

左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠性激素的影响

李红梅, 苗竹林*, 王奇玲, 韦相才, 范强, 黄密琼(广东省计划生育研究所, 广州 510600)

摘要: 目的 观察左归丸对免疫性卵巢早衰(POF)小鼠外周血抗透明带抗体(AZpAb)、FSH、 E_2 水平变化的影响, 进一步揭示中药补肾养血活血法在调节卵巢功能方面的作用机制。方法 以小鼠透明带3所合成透明带多肽为免疫原, 免疫SPF级BALB/C雌性小鼠, 建立小鼠免疫性POF模型, 随机分为模型组、左归丸高、中、低剂量组, 强的松组、己烯雌酚组和对对照组, 共灌胃给药4周。采用ELISA法检测外周血FSH及 E_2 、AZpAb值。结果 FSH、AZpAb组间的比较测定值都有显著性差异; 各用药组之间对正常组及模型组比较: 己烯雌酚组的FSH值有极显著的意义, 左归丸高、低剂量组的 E_2 值有显著的意义, 左归丸高、中、低剂量组及己烯雌酚组的AZpAb值都有极显著的意义。结论 左归丸能使阴虚小鼠外周血中雌二醇含量增加, 减缓POF小鼠外周血FSH的升高, 抑制AZpAb产生, 改善POF小鼠卵巢免疫性炎症的损伤。

关键词: 左归丸; 卵巢早衰; 性激素

中图分类号: R392.1; R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)13-1161-04

Influence of Zuogui Pill on Sex Hormone in Peripheral Blood Serum of Immune Premature Ovarian Failure Rats

LI Hongmei, MIAO Zhulin*, WANG Qiling, WEI Xiangcai, FAN Qiang, HUANG Miqiong(Guangdong Family Planning Research Institute of Science and Technology, Guangzhou 510600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of Zuogui pill (ZGP), a Chinese compound recipe for tonifying Shen, on AZpAb, FSH, E_2 in peripheral blood serum of immune premature ovarian failure (POF) rats and to further reveal the mechanism in regulating ovarian function in rats. **METHODS** BALB/C grade SPF female mice model of POF was established by multiple sites subcutaneous injection of zona pellucida 3 of mice, and treated with different dosage ZGP of low, middle and high one for 4 weeks, with prednisone and diethylstilbestrol as positive control. Detected AZpAb, FSH, E_2 in peripheral blood serum by ELISA. **RESULTS** There was significantly different within groups FSH and AZpAb, and the FSH was significantly different in diethylstilbestrol group, the E_2 value was significantly different in ZGP of low and high dosage group, and it markedly different in AZpAb value in ZGP of low and high dosage and diethylstilbestrol groups. **CONCLUSION** Zuogui pill may improve the immuno-inflammation damage in ovaries of POF rat by increasing the concentration of E_2 value in peripheral blood and inhibiting AZpAb production.

KEY WORDS: Zuogui pill; premature ovarian failure; sex hormone

正常的卵巢功能是生殖健康的基础。女性一生中仅有约400个卵泡能发育成熟并排卵, 有的女性一生中能发育的卵泡却远远少于400个, 因此不到40岁卵巢功能就已经衰竭, 出现绝经, 即卵巢早衰(premature ovarian failure, POF), 其发病率为1%~3%, 占继发性闭经的20%。患者40岁以前出现至少4个月以上闭经, 并有2次或以上检查血清卵泡刺激素(FSH) $>40 \text{ IU}\cdot\text{L}^{-1}$, 雌二醇水平(E_2) $<30 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($150 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 卵巢中几乎没有

卵泡发育。由于绝经出现早, 且较突然, 所以患者往往围绝经期综合征的表现相当严重, 不但给患者带来极大的痛苦, 也影响着家庭的幸福及社会的稳定^[1-2]。对于POF的治疗目前主要是采用雌、孕激素人工周期的替代疗法以改善低雌激素水平引起的各种并发症。但由于替代疗法的不良反应, 使得患者难以长期坚持。如何减缓卵巢功能的衰退, 寻找治疗卵巢早衰的有效方法, 是目前妇产科界倍受关注的话题。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(07001360); 广东省人口与计划生育资助项目(2008005)

作者简介: 李红梅, 女, 副主任技师 Tel: (020)87770416

E-mail: lihongmei@yahoo.com.cn

*通信作者: 苗竹林, 女, 博士, 副主任

任医师 Tel: (020)31958856

中医从补肾养血活血入手治疗卵巢早衰有一定的疗效,蔡立荣等^[3-4]的研究表明补肾活血中药复方可通过抑制特异性免疫损伤,使卵巢内残存的少数卵泡得以复苏,恢复部分卵巢功能。左归丸对卵巢功能、免疫功能具有一定的改善作用,临床治疗卵巢早衰取得一定的疗效^[5-6]。笔者对其补肾、调节生殖内分泌作用进行了初步研究,对寻找治疗卵巢早衰的有效途径,进一步揭示中医药在调节卵巢功能、维护生殖健康方面的作用机制有着重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验对象

BALB/c 小鼠,♀,15~18 g,90 只,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号:2008A023。

1.2 实验环境

SPF 级 BALB/c 小鼠饲养在广东省医学实验动物中心 SPF 级实验动物室,动物实验环境设施合格证号:粤监证字 2007C099,室内保持 20~25℃,自由饮水、进食,昼夜间断照明,每周换水 3 次,换垫料 2 次,水料充足,SPF 级饲料产自广东省医学实验动物中心。

1.3 受试药物

小鼠透明带多肽(杭州中肽生物有限公司,纯度>95%,批号:CC-11-030);弗氏完全佐剂(Sigma 公司,批号:038K8726);弗氏不完全佐剂(Sigma 公司,批号:086K8905)。强的松(广东华南药业有限公司,批号:070502,临床剂量为 20 mg·(60 kg)⁻¹·d⁻¹)。己烯雌酚(合肥久联制药有限公司,批号:20080104,临床剂量为 1 mg·(60 kg)⁻¹·d⁻¹)。左归丸(河南省宛西制药股份有限公司,批号:071203,临床剂量为一次 9 g(约 90 粒),2 次·d⁻¹。低剂量为临床剂量的 5 倍、中剂量为临床剂量的 10 倍,高剂量为临床剂量的 20 倍)。FSH、E₂ 及抗透明带抗体试剂盒(美国 UNIONHONEST)。

1.4 药物的配制方法

小鼠透明带多肽溶液的配制:称取 1 mg 的透明带 3 粉末,加入三蒸水配成 0.2 mg·mL⁻¹ 的溶液。免疫试剂:将小鼠透明带多肽溶液:弗氏完全佐剂按照 1:1 的比例混合,搅拌 30 min,充分混匀。免疫强化试剂:将小鼠透明带多肽溶液:弗氏不完全佐剂按照 1:1 的比例混合,搅拌 30 min,充分混匀。

2 实验方法

小鼠免疫性卵巢早衰模型建立: BALB/c 小鼠 90 只,随机分为对照组(A 组)10 只和模型组 80 只。对照组注射生理盐水;模型组按文献方法,以小鼠透明带 3 的第 330~342 个氨基酸序列(NSSSSQFQIHGPR)所合成透明带多肽为免疫原,以其免疫 SPF 级 BALB/C 雌性小鼠。在足底及腹部皮肤皮下多点注射,连续 3 次^[5],每 2 周 1 次,第 1 次加入等量弗氏完全佐剂,第 2 次和第 3 次加入等量弗氏不完全佐剂以制备免疫性 POF 动物模型。造模之日起,每天早上 8:00 阴道脱落细胞涂片观察小鼠动情周期的变化。

以出现动情周期紊乱表示造模成功。对动情周期无影响,阴道脱落细胞涂片显示卵巢功能未抑制者予以剔除。

造模成功后,将 BALB/c 小鼠随机分为模型组(B 组)、强的松组(C 组)、左归丸低(D 组)、中(E 组)、高(F 组)剂量组,己烯雌酚组(G 组)。对照组和模型组给予生理盐水,左归丸高、中、低剂量组给予相应浓度的药物,强的松组和己烯雌酚组给予相应浓度的药物。均于第 3 次免疫后开始灌胃,共灌胃 4 周,每周休息 1 d。第 3 次免疫 4 周后摘眼球取血,分离血清放-80℃备用;按 ELISA 法检测 FSH 及 E₂、抗卵巢抗体值。

3 实验结果

左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠外周血 AZpAb、FSH、E₂ 各组间的比较见表 1。FSH 测定值组间有极显著性差异($P<0.01$),AZpAb 组间的测定值比较也有显著性差异($P<0.05$)。

各用药组与对照组的比较见表 2。己烯雌酚组对 FSH 有极显著性影响($P<0.01$),左归丸高、低剂量组对 E₂ 有显著影响($P<0.05$);左归丸高、中、低剂量组及己烯雌酚组对 AZpAb 都有极显著性影响($P<0.01$)。

各用药组对模型组比较见表 3。左归丸高剂量组、己烯雌酚组对 FSH 值有极显著的抑制作用($P<0.01$),左归丸高剂量组对 E₂ 值有极显著性意义($P<0.01$)。

4 结论

本实验根据抗透明带抗体可以引起自身免疫性卵巢炎,并且可以加速卵母细胞的破坏和耗竭而致自身免疫性卵巢早衰这个原理^[7],以卵母细胞透明带的片段创新地建立了小鼠的自身免疫性卵

表 1 变量各组测量结果比较(采用非参数检验: Kruskal-Wallis 秩和检验)

变量	组别	只	均值	标准差	最大值	最小值	中位数	平均秩次	H	P
FSH	对照组	8	2.09	1.87	1.05	7.55	1.43	49.75	25.47	0.000
	模型组	13	7.16	8.16	0.09	26.92	4.27	60.23		
	C 组	12	7.99	11.61	0.81	29.20	1.17	49.41		
	D 组	13	5.25	7.85	0.60	21.73	0.89	40.77		
	E 组	12	5.94	7.47	0.43	19.46	0.90	42.00		
	F 组	12	3.58	6.90	0.01	19.60	0.62	29.38		
	G 组	12	0.72	0.69	0.22	2.71	0.49	18.04		
E ₂	对照组	8	29.87	18.94	11.70	86.06	23.93	48.75	12.30	0.056
	模型组	13	18.87	7.18	5.90	30.01	20.63	33.96		
	C 组	12	43.34	40.49	0.00	96.93	17.18	43.00		
	D 组	12	27.88	32.56	5.92	92.56	9.98	30.17		
	E 组	12	39.63	39.66	6.06	97.34	10.63	38.17		
	F 组	12	44.02	26.74	22.55	92.96	30.95	60.91		
	G 组	12	23.21	12.53	3.60	54.07	21.96	40.63		
AZpAb	对照组	12	1.48	0.44	1.10	2.40	1.34	62.38	15.08	0.020
	模型组	13	2.56	3.11	0.21	7.54	0.57	44.08		
	C 组	12	1.98	2.92	0.12	7.53	0.47	36.95		
	D 组	12	1.27	2.80	0.13	9.68	0.49	31.59		
	E 组	12	1.90	3.34	0.00	8.91	0.50	33.95		
	F 组	12	1.18	1.81	0.21	6.53	0.57	40.41		
	G 组	12	0.57	0.40	0.09	1.45	0.42	32.54		

表 2 变量不同浓度组与对照组的比较(采用 Mann-Whitney Test 秩和检验)

因素	组别	平均秩次		秩次总和		Z	P
		对照组	实验组	对照组	实验组		
FSH	C 强组	13.25	10.64	159.00	117.00	-0.924	0.356
	D 低组	14.50	9.27	174.00	102.00	-1.847	0.065
	E 中组	13.42	10.45	161.00	115.00	-1.047	0.295
	F 高组	15.25	9.75	183.00	117.00	-1.907	0.056
	G 酚组	17.25	7.75	207.00	93.00	-3.295	0.001
E ₂	C 强组	13.25	11.75	159.00	141.00	-0.520	0.603
	D 低组	15.50	9.50	186.00	114.00	-2.078	0.038
	E 中组	13.75	11.25	165.00	135.00	-0.866	0.386
	F 高组	9.25	15.00	111.00	165.00	-2.031	0.042
	G 酚组	13.92	11.08	167.00	133.00	-0.981	0.326
AZpAb	C 强组	14.50	9.27	174.00	102.00	-1.847	0.065
	D 低组	16.50	7.09	198.00	78.00	-3.325	0.001
	E 中组	15.50	8.18	186.00	90.00	-2.586	0.010
	F 高组	16.04	7.59	192.50	83.50	-2.986	0.003
	G 酚组	17.83	7.17	214.00	86.00	-3.697	0.000

表 3 变量不同浓度组与模型组的比较(采用 Mann-Whitney Test 秩和检验)

因素	组别	平均秩次		秩次总和		Z	P
		对照组	实验组	对照组	实验组		
FSH	C 松组	14.46	10.18	188.00	112.00	-1.478	0.139
	D 低组	14.85	9.73	193.00	107.00	-1.767	0.077
	E 中组	14.08	10.64	183.00	117.00	-1.188	0.235
	F 高组	16.69	9.00	217.00	108.00	-2.611	0.009
	G 酚组	18.08	7.50	235.00	90.00	-3.591	0.000
E ₂	C 松组	12.25	12.75	147.00	153.00	-0.173	0.862
	D 低组	14.00	11.00	168.00	132.00	-1.039	0.299
	E 中组	12.33	12.67	148.00	152.00	-0.115	0.908
	F 高组	7.25	17.18	87.00	189.00	-3.508	0.000
	G 酚组	11.21	13.79	134.50	165.50	-0.895	0.371
AZpAb	C 松组	12.96	10.95	155.50	120.50	-0.708	0.479
	D 低组	13.50	10.36	162.00	114.00	-1.108	0.268
	E 中组	13.04	10.86	156.50	119.50	-0.770	0.441
	F 高组	12.42	11.55	149.00	127.00	-0.308	0.758
	G 酚组	14.17	10.83	170.00	130.00	-1.155	0.248

巢早衰动物模型。从实验中发现,从第 1 次免疫后约第 25 天开始,模型组小鼠表现为易激惹,大便干结,动情期不典型,角化细胞数减少,与上皮细胞、白细胞并见;第 35 天左右出现动情周期紊乱,动情间期延长,渐至无动情周期,仅为动情间期的白细胞,时可见上皮细胞相混杂。小鼠逐渐表现为活动频度减少,对刺激反应淡漠,皮毛无光泽。模型组小鼠在第 3, 4, 5, 6, 7, 8 周的体重与对照组比较,具有显著性差异($P<0.05$)。模型组仅有 16.7%的动物维持正常的性周期,而空白对照组有 91.7%的动物维持正常的性周期,提示本实验所注射透明带片段有效地影响了卵巢的功能。通过对左归丸干预的免疫性卵巢早衰小鼠性激素水平的影响研究,表明左归丸能使阴虚小鼠外周血中雌二醇含量增加,减缓 POF 小鼠外周血 FSH 的升高,抑制 AZpAb 产生,改善 POF 小鼠卵巢免疫性炎症的损伤,具有调节卵巢功能的作用。

目前对左归丸治疗卵巢早衰的相关机制几无报道,全面深入开展其治疗卵巢早衰机制的相关研究不仅有助于阐明此类疾病的发病机制,且将

有助于寻找治疗该病的有效途径,为提高卵巢储备功能、防治卵巢老化、维护女性健康的生殖功能、延缓衰老开辟新的思路。

参考文献

- [1] KAUFFMAN R P, CASTRACANE V D. Premature ovarian failure associated with autoimmune polyglandular syndrome: pathophysiological mechanisms and future fertility [J]. J Womens Health (Larchmt), 2003, 12(5): 513-520.
- [2] ORSHAN S A, FURNISS K K, FORST C, et al. The lived experience of premature ovarian failure[J]. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs, 2001, 30(2): 202-208.
- [3] 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): 126-129.
- [4] 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): 435-438.
- [5] 朱玲, 陈彬彬, 黄泉智, 等. 左归丸临床与实验研究进展[J]. 国医论坛, 2003, 18(2): 51-53.
- [6] CHAO S L, HUANG L W, YEN H R. Pregnancy in premature ovarian failure after therapy using Chinese herbal medicine [J]. Chang Gung Med J, 2003, 26(6): 449-452.
- [7] 朱玲. 从调节卵泡凋亡探讨左归丸治疗免疫性卵巢早衰的机制[D]. 广州: 广州中医药大学, 2007.