

补益阳明津气对初老雌性大鼠卵巢流式细胞双标百分比的影响

李燕¹ 郭蓉晓² 吴涔³ 周淑芳⁴ 指导:谭万信⁴

摘要 目的:探讨“补益阳明津气”延缓初老雌性大鼠卵巢机能衰老,防治相关病证,提供一种新的研究与论治思路,并为相关方药提供药效学依据。方法:4~6 月龄雌性大鼠为正常对照组;10~12 月龄,阴道细胞学表现动情期延长的雌性大鼠为初老大鼠模型。模型动物随机分为益胃汤高剂量组、益胃汤中剂量组、益胃汤低剂量组、己烯雌酚组、模型对照组、六味地黄丸组;灌药 4 周后,断头处死,取左侧卵巢检测卵巢流式细胞双标百分比。结果:与模型对照组比较,益胃汤可使卵巢流式细胞双标百分比降低。结论:实验研究提示,益胃汤具有抑制卵巢细胞凋亡的作用,这可能是其延缓卵巢机能衰老的机理之一。

主题词 卵巢/药物作用 @ 补益阳明津气

Effect of Replenishing Functional Activities of the Body Fluid of The Yangming Channel on Double-Labeling Percentage of Ovary Flowcytes in the Initial Aging Female Rats

Li Yan¹, Guo Rongxiao², Wu Yunting³, et al.

(1. Guiyang College of TCM, Guiyang 550002; 2. Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM; 3. Chengdu University of TCM)

Objective: To probe into the mechanism of replenishing functional activities of the body fluid of the Yangming Channel in delaying functional aging of ovary in the initial aging female rats. **Methods:** Female rats aged 4-6 months were used as normal control group, and the female rats aged 10-12 months with prolongation of estrus examined by colpocytology were used as the initial aging model. The model animals were randomly divided into 6 groups: high dose Yiwei Decoction group, mid dose Yiwei Decoction group, low dose Yiwei Decoction group, diethylstilbestrol group, model control group, and Liuwei Dihuang Bolus group. After administration for 4 weeks, they were killed by decapitation, and left ovary was taken for detection of double-labeling percent of flowcytes of the ovary. **Results:** The double-labeling percent of flowcytes of the ovary decreased as compared with the model control group. **Conclusion:** The Yiwei Decoction has function of inhibiting apoptosis of ovary, which is possibly one of the mechanisms in delaying functional aging of the ovary.

Key Words Ovary/drug action; @ Replenishing functional activities of the body fluid of The Yangming Channel

随着社会的进步和医疗保健事业的发展、生活和营养等条件的改善,人类的寿命不断延长,老年人口的比例亦随之升高。据 WHO 报道,全球老年人口将从 1998 年的 5.8 亿增加至 2050 年的 20 亿,所占总人口的比例由 20% 增加到 35%,届时每 3 个人中即有 1 个 60 岁以上的老人。我国已进入老龄化社会,1998 年全国 60 岁以上老人已有 1.26 亿,占总人口的 10%。大城市老龄化的情况出现更早,情况更加突出^[1]。世界各国医学和预防医学组织日益重视老年人的医疗和预防保健问题。1994 年开罗世界人口和发展会议之后,生

殖健康的策略从以往多注重生育期母婴健康方面转向围绝经期的生殖健康问题。因此,注重生殖健康,延缓生殖轴机能的自然衰老,提高绝经过渡期妇女的生活质量是医学界崭新的具有积极作用和重大价值的研究课题。

为探求益胃汤方药对绝经前期卵巢功能的影响及作用机理,本实验通过对雌性初老模型大鼠(相类于绝经前期)的研究,从卵巢细胞凋亡入手,以初步论证中医学对绝经前期“五七,阳明脉衰”、“六七,三阳脉衰”特殊生理病理内环境理论认识的科学性和实用性,并为延缓绝经前期卵巢机能衰老,提高绝经前期妇女生活质量、身体素质,预防和治疗绝经前期月经紊乱、卵巢早衰等疾病开辟新的途径与治疗方药。

1 材料

1.1 实验动物:SD 雌性大鼠,10~12 月龄,符合初老模型动物 50 只,体重(310±20)g;4~6 月龄,体重(230±20)g,10 只;均为清洁级动物,检疫合格,身体

基金项目:国家自然科学基金项目(30371795)

1 贵阳中医学院妇科教研室,贵州省贵阳市市东路 50 号(550002)

2 成都中医药大学附属医院

3 成都中医药大学 2002 级博士研究生

4 成都中医药大学

收稿日期:2005-03-09;修回日期:2005-04-20

健康,由成都中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂:益胃汤制剂制备工艺据文献拟订^[2](按北沙参:生地黄:麦冬:玉竹:冰糖=30:10:15:10:6比例制成浓度为2g生药/ml的煎剂)。处方中药材均购自成都市中药材市场,经成都中医药大学药学院专家鉴定,符合《中国药典》2000版(一部)相关项下的规定。试剂:Annexin V(美国 Bender Medsystems,批号:1292000);PI(SIGMA CHEMICAL,批号:58H3613)。

1.3 主要仪器:流式细胞仪为美国 COULTER 公司产品(EPICS ELITE SP)。

2 方法

2.1 动物造模及分组:选10~12月龄雌性大鼠,采取阴道脱落细胞涂片巴氏染色连续观察4个动情周期,以阴道细胞学表现动情周期长、之后持续动情、反复假妊娠时,作为初老大鼠模型^[3,4]。选择4~6月龄雌性大鼠阴道细胞学涂片,每日1次,连续5天,以角化细胞指数高于50%者为正常模型。

动物随机分为6组。正常对照组:4~6月龄的青年雌性大鼠;益胃汤高剂量组:给予益胃汤27g/kg体重,相当于成人剂量的20倍,以生理盐水按13.5ml/kg配成混悬液灌胃给药;益胃汤中剂量组:给予益胃汤13.5g/kg体重,相当于成人剂量的10倍,以生理盐水按13.5ml/kg配成混悬液灌胃给药;益胃汤低剂量组:给予益胃汤6.75g/kg体重,相当于成人剂量的5倍,以生理盐水按13.5ml/kg配成混悬液灌胃给药;己烯雌酚组:给予己烯雌酚0.0042g/kg体重,相当于成人剂量的5倍,以5%羧甲基纤维素钠水溶液按13.5ml/kg配成混悬液灌胃给药;六味地黄丸组:给予六味地黄丸1.5g/kg体重,相当于成人剂量的10倍,以生理盐水按13.5ml/kg配成混悬液灌胃给药。模型对照组:灌胃等容积生理盐水(13.5ml/kg)。以上各组每天灌胃1次,连续4周,末次灌胃后24小时,断头处死大鼠。

2.2 实验方法及观察指标

2.2.1 单细胞悬液的制作^[5,6]:卵巢组织用PBS漂洗干净后,用眼科剪尽可能将组织剪碎。吸去上清液,组织块转入大瓶中加入10~20ml组织消化酶(含200μg/ml胶原酶),37℃,30分钟,并在磁力搅拌器上搅拌。在不锈钢网上轻轻研磨,使组织和细胞分离。滤液用200目筛网过滤2次。Annexin V/PI双染色法:(1)乳用蒸馏水稀释备用缓冲液1:4(50ml缓冲液+150ml蒸馏水);(2)用PBS洗细胞;(3)重悬细胞在前面稀释好的缓冲液里,调整浓度为 $2\sim5\times10^5/\text{ml}$;(4)

取195μl细胞悬液加5μl Annexin V-FITC;(5)混合在室温孵育10分钟;(6)洗细胞重悬在190μl已稀释的缓冲液;(7)加20μg/ml PI 10ml(终浓度1μg/ml);(8)流式分析。

2.2.2 观察指标:用流式细胞仪检测卵巢组织单细胞悬液双标百分比。

2.3 统计学方法:采用SPSS11.5统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用One-Way ANOVA方差分析,两组间比较采用LSD及S-N-K分析。

3 结果

益胃汤对初老大鼠卵巢流式细胞双标百分比的影响:附表表示,模型对照组卵巢凋亡细胞百分比高于正常对照组($P<0.01$)。益胃汤高剂量组、己烯雌酚组卵巢细胞凋亡百分比低于益胃汤低剂量组和模型对照组($P<0.01$),而与正常对照组比较及二者之间比较,差异均无显著性($P>0.05$)。益胃汤中剂量组、六味地黄丸组卵巢细胞凋亡百分比亦低于模型对照组($P<0.01$);益胃汤中、高剂量组和己烯雌酚组比较,差异有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。益胃汤低剂量组卵巢凋亡细胞百分比与模型对照组比较,差异无显著性($P>0.05$)。益胃汤中、低剂量组和六味地黄丸组之间两两比较,差异无显著性($P>0.05$),但均高于正常对照组($P<0.01$)。

附表 益胃汤对初老大鼠卵巢流式细胞双标百分比的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	双标百分比
正常对照组	8	3.95±1.75
模型对照组	8	11.23±1.44*
己烯雌酚组	8	5.73±1.76
益胃汤高剂量组	8	5.91±2.16
益胃汤中剂量组	8	8.13±2.47** ▲
益胃汤低剂量组	8	9.93±2.45*** ▲▲
六味地黄丸组	8	7.84±2.48*△

与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型对照组比较,△ $P<0.01$;与己烯雌酚组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与益胃汤高剂量组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

4 讨论

绝经过渡期是从月经周期出现明显改变至绝经前的一段时间,该期是下丘脑-垂体-卵巢-子宫性生殖轴功能逐步衰老的时期。绝经前期生殖功能减退出现较早,而卵巢机能活动的衰减又是最为直接的表现。卵巢功能的衰退主要由卵子的消耗所致,随着年龄的增长,卵泡数目不断减少,终至卵泡耗竭。

卵巢生理学中,退化是卵母细胞和卵泡被清除出卵巢的过程。细胞凋亡可能是卵巢清除卵泡的方式^[7]。

动物实验显示,细胞凋亡和卵泡退化有一定联系,只在退化的卵泡中有细胞凋亡的证据,而健康卵泡中没有。细胞凋亡是多细胞有机体为调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞主动死亡过程。它贯穿于多细胞生物整个生命活动过程中,与细胞产生构成一对矛盾,共同维系着组织细胞间动力学平衡,是维持机体内环境稳定的重要机理之一。Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白,最初发现其是一种具有很强的抗凝血特征的血管蛋白,具有易于结合到磷脂类如 PS 的特性,对 PS 有高度的亲和性。因此,该蛋白可充当一敏感的探针用以检测暴露在细胞膜表面的 PS。但 PS 转移到细胞膜外不是凋亡所特有的,它也可发生在细胞坏死中。两种细胞死亡方式的差别是在凋亡的初始阶段细胞膜是完好的,而细胞坏死在其早期阶段细胞膜的完整性就已破坏了。因此,用异硫氰酸荧光素(FITC)标记 Annexin V,同时结合使用 PI 拒染法,可以发现早期细胞凋亡,并能区分凋亡细胞和坏死细胞^[8,9]。

中医学自《黄帝内经》始,即对女性生长、发育、生殖、衰老的全过程有了甚为明晰的分阶段论述,其中“女子……五七,阳明脉衰;六七,三阳脉衰于上”^[10]即“阳明津气不足”是对女性绝经前期特殊病理生理内环境的认识,至今仍具有重要的临床指导意义。明代医家张景岳亦指出:“女为阴体,不足于阳,故其衰也,自阳明始。”^[11]清代名医吴鞠通本“胃体阳而用阴,十二经皆禀气于胃”,主张“治疗时当复其阴……则十二经之阴皆可复矣。欲复其阴,宜甘凉之品”,创立益胃汤以培补阳明津气^[12]。方中沙参入胃肺,功能益胃生津、养阴清肺,主治胃阴亏虚、津液不足诸证,《本草纲目》称之“除寒热,补中”;麦冬甘、微苦,微寒,亦具有益胃生津、养阴清肺作用,《别录》谓“强阴益精,消谷调中,保神”,《本经》言“久服轻身不老不饥”;生地黄养阴生津、清热

凉血,能“补肾中真阴”以资后天;玉竹养阴润燥、生津止渴,《本草拾遗》述其“主聪明,调血气,令人强壮”;冰糖味甘而性平,补中益气、和胃润肺、生津止渴。诸药合用,共奏益阳明津气之功。

本研究通过益胃汤对初老雌性大鼠(相类于绝经前期)卵巢细胞凋亡的研究,探讨补益阳明津气对女性这一特定时期生殖功能的影响。实验结果提示,模型对照组卵巢细胞凋亡较正常对照组明显增加,益胃汤高、中剂量组、六味地黄丸组及己烯雌酚组均能使双标百分比降低,对卵巢细胞凋亡有明显抑制作用,因而其可能是益胃汤延缓卵巢机能衰老的作用机理之一。通过实验,佐证了中医传统经典理论“五七,阳明脉衰”在绝经前期生殖轴机能衰老中的重要影响。

参考文献

- 1 华嘉增. 妇女更年期保健新进展. 中国妇幼保健, 2000, 15(12): 778~780.
- 2 谢秀琼. 中药新制剂开发与运用. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 16.
- 3 谢启文主编. 现代神经内分泌学. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 385.
- 4 程化奇, 熊舜华, 段新尤, 等. 大鼠更年期实验模型研究. 上海实验动物科学, 1993, 13(4): 192.
- 5 胡野, 凌志强, 单小云主编. 细胞凋亡的分子医学. 北京: 军事医学科学出版社, 2002: 504.
- 6 彭黎明, 王曾礼主编. 细胞凋亡的基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 171.
- 7 Vaskivuo TE, Tapanainen JS. Apoptosis in the human ovary. Reprod Biomed Online, 2003, 6(1): 24~35.
- 8 彭黎明, 江虹. 细胞凋亡检测方法的研究进展. 中华病理学杂志, 2001, 30(2): 135~136.
- 9 彭黎明. 六种细胞凋亡检测方法的比较. 中华病理学杂志, 1999, 28(1): 55~57.
- 10 黄帝内经素问译释. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社, 1981: 1~5.
- 11 彭锦, 冈增郁, 孔令谢, 等. 试论“健运阳明”是中年女性养生的重要方法. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(7): 22~23.
- 12 吴塘. 温病条辨. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 66.

欢迎邮购

《现代中医内科临床疗效评价与进展》

《现代中医内科临床疗效评价与进展》由杨仓良等编著, 陕西科技出版社出版。该书全面系统地反映了建国以来中医治疗内科 100 余种病症的客观疗效评价与进展状况, 内容包括论述(叙述不同时期古代医案的学术成就); 辨证论治(采用现代医学病名, 以中医四诊八纲为中心, 并列举病症的典型临床表现、治法方药); 现代中医临床客观疗效评价与进展(系统搜集、整理建国以来中医治疗内科疾病处方用药, 应用现代医学数据检测治疗效果, 及对治疗新方法、多途径用药、剂型改革、新成果进展状况加以评述); 临床资料(检索了全国公开发行的中医期刊治疗内科每一病症的最佳有效方药, 其诊断标准均以现代医学检测数据为准, 反映其治疗方法独特新颖, 治疗例数多、疗效高, 可以重复验证, 具可靠的医学数据, 经统计处理的疗效最佳的病例报道); 现代医学诊治(对中医治疗疗效不佳的病例, 应用现代医学诊治, 结合中医治疗以促进中医发展)等项目。被称为“开卷可识 40 载中医内科之最佳疗效”, 是中医、中西医结合内科临床、科研及教学的重要参考书。

本书由宁夏秦杨疑难病研究院中西医书店总经销, 每册 38 元, 免收邮挂费。

凡购 5~10 本者按 9 折, 11~20 本者 8 折, 21 本以上者按 7 折优惠。同时还有《毒药本草》78 元,《动物本草》120 元,《华佗神医秘方》7 元等书, 优惠方式同上。

邮购地址: 宁夏银川市金凤区满城南街 20 号宁夏秦杨疑难病研究院曹艳玲收, 邮编: 750000, 电话: (0951) 3069258。

石家庄炎黄针灸推拿专修学校招生

石家庄炎黄针灸推拿专修学校具有雄厚的师资力量, 办学独具特色。(1) 高级中医针灸师培训班: 学期 4 个月, 全日制, 每年 3 月 1 日、7 月 1 日、11 月 1 日开学。课本用大专统一教材的针灸学、推拿学、中医基础、中医诊断、解剖学、针法有腹针、眼针、火针、舌三针、锋针、梅花针、头皮针、学会为止。(2) 高级针灸师进修班: 学期 15 天, 每月 10 日开学。讲授腹针、火针、舌三针、锋针、头皮针技法, 重点讲授治疗高血压、半身不遂、针灸减肥、肠炎、胃炎、结肠炎、头痛、妇科病、皮肤病、手足病、更年期综合征。(3) 按摩师资格等级培训班: 学期 1~2 个月, 全天上课, 每月 1 日开学, 中级班学费 400 元, 高级班学费 600 元。考试合格颁发国家统一印制的等级资格证书及河北省卫生厅中医按摩师上岗证书。(4) 手诊班、小儿推拿班。

地址: 河北省石家庄市桥西区西三教广平街 69 号炎黄针灸推拿专修学校, 电话: (0311) 8872897, 7894902, 网址: www.yhzhenniu.com