

抗性早熟颗粒中药对性早熟 SD 大鼠模型雌二醇的调节及相关研究

陈 祺¹ 戴方伟^{2,3} 邵国民¹ 萨晓婴²

(1 浙江中医药大学第一附属医院儿科, 浙江省杭州市邮电路 54 号, 310006; 2 浙江省医学科学院实验动物中心; 3 浙江大学动物科学学院)

摘要 目的:研究抗性早熟颗粒中药对特发性性早熟模型大鼠的治疗作用。方法:将出生 4 天内 SD 大鼠分为正常组、模型组、药物组。模型组、药物组皮下注射达那唑 300 μ g, 正常组未做处理。药物组在 15 日龄时开始灌喂抗性早熟颗粒药, 正常组给予等量的自来水。15 日后每日观察阴道开口并进行阴道涂片, 于性周期稳定后的第 1 个发情前期时称体重、采样(血清, 子宫, 卵巢), 用放射免疫法观察 SD 大鼠血清 E2, FSH 和 LH 的分泌, 采用子宫和卵巢的湿重/采样体重求得脏器系数。结果:和正常组比较, 模型组 SD 大鼠的阴门开启和建立性周期的时间显著提前 ($P < 0.05$), 药物组 SD 大鼠的阴门开启和建立性周期时间延缓; 卵巢脏器系数差异显著 ($P < 0.05$), 模型组最高, 药物组较之明显缩小, 但药物组的卵巢脏器系数与正常组无明显差异; 模型组 E2 最高, 药物组和正常组低, 且控制效果与药物浓度呈正比。结论:300 μ g 达那唑皮下注射 5~8 日龄 SD 大鼠能诱导性早熟模型。抗性早熟颗粒中药对性早熟模型 SD 大鼠有治疗作用, 能延迟 SD 大鼠阴道开口平均日龄, 降低卵巢脏器系数, 控制 E2 过度升高, 延缓性发育, 为抗性早熟颗粒中药临床治疗性早熟提供科学实验依据。

关键词 性早熟/中医药疗法; 抗性早熟颗粒中药; 雌二醇

Adjustment of Anti-proeotia Keli on Aquadiol of SD Rat Model with Sexual Precocity

Chen Qi¹, Dai Fangwei^{2,3}, Shao Guomin¹, Sa Xiaoying²

(1 Pediatric Department, First Affiliated Hospital, Zhejiang University of Chinese Medicine, Add.: No. 54, Youdian Road, Hangzhou, Zhejiang Province, post code: 310006; 2 Laboratory Animal Center of Medical Academy of Zhejiang; 3 School of Animal Science, Zhejiang University)

Abstract Objective: To research the effect of Anti-proeotia Keli on SD rat model of idiopathic sexual precocity. **Methods:** Within 4 days of birth, rats were grouped, on D5~8 received H. injection of Danazol (300 μ g) except for normal group, from D15 were given keli or water aa, 15 days later, were observed vagina opening, made VS, weighed, took serum, uterus, and ovaries samples before 1st emphatema, determined E2, FSH and LH levels by RI, calculated uterus/ ovaries ratios (WW/BM). **Results:** ①vagina opening and sex cycle beginning: by comparison with the normal group, the model advanced in time ($P < 0.05$) and the medicine group was delayed; ②ovaries ratio: model group had the highest ratio ($P < 0.05$) where keli group was statistically the same with the normal group; ③E2 level: model group was higher than the other two groups and effect positively correlated with concentration. **Conclusion:** H. injection of Danazol (300 μ g) can produce sexual precocity in SD rats of 5~8 day of birth. Anti-proeotia Keli is effective for adjusting sex development by delaying vagina opening, lowering ovary ratio and E2 level.

Key Words sexual precocity/Chinese medical therapy; Anti-proeotia Keli; aquadiol

性早熟是指女孩在 8 岁前, 男孩在 9 岁或 9 岁半前出现第二性征发育^[1]。性早熟可分为真性特发性性早熟和假性性早熟。性发育受下丘脑-垂体-性腺轴 (Hypothalamic Pituitarygonad, HPGA) 和高级神经中枢的调控, 环路中还存在负反馈机制^[2]。目前国内外有关真性性早熟治疗等方面的实验研究, 主要应用的是处于正常青春期的动物, 应用真性性早熟动物进行相关研究更为合理。达那唑诱导 5 日龄雌性 SD 大鼠性早熟模型已报道为理想的真性性早熟模型^[3]。本实验通过抗性早熟颗粒中药对性早熟模型的治疗, 观察雌性 SD 大鼠的第二性征发育和雌二醇的变化, 为中药治疗性早熟提供科学的实验依据。

1 材料

1.1 动物 选用 SD 清洁级未孕大鼠, 雌雄鼠 20~30 对, 体重 250~300g, 浙江省实验动物中心提供, 生产许可证号 SCXK(浙)2003-0001。饲养于开放系统实验室, 温度范围为 19 $^{\circ}$ C~29 $^{\circ}$ C, 湿度 40%~80%, 照明时间早上 8 点~下午 5 点, 有通风系统保持室内空气流畅。每星期定时换 2 次垫料, 每天早上定时换水和加饲料, 水为一般的自来水, 全价营养配方饲料, 动物自饮自食。

1.2 试剂 达那唑胶囊 (来源: 江苏联环药业股份有限公司, 批号: 20030601) 每 300 μ g 溶解于 16.7mL 乙二醇/乙醇 (v:v=1:1) 混合液中。抗性早熟颗粒中药

(黄柏、生地黄、知母、鳖甲、焦栀子、海藻、牡丹皮、泽泻组成,江苏江阴天江药业有限公司生产),1剂15g,用温开水溶解。高浓度为15g/20mL溶解,低浓度为15g/40mL溶解。雌二醇放射免疫分析盒(来源:北京北方生物技术研究所,批号:0551120)等。

1.3 仪器 Nikon 荧光显微镜(上海培清科技有限公司)、SN-659 型智能免放 γ 测量仪(上海原子核研究所日环仪器一厂生产)、AB204-E 电子分析天平、TGL-16G 台式离心机、TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机、灌胃针、50 μ l 微量注射器等。

2 方法

2.1 配种 选用SD清洁级未孕大鼠,雌雄鼠20~30对,体重250~300g,一对一笼喂养交配,全价营养配方饲料,自饮自食。每天早上定时查看阴栓,有阴栓的选用母鼠饲养于另一只塑料笼盒中,并在笼上贴上标签,标签上写明配种日期、阴栓日期和笼号,笼号顺序从1~n开始编号。

2.2 动物分组 出现阴栓后第19天以后每天上、下午定时查看仔鼠出生情况,若有出生则选用雌仔鼠,称体重,记录雌鼠数量,在笼表签上再填上出生日期。选用4天内出生的雌鼠。点数,分笼,分组,分为正常组、模型组、溶剂组、高药组、低药组共5组。每组鼠数控制在8只以上,每笼出生鼠由亲母自养,每笼8只,若每笼出生雌鼠数量不足8只,则用该亲母生的雄仔鼠凑足8只,确保每笼内饲养密度一致,体重一致,以达到饲养条件一致。从出生开始每隔3天记1次体重,每天早上定时记录,并写在体重记录表上。

2.3 造模 用酒精棉签消毒,用50 μ l微量注射器吸取25 μ l达那唑溶解液皮下注射。注射时防止液体溢出,若有溢出则丢弃。模型组、低药组和高药组于出生最早的雌性大鼠为8日龄同一天每只皮下注射25 μ l达那唑。

2.4 灌喂 药物组SD大鼠在15日龄时药物组开始以0.5mL/20g左右灌胃,正常组、模型组灌自来水,刚开始两天以每天1次灌胃,以后每天定时灌胃2次,灌胃间隔时间为6h,直至处死。一般每隔3天称1次体重。SD大鼠在出生后26天断奶,断奶时去掉母鼠和雄仔鼠只剩下雌仔鼠。

2.5 观察阴道开口时间和阴道涂片 20日龄时开始每天观察阴道开启情况,阴道开启后,每天上午8点定时做阴道涂片,观察雌激素依赖的阴道脱落细胞的周期性变化并拍照保存,直至SD大鼠建立正常的性周期,SD大鼠建立正常性周期的第一个发情前期立即称体重采血清,处死,采集子宫、卵巢和下丘脑。

2.6 具体标本采集 一旦发现发情前期涂片,则立即称体重,然后股静脉采血。采血时防止溶血,杂质污染。室温放置30min后离心,分离血清分成2个Ep管,-20 $^{\circ}$ C保存。放射免疫法测定血清E2水平,在室温用颈椎脱臼法处死鼠,剥离子宫和卵巢,称子宫和卵巢湿重。根据脏器系数=器官湿重/体重,计算子宫脏器系数,卵巢脏器系数。

2.7 统计学方法 用SPSS10.0软件处理数据,计量资料采用 t 检验和方差分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 达那唑及抗性早熟颗粒中药对雌性SD大鼠体重的影响 雌性大鼠于4天内最晚出生为5日龄时同一天注射含300 μ g的达那唑溶液,观察12、15、18、19、22、25日龄时,模型组与正常组比较并无差异。药物组与正常组比较也无差异。

3.2 达那唑及抗性早熟颗粒中药对雌性SD大鼠阴道开口平均日龄(VO)和性周期稳定后第一发情前期平均日龄(P1)的影响 模型组首先发现阴道开口,接着陆续发现高药组、低药组和正常组的阴道开口,高药组各笼大鼠发现阴道开口间隔时间最长。模型组阴道开口日龄较正常组有显著性差异($P < 0.05$),药物组阴道开口时间较正常组有差异。高药组较低药组早开口约5天左右,P1出现日龄较阴道开口日龄迟7天左右,高药组P1出现日龄早于正常组、低药组,且迟于模型组,差异显著($P < 0.05$),见表1。

表1 达那唑及抗性早熟颗粒中药对雌性SD大鼠VO和P1的影响(天)

组别	正常组	模型组	低药组	高药组
鼠数	11	8	8	23
VO	34.45 \pm 2.30*	21.75 \pm 2.12	31.00 \pm 4.96*	26.96 \pm 3.28*
P1	40.55 \pm 2.94*	29.00 \pm 2.52	37.13 \pm 5.77*	34.27 \pm 4.81*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

表2 子宫脏器系数(10-3)和卵巢脏器系数(10-4)

组别	正常组	模型组	低药组	高药组
鼠数	11/11	8/7	8/8	23/20
子宫脏器系数	1.37 \pm 0.80	1.36 \pm 0.83	1.27 \pm 0.90	1.49 \pm 0.68
卵巢脏器系数	3.98 \pm 0.92*	6.16 \pm 1.20	4.25 \pm 0.16	4.27 \pm 0.15

注:高药组剔除性周期、体重不稳定鼠3个,模型组同样原因剔除1个。与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

3.3 本实验对子宫和卵巢湿重的影响主要为采样时鼠是否受到刺激。因刺激可通过神经系统和下丘脑-垂体-性腺轴,子宫和卵巢充盈程度会不同,从而对脏器系数产生干扰,应尽量避免其他刺激。模型组脏器系数对照正常组、药物组无差异($P > 0.05$);模型

组卵巢脏器系数较对照正常组有显著差异 ($P < 0.05$), 药物组脏器系数与模型组有差异; 低药组和高药组卵巢脏器系数几乎相等, 见表 2。

3.4 从表 3 可以看到, 模型组的 E2 水平最高, 与药物组特别是高药组有显著性差异 ($P < 0.05$); 低药组 E2 含量高于正常组, 高药组 E2 水平最低, 但高药组 E2 与正常组无显著性差异 ($P > 0.05$)。另外, 促卵泡素 FSH 正常组最高, 模型组最低, 二者存在显著差异 ($P < 0.05$), 药物组中高药组低于低药组, 高药组与模型组无显著差异 ($P > 0.05$), 高药组比低药组低。因采用放射免疫法检测血清, 脑垂体中重要的促性腺激素促黄体素 LH 未能全面测得。

表 3 血清雌二醇 E2 (pg/mL) 和促卵泡素 FSH (mIU/mL) 水平

组别	正常组	模型组	低药组	高药组
鼠数	11/11	8/7	8/7	23/19
E2	207.72 ± 116	333.4 ± 155	248.98 ± 92	192.34 ± 76.4*
FSH	4.97 ± 3.63*	0.98 ± 0.77	2.02 ± 1.14	1.21 ± 1.33

注: 考虑到血清溶血及实验室检测误差, 低药组和高药组又各剔除 1 个。与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

4 讨论

由于 SD 大鼠 HPGA 调控系统的作用机制与人类相似, 且生命周期短, 性成熟期短, 性周期短, 性发育指标明确, HPGA 系统敏感, 便于观察, 所以选用 SD 大鼠建立有关性早熟的模型。

中医学认为性早熟的病因为“肾阴虚而相火旺”,

“肾”对生殖机能的调节障碍。由知母、生地黄等中药组成的滋阴泻火中药在临床上用于治疗性早熟, 患儿服药后血中 FSH、LH 及 E2 等激素水平显著下降, 生殖器官及性征的发育明显消退, 阻断了骨骼的过早愈合^[4]。抗性早熟颗粒药对性早熟模型有治疗作用, 模型组的子宫脏器系数较模型组、药物组无差异, 说明用达那唑造模与抗性早熟颗粒中药对 SD 大鼠的子宫发育无影响。卵巢脏器系数差异显著, 模型组最高, 药物组与模型组有显著差异, 说明抗性早熟颗粒中药有治疗作用, 但药物组的卵巢脏器系数与正常组无明显差异, 说明抗性早熟颗粒中药对卵巢的正常发育无影响。通过实验证明: 抗性早熟颗粒中药对性早熟 SD 大鼠模型雌二醇有着重要的调节作用从而延缓第二性征发育, 为抗性早熟颗粒中药临床治疗性早熟提供了科学实验依据。

参考文献

- [1] 曾畿生, 王德芬. 现代儿科内分泌学 - 基础与临床. 上海科学技术文献出版社, 2001, 1: 125.
- [2] 贾悦. 性早熟临床研究及发展. 国外医学计划生育分册, 2004, 23 (3): 168 - 171.
- [3] 田占庄, 赵宏, 陈伯英. 滋阴泻火中药对性早熟模型大鼠促性腺激素释放激素及其受 mRNA 表达的影响. 中国中西医结合杂志, 2003, 23 (9): 9.
- [4] 蔡得培, 季志英, 时毓民. 性早熟女童阴虚火旺本质的研究. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4 (增刊): 76 - 78.

(2009 - 02 - 19 收稿)

经方化裁治验 2 则

潘建科

(广州中医药大学第二临床医学院 2006 级中医学生, 广州市机场路 12 号大院, 510405)

关键词 经方/临床应用

1 心悸, 失眠

某, 女, 43 岁, 2008 年 6 月 1 日就诊。患者平素体虚易感冒, 易出汗, 最近 1 个月来感觉心悸, 需要用手按压胸前, 始觉心悸稍减, 胸闷, 睡觉时觉心悸症状不减, 烦躁, 夜间难以入睡, 小便淋漓不尽, 大便正常, 纳可, 舌红苔白, 有齿痕, 脉沉弦细。辨为: 心阳虚兼肝血虚。治宜: 温通心阳, 化气行水兼养肝安神。方用茯苓桂枝甘草大枣汤加减: 茯苓 30g, 桂枝 15g, 白芍 15g, 生姜 10g, 炙甘草 10g, 大枣 5 枚, 酸枣仁 30g, 太子参 15g, 5 剂。服药后, 心悸、失眠、小便淋漓等症状消失。

按: 心脏失于阳气的鼓动, 则空虚无主, 故见心中悸动不安、患者用手喜按压胸部部位。心阳不足, 致心火不能下蛰以暖肾, 肾水无以蒸化而停于下, 故见小便不利, 取茯苓桂枝甘草大枣汤温通心阳, 化气行水。因患者平素易汗出, 加白芍与桂枝等量, 取桂枝汤之意, 以调和营卫; 加酸枣仁以滋养阴血养心安神; 加

太子参益气生津。诸药合力, 庶可见功。

2 痛经、便秘

某, 女, 22 岁, 2007 年 12 月 10 日就诊。患者素有手足不温的症状, 且痛经有 8 年病史, 每次经期第 1 天就会小腹部疼痛持续几个小时, 痛势剧烈, 冷汗淋漓, 手足厥冷, 遇温则疼痛稍减, 欲呕吐, 呕后则减, 食生姜泡水后有所缓解; 平时常大便干结, 舌红苔白, 脉弦细。辨为: 寒凝经脉, 气血亏虚。治宜: 温经散寒, 柔肝缓急。方用当归生姜羊肉汤: 羊肉 125g, 生姜 60g, 当归身 40g, 糯米酒 175g, 10 剂, 每天午餐和晚餐前分别服用 1 次。药后, 手足不温的症状消失, 大便通畅, 下 1 次月经来时没有再发生痛经。

按: 本证属血虚内寒所致。根据《素问·阴阳应象大论》“形不足者, 温之以气; 精不足者, 补之以味”的治则, 用当归生姜羊肉汤, 方中当归养血活血; 羊肉能养血补虚散寒; 生姜辛温散寒止痛; 糯米益肾健脾, 共奏补血散寒、润肠通便之效。

(2009 - 03 - 02 收稿)