

中药补肾调冲方对卵巢早衰大鼠性激素水平的影响*

梁 策¹,高 慧^{2△},张 腾¹

(1. 华北理工大学,河北唐山 063000;2. 承德医学院附属医院中医科,河北承德 067000)

[摘要] **目的** 研究中药补肾调冲方对雷公藤多苷片(GTW)所致卵巢早衰(POF)雌性大鼠性激素水平和卵巢中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)/ γ -干扰素(IFN- γ) mRNA 表达的影响。**方法** 将 42 只 SD 雌性大鼠,分为空白组,模型组,结合雌激素组(对照组),中药补肾调冲方高、中、低剂量组。运用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清中雌二醇(E2)、卵泡刺激素(FSH)、抗苗勒管激素(AMH)水平;RT-PCR 法检测卵巢组织中 TNF- α /IFN- γ mRNA 的表达水平。**结果** 模型组 E2、AMH 水平显著低于空白组($P<0.05$);中药补肾调冲方各给药组和对照组 E2、AMH 水平均高于模型组($P<0.01$);其中中药补肾调冲方中、高剂量组和对照组 E2、AMH 水平与空白组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组 FSH 水平显著高于空白组($P<0.05$);中药补肾调冲方各给药组和对照组 FSH 水平均低于模型组($P<0.01$);其中中药补肾调冲方中、高剂量组和对照组 FSH 水平与空白组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组 TNF- α 、IFN- γ mRNA 水平高于空白组($P<0.05$);中药补肾调冲方各给药组和对照组 TNF- α 、IFN- γ mRNA 水平均低于模型组($P<0.01$);其中补肾调冲方中、高剂量组 TNF- α 、IFN- γ mRNA 水平与空白组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 中药补肾调冲方对卵巢具有调节作用,可以预防卵巢早衰的发生。

[关键词] 补肾调冲方;卵巢早衰;性激素;肿瘤坏死因子- α ; γ -干扰素

[中图分类号] R711.75

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)31-4337-03

Effects of Bushen Tiaochong Recipe on sex hormone level and ovarian TNF- α /IFN- γ expression in rats with premature ovarian failure*

Liang Ce¹,Gao Hui^{2△},Zhang Teng¹

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital, Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of Bushen Tiaochong Recipe on the change of sex hormones and ovarian TNF- α /IFN- γ mRNA expression in the female rats with premature ovarian failure(POF) induced by tripterygium wilfordii(GTW). **Methods** Forty-two female SD rats were randomly divided into the blank group, model group, conjugated estrogen group(control group), Bushen Tiaochong Recipe prevention low, middle and high dosage group. Serum estradiol(E2), follicle-stimulating hormone(FSH) and anti-müllerian hormone(AMH) were detected by using the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Expression levels of TNF alpha, IFN-gamma mRNA in rats ovarian were detected by the RT-PCR method. **Results** The levels of E2 and AMH in the model group were significantly lower than those in the blank group($P<0.05$); The levels of E2 and AMH in the various Bushen Tiaochong Recipe medication groups and control group were higher than those in the model group($P<0.01$); in which the levels of E2 and AMH had no statistical difference between the Bushen Tiaochong Recipe middle and high dose groups and control group with the blank group($P>0.05$). The FSH level in the model group was significantly higher than that in the blank group($P<0.05$); the FSH level in the various Bushen Tiaochong Recipe medication groups and control group was lower than that in the model group($P<0.01$); in which the FSH level had no statistical difference between the Bushen Tiaochong Recipe middle and high dose groups and control group with the blank group($P>0.05$). The TNF alpha, IFN-gamma mRNA levels in the model group were higher than those in the blank group($P<0.05$); the TNF alpha and IFN-gamma mRNA levels in the various Bushen Tiaochong Recipe medication groups and the control group were lower than those in the model group($P<0.01$); in which the TNF alpha and IFN gamma mRNA levels had no statistical difference between the Bushen Tiaochong Recipe middle and high dose groups with the blank group($P>0.05$). **Conclusion** Bushen Tiaochong Recipe has some regulation effect on rats ovarian, which can prevent the POF occurrence.

[Key words] Bushen Tiaochong Recipe; premature ovarian failure; sex hormone; TNF alpha; IFN-gamma

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是指正常发育的妇女在 40 岁以前因某种原因引起卵巢功能衰竭,具有高促性腺激素及低雌激素特征,卵巢组织呈围绝经期或老年妇女绝经后改变^[1]。有文献报道,POF 发生率约 1%~3%,闭经患者

* 基金项目:河北省省级重大医学科研项目(zyzd2013018);河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目(2014571024);国家中医药管理局高慧全国名老中医药专家传承工作室建设项目(2015048157)。 作者简介:梁策(1988-),硕士,主要从事中医妇科方面的研究。 △ 通讯作者, E-mail: gaohuibed@163.com。

中约 2%~10% 发生 POF, 并且呈现逐年上升趋势^[2-3]。西医主要采用激素替代疗法、促排卵等方法进行治疗, 疗效明显, 但不良反应多, 易复发。中医药主要采用补肾填精、调理冲任的治法辨证施治, 改善卵巢功能, 促进卵巢功能的恢复, 临床上取得了良好的效果。本课题通过检测大鼠性激素水平的变化及卵巢中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)/ γ -干扰素 (IFN- γ) mRNA 的表达, 探讨中药补肾调冲方对大鼠 PDF 的预防作用。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 雌性 SD 大鼠, 12 周龄, 体质量 250~270 g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 许可证号: SCXK (京)2014-0004。自由饮水, 室温 25 °C 左右, 湿度 60%~70%, 自然光照, 通风良好。纳入标准: 购入动物后适应性喂养 7 d, 连续 10 d 行阴道涂片检查, 选取动情周期正常大鼠为受试动物。

1.2 药品 雷公藤多苷片: 10 mg \times 100 片/瓶, 远大医药黄石飞云制药有限公司, 生产批号 20140301, 国药准字 Z42021212。结合雌激素片: 0.625 mg/片, 新疆新资源生物制药有限责任公司, 生产批号 20130905, 国药准字 H20090172。补肾调冲方: 中药饮片均由承德医学院附属医院提供。菟丝子 15 g, 黄精 15 g, 熟地 15 g, 肉苁蓉 10 g, 巴戟天 10 g, 当归 10 g, 川芎 6 g, 紫石英 15 g, 五味子 6 g。水煎并浓缩, 相当于每毫升 2.5 g 生药, 4 °C 冰箱中储存备用。

1.3 试剂 TNF- α /IFN- γ 引物购自美国 Invitrogen 公司; 2 \times Bench TopTM Taq Master Mix 购自美国 Biomiga 公司; RT-PCR 试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。大鼠 E2、FSH、AMH ELISA 试剂盒购自上海联科生物技术有限公司。

1.4 仪器 Multiskan MK3 酶标仪购自美国 Thermo Electron 公司; iCycler PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; DYY-6B 型稳压稳流电泳仪购自北京六一仪器厂; 紫外线透射反射分析仪 (ZF 型) 购自上海嘉鹏科技有限公司。

1.5 方法 将 42 只 SD 雌性大鼠分为空白组, 模型组, 结合雌激素组 (对照组), 中药补肾调冲方高、中、低剂量组, 每组 7 只。空白组正常喂养。模型组用雷公藤多苷片 75 mg/kg 灌胃, 每日 1 次, 连续造模 14 d, 造模后用生理盐水 2 mL/kg 灌胃, 每日 1 次, 共 36 d, 合计 50 d。根据中药补肾调冲方临床常用剂量以及每公斤体质量用药量的人鼠比例换算^[4], 高、中、低剂量组于造模前分别以 24、12、6 g/kg 灌胃, 每日 1 次, 共 36 d; 之后用雷公藤多苷片 75 mg/kg 灌胃, 每日 1 次, 连续造模 14 d, 合计 50 d。对照组以 0.075 mg/kg 灌胃, 每日 1 次。方法同中药补肾调冲方组。

1.5.1 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法测定性激素水平 大鼠血清性激素 [雌二醇 (E2)、卵泡刺激素 (FSH)、抗苗勒管激素 (AMH)] 检测, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作进行。

1.5.2 RT-PCR 法检测大鼠卵巢组织中 TNF- α /IFN- γ mRNA 表达 取大鼠新鲜的卵巢组 100 mg, 采用 Trizol 一步法提取总 RNA。紫外线分光光度计测定总 RNA 纯度, 以 A 260/280 比值为基础, 介于 1.9~2.1 之间, 纯度良好。并计算 RNA 浓度。取 2 μ g 总 RNA 模板量进行反转录成 cDNA, 反应体系为 20 μ L, 反应条件为: 42 °C, 孵育 3 min; 加入反转录反应中的 Mix, 42 °C 孵育 15 min; 95 °C 孵育 3 min 后低温保存备用。PCR 扩增反应体系为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s;

各引物不同的退火温度见表 1, 退火时间 30 s; 72 °C 延伸 1 min; 10 °C 保存。94 °C 变性开始循环, 共 30 次。取 10 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, UVP 分析系统拍照, 用 Quantity One 软件定量分析, 以目的条带和 β -actin 条带的吸光度比值作为 mRNA 的表达水平。

表 1 不同目的基因的引物序列、退火温度、产物大小

基因	引物序列	产物大小	退火温度
TNF- α	上游 5'-ATCGGTCCCAACAAGGAGGAGAAGT-3'	119 bp	58 °C
	下游 5'-ACGTGGGCTACGGGCTTGCTACTC-3'		
IFN- γ	上游 5'-CAACCAGGCCATCAGCAACAACATA-3'	127 bp	57 °C
	下游 5'-CTGTGGGTTGTTCACCTCGAACTTG-3'		
β -actin	上游 5'-TTCTGGGTATGGAATCTG-3'	150 bp	57 °C
	下游 5'-CTTCTGCATCTGTGTCAGCAA-3'		

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清性激素 (E2、FSH、AMH) 水平表达 模型组 E2、AMH 水平显著低于空白组 ($P<0.05$); 中药补肾调冲方各给药组和对照组 E2、AMH 水平均高于模型组 ($P<0.01$); 其中中药补肾调冲方中、高剂量组和对照组 E2、AMH 水平与空白组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。模型组 FSH 水平显著高于空白组 ($P<0.05$); 中药补肾调冲方各给药组和对照组 FSH 水平均低于模型组 ($P<0.01$); 其中中药补肾调冲方中、高剂量组和对照组 FSH 水平与空白组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

表 2 各组大鼠血清 E2、FSH、AMH 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	E2 (ng/L)	FSH (IU/L)	AMH (pg/mL)
空白组	7	98.974 \pm 7.568*	16.286 \pm 2.63*	272.746 \pm 12.786*
模型组	7	51.593 \pm 7.488 Δ	30.614 \pm 1.556 Δ	134.260 \pm 16.582 Δ
补肾调冲方低剂量	7	87.997 \pm 3.001* Δ	19.906 \pm 0.827* Δ	247.491 \pm 8.192* Δ
补肾调冲方中剂量	7	91.121 \pm 6.637*	17.649 \pm 1.25*	252.791 \pm 12.491*
补肾调冲方高剂量	7	95.234 \pm 4.386*	17.706 \pm 1.705*	261.150 \pm 18.181*
对照组	7	92.907 \pm 5.295*	18.514 \pm 0.899*	251.267 \pm 12.168*

*: $P<0.01$, 与模型组比较; Δ : $P<0.05$, 与空白组比较。

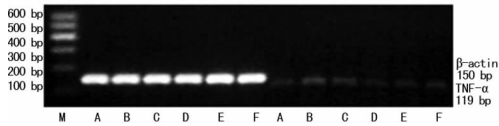
表 3 各组大鼠 TNF- α /IFN- γ mRNA 的表达 ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量	TNF- α	IFN- γ
空白组	0	0.077 \pm 0.003*	0.128 \pm 0.001*
模型组	75	0.154 \pm 0.002 Δ	0.162 \pm 0.001 Δ
补肾调冲方低剂量组	24	0.081 \pm 0.003* Δ	0.133 \pm 0.002* Δ
补肾调冲方中剂量组	12	0.079 \pm 0.002*	0.130 \pm 0.002*
补肾调冲方高剂量组	6	0.080 \pm 0.002*	0.127 \pm 0.001*
对照组		0.075 0.080 \pm 0.002*	0.127 \pm 0.002*

*: $P<0.01$, 与模型组比较; Δ : $P<0.05$, 与空白组比较。

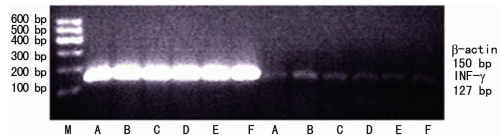
2.2 各组大鼠卵巢 TNF- α 、IFN- γ mRNA 的表达 模型组 TNF- α 、IFN- γ mRNA 水平高于空白组 ($P<0.05$); 中药补肾

调冲方各给药组和对照组 TNF- α 、IFN- γ mRNA 水平均低于模型组 ($P < 0.01$); 其中补肾调冲方中、高剂量组 TNF- α 、IFN- γ mRNA 水平与空白组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3, 图 1、2。



M: marker; A: 空白组; B: 模型组; C: 补肾调冲方低剂量组; D: 补肾调冲方中剂量组; E: 补肾调冲方高剂量组; F: 对照组。

图 1 大鼠卵巢 TNF- α mRNA 的表达



M: marker; A: 空白组; B: 模型组; C: 补肾调冲方低剂量组; D: 补肾调冲方中剂量组; E: 补肾调冲方高剂量组; F: 对照组。

图 2 大鼠卵巢 IFN- γ mRNA 的表达

3 讨论

AMH 为二聚体糖蛋白, 又称苗勒管抑制物质, 是转化生长因子- β (TGF- β)超家族成员之一^[5]。Meduri 等^[6]认为 AMH 最先在 POF 患者的早窦状卵泡表达呈下降趋势, 随着原始卵泡的耗竭, 生长卵泡期的卵泡数减少, 分泌入血清中的 AMH 降低, 表明 AMH 为早期评价卵巢储备降低的理想指标。张莉莉等^[7]指出 INHB 和 E2 是在 FSH 的刺激下由窦状卵泡分泌的, 同时通过性腺轴的反馈抑制 FSH 的分泌。卵泡池的耗竭导致血清 INHB、E2 的下降和 FSH 的升高。这 3 个指标的变化是相互依赖而非独立的, 它们的变化发生得较晚。徐琳等^[8]发现在人类衰老的过程中, 血清 AMH 的降低比 FSH 的升高能更早地反映出卵巢功能的衰竭, AMH 被用来作为一种评价生殖细胞储备的血清学标记。

TNF- α 存在于卵巢的颗粒细胞、泡膜黄体细胞、巨噬细胞内^[9], 其功能与细胞的增殖和凋亡有关^[10]。TNF- α 的表达升高能诱导早期卵泡的凋亡, 促进卵巢颗粒细胞的凋亡^[11]。由于卵巢损伤严重及凋亡造成卵泡闭锁, 排卵障碍, 内分泌紊乱, 因此出现雌激素分泌减少, 形成恶性循环, 加速了卵巢衰老^[12]。

IFN- γ 是一种小分子调节肽, 与多种自身免疫性疾病相关, 在机体的免疫应答及炎症反应中起着重要的作用^[13]。庄笑梅等^[14]研究表明, IFN- γ 为多功能的细胞调节因子, 对生殖系统的调控的主要作用在卵巢上。Russell^[15]认为卵泡闭锁是由 IFN- γ 启动的一系列细胞因子引起的。当机体免疫异常时, 表达和分泌的 IFN- γ 数量增加, 短暂的升高是排卵的关键, 如果水平过高超过正常生理浓度则会抑制排卵, 导致不孕。

本研究发现, 补肾调冲方各给药组和对照组 E2、AMH 的水平均高于模型组; 补肾调冲方中、高剂量组和对照组 E2、AMH、FSH 水平与空白组比较, 差异均无统计学意义。补肾调冲方各给药组和对照组 TNF- α 、IFN- γ mRNA 水平均低于

模型组, 补肾调冲方中、高剂量组 TNF- α 、IFN- γ mRNA 水平与空白组比较, 差异无统计学意义。上述实验表明, 补肾调冲方高、中剂量能够调节卵巢组织中 E2、FSH、AMH 激素的水平; 通过维持性激素水平的稳定, 来调节 TNF- α 、IFN- γ 含量表达的平衡, 保证卵巢细胞的正常凋亡, 这可能是其能够预防卵巢早衰发生的机制之一。因此, 补肾调冲方具有能够预防 POF 的作用, 为更好地应用于临床提供了一定的依据。

参考文献

- [1] 贺文婧, 马丽亚. 卵巢早衰的中西医病因研究[J]. 吉林中医药, 2010, 30(10): 847-849.
- [2] 杨业洲. 卵巢早衰[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 102-108.
- [3] 张蕾, 曲秀芬. 卵巢早衰的中医药治疗研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(2): 10-12.
- [4] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 145.
- [5] 孙夕平. 四二乌杞方对卵巢早衰模型大鼠血清抗苗勒管激素的影响[D]. 太原: 山西医科大学, 2014: 19.
- [6] Meduri G, Massin N, Guibouedenche J, et al. Mullerian inhibiting substance in humans normal levels from infancy to adulthood[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(2): 571-576.
- [7] 张莉莉, 张学红. 抗苗勒管激素与卵巢功能[J]. 中国妇幼保健研究, 2006, 17(6): 507-510.
- [8] 徐琳, 任莉, 韩雪松, 等. AMH、FSH、E2 在卵巢早衰诊断中的价值[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(3): 96-98.
- [9] 高慧, 杨涓, 夏天, 等. 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠卵巢相关细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 蛋白和基因表达的影响(续)[J]. 国医论坛, 2008, 23(3): 32-40.
- [10] Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha a key component of the obesity-diabetes link[J]. Diabetes, 1994, 43(11): 1271-1278.
- [11] 庄笑梅, 姜恩魁, 冯俐. TNF- α 对雌性大鼠生殖轴调控作用的研究[J]. 锦州医学院学报, 2003, 24(4): 5-9.
- [12] 丁原全, 刘鹏, 马乾章. 补肾复方对围绝经期大鼠卵巢 TNF- α 的影响[J]. 中华保健医学杂志, 2010, 12(4): 291-293.
- [13] 谢江燕, 何畏, 赵俪梅, 等. 卵巢早衰患者 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的变化及干扰素- γ 、转化生长因子- β 1 的表达[J]. 华西医学, 2013, 28(3): 377-379.
- [14] 庄笑梅, 岳立群. 细胞因子对女性生殖轴调控作用研究现状[J]. 锦州医学院学报, 2002, 23(5): 60-63.
- [15] Russell P. The clinicopathological features premature ovarian failure[J]. Verh Dtsch Ges Pathol, 1997(81): 197.