

## · 实验研究 ·

## 补肾中药对老龄大鼠睾丸功能影响的比较研究

曾金雄<sup>1</sup> 刘建华<sup>1</sup> 郑东海<sup>2</sup> 汤家铭<sup>3</sup> 顾祖曦<sup>3</sup>

(福建省自然科学基金资助项目 No. C0410046; 1 福州东方医院中医专科中心, 福州西二环北路 156 号, 350025;

2 北京东方伟达中医研究院; 3 上海中医药大学动物实验中心)

**摘要** 目的:比较研究补肾中药六味地黄汤和八味地黄汤对老龄大鼠睾丸功能的影响。方法:8 只 3 月龄成年雄性 SD 大鼠为正常对照组;24 只 22 月龄老龄雄性 SD 大鼠随机分为 3 组,每组 8 只,分别为老龄组(SC)、六味地黄汤组(LW)、八味地黄汤组(BW)。LW 组灌胃给药六味地黄汤,BW 组灌胃给药八味地黄汤,连续用药 60 天。应用精子运动 CASA 分析和流式细胞仪检测技术,比较研究六味地黄汤和八味地黄汤对衰老大鼠精子运动能力、生殖细胞凋亡率和增殖指数的影响。结果:老龄组大鼠与成年组比较,精子密度明显下降( $P < 0.05$ );活动率、直线活动率、细胞凋亡率下降非常显著( $P < 0.01$ );细胞增殖指数明显增加( $P < 0.05$ )。六味地黄汤和八味地黄汤对运动精子百分率有非常显著的提高( $P < 0.01$ ),生殖细胞凋亡率明显下降( $P < 0.05, P < 0.01$ )。八味地黄汤组与六味地黄汤组比较,精子直线活动率明显增加( $P < 0.05$ ),生殖细胞凋亡率明显下降( $P < 0.05$ )。结论:六味地黄汤和八味地黄汤在改善老龄大鼠睾丸功能方面,均有提高精子运动能力,减少其生殖细胞凋亡的作用。八味地黄汤在降低老龄大鼠睾丸生殖细胞凋亡率,提高精子直线活动率等方面优于六味地黄汤。

**关键词** 补肾中药/药理学;睾丸功能/药物作用

## Comparative Study of Impact of Kidney Supplemented Chinese Medicinals on Orchic Function of Old Rats

Zeng Jinxiang<sup>1</sup>, Liu Jianhua<sup>1</sup>, Zheng Donghai<sup>2</sup>, et al.

(National Natural Science Fund Project, No. C0410046; 1 Specialized Center for Chinese medicine, East Hospital, Fuzhou 350025)

**Abstract Objective:** to compare impact of kidney supplemented medicinals-Liuwei Dihuang and Bawei Dihuang on orchic function for old rats. **Methods:** Normal control group: eight 3-month SD adult rats (male); twenty-four 22-month old rats were randomly grouped to old age group, Liuwei treated group and Bawei treated group. Medicinals were intragastrically administrated for sixty consecutive days. Changes in sperm motility, generative cell apoptotic rate, and proliferation index were observed using semen auto-analysis (CASA) and flow cytometry technology. **Results:** The old group showed a significant decline than the adult group in sperm concentration ( $P < 0.05$ ), motile ratio, rectilinear movement ratio as well as apoptotic rate ( $P < 0.01$ ), and a rise of proliferation index ( $P < 0.05$ ). Both treated group are marked by elevated motile sperm ratio ( $P < 0.01$ ) and dropped apoptotic rates (respectively  $P < 0.05, P < 0.01$ ). Bawei group was superior to Liuwei group in rise of rectilinear movement ratio and fall of apoptotic rate ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Both medicinals were effective in raising sperm motility and reducing generative cell apoptotic rate for old rats in which aspects Bawei had advantage over Liuwei.

**Key Words** Kidney Supplemented Chinese Medicinals/ Pharmacology; Orchic Function/ Medicinal Action

睾丸功能的减退与男性衰老之间存在着重要的联系<sup>[1]</sup>,中医学认为肾虚是衰老的主要原因,现代研究也证明肾虚与衰老密切相关,补肾方药确有延缓衰老的作用<sup>[2-3]</sup>,肾阴阳两虚偏重阳虚是衰老肾虚的基本特点<sup>[4]</sup>。近年来研究表明<sup>[5-7]</sup>,六味地黄汤和八味地黄汤通过调整神经内分泌免疫调节网络的平衡,起到改善机体肾虚症状的作用,并能延缓机体的衰老。说明不同补肾法可能具有共同的调节机理,但阴阳双补偏重补阳的八味地黄汤的作用总体上明显优于单纯补肾阴的六味地黄汤,是否与补阴补阳药物配伍后从层次及环节上增强了对机体的双向调节作用,还有待于进一步研究。为了探讨补肾方药延缓衰老的机理,我们比较研究了六味地黄汤和八味地黄汤对老龄大鼠睾丸

功能的影响。现介绍如下。

## 1 材料与方法

1.1 药物制备:六味地黄汤由熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮和茯苓按 8:4:4:3:3:3 的比例混合;八味地黄汤由熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓、肉桂和附子按 8:4:4:3:3:3:1:1 的比例混合。加水浸泡 2h,以 600ml/100g 生药的比例加水煎煮 2 次,每次 2h,过滤后合并煎液,并经大孔树脂及超滤技术联用进行精制。配成浓度为 50mg/L 原液,灭菌后 4℃ 保存备用。

1.2 主要仪器及试剂:HTM-IVOS 8086 型精液自动分析仪(CASA),FACSCalibur 流式细胞仪(BECTON DICKINSON 公司),Cellquest 细胞凋亡分析软件,Modfit

表1 各组大鼠附睾精液自动分析结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	AC组	SC组	LW组	BW组
精子密度( $\times 10^6/\text{ml}$ )	132.2 ± 26.33	60.71 ± 5.28*	76.39 ± 12.69	91.83 ± 17.53
活动率(%)	68.32 ± 4.36	20.82 ± 2.93**	30.75 ± 2.83** $\Delta\Delta$	48.57 ± 13.29* $\Delta\Delta\Delta$
直线活动率(%)	27.24 ± 1.59	7.34 ± 1.67**	11.63 ± 1.42** $\Delta\Delta$	17.83 ± 3.79* $\Delta\Delta\Delta$

注:与AC组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与SC组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与LW组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

细胞周期分析软件, ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT (BD Biosciences 公司), 胰蛋白酶 (SINGMA 公司)。

1.3 动物分组: 雄性SD大鼠40只(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司)。3月龄成年大鼠8只(AC)为正常对照组; 22月龄老年大鼠24只, 随机分为3组, 每组各8只, 分别为老龄对照组(SC)、六味地黄汤组(LW)、八味地黄汤组(BW)。分别灌喂六味、八味地黄汤提取物, 每组给药量为 $0.05\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。成年组和老年对照组灌喂相当体积的生理盐水。连续用药2个月。

1.4 实验动物处理: 以3%戊巴比妥 $20\text{mg}/\text{kg}$ 腹腔注射麻醉动物。剥离附睾尾精子待测精子运动能力; 取右侧1/2睾丸分离生精细胞测细胞凋亡。

1.5 计算机辅助精子运动CASA分析: 解剖剥取附睾尾浆液, 分别加入0.1mlBAS至EPPENDOF管中, 参照人类精液常规分析方法检测<sup>[8]</sup>。

1.6 流式细胞仪检测凋亡细胞: 流式细胞仪分析条件为: 以波长488nm的氩离子激发光激发, 激发功率15mw。FL1收集Annexin V-FITC的荧光信号; FL2收集PI的荧光信号, 数据采集及分析使用Cellquest、Modfit软件。

1.7 单细胞悬液的制备: 按文献方法略加修改。取睾丸组织约200mg,  $0.01\text{mol}/\text{L}$  PH 7.2 BAS液漂洗干净, 在350目尼龙网上轻轻研磨, 过滤,  $1500\text{rpm}/\text{min} \times 10\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ 离心。取 $2 \times 10^5$ 细胞加 $100\mu\text{l}$  Annexin V Binding Buffered,  $5\mu\text{l}$  Annexin V-FITC形成Annexin V-FITC标记的细胞悬液, 避光, 并置室温下孵育15min, 离心洗涤( $1500\text{rpm}/\text{min} \times 5\text{min}$ ), 细胞悬浮于 $100\mu\text{l}$  Binding Buffered (冰浴)中, 加 $5\mu\text{l}$  Propidium Iodide (PI)配制成细胞悬液, 孵育15min, 室温避光, 上机检测凋亡细胞。取 $2 \times 10^6$ 细胞加 $100\mu\text{l}$  BAS、 $100\mu\text{l}$  RNA酶消化15min,  $37^\circ\text{C}$ 水浴, 加入 $60\mu\text{l}$  PI, 调成终浓度为 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ , 上机检测细胞周期。应用DNA细胞周期分析软件, 计算出各样品DNA含量及细胞周期G0/G1、S、G2/M期变化。细胞的增殖活性以增殖指数(proliferative index, PI)表示, 其计算公式为:

$$\text{PI}(\%) = \frac{S + G_2/M}{G_0/G_1 + S + G_2/M} \times 100\%$$

1.8 统计学分析: 组间比较应用SPSS 11.5.1版统计软件进行t检验和方差分析。

## 2 结果

2.1 计算机辅助精子运动CASA: 分析结果见表1。SC组精子密度明显低于AC组, 精子活动率及直线活动率与AC组、LW组及BW组比较有明显下降。LW组、BW组精子密度之间及与SC组、AC组比较无差异。与AC组比较, LW组精子活动率, LW组、BW组精子直线活动率明显下降。

2.2 细胞凋亡检测: 结果见表2。SC组睾丸生精细胞凋亡数量明显多于AC组、LW及BW组。LW组生精细胞凋亡数量明显高于AC组和BW组。

表2 各组大鼠睾丸生精细胞凋亡分析结果比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

项目	AC组	SC组	LW组	BW组
细胞凋亡量	2.62 ± 0.41	10.47 ± 1.29**	5.33 ± 0.67* $\Delta$	2.97 ± 0.46* $\Delta\Delta\Delta$

注: 与AC组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与SC组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与LW组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.3 细胞周期检测: 结果见表3。结果显示, SC组睾丸生精细胞增殖指数明显多于AC组, 其余各组之间比较无差异。

表3 各组大鼠睾丸生精细胞增殖指数分析结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	AC组	SC组	LW组	BW组
G0/G1(%)	82.36 ± 0.28	74.59 ± 6.11*	79.53 ± 4.16	80.37 ± 2.83
S(%)	4.39 ± 0.61	19.78 ± 7.46	8.36 ± 3.41	9.25 ± 5.13
G2/M(%)	7.58 ± 0.68	9.86 ± 2.27	9.43 ± 1.29	8.17 ± 1.38
PI(%)	11.24 ± 0.96	26.37 ± 4.47*	17.24 ± 4.77	16.35 ± 3.62

注: 与AC组比较,\* $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

中医学认为肾主生殖, 有研究表明, 机体老化是一种生理性肾阳虚, 肾阳虚是未老先衰的一种表现。睾丸功能的减退与男性衰老之间存在着重要的联系。补肾中药能改善老年大鼠睾丸间质细胞曲细精管的结构。

六味地黄汤(熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓)是“滋补肾阴”的代表方, 加肉桂、附子, 变“滋补肾阴”为“温补肾阳”的八味地黄汤(金匱肾气丸)。六味地黄汤和八味地黄汤功专于肾, 分别是“滋补肾阴”和“温补肾阳”的代表方剂, 临床广为应用, 其

疗效的显著性与可靠性在长期的临床医疗实践中得到了充分的证明。临床用于治疗男性更年期综合征、阳痿、遗精、早泄等病均具有较好疗效。

本实验研究表明,老龄大鼠睾丸生精细胞凋亡数量明显较成年组增加,其细胞增殖指数明显高于成年组,表明老龄大鼠睾丸的生殖细胞增殖虽然较活跃,但在G0/G1期发生大量细胞凋亡。六味地黄汤和八味地黄汤对老龄大鼠睾丸功能均有不同程度的改善作用,而阴阳双补偏重补阳的八味地黄汤在降低老龄大鼠睾丸生殖细胞凋亡率、提高精子直线活动率等方面优于六味地黄汤,体现了中医学“善补阳者,必于阴中求阳”的理论。

#### 参考文献

[1] Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, et al. Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts male

aging study. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, 73(5):1016-1025.

- [2] 沈自尹. 补肾和健脾在延缓衰老作用中的对比研究. *中国中西医结合杂志*, 1987, 7(10):584.
- [3] 王文健, 沈自尹, 张新民, 等. 补肾法对老年男性下丘脑-垂体-性腺轴作用的临床和实验研究. *中医杂志*, 1986, 19(4):32.
- [4] 李顺成, 蒋文跃, 王传社, 等. 正虚挟瘀是衰老的主要机制. *中国医药学报*, 1992, 7(6):4.
- [5] 张永祥. 六味地黄汤现代药理学及化学的初步研究. *基础医学与临床*, 2000, 20(5):15-19.
- [6] 王阶, 张东, 金艳. 方剂关键科学问题的基础研究-六味地黄方剂及机理研究综述. *中国中医药信息杂志*, 2000, 7(12):44-46.
- [7] 王传社, 李顺成. 六味地黄汤与八味地黄汤延缓衰老机理的对比研究回顾. 见周金黄主编《中药药理与临床研究进展·第四册》. 军事医学科学出版社, 1996, 193-201.
- [8] 世界卫生组织编. 谷翊群, 陈振文, 于和鸣, 等译. 人类精液及精子-宫颈黏液相互作用实验室检验手册. 第4版. 人民卫生出版社, 2001, 24-28.

(2007-08-10 收稿)

## 桂枝茯苓丸治疗卵巢囊肿 32 例

李 玉 龙

(黑龙江省伊春市南岔区浩良河中心卫生院, 153103)

关键词 卵巢囊肿/中医药疗法; @ 桂枝茯苓丸

卵巢囊肿是危害妇女健康的疾病之一, 笔者在 2004~2006 年间用桂枝茯苓丸治疗 32 例卵巢囊肿患者, 收到满意的疗效, 现报道如下。

### 1 临床资料

32 例均为门诊病例, 均为已婚妇女, 年龄 24~49 岁。其中囊肿最大者 7.6cm×4.5cm, 最小者 2.3cm×1.8cm。32 例患者中有 20 例伴有不同程度的腰腹疼痛, 有 23 例伴有带下增多, 有 18 例伴有月经不调。该病诊断均以 B 超诊断为依据。

### 2 治疗方法

以活血化瘀、理气消积为治疗法则, 方选桂枝茯苓丸加味: 桂枝 20g, 茯苓 20g, 桃仁 15g, 白芍 15g, 牡丹皮 10g, 五灵脂 15g, 延胡索 20g, 柴胡 15g, 没药 20g, 甘草 10g, 每日 1 剂, 水煎服, 早晚 2 次空腹服用。湿盛带下多者, 加黄柏、苍术; 腹痛按之坚硬者, 加牡蛎、穿山甲珠。以 15 天为 1 个疗程, 间隔 1 周再继续下 1 个疗程, 经期血多可暂时停药, 过后继续。以 2 个疗程为限, 无效则改为他法治疗。

### 3 治疗结果

疗效标准: 治疗后经 B 超检查囊肿完全消失者为痊愈, 囊肿比以前缩小者为好转, 未缩小者为无效。

治疗结果: 痊愈 23 例, 好转 6 例, 无效 3 例, 总有效率 90.63%。其中 1 个疗程痊愈者 10 例, 2 个疗程痊愈者 13 例。

### 4 病案举例

某, 女, 26 岁, 2005 年 5 月 13 日由妇科转入我科。患者有轻度腹痛和腰部不适, 月经愆期, 经期 3~4 天, 经量中等, 带下偏多。经 B 超检查示: 子宫 5cm×4.4cm×3.0cm, 回声尚均匀, 于子宫左侧可见一 5cm×4cm×3.8cm 液性暗区, 提示左侧卵巢囊肿。舌暗苔薄, 脉沉弦。证属气滞血瘀, 胞脉受阻, 湿困下焦。治宜活血化瘀, 消积祛湿。以上方加黄柏、苍术、泽泻。服用 1 个疗程后, 经 B 超检查囊肿消失。

### 5 讨论

本病在中医学中属于“症瘕”范畴。本病的成因, 多系妇女在经期或产后忽视调摄, 六淫内侵, 或因七情所伤, 脏腑功能失调, 致使湿浊、痰饮、瘀血阻滞胞脉, 蓄之既久, 则搏结成块。桂枝茯苓丸出自《金匮要略》, 原用于治疗孕妇患症瘕者, 与现代之卵巢囊肿相类, 故以治之。方中桂枝、茯苓温阳渗湿通络, 牡丹皮、白芍活血调营, 桃仁、没药、五灵脂、延胡索破血消症、祛瘀生新, 柴胡调理气机, 甘草调和。全方共奏活血化瘀、缓消症结之功, 临床用之每收良效。

(2007-04-25 收稿)