

坤泰胶囊对卵巢储备功能低下大鼠的治疗作用及对卵巢 GDF-9、Egr-1 表达的影响

崔亚萌¹, 高 慧^{2*}, 徐文君¹, 张 飒¹, 李欣捧¹

1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000

2. 承德医学院附属医院中医科, 河北 承德 067000

摘要: **目的** 探讨坤泰胶囊对注射用环磷酰胺致卵巢储备功能低下大鼠的治疗作用及机制。**方法** 将 60 只 12 周龄 SD 雌性大鼠随机分为对照组、模型组和坤泰胶囊高、中、低剂量 (1.2、0.6、0.3 g/kg) 组、结合雌激素片组, ip 注射用环磷酰胺建立卵巢储备功能低下大鼠模型, 各给药组于造模 14 d 后分别 ig 给药, 连续给药 36 d。观察大鼠一般状态、体质量改变, 定期行阴道涂片观察大鼠动情周期的变化; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测大鼠血清性激素抗穆勒管激素 (AMH)、卵泡刺激素 (FSH)、黄体生成激素 (LH)、雌二醇 (E₂) 水平变化; 光镜下观察卵巢形态与卵泡数; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测大鼠卵巢生长分化因子 9 (GDF-9)、早期生长反应因子 1 (Egr-1) mRNA 表达水平的变化; 免疫组化法检测大鼠卵巢 GDF-9、Egr-1 蛋白表达水平的变化。**结果** 与模型组比较, 坤泰胶囊组大鼠精神逐渐好转, 饮食恢复正常, 毛色有光泽, 大便色深; 体质量渐增, 差异显著 ($P<0.05$); 动情周期紊乱得到明显改善 ($P<0.05$); 卵巢存在成熟卵泡, 卵泡腔内卵子生长良好; 大鼠血清 FSH、LH 水平明显降低, E₂、AMH 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); GDF-9、Egr-1 蛋白及基因表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 且作用均呈剂量相关性, 高剂量组治疗效果与结合雌激素片无明显差距。**结论** 坤泰胶囊能够修复大鼠受损的卵巢组织结构, 提高成熟卵泡存在数量, 改善大鼠动情周期及激素水平, 机制可能与增加 GDF-9、Egr-1 表达相关。**关键词:** 卵巢储备功能低下; 坤泰胶囊; 结合雌激素片; 生长分化因子 9 (GDF-9); 早期生长反应因子 1 (Egr-1); 注射用环磷酰胺

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2018) 05- 0780 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.05.011

Effects of Kuntai Capsules on expression of ovarian GDF-9 and egr-1 in rats with diminished ovarian reserve

CUI Yameng¹, GAO Hui², XU Wenjun¹, ZHANG Sa¹, LI Xinpeng¹

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

2. Chengde medical University, Chengde 067000, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic effects and mechanism of Kuntai Capsules on ovarian reserve dysfunction in rats induced by cyclophosphamide injection. **Methods** The 60 12-week-old SD female rats were randomly divided into control group, model group, Kuntai Capsules high, middle, and low dose (1.2, 0.6, and 0.3 g/kg) groups, and estrogen group. Cyclophosphamide peritoneal injection was used to establish the model of ovarian reserve dysfunction. Rats in each drug group were ig administrated successively for 36 d after 14 d of modeling. During the experiment, the behavior and the changes of body mass of rats were observed. Regular vaginal smear was done to observe the changes of estrus cycle in rats. Serum sex hormone levels changes of antimullerian hormone (AMH), and follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and Estradiol (E₂) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ovary morphology and follicular number were observed under light microscope. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the changes in mRNA expression levels of growth differentiation factor 9 (GDF-9) and early growth response gene 1 (Egr-1) in rats. The expression levels of GDF-9 and Egr-1

收稿日期: 2018-01-21

基金项目: 河北省中医药管理局中医药类科研计划课题 (2016068); 国家中医药管理局全国名老中医药专家高慧传承工作室建设项目 (2015048157); 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)。

第一作者: 崔亚萌, 1990—, 女, 河北邯郸人, 华北理工在读硕士, 主要从事中医妇科研究 E-mail: 1668133970@qq.com。

***通信作者:** 高 慧, 博士后, 博士生导师, 第 5 批、第 6 批全国老中医药专家学术继承指导老师 E-mail: gaohuibcd@163.com

in rats were measured by immunohistochemistry. **Results** Compared with the model group, the spirit of the rats in the Kuntai Capsules group gradually improved, the diet was restored to normal, the hair color was luster, the color of the stool was deep, the body mass was increasing, the difference was significant ($P < 0.05$); The disorder of the estrous cycle was obviously improved ($P < 0.05$); The ovary had mature follicles and the follicles grew well in the follicle cavity; The level of FSH and LH in the serum of rats decreased significantly, the level of E_2 and AMH increased significantly ($P < 0.05$), and the expression of GDF-9, Egr-1 protein and gene increased significantly ($P < 0.05$), and the effect was in a dose-dependent manner. There were no significant therapeutic effects between Kuntai Capsules high dose group and Conjugated Estrogens Tablets group. **Conclusion** Kuntai Capsules could repair damaged ovarian tissue of rats structure, increase the number of mature follicles, and improve estrous cycle and hormone level in rats, which may be related to the increased expression of GDF-9 and Egr-1.

Key words: diminished ovarian reserve; Kuntai Capsules; Conjugated Estrogens Tablets; GDF-9; Egr-1; cyclophosphamide for injection

下丘脑-垂体-卵巢轴是女性生殖内分泌的重要组成部分。卵巢可以周期性地产生并排出卵泡,分泌雌孕等激素,以维持女性正常的月经卵巢和妊娠,卵巢的大小与年龄和产卵期有关。卵巢储备功能(Ovarian Reserve, OR)是指卵巢内库存的卵泡数量和质量^[1],潜在反映女性的生育能力。卵巢产生卵泡的能力下降,卵母细胞质量下降,从而导致生育能力降低,称为卵巢储备功能低下(Decreasing ovarian Reserve, DOR)。临床上常以早卵泡期的血清卵泡刺激素(FSH)水平在10 U/L以上或两侧窦卵泡数(AFC)小于5个为诊断指标^[2]。卵巢储备功能低下是一个渐进性的过程,从卵巢储备功能低下到卵巢功能衰竭需要1~6年的时间^[3],所以一旦出现相应的卵巢储备功能低下的症状,应及早查明病因,对症干预治疗,延缓其进入卵巢早衰,这对女性卵巢功能具有重大意义。

化疗是导致卵巢储备功能低下的常见医源性因素之一。其中环磷酰胺是影响卵巢功能最大的化疗药物之一^[4],临床上常用于治疗各种恶性肿瘤及系统性红斑狼疮、慢性肾病等自身免疫性疾病^[5]。有研究显示^[6],环磷酰胺在治疗疾病过程中,可导致女性月经周期紊乱、月经量少、月经后错、闭经甚至不孕等。环磷酰胺对卵巢的损伤机制可能是通过大量增加了初始卵泡的募集,或者是通过干扰卵泡的正常发育成熟而引起卵巢功能减退^[7]。

卵巢储备功能低下根本的原因是卵泡自身发育异常以及颗粒细胞的凋亡^[8],本研究通过制造卵巢储备功能低下的大鼠模型,检测大鼠血清激素水平和卵巢中生长分化因子9(GDF-9)、早期生长反应因子1(Egr-1)蛋白、mRNA的表达变化,探究坤泰胶囊对药物型卵巢储备功能低下的

调节作用,为药物型卵巢储备功能低下的治疗奠定理论基础。

1 材料

1.1 实验动物

SD雌性大鼠60只,10~12周龄,体质量220~250 g,由河北医科大学动物实验中心提供,动物生产许可证号SCXK(冀)2013-1-003,动物饲养于河北中医学院,室温23~25℃,相对湿度40%~70%,通风良好,光照充足,12 h自由饮食饮水,每隔3日换垫料一次。

1.2 药品及主要试剂

坤泰胶囊,贵阳新天药业股份有限公司,36粒/盒,0.5 g/粒,产品批号161231;注射用环磷酰胺,江苏盛迪医药有限公司,200 mg/支,批号20150617;结合雌激素片,新疆新资源生物制药有限责任公司,0.625 mg/片,生产批号20150608。

SYBR Gree 荧光定量PCR试剂盒,(TIANGEN);FSH试剂盒(批号RG11612)、黄体生成激素(LH)试剂盒(批号RG21612)、雌二醇(E_2)试剂盒(批号RG61612),均购自天津九鼎医学生物工程有限公司;抗穆勒氏管激素(AMH)试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号20161205);GDF-9 antibody(批号bs-1795R)、EGR-1 antibody(批号bs-1076R),北京博奥森生物技术有限公司;苏木素染液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号ZLI-90)。

1.3 主要仪器

MK3 酶联免疫检测仪,芬兰雷勃;600型电热恒温水箱,天津泰斯特;TDL-5-A离心机,上海安亭;FJ-2021 γ -放射免疫计数器,西安二六二厂;SHB-D 循环水真空泵,郑州长城;IX-70 倒置相差显微镜,日本Olympus;DL-CJ-1N 高性能无菌实验台,哈尔滨东联;PE-9600 基因扩增仪,

美国 PE。

2 方法

2.1 药物的配制

坤泰胶囊：取出胶囊内粉剂用三蒸水溶解，质量浓度为 0.25 g/mL；注射用环磷酰胺：用生理盐水配制，质量浓度为 20 mg/mL；结合雌激素片：研碎后用三蒸水溶解，质量浓度为 62.5 μg/mL。

2.2 给药方法

对照组，正常喂养；模型组，用注射用环磷酰胺 75 mg/kg ip 1 次造模^[1]后，正常喂养 14 d。坤泰胶囊组，造模 14 d 后分别 ig 给予坤泰胶囊 1.2、0.6、0.3 g/kg，每天 1 次；结合雌激素片组：造模 14 d 后 ig 给予结合雌激素片 0.075 mg/kg，每天 1 次；对照组和模型组给予等体积生理盐水，连续给药 36 d，共计 50 d。

2.3 取材

最后 1 次给药结束 24 h 后，给予 10%水合氯醛 ip 麻醉后腹主动脉取血，离心取上层血清，放置 EP 管内，-80 ℃冰箱保存待测；剖腹取大鼠卵巢，一部分置于 4%多聚甲醛中固定；一部分装入 EP 管里置 -80 ℃冰箱保存。

2.4 检测指标及方法

2.4.1 大鼠行为学变化 观察记录各组大鼠活动度、进食、饮水、毛色及体质量情况。

2.4.2 动情周期检测 用棉签刮取大鼠阴道分泌物行阴道涂片检查。苏木素-伊红 (HE) 染色后，光镜下观察大鼠阴道上皮细胞的变化。

2.4.3 ELISA 法检测性激素 FSH、LH、E₂、AMH 水平 按照试剂盒操作说明用 ELISA 法检测大鼠

血清性激素 (FSH、LH、E₂、AMH) 水平。

2.4.4 卵巢组织形态学变化 将固定于多聚甲醛的卵巢组织，梯度乙醇脱水，脱水结束后进行石蜡包埋，石蜡切片为 2 μm，脱蜡，HE 染色，中性树胶封片。晾干后置于光镜下观察卵巢组织形态学变化。

2.4.5 免疫组化法检测大鼠卵巢 GDF-9、Egr-1 蛋白表达 通过二甲苯和梯度酒精对组织切片进行脱蜡及水化，PBS 冲洗 5 min，0.3% H₂O₂ 去离子水孵育 30 min，以阻断内源性过氧化物酶，缓冲液冲洗 5 min。血清封闭：组织切片于稀释的正常血清室温孵育 20 min，血清尽可能与二抗来源一致，倾去多余的封闭液，勿洗。组织切片在缓冲液稀释的一抗中孵育 30 min，缓冲液冲洗切片 5 min，在滴加生物素标记的二抗中孵育 30 min，缓冲液冲洗切片 5 min。切片置于 VECTASTAIN ABC 试剂 30 min，缓冲液冲洗切片 5 min，在过氧化物酶底物溶液中孵育，直到所需的染色强度。自来水冲洗组织，复染、分化、脱水、透明、封片。通过免疫组化软件观察图片，并计算平均光密度值进行蛋白定量。

2.4.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测大鼠卵巢 GDF-9、Egr-1 mRNA 的表达 从 100 mg 左右的卵巢组织中提取总 RNA 2 μg，加入到 RT 反应体系管中，震荡混匀后离心，加少许矿物油于 PCR 仪 42 ℃ 30 min、99 ℃ 5 min、5 ℃ 5 min 逆转录为 cDNA，-20 ℃保存备用。Real time PCR 反应：应用 2 步法反应程序，预变性 95 ℃ 10 min，然后 40 个循环反应：95 ℃ 10 s、60 ℃ 32 s。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物名称	引物序列	引物大小/bp
GAPDH	上游引物	CCTCCTGAACCTTGAGGCAGTTT	235
	下游引物	TGTATTGTAACCAGTCATCAGCA	
GDF9	上游引物	TAGCTCTCAGGCTTCCACGG	98
	下游引物	TCCCATCTACAGGCAACAGC	
EGR-1	上游引物	AACAACCCTACGAGCACCTG	183
	下游引物	AAAGGGGTTTCAGGCCACAAA	

2.5 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析处理，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示；两样本比较采用成组 *t* 检验；多组间比较经方差齐性检验方差齐后，用单因素方差分析，

若组间差别有统计学意义，采用多重比较 (LSD) 检验进一步进行两两比较；若方差不齐，首先进行变量变换，如果经变量变换后满足方差分析条件，则进行方差分析，否则用秩和检验 (K-W) 进行统

计学处理。

3 结果

3.1 大鼠行为学变化

对照组大鼠毛色洁白润泽,活动度好,精神状态良好,每日进食饮水情况正常,大便褐色,不干燥,体质量渐增;模型组大鼠,ip注射用环磷酰胺后逐渐出现精神萎靡,喜蜷卧,皮毛晦暗,脱毛,每日饮水量增多,进食减少,大便稀,褐色,体

量较前减轻,于第二周起显著低于对照组($P<0.05$);坤泰胶囊高剂量组随着坤泰胶囊给药天数增加,大鼠精神逐渐好转,饮食恢复正常,毛色有光泽,大便色深,不干燥,体质量渐增,于第三周起显著高于模型组($P<0.05$);坤泰胶囊中、低剂量组大鼠,ig给药后,大鼠脱毛情况有所好转,进食增多,饮水较多,大便质稀,体质量稍增,于第三周起显著高于模型组($P<0.05$)。体质量结果见表2。

表2 大鼠平均体质量的变化($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Changes of average body mass in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	大鼠平均体质量/g						
		造模后第1周	造模后第2周	造模后第3周	造模后第4周	造模后第5周	造模后第6周	造模后第7周
对照	—	228.50±9.55	234.20±13.71	239.29±9.45	246.58±9.01	256.58±9.54	260.43±8.23	270.94±11.06
模型	—	231.20±11.70	224.74±14.78*	220.94±13.53*	217.49±13.72*	210.17±11.69*	203.17±12.62*	197.67±11.25*
结合雌激 素片	7.5× 10 ⁻⁵	240.17±10.48	247.57±9.67	252.97±11.52 [#]	255.89±14.28 [#]	263.67±13.62 [#]	268.17±13.61 [#]	274.19±7.03 [#]
坤泰胶 囊	1.2	226.50±9.40	229.40±11.38	236.67±12.05 [#]	242.78±13.05 [#]	247.33±15.98 [#]	258.00±14.22 [#]	265.36±9.79 [#]
	0.6	233.43±9.79	231.78±10.76	233.78±12.38 [#]	236.89±13.86 [#]	240.05±13.78 [#]	248.17±19.21 [#]	251.75±9.67 [#]
	0.3	239.27±11.81	237.93±14.14	229.57±14.34 [#]	229.06±17.64 [#]	225.17±16.77 [#]	227.17±18.08 [#]	231.47±8.32 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.01$

* $P<0.05$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs model group

3.2 动情周期变化

如表3所示,对照组大鼠的动情周期为4~5 d,所有大鼠至处死前均可规律出现动情期;模型组大鼠的动情周期延长,为8~9 d,所有大鼠动情周期均紊乱,与对照组比较,具有统计学差异($P<0.01$);坤泰胶囊中、高剂量组及结合雌激素片组大鼠紊乱率分别为20%、20%和10%,与对照组比较,差异均无统计学意义;坤泰胶囊低剂量组70%大鼠动情周期紊乱,与结合雌激素片组比较,差异显著($P<0.05$)。

表3 造模组大鼠动情周期变化

Table 3 Changes of estrus cycle in model group

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动情周期 紊乱动物数	紊乱率/%
对照	—	0	0
模型	—	10 ^{**}	100
结合雌激素片	7.5×10 ⁻⁵	1 [#]	10
坤泰胶囊	1.2	2 [#]	20
	0.6	2 [#]	20
	0.3	7 ^{&}	70

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$; 与结合雌激素片组比较: $^{\&}P<0.05$

** $P<0.01$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs model group; $^{\&}P<0.05$ vs conjugated estrogens tablets group

3.3 血清性激素 FSH、LH、E₂、AMH 水平检测

与对照组比较,模型组大鼠血清 E₂、AMH 水平明显降低, LH、FSH 明显升高,具有显著性差异($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,各给药组大鼠血清 E₂、AMH 水平明显升高, FSH、LH 明显降低,具有显著性差异($P<0.05$ 、 0.01);与对照组比较,高剂量坤泰胶囊组及结合雌激素片组大鼠血清 E₂、FSH、LH、AMH 的水平无明显差异;与对照组、结合刺激素片比较,低剂量坤泰胶囊组大鼠血清 E₂、AMH 的水平明显降低, FSH、LH 水平明显升高,中剂量组 E₂、AMH 的水平明显降低, LH 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见表4。

3.4 大鼠卵巢组织形态学变化

对照组大鼠卵巢外观色泽粉润,皮质内存在卵泡数量正常,可见各级卵泡形态,卵泡较大,卵泡液饱满,间质血管丰富;模型组大鼠卵巢外观色灰白,卵泡数减少,闭锁卵泡较多,间质可见纤维化;坤泰胶囊高剂量组大鼠卵巢存在成熟卵泡,卵泡腔内卵子生长良好,与对照组表现类似;坤泰胶囊中、低剂量组卵巢外观淡红,卵泡数量较少,整体卵泡较小,但存在成熟卵泡;结合雌激素片大鼠卵巢皮质内可见各级卵泡形态,卵泡较大,存在成熟卵泡。见图1。

表4 ELISA法检测大鼠血清FSH、LH、E₂、AMH水平 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 4 Levels of FSH, LH, E₂, and AMH detected by ELISA in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	FSH/(mIU·mL ⁻¹)	LH/(mIU·mL ⁻¹)	E ₂ /(pg·mL ⁻¹)	AMH (ng·mL ⁻¹)
对照	—	2.877±0.468	3.088±0.627	53.845±11.640	5.124±0.743
模型	—	6.732±0.720*	5.043±0.836*	10.583±3.348*	2.129±0.397*
结合雌激素片	7.5×10 ⁻⁵	3.075±0.613 [#]	3.106±0.575 [#]	51.790±4.921 [#]	5.112±0.539 [#]
坤泰胶囊	1.2	3.112±0.795 [#]	3.240±0.723 [#]	44.850±13.641 [#]	5.103±0.507 [#]
	0.6	3.080±0.741 [#]	4.048±0.653 ^{#*&}	29.209±9.658 ^{#*&}	3.881±0.674 ^{#*&}
	0.3	4.930±0.835 ^{#*&}	4.349±0.593 ^{#*&}	23.757±6.297 ^{#*&}	3.517±0.509 ^{#*&}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.01$; 与结合雌激素片组比较: & $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; & $P<0.05$ vs conjugated estrogens tablets group

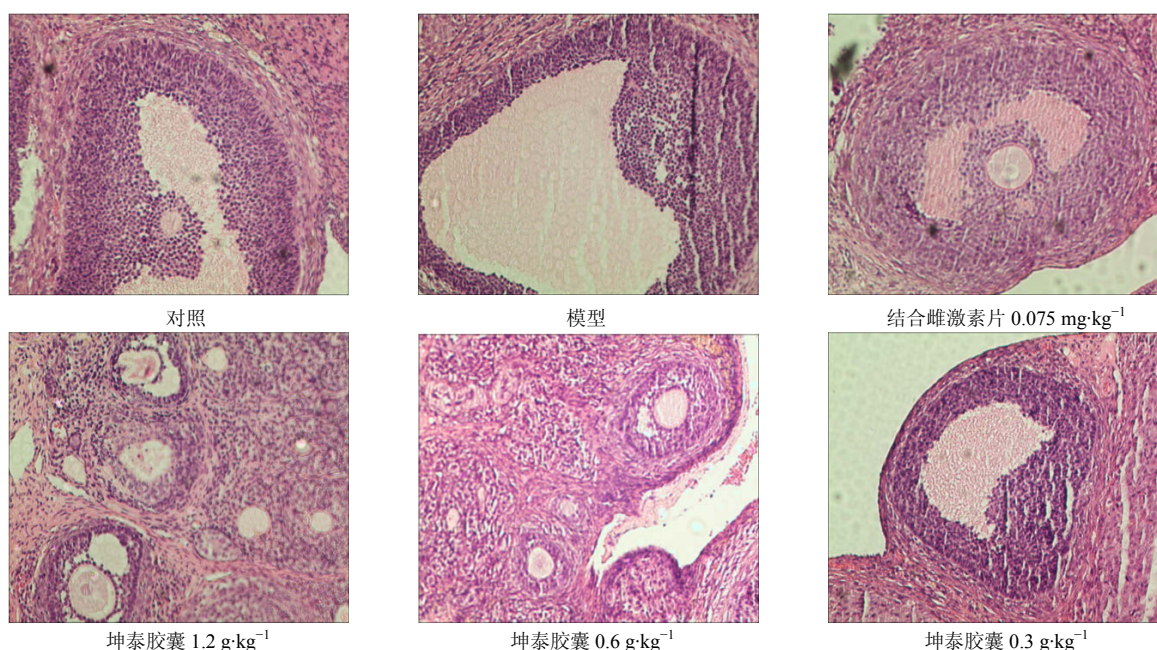


图1 大鼠卵巢组织形态学变化 (×200)

Fig. 1 Morphological changes of ovarian tissue in rats (×200)

3.5 免疫组化法检测 GDF9、EGR-1 蛋白的表达

与对照组比较, 模型组大鼠卵巢中 GDF-9、EGR-1 的蛋白表达明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠卵巢中 GDF-9、EGR-1 蛋白表达均明显升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 坤泰胶囊高剂量组大鼠卵巢 GDF-9、EGR-1 蛋白表达与结合雌激素片组比较, 差异无统计学意义; 坤泰胶囊中、低剂量组大鼠卵巢中 GDF-9、EGR-1 的蛋白表达与结合雌激素片组比较显著降低 ($P<0.05$)。结果见图 2、3, 表 5。

3.6 qRT-PCR 检测 GDF9、EGR-1 的基因表达

与对照组比较, 模型组大鼠卵巢中 GDF-9、

EGR-1 mRNA 表达明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠卵巢中 GDF-9、EGR-1 mRNA 表达均明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 坤泰胶囊高剂量大鼠卵巢中 GDF-9、EGR-1 mRNA 表达与对照组、结合雌激素片比较稍有减少, 差异无统计学意义; 中、低剂量组与对照组、结合雌激素片比较, 显著降低 ($P<0.05$)。结果见表 6。

4 讨论

4.1 坤泰胶囊的治疗作用

坤泰胶囊是由东汉医圣张仲景的“黄连阿胶汤(黄连、白芍、黄芩、阿胶、鸡子黄)”化裁而来, 原方载于《伤寒论·辨少阴病脉证并治》303 条之

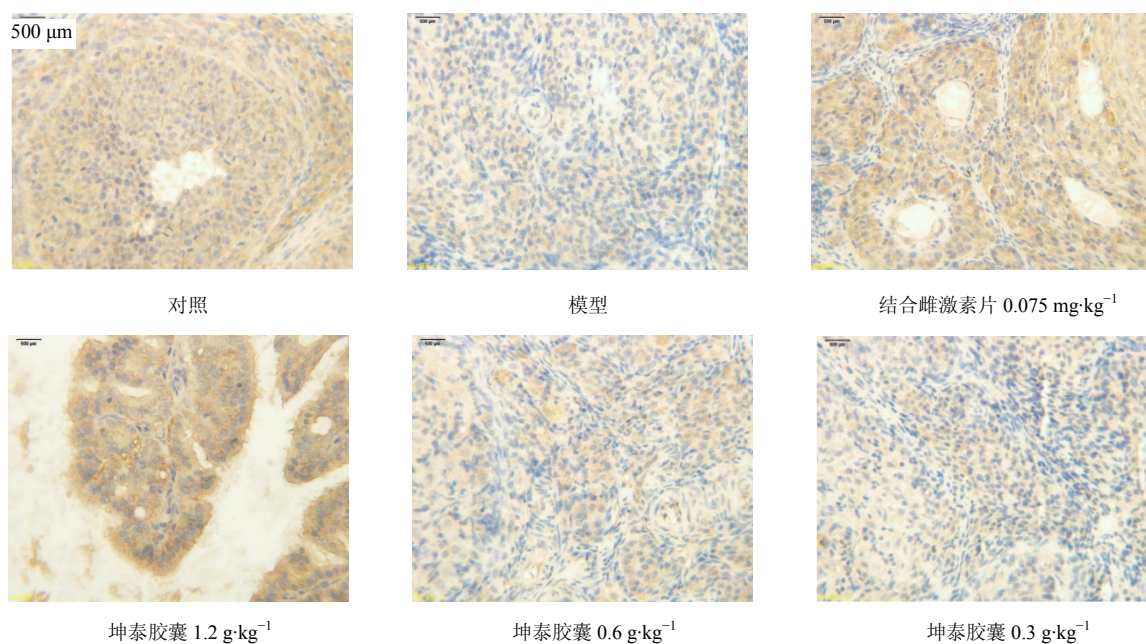


图 2 大鼠卵巢中 GDF-9 蛋白的表达

Fig. 2 Expression of GDF-9 protein in ovary of rats

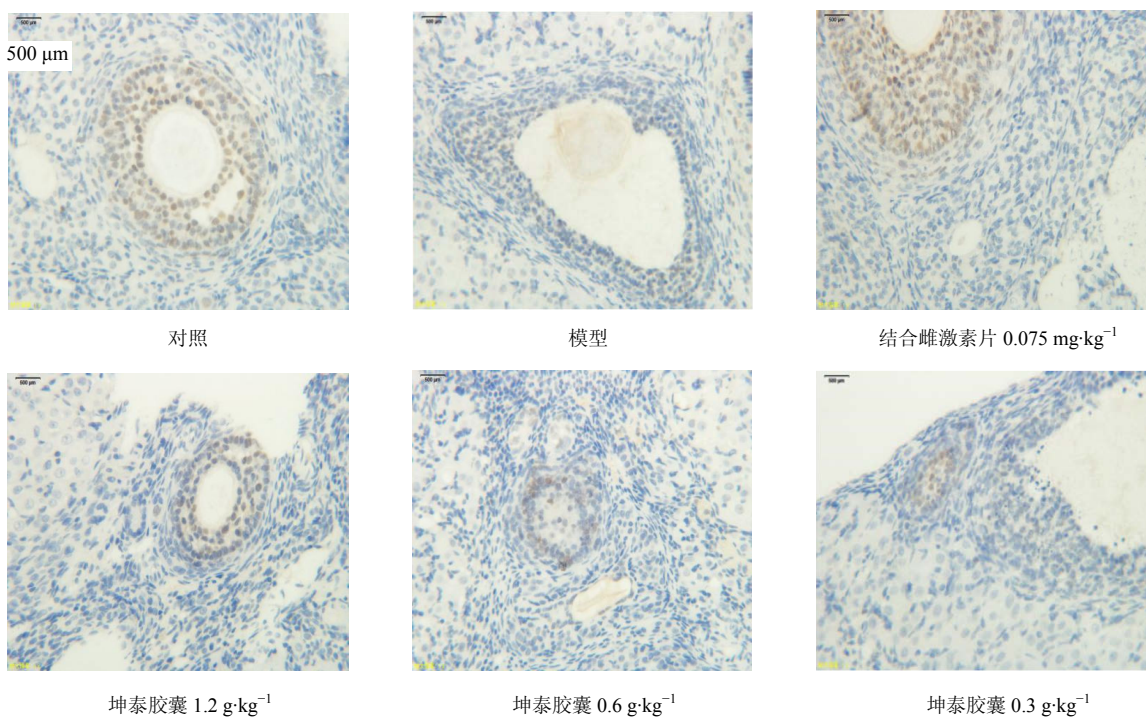


图 3 大鼠卵巢中 EGR-1 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of EGR-1 protein in ovary of rats

下，原文如下：“少阴病，得之二三日，心中烦，不得卧，黄连阿胶汤主之”，黄连阿胶汤养阴泻火，益肾宁心，主治少阴热化、阴虚火旺、心烦不得卧之不寐。坤泰胶囊为胶囊剂，主要组成为熟地黄、黄连、

白芍、黄芩、阿胶、茯苓六味中药，用于绝经期前后诸证。阴虚火旺者，症见潮热面红、自汗盗汗，心烦不宁，失眠多梦，头晕耳鸣，腰膝酸软，手足心热；妇女卵巢功能衰退更年期综合征见上述表现者。

表5 大鼠卵巢中 GDF-9、EGR-1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Expression of GDF-9 and EGR-1 in rat ovary ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	A 值	
		GDF-9	EGR-1
对照	—	0.176 5±0.010 5	0.183 8±0.084 7
模型	—	0.103 4±0.005 6*	0.129 6±0.002 3*
结合雌激素片	7.5×10 ⁻⁵	0.175 8±0.017 2 [#]	0.175 7±0.009 6 [#]
坤泰胶囊	1.2	0.172 9±0.018 4 [#]	0.170 4±0.011 7 [#]
	0.6	0.138 2±0.005 3 ^{#*&}	0.136 7±0.010 5 ^{#*&}
	0.3	0.121 6±0.011 6 ^{#*&}	0.138 0±0.009 3 ^{#*&}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.01$; 与结合雌激素片组比较: [&] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs conjugated estrogens tablets group

4.2 大鼠一般状态观察

模型组大鼠机能水平降低,说明环磷酰胺此类化疗药物不仅可以损害大鼠卵巢功能,还使大鼠生命体征处于低水平状态,生命活力降低。坤泰胶囊高剂量组、结合雌激素片组大鼠,随着给药天数增多,大鼠精神逐渐好转,饮食恢复正常,毛色有光泽,大便色深,不干燥,体质量渐增。说明坤泰胶囊能够增强大鼠免疫机能,改善卵巢储备功能低下大鼠行为状态,与结合雌激素片治疗效果相当。

4.3 动情周期

动情前期相当于人体月经周期的卵泡早期:此期以膨大椭圆、有核的上皮细胞存在为特征,偶可见少量角化细胞或白细胞;动情期^[10]相当于人体月经周期的排卵期:以大量不规则、无核角化鳞状上皮细胞存在为特征,呈树叶堆积状,偶有极少量上皮细胞或白细胞;动情后期相当于人体月经周期的黄体期:以白细胞、角化细胞和有核上皮细胞三者共存为特征,且三种细胞数量相当;动情间期相当于人体月经周期的黄体后期,以白细胞为主,兼可见少量上皮细胞。

正常的动情周期预示着规律的激素水平变化,模型组大鼠的动情周期延长说明卵巢储备功能低下大鼠体内激素水平已经紊乱。坤泰胶囊高剂量组、结合雌激素片组大鼠动情周期均得到较好恢复,这说明坤泰胶囊高剂量能够较好恢复卵巢储备功能低下大鼠的动情周期,也间接说明坤泰胶囊能够调节大鼠体内激素水平,与结合雌激素片效果无明显差异。

表6 大鼠卵巢 GDF-9、EGR-1 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 6 Expression of GDF-9 and EGR-1 mRNA in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	GDF-9	EGR-1
对照	—	1.820±0.218	1.791±0.129
模型	—	0.219±0.140*	0.397±0.048*
结合雌激素片	7.5×10 ⁻⁵	1.795±0.265 [#]	1.728±0.164 [#]
坤泰胶囊	1.2	1.787±0.465 [#]	1.714±0.102 [#]
	0.6	1.039±0.157 ^{#*&}	1.003±0.136 ^{#*&}
	0.3	0.853±0.231 ^{#*&}	0.952±0.162 ^{#*&}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.01$; 与结合雌激素片组比较: [&] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs conjugated estrogens tablets group

4.4 大鼠激素水平变化

AMH 由生长发育中的窦前、小窦卵泡中有功能的颗粒细胞分泌,是唯一从初级卵泡至窦卵泡期由颗粒细胞分泌的一种糖蛋白^[11]。血清 AMH 浓度可以反映始基卵泡库的大小,是目前预测卵巢储备功能低下最准确的指标,AMH 可能是通过降低卵泡对促卵泡雌激素的敏感性,从而达到调控始基卵泡募集、抑制始基卵泡池过快消耗的作用^[12]。其表达越低,标示卵巢的储备功能越差。基础 FSH 和 LH 是临床上间接反映卵巢储备功能的指标^[13],升高的 FSH 和 LH 与卵巢储备功能低下有关,E₂ 水平和 FSH 呈负相关,升高的 E₂ 可以通过负反馈机制使 FSH 降低。

模型组大鼠血清 E₂、AMH 值明显降低,FSH、LH 明显升高,说明卵巢储备功能低下动物模型制备成功,与人体激素变化趋势一致,治疗结果具有可参考意义。高剂量坤泰胶囊和结合雌激素片组大鼠激素水平与对照组差异无统计学意义,说明坤泰胶囊能够调节大鼠体内激素水平,改善卵巢储备功能低下的状态。

4.5 大鼠卵巢 GDF-9、Egr-1 蛋白、基因的表达

GDF-9 是由卵母细胞分泌的,它在卵泡发育过程中具有关键作用,参与了卵泡的生长、发育、成熟、排卵、闭锁,以及颗粒细胞增殖、凋亡过程^[14]。GDF-9 在始基卵泡转化至窦前卵泡和窦卵泡过程中起关键作用,体外培养液添加 GDF-9 能增加卵巢皮质组织中始基卵泡和次级卵泡数目;应用 GDF-9 基因敲除小鼠和 GDF-9 基因突变无活性的绵羊进行

实验^[15],进一步证实了 GDF-9 有促使初级卵泡向前发育的作用,其表达越高,卵巢排卵率越高,卵巢储备功能越好^[16]。

Egr-1 在体内分布广泛,在下丘脑-垂体-卵巢轴中起着重要的调控作用,其作用涉及诱导分化,在女性卵巢中的卵泡、黄体表达水平较高^[17],具有促进细胞生长、增殖、分化等多种功能^[18]。促性腺激素分泌高峰后 6 h 内,颗粒细胞中的 Egr-1 表达骤增^[19],卵巢储备功能越好,卵巢 Egr-1 mRNA 表达越高^[20]。

模型组大鼠卵巢中 GDF-9、EGR-1 蛋白及 mRNA 表达明显降低;说明注射用环磷酰胺能够破坏卵巢功能,通过减少 GDF-9、EGR-1 蛋白及 mRNA 表达导致卵巢储备功能下降,卵泡闭锁增多。与模型组比较,各给药组大鼠卵巢中 GDF-9、EGR-1 蛋白及 mRNA 表达均明显升高,说明坤泰胶囊能够通过升高卵巢中 GDF-9、EGR-1 蛋白及 mRNA 表达,调节卵巢储备功能。与对照组比较,坤泰胶囊中、低剂量大鼠卵巢中 GDF-9、EGR-1 蛋白表达减少,说明中、低剂量的坤泰胶囊作用于卵巢储备功能低下大鼠,效果并不显著,需加大用量,量大力效。

卵巢储备功能低下的病因病机复杂多样,西医目前尚无明确诊断标准及治疗方案,对于卵巢储备功能下降的治疗,可选择用药范围狭窄,副作用大,且易反弹,长期疗效不稳定。中药汤剂临床效果显著,但不易保存,口味欠佳,患者依从性差,导致临床效果不尽人意。本实验研究发现,坤泰胶囊可以通过多方位、多环节、多靶点整体调节卵巢储备功能,能够有效改善卵巢储备低下大鼠低机能状态,纠正大鼠动情周期,降低大鼠性激素 FSH、LH 的水平,升高 E₂ 及 AMH 水平,能够修复模型大鼠受损的卵巢组织结构,改善卵巢血供,促进大鼠卵泡的发育,减少卵泡闭锁,提高成熟卵泡存在数量,增加大鼠卵巢中 GDF-9、EGR-1 蛋白与 mRNA 的表达。且坤泰胶囊服用方法简便,无毒副作用^[21],在卵巢储备功能低下的治疗当中,值得推广。

参考文献

- [1] 袁 华. 抗苗勒管激素评价卵巢储备下降及妇科手术对卵巢储备影响的价值 [D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [2] Sills E S, Aiper M M, Walsh A P. Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, 146(1): 30-36
- [3] 韩玉芬, 程淑蕊, 敬文娜, 等. 卵巢储备功能下降的预测及治疗 [J]. 中国计划生育学杂志, 2007, 02: 117.
- [4] 吴 郁, 向 阳. 化疗及放疗对卵巢的影响及预防 [J]. 国外医学妇产科学分册, 2003, 3(30): 166-169.
- [5] 许树根, 李彩凤, 沈淑琼, 等. 环磷酰胺治疗难治性肾病综合征导致卵巢早衰的影响因素研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2013, 07: 599-601.
- [6] Falcone T, BEDAIWY M A. Fertility preservation and pregnancy outcome after malignancy [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2005, 17(1): 1714-1717.
- [7] letterie G S. Anovulation in the prevention of cytotoxic-induced follicular attrition and ovarian failure [J]. Hum Reprod, 2004, 19(4): 831-837.
- [8] 席稳燕. 血 AMH 与 PCOS 妇女辅助生殖技术结局的关系以及 AMH mRNA 在不同卵巢储备妇女颗粒细胞中的差异表达 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [9] 李 杨, 高 慧, 徐文君, 等. 中药补肾调冲方对卵巢储备功能低下大鼠的影响 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(18): 4-7.
- [10] 胡利霞, 涂雪松, 陈玉环, 等. 坤泰胶囊治疗卵巢储备功能低下及卵巢早衰的临床观察 [J]. 海峡药学, 2016, 02: 211-212.
- [11] 李 键, 乔 杰. 抗苗勒氏管激素在卵泡形成中的作用 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2007(10): 1-3, 102.
- [12] 张凤英, 夏 天, 赵丽颖, 等. 抗苗勒激素及生长分化因子-9 对环磷酰胺体外降低大鼠卵巢储备力机制的研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(5): 335-340.
- [13] 马新想, 张富青. 坤泰胶囊在卵巢早衰患者中的临床应用分析 [J]. 中国医学工程, 2012, 12: 68-69.
- [14] 王婷婷. 卵巢储备功能不良女性 GDF-9 表达、基因变异和功能研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [15] 吉冯伟, 赵泰娟, 李如颀, 等. 梅花针联合复方氟米松软膏封包治疗局限性神经性皮炎的 114 例临床疗效观察 [J]. 哈尔滨医药, 2010, 06: 18-19.
- [16] 王会妍. 超排卵周期生长分化因子 9 和生长分化因子 9B 表达及调控研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2011.
- [17] 崔丹丹, 马雯雯, 文 露, 等. 归肾丸对卵巢储备功能低下小鼠卵巢 Oct-4、MVH 及 Egr-1 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(1): 76-80.
- [18] 吕清媛, 郑培兰. 坤泰胶囊对绝经前子宫切除患者卵巢功能的影响 [J]. 医药导报, 2010, 29(6): 716-718.
- [19] Chateau D, Geiger J M, Samama B, et al. Vaginal keratinization during the estrous cycle in rats: a model for evaluating retinoid activity [J]. Skin Pharmacol, 1996 (9): 9-16.
- [20] 王 洁, 吴素慧, 尚海霞. 性成熟雌性 SD 大鼠动情周期的观察 [J]. 当代医学, 2013, 19(28): 25-26.
- [21] 李艳青, 李瑞霞, 段燕康, 等. 坤泰胶囊浸膏对大鼠的长期毒性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 1023-1027.