

· 实验研究 ·

中药天癸方对雄激素致不孕大鼠血 leptin 及垂体促性腺激素的影响*

孙 斐 俞 瑾

内容提要 目的:探讨中药天癸方对雄激素致不孕大鼠(ASR)肥胖及生殖功能的影响。方法:运用放射免疫法测定天癸方治疗前后血 leptin、促卵泡激素(FSH)、促黄体生成素(LH)的变化;同时对 ASR 能量状态指标(每日进食量、腹膜后脂肪垫、体重)进行评估。结果:ASR 呈高代谢、能量失衡肥胖状态,其血 leptin 水平明显增加($P < 0.01$),FSH、LH 明显低下($P < 0.01$)。leptin 与体重呈正相关($r = 0.8977, P < 0.001$),与 FSH、LH 呈负相关($r = -0.7517, P < 0.001; r = -0.8444, P < 0.001$)。中药治疗后各内分泌指标均恢复正常。结论:ASR 有肥胖及低促性腺激素性腺功能低下无排卵的特点。天癸方同时有减肥及促排卵作用。

关键词 中药 雄激素致不孕大鼠 leptin 垂体促性腺激素

Effect of Tiangui Recipe on Serum Leptin and Pituitary Gonadotropin in Androgen-Sterilized Rats Sun Fei, Yu Jin *Obstetric and Gynecologic Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200011)*

Objective: To explore the effect of Tiangui Recipe (TGR) on obesity and reproductive function in androgen-sterilized rats (ASR). **Methods:** ASR model was established by subcutaneous injection of testosterone propionate to SD female rats of 9 days age. Change of serum leptin, follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) in model rats of 115 days old before and after feeding TGR was measured by radioimmunoassay (RIA). Meanwhile, criteria of energy state, including diurnal food intake, retroperitoneal fat depot weight and body weight, were measured and evaluated. **Results:** ASR had the characteristics of high metabolic rate, energy imbalance and obesity. Serum level of leptin increased and FSH, LH decreased significantly ($P < 0.01$) in model rats as compared with the normal rats. Significant positive correlation between leptin level and body weight ($r = 0.8977, P < 0.001$) was observed, and negative correlation was seen between FSH, LH and leptin ($r = -0.7517, P < 0.001; r = -0.8444, P < 0.001$, respectively). The endocrinous changes of ASR all returned to normal range after the TGR treatment. **Conclusion:** Obesity and concerned hypogonadotropic hypogonadal anovulation were expressed in ASR. TGR may play an important role in reducing weight and inducing ovulation.

Key words Tiangui Recipe, androgen-sterilized rat, leptin, pituitary gonadotropin

充足的营养和一定的能量贮备和脂肪量才能启动和维持动物和人的生殖功能^[1]。能量摄入与消耗处于不平衡状态,如过度消瘦或肥胖均会影响生殖功能。遗传性肥胖小鼠模型(ob/ob 鼠)表现为肥胖、中枢性卵巢功能低下、不育、高胰岛素和胰岛素拮抗等现象^[2],与新近发现的肥胖基因编码的产物 leptin(瘦素,

有译作苗条因子)原发性缺乏有关^[3]。国内学者俞瑾等^[4]采用 9 日龄 SD 雌性大鼠成功地诱发出雄激素致不孕大鼠(androgen-sterilized rats, ASR),并对其进行了大量的研究,发现 ASR 具有许多类似 ob/ob 小鼠的症状,如高胰岛素高雄激素血症、无排卵、不育、性腺功能低下^[5,6],补肾中药可逆转这些现象。张月萍等^[6]于 1993 年注意到 ASR 有肥胖的特点,但未对其及其与生殖功能的关系深入研究。本实验运用 ASR 模型研究体内脂肪贮积的信号 leptin 的变化,及与垂体功能的关系及中药的调整作用,为中药调节代谢与生殖的关系提供依据。

*上海市医学领先专业重点学科中西医结合妇科资助项目(No. 96001)

上海医科大学妇产科医院(上海 200011)

材料与方法

1 药物 天癸方由生地、桃仁、仙灵脾、补骨脂、女贞子等组成,上海医科大学药学院生药教研室提取水溶性部分,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 体重给药约 1ml。

2 ASR 病理模型建立与分组 按俞瑾、魏美娟等实验方法^[4,7]。取 9 日龄 SD 雌性大鼠 45 只,分 3 组,每组 15 只。正常对照组(C 组);ASR 组(A 组);ASR 予以中药组(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 (相当于 0.05ml);C 组则每只注射中性茶油 0.05ml。3 组均于 21 日断乳,25℃ 恒温(50% 湿度)清洁级饲养,不加饲维生素类制品。12h 光照(6:00~18:00)和 12h 黑暗(18:00~6:00)周期交替进行。饲料和水充足供给。70 日龄起每天阴道涂片,连续 11 天,阴道角化细胞持续出现作为 ASR 模型。81 日龄起,A+H 组灌服补肾中药天癸方(1mg/100g 体重),C 组及 A 组灌服等量蒸馏水,每天 9:00 灌 1 次,连续 21 天,同时于 70~100 日龄每天记录进食量(以消耗同样饲料的多少为准)。101~114 日龄每天阴道涂片检查排卵(以性周期规则出现为准,天癸方促排卵成功率达 78.4%)。115 日龄起,大鼠不禁食,在 9:00~10:00,腹腔注入 4% 水合氯醛麻醉,抽取下腔静脉血,离心后取血清保存于 -20℃ 待放射免疫测定(RIA)leptin、垂体促性腺激素(gonadotropin, GTH),包括促卵泡激素(FSH)、促黄体生成素(LH)。分离腹膜后脂肪垫(retroperitoneal fat pads, RFPF)并精确称重。

3 精确测定大鼠每日进食量、RFPF 重量及体重(处死前)。

4 RIA 测定 大鼠 leptin RIA 药盒购自美国 Linco Research Inc.。由上海医科大学妇产科研究所内分泌研究室按统一操作规程测定(双抗体、双管法),批间及批内变异 < 5%。特异性大鼠 FSH(rFSH)、大鼠 LH(rLH)抗原、抗体、参照物均由美国 National Institute of Diabetes, Digestive & Kidney 和美国 National Hormone & Pituitary Program 的 Parlow 博士惠赠。FSH、LH 放射性¹²⁵I 标记采用氯胺-T 法。碘标及 RIA 均在上海计划生育研究所避孕药具国家重点实验室完成,批内变异分别 < 8%, 7%。

5 统计方法 用 SAS 6.12(98 年版)统计软件包(SAS Package)对数据进行 ANOVA 方差分析,分别采用 Dunnett T-Test 和 Student-Newman-Keuls (snk) 进行检验。相关检验采用 Pearson 相关系数(r)分析。

结 果

1 各组大鼠能量状态评价指标比较 见表 1。动态观察 A 组发现其摄食量比正常组明显增加($P < 0.01$),其腹膜后脂肪沉积增多,体重明显上升($P < 0.01$),同时表现为持续不排卵和卵巢黄体减少^[5]。给予补肾中药天癸方后(A+H 组),其摄食量、体内脂肪贮积明显下降,体重恢复正常($P > 0.05$),阴道细胞呈周期性变化,排卵功能恢复。

2 各组血 leptin、FSH、LH 水平变化及相关性 A 组血 leptin 水平明显高于正常组(不表现 leptin 缺乏),GTH 明显降低。中药治疗后,leptin 浓度下降,GTH 升高至正常,促使卵泡发育及排卵功能恢复。且 leptin 与体重呈明显正相关($r = 0.8977, P < 0.001$),与 FSH、LH 之间呈负相关($r = -0.7517, P < 0.001$; $r = -0.8444, P < 0.001$)。见表 2。

表 1 各组大鼠能量状态评价指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	摄食量(g/d)	RFPF 重量(g)	体重(g)
C	15	26.5 ± 1.2	9.6 ± 0.7	209.5 ± 12.4
A	15	46.3 ± 1.4*	17.9 ± 1.2*	243.9 ± 8.3*
A+H	15	28.1 ± 1.9**	10.2 ± 1.2**	207.4 ± 14.3**

注:与 C 组比较,* $P < 0.01$, ** $P > 0.05$

表 2 各组大鼠血清 leptin、FSH、LH 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	leptin	FSH	LH
		($\times 10^3$, ng/L)	($\times 10^4$, ng/L)	($\times 10^4$, ng/L)
C	15	1.19 ± 0.24	1.15 ± 0.14	8.28 ± 0.88
A	15	2.79 ± 0.16*	0.25 ± 0.07*	1.17 ± 0.59*
A+H	15	0.91 ± 0.29**	1.07 ± 0.03**	8.05 ± 0.91**

注:与 C 组比较,* $P < 0.001$, ** $P > 0.05$

讨 论

1 ASR 肥胖与无排卵的关系 本研究发现 ASR 较正常大鼠有高代谢、能量不平衡导致肥胖的特点,其明显的体重上升伴脂肪组织分泌的肥胖基因产物 leptin 升高,且有极显著相关性。leptin 作为一种脂肪贮积的分子信号协调性调节摄食行为(降低食欲)、代谢和能量平衡(增加能量消耗),对控制体内脂肪积聚有重要作用^[2]。本研究肥胖大鼠 leptin 明显增高说明可能存在着外周或中枢 leptin 拮抗现象。同时 leptin 与生殖功能亦有密切联系。它能逆转 ob/ob 小鼠不育现象^[8];并能启动正常雌性小鼠青春期出现^[9]。本研究 ASR 血 leptin 与垂体 GTH 有明显的负相关关系,提示异常水平的 leptin 可能直接作用于垂体抑制 GTH 的分泌。这与 Yu 等^[10]研究不同浓度的 leptin 对大鼠 GTH 释放实验中观察到低浓度或生理剂量 leptin 可促进 LH 分泌,而高浓度则抑制其分泌的现象

相一致。有作者认为⁽¹¹⁾ leptin 与下丘脑神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 的功能有关, ob/ob 小鼠 NPY 增加而促性腺激素释放激素(GnRH)分泌下降, 从而 LH/FSH 分泌下降。leptin 与 FSH/LH 的关系是通过 NPY 的作用抑或是直接通过垂体上受体发挥作用尚待进一步研究。Leptin 可能作为一种能量代谢失衡的信号“通知”中枢神经系统对生殖功能进行调节。

2 天癸方的减肥及促排卵效应 俞瑾根据中医“肾主生殖”的理论结合多年临床经验研制成天癸方, 已在临床和动物模型中取得良好的促排卵效果, 同时也注意到该方对多囊卵巢患者和 ASR 有减肥效应⁽⁵⁾。本研究对 ASR 用该方后, 其体重下降、脂肪贮积指标 leptin 下降、生殖功能恢复、排卵出现。说明天癸方可能在中枢(下丘脑—垂体)和外周(脂肪组织、卵巢)水平协调发挥作用, 调整能量失衡(leptin 变化)和低 GTH 性腺功能低下(低 FSH/LH)至正常水平; 同时也说明肥胖与不育某种程度上紧密相关, 补肾中药对 ASR 治疗可同时调节中枢及外周(代谢—生殖轴)功能, 进一步体现中医的整体观, 为肥胖及肥胖性不育的治疗提供科学依据; 也表明 ASR 为深入研究肥胖性不育的发病机理及探讨天癸方的治疗作用、药物生产提供一个较理想的模型。

参 考 文 献

1. Stewart D. Reproductive functions in eating disorders. *Ann Med* 1992;24:287—291.

2. White BD, Martin RJ. Evidence for a central mechanism of obesity in the Zucker rat: role of neuropeptide Y and leptin. *Proc Soc Exp Bio Med* 1997;214:222—232.
3. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425—432.
4. 俞瑾, 杨淑萍, 张月萍, 等. 雄激素致高胰岛素高雄激素无排卵大鼠模型. *生殖医学杂志* 1993;2(4):251—259.
5. 张月萍, 俞瑾, 归绥琪. 雄激素致不孕大鼠发病机制及滋肾阴药对其促排卵作用. *中华内分泌代谢杂志* 1994;10(2):98—101.
6. 归绥琪, 俞瑾, 魏美娟, 等. 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. *中国中西医结合杂志* 1997;17(12):735—738.
7. 魏美娟, 俞瑾. 补肾中药对大鼠多囊卵巢的形态学变化观察. *中西医结合杂志* 1989;9(2):70—74.
8. Chehab FF, Lim M, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996;12:318.
9. Chehab FF, Mounzih K, Lu R, et al. Early onset of reproductive function in normal female mice treatment with leptin. *Science* 1997;275:88.
10. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, et al. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1023—1028.
11. Aubert ML, Pierroz DD, Gruaz NM, et al. Metabolic control of sexual function and growth: role of neuropeptide Y and leptin. *Mol Cell Endocrinol* 1998;140:107—113.

(收稿:1998-12-29 修回:1999-03-10)

全国中西医结合肿瘤防治学术交流征文通知

为了及时总结与交流全国肿瘤防治经验, 促进肿瘤防治技术水平的不断提高与发展, 中国中西医结合学会与江苏省中西医结合学会拟定于 1999 年 9 月在江苏省苏州市联合召开全国中西医结合学会肿瘤防治学术研讨会。现将征文有关事项通知如下。

1 征文内容 有关中医、中西医结合诊治肿瘤的临床经验(包括单方、验方、针灸、气功、外治与民间疗法等)、实验研究、预防研究; 诊治肿瘤各种新技术、新方法的临床运用; 肿瘤患者的康复与护理经验以及文献综述等, 均属应征范围。

2 征文要求 论文请用方格稿纸书写清楚, 要求 3000 字以内的全文及 800 字摘要各一份, 写明姓名、单位、邮政编码以及详细通讯地址, 信封上注明“全国肿瘤会议稿件”, 自留底稿。征文截稿日期:1999 年 7 月 15 日。投稿地址:南京市汉中路 282 号江苏省中西医结合学会杨春山收。邮编:210029。电话:(025)6617284。

3 会议的具体时间、地点另行通知。会议期间邀请著名肿瘤病专家、教授进行专题学术讲座。

石家庄针灸推拿医师学校招生

石家庄针灸推拿医师学校以全国统编医学大专教材中的中医基础理论和针灸、推拿(含足疗)等为课程, 采取理论与实践、面授与函授等方式相结合, 高质量地培养实用型针灸推拿医师。面向全国招生, 每年 11 月 1 日、3 月 1 日、7 月 1 日开学, 学期 4 个月(另加实习 2 个月, 费用另收), 学杂费 816 元(含住宿费, 不含卧具、饮食及书费)、函授 452 元(含书费, 但不含来校辅导 12 天的学费及住宿费 60 元, 随时办理)。自学成才而要求证书者的考核及其重点补习者, 学费 363 元。所有学员经考核成绩及格者, 颁发石家庄市教委的《学业证书》和石家庄市卫生局的医师上岗资格证书(另可办理石家庄市卫生局的医师职称证书)。请持(邮)身份证复印件、两张 2 寸半身免冠近照、报名费 5 元, 向石家庄市翟营大街 281 号本校报到(从火车站乘 12 路、16 路、27 路汽车, 钢厂医院下车往北走 100 米路东)。联系人:张兆菊, 邮政编码:050031, 电话:0311—5651460。