

• 方药研究 •

助孕胶囊对多囊卵巢综合征大鼠卵巢
局部细胞因子表达的影响

刘艳巧 党慧敏 刘润侠 康晓玲 陈 梅

(西安交通大学医学院第二附属医院中西医结合科, 陕西省西安市西五路 157 号, 710004)

[摘要] 目的 观察助孕胶囊对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠血清性激素水平及卵巢局部细胞因子表达的影响。方法 采用孕激素联合人绒毛膜促性腺激素(HCG)法制备 PCOS 模型大鼠。SD 大鼠 40 只随机分为正常对照组、模型组、助孕胶囊组、克罗米酚组, 每组 10 只, 运用放射免疫法测定血清性激素水平的变化; 免疫组化法检测卵巢组织肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)、白血病抑制因子(LIF)表达水平并分析各因子之间的关系。结果 助孕胶囊可明显降低 PCOS 大鼠血清睾酮(T)、促黄体生成素(LH)水平, 并下调卵巢组织 TNF- α 和 IGF-1 的表达, 上调卵巢组织 LIF 的表达。结论 助孕胶囊能够通过调整内分泌及影响卵巢局部细胞因子的表达, 调整 PCOS 大鼠性腺功能, 促进卵泡的发育成熟及排卵。

[关键词] 多囊卵巢综合征; 助孕胶囊; 大鼠; 卵巢; 细胞因子; 性激素

Effect of Zhuyun Capsule on Expression of Ovarian Cytokine of Polycystic Ovary Syndrome Rats

LIU Yan-qiao, DANG Hui-min, LIU Run-xia, et al.

(College of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Zhuyun Capsule (Pregnant-promoting Capsule) on serum sex hormone and expression of ovarian cytokine of polycystic ovary syndrome (PCOS) rats. **Methods** Progestogen plus human chorionic gonadotrophin (HCG) was adopted to make PCOS rat models. Totally 40 SD rats were randomized into control group, PCOS model group, Zhuyun Capsule group, and clomiphene citrate group with 10 in each. Radioimmuno assay (RIA) was used to measure the sex hormone and immunohistochemical test was done to measure the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) of ovarian tissue, insulin-like growth factors-1 (IGF-1), and leukemia inhibitory factor (LIF) to analyze the relations among these factors. **Results** Zhuyun Capsule could reduce greatly serum testosterone (T) and luteinizing hormone (LH), decrease expression of TNF- α and IGF-1, but increase expression of LIF. **Conclusion** Zhuyun Capsule could regulate endocrine function and expression of ovarian cytokine to improve gonad functions of PCOS rats and to promote the maturation of follicle and ovulation.

Key Words Polycystic ovary syndrome; Zhuyun Capsule (Pregnant-promoting Capsule); Rat; Ovarian; Cytokine; Sex hormone

多囊卵巢综合征(PCOS)是一组发病多因性、临床表现多态性的综合征, 以雄激素过多和持续性无排卵为临床特征。研究表明, 卵巢局部调控因子与 PCOS 的关系十分密切。助孕胶囊为我们临床经验方, 治疗 PCOS 导致的月经不调、不孕不育有较好的疗效, 但其调控卵巢功能的机制尚不明确。本实验通过观察助孕胶囊对 PCOS 大鼠性激素水平、卵巢卵泡发育及卵巢局部细胞因子表达的影响, 从分子生物学水平分析其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SD 雌性大鼠 40 只, 24 日龄, 体重 50g 左右, 由西安交通大学医学院动物实验中心提供。

1.2 药品

助孕胶囊由西安交通大学医学院第二附属医院中药制剂室提供(主要成分为紫河车、淫羊藿、红花、胆南星等), 0.4g/粒, 1g 胶囊相当于生药 1.575g; 克罗米酚(CC)由上海衡山药业有限公司生产, 批号: 040301, 50mg/粒。

1.3 模型制备

参照朱辉等^[1]的方法, 选用 24 日龄未成年雌性 SD 大鼠, 皮下埋植左旋 18-甲基炔诺酮硅胶棒(3mm), 在 27 日龄时每日两次皮下注射 1.5IU 人绒毛膜促性腺激素(HCG), 正常对照组每日两次皮下注射注射用水, 共注射 9 天。37 日龄连续阴道涂片两个性周期。采血, 测睾酮(T)、胰岛素(INS)水平。观察到阴道角化细胞持续出现及结合血清 T、INS 测定, 符合标准者作为 PCOS 大鼠模型, 不符合者剔除。正常对照组连续阴道涂片两个性周期全部呈现完整的动情周期, 血清 T、

基金项目: 陕西省中医药管理局资助项目(2003-156)

通讯作者: 刘艳巧, liuyanqiao@sohu.com, 13991901361

INS 测定在正常范围。

1.4 动物分组

PCOS 模型自 47 龄日起,称体重,分组观察。将 30 只模型大鼠随机分为模型组、助孕胶囊组、CC 组,每组 10 只,正常对照组 10 只。

1.5 给药方法

助孕胶囊组按助孕胶囊生药 $6\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,CC 组按人与大鼠千克体重折算系数给药 $20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。正常对照组和模型组大鼠同期灌服同体积蒸馏水 $1\text{ml}/100\text{g}$ 体重,各组每日 1 次,共 14 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 血清学测定 末次给药后 24 小时,2%戊巴比妥钠 0.3ml 腹腔麻醉,打开腹腔,腹主动脉取血,离心、分离血清,采用放射免疫法检测血清卵泡刺激激素(FSH)、黄体生成素(LH)、血雌二醇(E_2)和睾酮(T)水平,由西安交通大学第二医院放免检验科按操作程序测定,批内批间误差 $<10\%$ 。性激素放射免疫分析药盒购自拉尔夫文生物工程技术有限公司。

1.6.2 病理观察 双侧卵巢大体解剖观察,并取下双侧卵巢组织用 10%的甲醛液固定,常规石蜡包埋、切片,待做 HE 染色及免疫组织化学分析,光镜观察卵巢的组织形态改变、卵泡的大小发育情况。

1.6.3 免疫组化 SP 法检测卵巢组织表达 SP 试剂盒和 LIF、TNF- α 、IGF-1 单克隆抗体购自福州迈新生物技术开发公司,应用 DAB 显色,均进行抗原修复、HE 染色,切片厚 4mm ,并行阴性和阳性对照。免疫组化结果判定:阳性染色为棕黄色颗粒,特异性位于细胞膜周围。对综合染色强度和分布范围进行半定量评分。评分标准:阴性为 0 分;染色弱但明显强于阴性对照者为 1 分;染色清晰者为 2 分;染色强者为 3 分。阳性细胞数 $<10\%$ 者为 0 分; $10\% \sim 20\%$ 为 1 分; $21\% \sim 30\%$ 为 2 分; $>30\%$ 为 3 分。上述两种评分相加为表达强度评分。

1.7 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,所有数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜结果

正常对照组镜下见多个黄体及不同发育阶段的卵泡,初级卵泡位于浅层,数目较多,体积小,呈圆形或椭圆形。生长卵泡大小不一,位置较深,成熟卵泡多位于浅表部,可见卵泡腔、卵细胞及卵丘结构。颗粒细胞呈多层(多为 6~8 层),形态完整,排列整齐,卵泡膜细胞呈梭形排列;模型组镜下见卵泡颗粒细胞减少而膜细胞层增加,后者常发生黄素化,卵巢皮质间质细胞明显增生,其中可见散在丛状的黄素化细胞巢;CC 组在镜下仍可见黄素化的膜细胞层增加,卵巢皮质间质细胞增生,同时可见皮质内出现许多初级卵泡、生长卵泡及少量成熟卵泡,颗粒细胞层数增加,泡膜细胞层变薄,黄体组织数量较模型组明显增多;助孕胶囊组镜下可见皮质内大多数卵泡为正常发育的卵泡,有初级卵泡、生长卵泡及成熟卵泡。颗粒细胞层数明显增加,约为 4~5 层,形态完整,排列整齐。泡膜细胞层明显变薄,黄体组织数量较模型组明显增多。

2.2 治疗后性激素水平的变化

表 1 示,模型组 T、LH 水平高于正常对照组,而 FSH、 E_2 水平明显低于正常对照组,符合 PCOS 内分泌紊乱的表现特征。助孕胶囊组大鼠血清 T、LH 水平明显低于模型组,而 FSH、 E_2 水平高于模型组,均具有统计学差异($P < 0.05$);CC 组大鼠血清 E_2 、FSH 水平亦显著高于模型组($P < 0.05$),而 CC 组大鼠血清 T、LH 水平与模型组比较则差异无统计学意义($P > 0.05$);与 CC 组比较,助孕胶囊组 T、LH 水平明显降低($P < 0.05$),而 FSH、 E_2 水平两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠卵巢组织 TNF- α 、IGF-1、LIF 蛋白表达变化

研究结果显示,TNF- α 主要表达在卵巢颗粒细胞,卵泡膜细胞亦有表达。表 2 示,模型组大鼠卵巢 TNF- α 表达水平明显升高,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);助孕胶囊组大鼠卵巢 TNF- α 表达水平比模型组明显下降($P < 0.05$);CC 组大鼠卵巢 TNF- α 表达水平较模型组有所下降,但无统计学意义

表 1 各组大鼠血清性激素水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	$\text{E}_2(\text{pmol/L})$	T(nmol/L)	FSH(IU/L)	LH(IU/L)
正常对照组	10	12.312 ± 4.253	0.012 ± 0.004	0.225 ± 0.118	2.964 ± 1.315
模型组	10	$5.976 \pm 2.644^*$	$0.157 \pm 0.091^*$	$0.100 \pm 0.025^*$	$7.200 \pm 1.372^*$
助孕胶囊组	10	$11.460 \pm 3.251^\Delta$	$0.073 \pm 0.052^\Delta^\#$	$0.200 \pm 0.038^\Delta$	$4.200 \pm 0.500^\Delta^\#$
CC 组	10	$10.887 \pm 3.175^\Delta$	0.138 ± 0.075	$0.194 \pm 0.051^\Delta$	7.180 ± 1.754

与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与 CC 组比较,# $P < 0.05$

($P>0.05$);助孕胶囊组与 CC 组之间比较, TNF- α 表达水平明显降低($P<0.05$)。

IGF-1 主要表达在卵泡膜细胞、间质细胞, 颗粒细胞亦有表达。表 2 示, 模型组大鼠卵巢 IGF-1 表达水平明显升高, 与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。助孕胶囊组 IGF-1 的表达相比模型组明显下降($P<0.05$);CC 组较模型组有所下降, 但无统计学意义($P>0.05$);助孕胶囊组与 CC 组比较, 卵巢组织 IGF-1 的表达明显降低($P<0.05$)。

在卵巢颗粒细胞、间质细胞及卵泡液中均有 LIF 的表达。表 2 示, 模型组大鼠卵巢组织 LIF 表达水平明显降低, 与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);助孕胶囊组大鼠卵巢组织 LIF 的表达相比模型组明显升高($P<0.05$);CC 组大鼠卵巢 LIF 表达水平较模型组有所升高, 但差异无统计学意义($P>0.05$);助孕胶囊组与 CC 组比较, 大鼠卵巢 LIF 表达水平明显升高($P<0.05$)。

表 2 卵巢组织 TNF- α 、IGF-1、LIF 蛋白表达评分比较(分, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IGF-1	LIF
正常对照组	10	2.17 $\pm$ 0.55	0.60 $\pm$ 0.89	3.21 $\pm$ 0.46
模型组	10	3.79 $\pm$ 0.85*	2.81 $\pm$ 0.45*	2.11 $\pm$ 0.35*
助孕胶囊组	10	2.68 $\pm$ 0.34 Δ #	1.43 $\pm$ 0.54 Δ #	3.09 $\pm$ 0.41 Δ #
CC 组	10	3.58 $\pm$ 0.89	2.42 $\pm$ 0.90	2.56 $\pm$ 0.37

与正常对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$;与 CC 组比较, # $P<0.05$

3 讨论

PCOS 是妇科常见的内分泌紊乱性疾病, 育龄妇女的患病率高达 5%~10%, 是一组以慢性无排卵、卵巢多囊性改变等为特征的症候群, 也是造成不孕的重要原因之一, 占无排卵性不育病因的 50%~70%^[2]。

IGF-1 是一种结构和功能与胰岛素相似, 具有广泛的胰岛素样作用的生长激素依赖性多肽, 在人类卵巢中可以由卵泡膜细胞和颗粒细胞合成。过高的 IGF-1 可导致雌、雄激素的合成过多和卵泡发育障碍, 与 PCOS 的发病可能有关^[3]。实验发现^[4], IGF-1 及其与 LH 的协同作用, 可以增强卵泡内膜细胞 LH 受体的表达, 同时又可以促进卵泡内膜细胞增殖, 导致 PCOS 的卵泡发育停滞。临床研究^[5]也证明, 在卵巢水平 IGF-1 的作用是协同 LH 进一步促进雄激素的合成和分泌。

TNF- α 是具有多向性作用的细胞因子, 其功能涉及细胞增殖和凋亡, 并与胰岛素抵抗(IR)和肥胖相关。TNF- α 与胰岛素抵抗存在着密切的关系, 可能涉及胰岛素信号通路的多个环节, 在 PCOS 的胰岛素抵

抗发病机制中发挥着重要的作用, 并联合 IR 作用加重了 PCOS 的病理生理改变表现, 如 PCOS 的多种表现如不孕、闭经肥胖、LH/FSH 升高的激素异常、卵巢的改变等^[6,7]。

LIF 是一种具有广泛生物学功能的细胞因子, 近来大量研究表明, LIF 可影响生殖活动的多个环节, 包括卵泡的生长发育、胚胎的生长、发育、分化、着床等方面。有研究表明, 雌激素主要是 E₂ 能刺激 LIF 的产生, 两者呈剂量依赖关系, 而孕激素和皮质类固醇激素并无刺激 LIF 产生的作用^[8], 随着雌激素剂量的增加, LIF 的量也随着增加。LIF 在未妊娠的 PCOS 患者的卵泡液中的浓度也较低^[9]。

实验研究结果提示, PCOS 模型组大鼠的卵巢组织卵泡颗粒细胞减少而膜细胞层增加, 卵巢皮质间质细胞明显增生;模型组大鼠血清 T、LH 水平高于正常对照组, 而 FSH、E₂ 水平明显低于正常对照组;模型组大鼠卵巢 TNF- α 、IGF-1 表达水平明显升高而 LIF 则明显降低。证明卵巢局部细胞因子 TNF- α 、IGF-1、LIF 在多囊卵巢的发生、发展中起重要作用。

PCOS 属中医学“不孕”、“闭经”、“崩漏”、“癥瘕”等范畴。其病机与肝、肾、脾三脏功能失调及痰、湿、气、血的瘀滞密切相关。助孕胶囊主要由紫河车、淫羊藿、红花、胆南星等组成, 具有补肾活血、化痰散结之功效。治疗 PCOS 导致的月经不调、不孕不育有较好的效果。研究表明, 助孕胶囊可以使 PCOS 大鼠的卵巢颗粒细胞层增厚, 卵泡膜细胞层变薄;降低血清 T、LH 水平, 升高血清 E₂ 水平;并可降低卵巢组织 TNF- α 、IGF-1 表达的同时升高卵巢组织中 LIF 表达水平。从实验结果分析, 助孕胶囊对 PCOS 大鼠的作用机制可能通过调整神经内分泌功能和调节卵巢局部调控因子的表达来实现。

参考文献

[1]朱辉,倪江,姚兰春,等.大鼠多囊卵巢动物模型的实验研究.哈尔滨医科大学学报,1999,33(3):187~188.
[2]李美芝.多囊卵巢综合征的研究现状.中华妇产科杂志,2000,35(10):581~582.
[3]Miller EA,Ge Z,Hedgpeth V,et al. Steroidogenic responses of pig corpora lutea to insulin-like growth factor 1(IGF-1) throughout the oestrous cycle. Reproduction, 2003, 125 (2): 241~249.
[4]武秀峰,李红真,范正红,等. IGF-I 对卵泡内膜细胞增殖及其 LH 受体表达的影响.生殖与避孕,2002,22(2):84~87.
[5]郝敏,范林霄,杨燕生.多囊卵巢综合征患者血清胰岛素样生长因子 I 的检测及临床意义.中国实用妇科与产科杂志,2005,21(3):181~182.

(下转第 458 页)

表 2 各组肾小球系膜细胞不同时间点增殖比较(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	12 小时	24 小时	48 小时	60 小时
空白组	12	0.2806±0.0097*	0.3232±0.0285**	0.4091±0.0112**	0.5133±0.0608**
LPS 组	12	0.2983±0.0124	0.4467±0.0444	0.5786±0.0961	0.7000±0.0694
苯那普利组	12	0.2642±0.0066**	0.3625±0.0034**	0.4298±0.0157*	0.5388±0.0558**
海昆肾喜小剂量组	12	0.2673±0.0065**	0.3724±0.0104**	0.4651±0.0318*	0.5661±0.0595**
海昆肾喜大剂量组	12	0.2629±0.0055**	0.3618±0.0572**	0.4370±0.0339*	0.5929±0.0843*

与 LPS 组同时点比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

型中,阿霉素可使肾小球毛细血管内皮细胞和足细胞肿胀,足突融合消失,基底膜增厚,实验表现蛋白尿、高脂血症、低蛋白血症、氮质血症、肾功能低下,与人类进行性肾脏疾病的表现非常类似^[2]。

ET 是目前已知体内作用最强和作用时间最持久的缩血管物质,除此之外,ET 还是一种炎症介质和纤维化介质。肾组织多种细胞如血管平滑肌细胞及内皮细胞、肾小球系膜细胞(GMC)、肾小球脏层上皮细胞、肾小管上皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等,均能合成及分泌大量成熟的 ET-1。据研究 ET-1 一方面可直接作用于血管平滑肌细胞,引起肾血管收缩^[3],另一方面 ET-1 还使肾小球滤过率,肾血浆流量和肾小球超滤系数下降,并使细胞外基质蛋白合成增加,使肾小球发生局灶性硬化,肾间质纤维化,加速肾功能恶化。肾小球系膜细胞增殖和细胞外基质增多是多种肾小球疾病、肾小球毁损、硬化过程中的主要表现^[4]。系膜细胞过度增生,一方面突入肾小球毛细血管管腔,导致管腔狭窄或闭塞;另一方面又可产生大量的细胞外基质,如胶原蛋白、层粘连蛋白等,致使肾小球硬化,肾功能丧失^[5]。因此抑制系膜细胞增生,是防止肾小球硬化发生、发展,防治 CRF 的重要环节。

海昆肾喜的主要成分是褐藻多糖硫酸酯(FPS),其是一种水溶性杂聚糖,含有强极性的活性基因硫酸酯,是一种强吸附剂,可充分吸附体内的一些毒性物质,使其排出体外,具有化浊排毒作用,用于慢性肾功能衰竭。临床研究表明,海昆肾喜对改善尿毒症症状、保护肾功能、尤其对延缓慢性肾功能衰竭病程有一定作用,且无明显副作用,是治疗慢性肾功能衰竭非透析

疗法中一个安全有效的药物^[6,7]。本实验结果显示,该药能够减少阿霉素肾病大鼠肾组织中 ET-1 蛋白及其 mRNA 的表达;通过体外培养大鼠肾小球系膜细胞,从 12、24、48、60 小时等 4 个时间点观察海昆肾喜对体外培养肾小球系膜细胞的影响,结果显示,海昆肾喜对 LPS 诱导的肾小球系膜细胞增殖具有不同程度的抑制作用,各时间点以大剂量组抑制效果较好。肾组织 ET-1 含量减少的具体机制有待进一步研究。

参考文献

[1]赵宗江,仇琪,杨美娟.海昆肾喜对阿霉素肾病大鼠肾组织结缔组织生长因子蛋白及其 mRNA 表达的影响.中国中西医结合肾病杂志,2006,7(12):689~692.
[2]赵宗江,刘宏,张新雪,等.肾康注射液对肾小管上皮细胞增殖影响的实验研究.中国中医药信息杂志,2000,7(12):38~39.
[3]Dammers R, Hoeks AP, Tordoir JH, et al. Endothelin-1 levels and conduit artery mechanical properties in end-stage renal disease. Blood Purif, 2005, 23(3):190~195.
[4]Wang JL, Cheng HF, Shappell S, et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases proteinuria and retards progressive renal injury in rats. Kidney Int, 2000, 57(6):2334~2342.
[5]Inagi R, Miyata T, Imasawa T, et al. Mesangial cell-predominant gene, megin. Nephrol Dial Transplant, 2002, 17(Suppl 9):32~33.
[6]姜鸿,朱晓华,莫继安,等.海昆肾喜治疗慢性肾衰竭 20 例临床观察.中国中西医结合肾病杂志,2006,7(7):420~421.
[7]肖素芹.海昆肾喜治疗慢性肾功能衰竭的临床观察.中华现代内科学杂志,2006,3(7):806~807.

(收稿日期:2006-07-17;修回日期:2007-12-20)

[编辑:邓 媛]

(上接第 455 页)

[6]初永丽,邱红玉,孙永玉.多囊卵巢综合征患者血清肿瘤坏死因子- α 的检测及意义.实用妇产科杂志,2003,19(3):167~168.
[7]叶秀峰,李丽文.肿瘤坏死因子 α 和可溶性肿瘤坏死因子受体 2 与多囊卵巢综合征胰岛素抵抗机制的关系.现代中西医结合杂志,2002,11(16):1529~1532.
[8]Sawai K, Matsuzki N, Okada T, et al. Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor; regulation by de-

cidal cytokines and steroid hormones. Biol Reprod, 1997, 56(5):1274~1280.
[9]Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, et al. Follicular fluid concentration of leukaemia inhibitory factor is decreased among woman with polycystic ovarian syndrome during assisted reproduction cycles. Hum Reprod, 2001, 16(10):2073~2078.

(收稿日期:2007-01-22;修回日期:2007-08-10)

[编辑:李春梅]