

补肾养血方对卵巢早衰大鼠中抗苗勒氏管激素的影响

姬霞, 傅金英*, 王冰玉, 胡俊攀

(河南省中医院, 河南中医药大学第二附属医院妇产科, 郑州 450002)

【摘要】 目的 建立雷公藤多苷致卵巢早衰大鼠的模型, 研究补肾养血方对卵巢早衰大鼠中抗苗勒氏管激素 (anti-mullerian hormone, AMH) 的影响。**方法** 使用雷公藤多苷建立卵巢早衰大鼠模型, 造模成功后, 分别采用高、中、低剂量补肾养血方对大鼠灌胃, 每日一次, 共 30 d。给药完毕后于显微镜下观察各组大鼠卵巢组织形态。酶联免疫吸附法、免疫组化染色法和定量反转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 分别检测大鼠血清中 AMH 含量以及卵巢内 AMH 的蛋白和 mRNA 表达水平。**结果** 组织形态学显示高中低剂量组的卵泡和黄体的生长均比模型组好; 酶联免疫吸附法、免疫组化和 qRT-PCR 结果显示补肾养血方呈剂量依赖性逆转雷公藤多苷导致大鼠血清中 AMH 浓度以及卵巢中 AMH 表达水平的降低。**结论** 补肾养血方可逆转雷公藤多苷引起卵巢中 AMH 水平降低, 提示补肾养血方具有防止卵巢早衰的功效。

【关键词】 补肾养血方; 卵巢早衰; AMH

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0049-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.010

Effect of bushenyangxue prescription on the levels of anti-mullerian hormone in rat with premature ovarian failure

Ji Xia, Fu Jin-ying*, Wang Bing-yu, Hu Jun-pan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Henan Province Hospital of TCM, the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

【Abstract】 Objective Establish premature ovarian failure (POF) model in female Sprague Dawley by tripterygium wilfordii, and investigate the effect of bushenyangxue prescription on the levels of anti-mullerian hormone (AMH). **Methods** After POF model was established, rats were gave by gavage of different dosage of Bushenyangxue prescription for 30 days. The changes of histomorphology on rat ovarian tissue were observed by hematoxylin-eosin staining. Serum AMH concentration, protein and mRNA expression of AMH were measure with ELISA, immunohistochemical staining and qRT-PCR, respectively. **Results** The follicle and corpus luteum were atrophied after tripterygium wilfordii challenge, which was improved after treatment with Bushenyangxue prescription. Serum AMH, protein and mRNA expression of AMH were decreased tripterygium wilfordii-treated rats; this decrease was inhibited after treatment with Bushenyangxue prescription. **Conclusions** Our study indicates that Bushenyangxue prescription could preserve the AMH levels of POF rats. These findings suggest that Bushenyangxue prescription may be a useful strategy to treat POF.

【Key words】 Bushenyangxue prescription; Premature ovarian failure (POF); AMH

[基金项目] 河南省中医药管理局科研课题 (2014ZY02013)。

[作者简介] 姬霞 (1968 -), 女, 副主任医师, 本科, 研究方向: 中西医结合治疗妇产科疾病的基础与临床研究。

E-mail: jx.1120@163.com

[通讯作者] 傅金英 (1968 -), 主任医师, 医学博士, 研究方向: 妇科生殖内分泌。E-mail: fujinying2003@163.com

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是一种多因素导致的卵巢功能提前减退的症状, 指女性在 40 岁以前出现持续闭经, 不育, 伴随雌激素降低, 卵泡雌激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 和黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 升高的一种疾病^[1]。卵巢早衰是妇科分泌领域的常见病, 常出现症状: 脸色潮红, 性欲低下, 午后潮热多汗, 皮肤暗黄长斑等。对女性的身心产生严重影响^[2]。有学者认为肾阴不足、天葵亏耗、任冲二脉受损是卵巢早衰的主要病机^[3]。通过补肾, 阴阳调和, 能够调节激素水平, 改善卵巢早衰的临床症状^[4], 且基于养血补肾为基础的补肾养血方对 POF 具有积极的治疗作用^[5]。近年来, 现代中医研究发现, 基于当归、熟地黄加减的补肾养血方能够通过上调 POF 大鼠卵泡及卵巢间质 Bcl₂ 蛋白的表达, 下调 Bax 蛋白的表达, 抑制卵泡的过快凋亡^[6], 另有研究证明^[7], 养血补肾方能够促进 POF 大鼠卵泡生长, 降低 POF 大鼠血清 FSH、LH 水平, 促进 E2 水平上升, 改善卵巢功能。近年来, 临床上使用抗穆勒氏管 (anti-mullerian hormone, AMH) 做为卵巢功能的评估^[8], 更有研究指出, AMH 在雌性动物体内由卵巢细胞分泌, 在一定程度上可以反映卵巢的功能状态^[9]。但, 关于养血补肾方对于 POF 大鼠中 AMH 的影响报道较少, 因此本实验采用雷公藤多苷建立大鼠卵巢早衰大鼠模型, 研究补肾养血方对卵巢早衰大鼠体内 AMH 的影响, 为补肾养血方可防治改善卵巢早衰提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

处于动情期的雌性 SD 大鼠 60 只, 10~12 周龄, SPF 级, 体重为 230~270 g, 由北京大学医学部实验动物中心提供 [SCXK (京) 2012-0016], 所有大鼠在河南省中医药大学动物实验中心完成 [SYXK (豫) 2012-009], 采用颗粒型普通饲料喂养, 饮自来水, 保持室温, 模拟正常昼夜生理节律光照。

1.2 实验药品与试剂

雷公藤多苷片, 购于安徽新陇海药业有限公司, 规格 10 mg/片; 补肾养血方由本院药剂科提供, 组方: 淫羊藿 10 g, 熟地黄 15 g, 当归 10 g, 丹参 15 g, 菟丝子 10 g, 枸杞子 10 g, 山茱萸 10 g, 白芍 8 g, 杜仲 8 g, 川芎 5 g, 甘草 5 g, 水煎并浓缩, 制成相当于生药材 2.0 g/mL 的混悬液, 放于 4℃ 冰箱储存备

用。戊酸雌二醇 (补佳乐), 购于法国 Delpharm Lille S. A. S, 规格 1 mg/片; 大鼠抗苗勒氏管激素 (anti-mullerian hormone, AMH) ELISA 试剂盒购于美国 Diagnostic Systems Laboratories 公司; AMH 抗体购于美国 Abcam 公司; AMH 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 分组和造模

将 SD 大鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 称重, 分别设空白组, 模型组, 高剂量组, 中剂量组, 低剂量组和阳性对照组。除空白组外, 其余 SD 大鼠以雷公藤多苷片 50 mg/kg 灌胃, 每日一次, 连续 15 d。

1.3.2 动物给药

造模成功 24 h 后进行给药, 依据大鼠的剂量换算, 折算为人的等效剂量的 10 倍; 空白组, 正常饮食; 模型组, 以生理盐水 2 mL/kg 给药, 每日灌胃 1 次; 高剂量给药组, 以补肾养血方 20 g/kg 给药, 每日灌胃一次; 中剂量给药组, 以补肾养血方 10 g/kg 给药, 每日灌胃一次; 低剂量给药组, 以补肾养血方 5 g/kg 给药, 每日灌胃一次。阳性对照组, 以戊酸雌二醇 0.12 mg/kg 给药, 每日灌胃一次。各组连续给药 30 d。

1.3.3 酶联免疫吸附试验检测大鼠血清中 AMH 含量

将各组大鼠称重, 尾静脉取血 3 mL, 3000 r/min 离心 15 min, 收集上清液待测。按 AMH ELISA 试剂盒说明书进行操作。将样品加入酶标包被板中, 37℃ 孵育 30 min, 洗板; 加入生物素化抗体工作液, 封板膜封板后 37℃ 孵育 1 h, 洗板; 加入 HRP, 37℃ 孵育 30 min, 洗板。加入显色剂, 酶标仪 450 nm 波长处检测各孔吸光度 (10 min 内)。

1.3.4 卵巢组织学观察

各组大鼠完成给药 24 h 后, 处死大鼠, 取双侧卵巢, 一侧卵巢置于 -80℃ 中保存。另一侧卵巢用 10% 中性甲醛固定, 洗涤, 依次用梯度乙醇脱水, 于二甲苯中透明 15 min, 石蜡包埋后切片, 烤干, 二甲苯脱蜡后再依次用梯度乙醇脱水, 苏木素染色, 盐酸乙醇分化, 进行 HE 染色。倒置显微镜下观察各组大鼠的卵巢形态学。

1.3.5 免疫组化染色法检测 AMH 的蛋白表达水平

将卵巢组织切片置于二甲苯 (I) (II) (III) 中脱蜡, 依次放入无水乙醇, 90% 乙醇, 80% 乙醇, 70% 乙

醇中,洗涤,置于 3% 过氧化氢溶液 10 min,封闭,加入 AMH 抗体,4℃ 过夜,显色。苏木素复染,返蓝,乙醇脱水,置于二甲苯中浸泡,加入中性树胶,封片晾干。根据染色细胞所占面积和细胞染色强度两项指标进行综合评分判断。综合评分 = (染色细胞分数 + 细胞染色强度分数)/2;0 - 0.5 分为(-);0.5 - 1.5 分为(+);1.5 - 2.5 分为(++);>2.5 分为(+++)。

1.3.6 卵巢 AMH 的 mRNA 表达水平

将冷冻的卵巢组织在冰浴中用电动匀浆机充分搅拌,提取各组卵巢的总 RNA,逆转录合成 cDNA,进行 PCR 反应,AMH 引物:上游:5'-TCCTAGAGACCCTCACTCGC-3';下游:5'-CACGGGCTCTGAAAGGTTGA-3'; β -actin 引物:上游:5'-GTGGGGCGCCCAGGCACCA-3';下游:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3';扩增条件:94℃ 30s,52℃ 1 min,72℃ 30 s,进行 25 个循环,于 73℃ 延伸 10 min。实验结果在荧光定量操作系统中进行分析对比,目标基因的相对定量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.4 统计处理

试验数据运用 SPSS16.0 软件进行处理,实验结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两组间比较采用 Bonferroni 校正的 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中 AMH 浓度水平

酶联免疫吸附试验结果显示,模型组的大鼠卵巢中 AMH 的水平显著低于空白组;给予补肾养血方后,发现其呈剂量依赖性逆转雷公藤多苷诱导卵巢早衰 AMH 降低,与模型组相比具有统计学差异 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 卵巢组织学观察

空白组卵巢体积大,可见不同时期发育的卵泡,包括原始卵泡、初次卵泡、次级卵泡、成熟卵泡和闭锁卵泡,血管形态正常,可见大量黄体;模型组卵巢萎缩,卵泡和黄体数量少,闭锁卵泡增多;低剂量组各级卵泡生长情况略好于模型组;中剂量组各级卵泡与黄体数量比模型组明显增多;高剂量组各级卵泡生长情况与空白组相似,卵泡与黄体数量较多;阳性对照组各级卵泡和黄体数量显著高于空白组,卵泡细胞和黄体细胞生长良好。见图 1。

表 1 补肾养血方对卵巢早衰大鼠 AMH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pmol/L}$)

Tab. 1 The effect of bushen yangxue prescription on the levels of AMH

组别 Group	AMH 水平 AMH levels
空白组 Blank control group	2.47 $\pm$ 0.11
模型组 Model group	0.34 $\pm$ 0.01 [*]
低剂量组 Low-dose group	1.07 $\pm$ 0.08 [#]
中剂量组 Middle-dose group	1.78 $\pm$ 0.13 [#]
高剂量组 High-dose group	2.45 $\pm$ 0.10 [#]
阳性对照组 Positive control group	4.12 $\pm$ 0.31 [#]

注: * $P < 0.05$, 与空白组相比较; # $P < 0.05$, 与模型组相比较。

Note. * $P < 0.05$ vs. blank control group. # $P < 0.05$ vs. model group.

2.3 免疫组化染色法检测 AMH 的蛋白表达水平

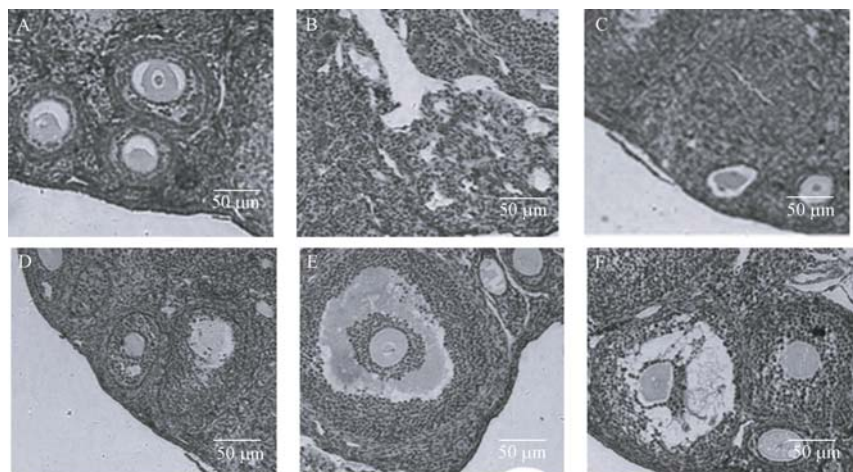
AMH 在卵巢中的主要表达窦前卵泡和小窦状卵泡的颗粒细胞,成熟卵泡和细胞间质表达也有表达。模型组中 AMH 的表达明显低于空白组;低剂量补肾养血方可逆转雷公藤多苷造成 AMH 表达的减少,并随着剂量增大而逆转效果更为显著;阳性对照组中 AMH 的表达水平显著高于空白组。见图 2,表 2。

2.4 qRT-PCR 检测卵巢中 AMH 的 mRNA 表达水平

qRT-PCR 检测结果表明,给予雷公藤多苷后大鼠卵巢中 AMH 的 mRNA 表达水平显著降低;而补肾养血方可明显逆转雷公藤多苷导致 AMH mRNA 表达的减少,并随给药剂量增大而逆转作用增强。见图 3。

3 讨论

卵巢早衰在中医可以归属为“血枯”、“血隔”、“月经后期”、“不孕”等范畴^[10]。虽然,各医家对本病的病因认识有所区别,但总体认为本病的根本在于“天癸早枯”,肾中精气亏虚为主导。中医认为肾藏先天之精,主生殖,精血同源,相互助生,相互转化。因此肾气不足会导致精血亏虚,从而影响女子的生育功能。补肾养血方以补肾为主的淫羊藿,菟丝子,杜仲,山茱萸和补气养血的熟地黄,当归,党参,枸杞子,白芍,川芎组成,附以甘草调和诸药。

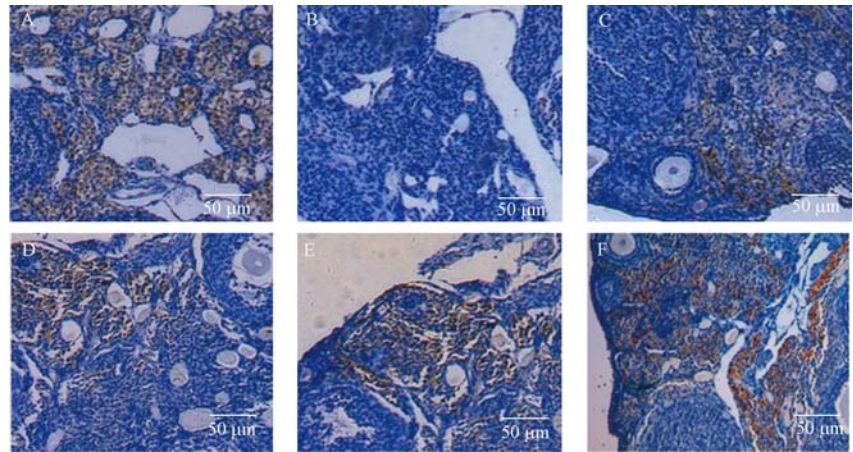


注：(A)空白组；(B)模型组；(C)低剂量组；(D)中剂量组；(E)高剂量组；(F)阳性对照组。

图 1 各组卵巢卵泡组织形态

Note. (A) blank control group. (B) model group. (C) low-dose group. (D) middle-dose group. (E) high-dose group. (F) positive control group.

Fig.1 Representative images of ovarian tissue follicle morphology.



注：(A)空白组；(B)模型组；(C)低剂量组；(D)中剂量组；(E)高剂量组；(F)阳性对照组。

图 2 各组大鼠卵巢组织中 AMH 的表达

Note. (A) blank control group. (B) model group. (C) low-dose group. (D) middle-dose group. (E) high-dose group. (F) positive control group.

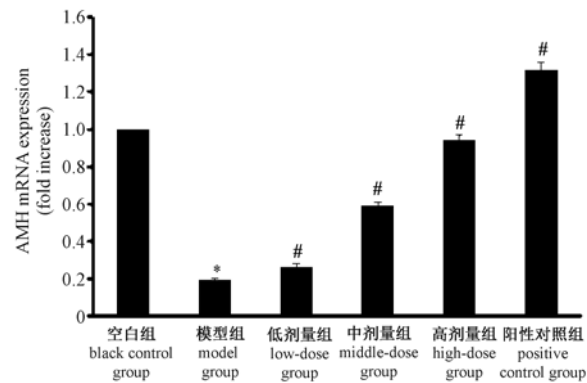
Fig.2 Immunohistochemical results showing the expression of AMH.

表 2 各组大鼠卵巢中的 AMH 表达($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.2 Immunohistochemical results showing the expression of AMH

组别	—	+	++	+++
Group	—	+	++	+++
空白组	0	2	5	3
Blank control group	0	2	5	3
模型组	8*	2	0	0
Model group	8*	2	0	0
低剂量组	3#	5	2	0
Low-dose group	3#	5	2	0
中剂量组	0#	5	5	0
Middle-dose group	0#	5	5	0
高剂量组	0#	3	6	1
High-dose group	0#	3	6	1
阳性对照组	0#	1	4	5
Positive control group	0#	1	4	5

注：* $P < 0.05$ ，与空白组相比较；# $P < 0.05$ ，与模型组相比较。
Note. * $P < 0.05$ vs. blank control group. # $P < 0.05$ vs. model group.



注：* $P < 0.05$ ，与空白组相比较；# $P < 0.05$ ，与模型组相比较。

图 3 各组大鼠卵巢中 AMH 的 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. * $P < 0.05$ vs. blank control group. # $P < 0.05$ vs. model group.

Fig.3 Expression of AMH mRNA in different dosage group

补肾养血方具有滋补肝肾,补气活血敛阴,补而不滞,滋而不腻的特点,使得肾气盛而天癸至,对女子卵巢早衰之经闭具有治疗功效,调节生殖内分泌功能失调。

卵巢功能的评估指标主要包含:年龄、滤泡刺激激素(FSH)、黄体生成素(LH)、抑制素 B(Inhibin B)、卵巢大小(Ovarian volume)、窦卵泡数目(Antral follicle count)和雌激素(oestrogen-2, E2)等,但凭单一指标却无法真实反应卵巢状况。近来研究发现,卵巢功能开始衰退前期,在 FSH、E2、inhibin B 尚未产生变化,AMH 即可明确反应出衰退的征兆^[11]。血清抗苗勒管素(AMH)是一种以二硫键连接的二聚体糖蛋白,是转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)家族的成员之一,雌性体内由卵巢颗粒细胞分泌^[12]。AMH 抑制卵泡的生长过快,防止卵泡过早消耗。血清中 AMH 水平可以反映早期卵泡数量,预示着女性的生殖能力,因此,可以利用 AMH 水平来反映女性卵巢衰老的变化^[11]。衰老是生命活动的普遍现象,其机制至今仍不完全清楚。而卵巢衰老主要表现为卵泡数量及卵泡质量的下降,卵巢生殖和内分泌功能减退,从而继发全身各器官功能改变^[12]。本实验采用雷公藤多苷对大鼠灌胃,通过显微观察大鼠卵巢形态,结果发现雷公藤多苷可导致卵巢早衰的特征出现,如卵泡和黄体数量少,闭锁卵泡增多等;给予不同剂量的补肾养血方后,均在一定程度上逆转大鼠卵巢早衰的症状,卵泡和黄体数量明显增加;高剂量组的逆转作用更为显著,表明补肾养血方具有抑制卵巢早衰的功效。另一方面,雷公藤多苷给药后,大鼠血清中 AMH 水平显著降低,提示卵巢功能下降,衰竭;而给予补肾养血方的大鼠,其血清中 AMH 水平呈剂量依赖性上升,其中高剂量组血清中 AMH 水平接近空白组,提示补肾养血方可增加卵巢中 AMH 水平。免疫组化染色和 qRT-PCR 检测结果表明,雷公藤多

苷可导致卵巢中 AMH 蛋白和 mRNA 表达水平显著下降,补肾养血方呈剂量依赖性逆转雷公藤多苷导致 AMH 蛋白和 mRNA 表达水平下降。综上所述,补肾养血方能有效逆转雷公藤多苷导致大鼠卵巢早衰中 AMH 水平下降。

参考文献:

- [1] 王松露,任锦锦,朱玲,等. 卵巢早衰的中西医治疗概况[J]. 中医药临床杂志,2016,28(1):134-137.
- [2] 牛聪,马堃,李敏. 40 例不孕症患者的中医临床特点分析及临床案例举隅[J]. 中国中药杂志,2016,41(5):960-964.
- [3] 张莉,施艳秋. 卵巢早衰的中医病因病机及治疗进展[J]. 山西医药杂志,2013,42(5):540-542.
- [4] 刘晓莉. 基于卵巢早衰中医证型与临床治疗方法研究[J]. 中医临床研究,2016,8(7):64-65.
- [5] 王方石,王晓男,闫秋. 补肾养血方剂联合人工激素疗法治疗卵巢早衰 54 例疗效研究[J]. 中国药业,2014,23(13):11-13.
- [6] 董晓英,柳顺玉,李冬华,等. 补肾养血方对卵巢早衰小鼠凋亡调控蛋白 Bcl-2/Bax 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,20(1):134-138.
- [7] 张丽娜,郑锦,刘特,等. 补肾活血方对卵巢早衰模型大鼠性激素水平及颗粒细胞凋亡调控相关因子的影响[J]. 上海中医药杂志,2015,49(7):72-76.
- [8] 刘建华. 血清抗苗勒管激素联合性激素检测在预测卵巢早衰中的临床意义[J]. 哈尔滨医药,2013,33(3):181-182.
- [9] 朱春兰,夏亦冬. 中药结合激素对卵巢早衰大鼠血清 AMH 及 VEGF 影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(2):88-90.
- [10] 黄宏丽,董莉. 浅述卵巢早衰证型分布特点[J]. 光明中医,2015,30(5):1146-1148.
- [11] 徐琳,任莉,韩雪松,等. AMH、FSH、E2 在卵巢早衰诊断中的价值[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,19(3):96-99.
- [12] 田勇,赖志文,石良艳,等. AMH 蛋白在性成熟小鼠卵泡发育不同阶段及自然衰老过程卵巢组织中的表达变化[J]. 现代妇产科进展,2012,21(12):936-940.

[收稿日期]2016-04-02