doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2020.13.012

黄芪改善衰老小鼠生殖功能的抗氧化机制研究*

朱嵩岳,伯 乐,杨光照,尹 娜,吴晨婷,茅彩萍△
(苏州大学附属第一医院生殖医学中心,江苏 苏州 215006)

摘要:目的 探讨黄芪(AS)对 *D*－半乳糖(*D*－gal)致雌性小鼠卵巢衰老的改善作用及其抗氧化机制。**方法** 将60只ICR雌鼠随机分为空白对照(CON)组、*D*－gal组、*D*－gal＋AS组,每组20只。每组各取6只小鼠行体外受精实验,计数并比较各组的二细胞数、四细胞数及囊胚数;收集各组其余小鼠卵巢组织和血清,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测其中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量;采用逆转录－聚合酶链式反应(RT－PCR)法检测囊胚 SOD_1 和 SOD_2 基因表达。**结果** 小鼠体外受精实验中,*D*－gal＋AS组各阶段胚胎数均高于 *D*－gal组($P<0.05$);*D*－gal＋AS组卵巢和血清中SOD含量均高于 *D*－gal组($P<0.05$, $P<0.01$),MDA含量均低于 *D*－gal组($P<0.05$);囊胚中 *D*－gal＋AS组 SOD_1 和 SOD_2 基因表达均高于 *D*－gal组($P<0.05$)。**结论** 黄芪可通过增加血液及卵巢组织中抗氧化物SOD含量,降低生殖系统氧化应激反应,并通过调控卵巢抗氧化基因的表达,有效改善卵巢衰老小鼠的生殖功能,可为临床应用黄芪防治卵巢衰老提供参考。

关键词:黄芪;卵巢衰老模型;胚胎;抗氧化作用
中图分类号:R932;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1006－4931(2020)13－0044－04

Antioxidant Mechanism of Astragalus on Reproductive Function in Aging Mice

ZHU Songyue, BO Le, YANG Guangzhao, YIN Na, WU Chenting, MAO Caiping
(*Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, China 215006*)

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of astragalus(AS) on ovarian aging induced by *D*－galactose(*D*－gal) in female mice. **Methods** Sixty ICR females were randomly divided into the control group(CON) group, *D*－gal group and *D*－gal＋AS group, 20 rats in each group. Six mice in each group were subjected to in vitro fertilization experiments, comparing the number of two cells, four cells and blastocysts in each group. The ovarian tissues and serum of the other rats were collected, and the contents of SOD (superoxide dismutase) and MDA(malondialdehyde) were detected by enzyme－linked immuno sorbent assay(ELISA). SOD_1 and SOD_2 gene expressions in blastocysts were detected by reverse transcription－polymerase chain reaction(RT－PCR). **Results** The number of embryos in *D*－gal＋AS group was higher than that in *D*－gal group($P<0.05$). The content of SOD in *D*－gal＋AS group was higher than that in *D*－gal group($P<0.05$, $P<0.01$), and the MDA content was lower than that in *D*－gal group($P<0.05$). SOD_1 and SOD_2 gene expressions in *D*－gal＋AS group was higher than that in *D*－gal group($P<0.05$). **Conclusion** Astragalus can effectively reduce the oxidative stress response of the reproductive system by increasing the content of antioxidant SOD and effectively improving the reproductive function of ovarian aging mice by regulating the expression of ovarian antioxidant genes. The results provide an important experimental theoretical basis for the clinical application of jaundice in the prevention and treatment of ovarian aging.

Key words: astragalus; ovarian aging model; embryo; antioxidant effect

人类女性生殖系统比绝大部分机体系统衰老得更迅速,生殖能力与年龄呈负相关[1]。随着年龄的增长,卵母细胞、卵丘细胞和卵泡液中活性氧增加和抗氧化水平降低引起女性生殖系统氧化应激压力增高,生育能力降低[2]。目前,临床主要治疗手段有免疫治疗、内分泌治疗等,有关中医药的治疗较少。黄芪(AS)在临床常用于防治免疫功能紊乱性疾病、心脑血管疾病、肿瘤等多种疾病,疗效确切[3]。黄芪可发挥抗衰老作用,可能是通过抗氧化、调节免疫功能、改善衰老基因和相关酶表达、抑制端粒酶缩短等作用机制而实现[4－5],但其对女性氧化应激和卵巢生殖功能方面的作用未见报道。现代药理学研究表明,黄芪的安全有效剂量范围为9～30 g[6]。故本研究中选取黄芪平均治疗量为20 g,按体表面积换算,小鼠用量为400 mg/kg。*D*－半乳糖在半乳糖氧化酶作用下分解成过氧化氢和醛糖,导致机体活性氧和超氧自由基累积,氧化应激增加,造成组织和细胞损伤,是用于构建衰老小鼠的常用药物[7]。本研究中探讨了黄芪对卵巢衰老生殖功能的影响及机制,为临床治疗卵巢衰老提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器:ETC811型基因扩增仪(苏州东胜兴业科学仪

*基金项目:国家自然科学基金[81671535];中华医学会临床医学科研专项资金－生殖医学青年医师研究与发展项目执行书[17020270696]。

第一作者:朱嵩岳,男,硕士研究生,研究方向为生殖医学,(电子信箱)xiyikebi890571@163.com。
△通信作者:茅彩萍,女,博士研究生,教授,研究方向为生殖医学,(电子信箱)maocp1018@163.com。

器有限公司);Gene Amp9700 型 Q-PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);TEC-VEMJ2 型全自动组织包埋机(日本樱花公司)。

试药:*D*-半乳糖(*D*-Galaactose,T0591,批号为 20160406,美国 Targrt Mol 公司);黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge 干燥根提取物(b21616-1g,批号为 20160605,上海源叶生物科技有限公司);孕马血清促性腺激素(PMSG,P9970,批号为 20161012,北京索莱宝科技有限公司);人绒毛膜促性腺激素(HCG,BM0066,批号为 20160815,武汉博士德生物工程有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)检测试剂盒(苏州绿叶日用品有限公司);RNeasy Mini Kit(74101,批号为 A180502A,美国 Qiagen 公司);逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒(RR047A,批号为 157019548,日本 Takara 公司);引物(批号为 HG1811290022,南京锐真生物公司)。

动物:60 只 SPF 级 ICR 雌性小鼠和 10 只 SPF 级 ICR 雄性小鼠,8 周龄,体质量(22.1±2.9)g,购自昭衍(苏州)新药研究中心有限公司,实验动物生产许可证号为 SCXK(苏)2018-0006。自由饮食饮水,期间喂食标准颗粒饲料,饲养环境温度为 18~25 ℃,相对湿度为 40%~60%,光照周期 12 h∶12 h。所有动物实验方案均按苏州大学第一附属医院伦理委员会规定进行。

1.2 方法

动物模型建立:选取 60 只 8 周龄 ICR 雌鼠,体质量均在(22±3)g,随机分为空白对照(CON)组、衰老模型(*D*-gal)组、黄芪治疗组(*D*-gal+AS)组,每组 20 只。在相同环境下饲养,饲料和水均经过灭菌处理。*D*-gal 组皮下注射 *D*-gal[(200 mg/(kg·d)]42 d,超纯水灌胃(每 10 g 体质量 0.2 mL)30 d,小鼠出现精神萎靡、毛色枯黄、行动迟缓等现象为造模成功;空白对照组注射与 *D*-gal 组等体积的生理盐水 42 d,超纯水灌胃(每 10 g 体质量 0.2 mL)30 d;D-gal+AS 组皮下注射 *D*-gal[200 mg(kg·d)]42 d,黄芪[400 mg/(kg·d)]灌胃(每 10 g 体质量 0.2 mL)30 d。

体外受精实验:造模后,各组均取 6 只小鼠腹腔注射 PMSG 0.1 mL(5 U),48 h 后,注射 HCG 0.1 mL(5 U)。在注射 PMSG 后第 4 天清晨 9:00,处死小鼠,取出卵丘-卵泡复合物;同时,处死雄鼠,取附睾尾内精子在体外与卵丘-卵泡复合物结合 6 h 后置二氧化碳(CO_2)培养箱(CO_2 体积分数为 5%,温度为 37 ℃)培养,并将受精卵体外培养至囊胚阶段,观察受精卵及各阶段胚胎情况,计数并比较各组的二细胞数、四细胞数及囊胚数。

血清和卵巢 SOD 和 MDA 检测:其余小鼠颈部脱臼法处死后收集血样,离心,取上清液;同时,取卵巢组织,迅速用生理盐水洗净,在冰上用小组织剪剪碎,放入匀浆管,用匀浆机匀浆,取上清液;上清液行 SOD 活性、MDA 含量测定。操作方法均严格按试剂盒说明书进行。

囊胚相关氧化应激基因 mRNA 表达检测:用研钵在液氮环境下将体外培养的囊胚组织研磨成粉末,放入 1.5 mL 无 RNA 酶离心管内,用 RNeasy Mini Kit 试剂盒提取 RNA,用 RT-PCR 试剂盒逆转录为 cDNA,用于目的基因扩增,用 Q-PCR 仪连续荧光检测扩增,程序设定为 UDG 酶激活 50 ℃,时间 2 min,预变性温度 95 ℃,时间 2 min;变性温度 95 ℃,3 s,退火、延伸,温度 60 ℃,30 s,持续 40 个循环,于 60 ℃处收集荧光,每个样本均以 β-actin 作为对照,行三复孔检测。采用 Graph Pad Prism7 软件进行分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析,行 LSD-*t* 检验和单因素方差(ANOVA)分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

连续造模 42 d 后,各组小鼠均未出现呕吐、拒食等病理情况。

2.2 促排卵后体外受精结果

3 组小鼠平均排卵数无统计学差异($P>0.05$);与 CON 组相比,*D*-gal 组小鼠平均二细胞数、四细胞数及囊胚数均显著减少($P<0.05$);*D*-gal+AS 组中二细胞数、四细胞数及囊胚数较 D-gal 组显著增加($P<0.05$)。详见表 1。

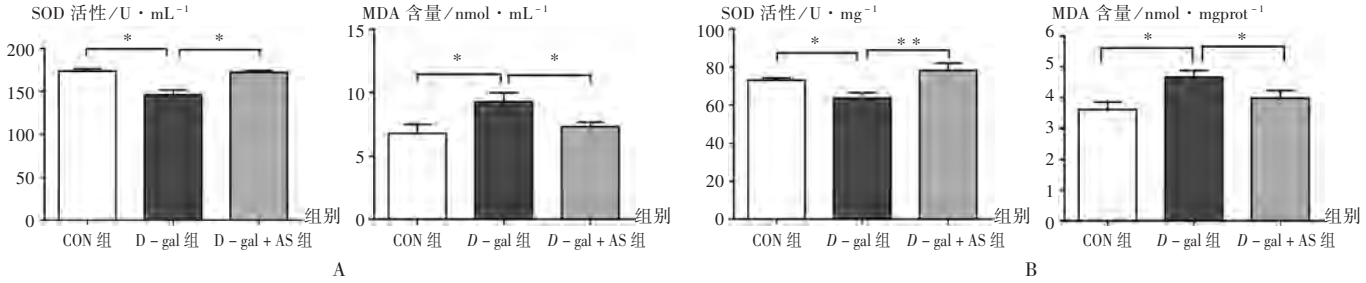
表 1 3 组小鼠排卵数及早期胚胎各阶段正常胚胎数($\bar{X}\pm s$, $n=6$)

组别	排卵数	二细胞数	四细胞数	囊胚数
CON 组	29.55±2.84	20.91±4.48*	20.61±4.18*	16.05±6.34*
D-gal 组	25.16±3.51	16.27±4.27	14.27±3.69	9.66±1.66
D-gal+AS 组	32.12±4.05	26.50±5.43*	23.38±5.74*	17.77±3.99*

注:与 *D*-gal 组相比,*$P<0.05$。图 1 和图 2 同。

2.3 小鼠血清、卵巢、囊胚中 SOD 和 MDA 水平

D-gal 组小鼠血清中 SOD 水平较 CON 组显著降低($P<0.05$),*D*-gal+AS 组较 *D*-gal 组 SOD 水平显著升高;*D*-gal 组中 MDA 水平较正常组显著升高($P<0.05$),*D*-gal+AS 组 MDA 水平较 *D*-gal 组显著降低($P<0.05$)。*D*-gal 组小鼠卵巢组织中 SOD 水平较 CON 组显著降低($P<0.05$),*D*-gal+AS 组较 *D*-gal 组 SOD 水平显著升高($P<0.01$);*D*-gal 组中 MDA 水平较 CON 组显著升高($P<0.05$),*D*-gal+AS 组 MDA 水平较 *D*-gal 组显著降低($P<0.05$)。*D*-gal 组与 CON 组相比,囊胚 SOD_1 和 SOD_2 基因表达水平显著降低($P<0.05$);与 *D*-gal 组相比,*D*-gal+AS 组中囊



A. 血清　B. 卵巢组织

图1　3组小鼠血清、卵巢、囊胚中SOD和MDA水平（$n=14$）

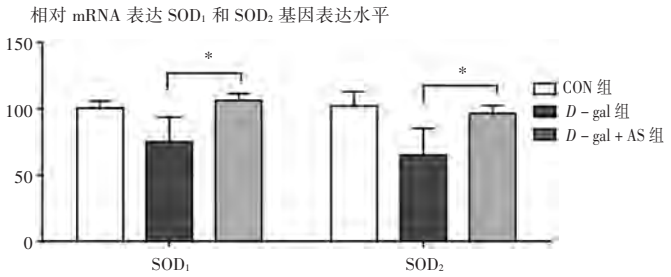


图2　囊胚中SOD_1和SOD_2表达水平（$n=14$）

胚SOD_1和SOD_2表达水平显著升高（$P<0.05$）。详见图1和图2。

3　讨论

高龄所伴随着的卵巢衰老是影响生殖健康的重要原因[1]。卵巢衰老直接影响卵子质量，而卵子老化导致卵母细胞线粒体结构异常、纺锤体及染色体排列异常、活性氧（ROS）增加等问题，进一步导致卵母细胞质量下降，可能出现低生育率、胚胎发育异常和先天性缺陷等生殖相关疾病，其中最主要的原因是ROS增加[8-9]。机体一般处于ROS平衡状态，即抗氧化水平与氧化水平持平，但当抗氧化水平降低或氧化水平增高时，则会产生过多的ROS，会对机体中的DNA、脂质等大分子造成损害[10]。脂质氧化最终产物为MDA，是机体氧化程度判定的重要指标之一，过量的MDA会破坏细胞膜中的不饱和脂肪酸，*D*－半乳糖可能产生过量的超氧阴离子和过氧化氢，导致脂质过氧化物在细胞膜中过量沉积，从而增加了MDA的含量[11]。SOD是机体最重要的抗氧化酶之一，是抵挡ROS的第一道防线，催化超氧化物向过氧化氢转化，对于正常细胞功能有重要意义[12]。当MDA代谢过量和SOD水平下降时，则表示机体氧化应激水平增强，ROS增加，引发衰老[13]。

黄芪多糖、黄芪提取物均有抗衰老、降低氧化应激水平的功能[14]，主要是通过清除多余的ROS及改善线粒体功能障碍等途径，最终改善机体能量代谢[15]。本研究结果显示，黄芪改善了小鼠胚胎的发育能力，增强了抗氧化酶的活性，且减少了氧化代谢产物的减少，表明黄芪改善了衰老小鼠卵母细胞的氧化应激状态，增强了卵母细胞的抗氧化能力，促进受精卵的成熟。初步推测与相关基因上调有关。

褪黑素可通过降低生殖系统氧化应激、去除ROS及抗卵母细胞凋亡等途径实现改善小鼠生殖功能的作用，其主要功能蛋白为SOD_2；同时，SOD_2蛋白将体内代谢生成的超氧化物转变成过氧化物，在过程中产生的超氧阴离子和过氧化氢对卵泡发育也起到了关键作用[16]。体外培养的囊胚在黄芪的作用下，SOD_1和SOD_2基因表达增加，表明黄芪通过增加SOD基因的表达也发挥了类似褪黑素的功能。目前，SOD_1的功能尚不明确，但应注意卵丘细胞SOD_1蛋白活性降低会导致体外受精－胚胎移植术（IVF－ET）成功率下降[17]，可推断黄芪可能会影响IVF－ET的成功率，但仍需后续研究进一步证实。

综上所述，黄芪可能通过增强抗氧化基因的表达，降低衰老小鼠的全身氧化应激作用，改善其生殖功能，均为临床黄芪治疗卵巢衰老提供了理论基础。

参考文献：

[1] LI Q, GENG X, ZHENG X, et al. Current understanding of ovarian aging[J]. Sci China Life Sci, 2012, 55(8): 659－669.

[2] LIM J, LUDERER U. Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary[J]. Biol Reprod, 2011, 84(4): 775－782.

[3] 李建娣. 黄芪注射液辅助治疗对卵巢癌患者的治疗效果及对患者生活质量、炎症因子、T淋巴细胞的影响[J]. 新中医, 2019, 51(8): 194－196.

[4] 倪慧艳, 陈　伟, 宋文静. 黄芪多糖抗氧化作用[J]. 中医学报, 2017, 32(9): 1705－1707.

[5] 向丽娟, 夏新中, 毛　坤, 等. 黄芪抗衰老研究现状[J]. 中国现代中药, 2014, 16(2): 177－180.

[6] 王　青, 赵林华, 邸　莎. 黄芪的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药, 2018, 38(12): 1450－1454.

[7] BANDYOPADHYAY S, CHAKRABARTI J, BANERJEE S, et al. Galactose toxicity in the rat as a model for premature ovarian failure: an experimental approach readdressed[J]. Hum Reprod, 2003, 18(10): 2031－2038.

[8] PODFIGURNA－STOPA A, CZYZYK A, GRYMOWICZ M, et al. Premature ovarian insufficiency: the context of long－term effects[J].