

滋阴泻火方对环境内分泌干扰物染毒大鼠拟雌激素活性的拮抗作用

孔元原 朱列伟 蔡德培

(复旦大学附属儿科医院, 上海市闵行区万源路 399 号, 201102)

[摘要] **目的** 观察滋阴泻火方对环境内分泌干扰物壬基酚(NP)及双酚A(BPA)的拟雌激素活性的拮抗作用。 **方法** 30只3周龄雌性SD大鼠随机分为对照组(喂饲玉米油), 染毒A组(喂饲NP¹⁰⁰mg/kg), 染毒B组(喂饲NP⁵⁰mg/kg + BPA²⁰⁰mg/kg), 治疗A组(喂饲NP¹⁰⁰mg/kg + 滋阴泻火方), 治疗B组(喂饲NP⁵⁰mg/kg + BPA²⁰⁰mg/kg + 滋阴泻火方), 疗程15天, 检测子宫增重试验及增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达。 **结果** 染毒A、B组与对照组比较子宫湿重、子宫脏器系数、子宫内膜及平滑肌厚度、子宫内腺体及腺上皮高度显著增加($P < 0.05$), 子宫内膜及肌层的PCNA蛋白表达显著增高($P < 0.05$)。治疗A、B组分别与染毒A、B组相比, 上述各指标均明显降低($P < 0.05$)。 **结论** 壬基酚及双酚A具有显著的拟雌激素活性, 滋阴泻火方中药对壬基酚及双酚A的拟雌激素活性具有显著的拮抗作用。

[关键词] 滋阴泻火方; 壬基酚; 双酚A; 子宫增重试验; 增殖细胞核抗原; 中医药疗法

Antagonistic Effect of Ziyin Xiehuo Recipe on Estrogen-like Activity of Environmental Endocrine Disruptors Exposed Rats

KONG Yuanyuan, ZHU Liewei, CAI Depei

(Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 201102, China)

ABSTRACT **Objective** To explore the antagonistic effect of Ziyin Xiehuo Recipe (ZYXHR, Recipe for nourishing kidney yin and purging ministerial fire) on estrogen-like activity of environmental endocrine disruptors, nonylphenol (NP) and mixture of NP and bisphenol A (BPA). **Methods** Totally 30 three-week-old female SD rats were randomly divided into control group (fed with corn oil), exposed group A (feeding NP¹⁰⁰ mg/kg), exposed group B (feeding NP⁵⁰ mg/kg + BPA²⁰⁰ mg/kg), treatment group A (NP¹⁰⁰ mg/kg + ZYXHR), treatment group B (NP⁵⁰ mg/kg + BPA²⁰⁰ mg/kg + ZYXHR). After 15 days of treatment, the uterine weight gain and PCNA protein expression were detected. **Results** As compared with those of the control group, Uterine wet weight, uterus organ coefficient, thickness of endometrium and smooth muscle, and the height of endometrial glands and glandular epithelium significantly increased in exposed group A and B ($P < 0.05$), PCNA expression in endometrium and myometrium significantly increased as well ($P < 0.05$). Above indicators were significant decreased in treatment group A and B as compared with those in exposed group A and B ($P < 0.05$). **Conclusion** NP and BPA have estrogenic-like activity, ZYXHR can be antagonistic to the estrogenic effect of NP and BPA.

Key Words Ziyin Xiehuo Recipe (ZYXHR, Recipe for nourishing kidney yin and purging ministerial fire); Nonylphenol; Bisphenol A; Uterotrophic assay; PCNA; Chinese medicine therapy

儿童性早熟是重要的内分泌疾病之一, 其发病率呈上升趋势, 国外流行病学调查显示, 该病的发病率为1/5 000~1/10 000, 女孩的发病率约为0.2%^[1], 严重影响儿童的生理、心理健康。儿童性早熟的发病与个体遗传、宫内发育环境、营养、地域、环境内分泌干扰物 (Environmental Endocrine Disruptors, EEDs) 等多种因素有关^[2]。我们前期的临床研究发现性早熟女孩壬基酚(NP)、双酚A(BPA)的暴露程度较正常儿童严重^[3]。10余年来, 我院对性早熟患儿采用滋肾阴泻火中药为主的治疗方案取得了显著的临床疗效^[4]。初步显示了该方药对EEDs暴露水平较高的性早熟患儿拟雌激素活性具有显著的拮抗作用, 本研究采用中药干预EEDs的染毒动物模型, 探讨其可能作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

21日龄雌性SD大鼠30只, 体重(50±5)g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证号SCXK(沪)2003-0003。

1.2 药物及试剂

滋阴泻火方由生地黄15g, 炙龟甲12g, 黄柏9g, 知母9g等组成, 由复旦大学附属儿科医院中药制剂室煎制成浓缩合剂, 每毫升约含生药2.5g。NP: 纯度≥98%, 批号070621, 江苏凌飞化工有限公司生产; BPA: 分析纯, 纯度≥99%, 批号60623087, 上海埃彼化学试剂公司生产; 小鼠抗大鼠增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆IgG^{2a}抗体, 武汉博士德生物工程公司生产, 批号BM0104g PV-9000; 两步法免疫组化检测试剂盒、浓缩型DAB试剂盒(北京中杉金桥生物技术有

限公司,批号 ZL 1-9093)。

1.3 主要仪器

Olympus BH² 型显微镜, Panasonic MV-CP410 型摄像机(日本松下电器公司生产);IMS 细胞图像分析系统(上海中腾信息技术有限公司生产)。

1.4 动物分组及处理

实验大鼠随机分成 5 组,每组 6 只。对照组:单纯喂饲玉米油;染毒 A 组:NP 100mg/kg;治疗 A 组:NP 100mg/kg + 滋阴泻火方 40ml/kg;染毒 B 组:NP 50mg/kg + BPA 200mg/kg;治疗 B 组:NP 50mg/kg + BPA 200mg/kg + 滋阴泻火方 40ml/kg,每天灌胃 1 次,给药期间每天称重,根据体重调整给药量。疗程 15 天,于末次给药后 24h,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后,迅速剥离子宫,在子宫颈与子宫角的交界部位切下子宫角,立即称重。中性福尔马林固定 24h 后,石蜡包埋,连续切片,片厚 5 μm,常规 HE 染色后镜检。

1.5 免疫组织化学方法检测 PCNA 蛋白表达

常规脱蜡,经柠檬酸盐缓冲液微波修复,中性磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗 3 遍,滴加 1:100 稀释的一抗,37℃ 孵育 1h,PBS 冲洗 3 遍后滴加二抗 37℃ 孵育 20min,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木素轻度复染,封片。

1.6 图像分析

采用 IMS 细胞图像分析系统医学图像分析软件,物镜 20 倍下,测量子宫上皮细胞高度,环行平滑肌厚度,腺上皮细胞高度,每组切片随机选 5 个视野,求出平均值。物镜 10 倍下观察整个切片,统计全部腺体数。PCNA 免疫组化阳性结果标准:PCNA 为细胞核着色(棕黄色颗粒),物镜 20 倍镜下,计算每个视野的子宫内膜及肌层的 PCNA 阳性细胞数,随机选取 5 个视野,取平均值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件,计量资料以($x \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,方差不齐时,用 Tamhane 检验。

2 结果

2.1 滋阴泻火方对模型大鼠子宫湿重、脏器系数影响

表 1 示,染毒 A、B 组与对照组比较,子宫湿重、子宫脏器系数(子宫湿重/体重)明显增加($P < 0.05$),中

药干预后,治疗 A、B 组子宫湿重、子宫脏器系数分别较染毒 A、B 组显著降低($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠子宫湿重、脏器系数比较($x \pm s$)

组别	鼠数	子宫湿重(mg)	脏器系数(‰)
对照组	6	120.7±9.3	0.83±0.08
染毒 A 组	6	182.0±52.1*	1.30±0.37*
治疗 A 组	6	127.5±23.7△	0.91±0.14△
染毒 B 组	6	161.7±30.4*	1.12±0.24*
治疗 B 组	6	121.8±21.9▲	0.86±0.15▲

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与染毒 A 组比较,△ $P < 0.05$;与染毒 B 组比较,▲ $P < 0.05$

2.2 滋阴泻火方对模型大鼠子宫内膜上皮细胞高度、环行平滑肌厚度、子宫内膜腺体数及腺上皮高度的影响

表 2 示,NP 及 NP 和 BPA 联合染毒均可使雌性未成熟大鼠子宫内膜上皮细胞高度、环行平滑肌厚度及子宫内膜腺体的腺上皮高度明显增加,NP 染毒组其子宫内膜腺体数明显增加,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。中药干预后,治疗 A、B 组的子宫内膜上皮细胞高度、环行平滑肌厚度、子宫内膜腺体及腺上皮高度显著下降($P < 0.05$)。

2.3 滋肾阴泄相火中药对实验动物子宫 PCNA 蛋白表达的影响

免疫组织化学染色显示了 PCNA 在各组子宫内膜及肌层的表达情况。各组子宫内膜 PCNA 的表达多于肌层。对照组子宫上皮细胞、平滑肌细胞及腺上皮的细胞核内 PCNA 均有零星表达,NP 及 NP+BPA 联合染毒后,大鼠子宫内膜及肌层 PCNA 蛋白的表达明显增高($P < 0.05$)。表 3 示,治疗 A、B 组分别与染毒 A、B 组比较,子宫内膜 PCNA 蛋白的表达均明显降低,治疗 B 组的子宫肌层 PCNA 蛋白的表达明显减少($P < 0.05$)。

3 讨论

环境污染特别是由洗涤剂、农药及塑料工业等向环境排放的物质及其降解产物能够产生一系列环境内分泌干扰物^[5],其对机体具有显著的生物毒性、并有累积作用,可干扰体内正常内分泌激素的合成、释放、转运、代谢、与受体结合等过程,激活或抑制内分泌系统

表 2 各组大鼠子宫内膜上皮细胞高度、环行平滑肌厚度、子宫内膜腺体及腺上皮高度变化比较($x \pm s$)

组别	鼠数	内膜上皮细胞高度(μm)	平滑肌厚度(μm)	腺上皮高度(μm)	腺体数目(个)
对照组	6	37.4±11.6	181.4±33.9	22.3±4.7	6.3±2.7
染毒 A 组	6	54.3±9.9*	319.7±32.1*	34.6±5.8*	13.3±4.4*
治疗 A 组	6	37.6±8.7△	236.2±31.2△	25.4±3.3△	7.0±2.9△
染毒 B 组	6	54.1±12.9*	272.6±54.2*	32.4±1.9*	10.8±5.1
治疗 B 组	6	37.9±7.3▲	217.4±21.0▲	21.9±1.9▲	8.8±3.4

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与染毒 A 组比较,△ $P < 0.05$;与染毒 B 组比较,▲ $P < 0.05$

表3 各组大鼠子宫PCNA 蛋白表达比较(个/视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	子宫内膜PCNA 阳性 细胞数	子宫肌层PCNA 阳性 细胞数
对照组	6	62.0±6.2	48.5±2.9
染毒A组	6	154.3±24.5*	101.3±19.9*
治疗A组	6	125.7±16.4△	100.3±21.7
染毒B组	6	175.5±9.0*	105.5±18.8*
治疗B组	6	115.8±16.8**	75.5±9.9**

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与染毒A组比较,△ $P<0.05$;与染毒B组比较,▲ $P<0.05$

功能,从而破坏机体内环境的协调和稳定^[6]。

大多数种类的EEDs均具有拟雌激素活性,如壬基酚和双酚A^[7,8],对女性生殖系统可产生不良影响。儿童对其生殖毒性的敏感性更高^[9],可引起女童生殖系统的发育和功能异常,如乳房发育、子宫卵巢增大,甚至不规则出血^[10],是儿童性早熟的致病因素之一^[11]。我院采用滋肾阴泻相火中药治疗EEDs暴露水平高的性早熟患儿,结果显示,治疗后患儿生殖器官及骨骼的病变均显著减轻,说明该中药方剂对EEDs的拟雌激素活性具有显著的拮抗作用^[12]。本研究以常见的EEDs 壬基酚及双酚A 作为染毒物质,单独喂饲或联合喂饲复制染毒动物模型,观察中药对EEDs 拟雌激素活性的拮抗作用,以进一步验证临床研究的结果。

子宫增重试验是药理学检测化学物质雌激素活性的经典试验,包括子宫湿重的增加、细胞和分子基因水平的改变等检测标准^[13]。有文献报道,低浓度的EEDs即可引起子宫内膜腺体分泌活动增高,表现为子宫内膜腺体数目的增多、腺上皮高度的增加。子宫内膜上皮的变化较肌层厚度及子宫湿重的改变是一个更为敏感的指标^[14]。PCNA 是DNA 聚合酶D 的辅助蛋白,为DNA 复制所必需,是细胞增殖的重要指标,在细胞增殖和分化中合成增加,因此其可反映细胞增殖活性。本研究将子宫湿重、子宫内膜上皮细胞高度、环行肌厚度、子宫内膜腺体数目及腺上皮高度、PCNA 蛋白表达作为观察指标,综合评价了EEDs 的拟雌激素样作用和滋肾阴泻相火中药对其的拮抗作用。研究结果显示,经NP 或NP+BPA 染毒15天后,大鼠子宫湿重、脏器系数增加,子宫内膜上皮细胞高度、环行平滑肌厚度、腺上皮高度及子宫内膜腺体明显增加,PCNA 在子宫固有层和肌层的表达均增强,证实NP 及BPA 具有显著的拟雌激素活性,这与国内外的许多报道是一致的^[15]。

研究结果还显示,滋肾阴泻相火中药与NP 或NP+BPA 喂饲,可使染毒大鼠子宫湿重、脏器系数降低,子宫内膜上皮细胞高度、环行平滑肌厚度、腺上皮高度

显著降低,子宫内膜层和肌层的PCNA 表达也明显降低,说明所拟定的中药治疗方案能够减缓子宫发育成熟,对EEDs 的拟雌激素活性具有显著的拮抗作用。中药对PCNA 蛋白表达的影响也提示其拮抗拟雌激素活性是通过抑制细胞的增殖来实现的。

本实验仅从体内研究证实,滋肾阴泻相火中药可拮抗壬基酚、双酚A 的拟雌激素活性。既往研究显示,EEDs 的拟雌激素活性机制表现在可干扰雌激素受体水平、促进雌激素的生物合成、干扰天然雌激素的转运、干扰下丘脑-垂体-性腺轴的调节功能等多方面^[12],滋肾阴泻相火中药拮抗EEDs 染毒大鼠的拟雌激素活性作用是否与上述机制有关,还需要进一步深入研究。

参考文献

[1]Teilmann G, Pedersen CB, Jensen TK, et al. Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries[J]. Pediatrics, 2005, 116(6):1323-1328.

[2]Parent AS, Teilmann G, Juul A, et al. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration[J]. Endocr Rev, 2003, 24(5):668-693.

[3]芦军萍, 郑力行, 蔡德培. 性早熟患儿血清中环境内分泌干扰物的测定和分析[J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(2):88-92.

[4]蔡德培. 性早熟与青春期延迟[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 2005:33-40.

[5]Rice C, Birnbaum LS, Cogliano J, et al. Exposure assessment for endocrine disruptors: Some considerations in the design of studies [J]. Environ Health Perspect, 2003, 111(13):1683-1690.

[6]Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans [J]. Environ Health Perspect, 1993, 101(5):378-384.

[7]Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, et al. Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A [J]. Mol Cell Endocrinol, 2006, 254-255:179-186.

[8]Kim HS, Shin JH, Moon HJ, et al. Comparative estrogenic effects of p-nonylphenol by 3-day uterotrophic assay and female pubertal onset assay [J]. Reprod Toxicol, 2002, 16(3):259-268.

[9]Landrigan P, Garg A, Droller DB. Assessing the effects of endocrine disruptors in the National Children's Study. Environ Health Perspect, 2003, 111(13):1678-1682.

[10]Den Hond E, Schoeters G. Endocrine disruptors and human puberty[J]. Int J Androl, 2006, 29(1):264-271.

[11]Euling SY, Selvaran SG, Pescovitz OH, et al. Role of environmental factors in the timing of puberty [J]. Pediatrics, 2008, 121(Suppl 3):167-171.

[12]叶细标, 阚东海, 桂永浩. 环境与儿童健康[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 57-58.

[13]Diel P. Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms[J]. Toxicol Lett, 2002, 127(1-3): 217-224.

[14]Jefferson WN, Padilla-Banks E, Clark G, et al. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 777(1-2): 179-189.

[15]Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, et al. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats[J]. Toxicol Sci, 2000, 54(1): 154-167.

(收稿日期: 2008-08-01; 修回日期: 2009-01-24)

[编辑: 行之]

加味回阳救急汤治疗急性心肌梗死合并休克 20 例

曾启全 周 波

(合浦县中医院内科, 广西壮族自治区合浦县廉州镇定海北路 66 号, 536100)

急性心肌梗死(AMI)患者合并休克的发生率为 10%~15%, 应用常规药物治疗病死率高达 80%以上, 约 50%的患者在休克发生 10 小时内死亡, 80%的患者在 1 周内死亡, 是 AMI 患者的重要致死原因^[1]。我们运用加味回阳救急汤治疗 AMI 合并休克取得较好的临床疗效, 现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

符合入选条件的 40 例患者均来源于我院 2008 年 3~12 月病房及门诊, 中医诊断为厥脱, 诊断标准参照《中药新药临床研究指导原则》制订^[2], 西医诊断标准参照《实用内科学》制订^[3]。所有入选病例按就诊时间顺序随机分为治疗组和对照组, 每组 20 例。治疗组男 15 例, 女 5 例; 平均年龄(68.40±14.89)岁。对照组男 16 例, 女 4 例; 平均年龄(66.95±11.72)岁。两组在性别、年龄、血压、脉搏、尿量等方面差异均无显著性($P>0.05$)。

1.2 纳入及排除标准

纳入标准: 符合诊断标准; 引起休克的病因为心肌梗死; 年龄 18~90 岁。

排除标准: 妊娠或哺乳期妇女, 合并有精神病者; 对试验药物过敏者。

2 治疗方法

对照组予以西医常规综合治疗, 包括心电监护、吸氧、纠正酸中毒、维持水电解质平衡、应用血管活性药物(缩血管药物尽量少用或不用), 适当补充血容量, 酌情应用止痛剂以及溶栓、PTCA 等介入疗法。24h 为 1 个疗程, 连续治疗两个疗程。治疗组在治对照的基础上予以加味回阳救急汤(熟附子 9g, 干姜 5g, 肉桂 3g, 人参 20g, 白术 15g, 茯苓 15g, 陈皮 10g, 五味子 3g, 半夏 9g, 桃仁 10g, 红花 10g, 川芎 6g, 黄芪 30g, 甘草 6g), 每日 1 剂, 水煎服, 分 2 次灌服或鼻饲, 24h 为 1 个疗程, 连续口服两个疗程。

3 疗效观察

3.1 疗效判定标准

参照全国中医急症厥脱证协作组制订的《中医厥脱证疗效评定标准》, 临床治愈: 血压回升(收缩压较治疗前升高 20mmHg, 且收缩压>80mmHg, 脉压差>20mmHg), 厥脱证改善(脉有力, 肢温回升, 尿量增加; 停药后血压症状稳定)。显效: 用药 3h 后血压回升 4~12mmHg, 厥脱证改善, 24h 内血压症状稳定。有

效: 用药 3h 后血压回升, 24h 厥脱证改善, 48h 内血压症状稳定。无效: 用药后血压不回升, 厥脱证情况不稳定。

3.2 两组临床疗效比较

治疗组 20 例, 痊愈 5 例, 显效 6 例, 有效 3 例, 无效 6 例, 总有效率为 70%。对照组 20 例, 痊愈 2 例, 显效 5 例, 有效 3 例, 无效 10 例, 总有效率为 50%。两组间经统计学处理差异有显著性($P<0.05$), 治疗组疗效明显优于对照组。

3.3 两组患者治疗前后血压、脉搏、尿量比较

两组患者治疗后较治疗前血压、脉搏、尿量均有明显改善, 治疗后组间比较, 治疗组优于对照组($P<0.05$)。

3.4 两组患者治疗前后症状改善比较

治疗组治疗前神萎、面色苍白、口唇发绀、肢冷、出汗、烦躁例数分别为 18 例、15 例、18 例、17 例、17 例、19 例, 治疗后分别为 3 例、2 例、3 例、2 例、4 例、3 例; 对照组治疗前分别为 17 例、16 例、16 例、15 例、18 例、17 例, 治疗后分别为 9 例、10 例、9 例、9 例、11 例、10 例。治疗组单项症状改善程度均明显优于对照组($P<0.05$)。

4 讨论

AMI 合并休克的主要病理生理为心排血量的减少与全身微循环的障碍, 中医病机为阳气衰微, 血脉瘀阻。加味回阳救急汤既有回阳救逆、益气固脱之功, 又有活血化瘀、通行血脉之效。本临床观察显示, 加味回阳救急汤与常规西药治疗 AMI 合并休克有明显疗效, 既能提高患者生存率、降低本病的病死率, 又能稳定血压, 减慢心率, 增加尿量, 改善肢冷、发绀、出汗等症状。提示治疗 AMI 合并休克, 可考虑从中医着手, 运用中西医结合的方法, 常规应用扩血管药物与加味回阳救急汤, 尽量减少或不用缩血管药, 对于稳定血液动力学, 改善微循环, 挽救和保护濒死的心肌细胞, 防止心肌梗死的再扩大有着重要的作用与意义。

参考文献

[1]黄从新. 心血管病急症治疗指南·急性心肌梗死并发心源性休克[J]. 中国实用内科杂志, 2002, 9(20): 515-517.

[2]中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[S]. 1993: 37-39.

[3]陈灏珠. 实用内科学[M]. 10 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 256-257.

(收稿日期: 2008-12-31; 修回日期: 2009-03-05)

[编辑: 黄健]