

论著·实验研究

白介素 1 β 在大鼠卵泡发育中 表达及功血宁 II 号冲剂的影响*

王 玲, 范琼琳, 李瑞环, 孙艳明, 徐 瑾, 哈孝贤, 陈 静, 玄明实

摘要:[目的] 观察白介素 1 β (IL-1 β)在大鼠卵泡发育过程中的表达以及功血宁 II 号冲剂对其表达的影响, 探讨该药促进卵泡发育诱发排卵的作用机制。[方法] 将未成年雌性大鼠随机分为模型对照组、阳性对照组和功血宁 II 号高、低剂量组, 分别给予蒸馏水、安坤赞育丸和功血宁 II 号冲剂, 14 d 后皮下注射妊马血清促性腺激素(PMSG)+人绒毛膜促性腺激素(hCG)制备诱发排卵大鼠的模型。分别在卵泡发育期和排卵前期处死动物摘取卵巢, 常规制备卵巢切片, 免疫组化法检测各组动物卵泡不同发育时期 IL-1 β 表达。[结果] IL-1 β 在模型对照组中的表达, 排卵前期的阳性细胞面积、阳性面积率、积分光密度、平均光密度均显著高于卵泡发育期($P<0.05$); 功血宁 II 号组在卵泡发育期和排卵前期 IL-1 β 表达的上述指标均明显高于模型对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 排卵前期的上述指标均明显高于相应卵泡发育期($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其中高剂量组的作用较低剂量组和阳性对照组显著。[结论] IL-1 β 在大鼠卵泡发育过程中均有表达并逐渐增强。功血宁 II 号冲剂能够显著提高 IL-1 β 的表达, 通过其参与卵母细胞成熟, 诱导卵巢排卵因子的产生, 在卵泡破裂激发排卵过程中发挥作用, 促进卵泡发育诱发排卵。

关键词:白介素 1 β ; 功血宁 II 号冲剂; 卵泡发育

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1673-9043(2009)01-0016-04

Expression of interleukin 1 β during development of follicle and the effect of GongXueNing Chongji No. II on it

WANG Ling, FAN Qiong-lin, LI Rui-huan, et al

(Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To observe the expression of interleukin 1 β (IL-1 β) during the development of follicle and the effect of GongXueNing Chongji No.II (Stopping the hemorrhage from the uterus) on it. [Methods] immature female rats were randomly divided into model control group, positive control group, GongXueNing II high and low dosage group. They were treated with distilled water, Ankunzanyu Pill and GongXueNing Chongji No.II (taken medicine after infused in boiling water) respectively. 14 days later a model of ovulation in rats was induced by subcutaneous FMSG+hCG. The animals were sacrificed at development period of follicle and preovulatory period and their ovaries were harvested. The expression of IL-1 β of pathologic section in the different development periods was measured with immunohistochemistry. [Results] In the model group the IL-1 β expression, the positive cell area, the rate of positive area, the integrated optical density, the average optical density in preovulatory period were obviously higher than that in the development period of follicles ($P<0.05$). In GongXueNing No.II group the above parameters of IL-1 β expression at the development period of follicles and preovulatory period were all higher than the model control group ($P<0.05$ or $P<0.01$). All the parameters described above at preovulatory period were obviously higher than that at the corresponding period of follicle development ($P<0.05$ or $P<0.01$). Among them, the effect of high dosage group was more obvious than that

* 基金项目: 天津市卫生局中医、中西医结合科研基金项目(03033)。

作者单位: 300193 天津中医药大学(王 玲, 范琼琳, 李瑞环, 孙艳明, 哈孝贤, 陈 静, 玄明实)
300211 天津医院(徐 瑾)

作者简介: 王 玲(1950-), 女, 研究员, 硕士生导师, 主要从事中医妇科科研和临床工作。

in low dosage group and the positive control group. **[Conclusion]** IL-1 β was expressed and increased gradually during the process of follicle development. GongXue Ning Chongji No. II can significantly increase the expression of IL-1 β and can accelerate the development of follicle and induce the ovulation.

Key words: interleukin 1 β ; GongXue Ning Chongji No. II; development of follicle

白介素 1(IL-1)是一种主要由血液中的单核细胞和巨噬细胞以及其他多种类型细胞合成和分泌的细胞因子和多肽调节因子,不仅对多种免疫活性细胞具有调节作用,而且在生殖过程中的作用日益受到关注。IL-1 β 是 IL-1 系统具有生物活性的亚型之一,与生殖活动关系最为密切,在调节卵细胞发育、成熟、排卵等卵巢功能方面发挥重要作用。

功血宁 II 号冲剂是治疗功能失调性子宫出血(简称功血)肝肾阴虚证型的中药方剂,主要用于血止后调理月经周期,促进排卵。经临床和实验研究表明,功血宁 II 号冲剂通过调节下丘脑—垂体—卵巢轴的功能,具有促进卵泡生长发育及其排卵的作用^[1-2]。本研究以未成年大鼠诱发排卵模型为研究对象,通过动态观察 IL-1 β 在大鼠卵泡发育过程中的表达,以及功血宁 II 号冲剂对其表达的影响,探讨功血宁 II 号冲剂促进卵泡发育诱发排卵的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar 雌性大鼠,25~28 日龄,体质量 60~80 g,由天津药物研究院动物中心提供。

1.1.2 药物 功血宁 II 号冲剂由熟地黄、山茱萸、山药、女贞子、枸杞子、菟丝子、仙灵脾、当归、白芍、香附等组成。药物用水煎煮 3 次,过滤,滤液减压浓缩成浸膏,加 95%乙醇制粒,整粒,真空干燥即得。每克冲剂含 4 g 生药,由天津中医药大学制剂中心提供。安坤赞育丸,天津达仁堂制药二厂产品(910066)。

1.1.3 主要试剂和仪器 兔抗鼠 IL-1 β 单克隆抗体(H-153):sc-7884;SP-9003 Goat Histostain-Plus Kits 免疫组化染色试剂盒,由天津灏洋生物制品有限责任公司提供。妊马血清促性腺激素(PMSG),天津正江科技有限公司产品;人绒毛膜促性腺激素(hCG),上海生物化学制药厂产品。RM2135 切片机,德国莱卡仪器有限公司;Japan OLYMPUS-BHT 光学显微镜;OLYMPUS 数码照相机。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与给药方法 选取 Wistar 未成年

雌性大鼠 80 只,随机分为模型对照组、阳性对照组和功血宁 II 号高、低剂量组 4 组,每组 20 只。实验前用蒸馏水将功血宁 II 号冲剂和安坤赞育丸配成不同浓度的药液。功血宁 II 号组剂量分别为 26 g/kg 和 13 g/kg,药物浓度为 2.6 kg/L 和 1.3 kg/L;阳性对照组给予安坤赞育丸,剂量为 3 g/kg,药物浓度为 0.3 kg/L;各组均按 10 mL/kg 灌胃给药。空白对照组给予等量蒸馏水。每日定时灌胃给药 2 次,连续给药 14 d。

1.2.2 动物模型的制备及处理 在 PMSG+hCG 超排卵动物模型基础上制备诱发排卵大鼠模型。于实验第 14 天给药 1 h 后,各组大鼠每只颈部皮下注射 PMSG 50 U,48 h 后每组随机选取 10 只大鼠,处死后摘取卵巢,此为卵泡发育期模型。每组各余下 10 只大鼠,每只颈部皮下注射 hCG 30 U。根据文献报道,用 hCG 诱导大鼠排卵,排卵从 14~16 h 开始,延续 8~10 h^[3],注射 hCG 后 12 h,在其开始排卵前即将各组所有大鼠处死,摘取卵巢,此为排卵前期模型。

1.2.3 卵巢组织切片的制备 以上各时间点摘取的卵巢,置于 4%多聚甲醛固定 8~24 h,经脱水,透明后石蜡包埋,连续切片厚 5 μ m,用于免疫组化染色。

1.2.4 免疫组化染色 按试剂盒操作指南进行。采用 S-P 法,DAB 显色,苏木素复染,工作稀释浓度为 1:50,以 0.01 mol/L PBS 代替一抗作为空白对照,已知阳性切片作为阳性对照。

1.2.5 免疫组化结果判断 免疫组化检测结果以切片细胞中出现的棕黄色染色为阳性,无棕黄色染色为阴性。IL-1 β 主要分布于卵泡膜细胞和颗粒细胞胞浆中,成熟卵泡的卵丘细胞、卵泡液中均有表达。表达强度依照阳性细胞着色程度判定:淡黄色为弱阳性(+),黄色为较弱阳性(++),棕黄色为阳性(+++),棕褐色为强阳性(++++)。

1.2.6 图像分析 选用同批染色切片,每组动物各取 5 张切片,每张切片选择阳性细胞较密集清晰的区域并能反映该切片染色强度的部位为代表部位,在光学显微镜下,用同一光强度和同一放大倍数(\times 400)采集 5 个视野照相,用 Image Pro Plus 5.0 图像

分析软件进行图像分析,以0.222 5 μm 像素点长,在3.027 1×10³ μm 测量窗下,测量阳性细胞面积(area)、阳性面积率(area%)、积分光密度(IOD)和平均光密度(MOD)。

1.2.7 统计学处理 采用SPSS 12.0 统计学软件进行分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用t 检验,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠卵泡不同发育时期 IL-1β 的表达分布和强度 光学显微镜下观察,IL-1β 蛋白阳性颗粒在初级卵泡、次级卵泡和成熟卵泡中表达,主要定位于细胞浆内,卵泡膜细胞、颗粒细胞以及成熟卵泡的卵丘细胞、卵泡液中均有表达。在卵泡发育期和排卵前期,模型对照组、功血宁 II 号低剂量组、阳性对照组和功血宁 II 号高剂量组 IL-1β 的表达强度依次增强(+~ ++++);排卵前期各组 IL-1β 的表达均强于卵泡发育期相应各组。

2.2 各组大鼠卵泡不同发育时期 IL-1β 的表达水平 见表1。表1所示,模型对照组中 IL-1β 的表达水平随卵泡发育而提高,排卵前期的阳性细胞面积、阳性面积率、积分光密度和平均光密度均显著高于卵泡发育期($P < 0.05$)。功血宁 II 号高、低剂量组和阳性对照组在卵泡发育 IL-1β 的阳性细胞面积、阳性面积率、积分光密度和平均光密度均高于模型对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);3 组的阳性细胞面积、阳性面积率和平均光密度之间无显著性差异($P > 0.05$);功血宁 II 号高剂量组的积分光密度高于低剂量组和阳性对照组 ($P < 0.05$),低剂量组和阳性对照组之间无显著性差异($P < 0.05$)。在排卵前期,功血宁 II 号高、低剂量组和阳性对照组 IL-1β 的阳性细胞面积、阳性面积率、积分光密度和平均光密度均高于模型对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),功血宁 II 号高剂量

组的阳性细胞面积、阳性面积率、积分光密度高于低剂量组和阳性对照组($P < 0.05$),而平均光密度3组之间无显著性差异($P > 0.05$);低剂量组的积分光密度高于阳性对照组 ($P < 0.05$),低剂量组和阳性对照组的阳性细胞面积、阳性面积率和平均光密度无显著性差异($P > 0.05$)。排卵前期各组的上述指标均高于卵泡发育期,有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

IL-1β 存在于卵巢中,国外学者^[4]证实了卵泡液中 IL-1β 的存在并较血清中检测到的比例大;在卵细胞发育全过程卵泡液都有 IL-1β 呈强阳性表达^[5]。排卵前,在黄体生成激素(LH)高峰或人绒毛膜促性腺素(hCG)刺激后的卵泡膜细胞及颗粒细胞中显示 IL-1β mRNA 存在,卵丘细胞中也可检测到高水平的 IL-1β,并有学者研究认为排卵时卵泡内存在一个 IL-1β 波峰,显示 IL-1β 具有调节卵泡生长发育、直至成熟的作用。本研究结果与文献报道相似,在模型对照组大鼠的卵泡发育期,初级卵泡和次级卵泡的卵膜细胞、颗粒细胞中,均有 IL-1β 免疫组化阳性产物的棕黄色颗粒着色,在排卵前期,成熟卵泡的卵丘细胞及卵泡液中亦有 IL-8 的表达且明显增强,提示 IL-1β 参与卵泡发育和成熟。

IL-1β 参与卵母细胞成熟和排卵。研究表明,IL-1β 的蛋白及 mRNA 存在于成熟的卵母细胞中。以大鼠体内外研究发现,IL-1β 具有与 LH 或 hCG 相似的可诱导排卵的功能,以及通过增加排卵卵母细胞的比例来增强 LH 诱发排卵的效力。排卵是一个周期性的类炎症过程,炎症过程中有许多抗感染机制发动,如前列腺素类激素(PG)和一氧化氮(NO)的生成、蛋白水解酶的合成等,这些因子在体细胞中的活性可受 IL-1β 的调控。由于在排卵前期可以在卵巢中检测到这些因子,就此可以认为 IL-1β 与

表1 各组大鼠卵巢卵泡发育期、排卵前期 IL-1β 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	阳性细胞面积(μm ²)	阳性面积率(%)	IOD	MOD
卵泡发育期	模型对照组	80.12± 7.33	2.45±0.22	4.22±0.36	0.040 6±0.004 1
	阳性对照组	100.58± 9.65*	3.07±0.30*	5.84±0.65*	0.058 1±0.006 8**
	功血宁 II 号低剂量组	98.65± 9.98*	3.02±0.31*	5.58±0.61*	0.054 6±0.006 5*
	功血宁 II 号高剂量组	106.54±10.04*	3.26±0.31*	7.85±0.81** ^{○△}	0.063 7±0.007 3**
排卵前期	模型对照组	103.66± 9.88 [△]	3.17±0.30 [△]	5.41±0.58 [△]	0.052 2±0.005 4 [△]
	阳性对照组	128.69±13.75 ^{△△}	3.93±0.42 ^{△△}	10.36±1.18 ^{△△}	0.070 5±0.007 2 ^{△△}
	功血宁 II 号低剂量组	124.61±12.48 [△]	3.81±0.38 [△]	7.18±0.76 ^{○△}	0.067 6±0.006 1 [△]
	功血宁 II 号高剂量组	160.25±16.08 ^{△△[○]}	4.90±0.49 ^{△△[○]}	12.58±1.32 ^{△△[○]}	0.078 5±0.007 2 ^{△△}

注:与模型对照组比较,*为 $P < 0.05$ **为 $P < 0.01$;与阳性对照组比较,[○]为 $P < 0.05$;与功血宁 II 号低剂量组比较,[△]为 $P < 0.05$,^{△△}为 $P < 0.01$;排卵前期与卵泡发育期比较,[△]为 $P < 0.05$,^{△△}为 $P < 0.01$ 。

排卵过程有关。研究结果显示,模型对照组大鼠在排卵前期,IL-1 β 免疫组化的阳性细胞面积、阳性面积率、积分光密度和平均光密度,均高于卵泡发育期,有显著性差异,表明IL-1 β 可通过促进卵母细胞成熟诱导排卵,以及调控PG、NO的产生并激活蛋白水解酶等在卵泡破裂过程发挥作用,从而参与排卵过程。

功血宁II号冲剂在卵泡发育期和排卵前期,IL-1 β 的阳性细胞面积、阳性面积率、积分光密度以及平均光密度均显著高于模型对照组,其中功血宁II号高剂量组的作用较低剂量组和阳性对照组更加显著。在排卵前期,功血宁II号高、低剂量组的上述指标均明显高于相应卵泡发育期的各组,有显著差异。表明功血宁II号冲剂能够使IL-1 β 的表达增加,且随着卵泡的生长发育,其表达逐渐增强,尤其是在排卵前期,IL-1 β 表达量达到高峰。表明了功血宁II号冲剂通过增强卵泡IL-1 β 的表达,从而发挥其促进卵泡发育成熟,特别是在卵泡破裂激发排卵过程中的重要作用。

功血宁II号冲剂具有滋肾调冲的功效,用治肝肾阴虚而致冲脉失调的功血疾病。方中熟地黄甘温味厚,滋肾填精而育真阴;山茶萸微温味酸,滋肾养肝而固冲任;枸杞子甘平质润,补肾益肝而生精血。女贞子甘凉,滋肾水而益肝阴;菟丝子甘温,益肾阴且补肾阳,两药相伍可收阴阳相济之妙用。且上述诸药俱归经肝肾,深符“乙癸同源”之旨。又,山药滋脾肾之阴;仙灵脾补肾中之阳,使能“阳中求阴”。兼用当归补血养肝,白芍养血柔肝,使血能“归精于肾而为精”。以上虽有养肝、益脾之味,但总的功用还在于滋肾。方用香附一味,为血中气药,意在行气活血,活泼气机,以防补药滋腻之弊。诸药配合,使肾精得以充沛,冲脉得以盛通,血海得以满盈,可促进卵泡的发育成熟以及卵子的排出,从而达到调整月

经周期的目的。药理研究表明,菟丝子黄酮类提取物具有雌激素样活性,可增强卵巢hCG/黄体生成素(LH)受体功能及垂体对促性腺激素释放激素的反应性^[6]。淫羊藿水提液能提高雌性大鼠垂体及卵巢对LH的反应,增加垂体前叶、卵巢及子宫的质量。枸杞子能够增加垂体和卵巢的质量,具有诱发排卵作用。当归可促进卵泡和卵母细胞的增殖和分化,并增加卵巢血流量,提高排卵率。香附挥发油有轻度雌激素样活性,是治疗月经不调的主要依据。

本研究结果表明,IL-1 β 在大鼠卵泡发育过程中均有表达,且随卵泡发育逐渐增强。功血宁II号冲剂能够显著提高大鼠卵泡不同发育时期IL-1 β 的表达,通过IL-1 β 参与卵母细胞成熟,诱导卵巢排卵因子的产生,在卵泡破裂激发排卵过程中发挥作用,从而促进卵泡发育成熟以诱发排卵。

参考文献:

- [1] 哈孝贤,刘永志,董素琴,等.中药功(更)血宁I、II号冲剂治疗功血的临床研究[J].天津中医学院学报,1990,8(4):23-29.
- [2] 王玲,哈孝贤,屈彩芹,等.功血宁对下丘脑-垂体-卵巢轴功能的影响[J].山东中医杂志,2001,20(2):106-108.
- [3] Liu YX, Cajander SB, Ny T, et al. Gonadotropin regulation of tissue-type and urokinase-type plasminogen activators in rat granulosa and theca-interstitial cells during the periovulatory period[J]. Mol. Cell. Endocrinol, 1987, 54 (2-3):221-229.
- [4] Karagouni EE, Chryssikopoulos A, Mantzavinos T, et al. Interleukin-1beta and interleukin1alpha may affect the implantation rate of patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer[J]. Fertil Steril, 1998,70(3):553-559.
- [5] De Los Santos MJ, Mercader A, Frances A, et al. Role endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoeactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development[J]. Biol Reprod, 1996, 54(2):563-574.
- [6] 秦达念,余白蓉,余运初.菟丝子黄酮对实验动物及人绒毛组织生殖功能的影响[J].中药新药与临床药理,2000,11(6):349-351.
- [7] 詹立平,赵鑫,张建军,等.淫羊藿属药用植物的研究现状与发展趋势[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(3):67-69.

(收稿日期:2009-01-11)