

# 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠卵泡发育的影响

杨涓<sup>1</sup> 高慧<sup>2</sup> 夏天<sup>3</sup> 韩冰<sup>4</sup> 董江川<sup>5\*</sup>

(1. 重庆医科大学附属第一医院, 重庆市渝中区友谊路 1 号, 400016; 2. 河北承德医学院附属医院;

3. 天津中医药大学第一附属医院; 4. 天津中医药大学第二附属医院; 5. 重庆医科大学中医药学院)

基金项目: 河北省中医药管理局科研项目(200411027)

\* 通讯作者: dongjiangchuan@yahoo.com.cn, 13436012689

**[摘要]** **目的** 从卵泡发育调控的旁分泌途径研究补肾调冲方的作用机制。 **方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组, 模型组, 补肾调冲方高、中、低剂量组及西药组, 每组 10 只, 采用雷公藤多苷灌胃(50mg/kg, 14 天)建立卵巢早衰模型, 分别使用高(1ml/100g)、中(0.5ml/100g)、低(0.25ml/100g)剂量补肾调冲方及倍美力(0.075ml/100g)进行干预, 时间为 35 天, 观察各组大鼠各级卵泡及黄体计数和卵巢超微结构改变, 检测卵巢卵泡刺激素受体(FSHR)、表皮生长因子(EGF)及缝隙连接蛋白 43(Cx43)的 mRNA 表达。 **结果** 模型组各级卵泡数、黄体数明显减少, 卵巢超微结构受损, EGF、Cx43 mRNA 表达显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 补肾调冲方中、低剂量组及西药组大、中卵泡数及黄体数明显增加, 卵巢超微结构明显改善, EGF 及 Cx43 的 mRNA 表达显著增高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。 **结论** 补肾调冲方可改善雷公藤多苷所致的卵泡发育障碍, 其作用机制可能是通过促进卵巢 EGF、Cx43 mRNA 表达这一旁分泌调控途径实现。

**[关键词]** 补肾调冲方; 卵巢早衰; 卵泡刺激素受体; 表皮生长因子; 缝隙连接蛋白 43

## Effect of Bushen Tiaochong Formula on Follicular Development in Ovarian Senilism Rats

YANG Juan<sup>1</sup>, GAO Hui<sup>2</sup>, XIA Tian<sup>3</sup>, HAN Bing<sup>4</sup>, DONG Jiangchuan<sup>5</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016; 2. The Affiliated Hospital of Chengde Medical University; 3. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Chinese Medicine; 4. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Chinese Medicine; 5. College of Chinese Medicine, Chongqing Medical University)

**ABSTRACT** **Objective** To investigate the regulatory mechanism of Bushen Tiaochong Formula (Formula for reinforcing the kidney and regulating the Chong meridian) on paracrine pathway of follicular development. **Methods** A total of 60 SD rats were randomized into normal group, model group, Bushen Tiaochong Formula large-dose group, medium-dose group, small-dose group, and western medicine group, with ten in each. Except for the normal group, the other groups were treated with glycoside of tripterygium wilfordii (GTW) by gavage (50mg/kg) for 14 days to establish ovarian senilism models, and then they were administered the large-dose (1ml/100g), medium-dose (0.5ml/100g), and small-dose (0.25ml/100g) of Bushen Tiaochong Formula and Premarin tablet (0.075mg/kg) respectively for 35 days. Different levels of follicle and corpus luteum were counted. Changes of the ovary ultrastructure were observed, follicle stimulating hormone receptor (FSHR) and epidermal growth factor (EGF) were determined, and expression of connexin 43 (Cx43) mRNA was detected. **Results** In the model group, different levels of follicle and corpus luteum were decreased significantly, ovary ultrastructure was damaged, and EGF and Cx43 mRNA expression were down-regulated significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). In the medium-dose and small-dose groups of Bushen Tiaochong Formula and western medicine group, the large and medium sized follicles and the corpus luteum increased significantly, the ovary ultrastructure improved obviously, and the expression EGF and Cx43 mRNA were up-regulated significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Bushen Tiaochong Formula is effective in relieving the GTW-induced follicular development disturbance, the action might be related to promoting the expression of EGF and Cx43 mRNA through regulating the paracrine of follicular development.

**Key Words** Bushen Tiaochong Formula (Formula for reinforcing the kidney and regulating the Chong meridian); Ovarian senilism; Follicle stimulating hormone receptor (FSHR); Epidermal growth factor (EGF); Connexin 43 (Cx43)

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 指女性 40 岁之前出现卵巢功能衰退的现象, 严重影响女性生活质量。补肾调冲方是临床治疗肾虚型闭经的有效验方。临床研究证实, 本方可使卵巢早衰患者

恢复月经, 性激素水平恢复正常, 且不良反应少<sup>[1]</sup>。卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 是刺激卵泡发育最重要的激素<sup>[2]</sup>, 其生理功能由卵泡刺激素受体 (FSHR) 介导, FSHR 的表达决定卵巢

的反应性。卵母细胞不存在FSHR,FSH 对其发育的调节必须通过旁分泌途径实现,表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF) 及缝隙连接蛋白 43 (connexin-43,Cx 43) 是重要的中间环节,三者共同调节卵泡发育。本研究旨在观察补肾调冲方对卵巢早衰大鼠卵泡生长的影响,并从旁分泌途径探讨其调控卵泡发育的作用机理。

1 材料与方法

1.1 动物

雌性SD 大鼠 60 只,12 周龄,体重( 260±10) g,由北京大学医学部实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK( 京) 2002-0001。每日行阴道脱落细胞涂片,凡间隔 4~5 天出现两次动情期者纳入实验。

1.2 药物

雷公藤多苷片,由湖南协力药业有限公司生产,国药准字 Z43020138,批号:20050402;补肾调冲方中药煎剂由菟丝子15g、肉苁蓉10g、巴戟天10g、黄精15g、熟地黄15g、当归10g、川芎6g、紫石英15g、五味子6g 组成,由天津中医药大学第一附属医院药剂科提供,水煎并浓缩,相当于生药 2.5g/ml。倍美力片由惠氏艾尔斯特制药公司艾尔斯特药厂生产,国药准字( 2001) J-51( 2) 号。

1.3 仪器与试剂

倒置相差显微镜(PMr<sup>10</sup>AD),日本Olympus 有限公司生产;透射电镜仪(JEM-1010),日本电子有限公司生产;多聚甲醛固定液,戊二醛固定液;Trizol RNA 提取试剂:Invitrogen 公司生产,批号:15596026;LightCycle SYBR Green I RNA 一步法扩增试剂盒和LightCycle 质控盒均购自德国 Roche 公司。

1.4 分组与处理

采用随机数字表法将大鼠分为正常组、模型组、高剂量组、中剂量组、低剂量组及西药组,每组 10 只。除正常组外其余各组大鼠按 50mg/kg 体重灌胃雷公藤多苷片水溶液,1 次/天,共14 天。造模完成后 24h 开始治疗,治疗时间 35 天。正常组:自由喂养;模型组:按 1ml/100g 灌胃生理盐水,1 次/天;高、中、低剂量组分别按 1、0.5、0.25ml/100g 灌胃补肾调冲方中药煎剂,1 次/天,其中生药含量分别为 24、12、6g/kg;西药组:按 0.075mg/kg 灌胃倍美力溶液,1 次/天。治疗结束次日处死大鼠取出双侧卵巢,分别行光镜、电镜标本制备及 RT-PCR 检测。

1.5 光镜、电镜组织标本制备

切取的卵巢组织用 4%多聚甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋、连续 5  $\mu$ m 切片后苏木精-伊红(HE) 染色、封片,取最大剖面切片光镜下观察,并计数具有正常结构的各级卵泡数、卵泡总数及黄体数。卵泡分级方法参考文献[3-4]:小卵泡直径<30  $\mu$ m,中卵泡直径 30~600  $\mu$ m,大卵泡直径>600  $\mu$ m;电镜组织经固定、冲洗、脱水、包埋、半薄切片定位后制成超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅双染色,JEM-1010 透射电镜仪观察卵巢超微结构。

1.6 卵巢FSHR、EGF、Cx43 的mRNA 表达检测

总 RNA 提取:参照 Trizol RNA 抽提试剂盒说明书进行抽提,基因引物由宝生物( 大连) 有限公司合成。

表1 各指标扩增的基因引物序列及片断长度

| mRNA | 核苷酸序列(5'-3';sense/antisense)   | 长度(bp) |
|------|--------------------------------|--------|
| FSHR | TGC TGC CAG CGT CAT GGT A      | 105    |
|      | ATG GGC AGG CAG ATG CTC ACT    |        |
| EGF  | GGC GTG TGC ATG TAT GTT GAA TC | 96     |
|      | CCA ACG TAA GTC TCG GTG CTG A  |        |
| Cx43 | CTT CCC TTT CCC TCC ACT AC     | 105    |
|      | TTC CCC AAG GCA CTA CA         |        |

RT-PCR 扩增反应:按照 Light Cyder SYBR Green I RNA 一步法扩增试剂盒说明书操作。反应条件:55℃ 30min,合成 cDNA;95℃、30s 孵育,56.1℃退火10s,72℃延伸15s,循环40 次;60 建立融解曲线。

目的基因检测:用建立的实时荧光PCR 反应条件检测目的基因的Ct 值,依照标准曲线计算起始模板拷贝数。定量PCR 仪扩增完成后自动生成荧光强度曲线,该荧光强度曲线反映所有标本不同循环时的荧光强度,阳性标本呈现典型的S 型曲线,阴性对照即使扩增 50 个循环也为不规则的波浪线。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,计量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示;两样本比较采用成组t 检验;多组间比较经方差齐性检验方差齐后,用单因素方差分析。

2 结果

2.1 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠各级卵泡及黄体数的影响

表2 示,与正常组比较,模型组各级卵泡数、总卵泡数及黄体数明显减少( $P<0.01$ )。高剂量组各

表2 各组大鼠各级卵泡数比较(个,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 鼠数 | 小卵泡        | 中卵泡        | 大卵泡       | 总卵泡数        | 黄体        |
|------|----|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 正常组  | 10 | 21.7±3.0   | 12.6±2.0   | 5.6±1.8   | 39.9±4.581  | 6.5±2.0   |
| 模型组  | 10 | 12.3±2.1△△ | 4.4±1.6△△  | 1.6±1.3△△ | 16.1±3.1△△  | 2.3±1.4△△ |
| 高剂量组 | 10 | 13.5±2.3△△ | 6.2±1.8△△  | 2.1±1.7△△ | 20.6±3.1△△  | 4.0±1.2*  |
| 中剂量组 | 10 | 12.7±2.0△△ | 12.2±1.8** | 5.8±1.6** | 30.6±2.5**△ | 6.3±1.9** |
| 低剂量组 | 10 | 13.4±2.6△△ | 13.6±1.7** | 5.1±1.8** | 31.7±3.1**△ | 7.4±2.3** |
| 西药组  | 10 | 12.7±2.8△△ | 12.7±2.2** | 5.6±1.6** | 31.2±3.3**△ | 8.6±2.0** |

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与正常组比较,△ $P<0.05$ ,△△ $P<0.01$

表3 各组大鼠卵巢组织FSHR、EGF、Cx43 mRNA 表达比较(起始拷贝数,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 鼠数 | FSHR               | EGF                 | Cx43              |
|------|----|--------------------|---------------------|-------------------|
| 正常组  | 10 | 66999.8±10940.3    | 141505.2±11694.8    | 64486.8±9289.5    |
| 模型组  | 10 | 61450.1±6039.1     | 130040.7±25664.6△   | 61138.1±4113.2△   |
| 高剂量组 | 10 | 60621.9±11281.1    | 153666.1±15512.1    | 54132.9±8122.1△   |
| 中剂量组 | 10 | 63309.8±14082.4    | 155391.6±30930.7*   | 68304.4±9257.0*   |
| 低剂量组 | 10 | 71608.1±9292.1*    | 160754.8±18728.6**△ | 74029.1±7327.5**△ |
| 西药组  | 10 | 78990.0±10395.0**△ | 155303.4±16409.8*   | 71145.8±9072.8**△ |

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与正常组比较,△ $P<0.05$ ,△△ $P<0.01$

级卵泡数、总卵泡数较正常组明显减少( $P<0.01$ ),与模型组比较差异无统计学意义;黄体数较模型组增加( $P<0.05$ )。中、低剂量组及西药组小卵泡数明显少于正常组( $P<0.01$ ),与模型组相当,组间无统计学差异( $P>0.05$ )。与模型组比较,中、低剂量组与西药组大、中卵泡数、总卵泡数及黄体数显著增加( $P<0.01$ )。

2.2 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠卵巢组织结构的影响

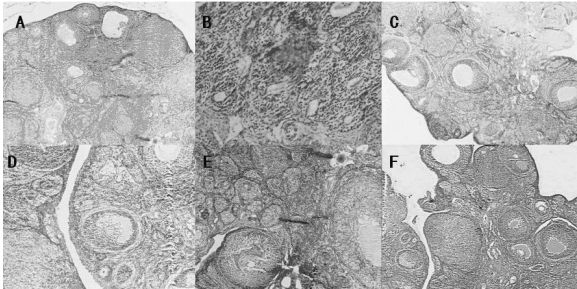


图1 光镜下各组大鼠卵巢组织结构比较(HE×40)  
(注:A 正常组;B 模型组;C 高剂量组;D 中剂量组;E 低剂量组;F 西药组)

图1示,光镜下正常组卵巢组织内可见丰富的各级卵泡及黄体,间质纤维组织少,血管丰富,卵泡颗粒细胞层丰富。模型组卵巢明显萎缩,组织发生纤维化改变,血管减少,卵泡颗粒细胞层减少。高剂量组较模型组无明显改善,中、低剂量组及西药组与模型组相比,间质纤维化改变明显减轻,血管增加,卵泡颗粒细胞层明显增加。

图2示,电镜下正常组卵巢内卵泡细胞层次排

列紧密,胞膜清晰,胞质内可见丰富的线粒体及游离核糖体,细胞核有明显的核仁,染色质均匀;模型组超微结构明显受损,与正常组相比,卵泡细胞层次紊乱,大小不一,细胞间见有间隙,胞质内细胞器减少且结构不清,部分细胞核呈斑块状凝集,细胞核异染色质凝集趋边,核膜不清;高剂量组超微结构好于模型组,与正常组相比,细胞排列尚有序,细胞间隙稍增宽,胞质较丰富,细胞器轻度变性,线粒体空泡变较明显,核膜间隙增宽核染色质欠均匀;中、低剂量及西药组明显好于模型组,卵泡排列有序,胞膜清晰,颗粒细胞层丰富,结构清晰,胞质内细胞器丰富,细胞核较大,核仁明显,核染色质欠均匀。

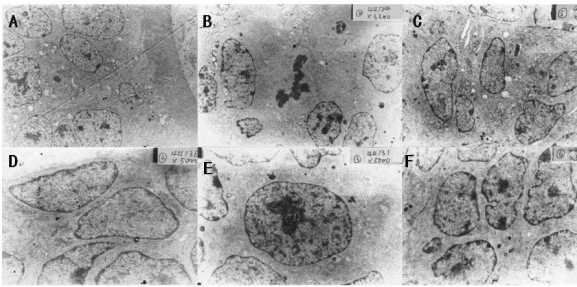


图2 电镜下各组大鼠卵巢组织超微结构比较(TEM×2500-5000)

(注:A 正常组;B 模型组;C 高剂量组;D 中剂量组;E 低剂量组;F 西药组)

2.3 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠卵巢FSHR、EGF、Cx43 mRNA 表达的影响

表3示,与正常组比较,模型组EGF及Cx43 mRNA 表达显著降低( $P<0.05$ ),FSHR mRNA 表

达无统计学差异;高剂量组较模型组三项指标均无统计学差异;中、低剂量组及西药组较模型组 EGF 及 Cx43 mRNA 表达显著增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与模型组比较,低剂量组及西药组对 FSHR mRNA 表达具有明显促进作用 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

3 讨论

卵巢早衰的病因包括遗传、环境毒物、医源性因素及免疫损伤等。雷公藤多苷(GTW)是广泛应用于临床的雷公藤制剂,部分自身免疫性疾病女性患者服药后发生月经紊乱和闭经,故成为卵巢早衰的医源性因素之一<sup>[5]</sup>。

FSH 是刺激卵泡发育最重要的激素,颗粒细胞(GC)是其作用于卵巢的靶细胞。FSH 可促使窦前卵泡及窦状卵泡的 GC 增殖与分化,缝隙连接形成、分泌卵泡液,使卵泡生长发育<sup>[5]</sup>,但 FSH 的生理功能必须通过其特异性受体 FSHR 介导,因此,FSHR 的表达量直接影响卵巢对 FSH 反应性。EGF 可对 FSH 的促卵母细胞成熟作用有促进效应,因此认为 FSH 对卵泡生长的调节是通过 EGF 及其受体来实现的<sup>[6]</sup>。卵泡处于无血管的微环境中,缝隙连接介导卵母细胞和其周围体细胞间的代谢交换,传递内分泌和旁分泌的生长因子,传递 cAMP 信号调节卵泡细胞的发育,Cx43 蛋白是卵巢组织表达最多的连接蛋白<sup>[7]</sup>。模型组卵巢 FSHR mRNA 表达无显著降低,而 EGF 及 Cx43 mRNA 表达显著降低,提示 GTW 并非通过降低卵巢对 FSH 反应性来影响卵泡发育,而是通过降低 EGF mRNA 表达影响 FSH 的旁分泌途径,并通过降低 Cx43 mRNA 表达影响卵母细胞和其周围体细胞间的代谢交换和内分泌、旁分泌生长因子的传递,从而影响卵泡的发育。既往研究表明,EGF 来源于泡膜细胞,因此我们认为,GTW 作用后的 EGF 降低可能是由于卵巢各级卵泡数减少,卵泡结构受损所致。

中医学认为肾主生殖,肾气盛,天癸至,冲任通,月事方能以时下,肾气衰、天癸竭则生殖功能衰竭,肾虚为POF的发病基础。补肾调冲法是治疗卵巢功能衰退的有效方法,补肾调冲方依本法设立,方中巴戟天、菟丝子、肉苁蓉温肾助阳,黄精、熟地黄滋补肾阴,两者相须为用,以补肾之不足;紫石英温肾暖宫,五味子敛肺滋肾;当归养血活血,川芎活血调经。补肾药与调理冲任药相须为用,补而不滞,滋而不膩,活血而不动血,全方具有平补肾气、滋阴扶阳、调理

冲任、理气养血的功效。本研究表明,补肾调冲方治疗后模型大鼠卵巢组织结构及血供改善,各级卵泡数增加,黄体数增加,提示本方对各级卵泡生长及排卵均有促进作用,卵巢间质纤维组织较模型组减少,颗粒细胞层增加,提示卵母细胞发育环境得到改善,但超微结构提示仍有轻度细胞器受损表现。进一步研究显示,高剂量组对模型大鼠卵巢 FSHR、EGF、Cx43 mRNA 表达无促进作用,中剂量组对模型大鼠卵巢 FSHR 无显著影响,但可显著增加 EGF、Cx43 mRNA 的表达。低剂量组及西药组卵巢 FSHR、EGF、Cx43 mRNA 表达均较模型组显著增加。提示本方高剂量无明显药效;中剂量对卵巢反应性无明显促进作用,但可通过促进 FSH 的旁分泌途径;低剂量及倍美力对上述 3 个环节均有显著促进作用。

综上所述,补肾调冲方可作用于卵泡发育旁分泌途径中的 EGF、Cx43,从而促进卵泡的生长发育,药理作用与剂量呈负相关,提示应进一步研究临床用药剂量,以达到最佳的疗效。

参考文献

[1]高慧,夏天,韩冰,等.中药补肾调冲方治疗卵巢早衰的临床研究[J].辽宁中医杂志,2007,34(11):1557-1560.

[2]Strauss JF 3rd,Steinkampf MP.Pituitary-ovarian interactions during follicular maturation and ovulation[J].Am J Obster Gynecol,1995,172(2 Pt 2):726-735.

[3]马晓玲,高云荷,郭红宇,等.促性腺激素释放激素类似物预防化疗对大鼠卵巢损伤作用的研究[J].生殖与避孕,2005,25(3):137-142.

[4]Ataya KM,McKanna JA,Weintraub AM,et al.A luteinizing hormone-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian follicular loss in rats[J].Cancer Res,1985,45(8):3651-3656.

[5]杨涓,董江川,韩冰.雷公藤多苷对女性生殖内分泌系统的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2006,20(5):437-440.

[5]曹泽毅.中华妇产科学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2004:44-45.

[6]Fujinaga H,Yamoto M,Nakano R,et al.Epidermal growth factor binding sites in porcine granulosa cells and their regulation by follicle-stimulating hormone[J].Biol Reprod,1992,46(4):705-709.

[7]Kidder GM,Mhawi AA.Gap junctions and ovarian folliculogenesis[J].Reproductio,2002,123(5):613-620.

(收稿日期:2010-08-13;修回日期:2010-12-14)

[编辑:行之]