

# 四物合剂对化疗后大鼠卵巢形态及颗粒细胞凋亡的影响

孙海芸<sup>1,2</sup>, 陈云芝<sup>3</sup>, 薛晓鸥<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学东直门医院妇科, 北京 100700;

2. 国家中医药管理局三级实验室北京中医药大学东直门医院中药药理学实验室, 北京 100700;

3. 北京市西城区丰盛中医骨伤专科医院妇科, 北京 100033)

**[摘要]** **目的:**探讨四物合剂对化疗所致卵巢储备功能下降的大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响。**方法:**以 40 只雌性 SD 大鼠为研究对象, 随机分为正常对照组(正常组)、顺铂模型组(模型组)、四物合剂组(四物组)和倍美力组, 每组各 10 只。模型组、四物组和倍美力组连续 7 d 腹腔注射顺铂  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 正常组连续 7 d 腹腔注射等量的生理盐水, 随后正常组和模型组连续 7 d 纯净水灌胃  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 四物组连续 7 d 四物合剂灌胃  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、倍美力组连续 7 d 倍美力溶液灌胃  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。自实验第 1 天起, 每日制作大鼠阴道分泌物涂片以观察大鼠动情周期; 实验第 14 天大鼠称重、麻醉, 取血清运用放免法测血中卵泡刺激素(FSH)、黄体生成激素(LH)、雌二醇( $E_2$ )和孕酮(Pro); 取双侧卵巢, 同侧切片后常规 HE 染色, 图像分析仪下进行颗粒细胞层最大厚度的显微测量, 并运用原位细胞死亡检测法检测颗粒细胞凋亡情况。**结果:**与正常组比较, 模型组大鼠 FSH 和凋亡指数均升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 同时  $E_2$  值下降。与模型组比较, 四物组大鼠 FSH 和凋亡指数降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 同时  $E_2$  值升高。**结论:**四物合剂对化疗后大鼠卵巢颗粒细胞的凋亡有一定的抑制作用, 能促进卵巢功能恢复, 但还不能起到完全修复的作用。

**[关键词]** 卵巢颗粒细胞; 四物汤; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0256-04

**[收稿日期]** 2012-02-06(148)

**[基金项目]** 首都医学科技发展基金项目(F-2007-III-11)

**[第一作者]** 孙海芸, 学士, 助理研究员, 从事中药药理学工作, Tel:010-84013195, E-mail:sunhaiyun1979@163.com

**[通讯作者]** \*薛晓鸥, 博士, 主任医师, 从事中西医结合妇科工作, Tel:010-84013150, E-mail:xxo123@sina.com

暂时缓解症状, 但存在较严重的毒副反应, 且停用后常可复发。中医根据痛风的发病为本虚标实, 以邪实为主的特点, 制定了急则治其标, 缓则治其本的原则。在急性发作时多属风寒湿热邪气杂至, 痹阻经络, 瘀血凝滞, 气血不畅, 脉络不通, 不通则痛; 气血郁于骨关节局部, 则灼热红肿, 功能障碍, 痛不可触; 久病遂使瘀血凝滞, 络道阻塞, 以致关节畸形等。因此依据病机在治疗上常采用清热利湿、祛风通络、活血化瘀、消肿止痛等法<sup>[8]</sup>。但中药口服治疗大多在 2~3 d 起效, 不能立即缓解病人的痛苦。因此我们研制了清热祛痛搽剂, 通过局部给药, 尽快缓解病人的痛苦。实验结果表明该药能够较快减轻尿酸钠引起的踝关节急性炎症, 降低肿胀率, 缓解局部疼痛, 对痛风性关节炎急性发作期有较好的治疗作用。

## [参考文献]

[1] 马颖, 颜海燕, 刘梅, 等. 鸡矢藤提取物对尿酸钠晶体诱导大鼠急性痛风性关节炎影响的研究[J]. 中国药房, 2008, 19(6):411.

- [2] 王占奎, 张庆祥. 中医药治疗实验性高尿酸血症研究进展[J]. 山东中医杂志, 2010, 29(6):428.
- [3] 陈光亮, 吕红霞, 王媛媛, 等. 草薢牛膝总皂苷对尿酸钠诱导的大鼠急性痛风性关节炎的防治作用[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(1):34.
- [4] 王新亚, 杨莉. 痛风舒合剂抗大鼠急性痛风性关节炎的实验研究[J]. 中药材, 2010, 33(3):435.
- [5] Coderre T J, Wall P D. Ankle joint urate arthritis in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant[J]. Pain, 1987, 28(3):379.
- [6] 廖丽锦, 黄霞, 庞伟明, 等. 消肿定痛膏外敷治疗痛风性关节炎的临床观察[J]. 中国医药导报, 2010, 7(7):70.
- [7] 陈光亮, 韩茹, 谷仿丽. 等. 加味四妙汤对微晶型尿酸钠致兔急性痛风性关节炎的防治作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2):42.
- [8] 王晓霞. 自拟山慈菇汤治疗急性痛风性关节炎 30 例[J]. 浙江中医杂志, 2010, 45(6):430.

[责任编辑 古云侠]

# The Effects of Siwu Mixture on Ovarian Granulosa Cell Apoptosis of Chemotherapy-Induced Rats

SUN Hai-yun<sup>1,2</sup>, CHEN Yun-zhi<sup>3</sup>, XUE Xiao-ou<sup>1\*</sup>

(1. Department of Gynecology of Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2. Key Laboratory of Pharmacology of Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 3. Department of Gynecology in Beijing Fengsheng Special Hospital of Traditional Medical Traumatology and Orthopaedics, Beijing 100033, China)

**[ Abstract ] Objective:** To explore the effects of Siwu mixture on chemotherapy-induced decline in ovarian reserve function of rat and rat's ovarian granulosa cell apoptosis. **Method:** Forty female SD rats randomly divided into normal control group, Cisplatin model group, Siwu treatment groups and Premarin treatment group. Each set was 10 female SD rats. Model group, Siwu group and Premarin group were consecutive intraperitoneal injected of cisplatin ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) for 7 days. The normal group was consecutive intraperitoneal injected of the same amount of normal saline for 7 days. Then the normal group and model group were continuous intragastric infusion with pure watergroups ( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) for 7 days, Siwu group was continuous intragastric infusion with Siwu mixture ( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) for 7 days, and Premarin group was continuous intragastric infusion with premarin ( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) for 7 days. Since the first day up, we made vaginal secretion real smear to observe rat's estrous cycle daily. At the experimental 14 day, we weighed and gave anesthesia to rats, to take serum of rats and using radio-immunity method measuring blood follicle-stimulating hormone (FSH), luteotrophic hormone (LH), estradiol ( $E_2$ ) and progestins (Pro). We took double side ovarian of rats, with the same side slice for HE dyeing, and imaged micro measurement the particles cell layer maximum thickness at Image Analyzer, then using TUNEL method to detected particles cell apoptosis. **Result:** Compared with the normal group, the FSH and apoptosis index were elevated in model group rats, the difference statistically significant ( $P < 0.05$ ), while  $E_2$  is decreased. Compared with the model group, FSH and apoptosis index in Siwu group rats were lower, the difference statistically significant ( $P < 0.05$ ), while the  $E_2$  values were rise. **Conclusion:** Siwu mixture has a certain degree of inhibition effects on ovarian granulosa cell apoptosis in rat after chemotherapy, but cannot afford to completely fix it.

**[ Key words ]** ovary granulosa cell; Siwu mixture; apoptosis

近年来关于化疗而导致卵巢功能低下和不孕的报道日渐增多,化疗成为卵巢早衰(premature overy failure, POF)的一个重要原因<sup>[1]</sup>,西医对此多采用激素替代治疗,但副作用明显。四物汤出自唐人集著的《仙授理伤续断秘方》,在宋代的《太平惠民和剂局方》被列入“妇科诸疾”中<sup>[2]</sup>。本研究选用四物汤中成药即四物合剂,为2005年版《中国药典》收载品种<sup>[3]</sup>,观察其对化疗后大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响,为临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 雌性SD大鼠,清洁级,体重( $190 \pm$

10)g,由北京维通利华实验技术有限公司提供,动物许可证SCXK(京)2007-0001。大鼠饲养和实验均在清洁级动物实验室内进行,动物共同饲养在 $23 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 室内,光照12h,食水随意。大鼠饲料为消毒饲料,大鼠垫料为消毒垫料,饮水为清洁水。

**1.2 药品** 四物合剂(熟地黄25g,当归25g,川芎25g,白芍25g),吉安泰(四川)药业有限公司,批号0703014。注射用顺铂(CDDP),齐鲁制药有限公司,批号711052CF,以生理盐水配成 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**1.3 仪器与试剂** DHP-360型电热恒温培养箱(北京光明医疗仪器厂)。ELEMENTS BR-3.1图像

分析系统(日本尼康)。

血清孕酮(Pro)、雌激素(E<sub>2</sub>)、黄体生成激素(LH)、卵泡刺激素(FSH)采用化学发光法,仪器贝克曼 DxI800,批号分别为 6285421,533892,894672,100536;原位细胞死亡检测试剂盒 TUNEL,北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 10854100。

### 1.4 方法

**1.4.1 造模** 雌性 SD 大鼠 40 只,随机分为四物组、倍美力组、顺铂组和正常组,每组 10 只。四物组、倍美力组、顺铂组,连续 7 d 顺铂 2 mg·kg<sup>-1</sup> ip 造模。正常组 ip 等量生理盐水,7 d 后,正常组 ig 等量纯净水 7 d。四物组 ig 四物合剂 1 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,倍美力组 ig 倍美力溶液(0.4 mg·kg<sup>-1</sup>),均连续 7 d;顺铂组 ig 等量纯净水 7 d。

### 1.4.2 标本采集

**1.4.2.1 大鼠阴道涂片激素测定** 自实验第 1 天起,每日取大鼠阴道分泌物,制作阴道涂片;观察大鼠动情周期变化。

**1.4.2.2 激素测定** 末次药后次日晨,ip 10% 水合氯醛(0.04 mL·kg<sup>-1</sup>),腹主动脉采血,离心后取血清运用放免法测定 FSH,LH,E<sub>2</sub> 和 Pro。

**1.4.2.3 颗粒细胞层厚度** 末次药后次日晨,大鼠麻醉后,取双侧卵巢,放入 10% 中性甲醛固定,脱水,包埋,切片,HE 染色,图像分析仪下显微测量颗粒细胞层最大厚度。

**1.4.2.4 卵巢颗粒细胞凋亡的观察** TUNEL 法检测颗粒细胞凋亡,卵巢切片常规脱蜡至水,具体操作按说明书。苏木精复染,流水冲洗返蓝,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

**颗粒细胞凋亡指数:**图像分析仪观察(阳性反应细胞核呈棕黄色,颗粒清晰,定位准确;阴性反应细胞呈紫蓝色),拍照,镜下随机计数 10 个视野细胞,计算阳性细胞数占总细胞数目的比例,求其均值即为卵巢细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)。

**1.5 统计学方法** 应用 SPSS 17.0 统计软件,数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行单因素方差分析,t 检验进行统计学分析, P < 0.05 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大体观察** 正常组大鼠体重增加正常,饮食活动如常,有正常动情周期。四物组、倍美力组及顺铂组在腹腔注射顺铂期间,均出现精神萎靡,蜷卧懒动,团缩拱背,毛色枯槁萎黄不泽,唇鼻苍白无华,耳、尾苍白而凉,饮食减少,明显消瘦等症状,阴道涂片显示逐渐停滞在动情间期。在灌胃后期,四物组

大鼠较倍美力组及顺铂组活跃,饮食增加,毛色逐渐具有光泽;四物组及顺铂组阴道涂片显示无动情周期恢复,至采血日,阴道涂片仍表现为动情间期;倍美力组自灌胃倍美力后,阴道涂片持续表现为动情前期至动情期;正常组大鼠整个实验期间外观正常,阴道涂片呈正常周期变化,至实验结束日,阴道涂片表现为动情间期。

**2.2 血清激素含量比较** 4 组大鼠血中 FSH 值差异有统计学意义,模型组 FSH 值升高明显且与正常组之间差异有统计学意义,卵泡对 FSH 敏感性降低是卵巢功能衰退的早期征象,此结果说明造模成功;各组 LH 值无统计学意义;Pro 值模型组与正常组之间有统计学意义;E<sub>2</sub> 值倍美力组与模型组之间有统计学意义(表 1~2)。

表 1 四物合剂对化疗后大鼠血清 FSH, LH 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	FSH /U·L <sup>-1</sup>	LH /U·L <sup>-1</sup>
正常	-	7.06 ± 1.88 <sup>2)</sup>	9.80 ± 3.00
模型	-	9.19 ± 0.55 <sup>1)</sup>	7.69 ± 2.55
四物合剂	1 000	5.17 ± 0.85 <sup>2)</sup>	5.80 ± 1.39
倍美力	0.4	6.10 ± 1.83 <sup>2)</sup>	8.18 ± 5.50

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P < 0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.05。(表 2-3 同)。

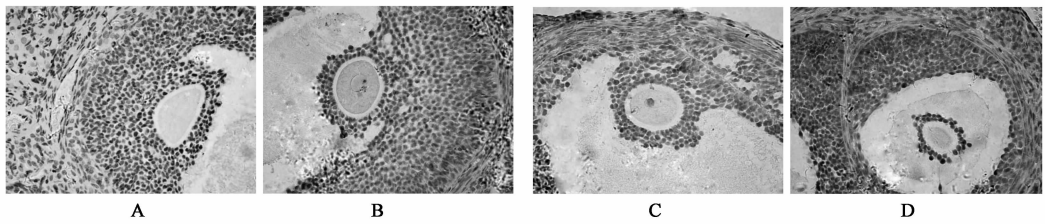
表 2 四物合剂对化疗后大鼠血清 Pro, E<sub>2</sub> 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	Pro /ng·mL <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /pg·mL <sup>-1</sup>
正常	-	3.16 ± 1.64 <sup>2)</sup>	1062.9 ± 849.9
模型	-	0.96 ± 0.55 <sup>1)</sup>	1030.4 ± 448.8
四物合剂	1 000	2.29 ± 1.22	1577.2 ± 522.8
倍美力	0.4	1.69 ± 0.67	2598.3 ± 919.3 <sup>2)</sup>

**2.3 卵巢颗粒细胞层厚度及凋亡情况** 颗粒细胞层厚度值中模型组与正常组间差异有统计学意义,倍美力组与模型组间差异有统计学意义。凋亡指数值中模型组与正常组间差异有统计学意义,四物合剂组和倍美力组与模型组间差异均有统计学意义,见表 3,图 1。

## 3 讨论

四物汤药理作用的研究主要集中在补血和改善免疫功能方面,在妇科调经方面的研究尚少。本研究旨在探讨四物汤对化疗所致卵巢储备功能下降的大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响,深入阐明古方四物



A. 正常组; B. 模型组; C. 四物组; D. 倍美力组

图1 卵巢颗粒细胞(TUNEL染色×400)

汤的药理作用机制。

表3 四物合剂对化疗后大鼠卵巢颗粒细胞层厚度及凋亡指数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	粒细胞层厚度 /μm	凋亡指数 /%
正常	-	16.16 ± 5.35 <sup>2)</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>2)</sup>
模型	-	10.87 ± 1.45 <sup>1)</sup>	0.37 ± 0.09 <sup>1)</sup>
四物合剂	1 000	14.28 ± 4.17	0.23 ± 0.1 <sup>2)</sup>
倍美力	0.4	15.61 ± 3.64 <sup>2)</sup>	0.21 ± 0.06 <sup>2)</sup>

顺铂是有效的抗癌药物,常用来治疗卵巢癌、宫颈癌、睾丸癌、膀胱癌、肺癌等,在取得临床疗效的同时,也带来一些副作用。研究显示顺铂除可以与DNA双链形成链间或链内交叉,诱导卵巢细胞凋亡<sup>[4]</sup>,还可以引起组织坏死等非典型的细胞凋亡<sup>[4]</sup>,使女性患者的卵巢功能过早衰退。近年来的研究也表明,细胞凋亡是化疗药物引起卵巢结构及功能损伤的重要机制。受化疗药物影响,卵泡内某些信号被激活而促使细胞发生凋亡,其中大中卵泡尤其是生长卵泡中颗粒细胞的异常凋亡,可导致卵泡提前闭锁。因此抑制颗粒细胞的异常凋亡就有可能保护卵巢功能,所以我们选择CDDP腹腔注射造成大鼠卵巢早衰<sup>[5]</sup>,本实验中模型组与其他组相比FSH升高,细胞凋亡指数明显增加,具有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示顺铂使卵泡闭锁,颗粒细胞不能分泌孕激素,性激素紊乱,进一步干扰下丘脑-垂体-卵巢性腺轴,导致血FSH升高, E<sub>2</sub>下降,这与临床卵巢早衰患者激素水平变化相符,FSH可增加原始卵泡到成熟卵泡的募集作用,使更多的成熟卵泡暴露于化疗药中,增加卵泡凋亡的机率,这种恶性循环使卵巢逐渐丧失功能。

在对化疗后的大鼠灌胃四物合剂进行治疗后,运用TUNEL检测各组卵巢组织中的颗粒细胞凋亡水平,结果显示:与模型组比较四物组凋亡指数降低,组间比较 $P < 0.05$ ,与正常组之间相比,凋亡指数明显提高;此结果表明四物合剂对颗粒细胞凋亡

有一定的治疗作用,但还不能起到完全修复的作用。有报道指出雌激素有抑制卵泡颗粒细胞凋亡的作用<sup>[6]</sup>,从实验结果中可看出倍美力组的凋亡指数也明显降低,但在E<sub>2</sub>值中可看出四物组中雌激素水平没有倍美力组高,但病理切片显示四物组和倍美力组中均可见始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡等不同卵泡发育阶段,提示四物合剂对颗粒细胞的保护作用应该还有其他途径。也有报道指出GnRH类似物或激动剂也可能通过抑制颗粒细胞凋亡而对卵巢起到保护作用<sup>[7-8]</sup>。究竟四物合剂是通过哪些点影响卵巢功能的还需进一步的研究。

综上所述,四物合剂可以降低顺铂对大鼠卵巢功能的损害,对化疗后大鼠卵巢的储备功能的恢复起一定作用,但四物合剂对化疗大鼠卵巢保护作用的详细机制仍有待深入研究。

[参考文献]

[1] Goswami D, Conway G S. Premature ovarian failure[J]. Hum Reprod Update, 2005, 11(4): 391.  
 [2] 焦秀珍,孙静. 四物汤的出典考略及其验案举隅[J]. 世界中西医结合杂志,2010. 5(5):379.  
 [3] 中国药典. 一部[S]. 2005:433.  
 [4] 柳友清,邢辉,韩晓兵,等. 顺铂诱导宫颈癌Hela细胞凋亡及其作用机制的研究[J]. 中国肿瘤临床,2006, 33(1):1.  
 [5] 艾浩,牛建昭,薛晓鸥,等. 化疗损伤性卵巢功能早衰小鼠动物模型的研究[J]. 中国实验动物学报,2007, 15(1):35.  
 [6] 吴际,张立柱,李潭,等. 性激素对人卵巢颗粒细胞凋亡的作用[J]. 中华妇产科杂志,1998,33:157.  
 [7] 彭萍,莫亚勤,杨传红,等. GnRH类似物对化疗大鼠卵泡凋亡的影响[J]. 南方医科大学学报,2010, 30(1):106.  
 [8] 李欢,辛晓燕,黄艳红,等. 促性腺激素释放激素激动剂对环磷酰胺引起大鼠卵巢损伤的预防作用[J]. 实用医学杂志,2008,24(18):3117.

[责任编辑 古云侠]