补肾调周法对卵巢早衰模型大鼠血清 INHB, VEGF 的影响

张大伟[1],李翠萍[2*],黄霞[3],张丹丹[4],范迎丽[4],张越[4],贺文婧[4]
(1. 河南中医学院基础医学院,郑州 450008;2. 河南中医学院第三附属医院,郑州 450008;
3. 河南省中医药研究院,郑州 450004;4. 河南中医学院 2008 级研究生,郑州 450008)

[摘要] **目的**:探讨补肾调周法对卵巢早衰模型大鼠血清抑制素 B(INHB)、血管内皮生长因子(VEGF)水平的影响。**方法**:90 只大鼠随机分为 9 组,即空白对照组,模型对照组,补肾Ⅰ号方高、低剂量(68.67,34.30 $g \cdot kg^{-1}$)组,补肾Ⅱ号方高、低剂量(61.40,30.70 $g \cdot kg^{-1}$)组,补肾调周高、低剂量组,分别序贯给药Ⅰ号,Ⅱ号高、低剂量(每 2 天轮换一次),阳性对照组,每组各 10 只。除空白对照组外其余各组均采用环磷酰胺(CTX)造模。给药 20 d 后,ELLSA 法测定各组大鼠血清 INHB,VEGF 水平,光镜下观察卵巢的病理组织形态。**结果**:补肾调周法能显著提高血清 INHB,VEGF 水平,从而提高卵巢的贮备能力,并能增加各级卵泡与黄体组织数量。**结论**:补肾调周法可提高卵巢早衰模型大鼠的卵巢储备能力,这可能是对卵巢早衰早期干预的机制之一。

[关键词] 卵巢早衰;补肾调周;血清抑制素 B;血管内皮生长因子
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)12-0213-04

Effects of Invigorating Kidney and Regulating Periphery on Rats with Pnemature Ovarian Failure and Its Influence on Inhibin B and Vascular Endothelial Growth Factor

ZHANG Da-wei[1], *LI Cui-ping*[2*], *HUANG Xia*[3], *ZHANG Dan-dan*[4], *FAN Ying-li*[4], *ZHANG Yue*[4], *HE Wen-jing*[4]
(1. *Basic Medical College, Henan University of Tradifional Chinese Medicine, Zhengzhou* 450008, *China*;
2. *The Third Hospital of Henan University of Tradifional Chinese Medicine, Zhengzhou* 450008, *China*;

[收稿日期] 2011-03-04
[基金项目] 河南省科技厅资助项目(092102310322)
[第一作者] 张大伟,副教授,从事方剂学及中医妇科教学、临床、科研,Tel:13938427612,E-mail:zhangdw@hactcm.edu.cn
[通讯作者] * 李翠萍,教授,博士生导师,从事中医妇科教学、临床、科研,Tel:13783683195,E-mail:licpingster@gmail.com

[5] Kostapanos M S, Liberopoulos E N, Elisaf M S. Statin pleiotropy against renal injury[J]. J Cardiometab Syndr, 2009,4(1):E4.
[6] Hsu H H, Ko W J, Hsu J Y, et al. Simvastatin ameliorates established pulmonary hypertension through a heme oxygenase-1 dependent pathway in rats[J]. Respir Res,2009,10:32.
[7] Lai I R, Chang K J, Tsai H W, et al. Pharmacological preconditioning with simvastatin protects liver from ischemia-reperfusion injury by heme oxygenase-1 induction[J]. Transplantation,2008,85(5):732.
[8] 夏大胜. 血红素氧合酶系统抗心肌缺血再灌注损伤的研究[J]. 中国心血管杂志,2005,10(4):315.
[9] Baan C, Peeters A, Lemos F, et al. Fundamental role for HO-1 in the self-protection of renal allografts[J]. Am J Transplant,2004,4:811.
[10] Hsieh C H, Jeng J C, Hsieh M W, et al. Involvement of the p38 pathway in the differential induction of heme oxygenase-1 by statins in Neuro-2A cells exposed to lipopolysaccharide[J]. Drug Chem Toxicol, 2011, 34(1):8.

[责任编辑 何伟]

3. *Henan Institute of Tradifional Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450004, *China*;
4. 2008 *Postgradutes*, *Henan University of Tradifional Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450008, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To study effects of the self-made series of prescriptions of invigorating kidney and regulating periphery. On inhibin B(INHB) and vascular endothelial growth factor(VEGF) in rats with premature ovarian failure(POF). **Method**: Ninety rats were randomly divided into 9 groups(n = 10): the blank control group, model control group, positive control group, the group of high dose Ⅰ prescription of invigorating kidney(68.67 $g \cdot kg^{-1}$), the group of low dose Ⅰ prescription of invigorating kidney(34.30 $g \cdot kg^{-1}$), the group of high dose Ⅱ prescription of invigorating kidney(61.40 $g \cdot kg^{-1}$), the group of low dose Ⅱ prescription of invigorating kidney (30.70 $g \cdot kg^{-1}$), the group of high dose prescription of invigorating kidney and regulating menstruatinon, the group of low dose prescription of invigorating kidney and regulating menstruatinon. In addition to the blank control group, the other groups were induced as POF models by CTX. After 20 days' treatments, the serum levels of INHB and VEGF were detected, and structure of ovary was observed under the lightmicroscope. **Result**: The method of invigorating kidney and regulating menstruation could obviously increase the serum levels of INHB and EGF, and increase all kinds of follicles and the quantity of the yellow body organization of the ovary. **Conclusion**: The method of invigorating kidney could improve the ability of ovarian reserve in POF rats. This might be one of the mechanisms of early intervention for premature ovarian failure.

[**Key words**] Premature overian failure; invigorating kidney and regulating menstruation; inhibin B; vascular endothelial growth factor

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是妇科内分泌领域的常见病，占妇女总人群的 1% ~ 3%[1]。它是指月经初潮年龄正常或青春期延迟、第二性征发育正常的女性，在 40 岁之前出现持续性闭经和性器官萎缩，并伴有卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)升高，而雌激素(E_2)降低的综合征。卵巢早衰的主要病理机制之一是卵巢储备能力的降低，而血清抑制素 B(INHB)可以反馈抑制垂体合成分泌 FSH，并抑制促性腺激释放激素对自身受体的升调节作用；血管内皮生长因子(VEGF)可促进卵巢血管生成，对卵泡的生长起重要作用，二者均可作为反映卵巢储备功能高低的直接指标。本实验通过观察补肾调周法对卵巢早衰模型大鼠血清 INHB, VEGF 水平的影响，为补肾调周法干预早期卵巢早衰提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 健康雌性 SD 大鼠 90 只，体重(180 ± 20)g，由河南省动物实验中心提供，动物合格证号 SCKx-(豫)2010-0630。

1.2 药物与试剂 补肾Ⅰ号方：熟地黄 15 g，黄精 30 g，女贞子 30 g，白芍 15 g，当归 15 g，仙茅 10 g，仙灵脾 30 g，紫石英 30 g，川芎 10 g，合欢皮 15 g，炙甘草 6 g。加水煎煮，浓缩为含生药 2.7 $g \cdot mL^{-1}$；补肾Ⅱ号方：菟丝子 30 g，仙灵脾 30 g，桑寄生 15 g，续断 30 g，巴戟天 10 g，何首乌 15 g，黄精 15 g，山药 15 g，合欢皮 15 g，木香 6 g，炙甘草 3 g。加水煎煮，浓缩为含生药 2.2 $g \cdot mL^{-1}$，药物均购自河南中医学院第三附属医院中药房，由河南中医学院药理实验室制备，批号 20100613；注射用环磷酰胺(CTX)粉针剂：江苏恒瑞医药股份有限公司，批号 20100328；己烯雌酚(E_2)片，合肥久联制药公司，批号 20100116；INHB, VEGF 酶联免疫分析测定盒，均购自上海劲马生物科技有限公司，批号均为 201008。

2 方法

2.1 造模及分组 健康雌性 SD 大鼠 90 只，体重(180 ± 20)g，随机分为 9 组：每组 10 只。参照文献[2]造模方法，除空白对照组外，其余动物均用 CTX 给予首次剂量 50 $mg \cdot kg^{-1}$后，以 8 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$连续 ip 14 d。空白组 ip 同容积生理盐水 14 d。造模完成后称重，并连续阴道上皮细胞涂片两个性周期，动情周期紊乱提示卵巢早衰大鼠模型制作成功。

2.2 给药方法 模拟大鼠动情周期，补肾Ⅰ号方高、低剂量组分别给予补肾Ⅰ号 68.67, 34.30 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$；补肾Ⅱ号方高、低剂量组分别给予补肾Ⅱ

号 61.40,30.70g·kg^{-1}·d^{-1};补肾调周高、低剂量组分别序贯于第 1 ~ 2 天予补肾 Ⅰ 号 68.67,34.30 g·kg^{-1}·d^{-1},第 3 ~ 4 天予补肾 Ⅱ 号 61.40,30.70 g·kg^{-1}·d^{-1};阳性对照组予 E_2 0.17 mg·kg^{-1}·d^{-1};均 ig。空白对照组及模型对照组 ig 等容蒸馏水,连续给药 5 个动情周期,即 20 d。

2.3 检测指标 末次给药后,各组大鼠禁食 24 h,不禁水,取血 5 mL,将所取血静置 3 0min,2 000 r·min^{-1},离心 10 min,取血清,ELLSA 法测定血清 INHB,VEGF 的含量,具体操作严格按药盒说明进行。同时剖取双侧卵巢,除去表面脂肪组织,称重,用 10% 的中性甲醛固定,常规石蜡切片,HE 染色,行组织病理学检查。

2.4 统计学方法 数据采用 SPSS 13.0 统计分析软件处理,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析进行多重组间差异性比较,$P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血清 INHB,VEGF 测定 与空白对照组比,模型对照组血清 INHB,VEGF 明显降低($P < 0.05$),说明造模成功;与模型组相比,补肾 Ⅰ 号方组,补肾 Ⅱ 号方组、补肾调周组、E2 组均有升高 INHB,VEGF 的作用($P < 0.05$),补肾调周组升高 INHB,VEGF 的作用更显著($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 INHB,VEGF 水平的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$) μg·mL^{-1}

组别	剂量/g·kg^{-1}·d^{-1}	INHB	VEGF
空白	-	16.56 ± 2.48[1)]	55.97 ± 12.09[1)]
模型	-	12.58 ± 3.20	38.99 ± 10.51
补肾 Ⅰ	68.67	16.66 ± 3.55[1)]	64.01 ± 9.38[1)]
	34.30	16.98 ± 1.92[1)]	59.05 ± 12.37[1)]
补肾 Ⅱ	61.40	18.81 ± 2.49[1)]	43.41 ± 9.57
	30.70	16.55 ± 2.51[1)]	57.71 ± 9.07[1)]
补肾 Ⅰ 与补肾 Ⅱ	68.67 与 61.40	15.91 ± 2.73[1)]	67.21 ± 9.80[2)]
	34.30 与 30.70	20.99 ± 3.34[2)]	63.56 ± 9.34[1)]
E2	0.17×10^{-3}	17.73 ± 3.70[1)]	57.26 ± 13.67[2)]

注:与模型对照组比较[1)] $P < 0.05$,[2)] $P < 0.01$。

3.2 卵巢病理组织学观察 空白对照组光镜下可见各级卵泡发育良好,数量较多,卵泡内各层结构清晰,颗粒细胞层形态完整,排列整齐;黄体细胞排列呈脑回状,细胞大而圆。模型组大鼠卵巢皮质内各级发育卵泡少见,多数呈囊性扩张,扩张的卵泡壁颗粒层细胞层明显减少,或仅剩 1 ~ 2 层,或消失,排列疏松,腔内无卵丘及卵细胞,间质细胞增生,黄体组织罕见。补肾调周组多数卵巢可见发育期各级卵泡,颗粒细胞层形态完整,排列整齐,较模型对照组明显增厚,可见卵丘及卵细胞,黄体组织数量显著增多,高剂量组最为明显。阳性对照组大体检查可见卵巢色泽鲜红,光镜下颗粒细胞层数增加,卵泡膜细胞层明显变薄,黄体组织数量较模型组明显增多,但低于补肾调周剂量组。

4 讨论

卵巢早衰是一个长期发展的病理过程,是卵巢储备功能减退渐至衰竭的最终结局。祖国医学将其归于血枯、闭经、不孕症、经断前后诸症等范畴。中医学认为卵巢功能失调以肾虚为主,肾藏精,主生殖,为先天之本,是天癸和生殖之源,为冲任之本,主系胞宫,是脏腑生理活动的本源,在女性生理活动中起着最重要的作用。而肾的阴阳失调是肾虚的核心问题,即所谓:阴平阳秘,精神乃治。只有肾的阴阳平衡协调,精气功能正常,卵巢的功能才能正常,因此,补肾乃治疗本病的关键。

补肾调周法正是针对卵巢早衰以肾虚为本的病因病机,从肾论治,滋肾补肾,并结合女性月经周期的生理变化,排卵前,以滋阴益肾、调补冲任为主,兼以活血通络,以便在重阴转阳的阶段,促进卵泡发育成熟;排卵后,以温肾壮阳为主,促进黄体发育,通过整体调理,使经血藏泻正常,从而达到调整脏腑气血阴阳动态平衡。根据此理论基础,拟定的补肾 Ⅰ 号方以熟地黄、黄精滋肾益精,填补真阴为君;当归、女贞子滋阴养肝,补血和血,白芍养血柔肝,仙茅、仙灵脾、紫石英偏于补阳,取“阳中求阴”之义,共为臣药;合欢皮、川芎活血行气,祛风止痛为佐药;使以甘

草调和诸药。诸药合用,妙在滋阴补肾,填精益髓。补肾Ⅱ号方以菟丝子、淫羊藿温阳补肾,调理任督为君;桑寄生、续断、巴戟天长于温补肝肾、壮阳益精,何首乌长于补肝肾、益精血,黄精功于滋阴益肾,填精补髓,取"阴中求阳"之义,共为臣药;山药平补三焦,合欢皮舒肝理气,镇静安神,木香乃三焦气分之药,升降诸气而为佐;甘草调和诸药而为使。诸药相伍,温补肾阳为主,兼顾调和肝脾肾之阴阳,共奏阴中求阳,以达阴平阳秘之效。

卵巢早衰的病因与免疫、遗传、代谢及卵巢手术、放疗、化疗有关,而发病机制尚不十分明确,主要病理机制之一可能是卵巢储备功能的降低[3]。INHB 主要由卵巢颗粒细胞产生,是妇女 FSH 分泌的重要调节因子,研究证明[4],INHB 的分泌量与基础 FSH 呈负相关。INHB 能特异作用于脑垂体细胞,通过旁分泌及自分泌方式发挥生物学效应,对促性腺激素释放激素(GnRH)诱导的 FSH 分泌有选择性抑制作用,对于卵巢早衰患者,INHB 可选择性抑制 FSH 的产生,并且可以调节增加 E_2 底物来调节 E_2 的产生,是比 FSH 更加敏感的反应卵巢贮备功能高低的直接指标;VEGF 作为一种多功能的生长因子,促进内皮细胞的分裂、增生、游走、迁移,从而促进新生血管形成,并参与卵巢内周期性的血管形成,调节卵巢的血液供应[5]。既往研究发现黄体中期卵巢 VEGF 表达出现高峰和黄体周围血管密度增加一致[6]。Malamitsi-puchner[7]认为在血管结构丰富的卵巢,血管结构及微循环血流是影响其功能的重要因素之一,在从致密无血管的初级卵泡向有血管的次级卵泡转换中,VEGF 与卵泡膜细胞层中血管内皮 VEGF 受体作用,增加血管的通透性,有利于卵泡液的形成,促进卵泡的成熟。由此可见,INHB 和 VEGF 均是直接反映卵巢储备功能高低的重要指标。

本实验结果表明,运用补肾调周法能明显升高模型大鼠血清 INHB 以及 VEGF 的水平,改善模型大鼠卵巢组织形态学的病理变化。补肾调周法一方面可通过升高血清中 INHB 的含量抑制垂体合成分泌 FSH,并抑制促性腺激释放激素对自身受体的上调作用,还可以通过调节增加 E_2 底物来提高 E_2 的生成,从而改善卵巢早衰异常的内分泌环境;另一方面可通过改善血清中 VEGF 的含量,通过旁分泌的形式刺激卵泡膜内皮细胞增生,促进卵巢血管生成,使卵巢功能恢复,产生排卵。本研究认为补肾调周法可通过提高卵巢早衰模型大鼠 INHB, VEGF 的水平,提高卵巢贮备功能,从而达到对卵巢早衰早期干预的目的。

[参考文献]

[1] Luborsky J L, Meyer P, Sowers M F, et a1. Prematuremenopausein a multiethnic population study of themenopaus[J]. Hum Reprod, 2003, 18(1): 199.

[2] 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.

[3] Blum enfeld Z, A vivi I, Eckm an A, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonistdecreases chemotherapy-induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients withHodgkin lymphoma[J]. Fertil Steril, 2008, 89: 166.

[4] Hall J E. Neuroendocrine changes with reproductive aging in women[J]. Semin Reprod Med, 2007, 25(5): 344.

[5] 张瑞鹏. 血管内皮生长因子最新研究进展[J]. 医学综述, 2008, 8(14): 2259.

[6] 艾红. 自然排卵周期中子宫卵巢血流与性激素、血管内皮生长因子的关系[J]. 中国医学影像学杂志, 2004, 12(4): 227.

[7] Malamitsi-puchner A, Sarandakou A, Tziotis J, et al. Circulating angiogenic factors during periovulation and theluteal phase of normal menstrual cycles [J]. Fertil Steril, 2004, 81 (5): 1322.

[责任编辑 何伟]