

助仙丹对多囊卵巢模型大鼠卵巢功能及形态的影响

董笑克 魏竞竞 杨凯 吴迪 李彤 赵丕文 牛建昭

【摘要】 目的 观察助仙丹对多囊卵巢大鼠模型卵巢形态和性激素的影响。**方法** 将 60 只大鼠随机分为 2 组,空白对照 8 只,另 52 只大鼠采用避孕硅胶棒联合皮下注射人绒毛膜促性腺激素方法进行造模,连续监测两个动情周期,选出造模成功大鼠 30 只,随机分为三组:助仙丹组(10 只)、炔雌醇环丙孕酮片组(10 只)、模型组(10 只),称重,记为用药前大鼠体质量,助仙丹组、炔雌醇环丙孕酮片组分别给予助仙丹配方颗粒和炔雌醇环丙孕酮片灌胃,模型组及空白对照组给予等量自来水灌胃,14 天后再次称重,记为用药后体质量,后腹主动脉取血,检测血清雄激素浓度,并摘除双侧卵巢。利用单因素方差分析的统计学方法,观察各组大鼠用药前后体质量变化,卵巢质量变化,及血清雄激素浓度变化,并观察闭锁卵泡数量、颗粒细胞层数目,卵泡发育状态等卵巢形态变化。**结果** 与模型组比较,炔雌醇环丙孕酮片组大鼠治疗前后体质量增加值明显降低,有显著差异($P < 0.05$),炔雌醇环丙孕酮片组大鼠卵巢质量与模型组比较,有显著差异($P < 0.05$);各组大鼠雄激素水平未见明显差异。助仙丹颗粒配方组大鼠卵巢切片与模型组大鼠相比:闭锁卵泡数量减少,卵巢颗粒细胞层数明显增加,可见正常发育阶段卵泡及成熟黄体组织。**结论** 助仙丹可改善多囊卵巢综合征大鼠卵巢形态、促进正常排卵。

【关键词】 助仙丹; 多囊卵巢综合征; 高雄激素血症

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.07.008

Influence of Zhuxian Dan on the ovarian function and morphology of the polycystic ovary syndrome model rats DONG Xiao-ke, WEI Jing-jing, YANG Kai, et al. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: ZHAO Pi-wen, E-mail: pwzhao@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of traditional Chinese medicine modified Zhuxian Dan (TCM-ZXD) on ovary tissues pathology and improving sex hormone in rat models of polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods** 60 rats were randomly divided into 2 groups, 52 rats in pathological model group and 8 in normal control group. Pathological model group was subcutaneous implanted of progesterone gel rod combined with HCG for building PCOS models. According to the vaginal smear, 30 successful model rats were selected and then randomly divided into three subgroups: TCM-ZXD group (10 rats), Diane-35 group (10 rats), model group (10 rats). All the rats were weighed, recorded as body weight before treatment. TCM-ZXD group and Diane-35 group were given the right amount of formula granules of TCM-ZXD and Diane-35, while the model group and the control group were given the same amount of water. After 14 days of therapy, the rats were weighed again, recorded as body weight after treatment.

基金项目:国家自然科学基金(81273887);北京中医药大学自主科研课题(JYBZZ-JS014);北京市支持中央在京高校共建项目(BJGJ1305)

作者单位:100029 北京中医药大学第二临床医学院[董笑克(硕士研究生)、杨凯(硕士研究生)、魏竞竞(硕士研究生)、吴迪(硕士研究生)、李彤(硕士研究生)];北京中医药大学基础医学院(赵丕文、牛建昭)

作者简介:董笑克(1992-),女,2010 级七年制硕士研究生。研究方向:中医科研。E-mail:15210977893@163.com

通讯作者:赵丕文(1967-),女,博士,教授。研究方向:妇科中药的作用机理。E-mail:pwzhao@sina.com

Blood was collected from abdominal aorta, then T in serum was determined. The weight of the ovary was recorded and ovarian morphology was observed. The results were analyzed by one-way anova. **Result** Compared with the model group, the added value of body weight of Diane-35 group before and after the treatment decreased significantly ($P<0.05$), there was a significant change in the Diane-35 group of the rats ovarian weight ($P<0.05$). There was no obvious difference in androgen levels in rats between these groups. According to the Ovary paraffin, TCM-ZXD group could increase the layers of ovarian granulosa cells and the number of luteal tissue, reduce the number of locked follicles. **Conclusion** Zhuxian Dan can improve the ovarian morphology and promote ovulation in rats with PCOS.

[Key words] Zhuxian Dan; Polycystic ovary syndrome; Hyperandrogenism

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是育龄期妇女常见的一种极为复杂的由神经、内分泌及代谢系统和卵巢局部的调控因素失衡引起的病理状态, 发病率为 5% ~ 10%^[1], 以高雄激素血症、持续无排卵、胰岛素抵抗和高胰岛素血症为主要临床特征。本实验通过观察助仙丹对造模大鼠血清睾酮及卵巢组织形态的影响, 初步探讨助仙丹改善高雄激素血症及卵巢多囊样改变的效果, 为助仙丹治疗多囊卵巢综合征的临床应用提供可靠的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 21 日龄幼年 Wistar 清洁雌性大鼠 60 只, 体质量 (50 ± 5) g, 均在 21 日龄断乳 [北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物生产许可证号: SCXK(京)2012-0001]。

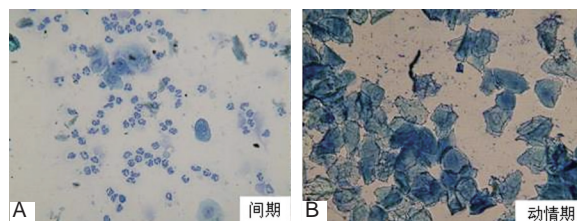
1.1.2 试验药物 助仙丹配方颗粒: 茯苓 15 g、陈皮 15 g、白术 9 g、白芍 9 g、山药 9 g、菟丝子 6 g、杜仲 3 g、甘草 3 g (购自北京中医药大学东方医院颗粒药房); 炔雌醇环丙孕酮片 (商品名: 达英-35, 拜耳先灵医药股份有限公司); 注射用人绒毛膜促性腺激素 (上海第一生化药业有限公司, 生产批号: 1303031); 左炔孕酮硅胶棒 (上海达华药业有限公司, 规格: 75 mg, 生产批号: 20121128); 血清睾酮酶联免疫吸附法检测试剂盒 (普博欣试剂公司)。

1.1.3 试验仪器 电子读数分析天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司), 高速离心机 (博励行仪器有限公司), 普通手术器械, 显微镜 (Olympus), 酶联免疫检测仪 (Tecan)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 60 只大鼠于室温 18 ~ 22℃ 环境下适应 2 天, 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。将实验大鼠随机分为 2 组, 空

白对照组 8 只, 造模组 52 只。空白对照组大鼠喂以普通饲料, 正常饲养, 于 27 日龄始每天颈背部皮下注射与实验组等量生理盐水, 共 9 天。造模组 52 只大鼠按照朱亮等^[2]的方法, 适应性喂养 3 天后于 24 日龄开始, 用 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉后皮下埋植左旋 18-甲基炔诺酮硅胶棒, 3 mm/只, 27 日龄开始皮下注射人绒毛膜促性腺激素 1.5 U, 2 次/天, 共 9 天, 35 日龄连续阴道涂片 2 个动情周期 [(4 ~ 5) 天 \times 2]。观察到阴道涂片染色 (阴道涂片染色后观察显示无规律动情周期, 见大量白细胞, 偶见少量角化细胞, 处于动情间期时相, 提示无排卵, 见图 1-A)。阴道涂片提示无排卵则符合 PCOS 大鼠模型, 不符合者剔除。对照组连续阴道涂片 2 个动情周期全部呈现完整的动情周期, 见图 1-B。



A 图提示大鼠处于动情间期; B 图提示大鼠处于动情期

图 1 大鼠阴道涂片 (次甲基蓝染色, 放大倍数 40 \times 10)

1.2.2 分组及给药方法 对照组 8 只, 从造模组中挑选出造模成功大鼠共 30 只, 随机分为模型组 10 只、助仙丹组 10 只、炔雌醇环丙孕酮片组 10 只。助仙丹组与炔雌醇环丙孕酮片组于 35 日龄开始, 于每天 18:00 药物灌胃, 助仙丹组给予助仙丹配方颗粒水溶液 (将助仙丹颗粒 2 袋溶解于 50 mL 水中配得含生药 1.38 g/mL 药液), 每只大鼠予生药 8 g/kg 助仙丹药液灌胃; 炔雌醇环丙孕酮片组大鼠给予炔雌醇环丙孕酮片 (12 g/片, 加水 50 mL 溶解配置 0.24 g/mL 药液), 每只大鼠予药液 1.4 g/kg, 连续给药 14 天。模型组 10 只以及空白对照组 8 只, 每天以 0.58 mL/kg 蒸馏水灌胃, 1 次/天, 连续 14 天。

表 1 各组大鼠治疗前后体质量的变化

组别	n	治疗前体质量(g)	治疗后体质量(g)	治疗前后质量变化值(g)
空白对照组	8	128.075±20.8533	167.400±26.4457	39.325±6.9578
模型组	10	138.100±8.1036	171.860±10.8880	33.760±7.3488
助仙丹组	10	136.470±11.2165	169.560±12.3492	33.090±4.8734
炔雌醇环丙孕酮片组	10	135.870±10.1261	162.370±13.7739	26.500±9.0902 ^a

注:与模型组比较,^a $P<0.05$ 。

所有大鼠试验期间均在标准环境内合笼饲养,室温 18~22℃,相对湿度 50%,颗粒饲料自由择食,保持每天光照 14 小时。

1.2.3 标本的收集与处理 将 49 日龄大鼠禁 12 小时后称重后,予 1% 戊巴比妥钠 0.3 mL/100 g 腹腔麻醉,打开腹腔,腹主动脉取血(2~3 mL),3000 rpm 离心,分离血清,-20℃ 冻存备用。采用酶联免疫吸附法检测血清性激素的水平,由普博欣试剂公司完成检测。摘取双侧卵巢,去除卵巢表面脂肪组织,称取卵巢质量(湿重),用 10% 的多聚甲醛液固定,用不同浓度的乙醇浸泡脱水,常规石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜观察卵巢的组织形态改变、卵泡的大小发育情况等。

1.3 统计学处理

所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,所有数据采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析。各组大鼠灌胃前后体质量变化、卵巢质量及大鼠雄激素比较进行单因素方差分析;本实验数据方差齐,符合正态分布,采用单因素方差分析,两两比较使用 LSD 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

4 组大鼠治疗前后均发育良好,体毛润泽,行为、体征变化无明显差异,反应灵活。4 组大鼠治疗前后质量变化值采用单因素方差分析,均服从正态分布;数据具有方差齐性;用 ANOVA 分析, $F=4.753$, $P=0.007<0.05$,可以认为四组治疗前后质量变化值有显著差异。采用 LSD 法进行两两比较,结果表明:与模型组比较,炔雌醇环丙孕酮片组大鼠用药前后体质量增加显著减少($P<0.05$)。结论:助仙丹颗粒配方组、炔雌醇环丙孕酮片组大鼠用药前后体质量的增加均小于模型组,其中炔雌醇环丙孕酮片组大鼠体质量增长更少,说明炔雌醇环丙孕酮片对于多囊卵巢模型大鼠体质量具有明显降低作用,两组相比,助仙丹组大鼠体质量变化与空白

对照组大鼠相比无差异($P>0.05$)。

2.2 卵巢质量及血清雄激素水平

大鼠卵巢质量及血清雄激素水平变化均采用单因素方差分析,各组之间两两比较采用 LSD 法。与空白对照组比较,模型组大鼠卵巢质量明显增加($P<0.05$);与模型组比较,炔雌醇环丙孕酮片组大鼠卵巢质量降低明显($P<0.05$),模型组大鼠卵巢湿重明显高于正常组大鼠卵巢湿重,而炔雌醇环丙孕酮片组、助仙丹组大鼠卵巢湿重均不同程度的下降。大鼠血清雄激素水平经单因素方差分析, $F=0.726$, $P=0.544>0.05$,认为四组大鼠血清雄激素水平没有明显差异,具体见表 2。

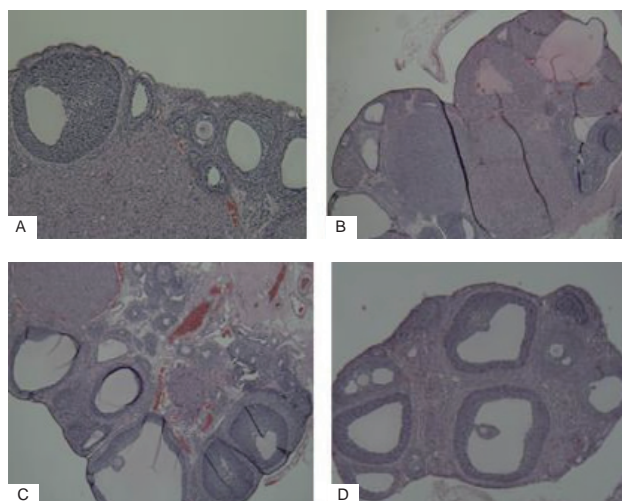
表 2 各组大鼠双侧卵巢湿重及血清雄激素比较

组别	n	双侧卵巢 质量和(g)	雄激素 (ng/mL)
空白对照组	8	0.139±0.024	5.28±0.80
模型组	10	0.166±0.022 ^a	5.60±0.62
助仙丹组	10	0.155±0.029	5.22±0.95
炔雌醇环丙孕酮片组	10	0.129±0.029 ^b	5.05±1.02

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 卵巢光镜结果

空白组可见处于不同分化等级的卵泡,颗粒细胞层较厚,排列整齐,卵巢组织可见正常成熟卵泡、黄体以及白体;模型组大鼠卵巢内罕见成熟卵泡,卵巢内有数量较多的闭锁卵泡,卵泡内颗粒层薄(2~3层),卵巢组织内少见黄体及白体;炔雌醇环丙孕酮片组卵巢切片可见成熟卵泡及处于不同阶段的卵泡,闭锁卵泡较模型组明显减少,颗粒层细胞数较模型组稍有增厚,但明显少于正常组;助仙丹颗粒配方组大鼠卵巢中可见成熟卵泡及一定数目闭锁卵泡,颗粒细胞层较模型组及炔雌醇环丙孕酮片组均明显增加,接近空白对照大鼠颗粒层数目,但排列欠整齐,卵巢内可见正常一定数目的黄体及白体。



A:空白对照组大鼠卵巢切片;B:模型组大鼠卵巢切片;
C:炔雌醇环丙孕酮片组大鼠卵巢切片;D:助仙丹组大鼠卵巢切片

图2 各组大鼠卵巢切片(HE染色,放大倍数:4×10)

3 讨论

PCOS 是妇科内分泌临床常见病,在排卵功能障碍不孕患者中占 90%^[3],育龄妇女患 PCOS 的概率为 5% ~ 10%,约占妇科内分泌临床病例数的 20% ~ 60%,在闭经妇女中占 25%^[4]。PCOS 的临床表现具有异质性,其病理生理也较为复杂,除对生活质量产生不利影响外,还易出现不孕症、高胰岛素血症及心血管疾病等并发症^[5]。而且流行病学资料显示随着儿童期和青春期肥胖发生率的增高,青春期 PCOS 的发病率也有所增高,因此对于多囊卵巢综合征的病因病机以及治疗等的相关研究具有较为重要的临床意义。但目前又无治疗多囊卵巢综合征的特效药,近年来随着中医药对其研究的深入,中医药治疗 PCOS 已显示其优势。助仙丹选自著名的女科专著《傅青主女科》,原方被用来治疗“经水数月一行”,傅青主评价此方“健脾益肾而不滞,解郁清痰而不滞”。而中医对于 PCOS 的中医病机认识多为脾肾两虚、痰湿阻滞、肝郁血瘀等。助仙丹中菟丝子、杜仲可温补肾气,肾气足自可化浊,茯苓、山药、白术等补脾气,脾气足则不生痰,痰浊即去,白芍可解肝郁、舒肝气,方义与现代医家对多囊卵巢综合征的认识较为一致,所用药物均为妇科常用药物,平补而不滞。

高雄激素血症、卵巢多囊性改变、稀发排卵是 PCOS 较为特征性的改变,本研究就血清雄激素、卵

巢形态等多方面研究分析助仙丹对多囊卵巢综合征的作用效果及机理初探。结果表明,助仙丹可促进多囊卵巢综合征大鼠排卵并增加卵泡颗粒细胞层细胞数目、黄体组织数目,减少囊状卵泡数目;与炔雌醇环丙孕酮片相比,助仙丹药效较为温和,对于增加颗粒细胞数有明显优势,但在改善体重、卵巢湿重方面效果不如炔雌醇环丙孕酮片明显。本研究表明助仙丹对 PCOS 大鼠卵巢形态、体质量、卵巢湿重等具有改善作用,尤其对颗粒细胞层数增加有明显作用,颗粒细胞可将雄激素转化为雌激素,从而降低血清雄激素的含量,纠正多囊卵巢综合征的高雄激素血症,进而促进排卵、改善症状。本研究提示助仙丹加减对 PCOS 有一定的治疗作用,但其确切的机理仍待进一步研究。

另外本实验仍有一些方面有待改善:(1)大鼠 PCOS 模型不够持久,且造模成功率低,其造模结果与人类 PCOS 仍有不同;(2)助仙丹药味少,各药剂量小,作用也较炔雌醇环丙孕酮片弱,考虑按照不同证型的 PCOS,调整助仙丹剂量,并可设立高、中、低剂量组,寻找助仙丹治疗多囊卵巢综合征的最佳有效剂量;(3)炔雌醇环丙孕酮片与助仙丹比较,炔雌醇环丙孕酮片在促进排卵方面占优势,助仙丹在促进卵巢形态恢复、增加颗粒层细胞的数目方面有明显的优势,中西药联用是否有更好地疗效仍待进一步研究;(4)因实验经费及周期的限制,实验所用血清学指标较少,可进一步研究更多的性激素改变的结果,以求为助仙丹临床应用取得更多证据。

参 考 文 献

- [1] Diamantik E, Kouli CR, Bergiele AT, et al. A survey of the polycystic ovary syndrome in the greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84 (11):4006-4011.
- [2] 朱亮,邢福祺,全松,等. 避孕硅胶棒联合 HCG 诱导 SD 大鼠多囊卵巢综合征模型的建立[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30 (6):534-536.
- [3] 李晓红,李红. 不孕不育的病因[J]. 中国全科医学, 2003, 6 (11):887-889.
- [4] 曹泽毅,中华妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999: 2177-2196.
- [5] Friedman JM, Leibel RL. Tackling a weighty problem[J]. Cell, 1992, 69(2):217-220.

(收稿日期: 2014-11-11)

(本文编辑: 董历华)