

坤泰胶囊对实验性卵巢早衰大鼠卵巢功能和生殖功能的影响

代春伶¹, 高 慧^{2*}, 侯金萌¹, 张 晴¹, 徐文君³

1. 华北理工大学中医学院, 河北 唐山 063000

2. 承德医学院附属医院, 河北 承德 067000

3. 廊坊市妇幼保健中心, 河北 廊坊 065000

摘要: **目的** 探讨坤泰胶囊对不同治疗方法下卵巢早衰大鼠卵巢功能和生殖功能的影响。**方法** 将84只SD雌性大鼠随机分为卵巢功能组和生殖功能组两个大组, 分别观察卵巢功能和生殖功能, 每个大组分为空白组、模型组和坤泰胶囊高、中、低剂量组及结合雌激素片组, 采用ig雷公藤多苷片(75 mg/kg, 14 d)建立卵巢早衰模型, 造模结束后, 分别用坤泰胶囊高、中、低剂量(1.2、0.6、0.3 g/kg, 36 d)及结合雌激素片(0.075 mg/kg, 36 d)进行治疗。治疗结束后, 卵巢功能组所有大鼠用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测大鼠血清性激素水平的变化, 用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测大鼠卵巢组织相关因子Fas、FasLmRNA的表达水平的变化。将生殖功能组所有雌性大鼠与12只SD雄性大鼠进行合笼, 观察记录孕鼠一般情况及子鼠的生长发育情况, 观察各组雌性大鼠的生殖能力。**结果** 治疗组与模型组比较, 随着治疗天数的增加, 大鼠的卵巢功能和生殖功能均明显改善, 血清卵泡生成激素(FSH)、黄体生成激素(LH)水平明显降低, 雌二醇(E₂)、抗穆勒管激素(AMH)水平明显升高, FasmRNA表达明显升高、FasLmRNA表达明显降低, 差异均有统计学意义(P<0.05); 孕鼠摄食量及体质量均增长较快, 差异有统计学意义(P<0.05)。大鼠产仔总数多, 受孕率、妊娠率均较高, 无明显子代小鼠畸形率, 差异有统计学意义(P<0.05)。**结论** 坤泰胶囊能够改善卵巢早衰大鼠的卵巢功能和生殖功能, 可修复育龄期大鼠卵巢功能病理性损伤, 有效调节卵巢早衰大鼠血清性激素水平, 上调FasmRNA表达, 下调FasLmRNA表达, 提高卵巢早衰大鼠受孕率及妊娠率, 对子代小鼠无明显的致畸性。

关键词: 坤泰胶囊; 卵巢早衰; 卵巢功能; 生殖功能

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)10-1942-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.10.005

Effect of Kuntai Capsule on ovarian function and reproductive function in rats with experimental premature ovarian failure

DAI Chunling¹, GAO Hui², HOU Jinmeng¹, ZHANG Qing¹, XU Wenjun³

1. College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Technology, Tangshan 063000, China

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

3. Langfang Maternal and Child Health Center, Langfang 065000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of Kuntai Capsule on ovarian function and reproductive function in rats with premature ovarian failure under different treatments. **Methods** 84 SD female rats were randomly divided into two groups: ovarian function group and reproductive function group. The ovarian function and reproductive function were observed. Each group was divided into blank group, model group and Kuntai capsule high, medium, low dose group and conjugated estrogen tablet group. The premature ovarian failure model was established by Ig Tripterygium glycoside tablet (75 mg/kg, 14 days). After the model was established, Kuntai capsule high dose group was used. Medium and low doses (1.2, 0.6, 0.3 g/kg, 36 days) and conjugated estrogen tablets (0.075 mg/kg, 36 days) were administered. After treatment, all rats in ovarian function group were tested for the changes of serum sex hor-

收稿日期: 2019-04-08

基金项目: 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(编号2015048157);河北省省级重大医学科研项目(编号zyzd2013018);河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目(编号2014571024);河北省中医药管理局中医药类科研计划课题(编号2016068)

第一作者: 代春伶(1992—),女,华北理工大学在读硕士研究生,专业为中医妇科学,主要从事中医妇科学研究。

***通信作者:** 高 慧,博士后,博导,教授,主任医师,全国名老中医药专家学术继承指导老师,国家中医药管理局全国名老中医药专家高慧传承工作室项目专家,国家重点中医专科(中医妇科)负责人和学术带头人。E-mail: gaohuihcd@163.com

mone levels by ELISA, and the expression levels of Fas and FasL in ovarian tissue were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). All female rats in reproductive function group were caged with 12 SD male rats. The general situation of pregnant rats and the growth and development of offspring were observed and recorded, and the reproductive ability of female rats in each group was observed. **Results** Compared with the model group, the ovarian function and reproductive function of rats were improved significantly with the increase of treatment days. The levels of serum follicle-forming hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were significantly decreased, the levels of estradiol (E_2) and anti-Mullerian hormone (AMH) were significantly increased, the expression of Fas gene was significantly increased, and the expression of FasL gene was significantly decreased in the treatment group ($P < 0.05$). The intake and body mass of pregnant rats increased rapidly, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The total number of offspring of rats was large, the pregnancy rate and pregnancy rate were high, and there was no obvious deformity rate in offspring of mice, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Kuntai Capsule can improve the ovarian function and reproductive function of premature ovarian failure rats, repair the pathological damage of ovarian function in reproductive age rats, effectively regulate the level of serum sex hormones, up-regulate the expression of Fas gene, down-regulate the expression of FasL gene, improve the pregnancy rate and pregnancy rate of premature ovarian failure rats, and has no obvious teratogenicity to offspring mice.

Key words: Kuntai Capsule; premature ovarian failure; ovarian function; reproductive function

卵巢早衰(premature ovary failure, POF)是指多种因素引起的女性卵巢功能衰竭,在40岁以前发生闭经,伴或不伴围绝经期综合征、促性腺激素水平增高、雌激素水平降低等^[1-2]。卵巢早衰常表现为潮热盗汗、阴道干涩、外阴萎缩、性欲低下等,严重者可导致不孕^[3],近十年来POF在育龄妇女中的发生率有逐年升高且向低龄化发展的趋势^[4]。近年来因卵巢功能过早衰退所致的不孕症患者逐年增多,严重影响女性生殖健康和生活方式。本研究通过探讨坤泰胶囊在卵巢功能和生殖功能中的作用及作用机制,旨在为临床上育龄期卵巢功能病理性损伤的患者及POF所致的不孕症患者提供用药依据。

1 材料及方法

1.1 实验动物

健康雌性SD大鼠84只,12周龄,体质量220~250 g;雄性健康SD大鼠12只,12周龄,体质量220~250 g,清洁级,由河北医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(冀)2013-1-003。饲料河北医科大学实验动物中心提供,饮水为双蒸水,饲养环境温度23~25℃,自然光照条件好,通风好,垫料每隔3 d更换1次,适应新环境1周。

1.2 实验药品

雷公藤多苷片,规格10 mg,湖南千金协力药业有限公司生产,生产批号20170608;坤泰胶囊,规格0.5 g/粒,贵阳新天药业股份有限公司生产,生产批号20170927;结合雌激素片,规格0.625 mg/片,新疆新姿源生物制药有限责任公司生产,生产批号20170112。

1.3 实验试剂与仪器

卵泡生成激素(FSH)酶联免疫吸附试验试剂盒

购自天津九鼎医学生物工程有限公司,批号RG11801;黄体生成激素(LH)酶联免疫吸附试验试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司,批号RG21801;雌二醇(E_2)酶联免疫吸附试验试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司,批号RG61801;抗穆勒管激素(AMH)酶联免疫吸附试验试剂盒购自北京华英生物技术研究所,批号20180106;MK3酶联免疫检测仪购自芬兰雷勃,7500fast实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。HM-200电子天平购自日本。

1.4 实验对象筛选

适应性喂养4 d后,对雌鼠进行阴道脱落细胞学涂片,连续7 d光镜下观察,将有动情周期的雌鼠纳入,无动情周期雌鼠排除后进入正式实验。

1.5 动物造模及分组

本实验在高慧教授前期的实验基础上展开,高慧教授^[5]通过比较雷公藤多苷片灌胃法和环磷酰胺注射法制造卵巢早衰模型,证实雷公藤多苷片POF模型组比环磷酰胺POF模型组成模更为理想,其中以ig雷公藤多苷片(50 mg/kg, 14 d)造模效果最理想。后本实验经过前期造模实验证实ig雷公藤多苷片(75 mg/kg, 14 d)雌性大鼠造成POF模型最为理想。

将雷公藤多苷片研碎加入等体积三蒸水,配制成质量浓度为75 mg/kg溶液ig给药;坤泰胶囊将成品粉末与等体积三蒸水混合后,配制成质量浓度为高、中、低(1.2、0.6、0.3 g/kg)溶液ig给药;将结合雌激素片研碎加入等体积三蒸水,配制成质量浓度为0.075 mg/kg溶液ig给药。

将84只雌性大鼠随机分为卵巢功能组和生殖功能组两个大组,分别观察卵巢功能和生殖功能(即受试药坤泰胶囊分别对卵巢功能和生育功能的影响)。每个大组又分为6个组,每组7只,分别为空白组、模型组及坤泰胶囊高、中、低剂量组和结合雌激素片组。

空白组正常食水喂养;模型组ig雷公藤多苷片14 d,每日1次,造模结束后24 h予ig 2 mL/kg生理盐水,每日1次,连续36 d;坤泰胶囊组造模14 d后分别ig予坤泰胶囊1.2、0.6、0.3 g/kg;结合雌激素片组造模14 d后予ig结合雌激素片0.075 mg/kg,每日1次,连续36 d,共计50 d。

实验期间,每周称体质量,每日定时行阴道涂片检查,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。

1.6 取材

卵巢功能组所有大鼠,处死动物前10天阴道涂片查动情周期,每日1次,在末次给药结束24 h后,将卵巢功能组所有大鼠用10%水合氯醛麻醉后腹主动脉取血,离心吸取上层血清;剖腹取出卵巢组织。装在高压过的EP管里,−80℃冰箱保存用于PCR实验。

1.7 生殖功能组合笼实验

合笼方法:治疗结束后将雌鼠与雄鼠按照7:2的比例进行合笼,即7只雌鼠与2只雄鼠关在同一笼子里交配,采用动情前期合笼法;即在大鼠的动情前期合笼。采用动情前期合笼法的原因:SD大鼠动情行为高峰和排卵高峰出现在动情前期和动情期,只有在此时合笼雌鼠才有可能受孕。但是,由于动情前期和动情期持续时间均小于24 h,1次/d的阴道涂片不一定都能观察到典型的动情期表现,考虑到大鼠动情行为和排卵高峰出现的时间,避免因阴道涂片时间的限制而错过大鼠排卵高峰,影响受孕率。合笼交配5 d休息2 d,再继续交配5 d,以此类推,直到全部或大部分雌鼠交配成功为止。交配

成功的雌鼠不再进行交配。具体的方法是大鼠适应环境以后,于每日晨7点做阴道涂片检查,大鼠的动情周期为4~5 d,分为动情前期、动情期、动情后期和动情间期。每一期涂片特征差异明显。确定大鼠属于上述何种动情周期后,将动情前期的雌鼠和雄鼠合笼。每日早晨检查阴栓及阴道涂片检查精子,以发现阴栓、精子的当天作为怀孕第0天,以雌鼠分娩确定受孕成功。孕鼠妊娠期为20 d(19~22 d)。

1.8 合笼次数

雌、雄鼠经过4次合笼,每次各选取雌鼠、雄鼠各2只,第1次选取2只健康状态下自由饮水的雌鼠与雄鼠合笼,第2次选取2只雷公藤多苷片ig 14 d后的雌鼠与雄鼠合笼,第3次选取2只坤泰胶囊中剂量ig 18 d后的雌鼠与雄鼠合笼,第4次为剩余所有雌鼠与雄鼠合笼,通过合笼次数的变化,观察卵巢功能损伤程度与生殖功能的关系。

1.9 检查指标

1.9.1 卵巢功能组大鼠检测指标 (1)用ELISA法检测大鼠血清性激素FSH、LH、E₂、AMH的水平,按照ELISA试剂盒说明书操作进行。(2)实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测大鼠卵巢组织中Fas、FasL mRNA的表达水平:取大鼠卵巢组织100 mg,采用Trizol一步法提取总RNA,提总RNA 2 μg,先在含Oligo dT Primer、dNTPs的混合液中65℃、5 min使模板RNA变性后,冰上迅速冷却。再加入反转录反应液(含PrimeScript II Buffer、PrimeScript II RTase、Rnase Inhibitor等),并用DEPC处理水补足到20 μL反应液体积,缓慢混匀后短暂离心,于PCR仪42℃、45 min(cDNA合成),95℃、5 min(酶失活),冰上冷却。应用两步法反应程序,预变性95℃、10 min,然后40个循环反应:95℃、15 s,60℃、45 s。Fas、FasL的引物序列见表1。

1.9.2 生殖功能组大鼠检测指标 (1)孕鼠及子鼠一般情况变化:观察记录孕鼠的一般情况(精神状

表1 引物序列及片段长度

Table 1 Primer sequence and fragment length			
基因名称	引物名称	引物序列	片段长度/bp
GAPDH	上游引物	CAGGAAATGATGACCTCCTGAAC	80
	下游引物	TGTTTTTGTAAAGTATCTTGGTGCC	
Fas	上游引物	AGAGAGCCTGCCACCTATGA	83
	下游引物	TGGCAAAAAGAACACGCCAG	
FasL	上游引物	CTGGTGGCTCTGGTTGGAAT	77
	下游引物	TCACGGAGTTCTGCCAGTTC	

态、活动度、毛色情况、饮水量、摄食量、体质量)及子鼠的生长发育情况(体肤情况、生长发育速度),孕鼠每3天称1次体质量,记录孕鼠孕0、3、6、9、12、15、18 d体质量,约每3天称量1次摄食量,记录孕鼠孕0、3、6、9、12、15、18 d摄食量。摄食量=(给予量-剩余量)/(只数×天数)。(2)大鼠生殖功能情况:合笼后确定雌鼠妊娠情况,产仔数,计算受孕率、妊娠率,观察仔鼠外观有无异常,计算子代小鼠畸形率。

妊娠率=孕鼠数/总雌鼠数

畸形率=畸形小鼠总数/总的小鼠只数

2 统计学处理

实验数据采用 SPSS21.0 统计学软件进行分析处理,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(LSD)多重比较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(K-W)秩和检验进行统计学处理。

3 结果

3.1 对大鼠卵巢功能的影响

3.1.1 大鼠血清性激素 FSH、LH、E₂、AMH 水平

如表2所示,与空白组相比,坤泰胶囊低剂量组大鼠血清 FSH、LH 浓度均明显升高,血清 E₂、AMH 浓度均明显降低($P < 0.05$);坤泰胶囊高、中剂量组和结合雌激素片组大鼠血清 FSH、LH、E₂、AMH 浓度变化与空白组比较差异均无统计学意义;与模型组相比,其余各组大鼠血清 FSH、LH 浓度均明显降低,血清 E₂、AMH 浓度均明显升高($P < 0.05$);与结合雌激素片组相比,坤泰胶囊低剂量组大鼠血清 FSH、LH 浓度明显升高,E₂、AMH 浓度明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);坤泰胶囊高、中剂量组大鼠血清 FSH、LH、E₂、AMH 浓度差异均无明显统计学意义。

3.1.2 大鼠卵巢 Fas、FasLmRNA 的表达水平 如表3所示,与空白组相比,坤泰胶囊低剂量组大鼠卵巢 FasLmRNA 表达均明显降低,FasLmRNA 表达均明显升高($P < 0.05$);坤泰胶囊高、中剂量组大鼠卵巢 Fas、FasLmRNA 表达与空白组相比,差异均无统计学意义;与模型组相比,其余各组大鼠卵巢 FasLmRNA 表达均明显升高,FasLmRNA 表达均明显降低($P < 0.05$);与结合雌激素片组比较,坤泰胶囊低剂量组大鼠卵巢 FasLmRNA 表达均明显降低,FasLmRNA 表达明显升高($P < 0.05$),坤泰胶囊高、中剂量组大鼠卵巢 Fas、FasLmRNA 表达差异均无统计学意义。

表2 大鼠血清 FSH、LH、E₂、AMH 含量的对比($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 2 Comparison of serum FSH, LH, E₂ and AMH levels in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	FSH/(mIU·mL ⁻¹)	LH/(mIU·mL ⁻¹)	E ₂ /(pg·mL ⁻¹)	AMH/(ng·mL ⁻¹)
空白	—	4.044±1.441	3.726±1.463	35.870±8.588	7.717±1.474
模型	—	7.044±1.386 ^{*&}	6.513±1.345 ^{*&}	11.946±2.481 ^{*&}	3.429±0.693 ^{*&}
坤泰胶囊	1.2	4.134±1.015 [#]	3.850±0.965 [#]	33.857±10.115 [#]	7.215±1.081 [#]
	0.6	4.210±0.695 [#]	3.874±0.960 [#]	32.697±8.260 [#]	7.074±1.083 [#]
	0.3	5.532±1.139 ^{*#&}	5.211±1.157 ^{*#&}	22.860±5.789 ^{*#&}	5.224±1.083 ^{*#&}
结合雌激素片	7.5×10 ⁻³	4.061±1.354 [#]	3.766±1.061 [#]	34.131±5.667 [#]	7.395±1.178 [#]

与空白组比较:^{*} $P < 0.05$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$;与结合雌激素片组比较:[&] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs blank group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs conjugated estrogen tablets group

表3 各组大鼠卵巢 Fas、FasLmRNA 的相对表达($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 3 Relative expression of Fas and FasL in ovaries of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Fas	FasL
空白	—	1.692±0.612	0.816±0.281
模型	—	0.598±0.147 ^{*&}	1.513±0.336 ^{*&}
坤泰胶囊	1.2	1.649±0.418 [#]	0.837±0.182 [#]
	0.6	1.521±0.206 [#]	0.844±0.216 [#]
	0.3	1.036±0.296 ^{*#&}	1.129±0.261 ^{*#&}
结合雌激素片	7.5×10 ⁻³	1.678±0.444 [#]	0.820±0.243 [#]

与空白组比较:^{*} $P < 0.05$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$;与结合雌激素片组比较:[&] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs blank group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs conjugated estrogen tablets group

3.2 对大鼠生殖功能的影响

3.2.1 孕鼠及子鼠的一般情况变化 本试验除模型组大鼠未受孕外,其余各组大鼠均为受孕鼠。空白组孕鼠精神状态较好,活动自如,毛发洁白明亮有光泽,大便黑褐色,小便淡黄色,饮水量及摄食量均较前明显增多,体质量快速增长,子鼠体肤红润有光泽,生长迅速,发育较好;坤泰胶囊高、中剂量组及结合雌激素片组孕鼠精神状态较好,活动比较灵活,毛色洁白润泽,饮水量较前增多,摄食量及体

质量增长较快,与空白组相比,差异均无统计学意义;子鼠体肤红润有光泽,生长较快,发育较好;坤泰胶囊低剂量组孕鼠精神欠佳,活动稍显迟缓,毛发洁白,进食增多,饮水较多,摄食量增长稍慢,于孕0 d显著低于结合雌激素片组,差异具有统计学意义($P<0.05$),大便质稀,体质量增长稍慢,于孕6 d起显著低于结合雌激素片组,差异具有统计学意义($P<0.05$);子鼠体肤红润有光泽,生长快,发育正常。体质量、摄食量结果分别见表4、5。

表4 各组孕鼠平均体质量的变化($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 4 Changes of average body mass of pregnant rats in each group($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g						
		孕0 d	孕3 d	孕6 d	孕9 d	孕12 d	孕15 d	孕18 d
空白	—	248.14±11.01	255.43±7.85	262.74±9.67	273.57±8.48	283.14±7.13	295.86±5.58	302.57±5.88
坤泰胶囊	1.2	244.71±7.23	251.14±5.49	260.71±5.12	271.00±5.74	280.86±4.60	292.43±4.93	300.43±5.00
	0.6	243.14±9.12	249.00±8.19	258.00±3.56	268.57±5.09	277.86±3.34	290.71±3.77	297.29±4.61
	0.3	240.43±8.46	245.43±8.54	248.86±7.63 ^{*&}	257.86±7.43 ^{*&}	268.14±7.06 ^{*&}	280.29±6.10 ^{*&}	286.29±7.41 ^{*&}
结合雌激素片	7.5×10 ⁻³	245.14±8.78	252.00±5.63	261.43±6.58	272.71±4.27	281.57±4.76	294.29±4.89	301.29±3.50

模型组为未孕鼠,故不列入表中。与空白组比较:^{*} $P<0.05$;与结合雌激素片组比较:[&] $P<0.05$

The model group was non-pregnant mice, so it was not included in the table. ^{*} $P<0.05$ vs blank group; [&] $P<0.05$ vs conjugated estrogen tablets group

表5 各组孕鼠平均摄食量的变化情况($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 5 Changes in the average intake of pregnant rats in each group($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	摄食量/g						
		孕0 d	孕3 d	孕6 d	孕9 d	孕12 d	孕15 d	孕18 d
空白	—	18.29±1.80	19.86±2.12	21.43±2.15	23.14±2.04	25.29±1.60	27.29±1.38	28.71±1.11
坤泰胶囊	1.2	17.29±1.11	18.86±1.57	20.43±2.44	21.86±1.77	24.00±1.91	26.14±1.35	28.00±1.63
	0.6	17.14±2.04	18.57±2.07	20.00±1.63	21.43±2.30	23.71±1.60	25.71±1.38	27.86±1.07
	0.3	14.71±1.50 ^{*&}	15.71±1.50 ^{*&}	17.14±1.57 ^{*&}	18.57±1.62 ^{*&}	20.43±1.27 ^{*&}	21.86±1.57 ^{*&}	23.57±1.40 ^{*&}
结合雌激素片	7.5×10 ⁻³	17.57±1.90	19.14±2.41	20.57±1.72	22.43±2.15	24.57±1.62	26.86±2.12	28.29±1.70

模型组为未孕鼠,故不列入表中。与空白组比较:^{*} $P<0.05$;与结合雌激素片组比较:[&] $P<0.05$

The model group was non-pregnant mice, so it was not included in the table. ^{*} $P<0.05$ vs blank group; [&] $P<0.05$ vs conjugated estrogen tablets group

3.2.2 大鼠的生殖功能情况 如表6、7所示,本试验除模型组大鼠未受孕外,其余各组大鼠均为受孕鼠。与空白组比较,坤泰胶囊低剂量组大鼠产仔总数、受孕率、妊娠率均较低,差异具有统计学意义($P<0.05$);坤泰胶囊低剂量组出现1例子代小鼠畸形,与其余各组比较差异无统计学意义;与模型组比较,除坤泰胶囊低剂量组大鼠外,其余各组大鼠的产仔总数均较多,受孕率及妊娠率均较高,差异具有统计学意义($P<0.05$),均未出现子代小鼠畸形;与结合雌激素片组比较,坤泰胶囊低剂量组大鼠产仔总数稍少,受孕率、妊娠率均略低,差异具有统计

学意义($P<0.05$),坤泰胶囊高、中低剂量组大鼠产仔总数、受孕率、妊娠率及子代小鼠畸形率差异均无统计学意义。

4 讨论

不孕症包括原发性不孕和继发性不孕,原发性不孕古代称为“全不产”、“无子”,继发性不孕古代称为“断绪”。《内经》曰:“女子二七而天癸至,任脉通,太冲脉盛,月事以时下,故有子……七七任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也。”阐明女子十四岁时天癸发育成熟,任脉通畅,太冲脉充盛,月经方能正常来潮,此时女子开始具

表6 各组大鼠受孕率情况
Table 6 Pregnancy rate of rats in each group

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	受孕率/%					
		第1~10天	第11~20天	第21~30天	第31~40天	第41~50天	第51~60天
空白	—	100 [#]	0	0	0	0	0
模型	—	0 ^{*&}	0	0	0	0	0
坤泰胶囊	1.2	85.71 [#]	14.29	0	0	0	0
	0.6	71.43 [#]	14.29	14.29	0	0	0
	0.3	28.57 ^{*&}	0	14.29	0	14.29	0
结合雌激素片	7.5×10 ⁻³	85.71 [#]	14.29	0	0	0	0

与空白组比较: *P<0.05; 与模型组比较: #P<0.05; 与结合雌激素片组比较: &P<0.05

*P<0.05 vs blank group; #P<0.05 vs model group; &P<0.05 vs conjugated estrogen tablets group

表7 各组大鼠产仔总数、妊娠率及子代小鼠畸形率情况
Table 7 Total litter size, pregnancy rate and deformity rate of offspring mice in each group

组别	样本量	产仔总数/只	妊娠率/%	子代小鼠畸形率/%
空白组	7	88	100 [#]	0
模型组	7	0	0 ^{*&}	0
坤泰胶囊	7	83	100 [#]	0
	7	82	100 [#]	0
	7	41	42.86 ^{*&}	14.29
	7	85	100 [#]	0

与空白组比较: *P<0.05; 与模型组比较: #P<0.05; 与结合雌激素片组比较: &P<0.05

*P<0.05 vs blank group; #P<0.05 vs model group; &P<0.05 vs conjugated estrogen tablets group

备一定的生育能力;而到了四十九岁时,任脉亏虚,太冲脉衰微,天癸枯竭,女子到了绝经年龄,月经断绝,此时身体各项机能均下降,女子便不再有生育能力,可见肾气-天癸-冲任-胞宫轴与女性生殖功能密切相关,若此轴各部分功能正常,生殖功能才能正常;若此轴各部分功能异常,便会导致女性不孕。

不孕症的病因复杂多样,其中排卵障碍性不孕是重要的病因之一,卵泡的正常生长发育及排卵依赖于卵巢功能的正常运行,若女性卵巢功能出现异常(卵巢储备功能低下或卵巢早衰),则会导致不孕。导师在临床工作中见到大量因卵巢功能过早衰退所致的不孕症患者前来就诊,不孕症给患者带来极大的困扰,严重影响夫妻生活质量。

目前卵巢早衰所致的不孕症西医主要用激素进行治疗,激素治疗疗效显著,但停药后往往容易复发,而且有研究显示长期使用雌激素可增加乳腺癌和子宫内膜癌的风险^[6];中医治疗主要以中药汤

剂和中成药为主,中药汤剂虽无激素治疗的副作用,但中药汤剂口感欠佳,不易储存与携带,患者需坚持复诊调方,容易中断治疗;而中成药坤泰胶囊方便储存、携带,以较好的治疗效果赢得患者的青睐。本研究引申并拓展了坤泰胶囊的功能主治(原功能主治是治疗绝经期综合征,新的功能主治是治疗卵巢早衰),将治疗绝经期综合征的坤泰胶囊用于治疗实验性大鼠卵巢早衰,其意义在于:临床上坤泰胶囊是用来治疗绝经期和更年期综合征的,这是因生理性增龄而造成的卵巢功能衰退和损伤;而卵巢早衰是育龄期的卵巢功能病理性损伤的疾病。本研究提示了坤泰胶囊既可以治疗卵巢功能生理性损伤(绝经期和更年期综合征);又可以治疗卵巢功能病理性损伤(卵巢早衰)。这是本研究的新发现,为临床上坤泰胶囊的拓展应用提供了理论依据。

坤泰胶囊乃由黄连阿胶汤化裁而来,包含熟地黄、黄连、阿胶、白芍、黄芩、茯苓六位中药,方中熟地黄具有滋阴补血、补肾填精益髓的功效;黄连、阿胶、白芍为臣药,黄连清心火、泻热除烦,可助熟地滋阴降火、交通心肾,阿胶可补血滋阴,白芍养血敛阴,二者可增强熟地黄滋阴补血之功;黄芩清热泻火,助黄连泻火之力,茯苓健脾宁心安神。全方共奏滋阴养血、清热泻火、安神除烦之效^[7]。

本研究用雷公藤多苷片灌胃制备大鼠卵巢早衰模型后,予坤泰胶囊及结合雌激素片灌胃治疗,治疗后大鼠的卵巢功能和生殖功能皆有改善,从而推测坤泰胶囊可修复育龄期大鼠卵巢功能病理性损伤,改善卵巢功能,提高卵巢早衰大鼠的受孕率及妊娠率。

4.1 坤泰胶囊对卵巢功能的影响

坤泰胶囊有植物雌激素样作用,可通过调节人体的下丘脑-垂体-卵巢轴,来促进卵泡发育,从而增

强卵巢功能^[8],改善卵巢的血供及营养,激活卵巢功能^[9],延长卵巢的生命力,进而改善性激素水平^[10]。

临床研究表明^[11]坤泰胶囊可使FSH、LH水平降低,能够刺激E₂的分泌,抑制卵巢颗粒细胞凋亡,延缓卵巢衰老,一定程度上能保护和改善卵巢功能。FSH和LH均是反应卵巢功能的重要指标^[12],两者均由垂体前叶分泌合成,可促进雌激素的分泌及卵泡的发育;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,参与抑制始基卵泡到初级卵泡的生长,及降低窦前卵泡对FSH的敏感性。Fas基因产物Fas蛋白是相对分子质量为4.5×10⁴的I型糖蛋白,是神经生长因子与肿瘤坏死因子受体超家族成员;Fas作为一个细胞凋亡信号受体,能通过与其配体FasL(FasL属II型糖蛋白)结合而诱导细胞发生凋亡^[13]。Fas/FasL通路又称死亡受体通路,在细胞增殖、降解和细胞凋亡过程中发挥着重要的作用^[14]。若Fas/FasL系统出现平衡失调,可诱导卵泡颗粒细胞凋亡,造成卵泡闭锁,从而使卵巢功能出现免疫性损伤;反之可调节Fas/FasL系统平衡,阻止卵泡颗粒细胞凋亡,减轻卵巢免疫炎症反应,以达到保护和改善卵巢功能的目的。

本实验研究显示模型组所有大鼠雷公藤多苷片灌胃14 d后均出现弓背、脱毛、喜蜷缩、体质量下降等表现,大鼠动情周期延长或紊乱,血清性激素水平严重紊乱,FSH、LH均明显升高,E₂、AMH均明显下降,卵巢FasmRNA表达均明显降低,FasLmRNA表达均明显升高,提示造模成功。各治疗组大鼠经过药物治疗后弓背及脱毛现象出现好转,体质量增加,动情周期恢复正常,血清性激素FSH、LH均明显下降,E₂、AMH均明显升高,FasmRNA表达均明显升高,FasLmRNA表达均明显降低,提示坤泰胶囊可通过调节大鼠的血清性激素水平及上调FasmRNA表达,下调FasLmRNA表达,来修复及改善卵巢功能,从而达到治疗卵巢早衰的目的,结果与临床研究一致。

4.2 坤泰胶囊对生殖功能的影响

从中医方面来看,肾藏精,主生长发育与生殖,肾阴亏虚,阴虚血少,精血不足,冲任血海匮乏,月经量少或停闭不行,影响卵泡发育及排卵,不能摄精则婚久不孕,证实肾与女性生殖功能密切相关,坤泰胶囊具有滋阴降火、补肾调经助孕之效,通过调控肾气-天癸-冲任-胞宫轴,从而可以改善生殖功能,提高妊娠率;西医临床研究证实坤泰胶囊能改善患者卵泡发育,提升排卵效果,利于受精卵着床,

亦可提高患者妊娠状况^[15-16],且无明显的母体毒性和胚胎-胎仔毒性,无致畸作用,无胎儿发育毒性^[17-18]。

本实验研究结果显示模型组所有大鼠均未受孕成功,提示大鼠生殖功能尚未恢复,各治疗组大鼠经过药物治疗后均受孕成功,提示大鼠生殖功能已恢复,孕鼠摄食量及体质量均增长较快,无阴道出血、早产及流产等现象发生,顺利产下小鼠,产仔总数多,受孕率及妊娠率均较高,外观正常,无明显子代小鼠畸形,提示雷公藤多苷片可使卵巢早衰大鼠出现生殖功能损伤,坤泰胶囊可以改善和修复卵巢早衰大鼠生殖功能,提高卵巢早衰大鼠受孕率及妊娠率,无明显的致畸性,本文研究结果与临床研究吻合。

临床上常用雷公藤多苷片治疗各种肾病及风湿免疫性疾病,但长期服用此药副作用较大,主要损害患者的生殖和内分泌系统^[19],本研究证实雷公藤多苷片可使大鼠卵巢功能受到损害,通过影响雌鼠的卵巢功能进而影响生殖功能,提示临床上育龄期妇女在长期服用雷公藤多苷片的同时加些保护性腺的药物,以免对其卵巢功能和生殖功能造成不可逆性损伤。

本研究证实坤泰胶囊可修复育龄期大鼠卵巢功能病理性损伤,调节卵巢早衰大鼠血清性激素水平,下调FSH、LH水平,上调E₂、AMH水平,使FasmRNA表达升高,FasLmRNA表达降低,从而保护和改善卵巢功能。此外坤泰胶囊还可改善大鼠的生殖功能,提高卵巢早衰大鼠的受孕率及妊娠率,对子代小鼠无明显的致畸性,安全可靠,值得临床推广使用。

参考文献

- [1] 焦智慧,史惠蓉. 卵巢早衰诊治进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2014, 41(2): 108-111.
- [2] 付天芳,王瑞. 卵巢早衰女性性生活状况调查及健康教育对策研究[J]. 中国性科学, 2016, 25(8): 42-45.
- [3] 鲍旭东,马莉. 中药坤泰胶囊联合激素替代疗法治疗卵巢早衰的临床效果[J]. 中国当代医药, 2017, 24(20): 148-150.
- [4] 王乾. 卵巢早衰的中医药治疗研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(11): 1252-1254.
- [5] 高慧,杨涓,韩冰,等. 药物型卵巢早衰动物模型的研究[J]. 国医论坛, 2007, 22(3): 22-26.
- [6] 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, 30(6): 18-19.

- [7] 杨芸. 坤泰胶囊治疗女性围绝经期综合征的临床观察 [J]. 天津药学, 2010, 22(3): 34-35.
- [8] Qin Y Y, Jiao X, Dalgleish R, et al. Novel variants in the SOHLH₂ gene are implicated in human premature ovarian failure [J]. *Fertility and Sterility*, 2014, 101(4): 1104-1109.e6.
- [9] 钟瑞华, 周娴颖, 谢淑武, 等. 坤泰胶囊对大鼠实验性子宫异位内膜生长及其妊娠结局的影响 [J]. 生殖与避孕, 2015, 35(8): 517-524.
- [10] 周华锋. 地屈孕酮联合坤泰胶囊治疗女性更年期综合征的临床研究 [J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(21): 3390-3392.
- [11] 耿利华, 谈勇. 坤泰胶囊对卵巢储备功能下降大鼠卵巢凋亡调控蛋白 Bcl-2, Bax 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 138-143.
- [12] Check J H, Wilson C, Citrino-Diantonio G, et al. In vitro fertilization (IVF) outcome in women in overt menopause attempting to induce follicular maturation by follicle stimulating hormone (FSH) receptor down-regulation [J]. *Fertility and Sterility*, 2013, 100(3): S150.
- [13] Peyvandi S, Buart S, Samah B, et al. Fas ligand deficiency impairs tumor immunity by promoting an accumulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells [J]. *Cancer Research*, 2015, 75(20): 4292-4301.
- [14] Cho H M, Sun W. Control of mitochondrial dynamics by fas-induced caspase-8 activation in hippocampal neurons [J]. *Exp Neurobiol*, 2015, 24(3): 219.
- [15] 栾素娴, 崔青, 张玉花, 等. 坤泰胶囊在卵巢储备功能降低的不孕症患者中的应用 [J]. 中成药, 2017, 39(6): 1318-1320.
- [16] 吴翠杰. 坤泰胶囊对排卵障碍性不孕症患者卵泡发育、子宫内膜及排卵的影响 [J]. 中国实用医药, 2015, 10(18): 10-11,12.
- [17] 王玮, 张云, 刘昆, 等. 坤泰胶囊对SD大鼠生育力和早期胚胎毒性的研究 [J]. 中成药, 2012, 34(10): 1869-1873.
- [18] 龚立, 刘昆, 张云, 等. 坤泰胶囊对大鼠胚胎和胎仔的发育毒性研究 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(5): 337-342.
- [19] 黄之锴, 陈普, 马伟光. 雷公藤的毒性作用及减毒研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(12): 20-21.