

益肾调肝Ⅱ号方对多囊卵巢综合征大鼠卵巢黄体生成素受体表达的影响

陈 芊* 孙云松 孙 选 张 斌 徐慧军

青岛市海慈医院妇科, 山东省青岛市人民路 4 号, 266033)

基金项目: 青岛市 2008 年度中医科研计划资助项目(青卫中医字 2008—ZYW035)

* 通讯作者: chendoudou75@163.com, 13963956001

[摘 要] 目的 观察益肾调肝汤Ⅱ号方对多囊卵巢综合征(PCOS)模型大鼠卵泡发育、卵巢黄体生成素受体(LHR)表达的影响。方法 24 日龄 Wistar 大鼠进行皮下埋植左炔诺孕酮结合皮下注射人绒毛膜促性腺激素造模, 将造模成功 60 只大鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 未造模 10 只大鼠为正常组。分组灌服生理盐水、盐酸二甲双胍片、益肾调肝汤Ⅰ号方、益肾调肝汤Ⅱ号方低、中、高剂量 15 天后, 观察动物卵巢重量, 光镜观察卵巢卵泡的大小、黄体数; 免疫组化分析 LHR 在卵巢中的表达情况。结果 运用益肾调肝汤Ⅱ号方中、高剂量后, 大鼠发育卵泡数增加, 不成熟的早期发育卵泡减少, 黄体数量增加, LHR 表达增加。结论 益肾调肝汤Ⅱ号方能明显增加大鼠卵巢重量、减少小卵泡数、增加黄体数, 可明显增强 LHR 在卵巢中的表达, 有利于卵泡的发育及排卵。

[关键词] 益肾调肝汤Ⅱ号方; 多囊卵巢综合征; 大鼠; 黄体生成素受体

Influence of Yishen Tiaogan Decoction Ⅱ on the Expression of Luteinizing Hormone Receptor of Polycystic Ovarian Syndrome Model Rats

CHEN Qian, SUN Yunsong, SUN Xuan, ZHANG Bin, XU Huijun

(Qingdao Haici Hospital, Qingdao 266033)

ABSTRACT **Objective** To observe the intervention effect of Yishen Tiaogan Decoction Ⅱ (Decoction for reinforcing the kidney and regulating the liver) on the follicular development and ovarian luteinizing hormone receptor (LHR) expression of model rats with polycystic ovarian syndrome (PCOS). **Methods** Twenty-four-day old female Wistar rats were made PCOS models with embedding levonorgestrel stick subcutaneously in combination with injecting HCG into subcutaneous tissue. Ten rats which were not made models were put into the normal group and the 60 PCOS model rats were randomized into 6 groups, with 10 in each. After intragastric feeding with normal saline, metformin, and Yishen Tiaogan Decoction Ⅰ, low-dose, medium-dose and high-dose of Yishen Tiaogan Decoction Ⅱ respectively for 15 days, the ovary was weighted, the size of follicle and number of luteum were observed with hematoxylin-eosin (HE) staining and optical microscope, and the expression of LHR in ovary was determined with immunohistochemical analysis. **Results** After using the medium-dose and high-dose of Yishen Tiaogan Decoction Ⅱ, the number of follicles of models rats increased, the immature follicles decreased, the quantity of luteum increased, and the expression of LHR enhanced. **Conclusion** Yishen Tiaogan Decoction Ⅱ is able to significantly increase the weight of ovary of rats, reduce the number of immature follicles, increase the quantity of luteum, and enhance the LHR expression in ovary, benefiting the development of follicles and ovulation.

Key Words Yishen Tiaogan Decoction Ⅱ (Decoction for reinforcing the kidney and regulating the liver); polycystic ovarian syndrome (PCOS); rats; luteinizing hormone receptor (LHR)

多囊卵巢综合征(PCOS)是常见的代谢及内分泌紊乱性疾病, 无排卵妇女中多囊卵巢检出率为 75%, 多囊卵巢是多种功能性紊乱的最终结果, 而不是中枢或局部的特异性疾病^[1], 常表现为排卵障碍及不孕。属于中医学闭经、不孕、崩漏、癥瘕等范畴, 并多从肾虚、痰湿、瘀血来论治。我们在临床上应用益肾调肝Ⅱ号方治疗 PCOS 取得满意疗效, 本研究旨在通过动物实验研究, 了解其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验药品、主要仪器和试剂

益肾调肝汤Ⅰ号方: 山茱萸 15g、怀牛膝 15g、菟丝子 15g、枸杞子 12g、淫羊藿 10g、当归 10g、丹参 12g、柴胡 10g、香附 12g、白术 12g、陈皮 12g、茯苓 12g 等; 益肾调肝汤Ⅱ号方: 在Ⅰ号方基础上加(炮)穿山甲 12g、鳖甲 30g 等。中药由青岛市海慈医院药剂科提供。盐酸二甲双胍片: 上海信谊九福药业有

限公司生产,规格 0.25g,批号 081113。左旋 18 甲基炔诺酮硅胶棒产自上海达华药业有限公司,每根硅胶棒含 75mg 左旋 18 甲基炔诺酮,规格 39mm×2.4mm,批号 080528。注射用人绒毛膜促性腺激素(HCG)购自广东丽珠医药集团股份有限公司,规格:1000 IU/支,批号 081102。黄体生成素受体(LHR)检测试剂(兔抗大鼠 LHR IgG)、抗原修复液、即用型 SABC(过氧化物酶)试剂盒、DAB 显色试剂盒(棕黄色)、PBS 缓冲液由武汉博士德生物工程有限公司提供。显微镜:日本 Olympus 公司生产(型号 BX60),分析天平:上海精科天平公司生产(TG328A 型),组织石蜡切片机:德国产 Leica RM 2135 型,BH-2 显微照相系统:日本 Olympus 公司产品。

1.2 实验动物

24 日龄 Wistar 雌性大鼠,70 只,清洁级,体重 45~55g,由青岛市动物研究所提供,动物许可证号:SCXK(鲁)20030010。用标准大鼠饲料分笼喂养,人工控制光照,自由饮水,12h 交替照明。

1.3 造模方法^[2]

将大鼠麻醉后皮下埋植左旋 18 甲基炔诺酮硅胶棒 3mm/只,3 天后实验组每次皮下注射 HCG 1.5IU,每天 2 次,共 9 天;对照组大鼠 3 天后每日颈背部皮下注射与实验组等量生理盐水,共 9 天。采用阴道细胞学检查来判定是否造模成功。

1.4 分组给药

选择造模成功 60 只大鼠及未造模 10 只大鼠,分 7 组,未造模 10 只大鼠为正常组;造模的 60 只大鼠随机分为 6 小组,每组 10 只。依据人与各种动物以及各种动物之间用药剂量换算系数表换算实验给药剂量,灌胃给药,每天 1 次,持续 15 天。模型组与正常组每日 1 次生理盐水;西药组每日 1 次盐酸二甲双胍片按成人剂量(500mg/60kg)的 7 倍(58mg/kg);益肾调肝汤Ⅰ号方(简称Ⅰ号方组)每日 1 次益肾调肝汤Ⅰ号方按成人剂量(2.95g/kg)的 7 倍(21.7g/kg);中药益肾调肝汤Ⅱ号方低、中、高剂量组(简称Ⅱ高组、Ⅱ中组、Ⅱ低组):每日 1 次益肾调肝汤Ⅱ号方按成人剂量(3.37g/kg)的 3.5 倍(11.8g/kg)、7 倍(23.6g/kg)、14 倍(47.2g/kg)。实验全过程动物自由饮水、进食。

1.5 观察指标

灌胃完成后 1 天晚 20:00 起禁食,次日麻醉各组大鼠,开胸心脏采血,取动物双侧卵巢组织,称重,

每个大鼠双侧卵巢组织放入同一标本中,经固定、切片(每个切片中含同一大鼠个体的双侧卵巢组织),每个标本切片 2 张,分别做苏木素-伊红(HE)染色分析,光镜观察卵巢卵泡的大小和数量,黄体数等及 LHR 免疫组化分析。

免疫组化测定:漂烘、脱蜡、水化、微波修复、PBS 缓冲液洗涤后滴加 5% BSA 封闭液,室温 20min,甩去多余液体,不洗。滴加一抗(效价 1:50 的兔抗大鼠 LHR IgG),37℃ 2h,PBS 液洗 2min×3 次。滴加生物素化兔抗大鼠 IgG,37℃ 20min,PBS 液洗 2min×3 次。滴加试剂 SABC(大鼠 IgG),37℃ 20min,PBS 液洗 5min×4 次。使用 DAB 显色试剂盒。取 1ml 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片。室温显色,镜下控制反应时间,一般在 5~10min。蒸馏水洗涤。苏木素复染,脱水、透明、封片。显微镜观察。

免疫组化染色结果判定标准:观察阳性反应采用双盲法,以细胞胞浆及包膜出现黄色颗粒为阳性判定标准,采用显色强度结合阳性百分比率判断结果,其中计算百分比率随机选取 5 个高倍镜视野计数,阳性细胞个数/全部细胞百分比,计算×400,得出阳性细胞百分比率。按阳性细胞率及显色程度分别评分,将两种评分结合起来分为 4 级:无论染色强度如何,细胞阳性率<20%为阴性(-);评 3~4 分的为弱阳性(+);5~6 分为中度阳性(++);7~8 分为强阳性(+++)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理,计量资料的组间比较采用方差分析,免疫组化结果运用秩和检验。

2 结果

2.1 各组大鼠卵巢重量、早期发育卵泡/卵泡总数及黄体数比较

表 1 示,模型组大鼠较正常组卵巢重量增加,早期发育卵泡/卵泡总数比例增加,黄体数减少($P<0.05$);西药组、Ⅱ中组、Ⅱ高组较模型组卵巢重量减轻($P<0.05$);Ⅱ中组、Ⅱ高组较模型组早期发育卵泡/卵泡总数增加,黄体数减少,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Ⅱ号方组、Ⅱ低组以上指标与正常组比较差异有统计学意义($P<0.05$),与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠卵巢组织中的 LHR 表达

表 2 示,正常组、Ⅰ号方组、Ⅱ中组与Ⅱ高组的

表 1 各组大鼠卵巢重量、早期发育卵泡/卵泡总数、黄体数的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	双卵巢重量(g)	早期发育卵泡/ 卵泡总数(%)	黄体数
正常组	10	0.1375±0.0175	51.63±4.31	25.60±6.47
模型组	10	0.1752±0.0282 [△]	62.62±7.90 [△]	16.40±5.10 [△]
西药组	10	0.1430±0.0112 [*]	59.18±7.11	16.80±4.19
I 号方组	10	0.1713±0.0200 [△]	59.58±9.46 [△]	20.70±6.38 [△]
II 低组	10	0.1712±0.0315 [△]	56.83±4.54 [△]	18.80±4.05 [△]
II 中组	10	0.1425±0.0139 [*]	50.31±2.43 [*]	25.50±3.84 [*]
II 高组	10	0.1432±0.0124 [*]	47.40±3.75 [*]	26.60±5.42 [*]

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

颗粒细胞、卵泡膜细胞、间质细胞上 LHR 的表达情况各组间的差异无统计学意义($P>0.05$),但与模型组、西药组、II 低组各组间的差异有统计学意义($P<0.05$),而后 3 组间的差异无统计学意义($P>0.05$)。

图 1 示,正常情况下 LHR 在颗粒细胞、卵泡膜细胞、间质细胞上能表达(见图 1a),经造模后 PCOS 模型大鼠卵巢 LHR 表达下降(见图 1b),盐酸二甲双胍片、益肾调肝 II 号方低剂量不能改善 LHR 低表达状态(分别见图 1c、图 1d),而益肾调肝 I 号方、益肾调肝 II 号方中剂量及高剂量改善(见图 1e、图 1f、图 1g)。

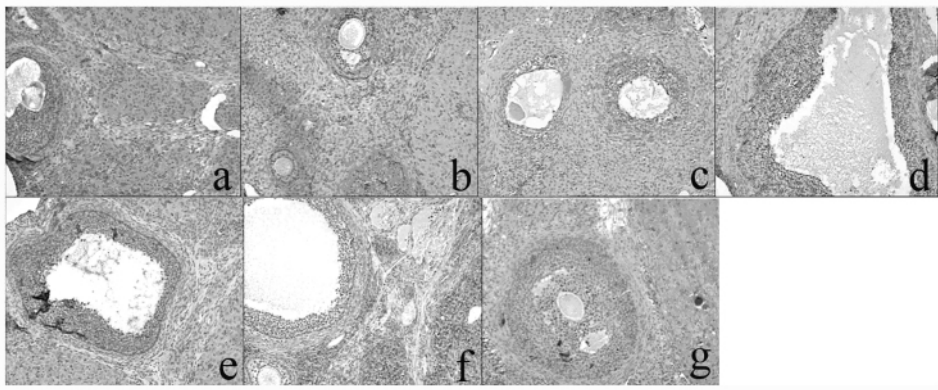


图 1 各组大鼠卵巢组织中 LHR 的表达($\times 100$)
(a 正常组, b 模型组, c 西药组, d II 低组, e I 号方组, f II 中组, g II 高组)

表 2 各组大鼠卵巢组织中 LHR 的表达情况(只)

组别	鼠数	颗粒细胞				卵泡膜细胞				间质细胞			
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++
正常组	10	2	0	2	6	1	2	3	4	1	0	4	5
模型组	10	5	2	3	0 [△]	1	7	2	0 [△]	2	2	6	0 [△]
西药组	10	7	3	0	0 ^{△△}	4	6	0	0 ^{△△}	0	6	3	1 [△]
I 号方组	10	0	2	6	2 ^{**}	0	2	5	3 ^{**}	0	1	6	3 [*]
II 低组	10	5	4	1	0 ^{△△}	2	5	3	0 [△]	2	3	4	1 [△]
II 中组	10	1	4	0	5 [*]	0	3	4	3 [*]	0	2	4	4 [*]
II 高组	10	1	0	2	7 ^{**}	0	0	4	6 ^{**}	0	1	1	8 ^{**}

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

3 讨论

卵泡液中黄体生成素与 LHR 结合后,激活腺苷酸环化酶系统而刺激甾体激素的合成,参与女性生殖过程,如受精卵着床、性腺发育及功能活动的调节。研究表明,用组织化学方法观察卵巢中促性腺激素受体的分布情况,结果显示:①正常卵巢 LHR 主要分布在颗粒细胞及卵泡膜;②PCOS 的 LHR 主要分布在增生的卵泡膜;增生的间质细胞只含少量;颗粒细胞层退化、变薄,LHR 较少;③正常卵巢及 PCOS 的白膜均不含 LHR。本研究显示,正常情况下 LHR 在颗粒细胞、卵泡膜细胞、间质细胞上能表达,经造模后大鼠卵巢 LHR 表达下降,这与一些研究结果相符^[3-4]。

中医药作为一种自然疗法已被证实治疗 PCOS 具有可靠的疗效^[5]。我们通过临床观察研究认为,PCOS 以肾虚为本,肝失调畅为要,瘀血、痰浊阻滞为标。肝肾亏虚,肝郁克脾,气血津液运行失常,气滞血瘀,痰湿内停,脉络受阻,故经血满溢失常。其病位在冲任,病久则虚实夹杂、寒热转化不定。治疗以治本同治,补肾调肝为治疗 PCOS 的根本大法,活血化瘀、健脾燥湿是必要手段。益肾调肝汤 I 号方以山茱萸、菟丝子补肾填精为君,肝肾同补,阴阳俱

全。枸杞子、淫羊藿等补益肝肾,当归补肝养血,柴胡、为要,标本香附疏肝理气,共为臣药。补肾调肝使精血互生,肝血充而肾精足,肝气调且精血畅。方中白术、陈皮、茯苓等疏肝健脾除湿为佐,怀牛膝、丹参等行气和血为使,活血通脉,促进益肾养精之功。全方补肝益肾、理气活血、疏肝调经、除湿祛痰,可祛除卵巢免疫因素,改善卵巢功能,促进卵泡发育及排卵^[6]。本研究表明中药益肾调肝Ⅰ号方能改善LHR低表达状态,但不能使PCOS模型大鼠变大增重的卵巢减轻,不能降低早期发育卵泡/卵泡总数比例,增加黄体数。盐酸二甲双胍片虽可改善模型大鼠的不良病理变化,却不能改善LHR低表达状态,因此二者治疗均不能达到理想效果。

我们分析认为,PCOS患者体内多脉络瘀阻、血脉不畅,有碍肾阴、肾阳的化生,惟瘀去而新生,故活血有助于肾阴、肾阳的化生,临床实践证明使用活血化瘀攻破的中药能提高排卵率^[7]。此外,由于PCOS病机变化错综复杂,病程较长,多为顽疾,用药需要效专力猛,因此,我们研究出益肾调肝汤Ⅱ号方,在Ⅰ号方基础上加用鳖甲、穿山甲等药,能入肝而调气血、散瘀结,助药达病所,理论上应能取得较Ⅰ号方更好的疗效。现代研究鳖甲具有免疫调节、抗肿瘤、抗纤维化、补血等作用^[8]。穿山甲水煎液对小鼠有降低血液黏度及延长凝血时间的作用^[9]。益肾调肝汤Ⅱ号方全方补肾调肝、破血消癥、除湿祛痰,标本兼治,甚合本证之肝肾不足,肝郁气滞,气滞血瘀,脾虚痰阻,本虚标实的病机。因此Ⅱ号方中剂量及高剂量不仅可使变大增重的卵巢减轻,增加卵巢的发育卵泡数,使黄体数增多,有利于卵泡的发育及排卵,还可增加LHR在卵巢组织相应部位的表

达,有利于维持及增强黄体的功能。益肾调肝Ⅱ号方低剂量不能改善LHR低表达状态,表明中药需达到一定剂量时才能发挥上述作用。本研究还显示益肾调肝Ⅱ号方中高剂量与Ⅰ号方均可改善LHR在卵巢组织相应部位的表达,印证了补肾中药能促进垂体及卵巢功能,改善神经内分泌调节功能,促进卵泡发育,改善黄体功能^[10]。

参考文献

- [1] Leon Speroff, Marc A. Fritz. 李继俊主译. 临床妇科内分泌学与不孕[M]. 2版. 济南: 山东科学技术出版社, 2006: 371.
- [2] 孙永生, 赵岩, 王秀霞. 卵巢Ⅱ号对多囊卵巢大鼠卵巢形态学的影响[J]. 中医药信息, 2002, 19(3): 70-72.
- [3] 葛杏林, 侯锁柱, 沈鸿敏. 应用免疫组织化学方法定位多囊卵巢促性腺激素受体的研究[J]. 河北医科大学学报, 1996, 17(3): 130-131.
- [4] 王永宏, 熊瑛. 补肾化痰方对不孕大鼠促排卵及卵巢促黄体生成素受体表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(5): 656-658.
- [5] 夏添. 中医治疗多囊卵巢综合征的研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(4): 82-84.
- [6] 陈芊, 张华, 颜建敏, 等. 益肾调肝汤对排卵障碍卵巢功能的免疫调节[J]. 中国自然医学杂志, 2007, 9(4): 336-339.
- [7] 张海峰. 排卵功能障碍的中医药治疗[J]. 河南中医, 2004, 24(3): 61-62.
- [8] 温欣, 周洪雷. 鳖甲化学成分和药理药效研究进展[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(2): 122-124.
- [9] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 1460.
- [10] 罗丽兰. 不孕与不育[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 474.

(收稿日期: 2010-11-24; 修回日期: 2011-05-18)

[编辑: 行之]

欢迎邮购《中医杂志》

1997年2、4、6、8~12期, 每册3.50元; 1998年3~8、10~12期, 每册4元; 1999年4~12期, 每册4元, 合订本65元; 2000年2~12期, 每册5.80元, 合订本85元; 2001年2~12期, 每册6.50元, 合订本95元; 2002年1~12期, 每册6.80元, 合订本105元; 2003年1~12期, 每册6.80元, 合订本105元; 2004年1、2、4~12期, 每册6.80元, 合订本115元; 2005年1~7、9、11、12期, 每册6.80元, 合订本125元; 2006年1~12期, 每册7.30元, 合订本135元; 2007年2~12期, 每册8.80元; 2008年2~12期, 每册9.80元; 2009年、2010年每册9.80元。2007年~2010年合订本每年140元。《中医杂志》2006~2009年增刊每册40元。以上免费邮寄, 如需挂号每件另加3元。

欲购者请汇款至北京东直门内南小街16号中医杂志社读者服务部, 邮编: 100700, 电话: (010) 64013164。

欢迎邮购医学VCD

四大经典VCD《黄帝内经》、《伤寒论》、《金匱要略》、《温病学》全套2500元, 其中《金匱要略》单套800元, 其余每套600元。四大基础VCD《中医基础理论》、《中医诊断学》、《中药学》、《方剂学》全套2700元, 单套700元。

“全国名老中医专家临床经验高级讲习班”授课内容为全国名老中医和专家个人几十年临床经验的宝贵结晶。现已制作成光盘, 可作为中医医疗、教育和研究机构收藏以及开展继续教育的培训教材, 也可供中医医务工作者临床自学。第一期1500元(22DVD), 第二期1500元(20DVD), 第三期1130元(16DVD), 第四期980元(16DVD), 第五期1330元(23DVD), 第六期1050元(16DVD), 第七期710元(13DVD), 第八期700元(11DVD), 第九期850元(10DVD), 第十期680元(10DVD), 第十一期540元(10DVD)。总价10970元。

汇款地址: 北京东直门内南小街16号中医杂志社; 收款人: 北京医海音像书店, 邮编: 100700, 联系人: 叶晨, 电话: (010) 64013162, 64014411-3045。