

DOI: 10.13703/j.0255-2930.20220301-k0002

中图分类号: R 245.3 文献标志码: A

“秩边”透“水道”针刺对早发性卵巢功能不全大鼠死亡受体通路 Fas/FADD/Caspase-8 表达的影响*

闫婧[△], 马梦娜, 赵季宇, 王红阳, 殷陆芸, 金晓飞[✉]

(山西中医药大学第二临床学院, 晋中 030619)

【摘要】 目的: 基于死亡受体通路 Fas/Fas 相关死亡域蛋白 (FADD)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8 (Caspase-8) 探讨“秩边”透“水道”针刺对早发性卵巢功能不全 (POI) 大鼠卵巢功能的影响及可能机制。方法: 将 48 只雌性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、药物组和针刺组, 每组 12 只。除空白组外, 其余各组大鼠均采用腹腔注射环磷酰胺制备 POI 模型。针刺组大鼠于造模后采用“秩边”透“水道”针刺干预 4 周, 每日 1 次, 每次 30 min; 药物组予戊酸雌二醇片 ($0.09 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 灌胃 4 周。比较各组大鼠一般情况和动情周期; 采用 ELISA 法检测大鼠血清卵泡刺激素 (FSH)、黄体生成素 (LH) 和雌二醇 (E_2) 水平, HE 染色法观察大鼠卵巢组织形态, 免疫组化法和 Western blot 法检测大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 蛋白表达。结果: 造模后, 除空白组外, 其他各组大鼠毛发干焦、脱毛, 精神萎靡, 进食减少, 小便增多, 大便稀软不成形; 干预后, 针刺组、药物组大鼠大便逐渐成形。干预后, 与空白组比较, 模型组大鼠动情周期紊乱率升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 针刺组、药物组大鼠动情周期紊乱率降低 ($P < 0.01$)。与空白组比较, 模型组大鼠体质量和血清 E_2 水平降低 ($P < 0.01$), 血清 FSH、LH 水平和卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 针刺组、药物组大鼠体质量和血清 E_2 水平升高 ($P < 0.01$), 血清 FSH、LH 水平和卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。结论: “秩边”透“水道”针刺可有效改善 POI 大鼠卵巢功能, 其机制可能为调节 POI 大鼠血清性激素水平, 降低卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 表达水平, 减缓卵巢细胞凋亡。

【关键词】 早发性卵巢功能不全; 秩边透水道针刺; 死亡受体; Fas/FADD/Caspase-8 通路

Effect of "Zhibian" (BL 54)-to-"Shuidao" (ST 28) needle insertion on the expression of Fas/FADD/Caspase-8 of death receptor pathway in rats with primary ovarian insufficiency

YAN Jing[△], MA Meng-na, ZHAO Ji-yu, WANG Hong-yang, YIN Lu-yun, JIN Xiao-fei[✉] (Second Clinical Medical College of Shanxi University of CM, Jinzhong 030619, China)

ABSTRACT Objective To explore the effect of "Zhibian" (BL 54)-to-"Shuidao" (ST 28) needle insertion on the ovarian function in the rats with primary ovarian insufficiency (POI) and the potential effect mechanism based on the Fas/FADD/Caspase-8 of death receptor pathway. **Methods** Forty-eight female SD rats were randomly divided into a blank group, a model group, a medication group and an acupuncture group, with 12 rats in each group. Except in the blank group, the rats in the other groups were intraperitoneally injected with cyclophosphamide to establish the POI model. In the acupuncture group, after successful modeling, the intervention was given with "Zhibian" (BL 54)-to-"Shuidao" (ST 28) needle insertion, once daily, 30 min in each intervention; and the duration of intervention was 4 weeks. In the medication group, estradiol valerate tablets were administered intragastrically, $0.09 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, for 4 weeks. The general situation and the estrous cycle of the rats were compared among groups. Using ELISA, the levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and estradiol (E_2) in the serum were detected. HE staining was adopted to observe the morphological changes of ovarian tissue of rats. The protein expression of Fas, FADD and Caspase-8 in ovarian tissue was detected with immunohistochemistry and Western blot. **Results** After modeling, except the rats of the blank group, the rats of the other groups had dry fur, lost hair, low spirits, reduced food intake, increased

*山西省教育厅研究生创新项目: 2021Y730; 山西中医药大学研究生创新项目: 2021CX032; 2022 年度山西省基础研究计划 (自由探索类) 项目: 202303021211216

✉通信作者: 金晓飞, 副教授。E-mail: jinxiaofei@sxtcm.edu.cn

△闫婧, 山西中医药大学硕士研究生。E-mail: 1412613013@qq.com

urination and loose stool. After intervention, the stool became regular gradually in the acupuncture group and the medication group. The percentage of estrous cycle disturbance was increased in the rats of the model group when compared with the blank group ($P < 0.01$); in comparison with the model group, the percentages of estrous cycle disturbance were reduced in the acupuncture group and the medication group after intervention ($P < 0.01$). When compared with the blank group, the body mass and E_2 content in the serum were lower ($P < 0.01$), the levels of FSH and LH in the serum and the protein expression levels of Fas, FADD and Caspase-8 were increased ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, the body mass and E_2 contents in the serum were higher ($P < 0.01$), the levels of FSH and LH in the serum and the protein expression levels of Fas, FADD and Caspase-8 were reduced ($P < 0.01$) in the acupuncture group and the medication group. **Conclusion** "Zhibian" (BL 54)-to-"Shuidao" (ST 28) needle insertion can effectively improve the ovarian function of POI rats, and its effect mechanism may be related to regulating the serum sex hormone levels, reducing the expression of Fas, FADD and Caspase-8 in ovarian tissue and retarding apoptosis of ovarian cells.

KEYWORDS primary ovarian insufficiency; Zhibian (BL 54)-to-Shuidao (ST 28) needle insertion; death receptor; Fas/FADD/Caspase-8 pathway

原发性卵巢功能不全 (primary ovarian insufficiency, POI), 又称为卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF), 是妇科临床常见的一种内分泌疾病, 以月经紊乱、低雌激素、高促性腺激素表现为特点^[1]。其主要发病机制为卵巢颗粒细胞凋亡引发卵泡闭锁, 进而导致卵巢功能逐渐衰竭^[2]。研究^[3]表明, 放化疗损伤可能是其发病原因之一。约 42% 接受烷化剂类化疗药物治疗的女性患者会发生 POI^[4], 大剂量、长时间的抗肿瘤治疗会使各年龄段患者的卵巢功能减退甚至衰竭, 导致闭经、生殖能力下降或丧失^[5]。环磷酰胺是临床常用的免疫抑制剂和抗肿瘤药物, 能通过一系列反应抑制细胞和体液免疫, 直接损伤卵巢颗粒细胞使卵泡过早耗竭或加速卵泡闭锁, 从而导致 POI 的发生^[6]。

秩边透水道针刺由冀来喜教授提出, 最初主要用于治疗慢性非细菌性前列腺炎、前列腺痛、阳痿等男科疾患, 后续拓展至妇科相关疾病^[7]。前期实验研究^[8]发现, “秩边”透“水道”针刺可通过内源性凋亡途径调控颗粒细胞凋亡以改善卵巢功能。故本研究在前期实验基础上, 以细胞凋亡的外部死亡受体途径为切入点, 进一步探讨“秩边”透“水道”针刺对环磷酰胺诱导 POI 模型大鼠 Fas 介导死亡受体凋亡相关因子表达的影响, 逐步完善该针法干预 POI 的作用机制, 为临床应用提供更加全面的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF 级雌性 SD 大鼠 48 只, 7~8 周龄, 体质量 (200 ± 20) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2016-0011]。常规饲养于山西中医药大学实验动物

房, 饲养温度: (24 ± 3) °C, 湿度: $55\% \pm 5\%$, 噪声 ≤ 60 dB, 人工控制照明 (12 h 光照与 12 h 黑暗交替), 分笼 (6 只 1 笼) 饲养。适应性饲养 1 周后, 按随机数字表法将大鼠分成空白组、模型组、药物组和针刺组, 各 12 只。本实验中的操作均符合动物实验伦理原则, 经山西中医药大学实验动物研究伦理委员会批准 (审批编号: 2021DW260)。

1.2 主要试剂和仪器

(1) 主要试剂: 环磷酰胺 (大连美仑生物技术有限公司, 国药准字 H32020857, 0.2 g), 戊酸雌二醇片 (拜耳医药保健有限公司, 国药准字 J20171038, 1 mg), 卵泡刺激素 (FSH) 检测试剂盒 (SU-B30447)、黄体生成素 (LH) 检测试剂盒 (SU-B30247)、雌二醇 (E_2) 检测试剂盒 (SU-B30267) 均购自上海瓦兰生物科技有限公司, Fas 抗体 (BA0484)、Fas 相关死亡域蛋白 (FADD) 抗体 (A00237-4)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase)-8 抗体 (A00042)、HRP-羊抗兔二抗 (BA1054)、SV 超敏两步法免疫组化试剂盒 (SV0002)、DAB 显色试剂盒 (AR1027)、GAPDH 抗体 (BM1623) 均购自武汉博士德生物工程有限公司, 苏木素-伊红染液 (DH0006, 北京雷根生物技术有限公司)。

(2) 主要仪器: 0.18 mm \times 25 mm 一次性无菌针灸针 (北京中研太和医疗器械有限公司), 正置显微镜 (ECLIPSE Ci-S, 日本 Nikon), 高速离心机 (HC-3018, 安徽中科中佳科学仪器有限公司), 酶标检测仪 (SM600, 上海永创医疗器械有限公司), 组织匀浆器 (SCIENTZ-24, 宁波新芝生物科技股份有限公司), 石蜡包埋机 (YB-6 LF, 湖北孝感亚光医用电子技术有限公司), 切片机 (YGQ-III, 湖北

孝感亚光医用电子技术有限公司),电泳仪(DYY-7C,北京六一生物科技有限公司)。

1.3 模型制备

在前期实验的基础上参考文献[9],采用左右交替腹腔注射环磷酰胺溶液的方式复制 POI 模型。将 0.2 g 环磷酰胺溶于 100 mL 0.9%氯化钠溶液,配制成浓度为 2 mg/mL 的溶液。除空白组外,其他各组大鼠腹腔注射环磷酰胺溶液(第 1 天 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,第 2~15 天 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),共 15 d。造模成功标准:①从造模之日开始,每天上午 8:00 进行阴道脱落细胞涂片观察各组大鼠动情周期情况,动情周期紊乱;②造模前后每组随机取 3 只大鼠尾静脉取血进行 ELISA 检测,大鼠血清 FSH、LH 水平升高, E_2 水平降低。

1.4 干预方法

针刺组:予“秩边”透“水道”针刺干预,穴位定位参照《实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分:大鼠》^[10]结合人体穴位定位及解剖位置。将大鼠俯卧位固定四肢,选用 $0.18 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$ 一次性针灸针从“秩边”穴(在大鼠臀部外侧,股骨大转子与第四荐骨连线中点的骨性缝隙处)刺向同侧“水道”穴(剑突至耻骨联合上缘上 2/3 与下 1/3 交界处下 25 mm,正中线上旁开 8 mm)方向,高频率、小幅度捻转进针,深度约 12 mm,施捻转平补平泻法 1 min,留针 30 min,每日 1 次,共针刺 4 周。

药物组:选用戊酸雌二醇片用 0.9%氯化钠溶液配制成浓度为 0.01 mg/mL 溶液,按照 $0.09 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量灌胃,每日 1 次,共 4 周。

空白组、模型组只进行同样的抓取固定,不进行其他干预。

1.5 观察指标及检测方法

(1) 大鼠一般情况

从造模之日起每日称量大鼠体质量并记录,观察大鼠躯体形态、毛发、精神、进食、二便、口鼻分泌物情况。

(2) 大鼠动情周期检测

每组随机选取 9 只大鼠,充分暴露阴道口,采用移液枪吸取 100 μL 0.9%氯化钠溶液,将枪头轻插入大鼠阴道内(深度约 1 cm),反复吹打 3 次后吸出少量分泌物,均匀涂在载玻片(范围约 $1.5 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$)上。晾干进行 HE 染色:苏木素染色 6~8 min、冲洗、1%盐酸乙醇溶液分化 2~4 s、冲洗、0.2%氨水溶液浸

泡 45~60 s、伊红染色 3~5 min,晾干后置于光学显微镜下观察。参照文献[11-12],大鼠正常动情周期 4~5 d 为 1 个周期(动情前期-动情期-动情后期-动情间期),4 个阶段是规律、连续、周期性的过程,阴道脱落的细胞随周期逐渐转变。

(3) 取材

所有大鼠于干预结束后次日取材,每组随机选取 9 只大鼠,腹主动脉取血,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 2 h,3 000 r/min 离心(离心半径 6 cm)15 min 后取上清,保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于 ELISA 检测;每组随机选取 9 只大鼠取双侧卵巢,左侧卵巢浸于组织固定液中保存用于形态学检测,右侧卵巢用锡纸包裹置于冻存管中,经液氮处理后保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于蛋白检测。

(4) ELISA 法检测大鼠血清 FSH、LH、 E_2 水平

按照 ELISA 试剂盒说明书,进行标准品的稀释;分别设置空白孔、样品孔、待测样品孔,标准品孔中加入不同浓度的标准品 50 μL ,待测样品孔先加入样品稀释液 40 μL ,然后再加 10 μL 的待测样品,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中 30 min;洗涤后甩干,重复 5 次;每孔加入 50 μL 酶标试剂(除空白孔外),封板 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;洗涤后甩干,重复 5 次;加入显色剂 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 min,加入终止液 50 μL 终止反应;检测各孔吸光度值,绘制标准曲线,计算 FSH、LH、 E_2 水平。

(5) HE 染色法观察大鼠卵巢组织形态

取固定的大鼠卵巢组织常规脱水、透明、浸蜡、包埋后,制成厚度为 4 μm 的切片。常规脱蜡、水化后进行苏木素-伊红染色:苏木素染色 5~8 min、冲洗 1~2 min、1%盐酸乙醇溶液分化 5 s、冲洗 1 min、0.2%氨水溶液浸泡 15 s、冲洗 1 min、伊红染色 4~5 min、冲洗 1~2 min,显微镜下观察染色情况后脱水透明,中性树脂封片,晾干后置于显微镜下观察、拍照。

(6) 免疫组化法检测大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 阳性表达

取上述大鼠卵巢组织切片常规脱蜡至水,滴加内源性过氧化物酶阻断剂,孵育 10 min,双蒸水清洗;将切片放入 EDTA 抗原修复液于微波炉中加热修复抗原;滴加 5%BSA 封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;滴加一抗(稀释比例均为 1:100)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;取出后 37 $^{\circ}\text{C}$ 复温 30 min, PBS 冲洗;滴加 HRP-羊抗兔二抗(1:100),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 冲洗;滴加 DAB 显色液镜下观察,控制反应时间;滴加苏木素室温孵

育 2 min, PBS 冲洗; 碱性溶液返蓝; 中性树胶封片; 显微镜下观察、拍照(棕黄色即为阳性表达), Image-Pro Plus 6.0 软件分析平均吸光度值。

(7) Western blot 法检测大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 蛋白表达

取 100~200 mg 卵巢组织切碎, 每 100 mg 样本加入 1 mL 的 RIPA 裂解液, 研磨匀浆裂解, 10 000 r/min 离心(离心半径 12.5 cm) 10 min, 取上清; BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白浓度统一为 3 mg/mL, 提取蛋白浓度小于 3 的直接加 1/4 体积的 5× 上样缓冲液, 将上样液于 100 ℃ 沸水中煮沸 5 min, 使蛋白变性, 冰上骤冷, 即为实验所用蛋白样本。将制好的凝胶置于电泳槽中, 经电泳、转膜、封闭后, 加入相应抗体(稀释比例均为 1:1 000), 摇床 4 ℃ 过夜, 洗膜; 然后加入 HRP-羊抗兔二抗(1:5 000), 摇床室温孵育 2 h, 洗膜; ECL 发光显色后, 置印迹膜于成像分析仪自动成像, 分析蛋白条带灰度值。

1.6 统计学处理

数据采用 SPSS26.0 软件进行统计分析, 使用 Graphpad Prism 9.0 软件生成统计图。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐者组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验; 组内比较采用重复测量方差分析。计数资料采用频数或百分数表示, 组间比较采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

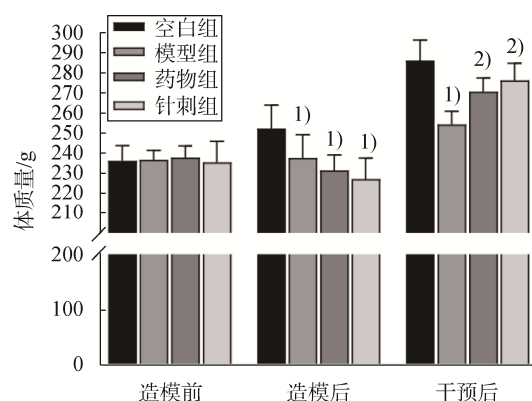
2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

造模前各组大鼠无弓背蜷缩, 毛发光亮、柔顺, 灵活、喜动, 进食正常, 大便黑褐色、卵圆形、光滑, 口鼻无异常分泌物。造模后, 除空白组外, 其他各组大鼠躯体瘦长、弓背蜷缩, 毛发散乱、干焦、脱毛, 精神萎靡、喜静、易激惹, 进食减少, 小便增多、大便稀软不成形, 较空白组更换垫料次数增多, 活动减

少, 唇周紫黑, 口鼻异常分泌物增多、偶见涕血。干预后, 针刺组、药物组大鼠大便逐渐成形, 口鼻异常分泌物减少。

造模前, 各组大鼠体质量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。造模后, 与空白组比较, 其他各组大鼠体质量降低 ($P < 0.01$), 其他各组间体质量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。干预后, 与空白组比较, 模型组大鼠体质量降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 针刺组、药物组大鼠体质量升高 ($P < 0.01$); 针刺组与药物组大鼠体质量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。



注: 与空白组同时时间点比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组同时时间点比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠造模前后及干预后体质量比较 ($\bar{x} \pm s$, 12 只鼠/组)

2.2 各组大鼠动情周期比较

大鼠正常动情周期表现见图 2。动情前期: 主要为圆形或椭圆形有核细胞, 细胞核呈紫蓝色, 细胞质呈淡红色, 也可见无核角化细胞, 呈淡红色; 动情期: 为满视野的淡红色不规则片状无核角化细胞; 动情后期: 主要为有核细胞、无核角化细胞和白细胞同时存在, 白细胞和有核细胞呈紫蓝色, 无核角化细胞呈淡红色; 动情间期: 主要为大量白细胞和少量无核角化细胞, 白细胞呈紫蓝色, 无核角化细胞呈淡红色。

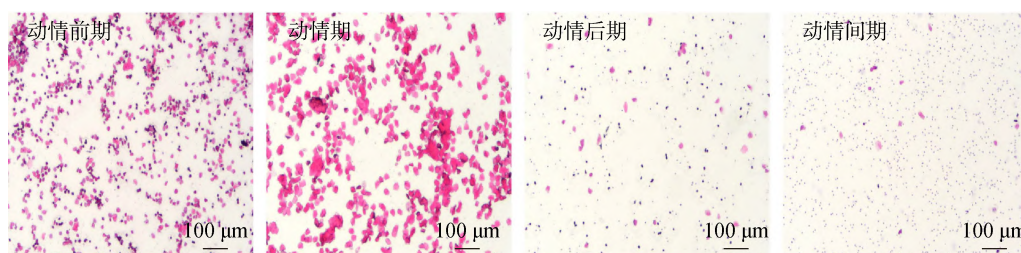


图 2 大鼠正常动情周期表现 (HE 染色)

造模后, 空白组大鼠动情周期规律转变; 其余各组大鼠均发生动情周期紊乱, 主要表现为周期停滞、

延长或无明显周期改变。干预后, 与空白组比较, 模型组大鼠动情周期紊乱率升高 ($P < 0.01$); 与模型

组比较, 针刺组、药物组大鼠动情周期紊乱率降低 ($P < 0.01$); 针刺组与药物组动情周期紊乱率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠干预后动情周期比较

组别	鼠数	正常	紊乱	动情周期紊乱率/%
空白组	9	9	0	0
模型组	9	1	8	88.9 ¹⁾
药物组	9	6	3	33.3 ²⁾
针刺组	9	7	2	22.2 ²⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 各组大鼠血清 FSH、LH、E₂ 水平比较

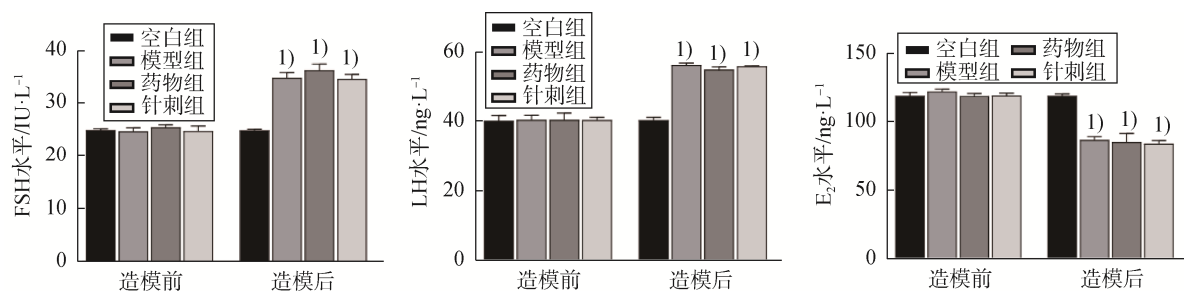
造模前, 各组大鼠血清 FSH、LH、E₂ 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 造模后, 与空白组比较, 其他各组大鼠血清 FSH、LH 水平升高 ($P < 0.01$), E₂ 水平降低 ($P < 0.01$), 结合动情周期, 表明 POI

大鼠模型复制成功。见图 3。

干预后, 与空白组比较, 模型组大鼠血清 FSH、LH 水平升高 ($P < 0.01$), E₂ 水平降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 针刺组、药物组大鼠血清 FSH、LH 水平降低 ($P < 0.01$), E₂ 水平升高 ($P < 0.01$); 针刺组与药物组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

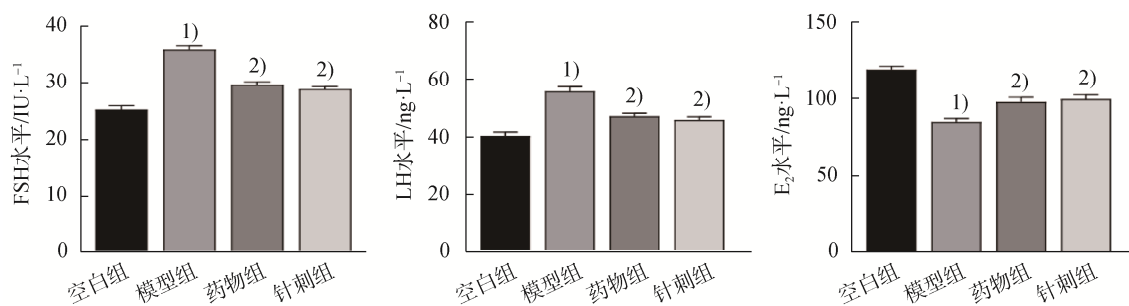
2.4 各组大鼠卵巢组织形态比较

空白组大鼠卵巢可见大量各级卵泡(原始、初级、次级、窦状卵泡)和黄体, 细胞核完整可见, 颗粒细胞层丰富、排列规则, 闭锁卵泡较少, 卵巢的皮质和髓质清晰可辨; 与空白组比较, 模型组大鼠各级卵泡减少, 生长卵泡较少, 闭锁卵泡增多, 颗粒细胞排列无规则; 与模型组比较, 针刺组、药物组大鼠卵巢生长卵泡(初级、次级卵泡)明显增多。见图 5。



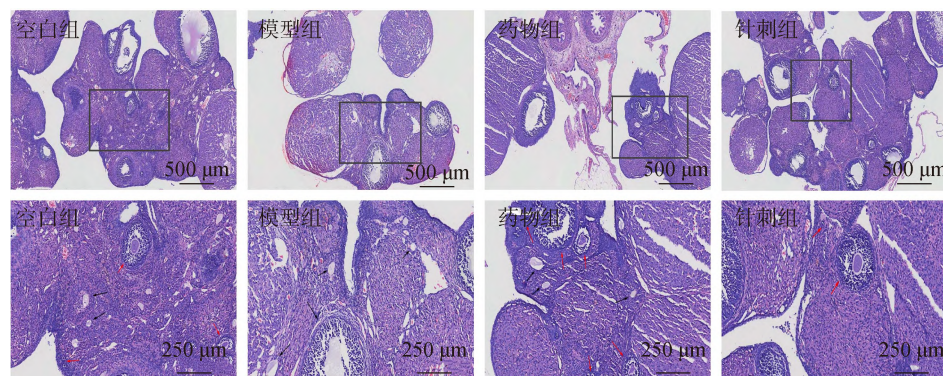
注: 与空白组比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

图 3 各组大鼠造模前后血清 FSH、LH、E₂ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, 3 只鼠/组)



注: 与空白组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 4 各组大鼠干预后血清 FSH、LH、E₂ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, 9 只鼠/组)



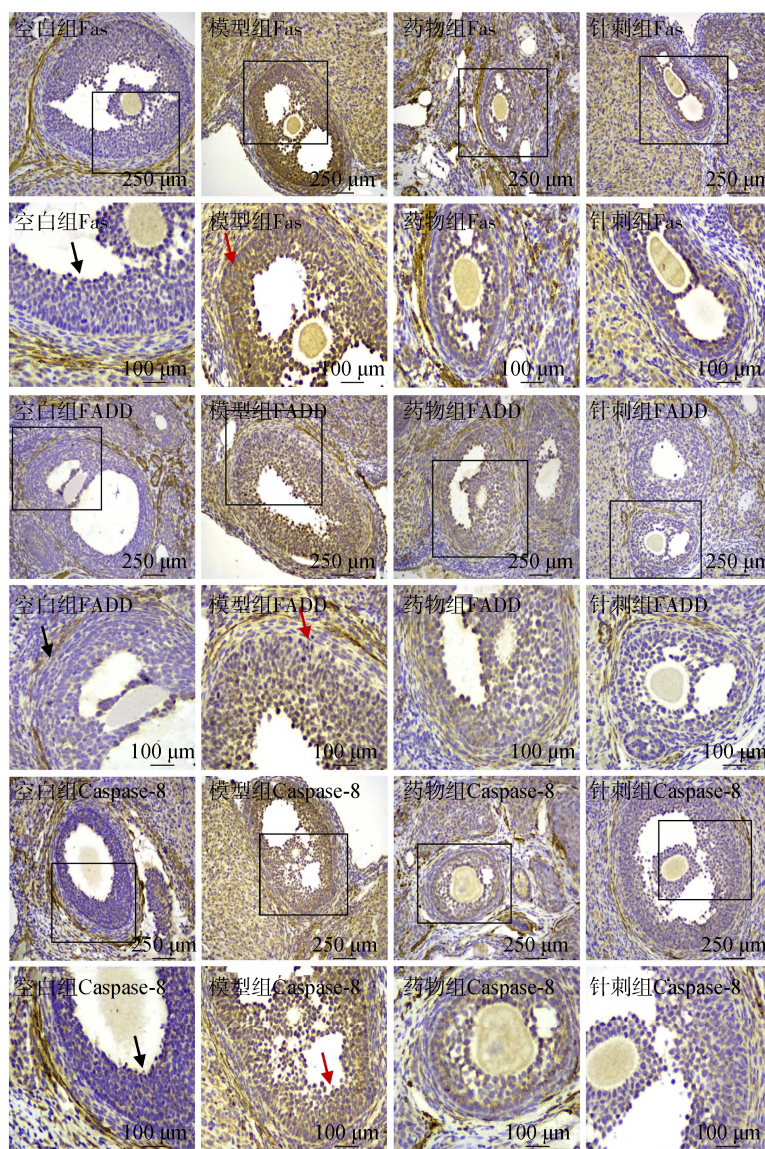
注: 第二行为第一行方框区域的放大图。红色箭头示正常各级卵泡, 黑色箭头示闭锁卵泡。

图 5 各组大鼠卵巢组织形态比较 (HE 染色)

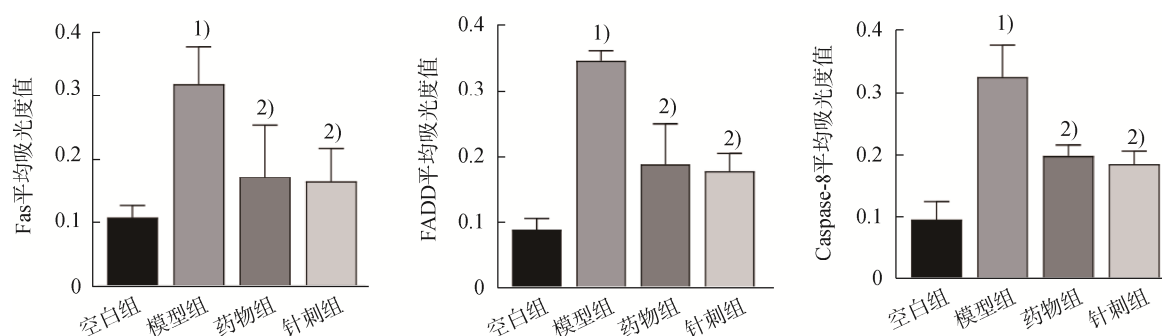
2.5 各组大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 阳性表达比较

Fas、FADD、Caspase-8 在卵巢颗粒细胞、卵母细胞及卵巢间质中均有表达,呈棕黄色或黄色。空白组大鼠卵巢组织颗粒细胞层 Fas、FADD、Caspase-8 阳性表达较弱,

染色较浅,呈浅黄色;与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 阳性表达增强 ($P<0.01$);与模型组比较,针刺组和药物组卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 阳性表达减弱 ($P<0.01$);针刺组与药物组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 6。



注:免疫组化染色。每个指标的第二行为第一行方框区域的放大图。黑色箭头示阴性表达,红色箭头示阳性表达。



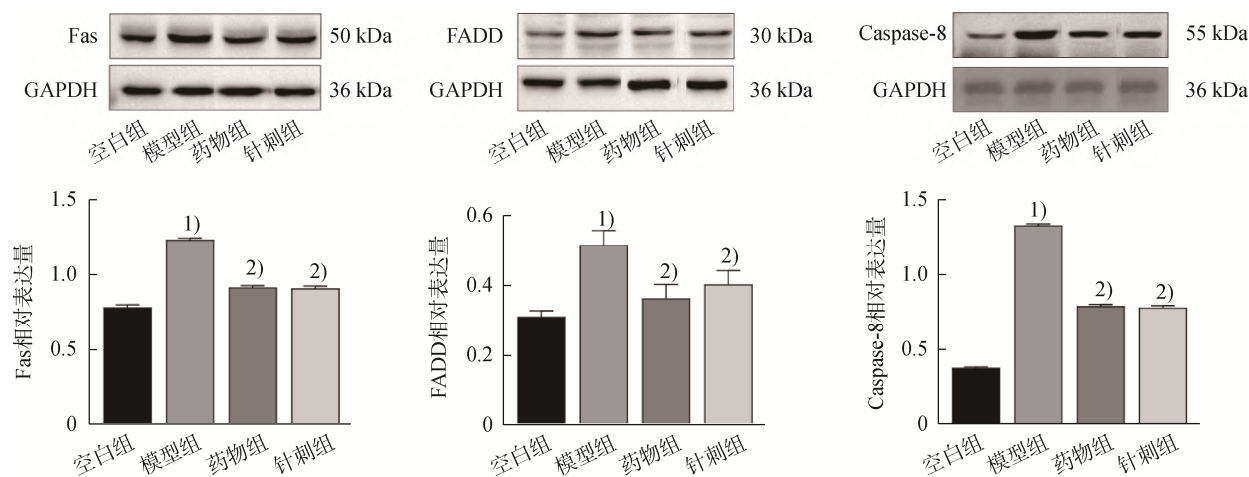
注:与空白组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较,²⁾ $P<0.01$ 。

图 6 各组大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 阳性表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 9 只鼠/组)

2.6 各组大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 蛋白表达比较

与空白组比较, 模型组大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与

模型组比较, 针刺组、药物组大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 针刺组与药物组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 7。



注: 与空白组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 7 各组大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 9 只鼠/组)

3 讨论

根据早发性卵巢功能不全 (POI) 的发病特点, 可将其归属于中医学“血枯”“闭经”“经水早断”“不孕”等范畴。中医学认为 POI 是由先天不足、气血亏虚、邪气外侵和情志失调等多种病因引起的多脏腑功能失调, 以肾虚为根本, 病变涉及心肝脾, 其主要病理因素为气滞、痰凝、血瘀^[13]。POI 的治疗选择有限, 激素替代疗法仍然是首选治疗方法, 体外激活、线粒体激活技术及干细胞、外泌体治疗等新一代的治疗方法还处于实验阶段^[14]。秩边和水道分别为足太阳膀胱经和足阳明胃经腧穴, 主治泌尿生殖系统等疾病。从解剖角度来讲^[15], 秩边透水道由秩边刺向同侧水道方向, 透过皮层、筋膜、肌层抵达盆腔深部, 刺激盆丛神经, 通过穴位刺激深层血脉、经络, 可收一针双穴之效, 使经络感传及气至病所, 疏通气血, 调节脏腑及冲任功能, 从而缓解患者相关临床症状^[7,16]。

《早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识》^[1]将血清 FSH、LH、E₂水平作为评价卵泡质量的重要指标, FSH 和 LH 可促进女性卵巢卵泡的发育、排卵和 E₂的合成, 影响卵泡生长。而卵巢分泌的雌孕激素和下丘脑、垂体分泌的促性腺激素为互反馈调节作用, 共同促进卵泡的生长、发育和成熟^[17-18]。本实验结果表明, 腹腔注射环磷酰胺后大鼠动情周期紊乱, 血清 FSH、LH 水平升高, E₂水平降低, 与 POI

患者临床症状相符, 表明模型复制成功; “秩边”透“水道”针刺干预后, FSH、LH 水平降低, E₂水平升高, 说明“秩边”透“水道”针刺能有效调节 POI 大鼠血清性激素水平。

细胞凋亡的外源性信号通路是由死亡受体介导的, 死亡受体属于肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 家族^[19]。其介导的信号转导途径主要有 3 条^[20-21], 本实验主要对死亡受体途径之一 Fas/FasL 信号通路进行探究。Fas/FasL 通路是肿瘤坏死因子受体家族的重要成员, 广泛存在于多种组织细胞中, 尤其在成熟卵巢组织中表达较多^[22]。Fas 和 FasL 结合激活的受体与 FADD 结合, 形成 Fas/FADD/Caspase-8 组成的死亡诱导信号复合物^[23-24], 从而激活 Caspase-8。激活的 Caspase-8 一方面进一步激活其同源酶家族的下游关键效应酶 Caspase-3, 引发卵巢颗粒细胞凋亡^[25]; 另一方面也可以通过线粒体依赖途径进一步激活 Bcl-2 家族成员促凋亡蛋白 Bid, 致使线粒体外膜透化触发下游机制, 释放细胞色素 c 和第二线粒体衍生胱天蛋白酶激活剂到胞质溶胶中, 与接头蛋白凋亡蛋白激活因子-1 和 Caspase-9 前体结合, 形成凋亡体信号复合体激活效应器 Caspase 蛋白酶, 如此不断传递凋亡信号加强诱导靶细胞快速凋亡^[26]。

针灸不仅可以调节人体内分泌及代谢水平, 减缓卵巢颗粒细胞凋亡; 还能通过延缓细胞的凋亡, 调节卵巢颗粒细胞的分泌功能, 调控卵泡的发育, 延缓

卵巢储备功能衰竭,降低 POI 的发生率。如曹俊红^[27]、马晓芃等^[28]通过对围绝经期大鼠施予针刺(“肾俞”“足三里”及“三阴交”),发现针刺能够上调卵巢颗粒细胞 Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达、下调 Fas 蛋白及 mRNA 表达,抑制颗粒细胞凋亡,延缓围绝经期大鼠卵泡闭锁进程。本实验结果表明,POI 大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 表达升高,免疫组化和 Western blot 两种检测方法结果一致。通过“秩边”透“水道”针刺和戊酸雌二醇干预后,POI 大鼠卵巢组织 Fas、FADD、Caspase-8 表达降低,说明“秩边”透“水道”针刺与戊酸雌二醇干预疗效相当,能够有效抑制 Fas/FADD/Caspase-8 死亡诱导信号复合物的形成,从而减缓 POI 大鼠卵巢颗粒细胞凋亡进程,减少卵泡闭锁发生,改善卵巢功能。颗粒细胞凋亡引发卵泡闭锁是 POI 的重要发病机制,其主要通过线粒体(内在)和死亡受体(外在)两种途径实现。前期实验^[8,29]发现“秩边”透“水道”针刺可以通过上调 Bcl-2 以及下调 Bax 蛋白水平延缓颗粒细胞凋亡改善卵巢功能。结合本研究结果,可以推测“秩边”透“水道”针刺可能还通过调节外源性凋亡途径 Fas/FADD/Caspase-8 通路抑制卵巢颗粒细胞凋亡,从而改善卵巢功能。

综上所述,“秩边”透“水道”针刺可调节 POI 大鼠血清性激素水平,改善 POI 大鼠卵巢功能,其机制可能为下调死亡受体通路 Fas/FADD/Caspase-8 表达水平以提高卵巢颗粒细胞抗凋亡能力。

参考文献

- [1] 陈子江,田秦杰,乔杰,等.早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识[J].中华妇产科杂志,2017,52(9):577-581.
- [2] Monniaux D, Huet C, Pisselet C, et al. Mechanism, regulation, and manipulations of follicular atresia[J]. Contracept Fertil Sex, 1998, 26(7/8): 528-535.
- [3] 王恬,王世宣.早发性卵巢功能不全的临床诊疗新进展[J].实用妇产科杂志,2021,37(10):723-726.
- [4] Meirow D, Biederman H, Anderson RA, et al. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction[J]. Clin Obstet Gynecol, 2010, 53(4): 727-739.
- [5] 薛晴,曾诚,周应芳.妇科手术及放化疗与卵巢早衰[J].中国实用妇科与产科杂志,2015,31(8):713-717.
- [6] 王聪,王一腾,魏鑫.环磷酰胺的临床应用现状[J].临床和实验医学杂志,2008,7(8):179,181.
- [7] 郝重耀,张天生,金晓飞,等.“秩边透水道”针法体系的临床应用与拓展[J].中国中医基础医学杂志,2015,21(11):1433-1434.
- [8] 马梦娜,司徒弘,金晓飞,等.“秩边透水道”针法调控早发性卵巢功能不全大鼠颗粒细胞凋亡的作用[J].时珍国医国药,2022,33(2):495-498.
- [9] 付霞霏,何援利.化疗所致卵巢早衰动物模型的建立[J].广

- 东医学,2008,29(12):1952-1954.
- [10] 中国针灸学会.实验动物常用穴位名称与定位第2部分:大鼠[J].针刺研究,2021,46(4):351-352.
- [11] Ajayi AF, Akhigbe RE. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update[J]. Fertil Res Pract, 2020, 6: 5.
- [12] 张森,王新,韦旭斌,等.大鼠发情周期各阶段的阴道细胞变化观察[J].动物医学进展,2006,27(2):69-72.
- [13] 宋佳玲,王铁蓉.中医治疗早发性卵巢功能不全研究现状[J].江西中医药,2020,51(6):77-80.
- [14] Huang QY, Chen SR, Chen JM, et al. Therapeutic options for premature ovarian insufficiency: an updated review[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2022, 20(1): 28.
- [15] 刘宝贵,冀来喜,郝重耀,等.秩边透水道针法治疗慢性前列腺炎的解剖学基础[J].中国针灸,2001,21(2):91-93.
- [16] 王海军,曹玉霞,姬俊强,等.“秩边透水道”针法治疗女性压力性尿失禁:随机对照研究[J].中国针灸,2020,40(10):1061-1064.
- [17] 刘冬娥.妇科性激素调节机制[J].中国实用妇科与产科杂志,2000,16(9):530-532.
- [18] 王洪雪,高杰,崔艳艳,等.围绝经期抑郁症与下丘脑-垂体-卵巢轴关系的研究进展[J].广西医学,2021,43(4):484-486,502.
- [19] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation[J]. Science, 1998, 281(5381): 1305-1308.
- [20] Hu R, Du QM, Yin XY, et al. Agonist antibody activates death receptor 6 downstream signaling involving TRADD recruitment[J]. FEBS Lett, 2014, 588(3): 401-407.
- [21] Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks[J]. Nat Immunol, 2009, 10(4): 348-355.
- [22] 李雨颖,邵喜英,金莉婷,等.川楝素通过 Fas/FasL 信号通路诱导人卵巢癌细胞凋亡[J].中国中西医结合杂志,2019,39(9):1089-1094.
- [23] Kelkar RL, Dharma SJ, Nandedkar TD. Expression of Fas and Fas ligand protein and mRNA in mouse oocytes and embryos[J]. Reproduction, 2003, 126(6): 791-799.
- [24] Gao JY, Zhao YN, Wang CX, et al. A novel synthetic chitosan selenate (CS) induces apoptosis in A549 lung cancer cells via the Fas/FasL pathway[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 158: 689-697.
- [25] Fouqué A, Debure L, Legembre P. The CD95/CD95L signaling pathway: a role in carcinogenesis[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1846(1): 130-141.
- [26] Schug ZT, Gonzalez F, Houtkooper RH, et al. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(3): 538-548.
- [27] 曹俊红.针刺对围绝经期大鼠卵巢颗粒细胞凋亡及 Bcl-2、Fas 蛋白表达的影响[J].中国老年学杂志,2016,36(19):4714-4716.
- [28] 马晓芃,戴明,吴焕淦,等.针刺对围绝经期大鼠卵巢颗粒细胞凋亡及相关基因表达的影响[J].中国针灸,2007,27(5):357-361.
- [29] 马梦娜,司徒弘,金晓飞,等.“秩边”透“水道”针法对早发性卵巢功能不全大鼠 HPO 轴和 Bcl-2、Bax 蛋白的影响研究[J].针灸临床杂志,2022,38(9):60-65.

(收稿日期:2022-03-01,网络首发日期:2023-02-08,编辑:张金超)