

补肾活血方对小鼠实验性卵巢早衰防治作用的研究^{*}

蔡立荣 李大金 孙晓溪 王明雁

内容提要 目的 探讨补肾活血中药复方对实验性的免疫性卵巢早衰(POF)的防治作用。方法 以免疫层析分离的猪卵透明带皮下和两后脚掌多点注射免疫 8~10 周龄雌性 BALB/c 小鼠建立 POF 的动物模型。分别在免疫早期或 3 次免疫后连续灌服中药复方,分析灌服中药后阴道脱落细胞涂片,外周血雌二醇(E_2)浓度和血清抗透明带(ZP)抗体水平变化,及受试动物脾淋巴细胞对不同浓度 ZP 刺激的反应和卵巢滤泡和黄体数改变。结果 预防组和治疗组小鼠体内血清 E_2 水平平均比免疫组高($P < 0.01$, $P < 0.05$),而抗 ZP 抗体则明显下降。卵巢组织形态学分析显示,治疗组和预防组生长滤泡和黄体数均比免疫组明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。免疫组脾淋巴细胞呈现抗原特异性的增殖反应,明显高于对照组,而治疗组脾淋巴细胞对抗原的特异性反应降低。结论 补肾活血中药复方主要通过抑制特异性免疫损伤,使卵巢内残存的少数滤泡能得以复苏,恢复部分卵巢功能,而且中药的预防效果优于治疗效果。

关键词 卵巢早衰 自身免疫性 中药复方 卵透明带抗体 雌二醇

Experimental Study on Preventive and Therapeutic Effect of Bushen Huoxue Recipe on Autoimmune Premature Ovarian Failure Model CAI Li-rong, LI Da-jing, SUN Xiao-xi, et al *Institute of Obstetrics/Gynecology, Shanghai Medical University, Shanghai (200011)*

Objective: To investigate the mechanisms of Bushen Huoxue Recipe (BSHXR), a Chinese herbal medicinal preparation for tonifying Kidney and invigorating blood circulation, to prevent and treat autoimmune premature ovarian failure (POF) model. **Methods:** Female 8–10 weeks old BALB/c mice were immunized by intracutaneously injecting porcine ovum zona pellucida (ZP), isolated by immuno-chromatography, in multiple points of two hind footpads to establish the POF model and treated with BSHXR started from early stage of immunization (prevented group) or after 3 times of injection (treated group). Changes in vaginal smears, serum estradiol (E_2), antibody titer against ZP, response of splenic lymphocyte to ZP stimulation of different concentrations, and numbers of ovarian follicles and corpus luteum were analyzed. **Results:** Serum E_2 level in the prevented and treated mice was all higher than that in the non-treated immunized model mice (the control group), $P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively. But the anti-ZP titer lowered significantly after BSHXR administration, as compared with that in the control group. Level of antibodies in the treated group was lower than that of the control, and it was also lower in the prevented group than that in the control. The histo-morphological examination showed that the developing follicles and corpus luteum after BSHXR medication in both prevented and treated group increased significantly as compared with that of the control group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively). Splenic lymphocyte in the immunized model showed a higher antigen-specific proliferation reaction than that in non-immunized animal, and the reaction was ameliorated by BSHXR medication. **Conclusion:** BSHXR could recover part of the ovarian function in POF mice mainly through inhibiting specific immune injury to revive the remnant follicles in ovary. The preventive effect of BSHXR was superior to the therapeutic effect of it.

Key words premature ovarian failure, autoimmune, Chinese herbal recipe, ovum zona pellucida antibody, estradiol

卵巢功能早衰(POF)常伴随其他内分泌自身免疫疾患,故其治疗比较困难^(1~3)。常用性激素替代疗法,但不能恢复卵巢周期性功能。如何减缓卵巢功能衰退的速度以恢复卵巢功能,提高生活质量,是目前

生殖内分泌临床研究的一项重要课题。考虑到 POF 按中医辨证属肾阴阳失调,阴虚火旺 宜用滋阴降火、补肾活血方予以治疗。

本研究用猪卵透明带免疫 BALB/c 小鼠以建立 POF 动物模型⁽⁴⁾。分别在免疫早期或 3 次免疫后给予实验小鼠连续灌服中药复方水煎剂。分析其生殖内分泌、免疫功能及卵巢形态学改变,以期探讨补肾

^{*} 上海市科技攻关项目(No. 004019061)

上海复旦大学医学院妇产科研究所(上海 200011)

活血方防治 POF 动物模型的作用机制,并为临床中药治疗 POF 提供理论及实验依据。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 8~10 周龄雌性 BAL B/c 小鼠 40 只,体重 18~20g,由上海医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂 补肾活血方由知母、黄柏、生地、龟板、枸杞子、女贞子、仙灵脾、补骨脂、赤芍、白芍、川芎和丹参组成,由上海医科大学附属妇产科医院提供,并制成相当生药 200% (W/V) 浓缩液。猪卵透明带 (PZP) 由上海医科大学妇产科研究所免疫室自制,方法参见文献^[5]。弗氏完全佐剂 (CFA) 和弗氏不完全佐剂 (IFA) 购自美国 Sigma 公司;雌二醇 (E₂) 放射免疫药盒为美国 Dianostic Systems Laboratories 公司产品,羊抗小鼠标记辣根过氧化物酶 IgG、底物 TMB 为上海华美生物医学公司产品,³H-TdR 上海核研究所提供。

2 方法

2.1 动物造模 每只小鼠两后脚掌和皮下多点注射 PZP 5 μ g 加 CFA 混合乳化液;每次免疫间隔 2 周,并且以 PZP 与 IFA 等量乳化加强免疫 2 次。缓冲液 PBS 代替 PZP 免疫作为正常对照组。

2.2 分组及给药 将第 1 次免疫后的小鼠随机分为 3 组,每组 10 只。免疫组,不用中药。POF 预防组从第 1 次免疫后即灌服中药水煎剂以预防 POF 的发生;POF 治疗组从第 3 次免疫后开始灌服中药水煎剂。剂量均相当于临床等效剂量的 10 倍 (0.2ml/10g)。正常对照组亦为 10 只。

2.3 生殖内分泌指标 每天上午 8:00 取小鼠阴道脱落细胞涂片,于光学显微镜下观察其性周期。在第 3 次免疫后 20 天摘眼球取血,并颈椎脱位处死小鼠,测定血清 E₂ 含量。

2.4 免疫功能指标 同上法处死小鼠,留取脾脏、卵巢和血清。

2.4.1 小鼠脾淋巴细胞分离及抗原刺激反应

取脾脏制备脾淋巴细胞悬液,调浓度为 3 $\times$ 10⁶/ml。将细胞悬液 0.1ml 加入圆底细胞培养板内 (3 复孔),随后加入 RPMI-1640 培养液稀释的 PZP 抗原 (浓度分别为 16.67 μ g/ml,2.77 μ g/ml,0.46 μ g/ml) 或 RPMI-1640 作为空白对照。置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养 96h,培养结束前 18h 加 ³H-TdR 0.6 μ Ci/孔。将每孔细胞用多头细胞收集仪收集至净化滤纸上,红外线干燥后,放入闪烁液中,于 β 射线计数仪测量 cpm 值。

2.4.2 血清抗透明带 (ZP) 抗体测定 ELISA 方法测定,试剂盒由本室制备。方法参见文献^[6]。

2.4.3 自身免疫性卵巢炎组织形态学观察 收集的卵巢经 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,切片,常规 HE 染色,每个小鼠选取 4 张切片,在光学显微镜下计数黄体及各个时期滤泡数量,取平均值。

2.5 统计学分析 计量资料行均数 *t* 检验;计数资料行 χ^2 检验。

结 果

1 灌服中药后生殖内分泌改变

1.1 阴道脱落细胞涂片 小鼠性周期一般为 4~5 天,包括动情前期、动情期、动情后期和动情间期。在第 1 次免疫后 2 周,除了对照组周期有不同程度延长 (6~7 天) 外,其余各组周期均不规则,表现为动情期延长 2~3 天或动情后期、间期延长 2~3 天。第 2 次免疫后 2 周,对照组仍表现为周期延长至 6~7 天,免疫组和治疗组则周期更加紊乱,而预防组表现为动情期延长 (3~4 天) 或动情间期延长 (2~3 天)。第 3 次免疫后 2 周,对照组周期无明显改变,免疫组大部分小鼠其周期持续表现为动情间期,治疗组持续表现为动情期或动情间期,然而预防组周期延长至 7~8 天 (动情期与动情间期均延长) 或持续表现为动情期。综上所述,治疗组体内雌激素水平比免疫组高;预防组灌服中药起始时间早且持续时间亦长,因此虽然性周期仍没有达到正常周期表现,但总的趋势更优于治疗组。

1.2 各组 E₂ 含量比较 见表 1。治疗组和预防组 E₂ 含量均比免疫组显著升高,与免疫组比较差异均有显著性 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。

1.3 自身免疫性卵巢组织炎形态学分析 见表 2。治疗组和预防组黄体数目明显增加 (包括新形成的黄体)。预防组黄体数量增加较治疗组多,与免疫组比较差异有显著性 (*P* < 0.01); 生长滤泡大部分仍受到破坏,但滤泡数量明显多于免疫组 (*P* < 0.01)。

1.4 E₂ 含量与滤泡数的相关性分析 灌服中药后,实验鼠血清 E₂ 含量升高及生长滤泡数增加,二者之间呈明显正相关 (*r* = 0.78, *P* < 0.01)。

表 1 各组血清 E₂ 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	E ₂ (pg/ml)
免疫	10	13.76 $\pm$ 4.63 [△]
治疗	10	18.35 $\pm$ 5.12 ^{* △}
预防	10	20.72 $\pm$ 5.96 ^{** △}
对照	10	25.14 $\pm$ 4.14 ^{**}

注 与免疫组比较,* *P* < 0.05,** *P* < 0.01;与对照组比较,[△] *P* < 0.05

表 2 各组小鼠卵巢滤泡及黄体计数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	始基滤泡	初级滤泡	生长滤泡	黄体
免疫	9	1.63 ± 1.22	5.25 ± 2.22	9.50 ± 4.44	0.88 ± 0.78
治疗	7	2.17 ± 1.95	6.33 ± 2.05	14.33 ± 3.14 *	2.33 ± 2.21
预防	8	5.78 ± 5.43	3.17 ± 0.69	15.67 ± 4.80 **	3.50 ± 1.71 **
对照	7	2.00 ± 1.22	6.40 ± 2.24	20.20 ± 4.87 **	4.00 ± 1.67 **

注 与免疫组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2 免疫学改变

2.1 各组血清抗 ZP 抗体效价比较 见表 3。与免疫组比较, 治疗组和预防组抗 ZP 抗体效价均明显下降 ($P < 0.01$)。提示治疗组、预防组抗体水平比免疫组明显降低。

2.2 脾淋巴细胞增殖反应 见表 4。免疫后鼠脾细胞在体外不同浓度的 PZP 抗原刺激下均呈增殖反应, 且反应强度与抗原浓度呈正相关趋势。与免疫组比较, 治疗组针对特异性抗原的淋巴细胞增殖反应下降。非常有意义的是, 无论治疗或免疫与否对 Con A 的增殖反应并无明显差异, 说明补肾活血中药仅调整异常增高的免疫状态, 而对实验动物整体免疫功能无明显影响。

3 免疫与内分泌变化的相关性 经中药治疗后, E_2 含量随抗体水平下降而增高, 二者之间呈明显负相关 ($r = -0.95, P = 0.0151$)。以上结果提示, 补肾活血中药主要通过抑制受试动物特异性免疫反应, 而改善卵巢的生殖内分泌周期性功能。

讨 论

传统的中医脏腑学说记载“肾主生殖, 肾藏精, 精生髓, 肾为‘先天之本’”。对肾主生殖和性腺调节机理

的研究表明, 肾的阴阳辨证与生殖内分泌的水平密切相关。肾阴虚者则表现为垂体功能亢进, 促卵泡成熟激素 (FSH) 水平升高, 是由于卵巢功能不足或衰退造成雌激素水平低落, 从而对垂体促性腺激素的分泌失去负反馈作用所致⁽⁷⁻¹⁰⁾。POF 按中医辨证属于肾阴虚火旺、血瘀征象。本研究所用中药复方即从上述辨证出发, 治则为滋阴降火、补肾活血。知母、黄柏、生地、龟板、女贞子、枸杞子滋肾阴降虚火, 仙灵脾、补骨脂虽有温补肾阳之功, 但温而不燥, 意在阳中求阴, 以上配伍意在抑制卵巢的自身免疫损伤, 促进滤泡发育。赤芍、白芍、川芎、丹参则有活血化瘀之功, 意在缓解卵巢自身免疫性损伤并诱发排卵。

以 ZP 抗原免疫所建立的 POF 动物模型, 其可能的发病机理在于致病性 (自身反应性) T 细胞被激活和自身抗体对卵巢组织的损伤⁽¹⁰⁻¹²⁾。给予已造成自身免疫性卵巢炎的小鼠灌服中药, 自身免疫损伤作用被抑制和卵巢生殖内分泌功能改善, 组织形态学分析显示, 卵巢黄体计数大于不服中药小鼠, 生长滤泡数量亦比不服中药小鼠增加。代表体内雌激素水平的动情周期显示雌激素水平上升, 血清 E_2 浓度比不服中药小鼠明显升高。抗 ZP 抗体下降, 而且血清 E_2 水平的升高与抗体效价降低呈明显的负相关。因此推测补肾中药参与调整生殖内分泌—免疫调节网络, 降低过强的免疫损伤作用, 而改善卵巢的内分泌功能。持续性高效价抗体不断攻击被募集的始基滤泡发育成的生长滤泡, 而抑制合成并分泌雌激素。中药能使 ZP 抗体水平下降, 继之缓解了对不同生长时期滤泡的破坏作

表 3 各组血清抗 ZP 抗体效价比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	490nm 光密度值				
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
免疫	10	0.520 ± 0.08	0.456 ± 0.071	0.391 ± 0.069	0.330 ± 0.075	0.229 ± 0.068
治疗	10	0.317 ± 0.122 *	0.265 ± 0.120 *	0.193 ± 0.126 *	0.157 ± 0.117 *	0.126 ± 0.092 *
预防	8	0.187 ± 0.062 *	0.131 ± 0.058 *	0.087 ± 0.053 *	0.058 ± 0.033 *	0.036 ± 0.031 *
对照	10	0.088 ± 0.022 *	0.061 ± 0.013 *	0.038 ± 0.016 *	0.028 ± 0.015 *	0 *

注 与免疫组比较, * $P < 0.01$

表 4 各组脾淋巴细胞增殖反应比较 (dcpm, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	刺激指数			
		PZP(0.46μg/ml)	PZP(2.77μg/ml)	PZP(16.67μg/ml)	Con A(50μg/ml)
免疫	7	62.77 ± 44.25	88.83 ± 57.39	278.19 ± 159.55	185.68 ± 56.44
治疗	6	45.87 ± 30.51	67.95 ± 46.89	157.77 ± 77.43 *	149.55 ± 61.70
对照	7	△	40.78 ± 20.47 *	35.79 ± 21.81 *	250.57 ± 105.23

注 △cpm 抗原刺激后的 cpm 值 - 未加抗原的 cpm 值; △cpm 值高于抗原刺激后的 cpm 值。与免疫组比较, * $P < 0.05$

用, 助其发育, 并促进类固醇产生细胞合成分泌雌激素, 提高血清 E_2 浓度。实验组灌服中药后卵巢黄体数量明显增加, 提示补肾中药可能不仅对卵巢直接起作用, 还可能通过调整小鼠的下丘脑—垂体而对卵巢

发挥作用。
本研究在模型建立之中给予小鼠灌服中药后, 意在观察中药对 POF 的预防作用。我们发现血清 E_2 浓度低于正常对照组 ($P < 0.05$), 而且动情周期亦反映

体内低于正常的雌激素水平,卵巢形态学显示卵巢并无明显萎缩,生长滤泡和黄体数量虽与正常对照组比较差异无显著性($P > 0.05$),但大部分滤泡遭受免疫攻击,滤泡内有炎症细胞浸润,血中可检测到抗 ZP 抗体,但其效价低于免疫组小鼠和治疗组小鼠。

总之,本中药复方主要通过抑制特异性免疫损伤作用,有可能使卵巢内残存的少数滤泡能得以复苏,恢复部分卵巢功能。

参 考 文 献

1. Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev* 1997;18:107—114.
2. Wheeler CA. Premature ovarian failure: treatment strategies. *RI Med* 1995;78:130—131.
3. Cust MP. The treatment of early ovarian failure. *Curr Obstet Gynecol* 1991;1:15—19.
4. Rhim SH, Millar SE, Robey F, et al. Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the mouse zona pellucida. *J Clin Invest* 1992;89:28—35.

5. 严敬明,李超荆,周抗美,等.猪卵透明带的分离和提纯. *上海医科大学学报* 1987;14:358—366.
6. 李大金,李超荆,朱影. BA-ELISA 检测透明带抗体. *上海免疫学杂志* 1988;3:296—298.
7. 李超荆. 虚证研究. 上海:上海科学技术出版社,1991:71—76.
8. 李大金,李超荆,朱影. 滋阴降火中药治疗免疫性不孕症. *中国中西医结合杂志* 1995;15(1):3—6.
9. 李大金,李超荆. 肾主生殖理论体系的科学内涵. 见: *中药药理与临床研究进展*. 第 4 册. 北京:军事医学科学出版社,1996:356—364.
10. Dunbar BS. Ovarian antigens and infertility. *Am J Reprod Immunol*. 1989;21:28—30.
11. Lou YH, Moelven F, Sallie A, et al. Altered target organ: A mechanism of post-recovery resistance to murine autoimmune cophoritis. *J Immunol* 1995;7:3667—3673.
12. Tung KSK. Elucidation of autoimmune disease mechanism based on testicular and ovarian autoimmune disease models. *Horm Metab Res* 1995;27:539—543.

(收稿 1999-03-31 修回 2000-11-02)