

益肾 方对 PCOS 大鼠胰岛素抵抗及性激素水平的改善作用

周艳¹, 林佳¹, 刘广南¹, 潘竞锵^{1*}, 邝少松², 黄小琼², 饶子亮²

(1. 广州市中医医院-广州市中医中药研究所, 广州 510130;

2. 广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248)

[摘要] 目的: 观察益肾 方对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠胰岛素抵抗以及性激素的改善作用。方法: 采用十一酸睾酮加绒促性素(HCG)建立PCOS大鼠模型, 连续ig二甲双胍或不同剂量的益肾 方6周, 观察大鼠血清肿瘤坏死因子-(TNF- α)、空腹血糖(FBG)、糖耐量(OGTT-2hBG)、胰岛素(Ins)含量和胰岛素敏感指数(ISI)、睾酮(T)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、雌激素(E₂)、孕酮(P)、泌乳素(PRL)的变化。结果: PCOS大鼠TNF- α , FBG, OGTT-2hBG和Ins水平以及T, IGF-1, E₂和PRL含量明显高于对照组; ISI, P水平则显著降低(均 $P < 0.01$)。二甲双胍和益肾 方3个剂量组均能不同程度地改善PCOS大鼠的上述病理改变($P < 0.01 \sim 0.05$), 但益肾 方低剂量组PRL和ISI未见明显改变($P > 0.05$)。结论: 二甲双胍及益肾 方均能不同程度地改善PCOS大鼠胰岛素抵抗以及性激素代谢异常。

[关键词] 益肾 方; 多囊卵巢综合征; 胰岛素抵抗; 性激素

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0161-04

Effects of Yishen Yifang Decoction on Intensifying Insulin Sensitivity and Improving Sex Hormone in Rats with PCOS

ZHOU Yan¹, LIN Jia¹, LIU Guang-nan¹, PAN Jing-qiang^{1*}, KUANG Shao-song²,
HUANG Xiao-qiong², RAO Zi-liang²

(1. Guangzhou Institute of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Guangzhou 510130, China;

2. Guangdong Medical Experimental Animal Center, Foshan 528248, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of Yishen Yifang decoction on insulin resistance and sex hormone in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Method:** The model of PCOS rats induced by testosterone undecanoate and human chorionic gonadotropin (HCG), afterwards metformin, different doses of Yishen Yifang decoction were taken by intragastric administration for 6 weeks. At the end the contents of fasting blood-glucose (FBG), 2-hours blood glucose after oral glucose tolerance test(OGTT-2hBG), testosterone (T) insulin-like growth factor-1 (IGF-1), estrogen (E₂), progesterone (P), prolactin (PRL), insulin(Ins), tumor necrosis factor (TNF)- α were determined; the changes of insulin sensitivity index (ISI) were counted. **Result:** Compared with the normal group, the concentrations of FB, OGTT-2hBG, TNF- α , T, IGF-1, E₂ and PRL were increased obviously ($P < 0.01$), but ISI, P were decreased significantly ($P < 0.01$) in model rats. metformin and Yishen Yifang decoction could improve the pathologic changes in PCOS rats ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); but Yishen Yifang decoction the effects of low-dose group did not change P and ISI ($P > 0.05$). **Conclusion:** Metfomin and Yishen Yifang de-

[收稿日期] 2010-01-13

[基金项目] 广州市中医药、中西医结合项目(2004A055)

[第一作者] 周艳, 副主任中药师, 从事中药学以及实验药理学研究, Tel: 13059133344; E-mail: zhouyan556@yahoo.cn

[通讯作者] * 潘竞锵, 主任药师, 从事抗炎-免疫、老年药理学和生化药理; 主要研究方向: 糖尿病及其慢性并发症以及胰岛素抵抗相关疾病药物的药理学研究, E-mail: pjq56@yahoo.com.cn

coction can improve the pathologic changes, IR, sex hormone in PCOS rats.

[Key words] Yishen Yifang; PCOS; insulin resistance; sex hormone

多囊卵巢综合征(PCOS)是育龄妇女常见的内分泌紊乱性疾病,发生率为育龄妇女的5%~10%。PCOS最具特征性的临床表现是高雄激素血症^[1]。许多研究资料表明,除了以高雄激素血症为突出表现之外,PCOS普遍存在胰岛素抵抗(insulin resistance, IR),由于胰岛素抵抗是代谢综合征的中心环节,使得PCOS患者成为2型糖尿病、动脉粥样硬化等远期并发症的高危人群^[1]。中医认为,肾虚血瘀是PCOS的主要病机,临床上有用六味地黄丸加味治疗PCOS取得良效的报道^[2]。益肾方是广州市中医医院的院内制剂,具有益气活血、补益肝肾等功能,作者探讨益肾方对PCOS模型大鼠胰岛素抵抗及性激素的作用,结果报道如下。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雌性出生9d乳鼠,广东省医学实验动物中心提供,合格证号SCXK(粤)2003002。SPF级动物实验室,广东省实验动物设施许验室,许可证号SYXK(粤)2003002。普通饲料及动物垫料,由广东省医学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂 十一酸睾酮注射液,浙江仙琚制药股份有限公司,批号020501;注射用绒促性素(HCG)粉针剂,丽珠集团丽珠制药厂生产,批号030603B;益肾方(由黄芪、丹参、益母草加六味地黄汤组成)9种单味中药颗粒剂,均由广东一方制药厂生产,用前按比例混合配成混悬剂;二甲双胍片,深圳市中联制药有限公司,批号200305095;睾酮(T,批号2004121915)、胰岛素样生长因子(IGF-1,批号2004091024)、雌二醇(E₂,批号2004121916)、孕酮(P,批号2005010915)、泌乳素(PRL,批号70621S)ELISA试剂盒,购自大连华仪理工有限公司代理的DR Lab. California USA(美国)公司;胰岛素(Ins,批号13487)ELISA试剂盒购自大连华仪理工有限公司代理的德国DRG公司。

1.3 仪器 美国宝特BIO-TEK ELX800酶标仪;DL-5A离心机(上海安亭科学仪器厂);XSZ-D型倒置生物显微镜(重庆光学仪器厂);ONE TOUCH II(Lifescan)血糖仪及配套的试纸;Thermo fora-80冰箱;德国LEICA公司RM2135型切片机;NIKON EC30型倒置光学显微镜及COOLPIX99 NIKON数码

相机。

2 方法

2.1 动物造模及分组给药^[3~5] 除空白对照组外,各组sc十一酸睾酮5mg·kg⁻¹(用中性注射用油稀释)。空白对照组14只注射同量的中性注射用油;连续注射70d后,取阴道涂片连续观察11d,以阴道涂片连续出现角化细胞判定为造模成功;取造模成功大鼠70只,按体重随机分为5组:模型组,二甲双胍组250mg·kg⁻¹,益肾方高、中、低剂量组(分别为25,12.5,6.25g·kg⁻¹),空白对照组和模型组双蒸水,ig1次/d,连续6周;给药后15d,造模大鼠im HCG1.5U/只,2次/d,连续9d;在SD大鼠108~122日龄时,每天取阴道涂片,以出现规则性周期为排卵标准。

2.2 观测指标 第125天,空腹称重后,眼眶放血,取血清留冰箱待检。

2.2.1 第123天,禁食过夜,参照文献^[6]方法,测定大鼠空腹血糖(FBG)和口服葡萄糖后2h血糖(OGTT-2hBG);

2.2.2 血清T,IGF-1,E₂,P,PRL和Ins含量测定,采用ELISA方法,具体操作步骤参见各试剂盒说明书;参照文献^[6]方法,计算胰岛素敏感指数(ISI);

2.2.3 卵巢组织学观察 处死大鼠,取出卵巢,常规固定切片、HE染色,显微镜下观察。

2.3 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 13.0统计软件,组内体重前后变化的比较,用配对t检验;组间两两比较,用完全随机设计两样本t检验处理。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 益肾方对PCOS大鼠体重的影响 结果表明,PCOS大鼠体重明显增加,与空白对照组比较,差异有高度显著性($P < 0.01$);二甲双胍和益肾方高、中剂量能不同程度减少PCOS大鼠的体重增加, ($P < 0.01 \sim 0.05$),益肾方低剂量对体重增加影响不大。结果见表1。

3.2 益肾方对PCOS大鼠FBG,OGTT-2hBG,Ins及ISI的影响 结果表明,PCOS大鼠FBG,OGTT-2hBG和Ins含量明显高于对照组,ISI降低,与空白组比较, $P < 0.01$;二甲双胍和益肾方高、中剂量能

表 1 益肾 方对 PCOS 大鼠体重的影响 (柳±s, n = 14)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	体重 /g		体重增加/g
		药前	药后	
空白对照	—	233.6 ±18.6	272.2 ±25.6 ¹⁾	38.6 ±10.3 ⁴⁾
模型	—	268.3 ±23.6	337.4 ±33.3 ²⁾	69.1 ±13.4
二甲双胍	0.25	260.2 ±22.6	312.6 ±30.2 ¹⁾	52.40 ±15.1 ⁴⁾
益肾 方	25	259.9 ±27.9	304.6 ±28.3 ¹⁾	44.7 ±14.2 ⁴⁾
	12.5	262.5 ±7.1	316.0 ±31.4 ¹⁾	53.6 ±17.5 ³⁾
	6.25	265.6 ±23.6	326.7 ±27.9 ²⁾	61.1 ±23.6

注:与给药前比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与模型组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01。

表 2 益肾 方对 PCOS 大鼠血糖、胰岛素含量及胰岛素敏感指数的影响 (柳±s, n = 14)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	FBG	OGTT-2hBG	InS	ISI	TNF-
		/mmol · L ⁻¹	/mmol · L ⁻¹	/μg · L ⁻¹		/ng · L ⁻¹
空白对照	-	3.37 ±0.34 ²⁾	6.91 ±0.62 ²⁾	1.04 ±0.24 ²⁾	- 1.21 ±0.31 ²⁾	235.13 ±20.29 ²⁾
模型组	-	5.99 ±0.59	9.16 ±0.68	2.10 ±0.22	- 1.87 ±0.17	970.00 ±86.21
二甲双胍	0.25	3.91 ±0.39 ²⁾	7.19 ±1.50 ²⁾	1.25 ±0.14 ²⁾	- 1.59 ±0.14 ²⁾	453.78 ±23.18 ²⁾
益肾 方	25.0	3.81 ±0.86 ²⁾	6.79 ±0.88 ²⁾	1.41 ±0.16 ²⁾	- 1.51 ±0.15 ²⁾	620.98 ±54.13 ²⁾
	12.5	4.01 ±0.44 ²⁾	6.78 ±0.78 ²⁾	1.43 ±0.22 ²⁾	- 1.70 ±0.17 ²⁾	669.05 ±64.18 ²⁾
	6.25	4.12 ±0.43 ²⁾	6.93 ±1.23 ²⁾	1.50 ±0.34	- 1.76 ±0.28	755.57 ±90.46 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 表 3 同。

表 3 益肾 方对 PCOS 大鼠 T, IGF-1, E₂, P, PRL 含量的影响 (柳±s, n = 14)

组别	T	IGF-1	E ₂	P	PRL
	/μg · L ⁻¹	/μg · L ⁻¹	/ng · L ⁻¹	/μg · L ⁻¹	μg · L ⁻¹
空白对照	0.131 ±0.025 ²⁾	33.16 ±3.66 ²⁾	94.00 ±23.80 ²⁾	20.07 ±2.36 ²⁾	13.56 ±3.59 ²⁾
模型	0.287 ±0.033	74.97 ±7.07	159.76 ±14.62	9.73 ±1.41	28.11 ±2.75
二甲双胍	0.188 ±0.020 ²⁾	54.14 ±5.36 ²⁾	99.00 ±10.90 ²⁾	14.04 ±1.52 ²⁾	17.61 ±1.96 ²⁾
益肾 方	0.191 ±0.030 ²⁾	58.68 ±6.51 ²⁾	114.54 ±15.94 ²⁾	14.97 ±1.82 ²⁾	19.23 ±2.14 ²⁾
	0.212 ±0.021 ²⁾	64.97 ±6.03 ²⁾	125.25 ±17.45 ²⁾	13.46 ±2.93 ²⁾	21.59 ±2.23 ²⁾
	0.239 ±0.035 ¹⁾	68.14 ±6.61 ¹⁾	132.41 ±16.23 ¹⁾	11.82 ±3.29 ²⁾	23.05 ±3.61

示:空白对照组镜下明显见多个黄体及不同发育阶段的卵泡,颗粒细胞呈多层(多为 6~8 层),形态完整,排列整齐,卵泡膜细胞呈梭形排列。模型对照组镜下见卵泡囊性扩张,明显比其他组增多,生长卵泡、黄体数目比较少。少量卵巢内有黄体组织;颗粒细胞层数减少,仅为 2~3 层,颗粒细胞排列疏松,泡膜细胞层明显增厚。二甲双胍组镜下见颗粒细胞层数增加,约为 5~6 层,形态完整,排列整齐,卵泡膜细胞呈梭形排列。泡膜细胞层变薄,黄体组织数量较模型组增多,扩张卵泡较模型组明显减少。益肾 方高剂量组镜下见颗粒细胞层数明显增加,约为 5~6 层,形态完整,排列整齐,卵泡膜细胞呈梭形排

不同程度地改善 PCOS 大鼠血糖、高胰岛素血症和胰岛素抵抗的病理改变 (P < 0.01)。结果见表 2。

3.3 益肾 方对 PCOS 大鼠 T、IGF-1、E₂、P 和 PRL 含量的影响 结果表明,PCOS 大鼠 T、IGF-1、E₂ 和 PRL 含量明显高于对照组, P 水平则降低,与空白组比较, P < 0.01;二甲双胍和益肾 方高、中剂量能不同程度地改善 PCOS 大鼠性激素和 IGF-1 含量的病理改变 (P < 0.01),益肾 方低剂量除 PRL 未见显著性外,其余都有不同程度的改善作用 (P < 0.01~0.05)。结果见表 3。

3.4 益肾 方对 PCOS 大鼠卵巢的作用 结果显

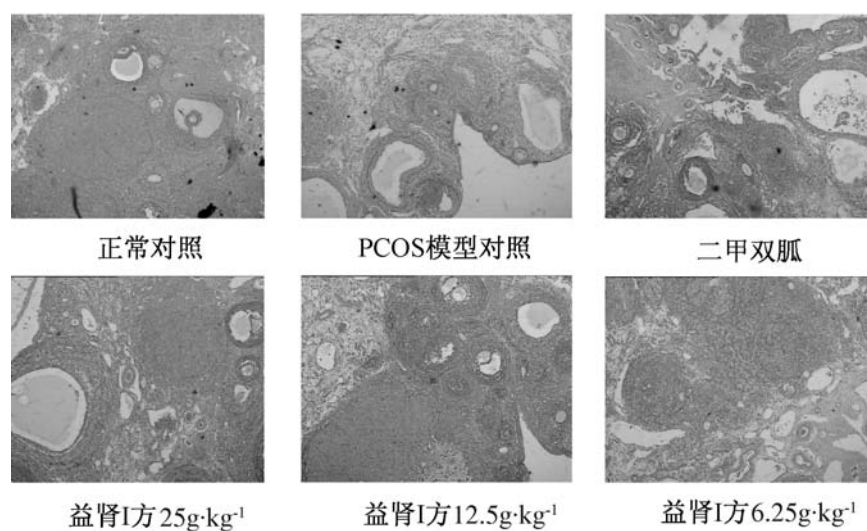


图 1 各组动物卵巢的形态学改变 (HE ×100)

列。泡膜细胞层变薄,黄体组织数量较模型组增多,扩张卵泡较模型组明显减少。益肾 方中剂量组镜

下见颗粒细胞层数较模型组增多, 约为 4 ~5 层, 形态完整, 排列整齐, 卵泡膜细胞呈梭形排列。泡膜细胞层变薄, 黄体组织数量较模型组增多。益肾 方低剂量组镜下见颗粒细胞层数较模型组增多, 泡膜细胞层变薄, 黄体组织数量较模型组增多。

4 讨论

多囊卵巢综合征(PCOS) 内分泌主要特征为高雄激素血症、高胰岛素血症、黄体生成素(LH) 水平增高、LH / 卵泡刺激素(FSH) 比值升高。PCOS 在中医学中无明确记载, 根据其临床表现属中医月经后期、月经量少、崩漏、闭经等范畴。尤昭玲等^[7] 认为肾虚血瘀是 PCOS 的基本病机。补肾活血法是治疗本病的基本方法。益肾 方由益母草、丹参、黄芪和六味地黄汤组成, 具有益气活血、补益肝肾等功能, 六味地黄汤是滋补肝肾的传统用方, 益母草和丹参的活血祛瘀功能较强, 而黄芪补气升阳的作用力大, 气行则血行, 三药与六味地黄汤合用, 在补肾的同时益气、活血、祛瘀, 更好地调节内分泌, 从而改善脂质代谢紊乱、平衡性激素。运用益肾 方对临床 PCOS 患者有良好的治疗效果。

本实验结果表明, PCOS 大鼠 TNF- α , T, FBG, OGTT-2hBG 和胰岛素水平均明显升高, 而 ISI 则显著降低。有研究表明, PCOS 的高血糖可刺激单核细胞产生活性氧, 并释放 TNF- α 诱导炎症, 而 PCOS 的高血糖有赖于高雄激素血症的直接刺激^[8]。TNF- α 能诱导 NF- κ B 结合雄激素受体启动子, 使其活性增加, 雄激素水平升高, 提示炎症因子水平升高及芳香化酶活性改变可能增加卵巢局部雄激素受体表达, 直接诱导 PCOS, 成为 PCOS 的又一重要发病机制^[9]。有资料表明^[10], IR 和高胰岛素血症通过 IGF 的作用放大促性腺激素的作用募集大量卵泡, 同时促进 LH 分泌增加, 而 LH 水平的升高又会刺激卵泡膜间质细胞增生, 分泌雄激素增加, 雄激素水平升高反过来又增加 IR 的发生, 使 PCOS 症状恶化。本组实验结果表明, PCOS 大鼠 T, IGF-1, E₂ 和 PRL 含量明显升高, 体重增加。

本实验结果表明, 益肾 方各个剂量和二甲双胍均能不同程度地改善 PCOS 大鼠胰岛素抵抗、高雄激素血症以及氧化应激状态, 益肾 方的效应与二甲双胍对脱氢表雄酮致高雄激素化小鼠调节卵巢功能的作用及其机制^[11] 基本一致, 说明益肾 方能用于临床 PCOS 患者胰岛素抵抗以及高雄激素血症

的治疗。

中医治疗 PCOS 可克服西药的不良反应, 在本病治疗中有较大的优势。但目前在机制阐述方面尚缺乏统一解释, 疗效标准尚未统一; 证型研究方面尚缺乏多中心、大样本的研究; 研究多以方剂为主, 对单味药研究较少; 剂型不方便且服药时间长等。总之, 中医药在 PCOS 治疗方面具有很大的研究空间和发展潜力, 有待更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Nisenblat V, Norman R J. Androgens and polycystic ovary syndrome[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009, 16(3):224.
- [2] 谢桂珍, 周卓秀. 多囊卵巢综合征中医临床研究概况 [J]. *广西中医药*, 2002, 25(4): 189.
- [3] Sun F, Yu J. The effect of a special herbal tea on obesity and anovulation in androgen-sterilized rats[J]. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000, 223(3): 295.
- [4] Poretsky L, Clemons J, Bogovich K. Hyperinsulinemia and human chorionic gonadotropin synergistically promote the growth of ovarian follicular cysts in rats[J]. *Metabolism.* 1992, 41(8):903.
- [5] 刘广南, 邝少松, 潘竞锵, 等. 益肾 方对 PCOS 大鼠胰岛素抵抗及血糖、血脂的影响 [J]. *中医药临床杂志*, 2009, 21(3): 189.
- [6] 郑琳颖, 潘竞锵, 吕俊华. 白芍总苷对脂肪肝大鼠增强胰岛素敏感性及抗脂肪肝作用 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(20): 2385.
- [7] 尤昭玲, 杨正望, 傅灵梅. 多囊卵巢综合征从肾虚血瘀调治的探讨 [J]. *湖南中医学院学报*, 2005, 25 (1): 25.
- [8] González F, Rote N S, Minium J, et al. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome [J]. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91 (1): 336.
- [9] Delfino F J, Boustead J N, Fix C, et al. NF- κ B and TNF- α stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells[J]. *Mol Cell Endocrinol.* 2003, 201(1-2): 1.
- [10] 李轶, 梁晓燕, 杨星, 等. 胰岛素和人绒毛膜促性腺激素建立高雄激素多囊卵巢大鼠模型 [J]. *国际生殖健康 / 计划生育杂志*, 2008, 27(1): 54.
- [11] 朱亮, 邢福祺. 脱氢表雄酮诱导 SD 大鼠多囊卵巢综合征模型胰岛素抵抗的研究 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2008, 16(5): 282.

[责任编辑 何伟]