补肾调经方、逍遥丸对雄激素致排卵障碍模型大鼠腺垂体、卵巢影响的比较研究

徐丁洁[1] 洪丽文[2] 徐 洪[3] 杨宏敏[2] 刘曼芳[2] 杜惠兰[2]

摘要 **目的** 观察补肾调经方、逍遥丸对雄激素致排卵障碍模型大鼠(ASR)腺垂体、卵巢形态及其分泌性激素的影响。**方法** 60只9日龄SD雌性大鼠随机选取10只为正常组,余50只皮下注射丙酸睾丸酮建立ASR模型,选取30只造模成功者,随机分为模型组、补肾调经方组(灌服补肾调经方混悬液)、逍遥丸组(灌服逍遥丸混悬液),每组10只,给药5周,择动情前期,断头法取血,放射免疫分析法检测血清雌二醇(E_2)、孕酮(P)、睾酮(T)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH);HE染色后观察腺垂体、卵巢形态。**结果** 与正常组比较,模型组血清E_2、T升高,FSH、LH降低(均$P<0.01$);腺垂体、卵巢形态异常。与模型组比较,补肾调经方组和逍遥丸组E_2、T降低,FSH、LH升高($P<0.05$,$P<0.01$),且补肾调经方组E_2、T,逍遥丸组FSH恢复正常(均$P>0.05$);两组受损的腺垂体、卵巢结构均得到不同程度修复。**结论** 补肾调经方及逍遥丸可改善排卵障碍性疾病。

关键词 补肾调经方;逍遥丸;雄激素致排卵障碍模型大鼠;腺垂体;卵巢

Effect of Bushen Tiaojing Recipe and Xiaoyao Pill on Adenohypophysis and Ovary in Androgen-induced Sterile Rats: a Comparative Study

XU Ding-jie[1], HONG Li-wen[2], XU Hong[3], YANG Hong-min[2], LIU Man-fang[2], and DU Hui-lan[2] *1 College of Traditional Chinese Medicine, Hebei United University, Hebei (063000), China; 2 Department of Integrative Medical Gynecology, Heibei Medical University, Shijiazhuang (050091), China; 3 Experimental Research Center, Hebei United University, Hebei (063000), China*

ABSTRACT Objective To observe the effect of Bushen Tiaojing Recipe (BTR) and Xiaoyao Pill (XYP) on the morphology and sex hormones secretion of adenohypophysis and ovaries in androgen-induced sterile rats (ASR). Methods Fifty 9-day old SD female rats randomly recruited from total 60 rats were subcutaneously injected with testosterone propionate to establish the ASR model. And the rest 10 rats were recruited as the normal group. Thirty successfully modeled rats were recruited and randomly divided into the model group, the BTR group (administered with BTR suspension), and the XYP group (administered with XYP suspension), 10 in each group. Five weeks later, rats were decapitated in the preoestrus. Serum levels of estradiol (E_2), progesterone (P), testosterone (T), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH) were detected by radioimmunoassay. The morphologies of adenohypophysis and ovary were observed after HE staining. Results Compared with the normal group, serum E_2 and T levels increased, while FSH and LH levels decreased in the model group (all $P<0.01$). The morphology of adenohypophysis and ovary was abnormal in the model group. Compared with the model group, serum E_2 and T levels decreased, while FSH and LH levels increased in the BTR group and the XYP group ($P<0.05$, $P<0.01$). Besides, E_2 and T levels in the BTR group and FSH levels in the XYP group restored to normal (all $P>0.05$). The damaged structure of adenohypophysis and ovary got restored to different degrees. Conclusion BTR and XYP both could improve ovulation failure.

KEYWORDS Bushen Tiaojing Recipe; Xiaoyao Pill; androgen-induced sterile rat; adenohypophysis; ovary

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30772818)

作者单位:1.河北联合大学中医学院(石家庄 063000);2.河北医科大学中西医结合妇科教研室(石家庄 050091);3.河北联合大学医学实验研究中心(石家庄 063000)

通讯作者:杜惠兰,Tel:0311-86265042,E-mail:duhuilan@163.com

DOI:10.7661/CJIM.2014.01.0087

排卵障碍是不孕症、闭经、功血、多囊卵巢综合征等多种妇科疾病共同的病理现象,其主要原因是由于下丘脑—垂体—卵巢轴(hypothalamic-pituitary-ovarian axis, HPOA)功能性或器质性病变。《傅青主女科》云"经水出诸肾"。肾藏精,为生殖之本。肾气旺,肾精充,任通冲盛,则经调子嗣。"女子以肝为先天",以血为本,经、孕、产、乳数伤于血,而肝藏血,主疏泄,若肝血不足,冲任血海亏虚,或肝失疏泄,冲任失调,均可致月经失调或不孕等。故肾、肝在维持女性正常生理功能方面具有重要作用。临床上运用补肾法、疏肝法治疗月经病、不孕症等疗效显著[1,2]。补肾调经方作为补肾法的代表方剂,具有补肾填精、养血活血的功能,逍遥丸作为疏肝法的代表方剂,具有疏肝理气、养血调经的功能。本实验运用雄激素致无排卵模型大鼠(androgen-induced sterile rats, ASR),探讨两方对 ASR 腺垂体及卵巢的影响,比较两方治疗雄激素致排卵障碍性疾病作用机制的异同。

材料与方法

1　动物　9 日龄同批出生 SD 雌性大鼠 60 只,体重约 15 g。均由河北医科大学实验动物中心提供,清洁级。合格证号:810164(鄂医动字)19－020。

2　药物　丙酸睾丸酮注射液:天津金耀氨基酸有限公司生产,合格证号:0203232。补肾调经方(熟地黄 12 g　当归 9 g　山药 12 g　山萸肉 9 g　枸杞子 12 g　女贞子 12 g　淫羊藿 9 g　紫河车 3 g　覆盆子 9 g　菟丝子 9 g　香附 6 g　红花 6 g　白芍 9 g)一次性购自石家庄乐仁堂药业。将当归、红花、川芎、香附提取挥发油后,加 8 倍量水与其他药物共同浸泡 40 min,煮沸后文火煎煮 60 min,滤出药液;药渣加适量水继续煎煮 40 min,合并两次滤液,水浴浓缩,与挥发油混和均匀,置于 4 ℃冰箱中保存。逍遥丸购自广西梧州三鹤药业有限公司,批号 Z45022232,规格为每丸重 9 g。将 200 丸(每 8 丸相当于生药 3 g)逍遥丸溶于 125 mL 蒸馏水中制成混悬液,置于 4 ℃冰箱中保存。

3　主要试剂及仪器　E_2(批号:RG60905)、P(批号:RG50905)、T(批号:RG40905)、FSH(批号:RG10905)、LH(批号:RG20905)放射免疫试剂盒均购自天津九鼎医学生物工程有限公司。分光光度计购于上海紫外可见分光光度计,型号为 756C;切片机购于莱卡上海分公司,型号为 LEICARM2245;普通光学显微镜购于日本 Olympus 公司。

4　造模方法及分组　参照文献[3],将 60 只 9 日龄同批出生 SD 雌性大鼠,随机选取 10 只为正常组,余 50 只大鼠于颈背部皮下一次性注射丙酸睾丸酮(1.25 mg/只),正常组注射同等量中性茶油。第 22 日龄断奶,自由进食,25 ℃ 恒温(50%湿度)清洁级饲养,12 h 光照(6:00～18:00)和 12 h 黑暗周期交替进行。第 70 日龄于阴道处开口,连续阴道上皮细胞涂片后观察,若上皮细胞持续角化,提示造模成功。选取 30 只造模成功的大鼠,分为模型组、补肾调经方组和逍遥丸组,每组各 10 只。补肾调经方组:每日灌服补肾调经方 5 mL,每毫升药液含生药 5.3 g,相当于临床剂量的 20 倍;逍遥丸组:每日灌服逍遥丸 5 mL,每毫升混悬液含生药 0.6 g,相当于临床剂量的 20 倍;正常组和模型组灌服等剂量蒸馏水,每日 1 次,连续灌胃 5 周。

5　观察指标及检测方法

5.1　阴道上皮细胞观察　每天上、下午各做阴道涂片 1 次,处死前 2 天,每隔 2 h 涂片 1 次以确定动情周期,以 0.5% 的碱性美蓝溶液染色 10 min,自来水轻轻洗去多余的染色液,待干,用普通光学显微镜观察。

5.2　生殖激素检测及腺垂体、卵巢形态观察　最后一次给药后禁食 8 h,择动情前期,断头法取血,制备血清,放射免疫分析法检测血清雌二醇(E_2)、孕酮(P)、睾酮(T)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)。在冰盘上取下部分腺垂体、卵巢,分别置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,切片,HE 染色,观察腺垂体、卵巢形态。

6　统计学方法　采用 SPSS16.0 软件进行统计处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,均数间两两比较采用 *SNK* 法 *Q* 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1　各组大鼠一般状况比较　实验过程中,正常组和两治疗组大鼠发育良好,毛色白而光泽,精神状况佳,活泼,反应灵敏,体重增加。模型组精神状况欠佳,活动少,反应迟钝,体重增加明显。

2　各组大鼠动情周期的变化比较　正常组大鼠阴道细胞呈典型的周期性变化,即动情前期、动情期、动情后期、动情间期;模型组大鼠阴道上皮细胞呈持续角化。两治疗组部分大鼠阴道上皮细胞呈周期性变化。

3　各组大鼠血清生殖激素比较(表 1)　与正常组比较,模型组血清 E_2、T 水平升高,FSH、LH 降低(均 $P<0.01$)。与模型组比较,补肾调经方组 E_2、T 水

表 1 各组大鼠血清生殖激素比较 （$\bar{x} \pm s$）

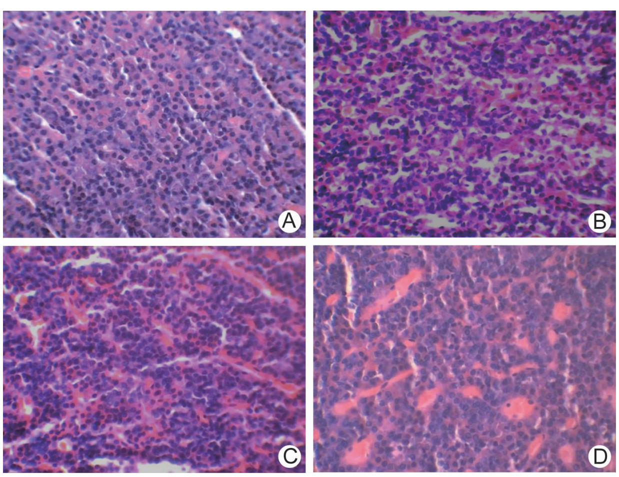
组别	n	E_2(pmol/L)	P(nmol/L)	T(nmol/dL)	FSH(U/L)	LH(U/L)
正常	10	30.55 ± 5.43	3.21 ± 1.28	2.78 ± 0.49	4.98 ± 0.92	6.83 ± 1.69
模型	10	46.38 ± 8.21 *	4.71 ± 1.82	4.86 ± 0.94 *	3.12 ± 0.73 *	3.07 ± 0.81 *
补肾调经方	10	35.56 ± 7.16 △△	4.09 ± 1.70	3.18 ± 0.68 △△	4.02 ± 0.81 △	4.32 ± 0.72 △
逍遥丸	10	38.96 ± 7.95 △	4.53 ± 1.73	3.91 ± 0.72 △△○	4.39 ± 0.83 △△	5.57 ± 1.38 △△○

注：与正常组比较，* $P<0.01$；与模型组比较，△ $P<0.05$，△△ $P<0.01$；与补肾调经方组比较，○ $P<0.05$

平降低（均$P<0.01$），FSH、LH 升高（均$P<0.05$）；与模型组比较，逍遥丸组 E_2、T 水平降低（$P<0.05$，$P<0.01$），FSH、LH 升高（均$P<0.01$）。逍遥丸组 T、LH 水平高于补肾调经方组（均$P<0.05$）。血清 P 各组之间比较差异均无统计学意义（均$P>0.05$）。

4 各组大鼠腺垂体及卵巢形态观察

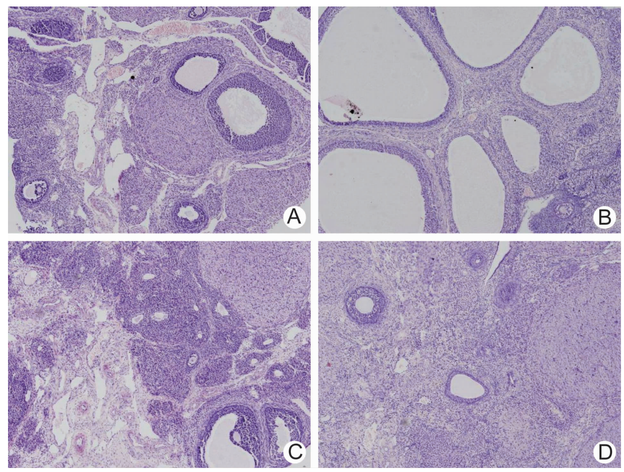
4.1 腺垂体形态观察（图 1） 正常组腺垂体组织内结构清晰，血窦丰富，腺细胞密集，胞浆丰满，着色均匀。模型组腺垂体结构稀疏，腺细胞数目减少，细胞体积变小，胞浆着色不均。与模型组比较，补肾调经方组腺垂体细胞数目增多，细胞体积增大，胞浆着色均匀，血窦增多。逍遥丸组腺垂体明显增多，结构清晰，细胞体积明显增大，血窦数目增多，腺细胞密集，胞浆饱满。



注：A 为正常组；B 为模型组；C 为补肾调经方组；D 为逍遥丸组

图 1 各组大鼠腺垂体形态观察 （HE，×400）

4.2 卵巢形态观察（图 2） 正常组卵巢内见多个黄体及不同发育阶段的卵泡，动情前期有成熟卵泡，颗粒细胞（granulosa cells，GC）呈多层，形态完整，排列整齐，间质正常。模型组卵泡膜细胞层增厚，闭锁卵泡数目增多，成大空泡排列，GC 层数减少，仅为数层，排列稀疏、染色加深，未见成熟卵泡和偏大卵泡，未见黄体。与模型组比较，补肾调经方组卵泡膜细胞层变薄，GC 层明显增多，形态完整，排列整齐，黄体数量增多，动情前期见成熟卵泡。逍遥丸组卵泡膜细胞层变薄，GC 层数增多，可见黄体组织，动情前期未见偏大卵泡。



注：A 为正常组；B 为模型组；C 为补肾调经方组；D 为逍遥丸组

图 2 各组大鼠卵巢形态观察 （HE，×200）

讨　论

正常性成熟期妇女是以卵巢周期性排卵和性甾体激素的周期性分泌为特征。女性生殖功能的内分泌调节以 HPOA 为中心，下丘脑以脉冲形式释放促性腺激素释放激素（GnRH），通过垂体门脉系统到达腺垂体，控制 LH、FSH 的合成和释放，后者经血循环到达卵巢，能刺激成熟卵泡排卵，促使排卵后的卵泡变成黄体，并产生 E_2 和 P，调节卵巢的生理功能。卵巢分泌的 E_2、P，受下丘脑分泌 GnRH 及腺垂体分泌的 LH 和 FSH 规律性调节，随月经周期而变化，并反馈调节 GnRH 和 LH、FSH 的分泌，这就是 HPOA，该轴在人体和哺乳动物的生长、发育、生殖中起重要作用[4]。正常育龄女性 HPOA 处于协调的动态平衡中，该轴任何一靶器官出现器质或者功能异常均可影女性正常生理功能，引发月经不调、不孕等[5]。

肾藏精，主生殖。“经水出诸肾”（《傅青主女

科》)。肾气旺盛,肾精充实,气血调和,任通冲盛,则经调子嗣。若"肾水既乏,则经水日以干涸"(《女科经纶》)。因此,补肾调经是妇科常用的治法[6],课题组以补肾化瘀,养血调经立法,组方补肾调经方治疗无排卵性疾病,临床疗效显著[7]。该方由养精种玉汤合五子衍宗丸加减化裁而成,方中熟地黄补血滋阴、益精填髓为君药;山萸肉、山药、枸杞子、女贞子、肉苁蓉滋肾添精;淫羊藿、紫河车、覆盆子、菟丝子补肾助阳,共为臣药。当归、白芍、丹参养血活血,滋阴柔肝,香附行气开郁,助血运行,共为佐药。纵观全方,共奏滋肾阴、温肾阳、填精血、调冲任之功。

另一方面,女子以血为本,经、孕、产、乳数伤于血。而肝主藏血,司血海,主疏泄。若肝血不足,肝失疏泄,则冲任失调为患,叶天士在《临证指南医案》中提出"女子以肝为先天"。诸多先贤论述,强调了肝在女性生殖功能方面的重要作用。《素问病机气宜保命集 · 妇人胎产论》"妇人……天癸既行,皆从厥阴论之",指出在生育年龄阶段患病,多从肝调治。逍遥丸中柴胡为君药,疏肝解郁;当归、白芍相得益彰,养血调经,调补冲任而为臣药。白术、茯苓健脾益气,以增加当归和芍药的养血之功,共为佐药。柴胡为肝经引经药,甘草调和药性,纵观此方,疏肝解郁,养血活血,气血调和,冲任二脉调畅,达到经调子嗣、治疗排卵障碍疾病的效果[8]。

基于上述认识,本实验围绕 HPOA,通过探讨补肾调经方、逍遥丸对 ASR 腺垂体、卵巢形态及其分泌的性激素的影响,比较两方治疗雄激素致排卵障碍性疾病机制的异同。

本实验结果显示,幼龄雌性给予外源性雄激素后,改变了 HPOA,使垂体分泌 LH 量不足,另外,卵巢颗粒细胞微环境由于雄激素增加,损害卵母细胞和颗粒细胞,促使卵泡闭锁,产生更多雄激素。高水平雄激素是卵泡闭锁的指示剂,高雄激素性微环境加上 LH 不足,抑制了卵泡发育和排卵,导致了无排卵的发生[3]。故模型组动物表现为血清 E_2、T 升高,FSH、LH 降低。

经中药治疗后,补肾调经方组 E_2、T 降低,FSH、LH 升高,且 E_2、T 恢复至正常水平。逍遥丸组 E_2、T 降低,FSH、LH 升高,且 FSH 恢复至正常水平。在降低 T 水平方面,补肾调经方优于逍遥丸;在升高 LH 水平方面,逍遥丸优于补肾调经方。形态学显示,模型组动物腺垂体结构极度稀疏,腺细胞数目明显减少,细胞体积明显变小,胞浆着色不均。卵巢内闭锁卵泡数目增多,成大空泡状,未见黄体及偏大卵泡。补肾调经方组和逍遥丸组动物腺垂体细胞数目增多,细胞体积增大,胞浆着色均匀,血窦增多;卵巢颗粒层明显增厚,见发育期的卵泡,并有黄体形成。

补肾调经方、逍遥丸通过改善腺垂体、卵巢形态,调节生殖内分泌激素水平,平衡 HPOA,促进卵泡发育和成熟、促进排卵。现代药理亦显示,补肾调经中药及逍遥丸均有具有类似性激素样作用,改善微循环[9],促使卵巢的内分泌功能得到调节和改善,有助于卵子排出[10,11]。肯定了两方在治疗排卵障碍疾病方面的治疗效果。另外,本实验显示,补肾调经方侧重调节卵巢分泌生殖激素,逍遥丸优于改善垂体分泌生殖激素。补肾调经方重在补肾益精,侧重于"补";而逍遥丸重在疏肝理气,侧重于"调"。

参　考　文　献

[1] 杨艳环.赵瑞华治疗不孕症的经验[J].中华中医药杂志, 2011, 26(7): 1528-1530.

[2] 宋燕,黄建玲.李丽芸治疗不孕症经验[J].中医杂志, 2011, 52(12): 1007-1007.

[3] 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[J].生殖医学杂志,1993, 2(4): 215-219.

[4] Metcalfe AD, Hunter HR, Bloor DJ, et al. Expression of 11 members of the Bcl-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryo development and fragmentation [J]. Mol Reprod Dev, 2004, 68(1): 35-50.

[5] Shi Y, Chen J, Weng C, et al. Identification of the protein-protein contract site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305(4): 989-996.

[6] 于桂艳,刘宇新.补肾法治疗月经后期临床体会[J].辽宁中医药大学学报, 2011, 13(6): 237-239.

[7] 常秀峰,高星,张敏,等.补肾调经方在体外受精-胚胎移植助孕中的应用[J].中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1123-1125.

[8] 张晓丹,徐继辉.疏肝解郁法治疗功能性月经过少机理探析[J].辽宁中医杂志, 2010, 37(1): 60-61.

[9] 陆君.补肾法、疏肝法对排卵障碍模型大鼠卵巢血液供应的比较研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.

[10] 倪张俊.雷公藤致大鼠药源性卵巢功能耗损模型建构与补肾法干预研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.

[11] 梁莹,赵胜男,常秀峰,等.逍遥丸对人卵巢壁颗粒细胞 ALK5/Smads 通路的影响[J].中医杂志, 2013, 54(9): 754-757.

(收稿:2012-08-20　修回:2013-9-24)