

苍附导痰汤对肥胖型多囊卵巢综合征模型大鼠子宫内膜及卵巢中 oatp4a1 表达与性激素水平的影响[△]

潘爱珍*, 陈克芳, 侯祥平, 李建军[#](中山大学孙逸仙纪念医院中医科, 广州 510120)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3473-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.06

摘要 目的:研究苍附导痰汤对肥胖型多囊卵巢综合征(PCOS)模型大鼠子宫内膜与卵巢中有机阴离子转运肽(oatp)4a1表达与性激素水平的影响。方法:复制大鼠肥胖型PCOS模型。50只大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、二甲双胍(0.043 g/kg)组与苍附导痰汤高、低剂量[5.68、1.42 g(生药)/kg]组,ig给药,每天1次,连续14 d。电化学发光法和Western blot法测定大鼠子宫内膜与卵巢中oatp4a1蛋白表达;酶联免疫吸附(ELISA)法测定大鼠血清中黄体生成素(LH)、促卵泡生成素(FSH)、睾酮(T)、雌二醇(E₂)水平。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠子宫内膜与卵巢中oatp4a1蛋白表达减弱,大鼠血清中LH、LH/FSH比值、T水平升高,FSH、E₂水平降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,二甲双胍组和苍附导痰汤高、低剂量组大鼠子宫内膜与卵巢组织中oatp4a1蛋白表达增强,血清中LH/FSH、T水平降低,E₂水平升高;二甲双胍组和苍附导痰汤高剂量组大鼠血清中LH水平降低,FSH水平升高,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:苍附导痰汤能够增强肥胖型PCOS模型大鼠子宫内膜与卵巢中oatp4a1的表达,改善机体痰湿状态,纠正性激素水平。

关键词 肥胖型多囊卵巢综合征;苍附导痰汤;有机阴离子转运肽;性激素;大鼠

The Effects of Cangfu Daotan Decoction on the Expression of oatp4a1 and Level of Sex Hormone in the Endometrium and Ovary of Rats with Obesity-type Polycystic Ovarian Syndrome

PAN Ai-zhen, CHEN Ke-fang, HOU Xiang-ping, LI Jian-jun(Dept. of Traditional Chinese Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the effects of Cangfu daotan decoction on expression of organic anion transporting polypeptide (oatp4a1) and level of sex hormone in the endometrium and ovary tissues of rats with obesity-type polycystic ovarian syndrome (PCOS). METHODS: Obesity-type PCOS rat models were established. 50 rats were randomized into a normal control (isometric normal saline) group, a model (isometric normal saline) group, a metformin (0.043 g/kg) group and Cangfu daotan decoction high-dose and low-dose [5.68 and 1.42 g(medicinal materials)/kg] groups. The rats were given drugs ig once a day for 14 consecutive days. The expression of oatp4a1 protein in the endometrium and ovaries of the rats was determined by ECL and Western blot. The levels of luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), testosterone (T) and estradiol (E₂) in rat's serum were detected by ELISA. RESULTS: Compared to the normal control group, those in the model group had weaker expression of oatp4a1 protein in the endometrium and ovaries, higher levels of serum LH, LH/FSH and T, lower levels of serum FSH and E₂. There were statistical significances ($P<0.01$). Compared to the model group, those in metformin group, Cangfu daotan decoction high-dose and low-dose group had higher expression of oatp4a1 protein in the endometrium and ovaries, lower levels of LH/FSH and T, higher levels of serum E₂; those in metformin group and Cangfu daotan decoction high-dose group had lower levels of serum LH, higher levels of serum FSH. There were statistical significances ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: Cangfu daotan decoction can increase the expression of oatp4a1 in the endometrium and ovaries of obesity-type PCOS model rat, alleviate phlegmy dampness and regulate the level of sex hormone.

KEYWORDS Obesity-type polycystic ovarian syndrome; Cangfu daotan decoction; Organic anion transporting polypeptide; Sex hormone; Rat

多囊卵巢综合征(Polycystic ovarian syndrome, PCOS)是

[△]基金项目:广东省中医药管理局基金(No.20141048);广东省科技计划项目(No.2013B21800235)

* 主治医师。研究方向:中西医结合。E-mail: keshan333@163.com

[#] 通信作者:副主任医师。研究方向:中西医结合。电话:020-81332463。E-mail: ljjwuan@126.com

育龄期妇女常见的难治性内分泌及代谢性疾病,发病率高达6%~10%,呈逐年增加之势,其发病机制至今尚未阐明,涉及遗传、内分泌、免疫、代谢等多个系统。PCOS中肥胖的发生率为50%~60%,肥胖常使PCOS向纵深发展^[1]。胖人多痰湿,在前期研究发现机体各组织有机阴离子转运肽(Organic anion transfer peptide, Oatp)表达与湿浊转运密切相关,痰湿内环境Oatp异常表达与肥胖型PCOS发生发展密切相关。苍附导痰

汤是治疗痰湿内蕴型PCOS的效方。该方出自《叶天士女科诊治秘方》，具有化痰散结、祛湿解郁之功效。方药组成：苍术10g，香附10g，枳壳10g，法半夏10g，陈皮6g，茯苓15g，胆南星6g，炙甘草6g，生姜6g。本实验通过研究苍附导痰汤对肥胖型PCOS模型大鼠子宫及卵巢中oatp4a1表达与性激素水平的影响，从痰湿运化的分子生物学水平探讨其作用机制。

1 材料

1.1 仪器

Uniwersal32R型台式高速冷冻离心机(美国Sigma公司); MJ gradient型聚合酶链反应(PCR)仪、3000型电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

苍附导痰汤[中山大学孙逸仙纪念医院中药制剂室,含量:0.86g(生药)/ml];二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号:LT1101073EX,规格:250mg/片);注射用硫酸普拉睾酮钠(江苏联环药业股份有限公司,批号:20070103,规格:9mg/100g);绒毛膜促性腺激素注射剂(HCG,安徽华康医药集团有限公司,批号:150535-201002,规格:1.5u/ml); β -actin鼠单克隆抗体、oatp4a1羊一抗(美国Santa Cruz公司);抗羊免疫球蛋白(Ig)G-辣根过氧化物酶(HRP,北京中杉金桥生物技术有限公司);黄体生成素(LH)、促卵泡生成素(FSH)、睾酮(T)、雌二醇(E_2)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(广州雅乐制药公司)。

1.3 动物

21日龄SD大鼠50只,♀,体质量35~45g,由广东省实验动物中心提供[实验动物使用合格证号:SCXK(粤)2004-0003]。

2 方法

2.1 复制模型

参考文献[2]改良PCOS大鼠模型。将SD大鼠适应性饲养2日后开始每日颈背sc硫酸普拉睾酮钠[9mg/100g,相当于脱氢雄酮(DHEA)6mg/100g],每天1次,连续40d;并于第27日龄开始腹部sc HCG(1.5u/100g),每天2次,连续35d,全程给予高脂饲料喂养。

2.2 分组与给药

50只大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型组(等容生理盐水)组、二甲双胍(0.043g/kg)组与苍附导痰汤高、低剂量[5.68、1.42g(生药)/kg]组,后4组大鼠复制模型成功后ig给药,每天1次,连续14d。给药量按人临床常用量4.1倍换算,给予二甲双胍0.043g/kg,苍附导痰汤5.68、1.42g(生药)/kg。

2.3 各组大鼠子宫内层与卵巢组织中oatp4a1蛋白表达测定

末次给药24h后,提取大鼠卵巢与子宫组织后,粉碎匀浆,在4℃下,以离心半径为13.5cm、10000r/min离心5min得蛋白提取液。采用考马斯亮蓝染料结合法检测蛋白浓度,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)垂直电泳法进行蛋白分离。采用电化学发光(ECL)法检测大鼠子宫内层与卵巢组织中oatp4a1蛋白表达。

2.4 各组大鼠子宫内层与卵巢组织中oatp4a1蛋白与卵泡、黄体分布测定

以Western blot法测定蛋白表达。末次给药24h后,取大鼠子宫内层与卵巢组织,中性缓冲福尔马林固定24h,梯度乙醇脱水、石蜡切片,水化,血清封闭,孵育,加底物,二氨基联苯胺(DAB)显色,HE复染细胞核,切片脱水,透明,封片。显微镜下观察大鼠子宫内层与卵巢组织中oatp4a1蛋白与卵泡、黄体分布。

2.5 各组大鼠血清性激素水平测定

末次给药24h后,麻醉大鼠,心脏取血,分离血清,-20℃保存。以ELISA法检测大鼠血清中LH、FSH、T、 E_2 水平。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0软件处理实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用LSD检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠子宫内层与卵巢组织中oatp4a1蛋白表达测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠子宫内层与卵巢组织中oatp4a1蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,二甲双胍组与苍附导痰汤高、低剂量组大鼠子宫内层与卵巢组织中oatp4a1蛋白表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组大鼠子宫内层与卵巢组织中oatp4a1蛋白表达测定结果见图1、表1。

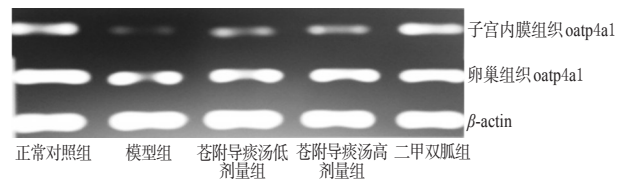


图1 oatp4a1蛋白表达结果图

Fig 1 Result chart of oatp4a1 protein expression

表1 各组大鼠子宫内层与卵巢组织中oatp4a1蛋白表达测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Expression results of oatp4a1 protein in the endometrium and ovaries tissue of rats in all groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	oatp4a1	
		子宫内层组织	卵巢组织
正常对照组		0.53 ± 0.32	0.61 ± 0.19
模型组		0.12 ± 0.04*	0.24 ± 0.03*
苍附导痰汤低剂量组	1.42	0.32 ± 0.12*	0.35 ± 0.26*
苍附导痰汤高剂量组	5.68	0.55 ± 0.35**	0.62 ± 0.15*
二甲双胍组	0.043	0.54 ± 0.36**	0.61 ± 0.34*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

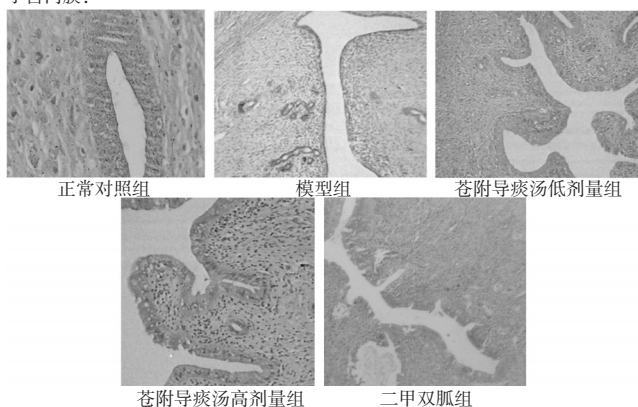
3.2 大鼠子宫内层与卵巢组织中oatp4a1蛋白分布测定结果

oatp4a1在腺上皮细胞和间质细胞的胞质中均有表达。正常对照组大鼠子宫内层腺体为多个簇状排列,腺腔大而多皱褶。模型组大鼠子宫内层腺体数目减少,多为单个腺体分散存在,腺腔小而直,无明显皱褶。用药组大鼠子宫内层腺体数目较模型组增多,可见簇状排列,但腺腔多小而直,部分可皱褶出现,未达到正常子宫内层状态。HE染色下,正常对照组大鼠卵巢内可见各级卵泡及黄体;模型组大鼠卵巢内可见多个囊状扩张的卵泡,未见成熟的卵泡,颗粒细胞层明显减少且排列疏松,卵巢组织中oatp4a1表达强度降低($P < 0.05$),呈弱阳性表达;用药组大鼠卵巢内可见少量成熟卵泡。大鼠子宫内层与卵巢组织中oatp4a1蛋白分布见图2。

3.3 各组大鼠血清性激素水平测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中的LH、LH/FSH比值、T水平升高,FSH、 E_2 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

子宫内膜:



卵巢组织:

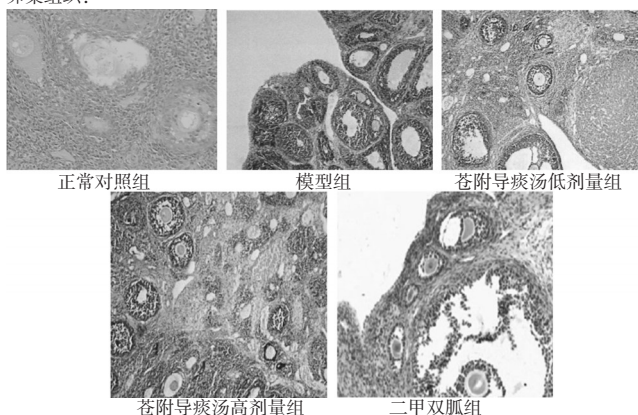


图2 各组大鼠子宫内膜与卵巢组织中 oatp4a1 蛋白分布 (HE, ×250)

Fig 2 Distribution of oatp4a1 protein in the endometrium and ovaries tissue of rats in all groups (HE, ×250)

或 $P < 0.05$)。与模型组比较,二甲双胍组与苍附导痰汤高、低剂量组大鼠血清 LH/FSH 比值、T 水平降低, E_2 水平升高;二甲双胍组和苍附导痰汤高剂量组大鼠血清中 LH 水平降低, FSH 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组大鼠血清性激素水平测定结果见表 2。

表 2 各组大鼠血清性激素水平测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Results of the level of sex hormone of rats in all groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, g/kg	LH, $\mu\text{u/ml}$	FSH, $\mu\text{u/ml}$	LH/FSH	T, ng/ml	E_2 , pg/ml
正常对照组		23.67 ± 4.62	8.69 ± 3.43	1.94 ± 2.42	0.79 ± 0.23	23.36 ± 3.51
模型组		48.71 ± 5.54**	7.94 ± 2.53*	5.09 ± 2.17**	1.72 ± 0.69**	11.24 ± 3.94**
苍附导痰汤低剂量组	1.42	26.32 ± 6.02	8.03 ± 3.71	3.12 ± 1.66 [#]	0.47 ± 0.26 [#]	23.81 ± 4.19 [#]
苍附导痰汤高剂量组	5.68	21.41 ± 3.58 ^{##}	9.75 ± 3.55 [#]	2.24 ± 1.32 [#]	0.21 ± 0.28 ^{##}	22.76 ± 2.85 ^{##}
二甲双胍组	0.043	24.34 ± 3.61 ^{##}	9.18 ± 2.62 [#]	2.32 ± 1.19 ^{##}	0.24 ± 0.31 ^{##}	21.41 ± 2.73 ^{##}

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$

4 讨论

PCOS 属于中医月经病、不孕、癥瘕等范畴。祖国医学认为肥胖型 PCOS 的病因病机主要责于“痰”。中医有“痰生百病”的说法,在妇女经孕中,痰既是病理产物又是导致多种疾病产生、发展的重要环节。《丹溪心法·子嗣》有云:“若是肥盛

妇人,享受甚厚,恣于酒食,经水不调,不能成胎,谓之躯脂满溢,闭塞子宫,宜行湿燥痰”。痰湿多由饮食失调,过食肥甘,脾失健运,聚湿成痰,或素体痰湿偏盛所致。痰湿蕴结是 PCOS 的重要证型。从现代医学来看,湿痰的产生、脂膏的形成和过盛积聚,与脂质、糖、能量的代谢失调等具有相关关系。中医认为痰湿蕴结是肥胖型 PCOS 的重要病理特征,“健脾化痰”为治疗该型患者的主要立法原则,苍附导痰汤是常用方剂。该方具有健脾燥湿、除痰行气之功效,但其燥湿化痰的分子生物学机制尚不明确,需要进一步实验研究。

王东坡等^[1]对痰湿体质与疾病相关性的进行了大量临床及实验研究,支持了“肥人多痰湿”的理论,阐明了痰湿体质与一些内分泌、代谢等疾病的相关性。Oatp(oatp)属于溶质载体超家族,是人及动物体内重要的膜转运蛋白,介导多种内、外源性物质的跨细胞转运,能够保持机体及细胞内外环境的稳态平衡。本课题组前期研究发现, oatp 与湿浊转运关系密切,对机体痰湿的转运起着重要调节作用^[4-6]。国外有研究证实 Oatp 与 PCOS 的发病存在一定关系。Plaza F 等^[7]首次研究发现 OATP-B(Oatp2b1)、OATP-D(Oatp3a1)和 OATP-E(Oatp4a1)在人类子宫内膜有表达;Oatp4a1 的表达水平与月经周期相关,其中分泌期子宫内膜中 Oatp4a1 表达较增殖期下降。Oatp4a1 参与脱氢表雄酮硫酸酯(DHEA-S)的转运,DHEA 以被动扩散方式进入细胞膜,其硫酸化需 Oatp 作为载体,而 Oatp4a1 与 PCOS 患者子宫内膜过度摄取 DHEA-S 相关。Oatp2b1 也参与了雌激素在肠道的吸收及代谢,Sai Y 等^[8]研究发现 Oatp2b1 表达于肠道 Caco-2 细胞中,作为雌酮代谢的转运子可将雌酮转入细胞内。因此,Oatp 介导了生殖内分泌激素在体内的分泌、代谢及吸收,在一定程度上影响了 PCOS 的发生和发展。

本研究结果表明,肥胖型 PCOS 模型大鼠子宫内膜及卵巢组织 oatp4a1 表达较正常对照组降低,中药苍附导痰汤可上调模型大鼠子宫内膜及卵巢组织 oatp4a1 表达,改善痰湿内环境状态,其中苍附导痰汤高剂量组改善更为明显。

综上所述,苍附导痰汤可通过调节 oatp4a1 表达、改善机体痰湿状态而达到纠正性激素水平的目的。本研究为苍附导痰汤防治肥胖型 PCOS 提供了分子生物学机制,为临床推广应用提供了实验室依据。

参考文献

- [1] 黄晓,吉柳,谢红梅,等.二甲双胍治疗多囊卵巢综合征研究进展[J].中国药房,2014,25(12):1 143.
- [2] 曾蕾,赵红艳,罗颂平.改良 PCOS-IR 大鼠模型的设计与实验[J].中华中医药杂志,2010,25(12):2 341.
- [3] 王东坡,王琦.痰湿体质研究现状分析与展望[J].中华中医药杂志,2008,23(1):5.
- [4] 潘爱珍,李建军,黄启辉,等.有机阴离子转运肽 oatp2b1 在痰湿证大鼠组织中表达及意义探讨[J].中华中医药杂志,2012,27(5):1 377.
- [5] Pan AZ, Hao YK, Lin YW, et al. Study on the expression of organic anion transporting polypeptide (oatp2a1) in rat with spleen deficiency syndrome and the exploration of clinical significance[J]. Chinese Medicine, 2011, 2(3): 109.
- [6] 孙保国,陈泽雄,张诗军,等.有机阴离子转运肽 oatp4a1 与脾主运化本质的关系[J].世界华人消化杂志,2011,19

养荣润肠舒合剂对慢传输型便秘模型大鼠结肠中 c-Kit、SP 与 VIP 的影响[△]

张虹玺*(辽宁中医药大学附属第三医院, 沈阳 110005)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3476-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.07

摘要 目的:研究养荣润肠舒合剂对慢传输型便秘(STC)模型大鼠结肠Cajal间质细胞中酪氨酸激酶受体蛋白CD117(c-Kit)、P物质(SP)与肠肌间神经丛血管活性肠肽(VIP)的影响。方法:sc盐酸吗啡(2.5 mg/kg),每天1次,连续45 d以复制大鼠STC模型。120只大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、麻仁丸(阳性对照,14.7 g/kg)组与养荣润肠舒合剂高、低剂量[15、7.5 g(生药)/kg]组。复制模型成功后ig给药,每天1次,连续10 d。采用免疫组化法染色,光镜下观察大鼠结肠c-Kit、SP、VIP分布,并测定其表达。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠结肠c-Kit、SP阳性细胞数量减少、表达减弱,VIP阳性数量增加、表达增强,差异有统计学意义($P<0.01$),细胞形态出现明显异常;与模型组比较,麻仁丸组和养荣润肠舒合剂高、低剂量组大鼠结肠c-Kit、SP阳性细胞数量增加、表达增强,VIP阳性细胞数量减少、表达减弱,差异有统计学意义($P<0.05$),细胞形态有一定改善。结论:养荣润肠舒合剂对STC模型大鼠结肠中SP、VIP含量及c-Kit的表达有一定改善作用。

关键词 养荣润肠舒合剂;慢传输型便秘;Cajal间质细胞;血管活性肠肽;P物质

The Effects of Yangrong Runchangshu Mixture on c-Kit, SP and VIP in the Colon of Rats with Slow Transit Constipation

ZHANG Hong-xi (The Third Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110005, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Yangrong runchangshu mixture on tyrosine kinase receptor protein CD117 (c-Kit), substance P (SP) and myenteric nerve plexus vasoactive intestinal peptide (VIP) in the colon interstitial cell of Cajal of rat with slow transit constipation (STC). METHODS: Morphine hydrochloride (2.5 mg/kg) was given sc once daily for 45 consecutive days to establish STC rat models. 120 rats were randomized into a normal control (isometric normal saline) group, a model (isometric normal saline) group, Maren pill (positive control, 14.7 g/kg) group and Yangrong runchangshu mixture high-dose and low-dose [15 and 7.5 g (medicinal materials)/kg] groups. After successful establishment of the models, drugs were given ig once daily for 10 consecutive days. Immunohistochemical method was employed for staining. The changes in the structure and c-Kit, SP and VIP expressions in rats' colonic tissues were observed under the light microscope. RESULTS: Compared to the normal control group, those in the model group demonstrated weaker expressions of c-Kit and SP and less positive cells in colon, stronger expression of VIP and more positive cells, with statistical significances ($P<0.01$); cellular morphology became abnormal obviously. Compared to the model group, those in Maren pill group and Yangrong runchangshu mixture high-dose and low-dose groups showed stronger expressions of c-Kit, SP and more positive cells in colon, weaker expressions of VIP and less positive cells with statistical significances ($P<0.05$); cellular morphology was improved to some extent. CONCLUSIONS: Yangrong runchangshu mixture can improve the contents of SP and VIP and the expression of c-Kit in rats with STC to some extent.

KEYWORDS Yangrong runchangshu mixture; Slow transit constipation; Interstitial cell of Cajal; Vasoactive intestinal peptide; Substance P

便秘是一种临床常见疾病,同时也是多种疾病的一种临床症状。随着现代人饮食结构改变和精神心理、社会因素影响,便秘发病率有逐年增高的趋势。流行病学资料显示,我国

便秘发生率为10%~15%,其中60岁以上的老年患者占18%~23%。如果把排便困难的主诉作为便秘的评定标准,发病率远超50%^[1]。而这其中又以结肠的传输功能障碍、肠内

=====

(30):3 154.

[7] Plaza F, Gabler F, Romero C, *et al.* The conversion of dehydroepiandrosterone into androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (androstenediol) is increased in endometria from untreated

women with polycystic ovarian syndrome[J]. *Steroids*, 2010,75(12):810.

[8] Sai Y, Kaneko Y, Ito S, *et al.* Predominant contribution of organic anion transport in polypeptide oatp2b1 to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal caco-2 cells[J]. *Drug Metab Dispos*, 2006,34(8):1 423.

△ 基金项目:辽宁省科学技术厅2012年科学技术计划项目(No.2012020108-206)

* 主任医师,硕士生导师,博士。研究方向:中医药防治便秘。电话:024-31323600-2505。E-mail:zhanghongxi999@163.com

(收稿日期:2015-01-14 修回日期:2015-03-10)

(编辑:张静)