

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.18.002
文章编号: 1005-8982(2019)18-0008-05

小檗碱对 D-半乳糖诱导多囊卵巢综合征模型小鼠的影响*

史成良, 宋春雨, 齐晓娟

(齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: **目的** 探讨小檗碱对 D-半乳糖诱导的小鼠多囊卵巢综合征(PCOS)模型的影响。**方法** 20周龄 ICR 小鼠根据 Poretsky 模型复制方法腹腔注射 D-半乳糖, 连续 21 d 复制 PCOS 模型, 小檗碱灌胃治疗 21 d。监测小鼠饮食和体重变化; 取血测定小鼠空腹血糖; 观察小鼠动情周期及排卵情况; 取卵巢组织观察小鼠卵巢超微结构及形态变化。**结果** 小檗碱组与 D-半乳糖组进食量、血糖值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但体重降低 ($P < 0.05$)。小檗碱可改善 D-半乳糖诱导的 PCOS 模型小鼠动情周期紊乱, 改善卵巢组织结构。黄体细胞内脂滴数量减少, 颗粒细胞质内细胞器完整, 卵泡膜细胞内脂滴及粗面和滑面内质网数量减少, 并可见少量凋亡的卵泡膜细胞。**结论** 小檗碱对 D-半乳糖诱导的小鼠 PCOS 模型具有治疗作用。

关键词: 多囊卵巢综合征; 小鼠; 小檗碱; 治疗

中图分类号: R711.75; R365

文献标识码: A

Effect of berberine on D-galactose-induced polycystic ovary syndrome in mice*

Cheng-liang Shi, Chun-yu Song, Xiao-juan Qi

(Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: Objective To explore the effect of berberine on d-galactose-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) in mice. **Methods** 20-week-old ICR mice were injected with d-galactose intraperitoneally according to the Poretsky modeling method, then PCOS model was constructed for 21 consecutive days and berberine was administered for 21 days. The changes in diet and weight of mice were monitored; blood glucose was measured; estrus cycle and ovulation were monitored; ovarian tissue was taken to observe the ultrastructure and morphological changes. **Results** Compared with d-galactose model group, berberine group had no significant difference in food intake and blood glucose ($P > 0.05$), but significantly reduced body weight ($P < 0.05$). Berberine can ameliorate the estrous cycle disorder and ovarian tissue structure in d-galactose induced polycystic ovary syndrome model mice. The number of lipid drops in luteal cells decreased, the cytoplasmic organelles in granulosa cells were intact, the number of lipid drops in follicular membrane cells and rough and smooth endoplasmic reticulum were significantly reduced, and a small number of apoptotic follicular membrane cells were observed. **Conclusions** Berberine has therapeutic effect on d-galactose-induced polycystic ovary syndrome in mice.

Keywords: polycystic ovary syndrome; mice; berberine; therapeutics

收稿日期: 2019-03-12

* 基金项目: 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目 (No: 201711230031)

[通信作者] 齐晓娟, E-mail: qixiaojuan@sina.com; Tel: 13846274570

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种慢性少排卵或不排卵、月经失调及与多巢卵巢形态学有关的高雄激素血症, 常伴有超重或肥胖^[1]。PCOS 为引起育龄期妇女不孕的常见病因, 发病率为 5% ~ 10%。D-半乳糖诱导的动物模型可产生脑、肝、肾及血细胞等多种器官及组织衰老^[2]。有学者提出, D-半乳糖不但能引起生殖器官衰老, 更易引起小鼠 PCOS 表型^[3]。周越等^[4]报道 D-半乳糖诱导复制的小鼠 PCOS 模型, 小檗碱可改善胰岛素抵抗; 同时具有抑制卵巢细胞分泌雄激素水平的作用, 具有与二甲双胍相似的生物学行为^[5]。本研究进一步探讨小檗碱对 PCOS 模型小鼠卵巢形态学及排卵的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 ICR 小鼠 48 只, 雌性, 20 周龄, 体重 (40 ± 2) g, 购于哈尔滨医科大学实验动物部 [许可证号: SCXK (黑) 2013-001]。所有实验动物饲养在齐齐哈尔医学院实验动物中心 [许可证号 SYXK (黑) 2016-001], 分笼饲养, 温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 40% ~ 60%, 12 h 昼/夜循环照明。所有小鼠自由进食和饮水。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.1.2 试剂与仪器 D-半乳糖、小檗碱及二甲双胍购自武汉远成共创科技有限公司, 血糖试纸和血糖仪为上海强生医疗器械有限公司生产, 电子显微镜为日本日立公司生产。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的复制和分组 48 只 ICR 小鼠随机分为: ①对照组 12 只, 注射生理盐水 0.2 ml/d, 连续皮下注射 21 d。模型复制第 22 天起小鼠给予生理盐水灌胃 0.2 ml/只, 1 次/d, 连续灌胃 21 d; ②D-半乳糖组 12 只, 采用 Poretsky 法^[6]复制 PCOS 小鼠模型, 皮下注射 D-半乳糖 200 mg/(kg·只), 1 次/d, 并按该剂量维持至第 21 天, 模型复制后同对照组; ③小檗碱组 12 只, 模型复制同 D-半乳糖组, 模型复制第 22 天起每只小鼠给予小檗碱灌胃, 1 次/d, 连续灌胃 21 d。药粉溶在生理盐水中, 灌胃浓度为小檗碱 100 mg/(kg·d); ④二甲双胍组 12 只, 模型复制同 D-半乳糖组, 模型复制第 22 天起每只小鼠给予二甲双胍灌胃, 1 次/d, 连续灌胃 21 d, 灌胃浓度为二甲双胍 300 mg/(kg·d)^[7]。

1.2.2 取材 采用颈椎脱臼的方法处死小鼠, 解剖取卵巢, 观察卵巢变化, 采用 2.5% 戊二醛固定, 透射电

镜检查。

1.2.3 动情周期检查 从给药后连续 10 d, 每天下午 5:00 ~ 6:00 收集小鼠阴道脱落细胞, 通过显微镜确定动情周期。

1.2.4 血糖值测定 给药治疗后第 21 天, 将小鼠隔夜禁食, 尾部取血, 测定空腹血糖。

1.2.5 饮水量及体重测定 每日测定小鼠饮食消耗量及体重。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.00 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用 Dunnett-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 进食量变化

对照组与 D-半乳糖组、小檗碱组及二甲双胍组治疗 21 d 后进食量分别为 (4.62 ± 0.90)、(4.24 ± 0.77) (3.87 ± 0.83) 及 (3.33 ± 0.68) g。4 组小鼠治疗 21 d 后进食量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 9.085, P = 0.000$)。对照组与 D-半乳糖组进食量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 对照组与小檗碱组进食量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 小檗碱组进食量相对降低; 对照组与二甲双胍组进食量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 二甲双胍组进食量相对较低; D-半乳糖组与小檗碱组进食量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); D-半乳糖组与二甲双胍组进食量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 二甲双胍组进食量相对较低; 小檗碱组与二甲双胍组进食量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 二甲双胍组进食量相对较低。见图 1。

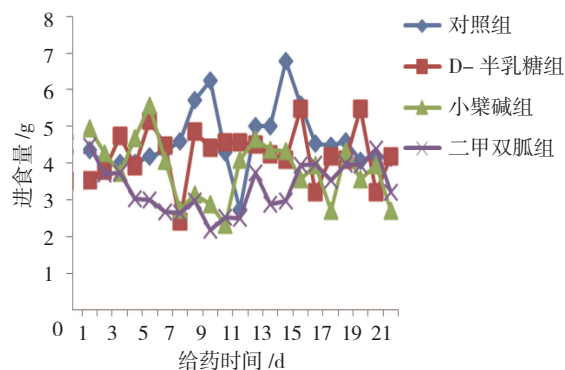


图 1 各组小鼠不同时间进食量的变化 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

2.2 体重变化结果

对照组、D-半乳糖组、小檗碱组及二甲双胍组给药 1、5、9、13、17 及 21 d 体重变化比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①各组不同时间点的体重变

化有差别 ($F=6.434, P=0.000$); ②各组的体重变化有差别 ($F=8.292, P=0.000$), D-半乳糖组、小檗碱组及二甲双胍组较对照组体重降低 ($P<0.05$); ③各组体重变化趋势有差别 ($F=11.331, P=0.000$)。见表 1 和图 2。

表 1 各组小鼠不同时间点的体重变化 ($n=12, g, \bar{x} \pm s$)

组别	1 d	5 d	9 d	13 d	17 d	21 d
对照组	28.84 ± 0.39	30.41 ± 0.59	29.83 ± 0.63	31.86 ± 0.65	31.27 ± 0.65	30.93 ± 0.64
D-半乳糖组	26.64 ± 0.78	27.46 ± 0.72	28.22 ± 0.78	29.06 ± 0.57	28.12 ± 0.54	29.04 ± 0.77
小檗碱组	27.80 ± 0.42	27.47 ± 0.47	27.33 ± 0.39	27.50 ± 0.19	26.40 ± 0.29	24.97 ± 0.63
二甲双胍组	28.13 ± 0.57	27.90 ± 0.42	26.85 ± 0.44	27.96 ± 0.46	28.74 ± 0.30	29.20 ± 0.29

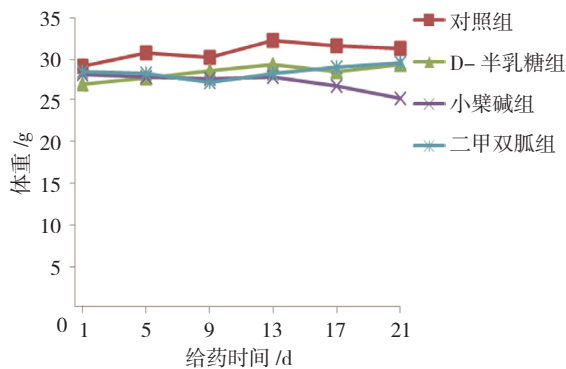
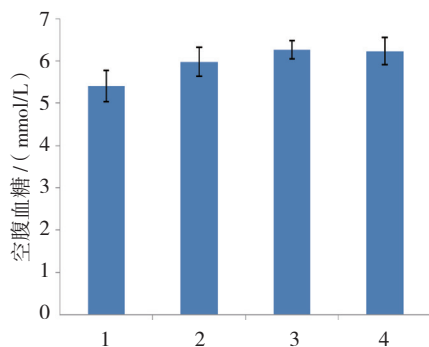


图 2 各组体重变化趋势 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

2.3 血糖测定结果

对照组、D-半乳糖组、小檗碱组及二甲双胍组空腹血糖分别为 (5.410 ± 0.365)、(5.980 ± 0.347)、(6.270 ± 0.218) 及 (6.230 ± 0.318) mmol/L。各组小鼠空腹血糖比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($F=1.516, P=0.227$)。见图 3。



1: 对照组; 2: D-半乳糖组; 3: 小檗碱组; 4: 二甲双胍组。

图 3 各组治疗 21 d 空腹血糖比较 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

2.4 动情周期

小鼠正常动情周期包括动情前期 (P)、动情期

(E)、动情后期 (M) 和动情间期 (D) 4 个时期^[8]。动情前期可见成群或单独出现的梭形上皮细胞, 白细胞较少。动情期见大量鳞状上皮细胞, 形状大而而不规则, 无核, 白细胞消失; 动情后期可见多种细胞类型, 白细胞, 无核的上皮细胞及梭形上皮细胞; 动情间期可见大量白细胞, 极少量梭形上皮细胞。经过连续 10 d 的动情周期观察发现, 对照组小鼠有 4 ~ 5 d 的动情周期, 且各期分布比较均衡; D-半乳糖组小鼠未表现出动情周期存在, 可见持续较多的动情间期, 而动情周期的其他期表现较少, 提示无排卵; 小檗碱组小鼠有动情周期存在, 提示应用小檗碱后动情周期恢复; 二甲双胍组小鼠亦有动情周期存在。见图 4。

2.5 电镜观察结果

2.5.1 对照组 黄体细胞溶酶体及脂滴散在分布, 可见圆形线粒体, 胞核染色质分布均匀, 卵泡内膜细胞可见少量脂滴。颗粒细胞内见中量滑面内质网和粗面内质网、脂滴及线粒体。见图 5A。

2.5.2 D-半乳糖组 黄体细胞内脂滴增多。颗粒细胞形态变形, 细胞核核型不整, 细胞间纤维增生, 胞质内可见大量的核糖体及粗面内质网, 少量线粒体肿胀、嵴断裂、絮状变。卵泡内膜细胞可见大量滑面内质网及脂滴。见图 5B。

2.5.3 小檗碱组 黄体细胞内脂滴数量减少。颗粒细胞胞质内细胞器完整, 可见中等量粗面及滑面内质网、脂滴及线粒体。卵泡膜细胞内脂滴及粗面内质网和滑面内质网数量减少可见少量凋亡的卵泡膜细胞。见图 5C。

2.5.4 二甲双胍组 黄体细胞内脂滴数量减少, 细胞器丰富。颗粒细胞和卵泡膜细胞脂滴减少, 可见粗面和滑面内质网。见图 5D。

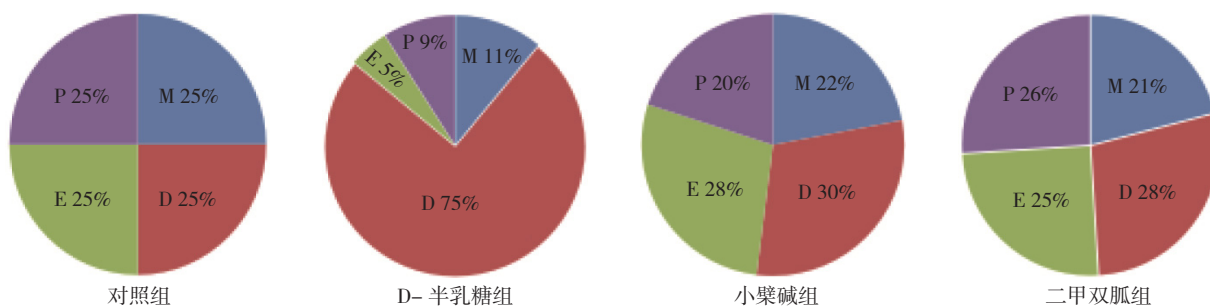
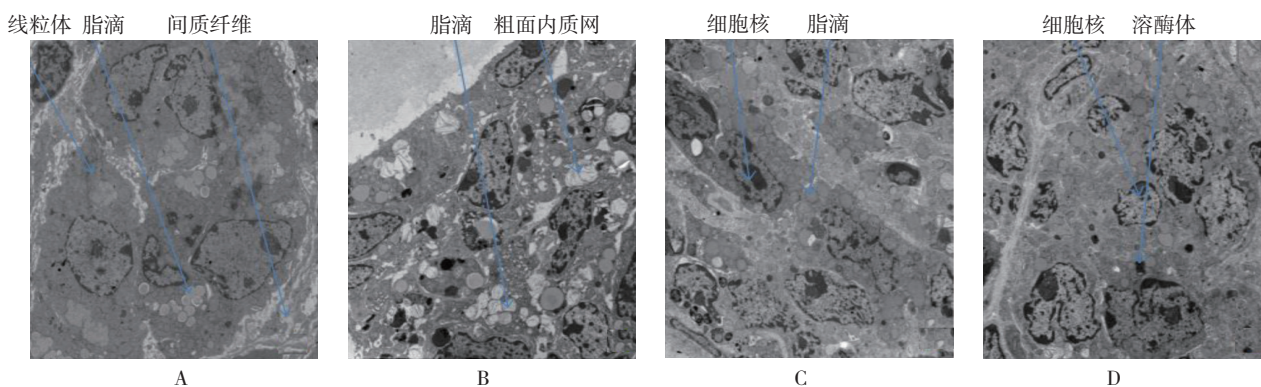


图 4 各组动情周期变化示意图



A: 对照组; B: D- 半乳糖组; C: 小檗碱组; D: 二甲双胍组。

图 5 小檗碱对小鼠卵巢超微结构的影响 (× 6 000)

3 讨论

PCOS 临床表现为雄激素过多 (高雄激素血症、多毛症、痤疮和脱发)、月经周期不规律、不孕不育、胰岛素抵抗和肥胖。PCOS 患者也有发展为严重代谢紊乱的风险, 如心血管疾病、2 型糖尿病、代谢综合征和子宫内膜癌^[9]。其发病机制尚不清楚, 胰岛素抵抗增加和代偿性高胰岛素血症在 PCOS 的发病机制中起关键作用^[10]。

D- 半乳糖通常用于诱导引起脑、肝及肾等多种组织的氧化损伤和其他组织一系列退行性变化的亚急性衰老动物模型^[11], 其对雌性生殖器官也有影响, 可诱发 PCOS^[3]。有报道称, 小檗碱在临床改善新陈代谢及激素紊乱, 可用于治疗女性 PCOS^[12]。本实验应用小檗碱治疗, 观察其对 D- 半乳糖诱导小鼠 PCOS 模型小鼠的影响。研究发现, 应用小檗碱治疗 PCOS 小鼠, 可使小鼠体重降低, 改善动情周期紊乱及卵巢组织结构, 修复细胞器, 结果与 LEE 的研究相似^[13]。

本实验结果显示, 二甲双胍组与模型组比较, 进食量及体重低于 D- 半乳糖组, 与最近的一项荟萃分析结果不完全一致^[14]。此荟萃分析结果表明, 二甲双

胍不能改善 PCOS 的体重^[14], 其产生的原因有待进一步探讨。有报道称, 二甲双胍可增加胃肠道紊乱的发生率^[15]。

小檗碱是一种异喹啉植物生物碱, 在中国小檗碱作为一种药物, 具有广泛的药理作用, 包括抗菌、降血糖、降胆固醇、抗肿瘤及免疫调节等活动。多项研究表明, 小檗碱对 2 型糖尿病、胰岛素抵抗、脂质代谢、一氧化氮生成及代谢综合征均有积极作用^[16-17]。一项针对 98 例 PCOS 临床研究表明, 应用小檗碱治疗可改善月经及排卵率^[18]。其治疗 PCOS 的作用机制尚不清楚, 可能通过活 AMP 激活的蛋白激酶发挥作用。有研究发现, 小檗碱有类似于二甲双胍的改善卵泡膜细胞和颗粒细胞的胰岛素抵抗作用^[19], 与二甲双胍相比, 小檗碱对脂质代谢的改善作用副作用少而轻^[20]。

综上所述, 小檗碱是治疗 PCOS 有效且副作用较少的药物, 其作用机制仍需进一步探讨。

参 考 文 献:

[1] 张娜, 张盛军, 赵君利, 等. 体重管理干预对肥胖型 PCOS 患者糖脂代谢的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(23): 53-56.
 [2] 董照瀛, 黄杰, 许梦雄, 等. 当归多糖对 D- 半乳糖致小鼠胰腺

- 损伤的保护作用[J]. 解剖学报, 2018(06): 740-744.
- [3] PARK J H, CHOI T S. Polycystic ovary syndrome (PCOS) -like phenotypes in the d-galactose-induced aging mouse model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(4): 701-704.
- [4] 周越, 董英, 陆嘉伟, 等. 半乳糖诱导建立的小鼠多囊卵巢综合征模型[J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(5): 19-24.
- [5] 肖瑶, 莫蕙, 曾诚, 等. 黄连素治疗多囊卵巢综合征胰岛素抵抗机制的研究进展[J]. *华西药理学杂志*, 2017, 32(2): 220-222.
- [6] PORETSKY L, CLEMONS J, BOGOVICH K. Hyperinsulinemia and human chorionic gonadotropin synergistically promote the growth of ovarian follicular cysts in rats[J]. *Metabolism*, 1992, 41(8): 903-910.
- [7] 刘逸超, 付杨, 郭滢, 等. 小檗碱对 PCOS 模型大鼠子宫内膜的影响[J]. *中医药信息*, 2017, 34(5): 16-19.
- [8] BERTOLIN K, BRUCE D M. 39 monitoring mouse estrous cycles[J]. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*, 2014, DOI. org/10.1016/B978-0-12-394445-0.00039-4.
- [9] WANG Y, FU X, XU J, et al. Systems pharmacology to investigate the interaction of berberine and other drugs in treating polycystic ovary syndrome[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28089.
- [10] 段阳, 刘丹, 瞿华, 等. 多囊卵巢综合症患者血清 betatrophin 水平与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2018, 43(6): 778-782.
- [11] 史成良, 王翱翔, 杜凯龙, 等. D-半乳糖诱导的衰老并发症[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2018(68): 187-188.
- [12] WEI W, ZHAO H, WANG A, et al. A clinical study on the short-term effect of berberine in comparison to metformin on the metabolic characteristics of women with polycystic ovary syndrome[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2012, 166(1): 99-105.
- [13] LEE Y S, KIM W S, KIM K H, et al. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states[J]. *Diabetes*, 2006, 55(8): 2256-2264.
- [14] MORLEY L C, TANG T, YASMIN E, et al. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility[J]. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017, 11: CD003053.
- [15] GRAHAM D J, GREEN L, SENIOR J R, et al. Troglitazone-induced liver failure: a case study[J]. *American Journal of Medicine*, 2003, 114(4): 306.
- [16] ZHANG Y, SUN J, ZHANG Y J, et al. The effect of berberine on insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: detailed statistical analysis plan (SAP) for a multicenter randomized controlled trial[J]. *Trials*, 2016, 17(1): 512.
- [17] 王娜梅. 小檗碱对多囊卵巢综合征大鼠代谢及生殖作用的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(35): 13-17.
- [18] LI L, LI C, PAN P, et al. A single arm pilot study of effects of berberine on the menstrual pattern, ovulation rate, hormonal and metabolic profiles in anovulatory Chinese women with polycystic ovary syndrome[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): DOI: 10.1371/journal.pone.0144072.
- [19] LI Y, MA H, ZHANG Y, et al. Effect of berberine on insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: study protocol for a randomized multicenter controlled trial[J]. *Trials*, 2013, 14(1): 1-5.
- [20] LI Y, KUANG H, SHEN W, et al. Letrozole, berberine, or their combination for anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome: study design of a double-blind randomised controlled trial[J]. *Bmj Open*, 2013, 3(11): DOI: 10.1136/bmjopen-2013-003934.

(唐勇 编辑)