

桂枝挥发油对PCOS大鼠模型卵巢VEGF、COX-2及MVD表达的影响*

姚菲¹, 曹建雄², 王若光²

(1.湖南中医药大学2005级七年制硕士研究生,湖南 长沙 410208;

2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的 观察桂枝挥发油对多囊卵巢综合征大鼠模型卵巢中血管内皮生长因子、环氧合酶及微血管密度表达的影响。方法 选用23日龄未成年的SD雌性大鼠60只,造模后随机分空白对照组、模型对照组、桂枝挥发油高剂量组、桂枝挥发油中剂量组、桂枝挥发油低剂量组共5组,每组12只。运用丙酸睾酮联合绒毛膜促性腺素建立大鼠多囊卵巢病理模型,采用免疫组化方法检测各组卵巢组织中VEGF、COX-2及MVD蛋白的表达水平。结果 VEGF、COX-2和MVD蛋白在模型对照组大鼠卵巢中的阳性表达率均明显高于空白对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),而给予桂枝挥发油灌胃干预的高、中、低剂量组卵巢局部较模型对照组相比均有所降低($P<0.01$),桂枝挥发油高、中剂量组均高于低剂量组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 桂枝挥发油能降低卵巢组织的VEGF、COX-2和MVD等因子的表达,它可能通过抑制此三者的生成来参与对多囊卵巢综合症的治疗作用。

[关键词] 桂枝挥发油;多囊卵巢综合征;免疫组化;VEGF;COX-2;MVD

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2012)01-0015-02

Effect of the volatile oil of ramulus cinnamomi on expression of VEGF、COX-2 and MVD in PCOS rats

Yao Fei¹, Cao Jianxiong², Wang Ruoguang²

(First affiliated hospital, TCM university of hunan, Hunan Changsha)

[Abstract] Object: To explore the effects of the volatile oil of ramulus cinnamomi (VORC) has on the expression of VEGF、COX-2 and MVD of the rats suffering from polycystic ovary syndrome. Methods: First, we select sixty rats of twenty-three days old and this random sample of rats, and then the PCOS model of the rats is set by hypodermically injecting Testosterone Propionate+HCG. after this the PCOS model of the rats are divided into five group for contrast, i.e., model group, normol group, VORC group of high dose, VORC group of average dose, VORC group of low dose, of which each group include twelve rats. The treat with medicine, check the expression of VEGF、COX-2 and MVD of the rats' ovarian by the technology of immunohistochemistry. Result: Firstly, VEGF、COX-2 and MVD of the rats suffering from PCOS have higher expression compare with normol group, the difference is conspicuous ($P<0.01$). The groups of high, average and low dose of VORC have higher expression than the model group, and among then, the higher and average dose group are superior to the group of low doses, and the difference is overt ($P<0.05$). Conclusion: VORC can lower the expression VEGF、COX-2 and MVD in the ovarian organization of the rats suffering from polycystic ovary syndrome to mediate the ovarian function.

[Key words] VORC; PCOS; Immunohistochemistry; VEGF; COX-2; MVD

血管内皮生长因子(VEGF)、环氧合酶(COX-2)及微血管密度(MVD)均是血管新生细胞信号转导通路上的指标。多囊卵巢综合征(PCOS)是现今妇

产科的研究热点之一,文献表明,本病的发生发展与卵巢局部间质纤维化、卵泡囊血管增生、卵巢白膜增厚等因素密切相关。本实验拟以桂枝茯苓丸的代表药桂枝为研究对象,提取其有效成分桂枝挥发油,运用免疫组化技术探讨其PCOS大鼠模型卵巢

* 基金项目:湖南省大学生研究性学习课题项目[湘教通(2009)320-159]

VEGF、COX-2及MVD表达的影响,现总结如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用23日龄(断奶后2 d)SD清洁级雌性大鼠60只,质量(41±5) g,由湖南中医药大学动物实验室提供,动物合格证编号 SCXK (湘)2009-0012。

1.1.2 实验药物 桂枝挥发油,由广西药用植物园制备,取自广樟科植物肉桂的干燥嫩枝(桂枝药材批号 J080203),按《中国药典》规定方法提取得到桂枝挥发油,以无水硫酸钠脱水,乙醚溶解。丙酸睾酮注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号 H12020531)。注射用人绒毛膜促性腺激素(1000 IU/瓶,丽珠集团丽珠制药厂,批号 H44020674)。

1.1.3 主要试剂 VEGF、COX-2及MVD免疫组化试剂盒(批号 BAO407、BAO738、BAO659),DAB显色试剂盒(SA2025),即用型SABC免疫组化试剂盒(SA1052)均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 采用丙酸睾酮联合绒毛膜促性腺激素造模^[1-2],以制造多囊卵巢综合征的病理模型。空白对照组12只每天同期皮下注射生理盐水0.15 mL/只。

1.2.2 分组及给药方法 造模成功后,将造模大鼠分为4组,即模型对照组、桂枝挥发油高剂量组、桂枝挥发油中剂量组、桂枝挥发油低剂量组,低、中、高剂量组每天分别按时灌服桂枝挥发油0.125 mL/100 g、0.25 mL/100 g、0.5 mL/100 g,在灌胃前,该3组的桂枝挥发油均用生理盐水定容至1 mL,空白对照组及模型对照组均灌以等量的生理盐水,连续灌胃30 d。

1.3 指标检测 药物干预结束后,各组称体重,处死大鼠,从腹部解剖,取双侧卵巢组织,以4%多聚甲醛固定,行HE染色,免疫组化切片。(1)免疫组化检测:免疫组化封片后分析软件计算各组切片阳性细

胞个数、平均阳性面积及平均光密度值,以检测各组蛋白表达情况。按染色强度打分 0分为无色,1分为浅黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色,染色强度依据背景着色进行比较,再按阳性细胞所占百分比打分 0分为阴性,1分为阳性细胞≤10%,2分为11%~50%,3分为51%~75%,4分为>75%。两种计分之总和所得总分进行结果判定。0~1分为阴性(-),2~3分为弱阳性(+),4~5分为中度阳性(++),6~7分为强阳性(+++)。

(2) VEGF、COX-2及MVD检测 VEGF主要以胞质中出现黄色或棕黄色颗粒视为阳性着色,COX-2以胞浆阳性细胞个数为主。凡被染成黄色或棕褐色的单个内皮细胞或内皮细胞簇为一个微血管计算MVD,官腔大于8个红细胞大小,肌层较厚的血管不计数,先在低倍显微镜下(×100)观察切片确定肿瘤血管密度区域,即所谓的“热点”,然后在高倍显微镜下(×400)随机计数5个视野的微血管数,取最大值作为该片的MVD值。

1.4 统计学方法 采用SPSS 16.0统计软件进行分析。计数资料采用 χ^2 检验,等级资料比较采用秩和检验。

2 结果

2.1 各组大鼠卵巢形态学比较 模型对照组大鼠卵巢表面苍白,单侧或双侧卵巢体积增大,可见卵巢白膜增厚,白膜皮质下见多个卵泡囊性扩张,颗粒细胞固缩、坏死、呈深染色团块状,并可见少量中性粒细胞。囊状卵泡的颗粒细胞层数较正常组织少,一般1~3层。空白对照组大鼠卵巢色泽红,可见多个不同发育阶段的卵泡,卵母细胞发育正常,胞核与胞质比例适当,透明带完整,颗粒细胞呈多层,形态完整,排列整齐,可见黄体形成。桂枝挥发油组卵巢体积较模型对照组小,色淡红,可见成熟卵泡。

2.2 各组大鼠卵巢组织VEGF、COX-2及MVD表达的比较 见表1。

表1 各组大鼠卵巢组织VEGF、COX-2及MVD表达的比较 (只)

组别	只数	VEGF表达的强度					COX-2表达的强度					MVD表达的强度				
		-	+	++	+++	阳性率(%)	-	+	++	+++	阳性率(%)	-	+	++	+++	阳性率(%)
空白对照组	12	10	1	1	0	16.7	9	2	1	0	25.0	10	2	0	0	16.7
模型对照组	12	3	5	2	2	75.0 ^a	2	3	3	4	83.3 ^a	1	4	3	4	91.6 ^a
桂枝挥发油低剂量组	12	6	4	1	1	50.0 ^b	4	1	5	2	66.7 ^b	3	3	4	2	75.0 ^b
桂枝挥发油中剂量组	12	9	2	1	0	25.0 ^{b c}	7	2	2	1	41.7 ^{b c}	7	2	3	0	41.7 ^{b c}
桂枝挥发油高剂量组	12	9	2	1	0	25.0 ^{b c}	8	2	1	1	33.3 ^{b c}	7	2	2	1	41.7 ^{b c}

注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与模型对照组比较,^b $P<0.05$;与桂枝挥发油低剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

名医临床思路与经验

关思友治疗慢性肝病思路探析

王 萍,蒋 翔,指导 阎清海
(安阳市中医院,河南 安阳 455000)

[关键词] 慢性肝病;关思友;诊疗经验

[中图分类号] R249 [文献标识码] B [文章编号] 1672-951X(2012)01-0017-02

关思友教授是第3批全国老中医药专家学术经验继承工作导师,河南省继承型高级中医人才导师,业医40余年,学验俱丰,临证擅治内外妇儿各科疑难

病证,尤其擅长肝胆、脾胃等消化系统疾病治疗,特别对肝病的治疗研究具有很深的造诣。本文总结其治疗慢性肝病临床经验点滴如下。

3 讨 论

血管内皮生长因子VEGF、环氧化酶COX-2、微血管密度MVD是现今血管新生研究的热点因子,均是血管新生信号转导通路上的因子^[3-4]。目前对多囊卵巢综合征的研究表明,多囊的发病与卵巢局部血管新生、卵巢纤维化、炎症-凝血系统、前列腺素系统等密切相关。卵巢的局部血管新生,一方面能促进卵巢局部纤维化,另外还能增厚卵巢白膜,使得卵巢增大呈多囊状,干扰卵巢基质降解,抑制卵巢排卵机制的启动,卵泡破裂受阻,导致排卵失败,最终导致不孕^[5]。

清·邹氏《本经疏证》载桂枝:“和营、通阳、利水、下气、行瘀、补中,为桂枝之六大功效。”桂枝助一身之气,其物质基础是桂枝挥发油,而桂枝挥发油中主要成分为桂皮醛^[6]。具有温经通脉、活血止痛的作用,常被用于治疗子宫肌瘤、卵巢囊肿、血栓性脉管炎等疾病,效果显著。人体病理产物如瘀血、痰湿、水饮的消除亦离不开桂枝(如桃核承气汤、温经汤、桂枝茯苓丸、苓桂术甘汤等),后世有医家称其为“桂枝法”,桂枝茯苓丸也是妇科中运用桂枝的经典方。

中医药对多囊卵巢综合征的临床与实验室研究的相关文献并不少见,大多研究仍停留在方剂水平,对单味药研究较少,而在药物作用途径和药理作用环节等方面的相关研究还不够深入。因此,本实验运用单药桂枝的有效成分桂枝挥发油干预PCOS大鼠模型,并探讨给药前后卵巢中VEGF、COX-2及MVD表达的影响。结果发现3组因子模型对照组的蛋白表

达情况均高于空白对照组,进一步证实多囊卵巢局部一系列血管新生因子均有升高。而给予桂枝挥发油干预后,各因子表达得到不同程度的下降,证明桂枝挥发油对多囊卵巢产生一定的作用,可能与抑制局部血管新生有关,防止卵巢纤维化、促进基质降解等方面有关,其治疗多囊卵巢综合征的机理尚需进一步的探讨。

参考文献

- [1] Artini PG, Monti M, Matteucci L, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in polycystic ovary syndrome during controlled ovarian hyperstimulation [J]. Gynecological Endocrinology, 2006, 22(8): 465-470
- [2] 杨正望,周芳,谈珍瑜,等.不同造模方法对大鼠多囊卵巢综合征模型的影响[J].中国实验动物学报,2010,18(1): 7-10
- [3] Maura N, Dickler I, Hope S, et al. A Phase II trial of erlotinib in combination with bevacizumab in patients with metastatic breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(23): 7878-7883
- [4] 郭贵龙,姚榛祥.环氧化酶-2在人乳腺癌中的表达及对肿瘤血管形成的影响[J].中华外科杂志,2004,42(20): 1271-1272
- [5] 王萍,杨艳.补肾活络方对PCOS大鼠促排卵及卵巢IGFBP-1表达影响的研究[J].中医药导报,2011,17(4): 98-100
- [6] 赵耀.桂枝的现代药理与临床应用浅议[J].中国中医药现代远程教育,2009,7(9): 77

(收稿日期:2011-10-12 编辑:谭旭仪)