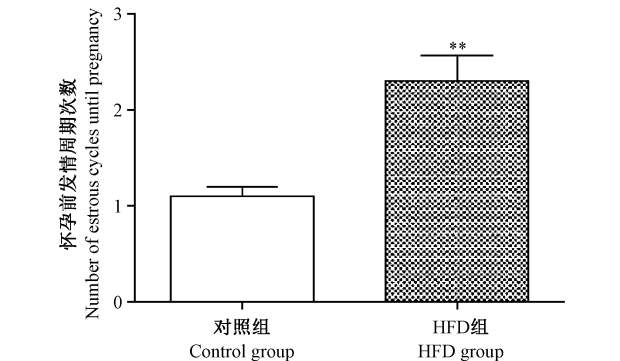


图 7 肥胖对大鼠生殖的影响 ($n = 20$)

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.001$.

Figure 7 Effects of obesity on reproduction in the rats

雌激素是由卵泡颗粒细胞在生育期间产生的,肥胖对其合成影响是有争议的。已有研究报道,肥胖女性血清雌激素浓度高于正常体重女性;但是也有研究指出,肥胖女性血清雌激素浓度较低,可能是由于体重可直接抑制促性腺激素和雌激素的产生^[13-14]。与以往研究结果一样,在本研究中发现 HFD 大鼠血清雌激素浓度降低。众所周知,雌激素抑制女性食物的摄入和饮水。在啮齿类动物中,卵巢切除术导致肥胖发生,而补充雌激素可抑制肥胖的发生^[15]。所以 HFD 会导致肥胖,而较低雌激素浓度可能也是肥胖发展的一个重要原因。低浓度雌激素诱导大鼠发情间期延长。据报道,45 d 高脂饮食与大鼠发情周期及发情间期延长有关,而跟换普通饲料可纠正不规则的发情周期^[16]。在本研究中,人们发 60 d HFD 饲养导致大鼠血清雌激素降低,以及发情间期延长。雌激素在生殖过程中起着关键作用,可影响卵泡的生成。雌激素缺乏导致卵泡闭锁,最终引起毛囊早期衰竭^[17]。此外,雌激素可抑制颗粒细胞凋亡和维持黄体功能^[18]。在本研究中,与对照组大鼠比较,肥胖大鼠血清雌激素降低,同时伴随着窦状卵泡凋亡数量增加,结果提示 HFD 诱导的雌激素降低与闭锁卵泡数量增加相关。

总之,目前结果表明,HFD 可诱发大鼠产生肥胖,肥胖可通过降低血清雌激素浓度,卵泡闭锁,延迟怀孕,最终降低成年雌性大鼠的生殖能力。

参考文献:

- [1] 黄文蓉,曾朝阳. 肥胖相关性炎症导致不孕症的相关机制研究进展[J]. 海南医学, 2018, 29(1): 90-92.
- [2] 季海波,王卓然. 育龄期肥胖女性生殖功能与多囊卵巢综合征的关系及治疗的研究进展[J]. 海南医学, 2015, 26(20): 3041-3045.
- [3] Goldman RH, Missmer SA, Robinson MK, et al. Reproductive outcomes differ following Roux-en-Y gastric bypass and adjustable gastric band compared with those of an obese non-surgical group [J]. *Obes Surg*, 2016, 26(11): 2581-2589.
- [4] Wang N, Luo L L, Xu J J, et al. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats [J]. *Metabolism*, 2014, 63(1): 94-103.
- [5] Tortoriello DV, Mcminn J, Chua SC. Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(3): 1238-1247.
- [6] Myers M, Britt KL, Wreford NG, et al. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary [J]. *Reproduction*,

2004, 127(5): 569-580.

- [7] 张璇,张玉敏,裴秀丛,等. 青春期营养性肥胖对雄性大鼠生殖器官发育及生育能力的影响[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2016, 19(9): 1323-1326.
- [8] Mor A, Tabone L, Omotosho P, et al. Improved insulin sensitivity after gastric bypass correlates with decreased total body fat, but not with changes in free fatty acids [J]. *Surg Endosc*, 2014, 28(5): 1489-1493.
- [9] Higa TS, Spinola AV, Fonsecaalaniz MH, et al. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice [J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2014, 6(1): 47-54.
- [10] Aoun M, Fouret G, Michel F, et al. Dietary fatty acids modulate liver mitochondrial cardiolipin content and its fatty acid composition in rats with non alcoholic fatty liver disease [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2012, 44(4): 439-452.
- [11] Carillon J, Romain C, Bardy G, et al. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase [J]. *Free Radical Biol Med*, 2013, 65(4): 254-261.
- [12] Lee YS, Li P, Huh JY, et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2011, 60(10): 2474-2483.
- [13] Zatko T, Matejovicova B, Boledovicova M, et al. Growth and obesity and its association with plasma level of steroid hormones and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in Slovak female students [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2013, 114(10): 573-580.
- [14] Rehman R, Hussain Z, Faraz N. Effect of estradiol levels on pregnancy outcome in obese women [J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2012, 24(3-4): 3-5.
- [15] Zoth N, Weigt C, Laidenbach-Leschowski U, et al. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 122(1-3): 100-105.
- [16] Lie ME, Overgaard A, Mikkelsen JD. Effect of a postnatal high-fat diet exposure on puberty onset, estrous cycle regularity, and kisspeptin expression in female rats [J]. *Reprod Biol*, 2013, 13(4): 298-308.
- [17] Mande PV, Thomas S, Khan S, et al. Immunization with ovarian autoantigens leads to reduced fertility in mice following follicular dysfunction [J]. *Reproduction*, 2012, 143(3): 309-323.
- [18] Albrecht ED, Pepe GJ. Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy [J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(3): 397-408.

[收稿日期] 2018-12-29