

本文引用:黄威,鲁耀邦,熊桦,崔培梧.补肾化痰方对多囊卵巢综合征大鼠血清25羟基维生素D<sub>3</sub>、AMH、T、INS及E<sub>2</sub>的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(6):650-652.

## 补肾化痰方对多囊卵巢综合征大鼠血清25羟基维生素D<sub>3</sub>、AMH、T、INS及E<sub>2</sub>的影响

黄威<sup>1</sup>,鲁耀邦<sup>1,2\*</sup>,熊桦<sup>1</sup>,崔培梧<sup>2</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.国家中医药管理局中药药性与药效三级科研实验室,湖南长沙410208)

**〔摘要〕**目的 研究补肾化痰方对多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome,PCOS)模型大鼠血清25羟基维生素D<sub>3</sub>[25-(OH)VD<sub>3</sub>]、抗苗勒管激素(AMH)、血清睾酮(T)、胰岛素(INS)及雌二醇(E<sub>2</sub>)的影响。方法 61只SD雌性大鼠随机选取8只设为空白组,剩余大鼠采用来曲唑灌胃法建立PCOS大鼠模型。建模后大鼠随机分为模型组、中药组及西药组,给予相应药物干预后腹主动脉取血。采用酶联免疫吸附法测定药物干预后各组大鼠血清激素[25-(OH)VD<sub>3</sub>、AMH、T、INS、E<sub>2</sub>]含量,分析各组血清激素水平的差异。结果 空白组、中药组以及西药组的血清E<sub>2</sub>与25(OH)VD<sub>3</sub>浓度高于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),而AMH与INS浓度均低于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论 补肾化痰方对灌服来曲唑所致PCOS模型大鼠血清AMH、INS、25(OH)VD<sub>3</sub>与E<sub>2</sub>等激素水平有调节作用,能有效改善PCOS的无排卵、卵泡发育停滞及糖脂代谢紊乱等问题。

**〔关键词〕** 多囊卵巢综合征;25羟基维生素D<sub>3</sub>;抗苗勒管激素;睾酮;胰岛素;雌二醇

**〔中图分类号〕**R271;R285.5 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.06.009

### Effect of Bushen Huayu Decoction on Serum 25 Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, AMH, T, INS and E<sub>2</sub> in Rats with Polycystic Ovary Syndrome

HUANG Wei<sup>1</sup>, LU Yaobang<sup>1,2\*</sup>, XIONG Hua<sup>1</sup>, CUI Peiwu<sup>2</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Grade Three Scientific Research Laboratory of Chinese Medicine Administration, Changsha, Hunan 410208, China)

**〔Abstract〕 Objective** To study the effect of Bushen Huayu decoction on serum vitamin D<sub>3</sub>, adrenal medullary hyperplasia (AMH), testosterone (T), insulin (INS) and estradiol (E<sub>2</sub>) in polycystic ovary syndrome (PCOS) rats. **Methods** Eight rats were randomly selected from 61 SD female as the blank group. The remaining rats by gastric perfusion of letrozole were to establishment of PCOS rat models. After modeling, the rats were randomly divided into the model group, the Chinese medicine group and the Western medicine group. The blood of abdominal aorta was taken after the intervention of the corresponding drug intervention. The serum levels of 25 (OH)VD<sub>3</sub>, AMH, T, INS, and E<sub>2</sub> in each group after drug intervention were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The difference of serum levels in each group was analyzed. **Results** The concentrations of serum E<sub>2</sub> and 25(OH)VD<sub>3</sub> in the blank group, the Chinese medicine group and the western medicine group were higher than those in the model group, the results were significantly different ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The serum AMH and INS concentrations in the three groups were lower than those in the model group, which were significantly different ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **Conclusion** Bushen Huayu decoction can regulate the levels of AMH, INS, 25(OH)VD<sub>3</sub> and E<sub>2</sub> in the serum of letrozole-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) rat models, which can effectively improve PCOS's anovulatory, follicular development stagnation

**〔收稿日期〕**2018-03-01

**〔基金项目〕**湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金(ZYFT201506);湖南省高校创新平台开放基金项目(6001-0736);湖南省研究生科研创新项目(CX2016B360)。

**〔作者简介〕**黄威,女,在读硕士研究生,研究方向:临床中药。

**〔通讯作者〕**\*鲁耀邦,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:luyb414@sina.com。

and disorder of glycolipid metabolism.

〔Keywords〕 polycystic ovary syndrome; 25 (OH) VD<sub>3</sub>; anti-müllerian hormone; T; INS; E<sub>2</sub>

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome,PCOS)已成为妇科临床常见内分泌及代谢紊乱性疾病。该病在育龄妇女中发病率为5%~10%,导致无排卵性不孕的机率为75%,目前其发病率呈现逐年上升的趋势<sup>[1]</sup>。补肾化痰方为尤昭玲教授治疗PCOS患者的经验方,临床案例及动物实验均显示其能有效改善PCOS<sup>[2-3]</sup>。近年来,有研究表明PCOS患者的血清25(OH)VD<sub>3</sub>水平偏低<sup>[4]</sup>,而抗苗勒管激素(AMH)水平是正常女性2~3倍<sup>[5]</sup>。本实验通过研究补肾化痰方对PCOS模型大鼠血清25羟基维生素D<sub>3</sub> [25-(OH)VD<sub>3</sub>]、抗苗勒管激素(AMH)、睾酮(T)、雌二醇(E<sub>2</sub>)、胰岛素(INS)水平的影响,探讨补肾化痰方改善PCOS的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

TGL16M型高速低温离心机(湖南湘立科学仪器有限公司)、海尔-86℃超低温冰箱(海尔公司)、SC-316(商流)冷藏冰箱(海尔公司)、ELx800酶标仪(美国宝特Bio-Tek公司)。

### 1.2 药品与试剂

来曲唑(批号:16113057,规格:25 mg/片,江苏恒瑞医药股份有限公司)、补肾化痰汤每剂含生药85 g(处方调整为紫石英15 g,补骨脂8 g,泽兰8 g,菟丝子8 g,泽泻8 g,桑寄生8 g,土鳖虫8 g,覆盆子8 g,菟蔚子5 g,三七3 g,莲子心3 g,甘草3 g),以上两种药物均购自湖南中医药大学第一附属医院;炔雌醇环丙孕酮片(达英-35)(批号:331B,规格:2 mg/片,拜耳医药保健有限公司广州分公司)购自养天和大药房;AMH、T、E<sub>2</sub>、25(OH)VD<sub>3</sub>、INS检测免疫试剂盒均由上海纪宁实业有限公司提供;水合氯醛由天津市科密欧化学试剂有限公司提供。

### 1.3 动物

60日龄的SPF级雌性SD大鼠61只,体质量(226.690±0.008)g,许可证号SCXK(湘)2014-0011,饲料垫料均由长沙市天勤生物技术有限公司提供,于湖南中医药大学实验动物中心动物房饲养。

## 2 方法

### 2.1 PCOS大鼠模型建立

随机选取53只SD雌性大鼠,按照8 mL/kg剂量灌服浓度为0.125 mg/mL的来曲唑—羧甲基纤维

素溶液<sup>[6]</sup>,每天1次,共21 d。其余8只按照8 mL/kg(大鼠体质量)的剂量同期灌服1%羧甲基纤维素水溶液,每天1次,共21 d。随机取3只造模大鼠,通过观察光镜下卵巢组织形态验证模型是否成功。

### 2.2 药物干预

剩余模型大鼠随机分为三组,模型组16只大鼠按1 mL/150 g灌服生理盐水;中药组17只大鼠按1 mL/150 g灌服1.32 g/mL中药汤液;西药组17只大鼠按1 mL/150 g灌服0.0317 mg/mL达英-35。空白组8只大鼠按1 mL/150 g灌服生理盐水。四组均为1次/d,连续灌服3 d后停药1 d,为1周期。共16个周期。

### 2.3 标本采集

药物干预结束后,停食1 d。用10%水合氯醛腹腔注射麻醉后腹主动脉取血,待血液凝固后,4 500 g,低温离心5 min,取上清冻存于-85℃冰箱备用。

### 2.4 血清指标检测

将冻存的血清(空白组5只,模型组、中药组、西药组6只)于4℃冰箱解冻,采用酶联免疫吸附法,按试剂盒说明书操作分别检测血清25(OH)VD<sub>3</sub>、AMH、T、INS、E<sub>2</sub>等激素水平;每个样本平行测量3次后取均值。

### 2.5 统计学方法

使用SPSS 17.0软件对数据结果进行统计分析,计量数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。组间差异比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐时采用LSD检验,方差不齐时采用Dunnnett's T3检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 PCOS大鼠模型验证

肉眼观察模型大鼠的卵巢表面泛白;光镜下查看卵巢组织形态:卵泡发育停滞且卵巢呈多囊性扩张,卵泡内未见卵细胞为空卵泡,另见大量小窦状卵泡集聚,符合多囊卵巢综合征的卵巢组织形态病变,表明造模成功。见图1。

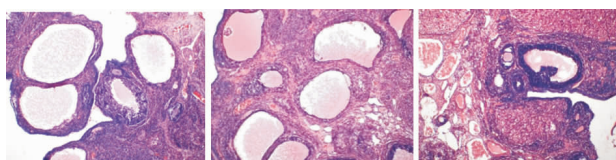


图1 PCOC模型大鼠卵巢局部形态(HE,×100)

### 3.2 各组大鼠血清激素检验结果

与空白组比较,模型组血清 25(OH)VD<sub>3</sub>、E<sub>2</sub> 水平均降低,AMH、INS 水平均升高,差异有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );与模型组相比,中药组、西药组的血清激素 25(OH)VD<sub>3</sub>、E<sub>2</sub> 浓度均升高,而血清

AMH、INS 浓度均降低,差异有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );与模型组比较,其他 3 组的血清激素 T 浓度差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。西药组与中药组比较,血清各激素水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠血清激素水平比较

( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	AMH/ng·mL <sup>-1</sup>	25(OH)VD <sub>3</sub> /ng·mL <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /pmol·L <sup>-1</sup>	T/pg·mL <sup>-1</sup>	INS/mU·L <sup>-1</sup>
空白组	5	8.27±0.04	21.83±0.07	38.61±0.10	168.17±0.20	19.02±0.07
模型组	6	14.16±0.23 <sup>△△</sup>	17.55±0.08 <sup>△</sup>	31.72±0.07 <sup>△</sup>	219.58±0.71	24.24±0.07 <sup>△△</sup>
中药组	6	8.9±0.05*	23.42±0.06**	38.76±0.03**	170.83±0.09	19.12±0.05**
西药组	6	8.84±0.06*	25.17±0.19**	42.20±0.13**	195.14±0.19	19.28±0.10**

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

## 4 讨论

当前,PCOS 已成为妇科临床最为常见的内分泌及代谢紊乱性疾病之一,其不仅导致育龄期妇女不孕不育,还能增加患者罹患心脑血管疾病和妇科肿瘤的风险<sup>[7]</sup>。因该病的病因病机较为复杂且病患的症状表征具有高度特异性,目前对于该病尚未有明确的治疗方针。短期内治愈该病的几率极低,大多数的治疗方案是从调节患者激素紊乱,改善 PCOS 症状着手。PCOS 的重要表现为卵巢病变,而在卵泡发育过程中,AMH 的抑制作用可导致卵泡发育停滞和无排卵现象的发生<sup>[8]</sup>。近年来,AMH 检测在妇科临床上具有重要意义,特别是在辅助诊断 PCOS 与药物疗效方面<sup>[9-11]</sup>。目前研究显示,PCOS 患者除内分泌紊乱外,还存在糖、脂及蛋白质代谢紊乱问题<sup>[12]</sup>。而 25(OH)VD<sub>3</sub> 参与糖脂代谢过程,另有一些研究表明,维生素 D 的缺乏可能是 PCOS 的病因之一<sup>[13-15]</sup>。

本次实验结果表明:与模型组相比,中药组与西药组的大鼠血清 AMH 及 INS 水平显著性下降,差异具有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。而 25(OH)VD<sub>3</sub> 与 E<sub>2</sub> 水平与之相反,中药组和西药组血清激素较模型组显著上升,差异具有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。虽然模型组与其他三组的血清 T 水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但模型组的血清 T 水平高于其他三组,值得关注的是,中药组血清 T 水平与空白组相近。通过该实验结果可以看出,中药组的激素水平与空白组更为接近,说明补肾化痰方在调节激素水平方面较西药治疗有较大的优势。

综上所述,补肾化痰方改善 PCOS 的作用机制可能与调节 PCOS 模型大鼠体内 T、INS、E<sub>2</sub> 水平,促进排卵,诱导卵细胞生长发育;降低 AMH 水平,促进卵泡发育,增加优势卵泡;升高 25(OH)VD<sub>3</sub> 水平,改善 PCOS 导致的糖脂代谢紊乱相关问题有关。当

然,要探讨更深层次的作用机制尚需进行代谢组学、基因组学及蛋白质组学等后续的实验研究。

### 参考文献:

- [1] 莫有敏,杨菁.二甲双胍联合克罗米芬治疗多囊卵巢综合征有效性的 Meta 分析[J].武汉大学学报(医学版),2013,34(1):99-104.
- [2] 罗佩,侯丽莹,邓丽玲,等.补肾化痰方对 PCOS 大鼠子宫内腺整合素 avβ3 及 LIF 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(3):254-258.
- [3] 姚绚.补肾化痰方对 PCOS 患者孕激素受体表达的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2013.
- [4] 廖鑫,张琳,张晗,等.多囊卵巢综合征患者血清 25(OH)D<sub>3</sub> 与糖脂代谢的相关性研究[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(10):1300-1303,1308.
- [5] 周密,丁旭,黄艳红.抗苗勒管激素与多囊卵巢综合征生殖内分泌的关系[J].中国妇幼保健研究,2017,28(11):1490-1493.
- [6] 杨正望,周芳,谈珍瑜,等.不同造模方法对大鼠多囊卵巢综合征模型的影响[J].中国实验动物学报,2010,18(1):13-16,94.
- [7] 李娟,马红霞,宋金龙,等.多囊卵巢综合征脂代谢异常的国内外研究进展及中医药治疗优势探讨[J].世界中医药,2015,10(7):1112-1116.
- [8] 陈晓,季银芬,徐键.抗苗勒氏管激素(AMH)与多囊卵巢综合征(PCOS)卵泡发育异常的关系[J].生殖与避孕,2014,34(5):383-387.
- [9] 何雪梅,李萍,沙艳伟,等.闽西南地区多囊卵巢综合征患者临床干预前、后血清抗苗勒管激素变化研究[J].生殖与避孕,2015,35(8):579-582.
- [10] 王丽萍,刘霞,方春霞,等.非肥胖的多囊卵巢综合征患者达英-35 治疗前后血清抗苗勒管激素变化[J].浙江医学,2016,38(24):2031-2033.
- [11] 娄英,王烈宏,董艳,等.高原地区多囊卵巢综合征患者抗苗勒氏管激素与临床检测指标的相关性分析[J].中国妇幼保健,2017,32(21):5378-5381.
- [12] 孙忻,丁彩飞,杨欣.补肾调肝方对非肥胖型多囊卵巢综合征患者糖脂代谢的影响[J].中国中西医结合杂志,2017,37(5):530-533.
- [13] 项守奎,王龙,吴阳,等.多囊卵巢综合征患者血清维生素 D 水平与抑郁症的关系[J].临床荟萃,2015,30(6):649-653.
- [14] 李茜西,伍萍芝,何琳琳,等.血清维生素 D 缺乏与多囊卵巢综合征的关联研究[J].中国妇幼保健,2015,30(21):3636-3638.
- [15] 杨坤,范雪梅,郗光霞.多囊卵巢综合征患者维生素 D 水平与糖脂代谢的研究[J].山西医药杂志,2017,46(16):2003-2005.

(本文编辑 李杰)