

苍附苁仙汤对多囊卵巢综合征氧化应激的影响

梁莹¹ 田茜华² 穆玉霞¹ 杜惠兰²

摘要 **目的** 观察苍附苁仙汤对多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)患者颗粒细胞氧化应激的影响。**方法** 选择行体外受精-胚胎移植术(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) PCOS患者40例,按随机数字法分为两组,治疗组20例,术前2个月服用苍附苁仙汤200 mL,分早、晚2次温服;对照1组20例,术前不予中药。另选同期因输卵管因素行IVF-ET患者20例为对照2组。观察各组患者的获卵数、两原核(2 pronuclear, 2PN)受精率、优质胚胎率、临床妊娠率、因卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)发生取消移植率。采用细胞免疫荧光结合共聚焦显微镜检测和流式细胞术检测颗粒细胞中活性氧(relative oxygen species, ROS)表达。**结果** 与对照1组比较,对照2组和治疗组获卵数、2PN受精率、优质胚胎率升高($P < 0.05$);对照2组因OHSS发生取消移植率降低($P < 0.05$)。与对照1组比较,治疗组和对照2组颗粒细胞ROS荧光强度降低($P < 0.01$)。**结论** 苍附苁仙汤通过下调卵巢颗粒细胞中ROS的表达,纠正患者体内的氧化应激,从而增加PCOS患者的优质胚胎率。

关键词 苍附苁仙汤;多囊卵巢综合征;氧化应激;活性氧;颗粒细胞

Effects of Cangfu Congxian Decoction on Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome Patients
LIANG Ying¹, TIAN Qian-hua², MU Yu-xia¹, and DU Hui-lan² 1 Reproductive Center, Obstetrics and Gynecology Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang (050011); 2 Faculty of Integrative Medical Gynecology, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center for Integrative Medical Reproductive Disease, Shijiazhuang (050091)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Cangfu Congxian Decoction (CCD) on oxidative stress in granulosa cells of polycystic ovary syndrome (PCOS) patients. **Methods** Forty PCOS patients underwent *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) were assigned to the treatment group and the control group 1 according to random digit table, 20 in each group. Patients in the treatment group took CCD (200 mL, once in the morning and once in the afternoon) 2 months before IVF-ET, while those in the control group 1 took no Chinese medical decoction. Recruited were another 20 patients undergoing IVF-ET for tubal factors (as the control group 2). The clinical effect of IVF-ET were observed, including oocyte retrieval number, 2 pronuclear (2PN) fertilization rate, good quality embryo rate, clinical pregnancy rate, and ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) induced transplantation cancel rate. The expression of relative oxygen species (ROS) in granulosa cells was detected using cell immunofluorescence combined with confocal microscopy and FCM. **Results** Compared with the control group 1, oocyte retrieval number, 2PN fertilization rate, and good quality embryo rate increased in the control group 2 and the treatment group ($P < 0.05$). OHSS induced transplantation cancel rate decreased in the control group 2 ($P < 0.05$). Fluorescence intensity of ROS decreased in the treatment group and the control group 2, as compared with the control group 1 ($P < 0.01$). **Conclusion** CCD increased good quality embryo rate by down-regulating the expression of ROS protein in ovarian granulosa cells, and correcting *in vivo* oxidative stress.

KEYWORDS Cangfu Congxian Decoction; polycystic ovary syndrome; oxidative stress; relative oxygen species; granulosa cell

作者单位:1.河北省石家庄市妇产医院生殖中心(石家庄 050011);2.河北中医学院中西医结合妇科教研室,中西医结合生殖疾病协同创新中心(石家庄 050091)

通讯作者:梁莹, Tel:0311-85281692, E-mail:18632166229@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.06.0685

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种代谢性疾病,是女性常见的内分泌紊乱性疾病^[1],表现为高胰岛素血症、高雄激素血症。肥胖是 PCOS 患者常见的临床表现之一,发病率远高于正常人群^[2]。研究提示此类患者存在氧化应激反应异常^[3]。活性氧(relative oxygen species, ROS)可反映氧化应激状态。实验表明氧化应激参与了胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)的形成^[4]。中药治疗 PCOS 疗效已得到证实^[5-8]。苍附苡仙汤是课题组治疗 PCOS 经验方,本研究拟对苍附苡仙汤治疗 PCOS 疗效进行前瞻性研究,并从颗粒细胞氧化应激方面探讨苍附苡仙汤治疗 PCOS 可能的作用机制,为中医治疗方案提供客观指标依据。

资料与方法

1 诊断标准 PCOS 诊断标准参照文献[9],以下 3 项中至少符合 2 项:(1)稀发排卵或无排卵;(2)高雄激素(androgen)血症或高雄激素临床表现(如多毛、痤疮等);(3)月经周期或黄体酮撤退后出血 3~5 天超声检查显示双侧卵巢直径 2~9 mm 小卵泡均 ≥ 12 个,即卵巢多囊样改变,和(或)卵巢体积增大(每侧 $> 10 \text{ cm}^3$)。中医辨证分型标准参照《中医妇科学》^[10]、《中药新药临床研究指导原则》^[11]不孕症痰湿阻滞证标准。主症:(1)月经周期延后,月经量少,经色淡红,月经质黏腻;(2)逐渐闭经;(3)结婚日久不孕。兼症:(1)胸腹痞闷;(2)常见恶心呕吐;(3)形体肥胖;(4)舌淡胖或有齿印,舌苔腻;(5)脉滑或弦滑。具备 1 项主症及 3 项兼症,即可诊断。

2 纳入及排除标准 纳入标准:符合 PCOS 诊断标准;同意接受检查、治疗并签订知情同意书。排除标准:高雄激素血症的其他原因(如高泌乳素血症和甲状腺疾病、先天性肾上腺皮质增生、库欣综合征、雄激素分泌性肿瘤、21-羟化酶缺乏性非典型肾上腺皮质增生、外源性雄激素应用等);合并 1 型糖尿病;高促性及低促性腺激素引起的闭经及子宫原因月经过少或闭经。

3 一般资料 40 例均为 2013 年 1—10 月在河北省石家庄市妇产医院就诊的 PCOS 患者,按照随机数字表分为治疗组和对照 1 组。另选取同期因输卵管因素[包括因输卵管切除或输卵管阻塞,均经腹腔镜或子宫输卵管造影(hysterosalpinography, HSG)证实导致的不孕]在石家庄市妇产医院接受 IVF-ET 患者 20 例为对照 2 组。治疗组年龄 23~32 岁,平均 (26.5 ± 3.6) 岁; BMI 21.6~25.5, 平均

23.7 ± 1.6 。对照 1 组年龄 22~31 岁,平均 (25.5 ± 2.6) 岁; BMI 20.4~26.3, 平均 24.1 ± 2.2 。对照 2 组年龄 22~33 岁,平均 (26.5 ± 3.8) 岁; BMI 18.6~22.3, 平均 20.8 ± 1.9 。各组患者年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗组和对照 1 组 BMI 高于对照 2 组($P < 0.05$)。本研究经石家庄市妇产医院伦理委员会批准。

4 治疗方法 治疗组术前 2 个月服用苍附苡仙汤(组成:苍术 10 g 香附 10 g 肉苡蓉 10 g 仙灵脾 10 g 清半夏 10 g 陈皮 10 g 茯苓 10 g 菟丝子 10 g 当归 10 g 川芎 10 g),饮片购自石家庄乐仁堂药店,饮片均经药房专门鉴定达标后,由乐仁堂药店代为煎煮。煎前先将中药加水(水量为药量 5 倍)充分浸泡 30 min,以武火迅速煮沸,沸后改用文火再煎 20 min,倒出药液,留取药渣重复煎煮 2 次,共取汁 200 mL,分早、晚 2 次温服。对照 1 组术前不予中药。

3 组均采用常规长方案促排卵治疗,月经黄体中期或者第 21 日皮下注射醋酸曲普瑞林(Triptorelin Acetate, 0.1 mg/支,法国博福-益普生,批号:D22863) 0.1 mg/日,至少 14 日。达到垂体降调节标准^[12](子宫内膜 $\leq 5 \text{ mm}$,血清 $E_2 < 50 \text{ pg/mL}$)后,皮下注射重组人促卵泡激素(Gonal-F, 果那芬, 75 IU/支,默克雪兰诺,批号:AU002290) 225~300 IU/日,观察血清黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、 E_2 、孕酮(progesterone, P),B 超监测卵泡发育情况,当 60% 卵泡直径 $\geq 18 \text{ mm}$ 时停药,皮下注射重组绒促性素(艾泽, 250 μg /支,默克雪兰诺,批号:DA009256) 250 μg 诱导卵泡成熟,36~38 h 经阴道超声引导下穿刺取卵。

5 观察指标及方法

5.1 促性腺激素(gonadotropin, Gn)使用时间及使用量 Gn 使用时间 7~5 日,至 60% 卵泡直径 $\geq 18 \text{ mm}$ 时停药;计量根据年龄、病史及 BMI 确定, 225~300 IU/日。

5.2 获卵数、受精率、卵裂率、胚胎数、优质胚胎率、因卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)发生取消移植率及临床妊娠率检测 将取卵获得的卵泡液置于体视镜观察,挑取卵冠丘复合物,培养并计数获卵数。所有卵母细胞按剥除卵丘细胞时的卵母细胞成熟度分为以下 3 组^[13], I 组:有第一极体,为 M II 期卵(成熟卵); II 组:无第一极体也无生发泡(germinal vesicle, GV),为 M I 期卵; III 组:有生发泡,为 GV 期卵。

卵-丘复合体(cumulus-oocyte complex,

COC)常规培养 4~6 h,加入处理后的配偶精液,受精约 16~18 h 后观察两原核(pronuclear,2PN),2PN 为正常受精,计算 2PN 受精率(%)=2PN 受精卵/获卵数×100%。取卵后第 3 日评价胚胎质量,按形态学分为以下 4 级,I 级:卵裂速度正常,细胞数目与时间相符,卵裂球等大,胞质均匀透明,颗粒均匀,无碎片或碎片<5%;II 级:卵裂速度基本正常,卵裂球不等大,胞质均匀,碎片 5%~25%;III 级:卵裂速度基本正常,卵裂球等大或不等大,色泽略差,碎片 26%~50%;IV 级:卵裂速度明显慢于正常,卵裂球不等大,胞质变暗,颗粒不均匀,碎片>50%;其中 I、II 级为优质胚胎。计算优质胚胎率(%)=(I 级+II 级)/胚胎数×100%。

因 OHSS 发生取消移植率(%)=中重度 OHSS 取消移植病例/总取卵病例×100%。

胚胎移植后 1 个月,在超声下可见到胎囊、胎芽及原始心管搏动,记为临床妊娠。临床妊娠率(%)=临床妊娠例数/移植胚胎周期数×100%。

5.3 颗粒细胞的分离和准备 参照参考文献[14],将含有颗粒细胞的卵泡液 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清,留取沉淀;取无菌离心管,加入人淋巴细胞分离液 5 mL 将上述沉淀物中加入 PBS 至 5 mL,将混悬液经 45°缓慢加入淋巴细胞分离液的液面上,离心(2 500 r/min,10 min);两液面间白色细胞层即为去除红细胞后的颗粒细胞,加 PBS 3 000 r/min 离心 5 min,下层即为壁颗粒细胞;将获得的壁颗粒细胞加入 200 μL 0.25%透明质酸酶消化 2~3 min,充分吹打,加入 1 mL PBS,终止消化,经 2 000 r/min 离心 5 min,去上清留取沉淀,用枪吹打离心管底部沉淀,准备处理过的黏附载玻片,取 50 μL 标本离心管底部的颗粒细胞涂在载玻片上,做好标记,待完全干片后加入 4%多聚甲醛固定,用于免疫荧光法检测;剩余细胞经 400 目网筛过滤后,做流式细胞术检测。

5.4 ROS 检测 采用流式细胞术和免疫荧光法。试剂盒购于 Beyotime 公司(批号:S0033-1)。

5.4.1 流式细胞术 将荧光探针 DCFH-DA 与颗粒细胞混悬液以 1:1 000 加入,使其终浓度为 10 μmol/L,室温孵育 2 h 后,流式细胞仪(美国 BD

公司,激发光波长 488 nm)检测,每个样品收集 1×10⁴个细胞,CellQuest 软件分析结果。

5.4.2 免疫荧光法 取多聚甲醛固定片,PBS 清洗 2 次,每次 3 min。将荧光探针 DCFH-DA 以 1:1 000 稀释,使其终浓度为 10 μmol/L,滴片,室温孵育 2 h,PBS 清洗 1 次,封片,SP-5 激光共聚焦显微镜(德国 Leica)下观察并计算荧光值。

6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计处理,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对所测定结果进行正态性及方差齐性检验,组间比较用单因素方差分析检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 IVF-ET 结局比较(表 1) 与对照 1 组比较,对照 2 组和治疗组获卵数、2PN 受精率、优质胚胎率升高($P<0.05$);对照 2 组因 OHSS 取消移植率降低($P<0.05$)。

2 各组颗粒细胞 ROS 荧光表达比较(图 1,表 2) 与对照 1 组比较,治疗组和对照 2 组颗粒细胞 ROS 荧光强度降低($P<0.01$)。

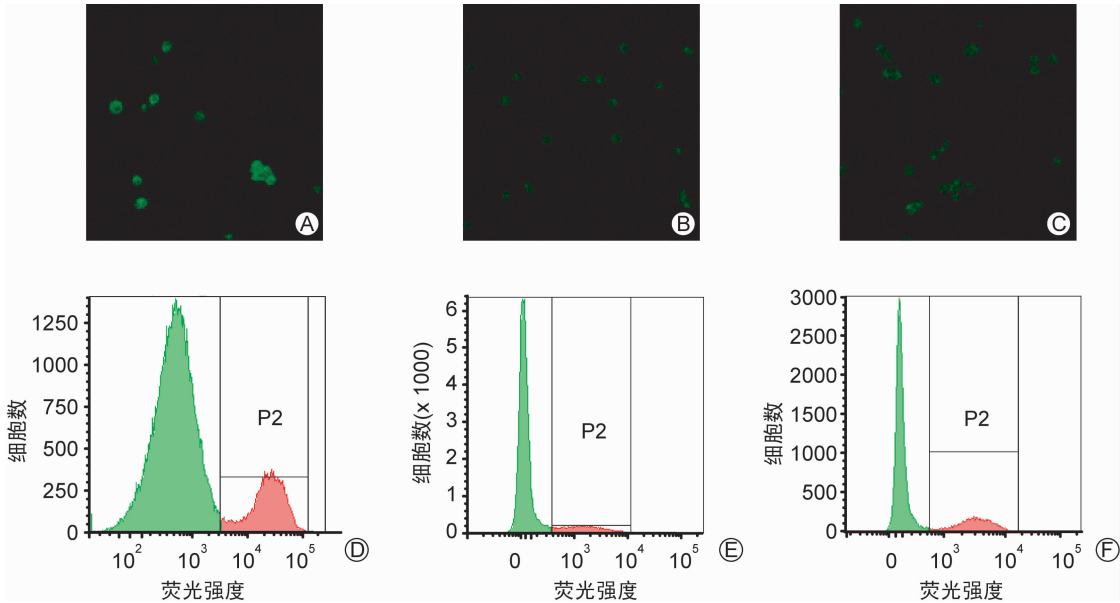
讨 论

50%~70%PCOS 患者无论是否肥胖均存在不同程度 IR^[15]。有学者认为,IR 是机体在细胞水平对 ROS 产生过多的一种生理性防御机制,而 PCOS 患者持续无排卵导致卵巢内雌激素持续中低水平,是诱发其卵巢内异常氧化应激的重要原因。卵巢内 ROS 的来源主要是巨噬细胞、颗粒细胞和上皮细胞,而抗氧化酶主要来自颗粒细胞和卵泡膜细胞。在卵泡生长过程中,卵泡液内雌激素的逐渐增加是卵巢内抗氧化防御主要机制之一;另一方面,卵泡液内异常的氧化应激又会影响颗粒细胞和泡膜细胞的功能。已有研究表明局部氧化应激的变化可能参与了 PCOS 疾病的形成或发展,据 Bedaiwy MA 等^[16]报道,卵泡液内氧化应激状态与卵子质量及单精子显微注射技术助孕患者的妊娠结局有关联。国内也有类似报道^[17]。氧化损伤由 ROS 产生和清除失衡所致,主要包括 DNA、蛋白和脂质氧化损伤。过量 ROS 损伤可以导致核 DNA 和

表 1 各组 IVF-ET 结局比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	获卵数(个)	2PN 受精率(%)	优质胚胎率(%)	因 OHSS 取消移植率(%)	临床妊娠率(%)
对照 1	20	19±4	65.34(213/326)	42.86(120/280)	75(15/20)	60.00(3/5)
对照 2	20	12±4*	86.80(217/250)*	60.95(128/210)*	15(3/20)*	58.82(10/17)
治疗	20	13±5*	89.08(261/293)*	63.03(150/238)*	3(6/20)	64.29(9/14)

注:与对照 1 组比较,* $P<0.05$



注:A、D 为对照 1 组;B、E 为对照 2 组;C、F 为治疗组;A ~ C 为颗粒细胞 ROS 荧光表达(×60),绿色荧光分布标记 ROS;D ~ F 为颗粒细胞 ROS 荧光表达流式细胞术结果

图 1 各组颗粒细胞 ROS 荧光表达

表 2 各组颗粒细胞 ROS 荧光表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	平均荧光强度	
		免疫荧光法	流式细胞术
对照 1	20	53 ± 10	23 674 ± 5 567
对照 2	20	11 ± 7 *	3 095 ± 997 *
治疗	20	12 ± 5 *	2 527 ± 767 *

注:与对照 1 组比较,* $P < 0.01$

线粒体 DNA 突变或缺失,细胞膜脂质过氧化导致膜流动性改变,而蛋白氧化损伤导致重要酶失活。本研究结果显示,与对照 2 组比较,对照 1 组获卵数多,优质胚胎率低,因 OHSS 取消移植率升高,而颗粒细胞 ROS 表达明显增加。与以上研究结果一致,提示 PCOS 患者卵子质量下降,可能与氧化损伤有关。

中医学无 PCOS 病名,但根据其临床症状,可归属于“不孕症”、“月经后期”、“闭经”、“癥瘕”等范畴。本病与肾、肝、脾三脏功能失调及痰湿、肝郁、脾虚、血瘀等因素密切相关。中药治疗 PCOS 的疗效已经得到证实。近年来许多研究提示中药在治疗 PCOS 方面有独特的功效^[7]。俞瑾^[5]将 PCOS 分为肾虚痰实型、肾虚肝郁型、肾阴虚痰实血瘀型,并分别给予补肾化痰法、清肝补肾法、益肾化痰祛瘀法进行辨证治疗。高雅^[6]将本病分为痰湿型、肾虚夹瘀型、肝经郁热型,分别以苍附导痰丸、归芍地黄丸、丹栀逍遥散加减治疗 3 个月,总有效率 88.3%,妊娠率 50.0%,临床收效良好。黄健^[7]用苍附导痰汤治疗痰湿型 PCOS 闭经

患者 6 个周期,血中 LH、催乳素、睾酮水平平均明显下降,与治疗前比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。杜倩等^[8]研究认为,采用健脾补肾法治疗痰湿型 PCOS 较化痰补肾法具有更好的临床疗效。

本课题组前期研究初步证实,应用苍附苡仙汤治疗 PCOS 有较好的临床疗效^[18]。苍附苡仙汤是苍附导痰汤、佛手散加减化裁而来,重在增加补肾之品。方从改善脾胃功能、温肾活血入手,旨在健脾和胃、清化痰湿、温补肾阳、行气活血,使得痰湿得化,气机通畅、血脉调和。方中苍术可燥湿化痰;香附、理气散结,开胸肋之痰;川芎、香附行气解郁,《本草纲目》^[19]曰:“芎藭,血中气药也,肝苦急以辛补之,故血虚者宜之;辛以散之,故气郁者宜之”。方中二陈汤(陈皮、半夏、茯苓)化痰燥湿,和胃健脾;当归养血活血调经,助川芎行气,且当归合川芎为佛手散,有益气活血、行气通经之效;菟丝子温肾填精补血;肉苁蓉温肾助阳以升少火。现代药理学研究发现,“肾”与下丘脑—垂体—卵巢轴、生殖内分泌相关^[20]。苍附苡仙汤的作用机制在于补肾温阳、健脾祛痰。本研究中,服用苍附苡仙汤的治疗组颗粒细胞 ROS 水平明显下降,并且优胚数及取消周期数明显下降,与因输卵管因素接受 IVF-ET 患者相似,提示中药苍附苡仙汤有提高卵子质量的作用,降低氧化损伤是重要的机制之一。

参 考 文 献

[1] Carmina E, Lobo RA. Polycystic ovary syndrome

- (PCOS): arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84 (6): 1897 – 1899.
- [2] 王莉. 肥胖型多囊卵巢综合征患者发病相关因素及与血清胃促生长素和肥胖抑制素相关性研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2013.
- [3] 刘瑾, 张丹. 氧化应激在肥胖型多囊卵巢综合征发病中的作用 [J]. *四川大学学报 (医学版)*, 2012, 43 (2): 187 – 190.
- [4] 李根霞, 李巍巍. 多囊卵巢综合征患者胰岛素抵抗和氧化应激的关系 [J]. *郑州大学学报 (医学版)*, 2011, 46 (5): 759 – 762.
- [5] 俞瑾. 多囊卵巢综合征诊断和分类的探讨 [J]. *生殖医学杂志*, 2006, 15 (4): 261 – 263.
- [6] 高雅. 中医辨治多囊卵巢综合征的临床研究 [D]. 天津: 天津中医学院, 2005.
- [7] 黄健. 苍附导痰汤治疗痰湿型多囊卵巢综合征闭经 35 例 [J]. *福建中医药大学学报*, 2011, 21 (1): 54 – 55.
- [8] 杜倩, 陈锦黎. 健脾补肾法治疗痰湿型多囊卵巢综合征的临床疗效观察 [J]. *上海中医药大学学报*, 2011, 25 (6): 35 – 37.
- [9] Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19 (1): 41 – 47.
- [10] 张玉珍主编. 中医妇科学 [M]. 中国中医药出版社: 2002: 72 – 327.
- [11] 郑筱萸主编. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 249 – 253.
- [12] Reissmann T, Felberbaum R, Diedrich K, et al. Development and applications of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview [J]. *Hum Reprod*, 1995, 10 (8): 1974 – 1981.
- [13] 黄国宁, 孙海翔主编. 体外受精 – 胚胎移植实验室技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 239.
- [14] 江欢, 谢宝国, 罗琛, 等. 两种人卵巢颗粒细胞分离提纯方法的比较研究 [J]. *生殖与避孕*, 2012, 32 (11): 728 – 732.
- [15] Cebeci F, Onsun N, Mert M. Insulin resistance in women with hirsutism [J]. *Arch Med Sci*, 2012, 8 (2): 342 – 346.
- [16] Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, et al. Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species [J]. *Fertil Steril*, 2004, 82 (3): 593 – 600.
- [17] 张丹, 罗万英, 廖华, 等. 氧化应激与多囊卵巢综合征的关系初探 [J]. *四川大学学报*, 2008, 39 (3): 421 – 423.
- [18] 梁莹, 杜惠兰, 穆玉霞. 苍附从仙汤对多囊卵巢综合征患者卵巢颗粒细胞胰岛素样生长因子-1 受体基因表达的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2015, 22 (1): 29 – 32.
- [19] (明) 李时珍著. 高晓玲, 朱英彩校注. 本草纲目 [M]. 昆明: 云南出版集团, 2014: 117.
- [20] 笪晨星, 郑清涟, 张哲. 从 RAS 系统研究“肾主生殖”的理论实质 [J]. *医学信息*, 2009, 22 (7): 1386 – 1388.

(收稿: 2015-01-22 修回: 2015-09-29)

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅