

姜黄素对卵巢过度刺激综合征模型大鼠血管通透性的影响

茹 雪^{1,2} 张昌军^{1*} 张 颖¹ 王晓宁^{1,2} 龚琴琴^{1,2}

(1. 湖北医药学院附属人民医院生殖医学中心, 湖北省十堰市朝阳中路 39 号, 442000; 2. 湖北中医药大学)

* 通讯作者: sycjzhang@sohu.com, (0719)8637128

[摘要] 目的 观察姜黄素对卵巢过度刺激综合征(OHSS)模型大鼠血管通透性的影响。方法 27 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、姜黄素组各 9 只,除正常组外其余均皮下注射孕马血清促性腺素(PMSG)和人绒毛膜促性腺素(HCG)建立 OHSS 模型。姜黄素组给予姜黄素混悬液 50 mg/(kg·d)灌胃,正常组和模型组分别给予等量 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃,各组均连续灌胃 1 周。光学显微镜下观察各组卵巢形态学特点,记录卵巢重量、腹腔冲洗液伊文思蓝(EB)含量及血清雌二醇(E₂)含量,检测卵巢组织中血管内皮生长因子(VEGF)及受体的表达。结果 模型组大鼠腹腔回收液量、卵巢重量、腹腔 EB 含量及血清 E₂ 水平均明显高于正常组($P < 0.05$),姜黄素组腹腔回收液量、卵巢重量、腹腔 EB 含量和血清 E₂ 水平均显著低于模型组($P < 0.05$)。模型组大鼠卵巢中 VEGF 及其受体水平均明显高于正常组($P < 0.05$),姜黄素组大鼠卵巢 VEGF 和血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)含量较模型组明显减少($P < 0.05$)。结论 姜黄素可通过降低 VEGF 及 VEGFR-2 含量而达到降低 OHSS 血管通透性的目的。

[关键词] 姜黄素;卵巢过度刺激综合征;血管内皮生长因子;血管内皮生长因子受体

Effect of Curcumin on the Vascular Permeability in Rat Models of Ovarian Hyperstimulation Syndrome

RU Xue^{1,2}, ZHANG Changjun¹, ZHANG Ying¹, WANG Xiaoning^{1,2}, GONG Qinqin^{1,2}

(1. The People's Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Hubei Province 442000; 2. Hubei University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Curcumin on the vascular permeability in rat models of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). **Methods** Twenty-seven SD rats were randomized into the normal group, model group and Curcumin group, with 9 in each. The OHSS models were established with subcutaneous injection of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and human chorionic gonadotropin (HCG) in the model group and Curcumin group. The Curcumin group was given 50 mg/(kg·d) of Curcumin suspension intragastrically. The normal group and model group was given the same amount of 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution intragastrically. The intragastric administration lasted for one week in the three groups. The morphology characteristics and differences of ovarian tissue were observed by optical microscope. The ovarian weight, peritoneal washings Evans blue (EB) content and serum estradiol (E₂) level was recorded. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor (VEGFR) in the ovarian tissue was detected. **Results** The volume of intraperitoneal recovery fluid, ovarian weight, EB content and E₂ level in the model group was significantly higher than those in the normal group ($P < 0.05$). The volume of intraperitoneal recovery fluid, ovarian weight, EB content and E₂ level in the Curcumin group was significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). The levels of VEGF and VEGFR in the model group were significantly higher than those in the normal group ($P < 0.05$). The levels of VEGF and VEGFR-2 in the Curcumin group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Curcumin could reduce the vascular permeability of OHSS by reducing the levels of VEGF and VEGFR-2.

Keywords Curcumin; ovarian hyperstimulation syndrome; vascular endothelial growth factor; vascular endothelial growth factor receptor

卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)是辅助生殖技术中超促排卵所发生的一种医原性疾病,重度患者可危及生命。OHSS 的发病机制复杂,其中毛细血管通透性增加是重要发病机制之一^[1]。姜黄素是从姜黄属中药郁金、莪术、姜黄等中提取的一种植物多酚,研究表明姜黄素在抗血管生成方面作用显著,能有效调节毛

细血管通透性^[2]。本实验以 OHSS 模型大鼠作为研究对象,通过观察卵巢组织中血管内皮生长因子(VEGF)及受体的表达,探讨姜黄素对 OHSS 模型大鼠血管通透性的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雌性 SD 大鼠 27 只,22 日龄,体重 35.0~

45.0 g。由湖北医药学院实验动物中心提供,饲养于标准实验环境中,自由摄取饮食。实验动物合格证号:SCXK(鄂)2011-0008。

1.2 试剂与仪器

姜黄素(分子式 $C_{21}H_{20}O_6$, 相对分子质量为 368.4, 纯度 94%)购自 Sigma 公司;0.5%羧甲基纤维素钠溶液由湖北医药学院附属人民医院药剂科惠赠;孕马血清促性腺激素(PMSG, 宁波三生药业有限公司);人绒毛膜促性腺激素(HCG, 珠海丽珠医药集团股份有限公司);大鼠卵巢组织 VEGF、血管内皮生长因子受体-1(VEGFR-1)、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)测定试剂盒购自美国 R&D 公司,批号分别为 E-30438、E-36702、E-36705;伊文思蓝(Evans Blue, EB)购自美国 Sigma 公司。

1.3 造模方法

采用完全随机化分组方法将大鼠分为姜黄素组、正常组、模型组,每组 9 只。姜黄素组和模型组参照文献[3]进行改良建立 OHSS 模型:从第 22 日龄灌胃 1 h 后开始连续 4 天皮下注射含有 10 IU PMSG 的生理盐水 0.1 ml,第 5 天(最后一次注射 PMSG 后 24 h)皮下注射含有 100 IU HCG 的生理盐水 0.1 ml。48 h 后卵巢显著增大,表面紫褐色,有多个卵泡形成,出现腹水表明模型建立成功。

1.4 给药方法

姜黄素组用 0.5%羧甲基纤维素钠溶液将姜黄素配成混悬液 50 mg/(kg·d)灌胃,正常组和模型组分别给予等量 0.5%羧甲基纤维素钠溶液灌胃,各组均于 22 日龄开始灌胃,连续 1 周。

1.5 观察指标及方法

HCG 注射 48 h 后(即 28 日龄灌胃 1 h 后),皮下注射利多卡因麻醉大鼠,尾静脉注射 1% EB 0.1 ml。30 min 后脱颈处死大鼠,正中切开腹腔,观察有无腹水,用 5 ml 生理盐水冲洗腹腔,将冲洗液收集到试管中。心脏采血 1 ml 入抗凝管,待血液凝固后,在离心机中以 3000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,置 -70℃ 储存备检。随后分离双侧卵巢,称重,照相,一侧卵巢组织置于 4% 甲醛溶液中固定,另一侧 -70℃ 冰箱保存待用。①组织形态学观察:4% 甲醛

溶液固定后,常规石蜡包埋,4 μm 厚度连续切片,HE 染色,光学显微镜下观察各组卵巢形态学特点。②腹腔毛细血管通透性:记录腹腔收集液含量,按照 Khanna^[4]和付永伦^[5]的方法,将收集的腹腔回收液稀释至 10 ml,加 0.1 mol/L 氢氧化钠 0.05 ml 过滤,并以 3000 r/min 离心 10 min,用分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司)测 420 nm 处 OD 值,根据标准浓度及其 OD 值绘制标准曲线,算出各组腹腔冲洗液 EB 含量。③血雌二醇(E_2)含量测定:采用电化学发光法检测。④卵巢中 VEGF 及受体的测定:采用酶联免疫法(ELISA)检测,具体方法及相关操作程序均按有关试剂盒说明书进行,结果用酶标仪(奥地利安图斯)读取吸光值,绘制标准曲线求相应值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用两独立样本双侧 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠卵巢形态学观察

肉眼观察模型组大鼠卵巢较正常组体积显著增大,表面呈蓝色,姜黄素组大鼠卵巢体积有所减少,表面颜色变淡。镜下可见正常组有多个不同发育状况的卵泡,模型组卵巢黄素化,呈囊样改变,各级卵泡明显减少,卵泡闭锁,卵巢内分隔规则,囊形态规则,间质水肿;姜黄素组卵巢黄素化程度减轻,卵泡较模型组有所增加,间质水肿程度减轻,黄体直径减小。

2.2 各组大鼠腹水回收液量、卵巢重量、腹腔 EB 含量和血清 E_2 水平的比较

表 1 示,模型组大鼠腹腔回收液量、卵巢重量、腹腔 EB 含量及血清 E_2 水平均明显高于正常组($P < 0.05$),姜黄素组大鼠卵巢重量、腹腔 EB 含量及血清 E_2 水平亦明显高于正常组($P < 0.05$)。姜黄素组腹腔回收液量、卵巢重量、腹腔 EB 含量和血清 E_2 水平均低于模型组($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠卵巢 VEGF 及受体水平的比较

表 2 示,模型组大鼠卵巢中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 含量均明显高于正常组($P < 0.05$),而姜黄素组大鼠各指标与正常组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);姜黄素组大鼠卵巢 VEGF 和 VEGFR-2

表 1 各组大鼠腹水回收液量、卵巢重量、腹腔 EB 含量和血清 E_2 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	腹腔回收液量(ml)	卵巢重量(mg)	腹腔 EB 含量(μ g/100g)	血清 E_2 水平(pg/ml)
正常组	9	3.74 ± 0.67	28.12 ± 10.38	1.72 ± 1.49	7.22 ± 11.49
模型组	9	4.60 ± 0.57*	275.075 ± 35.17*	3.55 ± 1.53*	197.25 ± 104.23*
姜黄素组	9	4.06 ± 0.41 Δ	221.263 ± 49.72* Δ	1.85 ± 1.33* Δ	85.33 ± 29.55* Δ

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

表 2 各组大鼠卵巢 VEGF 及受体水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	VEGF(pg/ml)	VEGFR-1(ng/ml)	VEGFR-2(pg/ml)
正常组	9	268.917±26.66	47.238±7.72	3626.943±579.93
模型组	9	304.500±18.85*	61.753±24.22*	4800.155±378.56*
姜黄素组	9	271.183±18.91 [△]	50.982±3.93	4302.675±483.23 [△]

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

水平较模型组明显减少($P<0.05$), VEGFR-1 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

本研究在总结前人造模的基础上,选择 22 日龄雌性 SD 大鼠,注射 HCG 48h 后,所有造模的大鼠卵巢增大将近 10 倍,卵泡增多,腹水形成,腹膜通透性增加,组织切片可见卵巢明显黄素化,囊内分隔规则,间质水肿,表明本实验造模成功。超促排卵导致的卵巢重量增加可能是因为卵巢血管通透性增加,间质水肿,多个卵泡形成所致;腹水出现可能是因为腹膜毛细血管通透性增加,血管内的液体流向腹腔所致。 E_2 来源于卵巢的卵泡膜细胞和颗粒细胞,卵巢过度刺激时,卵巢增大、卵泡增多,分泌 E_2 也相应增多。本实验中模型组注射 HCG 后血清中 E_2 水平显著增加,对预测 OHSS 的发生发展和判断预后有一定的意义。VEGF 作为一种血管活性物质,直接作用于内皮细胞,具有促进毛细血管通透性、血管内皮细胞增殖、迁移及诱导新生血管生成等作用^[6]。本研究 OHSS 模型大鼠卵巢组织中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 含量均明显增加,提示 VEGF 及受体与 OHSS 的发生密切相关。

本研究结果显示,在姜黄素干预后,OHSS 模型大鼠卵巢重量、腹腔回收液量、腹水 EB 含量均有所降低;根据课题组前期研究发现,姜黄素可明显抑制子宫内膜异位症异位内膜细胞 E_2 分泌,且具有时间依赖性^[7],本研究进一步验证了姜黄素具有降低 E_2 作用。其作用机制可能是抑制全身毛细血管通透性,减少腹水出现、降低卵巢重量。近年大量研究发现,姜黄素在体内均具有抗血管生成的作用,其降低毛细血管通透性作用显著^[8-9],本研究应用姜黄素对 OHSS 模型大鼠进行干预。研究姜黄素对 VEGF/VEGFR 系统作用的实验发现,姜黄素既能减少 VEGFR-1 含量^[10],同时也可以下调 VEGFR-2 表达^[11],达到降低血管通透性的目的。本研究结果显示,姜黄素可减少 VEGFR-1 和 VEGFR-2 的表达,但 VEGFR-1 差异无统计学意义,表明姜黄素对 VEGF/VEGFR 系统作用方面,可能以降低

VEGFR-2 作用为主,减少 VEGF 与受体结合的机会,从而发挥降低血管通透性的作用。

参考文献

- [1] Gómez R, Soares SR, Busso C, et al. Physiology and pathology of ovarian hyperstimulation syndrome[J]. Semin Reprod Med, 2010,28(6):448-457.
- [2] Chen C, Liu Y, Chen Y, et al. C086, a novel analog of curcumin, induces growth inhibition and down-regulation of NF κ B in colon cancer cells and xenograft tumors[J]. Cancer Biol Ther, 2011,12(9):797-807.
- [3] Ujioka T, Matsuura K, Kawano T, et al. Role of progesterone in capillary permeability in hyperstimulated rats [J]. Hum Reprod, 1997,12(8):1629-1634.
- [4] Khanna M, Chaturvedi UC, Sharma MC, et al. Increased capillary permeability mediated by dengue virus-induced lymphokine[J]. Immunology, 1990,69(3):449-453.
- [5] 付永伦,林其德,仲汗威. 卵巢过度刺激综合征大鼠模型建立[J]. 上海实验动物科学, 2002,22(1):16-18.
- [6] Peitsidis P, Agrawal R. Role of vascular endothelial growth factor in women with PCO and PCOS: a systematic review[J]. Reprod Biomed Online, 2010,20(4):444-452.
- [7] 余峥,王文娟,张昌军,等. 姜黄素抑制子宫内膜异位症雌激素生成的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2010,21(6):1447-1449.
- [8] Sharma AV, Ganguly K, Paul S, et al. Curcumin heals indomethacin-induced gastric ulceration by stimulation of angiogenesis and restitution of collagen fibers via VEGF and MMP-2 mediated signaling[J]. Antioxid Redox Signal, 2012,16(4):351-362.
- [9] Tung YT, Chen HL, Lai CW, et al. Curcumin reduces pulmonary tumorigenesis in vascular endothelial growth factor (VEGF)-overexpressing transgenic mice[J]. Mol Nutr Food Res, 2011,55(7):1036-1043.
- [10] Somers-Edgar TJ, Scandlyn MJ, Stuart EC, et al. The combination of epigallocatechin gallate and curcumin suppresses ER alpha-breast cancer cell growth in vitro and in vivo[J]. Int J Cancer, 2008,122(9):1966-1971.
- [11] El-Azab M, Hishe H, Moustafa Y, et al. Anti-angiogenic effect of resveratrol or curcumin in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice[J]. Eur J Pharmacol, 2011,652(1-3):7-14.

(收稿日期:2012-06-29;修回日期:2012-09-17)

[编辑:邓 媛]