

◆ 实验研究论著 ◆

寿胎丸对大鼠卵巢移植术后各级卵泡及黄体的影响

朱淑惠¹, 吴佩莼²

1. 广州中医药大学门诊部, 广东 广州 510405; 2. 汕头市中心医院, 广东 汕头 515000

[摘要] 目的: 观察寿胎丸对大鼠卵巢移植术后各级卵泡及黄体的影响。方法: 将210只Wistar雌性大鼠随机分为7组, 每组30只, 即自体移植模型组、自体移植+寿胎丸组、异体移植模型组、异体移植+寿胎丸组、异体移植+环孢A(CsA)组、异体移植+CsA+寿胎丸组和正常对照组。各组大鼠于移植术后7、14、21、28、35天分批处死, 每次6只。取左侧卵巢, HE染色, 光镜下计数整张切片中的各级卵泡和黄体数量。结果: 移植后7天, 异体移植+寿胎丸组的原始卵泡数比异体移植模型组多($P<0.05$), 异体移植+CsA+寿胎丸组的原始卵泡数、初级卵泡数、次级卵泡数与黄体数在移植后多个时点均比异体移植模型组多($P<0.05$)。结论: 寿胎丸有抗异体卵巢移植排斥反应的作用。

[关键词] 寿胎丸; 卵巢移植; 卵泡; 黄体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 05-0201-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.05.077

卵巢是女性重要的生殖和内分泌器官, 随着卵巢冷冻保存技术和移植免疫学的发展, 卵巢移植受到越来越多的重视, 而影响移植成功的关键在于控制移植后的排斥反应, 延长移植卵巢的存活时间。近年来, 中药免疫药理研究逐渐深入, 中药抗移植排斥作用的研究也取得了一定的进展^[1-4]。寿胎丸用于抗器官移植后免疫排斥反应的思路主要源于反复自然流产的治疗。对于母体而言, 胎儿相当于同种半异体移植物, 而自然流产可视为母体对胎儿的一种免疫排斥反应。本课题观察补肾复方寿胎丸对同种大鼠自体及异体移植卵巢各级卵泡及黄体的影响, 从移植卵巢形态学的变化来探讨寿胎丸抗卵巢移植排斥反应的机理。

1 材料与方

1.1 动物 Wistar大鼠210只, 由南方医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号: 0047261, 0048981, 0049554, 0050275, 0050721, 0050814。SD大鼠, 120只, 由广东省医学实验动物中心提供, 动物合格证号: 0049729和0051023。大鼠均为雌性, SPF级, 10~12周龄, 180~230g, 饲养于SPF级实验室, 照明时间12h/天(8:00~20:00), 相对湿度(55±10)%, 温度(22±2)℃, 以消毒大鼠专用饲料和洁净水饲养。

1.2 主要仪器与药剂 CX21BIM-SET生物显微镜

(OLYMPUS); Kryo320-1.7程序降温仪(Planer公司, 英国); 1640培养液、四季青新生牛血清、蔗糖Sucrose(超纯级)、DMSO二甲亚砜(无菌)、100mm培养皿、水合氯醛、多聚甲醛、苦味酸等均购于广州威佳科技有限公司。环孢A(CsA, 新赛斯平软胶囊), 每粒25mg, 杭州中美华东制药有限公司, 批号: 090324, 溶于蒸馏水, 定容为2mg/mL备用。菟丝子、桑寄生、续断、阿胶均购于康美药业有限公司。寿胎丸每剂含生药材200g, 按菟丝子: 桑寄生: 续断: 阿胶=4: 3: 3: 1的比例, 菟丝子、桑寄生、续断3味药加水750mL, 煎至150mL, 阿胶烊化, 浓缩至100mL, 含生药量2g/mL。

1.3 分组、造模与给药 取Wistar大鼠210只, 随机分为7组, 每组30只, 即自体移植模型组、自体移植+寿胎丸组、异体移植模型组、异体移植+寿胎丸组、异体移植+环孢A(CsA)组、异体移植+CsA+寿胎丸组和正常对照组。除正常对照组仅行腹部麻醉切开缝合外。其余各组大鼠下腹部消毒, 以10%水合氯醛腹腔麻醉, 正中切口, 腹腔探查并摘除双侧卵巢, 结扎残端, 术后伤口涂红霉素软膏抗感染, 术后第5天起, 每天行细胞学涂片, 连续9天, 涂片显示无周期性变化, 提示去势彻底。自体移植组取出卵巢后, 立即置于4℃含10%胎牛血清的1640基础培养液中, 洗去血迹, 去掉系膜, 冷冻保存^[5]。异体移植组于偏离Wistar大鼠原手术切口约

[收稿日期] 2013-12-13

[基金项目] 教育部高等学校博士点基金项目(编号: 20114425120016); 广州中医药大学科研创新基金项目(编号: 11CX013); 广东省中医药局科研基金项目(编号: 20111187)

[作者简介] 朱淑惠(1980-), 女, 副主任中医师, 研究方向: 生殖健康与生殖障碍的中医药研究。

[通讯作者] 吴佩莼, E-mail: 343546047@qq.com。

0.5 cm 处纵行切开 1 cm, 将 SD 大鼠的双侧卵巢分别移植于 Wistar 大鼠切口两侧的腹壁上, 缝合皮肤, 伤口涂红霉素软膏抗感染^⑥。

自体移植组采用快融法复苏冷冻卵巢后^⑥, 参照异体移植组手术方案移植。

自体移植 + 寿胎丸组和异体移植 + 寿胎丸组均给予寿胎丸 26.8 g/(kg·d), 28 天; 异体移植 + CsA 组, 给予 CsA 10 mg/(kg·d), 连用 14 天后, 6 mg/(kg·d)再连用 14 天; 异体移植 + CsA+ 寿胎丸组, 给予 CsA 6 mg/(kg·d)和寿胎丸 26.8 g/(kg·d), 连用 28 天; 自体移植模型组、异体移植模型组和正常对照组均给予等量生理盐水 28 天, 均为灌胃给药。移植术后 24 h 第 1 次给药, 以后每隔 24 h 给药 1 次。

1.4 观察指标与检测方法

1.4.1 HE 染色 各组于移植术后 7、14、21、28、35 天分批处死 Wistar 大鼠, 每次 6 只。取左侧卵巢, 用多聚甲醛保存, 石蜡包埋, 最大径切片, HE 染色, 光镜下计数整张切片中的各级卵泡、黄体, 观察间质的变化, 以及组织坏死或纤维化的程度。结果显示: 细胞核呈蓝色, 细胞浆、肌肉、结缔组织、红细胞和嗜伊红颗粒呈不同程度的红色, 钙盐和各种微生物染成蓝色或蓝紫色。

1.4.2 卵泡分级 原始卵泡直径为 20~30 μm, 由卵子及环绕其周围的单层梭形颗粒细胞组成; 初级卵泡体积增大, 卵泡细胞由单层扁平变为单层柱状。在卵母细胞和卵泡细胞之间出现透明带; 次级卵泡由初级卵泡继续发育形成。卵泡细胞之间的小腔隙融合形成一个大腔称卵泡腔, 腔内充满卵泡液。随着卵泡液增多, 卵泡腔扩大, 初级卵母细胞、透明带、放射冠及部分卵泡细胞突入卵泡腔内形成卵丘; 成熟卵泡: 卵泡液急剧增多, 使卵泡体积显著增大, 卵泡向卵巢表面突出^⑦。

1.4.3 黄体 黄体由颗粒黄体细胞和膜黄体细胞组成。颗粒黄体位于黄体的中央部, 数量多, 细胞较大, 呈多角形, 胞质中有脂滴, 细胞染色浅; 膜黄体细胞分布于黄体周边部, 并随结缔组织隔伸入颗粒黄体细胞之间, 膜黄体细胞较小, 呈圆形或多角形, 数量少, 核及胞质着色均比颗粒黄体细胞深^⑦。

1.5 统计学方法 采用 SPSS15.0 统计软件进行统计分析。计量资料均不服从正态分布, 采用中位数和四分位数表示, 多组间的比较采用非参数检验方法(Kruskal-Wallis H 检验)。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时点卵巢移植术后原始卵泡数量的比较见表 1。异体移植 + 寿胎丸组在移植后 7 天的原始卵泡数, 异体移植 + CsA 组在移植后 7、14、21、35 天的原始卵泡数, 异体移植 + CsA+ 寿胎丸组在移植后 7、14 天的原始卵泡数, 与异体移植模型组比较, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。自体移植 + 寿胎丸组、异体移植模型组各有 1 只大鼠因移植术前麻醉过深致死, 异体移植模型组另有 1 只大鼠因移植术后肠梗阻死亡, 死亡大鼠未纳入统计。

表 1 各组大鼠不同时点卵巢移植术后原始卵泡数量的比较(四分位数间距)

组别	原始卵泡 / 个				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
正常对照组	6.0(4.2)	7.0(6.0)	5.5(7.8)	4.0(2.0)	3.5(2.2)
自体移植模型组	5.0(3.0)	5.5(4.3)	5.0(3.7)	3.5(3.0)	3.0(1.4)
自体移植 + 寿胎丸组	5.5(3.6)	6.0(3.1)	4.0(5.1)	3.0(2.5)	3.0(1.8)
异体移植模型组	0.0(3.0)	0.0(1.8)	0.0(2.5)	0.0(0.0)	0.0(2.5)
异体移植 + 寿胎丸组	4.0(2.8)	0.0(4.3)	0.0(1.3)	0.0(1.0)	0.0(3.5)
异体移植 + CsA 组	3.5(3.2)	5.0(3.5)	3.5(3.0)	2.0(3.8)	3.0(2.3)
异体移植 + CsA+ 寿胎丸组	4.0(2.0)	3.5(2.0)	0.5(3.5)	0.0(0.3)	0.0(1.5)

与异体移植模型组比较, ① $P < 0.05$

2.2 各组大鼠不同时点卵巢移植术后初级卵泡数量的比较见表 2。移植后各时点, 异体移植模型组均未见初级卵泡出现; 异体移植 + CsA+ 寿胎丸组在移植后 7 天、14 天、21 天的初级卵泡数, 与异体移植模型组比较, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠不同时点卵巢移植术后初级卵泡数量的比较(四分位数间距)

组别	初级卵泡 / 个				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
正常对照组	3.5(3.3)	3.0(2.0)	4.5(4.8)	2.5(4.5)	3.5(6.0)
自体移植模型组	3.0(1.0)	2.5(1.3)	2.0(7.5)	2.0(4.5)	3.0(0.8)
自体移植 + 寿胎丸组	2.0(2.3)	2.0(5.0)	2.0(8.0)	1.5(1.0)	2.0(1.5)
异体移植模型组	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)
异体移植 + 寿胎丸组	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(2.0)	0.0(1.3)	0.0(0.0)
异体移植 + CsA 组	0.0(8.3)	0.0(0.5)	0.0(0.3)	0.0(1.8)	0.0(0.5)
异体移植 + CsA+ 寿胎丸组	2.5(4.5)	1.5(5.3)	2.0(1.0)	0.0(0.0)	0.0(3.8)

与异体移植模型组比较, ① $P < 0.05$

2.3 各组大鼠不同时点卵巢移植术后次级卵泡数量的比较见表 3。异体移植模型组在卵巢移植后各时点, 均无次级卵泡出现; 异体移植 + CsA+ 寿胎丸组在移植后 7 天、14 天的次级卵泡数, 与异体移植模型组比较, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠不同时点卵巢移植术后次级卵泡数量的比较(四分位数间距)

组别	次级卵泡 / 个				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
正常对照组	3.5(2.3)	4.0(3.0)	4.0(4.0)	4.0(2.5)	4.5(4.5)
自体移植模型组	3.0(4.0)	2.0(2.3)	3.5(2.3)	2.5(6.5)	3.0(2.3)
自体移植 + 寿胎丸组	3.0(3.8)	2.5(2.0)	2.0(3.8)	2.5(2.5)	2.0(2.5)
异体移植模型组	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)
异体移植 + 寿胎丸组	0.0(0.3)	0.0(0.0)	0.0(2.3)	0.0(1.3)	0.0(0.0)
异体移植 + CsA 组	0.0(2.5)	0.0(0.5)	0.0(0.0)	0.0(1.5)	0.0(0.8)
异体移植 + CsA+ 寿胎丸组	2.0(3.5)	2.0(1.5)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.5)

与异体移植模型组比较, ① $P < 0.05$

2.4 各组大鼠不同时点卵巢移植术后成熟卵泡数量的比较见表4。各组大鼠的成熟卵泡数在移植后各时点相比较,差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

表4 各组大鼠不同时点卵巢移植术后成熟卵泡数量的比较(四分位数间距)

组别	成熟卵泡/个				
	7d	14d	21d	28d	35d
正常对照组	0.5(1.5)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	1.0(1.3)	0.0(0.0)
自体移植模型组	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.5)	0.0(0.3)	0.0(0.0)
自体移植+寿胎丸组	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(1.3)	0.0(0.3)	0.0(0.3)
异体移植模型组	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)
异体移植+寿胎丸组	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)
异体移植+CsA组	0.0(0.3)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)
异体移植+CsA+寿胎丸组	0.0(0.5)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)

2.5 各组大鼠不同时点卵巢移植术后黄体数量的比较见表5。异体移植模型组仅在移植后7天见到黄体出现,异体移植+CsA+寿胎丸组在移植后7、14天的黄体数,与异体移植模型组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

表5 各组大鼠不同时点卵巢移植术后黄体数量的比较(四分位数间距)

组别	黄体/个				
	7d	14d	21d	28d	35d
正常对照组	5.5(4.0)	5.0(5.0)	7.5(1.8)	5.5(4.3)	6.5(7.0)
自体移植模型组	5.0(2.3)	3.0(2.5)	2.0(5.8)	3.0(9.8)	2.5(3.5)
自体移植+寿胎丸组	4.5(1.3)	3.5(6.0)	3.0(2.3)	2.5(4.5)	3.5(4.5)
异体移植模型组	0.0(4.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.0(0.0)
异体移植+寿胎丸组	0.0(3.5)	0.0(2.5)	0.0(8.5)	1.5(4.5)	0.0(0.5)
异体移植+CsA组	0.0(6.0)	0.0(3.3)	0.0(3.0)	0.0(2.5)	0.0(1.8)
异体移植+CsA+寿胎丸组	4.5(3.5)	3.0(2.5)	0.0(0.5)	0.0(0.0)	0.0(2.8)

与异体移植模型组比较,① $P < 0.05$

3 讨论

寿胎丸为补肾安胎之代表方,出自清代张锡纯《医学衷中参西录》,由菟丝子、桑寄生、续断、阿胶4味药组成,方中重用菟丝子为主药,菟丝子性柔润而多液,可平补肾阴肾阳,该药补而不燥,滋而不腻,为安胎之首选药物。《本经》将其列为上品,主治“续绝伤,补不足,益气力,肥健人”;续断补肝肾安胎,据药理研究其有抗维生素E缺乏症的作用而利于孕卵发育;桑寄生补肝肾,兼养血安胎;阿胶能补血滋阴止血安胎。全方具有补肾气、固冲任、调气血、安胎的作用。临床用于治疗先兆流产、反复自然流产疗效确切、显著^[8-9]。

本研究通过比较自体移植模型组与自体移植+寿胎丸组,移植后不同时点的各级卵泡数与黄体的数量,发现寿胎丸不能提高自体移植卵巢的成活率,两两比较,差异无显著性意义($P > 0.05$)。有文献报道,卵巢组织在冻融过程中会损失7%的卵

泡,但移植后组织的局部缺血性损伤会使移植卵巢损失全部的生长卵泡群以及显著数量的原始卵泡,新血供重新建立前可能丧失60%以上的原始卵泡,认为卵巢移植后缺血损伤可能限制了自体移植卵巢长期存活^[10]。寿胎丸可能在加速自体卵巢移植后的血管重建方面作用不明显,因而,在提高自体移植卵巢成活率、促进内分泌功能恢复等方面效果并不显著。

经统计分析发现,异体移植+寿胎丸组移植后7天的原始卵泡数比异体移植模型组多($P < 0.05$),异体移植+CsA+寿胎丸组的原始卵泡数、初级卵泡数、次级卵泡数与黄体数在移植后多个时点均比异体移植模型组多($P < 0.05$),这说明异体卵巢移植大鼠,应用CsA和寿胎丸抗排斥后,移植卵巢存活率提高,寿胎丸与CsA有协同作用,联合应用寿胎丸与CsA,可更好地逆转移植后的急性排斥反应。妊娠和器官移植部分相似的免疫机制,可能是寿胎丸抗移植排斥反应起作用的基础。

[参考文献]

- 王颖,马东丽,接英,等.中药菊花决明散防治大鼠高危角膜移植免疫排斥反应的研究[J].中国中西医结合杂志,2010,30(2):178.
- 陈夏,蔡宪安,周丽娟,等.丹参注射液在肾移植后急性排斥反应中的作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(44):8221-8224.
- 吴勤荣,时军,罗文峰,等.复方中药(苦黄汤)对大鼠原位肝移植急性排斥反应的影响[J].南昌大学学报:医学版,2012,52(2):6-10.
- 盛黎黎,李靖,张志强,等.益气活血安胎中药对异种皮肤移植急性排斥反应的影响[J].中西医结合研究,2013,5(5):240-243.
- Oktay K, Newton H, Aubard Y, et al. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology[J]. Fertil Steril, 1998, 69(1): 1-7.
- 唐丽丽,罗颂平.寿胎丸抗大鼠同种异体卵巢移植模型急性排斥反应的研究[J].中华中医药学刊,2009,27(10):2098-2101.
- 成令忠,钟翠平,蔡文琴.现代组织学[M].上海:上海科学技术文献出版社,2003:1002-1022.
- 周英,叶敦敏.寿胎丸合失笑散治疗肾虚血瘀型先兆流产的临床疗效观察[J].广州中医药大学学报,2006,23(1):25-29.
- 丁立,钱江,张颂,等.寿胎丸的药效学和毒理学研究[J].中药药理与临床,1997,13(5):5.
- 张皓云,管英俊,孙秀宁.冻存卵巢移植后功能及其影响因素[J].解剖科学进展,2004,10(4):332-335.

(责任编辑:马力)