

补肾活血化痰方改善雄激素致不孕大鼠高雄激素血症的机制探讨

俞瑾^{1△}, 张洁^{2,3△}, 韩洁², 雷玲², 俞超芹^{2*}, 翟东霞^{2*}

1. 上海中医药大学, 上海 201203

2. 第二军医大学长海医院中医科, 上海 200433

3. 上海市普陀区妇婴保健院中医科, 上海 200060

[摘要] **目的** 观察补肾活血化痰方(BHHR)对雄激素致不孕大鼠(ASR)高雄激素血症的治疗作用及治疗前后 ASR 卵巢内雄激素合成酶和代谢酶的表达量的变化,并探讨其可能的作用机制。**方法** SD 雌性大鼠于 9 日龄在颈背部皮下一次性注射丙酸睾酮(1.25 mg)制备 ASR 模型。将造模成功的 ASR 随机分为 3 组,分别为模型组(蒸馏水 10 mL/kg 灌胃)、二甲双胍治疗组(0.1 g/kg 灌胃)和 BHHR 治疗组(10 mL/kg 灌胃),每组各 13 只。另设正常对照组($n=10$)。疗程(28 d)结束后观察大鼠的性周期恢复情况、体质量及卵巢质量/体质量比值。采用放射免疫分析法测定血清睾酮(T)水平;免疫组织化学定量方法检测卵巢 β -羟甾脱氢酶、细胞色素 P450 17 α -羟化酶/17,20-裂解酶和 P450 芳香化酶的表达量。**结果** (1)性周期恢复: BHHR 治疗组及二甲双胍治疗组中恢复性周期的大鼠数量多于模型组($P<0.01$)。(2)体质量: 模型组大鼠体质量高于正常对照组($P<0.01$); BHHR 治疗组与二甲双胍治疗组大鼠体质量均较模型组降低($P<0.01$)。(3)卵巢质量/体质量比值: 模型组大鼠卵巢质量/体质量比值高于正常对照组、BHHR 治疗组及二甲双胍治疗组($P<0.01$)。(4)血清 T 水平: 模型组大鼠血清 T 值高于正常对照组、BHHR 治疗组及二甲双胍治疗组($P<0.01$)。(5)免疫组织化学结果: 与模型组和正常对照组相比, BHHR 治疗组大鼠 P450arom 表达升高 ($P<0.01$); BHHR 治疗组 β -羟甾脱氢酶、细胞色素 P450 17 α -羟化酶/17,20-裂解酶的表达与模型组间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** BHHR 可以降低 ASR 模型大鼠血清 T 水平,其机制可能是通过上调雄激素代谢酶 P450arom 的表达而实现的。

[关键词] 补肾活血化痰方; 雄激素增多症; β -羟甾脱氢酶; 类固醇 17 α -羟化酶; P450 芳香化酶

[中图分类号] R 287.4

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)05-0498-04

Mechanism of *Bushen huoxue huatan* recipe improving hyperandrogenism in androgen-induced sterile rats

YU Jin^{1△}, ZHANG Jie^{2,3△}, HAN Jie², LEI Ling², YU Chao-qin^{2*}, ZHAI Dong-xia^{2*}

1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3. Department of Traditional Chinese Medicine, Maternity and Child Health Hospital of Putuo District, Shanghai 200060, China

[Abstract] **Objective** To observe the therapeutic effect of *Bushen huoxue huatan* recipe (BHHR) on androgen-induced sterilized rats (ASR) and the expression of androgen synthase and metabolic enzymes in the ovary of ASR before and after treatment with BHHR, and to discuss the possible mechanism. **Methods** Female SD rats of 9-day old were injected subcutaneously with testosterone propionate (1.25 mg) to create model. The model rats were randomly divided into 3 groups: model group (treated with distilled water by gastrogavage, 10 mL/kg), metformin therapy group (gastrogavage, 0.1 g/kg) and BHHR therapy group (gastrogavage, 10 mL/kg), with 13 animals in each group. Ten rats with normal estrous cycle served as normal controls. The body mass, sexual cycle recovery and ovary mass/body mass ratio were observed after 28-day treatment. Serum testosterone level was measured by radioimmunoassay; the expressions of β -hydroxylsteroid dehydrogenase (β -HSD), cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17, 20-lyase (CYP17) and P450 aromatase (P450arom) in ovary were detected by

[收稿日期] 2013-02-20

[接受日期] 2013-03-27

[基金项目] 国家自然科学基金(30371838, 30672742, 30873353), 国家自然科学基金重点项目(30930113), 国家自然科学基金青年科学基金(81001535). Supported by National Natural Science Foundation of China (30371838, 30672742, 30873353), Key Program of National Natural Science Foundation of China (30930113) and National Natural Science Foundation of China for Young Scientists (81001535).

[作者简介] 俞瑾, 硕士生. E-mail: 395005545@163.com; 张洁, 硕士生. E-mail: 18621915728@qq.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-31161959, E-mail: chqyu81@gmail.com; Tel: 021-31161963, E-mail: zhaidongx@163.com

quantitative immunohistochemistry method. **Results** (1) Significantly more rats in the metformin and BHHR groups had sexual cycle recovery compared with that in the model group ($P<0.01$). (2) The body mass of rats in the model group was significantly heavier than that in the normal control group ($P<0.01$), and those of the BHHR and metformin groups were significantly lighter than that of ASR model group ($P<0.01$). (3) Ovary mass/body mass ratio of the model rats was significantly higher than those of the other three groups ($P<0.01$). (4) Serum testosterone level in the model group was significantly higher than those in the other three groups ($P<0.01$). (5) Compared with the model group and the normal group, the P450arom expression in the BHHR group was significantly increased ($P<0.01$), while no significant difference was found in 3β -HSD and CYP17 expression between the BHHR group and the model group ($P>0.05$). **Conclusion** BHHR can reduce serum testosterone levels in ASR rat, which might be through up-regulating the expression of the androgen metabolism enzyme P450arom.

[**Key words**] *Bushen huoxue huatan* recipe; hyperandrogenism; 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase; steroid 17alpha-hydroxylase; cytochrome P450 aromatase

[Acad J Sec Mil Med Univ,2013,34(5):498-501]

雄激素致不孕大鼠 (androgen-induced sterile rat, ASR) 具有高雄激素血症 (hyperandrogenism, HA)、无排卵性不孕及胰岛素抵抗等表现,因而常被用来制备多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 病理模型^[1]。补肾活血化痰方 (*Bushen huoxue huatan* recipe, BHHR) 用于临床治疗 PCOS 患者已取得良好的效果^[2],本研究通过观察 BHHR 对 ASR 模型血清睾酮 (T) 及卵巢内雄激素合成酶和代谢酶表达的影响,探讨该方治疗 PCOS 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物 3 个月龄雌性及雄性成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由上海斯莱克实验动物有限公司提供[许可证号:SCXK(沪)2003-0003],第二军医大学长海医院动物中心饲养。雌、雄大鼠按 4 : 1 合笼,交配后根据阴栓估计分娩日期,常规大鼠颗粒饲料喂养,自由摄食和饮水,分娩 8 d 后选出雌性幼鼠,21 d 断奶后按清洁级标准饲养。

1.2 药物及试剂 BHHR 由当归、赤芍、白芍、炒黄芩、桑椹子、枸杞子、瓦楞子、制首乌、麦冬等中药组成,由第二军医大学长海医院中药房提供;自制成浓度相当于生药 2.8 g/mL 的溶液,按临床剂量 20 倍计算给药,每 100 g 体质量灌胃给药 1 mL^[3]。丙酸睾酮 (上海第九制药厂,生产批号:1201081),中性茶油 (江西金海棠药用油有限公司,生产批号:C3547),二甲双胍 (深圳市中联制药有限公司,生产批号:120516)。

血清 T 试剂盒 (美国 Novertain 公司);免疫组织化学 SP 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司);免疫组织化学兔抗鼠 3β -羟甾脱氢酶 (3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3β -HSD)、细胞色素 P450 17α -羟化酶/ $17,20$ -裂解酶 (cytochrome

P450 17α -hydroxylase/ $17,20$ -lyase, CYP17)、P450 芳香化酶 (P450 aromatase, P450arom) 多克隆抗体购于北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 ASR 模型的制备 采用俞瑾等^[4]的方法制备 ASR 模型。9 日龄 SD 雌性大鼠于颈背部皮下一次性注射丙酸睾酮 1.25 mg (0.05 mL,溶剂为中性茶油);空白对照组大鼠于颈背部皮下注射中性茶油 0.05 mL。于 70 日龄起每日行阴道脱落细胞学检查,如大鼠连续 10 d 阴道涂片中上皮细胞呈角化状态、无动情周期出现者为 ASR 模型制备成功,进入后续实验,不典型者弃去不用。空白对照组大鼠阴道涂片呈现正常动情周期。

1.4 实验分组及药物干预 按照随机数字表法将造模成功的 ASR 随机分为 3 组:模型组、二甲双胍治疗组和 BHHR 治疗组,每组各 13 只。另从具有正常动情周期的空白对照组大鼠中按照随机数字表法随机选取 10 只,作为正常对照组 (简称“正常组”)。

自 81 日龄起, BHHR 治疗组每天灌服 BHHR 10 mL/kg,二甲双胍治疗组灌服二甲双胍 0.1 g/kg (每 mL 含二甲双胍 0.01 g,按大鼠与人体质量系数折算剂量),正常组及模型组分别灌以等量蒸馏水,4 组大鼠均连续灌胃 28 d,灌胃过程中未发生动物死亡。109 日龄起,4 组大鼠再次行阴道涂片,连续 10 d,观察各组大鼠性周期情况。

1.5 标本收集与制备 109 日龄起,根据阴道脱落细胞学检查,将处于动情前期或阴道上皮细胞持续呈角化状态的大鼠用电子天平称体质量,腹腔注入 3.5% 质量百分浓度的水合氯醛麻醉后行腹主动脉取血,并迅速摘取双侧卵巢组织。

大鼠血清标本:每只大鼠腹主动脉取血约 4 mL,将全血静置 2 h 后,1 025×g 离心 15 min,分离

血清,置于-20℃冰箱保存。待检测前 1 d 将血清标本转入 4℃冰箱。大鼠卵巢组织:每组随机抽取 6 只大鼠,麻醉后手术摘取双侧卵巢组织,用电子天平称取湿质量后迅速置于液氮中保存。

1.6 血清 T 水平的测定 采用放射免疫法对大鼠血清 T 进行检测,具体操作步骤严格按试剂盒操作指南进行。

1.7 卵巢组织雄激素合成酶、代谢酶的检测 采用免疫组织化学法对大鼠卵巢组织雄激素合成酶(3β-HSD、CYP17)和代谢酶(P450arom)进行检测,具体操作步骤严格按 ABC 试剂盒操作指南进行。应用上海求为生物科技有限公司 MIQAS 医学图像定量分析系统、医学图像定量分析软件进行分析,每种标本取 6 张切片,每张切片取 3 个视野,取积分光密度值的平均值。免疫组织化学阳性指数=阳性面积×光密度值/总面积。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件进行统计

分析。计量资料若方差齐则采用方差分析,方差不齐则用秩和检验;计数资料采用 χ^2 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 各组大鼠用药后性周期恢复情况 治疗后,BHHR 治疗组中有 8 只(61.5%,8/13)大鼠恢复性周期,二甲双胍治疗组中有 6 只(46.2%,6/13)大鼠恢复性周期,与模型组(0/13)比较差异均有统计学意义($P<0.01$),BHHR 治疗组与二甲双胍治疗组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠用药后体质量变化 模型组大鼠体质量高于正常组($P<0.01$);BHHR 治疗组与二甲双胍治疗组大鼠体质量均较模型组降低($P<0.01$),其中二甲双胍治疗组大鼠体质量高于 BHHR 治疗组($P<0.01$)。正常组大鼠体质量与 BHHR 治疗组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠体质量、卵巢质量/体质量比值和血清 T 值
Tab 1 Body mass, Ovary mass/body mass ratio and serum testosterone (T) levels of rats in each group

Group	n	Body mass m/g	Ovary mass/body mass ratio $w_B/(mg \cdot kg^{-1})$	T $\rho_B/(ng \cdot mL^{-1})$
Normal	10	186.30±5.31**△△	292.9±53.2**	0.33±0.073**
ASR model	13	209.75±7.44△△	438.8±72.9△△	0.55±0.18△△
BHHR-treated	13	187.92±8.04**△△	318.2±44.4**	0.40±0.12**
Metformin-treated	13	197.15±8.27**	306.8±67.0**	0.37±0.09**

ASR: Androgen-induced sterile rat; BHHR: *Bushen huoxue huatan* recipe; ** $P<0.01$ vs ASR model group; △△ $P<0.01$ vs metformin-treated group

2.3 各组大鼠卵巢质量/体质量比值 模型组大鼠卵巢质量/体质量比值高于正常组、BHHR 治疗组和二甲双胍治疗组($P<0.01$);正常组、BHHR 治疗组和二甲双胍治疗组之间大鼠卵巢质量/体质量比值比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.4 各组大鼠血清 T 水平测定结果 模型组大鼠血清 T 值高于正常组、BHHR 治疗组和二甲双胍治疗组($P<0.01$);正常组、BHHR 治疗组和二甲双胍治疗组之间血清 T 值差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.5 各组大鼠卵巢内雄激素合成酶 3β-HSD 和 CYP17 的表达 由表 2 可知,各组大鼠卵巢 3β-HSD 阳性表达差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组与正常组之间 CYP17 阳性表达差异无统计学意义($P>0.05$),BHHR 治疗组与正常组、模型组之间 CYP17 表达差异无统计学意义($P>0.05$),而二甲双胍治疗

组 CYP17 阳性表达低于正常组、模型组和 BHHR 治疗组($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.6 各组大鼠卵巢内雄激素代谢酶 P450arom 的表达 由表 2 可知,模型组 P450arom 阳性表达与正常组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。BHHR 治疗组 P450arom 阳性表达高于正常组和模型组($P<0.01$)。二甲双胍治疗组与模型组、正常组和 BHHR 治疗组比较,P450arom 阳性表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

高雄激素血症是 PCOS 的病理生理特征之一^[5],60%~80% 的 PCOS 患者伴有高雄激素血症^[6],高雄激素血症在卵巢内引起被膜纤维化增厚,抑制卵泡发育与排卵,造成卵巢增大。

表 2 各组大鼠卵巢 3β-HSD、CYP17 和 P450arom 的表达

Tab 2 Expression of 3β-HSD,CYP17 and P450arom in rat ovary of each group

n=6, $\bar{x}\pm s$

Group	3β-HSD	CYP17	P450arom
Normal	5.56±2.94	6.59±2.01*	4.63±0.72 ^{△△}
ASR model	6.78±2.33	6.25±1.54**	5.11±0.98 ^{△△}
BHHR-treated	6.55±1.81	6.61±2.22*	8.75±2.88
Metformin-treated	6.63±1.97	4.72±1.71	6.65±3.61

3β-HSD: 3β-hydroxysteroid dehydrogenase; CYP17: Cytochrome P450 17α-hydroxylase 17,20-lyase; P450arom; P450 aromatase; ASR: Androgen-induced sterile rat; BHHR: *Bushen huoxue huatan* recipe. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs metformin-treated group; ^{△△} $P<0.01$ vs BHHR-treated group

PCOS 病因病机复杂,大多数学者认为 PCOS 的中医病机以肾虚为主,痰湿瘀血是其病理产物^[7]。本研究所采用的 BHHR 是俞超芹教授依据传统中医理论进行深入研究,并结合多年诊治 PCOS 患者的临床经验总结而得,其中桑椹子、枸杞子、制首乌、白芍、麦冬滋阴补肾;当归、赤芍活血化瘀;炒黄芩、瓦楞子消痰散结,全方以补肾为主,辅以活血化瘀,佐以调畅气血,使月经如期,并能摄精成孕。BHHR 在临床应用中也取得了满意的疗效^[8]。本研究发现 BHHR 可降低 ASR 体质量及卵巢质量/体质量比值,并降低 ASR 雄激素水平、促进卵泡发育,恢复其性周期,证明 BHHR 对 ASR 高雄激素血症具有治疗作用。

影响雄激素合成代谢的基因有:(1) 3β-HSD 和 CYP17 基因;(2)胆固醇侧链裂解酶基因;(3)芳香化酶基因;(4)性激素结合蛋白基因等^[9]。其中 3β-HSD 和 CYP17 是雄激素合成过程中的关键酶,然而我们在研究中发现 BHHR 对这两种雄激素合成酶无明显影响。

卵巢颗粒细胞内 P450arom 是雄激素转化为雌激素的限速酶,是催化雄烯二酮(A2)和 T 转变为雌酮(E1)和雌二醇(E2)的关键酶,其表达水平及活性直接决定了卵泡液及外周组织中的 T 水平。有研究表明,P450arom mRNA 在 PCOS 大鼠卵巢组织中呈低表达^[10]。说明 PCOS 的高雄激素血症与卵巢 P450arom 表达异常相关,若刺激表达或增加 P450arom 的活性,能有效促进雄激素向雌激素转化,降低血清 T 水平。本研究结果显示模型组与正常组大鼠卵巢内 P450arom 阳性表达情况差异无统计学意义,这可能与模型建立方法有关,因为丙酸睾酮直接诱导雄激素的产生而不影响芳香化酶的活性强弱。而 BHHR 治疗组大鼠血清 T 值低于模型组($P<0.01$),而卵巢组织的 P450arom 的阳性表达高于模型组($P<0.01$),提示 BHHR 可能是通过增强 P450arom 的活性,促进雄激素的代谢,从而降低雄激素的水平。

综上所述,BHHR 对 ASR 高雄激素血症具有明显的治疗作用,其机制可能是通过诱导 P450arom 的表达,促进雄激素的代谢,从而降低 ASR 模型血清 T 水平,纠正其紊乱的内分泌环境,改善卵巢功能,促进性周期的恢复,但不能排除 P450arom 的上调是 BHHR 治疗后 ASR 状态好转的一种伴随现象,因此,其作用机制有待进一步深入研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] Walters K A, Allan C M, Handelsman D J. Rodent models for human polycystic ovary syndrome[J]. Biol Reprod,2012,86:149.

[2] 王针织,俞超芹. 补肾活血化痰法治疗多囊卵巢综合征的临床观察[J]. 实用中西医结合临床,2010,10:1-2.

[3] 王 莉,陆利民,俞 瑾,归绥琪. 补肾中药天葵方对雄激素致不孕大鼠胰腺及卵巢雄激素受体的影响[J]. 中华中医药杂志,2011,4:679-682.

[4] 俞 瑾,杨淑萍,张月萍,魏美娟,归绥琪. 雄激素致高胰岛素与高雄激素性无排卵大鼠模型[J]. 生殖医学杂志,1993,2:215-219.

[5] 丰有吉,沈 铿. 妇产科学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2010:256-257.

[6] 孙 莉,何贵翔. 多囊卵巢综合征高雄激素血症的中西医研究[J]. 长春中医药大学学报,2011,27:989-991.

[7] 刘新玉,朱淑惠,罗颂平. 中医药治疗多囊卵巢综合征所致不孕的思路与方法[J]. 江西中医药,2011,43:4-6.

[8] 韩 洁,雷 玲,张丹英,翟东霞,俞超芹. 补肾活血化痰组方治疗多囊卵巢综合征的临床疗效[J]. 吉林中医药,2011,31:141-143.

[9] 梁阿娟,高敏芝. 多囊卵巢综合征的遗传学研究进展[J]. 中国医药导报,2012,9:33-35.

[10] 刘秀兰,闫晓红. 细胞色素 P450 芳香化酶在大鼠多囊卵巢中的表达及意义[J]. 生殖医学杂志,2008,17:366-370.