

· 实验研究 ·

补肾中药对雄激素致不孕大鼠垂体、卵巢及肾上腺作用的实验研究*

归绥琪 俞 瑾 魏美娟 杨淑萍 施大文

内容提要 目的:探讨雄激素致不孕大鼠(ASR)发病机理和中药治疗作用。方法:采用光镜、电镜、细胞培养、免疫组化、放免测定等方法,对补肾药治疗前后的 ASR 的垂体、卵巢、肾上腺的形态学及内分泌功能进行同步观察。结果:ASR 的腺垂体细胞浆内有“脂滴”、“粒溶”、“空泡”、“自嗜”、卵巢呈无排卵;肾上腺皮质网状带增生,同时促卵泡激素(FSH)、促黄体激素(LH)明显低下($P < 0.05 \sim 0.005$);睾酮(T)、脱氢表雄酮(DHA)明显升高($P < 0.01 \sim 0.001$)。治疗后 ASR 的形态学及内分泌功能均恢复正常。结论:SD 雌性幼鼠 9 日龄给予外源性雄激素后,影响性腺轴和肾上腺,在 ASR 发病机理中起重要作用;补肾药是通过对性腺轴,肾上腺多水平,多靶器官的调节,起到降低雄激素、促排卵作用。

关键词 补肾药 雄激素致不孕大鼠 形态学 内分泌 性腺轴 肾上腺

Experimental Study of Effect on Tonifying Kidney Herbs in Pituitary Ovary Adrenal Gland of Androgen Sterilized Rats GUI Sui-qi, YU Jin, WEI Mei-juan, et al *Obstetrics and Gynecology Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200011)*

Objective: To observe the effect of tonifying Kidney herbs (TKH) in pituitary, ovary, adrenal gland of androgen sterilized rats (ASR). **Methods:** ASR model was established by injecting testosterone propionate subcutaneously to SD female rats of 9 days age. Morphological and hormonal change of pituitary, ovary and adrenal gland in rats of 100~107 days old before and after feeding TKH extract were observed by light and electron microscope, cell culture immunohistochemical studies and radioimmuno-assay. **Results:** In the ASR groups, there were intracytoplasmic lipid drops, autophagy, vacuole, granulolysis of pituitary gland. There were anovulation apparently and increased the amount of lipid drops in cytoplasm of interstitial glandular cell of ovary. The fatty drops of the reticular zone of adrenal gland decreased, the numbers of AGNOR ($P < 0.01$) and PCNA ($P < 0.01$) increased significantly. The levels of FSH, LH ($P < 0.05 \sim 0.005$) lowered, but the levels of DHA, T ($P < 0.01, 0.05, 0.001$) were raised significantly. Morphological and hormonal change of all RSA returned to normal range after the treatment. **Conclusions:** The hyperandrogenemia were disturbed by the function of sex gland axis and adrenal in female rats of 9 days old and played an important role in pathogenesis of ASR, the TKH reduced the levels of androgen and induced ovulation through sex gland axis and adrenal level and multi-organ regulation.

Key words tonifying kidney herbs, androgen sterilized rat, morphology, endocrine, sex gland axis, adrenal

临床上高雄激素无排卵月经病,除性腺轴功能紊乱引起外,肾上腺功能异常也产生一定影响,本研究采

用光镜、电镜、细胞培养、核仁组成区嗜银蛋白法(AGNOR),增殖前期细胞核仁抗原法(PCNA),对灌服补肾药前后雄激素致不孕大鼠(androgen sterilized rat, ASR)的垂体、卵巢、肾上腺的形态学及内分泌功能进行同步观察,探讨性腺轴和肾上腺异常对 ASR 发生的

*国家自然科学基金资助项目

上海医科大学妇产科医院(上海 200011)

影响及中药治疗机理。

材料和方法

1 材料

1.1 ASR 病理模型建立及分组 按俞瑾、魏美娟等^[1,2]实验方法,取 9 日龄 SD 雌性大鼠 30 只,分 3 组,每组 10 只。正常对照组(C 组);ASR 组(A 组);ASR 中药组(A+H 组)。A 组及 A+H 组每只于颈背部皮下注射丙酸睾丸酮 1.25mg, C 组则每只注射中性茶油 0.05ml。3 组均于 22 日断乳,同样条件饲养,70 日龄起每天查阴道涂片,连续 10 天,持续阴道角化细胞作为 ASR 模型。80 日龄起, A+H 组灌服补肾中药, C 组及 A 组灌服蒸馏水,每天 1 次,连续 2 周。100~107 日龄,用戊二醛心脏灌注或 4% 水合氯醛注入腹腔,抽取下腔静脉血,离心血清保存于 -20℃,待放免测定促卵泡激素(FSH),促黄体激素(LH),雌二醇(E₂),睾酮(T),脱氢表雄酮(DHA)。同时按以下实验要求取垂体、卵巢、肾上腺,所有实验均分 3 组,每批实验大鼠至少 30 只。

2 药物及试剂 补肾中药组成:熟附子 12g 肉桂 3g 仙灵脾 12g 菟丝子 12g 黄精 12g 补骨脂 12g 熟地 12g,由上海医科大学药学院教研组提取水溶性部分,制成浸膏 342mg/ml,每毫升含生药 3g,按临床剂量 20 倍计算给药,每 100g 体重给药 1ml。促黄体激素-释放激素(LHRH)为上海中科院生物制品研究所产品。丙酸睾丸酮及中性茶油为上海第九制药厂产品。199 培养液为 Gibco 公司产品。

3 方法

3.1 垂体、卵巢、肾上腺形态学变化 光镜(HE 染色)、透射电镜检查^[3]。

3.2 卵巢内雌二醇受体(ER)、孕激素(PR) 酶联亲和组化法^[3],阳性细胞评定标准按上海医科大学肿瘤医院病理标准^[4,5]。

3.3 卵巢颗粒细胞、间质细胞及肾上腺皮质网状带细胞的 AgNOR, PCNA 采用新生物素——生物复合法(简称 ABC 法)^[6]。阳性判断标准:AgNOR 于高倍镜下,可见细胞核内界限清楚的黑色小点,每只鼠均随机计数 100 个细胞/HP,计算每个细胞的平均 AgNOR 数;PCNA 于高倍镜下,阳性细胞表现为细胞核染黑,同样每张片随机计算 100 个细胞,计算阳性细胞占总数的百分率。

3.4 卵巢颗粒细胞培养 按刘承权报道方法培养^[7]。24h 后培养液在 -20℃ 保存,待测 E₂、T。肾上腺细胞培养:按 Terrey 法^[8]。24h 后培养液均在

-20℃ 保存,待测 T、DHA。

3.5 LHRH 兴奋试验(LRT) 颈静脉插管,每只大鼠静脉内注入 LHRH100ng。于注射前、注射后每 100min 抽血 1 次测 LH,共抽 7 次,血清在 -20℃ 贮存,待放免测定。

所有内分泌激素测定,均由北京中国科学院动物研究所内分泌室及上海市内分泌研究所放免法测定。测定批间误差 < 10%。

4 统计学方法 采用均数 *t* 检验分析。

结 果

1 ASR 补肾中药治疗前后垂体、卵巢、肾上腺形态学变化 ASR 组在透射电镜下,腺垂体细胞浆内颗粒增多,有“脂滴”、“粒溶”、“自嗜”、“空泡”现象。肉眼见卵巢小而苍白,表面见多个卵泡,无黄体,重量显著低于 C 组及 A+H 组;光镜下见卵巢囊状扩张,卵泡颗粒细胞层减少,排列松散,卵细胞消失,黄体缺如;卵巢间质腺呈小团块或小梁状;透射电镜下卵巢黄体细胞和间质腺细胞浆内脂滴明显增多,形态不规则,透亮,线粒体内见嗜糖颗粒。亲和组化法显示孕酮受体阴性。光镜目测仪检查肾上腺皮质网状带明显增宽($P < 0.01$);透射电镜下肾上腺网状带细胞浆内脂滴明显减少,透亮。ASR 灌服补肾中药后,腺垂体细胞内“脂滴”、“粒溶”、“自嗜”、“空泡”消失;卵巢重量增加,黄体增多,卵泡颗粒层增加,优势卵泡内见卵细胞,间质腺明显增多;透射电镜见黄体细胞及间质腺内脂滴减少,形态规则,致密;卵巢黄体孕酮受体转阳性。肾上腺皮质网状带变薄,脂滴增多,见正常线粒体、内浆网。表明以上所有形态学用药后改变均已恢复至正常范围。

2 ASR 治疗前后卵巢、肾上腺皮质细胞 AgNOR 计数、PCNA 阳性细胞百分率计数比较 见表 1、2。A 组肾上腺皮质网状带细胞 AgNOR 数较 C 组及 A+H 组显著增多($P < 0.01$);PCNA 阳性细胞百分率较 C 组及 A+H 组明显增加($P < 0.01$)。卵巢颗粒细胞、间质细胞 AgNOR 数及 PCNA 阳性细胞率较 C 组及 A+H 组明显减少($P < 0.01 \sim 0.05$)。治疗后,肾上腺、卵巢 AgNOR 及 PCNA 数均恢复正常^[6]。

表 1 3 组肾上腺网状带细胞 AgNOR 数及 PCNA 阳性细胞百分率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	AgNOR(个)	PCNA(%)
C	10	1.210 ± 0.006*	5.40 ± 0.55*
A	10	6.000 ± 1.732	8.00 ± 0.71
A+H	10	1.296 ± 0.790*	5.00 ± 1.04*

注:与 A 组比较,* $P < 0.01$

表 2 3 组卵巢颗粒细胞、间质细胞 AGNOR 数及 PCNA 阳性细胞百分率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	颗粒细胞		间质细胞	
		AgNOR(个)	PCNA(%)	AgNOR(个)	PCNA(%)
C	10	6.60 ± 0.55 **	15.20 ± 1.30 **	4.00 ± 1.00 *	5.20 ± 0.84 **
A	10	2.20 ± 0.05	1.20 ± 0.84	2.20 ± 0.75	1.40 ± 0.55
A+H	10	6.20 ± 1.30 **	13.80 ± 1.30 **	4.00 ± 0.63 **	4.60 ± 0.74 **

注:与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 表 3 3 组血 FSH、LH、E₂、T、DHA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FSH(mIU/ml)	LH(mIU/ml)	E ₂ (pg/ml)	T(ng/100ml)	DHA(μ g/100ml)
C	10	2.61 ± 1.17	3.54 ± 0.38	80 ± 22.41	36.80 ± 3.85	0.042 ± 0.012
A	10	2.03 ± 0.41	2.78 ± 0.07 *	82 ± 30.50	53.10 ± 16.45 **	0.079 ± 0.008 **
A+H	10	3.79 ± 0.87 *	3.37 ± 0.33 [△]	78 ± 34.45	36.49 ± 12.24	0.040 ± 0.011 [△]

注:与 C 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 A 组比较, [△] $P < 0.01$

3 ASR 治疗前后激素变化 见表 3、4。血 FSA 以 A 组最低, A+H 组最高, 与 C 组及 A 组比较, 差异显著($P < 0.05 \sim 0.005$)。血 LH 以 A 组最低, 与 C 或 A+H 组比较, 差异显著($P < 0.05$), 血 T 与 DHA, A 组明显增高, 与 C 或 A+H 组比较, 有显著性差异($P < 0.01 \sim 0.005$)。卵巢颗粒细胞培养液 A 组 T 含量高于 C 组或 A+H 组, 但差异不显著($P > 0.05$), 肾上腺细胞培养液 A 组 T 含量明显高于 A+H 组($P < 0.05$); A 组 DHA 含量高于 C 或 A+H 组, 有显著性差异($P < 0.05$)。

表 4 肾上腺细胞 T、DHA 产量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	T(ng/100ml)	DHA(μ g/100ml)
C	10	25.65 ± 11.45	0.035 ± 0.014 [△]
A	10	27.66 ± 10.54 *	0.066 ± 0.029
A+H	10	22.75 ± 6.98	0.047 ± 0.020 [△]

注:与 A+H 组比较, * $P < 0.05$;与 A 组比较, [△] $P < 0.05$

讨 论

在本研究中, 我们提出中医的“肾主生殖”不仅与性腺轴密切相关, 而且与肾上腺密切相关。《内经》“女子七岁肾气盛……”正值西医肾上腺机能初现(arenache)阶段, 是启动女性生殖生理发育成熟的关键, 如此时肾气不足将造成青春期后月经失调。故我们推测 SD 雌性大鼠 9 日龄给予外源性雄激素, 可能干扰大鼠肾上腺机能初现, 即影响肾上腺 11、21 羟化酶活性, 产生类似先天性肾上腺皮质增生变化。在本研究中确实存在肾上腺皮质网状带增生及其细胞异常增殖活跃的形态学变化, 可使其转为雄激素 T、DHA 增多, 并干扰雌性大鼠早期性分化中枢, 继之 FSH、LH

分泌不足, 影响卵泡发育及排卵。同时由于卵巢颗粒细胞微环境雄激素增加, 损害卵母细胞和颗粒细胞, 促使卵泡闭锁, 产生更多雄激素, 反过来又抑制肾上腺 11、21 羟化酶活性, 加重肾上腺合成雄激素, 如此互为因果形成不良循环, 导致 ASR 具有低促性腺高雄激素, 无排卵的特点, 此外, LH 基值低下, 但给予外源性 LHRH 后, 垂体分泌 LH 曲线类型与正常相似, 示垂体分泌 FSH、LH 不足与下丘脑功能异常有关。以上表明 ASR 的发病机理是多因素的, 它可继发于下丘脑—垂体—卵巢性腺轴功能紊乱, 也可因肾上腺功能异常或由其他因素, 如高胰岛素血症等相关。

本实验中证实了 ASR 灌服补肾药后, 其垂体、卵巢、肾上腺异常形态学均逆转至正常, 同时伴随性激素分泌功能正常, 提示肾上腺皮质网状带增生及其细胞增殖活跃的消失, 可能与肾上腺 11、21 羟化酶活性增加相关, 使之 T、DHA 合成减少。同时, 垂体对下丘脑 GnRH 敏感性增加, FSH、LH 分泌增加促使卵泡发育, 颗粒细胞增生, 卵子成熟、排卵, 为此卵巢分泌雄激素减少, 使卵巢从局部高雄激素微环境中解脱出来, 减少卵泡闭锁。由于肾上腺、卵巢来源雄激素下降, 对性腺轴的干扰解除, 表明了补肾法对 ASR 治疗机理, 除能调节性腺轴外, 同时也调节肾上腺皮质功能, 共同参与对生殖功能的调节作用, 进一步体现了中医的整体观。而国内外报道用中药或西药对 ASR 治疗促排卵效果, 均未提及对肾上腺功能的影响, 此乃有别于国内外报道的重要方面; 同时也为临床补肾药有效治疗高雄激素无排卵月经病提供了科学依据; 也表明 ASR 为深入研究高雄激素无排卵月经病的发病机理及探讨补肾药的治疗作用, 研制新药等提供了一个较理想的病理模型。

参 考 文 献

1. 俞瑾, 陈红英, 毛秋芝, 等. 肾主生殖的实验研究. 中西医结合杂志 1989; 9(9):548—551.
2. 魏美娟, 俞瑾. 补肾中药对大鼠多卵泡巢的形态学变化观察. 中西医结合杂志 1989; 9(增刊):70—74.
3. 魏美娟, 俞瑾. 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. 中国中西医结合杂志 1993; 13(3):164—166.
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—106.
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—125.

6. 魏美娟, 俞瑾. 补肾中药对雄激素不孕大鼠肾上腺皮质形态学观察. 中国中西医结合杂志 1994; 14(12):736—738.
7. 刘承权, 沈淑人, 曹霖, 等. 六种甾体化合物对离体胎盘滋养层、蜕膜和卵巢颗粒细胞的影响. 中国药理学与毒理学杂志 1987; 1(1):209—212.
8. Terrey TH, William JL. The effects of corticotropin, opioid peptides and crude pituitary extract on the production of dehydroepiandrosterone and corticosterone by mature rat adrenal cells in tissue culture. J Steroid Biochem 1988; 29(6):721—724.

(收稿:1996-05-18 修回:1996-08-20)

· 海外中西医结合 ·

丹参活血汤治疗冠心病 116 例

吴世华

本中心 5 年来应用自拟丹参活血汤结合针灸与西药治疗冠心病 116 例, 现报道如下。

临床资料 116 例冠心病患者根据世界卫生组织冠心病的诊断标准诊断, 其中男性 60 例, 女性 56 例; 年龄 39~101 岁, 其中 50~59 岁 35 例(30%), 60~69 岁 29 例(25%), 70~79 岁 24 例(21%)。伴高血压病 89 例(77%), 糖尿病 14 例(12%), 肥胖病 10 例(9%), 高血脂 3 例(3%)。所有患者均有典型的临床症状, 如心前区疼痛、胸闷气短、心电图、心动超声波、实验室检查, 或心导管检查或安装心脏起搏器或冠状动脉搭桥而确诊。大部分为经西医治疗效果差或产生抗药性或治疗无效者。

治疗方法 首先给予针刺治疗, 主要穴位为膻中、乳根、内关、神门、气海、关元、血海、太溪, 有时配合心俞、肺俞、膈俞、厥阴俞等, 每次选用 4~6 穴位, 根据具体症状而定, 开始每日 1 次, 待病情缓解改为每周 1~2 次。同时服用复方丹参片, 每日 3 次, 每次 5 片。服用丹参活血汤, 组成: 丹参、葛根、川芎、赤芍、红花、白芍。根据临床具体表现不同而再行加减, 如胸闷憋气、阵发性胸痛、心悸、气短等胸阳痹阻者加用瓜蒌薤白半夏汤; 心胸刺痛、痛引肩背、胸闷气短等心脉受阻者加桃红四物汤; 身困乏力、心悸气短、胸痛隐隐等气阴两虚者加用生脉散或当归补血汤; 心悸气短、胸痛、脉结代者加用炙甘草汤; 心悸气短、面色苍白、虚脱者加用

保元汤或参附汤。每剂药可服 1~3 天, 连服 3~6 周。逐渐减少西药到停止。一般连续治疗观察 12~24 周, 进行结果分析。

结 果 经 0.5 年的临床观察随访, 108 例有明显的效果占 93%。如心绞痛缓解或发作频率减少到消失, 血压降低到正常。糖尿病明显好转。血糖降低到正常。患者恢复正常工作或正常生活。但心率紊乱恢复较差。

讨 论 丹参活血汤是在学习中医学宝贵经验的基础上, 结合笔者近 40 年临床经验, 和国内有关专家指导下制定的方剂。丹参味苦性凉入心、肝二经, 活血化瘀、宁心安神、止痛; 川芎活血行气, 祛风止痛; 赤芍凉血活血、散瘀止痛; 红花活血通经、祛瘀止痛; 白芍柔肝止痛、养血敛阴、平抑肝阳; 葛根解肌升阳、生津止渴。

中医治疗应强调辨证论治, 但要结合美国目前实际情况, 中医中药在美国临床应用仅仅是个开始。因地制宜提出合理的治疗方案, 利于在美国进一步推广中医中药。从我们临床实践经验和办学经验来看, 我们既要强调中医中药的理论基础, 辨证论治, 又要强调中医中药的科学性、有效性、广泛性、实用性与大众性。并且逐步创造条件, 改造剂型, 提高疗效, 为美国广大医务人员所认识和理解, 为美国的广大患者所接受。真正做到中西医结合, 创造新医学, 真正做到中医中药为全中国人民和全世界人民的健康服务。