

# 菟丝子总黄酮对多囊卵巢综合征大鼠模型的影响

苗明三<sup>\*</sup>, 彭孟凡, 闫晓丽  
(河南中医药大学, 郑州 450000)

**[摘要]** **目的:**探讨菟丝子总黄酮对脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)联合人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)致大鼠多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)模型的影响。**方法:**70只SD大鼠,10只正常组除外,其余大鼠上午颈背部注射DHEA 0.06 mg·g<sup>-1</sup>,下午皮下注射1.5 U HCG/只,连续21 d。造模第16天,阴道涂片,实施动情周期监测。挑选成模大鼠60只,分为模型组,达英-35组(0.339 2 mg·kg<sup>-1</sup>),菟丝子总黄酮高、中、低剂量组(0.2, 0.1, 0.05 g·kg<sup>-1</sup>),每组10只。分组当天按照组别分别进行给药,正常组和模型组给予等体积溶剂,连续给药21 d。末次给药2 h后,腹主动脉取血,测血清睾酮(testosterone, T),雌二醇(estrogen, E<sub>2</sub>),促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)的含量;脱颈处死大鼠,取每只大鼠同一部位的卵巢固定于10%甲醛溶液中,进行苏木素-伊红(HE)染色光镜观察卵巢的形态变化;取另一相同部位的卵巢,免疫组化法测量卵巢中雄激素受体(androgen receptor, AR)和凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax),观察相关蛋白在卵巢中的表达情况;取下丘脑和垂体,免疫组化法检测下丘脑中促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH),垂体促性腺激素释放激素受体(gonadorelin releasing hormone receptor, GnRHR)的表达情况。**结果:**PCOS大鼠模型复制成功。与模型组比较,各给药组可以显著降低PCOS大鼠血清T, E<sub>2</sub>和LH含量,显著升高血清FSH含量(P<0.01);显著升高卵巢Bcl-2水平(P<0.01),不同程度升高垂体GnRHR水平(P<0.05, P<0.01);不同程度降低卵巢AR和Bax水平(P<0.05, P<0.01),显著降低下丘脑中GnRH水平(P<0.01)和显著改善PCOS大鼠卵巢组织的病理性改变。**结论:**PCOS大鼠模型复制成功。菟丝子总黄酮可能通过调节雌雄激素分泌、抑制卵巢凋亡蛋白的表达、影响下丘脑-垂体-卵巢轴途径发挥对PCOS模型大鼠的保护作用。

**[关键词]** 多囊卵巢综合征; 凋亡蛋白; 菟丝子总黄酮; 生化指标

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0143-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190506

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181119.0946.005.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-21 15:30

## Effect of Dodder Total Flavone on Polycystic Ovary Syndrome Rat Models

MIAO Ming-san<sup>\*</sup>, PENG Meng-fan, YAN Xiao-li

(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of dodder total flavone on polycystic ovary syndrome (PCOS) rat models induced by dehydroepiandrosterone (DHEA) combined with human chorionic gonadotropin (HCG). **Method:** Except the blank group, the remaining rats were injected with DHEA 0.06 mg·g<sup>-1</sup> in the morning on the nucha and 1.5 U HCG in the afternoon for 21 consecutive days. On the 16<sup>th</sup> day after the modeling, the vaginal smear was performed to monitor the estrus cycle. Sixty rats with successful modeling were selected and divided into model group, dacin-35 group, and high, middle and low-dose dodder total flavonoids groups, with 10 rats in each group. On the day of grouping, drugs were given respectively to the drug treatment groups, and the

**[收稿日期]** 20180813(016)

**[基金项目]** 国家国际合作基地项目[国科外函(2016)65号];河南省中原学者项目(162101510003);河南省科技攻关项目(162102310181)

**[通信作者]** <sup>\*</sup>苗明三,博士,教授,从事中药药理教学与研究, Tel:0371-65962546, Email: miaomingsan@163.com

blank group and the model group were given equal volume solvent. The drugs were given continuously for 21 days. Blood was collected from abdominal aorta 2 h later after the final administration, serum levels of testosterone (T), estrogen ( $E_2$ ), luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) were measured; rats were put to death, and the ovaries at the same part of each rat were fixed in 10% formalin solution. htoxylin eosin (HE) staining was performed, and the morphological changes in the ovaries were observed by light microscopy; the same part of the ovary was taken, and androgen receptor (AR), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) were measured in the ovary by immunohistochemistry to observe the expressions of relevant proteins in the ovary; the hypothalamus and pituitary were taken, and the expressions of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in hypothalamus and gonadorelin releasing hormone receptor (GnRHR) in pituitary were detected by immunohistochemistry. **Result:** PCOS rat model was successfully replicated. Serum levels of T,  $E_2$  and LH were significantly reduced, and FSH level of PCOS was significantly increased in each drug treatment group ( $P < 0.01$ ). The pituitary GnRHR level was increased to different degrees ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); AR and Bax levels of the ovary were decreased to different degrees ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); hypothalamus GnRH level was significantly decreased, and pathological changes in ovarian tissue of PCOS rats were obvious ( $P < 0.01$ ) in each drug treatment group. **Conclusion:** The PCOS rat model was successfully replicated. Total flavonoids of dodder may play a protective role in PCOS model rats by regulating the secretion of androgen, inhibiting the expression of ovarian apoptotic protein and impacting the hypothalamic-pituitary-ovary axis pathway.

[**Key words**] polycystic ovary syndrome; apoptosis proteins; dodder total flavone; biochemical indicators

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是常见的妇科内分泌疾病之一, 以月经异常或不孕、卵巢多囊性增大、胰岛素抵抗、痤疮、糖脂代谢紊乱、雄激素过多及排卵障碍等为临床特征<sup>[1]</sup>。PCOS 可导致患者不孕不育, 其所致的排卵障碍性不孕在女性无排卵性不孕症中占比高达 75%, 即使受孕也伴随较高的流产率<sup>[2]</sup>。西医认为 PCOS 的致病因素有遗传因素和非遗传因素<sup>[3-4]</sup>, 多采用激素、手术和腹腔镜下电灼等方法治疗该病, 疗效突出。但易导致多卵泡和卵巢过激综合征及黄体缺陷的风险, 且手术治疗成本高、风险大、损伤性严重。中医学从五脏生理病理入手, 基于独特的辨证论治中医思维, 分析本病关键乃是肾虚, 涉及肝、脾<sup>[5]</sup>, 病因病机主要为“肾气-天葵-冲任-胞宫”生殖轴紊乱, 肾脾两虚、化生无力、精亏血少; 引发痰瘀互结、壅塞胞络、伤及脏腑; 继而导致冲任阻滞、闭经不孕, 故中医多从“肾”论治该病<sup>[6]</sup>。

中医认为肾藏精、主生殖; 肝肾同源, 肝气郁结, 血行瘀滞; 肝木横逆克犯脾, 脾失运化, 可谓牵一“肾”, 而动全身。纵观多种妇科疾病的中医药史, 补肾中药多有应用。基于散在的、大量的、无规范的临床方药中补肾中药的频繁应用, 通过揭示相应中药治疗妇科或男科疾病的中医药和现代医学机理, 该实验室提出“反治调平衡”学说, 为部分妇科及男科的治疗提供新的治疗突破口<sup>[7-9]</sup>。

菟丝子是常用的补肾中药, 且是临床方剂中常用的治疗 PCOS 的中药, 具有调节生殖系统的药理作用<sup>[10]</sup>, 且其主要成分黄酮能够对下丘脑-垂体-性腺内分泌功能产生多方面的影响, 进而调节去卵巢大鼠骨代谢<sup>[11]</sup>。临床研究表明, 菟丝子与桑寄生、枸杞子、泽兰<sup>[12]</sup>或与牡丹皮、淫羊藿、女贞子<sup>[13]</sup>或与肉桂、巴戟天、鸡血藤等<sup>[14]</sup>配伍用于多囊卵巢综合征患者的治疗, 可以提高排卵障碍性不孕患者的受孕率、改善内分泌紊乱现象和减轻胰岛素抵抗。但菟丝子多以方剂的形式用于 PCOS 患者的临床治疗, 并没有相关的实验支撑, 且菟丝子总黄酮对 PCOS 的研究鲜见报道, 为确证其功效, 有必要对菟丝子单味中药进行研究。因此, 该实验将其主要成分总黄酮用于对脱氢表雄酮 (DHEA) 联合人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 致 PCOS 模型大鼠的实验研究, 以探讨其干预和治疗 PCOS 的合理性, 确证其功效。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 大鼠, SPF 级, 雌性, 23 日龄, 70 只。济南朋悦实验动物繁育有限公司提供, 合格证号 SCXK (鲁) 2015-0005; 动物合格证号 37009200006387; 科研实验中心培训上岗证编号 1612; 动物设施使用证明编号 00013517; 实验伦理编号 DWLL16020050。

**1.2 药物及试剂** 菟丝子总黄酮 (南京泽朗生物

科技有限公司,经 UV 检测菟丝子总黄酮含量为 51.25%);达英-35(炔雌醇环丙孕酮片,德国拜耳医药保健有限公司,批号 333A;批准文号国药准字 J20140114);脱氢表雄酮(DHEA,杭州阿拉丁信息科技股份有限公司,批号 B1227012)。兽用注射用 HCG[杭州动物药品厂,兽药批准文号兽药字(2010)110201281,批号 161008]。抗促性腺素释放激素(GnRH)多克隆抗体,抗促性腺素释放激素受体(GnRHR)多克隆抗体(北京博奥森生物科技有限公司,批号分别为 AC12243558S,AF11177594S);抗 AR 多克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号 GR310012-4);抗 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)多克隆抗体,过氧化物酶标记羊抗兔-免疫球蛋白(Ig)G 二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 BST02E26C35, BST09E24C21, BST12E27C55);大鼠睾酮(T),雌激素(E<sub>2</sub>),促黄体生成素(LH),卵泡刺激素(FSH)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒,苏木素-伊红(HE)染色液(苏州卡尔文生物科技有限公司,批号均为 20170623SR)。

**1.3 仪器** BX61 型电动显微镜(日本 Olympus 公司);AR1140/C 型电子分析天平[奥豪斯(上海)公司];680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);KDC-160HR 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分);TGL-168 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);Forma 900 系列超低温冰箱(美国 Thermo Fisher 科技有限公司);HWS12 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 造模与给药** 参照文献[15-16]并进行相关改造。70 只大鼠适应性喂养 2 d,第 3 天随机挑选 10 只作为正常组。余下 60 只大鼠每天上午颈背部注射 DHEA 60 mg·kg<sup>-1</sup>(每 6 mg 用 0.2 mL 注射用油进行溶解),下午皮下注射 1.5 U HCG/只(每 1.5 U 溶于 0.4 mL 注射用水)进行造模,连续 21 d。造模第 16 天开始,每日早上 8:00 取大鼠阴道分泌物,进行 1 个周期的阴道涂片,实施动情周期监测,选取 50 只阴道上皮持续角化(动情周期无规律,即造模成功)的大鼠受试动物。把成模的 50 只大鼠随机分为模型组,达英-35 组(0.3392 mg·kg<sup>-1</sup>),菟丝子总黄酮高、中、低剂量组(0.2,0.1,0.05 g·kg<sup>-1</sup>)组,每组 10 只。除正常组及模型组给予等量溶媒,各给药组分别给予相应药物,连续给药 21 d。取结果前 1 d 晚上 8 点禁食,自由饮水。

## 2.2 检测指标及方法

**2.2.1 ELISA 检测血清激素水平** 末次给药 2 h 后,10%的水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,4 ℃条件下 4 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,分离血清,按说明书检测血清 T,E<sub>2</sub>,LH,FSH 的含量。

**2.2.2 免疫组化法检测相关蛋白水平** 取每只大鼠同一部位的卵巢,免疫组化法测量卵巢中 AR,Bcl-2,Bax 平均积分吸光度 IA 以观察相关蛋白在卵巢中的表达情况,取下丘脑和垂体,免疫组化法检测下丘脑 GnRH,垂体 GnRHR 的平均 IA 以观察两者表达情况。操作步骤:取卵巢、下丘脑和垂体标本进行切片、脱蜡、水化处理;磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,每次 5 min;冲洗之后,用 3% 过氧化氢室温封闭 10 min,以阻断内源性过氧化物酶;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;PBS 冲洗后依据不同的组织和指标一次滴加相应的一抗;4 ℃冰箱孵育过夜,滴加二抗;DAB 显影,显微镜下分析结果。

**2.2.3 HE 染色观察卵巢组织病理变化** 脱颈处死大鼠,取每只大鼠另一相同部位的卵巢固定于 10% 甲醛溶液中,进行 HE 染色。将固定于 10% 甲醛溶液中的卵巢组织,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片,脱蜡,常规 HE 染色,置于光学显微镜下观察并记录卵巢的形态变化。病理评分,“-”镜下可见卵巢中含有不同发育阶段的卵泡,颗粒细胞发育良好,镜下呈多层结构,可见多个黄体,卵巢总体结构正常,未见无卵丘囊性卵泡;“+”在光镜下仍可见到各级卵泡,但颗粒细胞层稍微减少,且卵巢中可见少量的囊状卵泡,偶然可见黄体。“++”光镜下可见卵巢的次级卵泡数量减少,颗粒细胞萎缩,导致细胞层数明显减少,卵巢中囊状卵泡增多,极少见黄体出现。“+++”光镜下大鼠卵巢闭锁卵泡增多,并可见多个黄素化的无卵丘之囊性滤泡,在卵泡内,未见卵母细胞或放射冠,亦可观察到颗粒细胞出现严重凋亡现象,仅为数层,未见黄体迹象。

**2.3 统计学方法** 采用 SPSS 21.0 统计软件对实验结果进行统计学处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  的形式表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐者用 LSD 法进行检验,方差不齐者用 Games-Howell 法检验,等级资料用 Ridit 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 模型大鼠血清雌二醇激素水平的影响** 与正常组比较,模型组大鼠血清 T,E<sub>2</sub> 的含量显著升高( $P < 0.01$ ),提示 DHEA 联

合 HCG 造模后,大鼠体内出现了性激素紊乱现象。与模型组比较,达英-35 及菟丝子总黄酮高、中、低剂量可显著降低多囊卵巢综合征大鼠的 T, E<sub>2</sub> 含量 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 菟丝子总黄酮对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 模型大鼠血清 T, E<sub>2</sub> 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of dodder total flavone on serum T and E<sub>2</sub> of PCOS rat models induced by DHEA combined HCG ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	T/nmol·L <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /pmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	6.29 ± 0.85	47.44 ± 2.61
模型	-	7.63 ± 0.59 <sup>2)</sup>	56.47 ± 5.86 <sup>2)</sup>
达英-35	0.339 2	6.46 ± 0.50 <sup>4)</sup>	47.40 ± 3.86 <sup>4)</sup>
菟丝子总黄酮	200	6.45 ± 0.68 <sup>4)</sup>	48.36 ± 4.41 <sup>4)</sup>
	100	6.43 ± 0.58 <sup>4)</sup>	49.65 ± 3.46 <sup>4)</sup>
	50	6.42 ± 0.95 <sup>4)</sup>	50.35 ± 1.44 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

**3.2 对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 大鼠血清 LH, FSH 水平的影响** 与正常组比较,模型组大鼠血清中 LH 的水平显著增加 ( $P < 0.01$ ),FSH 的水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,达英-35 及菟丝子总黄酮高、中、低剂量可显著降低 PCOS 大鼠的血清 LH 水平 ( $P < 0.01$ ),达英-35 组与菟丝子总黄酮高、中剂量可明显升高大鼠 PCOS 的血清 FSH 水平 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 菟丝子总黄酮对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 模型大鼠血清 LH,FSH 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of dodder total flavone on serum LH and FSH of PCOS rat models induced by DHEA combined HCG ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	LH	FSH
正常	-	28.92 ± 2.69	8.15 ± 0.30
模型	-	35.02 ± 3.75 <sup>2)</sup>	7.55 ± 0.82 <sup>1)</sup>
达英-35	0.339 2	29.58 ± 2.00 <sup>4)</sup>	8.20 ± 0.29 <sup>3)</sup>
菟丝子总黄酮	200	29.70 ± 2.51 <sup>4)</sup>	8.18 ± 0.22 <sup>3)</sup>
	100	30.72 ± 2.62 <sup>4)</sup>	8.10 ± 0.37 <sup>3)</sup>
	50	31.39 ± 2.46 <sup>4)</sup>	8.04 ± 0.59

**3.3 对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 模型大鼠卵巢中 Bcl-2, Bax 表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠卵巢中 Bcl-2 平均 IA 显著降低 ( $P < 0.01$ ),Bax 平均

IA 显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,达英-35 与菟丝子总黄酮高、中剂量可显著升高卵巢中 Bcl-2 的 IA ( $P < 0.01$ ),菟丝子总黄酮低剂量可明显提高卵巢中 Bcl-2 的平均 IA ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,达英-35 与各剂量组的菟丝子总黄酮可显著降低卵巢中 Bax 的平均 IA ( $P < 0.01$ ),提示菟丝子总黄酮可能通过抑制抑制颗粒细胞凋亡抑制多囊卵泡的发生。见表 3,图 1。

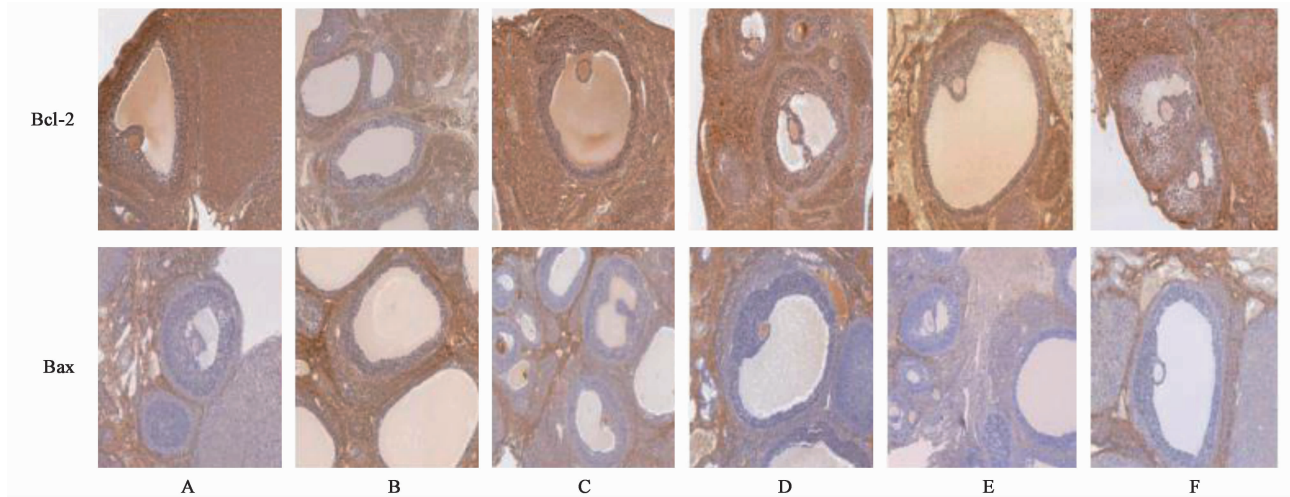
表 3 菟丝子总黄酮对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 模型大鼠卵巢中 Bcl-2, Bax IA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of dodder total flavone on Bcl-2 and Bax IA in ovary of PCOS rat models induced by DHEA combined HCG ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	Bcl-2	Bax
正常	-	0.246 ± 0.016	0.226 ± 0.011
模型	-	0.216 ± 0.012 <sup>2)</sup>	0.263 ± 0.015 <sup>2)</sup>
达英-35	0.339 2	0.241 ± 0.013 <sup>4)</sup>	0.231 ± 0.016 <sup>4)</sup>
菟丝子总黄酮	200	0.238 ± 0.006 <sup>4)</sup>	0.230 ± 0.014 <sup>4)</sup>
	100	0.235 ± 0.007 <sup>4)</sup>	0.232 ± 0.007 <sup>4)</sup>
	50	0.234 ± 0.015 <sup>3)</sup>	0.238 ± 0.015 <sup>4)</sup>

**3.4 对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 大鼠下丘脑中 GnRH,垂体 GnRHR 及卵巢中 AR 表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠下丘脑中 GnRH,卵巢中 AR 平均 IA 显著升高 ( $P < 0.01$ ),且垂体中 GnRHR 平均 IA 显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,达英-35 与菟丝子总黄酮高、中、低剂量均可以显著降低大鼠下丘脑中 GnRH,卵巢中 AR 的平均 IA ( $P < 0.01$ );达英-35 与菟丝子总黄酮高、中剂量可显著升高大鼠垂体中 GnRHR 平均 IA ( $P < 0.01$ ),菟丝子总黄酮低剂量组可明显升高模型大鼠垂体中 GnRHR 平均 IA ( $P < 0.05$ ),该结果提示菟丝子总黄酮改善 PCOS 的相关症状可能与调节性腺轴障碍有关。见表 4,图 2。

**3.5 对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 模型大鼠卵巢组织形态的影响** 正常组卵巢组织中各级卵泡随处可见,亦存在正常黄体和白体等,且结构正常,无病变。模型组卵巢皮质内原始卵泡数量正常,闭锁的卵泡增多,并可见多个黄素化的无卵丘之囊性滤泡。在卵泡内,光镜下未见卵母细胞或放射冠,亦可观察到颗粒细胞出现凋亡现象,黄体减少。达英-35 组卵巢内,可见各级卵泡,未见囊性改变,基本为正常



A. 正常组; B. 模型组; C. 达英-35 组; D. 菟丝子总黄酮高剂量组; E. 菟丝子总黄酮中剂量组; F. 菟丝子总黄酮低剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 菟丝子总黄酮对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 大鼠卵巢凋亡相关因子 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 1 Effect of dodder total flavone on Bcl-2 and Bax in ovarians of PCOS rat models induced by DHEA combined HCG (IHC, ×200)

表 4 菟丝子总黄酮对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 大鼠下丘脑中 GnRH, 垂体 GnRHR 及卵巢中 AR 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of dodder total flavone on expression of GnRH in hypothalamus, GnRHR in hypophysis, AR in ovarians of PCOS rat models induced by DHEA combined HCG ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	GnRH	GnRHR	AR
正常	-	0.204 ± 0.016	0.332 ± 0.007	0.295 ± 0.015
模型	-	0.249 ± 0.020 <sup>2)</sup>	0.282 ± 0.014 <sup>2)</sup>	0.348 ± 0.025 <sup>2)</sup>
达英-35	0.339 2	0.202 ± 0.019 <sup>4)</sup>	0.302 ± 0.004 <sup>4)</sup>	0.314 ± 0.015 <sup>4)</sup>
菟丝子总黄酮	200	0.205 ± 0.016 <sup>4)</sup>	0.304 ± 0.009 <sup>4)</sup>	0.316 ± 0.015 <sup>4)</sup>
	100	0.219 ± 0.016 <sup>4)</sup>	0.303 ± 0.008 <sup>4)</sup>	0.304 ± 0.010 <sup>4)</sup>
	50	0.220 ± 0.004 <sup>4)</sup>	0.301 ± 0.018 <sup>3)</sup>	0.302 ± 0.006 <sup>4)</sup>

卵巢结构。菟丝子总黄酮高剂量组卵巢内含不同发育阶段的卵泡,放射冠清晰可见,未见囊性改变的卵泡,同时可见少量的黄体和白体,提示有排卵现象。菟丝子总黄酮中剂量组卵巢镜下可见各级卵泡比例正常,无卵丘囊性卵泡少量出现,颗粒细胞层数亦出现减少现象。菟丝子总黄酮低剂量组镜下出现较多无卵丘卵泡,且视野中卵泡未看到卵母细胞或放射冠,卵巢颗粒细胞也出现萎缩现象,呈现出来的层数不同程度的减少。见图 3。按照半定量标准对实验各组卵巢组织进行测定,经 Ridit 检验,正常组大鼠卵巢组织形态均为正常,与正常组大鼠比较,光镜下可看到模型组卵巢组织中出现大量的闭锁卵泡,且颗粒细胞的层数显著减少 ( $P < 0.01$ ),说明造模后模型动物卵巢中颗粒细胞出现萎缩现象。与模型组比较,达英-35 及高、中、低剂量的菟丝子总黄酮均可显著改善 PCOS 的卵巢病理变化 ( $P < 0.01$ )。见表 5。

表 5 菟丝子总黄酮对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 模型大鼠卵巢组织的影响

Table 5 Effect of dodder total flavone on ovarian tissue of PCOS rat models induced by DHEA combined HCG

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	个			
		-	+	++	+++
正常	-	10	0	0	0
模型	-	0	1	1	8
达英-35	0.339 2	6	3	1	0
菟丝子总黄酮	200	6	2	2	0
	100	4	3	3	0
	50	4	3	2	1

#### 4 讨论

PCOS 是育龄妇女常见的内分泌疾病之一,临床表现多样,胰岛素抵抗、高胰岛素血症等是其病理生理变化,发病率占育龄妇女的 8.7% ~ 17.8%<sup>[17]</sup>。PCOS 的临床表现极具异质性,现代医学多采用各种亚型指导临床治疗<sup>[18]</sup>。研究表明

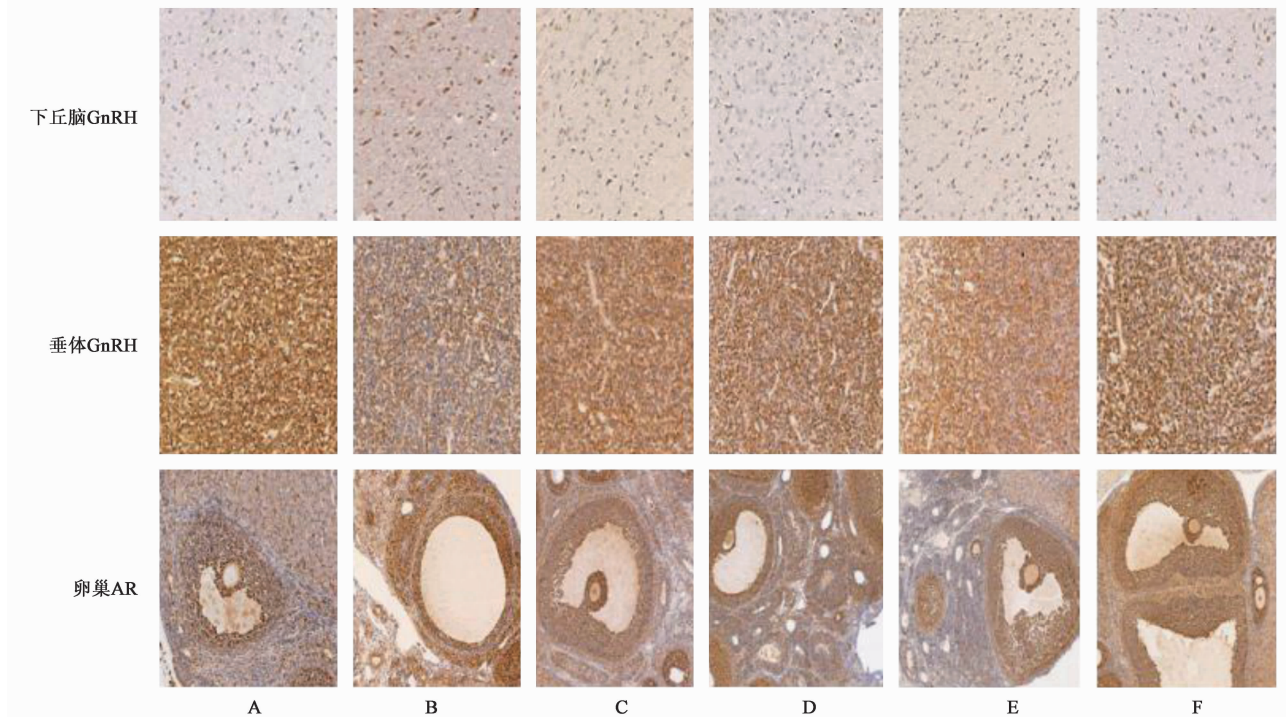


图 2 菟丝子总黄酮对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 大鼠丘脑中 GnRH, 垂体 GnRH-R 及卵巢中 AR 表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of dodder total flavone on expression of GnRH in hypothalamus, GnRH-R in hypophysis, AR in ovarary of PCOS rat models induced by DHEA combined HCG(IHC, ×200)

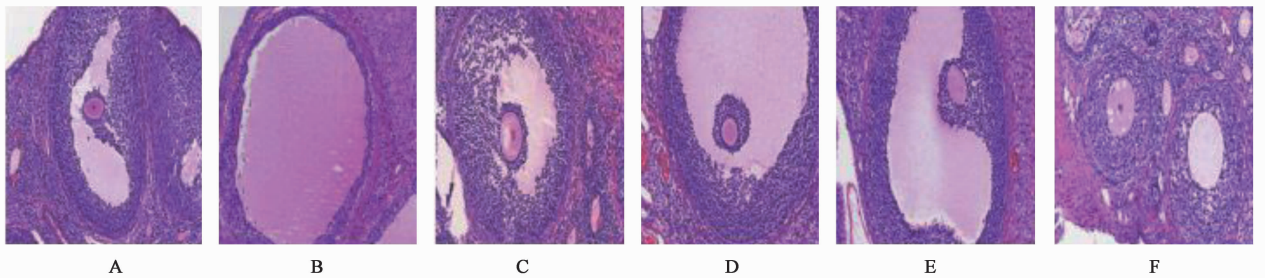


图 3 菟丝子总黄酮对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 模型大鼠卵巢组织的影响(HE, ×100)

Fig. 3 Effect of dodder total flavone on ovarian tissue of PCOS rat models induced by DHEA combined HCG(HE, ×100)

PCOS 与下丘脑功能性闭经<sup>[19]</sup>、月经周期紊乱<sup>[20]</sup>相关,而 PCOS 属中医“闭经”“月经推迟”“崩漏”和“月经失调”等范畴,中西医对 PCOS 的认识具有相通之处。此外,辩证论治是中医治疗疾病的特色,依其临床表现不同,中医将 PCOS 归于肾虚、血瘀、血虚、痰郁等不同的证型。调查研究表明,肾虚(肾阴虚、肾阳虚和肾阴阳两虚等)是最主要的证型,在 PCOS 的中医证型中位居第一<sup>[21]</sup>。中医认为,肾主生殖,对于妇科生殖相关疾病可用补肾阳中药进行治疗,因此实验室提出“反治调平衡”学说,并将该学说运用于围绝经期<sup>[22]</sup>、多囊卵巢综合征<sup>[23]</sup>痛经和子宫发育不良等的研究和探讨。菟丝子作为一种常用的补肾中药,其主要成分总黄酮具有改善排卵

障碍<sup>[24]</sup>,调节内分泌和抑制凋亡相关蛋白(Bcl-2, Bax 和 Csapase-3)表达的作用<sup>[25]</sup>。以上研究均表明,菟丝子总黄酮对生殖和内分泌系统具有较好的调节作用。在此基础上,结合多囊卵巢综合征的发病特点,将菟丝子总黄酮作为受试药用于对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 模型大鼠的实验研究,探讨其作用机制。

据报道,PCOS 患者下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴内分泌紊乱与卵巢类固醇的异常生成、高胰岛素血症等相互关联<sup>[26]</sup>。GnRH 作为 HPG 轴神经内分泌的主要调控者,以脉冲方式分泌并作用于垂体前叶内促性腺激素分泌细胞,对生殖轴发挥调控作用<sup>[27]</sup>。GnRHR 主要分布于下丘脑及腺垂体,

GnRHR 的表达受 GnRH 调节,长期、持续、高频率的 GnRH 脉冲刺激下,导致 GnRHR 分泌呈现下降的趋势<sup>[28]</sup>。GnRHR 与 GnRH 的异常调控导致垂体 LH 及 FSH 分泌异常,LH 和 FSH 是由垂体分泌的糖蛋白激素,两者水平的变化会影响下游卵巢性激素的分泌,进而使卵泡发育受阻。PCOS 患者体内 LH 分泌增高,FSH 较低或正常,导致 LH/FSH 升高,继发性造成卵巢雄性激素增多, $E_2$  相对缺乏,引起高雄激素血症,卵巢被膜纤维化增厚,抑制卵巢发育或排卵,最终导致 PCOS<sup>[29-30]</sup>。雄激素受体(AR)活性上调可导致高雄激素血症形成,而高雄激素血症与女性生殖病理障碍有关。AR 介导雄激素在女性生殖方面的调控作用,高水平的 AR 可导致闭锁卵泡增加、成熟卵泡减少<sup>[31]</sup>。而研究表明,菟丝子总黄酮可以下调 PCOS 模型大鼠 T、 $E_2$  和 FSH 的含量,升高血清 FSH 的含量;降低下丘脑内 GnRH 的水平,上调垂体 GnRHR 的水平,下调卵巢 AR 的水平,从而发挥调节 PCOS 模型大鼠激素分泌和下丘脑-垂体-性腺轴功能紊乱的现象。颗粒细胞异常凋亡是 PCOS 发病的原因之一,Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族功能相反的两类亚群,前者抵抗细胞凋亡,后者促进细胞凋亡,两者比例决定细胞的凋亡程序<sup>[32-33]</sup>。而研究表明,菟丝子总黄酮可以上调卵巢 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,表明其可以通过抑制卵巢颗粒细胞的异常凋亡,改善 PCOS 模型大鼠的卵巢功能。

综上,菟丝子总黄酮可以通过改善 PCOS 大鼠激素分泌(T、 $E_2$ 、LH 和 FSH);调节下丘脑-垂体-性腺轴的紊乱状态(GnRH、GnRHR 和 AR);抑制卵巢颗粒细胞的异常凋亡(Bcl-2 和 Bax);改善 PCOS 大鼠卵巢的病理性改变等发挥对 DHEA 联合 HCG 致 PCOS 大鼠的保护作用。

#### [参考文献]

[1] 周娴颖,周莉,孙祖越.用于治疗多囊卵巢综合症的中药药理学作用机制研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(20):3715-3720.

[2] Spritzer P M, Motta A B, et al. Adolescence and polycystic ovary syndrome: current concepts on diagnosis and treatment[J]. Int J Clin Pract, 2015, 69 (11): 1236-1246.

[3] SHI X, XIE X, JIA Y, et al. Associations of insulin receptor and insulin receptor substrates genetic polymorphisms with polycystic ovary syndrome: a systematic review and Meta-analysis [J]. J Obstet

Gynaecol Res, 2016, 42 (7):844-854.

[4] Ewens K G, Jones M R, Ankener W, et al. FTO and MC4R gene variants are associated with obesity in polycystic ovary syndrome[J]. PLoS One, 2011,6(1): e16390.

[5] 张美微,侯丽辉,刘颖华.中医药治疗多囊卵巢综合征胰岛素抵抗的研究进展[J].世界中西医结合杂志,2016,11(3):436-439.

[6] 谢敏,李丹,赵爽.多囊卵巢综合征的病因病机及治疗研究动态[J].世界中西医结合杂志,2018,13(1): 145-148.

[7] 刘绍龔,苗明三.基于中药新用的中医药理论创新发展研究[J].中医学报,2012,27(10):1309-1313.

[8] FU Z N,WEI Z Z,MIAO M S. Effects of total flavonoids of raspberry on perimenopausal model in mice [J]. Saudi J Biol Sci, 2018,25 (3):487-492.

[9] 辛卫云,白明,苗明三,等.浅析补肾阳中药治疗围绝经期综合征[J].中医学报,2017,32(1):67-70.

[10] 王焕江,赵金娟,刘金贤,等.菟丝子的药理作用及其开发前景[J].中医药学报,2012,40(6):123-125.

[11] 赵素霞,刘会丽,江红.菟丝子黄酮通过调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路干预去卵巢大鼠骨代谢的机制研究[J].临床和实验医学杂志,2018,17(1):25-28.

[12] 任秀朋,穆文涛,王叶婷,等.补肾活血中药治疗多囊卵巢综合征导致排卵障碍性不孕 30 例临床观察[J].中国药业,2018,27(17):75-77.

[13] 卿朝晖,钟琼兰.观察中药补肾活血方对青春期多囊卵巢综合征内分泌激素的影响[J].中国医药科学,2017,7(8):97-99.

[14] 刘玉芳,姚昶,孙海峰.温补脾肾化痰法治疗多囊卵巢综合征胰岛素抵抗的临床研究[J].中医药学报,2016,44(5):61-63.

[15] 姚莉娟,徐晓娟,王婧婧,等.体现中医病因病机的多囊卵巢综合征动物模型评价及筛选[J].世界科学技术—中医药现代化,2014,16(10):2137-2148.

[16] 王娜梅.脱氢表雄酮诱导多囊卵巢综合征大鼠模型的表型研究[J].世界中西医结合杂志,2015,10(11):1596-1599.

[17] Andrade V H, Mata A M, Borges R S, et al. Current aspects of polycystic ovary syndrome: a literature review [J]. Rev Assoc Med Bras, 2016, 62 (9):867.

[18] 金婧,阮祥燕,华琳,等.多囊卵巢综合征合并卵巢储备功能低下患者的发生现状[J].生殖医学杂志,2018,27(2):103-107.

[19] Enrico C, Franca F, Roger A. Increased anti-mullerian hormone levels and ovarian size in a subgroup of women with functional hypothalamic amenorrhea: further identification of the link between polycystic ovary

- syndrome and functional hypothalamic amenorrhea [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 214(6): 714-716.
- [20] Spalkowska M, Mrozinska S, Galuszka-Bednarczyk A, et al. The PCOS patients differ in lipid profile according to their phenotypes [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2018, 126(7): 437-444.
- [21] 黄一鸣, 康开彪, 潘文, 等. 基于数据挖掘多囊卵巢综合征的中医辨证用药规律分析 [J]. *新中医*, 2018, 50(6): 60-64.
- [22] MIAO M S, TIAN S, GUO L, et al. The effect of curculigoside on mouse model of perimenopausal depression [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2017, 24(8): 1894-1902.
- [23] 闫晓丽, 张志强, 苗明三. 基于中西医临床特征的多囊卵巢综合征模型分析 [J]. *中医学报*, 2017, 32(4): 598-601.
- [24] 罗克燕, 杨丹莉, 徐敏. 菟丝子总黄酮对大鼠排卵障碍的治疗作用及其机制研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2013, 22(20): 2184-2186, 2188.
- [25] 彭申明, 陈勤, 陈逸青, 等. 菟丝子总黄酮对内分泌衰退痴呆模型小鼠学习记忆功能的影响及保护作用机制 [J]. *激光生物学报*, 2014, 23(3): 218-226.
- [26] Mantelli F, Moretti C, Macchi I, et al. Effects of sex hormones on ocular surface epithelia: lessons learned from polycystic ovary syndrome [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(5): 971-975.
- [27] YANG W, YANG R, YANG S, et al. Infertile polycystic ovary syndrome patients undergoing *in vitro* fertilization with the gonadotropin-releasing hormone-antagonist protocol: role of hyperandrogen-ism [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(8): 715-718.
- [28] 宋俐. 固本祛瘀方对多囊卵巢综合征模型大鼠垂体促性腺激素释放激素受体表达的影响 [J]. *湖北中医杂志*, 2012, 34(2): 24-25.
- [29] 王德军, 李路凯, 张辉. 加味二陈汤对肾虚痰湿型多囊卵巢综合征患者卵巢多囊样改变、内分泌及代谢的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(24): 190-195.
- [30] 李俊波, 邓芳, 李霄汉, 等. 龙胆泻肝汤对 PCOS 模型大鼠的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(7): 121-126.
- [31] CHENG X B, Jimenez M, Desai R, et al. Characterizing the neuroendocrine and ovarian defects of androgen receptor-knockout female mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 305(6): 717-726.
- [32] 郑艳华, 吴婉婷, 马红霞, 等. 低频电针对多囊卵巢综合征大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2 表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(12): 1455-1460.
- [33] 唐忠庆, 吴坚, 郑庚唐, 等. 多囊卵巢综合征与卵巢颗粒细胞凋亡基因蛋白 Bcl-2、Bax、P53 的相关性研究 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16(A5): 98-99.

[责任编辑 周冰冰]