

淫羊藿总黄酮和薯蓣皂苷元联合用药对自然围绝经期大鼠影响的实验研究

李功营¹, 宋金带¹, 王剑²

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 观察中药有效组分淫羊藿总黄酮、薯蓣皂苷元对围绝经期大鼠内分泌激素水平、卵巢病变等影响。方法: 自然衰老围绝经期雌性SD大鼠30只, 随机分为3组, 各10只, 分别是中药低、高剂量组, 老年模型组, 另设6月龄左右雌性SD大鼠10只为青年对照组。中药组给予中药复方有效成分8周, 观察阴道涂片变化, 检测大鼠血清雌二醇(E₂)、促性腺激素释放激素(GnRH)、卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)值, 免疫蛋白印迹法检测卵巢凋亡蛋白半胱天冬酶(Caspase-3)、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白含量变化。结果: 与老年模型组比较, 青年对照组阴道涂片中有核上皮细胞百分率、E₂水平明显较高, LH、FSH、Caspase-3、VEGF的水平明显较低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 中药高剂量组阴道涂片中有核上皮细胞百分率、E₂、VEGF水平明显升高, Caspase-3的水平明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 中药低剂量组阴道涂片中有核上皮细胞百分率明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论: 淫羊藿总黄酮、薯蓣皂苷元合用能升高血清E₂和卵巢VEGF水平, 降低卵巢Caspase-3的表达, 从而延缓大鼠围绝经期的进程。

[关键词] 围绝经期综合征; 淫羊藿总黄酮; 薯蓣皂苷元; 有核上皮细胞; 血清雌激素; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2017)01-0009-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.01.003

Components of Epimedium Flavonoids and Diosgenin for Natural Perimenopause Rats

LI Gongying, SONG Jindai, WANG Jian

Abstract: Objective: To observe the effect of Chinese Medicine effective components epimedium flavonoids and diosgenin compound on endocrine hormone levels, ovarian diseases, etc. of natural perimenopause rats. Methods: Selected 30 female natural aging SD perimenopause rats and divided them into three groups randomly, 10 rats in each group. These groups were Chinese medicine low dosage group, Chinese medicine high dosage group and the elder model group. Selected other 10 six-month-old or so female SD rats as the youth control group. Rats in Chinese medicine groups were given effective components of Chinese medicine compound for eight weeks. Observed changes of vaginal smears and detected serum estradiol(E₂), gonadotropin releasing hormone(GnRH), follicle stimulating hormone(FSH) and luteinizing hormone(LH). Adopted western blot method to detect content changes of ovarian apoptosis protein Caspase(Caspase-3) and vascular endothelial growth factor(VEGF) protein. Results: When comparing with elder model group, in youth control group, percentage of nucleated epithelial cells on the vaginal smears and E₂ level were evidently higher, levels of LH, FSH, Caspase-3, VEGF obviously lower, differences being significant($P < 0.05$, $P < 0.01$). In Chinese medicine high dosage group, comparing with elder model group, percentage of nucleated epithelial cells on the vaginal smears, levels of E₂ and VEGF were significantly raised; levels of Caspase-3 were declined obviously, showing significant differences($P < 0.05$, $P < 0.01$). And in Chinese medicine low dosage group, percentage of nucleated epithelial cells on the vaginal smears was increased evidently as comparing with elder model group($P < 0.01$). Conclusion: Epimedium flavonoids and diosgenin compound can elevate levels of E₂ and VEGF, and decrease expression of ovarian Caspase-3, so as to delay the process of Perimenopause in rats.

Keywords: Perimenopausal syndrome; Epimedium flavonoids; Diosgenin; Nucleated epithelial cells; Serum estrogen; Animal experiment; Rats

[收稿日期] 2016-07-18

[基金项目] 广东省科技攻关项目资助(2011B031700037)

[作者简介] 李功营(1964-),男,主任药师,研究方向:中医药延缓衰老。

[通讯作者] 王剑, E-mail: nihaogz@126.com.

围绝经期综合征是妇女在绝经前后由于卵巢功能衰退,雌激素水平下降,机体内分泌重新调整,患者不能适应而引起植物神经功能紊乱,伴有神经心理症状的一组症候群。中医学认为该病主要归于先天之本肾中精气的衰竭,和后天之本脾气的亏虚,因而脾肾双补是中医学治疗围绝经期综合征的主要方法。传统的汤药或丸药因服用不方便或服用剂量大而限制了其广泛运用,本课题组从补肾中药淫羊藿和补脾中药山药中提取淫羊藿总黄酮和薯蓣皂苷元,观察对围绝经期综合征模型大鼠的效果,为临床治疗围绝经期综合征提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理 18月龄雌性SD大鼠30只(体质量范围450~510g),6月龄左右雌性SD大鼠10只(体质量范围170~200g),均购于广州中医药大学动物实验中心,广东省动物实验证编号:00103084,随机分为3组,每组10只,分别是中药低剂量组、中药高剂量组、老年模型组;另购6月龄左右的雌性大鼠10只作为青年对照组。动物实验通过本校动物伦理委员会的审批。按成人每天服用80mg淫羊藿总黄酮、80mg薯蓣皂苷元为标准,得到大鼠的等效剂量(8mg/kg淫羊藿总黄酮、8mg/kg薯蓣皂苷元)和5倍量(40mg/kg淫羊藿总黄酮、40mg/kg薯蓣皂苷元)分别作为低剂量和高剂量给药。淫羊藿总黄酮、薯蓣皂苷元在实验前以豆油溶化和稀释,予大鼠灌胃;青年对照组和老年模型组以等量的豆油灌胃,每天给药1次,持续8周。

1.2 实验药物和试剂 淫羊藿总黄酮纯度80%,薯蓣皂苷元纯度80%,由广州中医药大学中医基础理论学科实验室提供;雌二醇(E₂)、卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)放射免疫试剂盒由核医学室提供;一抗(Caspase-3、VEGF兔抗大鼠单克隆抗体,1:1000)购自CST公司,二抗购自CST公司;大鼠促性腺激素释放激素(GnRH)的ELISA试剂盒购自广州齐云生物公司。

1.3 实验仪器 SMARTe系列一体化数码显微镜;高速台式冷冻离心机(TGL-16);化学发光检测仪(Kodak 4000);离心机(SIGMA 1-16K),切片机(徕卡CM1950)。

1.4 有核上皮细胞的测定 给药第五周开始采用阴道涂片法检查,1%美兰染色,显微镜下进行细胞学检查。对大鼠逐只进行阴道涂片检查,每天1次,连续15天。统计有核上皮细胞所占比例(有核上皮细胞呈椭圆形,方便观察)。

1.5 血清激素水平测定 血样于低速离心机4000 r/min、离心15 min后取血清,送交广州中医药大学核医学室以放射免疫法检测E₂、FSH和LH值。GnRH的检测采用ELISA法。

1.6 卵巢半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白水平测定 各组实验动物于最后1次给药后,称重,禁食12 h,按照0.3 mL/100 g腹腔注射10%水合氯醛溶液,麻醉后剖开腹腔,腹主动脉采血。取出卵巢,取1/2组织置于4%中性甲醛中固定待测病理染色,1/2组织用锡纸包

裹,做好标记后放入液氮速冻,之后转至-80℃冰箱保存待测。

1.7 卵巢组织切片 HE染色 取出卵巢组织,固定、脱水、透明、包埋、石蜡切片、HE染色,显微镜下观察。

1.8 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数间两两比较采用方差分析,率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠阴道涂片中有核上皮细胞百分率比较 见表1。与老年模型组比较,青年对照组、中药高、低剂量组阴道涂片中有核上皮细胞百分率明显较高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 各组大鼠阴道涂片中有核上皮细胞百分率比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	有核上皮细胞百分率(%)
中药低剂量组	67.3±9.3 ^①
中药高剂量组	71.7±7.0 ^①
青年对照组	76.6±7.6 ^①
老年模型组	14.8±1.5

与老年模型组比较,① $P < 0.01$

2.2 各组大鼠给药后血清激素水平结果比较 见表2。与老年模型组比较,中药高剂量组和青年对照组的E₂水平明显较高,青年对照组的LH和FSH水平明显较低,差异均有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。

表2 各组大鼠给药后血清激素水平结果比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	GnRH(ng/L)	E ₂ (pg/mL)	LH(mIU/mL)	FSH(mIU/mL)
中药低剂量组	301.20±20.75	20.27±8.52	5.43±1.53	1.60±0.82
中药高剂量组	303.63±42.16	26.70±11.40 ^①	5.03±1.42	1.76±0.57
青年对照组	305.96±23.33	38.49±2.75 ^②	3.65±0.25 ^②	1.08±0.18 ^②
老年模型组	290.95±7.528	16.51±6.19	6.01±2.22	1.61±0.83

与老年模型组比较,① $P < 0.05$,② $P < 0.01$

2.3 各组大鼠卵巢Caspase-3、VEGF蛋白灰度值半定量分析结果比较 见表3。与老年模型组比较,青年对照组Caspase-3和VEGF的水平明显较低;中药高剂量组Caspase-3的水平明显降低,VEGF明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表3 各组大鼠卵巢Caspase-3、VEGF蛋白灰度值半定量分析结果比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Caspase-3(灰度值)	VEGF(灰度值)
中药低剂量组	7.50±0.50	1.67±0.42
中药高剂量组	4.50±0.71 ^①	1.80±0.20 ^①
青年对照组	2.33±1.53 ^①	1.07±0.12 ^①
老年模型组	8.50±0.58	1.40±0.35

与老年模型组比较,① $P < 0.01$

2.4 各组卵巢组织切片 HE 染色结果 见图 1。青年对照组：卵巢皮质光镜下可见较多各级生长卵泡，包括成熟卵泡，还有黄体，见图 A。老年模型组：卵巢内卵泡总数少，各级生长卵泡尤其成熟卵泡少，黄体数量亦少，见图 B。中药高剂量组：卵

巢皮质光镜下可见各级生长卵泡，卵泡总数较老年模型组为多，见图 C。中药低剂量组：成熟卵泡较少，明显低于高剂量组，见图 D。

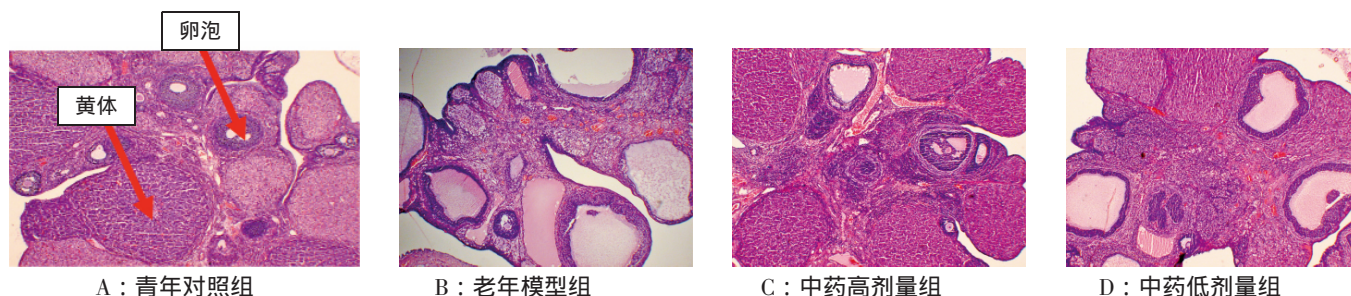


图 1 各组大鼠卵巢切片 HE 染色结果 (×100)

3 讨论

大鼠 3~6 月龄为青年期，8~12 月龄为中年期，24 月龄以后为老年期，由中年向老年的过渡时期为老年前期，12~18 月龄的雌性大鼠生殖内分泌功能衰退的表现与围绝经期女性极为相似，因此经常用来研究女性围绝经期综合征^[1]。本研究中卵巢衰老模型为自然衰老的围绝经期模型大鼠，因此本研究中得出的结果也更具现实参考价值及临床指导意义，为中药治疗卵巢衰老提供一定的参考依据。

淫羊藿具有补肾壮阳、强筋骨等功效，可用于治疗骨质疏松症、更年期综合征等。从淫羊藿中提取的淫羊藿总黄酮可调整下丘脑-垂体-性腺轴功能。山药具有平补脾肾的功效，从中提取的薯蓣皂苷元与体内甾体激素分子基本结构相似，被人体吸收后，可促进包括性激素、皮质激素等甾体类激素的生物合成。

给予淫羊藿总黄酮和薯蓣皂苷元后，大鼠阴道涂片中有核上皮细胞百分率明显升高，有显著差异($P < 0.01$)，说明具有改善卵巢衰老大鼠动情周期的作用。淫羊藿总黄酮和薯蓣皂苷元合用能显著提高 E_2 水平，但对 FSH、LH、GnRH 改变不明显，可能与改善卵巢组织对下丘脑-垂体轴的敏感性有关^[2-3]。从卵巢 HE 染色结果发现，给药组卵泡数量明显高于模型组，提示在卵巢水平具有延缓衰老的作用。

卵巢中卵泡的闭锁与颗粒细胞凋亡密切相关，颗粒细胞过多凋亡直接影响卵母细胞的质量和发育潜能。半胱天冬酶家族(Caspase)是哺乳动物细胞凋亡的启动者和执行者，其中 Caspase-3 是 Caspase 下游最关键的凋亡蛋白酶，直接执行细胞凋亡的职能，本实验中，给药组 Caspase-3 含量较模型组明显下调，说明补脾肾中药可以减缓卵巢的凋亡。

与青年大鼠比较，VEGF 蛋白在衰老大鼠卵巢中的表达增强是一种代偿反应，是因卵巢卵泡微循环不足，引起缺氧而引起的。这种代偿反应是有益的，因为 VEGF 促使卵泡周围微血管生成，从而使卵泡有机会得到更多的血液，促进 FSH 和 LH 的生成^[4-5]。研究发现，相同年龄群的个体之间，VEGF 水平高卵巢功能更优^[6]。本实验发现中药各剂量组和老年模型组比较，VEGF 含量明显升高，说明中药调动了 VEGF 的升高这种良性代偿反应。

[参考文献]

- [1] 程化奇,熊舜华,殷新尤,等. 大鼠更年期实验模型研究[J]. 上海实验动物科学, 1993, 13(4): 192-196.
- [2] 沈皓,蔡德培,陈伯英. 补肾中药对下丘脑-垂体促性腺机能的影响[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(1): 53-57.
- [3] 蔡德培,张炜. 补肾中药对下丘脑 GnRH、垂体 FSH、LH 及成骨细胞 BGP 基因表达的调节作用[J]. 中医杂志, 2002, 43(3): 221-223.
- [4] 沈维干,李金兰,朱军,等. 不同日龄小鼠卵丘颗粒细胞对卵泡刺激素/缺氧诱导因子-1 信号通路的影响[J]. 生殖医学杂志, 2008, 17(1): 43-48.
- [5] 赖志文. 利用小鼠生理性卵巢衰老模型研究缺氧诱导因子-1a 在卵巢衰老过程中作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- [6] 金锐,包俊华,王燕蓉,等. VEGF 超促周期妇女血清及卵泡液中血管内皮生长因子水平的研究[J]. 宁夏医学杂志, 2012, 34(9): 875-877.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)