

菟丝子总黄酮对排卵障碍大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴性激素水平的影响

罗克燕^{1*}, 杨丹莉², 徐敏¹

(1. 遵义医学院附属医院辅助生殖与计划生育科, 贵州 遵义 563000;

2. 遵义医学院药理学教研室, 贵州 遵义 563000)

[摘要] **目的:**探讨丝子总黄酮对排卵障碍大鼠下丘脑-垂体-卵巢(HPO)轴性激素水平的影响。**方法:**将大鼠分为对照组(C)、模型组(M)、菟丝子黄酮低、高剂量组(CCLD, CCHD)以及阳性对照枸橼酸氯米芬组(PC), 采用羟基脲以 300 mg·kg⁻¹ ig 连续进行 10 d 制作排卵障碍大鼠模型, 用不同剂量菟丝子总黄酮(10, 20 mg·kg⁻¹)及阳性对照, 4.5 mg·kg⁻¹ ig 连续 5 d 干预。放射免疫法观察并比较大鼠血清卵泡刺激素(FSH)、雌激素(E₂)、促黄体生成素(LH)以及孕激素(P)水平的变化。**结果:**与 C 组相比, M 组血清 FSH, LH, E₂ 及 P 水平显著降低(均 $P < 0.05$), 其中 FSH 由 $(8.18 \pm 1.37) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低至 $(4.22 \pm 0.94) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$; LH 由 $(17.25 \pm 5.36) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低至 $(7.81 \pm 1.39) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$; E₂ 由 $(48.59 \pm 8.11) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低至 $(23.18 \pm 7.62) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; P 由 $(16.02 \pm 4.83) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低至 $(5.94 \pm 1.02) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (均 $P < 0.05$)。与 M 组相比, CCLD, CCHD 以及 PC 组血清 FSH, LH, E₂ 及 P 水平显著升高(均 $P < 0.05$)。其中 PC 组与 CCHD 组 FSH, LH, E₂ 及 P 水平较 CCLD 组升高更为明显(均 $P < 0.05$)。**结论:**菟丝子黄酮可显著改善排卵障碍大鼠 HPO 轴性激素水平, 且以高剂量更为有效。

[关键词] 菟丝子总黄酮; 排卵障碍; 性激素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0258-03

[doi] 10.11653/syfj2013130258

Effects of Total Flavones from *Cuscuta chinensis* on Gonadal Hormone in Animal Model of Ovulation Failure

LUO Ke-yan^{1*}, YANG Dan-li², XU Min¹

(1. Assisted Reproductive and Family Planning Department, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China;

2. Teaching and Research Division of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of total flavones from *Cuscuta chinensis* (TFCC) on gonadal hormone in animal model of ovulation failure. **Method:** Animal model of ovulation failure was induced by intragastric administration of hydroxy urea, intragastric administration of TFCC was applied after establishment of ovulation failure; clomifene citrate was applied as positive control. Serum levels of FSH, LH, E₂ and P were observed in control group (C), model group (M), TFCC low dose group (CCLD), TFCC high dose group (CCHD) and positive control group (PC) by radioimmunoassay method. **Result:** Compared with C, FSH, LH, E₂ and P decreased significantly in M ($P < 0.05$). Compared with M, serum levels of FSH, LH, E₂ and P increased significantly in CCLD, CCHD and PC groups ($P < 0.05$), more significantly in CCHD and PC groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** TFCC shows significant effect in improving recovery of gonadal hormone level in rat with ovulation failure, more significant when applied at high dose.

[Key words] total flavones from *Cuscuta chinensis*; ovulation failure; gonadal hormone

[收稿日期] 20130214(004)

[基金项目] 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY2011-70)

[通讯作者] * 罗克燕, 硕士, 副主任医师, 从事内分泌和不孕症的治疗研究, Tel: 18685261291, E-mail: 958180245@qq.com

不孕症是常见临床病症,约有 20% 的适龄夫妇可发生此症,且其发病率近年来有不断上升的趋势。其病因涉及多个学科,常见病因可以分为 5 类,包括男性不育、女性免疫因素、盆腔因素、排卵因素以及其他不明因素^[1]。其中排卵功能障碍文献报道约占 20%~40%。现普遍认为,器质性病因及功能性病因均可引起排卵障碍,其中功能性病因占绝大部分。功能性病因指在多种致病因素的作用下,下丘脑-垂体-卵巢轴(HPO轴)正常功能受损,所分泌的卵泡刺激素、雌激素以及促黄体生成素等生殖激素调节失控,最终导致卵泡发育不良、卵泡闭锁以及排卵后黄体功能不足等病理改变,导致闭经、功能失调性子宫出血以及不孕不育等临床表现的出现^[2]。以枸橼酸氯米芬为代表的西药治疗虽有一定临床疗效,但其高排卵、低受孕及高流产率等限制了其临床应用^[3]。中医中药注重整体调节,可从调节 HPO 轴功能入手对排卵障碍进行治疗。本研究采用菟丝子总黄酮对排卵障碍大鼠进行干预,观察其对 HPO 轴生殖激素的影响。

1 材料

1.1 动物 选用第三军医大学医学院动物中心提供的同批雌性未孕未产 SD 大鼠 50 只,体重 180~200 g,实验动物均于(22±2)℃室温、自然光照条件以及(65±4)%湿度条件下饲养,自由进食及饮水。试验动物许可证号 SCXK(渝)20020003。

1.2 药物及试剂 羟基脲片(山西安特制药有限公司,批号 120201),菟丝子总黄酮(纯度 99.8%,购自陕西昂威生物医药科技有限公司),枸橼酸氯米芬(Codalsynto Ltd. Cyprus,批号 D1103),卵泡刺激素(FSH)、雌激素(E₂)、促黄体生成素(LH)以及孕激素(P)放射免疫测定试剂盒(均为北京北方生物技术研究所)。

1.3 仪器 Leica 光学显微镜及照相系统(德国 Leica Microsystems Ltd),放射免疫分析仪(科大创新股份有限公司中佳分公司,GC-2010 γ 计数器)。

2 方法

2.1 动物分组 采用数字表格法将上述动物平均随机分为 5 组,每组各 10 只,分别为对照组(C)、模型组(M)、菟丝子黄酮低剂量组(CCLD)、菟丝子黄酮高剂量组(CCHD)以及枸橼酸氯米芬阳性对照组(PC),各组之间体重无显著差异。

2.2 动物模型制作 参照文献[4]的方法进行动物模型制作。将羟基脲片碾碎制成粉末,使用 0.9% 氯化钠注射液将粉末充分溶解,制成质量浓度

为 30 g·L⁻¹ 的悬浊液,采用 ig 法以 300 mg·kg⁻¹ 的剂量给大鼠 ig,连续 ig 10 d 制成排卵障碍模型。

2.3 各组动物干预方法 使用 0.9% 氯化钠注射液将菟丝子黄酮粉末充分溶解,分别制成质量浓度为 1 g·L⁻¹ 及 2 g·L⁻¹ 的悬浊液备用。将枸橼酸氯米芬粉末溶解于 0.9% 氯化钠注射液中,制成 1 g·L⁻¹ 悬浊液备用。对于 C 组,采用 0.9% 氯化钠注射液连续 ig 10 d,20 d 后采用 0.9% 氯化钠注射液连续 ig 5 d;对于 M 组、CCLD 组、CCHD 组和 PC 组,先采用 30 g·L⁻¹ 羟基脲悬浊液以 300 mg·kg⁻¹ 连续 ig 10 d,连续 10 d 进行阴道涂片,巴氏染色后进行观察,大鼠的动情周期一般为 4~5 d,具有动情前期、动情期、动情间期以及动情后期的周期性变化,若连续观察 10 d 而无上述变化,则可认为大鼠动情周期消失,造模成功。20 d 后 C 组、CCLD 组、CCHD 组和 PC 组分别采用 0.9% 氯化钠注射液 10 mL·kg⁻¹ 剂量、菟丝子黄酮悬浊液以低、高剂量(10, 20 mg·kg⁻¹) ig 容积为 10 mL·kg⁻¹,枸橼酸氯米芬悬浊液以 4.5 mg·kg⁻¹ 剂量连续 ig 5 d。

2.4 各组血清 FSH, LH, E₂ 及 P 水平变化 采用 10% 水合氯醛以 0.3 mL·kg⁻¹ 进行麻醉。大鼠固定后开腹,腹主动脉室温下静置 30 min,移液器吸取上清液,以 1 500 r·min⁻¹ 离心 20 min 后收集上层血清,采用放射免疫法对血清 FSH, LH, E₂ 及 P 进行测定,测定步骤均严格按照试剂盒说明书进行。

2.5 统计学分析 本研究所得数据均录入 SPSS 18.0 软件包中进行分析处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 *t* 检验;计数资料采用百分比表示,组间差异采用卡方检验,均以 *P* < 0.05 为具有统计学意义。

3 结果

本研究发现,与 C 组相比,M 组血清 FSH, LH, E₂ 及 P 水平显著降低(*P* 均 < 0.05)。与 M 组相比,CCLD, CCHD 以及 PC 组血清 FSH, LH, E₂ 及 P 水平显著升高(*P* 均 < 0.05),其中 PC 组与 CCHD 组 FSH, LH, E₂, P 水平较 CCLD 组升高更为明显(*P* 均 < 0.05)。详见表 1。

4 讨论

卵细胞的正常生长发育是受孕的重要基础之一,其过程受到中枢神经系统、内分泌激素以及卵巢的自分泌的共同调节。生理状态下,由下丘脑、脑垂体以及卵巢共同调节,三者通过各自分泌的生殖激素相互作用,形成一个能够自我调控的内分泌调节系统,即下丘脑-脑垂体-卵巢轴(HPO Axis),对于生

表 1 菟丝子总黄酮对排卵障碍大鼠血清 FSH, LH, E₂, P 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	FSH /U·L ⁻¹	LH /U·L ⁻¹	E ₂ /μg·L ⁻¹	P /μg·L ⁻¹
对照 (C)	-	8.18 ± 1.37	17.25 ± 5.36	48.59 ± 8.11	16.02 ± 4.83
模型 (M)	-	4.22 ± 0.94 ¹⁾	7.81 ± 1.39 ¹⁾	23.18 ± 7.62 ¹⁾	5.94 ± 1.02 ¹⁾
菟丝子黄酮	10	5.37 ± 0.79 ²⁾	8.75 ± 3.20 ²⁾	32.87 ± 5.56 ²⁾	11.15 ± 7.04 ²⁾
	20	6.35 ± 1.14 ^{2,3)}	12.24 ± 3.81 ^{2,3)}	41.84 ± 9.44 ^{2,3)}	16.98 ± 6.40 ^{2,3)}
氯米芬	4.5	6.49 ± 2.28 ^{2,3)}	14.19 ± 4.62 ^{2,3)}	43.70 ± 7.35 ^{2,3)}	17.03 ± 5.01 ^{2,3)}

注:与 C 相比¹⁾ P < 0.05; 与 M 相比²⁾ P < 0.05; 与菟丝子黄酮 10 mg·kg⁻¹ 组相比³⁾ P < 0.05。

殖活动的调节起重要作用。卵细胞的发生、发育、成熟以及排卵等过程受到 HPO 轴的调节,这一调节作用主要通过甾体类激素对 HPO 各组成部分的相互作用来实现^[4]。

垂体可分泌 FSH 与 LH, 作用于卵巢细胞及卵泡颗粒细胞表面的 FSH 受体及 LH 受体以促进卵泡的生长, 而下丘脑可通过促性腺激素释放激素 (GnRH) 对脑垂体 FSH 及 LH 的分泌活动进行调节。P 呈脉冲式分泌, 其水平可较为精确的反映黄体功能。研究表明, E₂ 与 P 的比例失调也可影响子宫内膜的受容性, 故 E₂ 也被用作反映 HPO 正常生理功能^[5]。

当在各种内、外因素的作用下, HPO 的任一环节功能失调或发生器质性病变, 即可造成排卵障碍。根据 HPO 轴病变的部位, 排卵障碍分为下丘脑性无排卵、垂体性无排卵、卵巢性无排卵以及内分泌腺性无排卵。西医对无排卵最经典的药物为枸橼酸氯米芬, 可通过抑制内源性雌激素而对下丘脑产生负反馈, 促进 GnRH 释放, 从而促进 FSH、LH 的释放, 促进卵泡成熟; 也可通过其弱雌激素活性促进垂体及卵巢甾体激素的合成酶系统活性, 从而使 E₂ 及 P 的分泌增多而促进排卵。虽然枸橼酸氯米芬促排卵率较高, 约为 80%, 但妊娠率仅为 40% 左右, 可能与枸橼酸氯米芬导致 LH 作用过强、子宫内膜黏液量减少以及出现的卵巢过度刺激综合征等有关^[6]。中医中药注重从整体进行调节, 许多中药验方已经被证实具有较强的补肾安胎功效, 不良反应小, 受孕率高, 因此, 寻找一种对 HPO 轴调节作用强的中药有效成分具有重要的临床价值。

补肾安胎的代表验方为寿胎丸, 菟丝子为该方的君药之一, 而菟丝子总黄酮是菟丝子的主要有效化学成分。研究显示, 黄酮类为菟丝子的主要有效成分, 可促进下丘脑-垂体-性腺轴功能, 提高垂体对促性腺激素释放激素的反应性, 并促进卵泡发育, 提高应激大鼠的雌二醇和黄体酮水平, 同时也可以提

高垂体促黄体生成素和下丘脑 β-内啡呔水平^[7]。菟丝子黄酮能够修复流产大鼠血管损伤, 对流产大鼠 P, PRL, E₂ 等激素的平衡具有重要作用^[8]。本研究通过采用羟基脲灌胃法建立大鼠排卵障碍模型, 发现排卵障碍动物体内 FSH, LH, E₂ 及 P 水平显著降低, 采用菟丝子总黄酮进行治疗后, 体内 FSH, LH, E₂ 及 P 水平显著回升, 且以高剂量更为明显, 与枸橼酸氯米芬对体内 FSH, LH, E₂ 及 P 刺激效果相仿。通过以上结果不难看出, 菟丝子黄酮对排卵障碍动物 HPO 轴性激素恢复作用明显, 对 HPO 轴的正常功能恢复具有重要的调控作用, 与西医枸橼酸氯米芬促排卵作用相仿, 但受孕率及流产率等还有待进一步观察。

[参考文献]

[1] 徐文莉, 李康. 不孕不育症的实验室研究进展 [J]. 检验医学与临床, 2012, 16(9): 2042.

[2] Deligeoroglou E, Creatas G. Menstrual disorders [J]. Endocr Dev, 2012, 22: 160.

[3] Ragni G, Levi-Setti P E, Fadini R, et al. Clomiphene citrate versus high doses of gonadotropins for in vitro fertilisation in women with compromised ovarian reserve: a randomised controlled non-inferiority trial [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2012, 18(10): 114.

[4] 李淑云, 罗颂平. 补肾法对肾虚排卵抑制模型大鼠内分泌激素、脏器湿重及抑制素影响的研究 [J]. 新中医, 2010, 42(2): 90.

[5] Gassen D T, Herter L D, Chagas J K, et al. Evaluation of hormonal suppression with two contraceptive regimens using ethinyl estradiol and desogestrel [J]. Arch Gynecol Obstet, 2013, 287(2): 289.

[6] Vujović S, Ivović M, Tancić-Gajić M, et al. Premature ovarian failure [J]. Srp Arh Celok Lek, 2012, 140(11/12): 806.

[7] 柯江维, 王建, 红赵宏. 菟丝子黄酮对心理应激雌性大鼠海马-下丘脑-垂体-卵巢轴性激素水平的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 90.

[8] 刘华, 韦炳华, 马红霞, 等. 菟丝子黄酮对流产大鼠模型母胎免疫平衡因子的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(10): 837.

[责任编辑 聂淑琴]