

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.23.001
文章编号: 1005-8982 (2018) 23-0001-05

基础研究 · 论著

不同复合应激致卵巢早衰大鼠的 SRB1、 CYP2E1 蛋白表达水平比较 *

穆拉迪力·约麦尔, 纳菲沙·卡德尔, 阿卜力孜·克热木, 夏米西努尔·伊力克
(新疆医科大学基础医学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 目的 比较卵巢早衰 (POF) 及中医寒邪、热邪复合应激大鼠的 SRB1、CYP2E1 蛋白表达水平, 探讨其相互关系, 为研究 POF 的发生、发展提供依据。**方法** 选用 50 只性功能正常的雌性 Wistar 大鼠, 随机分为 POF 组 (A 组)、热邪复合应激模型组 (B 组)、寒邪复合应激模型组 (C 组), 以及 2 个正常对照组 (N1 组、N2 组)。采用免疫组织化学法检测各组大鼠卵巢组织中 SRB1、CYP2E1 蛋白的表达水平。**结果** 通过各组大鼠生物学表征的定性和定量指标, 以及相关中医专家的断定确认模型复制成功。与 N1 组相比, A 组和 B 组 SRB1、CYP2E1 表达升高 ($P < 0.05$)。与 N2 组相比, C 组 SRB1、CYP2E1 表达升高 ($P < 0.05$)。A 组与 B、C 组的 SRB1、CYP2E1 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), B 组与 C 组的 SRB1、CYP2E1 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 西医 POF、热邪和寒邪复合应激大鼠的 SRB1、CYP2E1 表达水平有不同程度的变化。寒邪、热邪导致的 POF 可能与体内胆固醇代谢异常及活性氧等物质的产生有一定联系。与寒邪复合应激相比, 热邪复合应激大鼠更易发生 POF。

关键词: 卵巢早衰; 寒邪; 热邪; 复合应激; 免疫组织化学

中图分类号: R711.75; R271.9

文献标识码: A

Comparison of expressions of SRB1 and CYP2E1 in rat models with premature ovarian failure induced by different combined stresses*

Muladili·Yuemaier, Nafeisha·Kadeer, Abulizi·Keremu, Xiamixinuer·Yilike
(College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous
Region 830054, China)

Abstract: Objective To study the connection between premature ovarian failure (POF) and cold and heat pathogens with multiple stresses, establish the POF rat models by cold and heat pathogens with multiple stresses, to compare the expressions of SRB1 and CYP2E1 proteins in all groups, to provide the evidence of the study of occurrence and development of POF. **Methods** Fifty normal female Wistar rats with normal sexual function were selected and randomly divided into a POF group (group A), a heat pathogen combined with stress group (group B), a cold pathogen combined with stress (group C) and two normal control groups (N1 and N2). Immunohistochemical method was used to detect the expressions of SRB1 and CYP2E1 proteins in the ovarian tissues of the rats. **Results** Through determination of the qualitative and quantitative indicators of biological characterization of the rats in each group, the relevant experts confirmed the success of the models. Compared with the group N1, the expressions of SRB1 and CYP2E1 in the group A and the group B were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the group N2, the expressions of SRB1 and CYP2E1 in the group C were significantly increased ($P < 0.05$).

收稿日期: 2018-03-17

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81460752); 新疆医科大学科研创新基金项目 (No: XYDCX201511)

[通信作者] 夏米西努尔·伊力克, E-mail: shamshinur@aliyun.com

The expressions of SRB1 and CYP2E1 in the group A were significantly different from those in the groups B and C ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the expression of SRB1 or CYP2E1 between the group B and the group C ($P > 0.05$). **Conclusions** The expression levels of SRB1 and CYP2E1 in the rats with POF induced by different combined stresses of cold and heat pathogens vary in different degree. It suggests that POF in the rats may be related to the abnormal metabolism of cholesterol and the production of reactive oxygen species. Compared with cold pathogen combined stress, heat pathogen combined stress is more likely to cause POF.

Keywords: premature ovarian failure; cold pathogen; heat pathogen; multiple stress; immunohistochemical technique

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 指 < 40 岁女性因某种原因引起原发或继发性闭经、卵泡生成受阻等卵巢整体功能受损^[1-3]。中医认为, 在妇科病“外邪入侵”的众多致病因素中, 寒、湿、热邪为主要原因, 能够伤及中焦阳气, 最终引起经络不通、水液代谢异常^[4]。SRB1 蛋白在胆固醇代谢平衡中起关键作用, 卵巢组织中 SRB1 的异常表达导致体内胆固醇代谢异常。CYP2E1 基因表达上调引起细胞毒素代谢增加, 导致活性氧大量合成, 最终卵巢功能受损^[5]。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

通过阴道涂片筛选法 (发情周期实验) 选取性成熟的 50 只健康 Wistar 雌性大鼠 (由新疆医科大学实验动物中心提供), 体重 (180 ± 30) g。适应性饲养 1 周后, 由于理论造模时间相差较大, 随机分为 POF 组 (A 组)、热邪复合应激模型组 (B 组)、正常对照第 1 组 (N1 组), 以及寒邪复合应激模型组 (C 组)、正常对照第 2 组 (N2 组)。各组 10 只大鼠。A 组、B 组、N1 组模型复制时间 10 d; C 组、N2 组模型复制时间 21 d。

1.2 主要试剂及仪器

RXZ 型人工气候箱 (宁波市新江南仪器有限公司), 兔多克隆抗体 CYP2E1、兔单克隆抗体 SRB1 购自美国 Abcam 公司, 顺氯氨铂 (美国 Sigma 公司), 大麦、芫荽籽、黑胡椒、干姜、西红花。

1.3 方法

1.3.1 POF 大鼠模型的复制 按照 LI 等^[6]的方法, 将 1.5 mg/kg 顺氯氨铂稀释于 1 ml 生理盐水, 每天下午 2:00 行腹腔注射, 连续 10 d。在 (20 ± 3) °C、相对湿度 (relative humidity, RH) 55% ~ 65% 条件下饲养大鼠。

1.3.2 中医寒邪复合应激致 POF 动物模型的复制 在杨宇琦等^[7]报道的模型基础上做适当调整, 采用干寒

饲养环境 [人工气候箱: (6 ± 2) °C、RH 25% ~ 35%, 12 h/次, 1 次/d], 干寒属性饲料 (大麦、芫荽籽) 饲养。同时予以间断性足底电刺激、制动, 冷水中强迫游泳等多因素复合作用, 产生慢性应激, 持续 3 周。

1.3.3 中医热邪复合应激致 POF 动物模型的复制 按照中医“热邪”证候特点^[8], 结合寒邪模型复制方法, 采用干热饲养环境 [人工气候箱: (26 ± 2) °C、RH 25% ~ 35%, 12 h/次, 1 次/d], 干热属性饮水 (1 g 西红花浸泡于 500 ml 双蒸水), 干热属性药物灌胃 (30.0 g 黑胡椒、30.0 g 干姜、0.3 g 西红花溶解于 500 ml 双蒸水, 按 2 ml/100 g 体质量灌胃, 1 次/d)。同时予以间断性足底电刺激、夹尾、噪音等多因素复合作用, 产生体内刺激, 持续 10 d。

1.3.4 正常对照组 大鼠在 (20 ± 3) °C、RH 55% ~ 65% 条件下饲养, 自由饮食。各组大鼠 12 h 昼/夜循环照明, 定时观测生物学表征变化。

1.3.5 观察指标 模型复制成功后用 10% 水合氯醛 (0.4 ml/100 g) 腹腔注射麻醉大鼠, 取卵巢组织, 用 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋、切片。

1.3.6 免疫组织化学法 每个样本随机选取 10 个视野, 并保证各视野间完全不重叠。采用阳性细胞计数法, 每组取 7 ~ 10 个不同样本, 进行组间比较。阳性范围指阳性细胞所占百分率, 分为 5 个等级: 阳性范围 <5% 计 0 分, 6% ~ 25% 计 1 分, 26% ~ 50% 计 2 分, 51% ~ 75% 计 3 分, >75% 计 4 分; 着色强度指阳性细胞染色程度, 分为 4 个等级: 几乎不着色或有一点着色为 0 分, 着色较浅为 1 分, 着色较深为 2 分, 着色很深为 3 分, 最终得分 = 阳性范围评分 × 着色强度评分 × 25。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 SRB1 蛋白表达水平比较

SRB1 蛋白在卵巢组织的黄体细胞、卵泡膜细胞、细胞质中呈阳性表达, 在细胞核和颗粒层细胞中呈阴性表达。N1 组、N2 组、A 组、B 组、C 组大鼠的 SRB1 蛋白相对表达量分别为 (92.86 ± 34.50) 、 (97.22 ± 44.10) 、 (246.88 ± 73.72) 、 (200.00 ± 35.36) 、 (182.14 ± 40.09) , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 18.734, P = 0.000$)。进一步两两比较经

SNK- q 检验, 各模型组卵巢组织中 SRB1 蛋白表达水平较正常对照组升高 ($P < 0.05$); 其中 A、B 组较 N1 组卵巢组织中 SRB1 蛋白表达变化率分别为 166% 和 115%, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$); C 组较 N2 组卵巢组织中 SRB1 蛋白表达变化率为 87%, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$); A 组与 B 组、A 组与 C 组卵巢组织中 SRB1 蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B 组与 C 组卵巢组织中 SRB1 蛋白表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1、2。

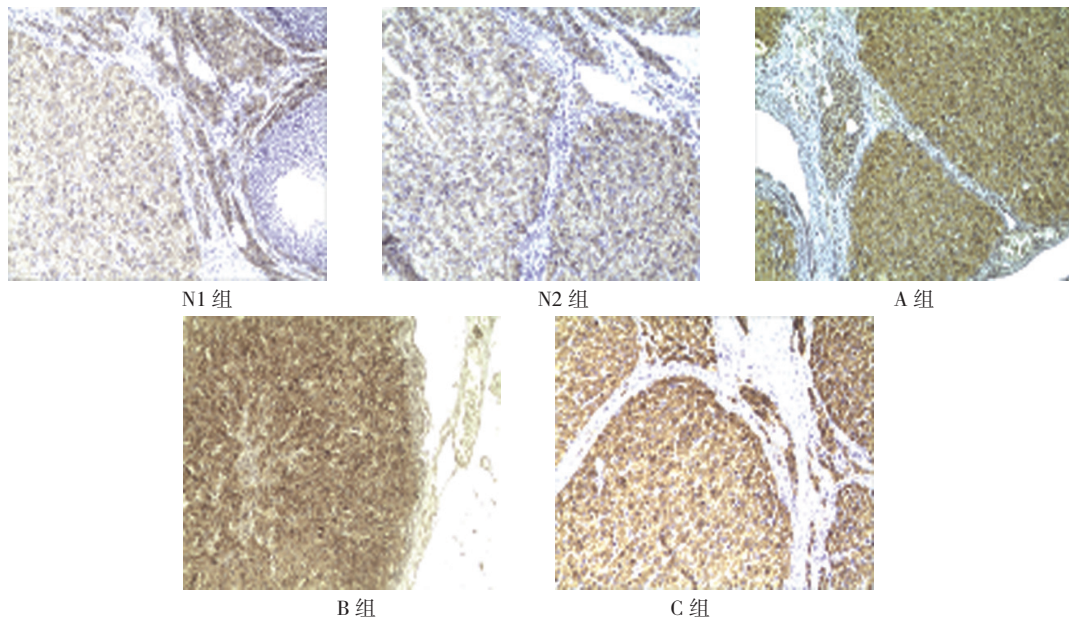
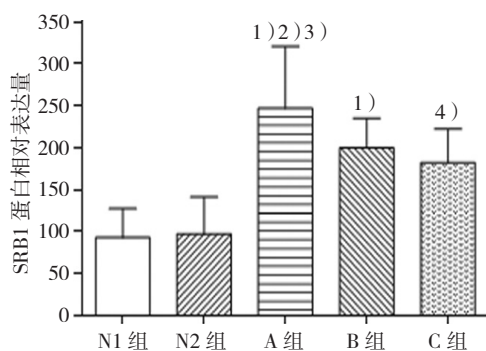


图 1 SRB1 在各组大鼠卵巢组织中的表达 ($\times 100$)



1) 与 N1 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 C 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 B 组比较, $P < 0.05$; 4) 与 N2 组比较, $P < 0.05$

图 2 各组大鼠卵巢组织中 SRB1 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 各组大鼠 CYP2E1 蛋白表达水平比较

CYP2E1 蛋白在卵巢组织的黄体细胞、卵泡膜细胞、颗粒层细胞、细胞浆中呈阳性表达, 在卵泡间

质细胞中呈阴性表达。N1 组、N2 组、A 组、B 组、C 组大鼠的 CYP2E1 蛋白相对表达量分别为 (106.25 ± 60.87) 、 (108.33 ± 43.30) 、 (265.63 ± 64.00) 、 (201.00 ± 35.36) 、 (182.14 ± 104.80) , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 10.198, P = 0.001$) 进一步两两比较经 SNK- q 检验, 各模型组卵巢组织中 CYP2E1 表达水平较正常对照组升高 ($P < 0.05$); 其中 A、B 组较 N1 组卵巢组织中 CYP2E1 蛋白表达变化率分别为 150% 和 89%, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$); C 组较 N2 组卵巢组织中 CYP2E1 蛋白表达变化率为 68%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); A 组与 B 组、A 组与 C 组卵巢组织中 CYP2E1 蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B 组与 C 组卵巢组织中 CYP2E1 蛋白表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3、4。

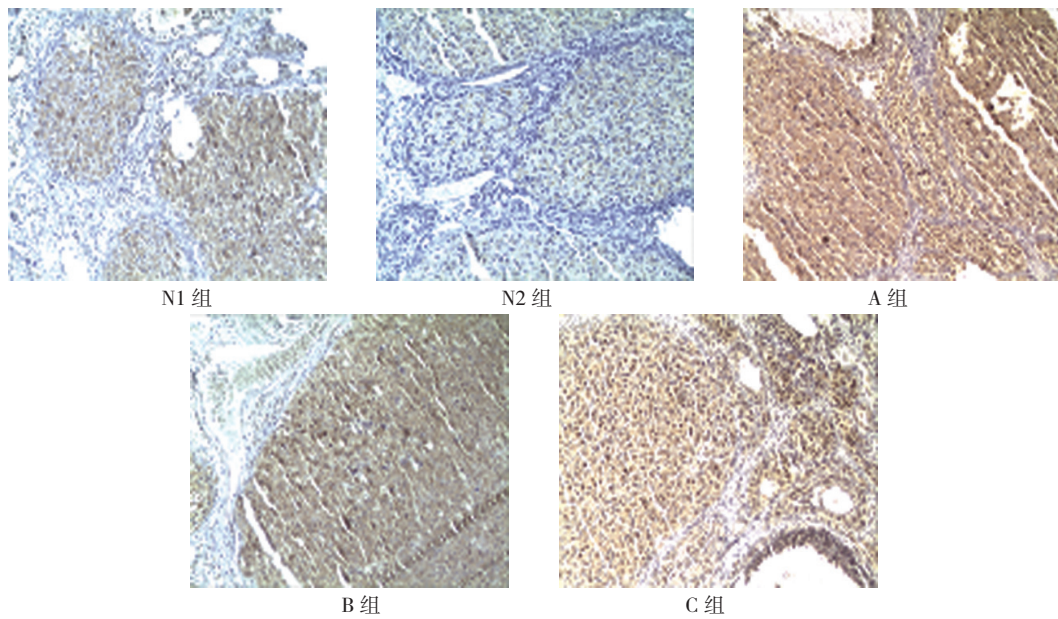
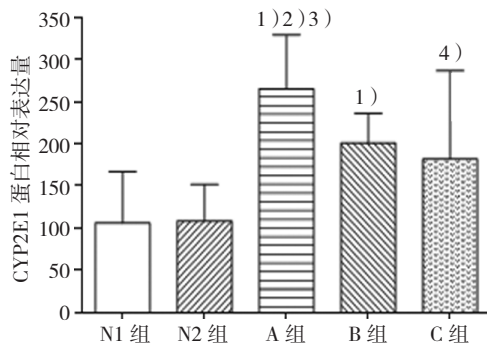


图 3 CYP2E1 在各组大鼠卵巢组织中的表达 (×100)



1) 与 N1 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 C 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 B 组比较, $P < 0.05$; 4) 与 N2 组比较, $P < 0.05$

图 4 各组大鼠卵巢组织中 CYP2E1 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

随着社会快速发展,引起 POF 的因素诸多,包括遗传因素、自身免疫、感染情况等^[9]。由于 POF 病因复杂,尚无有效的治疗方法。西医多采用激素替代疗法(hormone replacement therapy, HRT)和促排卵疗法,即给予相应激素以补充机体雌激素不足^[10-11]。HRT 疗法具有疗程长、毒副作用强等特点,使患者患心脏病、子宫内膜癌等恶性疾病的风险加大。中医学者认为,肾虚是 POF 的病理学基础,病变涉及心、肝、脾、肺等器官,肺脏在妇科疾病的诊疗中经常被忽略,但肺与肾组织关系密切,肺阴虚损,亦可致肾阴不足。由于中医实验动物研究起步晚,不同中医体质异常所致的 POF 动物模型尚未成功复制,其生物学基础与发病

机制需进一步从现代医学的角度进行研究。

SRB1 是位于细胞表面的一种受体糖蛋白,分布广泛,主要在肝脏、肾上腺、卵巢等能生成类固醇激素的组织中高度表达。SRB1 可以结合未被修饰过的 LDL、VLDL 等配体,对 HDL 有高亲和力,在 HDL 代谢中发挥关键作用。在细胞外膜上,SRB1 能够调节疏水脂蛋白中脂类物质的选择性摄取,既能介导肝脏对 HDL 中胆固醇脂的选择性摄取,又能促进外周组织细胞内游离胆固醇转运至 HDL,从而保持胆固醇代谢的平衡^[12]。因此,POF 的发生可能与体内胆固醇代谢有关,胆固醇代谢异常可能是热邪、寒邪导致 POF 的原因。CYP2E1 是 CYP450 酶系中重要的亚型,在乙醇代谢中起关键作用。在高浓度乙醇条件下,随着 CYP2E1 蛋白表达上调,细胞毒素代谢增加,产生大量活性氧,引起氧化应激,导致细胞死亡^[13]。CYP2E1 升高还可引起炎症反应加重,可以级联引发其他炎症因子的活性升高,促进其他炎症因子表达。POF 的发生还可能与细胞内有毒物质、活性氧,以及炎症因子的过度产生有关。

本研究结果表明,SRB1、CYP2E1 蛋白在 POF,以及热邪、寒邪复合应激模型大鼠卵巢组织中的表达水平有不同程度变化,POF 组表达最高,其次为热邪和寒邪复合应激大鼠模型组,模型组与正常对照组有差异。寒邪、热邪复合应激模型与 POF 的发生关系密切。热邪、寒邪所致 POF 可能与体内胆固醇代谢异常及活性氧等物质的产生有关。

参 考 文 献:

- [1] TŠUIKO O, NŌUKAS M, ŽILINA O, et al. Copy number variation analysis detects novel candidate genes involved in follicular growth and oocyte maturation in a cohort of premature ovarian failure cases[J]. Hum Reprod, 2016, 31(8): 1913-1925.
- [2] KOMOROWSKA B. Autoimmune premature ovarian failure[J]. Prz Menopauzalny, 2016, 15(4): 210-214.
- [3] 吕文漪, 董晓英. 卵泡发育与卵巢早衰相关性的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2016, 45(12): 160-162.
- [4] 宋玉彬. 早春 " 湿寒 " 所引发妇科病的研究 [J]. 当代医学, 2012, 18(18): 161.
- [5] 张良. 褪黑素参与调节卵巢功能的研究进展 [J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(6): 548-553.
- [6] LI D, CHEN Y, QI L, et al. Differentially expressed genes in cisplatin-induced premature ovarian failure in rats[J]. Anim Reprod Sci, 2013, 137(3/4): 205-213.
- [7] 杨宇琦, 杨泽武, 秦伟, 等. 寒邪致病对大鼠血糖、胰岛素水平的影响 [J]. 吉林中医药, 2017, 37(7): 708-710.
- [8] 王梦迪, 王珍, 闫润泽, 等. 应用德尔菲法对糖尿病肾脏病 " 热邪 " 证候特点的调查研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2017, 18(11): 953-956.
- [9] 张秀, 鲁雅, 王佩娟. 卵巢早衰的病因研究进展 [J]. 湖北中医药大学学报, 2017, 19(1): 118-120.
- [10] 王亚平, 郁琦. 卵巢早衰激素补充治疗 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015, 31(8): 730-733.
- [11] 徐文君, 高慧, 梁策等. 中西医治疗卵巢早衰的研究进展 [J]. 中国医学创新, 2016, 13(17): 139-142.
- [12] VALACCHI G, STICOZZI C, LIM Y, et al. Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011, 1229(1): E1-E7.
- [13] BARNES M A, ROYCHOWDHURY S, NAGY L E. Innate immunity and cell death in alcoholic liver disease: role of cytochrome P4502E1[J]. Redox Biology, 2014, 2(1): 929-935.

(童颖丹 编辑)