

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.009

淫羊藿总黄酮对多囊卵巢综合征大鼠性激素水平的影响

徐彩生, 罗丽莉, 曾如辉, 陈晓红

(广东省汕头大学医学院第一附属医院妇产科, 汕头 515000)

【摘要】目的:探讨淫羊藿总黄酮对多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)大鼠性激素水平的影响。**方法:**55 只 SD 大鼠连续灌胃 1 mg/kg 来曲唑 21 d, 建立 PCOS 大鼠模型; 选取造模成功的 50 只大鼠随机分为 PCOS 模型组, 达英-35 组, 淫羊藿总黄酮低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg), 另设正常对照组($n=10$)。连续治疗 21 d 后, 测量大鼠体重、卵巢重量, 计算卵巢指数; 采用放射免疫法测定各组大鼠血清睾酮(testosterone, T)、促卵泡生成素(follicle stimulating hormone, FSH)、雌二醇(estradiol, E2)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH) 水平。**结果:**与正常对照组相比, PCOS 组大鼠卵巢重量和卵巢指数均显著升高($P<0.05$), 血清 T、LH 水平显著升高($P<0.001$), E2 水平明显下降($P<0.01$), LH/FSH 比值明显高于正常组($P<0.01$); 经 21 d 治疗后, 与 PCOS 模型组相比, 200 mg/kg 淫羊藿总黄酮组大鼠卵巢重量和卵巢指数均显著下降($P<0.05$), 血清 T、LH 水平显著降低($P<0.01$), E2 显著升高($P<0.01$), LH/FSH 比值亦明显下降($P<0.01$)。100 mg/kg 和 50 mg/kg 淫羊藿总黄酮作用较弱。**结论:**淫羊藿总黄酮可改善 PCOS 大鼠高雄激素血症, 调节 LH/FSH 异常, 升高 E2, 改善卵巢功能。

【关键词】淫羊藿总黄酮; 多囊卵巢综合征; 高雄激素血症; 来曲唑

【中国图书分类法分类号】R711.75

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-05-25

Effects of epimedium total flavonoids on sex hormone in rats with polycystic ovary syndrome

XU Caisheng, LUO Lili, ZENG Ruhui, CHEN Xiaohong

(Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Shantou Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effects of epimedium total flavonoids on sex hormone in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods:** Letrozole (1 mg/kg) was intragastrically administered in SD rats for 21 d to establish PCOS model. The PCOS rats were randomly divided into 5 groups ($n=10$): PCOS model group, Diane-35 group (240 mg/kg), epimedium flavonoids group (50, 100,

作者介绍: 徐彩生, Email: xucaisheng123789@163.com,

研究方向: 妇科内分泌, 妇科腔镜。

tion[J]. J Urol, 2001, 166(1): 341-346.

[11] Kakkar R, Kalra J, Mantha S V, et al. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats[J]. Mol Cell Biochem, 1995, 151(2): 113-119.

[12] Rizk D E, Padmanabhan R K, Tariq S, et al. Ultra-structural morphological abnormalities of the urinary bladder in streptozotocin-induced diabetic female rats[J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2006, 17(2): 143-154.

[13] Garg M C, Chaudhary D P, Bansal D D. Effect of vitamin E supplementation on diabetes induced oxidative stress in experimental diabetes in rats[J]. Indian J Exp Biol, 2005, 43(2): 177-180.

[14] Celik S, Baydas G, Yilmaz O. Influence of vitamin E on the levels of fatty acids and MDA in some tissues of diabetic rats[J]. Cell Biochem Funct, 2002, 20(1): 67-71.

[15] Garg M C, Bansal D D. Protective antioxidant effect of vitamins C and E in streptozotocin induced diabetic rats[J]. Indian J Exp Biol,

2000, 38(2): 101-104.

[16] Montilla P L, Vargas J F, Túnez I F, et al. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin[J]. J Pineal Res, 1998, 25(2): 94-100.

[17] Anwar M M, Meki A R. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2003, 135(4): 539-547.

[18] Cam M, Yavuz O, Guven A, et al. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Pineal Res, 2003, 35(3): 212-220.

[19] Kurcer Z, Parlakpınar H, Vardi N, et al. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2007, 115(6): 365-371.

(责任编辑: 关蕴良)

200 mg/kg). In addition, normal control group ($n=10$) was established. After continuous oral administration for 21 d, rat body weight and ovarian weight were measured and ovarian index was calculated. Serum testosterone (T), follicle stimulating hormone (FSH), estradiol (E2), and luteinizing hormone (LH) were detected with radioimmunoassay. **Results:** Ovarian weight and ovarian indexes were significantly increased in PCOS group compared with those in normal control group ($P<0.05$). Moreover, PCOS group had higher serum T, LH ($P<0.001$), LH/FSH ($P<0.01$) and lower E2 level ($P<0.01$). After administration for 21 d, ovarian weight, ovarian index ($P<0.05$), serum T, LH ($P<0.01$) and LH/FSH ($P<0.01$) were decreased in 200 mg/kg epimedium flavonoids group compared with those in PCOS model group, but E2 level was significantly increased ($P<0.01$). However, 100 mg/kg and 50 mg/kg epimedium flavonoids had weak effects. **Conclusions:** Epimedium flavonoids can improve hyperandrogenism in PCOS rats, regulate LH/FSH, elevate E2 and improve ovarian function.

【Key words】epimedium flavonoids; polycystic ovary syndrome; hyperandrogenism; letrozole

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种以生殖功能障碍及糖代谢异常为特征的疾病, 是导致生育期妇女不孕的常见病, 发病率为 5%~22%。PCOS 主要临床表现为雄激素过多、持续无排卵及胰岛素抵抗等, 其病因极为复杂, 目前尚未完全阐明。淫羊藿是小檗科植物淫羊藿等植物的干燥地上部分, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效, 临床常用于治疗生殖系统疾病。现代研究表明^[1], 淫羊藿的主要有效成分是黄酮类化合物, 具有雌激素样作用, 升高小鼠血清雌激素水平, 并降低睾酮 (testosterone, T) 水平, 淫羊藿提取物亦可显著降低小鼠促卵泡生成素 (follicle stimulating hormone, FSH) 水平^[2]。但淫羊藿是否对 PCOS 具有治疗作用尚未可知。本实验建立 PCOS 大鼠模型, 通过观察淫羊藿总黄酮对 PCOS 大鼠血清 T、FSH、雌二醇 (estradiol, E2) 和黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 水平的影响, 初步探讨淫羊藿总黄酮改善 PCOS 高雄激素血症的作用, 为其临床治疗 PCOS 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

6 周龄的 SD 雌性大鼠, 体质量 (150 ± 10) g, SPF 级, 购自河南省实验动物中心, 许可证号: SCXK(豫)2005-0001。

1.2 试剂与药品

淫羊藿总黄酮购自西安草根生物工程有限公司, 总黄酮含量为 62.8%; 来曲唑购自江苏恒瑞医药股份有限公司; 达英-35 购自拜耳医药保健有限公司广州分公司。T、FSH、E2、LH 放射免疫分析试剂盒购自天津 DPC 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物模型 采用 Kafali 等^[3]的方法建立 PCOS 动物模型。65 只 6 周龄 SD 雌性大鼠, 随机分为正常对照组 ($n=10$)

和模型组 ($n=55$)。模型组大鼠灌胃 1 mg/kg 来曲唑, 来曲唑溶于 1% 羧甲基纤维素 (carboxymethyl cellulose, CMC) 中。正常对照组灌胃等量的 1% CMC。连续灌胃 21 d 后, 连续阴道涂片 2 个动情周期 ($5 \text{ d} \times 2$); 眼眶静脉丛取血, 检测血清中 T、E2、LH、FSH 水平; 结合阴道涂片结果及性激素水平, 选取符合 PCOS 大鼠模型标准者进行下一步研究, 不符合者排除。

1.3.2 分组给药 选取造模成功的大鼠 50 只, 随机分为 5 组: PCOS 模型组, 达英-35 组, 淫羊藿总黄酮低、中、高剂量组 ($n=10$)。PCOS 模型组以 10 ml/kg 灌胃 1% CMC, 达英-35 组灌胃 240 mg/kg 达英-35, 淫羊藿低、中、高剂量组分别灌胃 50、100 mg/kg 和 200 mg/kg 淫羊藿总黄酮。连续给药 21 d。

1.3.3 检测方法 末次给药后, 禁食 12 h, 动物称重, 眼眶静脉丛取血, 离心并分离血清, 置 -20°C 保存。采用放射免疫法测定各组大鼠血清 T、FSH、E2、LH 水平。处死大鼠, 摘取两侧卵巢, 去除软组织后称重, 计算卵巢指数。卵巢指数 = 卵巢重量/体质量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析软件对实验数据进行处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 差异比较选用单因素方差分析, 其组间两两比较采用 $LSD-t$ 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧), 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型判断

造模 21 d 后, 正常对照组和模型组大鼠进行阴道涂片观察排卵情况。结果发现, 正常对照组大鼠呈现规律的动情周期, 而模型组大鼠阴道涂片始终为白细胞, 无排卵, 亦无交替变化的动情周期。与正常对照组相比, 模型组大鼠血清 T、LH 水平显著升高 ($P<0.001$), E2 水平明显下降 ($P<0.01$)。FSH 水平无明显变化, 但 LH/FSH 比值明显高于正常对照组 ($P<0.01$)。该变化符合临床 PCOS 症状, 说明模型建立成功 (表 1)。

2.2 淫羊藿总黄酮对 PCOS 大鼠体质量及卵巢指数的影响

与正常对照组相比, PCOS 模型组大鼠体质量无明显变

化,但卵巢重量和卵巢指数均显著升高($P<0.05$)。达英-35 治疗后,卵巢重量和卵巢指数均明显下降($P<0.05$),恢复至正常水平。与 PCOS 模型组相比,200 mg/kg 淫羊藿总黄酮使卵巢重量和卵巢指数均显著下降($P<0.05$),但 100 mg/kg 和 50 mg/kg 淫羊藿组仅具有下降的趋势,而无统计学差异。各药对动物体质量均无明显影响(表 2)。

2.3 淫羊藿总黄酮对 PCOS 大鼠血清性激素水平的影响

与 PCOS 模型组相比,200 mg/kg 淫羊藿总黄酮组大鼠血清 T、LH 水平均显著降低,E2 显著升高,LH/FSH 比值亦明显降低。100 mg/kg 淫羊藿总黄酮亦显著逆转了 PCOS 模型组大鼠上述指标的变化,但作用弱于 200 mg/kg 组。50 mg/kg 淫羊藿总黄酮仅降低了 LH 水平,对其他指标均无明显作用。达英-35 逆转了 PCOS 模型组大鼠所有指标的变化(表 3)。

3 讨论

PCOS 是引起育龄妇女生殖障碍的一种常见内分泌疾病,主要临床表现为高雄激素血症、排卵障碍以及胰岛素抵抗等。PCOS 病理机制异常复杂,至

今尚未完全阐明。因此,动物模型只能从模拟其临床症状入手。来曲唑是一种芳香化酶抑制剂,通过抑制芳香化酶,使雄激素无法转化成雌激素,导致高雄激素血症;而雌激素的减少可通过反馈作用促进 LH 分泌,LH/FSH 的异常升高,导致卵泡内膜细胞及间质细胞合成过多雄激素,致使卵泡发育停滞^[4-5]。该动物模型呈现的高雄激素血症及排卵障碍类似于临床 PCOS 患者的病理特征,是一种较为理想的 PCOS 模型,有着广泛的应用。本实验结果发现,经连续灌胃 1 mg/kg 来曲唑 21 d 后,模型组大鼠阴道涂片为大量白细胞,无排卵,表明大鼠始终处于动情间期;而正常对照组大鼠则呈规律的动情周期变化(4~5 d)。模型组大鼠血清 T、LH、LH/FSH 较正常组均明显升高,E2 显著下降。该病理特征符合 PCOS 的典型临床症状,表明模型建立成功。

淫羊藿是我国传统温肾补阳中药,主要有效成分为黄酮类化合物。现代研究表明淫羊藿黄酮可增强下丘脑-垂体促性腺功能,且具有雌激素样活

表 1 PCOS 模型的判断 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Judgement of PCOS model ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	T (μg/L)	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E ₂ (ng/L)	LH/FSH
正常对照组	10	45.3 ± 7.5	7.6 ± 1.2	4.85 ± 0.77	26.2 ± 2.8	1.57 ± 0.33
PCOS模型组	50	97.8 ± 9.2 ^a	13.5 ± 2.7 ^a	5.96 ± 1.68	20.4 ± 3.5 ^a	2.27 ± 0.41 ^a

注:与正常对照组相比,a, $P<0.01$

表 2 淫羊藿总黄酮对 PCOS 大鼠体质量及卵巢指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab.2 Effects of epimedium total flavonoids on body weight of PCOS rats and ovarian index ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	体质量 (g)	卵巢重量 (mg)	卵巢指数 ($\times 10^{-2}$)
正常对照组		248.5 ± 46.7	25.8 ± 3.5	1.04 ± 0.31
PCOS模型组		244.6 ± 87.3	29.7 ± 4.2 ^a	1.21 ± 0.22 ^a
达英-35 组	240	238.1 ± 39.2	26.0 ± 3.8 ^b	1.09 ± 0.24 ^b
淫羊藿总黄酮组	50	255.4 ± 77.1	28.3 ± 5.7	1.11 ± 0.43
	100	245.9 ± 61.8	27.6 ± 6.2	1.12 ± 0.29
	200	247.5 ± 59.4	26.5 ± 4.9 ^b	1.07 ± 0.32 ^b

注:a,与正常对照组相比, $P<0.05$;b,与 PCOS 模型组相比, $P<0.05$

表 3 淫羊藿总黄酮对 PCOS 大鼠性激素水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab.3 Effects of epimedium total flavonoids on sex hormone level of PCOS rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	T (μg/L)	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E ₂ (ng/L)	LH/FSH
正常对照组		47.6 ± 8.7	7.8 ± 1.4	4.95 ± 0.92	25.7 ± 3.4	1.58 ± 0.27
PCOS模型组		95.3 ± 15.4 ^b	13.2 ± 2.9 ^a	6.04 ± 1.15	21.6 ± 2.9 ^a	2.19 ± 0.42 ^a
达英-35 组	240	54.2 ± 10.6 ^c	8.3 ± 1.6 ^c	4.78 ± 1.27 ^c	26.0 ± 3.5 ^c	1.74 ± 0.23 ^c
淫羊藿总黄酮组	50	83.8 ± 14.5	11.7 ± 3.8 ^c	6.02 ± 2.56	22.4 ± 5.7	1.94 ± 0.35 ^c
	100	74.1 ± 17.9 ^c	9.5 ± 2.7 ^c	5.75 ± 2.38	24.8 ± 5.3 ^c	1.65 ± 0.43 ^c
	200	66.2 ± 12.4 ^c	8.8 ± 2.3 ^c	5.26 ± 1.93	25.9 ± 6.1 ^c	1.67 ± 0.37 ^c

注:a,与正常对照组相比, $P<0.01$;b,与 PCOS 模型组相比, $P<0.001$;c, $P<0.05$

性^[6-7]。本研究发现,PCOS 大鼠卵巢重量及卵巢指数较正常组均明显升高,200 mg/kg 淫羊藿总黄酮和达英-35 均可显著降低卵巢重量及卵巢指数,恢复至接近正常组水平。50 mg/kg 和 100 mg/kg 淫羊藿总黄酮亦可减轻卵巢重量,但作用较弱。

下丘脑-垂体-卵巢轴功能的失调是 PCOS 重要病理特征之一。下丘脑-垂体-卵巢轴又称性腺轴,主要负责调节女性发育、正常月经和性功能等。下丘脑通过释放促性腺释放激素,刺激腺垂体分泌 LH 和 FSH。LH 和 FSH 作用于卵巢,促进卵泡的发育及排卵,并调节卵巢分泌性激素。大量的性激素可作用于下丘脑,反馈调节 LH 和 FSH 的分泌^[8]。临床上,血清 T 常作为 PCOS 患者的一项敏感性指标。吴瑕等^[9-10]研究发现,淫羊藿可调节 T 和 E2 的分泌,其机制可能是通过作用于下丘脑-垂体-性腺轴的上游。本研究发现,经 21 d 治疗后,200 mg/kg 淫羊藿总黄酮和达英-35 均显著降低了 PCOS 大鼠血清 T 和 LH 水平,升高 E2,降低 LH/FSH,逆转了 PCOS 大鼠所有性激素水平的变化。100 mg/kg 淫羊藿总黄酮亦具有类似作用,但作用较弱。50 mg/kg 淫羊藿总黄酮仅降低了 PCOS 大鼠血清 LH 水平,对其他指标无明显影响。表明淫羊藿总黄酮对 PCOS 大鼠性激素水平的影响具有剂量依赖效应。

综上所述,淫羊藿总黄酮可减轻来曲唑诱导的 PCOS 大鼠卵巢重量,降低 LH/FSH,从而减少雌激素向雄激素的转化,升高 E2,降低 T,有效逆转 PCOS 大鼠性激素水平的异常变化,提示淫羊藿总黄酮可能具有治疗 PCOS 的作用。然而,淫羊藿调节性激素水平的靶点及具体机制尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王大伟,邓秀兰,牛建昭,等.淫羊藿及淫羊藿苷在小鼠体内雌激素样作用的实验研究[J].北京中医药大学学报,2009,32(3):164-166.
- [2] 于燕,颜虹,胡森科,等.淫羊藿提取物的雌激素样作用研究[J].西安交通大学学报(医学版),2009,30(3):373-376.
- [3] Kafali H, Iriadam M, Ozardl I, et al. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease[J]. Arch Med Res, 2004, 35(2): 103-108.
- [4] 刘艳丽,贾莉婷,马葆靖,等.来曲唑法建立 PCOS 大鼠模型的评价[J].中国妇幼保健,2011,26(8):1213-1216.
- [5] 贾莉婷,刘艳丽,马葆靖,等.两种多囊卵巢综合征大鼠模型造模方法的比较[J].郑州大学学报(医学版),2011,46(4):538-542.
- [6] 张磊,王岚,吴瑕,等.淫羊藿总黄酮对不同性别大鼠性器官及相关激素的影响[J].中药药理与临床,2009,25(1):31-33.
- [7] 王静,张贵林,任光友.朝藿定 C 与淫羊藿苷对去卵巢小鼠子宫的影响[J].中国临床药理学杂志,2012,28(3):193-195.
- [8] 王娜梅,李威,吴效科,等多囊卵巢综合征病理生理的一些新认识[J].国际妇产科学杂志,2009,36(5):348-351.
- [9] 吴瑕,李东晓,邓文龙.淫羊藿对生殖及内分泌系统的药理学研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8):223-227.
- [10] 吴瑕,杨薇,张磊,等.下丘脑-垂体-性腺轴阻断对淫羊藿促性激素作用的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):161-164.
- [11] Wang D W, Deng X L, Niu J Z, et al. Estrogenic effect of Herba Epimedii and monosomic icariin on mice[J]. Journal of Beijing University of Chinese Medicine, 2009, 32(3): 164-166.
- [12] Wu X, Yang W, Zhang L, et al. Influence of hypothalamus-pituitary-gonadal axis blocking on sex hormone secretion promoted by Epimedii folium[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(5): 161-164.
- [13] Yu Y, Yan H, Hu S K, et al. Study on the estrogen-like effects of Epimedium extractive[J]. Journal of Xi'an Jiao Tong University (Medical science), 2009, 30(3): 373-376.
- [14] Liu Y L, Jia L T, Ma B J, et al. Evaluated study on the Letrozole-induced model of polycystic ovarian syndrome in rats[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2011, 26(8): 1213-1216.
- [15] Jia L T, Liu Y L, Ma B J, et al. Comparison of two kinds of polycystic ovary syndrome rat models[J]. Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences), 2011, 46(4): 538-542.
- [16] Zhang L, Wang L, Wu X, et al. Epimedium total flavone on different gender sex organs of rat and related hormone effects on[J]. Pharmacology and Clinic of Chinese Traditional Medicine, 2009, 25(1): 31-33.
- [17] Wang J, Zhang G L, Ren G Y. Effects of Epimedin C and Icaritin on uterus of ovariectomized mice[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2012, 28(3): 193-195.
- [18] Wang N M, Li W, Wu X K. Some new thoughts about the pathophysiology of polycystic ovary syndrome[J]. International Journal of Obstetrics and Gynecology, 2009, 36(5): 348-351.
- [19] Wu X, Li D X, Deng W L. Pharmacological progress of Epimedium on reproductive and endocrine system[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2010, 16(8): 223-227.
- [20] Wu X, Yang W, Zhang L, et al. Influence of hypothalamus-pituitary-gonadal axis blocking on sex hormone secretion promoted by Epimedii folium[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(5): 161-164.

(责任编辑:关蕴良)