

调神益肾针法对更年期大鼠卵巢芳香化酶细胞色素 P450mRNA 表达的影响

沈晓明¹ 杜元灏² 胡玲¹ 指导:石学敏²

摘要 目的:研究调神益肾针法对更年期大鼠卵巢芳香化酶细胞色素 P450(P450_{AROM})mRNA 表达的影响。方法:采用组织细胞原位杂交技术,辅以计算机图像分析。结果:更年期大鼠卵巢窦状卵泡、成熟黄体细胞中 P450_{AROM}mRNA 的表达减弱,间质腺细胞中的表达则基本维持正常;经针刺干预后,这些部位尤其是窦状卵泡、成熟黄体该酶 mRNA 的表达明显增强。结论:促进卵巢 P450_{AROM}mRNA 的表达,有利于增加雌激素合成限速酶的含量,这可能是调神益肾针法升高体内雌激素水平的分子机制之一。

关键词 细胞色素 P-450/针灸效应 更年期/针灸效应 @ 调神益肾针法

芳香化酶在体内分布较广,包括卵巢及脑、脂肪组织、子宫内膜、胎盘、皮肤成纤维细胞等^[1~3],显示体内雄激素向雌激素的最后转化所涉及部位非常复杂。然而,就女性雌激素主要合成、转化部位而言,Mahendroo 等指出,在绝经前是卵巢中卵泡的颗粒细胞,怀孕期是胎盘组织,绝经后是脂肪组织^[4]。另外,更年期时体内重要的生理变化就是卵巢功能减退,合成雌激素的能力下降。所以,卵巢芳香化酶的变化与更年期体内雌激素水平关系密切。

调神益肾针法是天津中医学院第一附属医院石学敏院士等专家创立的针灸处方,主穴为风府、百会、气海、肾俞,临床治疗女性更年期综合征疗效确切。动物实验初步证实,这与针刺能明显升高更年期大鼠原下降的血清雌二醇(E₂)水平、降低原升高的血清卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)水平^[5]以及能改善更年期大鼠卵巢的形态功能活动有关^[6]。为进一步揭示针刺的作用机制,本研究采用地高辛标记的多相寡核苷酸探针进行组织细胞原位杂交,辅以计算机图像分析,观测更年期大鼠卵巢中 P450_{AROM}mRNA 的表达、分布情况以及针刺的干预效应。

1 材料

1.1 主要仪器:Reichert-Jung 2040 普通切片机,德国产;Olympus BH-2 显微镜,日本产;HPIAS-100 高

清晰度彩色病理图文分析系统,武汉同济医科大学千屏影像公司提供;恒温孵育箱,日本产。

1.2 主要试剂:Aromatase 原位杂交检测试剂盒,包括 10×复合消化液(Pepsin)、含地高辛标记的 Aromatase 多相寡核苷酸探针的杂交液、20×杂交探针稳定液 A、杂交探针稳定液 B、封闭液、兔抗地高辛、生物素化羊抗兔 IgG、链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC-POD),武汉博士德公司产;DAB 显色试剂盒,武汉博士德公司产。

1.3 实验动物:选用 4 月龄雌性 Wistar 大鼠 15 只,平均体重 180g 左右;16 月龄雌性 Wistar 大鼠 30 只,平均体重 290g 左右,均由天津市劳动职业病卫生研究所动物室提供。喂养在 12h 光照、12h 黑暗的条件下,自由摄食、饮水,室温控制在 22~28℃。

2 方法

2.1 动物造模及分组:根据文献,采用自然老化的更年期大鼠模型^[7]。购进的动物适应性喂养 1 周后,30 只 16 月龄雌性 Wistar 大鼠随机分为更年期组 15 只、针刺组 15 只,15 只 4 月龄雌性 Wistar 大鼠作为青年组。针刺组根据华兴邦等制定的大鼠穴位图谱^[8],选取“风府”、“百会”、“气海”、“肾俞”、“风府”缓慢向下直刺 0.2cm,“百会”向后平刺 0.5cm,“气海”直刺 0.5cm,均行中等幅度的提插捻转手法,平补平泻;“肾俞”向脊柱方向斜刺 0.5cm,行小幅度高频捻转补法。均留针 20min,中间行针 2 次,加强刺激。每日 1 次,连续 6 天,中间休息 1 天,4 周为 1 个疗程。青年组、更年期组动物每天只进行抓取刺激,不作针刺。

2.2 标本采集与制备:为避免昼夜节律对观察指标的影响,标本采集均在上午 9:00~11:00 进行。待针刺组动物接受针刺刺激满 1 个疗程后,所有大鼠断头处死,迅速摘取卵巢,置 10%中性福尔马林液中固定约 36h;上行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片。光镜下观察,含 P450_{AROM}mRNA 细胞的胞质着色,呈淡黄至棕褐色。

2.3 组织细胞原位杂交:二甲苯脱蜡,下行梯度乙醇入水;3% H₂O₂ 甲醇溶液处理切片 10min,灭活内源性过氧化物酶;滴加 10×复合消化液,作用 10min,暴露 mRNA 片段;PBS 洗涤,3~5min;切片上滴加含地高

基金项目:安徽省自然科学基金(03043006)、江苏省教育厅针灸重点实验室开放课题资助项目(KJS02046)

1 安徽中医学院临床医学二系,合肥市梅山路 193 号(230038)

2 天津中医学院第一附属医院

收稿日期:2002-10-14;修回日期:2002-11-25

辛标记的 P450_{AROM} 多相寡核苷酸探针的杂交液,置湿盒中,于 37℃ 孵育箱内杂交 2h; 2×SSC 洗涤,3×5min,去除未结合的探针;滴加杂交探针稳定液 A 和杂交探针稳定液 B 的混合液,37℃ 作用 20min; 2×SSC 洗涤,3×5min;滴加封闭液,37℃ 作用 20min,甩去液体;滴加兔抗地高辛,37℃ 作用 60min;PBS 洗涤,3×2min;滴加生物素化羊抗兔 IgG,37℃ 作用 20min;PBS 洗涤,3×2min;滴加 SABC-POD,37℃ 作用 20min;PBS 洗涤,4×5min;DAB 避光显色约 20min,蒸馏水洗,终止显色反应;上行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片。

2.4 计算机图像分析:采用 MPIAS-1000 彩色病理图文分析系统,放大倍数 400×。

2.5 观察指标及方法:在尽量控制其灰度值一致的基础上,分别测定各组卵巢窦状卵泡、成熟黄体、间质腺细胞 P450_{AROM} mRNA 阳性反应物的总面积,积分光度值。具体操作如下:每组切片每个观察项目按统一标准随机截取 20 个视野,输入计算机进行定量分析,获取该组该项目的 20 个阳性反应物总面积、积分光度值。

2.6 统计学方法:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,分析借助 SPSS 10.0 for Windows 统计软件作方差分析。

3 结果

3.1 3 组大鼠卵巢窦状卵泡 P450_{AROM} mRNA 表达范围及强度比较:青年组:15 只大鼠 30 个卵巢低倍镜下观察,卵泡液特异性着色最深,呈棕褐色;颗粒细胞着色中等,为棕色,且从卵泡腔周围至卵泡壁逐渐衰减;而围绕卵泡壁的膜内层细胞着色较浅,呈淡棕色。高倍镜下观察,卵泡液中 P450_{AROM} mRNA 阳性反应物呈颗粒状,多数排列成线条,或聚结成团块;P450_{AROM} mRNA 阳性细胞为胞质着色,近细胞膜周围尤为显著。其阳性反应物平均面积、平均积分光度值见表 1。

更年期组:15 只大鼠 27 个卵巢镜下观察,窦状卵泡特异性着色、分布模式同上,但相应部位 P450_{AROM} mRNA 的表达强度较青年组明显减弱,阳性细胞数减少,两者之间差异有显著性 ($P < 0.01$)。其阳性反应物平均面积、平均积分光度值见表 1。

针刺组:15 只大鼠 30 个卵巢镜下观察,窦状卵泡特异性着色、分布模式未见明显改变,P450_{AROM} mRNA 的表达强度、阳性细胞数则较更年期组明显增加 ($P < 0.01$)。其阳性反应物平均面积、平均积分光度值见表 1。

3.2 3 组大鼠卵巢成熟黄体 P450_{AROM} mRNA 表达范围及强度比较:青年组:15 只大鼠 30 个卵巢镜下观察,颗粒黄体细胞、膜黄体细胞呈特异性着色,且中间

表 1 针刺后 3 组大鼠卵巢窦状卵泡 P450_{AROM} mRNA

表达范围、强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	卵巢数	阳性反应物平均面积 (μm^2)	平均积分光度值
青年组	15	30	2852.58 ± 742.03	1580.97 ± 414.69
更年期组	15	27	1038.84 ± 393.65*	561.99 ± 213.97*
针刺组	15	30	2533.32 ± 706.30 ^{△△}	1467.28 ± 382.45 ^{△△}

与青年组比较, * $P < 0.01$; 与更年期组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 下表同

表 2 针刺后 3 组大鼠卵巢成熟黄体 P450_{AROM} mRNA

表达范围、强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	卵巢数	阳性反应物平均面积 (μm^2)	平均积分光度值
青年组	15	30	2868.40 ± 1010.59	2061.80 ± 889.57
更年期组	15	27	809.58 ± 213.68*	728.92 ± 273.33*
针刺组	15	30	2438.76 ± 924.39 ^{△△}	1839.53 ± 747.86 ^{△△}

表 3 针刺后 3 组大鼠卵巢间质腺 P450_{AROM} mRNA

表达范围、强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	卵巢数	阳性反应物平均面积 (μm^2)	平均积分光度值
青年组	15	30	1990.60 ± 869.86	857.14 ± 320.89
更年期组	15	27	2065.52 ± 1150.79	958.44 ± 386.28
针刺组	15	30	2331.26 ± 843.05	1782.72 ± 277.16 [△]

部颗粒黄体细胞反应强度大于周边部。其阳性反应物平均面积、平均积分光度值见表 2。

更年期组:15 只大鼠 27 个卵巢镜下观察,成熟黄体特异性着色、分布模式同上,但相应部位 P450_{AROM} mRNA 表达强度较青年组明显减弱,阳性细胞数减少,两者之间差异有显著性 ($P < 0.01$)。其阳性反应物平均面积、平均积分光度值见表 2。

针刺组:15 只大鼠 30 个卵巢镜下观察,成熟黄体特异性着色、分布模式未见明显改变,P450_{AROM} mRNA 的表达强度、阳性细胞数则较更年期组明显增加 ($P < 0.01$)。其阳性反应物平均面积、平均积分光度值见表 2。

3.3 3 组大鼠卵巢间质腺 P450_{AROM} mRNA 表达范围及强度比较:青年组:15 只大鼠 30 个卵巢镜下观察,散在于卵巢基质中的间质腺细胞着色程度中等,呈棕色。其阳性反应物平均面积、平均积分光度值见表 3。

更年期组:15 只大鼠 27 个卵巢镜下观察,间质腺细胞 P450_{AROM} mRNA 的表达与青年组基本接近,两者之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。其阳性反应物平均面积、平均积分光度值见表 3。

针刺组:15 只大鼠 30 个卵巢镜下观察,间质腺细胞 P450_{AROM} mRNA 的表达有进一步加深的趋势,部分甚至超过青年组,但无统计学差异 ($P > 0.05$)。其阳性反应物平均面积、平均积分光度值见表 3。

4 讨论

更年期综合征中医学称为“绝经前后诸症”,是妇

女在绝经前后因卵巢功能减退,雌激素分泌减少,下丘脑—垂体—卵巢轴平衡失调,出现潮热、汗出、心悸、头痛、眩晕、情绪改变、失眠、注意力不集中、感觉异常等植物神经功能紊乱为主的症候群。对于其病机,多数以肾虚为本,兼及肝、脾、心,因而治疗上或直接补肾,或调肝补肾,或健脾益肾,或交通心肾。我们结合多年的临床实践,提出“肾精亏虚,脑肾失济”为更年期综合征病机的新思路,制定调神益肾的治疗法则^[11]。方中风府、百会位居头部,属督脉,故二穴能醒脑调神,通利督脉,交通脑肾;肾俞为肾之背俞穴,乃肾脏精气汇聚、转输之处,所以能补肾填精,生髓养神;气海属任脉,能理气,益肾,固精,平衡任督。诸穴合用,调元神,益肾精,交通脑肾,正切本病病机。

从组织细胞原位杂交结果来看,首先,P450_{AROM} mRNA 的卵巢分布。在窦状卵泡、成熟黄体及间质腺中 P450_{AROM} mRNA 均有表达,且颗粒细胞、颗粒黄体细胞的丰度明显高于内泡膜细胞、膜黄体细胞,这种分布模式与其编码的蛋白 P450_{AROM} 基本一致^[12],提示细胞内 P450_{AROM} 的基因表达部位与相应的功能蛋白大致相同;同时也提示颗粒细胞、颗粒黄体细胞转换雄激素为雌激素的能力大于内泡膜细胞、膜黄体细胞。对于卵泡液中 P450_{AROM} mRNA 阳性反应物的来源、生理意义目前尚不清楚。其次,进入更年期时,卵巢 P450_{AROM} mRNA 表达的变化,较之青年组大鼠,更年期大鼠的窦状卵泡、成熟黄体中 P450_{AROM} mRNA 表达明显减弱,显示这些部位转化雄激素为雌激素的能力降低。有资料表明,生育期内,排卵前高水平的 FSH 及随后升高的 LH 能增加窦状卵泡中芳香化酶的基因表达及其蛋白含量^[13,14]。本实验观察到,更年期时虽有体内 FSH、LH 水平的升高,但窦状卵泡中 P450_{AROM} mRNA 表达强度仍明显减弱,推测其 P450_{AROM} mRNA 的表达不仅受 FSH、LH 水平的调节,而且还与 P450_{AROM} mRNA 阳性细胞本身对这些调节因子的反应性有关。另外,有研究认为,更年期时卵巢仍有分泌 E₂ 的功能,且主要部位是在卵巢间质腺细胞^[15]。我们也发现,更年期大鼠卵巢间质腺 P450_{AROM} mRNA 的表达与青年组水平接近,显示该部位转化雌激素的能力在更年期时并未下降,而是基本维持原来水平。第三,针刺对更年期大鼠卵巢 P450_{AROM} mRNA 表达的影响。与更年期大鼠相比,针刺组大鼠卵巢窦状卵泡、成熟黄体中 P450_{AROM} mRNA 表达明显增强,间质腺 P450_{AROM} mRNA 表达也有提升,提示针刺可加强这些部位尤其是卵巢窦状卵泡、成熟黄体转化雄激素为雌激素的能力。由于针刺并不能改变更年期大鼠卵巢中

下降的窦状卵泡数目^[9],因此,针刺使更年期综合征患者血清 E₂ 水平上升的机制主要在于激发、促进了衰老卵巢残存的合成、分泌功能及维持间质腺的正常作用。

参考文献

- 1 Lephart ED. A review of brain aromatase cytochrome P450. Brain Res Rev, 1996, 22(1): 1—26.
- 2 richards JS, Bogovich k. Effects of human chorionic gonadotropin and progesterone on follicular development in the immature rat. endocrinology, 1982, 111(5): 1429—1438.
- 3 Evans CT, Corbin CJ, Saunders CT, et al. Regulation of estrogen biosynthesis in human adipose stromal cells. J Biol Chem, 1987, 262(14): 6914—6920.
- 4 Tseng L, Mazella J, Chen GA. Effect of relaxin on aromatase activity in human endometrial stromal cells. Endocrinology, 1987, 120(6): 2220—2226.
- 5 Evans CT, Ledesma DB, Schulz TZ, et al. Isolation and characterization of a complementary DNA specific for human aromatase-system cytochrome P450m RNA. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(17): 6387—6391.
- 6 Mahendroo MS, Means GD, Mendelson CR, et al. Tissue-specific expression of human P450_{AROM}. J Biol Chem, 1991, 266(17): 11276—11281.
- 7 沈晓明, 杜元灏, 朴泰虎, 等. 调神益肾针法对更年期大鼠下丘脑—垂体—卵巢轴功能的影响. 中国针灸, 2002, 22(10): 693—696.
- 8 沈晓明, 杜元灏, 李谈, 等. 调神益肾针法对更年期大鼠雌激素分泌器官的干预作用. 中医药学刊, 2002, 20(3): 336—337, 355.
- 9 程化奇, 熊舜华, 殷新尤, 等. 大鼠更年期实验模型研究. 上海实验动物科学, 1993, 13(4): 192—196.
- 10 华兴邦, 李辞蓉, 周浩良, 等. 大鼠穴位图谱的研制. 实验动物与动物实验, 1991, (1): 1—5.
- 11 沈晓明, 杜元灏, 石学敏. 从中医脑的学说谈更年期综合征病机及针刺立法处方. 中医杂志, 2002, 43(9): 668—670.
- 12 成令忠主编. 组织学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1994, 1412, 1418.
- 13 Hickey GJ, Chen SA, Besman MJ, et al. Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovary an follicles and corpora lutea; relationship to estradiol biosynthesis. Endocrinology, 1988, 122(4): 1426—1436.
- 14 李江源主编. 性腺疾病. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1997: 22.
- 15 吕琳丽. 围绝经期卵巢功能及老化机制的研究. 国外医学妇产科学分册, 1996, 23(5): 262—265.

全国中医基础理论学术研讨会征文通知

由中国中医研究院基础理论研究所、《中国中医基础医学杂志》社主办的“全国中医基础理论学术研讨会”拟于2003年12月18~20日在哈尔滨举行。议题:(1)中医基础理论研究的现状、存在问题及对策;(2)中医学理论与中国传统文化;(3)证候、病因病机、治则治法的基础理论研究、现代生物学基础研究、各家学说、临床应用。

要求:(1)为未公开发表的论文;(2)3000字以内,打印并附软盘;(3)论文格式参照《中国中医基础医学杂志》的要求;(4)邮寄审稿费20元;(5)优秀稿件将在杂志刊登;(6)会务费600元。截止时间:2003年11月10日。稿件请寄:北京东直门内南小街16号基础所于智敏收;邮编:100700;电话:010-64014411 转 2634;传真:010-64013896

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

Effect of Needling Method for Regulating Mental Activity and Tonifying the Kidney on Aromatase Cytochrome P450 mRNA Expression in the Ovary of Climacteric Rats

Shen Xiaoming, Du Yuanhao, Hu Ling, et al.

Objective: To study the effect of needling method for regulating mental activity and tonifying the kidney on expression of aromatase cytochrome P450 (P450 arom) in climacteric rats. **Methods:** Hybridization in situ and computer-aided image analysis were adopted. **Results:** Expression of P450 arom mRNA in cells of sinusoidal follicles and the mature corpus luteum of the ovary decreased and in the interstitial adenocytes basically kept normal in climacteric rats. After acupuncture, expression of P450 arom mRNA in these parts, particularly in the sinusoidal follicle and the mature corpus luteum were significantly strengthened. **Conclusion:** Promotion of expression of P450 arom mRNA in the ovary is beneficial to increase of the content of rate-limiting enzyme for synthesis of estrin, which is possibly one of molecular mechanisms of the needling method for regulating mental activity and tonifying the kidney increasing estrin level in the body.

Author's address: Second Clinical Medicine Department of Anhui TCM College, Hefei 230038

Key Words: Cytochrome P450/acup-mox eff. Climacterium/acup-mox eff. @ Needling method for regulating mental activity and tonifying the kidney

(Original article on page 589)

Clinical Observation on Protective Action of Xinmaitong Capsules on Survival Myocardium in the Patient of Acute Myocardial Infarction

Qiu Ruixiang, Feng Jun, Meng Jun

Objective: To study protective action of TCM complex prescription Xinmaitong Capsules on survival myocardium in the patient of acute myocardial infarction (AMI). **Methods:** 46 cases of AMI who had successfully received PTCA operation were randomly divided into treatment group and control group with 20 cases in each. On the basis of routine treatment of AMI, 3 days before the operation, treatment group began to take Xinmaitong Capsules for 4 weeks. Nuclide resting myocardium development segment numbers, nuclide myocardium perfusion defect range score (ES) and nuclide myocardium perfusion defect severe extent cumulative scores (SS), as well as the level of blood vascular endothelial growth factor (VEGF) were investigated before and after treatment. **Results:** The varying rate of the resting myocardium development segment number from score 1 to 2 was

58.33% in treatment group, significantly higher than 53.33% in control group ($P < 0.05$), and ES and SS in treatment group was significantly lower than those in control group ($P < 0.05$). VEGF levels of 3 days and one week after the operation in treatment group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xinmaitong Capsules can promote metabolic activity of the survival myocardium and expression of blood VEGF, exerting positive protective action on ischemic myocardium in the patient of AMI. Chinese drug for supplementing Qi and promoting blood circulation is of action like blood vessel neogenesis activity, contributing to formation of neonatal vessels and establishment of collateral circulation in the infarction region, which plays an important role in improvement of low perfusion state in ischemic survival myocardium.

Author's address: TCM Department, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen Medical University, Guangzhou 510080

Key Words: Myocardial infarction/TCM ther. Myocardium/metabolism. @Xinmaitong Capsules

(Original article on page 598)

Effect of TCM Complex Prescription for Invigorating Qi and Hemostasis on POMC mRNA Expression in the Brain Tissue in Rats of Failure of Spleen to Control the Blood

Chen Jiaxu, Qu Dehong, Ji Shaoliang

Objective: To explore the effect of Chinese drugs for invigorating Qi and hemostasis on POMC mRNA expression in the model rats of failure of spleen to control the blood. **Methods:** Hybridization in situ and image analysis were used for determination of cumulative optical density and area of POMC mRNA in the cortex, hippocampus and hypothalamus. **Results:** The cumulative optical density and area of POMC mRNA in the brain tissues in model rats of failure of spleen to control blood were increased as compared with control rats, and the complex prescription for invigorating Qi and hemostasis could down-regulate the expression of POMC gene in the brain tissues. **Conclusion:** The complex prescription for invigorating Qi and hemostasis has a better regulative action on POMC gene expression in the brain tissues with a stronger action than Guipi Pills.

Author's address: College of Basic Medicine, Beijing University of TCM, Beijing 100029

Key Words: Failure of spleen to control blood/TCM ther. Gene expression. Brain/drug action

(Original article on page 612)