

补肾活血方对免疫性卵巢早衰小鼠的影响

李芳^{1,3,4}, 孙兰^{1,3,4}, 唐传玲², 王振中^{1,3,4}, 萧伟^{1,3,4*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001; 2. 复旦大学附属妇产科研究所, 上海 200011;
3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001; 4. 江苏省企业院士工作站, 江苏 连云港 222001)

[摘要] **目的:**探讨补肾活血方对免疫性卵巢早衰(POF)小鼠的治疗作用。**方法:**以重组猪卵透明带(pZP4)蛋白两后脚掌和皮下多点注射免疫雌性 BALB/c 小鼠建立 POF 动物模型。小鼠随机分为正常组、模型组、雌二醇组和补肾活血方高、中、低剂量组(按生药量计分别为 15.0, 7.5, 3.75 g·kg⁻¹), 分析 ig 20 d 后阴道脱落细胞涂片、外周血雌二醇(E₂)浓度、血清抗透明带(pZP4)抗体变化及卵巢组织炎症形态学观察。**结果:**补肾活血方高剂量组小鼠阴道涂片显示动情周期基本规则为 6~7 d; 高剂量组可明显升高小鼠血清 E₂ 浓度($P < 0.01$); 高剂量组小鼠的血清抗 pZP4 抗体滴度显著下降($P < 0.05$); 高剂量组小鼠初级卵泡和次级卵泡的数量显著增加($P < 0.05$)。**结论:**补肾活血方能改善卵巢的生殖内分泌功能和卵巢内各期卵泡和黄体的发育状况, 并可在一定程度上抑制自身免疫早衰作用。

[关键词] 卵巢早衰; 雌二醇; 透明带抗体; 生殖内分泌

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0137-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110622.1305.006 **[网络出版时间]** 2011-06-22 13:05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110622.1305.006.html>

Effect of Reinforcing Kidney and Activating Blood Prescription on Autoimmune Premature Ovarian Failure in Mice

LI Fang^{1,3,4}, SUN Lan^{1,3,4}, TANG Chuan-lin², WANG Zhen-zhong^{1,3,4}, XIAO Wei^{1,3,4*}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China;

2. The Institute of Obstetrics and Gynecology, Fudan University, Shanghai 200011, China;

3. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China;

4. Enterprises Academician Workstations in Jiangsu Province, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutical effect of a Chinese prescription with the function of reinforcing kidney and activating blood on immune premature ovarian failure (POF) in mice. **Method:** Each female BALB/c mouse was received multipoint immunization of porcine ZP4 (pZP4) in two hind footpads and intracutaneously to made the POF model. The mice were randomly divided into three Chinese medicine groups, control group, model group and estradiol (E₂) group. After administrating Chinese medicine in three different doses (15.0, 7.5, 3.75 g·kg⁻¹), 0.5% CMC-Na and E₂ were given respectively for 20 days, vaginal smears were visualized microscopically. E₂ and pZP4 antibody levels were monitored. The morphology of ovarian tissue inflammation were studied. **Result:** Compared to the control group, the sex cycles of the high dose group was between 6 and 7 days without apparent change. Compared to the model group, the high dose group developed significantly higher serum E₂ level ($P < 0.01$) and lower serum antibodies to pZP4 ($P < 0.05$), and moreover, the

[收稿日期] 20110113(008)

[基金项目] 国家科技部(重大新药创制 2009ZX09313-032)

[第一作者] 李芳, 硕士, 中级职称, 从事药理学及注射剂安全性评价研究, Tel: 0518-85521946, E-mail: lfi98098@126.com

[通讯作者] * 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 研究方向为中药新剂型的研究与开发, Tel: 0518-85521956, E-mail: wzzhz-nj@tom.com

number of primary follicles and secondary follicles were increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** The Chinese prescription can improve the ovarian reproductive endocrine function and regulate the developmental capacity of ovarian follicle and corpus luteum in the four cycles. Otherwise, the Chinese medicine might inhibit the autoimmune presenility POF to some extent.

[**Key words**] premature ovarian failure; estradiol; zona pellucida antibodies; reproductive endocrine

卵巢早衰(POF)是指妇女在青春期发育后至 40 岁以前出现闭经、雌激素水平低下及面部潮红等类更年期症状。该病病因复杂,多数学者认为,自身免疫功能的异常是最常见的原因,约占 POF 的 20%^[1]。近 10 年来该病的发生率有升高趋势。由于 POF 导致生育能力丧失及低雌激素状态,成为影响女性生殖健康和社会稳定不可忽视的因素。目前西医治疗多采用雌激素的人工周期疗法,但由于有副作用和禁忌症,患者难以接受^[2]。中药有多系统、多环节的整体调节作用,能提高卵巢对促性腺激素的反应性,进而恢复和改善卵巢功能。本文以重组猪卵透明带蛋白免疫 BALB/c 小鼠,通过分析阴道脱落细胞周期变化、测定外周血雌二醇水平和抗卵巢透明带抗体滴度以及观察卵巢组织病理形态,探讨补肾活血方治疗免疫性卵巢早衰的药理作用。

1 材料

1.1 药物 补肾活血方由熟地黄、山茱萸、当归、白芍、淫羊藿、丹参 6 味药按相同比例组成,制剂由江苏康缘药业股份有限公司提供,批号 070426。17- β -雌二醇(E_2):Sigma,批号 016k1194。

1.2 动物 BALB/c 小鼠,雌性,8~9 周龄,18~22 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证号 SCXK(沪)2003-0002。

1.3 试剂 猪卵透明带蛋白(pZP4),复旦大学附属妇产科研究所免疫室自制,制备参见实验方法。磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4): Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g, NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, 加蒸馏水定容至 1 000 mL, 高压灭菌后于室温保存。Ni-NTA Agarose:Qiagen,批号 I2190983。离心超滤管(5KD):Milipore,Amicon Ultra-15。

BCA-100 蛋白定量试剂盒,上海申能博彩生物科技有限公司。完全弗氏佐剂(CFA),Sigma,批号 054k8931。不完全弗氏佐剂(IFA),Sigma,批号 025k8910。

小牛血清(FCS),GIBCO,批号 498716。羧甲基纤维素钠(CMC-Na):中国国药集团上海化学试剂公

司提供,批号 F2000027。羊抗鼠 E_2 测定试剂盒(ELISA):Adlitteram diagnostic laboratories, Inc. 批号 0708。辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体,上海华美生物工程公司,批号 576807。包被缓冲液($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸盐缓冲液, pH 9.6: Na_2CO_3 1.59 g, $NaHCO_3$ 2.93 g, 加蒸馏水定容至 1 000 mL)。洗涤缓冲液(PBST, pH 7.4):PBS + 0.05% 聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯(Tween-20)。封闭液及抗体稀释液:PBST + 5% FCS。底物缓冲液(pH 5.0): $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} Na_2HPO_4$ ($28.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 25.7 mL, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸 ($19.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 24.3 mL, 加蒸馏水 50 mL。TMB(四甲基联苯胺)使用液:TMB ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 无水乙醇) 0.5 mL, 底物缓冲液(pH 5.5) 10 mL, $0.75\% H_2O_2$ 32 μL 。终止液($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2SO_4$):蒸馏水 178.3 mL, 逐滴加入浓硫酸(98%)21.7 mL。

1.4 仪器 洁净操作台(细菌):上海净化设备厂。振荡培养箱:国华电器有限公司,BS-2F。低温离心机:Beckman,GS-15R。小型台式离心机:Eppendorf,5424 型。电泳图像分析系统仪:Alpha Innotech Corporation。酶标仪:Bio-Rad, Model 3550。荧光正置显微镜:OLYMPUS, BX51。电热恒温水浴槽:上海精宏实验设备有限公司,DKB-8A。微量振荡器:江苏海门其林医用仪器厂, MH-1 型。电子天平:METTER AE260 Delta Range。pH 仪:Fisher Scientific, Model 10。

2 方法

2.1 重组猪卵透明带蛋白(pZP4)的表达与纯化^[3]

将 pET28a (+) - pZP4 重组质粒转化到 BL21 (DE3) 大肠杆菌中。含重组质粒的大肠杆菌于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 A_{600} 达到 0.6, 加入终浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 5 h, 离心收集菌液沉淀。因为重组蛋白在大肠杆菌中以包涵体形式存在,故在变性条件下使用 Ni-NTA Agarose 纯化蛋白,具体步骤参见试剂说明书。将蛋白纯化洗脱液装入离心超滤管中, PBS (pH 7.4) 4 $^{\circ}\text{C}$ 脱盐浓缩, 收集到的蛋白溶液经 0.22 μm 滤器过滤后, 分装保存

于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。使用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白溶液定量,具体步骤参见试剂盒说明书。

2.2 卵巢早衰小鼠模型制备、分组给药

2.2.1 模型制备 每天上午 9:00 取雌性 BALB/c 小鼠阴道脱落细胞制备涂片,于光学显微镜下观察其性周期。2 周后筛选出性周期正常小鼠 90 只,随机选取 10 只小鼠作为正常对照组,其余小鼠以 6 His-pZP4 重组蛋白作为抗原进行免疫制备卵巢早衰小鼠模型^[4-5]。方法如下:将 $50\text{ }\mu\text{L}$ 含有 $5\text{ }\mu\text{g}$ 抗原的 PBS 溶液与 $50\text{ }\mu\text{L}$ CFA 充分乳化,于小鼠两后脚掌和皮下进行多点注射。之后每隔 2 周以等量抗原与 IFA 乳化液加强免疫 1 次,共加强免疫 2 次。正常对照组小鼠同时以 $100\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液 PBS 进行免疫。

2.2.2 分组给药 第 3 次免疫后第 7 天于小鼠眼球后静脉丛取血,离心取血清测定 E_2 。根据 E_2 含量筛选出造模成功小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,分别为补肾活血方高、中、低 3 个剂量组(按生药量计分别为 $15.0, 7.5, 3.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、雌激素组($0.13\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)及模型对照组(与正常对照组均给予等量的 0.5% CMC-Na)。卵巢早衰及卵巢储备功能下降,目前一般用雌激素补充疗法^[6]。各组小鼠每天 ig 1 次(雌激素组 ig 3 d,间隔 1 d),给药容积为 $0.02\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$,共给药 20 d。于末次给药后 1 h 从小鼠眼球后静脉丛取血,分离出血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。并行颈椎脱臼处死小鼠,摘取卵巢。

2.3 检测指标

2.3.1 阴道脱落细胞涂片观察 每天上午 9:00,用无菌棉签蘸适量生理盐水取雌性 BALB/c 小鼠阴道脱落细胞制备涂片,于光学显微镜下观察其性周期随时间的变化。

2.3.2 血清 E_2 的测定 ELISA 方法测定,具体操作按试剂盒说明书进行。

2.3.3 测定血清抗 pZP4 抗体滴度 96 孔酶标板每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 含有 $0.5\text{ }\mu\text{g}$ 重组 6His-pZP4 蛋白的包被缓冲液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBST 洗板 3 次,含 5% 小牛血清的 PBST 溶液 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。再洗板 3 次,将血清按一定比例进行 3 倍倍比稀释后于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 作为阴性对照。再洗板 6 次,用辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体($1:1\text{ }000$ 稀释) $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。再洗板 6 次,于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,最后用 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{SO}_4$ $50\text{ }\mu\text{L}$ 终止显色反应。以

630 nm 为参照波长,测定 A_{450} 。抗血清最高稀释度呈阳性者($A_{450}\geq 0.2$),其稀释度的倒数即为抗血清效价。

2.3.4 自身免疫性卵巢组织炎形态学观察 收集的卵巢经 10% 中性福尔马林固定,由实验设计非知情人员(南京东南大学基础医学院病理教研室)进行石蜡包埋、切片,常规 HE 染色,在光学显微镜下计数黄体及各个时期滤泡数量。

2.4 统计学分析 应用统计软件 SPSS 11.5.0 的多因素方差分析模块进行数据分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间数据比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 阴道脱落细胞涂片观察 小鼠动情周期一般为 $4\sim 5\text{ d}$,包括动情前期、动情期、动情后期和动期间期。正常对照组动情周期无明显变化,为 $4\sim 5\text{ d}$;模型组大部分小鼠周期延长至 $7\sim 9\text{ d}$,或持续处于动期间期;雌激素组周期紊乱,以动情期延长为主或持续处于动情期;补肾活血方低剂量组小鼠周期变化与模型对照组小鼠相似;补肾活血方中剂量组小鼠周期不规则,表现为动情期或间期延长;补肾活血方高剂量组小鼠周期略延长,但符合动情周期变化规律,大多数为 $6\sim 7\text{ d}$,其中动情期 $2\sim 3\text{ d}$,间期 $3\sim 4\text{ d}$ 。

3.2 各组小鼠的血清 E_2 含量、血清抗 pZP4 抗体效价比较 与模型组相比,雌激素组和补肾活血方高剂量组小鼠的血清 E_2 浓度明显升高,其差别具有显著性意义($P<0.01$);与模型组比较,雌激素组和补肾活血方各组小鼠的血清抗 pZP4 抗体滴度都有下降,但只有补肾活血方高剂量组的差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 补肾活血方对小鼠 E_2 和抗 pZP4 抗体滴度的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	n	E_2	抗体滴度
			$/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	$/\log_2$
正常	-	10	$99.80\pm 7.84^{2)}$	-
模型	-	10	58.86 ± 6.71	18.53 ± 0.84
雌激素	1.3×10^{-4}	10	97.94 ± 12.58	17.58 ± 0.50
补肾活血	15	7	$78.64\pm 6.72^{2)}$	$17.06\pm 0.85^{1)}$
	7.5	10	65.56 ± 7.94	17.58 ± 0.50
	3.75	9	60.24 ± 6.92	17.39 ± 0.70

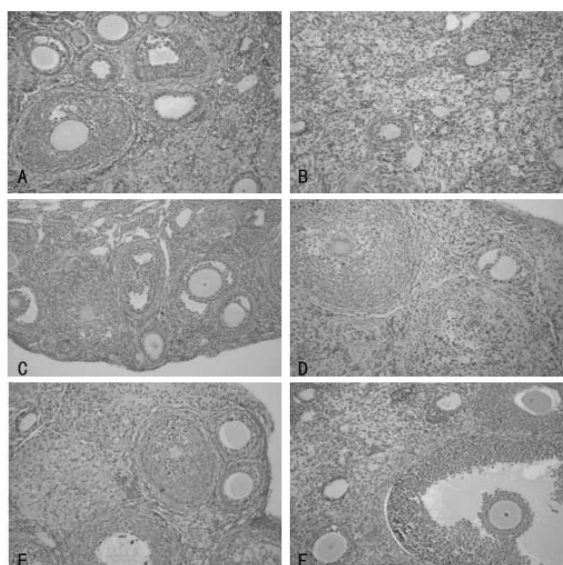
注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表 2 同)。

3.3 自身免疫性卵巢组织损伤的形态学分析 光镜下见模型组小鼠的卵巢组织表现为各期卵泡数量较正常组明显减少,包括原始卵泡、初级卵泡、次级

卵泡;黄体数量减少,多数呈萎缩状态,体积较小,中央部有较为明显的退化性变;卵巢间质致密,有多量闭锁卵泡和间质腺(发育退变的卵泡),未见明显的炎症细胞浸润。雌激素组和补肾活血方低、中、高剂量组各组小鼠卵巢组织各期卵泡数及黄体数较正常组少,但较模型组增多,部分黄体细胞发育良好,部分有萎缩现象。其中补肾活血方高剂量组小鼠初级卵泡和次级卵泡的数量与模型组比较具有统计学差异($P < 0.05$)。结果见表 2 和图 1。

表 2 补肾活血方对小鼠卵巢各期卵泡与黄体的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	原始卵 泡/个	初级卵 泡/个	次级卵 泡/个	黄体 /个
正常	-	1.7 ± 1.6	11.6 ± 3.7 ²⁾	8.7 ± 5.7 ²⁾	4.2 ± 3.2 ²⁾
模型	-	2.6 ± 2.2	4.4 ± 3.2	4.3 ± 3.1	1.4 ± 2.1
雌激素	1.3 × 10 ⁻⁴	2.1 ± 1.5	7.7 ± 3.1 ¹⁾	6.2 ± 2.0	3.4 ± 2.0 ¹⁾
补肾活血	15	1.4 ± 2.3	7.9 ± 2.4 ¹⁾	8.4 ± 3.1 ¹⁾	2.5 ± 2.2
	7.5	2.0 ± 1.4	8.6 ± 2.4 ²⁾	7.4 ± 3.8	2.1 ± 1.0
	3.75	1.9 ± 1.5	5.5 ± 2.7	4.7 ± 2.3	1.3 ± 2.1



A. 正常组;B. 模型组;C. 雌激素 0.13 mg·kg⁻¹组;
D. 补肾活血方 3.75 g·kg⁻¹组;E. 补肾活血方 7.5 g·kg⁻¹组;
F. 补肾活血方 15 g·kg⁻¹组

图 1 补肾活血方对小鼠卵巢组织形态的影响(HE, ×100)

4 讨论

卵巢的主要功能表现为周期性排卵及分泌相应性激素水平的周期性变化,同时伴有阴道上皮细胞学的周期性变化。据报道,由于雌二醇分泌减少,造成动情周期延长,主要表现为动情期缩短、动情间期延长,所以动情周期的紊乱可以作为反映性激素分泌与代谢失衡的敏感指标^[7]。抗卵巢抗体包括抗卵细胞抗体、抗透明带抗体等。抗原抗体复合物形成

后可从多方面影响卵巢功能,如抗透明带抗体在补体的作用下直接作用产生细胞毒破坏透明带,从而破坏卵细胞^[8]。因此,本研究选用阴道脱落涂片、外周血 E₂ 水平、抗透明带抗体滴度及卵巢组织形态学分析作为检测指标,能够客观地反映补肾活血方的药理作用。

补肾活血方以临床经验方作为基础通过中药新工艺提取制成。本研究在成功建立自身免疫性卵巢早衰小鼠模型后,以补肾活血方灌服小鼠,结果发现该方能够改善卵巢的生殖内分泌功能和卵巢内各期卵泡和黄体的发育状况,并可在一定程度上抑制自身免疫损伤作用。3 种不同剂量比较,以补肾活血方高剂量组的效果最佳。然而,相对于制剂本身来说,如应用于临床则高剂量的使用剂量偏大,患者长期服用相对困难。因此,该方的制剂与工艺仍需改进。随着对补肾活血方调节生殖、免疫功能的不断研究,必将有助于进一步揭示中医药防治卵巢早衰的机制。

[参考文献]

- [1] Layman L C, Shelley M E, Huey L O, et al. Follicle-stimulating hormone beta gene structure in premature ovarian failure[J]. Fertil Steril, 1993,60(5):852.
- [2] 杨利侠. 卵巢早衰的中医药证治思路与方法[J]. 四川中医,2005,23(8):11.
- [3] 金冬雁,黎孟枫,译. 分子克隆实验指南[M]. 2 版,北京:科学出版社,1992:822.
- [4] Rhim S H, Millar S E, Robey F, et al. Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the mouse zona pellucida [J]. J Clin Invest, 1992, 89(1):28.
- [5] 蔡立荣,李大金,孙晓溪,等. 补肾活血方对小鼠实验性卵巢早衰防治作用的研究[J]. 中国中西医结合杂志,2001,21(2):126.
- [6] 林农,张维嘉. 卵巢早衰的病因及诊治现状[J]. 中国计划生育学杂志,2005,115(5):318.
- [7] Rao R P, Kaliwal B B. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice[J]. Ind Health, 2002, 40(3): 237.
- [8] 朱玲,罗颂平,许丽绵,等. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠抗卵巢抗体的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2006,15(4):435.

[责任编辑 聂淑琴]