

“希韵”对雷公藤多苷致动物卵巢早衰改善作用的研究

王淑娥¹ 赵冰清² 马晓敏¹ 徐贵法³

(1. 山东大学公共卫生学院 山东 济南 250012)
(2. 山东大学附属生殖医院科室 山东 济南 250012)
(3. 山东营养学会 山东 济南 250012)

【摘要】用雷公藤多苷灌胃12周的SD大鼠30天,进行造模。没有进行造模的大鼠称为空白组,造模成功后对造模成功的大鼠灌胃希韵,称为希韵组,造模成功的大鼠只灌胃纯化水的称为模型组。大鼠体重、动情周期、脏器指数(卵巢指数与子宫指数)、雌二醇(E₂)、促卵泡生成激素(FSH)、促黄体生成激素(LH)及卵巢切片变化情况被用来做大鼠卵巢早衰改善的判断依据。通过实验发现,模型组的体重减轻,动情周期紊乱、时间延长,E₂较空白组降低(P<0.05),卵巢切片显示各级卵泡减少;希韵组较模型组体重有所增长,动情周期趋于正常,E₂升高(P<0.05),卵巢切片改善。实验中FSH、LH各组无明显差异。通过实验结果可以得出:“希韵”对雷公藤多苷导致的动物卵巢早衰具有改善的作用。

【关键词】雷公藤多苷;卵巢早衰;大鼠

1 前言

卵巢功能低下、闭经出现在40岁以前的女性中被称为卵巢早衰。雌激素水平较低是卵巢早衰女性经常出现的一个症状:性欲低下、多汗等,严重时导致女性出现不孕,对女性的生活造成了影响^[1]。本实验主要探讨“希韵”对于大鼠卵巢早衰(雷公藤多苷所致)的改善作用,“希韵”是一种含有多种营养素及中药(药食两用)功能成分的固体饮料。实验通过对大鼠体重、动情周期、脏器指数(卵巢指数与子宫指数)、血清性激素水平(E₂、FSH、LH)及卵巢病理切片进行研究来探讨希韵对雷公藤多苷致动物卵巢早衰模型改善的效果。

2 材料与方法

2.1 主要试剂与仪器

2.1.1 实验动物与试剂

实验动物为12周,雌性SD大鼠,于山东省济南朋悦实验动物繁育有限公司购买,体重在250g±30g,生产许可证:SCXK(鲁)20190003;实验动物饲料由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,生产许可证号:SCXK(鲁)20180003。规格为10mg/片的雷公藤多苷片,是由上海复旦复华药业生产,批号为190101,在济南市漱玉平民大药房购买。希韵,山东欣希安药业股份有限公司提供,批号:12200301。

2.1.2 试剂处理方法

将雷公藤多苷片溶于纯化水中,浓度为6.25mg/mL。希韵分别称取6.8g、13.6g、20.4g分别溶于60mL水中。

2.2 实验方法

2.2.1 分组

将服习3天后的大鼠随机分为空白组、建模组,建模成功的大鼠随机分为模型组、希韵组。希韵组又分为中、高、低剂量组。

2.2.2 动情周期观察

对实验大鼠麻醉后,将消毒棉签浸润过生理盐水后,轻轻插入实验大鼠阴道中,后慢慢旋转后抽出,涂片,涂片干燥后再对涂片进行染色,最后进行显微镜观察,根据涂片的细胞形态来确定动物发情周期^[2]。

2.2.3 雷公藤多苷片造模

购入大鼠后服习3天,其后进行阴道涂片观察(连续10天),筛选处于动情周期的大鼠,共110只,随机分为建模组90只、空白组20只。空白组进行超纯水灌胃,2mL/次/d,连续30d。模型组给予雷公藤多苷片溶液经口灌胃,50mg/kg/d^[3]。在对大鼠进行解剖前10d进行阴道涂片观察,每日1次;根据动情周期情况确定灌胃时间,动情周期延长、紊乱,则造模成功,对造模不成功的进行剔除。

2.2.4 希韵大鼠灌胃

将造模成功的SD大鼠随机分组,每组20只,分为模型组、

低剂量组、中剂量组、高剂量组,空白组20只。

根据人体推荐食用量,制定如下剂量梯度:a.希韵高剂量组:4.05g/kg灌胃,每日1次。b.希韵中剂量组:希韵2.7g/kg灌胃,每日1次。c.希韵低剂量组:希韵1.35g/kg灌胃,每日1次。对空白组大鼠与模型组大鼠灌胃相同体积的纯水。解剖大鼠前10天进行阴道涂片,观察动情周期,每日1次;处死动物时称量体重记重。

2.2.5 血清性激素的检测

各组分别在造模第30天、灌希韵第30天、60天、90天采血,离心后取血清送检,检验血清E₂、FSH、LH。血清中E₂、FSH、LH的检测使用的是酶联免疫检测法。

2.2.6 卵巢病理切片的检测

大鼠麻醉后,解剖,取卵巢与子宫,用滤纸吸取多余的脂肪与水分析重,用甲醛固定,送检。使用CaseViewer2.2浏览数字切片,在不同倍数下详细观察组织结构。

2.2.7 卵巢与子宫系数计算

末次灌希韵24h后,处死动物,取出完整卵巢及子宫,去除多余组织称重,按照以下公式计算脏器系数^[4]:

$$\text{卵巢系数} = \frac{\text{卵巢湿重 (mg)}}{\text{体重 (g)}} \times 100\%$$

$$\text{子宫系数} = \frac{\text{子宫湿重 (mg)}}{\text{体重 (g)}} \times 100\%$$

2.2.8 统计学方法

实验数据采用SPSS 17.0统计软件进行计算,用均数±标准差(x±s)来表示,显著性检验用t检验,组间比较采用单因素方差分析,以P<0.05为差异有统计学意义^[4]。

3 结果

3.1 动情周期结果

空白组大鼠动情周期为4~5天。模型组大鼠动情周期延长,时间为7~8天。希韵高、中、低剂量组的动情周期依次为4~5天;4~5天,偶有6天;4~5天,偶有6天。

3.2 体重情况

造模30d时,模型组体重下降,空白组体重增长稳定。希韵组各组体重随着灌胃时间的增加均有升高现象,灌希韵60天、90天时希韵组各组已与空白组无明显差异。

3.3 脏器系数

表1 灌希韵第90天各组脏器系数

组别	数量	卵巢系数	子宫系数
空白组	5	0.215±0.044	0.570±0.233
模型组	5	0.171±0.014#	0.512±0.167
低剂量组(1.35g/kg)	5	0.192±0.049*	0.413±0.149
中剂量组(2.7g/kg)	5	0.227±0.056*	0.379±0.140
高剂量组(4.05g/kg)	5	0.210±0.049*	0.453±0.130

注:*P<0.05希韵组与模型组比较。#P<0.05模型组与空白组比较。

卵巢系数:模型组较空白组减少(P<0.05)。灌希韵各剂量组较模型组升高(P<0.05)。子宫系数:各组无明显差异。

3.4 性激素检测结果

表 2 造模 30d 性激素均值

组别	数量	E2 (pg/mL)	FSH (ng/mL)	LH (pg/mL)
空白组	4	26.37 ± 5.52	4.93 ± 0.77	430.8 ± 75.12
建模组	5	20.12 ± 4.80#	5.06 ± 0.59	579.5 ± 51.77

注: #P < 0.05 模型组与空白组比较。

雷公藤多苷片造模 30 天后, 模型组大鼠 E2 均值较空白组显著降低 (P < 0.05), FSH、LH 无明显差异。(见表 3)

灌希韵 60d, 中、高剂量组 E2 的均值比模型组有所升高 (P < 0.05)。希韵组中、高剂量组 E2 较空白组差异不明显, 无统计学意义。FSH、LH 各组差异不显著。

3.5 病理切片结果

空白组 (图 1): 各级卵泡数量丰富, 黄体发育。模型组 (图 2): 组织各级卵泡数减少, 闭锁卵泡减少, 黄体数量减少。低剂量组 (图 3): 组织各级卵泡数量增多, 闭锁卵泡数量增多。中剂量组 (图 4): 组织各级卵泡数量较 M 组增多, 闭锁卵泡数量增多, 未见明显黄体, 少量卵泡扩张, 卵泡内可见嗜酸性絮状物。高剂量组 (图 5): 组织各级卵泡数量及黄体数量增多, 闭锁卵泡数量较少。

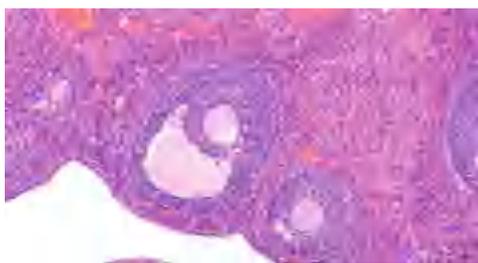


图 1 空白组 (HE 染色 ×20.0)

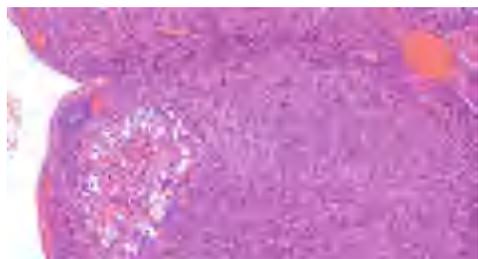


图 2 模型组 (HE 染色 ×20.0)

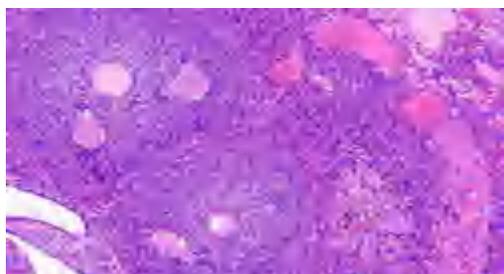


图 3 低剂量组 (HE 染色 ×20.0)



图 4 中剂量组 (HE 染色 ×20.0)



图 5 高剂量组 (HE 染色 ×20.0)

4 结论与分析

雷公藤多苷 50mg / kg / d (30d) 造模后, 模型组的动情周期紊乱, 时间延长, 体重减轻, E2 较空白组明显减低, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 希韵组灌胃 60 天后, 动情周期趋于正常, 中、高剂量组 E2 较模型组升高 (P < 0.05)。

阴道和子宫作为卵巢分泌激素的靶器官, 对雌激素高度敏感。本实验研究结果发现模型组阴道图片呈现持续无角化状态, 白细胞及少量的上皮细胞及茹液, 黄体退化。结合性激素检测指标, 说明雷公藤多苷致卵巢早衰后, 雌激素分泌不足以维持阴道上皮发生周期性变化, 体重减轻, 周期紊乱。给予希韵后, 卵巢早衰大鼠血清性激素水平有明显的改善作用, 提高 E2 水平的表达, 促进卵巢功能的恢复, 动情周期逐渐恢复正常。

造模后, 卵巢系数下降 (P < 0.05), 动物卵巢出现萎缩变小。灌希韵后卵巢系数较模型组有升高 (P < 0.05), 说明卵巢得到了改善。分析病理学图片得出, 在对动物经口给与希韵后, 可有效减少卵泡闭锁, 改变卵泡形态, 增加卵泡颗粒细胞层数, 促进卵泡发育。改善卵巢受损程度, 减缓卵巢受损程度和闭锁卵泡数目。

综合以上结果, 可以得出希韵对于雷公藤多苷片卵巢早衰动物模型有改善的作用。

参考文献:

- [1]Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure[J]. Hormone Research, 2007, 68: 196.
- [2]丁玉龙, 孙莉, 李丽亚. 小鼠阴道涂片三种染色方法比较. 实验动物科学, 2010, 27 (1): 67 - 69.
- [3]高慧, 杨娟, 韩冰, 夏天. 药物型卵巢早衰动物模型的研究 [J], 国医论坛 .2007
- [4]李晓红, 闫宏, 刘绪红, 等. 补肾养血方对卵巢早衰小鼠动情周期及卵巢指数的影响. 解剖学研究 [J], 2014, 36 (3): 204-209.

通信作者:

徐贵法, 大学学历, 教授, 研究方向: 营养与健康.

表 3 灌希韵 60d 性激素均值

组别	数量	E2 (pg/mL)	FSH (ng/mL)	LH (pg/mL)
空白组	4	28.70 ± 3.80	7.21 ± 2.57	733.67 ± 232.06
模型组	5	21.42 ± 0.54	10.45 ± 2.64	968.02 ± 269.04
低剂量组 (1.35g/kg)	5	22.01 ± 6.7	7.33 ± 1.65	837.28 ± 114.33
中剂量组 (2.7g/kg)	5	25.76 ± 2.60*	7.54 ± 1.05	816.97 ± 94.86
高剂量组 (4.05g/kg)	5	24.24 ± 2.35*	9.51 ± 1.60	1045.40 ± 134.71

注: *P < 0.05 希韵组与模型组比较。