

补肾促排卵汤对多囊卵巢综合征模型 大鼠卵巢形态及性激素的影响

郭银华¹, 谈 勇², 邹奕洁¹

(1. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023)

【摘要】 目的 通过观察补肾促排卵汤对多囊卵巢综合征模型大鼠的性激素、抗苗勒氏管激素 (anti-Müllerian hormone, AMH)、卵巢形态的影响, 探讨补肾促排卵汤治疗多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 的作用机制。**方法** 应用补肾促排卵汤作用于以脱氢表雄酮诱导的 PCOS 大鼠模型, 对卵巢进行形态学分析并检测血清性激素、AMH。**结果** 与正常组相比, 模型组大鼠卵巢弥漫性囊性重度扩张, 可见大小不等的囊腔, 粒层细胞被挤压呈扁平或立方形, 黄体及各种发育阶段卵泡稀少。补肾促排卵汤能明显改善 PCOS 模型大鼠成熟卵泡个数、黄体个数、性激素及 AMH 水平, 与模型组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 补肾促排卵汤能改善 PCOS 模型大鼠血清性激素水平、降低血清 AMH 及恢复卵巢排卵功能, 从而达到治疗多囊卵巢综合征的作用。

【关键词】 多囊卵巢综合征模型大鼠; 补肾促排卵汤; 性激素; 抗苗勒氏管激素; 卵巢形态

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 12-0027-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.12.006

Effect of Bushencupailuan Decoction on ovarian morphology and sex hormone levels in rat models of polycystic ovary syndrome

GUO Yin-hua¹, TAN Yong², ZOU Yi-jie¹

(1. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Nanjing 210029, China;

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Nanjing 210023)

【Abstract】 Objective To explore the effect of Bushencupailuan decoction, a Chinese medicine formula, on polycystic ovary syndrome (PCOS) and its mechanism through observing the sex hormones, anti-Müllerian hormone (AMH) and the morphology of ovaries of PCOS rat models. **Methods** Bushencupailuan decoction was administered in DHEA-induced PCOS model rats. The pathology of ovaries was examined, and the serum sex hormones and AMH were detected. **Results** Compared with the normal group, the ovaries of model group rats had severe diffuse cystic dilatation and cystic cavities of different sizes. The granular layer cells were compressed into flat or cubical shapes. Corpora lutea and follicles in various stages of development were rare. Bushencupailuan decoction obviously improved the numbers of mature follicles and corpora lutea, levels of sex hormones and AMH of PCOS model rats compared with those of model rats ($P < 0.05$). **Conclusions** Bushencupailuan decoction can treat PCOS by improving the serum sex hormone levels in PCOS model rats, reduce serum AMH and help to restore ovulation.

【Key words】 Polycystic ovary syndrome, PCOS; Rat model; Bushencupailuan decoction; Sex hormones; Anti-Müllerian hormone, AMH; Morphology, ovary

[基金项目] 江苏省中医药局 2010 年度康缘中医药科技创新基金项目 (HZ1010KY)。

[作者简介] 郭银华 (1980 -), 女, 博士生在读, 副主任中医师, 从事生殖内分泌研究。E-mail: gyhwelcom@126.com。

[通讯作者] 谈勇 (1956 -), 女, 博士生导师, 主任中医师, 从事生殖内分泌研究。E-mail: xijun1025@163.com。

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是青春期及育龄女性生殖功能障碍及代谢异常的常见内分泌疾病, 以长期无排卵和持续高雄激素血症为主要特征, 其发病率为 5% ~ 10%^[1], 占无排卵性不孕的 75%。PCOS 的病因和发病机制至今仍不十分清楚, 其病理生理改变涉及的范围较为广泛, 可涉及神经、内分泌、卵巢局部调控因素的异常变化以及脂肪、糖、蛋白质代谢等。我科应用国医大师夏桂成教授的补肾促排卵汤治疗多囊卵巢综合征, 临床疗效较好。研究表明^[2,3]: 补肾促排卵汤治疗 PCOS, 可以改善卵泡质量、提高排卵率、增加子宫内膜厚度、改善子宫内膜形态、提高子宫内膜容受性, 从而提高周期妊娠率, 减少流产率, 改善妊娠结局。本研究旨在通过观察补肾促排卵汤对 PCOS 模型大鼠性激素、AMH 水平以及卵巢形态的影响, 探讨补肾促排卵汤治疗多囊卵巢综合征的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 21 日龄雌性 SD 大鼠 60 只。由上海斯莱克实验动物责任有限公司提供。生产许可证号: SCXK(沪)2007-0005, 实验动物使用许可证: SYXK(苏)2007-0031。

1.1.2 药品与试剂: 补肾促排卵汤 (炒当归、赤白芍、熟地黄、川断、菟丝子、鹿角片 (先煎)、丹皮、茯苓、山药各 10 克, 等), 由江苏省中医院中药房提供; 枸橼酸氯米芬片 (clomifene citrate capsules, CC), 高特制药有限公司; 脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA), 美国 IL 公司; 注射用大豆油, 广州汉方现代中药研究开发有限公司。睾酮 T (testosterone)、雌二醇 E₂ (estradiol)、卵泡生成激素 FSH (follicle stimulating hormone)、黄体生成激素 LH (luteinizing hormone)、抗苗勒氏管激素 AMH (anti-Mullerian hormone) ELISA Kit 96T, 购自上海联硕生物技术有限公司。樱花全自动真空组织脱水机, 型号 VIP5; 樱花包埋机, 型号 TECTM5; 樱花全自动染色机, 型号 DRS2000, 均购自日本樱花医疗集团。Thermo 半自动切片机, 型号 HM340E, 购自德国 Thermo Fisher Scientific 公司。Olympus 显微镜, 型号 BX41, 购自日本 Olympus 公司。

1.2 实验方法

21 日龄 SD 雌性大鼠, 共 60 只。随机分为正常对照组 10 只、PCOS 模型组 50 只。正常对照组予以常规饲养。PCOS 模型组的大鼠均于 21 日龄断乳,

标准大鼠颗粒饲料饲养。适应性饲养 2 d 后, 即大鼠 23 日龄开始, 颈背部皮下注射 DHEA 60 mg/kg/d, 连续 20 d, 所有大鼠均在注药的第 20 日 (即大鼠 42 日龄日) 20:00 开始禁食。并在注药的第 21 天早晨, 眼眶后静脉取血, 测血清 T、E₂、FSH、LH、AMH。大鼠动情周期阴道涂片的细胞变化特点如下: ①动情前期: 阴道涂片可见大量有核上皮细胞, 偶有少量角化上皮细胞; ②动情期: 阴道涂片可见满视野不规则的角化上皮细胞, 呈“落叶状”堆积, 少量有核上皮细胞; ③动情后期: 阴道涂片可见角化上皮细胞、白细胞、有核上皮细胞, 比例相当; ④动情间期: 阴道涂片可见大量白细胞, 少量有核上皮细胞和阴道黏液。

阴道涂片失去完整动情周期及血清 T 升高者, 为 PCOS 模型。按体重随机分为模型空白对照组 10 只、中药治疗组 10 只、CC 组各 10 只、中药 + CC 组各 10 只, 正常对照组 10 只。将其余大鼠剔除。正常对照组及模型空白对照组均给予正常颗粒饲料, 中药组予以补肾促排卵汤灌胃, CC 组予以枸橼酸氯米芬灌胃, 中药 + CC 组予以补肾促排卵汤及枸橼酸氯米芬灌胃。根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”计算, 补肾促排卵汤给药剂量为 11.16 g 生药/kg/d, 枸橼酸氯米芬给药剂量为 4.5 mg/kg/d, 各组均给药 12 d, 给药结束的次日, 空腹眼眶取血后处死, 取卵巢标本。

1.3 观察方法

(1) 血清 T、E₂、FSH、LH; (2) 血清 AMH; (3) 阴道涂片观察动情周期、取卵巢标本, HE 染色并在显微镜下计算成熟卵泡数及黄体数。成熟卵泡的标准: 卵泡腔很大, 卵丘很明显。卵泡内膜细胞紧靠卵泡颗粒层, 与颗粒层细胞之间有一层基膜相隔, 内膜细胞呈多边形, 胞质清亮, 胞核圆形, 细胞间可见许多毛细血管, 外膜细胞位于最外层, 多呈梭形, 与周围结缔组织分界不明显。可见放射冠。各指标进行组间对照。

1.4 统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 给药结束血清 E₂、T、LH、FSH、AMH 水平 (表 1)

与正常组比较, 模型组血清 T、E₂、AMH 水平均

显著提高 ($P < 0.01$), 而 LH、FSH 没有差异 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 中药组、CC 组、中药 + CC 组血清 T、E2、AMH 水平均显著下降 (除中药组 E2 与模型组比较 $P < 0.05$ 外, 其余数值 $P < 0.01$); 中药组与 CC 组比较, 血清 T、AMH 下降水平略差, 但均没有显著差异 ($P > 0.05$); 中药 + CC 组与中药组比较, 血清 T、LH 水平均显著下降 ($P < 0.01$), 血清 E2、FSH、AMH 水平均没有显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 卵巢 HE 染色 (图 1)

正常对照组的大鼠卵巢皮质部分, 可以见到不同发育阶段的卵泡、黄体及白体, 颗粒细胞形态完整, 排列较整齐, 没有见到细胞变性、坏死及炎细胞

浸润等病变, 卵巢髓质部分也无充血、水肿及炎细胞浸润等病变。模型组大鼠卵巢弥漫性囊性重度扩张, 可见大小不等的囊腔, 粒层细胞被挤压呈扁平或立方形, 黄体及各种发育阶段卵泡稀少。中药组、氯米芬组、中药 + CC 组卵巢弥漫性囊性轻度-中度扩张, 可见黄体及闭锁卵泡, 各种发育阶段卵泡轻度减少, 与模型组比较, 明显好转, 中药 + CC 组优于 CC 组, CC 组优于中药组。

2.3 成熟卵泡个数及黄体数量 (表 2)

每组观察统计了 10 个卵巢, 每个卵巢观察统计了 5 张切片。

表 1 给药结束血清 E2、T、LH、FSH、AMH 水平
Tab.1 The levels of serum E2, T, LH, FSH, and AMH after drug administration

组别 Groups	雌二醇 E2 (pg/mL)	睾酮 T (ng/mL)	促黄体生成素 LH (mIU/mL)	促卵泡生成素 FSH (mIU/mL)	抗苗勒氏管激素 AMH (ng/mL)
正常组 Normal	32.94 ± 4.19	0.59 ± 0.10	35.14 ± 2.00	15.29 ± 1.11	2.99 ± 0.60
模型组 Model	49.18 ± 3.18	0.78 ± 0.15	33.93 ± 1.46	15.22 ± 1.10	3.93 ± 0.63
中药组 Chin med	42.41 ± 8.21	0.60 ± 0.09	35.72 ± 2.30	15.20 ± 0.56	2.92 ± 0.63
CC 组	39.52 ± 7.85	0.58 ± 0.14	35.38 ± 1.76	14.86 ± 1.60	2.53 ± 0.47
中药 + CC 组 Chin med + CC	42.73 ± 5.77	0.50 ± 0.05	33.56 ± 1.06	15.09 ± 0.87	2.60 ± 0.73

注: 模型组与正常组血清 E2 比较, $P = 0.000$; 模型组与中药组血清 T 比较, $P = 0.003$; 模型组与中药组血清 AMH 比较, $P = 0.003$; 中药组与模型组血清 E2 比较, $P = 0.030$; 中药组与模型组血清 T 比较, $P = 0.003$; 中药组与模型组血清 AMH 比较, $P = 0.002$; CC 组与模型组血清 E2 比较, $P = 0.002$; CC 组与模型组血清 T 比较, $P = 0.004$; CC 组与模型组血清 AMH 比较, $P = 0.000$; 中药 + CC 组与模型组血清 E2 比较, $P = 0.006$; 中药 + CC 组与模型组血清 T 比较, $P = 0.000$; 中药 + CC 组与模型组血清 AMH 比较, $P = 0.000$; 中药 + CC 组与 CC 组血清 LH 比较, $P = 0.012$; 中药 + CC 组与中药组血清 T 比较, $P = 0.008$; 中药 + CC 组与中药组血清 LH 比较, $P = 0.015$ 。

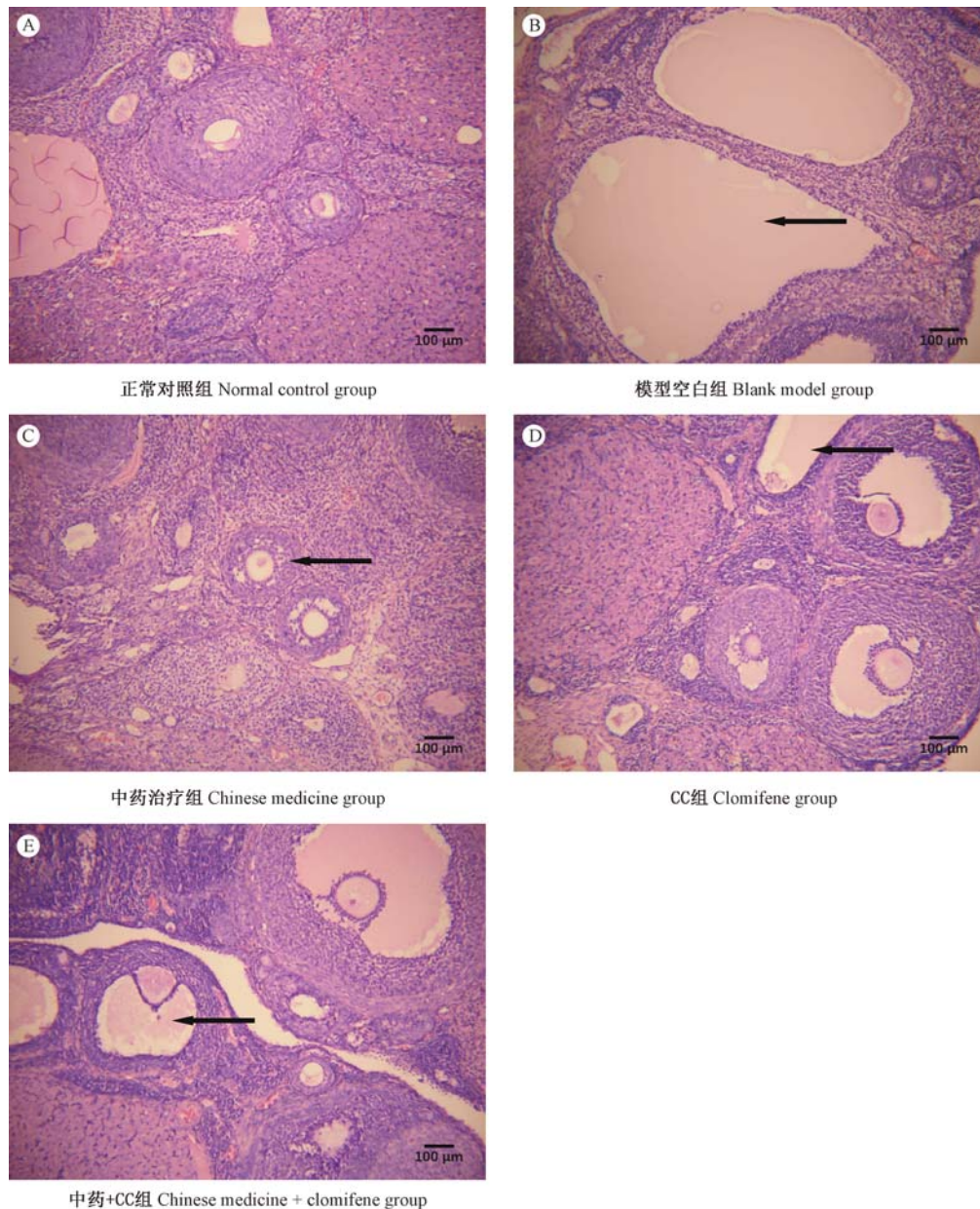
Note. E2 level in the model group vs. normal group, $P = 0.000$. Serum T level in the model group vs. Chinese medicine group, $P = 0.003$. Serum AMH level in the model group vs. Chinese medicine group, $P = 0.003$. Serum E2 level in the Chinese medicine group vs. model group, $P = 0.030$. Serum T level in the Chinese medicine group vs. model group, $P = 0.003$. Serum AMH level in the Chinese medicine group vs. model group, $P = 0.002$. Serum E2 level in the group CC vs. model group, $P = 0.002$. Serum T level in the group CC vs. model group, $P = 0.004$. Serum AMH level in the group CC vs. model group, $P = 0.000$. Serum E2 level in the Chinese medicine group vs. model group, $P = 0.006$. Serum T level in the Chinese medicine + CC group vs. model group, $P = 0.000$. Serum AMH level in the Chinese medicine + CC group vs. model group, $P = 0.000$. Serum LH level in the Chinese medicine + CC group vs. Chinese medicine group, $P = 0.008$. Serum T level in the Chinese medicine + CC group vs. Chinese medicine group, $P = 0.015$.

表 2 成熟卵泡数量及黄体数量
Tab.2 The quantity of mature follicles and corpora lutea in the rats

组别 Groups	正常组 Normal	模型组 Model	中药组 Chinese medicine	CC 组 Clomifene	中药 + CC 组 Chin med + clomifene
成熟卵泡数量 Number of mature follicles	3.90 ± 0.88	1.30 ± 0.48	2.10 ± 0.88	2.50 ± 0.53	3.10 ± 0.74
黄体数量 Number of corpora lutea	7.10 ± 1.37	2.90 ± 1.20	4.20 ± 1.03	4.50 ± 1.27	4.90 ± 1.20

注: 成熟卵泡数量: 模型组与正常组比较, $P = 0.000$; 中药组与模型组比较, $P = 0.021$; CC 组与模型组比较, $P = 0.000$; 中药 + CC 组与模型组比较, $P = 0.000$ 。黄体数量: 模型组与正常组比较, $P = 0.000$; 中药组与模型组比较, $P = 0.02$; CC 组与模型组比较, $P = 0.01$; 中药 + CC 组与模型组比较, $P = 0.002$ 。

Note. The quantity of mature follicles: Model group vs. normal group, $P = 0.000$; Chinese medicine group vs. model group, $P = 0.021$; Group CC vs. model group, $P = 0.000$; Chinese medicine group vs. model group, $P = 0.000$. The quantity of corpora lutea: Model group vs. normal group, $P = 0.000$; Chinese medicine group vs. model group, $P = 0.02$; Group CC vs. model group, $P = 0.01$; Chinese medicine + CC group vs. model group, $P = 0.002$.



注:箭头所指是卵泡。

图1 给药结束卵巢病理学改变(标尺 = 100 μm)

Note. Arrows indicate follicles.

Fig. 1 Pathological changes of the ovaries after drug administration(Bar = 100 μm)

与正常组比较,模型组成熟卵泡个数均显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,中药组成熟卵泡个数明显增加($P < 0.05$),而CC组、中药+CC组成熟卵泡个数均显著增加($P < 0.01$);中药组与CC组比较,成熟卵泡个数略少,但没有统计学显著差异($P > 0.05$);中药+CC组与CC组比较,成熟卵泡个数明显增加($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组黄体个数均显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,中药组黄体个数明显增加($P < 0.05$),而CC组、中药+CC

组黄体个数均显著增加($P < 0.01$);中药组与CC组比较,黄体个数略少,但没有统计学显著差异($P > 0.05$);中药+CC组与CC组比较,黄体个数略增加,但没有统计学显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

PCOS病理生理因素较为复杂,抗苗勒氏管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)属于转化生长因子b(transforming growth factor-beta, TGF-b)超家族

成员,在卵泡发育的启动和选择性生长中发挥了重要作用。AMH 的效应主要通过其 II 型受体——AMHR2 发挥作用,AMHR2 分布在苗勒氏管周围的间充质细胞和两性性腺,在女性卵巢中则主要表达于卵巢颗粒细胞(granulosa cells,GC),此外在窦前卵泡和小窦状卵泡内膜细胞中也检测到该受体的表达^[4]。AMH 作为卵巢重要的局部调节因子之一^[5],近年来成为了 PCOS 的发病机制的研究热点。

研究发现 AMH 仅与直径小于 2~5 mm 小窦状卵泡有关,过多的小窦状卵泡导致了 PCOS 患者血清 AMH 水平的显著升高^[6]。过高的 AMH 水平可使颗粒细胞将雄激素转化为雌激素的过程受到抑制,导致其卵巢局部出现了高雄激素的环境,抑制优势卵泡生成并又增加小窦卵泡,周而复始,形成恶性循环^[7],此外在体外细胞培养中,外源性 AMH 可以抑制原始卵泡的募集以及 FSH 诱导的卵泡生长发育,由此推断这可能就是 PCOS 卵泡停滞的机制。

目前研究发现,补肾活血类中药有使胰岛素、睾酮降低的作用以及促进排卵的作用^[8,9]。补肾活血类的中药利于子宫内膜的同步化^[10]。补肾促排卵汤是全国中医妇科名老中医夏桂成教授在补肾调周法中的主要验方,意在通过补肾,促使排卵。前期研究表明^[2,3]补肾促排卵汤治疗 PCOS 患者,可以改善卵泡质量、提高排卵率、增加子宫内膜厚度、改善子宫内膜形态、提高子宫内膜容受性,从而提高周期妊娠率,减少流产率,改善妊娠结局。

本研究发现,模型组血清 T、AMH 水平较正常组均显著提高($P < 0.01$),中药组、CC 组、中药 + CC 组血清 T、AMH 均较模型组显著下降($P < 0.01$);中药 + CC 组与中药组比较,血清 T、LH 显著下降($P < 0.01$),而血清 AMH 略有下降但没有显著差异($P > 0.05$),中药组与 CC 组比较,血清 T、AMH 下降水平没有显著差异($P > 0.05$)。在卵巢形态方面,中药组、CC 组、中药 + CC 组卵巢弥漫性囊性轻度-中度扩张,可见黄体及闭锁卵泡,各种发育阶段卵泡轻度减少,与模型组比较均明显好转,中药 + CC 组优于 CC 组,CC 组优于中药组。模型组成熟卵泡个数及黄体个数均较正常组显著减少($P < 0.01$);与模型组相比较,中药组优势卵泡个数、黄体个数明显

增加($P < 0.05$),而 CC 组、中药 + CC 组优势卵泡个数、黄体个数显著增加($P < 0.01$);中药 + CC 组与 CC 组比较,成熟卵泡个数明显增加($P < 0.05$),黄体个数略增加,但没有统计学显著差异($P > 0.05$),中药组与 CC 组比较,没有统计学显著差异($P > 0.05$)。由此推论,补肾促排卵汤可能是通过降低 PCOS 模型大鼠异常升高的血清 AMH,降低其血清雄激素水平,改善卵巢形态,促进了窦卵泡的募集,诱发恢复了排卵,从而起到了治疗 PCOS 的作用。

参考文献:

- [1] 吴效科,常惠,张颖,等.多囊卵巢综合征流行病学调查进展[J].科技导报,2010,28(21):101-105.
- [2] 郭银华,谈勇,邹奕洁,等.补肾促排卵汤联合枸橼酸氯米芬片治疗对多囊卵巢综合征所致不孕症及妊娠结局临床观察[J].湖北中医药大学学报,2013,15(6):53-54.
- [3] 郭银华,邱锦敏,谈勇,等.补肾促排卵汤联合氯米芬片多囊卵巢综合征所致不孕症的临床研究[J].江苏中医药,2013,45(8):24-25.
- [4] Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger AL, et al. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function [J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 211(1-2): 85-90.
- [5] Qiao J, Feng HL. Extra and intraovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence [J]. Hum Reprod Update, 2011, 17(1): 17-33.
- [6] Moran LJ, Harrison CL, Hutchison SK, et al. Exercise decreases anti-Müllerian hormone in anovulatory overweight women with polycystic ovary syndrome: a pilot study [J]. Horm Metab Res, 2011, 43(13): 977-979.
- [7] 孙秀红,韦相才.多囊卵巢综合征大鼠抗苗勒管素与胰岛素抵抗水平相关性分析[J].广东医学,2011,32(9):1100-1103.
- [8] 邓阿黎,周忠明,向楠,等.复方中药对多囊卵巢综合征模型大鼠血清性激素、瘦素水平的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2008,13(10):1139-1143.
- [9] 俞瑾,张洁制,韩洁,等.补肾活血化痰方改善雄激素致不孕大鼠高雄激素血症的机制探讨[J].第二军医大学学报,2013,34(5):498-501.
- [10] 孙振高,连方,李婷婷,等.补肾中药对超排卵周期子宫内膜容受性影响的超声学评价[J].中国超声医学杂志,2011,27(4):353-356.

[修回日期]2016-06-16