

本文引用:邓丽玲,罗佩,侯丽莹,杨正望,余曦明.丹栀逍遥散对多囊卵巢大鼠高雄激素血症雄激素、瘦素及其受体表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(4):353-356.

丹栀逍遥散对多囊卵巢大鼠高雄激素血症雄激素、瘦素及其受体表达的影响

邓丽玲¹,罗佩¹,侯丽莹¹,杨正望^{2*},余曦明¹

(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** 观察丹栀逍遥散对多囊卵巢综合征伴高雄激素血症大鼠雄激素、瘦素及其受体的影响。**方法** 利用脱氢表雄酮诱导建立多囊卵巢大鼠高雄激素血症模型,随机设立丹栀逍遥组、达英组、模型组、空白对照组,予以相应药物干预。实验结束后观察卵巢形态学变化;酶联免疫法测定血清雄激素水平;ELISA法检测血清瘦素;免疫组化测定卵巢瘦素受体的表达。**结果** 与模型组相比,丹栀逍遥散可显著降低大鼠血清瘦素、睾酮、游离睾酮水平值,减少卵巢瘦素受体阳性表达,差异均有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 丹栀逍遥散可降低多囊卵巢高雄激素血症大鼠血清瘦素、雄激素水平值,减少卵巢瘦素受体阳性表达,进而降低瘦素生物利用率及雄激素活性,从而改善多囊卵巢综合征高雄激素血症和排卵障碍。

[关键词] 丹栀逍遥散;多囊卵巢综合征;高雄激素血症;瘦素;瘦素受体

[中图分类号]R285.5;R711.75

[文献标识码]B

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.04.002

Effects of Danzhi Xiaoyao Powder on Androgen, Leptin and Leptin Receptor in Polycentric Ovary Hyperandrogenism Rats

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

(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 observe the effect of Danzhi Xiaoyao Powder (DZXYP) on the expression of androgen, leptin and leptin receptor (LEPR) in polycentric ovary (PCO) hyperandrogenism rats. **Methods** The PCO Hyperandrogenism model rats induced by dehydroepiandrosterone (DHEA) were randomly divided into DZXYP group, Diane group, model group and blank control group. The morphologic changes were observed after the experiment. The levels of androgen were determined by radioimmunity. Serum leptin was determined by ELISA. LEPR in the tissues of ovaries was assessed with immunohistochemistry method. **Results** Danzhi Xiaoyao Powder could reduce the values of leptin, testosterone, free testosterone, and the expression of LEPR obviously, the differences were statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** DZXYP could reduce the levels of leptin, androgen and decrease the expression of LEPR of PCO hyperandrogenism rats. Then it could decrease the bioavailability of leptin and androgenic activities to improve high serum-T and ovulation barrier of polycentric ovary syndrome.

[Keywords] Danzhi Xiaoyao Powder; polycentric ovary syndrome; hyperandrogenism; leptin; leptin receptor

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS)是生育年龄女性常见的、多发的生殖功能障碍性疾病,其发病机制复杂,不仅与生殖、脂质代谢和胰岛素抵抗有关,还与雄激素、瘦素及其受体密切相关^[1-2],其最重要的内分泌特征是高雄激素血症,它也是早期预示 PCOS 的独立危险因素^[3]。高雄激素

血症临床上泛指血清雄激素如睾酮(testosterone,T)、游离睾酮 (free testosterone,FT) 和雄烯二酮(androstenedione,DTA)含量增高,生成和活力增强状态,以血清高雄激素、高瘦素血症、排卵障碍和糖脂代谢异常为主要临床特征,其对女性患者的子宫内膜、心血管系统、糖脂代谢等有较危险的远期影响^[4]。相关

[收稿日期]2016-07-12

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(S2014JJ5041)。

[作者简介]邓丽玲,女,在读硕士研究生,研究方向:中医妇科生殖内分泌研究。

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

研究发现^[5],下丘脑-垂体-卵巢轴的功能紊乱是多囊患者最主要的病理生理变化,而瘦素(leptin,LP)作为脂肪细胞分泌的一种循环激素,参与机体生殖功能、能量代谢和体质量平衡的调节,可调节下丘脑-垂体-卵巢轴的功能,与瘦素受体(leptin receptor,LEPR)一并参与了PCOS发病的各个环节。目前有关瘦素及其受体与PCOS高雄激素血症之间的相关机制关系研究还较少,近年来也成了研究的难点和热点问题。因此,本研究旨在观察丹栀逍遥散对由脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone,DHEA)建立的多囊卵巢伴高雄激素血症大鼠卵巢组织形态、血清雄激素、瘦素及其受体的影响,初步探讨雄激素、瘦素及其受体在PCOS高雄激素血症中的作用和关系,为临床治疗该病提供治疗思路及实验基础,也对提高育龄女性生活质量具有重要现实意义。

1 方法

1.1 实验动物

选用21日龄断乳未成年SPF级雌性SD大鼠60只(体质量50~100g),由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号SCXK(湘2015-0005),饲养于湖南中医药大学动物实验中心SPF级动物房,自由进食标准颗粒饲料和蒸馏水,适应性喂养至23d。

1.2 药品及试剂

DHEA(购自湖北芳通药业有限公司);注射大豆用油(苏州捷易龙贸易有限公司);达英-35(拜耳医药保健有限公司广州分公司,规格:醋酸环丙孕酮2mg+炔雌醇0.035mg,批号H20140240);性激素放射免疫试剂盒:北京华英生物技术研究所;ELISA瘦素试剂盒、瘦素受体免疫组化试剂盒、SABC二抗试剂盒:北京中杉金桥生物技术有限公司。丹栀逍遥散(白术10g,柴胡6g,当归10g,茯苓15g,牡丹皮15g,山栀10g,薄荷5g,煨姜5g,芍药10g,甘草5g)由湖南中医药大学第一附属医院提供并煎煮成汤剂置于冰箱贮存备用,每1mL含生药0.91g。将1片达英-35溶于100mL蒸馏水中。

1.3 动物造模

大鼠采用随机数字表法分成模型组40只,空白对照组20只。参照李燕等^[6]造模方法:①模型组每天定时行颈背部皮下注射DHEA 6mg/(100g·d)+注射大豆用油0.2mL,即用酒精灯将DHEA与注射大豆用油混合加热至成清亮黄色,稍冷却后注射。②空白组每天同时间行颈背部皮下注射0.2mL大

豆油剂。两组均连续注射20d。注射第10天起每日观察阴道涂片,模型组大鼠阴道脱落细胞仅见大量白细胞和少量角化细胞,提示其始终处于动情间期,无规律动情周期变化,即无排卵;注射第20天当晚禁食水,次日两组各随机抽取10只大鼠,眼球摘除取血,血清雄激素显示模型组T、FT明显高于空白组;处死大鼠取双侧卵巢称质量,HE染色光镜下观察卵巢形态学改变,发现模型组大鼠卵巢质量和卵巢内卵泡明显高于空白组,成多囊样发育,可见小卵泡和闭锁卵泡及多个明显囊状扩张卵泡,无成熟卵泡,由此判定造模成功。

1.4 分组干预

判定造模成功后,将模型组大鼠30只完全随机分为:丹栀逍遥散组、达英组、模型组,每组10只,加上空白对照组10只,共4组。从第21天开始,给药剂量按成人女性平均体质量60kg体表面积换算,丹栀逍遥散组每日定时予以等效剂量9.2g/(kg·d)灌胃;达英组每日同时段给予等效剂量达英-35[0.21g/(kg·d)]灌胃;模型组和空白对照组每日同时段以同容积蒸馏水灌胃。1次/d,均连续灌胃21d,停药7d,28d为1个周期,共给药3个周期。

1.5 观察指标与检测方法

1.5.1 标本采集 最后一天灌胃后所有大鼠禁食水12h后称质量,并全部断颈取血,静置离心,分离血清,低温保存(-20℃),用于测定血清雄激素及血清瘦素;精确摘取大鼠双侧卵巢,除去表层脂肪缔结组织,称质量记录。

1.5.2 指标检测及方法 卵巢组织用4%多聚甲醛固定,脱水后常规石蜡包埋并切片染色,一侧卵巢组织HE染色后观察卵巢形态学改变。采用酶联免疫法测定血清T、FT;ELISA方法检测血清LP;采用免疫组化SABC法测定另一侧卵巢组织LEPR的表达,应用平均光密度法对免疫组化结果进行定量分析,即在切片染色后,选择染色良好区域,其表达情况根据显微镜下(40×10)下测定单位面积阳性细胞表达的光密度值判断,取5个视野的平均光密度值作为该蛋白在一只大鼠卵巢组织中的表达结果。结果判定:显色呈棕黄色或棕褐色颗粒为阳性表达。

1.6 统计学处理

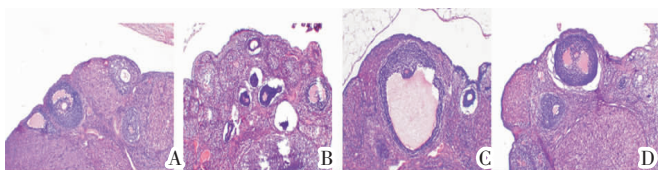
使用SPSS 23.0软件处理分析实验结果数据,全部计量资料采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用LSD法(方差齐性者)和Dunnett's T3检验(方差不齐者),计数资料采用 χ^2 (卡方)检

验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢组织形态学观察

药物干预结束后,模型组大鼠卵巢肉眼观察体积较大,形态不规则,表面凹凸不平,色苍白,HE染色光镜下观察其卵巢包膜增厚,呈多囊样发育,可见多个小卵泡和闭锁卵泡及囊状扩张卵泡,未见成熟卵泡或排卵征;丹栀逍遥组、达英组大鼠卵巢外观色泽稍红润,偶有表面不规则,包膜稍厚,偶可见多囊样发育,内可见窦状卵泡;丹栀逍遥组部分可见成熟卵泡或排卵征;空白对照组卵巢外表形态规则,表面光滑,内可见窦状卵泡发育及成熟卵泡,少量可见排卵征。见图1。



图注:A-D分别为空白对照组,模型组,丹栀逍遥组,达英组

图1 各组大鼠卵巢组织形态学改变光镜图(HE染色,×400)

2.2 血清雄激素变化

药物干预周期结束后,与空白对照组对比,模型对照组、丹栀逍遥组、达英-35组血清T、FT水平值均升高($P<0.01$);与模型组对比,丹栀逍遥组、达英组血清T、FT值均显著降低,组间差异均有统计学意义($P<0.01$)。见表1。

表1 大鼠组间血清雄激素值水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	T(ng/mL)	FT(ng/mL)
空白对照组	0.123±0.009	0.231±0.007
模型组	0.172±0.006*	0.465±0.005*
丹栀逍遥组	0.132±0.004**	0.242±0.002**
达英组	0.144±0.006**	0.256±0.004**
F	89.17	905
P	0.000	0.000

注:与空白对照组比较 * $P<0.01$,与模型组比较 # $P<0.01$ 。

2.3 血清LP水平比较

药物干预周期结束后,与空白对照组比较,模型组、丹栀逍遥组、达英组大鼠血清LP水平明显升高($P<0.01$);与模型组比较,丹栀逍遥组、达英组LP水平显著降低,差异具统计学意义($P<0.01$)。见表2。

2.4 卵巢组织LEPR表达观察

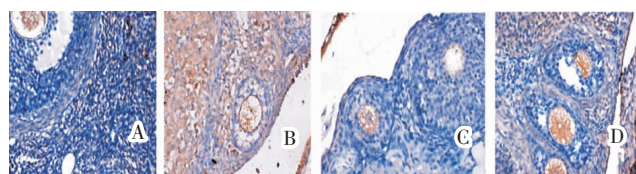
观察各组大鼠卵巢组织颗粒细胞及卵泡膜细

胞,显色呈棕黄色或棕褐色颗粒为LEPR阳性表达,发现空白对照组可见LEPR极少量表达;与空白对照组相比,模型组可见LEPR高表达(棕黄色和棕褐色颗粒最多),LEPR平均光密度值显著增高($P<0.01$);药物干预后,与模型组比较,丹栀逍遥组、达英组LEPR表达均明显减少,LEPR平均光密度值较模型组明显降低($P<0.01$)。见图2、表2。

表2 大鼠组间血清雄激素值水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	LP(ng/mL)	LEPR(平均光密度值)
空白对照组	0.83±0.50	0.125±0.008
模型组	4.85±0.52*	0.423±0.011*
丹栀逍遥组	2.62±0.45**	0.210±0.007**
达英组	3.42±0.46**	0.321±0.010**
F	12933	5543
P	0.000	0.002

注:与空白组比较 * $P<0.01$,与模型组比较 # $P<0.05$ 。



图注:A-D分别为空白对照组,模型组,丹栀逍遥组,达英组

图2 各组大鼠卵巢组织LEPR蛋白表达光镜图(DAB显色,×400)

3 讨论

PCOS高雄激素血症是一种涉及生殖、内分泌、糖脂代谢及卵巢局部调控因素等多系统多态性的疾患,与LP及LEPR异常密切相关,其导致的闭经和不孕可引起子宫内膜癌、乳腺癌的机率升高^[7]。LP在体内浓度受LEPR调节,LEPR将LP转运到作用靶点,并与LP结合后进行信号转导、实现生物效应。LP与LEPR一起在PCOS发生发展中参与卵泡膜细胞和颗粒细胞的作用,促进卵泡膜细胞合成雄激素,雄激素升高又可促抗苗勒管激素水平(anti-mulerian hormone, AMH)的产生,AMH增高可抑制芳香化酶的活性,阻碍雄激素向雌激素的转化,造成局部卵巢高雄激素的微环境改变,引起PCOS高雄激素血症,进而影响人体生殖功能^[8-9]。

目前关于LP、LEPR和雄激素的相互关系在PCOS高雄激素血症发病中的病理机制研究还较少,有研究认为^[10],一方面可能因雄激素可增强体内神经肽Y的表达,使促性腺激素释放激素和促性腺激素的分泌减少,进而促使LP分泌增加;另一方面高浓度的LP可抑制颗粒细胞芳香化酶活性,抑制雄烯

二酮芳香化,使血清雄激素水平异常升高。但 Chekhranova 等^[1]认为其内在联系与 LP 及 LEPR 基因突变有关,基因突变会导致 LP 及 LEPR 功能降低,使下丘脑对 LP 的敏感性减弱,从而导致机体高瘦素血症的发生。有动物实验^[2]研究证实高剂量 LP 作用于受体可抑制排卵,PCOS 大鼠卵巢中 LEPR 表达增强,导致 LP 对卵巢功能的抑制增强。Li 等^[13]研究发现 PCOS 高雄激素血症不孕患者血清和卵泡液 LP 浓度异常升高,提示卵巢局部的高 LP 很可能是引起不孕的病理因素。本研究中模型组大鼠血清 LP 异常升高,其大鼠卵巢组织 LEPR 表达增强,提示二者可能参与了 PCOS 高雄激素血症的发生发展。

总之,LP 和 LEPR 在维持人体正常的生理功能方面起着巨大的作用,在与 PCOS 高雄激素血症相关的高雄激素、排卵障碍、胰岛素抵抗及肥胖中所起的作用也不尽相同,其二者与 PCOS 高雄激素血症之间的具体机制错综复杂,目前还未透彻了解,需行大样本多中心的循证医学研究以进一步调查探讨,阐明 LP 及 LEPR 的作用,从而为揭示 PCOS 相关疾病的病因及其诊治开辟新途径。

综上所述并结合本研究结果提示,丹栀逍遥散可改善卵巢多囊样变,降低 PCOS 高雄激素血症大鼠血清雄激素、LP 水平,减少 LEPR 在卵巢组织的阳性表达,从而减少 LP 的生物利用度,进而抑制雄激素分泌,降低雄激素活性,有助于卵泡正常生长发育和优势卵泡的形成,促使卵巢正常排卵,改善大鼠高雄激素状态和卵巢排卵障碍功能。

参考文献:

- [1] Ardaw MSM, Rouzi AA. Plasma adiponectin and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2005,83(6):1708-1716.
- [2] Mendonça HC. Positive correlation of serum leptin with estradiol levels in patients with polycystic ovary syndrome[J]. *Brazilian Journal of Medical & Biological Research*, 2004, 37(5): 729-736.
- [3] Robin G, Catteau-Jonard S, Young J, et al. Physiopathological link between polycystic ovary syndrome and hyperprolactinemia: myth or reality? [J]. *Gynécologie, obstétrique & fertilité*, 2011, 39(3): 141-145.
- [4] Cominos AN. The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction [J]. *Human Reproduction Update*, 2014, 20(2): 153-174.
- [5] 程 涇,卢莉莉,程 蕾,等.益肾导痰调冲汤对多囊卵巢综合征大鼠瘦素及其受体和胰岛素样生长因子 I 受体表达的影响 [A].中国中西医结合学会妇产科专业委员会.第八届全国中西医结合妇产科学术大会论文及摘要集[C].重庆:中国中西医结合学会妇产科专业委员会,2012:6.
- [6] 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,(7):35-37.
- [7] 郑泳霞.中医辨证论治联合西药治疗多囊卵巢综合征的临床观察 [J].*湖南中医药大学学报*,2011,31(12):23-24.
- [8] 岑 怡.促排卵对多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗患者瘦素及性激素水平影响的临床研究[J].*河北中医*,2016,38(5):654-657.
- [9] 侯丽莹,邓丽玲,罗 佩,等.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.
- [10] Sun F, Yu J. The effect of a special herbal tea on obesity and anovulation in androgen-sterilized rats [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 2000, 223(3): 295-301.
- [11] Chekhranova MK, Karpova SK, Iatsyshina SB, et al. A new mutation c. 422C>G (p.S141C) in homo- and heterozygous forms of the human leptin gene [J]. *Bioorg K him*, 2008, 34 (6): 854-856.
- [12] 苏艳华,王雪金.瘦素受体在实验性多囊卵巢综合征大鼠卵巢中的表达及其意义 [J].*福建医科大学学报*,2009,43(1):18-22.
- [13] Li MG, Ding GL, Chen XJ, et al. Association of serum and follicular fluid leptin concentrations with granulosa cell phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 expression in fertile patients with polycystic ovarian syndrome [J]. *J ClinEndocrinol Metab*, 2007, 92(12): 4771-4776.

(本文编辑 杨 瑛)