

# 左归饮煎剂对围绝经期大鼠卵巢 Caspase-3 和 Fas 表达的影响<sup>△</sup>

赵薇<sup>1,2\*</sup>, 温海霞<sup>1</sup>, 庞海燕<sup>1</sup>, 沈宁<sup>2</sup>, 孙世晓<sup>2</sup>, 倪江<sup>1#</sup>(1. 哈尔滨医科大学大学生理学教研室, 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江中医药大学大学生理学教研室, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R285.5; R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)03-0201-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.03.03

**摘要** 目的: 研究左归饮煎剂对围绝经期大鼠卵巢细胞凋亡指数(AI)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(CysteinyI aspartate-specific protease, Caspase)-3和凋亡相关因子(Fas)表达的影响。方法: 采用围绝经期大鼠模型, 分别灌胃高、中、低剂量(31.00、20.67、13.78 g/kg)左归饮煎剂, 每周1次, 连续8周。用TdT介导原位缺口末端标记法观察卵巢细胞AI; 用RT-PCR和免疫组化法检测卵巢Caspase-3、Fas mRNA及蛋白的表达情况。结果: 高、中、低剂量左归饮煎剂可显著降低围绝经期大鼠卵巢细胞AI( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ), 显著降低围绝经期大鼠卵巢Caspase-3与Fas的表达( $P < 0.01$ )。结论: 左归饮煎剂可通过抑制围绝经期大鼠卵巢细胞过度凋亡来改善卵巢功能, 这种抑制作用可通过下调围绝经期卵巢Fas和Caspase-3的表达实现。

**关键词** 左归饮煎剂; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3; Fas; 围绝经期; 卵巢

## Effects of Zuoguiyin Decoction on the Expression of Ovarian Caspase-3 and Fas in Perimenopausal Rats

ZHAO Wei<sup>1,2</sup>, WEN Hai-xia<sup>1</sup>, PANG Hai-yan<sup>1</sup>, SHEN Ning<sup>2</sup>, SUN Shi-xiao<sup>2</sup>, NI Jiang<sup>1</sup>(1. Dept. of Physiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China; 2. Dept. of Physiology, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the effects of *Zuoguiyin* decoction on ovarian apoptosis index and the expression of ovarian cysteinyl aspartate-specific protease (Caspase-3) and Fas in perimenopausal rats. METHODS: Perimenopausal rat model were treated by intragastric administration (ig) with low (13.78 g/kg), middle (20.67 g/kg) and high (31.00 g/kg) dose of *Zuoguiyin* decoction once a week for 8 weeks. TUNEL was used to evaluate ovarian apoptosis index. The mRNA and protein expression of Caspase-3 and Fas were detected by RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. RESULTS: The apoptosis index of ovary cells in perimenopausal rats decreased obviously by high-dose, medium-dose and low-dose of *Zuoguiyin* ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ); the expression of Caspase-3 and Fas decreased obviously ( $P < 0.01$ ). CONCLUSION: *Zuoguiyin* decoction could improve ovarian function in perimenopausal rats by inhibiting excessive ovarian apoptosis. And it could play this role by down-regulating the expression of ovarian Caspase-3 and Fas.

**KEY WORDS** *Zuoguiyin* decoction; Caspase-3; Fas; Perimenopausal; Ovary

围绝经期综合征是由于卵巢功能减退引起体内神经-内分泌-免疫调节网络失调, 从而引发一系列累及全身多器官的临床综合征。自20世纪50年代以来, 国内、外绝经期综合征的预防和治疗主要采用雌激素替代疗法(Estrogen replacement therapy, ERT)。但越来越多的研究表明, ERT可能引起严重的副作用, 尤其是使乳腺癌、子宫内膜癌的发生率增加, 已威胁女性的身体健康。因此, 利用纯中药制剂治疗围绝经期综合征已成为研究的热点。左归饮属补益肾阴的常用方剂, 众多临床观察显示<sup>[1]</sup>, 左归饮或左归饮加减能有效改善围绝经期一些症状, 无毒副作用, 但其作用机制鲜有报道。

△ 基金项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金资助项目(No.2009RFQXS012); 黑龙江中医药大学科研基金资助项目(No.200911)

\* 讲师, 博士。研究方向: 衰老和生殖的分子机制。电话: 0451-82195794。E-mail: paradise1100@sina.com.cn

# 通信作者: 教授, 博士研究生导师。研究方向: 生殖内分泌生理学。电话: 0451-86666752。E-mail: nj1939@yahoo.cn

围绝经期综合征产生的根本原因是卵巢功能衰退, 其一个重要形态学特征是生长卵泡数量急剧减少、闭锁卵泡数量增多。虽然卵泡闭锁的基本机制目前还不清楚, 但大量研究表明, 卵巢细胞凋亡是触发卵泡闭锁、黄体退化与卵母细胞丢失的根本原因<sup>[2-4]</sup>。因此, 本研究以卵巢细胞凋亡为切入点, 观察左归饮煎剂对初老大鼠卵巢细胞凋亡指数(AI)及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3与凋亡相关因子(Fas)表达的影响, 以期进一步阐明左归饮在卵巢中的作用位点。

## 1 材料

### 1.1 仪器

PTC-100型PCR扩增仪(美国M.J.Research公司); UV-2102C型紫外分光光度计(英国Amersham公司); DYY-III-II型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂); GIS凝胶图像扫描及分析系统(上海天能生物软件公司); BH-2型显微照相仪(日本Olympus公司)。

## 1.2 药品与试剂

左归饮煎剂[生药购自哈尔滨世一堂制药厂,包括熟地(批号:0801053z)、山药(批号:0709030s)、山茱萸(批号:0708203s)、枸杞子(批号:0707007s)、茯苓(批号:0803072s)、炙甘草(批号0710037m),由黑龙江中医药大学动物实验中心煎制,终浓度为2g(生药)/ml];尼尔雌醇(北京四环制药有限公司,批号:11020123,规格:1mg/片);Trizol(美国Invitrogen公司);BcaBESTTMRNA PCR Kit(大连宝生物工程公司);DAB显色试剂盒、SP免疫组化染色试剂盒、兔Caspase-3多克隆抗体(北京中杉生物技术有限公司);小鼠Fas多克隆抗体(美国Santa Cruz公司);原位细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司);引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

## 1.3 动物

健康Wistar大鼠,12月龄40只,♀,体质量(310±20)g;3月龄10只,♀,体质量(210±10)g,由黑龙江省肿瘤防治研究所提供(动物使用合格证号:SCXK(黑)20050001)。

## 2 方法

### 2.1 模型的复制

12月龄♀Wistar大鼠,采用阴道脱落细胞涂片连续观察15d,选择动情周期紊乱的初老大鼠40只作为围绝经期的实验大鼠模型。另选取3月龄动情周期规律的大鼠10只作为对照。

### 2.2 分组与给药

40只初老大鼠随机分为5组,即模型(0.85%生理盐水溶液)、尼尔雌醇(0.158mg/kg)与左归饮煎剂高、中、低剂量(31.00、20.67、13.78g/kg)组。ig给药,除尼尔雌醇组外,其余大鼠每天给药1次,连续8周;尼尔雌醇组大鼠每周给药1次,连续8周。

### 2.3 取材与处理

大鼠末次给药24h后急性断头处死,迅速取出双侧卵巢,一侧经液氮速冻后于-70℃冰箱冻存,用于总RNA的提取和RT-PCR检测;另一侧置于4%多聚甲醛中固定,常规脱水,石蜡包埋,用于免疫组化与原位缺口末端标记(TUNEL)法检测。

### 2.4 RT-PCR检测

用Trizol试剂提取总RNA,紫外分光光度计测定260和280nm波长处的吸光度(A)值,分析RNA纯度并计算其含量。取总RNA2.5μg,按BcaBESTTMRNA PCR Kit说明书进行逆转录,合成cDNA20μL。大鼠Caspase-3、Fas基因引物采用Gene Runner软件设计,以β-actin作为内参照。PCR扩增条件均为94℃4min,94℃30s,55℃~62℃30s,72℃30min,72℃5min。PCR扩增产物于1.5%琼脂糖凝胶中电泳,采用GIS凝胶成像系统进行图像扫描及条带灰度分析,用目的基因与β-actin灰度的比值代表目的基因相对表达量,重复3次。PCR引物序列、产物长度、退火温度与循环次数见表1。

表1 PCR引物序列、产物长度、退火温度与循环次数

Tab 1 The sequence of primers, length of products, anneal temperature and cycles of PCR

| 基因        | 引物序列(5'~3')                         | 产物长度, bp | 退火温度, °C | 循环 |
|-----------|-------------------------------------|----------|----------|----|
| Caspase-3 | Sense: TCTGACTGGAAAGCCGAAATC        | 341      | 55       | 35 |
|           | Antisense: ACGGGATCTGTTCITTTGCATG   |          |          |    |
| Fas       | Sense: TCTAGTTGGAAAGAACCGAAGG       | 306      | 62       | 36 |
|           | Antisense: CCACAACGAGATGCAATCAC     |          |          |    |
| β-actin   | Sense: GTTTGAGACCTTCAACACCCC        | 320      | 55       | 25 |
|           | Antisense: GTGGCATCTCTCCTTCTCGAAGTC |          |          |    |

## 2.5 免疫组化染色

采用免疫组化SP法,参考文献操作<sup>[5]</sup>。石蜡切片常规脱水,3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,微波抗原修复后以山羊血清封闭30min,一抗工作液37℃孵育1h后依次滴加二抗IgG工作液、SP工作液,按DAB显色试剂盒进行显色,苏木素复染,常规脱水、透明,中性树胶封片。以PBS代替一抗作为阴性对照。细胞浆内棕黄色颗粒为阳性染色。染色结果采用Motic Images 2000显微图像分析系统扫描并分析结果,光镜10×10放大倍数下对每张切片选取一个视野拍照,每组8张切片,以染色阳性面积百分比代表蛋白表达相对强度。

## 2.6 AI测定

采用TUNEL法,按试剂说明书操作。石蜡切片常规脱水,3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,以新鲜稀释的蛋白酶K消化后滴加标记液,37℃孵育2h,然后依次滴加封闭液、二抗IgG工作液、SABC工作液,按DAB显色试剂盒进行显色,苏木素复染,常规脱水、透明,中性树胶封片。以PBS代替标记液作为阴性对照。光镜下观察,胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞。每张切片至少观察5个视野(200×,400×),选取一个最佳视野进行拍照(400×),每组8张切片,图像采用Motic Images 2000显微图像分析系统扫描并分析结果,以阳性染色细胞百分比代表AI。

## 2.7 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS11.5软件进行分析,首先进行方差齐性检验,然后进行one way-ANOVA方差分析,若有差异再进行Dunnett-*t*检验或组间比较的Student-Newman-Keuls(SNK)检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 左归饮煎剂对围绝经期大鼠卵巢细胞凋亡的影响

生长卵泡、闭锁卵泡与黄体细胞中均可见凋亡阳性细胞分布。以阳性染色细胞百分比代表AI,与对照组比较,模型组大鼠卵巢AI显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,左归饮煎剂高、中、低剂量组大鼠卵巢AI均显著降低( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),表明其抗凋亡作用呈现剂量依赖性。TUNEL法光镜观察卵巢凋亡细胞见图1;大鼠卵巢细胞AI见表2。

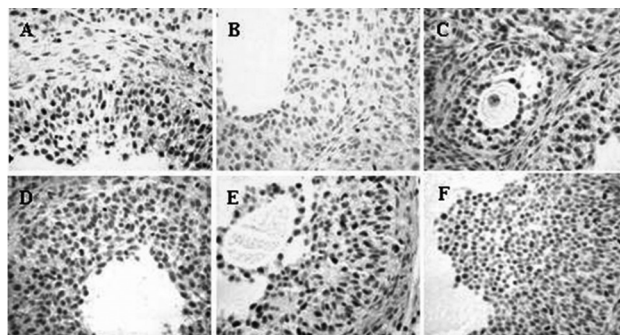


图1 TUNEL法光镜观察卵巢凋亡细胞(400×)

A. 对照组; B. 模型组; C. 尼尔雌醇组; D. 左归饮煎剂低剂量组; E. 左归饮煎剂中剂量组; F. 左归饮煎剂高剂量组

Fig 1 The morphological observation for apoptotic cell in rats ovaries by TUNEL(400×)

A. control group; B. model group; C. neal estradiol group; D. Zuoguiyin decoction low-dose group; E. Zuoguiyin decoction medium-dose group; F. Zuoguiyin decoction high-dose group

### 3.2 左归饮煎剂对围绝经期大鼠卵巢Caspase-3 mRNA表达

表2 大鼠卵巢细胞AI( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 2 AI of apoptotic cells in rats ovaries( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别        | 剂量          | AI, %            |
|-----------|-------------|------------------|
| 对照组       |             | 3.612 ± 0.940    |
| 模型组       |             | 80.687 ± 12.917* |
| 尼尔雌醇组     | 0.158 mg/kg | 29.093 ± 4.770** |
| 左归饮煎剂低剂量组 | 13.78 g/kg  | 69.537 ± 6.967*  |
| 左归饮煎剂中剂量组 | 20.67 g/kg  | 55.351 ± 3.464** |
| 左归饮煎剂高剂量组 | 31.00 g/kg  | 36.234 ± 6.252** |

与对照组比较: \* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$   
vs. control group: \* $P < 0.01$ ; vs. model group: \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$

的影响

RT-PCR 电泳结果显示,除尼尔雌醇组外,其余各组大鼠卵巢均扩增出一条清晰的、大小约为 341 bp 的 Caspase-3 特异片段。与对照组比较,模型组大鼠卵巢 Caspase-3 mRNA 的表达显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,左归饮高、中、低剂量组大鼠卵巢 Caspase-3 mRNA 的表达均显著降低( $P < 0.01$ ),且有剂量依赖性。RT-PCR 检测结果见图 2;大鼠卵巢中 Caspase-3 mRNA 表达的相对强度值见表 3。

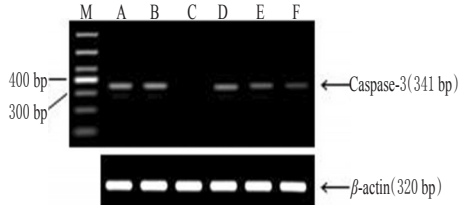


图2 RT-PCR检测大鼠卵巢Caspase-3 mRNA表达电泳条带 M.DNA 分子量标准(bp); A.对照组; B.模型组; C.尼尔雌醇组; D.左归饮煎剂低剂量组; E.左归饮煎剂中剂量组; F.左归饮煎剂高剂量组

Fig 2 Electrophoresis strip of the mRNA expression of Caspase-3 in rats ovaries detected by RT-PCR

M.DNA marker (bp); A. control group; B. model group; C. neal estradiol group; D. Zuoguiyin decoction low-dose group; E. Zuoguiyin decoction medium-dose group; F. Zuoguiyin decoction high-dose group

表3 大鼠卵巢中Caspase-3 mRNA表达的相对强度值( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 3 Relative intensity of Caspase-3 mRNA expression in rats ovaries( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别        | 剂量          | 相对比值                       |
|-----------|-------------|----------------------------|
| 对照组       |             | 0.336 ± 0.035              |
| 模型组       |             | 0.552 ± 0.017*             |
| 尼尔雌醇组     | 0.158 mg/kg | 0 <sup>#</sup>             |
| 左归饮煎剂低剂量组 | 13.78 g/kg  | 0.320 ± 0.018 <sup>#</sup> |
| 左归饮煎剂中剂量组 | 20.67 g/kg  | 0.144 ± 0.044 <sup>#</sup> |
| 左归饮煎剂高剂量组 | 31.00 g/kg  | 0.045 ± 0.027 <sup>#</sup> |

与对照组比较: \* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$   
vs. control group: \* $P < 0.01$ ; vs. model group: \*\* $P < 0.01$

3.3 左归饮煎剂对围绝经期大鼠卵巢Caspase-3蛋白表达的影响

免疫组化结果显示, Caspase-3 蛋白主要分布于卵巢膜细胞、黄体细胞及间质中,在模型组卵巢中,也可见生长卵泡颗粒细胞上的强阳性染色。与对照组比较,模型组大鼠卵巢中 Caspase-3 蛋白阳性染色强度显著增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,左归饮煎剂高、中、低剂量组大鼠 Caspase-3 蛋白表达强度均显著降低( $P < 0.01$ ),且有剂量依赖性;尼尔雌醇组大鼠卵巢

中未检测到 Caspase-3 蛋白阳性信号。免疫组化结果见图 3;大鼠卵巢 Caspase-3 蛋白阳性染色的相对强度值见表 4。

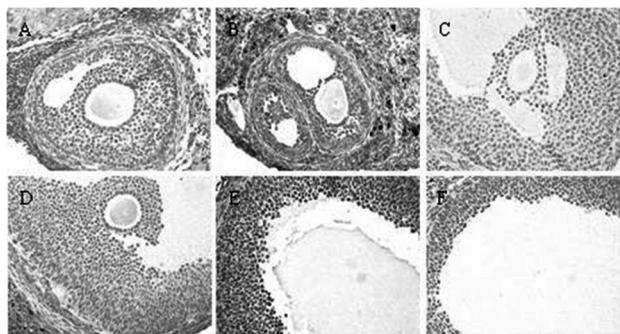


图3 免疫组化显示大鼠卵巢Caspase-3蛋白的表达情况(200×)

A.对照组; B.模型组; C.尼尔雌醇组; D.左归饮煎剂低剂量组; E.左归饮煎剂中剂量组; F.左归饮煎剂高剂量组

Fig 3 The protein expression of Caspase-3 in rats ovaries by immunohistochemistry(200×)

A. control group; B. model group; C. neal estradiol group; D. Zuoguiyin decoction low-dose group; E. Zuoguiyin decoction medium-dose group; F. Zuoguiyin decoction high-dose group

表4 大鼠卵巢Caspase-3蛋白阳性染色的相对强度值( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 4 Relative intensity of immunostaining for Caspase-3 protein expression in rats ovaries( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别        | 剂量          | 阳性面积百分比, %                 |
|-----------|-------------|----------------------------|
| 对照组       |             | 0.502 ± 0.042              |
| 模型组       |             | 0.903 ± 0.038*             |
| 尼尔雌醇组     | 0.158 mg/kg | 0 <sup>#</sup>             |
| 左归饮煎剂低剂量组 | 13.78 g/kg  | 0.479 ± 0.047 <sup>#</sup> |
| 左归饮煎剂中剂量组 | 20.67 g/kg  | 0.338 ± 0.033 <sup>#</sup> |
| 左归饮煎剂高剂量组 | 31.00 g/kg  | 0.166 ± 0.058 <sup>#</sup> |

与对照组比较: \* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$   
vs. control group: \* $P < 0.01$ ; vs. model group: \*\* $P < 0.01$

3.4 左归饮煎剂对围绝经期大鼠卵巢Fas mRNA表达的影响

RT-PCR 的电泳结果显示,各组大鼠卵巢均扩增出一条清晰的、大小约为 306 bp 的 Fas 特异片段。与对照组比较,模型组大鼠卵巢 Fas mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,左归饮煎剂高、中、低剂量组大鼠卵巢 Fas mRNA 表达均显著下降( $P < 0.01$ ),且呈剂量依赖性。RT-PCR 检测结果见图 4;大鼠卵巢中 Fas mRNA 表达的相对强度值见表 5。

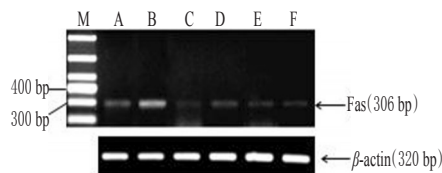


图4 RT-PCR检测大鼠卵巢Fas mRNA表达的电泳条带 M.DNA 分子量标准(bp); A.对照组; B.模型组; C.尼尔雌醇组; D.左归饮煎剂低剂量组; E.左归饮煎剂中剂量组; F.左归饮煎剂高剂量组

Fig 4 Electrophoresis strip of mRNA expression of Fas in rats ovaries detected by RT-PCR

M. DNA marker (bp); A. control group; B. model group; C. neal estradiol group; D. Zuoguiyin decoction low-dose group; E. Zuoguiyin decoction medium-dose group; F. Zuoguiyin decoction high-dose group

表5 大鼠卵巢中 Fas mRNA 表达的相对强度值( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Tab 5 Relative intensity of mRNA expression of Fas in rats ovaries( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别        | 剂量          | 相对比值         |
|-----------|-------------|--------------|
| 对照组       |             | 0.276±0.026  |
| 模型组       |             | 0.516±0.070* |
| 尼尔雌醇组     | 0.158 mg/kg | 0.073±0.020# |
| 左归饮煎剂低剂量组 | 13.78 g/kg  | 0.236±0.028# |
| 左归饮煎剂中剂量组 | 20.67 g/kg  | 0.159±0.024# |
| 左归饮煎剂高剂量组 | 31.00 g/kg  | 0.116±0.016# |

与对照组比较: \* $P<0.01$ ; 与模型组比较: \* $P<0.01$   
vs. control group: \* $P<0.01$ ; vs. model group: \* $P<0.01$

### 3.5 左归饮煎剂对围绝经期大鼠卵巢 Fas 蛋白表达的影响

免疫组化结果显示, 卵泡颗粒细胞、内膜细胞及黄体中均有 Fas 蛋白阳性表达, 间质中也可见阳性染色。与对照组比较, 模型组大鼠卵巢中 Fas 蛋白阳性染色强度显著增高( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 左归饮煎剂高、中、低剂量组大鼠卵巢中 Fas 蛋白阳性染色强度均显著降低( $P<0.01$ ), 且呈剂量依赖性。免疫组化结果见图5; 大鼠卵巢 Fas 蛋白阳性染色的相对强度值见表6。

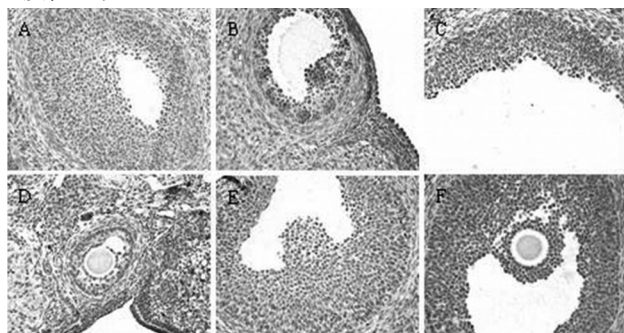


图5 免疫组化显示大鼠卵巢 Fas 蛋白的表达情况(200×)

A. 对照组; B. 模型组; C. 尼尔雌醇组; D. 左归饮煎剂低剂量组; E. 左归饮煎剂中剂量组; F. 左归饮煎剂高剂量组

Fig 5 Immunohistochemistry for Fas protein expression in rats ovaries(200×)

A. control group; B. model group; C. nealestradiol group; D. Zuoguiyin decoction low-dose group; E. Zuoguiyin decoction medium-dose group; F. Zuoguiyin decoction high-dose group

表6 大鼠卵巢 Fas 蛋白阳性染色的相对强度值( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 6 Relative intensity of immunostaining for Fas protein expression in rats ovaries( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别        | 剂量          | 阳性面积百分比, %   |
|-----------|-------------|--------------|
| 对照组       |             | 0.589±0.073  |
| 模型组       |             | 0.880±0.078* |
| 尼尔雌醇组     | 0.158 mg/kg | 0.156±0.049# |
| 左归饮煎剂低剂量组 | 13.78 g/kg  | 0.484±0.065# |
| 左归饮煎剂中剂量组 | 20.67 g/kg  | 0.421±0.050# |
| 左归饮煎剂高剂量组 | 31.00 g/kg  | 0.221±0.052# |

与对照组比较: \* $P<0.01$ ; 与模型组比较: \* $P<0.01$   
vs. control group: \* $P<0.01$ ; vs. model group: \* $P<0.01$

## 4 讨论

围绝经期是指女性从40岁以后到绝经后1年的这一时期。动物实验证明, 雌性 Wistar 大鼠从10~12月龄开始, 动情周期出现紊乱, 表现为动情周期延长, 之后持续动情以及反复

假妊娠; 血清性激素、促性腺激素水平以及卵巢相关生化指标等也都相应变化<sup>[6]</sup>, 这与人类女性围绝经期表现极为相似。故本研究选用12月龄雌性 Wistar 大鼠, 连续阴道细胞学观察, 选择呈动情周期变长、之后持续动情表现的大鼠作为初老动物模型, 该模型符合围绝经期表现。

临床资料显示, 左归饮或左归饮加减在治疗女性围绝经期综合征中的剂量多为2.01~4.61 g/kg<sup>[7-8]</sup>。本研究采用其中间值, 用体质量系数折算成大鼠的剂量(同体质量, 大鼠剂量相当于人的6.25倍), 此剂量确定为中剂量, 即20.67 g/kg。笔者在预实验中发现, 在此剂量基础上增加1.5倍是对大鼠灌胃的极限剂量, 如果继续加大剂量, 会对灌胃造成困难, 因此本实验采用1.5作为剂量的定比倍数。

发生围绝经期综合征的根本原因是卵巢功能减退。卵巢的功能性寿命是由卵巢内原始卵泡库的大小及其损耗率决定的。众多研究均表明, 细胞凋亡是引发围绝经期卵泡闭锁加剧, 从而导致卵巢功能减退的重要原因<sup>[9]</sup>。本研究发现, 围绝经期大鼠卵巢的细胞凋亡率较青年大鼠显著升高, 凋亡细胞主要存在于生长卵泡颗粒细胞、内膜细胞及黄体细胞中。这一结果与以往报道相一致, 提示细胞凋亡可能是参与围绝经期大鼠卵巢功能衰退的重要机制之一。而各剂量左归饮煎剂均能显著降低衰老卵巢细胞凋亡率, 并且其抗凋亡作用呈剂量依赖性, 以高剂量作用最显著, 说明左归饮煎剂可通过抑制衰老卵巢细胞凋亡过程, 改善其功能状态。

细胞凋亡是一个需要一系列酶参与、由基因控制的、主动的、高度有序的过程。哺乳动物细胞中, Caspase 被认为是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶, 它可直接水解激活与 DNA 断裂等凋亡特征性改变密切相关的蛋白, 又称为死亡蛋白酶。其中, Caspase-3 作为 Caspase 级联“瀑布”的最后共同通道, 在各种因素启动的凋亡程序执行中居于核心地位<sup>[10-11]</sup>。有研究表明, 在卵巢中, Caspase-3 主要表达于黄体细胞、内膜细胞及闭锁卵泡颗粒细胞中<sup>[12]</sup>, Caspase-3 的激活标志着卵巢颗粒细胞凋亡过程的完成<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, 在青年大鼠卵巢中, Caspase-3 蛋白确实主要分布于卵巢膜细胞、黄体细胞中; 而在围绝经期大鼠卵巢中, 生长卵泡颗粒细胞上也可见强阳性染色, 并且围绝经期大鼠卵巢 Caspase-3 表达显著高于青年大鼠。提示 Caspase-3 表达上调会促使衰老卵巢细胞凋亡增多, 进而导致卵泡闭锁、丢失, 卵巢功能衰退。与 TUNEL 法染色结果趋势相一致, 左归饮煎剂能剂量依赖性使 Caspase-3 在衰老卵巢中的表达显著降低, 说明左归饮可通过下调围绝经期大鼠卵巢 Caspase-3 的表达, 对其细胞过度凋亡起抑制作用, 从而改善衰老卵巢的功能。

死亡受体途径是激活 Caspase-3 的一个重要机制, 此途径中与卵巢细胞凋亡关系最为密切的是 Fas 配体(Fas ligand, FasL)/Fas 系统。大量研究表明, FasL/Fas 系统是引发卵巢颗粒细胞凋亡、卵泡闭锁的途径之一<sup>[14]</sup>, 并且在小鼠卵巢黄体溶解过程中起关键调节作用<sup>[15]</sup>。本实验观察到, 围绝经期大鼠卵巢 Fas 表达显著升高, 而左归饮煎剂能剂量依赖性降低衰老卵巢 Fas 表达, 其中高剂量的抑制作用最强, 表明 Fas→Caspase-3 途径的激活是导致衰老卵巢细胞过度凋亡、卵泡闭锁加剧的重要机制, 而左归饮煎剂可通过抑制此途径的活化发挥抗凋亡作用。

综上所述, 左归饮煎剂可通过下调 Fas、Caspase-3 的表达, 抑制衰老卵巢细胞的过度凋亡, 进而改善卵巢功能状态。本

研究不仅为左归饮的临床应用提供了可靠、客观的实验依据,还将促进中药制剂的研发及应用。

## 参考文献

- [1] Zheng CY, Zhong QL. Clinical observation of modified Zuoguiyin on menopause symptoms [J]. *Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine*, 2003, 17(5): 413.
- [2] Santos HB, Thomé RG, Arantes FP, et al. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in prochilodus argenteus and leporinus taeniatus (Teleostei: Characiformes)[J]. *Theriogenology*, 2008, 70(9):1 449.
- [3] Chen X, Gao H, Wei P, et al. Expression of apoptosis-related genes Fas/FasL, Bax/Bcl-2 and Caspase-3 in rat corpus luteum during luteal regression [J]. *Sci China C Life Sci*, 2003, 46(3):273.
- [4] Laszczyńska M, Brodowska A, Starczewski A, et al. Human postmenopausal ovary: hormonally inactive fibrous connective tissue or more? [J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(2):219.
- [5] 周翠英, 骆文龙. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对去卵巢大鼠面神经损伤修复的作用研究[J]. *中国药房*, 2010, 21(19):1 743.
- [6] Lisa CH, Mcdonald H, Strauss E. Deconstructing aging [J]. *Science*, 2004, 305(5 689):12 419.
- [7] 郑楚云, 钟启良. 左归饮加减治疗妇女更年期综合征的临床观察[J]. *实用中医内科杂志*, 2003, 17(5):413.
- [8] 高允珊. 左归饮加味治疗妇女更年期综合征 58 例临床观

察[J]. *江西中医药*, 2005, 36(9):49.

- [9] Matsumine M, Shibata N, Ishitani K, et al. Pentosidine accumulation in human oocytes and their correlation to age-related apoptosis[J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2008, 41(4):97.
- [10] Wang XF, Xie Y, Wang HG, et al.  $\alpha$ -Tocopheryl succinate induces apoptosis in erbB2-expressing breast cancer cell via NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(12):1 604.
- [11] Antipova TA, Sapozhnikova DS, Stepanichev MY, et al. Effects of selective anxiolytic afobazole on active caspase-3[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2010, 149(2):201.
- [12] Boone DL, Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression [J]. *Biol Reprod*, 1998, 58(6):1 533.
- [13] De Neubourg D, Gerris J, Knaapen M, et al. Human granulosa cells after ovulation induction show caspase-independent cell death[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2003, 56(2): 106.
- [14] Kim J, Yoon Y, Tsang BK. Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53 mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(5):2 307.
- [15] Komatsu K, Manabe N, Kiso M, et al. Soluble Fas (FasB) regulates luteal cell apoptosis during luteolysis in murine ovaries[J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, 65(4):345.

(收稿日期:2012-02-06 修回日期:2012-07-05)

## 卫生部部长陈竺考察指导湖南省血吸虫病防治工作

**本刊讯** 2012年12月21日, 卫生部部长陈竺、中国工程院院士王陇德赴湖南省安乡县考察指导血吸虫病防治工作。

陈竺部长一行深入基层, 实地察看了安乡县黄家台村和复兴村实施以机代牛、洲滩禁牧、改水改厕、沟渠治理等血防综合治理措施的情况, 考察了出口洲村卫生室、血防站和安乡县血防医院, 并与基层血防工作者和晚期血吸虫病患者进行了深入的交流。湖南省血防领导小组成员单位负责人、14个血防重点县(市、区)政府分管领导和血防办主任参加了交流会。在会上, 王陇德院士作了我国血吸虫病防治历程与展望的专题报告, 概括介绍了我国血吸虫病流行现状、防治策略演变情况、防治工作进展与挑战, 科学分析了湖南省当前的血防工作形势, 并提出意见和建议。

陈竺部长作了重要讲话。他强调, “全国血防看两湖”。湖南省是全国血防工作的重点地区之一, 其钉螺面积居全国第二、三位。做好湖南省的血防工作, 不仅关系全省疫区广大群众的身体健康和经济社会发展, 也关系全国血防中长期规划目

标的如期实现。

陈竺部长要求, 当前和今后一段时期, 要以深化“医改”为契机, 把血防工作作为保障和改善民生的重要内容, 作为提高人民健康水平的关键举措, 常抓不懈。一是要从现在开始加大血防工作力度, 实行目标责任制。以行政村为单位, 在科学评估疫情现状和防治工作能力的基础上, 制定分年度达标计划, 实施一村一策, 有序推进达标进程。二是要进一步发挥政府主导作用, 加强部门合作, 加大投入, 全面落实以传染源控制为主的血防综合防治策略。既要发挥行政组织的作用, 又要发挥民间经济组织的作用, 动员一切力量, 从而形成政府领导、全社会参与的局面。三是要结合深化“医改”, 进一步理顺血防工作管理体制, 重点加强基层血防专业机构的能力建设; 进一步健全基层医疗卫生服务网络, 巩固完善基层医疗卫生机构运行新机制, 认真履行其承担的公共卫生职能。四是各级政府及有关部门要以省部联动为平台, 进一步健全工作机制, 整合农业、林业、水利、国土等项目资源。