



论文

六味地黄苷糖对悬吊应激小鼠生殖内分泌及免疫系统的影响

谢兴振[†], 迟晓丽[†], 周文霞^{*}, 马渊, 张永祥

军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

[†] 同等贡献^{*} 联系人, E-mail: zhouwx@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2011-07-15; 接受日期: 2011-08-20

国家“重大新药创制”科技重大专项(批准号: 2009ZX09301-002)和国家自然科学基金(批准号: 90709012, 30772562 和 30701073)资助项目

摘要 目前尚无有效可靠的抗应激药物. 传统的补益中药六味地黄汤(LW)对多种类型应激所致内分泌和免疫平衡失调具有明显调节作用, 但目前已上市的 LW 成药缺乏可靠的质量控制方法, 其临床疗效的可靠程度难以估测. 本课题组在前期研究中以免疫和内分泌活性评价为导向, 从 LW 中追踪分离并组成了质量可控且安全性好的六味地黄苷糖(LW-AFC). 本文观察了悬吊应激雌性小鼠生殖内分泌及免疫系统的变化及 LW-AFC 的影响. 结果表明, 悬吊应激小鼠皮质酮升高, 动情期缩短、动情间期延长, 垂体 LH 下降, 动情间期血清 E₂ 升高; 脾细胞培养上清 IgG 含量明显降低; 口服 LW-AFC 能显著降低血清皮质酮, 升高垂体 LH, 且 LW-AFC 能明显降低动情间期血清 E₂, 并能明显增强脾细胞 IgG 分泌能力. 这提示, 悬吊应激可导致雌性小鼠生殖内分泌功能紊乱以及免疫功能下降, 口服 LW-AFC 具有明显调节作用, 对应激所致生殖内分泌功能紊乱以及免疫功能下降具有潜在防治作用.

关键词应激
下丘脑-垂体-卵巢轴
六味地黄苷糖
促黄体生成素
雌二醇
IgG

当今社会生活节奏加快、竞争压力增加、环境恶化, 人们身心经受着越来越复杂的考验, 应激(stress)已成为不可忽视的威胁人类健康的因素. 现有研究表明应激对健康具有双重作用: 适当应激能动员机体非特异性适应系统, 提高机体的适应能力; 而过度应激则可能导致生殖内分泌功能紊乱、免疫系统发生渐进性的抑制或衰退^[1-3], 最终会导致更年期综合征、消化性溃疡、高血压等一些疾病. 因此, 研究应激对生殖内分泌和免疫系统的影响, 对了解应激性生殖内

分泌系统及免疫系统的变化规律, 从改善或调节性生殖内分泌及免疫功能紊乱的角度寻找有效的抗应激药物具有重要意义.

目前抗应激药物多为对症治疗药物, 如开展心理卫生教育和训练、补充氨基酸等, 这些方法能在一定程度上缓解某些应激症状, 但对应激所致的生殖内分泌和免疫功能紊乱却疗效甚微. 传统的补益中药六味地黄汤(LW)是滋补肾阴的经典名方, 临床上用于多种生殖内分泌相关疾病及机体免疫功能下降^[4,5],

具有开发成为抗应激药物的良好前景. 但目前已上市的 LW 成药剂型几乎都是粗制剂, 缺乏可靠的质量控制方法, 其临床疗效的可靠程度难以估测. 可见, 研制疗效稳定、能够进行可靠质量控制的新药对于抗应激药物研制具有十分重要的现实意义. 我们以免疫、内分泌活性评价为导向, 从 LW 中分离获得了多个活性成分及活性成分群, 并组成六味地黄汤活性成分(群)复方, 即六味地黄苷糖(LW-AFC). 研究表明 LW-AFC 安全、稳定且质量可控, 有望开发成为新型抗应激中药新药. 本研究观察了 LW-AFC 对慢性应激雌性小鼠性周期、生殖内分泌系统各环节激素水平及免疫系统的影响, 阐明其干预生殖内分泌系统和免疫功能的作用及其可能机制, 为将 LW-AFC 开发成为新型抗应激中药新药提供依据.

1 材料与方法

1.1 药物

LW 和 LW-AFC: 熟地、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓购于北京同仁堂药店, 由本实验室制备, 制备方法见文献[5].

1.2 试剂

雌二醇检测试剂盒为天津协和生物技术研究产品, 小鼠促黄体生成素(LH)抗体购自美国 Santa cruz 公司, 辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.3 动物分组及给药

KM 小鼠, 雌性, 18~22 g, 军事医学科学院动物中心提供. 饲养室温度 18~22℃, 湿度 55%±2%, 动物自由进食和饮水. 按体重随机分为对照组、应激组、LW(10 g/kg)组和 LW-AFC(0.8, 1.6 和 3.2 g/kg)组, 每组 20 只, 各组每日予以相应剂量药物或蒸馏水灌胃, 连续 25 d.

1.4 悬吊应激模型制备

采用文献[6]的方法建立悬吊应激模型, 连续造模 25 d, 应激时间 14:00~19:00, 每日上午 8:00 取阴道涂片记录动情周期, 于实验第 25 d 取小鼠断头处死, 取垂体、双侧卵巢、胸腺和脾脏于液氮中冻存, 分离血清于-70℃冰箱冻存.

1.5 指标检测

1.5.1 动情周期检测

碱性美蓝染色法, 见文献[5].

1.5.2 雌二醇检测

放射免疫法检测雌二醇, 按试剂盒操作说明书进行.

1.5.3 免疫印记法检测垂体 LH 水平

将垂体称重后裂解制备总蛋白, 以 800 μg/孔上样, 于 15%聚丙烯酰胺凝胶中电泳(电压 60 V/100 V), 以 1.8 mA/cm² 半干转印 1 h, 5%脱脂奶粉封闭, 一抗 1:400, 二抗 1:600, 化学发光法显色, 底片曝光后扫描测定, 分析特异条带的灰度值变化.

1.5.4 ELISA 法检测小鼠脾细胞培养上清 IgG 水平

无菌取脾, 制备 5×10⁶ 个/mL 的脾细胞悬液, 用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 2.5 μg/mL)刺激, 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养 5 d 后离心取上清, ELISA 法检测培养上清中的 IgG 水平.

1.6 数据分析与统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 以 SAS 软件包(Release 8.0, Sas institute)进行单因素方差分析, SNK 检验进行各组间两两比较.

2 结果

2.1 LW-AFC 对悬吊应激小鼠血清皮质酮的影响

应用 ELISA 法检测 LW-AFC 对悬吊应激小鼠血清皮质酮(Cortisone)含量的影响. 结果表明, 与正常对照组比较, 悬吊应激 25 d 的小鼠血清皮质酮水平显著升高, 表明应激模型制备成功; 口服给予 LW 及 LW-AFC 1.6 g/kg 能明显逆转应激小鼠血清皮质酮含量的升高(表 1).

2.2 LW-AFC 对悬吊应激小鼠生殖内分泌系统的影响

2.2.1 LW-AFC 对悬吊应激小鼠动情周期的影响

连续悬吊 25 d, 应激组小鼠动情周期显著延长, 其中, 动情期明显缩短($P < 0.01$, 图 1(A)), 动情间期明

表 1 LW-AFC 对悬吊应激小鼠血清皮质酮水平的影响^{a)}

组别	剂量(g/kg)	n	皮质酮(ng/mL)
Con	—	10	287.1±19.7
Stress	—	9	333.1±41.3**
LW	10.0	10	296.9±22.0 [#]
LW-AFC	0.8	10	328.5±24.4
	1.6	9	294.6±22.1 [#]
	3.2	10	330.4±24.3

a) 数据用 $\bar{x} \pm SD$ 表示, **, $P < 0.01$, 与对照组比较; #, $P < 0.05$, 与应激模型组相比

显延长($P < 0.01$, 图 1(B)); 口服给予 LW 及 LW-AFC 有延长应激小鼠动情期, 缩短动情间期的趋势, 但无统计学意义。

2.2.2 LW-AFC 对悬吊应激小鼠血清雌二醇的影响

连续悬吊 25 d 可明显升高动情间期小鼠血清雌二醇水平($P < 0.01$, 图 2(B)), 而对动情期小鼠血清雌二醇

水平无明显影响(图 2(A)). 口服给予 LW 及 LW-AFC 0.8, 1.6 和 3.2 g/kg 均能明显降低动情间期悬吊应激小鼠血清雌二醇水平, 与应激组比较差别显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 2(B)).

2.2.3 LW-AFC 对悬吊应激小鼠垂体 LH 水平的影响

与正常对照组比较, 连续悬吊 25 d, 应激小鼠垂体 LH 水平明显下降. 连续口服给予 LW 及 LW-AFC 0.8 g/kg 能明显纠正悬吊应激小鼠垂体 LH 水平的下降($P < 0.01$, 图 3).

2.3 LW-AFC 对悬吊应激小鼠脾细胞培养上清 IgG 含量的影响

连续悬吊应激 25 d, 致 LPS 刺激与非刺激的应激小鼠脾细胞培养上清 IgG 含量明显降低, 而连续口服给予 LW 及各剂量 LW-AFC 均能明显促进应激小鼠脾细胞 IgG 分泌($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 4).

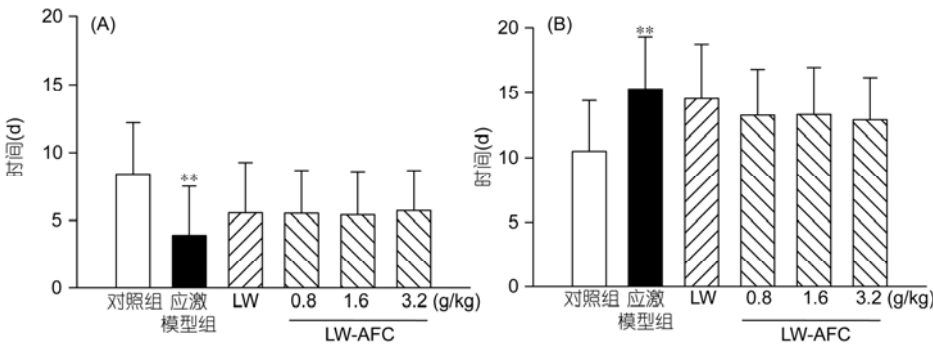


图 1 LW-AFC 对悬吊应激小鼠动情期及动情间期的影响

(A) 动情期; (B) 动情间期. $\bar{x} \pm SD$, $n=20$, **, $P < 0.01$, 与对照组相比

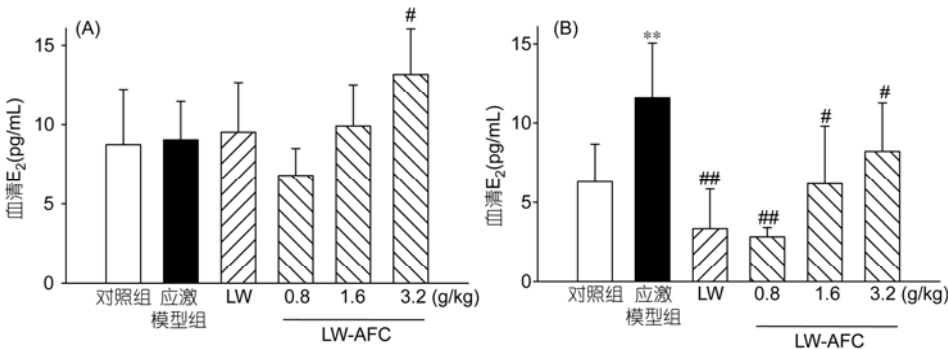


图 2 LW-AFC 对动情期及动情间期悬吊应激小鼠血清 E₂ 水平的影响

(A) 动情期; (B) 动情间期. $\bar{x} \pm SD$, $n=10$, **, $P < 0.01$, 与对照组相比; #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$, 与应激模型组相比

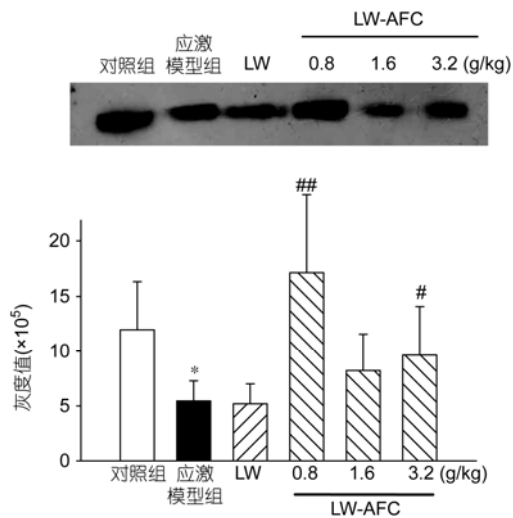


图3 LW-AFC对悬吊应激小鼠垂体LH水平的影响

$\bar{x} \pm SD$, $n=3$, *, $P<0.05$, 与对照组相比; #, $P<0.05$, ##, $P<0.01$, 与应激模型组相比

3 讨论

有研究表明, 悬尾法建立的心理应激模型动物存在较明显的生殖内分泌和免疫功能紊乱。例如, 悬吊应激可导致雄性小鼠血浆睾酮水平降低, 雌性小鼠性周期延长, 血清雌二醇水平显著降低^[7,8]。同时, 各种应激均会导致免疫功能紊乱^[9-11]。本实验进一步考察了悬吊应激对小鼠性周期组成、生殖内分泌系统激素尤其是对不同性周期状态下性激素的水平以及体液免疫功能的影响, 初步阐明 LW-AFC 干预生殖内分泌系统和免疫功能的作用及其可能机制, 为将 LW-AFC 开发成为新型抗应激中药新药提供实验依据。

应激反应的特征之一是下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能亢进, 应激过程中促肾上腺皮质激素释放激素及糖皮质激素的大量释放可在下丘脑、垂体、性腺各水平对生殖内分泌系统产生抑制作用^[12]。然而本研究发现悬吊应激对动情期血清 E_2 无明显影响, 反而显著升高了动情间期血清 E_2 水平, 考虑可能与长期应激导致下丘脑和垂体促性腺激素分泌或释放能力下降、引起雌激素水平代偿性升高有关, 研究结果发现应激小鼠垂体 LH 水平显著下降、动情周期延长、动情间期延长, 表明应激小鼠卵巢功能处于低下或紊乱状态, 也支持这一推测。有文献报道当应激强度处于耐受极限的 70%~75% 时, 血清性激素水平反而升高^[13], 与本研究结果类似, 但本研究结果进一步阐明了干预动情间期的性激素水平是应激状态下机体代偿性调节的主要环节, 而 LW-AFC 正是通过明显干预这一环节发挥对生殖内分泌系统的整体干预作用。

免疫系统在应激状态下主要以神经内分泌激素途径进行调节^[14], 应激对细胞免疫及体液免疫均产生抑制作用^[15,16]。本实验中应激小鼠脾细胞培养上清 IgG 含量明显降低, 提示其体液免疫功能下降, 其原因可能在于悬吊应激作为一种心理应激通过干预机体细胞免疫从而间接引起 B 淋巴细胞抗体生成能力的降低, 影响了机体体液免疫^[17,18], 最终导致机体免疫功能下降。而 LW-AFC 可通过明显升高脾细胞 IgG 分泌从而增强机体免疫功能。

本研究进一步阐明了悬吊应激所致的生殖内分泌和免疫功能紊乱的特点并分析了其可能的机制, 同时研究表明, LW-AFC 对应激所致机体生殖内分泌系统及免疫功能的紊乱具有良好的调节作用, 结合其主要成分明确、安全、稳定和质量可控的特点, 我们认为 LW-AFC 有望开发成为新型抗应激中药新药。

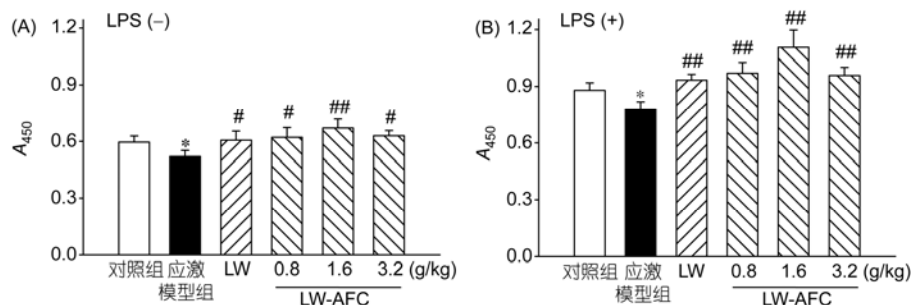


图4 LW-AFC对悬吊应激小鼠脾细胞培养上清IgG含量的影响

$\bar{x} \pm SD$, $n=3$, *, $P<0.05$, 与对照组相比; #, $P<0.05$, ##, $P<0.01$, 与应激模型组相比

参考文献

- 1 Pedersen B K, Tvede N. The immune system during exposure to extreme physiology conditions. *Int J Sports Med*, 1994, 15: s116-121
- 2 武妍, 周罗, 刘瑞琪, 等. 孕期应激对子代大鼠骨髓淋巴干细胞发育的影响. *现代生物医学进展*, 2011, 11: 368-370
- 3 Chu Z, Takagi H, Moenter S M. Hyperpolarization-activated currents in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons contribute to intrinsic excitability and are regulated by gonadal steroid feedback. *J Neurosci*, 2010, 30: 13373-13383
- 4 李继红. 六味地黄汤治疗更年期综合征 50 例报告. *中华中西医杂志*, 2005, 2: 68-69
- 5 马渊, 周文霞, 程军平, 等. 六味地黄汤调节皮质酮所致小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴紊乱作用的拆方研究. *中药药理与临床*, 2002, 18(增刊): 7-10
- 6 马渊, 周文霞, 马渊, 等. 六味地黄汤对悬吊应激小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴激素的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2002, 8: 18-21
- 7 连晓媛, 张均田. 重复应激造成小鼠性行为缺陷. *中国药理学通报*, 2004, 14: 273-274
- 8 连晓媛, 丁岩, 张均田. 应激性生殖内分泌功能低下动物模型. *中国新药杂志*, 1999, 8: 673-675
- 9 Bonea R H. Stress-induced modulation of the immune response. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 59: 253-269
- 10 Schmidt D, Reber S O, Botteron C, et al. Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th cell responses. *Brain Behav Immun*, 2010, 24: 1097-1104
- 11 Welsh C J, Steelman A J, Mi W. Effects of stress on the immune response to Theiler's virus—implications for virus-induced autoimmunity. *Neuroimmunomodulation*, 2010, 17: 169-172
- 12 孙露, 陶芳标. 孕期应激与早产的相关机制. *中国妇幼保健*, 2011, 26: 1110-1112
- 13 Sutton J, Coleman M, Casey G. Testosterone production rate during exercise. *Act Sci*, 2006, 72: 17-22
- 14 Dorshkind K, Horseman N D. Anterior pituitary hormones, stress and immune system homeostasis. *Bioessays*, 2006, 23: 288-294
- 15 Marshall G D, Agarwal S K. Stress, immune regulation, and immunity: Applications for asthma. *Allergy Asthma Proc*, 2005, 21: 241-246
- 16 傅涛, 郝选明, 刘智强. 运动应激对小鼠 T 淋巴细胞亚群和周期的影响. *内蒙古体育科技*, 2010, 23: 46-48
- 17 McEwen B S, Biron C A, Brunson K W, et al. The role of adrenocorticoids as modulates of immune function in health and disease: Neural, endocrine and immune interacts. *Brain Res Rev*, 1997, 23: 129-137
- 18 Hunzeker J T, Elftman M D, Mellinger J C. A marked reduction in priming of cytotoxic CD8⁺ T cells mediated by stress-induced glucocorticoids involves multiple deficiencies in cross-presentation by dendritic cells. *J Immunol*, 2011, 186: 183-194

LW-AFC Improved or Restored the Disturbance of Reproductive Endocrine and Immune Function in Stress-Loaded Mice

XIE XingZhen, CHI XiaoLi, ZHOU WenXia, MA Yuan & ZHANG YongXiang

Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

There are no effective and reliable anti-stress drugs. Traditional Chinese Medicine Liu Wei Di Huang Decoction (LW) can interfere with the various types of stress-induced endocrine and immune imbalance. However, traditional LW lacks reliable quality control methods, and the reliability of its clinical efficacy is difficult to estimate. In our previous study we evaluated the immune and endocrine activity of different parts from LW separation, and then formed LW-AFC which has satisfactory quality control, security and activity. In this paper, we observe the impact of LW-AFC on the reproductive endocrine and immune system of suspension-stressed female mouse. The results show that the stress increased the serum cortisone, reduced estrus cycle, prolonged diestrus, decreased the pituitary LH, but increased serum E2 on diestrus cycle, and IgG in spleen cell culture supernatant was significantly reduced after suspension stress. LW-AFC could significantly decrease the cortisone level, increase pituitary LH, lower serum E2 on diestrus cycle, and could significantly enhance the ability of spleen cells secreting IgG. These results suggest that stress can lead to reproductive endocrine disorders and decreased immune function, and oral administration of LW-AFC may significantly regulate the stress-induced reproductive endocrine disorders and decreased immune function, which might be developed as a potential new anti-stress drugs.

stress, hypothalamus-pituitary-ovary Axis, LW-AFC luteinizing hormone, estradiol, IgG

doi: 10.1360/052011-543