

针灸推拿

调神益肾针法对更年期大鼠卵巢、肾上腺皮质中 3β 羟类固醇脱氢酶的影响

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、肾上腺中 3β 羟类固醇脱氢酶(3β HSDH)的影响。方法:建立自然的更年期大鼠模型,实验动物包括青年组、更年期组、针刺组,采用细胞酶化学技术,辅以计算机图像分析,观测卵巢、肾上腺中阳性物质总面积、积分光度值。结果:更年期大鼠卵巢窦状卵泡及成熟黄体细胞中 3β HSDH 含量或活性明显降低,间质腺及肾上腺皮质束状带、网状带细胞中该酶的含量或活性仍维持正常。经针刺干预后,上述部位该酶的含量或活性均有显著提高。结论:调神益肾针法能增加卵巢、肾上腺中雌激素合成关键酶的含量或活性,这可能是针刺提升体内雌激素水平的物质基础之一。

主题词 针灸疗法 3-羟甾类脱氢酶类/针灸效应 更年期 @ 调神益肾针法

Effect of Needling Method for Regulating Mentality and Tonifying the Kidney on 3β Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Ovary and Adrenal Gland of Climacteric Rats

Shen Xiaoming¹, Du Yuanhao², Hu Ling¹

(1. The School of Acupuncture and Orthopedics & Traumatology, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038;

2. The First Affiliated Hospital of Tianjin College of Traditional Chinese Medicine)

Objective: To study the effect of needling method for regulating mentality and tonifying the kidney on 3β Hydroxysteroid dehydrogenase(3β HSDH) in the ovary and adrenal gland of climacteric rats. **Methods:** Climacteric model rats were made naturally. The experimental animals included young group, climacteric group, needling group. Cytozymochemical technique aided with computerized image processing was adopted to determine total areas and integrated optical density of positive substances in the ovary and adrenal gland. **Results:** In climacteric group, the content or activity of 3β HSDH in cells of the antral follicle and the mature corpus luteum of ovary were lowered significantly, and that of 3β HSDH in cells of the interstitial gland of ovary and cells of the zona fasciculata and zona reticularis of adrenal gland remained normal. After acupuncture, the content or activity of 3β HSDH in those regions were increased significantly. **Conclusion:** The needling method for regulating mentality and tonifying the kidney can enhance the content or activity of the key enzyme for synthesis of estrogen in the ovary and adrenal gland, which is one of the bases for acupuncture increasing estrogen level in the body.

Key Word Acupucnture therapy; 3β Hydroxysteroid Dehydrogenase/Acupucnture effect; Climacteric; @ Needling method for regulating mentality and tonifying the kidney

调神益肾针法是治疗更年期综合征的有效方法,实验证实其可能与针刺能改善卵巢、肾上腺的形态功能,进而升高血清雌二醇(E_2)水平有关^[1~3]。为进一步揭示调神益肾针法的作用机制,本研究运用细胞酶化学技术,观察了更年期大鼠卵巢、肾上腺中 3β 羟类固醇脱氢酶(3β HSDH)的变化规律及针刺干预效应。

1 材料

1.1 实验动物:选用 4 月龄雌性 Wistar 大鼠 15 只,体重 169~188g;16 月龄雌性 Wistar 大鼠 30 只,体重

280~302g。均由天津市劳动职业病卫生研究所动物室提供。喂养在 12 小时光照、12 小时黑暗的条件下,自由摄食、饮水,室温控制在 22~28℃。

1.2 主要仪器及试剂:冰冻切片机,德国 Reichert-Jung 公司;Olympus BH-2 显微镜,日本 Olympus 公司;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。去氢表雄酮(Trans-Dehydroandrosterone)、二甲基甲酰胺(N,N-Dimethyl Formamide, DMF)、氧化型辅酶 II (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADP)、氯化硝基四氮唑蓝(Nitro Blue Tetrazolium, NBT), Sigma 公司,分

1.3 动物模型:采用自然老化的更年期大鼠模型^[4]。

基金项目:安徽省自然科学基金(03043006)

1 安徽中医学院针灸骨伤临床学院,合肥市梅山路 103 号
(230038) (C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 天津中医药大学第一附属医院

收稿日期:2005-09-21;修回日期:2006-03-15

2 方法

2.1 动物分组及处理:购进的动物适应性喂养 1 周后,30 只 16 月龄大鼠随机分为更年期组 15 只、针刺组 15 只,15 只 4 月龄大鼠作为青年组。

针刺组根据华兴邦等制定的大鼠穴位图谱^[5],选取风府、百会、气海、肾俞穴。其中风府缓慢向下直刺 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 20 分钟,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,不做针刺。

2.2 标本采集及制备:为避免日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、肾上腺,置液氮内速冻,冰冻切片机-20℃切片。

2.3 观察指标及方法

Lojda 法显示 3βHSDH^[6]:切片入冷丙酮溶去脂滴;入 3βHSDH 染色孵育液(包括去氢表雄酮、DMF、磷酸缓冲液、NBT、NADP、双蒸水等),37℃恒温孵育 1 小时;蒸馏水漂洗,10%生理盐水甲醛固定;蒸馏水漂洗,甘油明胶封片。光镜下观察,切片上含 3βHSDH 的细胞质呈蓝紫色。

计算机图像分析:在放大倍数为 400 倍的条件下,每组切片每个观察项目按统一标准随机截取 20 个视野,在控制其灰度值一致的基础上,测定阳性反应物面积、积分光度值。

2.4 统计学方法:数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠卵巢 Lojda 染色情况比较:青年组大鼠窦状卵泡中围绕在卵泡周围的内泡膜细胞胞质阳性反应较强,颗粒细胞胞质阳性反应较弱,且卵泡腔周围细胞的反应弱于靠近卵泡壁细胞;成熟黄体中颗粒黄体细胞胞质均有较强阳性反应,膜黄体细胞仅部分细胞胞质有较弱阳性反应;间质腺细胞胞质均有较强阳性反应;而退化黄体、窦前卵泡、各级卵泡中的卵母细胞、卵巢结缔组织等均呈阴性反应。更年期组大鼠窦状卵泡、成熟黄体阳性反应模式与青年组类似,但反应面积、强度较青年组明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);间质腺细胞胞质反应面积、强度与青年组类似。针刺组大鼠窦状卵泡、成熟黄体阳性反应模式与青年组、更年期组类似,但反应面积、强度较更年期组明显增加($P < 0.05$ 或

$P < 0.01$);间质腺细胞胞质反应面积也较更年期组明显增加($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 针刺后 3 组大鼠卵巢 Lojda 染色阳性反应物平均面积、平均积分光度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	部位	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	窦状卵泡	15	30	3991.20±896.94	657.52±206.69
	成熟黄体	15	30	4502.28±1321.49	674.23±192.78
	间质腺	15	30	4913.00±1227.41	439.89±154.48
更年期组	窦状卵泡	15	27	2133.60±651.92**	218.84±98.74**
	成熟黄体	15	27	2012.00±784.61*	262.15±60.65**
	间质腺	15	27	3679.94±962.92	360.20±95.15
针刺组	窦状卵泡	15	29	3799.00±646.45△	560.90±43.69△△
	成熟黄体	15	29	4629.61±1577.98△	660.32±112.98△△
	间质腺	15	29	5603.20±820.89△	466.20±110.56

与青年组同项目比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与更年期组同项目比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;表 2 同

3.2 各组大鼠肾上腺 Lojda 染色情况比较:青年组大鼠肾上腺球状带、束状带、网状带的细胞胞质均为阳性反应,而被膜、髓质为阴性反应。更年期组大鼠肾上腺束状带、网状带细胞的阳性反应面积与青年组类似(因球状带细胞内缺乏 17α羟化酶,孕烯醇酮或孕酮不能在该部位转变为 E₂ 及其前体物质,故未将其作为观察对象)。针刺组大鼠肾上腺束状带、网状带细胞的阳性反应面积、强度明显高于更年期组($P < 0.05$)及青年组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 针刺后 3 组大鼠肾上腺 Lojda 染色阳性反应物平均面积、平均积分光度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	部位	鼠数	肾上腺数	阳性反应物平均面积(μm^2)	平均积分光度值
青年组	束状带	15	30	6147.00±1041.95	1053.14±366.29
	网状带	15	30	7683.00±1240.73	966.88±120.04
更年期组	束状带	15	30	7046.60±993.85	1272.74±390.51
	网状带	15	30	9417.80±1350.19	1425.44±124.89*
针刺组	束状带	15	30	9717.40±1227.66*△	2102.18±314.16*△
	网状带	15	30	11294.00±1186.78△	1810.13±93.42**△

4 讨论

女性进入更年期后,由于卵巢功能减退,体内雌激素水平降低,生殖道、下丘脑、垂体、心血管、骨骼、大脑等效应器官或部位失去有效支持,正常的形态、功能发生改变,从而导致更年期综合征及与更年期密切相关疾病的发生。雌激素属类固醇激素,主要在卵巢、肾上腺中合成,胆固醇是其合成原料。胆固醇转变为雌激素需经过一系列酶促反应,其中 3βHSDH 催化 3β羟-Δ⁵-类固醇(孕烯醇酮、17α羟孕烯醇酮、去氢表雄酮)脱氢变构为 3-酮-Δ⁴-类固醇(孕酮、17α羟孕酮、雄烯二酮),是类固醇激素生物合成的关键酶^[7]及限速

酶^[8], 常作为评价卵巢、肾上腺内分泌功能的指标^[9,10]。

我们研究发现, 在卵巢 3β HSDH 主要分布于窦状卵泡、成熟黄体 and 间质腺细胞, 在肾上腺则广泛分布于皮质的三层细胞中, 这与文献报道一致^[7,9,10]。与青年组大鼠比较, 更年期大鼠卵巢窦状卵泡、成熟黄体细胞中 3β HSDH 含量或活性明显降低, 而间质腺细胞以及肾上腺束状带则基本不变。提示更年期时体内合成、分泌 E_2 及其前体物质的主要结构功能减退, 而间质腺、肾上腺皮质功能仍暂时维持正常。但这种作用毕竟有限, 不足以抵消窦状卵泡、成熟黄体衰退所造成的影响, 所以血清中 E_2 水平仍逐渐降低。针刺组大鼠卵巢、肾上腺有关结构如肾上腺皮质细胞中所含 3β HSDH 的活性或含量比更年期组有显著提高, 接近甚至超过青年组水平, 提示针刺对卵巢、肾上腺皮质的增龄性变化有不同程度的干预作用, 使之往良性化方向发展。因此, 针刺能提高更年期大鼠卵巢窦状卵泡、成熟黄体、间质腺细胞及肾上腺皮质束状带、网状带细胞中原下降或尚维持正常的 3β HSDH 含量或活性, 这是血清 E_2 水平上升的物质基础之一。另外, 我们以往研究显示, 针刺并不能增加更年期大鼠卵巢中下降的窦状卵泡数目^[3], 通过对其 3β HSDH 的研究, 揭示针刺能激

发、促进残余的窦状卵泡功能, 加强雌激素的合成能力。

参考文献

- 1 沈晓明, 杜元灏, 阎莉, 等. 调神益肾针法治疗更年期综合征 35 例临床研究. 中医杂志, 2003, 44(5): 347~349.
- 2 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.
- 3 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. 中医学刊. 2002, 20(3): 336~337, 355.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 陈啸梅, 周文郁, 彭俊云, 等主编. 组织化学手册. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 230.
- 7 Tabarowski Z, Szoltvs M. Histochemical localization of delta 5-3 beta-HSDH activity in preovulatory rat follicles. Folia Histochem Cytobiol. 1987, 25(2): 149~153.
- 8 Sholl SA. 3 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-4 isomerase activity in the rhesus monkey placenta and fetal adrenal, testis and ovary during late gestation. Steroids, 1983, 41(6): 757~768.
- 9 诸定寿, 路欣, 翁静, 等. 小鼠胚胎及生后发育的肾上腺皮质的组织学与组织化学研究. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4(2): 220.
- 10 诸定寿, 路欣, 王兴翠, 等. 雌性大鼠、小鼠生殖系统与子宫内腺垂体激素分泌细胞的研究. 首都医学院学报, 1990, 11(2): 91.

全国中医与中西医结合治疗常见病临床研讨会 暨全国针灸及推拿疗法临床应用研讨会

征 文 通 知

由中华中医药学会和中医杂志社主办、北京东方岐黄科技服务中心承办的“全国中医与中西医结合治疗常见病临床研讨会暨全国针灸及推拿疗法临床应用研讨会”因故推迟到 2007 年 4 月在安徽省黄山市举办。现继续征文如下。

1. 征文内容: (1) 中医药传统理论的研究思路和方法; (2) 中医、中西医结合临床研究和治疗经验、成果与体会; (3) 中医基础研究和理论研究; (4) 临床应用经方、成方、验方的体会; (5) 中药理论研究及现代应用; (6) 非药物疗法在临床中的应用研究与总结; (7) 中药及复方制剂的开发与研究; (8) 名老中医临床经验总结与继承; (9) 中医临床各科经验介绍及研究进展; (10) 中药、方剂理论及现代应用综述; (11) 单味药临床应用体会; (12) 针灸在临床应用中的经验; (13) 临床应用推拿、按摩及其它理疗方法的经验; (14) 非药物康复疗法经验总结; (15) 常见病、多发病进行生活方式干预的成果报告; (16) 中医药现代研究的新思路、新方法。

2. 征文要求: (1) 论文要求论点明确, 论据充分, 结构严密, 层次分明, 文字精炼, 具有科学性、创新性、实用性; (2) 征文经专家评审后, 录用文章将刊登在《中医杂志》2007 年增刊上并发邀请函参加会议, 入选论文将安排在大会交流, 参加会议者颁发证书并授予国家级继续教育学分; (3) 征文请附医院或主管单位介绍信; (4) 征文截止日期为 2007 年 2 月 10 日; (5) 每位作者只限投一篇论文 (要求 2000 字以内); (6) 文稿中的计量单位均须采用法定计量单位, 如“克”应为“g”, “毫升”应为“ml”, “白细胞 $5000/\text{mm}^3$ ”应为“白细胞 $5 \times 10^9/\text{L}$ ”等; (7) 文题下署作者姓名, 作者单位名称、地址、邮政编码、电话请写在文稿末尾; 请在投稿信封左下角注明“会议”字样; (8) 论文尽量不用表格及图片; (9) 欢迎计算机软盘或电子邮件投稿。

3. 投稿地址: 北京市东直门内南小街 16 号, 中医杂志社东方岐黄科技服务中心, 邮编: 100700, 联系人: 牛易。电话: (010) 64035632, 传真: (010) 64050201, 网址: www.jtcm.net.cn, E-mail: 64013164@163.com