doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.02.003

促性腺激素释放激素类似物缓解环磷酰胺导致卵巢损伤的机制研究 *

陈 璇 刘思旋 李晓林 李佳敏 宗祥云△

（上海交通大学附属第六人民医院乳腺外科 上海 200233）

摘要 目的：通过动物实验和细胞实验初步探索促性腺激素释放激素类似物在环磷酰胺暴露下保护卵巢功能的机制。**方法：**构建乳腺癌荷瘤小鼠 36 只，随机分成 Control 组，CTX 组和 CG (CTX+GnRHa)组，药物干预后麻醉下剥离肿瘤和子宫卵巢并称重，计数卵巢原始卵泡和生长卵泡数目，提卵巢蛋白进行 Western blot 检测抗缪勒氏管激素 (Anti-Müllerian hormone, AMH) 蛋白表达量，提取卵巢 RNA 进行 qRT-PCR 实验检测 mRNA 水平，心尖取血检测血清 AMH 水平。卵巢颗粒细胞加药处理 36 小时后，收细胞蛋白进行 Western blot 检测 AMH 蛋白表达量，提细胞 RNA 进行 qRT-PCR 检测 mRNA 水平，ELISA 法检测细胞培养基上清中 AMH 水平。**结果：**成瘤后第 21 天，CTX 组和 CG 组小鼠肿瘤质量无统计学差异(P>0.05)且均小于 Control 组(P<0.05)；CTX 组子宫和卵巢的总重量均显著低于 Control 组和 CG 组(P<0.01)，卵巢内原始卵泡数量均低于 Control 组和 CG 组(P<0.001)，生长卵泡数量无统计学差异(P>0.05)。动物实验，Western blot 结果提示，CTX 组卵巢 AMH 蛋白含量显著高于 Control 组或 CG 组(P<0.05)；由 ELISA 结果提示，CTX 组血清 AMH 蛋白浓度显著低于 CG 组(P<0.01)。细胞实验，由 Western blot 可见，CTX 组 AMH 蛋白含量显著高于 Control 组和 CG 组(P<0.05)；由 ELISA 实验可见，CG 750 组和 CG1000 组培养基上清的 AMH 蛋白浓度均高于对应 CTX 剂量组(P<0.01)。无论在动物实验还是细胞实验中，各组 AMH 的 mRNA 表达水平均无统计学差异(P>0.05)。**结论：**在 CTX 化疗的同时运用 GnRHa,可以在不干扰化疗疗效的前提下，通过减少 CTX 所致细胞内 AMH 潴留程度，增加细胞外和血清中的 AMH 浓度从而发挥保护卵巢储备的功能。

关键词：促性腺激素释放激素类似物(GnRHa)；环磷酰胺(CTX)；抗缪勒管氏激素(AMH)；卵巢储备

中图分类号：R737.9；R730.53 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2022)02-213-07

The Mechanism of Gonadotropin-releasing Hormone Analogs to Relieve Ovarian Injury Induced by Cyclophosphamide*

CHEN Xuan, LIU Si-xuan, LI Xiao-lin, LI Jia-min, ZONG Xiang-yun△

(Department of Breast Surgery, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai, 200233, China)

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of gonadotropin-releasing hormone analogs (GnRHa) on protecting ovarian function during cyclophosphamide (CTX) exposure via animal and cell experiments. **Methods:** Thirty six breast cancer tumor-bearing mice were randomly divided into the Control group, CTX group, and CG (CTX+ GnRHa) group. After intervention, the tumor, uterine, and ovary were removed form mice and weighed under anesthesia. The number of primordial follicles and growing follicles in ovary were counted. The protein of the ovary was extracted to detect the protein expression of AMH by Western blot. The RNA of ovary was purified to detect the mRNA level of AMH by qRT-PCR assay. Then the blood of the heart apical was collected to detect the serum AMH level. Meanwhile, after 36 hours of treatment of ovarian granulosa cells, the cells were harvested for Western blot and qRT-PCR to detect AMH protein expression and mRNA level. ELISA assay was applied to detect AMH level in the cell culture supernatant. **Results:** On the 21st day after subcutaneous tumor formation, there was no significant difference in tumor mass from mice between the CTX group and the CG group (P>0.05), and both of them were smaller than the Control group (P<0.05). The weight of uterus and ovaries in the CTX group was significantly lower than Control group and CG group (P<0.01). Compared with the Control group and the CG group, the number of primordial follicles in the CTX group was significantly lower(P<0.001). There was no difference in the number of growing follicles between three group (P>0.05). In animal experiments, Western blot showed that the content of AMH protein in ovary of CTX group was significantly higher than that of Control group or CG group (P<0.05). The result of ELISA assay indicated that the concentration of AMH protein in serum of CTX group was significantly lower than that of CG group(P<0.01). In cell experiments, Western blot revealed that the content of AMH protein in CTX group was significantly higher than that in Control group and CG group (P<0.05). The result of ELISA assay indicated that the concentration of AMH protein in the medium supernatant of CG 750 and CG1000 groups was higher than that of CTX group(P<0.01). No matter in animal experiments or cell experiments, the mRNA expression levels of AMH in all the groups did not

* 基金项目：上海市科学技术委员会西医引导项目(15411966500)

作者简介：陈璇(1995-)，女，硕士研究生，研究方向：乳腺癌的基础与临床，电话：19921250069，E-mail: 854504483@qq.com

△ 通讯作者：宗祥云(1974-)，男，研究生导师，副教授，研究方向：乳腺癌的基础与临床，E-mail: tigerzong@msn.com

(收稿日期：2021-04-10 接受日期：2021-04-30)

change significantly. **Conclusions:** The application of GnRHa with CTX can protect ovarian reserve by reducing the level of AMH retained in the cells caused by CTX, and increasing the concentration of AMH outside the KGN cells and in the serum without interfering with the efficacy of chemotherapy.

Key words: Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa); Cyclophosphamide (CTX); Anti-Müllerian hormone (AMH); Ovarian reserve

Chinese Library Classification(CLC): R737.9; R730.53 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2022)02-213-07

前言

癌症是全球人口死亡的第二大原因[1],优化癌症治疗策略、改善癌症幸存者的生活质量仍是亟待解决和值得探讨的问题。对于女性来说,乳腺癌高居癌症发生率榜首。近年来,随着乳腺相关检查技术的发展,乳腺癌检出年龄逐渐提前,更多的女性得益于早发现和早治疗[2]。与此同时,乳腺癌治疗策略的完善和更多药物的临床发展也延长了患者的生命,使死亡率在近几年有所下降[3]。

化疗是最重要的抗肿瘤全身治疗,对降低肿瘤的复发率和提高肿瘤患者的生存率具有重要价值。化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时,对人体正常的组织细胞也具有毒性作用,其中对卵巢的毒性作用可引起卵巢功能不全、月经紊乱、闭经甚至卵巢功能早衰[4,5]。对于罹患乳腺癌的女性,年纪越小死亡风险越高,更应早期、足量、规律地接受化疗。而年轻女性乳腺癌治疗后,对于生育和生活质量的要求逐渐提高。因此,如何降低化疗药物对育龄女性卵巢的毒性是十分重要的研究课题。环磷酰胺(Cyclophosphamide, CTX)是乳腺癌一线化疗药的主要成分[6],但其作为烷化剂是公认的的对卵巢功能损伤最大的化疗药物[7],因此目前大多对乳腺癌化疗药物引发卵巢毒性的研究多聚焦在环磷酰胺。

促性腺激素释放激素类似物(Gonadotropin-releasing hormone analogue,GnRHa)是人工合成的促性腺激素释放激素的激动剂和拮抗剂,可与垂体上促性腺激素释放激素受体竞争性地结合,从而抑制黄体生成素和卵泡刺激素的分泌,使绝经前女性体内雌激素达到绝经后水平,其作用与手术去势(双侧卵巢切除或卵巢照射)及化疗相当[8]。近年来,它也逐渐被接受用于绝经前 HR 受体阳性的乳腺癌患者的辅助内分泌治疗[9]。除此之外,有多项临床随机对照试验发现在化疗期间联合运用 GnRHa(依据女性排排卵周期,每 28 天皮下注射一次)可以明显增加患者化疗后的月经恢复率,并增加自然怀孕的可能性,对绝经前乳腺癌患者卵巢功能起到保护作用[10-13]。欧洲圣加伦(StGallen)会议共识和美国国家综合癌症网(National Comprehensive Cancer Network,NCCN)指南甚至已建议同时使用 GnRHa 来降低绝经前乳腺癌患者接受化疗时卵巢功能衰竭的风险[14],但其中的作用机制并不明确。

抗缪勒氏管激素(Anti-Müllerian hormone, AMH)是一种在哺乳动物胚胎期促进生殖系统分化的同型二聚体,属于转化生长因子 β 家族[15]。抗缪勒氏管激素二型受体(Anti-Müllerian hormone receptor type 2,AMHR2)是一种跨膜感受器,它与 AMH 特异性结合,通过调节下游信号通路去改变细胞核内的转录来发挥作用[16,17]。AMH 在雌性哺乳动物主要由生长卵泡的颗粒细胞分泌,与卵巢内的 AMHR2 受体结合后抑制原始卵泡募集后转化为生长卵泡,负性调控卵泡的生长和成熟。大样本数据表明女性血清 AMH 水平从出生时开始上升,在青春期大约 25 岁达到峰值,直到更年期年龄,有一个稳定的下降直到无法检测的水平[18]。因此,血清 AMH 水平较高代表更好的卵巢储备,更丰富的原始卵泡[19]。

探明 GnRHa 保护化疗暴露下卵巢功能的机制,给这一药物在卵巢保护方面的运用提供证据,使更多年轻乳腺癌患者保留生育功能、提高生活质量,有重要意义。在本研究中,我们拟通过动物实验和细胞实验初步探索 GnRHa 在 CTX 暴露下保护卵巢功能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物实验

1.1.1 实验动物及试剂 5 周龄 SPF 级雌性 Balb/c 裸鼠,购自常州科康生物科技有限公司,动物实验经医学实验动物管理委员会批准;人乳腺癌细胞 MCF7 购自上海市中科院;环磷酰胺(CTX)购自江苏恒瑞公司,醋酸戈舍瑞林缓释植入剂(GnRHa)购自阿斯利康制药有限公司,生理盐水购自安徽丰原药业,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。

1.1.2 方法 36 只 5 周龄、体重 18-20 g 的雌性近交系 BALB/c 裸鼠,按 SPF 级条件适应性喂养一周后开始动物实验。随机分成 Control 组,CTX 组和 CG (CTX+GnRHa)组,每组 12 只小鼠,在小鼠背部进针,进针至皮下时针尖朝上,约进 0.5 cm,皮下注射 1×10^7 个 MCF7 细胞,每 2 天观察并记录肿瘤生长情况,用游标卡尺测量肿瘤最长和最短部位,$V=1/2*a*b^2$(a 为长轴,b 为短轴)[20]。当肿瘤体积达到 30 mm^3 以上时,开始进行后续药物处理。皮下成瘤后 13 天,Control 组、CTX 组和 CG 组分别皮下注射生理盐水、生理盐水、0.09 mg/kg GnRHa[21]。皮下成瘤后 14 天即小鼠 8 周龄时[22],3 组分别腹腔注射生理盐水、200 mg/kg CTX、200 mg/kg CTX。皮下成瘤后 18 天,再次分别皮下注射生理盐水、生理盐水、0.09 mg/kg GnRHa。皮下成瘤后 21 天即小鼠 9 周龄时,3 组 36 只小鼠麻醉下心尖采血,剥离肿瘤并称重,剥离子宫卵巢并称重。全血静置 1 小时后 4℃过夜,3000 rpm,离心 10 分钟后吸取上清液,血清中 AMH 水平通过酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒测定。显微镜下分离卵巢,一半卵巢制成全卵巢切片,每张切片厚度 5 μm 并标序号,H&E 染色后,每 5 张切片取一张显微镜下计数卵泡数量,每个卵巢计数五张切片,每个卵巢的卵泡数量运用 5 倍校正因子估计[23]。另一半提取卵巢蛋白后进行免疫印迹检测,提取卵巢 RNA 后进行实时荧光定量。整个动物实验过程中,每 2 天观察并记录肿瘤生长情况。荷瘤小鼠实验流程如图 1。

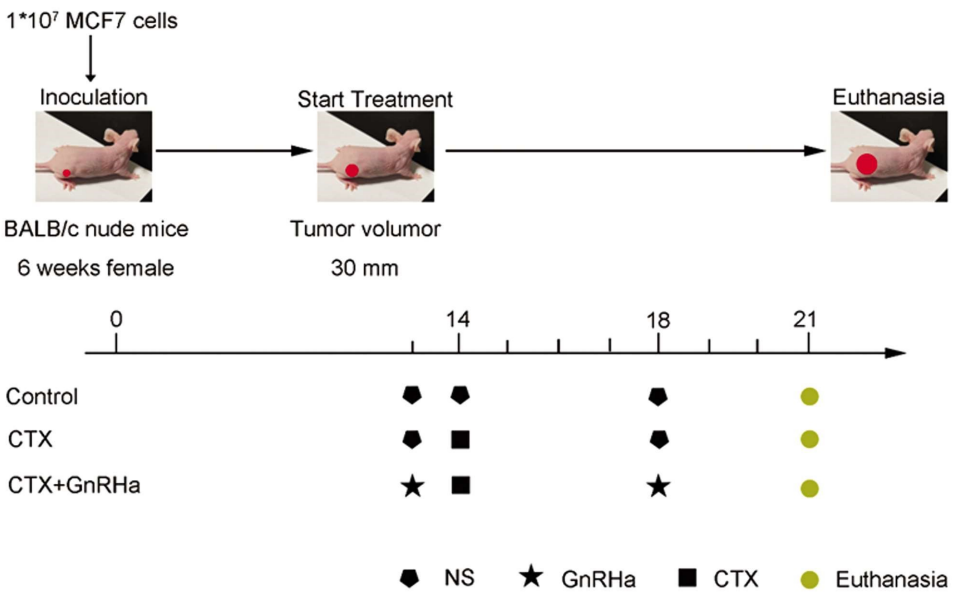

图 1 动物实验示意图

Fig. 1 Schematic diagram of animal experiment

Western blot:将小鼠卵巢组织捣碎,每只小鼠卵巢约 20 mg 加入 200 μL 的裂解液，涡旋仪充分震荡，使组织裂解充分，14000 rpm，离心 10 分钟。取上清 1:1 加入 2× loading buffer，100℃水浴蛋白变性 10 分钟。SDS-PAGE 蛋白恒压电泳,恒流转膜,5 %脱脂奶粉室温封闭 1 小时，兔抗人 AMH 单克隆抗体、兔抗人 AMHR2 单克隆抗体,1:500 稀释,4℃摇床孵育 12 小时,TBST 洗涤 3 次,每次 5 分钟,HRP 标记的羊抗兔二抗室温孵育 1 小时,TBST 洗 3 次,每次 5 分钟。ECL 发光液显影获图像。独立重复 3 次。

Real-time PCR:按照说明书步骤提取 RNA,测定 RNA 浓度，逆转录 RNA 成 cDNA 后进行 qRT-PCR 检测,95℃ 5 min 预变性；扩增 30 个循环:95℃45 s,55℃ 45 s,72℃ 45 s。然后 72℃ 5 min,4℃ 1 h。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 算法处理原始 CT 数值。AMH 正向引物:5' - CCGAGACCTACCAGGCCAACAA-3' ,反向引物 5'- GCATCTTCAGCAGCAGCACCA-3';AMHR2 正向引物:5'- AAGGATGCCGAGACAGTGATG -3',反向引物 5'- AGCAG GAGGAGGAGGAACAG -3'；内参基因 ACTIN 正向引物:5'-CTACGTCGCCCTGGAC TTCGAGC -3' ,反向引物:5'- GATG-GAGCCGCCGATCCACACGG -3'。每组 3 复孔。

1.2 细胞实验

1.2.1 细胞系及试剂 卵巢颗粒细胞 KGN（购自上海市中科院);环磷酰胺(CTX)购自江苏恒瑞制药厂,醋酸戈舍瑞林缓释植入剂(GnRHa)购自阿斯利康制药有限公司,rabbit anti-AMH 和 rabbit anti-AMHR2 购自 Abcam 公司,rabbit anti-beta-Actin、二抗购自 Absin 公司,PrimeScript RT 试剂盒和 Real time PCR 试剂盒购自 Takara 公司，胎牛血清、培养基 DMEM 均购自 Gibco 公司。

1.2.2 方法 细胞培养与药物处理:KGN 细胞培养于含 10% 的胎牛血清的 DMED 培养基内，置 5 %的 CO_2,37℃培养箱中培养。铺六孔板,待细胞生长汇合度达 70%-80%左右。换液后加药,Control 组：生理盐水;CTX750 组:CTX 750 μg/mL;CG (CTX+GnRHa)750 组:CTX 750 μg/mL + GnRHa 100 μg/mL; CTX1000 组：CTX1000 μg/mL;CG1000 组: CTX 1000 μg/mL+ GnRHa 100 μg/mL。培养箱内继续培养。提取细胞蛋白进行 Western blot，提取 RNA 并在逆转录 RNA 成 cDNA 后进行 qRT-PCR 检测转录水平 AMH 的表达。

ELISA 法检测细胞培养基上清:收取六孔板内细胞培养上清,离心 20 分钟左右(2500 rpm),吸取上清。加 100 μL 标准品、100 μL 培养基上清于相应反应板中,混匀后 37℃孵育 90 min，反复清洗反应板 5 次。每孔加入 100 μL 生物素化抗体工作液，混匀后 37℃孵育 60 min，反复清洗反应板 5 次。每孔中加入 100 μL 酶结合工作液,混匀后 37℃温育 30 min。反复清洗反应板 5 次。每孔分别加入 100 μL TMB 显色液,混匀后 37℃暗处温育 10 min。每孔加入 100 μL 终止液，混匀后 30 min 内在 450 nm 处读 OD 值。每组 3 复孔。

1.3 统计学分析

运用 GraphPad Prism 7 软件进行统计学分析和绘图,各组数据用平均数± 标准差表示，三组间比较采用单因素方差分析,组间进行 Lsd-t 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GnRHa 不影响 CTX 的抗肿瘤作用

三组小鼠皮下成瘤后每 2 天观察并记录肿瘤生长情况(图 2 A)。三组小鼠皮下成瘤后第 21 天即小鼠 9 周龄时,剥离肿瘤后称重(图 2,B),结果显示 CTX 组和 CG 组肿瘤质量均小于 Control 组（$P<0.05$), CTX 组和 CG 组间肿瘤质量无显著差异($P>0.05$)(图 2,C)。

2.2 GnRHa 可以减轻 CTX 所致的卵巢内原始卵泡丢失

三组小鼠皮下成瘤后进行药物干预,干预后,腹腔麻醉剥离子宫和卵巢。我们发现 CTX 组子宫和卵巢的总重量显著低于 Control 组($P<0.01$),CTX 和 GnRHa 共同处理的 CG 组子宫和卵巢的总重量显著高于 CTX 组($P<0.01$),且 CG 组与 Control 组子宫和卵巢的总重量无显著差异($P>0.05$)(图 3, A)。计数卵巢内卵泡数量，我们观察到原始卵泡在 CTX 组丢失严重

(P<0.001)，CG 组的原始卵泡数量与 Control 组比较无统计学差异(P>0.05)且比 CTX 组显著增加(P<0.001)(图 3, B)。三组间生长卵泡的数量无统计学差异(P>0.05)(图 3, B)。

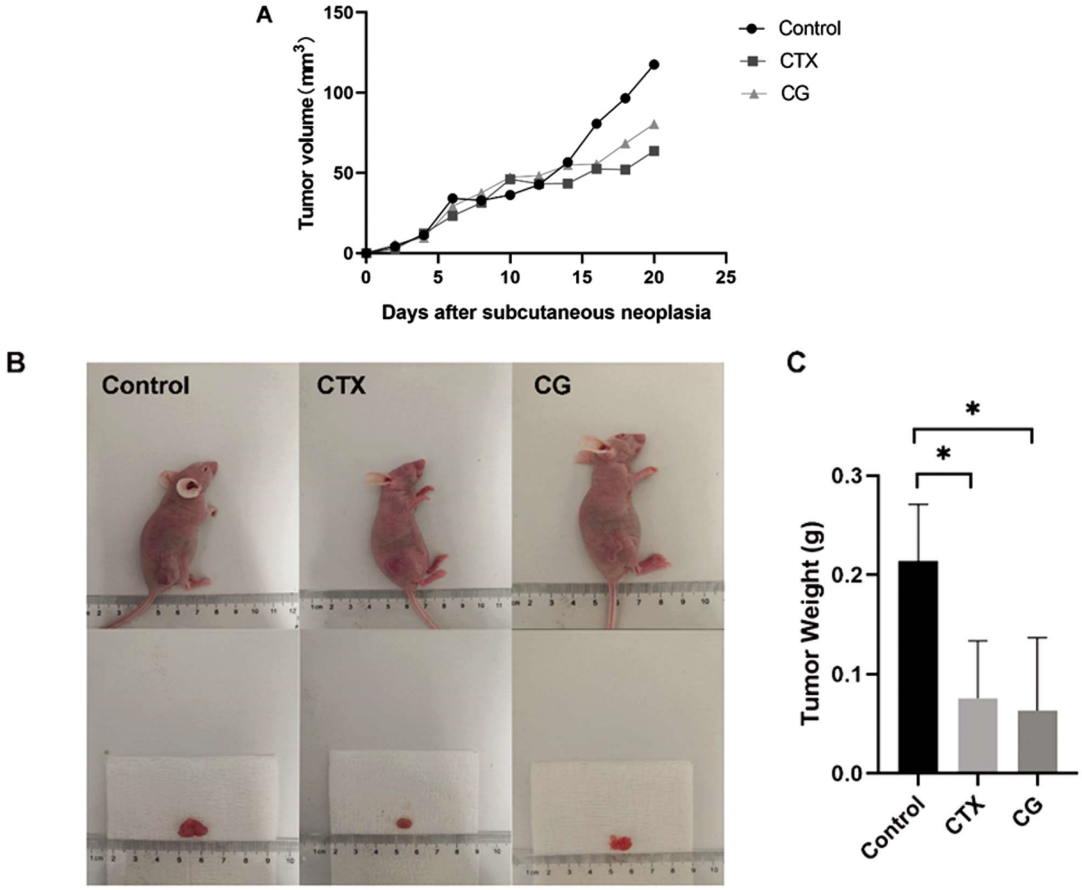

图 2 实验过程中小鼠在体肿瘤体积变化和离体肿瘤重量

*P<0.05

Fig.2 Changes of the tumor size in vivo during experimental and tumor weight in vitro

*P<0.05

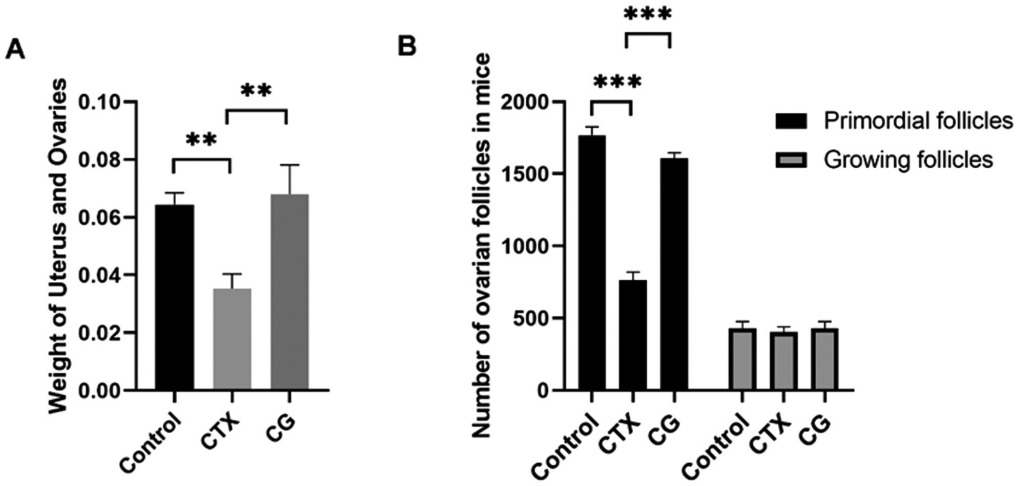

图 3 小鼠子宫卵巢总重量和卵泡计数

**P<0.01, ***P<0.001。

Fig.3 Total weight of uterus and ovaries and the number of ovarian follicles in mice

**P<0.01, ***P<0.001.

2.3 GnRHa 可以缓解 CTX 导致的 AMH 在小鼠卵巢和 KGN 细胞内的蓄积

在显微镜下精细剥离出单独的卵巢组织，然后提取卵巢组织蛋白。Western blot 显示，与对照组相比，CTX 处理过的小鼠

卵巢内 AMH 蛋白含量显著增多(P<0.01);GnRHa 和 CTX 共同处理的小鼠，卵巢内 AMH 蛋白含量显著少于 CTX 单独处理组(P<0.05),但与 Control 组无统计学差异(P>0.05)(图 4,A)。

为了进一步验证这一现象，我们用稳定培养的 KGN 细胞加药处理 36 小时后收取细胞蛋白，进行蛋白免疫印迹实验。CTX750 组和 CTX1000 组 KGN 细胞内 AMH 蛋白含量均显著高于对照组(P<0.05);加入 GnRHa 后,KGN 细胞内 AMH 蛋白的含量均显著低于对应 CTX 组(P<0.05)(图 4,B)。

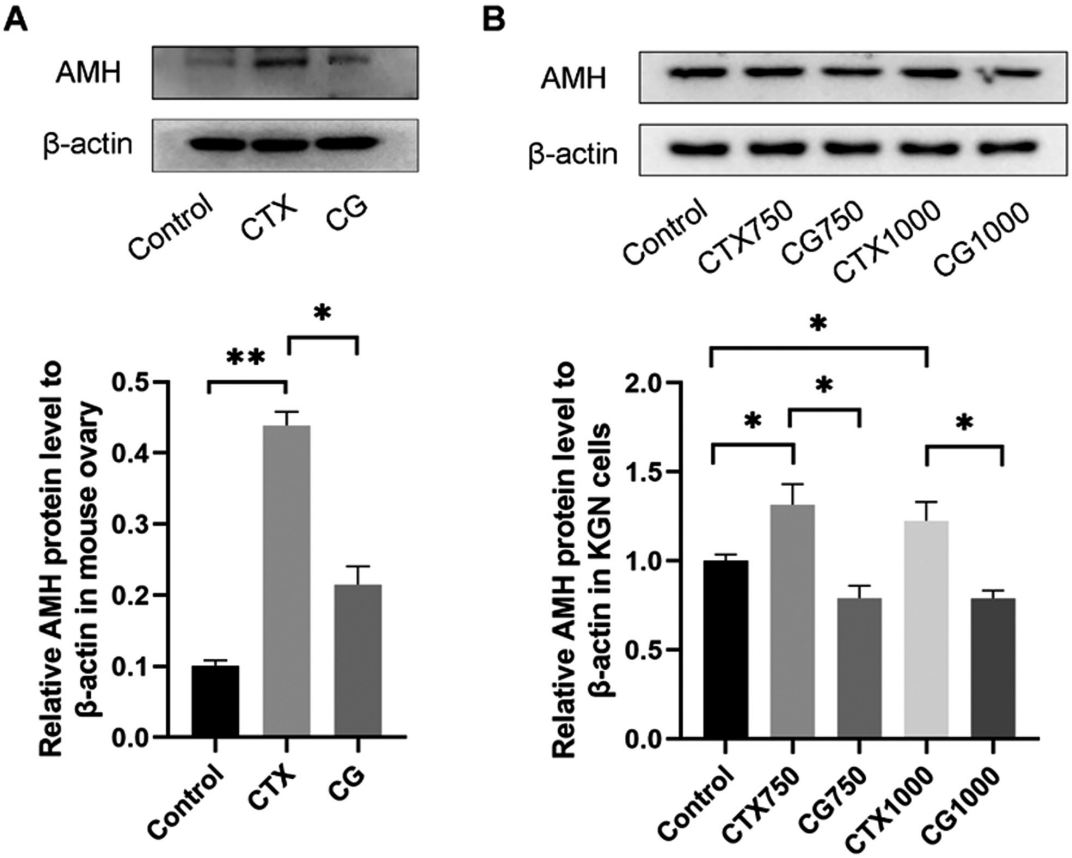

图 4 与 Control 组比较,加药处理后的小鼠卵巢(A)和 KGN 细胞(B)内 AMH 蛋白含量

Fig.4 Protein content of AMH in mouse ovary (A) and KGN cells (B) after drug treatment compared with Control group

2.4 GnRHa 可以逆转 CTX 导致的 AMH 在小鼠血清和 KGN 细胞培养基的浓度降低

通过酶联免疫吸附试验检测三组小鼠血清中 AMH 浓度，我们发现 CTX 组 AMH 血清浓度显著低于 Control 组和 CG 组(P<0.01),而 CG 组 AMH 浓度与 Control 组比较无统计学差异(P>0.05)(图 5,A)。检测培养基中颗粒细胞分泌的 AMH 水平发现，细胞培养基中 AMH 的浓度在 CTX 暴露组中显著下降(P<0.01),且在 CTX 浓度更高的 CTX1000 组中 AMH 浓度更低 (P<0.001)。CG750 组、CG1000 组的 AMH 水平与 Control 组比较均无统计学差异(P>0.05),但均分别高于 CTX750 组和 CTX1000 组,差异均有统计学意义(P<0.01)(图 5,B)。

2.5 CTX 和 GnRHa 不在转录水平改变 AMH 的表达

运用 RT-qPCR 技术检测药物处理的三组小鼠卵巢和 KGN 细胞,我们发现,各组间 AMH 的 mRNA 表达水平均无统计学差异(P>0.05)(图 6)。

3 讨论

随着恶性肿瘤患者的年轻化和患者生育需求的增加,避免生殖毒性化疗药物所带来的卵巢损伤是肿瘤生殖学研究的重点。临床工作中,GnRHa 与化疗联合应用保护卵巢功能已经较为普遍,探明其中的机制是十分急迫的。

我们的研究分为动物实验和细胞实验,动物实验中小鼠腹腔注射 CTX 的剂量是根据既往研究确定，即 200 mg/kg 的 CTX 能导致小鼠大约 45%的卵泡丢失[24,25];GnRHa 的小鼠皮下注射剂量由人的注射剂量推算得出，注射周期为每 5 天一次，依据小鼠排卵周期制定;细胞实验中,CTX 的浓度是依据我们前期的实验，用 250-1250 μg/mL 的 CTX 浓度梯度处理 KGN 细胞 36 小时后，在≥ 750 μg/mL 的 CTX 处理后的细胞中,培养基中分泌的 AMH 水平降低,CTX 1250 μg/mL 时,细胞死亡增多 [26]，因此确定 CTX 的加药浓度为 750 μg/mL 和 1000 μg/mL。在本研究中,首先通过比较小鼠药物治疗后肿块大小证明了 GnRHa 与 CTX 联合应用并不影响 CTX 的抗肿瘤作用。再通过比较组间化疗后卵巢内原始卵泡和生长卵泡的数量发现 GnRHa 可以缓解 CTX 所致的原始卵泡丢失。CTX 损伤卵巢的机制主要分为直接和间接两方面:一方面,CTX 可能对各级卵泡和其他卵巢间质细胞产生直接毒性，诱导 DNA 损伤和细胞凋亡[25,27]。另一方面,CTX 过度募集原始卵泡引起原始卵泡的耗竭,间接损伤卵巢储备[28]。因此,我们认为 GnRHa 可以逆转 CTX 对卵巢储备的损伤。接下来我们通过对小鼠卵巢蛋白和 KGN 细胞蛋白进行免疫印迹实验，对小鼠血清和 KGN

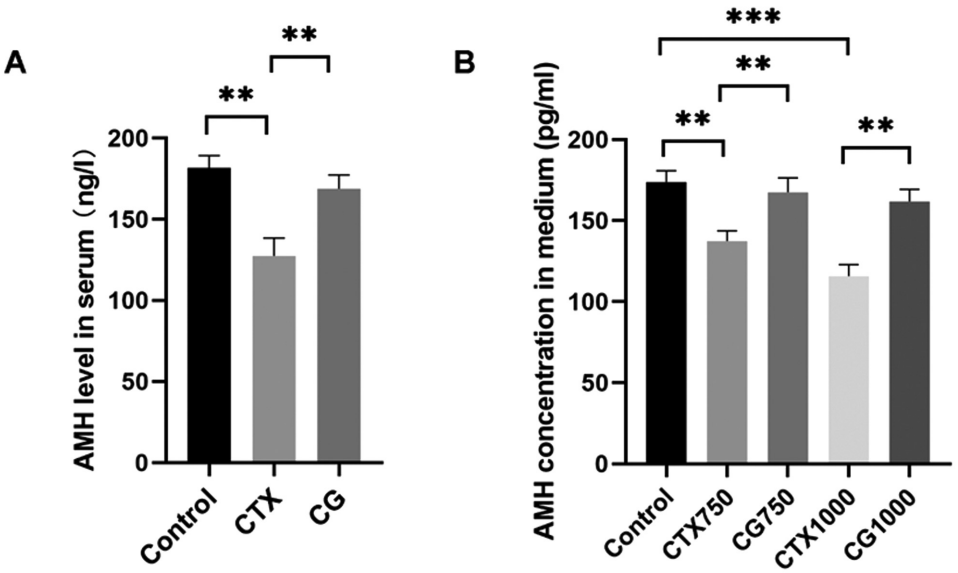

图 5 加药处理后的小鼠血清(A)和 KGN 细胞培养基(B)内 AMH 蛋白浓度

**P<0.01, ***P<0.001。

Fig.5 Protein concentration of AMH in mouse serum (A) and culture medium of KGN cells (B) after drug treatment

**P<0.01, ***P<0.001.

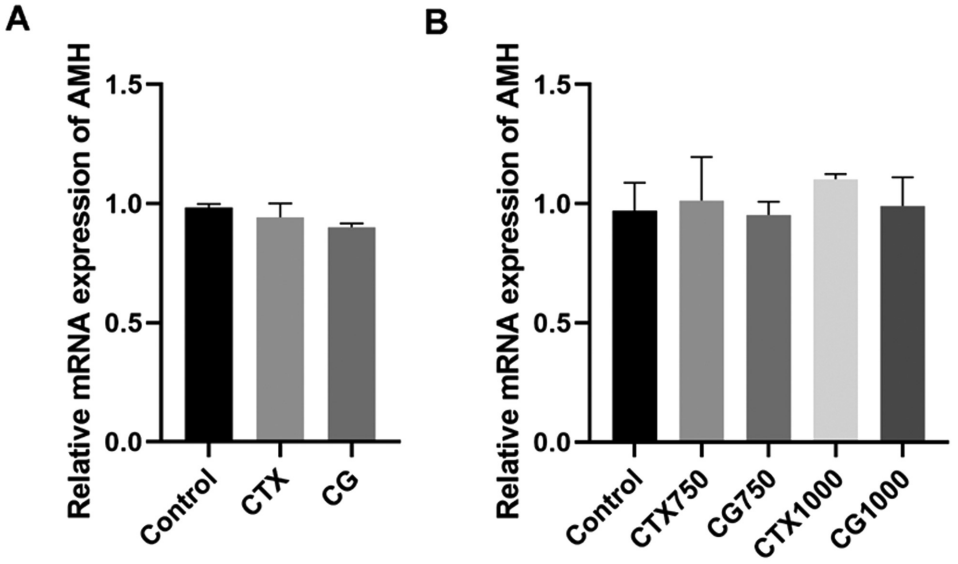

图 6 加药处理后的小鼠卵巢(A)和 KGN 细胞(B)内 AMH mRNA 表达

Fig.6 Relative mRNA expression of AMH in mouse ovary(A) and KGN cells (B) after drug treatment

细胞培养基进行免疫吸附实验，对小鼠卵巢 RNA 和 KGN 细胞 RNA 进行 PCR 实验,分析出 CTX 不在转录水平改变 AMH 的表达,而是增加 AMH 潴留在颗粒细胞内,并使得细胞外的 AMH 水平减少；而 GnRHa 也不在转录水平改变 AMH 的表达,而是将 CTX 潴留在颗粒细胞内的 AMH 浓度降低,同时增加细胞外和血清中的 AMH 浓度，这些游离的 AMH 通过靶向卵巢 AMHR2 抑制原始卵泡耗竭,保留卵巢储备。GnRHa 是否将 CTX 潴留在颗粒细胞内的 AMH 分泌至细胞外，其中的具体机制是我们团队后续的研究方向。现在科学界普遍认为 PI3K/AKT /MTOR 信号通路是调节原始卵泡的静止和存活的途径之一[29]。FoxO3A 是该通路上一个重要的分子,它磷酸化时可以激活原始卵泡 [30]。有研究报道用 AMH 治疗小鼠卵巢后，AMH 可能通过阻止环磷酰胺诱导的 FoxO3A 的磷酸化来抑制原始卵泡募集[27]。

此外，有研究证实 GnRHa 可以通过减少垂体卵泡刺激素的分泌,因此导致生长卵泡发育停滞、凋亡减少,使原始卵泡处于静止状态,从而达到卵巢功能抑制[31]。这也许是 GnRHa 保护卵巢储备的另一种思路。

我们的研究发现,在 CTX 化疗的同时运用 GnRHa,可以在不干扰化疗疗效的前提下，通过减少 CTX 导致的潴留在细胞内的 AMH 水平，增加细胞外和血清中的 AMH 浓度从而发挥保护卵巢储备的功能。这一发现为后续的深入研究提供了思路，也为 GnRHa 在化疗暴露下卵巢功能保护方面的运用提供了初步的参考依据。

参 考 文 献(References)

[1] CORTES J, PEREZ-GARCIA J M, LLOMBART-CUSSAC A, et al. Enhancing global access to cancer medicines [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(2): 105-124

[2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34

[3] RUDDY K J, GANZ P A. Treatment of Nonmetastatic Breast Cancer [J]. JAMA, 2019, 321(17): 1716-1717

[4] TORINO F, BARNABEI A, DE VECCHIS L, et al. Chemotherapy-induced ovarian toxicity in patients affected by endocrine-responsive early breast cancer[J]. Critical reviews in oncology/hematology, 2014, 89(1): 27-42

[5] BEDOSCHI G, NAVARRO P A, OKTAY K. Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact [J]. Future oncology (London, England), 2016, 12(20): 2333-2344

[6] WAKS A G, WINER E P. Breast Cancer Treatment: A Review[J]. JAMA, 2019, 321(3): 288-300

[7] JIANG Y, ZHAO J, QI H J, et al. Accelerated ovarian aging in mice by treatment of busulfan and cyclophosphamide [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2013, 14(4): 318-324

[8] LI X L, YU Y, ZONG X Y. Summary and expectation of the role of GnRHa in the treatment of breast cancer[J]. Chinese journal of oncology, 2019, 41(4): 246-250

[9] DEL MASTRO L, ROSSI G, LAMBERTINI M, et al. New insights on the role of luteinizing hormone releasing hormone agonists in premenopausal early breast cancer patients [J]. Cancer Treat Rev, 2016, 42: 18-23

[10] WANG S, PEI L, HU T, et al. Protective effect of goserelin on ovarian reserve during (neo)adjuvant chemotherapy in young breast cancer patients: a prospective cohort study in China [J]. Hum Reprod, 2021, 7:deaa349

[11] ZHONG Y, LIN Y, CHENG X, et al. GnRHa for Ovarian Protection and the Association between AMH and Ovarian Function during Adjuvant Chemotherapy for Breast Cancer [J]. J Cancer, 2019, 10(18): 4278-4285

[12] SENRA J C, ROQUE M, TALIM M C T, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonists for ovarian protection during cancer chemotherapy: systematic review and meta-analysis [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2018, 51(1): 77-86

[13] MUNHOZ R R, PEREIRA A A, SASSE A D, et al. Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists for Ovarian Function Preservation in Premenopausal Women Undergoing Chemotherapy for Early-Stage Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. JAMA Oncol, 2016, 2(1): 65-73

[14] JACKISCH C, HARBECK N, HUOBER J, et al. 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015: Evidence, Controversies, Consensus - Primary Therapy of Early Breast Cancer: Opinions Expressed by German Experts [J]. Breast Care (Basel), 2015, 10(3): 211-219

[15] BARBOTIN A L, PEIGNE M, MALONE S A, et al. Emerging Roles of Anti-Mullerian Hormone in Hypothalamic-Pituitary Function [J]. Neuroendocrinology, 2019, 109(3): 218-229

[16] MISHINA Y, REY R, FINEGOLD M J, et al. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation[J]. Genes Dev, 1996, 10(20): 2577-2587

[17] RAK A Y, TROFIMOV A V, ISCHENKO A M. Anti-mullerian hormone receptor type II as a Potential Target for Antineoplastic Therapy [J]. Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 2019, 13(3): 202-213

[18] DEWAILLY D, ANDERSEN C Y, BALEN A, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women[J]. Hum Reprod Update, 2014, 20(3): 370-385

[19] E. K M, F. M M, PIET K, et al. Serum Anti-Müllerian Hormone Levels Reflect the Size of the Primordial Follicle Pool in Mice [J]. 2006

[20] 车云. 肿瘤相关成纤维细胞引起化疗耐药及天然化合物治疗食管鳞癌的作用机制研究[D].北京协和医学院, 2018

[21] ZHANG Y, LU Z Y, YAN X H, et al. Study on the effects of gonadotropin-releasing hormone analogues in the inhibition of ovarian cancer transplanted tumors and in the protection of ovarian function after chemotherapy on nude mice [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2011, 46(12): 892-897

[22] 李晓林. AMH 对乳腺癌化疗暴露下卵巢功能损伤评估价值及机制研究[D].上海交通大学, 2019

[23] LI X, LIU S, MA L, et al. Can Anti-Mullerian Hormone Be a Reliable Biomarker for Assessing Ovarian Function in Women Postchemotherapy?[J]. Cancer Management and Research, 2020, 12: 8171-8181

[24] HORICKS F, VAN DEN STEEN G, HOUBEN S, et al. Folliculogenesis Is Not Fully Inhibited during GnRH Analogues Treatment in Mice Challenging Their Efficiency to Preserve the Ovarian Reserve during Chemotherapy in This Model [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137164

[25] OKTEM O, OKTAY K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve[J]. Cancer Res, 2007, 67(21): 10159-10162

[26] 刘思旋. 环磷酰胺诱导内质网应激损伤卵巢功能的机制研究[D]. 上海交通大学, 2020

[27] CUI W, STERN C, HICKEY M, et al. Preventing ovarian failure associated with chemotherapy[J]. Med J Aust, 2018, 209(9): 412-416

[28] SONIGO C, BEAU I, BINART N, et al. The Impact of Chemotherapy on the Ovaries: Molecular Aspects and the Prevention of Ovarian Damage[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5342

[29] REDDY P, ZHENG W, LIU K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles [J]. Trends Endocrinol Metab, 2010, 21(2): 96-103

[30] ADHIKARI D, LIU K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles [J]. Endocr Rev, 2009, 30(5): 438-464

[31] RONESS H, KALICH-PHILOSOPH L, MEIROW D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents [J]. Hum Reprod Update, 2014, 20(5): 759-774