

右归丸通过调节CXCL8/CXCR1/2信号通路及Ang-1, Ang-2表达促进大鼠卵巢血管生成的作用

魏小晶, 段恒*, 唐立明, 宋谦谦

(重庆医科大学 中医药学院, 中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室, 重庆 400016)

[摘要] 目的:研究补肾中药复方右归丸对自然衰老致卵巢功能低下的大鼠血管生成的影响与CXC趋化因子8(CXCL8)/趋化因子受体1/2(CXCR1/2)信号通路及血管生成素-1(Ang-1),血管生成素-2(Ang-2)的关系,探讨其改善卵巢功能的作用机制。方法:将56只雌性SD大鼠随机分为青年组8只、自然衰老致卵巢功能低下的雌性大鼠模型组48只,青年组大鼠常规饲养,48只模型组大鼠常规饲养过程中做5~7 d阴道脱落细胞学涂片,将连续4个动情周期阴道细胞学表现为动情周期长、之后持续动情、反复假妊娠的大鼠作为初老大鼠,连续10 d表现为角化细胞指数高于50%的青年大鼠作为青年组。模型建立后,将存活造模大鼠随机分为初老空白组,结合雌激素组($65 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),左归丸组($33 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),右归丸低、中、高剂量组($1.2, 2.4, 4.8 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),青年组和初老空白组以等体积生理盐水灌胃,持续30 d。实验结束后,苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠卵巢组织形态学变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠卵巢组织中趋化因子CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1, Ang-2的蛋白表达水平;免疫组化标记大鼠卵巢组织中趋化因子CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1, Ang-2蛋白的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠卵巢组织中趋化因子CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1, Ang-2 mRNA表达。结果:与青年组比较,初老空白组各级生长卵泡数、黄体数、血管数目数量少且闭锁卵泡多($P<0.01$),卵巢组织CXCL8, CXCR1及CXCR2水平蛋白和mRNA水平显著上升($P<0.01$),卵巢组织中Ang-1及Ang-2蛋白和mRNA水平明显下降($P<0.05$);与初老空白组相比,各用药组初老大鼠的各级生长卵泡数、黄体数、血管数目明显增加($P<0.05$),而闭锁卵泡数明显减少($P<0.05$),卵巢组织CXCL8, CXCR1及CXCR2水平蛋白和mRNA水平明显下降($P<0.05$),卵巢组织中Ang-1及Ang-2蛋白和mRNA水平明显上升($P<0.05$)。结论:右归丸可以通过下调大鼠卵巢组织中CXCL8, CXCR1及CXCR2水平,上调Ang-1和Ang-2水平,促进卵巢血管生成,改善大鼠的卵巢功能。

[关键词] 右归丸; 血管生成; 信号通路; 趋化因子(CXCL)8; CXC趋化因子受体1/2(CXCR1/2); 血管生成素

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)01-0050-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212406

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211027.0933.001.html>

[网络出版日期] 2021-10-27 16:27

Youguiwan Regulates CXCL8/CXCR1/2 Signaling Pathway and Ang-1 and Ang-2 Expression to Promote Ovarian Angiogenesis in Rats

WEI Xiao-jing, DUAN Heng*, TANG Li-ming, SONG Qian-qian

(College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chongqing Key Laboratory of TCM for Prevention and Cure of Metabolic Diseases, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Chinese herbal compound Youguiwan on angiogenesis of rats with ovarian dysfunction caused by natural aging and its relationship with chemokine interleukin 8 (CXCL8)/CXC chemokine receptor 1/2 (CXCR1/2) signaling pathway, angiopoietin 1 (Ang-1), and angiopoietin 2 (Ang-2), so as to explore its mechanism in improving the ovarian function. **Method:** Fifty six

[收稿日期] 20210725(005)

[基金项目] 2020年重庆市研究生科研创新项目(CYS20216);重庆市基础科学与前沿技术研究一般项目(cste2017jcyjAX0350)

[第一作者] 魏小晶, 硕士, 从事生殖调控的研究, E-mail: 1540201701@qq.com

[通信作者] *段恒, 博士, 副教授, 从事生殖调控的研究, E-mail: 404634014@qq.com

female SD rats were randomly divided into the young control group ($n=8$) and modeling group ($n=48$, ovarian dysfunction caused by natural aging). Rats in both the young control and modeling groups were routinely fed, during which the ones in the modeling group underwent exfoliative cytology of vaginal smears for five to seven days. The ones presented with prolonged estrous cycle, followed by continuous estrus and repeated pseudopregnancy revealed by vaginal cytology during four consecutive estrous cycles indicated early aging, and the young rats with keratinocyte proliferation index higher than 50% for 10 consecutive days were classified into the young control group. The successfully modeled rats were randomly divided into the early-aged group, estrogen ($65 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) group, Zuoguiwan ($33 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) group, as well as the low-, medium-, and high-dose ($1.2, 2.4, 4.8 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) Youguiwan groups. Rats in the young control group and the early-aged group were gavaged with the same volume of normal saline for 30 days. After the experiment, the morphological changes in rat ovary were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The protein expression levels of chemokines CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1, and Ang-2 in rat ovary were detected by Western blotting and immunohistochemistry, and the mRNA expression levels of CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1, and Ang-2 by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the young control group, the early-aged group exhibited reduced number of growing follicles, corpus luteum, and blood vessels at all levels, elevated atretic follicles ($P<0.01$), up-regulated protein and mRNA expression of CXCL8, CXCR1, and CXCR2 in the ovarian tissue ($P<0.01$), and down-regulated Ang-1 and Ang-2 protein and mRNA expression ($P<0.05$). Compared with the early-aged group, each medication remarkably increased the number of growing follicles, corpus luteum, and blood vessels ($P<0.05$), lowered the number of atretic follicles ($P<0.05$), down-regulated the protein and mRNA expression levels of CXCL8, CXCR1, and CXCR2 in the ovarian tissue ($P<0.05$), and up-regulated the protein and mRNA expression levels of Ang-1 and Ang-2 ($P<0.05$). **Conclusion:** Youguiwan down-regulates the levels of CXCL8, CXCR1, and CXCR2 in rat ovary and up-regulates the levels of Ang-1 and Ang-2 to promote ovarian angiogenesis and improve rat ovarian function.

[Keywords] Youguiwan; angiogenesis; signaling pathway; chemokine interleukin 8 (CXCL8); CXCR chemokine receptor 1/2 (CXCR1/2); angiopoietin

卵巢功能低下常见于围绝经期综合征和卵巢早衰等,严重影响了女性的生活质量,因此进行相关研究非常重要。右归丸是补肾的代表方,临床上用于治疗月经后期或量少、闭经、不孕症等多种病症。本研究旨在探讨右归丸治疗卵巢功能低下的主要机制,为中医药有效治疗卵巢功能低下性疾病提供科学依据。有研究显示,CXC趋化因子8 (CXCL8),又称白细胞介素-8(IL-8),CXC趋化因子受体1(CXCR1),CXCR2在雌性动物生殖系统有分布,对血管生成具有重要作用^[1]。右归丸(Youguiwan, YGW)出自《景岳全书》,有温补肾阳,填精益髓的功效,是治疗卵巢功能低下的有效方剂,右归丸延缓雌性自然衰老大鼠生殖器官血管衰萎与CXCL8/CXCR1/2信号通路关系的研究目前尚未见报道。血管生成素-1(Ang-1)和血管生成素-2(Ang-2)是生殖系统中重要的血管调控因子^[2]。本课题组前期研究发现左归丸可增加卵巢局部血运

来促进卵泡的发育^[3]。研究发现右归丸亦与血管生成相关联^[4-5],为进一步了解右归丸促进血管生成的机制,本实验研究右归丸对初老雌性大鼠卵巢组织血管生成与CXCL8/CXCR1/2信号通路及Ang-1, Ang-2的关系,为右归丸治疗卵巢功能低下类疾病提供客观依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雌性SD大鼠48只,10~12月龄,符合初老大鼠模型,体质量(310 ± 20)g;青年大鼠8只,4~6月龄,体质量(230 ± 20)g,由重庆医科大学动物实验中心提供,合格证号SCXK(渝)2018-0003,本研究动物实验部分符合重庆医科大学医学研究伦理委员会要求。

1.2 药品与试剂 左归丸、右归丸浸膏含生药量分别是 $1.75 \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1.9 \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,由重庆医科大学中医药学院中药教研室提供,批号20200803。所有药材均购于重庆桐君阁大药房,并由重庆医科大学中

医药学院费耀副教授据2015年版《中华人民共和国药典》鉴定为正品;结合雌激素片(新疆新姿源生物制药有限责任公司,批号20200301)研磨,溶于生理盐水制成混悬液。苏木素-伊红(HE)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1003);兔抗CXCL8, Ang-1, Ang-2(上海青牧生物科技有限公司,批号分别为DF6998, AF5184, AF5124);兔抗CXCR1, CXCR2(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-1009R, bs-4836R); β -肌动蛋白(β -actin)抗体,山羊抗兔二抗, TRIzol(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB12001, GB23303, G3013);逆转录试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(武汉擎科生物技术有限公司,批号分别为TSE202, TSK302S)。

1.3 仪器 Eclipse E100型正置显微镜, DS-U3型成像系统(日本尼康公司);iCEN-24R型低温高速离心机(杭州奥盛仪器有限公司);Synergy HTX型全自动酶标仪(中国香港基因有限公司);CFX PCR型检测系统, MINI型蛋白电泳及转印系统(美国Bio-Rad公司);NanoDrop型2000型超微量核酸测定(美国Thermo Fisher Scientific公司);DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 模型的制备 分笼适应性喂养大鼠,过程中做5~7 d阴道脱落细胞学涂片,将连续4个动情周期阴道细胞学表现为动情周期长、之后持续动情、反复假妊娠的初老大鼠作为模型大鼠。连续10 d表现为角化细胞指数高于50%的青年大鼠作为青年组^[6]。

2.2 动物分组及给药 将正常的青年大鼠作为青年组;将初老大鼠随机分为6组,分别为初老空白组、结合雌激素组、左归丸组、右归丸低、中、高剂量组,每组8只,青年组和初老空白组分别灌服蒸馏水 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,结合雌激素片混悬液 $65\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,左归丸浸膏 $33\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及右归丸浸膏 $1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,右归丸浸膏 $2.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,右归丸浸膏 $4.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组,每日1次,连续30 d。青年组大鼠灌胃同初老空白组大鼠,左归丸剂量参照前期研究最佳剂量^[3],参照《药理实验方法学》中人和动物间按体表面积折算的等效剂量法^[7],故左归丸浸膏剂量为 $33\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;右归丸人的临床用量为 $27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,按照人与大鼠的体表面积换算法为 $27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\times 0.018\times 5\approx 2.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,作为中剂量,故而设定右归丸高、中、低剂量分别为4.8, 2.4, $1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[8]。

2.3 取材 末次给药24 h后,大鼠腹部注射10%水合氯醛溶液麻醉,取其活体卵巢、子宫、阴道组织,剥离周围组织后取一侧的卵巢用4%多聚甲醛固定,乙醇梯度脱水,常规石蜡包埋、切片,待做HE染色及免疫组织化学分析,另一侧卵巢则快速取下放入液氮罐中保存,用于后续蛋白免疫印迹法(Western blot)和Real-time PCR实验。

2.4 免疫组化检测大鼠卵巢组织中CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1及Ang-2蛋白水平 每组大鼠选取8张石蜡切片,梯度乙醇脱蜡至水化。严格按照试剂盒说明书步骤进行SP法检测各组CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1, Ang-2蛋白,浸泡于柠檬酸(pH6.0)抗原修复缓冲液中,微波炉内进行抗原修复,3%BSA封闭液孵育30 min,滴加一抗(CXCL8, CXCR1, Ang-1, Ang-2的稀释比均为1:200, CXCR2稀释比为1:100),一抗4℃孵育过夜,冲洗,二抗(稀释比均为1:200),室温下30 min,流水冲洗。滴加新鲜配置的DAB显色液显色,苏木素复染,脱水封片;结果判定:光镜下观察细胞染色,免疫阳性细胞呈棕黄色或深棕色颗粒状。每张切片至少观察5个高倍视野($\times 400$),正置显微镜进行图像采集,并采用Imager Pro Plus 6.0对CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1, Ang-2蛋白的表达进行分析,测量各片染色阳性细胞的积分吸光度IA。

2.5 Western blot检测大鼠卵巢组织中CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1及Ang-2蛋白的表达 用眼科剪将大鼠卵巢组织剪碎,以RIPA组织细胞裂解液裂解后 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径9.6 cm,下同),取上清,完成蛋白提取,BCA蛋白浓度试剂盒检测蛋白浓度。配置10%SDS-PAGE凝胶,依次加样;进行SDS-PAGE电泳分离,300 mA恒流电转,用5%的脱脂牛奶封闭1 h;加入稀释的CXCL8(1:500), CXCR1(1:1 000), CXCR2(1:1 000), Ang-1(1:1 000)及Ang-2(1:1 000),4℃冰箱摇床孵育过夜;二抗(1:5 000),室温1 h;用ECL试剂盒曝光、显影、定影,于OdysseyFC近红外双色激光和化学发光双功能成像系统下成像,Image J软件分析条带灰度值,以 β -actin为内参照进行对比。

2.6 Real-time PCR法检测大鼠卵巢组织中CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1及Ang-2 mRNA水平 用TRIzol抽提卵巢组织RNA,匀浆仪 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心10 min取上清,加入三氯甲烷颠倒混匀,4℃下 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,加0.8倍

量异丙醇,颠倒混匀,-20℃放置15 min后,4℃下12 000 r·min⁻¹离心10 min,管底的白色沉淀即为RNA。测定纯度和浓度后逆转录为cDNA,并进行Real-time PCR检测。CXCL8反应条件为逆转录25℃孵育5 min,42℃孵育30 min,85℃孵育5 s;95℃预变性10 min;95℃扩增15 s,60℃扩增30 s,共40个循环;溶解曲线65~95℃,每15 s升温0.3℃。CXCR1, CXCR2, Ang-1及Ang-2反应条件为逆转录25℃孵育10 min,50℃孵育30 min,85℃

孵育5 min;95℃预变性1 min;反转录得到的cDNA产物适量稀释后作为Real-time PCR模板,以擎科2×T5 Fast Real-time PCR Mix进行扩增,扩增体系各组分分别是SYBR 10 μL,引物各0.8 μL,cDNA 1 μL,双蒸水7.4 μL(95℃15 s,60℃15 s,72℃30 s,共40个循环);溶解曲线95~50℃,每1 s升温0.11℃。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参照,采用2^{-ΔΔC_t}法计算mRNA相对表达量,引物序列由武汉擎科生物技术有限公司合成。见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

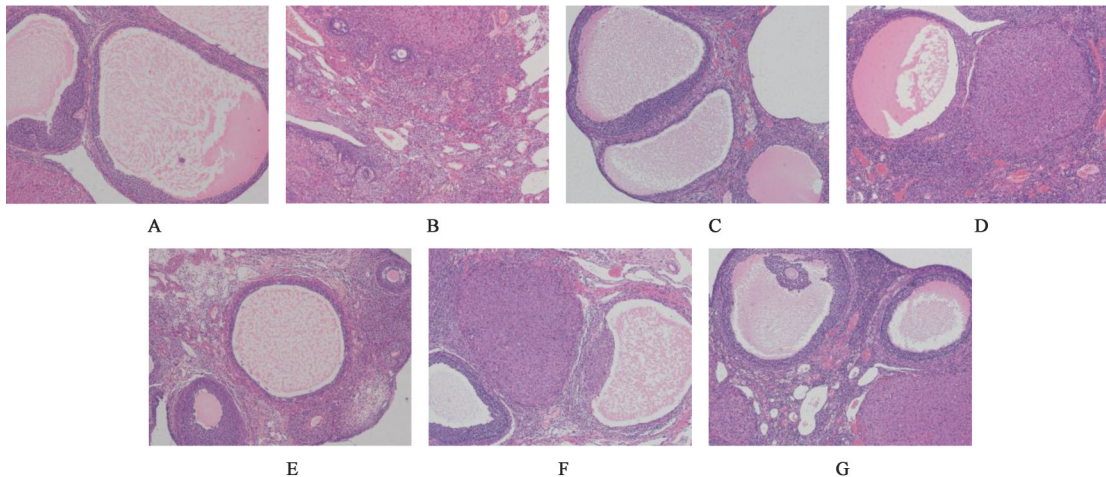
引物	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	长度/bp
CXCL8	ACGCTGGCTTCTGACAACACTAGT	CTTCTCTGTCCTGAGACGAGAAGG	498
CXCR1	TATACAGGCGAAGGACCCGA	GTGTGCCAAAAATCCAGCCC	173
CXCR2	CCACTCCCAGCATCGTAGAG	GTAAGGGCGGGTCAGAACT	102
Ang-1	GGGAACCGAGCCTACTCACA	CGTTATCAGCGTCCTTTGTGC	166
Ang-2	CTGACTGATGTGGAAGCCCA	TGTGCTTGTCTCCATGTCC	99
GAPDH	CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	138

2.7 统计学处理 采用统计软件SPSS 22.0进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布同时满足方差齐性,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对初老大鼠卵巢组织病理学的影响 青年组各级生长卵泡发育正常,颗粒细胞完整,黄体发育

良好;与青年组比较,初老空白组各级生长卵泡数量少且闭锁卵泡多($P < 0.01$);与初老空白组比较,右归丸各剂量组、左归丸组及结合雌激素组各级生长卵泡、黄体、血管数量增加,闭锁卵泡数量明显降低($P < 0.05$);与左归丸组比较,右归丸各剂量组的各级生长卵泡、黄体、血管数量较少,闭锁卵泡数量较多,结果差异无统计学意义。见图1,表2。



A. 青年组;B. 初老空白组;C. 结合雌激素组;D. 左归丸组;E. 右归丸1.2 g·kg组;F. 右归丸2.4 g·kg组;G. 右归丸4.8 g·kg组(图2同)

图1 右归丸对初老大鼠卵巢组织病理学的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of Youguiwan on ovarian histopathology of chuelest rat (HE,×100)

3.2 对初老大鼠卵巢组织中CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1及Ang-2的蛋白水平的影响 CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1及Ang-2蛋白免

疫阳性反应物定位于细胞胞质,卵泡颗粒细胞和卵泡膜细胞均有5种蛋白的分布,其中在卵泡颗粒细胞水平最高;另外CXCR1和CXCR2在卵泡细胞浆

表2 右归丸对初老大鼠卵泡、黄体及血管的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Youguiwan on follicles, corpus luteum and blood vessels of chuelest rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

个

组别	剂量/g·kg ⁻¹	各级生长卵泡	黄体	血管数目	闭锁卵泡
青年		12.3±3.8	12.4±3.3	27.7±4.1	2.4±2.1
初老空白		4.3±1.6 ²⁾	5.3±1.6 ²⁾	15.0±2.1 ²⁾	7.6±1.7 ²⁾
结合雌激素	65×10 ⁻⁶	9.0±1.9 ⁴⁾	10.4±2.9 ⁴⁾	25.5±3.5 ⁴⁾	3.0±1.6 ⁴⁾
左归丸	33	8.5±1.5 ⁴⁾	9.5±1.9 ⁴⁾	24.5±3.4 ⁴⁾	4.1±1.6 ⁴⁾
右归丸	1.2	6.8±1.3 ^{4,5)}	7.6±2.2 ³⁾	23.0±2.6 ⁴⁾	5.1±2.4 ³⁾
	2.4	8.3±1.2 ⁴⁾	7.8±2.0 ³⁾	23.3±2.4 ⁴⁾	5.0±1.7 ³⁾
	4.8	8.4±1.6 ⁴⁾	9.1±2.4 ⁴⁾	24.3±3.0 ⁴⁾	4.6±1.8 ⁴⁾

注:与青年组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与初老空白组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01;与左归丸组比较⁵⁾P<0.05,⁶⁾P<0.01(表3~5同)。

和黄体细胞中也有分布。CXCL8及两受体CXCR1和CXCR2在初老空白组SD鼠的卵巢组织中免疫反应最强,呈棕黄色浓染,面积较大。与青年组比较,初老空白组大鼠免疫反应阳性面积较大,且IA较高,青年组未见明显阳性反应(P<0.01);与初老空白组比较,右归丸各剂量组、左归丸组及结合雌激素组免疫反应阳性面积减小,且IA较低(P<0.05);与左归丸组比较,右归丸各剂量组免疫反应阳性面积增多,且IA较高(P<0.05)。Ang-1在青年组可见大面积深棕染色颗粒,初老空白组仅见少量淡棕色

反应产物。Ang-2在左归丸组及其余用药组可见大面积深棕染色颗粒,初老空白组仅见少量淡棕色反应产物。与青年组比较,初老空白组大鼠免疫反应阳性面积较小,且IA较低(P<0.05);与初老空白组比较,右归丸各剂量组、左归丸组及结合雌激素组卵巢颗粒细胞和卵泡细胞膜的棕黄染色颗粒增多,且各治疗组IA均增高(P<0.05);与左归丸组比较,右归丸各剂量组卵巢颗粒细胞和卵泡细胞膜的棕黄染色颗粒减少,且各治疗组IA均降低(P<0.05)。见表3。

表3 右归丸对初老大鼠卵巢组织中CXCL8,CXCR1,CXCR2,Ang-1及Ang-2 IA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Youguiwan on CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1 and Ang-2 IA in ovarian tissue of chuelest rat ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CXCL8	CXCR1	CXCR2	Ang-1	Ang-2
青年		21.68±3.04	26.23±3.13	23.85±3.34	34.39±3.69	24.93±2.16
初老空白		37.55±4.85 ²⁾	38.74±3.66 ²⁾	34.23±1.90 ²⁾	22.61±2.78 ²⁾	28.92±2.84 ¹⁾
结合雌激素	65×10 ⁻⁶	24.50±1.94 ⁴⁾	27.13±2.74 ⁴⁾	26.20±2.61 ⁴⁾	31.27±1.78 ⁴⁾	37.02±2.11 ⁴⁾
左归丸	33	32.23±1.79 ⁴⁾	33.94±2.40 ³⁾	26.08±2.58 ⁴⁾	32.79±2.63 ⁴⁾	38.92±2.67 ⁴⁾
右归丸	1.2	34.04±2.90	29.99±1.34 ^{4,6)}	26.05±3.30 ⁴⁾	30.81±2.65 ⁴⁾	37.11±2.38 ⁴⁾
	2.4	33.50±2.43	29.17±1.84 ^{4,6)}	30.07±1.98 ^{4,5)}	31.74±1.99 ⁴⁾	36.64±2.75 ⁴⁾
	4.8	31.53±3.14 ³⁾	27.16±2.70 ^{4,6)}	31.94±1.02 ^{3,6)}	30.86±2.90 ⁴⁾	38.31±2.87 ⁴⁾

3.3 对初老大鼠卵巢组织中CXCL8,CXCR1,CXCR2,Ang-1及Ang-2的蛋白水平的影响 与青年组比较,初老空白组大鼠卵巢组织中CXCL8,CXCR1及CXCR2蛋白表达量高,并且Ang-1和Ang-2蛋白表达量低;与初老空白组大鼠比较,治疗后的右归丸各剂量组、左归丸组及结合雌激素组大鼠卵巢组织的CXCL8,CXCR1及CXCR2蛋白水平下调,各用药组大鼠卵巢组织中Ang-1和Ang-2蛋白表达上调;与左归丸组比较,右归丸中、高剂量组大鼠卵巢组织的CXCL8,CXCR2蛋白水平上调,右归丸各剂量组大鼠卵巢组织中Ang-1和Ang-2蛋白表达下调(P<0.05)。见表4,图2。

3.4 对初老大鼠卵巢组织中CXCL8,CXCR1,CXCR2,Ang-1及Ang-2 mRNA水平的影响 与青年组比较,初老空白组大鼠卵巢组织中CXCL8,CXCR1及CXCR2 mRNA表达量高,并且Ang-1 mRNA表达量低(P<0.01);与初老空白组比较,右归丸各剂量组、左归丸组及结合雌激素组中大鼠卵巢组织上CXCL8,CXCR1及CXCR2 mRNA表达量均明显下降;右归丸各剂量组、左归丸组及结合雌激素组中大鼠卵巢组织的Ang-1和Ang-2 mRNA表达量均明显上升(P<0.05);与左归丸组比较,右归丸中、高剂量组大鼠卵巢组织的CXCL8,CXCR2 mRNA表达量上升,右归丸低、高剂量组大鼠卵巢

表4 右归丸对初老大鼠卵巢组织中CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1及Ang-2蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Youguiwan on CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1 and Ang-2 protein expression in ovary of chuelest rat ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CXCL8/ β -actin	CXCR1/ β -actin	CXCR2/ β -actin	Ang-1/ β -actin	Ang-2/ β -actin
青年		0.22±0.03	0.18±0.02	0.21±0.05	0.92±0.15	0.28±0.02
初老空白		0.88±0.12 ²⁾	0.93±0.09 ²⁾	1.05±0.04	0.10±0.00 ²⁾	0.20±0.01 ²⁾
结合雌激素	65×10 ⁻⁶	0.34±0.06 ⁴⁾	0.29±0.01 ⁴⁾	0.51±0.03 ⁴⁾	0.54±0.07 ⁴⁾	0.54±0.04 ⁴⁾
左归丸	33	0.41±0.04 ⁴⁾	0.72±0.06 ³⁾	0.39±0.02	0.83±0.17 ⁴⁾	0.88±0.08 ⁴⁾
右归丸	1.2	0.67±0.09 ⁵⁾	0.50±0.03 ^{4,6)}	0.27±0.05 ⁵⁾	0.31±0.01 ⁵⁾	0.63±0.03 ⁵⁾
	2.4	0.57±0.09 ³⁾	0.59±0.02 ^{4,5)}	0.58±0.03 ^{4,6)}	0.64±0.12 ⁴⁾	0.44±0.08 ³⁾
	4.8	0.51±0.09 ³⁾	0.41±0.01 ^{4,6)}	0.77±0.04 ^{4,6)}	0.44±0.06 ^{4,5)}	0.75±0.03 ⁶⁾

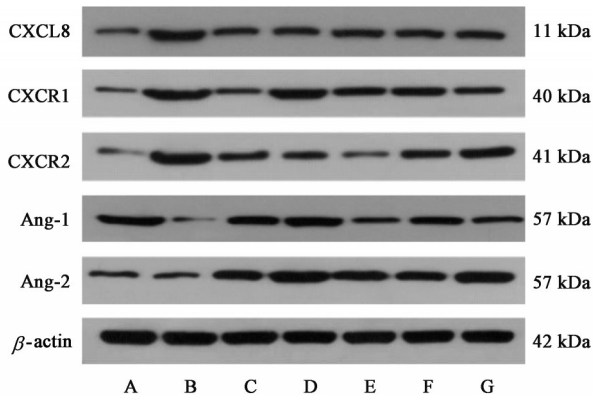


图2 各组大鼠卵巢CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1及Ang-2蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1 and Ang-2 protein in ovarian of rats

组织中Ang-1和Ang-2 mRNA表达量明显下降($P < 0.05$)。见表5。

4 讨论

中医学认为,卵巢功能低下患者临床症状特点,可归于“血枯”“闭经”等范畴,其发病的根本原因,中医认为是因肾、肝、脾脏腑功能整体失调,以及痰湿、瘀血、肝郁等多种症状,共同致肾-天癸-冲任-胞宫调节功能失衡,故治疗上应以补肾为主,同时结合健脾、化痰等方法协同治疗。左归丸、右归

丸同出自《景岳全书·新方八阵》中的补阵,均为纯补无泻的补肾名方。左归丸其君药熟地黄,具有滋肾阴、益精髓之功,臣药主要为山茱萸、山药、龟板胶、鹿角胶,具有滋肾固精及“阴中求阳”之义,佐药为枸杞子、菟丝子、川牛膝,具有益肝肾、助精髓之效,诸药合用,共奏滋阴补肾、填精益髓之功。本课题组前期研究发现左归丸可以通过促进大鼠卵巢组织血管生成来改善大鼠卵巢功能^[3],临床亦有研究表明,左归丸可以改善围绝经期综合征患者的临床症状^[9]。右归丸其君药为鹿角胶、肉桂和附子,具有温阳化气、直补肾阳之功效,臣药主要为枸杞子、山药、熟地黄和山茱萸,具有填精补髓、养肝补脾等功效,佐药为杜仲和菟丝子,具有补肾和健腰膝之效,并予当归补血养血,诸药合用,共奏温补肾阳,填精益髓之功。临床研究表明右归丸具有防治生殖功能低下性疾病的作用,如临床报道右归丸可以有效治疗多囊卵巢综合征、卵巢早衰、不孕症等^[10-12]。实验研究发现右归丸通过可改善POF大鼠卵巢微循环^[4-5]。本实验研究发现右归丸可以增加初老大鼠卵巢血管数目,维持卵泡生长,减少卵泡闭锁,并且通过下调卵巢组织中CXCL8/CXCR1/2通路上的CXCL8, CXCR1及CXCR2蛋白和mRNA

表5 右归丸对初老大鼠卵巢组织CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1及Ang-2 mRNA相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Youguiwan on relative mRNA expression of CXCL8, CXCR1, CXCR2, Ang-1 and Ang-2 in ovaries of chuelest rat ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CXCL8	CXCR1	CXCR2	Ang-1	Ang-2
青年		0.22±0.01	0.06±0.01	0.19±0.01	5.51±0.22	0.93±0.02
初老空白		1.00±0.03 ²⁾	1.03±0.08 ²⁾	1.00±0.07 ²⁾	1.00±0.03 ²⁾	1.04±0.03
结合雌激素	65×10 ⁻⁶	0.22±0.01 ⁴⁾	0.12±0.01 ⁴⁾	0.37±0.04 ³⁾	2.39±0.14 ⁴⁾	1.74±0.04 ⁴⁾
左归丸	33	0.24±0.00 ⁴⁾	0.37±0.04 ⁴⁾	0.36±0.05 ⁴⁾	2.84±0.29 ³⁾	1.90±0.03 ⁴⁾
右归丸	1.2	0.38±0.00 ⁴⁾	0.25±0.03 ^{4,5)}	0.25±0.03 ⁴⁾	1.63±0.09 ^{3,6)}	1.24±0.10 ⁶⁾
	2.4	0.30±0.01 ^{4,6)}	0.71±0.04 ^{3,6)}	0.42±0.05 ³⁾	2.96±0.06 ⁴⁾	1.48±0.07 ^{3,6)}
	4.8	0.29±0.02 ^{4,5)}	0.24±0.02 ^{4,5)}	0.44±0.01 ⁴⁾	2.03±0.09 ^{4,5)}	1.65±0.14 ³⁾

表达,进而促进大鼠卵巢组织中血管的生成,改善卵巢功能。

卵巢是血管生成最活跃的生殖器官,其内部循环障碍可导致卵巢缺血缺氧,加速细胞凋亡甚至卵泡闭锁,导致卵巢功能的下降。研究显示CXCL8, CXCR1及CXCR2参与卵巢的生理病理功能^[13],然而卵巢功能发生障碍之后也会影响CXCL8及其受体的表达水平^[14],CXCL8/CXCR1/2信号通路与血管生成相关联^[1,15]。CXCL8既是强效的血管生成因子,又属于促炎细胞因子,但在无炎症的情况下,CXCL8在体内外均可直接诱导血管生成,它的血管生成作用不同于其诱导炎症的作用^[16]。CXCL8作用于CXCR受体家族,抑制腺苷酸环化酶活性,在血管发生过程中起重要作用^[17]。CXCL8与CXCR1/2结合后,CXCR1/2通过Src激酶介导的受体磷酸化反式激活血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)^[18];或者通过NF- κ B途径诱导血管内皮生长因子(VEGF)的表达,进而刺激VEGFR2的活化^[19]。本实验发现,与初老空白组大鼠比较,从蛋白定位、蛋白定量以及基因各层面研究显示右归丸可明显下调卵巢组织中CXCL8/CXCR1/2信号通路上的CXCL8, CXCR1及CXCR2蛋白和mRNA表达。

本研究的Ang-1和Ang-2中60%的氨基酸序列是相同的,血管生成素家族中与血管生成密切相关的是Ang-1和Ang-2,实验研究表明,Ang-1和Ang-2在卵巢、子宫、胎盘等组织中广泛表达,并且对卵巢、子宫内膜等具有强烈的促血管生成的作用^[20-25]。Ang-1可与内皮细胞所表达的酪氨酸激酶受体Tie-2结合,从而促进新生血管生成及稳定;当有VEGF-A存在时,Ang-2可促进生长因子向血管内皮细胞靠近,有利于血管生成;当无VEGF-A存在时,可促进内皮细胞凋亡,使血管退化,对血管结构起稳定作用。本实验发现,与初老空白组大鼠比较,从蛋白定位、蛋白定量及基因多种层面显示右归丸可明显下调卵巢组织中Ang-1和Ang-2蛋白和mRNA表达。

综上所述,右归丸通过改善卵巢组织形态学指标、增加卵巢血管数目,并且通过下调大鼠卵巢组织中CXCL8/CXCR1/2信号通路上的CXCL8, CXCR1, CXCR2的蛋白和mRNA水平,以及上调Ang-1, Ang-2的蛋白和mRNA水平,促进大鼠卵巢组织血管生成,改善大鼠卵巢功能。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王开南,李芳. IL-8-CXCR1/2信号通路与卵巢上皮癌关系的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(6): 904-906.
- [2] FU J L, HSIAO K Y, LEE H C, et al. Suppression of COUP-TF II upregulates angiogenin and promotes angiogenesis in endometriosis[J]. Hum Reprod, 2018, 33(8):1517-1527.
- [3] 袁真英,段恒,吴笛,等. 左归丸对初老大鼠循环EPCs及其促动员因素E2、VEGF水平的影响[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(2):13-17.
- [4] 迟艳艳. 右归丸化裁方、针灸联合序贯疗法治疗卵巢早衰的临床观察[J]. 世界中医药, 2019, 14(9):2474-2478.
- [5] 佟雷,刘金丽,孙琳林,等. 左归丸及右归丸对卵巢早衰小鼠卵巢衰老的预防作用[J]. 中成药, 2017, 39(2):260-265.
- [6] 潘习龙,程化奇,殷新猷,等. 更年期平调冲剂对更年期大鼠骨质疏松的防治作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2000(4):284-285.
- [7] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[J]. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 2002:1861.
- [8] 颜春鲁,安方玉,刘永琦,等. 右归丸经IL-6/STAT3信号通路对膝骨关节炎模型大鼠软骨组织退变的调控机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1):17-23.
- [9] 王睿,吴睦霖,王伟,等. 左归丸对围绝经期抑郁症模型小鼠行为学影响及神经保护机制研究[J]. 医学研究杂志, 2020, 49(2):135-139.
- [10] 徐海霞,朱春兰,张尊胜,等. 右归丸联合二陈汤加减治疗多囊卵巢综合征的效果观察[J]. 临床医药杂志, 2021, 25(10):107-111, 115.
- [11] 迟艳艳. 右归丸化裁方、针灸联合序贯疗法治疗卵巢早衰的临床观察[J]. 世界中医药, 2019, 14(9):2474-2478.
- [12] 张艳军. 右归丸治疗不孕症患者卵巢储备功能下降分析[J]. 光明中医, 2019, 34(3):342-343.
- [13] 冯国芳,朱依敏. 血清/卵泡液人绒毛膜促性腺激素和白细胞介素-8水平与体外受精结局的关系[C]//中华医学会、中华医学会生殖医学分会(The Chinese Society of Reproductive Medicine). 中华医学会第六次全国生殖医学学术会议专刊. 北京:中华医学会, 2012:2.
- [14] 牛秀珑,邢杰,张晓雷,等. IL-8调节卵巢癌细胞VEGF表达,体外黏附与侵袭特性的机制研究[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(6):467-473.
- [15] TOBIN R P, JORDAN K R, KAPOOR P, et al. IL-6 and IL-8 are linked with myeloid-derived suppressor cell accumulation and correlate with poor clinical

- outcomes in melanoma patients[J]. *Front Oncol*, 2019, doi:10.3389/fonc.2019.01223.
- [16] 苗雪,官杰. IL-8的研究进展[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2011, 32(22):3693-3695.
- [17] 曹云,孔令博,黄幸,等. 生物信息学方法下缺血性脑卒中关键基因与通路的筛选及中药预测研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(7):1803-1812.
- [18] PETREACA M L, YAO M, LIU Y, et al. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability[J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(12):5014-5023.
- [19] MARTIN D, GALISTEO R, GUTKIND J, et al. CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NF- κ B through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(10):6038-6042.
- [20] 万秋园,赵文娜,吴晓玲,等. 益母草总生物碱对大鼠薄型子宫内膜 VEGF 和 Ang-2 表达的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(24):2606-2610.
- [21] LIU J, HU H H, LEE M H, et al. Serum levels of M2BPGi as short-term predictors of hepatocellular carcinoma in untreated chronic hepatitis B patients[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):97-107.
- [22] SHIRAZI S H, GARGARI B P, IZADI A, et al. Effect of Vitamin E on serum levels of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 in women with Polycystic ovary syndrome: a pilot randomized, placebo-controlled trial[J]. *Int J Fertil*, 2021, 15(1):44-50.
- [23] 米玲,尹巧芝,李利民,等. 左、右归丸对控制性超排卵小鼠子宫内膜 VEGF 及 Ang 影响的研究[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(5):2-6.
- [24] 陈思,王秀丽,何小静,等. Ang1-7, A779, Ang II 对胰岛素抵抗的大鼠卵巢颗粒细胞胰岛素信号通路蛋白的影响[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2021, 41(2):131-136.
- [25] 王雪梅,陈录,杨秀红. ACE2-Ang-(1-7)-MAS 轴对卵泡生长发育影响研究进展[J]. *慢性病学杂志*, 2021, 22(9):1340-1343, 1347.

[责任编辑 周冰冰]