

右归丸对雄激素致排卵障碍型不孕大鼠血清 E₂、T 和 IGF-1 水平影响研究

方云芸¹ 黄金珠² 马洁² 傅春华¹

(1 成都中医药大学中医临床学院中医妇科学专业, 成都中医药大学十二桥校区研究生一公寓 211 室, 610000; 2 成都中医药大学科技处)

摘要 目的: 右归丸对雄激素致排卵障碍性不孕大鼠血清中 E₂、T 和 IGF-1 水平的影响, 以进一步探讨右归丸治疗不孕症的作用机理。方法: 将 43 只 9 日龄 SD 雌性大鼠随机分为空白对照组、模型组、右归丸组、克罗米芬组。于颈背下注射丙酸睾丸酮建立 ASR 大鼠模型, 第 80 天开始灌服右归丸制剂, 5 周后股动脉取血, 并取出新鲜卵巢组织, 观察卵巢形态学, 用放射法检测血清中 E₂ 和 T 水平, 用酶联免疫法检测血清中 IGF-1 水平。结果: 右归丸能够促进卵泡生长发育及排出, 并有黄体生成, 降低病理性囊性卵泡数。右归丸能够增加血清中 E₂ 含量 ($P < 0.05$), 降低血清中 T 的含量 ($P < 0.05$), 右归丸有降低 IGF-1 趋势。结论: 右归丸有可能通过降低 IGF-1 和 T, 促进 T 转化为 E₂ 这一途径, 从而促进卵泡生长发育及排出。

关键词 右归丸; 雄激素; E₂; T; IGF-1

Effect of You Gui Pills on E₂, T, IGF-1 Levels of Rats with Androgen Induced Anovulation with Infertility

Fang Yunyun¹, Huang Jinzhu², Ma Jie², et al.

(1. Faculty of TCM Gynecology, College of TCM Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Add.: Room 2111, No. 1 Graduates' dorm, Shierqiao Campus, CUTCM, Post code: 610000; 2. Section of Sci-tech, CUTCM)

Abstract Objective: To study effect of You Gui Pills on E₂, T, IGF-1 levels of rats with androgen induced anovulation with infertility so as to investigate its act mechanism for treatment of infertility. **Methods:** Nine day-old SD female rats (n=43) were randomly divided to control group, model group, You Gui group and Clomiphene group, then established ASR model by neck injecting Andronate, followed by respective treatments according to groups on day 80. Five weeks later, blood collected from femoral artery was detected for E₂, T levels with radioimmunoassay, IGF-1 level with ELISA, and observe ovary morpha. **Results:** You Gui Pills induced development and discharge of ovarian follicle, production of corpus luteum, reduce number of pathological cystic follicles. Besides, it also raised E₂ level ($P < 0.05$), reduced T level ($P < 0.05$) and had a tendency to decrease IGF-1. **Conclusion:** You Gui Pills may promote development and discharge of ovarian follicle by way of reducing IGF-1 and T, transforming T to E₂.

Key Words You Gui Pills; Androgen; E₂, T, IGF-1

雄激素致排卵障碍性不孕大鼠 (Androgen-induced Sterile Rats, ASR) 是 Barraclough^[1] 于 1961 年首次诱发成功的, 但未进行深入研究。近年, 俞瑾等^[2-3] 采用第 9 日龄 SD 雌性大鼠成功的诱发出 ASR 模型, ASR 不孕大鼠模型的发病原因是由于外源性雄激素影响肾上腺功能, 产生类似肾上腺皮质增生的雄激素 T、DHA 增多, 后来发现 ASR 具有高雄激素血症、无排卵性不孕及胰岛素拮抗等表现。目前现代医学治疗排卵障碍型不孕首选药物为克罗米芬, 但因其抗雌激素作用, 影响受精和着床, 常常出现“高排低孕”现象, 且易产生过度卵巢刺激综合征和多胎等并发症^[4]。中医以肾主生殖为理论依据, 用补肾中药治疗排卵障碍型不孕效果显著, 具有一定的优势。古方右归丸是温补肾阳经典方, 出自《景岳全书》, 功效补肾助阳、填充精血, 临床上常用于治疗月经后期或伴量少、闭经、不孕症等多种病症, 中医辨证属肾阳虚精血亏虚证, 该方治疗不孕症疗效确切。本实验通过探讨右归丸对排卵障碍不孕大

鼠的 E₂、T 和 IGF-1 水平影响, 进一步阐明右归丸治疗不孕症的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康 9 日龄 SD 系雌性大鼠, 出生后母鼠哺乳至 22 日龄断奶, 专人饲养。利用自然光照, 室温维持在 20℃~25℃, 动物和饲料均由成都中医药大学实验动物中心提供, SD 大鼠批号为: SCXK(川)2008-11。

1.1.2 试剂及仪器 丙酸睾丸酮注射液 (规格: 1mL:25mg): 天津金耀氨基酸有限公司生产, 批号 0707031; 枸橼酸氯米芬片 (克罗米芬: 50mg/片), 批号 A1102, Codal Synto Limited, Cyprus/赛普路斯企业生产; 雌二醇放射免疫分析药盒, 批号 091120, 由北京北方生物技术研究所提供; 睾酮放射免疫分析药盒, 批号 091120, 由北京北方生物技术研究所提供; 胰岛素生长因子-1 酶联免疫分析药盒, 批号 DEZ30653, 由 RD 公司提供; 可调式移液器为美国 PALL - Gelman 公司生产。全自动多功能酶标仪 MK3 为芬兰雷勃生产。IL-DZ4-018 离心机为北京医用离心机厂生产。783643

基金项目: 四川省教育厅自然科学重点项目 (08ZA115)

型光学显微镜为日本 OLYMPUS 公司生产;BI2004 图像分析系统仪由成都泰盟科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 模型复制及分组方法 应用 SPSS13.0 统计软件包产生的随机数字表,将 43 只 9 日龄 SD 雌性大鼠随机分为空白对照组、模型组、右归丸组、克罗米芬对照组,共 4 组;参照俞瑾^[2]等研究方法,于实验组和模型组颈背部皮下注射丙酸睾酮 1.25mg/只(0.05mL/只)。正常组在同等条件下饲养,未作特殊处理;第 22 日龄断奶,利用自然光照,室温维持在 20℃ 左右,并由专人在同样条件饲养。第 70 日龄(大鼠体重约 150g 左右)阴道开口。连续阴道涂片 2 个性周期(1 个性周期为 5d),观察其阴道上皮细胞有无性周期变化,阴道上皮无性周期变化,则提示无排卵大鼠模型制作成功。

1.2.2 给药方法 从第 80d 开始,各组分别按如下方法给药,按临床用药,以 60kg 人为标准,按照体重-剂量换算法计算大鼠给药剂量。模型组和正常组给 1mL(100g·d)生理盐水灌胃;右归丸组给予 4.5mg/mL(100mg·d)灌胃;克罗米芬组给予 0.83mg/mL(100mg·d)灌胃,每天灌胃 1 次,连续灌胃 5 周后股动脉取血处死大鼠。

1.2.3 检测方法 阴道脱落细胞检查:给药 25 天后,对大鼠进行阴道涂片。将无菌棉签用生理盐水浸湿后轻轻插入大鼠阴道内,顺时针旋转一圈充分沾取分泌物后取出,在载玻片上同方向轻轻滚动 3 次,使分泌物均匀地涂布于载玻片上,待涂片自然晾干后,用 95% 乙醇固定 15min 后取出,采用巴氏染色法,在显微镜下观察并判定其性周期,以判定造模的成功与否;连续灌胃 5 周后,股动脉取血并处死大鼠,取出的血在室温下静置 2h 后,用转速 3000r/min 离心 10min 取上清液,用放射免疫法检测血清中 E2 和 T,用酶联免疫法检测血清中 IGF-1 的浓度,取出卵巢组织,小心的剔除脂肪组织,并包埋、切片、HE 染色,在 100 倍光镜下观察其形态学变化。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件分析,多样本之间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 对卵巢的病理形态学观察结果 镜下模型组卵巢苍白,表面见卵泡,但卵泡多呈囊性扩张,大量闭锁卵泡和原始卵泡存在,无成熟卵泡,卵泡较小,无黄体,卵泡内含大量浆液性物质,卵泡壁颗粒细胞稀疏,层次明显减少;正常组和给药组大鼠卵巢色泽鲜红,卵泡明

显增大,有成熟卵泡,表面见较多黄体。

2.2 各组间 E2、T 水平比较 各组与模型组 E2 比较,正常组 $P < 0.01$,差异显著,有统计学意义;右归丸组 $P < 0.05$,差异显著,有统计学意义;克罗米芬组 $P < 0.01$,差异显著,有统计学意义。右归丸与正常组比较 $P > 0.05$,无统计学意义。克罗米芬组与正常组比较 $P > 0.05$,无统计学意义。各组与模型组 T 比较,正常组 $P < 0.05$,差异显著,有统计学意义;右归丸组 $P < 0.05$;差异显著,有统计学意义;克罗米芬组 $P < 0.01$ 差异显著,有统计学意义;右归丸与正常组比较, $P > 0.05$,无统计学意义。克罗米芬组与正常组比较 $P < 0.05$,差异显著,有统计学意义。见表 1。

表 1 各组间 E2、T 水平统计结果比较

编号	例数	E2(pg/mL)	T(ng/dl)
模型组	10	172.44 ± 33.18	10.49 ± 4.03
右归丸组	10	252.89 ± 84.68	7.16 ± 3.60
克罗米芬组	11	316.68 ± 66.06	4.61 ± 1.65
正常组	12	280.33 ± 107.85	7.37 ± 1.70

2.3 各组间 IGF-1 水平比较 IGF-1,模型组与正常组比较 $P < 0.05$,差异显著,有统计学意义;右归丸与模型组比较, $P > 0.05$,无统计学意义。克罗米芬组与模型组比较, $P > 0.05$,无统计学意义。右归丸组与正常组比较, $P > 0.05$,无统计学意义;克罗米芬组与正常组比较 $P < 0.01$;差异显著,有统计学意义。见表 2。

表 2 各组间 IGF-1 水平统计结果比较

编号	例数	IGF-1(ug/L)
模型组	10	3.58 ± 0.27
右归丸组	10	3.44 ± 0.12
克罗米芬组	11	3.78 ± 0.20
正常组	12	3.29 ± 0.36

3 讨论

古方右归丸出自《景岳全书》,由熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子、菟丝子、鹿角胶、杜仲、肉桂、当归、制附子组成。方中制附子、肉桂、补益命门,温补肾阳,鹿角胶温肾壮阳,补肾脉,益精血,熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子滋阴益肾,养肝补脾,填精益髓,取阴中求阳之义。菟丝子、杜仲温肾助阳益精气,配当归养血和血,全方共奏温肾暖宫,调补冲任,填精益髓之功,主治肾阳不足,命门火衰之症。

为了进一步明确右归丸治疗肾阳虚型不孕症的作用机理,我们做了此项研究。E2 参与卵泡生长发育的各个环节的调节,卵巢颗粒细胞和卵泡膜细胞均为 E2 的靶细胞,主要有卵巢颗粒细胞分泌。本实验表明给予丙酸睾酮造模后,与正常组比较,E2 显著性下降

($P < 0.01$), 右归丸组与模型组比较 E2 明显升高 ($P < 0.05$), 与正常组比较无差异, 克罗米芬组与模型组比较 E2 明显升高 ($P < 0.01$), 与正常组比较无差异, 但高于大鼠体内正常范围趋势。

T 是雄激素的一种, 是协调和维持女性生殖发育的重要激素, 同时 T 是雌激素的前身, 可通过芳香化酶转化。本实验表明造模后与正常组比较, T 显著性升高 ($P < 0.05$), 而右归丸组与模型组比较, T 显著下降 ($P < 0.05$), 与正常组比较, 无统计学意义。克罗米芬组与模型组比较, T 显著下降 ($P < 0.01$), 但与正常组比较, T 显著下降, 远低于正常值水平 ($P < 0.05$)。表明 T 通过芳香化酶转化为雌激素可能是克罗米芬升高 E2 的途径之一, 同时是产生“高排低孕”现象, 且易产生过度卵巢刺激综合症和多胎等并发症的原因之一。

胰岛素样生长因子 I (IGF - I) 结构和功能与胰岛素相似, 它通过典型的内分泌途径对靶细胞产生作用, 也通过自分泌、旁分泌的方式参与局部组织、细胞的生长调节。卵泡内存在完整的 IGF 系统, 涉及卵泡发育、优势卵泡选择、类固醇合成。本实验结果显示模型组 IGF - I 明显升高, 抑制了卵泡的发育。模型组卵泡多呈囊性扩张, 大量闭锁卵泡和原始卵泡存在。克罗米芬组 IGF - I 与模型组比较无差异, 且有上升趋势, 与正常组比较 ($P < 0.01$), 差异显著, 有统计学意义, 表

明克罗米芬有可能不是通过降低 IGF - I 来促进卵泡生长发育, 有可能是通过激活芳香化酶活性等, 将过高的 IGF - I 转化为 E2, 进而导致大鼠体内 E2 过高, 其作用途径有待于进一步研究。右归丸组与模型组比较, 无显著差异, 但有降低 IGF - I 的趋势, 增加样本量, 给予右归丸更合适的浓度以及延长给药时间, 有可能发现其有统计学意义, 这有待于进一步研究, 方可证实。

综上所述, 在本实验中模型组 IGF - I 和 T 明显高于正常组, 而 E2 明显低于正常组, 表明 IGF - I 过高, 可促使 T 合成过多, 而 T 通过芳香化酶转化为 E2 过程受阻是导致排卵障碍的作用途径之一。右归丸治疗排卵障碍型不孕症作用机制, 有可能通过降低 IGF - I 和 T, 激活芳香化酶, 促进 T 转化为 E2 这一途径, 从而促进卵泡生长发育及排出, 其具体作用机制较为复杂, 有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Barraclough CA. Production of anovulatory sterile rats by single in - jection of testosteronepropionate. *Endocrinology* 1961, 68 :62.
- [2] 俞瑾. 无排卵性不孕症. *中西医结合杂志*, 1987, 7(10):617 - 618.
- [3] 俞瑾, 杨淑萍, 张月萍, 等. 雄激素致高胰岛素高雄激素性无排卵大鼠模型. *生殖医学* 1993, 2(4):251.
- [4] 张梅. 排卵障碍性不孕中医机理及中西医结合治疗的研究进展. *甘肃中医*. 2007, 20(7):70 - 72.

(2010 - 01 - 26 收稿) □

医话 2 则

张 流 秀

(重庆秀山渝东南同病医馆, 409902)

关键词 肾系结石; 重度水肿

1 肾系结石缘何久攻不下

当今由于饮食结构和生活习惯的改变, 肾系结石成了最为常见的病种之一。西医可选择体外碎石或注射黄体酮等措施, 中医则主要选择汤药内服。中医治疗结石的常规方法不外乎化石通便或利尿, 化石不外乎金钱草、海金沙、鸡内金、石韦、苜蓿, 通便不外乎大柴胡汤, 利尿不外乎八正散之类。对热瘀型肾系结石, 化石利尿当然有效, 但是对寒凝型肾系结石或久利伤肾气者则使人深感再无计可施。肾系结石久攻不下, 原因主要有三: 1) 化石力度不够, 结石较大, 难以排下; 2) 利尿太过, 伤了津质, 使肾系动力因缺失物质基础而出现力度、速度和尺度大打折扣, 相关组织严重丧失蠕动功能; 3) 肾系区域空间原本一派阴霾冷凝气象, 导致相关组织细胞生命活力严重下降。此时, 主

方: 真武汤: 白术 30g, 茯苓 30g, 白芍 30g, 赤芍 15g, 附子 30g, 生姜 20g。加味: 熟地黄 90g, 金钱草 250g 和 (或) 海金沙藤 250g。体会: 金钱草和海金沙藤, 惟大剂量溶石化石方显迅速。加大量熟地黄, 旨在急补肾系津质, 肾系动力由此获得物质基础。附子、生姜、白术, 解决肾系区域空间阴霾, 增加肾系各组织细胞活力。这样则肾系动力必定得到加强, 而其结石也因此顺利排下。

2 重度水肿缘何强泻不下

水肿是水分积在焦膜里面, 故用二丑、车前子等效果不佳。笔者经验, 对重度水肿的治疗首先着眼于对积水的温化, 积水温化以后, 排出途径主要选择尿道和汗孔。内服方药首选真武汤。方用: 附子 30g, 白术 15g, 茯苓 30g, 白芍 15g, 生姜 15g, 麻黄 15g, 桂枝 15g, 薏苡仁 30g。

(2010 - 05 - 18 收稿)