

# 淫羊藿苷对顺铂致卵巢早衰大鼠 卵巢储备功能的作用研究

董若曦 朱小丹 樊伯珍 张越 陈燕 陈超 许文娟

**【摘要】目的** 通过观察淫羊藿苷对顺铂腹腔化疗所致卵巢早衰大鼠卵巢卵泡数量和质量及卵巢颗粒细胞分泌抗苗勒氏管激素(AMH)的影响,从卵巢储备功能角度探讨淫羊藿苷治疗卵巢早衰的机制。**方法** 采用随机数字表法将 40 只 Wistar 大鼠分为正常组、模型组、淫羊藿苷低剂量(25mg/kg)组和淫羊藿苷高剂量(75mg/kg)组 4 组,每组 10 只。实验开始日(第 0 天)予淫羊藿苷低剂量组淫羊藿苷 25mg/kg(溶于 0.5ml 的 0.9%氯化钠注射液)腹腔注射给药,1 次/3d,至第 28 天实验结束;淫羊藿苷高剂量组淫羊藿苷 75mg/kg,其余方法同淫羊藿苷低剂量组。除空白组外,其余 3 组大鼠建立卵巢早衰动物模型,分别于第 14、21 天腹腔注射顺铂。第 28 天处死大鼠,采用 ELISA 法检测大鼠血清 AMH 水平,HE 染色观察卵巢卵泡数量和形态的变化。**结果** 与正常组大鼠比较,模型组大鼠血清 AMH 水平下降,卵巢卵泡数量减少,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与模型组大鼠比较,淫羊藿苷低剂量组和淫羊藿苷高剂量组大鼠血清 AMH 水平升高,卵巢卵泡数量增加,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。**结论** 淫羊藿苷可能通过促进卵巢颗粒细胞 AMH 的分泌,恢复卵泡正常募集和成熟,从而保护卵巢储备功能。

**【关键词】** 淫羊藿苷 卵巢早衰 卵巢储备功能

Effects of icariin on ovarian reserve function in female rats with premature ovarian failure induced by cisplatin DONG Ruoxi, ZHU Xiaodan, FAN Bozhen, et al. Department of Gynecology and Obstetrics, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

**【Abstract】Objective** To investigate the effects of icariin (ICA) on ovarian reserve function in female rats with premature ovarian failure induced by cisplatin. **Methods** Forty healthy female Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, low dose ICA group (25mg/kg), high dose ICA group (75mg/kg) with 10 rats in each group. The rat model of cisplatin-induced premature ovarian failure was established by intraperitoneal injection of cisplatin at d14 and d28. The intraperitoneal injection of ICA 25 or 75mg/kg was given every 3d starting from d0 till d28 in ICA treatment groups. Then the rats were sacrificed, the number and morphology of ovarian follicles were observed by HE staining and the serum AMH levels were measured by ELISA. **Results** Compared with the normal group, the ovarian follicular number in model group was reduced, and the serum AMH level in model group was decreased (both  $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the ovarian follicular number and serum AMH levels were increased in the ICA treatment groups (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** ICA may protect the ovarian reserve function by promoting the secretion of AMH in ovarian granulosa cells and restoring the normal recruitment and maturation of ovarian follicles.

**【Key words】** Icariin Premature ovarian failure Ovarian reserve function

卵巢早衰是由多因素导致的卵巢功能提前减退的一种常见妇科内分泌疾病,一般定义为女性在 40 岁以前因卵巢卵泡耗竭引起的闭经、不孕、雌激素过少和促

性腺激素水平升高等<sup>[1]</sup>。中医认为肾阴不足、天癸亏耗、任冲二脉受损是卵巢早衰的主要病理机制<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。小檗科淫羊藿是祖国传统医学中一味应用广泛、历史悠久,具有补肾壮阳、祛风湿和强筋骨功效的补益中药,在治疗闭经、不孕症、卵巢早衰等卵巢功能失调性疾病方面疗效显著。淫羊藿苷是淫羊藿主要的有效成分之一,是一类药理作用多样且具有较高的药用和保健价值的黄酮类化合物。本研究拟以顺铂腹腔化疗致大鼠卵巢早衰模型为研究对象,分析淫羊藿苷对卵巢卵泡数量和

DOI:10.42056/j.issn.1006-2785.2019.41.3.2018-1307

基金项目:上海中医药大学附属普陀医院引进人才基金(2016317A)

作者单位:200062 上海中医药大学附属普陀医院(安徽医科大学上海普陀中心临床学院)妇产科

通信作者:许文娟,E-mail:2403425354@qq.com

质量以及卵巢颗粒细胞抗苗勒氏管激素(anti müllerian hormone, AMH)分泌的影响,从卵巢储备功能角度探讨淫羊藿苷治疗卵巢早衰的机制,为中医药防治卵巢早衰提供理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级雌性 Wistar 大鼠 40 只,10~12 周龄,体重 200~230g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[SYXK(沪)2013-0055]。所有大鼠饲养于本院动物实验室,采用全价营养饲料,保持室温 22~25℃,相对湿度 65%~75%,模拟正常昼夜生理节律,12h 光照,自由饮水和进食。

1.2 试剂与仪器 注射用顺铂(冻干型)(批号:AA4A7021A,规格:20mg/瓶,批准文号:国药准字 H20023461)购于齐鲁制药有限公司;淫羊藿苷(批号:C10096641,纯度:95%,规格:5g/瓶,CAS 号:489-32-7)购于上海麦克林生物试剂公司;DMSO(Lot:RNBF1753,规格:100ml/瓶)购于美国 Sigma 公司;其余试剂均为国产分析纯 AR 试剂。Thermo Varioskan LUX 多功能酶标仪购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Leica EG1150 包埋机、Leica RM2235 切片机、Leica HI1210 摊片机、Leica CV5030 全自动玻璃盖片机均购于德国 Leica Biosystems Nussloch GmbH 公司;Olympus BX43 显微镜购于日本 Olympus 公司;大鼠 AMH ELISA 试剂盒(EK-R30586,进口分装)购于上海酶研生物有限公司。

## 1.3 实验方法

1.3.1 动物分组、用药及造模 40 只大鼠适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法分为正常组、模型组、淫羊藿苷低剂量组和淫羊藿苷高剂量组 4 组,每组 10 只。实验开始日(第 0 天)予淫羊藿苷低剂量组淫羊藿苷 25mg/kg(溶于 0.5ml 的 0.9%氯化钠注射液)腹腔注射给药,1 次/3d,至第 28 天实验结束;淫羊藿苷高剂量组淫羊藿苷 75mg/kg,其余方法同淫羊藿苷低剂量组。除空白组外,其余 3 组大鼠建立卵巢早衰动物模型,分别于第 14、21 天腹腔注射顺铂(4mg/kg,20mg 溶于 20ml 0.9%氯化钠注射液)。腹腔注射顺铂后,大鼠体重下降,进食减少,提示造模成功,造模后饲养同前。正常组大鼠仅予正常饮食;模型组大鼠每 3d 腹腔注射 0.5ml 0.9%氯化钠溶液。

1.3.2 大鼠行为学变化观察 造模后每日对比观察各组大鼠的精神状态,活动情况,皮毛是否茂密光泽,对外界的反应敏捷或迟钝,进食量等情况。

1.3.3 大鼠体重变化观测 自实验第 0 天起,每 7d 称

量大鼠体重并记录,观察给药及造模各个阶段大鼠体重变化。

1.3.4 大鼠血清 AMH 水平检测 第 28 天时,所有大鼠称重后麻醉,腹主动脉取血处死,收集的血液于室温下静置 2h 后,3 000r/min 离心 15min,收集血清。采用 ELISA 法检测大鼠血清 AMH 水平。

1.3.5 大鼠卵巢重量和组织病理学观察 取大鼠双侧卵巢,剥离干净周围脂肪组织,一侧卵巢称重后,置于冻存管中,-80℃冰箱冻存。另一侧卵巢用 4%多聚甲醛固定,洗涤,依次梯度乙醇脱水,于二甲苯中透明 15min,石蜡包埋后切片,烤干,二甲苯脱蜡后再依次梯度乙醇脱水,苏木素染色,盐酸乙醇分化,进行 HE 染色。光学显微镜下观察各组大鼠卵巢卵泡数量和形态的变化。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐性者两两比较采用 LSD-*t* 检验,方差不齐者采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大鼠行为学变化 实验前后对比,正常组大鼠无明显异常表现,精神状态良好,活动敏捷,皮毛光滑。造模后,模型组大鼠随着造模时间的推移,绝大部分进食逐渐减少,形体逐渐消瘦,反应迟钝,蜷缩不喜动,对外界反应淡漠,皮毛暗淡,毛发蓬松。淫羊藿苷低剂量组和高剂量组大鼠均有不同程度恢复,活动量逐渐增加,进食逐渐增多。

2.2 各组大鼠体重变化情况 各组大鼠第 0 天时体重比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),第 7、14、21 和 28 天时体重比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。第 7、14 天时,淫羊藿苷低剂量组和淫羊藿苷高剂量组大鼠体重均低于正常组和造模组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );第 21 和 28 天时,淫羊藿苷低剂量组、淫羊藿苷高剂量组和造模组大鼠体重均低于正常组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),而淫羊藿苷低剂量组、淫羊藿苷高剂量组和造模组大鼠体重比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ),见表 1。

2.3 各组大鼠卵巢重量比较 造模组、淫羊藿苷低剂量组、淫羊藿苷高剂量组和正常组大鼠卵巢重量分别为  $(40.78 \pm 5.40)$ 、 $(47.96 \pm 4.75)$ 、 $(49.73 \pm 2.20)$  和  $(45.78 \pm 3.68)$ mg,各组大鼠卵巢重量比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与正常组大鼠比较,造模组大鼠卵巢重量下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与造模组大鼠比较,淫羊藿苷低剂量组和淫羊藿苷高剂量组卵巢重量均升高,差

表 1 各组大鼠体重变化情况(g)

| 组别       | n  | 第 0 天        | 第 7 天                      | 第 14 天                     | 第 21 天        | 第 28 天        |
|----------|----|--------------|----------------------------|----------------------------|---------------|---------------|
| 造模组      | 10 | 203.4 ± 7.05 | 211.8 ± 6.63               | 214.8 ± 5.67               | 210.2 ± 7.21* | 206.8 ± 7.73* |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 10 | 202.2 ± 9.11 | 201.2 ± 6.87* <sup>△</sup> | 209.6 ± 7.53* <sup>△</sup> | 207.0 ± 6.62* | 208.2 ± 8.46* |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 10 | 204.2 ± 4.37 | 199.0 ± 4.24* <sup>△</sup> | 211.2 ± 4.83* <sup>△</sup> | 211.8 ± 6.07* | 207.0 ± 6.34* |
| 正常组      | 10 | 204.0 ± 4.52 | 208.4 ± 6.10               | 220.2 ± 4.76               | 224.2 ± 5.12  | 223.8 ± 2.57  |
| P 值      |    | >0.05        | <0.05                      | <0.05                      | <0.05         | <0.05         |

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与造模组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$

异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。

2.4 各组大鼠血清 AMH 水平比较 造模组、淫羊藿苷低剂量组、淫羊藿苷高剂量组和正常组大鼠血清 AMH 水平分别为(0.80±0.075)、(1.40±0.061)、(1.27±0.080)和(1.57±0.082)ng/ml, 各组大鼠血清 AMH 水平比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与正常组大鼠比较,造模组大鼠血清 AMH 水平下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与造模组大鼠比较,淫羊藿苷低剂量组和淫羊藿苷高剂量组血清 AMH 水平均升高,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。

2.5 大鼠卵巢组织病理学变化 正常组大鼠卵巢切片:卵巢皮、髓质结构清晰,可见原始卵泡、较多的初级卵泡、次级卵泡、黄体,间质较少。各期卵泡形态,数量正常;卵巢颗粒细胞层次多,卵泡液含量多;黄体数目较多,且体积正常,胞质丰富,色泽鲜艳,未见卵泡囊肿或黄体血肿;其间质未见炎细胞浸润及间质纤维化,间质

腺少见,血管丰富(图 1a)。造模组大鼠卵巢切片:卵巢萎缩,各期卵泡数均明显减少,其中生长卵泡和成熟卵泡的数量下降明显,甚至消失。黄体退化,部分黄体见不同程度的嗜酸性变和坏死,坏死区有嗜中性粒细胞为主的炎细胞浸润;间质大多有不同程度的炎细胞浸润及纤维化(图 1b)。淫羊藿苷低剂量组和高剂量组大鼠卵巢切片:卵巢病理形态与正常组相似,卵巢结构较造模组有明显改善,可见卵泡总数增加,其中有大量初级卵泡,并保存了较多生长卵泡,而且间质纤维化程度有所减轻。卵巢组织中各级卵泡数目及黄体组织数目均较造模组明显增多。淫羊藿苷高剂量组大鼠卵巢组织切片可见一定数量的原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡及成熟卵泡,且可见一定数目的黄体;淫羊藿苷低剂量组大鼠卵巢组织切片中的卵泡数目相对高剂量组略有减少,黄体数目稍有增加,可见少数生长卵泡细胞(图 1c-d)。

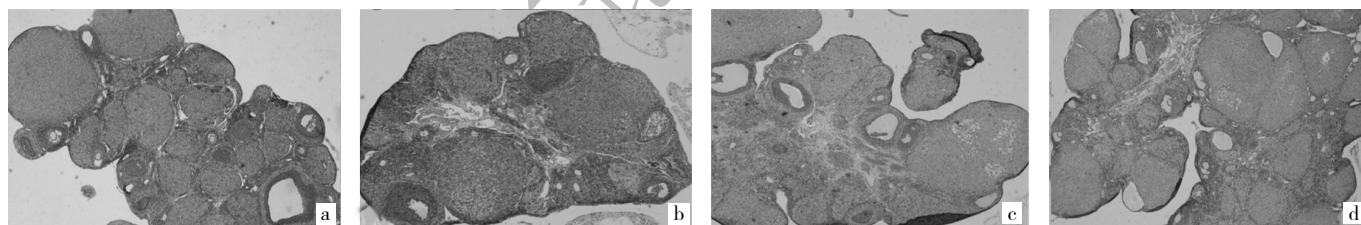


图 1 各组大鼠卵巢组织病理学形态(a:正常组;b:造模组;c:淫羊藿苷低剂量组;d:淫羊藿苷高剂量组;HE 染色,×40)

### 3 讨论

卵巢早衰指发生于 40 岁以前的闭经,发病率约为 1%,可对女性的健康造成严重影响,包括心理问题、不孕症、骨质疏松症、自身免疫性疾病、缺血性心脏病和增加死亡风险等,因此,对于卵巢早衰患者应尽早采取治疗措施。中医中虽然没有卵巢早衰的病名,但其发病特点在古籍中早有记载,可属“血枯”“不孕”“经水早断”等范畴,相似证治则散见于“闭经”“不孕”“经水不通”“年未老经先断”“月经过少”“月经后期”等病之中。肾藏精,主生长、发育与生殖。肾中精气充盛,天癸成熟,月经来潮,标志着女性卵巢生殖周期活动的开始;肾中精气衰

退,天癸耗竭,月经闭绝,提示女性卵巢生殖功能的结束。中医认为,肾中精气对于治疗生殖机能低下及其过早衰退的一类病症有较普遍的意义<sup>[4]</sup>。因此,对于防治女性生殖功能低下及过早衰退的病症,从肾论治,均有较普遍的意义<sup>[5]</sup>。卵巢早衰究其中医病机,多为肾中精血不足,阴阳失调,命门火衰所致。中医药针对卵巢早衰肾精不足的病机,予以补肾疗法,可有效改善和恢复卵巢功能。

对于卵巢早衰的治疗,西医常用雌孕激素治疗,但长期使用激素尤其是雌激素可导致一系列不良反应,如增加子宫内膜癌、乳腺癌及静脉栓塞性疾病的发病风险等<sup>[6]</sup>,故不宜长期服用。淫羊藿,又名仙灵脾,属小檗科多

年生草本植物,始载于汉代《神农本草经》,据载有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效<sup>[7]</sup>。研究发现,它可以调节下丘脑-垂体-卵巢轴的功能,已被广泛应用于卵巢早衰,恢复患者月经周期等病的治疗之中。现代药理学发现,淫羊藿中含有多种化学成分,其中黄酮类化合物作为最主要的有效成分,被认为具有多种生物活性,在这其中,淫羊藿苷又占很大比例<sup>[7]</sup>。多项研究表明,淫羊藿苷可增加碱性磷酸酶活性,降低抗酒石酸酸性磷酸酶活性,刺激雌二醇的产生<sup>[8]</sup>。这使得淫羊藿及其化合物成为除激素补充疗法外,治疗绝经症状可行的替代品。

顺铂致卵巢早衰的动物模型是根据临床化疗患者出现闭经及卵巢早衰而建立的。血清 AMH 水平相比卵巢窦状卵泡数、血促卵泡素及抑制素 B,能更早期、准确地反映育龄期女性卵巢的功能状态,是预测卵巢衰老的较准确的内分泌指标<sup>[9-10]</sup>。血清 AMH 水平现多用于卵巢功能的评估<sup>[11]</sup>,因其水平不依赖于月经周期,浓度随着年龄的增长而下降,是衡量卵巢早衰的良好标志<sup>[12]</sup>。在卵巢早衰患者中,血清 AMH 水平非常低,甚至可以忽略。此外,卵巢卵泡的数量和质量也被广泛使用作为反映卵巢储备功能的指标。本实验结果表明,雌性大鼠血清 AMH 水平因顺铂腹腔化疗而逐渐下降,表明顺铂腹腔化疗导致大鼠卵巢早衰造模成功。血清 AMH 水平与造模给药之间存在的负相关关系表明,雌性大鼠的卵巢早衰可能与血清 AMH 水平的降低有关。顺铂腹腔化疗可减少颗粒细胞 AMH 分泌,引起卵泡中的颗粒细胞凋亡<sup>[13]</sup>,减少卵泡总数,影响卵泡质量。本实验中,各组雌性大鼠在接受不同给药处理后,其卵巢储备功能出现了明显差异,其中造模组卵巢储备功能下降最多。病理组织学结果表明,顺铂腹腔化疗可破坏大鼠卵巢结构,显著降低其各级卵泡数,而淫羊藿苷能够明显减轻顺铂对大鼠卵巢组织结构的破坏及其对卵泡生长过程的抑制作用,促进卵泡生长,增加各级卵泡数,增加其血清 AMH 水平,从而增强卵巢的储备功能。本实验证实了淫羊藿苷能显著提高卵巢早衰模型大鼠血清 AMH 水平,增加大鼠卵巢卵泡的质量和数量,但其确切机制还有待进一步研究。

#### 4 参考文献

- [1] Alvaro Mercadal B, Imbert R, Demeestere I, et al. AMH mutations with reduced in vitro bioactivity are related to premature ovarian insufficiency[J]. Hum Reprod, 2015, 30(5):1196-1202. DOI: 10.1093/humrep/dev042.
- [2] 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.
- [3] 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.DOI: 10.3969/j.issn.1674-7860.2016.07.033.
- [4] 金毓莉,张婷婷,许华云,等.育肾助孕方对雷公藤多苷致卵巢储备下降大鼠卵巢形态和性激素的影响[J].中国中医药信息杂志, 2016, 23(6):56-59. DOI:10.3969/j.issn.1005-5304.2016.06.015.
- [5] 朱程芬,邱晓晓,帅军,等.补肾益冲抗衰汤对卵巢储备功能下降大鼠血清 AMH 和 INHB 的影响[J].浙江中西医结合杂志, 2016, 26(8):695-698.
- [6] Baber RJ, Panay N, Fenton A, et al. 2016 IMS Recommendations on women's midlife health and menopause hormone therapy[J]. Climacteric, 2016, 19(2): 109-150. DOI: 10.3109/13697137.2015.1129166.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社, 2010:306-307.
- [8] 王焕珍,柴艺汇,陈云志,等.淫羊藿化学成分与药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2016,12(7):63-65.DOI:10.11954/ytctyy/201607024.
- [9] Liu YQ, Han XF, Liu T, et al. A cell-based model of bone remodeling for identifying activity of icarrin in the treatment of osteoporosis[J]. Biotechnol Lett, 2015, 37(1):219-226. DOI: 10.1007/s10529-014-1661-8.
- [10] 朱晶,傅晓华,张岭,等.抗苗勒氏管激素水平测定对不同年龄段育龄期女性心血管疾病风险的预测价值[J].浙江医学, 2018, 40(6):586-588. DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2018.40.6.2017-1502.
- [11] Dewailly D, Andersen CY, Balen A, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women[J]. Hum Reprod Update, 2014,20(3):370-385. DOI: 10.1093/humupd/dmt062.
- [12] Oktay K, Rodriguez-Wallberg K, Munster P. Ovarian protection during adjuvant chemotherapy[J]. N Engl J Med, 2015, 372(23):2268-2269. DOI:10.1056/NEJMc1504241.
- [13] 张春燕,何援利.顺铂对人卵巢黄素化颗粒细胞的毒性及凋亡的影响[J].中国药理学通报, 2008, 24(6):796-799.

(收稿日期:2018-05-20)

(本文编辑:陈丽)