

本文引用:余小乔,李云君.电针对PCOS模型大鼠性激素及卵巢组织TSP-1表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(4):511-515.

电针对PCOS模型大鼠性激素及卵巢组织 TSP-1表达的影响

余小乔¹,李云君^{2*}

(1.湖北中医药大学,湖北 武汉 430061;2.湖北省中医院妇产科,湖北 武汉 430061)

〔摘要〕目的 探讨电针对多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)模型大鼠的治疗作用,以及对卵巢组织中血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1)表达的影响。**方法** 将32只雌性SD大鼠随机分为空白组10只、模型组12只、电针组10只,采用1 mg/kg来曲唑加1%羧甲基纤维素灌胃建立PCOS大鼠模型。治疗后检测大鼠血清睾酮(testosterone, T)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)水平,HE染色观察卵巢组织病理结构改变,免疫组化法检测卵巢组织中TSP-1的表达。**结果** 治疗后,电针组大鼠体重增量和卵巢相对质量较模型组降低($P<0.01$),血清T、LH水平及LH/FSH均较模型组降低($P<0.01$),卵巢切片可见小囊状扩张卵泡较模型组减少,颗粒细胞层增厚;TSP-1表达于卵巢组织颗粒细胞和卵泡膜细胞的胞浆,模型组TSP-1表达量较低空白组降低($P<0.01$),电针组TSP-1表达较模型组升高($P<0.05$)。**结论** 电针治疗可改善PCOS大鼠性激素紊乱状态,提高卵巢组织中TSP-1的表达,通过调节血管抑制因子、减少卵巢组织中血管新生、改善微循环以达到治疗PCOS的目的。

〔关键词〕 多囊卵巢综合征;电针;性激素;血小板反应蛋白-1

〔中图分类号〕R245 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.04.016

Effects of Electroacupuncture on Sex Hormone and Expression of TSP-1 in Ovarian Tissue of PCOS Rats

YU Xiaoqiao¹, LI Yunjun^{2*}

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China; 2. Obstetrics and Gynecology
Department, Chinese Medicine Hospital of Hubei, Wuhan, Hubei 430061, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the therapeutic effects of electroacupuncture (EA) on polycystic ovary syndrome (PCOS) model rats and its effects on the expression of thrombospondin-1 (TSP-1) in ovarian tissues. **Methods** A total of 32 female SD rats were randomly divided into the blank group ($n=10$), the model group ($n=12$), and the EA group ($n=10$). PCOS rat model was established by intragastric administration of 1 mg/kg letrozole dissolved in 1% carboxymethylcellulose (CMC). After treatment, serum levels of testosterone (T), luteinizing hormone (LH), and follicle stimulating hormone (FSH) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The pathological changes of the ovarian tissue were observed by HE staining. The expression of TSP-1 in ovarian tissues was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the model group, the body weight gain and the relative ovarian mass of the EA group were decreased when compared with the model group ($P<0.01$), and the serum T, LH levels and LH/FSH were decreased when compared with the model group ($P<0.01$). The HE staining of the ovarian tissue showed decreased cystic expansion follicles, and the granular cell layer was obviously thicker. TSP-1 was expressed in the cytoplasm of ovarian tissue granulosa cells and ovarian membrane cells. The expression of TSP-1 was decreased in the model group than in the blank group ($P<0.01$). After treatment, the expression of TSP-1 in the EA group was increased when compared with model group ($P<$

〔收稿日期〕2018-09-06

〔基金项目〕中科院中基所自主项目(YZ-1741);湖北省中医药中西医结合科研项目(鄂卫生计生通[2017]20号)。

〔作者简介〕余小乔,女,硕士,研究方向:中医治疗多囊卵巢综合征。

〔通讯作者〕*李云君,女,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:yejun84@126.com。

0.05)。Conclusion Electroacupuncture can improve the state of sex hormone disorder in PCOS rats, increase the expression of TSP-1, reduce the angiogenesis in ovarian tissue by regulating angiogenesis inhibitors, and improve microcirculation to achieve the purpose of treating PCOS.

[Keywords] polycystic ovary syndrome; electroacupuncture; sex hormone; thrombospondin-1

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种常见的妇科疾病,主要是由神经、内分泌及代谢系统失衡引起,它以持续无排卵、卵巢多囊样改变、高雄激素血症等为主要特征^[1]。血管生成在周期性改变的排卵过程中起重要作用,卵泡发育和黄体形成都依赖于毛细血管网生成,而卵巢组织的血流灌注也会随着卵泡发育和激素水平的周期性变化而改变^[2]。PCOS患者卵巢间质及卵泡囊的血管高度增生,使得卵巢表面呈结节状突起,超声检查可发现其卵巢基质血流增加,血管丰富且清晰,动脉血管阻力低于正常妇女^[3]。针刺已被证实能够通过调节下丘脑-垂体-卵巢轴改善人体内分泌^[4],有研究发现电针可通过增强梗死灶周围血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和促血管生成素-1(angiotensin-1, Ang-1)的表达从而促进缺血区的血管新生^[5],Tal等^[6]认为PCOS的血管生成促进因子和抑制因子的动态平衡被打破,导致血管生成处于失调状态。TSP家族是重要的血管抑制因子,血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1)在卵泡生长、黄体生成、卵巢血管生成等方面发挥着调节功能^[7]。本文旨在研究PCOS大鼠卵巢组织中TSP-1的表达是否失调以及电针治疗在血管生成方面的影响。

1 实验材料

1.1 动物

6周龄SPF级雌性SD大鼠32只,体质量180-200g,由湖北省实验动物研究中心提供,动物许可证号:SYXK(鄂)2015-0018。饲养环境:室温18-20℃,湿度65%-70%,自由进食饮水。本实验过程遵守实验动物福利伦理原则。

1.2 试剂与药品

来曲唑,批号LRAB3683;羧甲基纤维素,批号C-4888,均购自Sigma公司。抗体TSP-1,批号bs-2715R, Bioss公司。睾酮(testosterone, T)试剂盒,批号E-EL-0072c;黄体生成素(luteinizing hormone, LH)试剂盒,批号E-EL-R0026c;卵泡雌激素(follicle-stimulating hormone, FSH)试剂盒,批号E-EL-R0391c,

均购自伊莱瑞特公司。

1.3 仪器

微型高速离心机,C2500-R-230V,美国Labnet;电热恒温培养箱,ICV-450,日本ASONE;全自动酶标仪,Multiskan MK3,美国热电;病理切片机,德国Leica RM;脱水机,俊杰JT-12J;组织摊烤片机,俊杰JK-6;抗原修复用电烤炉,SKG;显微镜,奥林巴斯BX53;低频电子脉冲治疗仪:G6805-2A,上海华谊牌。

2 实验方法

2.1 分组及造模

按随机数字表法将大鼠分为3组:空白组、模型组、电针组,模型组12只,其余两组各10只。空白组用1%羧甲基纤维素灌胃,其余两组参照kafali^[8]方法,用1mg/(kg·d)来曲唑加1%羧甲基纤维素灌胃,连续灌胃30d。

2.2 治疗方法

电针组取穴参照《实验针灸学》^[9]和《大鼠穴位图谱》^[10]定位。将大鼠置于自制鼠衣中,暴露四肢及腹部,选取后三里:直刺7mm,左右两侧;三阴交:直刺5mm,左右两侧;关元:直刺2mm。后三里和三阴交:分别将两侧同名穴的针柄作为一组接至2个电极片上;关元:一个电极片连接关元穴针柄,另一个电极片连导丝缠绕于大鼠尾部中段。电针频率为2Hz,连续波,强度以肌肉轻微抖动为度,连续20min。每天1次,9d为1个疗程,疗程间休息1d,共3个疗程。

模型组大鼠置于鼠衣中,只捆绑,不行针刺。空白组大鼠常规饲养,不做任何处理。

2.3 样本收集

治疗结束后,于处死前禁食8h,空腹状态麻醉后,手术开腹采集腹主动脉血,分离血清,置于-20℃保存;取出双侧卵巢,称质量后一侧卵巢置于10%甲醛溶液中固定,另一侧卵巢-80℃冻存备用。脱水后以卵巢最大平面作为待检平面行石蜡包埋,以4μm厚度进行切片,制作HE染色病理片和免疫组化病理片。

2.4 指标检测

2.4.1 大鼠动情周期检测 造模15 d后,每日上午9点对大鼠进行阴道涂片,镜下观察细胞形态,并判断动情周期的变化。

2.4.2 大鼠体质量以及卵巢相对质量 取出卵巢后称湿重,根据大鼠体质量和卵巢重量计算卵巢相对质量。

2.4.3 卵巢组织病理形态 卵巢置于10%甲醛溶液中固定,行脱水石蜡包埋后制作HE染色病理切片,于镜下观察卵巢组织病理形态改变。

2.4.4 血清性激素检测 采集腹主动脉血并分离血清,ELISA法分别测定大鼠血清T、LH、FSH水平,严格按照试剂盒说明书操作,测定后计算LH/FSH比值。

2.4.5 免疫组化法检测卵巢组织中TSP-1的表达 镜下观察免疫组化病理切片中阳性细胞的表达部位。在400倍视野下,每张切片取不重叠的5个区域,定位后由摄像系统提取数字化细胞图像,输入至IPP6.0图像分析系统对阳性染色区域进行光密度分析,计算平均光密度值,TSP-1表达的强弱与平均光密度值呈正相关。

2.5 统计分析

采用SPSS 22.0统计软件进行分析,各组数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),均数间两两比较方差齐时采用LSD检验,方差不齐时用Dunnnett's T3检验;若不满足正态性,则采用非参数检验的Kruskal-Wallis H检验。均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动情周期的变化和造模效果

造模20 d后,模型组和电针组阴道涂片可见大量黏液和白细胞,处于持续动情间期,失去规律的动情周期变化;空白组仍保持5~6 d规律的动情周期变化。造模30 d后,模型组大鼠较空白组体质量明显增加,随机抽取2只模型组大鼠处死,解剖后行卵巢形态学检查,卵巢体积较正常同龄大鼠增大,卵巢周围有较多脂肪及纤维组织包裹,将卵巢组织制作病理切片,镜下可见卵泡发育停滞,未见优势卵泡,大量小窦状卵泡集聚,卵巢形成多囊样改变,证实造模成功。见图1。

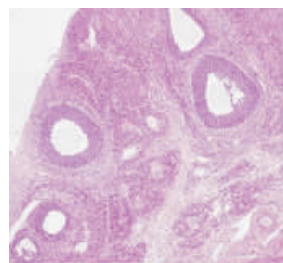


图1 PCOS模型大鼠卵巢局部形态(HE,×100)

3.2 体质量变化情况

与空白组相比,模型组体质量增量、卵巢相对质量显著升高($P<0.01$);电针组体质量增量、卵巢相对质量与模型组相比显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见表1。

表1 3组大鼠体质量变化及卵巢相对质量比较($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	大鼠体质量/g	体质量增量/g	卵巢相对质量/(mg/100 g 体质量)
空白组	253.33±7.99	64.50±5.72	20.39±0.23
模型组	334.00±8.41**	149.00±5.29**	23.80±0.28**
电针组	305.17±11.25 ^{△△}	117.83±9.79 ^{△△}	21.40±0.49 ^{△△}
F值	115.129	210.065	149.558
P值	0.000	0.000	0.000

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比, $\Delta\Delta P<0.01$

3.3 血清性激素水平

与空白组相比,模型组血清T、LH含量及LH/FSH显著升高($P<0.01$);电针组T、LH含量及LH/FSH与模型组相比降低($P<0.01$);各组FSH水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2 3组大鼠性激素比较($n=10, \bar{x}\pm s$)

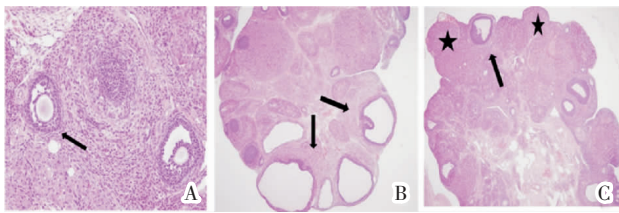
组别	T/(ng·dL ⁻¹)	LH(mIU·mL ⁻¹)	FSH(mIU·mL ⁻¹)	LH/FSH
空白组	67.35±4.67	3.68±0.37	2.19±0.19	1.69±0.26
模型组	109.85±8.56**	7.73±0.62**	2.06±0.36	3.86±0.76**
电针组	91.29±5.91 ^{△△}	5.08±0.90 ^{△△}	2.13±0.14	2.38±0.38 ^{△△}
F值	62.825	57.176	0.416	27.935
P值	0.000	0.000	0.626	0.000

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比, $\Delta\Delta P<0.01$

3.4 卵巢组织学改变

HE染色后镜下可见:空白组(图2A)卵泡颗粒细胞呈多层,较厚,形态完整,排列整齐,卵巢内可见优势卵泡;模型组(图2B)肉眼观色泽较苍白,可见较多早期发育的小卵泡和闭锁卵泡,无成熟卵泡及黄体,并出现多个囊状扩张卵泡,卵泡内卵母细胞多数消失,颗粒细胞层数减少,未见排卵迹象;电针组(图2C)大

鼠卵巢可见不同发育阶段的卵泡,还可见多个黄体,且出现了优势卵泡,说明大鼠恢复了正常排卵。

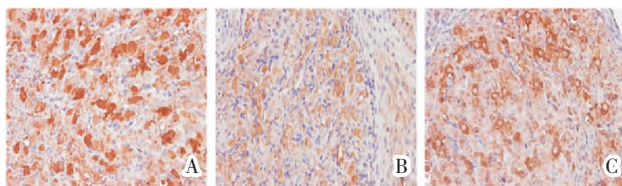


注:A.空白组(↑:优势卵泡,×100);B.模型组(↑:卵泡呈囊性改变,×40);C.电针组(↑:优势卵泡,★:黄体,×40)

图2 卵巢组织学改变(HE染色)

3.5 TSP-1 在卵巢组织中的表达

TSP-1 在各组大鼠卵巢组织中均呈阳性反应,主要表达于卵巢组织颗粒细胞和卵泡膜细胞的胞浆中。空白组有较多染色深的棕黄色颗粒,光密度分析发现 TSP-1 阳性表达较强(图 3A);模型组中阳性细胞数明显减少,TSP-1 阳性表达明显降低(图 3B);电针组中 TSP-1 阳性表达较模型组增强(图 3C)。对免疫组化照片进行光密度分析,与空白组相比,模型组平均光密度降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组相比,电针组平均光密度升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。



注:A.空白组;B.模型组;C.电针组

图3 TSP-1 在各组卵巢组织中的表达(×400)

表3 3组大鼠卵巢组织 TSP-1 表达的光密度($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TSP-1
空白组	10	0.066 36±0.006 12
模型组	10	0.032 43±0.006 96**
电针组	10	0.040 52±0.004 62 [△]
F 值		48.38
P 值		0.000

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比, $\Delta P<0.05$

4 讨论

针灸辨证是以调整阴阳的偏盛偏衰以达阴阳平衡为原则指导临床^[11],PCOS 患者内分泌常表现为高雄、低雌激素,贺晓霞等^[12]根据《内经》中“阴阳以平为期”的宗旨,认为此病是由于阴阳失衡,女性周期节律失序而导致,其中肾虚肝郁证是分布较多的中

医证型^[13]。大量临床观察^[14-15]证实针刺可有效改善 PCOS 患者的生殖内分泌状态。胰岛素抵抗是 PCOS 的病理特征之一,现代研究^[16]认为电针可通过激活交感神经和部分副交感神经系统进而提高全身葡萄糖摄取率。宫静等^[17]研究表明针刺关元、三阴交可调整下丘脑-垂体-卵巢轴的功能,进而改善内分泌激素水平。王君等^[18]研究发现针刺足三里可使穴区微血管灌注量增加,改善神经及淋巴管的血液运行,使神经末梢兴奋性提高,最终启动神经-内分泌-激素网络整体调节。《金针王乐亭》云:“三阴交,为治血之要穴”,本实验中选取三阴经之交会穴三阴交,疏通肝、脾、肾三经经气;选取足三阴、任脉之交会穴关元,培肾固本、调理冲任,且位于腹部,可直达病所;选取足阳明之合穴足三里,调和气血。

杨正望等^[19]发现 PCOS 大鼠卵泡颗粒细胞层中雄激素向雌激素转化的最后一步限速酶 P450arom 蛋白呈低表达。孙洁等^[20]发现 PCOS 大鼠在电针作用下 P450arom 表达增强,而细胞内雄激素合成酶 P450c17 α 表达降低,从而调节 PCOS 生殖内分泌异常。林鸾^[21]发现穴位刺激能下调促性腺激素受体 LHR 和 FSHR mRNA 的表达,改善卵巢对促性腺激素的高敏感性。本实验模型组大鼠 T、LH 升高,FSH 无显著性差异,一方面由于 FSHR mRNA 表达可能增高^[21],故卵巢对正常水平 FSH 的反应性增高,使大量小卵泡被募集进入发育过程;另一方面由于卵泡膜细胞的 LHR mRNA 高表达^[21],使卵泡膜细胞对 LH 的反应性增高,从而激活 P450c17 α 的活性,合成过量的雄激素,而颗粒细胞在高水平的 LH 作用下,其分裂能力会显著降低,卵泡发育停滞,导致无优势卵泡生成。电针治疗降低了 T、LH 水平,我们认为机体内分泌紊乱与卵巢间质血流的变化是相关的,故推测电针通过调节卵巢内微循环,使处于紊乱状态的因子重新分布,调节卵巢内促性腺激素受体的表达,使其发挥正常的作用。

TSP-1 是重要的血管抑制因子,通过与受体 CD36 结合,参与颗粒细胞增殖与黄体调亡的生理过程;还能通过抑制 VEGF 及其下游因子的表达来抑制血管生成。子宫内膜癌、卵巢癌患者病灶组织中 TSP-1 的表达减少,提示 TSP-1 的低表达导致了病灶周围血管生成增加^[22-23]。本研究发现,PCOS 大鼠卵巢组织中 TSP-1 阳性表达明显减弱,病理切片中也发现卵

巢间质血管增多,证实了PCOS存在卵巢间质微血管的增生,同时也提示了TSP-1表达降低,可能失去对某些促血管生成因子的制约,从而增加卵巢血管化。本实验中,电针治疗后TSP-1阳性表达增强,我们推测电针通过上调TSP-1的表达,抑制病变区域的血流信号,使卵巢内紊乱的激素及相关细胞因子重新分布,进而逆转整个病理过程,而与之相关的其它细胞因子有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] ROTTERDAM ESHRE. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome[J]. *Fertility and Sterility*, 2004,81(1):19-25.
- [2] QIU J J, LIU Y L, LIU M H, et al. Ovarian interstitial blood flow changes assessed by transvaginal colour Doppler sonography: predicting ovarian endometrioid cyst-induced injury to ovarian interstitial vessels[J]. *Archives of Gynecology&Obstetrics*, 2012,285(2):427-433.
- [3] 任凤岩,李一宁,王丹波,等.血管生成与多囊卵巢综合征发病机制的关系[J].*中国全科医学*,2007,10(13):1121-1123.
- [4] 王凡,张正红,肖开转,等.下丘脑-垂体-肾上腺轴和下丘脑-垂体-卵巢轴在多囊卵巢综合征神经内分泌功能紊乱中的作用[J].*中国医学科学院学报*,2017,39(5):699-704.
- [5] 万赛英,谭峰,方美凤,等.电针干预高血压大鼠脑缺血血管内皮生长因子和促血管生成素1表达的研究[J].*中华老年心脑血管病杂志*,2010,12(2):173-176.
- [6] RESHEF T A L, DAVID B S, RICHARD V G, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 are altered in polycystic ovarian syndrome during controlled ovarian stimulation[J]. *Vascular cell*, 2013,5(1):18.
- [7] OSZ K, ROSS M, PETRIK J.The thrombospondin-1 receptor CD36 is an important mediator of ovarian angiogenesis and folliculogenesis[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2014(12): 21.
- [8] KAFALI H, IRIADAM M, OZARDAII I, et al. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease[J]. *Archives of Medecal Research*, 2004,35(2):103-108.
- [9] 余曙光,徐斌.实验针灸学[M].北京:人民卫生出版社,2012:1.
- [10] 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等.大鼠穴位图谱的研制[J].*实验动物与动物实验*,1991(1):1-5.
- [11] 曾仁宏,陈家旭.针灸辨证选穴之探讨[J].*吉林中医药*,2008,28(2):86-87.
- [12] 贺晓霞,王若光.平衡阴阳法对多囊卵巢综合征雌雄激素的调节[J].*湖南中医药大学学报*,2016,36(2):16-19.
- [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] 施茵,虞莉青,尹小君.针灸治疗肥胖型多囊卵巢综合征的临床疗效观察[J].*中华中医药学刊*,2010,28(4):805-807.
- [15] 卓缘圆,吴家满,杨卓欣,等.“调任通督针刺法”治疗多囊卵巢综合征不孕症的临床疗效观察[J].*中国针灸*,2016,36(12):1237-1241.
- [16] NOROOZZADEH M N M, BEHBOUDI-GANDEVANI S B S, ZADEH-VAKILI A Z A, et al. Hormone-induced rat model of polycystic ovary syndrome: A systematic review[J]. *Life Sciences*, 2017,191:259-272.
- [17] 宫静,程凯,张露芬.电针不同穴位对去卵巢大鼠HPO轴的影响[J].*中华中医药杂志*,2011,26(3):595-597.
- [18] 王君,张宝文,于新宇,等.疾徐捻转泻法针刺足三里对高血压家兔的降压作用[J].*中国临床康复*,2006,10(7):116-117.
- [19] 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.
- [20] 孙洁,赵继梦,季蓉,等.电针对多囊卵巢综合征大鼠卵巢高雄激素症的影响[J].*针刺研究*,2013,38(6):465-472.
- [21] 林鸾.穴位埋线对PCOS-IR模型大鼠生殖内分泌和胰岛素抵抗的影响[D].广州:广州中医药大学,2016.
- [22] 黄玉秀,郑秀,刘林芳,等.TSP-1在子宫内膜腺癌中的表达及与VEGF,CD105的关系[J].*中国医师杂志*,2009,11(10):1301-1303.
- [23] 叶璐,冯亦军,马奔,等.VEGF-C和TSP-1在卵巢上皮癌中的表达及意义[J].*中华临床医师杂志*,2008,2(10):1142-1147.

(本文编辑 匡静之)