doi:10.11659/jjssx.05E018120

·基础研究·

白芨多糖对围绝经期大鼠卵巢 VEGF、血清 MDA、子宫内膜形态学的影响

颜文斌,曾祥涛,戴孟诗,叶 杭,房 源,黄春霞 (长沙医学院基础医学院,湖南 长沙 410219)

[摘 要] **目的** 观察白芨多糖对围绝经期大鼠卵巢血管内皮生长因子(VEGF)、血清丙二醛(MDA)、子宫内膜形态学的影响。**方法** 采用自然老化法建立围绝经期大鼠模型。12~14 月龄 SD 雌性大鼠40 只,随机分为低、中、高剂量白芨多糖(0.5 g/kg,1 g/kg,2 g/kg)及老年组,灌胃给药 8 周。免疫蛋白印迹法检测卵巢 VEGF 蛋白含量变化;用 TBA 法检测血清丙二醛(MDA)含量;HE 染色法观察大鼠子宫内膜形态学。**结果** 用药 8 周后,与老年对照组比较,VEGF 蛋白表达在白芨多糖低、中、高剂量组中表达呈阶梯性升高,血清 MDA 含量在白芨多糖低、中、高剂量组中表达呈阶梯性降低,差异有显著统计学意义($P<0.01$),并存在剂量依赖性,子宫内膜随剂量的增加而出现内膜层增厚以及腺体增多。**结论** 白芨多糖可通过升高卵巢 VEGF 蛋白表达、降低血清 MDA 的水平,改善子宫功能,从而延缓大鼠围绝经期的进程。

[关键词] 白芨多糖;VEGF;MDA;子宫内膜;围绝经期;卵巢

[中图分类号] R392.5;R271 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-05-13

Effects of bletilla striata polysaccharideon on expression of vascular endothelial growth factor in rat ovaries and malondialdehyde in rat serum and endometrial morphology during perimenopause period

YAN Wen-bin, ZENG Xiang-tao, DAI Meng-shi, YE Hang, FANG Yuan, HUANG Chun-xia (Basic Medicine, Changsha Medical University School, Changsha Hunan 410219, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of the bletilla striata polysaccharide on the expression of ovarian vascular endothelial growth factor(VEGF) and serum malondialdehyde(MDA) and endometrial morphology in rat during perimenopause period. **Methods** The animal model of perimenopause rats was established by unforced aging. A total of 40 female SD rats(12~14 months old) were randomly divided into four groups: Chinese medicine low(0.5 g/kg), medium(1 g/kg), high(2 g/kg) dosage group and the elder model group. The rats were given with corresponding drugs for 8 weeks. The content changes of ovarian VEGF protein was detected by western blot; serum MDA content was detected by thiobarbituric acid; the morphology of endometrium in rats was observed by HE staining. **Results** Eight weeks later,

[基金项目] 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目[湘教通(2017)205 号文件-840 号]

[通信作者] 黄春霞, E-mail:1054907485@qq.com

[16] 陈 磊,朱晓云,吕家爱,等.2014-2015 年上海金山区社区居民大肠癌筛查结果分析[J].中华疾病控制杂志,2017,21(2):132-135.doi:10.16462/j.cnki.zhjbkz.2017.02.007.

[17] Panic N, Larghi A, Amore R, et al. Single nucleotide prolymorphisms within the 8Q24 region are not associated with the risk of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas[J]. Gastrointestin Liver Dis, 2016, 25(3):311-315. doi:10.15403/jg1d.2014.1121.253.q24.

[18] Li H, Sun GY, Zhao Y, et al. DEPTOR has growth suppression activity against pancreatic cancer cells[J]. Oncotarget, 2014, 5(24):12811-12819. doi:10.18632/oncotarqet.2659.

[19] Yonghui Y, Carolyne B, Patrick F, et al. DEPTOR is linked to a TORC1-p21 survival proliferation pathway in multiple myeloma cells [J]. Genes Cancer, 2014, 5(12):407-419. doi:10.18632/qenesandcancer.44.

[20] Karly-Rai RB, Dimple C, George P, et al. Differential effects of rapalogues, dual kinase inhibitors on human ovarian carcinoma cellsin vitro [J]. Int J Oncol, 2016, 49(1):133-143. doi:10.3892/ijo.2016.3531.

[21] Zhou X, Guo J, Ji Y, et al. Reciprocal negative regulation between EGFR and DEPTOR plays an important role in progression of lung adenocarcinoma[J]. Mol Cancer Res, 2016, 14(5):448. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0480.

[22] 张浩然,曾志勇,陈君敏.体外 RNA 干扰下调 DEPTOR 表达对人多发性骨髓瘤细胞增殖和凋亡能力的影响[J].中国生物工程杂志,2013,33(5):13-21.doi:10.13523/j.cb.20130503.

[23] Parvani JG, Davuluri G, Wendt MK, et al. Deptor enhances triple-negative breast cancer metastasis and chemoresistance through coupling to survivin expression[J]. Neoplasia, 2015, 17(3):317-328. doi:10.1016/j.neo.2015.02.003.

[24] Bagaria B, Sood S, Sharma R, et al. Comparative study of CEA and CA19-9 in esophageal, gastric and colon cancers individually and in combination (ROC curve analysis) [J]. Cancer Biol Med, 2013, 10(3):148-157. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2013.03.005.

[25] 钟 武,张磊昌,钟世彪,等.结直肠癌患者术前 CEA、CA19-9 浓度与临床病理特征及预后的关系[J].中国普通外科杂志,2015,24(4):499-504.doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04008.

(编辑:刘 艺)

compared with the elder model group, the VEGF protein expression in Chinese medicine low, medium, high dosage group increased, the serum MDA content in Chinese medicine low, medium, high, dosage group reduced, the differences were statistically significant ($P < 0.01$), with dose dependence. Endometrial thickening and glandular increasing with the increase of dose. **Conclusion** Bletilla striata polysaccharide can upregulate the expression of VEGF protein, and down regulate the level of serum MDA, which improves the uterine function so as to delay the process of perimenopause in rats.

Keywords: bletilla striata polysaccharide; VEGF; MDA; endometria; perimenopause period; ovary

围绝经期综合征是卵巢功能减退引起下丘脑-垂体-卵巢内分泌轴(HPOA)的功能失调,从而出现以生殖系统改变、机体老化、神经精神状态异常等临床表现的一组症候群[1]。白芨多糖具有敛疮止血、活血化瘀的功效且药物不良反应少。本研究通过建立围绝经期大鼠模型,采用免疫印迹法(Western blot, WB)、TBA法和HE染色法,分别观察白芨多糖对围绝经期大鼠卵巢VEGF蛋白、血清MDA、子宫内膜形态学影响,探讨白芨多糖改善围绝经期大鼠卵巢的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

动物健康雌性大鼠40只,6~8月龄,体质量350~450 g;湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证号SCXK(湘)2016-0002。

1.2 药材与器材

主要的药材包括白芨多糖提取物(西安四季生物科技有限公司,水提醇沉,纯度90%)、HE染液(servicebio,产品批号:G1005)、蛋白Marker Therm(FERMENTAS 26616)、PVDF膜(MILLIPORE)、HRP标记山羊抗大鼠(GB23302)、PMSF(100 mM, G2008)、RIPA裂解液(G2002)、5×蛋白上样缓冲液(G2013)、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(G2003)武汉赛维尔生物科技有限公司提供。主要的器材包括冷冻离心机(HEAL FORCE NEOFUGE, 13R型)、酶标检测仪(RAYTO, RT2100C型)、电泳仪(北京六一仪器厂,DYY-6C型)、丙二醛试剂盒(南京建成生物工程研究所)、病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,产品批号:RM2016)。

1.3 模型建立、分组及给药

40只6~8月龄雌性大鼠无菌条件下饲养6个月,对12~14个月大鼠进行每日1次、连续15 d阴道涂片观察,经阴道脱落细胞涂片镜下检查,大鼠出现动情周期紊乱、动情间期延长为围绝经期大鼠模型。将40只围绝经期大鼠随机分为4组,每组10只,分别是中药低、中、高剂量、老年对照组。用白芨多糖溶剂按等效剂量分为低(0.5 g/kg)、中(1 g/kg)、高(2 g/kg)剂量分别灌胃低、中、高剂量组,用生理盐水2 mL灌胃老年对照组。每天给药1次,持续8周。

1.4 取材及处理

大鼠末次给药24 h后眼球取血4 mL,离心后取上清液,用于MDA检测;迅速处死后,取出卵巢后于-80 ℃冰箱冻存,用于WB检测;取出子宫组织用中性甲醛固定后制成石蜡切片,用于光镜观察。

1.5 蛋白免疫印迹法检测卵巢组织中VEGF蛋白表达

取适量卵巢组织,加入适量含PMSF及RIPA裂解液确保细胞完全裂解,离心后取上清液即为总蛋白溶液。加蛋白上样缓冲液,沸水浴变性15 min,配制所需浓度的分离胶,加入TEMED后进行灌胶与上样,SDS-PAGE电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳,进行转膜。TBST溶解的5%脱脂牛奶封闭1 h,稀释一抗4 ℃过夜,洗膜后加入二抗(TBST稀释3 000倍),室温下孵育30 min后,用TBST在室温下脱色摇床上洗3次,每次5 min。在暗室中将PVDF膜的蛋白进行曝光。曝光后的胶片进行显影和定影。根据不同的发光强度调整曝光条件,ALPHA软件处理系统分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白灰度值/GAPDH灰度值反映目的蛋白表达半定量水平。

1.6 TBA法测定丙二醛

具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.7 子宫内膜形态学采用HE染色法

切片脱蜡,苏木素染胞核5 min,水洗,盐酸酒精分色数秒,流水冲洗10 min,1%伊红染胞浆5 min,水洗,梯度酒精脱水(90%、95%、无水酒精),二甲苯透明,中性树胶封片、烤干,显微镜观察并摄片。

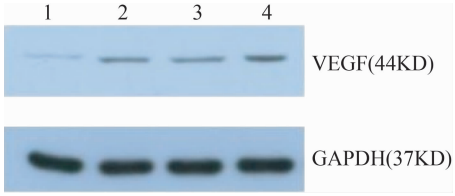
1.8 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数间两两比较采用方差分析,率的比较采用χ^2检验,$P < 0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量白芨多糖对各组围绝经期大鼠卵巢VEGF蛋白灰度值分析

用药8周后,与老年对照组比较,VEGF蛋白表达在白芨多糖低、中、高剂量组中呈阶梯性升高($P < 0.01$),并存在一定剂量依赖性(图1、表1)。



1:对照组;2:低剂量组;3:中剂量组;4:高剂量组

图1 Western bolt 检测大鼠卵巢 VEGF 蛋白表达的电泳条带

表1 白芨多糖对大鼠卵巢中 VEGF 蛋白质表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量($g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)	VEGF 蛋白
老年对照组	-	0.075 ±0.005
白芨多糖低剂量组	0.5	0.153 ±0.083 *
白芨多糖中剂量组	1	0.184 ±0.032 *
白芨多糖高剂量组	2	0.255 ±0.079 *#

*:与老年对照组比较,$P<0.01$;#:与中剂量组比较,$P<0.05$

2.2 不同剂量白芨多糖对各组围绝经期大鼠血清 MDA 含量分析

与老年对照组比较,血清 MDA 含量在白芨多糖低、中、高剂量组中表达呈阶梯性降低($P<0.01$),并存在剂量依赖性(表2)。

表2 白芨多糖对大鼠血清中 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量($g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)	MDA(nmol/mL)
老年对照组	-	10.372 ±0.198
白芨多糖低剂量组	0.5	7.918 ±0.173 *
白芨多糖中剂量组	1	5.206 ±0.159 *#
白芨多糖高剂量组	2	4.150 ±0.133 *#△

*:与老年对照组比较,$P<0.01$;#:与低剂量组比较,$P<0.01$;△:与中剂量组比较,$P<0.01$

2.3 围绝经期大鼠子宫内膜形态学观察

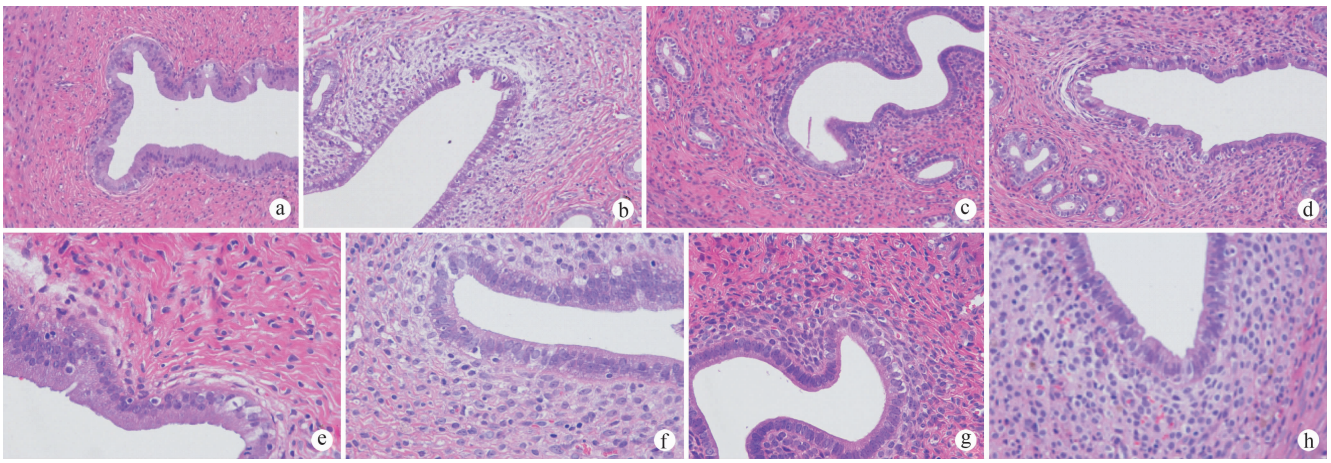
随着剂量增加子宫内膜单层柱状上皮排列更为紧密整齐,固有层的基质细胞、血管逐渐增多,腺体增生、活跃,说明白芨多糖对子宫有营养作用,并能刺激子宫内膜的增生(图2)。

3 讨论

围绝经期综合征是指由于卵巢血管结构及微循环血流的改变导致卵巢功能减退,引起下丘脑-垂体-卵巢内分泌轴(HPOA)的功能失调,而表现出以自主神经系统功能紊乱为主的临床症状。据估计,到2030年世界上的围绝经期和绝经后期妇女将达到12亿人口。现代实验研究表明白芨多糖具有活血化瘀、调节血液系统、提高机体抗氧化能力及抗细胞衰老作用[2-6]。

基于以上理论基础,本实验对白芨多糖能否改善下丘脑-垂体-卵巢内分泌轴(HPOA)的功能进行研究,寻求其治疗围绝经期的机制。实验中采用生殖功能衰退表现与围绝经期妇女相似的12~18月龄雌性大鼠建立围绝经期模型,因此得出的结果也更具现实参考价值及临床指导意义,为中药治疗卵巢衰老提供一定的参考依据[7-8]。

卵巢的功能主要依靠卵泡的血管生成而产生。血管生成受多种血管生长因子(如 TGFA、TGFB、VEGF 等)的调控。VEGF 是已知最重要的血管生长因子,能增加血管的通透性、有利于卵泡液的形成、促进卵泡的成熟同时维持血管内皮细胞功能,进一步调控血管生成和改善卵巢微循环[9-14]。Bruno 等[15]证实 VEGF 在雌性哺乳动物卵巢中有特异表达,VEGF 蛋白表达丰度随卵泡发育而逐渐增强。同时 Zimmermann 等[16]指出通过减弱 VEGF 信号的传递,会降低卵泡膜细胞层



a:老年对照组(HE ×200);b:白芨多糖低剂量组(HE ×200);c:白芨多糖中剂量组(HE ×200);d:白芨多糖高剂量组(HE ×200);e:老年对照组(HE ×400);f:白芨多糖低剂量组(HE ×400);g:白芨多糖中剂量组(HE ×400);h:白芨多糖高剂量组(HE ×400)

图2 大鼠子宫内膜形态学观察

的血管生成而阻止卵泡、卵泡腔的发育与形成,抑制颗粒细胞增殖和雌激素的产生。

女性月经周期循环导致原始卵泡不断消耗,颗粒细胞需氧量提高,使卵泡处于缺氧状态导致卵泡质量下降,同时体内超氧化物歧化酶等抗氧化酶系的活性下降使得卵巢内正常代谢产生的活性氧不断累积进而影响细胞正常功能[17-19],本实验测定的 MDA 作为一种脂质过氧化产物,既是评价衰老的重要指标之一,又可反映组织氧化的程度[20]。

本实验发现中药各剂量组和老年对照组比较,提示其作用机制。一方面降低血清中 MDA 的含量,阻止氧自由基的累积对衰老卵巢微循环的破坏,进而改善其血供;另一方面提高衰老卵巢中 VEGF 蛋白的含量,可能通过旁分泌的形式刺激卵泡膜内皮细胞增生,调控血管生成和改善卵巢微循环从而延缓卵巢衰老过程。白芨多糖以其局部滞留性、无刺激性、无毒副作用等特点,能够有效避免激素替代疗法(hormone replacement therapy,HRT)产生的副作用。但是,白芨多糖中何种类成分使 VEGF 含量发生改变及其具体的作用机制有待于进一步实验研究。

[参考文献]

[1] Marnocha SK,Bergstrom M,Dempsey LF. The lived experience of perimenopause and menopause[J]. Contemp Nurse,2011,37(2):229 - 240. doi:10.5172/conu.2011.37.2.229.

[2] 王 晓,崔 平,吴 冉,等.白芨胶载外源性重组人表皮生长因子促进伤口愈合机制[J].中国组织工程研究,2016,20(20):2964 - 2971. doi:10.3969/j.issn.2095 - 4344.2016.20.011.

[3] Venkatrajah B,Malathy VV,Elayarajah B,et al. Biopolymer and bletilla striata herbal extract coated cotton gauze preparation for wound healing[J]. J Med Sci,2012,12(6):148 - 160. doi:10.3923/jms.2012.148.160.

[4] 芮海云,吴国荣,陈景耀,等.白芨中性多糖抗氧化作用的实验研究[J].南京师大学报(自然科学版),2003,26(4):94 - 98. doi:10.3969/j.issn.1001 - 4616.2003.04.020.

[5] 徐 莲,符旭东,熊 蕊,等.3 种中药提取物对人真皮成纤维细胞增殖及胶原合成的影响[J].中国药师,2016,19(3):448 - 452. doi:10.3969/j.issn.1008 - 049X.2016.03.011.

[6] 刘光斌,黄 忠,黄长干,等.天然植物白芨胶的功能及在化妆品中的应用[J].日用化学品科学,2005,28(8):22 - 24. doi:10.3969/j.issn.1006 - 7264.2005.08.008.

[7] Danilovich N,Sairam MR,Maysinger D. The menopausal mouse:a new neural paradigm of a distressing human condition.[J]. Neuroreport,2003,14(12):1617 - 1622.

[8] Lisa CH,Mcdonald H,Strauss E. Deconstructing aging[J]. Science,2004,305(5689):12419.

[9] 高 冬,吴立娅,焦雨欢,等.血管内皮生长因子通路在血府逐瘀汤影响内皮祖细胞功能中的作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):104 - 107. doi:10.3969/j.issn.1005 - 9903.2010.11.032.

[10] Shimizu T. Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor(VEGF) and growth differentiation factor 9(GDF-9) genes[J]. J Reprod Dev,2006,52(1):23 - 32.

[11] Shikanov A,Zhang Z,Xu M,et al. Fibrin encapsulation and vascular endothelial growth factor delivery promotes ovaria graft survival in mice[J]. Tissue Eng Part A,2011,17(23 - 24):3095 - 3104. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0204.

[12] Zisch AH,Schenk U,Schense JC,et al. Covalently conjugated VEGF-fibrin matrices for endothelialization[J]. J Control Release,2015,72(1):101 - 113. doi:10.1016/S0168 - 3659(01)00266 - 8.

[13] Garrido N,Albert C,Krüssel JS,et al. Expression,production,and secretion of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 by granulosa cells is comparable in women with and without endometriosis[J]. Fertil Steril,2001,76(3):568 - 575. doi:10.1016/S0015 - 0282(01)01961 - 6.

[14] Geva E,Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology[J]. Fertil Steril,2000,74(3):429 - 438. doi:10.1016/S0015 - 0282(00)00670 - 1.

[15] Bruno JB,Matos MHT,Chaves RN,et al. Angiogenic factors and ovarian follicle development[J]. Animal Reproduction,2009(2):371 - 379.

[16] Zimmermann RC,Hartman T,Kavic S,et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development.[J]. J Clin Invest,2003,112(5):659. doi:10.1172/JCI200318740.

[17] Hirik E,Suleyman B,Mammadov R,et al. Effect of anakinra, an interleukin one beta antagonist, on oxidative testicular damage induced in rats with ischemia reperfusion[J]. Rev Int Androl,2018,16(3):87 - 94. doi: 10.1016/j.androl.2017.03.001.

[18] Morimoto Y,Oku Y,Sonoda M,et al. High oxygen atmosphere improves human follicle development in organ cultures of ovarian cortical tissues in vitro[J]. Human Reprod,2007,22(12):3170 - 3177. doi:10.1093/humrep/dem314.

[19] Lim J,Luderer U. Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary1[J]. Biol Reprod,2011,84(4):775. doi:10.1095/biolreprod.110.088583.

[20] 朱庆磊,杨 ,薛 桥,等.人工致衰老和自然衰老小鼠抗氧化能力改变的对比研究[J].中国老年学杂志,2003,23(7):448 - 450. doi:10.3969/j.issn.1005 - 9202.2003.07.026.

(编辑:左艳芳)