

逍遥散加减方对高催乳激素血症大鼠卵巢颗粒细胞增殖和细胞周期的影响

李燕*, 李肖梅

(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:探讨以肝脾为核心,运用逍遥散加减方治疗高催乳素血症(HPRL)模型大鼠,观察逍遥散加减方对体外培养HPRL大鼠卵巢颗粒细胞增殖及细胞周期的影响。方法:选用SD雌性大鼠120只,随机分为正常组、模型组、阳性药溴隐亭组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、逍遥散加减方高、中、低剂量组($55, 22.5, 13.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。采用ip甲氧氯普胺,制作HPRL大鼠模型。给药30 d后,采用MTT检测各组细胞培养24, 48, 72, 96 h细胞增殖情况;采用流式细胞仪分析细胞周期各时相的变化及细胞凋亡指数。结果:与正常组比较,模型组24, 48, 72, 96 h大鼠卵巢颗粒细胞增殖明显降低,细胞凋亡指数显著增高,S期的细胞增殖明显降低, G_0/G_1 期细胞相对比例明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,溴隐亭组、逍遥散加减方高、中、低剂量组明显增加大鼠卵巢颗粒细胞增殖($P < 0.05$),逍遥散加减方高剂量组降低卵巢细胞凋亡指数,使S期的细胞增殖显著增多, G_0/G_1 期细胞相对比例减少($P < 0.05$),其中加味逍遥散高剂量组的作用与溴隐亭组相近。结论:逍遥散加减方促进卵巢颗粒细胞增殖,降低细胞凋亡指数,其作用机制可能是通过促进颗粒细胞从 G_0 期向S期转化,增加S期细胞比例完成。

[关键词] 疏肝健脾; 高催乳素血症; 卵巢颗粒细胞; 细胞周期

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0088-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015190088

Effect of Modified Xiaoyao San Powder on Ovarian Granulosa Cell Proliferation and Cell Cycle of Hyperprolactinemia Rats LI Yan*, LI Xiao-mei (Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To using establish the hyperprolactinemia (HPRL) rat model by using modified Xiaoyao San, to observe the effect of modified Xiaoyao San on ovarian granulosa cell proliferation and cell cycle of HPRL rat *in vitro*, with the liver and spleen as the core, Intraperitoneal injection of metoclopramide was adopted to make the rat model of HPRL. **Method:** Totally 120 female SD rats were randomly divided into six groups: the blank group, the negative control group (model group), the positive control group (Bromocriptine group, $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and the modified Xiaoyao San powder high, middle and low dose groups ($55, 22.5, 13.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The intervention period was 30 days. MTT assay was used to detect the cell proliferation of cultured cells in each group at 24, 48, 72, 96 h. The change in each phase of the cell cycle was analyzed by flow cytometry and apoptotic index. **Result:** Compared with the model group, the model group showed significant decreases in granulosa cell proliferation at 24, 48, 72, 96 h and S phase and increase in cell ratio in G_0/G_1 phase ($P < 0.05$). Compared with the model group, modified Xiaoyao San powder group and Bromocriptine group showed significant reduce apoptotic index and increase in cell proliferation in S phase and decreases in cell ratio in G_0/G_1 phase ($P < 0.05$). The effect of modifid Xiaoyao San high dose group was similar with the Bromocriptine group. **Conclusion:** Modified Xiaoyao San has a significant effect in promoting proliferation of ovarian granulosa cells and reduce apoptotic index, and its mechanism may be correlated with the transformation of granulosa cells to S phase from G_0 period and the increase in ratio of cells in S phase.

[Key words] soothing liver and invigorating spleen; hyperprolactinemia; granulosa cell; cell cycle

[收稿日期] 20140821(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060301);贵州省科技支撑计划项目(黔科合SY[2010]3058号)

[通讯作者] *李燕,博士,教授,硕士生导师,从事中医药对生殖内分泌调控的研究, Tel:18985198251, E-mail:liyan2000315@163.com

高催乳素血症(hyperprolactinemia, HPRL)是各种原因导致血清催乳素(PRL)异常升高, $PRL > 1.14 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($> 25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 以月经紊乱、不孕、溢乳、闭经等为主要临床表现^[1]。传统治疗 HPRL 的药物主要有溴隐亭, 70% ~ 90% 的患者获得较好疗效, 但亦存在不良反应大、停药后易复发等缺陷^[2]。麦角卡琳和喹高利特是溴隐亭换代药物, 前者对无生育要求和 PRL 微腺瘤疗效好, 后者为溴隐亭抵抗患者的替代, 但二者价格昂贵^[3]。而中医药治疗本病具有一定优势和特色, 本研究组前期在以疏肝健脾法治疗本病取得满意疗效的基础上^[4], 提出“以肝脾为核心靶向干预高催乳素血症大鼠卵巢颗粒细胞凋亡机制研究”假说, 本研究依据中医肝脾藏象学说及经络理论, 以“肝脾”为核心, 继承出自《太平惠民和剂局方》名方“逍遥散”以疏肝解郁、健脾和营的组方理念, 立足于调和肝脾, 古方新用。为进一步探讨逍遥散加减方促进卵泡发育的机制, 本研究采用体内用药, 体外培养大鼠卵巢颗粒细胞为实验对象, 观察逍遥散加减方对大鼠卵巢颗粒细胞增殖及细胞周期的影响。

1 材料

1.1 动物 2 ~ 3 月龄 SPF 级 SD 雌性性成熟大鼠 120 只, 体重 220 ~ 250 g, 由重庆第三军医大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(渝)2007-0006, 检疫合格。高催乳素血症模型: 采用 *ip* 盐酸甲氧氯普胺注射液 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 正常组动物同时等量生理盐水 *ip*, 1 次/d, 连续 10 d 进行造模^[5-6]。

1.2 药物及试剂 逍遥散加减方制备工艺据文献拟定(按柴胡-生麦芽-白芍-当归-茯苓-白术-炙甘草 15:30:30:20:15:15:10 比例制成质量浓度为 $2.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的煎剂)。处方中药材均购于贵阳市同济堂药房, 经贵阳中医学院第一附属医院药学专家鉴定, 均符合 2010 年版《中国药典》相关项下的规定。甲磺酸溴隐亭片(意大利 Novartis Pharma S. p. A. 公司, 批号 TIA393A), 盐酸甲氧氯普胺注射液(胃复安, 天津药业集团新郑股份有限公司, 批号 120220321)。DMEM 培养基(批号 SH30022.01B)、胎牛血清(批号 SV30087.01)均购于美国 Hyclone 公司, MTT, DMSO(批号 C0009)均购于美国 Sigma 公司, PBS 液(北京鼎国昌盛技术公司, 批号 BF-0021), 免疫荧光染色洗涤液(批号 P0106), 免疫荧光封闭液(批号 P0102), 免疫荧光染色试剂盒-抗兔 FITC(批号 P1086)均购于碧云天公司, FSH 抗体(美国 Abcom 公司, 批号 ab103874), 细胞周期试剂盒(美国 BD 公司, 批号

340242)。

1.3 仪器 BX51 型正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司), ECCLIPSETi-s 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司), Centrifuge5418R 型离心机(德国 Eppendorf 公司), GZX-9140MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司), MLS-3750-SV 型全自动高压蒸汽灭菌锅(日本三洋公司), Galaxy 170s 型二氧化碳孵箱(德国 Eppendorf 公司), WD-9405B 型水平摇床(北京市六一仪器厂), BLX-800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司), FACS-CantoII 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 采用 SAS 统计软件 proc plan 过程对实验动物进行完全随机化分组, 将 120 只进行随机编号, 分为 6 组, 每组 20 只, 无脱失。正常组、模型组及阳性药组(溴隐亭组), 用生理盐水按体重配成悬浊液 *ig*, 按 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药, 相当于成人剂量的 10 倍, *ig* 30 d。逍遥散加减方高剂量组: 按 $55 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药, 相当于成人剂量的 20 倍; 逍遥散加减方中剂量组: 按 $27.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药, 相当于成人剂量的 10 倍; 逍遥散加减方低剂量组: 按 $13.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药, 相当于成人剂量的 5 倍, 以上各组均连续 *ig* 30 d。

2.2 大鼠卵巢颗粒细胞制备^[7] 各组大鼠颈椎脱臼处死, 在无菌条件下取出双侧卵巢, 放入无菌 PBS 液平皿移入超净工作台, 剥除干净卵巢组织经 PBS 清洗后置于预冷的 DMEM 培养基中, 刺破卵巢表面成熟卵泡, 释放颗粒细胞入培养基。收集卵泡液及颗粒细胞, 经细胞筛过滤(200 目不锈钢)后, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 垂悬细胞, 使之分散成单细胞悬液; 收集细胞, 用高糖 DMEM(含 15% 胎牛血清, $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素)培养基制成单细胞悬液, 计数活细胞数目, 细胞存活率 > 80%。根据实验要求分别将细胞的密度调整为: 用于细胞鉴定的细胞稀释成密度为 1.0×10^6 个/mL 的细胞悬液, 将细胞种入 6 孔培养板中, 设 3 个复孔; 用于流式细胞仪检测细胞密度为 1.0×10^6 个/mL, 接种于 25 cm^2 培养瓶, 设 2 个复瓶; 用于 MTT 检测的细胞密度为 5.0×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板, 设 2 个复孔; 各组原代细胞分别置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 浓度, 饱和湿度培养箱中培养, 预培养 24 h 半换液 1 次, 差速贴壁纯化细胞, 72 h 后全换液来进一步纯化, 这样既能提高细胞活性又能保证细胞纯度。

2.3 细胞的鉴定 原代培养大鼠卵巢颗粒细胞, 常

规细胞爬片,严格按细胞 HE 染色和 FSHR 细胞免疫荧光染色法操作,进行细胞鉴定。

2.4 MTT 实验观察逍遥散加减方对大鼠颗粒细胞增殖影响 原代培养各组颗粒细胞分别培养 24, 48, 72, 96 h 后每孔加 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 液 $20 \mu\text{L}$, 4 h 后吸取培养上清液,每孔加 DMSO $150 \mu\text{L}$, 震荡 10 min,选择 492 nm 波长,读取各孔吸光度 A ,记录结果。

2.5 流式细胞仪检测颗粒细胞周期各时相的变化 接种各组原代颗粒细胞,继续培养 72 h,用 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% 乙二胺四酸二钠 (EDTA) 溶液消化细胞,制成单细胞悬液。PBS 洗涤 3 次,离心去 PBS,加入预冷的 75% 的乙醇固定, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜;离心弃去固定液, PBS 垂悬细胞,过滤, $1 \text{ } 000$

$\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃去 PBS。加 1 mL PI 复合染液 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光染色 30 min,上流式细胞仪检测,激发光波长为 488 nm,发射光波波长为 633 nm。读取 G_0/G_1 期, S 期结果。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用组间比较采用 One-Way ANOVA 检验法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响 逍遥散加减方作用 HPR 大鼠卵巢颗粒细胞 24, 48, 72, 96 h 后,与正常组比较,模型组细胞的增殖明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,溴隐亭组及逍遥散加减方高、中、低剂量组作用 24, 48, 72, 96 h 后细胞增殖均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 逍遥散加减方对大鼠卵巢颗粒细胞增殖影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of modified Xiaoyao San on ovarian granulosa cell proliferation of rat ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	A_{490}			
		24 h	48 h	72 h	96 h
正常	-	0.26 ± 0.04	0.27 ± 0.04	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.02
模型	-	$0.22 \pm 0.02^{1)}$	$0.22 \pm 0.02^{1)}$	$0.25 \pm 0.01^{2)}$	$0.23 \pm 0.01^{2)}$
溴隐亭	0.001	0.25 ± 0.04	$0.27 \pm 0.04^{3)}$	$0.31 \pm 0.02^{4)}$	$0.29 \pm 0.01^{4)}$
逍遥散加减方	55	0.25 ± 0.03	$0.26 \pm 0.02^{3)}$	$0.31 \pm 0.02^{4)}$	$0.30 \pm 0.02^{4)}$
	27.5	0.24 ± 0.06	0.25 ± 0.06	$0.28 \pm 0.07^{5)}$	$0.26 \pm 0.04^{3,5)}$
	13.75	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.04	$0.26 \pm 0.03^{6)}$	$0.23 \pm 0.03^{5)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与溴隐亭组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对 HPR 大鼠卵巢颗粒细胞细胞周期的影响 对细胞周期中 G_0/G_1 期结果显示,与正常组比较,模型组无差异性;与模型组比较,逍遥散加减方中剂量组明显降低 G_0/G_1 期细胞比例 ($P < 0.05$),逍遥散加减方低剂量组明显升高 G_0/G_1 期细胞比例 ($P < 0.01$)。对细胞周期中 S 期结果显示,与正常组比较,模型组 S 期细胞比例明显下降 ($P < 0.01$);与模型组比较,逍遥散加减方高剂量组明显升高 S 期细胞比例 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 逍遥散加减方对大鼠卵巢颗粒细胞各周期影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of modified Xiaoyao San on ovarian granulosa cells of rat in each cycle ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	G_0/G_1	S
正常	-	66.63 ± 8.69	22.42 ± 4.10
模型	-	67.99 ± 6.11	$13.11 \pm 2.82^{2)}$
溴隐亭	0.001	68.28 ± 4.99	17.07 ± 2.93
逍遥散加减方	55	63.01 ± 9.37	$20.94 \pm 9.54^{4)}$
	27.5	$59.54 \pm 5.52^{3,5)}$	17.32 ± 5.12
	13.75	$69.31 \pm 2.65^{4)}$	15.91 ± 3.02

3.3 对细胞凋亡指数的影响 对细胞凋亡指数的

结果显示,与正常组比较,模型组明显升高 ($P < 0.01$),溴隐亭组上升 ($P < 0.05$);与模型组比较,逍遥散加减方高剂量组明显下降 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 逍遥散加减方对细胞凋亡指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of modified Xiaoyao San on cell apoptosis index ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	细胞凋亡指数/%
正常	-	6.96 ± 0.88
模型	-	$9.30 \pm 1.43^{2)}$
溴隐亭	0.001	8.67 ± 0.74
逍遥散加减方	55	$7.28 \pm 1.95^{3)}$
	27.5	7.94 ± 1.25
	13.75	9.11 ± 2.23

4 讨论

高催乳素血症是妇科常见内分泌紊乱性疾病之一,现代医学认为 HPRL 不仅对下丘脑 GnRH 及垂体 FSH, LH 的脉冲式分泌有抑制,而且还可直接抑制卵泡发育,造成卵泡发育不良,机制尚不完全明确^[8]。HPRL 在生殖功能失调中占 9% ~ 17%^[9]。

HPRL 属中医“月经不调”、“闭经”、“乳溢”、“不孕”等范畴。清代王旭高医案云：“……乳房属胃，乳汁血之所化，无孩子而乳房膨胀，亦下乳汁，非血之有余，乃不循其道为月水，反随肝气上入乳房，变为乳汁……”。中医学认为，乳房属足阳明胃经，乳头属足厥阴肝经。根据中医藏象学说及经络理论，脾与胃同属中焦、互为表里，在经络循行上相互络属。经血、乳汁同源脾，其排出溢泻有赖于肝气调达，疏泄有度。肝脾失调，血不循常道下注血海为月经，而随肝气上逆乳房为乳汁，即出现闭经溢乳。故高催乳素血症与肝脾关系密切，治疗上当以肝脾为核心。

逍遥散加减方以柴胡疏肝解郁，使肝气得条达，以和肝用；生麦芽疏肝健脾，回乳消胀，用于断乳乳房胀痛，二者共为君药。白芍、当归养血柔肝，以补肝体；白芍、当归与柴胡合用补肝体又助肝用，以疏肝气；肝血得补，则气血调和，疏泄得畅，二者共为臣药。白术、茯苓等补气健脾，脾健则气血生化有源，共为佐药。甘草调和诸药，为使药。诸药合用，共奏疏肝健脾，回乳之功。

卵巢颗粒细胞是卵巢的主要功能细胞也是卵泡发育的标志^[10]，故颗粒细胞增殖是卵泡发育的前提，颗粒细胞增殖需要合成大量 DNA，细胞增殖可以通过 DNA 的水平来反映^[11-12]。细胞周期指连续分裂的细胞从上一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的整个过程。细胞周期分为 4 个时期：M 期（有丝分裂期）染色质浓缩成染色体，组成染色体的两条染色单体分开，进入两个细胞中；G₁ 期（从有丝分裂结束到 DNA 复制前期）细胞或者向 DNA 合成方向发展，进入下一个细胞周期，或者可逆退出细胞周期，停留在 G₀ 期（细胞分裂静止期），在适当的刺激下，细胞从 G₀ 期转 G₁ 期入细胞周期；S 期（DNA 合成期），以及 G₂ 期（DNA 复制完成到有丝分裂开始）^[13]。本实验用 MTT 法检测细胞存活率直接反映细胞增殖，用流式细胞仪检测颗粒细胞周期各时相变化，反映细胞复制过程。

研究结果显示，逍遥散加减方作用于 HPRL 模型大鼠卵巢颗粒细胞后能降低 HPRL 模型动物卵巢颗粒细胞凋亡指数，使 S 期的细胞比例增多，说明逍遥散加减方能通过缩短 G₀/G₁ 期，推动细胞由 G₀ 期向 S 期转化、促进细胞周期的进程，增加 S 期细胞比例，从而促进颗粒细胞的增殖及其 DNA 的合成。因此，加味逍遥散对卵巢颗粒细胞增殖的显著促进

作用，可能是通过促进颗粒细胞从 G₀ 期向 S 期转化，增加 S 期细胞比例实现。

综上所述，逍遥散加减方能降低 HPRL 模型动物卵巢颗粒细胞凋亡指数，促进模型动物卵巢颗粒细胞由 G₀/G₁ 期向 S 期转化，推动细胞周期的进程，增加 S 期细胞比例，从而推进颗粒细胞的增殖及其 DNA 的合成，改善卵巢功能。这是该方治疗 HPRL 和改善卵巢功能可能的作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 367-368.
- [2] 中华医学会妇产科学分会. 中华妇产科杂志临床指南荟萃[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 91-92.
- [3] 郁琦. 妇科内分泌诊治指南解读·病案分析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 169-170.
- [4] 刘福珍, 李燕. 加味逍遥散治疗高泌乳素血症 30 例[J]. 光明中医, 2008, 23(11): 1688-1689.
- [5] 伊鸿鹏, 夏雷. 抑乳颗粒对高泌乳素血症大鼠性发育影响及其机制[J]. 山东医药, 2008, 48(29): 42-43.
- [6] 彭晓佳, 李燕. 高催乳素血症动物模型机制探讨[J]. 中医研究, 2012, 25(2): 47-48.
- [7] Ya Sui T, Matsuzaki T, Ogata R, et al. The herbal medicine Unkei-to stimulates the secretion of a cytokine-induced neutrophil chemoattractant, CINC/gro, in the rat ovarian cell culture [J]. Am J Reprod Immunol, 2003, 49(1): 14-20.
- [8] 李继俊. 妇产科内分泌治疗学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005: 252-254.
- [9] 华克群, 丰有吉. 实用妇产科学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 440.
- [10] Shimizu T, Kosaka N, Murayama C, et al. AP elin and AP jree ptorex pression in granulose and theaeacells during different stage soffolli cularde Velo pmenting the bovine ovary: in volvem to fa poptosi sand hormonal regulation [J]. Anim Re Prod SEI, 2009, 116(1/2): 28-37.
- [14] 李楠, 刘艳霞, 金哲, 等. 育泡饮对大鼠卵巢颗粒细胞增殖与细胞周期影响[J]. 北京中医药, 2012, 31(2): 148-151.
- [15] 童星丽, 赵娟, 谈勇. 奠基方含药血清对类多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能影响的研究[J]. 山西中医学院学报, 2013, 14(2): 21-23.
- [16] 郎景和, 向阳. 妇科学[M]. 14 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 78-79.

[责任编辑 周冰冰]