

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.16.017

补肾健脾方对免疫性卵巢功能衰退小鼠性激素及卵子质量的影响

冯桂玲^{*}, 李静², 周小琳³

(1. 南阳师范学院生命科学院, 河南省南阳市卧龙路 1638 号, 473000; 2. 开封市儿童医院; 3. 南阳医学高等专科学校)

摘要 目的 探讨补肾健脾方治疗卵巢储备功能减退的可能作用机理。方法 60 只小鼠随机分为空白组、模型组、倍美力组和补肾健脾方高、中、低剂量组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组建立免疫性卵巢功能衰退小鼠模型。于造模后 1 周开始补肾健脾方低、中、高剂量组分别给予浓度为 0.54、1.08、2.16 g/ml 的补肾健脾方灌胃, 每次 0.3 ml, 倍美力组给予倍美力片溶液 (浓度 0.002 mg/ml) 0.3 ml 灌胃, 空白组和模型组均予生理盐水 0.3 ml 灌胃, 连续 90 天, 每周休息 1 天。测定各组小鼠血清卵泡刺激素 (FSH)、黄体生成素 (LH)、雌二醇 (E_2) 水平, 测量卵巢重量并进行卵巢组织 HE 染色, 计数卵母细胞数目, 电镜下观察卵巢组织形态学改变。结果 与正常组比较, 模型组小鼠血清 FSH、LH 水平明显升高, E_2 水平明显降低, 卵巢重量降低, 卵母细胞数减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 补肾健脾方高剂量组与倍美力组均能降低血清 LH 与 FSH 水平, 升高 E_2 水平, 提高卵巢重量和卵母细胞数 ($P < 0.01$)。电镜显示, 模型组小鼠的卵母细胞透明带厚度不均匀, 边界不清晰, 可见到髓样小体和许多微绒毛; 补肾健脾方高剂量组和倍美力组小鼠的卵母细胞透明带厚度比较均匀, 边界也比较清晰。结论 补肾健脾方可调节卵巢储备功能下降小鼠的生殖激素水平, 提高卵子数量与质量, 可能是其治疗卵巢储备功能减退的作用机理之一。

关键词 卵巢功能衰退; 补肾健脾方; 性激素; 卵子质量; 透明带

生育期卵巢功能衰退 (decreasing ovarian reserve, DOR) 可以引起女性月经紊乱、闭经、不孕不育等病症, 在辅助生殖技术中也可导致卵巢低反应的发生, 增加试管婴儿失败的几率^[1]。我们在临床研究发现, 补肾健脾方通过调理女性机体脏腑、阴阳、气血关系, 从而改善女性月经不调, 治疗不孕不育, 可提高卵巢反应性^[2]。为了进一步阐明补肾健脾方治疗月经不调、不孕症及提高卵巢反应性的可能作用机制, 本实验观察补肾健脾方对免疫性卵巢功能衰退小鼠性激素、卵巢质量及组织形态学的影响, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雌性 BALB/C 小鼠 60 只, SPF 级, 8 周龄, 体重 (25 ± 5) g, 由北京维通利华实验动物

技术有限公司提供, 实验动物合格证号: SCXK-(京) 2012-0001。每笼饲养 5 只, 光亮: 黑暗时间为 14:10, 自由饮水取食, 温度 20~25℃, 相对湿度 65%~75%。

1.2 药物

补肾健脾方组成: 熟地黄 10 g, 莲子 10 g, 山药 10 g, 菟丝子 10 g, 巴戟天 10 g, 覆盆子 10 g, 黄精 10 g, 石斛 10 g, 橘叶 10 g, 香附 10 g, 甘草 3 g, 由北京同仁堂药业有限公司提供, 每剂总质量 103 g; 倍美力 (0.625 mg/片, 批准文号: H20100586), 惠氏制药有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

弗氏完全佐剂 (批号: F5881)、弗氏不完全佐剂 (批号: F5506) 均为 Sigma 公司产品; 小鼠透明带 3 (ZP3) 由杭州中肽生化有限公司合成; CX43 免疫组化试剂盒 (货号: BA1727)、BMP-45 免疫组化试剂盒 (货号: BA2018) 均为武汉博士德生物工程有限公司产品; 小鼠雌二醇 (E_2) 检测试剂盒 (货号: sc-elisa2464) 购自上海广锐生

基金项目: 河南省科技厅基础与前沿项目 (15106); 南阳师范学院专项 (70659)

* 通讯作者: ny.fgl.2009@163.com, 13903771390

物科技有限公司; 卵泡刺激素 (FSH, 货号: ZA-0264)、黄体生成素 (LH, 货号: ZA-0344) 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

相差倒置显微镜 (Coic 公司, 型号 XDS-1B), 低速台式离心机 (湖南湘仪仪器有限公司, 型号 TDZ4-WS); 涡旋仪 (IKA 公司, 型号 MS3), 纯水仪 (Milipore 公司, 型号 Millipore-D24UV), 酶标仪 (Bio-Rad 公司, 型号 680), 冰箱 (Siemens 公司, 型号 BCD610W), 超低温冰箱 (New brunswick scientific 公司, 型号 U410), 超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司公司, 型号 KQ500DV), 电热恒温鼓风干燥机 (上海精宏实验设备有限公司, 型号 DHG), 微量天平 (Mettler-Toledo 公司, 型号 PL403), 透射电镜 (日本日立公司, 型号 H7650)。

1.4 动物分组及模型建立

60 只小鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组、倍美力组和补肾健脾方高、中、低剂量组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组参考文献 [6] 建立免疫性卵巢功能衰退小鼠模型: 取 6 mg ZP3 透明带多肽粉末, 加入 6 ml 双蒸水配成溶液, 与弗氏完全佐剂按 1:1 配置成免疫试剂, 与弗氏不完全佐剂按 1:1 配置成免疫强化试剂。每鼠予 0.15 ml 免疫试剂注射双后脚掌处及腹腔皮下, 14 天后以免疫强化试剂 0.15 ml 再次注射双后脚掌及腹腔皮下。空白组每次造模时小鼠予以 0.15 ml 生理盐水注射双后脚掌处及腹腔皮下。

1.5 给药方法

补肾健脾方低、中、高剂量组分别按“人和动物体表面积折算的等效剂量表”[6] 折算成临床成人用药剂量的 1、2、4 倍, 制备成浓缩剂, 浓度分别为 0.54、1.08、2.16 g/ml, 每次灌胃 0.3 ml; 倍美力组给予倍美力片溶液 (浓度 0.002 mg/ml) 0.3 ml 灌胃; 空白组和模型组均予生理盐水 0.3 ml 灌胃。于造模后 1 周开始灌胃给药, 连续 90 天, 每周休息 1 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 激素水平检测 实验结束后从小鼠颌下静脉丛采血 0.5 ml, 室温下分离血清, 行放射免疫法测定 FSH、LH、E₂ 水平, 按照试剂盒说明书操作。

1.6.2 卵巢重量检测 小鼠脊髓离断处死, 剪开小鼠腹膜, 沿双侧子宫角上行, 分别找到双侧卵巢, 摘取双侧卵巢, 去除表面脂肪组织, 动物天平称质量, 然后放入液氮罐保存。

1.6.3 卵巢组织病理学分析 标本固定后经充分水洗 2 h, 先后经 70%、80%、95%、100% 酒精梯度脱水, 二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋后, 连续切片, 切片厚度 4 μm, 分别进行 HE 染色。HE 染色后, 随机取 5 处镜下视野, 计数卵母细胞数。

1.6.4 电镜下卵巢组织形态学观察 样本用 2.5% 戊二醛、1% 锇酸各固定 1 h。然后用 2% 醋酸油溶液染色, 酒精脱水, 用环氧树脂包埋。切片后薄片用醋酸油盒枸橼酸铅染色, 用透射电镜观察。

1.7 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理。计量资料数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析; 如方差齐性, 则组间两两比较采用 LSD 法或 Bonferroni 法; 方差不齐采用 Tamhanes T₂ 法。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 E₂、LH、FSH 水平比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组小鼠血清 FSH、LH 水平明显升高, E₂ 水平明显降低 (P < 0.01)。与模型组比较, 补肾健脾方高剂量组与倍美力组均能降低血清 LH 与 FSH 水平, 升高 E₂ 水平 (P < 0.01); 补肾健脾方中剂量组仅降低 FSH 水平, 升高 E₂ 水平 (P < 0.05), 而补肾健脾方低剂量组血清 LH、FSH、E₂ 水平与模型组比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。与倍美力组比较, 补肾健脾方低、中剂量组血清 LH、FSH、E₂ 水平差异均有统计学意义 (P < 0.05 或 P < 0.01)。

表 1 各组小鼠血清 FSH、LH、E₂ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	E ₂ (ng/L)
正常组	10	0.54 ± 0.16	2.93 ± 0.26	25.44 ± 3.21
模型组	10	1.15 ± 0.08*	4.74 ± 0.34*	10.04 ± 1.17*
倍美力组	10	0.62 ± 0.11 ^{△△}	3.05 ± 0.26 ^{△△}	23.22 ± 2.63 ^{△△}
补肾健脾方低剂量组	10	0.97 ± 0.08 ^{▲▲}	4.12 ± 0.37 ^{▲▲}	17.38 ± 1.06 ^{▲▲}
补肾健脾方中剂量组	10	0.78 ± 0.12 ^{△▲}	3.49 ± 0.33 [▲]	19.40 ± 2.22 ^{△▲}
补肾健脾方高剂量组	10	0.66 ± 0.13 ^{△△}	3.16 ± 0.42 ^{△△}	21.24 ± 1.55 ^{△△}

注: FSH, 卵泡刺激素; LH, 黄体生成素; E₂, 雌二醇; 与正常组比较, * P < 0.01; 与模型组比较, △P < 0.05, △△P < 0.01; 与倍力美组比较, ▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01

2.2 各组小鼠卵巢重量和卵母细胞数比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组小鼠卵巢重量减轻, 卵母细胞数目减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 倍美力组和补肾健脾方中、高剂量组小鼠卵巢重量升高, 卵母细胞数目增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。补肾健脾方低剂量组卵巢重量、卵母细胞数目均低于倍美力组, 补肾健脾方中剂量组仅卵母细胞数目低于倍美力组 ($P < 0.01$), 而补肾健脾方高剂量组卵巢重量、卵母细胞数目与倍美力组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠卵巢重量和卵母细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	卵巢重量 (mg)	卵母细胞数目 (个)
正常组	10	21.45 $\pm$ 3.12	146.3 $\pm$ 9.4
模型组	10	13.21 $\pm$ 3.25*	52.2 $\pm$ 4.4*
倍美力组	10	20.56 $\pm$ 3.70 $\Delta\Delta$	135.6 $\pm$ 10.4 $\Delta\Delta$
补肾健脾方低剂量组	10	14.06 $\pm$ 3.83 Δ	76.7 $\pm$ 8.0 Δ
补肾健脾方中剂量组	10	17.08 $\pm$ 3.69 Δ	95.5 $\pm$ 8.6 $\Delta\Delta$
补肾健脾方高剂量组	10	18.66 $\pm$ 3.15 $\Delta\Delta$	127.1 $\pm$ 12.5 $\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与倍美力组比较, $\Delta P < 0.01$

2.3 各组小鼠卵巢组织 HE 染色结果比较

图 1 示, 与正常组比较, 模型组小鼠发育中的卵泡及成熟的卵泡数目明显减少, 而补肾健脾方高、中剂量组以及倍美力组卵泡数量比模型组明显较多; 相对于正常组, 模型组卵巢颗粒细胞排列比较紊乱, 补肾健脾方高剂量组和倍美力组较模型组有明显改善。模型组卵母细胞形态畸形, 缩小或消失, 倍美力组和补肾健脾方高、中剂量组的卵母细

胞形态比较接近正常组, 而补肾健脾方低剂量组也有改善。

2.4 各组小鼠透射电镜下卵巢组织形态学比较

图 2 示, 空白组小鼠的卵母细胞透明带厚度均匀, 边界比较清晰, 可见到插入透明带的微绒毛; 模型组小鼠的卵母细胞透明带厚度不均匀, 边界不清晰, 可见到髓样小体和许多微绒毛; 补肾健脾方低剂量组透明带边界不清晰; 补肾健脾方中剂量组透明带边界尚清晰, 但是厚薄不一, 可见到微绒毛和髓样小体; 补肾健脾方高剂量组和倍美力组小鼠的卵母细胞透明带厚度比较均匀, 边界也比较清晰。

3 讨论

随着年龄的增长, 卵巢功能逐渐衰退属于生理现象, 但生育年龄阶段由于疾病或其他因素所致的卵巢功能衰退属于病理现象。根据其临床表现可以将其归属于中医学“月经不调”“闭经”“不孕”等范畴。现代中医学家对于卵巢功能衰退病因病机的认识不一, 归纳起来有肾虚、肝郁、血瘀等几种学说, 但多数医家认为以肾虚为主^[5-9]。夏桂成教授认为, 该病本于肾而关乎肝脾, 辨证要点在于肾阴亏虚、阴虚火旺等, 日久夹痰夹瘀^[10]。换言之, 该病病本在肾, 与肝脾关系密切, 而痰、瘀仅仅是其病理产物而已。脾肾二脏在生理上相互配合, 发挥协同作用; 病理上也常相互影响, 互为因果, 久之形成脾肾两虚的病证。尤昭玲认为, “养卵泡先暖巢”^[11]。根据“治病必求其本”“虚则补之”

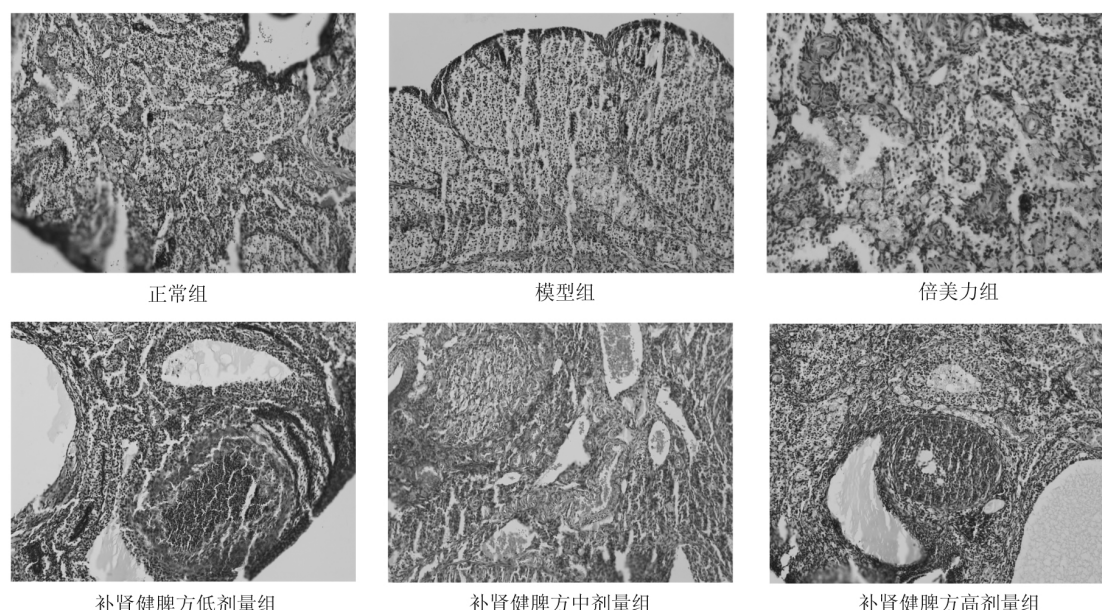


图 1 各组小鼠卵巢组织 HE 染色病理图 ($\times 200$)

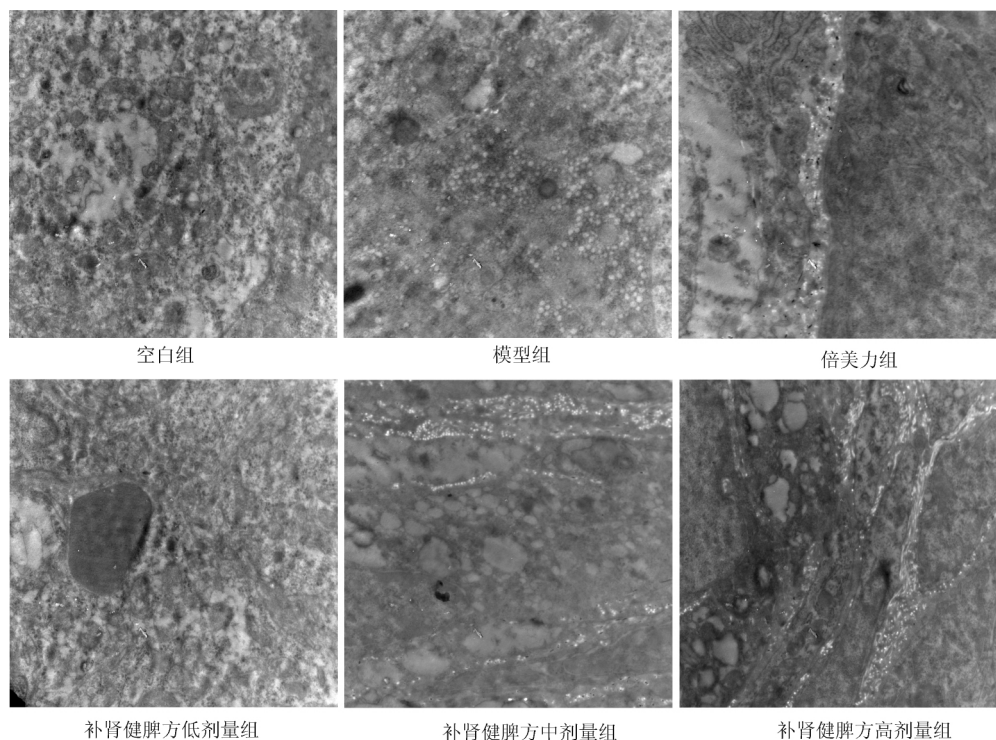


图2 各组小鼠卵巢组织透射电镜下组织形态学改变 (×15000)

“损者益之”的治疗原则，本病的治疗原则以补肾、补脾为主，化痰、祛瘀、疏肝为辅。本方中熟地黄益精填髓，覆盆子补肾固精，二者合温补肾阳之菟丝子、巴戟天，兼涩精之莲子，共后滋补肾精之功；黄精补中益气，石斛生津益胃，莲子益肾补脾，山药健脾开胃，四者合奏益胃健脾化痰之功，橘叶、香附疏肝理气祛瘀，兼顾脾运，甘草调和诸药。

美国生殖医学会把该病分为4个阶段：正常阶段、隐匿型阶段、生化异常阶段、临床异常阶段，生化异常阶段主要是指FSH异常升高与 E_2 水平下降^[1]。随着研究的深入，多数学者一致认为，在卵巢功能衰退早期 E_2 水平升高，FSH、LH维持在正常水平；当卵泡耗竭过多，卵巢储备明显下降时， E_2 则明显降低^[2]。另外，FSH升高，LH（相对）降低，或FSH/LH比值升高，预示着卵巢储备降低、卵巢低反应的发生，LH水平降低可能影响卵巢对促性腺激素的反应性^[3]。卵巢组织内的窦卵泡及发育中的卵泡的数目能够很好地反应卵泡池中剩余的原始卵泡，是卵巢储备能力常用的主要指标^[4]。透明带是由卵母细胞分泌的、围绕在卵外周的糖蛋白基质，随着卵母细胞成熟过程中的直径增加，透明带厚度也增加^[6-17]，卵母细胞透明带形态异常是影响卵子质量的一个重要因素^[8]。

本实验结果证明，补肾健脾方高剂量组和倍美力组可以下调卵巢功能减退小鼠的LH、FSH水平，

同时提高其 E_2 水平，增加卵巢重量，增加其发育中的卵泡数目；也可以使卵泡的透明带厚度比较均匀，边界也比较清晰。说明补肾健脾方不仅增加卵母细胞数目，而且可以提高卵子质量，有利于精卵结合，从而提高该病患者的受孕率，以高剂量效果最好，疗效与倍美力相当。总之，补肾健脾方能缓解自身免疫反应对卵巢组织的损伤，可能与平衡性激素水平、提高卵子质量有关，从而改善卵巢功能，其具体机理期待深入研究。

参考文献

- [1] 李艳青, 毕红征, 孙红. 更年舒胶囊对围绝经期卵巢功能衰退大鼠植物神经功能的调节作用 [J]. 中医杂志, 2011, 52(1): 54-56.
- [2] 冯桂玲. 护卵安胎方案对IVF-ET短方案治疗POR干预效应的临床研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2013.
- [3] 刘慧萍, 尤昭玲, 雷磊, 等. 补肾活血方对免疫性卵巢早衰小鼠卵泡凋亡调控基因(Bcl-2/Bax)蛋白的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(5): 1036-1038.
- [4] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 202-203.
- [5] 李云波, 李玲, 毛艳茹, 等. 金哲教授治疗卵巢早衰经验述要 [J]. 环球中医药, 2014, 7(3): 215-216.
- [6] 陈莞苏, 施艳秋. 卵巢早衰病因病机及中医治疗研究概况 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(12): 205-207.
- [7] 韩冰, 夏天, 高惠, 等. 冲任学说治疗卵巢功能失调性疾病 [J]. 天津中医药大学学报, 2008, 27(3): 168.

- 马敬华,孔丽蔚,李柳丽,等. 卵巢储备功能下降病因与治疗的中西医研究进展 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(14): 161-164.
- 曹晓静,王小云. 王小云辨治卵巢早衰经验 [J]. 中医杂志, 2015, 56(5): 372-375.
- 杨宏敏,宋翠森,周楠,等. 逍遥丸含药血清对人卵巢颗粒细胞内分泌功能的影响 [J]. 中医杂志, 2013, 54(21): 1850-1853, 1866.
- 刘文娥,谈珍瑜,陈燕霞,等. 尤昭玲“养卵泡先暖巢”治疗思路及应用 [J]. 中医杂志, 2014, 55(20): 1726-1728.
- 徐国萍,葛芳,张秀梅,等. 卵巢早衰预测及诊治最新进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(5): 554.
- 陈士岭. 卵巢储备功能的评价. 国际生殖健康/计划生育杂志 [J]. 2009, 28(5): 281-283.
- 徐琳,任莉,韩雪松,等. AMH、FSH、E₂ 在卵巢早衰诊断中的价值 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(3): 96-98.
- 王俊霞,孙海翔,王玢,等. 5865 例 IVF/ICSI-ET 患者基础窦卵泡数预测卵巢储备功能的价值 [J]. 生殖与避孕, 2010, 30(7): 453-457.
- BLEIL JD, WASSARMAN PM. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida [J]. Dev Biol, 1980, 76(1): 185-202.
- GREVE JM, SALZMANN GS, ROLLER RJ, et al. Bio-synthesis of the major zona pellucida glycoprotein secreted by oocytes during mammalian oogenesis [J]. Cell, 1982, 31(3 Pt 2): 749-759.
- 刘晓妍,张守信,郝翠芳,等. 透明带形态异常卵母细胞在 IVF 完全受精失败后行补救 ICSI 的临床结局 [J]. 生殖与避孕, 2012, 32(11): 754-758.

Effect of *Bushen Jianpi Fang* (补肾健脾方) on Sex Hormone and Oocyte quality in Mice with Immune Ovarian Function Decline

FENG Guiling¹, LI Jing², ZHOU Xiaolin³

(1. College of Life Science, Nanyang Normal University, Nanyang, 473000; 2. Kaifeng Children's Hospital; 3. Nanyang Medical College)

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Bushen Jianpi Fang* (补肾健脾方) in the treatment of ovarian reserve function decline. **Methods** Sixty mice were randomly divided into blank group, model group, premarin group and *Bushen Jianpi Fang* high, middle and low dose groups, with 10 mice in each group. Except for blank group, the other groups were established into mice model with immune ovarian function decline. Experiment began one week after the modeling. *Bushen Jianpi Fang* high, middle and low dose groups were given 0.54 g/ml, 1.08 g/ml, or 2.16 g/ml of *Bushen Jianpi Fang* for gavage respectively, 0.3 ml each time. Premarin group was given 0.3 ml of premarin tablet solution (concentration of 0.002 mg/ml) for gavage, while the blank group and model group were given 0.3 ml of normal saline for gavage, respectively. The gavage lasted for 90 days, with one day off every week. Serum levels of follicle stimulating prime (FSH), luteinizing hormone (LH) and estradiol (E₂) were tested, weight of ovary was measured, and ovarian tissues were stained with HE staining to count the number of oocytes and observe the ovarian morphology change under the electron microscope. **Results** Compared with those in the normal group mice, serum levels of FSH and LH were significantly increased, level of E₂ was significantly decreased, the ovarian weight was decreased, and the number of oocytes was decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with those in the model group, serum levels of LH and FSH reduced, level of E₂, weight of ovary and the number of oocytes increased in both the *Bushen Jianpi Fang* high dose group and premarin group ($P < 0.01$). Electron microscopy showed that the thickness of the oocyte zona pellucida of mice is not uniform, the boundary is not clear, with the myeloid bodies and many microvilli in the model group, but the thickness of the oocyte zona pellucida was more uniform, and the boundary was clear in the *Bushen Jianpi Fang* high dose group and the premarin group. **Conclusion** *Bushen Jianpi Fang* can regulate the level of sex hormone in mice with ovarian reserve function decline, and improve the quantity and quality of oocyte, which may be the one of the mechanisms of this herbal medicine in the treatment of ovarian reserve function decline.

Keywords ovarian function decline; *Bushen Jianpi Fang*; sex hormone; the quality of oocyte; zona pellucida

(收稿日期: 2015-10-26; 修回日期: 2016-04-11)

编辑: 邓 媛