紫菀二仙汤对雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全大鼠卵巢凋亡相关蛋白的影响

顾燕频，朱光，刘玮，吕雯

浙江省立同德医院妇科，浙江 杭州 310012

［摘要］**目的：**研究紫菀二仙汤对雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全模型大鼠卵巢凋亡蛋白的影响。**方法：**将60只SD大鼠分为空白组（N组）10只和造模组50只，采用雷公藤多苷灌胃法制作早发性卵巢功能不全大鼠模型，造模成功后将造模组分为模型组（M组）、西药组（X组）、紫菀二仙汤低剂量组（L组）、中剂量组（Z组）和高剂量组（H组）各10只。给药期间观察各组大鼠动情周期，9周后观察子宫指数及卵巢指数变化，蛋白印迹法检测B淋巴细胞瘤-2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）、冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3（Caspase-3）蛋白含量，并计算Bcl-2/Bax比值。**结果：**各组大鼠子宫指数及卵巢指数比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。与N组比较，M组大鼠动情周期延长（$P<0.05$）；与M组比较，X、Z及H组大鼠动情周期缩短（$P<0.05$）；各治疗组动情周期比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。各组大鼠Bax蛋白表达水平比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与N组比较，M组Bcl-2表达水平及Bcl-2/Bax降低（$P<0.05$），Caspase-3表达水平升高（$P<0.05$）；与M组比较，X组、Z组及H组Bcl-2表达水平及Bcl-2/Bax升高（$P<0.05$），Caspase-3表达水平下降（$P<0.05$），L组Caspase-3表达水平下降（$P<0.05$）；与X组比较，L组Bcl-2表达水平及Bcl-2/Bax降低（$P<0.05$）；与L组比较，Z组及H组Bcl-2表达水平及Bcl-2/Bax上升（$P<0.05$），Caspase-3表达水平下降（$P<0.05$）。**结论：**紫菀二仙汤可调节雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全模型大鼠的动情周期，其机制可能与提高Bcl-2表达，降低Caspase-3表达，提高Bcl-2/Bax密切相关。

［关键词］早发性卵巢功能不全；雷公藤多苷；紫菀二仙汤；卵泡凋亡；B淋巴细胞瘤-2；冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3；大鼠

［中图分类号］R285.5 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）13-0029-05

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.13.005

Effect of Zitu Erxian Decoction on Ovarian Apoptosis Related-Proteins in Rats with Premature Ovarian Insufficiency Induced by Tripterygium Glycosides

GU Yanpin, *ZHU Guang*, *LIU Wei*, *LYU Wen*

Department of Gynecology, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou Zhejiang 310012, China

Abstract: Objective: To study the effect of Zitu Erxian Decoction on ovarian apoptosis related-proteins in model rats with premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycosides. **Methods:** Sixty SD rats were divided into blank group(group N) with 10 rats and model group with 50 rats. Rat model of premature ovarian insufficiency was established by gavage of tripterygium glycosides. After two weeks of modeling, the model group rats were divided into the model group (Group M), the western medicine group (group X), the low-dose Zitu Erxian Decoction group (Group L), the medium-dose Zitu Erxian Decoction

［收稿日期］2022-07-13
［修回日期］2023-04-25
［基金项目］“十三五”浙江省中医药重点专科项目（浙卫办中医〔2019〕1号）；浙江省中医药科学研究基金项目（2015ZZ003）；2021年浙江省中青年临床名中医项目（浙中医药〔2021〕22号）
［作者简介］顾燕频（1983-），女，副主任中医师，E-mail：gyp19831008@163.com。
［通信作者］吕雯（1968-），女，主任医师，E-mail：ww4021@163.com。

group (Group Z), and the high-dose Zitu Erxian Decoction group (Group H), with 10 rats in each group. During the administration period, the estrous cycles of rats in each group were observed. After nine weeks, the changes in uterine indexes and ovarian indexes were observed, western Blot was used to detect the protein contents of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3), and the Bcl-2/Bax ratio was calculated. **Results:** There was no significant difference being found in the comparison of the uterine indexes and ovarian indexes of rats among the groups ($P>0.05$). Compared with that in Group N, the estrous cycle in rats in Group M was prolonged ($P<0.05$). Compared with that in Group M, the estrous cycles of rats in Groups X, Z, and H were shortened ($P<0.05$). There was no significant difference being found in the comparison of estrus cycles among the groups ($P>0.05$). There was no significant difference being found in the comparison of the protein expression levels of Bax among different groups of rats ($P>0.05$). Compared with those in Group N, the expression levels of Bcl-2 and Bcl-2/Bax in Group M were decreased ($P<0.05$), and the expression level of Caspase-3 was increased ($P<0.05$). Compared with those in Group M, the expression levels of Bcl-2 and Bcl-2/Bax in Group X, Z, and H were increased ($P<0.05$), and the expression levels of Caspase-3 were decreased ($P<0.05$), while the expression level of Caspase-3 in Group L was decreased ($P<0.05$); compared with those in Group X, the expression levels of Bcl-2 and Bcl-2/Bax in Group L were decreased ($P<0.05$); compared with those in Group L, the expression levels of Bcl-2 and Bcl-2/Bax in Group Z and H were increased ($P<0.05$), and the expression levels of Caspase-3 were decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Zitu Erxian Decoction can regulate the estrous cycles of model rats with premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycosides, and its mechanism may be closely related to increasing Bcl-2 expression, reducing Caspase-3 expression, and enhancing Bcl-2/Bax.

Keywords: Premature ovarian insufficiency; Tripterygium glycosides; Zitu Erxian Decoction; Follicles apoptosis; B-cell lymphoma 2; Cysteinyl aspartate specific proteinase-3; Rat

早发性卵巢功能不全(POI)的病因具有多元性的特点[1]，其中卵巢颗粒细胞的凋亡参与了POI的发生发展[2-4]，其调控作用机制的研究也成为热点。紫菀二仙汤为临床验方，具有改善患者临床症状，降低患者Kupperman评分，显著降低卵泡刺激素(FSH)，提高卵巢功能的作用[5]。本研究观察紫菀二仙汤对雷公藤多苷致POI大鼠动情周期、子宫指数、卵巢指数及凋亡蛋白的影响，初步探讨POI的发病机制，以期为中医药治疗POI提供实验支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雌性SD大鼠，10周龄，200 g左右，购自浙江医学科学院实验动物中心，动物许可证号：SCXK(浙)2019-0002。饲养于浙江医学科学院SPF级动物实验室，相对湿度50%～60%，室温(23±1)℃，明暗周期12 h/12 h，自由饮食和饮水。大鼠入室后适应1周，连续5～7 d行阴道涂片判断动情周期，选取有规律动情周期的60只大鼠作为实验动物。本实验操作均遵守动物伦理的相关规定。

1.2 实验药物、试剂及仪器 雷公藤多苷片(上海复旦复华药业有限公司，国药准字Z31020415，规格：10 mg/片，批号81808134B)、补佳乐(拜耳医药保健有限公司，进口药品注册证号H20160679，规格：1 mg/片，批号447A)、达芙通(雅培贸易上海有限公司，进口药品注册证号H20170221，规格：10 mg/片，批号357412)；紫菀二仙汤(紫河车3 g，菟丝子15 g，仙茅、淫羊藿、当归、知母、炒黄柏各12 g，郁金6 g)，购于江阴天江药业有限公司。B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)抗体由安迪生物科技(上海)有限公司(R&D)提供，Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体、冬氨

酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体购于艾博抗(上海)贸易有限公司(ABCam)。迷你垂直电泳转印系统购于伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.3 模型制备与动物分组 随机选取50只大鼠应用雷公藤多苷片按50 mg/kg的剂量灌胃制作POI动物模型，连续给药14 d[6]。给药后随机分为模型组(M组)、西药组(X组)、紫菀二仙汤低剂量组(L组)、中剂量组(Z组)和高剂量组(H组)5组，每组10只。余10只作为空白组(N组)。

1.4 给药方法 各药物组剂量按大鼠与人体表面积转换系数计算[7]。X组予补佳乐0.1 mg/kg+达芙通1.8 mg/kg溶于0.9%氯化钠溶液灌胃。Z组为紫菀二仙汤人体常规服用剂量转换[7]，即中药煎剂浓缩至含生药量1.8 g/mL，Z组以6 g/kg的剂量灌胃，L组为中剂量组一半的量，H组以2倍中剂量给药。M组及N组以等体积0.9%氯化钠溶液灌胃。共给药9周。

1.5 指标检测 ①一般情况。每天13时观察各组大鼠生命体征、进食、排便、行为变化和毛色变化等。②动情周期。每天13时采用移液器吸取100 μL 0.9%氯化钠溶液，移液器枪头轻轻于各组大鼠阴道口，抽提2~3次，将含有阴道分泌物的0.9%氯化钠溶液置于EP管中备用。吸取20 μL灌洗液均匀涂抹于载玻片上，20倍光学显微镜下观察。动情前期：大量膨大的有核上皮细胞，偶有少量角化细胞；动情期：大量无核角化细胞，偶有少量有核上皮细胞；动情后期：白细胞、角化细胞、有核上皮细胞均有；动情间期：大量白细胞，少量有核上皮和角化上皮细胞，混有黏液[8]。③子宫指数及卵巢指数。9周后称取各组大鼠体质量，按3 mL/kg的剂量用10%水合氯醛麻醉。麻醉后开腹剪取大鼠子宫及卵巢，0.9%氯化钠溶液冲洗，滤纸拭干，称取双侧子宫及卵巢质量。子宫指数=双侧子宫质量/大鼠体质量；卵巢指数=双侧卵巢质量/大鼠体质量。④免疫蛋白印迹(Western blot)法检测Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白水平。9周后取100 mg卵巢组织提取蛋白，采用考马斯亮蓝(BCA)法测定其浓度。制备蛋白质变性SDS-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)胶，蛋白上样量为20 μg，分离胶用200 V电泳40 min，300 mA恒流转移，根据所转蛋白分子量，约1 min/kd。聚偏二氟乙烯(PVDF)用含5%奶粉的Tris-盐酸缓冲液(TBST)封闭，室温下静置2 h。加入一抗[Bcl-2(1∶1 000)、Bax(1∶1 000)、Caspase-3(1∶500)]，4 ℃孵育过夜。分别加入相应的二抗(1∶10 000)，室温孵育2 h。加入强化学发光法(ECL)发光液，照片以TIFF格式导出后在Image J软件下分析各条带光密度。以目的蛋白/β-actin比值作为目的蛋白表达量。最后将N组的分析结果设定为1，各组与之进行标化作为最终结果，Bcl-2/Bax比值为同一样本Bcl-2与Bax蛋白含量的比值。

1.6 统计学方法 采用SPSS23.0统计学软件分析数据。计量资料符合正态分布以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，2组间比较采用成组t检验；多组间比较采用单因素方差分析进行LSD检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较 与N组比较，M组进食、排便、行为变化和毛色变化均无明显差异；与M组比较，L组、Z组、H组进食较多，毛色较光亮。

2.2 各组大鼠动情周期、子宫指数及卵巢指数比较 见表1。各组大鼠子宫指数及卵巢指数比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。与N组比较，M组大鼠动情周期延长($P<0.05$)；与M组比较，X、Z及H组大鼠动情周期缩短($P<0.05$)；各治疗组动情周期比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表1 各组大鼠动情周期、子宫指数及卵巢指数($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	动情周期(d)	子宫指数(10^{-3})	卵巢指数(10^{-4})
N组	10	3.62±0.74	1.90±0.42	4.37±0.42
M组	10	6.89±1.32①	2.35±0.50	4.45±0.67
X组	10	4.21±0.95②	1.93±0.44	4.20±0.89
L组	10	5.15±1.16	1.82±0.29	4.45±0.85
Z组	10	4.52±0.83②	2.32±0.51	4.40±0.75
H组	10	4.46±1.29②	2.05±0.57	4.32±0.40

注：①与N组比较，$P<0.05$；②与M组比较，$P<0.05$

2.3 各组大鼠Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达水平及Bcl-2/Bax比较 见表2、图1。各组大鼠Bax蛋白表达水平比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)。与N组比较，M组Bcl-2表达水平及Bcl-2/Bax降低($P<0.05$)，Caspase-3表达水平升高($P<0.05$)；与M组比较，X组、Z组及H组Bcl-2表达水平及Bcl-2/Bax升高($P<0.05$)，Caspase-3表达水

平下降（$P<0.05$），L组Caspase-3表达水平下降（$P<0.05$）；与X组比较，L组Bcl-2表达水平及Bcl-2/Bax降低（$P<0.05$）；与L组比较，Z组及H组Bcl-2表达水平及Bcl-2/Bax上升（$P<0.05$），Caspase-3表达水平下降（$P<0.05$）。

表2 各组大鼠Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达水平及Bcl-2/Bax比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Bcl-2	Bax	Caspase-3	Bcl-2/Bax
N组	3	1.00	1.00	1.00	1.00
M组	3	0.52±0.15①	1.12±0.16	3.25±0.24①	0.51±0.15①
X组	3	0.71±0.17②	1.05±0.13	1.88±0.32②	0.72±0.23②
L组	3	0.49±0.23③	1.21±0.08	2.65±0.21②	0.50±0.29③
Z组	3	0.68±0.12②④	1.18±0.15	1.58±0.35②④	0.62±0.18②④
H组	3	0.74±0.19②④	1.08±0.16	1.66±0.28②④	0.68±0.16②④

注：①与N组比较，$P<0.05$；②与M组比较，$P<0.05$；③与X组比较，$P<0.05$；④与L组比较，$P<0.05$

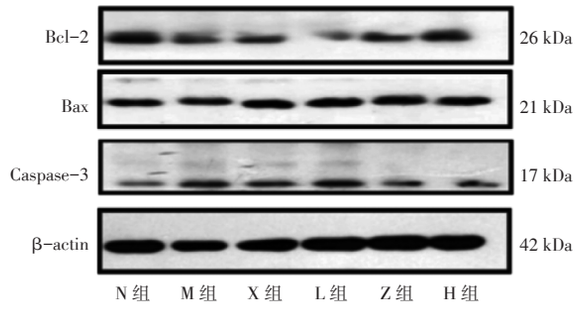


图1 各组大鼠Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达电泳图

3 讨论

POI是指女性在40岁以前出现卵巢功能减退，主要表现为月经异常（闭经、月经稀发或频发）、促性腺激素水平升高（FSH>25 U/L）、雌激素水平波动性下降[8]。POI的提出有利于临床的早发现、早诊断，使患者得到充分的重视和必要的干预，有利于患者身心健康。POI的病因有某些性染色体缺陷及常染色体基因缺陷；自身免疫功能紊乱，如自身免疫性肾上腺疾病、甲状腺疾病、1型糖尿病等；感染流行性腮腺炎、人类免疫缺陷病毒、带状疱疹病毒、巨细胞病毒等；医源性因素，如放疗、化疗、盆腔手术等[1]。细胞凋亡是一种自然现象，存在于多细胞生物的生长、发育和死亡等过程中，发挥着及时清除机体内受损和（或）多余细胞的作用，以维持组织器官及内环境的稳态[9]。女性卵母细胞储备量一出生就已确定，只有少数卵泡能完成排卵，绝大部分的卵泡存在不同阶段闭锁，其中卵母细胞的凋亡起到了重要作用[10]。研究显示，遗传、免疫、感染、医源性等因素都与卵巢颗粒细胞的凋亡有密切关系，参与了POI的发生发展[2-4]。细胞凋亡目前研究较多的主要两种凋亡途径为外源性（死亡受体介导凋亡）信号通路及内源性（细胞线粒体介导凋亡）信号通路。Bcl-2蛋白家族参与细胞线粒体凋亡信号通路，Bcl-2和Bax是其中重要的调节因子，两者通过形成异二聚体Bcl-2/Bax、同二聚体Bcl-2/Bcl-2或Bax/Bax的形式影响细胞凋亡。即Bcl-2表达水平升高、比值上调，抑制细胞凋亡；Bax表达水平升高、比值下调，促进细胞凋亡[11-12]。由内、外源共同执行的途径又叫Caspase途径，通过介导Caspase酶级联反应依次激活凋亡执行因子，最终导致细胞凋亡，其中细胞凋亡的中心环节是Caspase-3的活化[9]。

雷公藤是治疗自身免疫性疾病的传统中药材，治疗过程中会出现生殖毒性、损害卵巢功能。本研究采用雷公藤多苷制作POI大鼠模型，发现M组大鼠动情周期延长，Bcl-2表达下降，Bcl-2/Bax比值显著降低，Caspase-3表达显著上升，Bax表达有所提高但不具有统计学意义，且其子宫指数及卵巢指数未见显著变化。说明雷公藤多苷50 mg/kg剂量灌胃2周可造成大鼠卵巢功能变化，但未造成子宫及卵巢实质的损伤。结合本研究团队前期研究显示M组大鼠FSH上升，抗缪勒管激素及雌二醇下降，认为POI模型制作成功；POI与大鼠卵巢组织Bcl-2、Caspase-3含量的变化密切相关[13]。

中医认为肾气盛，天癸至，月经来潮；肾气衰退，天癸竭，月经停闭。二仙汤是上海中医药大学张伯讷教授针对围绝经期综合征研制的名方，具有补肾阳滋肾阴、调和阴阳之效。紫菟二仙汤是在二仙汤的基础上加入血肉有情之品的紫河车、补肝益肾的菟丝子、清心解郁化瘀的郁金组成。通过长期临床工作验证其具有改善POI患者临床症状，提高卵巢功能的作用[5]。动物实验显示，中、高剂量组的紫菟二仙汤可不同程度改善POI大鼠的卵巢结构，且可提高抗缪勒管激素、人抑制素B及雌二醇含量，降低FSH含量[13]。本研究结果显示，Z组及H组大鼠动情周期较M组有所缩短，Bcl-2表达有所提高，Caspase-3表达明显下降，Bcl-2/Bax比值上升，L组仅Caspase-3表达有所下降（$P<0.05$）。说明紫菟

二仙汤具有抑制卵巢凋亡，改善卵巢功能的作用，且与剂量呈正比。

综上所述，雷公藤多苷可致卵巢功能改变，且与临床 POI 患者的表现相符。紫菀二仙汤可调节雷公藤多苷致 POI 模型大鼠的动情周期，其机制可能与提高 Bcl-2 表达，降低 Caspase-3 表达，提高 Bcl-2/Bax 密切相关。

[参考文献]

[1] 陈子江，郁琦，华克勤，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] EBRAHIMI M，AKBARI ASBAGH F. The role of auto-immunity in premature ovarian failure[J]. Iran J Reprod Med，2015，13(8)：461-472.

[3] ROSSETTI F，RIZZOLIO F，PRAMPARO T，et al. A susceptibility gene for premature ovarian failure (POF) maps to proximal X q28[J]. Eur J Hum Genet，2004，12(10)：829-834.

[4] MASSIN N，MEDURI G，BACHELOT A，et al. Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients preseting with premature ovarian failure[J]. Mol Cell Endocr，2008，282(1-2)：95-100.

[5] 刘玮，姚慕崑，石吟. 紫菀二仙汤治疗卵巢储备功能下降32例疗效观察[J]. 浙江中医杂志，2015，50(9)：666.

[6] 高慧，杨涓，韩冰，等. 药物型卵巢早衰动物模型的研究[J]. 国医论坛，2007，22(3)：22-26.

[7] 魏伟，吴希美，李建元. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2010：69-72.

[8] 中华医学会妇产科学分会绝经学组. 早发性卵巢功能不全的激素补充治疗专家共识[J]. 中华妇产科杂志，2016，52(9)：881-886.

[9] 李帅，张炳东. 细胞凋亡途径的研究进展[J]. 山东医药，2017，57(37)：103-106.

[10] 叶娜，董晓英，李冬华. 卵巢早衰的颗粒细胞凋亡机制研究进展[J]. 首都医科大学学报，2014，35(3)：379-383.

[11] 卢岩，田梦，沈庆思. 隔药灸脐对卵巢早衰模型大鼠Bcl-2、Bax蛋白和mRNA表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志，2017，24(7)：40-44.

[12] 王馨怡. 左归丸含药血清对大鼠卵巢颗粒细胞Bcl-2、Bax蛋白表达的影响[D]. 兰州：甘肃中医药大学，2017.

[13] 顾燕频，王荷丹，刘玮，等. 紫菀二仙汤对雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全大鼠卵巢结构与功能的影响[J]. 浙江中医杂志，2020，55(11)：790-792.

(责任编辑：钟志敏)