

坤泰胶囊对卵巢早衰大鼠的治疗作用及其机制研究

徐文君¹, 高 慧², 李 杨³, 梁 策¹, 李欣捧¹, 张 飒¹, 崔亚萌¹

1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000

2. 承德医学院附属医院, 河北 承德 067000

3. 石家庄市妇幼保健院, 河北 石家庄 050000

摘要: **目的** 观察坤泰胶囊对卵巢早衰模型大鼠的治疗作用, 并初步探讨其作用机制。**方法** 将 40 只 SD 雌性大鼠随机分为 4 组: 对照组、模型组、坤泰胶囊组、结合雌激素片组, 除对照组外, ig 75 mg/kg 雷公藤多苷片制备卵巢早衰模型。造模结束后, 坤泰胶囊和结合雌激素片组分别以 0.6、0.625 g/kg 剂量 ig 给药, 连续给药 36 d。HE 染色观察卵巢形态并进行卵泡计数; 采用酶联免疫吸附 (Elisa) 法检测卵泡刺激素 (FSH)、黄体生成素 (LH)、血清雌二醇 (E_2)、及抗缪勒管激素 (AMH) 水平; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测卵巢组织中血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) mRNA 的表达变化。**结果** 与对照组比较, 模型组卵巢内的始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡数目明显减少, 闭锁卵泡数目明显增多 ($P < 0.05$); E_2 、AMH 水平明显降低 ($P < 0.05$), FSH、LH 水平明显升高 ($P < 0.05$); VEGF、bFGF mRNA 水平均明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 坤泰胶囊组卵巢内的始基卵泡、窦状卵泡、窦前卵泡数目明显增多, 闭锁卵泡数目明显减少 ($P < 0.05$); E_2 、AMH 水平明显升高 ($P < 0.05$), FSH、LH 水平明显降低 ($P < 0.05$); VEGF、bFGF mRNA 水平均明显升高 ($P < 0.05$)。**结论** 坤泰胶囊通过调节激素水平及上调 VEGF、bFGF mRNA 表达, 修复受损的卵巢组织, 促进卵泡的生长发育, 从而抑制卵泡过早耗竭。

关键词: 坤泰胶囊; 卵巢早衰; 雌二醇; 卵泡刺激素; 黄体生成素; 抗缪勒管激素; 血管内皮生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)03-0314-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.03.005

Effect and mechanism of Kuntai Capsule on premature ovarian failure in rats

XU Wen-jun¹, GAO Hui², LI Yang³, LIANG Ce¹, LI Xin-peng¹, ZHANG Sa¹, CUI Ya-meng¹

1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China;

2. Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, China

3. Shijiazhuang Maternal and Child Health Care Hospital, Shijiazhuang, 050000, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of Kuntai Capsule (KC) on premature ovarian failure in rats. **Methods** Totally 40 SD female rats were randomly divided into four groups: control group, model group, Kuntai Capsule (KC) group and conjugated estrogens tablets (CET) group. The premature ovarian failure model in rats was made by ig administration of 75 mg/kg tripterygium. After the model was established, rats were continually treated with 0.6 and 0.625 g/kg of KC and CET respectively by ig administration for 36 d. HE staining was used to observe the morphology of ovary and count the number of follicle. The enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) method was used for the detection of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), serum estradiol (E_2), and anti-Mueller tube hormone (AMH) level. The real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) method was used to detect the mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). **Results** Compared with control group, the number of primordial follicles, preantral follicles and antral

收稿日期: 2016-12-15

基金项目: 国家中医药管理局高慧全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (2015048157); 河北省中医药管理局中医药类科研计划课题 (2016068); 河北省省级重大医学科研项目 (zyzd2013018); 河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目 (2014571024)

作者简介: 徐文君, 女, 河北廊坊人, 在读研究生, 研究方向为中医妇科学。E-mail: 983972293@qq.com

***通信作者** 高 慧, 女, 湖南益阳人, 博士后, 硕导, 教授, 全国名老中医药专家学术继承指导老师。E-mail: gaohuibcd@163.com

follicles were significantly reduced, the number of atretic follicles was increased ($P < 0.05$), E_2 and AMH significantly decreased ($P < 0.05$), FSH and LH levels increased significantly ($P < 0.05$), and the levels of VEGF and bFGF mRNA in model group were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the number of primordial follicles, preantral follicles, and antral follicles were significantly increased, the number of atretic follicles was significantly reduced ($P < 0.05$), E_2 and AMH significantly increased ($P < 0.05$), FSH and LH levels significantly decreased ($P < 0.05$), and the levels of VEGF and bFGF mRNA in KC group were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** By regulating the level of hormone and up-regulating the expression of VEGF and bFGF, KC can repair the damaged ovarian tissue and promote the growth and development of the follicle, so as to inhibit the premature exhaustion of mRNA.

keyword: Kuntai Capsule; premature ovarian failure; serum estradiol; follicle stimulating hormone; luteinizing hormone; anti-Mueller tube hormone; vascular endothelial growth factor; basic fibroblast growth factor

卵巢早衰是指女性40岁以前出现闭经、低雌激素和高促性腺激素的现象,临床上多伴随心烦易怒、烘热汗出等围绝经期现象,已成为妇科领域常见的内分泌疾病。近年来,卵巢早衰的发生已经呈低龄化趋势,且发病率逐年升高。目前,西医对本病因还有一部分尚未明确,治疗上多以激素疗法为主,但激素治疗带来的副作用,增加靶器官癌的不确定性,患者不易承受,临床上依从性较差。坤泰胶囊服用简便,主要成份为熟地、黄连、白芍、阿胶、黄芪、茯苓,共同起滋阴降火、滋肾养肝、养心安神、调节阴阳平衡的作用^[1]。本研究观察坤泰胶囊对卵巢早衰模型大鼠的治疗作用及机制,为临床使用本药提供依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

健康雌性SD大鼠60只,体质量220~250 g,清洁级,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号SCXK(京)2014-0004。饲料同为北京华阜康药业提供的大鼠饲料,饮水为双蒸水,动物饲养自然光照好,清洁级实验室内。

1.2 实验药品及试剂

雷公藤多苷片,每片10 mg,远大医药黄石飞云制药有限公司提供,产品批号20150617;坤泰胶囊,每粒0.5 g,由贵州新天药业股份有限公司提供,产品批号20150534;结合雌激素片,新疆新资源生物制药有限公司,产品批号20150608。

大鼠的促卵泡雌激素(FSH)、雌二醇(E_2)、促黄体生成素(LH)、抗缪勒管激素(AMH)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒,购自上海联科生物技术有限公司;血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、GAPDH引物,购自美Invitrogen公司;Trizol法RNA提取试剂,购自天根生化科技(北京)有限公司;DL 2 000 DNA

Marker, 购自TaKaRa(宝生物)公司。

1.3 主要仪器

Multiskan MK3酶标仪,购自芬兰Thermo公司;荧光定量PCR仪,购自Applied Biosystems公司。

2 方法

2.1 实验对象筛选

适应性喂养4 d后,对大鼠进行阴道脱落细胞学涂片,连续7 d光镜下观察,筛选出动情周期正常的40只健康雌性大鼠进入正式实验。

2.2 卵巢早衰模型的制备

将雷公藤多苷片研碎加入双蒸水配制,除对照组外,每周称动物体质量,每天ig给予75 mg/kg雷公藤多苷片水溶液,连续14 d,制备卵巢早衰模型。造模结束后观察大鼠是否出现弓背、蜷缩、脱毛、行动缓慢、体质量下降等现象;每天行阴道涂片实验,连续两个性周期,观察动情周期的变化,动情周期紊乱提示造模成功,进一步检测血清性激素水平,也可提示造模成功。

2.3 动物分组及给药

将30只卵巢早衰模型大鼠随机分为模型组、坤泰胶囊组、结合雌激素片组,将坤泰胶囊成品粉末与等体积双蒸水混合后,0.6 g/kg ig给药,给药剂量为临床等效剂量;结合雌激素片配制方法与雷公藤多苷片相同,给药剂量为0.625 g/kg;ig体积均为1 mL/100 g,每天给药1次,连续给药36 d。另取10只健康雌性大鼠作为对照组,对照组与模型组给予等体积的双蒸水。

2.4 取材

给药结束后,大鼠麻醉后腹主动脉取血,3 000 r/min离心10 min,吸取上层血清;剖腹取子宫、卵巢。一部分用多聚甲醛固定,梯度酒精脱水后,浸蜡,包埋;一部分装在高压过的EP管里,−80 °C冰箱保存待测。

2.5 各级卵泡数目检测

实验结束后,摘取大鼠卵巢,称湿质量后,将卵巢标本固定、包埋、切片,HE染色后,光镜观察卵巢形态,并计算每组各10张切片各级卵泡数。

2.6 血清性激素水平的检测

采用Elisa法检测血清中FSH、LH、E₂、AMH水平,实验步骤按照试剂说明书进行操作,在Multiskan MK3酶标仪上,450 nm波长测量各孔吸光度(A)值。

2.7 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测卵巢中VEGF、bFGF mRNA表达

提取总RNA:把组织放入已预冷的研钵中进行研磨,待组织样本成粉末状后:①加入Trizol,室温保存5 min;②加氯仿0.2 mL,用力振荡离心管,充分混匀,室温下放置5~10 min;③12 000 r/min高速离心15 min后吸取上层水相(吸70%)到另一新离心管中,注意不要吸到两层水相之间的蛋白质;④12 000 r/min高速离心15 min后小心弃掉上清

液,加入DEPC乙醇洗涤沉淀,4 ℃ 12 000 r/min高速离心5 min;加入DEPC处理过的水溶解沉淀;估算RNA浓度和纯度,并用变性琼脂凝胶电泳鉴定总RNA完整性。

VEGF、bFGF mRNA表达水平的检测:①基因引物由北京Invitrogen公司设计合成。引物序列见表1。②qRT-PCR反应:取各组卵巢总RNA各1 μg分别逆转录合成cDNA,Real-time PCR法检测卵巢组织VEGF、bFGF mRNA的相对含量,结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。反应体系为:上游引物,0.5 μL;下游引物,0.5 μL;2×Master Mix,10 μL;每孔加入对应的cDNA 2 μL;加ddH₂O补足至20 μL。将上述96-PCR板放置于Real-time PCR仪上进行反应,按照如下程序进行:95 ℃、30 s,40个PCR循环(95 ℃、5 s,60 ℃、40 s)。为了建立PCR产物的熔解曲线,扩增反应结束后,按如下程序进行:95 ℃、10 s,60 ℃、60 s,95 ℃、15 s;并从60 ℃缓慢加热到99 ℃。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称		引物序列(5'-3')	产物大小/bp
VEGF	上游引物	CAAAGCCAGCACATAGGAGAGAT	133
	下游引物	TTTTTGCAGGAACATTACACGTC	
bFGF	上游引物	AAGGAAGATGGACGGCTGCT	115
	下游引物	TACCAACTGGAGTATTCCGTGAC	
GAPDH	上游引物	CCTTCCGTGTTCTACCCC	131
	下游引物	GCCCAGGATGCCCTTAGTG	

2.8 统计学方法

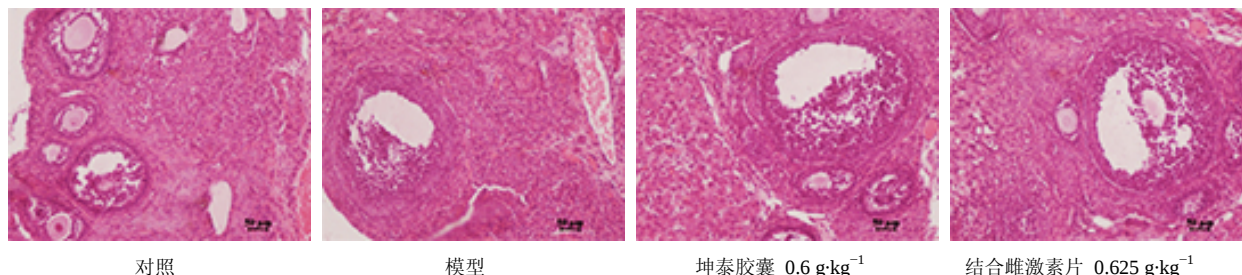
所得数据使用SPSS 21.0进行分析,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间用单因素方差进行分析。

3 结果

3.1 各组大鼠卵巢内各级卵泡数目比较

对照组卵泡体积明显较大,可见初级卵泡、生

长卵泡和成熟卵泡生长活跃,卵泡颗粒层数多且发育良好;模型组大鼠卵巢体积萎缩,各级卵泡数目减少,卵泡颗粒层数少;坤泰胶囊组卵泡发育明显好于模型组,各级卵泡数目增多,且卵泡颗粒层数增多;结合雌激素片组卵泡发育较好,接近对照组。



对照

模型

坤泰胶囊 0.6 g·kg⁻¹

结合雌激素片 0.625 g·kg⁻¹

图1 光镜下观察卵巢组织形态学的变化(HE染色)

Fig. 1 Morphological changes of ovary observed under light microscope (HE staining)

与对照组比较,模型组卵巢内的始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡数目明显减少,闭锁卵泡数目显著增多 ($P<0.05$);与模型组比较,坤泰胶囊

组和结合雌激素片组卵巢内的始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡数目显著增多,闭锁卵泡数目显著减少 ($P<0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠卵巢内各级卵泡数目比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Comparison on number of follicles in ovary of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	始基卵泡/个	窦前卵泡/个	窦状卵泡/个	闭锁卵泡/个
对照	—	9.23±2.56	8.01±2.12	5.62±1.44	5.21±1.80
模型	—	7.26±1.37*	6.27±1.06*	3.21±1.02*	9.89±2.13*
坤泰胶囊	0.6	8.08±2.21*#	7.28±1.78*#	4.38±1.29*#	7.67±2.12*#
结合雌激素片	0.625	8.73±1.38#	7.68±1.17#	4.89±1.09#	8.01±2.31#

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group

3.2 血清 FSH、LH、E₂、AMH 水平的测定

与对照组比较,模型组血清中 FSH、LH 值水平明显增高, E₂、AMH 水平显著下降 ($P<0.05$);与模型组比较,坤泰胶囊组和结合雌激素片组血清 FSH、LH 水平明显降低, E₂、AMH 水平显著升高,差异显著 ($P<0.01$),表明坤泰胶囊可通过调节血清 FSH、LH、E₂、AMH 的水平,改善激素水平,

防止卵泡过快过早的耗尽。见表3。

3.3 大鼠卵巢 VEGF、bFGF mRNA 的表达

与对照组比较,模型组卵巢 VEGF、bFGF mRNA 的表达显著降低 ($P<0.05$);与模型组比较,坤泰胶囊组卵巢 VEGF、bFGF mRNA 的表达显著升高 ($P<0.05$),说明坤泰胶囊有修复并促进受损卵巢新生血管生成的作用。见表4。

表3 坤泰胶囊对大鼠血清 FSH、LH、E₂、AMH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effects of KC on FSH, LH, E₂, and AMH in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	FSH/(IU·L ⁻¹)	LH/(ng·L ⁻¹)	E ₂ /(ng·L ⁻¹)	AMH/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	16.926±1.031	21.263±0.7641	97.117±1.565	297.417±23.376
模型	—	33.389±0.900*	41.761±0.951*	55.661±1.892*	142.715±17.894*
坤泰胶囊	0.6	26.383±0.962*#	27.762±0.947*#	88.322±1.109*#	228.622±27.128*#
结合雌激素片	0.625	17.625±0.418#	22.400±1.017#	93.961±2.097*#	280.755±24.471#

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group

表4 大鼠卵巢 VEGF 和 bFGF mRNA 的相对表达 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Relative expression of VEGF and bFGF mRNA in rat ovary ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	VEGF/GAPDH	bFGF/GAPDH
对照	—	1.0011±0.0484	1.0110±0.0584
模型	—	0.1469±0.0247*	0.0107±0.0691*
坤泰胶囊	0.6	0.5697±0.0143*#	0.3435±0.0127*#
结合雌激素片	0.625	0.9969±0.0371#	0.9606±0.0346#

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group

4 讨论

高慧教授在临床观察中发现,使用雷公藤药物制剂治疗类风湿性关节炎、肾炎等疾病时,可引起女性月经不调及闭经等症状,因此怀疑雷公藤多苷片可损伤卵巢功能。首创使用雷公藤药物制剂制备

SD 大鼠卵巢早衰模型^[2]。本实验在造模后取材发现,模型组子宫、卵巢明显萎缩,光镜下观察各级卵泡有明显差异,模型组闭锁卵泡明显增多。性激素检测显示,模型组 FSH、LH 血清水平明显升高, E₂、AMH 水平明显降低,提示造模成功。FSH 是

检测卵巢早衰的最重要指标,也用来判断损伤程度^[3]。卵巢早衰患者由于体内性激素水平低下,可引起脂质代谢紊乱,极易导致高脂血症、动脉粥样硬化、冠状动脉性心脏病等,因此对卵巢早衰的治疗已涉及到预防保健的范畴^[4]。卵巢早衰的发病是一种渐进性过程,从卵巢储备功能下降到卵巢功能衰竭需要1~6年^[5]。本课题在此基础上,观察坤泰胶囊对卵巢早衰的治疗效果。

卵巢早衰的发病原因主要是原始卵泡储备过少,卵泡闭锁或者耗竭太快。卵巢血流是维持卵泡生长、类固醇激素分泌及卵泡对促性腺激素敏感性的重要因素^[6],VEGF、bFGF为血管内皮生长因子,可修复受损卵泡,改善受损卵巢血管通透性,尤其可以特异性的促进类固醇激素生成器官的细胞增殖存活和趋化^[7],促进新生血管生成。

光镜下计算各级卵泡结果显示,与对照组比较,模型组与坤泰胶囊组卵巢内的始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡数目明显减少,闭锁卵泡数目明显增多($P<0.05$);与模型组比较,坤泰胶囊组卵巢内的始基卵泡、窦状卵泡、窦前卵泡数目明显增多,闭锁卵泡数目明显减少($P<0.05$);说明使用坤泰胶囊后各级卵泡生长均有改善,坤泰胶囊有促进卵泡生长的作用。坤泰胶囊组 E_2 、AMH水平明显升高($P<0.05$),FSH、LH水平明显降低($P<0.05$),提示坤泰胶囊能提高血清中 E_2 、AMH水平,降低FSH、LH水平,改善卵巢功能。qRT-PCR结果显示,模型组中VEGF、bFGF的表达明显减少($P<0.05$),说明卵巢内血流减少,卵泡减少,血管受损;ig坤泰胶囊后VEGF、bFGF表达明显升高($P<0.05$),说明坤泰胶囊可保护血管内皮细胞,使卵巢内血液运行通畅,提高卵巢储备能力,防治卵巢早衰。

卵巢早衰是妇科常见的内分泌疾病,西医治疗主要结合实验室检查及患者临床表现给予激素替代疗法,此疗法可恢复月经规律,促进生殖器官发育,但长时间用药会导致各种不良反应的发生,增加其他疾病的患病率。而中成药治疗具有良好的调节作用,也无长期使用激素的副作用,为卵巢早衰的治疗提供新的治法^[8]。坤泰胶囊主要成分为熟地黄、白芍、阿胶、茯苓、黄芩、黄连等六味中药组成。其中熟地黄为君药,滋阴养血、补肾、生精益髓;

黄连、白芍、阿胶为臣药,黄连清虚火、清心除烦,与熟地黄配伍,滋阴降火、交通心肾;白芍、阿胶补血养阴,补而不滞,养阴不腻,且能收敛精气,固摄元气;黄芩、茯苓为佐药,黄芩清热泻火,茯苓健脾益气、安神,以上6味中药合用,起到滋阴养血、补精益髓、安神除烦、交通心肾、调节阴阳平衡的作用^[9-10],上调VEGF、bFGF mRNA的表达,促进卵泡发育,改善受损卵巢。

实验证明,坤泰胶囊具有治疗卵巢早衰的作用,通过调节激素水平及上调VEGF、bFGF mRNA的表达,减轻雷公藤多苷片对卵巢功能造成的损害,延缓或阻遏卵巢早衰,促进卵泡发育,改善卵巢功能。

参考文献

- [1] 高 慧,徐文君,李 杨,等.坤泰胶囊治疗卵巢早衰的研究进展 [J].现代药物与临床,2016,31(8):1309-1312.
- [2] 梁 策,高 慧,刘玉兰,等.坤泰胶囊改善卵巢早衰的毒理及临床研究进展 [J].药物评价研究,2016,39(4):673-676.
- [3] 张丽娟,陶仕英.细胞凋亡途径探讨二仙汤治疗大鼠卵巢早衰实验研究 [J].世界科学技术-中医药现代化中医研究.2015,17(4):812-817.
- [4] 刘梅云.坤泰胶囊治疗卵巢储备功能下降及卵巢早衰的临床研究 [D].保定:河北大学,2014:1-20.
- [5] 陈 玓.“治未病”思想在卵巢储备功能减退中的应用体会 [J].湖北中医药大学学报,2016,18(1):46-48.
- [6] Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Tziotis J, et al. Circulating angiogenic factors during periovulation and the luteal phase of normal menstrual cycles [J]. Fertil Steril, 2004, 81(5): 1322-1327.
- [7] Keramidas M, Faudot C, Cibiel A, et al. Mitogenic functions of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bombesin-like peptide 8 on steroidogenic adrenocortical cells [J]. Endocrinol, 2008, 196(3): 473-482.
- [8] 王玉洁,宁 琳.四物合剂联合坤泰胶囊治疗卵巢储备功能下降及卵巢早衰的临床观察 [J].中国医学创新,2014,11(10):118-119.
- [9] 王 玮,张 云.坤泰胶囊对SD大鼠生育力和早起胚胎毒性的研究 [J].中成药,2012,34(10):1869-1873.
- [10] 史党民,孙国珍.坤泰胶囊治疗女性更年期失眠伴有焦虑及抑郁的临床观察 [J].中草药,2013,44(24):3531-3533.