

· 基础研究 ·

左归丸对大鼠卵巢血管生成与胎盘生长因子、
肝细胞生长因子及其受体关系的影响

唐立明 段 恒 肖彩仙 魏小晶

摘要 目的 观察左归丸对初老大鼠卵巢中胎盘生长因子 (PLGF) 及酪氨酸激酶受体 (Flt-1) 和肝细胞生长因子 (HGF) 及间质上皮细胞转化因子 (c-Met) 受体表达的影响。**方法** 初老大鼠 40 只按随机数字表法分为模型组、结合雌激素组、左归丸 11、33 g/kg 剂量组, 每组 10 只, 另取 10 只 4 月龄大鼠作为正常对照组。正常对照组以蒸馏水 20 g/kg 灌胃; 结合雌激素组灌胃 65 μ g/kg 结合雌激素混悬液; 左归丸 11、33 g/kg 组分别灌胃左归丸浸膏 11、33 g/kg, 1 次/天, 连续 20 天; 观察大鼠生殖器官形态学变化, 计算卵巢、子宫、阴道脏器指数, 采用免疫组化法及 Western Blot 法检测大鼠卵巢 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白表达水平, 原位杂交技术检测 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met mRNA 表达水平, ELISA 法检测雌二醇 (E_2)、孕激素 (P)、促卵泡生成激素 (FSH) 水平。**结果** 与正常对照组比较, 模型组大鼠生长卵泡数、黄体数、血管数更少, 闭锁卵泡数多, 卵巢、子宫、阴道指数及 E_2 、P 含量明显降低, FSH 含量明显升高, 大鼠卵巢 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白及 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 左归丸 11、33 g/kg 组及结合雌激素组的生长卵泡数、黄体数、血管数增多, 闭锁卵泡数明显减少, 卵巢指数、子宫指数、阴道指数及 E_2 、P 水平明显升高, FSH 水平明显降低, PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白及 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与结合雌激素组比较, 左归丸 33 g/kg 组 E_2 、P 升高 ($P < 0.05$), 左归丸 11、33 g/kg 组中生长卵泡数、黄体数、血管数更少, 闭锁卵泡数更多, 卵巢、子宫、阴道指数, FSH 水平, PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白及 mRNA 水平比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与左归丸 11 g/kg 组比较, 左归丸 33 g/kg 组生长卵泡数、黄体数、血管数增多, 闭锁卵泡数减少, 卵巢、子宫、阴道指数及 E_2 、P 水平均有所上升, FSH 水平下降, PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白及 mRNA 水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 左归丸可能通过上调 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白及 mRNA 水平, 促进初老大鼠卵巢血管生成, 进而改善大鼠卵巢功能, 且高剂量优于低剂量。

关键词 左归丸; 血管生成; 胎盘生长因子; 胎盘生长因子受体; 肝细胞生长因子; 肝细胞生长因子受体

Effect of Zuogui Pill on the Relationships between Ovarian Angiogenesis and Placental Growth Factor/Hepatocyte Growth Factor and Its Receptors in Rats TANG Li-ming, DUAN Heng, XIAO Cai-xian, and WEI Xiao-jing College of Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing (400016)

ABSTRACT Objective To observe effects of Zuogui Pill (ZGP) on the expressions of placental growth factor (PLGF), fms-like tyrosine kinase 1 (Flt-1) receptor, hepatocyte growth factor (HGF) and cellular-mesenchyma epithelial transition factor (c-Met) receptor. **Methods** Early-aged rats were randomly divided into the model group, conjugated estrogen group, low and high dose ZGP groups, 10 in each group. Other 10 4-month-old rats were selected as the normal control group and the model group. Rats in the normal control group were administered with distilled water (20 g/kg) by gastrogavage. Rats in conjugated estrogen group were administered with conjugated estrogen suspension (65 μ g/kg) by gastrogavage. Rats in low and high dose ZGP were administered with ZGP extract (11

基金项目: 重庆市科委基础科学与前沿技术研究项目 (No.cstc2017jcyjAX0350)

作者单位: 重庆医科大学中医药学院 (重庆 400016)

通讯作者: 段 恒, Tel: 023-65712062, E-mail: 404634014@qq.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20211011.368

g/kg and 33 g/kg) by gastrogavage. All administration was performed once per day for 20 successive days. The morphological changes of reproductive organs of rats were observed. The visceral indices of ovary, uterus, and vagina were calculated. Immunobiological method and Western Blot were used to detect the protein levels of PLGF, Flt-1, HGF, and c-Met in rats. Expression levels of PLGF, Flt-1, HGF, and c-Met mRNA were detected by in situ hybridization. ELISA was used to detect the levels of estrogen (E_2), progesterone (P), and follicular stimulating hormone (FSH). **Results** Compared with the normal control group, the numbers of growing follicles at each level, corpus luteum, and blood vessels were the least in the model group, more numbers of atresia follicles were seen. The indices of ovary, uterine, and vagina were significantly reduced. The contents of E_2 and P in the model group significantly decreased. FSH content significantly increased. In the model group, the protein and mRNA levels of PLGF, Flt-1, HGF, and c-Met in the ovary of rats were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the model group, the numbers of growing follicles at each level, corpus luteum, and blood vessels increased, numbers of atresia follicles obviously decreased. The indices of ovary, uterine, and vagina significantly increased. The contents of E_2 and P significantly increased. FSH content significantly decreased in conjugated estrogen group, low and high dose ZGP groups. The protein and mRNA levels of PLGF, Flt-1, HGF, and c-Met significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with conjugated estrogen group, contents of E_2 and P were elevated in high dose ZGP groups, The numbers of growing follicles at each level, corpus luteum, and blood vessels were the least and numbers of atresia follicles were the most in high and low dose ZGP groups. There were no statistical differences in indices of ovary, uterine, or vagina, FSH level, protein and mRNA levels of PLGF, Flt-1, HGF, or c-Met ($P > 0.05$). Compared with low dose ZGP group, the numbers of growing follicles at each level, corpus luteum, and blood vessels increased, numbers of atresia follicles decreased, indices of ovary, uterine, or vagina, contents of E_2 and P increased, FSH level decreased, protein and mRNA levels of PLGF, Flt-1, HGF, and c-Met increased in high dose ZGP group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** ZGP promoted ovarian angiogenesis in pre-aged rats possibly through up-regulating protein and mRNA levels of PLGF, Flt-1, HGF, and c-Met, thereby improving ovarian function in rats. Better effects were obtained in high dose ZGP group than in low dose ZGP group.

KEYWORDS Zuogui Pill; angiogenesis; placental growth factor; placental growth factor receptor; hepatocyte growth factor; hepatocyte growth factor receptor

卵巢功能衰退导致生育能力下降和性激素匮乏,是卵巢早衰中、青年女性和老年女性面临的主要问题^[1],近年来因卵巢功能低下就诊的患者呈逐年上涨趋势,因此保护和提高卵巢功能成为一个日渐被重视的医学和社会问题。目前针对卵巢功能衰退的治疗主要为雌激素替代疗法,但长期使用激素会增加罹患子宫内膜癌和乳腺癌的风险^[2],中药对于治疗因生殖功能衰退引起的阴道萎缩具有不良反应小、疗效稳定的优势^[3]。本实验从中医学理论出发,旨在探讨左归丸改善卵巢功能下降的作用机制。左归丸出自《景岳全书》^[4],由熟地、山药、山茱萸、枸杞子、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟板胶几味药材组成,功善补肝肾精血。有研究显示,胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF)及酪氨酸激酶(fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1)受体及肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和间质上皮细胞转化因子(cellular - mesenchymal epithelial transition factor,

c - Met)受体对血管生成具有重要作用,且在雌性动物生殖系统有分布^[5,6];左归丸延缓雌性自然衰老大鼠生殖器官血管衰老与 PLGF、HGF 及其受体关系的研究目前尚未见报道。前期研究发现,左归丸可以促进初老大鼠卵巢血管生成及维持卵泡发育,血管生成对卵巢生理功能具有重要作用^[7],为进一步了解左归丸促进血管生成的机制,本研究以初老大鼠为模型,观察左归丸对大鼠卵巢 PLGF、Flt-1 及 HGF、c-Met 蛋白和基因表达的影响。

材料与方 法

1 动物 SPF级雌性SD大鼠40只,10~12月龄,体重(310±20)g;青年大鼠10只,4~6月龄,体重(230±20)g,由重庆医科大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(渝)2012-0001。本动物实验过程中严格遵守动物福利原则,并经重庆医科大学中医药学院伦理委员会批准(No.2021-11-18)。

2 药物 左归丸浸膏(含生药 1.75 g/mL),由重庆医科大学中医药学院中药教研室提供,重庆医科大学中医药学院费耀副教授根据 2015 版《中国药典》鉴定;倍美力结合雌激素片(0.625 mg/片,爱尔兰惠氏药厂生产,批号:20181102)。

3 仪器及试剂 T-10 匀浆机(德国 KA 公司),1-14K 低温高速离心机(美国 Sigma),MINI 蛋白电泳转印系统(美国 BioRad),IX73 荧光显微镜(日本 Olympus),正置显微镜(日本 Olympus)。快速瑞士染色剂购自于南京建成科技公司,兔抗 PLGF、兔抗 Flt-1、兔抗 HGF 购自于美国 Affinity 公司,兔 SP 免疫组化试剂盒、DAB 显示剂购自于北京中杉金桥;兔抗 c-Met 购自于武汉三鹰公司,原位杂交试剂盒购自于武汉博士德生化科技有限公司,雌二醇(estradiol, E₂) ELISA 试剂盒、孕激素(progesterone, P) ELISA 试剂盒、促卵泡生成激素(follicle-stimulating hormone, FSH) ELISA 试剂盒购自于武汉优尔生公司。

4 造模及干预方法 按大鼠更年期实验模型研究方法造模^[8],将 SD 初大鼠按随机数字表法分为模型组、结合雌激素组、左归丸 11 g/kg 组、左归丸 33 g/kg 组,每组各 10 只;另取 10 只 4 月龄大鼠作为正常对照组。模型组和正常对照组灌胃蒸馏水,20 g/kg 结合雌激素组灌胃,65 μg/kg(相当于成人剂量的 6.25 倍)结合雌激素混悬液,左归丸 11、33 g/kg 组分别灌胃 11、33 g/kg(分别相当于成人剂量的 18.75 倍)左归丸浸膏,1 天 1 次,连续 20 天,药物剂量的换算参考《药理实验方法学》^[9]中人和动物间按体表面积折算的等效剂量法。

5 观察指标及检测方法

5.1 生殖器官指数测定 末次给药后 24 h 处死大鼠,即刻摘除卵巢、子宫、阴道组织,滤纸擦拭后置电子天平中称湿重,计算脏器指数,脏器指数 = 脏器质量 / 体重 × 100%。

5.2 PLGF、HGF 及其受体免疫组织化学检测 严格按照说明书步骤操作检测各组 PLGF、HGF 及其受体蛋白表达。实验结果判定:光镜下观察,每张切片至少观察 5 个高倍视野(×400),显微镜下采图,并采用 Imager-ProPlus 6.0 分析软件对 PLGF、HGF 及其受体蛋白进行分析,测量各片染色阳性细胞的平均光密度值。

5.3 PLGF、HGF 及其受体蛋白表达水平的 Western Blot 检测 将剪碎的大鼠卵巢组织加入 RIPA 组织细胞裂解液,12 000 r/min,离心 20 min,

取上清,完成蛋白提取。BCA 蛋白浓度试剂盒检测蛋白浓度。按试剂说明书加入蛋白上样缓冲液,取 50 μg 蛋白样品,进行 SDS-PAGE 电泳分离,250 mA 恒流电转,用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 冲洗 3 次,加入稀释的 PLGF(1:100)、Flt-1(1:1 000)、HGF(1:1 000)、c-Met(1:500),4 ℃ 冰箱孵育过夜;洗膜 3 次;加二抗,室温 1 h,洗膜 3 次。用 ECL 试剂盒曝光、显影、定影,于 Odyssey FC 近红外双色激光和化学发光双功能成像系统下成像,Image J 软件分析条带相对灰度值。

5.4 血清 E₂、P、FSH 水平检测 采用 ELISA 法。新鲜血液室温静置 30 min,3 000 r/min,离心 15 min,取上清液测定血清 E₂、P、FSH 水平,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

5.5 卵巢组织中 PLGF、HGF 及其受体 mRNA 表达水平 采用原位杂交技术检测。严格按照说明书步骤操作检测各组 PLGF、HGF 及其受体 mRNA 水平。实验结果判定:光镜下观察,每张切片至少观察 5 个高倍视野(×400),显微镜下采图,并采用 Imager-ProPlus 6.0 分析软件对 PLGF、HGF 及其受体 mRNA 表达进行分析,测量各片染色阳性细胞的平均光密度值。

6 统计学方法 采用统计软件 SPSS 17.0 进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布同时满足方差齐性,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 动物一般情况 正常对照组大鼠发育正常,行动灵活,毛发浓密有光泽;模型组大鼠精神差,喜静恶动,饮食量减少,毛发粗糙欠光泽;左归丸 33、11 g/kg 组及结合雌激素组大鼠上述体征与模型组比较,精神状态变好,饮食量增加,毛发变光泽,左归丸 33 g/kg 组、结合雌激素组大鼠在精神、饮食量、毛发等方面效果最明显。

2 各组大鼠生长卵泡数、黄体数、血管数、闭锁卵泡数比较(表 1) 与正常对照组比较,模型组的生长卵泡数、黄体数、血管数明显减少($P < 0.05$),闭锁卵泡数明显增多($P < 0.05$);与模型组比较,左归丸 11、33 g/kg 组及结合雌激素组生长卵泡数、黄体数、血管数明显增多($P < 0.01$),闭锁卵泡数明显减少($P < 0.01$);与结合雌激素组比较,左归丸 11、33 g/kg 组差异均无统计学意义($P > 0.05$);与左归丸

11 g/kg 组比较, 左归丸 33 g/kg 组生长卵泡数、黄体数、血管数增多 ($P<0.05$), 锁卵泡数减少 ($P<0.05$)。

3 各组大鼠卵巢、子宫、阴道指数比较 (表 2) 与正常对照组比较, 模型组卵巢、子宫、阴道指数均明显降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 左归丸 11、33 g/kg 组、结合雌激素组生殖器官指数均升高 ($P<0.05, P<0.01$); 与结合雌激素组比较, 左归丸 11、33 g/kg 组差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 与左归丸 11 g/kg 组比较, 左归丸 33 g/kg 组卵巢、子宫、阴道指数均升高 ($P<0.05$)。

4 各组大鼠血清性激素水平比较 (表 3) 与正常对照组比较, 模型组 E_2 、P 含量明显降低 ($P<0.01$), FSH 含量明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 左归丸 11、33 g/kg 组及结合雌激素组中 E_2 、P 水平明显升高 ($P<0.05, P<0.01$), FSH 水平明显降低 ($P<0.01$); 与结合雌激素组比较, 左归丸 33 g/kg 组 E_2 、P 含量升高 ($P<0.05$); 与左归丸 11 g/kg 组比较, 左归丸 33 g/kg 组 E_2 、P 含量升高 ($P<0.05$), 降低 FSH 水平 ($P<0.05$)。

5 各组大鼠 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白表达水平比较 (图 1, 表 4) 正常对照组卵

巢组织中 PLGF、Flt-1 阳性染色多见于卵泡颗粒细胞、卵泡膜细胞、黄体细胞及间质细胞, 在卵泡颗粒细胞中分布较多, HGF 在卵巢的上皮细胞、内膜细胞、间质细胞、颗粒细胞中高度表达, c-Met 多表达于上皮细胞, 在正常大鼠卵巢组织中免疫反应最强, 呈大面积深棕色颗粒。与正常对照组比较, 模型组中大鼠卵巢 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白水平显著降低 ($P<0.01$), PLGF、Flt-1、HGF 表达极少, 几乎不表达, c-Met 少量表达于上皮细胞; 与模型组比较, 左归丸 11、33 g/kg 组 PLGF、Flt-1 阳性染色多见于卵泡颗粒细胞、卵泡膜细胞及间质细胞 ($P<0.01$); 结合雌激素组 PLGF、HGF 及其受体主要表达于卵泡颗粒细胞, 免疫反应阳性面积增大, 光密度值较高 ($P<0.01$); 与结合雌激素组比较, 左归丸 11、33 g/kg 组差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 与左归丸 11 g/kg 组比较, 左归丸 33 g/kg 组卵巢 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白水平表达均有所上升 ($P<0.05$)。

6 各组大鼠 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met mRNA 表达水平比较 (图 2, 表 5) 与正常对照组比较, 模型组大鼠卵巢中 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met mRNA

表 1 各组大鼠生长卵泡数、黄体数、血管数、闭锁卵泡数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	生长卵泡数	黄体数	血管数	闭锁卵泡数
正常对照	10	13.70 ± 1.71	12.80 ± 1.53	33.71 ± 2.53	1.12 ± 0.80
模型	10	3.62 ± 0.82*	5.03 ± 1.41*	14.62 ± 1.60*	7.42 ± 1.01*
结合雌激素	10	10.21 ± 0.72 [△]	10.32 ± 1.21 [△]	30.02 ± 1.21 [△]	2.31 ± 1.02 [△]
左归丸 11 g/kg	10	4.74 ± 1.34 [△]	6.50 ± 0.82 [△]	21.02 ± 2.53 [△]	5.91 ± 0.72 [△]
左归丸 33 g/kg	10	8.41 ± 2.11 ^{△▲}	8.40 ± 1.22 ^{△▲}	27.52 ± 1.33 ^{△▲}	4.21 ± 1.53 ^{△▲}

注: 与正常对照组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.01$; 与左归丸 11 g/kg 组比较, [▲] $P<0.05$

表 2 各组大鼠卵巢、子宫、阴道指数比较 (mg/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	卵巢指数	子宫指数	阴道指数
正常对照	10	0.372 ± 0.040	2.023 ± 0.221	0.048 ± 0.008
模型	10	0.174 ± 0.040*	1.064 ± 0.197*	0.014 ± 0.003*
结合雌激素	10	0.312 ± 0.060 ^{△△}	1.944 ± 0.252 ^{△△}	0.025 ± 0.005 ^{△△}
左归丸 11 g/kg	10	0.217 ± 0.030 [△]	1.833 ± 0.294 [△]	0.017 ± 0.005 [△]
左归丸 33 g/kg	10	0.294 ± 0.040 ^{△△▲}	1.886 ± 0.221 ^{△△▲}	0.023 ± 0.003 ^{△△▲}

注: 与正常对照组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$; 与左归丸 11 g/kg 组比较, [▲] $P<0.05$

表 3 各组大鼠血清性激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E_2 (pg/mL)	P (ng/mL)	FSH (ng/mL)
正常对照	10	20.61 ± 0.91	12.39 ± 1.32	12.51 ± 0.83
模型	10	11.32 ± 1.10*	6.40 ± 1.11*	21.30 ± 1.40*
结合雌激素	10	18.37 ± 0.92 [△]	11.35 ± 1.72 [△]	15.77 ± 0.80 [△]
左归丸 11 g/kg	10	16.60 ± 1.11 [△]	7.30 ± 0.50 [△]	19.02 ± 0.72 [△]
左归丸 33 g/kg	10	17.55 ± 0.70 ^{△▲}	8.46 ± 1.72 ^{△▲○}	18.85 ± 1.21 ^{△○}

注: 与正常对照组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.05$; 与结合雌激素组比较, [▲] $P<0.05$, ^{▲▲} $P<0.01$; 与左归丸 11 g/kg 组比较, [○] $P<0.05$

表 4 各组大鼠卵巢 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

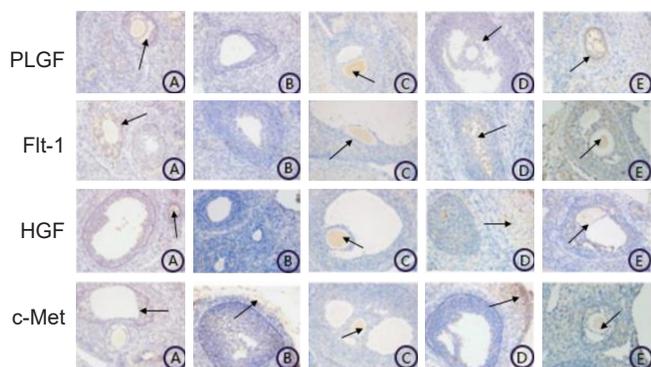
组别	n	PLGF	Flt-1	HGF	c-Met
正常对照	10	90.17 ± 1.10	66.11 ± 1.50	65.15 ± 1.62	72.05 ± 1.61
模型	10	45.04 ± 1.61*	13.01 ± 1.09*	25.01 ± 1.41*	24.02 ± 1.32*
结合雌激素	10	71.39 ± 1.42 ^{△△}	53.44 ± 1.13 ^{△△}	42.92 ± 1.53 ^{△△}	52.07 ± 1.11 ^{△△}
左归丸 11 g/kg	10	50.53 ± 2.11 [△]	39.15 ± 1.92 [△]	29.06 ± 1.10 [△]	32.44 ± 1.41 [△]
左归丸 33 g/kg	10	60.61 ± 0.90 ^{△△△}	49.01 ± 1.44 ^{△△△}	36.14 ± 1.22 ^{△△△}	47.05 ± 1.24 ^{△△△}

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与左归丸 11 g/kg 组比较,[△] $P < 0.05$

表 5 各组大鼠卵巢 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PLGF	Flt-1	HGF	c-Met
正常对照	10	180.67 ± 1.21	80.14 ± 1.61	120.45 ± 1.50	146.05 ± 1.61
模型	10	80.64 ± 1.70*	20.07 ± 1.19*	47.01 ± 1.43*	76.02 ± 1.30*
结合雌激素	10	168.37 ± 1.51 ^{△△}	76.44 ± 1.30 ^{△△}	112.32 ± 1.62 ^{△△}	122.07 ± 1.35 ^{△△}
左归丸 11 g/kg	10	100.73 ± 2.10 [△]	48.45 ± 1.70 [△]	76.06 ± 1.30 [△]	89.44 ± 1.62 [△]
左归丸 33 g/kg	10	146.41 ± 1.12 ^{△△△}	65.01 ± 1.71 ^{△△△}	96.14 ± 1.32 ^{△△△}	104.05 ± 1.40 ^{△△△}

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与左归丸 11 g/kg 组比较,[△] $P < 0.05$

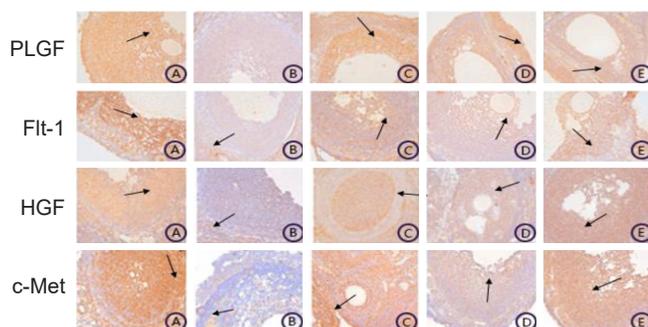


注: A 为正常对照组; B 为模型组; C 为结合雌激素组; D 为左归丸 11g/kg 组; E 为左归丸 33g/kg 组; 箭头所指为阳性反应区域

图 1 各组大鼠卵巢 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白水平比较 (免疫组化, ×400)

表达明显减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 结合雌激素组、左归丸 11、33 g/kg 组大鼠卵巢中 PLGF 主要表达于卵泡膜细胞, Flt-1、HGF、c-Met mRNA 主要表达于颗粒细胞, 表达量明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与结合雌激素组比较, 左归丸 11、33 g/kg 组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与左归丸 11 g/kg 组比较, 左归丸 33 g/kg 组卵巢 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met mRNA 水平表达均有所上升 ($P < 0.05$)。

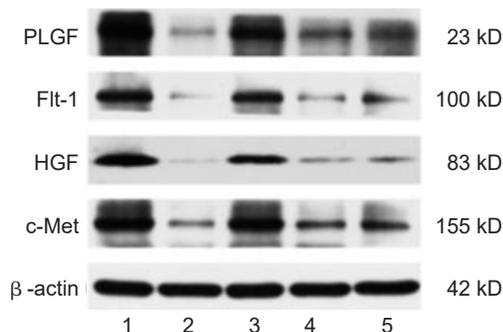
7 各组大鼠卵巢 PLGF、HGF 及其受体蛋白水平比较 (图 3) Western Blot 显示, 与免疫组化染色结果一致, 与正常对照组比较, 模型组卵巢组织中 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白含量最低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 结合雌激素组、左归丸 33、11 g/kg 组中卵巢组织蛋白浓度升高 ($P < 0.01$); 与左归丸 11 g/kg 组比较, 左归丸 33 g/kg 组卵巢



注: A 为正常对照组; B 为模型组; C 为结合雌激素组; D 为左归丸 11 g/kg 组; E 为左归丸 33 g/kg 组; 箭头所指为阳性反应区域

图 2 各组大鼠卵巢 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met mRNA 水平比较 (原位杂交, ×400)

PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 的蛋白水平表达均有所上升 ($P < 0.05$)。



注: 1 为正常对照组; 2 为模型组; 3 为结合雌激素组; 4 为左归丸 11g/kg 组; 5 为左归丸 33g/kg 组

图 3 各组大鼠卵巢 PLGF、Flt-1、HGF、c-Met 蛋白电泳图

讨论

《素问·上古天真论》揭示了“生殖功能衰退”

与肾精亏虚,天癸枯竭有关,奠定了中医学对卵巢功能衰退的理论基础^[10],补肾填精是治疗卵巢功能衰退的常用方法^[9]。左归丸由熟地、山药、山茱萸、枸杞子、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟板胶组成,君药熟地补肾气,能激发生殖的生长发育的功能,臣药枸杞子,补肾之精血,鹿角胶、龟板胶为血肉有情之品,峻补精髓,牛膝、山茱萸补肝肾;在卵泡发育,尤其是多个卵泡发育时,卵巢需要丰富的血供,左归丸能够针对性的补肾阴,调节人体的生殖功能,为卵泡的发育提供丰富的物质基础^[12]。有研究发现,左归丸在防治女性生殖功能退化性疾病方面效果较好^[13,14],现代药理学也证实左归丸各味药具有抗氧化、延缓衰老、雌激素样增加生殖器官重量等改善卵巢内分泌的药理作用^[15,16]。本课题组前期研究证实左归丸可以通过促进卵巢血管生成、从而改善卵巢功能^[17]。本研究发现,左归丸可以促进大鼠卵巢血管生成以及维持卵泡发育,减少闭锁卵泡的形成,从而改善卵巢功能。

卵巢是血管生成最活跃的生殖器官,其生理功能的正常发挥离不开丰富的血流供应,如果卵巢内部血液循环障碍,导致卵巢缺血,最终会导致卵巢功能衰退,因此,可从血管生成方面来研究卵巢功能的问题。PLGF 作为血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 家族成员之一,与生殖器官血管生成密切相关^[2,18],有研究发现,在人卵泡液中已经检测到 VEGF 的存在,与卵泡膜血管生成关系密切^[19],作为 VEGF 的同源基因,PLGF 也有可能参与卵泡膜血管生成;有学者在女性卵巢组织中检测到有 PLGF 及其受体 Flt-1 的表达,并具有促进卵巢血管生成的作用^[20,21]。Flt-1 是细胞外基质的组成部分,可引起血管内皮细胞黏附和迁移,在血管生成中发挥特有作用,当 PLGF 与 Flt-1 特异性结合后可以促进血管内皮细胞增殖,活化血管内皮细胞,促使卵泡新生血管的形成^[22]。相关研究认为,PLGF 在维持血管正常化方面发挥重要作用,除了直接作用刺激血管生成外,PLGF 也可能通过募集非血管细胞从而间接影响血管内皮细胞的反应性。此外,PLGF 还是多效的细胞因子,能够刺激血管形成,刺激内皮细胞生长、迁移、存活,缺血组织血管再通^[22]。

HGF 为间质来源多效性生长因子,与其受体 c-Met 特异性结合后具有广泛生物学功能,能够调控性腺发育以及生殖细胞的增殖,促进血管内皮细胞的增殖和侵袭,在卵巢的上皮细胞、内膜细胞、间质细胞、颗粒细胞中都有表达^[23-26],HGF 和 c-Met 可同

时促进卵巢膜细胞和颗粒细胞的形成,通过旁分泌或自分泌机制,借助上皮间质的相互作用,在胚胎发生、创伤愈合、血管发生、组织器官再生、形态发生等方面发挥重要作用^[27]。其具备多种生理调节功能,如促进血管内皮细胞的生成,抑制细胞的凋亡,对胎盘滋养细胞、卵泡发生相关细胞、血管内皮细胞增殖有调节作用^[28]。HGF/c-Met 信号通路可能通过直接作用于血管内皮细胞调节血管形成、提高毛细血管密度及血流速度来影响损伤的修复,并影响胚胎的发育^[29,30]。哺乳动物卵巢组织的颗粒细胞不含血管,但是卵泡膜细胞含有丰富的血管,这些血管对卵泡的发育和卵巢功能具有重要作用。HGF 促血管生成活性方面比 VEGF 更强且更安全^[31,32],由此可见 HGF 及其受体对生殖功能的完善具有重要作用,对卵巢血管形成有重要意义。左归丸可调节初老大鼠模型外周血性激素含量,进而改善生殖功能。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 陈子江,田秦杰,乔杰,等.早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识[J].中华妇产科杂志,2017,52(9):577-581.
- [2] 吴笛,段恒.左归丸上调雷公藤多苷诱导卵巢功能低下大鼠卵巢 PLGF 及 Flt-1 水平[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2016,3(4):238-241.
- [3] 姚石安.卵巢早衰中医证治需注意哪些方面[J].中医杂志,1998,39(5):313.
- [4] 明·张介宾著.孙玉信,朱生平校注.景岳全书[M].广州:第二军医大学出版社,2006:220.
- [5] Wagatsuma S, Konno R, Sato S, et al. Tumor angiogenesis, hepatocyte growth factor, and c-Met expression in endometrial carcinoma[J]. Cancer, 1998, 82(3):520-530.
- [6] Starzinski-Powitz A, Zeit Vogel A, Schreiner A, et al. In search of pathogenic mechanisms in endometriosis: the challenge for molecular cell biology[J]. Curr Mol Med, 2001, 1(6):655-664.
- [7] 段恒,费耀.左归丸对雌性大鼠生殖器官组织形态学与血管生成的影响[J].中药材,2014,37(4):667-669.
- [8] 程化奇,熊舜华,殷新尤,等.大鼠更年期实验模型研究[J].上海实验动物科学,1993;13(4):192.
- [9] 徐叔云,卞如镰,陈修主编.药理实验方法学[M].第

- 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1861.
- [10] 陈玉梅, 余志惠, 黄桂花, 等. 补肾调肝方抗卵巢衰老机制的研究 [J]. 中国实用医药, 2013, 8 (6): 14-16.
- [11] 夏冬琴, 李荣亨. 中成药治疗女性更年期综合征综述 [J]. 实用中医药杂志, 2015, 31 (5): 468-470.
- [12] 段恒, 周滢. 左归丸对大鼠生殖器官组织形态学与血管生成的影响 [J]. 中药材, 2014, 34 (4): 676-678.
- [13] 雷美华. 左归丸合桃红四物汤加减联合治疗卵巢早衰的临床研究 [J]. 中国社区医师, 2017, 33 (7): 107-109.
- [14] 尹芳, 王璐, 金国琴. 左归丸的临床应用与实验研究进展 [J]. 江苏中医药, 2017, 49 (10): 82-85.
- [15] 佟雷, 刘金丽, 孙琳, 等. 左归丸及右归丸对卵巢早衰小鼠卵巢衰老的预防作用 [J]. 中成药, 2017, 39 (2): 260-265.
- [16] 胡青莲, 孙文君. 从卵泡凋亡的调节机制研究左归丸对免疫性卵巢早衰的治疗作用 [J]. 中医临床研究, 2018, 10 (19): 1-4.
- [17] 苏萍红. 左归丸治疗卵巢储备功能减退的方解及其药理研究 [J]. 光明中医, 2016, 31 (15): 2282-2283.
- [18] Torry DS, Mukherjea D, Arroyo J, et al. Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation [J]. J Soc Gynecol Investig, 2003, 10 (4): 178-188.
- [19] 王志强, 倪亚莉, 柴三明. 卵泡液促血管生成因子在卵泡发育中的作用的研究进展现代妇产科进展, [J]. 2014, 23 (10): 834-835.
- [20] 李瑞瑞, 郑曙民. 卵巢浆液性囊腺性肿瘤中胎盘生长因子的表达及其意义 [J]. 中国现代医生, 2019, 15 (4): 13-19.
- [21] 孟凡谋, 肖晓辉, 王月飞, 等. VEGF 受体 Flt-1, FkA1 在大鼠过度刺激卵巢的表达研究 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28 (9): 1045-1046.
- [22] Nejabati HR, Latifi Z, Ghasemnejad T, et al. Placental growth factor (PLGF) as an angiogenic/ inflammatory switcher: lesson from early pregnancy losses [J]. Gynecol Endocrinol, 2017, 33 (9): 668-674.
- [23] Valente S, Ciavarella C, Pasanisi E, et al. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells derived from human arteries: a novel strategy to accelerate vascular ulcer wound healing [J]. Stem Cells Int, 2016, 9 (3): 281-285.
- [24] Xia YH, Yao L, Zhang ZX. Correlation between IRLB, Ilrl Ra gene poly-morphism and occurrence of polycystic ovary syndrome infertility [J]. Asian Pac J Trop Med, 2013, 6 (3): 232-236.
- [25] 王坚, 石磊, 潘颖, 等. 多囊卵巢综合征患者血清抑制素 B、类胰岛素样生长因子的受体测定及临床意义 [J]. 中国实验诊断学, 2010, 14 (7): 1100-1102.
- [26] 彭爱, 张水仙. 达英-35 配合促排卵法治疗多囊卵巢综合症不孕的疗效观察 [J]. 实用预防医学, 2011, 18 (9): 1699-1700.
- [27] Ding C, Zou Q, Wang F, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve ovarian function lateral aging through secreting hepatocyte growth factor and epidermal growth factor [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9 (1): 55.
- [28] Wu RI, Sluss PM, Mino-Kenudson M, et al. Analysis of VEGF/PLGF heterodimer level in pancreatic cyst fluid as a biomarker for serous cystadenoma [J]. J Am Chem Soc, 2015, 4: 79-83.
- [29] Ling L, Feng X, Wei T, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell HAD transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10 (1): 46.
- [30] Lu H, Li SR, Si Q, Regulation of MIRNAS on c-met protein expression in ovarian cancer and its implication [J]. Eur Rev Med Pharmacol, 2017, 21 (15): 3353-3359.
- [31] Sanada F, Taniyama Y, Azuma R, et al. Therapeutic angiogenesis by gene therapy for critical limb ischemia: choice of biological agent [J]. Immunol Endocr Metab Agents Med Chem, 2014, 14 (1): 32-39.
- [32] Nakamura M, Takahashi T, Matsui H, et al. Alteration of angiogenesis in *Helicobacter heilmanni* induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: interaction with e-met and hepatocyte growth factor [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2014, 29 (Suppl 4): 70-76.

(收稿: 2021-02-12 在线: 2021-12-06)

责任编辑: 段碧芳
英文责编: 张晶晶