

育麟方对卵巢储备功能降低大鼠颗粒细胞分泌功能的影响

蔡彬彬¹, 何嘉琳^{2*}, 王素霞²

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 杭州市中医院, 杭州 310007)

【摘要】 目的:研究育麟方影响环磷酰胺致卵巢储备功能降低大鼠模型卵巢颗粒细胞的分泌功能的机制。方法:性成熟雌性SD大鼠参考文献制备卵巢储备功能降低大鼠模型,分为育麟方高、中、低剂量组,补佳乐组,模型组,正常组。正常组,模型组予蒸馏水 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,补佳乐组予戊酸雌二醇片 $0.21\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,育麟方低、中、高组分别予育麟方生药 $15.2, 30.4, 60.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 21 d后,予动情前期处死,放射免疫法测定大鼠血清卵泡刺激素(FSH),黄体生成素(LH)水平及抗苗勒管激素(AMH)表达水平,光镜下观察卵巢组织形态学变化,卵泡数目及黄体数目。结果:与正常组比较,模型组FSH, LH含量明显升高($P < 0.05$), AMH含量明显降低($P < 0.05$),各级卵泡数目,黄体数目明显减少($P < 0.05$);与模型组比较,育麟方治疗组大鼠血清FSH, LH水平明显减少($P < 0.05$),育麟方中剂量组及补佳乐组血清AMH水平明显增高($P < 0.05$),育麟方中、高剂量组的各级卵泡及黄体数量明显增多($P < 0.05$)。结论:育麟方可能通过影响卵巢储备功能降低模型鼠的颗粒细胞内分泌功能而改善其卵巢储备功能。

【关键词】 育麟方; 卵巢储备功能下降; 卵巢颗粒细胞; 环磷酰胺

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2015)15-0138-04

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150138

Effects of Yulin Decoction on Secretion Function of Granulosa Cells of Ovarian Reserve Declined Rats

CAI Bin-bin¹, HE Jia-lin^{2*}, WANG Su-xia² (1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Traditional Chinese Medical Hospital of Hangzhou City, Hangzhou 310007, China)

【Abstract】 **Objective:** To investigate the effect of Yulin decoction on the secretion function of granulosa cells in cytoxan-induced (CTX) ovarian reserve declined rats. **Method:** The rats were randomly divided into 6 groups: the normal group (distilled water, $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), the model group (distilled water, $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), the progynova group ($0.21\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), the high-, medium-and low-dose Yulin decoction groups ($15.2, 30.4, 60.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) of 10 rats each. The ovarian reserve declined rats model were induced by injecting CTX intraperitoneally. The corresponding medicines were intragastrically administered rats for 21 days. Histomorphology changes of ovaries, the numbers of follicle and corpus luteum were observed, serum levels of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), anti-mullerian hormone (AMH) were determined by radioimmunoassay. **Result:** Compared with the normal group, the levels of FSH and LH increased, AMH level decreased, the numbers of follicle and corpus luteum decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of FSH and LH decreased in Yulin decoction groups, AMH level increased in the medium-dose Yulin decoction and progynova groups, the numbers of follicle and corpus luteum increased in the medium-and high-dose Yulin decoction groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yulin decoction could improve the ovarian reserve function by regulating the secretion function of granulosa cells of ovarian reserve declined rats.

【Key words】 Yulin decoction; decline in ovarian reserve; granulosa cells; cytoxan

育麟方是何氏女科临床经验积累而成的精华之方,用于治疗卵巢储备功能下降导致的月经失调、性

激素缺乏及不孕不育等疾病数年,取得满意的疗效^[1]。前期实验研究表明育麟方能有效提高排卵

【收稿日期】 20141106(003)

【基金项目】 浙江省科技厅项目(2010C33130)

【第一作者】 蔡彬彬,在读硕士,从事中医妇科, Tel:15088648420, E-mail:916927140@qq.com

【通讯作者】 *何嘉琳,国家级名中医,主任医师,从事不孕症、复发性流产等妇科疑难杂症, Tel:0571-85827557, E-mail:hjl0721@hotmail.com

障碍大鼠的排卵率^[2]。卵巢储备功能下降(decline in ovarina reserve, DOR)指卵巢皮质区卵泡生长、发育形成可受精的卵母细胞的能力减弱,而导致女性月经失调、性激素的缺乏及生育能力的下降的病证^[3-4]。卵巢颗粒细胞是卵泡内的主要体细胞成分,颗粒细胞功能与卵母细胞的生长、发育、成熟密切相关^[5]。本实验通过建立卵巢储备降低大鼠模型,以补佳乐为阳性对照,了解育麟方对大鼠颗粒细胞分泌功能的影响,从而进一步了解其药理学和改善卵巢储备功能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 8周龄SPF级健康性成熟雌性SD大鼠70只,体重(200±10)g,由浙江省实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(浙)2014-0001。饲养于浙江中医药大学动物实验中心,室温控制在20~25℃,光照12h,采用分笼架式喂养,标准饲料,饮用水为净化水。

1.2 药物及试剂 育麟方制剂:菟丝子30g,枸杞子12g,当归10g,川芎10g,熟地黄10g,巴戟天10g,肉苁蓉10g,淫羊藿15g,蛇床子6g,覆盆子15g,党参15g,炙甘草3g,经杭州市中医院俞进主任药师鉴定符合标准。上药水煎并浓缩为生药2.0g·mL⁻¹,4℃冰箱中储存备用。注射用环磷酰胺(cyclophosphamid,CTX,山西普德药业有限公司,批号H14023686),戊酸雌二醇片(补佳乐,拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号J20130009),大鼠促卵泡生成素(FSH)ELISA检测试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司,批号REV231),大鼠促黄体生成素(LH)ELISA检测试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司,批号REV048),大鼠抗苗勒管激素(AMH)ELISA检测试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司,批号REV049)。

1.3 仪器 BX53F型双目生物显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 动物模型的制备 连续观察阴道脱落细胞涂片7d,筛选具有规律动情周期的大鼠进入实验^[6]。大鼠根据随机数表抽取10只为正常组,剩余为造模组。参照文献^[7-9],造模组给予CTX首次负荷剂量50mg·kg⁻¹,后以8mg·kg⁻¹·d⁻¹的剂量连续腹腔注射14d,ip 7d后每日晨8:30取阴道分泌物涂片,光镜下观察记录造模大鼠所处动情周期,出现动情周期紊乱,外观见蜷卧少动,毛色晦暗易脱,易激易烦躁的实验大鼠,纳入造模成功。

2.2 分组及给药 造模成功后,根据随机数表法将实验大鼠分为育麟方高、中、低剂量组,补佳乐组,模型组。预留正常组与模型组予蒸馏水20mL·kg⁻¹,补佳乐组予戊酸雌二醇片0.21mg·kg⁻¹,育麟方低、中、高组分别予生药15.2,30.4,60.8g·kg⁻¹,ig,每天1次,连续3周。育麟方低、中、高剂量组给药剂量分别按“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”折算成临床成人用药剂量的1,2,4倍。补佳乐组,按每日戊酸雌二醇片每人2.0mg折算为实验动物剂量,配成戊酸雌二醇片混悬液。

2.3 观察指标和测定方法 每日上午8:30采集阴道脱落细胞,进行瑞氏染色,普通光镜观察。给药结束后1~5d内将处于动情前期或第5天尚未出现明显动情周期的大鼠乙醚麻醉,采用腹腔动脉法取血,先于室温下自然放置1h,再以3000r·min⁻¹速度离心10min,分离血清。采用酶联免疫测定试剂盒测定血清FSH,促LH,AMH水平。剖腹分离取出双侧卵巢,去除周围脂肪组织,放入10%的甲醛溶液中固定48h,经脱水、浸蜡、包埋、切片(取最大切面)、HE染色,封片后光镜下观察其组织学变化,计数卵巢最大切面各级卵泡数目及黄体数目^[10]。

2.4 统计学分析 采用SPSS 16.0统计软件包进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠动情周期变化的影响 与正常组比较,模型组动情周期正常例数明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组明显增加动情周期正常例数($P < 0.05$),尤其是戊酸雌二醇中剂量组完全正常。见表1。

表1 育麟方对大鼠动情周期变化的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	动情周期正常 数/例	正常比例 /%
正常	-	8	8	100.0
模型	-	8	1	12.5 ¹⁾
育麟方	15.2	7	6	85.7 ²⁾
	30.4	8	8	100.0 ²⁾
	60.8	8	7	87.5 ²⁾
戊酸雌二醇	0.21 × 10 ⁻³	8	7	87.5 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表2~3同)。

3.2 对大鼠血清FSH,LH,AMH水平的影响 与

正常组比较,模型组 FSH, LH 水平明显升高 ($P < 0.05$), AMH 水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比

较, 育麟方高、中、低剂量及补佳乐组均能明显降低 FSH, LH 水平, 升高 AMH 水平 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 育麟方对大鼠 FSH, LH, AMH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Yulin decoction on levels of FSH, LH, AMH in rats ($\bar{x} \pm s$)

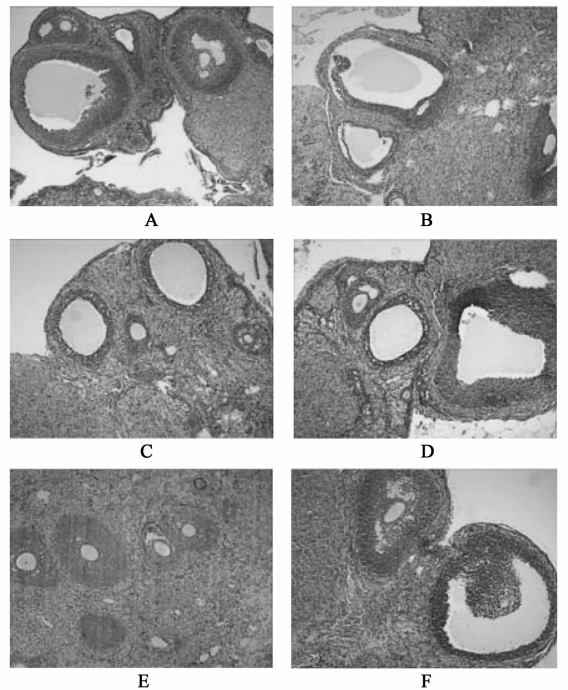
组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	FSH/ $ng \cdot L^{-1}$	LH/ $ng \cdot L^{-1}$	AMH/ $ng \cdot L^{-1}$
正常	-	8	12.57 \pm 0.92	20.52 \pm 2.58	142.62 \pm 8.60
模型	-	8	34.23 \pm 6.93 ¹⁾	30.41 \pm 2.53 ¹⁾	125.63 \pm 7.82 ¹⁾
育麟方	15.2	7	24.33 \pm 3.25 ²⁾	25.69 \pm 3.18 ²⁾	131.76 \pm 8.85
	30.4	8	23.85 \pm 2.29 ²⁾	26.74 \pm 1.94 ²⁾	137.85 \pm 8.36 ²⁾
	60.8	8	24.30 \pm 3.02 ²⁾	23.94 \pm 2.98 ²⁾	130.57 \pm 4.99
戊酸雌二醇	0.21 $\times 10^{-3}$	8	21.93 \pm 2.70 ²⁾	24.50 \pm 2.22 ²⁾	135.08 \pm 8.54 ²⁾

3.3 对卵巢组织形态学的影响 镜下模型组大鼠卵巢萎缩, 各级卵泡同时存在, 数目明显减少, 形态上出现囊性扩张, 闭锁卵泡增多, 卵母细胞的颗粒细胞层数减少, 排列疏松。部分卵泡发育不良, 卵泡内有炎细胞浸润。黄体较少, 可见不同程度的细胞变性及坏死, 坏死区有炎性细胞浸润。间质可见不同程度的炎细胞浸润及纤维化。戊酸雌二醇组、育麟方高、中、低剂量组: 卵巢较正常组偏小, 可见各级卵泡和黄体, 数量较正常组减少。部分卵泡发育不良, 卵母细胞颗粒细胞层数较模型组多, 卵泡液含量少, 小卵泡增多。黄体数目少, 偶有脂肪变性。间质伴见炎细胞浸润及纤维化。见图 1。

4 讨论

卵巢储备功能下降的临床表现为古代中医文献记载的“七七”变化有相似之处, 本病的发生与肾虚相关。中医认为“肾主藏精”, 主生长发育与生殖, 肾中真阳不足, 命门火衰, 阳虚气弱, 有碍气化与升腾, 以至发生气血、冲任、胞宫失煦, 影响卵泡的发育, 降低卵母细胞的质量, 导致卵巢储备功能下降。因此肾虚是卵巢储备功能下降的中医学基本病机。卵巢储备功能下降除肾虚型外, 另可见肝气郁结、痰湿内阻、瘀滞胞宫等兼证, 但大都属“本虚标实”证, 肾虚仍为主要矛盾^[11]。育麟方中以菟丝子、淫羊藿为君, 补肾温阳; 枸杞子、巴戟天、肉苁蓉、覆盆子为臣, 补肝肾益精血; 当归、川芎、熟地黄, 补血调血, 补而不滞; 川芎养血活血, 蛇床子益肾壮阳。诸药相伍, 重在补肾阳, 佐以养精血, 血充精足, 胞宫得以温养, 促进卵泡的发育、排卵, 使月经恢复正常, 从而达到改善卵巢储备功能的目的。

实验中育麟方能明显改善模型鼠“肾虚”症状, 恢复模型大鼠的动情周期。育麟方中大量应用补肾填精药物, 肾阳得充, 五脏得养, 全身症状明显改善。



A. 正常组; B. 模型组; C. 育麟方 15.2 $g \cdot kg^{-1}$ 组; D. 育麟方 30.4 $g \cdot kg^{-1}$ 组; E. 育麟方 60.8 $g \cdot kg^{-1}$ 组; F. 戊酸雌二醇组

图 1 育麟方对大鼠卵巢卵泡及黄体数量的影响 (HE, $\times 100$)
Fig.1 Effects of Yulin decoction on number of ovarian follicle and corpus luteum in rats (HE, $\times 100$)

说明育麟方可以调节机体的整体机能, 而补佳乐则无此明显效用。

实验中育麟方能显著降低模型大鼠血清 FSH, LH 水平。FSH 由腺垂体分泌, 作用于卵泡膜受体而直接促进窦前卵泡和窦状卵泡的生长发育、促进 E_2 的合成与分泌, 同时与 E_2 协同, 诱导颗粒细胞生成 LH 受体, 为排卵及黄素化做准备, 是应用最早、最广泛的卵巢储备预测指标之一^[12]。由此说明本方可能作用于下丘脑-垂体-卵巢轴, 间接影响颗粒细胞分泌功能, 改善卵巢的储备功能。另外研究^[13]

表明卵巢颗粒细胞分泌因子,如抑制素、激活素,参与调解垂体释放 FSH,可推测育麟方通过调节卵巢颗粒细胞分泌因子的分泌,影响 FSH 水平,反应卵巢储备功能的改变。

用药后,补佳乐组与育麟方中、高剂量组对卵巢组织形态的各方面均有显著改善。与模型组对照,育麟方中、高剂量组的各级卵泡及黄体数量显著增多。颗粒细胞在卵泡的生长启动、增殖、分化、闭锁/排卵到黄体的形成过程中起关键作用。由上可知育麟方及补佳乐均可改善环磷酰胺导致的卵巢储备下降大鼠的卵巢结构,对化疗所导致的卵巢功能损伤起到修复作用,改善颗粒细胞功能,促进卵泡的发育,增强卵巢储备能力。

AMH 主要由窦前卵泡和窦状卵泡的颗粒细胞分泌,特异性表达在窦前卵泡及小窦卵泡的颗粒细胞上。其水平与获卵数及卵巢反应性呈正相关,在整个月经周期的波动极小,呈相对稳定状态,因此 AMH 能够更好地反映卵巢的储备功能^[14-15]。由实验结果可知,各治疗组均增强 AMH 的表达,育麟方组中尤其以育麟方中剂量组对于 AMH 的影响效果明显。数值上中剂量组较补佳乐组效果显著。由此可推测育麟方能作用于颗粒细胞,增强其分泌生长因子,从而改善模型大鼠的卵巢功能。

综上所述,育麟方对卵巢储备功能下降的治疗,不仅能通过下丘脑-垂体-卵巢轴作用于卵巢^[15],还可以通过影响颗粒细胞的分泌功能、减缓卵泡的闭锁达到保护卵巢功能。对于育麟方影响颗粒细胞分泌功能的分子机制,将是下一步研究问题。

[参考文献]

[1] 何嘉琳,俞佳. 育麟方加减治疗不同年龄女性卵巢储备功能下降 30 例疗效观察[J]. 中国中医药科技, 2011,18(6):521-522.

[2] 何嘉琳,方晓红,高涛,等. 育麟颗粒对排卵障碍大鼠子宫、卵巢 ER 及下丘脑弓状核超微结构影响的研究[J]. 中国中医药科技,2008,15(2):90-91.

[3] 冯敬华,孔丽蔚,李柳丽. 卵巢储备功能下降病因与治疗的中西医研究进展[J]. 中国医药导报,2014,11(14):161-165.

[4] Wilkosz P, Greggains G D, Tanbo T G, et al. Female

reproductive decline is determined by remaining ovarian reserve and age [J]. PLoS One, 2014, 9(10):e108343.

[5] Emori C, Sugiura K. Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development [J]. Anim Sci J,2014, 85(6):627-633.

[6] 王洁,吴素慧,尚海霞. 性成熟雌性 SD 大鼠动情周期的观察[J]. 当代医学,2013,19(28):25-26.

[7] 许小凤,谈勇. 卵巢储备功能下降及卵巢早衰动物模型研究进展[J]. 中国实验动物学报,2008,16(4):309-312.

[8] 付霞霏,何援利. 化疗所致卵巢早衰动物模型的建立[J]. 广东医学,2008,29(12):1952-1954.

[9] Meirou D, Lewis H, Nugent D, et al. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide:clinical importance and proposed accurate investigative tool [J]. Hum Reprod,1999,14(7):1903-1907.

[10] M Myers, K L Britt, N G M Wreford, et al. Methods for quantifying follicular numbers with in the mouse ovary [J]. Reproduction,2004,127(5):569-580.

[11] 丁红卫,惠雪莲,武宏艳. 关于卵巢储备功能低下中医临床辨证分度的思考[J]. 中国药物经济学,2013,7(S3):41-42.

[12] Hassa H, Aydın Y, Taplamacıoğlu F. The role of perivitelline space abnormalities of oocytes in the developmental potential of embryos [J]. J Turk Ger Gynecol Assoc,2014,15(3):161-163.

[13] 卢翠玲,杨巍,胡召元,等. 颗粒细胞的增殖分化及其在卵泡发育中的作用[J]. 科学通报,2005,50(21):2341-2347.

[14] Li H W, Wong C Y, Yeung W S, et al. Serum anti-mullerian hormone level is not altered in women using hormonal contraceptives [J]. Contraception, 2011, 83(6):582-585.

[15] Tse Pelidis S, Devreker F, Demeesterel, et al. Stable serum levels of anti-Mullerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome [J]. J Clin Endocrinol Metab,2006,91(3):941-945.

[责任编辑 周冰冰]