

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:49 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.017.html>

定坤丹对多囊卵巢模型大鼠生殖功能的影响

宋玉荣, 王文艳, 卫兵

摘要 目的 研究定坤丹对多囊卵巢综合征(PCOS)模型大鼠生殖功能的影响。方法 采用丙酸睾酮注射液联合绒毛膜促性腺素造模法建立PCOS模型,比较给药前后大鼠卵巢形态学、性激素水平、卵巢中血管内皮生长因子(VEGF)及子宫内膜同源框基因A10(HOXA10)表达情况。结果 与模型组大鼠比较,定坤丹组卵巢内黄体数增加,血清促黄体生成素(LH)与雄激素(T)下降,卵泡刺激素(FSH)上升,卵巢VEGF表达下降,子宫HOXA10基因表达上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 定坤丹对PCOS模型大鼠具有促排卵、提高子宫内膜容受性作用。其机制可能与调节多囊卵巢模型大鼠体内性激素水平、减少卵巢中VEGF表达、增加子宫HOXA10表达有关。

关键词 多囊卵巢综合征; 定坤丹; 血管内皮生长因子; 同源框基因A10

中图分类号 R 711.51

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1473-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.017

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是妇科常见生殖内分泌代谢紊乱的疾病之一。PCOS是一种雄激素过多、伴有慢性无排卵和多囊卵巢形态等一系列变化的生殖内分泌紊乱疾病^[1]。目前PCOS病因及发病机制不明确,发病机制可能与代谢、胰岛素抵抗、免疫反应及炎症、血管生成学说等相关。临床常表现为月经稀发、多毛、痤疮、不孕等症状。治疗方式以药物为主,常用药物副作用大、复发率高,因此需寻求副作用小及疗效确切的药物。定坤丹具有滋补气血、活血化瘀、理气疏郁的功效。目前定坤丹对治疗PCOS尚无文献报道。该研究以卵巢形态学、性激素、卵巢血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、子宫内膜同源框基因A10(homeobox gene A10, HOXA10)为研究指标,研究定坤丹对多囊卵巢模型大鼠的内分

泌调控及促排卵、子宫内膜容受性方面的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 定坤丹(山西广誉国药有限公司);枸橼酸氯米芬胶囊(上海衡山药业有限公司);丙酸睾酮注射液(天津金耀药业有限公司);绒毛膜促性腺素(丽珠集团丽珠制药厂);卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(androgen, T)(武汉华美生物有限公司);HOXA10抗体(美国Abcam公司);VEGF抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.1.2 动物 21 d SPF级雌性SD乳鼠61只,50~60 g,由安徽医科大学动物实验中心提供,乳鼠饲养于安徽医科大学动物实验室,室内温度25℃,颗粒饲料常规饲养,饮用自来水。

1.2 方法

1.2.1 多囊卵巢大鼠模型建立 根据Beloosesky et al^[2]造模方法建立模型,50只大鼠于23日龄起颈背部皮下注射丙酸睾酮(1.25 mg/只,1次/d)及绒毛膜促性腺素(1.5 IU/只,2次/d),持续5周。另外11只为正常组,同期皮下注射食用橄榄油(0.05 ml,1次/d)及生理盐水(0.1 ml/只,2次/d),持续5周。期间大鼠每周测体重1次,造模最后10 d,大鼠每日行阴道涂片检查。

1.2.2 模型检测与纳入标准 阴道涂片提示建立模型的50只大鼠中有43只动情周期失去规律性变化,镜下见大量持续角化细胞,正常组11只仍保持规律的动情周期。从失去动情周期43只大鼠中随机选取10只处死,处死后取卵巢,显示卵巢体积增大,表面见囊状扩张明显的卵泡,4%甲醛固定12 h后行HE染色,镜下观察显示大鼠卵泡膜层增厚,颗粒细胞层数减少,卵巢间质细胞增生明显,其下有较多早期发育的小卵泡与闭锁卵泡,卵泡囊状扩张明显,提示模型复制成功。

1.2.3 实验分组及给药 结合阴道涂片及卵巢HE染色确定造模成功,43只大鼠中剩下的33只大鼠随机分为3组:模型对照组、定坤丹组、克罗米芬组。

2016-05-30 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:81100412);安徽省公益性研究联动计划项目(编号:5101ID04041)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院妇产科,合肥 230601

作者简介:宋玉荣,女,硕士研究生;

卫兵,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: weibing1965@hotmail.com

根据《实验动物学》药物剂量,定坤丹组 2.20 g/(kg·d),克罗米芬组 5 mg/(kg·d) 模型对照组、正常组每只给予等量蒸馏水灌胃,每日 1 次,共 3 周,期间正常组 1 只因灌胃操作不规范死亡。

1.3 指标检测与方法 给药期间每周大鼠测体重 1 次,比较大鼠用药前后体重。用药 3 周后摘取卵巢及子宫,比较卵巢体重。取腹主动脉血行血清学检测,HE 染色,镜下观察卵巢形态;免疫组化检测卵巢 VEGF 及子宫内膜 HOXA10 基因表达。

1.3.1 ELISA 法检测大鼠血清中性激素 末次给药后禁食过夜,次日 2% 戊巴比妥钠(0.2 ml/100 g)腹腔麻醉后打开腹腔取腹主动脉血,血液收集于 1.5 ml EP 管中,静置 2 h,分离血清(2 000 r/min,15 min) 将血清置于 -20 °C 冰箱保存。根据 ELISA 说明书测 T、LH、FSH,用酶标仪测定光密度(optical density,OD) 值,绘制标准曲线,通过标准曲线测浓度。

1.3.2 HE 染色 取卵巢及子宫,卵巢称重,4% 甲醛固定,卵巢固定 12 h,脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片、HE 染色、中性塑胶封片,光学显微镜观察卵巢形态。

1.3.3 免疫组化检测 卵巢及子宫固定 12 h,脱水、包埋、切片分别按照山羊超敏二步法及通用型二步法检测试剂盒操作说明操作。免疫组化二步法测定 VEGF 在大鼠卵巢组织中的表达及 HOXA10 在子宫内膜组织中的表达,每个样本随机选取 5 个不重叠高倍镜(40×10) 视野进行观察拍照,采用 Image Proplus 软件分析图像,对所有切片中阳性区域的单位 OD 值进行定量分析,测定 VEGF 及 HOXA10 的平均 OD 值,反应卵巢组织中 VEGF 及子宫组织中 HOXA10 基因表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组独立样本比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 4 组大鼠体重比较 4 组大鼠体重差异有统计学意义($F = 16.46, P < 0.01$)。模型对照组大鼠较正常组体重增长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。定坤丹组与克罗米芬组大鼠较模型组大鼠体重减轻,差异有统计学意义($P < 0.05$)。定坤丹组体重减轻明显,与克罗米芬组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 4 组大鼠卵巢体重比较 4 组大鼠卵巢体重差

异有统计学意义($F = 18.56, P < 0.01$)。与正常组比较,模型对照组卵巢重量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型对照组比较,定坤丹组卵巢重量减轻,差异有统计学意义($P < 0.05$)。克罗米芬组重量下降,差异无统计学意义。与克罗米芬组比较,定坤丹组卵巢重量减轻,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠体重和卵巢重量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	大鼠体重(g)	卵巢重量(g)
正常	10	124.2 ± 9.2	0.026 ± 0.003
模型对照	11	144.0 ± 8.4*	0.049 ± 0.010*
定坤丹	11	130.4 ± 2.4#	0.037 ± 0.004#
克罗米芬	11	136.5 ± 5.2#	0.044 ± 0.008

与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

2.3 4 组大鼠性激素比较 4 组大鼠血清 LH、FSH、T 浓度差异有统计学意义($F = 32.47、15.49、7.36, P < 0.01$)。与正常组比较,模型对照组 LH、T 升高、FSH 下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型对照组比较,定坤丹组 LH 及 T 下降、FSH 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);克罗米芬组 LH 下降、FSH 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),T 浓度差异无统计学意义。与克罗米芬组比较,定坤丹组 LH、T 下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),FSH 浓度差异无统计学意义,见表 2。

表 2 各组大鼠 LH、FSH、T 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LH(mIU/ml)	FSH(mIU/ml)	T(ng/ml)
正常	10	5.53 ± 0.58	4.69 ± 0.69	2.31 ± 0.83
模型对照	11	9.14 ± 1.10*	2.86 ± 0.78*	3.64 ± 1.13*
定坤丹	11	7.14 ± 0.73#	3.66 ± 0.23#	2.35 ± 0.60#
克罗米芬	11	8.12 ± 0.93#	3.46 ± 0.63#	3.13 ± 0.30

与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

2.4 卵巢镜下形态观察 镜下观察:正常组见颗粒细胞多层,见多个黄体;模型对照组见颗粒细胞层数减少,卵泡囊状扩张明显,卵泡膜细胞层及白膜增厚,未见黄体;定坤丹组及克罗米芬组颗粒细胞层数增多,白膜及卵泡膜细胞层较模型组变薄,黄体数目增多,见图 1。

2.5 模型对照组卵巢大体形态 模型对照组大鼠卵巢重量增加,体积增大明显,部分水肿,卵巢表面见多个透明扩张的卵泡,见图 2。

2.6 免疫组化二步法检测结果 VEGF 表达的阳性信号为浅棕色至深棕色颗粒,卵巢颗粒细胞、卵泡膜细胞及间质细胞均有表达。半定量实验结果:4

组大鼠卵巢组织 VEGF 表达差异有统计学意义 ($F = 17.54, P < 0.05$)。与正常组比较,模型对照组 VEGF 表达明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型对照组比较,定坤丹组 VEGF 表达降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),克罗米芬组 VEGF 表达差异无统计学意义。与正常组比较,定坤丹组 VEGF 表达差异无统计学意义,见图 3、表 3。

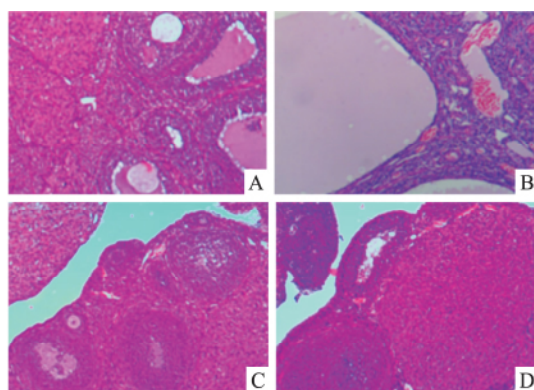


图 1 各组大鼠卵巢形态学 HE $\times 400$

A: 正常组; B: 模型对照组; C: 定坤丹组; D: 克罗米芬组



图 2 模型对照组大鼠卵巢大体形态

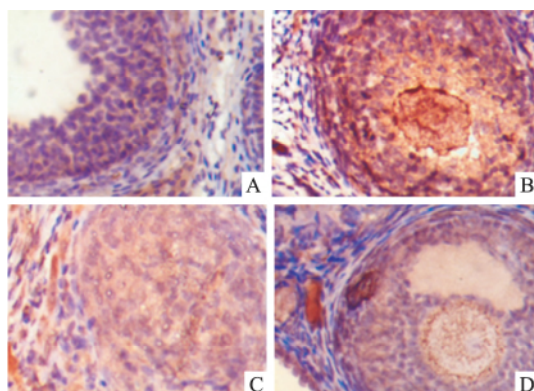


图 3 各组大鼠卵巢组织中 VEGF 的表达 免疫组化 $\times 400$

A: 正常组; B: 模型对照组; C: 定坤丹组; D: 克罗米芬组

2.7 免疫组化二步法检测 HOXA10 基因表达

HOXA10 基因表达信号为浅棕色至深棕色颗粒,子宫内膜腺上皮、腔上皮细胞质,间质细胞核及细胞质均有表达。半定量分析结果:4 组大鼠子宫内膜

HOXA10 基因表达差异有统计学意义 ($F = 11.21, P < 0.05$)。与正常组比较,模型对照组大鼠子宫 HOXA10 表达降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型对照组比较,定坤丹组 HOXA10 表达增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),克罗米芬组表达差异无统计学意义。与正常组比较,定坤丹组 HOXA10 表达差异无统计学意义,见图 4、表 3。

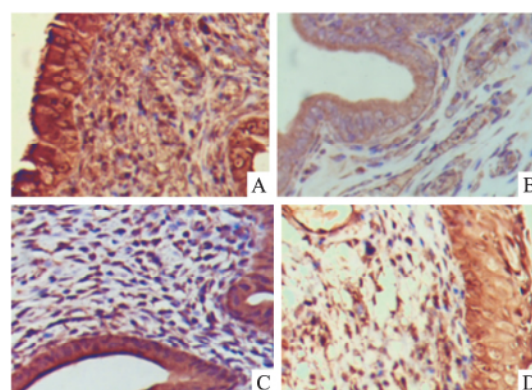


图 4 各组大鼠子宫内膜 HOXA10

基因表达 免疫组化 $\times 400$

A: 正常组; B: 模型对照组; C: 定坤丹组; D: 克罗米芬组

表 3 各组大鼠卵巢 VEGF 及子宫 HOXA10 基因平均 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF	HOXA10
正常	10	0.256 $\pm$ 0.040	0.464 $\pm$ 0.070
模型对照	11	0.376 $\pm$ 0.020*	0.312 $\pm$ 0.030*
定坤丹	11	0.232 $\pm$ 0.040#	0.445 $\pm$ 0.060#
克罗米芬	11	0.348 $\pm$ 0.030	0.312 $\pm$ 0.030

与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

PCOS 是孕龄期妇女月经紊乱常见的一种疾病,同时也是不孕症的主要原因之一,我国孕龄妇女患病率约为 5% ~ 10%,占无排卵性不孕症的 75%^[3],目前病因、机制复杂,不明确,临床表现呈多态性,治疗困难。其发病机制可能为下丘脑-垂体-卵巢轴失调、胰岛素抵抗、肾上腺功能异常,生长激素、类胰岛素样生长因子及受体、结合蛋白等分泌失常有关^[4]。研究^[5]表明 PCOS 发病与血管生成有关,VEGF 被认为可能参与了 PCOS 的发病。VEGF 是一种多功能的生长因子,可以促进血管内皮有丝分裂,促进新生血管形成,增加血管通透性。PCOS 患者体内 VEGF 过多导致卵巢内膜和间质增生及血管增多,卵巢血管生成异常导致不排卵。

Abramovich et al^[5]发现下调 VEGF 的表达可促进卵泡的排卵和发育。本次实验结果显示定坤丹降低卵巢中 VEGF 含量,与模型对照组比较差异有统计学意义。

PCOS 患者存在妊娠率低、流产率高,研究^[6]显示主要原因之一是子宫内膜容受性低。子宫内膜容受性是指母体子宫内膜处于一种允许胚胎黏附、穿透并植入的状态^[7]。PCOS 妊娠率低的原之一是胚胎着床障碍,而子宫内膜容受性低是阻碍胚胎着床的主要因素之一。HOXA10 是目前公认的 PCOS 子宫内膜相关基因,HOXA10 是一种多效性转录因子,参与胚胎种植各个环节,具有控制胚胎发育和调节细胞分化的作用,如子宫内膜的增殖与分化、子宫内膜容受性建立、胚胎定位、黏附及胞饮突形成、蜕膜化等,是胚胎着床和成功妊娠所必须的。无排卵患者子宫内膜 HOXA10 表达普遍低于正常者。HOXA10 表达受多种因素影响,雌孕激素上调 HOXA10 表达,睾酮阻断 HOXA10 表达。体外研究^[8]表明,雄激素可直接降低子宫内膜 HOXA10 的表达,提示降低雄激素可能有助于改善子宫内膜的容受性。此次实验数据可以看出,与正常组比较,模型对照组雄激素高、HOXA10 基因表达低,差异有统计学意义。定坤丹能显著降低血清雄激素,提高子宫内膜 HOXA10 表达,与模型对照组比较差异有统计学意义。

目前 PCOS 主要治疗方法是药物治疗,药物治疗目的是调整月经周期及促排卵。促排卵常用的一线药物克罗米芬,具有高排卵、低怀孕率特点,且 20%~25% 患者对克罗米芬无反应^[9]。克罗米芬干扰体内激素分泌,子宫内膜容受性低是其低妊娠率原因之一。本次实验结果显示与模型对照组比较,克罗米芬组子宫内膜 HOXA10 表达差异无统计学意义,即无提高子宫内膜容受性作用。中医认为 PCOS 基本机制为肾虚血瘀。定坤丹具有调补肝肾、益气养血、暖宫功效,主要用于不孕症及月经不调的治疗。与模型对照组比较,定坤丹组大鼠体重及卵

巢重量减轻,大鼠卵巢内卵泡成熟,黄体数增加。定坤丹对于多囊卵巢模型大鼠有促排卵作用,其机制可能通过调节下丘脑-垂体-卵巢轴,降低黄体生成素及雄激素,升高卵泡刺激素,抑制卵巢 VEGF 表达,抑制卵巢新生血管形成,改善卵巢血流,提高卵泡质量,促进卵巢排卵。定坤丹具有提高子宫内膜容受性作用,机制可能与改善大鼠体内激素分泌、降低雄激素、上调 HOXA10 表达有关。本次实验为临床使用定坤丹治疗 PCOS 提供了一定的实验依据。

参考文献

- [1] Turner-McGrievy G M, Davidson C R, Wingard E E, et al. Low glycemic index vegan or low-calorie weight loss diets for women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled feasibility study [J]. *Nutr Res* 2014, 34(6): 552-8.
- [2] Beloosesky R, Gold R, Almog B, et al. Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio [J]. *Int J Mol Med*, 2004, 14(2): 207-15.
- [3] 乔杰,李蓉,李莉,等.多囊卵巢综合征流行病学研究[J]. *中国实用妇科与产科杂志* 2013, 39(11): 849-52.
- [4] 张璇,陈捷,林岚.卵巢打孔术配合苍附导痰汤治疗多囊卵巢综合征不孕疗效观察[J]. *广西中医药大学学报*, 2013, 16(1): 49-51.
- [5] Abramovich D, Irusta G, Bas D, et al. Angiopoietins/TIE2 system and VEGF are involved in ovarian function in a DHEA rat model of polycystic ovary syndrome [J]. *Endocrinology* 2012, 153(7): 3446-56.
- [6] 郑海珍,陈彩飞.达英-35、二甲双胍联合克罗米芬治疗多囊卵巢综合征不孕患者的临床疗效[J]. *中国妇幼保健* 2010, 25(30): 4431-3.
- [7] 孙园园,许小凤.子宫内膜容受性中西医实验研究进展[J]. *吉林中医药* 2013, 33(1): 102-3.
- [8] Cloke B, Christian M. The role of androgens and the androgen receptor in cycling endometrium [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 358(2): 166-75.
- [9] 张婷,许彦来.补肾活血清肝方联合氯米芬治疗多囊卵巢综合征 90 例临床观察[J]. *中国中医基础医学杂志* 2014, 20(2): 266-7.

Effects of Ding Kundan on the reproductive function of polycystic ovary model rats

Song Yurong, Wan Wenyan, Wei Bing

(Dept of Gynecology and Obstetrics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To study the influence of Ding Kundan on the reproductive function of polycystic ovary syn-

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:49 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.018.html>

◇ 临床医学研究 ◇

CT-on-rail 图像引导技术在肺癌放疗中的应用

周梦熙, 王凡, 董东, 陈香存

摘要 目的 比较滑轨 CT(CT-on-rail) 和电子射野影像系统(EPID) 两种图像引导放射治疗(IGRT) 技术在肺癌放疗中的应用, 并比较不同图像匹配方式对放疗摆位精度的影响。方法 对 16 例肺癌患者在放疗期间每周行 1 次 EPID 和 CT 扫描并进行图像配准, 得出 X、Y、Z 3 个线性方向的误差值, 进行统计学分析, 对 2 种 IGRT 方法进行比较; 滑轨 CT 组分别有灰度、轮廓和骨性标志模式, 观察 3 种配准方式对摆位精度的影响。结果 CT 和 EPID 配准的 X、Y、Z 三维方向差异均有统计学意义($P < 0.05$)。CT 配准组中通过 3 种配准方法得出 X 轴、Z 轴图像匹配采用灰度模式比轮廓和骨性标志模式精度高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); Y 轴上灰度模式和轮廓模式精度高于骨性标志模式, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 基于 CT-on-rail 系统进行的图像引导放射治疗比基于 EPID 系统进行的图像引导放射治疗精度高; 在使用滑轨 CT 进行肺癌图像引导放疗时, 建议首选灰度模式配准。

关键词 滑轨 CT; 电子射野影像系统; 图像引导放射治疗; 摆位误差

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1477-04

2016-07-28 接收

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(KJ2009A82)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肿瘤放疗科, 合肥 230022

作者简介: 周梦熙, 女, 硕士研究生;

王凡, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangfan1965@126.com

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.018

图像引导放射治疗(image guided radiation therapy, IGRT) 是一种新型的、通过一系列影像系统进行靶区定位和患者摆位的肿瘤放疗技术^[1]。在肿瘤放疗过程中结合 CT、核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、正电子发射计算机断层显像(positron emission tomography, PET) 或超声等影像设备, 借助某些特殊解剖结构与计划图像进行配准融合, 其目的是减少放疗期间靶区位移误差和摆位误差, 监测和校正放疗时肿瘤和正常组织运动引起的误差, 实时监测肿瘤及其标志物^[2], 更好地保护正常组织器官, 减轻放疗副作用, 提高肿瘤照射量。IGRT 包括电子射野影像系统(electronic portal imaging device, EPID)、KV 级 X 线摄片和透视、滑轨 CT(CT-on-rail)、锥形束 CT(cone beam computerized tomography, CBCT) 等。当前最常用的是 CT-on-rail 和 KV 级或 MV 级 CBCT, 其采集靶区 2D 图像, 并迅速将其重建为 3D 图像, 在整个治疗过程中对放射线和荧光进行监控, 以减少靶区运动和周围正常组织生理变化引起的摆位变化^[3]。肺癌放疗过程中, 由于分次间的摆位误差、分次间的靶区移位和变形以及分次中的运动误差, 肺癌精确放疗的摆位重复性较差, 放疗精确度不如其他部位尤其是头颈部肿

drome model rats. **Methods** The PCOS model was established by using testosterone propionate injection combined with human chorionic gonadotropin to compare rat ovarian morphology, sex hormones levels, the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in ovary and homeobox gene A10(HOXA10) in uterus before and after drug administration. **Results** In a comparison to the model group, the number of ovarian corpus luteum of the Ding Kundan group was increased, and the serum luteinizing hormone(LH) and androgens(T) level of the Ding Kundan group declined, but follicle stimulating hormone(FSH) increased, the expression of VEGF in ovary reduced while HOXA10 in uterus rose. On top of that, their differences were statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** Ding Kundan has the function of promoting ovulation and can increase the role of endometrial receptivity. The mechanism may relate to the regulation of the serum sex hormones levels, the decrease of VEGF expression in ovary, and the addition of HOXA10 in uterus in PCOS model rats.

Key words polycystic ovary syndrome; Ding Kundan; vascular endothelial growth factor; homeobox gene A10