

温阳药对下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴 受抑大鼠模型的子宫雌激素受体的作用

林有斋* 陈玉生 韩新民 顾祖敏

指导 景沛** 莫启忠***

内容提要 本文观察了温阳药对下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴受抑大鼠模型的血浆皮质酮、血浆雌二醇和雌激素受体(简称 E-R)的影响。实验显示模型组大鼠血浆皮质酮及子宫胞浆中 E-R 含量降低,而温阳药治疗则使血浆皮质酮和血浆雌二醇明显增高,使子宫 E-R 含量增加,接近正常水平,且提高了雌二醇和 E-R 的亲合力。说明温阳药对下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴受抑大鼠的子宫 E-R 改变具有保护和治疗作用。

中医虚证是一种常见的临床现象,国内虚证的研究除了临床上运用辨证分型以及用现代科学指标来研究中医虚证在人体中的病理生理变化外,还注意模拟虚证动物模型以探讨其物质基础和功能,并用扶正固本中药使之恢复正常,进而试图阐明其可能机制。

对下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴受抑动物模型,不少作用已从激素调节系统 cAMP、cGMP、微量元素、免疫、超微结构等方面进行了研究,但对此模型的雌激素受体(以下简称 E-R)水平,迄今未见报道。

本实验研究了大鼠慢性应用地塞米松造成下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴受抑模型后的子宫雌激素受体改变,以及温阳药对其的作用,并为某些疾病治疗提供实验依据。

材料和方法

一、实验动物

取体重 250g 左右 Wistar 种雌性大白鼠,经阴道涂片全部选用性周期为间静期的大鼠,随机分为三组。各组动物每天下午 5~7 点按下列药物灌胃。对照组:生理盐水 4 ml;模型组:地塞米松混悬液 2 ml+生理盐水 2 ml(地塞米松粉剂由上海市十二制药厂提供,配制成 18 μ g/ml 的混悬液);治疗组:地塞米松混悬液 2 ml+温阳药 2 ml(温阳药为附子

30g 肉桂 15g 肉苁蓉 45g 补骨脂 45g 仙灵脾 45g 鹿角片 20g。由徐汇区中药切制厂按道地药材挑选,一次供应。加水 2,500ml 煮沸后,文火煎四小时,浓缩过滤至 200ml,含生药 1 g/ml)。

连续 17 天,中间休息一天,共灌胃 16 次,于第 18 天上午断头取血测血浆皮质酮、血浆雌二醇。迅速剖腹取出子宫,二个子宫为一份标本,去除周围脂肪和系膜组织,用冷生理盐水洗净,在 0~4 $^{\circ}$ C 以下制成子宫胞浆液,用 DCC 法测定 E-R。

二、试剂

1. TES 缓冲液:含 10mM Tris·HCl、1.5 mM EDTA·2 Na、0.1mM 巯基苏糖醇,PH7.4。

2. DCC 悬浮液:含 0.05%葡聚糖和 0.5%活性炭的 TES 缓冲液。

3. [6,7- 3 H]雌二醇(简称 3 H-E $_2$)比放射性 40Ci/mmol,由中国科学院上海生物化学研究所提供。

4. 乙萘酚(DES),由中国科学院上海生物化学研究所赠送。

5. 闪烁液:含 0.45%PPO 和 0.05%POPOP-甲苯以及 30%乙醇。

6. 测定血浆皮质酮、血浆雌二醇用的药箱由上海市内分泌研究所提供。

三、子宫胞浆液的 E-R 测定

方法参照常规方法(1~4)再结合本实验室条件略加修改。

1. 匀浆制备:全部操作在 0~4 $^{\circ}$ C 以下进行。将子宫称重、剪碎,按 1:3(重量:体积)加入缓冲液

* 上海中医学院附属曙光医院

** 中国科学院上海生物化学研究所

*** 上海中医学院同位素室

TES, 置于玻璃匀浆器中, 制成匀浆, 经冷冻超速离心 $105,000 \times g$ 1 h, 所得上清液即为子宫胞浆液。

2. 测定步骤: 按表 1 加样。

表1 子宫胞浆液的 E-R 测定步骤

	总结合管(A, A')	非专一性结合管(B, B')
625nM ³ H-E ₂	10 μ l	10 μ l
125 μ MDES	0	10 μ l
TES 缓冲液	190 μ l	180 μ l
子宫胞浆液	500 μ l	500 μ l
0°C 放置 2h 后移置 20°C 水浴 30min		
DCC 悬浮液	500 μ l	500 μ l

冰浴 15min, 每 5min 振荡一次→低温离心 10min(3,000rpm)→取上清液 100 μ l 加入到含有 6.5ml 闪烁液的计数杯中; 摇匀测放射性 cpm。

每一样品作双份复样, 取平均数。总结合管中的放射性减去非专一性结合的放射性为样品对³H-E₂的专一性结合, 根据样品中蛋白浓度用每 mg 蛋白结合雌二醇的 fmol 数表示细胞浆的 E-R 水平。

测定 E-R 的解离常数 (kd) 的操作和测定 E-R 步骤相同。³H-E₂ 在 0.94~33.13nM 之间取 6 个浓度, 非专一性结合管的 DES 按³H-E₂ 浓度相应增加 200 倍, 按 Scatchard 作图求得 kd 值。

胞液蛋白含量的测定: 取 0.1ml 胞液, 双蒸水稀释至 5 ml, 按 Lowry 氏法⁽⁶⁾测定。

3. 血浆皮质酮和血浆雌二醇浓度测定: 用放射免疫测定法。皮质酮抗血清最终浓度为 1:2,000; 雌二醇抗血清最终浓度为 1:20,000。

实验结果

一、温阳药对“模型”大鼠子宫 E-R 的影响

模型组大鼠子宫胞液的 E-R 含量降低, 经 t 检验, 与对照组比较有显著差异 (见表 2)。Scatchard 作图求得雌二醇和胞液 E-R 的 kd 值, 模型组比对照组高 (见附图)。说明下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴受抑大鼠雌二醇和 E-R 的亲合力明显下降。

温阳药使“模型”大鼠子宫胞液的 E-R 含量增高, 经 t 检验, 二组间有显著差异 (见表 2)。雌二醇和 E-R 的 kd 值也降低, 接近正常水平 (见附图)。说明温阳药使雌二醇和 E-R 的亲合力明显增高。

二、对血浆皮质酮和血浆雌二醇的影响

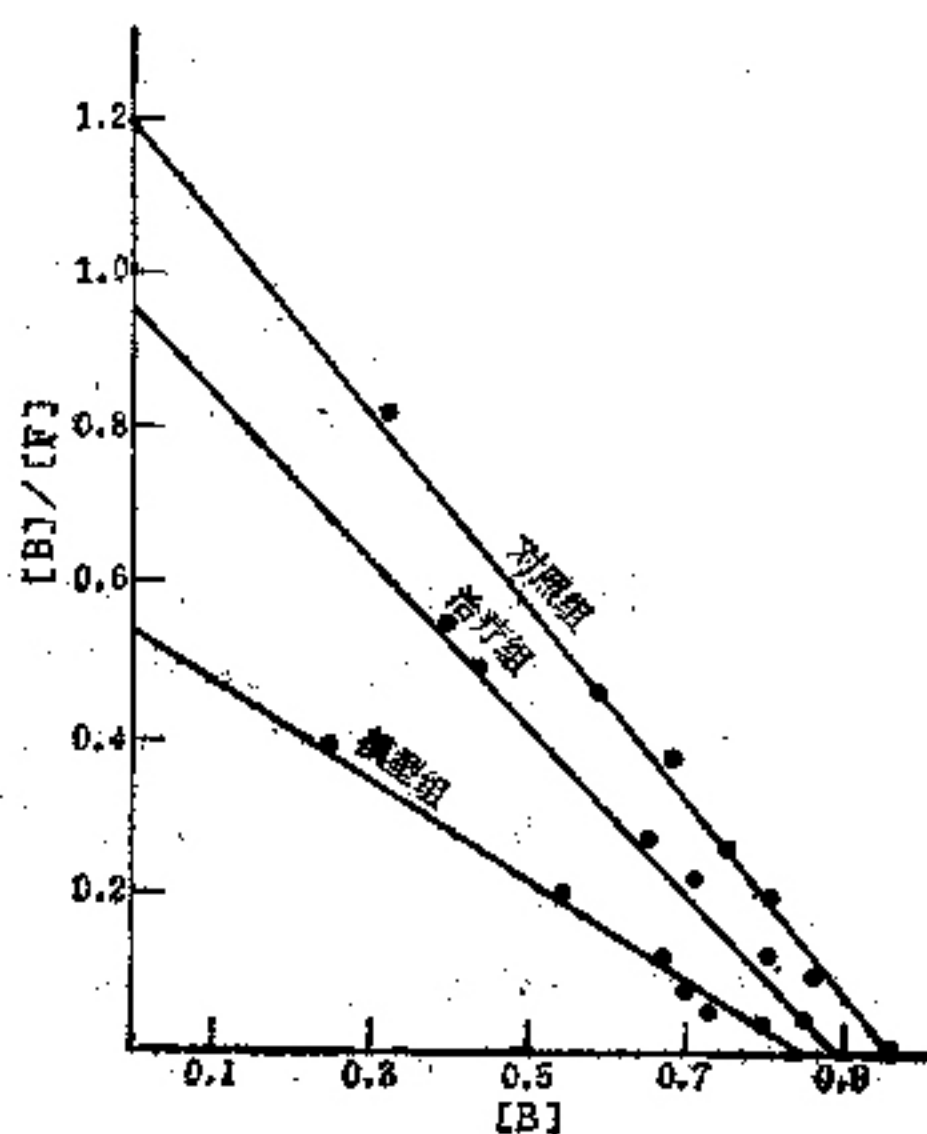
模型组的大鼠血浆皮质酮浓度明显降低 (见表

3)。说明下丘脑—垂体—肾上腺皮质系统处于明显

表2 温阳药对“模型”大鼠子宫 E-R 的影响

	E-R M $\pm$ SE fmol/mg 蛋白	P 值	kd 值 (解离常数)
对照组 (n=7)	166 $\pm$ 11.9	<0.05	1.1×10^{-9} M
模型组 (n=10)	136 $\pm$ 6.7		2.06×10^{-9} M
治疗组 (n=10)	156 $\pm$ 6.9	<0.05	1.3×10^{-9} M

治疗组和对照组比较 P>0.05



附图 大鼠子宫雌二醇与 E-R 的 kd 值

表3 “模型”大鼠用温阳药后血浆皮质酮和血浆雌二醇的变化

	血浆皮质酮 M $\pm$ SE ng/ml	P 值	血浆雌二醇 M $\pm$ SE Pg/ml	P 值
对照组 (n=10)	26.2 $\pm$ 3.4	<0.001	334.8 $\pm$ 184.0	>0.05
模型组 (n=9)	2.2 $\pm$ 0.4		320 $\pm$ 97.8	
治疗组 (n=9)	22.6 $\pm$ 2.6	<0.001	453.3 $\pm$ 116.3	<0.05

低下状态, 而温阳药使明显降低的血浆皮质酮提高到接近正常水平, 说明温阳药可在一定程度上对抗激素对肾上腺皮质的外源性抑制作用。

另外, 虽然模型组大鼠的血浆雌二醇与对照组无异, 但治疗组大鼠的血浆雌二醇浓度明显提高 (见表 3)。此二者显示了温阳药具有对下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴以及下丘脑—垂体—性腺轴的调整作用。

讨 论

模型组大鼠有弓背、消瘦，平均体重下降 33g/只；模型组的血浆皮质酮浓度比对照组明显降低，二者比较 $P < 0.001$ ，说明下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴受到抑制，模型成立。

下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴受抑动物模型的大鼠子宫胞浆液 E-R 降低、kd 值增大，说明不但全身情况、细胞水平有变化，而且分子水平上也有改变。而温阳药对这种改变具有保护和治疗作用，使胞液中 E-R 含量增加，接近正常水平，且提高了雌二醇和 E-R 的亲合力。

温阳药具有类似内分泌激素作用：仙灵脾、鹿角片具有类似性激素作用；附子、肉桂都能调整性腺和肾上腺机能；双料、补骨脂有激动肾上腺并释放皮质激素的作用。阳虚者有内分泌机能低下的表现，温阳药则起加强内分泌作用，而内分泌机能低下在分子水平上看导致雌激素受体含量降低，用温阳药则提高了雌激素受体的含量。

实验显示模型组未能使血浆雌二醇明显下降，这

可能是由于外源性皮质激素抑制时间不够长，未能更多地累及“肾阳”之故。使用温阳药后使血浆雌二醇浓度显著增高，虽然雌二醇能刺激其自身受体的合成，然而治疗组大鼠子宫胞浆的 E-R 含量的增高似还是温阳药直接作用所致。设想如果是通过提高血浆雌二醇来提高 E-R 含量，那末，在模型组 E-R 含量明显降低时血浆雌二醇浓度也应该是同步的。

上述实验资料有可能为临床上长期服用糖皮质激素的女性患者所引起的妇科并发症，提供实验和治疗的参考资料。

参 考 文 献

1. Secmatt RJ, et al. Cancer Research September 1978; 38:2800.
2. Lee HJ, et al. Journal of Steroid Biochemistry 1981; 14:1285—1291.
3. 刘以训. 雌孕激素受体测定. 生殖与避孕 1981; 2(1): 53.
4. 褚云鸿, 等. 15-甲基前列腺素 $F_{2\alpha}$ 对兔子宫孕酮受体和雌二醇受体的作用. 中国药理学报 1982; 4(3):256.
5. Lowry OH, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265.

“钩薄冲剂”对哮喘患者呼吸道阻力的影响

方文贤* 冯世伦** 王旭华* 赵悦如***

我们对 27 例哮喘患者用“钩薄冲剂”（由钩藤、薄荷、马兜铃、紫菀组成）进行了临床即时疗效观察，并对 20 例患者测定了呼吸道阻力。

27 例患者中，支气管哮喘或合并支气管炎者 15 例，慢性喘息型支气管炎 12 例。6 例为急性发作，其余均为慢性迁延期或哮喘慢性连续发作状态。病程 6 年以下者 6 例，7~20 年者 8 例，20 年以上者 13 例。临床诊断、病情判断及疗效判定均按 1972 年全国气管炎会议判定标准。呼吸道阻力用日本 RL-45 型多导生理测定仪配以呼吸换能器（日本 MEP-T 型）、载波放大器（测流速用）、积分放大器（测流量用）测定计算。于服药前、后 15、30、60、90、120 分钟测定，自身前后对照观察，同时进行听诊并测试血压、

心率。

结果：临床喘息状态和哮喘音即控、显效、有效、无效病例分别为 2、6、18、1 和 7、12、8、0；服药前呼吸道阻力（单位为 $\text{mmH}_2\text{O}/\text{L}/\text{S}$ ）为 74.40 ± 31.95 ，服药后 15、30、60、90、120 分钟分别为 66.27 ± 33.16 ($M \pm SD$)、 64.72 ± 28.83 、 67.72 ± 30.52 、 67.96 ± 28.79 、 68.59 ± 31.35 。服药前与服药后 30 分钟比较 $t = 2.5755$ ， $P < 0.025$ ；服药前与服药后比 $F = 7.0202$ ， $P < 0.025$ ；组间 $F = 1.6795$ ， $P > 0.10$ 。

我们曾用该仪器及方法测得健康人呼吸道阻力为 31.6 ± 2.0 ；慢性支气管炎为 40.6 ± 1.9 ；肺心病缓解期为 $47.4 \pm 13.6 \text{ mmH}_2\text{O}/\text{L}/\text{S}$ 。本次观察结果表明该制剂能明显降低哮喘患者呼吸道阻力，并可维持 2 小时之久，服药后哮喘状态能得以改善，两肺哮喘音可见明显减少或消失。根据其总阻力及哮喘音改善情况分析，认为可能是对直径为 2 mm 以上气道起作用，但作用原理及有效成分的分离尚待进一步深入研究。

* 中医研究院中药研究所
** 北京中日友好医院
*** 北京中医学院东直门医院

The Effects of Composite Prescription of Blood Activator and Tetramethylpyrazine on the Biosynthesis of Thromboxane A₂

Wu Yusheng (吴余升), Chen Keji (陈可冀)
Xiyuan Hospital, Academy of TCM, Beijing

The effects of composite prescription of blood activator and tetramethylpyrazine on the biosynthesis of thromboxane A₂ have been studied with radiochromatography, radioautography and radioimmunoassay technique. The results showed that both the composite prescription and tetramethylpyrazine could inhibit the biosynthesis of TXA₂. The mechanism consists in their inhibiting effect on the activity of TXA₂ synthetase but not on that of cyclooxygenase.
(Original article on page 169)

The Stimulative Effect of Injection Epimedium on the Growth of Chick Embryo Femur in Vitro

Gao Zifan (高子范), et al
Institute of Orthopedics, Luoyang,

This is a study of the effect of injection Epimedium on the growth of chick embryo femur in vitro. Nine-day-old chick embryo femora were cultivated with the roller-tube culture method for 6 days, the length, dry-weight and ³⁵S-sulfate uptake rate of the Epimedium-treated femora increased by 116%, 112% and 133% respectively in comparison with corresponding values of the control. The marked differences of the two groups have proved that the injection Epimedium markedly promoted the growth of the chick embryo femora and their protein polysaccharide synthesis in vitro. The results showed that the ideal proportion of the injection to medium was 2:100~3:100. The injection used in our experiments was a compound, the effective elements of which are to be isolated and identified.
(Original article on page 172)

The Effect of Yang Tonics on the Uterine Estrogen Receptors in Depressed Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Cortex Axis Rats

Lin Youyu (林有裔), et al
Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai TCM College, Shanghai

The authors studied the change in uterine estrogen receptors (E-R) of dexamethasone-induced depressed hypothalamus-pituitary-adrenal cortex axis rats and the effect of Yang tonics on it.

Female Wistar rats, weighing 250g each, during sexual quiescent stage were chosen and divided randomly into 3 groups: (1) controls (C), with 4ml of normal saline instilled into the stomach daily; (2) models (M), with 2ml of dexamethasone suspension and 2ml of normal saline instilled daily; and (3) treated (T) animals, with 2ml of dexamethasone suspension and 2ml of Yang tonics instilled daily instead. The animals were exsanguinated up to death on the 18th day, and their uteri removed promptly. Blood samples were taken for plasma cortisone and estradiol estimation. Uterine cytoplasmic homogenates were prepared under 0~4°C and their E-R values estimated with DCC method.

The result of the experiment showed that all of the animals in M group developed bowed (arched) back, had a mean drop in body weight of 33g and a marked decrease in plasma cortisone as compared with the controls ($P < 0.001$). This denoted an inhibition (depression) of hypothalamus-pituitary-adrenal cortex axis and establishment of the animal model.

The E-R contents of the three groups C, M and T of animals were 166 ± 11.9 , 136 ± 6.7 and 156 ± 6.9 (M $\pm$ SE) fmol/ng protein respectively; that in M group was significantly lower than in C group ($P < 0.05$). Yang tonics had been shown to have protective and also therapeutic effects in the reversal of such changes, which increased the E-R contents of the uterine cytoplasm and enhanced the affinity of estradiol to E-R. According to the authors the increase of E-R content in the treated animals might be the result of the action of Yang tonics.

(Original article on page 175)