

·方药研究·

本文引用:和梦珂,张静,李昕,李凌楠,石静纹,郭健.苍附导痰汤对米非司酮诱导 PCOS 大鼠卵巢形态及雄激素的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(8):862-865.

苍附导痰汤对米非司酮诱导 PCOS 大鼠 卵巢形态及雄激素的影响

和梦珂¹,张静¹,李昕¹,李凌楠¹,石静纹¹,郭健^{2*}

(1.北京中医药大学第二临床医学院,北京 100078;2.北京中医药大学中医学院,北京 100029)

[摘要] 目的 探讨苍附导痰汤对米非司酮诱导多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)大鼠卵巢形态及雄激素的影响。方法 60只 Wistar 大鼠分为正常组、模型组、二甲双胍组和苍附导痰汤高、中、低剂量组。采用皮下注射米非司酮造模并以阴道涂片监测大鼠发情周期,造模成功后各组灌胃干预 9 d,处死动物,称量双侧卵巢质量,HE 染色观察卵巢形态及卵泡发育情况,放射免疫法测定血清睾酮水平。结果 和正常组比较,模型组大鼠血清睾酮水平、卵巢指数、窦前卵泡及初级卵泡数量明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$);和模型组比较,中药组及二甲双胍组大鼠血清睾酮、窦前卵泡数量、初级卵泡数量都明显降低($P<0.05$)。结论 苍附导痰汤作用于米非司酮诱导的 PCOS 大鼠,可降低血清睾酮水平,使 PCOS 大鼠窦前卵泡、初级卵泡数量明显减少,改善卵巢多囊样改变。

[关键词] 苍附导痰汤;米非司酮;多囊卵巢综合征;卵巢形态;睾酮;窦前卵泡

[中图分类号] R285.5;R711.75

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.08.005

Effect of Cangfu Daotan Decoction on Ovarian Morphology and Androgen in Rats with Mifepristone-Induced Polycystic Ovary Syndrome

HE Mengke¹, ZHANG Jing¹, LI Xin¹, LI Lingnan¹, SHI Jingwen¹, GUO Jian^{2*}

(1. Second Clinical Medical School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Cangfu Daotan Decoction on ovarian morphology and androgen in rats with mifepristone-induced polycystic ovarian syndrome (PCOS). **Methods** Sixty Wistar rats were divided into normal group, model group, metformin group, high-dose Cangfu Daotan Decoction group, medium-dose Cangfu Daotan Decoction group, and low-dose Cangfu Daotan Decoction group. A rat model of PCOS was established by subcutaneous injection of mifepristone. The oestrous cycle was monitored by vaginal smear. The rats received drugs by gavage for 9 days after successful establishment of the model. The rats were sacrificed, and both ovaries were weighted. HE staining was used to observe the ovarian morphology and follicular development. Radioimmunoassay was used to measure the level of serum testosterone. **Results** The model group had significantly increased serum testosterone, ovary index, and numbers of preantral and primary follicles than the normal group ($P<0.05$). The Cangfu Daotan Decoction groups and the metformin group had significantly reduced serum testosterone and numbers of preantral and primary follicles compared with the model group ($P<0.05$). **Conclusion** For rats with mifepristone-induced PCOS, Cangfu Daotan Decoction can reduce the level of serum testosterone and the numbers of preantral and primary follicles. As a result, the quality of the ovary in rats is reduced and the polycystic changes in the ovary are improved.

[Keywords] Cangfu Daotan Decoction; mifepristone; polycystic ovarian syndrome; ovarian morphology; testosterone; preantral follicle

[收稿日期] 2017-11-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81273610);教育部大学生创新性实验计划项目(201410026052)。

[作者简介] 和梦珂,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合临床。

[通讯作者] *郭健,女,教授,硕士研究生导师,E-mail: guojian323@sina.com。

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是妇科常见的内分泌代谢紊乱综合征, 发病率占生育年龄妇女的 5%~10%。PCOS 导致的高度不孕率对患者的身心造成了极大的伤害, 但由于 PCOS 发病原因不明、病理涉及多系统、临床表现多态性, 使得 PCOS 的治疗出现多法多方^[1-3]。临床常见 PCOS 的中医分型有肾阴虚、肾阳虚、痰湿阻滞、肝经湿热、气滞血瘀等^[4]。针对痰湿阻滞型 PCOS 患者, 临床应用苍附导痰汤疗效显著^[5-9], 然具体的作用机制有待进一步研究, 本实验主要探讨苍附导痰汤对米非司酮诱导的 PCOS 大鼠卵巢形态及雄激素的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

6 周龄 Wistar 雌性大鼠 60 只, 体质量(200±20) g, 清洁级, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号: SYXK(京)2014-0010。60 只大鼠先随机分出正常组 6 只, 实验组 54 只。实验组中 44 只大鼠造模成功, 再随机分为模型组 8 只, 二甲双胍组及苍附导痰汤高、中、低剂量组各 9 只。

1.2 药品及试剂

苍附导痰汤由苍术 10 g, 香附 10 g, 半夏 10 g, 陈皮 10 g, 茯苓 15 g, 胆南星 5 g, 枳壳 10 g, 生姜 6 g, 炙甘草 10 g 组成^[10], 购于北京中医药大学第三临床医学院, 制成颗粒剂。苍附导痰汤高剂量组、中剂量组、低剂量组浓度比为 4:2:1。盐酸二甲双胍(北京京丰制药有限公司, 国药准字 H11021518); 米非司酮片(北京紫竹药业有限公司, 国药准字 H10950003); PBS 干粉、瑞氏染液、苏木素、伊红购于北京百诺威生物科技有限公司; 甲醛、乙醇购于北京健力园医疗器械有限公司。

1.3 主要仪器

德国 Sartorius BAS223S 精密电子天平; 上海一恒科学仪器有限公司 DHG-9055A 鼓风干燥箱; 德国 Leica RM2245 石蜡切片机; 日本 Olympus Optical BX53 光学显微镜。

1.4 造模方法与干预

采用孕激素拮抗剂米非司酮造模的方法进行

PCOS 大鼠造模。正常组大鼠连续 9 d 皮下注射 0.2 mL 橄榄油。实验组大鼠连续 9 d 皮下注射米非司酮, 用量为 4 mg/0.2 mL 橄榄油; 第 7、8、9 天, 监测阴道涂片, 若连续 2 d 以上观察到同一只大鼠阴道有角化细胞出现提示造模成功。造模成功后, 二甲双胍组给予 10 mg/(kg·d), 苍附导痰汤高、中、低剂量组分别给予 1 965.7 mg/(kg·d), 982.9 mg/(kg·d), 491.4 mg/(kg·d), 正常组、模型组给予蒸馏水 10 mg/(kg·d)。共干预 9 d。

1.5 标本采集及观察指标^[11-12]

各组大鼠每天灌胃前称量并记录大鼠体质量。(1) 干预 9 d 后, 腹腔麻醉, 剥离双侧卵巢观察记录卵巢大体形态并称质量, 计算并记录卵巢指数。卵巢指数=卵巢质量(mg)/大鼠体质量(g)×100%。(2) 双侧卵巢福尔马林固定后石蜡切片脱蜡、梯度酒精水化、HE 染色后光学显微镜观察各级卵泡发育情况; 首先在(HE×40)分左上、左下、右上、右下四个视野分别记录各级卵泡数量并计算总和, 对于不能明确分级的卵泡于(HE×100)、(HE×400)进一步确定。(3) 腹主动脉取血, 离心取上层血清, 2 000 r/min 离心 10 min, 分离上层血清, -20 ℃ 保存, 交由北京北方生物技术研究所测定睾酮浓度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析, 计数资料用 χ^2 检验。计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示; 数据首先进行正态性和方差齐性检验, 当满足正态分布及方差齐性时: 造模前后、用药后大鼠质量变化采用配对样本 *t* 检验, 其他计量资料采用数据组间单因素方差分析; 当不满足正态分布或方差不齐时, 造模前后、用药后大鼠质量变化采用配对样本非参数检验, 其他计量资料采用数据组间独立样本秩和检验。 $P < 0.05$ 认为所检验的差异有统计意义。

2 结果

2.1 大鼠质量、卵巢指数、血清睾酮水平

大鼠质量正常组、各给药组与模型组间比较均无差异($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型组大鼠卵巢指数明显升高($P < 0.05$), 给药后低剂量组大鼠卵巢指数较模型组明显降低($P < 0.05$); 与正常组比较,

模型组大鼠血清睾酮水平明显升高($P<0.05$),干预后各给药组大鼠血清睾酮水平较模型组均明显降低($P<0.05$)。

表1 各组大鼠造模前后质量比较及卵巢指数、血清睾酮比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	质量/g			卵巢指数 ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$)	血清睾酮浓度 ($\text{ng}\cdot \text{mL}^{-1}$)
		造模前	造模后	用药后		
正常组	6	197±6	219±8	225±11	0.948 1±0.393 9	0.80±0.17
模型组	8	204±7	210±9	216±10	1.218 7±0.163 6 [#]	1.37±0.24 [#]
苍附导痰汤低剂量组	9	205±12	215±13	220±13	0.975 0±0.191 1*	1.08±0.27 [#]
苍附导痰汤中剂量组	9	207±11	215±11	219±12	1.166 8±0.186 5	1.08±0.19 [#]
苍附导痰汤高剂量组	9	204±18	216±9	221±12	1.289 0±0.181 5 [#]	1.09±0.19 [#]
二甲双胍组	9	206±8	215±6	216±8	1.185 1±0.196 4	1.06±0.23 [#]

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 卵巢形态

大鼠卵巢呈卵圆形。正常组大鼠卵巢鲜红;模型组大鼠卵巢颜色较为苍白;各给药组大鼠卵巢颜色偏红。光镜下正常组可见分布较为均匀的各个阶段卵泡,颗粒细胞层多为8~10层。模型组可见窦前卵泡及闭锁卵泡明显增多且聚集明显,卵泡颗粒细胞层明显减少至2~4层,成熟卵泡及黄体数量减少。各给药组可见各个阶段卵泡,卵泡发育情况良好,颗粒细胞层多为3~7层,窦前卵泡及闭锁卵泡较少,成熟卵泡和黄体数量较模型组有所增加。见图1。

2.3 卵巢处于不同发育期的卵泡个数

正常组及各给药组窦前卵泡个数、初级卵泡个

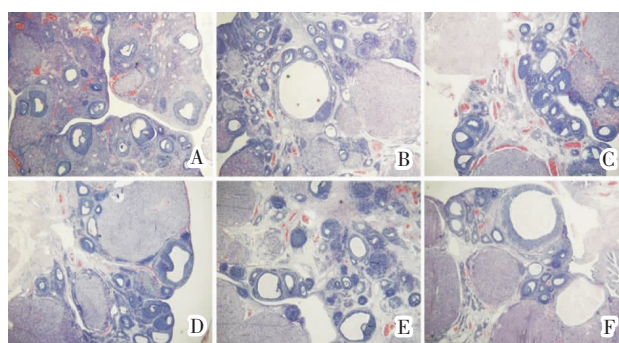


图1 各组大鼠卵巢组织切片(HE,×100)
A.正常组;B.模型组;C.苍附导痰汤低剂量组;D.苍附导痰汤中剂量组;E.苍附导痰汤高剂量组;F.二甲双胍组

图1 各组大鼠卵巢组织切片(HE,×100)

数均明显小于模型组($P<0.05$)。见表2。

表2 药物干预后各组卵巢初级、次级、窦前、成熟卵泡个数比较 ($\bar{x}\pm s$)

级别	n	初级卵泡/个	次级卵泡/个	窦前卵泡/个	成熟卵泡/个
正常组	6	13.40±3.29	13.00±5.96	26.60±6.03	4.40±1.34
模型组	8	27.00±13.53 [#]	21.00±7.56 [#]	48.00±16.28 [#]	5.25±2.12
苍附导痰汤低剂量组	9	13.78±2.33*	16.56±5.20	30.33±6.84*	7.56±4.33
苍附导痰汤中剂量组	9	12.11±8.04*	17.11±8.49	29.56±15.75*	7.22±3.31
苍附导痰汤高剂量组	9	8.13±2.85*	14.63±7.07	23.00±8.02*	9.38±6.32
二甲双胍组	9	16.13±8.01*	18.13±5.69	34.38±11.06*	7.50±5.56

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

根据PCOS患者的临床表现,中医学多将PCOS归于“月经后期”“月经过少”“闭经”“不孕”等范畴。《丹溪心法·子嗣》云:“若是肥盛妇人,禀赋甚厚,恣于酒食之人,经水不调,不能成胎,谓之躯脂满溢,闭塞子宫,宜行湿燥痰。”而PCOS患者约一半伴有肥胖,绝大多数有月经稀发或闭经的症状,部分因不孕而就诊。《叶天士女科诊治秘方》中提到:“肥盛妇人无

子者,宜服苍附导痰丸。”因而,针对痰湿阻滞型PCOS患者,临床治疗常以苍附导痰汤加减。赵娜等^[13]认为胰岛素抵抗是PCOS发病的主要病理机制,二甲双胍可以提高胰岛素的敏感性,改善胰岛素抵抗,黄晓等^[14]通过文献研究统计发现,二甲双胍可改善PCOS的激素水平、促进排卵功能、改善并发症发病率;欧幸甘等^[15]通过对PCOS患者服用二甲双胍后BMI、WHR、激素水平统计发现二甲双胍治疗PCOS安全、有效,副作用少,值得应用。

根据 2003 年欧洲人类生殖与胚胎学会和美国生殖学会在荷兰鹿特丹订立的诊断标准^[16]发现,PCOS 患者多具有高雄激素血症和卵巢形态学异常。本实验首次采用米非司酮造模的方法进行苍附导痰汤对 PCOS 大鼠卵巢形态及雄激素干预的研究。该造模方法除了内分泌和卵巢形态学改变与 PCOS 类似,其对于药物的反应性上也和 PCOS 患者有很大的相似程度^[17],而且米非司酮诱导的 PCOS 大鼠具有 PCOS 的典型特征^[11,18],对于研究苍附导痰汤能否改善 PCOS 高雄激素状态及卵巢形态较为合适。苍附导痰汤作用于米非司酮诱导的 PCOS 大鼠,可降低血清睾酮水平,使 PCOS 大鼠窦前卵泡、初级卵泡数量明显减少,从而引起大鼠卵巢质量降低。本实验发现苍附导痰汤降低米非司酮诱导的 PCOS 大鼠血清睾酮水平,从而减少高雄激素对卵泡选择生长的抑制,进而减少窦前卵泡、初级卵泡数量从而达到改善 PCOS 的目的。在此研究的基础上,苍附导痰汤是否能促进优势卵泡发育仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 黄玉华.柴松岩教授学术思想与临床经验总结及基于关联规则的多囊卵巢综合征用药规律研究[D].北京:北京中医药大学,2011.
- [2] 谈 勇.试从现代妇科疾病谈中医诊治理念[J].江苏中医药,2004,25(3):14-16.
- [3] 卢 芳.中医妇科学理论与实践能力提高的方法初探及临床体会[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2006.
- [4] 杜惠兰.中西医结合妇产科学[M].北京:中国中医药出版社,2013:163-164.
- [5] 刘芦屏.苍附导痰汤治疗肥胖型多囊卵巢综合征的效果探讨[J].中医临床研究,2012,4(8):122.
- [6] 刘桂英,廖燕飞,黎玉婷,等.加减苍附导痰汤联合减肥治疗肥胖型多囊卵巢综合征的疗效观察[J].中国民康医学,2014,26(15):6-8.
- [7] 陈淑琴.苍附导痰丸加减治疗痰湿内阻型多囊卵巢综合征不孕症的临床观察[D].福州:福建中医药大学,2014.
- [8] 蒋孟芳.苍附导痰汤加减治疗痰湿阻滞型 PCOS 的临床研究[D].广州:广州中医药大学,2011.
- [9] 李志中.苍附导痰汤治疗痰湿阻滞型多囊卵巢综合征的临床研究[D].广州:广州中医药大学,2010.
- [10] 王 岩,陈 莹,王 昕.苍附导痰汤对多囊卵巢综合征大鼠瘦素、脂联素、肿瘤坏死因子- α 影响[J].中华中医药学刊,2012,30(2):418-420.
- [11] 杨智莺,肖国宏,侯棚钟,等.米非司酮诱导大鼠 PCOS 动物模型的实验研究[J].现代妇产科进展,2011,20(8):637-640.
- [12] 吴克明,付 雨,吴也可,等.通脉大生片对雷公藤致卵巢损伤大鼠卵巢激素与卵泡发育的影响[J].成都中医药大学学报,2011,34(3):25-28.
- [13] 赵 娜,杨正望,全春梅.多囊卵巢综合征临床分型与中医证型的相关性分析[J].湖南中医药大学学报,2017,37(9):966-968.
- [14] 黄 晓,吉 柳,谢红梅,等.二甲双胍治疗多囊卵巢综合征研究进展[J].中国药房,2014,25(12):1143-1145.
- [15] 欧幸甘,覃秋萍.二甲双胍治疗多囊卵巢综合征的临床效果观察[J].当代医学,2010,16(26):66-67.
- [16] The Rotterdam ESHRE / ASRM sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome[J]. Hum Report, 2004,19(1):41.51.
- [17] 陈之江.多囊卵巢综合征——基础与临床[M].北京:人民卫生出版社,2009:2.
- [18] 杨智莺.GnRH 受体在米非司酮诱导 PCOS 大鼠垂体中的表达及意义[D].广州:广州医学院,2010.

(本文编辑 杨 瑛)