

补肾调肝活血方对卵巢早衰模型大鼠性激素水平及颗粒细胞凋亡的影响

余娜¹, 郑纯², 朱克检², 李勇敏², 唐皓²

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药研究院, 湖南 长沙 410006

[摘要] 目的: 观察补肾调肝活血方对卵巢早衰模型大鼠性激素水平以及颗粒细胞凋亡的影响。方法: 以雌性大鼠为研究对象, 随机分为空白组、模型组、预防组、己烯雌酚组、中药低剂量组、中药高剂量组, 用胃饲雷公藤多苷建立大鼠卵巢早衰模型。预防组、己烯雌酚组、中药低剂量组分别予以临床等效剂量给药, 中药高剂量组予以临床 4 倍量给药。预防组给药 34 天, 其余各组给药 20 天后, 检测各组大鼠性激素水平与卵巢颗粒细胞凋亡率。结果: 除中药低剂量组外, 其余各给药组均能提高雌激素水平, 与模型组比较, 差异有显著性或非常显著性意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。中药高剂量组、预防组的卵巢颗粒细胞凋亡率与模型组比较, 均有不同程度降低 ($P < 0.05$)。结论: 补肾调肝活血方能有效改善雷公藤多苷所致卵巢早衰大鼠模型的雌激素缺乏状态和对抗卵泡颗粒细胞的凋亡; 且预防组的各项观测指标改善明显, 提示早期治疗卵巢早衰疗效较好。

[关键词] 卵巢早衰; 补肾调肝活血方; 动物实验; 大鼠; 雌二醇; 颗粒细胞凋亡率

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2011) 07-0134-02

卵巢早衰(POF)指女性患者 40 岁之前出现闭经、不孕, 围绝经期症候群或绝经期症状、低雌激素血症和高促性腺激素血症。近年来, 随着中医中药研究的发展和不断深入, 以中药替代性激素治疗 POF 已为世人瞩目。本实验拟观察补肾调肝活血方对雌激素水平、卵泡颗粒细胞凋亡的影响, 并探讨其作用机理。

1 材料

1.1 实验动物 SD 大鼠, 8~12 周龄, 体重(200 ± 20)g, 60 只, 雌性, 动情周期规律(4~5 天), 健康清洁级, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 合格证号: 0047638。

1.2 药物 补肾调肝活血方: 龟板胶、鹿角胶、女贞子、熟地黄、山茱萸、当归、淫羊藿各 15g, 菟丝子、香附、玫瑰花各 10g, 水蛭 3g。将煎取的药汁根据给药剂量以及给药体积(后述)制备成不同浓度的药液。己烯雌酚: 合肥久联制药有限公司生产, 规格: 0.5mg/片, 批号 20080104。雷公藤多苷片: 湖南协力药业有限公司生产, 规格: 10mg/片, 批号 20080801。

1.3 主要试剂 细胞凋亡试剂盒, 试剂编号: KGA7032, 购自凯基生物科技发展有限公司。雌二醇(E_2)、促黄体生成激素(LH)、促卵泡生成激素(FSH)、催乳素(PRL)放免试剂盒, 批号: 081120, 购自北京北方生物技术研究所。

2 方法

2.1 动物分组 按大鼠重量根据随机数字表法将 60 只大鼠分

为 6 组各 10 只: 空白对照组(简称空白组)、模型组、中药预防组(简称预防组)、己烯雌酚组(简称西药组)、中药低剂量组(简称中药低组)、中药高剂量组(简称中药高组)。

2.2 动物造模 采用药物型卵巢早衰动物模型, 参照高慧等^[1]报道的雷公藤多苷片灌胃法。将雷公藤多苷片研碎后, 用蒸馏水溶化, 配成悬浮液, 除空白组外, 其余各组大鼠予以 50mg/kg/天灌胃 1 次, 空白组予等体积蒸馏水灌胃, 连续 14 天, 灌胃体积为 20mL/kg。

2.3 给药 给药剂量按动物与人体表面积折算, 将药物配成不同浓度的药液。己烯雌酚组、预防组、中药低组予以临床等效剂量分别为 0.045mg/kg/d、12g/kg/d、12g/kg/d。中药高组予以临床 4 倍量 48g/kg/d, 空白组与模型组给相应体积的蒸馏水。除预防组从造模时开始给药, 共 34 天; 其余各组从造模结束后 1 天给药, 共 20 天。给药体积均为 20mL/kg。

2.4 指标检测 末次给药 24h 后, 各组大鼠摘除眼眶取血, 室温静置自然凝固收缩后, 离心, 分离血清, 用放免法测定性激素 E_2 、FSH、LH、PRL 水平。将所有大鼠断颈处死, 剖腹取双侧卵巢, 用 10%(体积分数)的多聚甲醛液固定, 常规石蜡包埋、切片, 采用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的末端标记技术(TUNEL 法)测定卵巢颗粒细胞凋亡率。光镜下观察, 细胞核着棕色者为阳性细胞, 采用 MIAS 医学图象分析系统, 放大倍数为 400 倍, 凋亡率(面密度)= 阳性细胞面积(目标面积)/总面积(统计场面积), 每张切片观察 5 个视野, 计算凋亡率的平

[收稿日期] 2011-03-11

[作者简介] 余娜 (1984-), 女, 助教, 研究方向: 中西医结合妇科。

均值。

2.5 统计学方法 所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS12.0 统计学软件进行数据的分析。

3 结果

3.1 各组大鼠血清 E_2 、FSH、LH、PRL 水平比较 见表 1。除中药低组外, 其余各组 E_2 水平较模型组均有提高, 与模型组比较, 差异有显著性或非常显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); FSH、LH、PRL 水平各组间比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表1 各组大鼠血清 E_2 、FSH、LH、PRL水平比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	E_2 (pg/mL)	FSH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)	PRL(mIU/mL)
空白组	10	744.21± 91.04	11.09± 1.95	8.88± 1.77	31.99± 6.80
模型组	10	616.15± 77.42	11.37± 2.20	9.02± 1.04	32.31± 9.60
西药组	10	728.28± 91.03 ^①	12.89± 1.77	8.61± 0.77	35.08± 7.11
预防组	10	774.23± 74.47 ^②	12.48± 1.60	8.72± 0.74	34.67± 5.76
中药低组	10	705.06± 74.97	13.24± 3.88	8.39± 1.25	33.94± 8.92
中药高组	10	726.16± 122.26 ^①	12.83± 1.67	8.77± 1.58	34.13± 8.21

与模型组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$

3.2 各组卵巢颗粒细胞凋亡率比较 见表 2。TUNEL 法测定卵巢颗粒细胞凋亡率。预防组、中药高组的颗粒细胞凋亡率与模型组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表2 各组卵巢颗粒细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	凋亡率 %
空白组	10	27.69± 6.30
模型组	10	50.25± 14.25
西药组	10	37.16± 6.65
预防组	10	28.01± 9.02 ^①
中药低组	10	40.8± 11.64
中药高组	10	28.79± 7.17 ^①

与模型组比较: ① $P < 0.05$ 。

3.3 各组光镜下卵巢大体形态及颗粒凋亡情况 见图 1~图 6。空白组细胞核着深棕色者的凋亡颗粒细胞数目很少, 卵泡发育良好(见图 1)。模型组细胞核着深棕色的凋亡颗粒细胞数目多, 卵泡发育不良(见图 2)。预防组细胞核着深棕色的凋亡颗粒细胞数目很少, 卵泡发育良好(见图 3)。中药高组细胞核着深棕色者的凋亡颗粒细胞数目较少, 卵泡发育正常(见图 4)。西药组细胞核着深棕色的凋亡颗粒细胞数目较模型组少, 卵泡发育基本正常(见图 5)。中药低组细胞核着深棕色的凋亡的颗粒细胞较多, 卵泡发育不良(见图 6)。

4 讨论

4.1 模型评价 本实验中模型组 FSH 和 LH 以及 PRL 水平与空白组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 与文献报道的雷

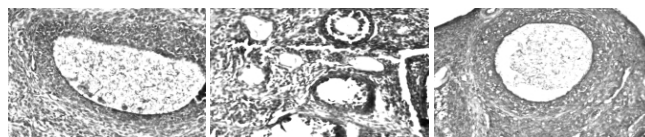


图 1: 空白组
(40× 10)

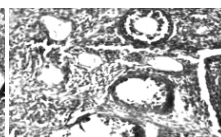


图 2: 模型组
(40× 10)

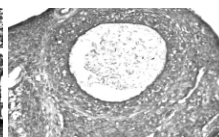


图 3: 预防组
(40× 10)

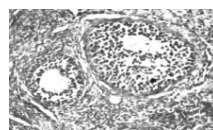


图 4: 高剂量组
(40× 10)

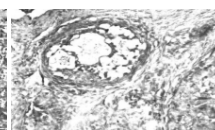


图 5: 西药组
(40× 10)

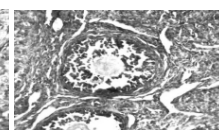


图 6: 低剂量组
(40× 10)

公藤多苷所致大鼠卵巢早衰模型性激素水平较一致。此结果提示: 其一, 由于种属原因, 大鼠无低雌激素引起 FSH、LH 升高的负反馈效应; 其二, 大鼠虽有高促性腺激素的持续无动情周期, 但由于实验时间短, FSH、LH 的变化在试验结束时尚未反应出来; 其三, 雷公藤多苷对垂体的促性腺激素无明显影响。总之, 虽然该模型的性激素水平与人类卵巢早衰不完全相同, 但参考其卵巢的形态、病理改变以及颗粒细胞的凋亡情况, 此种造模仍是成功的。

4.2 疗效机制初探 目前 POF 的发病机制还不甚明确, 一般认为遗传、免疫、外界致病因素等一系列病因导致卵巢先天性细胞数量减少(卵巢发育不良)、或卵泡闭锁加速、或直接损害卵巢实体, 最终致卵巢合成雌激素减少, FSH、LH 反馈性升高, 卵巢功能衰竭, 形成 POF^[2]。本研究显示: 补肾调肝活血方一方面产生类激素样作用, 其提高 E_2 的效果同西药己烯雌酚相似。且中药预防组给药时间早、持续时间长, 提高雌激素水平最为明显, 提示早期用药可有效稳定雌激素的水平, 防止 POF 的发生。另一方面补肾调肝活血方抑制雷公藤多苷所致大鼠的卵巢颗粒细胞凋亡, 从而阻止了大鼠 POF 的发生和加重。由上可知, 补肾调肝活血方的疗效机制主要是通过改善 POF 发病机制中的两个关键点, 即雌激素水平以及卵泡颗粒细胞凋亡而防治 POF 的发生与发展。但本实验中中药低组的疗效不明显, 其原因值得进一步的探讨。

[参考文献]

- [1] 高慧, 杨涓, 夏天, 等. 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠卵巢相关细胞因子 $TNF-\alpha$ 、 $IFN-\gamma$ 蛋白和基因表达的影响[J]. 国医论坛, 2008, 23(3): 38-39.
- [2] 马良坤, 林守清. 卵巢早衰与卵巢不敏感综合征[J]. 继续医学教育, 2005, 19(5): 1719.

(编辑: 冯天保)