

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.02.014

济阴颗粒对绝经综合征大鼠卵巢 Caspase 非依赖性细胞凋亡通路的影响

赵磊^{1,2}, 黄赫², 范英兰², 袁媛², 包玉龙², 梁茂新^{*}

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110847; 2. 辽宁省中医药研究院)

摘要 目的 探讨济阴颗粒治疗绝经综合征的可能作用机制。方法 105 只大鼠随机选择 10 只作为空白对照组, 其余 95 只采用腹腔注射去氧乙烯基环己烯溶液建造绝经综合征大鼠模型, 将造模成功 60 只大鼠随机分为模型组、西药对照组、中药对照组和济阴颗粒低、中、高剂量组, 每组 10 只。造模后空白对照组与模型组给予蒸馏水 10ml/(kg·d) 灌胃, 济阴颗粒低、中、高剂量组分别给予济阴颗粒 3.9、7.8、15.6g 济阴颗粒/(kg·d) 灌胃, 西药对照组给予戊酸雌二醇片 0.105mg/(g·d) 灌胃, 中药对照组给予坤宝丸 10.5g/(kg·d) 灌胃, 每日灌胃 1 次, 连续 30 天。免疫组织化学法检测卵巢细胞 P53 蛋白表达, 荧光 RT-PCR 法检测卵巢细胞凋亡诱导因子 (AIF) 和核酸内切酶 G (Endo-G) mRNA 表达。结果 与空白对照组比较, 模型组卵巢细胞 P53 蛋白表达及 AIF、Endo-G mRNA 表达均升高 ($P < 0.01$), 而济阴颗粒各剂量组均能降低卵巢细胞 P53 蛋白、AIF mRNA 与 Endo-G mRNA 表达 ($P < 0.01$)。济阴颗粒低剂量组下调 P53 蛋白最显著, 而高剂量组下调 AIF mRNA 作用最显著 ($P < 0.01$)。结论 济阴颗粒可抑制 Caspase 非依赖性细胞凋亡通路, 从而抑制卵巢细胞凋亡, 可能是其治疗绝经综合征的作用机制之一。

关键词 绝经综合征; 细胞凋亡; Caspase 非依赖性细胞凋亡通路; 济阴颗粒

绝经综合征是指妇女在绝经前后由于卵巢功能逐渐衰退、雌激素水平下降, 出现以植物神经系统功能紊乱为主伴有神经心理症状的一组症候群。现代医学多采用激素补充疗法治疗, 但会因干预人体自身对激素的调节能力, 加剧激素的紊乱, 引起恶心、头痛、增重、失眠及焦虑等不良反应^[1]。济阴颗粒是我们利用自建的《普济方》数据库管理系统, 结合临床经验筛选的中药小复方。前期研究^[2]表明, 济阴颗粒可促进雌性大鼠出现动情期、增加子宫和卵巢重量、上调血清雌二醇 (E_2) 含量。本研究从 Caspase 非依赖性细胞凋亡通路探讨济阴颗粒治疗绝经综合征的可能作用机制, 为后续临床应用和深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 105 只, 体重 180 ~ 220g, 6 ~ 9 周龄, 实验动物合格证号: 211002300005957。

基金项目: “十二五”国家科技重大专项 (2012ZX09303017); 国家临床重点专科建设项目; 国家中医药管理局中医药重点学科

* 通讯作者: lmxin@126.com, (024) 31207370

在辽宁省中医药研究院动物实验中心饲养, 温度 20 ~ 25℃, 湿度 20% ~ 30%, 自由摄食、饮水。

1.2 实验药物

济阴颗粒: 由生地黄、淫羊藿、香附、丹参、黄柏 (5 : 4 : 3 : 3 : 3) 组成, 配方颗粒购自江阴天江药业有限公司, 批号分别为: 1406117、1502036、1502028、1407057、1406044。坤宝丸: 北京同仁堂股份有限公司, 批号: 3035402。补佳乐 (戊酸雌二醇片): 拜耳医药保健有限公司, 批号: 126A。

1.3 主要试剂与仪器

10% 水合氯醛 (天津市北联精细化学品开发有限公司, 批号: 20140415); 去氧乙烯基环己烯 (VCD, 美国 Sigma 公司, 批号: 20130321); 大鼠血清 E_2 酶联免疫检测试剂盒 (R&D 公司, 批号: BPE14325R); 大鼠血清卵泡刺激素 (FSH) 酶联免疫检测试剂盒 (R&D 公司, 批号: BPE14325R); P53 抗体 (BioLegend 公司, 货号: 628201); 抗原修复液 (批号: 1511040072)、DAB 显色试剂盒 (批号: 1510240028)、磷酸缓冲

液 (批号: 1504230069) 均为福州迈新生物技术开发有限公司产品; RNA 纯化试剂盒 (货号: 03330591001)、cDNA 合成试剂盒 (货号: 04896866001)、SYBR GREEN 染料 (货号: 04707516001) 均为罗氏诊断产品 (上海) 有限公司产品。Light Cycler 480 实时荧光定量 PCR 系统、MagNA Pure LC 2.0 全自动核酸分离纯化及加样系统、MagNAlyser 组织匀浆系统, 均购自罗氏诊断产品 (上海) 有限公司; LC480 型实时荧光定量 PCR 仪, 罗氏公司; 240 全自动生化分析仪, 英国朗道公司。

1.4 动物分组与造模方法

105 只大鼠采用随机数字表法选择 10 只作为空白对照组, 其余 95 只参照文献 [3-4] 方法每日腹腔注射 VCD 160 mg/kg 进行造模, 连续 60 天后停药。造模期间死亡大鼠 23 只, 完成造模 72 只。造模后检测模型鼠动情周期, 所有 82 只大鼠 (包括空白对照组 10 只) 眼眶静脉取血, 检测血清 E_2 、FSH 含量。动情周期紊乱、血清 E_2 含量明显低于空白对照组最低值、FSH 含量明显高于空白对照组最高值, 且具有易惊、易怒、毛色不佳、精神不振等表现的大鼠为造模成功。造模成功的 60 只大鼠采用随机数字表法分为模型组、西药对照组、中药对照组和济阴颗粒低、中、高剂量组, 每组 10 只。

1.5 给药方法

造模后空白对照组与模型组给予蒸馏水 10 ml/(kg·d) 灌胃, 济阴颗粒低、中、高剂量组分别给予济阴颗粒 3.9、7.8、15.6 g/(kg·d) 灌胃, 西药对照组给予戊酸雌二醇片 0.105 mg/(g·d) 灌胃, 中药对照组给予坤宝丸 10.5 g/(kg·d) 灌胃, 每日灌胃 1 次, 连续 30 天。

1.6 观察指标及方法

大鼠末次给药后禁食禁水 24 h, 10% 水合氯醛 0.35 ml/100 g 腹腔注射麻醉, 每组中 6 只大鼠取左侧卵巢置于 10% 多聚甲醛溶液中固定, 用于蛋白表达的测定; 其余 4 只取右侧卵巢, 锡纸包裹, -70℃ 保存, 用于 mRNA 检测。

1.6.1 免疫组织化学法检测卵巢细胞 P53 蛋白表达 卵巢组织制作石蜡切片, 脱蜡, 3% 双氧水室温孵育 5 min; 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡; 5% 山羊血清封闭, 室温孵育, 倾去血清, 滴加一抗, 4℃ 过夜; PBS 冲洗, 滴加二抗, 37℃ 孵育 20 min; PBS 冲洗后滴加辣根酶, 37℃ 孵育 30 min; PBS 冲洗后

加显色剂显色; 自来水冲洗, 复染, 脱水, 透明, 封片。每组选择 6 张石蜡切片进行免疫组化检测, 每张免疫组化切片中随机选择 5 个视野拍照记录 ($\times 400$)。各组以出现黄色或黄棕色为反应阳性, 无颜色出现为阴性。采用 Image J (V1.8.0) 图像分析系统对图像进行分析, 检测每个视野中阳性区域的积分光密度。

1.6.2 荧光 RT-PCR 法检测卵巢细胞凋亡诱导因子 (AIF) 和核酸内切酶 G (Endo-G) mRNA 表达

称取卵巢组织 0.01 g, 提取组织总 RNA 及 cDNA。利用 NCBI 上 ORF Finder 找到 AIF、Endo-G 的翻译区和非翻译区, 设计基因特异性引物, 内参基因选择 β -actin。引物设计及合成由北京六合华大基因科技股份有限公司完成, AIF: 上游 GACGGTGAG-CAACATGAAGA, 下游 CTTGTTTCGATTCTGCTC-CTAC; Endo-G: 上游 AATCGAGCTGCGTTC-CTATG, 下游 AGTGATGGCCTTGAGGTTTC; β -actin: 上游 GTAAAGACCTCTATGCCAACA, 下游 GGACTCATCGTACTCCTGCT。反应使用 SYBR GREEN 染色, 采用 PCR 仪进行检测。使用相对定量方法, 应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析数据。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析统计, 计量数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠卵巢细胞 P53 蛋白表达比较

表 1 示, 与空白对照组比较, 模型组、西药对照组和济阴颗粒中、高剂量组卵巢细胞凋亡蛋白 P53 表达增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组卵巢细胞 P53 蛋白表达均减少 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠卵巢细胞 P53 蛋白表达比较 ($OD/\mu m^2$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	积分光密度
空白对照组	6	0.059859 $\pm$ 0.012089
模型组	6	0.214845 $\pm$ 0.040578*
西药对照组	6	0.107858 $\pm$ 0.026330* Δ
中药对照组	6	0.085783 $\pm$ 0.017765 Δ
济阴颗粒低剂量组	6	0.065306 $\pm$ 0.017012 $\Delta\Delta\nabla$
济阴颗粒中剂量组	6	0.105159 $\pm$ 0.034259* $\Delta\nabla$
济阴颗粒高剂量组	6	0.157780 $\pm$ 0.018107* $\Delta\#$

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, Δ $P < 0.01$; 与西药对照组比较, Δ $P < 0.01$; 与中药对照组比较, $\#$ $P < 0.01$; 与济阴颗粒高剂量组比较, ∇ $P < 0.01$; 与济阴颗粒中剂量组比较, ∇ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠卵巢细胞 AIF、Endo-G mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	AIF mRNA	Endo-G mRNA
空白对照组	4	1.000000 $\pm$ 0.361700	1.000000 $\pm$ 0.353168
模型组	4	6.726508 $\pm$ 0.393678 *	2.849682 $\pm$ 0.047682 *
西药对照组	4	2.623933 $\pm$ 0.272953 * Δ	2.816731 $\pm$ 0.232731 *
中药对照组	4	1.676069 $\pm$ 0.616401 * Δ $\blacktriangle$	1.036345 $\pm$ 0.098345 Δ $\blacktriangle$
济阴颗粒低剂量组	4	3.395298 $\pm$ 0.388186 * Δ $\blacktriangle$ ∇	1.159239 $\pm$ 0.212239 Δ $\blacktriangle$
济阴颗粒中剂量组	4	4.411056 $\pm$ 0.148606 * Δ $\blacktriangle$ ∇	1.145605 $\pm$ 0.190088 Δ $\blacktriangle$
济阴颗粒高剂量组	4	0.658226 $\pm$ 0.339426 * Δ $\blacktriangle$ ∇	1.036789 $\pm$ 0.223674 Δ $\blacktriangle$

注: AIF, 凋亡诱导因子; Endo-G, 核酸内切酶 G; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与西药对照组比较, $\blacktriangle P < 0.01$; 与中药对照组比较, $\#P < 0.01$; 与济阴颗粒高剂量组比较, $\nabla P < 0.01$; 与济阴颗粒中剂量组比较, $\blacktriangledown P < 0.01$

济阴颗粒低剂量组 P53 蛋白表达低于西药对照组, 济阴颗粒高剂量组 P53 蛋白表达高于中药对照组 ($P < 0.01$)。济阴颗粒低、中、高剂量组两两比较 P53 蛋白表达, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 以济阴颗粒低剂量组 P53 蛋白表达最低。

2.2 各组大鼠卵巢细胞 AIF、Endo-G mRNA 表达比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 模型组、西药对照组、中药对照组和济阴颗粒低、中剂量组卵巢细胞 AIF mRNA 表达增强, 而济阴颗粒高剂量组 AIF mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组均可降低卵巢细胞 AIF mRNA 表达 ($P < 0.01$)。各给药组之间两两比较, 卵巢细胞 AIF mRNA 表达差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与空白对照组比较, 模型组和西药对照组卵巢细胞 Endo-G mRNA 表达增强 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药对照组和济阴颗粒低、中、高剂量组卵巢细胞 Endo-G mRNA 表达均降低 ($P < 0.01$), 而西药对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。中药对照组和济阴颗粒低、中、高剂量组卵巢细胞 Endo-G mRNA 表达亦明显低于西药对照组 ($P < 0.01$)。中药对照组和济阴颗粒低、中、高剂量组卵巢细胞 Endo-G mRNA 表达组间两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

中医学认为“女子七七, 任脉虚, 太冲脉衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形坏而无子也”, 指出女性在 49 岁时, 任脉和太冲脉气血虚弱衰少, 天癸枯竭, 月经断绝, 形体衰老, 失去生育能力, 即进入自然绝经期。肾为先天之本, 藏先天之精, 肾气盛则天癸至, 肾气衰则天癸竭, 此为绝经综合症的发病基础。“五脏相移, 穷必及肾”, 肾阴阳失调, 每易波及其他脏腑, 而其他脏腑病变, 久则必然累及于肾。因此, 绝经综合征多从肾之阴阳辨

证, 或兼顾五脏之证。妇女因经、带、胎、产、乳, 数伤于血, 易处于“阴常不足, 阳常有余”的状态, 而经断前后肾气虚衰, 天癸先竭, 所以临床以肾阴虚、肝肾不足居多。济阴颗粒中生地黄甘、寒, 归心、肝、肾经, 清热凉血、养阴生津, 为君药。淫羊藿辛、甘、温, 归肝、肾经, 补肾阳、强筋骨, 为臣药。生地黄配伍淫羊藿滋补肝肾。香附辛、微苦、微甘、平, 归肝、脾、三焦经, 行气解郁、调经止痛; 丹参苦、微寒, 归心、肝经, 清心除烦、祛瘀止痛、活血通络; 黄柏苦、寒, 归肾、膀胱经, 清热燥湿、泻火坚阴, 三者共为佐药。诸药共奏滋补肝肾、和血调经、除烦安神之效, 用于绝经综合征肝肾阴虚证, 症见头面烘热、汗出、失眠多梦、烦躁易怒、腰膝酸软、月经紊乱等。

目前绝经综合症的发病机制尚未十分明确, 现代医学认为与卵巢衰老关系紧密^[4]。细胞凋亡是细胞的生理性死亡, 是器官生理性衰老的主要原因, 细胞凋亡总体受 Caspase 依赖性和非依赖性 2 条通路调控^[5]。细胞凋亡由 P53 蛋白的启动开始, P53 被称为“基因组卫士”, 是细胞凋亡的重要诱导因子, 在人体正常细胞中 P53 含量很低, 一般在确定细胞的形态或 DNA 损害不可逆后才会诱导细胞凋亡^[6]。Caspase 非依赖性细胞凋亡通路中重要因子包括 AIF 和 Endo-G。Endo-G 与线粒体 DNA 复制以及细胞内 DNA 修复有关, Endo-G 的过度表达可诱导细胞核内 DNA 大量断裂, 导致细胞凋亡^[7]。AIF 是处于线粒体内外膜之间的一类保守黄素蛋白, 细胞受到刺激后, AIF 会被释放到细胞质中, 使染色体凝聚形成 DNA 小片段, 诱导细胞凋亡^[8]。细胞核 DNA 降解进一步促进 P53 蛋白的表达, 形成促细胞凋亡信号通路。

本研究结果发现, 模型组大鼠卵巢细胞中 P53 蛋白表达明显增强, 说明卵巢细胞遭破坏严重, 致

使凋亡活动大面积开启。济阴颗粒各剂量组 P53 蛋白表达较模型组明显减弱,尤其是低剂量组蛋白表达降低的程度最大,说明济阴颗粒能够抑制 P53 蛋白的表达,降低细胞的凋亡,进而延缓卵巢衰老,效果以低剂量最好。模型组大鼠卵巢细胞中 AIF mRNA 和 Endo-G mRNA 表达明显增多,从而加剧细胞凋亡。济阴颗粒各剂量组可有效下调两者 mRNA 的表达,从而抑制细胞的凋亡。由此可见,抑制 Caspase 非依赖性细胞凋亡通路是济阴颗粒治疗绝经综合征可能作用机制之一。

参考文献

- [1] JOKINEN K, RAUTAVA P, MAKINEN J, et al. Experience of climacteric symptoms among 42-46 and 52-56-year-old women [J]. *Maturitas*, 2003, 46(3): 199-205.
- [2] 李东安, 梁茂新, 张慧颖, 等. 治疗绝经综合征中药小复方的筛选步骤与方案 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2005, 7(6): 31-36.
- [3] LORETTA P, MAYER CA, DYER RL, et al. Atherosclerotic lesion development in a novel ovary-intact mouse model of perimenopause [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(9): 1912-1923.
- [4] 赵淑芹, 侯软松, 邓晓惠. VCD 导致大鼠卵巢功能衰竭的动物实验研究 [J]. *泰山医学院学报*, 2009, 30(6): 413-416.
- [5] 林守清, 林萍, 姜玉新, 等. 绝经后卵巢和子宫萎缩及血 E₂ 降低的观察 [J]. *中华妇产科杂志*, 1997, 32(9): 524-527.
- [6] 李敏, 林俊. 细胞凋亡途径及其机制 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41(2): 103-105.
- [7] ITAHANA K, DIMRI G, CAMPISI J. Regulation of cellular senescence by p53 [J]. *Eur J Biochem*, 2010, 268(10): 2784-2791.
- [8] CHIOU SM, CHIU CH, YANG ST, et al. Danthron triggers ROS and mitochondria-mediated apoptotic death in C6 rat glioma cells through caspase cascades, apoptosis-inducing factor and endonuclease G multiple signaling [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(8): 1790-1800.
- [9] MIYAKE K, BEKISA J, ZHAO T, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF) is targeted in IFN- α 2a-induced Bid-mediated apoptosis through Bak activation in ovarian cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(8): 1378-1388.

Effect of *Jiyin Granule* (济阴颗粒) on the Caspase Independent Apoptosis Pathway in the Ovaries of Rats with Menopause Syndrome

ZHAO Lei^{1,2}, HUANG He², FAN Yinglan², YUAN Yuan², BAO Yulong², LIANG Maoxin¹

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning 110847; 2. Chinese Medicine Institute of Liaoning Province)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Jiyin Granule* (济阴颗粒) in the treatment of menopause syndrome. **Methods** Ten rats were randomly selected out of 105 rats as the control group, and the rest 95 rats were used to build rat model of menopause syndrome by intraperitoneal injection of 4-vinylcyclohexene diepoxide solution. Sixty successful modeling rats were randomly divided into a model group, a western medicine control group, a Chinese medicine control group and *Jiyin Granule* low, middle and high dose groups, with 10 rats in each group. After modeling, the control group and the model group were given 10 ml/(kg·d) of distilled water by gavage. The *Jiyin Granule* low, middle and high dose groups were given 3.9, 7.8, and 15.6 g/(kg·d) of *Jiyin Granule* by gavage, respectively. The western medicine control group was given 0.105 mg/(g·d) of Estradiol Valerate Tablets by gavage. The Chinese medicine control group was given 10.5 g/(kg·d) of *Kunbao Pills* (坤宝丸) by gavage. All of above treatment were given daily for 30 consecutive days. The expression of p53 protein in ovarian cells was detected by immunohistochemistry. The expression of apoptosis inducing factor (AIF) and Endonuclease G (Endo-G) mRNA in ovarian cells were detected by fluorescence RT-PCR. **Results** Compared with those in the blank control group, the expression of p53 protein and the expression of AIF and Endo-G mRNA in the ovarian cells in the model group were all increased ($P < 0.01$), while the expression of p53 protein, AIF mRNA and Endo-G mRNA in the ovary cells were reduced in the groups of different doses of *Jiyin Granule* ($P < 0.01$). The down-regulation of p53 protein in the *Jiyin Granules* low dose group was the most significant, while down-regulation of AIF mRNA in the high dose group was the most significant ($P < 0.01$). **Conclusion** *Jiyin Granule* could inhibit the Caspase independent apoptosis pathway and inhibit the apoptosis of ovarian cells, which may be one of its mechanisms in the treatment of menopause syndrome.

Keywords menopause syndrome; apoptosis; Caspase independent apoptotic pathway; *Jiyin Granules*

(收稿日期: 2017-06-15; 修回日期: 2017-10-12)

编辑: 邓媛