

本文引用:李 涵,刘慧萍,肖贾丽珏,杨开锋,辛雨霏. 补肾活血方对卵巢功能早衰大鼠卵巢组织外泌体相关膜蛋白的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(6): 885-892.

补肾活血方对卵巢功能早衰大鼠卵巢组织外泌体 相关膜蛋白的影响

李 涵,刘慧萍*,肖贾丽珏,杨开锋,辛雨霏
(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 观察补肾活血方对卵巢功能早衰模型大鼠卵巢组织中外泌体相关膜蛋白表达情况及卵巢组织形态和功能的影响。**方法** 选取30只大鼠,腹腔注射顺铂建立卵巢功能早衰模型,造模成功后随机分为模型组、阳性对照组和中药低、中、高剂量组,每组6只。另取6只大鼠为空白组。空白组和模型组大鼠每天灌胃蒸馏水;中药低、中、高剂量组分别按每天9.72、19.44、38.88 g/kg剂量补肾活血方灌胃;阳性对照组大鼠按每天0.09 mg/kg剂量灌胃给药戊酸雌二醇片,连续21 d。每周称体质量,计算体质量增量,每天观察大鼠动情周期。末次给药后于第2天取血和卵巢、胸腺、脾脏,称脏器质量,计算脏器指数;ELISA检测大鼠血清中雌二醇(estradiol 2, E₂)和抗米勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)水平变化含量;HE染色观察卵巢形态变化;免疫组织化学法检测卵巢组织中外泌体膜蛋白CD63、CD81、CD82的表达水平;透射电镜观察大鼠外周血外泌体形态;Western blot检测大鼠外周血外泌体相关蛋白。**结果** 与空白组相比,模型组动情周期紊乱、AMH和E₂减少($P<0.05$, $P<0.01$),体质量和体质量增量明显减少($P<0.01$),卵巢指数、胸腺指数明显减少而脾脏指数明显升高($P<0.01$),卵泡数和成熟卵泡明显减少,闭锁卵泡增多,卵巢组织CD63、CD81、CD82蛋白表达明显下降($P<0.01$)。与模型组相比,中药中、高剂量组和阳性对照组AMH和E₂显著升高($P<0.01$),中药高剂量组和阳性对照组动情周期恢复正常,体质量及体质量增量明显升高($P<0.01$),卵巢指数、胸腺指数明显升高而脾脏指数降低($P<0.05$, $P<0.01$),给药组卵泡数依次增多,中药高剂量组和阳性对照组蛋白表达明显升高($P<0.01$)。透射电镜和Western blot证明大鼠外周血外泌体提取成功。**结论** 补肾活血方可以明显改善卵巢功能早衰的情况,其改善卵巢形态和功能的机制可能与提高外周血和卵巢中外泌体活性有关。

[关键词] 卵巢功能早衰;补肾活血方;外泌体;抗米勒管激素;雌二醇;动情周期

[中图分类号] R271.9

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.06.003

Effect of Bushen Huoxue Recipe on exosome-related membrane proteins in ovarian tissue of rats with premature ovarian failure

LI Han, LIU Huiping*, XIAO Jialijue, YANG Kaifeng, XIN Yufei

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Bushen Huoxue Recipe on the expression of exosome-related membrane proteins in ovarian tissue and the morphology and function of ovarian tissue in rats with premature ovarian failure. **Methods** A total of

[收稿日期] 2021-12-25

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目(21A0233,18C0388);湖南省中医药科研计划重点项目(2021025);国家级大学生创新项目(202110541042);湖南省大学生研究性学习与创新性实验项目(2021-2394);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2020ZXYJH66,2020ZXYJH71);湖南中医药大学科研基金项目重点项目(2020XJJ003);中医方证研究转化医学湖南省重点实验室资助项目(2018TP1021);湖南省性与生殖健康中医临床医学研究中心项目(湘科计2020SK4014)。

[第一作者] 李 涵,女,硕士研究生,研究方向:女性内分泌疾病的中医药防治。

[通信作者] *刘慧萍,女,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:1074983953@qq.com。

30 rats were selected and injected with cisplatin intraperitoneally to establish the mode of premature ovarian failure. After successful modeling, they were randomly divided into model group, positive control group, low, middle and high dose groups of traditional Chinese medicine, with six rats in each group. Another six rats were selected as blank group. Rats in the blank group and model group were gavaged with distilled water every day, the rats in the low, middle and high dose groups of traditional Chinese medicine were given intragastric administration of Bushen Huoxue Recipe at the dose of 9.72, 19.44 and 38.88 g/kg, respectively, and the rats in the positive control group were given estradiol valerate tablets at the dose of 0.09 mg/kg every day for 21 d. The body weight was weighed every week, the body weight increment was calculated, and the estrous cycle of rats was observed every day. After the last administration, on the second day, the blood, ovary, thymus and spleen were taken, the organ weight was weighed and the organ index was calculated. The levels of estradiol (estradiol 2, E₂) and anti-Müllerian hormone (AMH) in serum were detected by ELISA; the morphological changes of ovary were observed by HE staining; the expression levels of CD63, CD81 and CD82 in ovarian tissue were detected by immunohistochemical method. The morphology of exocrine body in rat peripheral blood was observed by transmission electron microscope, the exocrine related protein in rat peripheral blood was detected by Western blot. **Results** Compared with the blank group, the estrous cycle disorder, AMH and E₂ were decreased ($P<0.01$, $P<0.05$), the body weight and body weight increment were significantly decreased ($P<0.01$), the ovarian index and thymus index were significantly decreased, and the spleen index was significantly decreased, the number of follicles and mature follicles decreased significantly, the atretic follicles increased, and the protein expression levels of CD63, CD81, and CD82 in ovarian tissue decreased significantly ($P<0.01$) in the model group. Compared with the model group, AMH and E₂ in the medium and high dose groups of traditional Chinese medicine and the positive control group were significantly increased ($P<0.01$). The estrous cycle in the traditional Chinese medicine high-dose group and the positive control group returned to normal, and the body weight and body weight increment increased significantly ($P<0.01$), the ovarian index and thymus index were significantly increased while the spleen index was decreased ($P<0.01$, $P<0.05$), the number of follicles in the administration group increased in turn, and the protein expression in the traditional Chinese medicine high-dose group and the positive control group was significantly increased ($P<0.01$). Transmission electron microscopy and Western blot proved that the extraction of exosomes from peripheral blood of rats was successful. **Conclusion** Bushen Huoxue Recipe can significantly improve the situation of premature ovarian failure, and the mechanism of improving ovarian morphology and function may be related to the increase of peripheral blood and ovarian exocrine activity.

[**Keywords**] premature ovarian failure; Bushen Huoxue Recipe; exosome; anti-Müllerian hormone; estradiol 2; estrous cycle

卵巢功能早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指在女性 40 岁之前出现围绝经期综合征, 而月经初潮年龄正常或延迟、第二性征发育正常^[1]。POF 导致女性提前老龄化, 出现持续 6 个月以上闭经, 生殖器官萎缩, 性功能降低甚至不孕, 促卵泡激素和黄体生成素质量浓度升高, 雌二醇 (estradiol 2, E₂) 和抗米勒管激素 (anti-Müllerian hormone, AMH) 质量浓度降低的一种妇科内分泌性疾病^[2]。临床上, POF 患者表现为月经失调甚至闭经、不孕、性欲低下、阴部干燥、生殖器及第二性征逐渐退化等围绝经期症状^[3]。POF 可以分为两类, 一类是卵泡数量的消失, 一类是卵泡功能的消失^[4]。西医认为此病因复

杂, 治疗比较困难, 目前主要采用性激素替代疗法, 但不能恢复卵巢周期性功能, 且有明显副作用^[5]。POF 可归属于中医学“闭经”“不孕”“血枯”等范畴^[6]。补肾活血方是国家名老中医尤昭玲教授的经验方, 已在临床应用多年, 对早发性卵巢功能不全有良好疗效^[7]。

近几年外泌体的研究, 尤其是在妇科疾病诊疗领域的研究成为一个热点^[8]。外泌体是细胞间通讯的关键参与者, 可调节免疫反应、炎症、感染和肿瘤等病理生理过程^[9]。外泌体由蛋白质、脂质、核酸等组成。外泌体的蛋白质主要包括膜蛋白 (CD9、CD63、CD81、CD82)、热休克蛋白 (HSP60、HSP70、HSP90)、

膜联蛋白(膜联蛋白 I、II、IV、V、VI、VII)、胞质蛋白(肌动蛋白、微管蛋白)和细胞特异性抗原(MHC-I、MHC-II)^[10-14]。外泌体在卵母细胞的生长发育中起着非常重要的作用,POF 与外泌体的减少有一定关联。随着外泌体的研究深入,人们发现干细胞中外泌体对早发性卵巢功能不全或 POF 的治疗有很好的疗效,这也为 POF 的治疗提供新思路^[15-17]。本研究通过建立 POF 大鼠模型,采用具有滋阴、益气、活血功效的补肾活血方治疗,初步研究了补肾活血方对于 POF 大鼠的干预作用以及对外泌体的调节作用,为 POF 的发病机制研究和治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 雌性大鼠 36 只,体质量(150±10) g,6 周龄,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SYXK(湘)2019-0009。3 只一笼饲养于湖南中医药大学动物实验中心 SPF 级屏障环境中,安静状态下,于消毒灭菌 IVC 笼里喂养,饮水不受限制、颗粒型饲料喂养,每 3 天换 1 次灭菌垫料和水。饲养环境尽量通风,12 h 明暗周期,温度控制在 25 ℃,相对湿度 50%~60%。本实验由湖南中医药大学动物伦理委员会批准,动物实验伦理审查编号:LLBH-202011140001,大鼠均适应性喂养 1 周后继续相关实验。

1.2 药品

所有中药饮片均购买自湖南中医药大学第一附属医院。补肾活血方药物组成:熟地黄 15 g,酒黄精 12 g,枸杞子 12 g,酒山茱萸 12 g,当归 15 g,白芍 12 g,川芎 9 g,丹参 12 g,燂桃仁 9 g(批号分别为 2008303、200803、NG20090902、TH20082402、TH20090301、TH20091405、TH20082404、HY20091606、2020082901),煎煮后用旋转蒸发仪浓缩,浓缩为生药含量 4 g/mL;氯氨铂(25 mg,美国 SIGMA 公司,批号:MKCL0026);戊酸雌二醇片(1 mg/片,德国拜耳公司,批号:558A)。

1.3 主要试剂

兔抗 CD63 抗体(美国 Affinit 公司,批号:Ab-AF5117);兔抗 CD81 抗体、兔抗 CD82 抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司(批号分别为 bs-6934R、bs-1470R);外泌体提取试剂盒(上海贝博生

物公司,批号:BB-39012);兔抗 ALIX 抗体、兔抗 FLOTILLIN 1、兔抗 CD9 抗体均购自上海艾博抗贸易有限公司(批号分别为 ab88388、ab41927、ab92726);BSA(武汉华美生物工程有限公司,批号:CSB-MC00031a0101);山羊抗鼠(上海西格玛奥德里奇贸易有限公司,批号:A4416);ECL 发光试剂盒(美国通用电气公司,批号:RPN2109);AMH、E₂ ELISA 试剂盒均购于江苏菲亚生物科技有限公司(批号分别为 201230R35、201230R11)。

1.4 主要仪器

切片机、摊片机、双目显微镜均购自德国 LEICA 公司(型号分别为 RM2235、HI1210、DMLB2);生物显微镜(麦克奥迪实业集团公司,型号:MotiC BA410);凝胶成像分析系统、蛋白电泳及转膜设备均购自美国 Bio-Rad 公司(型号分别为 ChemiDoc XRS、1704150);高速离心机、高速台式离心机、超速离心机均购自美国 Beckman 公司(型号分别为 J2-21、GS-15R、L-90K);微量移液枪(德国艾本德公司,型号:3120000240);脱色摇床(上海新波公司,型号:Ty-B)。

2 方法

2.1 POF 大鼠模型制备与分组

将 30 只大鼠参照文献[18]建立 POF 模型,每次予顺铂 4.0 mg/kg,隔周腹腔注射 1 次,共 2 次,通过每天观察动情周期,动情周期紊乱,大鼠体质量增长缓慢,毛发粗糙无光泽判断造模均成功^[18]。空白组每次予生理盐水 4.0 mg/kg,隔周腹腔注射 1 次,共 2 次。将造模成功后的 30 只大鼠按随机数字表法分为模型组、阳性对照组和中药低、中、高剂量组,每组 6 只。另取 6 只大鼠为空白组。

2.2 给药

空白组和模型组大鼠每天灌服蒸馏水;补肾活血中药组大鼠每天分别按 38.88、19.44、9.72 g/kg 高、中、低剂量灌胃,其中低剂量是大鼠与 70 kg 成人临床用量等效剂量,中剂量和高剂量分别为等效剂量的 2 倍与 4 倍;阳性对照组大鼠每天按 0.09 mg/kg 的剂量灌胃给药戊酸雌二醇片,与 70 kg 成人临床用量等效剂量相当。各组灌胃体积均为 10 mL/kg,每天 1 次,连续给药 21 d。

2.3 检测指标与方法

2.3.1 动情周期 于造模结束后第5~8天,参照文献[19]用10 mL移液枪吸取10 mL生理盐水在大鼠阴道内吹打几次后,吸出液体进行涂片。待自然干燥后滴加2滴瑞氏染液,1 min后加1.5倍的PBS,10 min后冲洗,待干燥后封片镜检。

2.3.2 ELISA检测大鼠血清中AMH和E₂水平变化含量 于给药结束的第2天,同时所有大鼠禁食禁水8 h,用10%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.4 mL/100 g),腹主动脉取血,3500 r/min,离心半径6 cm,离心15 min后取上清液置于-80 °C冰箱内保存。按ELISA试剂盒说明书步骤操作,在450 nm波长下的酶标仪测定光密度,根据标准曲线计算各样本指标含量。

2.3.3 HE染色观察卵巢组织病理形态 取出两侧卵巢,称重后一侧置于-80 °C冰箱内,一侧于4%多聚甲醛中浸泡。于多聚甲醛中浸泡的卵巢用梯度乙醇脱水后,用石蜡包埋,然后切片,HE染色,光学显微镜下观察卵巢形态大小及各级卵泡数以及总卵泡数。

2.3.4 脏器指数及体质量增量 取卵巢、脾脏、胸腺进行称量,计算脏器指数(脏器指数=脏器质量/体质量)。体质量增量即取材当天的体质量减去大鼠进动物房第1天的体质量。

2.3.5 免疫组织化学法检测卵巢组织中外泌体膜蛋白CD63、CD81、CD82 包埋切片后二甲苯脱蜡,过氧化氢溶液灭活后热修复,自然冷却后加CD63、CD81、CD82一抗(均按照1:100稀释),PBS冲洗后加二抗(1:200)。孵育及冲洗后DAB显色,自来

水冲洗后染色,待干燥后封片拍照,并用MIAS医学图像分析软件分析图片,阳性表达显示为棕黄色。

2.3.6 血清外泌体的提取 按外泌体提取试剂盒操作。将血清4 °C下3000×g离心15 min弃沉淀,再10 000×g离心20 min弃沉淀,加入提取液A混匀后加入提取液B混匀,4 °C冰箱内过夜。第2天10 000×g离心60 min,弃上清液,用外泌体保存液重悬沉淀即得到外泌体样品。

2.3.7 透射电镜观察外泌体 取PBS重悬的外泌体悬液20 mL,滴于载样铜网上,室温静置2 min,用滤纸从滤网侧边吸干液体,用3%磷钨酸溶液30 mL在室温下负染5 min,滤纸吸干负染液,白炽灯烤干,将铜网安装于样品槽中,透射电镜下观察。

2.3.8 Western blot鉴定外泌体 提取的外泌体等体积加入RIPA裂解液和苯甲基磺酰氟,冰上裂解30 min后,样品分装冻存于-20 °C冰箱内备用。测定蛋白浓度后制备分离胶,然后加入上样buffer混匀,沸水煮10 min,冰上5 min。加入样品开始电泳,电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜,然后脱脂牛奶室温封闭90 min后分别加入ALIX、FLOTILLIN和CD9一抗(均按照1:1000稀释),4 °C孵育过夜,加入二抗(1:5000)室温孵育1 h,ECL显色后在凝胶成像系统中拍照。

2.4 统计学方法处理

应用SPSS 25.0软件进行统计学分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,如果方差齐,则采用单因素方差分析比较组间数据,符合正态分布且方差齐者用LSD检验,如果方差不齐者用Tamhane检验,如果不符

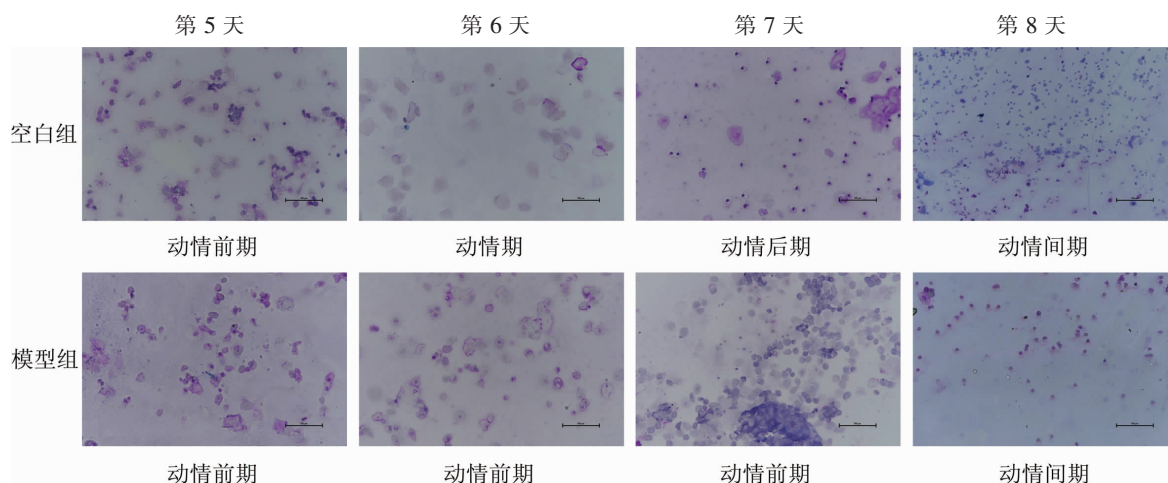


图1 2组大鼠阴道脱落细胞病理形态比较(瑞氏染色,标尺为100 μm,n=6)

合正态分布者用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠阴道脱落细胞病理形态

空白组大鼠有完整的动情周期,即动情前期、动情期、动情后期和动情间期;而模型组大鼠则长期处于动情前期和动情间期。详见图 1。

3.2 各组大鼠血清中 AMH 和 E_2 水平

与空白组比较,模型组 AMH 和 E_2 水平均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,中药中、高剂量组和阳性对照组 AMH 和 E_2 水平均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,中药低剂量组 AMH 水平明显升高($P < 0.05$)。中药低剂量组 E_2 水平与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与阳性对照组比较,中药低剂量组 AMH 水平明显降低($P < 0.05$)。中药各剂量组 E_2 水平和中药中、高剂量组 AMH 水平与阳性对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。中药各剂量组间 AMH 和 E_2 水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

3.3 各组大鼠体质量和脏器指数

与空白组比较,模型组卵巢指数、胸腺指数、体质量、体质量增量均明显减少($P < 0.01$),脾脏指数明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,中药高剂量组和阳性对照组卵巢指数、胸腺指数、体质量、体质量增量均明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),脾脏指数明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,中药中剂量组胸腺指数、体质量均明显升高($P < 0.05$)。中药中剂量组卵巢指数、脾脏指数、体质量增量与模型组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。中药低剂量组卵巢指数、胸腺指数、脾脏指数、体质量、体质量增量与模型组比

表 1 各组大鼠血清性激素水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	AMH/(ng·mL ⁻¹)	E_2 /(ng·dL ⁻¹)
空白组	7.03±0.73	3.66±0.61
模型组	4.86±0.52**	2.64±0.26*
中药低剂量组	5.87±0.75 [△] _A	3.05±0.29
中药中剂量组	6.12±0.96 ^{###}	3.38±0.32 ^{###}
中药高剂量组	6.56±0.78 ^{###}	3.44±0.56 ^{###}
阳性对照组	6.84±0.40 ^{###}	3.48±0.28 ^{###}

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.01$;与阳性对照组比较,^A $P < 0.05$ 。

较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与阳性对照组比较,中药低剂量组卵巢指数、体质量和体质量增量均明显降低($P < 0.05$),脾脏指数明显升高($P < 0.05$)。中药低剂量组胸腺指数和中药中、高剂量组卵巢指数、胸腺指数、脾脏指数、体质量、体质量增量与阳性对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与中药高剂量组比较,中药低剂量组卵巢指数、体质量、体质量增量均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。中药低剂量组胸腺指数、脾脏指数与中药高剂量组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。中药低剂量组与中药中剂量组、中药中剂量组与中药高剂量组间卵巢指数、胸腺指数、脾脏指数、体质量、体质量增量比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 2。

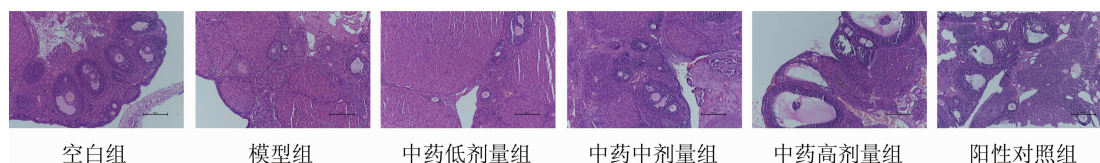
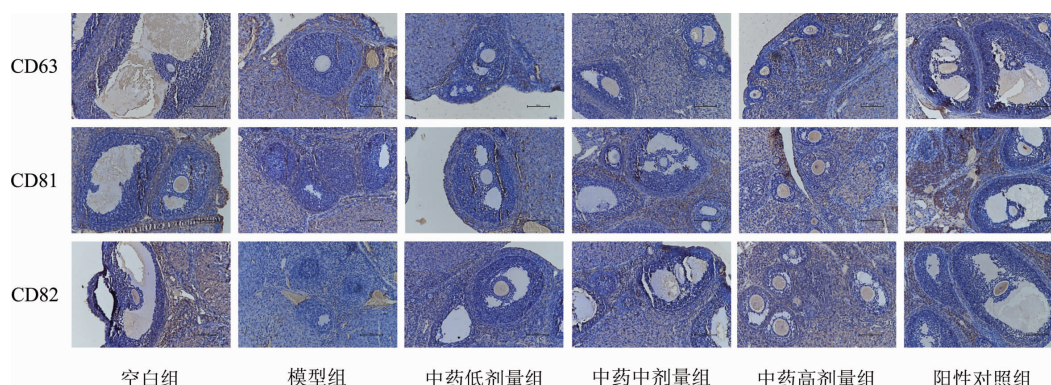
3.4 各组大鼠卵巢组织病理形态学观察

空白组大鼠卵巢结构清晰,卵巢内可见正常卵泡;模型组大鼠卵巢结构紊乱,以初级卵泡和闭锁卵泡居多;中药低剂量组与模型组相似,但较模型组有一定改善;中药中剂量组开始出现一些成熟卵泡,且闭锁卵泡和初级卵泡减少;中药高剂量组和阳性对照组卵巢形态均明显改善,卵泡数量增多,有成熟卵泡,闭锁卵泡数量低,与空白组相似。详见图 2。

表 2 各组大鼠脏器指数、体质量和体质量增量比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	卵巢指数	胸腺指数	脾脏指数	体质量/g	体质量增量/g
空白组	0.062 0±0.009 8	0.201 3±0.030 2	0.217 7±0.024 0	244.17±12.22	92.33±10.17
模型组	0.045 3±0.006 6 ^{###}	0.135 5±0.029 4 ^{###}	0.281 3±0.045 2 ^{###}	223.50±3.62 ^{###}	71.33±5.16 ^{###}
中药低剂量组	0.048 7±0.003 9 ^{△○○}	0.170 8±0.032 2	0.273 0±0.019 1 [△]	230.00±5.51 ^{△○○}	75.50±8.74 ^{△○○}
中药中剂量组	0.054 7±0.009 1	0.177 0±0.035 5*	0.243 0±0.057 6	234.17±4.40*	80.83±3.25
中药高剂量组	0.061 8±0.010 2**	0.185 0±0.038 8**	0.234 5±0.037 4*	242.83±11.02**	89.00±6.81**
阳性对照组	0.060 8±0.006 4**	0.179 8±0.035 9**	0.220 8±0.027 1**	240.83±9.11**	85.17±11.48**

注:与空白组比较,^{###} $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与阳性对照组比较,[△] $P < 0.05$;与中药高剂量组比较,[○] $P < 0.05$,^{○○} $P < 0.01$ 。

图2 各组大鼠卵巢组织形态的变化(HE,标尺为 100 μm , $n=6$)图3 各组大鼠卵巢组织 CD63、CD81、CD82 蛋白阳性表达(免疫组织化学法,标尺为 100 μm , $n=6$)

3.5 各组大鼠卵巢组织中外泌体膜蛋白 CD63、CD81、CD82 表达

与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织 CD63、CD81、CD82 蛋白表达均明显下降($P<0.01$)。与模型组比较,中药高剂量组和阳性对照组 CD63、CD81、CD82 蛋白表达均明显升高($P<0.01$)。中药低、中剂量组 CD63、CD81、CD82 蛋白表达与模型组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与阳性对照组比较,中药低、中剂量组 CD63、CD81、CD82 蛋白表达均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。中药高剂量组 CD63、CD81、CD82 蛋白表达与阳性对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与中药高剂量组比较,中药低剂量组 CD63、CD81、CD82 蛋白表达均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),中药中剂量组 CD82 蛋白表达明显降低($P<0.05$)。中药低剂量组与中药中剂量组、中药中剂量组与中药高剂量组间 CD82 蛋白表达比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。中药低剂量组与中药中剂量组、中药中剂量组与中药高剂量组间 CD63、CD81 蛋白表达比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。详见图3、表3。

表3 各组大鼠卵巢组织 CD63、CD81、CD82 水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

分组	CD63	CD81	CD82
空白组	9.37 \pm 4.09	13.04 \pm 5.52	10.19 \pm 5.24
模型组	3.03 \pm 0.73 ^{###}	3.27 \pm 0.85 ^{###}	2.74 \pm 0.42 ^{###}
中药低剂量组	4.05 \pm 0.15 ^{△△○}	5.32 \pm 0.37 ^{△△○}	3.69 \pm 0.12 ^{△△○}
中药中剂量组	5.33 \pm 0.56 [△]	6.35 \pm 0.41 [△]	4.62 \pm 0.46 ^{△○}
中药高剂量组	7.57 \pm 2.75 ^{**}	9.98 \pm 4.28 ^{**}	9.03 \pm 2.12 ^{**}
阳性对照组	8.19 \pm 2.97 ^{**}	11.02 \pm 3.56 ^{**}	8.49 \pm 4.22 ^{**}

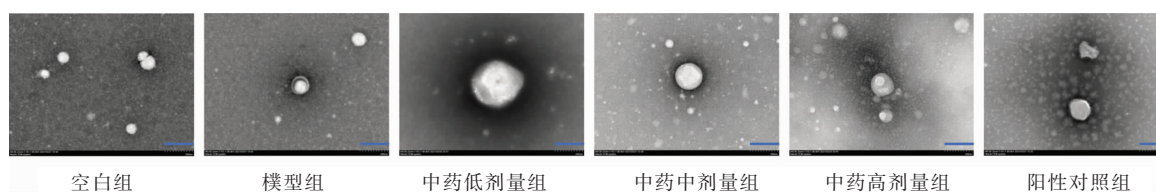
注:与空白组比较,^{###} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与阳性对照组比较,[△] $P<0.05$;与中药高剂量组比较,[○] $P<0.05$,^{△○} $P<0.01$ 。

3.6 各组大鼠透射电镜下外泌体形态观察

空白组、模型组、中药各剂量组和阳性对照组的外泌体均具有外泌体独特的双膜双杯状结构,而且电镜下的粒径范围为 50~150 nm,符合文献[15]报道的外泌体粒径大小,说明各组外泌体提取成功。详见图4。

3.7 各组外泌体标志性蛋白鉴定

各组外泌体中均有标志性蛋白 ALIX、FLOTILLIN 和 CD9 的表达,说明提取的 50~150 nm 微粒为外泌体。详见图5。

图4 各组大鼠透射电镜下外泌体形态观察(标尺为 200 nm, $n=6$)

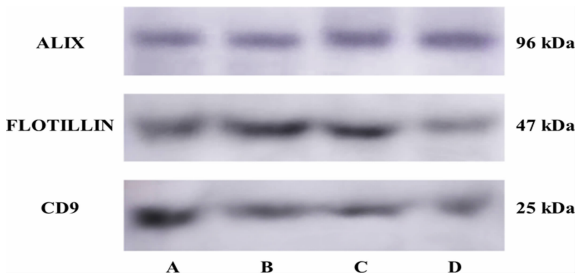


图5 各组外泌体标志性蛋白表达条带图

注:A.阳性对照组;B.中药高剂量组;C.模型组;D.空白组。

4 讨论

POF是女性内分泌疾病的一种,也是临床上造成不孕的原因之一,其发病与免疫功能紊乱、遗传、放射治疗、化学治疗等因素相关^[20-21]。

肾主藏精,主生殖。POF出现天癸衰竭,主要责之于肾精不足,不能司生殖之职。而肾虚精亏不能充养血脉及心、肝、脾、肺四脏,导致四脏气机郁滞,气为血之帅,气机不通则血液流通不畅,进而阻滞冲任,形成瘀血。瘀血阻滞经络胞宫,影响新血生成,进一步加重病情。而临床通过超声检查也发现POF患者卵巢动脉血流信号稀少纤细,或者流速过低难以探测,证明了瘀血是本病发展过程中的重要病理因素。这说明POF的中医病机主要为肾虚血瘀,所以补肾活血法也成为POF的主要治法。国家名老中医尤昭玲教授经多年临床实践,将左归丸化裁为补肾活血方,主要用来治疗肾虚血瘀型POF。补肾活血方由熟地黄、酒黄精、酒山茱萸、白芍、当归、川芎、燀桃仁、枸杞子、丹参这9味药组成。酒山茱萸为君药,可以补肾填精滋阴养血,白芍重在养血活血,且白芍可以增加E2的水平,对女性生殖系统疾病有疗效^[22]。研究发现,补肾活血方主要通过调节免疫反应来改善卵巢功能^[23]以及可以抑制细胞凋亡^[24-25],从而达到治疗POF的目的,同时补肾活血方也可以通过调节相关信号通路修复大鼠卵巢的自噬损伤^[26-27]。

HUANG等^[28]发现将人脂肪干细胞来源外泌体移植到原发性卵巢功能不全(primary ovarian insufficiency, POI)小鼠模型后可以抑制颗粒细胞的凋亡,增加卵泡的数量,使卵巢功能得以修复。ZHANG等^[29]发现人羊膜上皮细胞外泌体通过传递功能性miRNAs,抑制化疗诱导的颗粒细胞凋亡,同时还能减轻急性血管损伤,以此保护卵泡的发育。DING等^[30]发现人脐带间充质干细胞来源外泌体可恢复POI模

型小鼠的卵巢表型和功能,促进环磷酸胺损伤的人颗粒细胞和卵巢细胞的增殖。HAN等^[31]首次证明了将来自中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell, CHO)的外泌体添加到CHO细胞培养液中,能显著抑制细胞的凋亡。细胞自噬与POF的发生有一定关联,现在一些研究表明外泌体和自噬之间通过共享分子和细胞器存在直接的联系,这对正常机体的生理病理有重要意义,自噬相关分子参与外泌体的生物发生过程而非自噬过程^[32-34],以自噬内涵体的形式进行的自噬和外泌体的释放之间是相互拮抗的关系。因此,本实验研究从补肾活血方是否有疗效以及是否对外泌体含量有影响入手,来观察补肾活血方与外泌体的相关性,补肾活血方是否可以通过提高外泌体的含量来治疗POF。

本研究结果显示POF大鼠模型动情周期紊乱,体质量增长缓慢,卵巢指数、脾脏指数、胸腺指数变小,卵巢出现萎缩变小,卵泡数目减少,闭锁卵泡增多,而且外周血外泌体和卵巢中的外泌体膜蛋白CD63、CD81、CD82表达降低。补肾活血方可以使动情周期恢复正常,改善卵巢组织形态,促进卵泡生长发育成熟,同时可以使POF大鼠体质量增加接近正常,卵巢指数、胸腺指数增加,脾脏指数降低,这可能与增加外泌体的含量尤其是增加外周血外泌体和卵巢中的外泌体膜蛋白CD63、CD81、CD82有关。用药后POF大鼠的胸腺指数增加和脾脏指数降低,说明补肾活血方有一定的改善免疫功能作用。通过观察免疫组织化学法图片,可以发现卵巢组织中外泌体主要存在于卵泡液中。用药后,除模型组外其余各组都恢复正常的动情周期,因而结果中只将空白组和模型组进行对比。在用Western blot鉴定外泌体之前,通过其他实验结果发现中药低、中剂量组与模型组相比差异不大,因而选取疗效更好的中药高剂量组和阳性对照组与模型组和空白组进行外泌体的Western blot鉴定。上述实验说明补肾活血方对POF有一定的疗效,其作用机制可能与补肾活血方增加外周血和卵巢组织中的外泌体来控制 and 缓解POF有关。

参考文献

- [1] 张钰玉,刘慧萍,尤昭玲,等.尤昭玲从虚和瘀论治卵巢早衰经验[J]. 中华中医药杂志,2020,35(7):3440-3443.

- [2] 胡金芳,刘慧萍,张楚洁,等.尤昭玲运用助卵方治疗卵巢早衰经验[J].中华中医药杂志,2021,36(6):3369-3372.
- [3] 孙艳敏,胡俊攀,刘杉杉,等.补肾养肝膏方对卵巢储备功能减退患者激素水平及临床症状的影响[J].时珍国医国药,2021,32(7):1668-1671.
- [4] 宋林.经阴道多普勒超声在不孕症患者排卵预测及卵巢储备功能评估中的价值[J].黑龙江医学,2021,45(21):2331-2332,2335.
- [5] 郝培芹,蒋莉,高仁美,等.心肾合治序贯治疗卵巢储备功能下降临床观察[J].中医药临床杂志,2021,33(7):1361-1364.
- [6] 王蔚琳,陈小忆.卵巢早衰的中西医病因分析及治疗现状研究[J].中国中医药现代远程教育,2021,19(22):203-206.
- [7] 伍琴,张韞玉,刘慧萍,等.尤昭玲教授治疗早发性卵巢功能不全经验[J].陕西中医,2021,42(7):941-943.
- [8] 陈定芳,吴月峰,李海英,等.基于外泌体的精准信使靶向性和中医药超分子“气析”理论的中医药现代化实验研究思路与策略探索[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(7):198-206.
- [9] 赵濛,刘志红,李金泉.外泌体组成特征及其作为细胞通讯和分子标记的生物学作用[J].中国生物化学与分子生物学报,2016,32(6):612-619.
- [10] SONG H, LIU B, DONG B, et al. Exosome-based delivery of natural products in cancer therapy[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 650426.
- [11] 郭玲慧,王炜,蒋露,等.外泌体膜蛋白功能研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(10):3622-3628.
- [12] 许亚辉,胡素芹,郭健.外泌体通过 Toll 样受体调节固有免疫的研究进展[J].中国免疫学杂志,2021,37(21):2584-2591.
- [13] 黎智康,刘晨雪璇,谭楚敏,等. MFG-E8 作为外泌体载体蛋白的作用与功能[J].生物技术通报,2022,38(4):288-294.
- [14] VLASSOV A V, MAGDALENO S, SETTERQUIST R, et al. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1820(7): 940-948.
- [15] 周政,杜波,范雪,等.骨髓间充质干细胞外泌体对 SD 大鼠早衰卵巢的影响[J].中国科技论文,2018,13(12):1429-1433.
- [16] 刘梦宇,吴氢凯.干细胞及其外泌体治疗早发性卵巢功能不全的研究进展[J].国际妇产科学杂志,2020,47(2):217-222.
- [17] 付延津,高晶晶,李清瑜,等.基于补肾法探讨骨髓间充质干细胞治疗卵巢早衰的作用[J].中国中西医结合杂志,2021,41(7):860-864.
- [18] 董若曦,朱小丹,樊伯珍,等.不同剂量顺铂腹腔注射建立大鼠化疗损伤性卵巢早衰模型[J].实验动物与比较医学,2020,40(2):104-109.
- [19] 肖小芹,汤婉婷,成绍武,等.小鼠阴道涂片技术及其染色方法的研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(4):376-378.
- [20] 单政铭,陶述春,胡春梅,等.人脐带间充质干细胞来源外泌体的提取、鉴定和蛋白组学分析[J].中国组织工程研究,2022,26(19):3036-3042.
- [21] 林光耀,张米佳,叶涛,等.中西医对卵巢储备功能下降病因认识的研究进展[J].西南医科大学学报,2022,45(1):83-87.
- [22] 张韞玉,张思敏,刘平安,等.补肾活血方中马钱苷、莫诺苷、芍药苷含量测定及其对免疫性卵巢早衰小鼠的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(5):540-545.
- [23] 董亚兰,董莉.补肾活血方治疗卵巢早衰的临床观察及其对 ANA-ACA-AOA 通路的影响[J].上海中医药杂志,2020,54(8):61-65.
- [24] 黄姗姗,张韞玉,刘慧萍,等.滋阴益气活血方对免疫性卵巢早衰小鼠转化生长因子- $\beta 1$ 及 PI3K 相关蛋白表达的影响[J].中国中医药信息杂志,2020,27(1):33-38.
- [25] 王岩岩,刘媛媛,杜马,等.补肾活血方治疗卵巢早衰的疗效及对患者免疫调节的影响[J].世界中医药,2021,16(9):1468-1471.
- [26] 赵井苓,谢莉,江晓翠,等.补肾活血方通过调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路改善 DOR 大鼠卵巢储备功能[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(15):29-35.
- [27] 杨开锋,李兰,周虹,等.氧化应激与细胞自噬凋亡对卵巢早衰调控的研究进展[J].湖南中医药大学学报,2021,41(5):809-814.
- [28] HUANG B X, LU J F, DING C Y, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells improve ovary function of premature ovarian insufficiency by targeting SMAD[J]. *Stem Cell Research and Therapy*, 2018, 9(1): 216.
- [29] ZHANG Q W, SUN J Y, HUANG Y T, et al. Human amniotic epithelial cell-derived exosomes restore ovarian function by transferring microRNAs against apoptosis[J]. *Molecular Therapy*, 2019, 16: 407-418.
- [30] DING C Y, ZHU L P, SHEN H, et al. Exosomal miRNA-17-5p derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improves ovarian function in premature ovarian insufficiency by regulating SIRT7[J]. *Stem Cells*, 2020, 38(9): 1137-1148.
- [31] HAN S, RHEE W J. Inhibition of apoptosis using exosomes in Chinese hamster ovary cell culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(5): 1331-1339.
- [32] 陈思龙,徐光福,覃诗雨,等.miR-155/自噬/外泌体对酒精性肝病的影响[J].中国病理生理杂志,2021,37(5):891-897.
- [33] BURATTA S, TANCINI B, SAGINI K, et al. Lysosomal exocytosis, exosome release and secretory autophagy: The autophagic- and endo-lysosomal systems go extracellular[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(7): 2576.
- [34] SEPÚLVEDA D, CISTERNAS-OLMEDO M, ARCOS J, et al. Contribution of autophagy-lysosomal pathway in the exosomal secretion of alpha-synuclein and its impact in the progression of Parkinson's disease[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2022, 15: 805087.

(本文编辑 黎志清)