

二仙汤含药血清对顺铂干预的大鼠卵巢颗粒细胞凋亡调控蛋白 bcl-2、bax 表达的影响

杨 蕾 王继峰 牛建昭 赵丕文 孙丽萍 陶仕英 武洪波 蔡欣悦 齐明月

(北京中医药大学,北京,100029)

摘要 目的:观察二仙汤含药血清对顺铂干预的大鼠卵巢颗粒细胞凋亡调控蛋白 bcl-2、bax 表达的影响,从细胞凋亡的角度探讨二仙汤含药血清对卵巢颗粒细胞凋亡的作用机制。方法:22~24 d 的 SD 雌性大鼠 30 只,随机分为 3 组,分别为生理盐水组,补佳乐组,二仙汤组。每组大鼠 10 只。给药 4 d 后处死大鼠,心脏取血,制备药物血清。22~24 d 的 SD 大鼠卵巢颗粒细胞,经培养贴壁后,用顺铂损伤大鼠原代卵巢颗粒细胞。经各组药理血清作用后,应用放免法,进行雌激素和孕激素水平测定及分析。应用免疫组化法,测定各分组 bcl-2、bax 蛋白的表达情况,并进行图像分析。结果:放免结果显示,与正常组相比,模型组和补佳乐组 E_2 表达明显改变,有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比,补佳乐组、二仙汤组 E_2 表达均有增加;与正常组相比,模型组 P 表达水平有所变化,有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比,二仙汤组 P 表达略高于补佳乐组,但低于正常组。免疫组化结果显示,在卵巢颗粒细胞细胞质上可见 bcl-2 和 bax 蛋白表达的棕黄色颗粒。和正常组相比较,顺铂干预后各组 bcl-2 表达均减弱,而以模型组最明显,有统计学意义($P < 0.05$);和模型组比较,各药物组均可见 bcl-2 阳性表达增加,但弱于正常组,有统计学意义($P < 0.05$)。bax 与 bcl-2 表达强度结果相反,和正常组比较,顺铂干预后的各组 bax 均表达增强,模型组呈现极强表达现象,有统计学意义($P < 0.05$);和模型组比较,各药物组均可见阳性表达减弱,但表达高于正常组,有统计学意义($P < 0.05$)。结论:二仙汤能降低经顺铂干预后大鼠 bax 蛋白在卵泡颗粒细胞表达,增强 bcl-2 蛋白的表达,二仙汤能够通过调节凋亡蛋白 bcl-2、bax 蛋白的表达,抑制卵巢颗粒细胞发生凋亡,从而保护卵巢功能。

关键词 二仙汤;顺铂;颗粒细胞;细胞凋亡

Effects of Erxian Decoction Serum on Regulating Expression of Protein bcl-2 and bax in Rat Ovarian Granulosa Cells Apoptosis Induced by Cisplatin

Yang Lei, Wang Jifeng, Niu Jianzhao, Zhao Piwen, Sun Liping, Tao Shiyong, Wu Hongbo, Cai Xinyue, Qi Mingyue

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To observe the effect of serum containing Erxian decoction on regulating the expression of bcl-2 and bax protein from rats' ovarian granulosa cells induced by cisplatin and to investigate the mechanism of Erxian Decoction serum on apoptosis of ovarian granulosa cells from the perspective of apoptosis. **Methods:** Thirty SD female rats for 22 to 24 days birth were randomly divided into three groups: the normal saline group, progynova group and the Erxian Decoction group with 10 rats in each group. After 4-day drug administration, rat hearts were taken to prepare drug serum. Ovarian granulosa cells were taken from SD rats and cultured to acquire adherent cells. Then, primary ovarian granulosa cells in rats were induced by cisplatin. After pharmacological action to serum, radio immunity method was used to detect estrogen and progesterone and make analysis. Immunohistochemistry was applied to detect the expression of bcl-2 and bax protein in each group and then for image analysis. **Results:** Test results showed that E_2 expression significantly changed in the model group and progynova group ($P < 0.05$) with statistically significant difference, compared with the normal group. Compared with the model group, the expression of E_2 increased significantly in the progynova group and the Erxian Decoction group. Compared with the normal group, P expression in the model group was somewhat changed ($P < 0.05$), which showing statistically significant difference. Compared with the model group, P expression in Erxian Decoction group was slightly higher than that of the progynova group, but lower than that of the normal group. Immunohistochemistry results showed that brown granules of bcl-2 and bax protein were expressed in the cytoplasm of ovarian granulosa cells. Compared with the normal group, the expression of bcl-2 in each group under the intervention of cisplatin was decreased, and the model group was the most obvious ($P < 0.05$). Compared with model group, the positive expression of bcl-2 in each drug group was increased, but it was

基金项目:教育部国家外专局创新引智基地项目(编号:B07007);国家自然科学基金项目(编号:81273887;30772849)

作者简介:杨蕾(1990.02—),女,在读研究生,研究方向:中医药防治女性生殖内分泌疾病基础研究,E-mail:1171935855@qq.com

通信作者:陶仕英(1970.09—),女,副教授,研究方向:中医药防治女性生殖内分泌疾病基础研究,Tel:(010)64287538,E-mail:taoshiying1970@163.com

weaker than that in the normal group ($P < 0.05$). The intensity of bax and bcl-2's expression was opposite. Compared with the normal group, Bax expression in each group under the intervention of cisplatin were enhanced and that in the model group especially showed a strong expression ($P < 0.05$). Compared with the model group, the positive expression of the drug groups was decreased, but was higher than that of the normal group ($P < 0.05$) with statistically significant difference. **Conclusion:** Erxian Decoction can decrease the expression of Bax protein in follicular granulosa cells induced by cisplatin injury and increase the expression of bcl-2 protein. It can inhibit the apoptosis of ovarian granulosa cells and protect the ovarian function by adjusting the expression of bcl-2 and bax.

Key Words Erxian Decoction; Cisplatin; Granulosa cells; Apoptosis

中图分类号: R-332; R271.9 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.04.040

卵巢颗粒细胞对育龄期女性的生殖功能起着重要的作用。正常卵泡生长、发育以及排卵均需要颗粒细胞的正常的增殖和功能表达^[1]。顺铂作为抗癌药物,在临床治疗肿瘤的同时也具有细胞毒性作用。它可以破坏正常的卵巢颗粒细胞,使其发生凋亡,甚至形成卵巢早衰^[2]。而传统医学认为卵巢功能发生异常主要是肾气亏虚,精血不足所致,治当以填精益髓,调理阴阳,补益天癸。二仙汤是张伯讷教授研制出来的以补肾为主的方剂。在临床治疗卵巢功能异常中具有明显的疗效。

本实验观察二仙汤含药血清对顺铂干预的大鼠卵巢颗粒细胞凋亡调控蛋白 bcl-2、bax 表达的影响,旨在从细胞凋亡的角度探讨二仙汤含药血清对卵巢颗粒细胞凋亡的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 22~24 d 健康雌性 SD 大鼠,共 40 只,体质量 (60 ± 10) g。购于斯贝福(北京)实验动物科技有限公司。使用许可证: SCXK(京)2011-0004。

1.1.2 药物 二仙汤由淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、黄柏和知母组成。按照《妇科临床方剂学》规定的剂量比(9:6:10:15:12:10)称取,由北京中医药大学东直门医院提供,根据东直门院提供的中药颗粒与中药饮片的固有比例进行计算,最终按照人用药剂量计算大鼠用药剂量为 $7.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。注射用顺铂(CDDP),每支 10 mg,由齐鲁制药有限公司生产。补佳乐(雌激素)购自东直门医院,规格:1 mg/片,由拜耳医药有限公司生产。用法与剂量:成人每日 1 mg,折算成大鼠所需剂量即 $0.009 \text{ mg}/\text{kg}$ 。

1.1.3 试剂 免疫组化试剂:1) Bax(Rabbit polyclonal IgG)、Bcl-2(Rabbit polyclonal IgG)购于北京欧北科技有限公司。2) DAB 显色剂、二抗 SP-9000,(羊抗兔)购于北京中山金桥生物技术有限公司。

放免试剂:1) 血清孕酮放免测定盒 P(HY-031) RIAKIT、血清雌二醇放免测定盒 E2-17 β (HY-10029) RIAKIT 均购于北京华英生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 制备卵巢颗粒细胞 22~24 d 雌性 SD 大鼠 10 只,体质量 35 g,饲养在 $23 \sim 25^\circ\text{C}$,光照 12 h,食水随意,适应性喂养 1 d,注射 PMSG 50IU/只,48 h 后,在无菌条件下取出双侧卵巢颗粒细胞进行培养。具体操作如下:1) 取 SD 大鼠,10% 水合氯醛麻醉后,经脱臼处死,浸泡 75% 乙醇中消毒 3 min。2) 消毒后放入已消毒托盘中在超净台中取双侧卵巢,放入预冷的 Hank's 液 2.7 mL。3) 用 Hank's 液清洗 3 次,将其中的脂肪、包膜等清理干净。4) 将卵巢移入无血清培养基中,用 1 mL 一次性注射器刺破卵巢,5 min/只,使颗粒细胞充分释放。5) 加入 0.3 mL 2.5% 胰酶反复用吸管吹打悬液数次,使颗粒细胞团块分离。37 $^\circ\text{C}$ 消化 10 min(每 3 min,震荡或吹打一次)。6) 加入 1 mL 含血清培养液终止胰酶消化,并静置 10 min。取悬液加入 15 mL 离心管中。7) 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清。加入生理盐水 5 mL 冲散细胞再次离心。8) 弃上清,加入 10% 胎牛血清 0.2 mL,吹打均匀。9) 计数:应用血球小板计数,调整悬液浓度,以 5×10^5 接种于 96 孔板中。在 37 $^\circ\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养。观察贴壁情况,待细胞长满瓶底至 75%~80% 融合时,用于实验。

1.2.2 制备药理血清组 22~24 d 的雌性 SD 大鼠 50 只,体质量 35~40 g,饲养在 $23 \sim 25^\circ\text{C}$,光照 12 h,食水随意,适应性喂养 1 d,第 2 天取药理血清。具体操作如下。药理血清动物分 3 组:1) 正常组:灌胃蒸馏水 0.4 mL/d。2) 补佳乐组:灌胃补佳乐 0.5 mL/d。3) 二仙汤组:灌胃二仙汤 0.4 mL/d,各组连续灌胃 3 d,于第 4 天晨起七点灌胃,2 h 以后,心脏取血并分离血清, -20°C 保存。

1.2.3 顺铂干预卵巢颗粒细胞 待细胞生长至底

壁的 75% ~80% 时,将模型组、补佳乐组、二仙汤组的培养基吸出,每孔加入 CDDP (浓度为 2.5 μg/mL)200 μL,放入 37 ℃,5% CO₂ 的培养箱中培养 12 h。

1.2.4 药理血清处理 于 CDDP 作用 12 h 后,进行给药处理,每孔加入相应的药理血清组 200 μL,放入 37 ℃,5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,进行指标测定。

1.2.5 卵巢颗粒细胞 bcl-2、bax 免疫组化染色步骤
免疫组化染色采用 SABC 法,其中 bcl-2、bax 的一抗浓度均为 1:200。1)96 孔板每孔滴加 20 μL 4% 多聚甲醛固定 20 min。2)1 * PBS 清洗标本 3 次,2 min/次。3)每孔滴加 20 μL 0.5% tritox-100,摇匀,孵育 20 min。4)1 * PBS 清洗标本 3 次,2 min/次。5)3% H₂O₂ 去离子水孵育 7 min。6)1 * PBS 清洗标本 3 次,3 min/次。7)滴加试剂 A (封闭用正常山羊血清工作液)室温孵育 12 min,倾去,勿洗。8)滴加一抗,37 ℃ 孵育 3 h。9)1 * PBS 清洗标本 3 次,3 min/次。10)滴加试剂 B (生物素化二抗工作液 IgG/Bio),室温孵育 12 min。11)1 * PBS 清洗标本 3 次,3 min/次。12)滴加试剂 C (辣根酶标记链霉卵白素工作液 S-A/HRP),室温孵育 12 min。13)1 * PBS 清洗标本 3 次,3 min/次。14)DAB 显色剂显色。15)自来水冲洗,显微镜观察。

每孔随机选取 6 个视野,统一放大倍数为 200 倍,利用免疫组化软件包对卵巢颗粒细胞进行灰度测量分析,并测算视野内阳性目标总面积,并与视野面积相比得到阳性反应颗粒的灰度值。

1.2.6 放免法对 E₂ 及 P 的测定 取标本 100 μL、标准品 100 μL,加 E₂ 及 P 抗体 100 μL,加 E₂ 及 P 标记物 100 μL,37 ℃ 2 h,加二抗分离剂 1 mL,室温 15 min,3 500 r/min 离心 15 min。去上清,测沉淀 CPM。自动放免分析仪出结果。

1.3 统计学方法 实验结果采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有实验数据均采用 SPSS8.0 统计软件组间比较用单因素方差分析法 (One-Way ANOVA) 进行统计处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠雌二醇及孕激素实验分析结果 与正常组相比,模型组和补佳乐组 E₂ 表达明显改变,有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组相比,补佳乐组 E₂ 表达明显增加,而二仙汤组无统计学意义,但可看出与模型组相比较二仙汤组表达明显增加,见图 1;与正常组相比,模型组 P 表达水平有所变化,

有统计学意义 ($P < 0.05$),可见模型组 P 表达明显减少,见图 2。与模型组相比,补佳乐组、二仙汤组均有所变化,有统计学意义 ($P < 0.05$),其中二仙汤组 P 表达略高于补佳乐组。可看出二仙汤含药血清能促进顺铂干预后的卵巢颗粒细胞 E₂ 和 P 的合成与分泌能力。见表 1。

表 1 各组大鼠卵巢颗粒细胞中 E₂、P 的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	E ₂	P
正常组	5.971 ± 1.111 *	0.379 ± 0.021 $\Delta\Delta$
模型组	3.471 ± 0.87 Δ	0.224 ± 0.048 * *
补佳乐组	25.287 ± 1.803 $\Delta\Delta$ * *	0.358 ± 0.047 * *
二仙汤组	5.117 ± 0.818	0.363 ± 0.056 * *

注:与正常对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$ 。

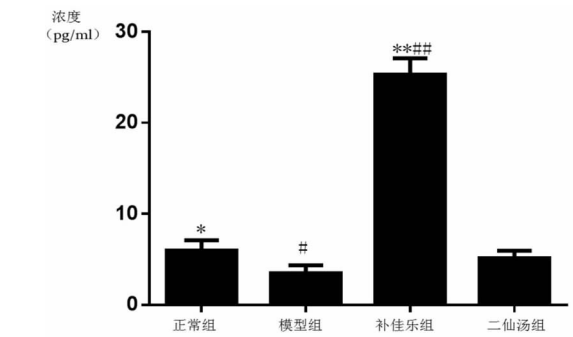


图 1 各组大鼠卵巢颗粒细胞中 E₂ 分泌柱状图

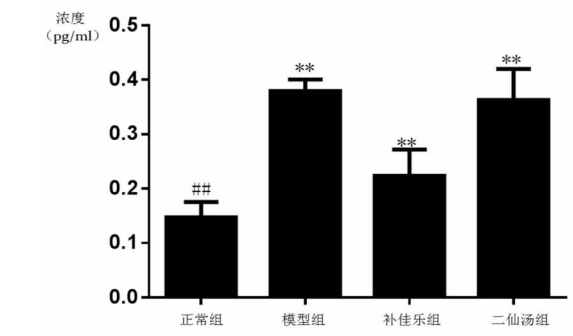


图 2 各组大鼠卵巢颗粒细胞中 P 分泌柱状图

2.2 卵巢颗粒细胞中 bcl-2、bax 蛋白表达比较 免疫组化结果显示:各组 bcl-2 棕黄色阳性表达位于胞质内,其中正常组表达最多,呈深棕色;模型组 bcl-2 阳性细胞表达明显减少,呈淡棕色。补佳乐组、二仙汤组阳性细胞着色增强,而二仙汤组阳性表达最为明显,但少于正常组。见图 3。而 bax 蛋白表达呈现相反的趋势,各组 bax 在细胞质内均有表达,可见棕黄色阳性物质位于胞质内,正常组 bax 阳性细胞染色较浅,呈棕色或浅棕色,表达较少。模型组阳性细胞着色较深,呈深棕色,表达较多。补佳乐组、二仙汤组和模型组相比,阳性表达细胞着色变浅,但不及正常组。见图 4。

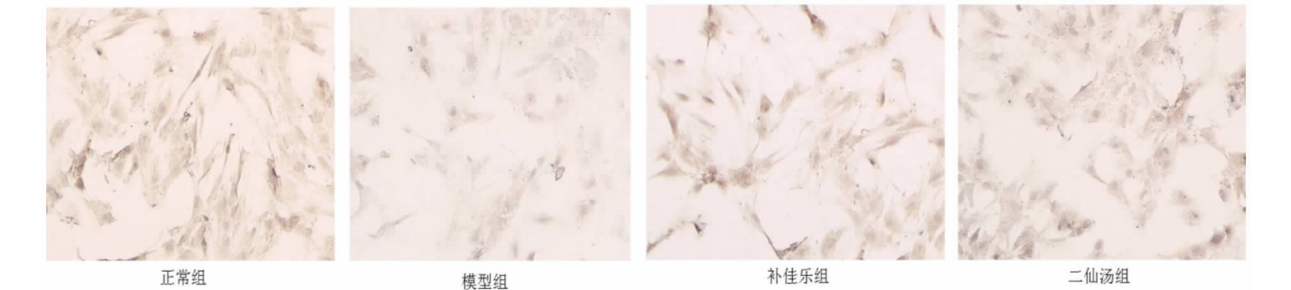


图3 检测各组大鼠卵巢颗粒细胞中 bcl-2 蛋白的表达情况(免疫组化×200)

注:正常组:阳性颗粒表达多,染色呈深棕色;模型组:阳性颗粒表达明显减少,呈现淡棕色;补佳乐组:阳性表达较模型组明显增多但不及正常组,呈现浅棕色;二仙汤组:阳性表达比补佳乐组表达多但不及正常组,呈现浅棕色偶有深棕色。

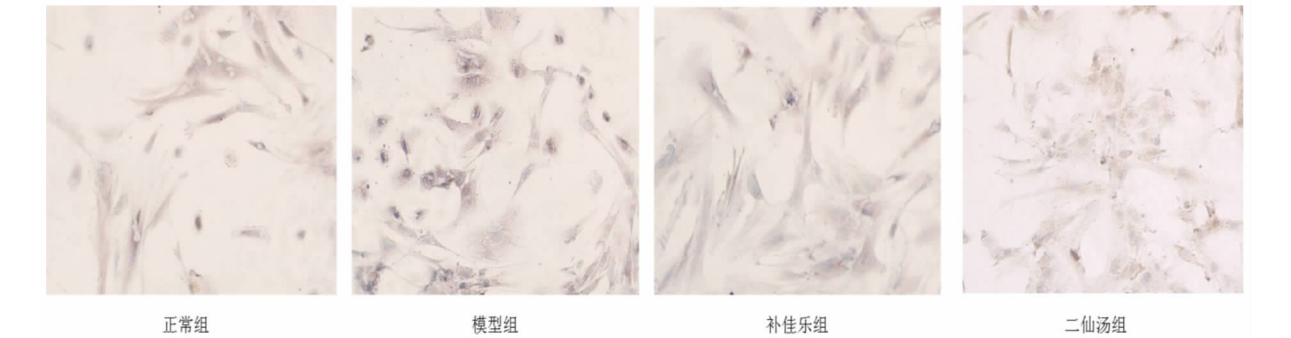


图4 检测各组大鼠卵巢颗粒细胞中 bax 蛋白的表达情况(免疫组化×200)

注:正常组:阳性颗粒表达少,染色呈浅棕色;模型组:阳性颗粒表达明显增多,呈现深棕色;补佳乐组:阳性表达较模型组明显减少但不及正常组,呈现浅棕色;二仙汤组:阳性表达比补佳乐组表达少但不及正常组,呈现浅棕色。

2.3 各组卵巢颗粒细 bcl-2、bax 表达的比较 免疫组化实验结果:和正常组相比较,顺铂干预后各组 bcl-2 表达均减弱,而以模型组最明显,有统计学意义($P<0.05$);和模型组比较,各药物组均可见 bcl-2 阳性表达增加,但弱于正常组,其中二仙汤组阳性表达要高于补佳乐组,有统计学意义($P<0.05$)(见表2)。bax 与 bcl-2 表达强度结果相反,和正常组比较,顺铂干预后的各组 bax 均表达增强,模型组呈现极强表达现象,有统计学意义($P<0.05$);和模型组比较,各治疗组均可见阳性表达减弱,但表达高于正常组,其中二仙汤组阳性表达略低于补佳乐组,有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠卵巢细胞中 bcl-2、bax 蛋白免疫组化图像分析结果($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	bcl-2	bax
正常组	200.338±2.366**	207.233±2.076**
模型组	206.092±2.312△△	196.649±1.115△△
补佳乐组	203.463±1.245△△	197.297±1.441△△
二仙汤组	202.183±1.456**	200.796±0.729△△**

注:与正常对照组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3 讨论

细胞凋亡是一个受严格调控的能量依赖性的自

杀程序,它引发细胞内一系列信号级联式放大反应,最终导致细胞死亡。细胞凋亡是通过2个信号转导途径实现:一种是内在途径另一种是外在途径^[3]。近年来研究表明,bcl-2蛋白广泛的存在于线粒体膜、内质网膜以及外核膜上,但其主要存在于线粒体外膜,bcl-2蛋白能够促进颗粒细胞的分裂,可以抑制凋亡,近而使卵泡闭锁率降低也就是说 bcl-2 蛋白表达缺失,会导致卵巢组织中有效卵泡减少,严重者会出现无卵母细胞的卵泡^[4]而 bax 蛋白约 21% 与 bcl-2 同源且有拮抗作用。高表达 bax 蛋白是卵子细胞死亡的关键因素,同时,bax 的基因产物能加速细胞凋亡^[5]。bcl-2 与 Bax,组成一个平衡体系,bax 过度表达可以加速细胞凋亡,而 bcl-2 过度表达则使细胞凋亡得到抑制。免疫组化结果提示:bcl-2 和 bax 蛋白表达与卵巢颗粒细胞凋亡密切相关,而细胞凋亡则是通过促进或抑制参与细胞凋亡的相关基因蛋白的表达情况来实现的^[6]。实验结果表明二仙汤可增加 bcl-2 蛋白的表达进而抑制颗粒细胞的凋亡。同时,二仙汤也可以降低 bax 蛋白的表达进而减缓颗粒细胞的凋亡。

雌二醇(Estradiol, E₂)是女性激素中生物活性最强的一种甾体类化合物,主要由卵巢合成和分泌,

少量由肾上腺分泌。雌二醇浓度是检查下视丘—垂体—生殖腺轴功能的指标之一^[7]。孕酮(Progesterone, P)是一种重要性激素,不仅在月经周期的调节中起重要作用,也是维持妊娠所必须的重要激素之一, P 由卵巢分泌,在卵巢内主要是由黄体产生,因此,临床上测定血清孕酮的含量,对于妇女卵巢排卵功能也有着重要的意义。本实验所反映出来的激素水平,可能预示着正常卵泡由正常到功能衰竭之间的一个过渡阶段。E₂ 的升高可作为早期卵巢功能不全或障碍的重要指标,可估计卵泡池中所剩卵泡的数量。本次实验表明,二仙汤能够升高 P、E₂ 水平,进而改善卵巢功能。

二仙汤对顺铂损伤的卵巢颗粒细胞具有较好的疗效。以往研究表明,二仙汤可以作用于垂体,改善 GTH 细胞的结构促性腺激素的合成和分泌,有效的治疗绝经后高血压。可以调节自身性腺分泌,使性激素增加,临床治疗月经不调。也可以延缓老年大鼠弓状核退化,用于治疗女性更年期综合征^[8-11]。本次实验研究表明,二仙汤通过调节血清中激素含量,能降低顺铂干预后大鼠卵巢颗粒细胞中 bax 蛋白在卵泡颗粒细胞表达,增强 bcl-2 蛋白的表达,二仙汤可抑制卵巢颗粒细胞凋亡,降低顺铂对卵巢颗粒细胞的损害,从而促进卵泡发育,改善卵巢功能。

参考文献

- [1] 艾浩,牛建昭,薛晓鸥,等. 化疗损伤性卵巢功能早衰小鼠动物模型的研究[J]. 中国实验动物学报,2007,15(1):35-38.
- [2] 李长艳,尤昭玲. 尤昭玲教授治疗卵巢早衰经验[J]. 湖南中医杂志,2012,28(3):18-20.
- [3] 叶娜,董晓英,李冬华,等. 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.
- [4] 张丽娟,陶仕英,赵丕文,等. 顺铂建立大鼠卵巢早衰模型的实验研究[J]. 世界中医药,2015,10(10):1563-1569.
- [5] 李鹏,张威,张奕,等. 顺铂对豚鼠耳蜗及螺旋神经节细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,30(1):45-48.
- [6] 高瑛,石坤和,顾渊,等. 二仙汤对乳腺癌细胞转移大鼠 Cdc42 的影响[J]. 中医学报,2016,31(214):312-315.
- [7] 余芳,姜涛,赵晶晶,等. 雌孕激素联合心理疏导治疗卵巢早衰的效果[J]. 中国医药导报,2015,12(26):65-69.
- [8] 李黎. 二仙汤的现代临床运用[J]. 四川中医,2014,32(12):182-184.
- [9] 王令军. 二仙汤合知柏地黄汤治疗卵巢早衰临床观察[J]. 中医学报,2010,25(148):534-535.
- [10] 王影,薛霁. 卵巢早衰的中西医研究进展[J]. 中国妇幼保健,2015,30(3):2897-2898.
- [11] 高昀,翟玉祥,高宝仁. 王灿晖二仙汤加减治疗围绝经期综合征经验[J]. 中医学报,2012,27(167):419-420.

(2016-06-28 收稿 责任编辑:白桦)

(上接第 864 页)

- [20] 谢辉辉,谢彤,徐建亚,等. 基于代谢组学方法研究乌头碱和苯甲酰乌头原碱对 BeWo 细胞的毒性机制[J]. 分析化学,2015,43(12):1808-1813.
- [21] 李艳茸,李春,王智民,等. 藏药甘青乌头化学成分研究(Ⅲ)[J]. 中国中药杂志,2014,39(7):1163-1167.

- [22] 姜婷,轩辕欢,付玲,等. 准噶尔乌头中 4 种生物碱在炮制过程中的含量变化[J]. 中成药,2016,38(12):2641-2646.
- [23] 孙蕾,王少辰,孙明谦,等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 研究 6 种乌头生物碱类成分的裂解途径[J]. 中草药,2016,47(16):2827-2831.

(2016-09-29 收稿 责任编辑:洪志强)