

痰瘀同治方对多囊卵巢综合征模型大鼠胰岛素抵抗的实验研究*

孙亚京¹, 黄益麒², 潘旭鸣¹, 黄 平^{1△}

(1. 浙江中医药大学第三临床医学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053)

摘要: **目的** 探究痰瘀同治方对多囊卵巢综合征模型大鼠胰岛素抵抗的作用。**方法** 采用硫酸普拉睾酮钠注射合并高脂饲料喂养诱导造模的方法诱导伴胰岛素抵抗的多囊卵巢综合征大鼠模型,通过光镜计算卵巢排卵情况,生化分析仪检测血脂(TG、TC、LDH、HDL)和空腹胰岛素(FINS)、血糖(FBG),并计算胰岛素敏感指数(ISI)及采用放射免疫法测定性激素(血清 T、E₂、FSH 和 LH)的表达来评估痰瘀同治方对多囊卵巢综合征模型大鼠胰岛素抵抗的影响。**结果** 与对照组相比,低中高剂量痰瘀同治方组血脂中 TG($P<0.01$)、TC($P<0.05$)和 LDL($P<0.01$)水平明显下降,HDL 水平显著上升($P<0.05$);空腹血糖无明显变化($P>0.05$),但空腹胰岛素显著降低($P<0.01$),胰岛素敏感度显著升高($P<0.01$);血清 T 和 E₂ 浓度均显著降低,FSH 浓度显著升高($P<0.01$),LH 水平无明显改变($P>0.05$)。**结论** 痰瘀同治方对伴胰岛素抵抗的多囊卵巢综合征模型大鼠具有改善卵巢排卵障碍、增加胰岛素敏感性和降低性激素水平的作用。

关键词: 痰瘀同治方; 多囊卵巢综合征; 血脂; 胰岛素抵抗; 胰岛素; 性激素; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)05-0029-03

多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种育龄期和青春期妇女常见的排卵障碍性疾病,患者以高雄激素血症,胰岛素抵抗为主要特征,临床表现为月经稀发、闭经、肥胖、多毛和不孕等。而胰岛素抵抗既是影响其发病的重要因素,还是 PCOS 患者主要病理生理改变^[1-3]。目前,中医学者普遍认为“痰瘀互结”是 PCOS 伴胰岛素抵抗的主要病机。根据丹溪的“痰瘀理论”,本研究拟观察其对 PCOS 大鼠胰岛素抵抗等代谢紊乱的作用。

1 材料

1.1 动物

选用 21 日龄清洁级雌性 SD 大鼠 60 只,购买自浙江中医药大学动物实验研究中心。动物许可证号为:SCXK(浙)2008-0037。

1.2 药物

吡格列酮购买自江苏恒瑞医药股份有限公司;痰瘀同治方由二陈汤和失笑散组成,均由杭州市胡庆余堂提供,经由浙江中医药大学鉴定为正品。二

陈汤和失笑散根据全国统编五版教材《方剂学》的组成和用量(二陈汤:橘红 30g,半夏 30g,白茯苓 18g,甘草 9g;失笑散:蒲黄 12g,五灵脂 12g),研磨成粉,均匀混合。

1.3 试剂

注射用硫酸普拉睾酮钠购于江苏联环药业股份有限公司(批号:20070701);血清胰岛素(insulin)、睾酮(T)、雌二醇(E₂)、孕酮(P)、促卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)放免试剂盒均由北方生物技术研究提供(批号:E080721、E081124、E080507、E080708、E080721、E080624);血糖试剂盒购于北京北化康泰试剂有限公司(批号:20080516)。

1.4 仪器

AU400 型 OLYMPUS 全自动生化分析仪(日本);AG204 电子分析天平(瑞士 METTLER);贝克曼库尔特 UniCel DxI 800 全自动化学发光免疫分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司);全自动放射免疫 γ 计数器(上海上立检测仪器厂)。

* 基金项目: 2014 年浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(2014R410009)

收稿日期: 2015-04-22

作者简介: 孙亚京(1990-),女,浙江杭州人,在读硕士研究生,主要研究方向:中医内科。

△通信作者: 黄平, E-mail: 524677224@qq.com

2 方法

2.1 SD 大鼠伴 IR 的 POS 模型建立^[4]

将 60 只清洁级 SD 大鼠动物先普食适应性喂养 1d 后,按照随机分组原则分成 2 组,造模组 45 只和正常组 15 只。从第 25 日起至第 55 日,造模组大鼠每日颈背部皮下注射硫酸普拉睾酮钠 0.9mg/kg^[5-7],正常组大鼠则同样位置处注射等量生理盐水。正常组给予普通饲料,造模组则喂以高脂饲料,均喂养 100 d。从喂养第 90 天起,每日早晨大鼠称量体重,测量空腹血糖,行阴道涂片 10 d,观察细胞涂片的周期变化情况。喂养 90 d 后,尾静脉采血测干预前的空腹血糖(FBG)和空腹胰岛素(Fins),并根据相关文献[8]中提及的方法计算胰岛素敏感指数:ISI=ln [1/(FBG×Fins)]。造模组中选择 ISI 小于正常组 ISI 均值减 1.96 倍标准差,且阴道涂片无周期变化者作为造模成功的大鼠。这批 PCOS 大鼠模型的临床表现上具有无排卵,体重增加,空腹血糖水平明显增加,胰岛素敏感异常等,与 PCOS 患者临床表现相似。

2.2 给药途径和方法

将造模成功的大鼠随机将其分为对照组、治疗组和模型组。从第 91 天起,用相应药物干预 3 周,治疗组每天灌服痰瘀同治方 30g/kg,对照组每天灌服吡格列酮(溶解于等量生理盐水)15mg,模型组和正常组灌服等容量生理盐水。对照组、治疗组和模型组在治疗期间均喂以高脂饲料,正常组喂以普通饲料。末次给药后禁食 12h,断尾采血测干预后 FBG 和 Fins,并计算 ISI。断尾采血结束后,大鼠以相应饲料喂养 7 d,并于第七天禁食 12h 后,用 6%水合氯醛腹腔注射麻醉,摘取双侧卵巢用 4%多聚甲醛固定,并断头取血并分离血清,用于检测各项性激素。

2.3 卵巢排卵情况比较

4%多聚甲醛固定双侧卵巢,切片后用 HE 染色,以黄体的形成判定为排卵,光镜下观察排卵,计算各组大鼠排卵率(排卵率=排卵大鼠数目/大鼠总数×100%)、平均排卵数(平均排卵数=黄体总数/大鼠总数)和囊性扩张卵泡率(囊性扩张卵泡率=囊性扩张卵泡数/卵泡总数×100%)。

2.4 血脂、空腹血糖及空腹胰岛素的检测

生化分析仪检测大鼠的 TG、TC、LDL、HDL。血糖用葡萄糖氧化酶法测定,胰岛素用放射免疫法测

定,均严格按照试剂盒说明书进行。

2.5 性激素检测

血清 T、E₂、P、FSH 和 LH 均采用放射免疫法测定,均严格按照试剂盒说明书进行。

2.6 统计学处理

采用统计软件 SPSS17.0 进行统计分析,所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采取单因素方差分析,多个组间比较采用 LSD 分析,均以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异具有显著统计学意义。

3 结果

3.1 各组排卵情况的比较

与对照组比较,低中高剂量治疗组平均排卵数及排卵率显著增加($P < 0.01$),但仍明显低于正常组($P < 0.05$),囊性扩张卵泡率无明显改变($P > 0.05$)。与正常组比较,模型组平均排卵数及排卵率均显著降低($P < 0.01$),囊性扩张卵泡率显著增加($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠排卵情况比较

组别	n	平均排卵数	排卵率/%	囊性扩张性排卵率/%
正常组	15	14.66	93.33(14/15)	10.96(8/73)
模型组	15	0.98**	20.00(3/15)**	33.33(39/117)*
对照组	15	2.98	33.33(5/15)	29.58(42/142)
治疗组	15	4.12 [△]	46.67(7/15) [△]	35.92(51/142)*

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组相比较,[△] $P < 0.01$

3.2 各组 FBG、Fins 及 ISI 的比较

与对照组比较,低中高剂量治疗组 FBG 无明显变化($P > 0.05$),但 Fins 显著降低($P < 0.01$),ISI 显著升高($P < 0.01$);与正常组比较,模型组 FBG 和 Fins 均升高($P < 0.05$),ISI 则显著降低($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 各组大鼠 FBG、Fins 及 ISI 比较

组别	n	FBG/ (mmol/L)	Fins/ (μIU/mL)	ISI
正常组	15	4.37±1.02	19.58±7.34	-3.876±0.438
模型组	15	5.64±0.67*	29.29±9.65*	-4.915±0.524
对照组	15	5.72±0.37	21.34±3.59	-4.539±0.515
治疗组	15	5.99±0.81**	20.13±6.49 [△]	-4.763±0.394 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组相比较,[△] $P < 0.01$

3.3 各组血脂的比较

与对照组比较,低中高剂量治疗组 TG、TC 和 LDL 水平均显著降低 ($P<0.01, P<0.05, P<0.01$), HDL 水平显著增高 ($P<0.05$);与正常组比较,模型组血清 TG、TC 和 LDL 浓度均显著升高 ($P<0.01$), HDL 显著降低 ($P<0.01$)。结果见表 3。

3.4 各组血清性激素的比较

与对照组比较,低中高剂量治疗组血清 T 和 E_2 浓度均降低,FSH 浓度升高 ($P<0.05$),LH 水平无明显改变 ($P>0.05$);与正常组比较,模型组血清 T、 E_2 和 LH 浓度均显著升高 ($P<0.01$),FSH 浓度显著降低 ($P<0.01$)。结果见表 4。

表 3 各组大鼠血清脂质比较

组别	n	TG/ (mmol/L)	TC/ (mmol/L)	LDL/ (mmol/L)	HDL/ (mmol/L)
正常组	15	1.57±0.52	1.62±0.36	0.92±0.81	0.82±0.46
模型组	15	3.11±0.32*	2.96±0.17*	2.15±0.75*	0.47±0.18*
对照组	15	3.05±0.66	2.59±0.14	1.35±0.75	0.54±0.23
治疗组	15	2.40±0.27**	2.37±0.67 [△]	1.24±0.33**	0.66±0.43 [△]

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组相比较,** $P<0.01$,
[△] $P<0.05$

表 4 各组大鼠血清性激素比较

组别	n	T/ (ng/mL)	P/ (ng/mL)	FSH/ (mIU/mL)	LH/ (mIU/mL)	E_2 / (pg/mL)
正常组	15	0.18±0.04	1.97±1.21	1.34±0.24	2.18±0.37	725.58±125.61
模型组	15	0.29±0.14*	2.01±1.42	0.67±0.54*	3.41±0.72*	658.34±119.54*
对照组	15	0.31±0.27	2.12±0.99	1.164±0.66	3.51±0.94	600.52±160.11
治疗组	15	0.26±0.81**	2.57±1.34	1.217±0.33 [△]	3.68±0.16**	575.84±120.04**

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与对照组相比较,** $P<0.05$,[△] $P<0.01$

4 讨论

PCOS 的病因尚不清楚,涉及的病理机制非常复杂。一般认为与下丘脑-垂体-卵巢轴功能失常、肾上腺功能紊乱、遗传、代谢等因素有关。但目前发病机制尚不明确,其内分泌特征包括:雄激素过多、雌酮过多、黄体生成激素、卵泡刺激素(LH/FSH)比值增大、胰岛素过多等,与以下因素有关:①下丘脑-垂体-卵巢轴功能紊乱;②胰岛素抵抗;③胰岛素样生长因子-1 的激活;④肾上腺来源雄激素过多等^[9-11]。

《内经》对“痰瘀”相关的理论早有记载,“痰”和“瘀”皆为阴邪,痰自津来,瘀本乎血,津血同源,阴精阳气失其常度,则津灼为痰,血滞为瘀,说明痰瘀实为同源。基于痰瘀同治方的理论,伴胰岛素抵抗的多囊卵巢综合征及其导致的糖、脂代谢紊乱属于中医“痰浊”和“瘀邪”范畴^[12-15]。而痰瘀同治方由二陈汤和失笑散构成,二陈汤中半夏辛温性燥,善能燥湿化痰,且又和胃降逆,为君药。橘红为臣,既可理气行滞,佐以茯苓健脾渗湿,渗湿以助化痰之力,健脾以杜生痰之源,又以甘草调和诸药;失笑散中五灵脂苦咸甘温,入肝经血分,功擅通利血脉,散瘀止痛;蒲黄甘平,行

血消瘀,炒用并能止血,二者相须为用,为化瘀散结止痛的常用组合。两方结合,化痰去瘀,健胃运脾,使脾胃运化正常,痰瘀去,脉道通,血行流利,胞宫得养,则疾病可愈。

实验显示:模型组大鼠出现卵巢排卵率下降,糖、脂代谢紊乱和胰岛素抵抗,表明伴胰岛素抵抗的 PCOS 建模成功。成模大鼠经痰瘀同治方干预后,平均排卵数及排卵率显著增加;血脂中 TG、TC 和 LDL 显著降低,LDL 明显升高,血清 T 和 Fins 浓度显著降低,FSH 浓度及 ISI 明显升高,且与正常组之间无明显差异。这一结果证实了痰瘀同治方对 IR 的 PCOS 大鼠具有改善排卵障碍、增加胰岛素敏感性和降低性激素水平的作用。该结果为痰瘀同治方在临床上治疗伴胰岛素抵抗的多囊卵巢综合征提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Bhathena R K. Therapeutic options in the polycystic ovary syndrome[J]. J Obstet Gynaecol 2007, 27(2):123-129.
- [2] 周芳. 中西医结合治疗多囊卵巢综合征 40 例临床观察[J]. 医学信息, 2015(13):219-220.
- [3] 吴泰蓉. 辨证施治多囊卵巢综合征的临床体会(附 60 例病例报道)[J]. 贵阳中医学院学报, 2010, 32(5):39-40.

(下转第 36 页)

- [11] 贾国惠,贾世山. 甘草中黄酮的药理作用研究进展[J]. 中国药学杂志,1998,33(9):513-516.
- [12] 王访,苏耀海. 甘草的药理作用及临床应用[J]. 时珍国医国药,2002,13(5):303-304.
- [13] 李德芳,王振华,罗锋,等. 异甘草素的药理作用研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):362-364.
- [14] 张玉龙,王梦月,杨静玉,等. 炙甘草化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2015,29(3):99-102.
- [15] 陈超,李宁,倪慧,等. 甘草化学成分分离、细胞培养和分析研究进展[J]. 现代药物与临床,2011,26(3):188-194.
- (编辑:杨阳)

Study on the HPLC Fingerprints of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

XIE Jiaying, YANG Liguang, XIA Weijun, ZHANG Haiyuan, ZHANG Yingjie, MEI Shuangxi[△]

(Yunnan Institute of Materia Medica/Yunnan Bai Yao Group Innovation and R&D Center/Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** To develop a HPLC fingerprints of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Methods** The HPLC method was adopted on ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) analytical column by gradient elution with acetonitrile and phosphoric acid water solution(0.05%) as mobile phase. The analysis time was 70 min and the detection wavelength was 215 nm(0-16 min), 360 nm (16-22 min) and 250 nm (22-70 min). **Results** The HPLC standard fingerprint chromatogram of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. which consists of 7 common characteristic peaks. The results of method validation accorded with the technical standard of fingerprints. **Conclusion** The method is stable, accurate, reliable, and can provide a scientific basis for the quality control of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

KEY WORDS: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; HPLC; fingerprints

(上接第 31 页)

- [4] 李琼. 补肾通脉方改善 PCOS 大鼠胰岛素抵抗和排卵障碍的分子机制研究[D]. 武汉:华中科技大学,2009.
- [5] 张娟,朱桂金,王昕荣,等. 硫酸普拉睾酮钠诱导大鼠多囊卵巢综合征动物模型的实验研究 [J]. 中国优生与遗传杂志,2007,15(2):83-84,96.
- [6] 冯光荣,尤昭玲,贺冰. 多囊卵巢综合征动物模型建立的研究现状与展望 [J]. 湖南中医药导报,2004,10 (1):45-46.
- [7] Lee MT, Anderson E, Lee GY. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone[J]. Anatomical Record, 1991, 231(2): 185-192.
- [8] 李光伟,潘孝仁, Lillioja S, 等. 检测人群胰岛素敏感性的—项新指数[J]. 中华内科杂志, 1993, 32(10): 656-659.
- [9] 高金玲. 多囊卵巢综合征研究进展 [J]. 中国中医药资讯, 2010, 2(16): 151-152.
- [10] 乐杰. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 315-316.
- [11] 安丰艳,隋文美,于秀红,等. 多囊卵巢综合征的中医临床施治[J]. 按摩与康复医学(中旬刊), 2012, 3(12): 379.
- [12] 史志刚,渠会莹. 从痰瘀脾虚论治胰岛素抵抗[J]. 疑难病杂志, 2002, 1(4): 249-250.
- [13] 陈英群,董福轮,王宇锋,等. 从脾论治胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱的思路[J]. 中医杂志, 2008, 49(3): 273-275.
- [14] 熊曼琪, 郑兆智. 内分泌科专病与风湿病中医临床诊治 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2000: 35.
- [15] 贾伟平,项坤三,陈俊茜. 中国人糖耐量异常与胰岛素抵抗和胰岛素分泌 [J]. 中国糖尿病杂志, 2000, 8(2): 67-71.
- (编辑:杨阳)