

◆ 实验研究论著 ◆

白藜芦醇拮抗雷公藤甲素卵巢毒性实验研究

曾又佳, 李顺民

深圳市中医院, 广东 深圳 518033

[摘要] 目的: 探讨白藜芦醇拮抗雷公藤甲素诱导卵巢损伤的作用。方法: 40只雌性NIH小鼠随机分为4组: 对照组(Ctrl组: 含5%二甲基亚砷的生理盐水), 模型组(TL组: 雷公藤甲素25 μg/kg), 低剂量治疗组(TL+ResL组: 25 μg/kg雷公藤甲素+5 mg/kg白藜芦醇)和高剂量治疗组(TL+ResH组: 25 μg/kg雷公藤甲素+10 mg/kg白藜芦醇)。各组连续灌胃50天。第41天起, 行连续阴道涂片。第47天, 行超排卵实验。于第50天处死各组小鼠, 收集计数输卵管中卵子, 留取卵巢行常规病理染色等。阴道涂片行巴氏染色检测小鼠性动周期, HE染色检测小鼠卵巢病理, 计数各级卵泡。结果: 雷公藤甲素刺激后, TL组小鼠出现明显的卵巢损伤, 表现为性动周期延长, 超排卵子数量减少, 与Ctrl组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$); TL+ResL组和TL+ResH组较TL组小鼠卵巢原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡和成熟卵泡数量增多, 差异均有显著性意义($P < 0.05$), TL+ResL组和TL+ResH组比较无差异。结论: 白藜芦醇可部分拮抗雷公藤甲素诱导的卵巢损伤, 但与白藜芦醇治疗剂量无明显关系。

[关键词] 白藜芦醇; 雷公藤甲素; 性动周期; 卵巢损伤; 小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 08-0172-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.08.079

雷公藤味苦、辛, 性凉, 有大毒, 归肝、肾经, 具有祛风除湿、通络止痛、解毒杀虫等功效, 相关制剂常用于治疗各类风湿免疫疾病、肿瘤、皮肤顽疾等。雷公藤作为大毒之物, 早在清代, 赵学敏《本草纲目拾遗》中有云: “采之有毒, 凡蚌螺亦死, 其性最烈, 以其草烟熏蚕子则不生。”现代医学证实, 雷公藤导致各种不良反应中, 以生殖系统损伤最常见: 男性患者可出现精子活力下降, 甚至不育; 女性患者最常发生月经紊乱、闭经等, 甚至进展至不可逆的卵巢功能早衰^[1], 纠正治疗十分棘手。近年有关雷公藤致卵巢损伤及相关拮抗药物的研究较少^[2]。中药单体中, 研究者普遍认为, 中药虎杖的根茎提取物白藜芦醇(Resveratrol)对卵巢有良好的保护作用^[3]。本研究拟在雷公藤甲素卵巢损伤小鼠模型基础上, 探讨不同浓度白藜芦醇的卵巢保护作用, 以期寻找合理的增效减毒的配伍方法, 为正确运用雷公藤提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 白藜芦醇、雷公藤甲素、二甲基亚砷(DMSO)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、孕马血清(以上试剂均购自Sigma-Aldrich公司, 美国); 荧光TUNEL试剂(Promega

公司, 美国); Anti-APAF1抗体、Anti-CytochromeC抗体; EliVisionTM plus试剂盒(福州迈新公司, 中国)。

1.1.2 仪器与器材 石蜡包埋机(LEICA公司, 德国); 石蜡切片机(LEICA公司, 德国); 低温离心机(Eppendorf公司, 德国); 普通光学显微镜(Olympus公司, 日本); 共聚焦显微镜(Olympus公司, 日本); 倒置荧光显微镜及成像系统, (Olympus公司, 日本)。

1.1.3 动物及分组 4周龄SPF级成熟雌性NIH小鼠40只(购自南方医科大学实验动物中心), 体重约20g。随机分为对照组(Ctrl组)、模型组(TL组)、低剂量治疗组(TL+ResL组)和高剂量治疗组(TL+ResH组)。

1.2 实验方法

1.2.1 NIH小鼠卵巢损伤及白藜芦醇治疗模型的建立 小鼠适应性喂养3天后进入实验。每周根据体重变化调整用药量。Ctrl组、TL组、TL+ResL组、TL+ResH组分别予以含5% DMSO的生理盐水、雷公藤甲素25 μg/(kg·d)(溶于含5% DMSO的生理盐水中)、低剂量白藜芦醇加雷公藤甲素(25 μg/kg雷公藤甲素+5 mg/kg白藜芦醇)、高剂量白藜芦醇加雷公藤甲素(25 μg/kg雷公藤甲素+10 mg/kg白藜芦醇),

[收稿日期] 2014-03-06

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(编号: S2012010010969); 深圳市科技计划研发资金项目(编号: JCYJ20120830095257926)

[作者简介] 曾又佳(1983-), 女, 博士, 博士后, 主治医师, 主要从事中西医结合肾病防治和中药药理等方面的研究。

[通讯作者] 李顺民, E-mail: zyylishunmin@126.com。

各组药物连续灌胃 50 天。每只小鼠每天灌胃量不超过 200 μ L。实验第 50 天处死各组小鼠。

1.2.2 阴道涂片及染色 灭菌小棉签,于处死前 10 天起,连续 10 天于每天 10:00~12:00 行阴道涂片。具体方法如下:左手从小鼠背部固定小鼠,暴露阴道,棉签蘸少量生理盐水,插入小鼠阴道,左右旋转一周,取出后将棉签于载玻片上涂抹,风干 3 s 后,置入 95%酒精中固定 15 min。巴氏染色、封片后,根据阴道涂片,计算小鼠的动情周期。

1.2.3 超排卵实验 参照 Singavarapu R 等^[9]描述方法进行,实验第 47 天,各组小鼠分别腹腔注射 10 IU 孕马血清,48 h 后(实验第 49 天),分别腹腔注射 5 IU HCG,16~18 h 后(第 50 天),各组小鼠内眦取血后,脱臼处死,分离双侧输卵管,1 mL 注射器吸取含 4%BSA 的 HEPES 溶液,充分冲洗双侧输卵管中的卵子至培养皿,立即拍照、计数。

1.2.4 标本留取 动物脱臼后,同时迅速取出卵巢,置于 4%多聚甲醛固定液中。组织脱水、透明、浸蜡、包埋,进行后续实验。

1.2.5 卵泡计数 参照 Devine PJ 等^[10]描述方法,卵巢蜡块连续切片 15 张(5 μ m),行 HE 染色。观察各级卵泡:包括原始卵泡(单层扁平颗粒细胞包裹),初级卵泡(单层立方颗粒细胞包裹),次级卵泡(2~4 层颗粒细胞包裹),成熟卵泡(>4 层颗粒细胞包裹)及闭锁卵泡。计数 15 张连续切片的各级卵泡数量。

1.2.6 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计软件进行分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),并进行两两比较;2 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 一般情况 实验过程中,TL 组小鼠给药后第 1 周后出现食欲下降,精神不振,活动减少,毛色差,身体消瘦,前 4 周体重增加缓慢,蜷缩,喜扎堆,捕捉时易激惹,并自第 5 周期,体重逐渐增加,TL 组死亡 2 只(第 4 周、第 5 周时死亡,疑与感染有关)。TL+ResL 组、TL+ResH 组小鼠体质量增长趋势与 TL 组一致,基本精神状态较 TL 组无明显区别。TL+ResL 组、TL+ResH 组各死亡 1 只(第 5 周时死亡,疑与拒食有关)。各组存活小鼠均达 8 只以上,每组随机选取 8 只小鼠,用于后续实验检测及数据统计。

2.2 性动周期 阴道涂片行巴氏染色,连续观察 10 天各组小鼠的阴道脱落上皮细胞变化。小鼠平均性动周期:Ctrl 组(4.5 \pm 1.5)天,TL 组(6.3 \pm 2.0)天,TL+ResL 组(5.0 \pm 1.25)天,TL+ResH 组(5.3 \pm 1.5)天。与 Ctrl 组比较,TL 组小鼠性动周期明显延长($P < 0.05$);与 TL 组比较,TL+ResL 组和 TL+ResH 组小鼠性动周期略缩短,但差异无显著性意义($P > 0.05$)。TL+ResL 组和 TL+ResH 组比较无差异($P > 0.05$)。提示:白藜芦醇能部分改善雷公藤甲素诱导的 NIH 小鼠性动周期延长。

2.3 各组小鼠超排卵子数量比较 见表 1。超排卵实验后,

立即予显微镜下观察并计数各组小鼠输卵管中的卵子。Ctrl 组小鼠超排卵子体积大而饱满,数量多。TL 组小鼠所排卵子体积较小,光泽度、饱满度差,数量较 Ctrl 组明显减少,与 Ctrl 组比较,差异有显著性意义($P < 0.05$)。TL+ResL 组和 TL+ResH 组的超排卵子质量和数量较 TL 组显著改善,特别在数量方面,与 TL 组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。提示:白藜芦醇能减轻雷公藤甲素诱导的超排卵功能降低。

表 1 各组小鼠超排卵子数量比较($\bar{x} \pm s, n=8$) 个

Ctrl 组	TL 组	TL+ResL 组	TL+ResH 组
74.5 \pm 15.2	18.5 \pm 6.6	65.3 \pm 17.4	58.2 \pm 16.8

与 Ctrl 组比较,① $P < 0.05$;与 TL 组比较,② $P < 0.05$

2.4 卵巢病理 见图 1。HE 染色提示 Ctrl 组小鼠卵巢各级卵泡(原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡)分布广泛,原始卵泡主要分布在卵巢皮质区;TL 组小鼠卵巢各级卵泡数量较 Ctrl 组减少,特别是进展期卵泡减少,且黄体较多,各级闭锁卵泡增多,间质区域结缔组织疏松。TL+ResL 组和 TL+ResH 组小鼠各级卵泡细胞较饱满,各级卵泡并存,间质较 TL 组致密。

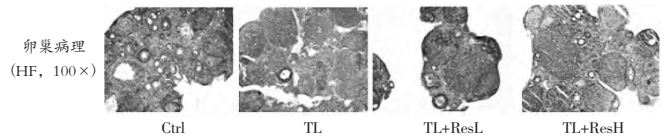


图 1 各组小鼠卵巢病理改变

2.5 各组小鼠各级卵泡计数比较 见表 2。计数 15 张连续的切片中的各级卵泡数量,与 Ctrl 组比较,TL 组小鼠各级卵泡数量减少,以进展期卵泡数量减少为主,此外闭锁卵泡显著增多;TL+ResL 组和 TL+ResH 组较 TL 组小鼠卵巢原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡和成熟卵泡数量增多,差异均有显著性意义($P < 0.05$),而闭锁卵泡数量较 TL 组有所减少。TL+ResL 组和 TL+ResH 组比较无差异。提示:白藜芦醇能改善雷公藤甲素诱导的各级卵泡丢失,促进卵泡正常的发展、成熟。

表 2 各组小鼠各级卵泡计数比较($\bar{x} \pm s, n=8$) 个

各级卵泡	Ctrl 组	TL 组	TL+ResL 组	TL+ResH 组
原始卵泡	50 \pm 6	30 \pm 11	41 \pm 13	38 \pm 15
初级卵泡	45 \pm 8	18 \pm 6	39 \pm 15	30 \pm 10
次级卵泡	77 \pm 11	57 \pm 17	71 \pm 20	65 \pm 14
成熟卵泡	28 \pm 5	11 \pm 4	19 \pm 6	15 \pm 4
闭锁卵泡	15 \pm 6	26 \pm 11	19 \pm 9	20 \pm 5

与 Ctrl 组比较,① $P < 0.05$;与 TL 组比较,② $P < 0.05$

3 讨论

本研究提示雷公藤甲素致雌性小鼠性动周期延长;超排卵子质量及数量明显下降;各级进展期卵泡数量减少;闭锁卵泡增多。以上结果提示雷公藤甲素显著损伤小鼠卵巢功能。在此

基础上,评价高、低剂量白藜芦醇的干预效果。结果证实:白藜芦醇干预后,模型小鼠超排卵子数量增加;各级进展卵泡增多,闭锁卵泡减少。从卵巢功能和结构上看,白藜芦醇能显著改善雷公藤甲素诱导的卵巢损伤。值得注意的是,白藜芦醇的剂量增加并不能显著提高其拮抗雷公藤卵巢毒性的作用。这也提示在后期的研究中,摸索最低有效浓度是减轻患者机体代谢负担与经济负担的重要课题之一。

[参考文献]

- [1] 周燕,盛梅笑.雷公藤对女性生殖系统的影响和防治[J].四川中医,2013,31(1):150-151.
- [2] 崔瑞琴,丁樱.菟丝子黄精颗粒剂对雷公藤多甙所致生殖损伤雌鼠卵巢损伤及 smad4mRNA 表达的影响[J].时珍国医国药,2009,31(12):3149-3150.
- [3] Kong XX, Fu YC, Xu JJ, et al. Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis [J]. J Endocrinol Invest, 2011, 34 (11): 374-381.
- [4] Singavarapu R, Buchinsky N, Cheon DJ, et al. Whole ovary immunohistochemistry for monitoring cell proliferation and ovulatory wound repair in the mouse[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2010, 8: 98.
- [5] Devine PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide [J]. Reprod Toxicol, 2004, 19(1): 71-77.

(责任编辑:马力)

益肾汤对糖尿病肾病大鼠肾组织 ET-1 和 TGF- β_1 表达的影响

余海源¹, 邹建琴², 王馥恩³, 刘伟¹, 张颖¹, 冯山丹¹

1. 烟台市中医医院肾内科, 山东 烟台 264000
2. 山东中医药大学 2010 级研究生, 山东 济南 250000
3. 山东滨州医学院中医教研室, 山东 烟台 264000

[摘要] 目的:观察益肾汤对糖尿病肾病(DN)大鼠内皮素-1(ET-1)和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的影响,并观察肾脏病理形态学变化,以探讨其改善糖尿病肾病的作用机制。方法:将50只SD雄性大鼠,随机分为5组,对照组、模型组、益肾汤大剂量组、益肾汤小剂量组、洛汀新组,每组10只。对照组行左肾摘除假手术,其余4组摘除左肾。1周后,各组大鼠每天灌胃给药,益肾汤大剂量组灌胃1.0 g/mL;益肾汤小剂量组灌胃0.5 g/mL;洛汀新组0.33 mg/mL。对照组和模型组灌等体积的生理盐水。分别在第4、8周检测24h尿微量白蛋白,心脏采血检测血肌酐(SCr)和尿素氮(BUN)。HE染色肾组织送病理科评价病变程度;免疫组化法测定ET-1及TGF- β_1 蛋白的表达情况。结果:①各组大鼠BUN、SCr及24h尿微量白蛋白的比较:4周末时,模型组各指标与对照组比较,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。各给药组与模型组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$),洛汀新组与益肾汤大、小剂量组比较,差异均无显著性意义($P > 0.05$);第8周末时,模型组与对照组比较,差异有非常显著性意义($P < 0.01$),各给药组与模型组比较,差异有显著性或非常显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);洛汀新组与益肾汤大、小剂量组比较,差异均有显著性或非常显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),益肾汤大、小剂量组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。②肾组织病理改变:肾小球增生肥大、基底膜增厚、系膜基质增生减轻,肾小囊腔轻度狭窄,治疗8周后益肾汤组较同期模型组减轻,肾间质炎症细胞浸润减少。③各组大鼠肾组织TGF- β_1 和ET-1表达比较:4周末模型组TGF- β_1 、ET-1表达水平较对照组升高($P < 0.05$),各给药组与模型组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。8周末模型组大鼠肾组织中表达与对照组比较,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$),益肾汤大剂量组与模型组比较,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$),益肾汤大剂量组表达减少;益肾汤小剂量组、洛汀新组表达水平均高于益肾汤大剂量组($P < 0.01$),益肾汤小剂量组与洛汀新组无差异($P > 0.05$)。结论:

[收稿日期] 2013-11-22

[基金项目] 烟台市科技计划项目立项课题(编号:2011243)

[作者简介] 余海源(1964-),男,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中医肾病理论与临床研究。