

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2021.02.006

• 实验研究 •

# 四物汤改善多囊卵巢综合征大鼠 卵巢功能实验研究<sup>\*</sup>

朱 彤<sup>1</sup> 张 楚<sup>2</sup> 董浩旭<sup>2</sup> 汪 辉<sup>1</sup> 张明敏<sup>2△</sup>华中科技大学同济医学院附属同济医院<sup>1</sup>妇产科,<sup>2</sup>中西医结合科,武汉 430030

**摘要 目的** 观察四物汤(Siwu tang, SWT)对多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)大鼠动情周期、卵巢形态学及血清激素水平的影响。**方法** 选取 SPF 级雌性 Wistar 大鼠 25 只,随机分为对照组、模型组、SWT 低剂量组、SWT 高剂量组和二甲双胍组,每组 5 只。除对照组外,各实验组大鼠均采用来曲唑 1 mg/(kg·d)灌胃诱导建立 PCOS 大鼠模型。造模成功后,SWT 低剂量组给予 SWT 8.64 g/(kg·d)灌胃,SWT 高剂量组给予 SWT 25.92 g/(kg·d)灌胃,二甲双胍组给予二甲双胍 200 mg/(kg·d)灌胃,对照组与模型组灌胃等量 0.9%氯化钠注射液。各组均连续干预 4 周后,记录各组大鼠的动情周期,观察卵巢形态,检测血清激素水平。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠动情期显著缩短( $P<0.05$ );黄体数量显著减少,囊肿数量显著增多( $P<0.05$ );血清睾酮(testosterone, T)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)水平显著升高,雌二醇(estradiol,  $E_2$ )、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)水平显著降低, LH/FSH 比值明显升高( $P<0.05$ )。与模型组大鼠相比,SWT 低剂量组、SWT 高剂量组和二甲双胍组大鼠动情期时间显著增加( $P<0.05$ );黄体数量显著增加,囊肿数量显著减少( $P<0.05$ );血清 T 水平及 LH/FSH 比值显著降低( $P<0.05$ );SWT 低剂量组、SWT 高剂量组大鼠血清  $E_2$  水平显著升高( $P<0.05$ );SWT 高剂量组大鼠血清 FSH 水平显著升高、LH 水平显著降低( $P<0.05$ )。**结论** SWT 可增加 PCOS 大鼠动情时间,减少卵巢囊肿,增加黄体数量,还可降低 PCOS 大鼠血清 T、LH 水平及 LH/FSH 比值,升高  $E_2$ 、FSH 水平;其治疗机制可能与通过调节血清激素水平改善 PCOS 大鼠卵巢功能有关。

**关键词** 四物汤;多囊卵巢综合征;血清激素;卵巢功能

**中图分类号** R711.75 **文献标志码** A

## Experimental Study of Siwu Tang on the Improvement of Ovarian Function in Rats with Polycystic Ovary Syndrome

ZHU Tong<sup>1</sup>, ZHANG Chu<sup>2</sup>, DONG Haoxu<sup>2</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, ZHANG Mingmin<sup>2△</sup>

<sup>1</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, <sup>2</sup>Department of Traditional Chinese Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

**Abstract Objective** To observe the effect of Siwu Tang(SWT)on the estrous cycle, ovarian morphology and serum hormone levels in polycystic ovary syndrome(PCOS)rats. **Methods** Twenty-five SPF female Wistar rats were randomly divided into control group, model group, SWT low-dose group, SWT high-dose group and metformin group, with 5 rats in each group. Except for the control group, rats in each experimental group were gavage with 1 mg/(kg·d)letrozole to establish PCOS rat models. After successful modeling, the rats in SWT low-dose group were gavage with 8.64 g/(kg·d)SWT, SWT high-dose group were gavage with 25.92 g/(kg·d)SWT, metformin

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金资助项目(No. 81803913)

<sup>△</sup>通信作者, Corresponding author, E-mail: mmzhang@tjh. tjmu. edu. cn

group were gavage with 200 mg/(kg · d) metformin, while the control and model group were gavage with the same dose of 0.9% NaCl injection. After 4 weeks of continuous intervention in each group, the estrus cycle of each group were recorded, the ovarian morphology were observed, and the serum hormone level were detected. **Results** Compared with control group, the time of estrus in the model group were significantly shortened ( $P < 0.05$ ), the number of corpus luteum were significantly decreased, the number of cysts were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the serum levels of testosterone (T), luteinizing hormone (LH) and the LH/FSH ratio were significantly increased, the levels of estradiol ( $E_2$ ) and follicle-stimulating hormone (FSH) were significantly reduced. Compared with the rats in the model group, the time of estrus in the SWT low-dose group, SWT high-dose group and metformin group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the number of corpus luteum were significantly increased, and the number of cysts were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), the serum levels of T and the LH/FSH ratio were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The serum levels of  $E_2$  rats in the SWT low-dose group, SWT high-dose group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The serum levels of FSH in the SWT high-dose group were significantly increased, and levels of LH were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** SWT could increase the time of estrus, reduce ovarian cysts, increase the number of corpus luteum, reduce the serum levels T, LH and LH/FSH ratios, and increase  $E_2$  and FSH levels in PCOS rats. The therapeutic mechanism might be related to improvement of ovarian function in PCOS rats by regulating serum hormone levels.

**Key words** Siwu Tang, polycystic ovarian syndrome, serum hormones, ovarian function

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是一种临床常见妇科疾病, 以月经稀发、高雄激素血症、卵巢多囊样改变、胰岛素抵抗为主要临床表现, 继发月经不调、不孕症、心血管功能改变等疾病, 严重影响女性身体健康和生殖功能<sup>[1-2]</sup>。目前, PCOS 的发病原因仍未清晰, 尚无法根治。研究<sup>[3-4]</sup>表明, 应用具有整体调理效果的传统中药单独或辅助西药进行治疗, 均能从多方面改善 PCOS 患者临床症状, 达到调理月经、治疗不孕症等目的。四物汤 (Siwu tang, SWT) 作为“妇科第一方”, 其补血活血特点在治疗 PCOS 方面具有独特优势, 临床应用中取得了不俗的疗效<sup>[5-6]</sup>。基于此, 本课题组设计了相关实验, 以期观察 SWT 对多囊卵巢综合征 (PCOS) 大鼠动情周期、卵巢形态学及血清激素水平的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雌性 Wistar 大鼠 25 只, 6~8 周龄, SPF 级, 购自湖北省疾病预防控制中心实验动物中心, 饲养在同济医院 SPF 级动物房恒温 (23±1)℃、恒湿 (50±5)% 的条件下, 每日的明暗循环为 12 h 和 12 h, 所有实验均经华中科技大学同济医学院附属同济医院伦理委员会批准 (TJH-201901003)。

### 1.2 药物、试剂及主要仪器

SWT 中药颗粒 (华润三九医药有限公司), 由熟地黄、当归、白芍和川芎以 4:3:3:2 的比例组成。

来曲唑 (Selleck), 二甲双胍 (Solarbio 公司)。戊巴比妥钠 (武汉谷歌), 睾酮 (testosterone, T)、雌二醇 (estradiol,  $E_2$ ) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (德国 Merck), 黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) ELISA 试剂盒 (武汉华联科公司)。

主要实验仪器: 酶标仪 (Biotek), DM IL LED 倒置显微镜 (德国 Feica)。

### 1.3 造模、分组及处理

将 25 只 SPF 级雌性 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、SWT 低剂量组、SWT 高剂量组和二甲双胍组, 各 5 只。除对照组外, 各实验组大鼠均采用来曲唑 1 mg/(kg · d) 灌胃诱导建立 PCOS 大鼠模型<sup>[7]</sup>, 连续灌胃 21 d。造模成功后, SWT 低剂量组给予 SWT 8.64 g/(kg · d) 灌胃, SWT 高剂量组给予 SWT 25.92 g/(kg · d) 灌胃, 二甲双胍阳性对照组<sup>[8]</sup>给予二甲双胍 200 mg/(kg · d) 灌胃, 对照组与模型组灌胃等量 0.9% 氯化钠注射液。各组均连续干预 4 周。

### 1.4 动情周期监测和统计

自造模开始即来曲唑干预第 1 天开始监测, 使用移液枪吸取 0.9% 氯化钠注射液冲洗阴道, 使用冲洗液制作阴道涂片, 显微镜下观察细胞形态, 以细胞类型判定大鼠动情周期, 分为动情前期、动情期、动情后期和动情间期<sup>[9]</sup>。造模成功后, 连续监测 15 d, 绘制动情周期曲线, 统计各组大鼠的动情期时间。

### 1.5 卵巢形态学观察

末次干预结束后,采用 40 mg/(kg·d)戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后处死大鼠,剖腹摘取双侧卵巢,4%多聚甲醛固定,24 h 后进行石蜡包埋切片,并行常规 HE 染色,光学显微镜下观察卵巢组织病理学变化,统计黄体及囊肿数量。

### 1.6 血清激素水平检测

末次干预结束后,腹主动脉采血,离心取血清后,通过 ELISA 检测大鼠血清中 FSH、LH、T、E<sub>2</sub> 水平并计算 LH/FSH 比值,操作严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,所有数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 动情周期比较

与正常对照组相比,模型组大鼠动情周期明显改变,动情期显著缩短( $P < 0.05$ )。

与模型组大鼠相比,SWT 低剂量组、SWT 高剂量组和二甲双胍组大鼠动情周期有所恢复,动情期时间显著增加( $P < 0.05$ )。见图 1。

### 2.2 卵巢形态学比较

与正常对照组相比,模型组大鼠卵巢形态明显改

变,黄体数量显著减少( $P < 0.05$ ),囊肿数量显著增多( $P < 0.05$ )。

与模型组大鼠相比,SWT 低剂量组、SWT 高剂量组和二甲双胍组大鼠卵巢形态均有一定程度的恢复,黄体数量显著增加( $P < 0.05$ ),囊肿数量显著减少( $P < 0.05$ )。见图 2。

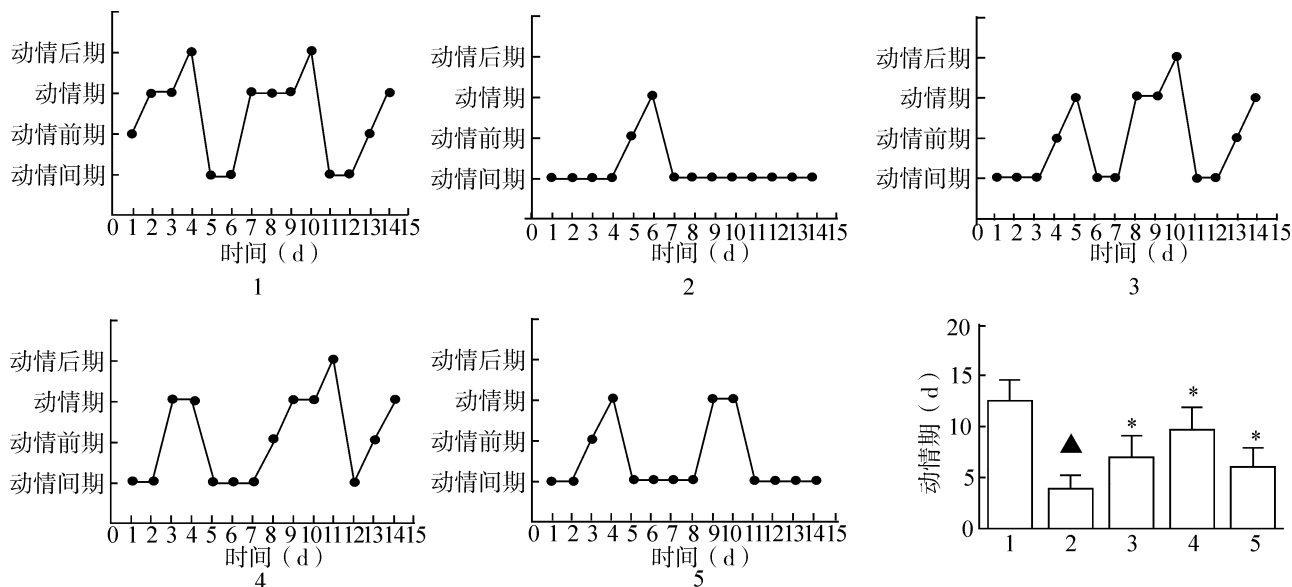
### 2.3 血清激素水平比较

与正常对照组相比,模型组大鼠血清 T、LH 水平显著升高,E<sub>2</sub>、FSH 水平显著降低,LH/FSH 比值明显升高( $P < 0.05$ )。

与模型组大鼠相比,SWT 低剂量组、SWT 高剂量组和二甲双胍组大鼠血清 T 水平及 LH/FSH 比值显著降低( $P < 0.05$ );SWT 低剂量组、SWT 高剂量组大鼠血清 E<sub>2</sub> 水平显著升高( $P < 0.05$ );SWT 高剂量组大鼠血清 FSH 水平显著升高、LH 水平显著降低( $P < 0.05$ )。见图 3。

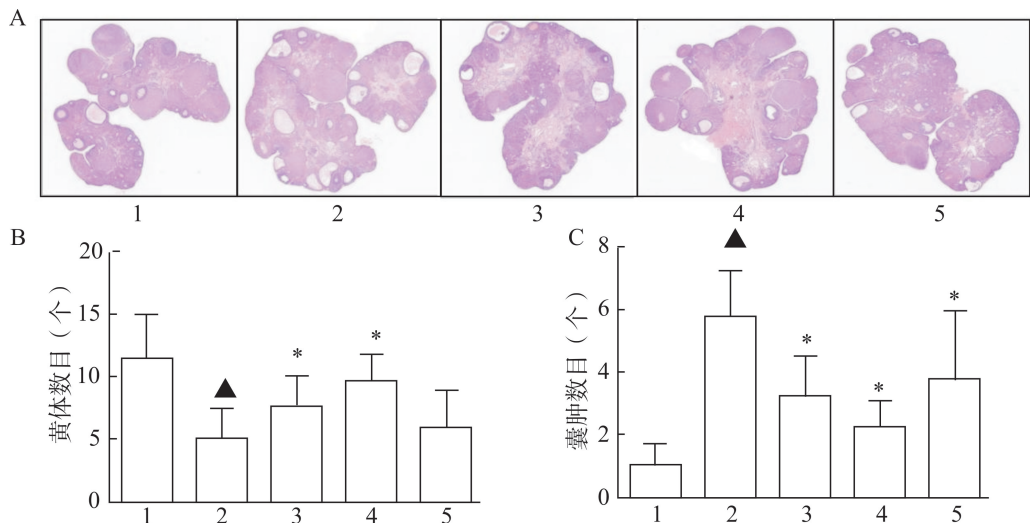
## 3 讨论

随着现代人类社会生活方式、饮食习惯的改变,PCOS 发病率呈逐年升高趋势。PCOS 的发病原因仍未明确,但现阶段的研究认为,该病的发生是由遗传层面的基因改变和后天环境包括饮食、运动、情绪等诸多因素共同决定。PCOS 患者多因月经紊乱、不孕或者面部痤疮等原因前来就诊,临床上多将生活方式干预作为 PCOS 的治疗首选。对生活方式干预效果不理想或有其他治疗要求的患者,给予相应药物治疗,



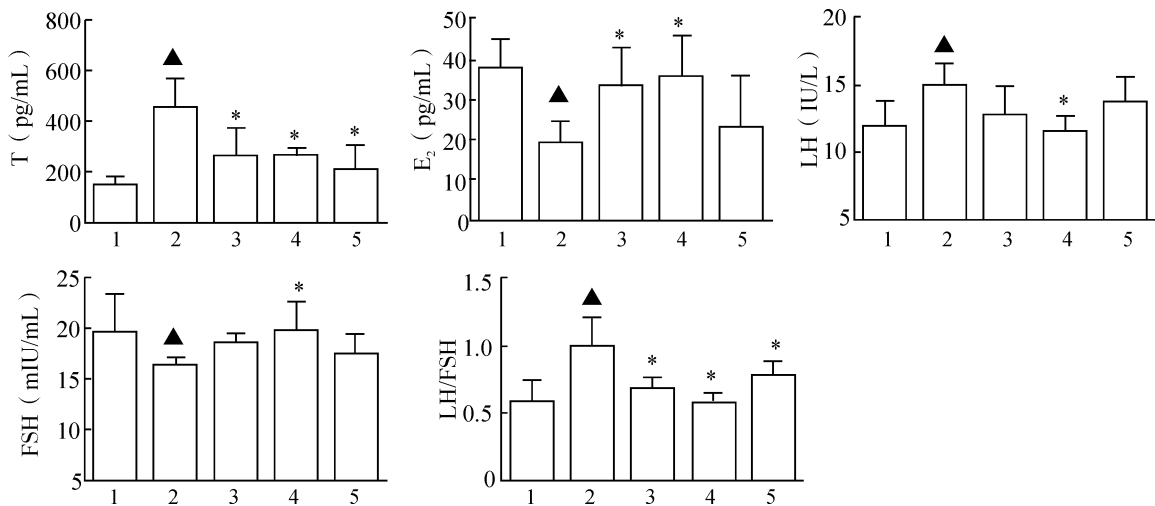
1 为模型组,2 为对照组,3 为 SWT 低剂量组,4 为 SWT 高剂量组,5 为二甲双胍组。与对照组比较 ▲  $P < 0.05$ ,与模型组比较 \*  $P < 0.05$

图 1 各组大鼠动情周期比较



A 为卵巢 HE 染色, B 为卵巢黄体数目, C 为卵巢囊肿数目。1 为模型组, 2 为对照组, 3 为 SWT 低剂量组, 4 为 SWT 高剂量组, 5 为二甲双胍组。与对照组比较 ▲  $P < 0.05$ , 与模型组比较 \*  $P < 0.05$

图 2 各组大鼠卵巢形态学情况



1 为模型组, 2 为对照组, 3 为 SWT 低剂量组, 4 为 SWT 高剂量组, 5 为二甲双胍组。与对照组比较 ▲  $P < 0.05$ , 与模型组比较 \*  $P < 0.05$

图 3 各组大鼠血清激素水平比较

例如雌孕激素人工周期替代自然周期调理月经和排卵、避孕药或者螺内酯抗雄激素治疗面部痤疮、来曲唑或克罗米芬调节性腺轴功能诱导排卵治疗不孕症。上述治疗方法疗效均较为显著, 但治疗效果持续时间较短, 通常影响单个或几个月经周期, 长期疗效较为欠缺。因此, 寻找有效的替代或补充疗法, 成为当前该病临床和基础研究的热点。

传统中医未有相应病名记载, 依据其临床表现可将其归为“闭经”“经少”“不孕”等。结合中医理论, 现代医家认为, PCOS 的病位在肝脾肾三脏, 主要病机包括气滞气虚、血虚血瘀等。SWT 最早记载于唐代《仙

授理伤续断秘方》, 于宋代《太平惠民和剂局方》中被首次记载应用于妇科疾病。经过长期的临床应用, 被后世医家称为“妇科第一方”“调理一切血证是其所长”, 表明 SWT 在调理女性月经紊乱相关疾病领域具有十分重要的作用。SWT 全方由当归、熟地黄、白芍、川芎 4 味中药组成, 补肝脾之血虚、化肝脾之瘀血, 妇女月经量少、经闭皆可用之。PCOS 患者凝血功能、氧化应激相关指标均高于正常人群<sup>[10-11]</sup>; 基础研究<sup>[12]</sup>表明, SWT 具有类雌激素样、抗氧化、抗凝血、修复肝损伤等作用; 临床研究<sup>[13]</sup>结果也显示, SWT 加减可调理 PCOS 患者月经周期, 提高患者排卵率和怀孕

率。基于此,本课题组设计了相关实验,希望初步探明 SWT 治疗 PCOS 的起效机制和作用方式。

排卵障碍是 PCOS 患者的常见特点,也是大多数患者月经不调、不孕症等的来源。通过观察,我们发现来曲唑诱导的 PCOS 模型大鼠出现了动情周期的显著改变,其出现与人类排卵期相对应的动情期时间显著减少,表明大鼠排卵功能受损。通过药物干预治疗,我们发现 SWT 低剂量组、SWT 高剂量组和二甲双胍组 3 个治疗组均能有效改善大鼠动情周期结构;与模型组大鼠相比,可显著增加动情期的出现时间,减少动情间期时间;其中,SWT 高剂量组大鼠动情期增加最为明显。表明高低剂量 SWT、二甲双胍均能有效改善 PCOS 大鼠排卵功能,且高剂量 SWT 效果最优。

卵巢的形态学改变是 PCOS 患者的诊断标准之一,表明患者的卵巢功能出现异常。通过 HE 染色,我们观察到 PCOS 模型大鼠卵巢出现了与临床相类似的多囊样改变,表现为囊肿数量增加、黄体数量显著降低。治疗干预后,与模型组对比,SWT 低剂量组和 SWT 高剂量组 2 组大鼠卵巢囊肿数量降低、黄体数量显著升高,而作为阳性对照的二甲双胍组大鼠虽然同样表现出卵巢囊肿数量降低,黄体数量却没有统计学差异;这与动情周期的统计结果是相符合的,高低剂量 SWT 能有效改善 PCOS 大鼠卵巢形态,一定程度地恢复其卵巢功能。

PCOS 患者血清性激素、促性腺激素水平往往异于正常人群,表现为 T 浓度、LH/FSH 比值的异常增高,不仅会直接抑制卵泡的发育和成熟,引起上述排卵功能障碍和卵巢形态功能改变,高雄激素还会诱发病体出现胰岛素抵抗、慢性炎症状态、氧化应激的异常激活等多种代谢功能异常,导致整体功能稳态破坏和局部组织损伤。而雌激素水平的降低,表明其主要分泌来源的卵巢颗粒细胞功能受损,影响子宫内膜的发育和着床时的容受性。实验结果显示,与正常对照大鼠相比,PCOS 模型大鼠血清 T、LH 浓度显著升高, $E_2$ 、FSH 浓度显著降低,且 LH/FSH 升高,表明 PCOS 大鼠出现了与临床患者相类似的血清激素水平变化。药物治疗后,3 组大鼠的血清 T 浓度、LH/FSH 比值均显著降低;SWT 低剂量组和 SWT 高剂量组大鼠血清  $E_2$  浓度显著升高,有且仅有 SWT 高剂量组大鼠表现出 FSH 浓度升高、LH 浓度降低。上述结果表明,高低剂量 SWT 和二甲双胍均能在一定程

度上纠正 PCOS 大鼠血清激素水平的异常变化,且 SWT 的效果明显优于二甲双胍。

综上,SWT 可通过纠正 PCOS 大鼠血清激素水平,一定程度上恢复下丘脑-垂体-卵巢性腺轴功能,改善卵巢排卵功能。本次实验初步探讨了 SWT 治疗 PCOS 的起效机制,为该方的临床应用和更深层次的机制研究提供了一定参考依据。

## 参 考 文 献

- [1] Patel S. Polycystic ovary syndrome(PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2018, 182: 27-36.
- [2] 张楚,董浩旭,宋琦璠,等.多囊卵巢综合征相关不孕症发病机制的研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2020, 29(8): 629-631.
- [3] 许啸虎,王志,郑翠红.补肾活血法治疗多囊卵巢综合征研究概述[J]. 中西医结合研究, 2021, 13(1): 38-42.
- [4] 许华云,金毓莉,付金荣,等.中药人工周期疗法治疗多囊卵巢综合征的 Meta 分析[J]. 中医药导报, 2018, 24(15): 113-117.
- [5] 刘霞,李凡,宋崎璠,等.四物汤药理及临床研究进展[J]. 中西医结合研究, 2020, 12(6): 392-395.
- [6] 王盾.桃红四物汤联合克罗米芬治疗多囊卵巢综合征患者疗效观察[J]. 新中医, 2015, 47(11): 146-147.
- [7] Pyun BJ, Yang H, Sohn E, et al. Tetragonia tetragonioides (Pall.) kuntze regulates androgen production in a letrozole-induced polycystic ovary syndrome model[J]. Molecules, 2018, 23(5): 1173.
- [8] 姚知林,黄映红,徐晓娟.补肾化痰法对肥胖型多囊卵巢综合征模型大鼠 IL-1 $\beta$ 、VEGF 表达水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(3): 202-205.
- [9] 李天鹤,武香梅,刘瑞霞,等.多囊卵巢综合征造模药物对大鼠内分泌和组织结构影响的初步比较[J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(12): 1633-1639.
- [10] 张哈,吴林玲,闫颖.多囊卵巢综合征氧化应激及标志物的研究进展[J]. 中国医药导报, 2020, 17(5): 31-34.
- [11] 陈虹羽.多囊卵巢综合征患者凝血功能改变[J]. 中华内分泌外科杂志, 2014, 8(2): 159-162.
- [12] 何丹,万丹,舒骏,等.四物汤物质基础、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(6): 221-229.
- [13] 田莉.百合固金汤合桃红四物汤加减治疗多囊卵巢综合征 30 例[J]. 光明中医, 2014, 29(1): 98-99.

(收稿日期:2020-12-29)