

· 基础研究 ·

低频电针对多囊卵巢综合征大鼠卵巢组织
Bax、Bcl-2 表达的影响郑艳华¹ 吴婉婷² 马红霞² 李娟²

摘要 **目的** 探讨低频电针对多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)大鼠卵巢组织中 Bax、Bcl-2 表达的影响。**方法** 24 只 3 周龄雌性 SD 大鼠等量随机分成模型组(M 组)、针刺组(A 组)与正常对照组(C 组),每组 8 只。通过注射睾酮和高脂饲料喂养进行造模。从 11 周龄开始,A 组连续 5 周,每周 5 次,每次 30 min 低频电针,M 组和 C 组不干预。在治疗前后,空腹取血检测睾酮(T)、胰岛素(FINS)、血糖(FBG),比较胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。卵巢组织通过 HE 染色观察结构,采用荧光定量 PCR 及 Western blot 检测卵巢组织中 Bax、Bcl-2 mRNA 及蛋白表达,并计算 Bax/Bcl-2 比值。**结果** 自 8 周龄起, M 组体重均重于 C 组($P < 0.05$, $P < 0.01$);自 14 周龄起,A 组体重明显低于 M 组($P < 0.05$)。11 周及 16 周,M 组血清 T、FINS 及 HOMA-IR 水平较 C 组显著升高($P < 0.01$);16 周龄 A 组血清 T、FINS 及 HOMA-IR 水平较 M 组及治疗前明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。A 组卵巢切片 HE 染色可见多个黄体存在,囊性卵泡减少,颗粒细胞层比 M 组明显增厚;M 组 Bax 蛋白及 mRNA 表达高于 C 组,Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达低于 C 组($P < 0.05$, $P < 0.01$);A 组 Bax 蛋白及 mRNA 表达低于 M 组($P < 0.05$),Bax/Bcl-2 比值低于 M 组($P < 0.01$)。**结论** 低频电针可能通过降调卵巢组织中 Bax mRNA 及蛋白表达和降低 Bax/Bcl-2 比值,抑制颗粒细胞凋亡,改善卵巢局部微环境,促进黄体生成,恢复正常排卵周期。

关键词 多囊卵巢综合征;电针;Bcl-2 相关 X 蛋白;B 淋巴细胞瘤-2

Effects of Low Frequency Electroacupuncture on the Expressions of Bax and Bcl-2 in the Ovary Tissue of Polycystic Ovary Syndrome Rats ZHENG Yan-hua¹, WU Wan-ting², MA Hong-xia², and LI Juan² 1 Department of Traditional Chinese Medicine, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou (511447); 2 Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou (510120)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of low frequency electroacupuncture (LF-EA) on the expressions of Bcl-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) in the ovary tissue of polycystic ovary syndrome (PCOS) rats. **Methods** Totally 24 female 3 weeks old Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups, the normal control group (C), the model group (M), and the EA group (A), 8 in each group. Rats in the M group and the A group were fed with high-fat diet and injected with andronate for 8 weeks. Rats in the A group received LF-EA for 5 successive weeks, 30 min each time 5 times per week from 11 weeks old. Rats in the M group and the C group received no intervention. Levels of testosterone (T), fasting insulin (FINS), and fasting blood glucose (FBG) were detected before and after intervention. HOMA-IR was compared. The structure of the ovarian tissue was observed by HE staining. mRNA and protein expressions of Bax and Bcl-2 were measured via real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot. Bax/Bcl-2 of the ovarian tissue was calculated. **Results** The weight of the M group was heavier than that of the C group from week 8 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The weight of the A group was lighter than that of the M group from week 14 ($P < 0.05$). The levels of serum T and FINS, as

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81704107);广东省自然科学基金资助项目(No. 2014A030313496)

作者单位:1. 广州医科大学附属第二医院中医科(广州 511447); 2. 广州医科大学附属第一医院中医科(广州 510120)

通讯作者:马红霞, Tel:020-83062042, E-mail: doctorhongxia@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20171026.255

well as HOMA-IR significantly increased in the M group than those of the C group at week 11 and week 16 ($P < 0.01$). The levels of serum T and FINS, as well as HOMA-IR significantly decreased in the A group than those of the M group at week 16 ($P < 0.05, P < 0.01$). HE staining of the ovarian tissue showed some corpora lutea existed in the A group, with lesser cystic follicles. The granular cell layer was obviously thicker in the A group than in the M group. mRNA and protein expressions of Bax were higher in the M group than in the C group; those of Bcl-2 were lower in the M group than in the C group ($P < 0.05, P < 0.01$). mRNA and protein expressions of Bax were lower in the A group than in the M group ($P < 0.05$); Bax/Bcl-2 ratio was lower in the A group than in the M group ($P < 0.01$). Conclusion LF-EA might inhibit apoptosis of ovarian granulosa cells, improve local ovarian microenvironment, promote luteal production, and restore normal ovulatory cycle possibly by down-regulating mRNA and protein expressions of Bax and decreasing Bax/Bcl-2 ratio.

KEYWORDS polycystic ovary syndrome; electroacupuncture; Bcl-2 associated X protein; B-cell lymphoma-2

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)的临床表现复杂多样,具有高度异质性,其特征可概括为两方面:(1)高雄激素血症,为 PCOS 的重要生化标志^[1],可表现为痤疮、多毛、稀发排卵或不排卵、闭经等症状;(2)高胰岛素血症(hyperinsulinemia, HI),大约 85% 的 PCOS 患者存在胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)^[2],出现超重或肥胖症状。PCOS 动物模型的建立方法有多种,多是模拟 PCOS 某一或某几方面的病理特征。为深入研究,需建立一种能凸显 PCOS 合并代谢功能紊乱特点的大鼠模型作为研究基础。外源性的睾酮可与大鼠皮肤、毛囊的雄激素受体结合,雄激素活性增强,有助于诱导卵巢多囊样病理改变,高脂饮食可以引起血脂和血糖代谢紊乱,并加重多囊卵巢症状表现^[3]。有研究证实,该雄激素皮下注射配合高脂饲料喂养制作的模型大鼠,具有人类 PCOS 相似的卵巢及代谢紊乱的特征,包括肥胖、多囊性卵巢、规律的动情周期消失、高血脂、HI、糖耐量受损等表现^[4,5],符合本实验需要。

近年来,已有显示针灸可减轻高雄激素血症及 IR^[6],有助于调整氧化应激状态^[7],改善 PCOS 患者的月经、促进排卵,从而提高妊娠率。PCOS 发病机制目前尚不清楚。动物实验证实了 PCOS 大鼠模型卵巢卵泡颗粒细胞凋亡明显增强^[8],本实验应用实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法观察低频电针对 PCOS 大鼠卵巢组织凋亡和抗凋亡因子 Bax、Bcl-2 表达的影响。

材料与方法

1 动物及分组 SPF 级 SD 21 日龄雌性大鼠 24 只,由广东省动物实验中心提供。动物合格证号:

SCXK(粤)2008-0002。随机分为正常对照组(C 组)、模型组(M 组)和针刺组(A 组),每组 8 只。本实验通过广州医学大学动物实验中心伦理审查,实验过程遵守实验动物福利伦理原则。

2 药物 丙酸睾酮,美国 Sigma 公司产品;注射用无菌大豆油,龙游县田雨山茶油开发有限公司产品。参照 Zhai HL 等^[5]的实验方法,将 1 g 丙酸睾酮粉末溶解于 100 mL 注射用无菌大豆油中,配成 10 mg/mL 的油剂,作为造模的材料。

3 主要试剂及仪器 参照文献^[5],高脂饲料成分分为 54% 的普通颗粒饲料、17% 猪油、15% 糖、9% 酪蛋白、1% 矿物质、1% 维生素、3% 麦芽糊精,由广东省实验动物中心加工完成。睾酮 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司);胰岛素 ELISA 试剂盒(瑞典 Mercodia AB 公司);Western blot 用兔抗 Bax、Bcl-2 多克隆抗体(Cell Signaling 公司);抗 β -actin 鼠单克隆抗体(北京康为世纪生物科技有限公司);Prime Script RT Master Mix (Perfect Real Time) 和 SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus, 宝生物工程有限公司);环球牌一次性 1 寸针灸针(0.30 mm $\times$ 25 mm);上海华谊牌 G6805-2A 型低频电子脉冲治疗仪;Leica 石蜡切片机 RM2125(德国 Leica 公司);倒置显微镜(德国 Leica 公司);罗氏活力型血糖仪(德国罗氏诊断有限公司);Olympus AU 640 全自动生化仪;Prism7300 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

4 方法

4.1 模型制备 参照 Zhai HL 等^[5]的方法,M 组和 A 组大鼠从 3 周龄开始颈背部皮下注射含丙酸睾酮的油剂,以 1 mg/100 g 体重剂量注射,连续注射 8 周。并持续以高脂饲料喂养至实验结束。C 组颈

背部皮下注射等量大豆油,以普通颗粒饲料(来自广东省实验动物中心)喂养。

4.2 干预方法 参考 Victorin ES 等^[9]的大鼠针刺实验选穴方法,选取中脘穴、关元穴、三阴交穴、后三里穴及骶部后会穴两旁作为针刺穴位。具体操作:实验中,将针刺穴位分为2组,其中1组为中脘、关元、双侧三阴交,另1组为后会穴旁及后三里穴,每次针1组穴,隔次交替,连续治疗5周,5天/周,1次/天,30 min/次。为排除饮食习惯改变的影响,对本实验中C组和A组在整个实验阶段维持高脂饲料喂养,以不改变饮食规律的前提下,进行针刺干预。清醒状态下,A组大鼠被固定在固定板上,被0.30 mm×25 mm不锈钢针针刺后,以电针治疗仪以2 Hz疏密波输出连接针柄,出现局部肌肉轻度抖动为度。其余组大鼠被同样固定于固定器上30 min/次,但不做任何处理。

5 检测项目及检测方法

5.1 动情周期观察 分别在8~10周龄及13~15周龄,每日晨8:00~9:00,采用阴道涂片,直接在普通显微镜下观看细胞的形态,判断有无动情周期改变。

5.2 体重监测 每周一8:00~9:00称量体重并记录。

5.3 胰岛素抵抗指数(HOMR-IR)的计算 禁食12 h,次日晨8:00起,尾静脉采血1 mL,3 000 r/min离心10 min收集血清,-20℃冻存,以ELISA试剂盒测FINS。利用血糖仪测FBG。计算HOMA-IR=(FBG×FINS)/22.5。

5.4 血清T检测 检测FBG后,以10%水合氯醛(6 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠,眶静脉采血3~5 mL,静置1 h,-4℃离心后收集血清,-20℃冻存,以ELISA法检测T,具体操作参照试剂盒说明。

5.5 采用实时荧光定量PCR检测Bax、Bcl-2 mRNA表达 各组的大鼠卵巢组织从-80℃冰箱取出,利用液氮在低温环境下快速研磨粉碎组织,按RNA Trizol提取试剂盒操作说明书提取总RNA,一步法反转录为cDNA。Bax、Bcl-2及内对照基因β-actin引物序列见表1,由上海英潍捷基生物公司合成。使用Applied Biosystems 7900HT和Step One Plus进行Real time PCR反应。PCR仪读取数据后,试验重复2次。将各组待测基因与对应内参β-actin的数值之比值的均数作为各待检基因mRNA的相对表达量,结果采用2^{-ΔΔCt}方法进行计算。

5.6 采用蛋白免疫印迹法检测Bax、Bcl-2表达 从大鼠卵巢组织提取总蛋白,在SDS-PAGE凝胶上

表1 Bax、Bcl-2、β-actin 基因引物序列表

基因名称	引物序列	扩增长度 (bp)
Bax	F:5'-TGGCGATGAACTGGACAACAAC-3'	301
	R:5'-CCCGAAGTAGGAAAGGAGGC-3'	
Bcl-2	F:5'-CACCCCTGGCATCTTCTCCT-3'	349
	R:5'-GTTGACGCTCCCCACACACA-3'	
β-actin	F:5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'	207
	F:5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'	

电泳分离2 h,将凝胶湿转至PVDF膜。封闭。用1×TBST洗涤PAGE膜,每次10 min,共3次。用TBST加5%脱脂牛奶配制封闭液,室温封闭1 h,加入相应的一抗(兔抗鼠Bax,1:1 000;兔抗鼠Bcl-2,1:1 000)4℃摇床过夜。次日取出,TBST冲洗膜5 min,3次,与辣根过氧化物酶标记的二抗(山羊抗兔IgG,1:5 000)室温孵育1 h。洗膜5 min,3次,采用ECL显影试剂盒(上海碧云天生物科技公司)进行曝光和显影。蛋白半定量采用美国NIH研制的Image J图像处理软件。以图像灰度分析显示目的蛋白/β-actin的蛋白平均灰度比值,进行计算分析。

5.7 统计学方法 采用SPSS 17.0系统软件进行分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。HOMA-IR呈偏态分布,故取其自然对数(ln)后用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间采用单因素方差分析及多个均数的两两比较采用LSD,治疗前后对比采用配对t检验;两变量的相关性采用Pearson相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 3组大鼠动情周期变化比较 8~10周龄,连续涂片显示M组和A组大鼠失去规律的动情周期改变,持续处于动情间期,涂片可见大量白细胞及少量黏液。而C组有规律的周期改变,保持4~5天规律的动情周期改变。至实验结束,A组有5只大鼠出现与C组相似的规律动情周期改变。而M组大鼠无动情周期改变。

2 3组大鼠体重变化比较(表2) 从8周龄开始,M组体重高于C组($P < 0.05, P < 0.01$)。14周龄起,A组体重明显低于M组($P < 0.05$)。

3 3组11、16周龄大鼠T及FINS比较(表3) 11、16周龄,M组血清T、FINS较C组显著升高($P < 0.01$)。16周龄,A组血清T、FINS较M组及治疗前明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。

4 3组11、16周龄大鼠FBG及HOMR-IR比较(表4) 11及16周龄,3组大鼠FBG比较,差异无统

表 2 3 组大鼠体重变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重(g)						
		3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周
C	8	50.0 ± 1.0	80.3 ± 5.7	106.6 ± 3.7	131.0 ± 2.3	148.6 ± 3.5	168.4 ± 5.0	183.9 ± 5.9
M	8	50.0 ± 1.3	83.3 ± 3.0	110.0 ± 2.8	132.6 ± 4.5	149.8 ± 3.9	177.6 ± 5.9 *	191.4 ± 4.1 *
A	8	50.0 ± 1.1	81.6 ± 2.2	107.9 ± 4.6	130.8 ± 1.9	151.1 ± 5.7	176.6 ± 4.1	191.5 ± 3.5

组别	n	体重(g)					
		10 周	11 周	12 周	13 周	14 周	15 周
C	8	199.4 ± 5.4	209.5 ± 4.8	216.3 ± 7.0	223.9 ± 7.4	229.9 ± 6.4	236.4 ± 5.8
M	8	209.5 ± 4.8 **	217.3 ± 6.8 **	228.6 ± 8.6 **	237.9 ± 8.4 **	247.5 ± 7.1 **	256.8 ± 7.4 **
A	8	212.0 ± 4.5	224.2 ± 6.1	229.3 ± 7.6	235.6 ± 11.1	241.0 ± 15.3 Δ	250.4 ± 15.1 Δ

注:与 C 组同期比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 M 组同期比较, Δ $P < 0.05$

表 3 3 组 11、16 周龄大鼠 T 及 FINS 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	周龄	T(pg/mL)	FINS(mU/L)
C	8	11	745.43 ± 52.09	19.26 ± 1.26
		16	717.49 ± 35.30	22.52 ± 3.11
M	8	11	932.55 ± 47.77 *	38.42 ± 0.83 *
		16	1 011.11 ± 48.03 *	40.40 ± 5.86 *
A	8	11	947.13 ± 24.61	38.69 ± 1.10
		16	800.04 ± 44.01 ΔΔ	22.34 ± 1.10 ΔΔΔ

注:与 C 组同期比较, * $P < 0.01$;与 M 组同期比较, Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$;与本组治疗前比较, Δ $P < 0.01$

表 4 3 组 11、16 周龄大鼠 FBG 及 HOMR-IR 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	周龄	FBG(nmol/L)	HOMA-IR
C	8	11	6.20 ± 0.64	1.65 ± 0.15
		16	6.20 ± 0.97	1.80 ± 0.14
M	8	11	6.30 ± 0.48	2.36 ± 0.11 *
		16	6.29 ± 0.88	2.40 ± 0.14 *
A	8	11	6.50 ± 0.44	2.41 ± 0.07
		16	6.64 ± 0.34	1.88 ± 0.07 ΔΔ

注:与 C 组同期比较, * $P < 0.01$;与 M 组同期比较, Δ $P < 0.01$;与本组治疗前比较, Δ $P < 0.01$

计学意义($P > 0.05$),M 组 HOMA-IR 较 C 组显著升高($P < 0.01$)。16 周龄,A 组 HOMA-IR 明显低于治疗前及 M 组水平($P < 0.01$)。

5 3 组大鼠卵巢组织切片观察比较(图 1) C 组大鼠卵巢组织切片镜下可见多个黄体及不同阶段发育的卵泡,极少见囊性扩张卵泡,卵泡内颗粒细胞层数多为 8~9 层;M 组大鼠卵巢多囊样改变,可见囊状扩张卵泡,黄体数目显著减少,卵泡内颗粒细胞层数较 C 组减少;A 组大鼠卵巢组织镜下黄体数目较 M 组明显增多,卵泡内颗粒细胞层数较 M 组增加,囊性卵泡减少。

6 3 组大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2 mRNA 及蛋白表达比较(表 5、6,图 2) M 组大鼠卵巢组织 Bax 蛋白及 mRNA 表达、Bax/Bcl-2 比值高于 C 组,Bcl-

2 蛋白及 mRNA 低于 C 组($P < 0.05$, $P < 0.01$);A 组 Bax 蛋白及 mRNA 表达及 Bax/Bcl-2 比值均低于 M 组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

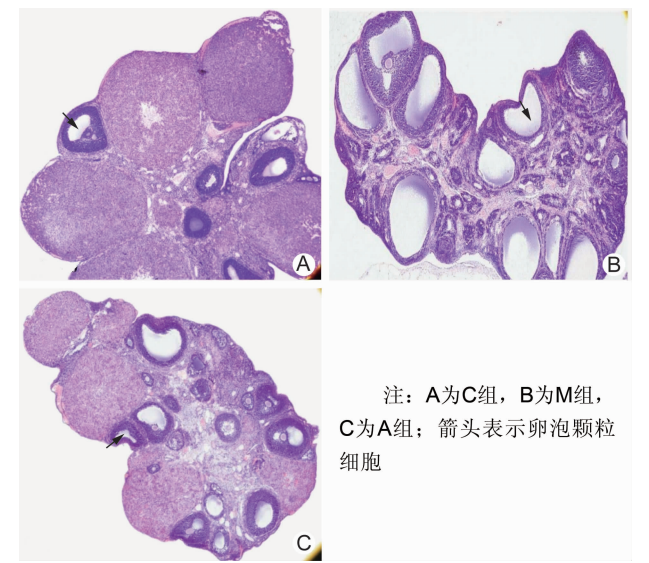


图 1 3 组大鼠卵巢组织切片观察比较 (HE 染色, ×40)

表 5 3 组大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

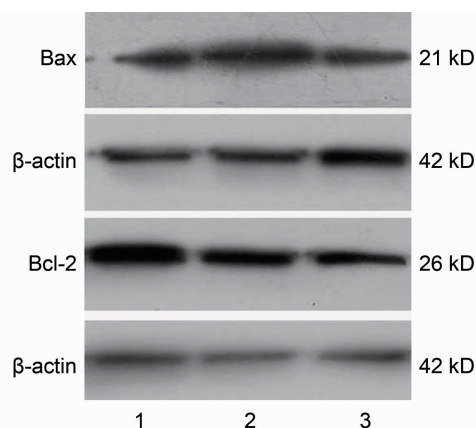
组别	n	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA
C	8	1	1
M	8	8.32 ± 0.54 **	0.03 ± 0.01 *
A	8	2.55 ± 0.90 Δ	0.09 ± 0.30

注:与 C 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 M 组比较, Δ $P < 0.05$

表 6 3 组大鼠卵巢 Bax、Bcl-2 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
C	8	1.15 ± 0.01	1.54 ± 0.02	0.75 ± 0.02
M	8	1.94 ± 0.01 *	1.01 ± 0.02 *	1.92 ± 0.05 *
A	8	1.09 ± 0.03 Δ	1.04 ± 0.02	1.06 ± 0.05 Δ

注:与 C 组比较, * $P < 0.01$;与 M 组比较, Δ $P < 0.01$



注:1 为 C 组;2 为 M 组;3 为 A 组

图2 3 组大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达电泳图

讨 论

PCOS 是一种常见的女性内分泌、代谢失调性疾病,需要长期治疗。针灸可以通过刺激机体的经络腧穴,调节经络,影响机体气血的运行,对脏腑器官的生理功能的发挥和病理状态的改善起到一定程度的治疗效果。研究发现给予 PCOS 模型大鼠反复的 2 Hz 电针刺激,可能产生类似锻炼的肌肉反复收缩,激活生理进程,使骨骼肌葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 表达增强,令正常的胰岛素敏感性恢复,改善 IR^[10]。针刺大鼠腹部、骶部和后肢,刺激与卵巢和子宫相同的周围神经支配区域^[11],借由卵巢交感神经介导的反射调节与由脊髓途径控制的反射调节,改善卵巢及子宫功能。文献研究显示:针灸治疗 PCOS 的主穴所属经脉频次排在前 3 位的依次为任脉、足太阴脾经、足阳明胃经^[12]。本实验同时参考 Victorin ES 等^[9]的选穴组方,选取中脘穴、关元穴、三阴交穴、后三里穴及骶部后会穴两旁作为针刺穴位。为观察单纯针刺的治疗效果,对模型组和针刺组在整个实验阶段维持高糖脂饲料喂养,以不改变饮食规律的前提下,进行干预。

雄激素为雌激素提供必要的前体,一定程度的升高可以增加卵泡的募集,但雄激素水平过度升高则会引起卵泡闭锁,导致不排卵。前期细胞研究亦证实高浓度雄激素环境下颗粒细胞将发生凋亡^[13],可能导致其雄激素不能转化为雌激素,导致卵巢微环境恶化。孙洁等^[14]发现通过电针刺激后 PCOS 大鼠,其卵泡颗粒细胞层中雄激素向雌激素转化的最后一步限速酶 P450arom 表达增强,卵泡颗粒层细胞增生,细胞内线粒体增多和线粒体嵴渐趋正常。本实验结束时,A 组 T 浓度仍高于 C 组的水平,但已明显低于 M 组,而连续 3 周阴道涂片显示,A 组 8 只大鼠中的 5 只逐渐

恢复规律的动情周期改变。卵巢组织切片 HE 染色亦显示,颗粒细胞层增厚,有多个黄体形成,已存在排卵。肥胖是加重 IR 的重要因素,肥胖导致各种病因引发不孕的主要原因^[15]。低频电针通过控制体重增长,减少内脏脂肪的聚积,有助于提高胰岛素敏感性和改善糖耐量受损。本在实验研究结束时,A 组大鼠体重已经显著低于 M 组。已经证实减重可以改善胰岛素敏感性,体重减轻 2% ~ 5% 可恢复排卵^[16]。

颗粒细胞凋亡异常增加可能是导致 PCOS 发病的原因之一,有研究通过直接获取 PCOS 患者的卵巢颗粒细胞,采用流式细胞技术和免疫荧光技术进行研究,发现 PCOS 患者颗粒细胞凋亡率高于对照组^[17]。研究发现 Bcl-2 在 PCOS 模型组和正常组大鼠卵巢的各级卵泡的颗粒细胞的胞浆表达,模型组卵泡颗粒细胞中 Bcl-2 蛋白表达降低^[8],另有研究也证实 Bcl-2 和 Bax 主要位于 PCOS 模型组和正常组大鼠卵巢的窦卵泡颗粒细胞中,PCOS 模型组 Bax 表达明显高于正常组^[18]。Bcl-2 家族包含了两类功能相反的亚群:一类参与抑制细胞凋亡,如 Bcl-2,具有抗细胞凋亡的功能,可以作为半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 的直接底物作用于 Caspase-3 的下游,通过阻断 Caspase 的激活而抗凋亡,延长细胞寿命^[19];另一类则促进细胞凋亡,如 Bax,其与 Bcl-2 为同源的相关蛋白,但具有对抗 Bcl-2 的生物学活性。当细胞中以 Bcl-2 为主导时,Bcl-2 与 Bax 结合的异源二聚体相对增多,对应 Bax 形成的同源二聚体减少,引起细胞增殖;反之,当 Bax 占主导时,则启动细胞凋亡。因此 Bax/Bcl-2 比值最终决定细胞是否进入凋亡程序。正常状态下 Bax/Bcl-2 比值接近 1.0,不启动凋亡,比值增大,就会启动细胞凋亡。虽然,本实验中 A 组大鼠具有抗凋亡作用 Bcl-2 mRNA 及其蛋白明显低于 C 组,但 Bax/Bcl-2 比值和 Bax mRNA 及蛋白表达明显低于 M 组。因此单纯针刺可能并不通过增强抗凋亡因子 Bcl-2 mRNA 及其蛋白表达,来改变以颗粒细胞为主的细胞凋亡过程,而更倾向于抑制 Bax mRNA 及其蛋白表达,降低 Bax/Bcl-2 比值,调整卵巢细胞增殖凋亡过程,改善卵巢微环境,优化卵泡选择,使卵泡的正常发育成熟过程得到恢复。

综上,本研究采用睾酮注射配合高脂饲料喂养制作 PCOS 模型大鼠,以低频电针进行干预,结果显示电针能够控制体重增长,降低 T,下调 FINS,改善 IR。并能降调大鼠卵巢组织 Bax mRNA 及蛋白表达和降低 Bax/Bcl-2 比值,改善卵巢局部微环境,促进黄体生成,恢复正常排卵周期。

参 考 文 献

- [1] Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(2): 456–488.
- [2] Stepto NK, Cassar S, Joham AE, et al. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp[J]. *Human Reproduction*, 2013, 28(3): 777–784.
- [3] 李静, 崔薇, 孙伟, 等. 电针对多囊卵巢综合征大鼠干细胞因子及肿瘤坏死因子- α 表达的调节[J]. *中国中医药信息杂志*, 2012, 19(12): 26–28.
- [4] 赖毛华, 马红霞, 郑艳华, 等. PCOS-IR 大鼠动物模型的构建与评价[J]. *云南中医中药杂志*, 2014, 35(9): 69–71.
- [5] Zhai HL, Wu H, Xu H, et al. Trace glucose and lipid metabolism in high androgen and high-fat diet induced polycystic ovary syndrome rats[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012, 10: 5.
- [6] Johansson J, Redman L, Veldhuis PP, et al. Acupuncture for ovulation induction in polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 304(9): 934–943.
- [7] 郑艳华, 丁涛, 叶丹凤, 等. 低频电针对多囊卵巢综合征大鼠糖代谢及氧化应激的影响[J]. *针刺研究*, 2015, 40(2): 125–130.
- [8] 刘秀兰, 杨宏新, 王妍, 等. 凋亡调控蛋白 bcl-2、caspase-3 在大鼠多囊卵巢颗粒细胞中的表达及生物学意义[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2015, 37(1): 10–14.
- [9] Victorin ES, Fujisawa S, Kurosawa M. Ovarian blood flow responses to electroacupuncture stimulation depend on estrous cycle and on site and frequency of stimulation in anesthetized rats[J]. *J Appl Physiol*, 2006, 101(1): 84–91.
- [10] Johansson JL, Feng Y, Shao RJ, et al. Intense electroacupuncture normalizes insulin sensitivity, increases muscle GLUT4 content, and improves lipid profile in a rat model of polycystic ovary syndrome[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(4): E551–E559.
- [11] Mitwally MF, Casper RF. Aromatase inhibition reduces the dose of gonadotropin required for controlled ovarian hyperstimulation[J]. *J Soc Gynecol Investig*, 2004, 11(6): 406–415.
- [12] 金春兰, 庞然, 徐立鹏, 等. 针灸治疗多囊卵巢综合征临床选穴组方规律[J]. *中国针灸*, 2015, 35(6): 625–630.
- [13] 郑艳华, 丁涛, 叶丹凤, 等. 高浓度雄激素环境对猪卵巢颗粒细胞分泌功能和增殖及分化的影响[J]. *广东医学*, 2012, 33(10): 3046–3050.
- [14] 孙洁, 赵继梦, 季蓉, 等. 电针对多囊卵巢综合征大鼠卵巢高雄激素症的影响[J]. *针刺研究*, 2013, 38(6): 465–471.
- [15] Talmor A, Dunphy B. Female obesity and infertility[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2015, 29(4): 498–506.
- [16] Corbould A, Zhao H, Mirzoeva S, et al. Enhanced mitogenic signaling in skeletal muscle of women with polycystic ovary syndrome[J]. *Diabetes*, 2006, 55(3): 751–759.
- [17] Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms[J]. *Hum Reprod Update*, 2005, 11(2): 162–177.
- [18] Bas D, Abramovich D, Hernandez F, et al. Altered expression of Bcl-2 and Bax in follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats[J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(5): 423–429.
- [19] Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(4): 437–441.

(收稿: 2016-02-19 修回: 2017-10-15)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶