左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠血清性激素及 IL-6、IL-17 水平的影响

江二喜
(恩施土家族苗族自治州中心医院, 湖北 恩施 445000)

[摘 要] **目的**: 探讨左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠血清性激素及 IL-6、IL-17 水平的影响。**方法**: SPF 级雌性小鼠 60 只随机分为对照组、模型组、西药组及左归丸组,除对照组外,所有雌鼠足底、腹部多点皮下注射免疫试剂 0.15 mL,14 d 后再次皮下注射免疫强化试剂 0.15 mL,建立免疫性卵巢早衰模型;造模成功第 6 天,西药组灌胃补佳乐 0.15 mg/kg,左归丸组灌胃 31.5 g/kg 左归丸,对照组和模型组灌胃等量的蒸馏水;各组雌鼠灌胃 8 周时,取清晨空腹静脉血,ELISA 法检测血清中雌激素、卵泡刺激素、黄体生成素,及抗苗勒管激素、抗透明带抗体、基础抑制素 B,及 IL-6、IL-17 水平;摘取雌鼠卵巢及子宫秤取湿重,计算小鼠卵巢系数、子宫系数。**结果**: 与对照组比较,模型组卵巢系数、子宫系数及血清雌激素、抗苗勒管激素、基础抑制素 B 水平明显降低($P<0.01$),卵泡刺激素、黄体生成素及抗透明带抗体、IL-6 及 IL-17 水平明显升高($P<0.01$);与模型组比较,西药组及左归丸组卵巢系数、子宫系数及血清雌激素、抗苗勒管激素、基础抑制素 B 水平明显升高($P<0.01$),卵泡刺激素、黄体生成素及抗透明带抗体、IL-6 及 IL-17 水平明显降低($P<0.01$);左归丸组上述指标优于西药组($P<0.01$)。**结论**: 左归丸有效下调免疫性卵巢早衰小鼠 IL-6、IL-17 水平,增加生殖器官重量、改善激素水平,从而保护卵巢功能。

[关键词] 左归丸; 免疫性疾病; 卵巢早衰; 性激素; 白细胞介素 6; 白细胞介素 17
[中图分类号] R711.75; R965 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2018)08-0909-04
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.08.009

The Effect of Zuogui Pills on Serum Sex Hormones and Il-6 and Il-17 Levels in Immune Ovarian Progeria Mice

JIANG Erxi
(*Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Central Hospital, Enshi 445000, Hubei, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effect of Zuogui pills on the serum sex hormones and IL-6 and IL-17 of the immune ovarian progeria mice. **Methods**: Sixty SPF female mice were randomly divided into control group, model group, western medicine group and Zuogui pill group. Except for the control group, all female mice were made subcutaneous injection of the foot and abdomen with 0.15 mL of the immune reagent and then were made subcutaneous injection with 0.15 mL of immune enhanced reagent again after 14 d to set up autoimmune ovarian premature senility model; 6 d after it, the western medicine group were filled stomach and lavage jiale 0.15 mg/kg, zuogui pill group took 31.5 g/kg of zuogui pill while control group and model group taking the same amount of distilled water. After all groups took eight weeks´continuous lavage, the morning fasting venous blood was taken to test the levels of estrogen, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and anti-muller tube hormone, anti-hyaluronic band antibody, basal inhibitory hormone B, and IL-6, IL-17 in serum by ELISA. The ovary and uterus scales of female mice were extracted and the wet weight was taken to calculate the ovary coefficient and uterine coefficient. **Results**: Compared with control group, model group were significantly lower in levels of ovarian coefficient, uterine coefficient and serum estrogen, anti-muller tube hor-

网络出版时间:2018 - 08 - 21 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180821.0759.005.html

mone, basic inhibitory factor B ($P<0.01$), the levels of follicular stimulating hormone, luteinizing hormone and anti-transparent band antibody, IL-6 and IL-17 were significantly increased ($P<0.01$); compared with model group, western medicine group and Zuogui pill group were significantly increased in levels of ovarian coefficient, uterine coefficient and serum estrogen, anti - muller tube hormone, basic inhibitory factor B ($P<0.01$). The levels of follicular stimulating hormone, luteinizing hormone and anti-transparent band antibody, IL-6 and IL-17 significantly decreased, the above indexes of zuogui pill group were better than those of western medicine group ($P<0.01$). VConclusions: The Zuogui pill effectively reduces the level of IL-6 and IL-17 in the immune ovarian premature aging mice, increases the weight of the reproductive organs, promotes follicular development, improves the hormone level and protects the ovarian function.

[**Key words**] Zuogui pill; immune diseases; premature ovarian failure; sex hormones; interleukin 6; interleukin 17

卵巢早衰是指女性在 40 岁前,由于自身免疫性、心理因素、感染、遗传等因素导致雌激素降低、内分泌紊乱,出现闭经、心烦、潮热、失眠、性欲下降等临床表现[1]。严重影响育龄妇女的生殖健康和生活质量,其中自身免疫是导致卵巢早衰的常见原因,约占卵巢早衰患者的 30%[2]。中医认为卵巢早衰的发病机制是肾气不足、气血两虚,左归丸具有平衡肾阴阳、补肾填精的功效,能够改善卵巢功能、提高免疫力[3]。本研究通过观察左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠模型激素水平及免疫功能的影响,为临床诊断及治疗提供依据。

1　材料与方法

1.1　动物、药品与试剂

8 周的 SPF 级雌性小鼠 60 只,雄性小鼠 10 只,体质量 18 ~ 22 g,购自中国医科大学动物部,合格证号 SCXK2017 - 0002。参照《景岳全书 · 新方八阵》[4]配制左归丸:熟地黄 24 g、山药 12 g、山茱萸 12 g、枸杞 12 g、菟丝子 12 g、鹿角胶 12 g、牛膝 9 g、龟板胶 12 g,将药物放入蒸馏水中煎煮 12 h、过滤、加水继续煎煮、两次药液合并、浓缩至每毫升药液中含生药 1 g,备用。戊酸雌二醇(补佳乐)(拜耳医药公司生产,批号 J20130009),透明带多肽(杭州中肽生物公司),弗氏完全佐剂(美国 Sigma 公司),弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司),IL-17 ELISA 试剂盒(美国 RD 公司),抗透明带抗体试剂盒(美国 RD 公司),OLYMPUS 光学显微镜(日本),JY3002 太平仪(上海精密科学仪器公司)。

1.2　分组与造模

小鼠适应性喂养 ,将雌雄 6∶1分笼喂养,诱导雌鼠发情,每天检测雌性小鼠阴道图片,待 2 个动情周期后,随机分为对照组、模型组、西药组、左归丸组,每组 15 只。取 1 mg 透明带多肽加入三蒸水中,配成 0.2 g/L 溶液,按 1∶1比例与弗氏完全佐剂混匀,制成免疫试剂。参照文献[5]造模,模型组、西药组、左归丸组雌鼠足底、腹部多点皮下注射免疫试剂 0.15 mL,14 d 后再次皮下注射免疫强化试剂 0.15 mL。每天检测雌鼠阴道图片,见阴道脱落细胞动情周期紊乱,小鼠活动减少、皮毛暗淡无光泽、反应迟缓、嗜睡、体质量减轻,表明造模成功;造模成功第 6 天,西药组灌胃补佳乐 0.15 mg/kg,左归丸组灌胃 31.5 g/kg(按照成人剂量 3.465 g/kg,相当于成人剂量的 7.7 ~ 11.5 倍),对照组和模型组灌胃等量的蒸馏水,连续灌胃 8 周,每日 1 次。

1.3　观察指标

各组雌鼠于灌胃 8 周结束时,比较 4 组小鼠卵巢系数、子宫系数及血清雌激素、卵泡刺激素、黄体生成素、抗苗勒管激素、抗透明带抗体、基础抑制素 B、IL-6 及 IL-17 水平。所有小鼠禁食 12 h 后,眶静脉采血离心,ELISA 试剂盒分别检测血清中雌激素、卵泡刺激素、黄体生成素,抗苗勒管激素、抗透明带抗体、基础抑制素 B,IL-6 及 IL-17 水平。每组小鼠采血后,分别摘取卵巢、子宫,去除周围脂肪、结缔组织后放在天平仪称湿重,卵巢系数 = 卵巢湿重(g)/100(g) ×100%,子宫系数 = 子宫湿重(g)/100(g) ×100%。

1.4　统计学分析

数据采用 SPSS 20.0 软件进行分析,计数资料用率(%)表示,组间比较采用卡方检验;计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　卵巢系数及子宫系数

与对照组比较，模型组卵巢系数及子宫系数均明显降低（$P<0.01$）；与模型组比较，西药组、左归丸组卵巢系数及子宫系数均明显升高（$P<0.01$）；与西药组比较，左归丸组卵巢系数及子宫系数均明显升高（$P<0.01$）。见表 1。

表 1　各组小鼠卵巢系数、子宫系数比较（$\bar{x}\pm s$，%）

Tab. 1　Comparison of ovarian coefficient and uterine coefficient in 4 groups of mice

组别	n	卵巢系数	子宫系数
对照组	15	0.136 ± 0.019	0.408 ± 0.076
模型组	15	0.087 ± 0.021$^{(1)}$	0.212 ± 0.048$^{(1)}$
西药组	15	0.102 ± 0.023$^{(2)}$	0.317 ± 0.093$^{(2)}$
左归丸组	15	0.131 ± 0.036$^{(2)(3)}$	0.376 ± 0.082$^{(2)(3)}$

$^{(1)}$ 与对照组比较，$P<0.01$；$^{(2)}$ 与模型组比较，$P<0.01$；$^{(3)}$ 与西药组比较，$P<0.01$

2.2　血清雌激素、卵泡刺激素及黄体生成素

与对照组比较，模型组血清雌激素水平降低（$P<0.01$），卵泡刺激素及黄体生成素水平均升高（$P<0.01$）；与模型组比较，西药组、左归丸组血清雌激素水平升高（$P<0.01$），卵泡刺激素及黄体生成素水平均降低（$P<0.01$）；与西药组比较，左归丸组血清雌激素水平升高（$P<0.01$），卵泡刺激素及黄体生成素水平均降低（$P<0.01$）。见表 2。

表 2　各组小鼠血清雌激素、卵泡刺激素、黄体生成素水平比较（$\bar{x}\pm s$）

Tab. 2　Comparison of serum estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone levels in 4 groups of mice

组别	n	雌激素（ng/L）	卵泡刺激素（IU/L）	黄体生成素（IU/L）
对照组	15	31.5 ± 6.7	7.3 ± 2.4	31.5 ± 4.5
模型组	15	18.7 ± 5.4$^{(1)}$	11.9 ± 3.4$^{(1)}$	56.4 ± 6.8$^{(1)}$
西药组	15	23.3 ± 6.2$^{(2)}$	9.1 ± 2.5$^{(2)}$	39.6 ± 5.6$^{(2)}$
左归丸组	15	27.8 ± 6.1$^{(2)(3)}$	7.7 ± 2.6$^{(2)(3)}$	33.5 ± 5.4$^{(2)(3)}$

$^{(1)}$ 与对照组比较，$P<0.01$；$^{(2)}$ 与模型组比较，$P<0.01$；$^{(3)}$ 与西药组比较，$P<0.01$

2.3　血清抗苗勒管激素、抗透明带抗体及基础抑制素 B 水平

与对照组比较，模型组血清抗苗勒管激素及基础抑制素 B 水平降低（$P<0.01$），抗透明带抗体水平升高（$P<0.01$）；与模型组比较，西药组、左归丸组血清抗苗勒管激素及基础抑制素 B 水平升高（$P<0.01$），抗透明带抗体水平降低（$P<0.01$）；与西药组比较，左归丸组血清抗苗勒管激素及基础抑制素 B 水平升高（$P<0.01$），抗透明带抗体水平降低（$P<0.01$）。见表 3。

表 3　各组小鼠血清抗苗勒管激素、抗透明带抗体、基础抑制素 B 水平比较（$\bar{x}\pm s$）

Tab. 3　Comparison of serum levels of anti mullerian hormone, anti zona pellucida antibody and basic inhibin B in 4 groups of mice

组别	n	抗苗勒管激素（μg/L）	抗透明带抗体（ng/L）	基础抑制素 B（g/L）
对照组	15	6.3 ± 2.9	38.8 ± 8.7	17.3 ± 5.2
模型组	15	2.2 ± 0.5$^{(1)}$	58.4 ± 9.4$^{(1)}$	12.9 ± 4.3$^{(1)}$
西药组	15	3.8 ± 2.2$^{(2)}$	47.1 ± 8.8$^{(2)}$	14.9 ± 5.2$^{(2)}$
左归丸组	15	4.5 ± 2.0$^{(2)(3)}$	41.2 ± 8.6$^{(2)(3)}$	16.8 ± 4.8$^{(2)(3)}$

$^{(1)}$ 与对照组比较，$P<0.01$；$^{(2)}$ 与模型组比较，$P<0.01$；$^{(3)}$ 与西药组比较，$P<0.01$

2.4　血清 IL-6 及 IL-17 水平

与对照组比较，模型组血清 IL-6 及 IL-17 水平升高（$P<0.01$）；与模型组比较，西药组及左归丸组血清 IL-6、IL-17 水平降低（$P<0.01$）；与西药组比较，左归丸组血清 IL-6 及 IL-17 水平降低（$P<0.01$）。见表 4。

表 4　各组小鼠血清 IL-6 及 IL-17 水平比较（$\bar{x}\pm s$）

Tab. 4　Comparison of serum levels of IL-6 and IL-17 in 4 groups of mice

组别	n	IL-6（ng/L）	IL-17（ng/L）
对照组	15	42.13 ± 5.87	203.46 ± 21.78
模型组	15	61.22 ± 10.53$^{(1)}$	254.58 ± 48.69$^{(1)}$
西药组	15	49.38 ± 8.49$^{(2)}$	226.39 ± 35.74$^{(2)}$
左归丸组	15	44.45 ± 12.36$^{(2)(3)}$	207.83 ± 34.52$^{(2)(3)}$

$^{(1)}$ 与对照组比较，$P<0.01$；$^{(2)}$ 与模型组比较，$P<0.01$；$^{(3)}$ 与西药组比较，$P<0.01$

3　讨论

卵巢早衰是指更年期前出现闭经、不孕、骨质疏松、动脉硬化等症状。免疫性卵巢早衰的患者，由于卵巢生成抗原抗体复合物引起卵巢免疫性损伤，导致卵巢的自分泌调节紊乱，卵泡发育缓慢或停滞，因此出现卵巢早衰症状，中医认为，卵巢早衰与肾气不足及情志郁结有直接关系，因此补肾方是

治疗卵巢早衰的常用中药。左归丸方剂是补肾填精的代表,它出自张介宾的《静岳全书》,临床应用在卵巢早衰、绝经期综合征的治疗,尤其对调节激素分泌、改善骨质疏松、修复卵巢损伤等方面效果较好,能够较好的保护卵巢功能。左归丸方剂中:熟地为君药、具有滋肾阴、补精血的作用;山茱萸为臣药,滋肾养肝;山药补脾、枸杞补肾、鹿角胶及龟板胶填精补髓,滋养肾阴和精血。有报道,左归丸用于雌激素水平低下的闭经患者,疗效较好[6]。

有研究表明,免疫性卵巢早衰与T淋巴细胞密切相关,可能与Th17细胞过度活跃有关[7]。Th17细胞参与自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、类风湿关节炎、溃疡性结肠炎等。有报道,Th17细胞与体内雌激素水平呈负相关,雌激素缺乏时,Th17细胞过度激活,机体免疫性应答增强[8]。有报道,IL-17诱导细胞产生IL-6、TNF等炎性细胞因子,IL-6能够诱导CD4+T细胞分化为Th17,诱发自身免疫性疾病[9]。

本研究结果显示,模型组小鼠的卵巢系数、子宫系数明显降低,雌激素水平明显降低,卵泡刺激素、黄体生成素水平均明显升高,抗苗勒管激素、基础抑制素B水平明显降低,抗透明带抗体水平明显升高,表明免疫性卵巢早衰导致小鼠生殖器官质量减少、激素水平改变,表明本研究造模成功。左归丸组小鼠的卵巢系数、子宫系数明显增高,雌激素水平明显升高,卵泡刺激素、黄体生成素水平均明显降低,抗苗勒管激素、基础抑制素B水平明显升高,抗透明带抗体水平明显降低,说明左归丸能够促进小鼠卵巢血管生成,增加生殖器官重量,促进卵泡发育,改善了激素水平,该结果与阳松威等[10]的结果一致。本研究结果还显示左归丸组IL-6、IL-17水平均明显降低,说明左归丸能够下调免疫性细胞因子IL-6、IL-17水平,减轻炎症反应,促进卵巢功能恢复,该结果与李霞等[11]的结果一致。另有报道,左归丸促进卵巢大血管数量增加明显,而雌激素能够增加卵巢小血管数量,因此左归丸能够更好地改善激素水平[12]。

综上所述,左归丸可有效下调免疫性卵巢早衰小鼠IL-6、IL-17水平,增加生殖器官重量、促进卵泡发育,改善性激素水平,保护卵巢功能,为临床治疗提供了理论依据。

4 参考文献

[1] 佟雷,刘金丽,孙琳林,等. 左归丸及右归丸对卵巢早衰小鼠衰老的预防作用[J]. 中成药, 2017,39(2):260-265.

[2] 赵锦秀,黄燕. 左归丸、右归丸对卵巢早衰前期患者卵巢储备功能的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2015,35(1):128-131.

[3] 欧阳进. 右归丸对自身免疫性卵巢早衰模型小鼠IL-6、IL-17、IL-21水平的影响[D]. 湖南:湖南中医药大学, 2014.

[4] 朱玲,罗颂平,许丽绵,等. 左归丸对卵巢早衰小鼠免疫功能的影响[J]. 中华中医药学刊, 2008,26(6):1157-1160.

[5] 李红梅,朱玲,钟志勇,等. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠卵巢GDF-9、BMP-15表达的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2012,11(19):1517-1518.

[6] 康艳南,满玉晶,冷杨阳,等. 卵巢早衰中西医发病机制探究[J]. 光明中医, 2015,30(2):358-359.

[7] BRICARE L,LAROCHE E,BOURCIGAUX N,et al. Premature ovarian failures [J]. Press Med, 2013,42(11):1500-1507.

[8] 潘涛,罗雪,于水,等. 雌激素E2对人外周血Th17细胞IL-17合成的抑制作用[J]. 免疫学杂志, 2010,26(8):698-701.

[9] LI X,WANG B,LI Y,et al. The Th1/Th2/Th17/Treg paradigm induced by stachydrine hydrochloride reduces uterine bleeding in RU486-induced abortion mice[J]. J Ethnopharmacol, 2013,145(1):241-253.

[10] 阳松威,孙晓峰,贺又舜,等. 左归丸对化疗致卵巢早衰小鼠卵巢功能的影响[J]. 中成药, 2016,38(4):717-722.

[11] 李霞,王丽,郭钰琪,等. 左归丸加减对雌激素缺乏骨丢失小鼠Th17/Treg亚群的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014,34(11):1359-1364.

[12] 段恒,周滢. 左归丸对大鼠卵泡发育与卵巢血管生成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(9):206-209.

(2018-04-25收稿,2018-07-09修回)
中文编辑:周 凌;英文编辑:冉海勇