

·方药研究·

本文引用:侯丽莹,邓丽玲,罗佩,余曦明,全春梅,赵娜,杨正望.丹栀逍遥散对多囊卵巢大鼠血清T、AMH及卵巢局部AMH蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(2):141-144.

丹栀逍遥散对多囊卵巢大鼠血清T、AMH及卵巢局部AMH蛋白表达的影响

侯丽莹¹,邓丽玲¹,罗佩¹,余曦明¹,全春梅¹,赵娜¹,杨正望^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学第一附属医院妇产科,湖南长沙410007)

[摘要] 目的 探讨丹栀逍遥散对多囊卵巢(polycystic ovaries, PCO)大鼠血清睾酮(testosterone, T)、抗苗勒管激素(anti-mulerian hormone, AMH)及卵巢局部AMH蛋白表达的影响。方法 SD雌性大鼠以颈背部皮下注射脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)溶液构建PCO大鼠模型,判定造模成功后再随机分成模型组、达英-35组、丹栀逍遥散组,并设空白组,分别用蒸馏水、达英-35及丹栀逍遥散对大鼠灌胃给药,连续灌胃21d,停药7d为一疗程,灌胃3个疗程后处死大鼠,采用放射免疫法测定T、AMH,免疫组织化学法检测PCO大鼠卵巢局部AMH蛋白表达。结果 与模型组比较,丹栀逍遥散组血清T、AMH水平及AMH蛋白表达强度均下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论 丹栀逍遥散治疗高雄激素血症(hyperandrogenism, HA)可能是通过降低PCO大鼠血清T、AMH水平,降低卵巢局部AMH蛋白表达强度,对AMH进行良性调节,从而改善HA。

[关键词] 多囊卵巢综合征;高雄激素血症;抗苗勒管激素;丹栀逍遥散;牡丹皮;栀子

[中图分类号]R285.5;R289.53;R711.75 **[文献标识码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.02.007

Effects of Danzhi Xiaoyao Powder on the Expression of Serum T, AMH and Local Ovaries AMH in Polycystic Ovaries Rats

HOU Liying¹, DENG Liling¹, LUO Pei¹, YU Ximing¹, QUAN Chunmei¹, ZHAO Na¹, YANG Zhengwang^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Danzhi Xiaoyao powder on the expression of serum testosterone (T), anti-mulerian hormone (AMH) and local ovarian AMH in polycystic ovaries (PCO) rats. **Methods** The PCO rat models were built by subcutaneous injection of dehydroepiandrosterone at back of SD female rats. The successfully modeling rats were randomly divided into normal group, Diane-35 group, Danzhi Xiaoyao powder group and the blank group was also assigned. The rats were given intragastric gavage with distilled water, Diane-35 and Danzhi Xiaoyao powder, respectively, continuously for 21 days, stopped for 7 days as a cycle. After 3 cycles of administration, the rats were executed. The serum level of T and AMH were measured with radioimmunoassay. The local ovarian expression of AMH were measured with immunohistochemical. **Results** Compared with the model group, the serum of T, AMH and the expression of AMH in the Danzhi Xiaoyao Powder group were reduced ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** Danzhi Xiaoyao powder could treat hyperandrogenism (HA) by lowering the serum T, AMH and the local ovarian AMH expression, so it can improve HA with benign regulation on AMH.

[Keywords] polycystic ovary syndrome; hyperandrogenism; anti-mulerian hormone; Danzhi Xiaoyao powder; cortex moutan radialis; fructus gardeniae

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄期常见的内分泌代谢和生殖障碍疾病。高雄激素血症(hyperandrogenism, HA)是引起PCOS患者局部病理变化的重要机制之一。近年来

的基础研究认为卵巢局部微环境的失调是维持高雄激素血症的重要机制。尤其是抗苗勒管激素水平(anti-mulerian hormone, AMH)作为一种卵巢局部重要调节因子,在PCOS患者中高表达,成为诊治和

[收稿日期]2016-07-02

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(14JJ7061)。

[作者简介]侯丽莹,女,在读硕士研究生,研究方向:生殖内分泌。

[通讯作者]*杨正望,女,博士,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:435068288@qq.com。

研究 PCOS 新的突破点。研究表明高雄激素的发生可能与 AMH 有一定的相关性,血清 AMH 浓度在 PCOS 合并 HA 妇女中更高^[1-2]。

既往 PCOS 的中医药治疗研究大多以补肾活血化瘀为主要目标进行攻关,相关的实验研究肯定了补肾活血方药能够改善 PCOS^[3]。随着临床研究的深入,以疏肝健脾清热为切入点的中医药治疗逐渐受到人们的关注,从肝论治 PCOS 高雄激素血症也取得了一定成效。本研究立足于从肝论治,以卵巢局部微环境 AMH 与雄激素调节失常在 HA 形成中发挥作用为假说,通过运用导师杨正望主任医师常用方剂丹栀逍遥散干预多囊卵巢 (polycystic ovaries, PCO) 大鼠模型,初步探讨丹栀逍遥散对 PCO 大鼠血清 T、AMH 及卵巢局部 AMH 蛋白表达的影响,进一步揭示其可能改善 HA 的作用机制。

1 材料

1.1 动物

21 d 龄断乳未成年雌性健康 SD 大鼠 60 只, SPF 级,体质量(75±15) g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号为:SCXK(湘)2011-0003,饲养在湖南中医药大学动物实验中心 SPF 级动物实验室饲养,许可证号为:SYXK(湘)2013-0005。室温 20~26℃,相对湿度 40%~60%,保持通风干燥,标准颗粒饲料喂养,自由进食饮水。

1.2 药品和试剂

丹栀逍遥散处方为:白术 10 g,柴胡 6 g,当归 10 g,茯苓 15 g,甘草 5 g,牡丹皮 15 g,山栀 10 g,芍药 10 g,薄荷 5 g,煨姜 5 g。饮片购自湖南中医药大学第一附属医院。先加蒸馏水浸泡 30 min,水煎煮两次,2 次所得滤液混合后浓缩,生药含量为 0.91 g/mL,于 4℃冰箱中保存备用。炔雌醇环丙孕酮片(商品名:达英-35,每片含醋酸环丙孕酮 2 mg 和炔雌醇 0.035 mg)由拜耳医药保健有限公司广州分公司提供,购自湖南中医药大学第一附属医院。DHEA 购自湖北芳通药业有限公司,注射用大豆油购自苏州捷易龙贸易有限公司,T、AMH 放射免疫试剂盒购自北京华英生物技术研究所,AMH 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

RM2235 轮转石蜡切片机(德国 LEIKA 仪器有限公司),脱水机、包埋机(武汉俊杰电子有限公司),金迪 YD-A 生物组织摊片机(浙江金华市益迪医疗设备厂),DNP-9162 电热恒温培养箱(上海新苗医疗器械制造商有限公司),Motic BA410 研究型显微镜(麦克奥迪实业集团公司),Motic Images Plus

6.0 计算机图像分析系统(麦克奥迪实业集团公司)。

2 方法

2.1 PCO 大鼠模型的制备与评价^[4-5]

SD 大鼠喂养至 23 d 龄后,按随机数字表法随机分为 2 组,即空白对照组 20 只,模型制备组 40 只。模型制备组每日上午 10 点颈背部皮下注射 DHEA 0.06 g/(kg·d)+0.2 mL 注射油剂(大豆油),溶剂用量恒定为 0.2 mL 不变,由于每天每只大鼠均需称量不等的 DHEA 单独配制不同浓度的注射液,在此基础上对 DHEA 注射液的配制进行调整,按 DHEA 0.06 g/(kg·d)+0.2 mL 注射油剂(大豆油)来换算。空白对照组 20 只,同期每日上午 10 点颈背部皮下注射 0.2 mL 注射油剂,连续 20 d。每日称体质量,定期观察摄食及活动情况,注射 10 d 后开始每天下午 4 时进行 1 次阴道脱落细胞学观察,用光滑吸管吸取少量生理盐水,冲入大鼠阴道内,吸取少量阴道液,涂于载玻片上直接光镜观察,观察其动情周期变化,阴道涂片显示模型制备组大鼠光镜下仅见大量白细胞,少量角化细胞提示一直处于动情间期,失去规律性变化,无排卵;正常组仍保持规律的动情周期。注射第 20 日当晚 8 时禁食,次日晨起各组随机抽取 10 只大鼠,颈椎脱臼法处死大鼠,解剖双侧卵巢,以卵巢最大平面作为待检平面石蜡包埋,进行 HE 染色观察卵巢形态学变化判定造模是否成功。

2.2 药物干预方法

判定造模成功后,模型制备成功大鼠按随机数字表分为 3 组,分别是模型组、丹栀逍遥散组、达英-35 组。模型组每天灌服等量蒸馏水,丹栀逍遥散组每天按时灌服丹栀逍遥散方,1 次/d,给药剂量换算法以成人女性平均体质量 60 kg 体表面积换算,折合到大鼠用药剂量为 9.2 g/(kg·d),约为 1 mL/100 g,达英-35 组每天灌服达英-35(每片含醋酸环丙孕酮 2 mg 和炔雌醇 0.035 mg),临床剂量为 2.035 mg/d,折合到大鼠约为 0.2 mg/(kg·d),以蒸馏水溶解后,灌胃量按当日大鼠体质量灌服药物,连续灌胃 21 d,停药 7 d,28 d 为 1 个疗程,共给药 3 个疗程。

2.3 标本采集及组织形态学检查

颈椎脱臼法处死大鼠,摘取大鼠双侧卵巢,除去表层脂肪缔结组织,用 4%多聚甲醛固定,双侧卵巢作如下操作:一侧 HE 染色后行形态学检查,观察卵巢形态学变化,另一侧行免疫组化法检测 AMH 蛋白表达情况。

2.4 血清相关指标检测

大鼠灌胃完毕后所有大鼠禁食水 12 h,断颈取

血后静置离心,3 000 r/min离心20 min,收集上清液,-20℃冰箱储存,按放免试剂盒说明书测定血清T及AMH。

2.5 卵巢组织免疫组织化学分析

按照SP检测试剂盒说明书进行,工作浓度为1:100,以细胞质中有棕黄色或者棕褐色颗粒出现为阳性表达。切片置于400倍高倍镜下观察,每张切片随机选择观察5个高倍镜视野,采用Motic Images Plus 6.0计算机图像分析系统对结果进行分析,以切片背景的灰度值作背底校正,测定平均光密度值(average optical density, AOD)。

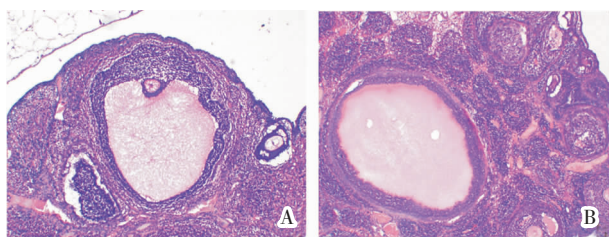
2.6 统计学方法

所有计量资料实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用SPSS 17.0软件进行数据统计分析,首先对各组数据进行正态性及方差齐性检验,若呈正态性、方差齐性,则按照完全随机设计,采用单因素方差分析进行统计;若不满足正态性和方差齐性,则采用非参数检验的Kruskal-Wallis H检验,各组间两两比较用Nemenyi法。不符合正态性,指标间相关分析用Kendall法或Spearman法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠卵巢形态组织学

空白对照组大鼠肉眼观见卵巢色泽较红润,HE染色光镜下可见空白对照组颗粒细胞排列整齐,形态完整,呈多层改变,可多达8~9层。模型组大鼠肉眼观见卵巢表面苍白,包膜增厚,隐约可见扩张的囊泡,光镜下可见囊状扩张卵泡,卵泡内可见卵母细胞及放射冠消失,颗粒细胞层数减少,可为2~3层,且排列较为疏松,提示PCO大鼠模型造模成功。见图1。



注:A.空白对照组;B.模型组

图1 大鼠卵巢组织光镜图(HE,×400)

3.2 大鼠血清T、AMH水平表达的比较

与空白对照组比较,模型组、丹栀逍遥散组、达英-35组T水平均显著升高($P<0.01$),模型对照组AMH水平升高($P<0.01$),但丹栀逍遥散组、达英-35组与空白对照组比较AMH水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型对照组比较,丹栀逍遥散组、达英-35组T及AMH水平下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。见表1。

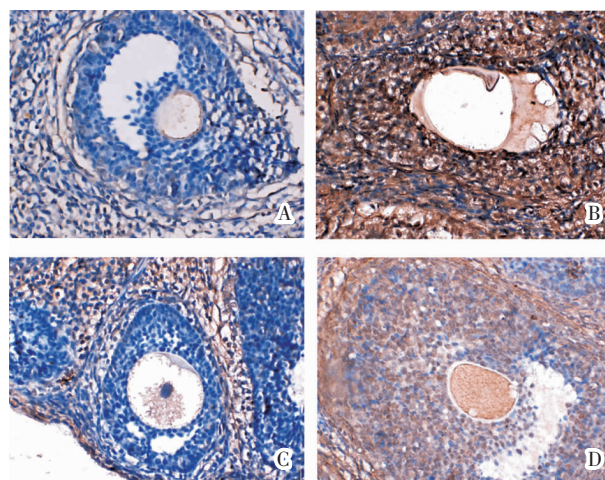
3.3 卵巢局部组织AMH表达比较

与空白对照组比较,模型组、达英-35组AMH表达强度升高($P<0.01$),但丹栀逍遥散组与其比较无显著统计学意义($P>0.05$)。与模型对照组比较,丹栀逍遥散组、达英-35组AMH表达强度均下降($P<0.05$)。见表1,图2。

表1 各组T、AMH、AMH蛋白表达的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	T(ng/mL)	AMH(ng/mL)	AMH吸光度值(OD)
空白对照组	10	0.123±0.009	5.252±0.621	0.307±0.117
模型组	10	0.172±0.006 [△]	6.078±0.325 [△]	0.498±0.105 [△]
丹栀逍遥组	10	0.132±0.004 ^{△△}	5.046±0.552 ^{△△}	0.302±0.278 [△]
达英-35组	10	0.144±0.006 ^{△△}	5.628±0.420 [△]	0.405±0.662 ^{△△}
F值		101.248	8.479	13.342
P值		0.000	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,△ $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。



注:A.空白对照组;B.模型组;C.丹栀逍遥组;D.达英-35组

图2 各组大鼠卵巢局部AMH蛋白的表达
(免疫组织化学法,×400)

4 讨论

PCOS是高度异质性内分泌疾病和代谢紊乱疾病,高雄激素血症与PCOS发病有相关性^[6]。随着国内外学者对于PCOS病理机制研究越来越多,AMH与雄激素在HA患者卵巢局部微环境中的作用也日益受到关注。研究发现,PCOS患者的AMH水平高于正常同龄女性的2~3倍,且PCOS患者的AMH水平与睾酮水平具有相关性^[7]。Xia等认为AMH与雄激素二者之间的失调才是造成卵巢多囊化的主要原因^[8]。其他报道^[9]指出AMH在高雄激素的PCOS患者外周血中的表达量远高于雄激素水平正常但卵巢中有更多小卵泡的PCOS患者,说明AMH与卵泡数量并非简单线性关系,可能是雄激素和AMH对卵巢多囊化的改变起着协同作用。

本实验结果显示,模型对照组较空白对照组血清 AMH 水平及 T 水平明显升高($P<0.01$),且模型对照组 AMH 表达明显高于空白对照组,这可能是睾酮水平的增高促进了 AMH 的产生,而 AMH 的高表达抑制了芳香化酶的活性,阻碍其合成及雄激素向雌激素的转化过程,造成局部卵巢高雄激素的微环境改变,引起 HA。我们已知过多的雄激素可以提高始基卵泡向窦前和小窦卵泡发展速度,超过临界,则可阻碍优势卵泡的选择,而小窦卵泡中的颗粒细胞激素转化并非朝着雌激素而是进一步加重了局部高雄激素环境,周而复始使睾酮与 AMH 之间形成一个恶性通路,造成 HA,并导致了卵巢多囊化。因此,我们认为 HA 与卵巢局部微环境 AMH 及雄激素调节失常有关。

在临床上,PCOS 高雄激素血症患者往往表现为月经失调、痤疮、毛发浓密、脱发、肥胖等肝郁化热症状。肝之不调影响到肾、脾、胃、心、肺等多脏腑的病变,导致痰、湿、热(火)、瘀等多重病理因素交织,但肝气郁结的病机贯穿 HA 发生发展的始终,为从肝论治 HA 提供了理论依据。袁迎军等^[10]用随机数字表法将 73 例肝郁血热型 PCOS 患者分为中药组 37 例和西药组 36 例,中药组口服丹栀逍遥散加减,西药组口服达因-35,3 个月为 1 个疗程,停药 1 个月经周期后两组血清 LH、LH/FSH、T 均下降($P<0.05$), E_2 、FSH、PRL 无明显变化($P>0.05$)。停药 6 个月经周期后,中药组血清 LH、LH/FSH、T 仍较治疗前下降($P<0.05$),西药组恢复到治疗前水平。丹栀逍遥散加减可有效治疗肝郁血热型 PCOS,且远期疗效肯定。本研究选用导师多年来运用治疗 PCOS 高雄激素血症的基本处方——丹栀逍遥散。源于明朝薛己著《内科摘要》,又名加味逍遥散,由山栀子、牡丹皮、当归、茯苓、白术、柴胡、牡丹皮、甘草等药物组成。方中牡丹皮调肝泻火,活血化瘀,栀子疏肝泻火,内清血热,引火下行,当归、白芍益荣养血以养肝也。四药合用清肝火泻内热,白术、茯苓、甘草实脾土御肝木,益脾和中。独柴胡一味,一以为厥阴之报使,一以升发诸阳。薄荷少许,疏散郁遏之气,煨姜降逆和中。诸药合用,正具有疏肝清热、养血健脾之效,我们的研究结果显示,与模型对照组比较,丹栀逍遥散组、达英-35 组 T 水平均下降($P<0.01$)。此外,还检测了 AMH 水平及其蛋白表达强度,实验结果发现,与模型对照组比较,丹栀逍遥散组 AMH 水平、AMH 表达强度均下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。说明丹栀逍遥散在一定程度上也能够降低 AMH 水平及 AMH 蛋白表达强度。根据 Jonard 和 Dewailly^[11]对 AMH 在 PCOS 中的作用机制提出的假说,认为丹栀逍遥散治疗 HA 可能是通过抑制高水平的 AMH,降低 AMH 蛋白表达,从而作用于颗粒细胞芳香化酶,促进其合成,并增加卵泡对

FSH 敏感性,使得 PCOS 中卵巢 AMH 与 FSH 的平衡趋向中,由以 AMH 抑制芳香化酶作用为主的部分减弱,而增强 FSH 激活芳香化酶的作用,促使颗粒细胞将雄激素转化为雌激素,阻断睾酮与 AMH 之间的恶性通路,调节二者改善卵巢局部微环境,从而改善 HA。

综上所述,实验提示丹栀逍遥散能够降低 AMH 及 T 水平,降低颗粒细胞 AMH 蛋白表达改善高雄激素状态,达到治疗 HA 的目的。中药治疗 HA 是多环节、多靶点的协同过程,丹栀逍遥散是否通过其他途径影响 AMH 从而改善 HA 尚不得知。因此,进一步以卵巢局部 AMH 为切入点深入研究中医药干预 HA 卵巢局部微环境的调控机制,可为我们探索中药干预 PCOS 高雄激素血症疑难病症方法研究提供理论依据和新的思路。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 李 轶,李瑞岐,欧颂邦,等.高雄激素和非高雄激素型多囊卵巢综合征患者血清抗苗勒管激素分泌特点及诊断效能比较[J].实用妇产科杂志,2014,30(2):111-115.
- [3] 杨正望,文 炯,张增玲.补肾化痰方对 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞 CYP450 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2011,31(1):30-32+39.
- [4] 张晓薇,邝健全,曾爱群,等.脱氢表雄酮诱导多囊卵巢综合征动物模型的研究[J].广州医学院学报,2000,28(3):14-18+91.
- [5] 李 燕,张庆文,王红彬.脱氢表雄酮诱导 SD 大鼠多囊卵巢综合征模型的实验研究[J].中国医药科学,2013,3(7):35-37.
- [6] 石玉华,陈子江,唐 蓉,等.多囊卵巢综合征患者内分泌及代谢特征研究[J].山东医药,2006,46(26):4-6.
- [7] Dewailly D, Pigny P, Soudan B, et al. Reconciling the definitions of polycystic ovary syndrome: The ovarian follicle number and serum anti-Mullerian hormone concentrations aggregate with the makers of hyperandrogenism [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(9): 4399-4405.
- [8] Xia N, Tsatsoulis A. Review:Fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies [J]. J Clin Endocrinol Metab,2006, 91(5): 1660-1666.
- [9] Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Gal M, et al. Serum anti-Mullerian hormone levels during controlled ovarian hyperstimulation in women with polycystic ovaries with and without hyperandrogenism[J]. Hum Reprod, 2005, 20(7): 1814-1819.
- [10] 袁迎军,蓝 岚.丹栀逍遥散加减治疗肝郁血热型多囊卵巢综合征 37 例疗效观察[J].河北中医,2014,36(8):1175-1178.
- [11] Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intravarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest [J]. Hum Reprod Update, 2004, 10:107-117.

(本文编辑 杨 瑛)