

补肾活血化痰汤对多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢血供及形态的影响^Δ

王瑞杰^{1*}, 李 晖², 邱 方², 王自闯¹(1.河南中医药大学第二临床医学院, 郑州 450002; 2.河南中医药大学第二附属医院生殖医学科, 郑州 450002)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0479-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.13

摘要 目的:探讨补肾活血化痰汤对多囊卵巢综合征(PCOS)模型大鼠卵巢血供及形态的影响。方法:取SD大鼠(♀)50只随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组[罗格列酮, 3 mg/(kg·d)]和补肾活血化痰汤低、高剂量组[5.0、7.5 g/(kg·d)], 每组10只。除正常对照组外,其余各组大鼠均采用Poresky法复制PCOS模型。成模后,各给药组大鼠ig相应药物,正常对照组和模型组大鼠ig生理盐水[10 mL/(kg·d)],每天1次,连续22 d。给药结束后处死大鼠,记录微血管密度(MVD),检测大鼠卵巢组织血管内皮生长因子(VEGF)、血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)1型受体(AT1)和2型受体(AT2)以及G蛋白偶联受体MAS mRNA的表达,并观察卵巢形态变化。结果:与正常对照组比较,模型组和各给药组大鼠MVD均升高,AT1、AT2、MAS mRNA表达均下调($P<0.05$);模型组大鼠卵巢组织可见囊性窦卵泡、颗粒细胞层减少,卵母细胞消失,黄体组织数量减少等明显病理变化。与模型组比较,各给药组上述指标均得到显著改善,且补肾活血化痰汤低、高剂量组作用均强于阳性对照组($P<0.05$);各给药组大鼠的卵巢组织病理变化均得到一定改善。结论:补肾活血化痰汤可增加PCOS模型大鼠卵巢组织血供,促进血管生成,促排卵,有助于改善卵巢形态。

关键词 补肾活血化痰汤;多囊卵巢综合征;卵巢形态;卵巢血供;大鼠

Effects of Bushen Huoxue Huatan Decoction on Ovarian Blood Supply and Form in Polycystic Ovarian Syndrome Model Rats

WANG Ruijie¹, LI Hui², QIU Fang², WANG Zichuang¹(1.Second Clinical College, Henan University of TCM, Zhengzhou 450002, China; 2.Dept. of Reproductive Medicine, the Second Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the effects of Bushen huoxue huatan decoction on ovarian blood supply and form in model rats with polycystic ovarian syndrome (PCOS). **METHODS:** 50 SD female rats were randomized into normal control group, model group, positive control group [rosiglitazone, 3 mg/(kg·d)], Bushen huoxue huatan decoction low-dose and high-dose groups [5.0, 7.5 g/(kg·d)], with 10 rats in each group. Except for normal control group, PCOS model was induced in the other groups by Poresky method. After modeling, treatment groups were given relevant medicine intragastrically. The normal control group and model group were given normal saline [10 mL/(kg·d)] intragastrically, once a day, for 22 days. After the end of administration, the rats were sacrificed. The microvessel density (MVD) was recorded. mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), ovarian angiotensin II receptor (Ang II) type 1 (AT1) and type 2 (AT2), G-protein coupled receptor MAS were all detected in ovarian tissue of rats. The ovarian form was observed. **RESULTS:** Compared with normal control group, MVD of model group and treatment groups were all increased, while mRNA expression of AT1, AT2 and MAS were down-regulated ($P<0.05$); cystic sinus follicle, the decrease of granular cell layer, egg mother cells disappearance, the decrease of luteal tissue and other obvious pathological changes could be found in ovarian tissue of rats in model group. Compared with model group, above indexes of treatment groups were improved significantly, and the effects of Bushen huoxue huatan decoction low-dose and high-dose groups were better than that of positive control group ($P<0.05$). The pathological changes of ovarian tissue in treatment groups were all improved to certain extent. **CONCLUSIONS:** Bushen huoxue huatan decoction can improve ovarian blood supply, angiogenesis and ovulation in PCOS rats. It is beneficial to improve ovarian form.

KEYWORDS Bushen huoxue huatan decoction; Polycystic ovarian syndrome; Ovarian form; Ovarian blood supply; Rats

多囊卵巢综合征(PCOS)为育龄期妇女常见内分泌

Δ 基金项目:河南省教育厅科学技术研究重点项目(No. 13A360579);全国名老中医药专家传承工作室建设项目(No.[2014]-20号);河南中医学院博士启动基金(No.BSJJ2012-21)

* 讲师,博士。研究方向:生殖内分泌、不孕不育。电话:0371-60908726。E-mail:wangruijie021@163.com

疾病,是引起不孕的重要原因。据报道,PCOS的发生与肾素-血管紧张素系统有明显关联^[1]。PCOS患者多存在肾素-血管紧张素-雄激素级联亢进表现,笔者推测这可能与血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)、促黄体生成素(LH)水平上调有关。同时,PCOS患者还伴有卵巢及子宫供血障碍,

大部分可见卵巢血管内皮生长因子(VEGF)表达增强。

补肾活血化痰汤为河南中医药大学第二附属医院褚玉霞教授总结临床经验而得的验方,由菟丝子、丹参、熟地黄、仙灵脾、茯苓等11味中药材组成,具有化痰祛湿、温肾健脾、调经助孕之效^[2]。该方已被证实可改善PCOS患者卵巢局部纤溶状态、双向调节女性性腺轴、促进卵泡发育,同时还可促进卵巢组织修复及再生^[3],但其对卵巢血供和形态的影响及其具体作用机制尚未明确。基于此,本研究拟建立PCOS大鼠模型,并给予补肾活血化痰汤进行干预,采用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)法检测Ang II 1型受体(AT1)、2型受体(AT2)及G蛋白偶联受体MAS mRNA在PCOS模型大鼠卵巢组织的表达情况,采用原位杂交法测定PCOS模型大鼠卵巢VEGF mRNA表达,镜下观察大鼠卵巢微血管密度(MVD)及形态变化,旨在明确其对PCOS模型大鼠卵巢血管生成、血供及形态的影响及其相关机制。

1 材料

1.1 仪器

Uniwersal 32R型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);DVM5000 HD型高分辨显微镜(德国Leica公司);CX23型光学显微镜(日本Olympus公司);荧光定量PCR仪(美国应用生物系统公司)。

1.2 药品与试剂

补肾活血化痰汤(河南中医药大学第二临床医学院制剂室自制,批号:002345,规格:每1 mL含生药1 g);罗格列酮片(成都恒瑞制药有限公司,批号:030569,规格:4 mg/片);VEGF原位杂交试剂盒、链霉亲和素-生物素复合物(SABC)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:MK1142、SA1053);引物由上海生工生物工程有限公司提供;其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级SD大鼠50只,♀,鼠龄54~60 d,体质量170~210 g,由河南省实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCKX(豫)2010-0002]。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

实验前先将大鼠适应性喂养1周,饲养环境温度为(22±1)℃、湿度为(60±5)%、每小时通风换气20~22次、压力梯度设定为20~50 kPa,期间自由饮水,喂颗粒饲料。1周后,将50只大鼠随机分为5组,每组10只,分别为正常对照组、模型组、阳性对照组[罗格列酮,3 mg/(kg·d)^[4]]和补肾活血化痰汤低、高剂量组[5.0、7.5 g/(kg·d),根据体表面积法换算分别为人临床用量的10、15倍剂量]。除正常对照组外,其余各组大鼠均采用Poresky法^[5]复制PCOS模型,若发现大鼠血胰岛素、睾酮

(T)水平增加且阴道涂片检查持续出现角化细胞、失去动情周期,则视为造模成功^[6];造模期间正常对照组大鼠同时ig生理盐水[10 mL/(kg·d)]。造模后,各给药组大鼠ig相应药物溶液,正常对照组和模型组大鼠ig等体积生理盐水,每天1次,连续22 d。

2.2 卵巢形态观察及MVD测定

末次给药后,观察大鼠阴道涂片结果,动情间期内(参照宫颈黏液结晶法^[7]判断动情周期)禁食不禁水12 h,称质量,25%乌拉坦麻醉,断头处死,游离卵巢。卵巢以4%多聚甲醛固定15 min,常规石蜡包埋,制备10 μm切片,脱蜡、梯度乙醇脱水,苏木精染色5 min,自来水冲洗,乙醇分化30 s,自来水浸泡15 min,置伊红液内2 min,脱水透明后封片。光镜下观察卵巢形态特点,并选取切片组织5个微血管密集区,镜下观察微血管数目,取其均值表示MVD。

2.3 卵巢组织中VEGF mRNA水平测定

采用原位杂交法^[8]。配制杂交用液,清洗载玻片。取材,冰冻切片,4%多聚甲醛室温固定0.5~1.0 h,蒸馏水洗涤,无水甲醇、双氧水(H₂O₂)混合,暴露mRNA核酸片段,胃蛋白酶消化,固定、洗涤、预杂交后杂交。VEGF引物序列:上游为5'-GCTCTACCTCCACCATGC-CAAGTGGTCCCA-3',下游为5'-GCAGCTTGAGTTA-AACGAACGTACTTGCAGC-3',每张切片加20 μL预杂交液,恒温箱40℃预杂交3 h;吸弃多余液体,每张切片加20 μL VEGF寡核苷酸探针杂交液,恒温箱40℃杂交过夜;洗涤,滴加封闭液,然后依次滴加生物素化鼠抗地高辛、SABC、生物素化过氧化物酶,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯透明,封片。显微镜下观察,VEGF mRNA细胞浆着色呈棕黄色为阳性,无棕黄色反应为阴性,低倍镜下定位阳性细胞位置,高倍观察细胞形态、分布。图像采用BST-20-M全自动图像分析系统进行处理,以灰度值表示各组VEGF mRNA阳性信号强弱,灰度值越高,表明表达强度越高。

2.4 卵巢组织中AT1、AT2及MAS mRNA水平测定

采用荧光定量PCR法。提取样本总RNA,进行反转录,以反转录合成的cDNA为模板,严格参照试剂使用说明操作进行PCR扩增。AT1引物序列:上游为5'-AGTGTGCGCGTTTCATTATGAGTCT-3',下游为5'-TTAGCTGGTGAGAATGATAAGGAAAGG-3',产物长度为112 bp;AT2引物序列:上游为5'-GGATGCTCT-GACCTGGATGGG-3',下游为5'-GGAGCCAAGTAAT-GGGAACCTCTAAAC-3',产物长度为188 bp;MAS引物序列:上游为5'-CTGTGCGGCGGTTCATCATCTT-3',下游为5'-TGTTCTTCCGTATCTTACCACCAA-3',产物长度为104 bp;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物序列:上游为5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3',下游

为5'-GCTTCACCACCTTCTTGATGTC-3',产物长度为135 bp。反应体系:REALSYBR Minxture 10 μL,上、下游引物各0.4 μL,cDNA模板2 μL。热循环参数:95℃、10 min;95℃、15 s,60℃、20 s,72℃、27 s,40个循环;72℃、5 min。收集荧光信号,通过各基因与GAPDH相比计算分析最终获取RQ值($RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$)。

2.5 统计学方法

采用SPSS 19.0软件处理数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠卵巢形态观察结果

正常对照组大鼠卵巢卵泡结构清晰,可见黄体及不同发育卵泡,卵泡壁可见形态完整、排列紧密的多层颗粒细胞,卵泡膜呈梭形,膜-间质无增生。模型组大鼠卵巢可见囊性窦卵泡,窦腔扩大,颗粒细胞层减少、排列疏松,卵母细胞消失,黄体组织数量减少,伴黄素化,膜细胞增生明显。阳性对照组大鼠卵巢可见囊性窦卵泡,黄体数量多于模型组,颗粒细胞层增多、形态完整,但排列紊乱。补肾活血化瘀汤低剂量组大鼠卵巢组织可见少量囊性窦卵泡,窦腔缩小,黄体组织数量增多,颗粒细胞层增加、细胞形态完整,但排列有些许紊乱。补肾活血化瘀汤高剂量组大鼠卵巢组织可见少量囊性窦卵泡,窦腔小,黄体数量少于正常对照组,颗粒细胞层增厚、形态完整、排列紧密。各组大鼠卵巢组织切片图见图1。

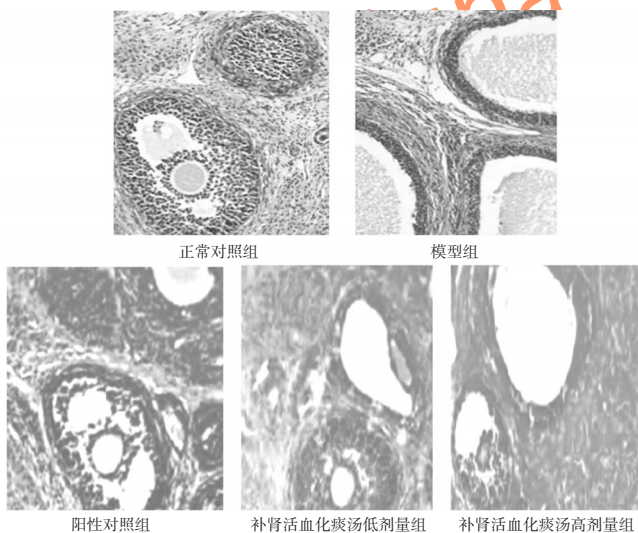


图1 各组大鼠卵巢组织切片图(HE染色,×100)

Fig 1 Sections of ovarian tissue of rats in each group (HE staining,×100)

3.2 各组大鼠卵巢组织中VEGF mRNA水平及MVD测定结果

与正常对照组比较,模型组及各给药组大鼠卵巢组织中VEGF mRNA表达均显著增强、MVD均显著升高

($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠卵巢组织中VEGF mRNA表达均显著减弱,MVD均显著降低;其中,补肾活血化瘀汤低、高剂量组作用优于阳性对照组($P < 0.05$),补肾活血化瘀汤高剂量组作用略高于低剂量组($P > 0.05$)。各组大鼠卵巢组织中VEGF mRNA水平及MVD测定结果见表1。

表1 各组大鼠卵巢组织中VEGF mRNA水平及MVD测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 mRNA level of VEGF and MVD in ovarian tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	VEGF mRNA	MVD
正常对照组	110.36 ± 4.51	6.015 ± 2.214
模型组	178.52 ± 6.05*	15.865 ± 4.322*
阳性对照组	141.26 ± 5.87**	11.231 ± 1.273**
补肾活血化瘀汤低剂量组	124.74 ± 7.26*** ^Δ	7.654 ± 1.167*** ^Δ
补肾活血化瘀汤高剂量组	126.52 ± 6.05*** ^Δ	7.711 ± 1.264*** ^Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.05$;与阳性对照组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. model group, ** $P < 0.05$; vs. positive control group, ^Δ $P < 0.05$

3.3 各组大鼠卵巢组织中AT1、AT2及MAS mRNA水平测定结果

与正常对照组比较,模型组和各给药组大鼠卵巢组织AT1、AT2、MAS mRNA表达均显著减弱($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠上述指标表达均显著增强;其中,补肾活血化瘀汤高、低剂量组作用优于阳性对照组($P < 0.05$),补肾活血化瘀汤高剂量组作用略高于低剂量组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠卵巢组织AT1、AT2及MAS mRNA水平测定结果见表2。

表2 各组大鼠卵巢组织AT1、AT2及MAS mRNA水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 mRNA level of AT1, AT2 and MAS in ovarian tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	AT1 mRNA	AT2 mRNA	MAS mRNA
正常对照组	0.861 ± 0.122	0.855 ± 0.167	0.711 ± 0.297
模型组	0.433 ± 0.211*	0.534 ± 0.178*	0.332 ± 0.269*
阳性对照组	0.526 ± 0.048**	0.601 ± 0.074**	0.498 ± 0.147**
补肾活血化瘀汤低剂量组	0.689 ± 0.014*** ^Δ	0.741 ± 0.026*** ^Δ	0.668 ± 0.036*** ^Δ
补肾活血化瘀汤高剂量组	0.692 ± 0.017*** ^Δ	0.743 ± 0.029*** ^Δ	0.671 ± 0.034*** ^Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.05$;与阳性对照组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. model group, ** $P < 0.05$; vs. positive control group, ^Δ $P < 0.05$

4 讨论

近年来,血管生成、供血等在卵巢周期调节中的作用引起了相关研究者的关注。血管生成成为正常周期性卵巢的重要功能,卵巢生长、黄体形成均依赖于毛细血管增生,而黄体细胞对胆固醇合成孕酮有关键作用,且卵巢优势卵泡选择同样与血管生成密切相关。卵巢组

织血管生成因子不仅调控血管生成,而且还具有内分泌功能,其释放及合成的自身激素可与细胞受体结合,促进卵泡发育。

唐智华等^[9]认为,囊泡及间质血管生成增多是引起PCOS患者排卵障碍或无排卵的重要原因,而VEGF与血管增殖、生成密切相关。VEGF为血管通透因子,有高渗透作用,可促进雄性激素分泌,导致卵巢间质增生。正常育龄期女性黄体、卵泡细胞内均有VEGF表达。卵巢发育过程中,窦状卵泡、原始卵泡均无独立毛细血管网,其营养提供来源于附近间质血管,VEGF可通过血供建立、毛细血管生成、毛细血管通透性等方面影响及参与卵泡发育、成熟及排卵过程。研究发现,排卵前VEGF mRNA转录增加,同时可与前列腺素发挥协同作用,从而提高微血管通透性,促进胶原酶、纤维原激活物活化,引起排卵过程中卵泡壁破裂,最终导致PCOS的发生^[10]。目前,已有报道指出,VEGF可通过自分泌或旁分泌等途径调控卵巢血管生成过程,且PCOS患者血清、卵巢组织中VEGF mRNA表达均高于正常育龄妇女^[11]。本研究发现,PCOS模型大鼠卵巢组织中VEGF mRNA表达也增强,与上述报道相符;而给药后,各给药组大鼠卵巢组织中VEGF mRNA表达均减弱。

RAS为激素调节系统,血管紧张素转化酶-Ang II-血管紧张素受体则为RAS系统代谢的关键途径,其中AT1参与血管平滑肌增殖、血管形成、血管收缩调节,AT2受体参与细胞凋亡与生长。前者表达于卵巢间质细胞,后者则主要存在于闭锁卵泡颗粒细胞。排卵前卵泡颗粒细胞中AT2水平较高,且随卵泡直径、质量的上升而增高。AT2存在于各阶段卵泡颗粒细胞,调控雌激素合成^[12]。MAS则定位于膜细胞、粒细胞内,随月经周期的变化其表达水平发生改变,在性激素合成、卵母细胞成熟等方面有重要作用。本研究结果显示,PCOS模型大鼠卵巢组织AT1、AT2、MAS mRNA表达均减弱;给药后,PCOS模型大鼠卵巢组织AT1、AT2、MAS mRNA基因表达均增强,表明中药补肾活血化瘀汤对卵巢血供具有一定的调节作用。

罗格列酮可通过直接或间接作用于垂体胰岛素受体,促排卵、减少卵巢颗粒细胞凋亡、改善卵巢组织形态及血供^[13],故本文选其为阳性对照药物。本研究发现,罗格列酮虽可改善PCOS大鼠卵巢组织血供及血管生成,有一定的促排卵作用,但药效不及补肾活血化瘀汤显著。可见,补肾活血化瘀汤可改善PCOS大鼠卵巢组织血管生成情况,促进排卵,有助于改善卵巢形态。

参考文献

- [1] Abramovich D, Irusta G, Bas D, *et al*. Angiopoietins/TIE2 system and VEGF are involved in ovarian function in a DHEA rat model of polycystic ovary syndrome[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(7):3446-3456.
- [2] 褚玉霞,史莲花,韩宁.褚玉霞教授治疗多囊卵巢综合征经验[J].*四川中医*, 2004, 22(1):1-3.
- [3] 刘昕媛,谭丽.补肾祛瘀汤治疗PCOS患者的疗效及对激素水平的影响[J].*中药材*, 2016, 39(4):911-913.
- [4] 苗竹林,韦相才,程龙球,等. TGF- β_1 及CTGF在PCOS大鼠的表达及罗格列酮的干预作用[J].*现代妇产科进展*, 2010, 19(9):676-679,683.
- [5] Krentz AJ, Von Mühlen D, Barrett-Connor E, *et al*. Adipocytokine profiles in a putative novel postmenopausal polycystic ovary syndrome (PCOS) phenotype parallel those in premenopausal PCOS: the Rancho Bernardo study[J]. *Metabolism*, 2012, 61(9):1238-1241.
- [6] 曾蕾,赵红艳,罗颂平.改良PCOS-IR大鼠模型的设计与实验[J].*中华中医药杂志*, 2010, 25(12):2341-2345.
- [7] 李靖,李炫诚,吴云霞,等.确定小鼠动情周期的三种方法[J].*实验动物科学*, 2007, 24(3):63-64.
- [8] 韩影,刁文卓,陈萍,等.荧光原位杂交技术检测非小细胞肺癌EGFR基因状态及与VEGF、D2-40、Ki-67表达相关性临床意义研究[J].*中国实验诊断学*, 2014, 18(12):1926-1928.
- [9] 唐智华,杨雪峰.多囊卵巢综合征患者着床窗口期子宫内膜VEGF、MIF的表达及意义[J].*中国妇幼保健*, 2011, 26(5):737-739.
- [10] Amato MC, Guarotta V, Forti D, *et al*. Metabolically healthy polycystic ovary syndrome (MH-PCOS) and metabolically unhealthy polycystic ovary syndrome (MU-PCOS): a comparative analysis of four simple methods useful for metabolic assessment[J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(7):1919-1928.
- [11] 郑建淮,艾红,曹缙孙,等.多囊卵巢综合征患者肾素-血管紧张素与子宫卵巢血流动力学的相关性[J].*西安交通大学学报(医学版)*, 2004, 25(5):478-480.
- [12] 潘爱珍,陈克芳,侯祥平,等.苍附导痰汤对肥胖型多囊卵巢综合征模型大鼠子宫内膜及卵巢中oatp4a1表达与性激素水平的影响[J].*中国药房*, 2015, 26(25):3473-3476.
- [13] 王宁,卢雪玲,谢自敬,等.盐酸二甲双胍联合罗格列酮治疗多囊卵巢综合征的疗效观察[J].*中国糖尿病杂志*, 2012, 20(2):99-101.

(收稿日期:2016-05-04 修回日期:2016-12-09)

(编辑:林 静)