

补肾药对雄激素致无排卵大鼠垂体及卵巢的形态学变化观察

上海医科大学妇产科医院(上海 200011) 魏美娟 俞瑾

内容提要 SD 雌性大鼠幼鼠, D 9 日龄丙酸睾酮处理。D 70 日龄阴道涂片两个性周期。D 80 日龄灌服补肾中药水溶液 2 周。用蒸馏水作为对照组。D 100 日龄处死, 取其垂体和卵巢, 通过光镜、透射电镜观察形态学变化, 并以亲和组化法检测卵巢内雌、孕激素受体。结果与对照组相比, 灌服补肾中药后卵巢的间质腺增多, 间质腺胞浆内脂滴减少; 雌、孕激素受体增加, 孕激素受体增加更明显。腺垂体细胞内“粒溶”、“自嗜”消失。提示补肾中药水溶液对大鼠卵巢、垂体的激素合成代谢有明显作用。并对卵巢的受体形成也有一定作用。

关键词 雄激素致无排卵 补肾中药 间质腺

在以往实验中^[1,2], 我们已观察到 SD 雌性大鼠幼鼠, 出生 D 5~7 日龄注射丙酸睾酮后发生完全性排卵障碍, 出生 D 8~9 日龄注射后则发生不完全排卵障碍。俞瑾等报道了补肾药水溶液对这型大鼠的失重卵巢有明显的增重作用, 并有形态学的改变, 而补肾药的脂溶部分则无此作用。本实验采用出生 D 9 日龄给雄激素致无排卵大鼠模型, 并灌服补肾中药水溶液后, 观察其垂体、卵巢的形态学变化。

材料与方法

一、动物 选用相同时期出生的雌性 SD 大鼠幼鼠, 同窝 10 只为一组, 共 40 只。出生后母鼠哺乳至 22 日龄断奶。利用自然光照, 室温维持在 20~28℃。由专人哺养, 颗粒饲料由上海医科大学实验动物部提供。

二、药物 注射用的丙酸睾酮、中性茶油均购自上海第九制药厂。补肾中药配方及剂量: 附子 12 g 肉桂 3 g 补骨脂 12 g 仙灵脾 12 g 菟丝子 12 g 黄精 15 g 熟地 12 g。补肾中药水溶液的提取、蒸馏水均由上海医科大学药学院生药教研室提供。浸膏 342 mg/ml, 相当于生药 3 g/ml, 按人的剂量 20 倍计算给药, 每 100 g 动物体重给药 1 ml。

三、实验方法 出生 D 9 日龄的 SD 雌性大鼠幼鼠 40 只分为四组, 一组颈背部皮下注射中性茶油 0.05 ml, 为正常对照组(10 只); 另三组颈背部皮下注射丙酸睾酮 1.25 mg(0.05 ml), 为模型组(共 30 只)。D 22 日龄断奶, 同样条件饲养, 不加饲维生素类制品。D 70 日龄(大鼠体重为 150 g 左右), 阴道开口, 阴道涂片二个性周期。D 80 日龄将一组模

型组大鼠灌服补肾中药水溶液(简称中药组); 一组灌服蒸馏水(简称蒸馏水组); 剂量为每只大鼠 1.5 ml/日, 灌服 2 周。另一组不灌服中药水溶液或蒸馏水(简称模型组)。100 日龄采用戊二醛心脏灌注法处死, 取其卵巢、垂体作光镜、透射电镜检查; 亲和组化法检测卵巢内雌、孕激素受体。

卵巢内雌、孕激素受体检测, 药盒由上海医科大学肿瘤医院免疫病理室提供。将新鲜标本液氮保存, 冰冻切片即可进行受体标记。阳性细胞评定标准按上海医科大学肿瘤医院免疫病理室的标准^[3,4]; “-”为阴性细胞; “+”细胞内颗粒呈淡棕黄色; “++”介于+~+++之间; “+++”细胞内颗粒为深棕色。

结 果

一、阴道涂片 大鼠出生 D 70 日龄时阴道涂片两个性周期。正常对照组大鼠, 阴道上皮有周期变化, 性周期为 4~5 天。全部经雄激素处理的大鼠, 阴道上皮呈现持续性角化, 无性周期变化。

二、卵巢大体检查 模型组 10 只大鼠卵巢苍白, 表面见多个卵泡, 无黄体。正常对照组 10 只大鼠, 卵巢色泽鲜红, 表面见多个黄体组织。中药组 10 只大鼠半数卵巢色泽鲜红, 表面见有黄体, 但数量较正常对照组的少; 半数卵巢色泽苍白, 表面见多个卵泡, 无黄体。蒸馏水组的卵巢大体检查同模型组。

三、卵巢光学显微镜检查(HE 染色)

1. 正常对照组大鼠卵巢在镜下见黄体组织及各期卵泡, 其比例为 3:2(低倍视野)。黄体细胞排列呈回状结构, 细胞大、圆, 胞浆深伊红色, 核圆。大部分卵泡内见卵丘、卵细胞、透明带、放射冠。卵泡腔内

含卵泡液。卵泡壁内层由数层颗粒细胞组成, 细胞圆形, 深染色; 外层为短棱形的内泡膜细胞层, 细胞的胞浆少, 呈伊红色, 核长圆居中。该层细胞内含有丰富的血管。皮质部的间质相对减少, 偶尔可见间质腺呈小梁状或小团块状。间质腺细胞比内泡膜细胞大, 上皮样, 多边形, 胞浆透亮, 核卵圆, 见核仁。

2. 模型组大鼠卵巢在镜下见卵泡囊性扩张。10只大鼠卵巢, 其中4只大鼠卵巢内有黄体组织, 但数量比正常对照组明显减少, 黄体与卵泡的比例约为1:4(低倍视野)。6只大鼠卵巢内没有黄体, 囊性扩张的卵泡壁颗粒细胞层次减少, 仅为1~2层, 排列松散, 卵细胞消失。间质中见小梁状或小团块的间质腺。

3. 中药组大鼠卵巢镜下见囊性卵泡壁颗粒细胞层次增加, 约为4~5层, 排列整齐, 优势卵泡内见有卵细胞。间质部位间质腺明显增多, 体积增大呈大团块状。10只大鼠有7只卵巢内有黄体。黄体数量较模型组的增多, 黄体与卵泡比例为2:1(低倍视野)。黄体的体积也较模型组增大。

4. 蒸馏水组大鼠卵巢镜下所见同模型组, 卵泡囊性扩张, 囊壁薄, 颗粒细胞层仅为1~2层。10只大鼠, 6只大鼠卵巢内没有见黄体。间质中见小团块、小梁状的间质腺。

四、卵巢透射电镜检查

1. 正常对照组卵巢的黄体细胞, 核卵圆位于细胞的中央, 胞浆内可见线粒体、内质网、高尔基复合体等细胞器, 线粒体嵴为泡沫状, 线粒体内见有嗜锇颗粒。胞浆内还可见脂滴, 形态规则、中等大小、较致密, 量中等。

正常对照组卵巢间质腺细胞, 形态与黄体细胞十分相似, 但线粒体内没有嗜锇颗粒, 脂滴中等大小, 形态规则、较致密, 量中等。

2. 模型组卵巢的黄体细胞, 胞浆内脂滴数量明显增多, 形态不规则, 透亮。线粒体内还可见有嗜锇颗粒。

模型组卵巢的间质腺细胞, 胞浆内脂滴数量明显增多, 形态不规则, 体积增大, 透亮。

3. 中药组卵巢的黄体细胞, 镜下所见同正常对照组, 脂滴数量中等, 形态规则、致密。

间质腺细胞的胞浆内脂滴数量减少接近正常对照组。

4. 蒸馏水组卵巢的黄体细胞、间质腺内脂滴的变化同模型组。

五、腺垂体细胞的透射电镜检查

1. 正常对照组腺垂体细胞 按照细胞内颗粒大小、细胞外形, 腺垂体细胞分为生长激素细胞、催乳激素细胞、促性腺激素细胞、促甲状腺激素细胞、促肾上腺皮质激素细胞、无颗粒细胞六种细胞。本实验主要观察促性腺激素细胞。这种细胞为圆形, 分泌颗粒多, 电子密度高, 十分深暗, 外形呈圆形或不规则形, 大小不一, 直径在100~300 nm。它的一部分通常紧靠在毛细血管壁上。

2. 模型组腺垂体细胞 促性腺激素细胞浆内分泌颗粒增多, 有的已越出胞浆到了窦间隙、窦腔内; 有的则在胞内引起“粒溶”、“自嗜”。胞浆内还可见有脂滴、空泡。

3. 中药组腺垂体细胞 胞浆内见颗粒分布正常, 未见“粒溶”、“自嗜”、“脂滴”、“空泡”现象。

4. 蒸馏水组腺垂体细胞的形态同模型组。

六、亲和组化法检测卵巢雌、孕激素受体, 结果见附表。

附表 各组卵巢雌、孕激素受体显色反应比较

项 目	雌激素受体			雌激素受体阻断			孕酮受体			孕酮受体阻断		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
黄体细胞	++	+	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-
卵巢生发上皮	++	+	+	-	-	-	±	±	±	-	-	-
卵巢间质	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
卵巢颗粒细胞	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血管内皮细胞	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: I 为正常对照组, II 为模型组, III 为中药组

讨 论

临床上采用中医补肾方法治疗多囊卵巢综合征⁽⁵⁾可引起血FSH上升, 而后产生血E₂上升, 引起正反馈而排卵。为了观察治疗后下丘脑-垂体-卵巢轴各个水平的具体变化及作用, 必须寻找一种无排卵动物模型进行研究。在这方面较有代表性的是制造多囊卵巢动物模型进行研究⁽⁶⁾。国外用来制造多囊卵巢模型的常用方法为: 持续性曝光、制造下丘脑病灶或给新生鼠以性激素。持续性曝光和引起下丘脑损伤的大鼠与临床病因差距大, 故二者均不适用。给新生鼠以性激素包括雌、孕激素, 二者不排卵现象不稳定且可自逆, 故亦不适合研究药物对卵巢的作用观察。Baraclough给出生D5日龄的大鼠注射丙酸睾丸酮⁽⁷⁾, 引起卵巢多囊变化, 无排卵现象。以后Hirota et al等发现D5日龄雌性大鼠幼鼠⁽⁸⁾, 注射丙酸睾丸酮后

第5~10天,血浆睾酮上升水平比对照组高,D40日龄LH显著上升,以后又下降。国内俞瑾等认为多囊卵巢综合征与肾上腺初现时雄激素过多分泌相关学说及中医肾主生殖理论,选择了给D5~D8日龄小鼠幼鼠注射丙酸睾丸酮促成小鼠多囊卵巢、无排卵模型进行补肾类中药对其性轴作用的观察,并认为此模型和人的多囊卵巢综合征从形态学、激素测定结果及发生机制方面有所不同,而且人和动物有关激素调节及作用方面也不尽相同,故不能用其作为研究人的多囊卵巢综合征的模型,但可以利用其观察补肾中药对雄激素干扰持续性不排卵动物下丘脑-垂体-卵巢轴。为了避免将本模型与临床上Pcos相混淆,我们将其改称为雄激素致无排卵大鼠模型。

本实验采用D9日龄雌性大鼠幼鼠,经丙酸睾丸酮处理,阴道上皮持续角化,卵泡囊性扩张,排卵率为40%,给予补肾中药水溶液后,阴道上皮出现周期性变化,排卵率上升为70%,黄体的数量也有增加,卵泡壁颗粒细胞层次增加。亲和组化法显示模型组内有的卵巢内虽有黄体,但孕酮受体阴性。灌服补肾中药水溶液后,孕酮受体阳性。提示补肾中药对本模型中出现的黄体在数量及功能上均有作用。

脂滴为类固醇激素合成细胞的特征。脂滴由脂肪酸、甘油三酯及胆固醇组成,能参与甾体激素的生物合成。Dean曾提及“出现在类固醇细胞里的脂滴,代表了在适当刺激发生时,可以转化成类固醇激素的前驱物质”。并且认为可以从脂滴的多少和大小来估计类固醇合成细胞的活性,当其分泌很强时,脂滴很少,反之脂滴增多。本实验见模型组的黄体细胞、间质腺细胞内脂滴数量增多,形态不规则,透亮,这显然与性激素的合成被阻断、前驱物质堆积有关。而灌服补肾中药水溶液后,卵巢的黄体细胞、间质腺细胞内脂滴减少。提示补肾中药对卵巢的激素合成代谢方面有明显作用。

正常的排卵过程受中枢神经-下丘脑-垂体调节。

某一环节发生异常,即能引起排卵功能障碍。本实验用雄激素干扰大鼠排卵后,发现垂体细胞分泌颗粒出现“粒溶”、“自嗜”,有的分泌颗粒进入细胞间隙,有的即将逸出细胞膜,并在胞浆内出现脂滴及空泡。灌服补肾中药后,上述现象消失。提示腺垂体细胞形态上的异常可能与垂体分泌促性腺激素有一定联系,而补肾中药水溶液在这方面有调整作用。

以上结果提示雄激素致无排卵大鼠模型可以作为补肾药调整性腺轴功能的一个病理模型,可以此为补肾病的筛选、提纯及中药作用机理研究提供线索。

(本实验过程得到上海医科大学电镜室钟慈声教授、俞永富老师,上海医科大学肿瘤医院免疫病理室刘尚廉教授、李小妹老师的帮助,深表谢意)

参 考 文 献

1. 魏美娟. 补肾药对多囊卵巢大鼠卵巢的形态学观察. 中西医结合杂志 1989; 9(特集):70.
2. 俞瑾. 肾主生殖的实验性研究. 中西医结合杂志 1989; 9(9):548.
3. 俞瑾. 补肾化痰治疗多囊卵巢综合征对下丘脑-垂体-卵巢功能调节. 中西医结合杂志 1986; 6(4):218.
4. 刘尚廉. 乳腺癌雌激素受体的酶联雌二醇组化标记法. 肿瘤 1986; 6(3):104.
5. 徐薇苓. 乳腺癌孕激素受体的酶联孕酮亲和组化检测. 肿瘤 1988; 8(3):123.
6. Damodar K. Mahajan, PhD Polycystic Ovarian Disease Animal Models. Endocrinology and Metabolism Clinis of north America Vol. 17. No 4. December 1988: 705.
7. Barraclough CA, Gorski RA. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. Endocrinology 1961; 68:68.
8. Hirota I, Ota, et al. Endocrinological and histological aspects of the process of polycystic ovary formation in the rat treated with testosterone propionate. Tohoku Journal Experimental Medicine 1983; 140:121.

《中医药管理杂志》公开出版发行征订启事

经有关部门正式批准,《中医药管理杂志》从1993年起已公开出版发行。该杂志由国家中医药管理局主办,双月刊,每期64面。

《中医药管理杂志》原为内部刊物,自1991年2月创刊以来,受到了本系统广大医药工作者的欢迎。此次公开出版发行,其办刊宗旨为宣传党的中医药方针政策,宣传中医药工作的成果和成就,指导中医药各级管

理工作,交流经验,沟通信息。投稿请寄:国家中医药管理局政策法规司《中医药管理杂志》编辑部,地址:北京朝阳区东兴路7号(邮政编码:100027)。

《中医药管理杂志》每期定价2元,全年24元。订阅汇款地址:北京市东直门内北新仓18号中医杂志社《中医药管理杂志》发行部,邮政编码100700。开户银行:北京工商银行北新桥分理处,帐号891128—94。

Screening of Anti-SIV Drugs from Chinese Medicinal Herbs

Guan Chong-fen (关崇芬), Wang Yi-zhe (王忆浙), Wu Xiao-xian (吴小闲) *

Institute of Basic Theory, China Academy of TCM, Beijing (100700)

* *Institute of Lab. Animal Science, Chinese Academy of Med. Sciences (100021)*

The inhibitory activities of more than 40 species of Chinese medicinal herbs or their single chemical components against simian immunodeficiency virus(SIV) have been studied. The study revealed that four species of the medicinal herbs and a single chemical component had more than 50% inhibition of SIV antigen expression and five other herbs' inhibitory rate of SIV antigen expression was between 30—50%. The results showed that Chinese medicinal herbs could inhibit the SIV activity.

Key words Acquired immunodeficiency syndrome, Chinese medicinal herbs, simian immunodeficiency virus

(Original article on page 162)

Morphological Changes of Pituitary Gland and Ovary in Testosterone-induced Anovulatory Rat Treated with Chinese Medicinal Herbs of Replenishing Kidney

Wei Mei-juan (魏美娟), Yu Jin (俞瑾)

Obstetrics and Gynecology Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200011)

Injection of testosterone propionate 1.25mg were given to SD rats on 9 days of age, and fed with replenishing Kidney herbal decoction as well as with distilled water as control from 80 to 94 days of age. On 100 days of age, all the rats were sacrificed and the pituitary glands and ovaries were excised for examination. In the ovaries, increase in interstitial glands' count and lowering of lipid drop's quantity in cytoplasm of interstitial glandular cells were observed after the treatment, and intracellular "crinophagy" and "autophagy" disappeared in the pituitary gland. After treatment with replenishing Kidney drugs, ovarian estrogen receptors increased whereas the ovarian progesterone receptors raised even higher. It suggests that both ovaries and pituitary gland in testosterone induced anovulatory rats were affected by herbs of replenishing Kidney.

Key words: testosterone-induced anovulation, medicinal herb of replenishing Kidney, interstitial gland

(Original article on page 164)

Experimental Study on Effects of 18 Kinds of Chinese Herbal Medicine for Synthesis of TXA₂ and PGI₂

Wang Shuo-ren (王硕仁), Guo Zi-qiang (郭自强), Liao Jia-zhen (廖家桢)

Affiliated Dongzhimen Hospital, Beijing College of TCM, Beijing (100700)

The effect of 18 kinds of Chinese herbal medicine for the synthesis of TXA₂ and PGI₂ was studied. The porcine lung microsoma was used as donor of enzymes such as cyclo-oxygenase, thromboxane A₂ synthetase and prostacyclin synthetase, etc. It was found that *Glehnia littoralis* could inhibit the synthesis of TXA₂ and increase the formation of PGI₂. *Rheum palmatum* (300mg group) and *Erigeron breviscapus* significantly inhibited the synthesis of TXA₂, but no apparent effect on the synthesis of PGI₂. When *Codonopsis pilosulae*, *Astragalus membranaceus*, *Angelica sinensis*, Ginsenosides and Baicalin, etc. markedly inhibited the formation of TXA₂ and mildly affected the formation of PGI₂. Some Chinese herbs for promoting blood circulation play an important role on the inhibition of TXA₂ synthesis. Some tonic herbs could either inhibit the synthesis of TXA₂ and increase the synthesis of PGI₂ or inhibit the formation of PGI₂. Therefore these tonic herbs had the characteristics of both strengthening the body resistance and eliminating pathogenic factors. In this aspect they are better than the control drug (Aspirin) and other herbs of promoting blood circulation.

Key words thromboxane A₂ (TXA₂), prostacyclin (PGI₂), Arachidonic acid

(Original article on page 167)